

稻米淀粉品质性状的资源筛选和相关基因初步鉴定

原小年¹, 徐娣玥¹, 乔卫华², 刘璇¹, 史雪妍¹, 刘忠学¹, 丁鑫¹, 刘亚焯¹, 万甜恬¹, 刘玲珑¹
(¹ 南京农业大学农学院, 南京 210095; ² 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘要: 淀粉是稻米品质形成的主要理化基础,也是水稻品质改良的重要育种目标。本研究旨在挖掘包含不同淀粉含量的特异种质和鉴定其相关的基因型,为完善水稻淀粉合成调控网络及水稻优质育种工作提供有用信息。以江苏南京水稻种质资源国家野外科学观测研究站收集的 119 份种质资源为材料,运用改进的免煮简易法测定供试材料的直链淀粉含量;以直链淀粉含量极高、低的材料,利用开发的 dCAPS 分子标记鉴定其 *Wx* 基因型。测定直链淀粉含量极高的 15 份材料的抗性淀粉含量,并选取 3 份高抗性淀粉材料,以日本晴为对照,进行 *SSIIIa* 与 *SBEIIb* 两个基因的序列比对和基因型鉴定。结果表明,改进的免煮简易法准确性与现行国标法结果相当,但操作更加简便容易。供试材料的直链淀粉含量大部分处于 9.0%~33.0% 之间,抗性淀粉含量位于 1.0%~4.5% 之间。dCAPS 分子标记鉴定表明高直链淀粉材料的 *Wx* 基因型一般为 *Wx^a* 型。通过序列比对,发现相对于日本晴, *SSIIIa* 基因在 3 个高抗性淀粉材料(立新梗、南特号、椰晚 3 号)有 3 处共同突变,其中第三外显子 +2362 位为错义突变; *SBEIIb* 在 2 个高抗性淀粉品种(立新梗与南特号)第四外显子 +96 位检测到共同的错义突变。这些错义突变可能是导致水稻抗性淀粉含量增加的原因,这为下一步精确定向编辑目标基因,创制淀粉品质性状优异新种质奠定了基础。

关键词: 种质资源; 直链淀粉; 抗性淀粉; 分子标记

Resource Screening of Starch Quality Traits and Preliminary Identification of Related Genes in Rice

YUAN Xiao-nian¹, XU Zi-yue¹, QIAO Wei-hua², LIU Xuan¹, SHI Xue-yan¹,
LIU Zhong-xue¹, DING Xin¹, LIU Ya-xuan¹, WAN Tian-tian¹, LIU Ling-long¹
(¹ Agronomy College, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095;
² Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100081)

Abstract: Starch is the main physiochemical basis for rice grain quality, and fine tuning of the starch content/composition is an important target in rice quality breeding. This study attempts to uncover specific rice germplasms that contain different starch content and determine their genotypes, in order to provide useful information for understanding the regulation network of rice starch synthesis as well as quality rice breeding. 119 rice accessions, which were collected from National Observatory of Rice Germplasm (Nanjing, Jiangsu), were examined for the amylose content using an improved method without boiling water bath. The *Wx* genotypes with extremely high and low amylose content were genotyped by a dCAPS marker. Out of the resistant starch content of 15 accessions with high amylose content, three were genotyped for *SSIIIa* and *SBEIIb* if compared to Nipponbare. The results showed that the updated method showed an accuracy similar to the current national standard, but became simpler and easier in the operation procedure. Most of accessions showed 9.0%-33.0% on

收稿日期: 2022-04-20 修回日期: 2022-05-09 网络出版日期: 2022-09-06

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20220420001>

第一作者研究方向为植物分子育种, E-mail: 31117125@njau.edu.cn

通信作者: 刘玲珑, 研究方向为水稻品质遗传育种, E-mail: liulinglong@njau.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划(2021YFF1000201, 2016YFD0100701); 南京农业大学大学生创新训练计划(202011XX24)

Foundation projects: National Key R & D Programs(2021YFF1000201, 2016YFD0100701); Student Research Training Projects of Nanjing Agricultural University(202011XX24)

the amylose content, and 1.0%-4.5% on resistant starch content. The genotyping using dCAPS marker showed the Wx^a allele generally in the Wx genotypes of high amylose accessions. Compared with Nipponbare, three accessions (including Lixinjing, Nantehao and Chenwan3) with high resistant starch contained three common mutations in *SSIIIa*, among which the 2362th nucleotide in the third exon resulted in a missense mutation. Likewise, a common missense mutation in the 96th nucleotide in the fourth exon of *SBEIIb* gene was detected in two high resistant starch accessions (Lixinjing and Nantehao). These missense mutations might be responsible for the increase of resistant starch content in rice, providing insights for precisely editing of key genes and creating new germplasms associated with starch quality traits.

Key words: germplasms; amylose; resistant starch; molecular marker

水稻 (*Oryza sativa* L.) 作为主要粮食作物之一, 全球有三分之一的人口以水稻为主食^[1]。随着生活水平的提高, 培育高品质健康水稻成为育种工作者的重要目标。淀粉是水稻胚乳的主要成分, 由直链淀粉和支链淀粉组成。水稻的直链淀粉含量是衡量稻米食味品质的重要指标, 直链淀粉含量稍低 (小于 20%) 的稻米容易消化, 食味品质往往较好^[2]。但另一方面, 稻米中可消化淀粉含量高, 食用后血糖水平升高快, 一些代谢缺失症患者往往不能正常食用普通水稻。高直链淀粉的稻米往往富含抗性淀粉, 抗性淀粉不仅能够帮助降低餐后血糖和胰岛素水平, 降低血脂和血胆固醇^[3], 还有利于肠道健康, 甚至抑制癌细胞的生长^[4]。因此, 培育不同淀粉类型稻米, 对于开发适应不同需求的营养健康稻米市场具有重要意义。

水稻中直链淀粉和支链淀粉通过不同途径合成。直链淀粉的合成需要通过颗粒结合淀粉合酶 I (GBSSI, granule-bound starch synthase I), 而支链淀粉合成略微复杂, 该途径还涉及淀粉合酶 (SSs, starch synthases)、淀粉分支酶 (SBEs, starch branching enzymes) 和淀粉去分支酶 (SDBEs, starch-debranching enzymes) 的不同异构体^[5]。在蒸煮米饭中, 直链淀粉分子冷却后迅速重新结合形成沉淀物或凝胶, 形成抗消化的复合物, 而支链淀粉分子重新结合速度较慢, 形成的复合物也就更容易消化。因此, 高直链淀粉产品抗性淀粉含量较高^[6]。 Wx ($Waxy$) 基因是控制直链淀粉合成的主效基因。除糯性品种外, Wx 基因主要分化为 Wx^a 和 Wx^b 两种等位基因。其中, 籼稻以 Wx^a 型为主, 直链淀粉含量较高; 粳稻基本为 Wx^b 型, 直链淀粉含量较低^[7]。与 Wx^a 相比, Wx^b 的第 1 内含子 5' 端剪切处发生突变, 导致粳型品种中成熟 Wx 转录本含量降低, 最后导致直链淀粉含量降低^[8]。通过对水稻高抗性淀粉突变体的研究, 发现可溶性淀粉

