

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2012.01148

青藏高原青稞农家品种淀粉颗粒结合蛋白组成及 *GBSSI* 基因 5'前导序列的多态性

王春萍^{1,2,**} 高丽娟^{1,2,**} 潘志芬^{1,*} 尼玛扎西³ 唐亚伟³ 曾兴权³
李 俏^{1,2} 邓光兵^{1,2} 龙 海¹ 余懋群^{1,*}

¹中国科学院成都生物研究所, 四川成都 610041; ²中国科学院研究生院, 北京 100049; ³西藏农牧科学院 / 农业部藏区青稞生物学与遗传育种重点实验室, 西藏拉萨 850032

摘 要: 利用 1D-SDS-PAGE 分离了 261 份青藏高原农家青稞的淀粉颗粒结合蛋白, 旨在为青藏高原青稞淀粉品质改良和淀粉颗粒结合蛋白机制研究提供依据和基础信息。在分子量 45~100 kD 区域共有 21 种多态性蛋白条带和 78 种组合带型, 其中 2、3、5、10、11 为新条带。利用 PCR 技术克隆了 236 份农家青稞 *GBSSI* 基因 5'前导序列, 出现 1 000 bp 和 800 bp 的多态性片段, 且以前者为主, 其频率为 80.1%。在 8 份农家青稞及 4 份引进的低直链淀粉材料的 *GBSSI* 基因 5'前导序列中共检测到 32 个多态性位点, 包括 9 个 InDels 和 23 个 SNPs。*GBSSI* 基因 5'前导序列中出现了特有的序列差异, 如未出现 600 bp 类型(约 400 bp 的特异缺失), 而该缺失被认为是低直链淀粉大麦形成的原因; 材料 yf127、yf70、011Z1396 和 09Z586 出现了特异点突变。因此认为, 青藏高原农家青稞品种的淀粉颗粒结合蛋白具有丰富的多态性和独特性。低直链淀粉青稞 *GBSSI* 基因序列的新特征表明可能存在新的低直链淀粉形成机制。

关键词: 农家品种; 青稞; 淀粉颗粒结合蛋白; *GBSSI* 基因

Polymorphism of Starch Granule-Associated Proteins and 5' Leader Sequence of *GBSSI* Gene in Indigenous Naked Barley (*Hordeum vulgare* L.) from Qinghai-Tibetan Plateau in China

WANG Chun-Ping^{1,2,**}, GAO Li-Juan^{1,2,**}, PAN Zhi-Fen^{1,*}, NIMA Zha-Xi³, TANG Ya-Wei³, ZENG Xing-Quan³, LI Qiao^{1,2}, DENG Guang-Bing^{1,2}, LONG Hai¹, and YU Mao-Qun^{1,*}

¹ Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China; ² Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; ³ Tibet Academy of Agriculture and Animal Sciences / Key Laboratory of Biology and Genetic Breeding of Tibetan Naked Barley, Ministry of Agriculture, Lhasa 850032, China

Abstract: Starch granule-associated proteins (SGAPs) are minor components tightly bound with starch granules, most of which are believed to be starch biosynthetic enzymes. We separated SGAPs from 261 indigenous naked barley accessions in Qinghai-Tibetan Plateau of China using 1D-SDS-PAGE technique. A total of 21 polymorphic bands with molecular weights of 45–100 kD and 78 SGAPs patterns were detected, of which bands 2, 3, 5, 10, and 11 were novel protein bands. The 5' leader sequences of *GBSSI* gene were cloned using 236 accessions of indigenous naked barley. Two types of length polymorphisms (1 000 bp and 800 bp) were found with frequencies of 80.1% and 19.9%, respectively. According to sequencing results, there were 32 polymorphic sites in the 5' leader sequences of *GBSSI* gene, including nine InDels and 23 SNPs. Specific mutations were found in Qinghai-Tibetan Plateau accessions. For example, the 400 bp deletion reported corresponding to low amylose content in barley was absent in this study; and special SNPs were detected in accessions yf127, yf70, 011Z1396, and 09Z586. These results imply that the SGAPs of the Qinghai-Tibetan Plateau indigenous naked barley are abundant and polymorphic. The novel sequence character-

本研究由国家自然科学基金项目(31101150), 国家科技支撑计划项目(2012BAD03B01), 国家重点基础研究计划(973 计划)前期研究专项(2012CB723006), 国家科技基础性工作专项规划(2006FY110700)和中国科学院西部之光人才培养计划项目资助。

