

# 水稻低谷蛋白创新种质的选育和鉴定

张云辉, 张所兵, 周金云亮, 林静, 汪迎节, 方先文

(江苏省农业科学院粮食作物研究所, 南京 210014)

**摘要:**谷蛋白是水稻种子中含量最高的贮藏蛋白, 占种子总蛋白的70%以上, 是稻米蛋白中可供人体吸收的主要成分。低谷蛋白稻米可以满足肾脏病人和并发肾脏机能损害的糖尿病患者蛋白代谢方面的特殊需求, 因此培育适合肾脏病人食用的低谷蛋白品种已成为水稻遗传改良的重要目标。本研究通过引进日本低谷蛋白品种LGC-1, 于2009年配置其与江苏高产优质粳稻武育粳3号的杂交组合, 经过6代自交和农艺性状筛选结合分子标记辅助选择, 于2013年选育出3个低谷蛋白新品系。经分子标记检测、种子总蛋白SDS-PAGE分析和谷蛋白含量测定表明, 这3个品系谷蛋白含量均降至LGC-1水平, 显著低于普通推广品种, 且农艺性状表现优异, 为水稻低谷蛋白新品种选育提供了优良的新种质。

**关键词:**水稻; 低谷蛋白; 品种创新; 分子标记辅助选择

## Enhancement and Identification of New Rice Germplasms with Low Glutelin Content

ZHANG Yun-hui, ZHANG Suo-bing, ZHOU Jin-yun-liang, LIN Jing, WANG Ying-jie, FANG Xian-wen

(Institute of Food Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014)

**Abstract:** Glutelin is the most abundant storage protein in rice seeds, accounting for over 70% of the total seed protein, as well as the major rice protein absorbed. Rice with low glutelin content (LGC) is suitable for the special needs of patients suffering from diabetes and kidney failure. Therefore, breeding rice with low glutelin content has become an important goal for rice genetic improvement. To improve the LGC rice variety, LGC-1, a LGC variety from Japan, was used to cross with Wuyujing 3, a japonica variety with high yield and quality in Jiangsu province. Three new LGC rice strains ( $F_6$  generation) with elite agronomic traits were obtained by agronomic traits selection and marker-assisted selection in 2013. SDS-PAGE analysis and glutelin content measurement showed that glutelin contents of the 3 new strains were reduced to the LGC-1 level, significantly lower than ordinary commercial varieties. It would provide elite new germplasm for low-glutelin rice breeding.

**Key words:** rice; low glutelin content; enhancement; marker-assisted selection

水稻是我国第一大粮食作物, 稻米中的蛋白质是仅次于淀粉的第二大贮藏物质, 为人们植物性蛋白摄取的主要来源, 其含量高低与稻米营养价值密切相关<sup>[1]</sup>。因此提高谷蛋白含量能增加稻米中可吸收蛋白的含量, 提升稻米的营养价值<sup>[2]</sup>。然而, 对于肾脏病人和并发肾脏机能损害的糖尿病人来

说, 摄入过高的可吸收性蛋白会增加肾脏负担, 导致病情恶化<sup>[3]</sup>。目前生产上大规模推广的水稻品种谷蛋白含量较高, 无法满足这类人群在蛋白代谢方面的特殊要求, 因此, 培育低谷蛋白水稻新品种已成为功能性水稻育种的一个热点<sup>[4]</sup>。

水稻种子中含有8%~10%的蛋白质, 根据其

收稿日期: 2014-03-13 修回日期: 2014-05-18 网络出版日期: 2014-12-11

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20141211.2203.009.html>

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目[ CX(13)2019 ]

