

李祥栋,张明生,王 洋,等. 贵州优质酒用高粱 *Waxy* 基因的鉴定分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(5):39-42.

贵州优质酒用高粱 *Waxy* 基因的鉴定分析

李祥栋¹, 张明生¹, 王 洋¹, 任明见¹, 高 翔²

(1. 贵州大学生命科学学院, 贵州贵阳 550025; 2. 贵州省农业科学院, 贵州贵阳 550006)

摘要:利用 10 个高粱品种(9 个酒用高粱品种和 1 个非糯性品种), 在进行单籽粒粳糯性检测、淀粉含量测定的基础上, 进一步对 *Waxy* 基因位点进行鉴定分析。结果表明, 9 个糯高粱品种糯性籽粒所占的比例基本上达到了 100%; 非糯性品种(BTx23)直链淀粉含量为 13.83%, 9 个糯性品种的直链淀粉含量在 0.18% ~ 3.26% 之间, 与非糯性品种差异极显著; 在所有糯高粱品种中有 2 个为 w^a 突变类型, 其余 7 个均为 w^b 突变类型, 非糯性品种属野生型(W)。

关键词:高粱; *Waxy* 基因; 淀粉; 粳糯性; 贵州省

中图分类号: S514.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)05-0039-03

高粱[*Sorghum bicolor* (L.) Moench]为世界重要粮食作物之一, 与许多禾谷类作物一样, 其种子的胚乳具有粳性和糯性之分, 这是由胚乳中直链淀粉和支链淀粉含量及比例决定的。淀粉在胚乳中的合成是一个复杂的代谢过程, 颗粒结合淀粉合成酶(granule-bound starch synthase, GBSS)被认为是淀粉合成途径中的关键酶, 它直接参与直链淀粉的生物合成, 该酶的活性及其表达都会影响胚乳的表观结构与纹理, 这与直链、支链淀粉的含量及比例变化密切相关^[1]。糯性基因在玉米^[2]、水稻^[3]、小麦^[4]、大麦^[5]、粟^[6]中均有发现, Karper 等首次将高粱糯性性状命名为 $wx^{[7]}$ 。Pedersen 等根据 GBSS 蛋白缺失和酶活性降低的特征, 将高粱糯性性状划分为 2 种类型 wx^a 、 wx^b , 通过分析不同高粱品系杂交后代的性状分离比确定野生型 Wx 、 wx^a 和 wx^b 之间的显隐性关系^[8]。有人对淀粉合成途径中的关键酶基因突变位点进行了分析, 并在 BTx-ARG1 糯性系中鉴定了 1 个与糯性性状极有可能相关的候选突变位点, 这为糯性位点的连锁遗传作图提供了参考^[9]。近年来, McIntyre 等在比较分析 BTxARG1 糯性系和 QL39 非糯性系的 GBSS 基因序列的基础上, 查找到了 9 个插入/缺失和 24 个 SNP 突变位点, 认为只有 2 个 SNP 位点会改变 GBSS 蛋白序列, 并将 wx 基因定位在 10 号染色体上^[10]。Sattler 等也对 wx^a 和 wx^b 在 DNA 水平上进行了探讨, 结果表明, wx^a 是由 GBSS 基因第 3 个外显子中有 1 个大约 4 kb 的大片段插入引起的, 这使得启动子和主要编码区分离开来, 从而阻止了 GBSS 蛋白的合成; wx^b 在第 8 个外显子上有 1 个 G→T 的突变, 致使 GBSS 蛋白 268 位的谷氨酰胺突变为组氨酸, 从而导致 GBSS 酶活性减弱^[11]。

