

罗嘉锐, 竺正航, 郝晴文, 等. 利用单片段代换系鉴定水稻抗性淀粉相关基因 [J]. 华南农业大学学报, 2023, 44(5): 708-717.

LUO Jiarui, ZHU Zhenghang, HAO Qingwen, et al. Identification of resistant starch related genes in rice by single segment substitution lines[J]. Journal of South China Agricultural University, 2023, 44(5): 708-717.

利用单片段代换系鉴定水稻抗性淀粉相关基因

罗嘉锐[✉], 竺正航, 郝晴文, 丁琳懿, 朱海涛, 张桂权, 王少奎, 杨维丰[✉]

(华南农业大学 农学院/广东省植物分子育种重点实验室/岭南现代农业科学与技术广东省实验室, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】发掘稻米淀粉合成相关基因 *SBEIIb*、*SSIIa* 和 *ISAI* 的高抗性淀粉等位基因。【方法】利用分子标记筛选携带 *SBEIIb*、*SSIIa* 或 *ISAI* 的单片段代换系 (Single segment substitution lines, SSSLs), 利用改良的 AOAC 法测定 SSSLs 材料的抗性淀粉含量 (w), 通过 Sanger 测序分析不同 SSSLs 的 *SBEIIb*、*SSIIa* 和 *ISAI* 基因序列, 结合基因型和表型连锁分析, 鉴定影响抗性淀粉含量的等位基因。【结果】*SBEIIb* 编码区的 1 个 SNP (Ex4-96G/A) 引起 1 个氨基酸的替换 (196-Arg/His), 从而产生 2 种等位基因 *SBEIIb-1* 和 *SBEIIb-2*。其中, *SBEIIb-1* 的 Ex4-96G 导致第 196 位氨基酸为 Arg, 表现为高抗性淀粉含量, 为 1.72%。*SSIIa* 第 8 外显子的 2 个 SNPs (Ex8-334G/A 和 Ex8-865C/T) 引起 2 个氨基酸替换 (604-Gly/Ser 和 781-Leu/Phe), 从而产生 3 种等位基因 *SSIIa-1*、*SSIIa-2* 和 *SSIIa-3*。其中, *SSIIa-1* 的 Ex8-334G 和 Ex8-865C 导致第 604 和 781 位氨基酸为 Gly 和 Leu, 表现为高抗性淀粉含量, 为 3.37%。*ISAI* 编码区序列的 1 个 Indel (AGG/---) 和 1 个 SNP (Ex17-117C/T) 导致第 70 位氨基酸 Glu 缺失和第 717 位氨基酸由 Thr 变为 Met, 从而产生 3 种等位基因 *ISAI-1*、*ISAI-2* 和 *ISAI-3*。其中, *ISAI-1* 编码区的 AGG 插入和 Ex17-117C 导致第 70 和 717 位氨基酸为 Glu 和 Thr, 表现为高抗性淀粉含量, 为 2.09%。【结论】*SBEIIb*、*SSIIa* 和 *ISAI* 是影响水稻抗性淀粉形成的重要基因, 这 3 个基因编码区的 SNPs 和 Indels 引起了氨基酸的改变, 继而影响了抗性淀粉的含量, 鉴定到了 3 个高抗性淀粉含量的等位基因 *SBEIIb-1*、*SSIIa-1* 和 *ISAI-1*。

关键词: 水稻; 单片段代换系; 抗性淀粉; 等位基因

中图分类号: S511; S331

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2023)05-0708-10

Identification of resistant starch related genes in rice by single segment substitution lines

LUO Jiarui[✉], ZHU Zhenghang, HAO Qingwen, DING Linyi, ZHU Haitao, ZHANG Guiquan, WANG Shaokui, YANG Weifeng[✉]

(College of Agriculture, South China Agricultural University/Guangdong Provincial Key Laboratory of Plant Molecular Breeding/Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To discover the alleles for high resistance starch in starch-synthesis-related genes *SBEIIb*, *SSIIa* and *ISAI*. 【Method】The single segment substitution lines (SSSLs) carrying the starch-synthesis-related genes *SBEIIb*, *SSIIa* or *ISAI* were detected using molecular markers. Then, the resistant starch contents

收稿日期: 2023-07-31 网络首发时间: 2023-09-12 16:22:33

首发网址: <https://link.cnki.net/urlid/44.1110.S.20230911.1807.003>

作者简介: 罗嘉锐, 硕士研究生, 主要从事抗性淀粉形成机制研究, E-mail: luojiarui25@126.com; 通信作者: 王少奎, 教授, 博士, 主要从事水稻重要农艺性状基因功能及设计育种应用研究, E-mail: shaokuiwang@scau.edu.cn; 杨维丰, 博士, 主要从事稻米品质基因功能及分子设计育种研究, E-mail: yangweifeng31@163.com

基金项目: 国家自然科学基金 (32201841, 32072040); 中国博士后基金 (2021M701265); 岭南现代农业科学与技术广东省实验室开放课题 (NT2021001); 大学生创新创业训练计划 (202310564035)

of the SSSLs were measured using an improved AOAC method. Sanger sequencing and sequence alignment were performed to analyze the sequence variations of *SBEIIb*, *SSIIa* and *ISAI* in different SSSLs. Through linkage analysis of genotypes and phenotypes, the alleles affecting resistance starch content were identified. 【Result】 For *SBEIIb* gene, a single nucleotide polymorphism (SNP) (Ex4-96G/A) in the coding region results in an amino acid substitution (196-Arg/His), generating two alleles *SBEIIb-1* and *SBEIIb-2*. *SBEIIb-1* carrying the Ex4-96G causes Arg at 196th residue, which shows high-resistant starch content of 1.72%. For *SSIIa* gene, two SNPs (Ex8-334G/A and Ex8-865C/T) in the 8th exon cause two amino acid substitutions (604-Gly/Ser and 781-Leu/Phe), generating three alleles *SSIIa-1*, *SSIIa-2* and *SSIIa-3*. *SSIIa-1* carrying the Ex8-334G and Ex8-865C causes Gly and Leu at 604th and 781th residue respectively, which shows high-resistant starch content of 3.37%. One Indel (AGG/---) and one SNP (C/T) in *ISAI* coding region sequence generate three alleles *ISAI-1*, *ISAI-2* and *ISAI-3*. *ISAI-1* carrying AGG-insertion and Ex17-117C causes Glu and Thr at 70th and 717th residue respectively, which shows high-resistant starch content of 2.09%. 【Conclusion】 *SBEIIb*, *SSIIa* and *ISAI* are key genes regulating resistant starch formation in rice. The SNPs and Indels in coding regions of the three genes lead to amino acid variations, which subsequently affects the resistance starch content. The three alleles *SBEIIb-1*, *SSIIa-1* and *ISAI-1* for high-resistant starch content are identified.

