

基于QTL-Seq的水稻籽粒蛋白含量性状的QTL定位

林添资, 孙立亭, 景德道, 余波, 曾生元, 李闯, 钱华飞, 杜灿灿,
胡庆峰, 杨军, 周义文, 巫章平, 龚红兵
(江苏丘陵地区镇江农业科学研究所, 句容 212400)

摘要: 稻米蛋白质含量是影响稻米品质的重要因素之一, 解析稻米蛋白质含量的遗传机制对培育优质食味稻米至关重要。本研究以稻米蛋白质含量有显著差异的镇粳2400和嘉禾218构建的RIL群体为材料, 利用QTL-Seq方法对RIL群体中的高、低蛋白质含量极端家系进行混池重测序以定位稻米蛋白含量QTL位点, 之后构建局部遗传连锁图谱, 通过QTL Ici Mapping 4.1软件验证结果并精细定位。F_{8:9}采用 Δ SNP指数法分析得到4个QTL, 分别位于第1、2和12染色体; F_{9:10}使用ED方法分析得到分布于第1、2、6、7、8、9和11染色体上共8个QTL, 其中位于第1染色体的37.64~39.61 Mb区间的QTL与F_{8:9}检测到的第1染色体36.07~39.87 Mb区间的QTL重合, 该QTL命名为*qGPC1*, 位于标记1-3782~1-3834之间, 物理距离为516 kb, 表型贡献率和LOD值分别为13.20%和3.91。通过测序分析发现, 镇粳2400和嘉禾218在已报道的调控籽粒蛋白质含量基因*OsAAP6*上无差异, 因此该区间可能有一个新的基因调控稻米蛋白质含量。同时从RIL家系中筛选出低蛋白型种质做亲本培育出的镇稻1818, 米饭食味分显著高于江苏省同熟期对照品种武运粳23号和优质食味主推品种南粳5055, 株高、结实率和千粒重均较武运粳23号和南粳5055显著增加。本研究为进一步克隆稻米蛋白质含量基因及解析遗传调控机制奠定了基础, 且提供了可供育种利用的优异种质资源。

关键词: 水稻; 食味品质; 稻米蛋白质含量; QTL定位

QTL-Seq Analysis for Identification of Protein Content Traits in Rice Grains

LIN Tianzi, SUN Liting, JING Dedao, YU Bo, ZENG Shengyuan, LI Chuang, QIAN Huafei,
DU Cancan, HU Qingfeng, YANG Jun, ZHOU Yiwen, WU Zhangping, GONG Hongbing
(Zhenjiang Institute of Agricultural Sciences in Hilly Region of Jiangsu Province, Jurong 212400)

Abstract: Grain protein content (GPC) represents one of the critical factors affecting rice eating quality. It is of great significance for improving this trait through analyzing its genetic regulation mechanism. This study deployed a recombinant inbred line (RIL) population derived from two japonica rice cultivars, Zhengeng 2400 and Jiahe 218, showing significant difference on grain protein content. A quantitative trait loci (QTL)-Seq was used to locate the QTLs controlling grain protein content in rice. QTL mapping and fine mapping was performed using Ici Mapping 4.1 software. Through deploying Δ SNP index analysis of the F_{8:9} RIL population, four QTLs on chromosomes 1, 2, and 12 were identified. Eight QTLs on chromosomes 1, 2, 6, 7, 8, 9, and 11 in the F_{9:10} RIL population were detected by the Euclidean distance (ED) method analysis. A major QTL, designated *qGPC1*, accounting for 13.20% of the phenotypic variation with a LOD score of 3.91, was consistently detected both in F_{8:9} and F_{9:10} RIL. Fine mapping delimited *qGPC1* to a 516 kb interval between markers 1-3782 and

收稿日期: 2024-08-12 网络出版日期: 2025-01-03

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240812001>

第一作者研究方向为水稻遗传育种, E-mail: 1668432530@qq.com

通信作者: 龚红兵, 研究方向为水稻遗传育种, E-mail: 1179809265@qq.com

基金项目: 江苏省现代农业重点项目(BE2021374); 生物育种钟山实验室项目(ZSBBL-KY2023-01-03); 江苏省种业振兴项目(JBG2021037, JBG2021038)

Foundation projects: Key Projects of Modern Agriculture in Jiangsu Province (BE2021374); Zhongshan Biological Breeding Laboratory Project (ZSBBL-KY2023-01-03); Seed Industry Revitalization Project of Jiangsu Province (JBG2021037, JBG2021038)

1-3834. Sequence analysis of a reported GPC regulatory gene *OsAAP6* revealed no polymorphisms between parents, suggesting the presence of a novel regulatory gene controlling GPC. A low-GPC line with superior eating quality from the RIL population was selected as a parental donor for developing the new cultivar strain Zhendao 1818. This advanced line exhibited significantly improved palatability scores to commercial cultivars Wuyunjing 23 and Nanjing 5055, along with increased plant height, seed setting rate, and thousand-grain weigh. Collectively, this study lays the foundation for further cloning of grain protein content genes and analyzing genetic regulatory mechanisms, and provides excellent germplasm resources for improving rice eating quality.

