

# 同源四倍体和二倍体水稻 Wx 基因与淀粉品质的遗传关系

刘玉花 栾丽 龙文波 王兴 孔繁伦 何涛 涂升斌\*

(中国科学院成都生物研究所, 四川成都 610041; \* 通讯联系人, E-mail: passy@126.com)

## Genetic Relationships Between Wx Gene and Starch Quality in Autotetraploid and Diploid Rice

LIU Yu hua, LUAN Li, LONG Wen bo, WANG Xing, KONG Fan lun, HE Tao, TU Sheng bin\*

(Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China; \* Corresponding author, E-mail: passy@126.com)

Abstract: Wx genotypes of 40 autotetraploid rice and 14 diploid rice were tested by using the (CT)<sub>n</sub> microsatellite marker and a cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) molecular marker named PCR-Acc. Three microsatellite alleles were produced, i.e. Wx<sup>1</sup>, Wx<sup>2</sup> and Wx<sup>3</sup> in both autotetraploid and diploid rice. Comparatively, PCR-Acc molecular marker produced two genotypes, G-type and T-type for both autotetraploid and diploid rice. Analysis on relationship between amylose content (AC), gel consistency (GC) and gelatinization temperature (GT) of rice and Wx alleles showed that both AC and GC were closely related to Wx genotypes, i.e. the materials with Wx<sup>1</sup> genotype and G-type of Wx gene had higher AC and harder GC, however, the materials with Wx<sup>2</sup>, Wx<sup>3</sup> genotypes and T-type of Wx gene had lower AC and softer GC. On the other hand, GT was not significantly correlated with AC and Wx genotype, indicating that AC and GC of rice grain were probably controlled by Wx gene or other gene whose location was strictly linked to Wx gene, while GT of rice was not. Analysis by using microsatellite marker and PCR-Acc molecular marker showed that 92.0% of Wx<sup>1</sup> genotypes were G-type, but all Wx<sup>2</sup> and 80.0% of Wx<sup>3</sup> genotypes were T-type in autotetraploid rice. The coefficient of correlation between Wx genotypes which revealed by (CT)<sub>n</sub> microsatellite marker and PCR-Acc molecular marker was 0.842, statistically significant at the level of 0.01.

Key words: autotetraploid; rice; waxy gene; amylose content; gel consistency; gelatinization temperature; genetic relationship; simple sequence repeats; cleaved amplified polymorphic sequence

摘要: 用 Wx 基因的 (CT)<sub>n</sub> 微卫星标记和切割的扩增产物多态性序列 (cleaved amplified polymorphic sequence, CAPS) 分子标记 PCR-Acc 对 40 份同源四倍体和 14 份二倍体水稻 Wx 基因型进行研究。利用 484/485 引物检测, Wx 基因呈 Wx<sup>1</sup>、Wx<sup>2</sup> 和 Wx<sup>3</sup> 3 种多态性; 而用 PCR-Acc 检测, Wx 基因表现为 G 型和 T 型。同时, 在测定稻米直链淀粉含量 (AC)、胶稠度 (GC) 和糊化温度 (GT) 的基础上探讨它们与 Wx 基因的关系, 结果表明 AC、GC 与 Wx 基因密切相关, GT 与 Wx 基因相关不显著。综合分析表明, 同源四倍体水稻中, 92.0% 的 Wx<sup>1</sup> 基因型材料为 G 型, 而 Wx<sup>2</sup> 基因型材料和 80.0% 的 Wx<sup>3</sup> 基因型材料为 T 型。统计分析表明, Wx 基因 (CT)<sub>n</sub> 微卫星标记检测与 PCR-Acc 分子标记检测的相关系数为 0.842, 呈极显著正相关。

关键词: 同源四倍体; 水稻; 蜡质基因; 直链淀粉含量; 胶稠度; 糊化温度; 遗传关系; 微卫星标记; 切割的扩增产物多态性序列

中图分类号: Q943; S511.033

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2007)02-0143-07

随着生活水平的提高, 人们对稻米品质的要求也越来越高, 为了适应市场需要, 培育产量高、品质好的水稻新品种是育种学家不断追求的目标。同源四倍体水稻 (2n = 4x = 48) 由于基因组比二倍体增加一倍, 可能隐含更大的改良潜力和更广的适应能力, 在很多方面具有比二倍体更大的优势, 有可能成为水稻品质再上新台阶的途径之一。直链淀粉含量 (amylose content, AC)、胶稠度 (gel consistency, GC) 和糊化温度 (gelatinization temperature, GT) 是影响稻米蒸煮和食用品质的重要因素<sup>[1-2]</sup>, 但测定受时间限制, 且工作量大, 所需时间长, 难以满足育种工作的需要。而分子标记辅助选择为水稻优质育种提供了一种切实有效的方法。研究表明, 稻米

AC 主要受蜡质 (Wx) 基因控制<sup>[3-4]</sup>, 张海燕等<sup>[5]</sup> 通过水稻 Wx 基因的表达谱分析证实水稻 Wx 基因表达丰度总体上与水稻胚乳的 AC 呈正相关, 而稻米 GC 和 GT 也受 Wx 基因或与其紧密连锁的区域控制<sup>[6]</sup>。

Bligh 等<sup>[7]</sup> 根据 Wx 基因序列中位于前导内含子剪切位点上游 55 bp 处的一段 (CT)<sub>n</sub> 序列两侧设计了一对微卫星标记引物 484/485, 检测不同水稻 Wx 基因多态性。Ayres 等<sup>[8]</sup> 用该引物对不同水稻

