

粳稻超亲变异系籽粒谷氨酰胺合成酶基因表达特性及序列变异分析

徐振华^{1,2} 曲莹¹ 刘海英^{1,2} 朱立楠¹ 张忠臣¹ 金正勋^{1,*}

(¹东北农业大学 农学院, 哈尔滨 150030; ²黑龙江省农业科学院 五常水稻研究所, 黑龙江 五常 150229; * 通讯联系人, E-mail: zxjin326@hotmail.com)

Expression Characteristics and Sequence Variation Analysis of Glutamine Synthetase Gene in Grain of *japonica* Rice with Transgressive Variation

XU Zhen-hua^{1,2}, QU Ying¹, LIU Hai-ying^{1,2}, ZHU Li-nan¹, ZHANG Zhong-chen¹, JIN Zheng-xun^{1,*}

(¹ Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; ² Wuchang Rice Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Wuchang 150229, China; * Corresponding author, E-mail: zxjin326@hotmail.com)

XU Zhenhua, QU Ying, LIU Haiying, et al. Expression characteristics and sequence variation analysis of glutamine synthetase gene in grain of *japonica* rice with transgressive variation. *Chin J Rice Sci*, 2016, 30(3): 304–312.

Abstract: The transgressive variants derived from rice varieties with significant difference in grain protein content were used to investigate the expression level and structure of glutamine synthetase gene (GS), activity of glutamine synthetase and protein accumulation characteristics during grain filling. The results showed that transgressive variants could be obtained through successive directive selection of grain protein content, because the grain protein content was closely related to corresponding genotype. During grain filling, the activity of glutamine synthetase followed a single-peak curve, highly correlated with grain protein content and significantly differed between parents and progenies. *GS1.3* and *GS2* genes, in transgressive variants and their parents with different protein content, exhibited similar transcription trend during grain filling, that is, the transcription level increased 15–20 days before heading and then decreased gradually. Moreover, the grain protein content was closely related to *GS1.3* and *GS2* expression levels. The varieties with higher GS transcription level showed higher protein content compared with their parents. In addition, although *GS1.3* and *GS2* gene sequences showed high conservation, the gene sequence and protein sequence of *GS1.3* and *GS2* were not completely identical in different varieties, and there are some single nuclear polymorphisms. Random base variation as well as changes in codon and amino acids might occur because inter-variety sexual hybridization causes base substitution during segregation and stability.

Key words: *japonica* rice; transgressive variant; grain; GS gene expression; sequence variation

徐振华, 曲莹, 刘海英, 等. 粳稻超亲变异系籽粒谷氨酰胺合成酶基因表达特性及序列变异分析. 中国水稻科学, 2016, 30(3): 304–312.

摘要: 选用籽粒蛋白质含量有显著差异的亲本和杂种后代超亲变异系, 比较分析灌浆过程中籽粒蛋白质积累特性、谷氨酰胺合成酶(GS)活性变化、GS基因 mRNA 表达量变化和基因碱基序列。结果表明, 杂交后代通过籽粒蛋白质含量的连续定向选可获得超亲变异系, 籽粒蛋白质积累量与基因型紧密相关; 灌浆过程中籽粒 GS 活性呈单峰曲线变化, 籽粒蛋白质含量与籽粒 GS 活性密切相关, 而且籽粒 GS 活性也能产生超亲变异; 在灌浆过程中籽粒蛋白质含量不同的亲本及超亲变异系籽粒 *GS1.3* 和 *GS2* 基因的 mRNA 表达量变化趋势基本一致, 即随灌浆进程 mRNA 表达量逐渐增加, 到抽穗后 15~20d 表达量最高, 随后逐渐下降, 呈单峰曲线变化; *GS1.3* 和 *GS2* 基因 mRNA 表达量与籽粒蛋白质含量关系密切, GS 基因 mRNA 表达量高的基因型籽粒蛋白质含量也高, 而且超亲表达; 尽管不同品种 *GS1.3* 和 *GS2* 基因碱基序列保守性很高, 但不同品种水稻 *GS1.3* 和 *GS2* 基因的碱基序列和蛋白质氨基酸序列并不完全一致, 存在着个别碱基不同的基因多态性, 品种间有性杂交后代在基因分离和稳定过程中通过碱基的替换仍然能发生碱基的随机性变化及三联体密码和氨基酸的变化。

关键词: 粳稻; 超亲变异系; 籽粒; GS 基因表达; 序列变异

中图分类号: Q786; S511.032

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2016)03-0304-09

收稿日期: 2015-10-19; 修改稿收到日期: 2015-12-23。

基金项目: 科技部科技支撑计划资助项目(2015BAD23B05); 东北农业大学学科团队建设项目。

谷氨酰胺合成酶(GS)是无机态氮转化为有机态氮过程和植物体内氮同化的关键酶之一,是氮代谢途径中具有多功能的酶,参与调控多个氮代谢过程^[1-3]。谷氨酰胺合成酶活性的降低可影响植物体内氮代谢及糖代谢过程。在水稻籽粒灌浆过程中,不同品种间 GS 活性变化与籽粒蛋白质含量和蒸煮食味品质间的关系甚密^[4-8]。GS 在水稻中有 2 个同工型酶,即 GS1 和 GS2,其中 GS1 是由 *OsGS1.1*、*OsGS1.2*、*OsGS1.3* 共同编码。*OsGS1.1* 和 *OsGS1.2* 在所有组织中均表达,但 *OsGS1.1* 偏向于在 NH_4^+ 不足的环境中表达,而 *OsGS1.2* 则更偏向于在 NH_4^+ 充足的环境中表达,*OsGS1.3* 主要在穗中检测到表达^[8-9];GS2 基因的主要功能是将叶绿体以及光呼吸中再合成的 NH_4^+ 合成为谷氨酰胺^[10]。Jacek 和 Andrej 等的研究结果表明,谷氨酰胺合成酶是植物氮同化的关键酶,此酶在进化中是相当保守的^[11]。

有性杂交后代在数量性状上产生超亲遗传变异是生物界普遍存在的现象。品种间有性杂交仍然是目前乃至将来培育水稻新品种的主要途径之一。因此,本研究以籽粒蛋白质含量为选择指标,从 F_2 代起连续定向选择培育成的籽粒蛋白质含量有显著差异的 F_{10} 超亲变异系,比较分析灌浆成熟过程中籽粒 GS 基因的表达特性及其基因序列,旨在为阐明水稻 GS 活性和基因表达量与蛋白质含量的关系以及杂种后代籽粒蛋白质含量产生超亲遗传变异的分子机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料和试验方法

