

基于染色体置换系的野生稻抽穗期及紫色性状 QTL 的鉴定

李 静, 孙 妍, 齐 兰, 苏 龙, 丁膺宾, 许 睿, 张莉珍, 王艳艳,
郑晓明, 张丽芳, 程云连, 乔卫华, 杨庆文
(中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘要: 利用一套以 9311 为背景的普通野生稻染色体片段置换系群体为研究材料, 进行野生稻相关 QTL 的定位与基因的鉴定。在多年多点的抽穗期调查数据基础上, 结合 200 多个分子标记引物的基因型鉴定结果, 定位到 11 个与抽穗期相关的 QTL; 选取携带相关 QTL 导入片段的两个置换系进一步研究, 发现 2 个抽穗期主效 QTL 均为已克隆基因的等位基因。利用叶鞘、稃尖、柱头颜色与 9311 差异显著的一个单片段置换系定位到来自野生稻的紫色性状基因 *OrC*, 初步鉴定与栽培稻的等位基因功能不同。这些结果再次表明染色体片段置换系是行之有效的 QTL 定位以及基因发掘的遗传群体。通过对抽穗期、紫色性状相关 QTL 的定位与基因的鉴定, 为进一步的功能研究提供了基因资源。

关键词: 水稻; CSSL; 抽穗期; 紫色性状; QTL 定位

Identification of Agronomic Traits Related QTLs from Wild Rice in Chromosome Segment Substitution Lines

LI Jing, SUN Yan, QI Lan, SU Long, DING Ying-bin, XU Rui, ZHANG Li-zhen, WANG Yan-yan,
ZHENG Xiao-ming, ZHANG Li-fang, CHENG Yun-lian, QIAO Wei-hua, YANG Qing-wen
(Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: In this study, QTLs controlling heading date (HD) and purple trait were identified in a chromosomal segments substitution line population, which derived from a cross between wild rice as donor parent and 9311 as receptor parent. By determining the heading date of CSSLs at multi-environmental conditions, we identified and mapped eleven HD QTLs by using more than 200 molecular markers. Two CSSLs significantly delayed the heading later under long day condition, and genetic analysis revealed two known genes that controlled the rice flowering time. One CSSL showed purple stigma and apiculus, and the introgression fragment contained an *OrC* gene that associated with anthocyanin biosynthesis. The preliminary results implied that the *OrC* gene might function differently with the allele from cultivated rice. Our data indicated that the CSSL population was a valuable resource for identifying the elite genes from wild rice. Those genes might be candidates used for rice breeding and function analysis in future.

Key words: wild rice; CSSL; heading date; purple trait; QTL

收稿日期: 2017-09-14 修回日期: 2017-11-20 网络出版日期: 2018-04-17

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20180417.1433.046.html>

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0100101-01-02); 国家自然科学基金(31471471); 农业部财政专项;(2016NWB036-01-12); 山东农业大学重点实验室开放课题(2016KF08)

第一作者研究方向为稻种资源及创新利用研究。李静; E-mail: lijing0205@foxmail.com

通信作者: 乔卫华, 研究方向为种质资源创新利用研究。E-mail: qiaoweihua@caas.cn

杨庆文, 研究方向为种质资源创新利用研究。E-mail: yangqingwen@caas.cn

稻属植物共有 23 个种,包括 2 个栽培种和 21 个野生种,含有 AA、BB、CC、BBCC、CCDD、EE、GG、HHJJ、FF、HHKK 等 10 个染色体组,广泛分布于亚洲、非洲、拉丁美洲和澳洲^[1]。其中 AA 染色体组的普通野生稻被认为是亚洲栽培稻的祖先种。栽培稻在驯化过程中丢失了约 1/3 的等位基因和一半的基因型,因此很多重要的农艺性状与野生稻有很大差异^[2]。虽然野生稻的整体产量性状劣于栽培稻,但是相关研究表明野生稻中仍然存在高效营养基因和高产优质基因^[2-3]。发掘野生稻中与重要农艺性状相关的基因,既可以为栽培稻育种提供基因资源,也可以为研究水稻的起源与驯化提供分子依据。

构建合适的遗传作图群体,消除野生稻复杂的遗传背景,是野生稻种质资源研究与利用的关键^[4]。AA 基因组的野生稻的单片段置换系最早于 20 世纪 90 年代末开始构建^[5-6]。T. Kurakazu^[6] 利用 105 个 RFLP 分子标记构建了包含 61 个以澳洲野生稻 *Oryza. meridionalis* N. Q. Ng 为供体亲本的染色体片段置换系。近年来,水稻中先后构建了大量的染色体片段导入系或染色体片段置换系,包括籼—粳亚种间以及栽培稻—野生稻之间的代换系^[7-13]。F. Tian 等^[3]以东乡野生稻为供体,桂朝 2 号为受体构建了 159 个导入系群体,覆盖东乡野生稻基因组的 68%;L. B. Tan 等^[14]利用云南普通野生稻为供体,栽培稻特青为受体构建了 120 个导入系,而且覆盖了整个野生稻基因组。张晨昕等^[15]以珍汕 97B 为背景材料,构建了 105 份来自于马来西亚普通野生稻的染色体片段置换系。利用这些遗传群体材料定位到很多与水稻重要农艺性状相关的 QTL 并进行了基因克隆^[14-18]。

本实验室以栽培稻 9311 为受体亲本、普通野生稻为供体亲本构建了一套染色体片段置换系^[19]。

表 1 试验材料种植地点信息列表

Table 1 The general information of planting fields

环境编号 Environment	种植地点 Crop location	种植周期 Cropping season	播种日期 Seeding date	插秧日期 Transplanting date
E1	北京,昌平 40.20°N,115.51°E	2015(2016)年 4-10 月	4 月 28 日	6 月 2 日
E2	江苏,南京 32.03°N,118.47°E	2015(2016)年 5-10 月	5 月 11 日	6 月 13 日
E3	海南,三亚 18.15°N,109.3°E	2014(2015)年 12 月- 2015(2016)年 5 月	12 月 1 日	12 月 30 日