收稿日期: 2006-09-08; 修改稿收到日期: 2006-10-17。

基金项目: 中国科学院“西部之光”人才计划资助项目。

第一作者简介: 刘玉花 (1979-), 女, 硕士研究生。

进行分析,发现  $(CT)_n$  标记与 AC 显著相关;舒庆尧等<sup>[9]</sup>采用该引物分析了 74 个粳、籼稻品种,表明  $Wx$  基因与 AC 显著相关;另外,包劲松等<sup>[10]</sup>研究表明  $(CT)_n$  微卫星标记与稻米 AC、GC、GT 等淀粉品质性状有关。蔡秀玲等<sup>[11]</sup>根据不同  $Wx$  基因 ( $Wx^a$  和  $Wx^b$ ) 第 1 内含子 + 1 位碱基的差异设计了 PCR *Acc* 分子标记,检测发现  $Wx$  基因第 1 内含子 + 1 位 G 和 T 的差异与水稻 AC 的高、低呈紧密连锁、共同分离关系;毛兴学等<sup>[12]</sup>用 PCR 一步法也检测到  $Wx$  基因第一内含子剪接供体 + 1 位碱基为 G 的水稻品种 AC 均高于 + 1 位碱基为 T 的水稻品种。

上述标记虽然已广泛用于二倍体水稻研究,但用于同源四倍体水稻的研究在国内外尚未见报道。为了找到合适的分子标记辅助选育优质同源四倍体水稻材料,本研究以我们培育的 40 份同源四倍体和 14 份二倍体水稻为材料,测定了稻米 AC、GC 和 GT,应用  $(CT)_n$  微卫星标记及切割的扩增产物多态性序列 (cleaved amplified polymorphic sequence, CAPS) 分子标记 PCR *Acc* 检测  $Wx$  基因,并探讨  $Wx$  基因与稻米 AC、GC、GT 的关系,为进一步研究同源四倍体水稻的遗传机理奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

本实验共选用了 54 份水稻材料进行分析,其中包括中国科学院成都生物研究所培育的同源四倍体水稻 40 份,对应的二倍体水稻 14 份 (详见表 1)。所有供试材料均种植于成都生物研究所温江实验基地,并进行田间性状观察,以确保实验材料的可靠性。

### 1.2 DNA 提取

剪取幼嫩叶片,参照 McCouch 等<sup>[13]</sup>的 SDS 法,大量提取水稻基因组 DNA。

### 1.3 $Wx$ 基因的微卫星分析

$(CT)_n$  微卫星标记引物采用 484/485 组合,引物 484、485 的核苷酸序列分别为 5'-CTTTGTCTA TCTCAAGACAG 3'、5'-TTGCAGATGTTCTTC CTGATG 3',PCR 反应方法同舒庆尧等<sup>[9]</sup>,扩增产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。PCR *Acc* 分子标记引物及 PCR 反应方法同蔡秀玲等<sup>[11]</sup>。上、下游引物序列分别为 5'-GCTTCACTTCTCTGCT TGTG 3' 和 5'-ATGATTTAACGAGAGTTGAA -3',扩增产物经 *Acc* 酶切后在 2% 的琼脂糖凝胶

上电泳。据蔡秀玲等的分类定义,若  $Wx$  基因第 1 内含子 + 1 位为 T,则只有一条 460 bp 的 DNA 带,该品种为 T-型;若第 1 内含子 + 1 位为 G,则只有一条 403 bp 的 DNA 带,该品种为 G-型;若两种长度的 DNA 带等量存在,该位点是杂合的,该品种则为 GT-型。

### 1.4 淀粉品质测定

在供试材料成熟时及时收获适量稻谷样品并干燥,按照农业部部颁标准《NY147-88 米质测定方法》<sup>[14]</sup>对稻米 AC、GC 和 GT 进行测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 $Wx$ 基因分子标记检测二倍体和同源四倍体水稻的结果

采用引物 484/485 检测供试材料,同源四倍体和二倍体水稻扩增片段均存在 3 种多态性,据微卫星标记分子量的不同,分别记为  $Wx^1$ 、 $Wx^2$  和  $Wx^3$ 。54 份材料中,61.1% 的材料为  $Wx^1$ ,27.8% 的材料为  $Wx^2$ ,11.1% 的材料为  $Wx^3$ ,且所有扩增片段均为单一条带 (表 1、图 1 A)。同源四倍体与对应二倍体水稻相比,扩增片段长度存在 3 种情况:1) 同源四倍体的扩增片段与对应二倍体没有差异,如 D46B 与冈 46B、D 海天与海天、D46A 与冈 46A 等均为  $Wx^1$ ,D 成恢 149 与成恢 149、D2248 与 2248 均为  $Wx^2$ ,D 乌血糯与乌血糯均为  $Wx^3$ ;2) 同源四倍体的扩增片段大于对应二倍体,如 DCDR22 为  $Wx^3$ ,CDR22 为  $Wx^2$ ;3) 同源四倍体的扩增片段小于对应二倍体,如 D 明恢 63 与 D193 为  $Wx^1$ ,而明恢 63 与 193 则为  $Wx^2$ 。

应用 PCR *Acc* 分子标记检测供试材料,结果表明,未经酶切的扩增产物,54 份材料均为一条 460 bp 的带,而酶切后扩增产物表现为两类分子量大小不同的带,40.7% 的材料仍为一条 460 bp 的带,其  $Wx$  基因型为 T-型;59.3% 的材料为一条 403 bp 的带,其  $Wx$  基因型为 G-型 (图 1 B)。同源四倍体与对应二倍体相比,酶切片段长度存在以下 3 种情况:1) 同源四倍体酶切片段与对应二倍体没有差异,如 D46B 与冈 46B、DTB 与 TB、D 海天与海天等同为 403 bp,DCDR22 与 CDR22、D 成恢 149 与成恢 149、D2248 与 2248、D 乌血糯与乌血糯同为 460 bp;2) 同源四倍体酶切片段大于对应二倍体,如 D46A 为 460 bp,而冈 46A 为 403 bp;3) 同源四倍体酶切片段小于对应二倍体,如 D 明恢 63 和 D193 为 403 bp,而明恢 63 和 193 为 460 bp。

表 1 试验材料的 *Wx* 基因型、直链淀粉含量、胶稠度和糊化温度Table 1. *Wx* genotypes, amylose content(AC), gel consistency(GC) and gelatinization temperature(GT) of the tested materials.