合酶基因 *SSIIIa* (soluble starch synthase IIIa) 突变后显著提高了水稻胚乳中的抗性淀粉、直链淀粉、脂类、直链淀粉-脂质复合体含量以及糊化温度, 降低了淀粉的粘性。进一步研究发现, *SSIIIa* 和 Wx 共同参与抗性淀粉的合成, *SSIIIa* 对抗性淀粉的调控依赖于 Wx 基因的高表达。在 *SSIIIa* 抑制背景下降低 Wx 的表达能够使抗性淀粉含量下降, 直链淀粉-脂质复合体减少^[9]。水稻胚乳中淀粉性质的改变是由于支链淀粉精细结构发生变化而引起的, 支链淀粉具有丰富的长链, 淀粉分支酶 IIb (*SBEIIb*, starch branching enzyme IIb) 通过产生短链来影响支链淀粉的精细结构^[10]。*SBEIIb* 功能缺失突变体 *ae* (*amylose extender*) 显著影响淀粉的精细结构; 降低或敲除 *OsSBEIIb* 导致籽粒抗性淀粉较野生型提高 4 倍^[11]。因此, *SSIIIa* 与 *SBEIIb* 是影响抗性淀粉含量的主要基因, 但目前对于水稻种质资源中与抗性淀粉相关的基因型鉴定还鲜有报道。

本研究通过对 119 份种质资源进行直链淀粉、抗性淀粉含量的测定以及对淀粉合成相关基因进行鉴定来挖掘鉴定特异淀粉种质的基因型, 为完善水稻淀粉合成调控网络及水稻优质育种提供有用资源和信息。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究使用籼稻、粳稻共 119 份种质资源, 这些材料主要来源于湖北、湖南、四川、江苏、云南、上海、广西、贵州等省市科研院所、高校、种子实验基地等单位 (表 1)。水稻种子于 2020 年在南京农业大学土桥水稻育种基地收获, 大部分资源由江苏南京水稻种质资源国家野外科学观测研究站提供和保存, 部分资源由中国农科院作物所作物种质资源中心提供。

表 1 119 份水稻种质资源信息和淀粉相关性状

Table 1 The information of 119 rice germplasms and starch related traits

编号 Code	名称 Name	直链淀粉 含量 (%) AC	抗性淀粉 含量 (%) RS	籼粳类型 Type	编号 Code	名称 Name	直链淀粉 含量 (%) AC	抗性淀粉 含量 (%) RS	籼粳类型 Type
ZD-00560	南京 11 号	32.6	2.3	籼稻	2020Y29452	雌毛雄	22.6	—	粳稻
17-00435	洞庭晚籼	32.5	2.6	籼稻	ZD-00592	苏粳 2 号	22.5	—	粳稻
ZD-02605	金优 1 号	31.2	0.5	籼稻	20-02821	中农 4 号	22.1	—	籼稻
12-02373	矮密	31.1	0.6	籼稻	18-01067	矮脚早	22.1	—	籼稻
ZD-01512	南特号	31.0	3.6	籼稻	09-00530	黄壳早廿日	22.1	—	粳稻
21-01120	香谷	30.6	0.3	粳稻	2020Y29456	小白元	22.0	—	粳稻
ZD-02715	湘早籼 7 号	30.6	1.6	籼稻	20-02073	梅花糯	21.9	—	籼稻
ZD-00358	郴晚 3 号	30.3	3.0	籼稻	ZD-03525	郑稻 5 号	21.8	—	粳稻
ZD-02032	矮沱谷 151	30.2	1.6	籼稻	2020Y29472	改良一穗种	21.2	—	粳稻
09-00666	罗汉黄	30.1	1.8	粳稻	20-03215	山酒谷	20.9	—	粳稻
21-01257	清可	30.0	1.6	籼稻	12-02280	矮禾迟	20.6	—	籼稻
21-01899	公居 73	29.6	2.5	粳稻	09-00724	百歌稻	20.5	—	粳稻
ZD-00760	蜀丰 101	29.6	1.3	籼稻	A0246	江农早 1 号 B	20.5	—	籼稻
17-01470	霸王鞭 1	29.5	3.1	粳稻	12-02850	红米三担白	20.4	—	粳稻
ZD-00806	立新梗	29.2	4.5	粳稻	2020Y29459	小白银杏	19.7	—	粳稻
15-03336	黑督 4	29.1	—	籼稻	2020Y29629	青梗晚稻	19.4	—	粳稻
13-00816	陆财号	29.0	—	籼稻	R0215	培 C122	19.4	—	粳稻
ZD-02944	镇籼 232	29.0	—	籼稻	ZD-02685	粳 87-304	19.3	—	粳稻
ZD-01423	湘晚籼 1 号	28.9	—	籼稻	21-00529	三七十萝	19.3	—	粳稻
21-04413	半节芒	28.8	—	粳稻	18-04906	万利籼	19.1	—	籼稻
15-01740	饿死牛	28.7	—	籼稻	09-00229	灰藻	18.2	—	粳稻
12-00589	金溪白	28.6	—	籼稻	22-04053	阳壳糯	18.0	—	籼稻
21-00694	齐头白谷	28.6	—	粳稻	R0604	JWR 221	18.0	—	粳稻
30-00206	台中 65 号	28.5	—	粳稻	09-00298	烂芒一时兴	17.5	—	粳稻
ZD-02547	墨米	28.0	—	籼稻	ZD-02324	辽梗 287	17.4	—	粳稻
17-00524	柳叶粘	28.0	—	籼稻	02-00295	叶里藏花	17.3	—	粳稻
10-00463	铁秆乌	27.9	—	粳稻	21-01577	五子堆	17.1	—	粳稻
02-00133	隆化毛葫芦	27.6	—	粳稻	ZD-03386	成农水晶	16.9	—	籼稻
31-00388	包二幅	27.6	—	籼稻	2020Y29498	黑稻	16.7	—	粳稻
ZD-00213	柳沙 1 号	27.5	—	籼稻	08-00253	有芒早梗	16.6	—	粳稻
2020Y29458	江北种	27.5	—	粳稻	05-00024	卫国	15.8	—	粳稻
ZD-01006	桂朝 2 号	27.5	—	籼稻	21-01744	老造谷	15.5	—	籼稻
28-00005	黑芒稻	27.4	—	粳稻	ZD-01820	扬稻 2 号	15.0	—	籼稻
ZD-02431	黄丝桂占	27.3	—	籼稻	20-03042	小红谷	14.6	—	粳稻
ZD-02017	沪科 3 号	26.9	—	籼稻	06-00035	兴国	13.8	—	粳稻
17-00966	宣恩长坛青粘	26.8	—	籼稻	A0430	包协 123B	13.7	—	籼稻
09-02068	二黑稻	26.7	—	籼稻	05-00052	丹东陆稻	13.6	—	粳稻
901803	大禾稻	26.7	—	粳稻	30-00206	台中 65 号 / 台中 HR539	13.3	—	粳稻
18-03950	木瓜糯	26.7	—	粳稻	A0408	滇瑞 409B	12.9	—	籼稻
22-01615	马尾粘	18.6	—	籼稻	ZD-03115	当育 5 号	12.8	—	粳稻
ZD-01559	秀水 115	26.6	—	粳稻					