1.2.2 性状调查 依据《水稻种质资源描述规范与数据标准》^[20]。抽穗期是指从播种到始穗的

以整套野生稻染色体片段置换系为研究材料,利用多年多点的表型鉴定试验,结合 200 多个分子标记引物的基因型鉴定结果,定位到多个与抽穗期相关和 1 个与紫色性状相关的 QTL,通过与水稻中已知基因比对发现,大部分主效 QTL 为已克隆基因的等位基因,亦有微效 QTL 中发现未知基因。表明染色体片段置换系是行之有效的 QTL 定位以及基因发掘的遗传群体。通过对野生稻中抽穗期、紫色性状相关基因的鉴定,为进一步的功能研究提供了基因资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以来自海南三亚的 1 个普通野生稻居群为供体亲本,栽培稻测序品种 9311 为受体亲本,利用在双亲间具有多态性的 300 多对 SSR 分子标记引物,通过多代回交与分子标记辅助选择技术,构建了 1 套染色体片段置换系^[19]。选取多态性良好的 191 对 SSR 引物,另外设计 75 对双亲间具有多态性的 In-Del 引物,选取 146 个能够覆盖野生稻染色体基因组的置换系材料,进行抽穗期、紫色性状 QTL 的定位与鉴定。

1.2 试验方法

1.2.1 田间种植 置换系材料分别种植于北京昌平中国农业科学院作物科学研究所试验基地、江苏南京试验基地以及海南三亚试验基地。春季材料播种后 30 d 插秧,夏季材料播种后 25 d 插秧。株行距 16 cm × 26 cm,每行 10 株,普通大田管理。试验材料种植地点信息如表 1 所示。同一环境下分 2 年重复种植。根据环境的日照时间,北京为自然长日照 (NLD, natural long day) 条件,三亚为自然短日照 (NSD, natural short day) 条件。

天数,始穗期是指单株的主穗抽出叶鞘 1 cm 时的时间,每个株系以 50% 单株始穗日期为该株系

的抽穗期,每个环境下的抽穗期数据为2年重复的平均值。苗期叶鞘的颜色分为紫色与绿色,芒、稃尖、柱头颜色分为紫色与白色,颜色性状分单株调查,并准确做好记录以对分离情况进行遗传分析。

1.2.3 引物设计 本试验共使用2种分子遗传标记引物,用于检测基因型与构建基因连锁图谱。第1种为SSR标记,来源于美国Cornell大学公布的研究成果以及Gramene网站^[21],第2种为InDel标记,根据已经测序完成的日本晴和9311的序列信息,使用primer5软件进行引物设计,设计好的引物均在Gramene网站进行在线比对,验证其所在染色体位置,确保设计标记的准确性。挑选出的引物全部进行两亲本间多态性鉴定,选择多态性良好的引物作为标记引物。

1.2.4 QTL分析和候选基因的预测 通过QTL分析软件QTL IciMapping对染色体置换系群体的基因型和表型数据进行处理^[22],软件中LOD值定为2.5,即只有当LOD值大于2.5时才能说明具有有效QTL的存在。当QTL定位到较小的DNA片段之间时,利用美国水稻基因组注释计划(<http://rice.plantbiology.msu.edu/cgi-bin/gbrowse/rice/#search>)中基因的注释分析,筛选与目标性状相关的候选基因。在NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中,下载候选区域的9311序列,并设计测序引物将双亲的候选区域全部测通,所得测序数据使用DNASTAR软件进行拼接与对比^[23]。

2 结果与分析

2.1 CSSL群体的基因型分析与抽穗期QTL的定位

本试验所用的分子标记引物经过多态性检测,筛选出191个SSR引物和75个InDel引物,在野生稻与9311双亲间有良好的多态性且均匀分布于12条染色体(图1);利用这266对标记引物检测染色体置换系群体的基因型即遗传背景。通过基因型的分析,筛选其中146个稳定无分离且群体能够覆盖野生稻染色体全基因组的株系,作为抽穗期、紫色性状等农艺性状的QTL定位群体。