第一作者研究方向为水稻品种资源。E-mail: zyhrice@163.com

通信作者: 方先文, 研究方向为水稻品种资源。E-mail: fxianwen@yahoo.com.cn

溶解性不同,可以分为碱溶性的谷蛋白(glutelins)、醇溶性的醇溶蛋白(prolamins)、水溶性的清蛋白(albumins)和盐溶性的球蛋白(globulins)。其中谷蛋白含量最高,占总贮藏蛋白的60%~75%,醇溶蛋白次之,占20%~25%,还有少量的清、球蛋白<sup>[5-6]</sup>。水稻谷蛋白主要以37~39kD酸性亚基和22~23kD碱性亚基2种形式贮存在二型蛋白体(PBII, protein body II)中,这类蛋白首先在内质网中合成57kD的前体,经过高尔基体运输,最终在蛋白质贮藏液泡中被剪切为成熟的酸碱亚基<sup>[7-9]</sup>,经过胰蛋白酶分解后被人体吸收利用;醇溶蛋白贮存在致密的一型蛋白体(PBI, protein body I)中,不能被人体消化利用<sup>[10]</sup>。1993年,日本学者S. Iida等<sup>[11]</sup>通过化学诱变剂乙烯亚胺诱变日本优(Nihonmasari)的种子,获得了低谷蛋白突变体,并以此突变体为亲本,选育出了第1个低谷蛋白水稻粳稻新品种LGC-1。此后,该品种被各个单位陆续引进,被育种家广泛用于低谷蛋白水稻新品种的选育。

万建民等<sup>[12]</sup>以LGC-1为母本,与日本优质粳稻越光杂交配组,并以越光为轮回亲本连续回交结合分子标记选择,培育出了国内第1个低谷蛋白水稻新品种W3660。2005年M. Nishimura等<sup>[13]</sup>利用LGC-1与球蛋白缺失的越光突变体杂交育成了2个优良食味水稻品种LGC-Katsu和LGC-Jun。K. Miyahara等<sup>[14]</sup>研究发现LGC-1的低谷蛋白特性受显性单基因控制,并利用F<sub>2</sub>群体将*Lgc-1*基因定位在第二染色体RFLP标记XNpb243和G365之间。M. Kusaba等<sup>[15]</sup>克隆了*Lgc-1*基因并阐明了其分子机理,发现核苷酸序列相似性达99.8%的B亚族谷蛋白基因*GluB4*和*GluB5*通过一段DNA序列尾尾反向相连,LGC-1突变体的*GluB5*基因的3'端及其下游缺失了一段3.5 kb的序列造成*GluB5*终止子的缺失,在转录时通读至*GluB4*基因,形成了包含dsRNA的RNA发夹结构,进而提出基因沉默是LGC-1低谷蛋白性状的分子机制。这种基因内部片段的缺失为针对基因本身开发分子标记提供了便利,大大提高了分子标记选择效率。T. Chen等<sup>[16]</sup>根据*GluB4*和*GluB5*之间的碱基缺失,设计了2对插入缺失标记InDel-*Lgcl-1*和InDel-*Lgcl-2*,2对引物同时加入PCR体系能准确区分谷蛋白3种基因型。

2009年,江苏省农业科学院通过种质交换,引进日本低谷蛋白品种LGC-1。但LGC-1的生长量偏小,茎秆细,穗子偏小,穗粒数偏少。随着低谷蛋白大米需求量的增加,需为低谷蛋白水稻高产

新品种选育提供一批农艺性状优良的具有增产潜力的新种质。本研究于2009年配置了LGC-1与大面积推广的优良品种武育粳3号的杂交组合,经过6代分子标记辅助选择及SDS-PAGE验证,选育成了3个综合农艺性状优良的低谷蛋白粳稻新品系,其谷蛋白含量与LGC-1相当,较江苏省几个常规高产品种显著降低。在株高、有效穗数、每穗粒数、千粒重等产量相关农艺性状方面表现优异,以期为水稻低谷蛋白高产新品种选育提供优良种质资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验材料为3个创新品系2054、2059、2084和原始亲本LGC-1、武育粳3号。同时选择江苏省高产优质推广品种南粳46、南粳5055、南粳47和9311作为对照品种。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 DNA提取** 3个创新品系各取20个单株的叶片,其他品种各取一个单株叶片冻存于-20℃冰箱。DNA提取方法参照S. L. Dellaporta等<sup>[17]</sup>。DNA提取后溶解于TE缓冲液(10 mmol/L Tris-base, 0.1 mmol/L EDTA)。用ddH<sub>2</sub>O稀释20倍作为PCR模板工作液。

**1.2.2 分子标记检测** 分子标记的选用参照T. Chen等<sup>[16]</sup>,2对引物分别为InDel-*Lgcl-1*:正向引物序列5'-TTCTACAATGAAGCGCATGC-3',反向引物序列5'-CTGGGCTTTAACGGGACT-3';InDel-*Lgcl-2*:正向引物序列5'-ACCGTGTTATGGCAGTTT-3',反向引物序列5'-ATTCAAGGGCTATCGTCT-3'。PCR反应体系(20 μL)包括:2×PCR Buffer for KOD FX 10 μL,10 μmol/L的2对正、反向引物各0.5 μL,模板DNA 1 μL,KOD FX 0.2 μL,灭菌ddH<sub>2</sub>O 6.8 μL。反应程序为:94℃预变性2min;98℃变性30s,56℃退火30s,68℃延伸1min,共34个循环;68℃再延伸5min。反应产物在GelRed预染的1%琼脂糖凝胶上进行电泳,紫外凝胶成像仪上观察记录。