贵州素有“名酒之乡”之称, 除了国酒茅台之外, 董酒、习

酒等也闻名遐迩。其中, 糯高粱是酿酒的主要原料。这些名酒传统、独特的酿酒工艺对高粱的品质有着特殊要求, 其糯性是必备条件之一。为了满足酿酒的要求, 相关领域的育种工作者经过数十年的努力, 选育出了“红缨子”“红茅糯”等优质酒用糯高粱品种。因为这些品种都是以传统育种方法选育出来的常规种, 再加上高粱常异花授粉的特性极易造成种质退化。糯性性状对高粱品质有重要的影响, 且现阶段在贵州酒用高粱的糯性性状方面的研究一直处于空白状态, 因此, 本研究在前人研究的基础之上, 对贵州优质酒用高粱的糯性基因类型进行了鉴定分析, 以期对贵州优质酒用高粱的提纯复壮及遗传改良提供理论支撑。

1 材料与与方法

1.1 试验材料

以 9 个贵州优质酒用糯高粱品种和 1 个粳性高粱品种为试验材料, 各品种详细信息见表 1。

表 1 高粱种质编号、来源及粳糯性

品种编号	名称	来源	粳/糯性	糯性粒所占比例(%)
S1	红缨子	贵州仁怀	糯	100
S2	茅梁 1 号	贵州大学农学院	糯	100
S3	红茅糯	贵州仁怀	糯	100
S4	红青壳	贵州仁怀	糯	100
S5	红珍珠	贵州仁怀	糯	100
S6	黔高 7 号	贵州省农业科学院	糯	100
S7	黔高 8 号	贵州省农业科学院	糯	100
S8	务川高粱	贵州省农业科学院	糯	98
S9	泸糯 8 号	贵州省农业科学院	糯	100
S10	BTx23	贵州省农业科学院	粳	0

1.2 试验方法

1.2.1 高粱籽粒的糯性鉴定和淀粉含量测定 每个高粱品种随机选取 100 粒, 采用 Pedersen 等的快速碘染色法^[12]对单个籽粒进行粳、糯性鉴定, 并计算糯性粒所占的比例, 结果见表 1。直链、支链淀粉含量的测定采用双波长比色法^[13]。

1.2.2 高粱 DNA 的提取与检测 选取饱满的籽粒进行苗盘育苗, 25 ℃ 温室培养 2 ~ 3 周, 采用 CTAB 法^[14]对单株总

收稿日期: 2013-09-23

基金项目: 国家农业科技成果转化资金(编号: 2013GB2F200437); 农业部引进的国际先进农业科学技术项目(编号: 2012-Z37); 贵州省国际科技合作计划(编号: 黔科合外 G 字[2012]7014); 贵州省科技计划[编号: 黔科合 NYC(2013)3016]。

作者简介: 李祥栋(1987—), 男, 山东临沂人, 硕士研究生, 研究方向为植物生理与分子调控。

通信作者: 张明生, 教授, 博士生导师。E-mail: mshzhang@163.com。

DNA 进行提取,采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组的完整性,采用紫外分光光度法测定其浓度,最终稀释至 30 ~ 50 ng/ μ L 使用。

表 2 *Waxy* 基因位点引物序列及扩增片段大小

<i>Waxy</i> 位点	正向引物	反向引物	退火温度 ($^{\circ}$ C)	扩增片断大小 (bp)
<i>W</i>	5'-GGCCTGGATTCAATGTTCTT-3'	5'-GCAGCTGCTTGTCCTTGTAG-3'	57	523
<i>w^a</i>	5'-CGTGGCGAGATCAAACCTCTA-3'	5'-GCAGCTGCTTGTCCTTGTAG-3'	57	615
<i>w^b</i>	5'-CGACCGTGTGTTCAATTGACCAC-3'	5'-TTGTTCACTGCCCTTTGCCTCG-3'	59	1 281

