

基于高密度遗传图谱对水稻抗性淀粉 QTL 定位及分析

张风琴, 于雪然, 李玲, 王蕊, 李培富, 马天利
(宁夏大学农学院 / 宁夏优势特色作物现代分子育种重点实验室, 银川 750021)

摘要: 高抗性淀粉的稻米有益于改善人类健康并降低与饮食相关的慢性疾病风险。挖掘新的水稻籽粒抗性淀粉相关基因, 对揭示水稻籽粒抗性淀粉合成的遗传机理有重要意义, 同时可为选育高抗性淀粉水稻新品种提供新的基因资源。本研究以宁夏本地高产粳稻品种宁粳28号和外引粳稻品种JTD, 以及构建的126个F₇重组自交系(RILs, recombination inbred lines)群体为研究材料, 通过全基因组重测序技术构建了一张含有1,856个Bin标记的遗传连锁图谱。该图谱全长1973.86 cM, 标记间平均遗传距离为1.06 cM。采用CIM区间作图法对水稻群体的抗性淀粉性状进行QTL定位, 检测到1个控制抗性淀粉的QTL, 位于第7号染色体上, LOD值为4.2, 贡献率为9.7%。深入分析获得候选基因Os07g0444000(预测为水稻葡萄糖神经酰胺酶)和Os07g0443500(含有MYB结构域的DNA结合蛋白)。研究发现Os07g0444000上SNP₁₅₇₄₀₁₇₉和SNP₁₅₇₄₀₂₀₇位点的基因型频率在RIL群体高抗性淀粉组和低抗性淀粉组之间存在显著差异。在灌浆过程中, Os07g0443500和Os07g0444000在父本JTD(高抗性淀粉亲本)中的表达量均不同程度的高于母本宁粳28号。由此推测这两个候选基因可能参与水稻籽粒灌浆过程中抗性淀粉的形成。本研究通过挖掘水稻籽粒抗性淀粉QTL位点和相关基因为选育高抗性淀粉水稻新品种提供新的基因资源。

关键词: 水稻; 抗性淀粉; Bin图谱; QTL定位; 候选基因

Mapping and Analysis of QTL of Rice Resistant Starch Based on High Density Genetic Map

ZAHNG Feng-qin, YU Xue-ran, LI Ling, WANG Rui, LI Pei-fu, MA Tian-li

(Agricultural College, Ningxia University/Ningxia Key Laboratory of Modern Molecular Breeding for Dominant and Characteristic Crops, Yinchuan 750021)

Abstract: Functional rice with high resistant starch content improves human health considering the risk of diet-related chronic diseases. Exploring the resistant starch-related genes is of great significance to reveal the genetic mechanism of rice grain resistant starch synthesis, which has implication in breeding rice varieties with high resistant starch. In this study, 126 F₇ recombinant inbred lines (RILs) from cross between Ningxia local high-yield japonica rice variety Ningjing 28 and imported japonica rice variety JTD were used. A genetic linkage map containing 1,856 Bin markers was constructed by whole genome resequencing technology, showing a length of 1973.86 cM, and the average genetic distance of 1.06 cM between markers. Using CIM interval mapping method to map the QTL of resistant starch traits in rice populations, one QTL controlling resistant starch was detected on chromosome 7, with a LOD value of 4.2 and a contribution rate of 9.7%. Through in-depth analysis, two candidate genes Os07g0444000 (predicted as rice glucosylceramidase) and Os07g0443500 (DNA binding protein containing MYB domain) were obtained. The study found that the genotype frequencies of SNP₁₅₇₄₀₁₇₉ and SNP₁₅₇₄₀₂₀₇ on Os07g0444000 were significantly different between the high resistant starch group and the low resistant starch group in the RIL population. During the grain filling process, the expression levels of Os07g0443500 and Os07g0444000 in the male parent JTD (high resistant starch parent) were higher than those

收稿日期: 2023-01-16 修回日期: 2023-02-07 网络出版日期: 2023-03-14

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230116004>

第一作者研究方向为水稻遗传育种, E-mail: 1916640220@qq.com

通信作者: 马天利, 研究方向为水稻遗传育种, E-mail: tianlima2018@163.com

基金项目: 宁夏自然科学基金项目(2021AAC03086); 宁夏重点研发项目引才专项(2019BEB04014)

Foundation projects: Ningxia Natural Science Foundation Project (2021AAC03086); Ningxia Key R&D Project for Talent Introduction (2019BEB04014)

of the female parent Ningjing 28. These results implied that both candidate genes may be involved in forming resistant starch during rice grain filling. Collectively, this study provides new genetic resources for the breeding of new rice varieties with high resistant starch by mining the QTL loci and related genes of rice grain-resistant starch.

Key words: rice; resistant starch; Bin map; mapping of QTL; candidate genes

当前,肥胖、超重和营养不均衡导致的慢性病和糖尿病人数逐年增长。根据国际糖尿病联盟(<http://www.diabetesatlas.org/>)最新报告,2021年全球约5.37亿成年人(20~79岁)患糖尿病且人数在不断增加。中国患有糖尿病的人数已经达到约1.4亿,排名世界第一^[1]。开展功能型农产品的遗传育种工作,开发适合慢性病人的食物,越来越受到重视。抗性淀粉又称为抗消化淀粉,是指在健康人体的小肠中不能被分解吸收,而在大肠中可被酵母菌发酵分解的淀粉。因此,抗性淀粉能够有效降低餐后的血糖浓度,同时增加饱腹感,有助于糖尿病的预防和控制^[2-4]。

稻米是世界一半以上人口的主食,我们要响应习总书记提出的“中国人的饭碗要牢牢端在自己手中”的号召,以提升水稻的产量和品质为生产目标。稻米的升糖指数高,抗性淀粉含量低。大多数稻米品种抗性淀粉含量低于干重的1%^[5]。研究发现,不同品种水稻籽粒中抗性淀粉含量差异较大,一般杂草稻>籼稻>粳稻^[6]。抗性淀粉含量高的稻米有益于改善人类健康并降低与饮食相关的慢性疾病、肿瘤的风险,因此加强高抗性淀粉水稻育种具有重要的社会效益和经济效益^[7-10]。宁夏引黄灌区是我国四大古老灌区之一,是中国优质粳稻生态区之一,这里的水稻生产向着中高档品质、绿色食品的方向发展。因此开发宁夏本地高抗性淀粉含量功能性水稻新品种具有重要的现实意义。

