DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.92002

优良水稻染色体片段代换系 Z746 的鉴定及重要农艺性状 QTL 定位及其验证

沈文强** 赵冰冰** 于国玲 李凤菲 朱小燕 马福盈 李云峰
何光华 赵芳明*

西南大学水稻研究所 / 西南大学农业科学研究院 / 转基因植物与安全控制重庆市重点实验室, 重庆 400715

摘要: 粒型、株高及穗部组成性状与产量形成密切相关, 是水稻重要农艺性状, 但遗传基础复杂。染色体片段代换系是用于复杂性状遗传研究的良好材料。本研究鉴定了一个以日本晴为受体、西恢 18 为供体亲本的水稻优良染色体片段代换系 Z746。Z746 携带来自西恢 18 的 7 个代换片段, 平均代换长度为 3.99 Mb, 其株高、粒长和穗部性状均与受体存在显著差异。进一步通过日本晴与 Z746 杂交构建的次级 F₂ 群体共检测到 36 个相关 QTL, 分布于 2 号、3 号、4 号、6 号和 11 号染色体。其中 5 个可能与已克隆基因等位, 如 *qPH3-1* 等, 8 个可被多次检出, 表明这些是遗传稳定的主效 QTL。Z746 的粒长主要由 4 个 QTL (*qGL3*、*qGL4*、*qGL2*、*qGL6*) 控制, 其中 *qGL3* 和 *qGL4* 对粒长变异的贡献率分别为 60.28% 和 27.47%。株高由 5 个 QTL 控制, 穗长由 4 个 QTL 控制, 每穗粒数由 2 个 QTL 控制, 千粒重由 2 个 QTL 控制。然后以 MAS 在 F₃ 共选出 8 个单片段代换系, 并以此在 F₄ 进行了相关 QTL 验证, 共有 24 个 QTL 可被 8 个单片段代换系 (SSSL) 检出, 重复检出率为 66.7%, 表明这些 QTL 遗传稳定。本研究为目的 QTL 的进一步遗传机制研究及分子设计育种奠定了良好基础。

关键词: 水稻; 染色体片段代换系; 粒长; 株高; 穗部组成; QTL 定位

Identification of an excellent rice chromosome segment substitution line Z746 and QTL mapping and verification of important agronomic traits

SHEN Wen-Qiang**, ZHAO Bing-Bing**, YU Guo-Ling, LI Feng-Fei, ZHU Xiao-Yan, MA Fu-Ying, LI Yun-Feng, HE Guang-Hua, and ZHAO Fang-Ming*

Rice Research Institute, Southwest University / Academy of Agricultural Sciences, Southwest University / Transgenic Plants and Safety Control, Chongqing Key Laboratory, Chongqing 400715, China

Abstract: The important agronomic traits, such as grain type, plant height, and panicle composition, are closely related to rice yield, and their gene inheritance is complex. Chromosome segment substitution lines (CSSLs) are useful materials for studying these complex traits. An excellent CSSL, Z746, containing seven substitution segments and with an average substitution length of 3.99 Mb, was identified from Nipponbare as a recipient and ‘Xihui 18’ as a donor parent. There were significant differences in plant height, panicle composition and grain size between Z746 and Nipponbare. Furthermore, a total of 36 quantitative trait loci (QTL) were detected on chromosomes 2, 3, 4, 6, and 11 in the secondary F₂ population constructed by hybridization between Nipponbare and Z746. Five of them may be alleles of the cloned genes, such as *qPH3-1*, and eight can be detected by multiple times, indicating that these were genetically stable major QTLs. The grain length in Z746 was mainly controlled by four QTLs

本研究由国家重点研发计划项目(2017YFD0100202), 重庆市科委项目(cstc2016shms-ztxx0017, CSTCCXLJRC201713)和西南大学基本业务费专项创新团队项目(XDJK2017A004)资助。

This study was supported by the National Key Research and Development Program of China (2017YFD0100202), the Project of Chongqing Science & Technology Commission Grants (cstc2016shms-ztxx0017, CSTCCXLJRC201713), and the Southwest University Innovation Team Project (XDJK2017A004).

* 通信作者(Corresponding author): 赵芳明, E-mail: zhaofangming2004@163.com

** 同等贡献(Contributed equally to this work)

第一作者联系方式: 沈文强, E-mail: 412588538@qq.com; 赵冰冰, E-mail: 977276044@qq.com

Received (收稿日期): 2019-01-09; Accepted (接受日期): 2020-10-14; Published online (网络出版日期): 2020-11-02.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20201030.1702.008.html>

(*qGL3*, *qGL4*, *qGL2*, and *qGL6*), and the phenotypic variation of *qGL3* and *qGL4* for grain length was 60.28% and 27.47%, respectively. Plant height was controlled by five QTLs, panicle length by four QTLs, grain number per panicle by two QTLs, and the 1000-grain weight by two QTLs. Eight single segment substitution lines (SSSLs) were developed in F_3 population by molecular marker-assisted selection (MAS), and relevant QTLs verification was conducted in F_4 . Finally, 24 QTLs were detected by 8 SSSLs and the repeat detection rate was 66.7%, indicating that these QTLs were genetically stable. These results provide a good foundation for further research on genetic mechanisms of the target QTLs and molecular design breeding.

