

水稻 Wx 基因的遗传多态性及其与主要米质指标的相关性分析

万映秀^{1 2} 邓其明^{1 2} 王世全^{1 2} 刘明伟^{1 2} 周华强^{1 2} 李 平^{1 2,*}

(¹四川农业大学 水稻研究所,四川 温江 611130 ; E-mail : wanyingxiu@163 . com ; ²四川农业大学 西南作物基因资源与遗传改良教育部重点实验室,四川 雅安 625014 ; * 通讯联系人, E-mail : liping@cngk . com)

Genetic Polymorphism of Wx Gene and Its Correlation with Major Grain Quality Traits in Rice

WAN Ying xiu^{1 2} , DENG Qi ming^{1 2} , WANG Shi quan^{1 2} , LIU Ming wei^{1 2} , ZHOU Hua qiang^{1 2} , LI Ping^{1 2,*}

(¹ Rice Research Institute , Sichuan Agricultural University , Wenjiang 611130 , China ; E-mail : wanyingxiu@163 . com ; ² Key Laboratory of Southwest Crop Genetic Resource and Improvement , Ministry of Education , Sichuan Agricultural University , Ya an 625014 , China ; * Corresponding author , E-mail : liping@cngk . com)

Abstract : An experiment was conducted to analyze the allelic variation of the Wx gene in 50 non glutinous rice varieties (lines) using molecular markers RM190 [for (CT)_n single sequence repeat] and 484/W2R-ACC (for G/T SNP) . A total of seven homozygous (CT)_n type variations , namely (CT)₂₀ , (CT)₁₉ , (CT)₁₈ , (CT)₁₇ , (CT)₁₄ , (CT)₁₁ and (CT)₁₀ , and one heterozygous genotype (CT)₁₁ / (CT)₁₈ were detected with RM190 , of which (CT)₁₁ and (CT)₁₈ were predominant . Two homozygous (G/G and T/T genotypes) and one heterozygous G/T Wx genotype were detected using 484/W2R-ACC . Most of the materials with a (CT)₁₁ of RM190 were G/G SNP of 484/W2R-ACC , while (CT)₁₈ were T/T . The materials tested were grouped into 10 categories using the two markers together . Further analysis indicated that 59.3% variance of amylose content was attributed to the polymorphism of Wx gene resulted from RM190 marker , whereas 56.1% and 24.6% of the variance in amylose content and gel consistency were respectively attributed to the polymorphism of Wx gene resulted from 484/W2R-ACC marker . Furthermore , in the presence of SSR and CAPS markers together , 72.4% of the variance in amylose content could be explained . The application prospects of the two markers in breeding were also discussed .

Key words : waxy gene ; microsatellite ; cleaved amplified polymorphic sequence marker ; gelatinization temperature ; gel consistency ; amylose content ; rice ; polymorphism

摘要 : 利用 RM190 和 484/W2R-ACC 标记分析了 50 个水稻非糯品种的 Wx 基因的等位性变异。其中 ,RM190 揭示出 7 种 (CT)_n 纯合变异类型和 1 种杂合类型 , 分别为 (CT)₂₀、(CT)₁₉、(CT)₁₈、(CT)₁₇、(CT)₁₄、(CT)₁₁、(CT)₁₀ 和 (CT)₁₁ / (CT)₁₈ , 并以 (CT)₁₁ 和 (CT)₁₈ 两种类型为主 ; 484/W2R-ACC 共揭示出 2 种纯合类型和 1 种杂合类型 , 分别为 G/G 型、T/T 型及 G/T 型 ; (CT)₁₁ 大多为 G/G 型 , (CT)₁₈ 大多为 T/T 型 , 这两个标记可将供试材料划分为 10 种等位基因变异类型。进一步分析表明 ,RM190 揭示的 Wx 基因多态性可以解释直链淀粉含量变异的 59.3% ; 484/W2R-ACC 揭示的 Wx 基因多态性可以分别解释直链淀粉含量及胶稠度变异的 56.1% 和 24.6% ; 而两标记共同可解释直链淀粉含量变异的 72.4%。还对这两个标记在育种实践中的应用前景进行了探讨。

关键词 : 蜡质基因 ; 微卫星标记 ; 酶切扩增多态性序列标记 ; 糊化温度 ; 胶稠度 ; 直链淀粉含量 ; 水稻 ; 多态性

中图分类号 : Q943 ; S511 . 033

文献标识码 : A

文章编号 : 1001-7216(2006)06-0603-07

稻米品质主要是指稻米的外观品质和蒸煮食用品质 , 其中直链淀粉含量 (amylose content , AC)、糊化温度 (gelatinization temperature , GT) 和胶稠度 (gel consistency , GC) 是衡量稻米蒸煮食用品质的主要指标。直链淀粉和支链淀粉含量的比例影响淀粉粒的结构和特点^[1] , 而 AC 的高低则是稻米品质优劣的决定因素^[2]。研究表明 AC 主要由 Wx 基因控制 , 对 Wx 基因的等位变异研究发现其第一内含子供体 + 1 位碱基 G/T 多态性位点影响该基因的正常表达。若第一内含子供体 + 1 位的碱基是 G 则能够正常剪切 , 成熟 mRNA 表达量高 , AC 较高 ; 若

是 T , 则不能正常剪切 , 成熟 mRNA 表达量少 , AC 较低^[3-5]。此外 , 还发现第一内含子剪切位点上游 55 bp 处具有一个 (CT)_n 重复的多态性位点^[6] , 大量研究表明该多态性位点也与稻米的 AC 变异存在显著的相关性^[6-11]。

