

非洲栽培稻垩白粒率耐热性 QTL 的定位

曹志斌^{1, #} 李瑶^{2, #} 曾博虹¹ 毛凌华¹ 蔡耀辉¹ 吴晓峰^{1, *} 袁林峰^{1, *}

[¹江西省超级水稻研究发展中心/国家水稻工程实验室(南昌), 南昌 330200; ²江西省农业科学院 土壤肥料与资源环境研究所/农业部长江中下游作物生理生态与耕作重点实验室, 南昌 330200; #共同第一作者; *通信联系人, E-mail: yuanlf2003@sina.com; jxnkzy208@163.com]

QTL Mapping for Heat Tolerance of Chalky Grain Rate of *Oryza glaberrima* Steud.

CAO Zhibin^{1, #}, LI Yao^{2, #}, ZENG Bohong¹, MAO Linghua¹, CAI Yaohui¹, WU Xiaofeng^{1, *}, YUAN Linfeng^{1, *}

(¹Laboratory of Rice National Engineering, Jiangxi Research and Development Center of Super Rice, Nanchang 330200, China; ²Institute of Soil and Fertilizer & Resources and Environment, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Crop Ecophysiology and Farming System for the Middle and Lower Reaches of the Yangtze River, Ministry of Agriculture, Nanchang 330200, China; #These authors contributed equally to this work; *Corresponding author, E-mail: yuanlf2003@sina.com; jxnkzy208@163.com)

Abstract: 【Objective】 The objective of the research is to identify a QTL for heat tolerance of chalky grain rate, so as to provide support for the appearance quality breeding and analysis of genetic mechanism of rice high temperature tolerance of chalky grain rate. 【Method】 We developed a chalky grain rate heat-tolerant CSIL(chromosomal segment introgression lines), CSIL05-2, by backcrossing and marker assisted selection with African cultivated rice acc. IRGC102309 (*Oryza glaberrima* Steud.) as donor parent and Asian cultivated rice R9311 (*O. sativa* L. subsp. *indica* Kato) as recipient parent. And a QTL for insensitivity of heat tolerance of chalky grain rate on chromosome 5 was analyzed using secondary populations from CSIL05-2. 【Results】 In a BC₆F₂ segregation populations, the SSR marker RM1200 on chromosome 5 showed significant correlation with heat tolerance of chalky grain rate by single marker analysis ($P=0.0005$). Using Cartographer 2.5 and the composite interval mapping with BC₆F₃ and BC₆F₄ populations, we further anchored the quantitative trait loci (QTL) associated with heat tolerance of chalky grain rate at filling stage to the same position within a 1.3 cM interval, which was designed as qHTCGR and explained 11.4% and 17.5% of the phenotypic variances, respectively. Using homozygous recombinants screened from BC₆F₄ populations, qHTCGR5 was also detected in a ~333.4 kb region between RM11633 and RM11642. 【Conclusion】 The QTL controlling the heat tolerance of chalky grain rate qHTCGR5 is a novel QTL.

Key words: rice; chalky grain rate; heat tolerance; QTL; gene mapping

摘要: 【目的】本研究旨在定位一个稻米垩白粒率高温耐性 QTL, 为外观品质育种及解析垩白粒率高温耐性的遗传机制提供依据。【方法】以非洲栽培稻耐热品种 IRGC102309(*Oryza glaberrima* Steud.)和籼稻品种 R9311(*O. sativa* L. subsp. *indica* Kato.)为亲本构建的栽培稻种间染色体片段导入系 CSIL05-23 为材料构建次级分离群体, 结合人工气候室模拟灌浆期高温胁迫处理, 采用垩白粒率高温钝感值为评价指标, 对非洲栽培稻垩白粒率高温耐性 QTL 进行检测。【结果】在 BC₆F₂ 分离群体, 利用单标记分析, 发现第 5 染色体上的 SSR 标记 RM1200 与垩白粒率耐热性状极显著正相关 ($P=0.0005$)。进一步利用 BC₆F₃ 和 BC₆F₄ 分离群体, 采用 QTL Cartographer 2.5 软件和复合区间作图法在水稻第 5 染色体上的 SSR 标记 RM1200–RM5796 区间重复检测到一个灌浆期垩白粒率耐热性 QTL, 命名为 qHTCGR5, 分别解释 11.4% 和 17.5% 表型变异。根据 BC₆F₄ 分离群体的纯合重组体表型分组, 利用置换作图方法将目标 QTL 同样定位在 SSR 标记 RM1200–RM5796 之间, 遗传图距为 1.3 cM, 物理图距约为 333.4 kb。

【结论】控制垩白粒率耐热性的 qHTCGR5 是一个能够用于稻米外观品质育种的新 QTL。

关键词: 水稻; 垩白粒率; 耐热性; 数量性状位点; 基因定位

中图分类号: Q343.1⁺5; S511.32

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2020)02-0135-08

收稿日期: 2019-07-26; 修改稿收到日期: 2019-10-17。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31560382); 江西省杰出青年科学基金资助项目(2018ACB21026); 江西省自然科学基金资助项目(20151BAB214013; 2017BAB204020); 江西省现代农业科研协同创新专项(JXXTXCFY201902); 国家重点研发计划资助项目(2017YFD0301601; 2018YFD0301103); 江西省重点研发计划资助项目(20171ACF60019)。

水稻是全球最重要的粮食作物之一,世界上将近一半人口的能量供应与之直接相关^[1]。未来全球气候变暖的趋势对全球水稻生产不利影响将日益加剧,热带及亚热带地区作物生长季节,气温可能会提高 3~5℃,将会超过有记录的作物生长季节性高温极值^[2]。而且高温热害天气经常与水稻生殖生长关键期相遇,在孕穗期、扬花期以及灌浆期均有发生。因此,培育能够适应未来气候变化的水稻品种,是应对全球气候变暖的迫切需要^[3]。灌浆期对水稻籽粒产量与品质形成极为关键。当灌浆期遇到炎热的气候条件,对优质稻米品质的形成很不利,当气温超过 35℃,籽粒的灌浆速度加快,灌浆时间缩短,出现高温逼熟现象。产量方面的不利影响,主要表现为籽粒充实度差,千粒重显著降低。稻米品质方面的不利影响,主要表现为垩白粒率高,垩白大,整精米率下降,食味品质变差^[4-10]。