* 通讯作者(Corresponding authors): 潘志芬, E-mail: panzf@cib.ac.cn, Tel: 028-85226136; 余懋群, E-mail: yumq@cib.ac.cn, Tel: 028-85229053

第一作者联系方式: 王春萍, E-mail: wcp49930000@sina.com; 高丽娟, E-mail: gaolijuan824@163.com

** 同等贡献(contributed equally to this work)

Received(收稿日期): 2011-12-05; Accepted(接受日期): 2012-04-16; Published online(网络出版日期): 2012-05-11.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20120511.1807.023.html>

istics in the *GBSSI* 5' leader sequence of the low amylose accessions suggest a different mechanism for amylose biosynthesis in Qinghai-Tibetan Plateau indigenous naked barley.

Keywords: Indigenous variety; Naked barley; Starch granule-associated proteins (SGAPs); *GBSSI* gene

淀粉颗粒结合蛋白(starch granule-associated proteins, SGAPs)是与淀粉颗粒紧密结合的微量成分。研究表明,大多数 SGAPs 参与淀粉合成^[1-2]。研究不同作物或不同基因型的 SGAPs 组成有利于发现新的淀粉合成酶或与淀粉合成相关的蛋白。青藏高原栽培青稞的 SGAPs 组成丰富,存在多种独特的 SGAPs,可能蕴藏着独特的淀粉合成机制^[2-3]。青藏高原农家青稞较栽培青稞资源更为丰富,但还未见关于其 SGAPs 组成的报道。*GBSSI* (waxy)蛋白是一种重要的 SGAPs,是 *GBSSI* 基因的产物,*GBSSI* 基因突变与直链淀粉含量的变化密切相关^[4-7]。大麦 *GBSSI* 基因 5'端前导序列特异片段的长度和序列多态性与该基因的表达及功能具有重要关系^[8-9]。为了解青藏高原青稞农家品种的 SGAPs 组成及多态性,发掘新的 SGAPs 和特殊的淀粉基因资源,加速该地区青稞品质遗传改良,本研究以 261 份青藏高原农家青稞为材料,探索其 SGAPs 组成和 *GBSSI* 基因 5'端前导序列长度和序列多态性,以筛选具新 SGAPs 的种质材料。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料 261 份,其中 72 份从云南周边地区四川的甘孜州和凉山州、西藏的察隅县和芒康县收集,其余农家青稞由西藏农牧科学院提供。以 4 份国外引进的糯大麦材料为对照,包括全糯青稞 08-1127 和 Yon M Kei (籽粒中不能检测出直链淀粉含量)和国外引进的低直链淀粉青稞 08-1128 和 Waxy Hector。

1.2 淀粉颗粒结合蛋白分离

青稞 SGAPs 的提取、电泳分离及染色参照潘志芬等^[10]报道的方法。条带用数字命名,随电泳迁移距离递增而增加。分子量在 45 kD 以下的青稞 SGAPs 主要为醇溶蛋白,可能与淀粉代谢相关性小^[2],因此本研究仅统计 45 kD 以上的 SGAPs。

1.3 *GBSSI* 基因 5'前导序列特异片段的克隆和序列分析

采用 CTAB 法^[11]从幼叶中提取基因组 DNA。参照 Domon 等^[8]的报道,上游引物为 p-197 (5'-CAA ACAGACGACAAGCGGAGAA-3'),下游引物为 p+606 (5'-TAGAAAAAGAAAACATCAAGCA-3')。

反应体系参照 Domon 等^[8]的实验,略作改进,包括 10×buffer 2 μL, MgCl₂ 1.2 μL (1.5 μmol L⁻¹), 模板 DNA 50 ng, 上下引物各 1 μL (0.1 μmol L⁻¹), dNTP 2 μL (200 μmol L⁻¹), *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μL, ddH₂O 11.6 μL。PCR 反应程序为 94 °C 变性 4 min, 56 °C 复性 2 min, 72 °C 延伸 2 min, 1 个循环; 94 °C 变性 1 min, 56 °C 复性 2 min, 72 °C 延伸 2 min, 34 个循环; 最后 72 °C 延伸 2 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离,然后回收和纯化目的片段。按 Pmd18-T vector 试剂盒 (TaKaRa) 说明,将回收纯化的目的片段与 Pmd18-T 载体连接,转化 JM109 感受态大肠杆菌细胞 (Transgen),挑取阳性克隆培养,通过 PCR 检测后送 Invitrogen 公司 (上海) 测序,对每个目标片段检测 3 个克隆。用 DNAMAN 软件进行序列分析。

