

分子标记辅助选择降低籼稻 057 的直链淀粉含量

张士陆^{1,3,4} 倪大虎¹ 易成新¹ 李莉¹ 汪秀峰¹ 王宗阳² 杨剑波^{1,*}

(¹安徽省农业科学院 水稻研究所, 安徽 合肥 230031; ²中国科学院 上海植物生理生态研究所, 上海 200032; ³安徽农业大学 农学系, 安徽 合肥 230036; ⁴安庆市农业科学研究所, 安徽 安庆 246007; *通讯联系人, E-mail: yjianbo@mail.ah.hf.cn)

Reducing Amylose Content of Indica Rice Variety 057 by Molecular Marker-Assisted Selection

ZHANG Shi-lu^{1,3,4}, NI Da-hu¹, YI Cheng-xin¹, LI Li¹, WANG Xiu-feng¹, WANG Zong-yang², YANG Jian-bo^{1,*}

(¹Rice Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China; ²Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China; ³Department of Agronomy, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; ⁴Anqing Institute of Agricultural Sciences, Anqing 246007, China; *Corresponding author, E-mail: yjianbo@mail.ah.hf.cn)

Abstract: To lower the high amylose content (AC) of an elite indica rice restorer line 057, four indica varieties (R367, 91499, Yanhui 559 and Hui 527) with low amylose content were used as donor and backcrossed with recurrent parent 057 respectively, and their backcrosses were identified using a molecular marker (PCR-*A_{cc}*). There existed significant differences in AC among three *W_x* genotypes (GG, TT, GT). Amylose contents in rice grain were more than 20% in GG genotype, 17.71% to 28.48% in GT genotype and less than 18% in TT genotype. It was suggested that the PCR-*A_{cc}* molecular marker-assisted selection for AC of rice grain was usable and reliable, and the AC of 057 had been lowered successfully.

Key words: molecular marker-assisted selection; indica rice; amylose content; breeding; grain quality

摘要: 以 4 种低直链淀粉含量(AC)的籼稻品种(R367、91499、盐恢 559、恢 527)作优质基因的供体,以产量配合力较强的三系籼稻恢复系 057 为受体轮回亲本,对高 AC 值的 057 进行回交改良。在回交改良中利用分子标记对控制 AC 值的基因型进行选择,并对分子标记鉴定的 *W_x* 基因 3 种表达类型(GG、TT、GT)植株稻米的 AC 值进行测定分析。结果显示,GG 型植株的稻米 AC 值高于 20%;GT 型的变化较大,为 17.71%~28.48%;TT 型的小于 18%。经最小显著差数法(LSR)检验,3 种基因型间 AC 差异达极显著水平。表明这种分子标记对稻米 AC 值的辅助选择是可靠有效的。通过分子标记辅助选择有效降低了 057 的 AC 值。

关键词: 分子标记辅助选择; 籼稻; 直链淀粉含量; 育种; 稻米品质

中图分类号: S331; S511.033

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2005)05-0467-04

近年来,水稻育种在注重产量提高的同时,更加注重品质的改良。许多研究表明水稻胚乳中直链淀粉含量在决定稻米食用品质与蒸煮加工品质上起着重要的作用,适中的直链淀粉含量是优质稻米的重要指标^[1]。育种实践表明,要获得适中直链淀粉含量(AC)的籼型杂交稻,其亲本选配原则是低 AC 值与中、高 AC 值配组或中 AC 值之间配组^[1,2]。因此,选育中、低 AC 的亲本是必要的。由于稻米 AC 值受主效基因控制并受到微效基因和环境因素的影响,用传统育种方法无法直接对主效基因进行选择,而针对其主效基因的分子标记辅助选择,可克服传统育种方法的不足,在育种早期世代直接进行基因型选择,从而提高品质育种的效率。

水稻蜡质基因(*W_x*)编码的结合在淀粉粒上的淀粉合成酶(CBSS)直接控制了水稻的 AC 值。王宗阳等^[3]成功分离到水稻的 *W_x* 基因后,又对 *W_x* 基因表达调节规律进行了研究,发现水稻的 AC 值的高低与 *W_x* 基因第 1 内含子的剪接效率关系密切^[4]。进一步研究^[5-9]揭示,蜡质基因第一内含子的剪接效率与第一内含子中 +1 位置的碱基有关,正常 *W_x* 基因第一内含子中 +1 位置为 G 碱基,其第一内含子能被有效剪接从而产生较多的蜡质基因成熟的 mRNA,使翻译成的 CBSS 量增多,相应的水稻胚乳中直链淀粉含量就会提高;若 +1 位置碱基突变为 T 碱基,第一内含子不能被有效