表 1(续)

编号 Code	名称 Name	直链淀粉 含量 (%) AC	抗性淀粉 含量 (%) RS	粳粳类型 Type	编号 Code	名称 Name	直链淀粉 含量 (%) AC	抗性淀粉 含量 (%) RS	粳粳类型 Type
12-00644	解放粳	26.2	—	粳稻	07-00010	老光头 83	12.0	—	粳稻
13-00737	闽北晚粳	26.1	—	粳稻	A0172	青四矮 16B	11.9	—	粳稻
11-00403	雷火占	25.4	—	粳稻	R0333	粳 7623	10.2	—	粳稻
18-01903	须谷糯	25.4	—	粳稻	R0468	特青选恢	10.1	—	粳稻
A0244	献改 B	24.9	—	粳稻	2020Y29454	缺儿糯	10.0	—	粳稻
08-00036	木樨球	24.7	—	粳稻	04-00115	中楼一号 1	8.9	—	粳稻
09-00138	野凤凰	24.6	—	粳稻	R0004	古 154	8.5	—	粳稻
20Y29455	青旻稻	24.4	—	粳稻	R0515	湘恢 91269	8.3	—	粳稻
22-02754	油粘	24.1	—	粳稻	R0032	IR 661-1 (早)	6.8	—	粳稻
20-01262	细白粘	24.0	—	粳稻	15-03586	赤壳糯	5.4	—	粳稻
21-00785	木邦谷	23.8	—	粳稻	20-03053	三颗寸	4.0	—	粳稻
2020Y29505	铁壳稻	23.8	—	粳稻	21-01106	紫米	3.7	—	粳稻
A0298	京虎 B	23.5	—	粳稻	09-00625	红糯稻	3.6	—	粳稻
09-00429	有芒早稻	23.4	—	粳稻	12-01446	三百粒	3.5	—	粳稻
12-02254	台山糯	23.3	—	粳稻	21-00083	毫马克 (K)	2.8	—	粳稻
2020Y29465	密子晚	23.1	—	粳稻	21-03433	金枝糯	2.8	—	粳稻
11-00389	秋前白	22.9	—	粳稻	2020Y29475	薄稻	2.1	—	粳稻
30-00195	台东陆稻 328	22.8	—	粳稻	22-01439	粘壳糯	2.0	1.1	粳稻
11-00529	肥东塘稻	22.6	—	粳稻	20-03042	红谷	2.0	0.5	粳稻

- 表示无数据
-indicates no data; AC: amylose content; RS: resistant starch content

1.2 试验方法

1.2.1 直链淀粉含量测定 精米粉中直链淀粉含量测定主要参照焦桂爱等^[12]的方法和现行国家农业行业标准 (NY/T 2639-2014, <http://www.eshian.com/sat/standard/standardinfodown/34949>), 稍有修改。称取精米粉 100 ± 0.2 mg, 置于 100 mL 容量瓶中, 加入 1 mL 95% 乙醇, 使样品湿润分散, 再沿颈壁加入 9 mL 氢氧化钠 (1.8 mol/L) 溶液, 封口, 震荡后静置 16~18 h。静置完毕后定容至 100 mL, 吸取待测液 5 mL 于 100 mL 容量瓶中, 加入约 50 mL 的水, 再加入 1 mL 乙酸溶液 (1.8 mol/L) 和 2 mL 碘液 (I₂-KI), 以 Spring-RODI^R 实验室纯水系统 (锐思捷公司, 厦门) 制备的过滤水定容。静置 10 min 后, 在波长 720 nm 处测定溶液的吸光度。按照公式 $y = 0.9356x - 0.0019$ ($R^2 = 0.995$, y 为吸光度, x 为直链淀粉含量) 计算相应的直链淀粉含量。每份样品 3 次重复。

1.2.2 抗性淀粉含量测定 采用 AOAC 2002.02 淀粉与植物性基质中的抗性淀粉酶消化法测定抗性淀粉含量。准确称取 100 ± 0.5 mg 精米粉, 利用抗性淀粉检测试剂盒 (Megazyme, 货号: K-RSTAR) 进

行检测。每份样品重复测定两次。

1.2.3 DNA 的提取、dCAPS 标记的开发、PCR 扩增、酶切与电泳检测 将温室种植成苗的植株剪取叶片, 采用 CTAB 法提取其基因组 DNA^[13]。从国家水稻数据中心网站 (ricedata.cn) 获取 Wx 基因序列, 利用 dCAPS Finder 2.0 (<http://helix.wustl.edu/dcaps/>) 设计 dCAPS (derived cleaved amplified polymorphic sequences) 标记, 结合 SnapGene (Version 6.0.2, Insightful Science) 软件, 在 Wx 基因内含子 +1 位两侧设计相应的引物 (表 2)。利用该引物进行 PCR 扩增。PCR 反应程序为: 94 ℃ 预变性 2 min; 98 ℃ 变性 10 s, 58 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 25 s, 循环数为 34; 72 ℃ 充分延伸 10 min, 4 ℃ 保温 10 min。之后在 0.5 mL 离心管中, 加入 5 μL PCR 反应产物, 0.5 μL *Mva* I 限制性内切酶 (Thermo Scientific, 货号: ER0551), 1.5 μL 10 × 缓冲液 R, 用 ddH₂O 将总体积补全为 15 μL, 混合均匀后在 37 ℃ 下过夜进行酶切。酶切产物和未酶切产物在 8% 聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 根据迁移距离区分能被酶切与不能被酶切的 DNA 条带。

表 2 *Wx* 基因 dCAPS 分子标记引物及 *SSIIa* 与 *SBEIIb* 扩增引物Table 2 dCAPs molecular marker primers of *Wx* and primers for *SSIIa* and *SBEIIb* gene amplification