2 结果与分析

2.1 农家青稞淀粉颗粒结合蛋白组成及多态性

261 份材料中共分离出 21 种分子量 (45~100 kD) 不同的 SGAPs 条带 (图 1)。除条带 7 外都呈多态性,分布频率为 0.4%~99.2% (表 1)。多态性条带主要集中在分子量为 80~100、63~70 和 45~58 kD 的 A、B 和 D 区,其中 A 区含条带 3、4、5、6, B 区含条带 8、9、10、11, D 区的多态性最丰富,条带 13~21 在材料中的分布频率为 10.3%~46.0%。C 区的条带 12 的分子量约为 60 kD,为 waxy 蛋白。低直链淀粉材料 08-1128 缺失该蛋白,而从 Waxy Hector 能分离出正常丰度的 waxy 蛋白;从全糯材料 Yon M Kei 中未分离出 waxy 蛋白,但从 08-1127 中能分离出 waxy 蛋白;我国材料中未发现此蛋白缺失类型。共发现 78 种 SGAPs 组合带型 (表 2),其中 1 和 3 带型分布最丰富。从每份材料检测出 8~12 种蛋白条带,以 8、9 和 10 种条带组成最多,其频率分别为 54.4%、14.9% 和 9.6%。

2.2 *GBSSI* 基因 5'前导序列长度多态性

利用 *GBSSI* 基因 5'前导序列引物,在 236 份农家品种中扩增出 800 bp 和 1 000 bp 两种特异片段 (图 2),其中 47 份材料的扩增片段长度为 800 bp,占 19.9%; 189 份材料中扩增出 1 000 bp 的片段,分布频率为 80.1%。低直链淀粉材料 08-1128 和 Waxy Hector 的扩增片段分别为 600 bp 和 800 bp,无直链

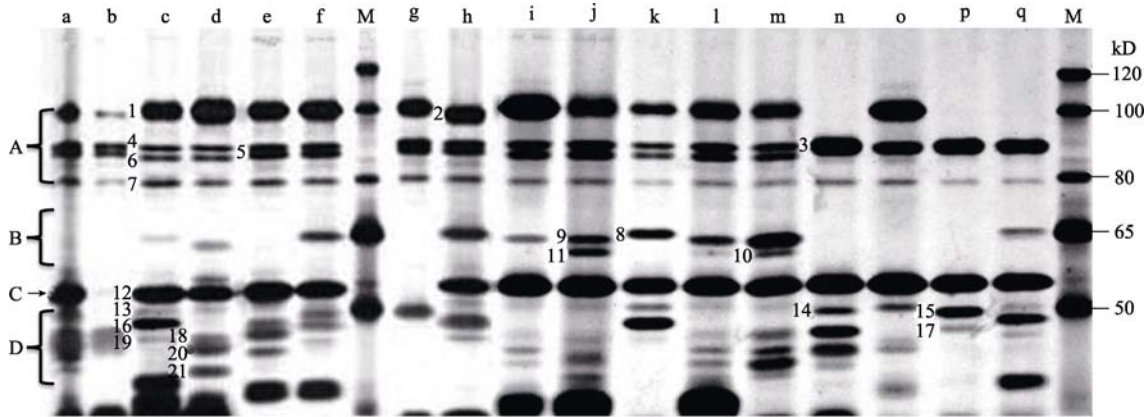


图 1 青藏高原农家青稞淀粉颗粒结合蛋白的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 1 SDS-PAGE of starch granule-associated proteins of indigenous naked barley from Qinghai-Tibetan Plateau in China
A: 80-100 kD; B: 63-70 kD; C: 60 kD; D: 45-58 kD. M: Molecular weight standards; a: 08-1127; b: 08-1128; C: yf127^[2]; d: yf70^[2]; e: 011Z1557; f: 011Z1558; g: Yon M Kei; h: Waxy Hector; i: 011Z1240; j: 011Z1283; k: 011Z1323; l: 011Z1421; m: 011Z1350; n: 011Z286; o: 011Z277; p: 011Z283; q: 011Z284.