水稻灌浆期耐热性属于受多基因控制的复杂数量性状,受外界环境影响明显^[11-16]。目前已有学者利用不同作图群体及鉴定指标结合分子标记技术,对灌浆期耐热性相关 QTL 进行了初步定位。朱昌兰等^[17]利用 Nipponbare/Kasalath/Nipponbare 回交重组自交系群体,以直链淀粉含量为鉴定指标,在第 6 和 9 染色体上检测到 3 个 QTL。以胶稠度为鉴定指标,在第 4、6、7、8、10 和 11 染色体上分别定位到 1 个水稻灌浆期耐热相关 QTL。朱昌兰等^[18]利用 Nipponbare/Kasalath/Nipponbare 回交重组自交系群体,在第 1、4 和 7 染色体上分别定位了一个灌浆期粒重为耐热指标的 QTL。Kobayashi 等^[19]利用 Hana-echizen/Niigatawase 构建的 F₃ 群体,以稻米外观品质性状背白和腹白为灌浆期耐热性鉴定指标,共检测到 3 个 QTL,其中在第 4 及第 6 染色体上分别鉴定到 1 个白背耐热 QTL,在第 6 染色体上定位到一个白背和基白 QTL。Shirasawa 等^[20]利用 Kokoromachi/Tohoku 168 构建的重组群体在第 1 和 6 染色体上检测到 1 个白背耐热性 QTL。Tabata 等^[21]利用 Koshijiwase/Chiyonishiki 构建的重组自交系群体在第 1、2 和 4 染色体上共检测到 4 个稻米白背耐热性 QTL。张桂莲等^[22]以耐热水稻品系 996 和热敏感水稻品系 4628 为亲本构建的重组自交系为材料,在第 1、3、6、7 染色体上检测到 8 个垩白粒率高温钝感性 QTL,在第 1、2、4、6、7 和 10 染色体上检测到 12 个垩白大小高温钝感性 QTL,在第 1、3、7 染色体上检测到 4 个垩白度高温钝感性 QTL。

目前这些定位结果主要是利用亚洲栽培稻粳稻种内或粳粳亚种间杂交构建的初级作图群体分析得到的。本研究利用非洲栽培稻耐热品种为供体亲本,粳稻品种 R9311 为受体亲本,获得垩白粒率为 17.8% 的染色体片段导入系 CSIL05-23。并通过进一步构建次级分离群体结合人工气候室进行表型鉴定,结合复合区间作图及置换作图法在第 5 染色体上定位到一个主效垩白粒率高温钝感 QTL。这一工作可为研究垩白粒率高温钝感性的遗传机理,筛选与垩白粒率高温钝感性紧密连锁的分子标记以及下一步的育种应用及图位克隆打下基础。

1 材料与方法

1.1 非洲栽培稻垩白粒率耐热性 QTL 分析材料

利用亚洲栽培稻品种 R9311 作为受体,非洲栽培稻品种 IRGC102309 作为供体,2008 年夏季开始连续回交 5 次,自交 1 次获得 BC₅F₂ 种子。2010 年种植 BC₅F₂ 群体 400 株,挑选 20 株综合农艺性状良好的单株自交套袋收种。2011 年冬季将中选材料海南三亚育种试验站加代繁殖获得 BC₅F₃ 群体。

2012 年于南昌试验站中稻季节灌浆期(8 月 16~26 日)经历自然高温胁迫,日平均温度不低于 32℃,最高温度不低于 36℃。种植 BC₅F₃ 群体 134 行,每行 8 株。成熟后单株收获,脱壳调查垩白性状,以播种时间推迟 15 d,9 月初开始灌浆的株系的垩白性状值作为正常温度下的表型对照。其中编号为 CSIL05-23 的染色体片段导入系,高温胁迫处理下垩白粒率平均值为 17.8%,而在正常温度下垩白粒率平均值为 17.1%,钝感值为 1.041,比值接近 1,两者差异不显著,对高温表现为强钝感性,同时自交留种,冬季到海南繁殖得到 BC₅F₄ 种子。将含有目的片段的染色体片段导入系 CSIL05-23,分别于 2013 年、2014 年、2015 年种植在南昌高安基地,种植 4 行,行长 1.2 m,株距 16.5 cm,行距 19.8 cm,随机区组设计,设 2 次重复。2014 年夏季在南昌试验站种植 200 个 BC₆F₂ 单株。2015 年种植 RM1200 和 RM5796 片段杂合的 BC₆F₂ 单株自交获得的 BC₆F₃ 分离群体 380 株,2016 年种植目标区段杂合的 BC₆F₃ 单株自交获得的 BC₆F₄ 群体 420 株。上述分离群体单株,待幼穗分化至 6 期左右,带泥移栽至盆钵中继续生长发育。将挂牌标识扬花的稻穗于花后 7 d 开始用人工气候室模拟高温胁迫 14 d。然后移入正常自然条件下成熟 5~7 d,调查挂牌标识稻穗垩白粒率。

1.2 人工气候室高温胁迫处理

人工气候室(北京易盛泰和科技)模拟高温胁迫的条件为 8:00–17:00, 控制在 $38.0^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 其余时间均为 $25.0^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。正常对照条件为 8:00–17:00 控制在 $32.0^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 其余时间均为 $25.0^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。所有处理的相对湿度均为 $75\% \pm 5\%$; 光照时间为 14 h, 光照强度为 20 000~25 000 lx。

