

软米基因 *Wx-mp* 在部分粳稻品种资源中的分布

陈智慧^{1,2}, 王芳权^{1,2}, 许扬^{1,2}, 王军^{1,2}, 李文奇^{1,2}, 范方军^{1,2}, 仲维功^{1,2}, 杨杰^{1,2}

(¹江苏省农业科学院粮食作物研究所 / 国家水稻改良中心南京分中心 / 江苏省优质水稻工程技术研究中心, 南京 210014;

²扬州大学江苏省粮食作物现代产业技术协同创新中心, 扬州 225009)

摘要: 携带 *Wx-mp* 基因的水稻材料直链淀粉含量约为 10%, 其米饭柔软, 富有弹性, 深受市场欢迎。为探明该基因在水稻品种资源中的分布情况以及加快该基因利用进程, 本研究开发了该基因的功能标记, 对我国南方 243 份粳稻品种资源进行了检测, 发现 26 份品种资源携带 *Wx-mp* 基因, 其中 25 份来源于江苏品种和育种中间材料, 1 份来源于上海; 为验证标记检测的准确性, 对 26 份材料进行了重测序, 测序结果与标记检测结果完全吻合; 对 26 份材料的直链淀粉含量进行测定, 直链淀粉平均含量为 9.2%, 变异幅度 3.3%, 直链淀粉含量最低的品种为南粳 505, 含量为 7.3%, 直链淀粉含量最高的品种是南粳 46, 含量为 10.6%, 以上结果表明, 软米基因 *Wx-mp* 主要分布在江沪一带。

关键词: *Wx-mp*; 低直链淀粉含量; 水稻

The Distribution of Low Amylose Content Allele *Wx-mp* in Japonica Rice

CHEN Zhi-hui^{1,2}, WANG Fang-quan^{1,2}, XU Yang^{1,2}, WANG Jun^{1,2},

LI Wen-qi^{1,2}, FAN Fang-jun^{1,2}, ZHONG Wei-gong^{1,2}, YANG Jie^{1,2}

(¹Institute of Food Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences / Nanjing Branch of Chinese National Center for Rice Improvement / Jiangsu High Quality Rice R & D Center, Nanjing 210014; ²Jiangsu Co-Innovation Center for Modern Production Technology of Grain Crops, Yangzhou University, Yangzhou 225009)

Abstract: The rice varieties harboring *Wx-mp* genotype generally results in 10% of amylose, which brings elite eating quality (e.g soft and elastic) favored by consumers in Yangtze River Region, China. In order to identify *Wx-mp* carrying rice germplasm in future breeding, a functional marker associating to *Wx-mp* has been developed. By tests in 243 japonica rice materials collected from southern China, twenty-six germplasms were found carrying *Wx-mp* gene. Out of that, 25 varieties or breeding materials were collected from Jiangsu, the others from Shanghai. By validation using Sanger sequencing, this newly-developed marker proved 100% accuracy within 26 samples. Furthermore, the average content of amylose was 9.2%, with a range of 3.3%. The rice cultivar Nanjing 505 with the lowest amylose content was 7.3%, while cv. Nanjing 46 showed the highest amylose content of 10.6%. Thus, by deployment of the new functional marker, this study unlocked the distribution of *Wx-mp* carrying cultivars that were mainly found in Jiangsu and Shanghai.

Key words: *Wx-mp*; low amylose content; rice

收稿日期: 2018-11-21 修回日期: 2018-12-26 网络出版日期: 2019-01-18

URL: <http://www.doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20181121002>

第一作者研究方向为水稻遗传育种, E-mail: 987762831@qq.com

通信作者: 杨杰, 研究方向为水稻遗传育种, E-mail: yangjie168@aliyun.com

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFD0100403); 江苏省农业科技自主创新资金项目 [CX(18)2022]; 江苏省现代农业重点研发项目 (BE2017368)

Foundation project: The National Key Research and Development Program (2017YFD0100403), The Jiangsu Agricultural Science and Technology Innovation Fund [CX(18)2022], The Jiangsu Province Key Research and Development Program Modern Agriculture (BE2017368)

淀粉是水稻胚乳的主要营养物质,淀粉的组成与结构是决定稻米蒸煮与食味品质的重要因素。一般而言,直链淀粉含量 20% 以上的稻米食味品质较差,直链淀粉在 15%~20% 以下的食味品质较好。直链淀粉含量介于 5%~12% 的软米,由于其米饭具有软而不烂、甜润爽口、膨化性好、富有弹性、冷后不易变硬和回生程度小等优点,而具有广泛的市场^[1-2]。

