

2个低直链淀粉含量籼稻突变体的遗传分析

郭涛¹, 韦璇¹, 王慧¹, 刘永柱¹, 周伟坚², 张建国¹, 陈志强¹

(1 华南农业大学植物航天育种研究中心, 广东 广州 510642; 2 华南农业大学食品学院, 广东 广州 510642)

摘要:对2个空间诱变低直链淀粉含量籼稻突变体 XLA-1 和 XLA-2 进行了遗传分析和分子生物学研究. 结果表明: XLA-1 低直链淀粉遗传特性受2对隐性基因控制, 这2对基因具有连锁关系和互补作用, 任何1对基因隐性纯合都将导致直链淀粉含量降低; XLA-2 低直链淀粉遗传特性受1对隐性主效基因控制, 该基因可能为 Wx 的等位基因, 同时受微效基因的修饰. XLA-1 和 XLA-2 蜡质基因 (CT)_n 微卫星多态性与糯稻相同, 但其直链淀粉质量分数分别为 14.42% 和 11.59%, 说明除 Wx 基因外确实还有其他影响直链淀粉含量的遗传因素, 这与遗传分析结果相符.

关键词:水稻; 空间诱变; 低直链淀粉突变体; 遗传分析

中图分类号: S335

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2009)01-0010-04

Genetic Analysis of Low Amylose Content Trait in Two *Oryza indica* Mutants

GUO Tao¹, WEI Xuan¹, WANG Hui¹, LIU Yong-zhu¹,
ZHOU Wei-jian², ZHANG Jian-guo¹, CHEN Zhi-qiang¹

(1 Plant Space Breeding Research Center, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Series of experiments of genetic analysis were carried out in this paper. The main results obtained as follows: (1) The low amylose content trait in XLA-1 was controlled by two recessive linked genes. The two genes had complementary interaction and any homozygous gene can reduce the amylose content. In these two genes, one was possibly a multiple allele to Wx gene and another gene maybe a new mutant gene. (2) One major recessive gene and several minor genes controlled the low amylose content trait in XLA-2. This gene maybe a multiple allele to Wx gene. (3) The genomic DNA polymorphism analysis with the (CT)_n microsatellite marker 484/485 of Wx gene indicated that the genomic DNA polymorphism had no difference among XLA-1, XLA-2 and Jingxiangnuo (glutinous rice), but the amylose content of XLA-1, XLA-2 were 14.42% and 11.59%, respectively. The results showed that there were other genetic factors which could affect the amylose content. The result coincided with the genetic analysis.

Key words: rice; space mutation; low amylose content mutants; genetic analysis

水稻是我国第一大粮食作物, 其总产量与播种面积分别居世界第1、2位^[1]. 随着我国种植业结构的调整 and 消费观念的改变, 水稻生产已由数量型向

质量型转化, 但是目前大面积种植的大多数籼稻品种的米质仍然不够理想. 蒸煮品质差, 尤其是直链淀粉含量过高已成为制约优质籼稻发展的关键因

收稿日期: 2008-09-20

作者简介: 郭涛(1978—), 男, 助理研究员, 硕士; 通讯作者: 陈志强(1956—), 男, 教授, E-mail: chenlin@scau.edu.cn

基金项目: 国家863计划项目(2007AA100101); 国家自然科学基金(307711313); “十一五”国家科技支撑计划重点项目(2008BAD97B02); 广东省科技计划项目(2004A20107001, 2006A20202006, 2007A020400003); 广东省自然科学基金(010353, 05006656)

素^[2]. 要改良水稻直链淀粉含量,除了传统的育种手段外,优异种质资源的发掘、创新和利用相当重要,利用低直链淀粉突变种质是改良稻米食味品质的有效途径之一,空间诱变在水稻品质改良方面表现出一定的应用价值^[3,4]. 已有的资料表明,目前已发现的20多种低直链淀粉水稻突变体中有11种是与Wx基因非等位的突变基因^[5]. 但这些突变体大多来源于粳稻,有关籼稻低直链淀粉突变体的研究报道较少. 本研究对籼稻“籼小占”经空间诱变筛选出的2个低直链淀粉含量突变体XLA-1、XLA-2进行了遗传分析,旨在阐明其低直链淀粉特性遗传机理,并探讨其在水稻品质改良上的可行性.

