

水稻甜质胚乳突变体 *m5788* 的鉴定及基因定位

郑思怡¹ 杨 晔¹ 宋远辉¹ 花 芹¹ 林泉祥¹ 张海涛¹ 程治军²

(¹安徽农业大学农学院, 230036, 安徽合肥; ²中国农业科学院作物科学研究所, 100081, 北京)

摘 要 胚乳发育是种子形成的关键, 其决定水稻的外观品质和食味品质。*m5788* 是从粳稻品种中花 11 的组织培养后代中发现的甜质胚乳突变体, 其籽粒皱缩, 千粒重与穗粒数均显著降低, 淀粉合成受阻, 可溶性糖含量显著增加。通过对 *m5788* 与 IRAT129 杂交产生的 F₂ 代群体分析表明, 甜质胚乳性状受 1 对隐性核基因控制。对 569 个 F₂ 隐性极端单株进行连锁分析和定位, 将目的基因定位在 8 号染色体长臂端 Z8-25.8 和 Z8-25.9 之间 110kb 的区域内。该区间内存在 1 个与玉米甜质基因 *Sugary 1* 氨基酸序列相似性高达 82.2% 的基因 *LOC_Os08g40930*, 编码一个属于淀粉去分支酶 (DBE) 途径的异淀粉酶 *ISA1*。测序结果表明, 该基因序列和启动子在野生型和 *m5788* 中不存在碱基差异。qRT-PCR 分析结果表明, 与野生型相比, 突变体中 *LOC_Os08g40930* 的表达量明显降低。同时, DBE 途径中支链淀粉酶的编码基因表达量也显著降低。因此, *m5788* 携带的 *isa1* 基因是一个新发现的等位变异。

关键词 水稻; 胚乳发育; 精细定位; 淀粉合成

水稻 (*Oryza sativa* L.) 是世界上主要的粮食作物之一。淀粉是稻米的主要成分 (占 90% 以上), 胚乳中淀粉的组成、性状和排列方式对稻米的外观和食味品质起着至关重要的作用^[1]。随着人们生活质量的提高, 对稻米品质的要求也随之提高, 稻米品质改良逐渐成为水稻育种家们重点关注的问题。淀粉主要有直链淀粉和支链淀粉 2 种形式。前者是由 D-葡萄糖基以 α -1,4-糖苷键连接的线性葡聚糖链, 后者除此之外, 还有 α -1,6-糖苷键连接的分支链^[2]。

研究^[3]表明, 直链淀粉和支链淀粉的生物合成涉及 ADP-葡萄糖焦磷酸酯酶 (ADP-glucose pyrophosphorylases, AGPase)、淀粉合成酶 (granule bound starch synthase, GBSS)、可溶性淀粉合成酶 (soluble starch synthase, SS)、淀粉分支酶 (starch branching enzyme, BE)、淀粉去分支酶 (starch debranching enzyme, DBE) 和质体淀粉磷酸化酶 (plastidial starch phosphorylase, Pho) 等路径。高等植物中的 DBE 存在着支链淀粉酶 (pullulanase-type, PUL) 和异淀粉酶 (isoamylase-type, ISA) 2 种不同的底物特异性酶。PUL 主要参与普鲁兰多糖和支链淀粉的支链修饰, ISA 通过去除 BE 形成的支链淀粉过度分支, 从而将植物支链淀粉和糖原转

变为组织更强、支链较少的支链淀粉^[4]。

在玉米中, *Sugary 1* 基因编码 *ISA1* 的等位基因, 突变体 *sugary 1* 胚乳淀粉含量减少, 可溶性糖积累, 籽粒皱缩^[5]。2019 年, Takahashi 等^[6]分离出了一种新型甜米突变体 *hemisugary1*, 其籽粒中含有未去分支的短链高分子, 植物糖原由于 ISA 活性降低而积累, 从而改善了甜质胚乳突变体典型的皱缩表型, 外观表现为籽粒中等皱缩。在其他作物如硬粒小麦中, 敲除 *ISA1* 会导致胚乳中的淀粉含量降低, 植物糖原和植物葡聚糖含量增加, 改变了支链淀粉的精细结构^[7]。在马铃薯中同时降低 3 个 *ISA* 基因 (*ISA1*、*ISA2* 和 *ISA3*) 的表达量会导致淀粉代谢缺陷, 使得块茎中淀粉含量降低和淀粉颗粒尺寸减小^[8]。在水稻中, Peng 等^[9]发现突变体 *isa1* 的含糖胚乳缺少淀粉颗粒, 基因 *ISA1* 与 *FLO6* (一种结合淀粉的碳水化合物结合结构域蛋白编码基因) 相互作用, 作为淀粉结合蛋白参与淀粉合成和复合颗粒的形成。李家洋等^[10]在第 8 号染色体上发现了一个控制水稻甜质胚乳的基因 *SUI*, 该突变体可溶性多糖含量高, 胚乳带有甜味, 可能编码一种参与支链淀粉生物合成的 ISA。2015 年, 赵华等^[11]通过组织培养得到了水稻糖质胚乳突变体 *sug-11*, 胚乳呈甜味, 籽粒皱缩, 其成熟籽粒中的蔗糖和可溶性

作者简介: 郑思怡, 研究方向为作物遗传育种, E-mail: 2363085742@qq.com

程治军为通信作者, 主要从事水稻分子遗传和育种研究, E-mail: chengzhijun@caas.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (31871603)