1.3 垩白粒率高温耐性表型测定

利用 JSE-II 稻米垩白观测仪考察表型。取整精米 100 粒, 置于观测板上观察, 挑选有垩白(包括心白、腹白、背白)的米粒, 计平均值作为垩白粒率。以垩白粒率高温钝感值(insensitivity value)表示垩白粒率耐热性。垩白高温钝感值的计算参照钟秉强等^[23]方法, 钝感值(IV) = X_1/X_2 , 其中 X_1 , X_2 分别为高温胁迫下和正常温度条件下的垩白粒率。从理论上讲, 钝感值越接近 1, 该性状越耐高温。

1.4 DNA 提取, PCR 扩增及多态性标记筛选

应用 CTAB 法^[24]提取 DNA, 本实验室根据 Gramene 数据库(<http://www.gramene.org>)选择 SSR 引物进行 PCR 扩增, 扩增体系为 10 μL , DNA 模板 1 μL 。

PCR 扩增条件为: 94°C 下预变性 5 min; 94°C 下变性 30 s, 57°C 下复性 30 s, 72°C 下延伸 1 min; 35 个循环后, 72°C 下再延伸 10 min。扩增产物经非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 凝胶浓度为 6%, 电泳缓冲液为 0.5 倍 TBE, 220 V 恒压电泳 1 h, 并银染显色。

1.5 QTL 分析

根据 Mapmaker/Exp 3.0b 软件^[25]分析多态性标记之间的连锁遗传关系, 构建局部连锁遗传图谱。设定最小 LOD 值为 3.0, 根据 Kosambi 函数^[26]将分子标记重组率换算成遗传图距(cM), 遗传图距最大值为 50 cM。利用 Windows QTL Cartographer 2.5^[27]检测目的性状 QTL。利用复合区间作图法(composite interval mapping, CIM)^[28], 取 LOD 值 2.5 为 QTL 存在的阈值, 利用模型 6 进行分析。用 SAS 统计软件对标记与性状进行单标记相关性分析。根据多态性分子标记对群体单株的基因型检测结果将数据分组。利用 SAS 统计软件中方差相同的 t 测验检验组间平均数的差异, 确定单标记与性状的相关性^[29]。通过差异显著性分析, 判断控制数量性状的 QTL 是否与标记连锁。 R^2 是标记能够解释性状表型变异的比率, 由表型性状与标记的回归方程中的决定系数决定^[30]。QTL 命名方法参照 McCouch 等制定的规则^[31]。

2 结果与分析

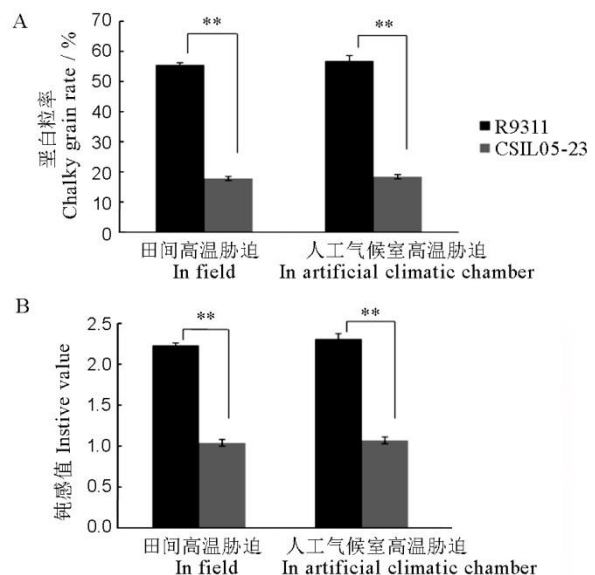
2.1 染色体片段导入系 CSIL05-23 高温胁迫及常温条件下垩白粒率表现

CSIL05-23 在田间高温胁迫和人工气候室模拟高温胁迫条件下垩白粒率分别为 17.8% 和 18.4%, 显著低于受体亲本 R9311, R9311 分别为 55.5% 和 56.8%(图 1-A)。CSIL05-23 在田间高温胁迫和人工气候室模拟高温胁迫条件下垩白粒率高温钝感值分别为 1.04 和 1.07, R9311 分别为 2.25 和 2.30(图 1-B)。

2.2 垩白粒率耐热性 QTL 的初步鉴定

由表 1 可知, BC_6F_2 群体中垩白粒率高温钝感值表现出极显著差异, 且变异幅度较大, 存在显著的超亲分离。因此推测非洲栽培稻片段含有降低垩白粒率高温钝感值的优异等位基因, 且这些优异位点已在亚洲栽培稻中发生了重组并引起了群体表型的变异。偏度和峰度的绝对值均小于 1, 认为垩白粒率高温钝感值表型均符合正态分布, 呈多基因控制的数量性状遗传特点。

从 Gramene 数据库(<http://www.gramene.org>)中选择均匀覆盖水稻基因组的 430 对多态性 SSR 引物对 CSIL05-23 和 R9311 进行 PCR 扩增, 获得 3 对具多态性 SSR 标记, 分别为 RM488(Chr. 1),



**差异极显著($p < 0.01$), t 检验。

**Significant differences at 0.01 level, t -test.

图 1 CSIL05-23 与 R9311 在田间及人工气候室高温胁迫处理下垩白粒率耐热性

Fig. 1. Comparison of heat tolerance of chalky grain rate of CSIL05-23 and R9311 in field and artificial climatic chambers.

表1 亲本及 BC₆F₂、BC₆F₃、BC₆F₄ 群体垩白粒率高温钝感值的表型变异Table 1. Phenotypic variation of insensitive value of heat tolerance of chalky grain rate in BC₆F₂, BC₆F₃ and BC₆F₄ population and their parents.

