

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2019.82064

籼稻背景下导入 Wx^{in} 等位基因改良稻米食味和理化品质

杨 勇¹ 陆 彦^{1,2} 郭淑青¹ 石仲慧¹ 赵 杰¹ 范晓磊¹ 李钱峰¹
刘巧泉^{1,*} 张昌泉^{1,*}

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 / 粮食作物现代产业技术协同创新中心, 江苏扬州 225009; ² 扬州大学测试中心, 江苏扬州 225009

摘 要: 水稻 Wx^b 等位基因已广泛用于籼稻的品质改良, 但携带该等位基因的一些籼稻米饭往往偏软, 仍需进一步改良。为明确籼稻背景下导入 Wx^{in} 等位基因对稻米食味品质和理化品质的效应, 分别以携带 Wx^{in} 的 IR64 和携带 Wx^b 的 9311 为供体, 以携带 Wx^a 的籼稻 SIR3611 (3611) 为受体, 基于分子标记辅助选择, 通过杂交和连续回交的方式构建了 3611 背景下携带 Wx^{in} 和 Wx^b 的近等基因系。系统比较了不同近等基因系间的农艺性状以及稻米的食味和理化品质。结果表明, 近等基因系与受体亲本 3611 的主要农艺性状基本接近, 无显著差异。NIL(Wx^{in}) 稻米的表观直链淀粉含量较亲本 3611 极显著下降而胶稠度极显著增加。NIL(Wx^b) 稻米表观直链淀粉含量最低且与之对应的胶稠度最高。近等基因系 NIL(Wx^{in}) 和 NIL(Wx^b) 稻米的食味值较亲本极显著提高。NIL(Wx^{in}) 和 NIL(Wx^b) 稻米的 GBSSI 丰度与对应的表观直链淀粉含量具有明显的正相关。稻米粉的黏滞性谱、热糊化特性和晶体结构与直链淀粉含量显著相关性。本研究为在我国籼稻品种品质改良中有效利用 Wx^{in} 等位基因提供了重要依据。

关键词: 水稻; 食味品质; Wx 等位基因; 表观直链淀粉含量; 分子标记辅助选择

Improvement of rice eating quality and physicochemical properties by introgression of Wx^{in} allele in *indica* varieties

YANG Yong¹, LU Yan^{1,2}, GUO Shu-Qing¹, SHI Zhong-Hui¹, ZHAO Jie¹, FAN Xiao-Lei¹, LI Qian-Feng¹, LIU Qiao-Quan^{1,*}, and ZHANG Chang-Quan^{1,*}

¹ Jiangsu Key Laboratory for Crop Genomics and Molecular Breeding / Key Laboratory of Plant Functional Genomics of Ministry of Education / Co-Innovation Center for Modern Production Technology of Grain Crops, Agricultural College of Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China; ² Instrumental Analysis Center, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

Abstract: Nowadays, the Wx^b allele has been widely used to improve grain quality of *indica* rice. However, some *indica* varieties carrying Wx^b allele usually has a much softer texture, which is not favored by consumers in South China. So the grain quality of these varieties needs to be further improved. To understand the effect of Wx^{in} allele on rice eating quality and physicochemical properties in *indica* rice, we developed two Near-Isogenic Lines (NILs) carrying Wx^{in} and Wx^b alleles by crossing an *indica* variety 3611 (receptor, carrying Wx^a) with IR64 (carrying Wx^{in}) and 9311 (carrying Wx^b), and seven times of backcrossing based on molecular marker assistant selection (MAS). The Wx effects in controlling the synthesis of amylose, grain quality, and physicochemical properties were investigated. There were non-significant differences in the agronomic traits among the NILs. However,

本研究由国家重点研发计划项目(2016YFD0100501), 国家自然科学基金项目(31872860, 31561143008), 江苏省科技计划项目(BE2018357, BK20160464), 江苏省高等学校自然科学研究项目(16KJB210011), 杂交水稻国家重点实验室(湖南杂交水稻研究中心)开放课题(2018KF04)和扬州大学农学院农学专业本科生创新训练计划项目资助。

This study was supported by the National Key Research and Development Program of China (2016YFD0100501), the National Natural Science Foundation of China (31872860, 31561143008), the Government of Jiangsu Province (BE2018357, BK20160464), the Natural Science Foundation of the Jiangsu Higher Education Institutions of China (16KJB210011), the Open Research Fund of State Key Laboratory of Hybrid Rice (Hunan Hybrid Rice Research Center), and the Personnel Training Program for Undergraduates in Agricultural College of Yangzhou University.

* 通信作者(Corresponding authors): 刘巧泉, E-mail: qqliu@yzu.edu.cn; 张昌泉, E-mail: cqzhang@yzu.edu.cn

第一作者联系方式: E-mail: 1046354026@qq.com

Received (收稿日期): 2018-12-14; Accepted (接受日期): 2019-06-20; Published online (网络出版日期): 2019-07-15.

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20190712.1548.006.html>

for grain quality characters, we found that the NIL(Wx^{in}) rice showed significantly lower apparent amylose content (AAC) and higher gel consistency (GC), compared with the wild type 3611. Besides, the NIL(Wx^b) rice showed the lowest AAC and highest GC among three lines. The NIL(Wx^{in}) rice had a significantly higher taste value than the wild type 3611, while the NIL(Wx^b) rice exhibited the highest taste value among the three samples. The granule-bound starch synthase I (GBSSI) level was the highest in 3611, moderate in NIL(Wx^{in}) and lowest in NIL(Wx^b), which showed a positive correlation with the AAC level. Also, the starch viscosity, thermal gelatinization property and crystal structure of different rice flours had a high correlation with the AAC level. To sum up, our results proved that both Wx^{in} and Wx^b allele can improve the grain quality in 3611 background, and what is more, the Wx^{in} allele might be more useful for the improvement of grain quality in *indica* rice.

Keywords: *Oryza sativa* L.; eating quality; Wx allele; apparent amylose content; molecular marker assisted selection

水稻(*Oryza sativa* L.)是世界上食用人口最多、种植范围最广的农作物,也是我国的主要粮食作物之一。目前我国水稻高产育种已经走在了世界前列,但是稻米品质普遍不高,尤其是很多籼稻品种的稻米品质还无法达到优质米标准^[1-2]。因此,稻米品质性状的遗传改良是当前水稻育种研究的一个重要方向^[3]。稻米的食用部分为胚乳,其主要成分为淀粉,包括直链淀粉和支链淀粉两类。一般认为,两类淀粉形成了淀粉的半晶体结构,并且不同类型的比例和结构对稻米品质的优劣起着重要作用^[4]。其中直链淀粉含量是影响稻米品质尤其是食味品质的最主要因素,一直被作为衡量稻米食味品质的一个最重要指标。通常高直链淀粉含量的米饭质地较硬而低直链淀粉含量的米饭软而有弹性^[5-6]。由于直链淀粉含量难以准确测定,一般用表观直链淀粉含量(apparent amylose content, AAC)来表示。尽管一些研究发现 AAC 相似的水稻品种间也存在显著的食味品质差异,并且认为这种差异主要是由支链淀粉的精细结构差异造成的^[7-8],但是,最近的一些研究表明直链淀粉的精细结构对米饭的适口性影响也非常大^[9]。