剪接,水稻胚乳中产生的蜡质基因成熟 mRNA 的量就减少,翻译成 CBSS 的量也变少,相应的水稻胚乳中直链淀粉含量就会下降。对 *W_x* 基因 DNA 序列分析发现正常的碱基 G 及其旁邻序列恰是 *A_{cc}* 酶的酶切位点,若突变成 T 就不能被 *A_{cc}* 酶酶切。选用适当引物对 *W_x* 基因上游的 DNA 片段进行体外聚合酶链式反应(PCR),对产物进行 *A_{cc}* 酶切,就能根据电泳条带的多态性来判别第一内含子 +1 位置的碱基是 T 还是 G。蔡秀玲等^[10]利用这种分析方法检测了来自不同地区的 63 个栽培水稻品种(系),证实了 PCR-*A_{cc}* 分子标记技术用于 AC 值辅助选择的可行性。分子标记辅助选择改良水稻品质的基础研究已有不少报道^[11-14],但在实际应用中取得成功的例子尚不多见。

籼型杂交稻协优 57 以其优势强、产量高、适应广,而深受稻农喜爱,但美中不足的是直链淀粉含量偏高,食味品质和蒸煮品质欠佳。主要原因是其父本 057 的 AC 值过高。我们使用 4 个食味佳、AC 值适中的品种作供体亲本分

收稿日期: 2004-12-08; 修改稿收到日期: 2005-03-21。

基金项目: 国家“863”计划资助项目(2004AA211163); 国家转基因植物研究与产业化开发专项(JY03-B-11); 安徽省自然科学基金资助项目(03041102)。

第一作者简介: 张士陆(1975-),男,在职硕士研究生。

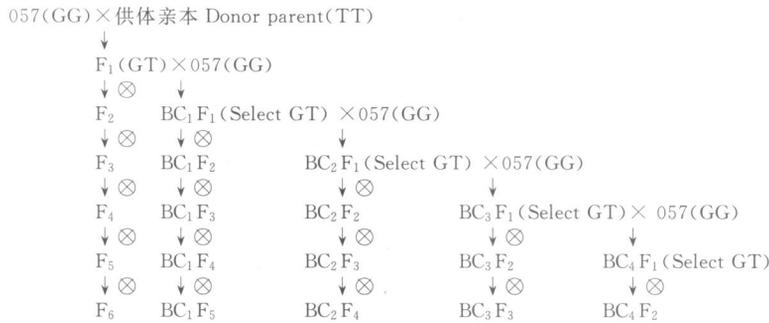


图 1 PCR-*Acc* 分子标记辅助选择回交降低 057 直链淀粉含量的流程

Fig. 1. Procedure for reducing the AC of 057 by PCR-*Acc* molecular marker-assisted selection.

别与 057 回交, 并利用 PCR-*Acc* 分子标记进行辅助选择, 初步降低了 057 的直链淀粉含量。本文报道这一研究结果。

1 材料与方法

1.1 供试材料

受体亲本为 057, 供体亲本为 91499、R367、盐恢 559、恢 527。057 是三系籼型杂交稻优良恢复系; 91499 是安徽省农业科学院水稻研究所选育的优质常规籼稻; R367 是美国的优质常规品种; 盐恢 559 是江苏省选育的优质恢复系; 恢 527 是四川省选育的优质恢复系。4 个供体亲本来自不同的地区, 具有一定的代表性。

1.2 试验方法

1.2.1 叶片总 DNA 的提取

参照卢扬江和郑康乐^[15]的方法。

1.2.2 PCR 反应及 *Acc* 酶切分析

参照蔡秀玲等^[10]的方法。上下游引物是 5'-GCTTCAC TTCTCTGCTTGTG-3' 和 5'-ATGATTTAACGAGAGTTG AA-3'。该引物可在 *Wx* 基因的上游特异扩增出包含第一内含子 +1 位碱基在内的 460 bp 的 DNA 片段, 利用 *Acc* 酶切可使含有 GG 型内含子的扩增片段产生 403 bp 和 57 bp 片段; 含有 TT 型内含子的扩增片段不能被酶切, 电泳只显示 460 bp 的条带; 而含有杂合 GT 型内含子的扩增片段能部分酶切产生 403 bp 和 460 bp 的条带, 因此可通过琼脂糖凝胶 (2%) 电泳分析进行 3 种基因型的识别检测。

