

## 优质稻米‘青香软粳’低直链淀粉含量形成分子机制的初步研究

李凌<sup>1,\*</sup>, 田麟<sup>1,\*</sup>, 王涛涛<sup>1</sup>, 蒋其根<sup>2</sup>, 罗治靖<sup>1</sup>, 陈明姣<sup>1</sup>, 张建中<sup>3</sup>, 张大兵<sup>1</sup>, 袁政<sup>1,\*\*</sup>

<sup>1</sup>上海交通大学生命科学技术学院, 上海200240; <sup>2</sup>上海市青浦区农业技术推广服务中心, 上海201700; <sup>3</sup>上海市农业技术推广服务中心, 上海201103

**摘要:** *Waxy* (*Wx*)基因在调控直链淀粉含量形成过程中起着重要的作用, 是稻米蒸煮食味品质的一个关键决定因素。在本项研究中, 我们以直链淀粉含量为8.7%和10.2%的优质稻品种‘青香软粳’和‘南粳46’为主要研究对象, 初步分析并探讨了这两个优质稻品种稻米低直链淀粉形成的分子调控机理。结果显示, 虽然都为*Wx*-II型粳稻品种, ‘南粳46’的*Wx*基因在启动子-1 773位置存在AA/CT的变异, ‘南粳46’和‘青香软粳’的*Wx*基因在启动子+693位置具有G/A位点多态性。转录水平分析表明, 在‘南粳46’和‘青香软粳’稻米发育过程中, *Wx*基因的表达模式有较大的差异, 可能与其启动子序列的多态性相关, AA/CT变异处于*Wx*基因的转录调控区。*Wx*基因启动子后+693位点的多态性与已报道*Wx<sup>mq</sup>*多态性位点之一相同, 引起Arg<sup>158</sup>/His<sup>158</sup>的变异; 生物信息学软件分析表明, 该位点处于底物进入*Wx*蛋白催化中心的袋口上, Arg<sup>158</sup>/His<sup>158</sup>位点的变异可能影响到底物进入*Wx*蛋白催化活性中心的速率, 从而影响稻米直链淀粉的合成过程和含量。文章丰富了*Wx*基因多态性的研究, 为进一步验证其核苷酸变异与稻米直链淀粉含量的相关性奠定了基础。

**关键词:** 优质稻米; ‘青香软粳’; 直链淀粉含量; *Wx*基因; 多态性

## Preliminary Study for the Molecular Mechanism of Low Amylose Content in High-Quality Rice (*Oryza sativa* L.) Variety ‘Qingxiangruanjing’

LI Ling<sup>1,\*</sup>, TIAN Lin<sup>1,\*</sup>, WANG Tao-Tao<sup>1</sup>, JIANG Qi-Gen<sup>2</sup>, LUO Zhi-Jing<sup>1</sup>, CHEN Ming-Jiao<sup>1</sup>, ZHANG Jian-Zhong<sup>3</sup>, ZHANG Da-Bing<sup>1</sup>, YUAN Zheng<sup>1,\*\*</sup>

<sup>1</sup>School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; <sup>2</sup>Shanghai Qingpu District Agricultural Technology Extension and Service Center, Shanghai 201700, China; <sup>3</sup>Shanghai Agricultural Technology Extension and Service Center, Shanghai 201103, China

**Abstract:** *Waxy* (*Wx*) gene, which is a key factor in regulating amylose content (AC), plays an important role in determining rice eating and cooking quality (ECQ). In this study, for further exploiting the underlying relationship and regulatory mechanism between the AC and ECQ, the *Wx* polymorphism was characterized in the high-quality rice varieties ‘Qingxiangruanjing’ and ‘Nanjing46’ with 8.7% and 10.2% AC respectively. Although all of the varieties we analyzed belong to the *Wx*-II *japonica* cultivars, the AC is different among them. Expression analysis of *Wx* gene in ‘Qingxiangruanjing’ and ‘Nanjing46’ indicates that their expression patterns are different, which might be correlated to the nucleotide polymorphism at nucleotide position -1 773 from the start codon in ‘Nanjing46’ variety, and the AA/CT nucleotides locate in the transcription regulatory area. While the Arg<sup>158</sup>/His<sup>158</sup> polymorphism in both ‘Qingxiangruanjing’ and ‘Nanjing46’ varieties might have sophisticated effect on AC since the amino acid is located in the pocket area of the *Wx* protein, which may change the catalytic activity of the starch synthase for substrate and affect the AC in rice, and this mutation site also have been reported to be the one of characterizations of the *Wx<sup>mq</sup>* gene. Therefore, our study enriches the research of *Wx* genetic polymorphism, and provides basis for further validating the relationship between rice AC and *Wx* gene polymorphism.

**Key words:** high-quality rice; ‘Qingxiangruanjing’; amylose content; *Wx* gene; polymorphism

稻米蒸煮食味品质是稻米品质的核心, 已成为水稻育种工作者和消费者首要考虑的因素。进行稻米品质形成的遗传调控因子、环境影响因素及其相互作用的研究也成为近年来水稻育种学家的研究热点之一。到目前为止, 关于稻米食味和蒸煮品质方面的研究, 主要集中在直链淀粉含量 (amylose content, AC)、胶稠度 (gel consistency,

收稿 2011-11-10 修定 2011-11-30

资助 国家自然科学基金面上项目(30971739)、上海市科委重点科技攻关项目(09391912200)和上海市农委“水稻产业技术体系建设”专项。

致谢 张蒙和刘捷在*Wx*蛋白结构生物信息学软件分析方面给予帮助。

\* 对本文贡献相同。

\*\* 通讯作者(E-mail: zyuan@sju.edu.cn; Tel: 021-34204869)。

GC)和糊化温度(gelatinization temperature, GT) 3个方面(易俊良等2011)。前期的研究表明, 稻米的蒸煮食味品质属数量性状, 遗传特征较为复杂(康美花等2010); 其形成还较大地受到播种期、大田密度、灌溉、收获期以及施肥等环境因素的影响(陈翠竹等2008)。目前普遍认为稻米蒸煮食味品质主要受胚乳基因型控制, 同时还受母体遗传效应以及环境效应的影响, 受主效基因控制和微效基因的修饰(康美花等2010)。

