

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2010.00728

水稻淀粉脱分支酶基因 *PUL* 对稻米理化品质的影响

严长杰 房玉伟 李敏 彭军成 刘巧泉 汤述翥 顾铭洪*

扬州大学教育部植物功能基因组学重点实验室 / 江苏省作物遗传生理国家重点实验室培育点, 江苏扬州 225009

摘要: 为了研究 *PUL* 基因的变异对稻米蒸煮食味品质的影响, 分别以籼稻品种桂朝 2 号和粳型糯稻品种苏御糯互为供体和轮回亲本, 通过分子标记辅助选择, 经过多代回交构建了 *PUL* 基因的近等基因系, 分析了各近等基因系和轮回亲本的蒸煮品质指标。结果表明, 近等基因系与轮回亲本在直链淀粉含量、胶稠度和淀粉晶体结构等指标上没有显著差异, 而淀粉的热力学特性和淀粉黏滞性等指标存在显著的变化。说明 *PUL* 基因是影响稻米蒸煮品质的重要基因之一。来源于籼稻桂朝 2 号和粳稻苏御糯的 *PUL* 等位基因在功能上已经发生明显的分化。本研究中基于 *PUL* 基因序列差异设计的分子标记可以直接用于水稻品质的改良。

关键词: 水稻; 蒸煮食味品质; *PUL* 基因; 近等基因系

Effect of *PUL* Allelic Variation on Rice Cooking and Eating Quality

YAN Chang-Jie, FANG Yu-Wei, LI Min, PENG Jun-Cheng, LIU Qiao-Quan, TANG Shu-Zhu, and GU Ming-Hong*

Key Laboratory of Plant Functional Genomics, Ministry of Education / Jiangsu Key Laboratory of Crop Genetics and Physiology, Agricultural College of Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

Abstract: In order to investigate the genetic effect of allelic variation of *PUL* gene on rice cooking and eating quality, two sets of near-isogenic lines for *PUL* gene were successfully developed, using an *indica* variety Guichao 2 and a *japonica* glutinous variety Suyunuo to make a cross, and then the backcrossing for several generations with two parents, respectively. For each generation, the target plants were selected under the help of the gene specific STS marker on *PUL* gene. Furthermore, the cooking and eating quality was measured in two sets of NIL as well as their parents. The results indicated that, the NILs did not alter significantly with respect to amylose content, gel consistency and the starch crystalline structure when compared to their recurrent parents; in the contrast, the significant differences were observed between NILs and their recurrent parents with respect to starch paste viscosity and starch thermal property. Hence, it can be concluded that *PUL* gene plays an important role in determining rice grain cooking and eating quality. Functional differentiation occurred in *PUL* locus between *indica* variety Guichao 2 and *japonica* variety Suyunuo. The gene specific molecular markers on *PUL* gene developed on the basis of genomic sequence diversity could be directly applied in rice breeding for quality.

Keywords: Rice; Cooking and eating quality; *PUL* gene; Near-isogenic lines

近年来, 随着人们生活水平的提高, 人们对稻米品质, 尤其是蒸煮和食味品质的要求越来越高。因此对稻米蒸煮食味品质的遗传特点和品种改良受到了水稻遗传育种家的广泛重视。稻米的主要成分是淀粉, 包括直链淀粉和支链淀粉两种形式, 约占精米干重的 90% 左右。淀粉的组成与结构在相当程度上决定了稻米品质的优劣。

稻米的蒸煮食味品质的评定主要包括 4 个理化指标, 即表观直链淀粉含量(apparent amylose

content, AAC)^[1]、胶稠度(gel consistency, GC)^[2]、糊化温度(gelatinization temperature, GT)^[3]和淀粉黏滞性谱(paste viscosity profile, 用 Rapid Visco Analyzer 测定, 简称 RVA)^[4]。迄今为止, 研究者们已经对上述 4 个指标的遗传基础进行了广泛的研究。人们发现编码颗粒结合淀粉合成酶的 *Wx* 基因是控制 AAC、GC, 以及大部分 RVA 特征值的主效基因^[5-10]; 而 GT 则主要由可溶性淀粉合成酶基因 *SSII-3* 控制^[11-15]。然而在已有的研究中发现, 尽管检测到控制上

本研究由国家自然科学基金项目(30530470, 30771323, 30871501), 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2006AA10Z118), 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2005CB12804), 霍英东青年教师基金(101030)和江苏省高校自然科学基金重大基础研究项目(08KJA210002)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 顾铭洪, E-mail: gumh@yzu.edu.cn; Tel: 0514-87972139

第一作者联系方式: E-mail: yichuan@yzu.edu.cn

Received(收稿日期): 2009-11-03; Accepted(接受日期): 2010-02-07.

