

张 羽, 李小刚, 王保军, 等. 陕西省水稻  $Wx$  基因种质资源遗传多样性分析[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(11): 59–62.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.11.015

# 陕西省水稻 $Wx$ 基因种质资源遗传多样性分析

张 羽<sup>1</sup>, 李小刚<sup>2</sup>, 王保军<sup>2</sup>, 王业文<sup>2</sup>, 王俊义<sup>2</sup>

(1. 陕西理工学院 生物科学与工程学院, 陕西汉中 723000; 2. 陕西省水稻研究所, 陕西汉中 723000)

**摘要:** 稻米品质与稻米中直链淀粉含量(AC)有关, 而直链淀粉含量与蜡质基因( $Wx$ )的基因型有关, 研究表明  $Wx$  基因第一内含子的剪接效率决定直链淀粉含量。明确陕西省主要水稻种质资源中  $Wx$  基因的基因型, 可为水稻品质育种提供依据。应用 CAPS 法对 112 份陕西省水稻主要种质资源  $Wx$  基因第一内含子供体 +1 位碱基 G/T 进行检测, 根据 G/T 碱基将 112 份供试材料的  $Wx$  基因分为 GG、GT、TT 等 3 种基因型。同时, 按国标检测 3 种不同 G/T 型 37 份稻米的直链淀粉含量及其他相关性状。结果显示, 112 份供试材料中有 1 份材料为 GG 型, 约占 1%; 25 份为 GT 型, 占 22%; 86 份材料为 TT 型, 约占 77%。说明  $Wx$  基因第一内含子供体 +1 位碱基 G/T 的多态性与 AC 含量有良好的对应关系, 与垩白粒率和垩白度有一定的对应关系。

**关键词:** 陕西省; 水稻; 蜡质基因( $Wx$ ); 基因型; 剪接效率; 支链淀粉含量; 稻米品质; 育种

**中图分类号:** S511.033 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)11-0059-04

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、糊化温度、胶稠度、垩白度等是衡量稻米蒸煮食用品质的主要指标, 而直链淀粉含量则是稻米品质优劣的决定因素<sup>[1]</sup>。直链淀粉含量高的稻米较直链淀粉含量低的稻米硬, 饭粒松散, 胀性好。随着人们生活水平的提高以及用途和地域的不同, 人们对直链淀粉含量的要求也不尽相同, 直链淀粉含量已经成为水稻品质育种的一个重要方面<sup>[2-8]</sup>。

收稿日期: 2016-03-11

基金项目: 陕西省科技厅农业科技攻关项目(编号: 2013K02-10-01); 陕西省科技厅农业科技创新项目(编号: NK01-01); 陕西省科技统筹创新工程计划(编号: 2011KTCG02-01)。

作者简介: 张 羽(1968—), 女, 陕西汉中中人, 硕士, 教授, 主要从事遗传学理论与实践等教学和科研工作。E-mail: zy68169@sina.com。

研究发现, 蜡质基因( $Wx$ )编码的结合在淀粉粒上的淀粉合成酶, 是水稻中控制直链淀粉合成的主要基因, 非糯性基因( $Wx$ )对糯性基因( $wx$ )表现为不完全显性, 存在较为明显的剂量效应,  $Wx$  基因序列由于 SNP 变异产生了一些复等位基因, 如  $Wx^a$ 、 $Wx^b$ 、 $Wx^m$  和  $Wx-mq$ , 其直链淀粉含量也因为 SNP 变异导致各不相同,  $Wx^a$  的直链淀粉含量较高,  $Wx^b$ 、 $Wx^m$  和  $Wx-mq$  的直链淀粉含量较低。在  $Wx$  的分子标记研究中, Bligh 等报道利用和  $Wx$  基因紧密连锁的微卫星(CT)<sub>n</sub> 标记进行  $Wx$  基因多态性检测<sup>[9]</sup>。随着对水稻蜡质基因表达调控规律的深入研究, 表明稻米中直链淀粉含量是由该品种蜡质基因第一内含子的剪接效率决定的, 若蜡质基因第一内含子供体 +1 位是正常的碱基 G, 蜡质基因第一内含子能被正常剪接, 水稻胚乳中就能产生较多的蜡质基因成熟 mRNA, 淀粉合

[17] 郎有忠, 胡 健, 杨建昌, 等. 抗旱型稻根系形态与机能的研究[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2003, 24(4): 58–61.