世代 Generation	供体亲本 Donor parent (IRGC102309)	受体亲本 Recipient parent (R9311)	群体 Population				
			平均 Mean	范围 Range	标准差 SD	峰度 Kurtosis	偏度 Skewness
BC ₆ F ₂ (n=200)	1.074	2.36	2.18	1.52–2.62	0.23	0.17	0.12
BC ₆ F ₃ (n=368)	1.054	2.23	2.11	1.48–2.68	0.31	0.23	0.32
BC ₆ F ₄ (n=430)	1.082	2.06	2.03	1.42–2.56	0.27	0.17	0.12

表2 BC₆F₃与 BC₆F₄ 世代灌浆期高温胁迫后垩白粒率耐热性 QTL 分析Table 2. QTL analysis of heat tolerance of chalky grain rate in BC₆F₃ and BC₆F₄ populations.

性状 Character	群体 Population	区间 Interval	LOD	表型方差 Phenotypic variance/%	加性效应 Additive effect/%
垩白粒率高温钝感值 IV	BC ₆ F ₃	RM1200–RM5796	6.3	11.3	-5.9
	BC ₆ F ₄	RM1200–RM5796	7.4	17.5	-11.8
高温胁迫下的垩白粒率 X ₁	BC ₆ F ₃	RM1200–RM5796	5.9	9.5	-5.6
	BC ₆ F ₄	RM1200–RM5796	6.9	16.7	-12.5
正常温度条件下的垩白粒率 X ₂	BC ₆ F ₃	RM1200–RM5796	6.2	12.6	-5.7
	BC ₆ F ₄	RM1200–RM5796	7.1	16.5	-11.2

IV indicates insensitive value of heat tolerance of chalky grain rate. X₁ and X₂ indicate chalky grain rate under heat stress condition and normal condition, respectively.

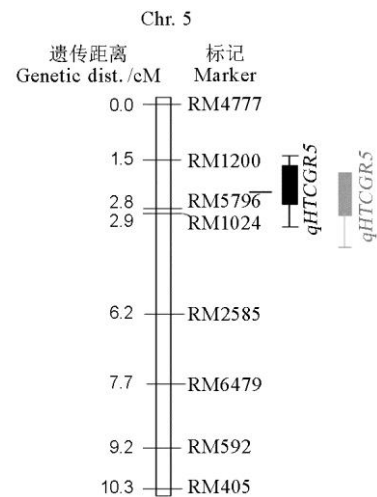
RM5460(Chr. 2), RM1200(Chr. 5)。利用这 3 个 SSR 标记对 200 个 BC₆F₂ 分离单株进行检测, 发现 3 个标记基因型均发生分离。根据分子标记结果将数据分组, 利用方差相同的 *t* 测验检验组间平均数的差异, 确定标记与垩白粒率高温钝感性状的连锁关系, 发现第 5 染色体上 RM1200 与垩白粒率高温钝感值呈极显著正相关 ($P=0.0005$)。该标记位点的非洲栽培稻增效基因能够显著提高垩白粒率高温钝感性, 解释 9.4% 的表型变异。

2.3 垩白粒率耐高温 QTL 复合区间作图

为了进一步消除遗传背景的影响, 有效确定目标 QTL 的位置和遗传效应。在 BC₆F₂ 分离群体中利用 RM488、RM5460 和 RM1200 进行渗入片段标记基因型鉴定, 将 RM488 和 RM5460 基因型为轮回亲本纯合基因型, 而目标渗入片段 RM1200 为杂合基因型的 BC₆F₂ 单株自交, 获得 BC₆F₃ 和 BC₆F₄ 次级分离群体进行分析。如表 1 所示, 群体间差异达到极显著水平并存在明显的超亲分离现象。2 个世代垩白粒率耐热性状的钝感值均符合正态分布, 呈多基因控制的数量性状遗传特点。

根据 Gramene 数据库, 在第 5 染色体目标区域附近挑选并合成 25 对 SSR 引物进行多态性筛选, 共获得 8 对多态性 SSR 标记。将这些具多态性的引物进一步分析整个 BC₆F₃ 群体, 应用 Mapmaker/Exp 3.0 软件构建分子遗传图谱, 该渐渗片段长 10.3 cM, 标记间平均距离为 1.5 cM(图 2)。

应用 QTL Cartographer 2.5 软件, 采用复合区间作图法对 BC₆F₃ 单株及 BC₆F₄ 群体垩白粒率高温钝感值, 高温胁迫处理下垩白粒率、正常温度处理下垩白粒率分别进行了 QTL 分析(表 2), 三个指标性状在 2 个世代相同标记 RM1200–RM5796 区间都



左右箱线图分别表示来自 BC₆F₃ 和 BC₆F₄ 群体的 1 LOD 和 2 LOD 似然区间位置。

The left and right bars and whiskers indicate 1 logarithm of the odds (LOD) and 2 LOD likelihood intervals from BC₆F₃ and BC₆F₄ populations, respectively.