1.2.4 不同高粱品种 *W*、*w^a* 和 *w^b* 基因的检测 *W*、*w^a* 和 *w^b* 基因的 PCR 均采用 25 μ L 体系:1 \times PCR Buffer (10 mmol/L Tris \cdot HCl, pH 值 8.3, 50 mmol/L KCl), 2 mmol/L MgCl₂, 200 μ mol/L dNTP, 正向、反向引物各 0.2 μ mol/L, *Taq* 酶 1.5 U, DNA 模版 50 ~ 100 ng。反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 退火 50 s (各退火温度见表 2), 72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 *w^a* 和 *w^b* 基因的 PCR 产物,并将 *w^b* 的 PCR 产物送往生工(上海)生物工程有限公司进行 DNA 测序。

2 结果与分析

2.1 不同高粱品种的粳糯性

糯性籽粒与碘试剂反应呈棕红色,而粳性籽粒呈蓝色,其鉴定结果见表 1。试验结果表明,这种碘染色法基本不受粒色干扰,可以对高粱的单个籽粒进行快速的粳糯性检测且精确度高;除了务川高粱(S8)的糯性籽粒比例为 98% 外,其余

1.2.3 不同 *Waxy* 基因 PCR 引物的选择 不同 *Waxy* 基因的引物与 Sattler 等开发的引物^[11]一致(表 2),*w^a* 和野生型 *W* 共用 1 个反向引物。

糯性品种的糯性粒比例均达到 100%,从而间接说明了各个高粱品种的种子纯度较高。务川高粱的糯性籽粒比例未达到 100%,这可能是高粱常异花授粉的结果,也可能是收获过程中混入了极少量的其他品种。

2.2 不同高粱品种的淀粉含量表现

高粱的胚乳是积累淀粉的主要场所,而胚乳的糯性与非糯性取决于直链淀粉和支链淀粉的含量及比例。不同高粱种质的直链淀粉、支链淀粉和总淀粉的含量见表 3。试验结果显示,在 S1 ~ S9 的糯性品种中,S3 的直链淀粉含量最高,为 3.26%,其余 8 个品种在 0.18% ~ 0.72% 之间变动;非糯性品种的直链淀粉含量高达 13.82%,与糯性品种的含量差异极显著。所有品种的支链淀粉和总淀粉的变化范围分别为 50.47% ~ 80.53%、50.72% ~ 83.75%,而且糯性品种支链淀粉占总淀粉含量的比例均较高,其变化范围在 95.64% ~ 99.73% 之间。

表 3 不同高粱品种淀粉含量和 *Waxy* 位点检测结果

品种编号	淀粉含量(%)			直链淀粉/总淀粉 (%)	<i>w^a</i> (大片段插入)	<i>w^b</i> (G \rightarrow T 突变)
	直链淀粉	支链淀粉	总淀粉			
S1	0.30 \pm 0.01fF	80.53 \pm 0.42aA	80.82 \pm 0.41bB	99.63 \pm 0.01bB	-	+
S2	0.36 \pm 0.00eE	76.65 \pm 0.18bB	77.01 \pm 0.18cC	99.53 \pm 0.00cdCD	-	+
S3	3.26 \pm 0.01bB	71.46 \pm 0.46dD	74.72 \pm 0.47dD	95.64 \pm 0.02hH	-	+
S4	0.18 \pm 0.03hH	66.97 \pm 1.28fF	67.16 \pm 1.26fF	99.73 \pm 0.05aA	-	+
S5	0.45 \pm 0.01dD	72.67 \pm 0.43cC	73.13 \pm 0.43eE	99.38 \pm 0.02eE	-	+
S6	0.25 \pm 0.00gG	55.80 \pm 0.05gG	56.05 \pm 0.05gG	99.55 \pm 0.00cC	-	+
S7	0.46 \pm 0.00dD	54.94 \pm 0.03gG	55.40 \pm 0.03gG	99.17 \pm 0.00fF	-	+
S8	0.25 \pm 0.00gG	50.47 \pm 0.15hH	50.72 \pm 0.15hH	99.51 \pm 0.01dD	+	-
S9	0.72 \pm 0.01cC	67.01 \pm 0.11fF	67.73 \pm 0.10fF	98.94 \pm 0.01gG	+	-
S10	13.82 \pm 0.01aA	69.93 \pm 0.20eE	83.75 \pm 0.20aA	83.50 \pm 0.04iI	-	-