Keywords: rice (*Oryza sativa* L.); chromosome segment substitution line; grain length; plant height; spike composition; QTL mapping

粒型、株高和穗部组成与水稻产量形成紧密相关,是水稻重要的农艺性状。水稻粒型不仅影响千粒重,还影响稻米的外观品质和商品价值^[1]。株高和穗部组成性状决定每穗粒数的多少,是产量形成的重要因素^[2]。

粒型一直是研究的热点。目前,已克隆了一些和粒型相关的基因并对其部分遗传机制进行了解析。*GS3* 是调控水稻谷粒大小的主要基因,编码跨膜蛋白,该蛋白存在相互对抗的前后两部分,N端是控制水稻粒型的关键区,即 OSR,而 C 端对 OSR 功能有抑制作用,这两部分的“博弈”决定水稻粒型。没有 *GS3* 蛋白的水稻品种为长粒型,含有完整 *GS3* 蛋白的水稻品种为中间型,只有 OSR 的水稻品种为短粒^[3]。此外,*SLG* 编码类 BAHD 酰基转移酶,参与油菜素内酯稳态的调控,其突变引起籽粒变长^[4]。*GAD1* 编码一个表皮模式因子类蛋白 EPFL1,通过激活 *OsCKX2* 和 *DST* 的表达降低植株内源细胞分裂素的含量,从而控制粒长和穗粒数发育^[5]。*GW6a* 编码类 GNAT 蛋白,具有组蛋白乙酰转移酶 (OsgIHAT1) 活性,其高表达会导致转基因植株中组蛋白 H4 的乙酰化水平提高,增加籽粒颖壳细胞数目并加速籽粒灌浆,从而增加粒重和产量^[6]。*GL3.1* 编码蛋白磷酸酶 PPKL 家族的丝氨酸/苏氨酸磷酸酶,通过调控细胞周期蛋白 T1;3 控制水稻籽粒大小和产量^[7]。*GL3.2* 与 *CYP78A13* 同源,含有 *CYP78A13* 或 *GL3.2* 的转基因植株都能促进水稻的籽粒伸长^[8]。

水稻株高与抗倒伏及产量密切相关。目前,已经鉴定出许多矮秆及半矮秆基因。例如多个调控 GA 合成途径的基因 *SD1*、*D18*、*D35* 等突变,导致不同程度的水稻矮化^[9-11];水稻 BR 生物合成的关键酶 *OsBR6ox* 基因突变引起水稻植株矮化^[12];SLs 的生物合成途径基因突变也会使水稻植株矮化,如矮秆突变体 *d10*^[13]。

水稻穗部组成是体现产量的最终部位,因此,穗部性状在产量构成中起至关重要的作用^[11]。迄今

为止,已初步定位并鉴定了较多的穗部 QTL,同时也克隆了一些相关基因。*SPL14* 受 miR156 负调控,当 miR156 识别位点突变后,转基因植株的枝梗数和每穗粒数增加^[14];*Gnla* 编码一种细胞分裂素氧化酶 *OsCKX2*,通过降低该基因的表达使细胞分裂素在顶端分生组织中积累,从而使一次枝梗和二次枝梗数目增加,最终导致穗粒数增加^[15];水稻密穗多粒的 *DEP1* 编码一个类磷脂酰乙醇胺结合蛋白,通过促进细胞分裂,降低穗颈节长度和增加枝梗数使稻穗变密来增加每穗粒数^[16];*FZP* 编码一个 ERF 转录因子,该基因突变导致穗轴过度分枝^[17];此外,还有一些未知功能的蛋白也参与水稻穗部发育,如密穗多粒基因 *DEP2*^[18]。

可见,这些性状的遗传机理异常复杂,目前克隆的基因还不足以揭示这些性状的遗传多样性和分子机理。水稻染色体片段代换系可创造丰富的自然变异,且仅存在少量代换片段的差异,因而是复杂性状研究的理想材料。本研究以日本晴为受体亲本、西恢 18 为供体亲本鉴定了一个 7 代换片段的水稻优良染色体片段代换系 Z746。利用日本晴/Z746 构建的次级 F_2 群体进行株高、粒长和穗部性状的 QTL 定位,进一步进行单片段代换系培育和相关 QTL 验证,研究结果对目标 QTL 的进一步分子机制研究及分子育种有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

水稻染色体片段代换系 Z746,是以日本晴为受体亲本、西恢 18 为供体亲本,经多代回交和自交,结合 SSR 分子标记辅助选择选育而成的 7 片段优良代换系。

QTL 定位群体材料为受体亲本日本晴和 Z746 杂交构建的次级 F_2 群体,鉴于 Z746 与日本晴仅存在 7 个代换片段的差异,其余基因组与受体亲本日本晴基因组完全一致,因而理论上,次级 F_2 群体遗传交换仅发生在代换片段区域。

次级单片段代换系(single segment substitution lines, SSSL)选育材料: 在 2018 年 QTL 定位结果的基础上, 据基因型和表型从 F_2 代选择 8 个单株, 2019 年种成株系, 每个株系取 20 株, 利用分子标记辅助选择(molecular marker-assisted method selection, MAS)进一步对其中的杂合标记进行跟踪筛选, 最后选出 8 个 SSSL, 然后 2020 年用这些 SSSL 进一步进行 QTL 验证。

1.2 试验方法

1.2.1 Z746 代换片段系培育 采用均匀分布于水稻 12 条染色体的 429 个标记, 对日本晴和西恢 18 进行多态性分析, 选出 263 个多态性标记^[19], 然后用这些多态性标记从 BC_2F_1 进行分子标记辅助选择, 在 BC_2F_4 鉴定到一个 18 代换片段的良好株系, 然后以日本晴与这一株系杂交, 产生的 F_1 再与日本晴回交、自交, 直至其 F_5 代初步选育出 7 代换片段的 Z746。参照周可等^[20]描述的方法分析代换片段。按 Paterson 等^[21]方法估计代换片段长度。

1.2.2 材料种植 2017 年以日本晴与 Z746 杂交, 收获杂交种并于同年秋季种植于海南基地, 分单株收获 F_1 代种子。2018 年 3 月 10 日, 将亲本(日本晴和 Z746)及 F_2 代群体于重庆西南大学水稻研究所实验基地育苗。4 月 18 日, 以株、行距分别为 16.65 cm 和 26.65 cm 移栽日本晴和 Z746 各 40 株及 164 个 F_2 单株于同一试验田, 常规管理。2019 年 3 月和 2020 年 3 月, 以同样规格和管理种植 F_2 代所选的用于次级代换片段系选育的 8 个株系、 F_3 代选出的 8 个纯合 SSSL 及其受体亲本日本晴于西南大学水稻研究所实验基地。