近些年来,国内外育种家通过理化诱变、传统育种、RNAi干扰和CRISPR基因编辑技术创制了多个高抗性淀粉育种材料及品种,包括浙辐111、降糖稻、优糖稻、宜糖稻、适糖稻、功米3号等,选育出来的水稻品种精米中抗性淀粉含量在3%~13.69%之间^[11-20]。然而,相比于其他品质性状,水稻主栽品种中抗性淀粉含量高的品种较少,可应用于育种技术的材料更少。抗性淀粉的形成受淀粉固有特性、非淀粉成分以及储存加工条件的影响,是一个复杂的过程,因此挖掘水稻与抗性淀粉有关的QTL位点,分析抗性淀粉在水稻中的形成及其遗传调控机制是目前抗性淀粉研究的主要方向^[21]。目前,关于抗性淀粉的形成机制尚不明确,抗性淀粉相关QTL研究报道较少。李鸣晓^[22]对抗性淀粉进行QTL定位找

到3个QTL,分别位于第1、6、7号染色体上,单个贡献率为6.39%~12.68%。罗曦等^[23]以高抗性淀粉水稻品种籼稻功米3号和粳稻日本晴的正、反交组合F₁及其自交后代F₂、F_{2:3}群体为研究材料,定位到3个和抗性淀粉含量相关的QTL区域,均分布在第6号染色体上,其中*qRS6-2*和*qRS6-3*贡献率分别为20.36%和40.13%。目前已经报道了多个基因能够直接参与水稻抗性淀粉的形成,如*GBSSI*、*SSIIa*、*SSIIIa*和*SBEIIb*^[21]。一些转录因子和mRNA剪接因子能够间接影响水稻籽粒中抗性淀粉的含量^[21]。前人用全基因组关联分析(GWAS)共鉴定到11个和抗性淀粉含量相关的SNP位点,筛选出一些可能参与抗性淀粉形成的候选基因,包括*GBSSI*、*GBSSIIa*、*ISAI*、*APLSI*、*AGPL3*、*DRUS2*、*CRCT*和*BTI-3*^[24-25]。这些水稻抗性淀粉相关QTL区域和候选基因对揭示水稻抗性淀粉调控的遗传机理研究有重要意义,同时可为水稻抗性淀粉分子育种提供新的基因资源。

尽管国内外研究人员获得了一些高抗性淀粉的水稻材料,定位到一些候选基因,但是深入研究基因功能和调控机制的研究仍然较少。虽然前人已经发现了一些参与水稻抗性淀粉形成的QTL区域,但是QTL定位结果会受到作图群体、分子标记数量和统计方法等因素的制约。基于这些因素,已有研究中所绘制的遗传连锁图谱精确度较低,很可能遗漏了一些重要的QTL区域。另外研究发现,抗性淀粉与直链淀粉的相关系数为0.75,与支链淀粉酶活性的相关系数为0.98;直链淀粉和长支链淀粉之间存在竞争关系^[26],而目前发现的参与抗性淀粉合成的基因*GBSSI*、*GBSSIIa*、*SSIIIa*和*SBEIIb*实际上也参与直链淀粉和支链淀粉的形成。因此,一些与抗性淀粉合成相关的关键基因可能仍未被挖掘出来。宁粳28号(又名花99115)是宁夏本地高产粳稻品种,具有抗病、耐盐碱、米质优等特点,在宁夏地区种植面积较广^[27],但经过测定发现,其抗性淀粉含量低。JTD自长春农业科学院引进宁夏银川后,表现出剑叶夹角大、散穗、长粒、垩白含量低,加工过程中有明显香味,适口性好,是抗性淀粉含量较高的粳稻品种。本研究以宁粳28号/JTD构建的重组自交系(RILs, recombination inbred lines)群体为材

料,通过全基因组重测序构建高精度的遗传图谱,对水稻进行抗性淀粉QTL定位,为进一步研究基因功能及利用分子标记辅助选择培育高抗性淀粉含量的功能性水稻育种研究提供参考价值。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

以宁粳28号为母本和JTD为父本,于2011年在宁夏大学农学院作物种植温室配置宁粳28号/JTD杂交组合,产生F₁,通过连续自交7代衍生出126个性状和基因型稳定的株系作为重组自交系群体。群体及亲本于2019年种植在宁夏银川永宁县宁夏大学教学实验农场,行距为10 cm,株距为2 cm,每个株系穴栽一行,管理标准采用一般大田管理的方式。

1.2 水稻农艺性状考察及籽粒抗性淀粉含量测定方法

1.2.1 农艺性状考察 水稻籽粒完全成熟后,每个家系随机挖取3个重复的考种样,自然条件下晾干,用于农艺性状考察。用长直尺测量家系穗长、株高、茎基粗,剪下单穗称取单穗粒重,用玻璃培养皿盖子将籽粒小心全部刮下,称取千粒重。经JLGJ4.5型检验砻谷机碾出糙米,用LTJM-2009精米机碾磨成精米,选择完整的精米1000粒,用大米外观品质检测仪检测家系的垩白粒率、粒长、粒宽、粒长宽比。

1.2.2 抗性淀粉测定方法 在水稻黄熟期收获水稻种子,将种子在80℃烘箱干燥并剔除杂质和空瘪粒,经JLGJ4.5型检验砻谷机碾出糙米,用LTJM-2009精米机碾磨成精米,然后用JFSD-70型实验用粉碎机将精米碾磨成粉,放入4℃冰箱备用。准确称取100 mg(±5 mg)样品,利用爱尔兰Megazyme公司的抗性淀粉试剂盒测定水稻籽粒抗性淀粉含量。用葡糖氧化酶/过氧化物酶试剂(GOPOD)测定D-葡萄糖的含量,然后根据公式计算得到抗性淀粉含量。试验过程重复3次,取平均值。所得数据用Excel处理其平均数、标准差和变异系数并绘图。

抗性淀粉含量 = $\Delta E \times F \times 10.3 / 0.1 \times 1 / 1000 \times 100 / W \times 162 / 180 = \Delta E \times F / W \times 9.27$

其中,ΔE为相对于空白试剂的吸光度值;F为从吸光度值到微克的转换;10.3/0.1为体积校正;1/1000为体积校正;W为分析样品的干重;100/W为抗性淀粉在样品重量中的百分比分子;162/180为从测定获得的游离D-葡萄糖转换到淀粉中存在的脱水D-葡萄糖的因子。