除 AC 对稻米品质有重要影响外 , 其他一些因素也起着重要的作用。已有研究表明 , 在 AC 相似

收稿日期 : 2006-01-20 ; 修改稿收到日期 : 2006-05-20。

基金项目 : 教育部长江学者和创新团队发展计划资助项目 (IRT0453)。

第一作者简介 : 万映秀 (1980 -) , 男 , 硕士研究生。

的品种间米饭的质地也存在较大的差异,而导致这些差异的原因主要包括糊化温度(GT)、胶稠度(GC)等^[12-13]。近年来,针对 AC、GC 和 GT 三项指标与 *Wx* 基因的关系进行了广泛的遗传研究,但不同的研究者得出不同的结论^[14-15]。随着对 *Wx* 基因遗传研究的深入,一些研究利用了 (CT)_n 多态性和 G/T 多态性,对 *Wx* 座位进行了复等位基因分析,已发现存在 16 种 *Wx* 等位基因^[9-11,16],这些 *Wx* 等位基因变异与水稻 AC 之间存在显著的相关性,可以解释水稻品种中 81.2% ~ 91.2% 的 AC 变异^[9-11]。但这些 *Wx* 复等位基因与水稻 GC、GT 之间的关系如何,(CT)_n 和 G/T 标记揭示的等位基因在对品质主要指标影响方面的相互关系如何,以及开展水稻分子标记辅助品质育种等一系列问题还有待深入研究。为此,本研究选用一组直链淀粉含量差异较大且亲缘关系较远的非糯品种(系)作为研究对象,用 G/T 揭示标记 484/W2R ACC 和 (CT)_n 揭示标记 RM190 进行基因等位性变异检测,分析了这些等位性变异与 GT、GC 和 AC 之间的关系、遗传效应及 *Wx* 基因型对稻米 GT、GC 和 AC 遗传变异的决定程度,为揭示 *Wx* 基因型的遗传多样性及其与稻米蒸煮食用品质各指标之间的相关性和分子标记辅助选择改良稻米品质提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选取直链淀粉含量差异较大且亲缘关系较远的一组非糯水稻材料共 50 个(品种名见图 2),于 2005 年 4 月种植于四川农业大学水稻研究所试验田,在分蘖盛期取叶片提取 DNA,完全成熟后收种进行稻米品质检测。

1.2 胶稠度、糊化温度及直链淀粉含量的检测

所有参试材料完全黄熟后收种委托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)测定直链淀粉含量、胶稠度和糊化温度 3 项蒸煮食用品质指标。

1.3 DNA 的提取

在水稻分蘖盛期取叶片,参照 Murray 等^[17]的 CTAB 法提取总 DNA。

1.4 PCR 和电泳

试验所用标记引物均由 Invitrogen 公司合成,酶切所用 ACC 酶购自 TaKaRa 宝生物工程有限公司。*Wx* 基因 (CT)_n 揭示标记利用 Bligh 等^[8]设计的引物“484/485”,但由于其 PCR 产物存在明显

的拖尾现象且扩增的效果和重复性较差,本研究重新设计了一对有同样揭示能力的微卫星标记 RM190,其上游引物序列为 5'-CTTTGTCTATCTCAAGACAG-3',下游引物序列为 5'-TTGCAGATGTTCTTCCTGATG-3';*Wx* 基因 G/T 多态性利用 Ayres 等^[9]设计的酶切扩增多态性序列(cleaved amplified polymorphic sequence, CAPS)标记 484/W2R 分析,其前引物序列为 5'-CTTTGTCTATCTCAAGACAG-3',后引物序列为 5'-TTTCCAGCCCAACACCTTAG-3'。

反应在 PCR 扩增仪(MJ PTC-220 DNA Engine Dyrad Cyclor)中进行。扩增体系为 20 μL,其中引物 2 μL (50 μmol/L),DNA 模板 2.5 μL (50 ng/μL),dNTPs 2 μL (2.5 μmol/L),10 × buffer 2.0 μL,1 U *Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL),超纯水 11.3 μL。热循环条件为:94 °C 下预变性 4 min,然后 94 °C 下 1 min、55 °C 下 45 s 和 72 °C 下 1 min,35 个循环,最后 72 °C 下延伸 10 min。

RM190 扩增产物用 6% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳后,快速银染检测^[18]。对目标条带进行回收、纯化和克隆,利用 ABI 3730XL DNA 分析系统测序。标记 484/W2R 扩增产物在 37 °C 条件下使用 ACC 酶切(反应体系为:10 μL PCR 反应液、2 μL 10 × M buffer 和 2 U ACC 酶加水至 20 μL)2 h 后,用 3% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.5 统计分析

根据 RM190 和 484/W2R-ACC 检测结果,对供试材料进行基因型分类,在 0.05 的显著水平上,用 Duncan 新复极差法对不同基因型材料间的蒸煮食用品质 3 项指标 AC、GC 和 GT 平均数进行多重比较,基因型对 AC、GC 及 GT 的决定程度参照陈跃进等^[19]的方法分析。

2 结果与分析

2.1 *Wx* 基因的遗传多态性

2.1.1 *Wx* 基因的 (CT)_n 多态性

用 RM190 检测了 50 个材料的多态性,发现共存在 7 种纯合带型和 1 种杂合带型(图 1)。对 PCR 扩增产物测序表明分别有 10 个材料表现为 11 个 CT 重复[以 (CT)₁₁ 表示],23 个材料表现为 18 个 CT 重复[以 (CT)₁₈ 表示],另外分别有 2 个、2 个、5 个、1 个和 3 个材料表现为 (CT)₁₀、(CT)₁₄、(CT)₁₇、(CT)₁₉ 和 (CT)₂₀。其中 46 份材料在该位点上为纯合状态,而另外 4 份材料香大粒选、2008R、