1.2.3 改良 057 的流程

用 4 个供体亲本按图 1 所示分别对 057 进行回交改良, 利用 PCR-*Acc* 分子标记选择 *Wx* 基因型的 GT 型单株, 部分与 057 继续回交, 部分一直自交。文中世代均指植株的世代, 如回交 4 次自交 1 次所得种子长成的植株的世代为 BC₄F₂。试验从 2000 年正季开始并经海南岛加代, 至 2003 年正季已获得回交 6 代材料。

1.2.4 直链淀粉含量的测定

按中华人民共和国农业部部颁标准米质测定方法 NY147-88 测定 AC 值。

2 结果与分析

2.1 受体亲本 057 和供体亲本之间直链淀粉含量差异及分子标记的多态性比较

分别对 4 个供体亲本及受体亲本 057 进行 AC 值的测

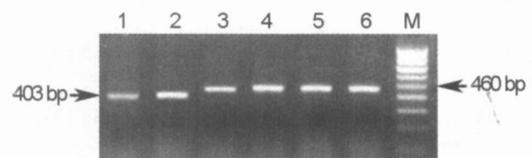


图 2 PCR-*Acc* 分子标记检测受体亲本和供体亲本

Fig. 2. PCR-*Acc* pattern of receptor and donor parent.

泳道 1 - 057; 泳道 2 - 协青早 A; 泳道 3 - R367; 泳道 4 - 91499; 泳道 5 - 恢 527; 泳道 6 - 盐恢 559; 泳道 M - Marker。

Lane 1, 057; Lane 2, Xieqingzao A; Lane 3, R367; Lane 4, 91499; Lane 5, Hui 527; Lane 6, Yanhui 559; Lane M, Marker.

定, 结果显示 057 的 AC 值高达 28.4%, 4 个供体亲本 R367、91499、盐恢 559、恢 527 的 AC 值分别为 17.66%、16.08%、14.37% 和 14.24%。PCR-*Acc* 分析表明受体亲本 057 与供体亲本之间具有多态性 (图 2)。杂交稻协优 57 的母本协青早 A 与父本 057 显示 403 bp 的条带, 表达类型为 GG 型, 而 4 个供体亲本都只出现 460 bp 的条带, 表达类型为 TT 型。由此不难看出 GG 型的 AC 值明显较 TT 型高。另外, 同为 GG 型或 TT 型其 AC 值也会因遗传背景和环境的影响等而表现一定程度的差异。

2.2 PCR-*Acc* 分子标记的辅助选择

按图 1 设定的步骤, 对 057 进行杂交和回交改良。在每次回交前用 PCR-*Acc* 分子标记检测 *Wx* 基因, 选择 GT 型单株与 057 回交 (图 1), 随着回交世代的增加, 后代的性状也越接近 057。2003 年正季, 选取株叶形态与 057 相似的各改良世代株系或单株, 用 PCR-*Acc* 分子标记统一进行 *Wx* 基因的选择, 并测定其植株所结的稻米 AC 值, 结果显示 GG 型株系或单株上的稻米 AC 值大于 20%; TT 型低于 18%, 都比亲本 057 的 AC 值低, 且出现超低亲现象, 株系中最低 AC 值只有 10.77%; GT 型的平均 AC 值为 22.40%, 但株系间变化很大。经最小显著差数法 (LSR) 检验表明 GG 型、GT 型和 TT 型间差异都达极显著水平 (表 1)。说明第一内含子 +1 位置的碱基替换直接影响了稻米的 AC 值。这进一步证明了 PCR-*Acc* 分子标记辅助选择在回交改良中应用是可靠的。

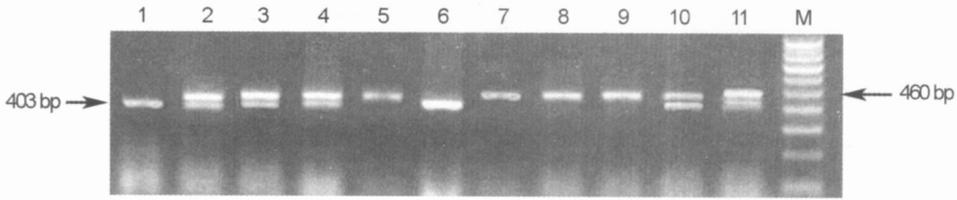


图3 PCR- Acc 分子标记检测 057 改良后代(BC₄F₂)

Fig. 3. PCR- Acc pattern of the improved generations(BC₄F₂) of 057.