材料名称 Name of the materials	倍性 Ploidy	<i>Wx</i> 基因型 <sup>1)</sup>		直链淀粉含量 AC/%	胶稠度 GC/mm	糊化温度 GT
		<i>Wx</i> genotype <sup>1)</sup>				
		(CT) <sub>n</sub>	PCR Acc			
D 常菲 22B D Changfei 22B	4	<i>Wx</i> <sup>1</sup>	G	14.4	30.0	4.2
常菲 22B Changfei 22B	2	<i>Wx</i> <sup>1</sup>	G	15.1	30.2	4.5
D 金 23B D Jin 23B	4	<i>Wx</i> <sup>1</sup>	G	17.0	28.5	3.5
金 23B Jin 23B	2	<i>Wx</i> <sup>1</sup>	G	19.5	27.9	4.7
DCB	4	<i>Wx</i> <sup>1</sup>	G	18.0	30.5	4.2
CB	2	<i>Wx</i> <sup>1</sup>	G	18.5	31.0	4.7
D32B	4	<i>Wx</i> <sup>1</sup>	G	19.2	30.3	4.4
32B	2	<i>Wx</i> <sup>1</sup>	G	19.5	29.5	6.1
D46B	4	<i>Wx</i> <sup>1</sup>	G	19.0	30.4	3.4
冈 46B Gang 46B	2	<i>Wx</i> <sup>1</sup>	G	19.3	35.0	4.2
DTB	4	<i>Wx</i> <sup>1</sup>	G	15.9	28.8	3.9
TB	2	<i>Wx</i> <sup>1</sup>	G	17.2	27.9	4.3
DCDR22	4	<i>Wx</i> <sup>3</sup>	T	4.3	59.8	4.1
CDR22	2	<i>Wx</i> <sup>2</sup>	T	11.8	75.0	3.2
D 成恢 149 D Chenghui 149	4	<i>Wx</i> <sup>2</sup>	T	8.2	68.5	4.6
成恢 149 Chenghui 149	2	<i>Wx</i> <sup>2</sup>	T	11.8	39.0	2.4
D 明恢 63 D Minghui 63	4	<i>Wx</i> <sup>1</sup>	G	21.3	30.4	3.5
明恢 63 Minghui 63	2	<i>Wx</i> <sup>2</sup>	T	11.9	37.5	5.8
D2248	4	<i>Wx</i> <sup>2</sup>	T	12.9	30.3	2.9
2248	2	<i>Wx</i> <sup>2</sup>	T	10.3	30.0	6.9
D 海天 D Haitian	4	<i>Wx</i> <sup>1</sup>	G	17.4	29.0	5.2
海天 Haitian	2	<i>Wx</i> <sup>1</sup>	G	20.9	37.5	4.6
D193	4	<i>Wx</i> <sup>1</sup>	G	19.0	29.0	4.6
193	2	<i>Wx</i> <sup>2</sup>	T	10.5	47.0	2.5
D 乌血糯 D Wuxuenuo	4	<i>Wx</i> <sup>3</sup>	T	2.2	91.2	4.0
乌血糯 Wuxuenuo	2	<i>Wx</i> <sup>3</sup>	T	2.5	86.7	3.8
D46A	4	<i>Wx</i> <sup>1</sup>	T	13.5	30.8	3.5
冈 46A Gang 46A	2	<i>Wx</i> <sup>1</sup>	G	19.0	26.5	3.2
H5409	4	<i>Wx</i> <sup>2</sup>	T	9.7	39.3	2.5
D6039	4	<i>Wx</i> <sup>1</sup>	G	21.7	30.2	3.1
H5815	4	<i>Wx</i> <sup>3</sup>	T	5.6	94.5	2.9
H5905	4	<i>Wx</i> <sup>3</sup>	T	1.9	95.1	3.7
H5776	4	<i>Wx</i> <sup>2</sup>	T	2.4	82.5	3.5
H5609	4	<i>Wx</i> <sup>2</sup>	T	11.3	38.3	3.5
H5647	4	<i>Wx</i> <sup>2</sup>	T	12.7	35.9	4.0
D19B	4	<i>Wx</i> <sup>1</sup>	G	19.1	33.3	3.1
D 广什 D Guangshi	4	<i>Wx</i> <sup>1</sup>	G	17.5	31.2	3.5
TP 4	4	<i>Wx</i> <sup>2</sup>	T	13.2	35.1	3.4
TP 3	4	<i>Wx</i> <sup>1</sup>	G	17.3	31.0	3.8
D6043	4	<i>Wx</i> <sup>1</sup>	G	16.4	39.5	2.1
D237	4	<i>Wx</i> <sup>2</sup>	T	10.7	34.5	4.9
D 巴西 D Baxi	4	<i>Wx</i> <sup>1</sup>	G	18.8	29.7	4.8
D2204	4	<i>Wx</i> <sup>1</sup>	G	13.4	32.8	3.0
D89-37	4	<i>Wx</i> <sup>1</sup>	G	16.3	28.1	6.0
29 矮 29 Ai	4	<i>Wx</i> <sup>1</sup>	G	17.7	31.0	3.4
Ac 27	4	<i>Wx</i> <sup>1</sup>	G	9.3	53.3	4.2
D187	4	<i>Wx</i> <sup>1</sup>	T	13.4	35.0	4.8
D 江 A D Jiang A	4	<i>Wx</i> <sup>1</sup>	G	17.5	31.4	3.5
D 什香 D Shixiang	4	<i>Wx</i> <sup>2</sup>	T	10.1	30.0	3.8
DL10	4	<i>Wx</i> <sup>1</sup>	G	21.1	31.5	5.5
Lemont	4	<i>Wx</i> <sup>3</sup>	G	18.5	29.8	4.6
D 宜香 B D Yixiang B	4	<i>Wx</i> <sup>2</sup>	T	10.3	33.1	6.9
D 协青早 B D Xieqingzao B	4	<i>Wx</i> <sup>1</sup>	G	22.3	27.0	5.3
D64	4	<i>Wx</i> <sup>1</sup>	G	18.2	28.3	5.9