引物名称 Primer name	正向引物序列 (5' → 3') Forward primer sequence (5' → 3')	反向引物序列 (5' → 3') Reverse primer sequence (5' → 3')
<i>Wx</i> -dCAPS	GTTTCATCAGGAAGAACATCTG <u>C</u> CAG	AGCCCAACACCTTACAGAAATTAGCA
<i>SSIIa</i> -1	GGTGTTCAGGACAGTGC	AGGGAAATCGTCCTCTTTGCT
<i>SSIIa</i> -2	CCCCCTACAAGCACAGATT	TTCCATATTCTGCGCCGCTT
<i>SSIIa</i> -3	GGAGCGTATGAACCTCGGTC	TTGTTTTGCTCAGGCACACT
<i>SSIIa</i> -4	TGGGCTCCATTTC AACACC	TGCATAAGCGGCCTTGAGTT
<i>SSIIa</i> -5	TGGCACATAGAGCCTAGCAC	CCTCTGGCTTTCCATT CAGC
<i>SSIIa</i> -6	TGTTGTGAAGTCCTTCGGCTT	TTGTGACAACGTCAGCAAGG
<i>SSIIa</i> -7	ATAGCGTTGAGATGGCACC	TGCAGTGGAAGGAGGGATCA
<i>SSIIa</i> -8	ACCAATTGTTGGTTCCTGTCG	AGTGACTGGGAAAGAAAAGGCT
<i>SSIIa</i> -9	ATGCTGGCAGATTGGCTTG	CATTGCGTTCAAGTGTCGA
<i>SSIIa</i> -10	AGAGAGCATTGCAGCAGAGG	TTCTCTGCCACCGTTGGAT
<i>SSIIa</i> -11	GGTTGGTTCCACTCCCTCTG	TCACCGTACTCTCTCTCGCA
<i>SBEIIb</i> -1	TCGCTCCATCAGGACCAGAG	TGTTGGTGGGACAACCTCGTG
<i>SBEIIb</i> -2	TGTCGCTCATTCCGTT CAGT	TAGCATTTTAGGTAAATGGTGAGAC
<i>SBEIIb</i> -3	CCCATGTAGTGCTGAAGGTGT	GTATGGGATTTCTCCTGCGG
<i>SBEIIb</i> -4	TATCCTGCTTGGCCAGTGTT	AGGGGTCAGTAACAGCATTGT
<i>SBEIIb</i> -5	TGGAAGCTTTGGGTGATCAAAT	ACCCAGAGGCCAATGAGCTA
<i>SBEIIb</i> -6	GCCCTCATGTTGGTGAACCC	TCCTTGCTGTTTTCTAAGCCCA
<i>SBEIIb</i> -7	ACGCTAATGTCAGTTTGGCT	ACCAACCCCAACCATCTTGAA
<i>SBEIIb</i> -8	ATGCCGCATAGAAGTGTCCA	TATGTGAGTTTCTCATGCCAGT
<i>SBEIIb</i> -9	GGCTTTCTGCAGTCTACACC	TACTGTCCACATAGCCCATGC
<i>SBEIIb</i> -10	TTTCTGGGGGTTGCACAAAT	TCTGAGCAAGACTTACGGCA
<i>SBEIIb</i> -11	CAGTTTTCAGCGCGTTCAT	CAGAGTAGGACCACACGACC

Wx-dCAPS 分子标记引物中加粗并下划线的碱基 C 为引入的错配标记

The bold and underlined base C in the *Wx*-dCAPS molecular marker primers is the introduced mismatched base

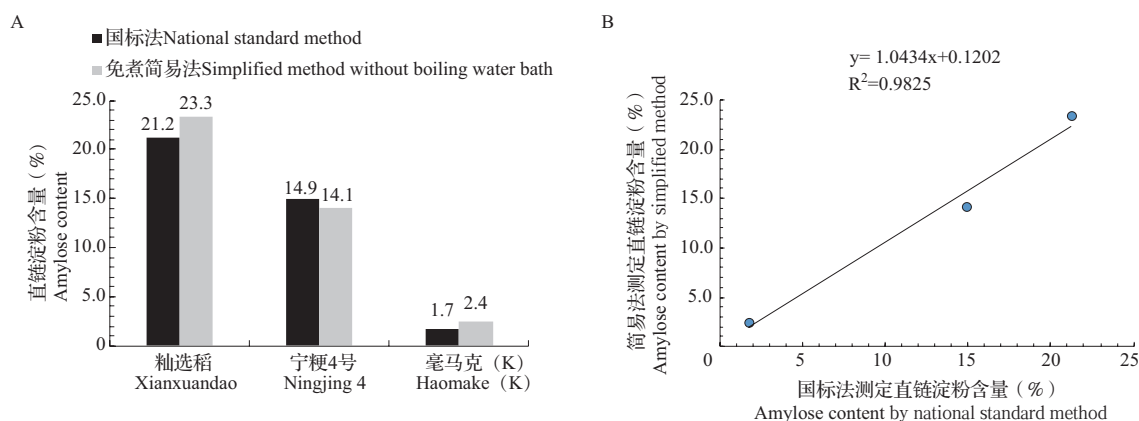
1.2.4 序列比对和测序验证 从水稻功能基因组育种数据库 (RFGB v2.0, <https://www.rmbreeding.cn/>) 中获取日本晴、立新粳、南特号、郴晚 3 号等品种与抗性淀粉合成相关的基因 (*SSIIa* 与 *SBEIIb*) 序列, 利用 SnapGene (Version 6.0.2, Insightful Science) 软件进行基因序列比对。同时对 *Wx* 第一内含子片段、*SSIIa* 与 *SBEIIb* 的全长基因利用网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>) 设计特异性引物 (表 2), 进行 PCR 和产物测序, 测序由南京擎科公司完成。

2 结果与分析

2.1 免煮简易法测定直链淀粉的改进

参照前人研究和国家行业标准 (NY/T 2639-

2014, 简称国标法), 在测定直链淀粉方法上主要进行了 2 个方面的改进。第一, 碱液糊化浓度从 1.0 mol/L 提高到 1.8 mol/L, 静置过夜 (16~18 h), 这样既可以使米粉充分糊化, 又可以处理大量样品, 避免了繁琐的沸水浴操作; 第二, 最终的淀粉-碘比色液在 720 nm 而不是 620 nm 波长检测, 这样可以尽量减少支链淀粉对比色的干扰作用^[14-15]。为测试该方法的效果, 分别选取籼选稻 (籼稻类型)、宁粳 4 号 (粳稻类型) 和毫马克 (糯稻类型) 进行免煮简易法和国标法的比较。结果表明, 免煮简易法与国标法测定值接近 (图 1A), 两者相关系数为 0.9825 (图 1B), 表明该方法可以替代国标法用于大量资源的筛选。



A: 国标法和免煮简易法测定直链淀粉含量的比较; B: 国标法和免煮简易法测定结果的相关性分析

A: Comparison of national standard and simplified methods without boiling water bath;

B: Correlation analysis between national standard and simplified method without boiling water bath

图1 免煮简易法和国标法测定直链淀粉含量的比较和相关分析

Fig.1 Comparison of detection of amylose content by simplified method without boiling water bath and national standard method and their correlation analysis