淀粉是稻米胚乳中最主要的成分, 由直链淀粉和支链淀粉组成, 二者在胚乳中所占比例以及支链淀粉的精细结构决定了水稻籽粒的理化性质、营养品质、最终产量和稻米蒸煮食用品质的优劣(Nakamura等2002)。合适的直链淀粉含量是优质稻米的重要指标。研究表明, 淀粉的生物合成和积累是一个复杂的生化调控过程, 由ADP-葡萄糖焦磷酸化酶(ADP-glucose pyrophosphorylase, AGPase)、颗粒结合淀粉合成酶(granule binding starch synthase, GBSS)、可溶性淀粉合成酶(soluble starch synthase, SSS)、淀粉分支酶(starch branching enzyme, SBE)和脱分支酶(debranching enzyme, DBE)等关键酶调控其合成代谢(田志喜等2010; Jeon等2010; Nakamura等2010; Zeeman等2010; James等2003)。这些籽粒淀粉合成代谢调控酶在水稻籽粒的灌浆过程中特异表达(沈鹏等2006), 并受环境条件调节(陈翠竹等2008; Jiang等2003), 进而影响稻米的蒸煮食用品质。分子生物学研究发现, 水稻淀粉粒结合淀粉合成酶I (GBSS I, 又名ADP-Glu-淀粉葡萄糖基转移酶)主要负责淀粉粒中直链淀粉成分的合成, 是由第6染色体上的 $Waxy$  ( $Wx$ )位点控制的(Wang等1995; Okagaki和Wessler 1988), 催化ADP-Glu+(1,4)- $\alpha$ -D-glucose (N) $\rightarrow$ ADP+(1,4)- $\alpha$ -D-glucose (N+1)的反应(舒小丽和舒庆尧2004)。直链淀粉含量影响稻米品质和蒸煮特性: 直链淀粉含量过高, 米饭粘性小, 米饭硬, 饭粒松散, 无光泽; 而含量过低, 米饭太软, 饭粒黏结, 粘而腻, 弹性差(李广贤等2008)。相对而言, 较多的人喜欢吃中等直链淀粉含量的大米, 因此对 $Wx$ 位点多态性及表达调控机制的研究具有重要的理论意义和广泛的应用价值。

已有研究表明,  $Wx$ 座位上存在多种复等位基

因( $Wx^a$ 、 $Wx^b$ 、 $Wx^{op}$ 、 $Wx^{in}$ 、 $Wx^{hp}$ 、 $Wx^{mq}$ 和 $wx$ ) (Liu等2009; Mikami等2008; Sato等2002; Mikami等1999), 其多态性与表达量和酶的活性直接相关(Sun等2011; Liu等2009; Prathepha 2007; 蔡秀玲等2000; Hirano和Sano 2000; Cai等1998; Hirano等1998; Bligh等1998; Wang等1995; Sano 1984), 是导致水稻直链淀粉含量和胶稠度变异最主要的原因(Tran等2011; Tian等2009; Itoh等2003)。这些多态性位点可被利用进行分子标记辅助育种, 为稻米品质选育提供可靠的依据(田志喜等2010; Bao等2006; Yamanaka等2004)。但水稻是一种多型性作物, 在自然界中存在大量的遗传变异, 有必要在同一遗传背景和种植环境下, 对常规育种材料及其选育后代进行系统的性状和基因型分析, 从而研究稻米籽粒淀粉合成代谢相关调控基因多态性形成的原因及其表达调控与稻米品质间的相互关系。‘青香软粳’是上海市青浦区农业技术推广服务中心育种学家从中熟晚粳稻品种‘南粳46’群体中选育出的新型优质米品种, 其蒸煮的米饭光亮、滑爽、较软, 并富有弹性, 食味佳, 具有较好的推广前景。本文以‘南粳46’和‘青香软粳’等6个正在上海市种植和选育推广的品种为研究对象, 结合Tian等(2009)的测序结果, 分析这些品种稻米的直链淀粉含量和 $Wx$ 基因位点多态性的相关性, 发现 $Wx$ 基因在-1 773和+2 078位置还存在新的AA/CT和C/T位点多态性; 在‘青香软粳’和‘南粳46’的基因组中, +693还具有 $Wx^{mq}$ 相同的多态性位点G/A。生物信息学分析表明, 这3个位点的多态性可能会影响到 $Wx$ 基因的表达模式和蛋白酶对底物的催化效率, 从而影响稻米直链淀粉的合成过程、含量和蒸煮食用品质。这些研究结果为进一步分析 $Wx$ 基因多态性与稻米直链淀粉含量及蒸煮食用品质的相关性提供了基础, 为在生产中进行优质稻米的品质选育提供理论基础。

## 材料与方法

### 1 水稻种植以及稻米直链淀粉含量的分析

本研究共收集了6个上海市正在种植和选育的水稻(*Oryza sativa* L.)品种: ‘南粳46’、‘青香软粳’、‘沪两优51’、‘沪优617’、‘金汇优50’和‘早丰优69’。‘南粳46’是江苏省农业科学院粮食作物研

究所选育的国标二级优质稻谷; ‘青香软粳’是‘南粳46’的自然变异株, 由上海市青浦区农业技术推广服务中心选育; ‘沪两优51’、‘沪优617’、‘金汇优50’和‘早丰优69’是杂交稻品种, 具有‘武运粳7号’遗传背景。所有水稻品种于2009~2011年种植于上海交通大学试验田(东经121.44°, 北纬31.03°), 常规水肥管理, 用于收获叶片、DNA提取和稻米直链淀粉含量测定。稻米正常成熟后送至农业部稻米及制品质量监督检验测试中心(中国水稻研究所)进行检验分析。

## 2 DNA提取和测序

通过常规CTAB法提取不同水稻品种叶中DNA。在NCBI数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中获得‘武运粳7号’的*Wx*基因组序列(*LOC\_Os06g04200*), 并以此序列为模板合成测序用引物(表1)。

通过梯度PCR确定每对PCR引物的最适退火温度。PCR扩增体系包括: 1  $\mu\text{L}$  DNA抽提液(约10 ng DNA)模板、50  $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物0.2  $\mu\text{L}$ 、0.25  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTP 1  $\mu\text{L}$ 、1 $\times$ GCI缓冲液1  $\mu\text{L}$ 、1 U Taq DNA聚合酶0.25  $\mu\text{L}$ , 加ddH<sub>2</sub>O至10  $\mu\text{L}$ 。扩增程序分两种: 500 bp以下的采用程序I (95  $^{\circ}\text{C}$  变性5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 50~64  $^{\circ}\text{C}$  梯度退火温度0.5 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  0.5 min, 35个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸5 min); 500 bp以上的采用程序II (95  $^{\circ}\text{C}$  变性5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 50~64  $^{\circ}\text{C}$  梯度退火温度0.5 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 35个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸5 min)。将扩增后的片段进行电泳检测, 以条带最清晰的反应温度为最适温度。

PCR扩增体系共20  $\mu\text{L}$ , 其中包括: 2  $\mu\text{L}$  DNA抽提液(约20 ng DNA)模板、50  $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物(表1)

