

02428 × 合系 35 RILs 群体糙米和发芽糙米 γ-氨基丁酸、抗性淀粉的遗传分析

杨涛¹, 杨武振², 王荔², 曾亚文¹, 文国松², 杜娟¹, 杨树明¹, 普晓英¹

(¹云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所/云南省农业生物技术重点实验室/农业部西南作物基因资源与种质创制重点实验室, 昆明 650205; ²云南农业大学农学与生物技术学院, 昆明 650201)

摘要:以水稻 02428 × 合系 35 的 RILs 群体及其亲本糙米和发芽糙米为材料, 对糙米、发芽糙米各 222 个群体样品的 γ-氨基丁酸、抗性淀粉含量进行测定, 以期选育出高 γ-氨基丁酸、高抗性淀粉的水稻新品种。研究表明, 重组自交系糙米、发芽糙米 γ-氨基丁酸含量差异不大, 群体间存在广泛变异, 由主效基因控制。重组自交系糙米、发芽糙米抗性淀粉含量差异大, 发芽糙米抗性淀粉平均含量是该群体糙米的 1.2 倍, 群体间存在广泛变异, 呈偏态分布。高海拔冷凉气候有利于糙米高抗性淀粉含量的提升与进化。本研究可以为功能水稻的遗传及品种选育提供一定的理论依据。

关键词:重组自交系; γ-氨基丁酸; 抗性淀粉; 糙米; 遗传分析

Genetic Analysis of γ-aminobutyric Acid and Resistant Starch Content between Germinated Brown Rice and Brown Rice of 02428 × Hexi 35 RILs Group

YANG Tao¹, YANG Wu-zhen², WANG Li², ZENG Ya-wen¹,
WEN Guo-song², DU Juan¹, YANG Shu-ming¹, PU Xiao-ying¹

(¹Biotechnology and Germplasm Resources Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences/Yunnan Provincial Key Lab of Agricultural Biotechnology/Key Lab of Southwestern Crop Gene Resources and Germplasm Innovation, Ministry of Agriculture, Kunming 650205; ²College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201)

Abstract: The γ-aminobutyric acid (GABA) and resistant starch (RS) content were studied based on germinated brown rice and brown rice of 222 RILs as well as their parents to breed new varieties with high content. The results showed that the difference of GABA content between germinated brown rice and brown rice of RILs population was not significant. GABA content presented a wide range of genetic variation in germinated brown rice and brown rice and controlled by major gene. RS content in germinated brown rice was 1.2 times as much as the brown rice. RS content presented a wide range of genetic variation in germinated brown rice and brown rice, but all appeared the skewed distribution. High altitude and cold climate were effective for improvement and evolution of high content of resistant starch of brown rice. This study could be a theoretical basis for genetic and breeding of the functional rice.

Key words: recombinant inbred lines; γ-aminobutyric acid; resistant starch; brown rice; genetic analysis

功能性稻米是指具有调节人体生理功能、适宜特定人群食用, 但又不以治疗为目的的一类稻米^[1]。功能性水稻含有膳食纤维、抗性淀粉、不饱

和脂肪酸、黄酮、强心苷、甾醇、γ-氨基丁酸等特殊生理活性物质^[2], 其中 γ-氨基丁酸和抗性淀粉是近年来研究的热点。

收稿日期: 2014-13-18 修回日期: 2014-05-12 网络出版日期: 2014-12-11

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20141211.2155.002.html>

基金项目: 云南省重点新产品开发项目(2010BB001); 国家自然科学基金(31060186); 云南省技术创新人才培养项目(2011CI059, 2012HB050)

第一作者研究方向为功能作物评价遗传育种及应用。E-mail: yt52279076@163.com

通信作者: 曾亚文, 主要从事功能作物方面的研究。E-mail: zengyw1967@126.com

γ -氨基丁酸是一种非蛋白质氨基酸,是谷氨酸在谷氨酸脱羧酶作用下的产物,广泛存在于动、植物界,是哺乳动物的脑脊髓中具有抑制性的神经递质,介导 40% 以上的抑制性神经传递。另外还广泛存在于细菌、真菌、蕨类以及一些高等植物中^[3]。1950 年,Flory 等在哺乳动物的脑萃取液中首次发现 γ -氨基丁酸。近年来的研究表明, γ -氨基丁酸是中枢神经系统的一种抑制性传递物质,是脑组织中最重要神经递质之一^[4-9],可结合抗焦虑的受体使之激活,阻止与焦虑有关的信息抵达脑中枢,从根本上镇定神经,起到抗焦虑的效果^[5]。