1.3 基因组重测序研究方法

利用CATB方法分别提取亲本和126个RILs的DNA,通过凝胶电泳方法检测DNA是否有降解或蛋白质、RNA污染等问题。合格的DNA样品标准为:浓度≥20 ng/μL,总量≥2 μg,OD260/280=1.8~2.2,主带清晰,无或轻度降解,无严重RNA污染。按照Illumina公司提供的标准方法进行样品检测、文库构建、文库质检和上机测序过程。

1.4 遗传图谱构建及QTL分析

基于重测序结果对双亲和126个RILs进行SNP标记分型及筛选。以15个SNP为1个窗口,1个SNP为步长在染色体上滑动扫描,当滑窗内的SNP分型为aa的数目大于等于11个时分型为aa,当滑窗内的SNP分型为bb的数目大于等于11个时分型为bb,其他情况的以ab进行基因型填补和校正。将筛选得到的Bin分为12个连锁群,以连锁群为单位,采用HighMap^[28]软件分析获得连锁群内Marker的线性排列,并估算相邻Marker间的遗传距离,最终得到总图距为1973.86 cM的遗传图谱。通过CIM区间作图法定位性状,用置换检验(PT, permutation test)1000次进行设定阈值,首先考虑0.99置信度对应的LOD阈值,若没有定位区间则依次向下考虑0.95、0.90置信度的阈值。若仍没有结果则不考虑PT检验的结果,手动降低阈值到3.0。对获得的QTL位点及候选区域进行基因功能注释和富集分析(功能注释包括Nr数据库、COG数据库、GO数据库、Swissprot数据库、KEGG数据库),得到候选基因。

1.5 实时荧光定量PCR检测

将双亲在灌浆期第10 d和第16 d的籽粒(3个重复,每个重复6个植株)样品用液氮保存,长期保存至-80℃冰箱中。利用TriQuick Reagent提取籽粒的RNA,用Aidlab公司反转录试剂盒(TUREscript 1st Stand cDNA SYNTHESIS Kit)进行反转录。以*OsActin*基因为内参,引物序列如表1。使用ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix进行荧光定量PCR实验。在analytikjena-qTOWER2.2型荧光定量PCR仪(德国)上完成。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 的方法计算基因相对表达水平,使用IBM SPSS Statistics 26处理数据,Excel 2010绘图。

2 结果与分析

2.1 水稻籽粒抗性淀粉含量在RIL群体中的遗传变异及相关性分析

2.1.1 水稻籽粒抗性淀粉含量在RIL群体中的遗传变异 经检测,双亲(宁粳28号和JTD)在抗性淀

粉含量上存在显著差异。母本宁粳28号抗性淀粉含量较低,仅为0.5%,父本JTD抗性淀粉含量较高,为1.75%。两亲本杂交后代获得的RIL群体有126个株系,抗性淀粉含量在0.25%~2.38%之间,平均值为1.05%(表2)。RIL群体抗性淀粉含量分布范围

比较广泛,且呈现正态分布,峰度为-0.02,偏度为0.63(图1)。RIL群体中有44%的材料抗性淀粉含量高于平均值,抗性淀粉含量最高能达到2.38%,出现超亲现象,表现出数量性状遗传特点,符合QTL定位区间作图的要求。

表1 荧光定量PCR检测所用引物

Table 1 Primers for qRT-PCR

引物名称 Prime 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>OsActin</i>	GACCTTCAACACCCCTGCTA	ACAGTGTGGCTGACACCATC
<i>Os07g0443500</i>	GAGTGGAGCAAAGAGGAG	CTTGTGCCAGAGATCAGG
<i>Os07g0444000</i>	CCACTACAGGTCGCTGATAT	CGAGTATGGTTCTTGAGGA

表2 亲本及RIL群体抗性淀粉含量

Table 2 Resistance starch content of the parental and RIL populations

性状 Character	亲本 Parents		RIL群体 RIL population			
	宁粳28号 Ningjing 28	JTD	范围 Range	平均值 Average	标准差 SD	变异系数 CV
抗性淀粉含量(%) RS content	0.5	1.75	0.25~2.38	1.05	0.44	41.91

RS:Resistance starch, the same as below

2.1.2 水稻籽粒抗性淀粉含量及其他农艺性状相关性分析 本研究通过分析重组自交系群体126个家系的水稻籽粒抗性淀粉含量和其他9个农艺性状的相关性,结果表明抗性淀粉与垩白粒率、粒长、千粒重呈显著正相关,相关系数分别为0.22、0.18和0.27(表3)。此外,通过农艺性状综合分析在RILs群体中

获得3个抗性淀粉含量较高、其他农艺性状表现较好的家系,编号分别为201941、201950、201956(表4)。

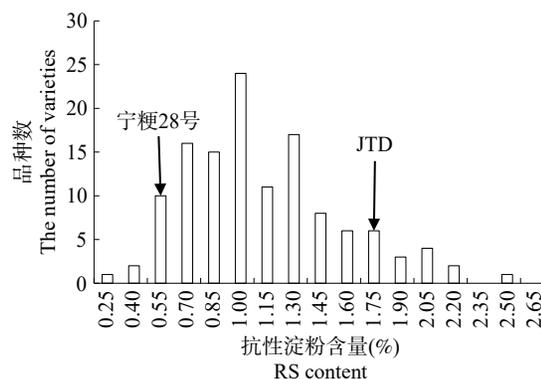


图1 RIL群体抗性淀粉含量分布图

Fig.1 Distribution of resistant starch content in RIL population

表3 宁粳28号/JTD F₇抗性淀粉含量与其他农艺性状的相关性分析

Table 3 Correlation analysis of resistant starch content and other agronomic shapes in Ningjing 28/JTD F₇ generation

性状 Character	垩白粒率 Cretaceous grain rate	穗长 Spike length	株高 Plant height	茎基粗 Stem base thick	粒长 Grain long	粒宽 Grain width	粒长宽比 Grain length and width ratio	千粒重 Thousand-grain weight	单穗粒重 Single ear grain weight
抗性淀粉含量 RS content	0.22*	0.01	0.09	-0.13	0.18*	0.16	0.01	0.27**	0.01

*表示不同性状间呈显著相关,**表示不同性状间呈极显著正相关

* indicates a significant correlation between different traits, and ** indicates a very significant positive correlation between different traits