收稿日期: 2021-10-06; 修回日期: 2021-12-08; 网络出版日期: 2022-04-17

糖含量约为野生型中花 11 的 3 倍。2018 年, Du 等^[12]在水稻中鉴定了一个编码淀粉去分支酶 *ISA1* 突变的穗发芽突变体 *phs8*, 由于胚乳含糖量增加, 导致 *OsABI3* 和 *OsABI5* 的表达量降低, 对脱落酸敏感性降低, 表明甜质胚乳突变还会影响种子的休眠和萌发。

甜质胚乳突变体是一种特异的淀粉合成突变体, 被认为是新型功能性食品开发的重要原料, 也是健康食品的新材料。挖掘和利用甜质胚乳突变体, 对于开发具有保健功能的稻米产品具有积极意义。本研究以水稻甜质胚乳突变体 *m5788* 为研究材料, 在精细定位的基础上, 比较了突变体与之前报道的甜米材料的关系, 发现它是一个水稻 *ISA1* 位点新的等位变异, 是研究该基因表达调控难得的材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

甜质胚乳突变体 *m5788* 是从粳稻品种中花 11 组织培养后代中筛选得到的。在安徽合肥和北京自然环境条件下, 经多年种植, 其综合农艺性状与对照品种中花 11 十分相近, 胚乳突变性状均能稳定遗传, 成熟胚乳呈甜味。2019 年将其与正常胚乳品种 IRAT129 配制杂交组合, 2019 年冬, 在海南南繁后收获的 F₁ 种子脱壳磨米, 挑选甜质米, 经灭菌消毒后, 无菌条件下培养成苗并进行基因定位。田间管理同大田生产。种子自然风干后测定千粒重。

1.2 试验方法

1.2.1 表型分析 大田材料成熟后, 随机选取突变体 *m5788* 与野生型各 10 株, 考察株高、主茎穗长、节间长、主穗粒数、一次枝梗数、二次枝梗数和结实率等农艺性状。

1.2.2 理化性质测定 中花 11 和 *m5788* 成熟种子风干去壳后, 利用 Perten 公司的 DA7200 型近红外

光谱仪测定直链淀粉含量、胶稠度、蛋白质和水分含量等品质指标, 每个材料测定 3 次。

采用蒽酮比色法^[13]测定可溶性糖含量, 待水稻在田间生长发育至开花期, 于上午 11:00-11:30 取生长发育一致的植株的旗叶和穗, 液氮冷冻, 放入 -80℃冰箱保存待测。待水稻在田间生长发育至成熟期, 取成熟籽粒, 液氮冷冻, 放入 -80℃冰箱待测, 每个材料测定 3 次。

1.2.3 I₂-KI 染色 取 10 粒种子, 去粳壳, 在 30℃ 条件下清水浸种 24h, 设置 3 次重复。用滤纸吸干种子表面水分, 加 20μL 2% I₂-KI 溶液, 完全浸染后用吸水纸吸干多余溶液, 在 BA410 型显微镜下观察染色情况并拍照。

1.2.4 目标基因定位及分子标记的开发 以中花 11 和 IRAT129 为亲本, 筛选出均匀分布于 12 条染色体具有多态性的 197 对 SSR 和 Indel 标记, 利用 20 株 F₂ 隐性极端个体, 通过 TPS 法提取叶片总 DNA, 构建 DNA 混池, 筛选连锁标记。再根据连锁结果, 开发新的标记, 扩大定位群体, 对目标基因进行精细定位 (表 1)。利用 Gramene (<http://www.gramene.org>) 和 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库进行新标记开发, 对比日本晴和 9311 基因组序列, 寻找插入/缺失位点, 用 Primer 3.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>) 软件开发 SSR 标记, 在 RAP-DB/HOME 的 Blast 网站 (<https://rapdb.dna.affrc.go.jp>) 比对特异性, 将特异性较好的引物送至北京擎科生物有限公司合成。PCR 扩增采用 10μL 反应体系: Premix Taq 5μL、正反向引物 (10μmol/L) 共 1μL、DNA 模板 1μL 和 ddH₂O 3μL。PCR 反应条件为 94℃ 预变性 2min; 94℃ 变性 30s, 55℃~58℃退火 30s, 72℃ 延伸 1min, 设置 35 个循环; 72℃ 延伸 5min, 4℃ 保存。PCR 产物经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染显色后观察拍照并记录。

表 1 新开发的 Indel 和 SNP 分子标记
Table 1 New developed polymorphic Indel and SNP primers used for fine mapping

标记 Marker	正向引物 Forward primer (5'-3')	反向引物 Reverse primer (5'-3')
Z8-25.6	CTCGTGCGCGCGCACCGTTGG	GCAGATGGATGGGACGGAGT
Z8-25.7	TTTGGGGCTGGAGCACCTTG	CATCATAGAATGTGCTGA
Z8-28.8	TTTTTCTTCTTCTCATGCCTT	TTTAGCTTCTCTCCATTCCA
Z8-25.9	GAAGAGAGCTGATTACAGGAGAGAGC	ATAGTTAGGCAGCAACAGCAACG
Z8-26.2	ATGATGGTCCATAAGAGTCG	CAGTGTTCAAGATGGTCATTG

1.2.5 RNA 提取与 qRT-PCR 表达量分析 取 10cm 幼穗，用 RNA 试剂盒（北京康润生物科技有限公司）提取总 RNA，用 RNA 反转录试剂盒（江苏愚公生命科技有限公司）获得 cDNA。利用 *ISA1* 和 *PUL* 基因的蛋白质编码区序列设计扩增引物（表 2），内参采用水稻 Ubiquitin (*Os03g0234200*)，采用 Takara 公司试剂盒 TB Green™ Premix ExTaq™ II (Tli RNaseH Plus) 反应体系，在 BIO-RAD CFX96™ Real-Time System (BIO-RAD, 美国) 上进行扩增反应。每个样品重复 3 次，以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算相对表达量。

