



研究报告

Research Report

水稻 Wx 基因的功能标记开发及有效性验证

高利军^{1,2}, 周萌^{1,2}, 陈仁天¹, 高汉亮¹, 颜群¹, 周维永¹, 戴高兴¹, 梁海福¹, 邓国富^{1,2}

1. 广西农业科学院, 南宁, 530007

2. 广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室, 南宁, 530007

✉ 通讯作者: dengguofu@gxaas.net; ✉ 作者

分子植物育种, 2013 年, 第 11 卷, 第 13 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2013.11.0013

本文首次以英文发表在 Rice Genomics and Genetics, 2012, Vol.3, No.10, 61-65 上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 协议对其进行授权, 用中文再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。如果读者对中文含义理解有歧义, 请以英文原文为准。

引用格式:

Gao et al., 2012, Developing and Validating the Functional Marker of Rice Waxy Gene, M-Wx, Rice Genomics and Genetics, Vol.3, No.10 61-65 (doi: 10.5376/rgg.2012.03.0010)

摘要 开发能有效跟踪水稻直链淀粉含量高低的分子标记对选育优质水稻品种有重要意义。本研究利用 Wx 基因第一内含子剪接处碱基(G/T)差异, 开发了 Wx 基因的显性功能标记 M-Wx, 通过检测 72 个水稻亲本的基因型与直链淀粉含量的关系, 以验证该功能标记 M-Wx 的有效性。结果表明, 72 个水稻亲本中, 有 43 个亲本检测到 228 bp 和 425 bp 两条带, 基因型为 TT, 其直链淀粉均小于 15.6%, 其余 29 个亲本只有 425 bp 的对照条带, 基因型为 GG, 其直链淀粉均大于 20.1%。这说明标记 M-Wx 能准确检测 Wx 基因第一内含子剪接处碱基(G/T)差异, 与 72 个亲本直链淀粉含量相关性高, 可应用于分子标记辅助选择, 改良品种, 改善米质。

关键词 水稻; 蜡质基因; 直链淀粉; 功能标记

Development of Rice Waxy Marker Gene and Its Availability Testing and Verification

Gao Lijun^{1,2}, Zhou Meng^{1,2}, Chen Rentian¹, Gao Hanliang¹, Yan Qun¹, Zhou Weiyong¹, Dai Gaoxing¹, Liang Haifu¹, Deng Guofu^{1,2}

1. Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, 530007, P.R. China

2. Guangxi Crop Improvement and Biotechnology Lab, Nanning, 530007, P.R. China

✉ Corresponding author, dengguofu@gxaas.net; ✉ Authors

Abstract To develop effective molecular marker to assist the selection of rice amylose content is a powerful strategy in breeding on high quality rice variety. In this study, a dominant functional marker Named M-Wx has been established based on the SNP that cause gene Wx function changes. 72 rice germplasm' gene-type by M-wx and amylose content were tested to verificate that M-Wx is a effective marker to assist the selection of rice amylose content. The results showed that 43 rice germplasm tested by Wx have two band containing 228 bp and 425 bp, the genotype is TT, and their amylose content were less than 15.6%. The other 29 rice germplast only have the 425 bp band, the genotype is GG, and their amylose content were more than 20.1%. So the marker M-Wx can effectively to assist the selection of the SNP that causegene Wx function changes to improve quality of rice variety.

Keywords Rice; Waxy gene; Amylose; Functional marker

收稿日期: 2013 年 01 月 11 日

接受日期: 2013 年 04 月 24 日

发表日期: 2013 年 05 月 27 日

基金项目: 本研究由广西“八桂学者”专项、“十二五”国家科技计划课题(2012AA101201-2)、国家国际科技合作项目专项(2012DF131220)、广西“十二五”科技攻关项目(20100005-2)、广西自然科学基金(2010GXNSFA013085)和广西农科院基金(201013)共同资助

研究背景

蜡质基因(waxy, Wx), 是编码直链淀粉合成的关键基因, 它通过编码淀粉粒结合淀粉合成酶来控制水稻胚乳中直链淀粉的合成, 于 1990 年成功被克隆(Wang et al., 1990)。近年来研究表明, 不同品种直链淀粉含量高低由该品种 Wx 基因第 1 内含子的剪切效率所决定(Wang et al., 1995), 而剪切效率受第 1 内含子中供体+1 位碱基是正常型的 G 还是突变型的 T 所