根据置换系群体在3个环境2年重复(表1)的抽穗期表型调查数据,利用QTL IciMapping软件对146个株系中与抽穗期相关的QTL进行初步定位。

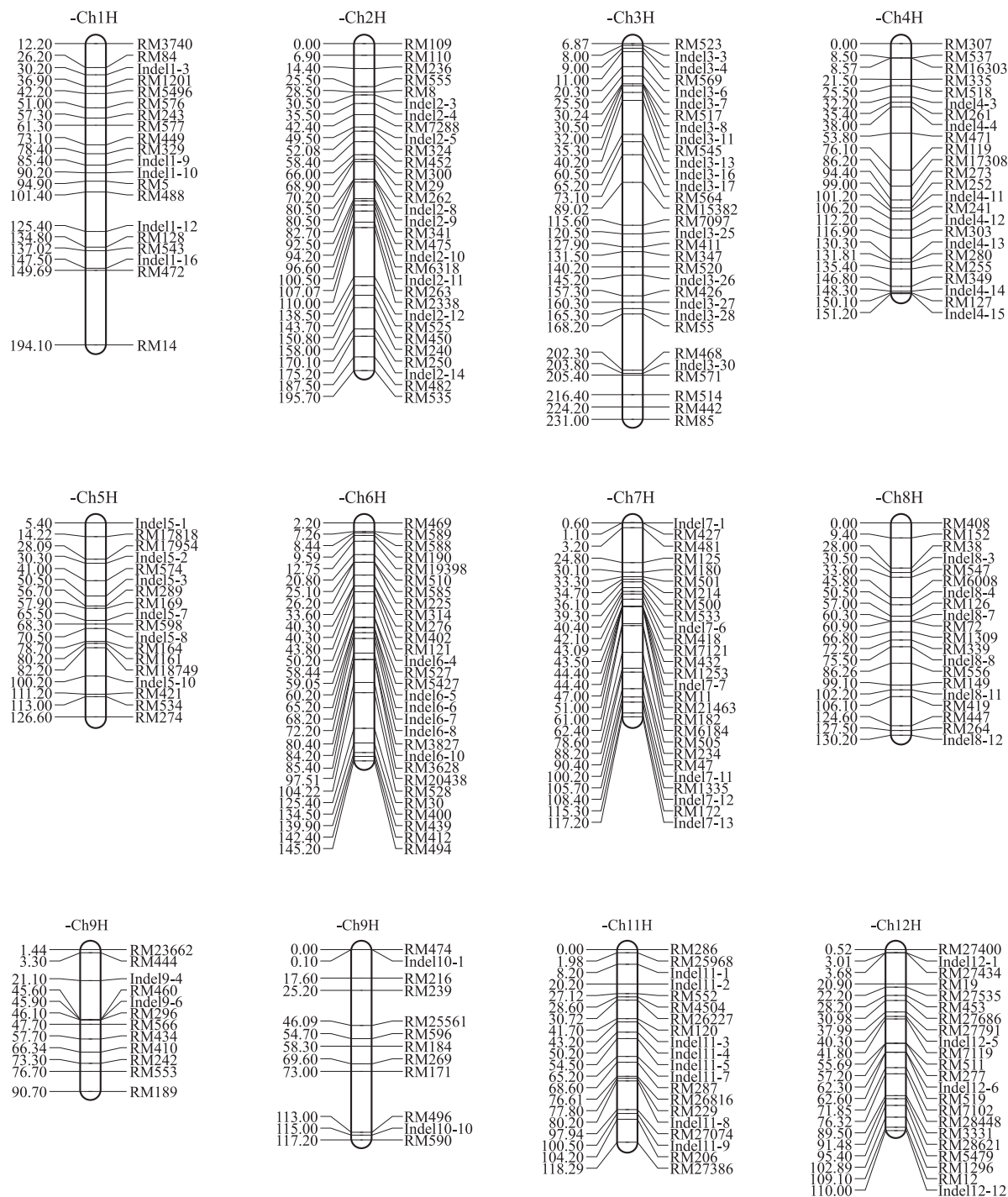
共检测到11个QTL(表2),分布于2、3、5、6、7、10、12号染色体上。其中有6个QTL能在2个环境中检测到,分别位于:2号染色体RM109和RM535、6号染色体InDel 6-4、7号染色体InDel 7-13、10号染色体RM590、12号染色体RM19附近,为稳定遗传的抽穗期QTL;6个来自于野生稻的QTL在长日照与短日照环境下均能延迟9311的抽穗时间,其加性效应全部为正值;其中InDel 7-13附近的QTL在北京长日照条件下贡献率高达27.2%,应为主效QTL。另有4个QTL加性效应为负值,且全部来自三亚短日照环境,表明野生稻中存在自然短日照条件下缩短抽穗期的等位基因。

2.2 CSSL129与CSSL39株系的抽穗表型及QTL分析

挑选了置换系在NLD(北京)条件下抽穗最晚的2个株系:CSSL129与CSSL39,进行野生稻抽穗期相关QTL与基因的鉴定。CSSL129株系的基因型鉴定表明:分布于第1、6、10号染色体的4个导入片段来源于野生稻(图2c)。在北京NLD环境下,CSSL129整个生育期不能抽穗,9311抽穗期为121 d;在三亚NSD环境下,CSSL129抽穗期天数为124 d,9311抽穗期天数为114 d,CSSL129比9311晚抽穗10 d左右(图2b)。结果表明在NLD与NSD两环境下,CSSL129的抽穗期与亲本9311相比差异达到极显著水平,CSSL129与9311的 F_1 抽穗期则介于两个亲本之间(图2a)。

在CSSL129的4个导入片段中,只有在6号染色体的InDel 6-4标记处检测到QTL,命名为*qHd6.1*,其贡献率在NLD条件下高达21.1%(表2)。已报道的水稻抽穗期*Hd1*基因,所在染色体上的物理位置与InDel 6-4分子标记所在的物理位置相近^[24]。据此,设计了*Hd1*基因的6对引物(表3),扩增CSSL129与9311中的*Hd1*基因并进行测序,序列比对发现与9311相比,CSSL129(野生稻)的*Hd1*基因在3013 bp处有4 bp的插入片段,4 bp的缺失造成了9311 *Hd1*蛋白功能的改变,使得抽穗提前,据此推断*qHd6.1*就是*Hd1*的等位基因。

CSSL39株系的基因型鉴定表明:分布于第2、5、6、7、8、10号染色体7个导入片段来自野生稻(图3c)。在NLD和NSD条件下,CSSL39与9311的抽穗期差异都达到了极显著水平, F_1 的抽穗期介于两亲本之间;北京NLD环境下,CSSL39的抽穗期为144 d,



分子标记引物对应的遗传距离标注在所在染色体的左边

Molecular markers are shown at the right side of chromosomes, and the respective genetic distance(cM) are at the left side