[18] 张亚洁, 陈海继, 刁广华, 等. 种植方式对陆稻和水稻生长特性和产量形成的影响[J]. 江苏农业学报, 2006, 22(3): 205–211.

[19] 陈年来, 孙小妹, 张玉鑫, 等. 土壤水分和氮素水平对春小麦水分与氮素利用效率的影响[J]. 自然资源学报, 2012, 27(1): 74–81.

[20] 魏海燕, 张洪程, 张胜飞, 等. 不同氮利用效率水稻基因型的根系形态与生理指标的研究[J]. 作物学报, 2008, 34(3): 429–436.

[21] Aulakh M S, Malhi S S. Interactions of nitrogen with other nutrients and water: Effect on crop yield and quality, nutrient use efficiency, carbon sequestration, and environmental pollution[J]. Advances in Agronomy, 2005, 86: 341–409.

[22] 赵俊芳, 杨晓光, 陈 斌, 等. 不同灌溉处理对旱稻根系生长及水分利用效率的影响[J]. 中国农业气象, 2004, 25(4): 44–48.

[23] Henry A, Gowda V R, Torres R O, et al. Variation in root system architecture and drought response in rice (*Oryza sativa*): Phenoty-

ping of the *Oryza* SNP panel in rainfed lowland fields[J]. Field Crops Research, 2011, 120(2): 205–214.

[24] Olesinski J, Lavigne M B, Kershaw J. Fine-root dynamics change during stand development and in response to thinning in balsam fir (*Abies balsamea* L. Mill.) forests[J]. Forest Ecology and Management, 2012, 286(12): 48–58.

[25] Paliwal A K, Singh R N, Singh V K. Effect of Nitrogen and phosphorus on yield and uptake of N, P and K by upland rice[J]. Advances in Plant Sciences, 1997, 10(2): 257–259.

[26] Saekar P K, Debnath N C, Root C C. Growth composition and uptake of nutrients in upland rice as influenced by levels of nitrogen[J]. Environment and Ecology, 1992, 10(2): 440–444.

[27] 张亚洁, 林强森, 杨 建, 等. 种植方式对水稻和陆稻 N 素吸收利用的影响[J]. 中国水稻科学, 2005, 19(6): 539–544.

[28] Schiefelbein J W, Benfey P N. The development of plant roots: new approaches to underground problems[J]. Plant Cell, 1991, 3(11): 1147–1154.

[29] Robinson d. The responses of plants to nonuniform supplies of nutrients[J]. New Phytologist, 1994, 127(4): 635–674.

成酶的量就较多,胚乳中直链淀粉含量就高;反之,蜡质基因第一内含子供体+1位突变成T后,蜡质基因第一内含子利用别的剪接位点进行剪接,剪接效率低,胚乳中产生的蜡质基因成熟mRNA的量较少,淀粉合成酶的量也较少,相应的胚乳中直链淀粉含量也较低。Ayres等最早根据Wx基因第一内含子供体+1位的这种G/T多态性,设计了PCR-ACCI酶切法,即蜡质基因第一内含子供体+1位是G时,它能与旁邻的碱基构成ACCI的酶切识别序列AGGTATA,使含AGGTATA序列的扩增片段能被ACCI酶切,而含AGTTATA序列的不能被ACCI酶切<sup>[10]</sup>。随后,很多研究人员对此结论进行了验证和深入研究,充分证明Wx基因第一内含子供体+1位G/T多态性影响稻米直链淀粉含量<sup>[11-17]</sup>。本试验通过CAPS方法对112份水稻样品Wx的G/T多态性进行研究,同时利用国标法<sup>[18]</sup>对37份不同Wx基因型的米样测定其直链淀粉含量及相关性状,为陕西省稻米品质育种提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料为陕西省水稻研究所提供。