表4 抗性淀粉含量较高的3个家系的农艺性状表现

Table 4 Agronomic traits of three lines with higher resistant starch content

编号 Number	抗性淀粉含量(%) RS content	垩白粒率(%) Cretaceous grain rate	穗长(cm) Spike length	株高(cm) Plant height	茎基粗(mm) Stem base thick	粒宽(mm) Grain long	粒长(mm) Grain width	粒长宽比 Grain length and width ratio	千粒重(g) Thousand-grain weight	单穗粒重(g) Single ear grain weight
201941	1.75	7.00	23.46	128.74	7.15	3.12	8.36	2.20	25.45	2.90
201950	1.69	4.00	24.56	121.68	7.28	3.17	8.51	2.40	25.10	3.11
201956	1.54	3.00	22.96	114.38	6.92	3.37	7.94	2.10	24.48	4.78

2.2 Bin 标记筛选及遗传图谱构建

基于双亲和126个RIL群体的双端测序(PE,

pari end)结果,序列读长为150 bp,利用短序列比对软件BWA将测序数据比对到日本晴参考基因组

(ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCF/000/005/425/GCF_000005425.2_Build_4.0/)上。过滤掉非染色体标记,亲本纯合一致且亲本标记深度低于4×的标记,以保证子代分型正确性。利用HighMap软件对筛选得到的199,616个SNP进行基因型填补和校正,根据子代重组情况进行Bin划分,将各样本按染色体物理位置排列整齐,当任何样本中出现分型转变就认为出现了重组断点,将重组断点间的SNP划为Bin中,Bin内认为没有重组事件发生。筛除长度小于10 kb以下的Bin,过滤掉严重偏分离(卡方检

验 $P<0.0001$)的多态性标记,最终以1,856个Bin标记构建遗传图谱。该遗传图谱包含12个连锁群,分别对应水稻的12条染色体,总图距为1973.86 cM,其中第3条染色体Bin标记数目最多,为254条,第5条染色体Bin标记数目最少,为82条;第7条染色体标记间Max Gap最大,为13.34 cM,第10条染色体标记间Max Gap最小,为4.7 cM;第12条染色体Bin标记间平均遗传距离最大,为2.26 cM,第10条染色体Bin标记间距离最小,仅为0.55 cM,整个染色体组的标记平均间距为1.06 cM(表5、图2)。

表5 Bin 图谱信息表

Table 5 Bin map information

染色体 Chromosome	每条连锁群总的Bin标记 Total Bin marker	总遗传距离(cM) Total distance	平均图距(cM) Average distance	最大Gap(cM) Max gap	Gap<5 cM的百分比(%) Gaps<5 cM
1	171	189.71	1.12	7.20	97.65
2	194	192.49	1.00	6.26	99.48
3	254	193.92	0.77	7.61	99.21
4	95	169.88	1.81	7.66	97.87
5	82	134.69	1.66	7.66	86.42
6	174	155.58	0.90	10.89	97.11
7	106	165.96	1.58	13.34	87.62
8	210	187.22	0.90	9.96	83.73
9	100	154.38	1.56	9.38	94.95
10	237	130.84	0.55	4.70	99.15
11	144	100.25	0.70	9.63	97.20
12	89	198.93	2.26	7.52	77.27
总计Total	1856	1973.86	1.06	13.34	77.27

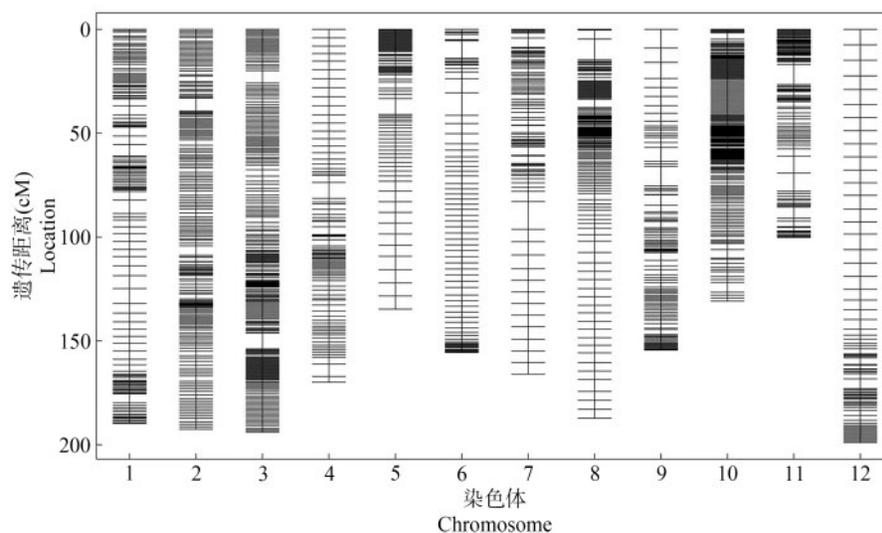


图2 标记构建的遗传图谱

Fig.2 Bin genetic linkage map

2.3 水稻籽粒抗性淀粉含量的QTL分析

以构建的水稻高密度遗传连锁图谱为基础,

利用R/qtl软件通过CIM区间作图法对水稻F₇群体的抗性淀粉性状进行QTL定位。用置换检验PT

(Permutation test) 检验 1000 次进行阈值设定。结果显示,当 LOD 阈值为 4.2 时,在水稻第 7 号染色体上检测到一个间距 0.397 cM 的水稻抗性淀粉性状相关 QTL 位点,命名为 *qRS-7*,遗传位置为 52.99~53.38 cM,贡献率 9.7%,呈现加性效应(图 3)。对候选区域进行基因功能注释,获得两个候选基因

Os07g0444000 和 *Os07g0443500*(表 6)。基因功能富集分析结果表明,*Os07g0444000* 富集在葡萄糖神经酰胺代谢通路上,该基因定位在细胞膜上,预测可能参与水稻葡萄糖神经酰胺分解相关途径。*Os07g0443500* 是一种预测定位在细胞核上,含有 MYB 结构域的 DNA 结合蛋白。