Key words: Rice; Single segment substitution line; Resistant starch; Allele

水稻是人类最重要的粮食作物之一，稻米的主要成分是淀粉，为人类提供了丰富的碳水化合物^[1]。随着社会经济的发展和生活水平日益提升，高热量食物在饮食中的占比逐渐增大，从而导致高血糖、高血压和肥胖等慢性疾病的发病率越来越高；糖尿病现已成为威胁人类健康的重大疾病之一^[2]。抗性淀粉是指不能在人的健康小肠中被消化和吸收的淀粉及其降解物，是一种有益于健康的膳食纤维^[3]。抗性淀粉在大肠中可以经过肠道微生物群发酵产生大量对肠道健康有益的短链脂肪酸，以及改善肠道健康。抗性淀粉被认为是一种有益于预防和控制炎症性肠病、II型糖尿病和肥胖等慢性疾病的功能性食品^[4-6]。目前，大多数水稻品种的抗性淀粉含量(w)低于1%，只有极个别品种的抗性淀粉含量接近3%，籼稻品种的抗性淀粉含量高于粳稻^[7-8]。因此，培育高抗性淀粉含量的功能性水稻新品种具有重要的现实意义。

抗性淀粉的形成与水稻胚乳淀粉的生物合成紧密相关，胚乳淀粉是由颗粒结合淀粉合酶、可溶性淀粉合酶、淀粉分支酶和淀粉去分支酶等淀粉合成相关酶协同合成的，抗性淀粉含量同样受到这类酶的调控^[9-11]。这些淀粉合成相关酶的活性直接影响了胚乳直链淀粉和支链淀粉的含量以及淀粉分子链的结构特性，表现出不同胚乳淀粉的理化特性，进而影响了抗性淀粉的形成^[11-13]。相关研究表明，直链淀粉比例较高的胚乳淀粉消化率低，抗性淀粉含量与直链淀粉含量呈正相关^[14]。支链淀粉的

链长也是影响抗性淀粉形成的重要因素，抗性淀粉含量与短支链比例呈显著负相关^[15]，与中长支链比例呈正相关，这是因为中长支链在淀粉晶体结构中形成更稳定的螺旋(B-型淀粉晶体)，从而降低淀粉的消化率^[15-17]。

SBEIIb 基因位于水稻第 2 号染色体上，编码淀粉分支酶 IIb，*SBEIIb* 在淀粉合成过程中支链淀粉簇内的短链形成中起关键作用。‘降糖稻 1 号’是一个高抗性淀粉水稻突变系，‘降糖稻 1 号’的 *SBEIIb* 的 1 个 SNP 引起第 599 位的 Leu 突变为 Pro，导致 *SBEIIb* 酶活性降低，结果促进了抗性淀粉含量的增加^[10]。利用 CRISPR/Cas9 基因编辑获得‘日本晴’和‘IR36’的 *SBEIIb* 突变体，其抗性淀粉含量较野生型增加了将近 10 倍。*SBEIIb* 突变体具有更高的直链淀粉含量及更多的支链淀粉长链，从而具有更高的抗性淀粉含量。*SSIIa* 基因位于水稻第 6 号染色体上，编码可溶性淀粉合成酶 IIa，主要负责合成中等长度的支链淀粉分支，*SSIIa* 第 8 外显子内有 3 个 SNPs，引起氨基酸的改变，并导致了 *SSIIa* 酶活性的变化，进而影响了淀粉的理化性质^[13,18]。*ISAI* 基因位于水稻第 8 号染色体上，编码淀粉去分支酶，去除 α -D-1,6 糖苷键，参与支链淀粉的合成，影响了直链淀粉和支链淀粉的比例^[19-21]。Bao 等^[7]通过对 105 个水稻品种进行全基因组关联分析，鉴定出 4 个水稻抗性淀粉含量候选基因 *Wx*、*SSIIa*、*ISAI* 和 *AGPS1*，这些基因都是水稻胚乳淀粉生物合成相关基因。综上，*SBEIIb*、*SSIIa* 和 *ISAI* 等水稻胚

乳淀粉合成相关基因对抗性淀粉的影响十分显著，因此发掘这些基因中高抗性淀粉含量的等位基因对功能稻分子育种具有非常重要的意义。

染色体单片段代换系 (Single segment substitution line, SSSL) 是指在受体遗传背景中只代换供体的某一段染色体片段，其他遗传背景与受体亲本完全一致。SSSL 排除了遗传背景的干扰，是复杂性状基因定位、克隆以及挖掘有利等位基因的理想材料^[22]。广东省植物分子育种重点实验室以 ‘华粳 74(HJX74)’ 为受体，构建了 43 个不同供体来源的 2360 份 SSSLs，利用这些 SSSLs 定位和克隆了很多与水稻产量和品质相关基因，并利用有利等位基因进行分子设计育种，定向改良水稻产量和品质^[22]。本研究利用携带淀粉合成相关基因 *SBEIIb*、*SSIIa* 或 *ISA1* 的 SSSLs，分析 *SBEIIb*、*SSIIa* 或 *ISA1* 基因的等位变异与抗性淀粉含量的关系，发掘高抗性淀粉含量等位基因，为高抗性淀粉含量的水稻新品种

培育提供理论基础和基因资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料与种植

受体亲本 ‘华粳 74(HJX74)’ 是广东省植物分子育种重点实验室培育的华南地区高产籼稻品种；利用 HJX74 与供体亲本多态性分子标记进行代换片段检测，从 HJX74-SSSL 文库中筛选到 20 份 SSSLs 分别携带淀粉合成相关基因 *SBEIIb*、*SSIIa* 或 *ISA1*，其代换片段来源于不同品种 (表 1)。所有试验材料于 2021 年早季 (2 月下旬至 7 月上旬) 和晚季 (7 月中旬至 11 月上旬) 在华南农业大学科研农场 (中国广州，北纬 23°07′ 东经 113°15′) 种植。每个材料种植 3 个重复小区，完全随机区组，每个小区 2 行，每行 10 株，株距为 16.7 cm，单株插秧，根据广州地区的常规栽培管理措施进行田间栽培和病虫害防治。

表 1 用于本研究的单片段代换系信息
Table 1 The information of SSSLs used in this study

编号 Code	单片段代换系名称 SSSL name	染色体 Chr.	携带的基因 Carrying gene	供体亲本 Donor	亚种类型 Subspecies
04-02	W04-47-61-02-04	2	<i>SBEIIb</i>	BG367	籼稻 <i>Indica</i>
07-02	W07-11-06-04-07-03	2	<i>SBEIIb</i>	苏御糯 Suyunuo	粳稻 <i>Japonica</i>
12-02	W12-09-28-04-01-07-01	2	<i>SBEIIb</i>	IR58025B	籼稻 <i>Indica</i>
15-02	W15-12-10-11-07	2	<i>SBEIIb</i>	American Jasmine	籼稻 <i>Indica</i>
27-02	W27-18-05-08-01	2	<i>SBEIIb</i>	IAPAR9	粳稻 <i>Japonica</i>
02-06	W02-15-01-08-02-05	6	<i>SSIIa</i>	Amol 3	籼稻 <i>Indica</i>
08-06	W08-18-09-09-06-02	6	<i>SSIIa</i>	IR64	籼稻 <i>Indica</i>
12-06	W12-42-42-08-02-04-02	6	<i>SSIIa</i>	IR58025B	籼稻 <i>Indica</i>
14-06	W14-12-03-06-04-08	6	<i>SSIIa</i>	联鉴33 Lianjian33	籼稻 <i>Indica</i>
15-06	W15-06-06-21	6	<i>SSIIa</i>	American Jasmine	籼稻 <i>Indica</i>
18-06	W18-11-01-02-06-06-04	6	<i>SSIIa</i>	IRAT 261	粳稻 <i>Japonica</i>
21-06	W21-23-36-06-07-04-06	6	<i>SSIIa</i>	IR65598	粳稻 <i>Japonica</i>
04-08	W04-10-04-10-07-06	8	<i>ISA1</i>	BG367	籼稻 <i>Indica</i>
05-08	W05-36-75-01-01-06	8	<i>ISA1</i>	籽恢100 Zihui100	籼稻 <i>Indica</i>
07-08	W07-18-05-01-09-03-05	8	<i>ISA1</i>	苏御糯 Suyunuo	粳稻 <i>Japonica</i>
08-08	W08-15-06-05-11	8	<i>ISA1</i>	IR64	籼稻 <i>Indica</i>
09-08	W09-38-60-07-07-11-06	8	<i>ISA1</i>	Basmati 385	籼稻 <i>Indica</i>
11-08	W11-15-08-09-04	8	<i>ISA1</i>	Basmati 370	籼稻 <i>Indica</i>
13-08	W13-30-45-01-10-02-06	8	<i>ISA1</i>	江西丝苗 Jiangxisimiao	籼稻 <i>Indica</i>
14-08	W14-09-06-09-12	8	<i>ISA1</i>	联鉴33 Lianjian33	籼稻 <i>Indica</i>