图2 垩白粒率耐热性 QTL 遗传连锁图和似然区间

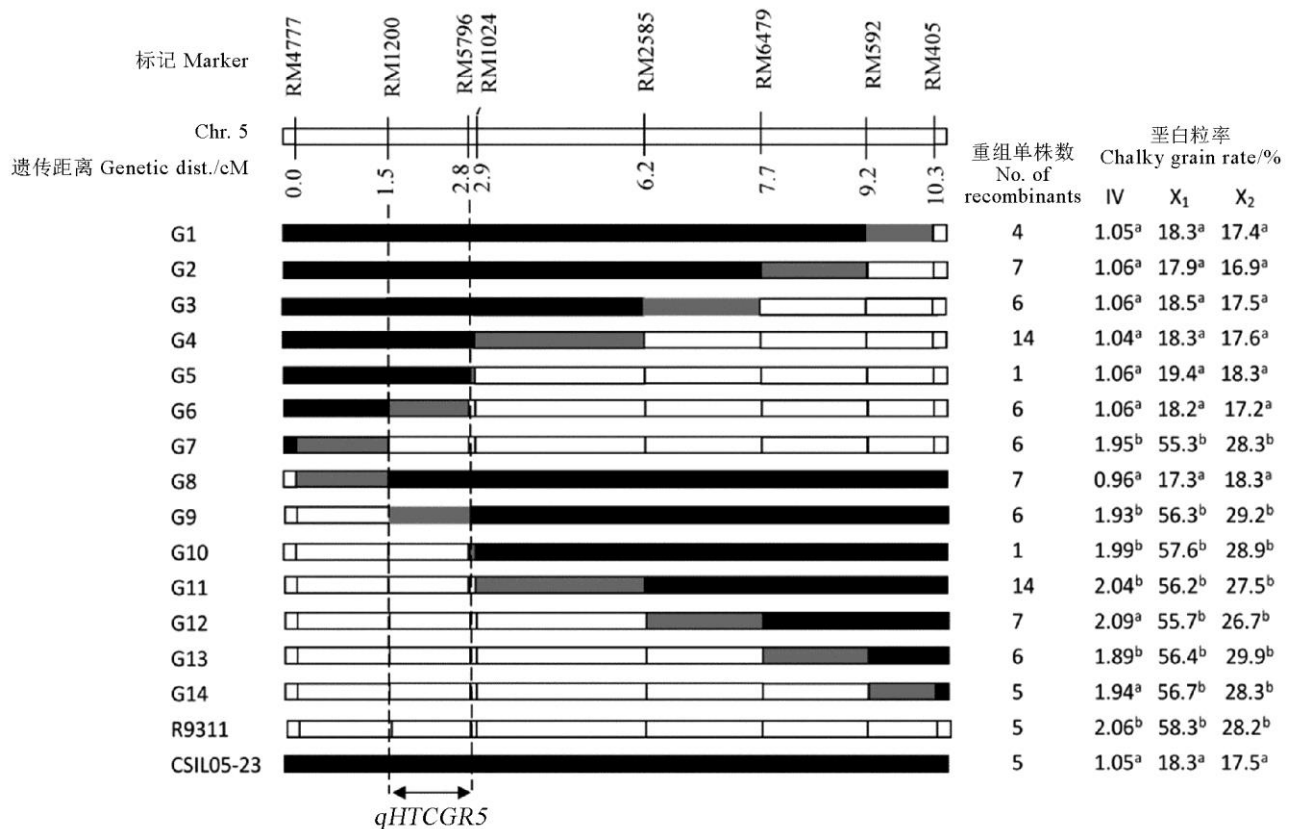
Fig. 2. Genetic linkage map and likelihood intervals for QTL associated with heat tolerance of chalky grain rate.

定位到目标 QTL, 增效基因来源于非洲栽培稻。针对目标 QTL *qHTCGR5* (a QTL for heat tolerance of chalky grain rate) 以垩白粒率高温钝感值为鉴定指标进行 QTL 分析, 发现在 2 个世代分别可以解释 11.3%, 17.5% 的表型变异。以高温胁迫处理下垩白粒率 X_1 为鉴定指标进行 QTL 分析, 发现在 2 个世代分别可以解释 9.5%, 16.7% 的表型变异。以高温胁迫处理下垩白粒率为鉴定指标进行 QTL 分析, 发现在 2 个世代分别可以解释 9.5%, 16.7% 的表型变异。正常温度处理下垩白粒率为鉴定指标进行 QTL 分析, 发现在 2 个世代分别可以解释 12.6%、16.5% 的表型变异。

2.4 利用置换作图方法定位

利用上述 8 个 SSR 标记对 430 个 BC_6F_4 单株分

析, 在 RM1200 和 RM5796 之间总共得到 90 个交换单株, 通过连锁分析构建了目标区域染色体片段置换图 (图 3)。根据交换单株标记基因型信息, 将 90 个交换单株中部分纯合体按交换位置信息分为 14 组。利用置换作图的方法分别利用高温胁迫处理下垩白粒率 (X_1)、正常温度处理下垩白粒率 (X_2)、垩白粒率高温钝感值 (IV) 三个指标性状对 *qHTCGR5* 进行定位。重组体 G1~G7 分别携带 RM592 到 RM4777 逐渐递减的 IRGC102309 纯合渐渗片段。G1~G6 纯合重组体与 R9311 之间比较在 X_1 、 X_2 和 IV 性状上均存在显著差异 ($P < 0.05$), 与 CSIL05-23 比较在 X_1 、 X_2 和 IV 性状上差异不显著。G7 纯合重组体与 R9311 之间比较在 X_1 、 X_2 和 IV 性状上差异不显著, 与 CSIL05-23 比较在 X_1 、 X_2



由 380 个 BC_6F_3 单株的分析数据构建 QTL 区域的连锁图。 BC_6F_4 纯合重组体的后代在灌浆期模拟高温逆境处理后, 根据垩白粒率及钝感值 ($IV=X_1/X_2$) 调查结果将 *qHTCGR5* 定位在 RM1200 和 RM5796 之间, 根据基因型将 90 个重组体分为 14 组。每组的重组体数目及与 R9311 和染色体片段导入系 CSIL05-23 之间的垩白粒率高温钝感表型差异显著性在右边标出。“a”表示重组体与 R9311 的表型值在 0.05 水平无显著差异; “b”表示重组体与 CSIL05-23 的表型值在 0.05 水平无显著差异。

Linkage map of the QTLs region produced with 380 BC_6F_3 plants. The number of recombinants between adjacent markers is indicated under the linkage map. Progeny testing of BC_6F_4 homozygous recombinants delimited the *qHTCGR5* locus to the region between markers RM1200 and RM5796. The 90 recombinants were grouped into 14 groups based on genotypes. The numbers of recombinants in each group and phenotypic difference of each group from the controls CSIL05-23 and R9311 for mean insensitive value of heat tolerance of chalky grain rate are shown on the right. An “a” following the phenotypic value indicates that the mean phenotypic value of recombinant was not significantly different from that of R9311 at $P < 0.05$; a “b” indicates that the mean phenotypic value of recombinant was not significantly different from that of CSIL05-23 at $P < 0.05$.