注:“-”表示不存在该突变位点,“+”表示存在该突变位点;同列数据后标有不同小写、大写字母表示在 0.05、0.01 水平上差异显著。

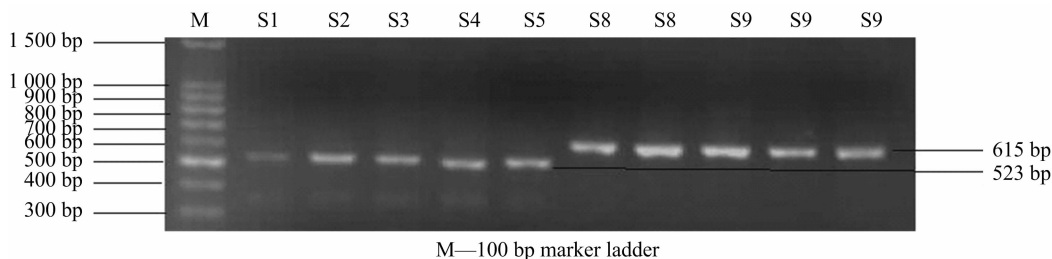
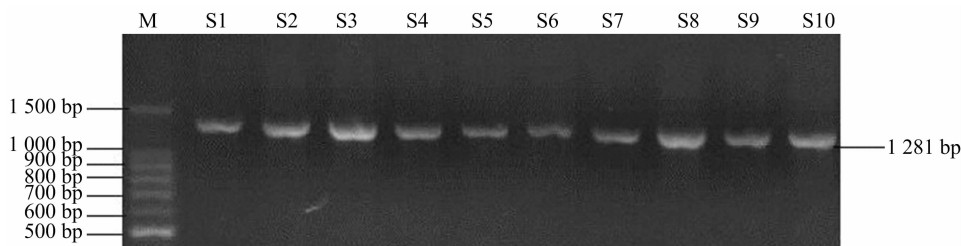
2.3 不同高粱品种的 *Waxy* 基因类型

由于 *w^a* 是由 1 个长度约 4 000 bp 的大片段插入引起的,一般的 PCR 反应很难实现扩增,因此设计 2 个正向引物和 1 个共同的反向引物(表 2)来区分 *w^a* 和 *W* 基因。当 *w^a* 存在时,PCR 扩增产物片段 615 bp,它包含了部分 *w^a* 的片段插入到第 5 个外显子的序列区域;当 *w^a* 不存在时,PCR 产物长度为 523 bp,此片段包含了第 2 个内含子到第 5 个外显子的 DNA 序列。*w^a* 的检测结果(图 1 和表 3)显示,除了 S8(务川高粱)和 S9(泸糯 8 号)存在 *w^a* 外,其余的 8 个高粱品种均不存在 *w^a*。*w^b* 的突变位点是 1 个 SNP,并且产生了 1 个 *Nco* I 酶切位点,设计的扩增片段长度为 1 281 bp(图 2)。*w^b* 测序结果显示,S1 ~ S7 均发生了 G \rightarrow T 突变(图 3),而 S10 在 *w^a*、

w^b 位点均没有突变,属于野生型 *W*。从 *w^a* 和 *w^b* 的检测结果中并没有发现杂合体的存在,这应该是人们长期选择的结果。

3 结论与讨论

高粱作为一种单子叶禾本植物,其胚乳的倍性为三倍体,其中有 2 个染色体拷贝来自于母本、1 个拷贝来自于父本,因此胚乳是否为糯性是由 3 个拷贝的 GBSS 蛋白基因共同决定的。已有研究表明,糯性基因的存在不仅能降低直链淀粉含量,而且能影响淀粉的糊化、老化和胶黏性等品质特性^[15]。Han 等发现,GBSS 蛋白活性无论是改变还是缺失,都会改变淀粉的生理生化特性^[16-17]。另外,Rooney 等发现,*w^a* 或 *w^b* 的存在能够使高粱籽粒的蛋白质和淀粉更容易被淀粉酶消