控制(Cai et al., 1998)。基于此原理,蔡秀玲等(2002)创立了 W_x 基因的 PCR-AccI 分子标记,该标记经 PCR 扩增后,用 AccI 酶消化,以 2%的琼脂糖凝胶电泳后,GG 基因型的 DNA 模板仅出现 403 bp 片段,TT 基因型的 DNA 模板仅有 460 bp 条带,而 GT 杂合基因型同时有 403 bp 和 460 bp 条带。利用该标记对 63 个水稻亲本进行了检测,结果表明,GG 基因型的水稻品种直链淀粉含量在 20%~32%之间,而 TT 基因型的直链淀粉含量都小于 18%。随后, Mao 等(2004)建立了能特异扩增第一内含子+1 位正常 G 碱基的一步 PCR 显性标记,但该标记在 PCR 扩增时需将退火温度提高到 67°C 以提高扩增特异性,因而其缺点是扩增要求较高,容易出现 PCR 扩增失败而造成 G 碱基检测不到的现象。

直链淀粉含量是影响稻米蒸煮和食味品质的重要因子。因此,开发出有效的 W_x 功能标记具有重要意义。而以上两种功能标记缺点显而易见,一种是需要酶切消化,因而成本较高,操作繁琐而不利于高通量的分子标记辅助育种;另一种虽然是基于 SNP 设计的显性分子标记,但退火温度较高而较难

把握,如退火温度偏低,则该位点无论是 G 或为 T 均可扩增出条带,而退火温度偏高,则很难扩增出条带。有鉴于此,本文设计了一种基于该 SNP 带阳性对照的功能标记 M- W_x ,该标记在退火温度为 55°C 时即可正常扩增,1.2%琼脂糖凝胶电泳后可检测等位碱基的差异。本研究通过检测 72 个水稻亲本基因型与直链淀粉含量的关系,来验证该功能标记 M- W_x 的有效性,从而 M- W_x 应用于直链淀粉的育种应用提供一定理论基础和实践意义。

1 结果与分析

1.1 引物设计

根据引起蜡质基因功能变化的单碱基突变,G-T 差异位置的序列设计能特异扩增突变型 T 的引物 W_xT ,并在 3'端第四个位置引入一个错配以加强特异性,在其上游和下游分别设计一条正向引物 W_xF 、下游设计一条反向引物 W_xR (表 1)。当水稻 DNA 模版在该 G-T 位置有为 TT 型或 GT 型存在时,将会扩增出 228 bp 和 428 bp 两条带,而该位置为 GG 型时,则只有 425 bp 的对照条带(图 1)。

表 1 标记 M- W_x 信息表

Table 1 Information of marker M- W_x

引物名 Primer	序列 Sequence	位置 Location	多态性 Polymorphism
W_xF	AGAGGGGAGAGAGAGAAaCG	1764537-1764556	
W_xT	CAGGAAGAACATCTGCgAGT	1764734-1764753	228bp/425bp
W_xR	CCTAACCAACATAACGAACG	1764941-1764961	