### 1.2 方法

1.2.1 基因组提取及PCR 水稻基因组DNA采用SDS法提取,并采用1%琼脂糖凝胶检测基因组DNA的质量。PCR反应体系为:2×Taq Master Mix 15 μL,10 μmol/L正反引物各1 μL,DNA模板1 μL,反应总体积30 μL,用ddH<sub>2</sub>O补足。反应程序为:94.0℃预变性5 min;94.0℃变性50 s,55℃退火50 s,72.0℃延伸1 min,35个循环;最后72.0℃延伸10 min,4℃保存;8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离PCR产物,银染法显色拍照。

1.2.2 引物设计 Wx基因G/T多态性利用Ayres等设计的酶切扩增多态性序列标记Wx484/W2R-ACCI酶切分析,上游引物为Wx484,序列为5'-CTTTGTCTATCTCAAGACAC-3';下游引物为W2R,序列为5'-TTTCCAGCCCCAACACCT-TAC-3'。引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成,ACCI酶购自Thermo Scientific。

1.2.3 直链淀粉含量(AC)及其他性状的测定 从供试的113份材料中随机选取有3种基因型的材料37份,按照NY/T 593—2013《食用稻米品质》标准进行糙米率、精米率、长宽比等性状的计算。然后用旋风式粉碎磨(JFS-13A型)磨粉,再经100目筛后放置烘箱内经60℃干燥过夜。准确称取0.25 g淀粉小心放入50 mL容量瓶,加入0.5 mL 95%乙醇,轻摇,使样品湿润分散。再加入4.5 mL 1 mol/L NaOH溶液,用碱液将瓶壁上黏附的样品冲洗下去,然后沸水浴10 min,冷却至室温,用超纯水定容至50 mL,混匀后取其样液2.5 mL,加入已盛有半瓶蒸馏水的50 mL容量瓶中,再向容量瓶中加入0.5 mL 1 mol/L乙酸溶液,使样品酸化,加0.75 mL碘试剂溶液(0.12 mol/L KI,0.008 mol/L I<sub>2</sub>),充分摇匀,用蒸馏水定容,静置20 min,以0.09 mol/L NaOH溶液为空白对照,利用紫外分光光度计(752型)于620 nm波长处测定吸光度,根据标准曲线回归方程 $y = 0.7382x - 0.0367$  ( $r^2 = 0.9986$ ,标准曲线由不同含量的直链淀粉按国标规定方法配置标样测定产生)计算表观直链淀粉含量,每个样品3次重

复,其平均值作为该样品的AC含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 供试材料Wx基因的G/T多态性

CAPS标记Wx484/Wx2R-ACCI检测结果表明,112份材料中有86份材料基因为TT,约占总试材料的77%,酶切后只有1条257 bp的条带;25份材料基因为GT,约占总试材料的22%,酶切后既有257 bp的片段,也有129、128 bp的片段;只有1份材料基因为GG,约占总试材料的1%,酶切后只有128 bp左右的片段。

### 2.2 Wx基因G/T多态性与水稻恢保种类的关系

112份供试材料中有76份恢复系材料,其中70份Wx基因型为TT,占92.11%,6份基因型为GT,占7.89%。有20份保持系材料,其中4份基因型为TT,占20%,15份基因型为GT,占75%,1份基因型为GG,占5%。供试的恢复系材料中Wx基因型主要为TT,而保持系材料的Wx基因型主要为GT(表1)。

### 2.3 Wx基因G/T多态性与其他性状的关系

从3种基因型材料中随机抽取37份材料进行相关性状和直链淀粉含量测定,结果如表2所示。

37份材料的直链淀粉含量在9.3%~21.9%之间,其中基因型为GG和GT的材料直链淀粉含量在12.29%~21.88%之间,基因型为TT的材料直链淀粉含量在9.26%~19.65%之间。从研究结果看,基因型为GT的直链淀粉含量较高,平均为18.64%,糙米率平均为76.69%,精米率平均为67.64%,整精米率平均为56.36%,米粒长宽比平均为2.79,垩白粒率平均为69.83%,垩白度平均为16.35%。而基因型为TT的材料直链淀粉含量较低,平均为13.81%,糙米率平均为77.22%,精米率平均为66.43%,整精米率平均为46.65%,米粒长宽比平均为2.63,垩白粒率平均为22.57%,垩白度平均为7.99%。