图1 w^a 位点琼脂糖凝胶电泳检测结果图2 w^b 位点的琼脂糖凝胶电泳检测结果

S1 TCTCCTA CCATGG CAGGTTTCG
 S2 TCTCCTA CCATGG CAGGTTTCG
 S3 TCTCCTA CCATGG CAGGTTTCG
 S4 TCTCCTA CCATGG CAGGTTTCG
 S5 TCTCCTA CCATGG CAGGTTTCG
 S6 TCTCCTA CCATGG CAGGTTTCG
 S7 TCTCCTA CCATGG CAGGTTTCG
 S8 TCTCCTA CCAGGG CAGGTTTCG
 S9 TCTCCTA CCAGGG CAGGTTTCG
 S10 TCTCCTA CCAGGG CAGGTTTCG

加下划线碱基为突变位点

图3 w^b 位点的DNA序列变异结果

化,这可能与淀粉颗粒在胚乳中的排列方式相关^[18-19]。Sattler 等利用扫描电镜对糯性和非糯性胚乳进行扫描后发现,糯性胚乳中的淀粉颗粒较大,因而能够形成较大的间隙,这可能有利于酶与淀粉的结合^[11]。由于 w^b 的突变产生了 1 个 *Nco* I 酶切位点,本研究中的 w^b 引物也是基于酶切位点进行设计的,其 PCR 产物长度可达 1 281 bp。然而本试验的酶切效果不佳(结果未展示),不能将 w^b 和 *W* 区分开来,这可能与 DNA 的甲基化等修饰有关;也可能因为 DNA 片段较大,容易形成比较复杂的拓扑结构,阻止了限制性内切酶与酶切位点的结合。在当今 DNA 测序条件下,一般每个单向测序反应的测序长度不会超过 800 bp,超过 800 bp 的 DNA 片段往往需要正反向测序并进行校正以保证测序的准确性。尽管通过双向 DNA 测序也能得到可靠的效果,但这显然是不经济的,因此,尝试对 w^b 位点 800 bp 以内的 DNA 序列进行特定引物设计,实现较小片段 DNA 的体外扩增,这对于 w^b 的检测可能会更高效、更经济。

分子辅助育种是进行作物良种选育的重要手段,建立高效的高粱糯性基因 w^a 和 w^b 的检测体系,对贵州优质酒用高粱的提纯复壮、品种的改良与选育具有重要的指导意义。

参考文献:

- [1] Denyer K, Johnson P, Zeeman S, et al. The control of amylose synthesis[J]. Journal of Plant Physiology, 2001, 158(4): 479-487.
- [2] Shure M, Wessler S, Fedoroff N. Molecular identification and isolation of the *Waxy* locus in maize[J]. Cell, 1983, 35(1): 225-233.
- [3] Hirano H Y, Sano Y. Molecular characterization of the waxy locus of rice (*Oryza sativa*) [J]. Plant & Cell Physiology, 1991, 32(7): 989-997.
- [4] Ainsworth C, Clark J, Balsdon J. Expression, organisation and structure of the genes encoding the Waxy protein (granule-bound starch synthase) in wheat[J]. Plant Molecular Biology, 1993, 22(1): 67-82.
- [5] Rohde W, Becker D, Salamini F. Structural analysis of the *Waxy* locus from *Hordeum vulgare*[J]. Nucleic Acids Research, 1988, 16(14B): 7185-7186.
- [6] Fukunaga K, Kawase M, Kato K. Structural variation in the *Waxy* gene and differentiation in foxtail millet [*Setaria italica* (L.) P. Beauv.]: implications for multiple origins of the Waxy phenotype[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2002, 268(2): 214-222.
- [7] Karper R. Inheritance of *Waxy* endosperm in sorghum[J]. Journal of Heredity, 1933, 24(6): 257-262.
- [8] Pedersen J F, Bean S R, Graybosch R A, et al. Characterization of *Waxy* grain sorghum lines in relation to granule-bound starch synthase[J]. Euphytica, 2005, 144(1/2): 151-156.
- [9] Hamblin M T, Fernandez M G S, Tuinstra M R, et al. Sequence variation at candidate loci in the starch metabolism pathway in sorghum: prospects for linkage disequilibrium mapping[J]. Crop Science, 2007, 47(Suppl): 125-134.
- [10] McIntyre C L, Drenth J, Gonzalez N, et al. Molecular characterization of the *Waxy* locus in sorghum[J]. Genome, 2008, 51(7): 524-533.
- [11] Sattler S E, Singh J, Haas E J, et al. Two distinct *Waxy* alleles impact the granule-bound starch synthase in sorghum[J]. Molecular Breeding, 2009, 24(4): 349-359.
- [12] Pedersen J F, Bean S R, Funnell D L, et al. Rapid iodine staining techniques for identifying the *Waxy* phenotype in sorghum grain and *Waxy* genotype in sorghum pollen[J]. Crop Science, 2004, 44: 764-767.
- [13] 范明顺, 张崇玉, 张琴, 等. 双波长分光光度法测定高粱中的直链淀粉和支链淀粉[J]. 中国酿造, 2008(11): 85-87.

陶 隽, 贾 青, 魏星灿, 等. 猪 *ACACA* 基因及其编码蛋白质的生物信息学分析[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(5): 42–45.

猪 *ACACA* 基因及其编码蛋白质的生物信息学分析

陶 隽¹, 贾 青^{1,2}, 魏星灿¹, 胡慧艳¹, 邢增喜¹

(1. 河北农业大学动物科技学院, 河北保定 071001; 2. 国家北方山区农业工程技术研究中心, 河北保定 071001)

摘要: 为从分子水平研究猪脂肪合成过程, 对脂肪合成关键酶乙酰辅酶 A 羧化酶- α 基因(*ACACA*)进行分析。采用生物信息学的方法, 查找猪 *ACACA* 基因的 ORF 框, 对基因 CDS 序列的限制性酶切位点进行分析, 并对其编码蛋白质的理化性质、二级结构、三级结构、拓扑结构、结构功能域进行预测分析。结果表明, 猪 *ACACA* 基因 CDS 区全长 7 041 bp, 其编码蛋白质含 2 346 个氨基酸。二级结构以 α 螺旋与无规则卷曲为主, 局部出现 β 转角, 三级结构显示结果与二级结构预测结果相符。该蛋白质为亲水性蛋白质, N 端无信号肽, 为非分泌蛋白质; 不含跨膜结构区, 未定位于膜内, 预测其为膜外区蛋白质; 亚细胞定位结果显示该蛋白质为非细胞器蛋白质, 是胞质蛋白质的可能性最大; 功能域分析发现该蛋白质序列含有 BC 结构域、CT 结构域、CPSase 大亚基 N 端结构域、ATP-grasp 折叠结构域、生物素基/硫辛酰基结合域等及一些蛋白质基序。该结果将为进一步研究猪 *ACACA* 基因与脂肪合成的关系提供基础资料。