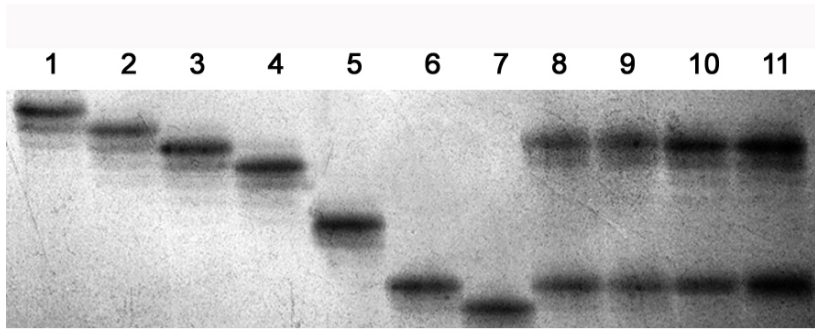


图 1 引物 RM190 揭示的 *Wx* 基因的 $(CT)_n$ 多态性
Fig. 1 $(CT)_n$ polymorphism of *Wx* gene unveiled by primer RM190.

1~7 为纯合带型,分别为 $(CT)_{20}$ 、 $(CT)_{19}$ 、 $(CT)_{18}$ 、 $(CT)_{17}$ 、 $(CT)_{14}$ 、 $(CT)_{11}$ 和 $(CT)_{10}$; 8~11 分别为香大粒选、2008R、蜀恢 205 和宏成 20,基因型为 $(CT)_{11}/(CT)_{18}$ 。

Lanes 1 to 7 represent $(CT)_{20}$, $(CT)_{19}$, $(CT)_{18}$, $(CT)_{17}$, $(CT)_{14}$, $(CT)_{11}$ and $(CT)_{10}$, respectively; Lanes 8 to 11 represent genotype $(CT)_{11}/(CT)_{18}$ of Xiangdalixuan, 2008R, Shuhui 205 and Hongcheng 20, respectively.

蜀恢 205 和宏成 20 在该位点为杂合状态,出现了 $(CT)_{11}$ 和 $(CT)_{18}$ 两种等位基因。

2.1.2 *Wx* 基因的 G/T 多态性

CAPS 标记 484/W2R-ACC 检测结果表明(图 2):有 20 个材料表现为 G/G 型(包含 1 个 ACC 酶切位点),酶切后得到两个 120 bp 左右的片段;有 27 个材料表现为 T/T 型(无 ACC 酶切位点),酶切后得到 1 个 240 bp 左右的片段;而表现为 G/T 杂合带型的有 3 个材料,分别为 2008R、蜀恢 205 和宏成 20,同时出现了上述两种带型。

2.1.3 *Wx* 等位基因类型的分布情况

利用 RM190 和 484/W2R-ACC 两个标记将

供试材料的 *Wx* 基因分成 10 种等位基因类型(表 1)。其中 T/T 型品种(系)的 *Wx* 基因前导区重复数类型较少,只有 $(CT)_{17}$ (5 份材料)和 $(CT)_{18}$ (21 份材料)两种,并以 $(CT)_{18}$ 为主。T/T- $(CT)_{18}/(CT)_{18}$ 型材料分别占整个 T/T、 $(CT)_{18}/(CT)_{18}$ 型材料的 91.3% 和 77.8%,表明 T/T 型品种大多为 $(CT)_{18}$;G/G 型品种(系) *Wx* 基因前导区重复的 $(CT)_n$ 较复杂,分别有 3 个、1 个、2 个、2 个、10 个及 2 个材料表现为 $(CT)_{20}$ 、 $(CT)_{19}$ 、 $(CT)_{18}$ 、 $(CT)_{14}$ 、 $(CT)_{11}$ 和 $(CT)_{10}$,其中 G/G $(CT)_{11}/(CT)_{11}$ 型材料分别占整个 G/G、 $(CT)_{11}/(CT)_{11}$ 型材料的 50% 和 100%,表明 G/G 型品种大多为 $(CT)_{11}$ 。而这两种等位基因类型为 *Wx* 基因的主要类型,占供试品种的 62%。

2.2 *Wx* 等位性变异与 GC、GT 和 AC 的相关性分析

2.2.1 GC、GT 和 AC 间相关性分析

对 50 个材料 AC、GC 和 GT 的测定值进行相关性分析表明:AC 与 GC 两者相关系数 $R = -0.589^{**}$,呈极显著负相关;GC 与 GT 两者相关系数 $R = -0.323^*$,呈显著负相关;而 AC 与 GT 无相关性。