注:位置为引物序列在日本晴第 6 染色体的序列位置

Note: Location, primer sequences in Nipponbare sequence of chromosome

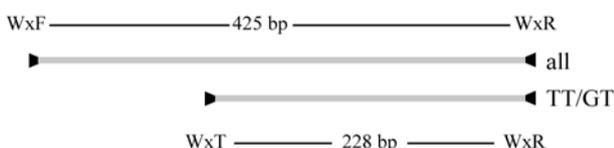


图 1 M- W_x 扩增示意图

Figure 1 Diagram of PCR amplification with primers

1.2 标记 M- W_x 在水稻亲本中的等位分布与直链淀粉的相关性

为了检验功能标记 M- W_x 检测的基因型与直链淀粉含量的相关性,我们选择了 72 份遗传稳定、 W_x 基因为纯合状态的水稻亲本。用标记

M- W_x 经 PCR 扩增,1.2%琼脂糖凝胶电泳检测后发现,72 个亲本均扩增出产物,出带率为 100%,且条带清晰(图 1; 图 2)。有 43 份水稻亲本有 228 bp 和 425 bp 两条带,基因型记为 TT,其直链淀粉均小于 15.3%,其直链淀粉的平均值为 12.5%;有 29 份水稻亲本只有 425 bp 条带,基因型记为 GG,其直链淀粉均高于 20.7%,其直链淀粉的平均值为 22.3%(表 2)。结果表明, M- W_x 检测 72 份水稻亲本的基因型与直链淀粉含量的表型完全吻合, M- W_x 检测为 TT 型的 42 份非糯性水稻亲本直链淀粉含量为 9.1%-15.3%; M- W_x 检测为 GG 型的 29 份水稻亲本直链淀粉为 20.1%~25.6%。因

此, M-Wx 能有效跟踪蜡质基因 Wx 第一内含子 5'端剪切处发生一个 G->T 的 SNP 突变, 从而成为一个有效的功能标记。从直链淀粉的检测结果

看, 蜡质基因 Wx 稻米的直链淀粉含量影响巨大, 基因型为 TT 的亲本比基因型为 GG 的亲本的直链淀粉含量平均少 9.8%。

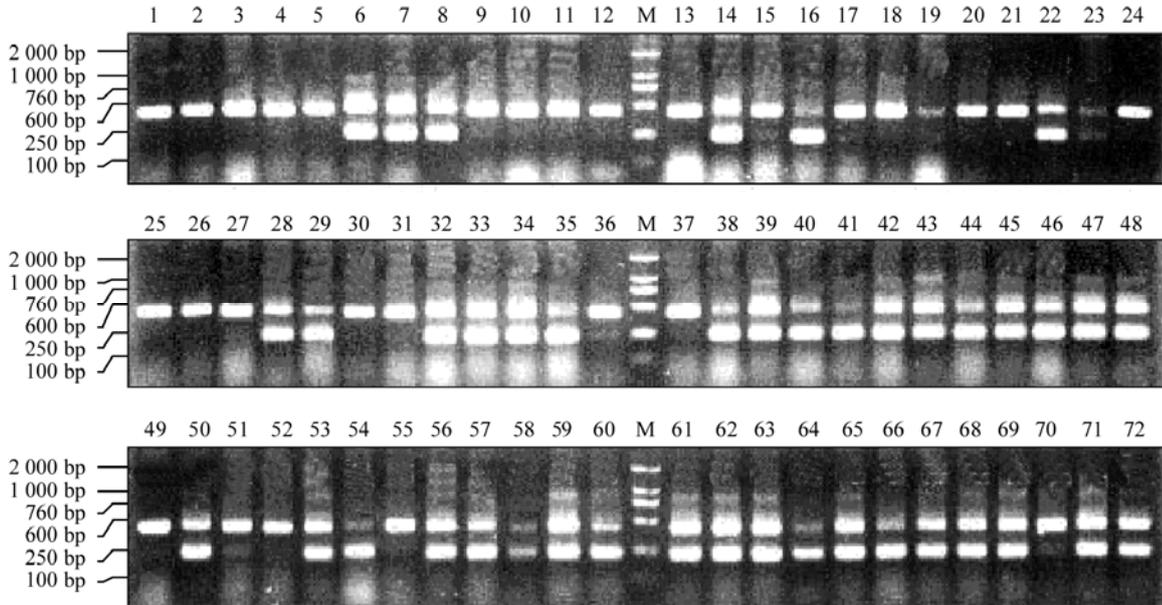


图2 标记 M-Wx 检测 72 份水稻亲本电泳图

注: M: DL2000 DNA marker

Figure 2 72 rice germplasm, using marker M-Wx tested

Note: M: DL2000 DNA marker

表 2 72 份水稻亲本直链淀粉含量及 M-Wx 检测基因型

Table 2 Gene-type by M-wx and amylose content of 72 rice germplasm

编号 No.	品名 Variety	直链淀粉含量 Content of amylose	基因型 Genotype	编号 No.	品名 Variety	直链淀粉含量 Content of amylose	基因型 of Genotype
1	枝 B Zhi B	20.1	GG	9	229B	23.2	GG
2	美 B MeiB	25.6	GG	10	福伊 B Fuyi B	21.8	GG
3	天丰 B TianfengB	23.9	GG	11	II-32B	21.7	GG
4	博 II B BoII B	22.8	GG	12	星 B Xing B	22.7	GG
5	华农 B Huanong B	20.8	GG	13	谷梅 3 号 Gumei No.3	21.8	GG
6	华育 B Huayu B	12.6	TT	14	三香 B Sanxiang B	14.7	TT
7	宜香 B Yixiang B	11.0	TT	15	特 B Te B	22.0	GG
8	粳 B Jing B	15.3	TT	16	花 I B Hua I B	11.4	TT