Key words: rice; eating quality; grain protein content; QTL mapping

水稻是我国重要的粮食作物之一,随着人民生活水平的提高,人们对优质食味稻米的需求越来越大。但目前国内稻米食味品质改良仍以直链淀粉含量的调控为研究重点,我国的行业标准(NYC593-2013)也仅从稻米的胶稠度、直链淀粉含量和糊化温度来量化稻米蒸煮食味品质。蛋白质作为稻米中第二大营养物质,仅次于淀粉含量,通过影响淀粉的糊化特性及与淀粉分子链的相互作用而影响食味品质^[1-2]。许多研究认为,蛋白质含量与食味品质呈显著负相关,一般总蛋白含量大于9%的品种其食味口感通常较差^[3]。然而,蛋白质含量与食味品质之间不是简单的线性关系,在低蛋白含量范围内(蛋白质含量在3.88%~6.03%之间),蛋白质含量增高尤其是醇溶蛋白和谷蛋白含量增高的稻米,可提升米饭的综合口感^[4];蛋白质含量过高或过低都会降低食味品质,只有当蛋白质与直链淀粉相互平衡才会形成优良品质^[5]。因此,稻米蛋白质含量研究有助于解析蛋白质遗传调控机制,对培育优质食味稻米具有重要的指导意义和参考价值。稻米蛋白质含量主要受遗传因子控制,且是由多基因控制的数量性状。目前为止,人们对控制稻米蛋白质含量的QTL定位已有大量报道,在水稻12条染色体上均有分布。为了得到较为准确的表型,定位群体主要有3类。第1类是重组自交系群体(RIL, recombinant inbred line),钟明等^[6]和Wang等^[7]以珍汕97和南洋占杂交构建的RIL群体定位到6个控制蛋白质含量的QTL,其中位于第1染色体的*qpc1*和位于第2染色体的*qpc2*对糙米和精米蛋白质含量均具有较大的作用;Kepiro等^[8]利用Cypress和Panda的RIL群体在糙米中定位到2个QTL,精米中定位到3个QTL,其中第1和第4染色体上的QTL同时控制糙米和精米蛋白质含量;张涛等^[9]利用中优早和丰锦的RIL群体检测到控制糙米蛋白质含量的QTL位点有6个,分别位于第3、6、7、8和11染色体

上,联合贡献率为61.07%,其中位于第8染色体的*qPC-8-1*对糙米蛋白质含量具有主效作用;黄覃等^[10]利用明恢63和优质泰国香米KDML105的RIL群体于2009年检测到蛋白质含量相关QTL有2个,分别位于第6和第11染色体上,2010年检测到3个,分别位于第3染色体和第12染色体上;鄢宝等^[11]以华恢3号与中国香稻的RIL群体为材料,定位到3个控制糙米蛋白质含量的QTL,即*qpb4*、*qpb6*、*qpb8*,分别位于第4、6、8染色体上,其中只有*qpb8*连续两年被重复检测到;杨亚春等^[12]用9311和日本晴的RIL群体定位到1个稳定性较高的QTL *qBRPCI.3*,位于第1染色体上,同时控制糙米蛋白质含量和精米蛋白质含量;张杰等^[13]利用Sasanishiki/Habataki回交RIL群体检测到与蛋白质含量相关的5个稳定表达的QTL,分别位于第1、8、9和12染色体;Park等^[14]利用Hwayeong和Wandoaengmi6的RIL群体在第9染色体上定位到1个QTL *qPro9*。第2类是染色体片段置换系(CSSL, chromosome segment substitution line),Yang等^[15]利用Sasanishiki和Habataki的CSSL鉴定到2个主效QTL *qPC-1*和*qPC-10*,分别位于第1和10染色体;赵琳琳等^[16]以云南元江普通野生稻和特青构建的高代回交群体定位到6个低蛋白QTL,分别位于第1、7和10染色体;Takayuki等^[17]利用Koshihikari和Nona Bokra的CSSL鉴定到1个稳定的QTL *TGPI2*,该QTL能特异降低蛋白质含量而不影响食味品质;王小雷等^[18]利用昌恢121和越光构建CSSL群体,鉴定出2个稳定表达的QTL *qPGWC1*和*qPaT12*,分别位于第1和12染色体。第3类是自然群体,有研究者利用水稻自然群体进行全基因组关联分析,挖掘控制稻米蛋白质含量的QTL,但检测到的QTL数量极少^[19-20]。由于稻米蛋白质含量影响因素众多,如抽穗期和栽培措施等,因此对检测到的QTL难以进行更深入的研究,以至