2.2 水稻直链淀粉含量的分析

利用免煮简易法测定了119份种质资源的直链淀粉含量。结果表明,直链淀粉含量的平均值为20.9%。大部分水稻品种直链淀粉含量位于9.0%~33.0%之间,占比88.2%(图2),与前人报道的水稻直链淀粉含量变异在8.0%~34.0%之间一致^[16]。Juliano^[17]将稻米直链淀粉含量分为5个等级,分别为糯性(<2.0%)、极低含量(2%~9%)、低含量(9%~20%)、中等含量(20%~25%)、高含量(>25%)。根据这一分类标准将所测得的119份供试材料的直链淀粉含量进行了分组。高直链淀粉含

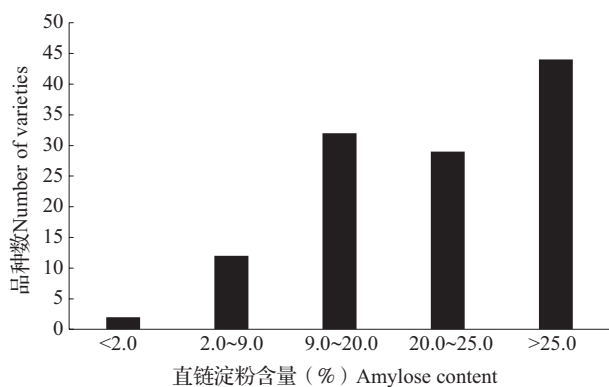


图2 供试材料直链淀粉含量在不同区间的分布频率

Fig.2 The distribution frequency of amylose content in different regions of the tested materials

量的材料一共有44份,占比37.0%,其中直链淀粉含量高于30%的品种有10个。在直链淀粉含量最高的前18个品种中(按照全部测定品种的15%取样计),13份为籼稻,5份材料为粳稻。在所测直链淀粉含量最低的18个品种中,11份为籼稻,7份为粳稻。

2.3 水稻抗性淀粉的含量与分析

抗性淀粉测定繁琐且成本高,前人报道直链淀粉含量和抗性淀粉含量密切正相关^[6],因此可以从高直链淀粉含量资源中进一步筛选鉴定高抗性淀粉种质。从119份供试材料中选取15份直链淀粉含量最高的品种与2份低直链淀粉品种(粘壳糯、红谷)进行抗性淀粉含量的测定。结果如图3,17份材料抗性淀粉的含量平均值为1.9%,极差为4.2%。在抗性淀粉含量最高的前10份种质资源中,有6份为籼稻。抗性淀粉含量最高的品种是立新梗、南特号和霸王鞭1,分别为4.5%、3.6%和3.1%;而红谷和香谷的抗性淀粉含量最低,分别为0.5%和0.3%。其余大部分品种的抗性淀粉含量处于1.0%~3.0%之间,与前人研究结果一致^[3]。尽管矮密、金优1号和香谷都被归类于高直链淀粉含量品种,但这3个品种的抗性淀粉含量与普通稻米差异不显著($P>0.05$)。这表明直链淀粉和抗性淀粉含量可能具有不同的遗传学基础。

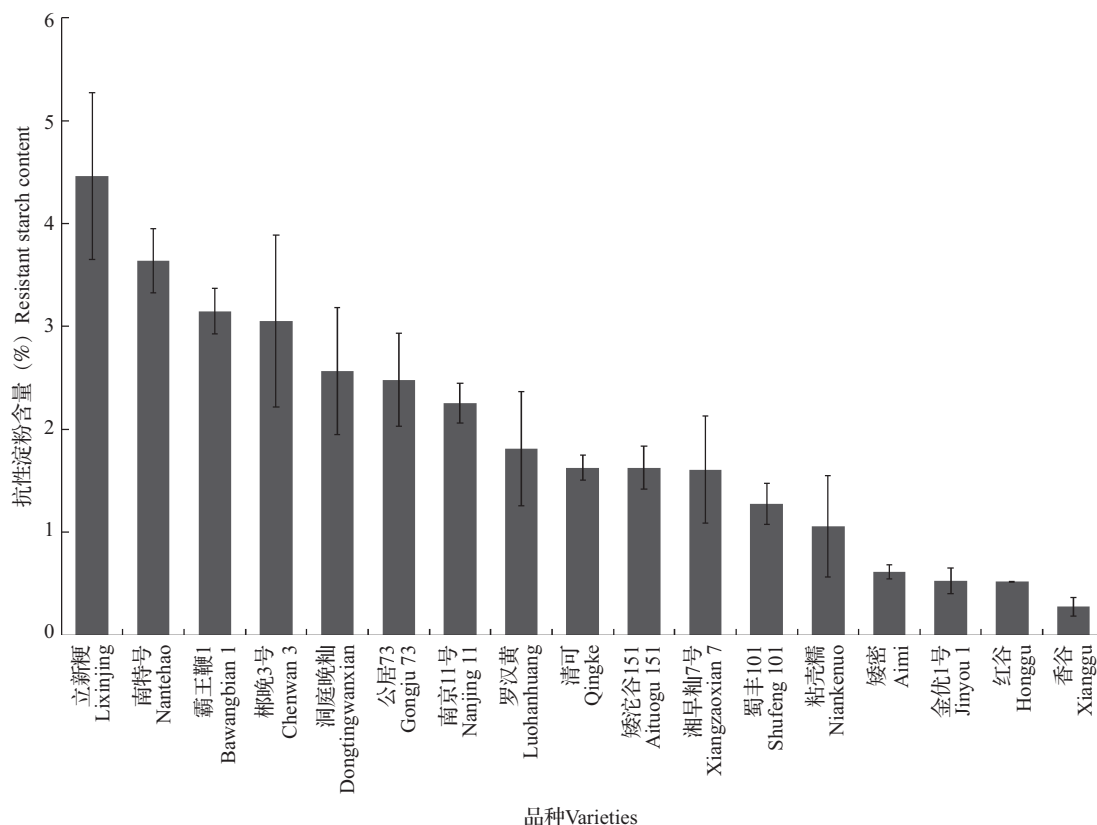


图3 15份高直链淀粉材料与2份低直链淀粉材料抗性淀粉含量

Fig.3 Resistant starch contents of fifteen high amylose and two low amylose materials