续表 2
Continuing table 2

编号 No.	品名 Variety	直链淀粉含量 Content of amylose	基因型 Genotype	编号 No.	品名 Variety	直链淀粉含量 Content of amylose	基因型 Genotype
17	珍汕 97B Zenshan 97 B	21.7	GG	45	F18B-3	14.4	TT
18	中九 B Zhongjiu B	21.5	GG	46	台引一号 Taiyin No.1	12.7	TT
19	优 I B You I B	20.8	GG	47	桂 99 Gui 99	13.6	TT
20	谷丰 B Gufeng B	22.4	GG	48	桂 33 Gui 33	13.3	TT
21	绮 B Qi B	21.8	GG	49	三黄占 2 号 Sanhuangzhan No.2	20.7	GG
22	红广 B Hongguang B	11.1	TT	50	测 253 Ce 253	11.6	TT
23	佳福 B Jiafu B	14.0	TT	51	泰国 18 号 Taiguo No.18	21.2	GG
24	红早糯 Hongzaonuo	1.9	TT	52	Lemont	22.0	GG
25	D702B	25.3	GG	53	9308	12.6	TT
26	907B	23.7	GG	54	测 258 Ce 258	11.7	TT
27	T98B	23.2	GG	55	1577	21.8	GG
28	粤丰 B Yuefeng B	13.2	TT	56	测 781 Ce 781	12.5	TT
29	19B	11.0	TT	57	1025	12.1	TT
30	博 B Bo B	21.4	GG	58	黄占 Huangzhan	13.0	TT
31	地谷 B Digu B	22.4	GG	59	香恢 1 号 Xianghui No.1	10.8	TT
32	中丝 2 号 Zhongsi No.2	9.2	TT	60	宇 301 Yu 301	13.9	TT
33	中丝 3 号 Zhongsi No.3	11.7	TT	61	宇 306 Yu 306	12.6	TT
34	58025B	12.8	TT	62	T-58	13.4	TT
35	粳 10 号 Xian No.10	13.2	TT	63	MY46	13.0	TT
36	秋 B Qiu B	21.3	GG	64	广恢 998 Guanghui998	11.2	TT
37	协青早 B Xiezaoqing B	23.4	GG	65	广恢 880 Guanghui880	11.6	TT
38	明恢 2155 Minghui 2155	11.8	TT	66	桂 87 Gui 87	14.6	TT
39	恢 198 Hui 198	13.0	TT	67	桂 88 Gui 88	12.2	TT
40	多系 1 号 Duoxi No.1	12.6	TT	68	桂 89 Gui89	13.9	TT
41	725	13.4	TT	69	O84	12.6	TT
42	蜀恢 527 Shuhui 527	13.5	TT	70	NN208	22.2	GG
43	辐恢 838 Fuhui 838	13.0	TT	71	明恢 63 Minghui 63	10.9	TT
44	A-12B	13.6	TT	72	明恢 86 Minghui 86	13.3	TT

2 讨论

本研究用新建立的蜡质基因的功能标记 M-Wx 对 72 份水稻材料进行了检测, 在正常 PCR 条件下扩增完成后直接进行 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳, 72 份材料均有条带, 且条带清晰, 能准确辨别亲本为 GG 型或 TT 型。相较于前人建立的两种功能标记而言, 操作简便、经济, 符合水稻育种的大批量检测。

目前主栽三系杂交稻亲本中, 三系保持系的直链淀粉偏高, 这是导致目前三系杂交稻米质差的一个因素。以蜡质基因 Wx 基因型为 TT 的三系保持系宜香 B、粤丰 B 等为材料, 利用标记 M-Wx 可以应用于选育低直链淀粉的三系保持系。本课题组将该功能标记 M-Wx 用于水稻三系不育系的育种实践, 选育了一批低直链淀粉的不育系, 其中一个不育系命名为 62A 测配杂交组合表现优异, 所配的杂交组合 62A/辐恢 838 已经通过广西区试筛选实验, 进入复试(未发表)。从本课题组的育种实践看, M-Wx 标记对检测样品出带率高, 条带清晰, 符合水稻育种的大批量检测的需求。