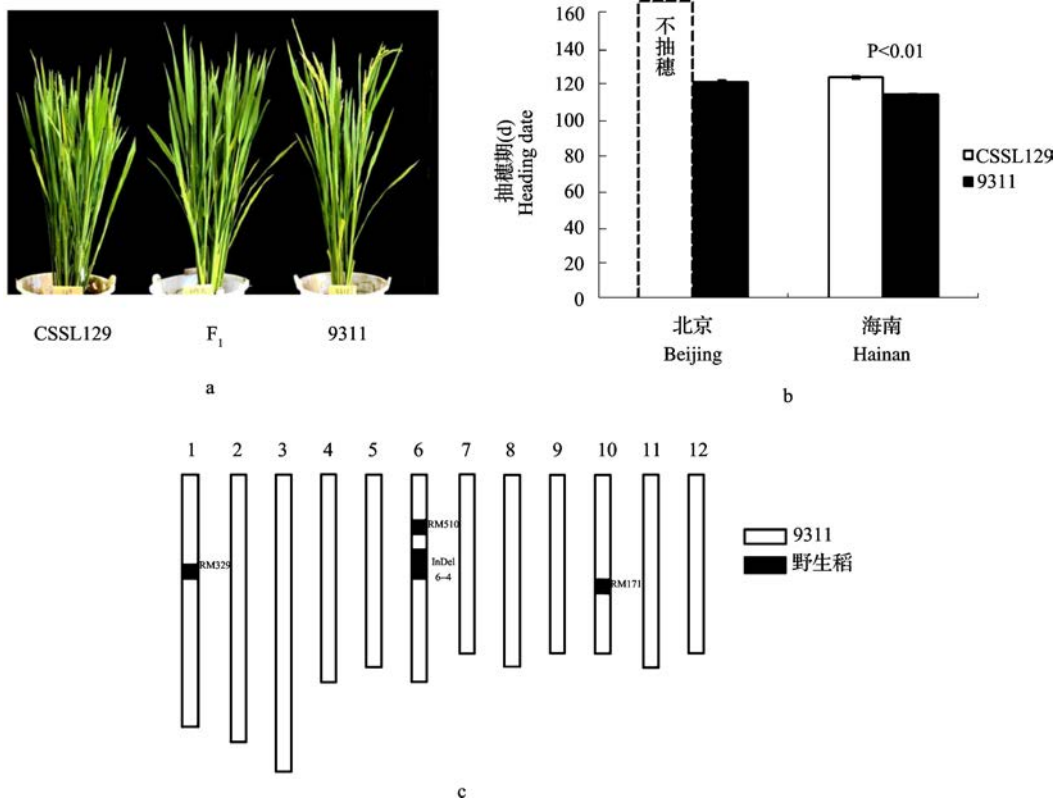
图 1 试验所用 191 个 SSR 引物和 75 个 InDel 引物遗传连锁图

Fig. 1 Genetic linkage map of 191 SSR and 75 InDel polymorphic markers

表 2 不同环境下利用染色体片段置换系检测到的抽穗期 QTL 列表

Table 2 The heading date related QTLs that were identified in CSSL population

性状	染色体	QTL	标记	地点	LOD 值	贡献率	效应值
Trait	Chr.	QTL	Marker	Locations	LOD value	(%) PVE	Effects
抽穗期 Heading Date	2	<i>qHd2.1</i>	RM109	南京	2.97	17.3	20.6
				三亚	2.67	10.5	14.5
		<i>qHd2.2</i>	RM535	南京	4.65	7.89	19
				三亚	5.94	5.38	12.5
	3	<i>qHd3.1</i>	InDel 3-8	三亚	4.92	11.1	-2.59
	3	<i>qHd3.2</i>	InDel 3-17	三亚	4.12	9.46	-2.64
	5	<i>qHd5.1</i>	InDel 5-8	北京	3.41	5.4	1.34
	6	<i>qHd6.1</i>	InDel 6-4	北京	11.7	21.1	11.5
				三亚	2.75	7.38	6.19
	6	<i>qHd6.2</i>	RM20438	三亚	2.95	6.53	-1.5
	7	<i>qHd7.2</i>	InDel 7-13	北京	14.6	27.2	5.02
				三亚	2.67	6.71	1.9
	10	<i>qHd10.1</i>	RM590	北京	2.86	4.51	2.4
				南京	2.86	15.3	21.2
	12	<i>qHd12.1</i>	RM19	北京	4	5.99	3.04
				三亚	4.13	11.4	3.19
12	<i>qHd12.2</i>	RM28448	三亚	3.67	8.73	-2.05	



a: NLD 条件下的 CSSL129、9311 以及 F₁ 植株, 照片拍摄于 9311 抽穗后 15 d; b: 两环境下 CSSL129 与 9311 抽穗期比较;
c: CSSL129 基因型图示, 黑色为导入的野生稻染色体片段, 下同
a: The delayed heading date of CSSL129. Photos were taken under NLD condition in Beijing at 15 days after the heading of 9311,
b: Statistics of the heading date between CSSL129 and 9311. Two-tailed t-test was deployed,
c: Graphical representation of introgression segments in CSSL129, black bars indicate chromosomes of wild rice, the same as below