图 3 利用置换作图法定位 *qHTCGR5*

Fig. 3. Mapping of *qHTCGR5* by a substitution mapping strategy.

和 IV 性状上差异显著($P < 0.05$)。因此, 根据 G1~G6 和 G7 纯合重组体与对照之间的差异显著性分析结果把垩白粒率高温钝感 QTL 界定在 RM1200 的下游。G8~G14 分别携带从 RM1200 到 RM405 逐渐递减的 IRGC102309 纯合渐渗片段。其中, G8 纯合重组体与 R9311 比较, 在 X_1 、 X_2 和 IV 性状上差异显著($P < 0.05$), 与 CSIL05-23 比较在 X_1 、 X_2 和 IV 性状上差异不显著。G9~G14 纯合重组体与 R9311 比较, 在 X_1 、 X_2 和 IV 性状上差异不显著, 与 CSIL05-23 比较在 X_1 、 X_2 和 IV 性状上差异显著($P < 0.05$)。因此, G8 和 G9~G14 纯合重组体与对照亲本比较结果把垩白粒率高温钝感 QTL 界定在 RM5796 的上游。这些研究结果表明 *qHTCGR5* 位于 SSR 标记 RM1200~RM5796 之间, 遗传距离为 1.3 cM, 物理距离约为 333.4 kb。

3 讨论

非洲栽培稻与亚洲栽培稻同属 AA 基因组的不同种, 两者在进化中属于独立起源种, 并且存在明显的生殖隔离现象。需要构建染色体片段导入系或近等基因系来克服种间不育问题。目前通过传统回交结合现代生物技术手段已经能够有效挖掘利用非洲栽培稻的种质特性。非洲栽培稻在当地自然选择及进化过程中, 已经具备适应或抵抗高温热害、涝害、干旱、耐盐碱及各种病虫害特性, 对亚洲栽培稻品种改良具有重要意义。本研究利用构建的 QTL-CSIL 群体为鉴定垩白粒率耐热性 QTL *qHTCGR5* 提供了丰富的遗传信息。除了证实控制目的性状的非洲栽培稻等位基因, 在不同世代的遗传效应稳定及方向一致外, 而且通过消除背景噪音将 *qHTCGR5* 的遗传效应值大小进行准确的评估。很显然利用复合区间作图法分析 F_2 群体对这些 QTL 遗传效应估计的准确性是不足的, 实际上目前水稻耐热 QTL 克隆的成功例子也是得益于高质量近等基因系的培育^[32]。

在籽粒灌浆期遇到高温胁迫会导致灌浆速率加快, 导致籽粒垩白粒率、垩白大小、垩白度显著增加。垩白相关性状受多个基因/QTL 位点协同调控表达, 并且与外界环境因素存在明显的互作效应。目前第 5 染色体上垩白性状 QTL 的定位研究已有报道, 且都是在田间自然条件下鉴定得到的。Liu 等^[33]利用 2 个粳稻品种 Koshihikari 和 C602 杂交、自交构建了 261 个重组自交系(F_8)进行垩白性状 QTL 分析, 在第 5 染色体上鉴定到一个垩白粒

率 QTL *qJPGC-5*, 定位在 RM289 和 RM3437 之间, 解释 18.2% 的表型变异。高方远等^[34]利用籼稻保持系骨干亲本岗 46B 与美国水稻品种 Lemont 多次回交培育的低垩白、窄粒株系 K1075 与岗 46B 构建 F_2 群体, 对垩白粒率进行 QTL 分析, 将第 5 染色体上的垩白粒率 QTL *qPGWC5* 定位在 RM18004~RM18068 之间, 该 QTL 解释 52.55% 的表型变异。上述 2 个垩白粒率 QTL 与 *qHTCGR5* 区间标记位置均不重叠。因此 *qHTCGR5* 是一个新的耐热性 QTL 位点。该位点在 BC_6F_3 和 BC_6F_4 两个世代被定位在同一个标记区间, 遗传距离为 1.3 cM, 并且遗传效应值较大。这对水稻的生殖期高温胁迫条件下外观品质的改良非常有意义。

置换作图法最早由 Paterson 提出^[35], 并成功应用于 QTL 精细定位。这种方法已经证明置换作图是一种区分基因多效性及排除连锁累赘的有力工具, 可以为 QTL 的精细定位及图位克隆打下坚实的基础^[36-37]。CSIL05-23 所含渐渗区域已被证实能够改良受体的垩白粒率高温耐性。在本研究 BC_6F_4 群体的置换作图中, 我们对纯合交换片段都进行了分析, 对不同交换片段的作用效果进行了评估。同时 SSR 标记在确定重组位置及基因渗入区域边界是非常有效的。与受体亲本相比, 通过置换作图发现 1.3 cM 的 IRGC102309 渗入片段上存在能够在正常温度下显著降低受体亲本垩白粒率 X_2 值的 QTL, 在高温胁迫下该片段上 QTL 也能显著降低受体亲本垩白粒率 X_1 值, 并且垩白粒率高温钝感值 IV 接近 1, 表现为垩白粒率高温绝对钝感(图 2)。由于本研究人工气候室处理群体数量有限, 不能用于精细定位的大规模分离群体的表型鉴定, 因此本研究置换作图分辨率仍然不能清楚地分辨出 X_1 , X_2 和 IV 三个性状是由于基因连锁导致, 还是基因的多效性导致这种现象发生。因此, 下一步将设计精细定位实验方案, 构建高密度局部分子标记遗传图谱, 增加 QTL 精细定位分辨率, 分析上述三个性状是否由这个区域上的同一个 QTL 控制, 还是三个 QTL 紧密连锁影响, 为目标 QTL 的育种应用及相关基因克隆打下坚实的基础。

参考文献:

- [1] Carriger S, Vallé D. More crop per drop[J]. *Rice Today*, 2007, 6(2): 10-13.
- [2] Hockley N, Gibbons J M, Edwards-Jones G. Risks of extreme heat and unpredictability[J]. *Science*, 2009, 324(5924): 177-179.