1.2.3 农艺性状调查 在成熟期, 平地随机收取日本晴和 Z746 各 10 株以及 F_2 群体 164 株作为样本, 考察株高、有效穗数、每穗穗长、一次枝梗数、二次枝梗数、粒长、粒宽、每穗总粒数、每穗实粒数、千粒重和单株产量。各农艺性状的测定参照崔国庆等^[22]描述的方法进行。分别利用 Microsoft Excel 2016 统计 10 株日本晴和 10 株 Z746 各性状的平均值、标准差及进行 t 检验, 统计 F_2 代群体各参数如平均数、最小值、最大值、偏度和峰度。

1.2.4 QTL 定位 采用 CTAB 法提取亲本和用于 QTL 定位的 164 个 F_2 代单株的基因组 DNA^[23]。参照周可等^[21]描述的方法进行 PCR 扩增和非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和快速银染。将日本晴带型标以“-1”, Z746 带型标以“1”, 杂合带型标以“0”, 缺失带型标以“.”。将 F_2 的 164 个单株的各性状平均值及标

记赋予值一同用于 QTL 定位。在 SAS 统计软件上, 利用加州大学河滨分校徐世忠教授编写的 HPMIXED 程序限制性最大似然(REML)法(加以修改)定位 QTL^[24], 以 $P < 0.05$ 为阈值决定一个 QTL 与代换片段上的某标记连锁。

1.2.5 基于 8 个 SSSL 的 QTL 验证 2020 年 7 月下旬, 在日本晴和 8 个 SSSL (S1~S8)的小区中间各收获 10 株, 并按 1.2.3 描述的方法测量株高、有效穗数、穗长等性状。因每个 SSSL 与受体亲本相比, 仅存在唯一代换片段的差异, 因此本研究使用 t 测验进行每个 SSSL 携带 QTL 的鉴定。对 10 株 SSSL 和 10 株日本晴的 2018 年鉴定出 QTL 的性状进行统计分析, 当 P 值小于 0.05 时, 认为该 SSSL 存在某一性状的 QTL。QTL 的加性效应以每个 SSSL 和日本晴表型值之间差异的一半计算^[25]。所有计算均在 Microsoft Excel 2016 中完成。

2 结果与分析

2.1 Z746 的代换片段鉴定

用 Z746 代换片段上的所有 SSR 标记及代换片段外的 36 个 SSR 标记对 5 株 Z746 进行进一步代换片段鉴定和遗传背景纯度检测, 发现 5 个单株的代换片段一致, 且没有检测出除代换片段外的西恢 18 其他残留片段, 表明 Z746 已经纯合。Z746 的 7 个来自西恢 18 的代换片段, 分布于水稻 2 号、3 号、4 号、6 号和 11 号染色体(图 1)。总代换长度为 27.96 Mb, 最长代换长度为 7.34 Mb, 最短代换长度为 1.43 Mb, 平均代换长度为 3.99 Mb。

2.2 Z746 的农艺性状分析

Z746 的株型与受体日本晴相近(图 2-A)。粒长与日本晴相比极显著增加, 每粒平均增加 0.15 mm, 而粒宽显著减少(图 2-B~F 和表 1)。此外, Z746 的株高、籽粒长宽比、一次枝梗数、二次枝梗数、每穗总粒数、每穗实粒数均显著增加; 而结实率显著减少, 但是 Z746 的结实率仍达 89.01%; Z746 的有效穗数、穗长、千粒重和单株产量与日本晴无显著差异(表 1)。

2.3 重要农艺性状 QTL 定位

利用日本晴与 Z746 构建的次级 F_2 群体共鉴定出 36 个粒长等重要农艺性状 QTL (表 2), 分布于 2 号、3 号、4 号和 6 号染色体。

影响 Z746 籽粒长度的 QTL 共有 4 个, 其中 $qGL3$ 、 $qGL4$ 和 $qGL6$ 的加性效应分别增加粒长 0.36、0.26 和 0.08 mm, 对长度变异的贡献率分别为

图 2 成熟期日本晴和 Z746 的株型、穗型和籽粒

Fig. 2 Plant type, panicle type, and grain of Nipponbare and Z746 at maturity stage

A: 日本晴和 Z746 的株型, 标尺为 10 cm; B: 日本晴和 Z746 的穗型, 标尺为 5 cm; C, D: 日本晴和 Z746 的籽粒, 标尺为 5 mm; E, F: 日本晴和 Z746 的糙米, 标尺为 5 mm。

A: plant type of Nipponbare (left) and Z746 (right). Scale bar, 10 cm; B: main panicle of Nipponbare (left) and Z746 (right). Scale bar, 5 cm; C, D: grains of Nipponbare (C) and Z746 (D). Scale bar, 5 mm; E, F: brown grains of Nipponbare (E) and Z746 (F). Scale bar, 5 mm.

比较有趣的是, 有些性状的 QTL 连锁于同一标记, 如控制株高的主效 QTL-*qPH6-2* 和控制一次枝梗数的主效 QTL-*qNPB6-2* 均连锁于标记 RM103; 控制粒长的主效 QTL-*qGL3* 和控制千粒重的主效 QTL-*qGWT3* 均连锁于标记 RM6266; 控制一次枝梗数的主效 QTL-*qNPB4* 和控制粒长的主效 QTL-*qGL4* 均连锁于标记 RM1155, 暗示这些 QTL 可能具有一因多效或成簇状分布。

2.4 次级单片段代换系选育及目标 QTL 验证

在 QTL 的初定位基础上, 利用 MAS 在 F_3 选育出 8 个单片段代换系(S1~S8), 小区种植进一步验证了 24 个 QTL (如 *qPH2-1*, *qPL3*, *qGL3*, *qGL6*, *qGWT6* 等)的遗传稳定性(表 3)。而有 9 个 QTL (*qNPB2-2*, *qNPB3*, *qNPB4*, *qNPB6-2*, *qNPB6-3*, *qNSB4*, *qNSB6*, *qGL2*, *qGL4*)未能被相应的 SSSL 检测到, 表明这些微效 QTL 的表达可能易受环境影响。另外 3 个 QTL (*qNPB2-3*, *qRLW2*, *qGWT2*)因未选到相应的 SSSL 而无法被验证。