3 材料与方法

3.1 供试材料

供试材料是广西常用的遗传稳定的 72 份水稻亲本材料(表 2)。

3.2 水稻亲本直链淀粉的测定

供试材料于 2010 年早稻统一种植在广西农科院试验田, 成熟后收获。按国家标准(GB/T15683-1995)在广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室测定稻米直链淀粉。

3.3 水稻基因组 DNA 提取

待到 72 份水稻亲本材料插秧后 20 d, 分别取其叶片, 置于-20℃冰箱保存。基因组 DNA 的提取按 Murray 和 Thompson (1980) 的 CTAB 法进行。

3.4 PCR 扩增

PCR 反应体系采用 10 μL 的体系, 含 1.0 μL 10×Buffer, 0.2 μL dNTP, 三种引物各 0.5 μL 4 mol/L, 0.1 μL Taq 酶, 1.0 μL 模板 DNA, ddH₂O 补足 10 μL。配置反应体系的过程均在冰上操作, 待 PCR 反应温度上升到 94 时再将 PCR 板放入 PCR 仪进行扩增, 以减少引物二聚体的形成。PCR 反应程序 94℃ 5 min, 然后 35 个循环 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 45 s, 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳, GelRed 生物染剂染色, 紫外灯

下观察拍照。

作者贡献

高利军是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 周萌、陈仁天完成数据分析, 论文初稿的写作; 高汉亮、颜群和戴高兴负责稻米直链淀粉的测定; 周维永和梁海福参与实验设计, 试验结果分析; 邓国富是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。该文为全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由广西“八桂学者”专项、“十二五”国家科技计划课题(2012AA101201-2)、国家国际科技合作项目专项(2012DF131220)、广西“十二五”科技攻关项目(20100005-2)、广西自然科学基金(2010GXNSFA013085)和广西农科院基金(201013)共同资助。感谢李映照研究员为本研究提供部分水稻材料。

参考文献

- Cai X.L., Liu Q.Q., Tang S.Z., Cu M.H., and Wang Z.Y., 2002, Development of molecular marker for screening the rice cultivars with intermediate amylose content in *Oryza sativa* subsp. *indica*, *Zhiwu Shengli Yu Fenzi Shengwuxue Xuebao* (Journal of Plant Physiology and Molecular Biology), 28(2): 137-144 (蔡秀玲, 刘巧泉, 汤述翥, 顾铭洪, 王宗阳, 2002, 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, 28(2): 137-144)
- Cai X.L., Wang Z.Y., Xing Y.Y., Zhang J.L., and Hong M.M., 1998, 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.*, 14(4): 459-465
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00126.x>
PMid:9670561
- Mao X.X., Liu Y.Z., Xiao X., Chen J.W., Luo W.Y., and Li X.F., 2004, A one-step pcr method for detecting the first base of splice donor of wx intron 1 in rice, *Rice Science*, 11(5-6): 342-344
- Murray M.G., and Thompson W.F., 1980, Rapid isolation of high molecular weight plant DNA, *Nucleic Acids Res.*, 8(19): 4321-4325
<http://dx.doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>
PMid:7433111 PMCid:324241
- Wang Z.Y., Wu Z.L., Xing Y.Y., Zheng F.G., Guo X.L., Zhang W.G., and Hong M.M., 1990, Nucleotide sequence of rice waxy gene, *Nucleic Acids Res.*, 18(19): 5898
<http://dx.doi.org/10.1093/nar/18.19.5898>
PMid:2216792 PMCid:332347
- Wang Z.Y., Zheng F.Q., Shen G.Z., Gao J.P., Snustad D.P., Li M.G., Zhang J.L., and Hong M.M., 1995, The amylose content in rice endosperm is related to the post-transcriptional regulation of the waxy gene, *Plant J.*, 7(4): 613-622
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313X.1995.7040613.x>
PMid:7742858