近十几年来的研究发现,有少部分淀粉受某种因素或加工过程的影响,结构发生变化,在小肠中会产生抗消化现象,即在人体肠胃中仍不能被水解。英国生理学家 Hans 于 1983 年首先将它定义为抗性淀粉^[10]。1992 年联合国粮农组织(FAO, Food and Agriculture Organization)根据 Englyst 和欧洲抗性淀粉研究协作网(EURESTA, European Flair Concerted Action on Resistant Starch)的建议,将抗性淀粉定义为健康者小肠中不被吸收的淀粉及其降解产物。糖代谢、脂代谢紊乱和胰岛素抵抗是代谢综合征产生的主要诱因,抗性淀粉通过发挥其潜在的生理学特性可以有效地改善糖脂代谢、减轻体重、增强胰岛素的敏感性,达到防治代谢综合征的目的^[11-13]。

本研究旨在通过对 γ -氨基丁酸、抗性淀粉含量的遗传分析,以期选育出高 γ -氨基丁酸、高抗性淀粉的水稻新品种,为功能水稻的遗传及品种选育提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

推广粳稻品种 02428 (P_1) 和粳稻合系 35 (P_2) 及其杂交培育的 222 个重组自交系群体。试验设 2 个处理,处理 1 为 02428 和合系 35 及其杂交培育的重组自交系群体经过糙米机脱壳变为糙米。处理 2 为 02428 和合系 35 及其杂交培育的重组自交系群体糙米发芽 24 h 的发芽糙米。打粉备用。

1.2 γ -氨基丁酸含量的测定

按 K. Inatomi 等^[14]的方法测定水稻 γ -氨基丁酸含量。称取打成粉状的样品 0.5 g,用蒸馏水定容至 5 mL 后,振荡浸提 2 h,过滤、离心。取滤液 1 mL,加入 0.6 mL pH9.0 的硼酸缓冲液,2 mL 5% 的重蒸酚溶液,1 mL 有效氯为 7% 的次氯酸钠,充分振荡。沸水浴 10 min 后,立即冰浴 20 min 并不断地

振荡,直至有蓝绿色化合物出现,然后加入 2 mL 60% 的乙醇于 645 nm 下比色,测吸光度(A)。取 5 个标样浓度 0、5、10、15、20 mg/100g 计算出标准曲线方程 $Y = 477.77X + 13.789$,其中 X 为 γ -氨基丁酸的浓度, Y 为 645 nm 可见光下的吸光度, $R = 0.9993$ 。通过所得 γ -氨基丁酸的标准曲线求出样品 γ -氨基丁酸含量。

1.3 抗性淀粉的含量测定

采用 I. Goñi 等^[15]的方法测定抗性淀粉含量,称取 0.5 g 样品于 10 mL 离心管,加入 2 mL pH5.8 磷酸盐缓冲溶液和 0.6 mL 耐高温 α -淀粉酶,沸水浴 30min 冷却至室温,离心(5000 r/min, 20 min)弃上清液;加入 4 mL 蒸馏水,洗涤沉淀,离心弃上清液(至少重复 1 次),加入 1.2 mL 2mol/L KOH 溶解沉淀,室温下振荡 30 min,促进沉淀溶解,以 2mol/L HCl 调 pH 至中性,加入 1 mL 醋酸钠缓冲液(pH4.4)和 0.2 mL 葡萄糖淀粉酶。60 °C 水浴 45 min。离心(5000 r/min, 20 min),收集上清液,再用 10 mL 蒸馏水洗涤沉淀(重复 2 次),离心(5000 r/min, 20 min),取上清液。合并所收集上清液,定容至 100 mL 容量瓶中。用葡萄糖试剂盒测样品中葡萄糖含量,计算抗性淀粉含量。