表 1 淀粉颗粒结合蛋白条带的分子量大小和分布频率

Table 1 Molecular weight and frequencies of starch granule-associated proteins (SGAPs)

SGAP	分子量 Molecular weight (kD)	频率 Frequency (%)	SGAP	分子量 Molecular weight (kD)	频率 Frequency (%)
SGAP1	100.0	96.9	SGAP12	60.0	99.2
SGAP2	98.0	0.4	SGAP13	58.0	40.6
SGAP3	96.0	3.1	SGAP14	56.0	10.3
SGAP4	94.0	96.6	SGAP15	54.0	32.6
SGAP5	90.0	3.8	SGAP16	49.0	26.4
SGAP6	86.0	95.4	SGAP17	48.0	42.9
SGAP7	80.0	100.0	SGAP18	47.0	43.3
SGAP8	68.0	27.6	SGAP19	46.5	46.0
SGAP9	66.0	54.8	SGAP20	45.5	28.7
SGAP10	65.0	8.4	SGAP21	45.0	45.6
SGAP11	64.0	12.6			

淀粉材料 Yon M Kei 和 08-1127 的扩增片段分别为 1 000 bp 和 800 bp。

2.3 GBSSI 基因 5'前导序列多态性

根据 5'前导序列特异扩增片段长度多态性及直链淀粉含量差异,共选取 12 份材料,其中包括 5 份直链淀粉含量小于 15%的低直链淀粉材料及 4 份国外引进的糯性材料,测其 GBSSI 基因 5'前导序列,该序列含大麦 GBSSI 基因的上游调控序列、TATA 框、第 1 外显子和部分第 1 内含子序列。共检测到 32 个多态性位点(表 3),包含 9 个 InDels, 23 个 SNPs,仅在 1 000 bp 的片段中出现了 TTGCT 和 CGAG 缺失。800 bp 和 1 000 bp 片段差异在于后者具有一个 191 bp 的插入片段,该片段位于第 1 内含子处。yf127、yf70、011Z1396 和 09Z586 中的 GBSSI 基因 5'前导序列中存在多处特有的 SNP 突变,外引材料中仅 08-1128 含有 403 bp 的缺失,国内材料中没有

出现该特异片段的缺失。

3 讨论

SGAPs 与淀粉代谢及淀粉品质密切相关,所以谷物籽粒淀粉颗粒结合蛋白质组的研究已受到高度关注^[12-16]。潘志芬等^[3]已报道了栽培青稞的主要 SGAPs 的组成,并推测其对淀粉特性的影响。Wang 等^[2]已对 2 份青稞的 SGAPs 进行了单向电泳蛋白条带和双向电泳蛋白点的质谱鉴定,发现了多种新的 SGAPs。本研究发现青藏高原农家青稞 SGAPs 有 21 条,多态性非常丰富,其中蛋白带 2、3、5、10、11 在以前的研究中未见报道。农家青稞比栽培青稞中的 SGAPs 组成更丰富,且多态性更高,其原因可能是本研究的材料群体较大,材料来源覆盖地域广,而且人为选择的干扰较小,保留了其原始的独特性和多样性。根据 Wang 等^[2]的报道,A 区主要为淀粉

表 2 淀粉颗粒结合蛋白条带组合类型
Table 2 Types of patterns of starch granule-associated proteins (SGAPs) bands

