

籼稻背景下抑制不同 *ALK* 等位基因表达对稻米品质的影响

陈专专^{1,2,#} 李先锋^{1,#} 仲敏¹ 葛家奇¹ 范晓磊^{1,2} 张昌泉^{1,2} 刘巧泉^{1,2,*}

(¹ 扬州大学 农学院 植物功能基因组学教育部重点实验室/江苏省作物基因组学和分子育种重点实验室, 江苏 扬州 225009; ² 扬州大学 江苏省粮食作物现代产业技术协同创新中心, 江苏 扬州 225009; [#]共同第一作者; ^{*}通讯联系人, E-mail: qqliu@yzu.edu.cn)

Grain Quality as Affected by Down-regulation of Expression of Different *ALK* Alleles in *indica* Rice (*Oryza sativa* L.)

CHEN Zhuanzhuan^{1,2,#}, LI Xianfeng^{1,#}, ZHONG Min¹, GE Jiaqi¹, FAN Xiaolei^{1,2}, ZHANG Changquan^{1,2}, LIU Qiaoquan^{1,2,*}

(¹ Key Laboratory of Plant Functional Genomics of Ministry of Education /Jiangsu Key Laboratory of Crop Genomics and Molecular Breeding, College of Agriculture, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; ² Jiangsu Collaborative Innovation Center for Modern Industrial Technology of Grain Crops, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; [#] These authors contributed equally to this work; ^{*} Corresponding author, E-mail: qqliu@yzu.edu.cn)

Abstract: 【Objective】 Gelatinization temperature (GT) is one of the key physicochemical properties in rice quality, which is mainly regulated by *ALK* (*SSII-3*) gene. In general, there are two *ALK* alleles among *indica* cultivars. To detect their functional differentiation in *indica* rice, **【Method】** Zhenshan 97B (a high GT variety carrying *ALK^c* allele) and Longtefu B (a low GT variety carrying *ALK^b* allele), were used as receptors for the generation of transgenic rice with down-regulation of *ALK* expression by RNA interference (RNAi). **【Result】** Down-regulation of *ALK* gene significantly decreased the GT of the transgenic lines. Due to the difference of original GT between the two receptors, the GT of transgenic rice lines derived from Zhenshan 97B (a high GT variety) decreased significantly, but it is slightly decreased in transgenic plants derived from Longtefu B (a low GT variety). The differential scanning calorimetry (DSC) results showed that the initial temperature of RNAi transgenic rice was significantly lower than the corresponding control and the transgenic lines were gelatinized in advance. The peak value of GT (T_p) in RNAi rice grains was significantly lower than that of the control under Zhenshan 97B background. However, T_p of RNAi rice grains under Longtefu B background was significantly lower than the control to a lesser extent. Also, down-regulation of *ALK* expression had a significant effect on rice physical-chemical characteristics. An increase of apparent amylose content in RNAi transgenic plants was detected due to the decreased expression of *ALK* gene. Besides, the pasting properties showed that down-regulation of *ALK* gene had obvious effects on peak viscosity and breakdown value, improving the taste of the transgenic rice. The gel consistency was significantly different among Zhenshan 97B RNAi lines and their parents, but no difference was found in Longtefu-derived transgenic lines. **【Conclusion】** RNA interference to *ALK* allele expression had a significant effect on rice quality, especially the gelatinization characters. Down-regulated expression level of *ALK^c* allele would cause larger variation of physical-chemical characteristics between transgenic rice and their parent than that of *ALK^b* allele.

Key words: rice; *ALK* allele; RNA interference; gelatinization temperature; rice grain quality

摘 要: 【目的】 稻米糊化温度是影响稻米品质的重要指标, 该性状受主效基因 *ALK/SSII-3* 调控, *ALK* 基因具有多个复等位基因, 本研究旨在通过 RNAi 技术明确籼稻亚种中两个不同 *ALK* 等位基因的效应。 **【方法】** 以分别含有 *ALK^c* 和 *ALK^b* 等位基因的高糊化温度品种珍汕 97B 和低糊化温度品种龙特甫 B 为试验材料, 使用 RNAi 技术构建 *ALK* 表达下调的转基因株系, 通过对其稻米理化品质的测定来明确不同等位基因表达下调对稻米品质的影响。 **【结果】** 对不同转基因水稻目的基因的表达分析显示本研究中转基因株系的 *ALK* 基因受到了不同程度的干扰。重点分析了不同 RNAi 株系稻米的糊化温度, 结果表明珍汕 97B 的 RNAi 转基因稻米的糊化温度极显著降低, 而在低糊化温度品种龙特甫 B 背景下下调表达 *ALK* 基因后对糊化温度的影响较小; 转基因株系与未转化亲本相比,

收稿日期: 2019-08-07; 修改稿收到日期: 2019-09-13。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31825019); 国家转基因重大专项(2016ZX08001006-005); 江苏省科技计划资助项目(BE2018357)。

米粉的起始糊化温度都显著降低,表现为提前糊化;在珍汕 97B 背景下干扰系的峰值温度与未转化亲本相比极显著降低,而在龙特甫背景下米粉的峰值温度与未转化对照相比显著降低。对不同转基因系的理化品质分析表明,*ALK* 下调表达植株稻米的表现直链淀粉含量显著增加,下调表达 *ALK* 后会引起米粉峰值黏度和崩解值的改变。高糊化温度品种珍汕 97B 干扰系与未转化对照相比胶稠度呈现极显著性差异,而低糊化温度品种龙特甫干扰系的胶稠度与未转化对照相比没有差异。【结论】下调表达 *ALK* 等位基因对稻米理化品质产生显著影响,并且干扰不同等位基因的效应存在明显差异,即籼稻中的两个 *ALK* 等位基因的效应存在显著差异。

关键词: 水稻; *ALK* 等位基因; RNA 干扰; 糊化温度; 稻米品质

中图分类号: Q755; S511.01

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2019)06-0513-10

水稻是世界上近一半人口的主食。随着人们生活水平的不断提高和水稻单产的不断增长,优质稻米已经成为引导消费和品种改良的首要目标^[1-4],其中稻米的蒸煮食味品质是当前品质改良育种的关键,一般通过稻米的理化特性包括直链淀粉含量、糊化温度、胶稠度以及淀粉黏滞性等指标对蒸煮食味品质进行综合评价。