图 2 置换系 CSSL129 的抽穗期表型与基因型鉴定

Fig. 2 The heading date and introgression segment of CSSL129

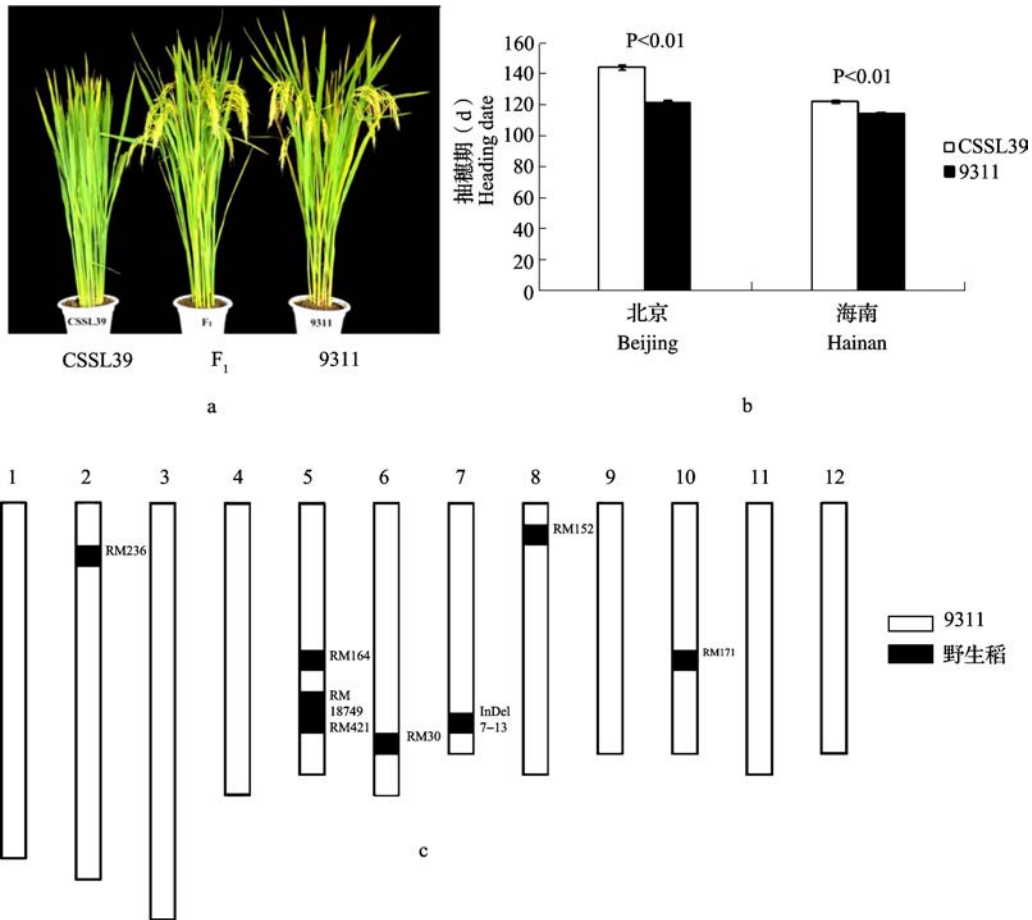
表 3 对两亲本中 *Hdl* 基因进行测序所用的引物

Table 3 The primer for sequencing *Hdl* gene in two parents

编号 No.	前引物序列(5'-3') Forward primer sequence (5'-3')	后引物序列(5'-3') Reverse primer sequence (5'-3')
<i>Hdl-1</i>	GCTCTAATAGCACCCT	CTGCTTCAGCGTTTCT
<i>Hdl-2</i>	ATGGGAGGATTCTATT	TTGTCGGAATCTTTGG
<i>Hdl-3</i>	GGAGGTTGGAGTTGGA	ATGAGGTCTTTTCGTGT
<i>Hdl-4</i>	ACAGCGTGAGTTCATC	TTCGTCACCTAAACCC
<i>Hdl-5</i>	AACTGGACCAGATGTT	TCTGTATCTCCCCTGT
<i>Hdl-6</i>	GAACATTGCCTGATACTGA	GACTGGATTGGGATTT

9311 为 121 d, CSSL39 比 9311 延迟抽穗 23 d; 在三亚 NSD 环境下, CSSL39 抽穗期为 122 d, 9311 抽穗期为 114 d, 比 9311 延迟抽穗 8 d(图 3a,b)。

CSSL39 中的 7 个导入片段在 7 号染色体的 InDel 7-13 标记附近检测到 QTL, 命名为 *qHd7.2*, 其贡献率在 NLD 条件下高达 27.2%, 是一个主效 QTL。比较所在染色体上的物理位置, 发现有已克隆基因 *OsPRR37* 位于导入片段区间。在 InDel 7-13 附近区间设计 4 对引物(表 4), 扩增 *OsPRR37* 基因并进行测序比对, 发现 9311 与 CSSL39 基因编码区有 10 个碱基的替换与 1 个 8 bp 的 InDel, 栽培稻 9311 中 8 bp 的缺失造成 *OsPRR37* 的翻译提前终止^[25-26], 基因丧失功能, 使得 9311 抽穗提前; 推测 *qHd7.1* 即是 *OsPRR37* 的等位基因。



a: NLD 条件下的 CSSL39、9311 以及 F₁ 植株, 照片拍摄于 9311 抽穗后 20 d;

b: 两环境下 CSSL39 与 9311 抽穗期比较; c: CSSL39 基因型图示

a: The delayed heading date of CSSL39. Photos were taken under NLD condition in Beijing at 20 days after the heading of 9311,

b: Statistics of the heading date between CSSL39 and 9311. Two-tailed t-test was deployed,

c: Graphical representation of introgression segments in CSSL39

图 3 置换系 CSSL39 的抽穗期表型与基因型鉴定

Fig. 3 The heading date and introgression segment of CSSL39

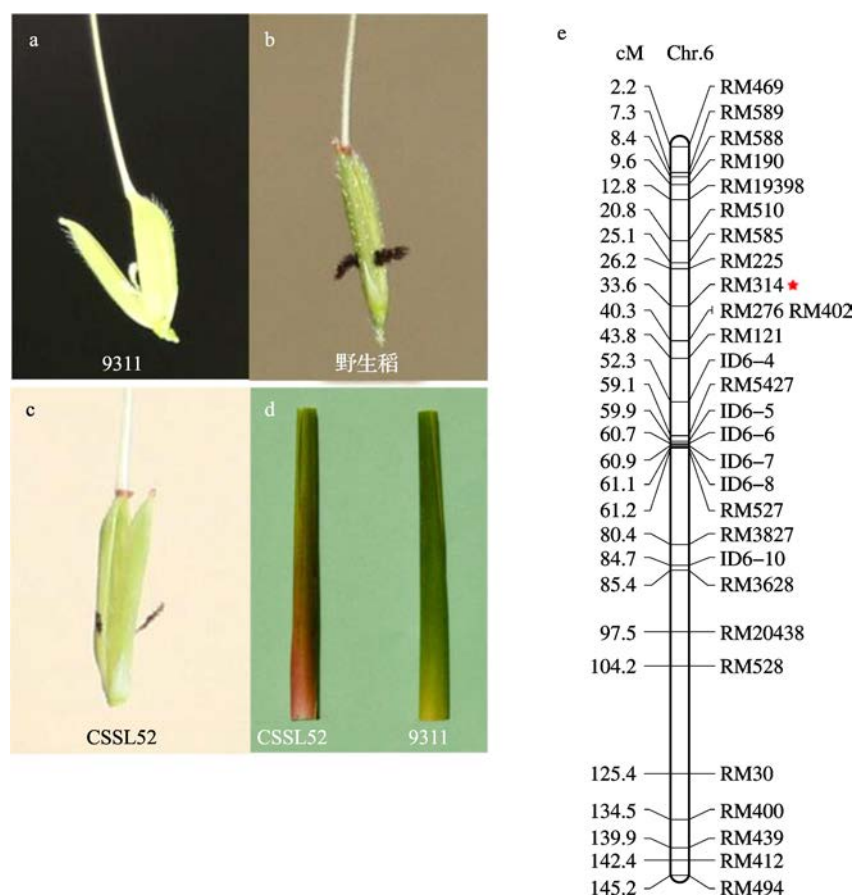
表 4 对亲本中 *qHd7.2* 基因进行测序所用的引物Table 4 The primer for sequencing *qHd7.2* gene in two parents