0.4  $\mu\text{L}$ 、0.25  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTP 2  $\mu\text{L}$ 、1 $\times$ GCI缓冲液2  $\mu\text{L}$ 、1 U Taq DNA聚合酶0.5  $\mu\text{L}$ , 加ddH<sub>2</sub>O至20  $\mu\text{L}$ 。扩增程序分两种: 500 bp以下的采用程序I (95  $^{\circ}\text{C}$  变性5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 最适退火温度0.5 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  0.5 min, 35个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸5 min); 500 bp以上的采用程序II (95  $^{\circ}\text{C}$  变性5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 最适退火温度0.5 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 35个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸5 min)。

## 3 定量PCR分析

取授粉后0~5 d以及6~10 d的新鲜种子, 采用Trizol (上海Genery公司)法提取组织总RNA。初步提取的总RNA通过DNase (美国Promega公司)处理后, 用0.3  $\mu\text{g}$ 的RNA反转录为双链的cDNA, 反转录试剂盒为Ferments公司产品。1  $\mu\text{L}$ 反转录产物用于定量PCR反应, 所用引物为QW<sub>x</sub> (表1)。定量PCR反应在BIO-RAD公司CFX96荧光定量PCR仪上进行。*Wx*基因在组织中表达量的判定通过相对定量法, 即同时在组织cDNA中扩增*Wx*基因和*ACTIN*基因, 将CT值的差值转化为相对表达量的值。所有QRT-PCR实验均进行3次技术性重复和3次生物学重复, 以这3次技术性重复的数值取平均值作为一个生物学数值; 而对3个这样的生物学数值取平均得到最终表达值, 并依据这3个生物学数值计算标准差。

## 4 基因多态性的生物信息学分析

参考Tian等(2009)的研究结果, 作为系统对照, 选择I型(‘桂香丝糯’、‘太湖糯’、‘江洲香糯’、‘苏御糯’)、II型(‘农垦58’、‘武运粳7号’)和III型(‘台中在来1号’、‘桂朝2号’、‘广陆矮4号’、‘龙特甫B’) *Wx*基因单倍型品种进行*Wx*基因多态性与稻米

表1 *Wx*基因测序引物及定量RT-PCR所用引物序列

Table1 Primer sequences of *Wx* gene for DNA sequencing and quantitative RT-PCR

引物名称	F (正向引物, 5'→3')	R (反向引物, 5'→3')
1	CAACAGAAACCACACCACC	CCTAACCAAACATAACGAACG
2	CATTCCTTCAGTCTTTGTCTATC	GATTGGGGATTAGAATTTGAAGC
3	GGCTCACCAAACCTTAAACAA	ATGAACACACGGTTCGACTCC
4	TTCGCAAGATTTTAAACCAAG	GCAACCTGCAGTGAAAAAGA
5	ACTGGCGAGCTACTGAAGA	CTGCAACGCCTCCTTGT
6	TGACAAATTCAGGCAATCG	AGGGCTGGAGAAATCAACAA
7	AGCTGCAGGGGATGAGATAC	TCATCATCAGCATCAGACAGG
8	TTGAACAAGACGAACGGTCA	GACTTGGCATAAAAACAAAAATGG
QW <sub>x</sub>	GCTTGGGATACCAGCGTTGTG	ATGGGTTGTTGTTGAGGTTAGGA

直链淀粉含量相关性的对比分析。在NCBI数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中搜索 *Wx* 基因全长 cDNA, 并用 BlastN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Genome/PlantBlast.shtml>) 寻找籼稻 (*indica*) 和粳稻 (*japonica*) 对应的基因组 DNA 序列。通过 Rice Genome Annotation Project (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) 和 Gramene 禾本科植物网 (<http://www.gramene.org/>) 获得相关基因外显子和内含子等信息, 根据 cDNA 序列对基因组 DNA 进行标注。

测序结果利用 Vector NTI 11.0 软件进行分析。首先将本项研究和 Tian 等 (2009) 的测序结果导入 Vector NTI 11.0 软件的 DNA 数据库, 利用该软件中自带的 Align X 功能对片段进行比对。将具有相同多态性位点的品种进行进一步聚类分析。对于比对中发现的多态性位点, 采用 TFBIND 软件 (<http://tfbind.hgc.jp/>) 预测转录因子与 *Wx* 基因上游的结合位点。预测突变位点对于蛋白结构造成的影响时, 采用 Swiss-Model 的同源建模功能 (<http://swissmodel.expasy.org/>) 预测蛋白的结构变化, 通过 Discovery Studio 软件预测底物 (ADP-葡萄糖) 与 *Wx* 蛋白的结合位点, 并用 PyMOL 软件显示蛋白质的三维结构。

## 实验结果

### 1 稻米品质测定

‘青香软粳’是上海市青浦区农业技术推广服务中心选育出的优质水稻新材料, 与其遗传亲本材料‘南粳46’相比, ‘青香软粳’稻米软而弹性适中, 在上海市优质稻区试评比中表现优异, 是进行优质稻米形成分子调控机制研究的工具材料。与上海市主栽品种‘武运粳7号’稻米外观相比, ‘南粳46’和‘青香软粳’稻米外观透明度下降, 暗示‘南粳46’和‘青香软粳’稻米的直链淀粉含量可能降低。测定结果显示, ‘南粳46’直链淀粉含量为10.2%, ‘青香软粳’直链淀粉含量为8.7%, 较‘武运粳7号’直链淀粉含量(15.5%)明显下降(分别为34.20%和43.87%) (表2)。而正在选育的品种‘沪优617’、‘早丰优69’、‘沪两优51’、‘金汇优50’直链淀粉含量在16%~17%之间, 与‘武运粳7号’直链淀粉含量相近(表2), 这可能与选育亲本材料具有‘武运粳7号’遗传背景相关。