1.2 SSSLs 的代换片段检测和目标基因测序分析
秧苗移栽 10 d 后，针对 20 个 SSSLs 以及受体

亲本 HJX74 和供体亲本，每种材料取 5 个单株的幼叶，采用 CTAB 法提取基因组 DNA。以合格的

DNA 样品作为模板, 利用 SSR 标记进行 PCR 扩增, 利用 60 g/L 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 PCR 产物, 银染显影后, 以受体亲本 HJX74 和供体亲本为对照, 根据 SSR 的带型来确定 SSSLs 的代换片段位置及长度。然后, 根据目标基因的位置, 筛选出分别携带 *SBEIIb*、*SSIIa* 或 *ISAI* 的 SSSLs。

以‘日本晴’基因组序列为参考序列, 利用引物设计软件 Primer3Plus 对 *SBEIIb*、*SSIIa* 和 *ISAI* 基因序列分别设计特异扩增引物, 然后利用 PCR 扩增 HJX74 和 SSSLs 上的目标基因, 将测序引物和 HJX74 及 SSSLs 目标基因的 PCR 产物送至擎科生物公司进行测序, 利用 SeqMan 软件进行序列拼接和比对分析。

1.3 抗性淀粉含量的测定

利用改良的 AOAC 法^[9] 测定水稻抗性淀粉含量, 具体步骤如下: 1) 取 0.01 g 干燥米粉与 0.4 mL 混合作液 (10 mg/mL 胰 α-淀粉酶、3 U/mL 淀粉葡萄糖苷酶) 充分混匀后, 在 37 °C 恒温震荡摇床中孵育 12 h(200 r/min); 2) 加入 0.4 mL 无水乙醇充分混匀后离心 10 min(13 000 r/min, 4 °C); 3) 倒去上清液, 加入 0.8 mL 体积分数为 50% 的乙醇溶液充分混匀后离心 10 min(13 000 r/min, 4 °C); 4) 重复步骤 3) 1 次, 倒尽上清液后烘干沉淀; 5) 加入钢珠和 2 mol/L 的 KOH 溶液 0.2 mL 碾磨 60 s, 冷却 10 min 后再次碾磨 60 s; 6) 加入 0.8 mL 醋酸钠缓冲液 (1.2 mol/L, pH=3.8) 和 0.01 mL 淀粉葡萄糖苷酶溶液 (1650 U/mL), 在 50 °C 水浴中孵育 30 min, 每隔 10 min 摇匀 1 次; 7) 离心 10 min(13 000 r/min, 4 °C), 收集上清液; 8) 利用 GOPOD 法测定上清液中的葡萄糖质量浓度, 再用如下公式计算样品抗性淀粉含量 (w)。

$$w = \frac{\text{葡萄糖质量浓度} \times 1.03 \times 0.9}{10.0 \times 1\,000} \times 100\%,$$

式中: 葡萄糖质量浓度单位为 μg/mL; 1.03 为溶液体积, 单位为 mL; 0.9 为淀粉的水解系数; 10.0 为样品的质量, 单位为 mg; 1 000 是将样品质量单位 mg 转变为 μg 的转换系数。

1.4 数据分析和作图

利用 Microsoft Excel 2016 和 SPSS 23.0 进行数据收集和统计分析; 用 MapChart、Origin 2018、Microsoft PowerPiont 2016 和 Adobe Illustrator 2018 进行绘图。采用 Dunnett’s *t*-test 比较分析每个 SSSLs 抗性淀粉含量与对照 HJX74 的差异显著性; 采用 Duncan’s 法多重比较分析携带同一基因座的不同 SSSLs 间的抗性淀粉含量差异显著性。利用 SMART 数据库 (<http://smart.embl-heidelberg>。

[de/](#)) 预测蛋白的功能结构域, 利用 SWISS-MODEDL 数据库 (<https://swissmodel.expasy.org/>) 进行蛋白的三维同源性建模绘图。

2 结果与分析

2.1 携带 *SBEIIb*、*SSIIa* 或 *ISAI* 的 SSSLs 鉴定及抗性淀粉含量分析

2021 年早季对筛选到的 20 份分别携带了不同供体来源的 *SBEIIb*、*SSIIa* 或 *ISAI* 的 SSSLs 的代换片段进行检测分析。其中: 5 份 SSSLs(04-02、07-02、12-02、15-02 和 27-02) 的代换片段位于第 2 号染色体上, 与 *SBEIIb* 基因座位重叠, 这 5 份 SSSLs 的代换片段长度分别为 7.64、12.81、2.77、7.74 和 5.17Mb (图 1); 7 份 SSSLs(02-06、08-06、12-06、14-06、15-06、18-06 和 21-06) 的代换片段位于第 6 号染色体上, 与 *SSIIa* 基因座位重叠, 这 7 份 SSSLs 的代换片段长度分别为 2.92、12.05、3.03、2.73、4.22、6.82 和 6.59 Mb(图 1); 8 份 SSSLs(04-08、05-08、07-08、08-08、09-08、11-08、13-08 和 14-08) 的代换片段位于第 8 号染色体上, 与 *ISAI* 基因座位重叠, 这 8 份 SSSLs 的代换片段长度分别为 3.28、3.86、5.63、4.54、3.53、4.66、4.97 和 5.64 Mb(图 1)。

在 2021 年早季和晚季, 分别对这 20 份 SSSLs 和 HJX74 进行抗性淀粉含量检测分析。HJX74 在早季和晚季的抗性淀粉含量分别为 0.76% 和 0.68%, 20 份 SSSLs 的抗性淀粉含量的差异很大, 在早季和晚季的变异范围分别为 0.61%~3.32% 和 0.67%~3.41%。其中, 12 份 SSSLs 的抗性淀粉含量与 HJX74 一样低, 没有显著差异; 8 份 SSSLs(04-02、12-02、15-02、08-06、21-06、08-08、09-08 和 11-08) 的抗性淀粉含量都极显著高于 HJX74, 在早季和晚季分别在 1.02%~3.32% 和 1.12%~3.41% (图 2)。结果表明, 这 20 份 SSSLs 的抗性淀粉含量存在丰富的变异, *SBEIIb*、*SSIIa* 和 *ISAI* 基因影响稻米抗性淀粉的形成, 不同供体来源的 *SBEIIb*、*SSIIa* 和 *ISAI* 对抗性淀粉含量的影响差异很大。

2.2 *SBEIIb* 的等位变异对抗性淀粉含量的影响

对 HJX74 和位于第 2 号染色体上的 5 份 SSSLs(04-02、07-02、12-02、15-02 和 27-02) 的 *SBEIIb* 基因序列进行测序分析。结果发现, HJX74 和这 5 份 SSSLs 在 *SBEIIb* 的编码区序列中存在 4 个单核苷酸差异 (SNPs), 可分为 3 种单倍型。4 个 SNPs 中, 只有位于第 4 外显子的第 96 碱基由 G 变为 A, 导致第 196 位氨基酸由 Arg 变为 His。结合 HJX74 和 5 份 SSSLs 的 *SBEIIb* 基因序列和表