泳道 5、7、8、9 为 TT 型;泳道 1、6 为 GG 型;泳道 2、3、4、10、11 为 GT 型;M 为 Marker。

Lanes 5, 7, 8 and 9, TT type; Lanes 1, 6, GG type; Lanes 2, 3, 4, 10 and 11, GT type; M, Marker.

表 1 057 改良后代 Wx 基因 3 种表达型的单株或株系的稻米 AC 值

Table 1. Comparison of AC in rice of single plant or line for the three genotypes of Wx.

基因型	株系数	平均值 ±标准差	AC 变化幅度
Genotype	Number of lines	Mean ±SD/ %	Range of AC/ %
GG	65	24.69 ±1.97 A	20.41 ~ 29.38
GT	96	22.40 ±2.41 B	17.71 ~ 28.48
TT	106	13.79 ±1.43 C	10.77 ~ 17.48

同一列数据后跟有不同字母者表示差异达 1 % 显著水平。

Data within a column followed by different letters indicate significance at 1 % level.

表 2 不同供体亲本对 057 改良的 BC₄F₂ 代 GT 型的 AC 值比较

Table 2. Comparison of AC in BC₄F₂ generation with GT derived from different donors backcrossed with 057 respectively.

供体亲本	株系数 ¹⁾	平均值 ±标准差 ²⁾
Donor parent	Number of lines ¹⁾	Mean ±SD ^{2)/ %}
R367	14	24.81 ±2.16 aA
91499	14	23.74 ±1.89 aAB
盐恢 559 Yanhui 559	5	23.66 ±0.40 aAB
恢 527 Hui 527	4	21.78 ±0.85 bB

¹⁾ 分子标记检测到含有 GT 型单株的株系数总数。

²⁾ 同一列数据后跟有相同大、小写字母者分别表示差异未达 1 % 和 5 % 显著水平。

¹⁾ The number of lines with GT type identified by the molecular marker.

²⁾ Data within a column followed by the same capital and lower-case letters indicated no significant difference at 1 % and 5 % levels, respectively.

2.3 遗传背景对直链淀粉含量的影响

2.3.1 供体亲本的遗传背景对 GT 基因型的植株稻米直链淀粉含量的影响

在 057 回交改良的后代中, 统一选取 BC₄F₂ 代 GT 型植株, 收获其籽实进行稻米的 AC 值测定, 比较不同供体亲本的遗传背景对植株的稻米 AC 值的影响(表 2), 可看出 BC₄F₂ 代植株上所结的稻米 AC 均值大小表现出与供体亲本 AC 值相同的变化趋势, 供体亲本 AC 值差异越大(如 R367 与 527), 它们改良的后代平均 AC 值差异也就越大。这表明 057 遗传组基本相同(同为回交 4 代)的情况下, 各供体亲本的遗传背景对 AC 值表现有一定的影响, 即供体亲本 AC 值越高改良后代的 AC 值也就相对越高, 反之也是一样。这

种影响在 BC₄F₂ 代 TT 型植株中也显示出来(表 3)。这表明要获得适中的 AC 值, 供体亲本的选择是很重要的。同时也说明微效修饰基因的存在。

2.3.2 受体亲本的遗传背景对 TT 基因型植株上的稻米直链淀粉含量的影响

在 4 个品种同步改良 057 所得后代群体中, 通过对不同世代 TT 型植株的稻米 AC 值测定(表 3)可以看出, 一些供体亲本(如 R367 和恢 527)的回交后代随着回交世代的增加, 轮回亲本 057 的遗传组分不断增多, 057 背景对回交后代 AC 值的影响逐渐增强, AC 值呈逐渐增高趋势。而在另一些供体亲本(如 91499)的回交后代中, 这种趋势则不太明显。尽管轮回亲本 057 对不同供体后代和不同世代的 AC 值的影响有程度上的差异, 但随着世代的进程逐步趋于稳定。从表 3 的 AC 值的变异系数看出, 在较低的回交世代(BC₁F₅ 和 BC₂F₄)中, 大部分供体亲本对 057 改良的后代各株系间的变异系数较大, 而在较高的回交世代变异系数则相对较小。说明在低回交世代, 基因互作效应较明显。这表明在回交育种中, 要获得 AC 值较稳定的株系, 需要一定的回交次数。