于 QTL 克隆鲜为报道。Peng 等^[21]首次克隆了调控籽粒蛋白质含量的基因 *OsAAP6/qPC1*, 该基因编码一个假定的氨基酸通透酶, 能够正向调控籽粒蛋白质含量, 在 *OsAAP6* 的 5' 非翻译区顺式调控元件中的两个自然变异可能与籼稻中籽粒蛋白质含量的多样性相关; Yang 等^[22]克隆了 *qGPC10* 基因, 该基因编码谷蛋白 A2 前体 (*OsGluA2*), 启动子上的序列差异导致籼粳亚种蛋白质含量存在差异。因此, 进一步挖掘控制稻米蛋白质含量的 QTL 位点或关键基因, 将为稻米品质育种提供更多有利基因资源, 加快稻米品质育种效率。前人应用的定位群体大多基于双亲分子标记的多态性考虑, 采用籼粳杂交策略构建定位群体, 尽管鉴定出了一系列的控制稻米蛋白质含量的 QTL, 但在育种上有利用价值的 QTL 和高效的分子标记极少。鉴于第二代测序技术和混合池分组分析法 (BSA-Seq, bulked segregated sequencing, 又称 QTL-Seq) 具有快速、准确和廉价的特点, 本研究针对长江中下游粳稻稻米蛋白质含量偏高且稻米食味欠佳现状, 利用低蛋白质含量种质镇粳 2400 和优质长粒粳稻品种嘉禾 218 构建 RIL 群体。前期研究表明, 该群体抽穗期变幅大, 由主效基因 *Hd1* 和 *Ehd1* 控制; 镇粳 2400 中 *Hd1* 基因第一外显子处存在 123 bp 碱基插入导致 *Hd1* 功能丧失, 表现为光周期钝感, 同时, *Ehd1* 基因编码区 655 bp 处 G 替换为 A 导致 *Ehd1* 功能丧失, 抽穗期延迟, 即 *hd1+ehd1*; *Hd1* 和 *Ehd1* 的 4 种组合, 即 *Hd1+Ehd1*、*hd1+Ehd1*、*Hd1+ehd1* 和 *hd1+ehd1*, 不同组合的抽穗期各不相同^[23]。由于蛋白质含量受抽穗期影响较大, 本研究在每种组合下分别选取蛋白质含量极端家系构建极端池, 采用 QTL-Seq 技术挖掘稻米蛋白质含量相关的 QTL, 以期对稻米食味品质改良提供优异种质和高效分子标记。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

水稻种质镇粳 2400 是由镇稻育种中间材料经 N-亚硝基-N-甲基脲 (MNU, N-Nitroso-N-Methylurea) 诱变而来, 属于优质中粳稻, 抽穗期 96.6 ± 1.52 d; 嘉禾 218 是嘉兴市农业科学研究所与中国水稻研究所联合培育的优质早熟晚粳稻, 抽穗期 105.2 ± 1.10 d。以镇粳 2400/嘉禾 218 通过单籽传法获得一套包含 268 个株系的 RIL 群体 ($F_{8,9}$)。镇稻 1818 是利用 RIL 群体筛选到的低蛋白质含量种质与镇稻 18 号杂交创制的新种质, 属于早熟晚粳;

对照品种南粳 5055 是江苏省农业科学院粮食作物研究所选育的半糯型优质食味品种, 属于早熟晚粳, 用于食味品质对照; 武运粳 23 号是常州市武进区农业科学研究所选育的早熟晚粳稻区试对照品种, 达到国标三级优质稻谷标准。

1.2 田间试验

镇粳 2400 和嘉禾 218 于 2021 年和 2022 年正季种植 (预备试验), 其余试验材料于 2022 年和 2023 年正季种植, 均种植在江苏丘陵地区镇江农业科学研究所行香试验基地。5 月 15 日播种, 6 月 15 日移栽, 单苗栽插, 每份材料种植 4 行, 每行 12 株, 株行距 $16.5 \text{ cm} \times 19.8 \text{ cm}$, 常规水肥管理。待成熟后收获每个材料的中间 2 行, 边棵不收, 共计 20 株, 脱粒后室温下储存 3 个月备用。

1.3 籽粒蛋白质含量测定

RIL 群体及亲本的成熟水稻种子经出糙机 (FC2K, Otake, Japan) 脱壳制成糙米, 糙米由精米机 (VP-32, Yamamoto, Japan) 研磨制成精米。蛋白质含量测定采用米粒食味计 (RLTA10B-K, SATAKE) 进行测定, 每份材料测定 3 次, 取均值作为该株系的表型值进行分析。

1.4 农艺性状、米饭食味分及理化指标测定

镇稻 1818、武运粳 23 号和南粳 5055 于成熟期 (按 95% 以上谷粒黄熟、米质坚实的标准) 调查株高、每公顷有效穗、每穗粒数、结实率和千粒重农艺性状及全生育期 (播种期至成熟期的天数), 每份材料调查 5 株。参照米饭食味仪 (STA1A, SATAKE) 使用说明书测定米饭外观、口感和综合评分, 每份材料测定 4 次。垩白粒率和垩白度使用 SC-E 型大米外观品质检测分析系统 (万深), 每份材料测定 4 次。胶稠度、蛋白质含量和直链淀粉含量委托华智生物技术有限公司测定。镇粳 2400 和嘉禾 218 蛋白质含量分析采用 *t*-测验, 镇稻 1818、武运粳 23 号和南粳 5055 农艺性状及稻米品质指标分析采用邓肯测验。