## 2.2 二倍体和同源四倍体水稻 *Wx* 基因型及相应 AC、GC 和 GT 的分析结果

### 2.2.1 基于微卫星标记的 *Wx* 基因型与 AC、GC 和 GT 的分析结果

从表 1 和表 2 可知,二倍体的稻米 AC,8 个 *Wx*<sup>1</sup> 基因型材料均高于 15.1%,最高达 20.9%,平均 18.6%,5 个 *Wx*<sup>2</sup> 基因型材料为 10.3% ~ 11.9%,平均 11.3%,1 个 *Wx*<sup>3</sup> 基因型材料为

2.5%;同源四倍体的稻米 AC,25 个 *Wx*<sup>1</sup> 基因型材料除 Ac 27 外,其余均高于 13.4%,最高达 22.3%,平均 17.4%,10 个 *Wx*<sup>2</sup> 基因型材料为 2.4% ~ 13.2%,平均 10.2%,5 个 *Wx*<sup>3</sup> 基因型材料为 1.5% ~ 18.5%,平均 6.5%。结果表明,二倍体和同源四倍体水稻在 *Wx* 基因型相同时,AC 差异较小,*Wx* 基因型不同时,AC 差异较大,*Wx*<sup>1</sup> 基因型材料 AC 高于 *Wx*<sup>2</sup>、*Wx*<sup>3</sup> 基因型材料;相同基因型的同源四

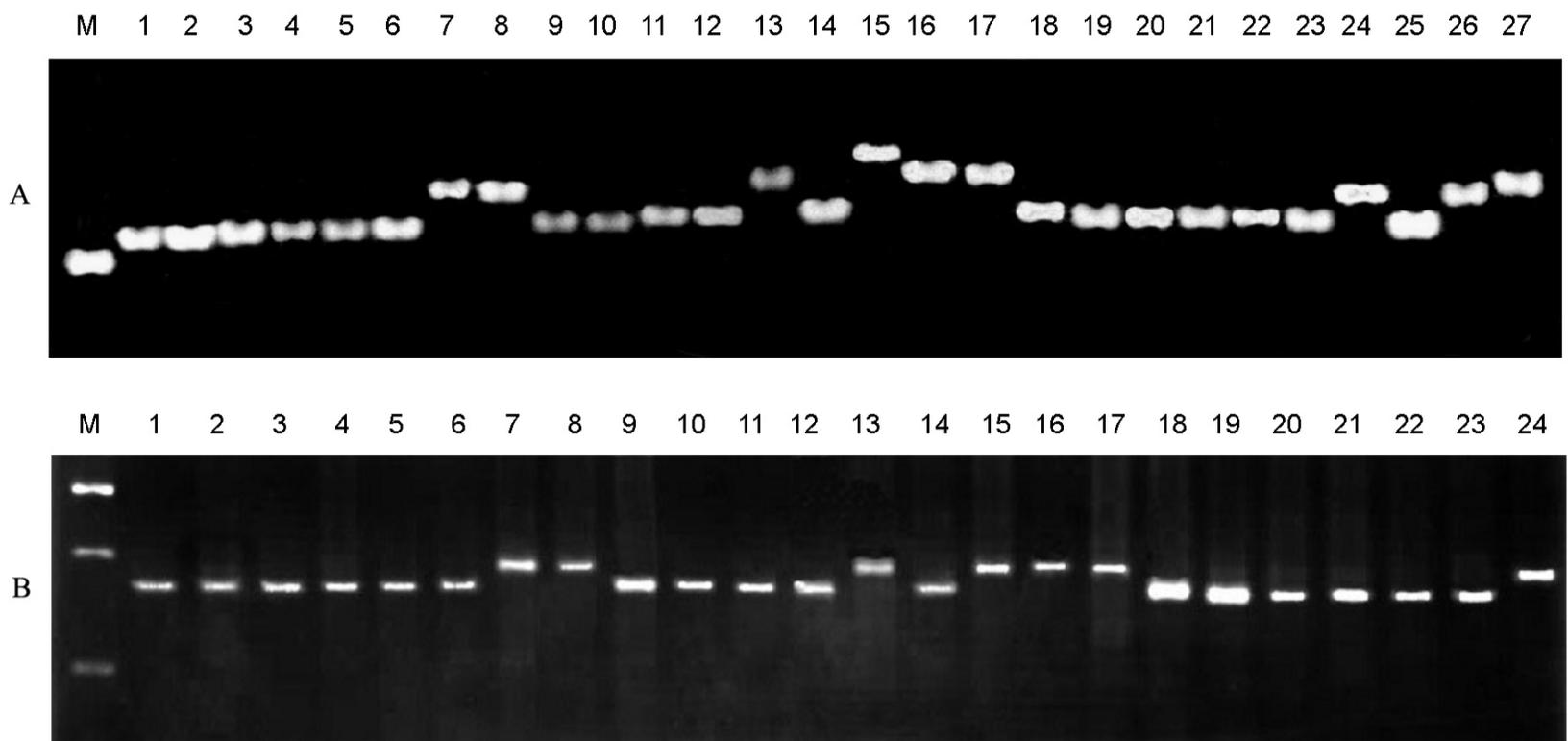


图 1 两种分子标记对水稻品种的检测结果

Fig. 1. Results of detecting rice samples by two types of marker.