1.4 数据处理

利用 Excel 和 SPSS 16.0 进行数据处理和统计分析。

2 结果与分析

2.1 发芽糙米和糙米 γ -氨基丁酸含量遗传变异

02428 与合系 35 糙米 γ -氨基丁酸含量分别为 5.54 mg/100g 和 11.27 mg/100 g,两者相差 5.73 mg/100 g。如表 1 所示,222 个 RILs 发芽糙米和糙米 γ -氨基丁酸平均含量分别为 11.16 mg/100 g 和 8.72 mg/100 g, RILs 群体发芽糙米 γ -氨基丁酸含量略高于该群体糙米;其发芽糙米 γ -氨基丁酸最高含量(22.54 mg/100 g)是最低含量(4.75 mg/100 g)的 4.75 倍,糙米 γ -氨基丁酸最高含量(24.4 mg/100 g)是最低含量(2.92 mg/100 g)的 8.36 倍。

由图 1 可看出, RILs 发芽糙米 γ -氨基丁酸含量在 6 ~ 8 mg/100g 及 13 ~ 14 mg/100g 的分布株数最高,高于高值亲本有 121 株,低于低值亲本有 32 株;而糙米在 4 ~ 5 mg/100g 及 10 mg/100g 左右的分布株数最高,高于高值亲本有 48 株,低于低值亲本有 78 株,发芽糙米和糙米的分布趋势相同,呈双峰分布。

表 1 02428 × 合系 35 的 222 个 RILs 发芽糙米和糙米 γ -氨基丁酸含量

Table 1 GABA content between germinated brown rice and brown rice of 222 RILs of 02428 × Hexi 35

处理 Treatments	02428	合系 35	RILs 群体平均值 (mg/100g) RILs population average	标准差 SD	变异系数 (%) CV	最大值 (mg/100g) Max.	最小值 (mg/100g) Min.	最大值/ 最小值 Max./Min.
发芽糙米 Germinated brown rice	7.66	10.54	11.16	3.29	29.48	22.54	4.75	4.75
糙米 Brown rice	5.54	11.27	8.72	4.94	56.65	24.4	2.92	8.36

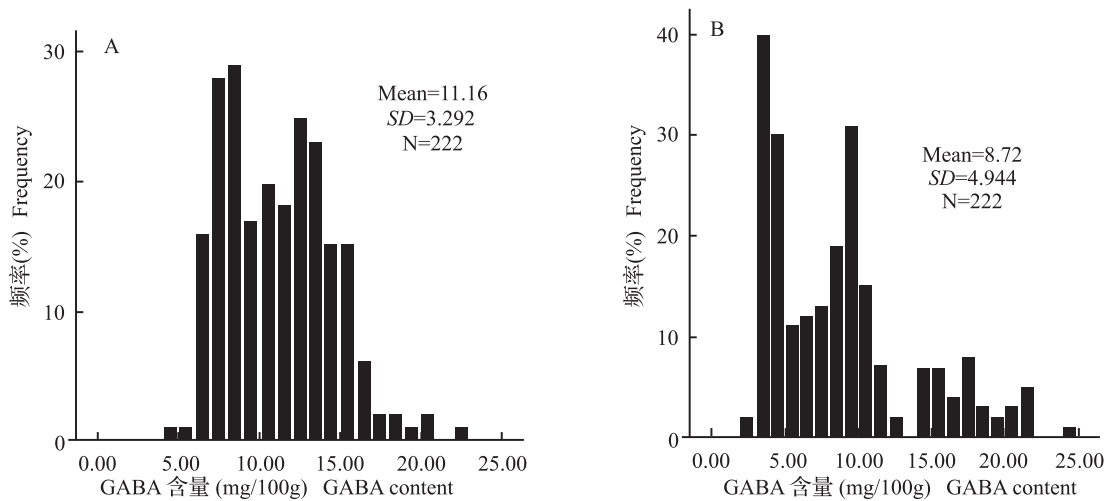
图 1 02428 × 合系 35 的 RILs 群体发芽糙米 (A) 和糙米 (B) γ -氨基丁酸含量分布