Tian 等 (2009) 根据稻米中直链淀粉含量和基

表2 稻米直链淀粉含量和胶稠度的测定

Table 2 Amylose content and gel consistency test

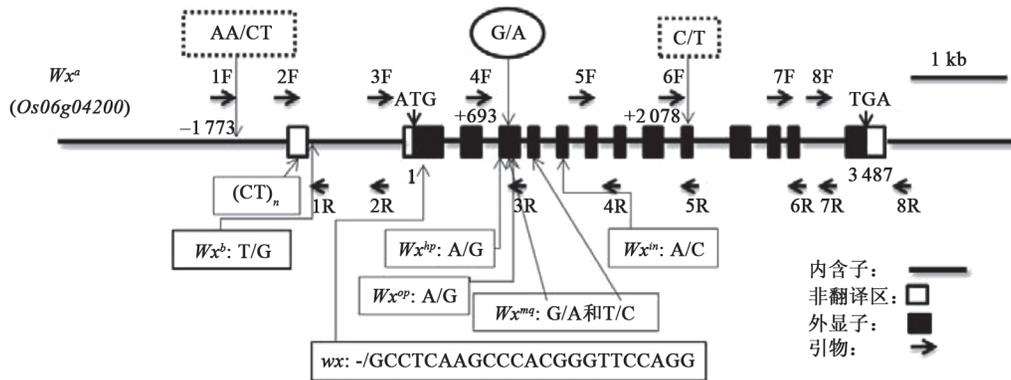
编号	品种名称	直链淀粉含量/%	<i>Wx</i> 基因单倍型
1	‘青香软粳’	8.7	II
2	‘南粳46’	10.2	II
3	‘沪优617’	16.5	II
4	‘早丰优69’	16.5	II
5	‘沪两优51’	17.0	II
6	‘金汇优50’	17.0	II
7	‘农垦58’*	15.3	II
8	‘武运粳7号’	15.5	II
9	‘台中在来1号’*	24.4	III
10	‘桂朝2号’*	25.3	III
11	‘广陆矮4号’*	24.7	III
12	‘龙特甫B’*	25.1	III

\*数据来源于 Tian 等 (2009) 的研究结果。

因多态性的相关性, 将 *Wx* 的基因型划分为 *Wx*-I、*Wx*-II 和 *Wx*-III 型。*Wx*-II 型品种的直链淀粉含量低于 *Wx*-III 型, 但高于 *Wx*-I 型。从表2中可见, ‘青香软粳’及其他正在选育的4个品种虽然都属于 *Wx*-II 型粳稻品种, 但其直链淀粉含量仍存在较大差异 (>30%), 这一差异可能是‘南粳46’和‘青香软粳’稻米更软的原因。

### 2 *Wx* 基因测序及基因多态性分析

前人的研究表明, *Wx* 基因位点的变异在调控稻米直链淀粉含量和胶稠度中起到重要的作用 (Tran 等 2011; Tian 等 2009; 蔡秀玲等 2000; Cai 等 1998; Bligh 等 1998; Wang 等 1995)。因此, 我们以 *Wx*-II 型粳稻品种‘武运粳7号’的 *Wx* 基因序列为模板, 设计测序引物 (表1), 以期通过测序分析, 在上海市正在种植和选育推广的品种中获得 *Wx* 基因新的多态性位点。测序结果显示, 与‘武运粳7号’品种 *Wx* 基因序列相比, 低淀粉含量品种‘南粳46’和‘青香软粳’材料的 *Wx* 基因具有新的多态性位点: 在‘南粳46’ *Wx* 基因启动子-1 773 位有 AA/CT 的多态性, 在‘南粳46’和‘青香软粳’ *Wx* 基因启动子+693 位有 G/A 的单碱基核苷酸多态性, 这一多态性改变发生在外显子上, 造成翻译后的氨基酸由精氨酸 (Arg, R) 变为组氨酸 (His, H)。该多态性位点与 Sato 等 (2002) 在低淀粉含量 ‘Milky Queen’ 材料中发现的 *Wx<sup>mq</sup>* 多态性位点之一相同 (图1), 暗示着该位点的改变可能与直链淀粉含量的变化有一定的相关性。此外, 根据 Tian 等 (2009) 的测序结果, 我们发现

图1  $Wx$ 基因多态性分析Fig.1 Polymorphism analysis of  $Wx$  gene

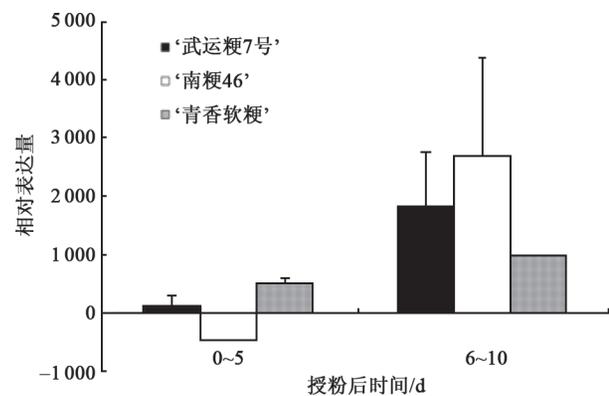
$Wx^a$  (*Os06g04200*)为野生型基因序列,含有14个外显子。所示测序用引物与表1中的一致。实方框显示的是已经报道的 $Wx$ 基因的多态性位点;虚方框显示的是本文发现的新多态性位点;实线圆框显示的是我们发现的与 $Wx^m$ 相同的多态性位点。

III型 $Wx$ 基因的品种‘台中在来1号’、‘桂朝2号’、‘龙特甫B’的 $Wx$ 基因存在多个具有连锁遗传特点的多态性位点。其中位于+2 078位碱基由野生型中的C转换为T(图1),这一突变的类型为错义突变,导致这3个品种中编码的氨基酸由脯氨酸(Pro, P)变为丝氨酸(Ser, S)。对这些多态性位点生物学功能的分析将有助于加深对 $Wx$ 基因表达调控机制和生物学功能的认识。

### 3 $Wx$ 基因表达的定量PCR分析

前人的研究结果显示, $Wx$ 基因启动子区的多态性与 $Wx$ 基因的表达特征改变密切相关(蔡秀玲等2000; Hirano和Sano 2000; 舒庆尧等1999; Cai等1998; Bligh等1998, 1995; Hirano等1998; Ayres等1997; Wang等1995)。为了研究 $Wx$ 多态性与其表达量的关系,通过定量PCR,我们在‘武运粳7号’、‘南粳46’和‘青香软粳’的稻米发育过程中分析了授粉后0~10 d中 $Wx$ 基因的表达模式。由图2可见,3个品种 $Wx$ 基因表达趋势一致,即6~10 d时种子中的 $Wx$ 基因表达都比0~5 d的种子中高;但‘南粳46’的表达模式与‘武运粳7号’和‘青香软粳’有明显的不同,主要表现在授粉后0~5 d时,‘南粳46’种子中的 $Wx$ 基因表达量很低,而在第6~10 d时 $Wx$ 基因的表达量迅速升高,这种转录水平上的差异可能主要与‘南粳46’ $Wx$ 基因启动子-1 773位具有的AA/CT核苷酸多态性有关(图1)。

TFBIND软件(<http://tfind.hgc.jp/>)分析预测发现,-1 773位左右的GAAAACAAACGG序列结合

图2  $Wx$ 基因表达模式的定量RT-PCR分析Fig.2 Quantitative RT-PCR analysis of  $Wx$  gene expression pattern