1 材料与方 法

1.1 试验材料

籼粘稻品种:籼小占和华航一号,籼糯稻品种:荆香糯. 直链淀粉质量分数分别为25.31%、24.77%和3.22%(数据来源于2007年早造),均由华南农业大学农学院提供.

籼小占种子1000粒于2003年10月搭载返回式卫星,2004年早造种植诱变一代(SP₁),2004年晚造种植诱变二代(SP₂),从SP₂中选择出2个低直链淀粉突变体XLA-1和XLA-2. 经多代的观察测定,XLA-1和XLA-2突变性状均稳定遗传. XLA-1和XLA-2的直链淀粉质量分数分别为14.42%和11.59%(数据来源2007年早造).

1.2 低直链淀粉性状遗传分析方法

2007年早季分别配制XLA-1、XLA-2与华航一号、籼小占、荆香糯F₁杂交组合,2007年晚造种植上述杂交组合,成熟收获并储藏3个月后,对F₁自交得到的F₂籽粒直链淀粉含量利用单粒法测定(测定于2008年2月在华南农业大学农学院进行),分析XLA-1和XLA-2低直链淀粉含量突变基因的显隐性及对数.

单粒法测定:将单粒稻米制成粉末,称质量(*m*),放入25 mL容量瓶,加0.25 mL $\rho = 95\%$ 酒精使其分散,2.25 mL 1 mol/L NaOH煮沸10 min,定容,吸取1.25 mL样品溶液移入另一25 mL容量瓶(同时移取1.25 mL 9×10^{-2} mol/L NaOH作为空白对照),加0.25 mL 1 mol/L乙酸、0.375 mL碘液,定容,20 min后用分光光度计测定620 nm下吸光值($D_{620\text{ nm}}$). 单粒法标准曲线绘制:称取标样0.01 g,用上述方法与待测样品进行测定,以标样直链淀粉质量分数为纵坐标,以相对应的吸光值为横坐标,绘制标准曲线. 用换算后的值 $D(D = D_{620\text{ nm}} \times 0.01/m)$

代入标准方程计算直链淀粉质量分数.

1.3 XLA-1、XLA-2 蜡质基因(CT)n 微卫星多态性分析

水稻DNA的提取参照McCouch等^[6]和王慧等^[7]的方法稍加修改.

采用Bligh等^[8]根据Wx基因核苷酸序列中位于前导内含子剪切点上游55 bp处的一段(CT)n微卫星序列设计的引物484/485,其核苷酸序列分别为3'CTTTGTCTATCTCAAGACAC 5'和3'TTGCAGATTCTTCCTGATA 5'. 20 μL PCR反应体系中含有: 1.5×10^{-7} mol/L的引物, 1×10^{-4} mol/L dNTPs, 1 \times PCR Buffer (5×10^{-2} mol/L Tris-HCl pH 8.3, 1.5×10^{-3} mol/L MgCl₂, 0.1 g/L明胶, 20~50 ng的模板DNA, 1 U的Taq DNA聚合酶. 反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min, 35个循环(94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min), 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸5 min. 扩增产物在60 g/L的聚丙烯酰胺凝胶中电泳后,蒸馏水中洗胶2次,每次约1 min,再用1 g/L AgNO₃溶液染色10 min,蒸馏水中同样洗胶2次,1 \times 显影液中摇动显影后观察分析.