## 3 讨论与结论

随着人们生活水平的提高,对品质要求越来越高,同时地处不同区域的人们由于生活习惯口味不同,对米质要求也各不相同,另外不同的稻米加工对直链淀粉含量的要求也不一致。TT基因型的材料直链淀粉含量较低,GT基因型的材料直链淀粉含量较高,TT基因型的材料其垩白粒率和垩白度比GT基因型的材料低。供试的陕西省主要水稻种质资源中保持系材料和恢复系材料占85.71%,其中恢复系材料的Wx基因型大部分为TT,而保持系材料的Wx基因型大部分为GT,因此杂交种Wx基因型可能为TT或GT,TT基因型的品种直链淀粉含量较低,黏性强,适口性好,GT基因型的品种直链淀粉含量较高,黏性弱,膨胀性好。由于Wx基因型与AC含量有良好的对应关系,因此无需等种子成熟后测定AC含量,而在作物生长的任何时期可以根据育种需要,利用检测Wx基因型来培育满足要求的不同品种。由于供试材料中只有1份材料的Wx基因型是GG,其直链淀粉含量及其他所测性状接近GG基因型材料。在长江上游籼稻种植区,科研人员在育种实践中发现稻米品质由碾米品质、外观品质、食味品质决定,其中直链淀粉含量是食味品质的重要指标之一。目前使用的育种材料中大部分不育系(保持系)材料的直链淀粉含

表 1 供试材料 Wx 基因位点的 G/T 多态型

材料	G/T 型	类型	材料	G/T 型	类型	材料	G/T 型	类型
R7598	TT	R	R122	TT	R	多选一号-2	TT	C/R
R5759	TT	R	R725	TT	R	7582 多	TT	R
R1521	TT	R	52 香占	TT	R	7582 多-2	TT	R
R6563	TT	R	15 香占	TT	R	黄晴	TT	R
R2152	TT	R	15 香占-2	TT	R	KDLM105	TT	R
R2152-2	TT	R	52 香占-2	TT	R	R9311	TT	R
R2152-3	TT	R	协美占	TT	R	日本晴	TT	G
R2152-4	GT	R	协美占-2	TT	R	Tsuguake	TT	C
R2152-5	TT	R	多选一号	TT	R	泰引一号	TT	C
R2021	TT	R	15 黄	TT	R	香改 B	GT	B
R2021-2	TT	R	黄 52	TT	R	马协 B	GT	B
R1527	TT	R	黄 52-2	TT	R	红 410B	GT	B
R1527-2	TT	R	527 培	GT	R	菲改 B	GT	B
R6563-2	TT	R	527 培-2	GT	R	岗 46B	GT	B
多泰 7582 变	TT	R	IR-24	TT	R	金 23B	GT	B
多泰 7582 变-2	TT	R	协×9	GT	F1	协 B	GT	B
多选 811	GT	R	Tetep	GT	C	8010B	TT	B
多选 811-2	TT	R	Toride 1	TT	C	优 1B	GT	B
多选 811-3	TT	R	蜀恢 527	TT	R	D297B	TT	B
多选 811-4	TT	R	蜀恢 781	TT	R	D62B	GT	B
多泰多选 811	TT	R	蜀恢 838	TT	R	中 9B	GT	B
多泰多选 811-2	GT	R	内恢 182	TT	R	K18B	GT	B
多泰多选 811-3	TT	R	辐恢 838	TT	R	D 香 B	TT	B
美泰	GT	R	航恢 1 号	TT	R	珍汕 97B	GT	B
泰培 811	TT	R	达恢 2079	TT	R	D 汕 B	GG	B
培辐 758	TT	R	宜恢 1577	TT	R	2480B	GT	B
辐 74B	GT	B	成恢 047	TT	R	佳禾 7 号	TT	B
谷酶 4 号	GT	C	明恢 63	TT	R	K17B	GT	B
R2198	TT	R	明恢 78	TT	R	美香占	TT	C
R5721	TT	R	明恢 86	TT	R	银丝占	TT	C
R1521-2	TT	R	南恢 511	TT	R	黄丝占	TT	C
R2157	TT	R	南恢 445	TT	R	水晶稻	TT	C
R6563-2	TT	R	成恢 425	TT	R	香珍 2 号	TT	C
R207	TT	R	泸恢 177	TT	R	湘晚粳 5 号	TT	C
R207m	TT	R	明 6547	TT	R	湘晚粳 3 号	TT	C
R 晚 5	TT	R	杨稻 6 号-1	TT	C/R	信阳软米	TT	C
R6547	TT	R	杨稻 6 号-2	TT	C/R	75-1-127	GT	品系
R57	TT	R						