2.2.2 不同等位基因类型间 AC、GC 及 GT 变化特点

将 50 个供试材料的 *Wx* 基因等位基因类型及品质主要指标测定值列于表 2。

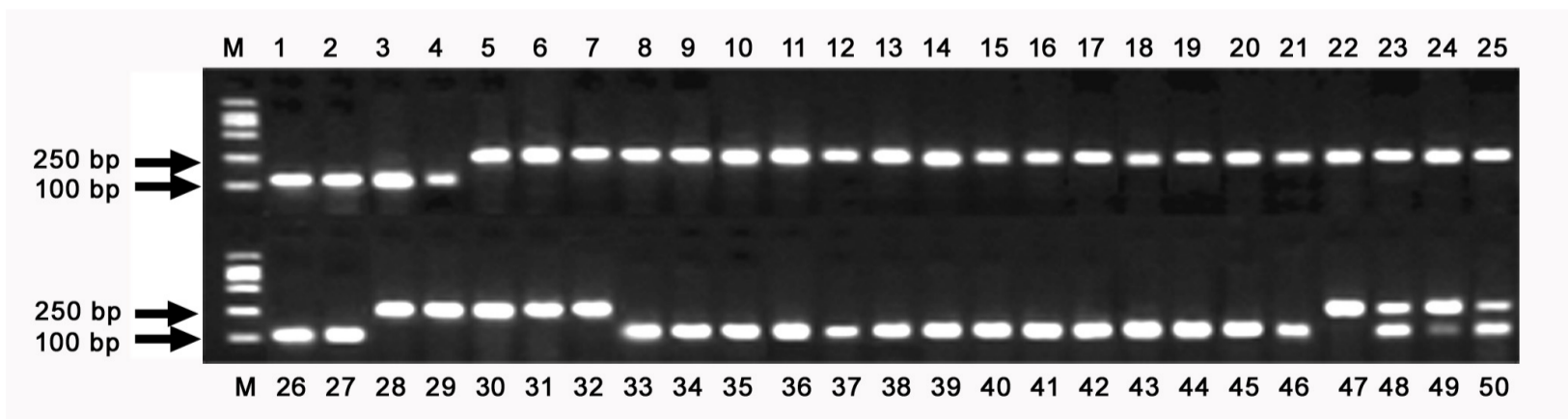


图 2 484/W2R-ACC 揭示的 *Wx* 基因的 G/T 多态性
Fig. 2 G/T polymorphism of *Wx* gene unveiled by 484/W2R-ACC.

泳道对应的品种分别为:1 - ADAIR; 2 - 巴利拉; 3 - CALMAIL201; 4 - Maintmolotsy 1226; 5 - 5837; 6 - BENGAL; 7 - 宝大粒; 8 - 大粒稻; 9 - 北粳 1; 10 - 北粳 3; 11 - 北粳 4; 12 - 北粳 5; 13 - 辽开 97-3-1; 14 - 蜀恢 881; 15 - 蜀恢 202; 16 - E540; 17 - CDR22; 18 - 多恢 1 号; 19 - 香恢; 20 - 绵恢 725; 21 - 蜀恢 885; 22 - 圭 630; 23 - 蜀恢 527; 24 - 泸恢 17; 25 - D725; 26 - 新汕 B; 27 - G46B; 28 - EARL; 29 - 北粳 2; 30 - 五玉粳; 31 - 镇稻 99; 32 - G201B; 33 - New Bonnet; 34 - Katy; 35 - 乐恢 188; 36 - 献国; 37 - Maylele; 38 - COCODRIE; 39 - 奇妙香; 40 - 桂朝 2 号; 41 - 宜恢 1577; 42 - IR24 3; 43 - 广恢 128; 44 - IR24 2; 45 - 滇屯 502; 46 - 云恢 290; 47 - 香大粒选; 48 - 2008R; 49 - 蜀恢 205; 50 - 宏成 20。

Varieties represented by corresponding lanes were as follows: 1, ADAIR; 2, Balilla; 3, CALMAIL201; 4, Maintmolotsy 1226; 5, 5837; 6, BENGAL; 7, Baodali; 8, Dalidao; 9, Beijing 1; 10, Beijing 3; 11, Beijing 4; 12, Beijing 5; 13, Liaokai 97-3-1; 14, Shuhui 881; 15, Shuhui 202; 16, E540; 17, CDR22; 18, Duohui 1; 19, Xianghui; 20, Mianhui 725; 21, Shuhui 885; 22, Gui 630; 23, Shuhui 527; 24, Luhui 17; 25, D725; 26, Xinshan B; 27, G46B; 28, EARL; 29, Beijing 2; 30, Wuyujing; 31, Zhendao 99; 32, G201B; 33, New Bonnet; 34, Katy; 35, Lehui 188; 36, Xianguo; 37, Maylele; 38, COCODRIE; 39, QimiaoXiang; 40, Guichao 2; 41, Yihui 1577; 42, IR24 3; 43, Guanghui 128; 44, IR24 2; 45, Diantun 502; 46, Yunhui 290; 47, Xiangdalixuan; 48, 2008R; 49, Shuhui 205; 50, Hongcheng 20.

表1 Wx复等位基因在供试材料中的分布

Table 1 Distribution of Wx alleles detected by 484/W2R ACC and RM190 in the tested materials.

类型 Type	G/G	G/T	T/T	合计 Total
(CT) ₂₀ /(CT) ₂₀	3	0	0	3
(CT) ₁₉ /(CT) ₁₉	1	0	0	1
(CT) ₁₈ /(CT) ₁₈	2	0	21	23
(CT) ₁₇ /(CT) ₁₇	0	0	5	5
(CT) ₁₄ /(CT) ₁₄	2	0	0	2
(CT) ₁₁ /(CT) ₁₁	10	0	0	10
(CT) ₁₀ /(CT) ₁₀	2	0	0	2
(CT) ₁₁ /(CT) ₁₈	0	3	1	4

由表2可以看出,G/G型品种的AC平均值为21.5%,明显高于T/T型品种的平均值14.5%,而G/T杂合型的平均值为19.9%,居于两者之间;在G/G型中有4个品种的AC表现较低,变幅在13.0%~15.5%,与T/T型品种相似,其余的变幅在20.0%~27.4%,且不同(CT)_n类型间AC变幅不大;G/G型品种中的4个低AC的材料,分别为云南软米滇屯502和云恢290,其基因型为G/G-(CT)₁₀/(CT)₁₀,美国稻Maylele[G/G-(CT)₁₁/

表2 供试材料的等位基因类型及GT、GC和AC测定值

Table 2 Allelic genotypes of test materials and their measurements of GT, GC and AC.