3 讨论

产量始终是水稻育种的主要目标之一, 然而它是一个复杂性状, 受多个性状影响。粒型、株高、穗部性状与水稻产量密切相关。这些性状遗传基础

表 1 日本晴和 Z746 及 F_2 群体各性状统计参数

Table 1 Statistical parameters of different traits in Nipponbare, Z746, and the F_2 population

性状 Trait	平均值±标准差(亲本) Mean±SD (parents)		F ₂ 群体 F ₂ population			
	日本晴 Nipponbare	Z746	平均值±标准差 Mean±SD	范围 Range	偏度 Skewness	峰度 Kurtosis
株高 Plant height (cm)	87.93±5.32	96.70±2.11**	89.61±8.43	78.00–124.00	2.16	5.33
有效穗数 Panicle number per panicle	18.40±5.55	17.70±5.42	14.41±4.56	6.00–28.00	0.67	0.23
穗长 Panicle length (cm)	19.68±0.88	20.64±0.62	19.38±1.70	15.86–29.25	1.93	6.44
一次枝梗数 Number of primary branch	7.42±0.43	8.05±0.67*	8.36±1.49	6.67–14.47	2.75	7.62
二次枝梗数 Number of secondary branch	14.62±1.67	22.99±2.42**	14.59±4.38	7.17–34.73	2.20	6.71
粒长 Grain length (mm)	7.40±0.08	8.93±0.19**	7.71±0.57	7.03–9.42	1.16	0.19
粒宽 Grain width (mm)	3.44±0.06	2.85±0.11**	3.26±0.56	2.63–3.48	10.85	132.05
长宽比 Ratio of length to width	2.15±0.03	3.13±0.15**	2.40±0.34	2.11–3.53	0.56	4.21
结实率 Seed-setting rate (%)	91.79±2.02	89.01±2.34*	87.00±11.02	30.00–96.05	-3.25	11.54
每穗总粒数 Spikelets per panicle	97.70±23.84	122.66±10.99*	91.75±18.10	62.56–182.67	2.24	7.62
每穗实粒数 Grains per panicle	89.68±22.56	109.23±10.58*	78.77±15.17	26.11–166.73	0.90	7.86
千粒重 1000-grain weight (g)	25.41±0.91	26.09±0.71	25.34±1.58	18.33–30.10	0.04	2.15
单株产量 Yield per plant (g)	38.44±10.23	44.42±15.42	28.87±11.46	9.91–64.25	0.89	0.36

* 和 ** 分别表示性状间存在显著($P < 0.05$)和极显著($P < 0.01$)差异。

* and ** indicate significant difference between traits at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

表 2 水稻重要农艺性状 QTL
Table 2 QTLs for agronomic important traits in rice

性状 Trait	QTL	染色体 Chr.	连锁标记 Linked marker	估计效应 Additive	贡献率 Var. (%)	P 值 P-value
株高 Plant height (cm)	<i>qPH2-1</i>	2	RM1075	-5.06	15.06	< 0.0001
	<i>qPH2-2</i>	2	RM6378	4.11	13.70	0.0037
	<i>qPH3-1</i>	3	RM14389	3.17	2.71	0.0108
	<i>qPH3-2</i>	3	RM6266	1.92	5.06	0.0258
	<i>qPH4</i>	4	RM1155	4.71	16.67	< 0.0001
	<i>qPH6-1</i>	6	RM7412	3.01	13.59	0.0009
	<i>qPH6-2</i>	6	RM103	-4.13	26.98	0.0075
穗长 Panicle length (cm)	<i>qPL2</i>	2	RM1075	-0.99	13.12	< 0.0001
	<i>qPL3</i>	3	RM6266	0.39	4.85	0.0346
	<i>qPL4</i>	4	RM1155	0.49	4.16	0.0276
	<i>qPL6</i>	6	RM7412	0.64	13.81	0.0011
一次枝梗数 Number of primary branch	<i>qNPB2-1</i>	2	RM1075	-0.49	4.19	0.0198
	<i>qNPB2-2</i>	2	RM6378	0.70	11.59	0.0074
	<i>qNPB2-3</i>	2	RM13262	-0.47	5.43	0.0449
	<i>qNPB3</i>	3	RM14389	0.46	5.92	0.0424
	<i>qNPB4</i>	4	RM1155	1.10	27.43	< 0.0001
	<i>qNPB6-1</i>	6	RM7412	0.57	14.32	0.0007
	<i>qNPB6-2</i>	6	RM103	-0.87	35.15	0.0023
二次枝梗数 Number of secondary branch	<i>qNSB2-1</i>	2	RM1075	-1.42	3.35	0.0366
	<i>qNSB2-2</i>	2	RM6378	1.76	7.10	0.0284
	<i>qNSB4</i>	4	RM1155	2.01	8.73	0.0015
	<i>qNSB6</i>	6	RM7412	1.80	13.81	0.0011
粒长 Grain length (mm)	<i>qGL2</i>	2	RM1075	-0.11	3.63	0.0302
	<i>qGL3</i>	3	RM6266	0.34	60.28	< 0.0001
	<i>qGL4</i>	4	RM1155	0.26	27.47	< 0.0001
	<i>qGL6</i>	6	RM7412	0.08	4.77	0.0467
长宽比 Ratio of length to width	<i>qRLW2</i>	2	RM13262	0.16	12.97	0.0017
	<i>qRLW3</i>	3	RM6266	0.13	14.23	0.0004
	<i>qRLW4</i>	4	RM1155	0.15	10.41	0.0005
	<i>qRLW6</i>	6	RM7412	0.08	5.30	0.0414
结实率 Seed-setting rate (%)	<i>qSSR4</i>	4	RM1155	-0.07	17.33	< 0.0001
每穗粒数 Spikelets per panicle	<i>qSP4</i>	4	RM1155	6.24	4.73	0.0122
	<i>qSP6</i>	6	RM7412	4.33	4.51	0.0481
千粒重 1000-grain weight (g)	<i>qGWT2</i>	2	RM13262	-0.88	14.82	0.0009
	<i>qGWT3</i>	3	RM6266	1.13	40.50	< 0.0001