表 2 qRT-PCR 所用引物
Table 2 Primers used for qRT-PCR

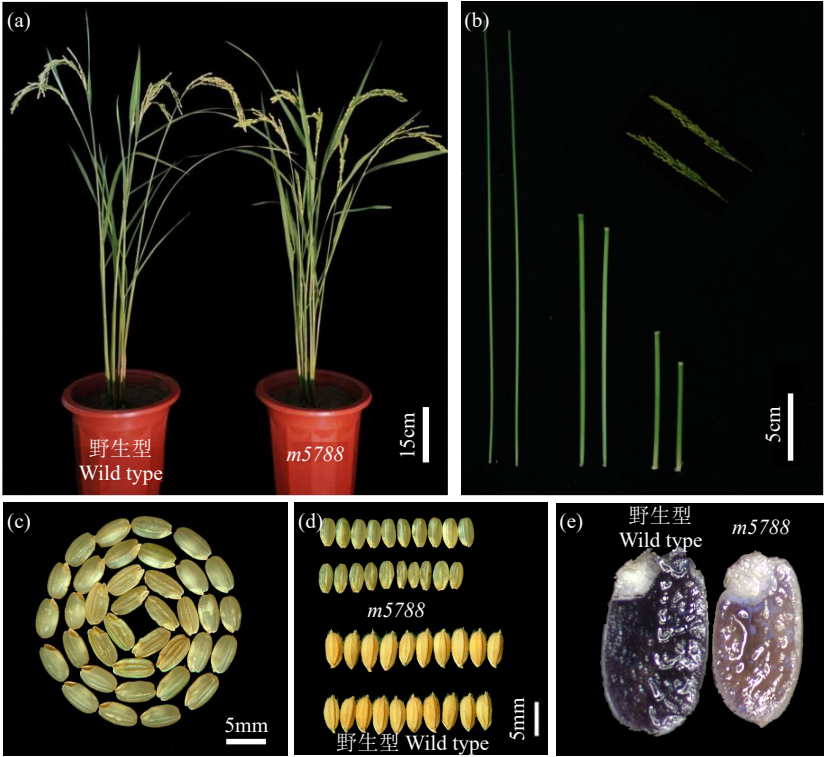
引物 Primer	正向引物 Forward primer (5'-3')	反向引物 Reverse primer (5'-3')
<i>ISA1</i>	GTACTTCGATGTCTCCAATGTCG	ATACTCTCCTCGGCTTATCACTG
<i>PUL</i>	CCTAAAGCTTACTACCCATGCAT	ACATGTCCTTGTCTCCACTTCTT

2 结果与分析

2.1 野生型和突变体 *m5788* 的表型分析

突变体 *m5788* 来自于粳稻品种中花 11 的组织培养后代，经多年的田间观察发现，籽粒皱缩性状表现稳定。农艺性状考察发现，*m5788* 平均株高为 $100.2\pm2.7\text{cm}$ ，低于野生型 ($117.0\pm2.8\text{cm}$)，突变体的各节间长度都相对较短，穗长缩短了 14.9% (图 1a~b 和表 3)。*m5788* 突变体的分蘖数 (12.6 ± 1.9)

显著多于野生型 (9.5 ± 2.1)，有效穗数极显著高于野生型。与野生型相比，*m5788* 穗粒数 (184.0 ± 12.3) 仅是野生型 (278.0 ± 45.8) 的 66.2%。突变体的千粒重 ($15.6\pm0.87\text{g}$) 仅为野生型 ($29.6\pm1.95\text{g}$) 的 52.7% (表 3)。野生型糙米饱满、胚乳有垭白、部分透明，而 *m5788* 突变体糙米皱缩、胚乳透明 (图 1c~d)。用 $\text{I}_2\text{-KI}$ 染色发现，野生型胚乳被染成紫黑色，*m5788* 突变体胚乳被染成淡紫色，说明野生型籽粒淀粉合成和积累正常，而突变体的籽粒



(a) 成熟期植株; (b) 株高组成 (左: 野生型, 右: *m5788*); (c) 籽粒外观 (中花 11 号: 外侧 2 圈; *m5788*: 内侧 2 圈); (d) 粒宽; (e) $\text{I}_2\text{-KI}$ 染色
(a) Plant at maturity stage; (b) Plant height components (left: wild type, right: *m5788*); (c) Grain appearance (Zhonghua 11: two circles outside; *m5788*: two circles inside); (d) Grain width; (e) $\text{I}_2\text{-KI}$ dyeing

图 1 野生型和突变体 *m5788* 的表型鉴定

Fig.1 Agronomic traits comparison between wild type and the mutant *m5788*

表 3 野生型和突变体 *m5788* 农艺性状比较

Table 3 Comparison of agronomic traits between wild type and the mutant *m5788*

农艺性状 Agronomic trait	野生型 Wild type	突变体 Mutant
株高 Plant height (cm)	117.0±2.8	100.2±2.7**
分蘖数 Tiller number	9.5±2.1	12.6±1.9*
有效穗数 Effective tiller number	9.3±1.7	13.1±2.7**
穗长 Panicle length (cm)	24.2±1.3	20.6±1.0**
一次枝梗数 Number of primary branches	14.0±1.8	12.9±1.1
二次枝梗数 Number of secondary branches	45.8±4.0	43.0±6.6
穗粒数 Grain number per panicle	278.0±45.8	184.0±12.3*
结实率 Seed setting (%)	97.0±0.0	95.0±2.0
千粒重 1000-grain weight (g)	29.6±1.95	15.6±0.87**