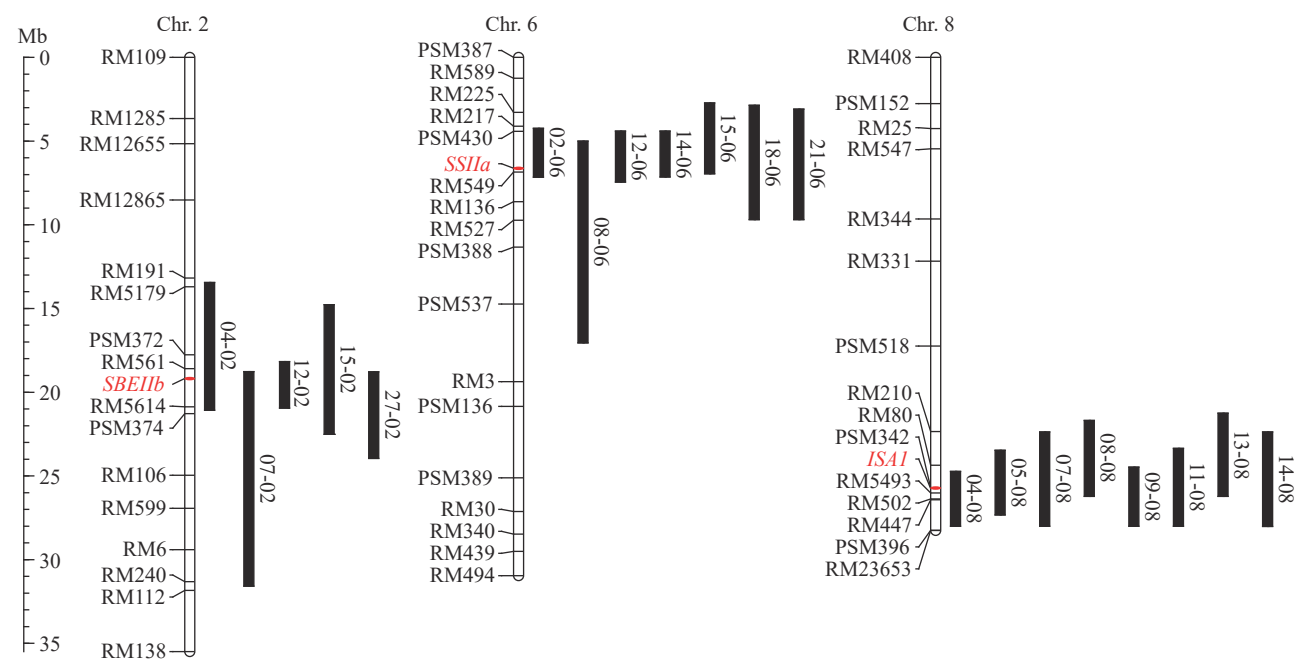


图 1 分别携带 *SBEIIb*、*SSIIa* 和 *ISA1* 的 SSSLs 代换片段长度及在 HJX74 染色体上的位置

Fig. 1 The lengths of the target substituted segments of SSSLs carrying *SBEIIb*, *SSIIa* and *ISA1*, respectively, and their positions on the chromosomes of HJX74

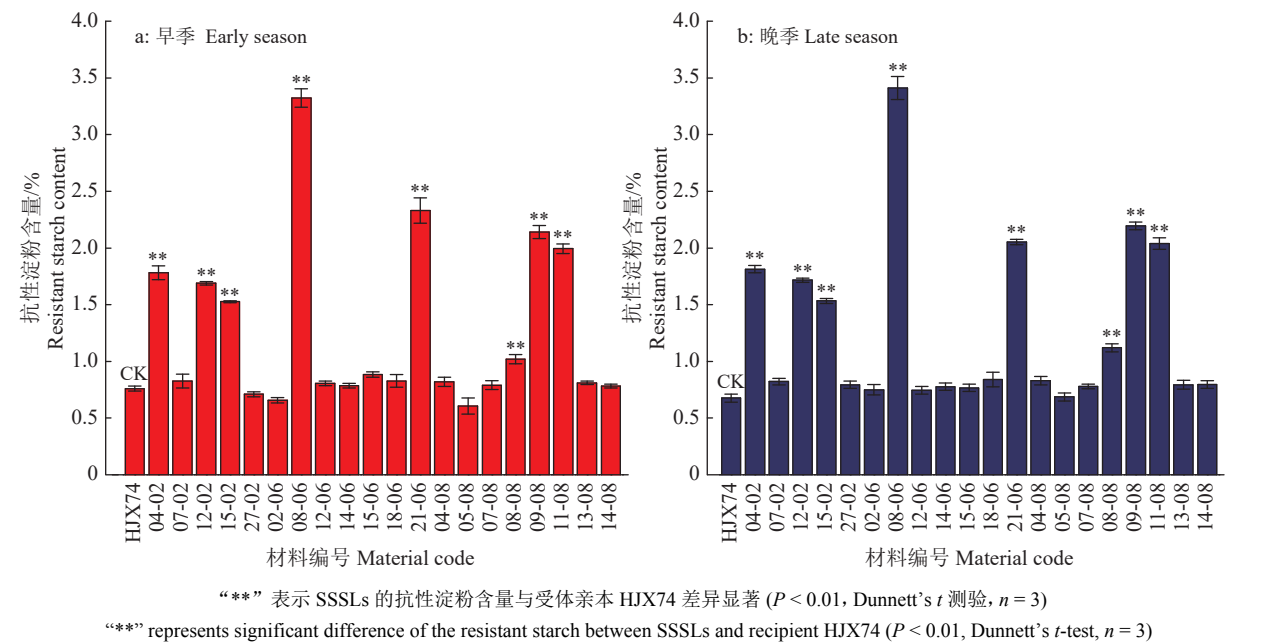


图 2 分别携带 *SBEIIb*、*SSIIa* 和 *ISA1* 的 SSSLs 的抗性淀粉含量

Fig. 2 The resistant starch contents of the SSSLs carrying *SBEIIb*, *SSIIa* and *ISA1*, respectively

型变异连锁分析,可将这 6 个材料的 3 种单倍型分为 2 种等位基因,分别为 *SBEIIb-1* 和 *SBEIIb-2*。携带 *SBEIIb-1* 的 04-02、12-02 和 15-02 的抗性淀粉含量在 1.63%~1.82% 之间;携带 *SBEIIb-2* 的 HJX74、07-02 和 27-02 的抗性淀粉含量在 0.72%~0.82% 之间(表 2、图 3a)。结果表明, *SBEIIb-1* 的抗性淀粉含量显著高于 *SBEIIb-2*。SBEIIb 蛋白有 3 个功能结构域 CBM_48、Alpha-amylase 和 Alpha-amylase_C, 功能域 CBM_48 具有水解酶活性功能,196-Arg/His 氨基酸变异位于功能域 CBM_48 中,可能影响了 SBEIIb 酶活性(图 3b)。 *SBEIIb-1* 和 *SBEIIb-2* 编码的两个等位变异蛋白的三级结构没有差异(图 3c)。