复杂，由多基因控制。水稻染色体片段代换系是利用基因重组交换原理，通过与受体亲本连续回交和自交的手段，结合分子标记辅助选择选育而成，因而是创造自然变异和分解复杂性状的有效途径。而且，每个代换系与受体亲本仅存在少量代换片段的

差异，减少了个体间遗传背景的干扰，可使 QTL 鉴定更加准确^[26]。鉴定的 QTL 准确、分析出优良的等位基因以及将这些分散的优良等位基因聚合在一起是分子设计育种的 3 个重要环节^[27]。日本晴是一个具有完整基因组数据的公认粳稻品种，西恢 18 是西

表 3 SSSL 中 QTL 的加性效应分析
Table 3 Additive effect analysis of QTLs in SSSLs

SSSL 代码 SSSL code	代换片段 ^b Substitution segment ^b	长度 (Mb) Length (Mb)	染色体 Chr.	性状 Trait	QTL	均值±标准差 Mean±SD	加性效应 Additive	P 值 P-value
N ^a		—		株高		90.60±4.50		
S1	RM2770--RM6378--RM1075	1.04	2	Plant height (cm)	<i>qPH2-1</i>	101.06±1.65	5.23	2.86E-06
S2	RM6378--RM1075--RM5699	2.58	2		<i>qPH2-2</i>	128.12±3.46	18.76	2.58E-13
S3	RM132--RM14389--RM175	7.34	3		<i>qPH3-1</i>	101.15±1.54	5.28	2.31E-06
S4	RM5928--RM6266--RM157	1.43	3		<i>qPH3-2</i>	110.65±3.48	10.02	4.55E-08
S5	RM5688--RM1155--RM17078	2.95	4		<i>qPH4</i>	108.66±3.19	9.03	1.40E-08
S6	RM7412--RM103--RM494	0.90	6		<i>qPH6-1</i>	109.31±2.00	9.36	1.35E-09
S7	RM103--RM494--long arm end	0.20	6		<i>qPH6-2</i>	104.95±1.73	9.36	4.67E-08
S8	RM5371--RM7412--RM103--RM494--long arm end	2.57	6		<i>qPH6</i>	106.20±2.29	7.80	2.93E-08
N ^a		—		穗长		19.02±1.11		
S1	RM2770--RM6378--RM1075	1.04	2	Panicle length (cm)	<i>qPL2</i>	22.70±1.29	1.84	8.53E-07
S4	RM5928--RM6266--RM157	1.43	3		<i>qPL3</i>	24.60±2.19	2.79	1.69E-05
S5	RM5688--RM1155--RM17078	2.95	4		<i>qPL4</i>	21.64±1.62	1.31	0.001
S7	RM103--RM494--long arm end	0.20	6		<i>qPL6</i>	26.02±1.92	3.50	4.63E-08
N ^a		—		一次枝梗数		9.47±0.55		
S2	RM6378--RM1075--RM5699	2.58	2	Number of primary branch	<i>qNPB2</i>	12.80±1.60	1.67	1.57E-05
S8	RM5371--RM7412--RM103--RM494--long arm end	2.57	6		<i>qNPB6</i>	10.27±0.96	0.40	0.02
N ^a		—		二次枝梗数		16.03±2.54		
S1	RM2770--RM6378--RM1075	1.04	2	Number of secondary branch	<i>qNSB2-1</i>	18.82±2.75	1.40	0.03
S2	RM6378--RM1075--RM5699	2.58	2		<i>qNSB2-2</i>	25.78±2.97	4.88	1.38E-06
N ^a		—		粒长		7.25±0.13		
S4	RM5928--RM6266--RM157	1.43	3	Grain length (mm)	<i>qGL3</i>	7.71±0.23	0.23	0.0002
S7	RM103--RM494--long arm end	0.20	6		<i>qGL6</i>	7.55±0.21	0.15	0.002

(续表 3)

SSSL 代码 SSSL code	代换片段 ^b Substitution segment ^b	长度 Length (Mb)	染色体 Chr.	性状 Trait	QTL	均值±标准差 Mean±SD	加性效应 Additive	P 值 P-value
N ^a		—		长宽比		2.17±0.04		
S4	RM5928--RM6266--RM157	1.43	3	Ratio of length to width	<i>qRLW3</i>	2.31±0.07	0.07	0.0003
S5	RM5688--RM1155--RM17078	2.95	4		<i>qRLW4</i>	2.33±0.11	0.08	0.0007
S7	RM103--RM494--long arm end	0.20	6		<i>qRLW6</i>	2.50±0.12	0.16	9.94E-07
N ^a		—		结实率		92.73±3.59		
S5	RM5688--RM1155--RM119	2.95	4	Seed-setting rate (%)	<i>qSSR4</i>	81.24±4.32	-5.75	0.0002
N ^a		—		每穗总粒数		91.76±8.36		
S5	RM5688--RM1155--RM17078	2.95	4	Spikelets per panicle	<i>qSP4</i>	104.00±9.37	6.12	0.006
S7	RM103--RM494--long arm end	0.20	6		<i>qSP6</i>	117.6±10.12	12.92	1.30E-05
N ^a		—		千粒重		24.07±0.53		
S4	RM5928--RM6266--RM157	1.43	3	1000-grain weight (g)	<i>qGWT3</i>	27.56±0.47	1.75	7.11E-10

^a; N 表示 Nipponbare; ^b; 标记中间的单线表示代换片段, 侧端标记两端的双线表示可能发生重组的区段。

^a; N stands for Nipponbare; ^b; The single hyphen in the middle of markers indicates substitution segment while the double hyphens on the border of markers indicate segments recombination might appear.