2 结果与分析

2.1 XLA-1、XLA-2 与各亲本杂交F₁的遗传分析

2007年早季,分别配制了XLA-1、XLA-2与籼小占、华航一号、荆香糯的杂交组合,各杂交组合F₁代籽粒(测定群体为20粒)及对应亲本的直链淀粉质量分数见表1. 从表1可以看出,XLA-1、XLA-2与具有高直链淀粉质量分数的华航一号、籼小占杂交得到的F₁代籽粒直链淀粉质量分数居于双亲之间,其籽粒的直链淀粉质量分数平均值显著超过突变体,说明高直链淀粉质量分数对低直链淀粉质量分数表现不完全显性,控制XLA-1和XLA-2低直链淀粉质量分数的突变基因属于隐性基因. XLA-1、XLA-2与糯稻杂交其F₁籽粒均为半透明特性,表明控制XLA-1、XLA-2低直链淀粉质量分数的突变基因并不是糯质基因.

表1 各组合F₁代及亲本直链淀粉含量表现值
Tab.1 The amylose content of F₁ and its parents

组合	$w_{\text{直链淀粉}}/\%$				
	♀	♂	F ₁	MP ¹⁾	F ₁ -MP
XLA-1/籼小占	14.42±0.13	25.31±0.11	23.58±0.17	19.87	3.71
XLA-1/华航一号	14.42±0.13	24.77±0.11	20.60±0.20	19.60	1.00
XLA-1/荆香糯	14.42±0.13	3.22±0.98	8.56±0.18	8.82	-0.26
XLA-2/籼小占	11.59±0.13	25.31±0.11	18.59±0.11	18.45	0.14
XLA-2/华航一号	11.59±0.13	24.77±0.11	19.92±0.10	18.18	1.74
XLA-2/荆香糯	11.59±0.13	3.22±0.98	9.68±0.16	7.41	2.27

1) MP为双亲的直链淀粉质量分数平均值

2.2 XLA-1、XLA-2 与各亲本杂交组合 F₂ 代籽粒群体的遗传分析

2.2.1 XLA-1、XLA-2 与高直链淀粉亲本杂交组合 F₂ 代籽粒群体的遗传分析 XLA-1、XLA-2 与籼小占、华航一号杂交组合 F₂ 籽粒群体(测定群体为 250 粒)直链淀粉分离情况见表 2. 由表 2 可以看出, XLA-1 与籼小占、华航一号杂交的 F₂ 代籽粒群体直链淀粉含量出现了明显的双峰分离. 卡平方测验表明, 其 F₂ 籽粒群体的直链淀粉含量分离比例均不符合 1 对基因 3:1 遗传分离模式, 也不符合 2 对基因自由分离的模式. 初步推断 XLA-1 低直链淀粉遗传特性受 2 对连锁隐性基因控制. XLA-2 与籼小占、华航一号杂交的 F₂ 代籽粒群体直链淀粉含量出现了明显的双峰分离. 卡平方测验表明, 其 F₂ 籽粒群体的直链淀粉含量分离比例均符合 1 对基因 3:1 遗传分离模式. 初步推断 XLA-2 低直链淀粉遗传特性受 1 对隐性主效基因控制.

表 2 F₂ 代籽粒群体的直链淀粉含量分离模式分析¹⁾

Tab.2 Genetic mode in F₂ seeds generation

组合	AC 分组/株		实际比例	χ^2
	高	低		
XLA-1 × 籼小占	135	72	1.88:1	10.56
XLA-1 × 华航一号	115	58	1.98:1	6.71
XLA-2 × 籼小占	154	47	3.28:1	0.28
XLA-2 × 华航一号	152	57	2.67:1	0.56