A - SSR 引物 484/485 检测结果 ; B - PCR  $A\alpha$  检测结果。

1 - 常菲 22B ; 2 - D 常菲 22B ; 3 - 金 23B ; 4 - D 金 23B ; 5 - CB ; 6 - DCB ; 7 - 成恢 149 ; 8 - D 成恢 149 ; 9 - 32B ; 10 - D32B ; 11 - 冈 46B ; 12 - D46B ; 13 - 明恢 63 ; 14 - D 明恢 63 ; 15 - DCDR22 ; 16 - CDR22 ; 17 - 193 ; 18 - D193 ; 19 - TB ; 20 - DTB ; 21 - 海天 ; 22 - D 海天 ; 23 - D6039 ; 24 - H5776 ; 25 - TP 3 ; 26 - D 什香 ; 27 - Lemont。

A , Detection by SSR primer 484/485 ; B , Detection by PCR-  $A\alpha$  .

Lane 1 , Changfei 22B ; Lane 2 , D Changfei 22B ; Lane 3 , Jin 23B ; Lane 4 , D Jin 23B ; Lane 5 , CB ; Lane 6 , DCB ; Lane 7 , Chenghui 149 ; Lane 8 , D Chenghui 149 ; Lane 9 , 32B ; Lane 10 , D32B ; Lane 11 , Gang 46B ; Lane 12 , D46B ; Lane 13 , Minghui 63 ; Lane 14 , D Minghui 63 ; Lane 15 , DCDR22 ; Lane 16 , CDR22 ; Lane 17 , 193 ; Lane 18 , D193 ; Lane 19 , TB ; Lane 20 , DTB ; Lane 21 , Haitian ; Lane 22 , D Haitian ; Lane 23 , D6039 ; Lane 24 , H5776 ; Lane 25 , TP 3 ; Lane 26 , D Shixiang ; Lane 27 , Lemont .

倍体 AC 低于二倍体 ,同源四倍体与对应二倍体间 ,  $Wx$  基因型相同时 ,AC 差异很小 ,如 D 常菲 22B 与常菲 22B 均为  $Wx^1$  基因型 ,AC 分别为 14.4% 和 15.1% ,D2248 与 2248 均为  $Wx^2$  基因型 ,AC 分别为 12.9% 和 10.3% ,D 乌血糯与乌血糯均为  $Wx^3$  基因型 ,AC 分别为 2.2% 和 2.5% ;而  $Wx$  基因型

发生变异时 ,AC 差异很大 ,如 D 明恢 63 与明恢 63 分别为  $Wx^1$ 、 $Wx^2$  基因型 ,AC 分别为 21.3% 和 11.9% ,DCDR22 与 CDR22 分别为  $Wx^3$  和  $Wx^2$  基因型 ,AC 分别为 4.3% 和 11.8%。经统计分析 (表 3) 二倍体 AC 与基因型的相关系数为  $-0.964^{**}$  ,同源四倍体的为  $-0.759^{**}$  ,表明二倍体和同源四

表 2 水稻样品微卫星标记  $Wx$  基因型与相应 AC、GC 和 GT 数据

Table 2.  $Wx$  genotypes of rice samples by SSR marker and corresponding data of AC , GC and GT .

$Wx$ 基因型 $Wx$ genotype	倍性 Ploidy	材料数 No. of varieties	直链淀粉含量 AC/%		胶稠度 GC/mm		糊化温度 GT	
			均值 Mean	变幅 Range	均值 Mean	变幅 Range	均值 Mean	变幅 Range
$Wx^1$ 型 $Wx^1$ type	2	8	18.6	15.1~20.9	30.7	26.5~37.5	4.5	3.2~6.1
	4	25	17.4	9.3~22.3	31.6	27.0~53.3	4.1	2.1~6.0
$Wx^2$ 型 $Wx^2$ type	2	5	11.3	10.3~11.9	45.7	30.0~75.0	4.2	2.4~6.9
	4	10	10.2	2.4~13.2	42.8	30.0~82.5	4.0	2.5~6.9
$Wx^3$ 型 $Wx^3$ type	2	1	2.5	-	86.7	-	3.8	-
	4	5	6.5	1.5~18.5	74.1	29.8~95.1	3.9	2.9~4.6
G 型 G type	2	8	18.6	15.1~20.9	30.7	26.5~37.5	4.5	3.2~6.1
	4	24	17.8	9.3~22.3	31.5	27.0~53.3	4.1	2.1~6.0
T 型 T-type	2	5	9.4	2.5~11.9	48.0	30.0~86.7	4.3	2.4~6.9
	4	17	9.1	1.9~13.5	53.5	30.0~95.1	3.9	2.5~6.9

表 3 两种标记 *Wx* 基因型与 AC、GC 和 GT 的相关系数Table 3 . Coefficients of correlation between *Wx* genotypes and AC , GC , GT .