转录因子的可能性极大,因此,该结合位点的多态性可能直接影响到 $Wx$ 基因的表达模式。‘青香软粳’和‘武运粳7号’在启动子-1 773位点序列为AA,而在‘南粳46’序列中变化为CT(图1)。荧光定量PCR表达模式分析显示,‘青香软粳’和‘武运粳7号’ $Wx$ 基因具有相近似的表达模式,而‘南粳46’中 $Wx$ 基因的表达模式与它们明显不同,暗示该位点的多态性变化可能影响不同材料中转录因子结合的活性,造成表达量和表达模式的差异。当然,这种多态性与表达模式的变化以及与稻米中直链淀粉含量变化的直接关系还需在今后的研究中进一步深入分析。

### 4 $Wx$ 蛋白结构的生物信息学分析

序列分析比对表明:与其他14个材料相比,

‘青香软粳’和‘南粳46’这两个品种的Wx基因序列在启动子+693位核苷酸发生了由G向A的单碱基变化,使得翻译后Wx蛋白的第158号氨基酸由Arg变为His(图1),这一基因型与Wx<sup>mq</sup>基因中的多态性之一相同(图1)(Sato等2002),暗示这一位点的变化可能与稻米中直链淀粉含量的变化有密切的关系。此外,在‘台中在来1号’、‘桂朝2号’和‘龙特甫B’这三个高淀粉含量的籼稻品种中,启动子+2 078位的核苷酸发生了C向T的转变(Tian等2009),使翻译后Wx蛋白的第415号氨基酸由Pro变为Ser(图1)。我们推测,Wx蛋白外显子的多态性与其酶活性可能相关。

为了对上述推测进行验证,通过同源建模的方法,我们利用Swiss-Model的蛋白结构预测功能对Wx蛋白的三维结构进行预测(<http://swissmodel.expasy.org/>)。在寻找Wx蛋白与底物结合位点这一步骤中,我们选择ADP-葡萄糖为底物(舒小丽和舒庆尧2004),使用Discovery Studio软件模拟底物与蛋白结合的情况,结果发现以下位点可能是与底物结合的潜在位点: Lys<sup>97</sup>、Thr<sup>98</sup>、Gly<sup>99</sup>、Gly<sup>100</sup>、Ile<sup>406</sup>、Gly<sup>407</sup>、Arg<sup>408</sup>、Lys<sup>413</sup>、Leu<sup>489</sup>、Ile<sup>490</sup>、Gln<sup>493</sup>和Trp<sup>360</sup>,这些位点在图3-A中用蓝色标出。由此可以推测,Wx蛋白催化活性中心或空间结构上相近的氨基酸的变化可能会影响Wx蛋白与底物的结合能力,进而影响催化效率。‘青香软粳’和‘南粳46’这两个品种中Arg<sup>158</sup>(红色)/His<sup>158</sup>(绿色)的

转变显示在图3-B中,尽管Arg和His都属于碱性氨基酸,但是Arg的侧链是长且带正电的直链,而His的侧链则是由一个五元环状的结构,它们侧链的性状是不同的。‘台中在来1号’、‘桂朝2号’和‘龙特甫B’这三个品种中Pro<sup>415</sup>(红色)/Ser<sup>415</sup>(绿色)的突变显示在图3-C中,Pro属于芳香族氨基酸,侧链有苯环的结构,不能和周围原子形成氢键,而丝氨酸属于极性氨基酸,侧链有一个羟基,能和周围原子形成氢键。从蛋白结构分析可以看出,Pro<sup>415</sup>位点在底物结合中心区附近(图3-A和C),该位点突变成Ser后可能影响蛋白结合位点与底物的亲和力;Arg<sup>158</sup>虽然距离底物结合位点较远,但是该位点处于底物进入催化中心的袋口上(图3-A和B),Arg的长链突变成His后可能会对底物ADP-葡萄糖进入催化活性中心的速率产生影响,从而会改变Wx蛋白的催化效率。当然,多态性位点与Wx蛋白酶活性的相关性需要通过蛋白酶活性分析进一步验证。

## 讨 论

我国稻种资源丰富,类型复杂,其中不乏口感与蒸煮性质相当优秀的品种,但多数稻米的食用品质不够理想(刘巧泉等2006);此外,我国有相当一部分水稻品种,特别是籼型杂交稻,虽然产量水平较高,但稻米的蒸煮食味品质急需改善;而且,普通百姓对大米的食味品质也提出更高的要求,因此,近年来水稻育种学家对改良稻米食用蒸煮

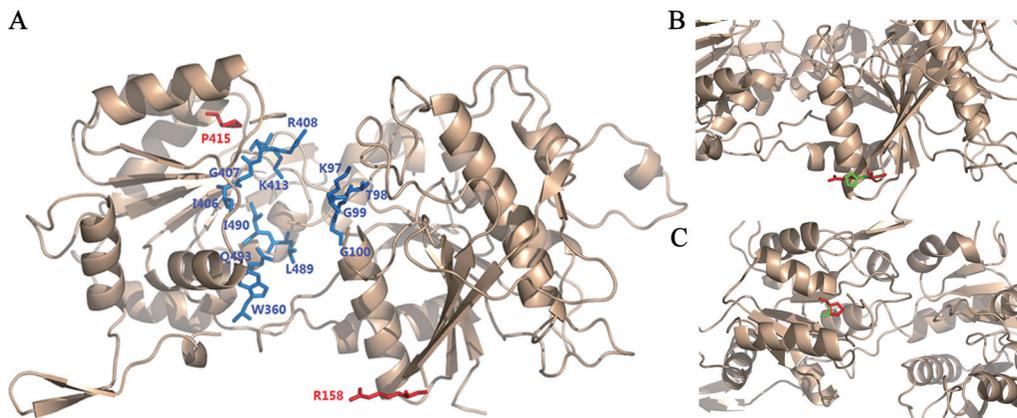


图3 Wx蛋白结构建模和催化活性中心预测

Fig.3 Modeling of Wx protein and catalytic center prediction

A: Discovery Studio软件模拟底物(ADP-葡萄糖)与Wx蛋白结合示意图; B: ‘青香软粳’和‘南粳46’ Wx蛋白发生Arg<sup>158</sup>/His<sup>158</sup>的氨基酸变异产生结构变化示意图(Arg<sup>158</sup>红色/His<sup>158</sup>绿色); C: ‘台中在来1号’、‘桂朝2号’和‘龙特甫B’ Wx蛋白发生Pro<sup>415</sup>/Ser<sup>415</sup>的氨基酸变异产生结构变化示意图(Pro<sup>415</sup>红色/Ser<sup>415</sup>绿色)。