糊化温度作为评价稻米蒸煮食味品质的主要指标,是指大约 90%淀粉颗粒吸热膨胀,自然的晶体结构被破坏和双折射性丧失,发生非均质改变的不可逆过程时所需要的临界温度^[4]。根据糊化温度的不同,可将稻米分为高、中、低糊化类型。其中,中等以及较低糊化温度的稻米蒸煮后米饭质地较软且食味特性较好,在市场上广受消费者欢迎。迄今为止,稻米糊化温度的形成在遗传和受环境影响方面已有广泛研究^[3,5,6]。尽管稻米糊化温度是一个在较大范围内表现出持续变化的数量性状,但其主要由 *ALK* 基因编码的可溶性淀粉合成酶 SS II-3 控制^[7-11]。*ALK* 基因在栽培稻中存在多种等位变异类型,是导致不同水稻品种之间糊化温度差异,进而影响稻米蒸煮食味品质的主要原因^[12]。*ALK* 基因的定位和克隆最早由高振宇等^[8]完成,前人通过分析不同水稻品种间 *ALK* 基因的序列差异,证明了 *ALK* 基因序列差异引起的氨基酸改变会引起 SS II-3 酶活性改变,从而影响支链淀粉的中等长度分支链的合成,使晶体层结构改变,最终表现为糊化温度的差异^[8,13-14]。

多个研究显示,位于 *ALK* 基因第 8 外显子的 3 个单核苷酸差异(SNP)对 SS II-3 功能和淀粉的糊化特性至关重要^[15-18]。根据这 3 个 SNP,可将栽培品种中的 *ALK* 基因分为 A-GC, G-TT 和 G-GC 三种单倍型。其中的 G-GC 型 *ALK* 等位基因(简称为 *ALK^c*)控制稻米的高糊化温度, A-GC(简称为 *ALK^a*)和 G-TT(简称为 *ALK^b*)控制低糊化温度。由于 *ALK^a*(A-GC)主要存在于粳稻中^[18-21],而 *ALK^b*(G-TT)和 *ALK^c*(G-GC)主要存在于籼稻中。因此,本研究选取了籼稻背景下低糊化温度的龙特甫 B(携 *ALK^b*

基因)和高糊化温度的品种珍汕 97B(携 *ALK^c* 基因)为受体品种,利用 RNAi 技术下调表达 *ALK* 等位基因,以明确下调表达籼稻中两个 *ALK* 等位基因对稻米品质的影响。

1 材料与方法

1.1 水稻材料和种植方法

用于本研究的两个籼稻品种(*Oryza sativa* L. subsp. *indica*)为龙特甫 B 和珍汕 97B。两个籼稻品种分别含有不同的 *ALK* 等位基因,稻米的糊化特性差异较大,含有 *ALK^b*(G-TT)的龙特甫 B 对应低糊化温度,含有 *ALK^c*(G-GC)的珍汕 97B 对应高糊化温度。两个受体品种龙特甫 B 和珍汕 97B 稻米分别为低糊化温度和高糊化温度品种,两者的 *ALK* 等位基因类型可通过引物 4342(GC/TT)区分。如图 1A,两个品种中的 *ALK* 基因型不同,龙特甫 B 中表现为 G-TT 的 *ALK^b* 型,而珍汕 97B 中表现为 G-GC 的 *ALK^c* 型。所用水稻材料在扬州大学农学院作物遗传育种实验田或海南三亚育种基地种植(加代),按常规方法进行栽培管理。用于品质测定的材料均种植于江苏省扬州大学农学院作物遗传育种实验田。

1.2 载体构建与水稻转化

以来自日本晴 RNA 所合成的第一链 cDNA 为模板,以 *ALK-5* 和 *ALK-3* 为引物(表 1)扩增 *ALK* 基因编码区片段;将 PCR 扩增片段连入含有 *Bam*H I /*Spe* I 和 *Bam*H I /*Sac* I 双酶切位点的 p1022 载体中,形成同时含有正向和反向 SS II-3 基因片段的结构。将整个含有正反向重复的片段连入含有水稻谷蛋白基因 *Gt1* 启动子(胚乳特异性表达)的 p3002 载体中,构建 *ALK*-RNAi 载体(图 1-B)。

利用农杆菌介导的遗传转化方式^[22]将以上载体导入籼稻品种龙特甫 B 中,获得 L-*ALK^b*-RNAi 转基因材料,选取 3 个转基因纯合系 L-*ALK^b*-RNAi-1、-2 和 -3 用于后续品质分析。以 L-*ALK^b*-RNAi-2 转基因材料为供体,与珍汕 97B 杂交,后自交。通过分子标记辅助选择筛选杂交后代,

表 1 本研究所用的 PCR 引物

Table 1. Primers used in this study.

正向引物 Forward primer	引物序列 Primer sequence(5'-3')	反向引物 Reverse primer	引物序列 Primer sequence(5'-3')
ALK-5	GTCCATGGTCGACCTCAAGTAAGAACGGAG	ALK-3	GTACTAGTCGCCTTTGGCTTC
4342(GC/TT)-F1	CAAGGAGAGCTGGAGGGGGC	4342(GC/TT)-R1	CATGCCGCGCACCTGGAAA
4342(GC/TT)-F	TCGGCGGGCTGAGGGACAC	4342(GC/TT)-R	TCGCATCAATGGACATAACAAACAC
INT-F	CCTCGTAATCAATTTTAGAT	NOS-R	GACCGCACAGGATTCAAT
ALK-RT-F	TGATCTGAACGAACCGGACG	ALK-RT-R	TGGGTAAAGCACCTGCAACA

在 F₃ 代获得同时携带有 *ALK^c* 等位基因和 *ALK^b*-RNAi 干扰结构的转基因材料, 选取 3 个纯合转基因系 Z-*ALK^c*-RNAi-2-1、Z-*ALK^c*-RNAi-2-2 和 Z-*ALK^c*-RNAi-2-3 用于后续的品质分析。

1.3 基因型鉴定

水稻基因组 DNA 抽提按 Murray 等^[23]的方法进行。*ALK* 等位变异位点用四引物 4342 进行基因型鉴定, RNAi 株系的基因型用引物 INT-F 和 NOS-R 进行 PCR 验证, 所有引物序列列于表 1。

1.4 *ALK* 基因的表达量分析

利用总 RNA 提取试剂盒(TIANGEN)提取水稻花后 15 d 种子胚乳中的总 RNA 并纯化定量, 每个样品取 3 μg 预处理后的 RNA, 用含有去除基因组 DNA 进行实时荧光定量 PCR 的专用反转录试剂盒(Prime script RT reagent kit with gDNA Eraser, TaKaRa)除去 RNA 样品中的基因组 DNA 后对 RNA 样品进行反转录, 获得第一链 cDNA。随后用实时荧光定量 PCR 的专用试剂盒(TaKaRa)和实时荧光定量 PCR 仪(CFX96 Touch Real-time PCR detection system, Bio-Rad)进行实时定量 PCR 分析。*ALK* 基因的表达量分析所用引物为 ALK-RT-F 和 ALK-RT-R(表 1)。