水稻蜡质基因(*Waxy*, Wx)是控制稻米直链淀粉含量的主效基因,其编码的颗粒结合淀粉合酶(Granule-Bound Starch Synthase I, GBSSI)直接控制直链淀粉的合成。研究发现 Wx 基因的不同等位变异是稻米 AAC 广泛分布的重要原因^[10]。在我国非糯水稻品种中, Wx 基因主要分化为 Wx^a 和 Wx^b 两种等位类型。其中, Wx^a 主要分布在籼稻中,携带该等位基因的稻米 AAC 较高,一般在 25%以上^[11]。与 Wx^a 相比, Wx^b 等位基因在第 1 内含子剪接位点处发生了从 G 到 T 的突变,该突变影响了前体 mRNA 的剪接效率,从而降低了其编码蛋白 GBSSI 的量^[12]。 Wx^b 主要分布在粳稻品种中,携带该等位基因的稻米 AAC 一般在 15%~18%之间,属于中等或偏低水平。随着水稻品质性状遗传改良的进步,近些年来我国

选育的一些籼稻品种(亲本)如扬稻 6 号(9311)、黄华占、明恢 63 和 Y58S 等都已携带 Wx^b 等位基因,这些籼稻品种已经在稻米食味品质上有了很大的提升^[3],但是对于南方地区尤其是以杂交稻米为消费者主体的省份,由于水稻生长季节的高温等环境因素的影响,一些以携带 Wx^b 等位基因为双亲配出的杂交组合,其稻米 AAC 含量偏低,米饭偏软,尚需要进一步改良以满足消费者的多样化需求^[13]。此外,在籼稻中还存在一个控制中等直链淀粉含量的 Wx^{in} 等位基因,与 Wx^a 相比,该等位基因在第 6 外显子 62 碱基处发生了 A 到 C 的突变,引起了酪氨酸到丝氨酸的替换^[14]。携带该等位基因的稻米 AAC 一般在 18%~20%之间,米饭软硬适中,食味较好,一些优质籼稻如 Basmati 类和泰国香米等都携带该等位基因。但是 Wx^{in} 等位基因至今未在我国水稻品种选育中获得大范围应用。

有关 Wx 等位变异对稻米品质的效应研究已有很多报道^[14-18],但这些研究多采用一些品种或者染色体片段代换系,可能会存在其他基因的干扰,而近等基因系是研究基因等位变异效应的理想材料。本研究以携带 Wx^a 等位基因的籼型杂交稻恢复系亲本 SIR3611 (简称为 3611)为受体亲本,以携带 Wx^{in} 和 Wx^b 等位基因的籼稻品种 IR64 和 9311 为供体,通过杂交和连续回交,并结合分子标记辅助选择构建了 3611 背景下 Wx^a 、 Wx^{in} 和 Wx^b 的近等基因系。系统分析了不同近等基因系间的农艺性状和稻米理化品质等指标,来重点评价 Wx^{in} 等位基因在籼稻背景下对稻米品质的改良效应及其育种应用潜力。

1 材料与方法

1.1 供试品种与试验条件

用于研究的水稻材料包括籼型恢复系 3611 (携带 Wx^a 等位基因)、籼型品种 IR64 (携带 Wx^{in} 等位基因)和 9311 (又名扬稻 6 号,携带 Wx^b 等位基因)。以上材料及其来源的近等基因系正季均种植于扬州大

学文汇路校区试验农场, 春季种植于海南省陵水县试验基地。每个材料种植 2 行, 每行 10 株, 株行距分别为 14 cm 和 18 cm。土壤肥力中等, 采用一般田间栽培管理技术。

1.2 近等基因系构建

分别以 9311 和 IR64 作为供体亲本(父本)与受体亲本 3611 杂交, 杂交种 F_1 再与 3611 进行多次回交(图 1-A), 从回交 BC_1F_1 代开始, 利用分子标记 Wxin1、Wxin2 和 QRM190 分别对 Wx^{in} 和 Wx^b 近等基因系进行分子标记辅助选择(MAS)。在回交 7 代后再进行自交 3 代。为排除遗传背景的干扰, 利用实验室已有的 18 个淀粉合成酶基因的 51 个分子标记进行背景筛选, 参照田志喜等^[19]的相关分子标记信息。通过筛选, 获得了 Wx^{in} 和 Wx^b 纯合且主要淀粉合成酶基因一致的近等基因系 NIL(Wx^{in}) 和 NIL(Wx^b)。

1.3 水稻植株 DNA 提取和 PCR 分析

在水稻分蘖期, 按照单株取叶片并编号, 用液氮速冻并研磨后, 采用 CTAB 法^[20]提取总 DNA 用于 PCR 分析。在 20 μ L 反应液中混合 1 μ L 总 DNA (50~100 ng)、1 \times 反应缓冲液(含镁离子和 dNTPs)、1 μ mol L⁻¹引物和 1 U Taq DNA 聚合酶(诺唯赞)及适量水, 进行 PCR 扩增。PCR 引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。根据 Wx^a 和 Wx^b 等位基因第 1 外显子区 CT 重复序列, 设计能够区分 Wx^a 和 Wx^b 的特异性引物 QRM190-F (5'-ATTCCTTCAGTTCTTTGTCTATCTC-3')与 QRM190-R (5'-TCCTGATGAACAA CAGAACAACAC-3')。根据 Wx^{in} 和 Wx^a 在第 6 外显子 A/C 的变异, 设计四引物扩增受阻突变(tetra-primer ARMS-PCR)引物对 Wxin1-F (5'-AACAACC CATACTTCAAAGGAACATC-3')和 Wxin1-R (5'-GT AGATGCCATTGGGCTGGTAGT-3')、以及引物对 Wxin2-F (5'-GCTTAGCTTCCACTGGTGATTTC-3')和 Wxin2-R (5'-TCTTGAGATCAATTGTAACCTCC CAT-3')。QRM190 分子标记的 PCR 条件为 95 $^{\circ}$ C, 5 min, 95 $^{\circ}$ C, 50 s, 53 $^{\circ}$ C, 30 s, 72 $^{\circ}$ C, 20 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C, 10 min。Wxin 分子标记的 PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C, 5 min, 95 $^{\circ}$ C, 50 s, 53 $^{\circ}$ C, 30 s, 72 $^{\circ}$ C, 35 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C, 10 min。PCR 产物在 3.0%的琼脂糖凝胶电泳上分离, 然后在 Bio-RAD UV 1000 核酸成像仪上观察。