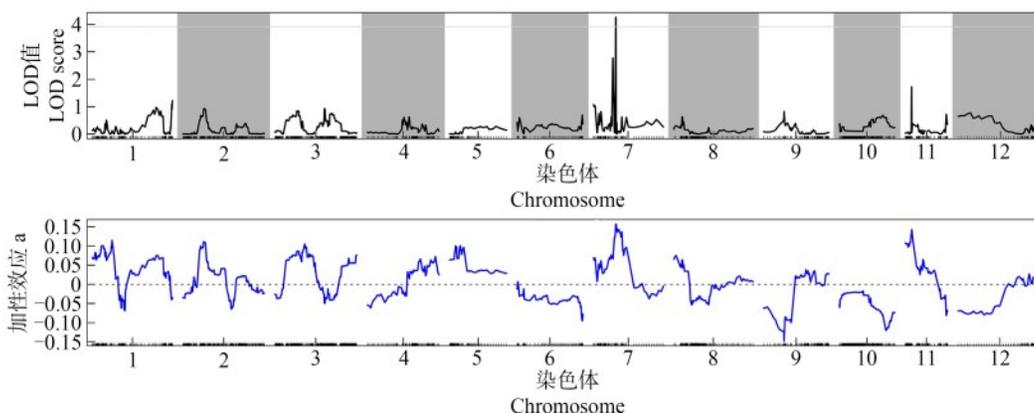


图3 抗性淀粉 QTL 定位分析

Fig.3 Resistant starch QTL mapping analysis

表6 候选基因分析

Table 6 Candidate gene analysis

基因名称 Gene name	功能描述 Gene description	定位 Location
<i>Os07g0444000</i>	类似于非溶酶体葡萄糖神经酰胺酶	细胞膜
<i>Os07g0443500</i>	包含 MYB 结构域的蛋白	细胞核

2.4 候选基因在亲本及 RIL 群体中的序列分析

根据基因组重测序的结果,分析了候选基因 *Os07g0444000* 和 *Os07g0443500* 在双亲中 SNP 标记的序列信息。双亲序列比对发现,候选基因 *Os07g0443500* 上有 1 个 SNP 位点在父本 JTD 中是 A,在母本宁粳 28 号中是 G。候选基因 *Os07g0444000* 上有 6 个 SNP 位点在双亲中存在序列差异(表 7)。通过分析 RIL 群体中携带 *qRS-7* 不同亲本基因型的家系和抗性淀粉含量之间的关系,发现候选基因 *Os07g0444000* 上的 SNP₁₅₇₄₀₁₇₉ 位点在高抗性淀粉含量家系中携带的基因型与父本 JTDA 一致,在低抗性淀粉含量家系中携带的基因型与母本宁粳 28 号 G 一致,两组抗性淀粉含量均值达到显著差异($P=0.033$);该基因上的另一个 SNP₁₅₇₄₀₂₀₇ 位点在高抗性淀粉含量家系中携带的基因型与父本 JTDT 一致,在低抗性淀粉含量家系中携带的基因型与母本宁粳 28 号 C 一致,两组抗性淀粉含量均值也达到显著差异($P=0.031$)(图 4)。以上结果说明抗性淀粉在 RILs 群体中的变异可能来源于候

选基因 *Os07g0444000* 上 SNP₁₅₇₄₀₁₇₉ 和 SNP₁₅₇₄₀₂₀₇ 的差异表达。

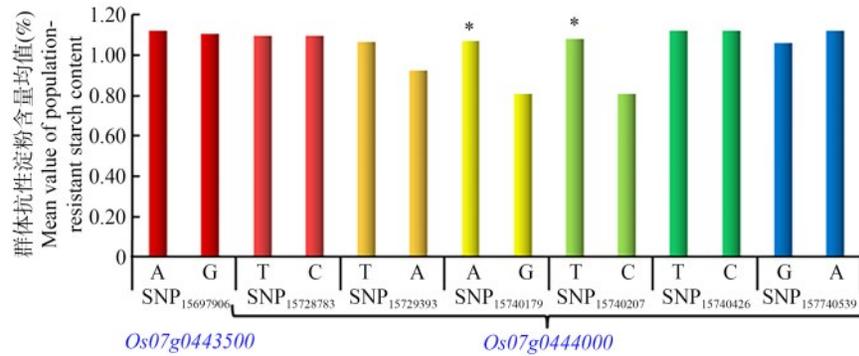
2.5 候选基因在亲本灌浆中后期的表达分析

利用实时荧光定量 qPCR 检测了候选基因在双亲灌浆中期^[2]两个时间点(10 d 和 16 d)的 mRNA 表达情况。结果表明在灌浆 16 d 时,*Os07g0443500* 在父本 JTD 中的表达量显著高于母本宁粳 28 号。在灌浆 10 d 和 16 d 时,*Os07g0444000* 在父本 JTD 中的表达量均显著高于母本宁粳 28 号(图 5)。说明这两个候选基因可能参与水稻籽粒灌浆过程中抗性淀粉的积累。以上说明 *Os07g0444000* 和 *Os07g0443500* 可能在水稻抗性淀粉的形成过程中发挥功能,因此下一步需要克隆基因,利用基因编辑和过表达等技术深入研究基因的功能。

表7 双亲中有序列差异的候选基因 SNP 位点

Table 7 Analysis of SNP variants of the candidate genes in parents

候选基因 Candidate gene	SNP 位点 SNP site	JTD	宁粳 28 号 Ningjing 28
<i>Os07g0443500</i>	SNP ₁₅₆₉₇₉₀₆	A	G
<i>Os07g0444000</i>	SNP ₁₅₇₂₈₇₈₃	T	C
	SNP ₁₅₇₂₉₃₉₃	T	A
	SNP ₁₅₇₄₀₁₇₉	A	G
	SNP ₁₅₇₄₀₂₀₇	T	C
	SNP ₁₅₇₄₀₄₂₆	T	C
	SNP ₁₅₇₄₀₅₃₉	G	A

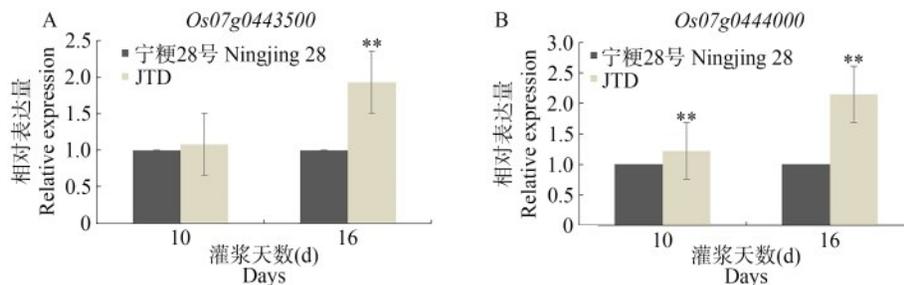


*表示在 0.05 水平有显著差异;不同颜色代表不同的 SNP 位点,相同颜色代表同一个 SNP 位点

* represents a significant difference at the 0.05 level; Different colors represent different SNP sites and the same color represents the same SNP site

图 4 RIL 群体中携带候选基因不同亲本基因型的家系和抗性淀粉含量之间的关系

Fig.4 Relationship between families carrying candidate genes with different parental genotypes and RS content in RIL population