编号 No.	前引物序列(5'-3') Forward primer sequence (5'-3')	后引物序列(5'-3') Reverse primer sequence (5'-3')
<i>qHd7.2-1</i>	ggttagctgetgtgtggt	ccataatctgcaccccttt
<i>qHd7.2-2</i>	gggaagttcttcccttgg	cagtgacatggtgaactctcc
<i>qHd7.2-3</i>	gttcagtgacatggccgata	cgagggtgtgtacgaggtt
<i>qHd7.2-4</i>	tctctcggcattacgaggt	gatgcattggatgtgttga

2.3 紫色性状的基因定位与遗传分析

选取置换系 CSSL52 株系,进行紫色性状 QTL 及

基因的鉴定分析。CSSL52 中只有 1 个野生稻置换片段,位于 6 号染色体 RM314 附近(图 4e),为单片段置换系或近等基因系。表型调查发现,CSSL52 在幼苗期就可以观察到叶鞘呈紫红色(图 4d),随着植株生长颜色加深,抽穗后颜色开始变淡;在抽穗时期,刚抽出的穗部没有紫红色性状,抽穗约 1~2 d 后开始在稃尖、芒的尖部和柱头部位上呈现紫红色性状(图 4c),颜色会随着生长时间而逐渐加深变成紫色,最后成熟期稃尖颜色会变淡,而芒的颜色会逐渐消失。CSSL52 的叶鞘、柱头、稃尖和芒的颜色表型,与野生稻基本相同(图 4a,b)。



a~c:9311、野生稻、CSSL52 的柱头以及稃尖颜色;d:9311、CSSL52 叶鞘颜色比较;

e:CSSL52 的基因型,唯一的来自野生稻的导入片段位于 6 号染色体的 RM314 附近(红星标注)

a-c:The stigma and apiculus colors of 9311,wild rice and CSSL52,d:The leaf sheath color of CSSL52 and 9311,

e:Genotype of CSSL52,the only substitution segment was marked with red star

图 4 CSSL52 颜色表型与基因型

Fig. 4 The coloration phenotype and genotype of CSSL52

为了鉴定紫色性状是否为单基因控制性状,将 CSSL52 与 9311 回交,调查发现,CSSL52/9311 F_1 植株幼苗期叶鞘、成年植株柱头、稃尖和芒均有紫色性状;随后构建了 CSSL52/9311 F_2 分离群体。在三亚

的 452 个 F_2 单株中,共有 347 个单株具有紫色叶鞘、紫色柱头、紫色稃尖和紫色芒性状,有 105 个单株具有无色性状,未发现有紫色叶鞘、紫色柱头、紫色芒和紫色稃尖中 1 个、2 个或 3 个部位是紫色性状的

重组单株;紫色性状的分离比符合 3:1。在北京的 CSSL52/9311 F₂ 群体 1512 个单株中,共有 1145 个单株具有紫色性状,有 367 个单株具有无色性状,4

个紫色性状呈共显性,也未发现有表型重组单株,分离比符合 3:1(表 5)。结果表明,CSSL52 紫色性状受一对显性基因控制。

表 5 两个紫色性状 F₂ 群体的分离情况

Table 5 Segregation of two F₂ populations with purple trait

群体 Population	总数 Population size	紫色性状 Purple trait	无色性状 White(or no color)trait	期望比值 Expect ratio	χ^2	$\chi^2_{0.05}$
F ₂ 三亚	452	347	105	3:1	0.755	3.84
F ₂ 北京	1512	1145	367	3:1	0.427	3.84

随后,在 RM314 附近区段,新筛选了在 CSSL52 与 9311 间具有多态性的 8 个 SSR 标记和 2 个 InDel 标记(表 6)。采用了隐性群体分析法^[27]。对 F₂ 分离群体中 472 株隐性植株进行基因型鉴定,根据重组单株的个数以及连锁标记的物理位置,最后将目标基因定位在两个标记 RM19552 和 RM19561 之间,物理距离约为 131.1 kb。利用 Rice Genome Automated Annotation Project (<http://rice.plantbiology.msu.edu/cgi-bin/gbrowse/rice/>) 网站在 131.1 kb 区间内找到

17 个开放阅读框架(ORF)。其中,ORF14(LOC_Os06g10350)与前人报道的水稻控制颖尖颜色的 CI 基因序列一致^[28-31];而目前很多对水稻紫色性状的基因定位区间均包含 ORF14 位点;对 ORF14 基因进行测序发现,与 CSSL52 相比,9311 中该基因在第 3 个外显子 795 位缺失了 10 bp,导致翻译提前终止,其他序列均相同。由此推断 9311 中该基因由于外显子处 10 bp 的缺失使控制紫色性状的基因功能缺失,ORF14 基因就是野生稻中控制紫色性状的基因 OrC。