述 4 个理化指标的主效基因相同的品种, 其品质指标却存在较大差异。这一方面与不同研究者使用的材料和生长的环境不同有关; 另一方面, 稻米品质是一个十分复杂的性状, 稻米淀粉的合成不仅受到上述主效基因的控制, 同时还受其他与淀粉合成相关基因的影响。

随着植物分子生物学研究的不断深入, 水稻淀粉合成的分子机制已经基本明了。淀粉的合成需要 ADP 焦磷酸化酶(AGPase)、淀粉合酶(starch synthase, SS)、淀粉分支酶(starch branching enzyme, SBE)、脱分支酶(debranching enzyme, DBE)的共同参与, 其中每种酶又具有多个同工型(isoform)。在水稻中, 已经克隆了近 20 个编码各类酶的基因, 各个基因的功能也基本清楚^[16]。然而, 已有的研究表明, 在不同的水稻品种之间, 编码淀粉合成相关酶的每一个基因座上均存在数目不等的等位变异, 此类变异对淀粉品质性状的影响有的已经比较清楚。例如, 控制直链淀粉合成的 *Wx* 基因, 其基因座上至少存在 5 种复等位基因, 包括 *Wx^a*、*Wx^b*、*Wx^{op}*、*Wxⁱⁿ* 和 *wx*, 带有不同等位基因的品种直链淀粉含量差异较大^[17]。控制糊化温度的主效基因 *SSII-3* 座位上, 也至少存在两种等位基因, 它们分别决定籼、粳稻中不同的支链淀粉结构^[11-15]。然而, 对于其他淀粉合成相关基因座位上等位性变异, 以及这些变异对稻米蒸煮品质的影响, 目前还知之甚少。这在相当程度上影响了稻米品质改良的效率。

DBE 是淀粉合成中的一种重要酶类^[18-20], 依据其作用底物的不同, 可分为极限糊精酶或称 R 酶(Pullulanase)和异淀粉酶(Isoamylase)两大类。在水稻基因组中, 只存在一个拷贝的 *PUL* 基因^[18], 其功能丧失会导致 DP 13 的分支链增加、B2-3 链加长(约 3 个残基), 但是籽粒的外观和淀粉的晶体结构没有显著的变化^[20]。在长期的进化过程中, 亚洲栽培稻形成了籼粳两个主要类型或亚种, 许多基因已经发生了等位分化。*PUL* 基因在粳稻品种日本晴和籼稻品种 93-11 之间也发生了许多序列变异(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 包括碱基的插入/缺失, 以及碱基的替换, 但是这些变异是否导致其功能变化, 目前并不清楚。本研究通过测序发现粳型糯稻品种苏御糯与籼稻品种桂朝 2 号之间, *PUL* 基因的序列也存在一定的差异^[21]。为明确这些差异对淀粉品质的影响, 我们通过构建近等基因系开展了研究。

1 材料与方法

1.1 近等基因系的构建

近等基因系的构建从 2002 年开始, 分两组进行。第一组以高产籼稻桂朝 2 号为轮回亲本, 以粳稻品种苏御糯为供体亲本, 将来源于苏御糯中的

PUL 基因, 通过分子标记辅助选择导入桂朝 2 号, 构建了以桂朝 2 号为背景的 *PUL* 基因近等基因系。第二组将桂朝 2 号的 *PUL* 基因导入苏御糯, 构建了苏御糯为轮回亲本的近等基因系。近等基因系的构建流程如图 1 所示。

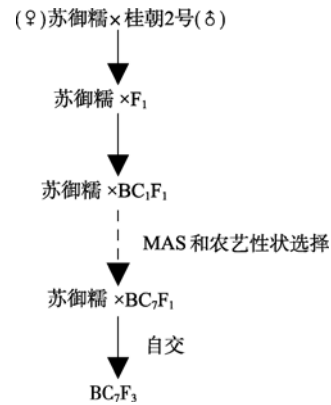


图 1 以苏御糯为背景的近等基因系构建流程

Fig. 1 Diagram of development of near-isogenic lines for *PUL* gene with Suyunuo as genetic background

1.2 目标基因检测

采用 CTAB 法提取水稻叶片基因组 DNA, 用于分子标记的检测。分子标记 *PUL-M* 是根据粳稻品种日本晴和籼稻品种 93-11 基因组序列在 *PUL* 基因上的插入/缺失差异设计的。在 *PUL* 基因的启动子区, 粳稻日本晴带有一段 13 bp (5'-GGTCAATAAGCC A-3')的序列在籼稻品种 93-11 中发生了缺失, 据此设计了 STS 标记 *PUL-M*, 其引物序列为 5'-AGA GAAGGAGAAAGAAGTGGAGAC-3'和 5'-GTCCAA ACTGAATCACTCAATCG-3'。该标记在两个亲本苏御糯和桂朝 2 号之间具有良好的多态性。参考文献 [22] 扩增和检测 PCR 产物。

1.3 近等基因系背景检测

在对 BC_7F_2/BC_8F_2 株系进行前景选择的基础上, 选择目标基因纯合单株种成 BC_7F_3/BC_8F_3 株系。每个 BC_7F_3/BC_8F_3 选择 25 个株系, 首先利用除 *PUL* 基因以外其他 14 个淀粉合成相关基因座位上的特异分子标记进行检测, 然后利用均匀分布于染色体上的 76 个 SSR 标记进行遗传背景检测(表 1)。

1.4 蒸煮食味品质理化指标测定

1.4.1 AC 和 GC 测定 依据 GB/T15683-1995 测定 AC, 依据 GB/T 17891-1999 测定 GC。

1.4.2 RVA 谱测定 采用澳大利亚 Newport Scientific 仪器公司生产的 3-D 型黏度速测仪测定淀粉黏滞性, 并用 TCW (thermal cycle for Windows) 配套软件分析^[23]。RVA 谱特征值用峰值黏度(peak viscosity, PKV)、热浆黏度(hot paste viscosity, HPV)、冷胶黏度(cool paste viscosit, CPV)、崩解值(breakdown value, BDV)、消减值(setback value,