1.4 田间农艺性状测定

水稻成熟时, 选取每个系中间 10 个单株, 测量株高和有效穗数。随后, 选取每株一个主穗, 统计穗长、结实率和千粒重。

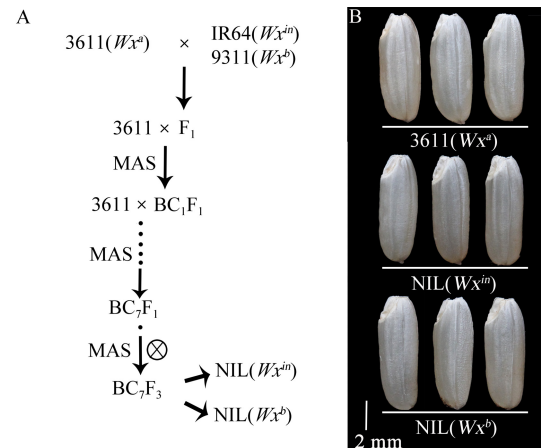


图 1 近等基因系构建过程(A)与近等基因系糙米表型(B)

Fig. 1 Construction of near-isogenic lines (A) and comparison of their grain phenotype (B)

MAS: 分子标记辅助选择; NIL: 近等基因系。

MAS: molecular marker-assisted selection; NIL: near-isogenic line.

1.5 稻米样品前处理

收获的成熟稻谷经 40 $^{\circ}$ C 烘干后用砻谷机出糙获得糙米, 去除发霉变质及未成熟米粒后用精米机(日本 Kett 公司)处理得精米。利用旋风式磨粉机(丹麦 FOSS 公司)将精米磨成粉, 并过 100 目筛, 放入 40 $^{\circ}$ C 烘箱中烘 2 d, 在室温下平衡 2 d 后装于自封袋密封, 于 4 $^{\circ}$ C 存放备用。

1.6 蛋白 SDS-PAGE 分析

准确称取 100 mg 米粉, 加入 1.5 mL 抽提缓冲液 [Tris-HCl (pH 6.8) 0.05 mol L⁻¹, SDS 2.8%, 甘油 10%, 2-ME 5%], 放于摇床上, 37 $^{\circ}$ C 抽提 30 min, 10,000 \times g 离心, 吸取上清液, 获得总蛋白抽提物(含有游离态 GBSSI), 放于 4 $^{\circ}$ C 备用。剩余沉淀, 用相同抽提液抽提 3 次, 每次 30 min, 离心, 去掉上清液。沉淀再次加入 500 μ L 抽提缓冲液, 混匀后高温煮沸 5 min, 冷却至室温后再加入 500 μ L 抽提缓冲液, 10,000 \times g 离心 10 min, 吸取上清液到新的离心管中, 获得淀粉粒结合 GBSSI。对上述总蛋白和淀粉粒结合 GBSSI 参照 Liu^[21]的方法进行 SDS-PAGE 分析。

1.7 稻米理化品质测定

采用万深公司大米外观品质检测仪(SC-E)测定稻米外观品质; 采用 STA1A 食味仪(日本佐竹公司)测定米饭食味值; 参照农业部颁布的标准《NY147-88 米质测定方法》测定稻米 AAC 及胶稠度(Gel consistency, GC); 稻米粉黏滞性(RVA)的测定参照 Zhang 等^[22]的方法; 利用差示扫描量热仪(DSC) (德国耐驰公司, DSC 200 F3 型号)测量米粉的热力学特性^[22]; 参照 Zhang 等^[22]的方法, 分别利用多晶 X-射

线衍射仪(德国布鲁克 AXS 公司, D8-ADVANCE)和傅里叶红外光谱分析(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)测定米粉的晶体结构。

1.8 统计分析

每个样品测定至少作 2 次重复, 利用 Microsoft Excel 2016 进行数据收集, 用统计分析软件 SPSS 15.0 进行方差分析。实验中所有的数据均为平均值±标准差(mean±SD)。

2 结果与分析

2.1 近等基因系的构建及其田间表现

如图 2-A 所示, QRM190 能够很好的对 Wx^a 和 Wx^b 进行区分。如图 2-B 所示, 分子标记 $Wxin1$ 和 $Wxin2$ 能够很好地区分 Wx^{in} 和非 Wx^{in} 基因型。通过分子标记辅助选择, 回交系继续与轮回亲本 3611 回交 7 代并自交 3 代, 获得了 BC₇F₃ 群体。通过筛选, 获得了 3611 背景下 Wx^{in} 和 Wx^b 基因型纯合且其他 18 个淀粉合成酶基因型与受体亲本一致的近等基因系 NIL(Wx^{in})和 NIL(Wx^b) (图 1-A)。

在选育获得纯合近等基因系后, 首先比较了近等基因系与受体亲本的主要农艺性状, 如表 1 和图 1-B 所示, 2 个近等基因系在株高、穗长、结实率、千粒重和粒形等方面与受体亲本 3611 相比均没有显著差异。这些结果表明, 在田间正常种植条件下两个近等基因系主要农艺性状与受体亲本一致, 可以用于后续等位基因的效应分析。

2.2 不同近等基因系稻米中 GBSSI 表达量的比较

为进一步确认不同 Wx 等位基因在相同背景下编码的蛋白丰度的差异, 分析了 3 个近等基因系稻米中 GBSSI 的积累情况。如图 3-A 所示, 在其他蛋白总量一致的情况下, 3 个样品米粉中可溶性 GBSSI 蛋白的差异显著, 携带 Wx^a 的稻米米粉中游离态 GBSSI 含量最高, 其次为 NIL(Wx^{in})样品, 而 NIL(Wx^b)米粉中的游离态 GBSSI 水平最低。进一步分析 GBSSI 的量(图 3-B)表明, Wx^a 米粉中结合态 GBSSI 量仍然最多, 其次是 Wx^{in} 米粉, 最少的是 Wx^b 米粉。这些结果与各近等基因系稻米的 AAC 具有明显的正相关(表 2), 也与已有的报道较为一致^[23]。

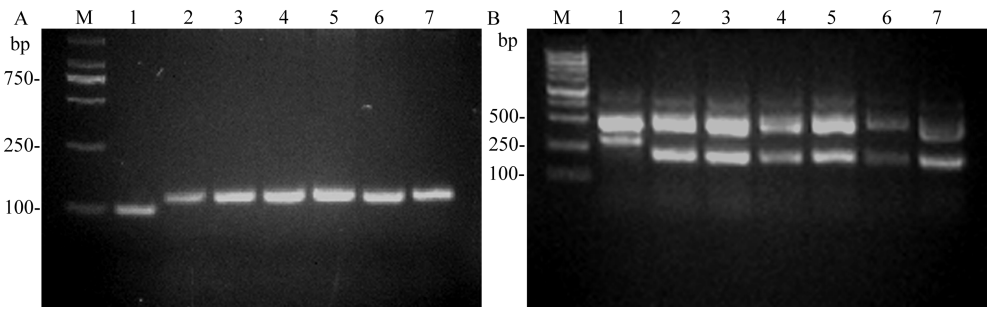


图 2 不同 Wx 等位基因特异分子标记的检测

Fig. 2 Detection of specific molecular markers for different Wx alleles

A 图为利用 QRM190 分子标记区分 Wx^a 和 Wx^b 的 PCR 检测结果, 泳道 1 为 3611, 2 为 9311, 3~7 为近等基因系 NIL(Wx^b); B 图为利用基因特异分子标记区分 Wx^a 和 Wx^{in} 的 PCR 检测结果, 泳道 1 为 3611, 2 为 IR64, 3~7 为近等基因系 NIL(Wx^{in})。

(A): allelic specific molecular marker QRM190 for detecting Wx^a and Wx^b . Lanes 1–7: 3611, 9311 and their derived NIL NIL(Wx^b) (lanes 3–7), respectively. (B): allelic specific molecular marker for detecting Wx^a and Wx^{in} . Lanes 1–7: 3611, IR64 and their derived NIL NIL(Wx^{in}) (lanes 3–7), respectively.