水稻直链淀粉的合成由蜡质基因 *Waxy* (*Wx*) 控制,该基因的不同等位变异决定了稻米的直链淀粉含量^[3],是控制水稻蒸煮食味品质的主效基因^[4],截至目前至少有 8 个已发表的 *Wx* 等位基因^[5]。在糯稻中, *Wx* 由于第 2 外显子 23 bp 的缺失造成了转录提前终止^[6]。在非糯品种中, *Wx* 主要分化为 *Wx-a* 和 *Wx-b* 2 种等位类型。其中,携带 *Wx-a* 的稻米直链淀粉含量都在 25% 以上,属于高直链淀粉类型^[3]。在 *Wx-a* 变异基础上,还存在一种第 10 外显子变异的等位基因 *Wx-g3*,尽管携带该等位基因的稻米直链淀粉含量与 *Wx-a* 持平,但其糊化特性与胶稠度明显与携带 *Wx-a* 等位基因稻米不同^[7-8], Zhang 等^[9]的研究发现这种差异可能是由于直链淀粉的精细结构不同造成的。*Wx-b* 主要分布在粳稻品种中,携带该基因稻米的直链淀粉含量属中等至较低水平(15%~18%),与 *Wx-a* 相比, *Wx-b* 的变异是由第一内含子剪接位点处 G-T 变异造成的,突变降低了前体 mRNA 的剪接效率从而导致稻米中的直链淀粉含量降低^[3]。此外, Mikami 等^[10]克隆了 *Wx-in* 等位基因,证明在第 6 外显子上发生 A-C 变异可导致直链淀粉含量降至中等水平(18%~22%)。此外,还有 3 个“软米基因”即 *Wx-mq*、*Wx-mp* 和 *Wx-op* 相继被克隆。与 *Wx-b* 相比, *Wx-mq* 在第 4 和第 5 外显子处存在两处突变,导致直链淀粉含量降到 10% 左右^[11-12]。另一等位基因 *Wx-mp* 在第 4 外显子发生突变,位置与 *Wx-mq* 相同,第 5 外显子没有突变,携带该等位基因的稻米直链淀粉含量也在 10% 左右^[13],另一个软米基因为 *Wx-op* 与来源于云南毫屁的 *Wx-hp*,都是由第 4 外显子的 A-G 突变造成的^[8,14]。Liu 等^[14]以根癌土壤杆菌杆菌糖原合酶为模型,绘制了 *Wx-hp* 的三维结构图,推测突变位于淀粉合成酶催化域,导致淀粉合成能力下降。

日本在 20 世纪 80 年代初开始利用辐射和化学诱变剂处理水稻种子,通过大规模地筛选胚乳突变体获得了多个低直链淀粉含量突变体,其中一些突变体在直链淀粉含量下降的同时,胚乳外观也发生了显著改变,呈半透明或不透明^[15-19]。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* 等位和非等位两大类。非等位 *Du* 基因是调控直链淀粉含量的另一类基因^[20]。

我国软米种植主要分布于西南地区,尤其是云南。云南地区历史上就种植软米品种,由当地百姓的食用习惯得以保留,其中以毫民、毫屁为典型代表,是历代向朝廷进贡的佳品,解放后被列为国家优质上等米,常用以招待贵宾^[14]。利用日本软米资源,云南已经培育出银光、云粳 20 号、云粳 29 号等一系列优质软米粳稻品种^[21-22]。

江苏近年来利用日本的粳稻软米资源选育出系列软米品种,年推广面积接近 800 万亩。本研究利用长江中下游地区广泛应用的低直链淀粉含量基因 *Wx-mp* 的功能标记进行了资源筛选。

1 材料与方法

1.1 试验材料

粳稻品种材料共 110 份,其中江苏 94 份、浙江 7 份、云南 4 份、天津 2 份、上海 3 份,江苏省育种单位中间试验品系 133 份(表 1)。2018 年夏季统一种植试验材料于江苏省农业科学院试验田。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取 取分蘖期叶片,采用 CTAB 快速法提取样品 DNA。