带型 Banding pattern	SGAP 组合类型 Type of SGAPs	带型 Banding pattern	SGAP 组合类型 Type of SGAPs
1	1+4+6+7+8+12+13+15+17	40	1+4+6+7+8+12+14+15+19
2	1+4+6+7+8+12+15+17+21	41	1+4+6+7+8+12+13+15+17+20
3	1+4+6+7+9+12+18+19+21	42	1+4+6+7+8+12+13+15+17+19+20
4	1+4+6+7+9+12+16+20+21	43	1+4+6+7+8+12+13+15+17
5	1+4+6+7+12+14	44	1+4+6+7+8+12+13+15+17+19
6	1+4+6+7+12+13+18+19	45	1+4+6+7+9+12+16+19
7	1+4+6+7+12+16+18+21	46	1+4+6+7+9+12+13+17+18
8	1+4+6+7+12+13+15+17	47	1+4+6+7+9+12+13+17+20
9	3+6+7+8+12+13+15+17	48	1+4+6+7+9+12+13+16+17+20
10	3+6+7+9+12+16+20	49	1+4+6+7+12+13+16+18+20
11	3+7+9+12+16+18+20	50	1+4+6+7+12+13+15+18+19+20+21
12	1+3+6+7+9+12+13+18+19	51	1+4+6+7+12+15+18+20
13	3+7+9+12+13+18+19	52	1+4+6+7+12+16+18+19+20+21
14	3+6+7+12+13	53	1+4+6+7+12+16+17+20
15	1+4+6+7+9+11+12+18+19+21	54	1+4+6+7+12+13+14+19+21
16	1+4+6+7+9+11+12+15+19+21	55	1+4+6+7+12+14+16
17	1+4+6+7+9+11+12+13+16+17+19+21	56	1+4+6+7+12+15+17
18	1+4+6+7+9+10+12+13+16+17+19+21	57	1+4+6+7+9+11+12+16+17+20
19	1+4+6+7+12+16+18+20	58	1+4+6+7+9+11+12+13+15+16+17+19+20+21
20	1+4+6+7+9+11+12+13+16+18+20+21	59	1+4+6+7+9+11+12+13+16+17+19+20+21
21	1+4+6+7+10+12+17+19+20	60	1+4+6+7+9+11+12+14+17+18+19
22	1+4+5+7+9+12+16+17+19+20	61	1+4+6+7+8+9+12+16+18+19+20
23	1+4+6+7+9+12+13+16+18+20	62	1+4+6+7+8+9+12+14+15+18+19+20
24	1+4+6+7+9+10+12+13+17+18+20	63	1+4+6+7+8+9+12+13+15+17+19+20
25	1+4+6+7+10+12+17+18+20	64	1+4+6+7+8+9+12+13+15+17+20
26	1+4+6+7+8+9+12+13+15+17+18+19	65	1+4+6+7+9+10+12+14+16+17+19
27	1+4+6+7+10+12+16+18+20	66	1+4+6+7+9+10+12+13+17+20
28	1+4+6+7+9+12+13+17+19+20	67	1+4+6+7+9+10+12+14+17+19+20
29	1+4+6+7+12+15+17+20+21	68	1+4+6+7+9+10+12+16+17+19
30	1+4+6+7+8+9+12+13+15+17+20	69	1+4+6+7+9+10+12+13+16+17+20
31	1+4+6+7+9+12+16+18+19+20	70	1+4+6+7+9+10+12+13+16+18+21
32	1+4+6+7+9+10+12+13+16+17+19+20	71	1+4+5+7+9+12+13+16+17+18+19
33	1+4+6+7+9+12+13+18+19	72	1+4+5+7+16+17
34	1+4+6+7+10+12+17+20	73	1+4+5+7+12+15+16+18
35	1+4+6+7+10+12+16+17+20	74	1+4+5+7+14
36	1+4+6+7+8+12+14+15	75	2+4+5+7+8+12+13+15+17
37	1+4+6+7+8+12+14+15+17	76	1+4+5+7+12+14+15+17
38	1+4+6+7+8+12+13+16+19+21	77	1+4+5+7+8+12+14+15+17
39	1+4+6+7+8+12+14+15+17+19	78	1+4+5+7+9+12+13+16+18+20

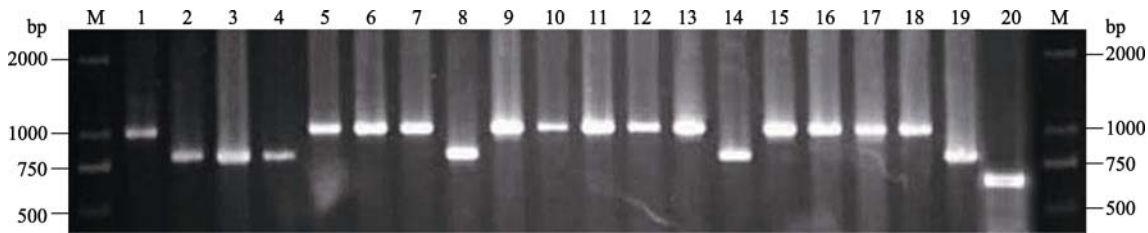


图 2 青藏高原农家青稞 *GBSSI* 基因 5'前导序列特异 PCR 扩增片段
Fig. 2 Specific PCR fragments of *GBSSI* 5' leader sequence in Qinghai-Tibetan indigenous naked barley

M: Trans 2K DNA marker; 1: 011Z525; 2: 011Z521; 3: 011Z522; 4: 011Z524; 5: 011Z538; 6: 011Z540; 7: 011Z541; 8: 011Z528; 9: 011Z545; 10: 011Z546; 11: 011Z547; 12: 011Z548; 13: 011Z550; 14: 011Z535; 15: 011Z552; 16: 011Z552; 17: 011Z553; 18: 011Z554; 19: 011Z536; 20: 08-1128.