2.4 *Wx* 基因型鉴定

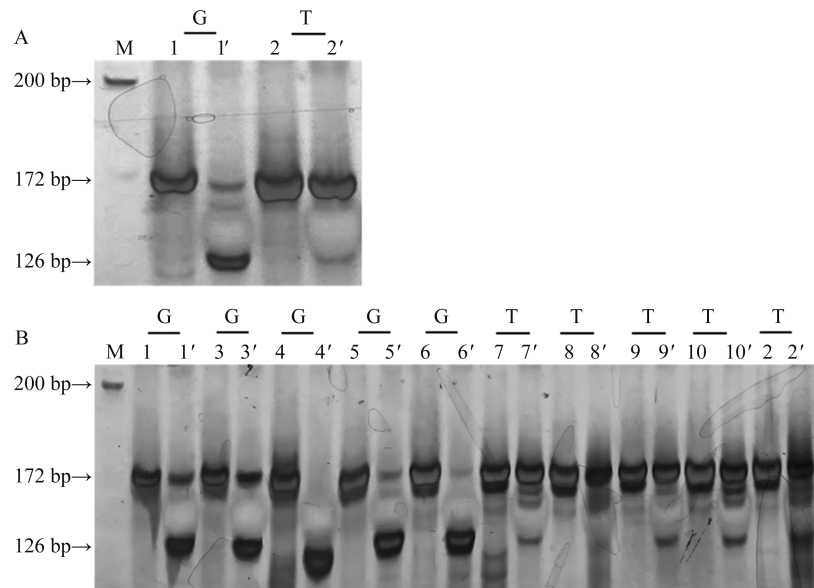
Wx 基因是控制直链淀粉含量的主效基因, Wx^a 和 Wx^b 是 *Wx* 基因的两个常见等位基因, Wx^b 的第1内含子5'端剪切处发生由G→T的突变,导致第1内含子剪接效率降低及剪接不正常,直链淀粉含量降低^[18]。针对内含子+1位这种单碱基变异,开发了1个dCAPS分子标记。当内含子+1位是T时,该标记的扩增不会被 *Mva* I 限制性内切酶切割,扩增产物为172 bp;当内含子+1位是G时,该标记的扩增将会被 *Mva* I 切割为126 bp和46 bp (图4A)。用所设计的引物对高直链淀粉含量的5份材料,包括南京11号、洞庭晚粳、金优1号、南特号、香谷以及低直链淀粉含量的5份材料,包括三百粒、湘恢91269、赤壳糯、金枝糯、粘壳糯的 *Wx* 基因进行标记分型。结果显示(图4B),高直链淀粉含量的5份材料扩增产物经酶切后片段大小均为126 bp,说明它们的 *Wx* 基因内含子+1位为G碱基;低直链淀粉含量的5份材料的扩增产物经酶切后,排除由于过量酶切产生的非特异性产物或DNA中少量污染带来的杂带,酶切后主要片段大小均为172 bp,说明它们的 *Wx* 基因内含子+1

位均为T碱基。利用水稻3K数据库(RFGB v2.0 <https://www.rmbreeding.cn/>)获取部分品种 *Wx* 基因内含子+1位的碱基序列和测序验证,表明 *Wx* 等位基因序列与dCAPS分子标记鉴定结果一致(图4B)。因此可用该dCAPS标记来鉴定 Wx^a 和 Wx^b 基因型,对种质资源的直链淀粉含量进行初步鉴定。

2.5 抗性淀粉合成相关基因的基因型鉴定

从15份高抗性淀粉材料中选取3份抗性淀粉含量较高的品种:立新梗、南特号、榔晚3号,以日本晴(低抗性淀粉含量品种^[19])为对照,对影响抗性淀粉形成的2个关键基因 *SSIIIa* 与 *SBEIIb* 进行了测序对比分析。

对于 *SSIIIa* 基因,立新梗、南特号、榔晚3号作为高抗性淀粉品种,在与日本晴序列对比中出现了3个相同的位点突变。第三外显子+1078位与第五外显子+153位的碱基突变均未改变氨基酸的编码序列,属于同义突变。此外,在 *SSIIIa* 第三外显子+2362位出现了T到A的替换,使缬氨酸转变为谷氨酸,该碱基的错义突变,可能影响抗性淀粉含量(图5A)。



A: dCAPS 分子标记酶切示意图; B: 5 个高直链淀粉品种与 5 个低直链淀粉品种酶切结果; 字母 G 和 T 表示 *Wx* 基因第一内含子 +1 位碱基; 未加引号的数字为酶切前, 加引号的数字为酶切后; 1: 南京 11 号; 2: 三百粒; 3: 洞庭晚粳; 4: 金优 1 号; 5: 南特号; 6: 香谷; 7: 粘壳糯; 8: 金枝糯; 9: 赤壳糯; 10: 湘恢 91269; M: 核酸分子量标记; 注意: 在 126 bp 处有一些弱的条带, 可能是过量酶切产生的非特异性产物或 DNA 中的少量污染

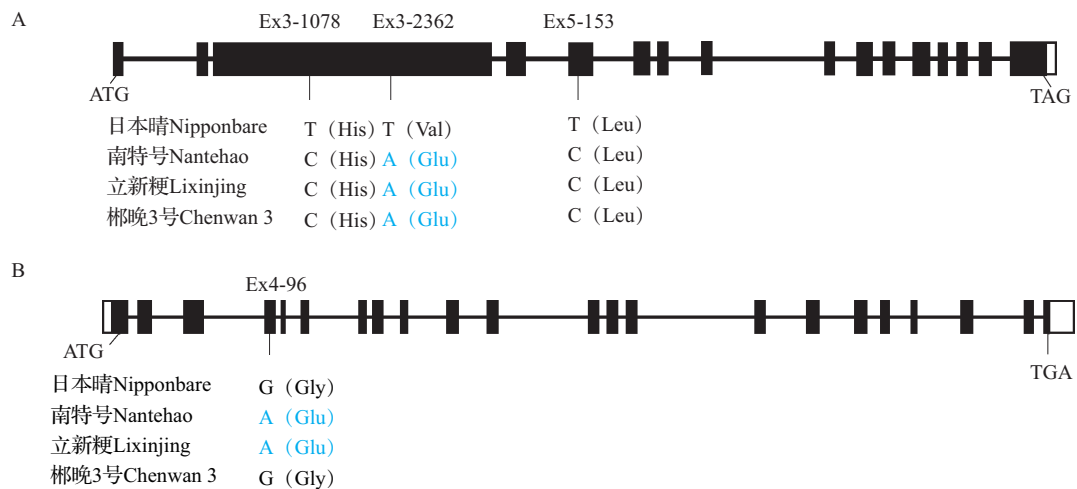
A: Schematic diagram of dCAPS molecular marker enzyme digestion; B: Enzymatic digestion results of five high and five low amylose varieties;

The letters G and T indicate the first nucleotide in the first intron of *Wx* gene; The unquoted numbers are before digestion, and the quoted numbers are after digestion; 1: Nanjing 11; 2: Sanbaili; 3: Dongtingwanxian; 4: Jinyou 1; 5: Nantehao; 6: Xianggu; 7: Niankenuo; 8: Jinzhinuo; 9: Chikenuo; 10: Xianghui 91269; M: Nucleotide molecular weight marker;

Note: That some weak bands in 126bp region are nonspecific digested products due to abundant enzyme or slight contamination in DNAs