1.2.2 *Wx-mp* 等位基因标记检测引物和测序扩增引物 已有研究表明, *Wx-mq* 编码区有 2 个位置发生突变,分别在第 4 外显子有 1 个由 G 到 A 的突变(G-A)以及第 5 外显子有 1 个 T-C 的突变,本课题组发现 *Wx-mp* 仅在其编码区第 4 外显子有 1 个 G-A 的突变^[12-13]。本课题组设计了 *Wx-mp* 等位基因特异 PCR (Allelic-specific PCR, AS-PCR) 检测的功能标记,用于特异检测 *Wx-mp* 第 4 外显子 G-A 的突变。为增加扩增特异性,在引物设计时 3' 端增加了错配碱基^[13],把突变点作为引物的 3' 端,在 3' 到 5' 的第 3 个碱基 C 错配为 A,即 5' GAACACACGGTCGACTCCAC 3', 错配为 5' GAACACACGGTCGACTCAAC 3' 和 5' GAACACACGGTCGACTCAAT 3', 详见表 2。用 *Wx-F* 为共用正向引物, *Wx-b-R*、*Wx-mp-R* 为反向引物对目标 DNA 进行独立 PCR 扩增。如用 *Wx-F* 和 *Wx-b-R* 引物对能扩增出 377 bp 的片段,并且用 *Wx-F* 和 *Wx-mp-R* 引物对不能扩增出 377 bp 片段,则该品种或材料携带 *Wx-b* 基因;反之,则该品种或材料含有 *Wx-mp* 基因。

表 1 试验材料列表

Table 1 Rice varieties for this research

名称 Name	来源 Source
常农粳 3 号, 常农粳 4 号, 常农粳 5 号, 常农粳 6 号, 常农粳 7 号, 华粳 3 号, 华粳 4 号, 华粳 5 号, 华粳 6 号, 华粳 7 号, 华瑞稻 1 号, 淮稻 10 号, 淮稻 11 号, 淮稻 13 号, 淮稻 5 号, 淮稻 7 号, 淮稻 8 号, 淮稻 9 号, 淮优粳 2 号, 连粳 10 号, 连粳 11 号, 连粳 12 号, 连粳 15 号, 连粳 4 号, 连粳 6 号, 连粳 7 号, 连粳 9 号, 南粳 40, 南粳 41, 南粳 42, 南粳 43, 南粳 44, 南粳 45, 南粳 46, 南粳 49, 南粳 5055, 南粳 9108, 宁粳 1 号, 宁粳 2 号, 宁粳 3 号, 宁粳 4 号, 宁粳 5 号, 宁粳 7 号, 宁粳 8 号, 泗稻 12 号, 泗稻 785, 苏沪香粳, 苏粳 8 号, 苏粳 9 号, 苏香粳 2 号, 苏香粳 100, 苏垦 118, 通粳 981, 武粳 13 号, 武粳 15 号, 武粳 4 号, 武陵粳 1 号, 武香粳 14 号, 武香粳 9 号, 武育粳 18 号, 武育粳 3 号, 武运粳 11 号, 武运粳 19 号, 武运粳 21 号, 武运粳 23 号, 武运粳 24 号, 武运粳 27 号, 武运粳 29 号, 武运粳 7 号, 徐稻 3 号, 徐稻 4 号, 徐稻 8 号, 徐稻 9 号, 盐稻 11 号, 盐稻 8 号, 盐稻 9 号, 盐粳 10 号, 盐粳 11 号, 盐粳 16 号, 扬辐粳 8 号, 扬育粳 2 号, 扬育粳 3 号, 镇稻 10 号, 镇稻 12 号, 镇稻 13 号, 镇稻 15 号, 镇稻 16 号, 镇稻 17 号, 镇稻 18 号, 镇稻 1 号, 镇稻 7 号, 镇稻 88, 镇稻 99, 镇糯 19 号	江苏
苏秀 10 号, 苏秀 867, 秀水 63, 嘉 33, 嘉 58, 嘉 991, 嘉花 1 号	浙江
金粳 818, 津稻 263	天津
楚粳 39, 楚粳 28, 楚粳 37, 云粳 29 号	云南
沪香软 386, 花培 12, 沪粳 137	上海
武 055, 武 180, 武 619, 金运 7846, 武运 7277, 武粳 073, 武运 7400, 武粳 357, 天丰 7821, 金粳 7807, 宁 7817, 宁 7837, 泰粳 7268, 泰粳 7206, 天隆粳 1700, 天隆粳 1758, 盐鉴 19, 扬农粳 17-3614, 常粳 18-6, 常粳 18-5, 连粳 17219, 南粳 73103, 南粳 73095, 福粳 7193, 南粳 62055, 苏垦 72048, 农粳 1801, 农粳 1802, 金稻 220, 金香糯 374, 金粳稻 7318, 金粳稻 7398, 金粳稻 7382, 扬粳 7207, 扬粳 7035, 练 605, 泗稻 17-424, 泗稻 17-333, 泗稻 17-543, 珠光粳 1216, 瑞华 1804, 瑞华 1803, 7185, 裕稻 7261, 镇稻 4720, 盐稻 17118, 金粳 17012, 润扬稻 17001, 镇稻 9908, 润扬稻 17114, 华丰 1346, 保丰 1704, 保丰 1703, 中江粳 6131, 中江粳 7117, 通粳 17-3, 明粳 256, 丰登粳 16188, 广稻 1, 中江粳 18122, 中江粳 18124, 悦粳 1 号, 悦粳 4 号, 7457, 盐粳 1123, 盐粳 1530, 盐粳 16005, 盐粳 17136, 镇稻 4709, 瑞诚 16040, 瑞诚 519, 明粳 1611, 宁粳 043, 华浙粳 15-20, 长香粳 5510, 宁 7273, 科粳 812, 扬辐粳 6068, 生南 73070, 扬粳 7052, 振稻 5095, 振稻 7133, 振稻 7167, 软香玉 141, 金粳 7114, 焦粳 7263, 焦粳 7211, 连粳 17313, 福粳 802, 丰登粳 1596, 天丰粳 443, 天丰 988, 淮 723, 淮 1250, 淮 877, 金运 1714, 扬江粳 908, 2137, 2277, 苏 5506, 苏 5555, 灵谷粳 9 号, 沐香稻 1801, 徐 52916, 华粳 7298, 华粳 7149, 徐农 53029, 皖垦粳 5027, 皖垦粳 1107, 皖垦粳 1811, 皖垦粳 2021, 姜丰 084, 宁 5916, 皖垦粳 201, 常粳 16-2, 武 5791, 扬粳 6217, 武粳 280, 6389, 宁粳 039, 武 T26(糯), 泰粳 6044, 金粳 322, 振稻 26347, 金粳 58, N12-142, 金运 1626, 南粳 53045, 南粳 73119, 南粳 73062, 宁 2602, 苏 05-1176, 宁 2604	江苏育种新品系