SBV)、回复值(consistence value, CSV)、峰值时间表示。黏滞性值用 centiPoise (cP)为单位。(peak time, PeT)和糊化温度(pasting temperature, PaT)

表1 用于近等基因系遗传背景检测的分子标记和基因
Table 1 Information of molecular markers and genes used for testing the genetic background of NILs

标记/基因 Marker/gene	染色体 Chromosome	位置 Position (Mb)	标记/基因 Marker/gene	染色体 Chromosome	位置 Position (Mb)	标记/基因 Marker/gene	染色体 Chromosome	位置 Position (Mb)
RM495	1	0.21	SSIII-1	4	31.50	RM210	8	22.34
RM1	1	4.60	RM348	4	32.60	RM308	8	24.66
RM259	1	7.40	RM13	5	0.04	ISA	8	25.80
RM580	1	9.60	RM267	5	2.86	RM264	8	27.92
RM493	1	12.26	RM169	5	7.48	RM336	9	1.02
RM9	1	23.65	RM249	5	10.75	RM464	9	6.58
AGPiso	1	25.70	RM305	5	20.92	AGP _{sma}	9	7.20
SSIV-1	1	30.40	SSIV-2	5	26.40	RM296	9	10.73
RM302	1	33.31	RM334	5	28.32	RM242	9	18.81
RM312	1	33.38	AGPlar	5	28.80	RM160	9	19.78
RM71	2	8.76	RM508	6	0.44	RM205	9	22.75
RM521	2	10.80	RM588	6	1.61	RM474	10	1.80
RM324	2	11.38	Wx	6	1.75	RM216	10	5.10
RM341	2	19.36	RM587	6	2.29	RM239	10	9.22
SBE3	2	19.40	SSI	6	3.10	SSII-1	10	15.40
RM211	2	20.20	RM584	6	3.42	RM258	10	17.75
RM525	2	28.27	SSII-3	6	6.75	RM228	10	21.98
SSII-1	2	31.30	RM412	6	30.32	RM496	10	22.17
RM241	2	31.49	SBE1	6	30.85	RM4B	11	0.93
RM535	2	35.78	RM298	7	2.80	RM332	11	2.84
RM448	3	0.01	RM481	7	2.90	RM167	11	4.07
RM523	3	1.29	RM501	7	8.04	RM 202	11	8.98
RM489	3	4.31	RM542	7	12.71	RM229	11	18.37
RM232	3	9.72	GBSSII	7	12.90	RM224	11	22.79
RM168	3	28.05	RM11	7	19.26	RM20A	12	0.97
RM520	3	30.87	RM182	7	21.45	RM19	12	2.43
RM422	3	33.65	RM18	7	25.62	RM247	12	3.18
RM551	4	0.16	RM408	8	0.12	RM101	12	8.82
RM335	4	0.67	RM38	8	2.11	RM235	12	26.10
PUL	4	4.45	SSIII-2	8	5.40	RM17	12	26.95
SBE4	4	20.00	RM547	8	5.58			
RM273	4	24.02	RM331	8	12.29			

1.4.3 淀粉热力学特性的测定 淀粉热力学特征的测定在差示扫描量热仪(differential scanning calorimetry, DSC, 型号 DSC 200 F3)上进行, 用配套的分析软件分析。称取干燥的精米米粉样品 5 mg 左右, 加 10 mL 左右的去离子水(样品 水=1 2), 以铝制样品盘密封后于冰箱(4)过夜平衡, 在测试前取出回温 1 h, 放入差示扫描量热仪中测定, 以空盘为参考样品, 升温速率为 10.0 min⁻¹, 温度范围为

20~120 , 得到试样的 DSC 热效应曲线, 其特征参数包括淀粉糊化时需要的热焓的变化、起始温度(T_0)、峰值温度(T_p)、终止温度(T_c)、糊化范围(R)和回生度(%R)。

1.4.4 淀粉晶体结构的测定 淀粉样品在室温环境均衡 24 h 后用多晶 X-衍射仪(D8-ADVANCE, 德国布鲁克 AXS 公司)。进行测定。X-衍射操作在 40 mA 和 45 kV 下进行, 衍射角(2 θ)的扫描范围为 5°~40°, 每

0.2 s 扫描 0.1°。通过机械极差求积法(mechanical polar plamimeter)计算得到晶体峰面积和总的衍射面积。结晶度用晶区面积占总面积的百分比表示, 相对结晶度 = $I_c / (I_a + I_c) \times 100\%$, 其中, I_a 是 X 射线衍射图谱中非结晶区的面积, I_c 是结晶区的面积。

1.5 统计分析

利用 Microsoft Excel 和 DPS 数据处理系统对基因型间的差异进行方差分析, 利用新复极差法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 *PUL* 基因近等基因系的构建

2002 年夏将桂朝 2 号和苏御糯种于扬州大学农学院实验农场, 配制杂交种 F_1 。冬季在海南陵水种植 F_1 代, 以桂朝 2 号和苏御糯分别作为轮回亲本进行大量回交, 并连续回交得 BC_7F_1 (苏御糯为背景)和 BC_8F_1 (桂朝 2 号为背景)。在此过程中, 借助分子标记 *PUL-M* 进行辅助选择目标单株。