Fig. 1 The distribution of GABA content between germinated

brown rice (A) and brown rice (B) of 02428 × Hexi 35 RILs population

2.2 发芽糙米和糙米抗性淀粉含量的遗传变异

02428 与合系 35 糙米抗性淀粉含量分别为 3.65% 和 5.54%，两者相差 1.89%。如表 2 所示，222 个 RILs 发芽糙米和糙米抗性淀粉平均含量分别为 6.19% 和 5.18%，RILs 发芽糙米抗性淀粉平均含量是该群体糙米的 1.2 倍；其发芽糙米抗性淀粉最高含量 (11.89%) 是最低含量 (0.15%) 的 79.27

倍；糙米抗性淀粉最高含量 (11.84%) 是最低含量 (0.11%) 的 107.64 倍。

由图 2 看出，222 个 RILs 群体发芽糙米总抗性淀粉含量 5% ~ 6% 分布株系数最高，高于高值亲本有 66 株，低于低值亲本有 27 株；糙米抗性淀粉含量在 4% ~ 6% 的株系数最高，高于高值亲本有 92 株，低于低值亲本有 71 株。且两者呈现正态分布特征。

表 2 02428 × 合系 35 的 222 个 RILs 群体发芽糙米和糙米抗性淀粉含量

Table 2 Resistant starch content between germinated brown rice and brown rice of 222 02428 × Hexi 35 RILs population

处理 Treatments	02428	合系 35	RILs 群体平均值 (%) RILs population average	标准差 SD	变异系数 (%) CV	最大值 (%) Max.	最小值 (%) Min.	最大值/ 最小值 Max./Min.
发芽糙米 Germinated brown rice	3.48	7.50	6.19	2.31	37.32	11.89	0.15	79.27
糙米 Brown rice	3.65	5.54	5.18	2.96	57.19	11.84	0.11	107.64

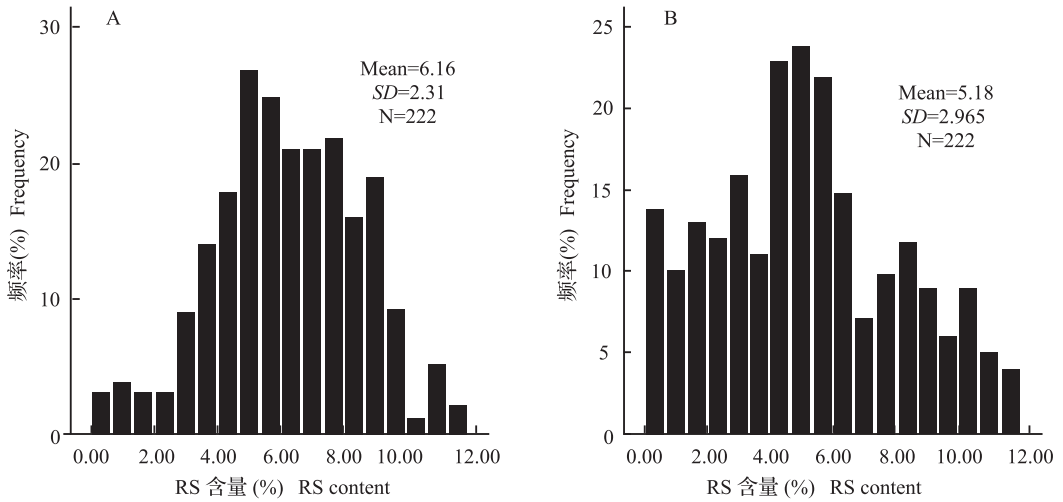


图2 02428 × 合系 35 的 RILs 群体发芽糙米 (A) 和糙米 (B) 抗性淀粉含量分布
Fig. 2 The distribution of resistant starch content between germinated brown rice (A) and brown rice (B) of 02428 × Hexi35 RILs population