2002 年选用籽粒蛋白质含量不同的 2 个亲本系选 1 号(蛋白质含量为 9.52%)和通 769(8.27%)配制单交组合,以籽粒蛋白质含量为选择指标,从 F_2 起逐代按高、低两个方向进行连续的定向选择至 F_{10} ,从中选择蛋白质含量有显著差异且超亲变异的 2 个品系东农 1101(7.81%)和东农 1124(10.18%)。

2013 年选用上述亲本及超亲变异系进行盆栽试验,盆的规格为长 60 cm、宽 40 cm、高 60 cm。4 月 1—15 日按供试材料的生育期进行分期播种,大楼盘育苗,单粒等距离点播催芽籽,早育秧管理,5 月 15 日插秧,每个品种插 3 盆,每盆等距离插长势一致的秧苗 24 棵,待缓苗后定植 12 棵苗,正常肥水

管理。

抽穗时每个供试材料选取同日抽出且大小基本一致的穗挂牌标记,待抽穗后第 10 d、15 d、20 d、25 d、30 d 分别取挂牌标记的稻穗 8 个,迅速放入液氮中,然后各稻穗中选取灌浆一致的穗中部籽粒 20 粒,在低温下去壳去胚后放入冻存管里,置于 -80°C 冰柜保存备用。

1.2 谷氨酰胺合成酶活性及基因 mRNA 表达量测定

参照金正勋等^[4]方法测定谷氨酰胺合成酶活性。采用 RT-PCR 方法测定 GS 基因 mRNA 表达量。用冷饱和酚法^[12]提取籽粒总 RNA,以无 RNase 的 DNase I 进行处理,消除基因组 DNA 污染,取 1 μg 处理后的 RNA 用于反转录。

根据 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上已公布的水稻 GS 基因序列,利用 Premier 5.0 软件设计同工型基因的 RT-PCR 引物(表 1)。以 *Actin* 基因为内标设计 1 对特异引物,其中,正向引物为 5'-GGAAGTGGTATGGTCAAGGC-3';反向引物为 5'-AGTCTCATGGATACCCGCAG-3'。

按照 Promega 公司的 M-MLV 逆转录试剂盒说明进行第 1 链 cDNA 的合成。以反转录得到的 cDNA 为模板,对 5 个时期的供试材料同时进行 PCR 扩增内参基因,利用 Quantity one 7.0.5 软件分析条带亮度,调整 cDNA 浓度直至扩增内参基因条带亮度一致。以调整浓度后的 cDNA 为模板扩增目标基因。扩增程序如下: 95°C 下预变性 10 min; 95°C 下变性 30 s, 55°C 下退火 30 s, 72°C 下 45 s,共进行 30 个循环;对扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳,利用 Quantity one 7.0.5 软件对扩增谱带进行表达丰度的比对分析。

1.3 谷氨酰胺合成酶基因 cDNA 克隆及全序列分析

1.3.1 质粒与细菌菌株

用于基因克隆及构建的质粒载体有 Peasy-T1(购自 TransGen Biotech 公司),主要用于 PCR 产物的克隆。所有的质粒扩增及其克隆操作都在大肠杆菌(*E.coli*)菌株 Trans1-T1 感受态细胞中进行。

1.3.2 PCR 扩增谷氨酰胺合成酶基因全长 cDNA

参考 NCBI 上已公布的水稻谷氨酰胺合成酶基因 *GS1.3* 和 *GS2* 的核苷酸序列,设计并合成引物(表 1),通过 NCBI 中 BLAST 的同源比对功能,对设计的引物特异性进行评价,用 PCR 方法从合成的

表 1 PCR 实验所用引物

Table 1. PCR primers used in the study.

引物名称	引物序列号	引物序列(5'-3')
Primer name	Primer sequence number	Primer sequence(5'-3')
RT-GS1-3-S	AB180689	CTCCACCCTCAAGCCATCT
RT-GS1-3-A		ACGACGCCAGCAATCTCA
RT-GS2-S	X14246	GGAACCCATCCCTACTAACA
RT-GS2-A		TCACCTCAAATCCTCCATCT
Os-GS1-3-A	AB180689	CTCACTTGCCGTTGGATT
Os-GS1-3-S		ATTGATAGCCTGTGCGTCTC
Os-GS2-S	X14246	GTTGGTGATTATCTGTAGGGG
Os-GS2-A		AAGGTGGCGTGTTTTCT

表 2 灌浆不同时期水稻籽粒蛋白质含量比较

Table 2. Comparison of protein content in rice grains during grain filling.

供试材料	抽穗后天数 Days after heading/d					精米蛋白质含量
	10	15	20	25	30	Protein content in polished rice
系选 1 号 Xixuan 1	11.68 d	11.04 b	11.13 b	9.97 b	9.26 b	9.52 b
通 769 Tong 769	12.14 c	11.06 b	10.68 c	9.19 c	8.85 c	8.27 c
东农 1101 Dongnong 1101	12.47 b	10.04 c	8.88 d	8.39 d	8.44 d	7.81 d
东农 1124 Dongnong 1124	12.75 a	11.87 a	11.78 a	11.94 a	10.98 a	10.18 a

数据后跟不同小写字母表示在 5%水平上差异显著。下同。

Values followed by different lowercase letters mean significant difference at 0.05 level.The same as below.