表 6 OrC 基因精细定位所用引物

Table 6 Molecular markers utilized for fine mapping of OrC gene

标记 Marker	正向引物(5'-3') Forward primer	反向引物(5'-3') Reverse primer	产物大小 (bp) Size
RM314	CTAGCAGGAACCTTTTCAGG	AACATTCACACACACACGC	108 ~ 118
RM19552	TGCTGCCACATGTTTGTCATGG	AAGAAAGGGATAGTTCGGAGTGG	200
RM5754	GCCCATGTTGCTAGTTTGATTCC	GTGCGTCTTTGACACACAATGG	187
RM19555	GGCACTATATGTTGATCGCTAGTGG	ATGGTCCTTTGCAGGGATTACG	296
RM19561	AGGAATCACATCCACCCATGTCC	GTCAGGCACGGCTCGAAGTAGG	116
RM19569	TATAAGGCTTGGAACTTGTCC	CAAGCCCATTATGAGTTAGAGG	346
RM19570	CCCAGATATTCTGTGTGATCATGAGG	GAGTGAATGTGAGCCGTCTATTGG	261
RM253	CCATCTCTGCTCTGACTCACC	TCCTTCAATGTGCTATCTTCTCC	195
InDel-13	TCTAACCAAAAAGTATTTCCAA	TCTACTCCATCGTTTCCGTGT	239
InDel-14	ATGGTGCCGTCTCCTC	AATGTGAGCCGTCTAT	296

3 讨论

染色体片段置换系作为永久性的遗传群体在当前植物育种中广泛应用。其特点是极大地消除了遗传噪音,且稳定不会分离,可进行多年多点的重复试验。由于每个置换系只有一个或者几个置换片段与受体亲本不同,在初级定位基础上,利用含有目标 QTL 的置换系与背景亲本杂交,构建次级 F₂ 群体,可使目标 QTL 定位在更小的染色体区段内,进一步

对该 QTL 进行基因克隆。而整套置换系又可以覆盖供体亲本整个基因组,可以作为基因组学研究的有利工具。目前,国内外利用置换系群体已经定位和发现了很多新的野生稻重要农艺性状的 QTL。本研究以一套 9311 为遗传背景的普通野生稻染色体片段置换系群体为研究材料,与国内外其他野生稻染色体片段置换系相比,所用置换系的特点是分子标记密度大,其置换片段覆盖整个野生稻染色体基因组。但是每个置换系仍然含有多个导入片段,

需要进一步的回交优化,直至每个置换系为单片段的近等基因系。

抽穗期是水稻重要的农艺性状。与9311相比,普通野生稻在长日照条件下不抽穗。鉴定野生稻中对光周期敏感的QTL或基因,有助于深入了解光周期基因的调控机制,也可以为水稻品种抽穗期的改良、起源驯化研究提供基因资源。前人已做了大量的水稻抽穗期QTL的定位研究,大部分主效QTL已经被克隆并进行了功能验证,这就对进一步的QTL定位加大了难度。利用置换系群体2年3点的抽穗期调查数据,定位到了11个与抽穗期相关的QTL,其中在NLD与NSD两环境下都能检测到的QTL有6个,全部具有加性效应即延迟抽穗。来源于野生稻的大部分光周期等位基因都有在长日照条件下延迟抽穗的功能,但是,仍有部分QTL在短日照条件下有提前抽穗的功能,表明野生稻中仍然存在提前抽穗的基因。

选择进行抽穗期基因鉴定的两个置换系中,CSSL129在NLD条件下不能抽穗,CSSL39在NLD条件下比9311延迟抽穗23d,差异极为显著。CSSL129中4个置换片段,位于6号染色体的InDel 6-4附近检测到抽穗期QTL,与已克隆基因*Hd1*基因的位置相同^[22],测序分析发现即*qHd6.1*是*Hd1*的等位基因。CSSL39中有7个置换片段,在InDel 7-13标记处检测到的QTL命名为*qHd7.2*,基因测序分析发现*qHd7.2*是光周期敏感基因*OsPRR37*的等位基因。虽然抽穗期主效QTL位点没有发现新的位点,但说明了本研究中所定位到的QTL可信度高,且具有较好的重复性,即利用染色体片段置换系能准确地对各种性状进行定位和检测,而且野生稻中的遗传信息具有很好的利用价值。下一步的研究需要对一些微效QTL进行分析以期找到新的抽穗期QTL。

利用置换系CSSL52与9311的F₂分离群体,定位到一个与紫色性状相关的基因*OrC*,遗传分析结果显示紫色稃尖、紫色柱头、紫色芒和紫色叶鞘表型呈共显性,受一对显性基因控制,该基因可能呈现一因多效性。已有研究利用不同的群体,都将控制紫色稃尖和叶鞘的基因定位在*LOC_Os06g10350*附近区域^[28-30]。S. S. Zhao等^[31]也定位到*LOC_Os06g10350*,克隆了来自栽培稻丽江新团黑谷的*OsC*基因,但通过转基因发现,转*OsC*基因的日本晴植株产生了红色稃尖但柱头的颜色仍为无色。本研究在定位野生稻来源*OrC*的过程中,通过近等基因

系CSSL52及F₂分离群体中显性植株的表型,发现该基因与叶鞘、稃尖、柱头以及芒的颜色共分离,这可能是来自野生稻的等位基因行使着不同的功能,同时控制这些组织器官的颜色;也可能是分别由不同基因控制,但紧密连锁而无法区分。因此,下一步将开展*OrC*基因功能的验证以及紫色性状的分子调控机理研究,并探讨紫色性状基因的起源驯化途径。