表 1 近等基因系主要农艺性状表现

Table 1 Main agronomic traits in different near-isogenic lines

品系 Line	株高 Plant height (cm)	有效分蘖 Tiller number	主穗长 Main panicle length (cm)	结实率 Seed setting rate (%)	千粒重 1000-kernel weight (g)
3611(Wx^a)	117.8±1.2 a	5.6±0.9 a	26.5±0.4 a	91.2±2.2 a	30.7±0.8 a
NIL(Wx^{in})	118.2±2.3 a	5.2±0.8 a	26.7±0.6 a	90.5±3.1 a	29.8±0.5 a
NIL(Wx^b)	115.0±1.5 a	6.0±0.6 a	25.8±0.4 a	91.5±2.8 a	31.0±0.2 a

同列标以不同小写字母的值差异极显著($P < 0.01$), $n = 10$ 。

Values within the same column followed by different letters are significant different at $P < 0.01$ and $n = 10$.

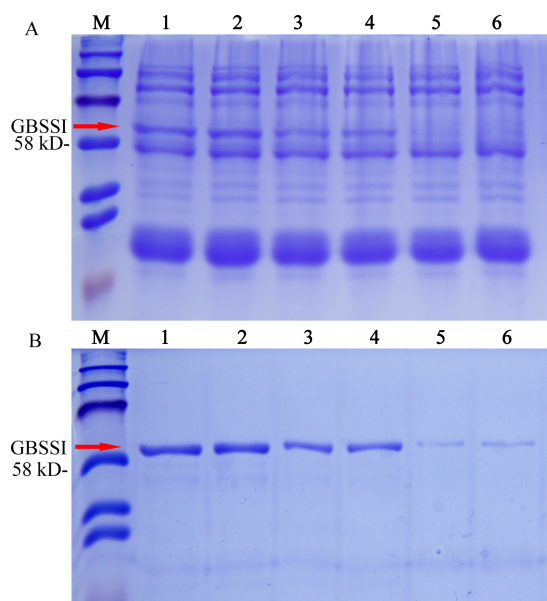


图 3 近等基因系成熟种子中 GBSSI 蛋白游离态(A)和结合态(B)的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the soluble (A) and bound (B) GBSSI isolated from mature rice of different NILs

M: 蛋白质分子质量标准; 1~2: 3611(Wx^a); 3~4: NIL(Wx^{in}); 5~6: NIL(Wx^b); 箭头所示为 60 kD 的 GBSSI 蛋白。

Lane M: the protein standard molecular mass; Lanes 1~2: 3611(Wx^a); Lane 3~4: NIL(Wx^{in}); Lanes 5~6: NIL(Wx^b); The arrows indicate the 60 kD GBSSI.

表 2 不同近等基因系稻米理化和外观品质

Table 2 Appearance quality and physicochemical properties of different near-isogenic lines

品系 Line	表观直链淀粉含量 Apparent amylose content (%)	胶稠度 Gel consistency (mm)	食味值 Taste value	垩白粒率 Chalkiness rate (%)	垩白度 Chalkiness degree (%)
3611(Wx^a)	25.51±1.48 a	42.35±4.17 c	43.15±1.35 c	18.62±0.87 a	2.89±1.05 a
NIL(Wx^{in})	19.85±0.27 b	78.54±2.32 b	55.09±2.51 b	13.04±0.30 b	1.93±0.06 c
NIL(Wx^b)	14.78±0.55 c	87.62±3.48 a	60.51±1.87 a	13.05±0.40 b	2.03±0.32 b

同列标以不同小写字母的值差异极显著($P < 0.01$), $n = 3$ 。

Values within the same column followed by different letters are significant different at $P < 0.01$ and $n = 3$.

2.4 不同近等基因系稻米黏滞性的比较

稻米黏滞性是反映稻米食味品质的另一重要指标, 稻米黏滞性测定能够模拟稻米蒸煮过程的动态变化, 相关指标能贴切反映米饭的口感和质地^[24]。因此, 我们测定了不同近等基因系米粉的 RVA 谱。如图 4 所示, 近等基因系 NIL(Wx^b) RVA 谱的峰值黏度最高, 而 NIL(Wx^{in})和 3611(Wx^a)的峰值黏度较为接近。此外, 3611(Wx^a)米粉的冷胶黏度最高, 说明其蒸煮后的米饭冷却后较硬, 这与胶稠度测定结果具有很好的一致性, 也与其米饭食味值测定结果相符, 这进一步说明 RVA 谱的冷胶黏度越大, 对应稻米的食味品质可能越差^[4]。已有的研究发现食味品质好的稻米一般具有较大的崩解值和较小的消碱值^[24]。

2.3 不同近等基因系稻米理化品质的比较

如表 2 所示, 3611(Wx^a)成熟稻米的表观直链淀粉含量最高, 近等基因系 NIL(Wx^{in})稻米的 AAC 处于中间水平, 而 NIL(Wx^b)稻米 AAC 较低。这些结果与上述的 SDS-PAGE 分析具有非常好的一致性, 说明 AAC 的水平与 GBSSI 丰度具有直接的正相关性。3611(Wx^a)稻米的胶稠度最硬, 而 NIL(Wx^{in})稻米的胶稠度极显著变软, 与 NIL(Wx^b)较为接近, 说明 Wx^{in} 等位基因能够显著改善籼米的米饭质地, 使其变软。该结果与 AAC 的水平也表现出非常好的负相关性。进一步比较米饭的食味值发现, 3611(Wx^a)稻米的食味值最低, 其次是 NIL(Wx^{in}), 而 NIL(Wx^b)的食味值最高。考虑到米饭食味值采用的是黑龙江粳稻打分模式, 可能会对籼稻的分析造成一定影响, 结合胶稠度结果来看, NIL(Wx^{in})稻米的实际食味表现可能会更好, 甚至优于 NIL(Wx^b)稻米。此外, 近等基因系 NIL(Wx^{in})和 NIL(Wx^b)的稻米垩白粒率较亲本对照均极显著下降, 稻米垩白度在 2 个近等基因系中也极显著下降, 说明在杂交和回交过程中 3611 的外观品质也得到了改良。