**1.2.3 种子总蛋白提取和SDS-PAGE分析** 3个创新品系各随机选20个单株,每株取一粒成熟种子,其他品种各取一粒种子。蛋白提取参照G. B. Cagampang等<sup>[18]</sup>。将种子在研钵中碾碎后转移到1.5 mL离心管,加入700 μL蛋白提取液(8 mol/L尿素,4% SDS,5% β-巯基乙醇,20%甘油,50 mmol/L Tris-HCl pH6.8,少量溴酚蓝指示剂),涡旋混匀,放

入 50 °C 烘箱 6 ~ 8 h, 期间颠倒样品几次以提取充分, 12000 r/min 离心 5 min, 取 5  $\mu$ L 上清进行 SDS-PAGE 分析(分离胶 15%, 浓缩胶 7.5%), 电泳完成后用考马斯亮蓝 R250 染色液染色。

**1.2.4 种子谷蛋白含量测定** 水稻种子加工成糙米粉和精米粉, 采用考马斯亮蓝 G-250 法( Bradford 法), 设置 3 次重复, 使用 BioTek Epoch 微孔板分光光度计进行测定。其中碱溶蛋白含量即认为谷蛋白含量。

**1.2.5 农艺性状调查** 水稻成熟期每个创新品系、2 个亲本 LGC-1 和武育粳 3 号及南粳 46、南粳 5055、南粳 47 各随机选 10 个单株, 分别考察株高、穗长、单株有效穗数、每穗粒数、千粒重和结实率, 取平均值作为材料的性状值。

## 2 结果与分析

### 2.1 水稻低谷蛋白新品系的选育过程

2009 年南京正季选用武进稻麦育种场选育的高产优质粳稻品种武育粳 3 号为母本, 日本引进的低谷蛋白品种 LGC-1 作父本配置杂交组合, 同年冬天海南种植  $F_1$ , 2010 年南京正季混收  $F_2$  的种子, 同年冬天在海南种植  $F_3$ , 成熟后混收, 2011 年在南京种植  $F_4$ , 成熟期进行农艺性状筛选结合分子标记辅助选择, 保留 300 个  $F_4$  单株进行 PCR 检测, 确认为低谷蛋白纯合基因型的分单株收种, 2012 年继续在南京种植  $F_{4.5}$  小区, 在每个株系中筛选病虫害抗性好、农艺性状优、丰产性好的单株进行 PCR 检测。中选单株 2013 年在南京种植成  $F_{5.6}$  小区, 表现稳定一致的、综合性状优良的小区进行 PCR 检测、种子全蛋白 SDS-PAGE 分析和谷蛋白含量测定。最终选育出了 3 个谷蛋白含量低且农艺性状好的新品系, 编号为 2054、2059 和 2084(图 1)。

### 2.2 低谷蛋白基因的 PCR 检测与种子总蛋白 SDS-PAGE 分析

运用 InDel-*Lgc1-1* 和 InDel-*Lgc1-2* 两对标记对 3 个创新品系各 20 个单株和 LGC-1 以及江苏省几个高产品种进行 PCR 扩增。结果表明, 3 个创新品系和 LGC-1 均扩增出低谷蛋白纯合带型, 而常规品种均表现正常谷蛋白带型(图 2A)。

种子总蛋白的 SDS-PAGE 分析表明, 3 个创新品系及 LGC-1 成熟谷蛋白的酸性亚基(37 ~ 39kD) 和碱性亚基(22 ~ 23kD) 含量明显低于几个常规品种(图 2B)。