2007 年夏季在扬州大学农学院种植 BC_7F_1/BC_8F_1 , 对群体利用分子标记检测, 并收获目标单株。冬季在海南种植 BC_7F_2/BC_8F_2 , 在分子标记 *PUL-M* 辅助选择下, 在 BC_8F_2 (桂朝 2 号背景)和 BC_7F_2 (苏御糯背景)两个群体中分别筛选到目标基因纯合单株 5 个, 2008 年种成 $BC_7F_3 BC_8F_3$ 株系。并进一步用分子标记 *PUL-M* 检测各单株的基因型, 证实各单株带有供体亲本的 *PUL* 基因座位的等位基因(图 2)。

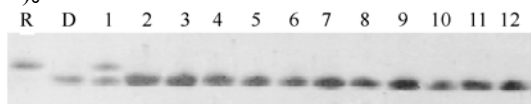


图 2 *PUL* 基因座的分子标记在苏御糯群体中(BC_8F_3)的部分验证结果

Fig. 2 Partial results of target plants in BC_8F_3 population (Suyunuo as recurrent parent) validated with *PUL* gene specific marker

R: 轮回亲本苏御糯; D: 供体亲本桂朝 2 号; 1~12 为分离群体的单株。

R: recurrent parent, Suyunuo; D: donor parent, Guichao 2; 1-12 indicates the plant in segregation population.

由于参与淀粉合成的基因众多, 为排除其他基因的干扰, 在近等基因系构建过程中除了在每代进行目标基因的检测外, 在 BC_7F_3 和 BC_8F_3 群体中, 每个株系选取 5 个单株进行遗传背景检测。从而发现, 在以桂朝 2 号为背景的 BC_8F_3 群体中, 所有 25 个单株均只带有供体亲本苏御糯的 *PUL* 等位基因, 而在其他淀粉合成相关基因座位上均为桂朝 2 号的等位基因; 在苏御糯为背景的 BC_7F_3 群体中, 所有 25 个单株在 *PUL* 基因座上都有桂朝 2 号的等位基因, 但是其中有 15 株在其他 14 个淀粉合成相关基因座位上或多或少带有桂朝 2 号的等位基因。因此, 共分别获得 25 个和 5 个独立的 *PUL* 基因的近等基因系, 分别记作 NIL-*PUL*(S)(桂朝 2 号为背景)和 NIL-*PUL*(G)(苏御糯为背景)。

进一步用均匀分布于 12 对染色体上的 76 个 SSR 标记(表 1)对获得的 25 个 NIL-*PUL*(S)和 5 个 NIL-*PUL*(G)进行遗传背景的检测, 计算每个单株与轮回亲本的遗传相似率(相似率=与轮回亲本相同基因型的标记数/总的标记数)。结果表明, 25 个 NIL-*PUL*(S)与轮回亲本桂朝 2 号的平均相似率为 99.78%, 5 个 NIL-*PUL*(G)与轮回亲本苏御糯的平均相似率也达到 92.05%。说明获得的近等基因系除目标基因外, 已基本回复到轮回亲本的基因型, 在分析 *PUL* 基因的遗传效应时可以基本排除遗传背景的干扰, 比较准确地估计 *PUL* 基因的遗传效应和不同等位基因的功能差异。

2.2 近等基因系理化品质性状分析

2.2.1 直链淀粉含量和胶稠度 直链淀粉含量和胶稠度是评价稻米蒸煮食用品质的两个重要理化指标。我们随机选择了 12 个 NIL-*PUL*(S)和 5 个 NIL-*PUL*(G), 测定其直链淀粉含量和胶稠度。结果表明, NIL-*PUL*(S)和 NIL-*PUL*(G), 与其各自轮回亲本相比, 直链淀粉含量和胶稠度虽有变化, 但都没有达到显著水平(表 2)。

表 2 近等基因系与轮回亲本的胶稠度和直链淀粉含量比较

Table 2 Comparison of the gel consistencies and amylose contents between NILs and their recurrent parents

材料名称 Material	样本数 Sample number	直链淀粉含量 Amylose content (%)	胶稠度 Gel consistency (cm)
桂朝 2 号 Guichao 2	2	25.02±1.65	3.10±0.14
NIL- <i>PUL</i> (S)	12	27.07±1.31	3.23±0.27
苏御糯 Suyunuo	2	2.528±0.068	11.1±0.1
NIL- <i>PUL</i> (G)	5	2.257±0.236	10.76±0.36

2.2.2 淀粉黏滞性特性 由表 3 可以看出, NIL-*PUL*(S)与桂朝 2 号相比, 在 8 个特征值中, 只有 PKV 和 CPV 极显著地高于轮回亲本, 其他 6 项特征

值没有发生显著的变化。然而, NIL-*PUL*(G)的 PKV、BDV、CPV、HPV 和 SBV 与轮回亲本苏御糯相比均明显提高, 其差异达到显著或极显著水平。表明

PUL 基因在籼稻桂朝 2 号和粳稻苏御糯中发生了功能分化, 也说明 *PUL* 基因在淀粉合成过程中起着重要作用。

进一步分析 NIL-*PUL*(G)和 NIL-*PUL*(S)的 RVA 特征值发现, 当轮回亲本的 *PUL* 基因被其相应的供体亲本代换以后, 两套近等基因系在发生(极)显著变化的指标上均比轮回亲本有所提高; 而且两套近等基因系发生显著改变的 RVA 特征值数目也不同, 在 NIL-*PUL*(G)中有 5 个特征值(包括 PKV、BDV、CPV、HPV 和 SBV), 而在 NIL-*PUL*(S)中只有 2 个特征值(PKV 和 CPV)。这似乎与预期结果相矛盾。导致这一现象的原因, 一方面可能与实验本身存在的误差有关; 另一方面, 淀粉合成过程受到复杂的遗传网络调控, 有大约 20 个基因参与淀粉的合成, 其中每一个基因都是在一定的遗传网络中发挥作用。同一基因在不同的遗传网络背景下的遗传效应可能不同。桂朝 2 号和苏御糯分别是典型的籼稻和粳型糯稻品种, 在参与淀粉合成的遗传网络上存在较大差别, 其中各个基因的功能也不尽相同。例如,