南大学水稻研究所培育的优良籼稻恢复系。为了更好地利用和定向改良西恢 18, 创造在日本晴背景下西恢 18 的基因自然变异对明确其重要性状的基因座位有重要意义。我们以日本晴为受体亲本、西恢 18 为供体亲本鉴定了一个水稻优良染色体片段代换系 Z746。Z746 含有多个育种有利性状, 如株高、粒长、长宽比、一次枝梗数、二次枝梗数、穗长、每穗粒数、每穗实粒数比受体亲本显著增加, 因而是用于引起这些性状变异的 QTL 鉴定的良好材料。

通过 QTL 定位, 我们将 36 个水稻重要农艺性状的 QTL 分解到了 Z746 的 2 号、3 号、4 号和 6 号染色体的 6 个代换片段上, 其中包括 10 个负效应和 26 个正效应的 QTL。这对于我们进一步利用 MAS 法进行这些 QTL 的单片段代换系选育有重要意义。我们鉴定的粒长 *qGL3*、千粒重 *qGWT3* 以及株高 *qPH3-2* 均连锁于 RM6266 (物理距离为 23.62 Mb), 而且 *qGL3*、*qGWT3* 和 *qPH3-2* 均具有增加对应性状的加性效应。其中 *qGL3* 和 *qGWT3* 可能具有一因多效性, 粒重的增加应由粒长增加所致。经与已克隆和定位的 QTL 比较, 在与其连锁标记 RM6266 (23.62 Mb) 2 Mb 的区域内包含 *GL3.1* 和 *qGL3-1*^[7,28], 这 2 个粒长基因均编码 *OsPPKL1*, 属 *OsPPKL1* 的不同等位变异。*GL3.1* 通过调控细胞周期蛋白 T1;3 控制水稻籽粒大小和产量。因而我们定位的 *qGL3* 和 *qGWT3* 可能也是 *OsPPKL1* 的等位变异, 也正是由于这些等位变异的丰富性造就了水稻籽粒长度的多样性和遗传的复杂性。此外, 这 2 个 QTL 还与王大川等^[29]鉴定的 *qGL3*、*qGWT3*, Wang 等^[30]鉴定的 *qKL3*、*qKWT3* 相同, 表明这 2 个 QTL 遗传稳定。*qPH3-2* 可能与株高 *OsHox32* 基因 (物理距离为 24.651 Mb~24.657 Mb) 等位, 过表达 *OsHox32* 导致水稻株高变矮^[31]。同时, 该 QTL 也可被王大川等^[29]和 Wang 等^[30]鉴定出, 同样表明 *qPH3-2* 是一个遗传稳定的主效 QTL。同样地, *qGL6* 和 *qRLW6* 也可被 Zhang 等^[32]鉴定出, 并经 DNA 测序表明 *qGL6* 是生长素响应因子 *OsARF19* 的等位基因。

qPL2 与 *ZFP185* (物理距离为 5.345 Mb~5.347 Mb) 可能等位, *ZFP185* 编码一个锌指蛋白, 过表达 *ZFP185* 表现稻穗变短^[33]。*qPL2* 也具有减少穗长的加性效应, 其连锁标记与 *ZFP185* 相距 1.52 Mb, 可作为 *qPL2* 的候选基因。株高 *qPH3-1* 与 RM14389 (2.70 Mb) 连锁, 与 *PAD* 和 *SD37* 分别相距 0.36 Mb 和 0.48 Mb。*PAD* 和 *SD37* 分别编码 *OsMCA1* 和

CYP96B4, 这 2 个基因突变均引起水稻株高矮化^[34-35]。因而, *PAD* 和 *SD37* 可作为 *qPH3-1* 的候选基因。*qPH6-1* 与 RM7412 (28.77 Mb) 连锁, 可能与 *OsPIN2* (物理距离为 27.200 Mb~27.204 Mb) 等位, 过表达 *OsPIN2* 引起水稻植株矮化^[36]。至于是否等位, 均有待于对这些基因进行日本晴和 Z746 进一步 DNA 测序和功能互补验证。此外, *qNSB2-1*、*qNPB2-2*、*qPH3-2*、*qPL3* 也可被崔国庆等^[22]、王大川等^[29]和 Wang 等^[30]检测到。其中 36 个 QTL 中, 24 个也被我们选出的 8 个 SSSL 验证。表明这些遗传稳定的主效 QTL 由于受环境影响较小, 对分子设计育种至关重要。

本研究中的其他 QTL 均未见报道, 可能是新的位点。对于未报道的 QTL, 我们进一步精细定位和克隆, 为其生物学功能研究奠定基础。

4 结论

鉴定了一个以日本晴为受体、西恢 18 为供体亲本的含有 7 个代换片段的优良水稻染色体片段代换系 Z746, 其平均代换长度为 3.99 Mb。Z746 携带多个育种有利性状。进一步利用日本晴/Z746 构建的次级 F₂ 群体共鉴定出 36 个重要性状的 QTL。其中 24 个可被我们选出的 8 个 SSSL 所验证, 5 个可能与已克隆的基因等位, 8 个可被前人多次检出, 表明这些是遗传较稳定的主效 QTL。Z746 的粒长主要由 4 个粒长 QTL (*qGL3*、*qGL4*、*qGL2*、*qGL6*) 控制; 株高主要由 7 个 QTL 控制; 穗长由 4 个 QTL 控制; 每穗粒数由 2 个 QTL 控制; 千粒重由 2 个 QTL 控制。这些结果为目标 QTL 的遗传机制解析和育种应用奠定了良好基础。

References

- [1] 刘喜, 牟昌铃, 周春雷, 程治军, 江玲, 万建民. 水稻粒型基因克隆和调控机制研究进展. 中国水稻科学, 2018, 32: 1-11.
Liu X, Mou C L, Zhou C L, Cheng Z J, Jiang L, Wan J M. Research progress on cloning and regulation mechanism of rice grain shape genes. *Chin J Rice Sci*, 2018, 32: 1-11 (in Chinese with English abstract).
- [2] 卢襄, 时振英. 水稻穗发育的分子生物学研究进展. 植物生理学报, 2013, 49: 111-121.
Lu H, Shi Z Y. Molecular research progress of rice panicle development. *Acta Photophysiol Sin*, 2013, 49: 111-121 (in Chinese with English abstract).
- [3] Mao H L, Sun S Y, Yao J L, Wang C R, Yu S B, Xu C G, Li X H, Zhang Q F. Linking differential domain functions of the GS3 protein to natural variation of grain size in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 19579-19584.