1.5 全基因组重测序 QTL-Seq 关联分析

在镇粳 2400 和嘉禾 218 的 RIL 群体中, 按双亲的抽穗期差异基因 *Hd1* 和 *Ehd1* 的 4 种基因型组合, 分别取蛋白质含量最高和最低的 10% 的单株构建高、低蛋白质含量极端池。选取的极端单株采用 CTAB 法提取 DNA 后, 等量混合成 $F_{8,9}$ 的高、低蛋白极端池和 $F_{9,10}$ 的高、低蛋白极端池。通过 Illumina HiSeq 对 $F_{8,9}$ 两个极端池、 $F_{9,10}$ 两个极端池和两个亲本进行全基因组重测序, 亲本和极端池的平均测序

深度为30×。测序数据经过筛选过滤去除低质量数据,得到Clean Reads;使用BWA软件将数据与水稻参考基因组日本晴(http://plants.ensembl.org/Oryza_sativa/Info/Index)序列进行比对,通过比对定位Clean Reads在参考基因组上的位置,结合GATK软件对双亲及混池的序列进行比对和SNP读取^[24-25],QTL位点搜索采用 Δ SNP指数法和欧氏距离法(ED, euclidean distance)两种分析方法进行计算^[26]。全基因组重测序由南京英德尔生物技术有限公司完成。

1.6 局部遗传图谱构建及QTL分析验证

根据重测序结果获得双亲具有差异的基因组

结构,开发出特异性SNP标记,筛选亲本间有多态的SNP标记(表1),利用这些标记检测RIL群体家系的基因型,通过QTL Ici Mapping 4.1软件,分析多态性标记之间的遗传连锁关系,构建目标基因所在区间的连锁遗传图谱。SNP基因型检测委托景肽生物有限公司完成。*OsAAP6*基因测序委托南京思普金生物技术有限公司完成。PCR扩增反应体系:基因组DNA 1 μ L (50 ng/ μ L), 2 \times pfu Mix Buffer 25 μ L, 上游引物(10 μ mol/L) 1 μ L, 下游引物(10 μ mol/L) 1 μ L, ddH₂O 22 μ L。PCR扩增程序为:预变性95 $^{\circ}$ C 5 min; 变性95 $^{\circ}$ C 30 s, 退火55 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸72 $^{\circ}$ C 1 min, 35个循环数;终延伸7 min。

表1 基因定位SNP标记和*OsAAP6*基因测序引物

Table 1 Primer sequences of SNP markers for gene mapping and *OsAAP6* gene sequencing

标记 Marker	物理位置(bp) Position	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
1-3764 F	37643035	GTATTCGTGATCCATTTCATGTTG
1-3764 Rg	37643035	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGTATGTAACGGTCAGGTATAAGTTCAG
1-3764 Rc	37643035	GAAGGTCTGGAGTCAACGGATTGTATGTAACGGTCAGGTATAAGTTCAC
1-3782 F	37825493	GTGAGCTGCCATGACGCC
1-3782 Ra	37825493	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCGGCGTGAAGAAGACGA
1-3782 Rg	37825493	GAAGGTCTGGAGTCAACGGATTCTGGCGTGAAGAAGACGG
1-3806 Fc	38060795	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGTTTTGTAAATTATCCCGTGACTAC
1-3806 Ft	38060795	GAAGGTCTGGAGTCAACGGATTGGTTTTGTAAATTATCCCGTGACTAT
1-3806 R	38060795	CAAACCAATCCAATACTTCGCA
1-3834 F	38341969	CGTTGTTGTTCCCGCGG
1-3834 Rg	38341969	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGAAGGTCGTGCGCCCTG
1-3834 Ra	38341969	GAAGGTCTGGAGTCAACGGATTAGAAGGTCGTGCGCCCTA
1-3876 Fa	38762634	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTACATATCTATATAGTATCGGCCTTCAGCA
1-3876 Ft	38762634	GAAGGTCTGGAGTCAACGGATTACATATCTATATAGTATCGGCCTTCAGCT
1-3876 R	38762634	AACCGAGAAAGCAGAGCGAA
1-3960 Fg	39602780	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCTGCAAATAGGCGTGATCCATTTG
1-3960 Fa	39602780	GAAGGTCTGGAGTCAACGGATTCTGCAAATAGGCGTGATCCATTTA
1-3960 R	39602780	ATCTGCATTGAAAGGGGCCA
OsAAP6-F1	38136496	CTCAAAATCCTTTCCGCTCAG
OsAAP6-R1	38137749	CCACTTGACTTGGTAGGGTAT
OsAAP6-F2	38137597	TTACTAGGACAACGTGAAGGATAG
OsAAP6-R2	38138955	AACAAAATTCAGTTTCGTCACTG
OsAAP6-F4	38139928	GCGTCACGACCGTCTTCTAC
OsAAP6-R4	38140674	ACCATACTCCTCAAGTCCCAT
OsAAP6-F5	38138660	GATGGAATCCTGGAGATCCTTTTG
OsAAP6-R5	38139382	TCGTAGCGGTCGTGATGGTGT

表 1 (续)