图 4 dCAPS 分子标记检测 *Wx* 基因型

Fig.4 Detection of *Wx* genotypes with dCAPS molecular marker



A: 3 个高抗性淀粉品种中 *SSIIIa* 碱基突变; B: 3 个高抗性淀粉品种中 *SBEIIb* 碱基突变; 蓝色字体表示突变的碱基, 括号内为改变的编码氨基酸

A: Base mutation of *SSIIIa* in three high resistant starch varieties; B: Base mutation of *SBEIIb* in three high resistant starch varieties; Mutational nucleotides are shown in blue letters and changed amino acids are shown in parenthesis

图 5 高抗性淀粉品种中 *SSIIIa* 与 *SBEIIb* 的基因分析

Fig.5 Gene analysis of *SSIIIa* and *SBEIIb* in high resistant starch varieties

对于 *SBEIIb* 基因, 与日本晴序列相比, 3 个高抗性淀粉品种在外显子区没有发现共同的碱基突变。但 *SBEIIb* 基因第四外显子 +96 bp 处有 2 个品种 (立新梗与南特号) 发生了 G 到 A 的替换, 导

致编码的甘氨酸改变为谷氨酸 (图 5B)。这些在 *SSIIIa* 与 *SBEIIb* 鉴定的共同碱基突变, 为以后通过基因编辑改良抗性淀粉提供了靶点。

3 讨论

前人研究认为稻米直链淀粉含量在 10.0%~26.1% 时,适宜优质米粉加工^[20]。本研究材料来源为收集于全国各地的 119 份种质,大部分水稻直链淀粉含量在 9.0%~33.0% 之间,说明这些种质在淀粉品质上具有广泛的差异。在水稻抗性淀粉含量方面,前人研究表明普通稻米中抗性淀粉的含量较低,热米饭的抗性淀粉含量低于 1.0%,冷米饭的抗性淀粉含量在 1.0%~2.1% 之间^[21]。本研究试验材料多为育成或地方品种,直链淀粉含量普遍较高,测得抗性淀粉含量均值为 1.9%,最高者为立新梗的 4.5%,较以往测定的种质抗性淀粉水平有一定提高,可用于后续高抗性淀粉育种改良的优异材料。前人对抗性淀粉和直链淀粉的研究,揭示直链淀粉参与抗性淀粉结晶区和无定形区的形成^[22],表明抗性淀粉与直链淀粉高度相关。但本研究部分材料抗性淀粉和直链淀粉的相关性不高,例如香谷的直链淀粉含量较高,达 30.7%,但抗性淀粉含量较低,仅有 0.3%。分析其原因可能是,影响抗性淀粉含量的因素除了直链淀粉含量外,淀粉的分子量大小、淀粉结构、链长分布、淀粉颗粒形状、淀粉结晶度、热力学特性和支链淀粉结构、回生等因素均会对抗性淀粉的形成产生影响^[19]。此外,稻米中其他成分,如蛋白质、脂肪等也会影响抗性淀粉的形成^[5],这为比较不同遗传资源稻米中抗性淀粉和直链淀粉含量相关性带来了一定的影响。

对于 Wx^a 和 Wx^b 基因型的鉴定,以往研究常利用 PCR-*Acc* I 酶切法进行检测^[18],但 *Acc* I 酶 (Thermo Scientific, 货号: ER1482) 较为稀缺,导致实验成本较高。本研究开发了一个新的 dCAPS 分子标记,引入了错配碱基使得 Wx 基因的内含子 +1 位能够被 *Mva* I 切割。该方法在保证实验准确性的同时,相较 *Acc* I 还可以降低 5/6 的实验用酶成本,因此该标记具有一定应用价值。为了发掘提高水稻抗性淀粉含量的基因,本研究对高抗性淀粉含量相关基因 *SSIIIa* 及 *SBEIIb* 与日本晴做了序列对比。对于 *SSIIIa* 基因,尽管 3 种高抗性淀粉品种均存在几十种不同的碱基突变,但与日本晴相比,发现 3 个共同的位点突变。其中位于 *SSIIIa* 第三外显子 +2362 bp 处的错义突变可能导致 *SSIIIa* 编码的可溶性淀粉合酶表达降低或酶活性改变,使抗性淀粉含量提高。同理, *SBEIIb* 在两个高抗性淀粉含量材料中出现共同的错义突变。这些突变位点的作用还

需要通过转基因、体外表达酶活性比较等手段进一步验证。随着新型基因精准编辑工具的开发^[23-24],还可以利用单碱基编辑器在不同背景材料验证关键碱基替换对抗性淀粉含量提升的作用。

基因产物的调控不仅依赖各种编码酶的活性差异,同时也依赖各种不同结构的核心启动子的作用。已报道的 Wx 基因启动子 S7 位点的改变导致 Wx 基因转录水平表达降低,引起直链淀粉水平降低;而在不同类型水稻品种 *SBEIIb* 基因启动子序列的同源性高达 99% 以上,保守性较强^[25-26];对于 *SSIIIa* 基因,其启动子序列对基因表达的影响尚未报道。因此对 Wx 和 *SSIIIa* 的启动子序列差异和不同种质资源淀粉性状的关系,还有待进一步研究。

致谢: 农业部长江中下游粳稻生物学与遗传育种重点实验室、长江流域杂交水稻协同创新中心、现代作物生产省部共建协同创新中心、江苏南京水稻种质资源国家野外科学观测研究站、南方粳稻研究院(公司)给予支持,谨致谢意。

参考文献

- [1] 李润宝,王哲伟,林亚三,张友庚. 水稻品质及其研究进展. 种子世界, 2011 (12): 22-23
Li R B, Wang Z W, Lin Y S, Zhang Y G. Research progress in rice quality. Seed World, 2011 (12): 22-23
- [2] 曾庆孝,蒋卫东,张晓燕. 大米特性对方便米饭生产工艺的影响. 食品科学, 1995 (9): 25-30
Zeng Q X, Jiang W D, Zhang X Y. Effects of rice characteristics on production technology of instant rice. Food Science, 1995 (9): 25-30
- [3] 吴伟,刘鑫,杨朝柱,舒小丽,吴殿星. 抗性淀粉及预防糖尿病和肥胖症功能稻米研究进展. 核农学报, 2006, 20 (1): 60-63, 22
Wu W, Liu X, Yang C Z, Shu X L, Wu D X. Progress in the study of resistant starch and functional rice for prevention of diabetes and hyperlipidemia. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2006, 20 (1): 60-63, 22
- [4] 郭春峰,李婧妍,张守文. 抗性淀粉生理功能研究进展. 食品科技, 2006, 31 (2): 1-3
Guo C F, Li J Y, Zhang S W. The research development on the physiological function of resistant starch. Food Science and Technology, 2006, 31 (2): 1-3
- [5] Ding Y, Wang M K, Shen Y, Shu X L, Wu D X, Song W J. Physiochemical properties of resistant starch enhancement approaches in rice. Rice Science, 2021, 28 (1): 31-42
- [6] Regina A, Bird A, Topping D, Bowden S, Freeman J, Barsby T, Kosar-Hashemi B, Li Z Y, Rahman S, Morell M. High-amylose wheat generated by RNA interference improves indices of large-bowel health in rats. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103 (10): 3546-3551
- [7] Sano Y, Katsumata M, Okuno K. Genetic studies of speciation