性状 Trait	倍性 Ploidy	<i>Wx</i> 基因型 <i>Wx</i> genotype		直链淀粉含量 AC	胶稠度 GC
		(CT) <sub>n</sub>	PCR Acc [G/T]		
直链淀粉含量 AC	2	-0.964**	-0.871**		
	4	-0.759**	-0.788**		
胶稠度 GC	2	0.785**	0.552*	-0.740**	
	4	0.689**	0.555**	-0.845**	
糊化温度 GT	2	-0.186	-0.099	0.174	-0.376
	4	-0.081	-0.110	0.206	-0.211

倍体 AC 与 *Wx* 基因均密切相关。

二倍体的稻米 GC ,8 个 *Wx*<sup>1</sup> 基因型材料为 26.5 ~ 37.5 mm ,平均 30.7 mm ,5 个 *Wx*<sup>2</sup> 基因型材料为 30.0 ~ 75.0 mm ,平均 45.7 mm ,1 个 *Wx*<sup>3</sup> 基因型材料为 86.7 mm ;同源四倍体的稻米 GC 25 个 *Wx*<sup>1</sup> 基因型材料为 27.0 ~ 53.3 mm ,平均 31.6 mm ,10 个 *Wx*<sup>2</sup> 基因型材料为 30.0 ~ 82.5 mm ,平均 42.8 mm ,5 个 *Wx*<sup>3</sup> 基因型材料为 29.8 ~ 95.1 mm ,平均 74.1 mm。相关性分析表明 ,二倍体稻米 GC 与 AC、基于 (CT)<sub>n</sub> 微卫星标记的 *Wx* 基因型的相关系数为 -0.740\*\* 和 0.785\*\* ,同源四倍体稻米 GC 与 AC、基于 (CT)<sub>n</sub> 微卫星标记的 *Wx* 基因型的相关系数分别达 -0.845\*\* 和 0.689\*\* 。表明二倍体和同源四倍体稻米 GC 与 AC、*Wx* 基因型均显著相关。*Wx*<sup>3</sup> 基因型材料 GC 最高 ,AC 最低 ;*Wx*<sup>1</sup> 基因型材料 GC 最低 ,而 AC 最高。

二倍体稻米 GT ,*Wx*<sup>1</sup>、*Wx*<sup>2</sup> 和 *Wx*<sup>3</sup> 基因型材料分别为 3.2 ~ 6.1、2.4 ~ 6.9、3.8 ;同源四倍体稻米 GT ,*Wx*<sup>1</sup>、*Wx*<sup>2</sup> 和 *Wx*<sup>3</sup> 基因型材料分别为 2.1 ~ 6.0、2.5 ~ 6.9、2.9 ~ 4.6。表 3 统计结果表明 ,二倍体和同源四倍体水稻中 ,稻米 GT 与基于微卫星标记的 *Wx* 基因型相关不显著。

### 2.2.2 基于 PCR Acc 分子标记的 *Wx* 基因型与 AC、GC 和 GT 的分析结果

PCR Acc 分子标记对 *Wx* 基因的检测及稻米 AC、GC、GT 的测定结果见表 1 及表 2。二倍体水稻中 ,8 个 G 型材料的 AC 为 15.1% ~ 20.9% ,平均 18.6% ,GC 为 26.5 ~ 37.5 mm ,平均 30.7 mm ,而 5 个 T 型材料的 AC 为 2.5% ~ 11.9% ,平均 9.4% ,GC 为 30.0 ~ 86.7 mm ,平均 48.0 mm ;同源四倍体水稻中 ,24 个 G 型材料的 AC 为 9.3% ~ 22.3% ,平均 17.8% ,GC 为 27.0 ~ 53.3 mm ,平均 31.5 mm ;而 17 个 T 型材料的 AC 为 1.9% ~ 13.5% ,平均 9.1% ,GC 为 30.0 ~ 95.1 mm ,平均

53.5 mm。表明二倍体与同源四倍体水稻均存在 G 型材料的 AC 显著高于 T 型材料 ,而 GC 显著低于 T 型材料 ;对于相同 *Wx* 基因型的材料 ,同源四倍体稻米 AC 低于二倍体 ,而 GC 高于二倍体 ;对于同源四倍体及其对应二倍体水稻 ,*Wx* 基因型的差异同样表现在 AC 和 GC 的差异上 ,如 D 常菲 22B 与常菲 22B 均为 G 型 ,其 AC 分别为 14.4%、15.1% ,GC 分别为 30.0 mm、30.2 mm ,而 D 明恢 63 为 G 型 ,明恢 63 为 T 型 ,其 AC 分别为 21.3%、11.9% ,GC 分别为 30.4 mm、37.5 mm。二倍体水稻基于 PCR Acc 分子标记的 *Wx* 基因型与 AC、GC 的相关系数分别为 -0.871\*\*、0.552\* ,同源四倍体的为 -0.788\*\*、0.555\*\* (表 3) 达极显著或显著水平。表明 PCR Acc 分子标记检测的 *Wx* 基因型与稻米 AC、GC 密切相关 ,PCR Acc 分子标记既可以鉴别二倍体水稻 ,又可鉴别同源四倍体水稻。

二倍体水稻中 ,G 型稻米 GT 为 3.2 ~ 6.1 ,平均 4.5 ,T 型为 2.4 ~ 6.9 ,平均为 4.3 ;同源四倍体水稻中 ,G 型稻米 GT 为 2.1 ~ 6.0 ,平均 4.1 ,T 型为 2.5 ~ 6.9 ,平均 3.9。表明不同 *Wx* 基因型的材料和不同 AC 的材料 ,GT 有高的也有低的 ,分布范围大致相同。从表 3 还可以看出 ,二倍体和同源四倍体均存在 ,稻米 GT 与 AC、GC 及基于 PCR Acc 分子标记的 *Wx* 基因型不显著相关。