等位基因类型 Allelic genotype		品种(系) Variety (Line)	糊化温度 Gelatinization temperature / Grade	胶稠度 Gel consistency /mm	直链淀粉含量 Amylose content /%		
G/T	(CT) _n						
G/G	(CT) ₂₀ /(CT) ₂₀	ADAIR	5.0	36.0	22.9		
		巴利拉 Balilla	4.6	41.0	13.6		
		CALMAIL201	5.0	35.0	20.0		
		(CT) ₁₉ /(CT) ₁₉	Maintmolotsy 1226	5.0	42.0	21.3	
		(CT) ₁₈ /(CT) ₁₈	新汕 B Xinshan B	6.0	35.0	22.7	
			G46B	6.0	34.0	21.7	
		(CT) ₁₄ /(CT) ₁₄	New Bonnet	5.0	34.0	20.9	
			Katy	6.0	46.0	22.5	
		(CT) ₁₁ /(CT) ₁₁	乐恢 188 Lehui 188	6.0	40.0	24.0	
			献国 Xianguo	6.0	34.0	24.2	
			Maylele	4.5	46.0	13.0	
			COCODRIE	5.0	68.0	23.6	
			奇妙香 Qimiaoxiang	7.0	31.0	23.7	
			桂朝 2号 Guichao 2	7.0	31.0	27.4	
			宜恢 1577 Yihui 1577	7.0	41.0	26.0	
			IR24 3	7.0	48.0	25.3	
			广恢 128 Guanghui 128	6.0	32.0	23.1	
			IR24 2	7.0	38.0	23.9	
			(CT) ₁₀ /(CT) ₁₀	滇屯 502 Diantun 502	7.0	58.0	13.7
				云恢 290 Yunhui 290	7.0	42.0	15.5
		T/T	(CT) ₁₈ /(CT) ₁₈	5837	4.5	68.0	12.8
				BENGAL	7.0	45.0	14.5
				宝大粒 Baodali	7.0	40.0	15.0
				大粒稻 Dalidao	7.0	41.0	15.4
				北粳 1 Beijing 1	7.0	50.0	15.1
				北粳 3 Beijing 3	5.7	38.0	15.8
北粳 4 Beijing 4	5.2			48.0	15.6		
北粳 5 Beijing 5	7.0			46.0	15.3		
辽开 97-3-1 Liaokai 97-3-1	7.0			45.0	14.6		
蜀恢 881 Shuhui 881	6.5			54.0	14.1		
蜀恢 202 Shuhui 202	4.5			68.0	13.8		
E540	7.0			50.0	13.9		
CDR22	4.5			72.0	13.9		
多恢 1号 Duohui 1	7.0			44.0	13.3		
香恢 Xianghui	5.0			56.0	13.4		
绵恢 725 Mianhui 725	7.0			53.0	15.1		
蜀恢 885 Shuhui 885	5.0			78.0	13.7		
圭 630 Gui 630	7.0			57.0	14.3		
蜀恢 527 Shuhui 527	5.0			57.0	13.5		
泸恢 17 Luhui 17	7.0			49.0	13.8		
D725	4.5			54.0	12.9		
(CT) ₁₇ /(CT) ₁₇	EARL			7.0	52.0	14.2	
	北粳 2 Beijing 2			7.0	38.0	17.5	
	五玉粳 Wuyujing			6.8	40.0	19.0	
	镇稻 99 Zhendao 99			7.0	58.0	15.7	
	G201B			4.2	62.0	10.6	
(CT) ₁₁ /(CT) ₁₈	香大粒选 Xiangdalixuan			7.0	45.0	15.7	
	2008R			5.4	31.0	21.3	
G/T	(CT) ₁₁ /(CT) ₁₈			蜀恢 205 Shuhui 205	7.0	42.0	22.1
				宏成 20 Hongcheng 20	7.0	50.0	16.2

(CT)₁₁] 及来自意大利的品种巴利拉 [G/G (CT)₂₀/(CT)₂₀]; 在 T/T 型材料中, (CT)₁₈/(CT)₁₈ 型品种(系)内 AC 变幅较小(12.8% ~ 15.8%), 而(CT)₁₇/(CT)₁₇ 型品种(系)AC 变幅较大(10.6% ~ 19.0%); 在 T/T (CT)₁₈/(CT)₁₈ 型材料中 AC 变异较小, 但 GC 变异较大(为 38 ~ 78 mm); 在 (CT)₁₈/(CT)₁₈ 型材料中, G/G (CT)₁₈/(CT)₁₈ 型品种(系)AC 均值为 22.2%, 明显高于 T/T (CT)₁₈/(CT)₁₈ 型品种(系)AC 均值 14.3%。

2.2.3 484/W2R ACC 揭示的等位基因变异与 GT、GC 和 AC 相关性分析

对标记 484/W2R ACC 在供试材料中的多态性进行统计分析表明(表 3), 不同基因型品种(系)间 GT 无显著差异, 而 GC 和 AC 两项指标均存在显著差异。其中, T/T 型品种(系)AC 均值为 14.5%, 显著低于 G/G 型品种(系)AC 均值 21.5%; 但 GC 均值为 52.2 mm, 显著高于 G/G 型品种(系)均值 40.6 mm。标记 484/W2R ACC 揭示的基因型与 AC 呈极显著负相关 ($R = -0.749^{**}$, 决定系数 $R^2 = 0.561$), 与 GC 呈极显著正相关 ($R = 0.496^{**}$, 决定系数 $R^2 = 0.246$), 即标记 484/W2R ACC 揭示的 Wx 基因遗传多态性