2.3 *SSIIa* 的等位变异影响抗性淀粉含量

对 HJX74 和位于第 6 号染色体上的 7 份 SSSLs (02-06、08-06、12-06、14-06、15-06、18-06 和 21-

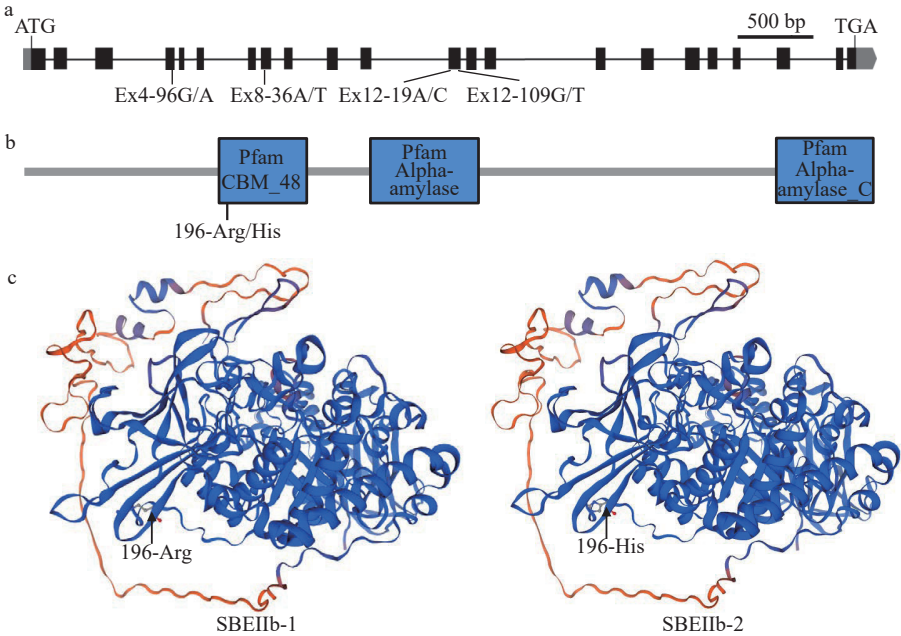
表 2 SSSLs 中的不同 *SBEIIb* 等位基因的基因型和表型

Table 2 Genotypes and phenotypes of different *SBEIIb* alleles in SSSLs

编号 Code	Ex4-96 (P.196)	Ex8-36 (P.270)	Ex12-19 (P.412)	Ex12-109 (P.442)	单倍型 Haplotype	等位基因 Allele	w(抗性淀粉) ¹⁾ /% Resistant starch content
04-02	CGC (Arg)	TCA (Ser)	ACA (Thr)	CTG (Leu)	HT-1	<i>SBEIIb-1</i>	1.82±0.03A
12-02	CGC (Arg)	TCA (Ser)	ACA (Thr)	CTG (Leu)	HT-1	<i>SBEIIb-1</i>	1.71±0.01A
15-02	CGC (Arg)	TCA (Ser)	ACA (Thr)	CTG (Leu)	HT-1	<i>SBEIIb-1</i>	1.63±0.05A
HJX74	CAC (His)	TCA (Ser)	ACA (Thr)	CTG (Leu)	HT-2	<i>SBEIIb-2</i>	0.72±0.03B
07-02	CAC (His)	TCT (Ser)	ACC (Thr)	CTT (Leu)	HT-3	<i>SBEIIb-2</i>	0.82±0.03B
27-02	CAC (His)	TCT (Ser)	ACC (Thr)	CTT (Leu)	HT-3	<i>SBEIIb-2</i>	0.75±0.03B

1) 抗性淀粉含量数据为早、晚季的平均值±标准误($n=6$); 该列数据后的不同大写字母表示显著差异($P<0.01$, Duncan’s法)

1) The data of resistant starch content are represented as mean ± SE of the early and late seasons ($n=6$); Different uppercase letters of this column indicate significant differences ($P<0.01$, Duncan’s test)



a: *SBEIIb* 的基因结构示意图; b: *SBEIIb* 蛋白的功能结构域示意图; c: *SBEIIb* 的等位变异蛋白的三维同源性建模

a: Gene structure schematic of *SBEIIb*; b: The schematic illustration of *SBEIIb* protein functional domains; c: Three-dimensional homology modeling of allelic variant proteins of *SBEIIb*

图 3 SSSLs 中的 *SBEIIb* 等位变异

Fig. 3 The allelic variations of *SBEIIb* in SSSLs

06) 的 *SSIIa* 基因序列进行测序分析。结果发现 HJX74 和这 7 份 SSSLs 在 *SSIIa* 的第 8 外显子中有 4 个 SNPs, 即 G/A、G/T、G/T 和 C/T, 可分为 3 种单倍型。在第 8 外显子的 4 个 SNPs 中, 位于第 334 碱基由 G 变为 A, 导致第 604 位氨基酸由 Gly 变为 Ser; 位于第 865 碱基由 C 变为 T, 导致第 781 位氨基酸由 Leu 变为 Phe。结合 HJX74 和 7 份 SSSLs 的 *SSIIa* 基因序列和表型变异连锁分析, 可将这 8 个材料的 3 种单倍型分为 3 种等位基因, 分别为 *SSIIa-1*、*SSIIa-2* 和 *SSIIa-3*。携带 *SSIIa-1* 等位基因的 08-06 抗性淀粉含量为 3.37%, 显著高于其

他材料; 携带 *SSIIa-2* 等位基因的 21-06 抗性淀粉含量次之, 为 2.19%; 携带 *SSIIa-3* 等位基因的 02-06、12-06、14-06、15-06、18-06 和 HJX74 的抗性淀粉含量最低, 在 0.71%~0.83% 之间 (表 3、图 4a)。 *SSIIa* 蛋白有 2 个功能结构域 Glyco_transf_5 和 Glycos_transf_1, Glyco_transf_5 为淀粉合成酶的催化结构域, Glycos_transf_1 具有糖基转移酶的作用, 604-Gly/Ser 位于 2 个功能域之间, 781-Leu/Phe 紧挨着功能域 Glycos_transf_1 的 C 端 (图 4b)。 *SSIIa-1*、*SSIIa-2* 和 *SSIIa-3* 编码的 3 个等位变异蛋白的三级结构没有差异 (图 4c)。