Hiroyuki 等^[12]报道 *Wx-mq* 在第 4 和第 5 外显子均存在突变, 本课题组发现 *Wx-mp* 仅在第 4 外显子存在突变^[13]。为进一步验证功能标记检测结果

以及明确 *Wx-mp* 和 *Wx-mq* 的序列差异, 设计了跨第 4 和第 5 外显子的引物对, 对试验材料进行 PCR 扩增, 序列见表 2。直接将 PCR 产物进行测序分析。

表 2 等位基因特异性 PCR 标记检测引物和测序扩增引物

Table 2 The primers for allelic-specific PCR markers and sequencing

单核苷酸多态性 SNP	引物 Primers	引物序列 Primer sequence	产物长度 Size of products
G-A	Wx-F	5' GGCTGTAAGCACACAAAACCTTC 3'	
	Wx-b-R	5' GAACACACGGTTCGACTCaAC 3'	Wx-b 反向引物, 产物 377 bp
	Wx-mp-R	5' GAACACACGGTTCGACTCaAT 3'	Wx-mp 反向引物, 产物 377 bp
G-A, T-C	Wxb-PCR-F	5' CAAGCAGCAGCGGTCGG 3'	904 bp
	Wxb-PCR-R	5' TTGAAGTATGGGTTGTTGTTGAGG 3'	904 bp

小写字母标出的碱基为引物错配的碱基

Lowercase letters represent mismatched bases

1.2.3 PCR 扩增和电泳 20 μL 反应 PCR 体系包括模板 DNA (约 15~40 $\text{ng}/\mu\text{L}$) 2 μL 、引物 (2 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 2 μL 、2xTaq PCR Master Mix 10 μL 、灭菌双蒸水 6 μL 。在 Eppendorf PCR 仪上扩增, 反应条件为: (1) 94 $^{\circ}\text{C}$, 预变性 5 min; (2) 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 55 $^{\circ}\text{C}$ (测序)/61 $^{\circ}\text{C}$ (标记检测), 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 30 s/1 min; 共 32 个循环; (3) 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 10 min。反应产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离。

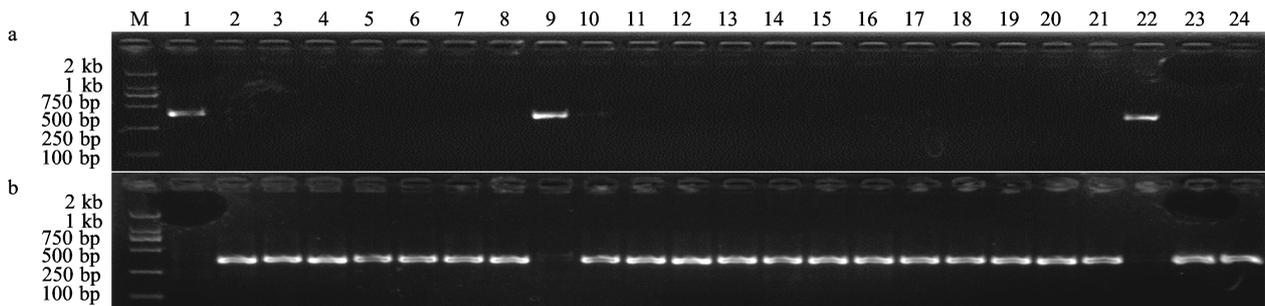
1.2.4 直链淀粉含量测定方法 根据测序结果, 统一收获试验材料的成熟种子, 单个材料混收, 晾干至含水量在 14% 左右, 挑选 50 粒饱满种子。按照农业部标准 NY147-88 所示方法测定直链淀粉含量。