注:R 代表恢复系材料;B 代表保持系材料;C/R 为既是常规稻,又是两系恢复系;C 为常规稻;G 为粳稻。

量都略高,恢复系材料的直链淀粉含量略低。选用直连淀粉含量略低恢复系和不育系配组,才有可能选育出直链淀粉含量适中的杂交组合。

参考文献:

[1]Yan C J,Tian Z X,Fang Y W,et al. Genetic analysis of starch paste viscosity parameters in glutinous rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics,2011,122(1):63-76.

[2]蔡秀玲,刘巧英,汤述翥,等. 用于筛选直链淀粉含量为中等的粳稻品种的分子标记[J]. 植物生理与分子生物学学报,2002,28(2):137-144.

[3]周屹峰,赵 霏,任三娟,等. 利用 Wx 基因功能性标记选育中等直链淀粉含量优质水稻保持系[J]. 浙江大学学报(农业与生命

科学版),2010,36(6):602-608.

[4]侯立恒,夏明元,戚华雄,等. 利用 Wx 基因分子标记辅助选择技术培育中等直链淀粉含量的水稻恢复系[J]. 中国农学通报,2009,25(14):32-36.

[5]陈深广,周屹峰,赵 霏,等. 利用 Wx 和 fgr 基因双功能性标记高效选育优质水稻保持系[J]. 中国水稻科学,2011,25(1):31-36.

[6]刘燕清,强新涛,赵春芳,等. 水稻淀粉合成相关基因分子标记的筛选与利用[J]. 江苏农业学报,2015,31(3):471-476.

[7]Frances H,Bligh J,Larkin P D,et al. Use of alternate splice sites in granule-bound starch synthase mRNA from low-amylose rice varieties[J]. Plant Molecular Biology,1998,38(3):407-415.

[8]强新涛,赵春芳,赵 凌,等. 籼稻栽培品种中淀粉合成相关基因的遗传变异和群体结构分析[J]. 江苏农业学报,2016,32(2):