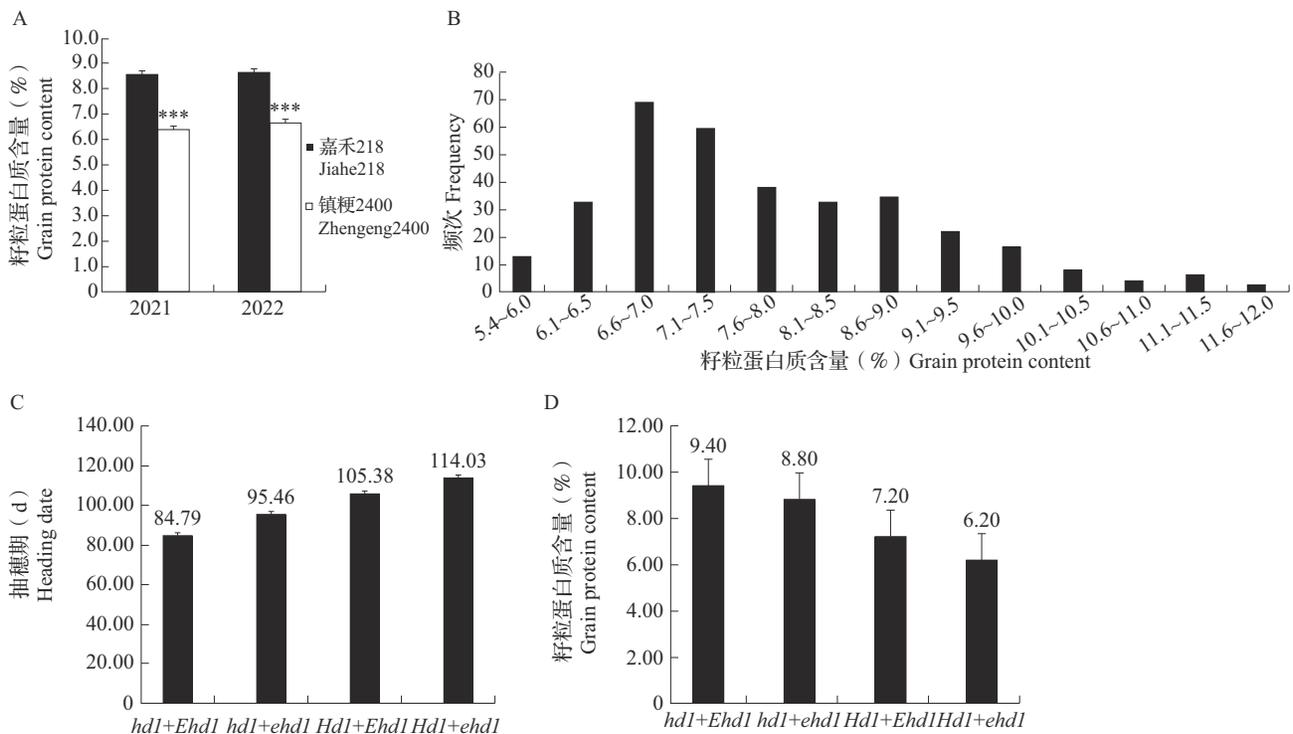
标记 Marker	物理位置(bp) Position	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
OsAAP6-F6	38138943	ACGCAAGAATGGCACTGACGAAA
OsAAP6-R6	38140201	CCAGCTTGACAGCGTGAACC
OsAAP6-1-f	38134303	GGTGAAGGAAAACCACAGCCG
OsAAP6-1-r	38135699	CCGCCACGAAGCACACATTG
OsAAP6-2-f	38135363	ATATGACGACACGTGAGGCTGT
OsAAP6-2-r	38136838	TCAACGGTATGTGGTGACAATG

2 结果与分析

2.1 双亲及 RIL 群体的籽粒蛋白质含量表型

镇梗 2400 在 2021 年和 2022 年的籽粒蛋白质含量都在 6.5% 左右, 而嘉禾 218 的籽粒蛋白质含量均在 8.6% 左右, 双亲的籽粒蛋白质含量在年际间表现较为稳定, 且双亲连续两年都存在极显著差异 (图 1A)。重组自交系 (RIL) 的籽粒蛋白质含量分布于 5.4%~12.0%, 中亲值偏向低蛋白质含量, 表现出连续分布和显著的超亲分离 (图 1B), 表明该性状由多基因控制。

该 RIL 家系抽穗期变化幅度较大, 前期研究表明控制抽穗期的主效基因为 *Hdl* 和 *Ehd1*^[23], 而 RIL 家系的蛋白质含量在 *Hdl* 和 *Ehd1* 不同基因型间存在差异, 具体表现为 *hdl+Ehd1* 抽穗期 84.79 d, RIL 家系蛋白质含量均值为 9.40%; *hdl+ehd1* 抽穗期为 95.46 d, RIL 家系蛋白质含量均值为 8.80%; *Hdl+Ehd1* 抽穗期为 105.38 d, RIL 家系蛋白质含量均值为 7.20%; *Hdl+ehd1* 抽穗期为 114.03 d, RIL 家系蛋白质含量均值为 6.20% (图 1C、D)。不同基因型间表现出随抽穗期的延迟而蛋白质含量降低的趋势。