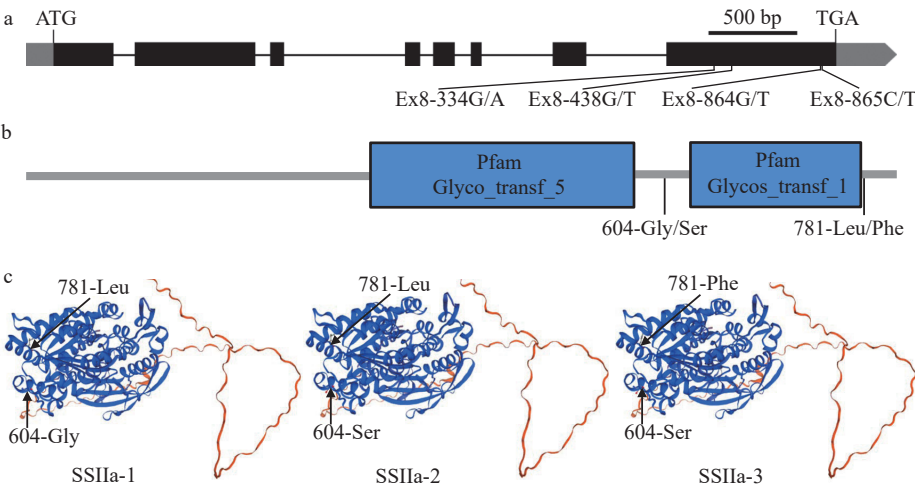
表 3 SSSLs 中的不同 *SSIIa* 等位基因的基因型和表型

Table 3 Genotypes and phenotypes of different *SSIIa* alleles in SSSLs

编号 Code	Ex8-334 (P.604)	Ex8-438 (P.638)	Ex8-864 (P.780)	Ex8-865 (P.781)	单倍型 Haplotype	等位基因 Allele	w(抗性淀粉) ¹⁾ % Resistant starch content
08-06	GGC (Gly)	GGG (Gly)	GGG (Gly)	CTC (Leu)	HT-1	<i>SSIIa-1</i>	3.37±0.06A
21-06	AGC (Ser)	GGT (Gly)	GGG (Gly)	CTC (Leu)	HT-2	<i>SSIIa-2</i>	2.19±0.08B
02-06	AGC (Ser)	GGT (Gly)	GGT (Gly)	TTC (Phe)	HT-3	<i>SSIIa-3</i>	0.71±0.03C
12-06	AGC (Ser)	GGT (Gly)	GGT (Gly)	TTC (Phe)	HT-3	<i>SSIIa-3</i>	0.77±0.02C
14-06	AGC (Ser)	GGT (Gly)	GGT (Gly)	TTC (Phe)	HT-3	<i>SSIIa-3</i>	0.78±0.02C
15-06	AGC (Ser)	GGT (Gly)	GGT (Gly)	TTC (Phe)	HT-3	<i>SSIIa-3</i>	0.82±0.03C
18-06	AGC (Ser)	GGT (Gly)	GGT (Gly)	TTC (Phe)	HT-3	<i>SSIIa-3</i>	0.83±0.04C
HJX74	AGC (Ser)	GGT (Gly)	GGT (Gly)	TTC (Phe)	HT-3	<i>SSIIa-3</i>	0.72±0.03C

1) 抗性淀粉含量数据为早、晚季的平均值±标准误($n=6$); 该列数据后的不同大写字母表示显著差异($P<0.01$, Duncan's法)

1) The data of resistant starch content are represented as mean ± SE of the early and late seasons ($n=6$); Different uppercase letters of this column indicate significant differences ($P<0.01$, Duncan's test)



a: *SSIIa* 的基因结构示意图; b: *SSIIa* 蛋白的功能结构域示意图; c: *SSIIa* 的等位变异蛋白的三维同源性建模

a: Gene structure schematic of *SSIIa*; b: The schematic illustration of *SSIIa* protein functional domains; c: Three-dimensional homology modeling of allelic variant proteins of *SSIIa*

图 4 SSSLs 中的 *SSIIa* 等位变异

Fig. 4 The allelic variations of *SSIIa* in SSSLs

2.4 *ISA1* 的等位变异及对抗性淀粉含量的影响

对 HJX74 和位于第 8 号染色体的 8 份 SSSLs (04-08、05-08、07-08、08-08、09-08、11-08、13-08 和 14-08) 的 *ISA1* 基因序列进行测序分析。结果发现 HJX74 和这 8 份 SSSLs 的 *ISA1* 编码区序列存在 1 个 Indel 和 4 个 SNPs, 即 AGG/---、C/T、C/T、C/T 和 G/T, 可分为 4 种单倍型。第 1 外显子的第 209~211 的 3 个碱基缺失, 导致第 70 位氨基酸 Glu 缺失; 位于第 17 外显子的第 117 碱基由 C 变为 T, 导致第 717 位氨基酸由 Thr 变为 Met。结合 HJX74 和这 8 份 SSSLs 的 *ISA1* 基因序列和表型变异连锁分析, 可将这 9 个材料的 4 种单倍型分为 3 种等位基因, 分别为 *ISA1-1*、*ISA1-2* 和 *ISA1-3*。携

带 *ISA1-1* 等位基因的 09-08 和 11-08 抗性淀粉含量分别为 2.17% 和 2.02%, 显著高于其他材料; 携带 *ISA1-2* 等位基因的 08-08 抗性淀粉含量为 1.07%; 携带 *ISA1-3* 等位基因的 05-08、13-08、14-08、04-08、07-08 和 HJX74 的抗性淀粉含量在 0.65%~0.83% 之间 (表 4、图 5a)。ISA1 蛋白有 2 个功能结构域 CBM_48 和 Alpha-amylase, CBM_48 具有水解酶活性, Alpha-amylase 是催化活性功能域, 70-Glu/—紧挨着功能域 CBM_48 的 N 端, 717-Thr/Met 位于 ISA1 蛋白的 C 端 (图 5b)。ISA1-3 编码的蛋白缺失了 1 个氨基酸 Glu, 与 ISA1-1、ISA1-2 编码的等位变异蛋白的三级结构有略微差异 (图 5c)。

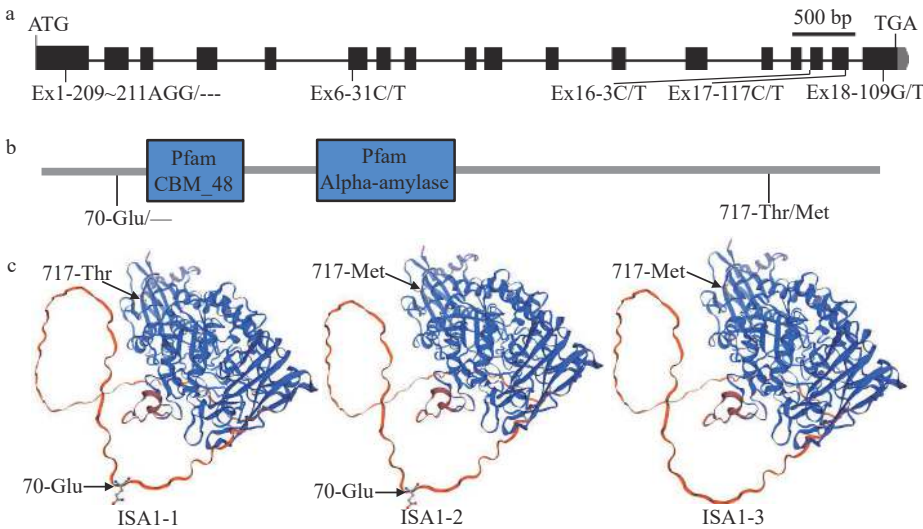
表 4 SSSLs 中的不同 *ISA1* 等位基因的基因型和表型

Table 4 Genotypes and phenotypes of different *ISA1* alleles in SSSLs

编号 Code	Ex1-209~211 (P.70~71)	Ex6-31 (P.336)	Ex16-3 (P.353)	Ex17-117 (P.717)	Ex18-109 (P.777)	单倍型 Haplotype	等位基因 Allele	w(抗性淀粉) ¹⁾ % Resistant starch content
09-08	GAGGGT (Glu-Gly)	AAC (Asn)	GTC (Val)	ACG (Thr)	CTG (Leu)	HT-1	<i>ISA1-1</i>	2.17±0.03A
11-08	GAGGGT (Glu-Gly)	AAC (Asn)	GTC (Val)	ACG (Thr)	CTG (Leu)	HT-1	<i>ISA1-1</i>	2.02±0.04A
08-08	GAGGGT (Glu-Gly)	AAT (Asn)	GTT (Val)	ATG (Met)	CTG (Leu)	HT-2	<i>ISA1-2</i>	1.07±0.03B
HJX74	G---GT (Gly)	AAT (Asn)	GTT (Val)	ATG (Met)	CTG (Leu)	HT-3	<i>ISA1-3</i>	0.72±0.03C
05-08	G---GT (Gly)	AAT (Asn)	GTT (Val)	ATG (Met)	CTG (Leu)	HT-3	<i>ISA1-3</i>	0.65±0.04C
13-08	G---GT (Gly)	AAT (Asn)	GTT (Val)	ATG (Met)	CTG (Leu)	HT-3	<i>ISA1-3</i>	0.81±0.02C
14-08	G---GT (Gly)	AAT (Asn)	GTT (Val)	ATG (Met)	CTG (Leu)	HT-3	<i>ISA1-3</i>	0.79±0.03C
04-08	G---GT (Gly)	AAT (Asn)	GTT (Val)	ATG (Met)	CTT (Leu)	HT-4	<i>ISA1-3</i>	0.83±0.02C
07-08	G---GT (Gly)	AAT (Asn)	GTT (Val)	ATG (Met)	CTT (Leu)	HT-4	<i>ISA1-3</i>	0.77±0.02C