表 3 GBSSI 基因 5'前导序列的多态性
Table 3 Polymorphism in 5' leader sequence of GBSSI gene

材料 Accession	Position															
	86-90	120	134	144	158	160	165	175-179	218-221	276	357-360	363	375	425	434	477
Waxy Hector		G	G	G	G	A	A	AGCGG				G	T	G	G	A
08-1127		G	G	G	G	A	A	AGCGG				G	T	G	G	A
Yon M Kei	TTGCT	G	A	G	G	A	A		CGAG		TCAC	G	T	G	G	C
yf127		G	A	G	G	A	A				TCAC	G	T	G	C	C
yf70		G	A	G	G	A	A				TCAC	G	C	C	C	C
011Z1396	TTGCT	G	A	A	G	A	A	AGCGG			TCAC	G	T	G	G	C
011Z1337	TTGCT	G	A	G	G	A	A		CGAG		TCAC	G	T	G	G	C
011Z895		G	A	G	G	A	A				TCAC	G	T	C	C	C
09Z586		G	A	G	G	A	A				TCAC	G	T	C	C	C
09Z543	TTGCT	G	A	G	G	A	A		CGAG		TCAC	G	T	G	G	C
09Z540	TTGCT	G	A	G	G	A	A		CGAG		TCAC	G	T	G	G	C
AB054055	TTGCT			G	A	A	A		CGAG	G	TCAC	A	T	G	G	C
AB054057								403 bp deletion (72-495)								
08-1128								403 bp deletion (72-495)								
X07931		G	A	G	G							G	T	G	G	A

材料 Accession	Position															
	496-506	540	555-559	562	579-580	584	607	614	656	670	752	766	788	797	802-992	
Waxy Hector	GCAGCCGGCCG	C		C	AT	T	T	T		C		C	G			
08-1127	GCAGCCGGCCG	C		C	AT	T	T	T		C		C	G			
Yon M Kei	GCAGCCGGCCG	C	GATTC	G	AT	T	T	T		C		G	G		191 bp insertion	
yf 127		C	GATTC	G	AT	T	T	T		C		G	G			
yf 70		T	GATTC	G	AT	T	T	T		C		G	G			
011Z1396	GCAGCCGGCCG	C	GATTC	G		A	A	A		C		G	G		191 bp insertion	
011Z1337	GCAGCCGGCCG	C	GATTC	G	AT	T	T	T		C		G	G		191 bp insertion	
011Z895		C	GATTC	G	AT	T	T	T		C		G	G			
09Z586		C	GATTC	G	AT	T	T	T		C		G	A	A		
09Z543	GCAGCCGGCCG	C	GATTC	G	AT	T	T	T		C		G	G		191 bp insertion	
09Z540	GCAGCCGGCCG	C	GATTC	G	AT	T	T	T		C		G	G		191 bp insertion	
AB054055	GCAGCCGGCCG	C	GATTC	G	AT	T	T	T		C		G	G		191 bp insertion	
AB054057	GCAGCCGGCCG	C	GATTC	G	AT	T	T	T		C		G	G		191 bp insertion	
08-1128	GCAGCCGGCCG	C	GATTC	G	AT	T	T	T		C		G	G		191 bp insertion	
X07931	GCAGCCGGCCG	C		C	AT	T	T	T	T	A	C	C	G			

Position 的起点从 5'引物第 1 个碱基开始; 材料 yf127、yf70、011Z1396、011Z1337 和 011Z895 的直链淀粉含量都低于 15%; Waxy Hector、08-1127、Yon M Kei、08-1128 为从国外引进的糯性大麦; X07931、AB054055 和 AB054057 的序列都来源于 NCBI 核酸序列数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/>), 作为比对参考序列。

The start position is the first base of 5' primer sequence. Amylose content of accessions yf127, yf70, 011Z1396, 011Z1337, and 011Z895 are lower than 15%. Waxy Hector, 08-1127, Yon M Kei, and 08-1128 are waxy barley varieties introduced from other countries. Sequence information of X07931, AB054055, and AB054057 was from NCBI nucleotide sequence database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/>).