1.2.5 测序及序列对比 以 Wxb-PCR-F/Wxb-PCR-R 为引物对, 采用等位基因特异 PCR 鉴定、筛选出携带 *Wx-mp* 的材料, 进行扩增, 将扩增产物测序, 以日本晴 *Wx-b* 基因序列为参照序列, 利用 SnapGene 软件进行序列比对。*Wx-mp* 基因、*Wx-mq* 基因和 *Wx-b* 基因序列的 GenBank 登录号分别为 KC332294、AB06609 和 AF141954。

2 结果与分析

2.1 *Wx-mp* 等位基因检测结果

利用 *Wx-mp* 等位基因特异 PCR 功能标记对部分江苏省育种材料进行检测 (图 1), 编号 1、9、22 材料可被 *Wx-mp* 特异引物扩增出目的条带, 而 *Wx-b* 特异引物无扩增产物 (图 1a), 表明上述 3 份材料携带 *Wx-mp* 等位基因; 与其他材料则相反, 其余 21 份材料只含有 *Wx-b* 特异引物扩增产物 (图 1b), 表明这些材料携带 *Wx-b* 基因型。采用上述方法, 从供试的 243 份育种材料中共筛选出 26 份携带 *Wx-mp* 的材料, 均来自于江苏省和上海市选育的品种或中间材料, 包括南粳系列软米品种如南粳 46、南粳 5055、南粳 9108、南粳 505 等, 南京农业大学选育的宁粳 8 号, 苏州农业科学院选育的苏香粳 100, 徐州市农业科学院选育的徐稻 9 号, 上海市农业科学院选育的沪香软 386 等。来自浙江和天津的粳稻品种以及云南的软米粳稻品种没有检测到 *Wx-mp* 基因。



a: *Wx-mp* 扩增结果; b: *Wx-b* 扩增结果

a: amplification products for *Wx-mp*, b: amplification products for *Wx-b*

M: DL2000 分子标记; 1~24: 武 055, 武 180, 武 619, 金运 7846, 武运 7277, 武粳 073, 武运 7400, 武粳 357,

天丰 7821, 金粳 7807, 宁 7817, 宁 7837, 泰粳 7268, 泰粳 7206, 天隆粳 1700, 天隆粳 1758, 盐鉴 19,

扬农粳 17-3614, 常粳 18-6, 常粳 18-5, 连粳 17219, 南粳 73103, 南粳 73095, 福粳 7193

M: DL2000 marker, 1-24: Wu 055, Wu 180, Wu 619, Jinyun7846, Wuyun 7277, Wujing 073, Wuyun 7400, Wujing 357,

Tianfeng 7821, Jinjing 7807, Ning 7817, Ning 7837, Taijing 7206, Tianlongjing 1700, Tianlongjing 1758, Yanjian 19,

Yangnongjing 17-3614, Changjing 18-6, Changjing 18-5, Lianjing 17219, Nanjing 73103, Nanjing 73095, Fujing 7193

图 1 等位基因特异性 PCR 标记部分样品检测结果

Fig.1 PCR amplification products of partial rice varieties by using AS-PCR

2.2 携带 *Wx-mp* 等位基因的材料直链淀粉含量

测定标记检测携带 *Wx-mp* 等位基因材料种子, 直链淀粉含量的检测结果 (表 3), 携带 *Wx-b* 的品种苏垦 118 直链淀粉含量为 14.8%, 糯稻品种镇糯 19 的直链淀粉含量为 1.4%。携带 *Wx-mp* 基因的 26 份材料稻米中, 直链淀粉平均含量为 9.2%, 变异幅度 3.3%, 其中含量最低的为南粳 505 (7.3%), 含

量最高的品种为南粳 46 (10.6%)。

2.3 携带 *Wx-mp* 等位基因测序及序列对比结果

已有研究表明, *Wx-mq* 编码区有 2 个位置发生突变, 分别为第 4 外显子处的一个 G/A 单碱基突变以及第 5 外显子一个 T/C 突变, 本课题组发现 *Wx-mp* 仅在其编码区第 4 外显子处存在 G/A 突变^[12-13]。鉴于本研究采用的 AS-PCR 标记仅适用