通过对表 3 中 RVA 谱的特征值分析, 发现与亲本 3611(Wx^a)相比, NIL(Wx^{in})和 NIL(Wx^b)稻米的崩解值显著提高, 而冷胶黏度和消减值显著下降, 尤其是 NIL(Wx^b)稻米的崩解值最大而消减值最小。这些结果说明在 3611 背景中导入 Wx^{in} 或 Wx^b 等位基因后, 其稻米食味品质得到了显著改良。

2.5 不同近等基因系稻米糊化特性的比较

稻米糊化温度也是评价稻米食味品质的重要指标。研究表明, *ALK* 基因是控制糊化温度的主效基因且与 *Wx* 基因连锁^[15]。我们在近等基因构建过程中, 已经根据分子标记筛选了可能与 *Wx* 等位基因连锁导入的 *ALK* 等位基因, 排除了由 *ALK* 基因带来的可能干扰。为进一步明确不同 *Wx* 等位基因对稻米糊

化温度的影响, 利用差式量热扫米仪(DSC)分析了不同稻米样品的热糊化特性。如图 5 所示, 尽管 3 个样品的吸热曲线比较相似, 但是亲本 3611(Wx^a)稻米的吸热峰较为提前, 表现为起始糊化温度较低。通过热糊化参数分析(表 4)可以看出, 与亲本 3611(Wx^a)相比, 近等基因系 NIL(Wx^{in})和 NIL(Wx^b)

米粉的起始糊化温度、峰值糊化温度和终止糊化温度都显著提高, 其中 NIL(Wx^b)的糊化温度最高。此外, 从吸收的热量来看, NIL(Wx^b)稻米的热焓值也最高, 而 3611(Wx^a)稻米最低。这些结果表明不同 Wx 等位基因的差异也能造成稻米糊化特性的显著改变。这与我们前期的研究结果也较为一致^[25]。

表 3 不同近等基因系稻米 RVA 特征值
Table 3 Pasting properties of flours from different near-isogenic lines

品系 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)	回复值 Setback (cP)	峰值时间 Peak time (min)	起浆温度 Peak temperature ($^{\circ}\text{C}$)
3611(Wx^a)	3143.2 \pm 35.2 b	2607.4 \pm 27.1 a	536.4 \pm 12.8 c	3960.2 \pm 31.6 a	817.6 \pm 18.6 a	6.4 \pm 0.1 a	70.80 \pm 1.1 b
NIL(Wx^{in})	2961.5 \pm 47.1 c	2211.5 \pm 31.1 c	750.6 \pm 9.3 b	3503.4 \pm 28.7 b	514.8 \pm 12.6 b	6.3 \pm 0.1 a	71.65 \pm 1.0 b
NIL(Wx^b)	3628.5 \pm 28.3 a	2383.3 \pm 30.4 b	1245.7 \pm 10.5 a	3390.3 \pm 21.5 c	-238.7 \pm 9.5 c	6.4 \pm 0.1 a	73.25 \pm 1.0 a

同列标以不同小写字母的值差异极显著($P < 0.01$), $n = 2$ 。
Values within the same column followed by different letters are significant different at $P < 0.01$ and $n = 2$.

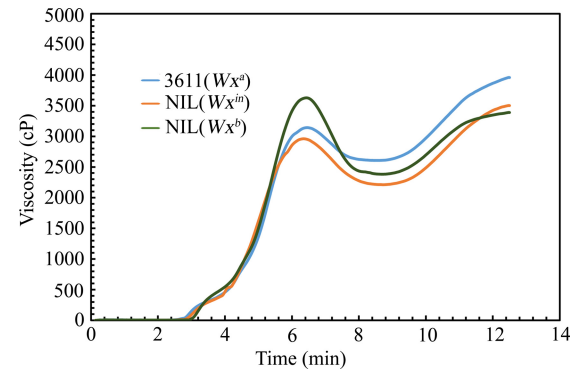


图 4 不同近等基因系稻米粉 RVA 谱分析
Fig. 4 RVA profiles of rice flours from different near-isogenic lines

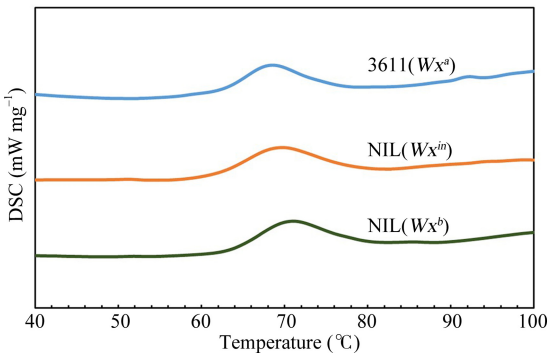


图 5 不同近等基因系米粉的 DSC 分析
Fig. 5 Gelatinization of rice flours from different near-isogenic lines as determined by differential scanning calorimetry (DSC)

表 4 不同近等基因系稻米米粉热糊化参数
Table 4 Thermal properties of rice flours from different near-isogenic lines

品系 Line	起始温度 T_0 ($^{\circ}\text{C}$)	峰值温度 T_p ($^{\circ}\text{C}$)	终止温度 T_c ($^{\circ}\text{C}$)	热焓值 ΔH (J G^{-1})
3611(Wx^a)	62.89 \pm 0.21 c	67.68 \pm 0.62 c	76.54 \pm 0.31 c	6.39 \pm 0.30 c
NIL(Wx^{in})	63.57 \pm 0.12 b	69.53 \pm 0.70 b	77.02 \pm 0.07 b	8.01 \pm 0.10 b
NIL(Wx^b)	64.86 \pm 0.41 a	71.33 \pm 0.60 a	77.91 \pm 0.46 a	8.53 \pm 0.11 a

同列标以不同小写字母间差异极显著($P < 0.01$), $n = 3$ 。
Values within the same column followed by different letters are significant different at $P < 0.01$ and $n = 3$.