“*”表示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著, “**”表示在 $P < 0.01$ 水平上差异极显著, 下同
“*” indicates significant difference at $P < 0.05$, “**” indicates extremely significant difference at $P < 0.01$, the same below

淀粉积累不正常（图 1e）。

2.2 野生型和突变体 *m5788* 籽粒品质的理化指标分析

对 *m5788* 和野生型籽粒中蛋白质、直链淀粉、脂肪酸含量和胶稠度等几个关键品质性状的测定结果（表 4）表明，胚乳糖质突变对稻米品质的理化特性产生了较明显的影响。*m5788* 蛋白质含量为 7.58%，较野生型的 5.67%增加了 1.91 个百分点，直链淀粉含量增加了 0.36 个百分点，脂肪酸含量增加了 1.52 个百分点。由于直链淀粉含量没有下降，因此，突变体淀粉总量的减少可能发生在支链淀粉上，与支链淀粉有关的胶稠度降低了 14.66 个百分点，也间接支持这一结论。

表 4 野生型和突变体品质指标比较

Table 4 Comparison of quality index between wild type and the mutant

品质指标 Quality index	野生型 Wild type	突变体 Mutant	%
水分 Moisture	9.99±0.0011	9.89±0.0004	
蛋白质 Protein	5.67±0.0005	7.58±0.0012**	
直链淀粉 Amylose	19.26±0.0035	19.62±0.0008*	
脂肪酸 Fatty acid	14.67±0.0113	16.19±0.0092**	
胶稠度 Gel consistency	50.63±0.0073	35.97±0.0227**	

2.3 野生型和突变体 *m5788* 籽粒灌浆特性分析

由于 *m5788* 籽粒皱缩，淀粉积累少，可能是突变体由糖到淀粉的合成步骤出了问题。开花期旗叶、穗和成熟期籽粒可溶性糖含量（图 2）表明，与野生型相比，*m5788* 开花期旗叶叶片可溶性糖含量为 0.33mmol/L，穗部可溶性糖含量为 0.42mmol/L，野

生型的相应含量分别为 0.21 和 0.23mmol/L，差异均达到了极显著水平；在籽粒的灌浆过程中，野生型和 *m5788* 可溶性糖含量的差距逐渐增大。突变体成熟籽粒可溶性糖含量为 1.83mmol/L，野生型为 1.00mmol/L，突变体约为野生型的 1.8 倍。

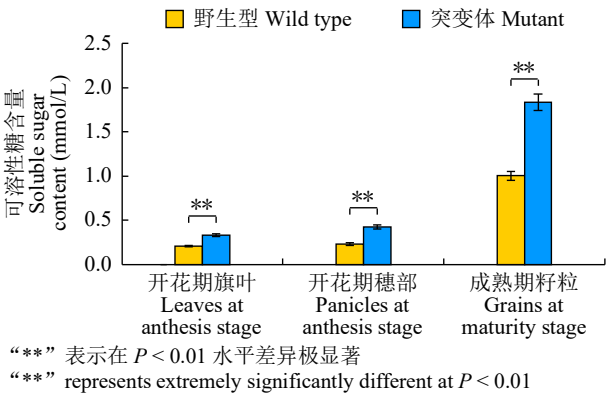


图 2 野生型和突变体不同时期可溶性糖含量比较
Fig.2 Comparison of soluble sugar content between wild type and mutant at different stages

2.4 遗传分析

以突变体 *m5788* 为母本与正常胚乳品种 IRAT129 杂交，构建遗传作图群体。F₁ 植株所结种子的胚乳出现明显的性状分离，随机抽取 341 粒 F₁ 成熟种子，将去壳糙米置于 X 线光片观影灯下计数发现，其中正常胚乳籽粒和皱缩胚乳籽粒数目分别为 277 和 64。符合 3:1 ($\chi^2=1.09 < \chi^2_{0.005}=3.84$) 的理论分离比例。由此推断，突变体 *m5788* 的皱缩胚乳性状受 1 对隐性核基因控制。

2.5 精细定位

从 F₂ 群体中随机选取 20 个突变体隐性单株构建 2 组 DNA 混池，利用筛选出的分布于水稻全基因组的 197 对多态性引物，进行突变基因的连锁分析，初步确定第 8 号染色体上的 Indel 引物 Z8-24 和 Z8-26.2 与突变基因连锁，再利用 66 个 F₂ 极端单株对 2 个标记进行验证。利用 Gramene 网站 (<http://ensembl.gramene.org/genome>) 的籼粳稻基因组序列对比信息，在初定位区间新开发了 4 个 SNP 分子标记 (Z8-25.6、Z8-25.7、Z8-25.8 和 Z8-25.9)，利用 569 个 F₂ 隐性突变体单株，最终将突变基因定位在了标记 Z8-25.8 和 Z8-25.9 之间物理距离为 110kb 区间内（图 3b）。

根据水稻基因组数据库 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/cgi-bin/gbrowse/rice/>)，该区间内存在 14 个基因和 3 个转座子（表 5），其中包含 1 个前人^[12]