合成酶, 材料间的 SGAPs 的组成差异可能是造成淀粉差异的原因; B 区主要为肌动蛋白, 其是否影响淀粉的合成目前还不清楚; D 区主要为 GBSSI 蛋白条带, 可能与材料间直链淀粉含量的差异有关。新发现的 SGAPs 条带主要位于 A 区和 D 区, 可能与材料

间淀粉差异密切相关, 通过质谱对这些蛋白进一步鉴定及研究种子发育中这些蛋白变化与淀粉特性间的联系, 可更加明确其在淀粉代谢中的作用。另外, waxy 蛋白缺失通常可作为鉴定直链淀粉含量极低的生化标记^[17], 但本研究中发现 60 kD 左右的 GBSSI

蛋白条带有无与其直链淀粉含量极端变化并不相关,可能与该蛋白酶的活性密切相关。

236 份农家青稞的 GBSSI 基因 5'前导序列共存在 800 bp 和 1 000 bp 两种长度多态性,含有 1 000 bp 的材料远远多于具有 800 bp 的材料, Domon 等^[8]也发现了相同的分布趋势。另外 2 个序列其他位点同源性很高,因此 800 bp 片段可能是由 1 000 bp 片段缺失突变造成的。

对 8 份农家青稞及 4 份引进的糯性材料的 GBSSI 基因 5'前导序列的多态性分析,共检测出 32 个多态性位点。与 Domon 等^[8]和 Patron 等^[9]的研究比较,大部分突变都相同,如 TTGCT 和 CGAG 缺失只在 1 000 bp 的片段中出现,基因序列中出现了 191 bp 的插入,造成了 800 bp 和 1 000 bp 长度差异等。材料 yf127、yf70、011Z1396、09Z586 中出现了一些特异的突变位点,可通过研究这些材料种子发育过程中 GBSSI 基因的表达差异来探索这些突变是否影响 GBSSI 基因的功能。值得关注的是,Patron 等^[9]发现,人工诱变的低直链淀粉大麦突变体是由于 GBSSI 基因编码区的点突变,造成无活性的 GBSSI 蛋白或基因转录提前终止而成熟的 GBSSI 蛋白产生,而所有自然突变的低直链淀粉大麦的 GBSSI 基因 5'前导序列特异扩增片段都含有约 400 bp 的缺失,该缺失片段含有 TATA 框和转录起始点,改变了基因的时空表达,减少了 GBSSI 蛋白的含量,从而使直链淀粉合成的含量降低。而在我国青藏高原低直链淀粉农家青稞中只扩增出 800 bp 和 1 000 bp 两种特异片段,未发现缺失 400 bp 片段的材料,这表明可能存在其他低直链淀粉大麦形成的机制。Patron 等^[9]追溯其研究材料来源,认为低直链淀粉性状可能都来于一个共同祖先(同一份中国的低直链淀粉大麦)的 GBSSI 基因,这也表明可能存在其他低直链淀粉大麦形成的分子机制。因此,继续研究我国低直链淀粉青稞的 GBSSI 基因的分子结构、表达差异以及 GBSSI 蛋白的生理形成差异及酶活性,有利于更全面深入地地了解低直链淀粉大麦的形成机制。

4 结论

青藏高原农家青稞 SGAPs 组成独特而丰富,并具有广泛的多态性。261 份青藏高原农家青稞中,在分子量约为 45~100 kD 区域,多态性主要分布于淀粉合成酶区域、肌动蛋白区域和 GBSSI 蛋白条带区域。236 份青藏高原农家青稞的 GBSSI 基因 5'前导

序列只存在 800 bp 和 1 000 bp 两种长度多态性,含有 1 000 bp 的材料较多,占供试材料的 80.1%。青藏高原农家青稞 GBSSI 基因 5'前导序列中存在特有的序列差异。在青藏高原农家青稞的低直链淀粉材料中没有发现约 400 bp 的片段缺失,表明这些材料可能有新的低直链淀粉形成机制。