参考文献

- [1] 汤圣祥,魏兴华,徐群. 国外对野生稻资源的评价和利用进展[J]. 植物遗传资源学报,2008,9(2):223-229
- [2] Sun C, Wang X, Yoshimura A, et al. Genetic differentiation for nuclear, mitochondrial and chloroplast genomes in common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) and cultivated rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Theor Appl Genet, 2002, 104(8): 1335-1345
- [3] Tian F, Li D J, Fu Q, et al. Construction of introgression lines carrying wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) segments in cultivated rice (*Oryza sativa* L.) background and characterization of introgressed segments associated with yield-related traits [J]. Theor Appl Genet, 2006, 112(3): 570-580
- [4] Tanksley S D, Grandillo S, Fulton T M, et al. Advanced backcross QTL analysis in a cross between an elite processing line of tomato and its wild relative *L. pimpinellifolium* [J]. Theor Appl Genet, 1996, 92(2): 213-224
- [5] Kubo T. Development of a series of Indica chromosome segment substitution lines in Japonica background of rice [J]. Rice Genet Newsl, 1999, 16: 104-106
- [6] Kurakazu T. *Oryza meridionalis* chromosomal segment introgression lines in cultivated rice, *O. sativa*. [J]. Rice Genet Newsl, 2001, 18: 81-82
- [7] Doi K, Iwata N, Yoshimura A. The construction of chromosome substitution lines of African rice (*Oryza glaberrima* Steud.) in the background of Japonica rice (*O. sativa* L.) [J]. Rice Genet Newsl, 1997, 14: 39-41
- [8] Ebitani T, Takeuchi Y, Nonoue Y, et al. Construction and evaluation of chromosome segment substitution lines carrying overlapping chromosome segments of indica rice cultivar 'Kasalath' in a genetic background of japonica elite cultivar 'Koshihikari' [J]. Breeding Sci, 2005, 55(1): 65-73
- [9] Bian J M, Jiang L, Liu L L, et al. Construction of a new set of rice chromosome segment substitution lines and identification of grain weight and related traits QTLs [J]. Breeding Sci, 2010, 60(4): 305-313
- [10] Xu J J, Zhao Q, Du P N, et al. Developing high throughput genotyped chromosome segment substitution lines based on population whole-genome re-sequencing in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. BMC genomics, 2010, 11(1): 656
- [11] Kubo T, Aida Y, Nakamura K, et al. Reciprocal chromosome segment substitution series derived from japonica and indica cross of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Breeding Sci, 2002, 52(4): 319-325
- [12] Takai T, Nonoue Y, Yamamoto S, et al. Development of chromosome segment substitution lines derived from backcross between indica donor rice cultivar 'Nona Bokra' and japonica recipient cultivar 'Koshihikari' [J]. Breeding Sci, 2007, 57(3): 257-261
- [13] Xi Z Y, He F H, Zeng R Z, et al. Development of a wide population of chromosome single-segment substitution lines in the genetic background of an elite cultivar of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Genome, 2006, 49(5): 476-484
- [14] Tan L B, Liu F X, Xue W, et al. Development of *Oryza rufipogon* and *O. sativa* introgression lines and assessment for yield-related

- quantitative trait loci [J]. *J Integr Plant Biol*, 2007, 49 (6): 871-884
- [15] 张晨昕, 邱先进, 董华林, 等. 野生稻染色体片段代换系构建及其效应分析 [J]. *分子植物育种*, 2010, 8 (6): 1113-1119
- [16] Kazuhiro U, Ken I. Identification of chromosome regions affecting leaf area with rice chromosome segment substitute on lines [J]. *Plant Prod Sci*, 2012, 16 (1): 31-36
- [17] Yang D W, Zhang Y D, Zhu Z, et al. Substitutional mapping the cooked rice elongation by using chromosome segment substitution lines in rice [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2013, 4 (13): 107-115
- [18] Zhang Y X, Wang Q, Jiang L, et al. Fine mapping of *qSTV11KAS*, a major QTL for rice stripe disease resistance [J]. *Theor Appl Genet*, 2011, 122 (8): 1591-1604
- [19] Qiao W H, Qi L, Cheng Z J, et al. Development and characterization of chromosome segment substitution lines derived from *Oryza rufipogon* in the genetic background of *O. sativa* spp. *indica* cultivar 9311 [J]. *BMC genomics*, 2016, 17 (1): 580
- [20] 韩龙植, 魏兴华, 曹桂兰. 水稻种质资源描述规范和数据标准 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2006
- [21] McCouch S R, Teytelman L, Xu Y B, et al. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *DNA Res*, 2002, 9 (6): 199-207
- [22] Meng L, Li H H, Zhang L Y, et al. QTL IciMapping: Integrated software for genetic linkage map construction and quantitative trait locus mapping in biparental populations [J]. *The Crop Journal*, 2015, 3 (3): 269-283
- [23] Burland T G. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. In *Bioinformatics methods and protocols* [M]. Totowa, NJ: Humana Press, 2000: 71-91
- [24] Takahashi Y, Shimamoto K. *Heading date 1 (Hd1)*, an ortholog of *Arabidopsis CONSTANS*, is a possible target of human selection during domestication to diversify flowering times of cultivated rice [J]. *Genes Genet Syst*, 2011, 86 (3): 175-182
- [25] Koo B H, Yoo S C, Park J W, et al. Natural variation in *OsPRR37* regulates heading date and contributes to rice cultivation at a wide range of latitudes [J]. *Mol Plant*, 2013, 6 (6): 1877-1888
- [26] Murakami M, Matsushika A, Ashikari M, et al. Circadian-associated rice pseudo response regulators (OsPRRs): insight into the control of flowering time [J]. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2005, 69 (2): 410-414
- [27] Zhang Q F, Shen B Z, Dai X K, et al. Using bulked extremes and recessive class to map genes for photoperiod-sensitive genic male sterility in rice [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1994, 91 (18): 8675-8679
- [28] Fan F J, Fan Y Y, Du J H, et al. Fine mapping of *C* (*chromogen for anthocyanin*) gene in rice [J]. *Rice Science*, 2008, 15 (1): 1-6
- [29] Liu X, Sun X, Wang W B Y, et al. Fine mapping of *Pa-6* gene for purple apiculus in rice [J]. *J Plant Biol*, 2012, 55 (3): 218-225
- [30] Chin H S, Wu Y P, Hour A L, et al. Genetic and evolutionary analysis of purple leaf sheath in rice [J]. *Rice*, 2016, 9 (1): 8
- [31] Zhao S S, Wang C H, Ma J, et al. Map-based cloning and functional analysis of the chromogen gene *C* in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *J Plant Biol*, 2016, 59 (5): 496-505