图 1 水稻低谷蛋白新品系的选育过程图示

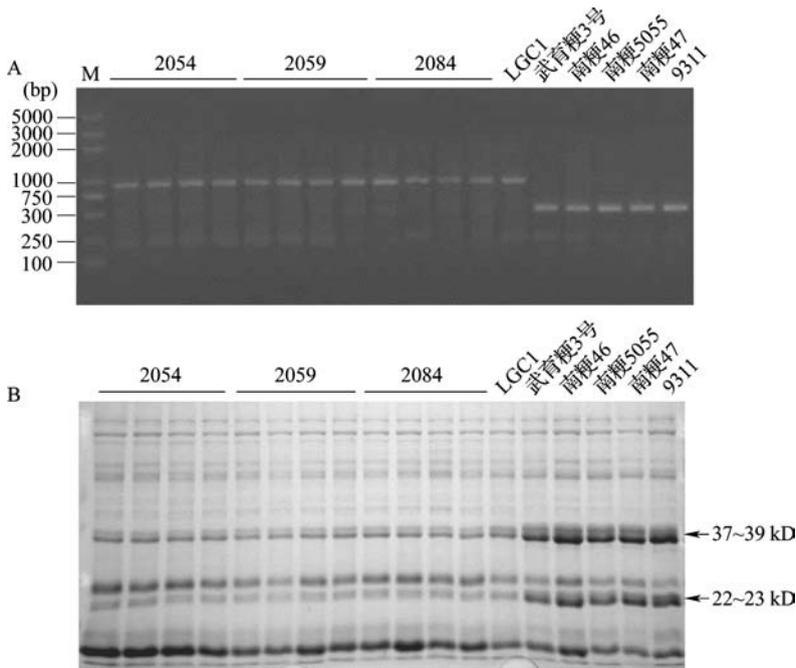
Fig. 1 Diagrammatic presentation of enhancement of new rice strains with low glutelin content

### 2.3 水稻谷蛋白含量测定

将 3 个创新品系、引进低谷蛋白品种 LGC-1 和江苏省几个高产常规品种南粳 46、南粳 5055、南粳 47 和 9311 加工成糙米粉和精米粉, 采用考马斯亮蓝 G-250 法测定其中碱溶性蛋白(谷蛋白)含量。结果表明, 大米在加工过程中, 蛋白质含量有所损失, 精米中谷蛋白含量低于糙米。3 个创新品系糙米和精米中谷蛋白含量均显著低于常规品种, 2059 和 2084 精米谷蛋白含量约分别为 4.08% 和 4.55%, 和 LGC-1(4.01%) 相当; 2054 精米谷蛋白含量最低, 为 3.83%。而几个常规品种精米谷蛋白含量在 5.91% ~ 7.45% 之间(图 3)。

### 2.4 低谷蛋白创新品系农艺性状调查

3 个创新品系中, 2054 和 2059 株高适中, 与亲本和 3 个推广粳稻品种(南粳 46、南粳 5055、南粳 47) 相当, 2084 略高。单株有效穗数 7 ~ 10 个, 与推广品种相当, 低于 LGC-1。穗长均显著超过亲本及 3 个推广品种, 且 2054 和 2084 的每穗粒数显著提高。千粒重方面, 2059 和 2084 千粒重与 3 个推广高产品种相当, 而 2054 的千粒重为 27.1 g, 达到武育粳 3 号水平, 显著高于其他品种, 表现典型的大穗大粒特征, 3 个品系结实率均表现正常(表 1)。综上所述, 这 3 个创新品系均表现出较高的产量潜力, 尤其以 2054 表现最佳。



A:2对插入-缺失标记对水稻谷蛋白基因 *LGC-1* 的 PCR 扩增;B:水稻单粒种子总蛋白的 SDS-PAGE 分析

A:PCR amplification of rice glutelin gene *LGC-1* by two insertion-deletion markers,B:SDS-PAGE analysis of total protein in a single rice seed

图2 低谷蛋白基因 PCR 扩增及种子总蛋白 SDS-PAGE 检测

Fig. 2 PCR detection of low glutelin gene and SDS-PAGE analysis of total protein in rice seed