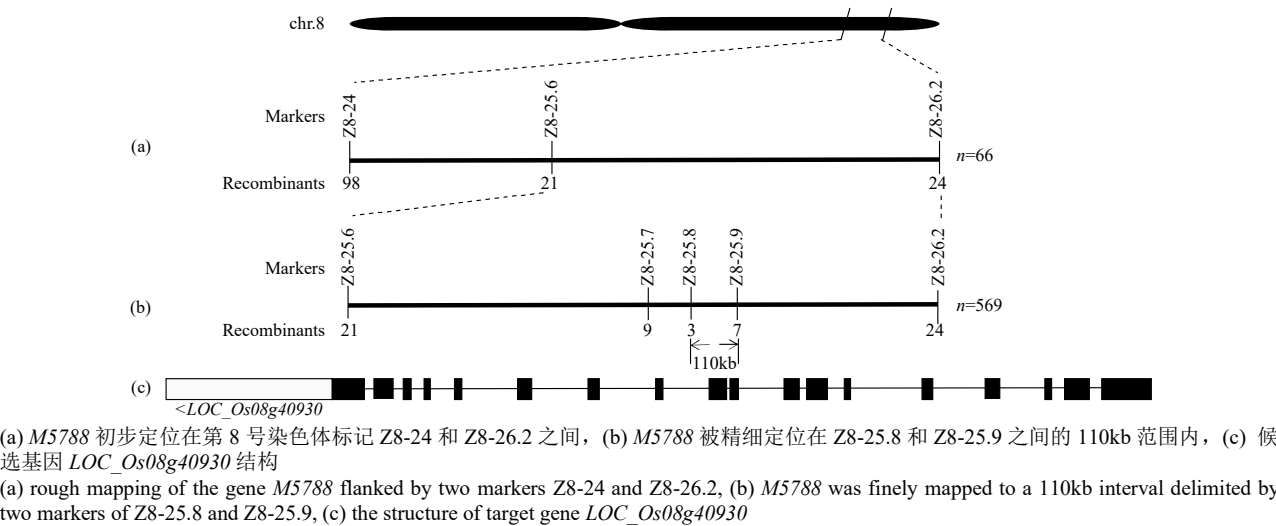


图 3 候选基因 *M5788* 的图位克隆

Fig.3 Schematic diagram of map-based cloning on the candidate gene *M5788*

表 5 定位区间内基因的功能注释		
Table 5 Gene annotations in the mapping interval		
基因 Gene	基因注释 Gene annotation	
<i>LOC_Os08g40830</i>	含有 pumilio 结构域蛋白 PPD1	
<i>LOC_Os08g40890</i>	与精胺合酶有关	
<i>LOC_Os08g40940</i>	表达蛋白	
<i>LOC_Os08g40840</i>	胞外复合亚基 EXO70	
<i>LOC_Os08g40910</i>	表达蛋白	
<i>LOC_Os08g40950</i>	表达蛋白	
<i>LOC_Os08g40850</i>	线粒体载体蛋白	
<i>LOC_Os08g40919</i>	表达蛋白	
<i>LOC_Os08g40860</i>	RNA 假尿苷合酶	
<i>LOC_Os08g40930</i>	α 淀粉酶, 含有蛋白质的催化结构域	
<i>LOC_Os08g40990</i>	受体蛋白激酶 1	
<i>LOC_Os08g40870</i>	五肽重复蛋白	
<i>LOC_Os08g40880</i>	含有蛋白质的 RNA 识别基序	
<i>LOC_Os08g40900</i>	生长素响应因子	

已经进行功能验证的甜质胚乳基因 *OsISA1*。

利用 phyto-zome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) 上公布的 *LOC_Os08g40930* 基因翻译序列, 在 NCBI 数据库中搜索显示, 水稻的 *ISA1* 与其他物种如拟南芥、大麦、小麦、玉米中的 Sugary1 蛋白高度同源 (图 4)。且与已经报道^[12] 过的玉米甜质基因 *Sugary 1* (*GRMZM2G138060*) 的同源性高达 82.2%。

对 *LOC_Os08g40930* 的启动子和编码区进行测序, 结果表明在野生型和突变体之间序列不存在差异, 但 qRT-PCR 的结果表明, 突变体中该基因的表达水平下调, 预示着表达水平的下降可能是导致表型变异的主要原因。对同属于淀粉去分支酶基

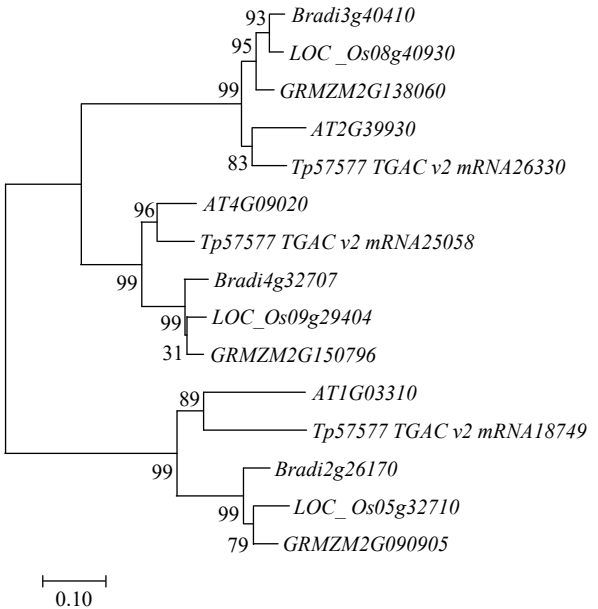


图 4 *LOC_Os08g40930* 与不同物种同源基因构建的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of *LOC_Os08g40930* homologs

GRMZM2G138060、*GRMZM2G150796* 和 *GRMZM2G090905* 为玉米基因, *Bradi3g40410*、*Bradi4g32707* 和 *Bradi2g26170* 为小麦基因, *AT2G39930* 和 *AT1G03310* 为拟南芥基因, *LOC_Os05g32710* 和 *LOC_Os09g29404* 为水稻基因