1.5 稻米理化品质测定

米粉的制备以及直链淀粉含量、胶稠度、碱消值等指标的测定采用农业部颁布的标准《米质测定方法》(NY147-1988)。米粉热力学特性参照 Zhang 等^[24]的方法测定, 用带有配套分析软件的差示扫描量热仪 DSC 200 F3(德国耐驰公司)进行作图分析。淀粉的黏滞性采用 3-D 型淀粉黏滞性快速测定仪(Newport Scientific, 澳大利亚)进行测定, 配套分析软件为 TCW(Thermal Cycle for Windows)。粗蛋白含量利用凯氏定氮法测定。

1.6 精米食味值的测定

采用 RCTA-11A 米饭食味计(日本佐竹)测定食味值, 称取整精米 20.0 g, 使用配套的淘米用具在

清水下清洗, 清洗完毕转移至含有 40 mL 蒸馏水的铝制容器中, 用电饭锅蒸煮 30 min 后室温冷却平衡 20 min, 称取 8.0 g 冷却好的米饭, 装入金属环内, 正反方向各压 10 s, 置于食味仪上测得食味值。

1.7 淀粉链长分布的测定

采用高效阴离子交换色谱法测定支链淀粉的链长分布, 样品制备参考 Zhu 等^[25]的方法。

1.8 数据分析

数据采用 Microsoft Excel 2016 以及 SPSS 19.0 软件进行方差分析; 采用 Adobe Illustrator 制图; 新复极差法进行多重比较检验差异显著性。

2 结果与分析

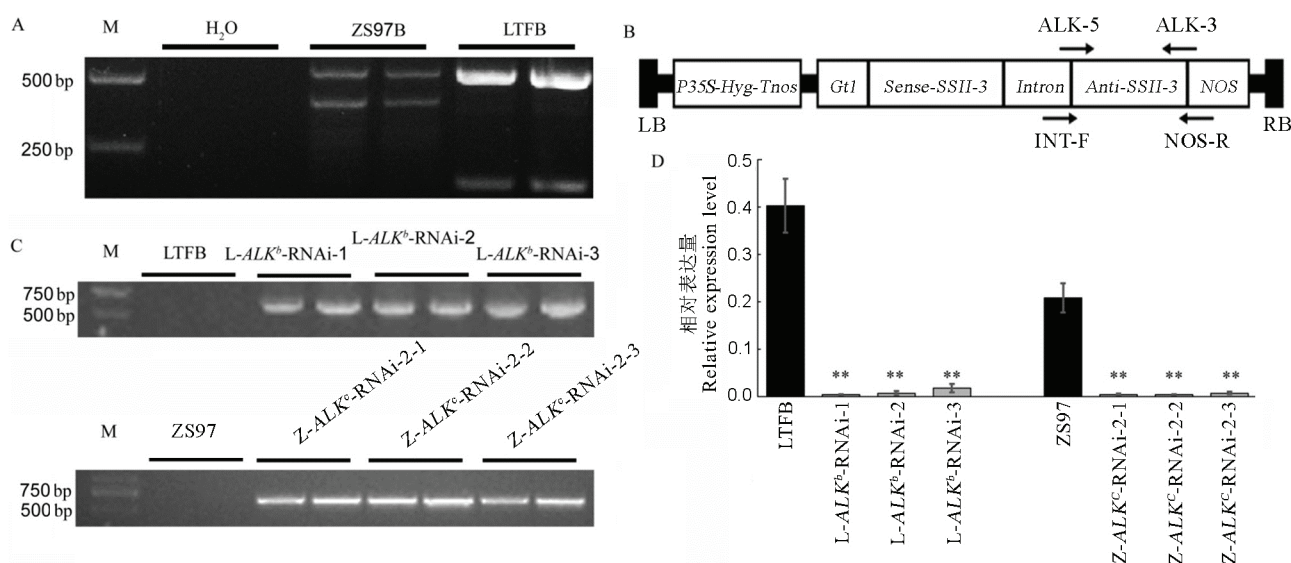
2.1 转基因水稻植株的获得及其表达分析

通过分子标记辅助选择筛选杂交后代, 在 F₃ 代获得同时携带有 *ALK^c* 等位基因和 RNAi 干扰结构的三份转基因株系 Z-*ALK^c*-RNAi-2-1、Z-*ALK^c*-RNAi-2-2 和 Z-*ALK^c*-RNAi-2-3, 其生育期与珍汕 97B 基本一致。以 RNAi 载体中的引物 INT-F 和 NOS-R(引物位置如图 1-B)对 RNAi 干扰株系进行 PCR 扩增, 所有转基因水稻植株中都能扩增出大小为 534 bp 的目的片段(图 1-C)。

由于 *ALK* 基因主要在水稻胚乳中表达, 为验证 RNAi 株系中对 *ALK* 表达的干扰效果, 我们利用荧光实时 RT-PCR 技术对花后 15 d 胚乳中 *ALK* 基因的表达量进行分析(图 1-D)。不论是高糊化温度品种珍汕 97B 背景还是低糊化温度品种龙特甫背景, *ALK*-RNAi 转基因材料的表达量都大幅度下降, 表明 RNA 干扰结构确实导入水稻体内并发挥了作用。

2.2 *ALK*-RNAi 转基因稻米的热力学特性

干扰 *ALK* 基因表达后, 与各自未转化亲本相比, 碱消值显著上升, 糊化温度明显下降(图 2)。结合表 2 来看, 在含有 *ALK^b* 等位基因的龙特甫 B 背景下, 干扰株系稻米糊化温度 *T_p* 变化较小, 仅下降了