A: 候选基因 *Os07g0443500* 在双亲灌浆 10 d 和 16 d 的 mRNA 表达分析; B: 候选基因 *Os07g0444000* 在双亲灌浆 10 d 和 16 d 的 mRNA 表达分析; **表示在 0.01 水平有显著差异

A: mRNA expression analysis of candidate gene *Os07g0443500* in parental grouting 10 d and 16 d; B: mRNA expression analysis of the candidate gene *Os07g0444000* in parental grouting 10 d and 16 d; ** indicates a significant difference at the 0.01 level

图 5 候选基因在亲本灌浆中后期的表达分析

Fig.5 Expression analysis of candidate genes in parents at different grain filling stages

3 讨论

水稻籽粒抗性淀粉性状为多基因控制的数量性状,同时也受外界环境影响,因此研究过程中品种差异、构建的群体类型和大小、水稻生长环境以及籽粒抗性淀粉的测定方法等差异都将不同程度地影响 QTL 定位结果^[21,29]。本研究利用爱尔兰 Megazyme 公司的抗性淀粉试剂盒测定水稻籽粒抗性淀粉含量。在测定过程中,采用 3 次生物学重复试验,每次生物学重复试验中保证 3 次技术重复,并且严格把控每个试剂的浓度、pH 值、用量等从而确保抗性淀粉测定结果的准确性和可重复性。本研究选用的双亲为宁夏本地高产品种宁梗 28 号和外引品种 JTD。尽管双亲的抗性淀粉相对含量差异大于 3 倍(图 1),但绝对含量在水稻品种中都不算高。双亲均为粳稻品种,通过连续自交获得的 RIL 群体数量有 126 个。构建的重组自交系群体应尽可能大一些才能包含更多的遗传多样性,检测群体抗性淀粉表型数据最好能采用多年多点的方式。本研究

构建的重组自交系群体较小,且仅有一年抗性淀粉表型数据,这些因素可能导致本研究最终只发现了 1 个 QTL 位点。

本研究通过高通量测序技术对亲本及重组自交系群体进行基因组重测序,筛选出大量 SNP 位点,基于这些位点构建了高密度的 Bin 图谱,结合抗性淀粉表型数据进行 QTL 分析,在水稻第 7 号染色体上获得了两个候选基因 *Os07g0443500* 和 *Os07g0444000*。李鸣晓^[22]曾利用区间作图法,也在水稻 7 号染色体上找到和抗性淀粉相关的 QTL 位点,LOD 为 3.07,单个贡献率为 6.39%。但该研究并未深入挖掘 QTL 区间可能存在的候选基因。目前,本研究发现的两个候选基因尚未报道。生物信息学分析表明 *Os07g0443500* 是一个定位于细胞核上,含有 MYB 结构域的 DNA 结合蛋白,推测该蛋白可能是一个转录因子。已有研究表明,一些转录因子通过促进或者抑制直接参与抗性淀粉形成的基因 *GBSSI*、*SSs* 和 *SBEs* 转录水平的表达,影响籽粒中直链淀粉和淀粉的精细结构,从而响应抗性淀粉的形成和调控^[21]。

例如,MYC家族成员OsBP-5可以直接结合到Wx基因启动子区的CAACGTG基序上,通过与AP2/EREBP家族成员OsEBP-89蛋白互作进而激活Wx基因的转录水平表达,和野生型相比,OsBP-5 RNAi植株中直链淀粉含量降低^[30]。在转录后阶段,Du基因(Du1、Du2和Du3)能够通过影响Wx^b基因mRNA前体的剪接进而调控直链淀粉的合成^[31-33]。另一个候选蛋白Os07g0444000是一个预测定位于细胞膜上的葡萄糖神经酰胺酶。葡萄糖神经酰胺(GlcCer)和葡萄糖结合成的鞘脂是大多数真核细胞内膜系统和质膜的主要成分。常见的GlcCer存在于植物、真菌和动物中,但是目前仅在动物中有一些相关基因的功能研究,在植物中的研究很少^[34]。植物中的GlcCers可能参与脂质微区的形成和适应胁迫^[35]。植物GlcCer生物合成的抑制导致细胞内高尔基体的剧烈形态变化和蛋白质分泌减少,敲除葡萄糖神经酰胺合酶会导致幼苗死亡,表明GlcCers对于植物发育和生长至关重要^[36-37]。最新研究发现,人类非溶酶体葡萄糖神经酰胺酶的拟南芥同源蛋白AtGCD3是一种植物葡萄糖神经酰胺酶,GFP-AtGCD3融合蛋白主要定位于质膜或内质网膜,AtGCD3通过优先水解长酰基GlcCer(C16-C18)参与GlcCer分解代谢^[38]。

一般认为抗性淀粉有5种类型,其中RS5是直链淀粉和脂质的复合物,通过形成螺旋结构,防止被淀粉酶消化^[39]。抗性淀粉的合成除受到淀粉固有特性的影响外,也会受到非淀粉成分,包括糖、脂类和蛋白质等生物大分子的影响,并且一些转录因子和mRNA剪接因子已被证明在抗性淀粉形成中发挥潜在作用^[21]。因此推测上述两个候选基因可能参与水稻籽粒抗性淀粉的形成过程。本研究通过挖掘水稻抗性淀粉QTL位点和相关基因为进一步克隆水稻抗性淀粉相关基因和品种选育提供了新线索。

目前对于水稻抗性淀粉形成的遗传和分子机制阐释仍然不够充分,一些与抗性淀粉形成具有间接作用的基因还需要进一步验证生物学功能。在育种工作中,通常会发现增加水稻中抗性淀粉的含量导致了其他水稻农艺性状,如产量、食味品质和外观品质的降低^[40-41]。水稻中淀粉合成的调控网络还有许多未知因子的加入,功能成分含量的增加也需要多个特殊性状的聚合,并且在不同的种质资源群体淀粉品质差异广泛^[42-44]。因此需要构建不同的种质资源群体、RIL群体,对抗性淀粉进行QTLs定

位和区间内候选基因的深入挖掘与解析。借助高通量组学(转录组学、蛋白质组学和代谢组学等)技术、基因编辑等多种手段与方法,充分掌握抗性淀粉合成的遗传和分子调控机制,将能够较好的平衡抗性淀粉含量、产量和食用品质之间的关系,并最终培育出更多更好的农作物新品种。