性状开展了越来越多的研究。大量的研究工作已经证实, *Wx*基因的表达调控是调节稻米直链淀粉含量的关键因素之一, 直接影响到水稻种子发育过程中直链淀粉的合成代谢和制成品的口感(Tran等2011; Sun等2011; 康美花等2010; Tian等2009; Liu等2009; Mikami等2008; 沈鹏等2006; Itoh等2003; Sato等2002; 黄发松等1998; Bligh等1998; Wang等1995)。但稻种资源的丰富性在生产应用中受遗传及环境因素的限制, 有必要对不同遗传背景的*Wx*基因多态性进行深入挖掘, 并研究其在调控直链淀粉合成代谢及稻米蒸煮食用品质性状中的相关性, 为充分利用稻种资源、在实际生产中进行优质稻的分子辅助育种的应用奠定基础。

参考Tian等(2009)的研究结果, 与10个传统糯、粳和籼稻水稻材料的*Wx*基因序列相比(见实验方法), 我们的测序结果进一步证实了*Wx*基因的基因型与稻米直链淀粉含量的相关性, 即I型*Wx*基因的启动子前-1 160位的核苷酸是T, 启动子后+111位有23 bp核苷酸插入; II型*Wx*基因的启动子前-1 160位的核苷酸是T, 启动子后+111位有23 bp核苷酸缺失; III型*Wx*基因的启动子前-1 160位的核苷酸是G, 启动子后+111位有23 bp核苷酸缺失(图1)。上海市正在种植和选育的‘南粳46’、‘青香软粳’、‘沪两优51’、‘沪优617’、‘金汇优50’和‘早丰优69’都为*Wx*-II型粳稻品种, 但‘南粳46’的*Wx*基因在启动子-1 773位置存在AA/CT的变异, ‘南粳46’和‘青香软粳’的*Wx*基因在启动子+693位置具有G/A位点多态性。虽然舒庆尧等(1999)的研究结果显示在*Wx*基因启动子前-1 220附近, 有一段多态性微卫星(CT)<sub>n</sub>, 这段微卫星中CT重复的程度和直链淀粉含量有着一定联系, 通常n为16或者17时, 直链淀粉含量中等, 往往有较好的口感。但我们分析的6个品种与‘武运粳7号’相比, 在-1 220位点没有差异, 都为17个CT重复。这也暗示我们发现的多态性位点可能对*Wx*基因的多态性与淀粉含量的相关性具有一定的贡献。

前人的研究显示, *Wx*基因在自然界中存在着大量的变异, 在普通籼稻、粳稻、‘云南软米’品种、美国长粒粳稻‘Lemont’、‘云南稻毫秕’、‘Milky Queen’和糯稻中分别存在着*Wx<sup>a</sup>*、*Wx<sup>b</sup>*、*Wx<sup>op</sup>*、*Wx<sup>in</sup>*、*Wx<sup>hp</sup>*、*Wx<sup>mq</sup>*、*wx*基因型(Tran等2011;

Liu等2009; Tian等2009; Mikami等2008; Sato等2002; Wang等1995)。其中*Wx<sup>b</sup>*与*Wx<sup>a</sup>*相比, 第1内含子+1位碱基由G变为T, 降低了*Wx*基因转录后mRNA的剪接效率(Isshiki等2001, 2000; 蔡秀玲等2000; Hirano和Sano 2000; Cai等1998; Hirano等1998; Isshiki等1998; Wang等1995), 这种剪接效率受转录调节因子如dull、Du1 (Zeng等2007; Isshiki等2000)和环境温度的影响(Larkin和Park 1999)。此外, Zhu等(2003)的研究结果证明MYC蛋白(OsBP-5)能与EREBP转录因子(OsEBP-89)相互作用, 共同调节*Wx*基因的转录表达水平并影响籽粒中的直链淀粉含量。转录水平上对*Wx*基因的调节还表现在*Wx*基因的5'-UTR区的(CT)<sub>n</sub>微卫星序列的差异(舒庆尧等1999; Ayres等1997; Bligh等1995)。高继平等(1995)的研究结果显示, 在*Wx*基因的第二个外显子中, TTCATCA这段序列是*Wx*基因的TATA盒, TATA盒结合蛋白与这段序列结合。华健等(1992)通过凝胶滞后实验表明, 在TATA盒上游240~577 bp的区域存在核蛋白结合位点, 即是上游转录因子结合位点, 这一区域的突变可能会对转录效率产生一定影响。

在本文中, 我们报道了一个AA/CT的新变异位点, 生物信息学分析显示该位点左右序列(GAAAACAAACGG)很可能是调节*Wx*基因转录表达水平的转录调控位点(TATA盒上游544 bp), 此段区域的多态性可能直接影响到*Wx*基因的表达模式。定量PCR分析*Wx*基因的表达模式, 初步证明了我们的推测, ‘南粳46’的*Wx*基因在该位点发生了AA/CT的变异, 可能是其*Wx*基因表达模式与‘武运粳7号’和‘青香软粳’明显不同的原因之一。值得注意的是, ‘青香软粳’是‘南粳46’的自然变异株, 其直链淀粉含量的降低是否只是由于*Wx*基因启动子CT回复至AA的变异引起的, 对这一问题的研究显得十分有意义。虽然这一多态性与*Wx*基因表达模式的相关性还需在不同的品种中深入分析验证, 但我们的研究结果足以暗示*Wx*基因的表达调控具有多样性, 这种多样性不仅与其基因的剪接效率相关, 也可能与上游调控因子的调控效率或环境因素的调节相关(Larkin和Park 1999)。