A—用引物 4342(GC/TT)鉴定亲本对照龙特甫 B(LTFB)和珍汕 97B(ZS97B)的 *ALK* 基因型。B—含 *ALK*-RNAi 结构双元载体的 T-DNA 区结构。*P35S* 和 *Tnos*, 分别表示 *CaMV35S* 基因的启动子和终止子区; *NOS*-农杆菌胭脂碱合成酶基因终止子; *Hyg*-潮霉素抗性基因; LB 和 RB 分别表示 T-DNA 区的左右边界序列; Anti 和 Sense 分别表示目的基因片段的反向和正向结构;图中箭头表示设计引物方向。C—*ALK*-RNAi 转基因水稻植株的 PCR 鉴定。D—*ALK*-RNAi 转基因水稻植株胚乳中 *ALK* 基因表达量分析。L-*ALK*^b-RNAi-1、L-*ALK*^b-RNAi-2 和 L-*ALK*^b-RNAi-3 为龙特甫背景下的 *ALK*^b-RNAi 转基因纯合系; Z-*ALK*^c-RNAi-2-1、Z-*ALK*^c-RNAi-2-2 和 Z-*ALK*^c-RNAi-2-3 为同时携带有 *ALK*^c 等位基因和 *ALK*^b-RNAi 干扰结构的转基因材料纯合系。对不同背景下的转基因系和未转化对照的表达量进行方差分析,并用新复极差法进行多重比较。**表示转基因系与未转化对照之间的差异达 0.01 显著水平,*表示转基因系与未转化对照之间的差异达 0.05 显著水平($n=3$)。

A, *ALK* genotype in Longtefu B(LTFB) and Zhenshan 97B(ZS97B) on sites 4342 and 4343 based on primer 4342(GC/TT). B, The T-DNA structure of *ALK*-RNAi construct. *P35S* and *Tnos* represent the promoter and terminator region of the *CaMV 35S* gene respectively; *NOS* represents agrobacterium nopaline synthetase gene terminator; *Hyg* represents hygromycin resistance gene; LB and RB represent the left and right boundary sequences of the T-DNA region respectively; the anti-sense and the sense represent the reverse and forward structure of the target gene segment respectively; and the arrow in the figure indicates the direction of the designed primer. C, PCR analysis of *ALK*-RNAi transgenic rice plants. D, Transcription level expression of *ALK* Gene in RNAi Line. L-*ALK*^b-RNAi-1, L-*ALK*^b-RNAi-2 and L-*ALK*^b-RNAi-3 are *ALK*^b-RNAi transgenic homozygous lines under the background of Longtefu and Z-*ALK*^c-RNAi-2-1, Z-*ALK*^c-RNAi-2-2 and Z-*ALK*^c-RNAi-2-3 are homozygous transgenic lines carrying both *ALK*^b-RNAi interference structure and *ALK*^c allele. Data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) depending on the experiment, followed by a comparison of the means according to a Duncan's multiple range test at $P < 0.05$ or $P < 0.01$. Double asterisks denote a highly significant difference between transgenic line and its wild type ($P < 0.01$), single asterisk denotes a significant difference between transgenic line and its wild type ($0.01 \leq P < 0.05$). ($n=3$).

图 1 *ALK*-RNAi 载体结构及转基因水稻的鉴定

Fig. 1. *ALK*-RNAi construction and identification of transgenic rice.

0.7℃~1.1℃;在含有 *ALK*^c 等位基因的珍汕 97B 背景下,干扰株系稻米糊化温度变化较大,相比亲本极显著下降了 5.8℃~6.8℃。各干扰材料的起始糊化温度和终止糊化温度也呈现出相同的规律,表现为高糊化温度品种珍汕 97B 中干扰 *ALK* 等位基因对糊化温度的效应较强,而低糊化温度品种龙特甫中干扰 *ALK* 等位基因对糊化温度的效应较弱。

2.3 RNAi 转基因系稻米的表观直链淀粉含量和胶稠度

下调表达 *ALK* 基因后,转基因株系米粉的表观直链淀粉含量都有所上升,其中高糊化温度品种珍汕 97B 干扰系的表观直链淀粉含量与未转化对照相比上升了 1.5~2.7 个百分点(表 2),呈现极显著差异,而低糊化温度品种龙特甫干扰系的表观直链淀粉含量与未转化对照相比没有显著差异。在两个不同糊化温度品种中下调表达 *ALK* 后,胶稠度数值都有

所下降,米胶变硬。低糊化温度的龙特甫背景下干扰系的胶稠度与未转化对照无显著差异;相反,高糊化温度的珍汕 97B 品种干扰系的胶稠度与未转化对照相比存在极显著差异,相较于未转化对照下降幅度为 13~33 mm。可以看出,通过 RNAi 下调表达 *ALK* 基因对高糊化温度品种珍汕 97B 米粉的理化性质影响较大,导致相应的转基因株系胶稠度数值极显著下降。

2.4 *ALK*-RNAi 转基因系稻米的 RVA 谱分析

本研究用黏度速测仪测定了龙特甫 B 和珍汕 97B 及其 RNA 干扰系米粉的黏滞性(图 3-A)。结合表 3 可以看出,从峰值黏度、热浆黏度和崩解值来看,龙特甫 B 和珍汕 97B 的干扰系与各自亲本相比都明显升高,高糊化温度品种珍汕 97B 干扰 *ALK* 后表现出更高的峰值黏度、热浆黏度和崩解值;就消减值而言,龙特甫 B 背景仅仅下降了 184~441 cP,

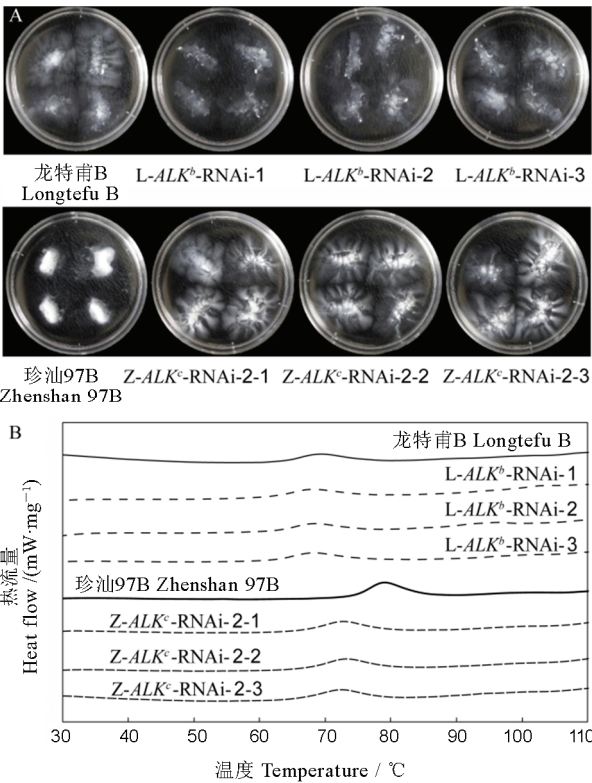
表 2 *ALK*-RNAi 转基因水稻株系米粉的热力学特性和理化特性

Table 2. Gelatinization properties and physical-chemical qualities of *ALK*-RNAi transgenic rice.