GRMZM2G138060, *GRMZM2G150796*, and *GRMZM2G090905* are maize genes, *Bradi3g40410*, *Bradi4g32707*, and *Bradi2g26170* are wheat genes, and *AT2G39930* and *AT1G03310* are *Arabidopsis* genes, *LOC_Os05g32710* and *LOC_Os09g29404* are rice genes

因 *OsPUL* 进行了表达量分析, 结果 (图 5) 表明在突变体 *m5788* 中 *OsPUL* 表达量也显著下降。突变体胚乳 DBE 途径中的 2 种底物特异性酶 *ISA1* 和 *PUL* 的基因表达量均大幅度降低, 进一步说明了 DBE 途径的代谢出现问题, 其主要原因是 *ISA1* 基因发生了突变, 而 *PUL* 基因表达量变化可能是负

调控的结果。

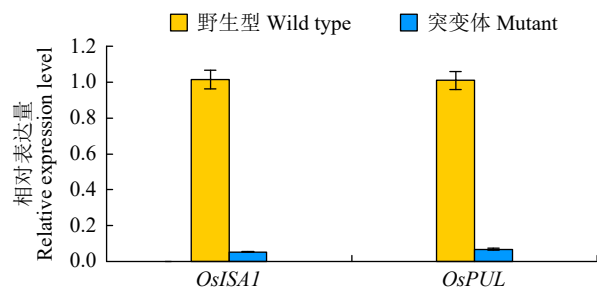


图 5 *OsISA1* 和 *OsPUL* 在野生型和突变体中表达量的比较

Fig.5 Comparison of expression levels of *OsISA1* and *OsPUL* in wild type and mutant

3 讨论

胚乳直接决定稻米的品质和用途。甜质水稻胚乳因可溶性糖含量多，淀粉含量少，被认为是新型功能性食品原料。水稻甜质胚乳突变体 *m5788* 是粳稻品种中花 11 的组织培养后代，籽粒自然风干后胚乳皱缩，千粒重和穗粒数明显下降，成熟籽粒中的可溶性总糖含量约是其野生对照品种中花 11 的 1.8 倍，胚乳呈甜味。突变基因被定位在 8 号染色体 Z8-25.8 和 Z8-25.9 之间物理距离为 110kb 的区间内。区间内 *LOC_Os08g40930* 基因的表达量在突变体内显著下调，该基因表达量的下降可能是造成突变体表型变化的原因。

DBE 具有 ISA 和 PUL 2 种类型的酶。ISA 主要分解植物糖原和支链淀粉，而 PUL 作用于普鲁兰多糖和支链淀粉，但不作用于植物糖原。在植物中至少存在 3 种 ISA (*ISA1*、*ISA2* 和 *ISA3*) 基因，但到目前为止 PUL 只报道了 1 种^[14]。在淀粉生物合成中，ISA 可以通过编辑过多支链或去除支链酶来去除不适当分支的支链，以维持其簇状结构，形成淀粉颗粒中的结晶。研究^[15]表明，缺乏 DBE 蛋白的拟南芥突变体 *isa1/isa2/isa3/lda* 的叶片中没有淀粉颗粒，但积累了高度分支的葡聚糖。在本研究中，中花 11 糙米籽粒饱满，胚乳有垩白，表现为部分透明，而 *m5788* 糙米皱缩，胚乳透明，几乎不存在结晶，推测 *m5788* 中 ISA 基因受损，无法去除淀粉生物合成过程中形成的不适当分支，导致支链淀粉的簇状结构无法维持。试验证实 *ISA1* 表达量降低与推测结论相符。但是另外 2 个 ISA 基因 (*ISA2* 和 *ISA3*) 对 *m5788* 突变表型的影响还需进一步研究。

与 ISA 相比，另一个淀粉去分支酶类型 PUL 的生理功能研究报道较少。PUL 参与淀粉的生物合

成，PUL 的水解活性有助于淀粉的分解代谢，补偿了 ISA 部分缺陷，在谷类胚乳淀粉的生物合成过程中具有重要作用^[16]。在水稻中，编码普鲁兰酶的 *OsPUL* 基因在整个种子发育阶段高度表达，在发育的中后期达到峰值^[17]。Kawagoe 等^[18]利用淀粉糊质的绿色荧光蛋白探究 *isa1* 突变体中的淀粉质体和淀粉颗粒的形成，发现 *isa1* 突变体的含糖胚乳中没有淀粉颗粒，表明 *ISA1* 在淀粉颗粒形成的早期至关重要。本研究中的突变体 *m5788* 与野生型相比籽粒更加透明，淀粉颗粒明显减少，与上述报道相似。

在水稻 ISA 活性降低的 *sug1* 突变系中，高活性 PUL 会导致淀粉区域形成 α -葡聚糖而不是植物糖原^[19]。PUL 功能失活的玉米突变体 *zpu1-204* 中的胚乳淀粉结构和组成与野生型相比没有显著差异。但相较于野生型，*Zpu1-204* 在胚乳发育过程中会积累分枝性麦芽低聚糖。表明 PUL 参与籽粒淀粉形成过程中的葡聚糖水解，有助于淀粉的分解代谢。*ISA1* 功能失活突变体 *sul-st* 和 *zpu1-204* 纯合子双突变体与野生型相比，胚乳中植物糖原积累显著^[16]。Fujita 等^[20]研究表明，与野生型相比，在 PUL 突变体中，支链淀粉聚合度 (DP) < 13 的短链增加，但变化幅度远小于 *ISA1* 缺陷突变体 *sug1*，但 PUL 突变体的 α -葡聚糖和淀粉结构基本一致。*PUL/sul* 双突变体保留了胚乳外层淀粉组织，但表现出比 *sul* 含量更高的可溶性多糖和更多的 DP < 7 短链。这表明 PUL 功能缺失对支链淀粉合成的影响虽小于 *sul*，但 PUL 的活性对 *sug1* 表型的变化也具有一定的影响。在本研究中，*m5788* 胚乳中的 DBE 途径中的 2 种底物特异性酶基因 *OsISA1* 和 *OsPUL* 的表达量均显著下降，*ISA1* 功能损伤可能是导致突变体可溶性糖含量增加和淀粉含量下降的主要原因，而 PUL 对 *m5788* 表型变化也产生了一定的影响，与上述研究结果相符。但 2015 年赵华等^[21]对 *Sug-11* 糖质突变体与其野生对照籽粒灌浆中的 ISA 与 PUL 基因的转录表达水平检测结果显示，*ISA1* 基因的表达量并没有明显下降，但 PUL 的表达量出现了一定程度的下降。该结论与本研究有所区别，猜测可能是由于具有甜质胚乳的水稻材料不同，导致 *ISA1* 活性差异。