于分析第 4 外显子的变异, 因此为了明确筛选获得的 26 份材料具体携带的是 *Wx-mq* 还是 *Wx-mp*, 通过跨第 4、第 5 外显子设计引物对 26 份材料进行

测序, 发现 26 份材料都只在第 4 外显子处存在突变 (G/A), 而在第 5 外显子处没有突变, 如图 2 所示。

表 3 利用功能标记检测携带 *Wx-mp* 基因的材料及其直链淀粉含量

Table 3 AS-PCR detection and the amylose content of rice varieties carrying *Wx-mp*

品种名称 Varieties name	<i>Wx-mp</i> 带型 Type of <i>Wx-mp</i>	直链淀粉含量 (%) Amylose content	品种名称 Varieties name	<i>Wx-mp</i> 带型 Type of <i>Wx-mp</i>	直链淀粉含量 (%) Amylose content
镇糯 19 (CK)	-	1.4	武 055	+	9.7
苏垦 118 (CK)	-	14.8	天丰 7821	+	9.2
南粳 46	+	10.6	南粳 73103	+	9.1
南粳 505	+	7.3	南粳 62055	+	9.3
南粳 9108	+	8.8	农粳 1801	+	9.6
宁粳 8 号	+	8.7	盐粳 16005	+	9.3
南粳 5055	+	9.0	宁 7273	+	9.7
徐稻 9	+	9.7	振稻 7133	+	8.6
苏香粳 100	+	8.7	振稻 7167	+	9.3
沪香软 386	+	9.3	常粳 16-2	+	9.2
南粳 53045	+	9.2	宁粳 039	+	10.3
南粳 73119	+	9.0	N12-142	+	9.3
南粳 72063	+	8.4	苏 05-1176	+	7.7
宁 2602	+	10.3	宁 2604	+	11.2

“-”表示不携带 *Wx-mp* 基因; “+”表示携带 *Wx-mp* 基因

“-”: without *Wx-mp*, “+”: with *Wx-mp*

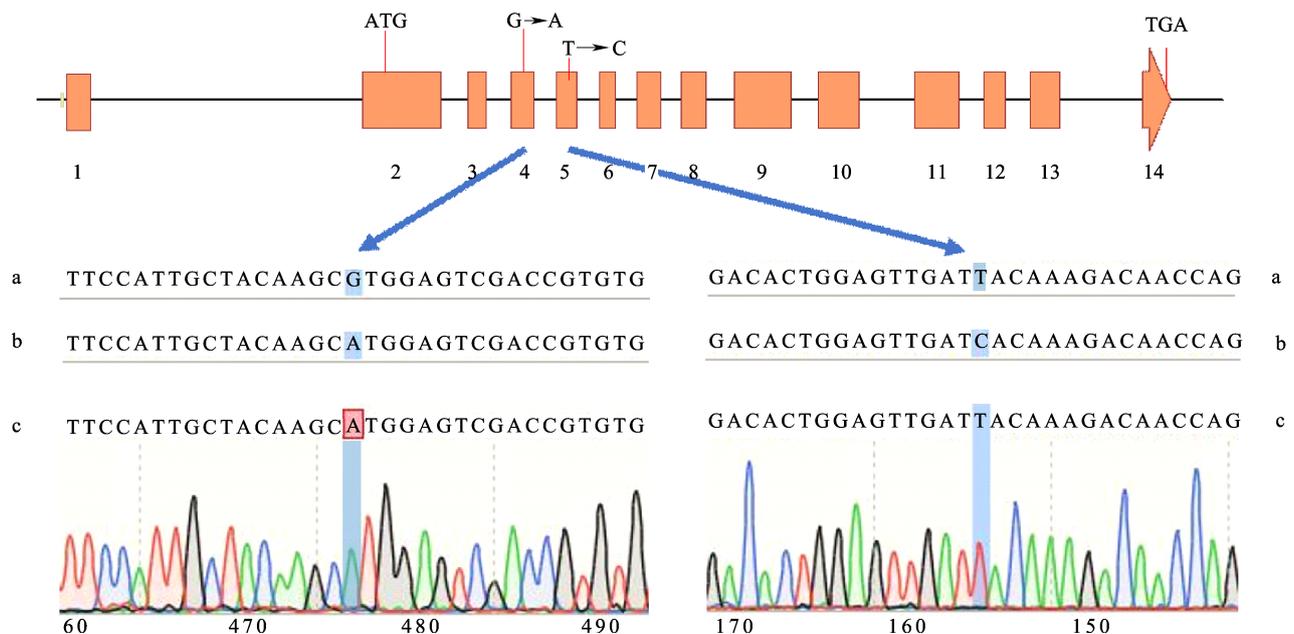


图 2 在第 4、第 5 外显子突变位点的测序和序列比对图

Fig.2 The sequencing and the sequence alignment of the point mutation in exon 4 and 5