转基因系	起始温度	峰值温度	终止温度	热焓值	直链淀粉含量	胶稠度	粗蛋白含量
Transgenic line	$T_o/^{\circ}\text{C}$	$T_p/^{\circ}\text{C}$	$T_c/^{\circ}\text{C}$	$\Delta H/(\text{J}\cdot\text{g}^{-1})$	AAC/%	GC/mm	Protein content/%
龙特甫 B LTFB	63.6±0.1	69.5±0.1	77.2±0.3	6.30±0.41	23.16±1.55	19.0±0.0	10.47±0.12
L- <i>ALK</i> ^b -RNAi-1	61.8±0.4*	68.2±0.0**	76.2±0.5*	6.40±0.49	24.42±0.13	18.0±0.0	9.80±0.17
L- <i>ALK</i> ^b -RNAi-2	62.2±0.3*	68.3±0.1**	76.0±0.5*	6.30±0.82	24.01±0.15	18.0±0.1	9.73±0.19
L- <i>ALK</i> ^b -RNAi-3	62.2±0.5*	68.6±0.1**	76.0±0.0*	6.00±0.31	23.66±0.26	17.7±0.1	10.11±0.49
珍汕 97B ZS97B	74.6±0.2	79.2±0.2	85.2±0.1	9.43±0.16	25.11±0.04	58.5±0.4	10.61±0.04
Z- <i>ALK</i> ^c -RNAi-2-1	67.1±0.3**	73.4±0.1**	80.2±0.1**	8.20±0.08**	27.73±0.24**	25.5±0.1**	9.21±0.05*
Z- <i>ALK</i> ^c -RNAi-2-2	66.3±0.0**	72.9±0.1**	79.4±0.2**	7.99±0.12**	27.85±0.13**	28.0±0.3**	9.65±0.42*
Z- <i>ALK</i> ^c -RNAi-2-3	65.6±0.1**	72.4±0.1**	79.0±0.0**	7.29±0.07**	26.69±0.01**	45.0±0.0**	9.03±0.46*

平均值±标准差($n=2$)。**表示转基因系与未转化对照差异极显著($P<0.01$)，*表示转基因系与未转化对照差异显著($0.01\leq P<0.05$)。下表同。

Data are shown as mean±SD($n=2$). Double asterisks denote a highly significant difference between transgenic line and its wild type at $P<0.01$, single asterisk denotes a significant difference between transgenic line and its wild type at $0.01\leq P<0.05$. The same as below.



A-*ALK*-RNAi 水稻株系精米在 1.7% KOH 中的碱消值; B-*ALK*-RNAi 水稻株系米粉的 DSC 曲线。

A, Alkali spreading value of milled rice in 1.7% KOH; B, DSC curve of rice flours of *ALK*-RNAi transgenic rice.

图 2 *ALK*-RNAi 转基因水稻的糊化温度

Fig 2. Gelatinization properties of *ALK*-RNAi transgenic rice.

而在珍汕 97B 背景下, 相较于未转化对照下降了 948~1429 cP。起浆温度也呈现出同样的规律, 低糊化温度品种龙特甫的干扰系相较于未转化对照只下降了 0.1℃~1.0℃, 而高糊化温度品种珍汕 97B 的干扰系则下降了 11.2℃~12.1℃, 这与糊化温度的数据规律相一致。

2.5 RNAi 转基因稻米的食味值

为进一步确认 *ALK*-RNAi 对稻米食味品质的影响, 我们测定了转基因株系稻米的食味值, 结果如表 4 所示。在水稻中干扰 *ALK* 基因后, 稻米的食味值会出现显著甚至极显著下降。在龙特甫背景下 *ALK*^b 干扰株系热米饭的食味值降幅较小, 为 2.2~5.0, 珍汕 97B 背景下 *ALK*^c 干扰株系热米饭的食味值降幅较大, 为 9.5~13.0。食味值的变化与糊化温度的变化规律一致, 食味值的下降主要由于下调表达 *ALK* 后引起了直链淀粉含量的增加和胶稠度的下降而使得稻米的外观和口感变差, 最终导致食味值的综合评分降低。

2.6 RNAi 转基因稻米的淀粉精细结构

前人研究表明, *ALK* 等位变异会引起支链淀粉结构短链(DP<11)的增加以及中短链(DP 12~24)含量的减少, 进而导致稻米糊化温度降低^[7, 26, 27]。因此, 我们利用 HPAEC 技术分析了水稻 *ALK* 干扰株系中支链淀粉的链长分布情况。如图 3-B 所示, 干扰 *ALK* 等位基因会改变支链淀粉结构, 淀粉中的短

表3 *ALK*-RNAi 转基因水稻株系米粉的 RVA 谱特征值
Table 3. RVA parameters of mature rice flour in *ALK*-RNAi transgenic rice lines.

转基因系 Transgenic line	峰值黏度 Peak viscosity /cP	热浆黏度 Hot paste viscosity/cP	崩解值 Breakdown /cP	冷胶黏度 Cool paste viscosity /cP	消减值 Setback /cP	峰值时间 Peak time /min	起浆温度 Pasting temperature /℃
龙特甫 B LTFB	3699±11	3217±18	482±7	6385±18	2686±5	6.5	87.9
L- <i>ALK</i> ^b -RNAi-1	3923±7**	3390±10**	533±13**	6390±11	2467±8**	6.5	87.0*
L- <i>ALK</i> ^b -RNAi-2	3810±13**	3312±25**	498±8*	6055±7**	2245±6**	6.5	86.9*
L- <i>ALK</i> ^b -RNAi-3	3843±8**	3137±17*	706±10**	6345±14*	2502±7**	6.5	87.8*
珍汕 97B ZS97B	2885±12	2510±16	375±9	4974±15	2089±9	6.5	88.6
Z- <i>ALK</i> ^c -RNAi-2-1	3608±9**	2945±17**	663±12**	4749±17**	1141±11**	6.5	76.5**
Z- <i>ALK</i> ^c -RNAi-2-2	3930±11**	3249±13**	681±11**	4590±16**	660±12**	6.6	77.4**
Z- <i>ALK</i> ^c -RNAi-2-3	3976±6**	3337±14**	639±8**	4956±19	980±14**	6.5	76.5**

表4 *ALK*-RNAi 转基因水稻株系稻米食味值
Table 4. Sensory evaluation of milled rice in *ALK*-RNAi transgenic rice lines.