East 等^[22]于 1911 年在玉米中首次描述了甜质突变体 *sul* 以来，玉米中已经鉴定了许多甜质胚乳突变体，例如甜质基因 *sugary 1* 和 *sugary 2*，超甜突变基因 *sh2*、*bt1* 和 *bt2*，加强甜突变基因 *sel*

等^[23]。Nakamura 等^[24]在玉米糖质胚乳突变体中发现, 与 DBE 相关的 *ISAI* 基因表达活性显著下降。随后, 通过对玉米 *ISAI* 同源性分析发现, 在水稻的 8 号染色体上有 1 个它的同源 *ISAI*。2005 年, Kubo 等^[25]将小麦的甜质胚乳基因组导入水稻 *ISAI* 基因损伤的甜质胚乳突变体 *EM91* 中, 在转基因的 T₀ 水稻植株中, 胚乳性状恢复正常, 胚乳中的可溶性糖含量降低, 淀粉积累正常, 证明了 *ISAI* 基因在淀粉合成过程中的作用。我们的突变体材料与报道的甜质胚乳突变体籽粒表型相似。前人研究^[7,10]表明, *LOC_Os08g4093* 中碱基替换是导致水稻甜质胚乳的遗传基础, 而我们的试验结果表明, *LOC_Os08g40930* 基因组在 *m5788* 与野生型中不存在碱基差异, 水稻甜质胚乳是由于 *ISAI* 表达量降低导致的, 故 *M5788* 是水稻基因 *OsISAI* 的一个新的等位变异。但导致 *ISAI* 表达量降低的分子机制仍需进一步深入研究。

4 结论

通过对甜质胚乳突变体 *m5788* 的研究发现, *m5788* 表现出株高降低、籽粒皱缩和千粒重降低等表型。突变体碘染呈浅紫色, 淀粉含量减少。生理试验表明, 突变体可溶性糖含量增加是导致甜质胚乳的主要原因。对蛋白质和直链淀粉含量等几个关键品质性状的测定结果表明, *m5788* 蛋白质含量增加了 1.91 个百分点, 直链淀粉含量增加了 0.36 个百分点, 脂肪酸含量增加了 1.52 个百分点, 胶稠度降低了 14.66 个百分点。胚乳糖质突变对稻米品质的理化特性产生了较明显的影响。遗传分析表明, 该性状受 1 对隐性等位基因控制, 突变体 *m5788* 目标基因被精细定位在水稻 8 号染色体上标记 Z8-25.8 和 Z8-25.9 之间物理距离为 110kb 的区间内。该区间含有 1 个已经报道的 *OsISAI* 甜质基因, 编码 1 个名为异淀粉酶 1 的淀粉去分支酶蛋白^[12]。测序分析表明, *OsISAI* 基因组序列未发生变化, 但是该基因的表达量明显降低, 同时与 *ISAI* 基因功能相似的 *OsPUL* 表达量也明显降低。综上, 突变体 *m5788* 是一个新的甜质胚乳材料, 在培育功能性水稻品种中具有一定的利用价值。