关键词: 猪; *ACACA* 基因; 蛋白质; 生物信息学

中图分类号: Q753 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)05-0042-04

乙酰辅酶 A 羧化酶 (Acetyl-coenzyme A carboxylase, ACC) 属于分子间羧化转移家族成员, 在脂肪酸代谢过程中起着重要作用。现已确认, 在人和哺乳动物中存在两种形式的 ACC: 由 *ACACA* 基因编码的 ACC- α (ACC-1) 和由 *ACACB* 基因编码的 ACC- β (ACC-2)。前者作为调节长链脂肪酸合成的限速酶, 主要存在于脂肪酸生成活跃的组织 (如肝脏、脂肪组织和乳腺), 催化乙酰辅酶 A 转化成脂肪酸合成起始物丙二酸单酰辅酶 A, 它是调节脂肪酸合成的关键酶^[1-2]。除了在脂肪酸合成过程中发挥重要作用外, Galdieri 等研究发现, ACC- α 表达量的减少会增加染色质组蛋白质的乙酰化以及改变其转录调控^[3]。Cody 等研究发现, ACC- α 是人类巨细胞病毒 (HCMV) 的靶位点, HCMV 感染可增加 *ACACA* 在 mRNA 水平和蛋白水平的表达丰度, 用 RNAi 或抑制剂抑制 ACC- α , 会使 HCMV 的复制能力减弱^[4]。

目前, *ACACA* 基因在植物、微生物、小鼠中报道较多, 但是家畜中该基因的研究报道较少。本研究通过分子生物信息

学的方法, 分析猪 *ACACA* 基因的一般特征, 预测其编码的蛋白质二级、三级结构, 并进行蛋白质的拓扑结构, 及其结构功能域的预测, 旨在为进一步开展猪脂肪合成过程的相关研究提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料

从 NCBI 数据库下载猪乙酰辅酶 A 羧化酶基因 (*ACACA*) 核苷酸序列, 登录号为 NM_001114269.1。

1.2 方法

1.2.1 开放阅读框查找及限制性酶切位点分析 利用 NCBI 网站的 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 工具查找猪 *ACACA* 基因的开放阅读框 (open reading frame, ORF); 利用 Restriction Mapper (<http://www.restriction-mapper.org/>) 程序对 *ACACA* 基因 CDS 序列进行内切酶图谱分析。

1.2.2 *ACACA* 基因编码蛋白质的一级结构分析 利用 ExPASy 网站的 ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) 工具分析基因编码蛋白质的氨基酸残基性质、分子量及理论等电点等信息; 利用 ExPASy 中的 ProtScale 工具 (<http://web.expasy.org/protscale/>) 对该蛋白质的亲水性和疏水性进行预测; 采用 Hphob./Kyte & Doolittle 算法预测氨基酸序列的

收稿日期: 2013-09-09

基金项目: 河北省现代农业产业技术体系创新团队建设专项资金。

作者简介: 陶 隽 (1989—), 女, 甘肃民勤人, 硕士, 主要从事动物遗传学研究。E-mail: taojun0703@163.com。

通信作者: 贾 青, 教授, 博士生导师。E-mail: jiaqing@hebau.edu.cn。

[14] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. Phytochem Bull, 1987, 19: 11–15.

[15] Sang Y J, Bean S, Seib P A, et al. Structure and functional properties of sorghum starches differing in amylose content [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(15): 6680–6685.

[16] Han X Z, Campanella O H, Guan H, et al. Influence of maize starch granule-associated protein on the rheological properties of starch pastes. Part II. Dynamic measurements of viscoelastic properties of starch pastes [J]. Carbohydrate Polymers, 2002, 49(3): 323–330.

[17] Pedersen J F, Graybosch R A, Funnell D L. Occurrence of the *Waxy* alleles *wx^a* and *wx^b* in *Waxy* sorghum plant introductions and their effect on starch thermal properties [J]. Crop Science, 2007, 47: 1927–1933.

[18] Rooney L W, Pflugfelder R L. Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn [J]. Journal of Animal Science, 1986, 63(5): 1607–1623.

[19] Wong J H, Lau T, Cai N, et al. Digestibility of protein and starch from sorghum (*Sorghum bicolor*) is linked to biochemical and structural features of grain endosperm [J]. Journal of Cereal Science, 2009, 49(1): 73–82.