A: 镇梗 2400 和嘉禾 218 的籽粒蛋白质含量, *** 分别代表在 $P < 0.001$ 水平上显著差异; B: RIL 家系的籽粒蛋白质含量分布; C: RIL 家系抽穗期; D: 不同抽穗期类型的 RIL 家系蛋白质含量

A: Grain protein content in Zhengeng 2400 and Jiahe 218, *** respectively representing significant differences at the $P < 0.001$ level; B: Grain protein content distribution in RIL; C: Heading date of RIL; D: Grain protein content of RIL with different heading date

图 1 亲本和 RIL 的籽粒蛋白质含量及抽穗期分布

Fig. 1 Distribution patterns of grain protein content and heading date in parents and RIL

2.2 RIL家系蛋白质含量极端选取及QTL-Seq混池重测序

由于RIL家系的蛋白质含量随抽穗期的延迟而降低(图1C、D),基因型 *hd1+Ehd1* 共72份家系,蛋白质含量最低为7.5%,最高为12.4%,基因型 *hd1+ehd1* 共54份家系,蛋白质含量最低为6.2%,最高为10.3%,基因型 *Hd1+Ehd1* 共106份家系,蛋白质含量最低为5.9%,最高为10.5%,而基因型为 *Hd1+*

ehd1 的共36份家系,蛋白质含量最低为5.4%,最高为9.3%(图2),为了排除 *Hd1* 和 *Ehd1* 基因对定位蛋白质含量相关QTL的影响,按 *Hd1* 和 *Ehd1* 基因型组合选取10%的极端个体(表2),根据此标准,从 $F_{8,9}$ 的RIL中挑选出高蛋白质含量的极端株系25个,低蛋白质含量的极端株系28个;从 $F_{9,10}$ 的RIL中挑选出高蛋白质含量的极端株系25个,低蛋白质含量的极端株系22个(表2)。

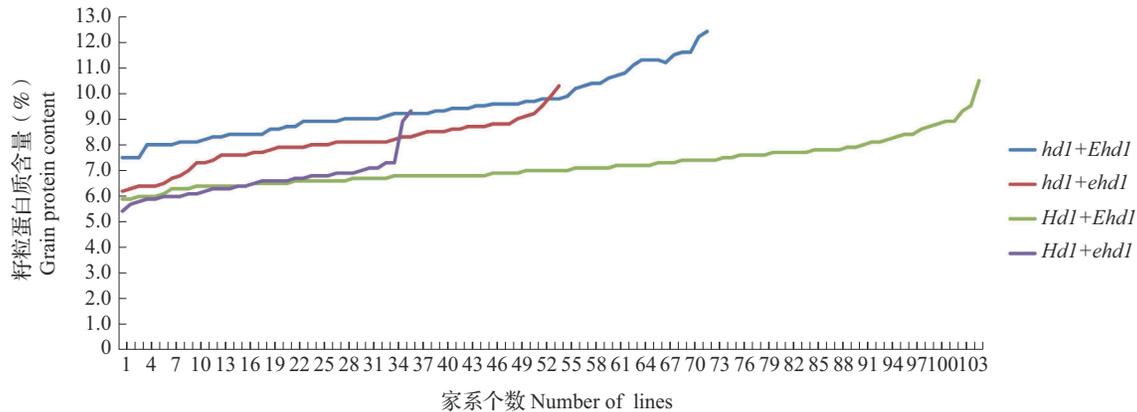


图2 不同的抽穗期基因型家系的蛋白质含量分布

Fig. 2 Distribution of protein content in RILs with different genotypes of heading date

表2 蛋白质含量极端家系挑选标准与个数

Table 2 Selection criteria and number for lines with extreme protein content

基因型 Genotype	家系数量 Number of lines	高蛋白极端家系 含量(%)	低蛋白极端家系 含量(%)	高蛋白极端家系个数		低蛋白极端家系个数	
		The standard for extreme lines with high protein	The standard for extreme lines with low protein	Number of extreme lines with high protein content	Number of extreme lines with low protein content	Number of extreme lines with high protein content	Number of extreme lines with low protein content
				$F_{8,9}$	$F_{9,10}$	$F_{8,9}$	$F_{9,10}$
<i>hd1+Ehd1</i>	72	≥11.0	≤7.5	7	7	7	6
<i>hd1+ehd1</i>	54	≥9.0	≤7.0	6	5	6	5
<i>Hd1+Ehd1</i>	106	≥8.5	≤6.5	8	10	11	9
<i>Hd1+ehd1</i>	36	≥8.0	≤6.0	4	3	4	2
合计Total	268			25	25	28	22

对亲本镇粳2400、嘉禾218和4个混池进行全基因组重测序,镇粳2400和嘉禾218分别获得11.82 Gb和10.67 Gb高质量总碱基序列, $F_{8,9}$ 高低混池分别获得12.51 Gb和11.57 Gb的高质量碱基序列, $F_{9,10}$ 高低混池分别获得13.33 Gb和12.90 Gb的高质量碱基序列,测序深度约为25~32 \times 。总体样品的GC含量在41%~43%之间,Q20均大于96%,Q30均大于91%,测序数据充足,质量较高,将过滤后的序列比对到水稻日本晴参考基因组上,6个样品与参考基因组的比对率在98.54%~99.20%之间,比对率高,可用于后续目标QTL的定位(表3)。经过序列比对和