- [3] Battisti D S, Naylor R L. Historical warnings of future food insecurity with unprecedented seasonal heat[J]. *Science*, 2009, 323(5911): 240-244.
- [4] Fitzgerald M A, McCouch S R, Hall R D. Not just a grain of rice: the quest for quality[J]. *Trends Plant Science*, 2009, 14(3): 133-139.
- [5] 森谷国男. 徐正进, 译. 水稻高温胁迫抗性遗传育种研究概况[M]. 杂交水稻, 1992(1): 47-48.
Sengu G N. Translated by Xu Z J. General Research on Genetic Breeding of Resistance to High Temperature Stress in Rice[M]. *Hybrid Rice*, 1992(1): 47-48. (in Chinese with English abstract)
- [6] 李木英, 熊伟, 石庆华, 胡志红, 潘晓华, 谭雪明. 高温胁迫对早稻不同品种灌浆结实和稻米品质的影响[J]. 江西农业学报, 2006, 28(4): 483-487.
Li M Y, Xiong W, Shi Q H, Hu Z H, Pan X H, Pan X M. Effect of high temperature stress on endosperm filling and grain quality of early rice varieties[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2006, 28(4): 483-487. (in Chinese with English abstract)
- [7] 赵海燕, 姚凤梅, 张勇, 徐宾, 袁静, 胡亚南, 许吟隆. 长江中下游水稻开花灌浆期气象要素与结实率和粒重的相关性分析[J]. 中国农业科学, 2006, 39(9): 1765-1771.
Zhao H Y, Yao F M, Zhang Y, Xu B, Yuan J, Hu Y N, Xu Y L. Correlation analysis of rice seed setting rate and weight of 1000-grain and agro-meteorology over the middle and lower reaches of the Yangtze River[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(9): 1765-1771. (in Chinese with English abstract)
- [8] 李林, 沙国栋, 陆景淮. 水稻灌浆期温光因子对稻米品质的影响[J]. 中国农业气象, 1989, 10(3): 33-38.
Li L, Sha G D, Lu J H. Effect of temperature and light on rice quality [J]. *Chinese Journal of Agrometeorology*, 1989, 10(3): 33-38. (in Chinese with English abstract)
- [9] 程方明, 张嵩午, 吴永常. 灌浆结实期温度对稻米垩白形成的影响[J]. 西北农业学报, 1996, 5(2): 31-34.
Cheng F M, Zhang H W, Wu Y C. Effect of high temperature stress on chalkiness at filling stage[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 1996, 5(2): 31-34.
- [10] Zhong L, Cheng F, Wen X, Sun Z X, Zhang G P. The deterioration of eating and cooking quality caused by high temperature during grain filling in early-season indica rice cultivars[J]. *Journal of Agronomy and Crop Science-Zeitschrift Fur Acker Und Pflanzenbau*, 2005, 191(3): 218-225.
- [11] Mei D Y, Zhu Y J, Yu Y H, Fan Y Y, Huang D R, Zhuang J Y. Quantitative trait loci for grain chalkiness and endosperm transparency detected in three recombinant inbred line populations of indica rice[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2013, 12(1): 1-11.
- [12] 周立军, 刘喜, 江玲, 郑蕾娜, 陈亮明, 刘世家, 翟虎渠, 万建民. 利用 CSSL 和 BIL 群体分析稻米垩白粒率 QTL 及互作效应. 中国农业科学, 2009, 42(4): 1129-1135.
Zhou L J, Liu X, Jiang L, Zheng L N, Chen L M, Liu S J, Zhai H Q, Wan J M. Analysis of QTL and GE effects on PGWC in rice (*Oryza sativa* L.) using CSSL and BIL populations. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(4): 1129-1135. (in Chinese with English abstract)
- [13] Liu X, Wang Y, Wang S W. QTL analysis of percentage of grains with chalkiness in japonica rice (*Oryza sativa*)[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2012, 11(1): 717-724.
- [14] 晁园, 冯付春, 高冠军, 朱雪萍, 何予卿. 利用重组自交系群体定位水稻品质相关性状的 QTL[J]. 华中农业大学学报, 2012, 31(4): 397-403.
Chao Y, Feng F C, Gao G J, Zhu X P, He Y Q. Mapping quantitative trait loci for qualities of rice grains using a Recombinant inbred(RIL) population [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2012, 31(4): 397-403. (in Chinese with English abstract)
- [15] 杨亚春, 倪大虎, 宋丰顺, 李泽福, 易成新, 杨剑波. 不同生态地点下稻米外观品质性状的 QTL 定位分析[J]. 中国水稻科学, 2011, 25(1): 43-51.
Yang Y C, Ni D H, Song F S, Li Z F, Yi C X, Chen J B. Identification of QTLs of rice appearance quality traits across different ecological sites[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2011, 25(1): 43-51. (in Chinese with English abstract)
- [16] 王林森, 陈亮明, 王沛然, 王卓然, 郑海, 马宏阳, 江玲, 赵志刚, 万建民. 利用高世代回交群体检测水稻垩白相关性状 QTL[J]. 南京农业大学学报, 2016, 39(2): 183-190.
Wang L S, Chen L M, Wang P R, Wang Z R, Zheng L, Ma H Y, Jiang L, Zhao Z G, Wan J M. Detecting the QTL of rice chalkiness traits using advanced backcrossing population[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2016, 39(2): 183-190. (in Chinese with English abstract)
- [17] 朱昌兰. 稻低直链淀粉含量的遗传及品质形成对高温耐性的 QTL 分析. 南京: 南京农业大学, 2004. Zhu C L. Identifying QTLs for thermo-tolerance of quality formation and inheritance of low amylose content in rice. Nanjing: Nanjing Agriculture University, 2004. (in Chinese with English abstract)
- [18] 朱昌兰, 肖应辉, 王春明, 江玲, 翟虎渠, 万建民. 水稻灌浆期耐热害的数量性状基因位点分析[J]. 中国水稻科学, 2005, 19(2): 117-121.
Zhu C L, Xiao Y H, Wang C M, Jiang L, Zhai H Q, Wan J M. Mapping QTLs for heat tolerance during grain filling in rice[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2005, 19(2): 117-121. (in Chinese with English abstract)
- [19] Kobayashi A, Bao G, Ye S, Tomita K. Detection of quantitative trait loci for white-back and basal white kernels under high temperature stress in japonica rice varieties[J]. *Breeding Science*, 200, 57(2): 107-116.