样品 Sample	转基因系 Transgenic line	综合 Integrated score	外观 Appearance	口感 Taste
热饭 Cooked rice	龙特甫 B LTFB	53.3±1.3	5.0±0.1	4.5±0.2
	L- <i>ALK</i> ^b -RNAi-1	48.3±1.3**	4.3±0.1**	3.9±0.2*
	L- <i>ALK</i> ^b -RNAi-2	51.0±0.8*	4.7±0.1*	4.2±0.1*
	L- <i>ALK</i> ^b -RNAi-3	50.5±1.7**	4.6±0.2*	4.1±0.2*
	珍汕 97B ZS97B	55.0±2.6	5.1±0.3	4.8±0.3
	Z- <i>ALK</i> ^c -RNAi-2-1	43.8±1.9**	3.6±0.3**	3.3±0.3**
	Z- <i>ALK</i> ^c -RNAi-2-2	42.0±0.8**	3.5±0.0**	3.1±0.1**
	Z- <i>ALK</i> ^c -RNAi-2-3	44.5±0.6**	3.8±0.0**	3.4±0.0**
冷饭 Cooled rice	龙特甫 B LTFB	49.8±0.5	4.6±0.0	3.9±0.1
	L- <i>ALK</i> ^b -RNAi-1	44.8±0.5**	4.1±0.1**	3.6±0.1**
	L- <i>ALK</i> ^b -RNAi-2	48.5±1.0*	4.3±0.1*	3.7±0.1*
	L- <i>ALK</i> ^b -RNAi-3	46.5±0.6**	4.3±0.1*	3.7±0.1*
	珍汕 97B ZS97B	54.0±0.8	5.1±0.0	4.7±0.1
	Z- <i>ALK</i> ^c -RNAi-2-1	45.8±0.5**	3.0±1.4**	3.4±0.0**
	Z- <i>ALK</i> ^c -RNAi-2-2	44.8±1.7**	3.4±0.2*	3.1±0.4**
	Z- <i>ALK</i> ^c -RNAi-2-3	47.8±2.1**	4.0±0.2	3.6±0.3**

链含量受 *ALK* 基因干扰的影响较大。在两个不同糊化温度品种中干扰 *ALK* 等位基因后, 淀粉链长分布变化曲线差异较大。低糊化温度品种干扰株系的支链淀粉结构与未转化对照相比, DP 6–8 和 DP 13–30 的中长链淀粉含量增加, DP 9–12 含量减少; 高糊化温度品种干扰株系的支链淀粉结构与未转

化对照相比 DP 6–11 和 DP 25–36 的中长链淀粉含量增加, DP 12–24 含量减少(图 3-B)。这些结果可以很好地解释干扰 *ALK* 基因引起的糊化温度的变化, 因为 DP<10 支链淀粉的减少可以提高糊化温度^[26, 28]。同时也能从一定程度上解释不同 *ALK* 等位基因之间的差异, *ALK*^c-RNAi 株系的糊化温度的大

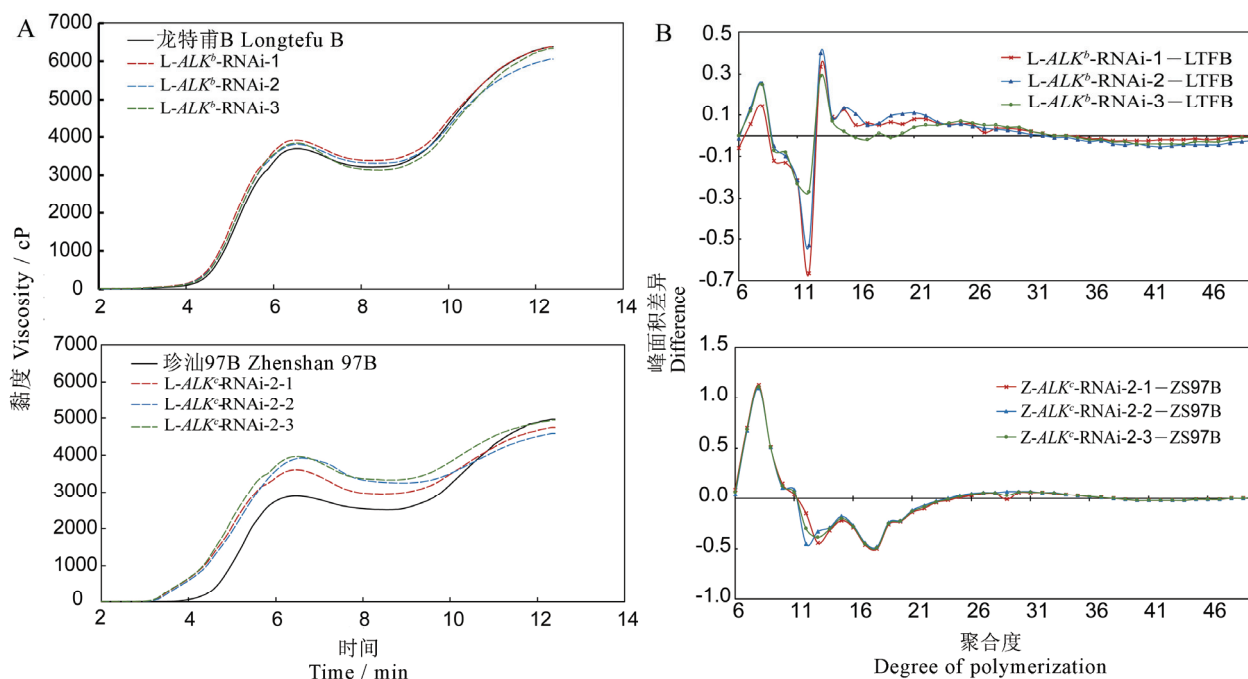


图3 *ALK*-RNAi 转基因稻米的 RVA 曲线(A)和淀粉聚合度分析(B)

Fig. 3. RVA curve (A) and the degree of polymerization (B) of rice flours from different *ALK*-RNAi lines.