参考文献

- [1] 郭立新. 2021年糖尿病领域年度重大进展回顾. 中华糖尿病杂志, 2022, 14(1): 1-8
Guo L X. 2021 annual review of major progress in diabetes. Chinese Journal of Diabetes, 2022, 14(1): 1-8
- [2] Raben A, Tagliabue A, Christensen N J, Madsen J, Holst J J, Astrup A. Resistant starch: The effect on postprandial glycemia, hormonal response, and satiety. The American Journal of Clinical Nutrition, 1994, 60(4): 544-551
- [3] Raigond P, Ezekiel R, Raigond B. Resistant starch in food: A review. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2015, 95(10): 1968-1978
- [4] Emilien C H, Hsu W H, Hollis J H. Effect of resistant wheat starch on subjective appetite and food intake in healthy adults. Nutrition, 2017, 43: 69-74
- [5] Hu P S, Zhao H J, Duan Z Y, Zhang L L, Wu D X. Starch digestibility and the estimated glycemic score of different types of rice differing in amylose contents. Journal of Cereal Science, 2004, 40(3): 231-237
- [6] 赵雪. 杂草稻抗性淀粉相关性状的QTL定位分析及不良农艺性状的分子改良. 沈阳: 沈阳农业大学, 2022
Zhao X. QTL Mapping analysis of resistant starch related traits and molecular improvement of undesirable agronomic traits in weedy rice. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2022
- [7] Birt D F, Boylston T, Hendrich S, Jane J, Hollis J, Li L, McClelland J, Moore S, Phillips G J, Rowling M, Schallinske K, Scott M P, Whitley E M. Resistant starch: Promise for improving human health. Advances in Nutrition, 2013, 4(6): 587-601
- [8] Higgins J A, Brown I L. Resistant starch: A promising dietary agent for the prevention/treatment of inflammatory bowel disease and bowel cancer. Current Opinion in Gastroenterology, 2013, 29(2): 190-194
- [9] Mathers J C, 廖联明. 抗性淀粉可以预防肿瘤. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(22): 2683
Mathers J C, Liao L M. The resistant starch can prevent the tumors. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2022, 38(22): 2683
- [10] Mathers J C, Elliott F, Macrae F, Mecklin J P, Möslrin G, McRonald F E, Bertario L, Evans D G, Gerdes A M, Ho J W C, Lindblom A, Morrison P J, Rashbass J, Ramesar R S, Seppälä T T, Thmas H J W, Sheth H J, Pylvänäinen K, Reed L, Borthwick G W, Bishop D T, Burn J. Cancer prevention with resistant starch in Lynch syndrome patients in the CAPP2-randomized

- placebo controlled trial: Planned 10-year follow-up. *Cancer Prevention Research*, 2022, 15:623-634
- [11] 沈伟桥, 舒小丽, 张琳琳, 夏英武, 吴殿星. 加工型功能早籼稻新品种“浙辐 201”的选育与特性. *核农学报*, 2006(4): 312-314
Shen W Q, Shu X L, Zhang L L, Xia Y W, Wu D X. Development and characteristics of processing-functional indica early rice cultivar “Zhe fu201”. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2006(4):312-314
- [12] Yang C Z, Shu X L, Zhang L L, Wang X Y, Zhao H J, Ma C X, Wu D X. Starch properties of mutant rice high in resistant starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(2): 523-528
- [13] 朱辉明, 白建江, 王慧, 李茂柏, 郝再彬, 朴钟泽. 高抗性淀粉粳稻新品种系稻米淀粉特性. *中国农学通报*, 2010, 26(14): 108-112
Zhu H M, Bai J J, Wang H, Li M B, Hao Z B, Piao Z Z. Starch properties of japonicarice enriched with resistant starch. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(14):108-112
- [14] Butardo V M, Fitzgerald M A, Bird A R, Gidley M J, Flanagan B M, Larroque O, Resurreccion A P, Laidlaw H K C, 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
- [15] Butardo J V M, Daygon V D, Colgrave M L, Campbell P M, Resurreccion A, Cuevas R P, Jobling S A, Tetlow I, Rahman S, Morell M, Fitzgerald M. Biomolecular analyses of starch and starch granule proteins in the high-amylose rice mutant Goami 2. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(46): 11576-11585
- [16] Itoh Y, Crofts N, Abe M, Hosaka Y, Fujita N. Characterization of the endosperm starch and the pleiotropic effects of biosynthetic enzymes on their properties in novel mutant rice lines with high resistant starch and amylose content. *Plant Science*, 2017, 258: 52-60
- [17] Sun Y W, Jiao G A, Liu Z P, Zhang X, Li J Y, Guo X P, Du W M, Du J L, Francis F, Zhao Y D, Xia L Q. Generation of high-amylose rice through CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of starch branching enzymes. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 298
- [18] Chao S F, Cai Y C, Feng B B, Jiao G A, Sheng Z H, Luo J, Tang S Q, Wang J L, Hu P S, Wei X G. Editing of rice isoamylase gene ISA1 provides insights into its function in starch formation. *Rice Science*, 2019, 26(2): 77-87
- [19] Yang R F, Piao Z Z, Wang C Z. Breeding and characteristics of new rice variety Youtangdao 2 with high resistant starch. *China Rice*, 2020, 1: 1-3
- [20] 杨瑞芳, 白建江, 万常照, 汤剑豪, 龚长春, 朴钟泽. 高抗性淀粉含量粳稻新品种“优糖稻 3 号”的选育. *上海农业学报*, 2022, 38(2):6-9
Yang R F, Bai J J, Wan C Z, Tang J H, Gong C C, Piao Z Z. Breeding of new rice variety 'Youtangdao 3' with high resistant starch. *Acta Agriculturae Shanghai*, 2022, 38(2):6-9
- [21] Shen L, Li J, Li Y. Resistant starch formation in rice: Genetic regulation and beyond. *Plant Communications*, 2022, 3(3): 100329
- [22] 李鸣晓. 环境和遗传因素对水稻 RILs 群体淀粉特性的影响. 沈阳: 沈阳农业大学, 2019
Li M X. Effects of environmental and genetic factors on starch properties of RILs on rice. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2019
- [23] 罗曦, 黄锦峰, 朱永生, 谢鸿光, 吴方喜, 张木清, 张建福, 谢华安. 水稻功米 3 号高抗性淀粉性状的遗传分析. *农业生物技术学报*, 2014, 22(1):10-16
Luo X, Huang J F, Zhu Y S, Xie H G, Wu F X, Zhang M Q, Zhang J F, Xie H A. Genetic analysis of high resistant starch characteristics for rice variety gongmi 3 (*Oryza sativa* ssp. indica). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2014, 22(1): 10-16
- [24] Bao J S, Zhou X, Xu F F, He Q, Park Y J. Genome-wide association study of the resistant starch content in rice grains. *Starch*, 2017, 69(7-8): 1600343
- [25] Biselli C, Volante A, Desiderio F, Tondelli A, Gianinetti A, Finocchiaro F, Taddei F, Gazza L, Sgrulletta D, Cattivelli L, Valè G. GWAS for starch-related parameters in japonica rice (*Oryza sativa* L.). *Plants*, 2019, 8(8): 292
- [26] Ma T L, Yu X R, Luo C K, Li P F, Tian L, Zhang Y X, Yang S Q, Yang R. A review of rice starch-related genes. *Wuhan University Journal of Natural Sciences*, 2021, 26(1):24-38
- [27] 安永平, 张文银, 马静, 王彩芬, 韩国敏. 水稻新品种宁粳 28 号简介. *宁夏农林科技*, 2005(4): 14
An Y P, Zhang W Y, Ma J, Wang C F, Han G M. Introduction of rice cultivar “Ning Jing 28”. *Journal of Ningxia Agriculture and Forestry Science and Technology*, 2005(4):14
- [28] Liu D, Ma C, Hong W, Liu M, Liu H, Zeng H P, Deng D J, Xin H G, Song J, Xu C H, Sun X W, Hou X L, Wang X W, Zheng H K. Construction and analysis of high-density linkage map using high-throughput sequencing data. *PLoS ONE*, 2014, 9(6): e98855
- [29] 张春龙, Channarong Phongsai, 张江丽, 于洋, 苏耀华, 杨米, 高亮, 普世皇, 李娟, 金寿林, 谭学林, 文建成. 稻米抗性淀粉含量及其环境稳定性分析. *中国农业科学*, 2019, 52(17): 2921-2928
Zhang C L, Channarong P, Zhang J L, Yu Y, Su Y H, Yang M, Gao L, Pu S H, Li J, Jin S L, Tan X L, Wen J C. Evaluation of rice germplasm for grain resistant. *Scientia Agricultura Sinica*, 2019, 52(17): 2921-2928
- [30] Zhu Y, Cai X L, Wang Z Y, Hong M M. An interaction between a MYC protein and an EREBP protein is involved in transcriptional regulation of the rice *Wx* gene. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(48): 47803-47811
- [31] Isshiki M, Nakajima M, Satoh H, Shimamoto K. *dull*: Rice mutants with tissue-specific effects on the splicing of the *waxy*