3 讨论

针对直链淀粉含量的品种改良, 传统的方法是对收获的种子进行 AC 值的测定, 用时长, 效率低, 易受环境条件的影响。分子标记技术为实现对基因型的直接选择提供了可能, PCR- Acc 分子标记与控制直链淀粉含量的基因型直接相关。因此我们能够借助这种分子标记对目标性状的基因型进行选择。本试验采用不同的亲本对 057 进行回交改良, 在回交后代利用 PCR- Acc 分子标记技术选择基因型, 结合直链淀粉含量测定进行验证, 收到了很好的改良效果, 获得一批农艺性状与 057 相似且 AC 值得到改良的稳定株系, 显示

表 3 不同品种改良 057 的部分世代 TT 型的 AC 值统计

供体亲本 Donor parent	BC ₁ F ₃	BC ₂ F ₂	BC ₂ F ₄	BC ₃ F ₂	BC ₃ F ₃	BC ₄ F ₂	%
R367	13.11 ±0.77	-	13.43 ±1.70	14.71 ±0.17	15.31 ±1.43	15.59 ±1.47	
91499	14.11 ±1.68	-	-	14.33 ±0.86	13.72 ±0.43	14.60 ±0.87	
盐恢 559 Yanhui 559	12.99 ±1.26	15.89 ±0.52	15.12 ±0.68	15.67 ±1.87	13.81 ±0.91	14.52 ±0.48	
恢 527 Hui 527	12.16 ±1.77	13.43 ±1.35	13.67 ±1.37	-	13.86 ±1.27	13.91 ±0.97	

了该方法的可靠性和先进性。

在利用低 AC 值供体亲本对 057 回交改良的后代中,所有 TT 型植株的 AC 值都比 057 低(表 3)。而且部分 TT 型株系出现超低亲,表 1 也显示部分 GG 型株系 AC 值出现超高亲现象,这与戚华雄等^[16]的结果相似。另外,在整个 AC 值回交改良的进程中,供体和受体的遗传背景都不同程度地对 AC 值的高低产生影响,这都说明了微效基因的存在。总之,AC 值变化的影响因素是复杂的,除了 *Wx* 基因组成型核苷酸序列以外,其内含子组成与结构尤其是第一内含子中 +1 位置上的碱基组成直接影响到基因表达的效率,这在本研究及先前研究中已加以证实,也有报道证实 *Wx* 基因引导序列中的微卫星 (CT)_n 的多态性变化同样影响着 *Wx* 基因的表达^[14,17]。上述都说明了 *Wx* 基因表达的复杂性以及可能导致 AC 含量的多样性变化,这都要求我们在品种 AC 值改良的实践中加以综合考虑。

参考文献:

- 张隆芬,梁敬,梁承邨. 中等直链淀粉的粳型杂交稻选配规律初步研究. 广东农业科学, 1991, (5): 10 - 12.
- 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.
- Wang Z Y, Wu Z L, Xing Y Y, et al. Nucleotide sequence of rice waxy gene. *Nucl Acids Res*, 1990, 18: 5898.
- 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.
- 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. *Plant J*, 1998, 14(4): 459 - 465.
- Bligh H F J, Larkin P D, Roach P S, et al. Use of alternate splice sites in granule-bound starch synthase mRNA from low-amylose rice varieties. *Plant Mol Biol*, 1998, 38: 407 - 415.
- Hiranto 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. *Mol Biol Evol*, 1998, 15(8): 978 - 987.

- Isshiki M, Morino K, Nakajima M, et al. 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*, 1998, 15(1): 133 - 138.
- 程世军,葛鸿飞,王宗阳,等. 在转基因水稻植株中蜡质基因第 1 内含子对基因表达影响的分析. 植物生理学报, 2001, 27(5): 381 - 386.
- 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.
- 谈移芳,张启发. 水稻蜡质基因引导区的两个 SSR 序列与直链淀粉含量的相关性. 植物学报, 2001, 43(2): 146 - 150.
- Bao J S, Corke H, Sun M, et al. Microsatellites in starch-synthesizing genes in relation to starch physicochemical properties in waxy rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 2002, 105: 898 - 905.
- Zhou P H, Tan Y F, He Y Q, et al. Simultaneous improvement for four quality traits of Zhenshan 97, an elite parent of hybrid rice, by molecular marker-assisted selection. *Theor Appl Genet*, 2003, 106: 326 - 331.
- 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.
- 卢扬江,郑康乐. 提取水稻 DNA 的一种简易方法. 中国水稻科学, 1992, 6(1): 47 - 48.
- 戚华雄,李进波,张建华,等. 水稻直链淀粉含量分子标记辅助育种. 见:万建民,马有志. 全国作物遗传育种学术研讨会论文集. 北京: 中国作物学会, 2003. 351 - 354.
- 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.