分别可以解释 GC、AC 变异的 24.6% 和 56.1%。

2.2.4 RM190 标记揭示的等位基因变异与 GT、GC 和 AC 相关性分析

标记 RM190 在供试材料中多态性的统计分析结果表明(表 4), 不同基因型品种(系)间, 在 GT 和 GC 两项指标上无显著差异, 而 AC 则表现出显著差异。其中基因型为 (CT)₁₁/(CT)₁₁、(CT)₁₄/(CT)₁₄、(CT)₁₉/(CT)₁₉ 和 (CT)₁₁/(CT)₁₈ 型水稻品种(系)AC 显著高于 (CT)₁₀/(CT)₁₀、(CT)₁₇/(CT)₁₇ 和 (CT)₁₈/(CT)₁₈ 型品种(系)。标记 RM190 揭示的基因型与 AC 呈极显著负相关 ($R = -0.770^{**}$, 决定系数 $R^2 = 0.593$), 即 59.3% 的 AC 变异是由标记 RM190 揭示的 Wx 基因遗传多样性决定的。

2.2.5 RM190 和 484/W2R ACC 共同揭示的等位基因变异与 GT、GC 和 AC 的相关性分析

统计分析结果表明(表 5), 不同基因型品种(系)间 GT 和 GC 两项指标无显著差异, 而 AC 存在极显著差异。其中 (CT)₁₉/(CT)₁₉、(CT)₁₈/(CT)₁₈、(CT)₁₄/(CT)₁₄ 和 (CT)₁₁/(CT)₁₁ 的 G/G 型品种(系)的 AC 显著大于 (CT)₁₈/(CT)₁₈、(CT)₁₇/(CT)₁₇、(CT)₁₁/(CT)₁₈ 的 T/T 型及

表 3 484/W2R ACC 标记分类的不同基因型品种间品质相关数据平均数差异比较

Table 3. Comparisons of grain quality traits among varieties with different genotypes classified by 484/W2R ACC marker.

基因型 Genotype	品种数 Number of varieties	糊化温度 Gelatinization temperature/Grade	胶稠度 Gel consistency /mm	直链淀粉含量 Amylose content/%
G/G	20	6.0 a	40.6 b	21.5 a
G/T	3	6.5 a	41.0 b	19.9 a
T/T	27	6.2 a	52.2 a	14.5 b

同一列数据后带相同字母者表示在 0.05 的显著水平下差异不显著。下表同。

Mean values followed by the same letters within a column are not significantly different at $P > 0.05$. The same as in tables below.

表 4 RM190 标记分类的不同基因型品种间品质相关数据平均数差异比较

Table 4. Comparisons of grain quality traits among varieties with different genotypes classified by RM190 marker.

基因型 Genotype	品种数 Number of varieties	糊化温度 Gelatinization temperature/Grade	胶稠度 Gel consistency /mm	直链淀粉含量 Amylose content/%
(CT) ₁₀ /(CT) ₁₀	2	7.0 a	50.0 a	14.6 b
(CT) ₁₁ /(CT) ₁₁	10	6.3 a	40.9 a	23.4 a
(CT) ₁₄ /(CT) ₁₄	2	5.5 a	40.0 a	21.7 a
(CT) ₁₇ /(CT) ₁₇	5	6.4 a	50.0 a	15.4 b
(CT) ₁₈ /(CT) ₁₈	23	6.1 a	51.4 a	15.0 b
(CT) ₁₉ /(CT) ₁₉	1	5.0 a	42.0 a	21.3 a
(CT) ₂₀ /(CT) ₂₀	3	4.9 a	37.3 a	18.8 ab
(CT) ₁₁ /(CT) ₁₈	4	6.6 a	42.0 a	18.8 a

表 5 RM190 和 484/W2R ACC 分类的不同基因型品种间品质相关性状平均数差异比较

Table 5 . Comparisons of grain quality traits among varieties with different genotypes jointly classified by markers of 484/W2R ACC and RM190 .

基因型 Genotype	品种数 Number of varieties	糊化温度 Gelatinization temperature/Grade	胶稠度 Gel consistency /mm	直链淀粉含量 Amylose content/%
G/G (CT) ₂₀ /(CT) ₂₀	3	4.9 a	37.3 a	18.8 abc
G/G (CT) ₁₉ /(CT) ₁₉	1	5.0 a	42.0 a	21.3 a
T/F (CT) ₁₈ /(CT) ₁₈	21	6.1 a	53.0 a	14.3 c
G/G (CT) ₁₈ /(CT) ₁₈	2	6.0 a	34.5 a	22.2 a
T/F (CT) ₁₇ /(CT) ₁₇	5	6.4 a	50.0 a	15.4 bc
G/G (CT) ₁₄ /(CT) ₁₄	2	5.5 a	40.0 a	21.7 a
G/G (CT) ₁₁ /(CT) ₁₁	10	6.3 a	40.9 a	23.4 a
G/G (CT) ₁₀ /(CT) ₁₀	2	7.0 a	50.0 a	14.6 bc
T/F (CT) ₁₁ /(CT) ₁₈	1	7.0 a	45.0 a	15.7 bc
G/T (CT) ₁₁ /(CT) ₁₈	3	6.5 a	41.0 a	19.9 ab