- [4] Feng Z M, Wu C, Wang C, Roh J, Zhang L, Chen J, Zhang S, Zhang H, Yang C, Hu J, You X, Liu X, Yang X, Guo X, Zhang X, Wu F, Terzaghi W, Kim S K, Jiang L, Wan J M. *SLG* controls grain size and leaf angle by modulating brassinosteroid homeostasis in rice. *J Exp Bot*, 2016, 67: 4241–4253.
- [5] Jin J, Hua L, Zhu Z F, Tan L B, Zhao X H, Zhang W F, Liu F X, Fu Y C, Cai H W, Sun X Y, Gu P, Xie D X, Sun C Q. *GAD1* encodes a secreted peptide that regulates grain number, grain length, and awn development in rice domestication. *Plant Cell*, 2016, 28: 2453–2463.
- [6] Song X J, Kuroha T, Ayano M, Furuta T, Nagai K, Komeda N, Segami S, Miura K, Ogawa D, Kamura T. Rare allele of a previously unidentified histone H4 acetyltransferase enhances grain weight, yield, and plant biomass in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 76–81.
- [7] Qi P, Lin Y S, Song X J, Shen J B, Huang W, Shan J X, Zhu M Z, Jiang L, Gao J P, Lin H X. The novel quantitative trait locus *GL3.1* controls rice grain size and yield by regulating Cyclin-T1; 3. *Cell Res*, 2012, 22: 1666–1680.
- [8] Fan X, Jun F, Shu J O, Shao P G, Feng X Z, Lin D, Yun H X, Hong R W, Xiao H S, Jin F C, Guo D W, Cheng C C. Variations in CYP78A13 coding region influence grain size and yield in rice. *Plant Cell Environ*, 2015, 38: 800–811.
- [9] Monna L, Kitazawa N, Yoshino R, Suzuki J, Masuda H, Maehara Y, Tanji M, Sato M, Nasu S, Minobe Y. Positional cloning of rice semidwarfing gene, *sd-1*: rice “green revolution gene” encodes a mutant enzyme involved in gibberellin synthesis. *DNA Res*, 2002, 9: 11–17.
- [10] Tong H N, Xiao Y H, Liu D P, Gao S P, Liu L C, Yin Y H, Jin Y, Qian Q, Chu C C. Brassinosteroid regulates cell elongation by modulating gibberellin metabolism in rice. *Plant Cell*, 2014, 26: 4376–4393.
- [11] Wu J H, Zhu C F, Pang J H, Zhang X R, Yang C L, Xia G X, Tian Y C, He C Z. *OsLOLI*, a C2C2-type zinc finger protein, interacts with OsbZIP58 to promote seed germination through the modulation of gibberellin biosynthesis in *Oryza sativa*. *Plant J*, 2014, 80: 1118–1130.
- [12] Hong Z, Ueguchi-Tanaka M, Shimizu-Sato S, Inukai Y, Fujioka S, Shimada Y, Takatsuto S, Agetsuma M, Yoshida S, Watanabe Y, Uozu S, Kitano H, Ashikari M, Matsuoka M. Loss-of-function of a rice brassinosteroid biosynthetic enzyme, C-6 oxidase, prevents the organized arrangement and polar elongation of cells in the leaves and stem. *Plant J*, 2002, 32: 495–508.
- [13] Ito S, Kitahata N, Umehara M, Hanada A, Kato A, Ueno K, Mashiguchi K, Kyoizuka J, Yoneyama K, Yamaguchi S, Asami T. A new lead chemical for strigolactone biosynthesis inhibitors. *Plant Cell Physiol*, 2010, 51: 1143–1150.
- [14] Miura K, Ikeda M, Matsubara A, Song X J, Ito M, Asano K, Matsuoka M, Kitano H, Ashikari M. *OsSPL14* promotes panicle branching and higher grain productivity in rice. *Nat Genet*, 2010, 42: 545–549.
- [15] Motoyuki A, Hitoshi S, Shao Y L, Toshio Y, Tomonori T, Asuka N, Enrique R A, Qian Q, Hidemi K, Makoto M. Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science*, 2005, 309: 741–745.
- [16] Huang X Z, Qian Q, Liu Z B, Sun H Y, He S Y, Luo D, Xia G M, Chu C C, Li J Y, Fu X D. Natural variation at the *DEP1* locus enhances grain yield in rice. *Nat Genet*, 2009, 41: 494–497.
- [17] Komatsu M, Chujo A, Nagato Y, Shimamoto K, Kyoizuka J. *FRIZZY PANICLE* is required to prevent the formation of axillary meristems and to establish floral meristem identity in rice spikelets. *Development*, 2003, 130: 3841–3850.
- [18] Li F, Liu W B, Tang J Y, Chen J F, Tong H N, Hu B, Li C L, Fang J, Chen M S, Chu C C. Rice *DENSE AND ERECT PANICLE 2* is essential for determining panicle outgrowth and elongation. *Cell Res*, 2010, 20: 838–849.
- [19] 赵芳明, 郭超, 魏霞, 杨正林, 凌英华, 桑贤春, 王楠, 张长伟, 李云峰, 何光华. 日本晴与 5 个优良恢复系的多态性标记筛选及遗传差异分析. 西南大学学报(自然科学版), 2016, 38(11): 1–7.
Zhao F M, Guo C, Wei X, Yang Z L, Ling Y H, Sang X C, Wang N, Zhang C W, Li Y F, He G H. Polymorphic SSR markers screening and genetic difference analysis between Nipponbare and five excellent restorer line. *J Southwest Univ (Nat Sci Edn)*, 2016, 38(11): 1–7 (in Chinese with English abstract).
- [20] 周可, 李燕, 王世明, 崔国庆, 杨正林, 何光华, 凌英华, 赵芳明. 水稻紫鞘染色体片段代换系 Z519 的鉴定及 *PSH1* 候选基因分析. 作物学报, 2017, 43: 974–982.
Zhou K, Li Y, Wang S M, Cui G Q, Yang Z L, He G H, Ling Y H, Zhao F M. Identification of rice chromosome segment substitution line Z519 with purple sheath and candidate gene analysis of *PSH1*. *Acta Agron Sin*, 2017, 43: 974–982 (in Chinese with English abstract).
- [21] Paterson A H, Damon S, Hewitt J D, Zamir D, Rabinowitch H D, Lincoln S E, Lander E S, Tanksley S D. Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: comparison across species, generations, and environments. *Genetics*, 1991, 127: 181–197.
- [22] 崔国庆, 王世明, 马福盈, 汪会, 向朝中, 李云峰, 何光华, 张长伟, 杨正林, 凌英华, 赵芳明. 水稻高秆染色体片段代换系 Z1377 的鉴定及重要农艺性状 QTL 定位. 作物学报, 2018, 44: 1477–1484.
Cui G Q, Wang S M, Ma F Y, Wang H, Xiang C Z, Li Y F, He G H, Zhang C W, Yang Z L, Ling Y H, Zhao F M. Identification of rice chromosome segment substitution line Z1377 with increased plant height and QTL mapping for agronomic important traits. *Acta Agron Sin*, 2018, 44: 1477–1484 (in Chinese with English abstract).
- [23] Murray M, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*, 1980, 8: 4321–4326.
- [24] Zhao F M, Tan Y, Zheng L Y, Zhou K, He G H, Ling Y H, Zhang L H, Xu S Z. Identification of rice chromosome segment substitution line Z322-1-10 and mapping QTL for agronomic traits from the F₃ population. *Cereal Res Commun*, 2016, 44: 370–380.
- [25] Zhao F M, Zhu H T, Ding X H, Zeng R Z, Zhang Z M, Li W T, Zhang G Q. Detection of QTLs for important agronomic traits and analysis of their stabilities using SSSLs in rice. *Agric Sci China*, 2007, 6: 769–778.
- [26] Balakrishnan D, Surapaneni M, Mesapogu S, Neelamraju S. Development and use of chromosome segment substitution lines as a genetic resource for crop improvement. *Theor Appl Genet*, 2006, 132: 1–25.
- [27] 张桂权. 基于 SSSL 文库的水稻设计育种平台. 遗传, 2019, 41:

- 754–760.
- Zhang G Q. The platform of breeding by design based on the SSSL library in rice. *Hereditas* (Beijing), 2019, 41: 754–760 (in Chinese with English abstract).
- [28] Zhang X J, Wang J F, Huang J, Lan H X, Wang C L, Yin C F, Wu Y Y, Tang H J, Qian Q, Li J Y, Zhang H S. Rare allele of *OsPPKL1* associated with grain length causes extra-large grain and a significant yield increase in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 21534–21539.
- [29] 王大川, 汪会, 马福盈, 杜婕, 张佳宇, 徐光益, 何光华, 李云峰, 凌英华, 赵芳明. 增加穗粒数的水稻染色体代换系 Z747 鉴定及相关性状 QTL 定位. *作物学报*, 2020, 46: 140–146.
- Wang D C, Wang H, Ma F Y, Du J, Zhang J Y, Xu G Y, He G H, Li Y F, Ling Y H, Zhao F M. Identification of rice chromosome segment substitution line Z747 with increased grain number and QTL mapping for related traits. *Acta Agron Sin*, 2020, 46: 140–146 (in Chinese with English abstract).
- [30] Wang H, Zhang J Y, Naz F, Li J, Sun S F, He G H, Zhang T, Ling Y H, Zhao F M. Identification of rice QTLs for important agronomic traits with long kernel CSSL Z741 and three SSSLs. *Rice Sci*, 2020, 27: 414–422.
- [31] Li Y Y, Shen A, Xiong W, Sun Q L, Luo Q, Song T, Li Z L, Luan W J. Overexpression of *OsHox32* results in pleiotropic effects on plant type architecture and leaf development in rice. *Rice*, 2016, 9: 1–15.
- [32] Zhang T, Wang S M, Sun S F, Zhang Y, Li J, You J, Su T, Chen W B, Ling Y H, He G H, Zhao F M. Analysis of QTL for grain size in a rice chromosome segment substitution line Z1392 with long grains and fine mapping of *qGL-6*. *Rice*, 2020, 13: 1–11.
- [33] Zhang Y, Lan H X, Shao Q L, Wang R Q, Chen H, Tang H J, Zhang H S, Huang J. An A20/AN1-type zinc finger protein modulates gibberellins and abscisic acid contents and increases sensitivity to abiotic stress in rice (*Oryza sativa*). *J Exp Bot*, 2016, 67: 315–326.
- [34] Liu L C, Tong H N, Xiao Y H, Che R H, Xu F, Hu B, Liang C Z, Chu J F, Li J Y, Chu C C. Activation of *big grain1* significantly improves grain size by regulating auxin transport in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 11102–11107.
- [35] Zhang J, Liu X Q, Li S Y, Cheng Z K, Li C Y. The rice semi-dwarf mutant *sd37*, caused by a mutation in CYP96B4, plays an important role in the fine-tuning of plant growth. *PLoS One*, 2014, 9: e88068.
- [36] Chen Y N, Fan X R, Song W J, Zhang Y L, Xu G H. Over-expression of *OsPIN2* leads to increased tiller numbers, angle and shorter plant height through suppression of *OsLAZY1*. *Plant Biotechnol J*, 2012, 10: 139–149.