表 2 Wx 基因位点的 G/T 多态型与其他性状

材料	G/T 型	直连淀粉含量 (%)	糙米率 (%)	精米率 (%)	整精米率 (%)	长宽比	垩白粒率 (%)	垩白度 (%)
D 汕 B	GG	19.02	79.17	71.92	69.36	2.35	100.00	29.00
香改 B	GT	12.29	75.36	73.98	66.38	2.83	21.00	3.78
菲改 B	GT	21.62	76.80	70.83	56.17	3.13	38.00	7.22
中 9B	GT	17.66	76.32	72.96	68.94	3.13	52.00	11.44
金 23B	GT	18.81	78.48	67.41	56.95	3.41	74.00	13.32
珍汕 97B	GT	20.14	77.74	69.17	52.67	2.07	90.00	10.35
马协 B	GT	17.87	76.40	67.49	64.19	3.00	86.00	17.20
岗 46B	GT	21.65	78.29	68.30	67.46	2.11	72.00	11.52
K17	GT	21.88	76.49	60.03	21.63	2.62	98.00	29.40
K18B	GT	15.45	78.38	64.94	45.41	3.22	100.00	37.00
D62B	GT	18.18	78.59	67.59	51.67	3.09	17.00	2.89
2480B	GT	17.43	75.87	64.46	57.98	2.35	91.00	15.47
红 410B	GT	20.70	71.50	64.54	53.92	2.56	99.00	36.63
佳禾 7 号	TT	12.14	72.96	62.97	13.12	3.55	19.00	32.30
R725-1	TT	12.49	78.3	67.83	60.07	2.35	69.00	51.06
R207m	TT	15.53	77.23	66.83	64.13	2.58	8.00	2.68
航恢 1 号	TT	14.28	77.73	66.07	60.93	2.46	45.00	3.87
辐培 758	TT	15.71	77.47	68.53	36.40	2.42	13.00	2.16
黄丝占	TT	12.84	78.10	68.83	63.73	2.61	11.00	3.19
明恢 63	TT	12.13	76.23	65.80	54.27	2.53	21.00	6.62
辐恢 838	TT	12.31	78.67	67.83	61.93	2.27	36.00	17.10
明 6547	TT	15.53	79.07	67.90	40.50	2.54	17.00	7.40
黄晴	TT	12.49	70.43	57.73	24.37	3.15	1.00	0.10
扬稻 6 号	TT	13.56	76.80	66.87	60.83	2.60	25.00	10.25
IR24	TT	12.66	76.70	65.20	53.27	2.62	13.00	8.26
成恢 047	TT	14.99	73.77	66.47	49.87	3.06	2.00	0.06
多选 1 号	TT	19.65	78.23	66.33	62.53	2.51	84.00	32.76
泰引 1 号	TT	9.26	77.17	68.60	54.13	2.68	2.00	0.15
R725	TT	12.49	78.30	67.83	60.07	2.35	9.00	1.00
R725m	TT	10.87	75.23	65.80	44.30	2.48	17.00	4.69
R527	TT	15.17	78.30	61.97	33.90	2.80	22.00	2.53
美香占	TT	13.74	79.47	70.37	59.47	2.48	14.00	7.56
7582 多	TT	13.20	77.07	66.80	11.23	2.67	66.00	27.72
达恢	TT	16.43	79.47	62.17	32.60	2.78	22.00	7.11
明 6547	TT	15.53	79.07	67.90	40.50	2.54	17.00	7.40
泸恢 177	TT	13.92	80.33	70.80	66.23	2.43	38.00	1.00
多泰 7582 变	TT	14.46	77.07	66.80	11.23	2.67	66.00	27.72

241-249.

[9] Bligh H, Till R I, Jones C A. A microsatellite sequence closely linked to the *Waxy* gene of *Oryza sativa* [J]. *Euphytica*, 1995, 86(2): 83-85.

[10] 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 germ plasm [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, 94(6/7): 773-781.

[11] 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 [J]. *中国水稻科学*, 2005, 19(3): 285-287.

[12] 万映秀, 邓其明, 王世全, 等. 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 [J]. *中国水稻科学*, 2006, 20(6): 603-609.

[13] 张娅丽, 许明辉, 曾亚文, 等. 云南地方稻种 *Wx* 基因第一内含子供体 +1 位碱基变异与直链淀粉含量的关系 [J]. *中国水稻科学*, 2007, 21(1): 20-24.

[14] Cai X L, Wang Z Y, Xing Y Y, et al. Aberrant splicing of intron 1 leads to the heterogeneous 5' UTR and decreased expression of *waxy* gene in rice cultivars of intermediate amylose content [J]. *The Plant Journal*, 1998, 14(4): 459-465.

[15] 栾 丽, 陈 英, 王 兴, 等. 同源四倍体水稻釉质突变体 *Wx* 基因序列分析及特异识别分子标记的建立 [J]. *遗传*, 2008, 30(2): 209-216.

[16] Hirano H Y, Eiguchi M, Sano Y. A single base change altered the regulation of the *Waxy* gene at the posttranscriptional level during the domestication of rice [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1998, 15(8): 978-987.

[17] Wang Z Y, Zheng F Q, Shen G Z, et al. The amylose content in rice endosperm is related to the posttranscriptional regulation of the *Waxy* gene [J]. *Plant Journal*, 1995, 7(4): 613-622.

[18] 稻米直链淀粉含量的测定常规方法: ISO/TC 34 ISO 6647-2-2007 [S]. 2007.