1) 理论比例为 3:1, $\chi_{0.05}^2 = 3.84$, AC 表示直链淀粉质量分数

2.2.2 XLA-1、XLA-2 与糯稻亲本杂交组合 F₂ 代籽粒群体的遗传分析 由图 1 看出, XLA-1、XLA-2 与荆香糯杂交 F₂ 代籽粒的直链淀粉含量除分离出糯性及极低直链淀粉含量籽粒外, 还有许多介于双亲之间及超亲的高直链淀粉含量籽粒. 在 202 粒 (XLA-1 × 荆香糯) F₂ 代籽粒中, 非糯粒与糯粒的比例为 2.81:1, 通过卡平方测验符合 3:1 的理论比例. 选取 532 粒 (XLA-2 × 荆香糯) F₂ 代籽粒考察胚乳外观, 发现非糯粒与糯粒的比例为 2.55:1, 卡平方测验符合 3:1 的理论比例. 初步推测 XLA-1 低直链淀粉遗传特性受 2 对隐性基因决定, 它们具有连锁和互补关系, 其中 1 对为 *Wx* 的等位基因, 另 1 对与 *Wx* 不等位.

2.3 XLA-1、XLA-2 蜡质基因 (CT) n 微卫星多态性分析

利用微卫星引物 484/485 对荆香糯、华航一号、

原种、XLA-1 和 XLA-2 扩增, 结果见图 2. 由图 2 可知, 荆香糯、XLA-1 和 XLA-2 具有相同的带型, 而华航一号和籼小占具有相同的带型, 这 2 种带型存在扩增片段长度的差异.