SNP位点提取,将 $F_{8,9}$ 和 $F_{9,10}$ 极端混池共得到的SNP和InDel位点与两亲本进行比较,过滤不一致的位点后, $F_{8,9}$ 共有978999个SNP和InDel位点, $F_{9,10}$ 共有938767个SNP和InDel位点用于QTL-Seq分析。

2.3 籽粒蛋白质含量QTL定位

分别利用ED和SNP指数两种关联算法对重测序数据进行关联分析。 $F_{8,9}$ 采用 Δ SNP指数法分析后在第1、2和12染色体上共得到4个QTL,第1染色体检测到2个QTL,第2和12染色体分别检测到1个QTL(表4,图3A),采用ED算法结果与 Δ SNP指数法结果一致(图3B)。进一步将 $F_{9,10}$ 进行QTL-

Seq 分析发现,采用 Δ SNP 指数法分析在 1~12 染色体上均有显著的 QTL,而使用 ED 分析方法分析后,在第 1、2、6、7、8、9 和 11 染色体上共得到 8 个 QTL,且这 8 个 QTL 存在于采用 Δ SNP 指数法分析结果中

(表 4,图 3C、D),第 1 染色体检测到 2 个 QTL,其中位于 36.07~39.87 Mb 区间的 QTL 在两世代的两种关联算法中被重复检测到,因此对该 QTL 位点进行验证及精细定位。

表 3 全基因组重测序结果

Table 3 Result of whole genome resequencing

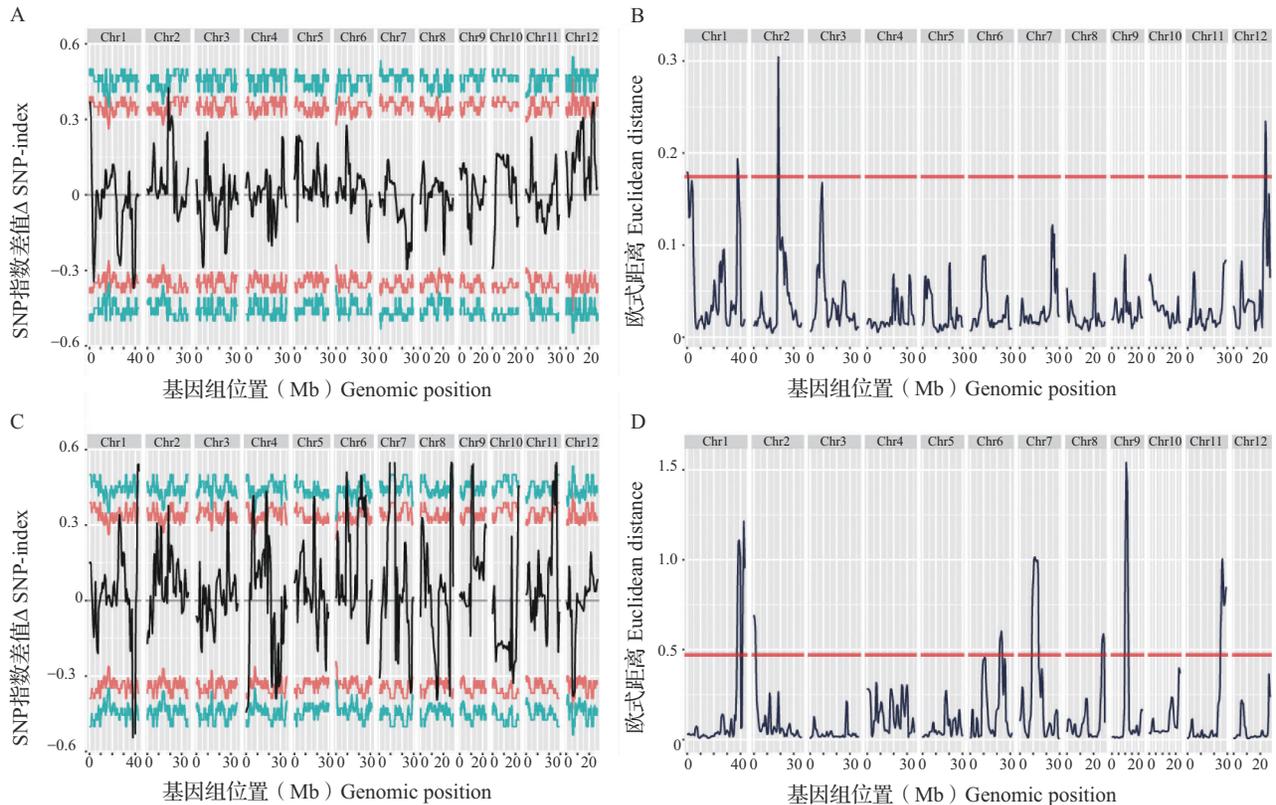
数据的质量指标 Quality of data output	镇梗 2400 Zhengeng 2400	嘉禾 218 Jiahe 218	F _{8:9} 低蛋白池 F _{8:9} LP-Pool	F _{8:9} 高蛋白池 F _{8:9} HP-Pool	F _{9:10} 低蛋白池 F _{9:10} LP-Pool	F _{9:10} 高蛋白池 F _{9:10} HP-Pool
原始测序读数 Raw reads	79381740	71597982	77642488	83963220	86657424	89637122
原始数据的总碱基数(bp) Raw bases	11907261000	10739697300	11646373200	12594483000	12998613600	13445568300
质量清理后读数 Cleaned reads	78924050	71234480	77269480	83530060	86085918	88936900
高质量数据的总碱基数(bp) Cleaned bases	11817033900	10667141054	11571778444	12509203080	12899711423	13327540729
Q20 (%)	97.08	97.32	97.42	97.21	97.19	96.96
Q30 (%)	91.89	92.40	92.58	92.12	92.22	91.81
GC 含量 (%) GC content	42	41	41	41	43	43
与参考基因组的比对率 (%) Comparison rate with reference genome	99.20	98.84	98.78	98.54	99.00	99.00