与转录水平上的调节相比, *Wx*基因外显子上存在更多的多态性, 直接影响了*Wx*基因翻译及其

催化底物的效率。*Wx*基因的第2外显子中23 bp的插入,导致终止密码子提前出现,是形成*wx*等位基因的根本原因(Mikami等2008)。*Wx<sup>op</sup>*与*Wx<sup>a</sup>*相比,在第4外显子的A<sub>762</sub>突变为G<sub>762</sub>,导致氨基酸由Asp变为Gly(Mikami等1999);*Wx<sup>in</sup>*与*Wx<sup>a</sup>*相比,第6外显子中的A<sub>1132</sub>突变为C<sub>1132</sub>,其编码的氨基酸由Tyr变为Ser(Sano 1984);*Wx<sup>mq</sup>*与*Wx<sup>a</sup>*相比,第4外显子和第5外显子分别发生了Arg<sup>158</sup>/His<sup>158</sup>和Tyr<sup>191</sup>/His<sup>191</sup>的转变(Sato等2002);Liu等(2009)的研究则发现,*Wx<sup>hp</sup>*与*Wx<sup>a</sup>*相比,第4外显子发生了Asp<sup>165</sup>/Gly<sup>165</sup>的转变,生化分析显示这一变异没有影响GBSS I体外的催化活性,却大大降低了GBSS I与淀粉颗粒的结合能力,从而降低了稻米中直链淀粉的含量。我们的研究结果显示,在‘南粳46’和‘青香软粳’*Wx*基因的第4外显子中,也存在着与*Wx<sup>mq</sup>*一致的Arg<sup>158</sup>/His<sup>158</sup>变异,属于错义突变(图1),暗示Arg<sup>158</sup>位点的变异在*Wx*蛋白功能变化中可能起着重要的作用。蛋白质同源建模结构预测显示,Arg<sup>158</sup>位于底物进入催化中心的袋口上(图3-A和B),该多态位点的差异可能会在体内改变*Wx*蛋白的催化活性或效率,从而影响水稻稻米的淀粉合成代谢、含量和稻米品质。这也可能是‘青香软粳’低直链淀粉含量形成的原因之一。另一方面,我们在已报道的‘台中在来1号’、‘桂朝2号’和‘龙特甫B’这3个籼稻品种中,发现了Pro<sup>415</sup>/Ser<sup>415</sup>的变异(Tian等2009),蛋白结构分析显示Pro<sup>415</sup>位点在底物结合中心区附近(图3-A和C),该位点的变异可能会影响到蛋白结合位点与底物的亲和力。Tian等人(2009)的报道显示,这3个品种直链淀粉含量和胶稠度均无明显差异,而糊化温度却相差很大。由此猜测这些多态性位点的变异可能影响了*Wx*基因对糊化温度的调控作用,暗示*Wx*蛋白的功能受到本身蛋白结构的影响较大,不仅影响到对底物的催化效率和直链淀粉含量的高低,还可能影响到对底物的亲和力,影响直链淀粉颗粒的形成。尽管这些推测有待于生化实验和蛋白晶体结构解析等实验的验证,但我们的研究结果进一步暗示在田间选种过程中,进化压力引起的*Wx*基因的多态性变异很可能影响到*Wx*蛋白的催化效率,从而影响到稻谷中淀粉含量和食用品质(Olsen等2006)。此外,由图1可见,*Wx*基因第4外显子发生了大量的变异,该区域可能

在*Wx*蛋白的调控功能起着重要的作用。

Tian等(2009)的研究表明,有多个基因参与调控稻米中淀粉的合成代谢,因此,后期的研究中,有必要在‘青香软粳’和‘南粳46’这两个材料中对其他基因的功能进行进一步的研究,以确认该材料米质变化的根本原因。相信在*Wx<sup>mq</sup>*、*Wx<sup>hp</sup>*、*Wx<sup>op</sup>*基因型材料以及‘南粳46’和‘青香软粳’中深入分析米质变化与关键调控基因变异的相互关系及分子调控机制,将大大加深我们对*Wx*基因调控直链淀粉合成代谢分子机理的认识。

### 参考文献

- 蔡秀玲, 王宗阳, 邢彦彦, 张景六, 洪孟民(2000). 水稻蜡质基因第一内含子碱基突变引起其RNA二级结构的可能变化. 植物生理学报, 26: 59~63
- 陈翠竹, 徐艳, 相华(2008). 氮肥对稻米品质的影响研究综述. 安徽农业通报, 14: 51~53
- 高继平, 郦永忠, 王宗阳, 洪孟民(1995). 籼稻 232 蜡质基因转录起始位点的鉴定. 遗传学报, 22: 431~436
- 华健, 王宗阳, 张景六, 洪孟民(1992). 核蛋白因子与水稻蜡质基因5'端上游顺序的结合. 科学通报, 37: 1698~1700
- 黄发松, 孙宗修, 胡培松, 唐绍清(1998). 食用稻米品质形成研究的现状与展望. 中国水稻科学, 12: 172~176
- 康美花, 曹丰生, 高珍珠, 陈红萍, 刘建华, 邓人启(2010). 稻米蒸煮食味品质性状遗传研究进展. 安徽农业通报, 16: 68~70
- 李广贤, 姜明松, 姚方印, 宫德英, 袁守江, 陈峰, 侯恒军(2008). 稻米直链淀粉含量遗传及相关基因的研究进展. 山东农业科学, 6: 41~45
- 刘巧泉, 蔡秀玲, 李钱峰, 汤述翥, 龚志云, 于恒秀, 严长杰, 王宗阳, 顾铭洪(2006). 分子标记辅助选择改良特青及其杂交稻米的蒸煮与食味品质. 作物学报, 32: 64~69
- 沈鹏, 金正勋, 罗秋香, 金学泳, 孙艳丽(2006). 水稻灌浆过程中籽粒淀粉合成关键酶活性与蒸煮食味品质的关系. 中国水稻科学, 20: 58~64
- 舒庆尧, 吴殿星, 夏英武, 高明尉(1999). 籼稻和粳稻中蜡质基因座位上微卫星标记的多态性及其与直链淀粉含量的关系. 遗传学报, 26: 350~358
- 舒小丽, 舒庆尧(2004). 作物淀粉生物合成与转基因修饰研究进展. 生物技术通报, (4): 19~26
- 田志喜, 严长杰, 钱前, 严松, 谢会兰, 王芳, 徐洁芬, 刘贵富, 王永红, 刘巧泉等(2010). 水稻淀粉合成相关基因分子标记的建立. 科学通报, 55: 2591~2601
- 易俊良, 周少川, 唐晓艳, 周向阳, 彭琼, 陈立云, 王海斌(2011). 水稻稻米品质的分子设计育种研究进展. 分子植物育种(网络版), 9: 1134~1151
- Ayres NM, McClung AM, Larkin PD, Bligh HFJ, Jones CA, Park WD (1997). Microsatellites and a single-nucleotide polymorphism differentiate apparent amylose classes in an extended pedigree of US rice germplasm. Theor Appl Genet, 94: 773~781
- Bao JS, Corke H, Sun M (2006). Microsatellites, single nucleotide