在 *Wx* 座位上两个亲本的基因型分别为 Wx^aWx^a 和 $wxwx$, 二者在直链淀粉含量上差异较大(表 1), 分别为 25.0%和 2.5%左右。已有研究表明, *Wx* 基因对 *PUL* 基因具有明显的上位性作用^[24]。*PUL* 基因与 *Wx* 基因, 以及其他淀粉合成相关基因之间的互作情况仍需进一步研究。

2.2.3 淀粉热力学特性 从表 4 可以看出, 桂朝 2 号与 NIL-*PUL*(S)在反映淀粉热力学特性的各项指标上没有显著差异; 而轮回亲本苏御糯与 NIL-*PUL*(G)相比, 起始温度(T_p)、终止温度(T_c)和糊化范围(R)等 3 个指标均发生了显著的改变。该结果表明, 除前人报道的 *SSII-3* 基因控制淀粉的糊化特性外, *PUL* 基因对淀粉的糊化特性也有影响。

2.3 淀粉晶体结构

稻米的淀粉晶体类型均为典型的 A 型模式, 衍射峰的位置主要集中于 $13^\circ\sim 28^\circ$, 此区间之外基本不存在衍射峰, 在 2θ 为 15.06° 、 17.16° 、 17.94° 和 23.00° 处有明显的衍射峰, 在 20.0° 和 26.5° 左右有较小的吸收峰, 在 17.94° 附近出现最强衍射峰。从图 3

表 3 近等基因系与轮回亲本的 RVA 特征值比较

Table 3 Comparison of RVA characteristic values between NILs and their recurrent parents

性状 Trait	桂朝 2 号 Guichao 2	NIL- <i>PUL</i> (S)	苏御糯 Suyunuo	NIL- <i>PUL</i> (G)
峰值黏度 Peak viscosity (cP)	3139.50±136.36	3363.58±112.07**	1037.25±119.76	1278±53.63*
热浆黏度 Hot paste viscosity (cP)	2654.75±87.03	2740.33±111.87	346.50±52.74	470.50±30.69**
崩解值 Breakdown (cP)	484.75±51.55	623.25±126.21	690.75±73.95	807.50±29.15*
冷胶黏度 Cool paste viscosity (cP)	3818.75±129.99	4270.92±267.94**	491.50±66.38	625.25±39.48*
回复值 Consistence (cP)	1164.00±69.18	1530.58±331.07	145.00±14.63	154.75±0.49
消减值 Setback (cP)	679.25±68.36	907.33±224.83	-545.75±59.97	-652.75±25.32*
峰值时间 Peak time (min)	6.70±0.07	6.57±0.18	3.50±0.03	3.53±0.05
起浆温度 Pasting temperature ()	85.17±0.84	81.34±5.61	71.05±0.44	70.7±0.34

*表示显著水平为 0.05, **表示显著水平为 0.01; 桂朝 2 号、苏御糯和 NIL-*PUL*(G)的样本数为 4, NIL-*PUL*(S)的样本数为 12。

* Significant at $P\leq 0.05$, ** significant at $P\leq 0.01$. The sample number of Guichao 2, NIL-*PUL*(S), Suyunuo and NIL-*PUL*(G) is 4, 12, 4, and 4, respectively.

表 4 近等基因系与轮回亲本热力学特性的比较

Table 4 Comparison of thermal properties between NILs and their recurrent parents

性状 Trait	桂朝 2 号 Guichao 2	NIL- <i>PUL</i> (S)	苏御糯 Suyunuo	NIL- <i>PUL</i> (G)
峰值温度 Peak temperature ()	68.56±0.32	69.10±0.40	71.85±0.17	72.12±0.33
起始温度 Onset temperature ()	63.54±0.51	63.63±0.70	64.15±0.40	65.06±0.62*
终止温度 Conclusion temperature ()	75.06±0.48	75.70±0.72	80.1±0.29	79.62±0.30*
糊化范围 Range of gelatinization ()	11.52±0.24	12.07±0.81	15.95±0.60	14.56±0.61*
焓值 Enthalpy of gelatinization (ΔH_g) ($J g^{-1}$)	24.42±1.44	26.63±2.14	38.48±2.38	36.46±3.15
回生焓值 Enthalpy of retrogradation (ΔH_r) ($J g^{-1}$)	7.63±1.32	8.62±0.52	3.15±1.70	3.49±1.56
回生度 Percentage of retrogradation (%)	32.01±5.37	33.09±5.03	8.01±3.95	9.52±3.96

*表示显著水平为 0.05, **表示显著水平为 0.01; 桂朝 2 号和 NIL-*PUL*(G)的样本数为 5, NIL-*PUL*(S)的样本数为 3, 苏御糯的样本数为 4。

* Significant at $P\leq 0.05$, ** significant at $P\leq 0.01$. The sample number of Guichao 2, NIL-*PUL*(S), Suyunuo and NIL-*PUL*(G) is 5, 3, 4, and 5, respectively.