3 讨论

日本在1996年以前就利用诱变育种选育出低直链淀粉含量且食味较好的 Milky Queen, 2001年对该软米性状进行了遗传分析, 2002年首次报道克隆了该软米基因 *Wx-mq*, 明确了第4、5外显子单碱基突变, 并导致氨基酸突变^[11-12]。中国从日本引进了以 Milky Queen 改良的粳稻品种 Kanton 194, 又称 Milky Princess。利用该资源南京农业大学育成了宁粳8号, 江苏省农业科学院育成了系列软米品种南粳46、南粳9108等, 徐州市农业科学院育成了徐稻9号, 苏州市农业科学院育成了苏香粳100, 上海市农业科学院育成了的中间品系沪香软386, 同时一些品种聚合了来源于江苏太湖流域的香味基因, 这些优质软米品种米饭柔软可口, 冷饭不回生, 深受江浙沪一带市民欢迎。为加快该基因的利用, 本课题组开发了针对第4和第5外显子单碱基突变的等位基因特异 PCR, 利用突变点作为引物的3'端, 同时增加引物错配, 提高扩增特异性, 为验证所开发的标记的有效性, 对第4、5外显子进行重测序, 发现来源于南粳46等材料携带的 *Waxy* 基因在第4外显子存在与 *Wx-mq* 相同的突变, 而第5外显子没有T到C的突变, 随后对其亲本 Milky Princess 测序, 发现携带相同等位基因, 因此将该新等位基因命名为 *Wx-mp*^[13]。

本研究对江苏、上海审定的品种和育成的中间品系进行了分子标记检测, 对检测阳性的材料进行了重测序以及直链淀粉含量测定, 发现标记检测结果与测序结果完全对应, 其直链淀粉含量都在9%左右, 符合软米特征。同时发现该基因只在江苏和上海的品种和材料中分布, 在云南、天津、浙江等材料中未检测到, 在江苏的分布频率最高, 说明主要是江苏的育种家在利用该基因, 同时该基因是利用人工诱变获得的, 也可以解释该基因在其他地区尤其是云南等软米资源丰富的地区不能被检测到的原因。

Wx 基因等位突变与直链淀粉含量密切相关, 目前报道的突变体数量还不多, 既有籼稻也有粳稻, 既有人工诱变突变体也有自然突变体^[5]。软米突变体直链淀粉含量在10%左右, 稻米外观表现为不透明, 俗称阴糯, 长江中下游地区粳稻育种单一使用 *Wx-mp* 等位基因已成为制约通过淀粉含量提升品质育种的重要限制因子。