水稻籽粒 cDNA 库中扩增谷氨酰胺合成酶基因全长 cDNA 片段。

PCR 条件如下:95℃下 10 min;95℃下 1 min;55℃下 1 min;72℃下 5 min,共 30 个循环,最后在 72℃下延伸 15 min。

1.3.3 PCR 产物的克隆鉴定

PCR 产物在 0.7%琼脂糖凝胶电泳上分离后,用 NucleoTrap 胶回收试剂盒(Clontech)回收目的片段,并连接到 Peasy-T1 载体中转化大肠杆菌 DH5a 感受态细胞。然后通过 IPTG 和 X-gal 进行蓝白斑筛选,提取质粒 DNA,并进行酶切鉴定。

1.3.4 cDNA 序列分析

克隆在 Peasy-T1 载体中的谷氨酰胺合成酶基因 cDNA,委托上海英潍捷基贸易有限公司测定全核苷酸序列,双向重复测定。利用网站 NCBI 分析核苷酸序列及其推导的氨基酸序列,序列比较分析在 DNAMAN 数据库中进行。

2 结果与分析

2.1 灌浆不同时期亲本及超亲变异系籽粒蛋白质积累特性比较

灌浆不同时期亲本及超亲变异系籽粒蛋白质含量多重比较结果列于表 2。

由表 2 可见,后代东农 1124 的精米蛋白质含量

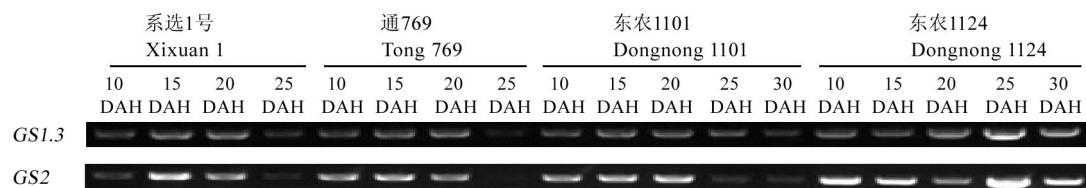
显著高于高亲系选 1 号,而后代东农 1101 的精米蛋白质含量显著低于低亲通 769;在灌浆各时期,籽粒蛋白质含量高的后代及亲本积累的蛋白质含量均高于蛋白质含量低的后代及亲本。说明有性杂交后代通过籽粒蛋白质含量的连续定向选择能获得籽粒蛋白质含量显著高的超亲变异系。

2.2 灌浆不同时期亲本及超亲变异系籽粒 GS 酶活性比较

灌浆不同时期亲本及超亲变异系籽粒谷氨酰胺合成酶活性多重比较结果列于表 3。

亲本及超亲变异系在灌浆过程中籽粒 GS 活性变化趋势基本一致,均呈单峰曲线变化,即随着灌浆进程酶活性逐渐上升,达到峰值后逐渐降低(表 3)。但不同材料的酶活性达到峰值的时间有差异,其中,亲本系选 1 号和后代东农 1124 在抽穗后 15 d 达到峰值,亲本通 769 和后代东农 1101 则在抽穗后 20 d 达到峰值。说明抽穗后 15~20 d 是籽粒 GS 活性最强的时期,其中高蛋白品种达到酶活性峰值的时间要早于低蛋白品种,籽粒蛋白质的合成与积累主要在灌浆前中期。

由表 3 还可知,灌浆各时期籽粒蛋白质含量高的后代东农 1124 的 GS 活性显著或略高于蛋白质含量低的后代;而且高蛋白质含量后代的 GS 活性显著强于高亲,低蛋白质含量后代的 GS 活性显著



DAH—抽穗后天数。下同。
DAH, Days after heading. The same as below.

图 1 灌浆不同时期亲本及杂种后代籽粒 GS 基因 mRNA 转录表达量变化

Fig. 1. Expression of genes involved in GS in grains of tested parents and their derived progenies at various days after heading.

或略低于低亲。说明籽粒蛋白质含量与籽粒 GS 活性密切相关,而且籽粒 GS 活性能产生超亲变异。

2.3 灌浆过程中亲本及超亲变异系籽粒 GS 基因 mRNA 表达量变化

灌浆不同时期亲本及超亲变异系籽粒 GS 酶同工型基因 GS1.3 和 GS2 的 mRNA 表达量变化示于图 1。

由图 1 可见,亲本及超亲变异系在灌浆过程中籽粒 GS1.3 和 GS2 基因的 mRNA 表达量变化趋势基本一致,随着籽粒灌浆进程 2 个同工型基因的 mRNA 表达量逐渐增加,达到峰值后又逐渐下降,呈单峰曲线变化,峰值出现在抽穗后 15~20 d。与 GS1.3 基因相比,GS2 基因的谱带亮度普遍大,说明在灌浆过程中籽粒 GS2 基因的 mRNA 表达量大于 GS1.3 基因,在籽粒 GS 同工型基因中 GS2 基因是主要表达的基因,在籽粒谷氨酰胺合成酶活性中

起主要作用。

以系选 1 号的 GS 基因表达量为基准,计算灌浆不同时期亲本及超亲变异系籽粒 GS1.3 和 GS2 基因的 mRNA 相对表达量,并进行多重比较,其结果列于表 4。

由表 4 可见,抽穗后 10 d,籽粒蛋白质含量高的东农 1124 的 GS1.3 和 GS2 基因的 mRNA 相对表达量极显著高于高亲系选 1 号;籽粒蛋白质含量低的后代东农 1101 的 GS2 基因的 mRNA 相对表达量极显著低于低亲通 769,但 GS1.3 基因的 mRNA 相对表达量极显著高于低亲;抽穗后 15 d,籽粒蛋白质含量高的东农 1124 的 GS2 基因的 mRNA 相对表达量极显著高于高亲系选 1 号,而 GS1.3 基因的 mRNA 相对表达量极显著低于高亲;籽粒蛋白质含量低的东农 1101 的 GS1.3 和 GS2 基因的 mRNA 相对表达量极显著低于低亲通 769;抽穗后 20~

表 3 灌浆不同时期亲本及后代籽粒谷氨酰胺合成酶活性比较

Table 3. Comparison of grain glutamine synthetase activity during grain filling for parents and hybrid progenies.						OD · grain ⁻¹ min ⁻¹	
供试材料 Material	10DAH	15DAH	20DAH	25DAH	30DAH		
系选 1 号 Xixuan 1	0.39 a	0.90 b	0.88 c	0.78 b	0.58 b		
通 769 Tong 769	0.47 a	0.95 b	0.99 b	0.60 c	0.50 b		
东农 1101 Dongnong 1101	0.38 a	0.71 c	0.83 c	0.53 c	0.54 b		
东农 1124 Dongnong 1124	0.41 a	1.25 a	1.06 a	0.97 a	0.87 a		