参考文献

- [1] 金锡铭. 水稻淀粉突变体 *flo6* 的表型分析及基因精细定位. 南京: 南京农业大学, 2010.
- [2] Manners D J. Recent developments in our understanding of amylopectin structure. Carbohydrate Polymer, 1989, 11(2): 87-112.
- [3] Jeon J S, Ryoo N, Hahn T R, et al. Starch biosynthesis in cereal endosperm. Plant Physiology Biochemistry, 2010, 48(6): 383-392.
- [4] Pfister B, Zeeman S C. Formation of starch in plant cells. Cellular and Molecular Life Sciences, 2016, 73(14): 2781-2807.
- [5] Dinges J R, Colleoni C, Myers A M, et al. Molecular structure of three mutations at the maize *sugary1* locus and their allele-specific phenotypic effects. Plant Physiology, 2001, 125: 1406-1418.
- [6] Takahashi S, Kumagai Y, Igarashi H, et al. Biochemical analysis of a new sugary-type rice mutant, *Hemi-sugary1*, carrying a novel allele of the *sugary-1* gene. Planta, 2019, 251(1): 1-29.
- [7] Sestili F, Sparla F, Botticella E, et al. The down-regulation of the genes encoding *Isoamylase 1* alters the starch composition of the durum wheat grain. Plant Science, 2016, 252: 230-238.
- [8] Ferreira S J, Senning M, Fischer-Stettler M, et al. Simultaneous silencing of isoamylases *ISAI*, *ISA2* and *ISA3* by multi-target RNAi in potato tubers leads to decreased starch content and an early sprouting phenotype. PLoS ONE, 2017, 12(7): e0181444.
- [9] Peng C, Wang Y H, Liu F, et al. *FLOURY ENDOSPERM 6* encodes a CBM48 domain-containing protein involved in compound granule formation and starch synthesis in rice endosperm. The Plant Journal, 2014, 77(6): 917-930.
- [10] 李家洋, 钱前, 曾大力, 等. 水稻胚乳甜质控制基因 *SUI* 及其应用: 中国, 200510006770.8. 2005-02-04.
- [11] 赵华, 张其芳, 赵倩, 等. 水稻胚乳糖质突变体 *Sug-11* 的淀粉粒结构和粒径分布及相关理化特性. 核农学报, 2015, 29(4): 724-733.
- [12] Du L, Xu F, Fang J, et al. Endosperm sugar accumulation caused by mutation of *PHS8/ISAI* leads to pre-harvest sprouting in rice. The Plant Journal, 2018, 95(3): 545-556.
- [13] 张述伟, 宗营杰, 方春燕, 等. 蒽酮比色法快速测定大麦叶片中可溶性糖含量的优化. 食品研究与开发, 2020, 41(7): 196-200.
- [14] Kubo A, Colleoni C, Dinges J R, et al. Functions of heteromeric and homomeric isoamylase-type starch-debranching enzymes in developing maize endosperm. Plant Physiology, 2010, 153(3): 956-969.
- [15] Streb S, Delatte T, Umhang M, et al. Starch granule biosynthesis in arabidopsis is abolished by removal of all debranching enzymes but restored by the subsequent removal of an endoamylase. Plant Cell, 2008, 20: 3448-3466.
- [16] Dinges J R, Colleoni C, Myers J. Mutational analysis of the pullulanase-type debranching enzyme of maize indicates multiple functions in starch metabolism. Plant Cell, 2003, 15(3): 666-680.
- [17] Li Q F, Zhang G Y, Dong Z W, et al. Characterization of expression of the *OsPUL* gene encoding a pullulanase-type debranching enzyme during seed development and germination in rice. Plant Physiology Biochemistry, 2009, 47(5): 351-358.
- [18] Kawagoe Y, Kubo A, Satoh H, et al. Roles of isoamylase and ADP-glucose pyrophosphorylase in starch granule synthesis in rice endosperm. The Plant Journal, 2005, 42(2): 164-174.
- [19] Kubo A, Fujita N, Harada K, et al. The starch-debranching enzymes isoamylase and pullulanase are both involved in amylopectin biosynthesis in rice endosperm. Plant Physiology, 1999, 121(2): 399-409.
- [20] Fujita N, Toyosawa Y, Utsumi Y, et al. Characterization of pullulanase (*PUL*)-deficient mutants of rice (*Oryza sativa* L.) and the function of *PUL* on starch biosynthesis in the developing rice

- endosperm. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(3): 1009-1023.
- [21] 赵华, 王俊敏, 张其芳, 等. 水稻糖质胚乳突变体 *Sug-11* 籽粒灌浆过程的淀粉合成关键酶活性及其与淀粉理化特性关系. *中国水稻科学*, 2015, 29(1): 73-81.
- [22] East E M, Hayes H K. Inheritance in maize. *Zeitschrift für induktive Abstammungs-und Vererbungslehre*, 1911, 6(1): 193-196.
- [23] 李水琴, 王文瑞, 刘海英, 等. 玉米胚乳遗传基础及相关基因研究. *种子*, 2016, 35(6): 45-49.
- [24] Nakamura Y, Kubo A, Shimamune T, et al. Correlation between activities of starch debranching enzyme and α -polyglucan structure in endosperms of *sugary-1* mutants of rice. *The Plant Journal*, 1997, 12(1): 143-153.
- [25] Kubo A, Rahman S, Utsumi Y, et al. Complementation of *sugary-1* phenotype in rice endosperm with the wheat isoamylase1 gene supports a direct role for isoamylase1 in amylopectin biosynthesis. *Plant Physiology*, 2005, 137(1): 43-56.

Identification and Fine Mapping of Sugary Endosperm Mutant *m5788* in Rice (*Oryza sativa* L.)

Zheng Siyi¹, Yang Ye¹, Song Yuanhui¹, Hua Qin¹, Lin Quanxiang¹, Zhang Haitao¹, Cheng Zhijun²

(¹College of Agriculture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China;

²Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract Starch synthesis in endosperm development determines the appearance and flavor quality of rice grains. *m5788* is a shriveled grain sweet embryo mutant derived from the tissue culture progeny of *Japonica* var. Zhonghua 11. The 1000-grain weight and the number of grains per panicle decreased significantly. Due to the blocking of starch synthesis, the level of soluble sugar increased significantly. Genetic analysis revealed that *m5788* was determined by a pair of recessive nuclear genes. Linkage analysis localized the candidate gene to the 110kb region flanked by indel markers of Z8-25.8 and Z8-25.9 on chromosome 8 in 569 F₂ mutant individuals. In this region there was a putative isoamylase encoding the gene *LOC_Os08g40930*, which was 82.2% homologous to maize *Sugary 1* and was involved in the DBE pathway of the starch debranching enzyme ISA1. The sequencing results showed that no genomic sequence change occurs in *LOC_Os08g40930* between wild type and *m5788*. However, the qRT-PCR analysis showed that the decrease in the expression level of the gene *LOC_Os08g40930* in the mutant *m5788* was presented together with the expression level of the coding-gene of pullulanase-type in same DBE pathway. All results suggest that *isa1* carried by *m5788* is a novel allele.

Key words Rice; Endosperm development; Fine mapping; Starch synthesis