(CT)₁₀/(CT)₁₀ 的 G/G 型品种(系)。两标记共同揭示的 *Wx* 基因遗传多态性与 AC 呈极显著相关 ($R=0.851^{**}$, 决定系数 $R^2=0.724$), 即在 50 份材料中, 72.4% 的 AC 变异可以解释为由标记 RM190 和 484/W2R ACC 揭示的 *Wx* 等位基因变异所引起。

3 讨论

3.1 *Wx* 基因的遗传多样性

Wx 基因存在广泛的复等位基因变异。一些研究人员利用 (CT)_n 多态性和 G/T 多态性对 *Wx* 基因进行了复等位基因分析, 鉴定出 16 种 *Wx* 等位基因^[9,11,16]。本研究利用来源广泛的 50 个水稻材料进行 *Wx* 基因的等位性变异分析, 共检测出 10 种等位基因, 其中包括 8 种纯合基因类型, 分别为 G/G (CT)₂₀/(CT)₂₀、G/G (CT)₁₉/(CT)₁₉、T/T (CT)₁₈/(CT)₁₈、G/G (CT)₁₈/(CT)₁₈、T/T (CT)₁₇/(CT)₁₇、G/G (CT)₁₄/(CT)₁₄、G/G (CT)₁₁/(CT)₁₁ 及 G/G (CT)₁₀/(CT)₁₀ 和 2 种杂合基因类型 T/F (CT)₁₁/(CT)₁₈ 和 G/T (CT)₁₁/(CT)₁₈。两种杂合基因型纯合后可能形成一种新的等位基因类型 T/T (CT)₁₁/(CT)₁₁, 这将丰富 *Wx* 基因的等位性变异类型, 对进一步分析 *Wx* 基因的遗传效应和稻米品质改良具有重要的作用。

3.2 *Wx* 基因遗传多样性与稻米品质的关系

对 AC 研究表明, 在 G/G 型材料中, 发现了 4 份低 AC 材料。2 份为云南软米品种滇屯 502 和云恢 290, 其基因型为 G/G (CT)₁₀/(CT)₁₀, AC 分别为 13.7% 和 15.5%, 明显低于 G/G 型品种的 AC 均值 21.5%, 由此推断, 在 G/G 型材料中, (CT)₁₀/(CT)₁₀ 型突变可能是低 AC 产生的原因之一。曾亚文等^[20] 利用 IR36/八宝米 F₂ 群体定位了控制软

米 AC 的一对隐性单基因, 它与 RM190 的遗传距离为 18.8 cM。因此云南软米品种滇屯 502 和云恢 290 中, 低 AC 的遗传原因到底是由 *Wx* 基因的 (CT)_n 多态性位点变异引起还是由其他因子导致的, 还有待进一步的遗传分析。另外 2 份低 AC 材料分别为 G/G (CT)₁₁/(CT)₁₁ 型中的美国稻 May-lele [其 AC 值 13.0% 明显低于该类型品种(系)的 AC 均值 23.4%] 及 G/G (CT)₂₀/(CT)₂₀ 型中的意大利品种巴利拉 [其 AC 值 13.6% 明显低于该类型品种(系)的 AC 均值 18.8%]。Sato 等^[21] 对水稻低 AC 品种 Milky Queen 的遗传分析发现, 该品种的低 AC 受一对 *Wx* 等位基因 *Wx mq* 控制。最近对一些水稻低 AC 的突变体研究发现, 水稻低 AC 还受一些其他 *Wx* 等位基因^[22] (如 *Wx^{OP}*) 和非等位基因^[23] [如 *du* 基因及定位于水稻第 9 染色体上的 *lam(t)* 基因] 控制。据此推断, 这 2 个材料低 AC 形成可能是由除标记 RM190 和 484/W2R ACC 所揭示的 *Wx* 等位基因外的其他因子决定的。另外, T/T (CT)₁₇/(CT)₁₇ 型材料 AC 均匀分布于 10.6% ~ 19.0%。葛鸿飞等^[24] 发现, 水稻蜡质基因 5' 上游区中有一个 31 bp 的序列片段具有增强基因表达的作用, 这表明 AC 的变异可能由一些微效因子调控。综合上述结果, 稻米 AC 的遗传控制基因, 除标记 RM190 和 484/W2R ACC 所揭示的 *Wx* 等位基因外, 可能还有一些其他 *Wx* 等位、非等位基因及一些微效因子。

对 GC 研究表明, GC 受细胞质效应、胚乳基因型和互作效应控制^[25], 而种子基因主要是由若干复等位主效基因和微效基因控制, 如在 GC 这项指标上, 表现出硬对中等或软、中等对软的显性效应^[15]。本研究发现 GC 与 *Wx* 基因的 G/T 多态性位点有关, 但对 T/T (CT)₁₈/(CT)₁₈ 和 G/G (CT)₁₁/

(CT)₁₁ 基因型材料的研究发现其 AC 变异较小,而 GC 变异较大,说明 GC 除受 *Wx* 基因调控外,可能还受其他基因调控。He 等^[26] 在第 2、7 染色体上定位了 2 个分别能解释 20.2% 和 14.2% GC 变异的 QTL,黄祖六等^[27] 认为稻米的 GC 受控于第 3 染色体上的两个连锁位点。由此可以推断,稻米 GC 的遗传可能受多个主效基因位点(*Wx* 基因是其中一个主效位点)、细胞质效应、胚乳基因型和互作效应共同控制。

对 GT 研究表明,*Wx* 基因的遗传多态性与 GT 高低无相关性,已有研究表明,位于第 6 染色体短臂上的 *ALK* 基因是控制 GT 的主效基因,并且已被分离克隆^[28],这也说明控制稻米 GT 的主效基因不是 *Wx* 基因位点,这与本研究的相关结论是一致的。