2.6 不同近等基因系稻米晶体结构的比较

稻米淀粉是由直链淀粉和支链淀粉形成的半晶体复合物, 其理化特性与淀粉精细结构密切相关。我们首先利用 X 射线衍射仪(XRD)分析了 3 个近等基因系米粉样品的晶体衍射情况。如图 6-A 所示, 3 个样品在衍射角 15° 、 17° 、 18° 和 23° 附近有较强的衍射峰, 属于谷物淀粉中典型的 A 类型晶体结构^[26]。从

衍射曲线来看, 不同近等基因系样品间无显著差异, 但是通过结晶度计算, 发现不同样品间结晶度差异都极显著。如表 5 所示, NIL(Wx^b)样品的结晶度最高, 其次是 NIL(Wx^{in}), 亲本 3611(Wx^a)样品结晶度最低。研究表明结晶度越高, 在吸热反应中所需的热量就越多^[27], 该结果能够很好地解释 NIL(Wx^b)的热焓值最高而 3611(Wx^a)最低。

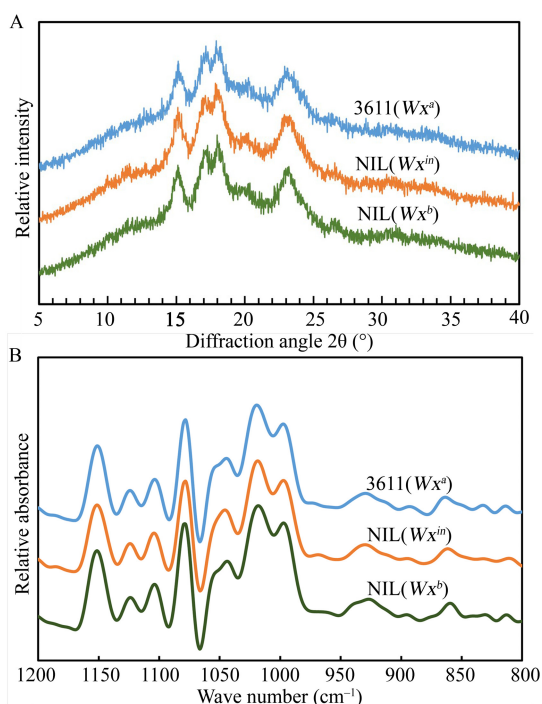


图 6 不同近等基因系米粉的 X 射线衍射(A)和红外光谱分析(B)
Fig. 6 XRD patterns (A) and FTIR spectra (B) of rice flours from different near-isogenic lines

傅里叶变换红外光谱技术(FTIR)能够用于精确分析淀粉晶体结构中的短程有序结构^[26]。通过计算特定波长的吸收强度比值($1045/1022\text{ cm}^{-1}$),可以分析淀粉分子的短程有序程度,一般认为其比值越大,

短程有序度越高^[28]。因此,利用该技术对不同近等基因系样品进行了分析。如图 6-B 所示,3 个样品的红外吸收曲线较为一致,但是通过参数计算($1045/1022\text{ cm}^{-1}$),发现 NIL(Wx^b)样品的短程有序程度最高,其次是 NIL(Wx^{in}),而最低的是受体亲本(表 5)。这与 XRD 的分析结果完全一致,也与我们前期通过修饰 GBSSI 活性而创建的具有不同 AAC 稻米淀粉的晶体结构分析相符合^[25]。

3 讨论

随着生活水平的提高,消费者对于稻米品质的要求越来越高,尤其关心稻米的食味品质。通常认为,直链淀粉含量对于稻米食味品质的影响最大。因此,在近些年来的稻米品质改良研究中已广泛开展了 Wx 等基因的分子标记辅助选择利用^[3,29]。我国目前大部分籼稻产区一般通过引入 Wx^b 等位基因来改良籼稻的食味品质。但是东南亚一带的优质籼稻一般携带 Wx^{in} ,说明该等位基因在籼稻食味品质改良中可能更有效^[30-32]。为系统比较 Wx^a 、 Wx^{in} 和 Wx^b 在籼稻背景下对稻米品质的影响,本研究构建了籼稻 3611(Wx^a)背景下 Wx^{in} 和 Wx^b 的近等基因系,分析了 Wx^{in} 等位基因在籼稻背景下对稻米食味品质的改良效应和不同 Wx 等位基因对稻米其他理化特性的影响。

表 5 不同近等基因系米粉的 X 射线衍射和傅里叶变换红外光谱参数

Table 5 XRD and FTIR spectra parameters of rice flours from different near-isogenic lines

品系 Line	结晶度 Crystallinity (%)	峰强比值 IR ratio of $1045/1022\text{ cm}^{-1}$
3611(Wx^a)	27.35±0.31 c	0.64±0.01 c
NIL(Wx^{in})	29.17±0.28 b	0.76±0.01 b
NIL(Wx^b)	32.04±0.41 a	0.80±0.01 a

同列标以不同小写字母间差异极显著($P < 0.01$), $n = 3$ 。

Values with in the same column followed by different letters are significant different at $P < 0.01$ and $n = 3$.

近年来有关 Wx 基因的等位变异及其对稻米品质的效应研究已有很多,如通过不同品种间的关联分析,发现 Wx 基因和 ALK 基因是稻米蒸煮与食味品质调控网络的主效基因^[5,15,32]。此外,基于 Wx 等位变异和 SSI 、 $SSIIa$ 和 $SSIIIa$ 的互作研究,发现 Wx 不同等位基因类型能够协同 SSI 、 $SSIIa$ 和 $SSIIIa$ 调控稻米的理化品质,如 Wx^a 等位基因是 $ssIIIa$ 控制高抗性淀粉的必要条件^[33-35]。在品质性状全基因组关联分析研究方面,发现 Wx 基因的不同等位变异位点与稻米品质的理化指标关联密切^[36-37]。为排除遗

传背景干扰, Teng 等^[38-39]通过染色体片段代换系分析了 5 个 Wx 自然等位变异基因的效应,发现 GBSSI 活性水平与 AAC 及其他理化指标存在明显的相关性。本研究尽管没有进行 GBSSI 的活性测定,但是对 GBSSI 的丰度包括游离态和淀粉粒结合态的 GBSSI 丰度进行了分析,说明不同 Wx 等位基因所编码的 GBSSI 丰度无论是游离态还是淀粉粒结合态都存在显著差异,并且与 AAC 呈现出明显的正相关性。我们进一步分析了不同近等基因系稻米的晶体结构,发现 AAC 与稻米晶体结构存在直接的负相关

性, 即 AAC 越高, 结晶度越低, 而结晶度又与稻米的热焓值正相关, 即较高的结晶度需要较高的热量去溶解。这些结果不仅符合之前一些有关淀粉精细结构与稻理化指标的相关性结果^[25,39], 而且更加明确了这种相关性。