表 4 灌浆不同时期亲本及超亲变异系籽粒 GS1.3 和 GS2 基因 mRNA 相对表达量比较

Table 4. Relative expression levels of GS genes in parents and hybrid progenies after heading.									OD · grain ⁻¹ min ⁻¹	
供试材料 Material	10 DAH		15 DAH		20 DAH		25 DAH			
	GS1.3	GS2	GS1.3	GS2	GS1.3	GS2	GS1.3	GS2		
系选 1 号 Xixuan 1	1.00 Bc	1.00 Dd	1.00 Aa	1.00 Bb	1.00 Aa	1.00 Bb	1.00 Cc	1.00 Cc		
通 769 Tong 769	0.98 Bc	2.87 Bb	0.71 Bc	1.06 Bb	0.96 Aa	0.90 Bc	1.32 Aa	2.16 Aa		
东农 1101 Dongnong 1101	1.20 Ab	1.76 Cc	0.83 Bb	0.33 Cc	0.69 Bb	0.72 Cd	1.15 Bb	0.84 Dd		
东农 1124 Dongnong 1124	1.35 Aa	3.08 Aa	0.76 Bc	2.16 Aa	0.97 Aa	1.43 Aa	1.00 Cc	1.80 Bb		

数据后跟不同大小写字母表示在 0.01 和 0.05 水平上差异显著。
Values flanked by different uppercase and lowercase letters mean significant difference at 0.01 and 0.05 levels.

25 d, 籽粒蛋白质含量高的东农 1124 的 *GS2* 基因的 mRNA 相对表达量极显著高于高亲系选 1 号, 而 *GS1.3* 基因 mRNA 相对表达量与高亲之间没有显著差异; 籽粒蛋白质含量低的东农 1101 的 *GS1.3* 和 *GS2* 基因的 mRNA 相对表达量极显著低于低亲通 769。说明灌浆不同时期籽粒蛋白质含量与 *GS1.3* 和 *GS2* 基因的 mRNA 表达量有密切关系, 在灌浆不同时期籽粒蛋白质含量高的品种其 *GS* 基因的 mRNA 表达量也高, 而且杂交后代能超亲表达。

2.4 亲本及超亲变异系籽粒 GS 基因克隆及相似性比较

由基因测序结果可知, 亲本及超亲变异系籽粒 *GS1.3* 和 *GS2* 基因的 cDNA 全序列长分别为 1113 bp 和 1287 bp, 分别编码 371 个和 429 个氨基酸, 包含了全部的编码区序列, 与预期结果完全相符。现将其中的亲本系选 1 号籽粒 *GS1.3* 基因和 *GS2* 基因的 cDNA 全长核苷酸序列及推导出的氨基酸序列分别示于图 2~3。

将测得的供试材料 *GS1.3*-系选 1 号、*GS1.3*-通 769、*GS1.3*-东农 1101、*GS1.3*-东农 1124 和 *GS2*-系选 1 号、*GS2*-通 769、*GS2*-东农 1101、*GS2*-东农 1124 基因 cDNA 全序列与 GenBank 中已发表的日本晴 *GS1.3* 和 *GS2* 的核苷酸序列 AB180689

和 X14246 进行比较, 其结果如图 4 所示。

由图 4 可见, 与日本晴相比, 亲本系选 1 号和通 769 及超亲变异系东农 1101 和东农 1124 的 *GS1.3* 同源性分别为 99.7%、99.8%、99.6%、99.6%, *GS2* 同源性分别为 99.9%、99.9%、100%、100%, 证明本研究已成功克隆 *GS1.3* 和 *GS2* 的 cDNA, 并说明籽粒蛋白质含量不同的水稻品种间谷氨酰胺合成酶基因序列差异很小, 具有非常高的保守性, 并且 *GS2* 的保守性大于 *GS1.3*。

2.5 亲本及超亲变异系籽粒 GS 基因全长 cDNA 序列比较

现将日本晴和亲本及超亲变异系籽粒 *GS1.3* 基因 cDNA 全序列碱基和三联体密码变异位点比较结果列于表 5。

由表 5 可见, 超亲变异系东农 1101 与母本系选 1 号相比, 有 5 个位点的碱基发生变化, 其中 120 位点和 126 位点的碱基 G 转换成 A, 三联体密码由 AGG 和 TTG 分别变成 AGA 和 TTA, 都为精氨酸(R)和亮氨酸(L); 214 位点的碱基 G 转换成 A, 三联体密码 GTC 变成 ATC, 由缬氨酸(V)变成异亮氨酸(I); 549 位点的碱基 T 和 552 位点的碱基 C 分别转换成 C 和 T, 三联体密码 TTT 和 GCC 分别变成 TTC 和 GCT, 都为苯丙氨酸(F)和丙氨酸(A)。与父本通 769 相比, 有 6 个位点的碱基发生