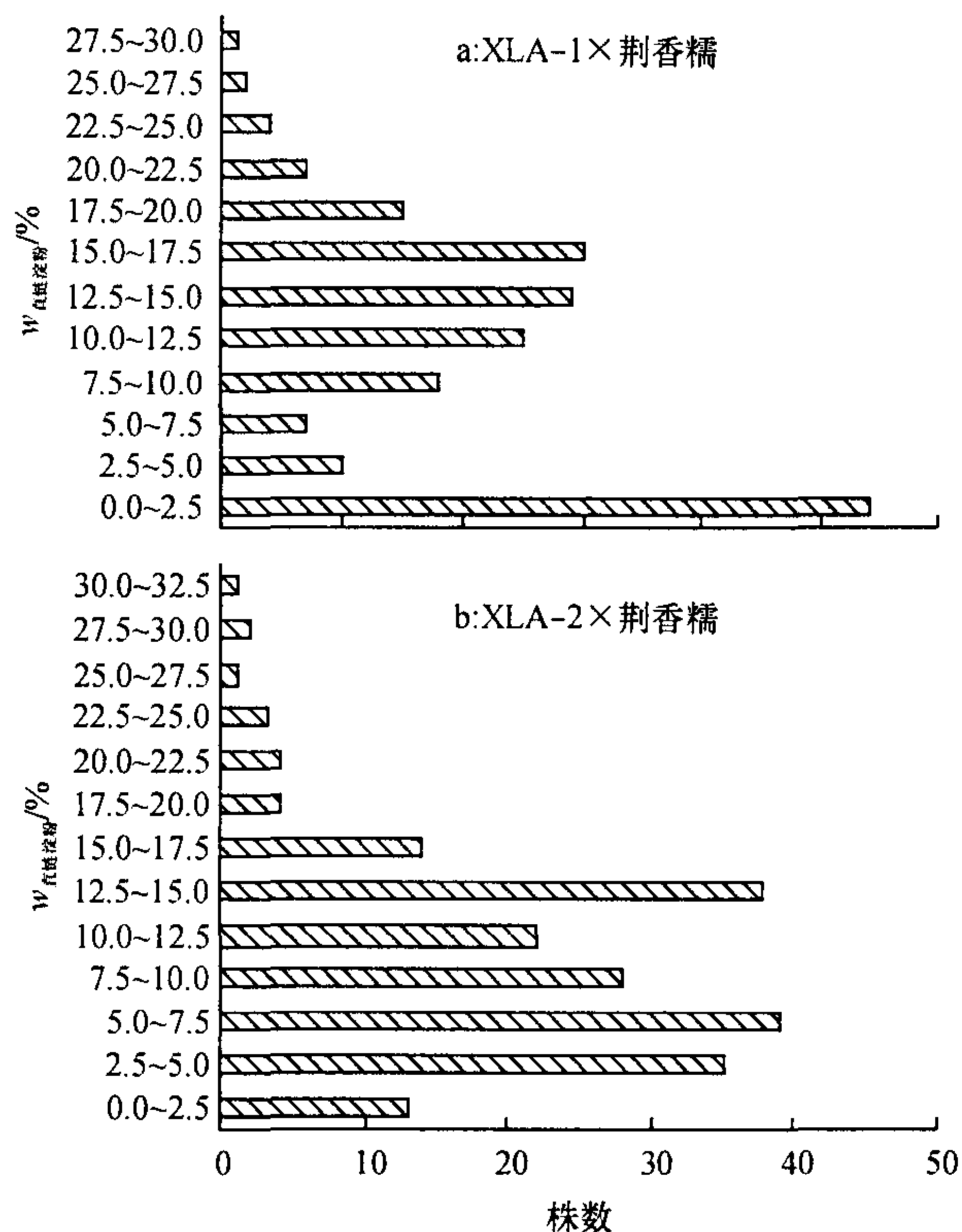
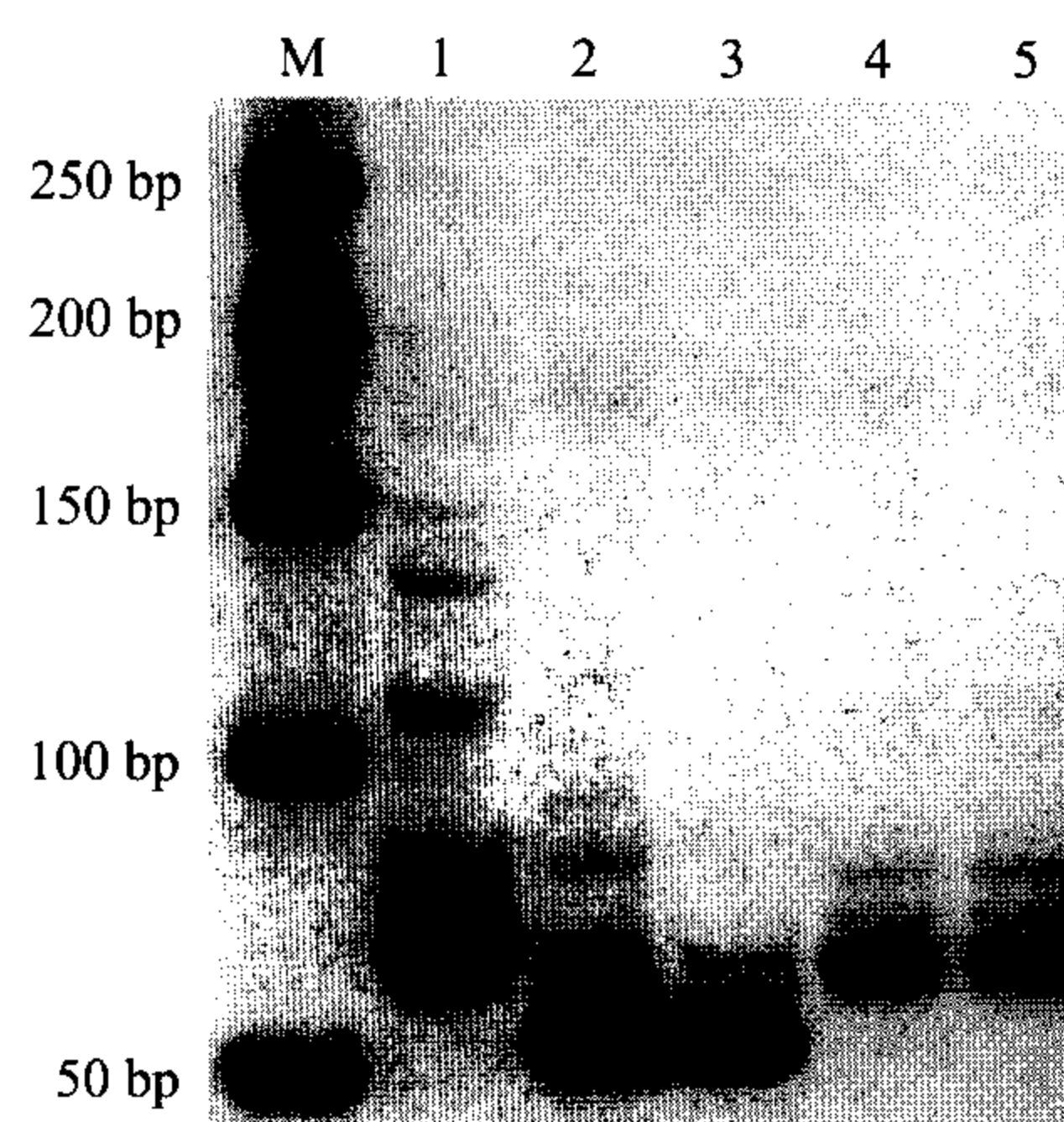