### 2.3 *Wx* 基因微卫星标记检测与 PCR Acc 分子标记检测的相关性

本试验中 ,*Wx*<sup>1</sup> 基因型材料稻米的 AC 较高 ,GC 较低 ,*Wx*<sup>2</sup> 和 *Wx*<sup>3</sup> 基因型材料稻米的 AC 低 ,GC 高 ;而 PCR Acc 分子标记检测中 ,G 型材料稻米的 AC 高 ,GC 低 ,T 型材料稻米的 AC 低 ,GC 高。由表 4 可见 ,8 个 *Wx*<sup>1</sup> 基因型二倍体水稻全部为 G 型 ,25 个 *Wx*<sup>1</sup> 基因型同源四倍体水稻 ,除 D46A 和 D187 为 T 型外 ,其他均为 G 型 ,而 D46A

表 4 两种分子标记检测的基因型与 AC、GC、GT

Table 4 . AC , GC , GT in materials of *Wx* genotype revealed by the two molecular markers .

(CT) <sub>n</sub> 基因型 (CT) <sub>n</sub> genotype	PCR- Acc 基因型 PCR- Acc genotype	倍性 Ploidy	材料数 No . of varieties	直链淀粉含量 AC/%		胶稠度 GC/mm		糊化温度 GT	
				均值 Mean	变幅 Range	均值 Mean	变幅 Range	均值 Mean	变幅 Range
<i>Wx</i> <sup>1</sup> 型 <i>Wx</i> <sup>1</sup> type	G 型 G type	2	8	18.6	15.1 ~ 20.9	30.7	26.5 ~ 37.5	4.5	3.2 ~ 6.1
		4	23	17.7	9.3 ~ 22.3	31.5	27.0 ~ 53.3	4.1	2.1 ~ 6.0
	T 型 T-type	4	2	13.5	13.4 ~ 13.5	32.9	30.8 ~ 35.0	4.1	3.5 ~ 4.8
<i>Wx</i> <sup>2</sup> 型 <i>Wx</i> <sup>2</sup> type	T 型 T-type	2	5	11.3	10.3 ~ 11.9	45.7	30.0 ~ 75.0	4.2	2.4 ~ 6.9
		4	10	10.2	2.4 ~ 13.2	43.7	30.0 ~ 82.5	4.0	2.5 ~ 6.9
<i>Wx</i> <sup>3</sup> 型 <i>Wx</i> <sup>3</sup> type	G 型 G type	4	1	18.5		29.8		4.6	
		T 型 T-type	2	1	2.5		86.7		3.8
		4	4	3.5	1.9 ~ 5.6	85.2	59.8 ~ 95.1	3.7	2.9 ~ 4.1

和 D187 的稻米 AC 分别为 13.5%、13.4% ,较接近于 *Wx*<sup>1</sup> 基因型中稻米 AC 较低的品种和 T-型中稻米 AC 较高的品种 ;*Wx*<sup>2</sup> 基因型二倍体和同源四倍体水稻均为 T-型 ,*Wx*<sup>3</sup> 基因型中除同源四倍体水稻 Lemont 外 ,其他品种均为 T-型。统计分析表明 ,*Wx* 基因 (CT)<sub>n</sub> 微卫星标记检测与 PCR- Acc 分子标记检测的相关系数为 0.842\*\* ,达到极显著水平。

### 3 讨论

#### 3.1 二倍体和同源四倍体水稻 *Wx* 基因位点及 AC 差异的原因探讨

国内外学者对 AC 的遗传进行了较多研究 ,大量结果已表明 ,在二倍体水稻中控制稻米 AC 的主效基因是 *Wx* 基因 ,且 AC 与 *Wx* 基因的多态性高度相关。本研究用 (CT)<sub>n</sub> 微卫星标记及 PCR- Acc 分子标记检测供试材料 ,同时测定其稻米 AC ,结果大多数同源四倍体与其对应二倍体品系基因型一致 ,而少数几个发生变异 ,且这种变异同样也表现在稻米 AC 上。我们推测导致同源四倍体水稻 *Wx* 基因变异的原因可能是以下几方面 :同源四倍体水稻染色体数目变化 ,减数分裂过程中 ,由于不正常的联会发生染色体片段的缺失、重复、倒位或易位 ,导致该基因发生变异<sup>[15]</sup> ;同源四倍体由于核质比发生变化而对现有环境不适应 ,引起碱基替代、插入或缺失 ,导致 *Wx* 基因发生变异。而相同 *Wx* 基因型的同源四倍体稻米 AC 比二倍体低 ,可能有以下几方面原因 :同源四倍体水稻遗传物质增加 ,核酸序列重复 ,引发 DNA 甲基化模式的改变<sup>[16]</sup> ,可能引起 *Wx* 基因表达的异常 ,导致稻米 AC 的差异 ;有研究表明 ,核酸序列重复以及它们之间异常的相互作用是转录子表现基因沉默的诱发因素<sup>[17]</sup> ,同源四倍体水

稻核酸序列重复且发生异常的相互作用 ,可能诱发控制 AC 的基因表达降低 ;稻米 AC 除受遗传因素控制外 ,还受环境因素的影响 ,二倍体水稻经染色体加倍形成同源四倍体 ,基因的剂量效应及互作效应发生变化 ,改变原来的生理生化功能<sup>[18]</sup> ,使其更利于在现有环境条件下合成较低的直链淀粉 ;基因组的这些变化在庄勇等<sup>[19]</sup> 关于异源多倍体植物的文章中也有类似报道。