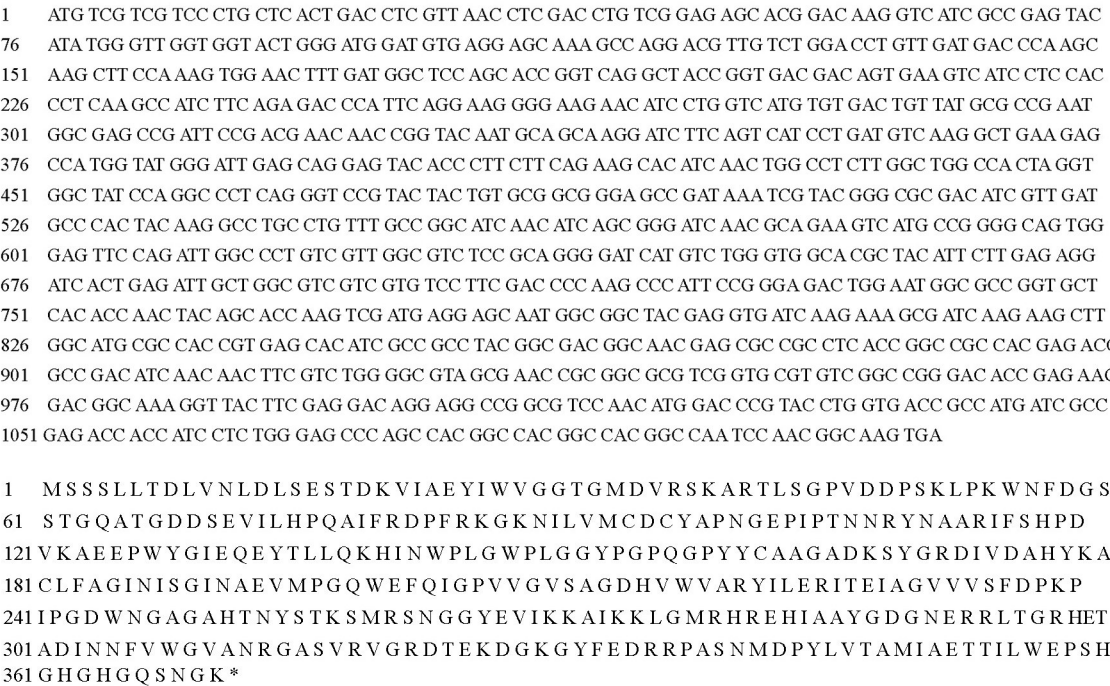


图 2 系选 1 号籽粒 *GS1.3* 基因的 cDNA 全长序列(上)及推导出的氨基酸序列(下)
Fig. 2. Deduced cDNA sequence(top) and amino acid sequence(bottom) of grain *GS1.3* gene in Xixuan 1.

1 ATG GCG CAG GCG GTG GTG CCG GCG ATG CAG TGC CAG GTC GGG GCC GTG CGG GCG AGG CCG GCG GCG GCT GCG GCG
76 GCG GCG GGG GGG AGG GTG TGG GGA GTC AGG AGG ACC GGG CGC GGC ACG TCG GGG TTC AGG GTG ATG GCC GTG AGC
151 ACG GAG ACC ACC GGG GTG GTG ACG CGG ATG GAG CAG CTG CTC AAC ATG GAC ACC ACC CCC TTC ACC GAC AAG ATC
226 ATC GCC GAG TAC ATC TGG GTT GGA GGA ACT GGA ATT GAC CTC AGA AGC AAA TCA AGG ACA ATA TCA AAA CCA GTG
301 GAG GAC CCC TCG GAG CTA CCA AAA TGG AAC TAC GAT GGA TCA AGC ACA GGG CAA GCT CCA GGA GAA GAT AGT GAA
376 GTC ATC TTA TAC CCA CAG GCT ATA TTC AAG GAC CCA TTT CGA GGT GGC AAC AAC ATA TTG GTT ATG TGT GAT ACC
451 TAC ACA CCA GCT GGG GAA CCC ATC CCT ACT AAC AAA CGT AAC AGG GCT GCA CAA GTA TTC AGT GAT CCA AAG GTT
526 GTC AGC CAA GTG CCA TGG TTT GGA ATA GAA CAG GAG TAC ACT TTG CTC CAG AGA GAC GTA AAC TGG CCT CTT GGC
601 TGG CCC GTT GGA GGC TAC CCT GGG CCC CAG GGT CCA TAC TAC TGC GCT GTA GGA TCG GAC AAA TCG TTT GGC CGT
676 GAC ATA TCA GAT GCT CAC TAC AAG GCA TGT CTT TAT GCT GGA ATT AAC ATT AGT GGA ACA AAT GGA GAG GTC ATG
751 CCT GGT CAG TGG GAG TAC CAG GTT GGA CCT AGT ATC GGT ATT GAA GCT GGA GAC CAC ATA TGG ATT TCA AGA TAT
826 ATT CTT GAG AGA ATA ACG GAG CAG GCT GGT GTA GTG CTT ACC CTT GAC CCC AAA CCA ATT CAG GGA GAC TGG AAT
901 GGA GCT GGG TGC CAC ACA AAC TAC AGC ACC AAG AGT ATG CGT GAA GAT GGA GGA TTT GAG GTG ATC AAG AAG GCA
976 ATC CTA AAC CTA TCA CTT CGC CAT GAC TTG CAT ATA AGT GCA TAT GGT GAA GGA AAT GAA AGG AGG TTG ACA GGT
1051 TTA CAC GAG ACA GCT AGC ATT GAC AAT TTC TCA TGG GGT GTG GCA AAC CGT GGA TGC TCT ATT CGG GTG GGG CGA
1126 GAC ACC GAG GCG AAG GGA AAA GGC TAC TTG GAA GAC CGT CGC CCG GCA TCA AAC ATG GAC CCG TAC GTC GTG ACA
1201 GCG CTA TTG GCT GAA ACC ACA ATT CTT TGG GAG CCA ACC CTC GAA GCG GAG GTT CTT GCT GCT AAG AAG TTG GCC
1276 CTG AAG GTA TGA

1 MAQAVVPAMQCQVGVAVRARPAAAAAAGGRVWGVVRRTRGRGTSGFRVMAVSTETTGVVTRM
61 EQLLNMDTTPFTDKIIAEYIWVGGTGIDLRSKSRTISKPVEDPSELPKWNYDGSSTGQAP
121GEDSEVILYPQAIKDFRGGNNILVMCDTYTPAGEPIPTNKRNRAAQVFSDPKVVSQVP
181WFGIEQEYTLQRDVNWPLGWPGVGGYPGPQGPYYCAVGSDKSFGRDISDAHYKCLYAGI
241NISGTNGEVMPPGQWEYQVGPSIGIEAGDHIWISRYILERITEQAGVVLTLDPKPIQGDWN
301GAGCHTNYSTKSMREDGGFEVIKKAILNLSLRHDLHISAYGEGNERRLTGLHETASIDNF
361SWGVANRGC SIRVGRDTEAKGKGYLEDRRPASNMDPYVVTALLAETTILWEPTLEAEVLA
421AKKLALKV*

图3 系选1号籽粒GS2基因CDNA全序列(上)及推导出的氨基酸序列(下)
Fig. 3. CDNA sequence(top) and deduced amino acid sequence(bottom) of grain GS2 gene in Xixuan 1.

A		相似度 Percent identity / %				
差异 Divergence / %		1	2	3	4	5
	1		99.7	99.8	99.6	99.6
	2	0.3		99.6	99.3	99.4
	3	0.2	0.5		99.4	99.5
	4	0.5	0.7	0.6		99.2
	5	0.4	0.6	0.5	0.8	

B		相似度 Percent identity / %				
		1	2	3	4	5
	1		99.9	99.9	100.0	100.0
	2	0.1		99.8	99.9	99.9
	3	0.1	0.2		99.9	99.9
	4	0.0	0.1	0.1		100.0
	5	0.0	0.1	0.1	0.0	

1—日本晴；2 系选1号；3—通769；4—东农1101；5—东农1124。
1, Nipponbare; 2, Xixuan 1; 3, Tong 769; 4, Dongnong 1101; 5, Dongnong 1124.