- polymorphisms and a sequence tagged site in starch-synthesizing genes in relation to starch physicochemical properties in non-waxy rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 113: 1185~1196
- Bligh HFJ, Larkin PD, Roach PS, Jones CA, Fu H, Park WD (1998). Use of alternate splice sites in granule-bound starch synthase mRNA from low-amylose rice varieties. *Plant Mol Biol*, 38: 407~415
- Bligh HFJ, Till RI, Jones CA (1995). A microsatellite sequence closely linked to the *Waxy* gene of *Oryza sativa*. *Euphytica*, 86: 83~85
- Cai XL, Wang ZY, Xing YY, Zhang JL, Hong MM (1998). Aberrant splicing of intron 1 leads to the heterogeneous 5' UTR and decreased expression of *waxy* gene in rice cultivars of intermediate amylose content. *Plant J*, 14: 459~465
- Hirano HY, Eiguchi M, Sano Y (1998). A single base change altered the regulation of the *Waxy* gene at the posttranscriptional level during the domestication of rice. *Mol Biol Evol*, 15: 978~987
- Hirano HY, Sano Y (2000). Comparison of *Waxy* gene regulation in the endosperm and pollen in *Oryza sativa* L. *Genes Genet Syst*, 75: 245~249
- Isshiki M, Morino K, Nakajima M, Okagaki RJ, Wessler SR, Izawa T, Shimamoto K (1998). A naturally occurring functional allele of the rice *waxy* locus has a GT to TT mutation at the 5' splice site of the first intron. *Plant J*, 15: 133~138
- Isshiki M, Nakajima M, Satoh H, Shimamoto K (2000). *dull*: rice mutants with tissue-specific effects on the splicing of the *waxy* pre-mRNA. *Plant J*, 23: 451~460
- Isshiki M, Yamamoto Y, Satoh H, Shimamoto K (2001). Nonsense-mediated decay of mutant *waxy* mRNA in rice. *Plant Physiol*, 125: 1388~1395
- Itoh K, Ozaki H, Okada K, Hori H, Takeda Y, Mitsui T (2003). Introduction of *Wx* transgene into rice *wx* mutants leads to both high- and low-amylose rice. *Plant Cell Physiol*, 44: 473~480
- James MG, Denyer K, Myers AM (2003). Starch synthesis in the cereal endosperm. *Curr Opin Plant Biol*, 6: 215~222
- Jeon JS, Ryoo N, Hahn TR, Walia H, Nakamura Y (2010). Starch biosynthesis in cereal endosperm. *Plant Physiol Biochem*, 48: 383~392
- Jiang H, Dian W, Wu P (2003). Effect of high temperature on fine structure of amylopectin in rice endosperm by reducing the activity of the starch branching enzyme. *Phytochemistry*, 63: 53~59
- Larkin PD, Park WD (1999). Transcript accumulation and utilization of alternate and non-consensus splice sites in rice granule-bound starch synthase are temperature-sensitive and controlled by a single-nucleotide polymorphism. *Plant Mol Biol*, 40: 719~727
- Liu L, Ma X, Liu S, Zhu C, Jiang L, Wang Y, Shen Y, Ren Y, Dong H, Chen L et al (2009). Identification and characterization of a novel *Waxy* allele from a Yunnan rice landrace. *Plant Mol Biol*, 71: 609~626
- Mikami I, Aikawa M, Hirano HY, Sano Y (1999). Altered tissue-specific expression at the *Wx* gene of *opaque* mutants in rice. *Euphytica*, 105: 91~97
- Mikami I, Uwatoko N, Ikeda Y, Yamaguchi J, Hirano HY, Suzuki Y, Sano Y (2008). Allelic diversification at the *wx* locus in landraces of Asian rice. *Theor Appl Genet*, 116: 979~989
- Nakamura Y, Sakurai A, Inaba Y, Kimura K, Iwasawa N, Nagamine T (2002). The fine structure of amylopectin in endosperm from Asian cultivated rice can be largely classified into two classes. *Starch*, 54: 117~131
- Nakamura Y, Utsumi Y, Sawada T, Aihara S, Utsumi C, Yoshida M, Kitamura S (2010). Characterization of the reactions of starch branching enzymes from rice endosperm. *Plant Cell Physiol*, 51: 776~794
- Okagaki RJ, Wessler SR (1988). Comparison of non-mutant and mutant *waxy* genes in rice and maize. *Genetics*, 120: 1137~1143
- Olsen KM, Caicedo AL, Polato N, McClung A, McCouch S, Purugganan MD (2006). Selection under domestication: evidence for a sweep in the rice *Waxy* genomic region. *Genetics*, 173: 975~983
- Prathepha P (2007). Identification of variant transcripts of *Waxy* gene in non-glutinous rice (*O. sativa* L.) with different amylose content. *Pak J Biol Sci*, 10: 2500~2504
- Sano Y (1984). Different regulation of *waxy* gene expression in rice endosperm. *Theor Appl Genet*, 68: 467~473
- Sato H, Suzuki Y, Sakai M, Imbe T (2002). Molecular characterization of *Wx-mq*, a novel mutant gene for low-amylose content in endosperm of rice (*Oryza sativa* L.). *Breed Sci*, 52: 131~135
- Sun MM, Abdula SE, Lee HJ, Cho YC, Han LZ, Koh HJ, Cho YG (2011). Molecular aspect of good eating quality formation in *Japonica* rice. *PLoS One*, 6: e18385
- Tian Z, Qian Q, Liu Q, Yan M, Liu X, Yan C, Liu G, Gao Z, Tang S, Zeng D et al (2009). Allelic diversities in rice starch biosynthesis lead to a diverse array of rice eating and cooking qualities. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 21760~21765
- Tran NA, Daygon VD, Resurreccion AP, Cuevas RP, Corpuz HM, Fitzgerald MA (2011). A single nucleotide polymorphism in the *Waxy* gene explains a significant component of gel consistency. *Theor Appl Genet*, 123 (4): 519~525
- Wang ZY, Zheng FQ, Shen GZ, Gao JP, Snustad DP, Li MG, Zhang JL, Hong MM (1995). The amylose content in rice endosperm is related to the post-transcriptional regulation of the *waxy* gene. *Plant J*, 7: 613~622
- Yamanaka S, Nakamura I, Watanabe KN, Sato Y (2004). Identification of SNPs in the *waxy* gene among glutinous rice cultivars and their evolutionary significance during the domestication process of rice. *Theor Appl Genet*, 108: 1200~1204
- Zeeman SC, Kossmann J, Smith AM (2010). Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 61: 209~234
- Zeng D, Yan M, Wang Y, Liu X, Qian Q, Li J (2007). *Du1*, encoding a novel Prp1 protein, regulates starch biosynthesis through affecting the splicing of *Wx<sup>b</sup>* pre-mRNAs in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol Biol*, 65: 501~509
- Zhu Y, Cai XL, Wang ZY, Hong MM (2003). An interaction between a MYC protein and an EREBP protein is involved in transcriptional regulation of the rice *Wx* gene. *J Biol Chem*, 278: 47803~47811