- pre-mRNA. *The Plant Journal*, 2000, 23(4): 451-460
- [32] Zeng D L, Yan M X, Wang Y H, Liu X F, Qian Q, Li J Y. *Du1*, encoding a novel Prp1 protein, regulates starch biosynthesis through affecting the splicing of *Wx^b* pre-mRNAs in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Molecular Biology*, 2007, 65 (4) : 501-509
- [33] Isshiki M, Matsuda Y, Takasaki A, Wong H L, Satoh H, Shimamoto K. *Du3*, a mRNA cap-binding protein gene, regulates amylose content in Japonica rice seeds. *Plant Biotechnology*, 2008, 25(5): 483-487
- [34] Ishibashi Y, Kohyama-Koganeya A, Hirabayashi Y. New insights on glucosylated lipids: Metabolism and functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2013, 1831(9): 1475-1485
- [35] Markham J E, Li J, Cahoon E B, Jaworski J G. Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281 (32) : 22684-22694
- [36] Melsner S, Batailler B, Peypelut M, Poujol C, Bellec Y, Watelet-Boyer V, Maneta-Peyret L, Faure J D, Moreau P. Glucosylceramide biosynthesis is involved in Golgi morphology and protein secretion in plant cells. *Traffic*, 2010, 11 (4) : 479-490
- [37] Msanne J, Chen M, Luttgeharm K D, Bradley A M, Mays E S, Paper J M, Boyle D L, Cahoon R E, Schrick K, Cahoon E B. Glucosylceramides are critical for cell-type differentiation and organogenesis, but not for cell viability in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 2015, 84(1): 188-201
- [38] Dai G Y, Yin J, Li K E, Chen D K, Liu Z, Bi F C, Rong C, Yao N. The *Arabidopsis* AtGCD3 protein is a glucosylceramidase that preferentially hydrolyzes long-acyl-chain glucosylceramides. *Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295(3): 717-728
- [39] Hasjim J, Lee S O, Hendrich S, Setiawan S, Ai Y F, Jane J L. Characterization of a novel resistant-starch and its effects on postprandial plasma-glucose and insulin responses. *Cereal Chemistry*, 2010, 87(4): 257-262
- [40] Sun Y, Jiao G, Liu Z, Zhang X, Li J Y, Guo X P, Du W M, Du J L, Francis F, Zhao Y D, Xia L Q. Generation of high-amylose rice through CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of starch branching enzymes. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 298
- [41] Li Q F, Huang L C, Chu R, Li J, Jiang M Y, Zhang C Q, Fan X L, Yu H X, Gu M H, Liu Q Q. Down-regulation of *SSSII-2* gene expression results in novel low-amylose rice with soft, transparent grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(37): 9750-9760
- [42] 高振楠,郝媛媛,李春寿,黄福灯,赵向前,田志宏.水稻调控淀粉合成基因的研究进展.植物遗传资源学报,2023,24(1): 61-74
- Gao Z N, Hao Y Y, Li C S, Huang F D, Zhao X Q, Tian Z H. Study on genes regulating starch synthesis in rice. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2023, 24(1): 61-74
- [43] 柏鹤,马小定,曹桂兰,刘宪虎,韩龙植.不同类型特种稻种质营养及功能性成分含量的差异.植物遗传资源学报,2017, 18(6):1013-1022
- Bai H, Ma X D, Cao G L, Liu X H, Han L Z. The differences of nutritional and functional components content in different types of special rice. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2017, 18(6):1013-1022
- [44] 原小年,徐姊玥,乔卫华,刘璇,史雪妍,刘忠学,丁鑫,刘亚焯,万甜恬,刘玲珑.稻米淀粉品质性状的资源筛选和相关基因初步鉴定.植物遗传资源学报,2022,23(6):1756-1765
- Yuan X N, Xu Z Y, Qiao W H, Liu X, Shi X Y, Liu Z X, Ding X, Liu Y X, Wan T T, Liu L L. Resource screening of starch quality traits and preliminary identification of related genes in rice. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022, 23(6): 1756-1765