参考文献

- [1] 朱昌兰, 沈文飏, 翟虎渠, 万建民. 水稻低直链淀粉含量基因育种利用的研究进展. 中国农业科学, 2004, 37(2): 157-162
Zhu C L, Shen W B, Zhai H Q, Wan J M. Advances in researches of the application of low-amylose content rice gene for breeding. Scientia Agricultura Sinica, 2004, 37(2): 157-162
- [2] 张昌泉, 赵冬生, 李钱峰, 顾铭洪, 刘巧泉. 稻米品质性状基因的克隆与功能研究进展. 中国农业科学, 2016, 49(22): 4267-4283
Zhang C Q, Zhao D S, Li Q F, Gu M H, Liu Q Q. Progresses in research on cloning and functional analysis of key genes involving in rice grain quality. Scientia Agricultura Sinica, 2016, 49(22): 4267-4283
- [3] Isshiki M K, Morino M, Nakajima R J, Okagaki S R, Izawa W T, Shimamoto K. A naturally occurring functional allele of the rice *Waxy* locus has a GT to TT mutation at the 5 splice site of first intron. Plant Journal, 1998, 15: 133-138
- [4] Gu M H, Liu Q Q, Yan C J, Tan S Z. Grain quality of hybrid rice: genetic variation and molecular improvement//Xie F M, Hardy B. Accelerating hybrid rice development (ISBN 978-971-22-0252-0). Los Baños, Philippines: International Rice Research Institute, 2009: 345-356
- [5] 朱霁晖, 张昌泉, 顾铭洪, 刘巧泉. 水稻 *Wx* 基因的等位变异及育种利用研究进展. 中国水稻科学, 2015, 29(4): 431-438
Zhu J H, Zhang C Q, Gu M H, Liu Q Q. Progress in the allelic variation of *Wx* gene and its application in rice breeding. Chinese Journal of Rice Science, 2015, 29(4): 431-438
- [6] Wanchana S, Toojinda T, Tragoonrun S, Vanavichita. Duplicated coding sequence in the *Waxy* allele of tropical glutinous rice (*Oryza sativa* L.). Plant Science, 2003, 165(6): 1193-1199
- [7] Tran N A, Daygon V D, Resurreccion A P, Cuevas R P, Corpuz H M, Fitzgerald M A. A single nucleotide polymorphism in the *Waxy* gene explains a significant component of gel consistency. Theoretical and Applied Genetics, 2011, 123(4): 519-525
- [8] Hoai T T T, Matsusaka H, Toyosawa Y, Suu T D, Satoh H, Kumamaru T. Influence of single-nucleotide polymorphisms in the gene encoding granule-bound starch synthase I on amylose content in Vietnamese rice cultivars. Breeding Science, 2014, 64(2): 142-148
- [9] Zhang C Q, Zhu L J, Shao K, Gu M H, Liu Q Q. Toward underlying reasons for rice starches having low viscosity and high amylose: physicochemical and structural characteristics. Journal of the Science of Food Agriculture, 2013, 93(7): 1543-1551
- [10] Mikami I, Uwatoko N, Ikeda Y, Yamaguchi J, Hirano H Y, Suzuki Y, Sano Y. Allelic diversification at the *Wx* locus in landraces of Asian rice. Theoretical and Applied Genetics, 2008, 116(7): 979-989
- [11] Sato H, Suzuki Y, Okumo K, Hirano H, Imbe T. Genetic analysis of low-amylose content in a rice variety, 'Milky Queen'. Breeding Research, 2001, 3: 13-19
- [12] Hiroyuki S, Yasuhiro S, Makoto S, Tokio I. Molecular characterization of *Wx-mq*, a novel mutant gene for low-amylose content in endosperm of rice (*Oryza sativa* L.). Breeding Science, 2002, 52: 131-135
- [13] Yang J, Wang J, Fan F J, Zhu J Y, Chen T, Wang C L, Zheng

- T Q, Zhang J, Zhong W G, Xu J L. Development of AS-PCR marker based on a key mutation confirmed by resequencing of *Wx-mp* in Milky Princess and its application in *Japonica* soft rice (*Oryza sativa* L.) breeding. *Plant Breeding*, 2013, 132 (6): 595-603
- [14] Liu L, Ma X, Liu S, Zhu C, Jiang L, Wang Y, Shen Y, Ren Y, Dong H, Chen L, Liu X, Zhao Z, Zhai H, Wan J. Identification and characterization of a novel *Waxy* allele from a Yunnan rice landrace. *Plant Molecular Biology*, 2009, 71: 609-626
- [15] Amano E. Genetic and biochemical characterization of *Waxy* mutant mutants in cereals. *Environmental Health Perspect*, 1981, 37: 35-41
- [16] Satoh H, Omura T. New endosperm mutations induced by chemical mutagenes in rice (*Oryza sativa* L.). *Japanese Journal of Breeding*, 1981, 31: 316-326
- [17] Okuno K, Fuwa H, Yano M. A new mutant gene lowering amylose content in endosperm starch of rice (*Oryza sativa* L.). *Japanese Journal of Breeding*, 1983, 33: 387-394
- [18] Okuno K, Nagdmine T, Oka M. New lines harboring du genes for low amylose content in endosperm starch of rice. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 1993, 27: 102-105
- [19] Yano M, Okuno K, Satoh H, Omura T. Chromosomal location of genes conditioning low amylose content of endosperm starches in reie (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 1988, 76: 183-189
- [20] Isshiki M, Nakajima M, Satoh H, Shimamoto K. Dull: rice mutants with tissue-specific effects on the splicing of the *Waxy* pre-mRNA. *Plant Journal*, 2000, 23: 451-460
- [21] 赵国珍, 邹茜, 陈于敏, 苏振洗, 朱振华, 袁平荣. 云南软米直链淀粉含量的遗传分析与基因定位. *植物遗传资源学报*, 2013, 14 (5): 974-977
- Zhao G Z, Zou Q, Chen Y M, Su Z X, Zhu Z H, Yuan P R. Genetic analysis and mapping QTLs for amylose content of soft rice variety from Yunnan. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2013, 14 (5): 974-977
- [22] 陈于敏, 胡家权, 刘慰华, 王月英, 赵国珍. 香软米新品种云粳 29 号选育及高产栽培技术. *中国稻米*, 2013, 19 (3): 74-75
- Chen Y M, Hu J Q, Liu W H, Wang Y Y, Zhao G Z. Breeding and high yield cultivation techniques of a fragrant and soft *Japonica* rice variety Yunjing 29. *China Rice*, 2013, 19 (3): 74-75