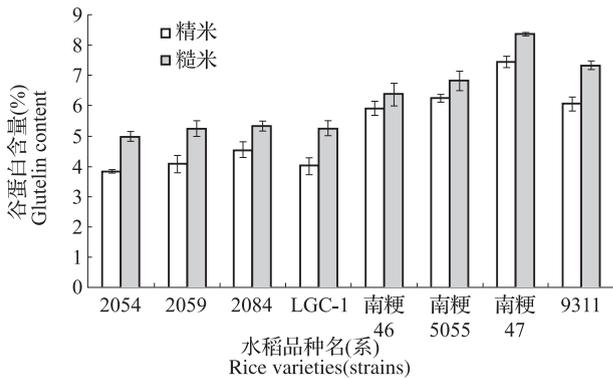


图3 水稻种子谷蛋白含量测定

Fig. 3 Determination of glutelin content in rice seeds

### 3 讨论

谷蛋白是水稻种子中的主要贮藏蛋白,也是能为人体消化吸收的最主要蛋白。近年来,随着生活水平的提高,肾脏病人和并发肾脏机能损害的糖尿病患者人数逐年上升。由于患者肾功能的障碍,不能食用可溶性蛋白质含量超过4%的大米,否则会加重肾脏负担<sup>[3]</sup>。而现有常规水稻品种谷蛋白含量大多较高。因此培育低谷蛋白水稻新品种,既满足了特殊人群对蛋白质摄入量的要求,又不增加身体负担,成为当今功能性水稻育种的一个研究热点。

表1 创新品系与高产品种重要农艺性状对比

Table 1 Comparison of important agronomic traits between innovative strains and high-yielding varieties

名称	株高(cm)	穗长(cm)	单株有效穗数	每穗粒数	千粒重(g)	结实率(%)
Name	Plant height	Panicle length	Panicles per plant	Spikelets per panicle	1000-grain weight	Seed fertility
2054	94.5 ± 4.2	21.8 ± 1.8	8.7 ± 1.6	223.8 ± 38.1	27.1 ± 0.7	92.4 ± 2.5
2059	93.8 ± 3.3	19.6 ± 0.3	9.7 ± 1.2	181.5 ± 31.7	24.3 ± 0.7	93.6 ± 1.6
2084	116.8 ± 2.6	22.0 ± 1.0	7.0 ± 1.0	228.3 ± 37.8	23.0 ± 0.6	92.7 ± 1.8
LGC-1	92.4 ± 1.8	16.9 ± 1.3	11.6 ± 1.1	85.6 ± 12.5	21.4 ± 1.2	92.1 ± 2.0
武育粳3号	89.3 ± 2.4	17.8 ± 1.2	8.0 ± 0.4	141.0 ± 17.5	27.6 ± 0.8	94.0 ± 2.5
南粳46	99.3 ± 1.9	15.3 ± 0.9	7.0 ± 1.0	206.4 ± 16.0	22.8 ± 0.2	93.4 ± 2.0
南粳5055	87.1 ± 2.1	16.7 ± 0.8	10.3 ± 0.6	167.0 ± 10.0	23.9 ± 1.0	93.3 ± 2.8
南粳47	103.7 ± 1.6	16.7 ± 0.8	8.0 ± 1.0	160.9 ± 21.5	21.0 ± 0.4	92.7 ± 0.2

日本育种家最先选育出了低谷蛋白水稻品种 LGC-1,并将其用于临床试验。结果表明,长期食用 LGC-1 大米的肾脏病患者的蛋白质摄入量和血清肌酐含量明显降低,病情得到改善<sup>[3]</sup>。因此,作为预防和辅助治疗上述疾病的有效手段,低谷蛋白大米的需求量日益增多,迫切需要培育低谷蛋白水稻高产新品种。

本研究以 LGC-1 与江苏省优质高产粳稻品种武育粳 3 号杂交,经过 6 代的自交、农艺性状筛选并结合分子标记、蛋白 SDS-PAGE 分析,于 2013 年选育出了 3 个农艺性状优异、稳定一致的低谷蛋白水稻新品系 2054、2059 和 2084。稻米谷蛋白含量测定结果显示,3 个品系谷蛋白含量均显著低于常规品种,与 LGC-1 相当。此外,3 个品系表现出穗长、粒大、着粒密度大的特性,具有较好的增产潜力,其中以 2054 综合表现最优异,且谷蛋白含量最低,为低谷蛋白水稻高产新品种的选育创造了优良新种质。

水稻种质资源中存在大量的优异性状,其中包括谷蛋白含量较低的自然材料,需要进行广泛筛选、挖掘。江绍玫等<sup>[19]</sup>通过对国内外水稻品种种子的全蛋白分析,筛选到 3 个低谷蛋白突变材料。王艳平等<sup>[20]</sup>以江苏省农业科学院粮食作物研究所保存的水稻品种资源,采用化学测定和 SDS-PAGE 分析鉴定了 3000 多份水稻品种,获得了细老鼠牙、冷水糯等天然低谷蛋白材料。这些低谷蛋白材料是功能性专用水稻育种的优良种质资源。低谷蛋白新品种的选育在不影响其功能的前提下,需要与高产、优质、多抗等育种目标相结合,天然材料往往产量低、抗性差、适应性差,直接用于育种费时费力,因此在筛选鉴定这类材料的基础上,创造一些农艺性状优良的中间材料和新品系,对加快育种进程具有积极的意义。