图4 供试材料间GSI.3(A)和GS2(B)基因序列的同源性
Fig. 4. Comparison of homology between GSI.3(A) and GS2(B) gene sequences for the tested materials.

变化,其中126位点和214位点的碱基G转换成A,三联体密码TTG和GTC分别变成TTA和ATC,前者都为亮氨酸,后者由缬氨酸(V)变成异亮氨酸(I);306位点和652位点的碱基A转换成G,三联体密码由GAA和ATG分别变成GAG和GTG,前者都为谷氨酸(E),后者由甲硫氨酸(M)变成缬氨酸(V);549位点的碱基T和552位点的碱基C分别转换成C和T,三联体密码由TTT和GCC分别变成TTC和GCT,前者都为苯丙氨酸(F),后者都为丙氨酸(A)。与父母本同时相比,超

亲变异系东农1101有4个位点的碱基与双亲不同,其中126位点、549位点、552位点的碱基变化和三联体密码的变化没引起氨基酸的变化,只有214位点的碱基变化和三联体密码的变化导致了氨基酸的变化。
超亲变异系东农1124与母本系选1号相比,有5个位点的碱基发生变化,其中96位点和120位点的碱基G转换成A,三联体密码由GGG和AGG分别变成GGA和AGA,都为甘氨酸(G)和精氨酸(R);230位点的碱基A和287位点的碱基G分别

表 5 日本晴、供试亲本及超亲变异系籽粒 *GS1.3* 基因 cDNA 全序列三联体密码比较

Table 5. Comparison of triplets for gene cDNA sequence of *GS1.3* in grains of Nipponbare, tested parents and their derived progenies.

品种 Variety	碱基位点 Base site											
	96	120	126	214	230	287	306	549	552	652	930	
日本晴 Nipponbare	GG G	AG A	TT G	G TC	C A A T	G T GA	G TT	T GC	C G	TG GT	A	
系选 1 号 Xixuan 1	GG G	AG G	TT G	G TC	C A A T	G T GA	G TT	T GC	C G	TG GT	A	
通 769 Tong 769	GG G	AG A	TT G	G TC	C A A T	G T GA	A TT	T GC	C A	TG GT	A	
东农 1101 Dongnong 1101	GG G	AG A	TT A	A TC	C A A T	G T GA	G TT	C GC	T G	TG GT	A	
东农 1124 Dongnong 1124	GG A	AG A	TT G	G TC	C G A T	A T GA	G TT	T GC	C G	TG GT	T	

转换成 G 和 A,三联体密码由 CAA 和 TGT 分别变成 CGA 和 TAT,由原来的谷氨酰胺(Q)和半胱氨酸(C)分别变成精氨酸(R)和酪氨酸(Y);930 位点的碱基 A 颠换成 T,三联体密码 GTA 变成 GTT,都为缬氨酸(V)。与父本通 769 相比,有 6 个位点的碱基发生变化,其中 96 位点和 287 位点的碱基 G 转换成 A,三联体密码由 GGG 和 TGT 分别变成 GGA 和 TAT,前者都为甘氨酸(G),后者由半胱氨酸(C)变成酪氨酸(Y);306 位点、230 位点、652 位点的碱基 A 转换成 G,三联体密码由 GAA、CAA、ATG 分别变成 GAG、CGA、GTG,前者都是谷氨酸(E),后两者分别由谷氨酰胺(Q)变成精氨酸(R),甲硫氨酸(M)变成缬氨酸(V);930 位点的碱基 A 颠换成 T,三联体密码 GTA 变成 GTT,都为缬氨酸(V)。与父母本同时相比,超亲变异系东农 1124 有 4 个位点的碱基与双亲不同,其中 96 位点和 930 位点的碱基变化和三联体密码的变化没引起氨基酸的变化,但 230 位点和 287 位点的碱基变化和三联体密码的变化导致了氨基酸的变化。

将超亲变异系东农 1101 和东农 1124 相互比较可知,两个变异系间有 8 个位点的碱基和三联体密码不同,其中 96 位点、126 位点、549 位点、552 位点及 930 位点的三联体密码变化没导致氨基酸的变化,而 214 位点、230 位点、287 位点的三联体密码变化导致了氨基酸的变化。

由亲本和超亲变异系间的籽粒 *GS2* 基因的全长 cDNA 核苷酸序列比较可知,2 个超亲变异系东农 1101 和东农 1124 的核苷酸序列完全一致,但与母本系选 1 号相比,两个超亲变异系只有在 784 位点的碱基 A 转换成 G,三联体密码由 ATC 变成 GTC,由异亮氨酸(I)变成缬氨酸(V)。与父本通 769 相比,两个超亲变异系也只有在 700 位点的碱基 A 转换成 G,三联体密码由 ACA 变成 GCA,由苏氨酸(T)变成丙氨酸(A)。

由以上碱基序列比较结果可知,碱基发生变异后既能形成只与母本或父本单亲一样的序列或不一

样的序列,也能形成与双亲都不一样的序列,而且变异后既能形成同义的三联体密码,也能形成突变的三联体密码。通过杂交产生的后代在基因分离和稳定过程中通过某位点的碱基变化,可形成个别碱基不同的多态性基因和改变蛋白质氨基酸序列的突变基因。

2.6 亲本及超亲变异系籽粒 *GS* 氨基酸序列保守功能域比较

GS 序列保守功能域包括谷氨酰胺合成酶 ATP 结合功能域、谷氨酰胺合成酶催化功能域、谷氨酰胺合成酶铵离子集合功能域。本研究根据日本晴氨基酸序列预测的保守功能域对亲本及超亲变异系间的谷氨酰胺合成酶氨基酸序列保守功能域进行比较分析,其结果分别列于表 6 和表 7。