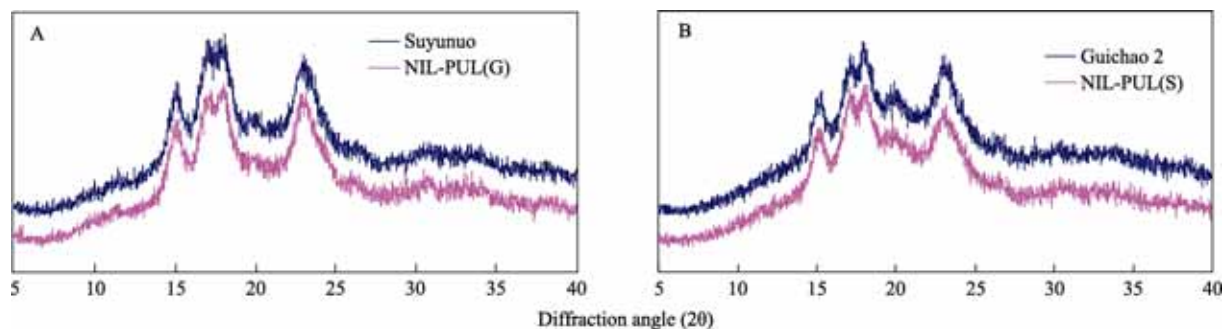


图 3 近等基因系与轮回亲本的淀粉 X-衍射图谱比较

Fig. 3 X-ray diffraction profiles comparison between NILs and their corresponding recurrent parents

(A) 苏御糯及其近等基因系; (B) 桂朝 2 号及其近等基因系。
(A) Suyunuo and NIL-*PUL*(G); (B) Guichao 2 and NIL-*PUL*(S).

可以看出, 桂朝 2 号和苏御糯的淀粉晶体类型属于 A 型模式, 但是两者的衍射峰存在显著差异, 在 20 为 20°位置上, 苏御糯具有较小的吸收峰; 而在桂朝 2 号和苏御糯背景下的 *PUL* 基因近等基因系的 X 衍射峰与轮回亲本相比没有发生明显的变化, 具有相似的 X 衍射峰特征。进一步分析轮回亲本和近等基因系的相对结晶度发现, 两个轮回亲本桂朝 2 号和苏御糯的结晶度分别为 27.04%和 30.95%, 两者之间差别较大 ($P < 0.01$); 而两个近等基因系 NIL-*PUL*(G)和 NIL-*PUL*(S)的淀粉相对结晶度分别为 26.71%和 32.44%, 与其相应的轮回亲本相比也没有显著差异。由此可以推测 *PUL* 近等基因系淀粉体的排列紧密程度与轮回亲本相比没有发生显著变化。

3 讨论

PUL 是编码脱分支酶之一的极限糊精酶 (pullulanase) 基因, 仅在胚乳中表达^[25]。已经证实 *PUL* 不仅参与水稻胚乳中淀粉的降解, 而且在淀粉的合成过程中发挥重要作用^[19-20]。已有研究表明, *PUL* 基因发生突变后, 胚乳中支链淀粉的聚合度小于 13 的短链明显增加, 而 B2-3 链的平均链长要比野生型增加约 3 个葡萄糖残基^[20], 说明 *PUL* 基因对支链淀粉的精细结构起重要作用。本研究发现近等基因系与轮回亲本在直链淀粉含量、胶稠度, 以及淀粉晶体结构上没有显著的差异, 但是淀粉的黏滞性特征和热力学特性有显著的差异, 这一方面说明 *PUL* 基因影响稻米蒸煮食味品质, 另一方面也说明来源于粳、籼两个品种的 *PUL* 等位基因在功能上发生了明显的分化。

Wan 等^[8]利用 Asominori 和 IR24 构建的染色体片段代换系研究发现, 在水稻第 4 染色体的短臂存在 1 个 QTL 同时控制米饭的光泽 (*qLT-4*)、香味 (*qST-4*)、黏性 (*qVC-4*) 和胶稠度 (*qGC-4*)。 *PUL* 基因也位于第 4 染色体短臂的相同区域内, 推测两者很可能是同一个基因。He 等^[10]利用加倍单倍体群体 (南京 11×Balilla) 分析表观直链淀粉含量、胶稠度和糊

化温度的遗传时, 没有检测到 *PUL* 基因的效应; 而在苏御糯×扬辐糯 4 号衍生的 F_2 群体中发现 *PUL* 与 *SSIIa* 之间存在互作, 对糊化温度的变异有显著的影响, 但是没有发现 *PUL* 基因与直链淀粉含量和胶稠度等指标的变异有关。本研究发现在苏御糯背景下的近等基因系糊化特性发生了显著的改变, 进一步证实 *PUL* 基因对稻米的部分品质指标有影响。