1) 抗性淀粉含量数据为早、晚季的平均值±标准误($n=6$); 该列数据后的不同大写字母表示显著差异($P<0.01$, Duncan's法)

1) The data of resistant starch content are represented as mean ± SE of the early and late seasons ($n=6$); Different uppercase letters of this column indicate significant differences ($P<0.01$, Duncan's test)



a: *ISA1* 的基因结构示意图; b: *ISA1* 蛋白的功能结构域示意图; c: *ISA1* 的等位变异蛋白的三维同源性建模

a: Gene structure schematic of *ISA1*; b: The schematic illustration of *ISA1* protein functional domains; c: Three-dimensional homology modeling of allelic variant proteins of *ISA1*

图 5 SSSLs 中的 *ISA1* 等位变异

Fig. 5 The allelic variations of *ISA1* in SSSLs

3 讨论与结论

前人利用突变体材料研究表明, *SBEIIb*、*SSIIa* 和 *ISA1* 等水稻胚乳淀粉生物合成相关基因影响了胚乳淀粉的理化性质, 进而影响了抗性淀粉的形成^[10-11, 14, 23]。本研究利用 HJX74-SSSL 文库材料筛选到 20 份 SSSLs 分别携带了供体来源的 *SBEIIb*、*SSIIa* 或 *ISA1* 的基因座位。这 20 份 SSSLs 的抗性淀粉含量在 0.61%~3.41% 之间, 其中有 8 份 SSSLs 的抗性淀粉含量显著高于 HJX74, 在 1.02%~3.41% 之间, 表现出高抗性淀粉含量。综

上结果表明, 淀粉生物合成相关基因 *SBEIIb*、*SSIIa* 和 *ISA1* 与抗性淀粉含量密切相关, 而且存在不同的自然等位变异, 影响抗性淀粉含量。*SBEIIb* 对支链淀粉短链的合成至关重要, 同时也是影响抗性淀粉形成的关键基因^[24-25]。很多研究者利用 T-DNA 或 CRISPR/Cas9 等技术获得 *SBEIIb* 功能缺失的高抗性淀粉突变体, *SBEIIb* 酶活性丧失, 使得支链淀粉短链合成受阻, 导致直链淀粉含量显著增加, 中长支链淀粉链比例增加, 继而导致抗性淀粉含量增加 10 倍左右, 说明 *SBEIIb* 负调控抗性淀粉含量^[12, 26-28]。本研究鉴定到 2 种影响抗性淀粉

含量的 *SBEIIb* 等位基因 *SBEIIb-1* 和 *SBEIIb-2*。*SBEIIb-1* 和 *SBEIIb-2* 在第 4 外显子的第 96 碱基 G/A 突变, 引起 196-Arg 变为 196-His, 196-Arg/His 位于功能域 CBM₄₈, 与水解酶活性相关。196-Arg 可能导致 *SBEIIb-1* 酶活性降低, 支链淀粉短链比例降低, 继而提高抗性淀粉含量。

SSIIa 基因编码可溶性淀粉合成酶 IIa, 是一个控制糯米糊化温度的主效基因 (*ALK*)^[29]。根据第 8 外显子的 2 个 SNPs(G/A 和 C/T) 将 *ALK* 分为 3 种等位基因, *ALK^a*(A-C) 和 *ALK^b*(G-T) 等位基因编码的 *SSIIa* 酶具有约 10% 的活性, 而 *ALK^c*(G-C) 等位基因编码强活性的 *SSIIa* 酶, 2 个 SNPs 影响了 *SSIIa* 酶活性^[29-30]。*SSIIa* 酶负责合成支链淀粉中的中长分支, 中长支链比例高的淀粉更容易形成高结晶度的淀粉晶体 (B-型淀粉晶体), 很难被消化降解, 进而增加抗性淀粉含量^[7, 11, 31]。本研究鉴定到 *SSIIa* 的 3 种等位基因 *SSIIa-1*、*SSIIa-2* 和 *SSIIa-3* 影响抗性淀粉含量, 这 3 个等位基因在第 8 外显子存在 2 个 SNPs(Ex8-334G/A 和 Ex8-865C/T) 引起 2 个氨基酸的序列变异 (604-Gly/Ser 和 781-Leu/Phe)。其中, *SSIIa-1* 的 Ex8-334G 和 Ex8-865C 导致第 604 和 781 位氨基酸分别为 Gly 和 Leu, 表现为高抗性淀粉含量, 为 3.37%。以上结果表明, 2 个位点 (604-Gly/Ser 和 781-Leu/Phe) 的氨基酸变异影响了抗性淀粉的含量。781-Leu/Phe 紧挨着功能域 Glycos_{transf_1} 的 C 端。有研究表明, 781-Leu/Phe 是影响 *SSIIa* 酶催化活性的关键位点, 781-Leu 的酶活性显著高于 781-Phe; 604-Gly/Ser 对 *SSIIa* 酶催化活性起到修饰作用, 604-Gly 的酶活性要略高于 604-Ser^[32]。*SSIIa-1* 表现出高抗性淀粉含量, 可能是因为 *SSIIa-1* 编码的 *SSIIa* 酶 (604-Gly 和 781-Leu) 具有较强的催化活性, 促进了支链淀粉中的中长链比例显著增加, 继而导致抗性淀粉含量增加。

Bao 等^[7] 通过全基因组关联分析, 鉴定到抗性淀粉相关候选基因 *ISA1*。*ISA1* 编码淀粉去分支酶, 去除 α -D-1,6-糖苷键, 影响和修饰支链淀粉的链长分布和分子特性, 增加了直链淀粉和支链淀粉的比例, 从而影响抗性淀粉的含量, 进而推测 *ISA1* 与抗性淀粉有关^[7, 21, 23]。本研究鉴定到 *ISA1* 的 3 种等位基因 *ISA1-1*、*ISA1-2* 和 *ISA1-3*, 其抗性淀粉含量分别为 2.09%、1.07% 和 0.76%。这 3 个等位基因编码区序列的 1 个 Indel(AGG/---) 和 1 个 SNP (Ex17-117C/T), 导致第 70 位氨基酸 Glu 缺失和第 717 位氨基酸由 Thr 变为 Met, *ISA1* 蛋白 N 端的

70-Glu 缺失引起了蛋白三级结构的微小差异。*ISA1-1* 编码区的 AGG 插入和 Ex17-117C 导致第 70 和 717 位氨基酸为 Glu 和 Thr, 表现为高抗性淀粉含量。综上结果表明, *ISA1* 的 2 个变异位点 Indel(AGG/---) 和 SNP(Ex17-117C/T) 都影响了 *ISA1* 蛋白功能, 进而影响抗性淀粉含量, 产生 3 种不同的等位基因。