3.3 分子标记辅助选择品质性状的可能性

本研究发现,GC 变异与 *Wx* 基因 G/T 多态性显著相关,与 (CT)_n 多态性相关不显著。因此,CAPS 标记 484/W2R-ACC 可以用于辅助选择改良稻米 GC 品质指标。对 AC 研究表明,在一些高代品系甚至推广品种中,*Wx* 基因在 (CT)_n 和 G/T 位点上仍处于杂合状态,如 2008R、蜀恢 205 和宏成 20,且 *Wx* 基因的 (CT)_n 位点与 G/T 位点并不完全连锁。因此,在育种实践中,对 AC 这一指标的选择应该更加严格,特别要注意的是 *Wx* 基因是否已完全纯合,否则会导致后代 AC 和 GC 这两项指标出现分离,造成实验的结果不确切。另外还发现仅利用单一标记并不能很好地解释 AC 的变异,例如 (CT)₁₈/(CT)₁₈ 型品种(系)中,G/G 型品种 AC 明显地高于 T/T 型品种(系);G/G 型品种(系)中,(CT)_n 重复不同的品种间 AC 也存在显著差异。统计表明同时利用两标记可以解释 AC 指标的变异(72.4%)较单一标记要高出 20 个百分点左右。因此,利用标记 RM190 和 484/W2R-ACC 协同完成对稻米 AC 指标的辅助选择较单一标记具有更好的效果。

参考文献:

- [1] Martin C, Smith A M. Starch biosynthesis. *Plant Cell*, 1995, 7: 974-985.
- [2] Juliano B O. Rice Chemistry and Technology. St. Paul, MN: AACC, 1985: 443-524.
- [3] Wang Z Y, Zheng F Q, Shen G Z, et al. The amylose content in rice endosperm is related to the post transcriptional regulation of the waxy gene. *Plant J*, 1995, 7(4): 613-622.
- [4] 蔡秀玲,王宗阳,郑霏琴,等.水稻蜡质基因与 5' 非翻译区一个与调控有关的内含子. *植物生理学报*, 1997, 23: 257-261.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Bergman C J, Delgado J T, McClung A M, et al. An improved method for using a microsatellite in the rice waxy gene to determine amylose class. *Cereal Chem*, 2001, 78: 257-260.
- [8] 包劲松,何平,夏英武,等.稻米淀粉 RVA 谱特征主要受 *Wx* 基因控制. *科学通报*, 1999, 44(18): 1973-1976.
- [9] 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.
- [10] Tan Y F, Zhang Q F. Correlation of simple sequence repeat (SSR) variants in the leader sequence of the waxy gene with amylose content of the grain in rice. *Acta Bot Sin*, 2001, 43(2): 146-150.
- [11] 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.
- [12] Little R R, Hilder G B, Dawson E H. Differential effect of dilute alkalia on 25 varieties of milled white rice. *Cereal Chem*, 1958, 35: 111-126.
- [13] Cagampang G B, Perez C M, Juliano B O. A gel consistency test for the eating quality of rice. *J Sci Food Agric*, 1973, 24: 1589-1594.
- [14] 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.
- [15] Lanceras J C, Hun Z L, Naivikul Q, et al. Mapping of genes for cooking and eating qualities in Thai Jasmine rice (KDML105). *DNA Res*, 2000, 7: 93-101.
- [16] 曾瑞珍,张泽民,何风华,等.水稻 *Wx* 复等位基因的鉴定及单片段代换系的建立. *中国水稻科学*, 2005, 19(6): 495-500.
- [17] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acids Res*, 1980, 8: 4321-4325.
- [18] 王凤格,赵久然,郭景伦,等.一种改进的玉米 SSR 标记的 PAGE/快速银染检测新方法. *农业生物技术学报*, 2004, 12(5): 606-607.
- [19] 陈跃进.水稻直链淀粉含量的分子遗传研究. *湖南农业大学学报*, 2002, 28(3): 195-198.
- [20] 曾亚文,申时全,徐绍忠,等.云南软米低直链淀粉含量及其相关性状遗传分析. *植物遗传资源学报*, 2004, 5(1): 12-16.
- [21] Sato H, Suzuki Y, Okuno K, et al. Genetic analysis of low amylose content in a rice variety, 'Milky Queen'. *Japan Breeding Res*, 2001, 3: 13-19.
- [22] Mikami I, Aikawa M, Hirano H Y, et al. Altered tissue specific expression at the *Wx* gene of opaque mutants in rice. *Euphytica*, 1999, 105: 91-97.
- [23] Sato H. Genetics and breeding of high eating quality rice: status and perspectives on the research of low amylose content rice. *Japan Agric Hort*, 2002, 77(5): 20-28.
- [24] 葛鸿飞,王宗阳,洪孟民,等.水稻蜡质基因 5' 上游区中 31 bp 序列增强基因表达的作用. *植物生理学报*, 2000, 26(2): 159-163.
- [25] 李欣,汤述翥,印志同,等.粳型杂种稻米品质性状的表现及遗传控制. *作物学报*, 2000, 26(4): 411-419.
- [26] He P, Li S G, Qin Q, et al. Genetic analysis of rice grain quality. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 502-508.
- [27] 黄祖六,谭学林,徐辰武,等.稻米胶稠度基因位点的标记分析. *中国农业科学*, 2002, 18(6): 66-71.
- [28] 高振宇,曾大力,崔霞,等.水稻稻米糊化温度控制基因 *ALK* 的图位克隆及其序列分析. *中国科学:C 辑*, 2003, 33(6): 481-487.