幅降低是由于短链的 DP 6–11 显著增加以及 DP 25–36 的显著减少导致的。

3 讨论

本研究通过 RNAi 技术抑制不同 *ALK* 等位基因的表达,结果表明干扰 *ALK* 表达会对稻米的理化品质产生显著的影响,并且干扰不同 *ALK* 等位基因的效应存在明显的差异。前人研究表明,直链淀粉含量、糊化温度以及胶稠度都存在加性和非加性效应,并且稻米糊化温度与直链淀粉含量之间表现为显著正相关^[29],这是由于 ADP-葡萄糖是合成直链淀粉和支链淀粉的底物,在 ADP-葡萄糖的总量有限的前提下,直链淀粉和支链淀粉的合成对 ADP-葡萄糖具有竞争效应,下调表达 *ALK* 基因后,支链淀粉的合成受到影响,导致可用于合成直链淀粉的底物增加,最终导致直链淀粉含量增加。由于直链淀粉的含量增加会导致胶稠度下降^[30],因而 *ALK*-RNAi 转基因株系的胶稠度下降。

下调 *ALK* 等位基因的表达后,虽然高糊化温度品种 RNAi 转基因系稻米的糊化温度与未转化对照相比显著降低,而低糊化温度品种 RNA 干扰转基

因系稻米与亲本相比降幅较小。但两种遗传背景下 RNAi 转基因系的直链淀粉含量增加并且胶稠度降低,这两者的变化都导致转基因株系米饭质地变硬,可能会导致食味值下降;而前人研究表明,崩解值大的水稻品种米饭食味品质都较好^[15, 31],在 RNAi 转基因系稻米中的崩解值有所上升,可能会导致食味值的改善。由此,我们测定了食味值以明确下调 *ALK* 基因表达对稻米食味品质的影响。结合食味值数据来看, *ALK*-RNAi 转基因株系的食味值与对照相比均出现显著下降,主要是由于直链淀粉含量增加和胶稠度下降导致米饭变硬,煮熟的米饭不易黏结,质地松散导致外观和口感打分较低最终影响食味值。从稻米的 RVA 谱来看,下调表达 *ALK^c* 基因的效应更加明显。在高糊化温度品种珍汕 97B 中, *ALK^c-RNAi* 对米粉黏度的效应要明显高于低糊化温度品种龙特甫 B 中的 *ALK^b-RNAi* 的效应,相较于未转化对照表现出更高的峰值黏度,热浆黏度和崩解值以及更低的消减值和起浆温度。隋炯明等^[31]对 215 个水稻品系进行 RVA 谱的测定发现稻米的糊化温度与 RVA 特征值显著相关。由于稻米不同的理化品质之间是相互关联的,因此糊化温度的改变会引起其他品质性状的变化。因此,我们可以针

对目标品质性状进行育种改良, 获得理想品质的水稻品种。

此外, 有研究表明位于水稻 *ALK* 基因第 8 外显子的 SNP 差异对稻米糊化温度的变化至关重要^[17], Fjellstrom 等^[15-18]也曾报道 *ALK* 基因内的 2 个 SNP 造成的氨基酸改变会导致稻米糊化温度降低。结合本研究结果来看, 抑制 *ALK* 等位基因的表达后对稻米的理化品质会产生显著的影响, 并且不同的等位基因的干扰效应存在明显的差异, 这进一步证明了籼稻中这两个 *ALK* 等位变异位点的功能差异。糊化温度作为衡量稻米蒸煮食味品质的一项重要指标, 还受到很多因素的影响。曹清明等^[32, 33]发现外源添加物(蔗糖、食用明胶、氯化钠、氯化钙等)也可以改变水稻淀粉的糊化特性。刘鑫燕等^[34]认为糊化温度还受到加工过程中工艺的影响。水稻作为我国主要的粮食作物之一, 在高产多抗育种研究方面进展非常快, 而水稻优质育种的进度相对缓慢, 需要进一步对稻米品质形成的机制展开深入的研究^[34], 糊化温度作为影响稻米的蒸煮食味品质的关键因素是现阶段稻米品质改良的重要研究方向, 稻米糊化温度性状的改良同样会影响稻米市场表现^[15]。目前, 我国水稻改良工作已经将重心放在提高稻米的品质(重点是蒸煮食味品质)等领域, 本研究对籼稻背景下的两个稻米糊化温度关键基因 *ALK* 等位变异的相关研究, 解析了不同 *ALK* 等位基因的功能差异, 能够为后续的优质籼稻分子设计育种奠定坚实的理论基础。

参考文献:

- [1] 陈静. 江苏省水稻食味改良育种研究进展. *江苏农业科学*, 2015, 43(12): 77-80.
Chen J. A review of the research on the improvement of rice taste in Jiangsu Province. *Jiangsu Agric Sci*, 2015, 43(12): 77-80. (in Chinese)
- [2] 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 diverse array of rice eating and cooking qualities. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(51): 21 760-21 765.
- [3] Xu C W, Mo H D. Qualitative-quantitative analysis for inheritance of gelatinization temperature in *indica* rice (*O. sativa* subsp. *indica*). *Acta Agron Sin*, 1996, 22(4): 386-389.
- [4] Khush G S, Paule C M, De La Cruz, N M. Rice grain quality evaluation and improvement at IRRI//The Workshop on Chemical Aspects of Rice Grain Quality, 1978.
- [5] Chun A, Lee H J, Hamaker B R, Janaswamy S. Effects of ripening temperature on starch structure and gelatinization, pasting, and cooking properties in rice (*Oryza sativa*). *J Agric Food Chem*, 2015, 63(12): 3085-3093.
- [6] Nakamura Y, Francisco J P, 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(2): 213-227.
- [7] 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): 1-8.
- [8] Gao Z Y, Zeng D L, Cui X, Zhou Y H, Yan M X, Huang D N, Li J Y, Qian Q. Map-based cloning of the *ALK* gene, which controls the gelatinization temperature of rice. *Sci China C Life Sci*, 2003, 46(6): 661-668.
- [9] Bao J S, Sun M, Zhu L H, Corke H. Analysis of quantitative trait loci for some starch properties of rice (*Oryza sativa* L.): Thermal properties, gel texture and swelling volume. *J Cereal Sci*, 2004, 39(3): 379-385.
- [10] 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(8): 1445-1452.
- [11] Ebadi A A, Farshadfar E, Rabiei B. Mapping QTLs controlling cooking and eating quality indicators of Iranian rice using RILs across three years. *Aust J Crop Sci*, 2013, 7(10): 1494-1502.
- [12] Zhao W G, Chung J W, Kwon S W, Lee J H, Ma K H, Park Y J. Association analysis of physicochemical traits on eating quality in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*, 2013, 191(1): 9-21.
- [13] Gao Z Y, Zeng D L, Cheng F M, Tian Z X, Guo L B, Su Y, Yan M X, Jiang H, Dong G J, Huang Y C, Han B, Li J Y, Qian Q. *ALK*, the key gene for gelatinization temperature, is a modifier gene for gel consistency in rice. *J Integr Plant Biol*, 2011, 53(9): 756-765.
- [14] Nakamura Y, Francisco P 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(2): 213-227.
- [15] Cuevas R P, Daygon V D, Corpuz H, Nora L, Reinke R, Waters D, Fitzgerald M. Melting the secrets of gelatinisation temperature in rice. *Funct Plant Biol*, 2010, 37(5): 439-447.
- [16] Bao J S, Peng X, Hiratsuka M, Sun M, Umemoto T. Granule-bound SSIIa protein content and its relationship with amylopectin structure and gelatinization temperature of rice starch. *Starch-Stärke*, 2010, 61(8): 431-437.
- [17] Kharabianmasouleh A, Waters D L E, Reinke R F, Ward R, Henry R J. SNP in starch biosynthesis genes associated with nutritional and functional properties of rice. *Sci Rep*, 2012, 2: 557.
- [18] Waters D L E, Henry R J, Reinke R F, Fitzgerald M A. Gelatinization temperature of rice explained by polymorphisms in starch synthase. *Plant Biotechnol J*, 2010, 4(1): 115-122.
- [19] Chen M H, Bergman C J, Fjellstrom R G. *SSSIIA* locus genetic variation associated with alkali spreading value in international rice germplasm. Proceedings of the Plant and Animal Genome Conference, 2003, 153.
- [20] 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(7): 1171-1183.
- [21] Zhou Y, Zheng H Y, Wei G C, Zhou H, Han Y N, Bai X F, Xing Y Z, Han Y P. Nucleotide Diversity and Molecular Evolution of the *ALK* Gene in Cultivated Rice and its Wild Relatives. *Plant Mol Biol Rep*, 2016, 34(5): 1-8.
- [22] 陈秀花, 刘巧泉, 王宗阳, 王兴稳, 蔡秀玲, 张景六, 顾铭洪. 反义 *Wx* 基因导入我国籼型杂交稻重点亲本. 科学通报, 2002, 47(9): 684-688.
- Chen X H, Liu Q Q, Wang Z Y, Wang X W, Cai X L, Zhang J L, Gu M H. Introduction of antisense *Wx* Gene into key parents of indica hybrid rice in China. *Chin Sci Bull*, 2002, 47(9): 684-688. (in Chinese)
- [23] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acids Res*, 1980, 8(19): 4321-4325.
- [24] Zhang C Q, Zhou L H, Zhu Z B, Lu H W, Zhou X Z, Qian Y T, Li Q F, Lu Y, Gu M H, Liu Q Q. Characterization of grain quality and starch fine structure of two *japonica* rice (*Oryza sativa*) cultivars with good sensory properties at different temperatures during the filling stage. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(20): 4048-4057.
- [25] Zhu L J, Meng X L, Shi Y C, Gu M H, Liu Q Q. High-amylose rice improves indices of animal health in normal and diabetic rats. *Plant Biotechnol J*, 2012, 10(3): 353-362.
- [26] Umemoto T, Horibata T, Aoki N, Hiratsuka M, Yano M, Inouchi N. Effects of variations in starch synthase on starch properties and eating quality of rice. *Plant Prod Sci*, 2008, 11(4): 472-480.
- [27] Miura S, Crofts N, Saito Y, Hosaka Y, Oitome N F, Watanabe T, Kumamaru T, Fujita N. Starch Synthase IIa-deficient mutant rice line produces endosperm starch with lower gelatinization temperature than *japonica* rice cultivars. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 1-10.
- [28] Umemoto T, Aoki N, Lin H, Nakamura Y, Inouchi N, Sato Y. Natural variation in rice starch synthase IIa affects enzyme and starch properties. *Funct Plant Biol*, 2004, 31(7): 671-684.
- [29] Kaw R N, Cruz N M D L. Genetic analysis of amylose content, gelatinization temperature and gel consistency in rice. *J Genet Breed*, 1990: 103-111.
- [30] 李晓方, 肖昕, 刘彦卓, 刘志霞, 卢东柏, 毛兴学, 杨俊, 方正武, 李志新. 籼稻稻米品质性状遗传特点新解析. 分子植物育种, 2009, 7(6): 1077-1083.
- Li X F, Xiao X, Liu Y Z, Liu Z X, Lu D B, Mao X X, Yang J, Fang Z W, Li Z X. Novel analysis on genetic characters of quality traits in indica rice. *Mol Plant Breed*, 2009, 7(6): 1077-1083. (in Chinese with English abstract)
- [31] 隋炯明, 李欣, 严松, 严长杰, 张蓉, 汤述翥, 陆驹飞, 陈宗祥, 顾铭洪. 稻米淀粉 RVA 谱特征与品质性状相关性研究. 中国农业科学, 2005, 38(4): 657-663.
- Sui J M, Li X, Yan S, Yan C J, Zhang R, Tang S Z, Lu J F, Chen Z X, Gu M H. Studies on the rice RVA profile characteristics and its correlation with the quality. *Sci Agric Sin*, 2005, 38(4): 657-663. (in Chinese with English abstract)
- [32] 曹清明, 钟海雁, 李忠海, 孙昌波. 蕨根淀粉糊化温度测定及影响因素研究. 食品与机械, 2007, 23(3): 16-19.
- Cao Q M, Zhong H Y, Li Z H, Sun C B. Studies on the rice RVA profile characteristics and its correlation with the quality. *Food & Mach*, 2007, 23(3): 16-19. (in Chinese with English abstract)

- [33] 张昌泉, 潘立旭, 周兴忠, 李钱峰, 刘巧泉. 不同 *Wx* 等位组合对杂交稻天优 3611 品质的影响. 中国科技论文在线, 2017. (<http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201704-764>)
- Zhang C Q, Pan L X, Zhou X Z, Li Q F, Liu Q Q. The combined effects of different *Wx* allele on grain quality of hybrid rice Tianyou 3611. *Chin Sci Paper*, 2017. (in Chinese with English abstract) (<http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201704-764>)
- [34] 刘鑫燕, 朱孔志, 张昌泉, 洪燃, 孙鹏, 汤述翥, 顾铭洪, 刘巧泉. 利用 9311 来源的粳型染色体片段代换系定位控制稻米糊化温度的微效 QTL. 作物学报, 2014, 40(10): 1740-1747.
- Liu X Y, Zhu K Z, Zhang C Q, Hong R, Sun P, Tang S Z, Gu M H, Liu Q Q. Mapping of minor QTLs for rice gelatinization temperature using chromosome segment substitution lines from indica 9311 in the japonica background. *Acta Agron Sin*, 2014, 40(10): 1740-1747. (in Chinese with English abstract)