由表 6 可见,超亲变异系东农 1101 和东农 1124 与母本系选 1 号和父本通 769 相比,*GS1.3* 氨基酸序列保守功能域氨基酸起始和终止位置及谷氨酰胺合成酶 ATP 结合功能域的氨基酸序列完全一致;在谷氨酰胺合成酶催化功能域中,超亲变异系东农 1101 和东农 1124 与母本系选 1 号的氨基酸序列完全一致,但与父本通 769 相比,两个超亲变异系在第 108 位氨基酸上由甲硫氨酸(M)变成缬氨酸(V);在谷氨酰胺合成酶铵离子集合功能域中,双亲的氨基酸序列完全一致,但超亲变异系东农 1101 与双亲相比,在第 72 位氨基酸上由缬氨酸(V)变成异亮氨酸(I),超亲变异系东农 1124 与双亲相比,分别第 77 位和第 96 位氨基酸上由谷氨酰胺(Q)变成精氨酸(R),半胱氨酸(C)变成酪氨酸(Y)。

由表 7 可见,超亲变异系东农 1101 和东农 1124 与母本系选 1 号和父本通 769 相比,*GS2* 氨基酸序列保守功能域氨基酸起始和终止位置及谷氨酰胺合成酶 ATP 结合功能域和谷氨酰胺合成酶铵离子集合功能域的氨基酸序列完全一致;在谷氨酰胺合成酶催化功能域中,超亲变异系东农 1101 和东农 1124 的氨基酸序列完全一致,但与母本系选 1 号相比,在第 273 位氨基酸上由异亮氨酸(I)变成缬氨酸

表 6 GS1.3 保守功能域氨基酸序列比较

Table 6. Conserved domain analysis of the GS1.3 sequence.

功能域 Domain	氨基酸序列位置 Position sequence		系选 1 号 Xixuan 1	通 769 Tong 769	东农 1101 Dongnong 1101	东农 1124 Dongnong 1124
	起始	终止				
	Start	End				
	—	—				
谷氨酰胺合成酶 ATP 结合功能域 GS ATP binding domain	239	255	—	—	—	—
谷氨酰胺合成酶催化功能域 GS catalytic domain	105	357	V	M	M → V	M → V
谷氨酰胺合成酶铵离子集合功能域 GS beta-grasp domain	19	99	—	—	V → I	Q → R C → Y

“—” 表示氨基酸序列一致。下同。
‘—’ means the identical amino acid sequence. The same as below.

表 7 GS2 保守功能域氨基酸序列比较

Table 7. Conserved domain analysis of the GS2 sequence.

功能域 Domain	氨基酸序列位置 Position sequence		系选 1 号 Xixuan 1	通 769 Tong 769	东农 1101 Dongnong 1101	东农 1124 Dongnong 1124
	起始	终止				
	Start	End				
	—	—				
谷氨酰胺合成酶 ATP 结合域 GS ATP binding domain	294	305	—	—	—	—
谷氨酰胺合成酶催化功能域 GS catalytic domain	159	411	I	T	I → V T → A	I → V T → A
谷氨酰胺合成酶铵离子集合功能域 GS beta-grasp domain	73	154	—	—	—	—

(V);与父本通 769 相比,在第 234 位氨基酸上由苏氨酸(T)变成丙氨酸(A)。

由上比较结果可知,与亲本相比超亲变异系的 GS1.3 和 GS2 基因碱基序列中个别碱基的变化导致了该酶催化功能域和铵离子集合功能域的氨基酸序列变化。

3 讨论

关于灌浆过程中 GS 活性与蛋白质合成积累的关系,国内外已有较多报道。Xie 等^[13]研究结果表明,籽粒 GS 活性的变化对籽粒蛋白质合成影响较小,籽粒 GS 活性与籽粒蛋白质含量的相关性较小。朱红梅等^[12]研究结果表明,水稻高蛋白质含量基因型品种功能叶的 GS 活性明显高于低蛋白质含量基因型品种。唐湘如等^[14]研究结果表明,水稻产量和蛋白质含量均高的品种超丰早 1 号成熟后期叶片和籽粒的全氮、蛋白氮和非蛋白氮含量及 GS 活性较高,籽粒蛋白质含量和产量增加。本研究的供试材料是在同一个杂交组合分离群体中通过籽粒蛋白质含量的连续定向选择获得的籽粒蛋白质含量有显著差异的超亲变异系,而且试验是在严格控制环境条件的盆栽里进行,试验结果可靠性很高。由本研究结果可知,在灌浆过程中籽粒 GS1.3 和 GS2 基因的 mRNA 表达量及 GS 活性变化趋势非常一致,都是单峰曲线变化,峰值都出现在抽穗后 15~20d,而

且籽粒蛋白质含量与 GS1.3 和 GS2 基因的 mRNA 表达量及 GS 活性变化又是同步变化关系,即籽粒蛋白质含量高的超亲变异系的 GS1.3 和 GS2 基因的 mRNA 表达量及 GS 活性显著大于蛋白质含量低的超亲变异系,并且 mRNA 表达量和 GS 活性也表现出超亲变异,因此笔者认为蛋白质含量与籽粒 GS 基因 mRNA 表达量和活性有很密切的关系。由基因碱基序列和氨基酸序列比较分析还可知,籽粒蛋白质含量、GS 酶活性及 GS2 基因 mRNA 表达量有显著差异的超亲变异系东农 1101 和东农 1124 间的 GS2 基因编码序列和氨基酸序列却完全一致。由于氨基酸序列相同的蛋白质,其结构与功能也应相同。因此,GS 基因 mRNA 表达量变化导致的酶活性变化是超亲变异系间籽粒蛋白质含量表现显著差异的内在原因。基因 mRNA 表达量变化主要受基因调控因子的影响,即基因启动子、转录因子等因素的控制。这也许是各研究者对籽粒蛋白质含量与 GS 活性关系上得到不同结果的原因之一。所以,今后的 GS 活性与籽粒蛋白质含量的关系研究应该重视 GS 基因调控因子的结构变异和功能变异,这对阐明有性杂交产生数量性状的超亲遗传变异分子机制及 GS 在籽粒蛋白质合成积累上的作用都具有重要意义。