图 1 F₂ 代籽粒群体的直链淀粉含量分离情况

Fig.1 Segregation of amylase content in F₂ seeds population



M: Marker; 1: 荆香糯; 2: 华航一号; 3: 籼小占; 4: XLA-1; 5: XLA-2

图 2 微卫星引物 484/485 的多态性表现

Fig.2 The DNA polymorphism of SSR marker 484/485

3 讨论

根据与 *Wx* 基因等位性关系的不同, 可将目前已报道的低直链淀粉含量水稻突变体的基因分为与 *Wx* 等位和非等位 2 大类. 其中, *Wx^{ma}*, *Wx^{op}* 等属于与 *Wx* 等位的低直链淀粉含量基因^[9-10], 而 *dull*, *lam(t)*

等属于与 Wx 非等位的基因^[11]。 *dull* 突变体与正常型品种杂交, F_2 代非 *dull* 粒与 *dull* 粒呈 3:1 分离, 回交 1 代呈 1:1 分离; 与糯性突变体杂交, 除分离出糯性及低直链淀粉含量籽粒外, F_2 代还有许多介于两亲之间及超亲的高直链淀粉含量籽粒, 表明这些 *dull* 突变体的低直链淀粉含量是由 1 个独立于 Wx 的隐性单基因 *dull* 控制^[12]。

本研究中, XLA-1 与高直链淀粉亲本杂交的 F_2 代籽粒直链淀粉出现了高低分离, 且分离比例不符合 3:1 的分离模式。初步推测 XLA-1 低直链淀粉遗传特性受 2 对隐性基因控制, 它们具有连锁关系和互补作用, 这 2 对基因 1 对可能为 Wx 的等位基因, 另 1 对可能是与 Wx 不等位的基因, 两者均控制直链淀粉合成过程中的某一环节, 任何 1 对基因隐性纯合都将导致直链淀粉含量降低。进一步的分析表明, XLA-1 与糯稻的杂交后代出现了许多介于双亲之间及超亲的高直链淀粉含量籽粒, 初步证明另 1 对突变基因为非 Wx 的基因位点。

XLA-2 与高直链淀粉亲本杂交, 其 F_2 代籽粒直链淀粉出现了高低分离, 分离比例符合 1 对基因 3:1 的分离模式; XLA-2 与糯稻杂交后代直链淀粉也出现了分离, 且非糯粒与糯粒的比例符合 3:1 分离模式, 初步表明 XLA-2 低直链淀粉遗传特性受 1 对隐性主效基因控制, 且该基因可能为 Wx 的等位基因, 同时受微效基因的修饰。何予卿等^[13]的研究表明, 由于微效基因的分离导致糯稻与非糯稻的杂交后代出现超亲类型籽粒, 本研究中 XLA-2 与糯稻杂交后代也出现类似情况。