截至目前, 在水稻中至少发现了 8 个 Wx 基因的等位变异类型^[2], 在非糯栽培稻中广泛分布的主要为 Wx^a 、 Wx^{in} 和 Wx^b 。其中 Wx^a 主要存在于我国传统的籼稻品种中, 而 Wx^b 主要存在于粳稻品种中。 Wx^{in} 等位基因目前在国内栽培水稻中分布非常稀少, 而在东南亚以及美国等地区的热带粳稻和部分籼稻中广泛存在^[30-31]。由于水稻品质遗传改良的发展, 我国目前很多籼稻品种中已经通过导入 Wx^b 等位基因来进行稻米品质改良^[3], 但其 AAC 水平在籼稻中偏低, 尤其是南方夏季高温稻区很难达到优质米的标准。本研究表明, 较 Wx^b 而言, 导入 Wx^{in} 等位基因的稻米具有稍高的 AAC, 稍硬的胶稠度和适中的糊化温度, 其可能在食味品质改良方面较 Wx^b 等位基因具有更大的潜力。近些年来的研究表明, 除了遗传因素, 环境条件也是影响稻米食味品质的众多因素之一^[40-41]。其中, 水稻灌浆结实期的高温环境是降低稻米食味品质的重要因素, 高温一方面能造成外观品质变差, 另一方面也能导致 AAC 下降^[13,25]。因此, 尽管通过在籼稻中引入 Wx^b 等位基因能够提高稻米的食味品质, 但在南方高温高湿的环境下会造成其品质表现不稳定, 高温年份品质容易变差^[41-42]。Teng 等对籼稻背景下携带不同 Wx 等位基因的染色体片段代换系的分时播期试验, 证明携带 Wx^b 等位基因的稻米品质对环境改变更敏感^[38]。目前杂交籼稻也多通过引入 Wx^b 等位基因进行品质改良, 但我国南方地区的杂交籼稻抽穗灌浆期多位于高温频发季节, 而 Wx^b 相对 Wx^a 对高温更敏感^[43], 因此, 携带 Wx^b 的杂交稻米 AAC 会偏低, 米饭对于南方消费者而言偏软。而 Wx^{in} 等位基因可能更适合南方地区的消费者。Wang 等利用携带 Wx^a 、 Wx^{in} 和 Wx^b 等位基因的 17 份亲本材料, 配制了 136 个杂交组合, 证明 Wx^{in}/Wx^{in} 和 Wx^b/Wx^{in} 组合类型的杂交稻米 AAC 较为适中^[44], 这进一步说明 Wx^{in} 等位基因在我国籼稻尤其是杂交籼稻品质改良方面可能更有效。

4 结论

在当下栽培稻中广泛分布的 Wx^a 、 Wx^{in} 和 Wx^b 等位基因对稻米食味品质的效应已经非常明确, Wx^b 和 Wx^{in} 等位基因的引入能够显著改善籼稻米饭的食

味品质, 其中 Wx^{in} 在籼稻中由于能够适度提高 AAC 和改良米饭质地, 可能是今后籼稻尤其是杂交籼稻品质改良重点关注的等位基因。通过 Wx^{in}/Wx^{in} 或者 Wx^b/Wx^{in} 组合来尝试杂交稻米品质改良可能是一个重要的研究方向。在稻米品质改良生产实践中, 由于地域和文化的差异, 可能需要在考虑当地消费者对米饭食味偏好性的基础上, 有针对性地引入多样化的 Wx 等位基因, 搭配出具有不同食味品质的组合以满足不同人群的需求。

References

- [1] Tilman D, Balzer C, Hill J, Befort B L. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 20260–20264.
- [2] 张昌泉, 赵冬生, 李钱峰, 顾铭洪, 刘巧泉. 稻米品质性状基因的克隆与功能研究进展. *中国农业科学*, 2016, 49: 4267–4283.
Zhang C Q, Zhao D S, Li Q F, Gu M H, Liu Q Q. Progresses in research on cloning and functional analysis of key genes involving in rice grain quality. *Sci Agric Sin*, 2016, 49: 4267–4283 (in Chinese with English abstract).
- [3] Zeng D L, Tian Z X, Rao Y C, Dong G J, Yang Y L, Huang L C, Leng Y J, Xu J, Sun C, Zhang G H, Hu J, Zhu L, Gao Z Y, Hu X M, Guo L B, Xiong G S, Wang Y H, Li J Y, Qian Q. Rational design of high-yield and superior-quality rice. *Nat Plants*, 2017, 3: 17031.
- [4] Li H Y, Prakash S, Nicholson T M, Fitzgerald M A, Gilbert R G. The importance of amylose and amylopectin fine structure for textural properties of cooked rice grains. *Food Chem*, 2016, 196: 702–711.
- [5] 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 H, 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.
- [6] Mohapatra D, Bal S. Cooking quality and instrumental textural attributes of cooked rice for different milling fractions. *J Food Eng*, 2006, 73: 253–259.
- [7] 贺晓鹏, 朱昌兰, 刘玲珑, 江玲, 张文伟, 刘宜柏, 万建民. 不同水稻品种支链淀粉结构的差异及其与淀粉理化特性的关系. *作物学报*, 2010, 36: 276–284.
He X P, Zhu C L, Liu L L, Jiang L, Zhang W W, Liu Y B, Wan J M. Difference of amylopectin structure among various rice genotypes differing in grain qualities and its relation to starch physicochemical properties. *Acta Agron Sin*, 2010, 36: 276–284 (in Chinese with English abstract).
- [8] Li H Y, Gilbert R G. Starch molecular structure: The basis for an improved understanding of cooked rice texture. *Carbohydr Polym*, 2018, 195: 9–17.
- [9] Tao K Y, Li C, Yu W W, Gilbert R G, Li E P. How amylose molecular fine structure of rice starch affects functional properties. *Carbohydr Polym*, 2019, 204: 24–31.
- [10] 朱霖晖, 张昌泉, 顾铭洪, 刘巧泉. 水稻 Wx 基因的等位变