#### 3.2 同源四倍体水稻 AC、GC、GT 与 *Wx* 基因型的关系及分子标记辅助品质改良

很多研究均发现二倍体稻米 AC、GC 与 *Wx* 基因型均密切相关 ,我们的研究发现同源四倍体稻米 AC、GC 与 *Wx* 基因型也密切相关。统计分析表明 ,二倍体稻米 AC、GC 与基于 (CT)<sub>n</sub> 微卫星标记的 *Wx* 基因型相关系数为 -0.964\*\*、0.785\*\* ,与基于 PCR- Acc 分子标记的 *Wx* 基因型相关系数为 -0.871\*\*、0.552\* ,而稻米 AC 与 GC 的相关系数为 -0.740\*\* ,均达极显著或显著水平 ,稻米 GT 与 *Wx* 基因型几乎不存在相关性 ,这与孙业盈等<sup>[20]</sup> 结果一致。在四倍体水稻中我们也得出相似的结论 ,说明二倍体和同源四倍体稻米 AC 主要由 *Wx* 基因控制 ,并进一步推断稻米 GC 也可能主要由 *Wx* 基因或与它紧密连锁的基因位点控制 ,而控制稻米 GT 的主效基因不是 *Wx* 基因 ,也不是与它紧密连锁的基因位点。这表明基因组的加倍并没有显著改变 *Wx* 基因与稻米 AC、GC、GT 之间的遗传关系。但是同源四倍体水稻 AC 与 *Wx* 基因型的相关系数低于二倍体品系 ,这暗示基因组的加倍可能通过某种方式影响了原有的基因表达调控 ,最终导致 AC 与基因型相关关系的改变 ,这有待于进一步研究。

微卫星是 *Wx* 基因内的一段序列 ,它选择的是

*Wx* 基因本身;PCR-*Acc* 分子标记检测的是起决定作用的 *Wx* 基因第 1 内含子供体 + 1 位的碱基本身,准确率均很高,利用它们进行辅助选择、改良同源四倍体稻米品质是可行的。本研究对 *Wx* 基因 (CT)<sub>n</sub> 微卫星标记检测与 PCR-*Acc* 分子标记检测进行的相关性分析,结果达极显著水平,也说明两种分子标记检测的结果是一致的,可以将它们结合起来进行同源四倍体新品种的选育和改良,为配制具有应用价值的杂交水稻新组合提供优质亲本。

#### 参考文献：

- [1] Juliano B O, Perez C M, Kaosaad M. Grain quality characteristics of export rice in selected markets. *Cereal Chem*, 1990, 67:192-197.
- [2] Hamaker B R, Griffin V K. Effect of disulfide bond containing protein on rice starch gelatinization and pasting. *Cereal Chem*, 1993, 70:377-380.
- [3] 黄超武,李锐.水稻杂种直链淀粉含量的遗传分析.华南农业大学学报,1990,11(1):23-29.
- [4] 申岳正,闵绍楷,熊振民,罗玉坤.稻米直链淀粉含量的遗传及测定方法的改进.中国农业科学,1990,23(1):60-68.
- [5] 张海燕,董海涛,姚海根,等.冻融法纯化水稻胚乳 RNA 及稻米品质重要相关基因表达谱研究.中国水稻科学,2005,19(2):105-110.
- [6] Tan Y F, Li J X, Yu S B, et al. The three important traits for cooking and eating quality of rice grains are controlled by a single locus in an elite rice hybrid, Shanyou 63. *Theor Appl Genet*, 1999, 99:642-648.
- [7] Bligh H F J, Till R I, Jones C A. A microsatellite sequence closely linked to the waxy gene of *Oryza sativa*. *Euphytica*, 1995, 86:83-85.
- [8] Ayres N M, McClung A M, Larkin P D, et al. Microsatellites and a single nucleotide polymorphism differentiate apparent amylose classes in an extended pedigree of US rice germplasm. *Theor Appl Genet*, 1997, 94:773-781.
- [9] 舒庆尧,吴殿星,夏英武,等.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,1999,26(4):350-358.
- [10] 包劲松,舒庆尧,吴殿星,等.水稻 *Wx* 基因 (CT)<sub>n</sub> 微卫星标记与稻米淀粉品质的关系研究.农业生物技术学报,2000,8(3):241-244.
- [11] 蔡秀玲,刘巧泉,汤述翥,等.用于筛选直链淀粉含量为中等的籼稻品种的分子标记.植物生理与分子生物学学报,2002,28(2):137-144.
- [12] 毛兴学,肖昕,陈建伟,等.PCR 一步法检测水稻蜡质基因第一内含子剪接供体 + 1 位碱基.中国水稻科学,2005,19(3):285-287.
- [13] McCouch S R, Kochert G, Yu Z H, et al. Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor Appl Genet*, 1988, 76:815-829.
- [14] 中华人民共和国农业部部颁标准 NY147-88 米质测定方法.北京:中国标准出版社,1988.
- [15] 栾丽,涂升斌,孔繁伦,何涛.同源四倍体与二倍体水稻 *Wx* 基因位点的遗传差异.应用与环境生物学报,2005,11(4):404-407.
- [16] Galitski T, Saldanha A J, Styles C A. Ploidy regulation of gene expression. *Science*, 1999, 285:251-254.
- [17] 杨继.植物多倍体基因组的形成与进化.植物分类学报,2001,39(4):357-371.
- [18] 张华华,冯九焕,卢永根,等.利用激光扫描共聚焦显微镜观察同源四倍体水稻胚囊的形成与发育.电子显微学报,2003,22(5):380-384.
- [19] 庄勇,陈龙正,杨寅桂,等.植物异源多倍体进化中基因表达的变化.植物学通报,2006,23(2):207-214.
- [20] 孙业盈,吕彦,董春林,等.水稻 *Wx* 基因与稻米 AC、GC 和 GT 的遗传关系.作物学报,2005,31(5):535-539.