已有的研究表明, Wx 基因前导内含子剪切点上游的 1 段 (CT)_n 微卫星多态性可解释非糯品种中 82.9% 的直链淀粉含量变异, (CT)_n 重复次数的多少同直链淀粉含量具有高度相关性^[14]。本研究利用特异引物 484/485 的分析结果也表明, 高直链淀粉亲本 (CT)_n 重复次数较少, 而低直链淀粉材料及糯稻 (CT)_n 重复次数较多。2 个突变材料 XLA-1 和 XLA-2 (CT)_n 带型同糯稻相同, 但其直链淀粉质量分数分别为 14.42% 和 11.59%, 远高于糯稻的直链淀粉质量分数, 说明还有其他影响直链淀粉含量的遗传因素。XLA-1 和 XLA-2 低直链淀粉性状均受隐性主效基因控制, 在改良高直链淀粉材料的育种实践中具有一定的价值, 进一步的基因定位工作还在进行中。

参考文献:

- [1] 沈镇昭, 梁书升. 中国农业年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2006: 30-39.
- [2] 胡培松, 翟虎渠, 万建民, 等. 中国水稻生产新特点与稻米品质改良[J]. 中国农业科技导报, 2002, 4(4): 33-39.
- [3] 郭涛, 蔡金祥, 王慧, 等. 水稻空间诱变 SP₂ 代品质性状变异分析[J]. 华南农业大学学报, 2007, 28(1): 6-9.
- [4] 王慧, 陈志强, 张建国, 等. 优质高抗水稻新品种华航丝苗的选育[J]. 广东农业科学, 2006(9): 43-44.
- [5] 朱昌兰, 沈文飏, 翟虎渠, 等. 水稻低直链淀粉含量基因育种利用的研究进展[J]. 中国农业科学, 2004, 37(2): 157-162.
- [6] McCOUCH S R, CHEN X, PANAUD O, et al. Microsatellite marker development mapping and applications in rice genetics and breeding[J]. Plant Mol Biol, 1997, 35(1-2): 89-99.
- [7] 王慧, 张书涛, 郭涛, 等. 籼型矮秆突变体 CHA-2 的矮生性状遗传分析及基因初步定位[J]. 分子植物育种, 2006, 4(6S): 1-6.
- [8] BLIGH H F, TILL R L, JONES C A. A micro satellite sequence closely linked to the *waxy* gene of *Oryza sativa* [J]. Euphytica, 1995, 86: 83-85.
- [9] SATO H, SUZUKI Y, OKUMO K. Genetic analysis of low-amylose content in a rice variety "Milky queen" [J]. Breeding Research, 2001, 3: 13-19.
- [10] MIKAMI I, AIKAWA M, HIRANO H Y, et al. Altered tissue-specific expression at the Wx gene of opaque mutants in rice [J]. Euphytica, 1999, 105: 91-97.
- [11] SATO H. Genetics and breeding of high eating quality rice, status and perspectives on the researches of low amylose content rice [J]. Japan Agriculture and Horticulture, 2002, 77(5): 20-28.
- [12] 赵国珍, 刘吉新. 粳稻低直链淀粉 *dull* 基因的遗传分析[J]. 西南农业学报, 1998, 11(3): 1-4.
- [13] 何予卿, 吕志仁. 籼稻米直链淀粉含量的遗传及其基因剂量效应[J]. 华中农业大学学报, 1993, 12(5): 414-420.
- [14] ARYES N M, MCCLUNG A M, LARKIN P D, et al. Microsatellites and a single nucleotide polymorphism differentiate apparent amylase classes in an extend pedigree of US rice germplasm [J]. Theor Appl Genet, 1997, 94: 773-781.

【责任编辑 周志红】