目前, 大多数水稻品种的抗性淀粉含量低于 1%, 只有极个别品种的抗性淀粉含量能接近 3%^[7, 33]。近年来, 通过理化诱变、RNA 干扰和基因编辑技术创制了多个与 *SBEIIa*、*SBEIIb* 和 *SSIIa* 等淀粉合成相关基因突变的高抗性淀粉材料和品系, 其抗性淀粉含量大都在 10% 左右, 高抗性淀粉突变体材料往往表现出产量低和较差的蒸煮食味品质, 很难直接应用于培育新品种^[10-12, 14]。广东省植物分子育种重点实验室已构建了 HJX74-SSSL 分子设计育种平台, 设计聚合了不同优异性状的等位基因, 培育了多个高产、优质和多抗的新品种 (系)^[22]。因此, 基于 HJX74-SSSL 分子设计育种平台, 利用本研究鉴定到的 3 个自然变异的高抗性淀粉含量的等位基因 *SBEIIb-1*、*SSIIa-1* 和 *ISA1-1* 对高产、优质和多抗的水稻品种 (系) 再进行定向改良, 将是培育高抗性淀粉含量水稻新品种的有效途径。

参考文献:

- [1] KHUSH G S. What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030[J]. *Plant Molecular Biology*, 2005, 59(1): 1-6.
- [2] ZOU W, BUTARDO V M, TOUTOUNJI M, et al. Harnessing particle disintegration of cooked rice grains for predicting glycaemic index[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 248: 116789.
- [3] RAIGOND P, EZEKIEL R, RAIGOND B. Resistant starch in food: A review[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2015, 95(10): 1968-1978.
- [4] 胡时开, 胡培松. 功能稻米研究现状与展望[J]. *中国水稻科学*, 2021, 35(4): 311-325.
- [5] 郑宝东, 王琦, 郑亚凤, 等. 抗性淀粉的生物学功效及在食品加工中的应用[J]. *食品科学技术学报*, 2015, 33(5): 1-7.
- [6] 朱平, 孔祥礼, 包劲松. 抗性淀粉在食品中的应用及功效研究进展[J]. *核农学报*, 2015, 29(2): 327-336.
- [7] BAO J, ZHOU X, XU F, et al. Genome-wide association study of the resistant starch content in rice grains[J]. *Starch - Stärke*, 2017, 69(7/8): 1600343.
- [8] 林静, 张云辉, 张所兵, 等. 水稻地方品种高抗性淀粉含量 QTL 挖掘与定位[J]. *江苏农业科学*, 2021, 49(23): 58-61.
- [9] 魏霞, 徐延浩, 丁保森, 等. 抗性淀粉及其遗传改良研究进展[J]. *长江大学学报(自然科学版)*, 2019, 16(8): 101-107.

[10] YANG R, BAI J, FANG J, et al. A single amino acid mutation of *OsSBEIIb* contributes to resistant starch accumulation in rice[J]. *Breeding Science*, 2016, 66(4): 481-489.

[11] SHEN L, LI J, LI Y. Resistant starch formation in rice: Genetic regulation and beyond[J]. *Plant Communications*, 2022, 3(3): 100329.

[12] SUN Y, JIAO G, LIU Z, et al. Generation of high-amylose rice through CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of starch branching enzymes[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 298.

[13] ZHANG G, CHENG Z, ZHANG X, et al. Double repression of soluble starch synthase genes *SSIIa* and *SSIIIa* in rice (*Oryza sativa* L.) uncovers interactive effects on the physicochemical properties of starch[J]. *Genome*, 2011, 54(6): 448-459.

[14] ZHOU H, WANG L, LIU G, et al. Critical roles of soluble starch synthase *SSIIIa* and granule-bound starch synthase *Waxy* in synthesizing resistant starch in rice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(45): 12844-12849.

[15] PAN L, CHEN F, YANG Y, et al. The underlying starch structures of rice grains with different digestibilities but similarly high amylose contents[J]. *Food Chemistry*, 2022, 379: 132071.

[16] LEHMANN U, ROBIN F. Slowly digestible starch—its structure and health implications: A review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2007, 18(7): 346-355.

[17] RAMADOSS B R, GANGOLA M P, AGASIMANI S, et al. Starch granule size and amylopectin chain length influence starch in vitro enzymatic digestibility in selected rice mutants with similar amylose concentration[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2019, 56(1): 391-400.

[18] 姚姝, 张亚东, 路凯, 等. 水稻可溶性淀粉合成酶基因 *SSIIa* 和 *SSIIIa* 的功能、等位变异及其互作研究进展[J]. *中国水稻科学*, 2022, 36(3): 227-236.

[19] 方结红, 张明洲, 刘军, 等. 水稻 *ISA1* 基因的克隆与分析[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(9): 4440-4441.

[20] CHAO S F, CAI Y C, FENG B B, et al. Editing of rice isoamylase gene *ISA1* provides insights into its function in starch formation[J]. *Rice Science*, 2019, 26(2): 77-87.

[21] FUJITA N, KUBO A, SUH D, et al. Antisense inhibition of isoamylase alters the structure of amylopectin and the physicochemical properties of starch in rice endosperm[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2003, 44(6): 607-618.

[22] 张桂权. 基于 SSSL 文库的水稻设计育种平台[J]. *遗传*, 2019, 41(8): 754-760.

[23] KAWAGOE Y, KUBO A, SATOH H, et al. Roles of isoamylase and ADP-glucose pyrophosphorylase in starch granule synthesis in rice endosperm[J]. *The Plant Journal*, 2005, 42(2): 164-174.

[24] SAWADA T, ITOH M, NAKAMURA Y. Contributions of three starch branching enzyme isozymes to the fine structure of amylopectin in rice endosperm[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 1536.

[25] MIURA S, KOYAMA N, CROFTS N, et al. Generation and starch characterization of non-transgenic BEI and BEIIb double mutant rice (*Oryza sativa*) with ultra-high level of resistant starch[J]. *Rice*, 2021, 14(1): 3.

[26] GUO D, LING X, ZHOU X, et al. Evaluation of the quality of a high-resistant starch and low-glutelin rice (*Oryza sativa* L.) Generated through CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(36): 9733-9742.

[27] YANG R, SUN C, BAI J, et al. A putative gene *sbe3-rs* for resistant starch mutated from *SBE3* for starch branching enzyme in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43026.

[28] BUTARDO V M, FITZGERALD M A, BIRD A R, et al. Impact of down-regulation of starch branching enzyme IIb in rice by artificial microRNA- and hairpin RNA-mediated RNA silencing[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(14): 4927-4941.

[29] GAO Z, ZENG D, CHENG F, et al. *ALK*, the key gene for gelatinization temperature, is a modifier gene for gel consistency in rice[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2011, 53(9): 756-765.

[30] CHEN Z, LU Y, FENG L, et al. Genetic dissection and functional differentiation of *ALK^a* and *ALK^b*, two natural alleles of the *ALK/SSIIa* gene, responding to low gelatinization temperature in rice[J]. *Rice*, 2020, 13(1): 39.

[31] YOU H, LIANG C, ZHANG O, et al. Variation of resistant starch content in different processing types and their starch granules properties in rice[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2022, 276: 118742.

[32] NAKAMURA Y, FRANCISCO P B, HOSAKA Y, et al. Essential amino acids of starch synthase IIa differentiate amylopectin structure and starch quality between *japonica* and *indica* rice varieties[J]. *Plant Molecular Biology*, 2005, 58(2): 213-227.

[33] 张风琴, 于雪然, 李玲, 等. 基于高密度遗传图谱对水稻抗性淀粉 QTL 定位及分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2023, 24(4): 1075-1084.

【责任编辑 庄 延】