然而, Bao 等^[6]利用分子标记研究 DH 群体 (京系 17×窄叶青 8 号) 的 6 个淀粉黏滞性特征值的遗传特征, 在第 4 号染色体上没有检测到相关的 QTL。Bao 等^[27]利用表观直链淀粉含量相似的亲本 (IR24/Azucena) 衍生的 DH 群体进行 AC、GC、GT 和 RVA 特征值的 QTL 分析, 在检测到的 17 个 QTL 中, 没有 QTL 位于 *PUL* 基因所在的第 4 染色体相应区域内。Wang 等^[7]在利用重组自交系群体 (Zhenshan 97×Delong 208) 分析包括淀粉黏滞性特征、直链淀粉含量、胶稠度、碱扩散值、米饭延伸性等稻米品质指标的相关 QTL, 两年共鉴定了 26 个 QTL, 也没有发现 *PUL* 基因的遗传效应。由此可见, 不同研究者的结果之间存在较大的差别。其原因可能有三个: (1) 稻米的蒸煮食味品质容易受到环境的影响。一般不同的年份、地点测定的稻米品质性状, 存在较大的差异。Bao 等^[6]利用 DH 群体 (京系 17×窄叶青 8 号) 分析了 6 个淀粉黏滞性特征值的遗传机制, 在检测到的 20 个 QTL 中, 只有 *Wx* 基因可以在 2 年被重复检测到, 充分说明淀粉的 RVA 特征值受环境影响较大。(2) 基因之间存在复杂的关系。在众多影响稻米品质性状的基因/QTL 中, *Wx* 基因的作用最大, 控制多个品质性状的遗传^[6-8,10,27]。已有研究表明, *Wx* 基因对其他影响稻米品质的基因具有掩盖作用^[24], 而且基因之间存在广泛的互作^[10,24], 不同基因的互作在分子水平上也得到了证明^[19-20,28]。在不同的研究中, 有的用亲本直链淀粉含量差异较大的群体 (Zhenshan 97×Delong 208, 京系 17×窄叶青 8 号)^[6-7], 有的用直链淀粉含量相似的亲本配置的群体 (IR24/Azucena)^[27], 还有的用两个糯稻配置的分析

群体(苏御糯×扬辐糯4号)^[10],而由于直链淀粉含量的高低影响效应较小的基因被检测出的效率,使得不同的研究者之间的研究结果存在一些差别。(3)遗传分析群体本身的特征对分析稻米品质性状的影响。以往用于稻米品质分析的遗传分析群体类型复杂,有DH、RIL、F₂、CSSL等群体。而像DH、RIL和F₂等遗传平衡群体,群体内遗传变异较大,利用这类群体分析极易受环境影响的数量性状遗传基础时,效应较小的QTL难以检测到^[29]。因此,在水稻中,CSSL群体和近等基因系群体越来越被广泛用于数量性状基因的遗传分析和克隆研究。

本研究结果表明,PUL基因对稻米直链淀粉含量、胶稠度,以及淀粉的晶体结构虽存在一定的影响,但没有达到显著水平;而近等基因系在淀粉黏滞性和热力学特性方面与轮回亲本相比却发生了显著的变化。说明PUL基因在稻米品质形成中也具有重要的作用,在稻米品质改良中,除了要重视Wx、SSII-3等重要基因以外,像PUL等效应较小的基因也不容忽视。

4 结论

比较了PUL基因的近等基因与轮回亲本的蒸煮食味品质,发现两者在直链淀粉含量、胶稠度和淀粉晶体结构等指标上没有显著差异,而淀粉的热力学特性和淀粉黏滞性等指标存在显著的变化。说明PUL基因也是影响稻米蒸煮品质的重要基因之一。来源于籼稻桂朝2号和粳稻苏御糯的PUL等位基因在功能上已经发生明显的分化。