3 讨论

3.1 发芽糙米和糙米 γ -氨基丁酸含量由主效基因控制

尽管 02428 × 合系 35 的 RILs 群体的发芽糙米和糙米 γ -氨基丁酸含量差异不大,但 RILs 群体间遗传多样性较为突出,呈现了广泛的遗传变异,说明利用单粒遗传法选育的重组自交系群体能够代表后代的遗传变异;无论是发芽糙米还是糙米 γ -氨基丁酸含量均呈现双峰分布,说明控制 γ -氨基丁酸含量的基因是由主效基因控制的,这些材料可以用于 γ -氨基丁酸含量的分子定位,也可以在这些材料中选育出高 γ -氨基丁酸含量的育种材料,进一步培育成功能性水稻品种。另外,02428 × 合系 35 的 RILs 群体无论是发芽糙米还是糙米 γ -氨基丁酸含量均呈现众多明显的超高亲优势,由于该 RIL 群体是在高原粳稻区培育而成的,高海拔冷凉气候是否有利于糙米高 γ -氨基丁酸含量的提升与进化尚待深入研究,这对选育高 γ -氨基丁酸含量的功能稻米提供了材料基础。

稻米粒用水浸泡后,游离氨基酸的组成和含量发生了显著的变化,其中 γ -氨基丁酸的变化最突出,出现了大幅度提高^[16]。研究表明发芽前稻谷中各部位 γ -氨基丁酸含量依次为皮胚 > 颖壳 > 糙米 > 精米。稻谷和糙米萌发后各部位 γ -氨基丁酸含量为胚芽 > 糙米 > 精米^[17]。各种外界条件对发芽糙米中 γ -氨基丁酸含量具有较大的影响^[18-20],一般情况下,细胞内的 γ -氨基丁酸含量较低,但是遇到

缺氧、干旱、冷害、高温、机械刺激等非生物胁迫, γ -氨基丁酸含量会升高^[21]。在发芽过程中,GABA 的积累主要来自谷氨酸脱羧酶的催化反应,其积累速度和积累量与发芽条件有较大关系^[22]。发芽后糙米中 γ -氨基丁酸含量是未发芽糙米的 2.3 倍,是精白米的 7.6 倍^[23]。糙米经过发芽后,不仅可改善其适口性,而且其营养价值得到大幅度地提高^[24]。本研究发现发芽糙米比糙米的 γ -氨基丁酸等功能性成分含量都高,与罗曦等^[17]、郑向华等^[23]、刘丽萍等^[24]的研究结果一致。

3.2 发芽糙米和糙米抗性淀粉含量呈现广泛的遗传变异

02428 × 合系 35 的 RILs 群体的发芽糙米和糙米抗性淀粉含量相差较大,且 RIL 群体间遗传多样性较为突出,呈现了广泛的遗传变异;02428 × 合系 35 的 RILs 群体发芽糙米和糙米抗性淀粉含量呈偏态分布特征。赵国珍等^[25]利用水稻 F₂ 分离群体,研究云南软米品种毫木细的低直链淀粉含量对桂朝 2 号的高直链淀粉含量为隐性,并且由主效基因控制。大多数数量性状可能是微效基因突变累积到一定程度进化成主效基因而形成的^[26]。RILs 群体发芽糙米抗性淀粉平均含量是该群体糙米的 1.2 倍,这与麦芽制造有类似之处,如皮大麦的 α -淀粉酶由原麦 0.1 U/g 提高至麦芽 258.4 U/g,糖化力由 71.0 °升至 189.5 °,蛋白质水解酶活性由 42.0 mg NPN/kg 升至 112.0 mg NPN/kg^[27]。另外,02428 × 合系 35 的 RILs 群体无论是发芽糙米还是糙米抗性淀粉含量均呈现众多明显的超高亲优势,由于该 RIL 群体

是在滇中一季籼粳稻区培育而成的,曾亚文等^[28]研究云南稻核心种质发现滇中一季籼粳稻区抗性淀粉含量均为第一,高海拔冷凉气候有利于糙米高抗性淀粉含量的提升与进化,这对选育高抗性淀粉含量的功能稻米提供了材料基础。