研究表明,在植物体内蕴藏着大量的自然等位基因变异,这些基因序列变异直接导致表型变

异^[15]。功能上有差异的突变主要有以下几种可能:一是基因重要功能域内的非同义突变,导致酶活性中心重要氨基酸取代而影响其功能;二是在启动子区域上下游存在的其他顺式元件中发生变异,从而影响基因对调控信息的响应与基因表达^[16]。基因内部不同位点上的碱基发生变化是生物界形成复等位基因和基因多态性的内在原因。由本研究结果可知,虽然籽粒蛋白质含量不同的亲本及超亲变异系间 *GS1.3* 和 *GS2* 基因编码区碱基序列同源性很高,氨基酸序列保守性很强,序列相似度高达 99% 以上,甚至 *GS2* 基因在两个超亲变异系东农 1101 和东农 1124 中序列相似度达到了 100%,但水稻不同品种间 *GS1.3* 和 *GS2* 基因的碱基序列和蛋白质氨基酸序列并不完全一致,与亲本相比,通过有性杂交定向选择培育的籽粒蛋白质含量超亲变异系仍然在个别碱基位点上发生变化,甚至改变蛋白质功能域上的氨基酸。这就说明,品种间有性杂交后代在基因分离和重组过程中通过碱基转换或颠换产生个别碱基和氨基酸有差异的等位基因和同工型酶,是生物界基因产生多态性和表型性状产生遗传变异的内在分子机制和重要途径。已有研究结果也表明,单核苷酸多态性(SNPs)和小的插入缺失是大多数生物基因组中最丰富的变异^[17]。由本研究结果还可知,基因碱基序列的变化是不同品种间等位基因产生多态性的内在基础,但由于三联体密码的简并现象而并不是每个碱基的变化都能导致氨基酸序列的变化和蛋白质功能的变化。因此,从 DNA 水平上检测分析得到的基因多态性信息不一定能准确反映不同品种间等位基因遗传功能的多样性,这也许是根据 DNA 分子标记遗传距离选配亲本得不到理想遗传变异的内在原因。

参考文献:

- [1] Cren M, Hirel B. Glutamine synthetase in higher plant: Regulation of gene and protein expression from the organ to the cell. *Plant Cell Physiol*, 1999, 40: 1187-1193.
- [2] Hill J, Philip L H. Bacterial aspartic proteinases. *FEBS Let*, 1997, 409(3): 357-360.
- [3] Ochs G, Schoth G, Trischler M, et al. Complexity and expression of the glutamine synthetase multigene family in the amphidiploid crop *Brassica napus*. *Plant Mol Biol*, 1999, 39: 395-405.
- [4] 金正勋, 钱春荣, 杨静, 等. 水稻灌浆成熟期籽粒谷氨酰胺合成酶活性变化及其与稻米品质关系的初步研究. *中国水稻科学*, 2007, 21(1): 103-106.
Jin Z X, Qian C R, Yang J, et al. Changes of activity of glutamine synthetase during grain filling and its influence on rice grain quality. *Chin J Rice Sci*, 2007, 21: 103-106.
- [5] Paulam M, Ligia M L, Isabel M S. Expression of the plastid located glutamine synthetase of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol*, 2003, 132(1): 390-399.
- [6] 黄星, 李晓光, 刘洪亮, 等. 水稻籽粒蛋白质含量选择对杂交后代蛋白质含量及氮代谢关键酶活性的影响. *中国水稻科学*, 2009, 23(6): 657-660.
Huang X, Li X G, Liu H L, et al. Effects of grain protein content selection on protein content and key enzymes activities for nitrogen metabolism in rice hybrid progenies. *Chin J Rice Sci*, 2009, 23: 657-660.
- [7] 莫良玉, 吴良欢, 陶勤南. 高等植物 GS/GOGAT 循环研究进展. *植物营养与肥料学报*, 2001, 7(2): 223-231.
Mo L Y, Wu L H, Tao Q N. Research advances on GS/GOGAT cycle in higher plants. *Plant Nut Fert Sci*, 2001, 7(2): 223-231.
- [8] Tabuchi M, Sugiyama K, Ishiyama K, et al. Severe reduction in growth rate and grain filling of rice mutants lacking OsGS1: 1, a cytosolic glutamine synthetase 1. *Plant J*, 2005, 42: 641-651.
- [9] Tabuchi M, Abiko T, Yamaya T. Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.). *J Exp Bot*, 2007, 58: 2319-2327.
- [10] Mifflin B J, Lea P J. Ammonia assimilation // *The Biochemistry of Plants*. New York: Academic Press, 1980: 169-202.
- [11] Jacek B, Andrzej B L. Evolution of the glutamine synthetase gene in plants. *Plant Sci*, 2011, 28: 51-58.
- [12] 朱红梅, 荣湘民, 刘强, 等. 不同基因型水稻籽粒蛋白质含量差异的研究: I. 两个常规早稻品种籽粒蛋白质含量差异. *湖南农业大学学报*, 2001, 27(1): 13-16.
Zhu H M, Rong X M, Liu Q, et al. Differences in contents of grain protein of different genotype rice varieties: I. Differences in contents of grain protein between two varieties of early convention rice. *J Hunan Agric Univ*, 2011, 27(1): 13-16.
- [13] Xie Z J, Jiang D, Cao W X, et al. Effects of post anthesis soil water status on the key regulatory enzymes of starch and protein accumulation in wheat grains. *J Plant Physiol Mol Biol*, 2003, 29(4): 309-316.
- [14] 唐湘如, 余铁桥. 密度对饲用杂交稻几种酶活性的影响及其与产量和蛋白质含量的关系. *杂交水稻*, 1999, (6): 47-50.
Tang X R, Yu T Q. Effects of density on activities of several enzymes in fodder hybrid rice and its relation to protein content and yield. *Hybrid Rice*, 1999, (6): 47-50.
- [15] 吴永生, 李新海, 郝转芳, 等. 玉米 Gln1-4 的 gDNA 序列、基因结构、保守功能域与等位变异. *作物学报*, 2009, 35(6): 983-991.
Wu Y S, Li X H, Hao Z F, et al. Genomic DNA sequence, gene structure, conserved domains, and natural alleles of Gln1-4 gene in maize. *Acta Agron Sin*, 2009, 35(6): 983-991.
- [16] Reddy A. Alternative splicing of pre-messenger RNAs in plants in the genomic era. *Annu Rev Plant Biol*, 2007, 58: 267-294.
- [17] Kruglyak L. The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies. *Nat Genet*, 1997, 17: 21-24.