References

- [1] Juliano B O. Criteria and test for rice grain quality. In: Juliano B O ed. Rice Chemistry and Technology. St. Paul, Minn. American Association of Cereal Chemists Inc., 1985. pp 443–513
- [2] Cagampong G B, Perez C M, Juliano B O. A gel consistency test for eating quality in rice. *Sci Food Agric*, 1973, 24: 1589–1594
- [3] Little R R, Hilder G B, Dawson E H. Differential effect of dilute alkali on 25 varieties of milled white rice. *Cereal Chem*, 1958, 35: 111–126
- [4] Juliano B O. Rice quality screening with the Rapid Visco Analyser. In: Walker C E, Hazelton J L, eds. Applications of the Rapid Visco Analyser. Newport Scientific, Sydney, 1996. pp 19–24
- [5] Tan Y F, Li J X, Yu S B, Xing Y Z, Xu C G, Zhang Q F. The three important traits for cooking and eating quality of rice grains are controlled by a single locus in an elite rice hybrid, Shanyou 63. *Theor Appl Genet*, 1999, 99: 642–648
- [6] Bao J S, Zheng X W, Xia Y W, He P, Shu Q Y, Lu X, Chen Y, Zhu L H. QTL mapping for the paste viscosity characteristics in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 280–284
- [7] Wang L Q, Liu W J, Xu Y, He Y Q, Luo L J, Xing Y Z, Xu C G, Zhang Q F. Genetic basis of 17 traits and viscosity parameters characterizing the eating and cooking quality of rice grain. *Theor Appl Genet*, 2007, 115: 463–476
- [8] Wan X Y, Wan J M, Su C C, Wang C M, Shen W B, Li J M, Wang H L, Jiang L, Liu S J, Cheng L M, Yasui H, Yoshimura A. QTL detection for eating quality of cooked rice in a population of chromosome segment substitution lines. *Theor Appl Genet*, 2004, 110: 71–79
- [9] Fan C C, Yu X Q, Xing Y Z, Xu C G, Luo L J, Zhang Q F. The main effects, epistatic effects and environmental interactions of QTLs on the cooking and eating quality of rice in a doubled-haploid line population. *Theor Appl Genet*, 2005, 110: 1445–1452
- [10] He Y, Han Y P, Jiang L, Xu C W, Lu J F, Xu M L. Functional analysis of starch-synthesis genes in determining rice eating and cooking qualities. *Mol Breed*, 2006, 18: 277–290
- [11] Gao Z Y, Zeng D L, Cui X, Zhou Y H, Yan M, Huang D, Li J Y, Qian Q. Map-based cloning of the *ALK* gene, which controls the GT of rice. *Sci China (Ser C)*, 2003, 46: 661–668
- [12] Umemoto T, Aoki N. Single-nucleotide polymorphisms in rice starch synthase IIa that alter starch gelatinization and starch association of the enzyme. *Funct Plant Biol*, 2005, 32: 763–768
- [13] Umemoto T, Yano M, Satoh H, Shomura A, Nakamura Y. Mapping of a gene responsible for the difference in amylopectin structure between *japonica*-type and *indica*-type rice varieties. *Theor Appl Genet*, 2002, 104: 1–8
- [14] Bao J S, Corke H, Sun M. Nucleotide diversity in *starch synthase IIa* and validation of single nucleotide polymorphisms in relation to starch gelatinization temperature and other physicochemical properties in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 2006, 113: 1171–1183
- [15] Nakamura Y, Francisco Jr P B, Hosaka Y, Sato A, Sawada T, Kubo A, Fujita N. Essential amino acids of starch synthase IIa differentiate amylopectin structure and starch quality between *japonica* and *indica* rice varieties. *Plant Mol Biol*, 2005, 58: 213–227
- [16] Nakamura Y. Towards a better understanding of the metabolic system for amylopectin biosynthesis in plants: rice endosperm as a model tissue. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43: 718–725
- [17] 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. *Theor Appl Genet*, 2008, 116: 979–989
- [18] James M G, Robertson D S, Myers A M. Characterization of the maize gene *sugary1*, a determinant of starch composition in kernels. *Plant Cell*, 1995, 7: 417–429
- [19] Kubo A, Fujita N, Harada K, Matsuda T, Satoh H, Nakamura Y. The starch debranching enzymes isoamylase and pullulanase are both involved in amylopectin biosynthesis in rice endosperm. *Plant Physiol*, 1999, 121: 399–409
- [20] Fujita N, Toyosawa Y, Utsumi Y, Higuchi T, Hanashiro I, Ikegami A, Akuzawa S, Yoshida M, Mori A, Inomata K, Itoh R, Miyao A, Hirochika H, Satoh H, Nakamura Y. Characterization

- of pullulanase (PUL)-deficient mutants of rice (*Oryza sativa* L.) and the function of PUL on starch biosynthesis in the developing rice endosperm. *J Expl Bot*, 2009, 60: 1009–1023
- [21] Tian Z X, Qian Q, Liu Q Q, Yan M X, Liu X F, Yan C J, Liu G F, Gao Z Y, Tang S Z, Zeng D L, Wang Y H, Yu J M, Gu M H, Li J Y. Allelic diversities in rice starch biosynthesis lead to a diverse array of rice eating and cooking qualities. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 21760–21765
- [22] Yan C J, Tian S, Zhang Z Q, Han Y P, Chen F, Li X, Gu M H. The source of genes related to rice grain starch synthesis among cultivated varieties and its contribution to quality. *Agric Sci China*, 2007, 6(2): 129–136
- [23] American Association of Cereal Chemists. Approved Methods for the AACC, 10th edn. Method 61-01 (amylograph method for milled rice) and Method 61-02 (determination of the pasting properties of rice with rapid visco analyzer). The Association, St. Paul, 2000
- [24] Wu H-K(吴洪恺), Liang G-H(梁国华), Gu Y-J(顾燕娟), Shan L-L(单丽丽), Wang F(王芳), Han Y-P(韩月澎), Gu M-H(顾铭洪). The effect of the starch-synthesizing genes on RVA profile characteristics in rice (*O. sativa*). *Acta Agron Sin* (作物学报), 2006, 11(32): 1597–1603 (in Chinese with English abstract)
- [25] Li Q F, Zhang G Y, Dong Z W, Yu H X, Gu M H, Sun S S M, Liu Q Q. Characterization of expression of the *OsPUL* gene encoding a pullulanase-type debranching enzyme during seed development and germination in rice. *Plant Physiol Biochem*, 2009, 47: 351–358
- [26] Dinges J R, Colleoni C, James M G, Myers A M. Mutation analysis of the pullulanase-type debranching enzyme of maize indicates multiple functions in starch metabolism. *Plant Cell*, 2003, 15: 666–680
- [27] Bao J S, Wu Y R, Hu B, Wu P, Cui H R, Shu Q Y. QTL for rice grain quality based on a DH population derived from parents with similar apparent amylose content. *Euphytica*, 2002, 128: 317–324
- [28] Fujita N, Yoshida M, Asakura N, Ohdan T, Miyao A, Hirochika H, Nakamura Y. Function and characterization of starch synthase I using mutants in rice. *Plant Physiol*, 2006, 140: 1070–1084
- [29] Yan C-J(严长杰), Gu M-H(顾铭洪). Advanced backcross QTL analysis and its potential in rice high yield breeding. *Hereditas* (遗传), 2000, 22(6): 419–422 (in Chinese with English abstract)