References

- [1] Paul M B. Starch granule-associated proteins and polypeptides: a review. *Starch*, 2001, 53: 475–503
- [2] Wang C P, Pan Z F, Nima Z X, Tang Y W, Cai P, Liang J J, Deng G B, Long H, Yu M Q. Starch granule-associated proteins of hull-less barley (*Hordeum vulgare* L.) from the Qinghai-Tibet Plateau in China. *J Sci Food Agric*, 2011, 91: 616–624
- [3] Pan Z-F(潘志芬), Zou Y-X(邹奕星), Zhao T(赵桃), Deng G-B(邓光兵), Zhai X-G(翟旭光), Wu F(吴芳), Yu M-Q(余懋群). SGP polymorphism in cultivated naked barley from Qinghai-Tibet Plateau in China and the relationship between SGPs and starch content. *Hereditas* (遗传), 2007, 29(5): 599–606 (in Chinese with English abstract)
- [4] Ge H F, Wang Z Y, Hong M M. A 31 bp fragment within the 5' upstream region of rice waxy gene enhances gene expression. *Acta Phytophysiol Sin*, 2000, 26: 159–163
- [5] Van de Wal M H B J, Jacobsen E, Visser R G F. Multiple allelism as a control mechanism in metabolic pathways: GBSSI allelic composition affects the activity of granule-bound starch synthase I and starch composition in potato. *Mol Genet Genomics*, 2001, 265: 1011–1021
- [6] Zhu C-M(朱彩梅), Zhang J(张京). Single nucleotide polymorphism of Wx gene associated with amylose content in barley germplasm. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2010, 43(5): 889–898 (in Chinese with English abstract)
- [7] Wu K-L(吴昆仑), Zhao Y(赵媛), Chi D-Z(迟德钊). Relationship between polymorphism of Wx gene and amylose content in hull-less barley. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2012, 38(1): 71–79 (in Chinese with English abstract)
- [8] Domon E, Fuijita M, Ishikawa N. The insertion/deletion polymorphisms in the waxy gene of barley genetic resources from East Asia. *Theor Appl Genet*, 2002, 104: 132–138
- [9] Patron N J, Smith A M, Fahy B F, Hylton C M, Naldrett M J, Rossnagel M J, Denyer K. The altered pattern of amylose accumulation in the endosperm of low-amylose barley cultivars is attributable to a single mutant allele of granule-bound starch synthase I with a deletion in 5'-non-coding region. *Plant Physiol*,

- 2002, 130: 190–198
- [10] Pan Z-F(潘志芬), Deng G-B(邓光兵), Yu M-Q(余懋群). An improved 1D-SDS-PAGE method for identification of wheat waxy protein. *Chin J Appl Environ Biol* (环境与应用生物学报), 2000, 6(5): 487–489 (in Chinese with English abstract)
- [11] Wang G-L(王关林), Fang H-J(方宏筠). Theory of Plant Genetic Engineering (植物基因工程原理), 2nd edn. Beijing: Science Press, 2005 (in Chinese)
- [12] Peng M, Gao M, Båga M, Hucl P, Chibbar R N. Starch-branching enzymes preferentially associated with A-type starch granules in wheat endosperm. *Plant Physiol*, 2000, 124: 265–272
- [13] Borén M, Larsson H, Falk A, Jansson C. The barley starch granule proteome-internalized granule polypeptides of the mature endosperm. *Plant Sci*, 2004, 166: 617–626
- [14] Regina A, Kosar-Hashemi B, Li Z, Pedler A, Mukai Y, Yamamoto M, Gale K, Sharp P J, Morell M K, Rahman S. Starch branching enzyme IIb in wheat is expressed at low levels in the endosperm compared to other cereals and encoded at a non-synthetic locus. *Planta*, 2005, 222: 899–909
- [15] Alexander R D, Morris P C. A proteomic analysis of 14-3-3 binding proteins from developing barley grains. *Proteomics*, 2006, 6: 1886–1896
- [16] Hennen-Bierwagen T A, Lin Q H, Grimaud F, Planchot V, Peter L K, Martha G J, Alan M M. Proteins from multiple metabolic pathways associate with starch biosynthetic enzymes in high molecular weight complexes: a model for regulation of carbon allocation in maize amyloplasts. *Plant Physiol*, 2009, 149: 1541–1559
- [17] Miural H, Sugawara A. Effects of the three *Wx* genes on amylose synthesis in wheat endosperm. *Theor Appl Genet*, 1996, 93: 1066–1070