- in cultivated rice. 5. Inter- and intraspecific differentiation in the *Waxy* gene expression of rice. *Euphytica*, 1986, 35 (1): 1-9
- [8] 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. *Molecular Biology and Evolution*, 1998, 15 (8): 978-987
- [9] Zhou H J, Wang L J, Liu G F, Meng X B, Jing Y H, Shu X L, Kong X L, Sun J, Yu H, Smith S M, Wu D X, Li J Y. Critical roles of soluble starch synthase SSIIa and granule-bound starch synthase *Waxy* in synthesizing resistant starch in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113 (45): 12844-12849
- [10] Tanaka N, Fujita N, Nishi A, Satoh H, Hosaka Y, Ugaki M, Kawasaki S, Nakamura Y. The structure of starch can be manipulated by changing the expression levels of starch branching enzyme IIb in rice endosperm. *Plant Biotechnology Journal*, 2004, 2 (6): 507-516
- [11] Lu F H, Park Y J. An SNP downstream of the *OsBEIIb* gene is significantly associated with amylose content and viscosity properties in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Cereal Science*, 2012, 56 (3): 706-712
- [12] 焦桂爱, 胡培松, 唐绍清, 罗炬, 邵高能. 稻米直链淀粉含量的简易测定方法. *中国稻米*, 2009 (3): 23-24
- Jiao G A, Hu P S, Tang S Q, Luo J, Shao G N. A simple method for the determination of amylose content in rice. *China Rice*, 2009 (3): 23-24
- [13] 马文东. 水稻基因组 DNA 提取方法的研究. *黑龙江农业科学*, 2014 (1): 7-11
- Ma W D. Study on extraction method of rice genomic DNA. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2014 (1): 7-11
- [14] 熊宁, 刘坚, 袁建, 周显青, 刘勇, 余敦年, 尹成华, 史玮, 应美蓉, 牟钧, 莫晓嵩, 周红梅, 夏遇秋, 郑少华, 柳永英, 王亚军, 王艳, 赵武善, 倪勇. GB/T 15683-2008 大米直链淀粉含量的测定. 北京: 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 / 中国国家标准化管理委员会, 2008
- Xiong N, Liu J, Yuan J, Zhou X Q, Liu Y, Yu D N, Yin C H, Shi W, Ying M R, Mou J, Mo X S, Zhou H M, Xia Y Q, Zheng S H, Liu Y Y, Wang Y J, Wang Y, Zhao W S, Ni Y. GB/T 15683-2008 Rice-Determination of amylose content. Beijing: State General Administration of the People's Republic of China for Quality Supervision and Inspection and Quarantine/Standardization Administration of the People's Republic of China, 2008
- [15] ISO. ISO 6647-1-2020 Rice-Determination of amylose content-Part 1: Spectrophotometric method with a defatting procedure by methanol and with calibration solutions of potato amylose and waxy rice amylopectin. Third Edition. Brussels: International Organization for Standardization, 2020: 11
- [16] 揭厚胜. 不同直链淀粉含量的水稻品种籽粒淀粉和蛋白质积累特性的研究. 成都: 四川农业大学, 2004
- Jie H S. Study on characteristics of starch and protein accumulation in different amylose content rice varieties. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2004
- [17] Juliano B O. Rice chemistry and technology. 2nd ed. St Paul, MN: American Association of Cereal Chemists, 1985: 443-513
- [18] 张娅丽, 许明辉, 曾亚文, 姚春馨, 陈善娜. 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. *中国水稻科学*, 2007, 21 (1): 20-24
- Zhang Y L, Xu M H, Zeng Y W, Yao C X, Chen S N. Relationship between the first base of splice donor of *Wx* gene intron 1 and amylose content in Yunnan indigenous rice varieties. *Chinese Journal of Rice Science*, 2007, 21 (1): 20-24
- [19] Butardo V M, Fitzgerald M A, Bird A R, Gidley M J, Flanagan B M, Larroque O, Resurreccion A P, Laidlaw H K, Jobling S A, Morell M K, Rahman S. Impact of down-regulation of starch branching enzyme IIb in rice by artificial microRNA- and hairpin RNA-mediated RNA silencing. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62 (14): 4927-4941
- [20] 张慧杰, 王步军. 影响米粉品质的稻米质量指标分析. *农产品质量与安全*, 2020 (3): 78-81
- Zhang H J, Wang B J. Analysis of rice quality indexes affecting rice flour quality. *Quality and Safety of Agro-Products*, 2020 (3): 78-81
- [21] 方长云, 胡贤巧, 卢林, 段彬伍. 稻米抗性淀粉的研究进展. *核农学报*, 2015, 29 (3): 513-520
- Fang C Y, Hu X Q, Lu L, Duan B W. Advances in study on rice resistant starch. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2015, 29 (3): 513-520
- [22] 杨光, 丁霄霖. 抗性淀粉分子量分布的研究. *中国粮油学报*, 2000 (5): 37-40
- Yang G, Ding X L. Studies on molecular weight distribution of resistant starch. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2000 (5): 37-40
- [23] Anzalone A V, Koblan L W, Liu D R. Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nature Biotechnology*, 2020, 38 (7): 824-844
- [24] 王超凡, 张大健. 基因编辑技术在大豆种质资源研究中的利用. *植物遗传资源学报*, 2020, 21 (1): 26-32
- Wang C F, Zhang D J. Application of gene editing in studies of soybean germplasm resources. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2020, 21 (1): 26-32
- [25] 黄李春. 精细调控 *Wx* 和 *SSI* 基因表达改良稻米蒸煮食味品质. 扬州: 扬州大学, 2020
- Huang L C. Fine-tuning of *Wx* and *SSI* gene expression to improved rice eating and cooking quality. Yangzhou: Yangzhou University, 2020
- [26] 李明月, 李丹, 同拉嘎, 潘冬, 张玉磊, 王海微, 韩云飞, 张忠臣, 金正勋. 不同类型水稻品种胚乳 *SBEIIb* 基因表达特性及启动子序列比较分析. *分子植物育种*, 2017, 15 (11): 4325-4335
- Li M Y, Li D, Tong L G, Pan D, Zhang Y L, Wang H W, Han Y F, Zhang Z C, Jin Z X. Expression characteristics and promoter sequences comparison analysis of *SBEIIb* gene in endosperms of different rice varieties. *Molecular Plant Breeding*, 2017, 15 (11): 4325-4335