#### 参考文献

[1] 王康君,葛立立,范苗苗,等. 稻米蛋白质含量及其影响因素

- 的研究进展[J]. 作物杂志,2011(6):1-5
- [2] Ogawa M, Kumamaru T, Satoh H, et al. Mutants for rice storage proteins: 2. Isolation and characterization of protein bodies from rice mutant [J]. Theor Appl Genet, 1989, 78(3): 305-310
- [3] Mochizuki T, Hara S. Usefulness of the low protein rice on the diet therapy in patients with chronic renal failure [J]. Jpn J Nephrol, 2000, 42(1): 24-29
- [4] 苏宁, 方向元, 翟虎渠, 等. 功能性水稻研究现状和发展趋向[J]. 中国农业科学, 2007, 40(3): 433-439
- [5] Ogawa M, Kumamaru T, Satoh H, et al. Purification of protein body-I of rice seed and its polypeptide composition [J]. Plant Cell Physiol, 1987, 28(8): 1517-1527
- [6] Li X, Wu Y, Zhang D Z, et al. Rice prolamine protein body biogenesis: a BiP-mediated process [J]. Science, 1993, 262(5136): 1054-1056
- [7] Tanaka K, Sugimoto T, Ogawa M, et al. Isolation and characterization of two types of protein bodies in the rice endosperm [J]. Agric Biol Chem, 1980, 44(7): 1633-1639
- [8] Yamagata H, Tanaka K, Kasai Z. Evidence for a precursor form of rice glutelin subunits [J]. Agric Biol Chem, 1982, 46(1): 321-322
- [9] Yamagata H, Sugimoto T, Tanaka K, et al. Biosynthesis of storage proteins in developing rice seeds [J]. Plant Physiol, 1982, 70(4): 1094-1100
- [10] Wang Y H, Liu S J, Ji S L, et al. Fine mapping and marker-assisted selection (MAS) of a low glutelin content gene in rice [J]. Cell Res, 2005, 15(8): 622-630
- [11] Iida S, Amano E, Nishio T. A rice (*Oryza sativa* L.) mutant having a low content of glutelin and a high content of prolamine [J]. Theor Appl Genet, 1993, 87(3): 374-378
- [12] 万建民, 翟虎渠, 刘世家, 等. 功能性专用水稻品种 W3660 的选育[J]. 作物杂志, 2004(5): 58
- [13] Nishimura M, Kusaba M, Miyahara K, et al. New rice varieties with low levels of easy-to-digest protein, 'LGC-Katsu' and 'LGC-Jun' [J]. Breed Sci, 2005, 55(1): 103-105
- [14] Miyahara K. Analysis of LGC-1, low glutelin mutant of rice [J]. Gamma Field Symposia, 1999, 38: 43-52
- [15] Kusaba M, Miyahara K, Iida S, et al. *Low glutelin content1*: a dominant mutant that suppress the *glutelin* multigene family via RNA silencing in rice [J]. Plant Cell, 2003, 15(6): 1455-1467
- [16] Chen T, Tian M X, Zhang Y D, et al. Development of simple functional markers for low glutelin content gene 1 (*Lgc1*) in rice (*Oryza sativa*) [J]. Rice Sci, 2010, 17(3): 173-178
- [17] Dellaportas S L, Wood J, Hicks J B. A new plant DNA miniprep: Version II [J]. Plant Mol Biol Rep, 1983, 1: 19-21
- [18] Cagampang G B, Cruz L J, Espiritu S G, et al. Studies on the extraction and composition of rice proteins [J]. Cereal Chem, 1966, 43: 145-155
- [19] 江绍玫, 朱速松, 刘世家, 等. 水稻谷蛋白突变体的筛选及遗传分析[J]. 遗传学报, 2003, 30(7): 641-645
- [20] 王艳平, 汤陵华, 方先文, 等. 低谷蛋白含量水稻种质的筛选[J]. 江苏农业学报, 2008, 24(3): 363-365