- [20] Shirasawa, K. QTL analysis of high-temperature-stress tolerance in filling period based on rice grain quality[J]. *Breeding Research*, 2006, 8(1): 155.
- [21] Tabata M, Hirabayashi H, Takeuchi Y, Ando I. Mapping of quantitative trait loci for the occurrence of white-back kernels associated with high temperatures during the ripening period of rice(*Oryza sativa* L)[J]. *Breeding Science*, 2007, 57(1): 47-52.
- [22] 张桂莲, 廖斌, 唐文帮, 陈立云, 肖应辉. 稻米垩白性状对高温耐性的 QTL 分析. 中国水稻科学, 2017, 31(3): 257-264.
Zhang GL, Liao B, Tang W B, Chen L Y, Xiao Y H. Identifying QTLs for thermo-tolerance of grain chalkiness trait in rice[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2017, 31(3): 257-264. (in Chinese with English abstract)
- [23] 钟秉强, 杨正林, 冉启良, 何光华. 美国水稻品种农艺性状和品质性状的温度钝感特性研究[J]. 中国农学通报, 2005, 21(2): 118-121.
Zhong B Q, Yang Z L, Ran Q L, He g H. Study on temperature insensitivity of characters of agronomy and quality in the American rice variety[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2005, 21(2): 118-121. (in Chinese with English abstract)
- [24] Rogers S O, Bendich A J. Extraction of DNA from plant tissues[M]. *Plant molecular Biology Manual*. Springer, Dordrecht, 1989: 73-83.
- [25] Lander E S, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly M J, Lincoln S E, Newberg L A. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations[J]. *Genomics*, 1987, 1(2): 174-181.
- [26] Kosambi D D. The estimation of map distances from recombination values[J]. *Annals of Eugenics*, 1943, 12(YRS 1943/5): 172-175.
- [27] Wang S C, Basten C J, Zeng Z B. Windows QTL Cartographer 2.5. Statistical Genetics, Raleigh, NC: North Carolina State, 2012.
- [28] Zeng Z B. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics*, 1994, 136: 1457-1468.
- [29] 王慧, 喻德跃, 吴巧娟, 盖钧镒. 大豆对斜纹夜蛾抗性基因的微卫星标记(SSR)的研究[J]. 大豆科学, 2004, 23(2): 91-95.
Wang H, Yu D Y, Wu Q J, Gai J Y. Characterization of resistance genes to cotton worm with SSR markers in soybean[J]. *Soybean Science*, 2004, 23(2): 91-95. (in Chinese with English abstract)
- [30] 徐吉臣, 邹亮星. 利用相关性分析鉴定与水稻根部性状表达相关的分子标记[J]. 遗传学报, 2002, 29(3): 245-249.
Xu J C, Zou L X. Identification of molecular markers associated with rice root traits by correlation coefficient analysis[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2002, 29(3): 245-249. (in Chinese with English abstract)
- [31] McCouch S R, Cho Y G, Yano M, Paul E, Blinstrub M, Morishima H, Kinoshita T. Report on QTL nomenclature[J]. *Rice Genetic Newsletter*, 1997, 14: 11-13.
- [32] Li X M, Chao D Y, Wu Y, Huang X H, Chen K, Cui L G, Su L, Ye W W, Chen H, Chen H C, Dong N Q, Guo T, Shi M, Feng Q, Zhang P, Han B, Shan J X, Gao J P, Lin H X. Natural alleles of a proteasome $\alpha 2$ subunit gene contribute to thermos-tolerance and adaptation of African rice[J]. *Nature Genetics*, 2015, 47(7): 827.
- [33] Liu X, Wang Y, Wang S W. QTL analysis of percentage of grains with chalkiness in Japonica rice (*Oryza sativa*) [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2012, 11(1): 717-724.
- [34] 高方远, 邱玲, 陆贤军, 任鄯胜, 吴贤婷, 任光俊, 曾礼华. 杂交籼稻骨干保持系岗 46B 稻谷粒形及垩白的 QTL 分析[J]. 中国水稻科学, 2014, 28(3): 235-242.
Gao F Y, Qiu L, Lu X J, Ren J S, Wu X T, Ren G J, Zeng L H. QTL analysis on grain shape and chalkiness of an elite maintainer line Gang 46B in hybrid rice(*Oryza sativa* L.) [J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2014, 28(3): 235-242.
- [35] Paterson A H, Deverna J W, Lanini B, Tanksley S D. Fine mapping of quantitative trait loci using selected overlapping recombinant chromosomes, in an interspecies cross of tomato[J]. *Genetics*, 1990, 124(3): 735-742.
- [36] Tanksley S D, Ganai M W, Martin G B. Chromosome landing: a paradigm for map-based gene cloning in plants with large genomes[J]. *Trends in Genetics*, 1995, 11(2): 63-68.
- [37] Alpert K B, Tanksley S D. High-resolution mapping and isolation of a yeast artificial chromosome contig containing fw2.2: A major fruit weight quantitative trait locus in tomato[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(26): 15503-15507.