- 异及育种利用研究进展. 中国水稻科学, 2015, 29: 431–438.
- Zhu J H, Zhang C Q, Gu M H, Liu Q Q. Progress in the allelic variation of *Wx* gene and its application in rice breeding. *Chin J Rice Sci*, 2015, 29: 431–438 (in Chinese with English abstract).
- [11] Cai X L, Wang Z Y, Xing Y Y, Zhang J L, Hong M M. Aberant splicing of intron 1 leads to the heterogeneous 5' UTR and decreased expression of *waxy* gene in rice cultivars of intermediate amylose content. *Plant J*, 2010, 14: 459–465.
- [12] Isshiki M, Morino K, Nakajima M, Okagaki R J, Wessler S R, Izawa T, Shimamoto K. A naturally occurring functional allele of the rice *waxy* locus has a GT to TT mutation at the 5' splice site of the first intron. *Plant J*, 1998, 15: 133–138.
- [13] Sreenivasulu N, Butardo V M J, Misra G, Cuevas R P, Anacleto R, Kavi Kishor P B. Designing climate-resilient rice with ideal grain quality suited for high-temperature stress. *J Exp Bot*, 2015, 66: 1737–1748.
- [14] 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.
- [15] Xiang X C, Kang C F, Xu S J, Yang B W. Combined effects of *Wx* and *SSIIa* haplotypes on rice starch physicochemical properties. *J Sci Food Agric*, 2017, 97: 1229–1234.
- [16] Yang B W, Xu S J, Xu L, You H, Xiang X C. Effects of *Wx* and its interaction with *SSIII-2* on rice eating and cooking qualities. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 456.
- [17] 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: 472–480.
- [18] Cao X M, Sun H Y, Wang C G, Ren X J, Liu H F, Zhang Z J. Effects of late-stage nitrogen fertilizer application on the starch structure and cooking quality of rice. *J Sci Food Agric*, 2017, 98: 2332–2340.
- [19] Tian Z X, Yan C J, Qian Q, Yan S, Xie H L, Wang F, Xu J F, Liu G F, Wang Y H, Liu Q Q, Tang S Z, Li J Y, Gu M H. Development of gene-tagged molecular markers for starch synthesis-related genes in rice. *Chin Sci Bull*, 2010, 55: 3768–3777.
- [20] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acids Res*, 1980, 8: 4321–4325.
- [21] 刘巧泉, 张景六, 王宗阳, 洪孟民, 顾铭洪. 根癌农杆菌介导的水稻高效转化系统的建立. 植物生理学报, 1998, 24: 259–271.
- Liu Q Q, Zhang J L, Wang Z M, Hong M M, Gu M H. A highly efficient transformation system mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Phytophysiol Sin*, 1998, 24: 259–271 (in Chinese with English abstract).
- [22] Zhang C Q, Zhu L J, Shao K, Gu M M, Liu Q Q. Toward underlying reasons for rice starches having low viscosity and high amylose: physicochemical and structural characteristics. *J Sci Food Agric*, 2013, 93: 1543–1551.
- [23] Liu D R, Wang W, Cai X L. Modulation of amylose content by structure-based modification of OsGBSSI activity in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Biotechnol J*, 2015, 12: 1297–1307.
- [24] 舒庆尧, 吴殿星, 夏英武, 高明尉, Anna M C. 稻米淀粉 RVA 谱特征与食用品质的关系. 中国农业科学, 1998, 31: 25–29.
- Shu Q Y, Wu D X, Xia Y W, Gao M W, Anna M C. Relationship between RVA profile characteristics of rice starch and edible quality. *Sci Agric Sin*, 1998, 31: 25–29 (in Chinese with English abstract).
- [25] Zhang C Q, Chen S J, Ren X Y, Lu Y, Liu D R, Cai X L, Li Q F, Gao J P, Liu Q Q. Molecular structure and physicochemical properties of starches from rice with different amylose contents resulting from modification of OsGBSSI activity. *J Agric Food Chem*, 2017, 65: 2222.
- [26] Cai J W, Man J M, Huang J, Liu Q Q, Wei W X, Wei C X. Relationship between structure and functional properties of normal rice starches with different amylose contents. *Carbohydr Polym*, 2015, 125: 35–44.
- [27] Cooke D, Gidley M J. Loss of crystalline and molecular order during starch gelatinisation: origin of the enthalpic transition. *Carbohydr Polym*, 1992, 227: 103–112.
- [28] Sevenou O, Hill S E, Farhat I A, Mitchell J R. Organisation of the external region of the starch granule as determined by infrared spectroscopy. *Int J Biol Macromol*, 2002, 31: 79–85.
- [29] Chen M J, Liu G F, Yu H, Wang B, Li J Y. Towards molecular design of rice plant architecture and grain quality. *Chin Sci Bull*, 2018, 63: 1276–1289.
- [30] Chen M H, Bergman C J, Pinsona S R M, Fjellstrom R G. *Waxy* gene haplotypes: associations with pasting properties in an international rice germplasm collection. *J Cereal Sci*, 2008, 48: 781–788.
- [31] Hoai T T T, Matsusaka H, Toyosawa Y, Suu T D, Satoh H, Kumamaru T. Influence of single-nucleotide polymorphisms in the gene encoding granule-bound starch synthase I on amylose content in Vietnamese rice cultivars. *Breed Sci*, 2014, 64: 142.
- [32] Luo J X, Jobling S A, Millar A, Morell M K, Li Z Y. Allelic effects on starch structure and properties of six starch biosynthetic genes in a rice recombinant inbred line population. *Rice*, 2015, 8: 15.
- [33] Li Q F, Liu X Y, Zhang C Q, Jiang L, Jiang M Y, Zhong M, Fan X L, Gu M H, Liu Q Q. Rice soluble starch synthase: I. Allelic variation, expression, function, and interaction with *Waxy*. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 1591.
- [34] Wang K, Hasjim J, Wu A C, Li E P, Henry R J, Gilbert R G. Roles of GBSSI and SSIIa in determining amylose fine structure. *Carbohydr Polym*, 2015, 127: 264–74.
- [35] Zhou H J, Wang L J, Liu G F, Meng X B, Jing Y H, Shu X L, Kong X L, Sun J A, Yu H, Smith S M, Wu D X, Li J Y. Critical roles of soluble starch synthase SSIIa and granule-bound starch synthase *Waxy* in synthesizing resistant starch in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 12844–12849.
- [36] Fan M Y, Wang X J, Sun J, Zhang Q, Xu Z J, Xu Q. Effect of indica pedigree on eating and cooking quality in rice back-cross inbred lines of *indica* and *japonica* crosses. *Breed Sci*, 2017, 67: 450–458.

- [37] Misra G, Badoni S, Domingo C J, Cuevas R P O, Llorente C, Mbanjo E G N, Sreenivasulu N. Deciphering the genetic architecture of cooked rice texture. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 1405.
- [38] Teng B, Zeng R Z, Wang Y C, Liu Z Q, Zhang Z M, Zhu H T, Ding X H, Li W T, Zhang G Q. Detection of allelic variation at the Wx locus with single-segment substitution lines in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Breed*, 2012, 30: 583–595.
- [39] Teng B, Zhang Y, Du S Y, Wu J D, Li Z F, Luo Z H, Yang J B. Crystalline, thermal and swelling properties of starches from single-segment substitution lines with different Wx alleles in rice (*Oryza sativa* L.). *J Sci Food Agric*, 2017, 97: 108–114.
- [40] Bao J S, Kong X G, Xie, J K, Xu L J. Analysis of genotypic and environmental effects on rice starch: 1. Apparent amylose content, pasting viscosity, and gel texture. *J Agric Food Chem*, 2004, 52: 6010–6016.
- [41] Xu Y J, Ying Y N, Ou-Yang S H, Duan X L, Sun H, Jiang S K, Sun S C, Bao J S. Factors affecting sensory quality of cooked *japonica* rice. *Rice Sci*, 2018, 2: 330–339.
- [42] Champagne E T, Bett-Garber K L, Fitzgerald M A, Grimm C C, Lea J, Ohtsubo K I, Jongdee S, Xie L H, Bassinello P Z, Resurreccion A, Ahmad R, Habibi F, Reinke R. Important sensory properties differentiating premium rice varieties. *Rice*, 2010, 3: 270–281.
- [43] Inukai T, Hirayama Y. Comparison of starch levels reduced by high temperature during ripening in *japonica* rice lines near-isogenic for the Wx locus. *J Agron Crop Sci*, 2010, 196: 296–301.
- [44] Wang K, Zhou Q F, Liu J Y, Qiu F L, Angelita dela Paz M, Larazo W, Yang Y Z, Xie F M. Genetic effects of Wx allele combinations on apparent amylose content in tropical hybrid rice. *Cereal Chem*, 2017, 94: 887–891.