参考文献

- [1] 李学进,曾亚文. 功能稻米研究利用进展[J]. 种子,2008,9(9):64
- [2] 杨树明,曾亚文,吴殿星,等. 浅论云南功能稻米开发[J]. 科技创新导报,2008(1):253
- [3] 何熙璞,张敏,李俊芳,等. γ -氨基丁酸的生理学功能及研究现状[J]. 广西大学学报,2007(32):464-466
- [4] 万选才,杨天祝,徐承熹. 现代神经生物学[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1999:158-162
- [5] 杨藻震. 药理学和药物治疗学(上册)[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:487-530
- [6] 徐叔云. 临床药物指南(修订版)[M]. 合肥:安徽科学出版社,1997
- [7] 尤浩军,孙红卫. GABA 在镇痛中的基础与临床[J]. 国外医学——神经外科分册,1998,25(4):171-174
- [8] Andrieux C, Sacquet E. Effects of amylo maize starch on mineral metabolism in the adult rat; role of the microflora[J]. J Nutr, 1986,116:991-998
- [9] 江波. GABA——一种新型的功能食品因子[J]. 中国食品报,2008,8(2):1-4
- [10] 曾亚文,杨树明,杜娟,等. 高抗性淀粉稻米防治慢性病研究进展[J]. 农业科技通讯,2009(1):37-39
- [11] 连喜军,李建颖. 抗性淀粉生理功能研究进展[J]. 粮食与油脂,2008(7):3-5
- [12] 李敏. 抗性淀粉生理功能的研究进展[J]. 卫生研究,2008,37(5):640-643
- [13] 赵凯,张守文,方桂珍. 抗性淀粉的生理功能及在食品工业中的应用[J]. 哈尔滨商业大学学报,2002,18(6):661-663
- [14] Inatomi K, Slaughter J C. The role of glutamate decarboxylase and γ -aminobutyric acid in germinating barley[J]. J Exp Bot, 1971, 22(3):561-571
- [15] Goñi I, Garcia-Diaz L, Mañas E, et al. Analysis of resistant starch: a method for foods and food products[J]. Food Chem, 1996,56(4): 445-449
- [16] Saikusa T, Horino T, Mori Y. Distribution of free amino acids in the rice kernel and kernel fractions and effect of water soaking on the distribution[J]. Agric Food Chem, 1994,42:1122-1125
- [17] 罗曦,曾亚文,杨树明,等. 不同发芽时间下发芽稻谷和糙米不同部位 γ -氨基丁酸含量差异[J]. 食品科学,2009,30(13): 124-128
- [18] 姚森,郑理,赵思明,等. 发芽条件对发芽糙米中 γ -氨基丁酸含量的影响[J]. 农业工程学报,2006,22(12):211-215
- [19] 黄建韶. 富含 γ -氨基丁酸发芽糙米生产技术的研发[D]. 长沙:湖南农业大学,2003
- [20] 韩永斌,顾振新,蒋振辉. Ca^{2+} 浸泡处理对发芽糙米生理指标和 GABA 等物质含量的影响[J]. 食品科学,2006,27(10): 58-60
- [21] Bown A W, Shelp B J. The metabolism and functions of γ -aminobutyric acid[J]. Plant Physiol, 1997,115:1-5
- [22] 郭晓娜,朱永义. 响应面法在发芽糙米研究中的应用[J]. 粮食与饲料工业,2003(11):11-12
- [23] 郑向华,陈荣,叶宁,等. 温度和时间对发芽糙米中 γ -氨基丁酸含量的影响[J]. 中国粮油学报,2009,24(9):1-4
- [24] 刘丽萍,李雨露. 糙米发芽前后营养成分的变化及功能特性[J]. 粮油加工,2008(11):81-83
- [25] 赵国珍,邹茜,陈于敏,等. 云南软米直链淀粉含量的遗传分析与基因定位[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(5):975-978
- [26] 曾亚文,申时全,陶大云,等. 核代换群体和系选品种在水稻耐冷性近等基因系研制中的作用[J]. 作物学报,2001,27(4):533-537
- [27] Bhatta R S. Production of food malt from hull-less barley[J]. Cereal Chem, 1996,73(1):75-80
- [28] 曾亚文,杜娟,杨树明,等. 云南稻核心种质糙米功能成分栽培型差异及其地带性特征[J]. 光谱学与光谱分析,2010,30(12):3383-3394