LP: Low protein content; HP: High protein content

表 4 QTL-Seq 检测到的控制稻米蛋白质含量的 QTL 区间

Table 4 Grain protein content QTLs detected by QTL-Seq

世代 Generations	染色体 Chromosome	起始 (bp) Start	终止 (bp) End	Δ SNP 峰值 Δ SNP peak value	Δ SNP 峰值位置 (bp) Δ SNP peak position	片段大小 (Mb) Size
F _{8:9}	1	21547	1975210	0.83	304376	1.9
	1	36072210	39871484	-0.89	38762634	3.6
	2	16395716	19999826	-0.86	19801825	3.6
	12	21143708	24994311	0.77	23162720	3.9
F _{9:10}	1	37643035	39609020	-0.96	38974500	1.9
	1	41135157	43226829	-0.95	42529885	2.1
	2	17321	2481618	-0.96	1585992	2.5
	6	21023225	24999963	0.96	21359081	4.0
	7	10000071	14998576	0.97	10572722	5.0
	8	25022875	28433855	0.96	26870574	3.4
	9	9000387	11997888	-0.96	11300356	3.0
	11	24066710	29018426	0.97	26390493	4.9



A、C分别是RIL家系 $F_{8,9}$ 和 $F_{9,10}$ 基于SNP/InDel的 Δ SNP-index关联分析,红线代表95%的阈值线,蓝线代表99%的阈值线;

B、D分别是RIL家系 $F_{8,9}$ 和 $F_{9,10}$ 基于SNP/InDel的ED关联分析,红线代表99%的阈值线

A, C: Δ SNP-index association analysis diagram based on SNP/InDel for RIL $F_{8,9}$ and $F_{9,10}$, respectively, the red line indicates the 95% threshold line, the blue line indicates the 99% threshold line; B, D: ED association analysis figures based on SNP/InDel for RIL $F_{8,9}$ and $F_{9,10}$, respectively, the red line indicates the 99% threshold line

图3 QTL-Seq 分析结果

Fig. 3 Result of the QTL-Seq analysis

2.4 QTL 位点的验证及精细定位

利用全基因组重测序数据获得的亲本间基因组差异数据,在第1染色体36.07~39.87 Mb的区间内设计SNP标记,共获得6对有多态的引物(表1)。利用这些多态性SNP标记对RIL群体进行基因型鉴定,通过QTL IciMapping 4.1,构建了控制籽粒蛋白质含量基因的局部遗传连锁图谱,并结合各RIL家系蛋白质含量进行QTL精细定位,最终在第1染色体检测到1个调控籽粒蛋白质含量的QTL,位于标记1-3782~1-3834之间,物理距离为516 kb,表型贡献率和LOD值分别为13.20%和3.91(图4),将其命名为 $qGPC1$ 。

2.5 候选基因分析及测序验证

通过与Peng等^[21]的相关研究结果比较,发现 $qGPC1$ 位点含有已克隆的籽粒蛋白质含量调控基因 $qPC1$,该基因编码一个假定的氨基酸通透酶OsAAP6,能够正向调控籽粒蛋白质含量,在OsAAP6

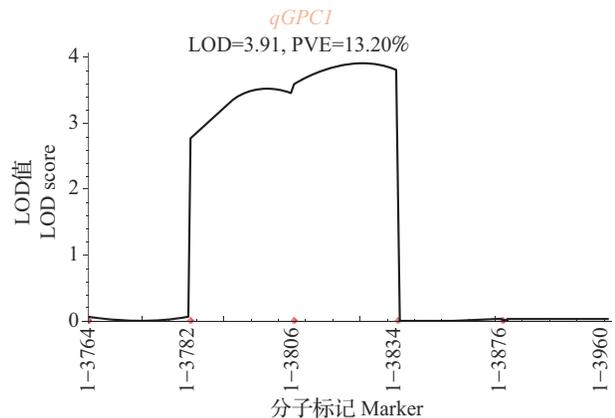
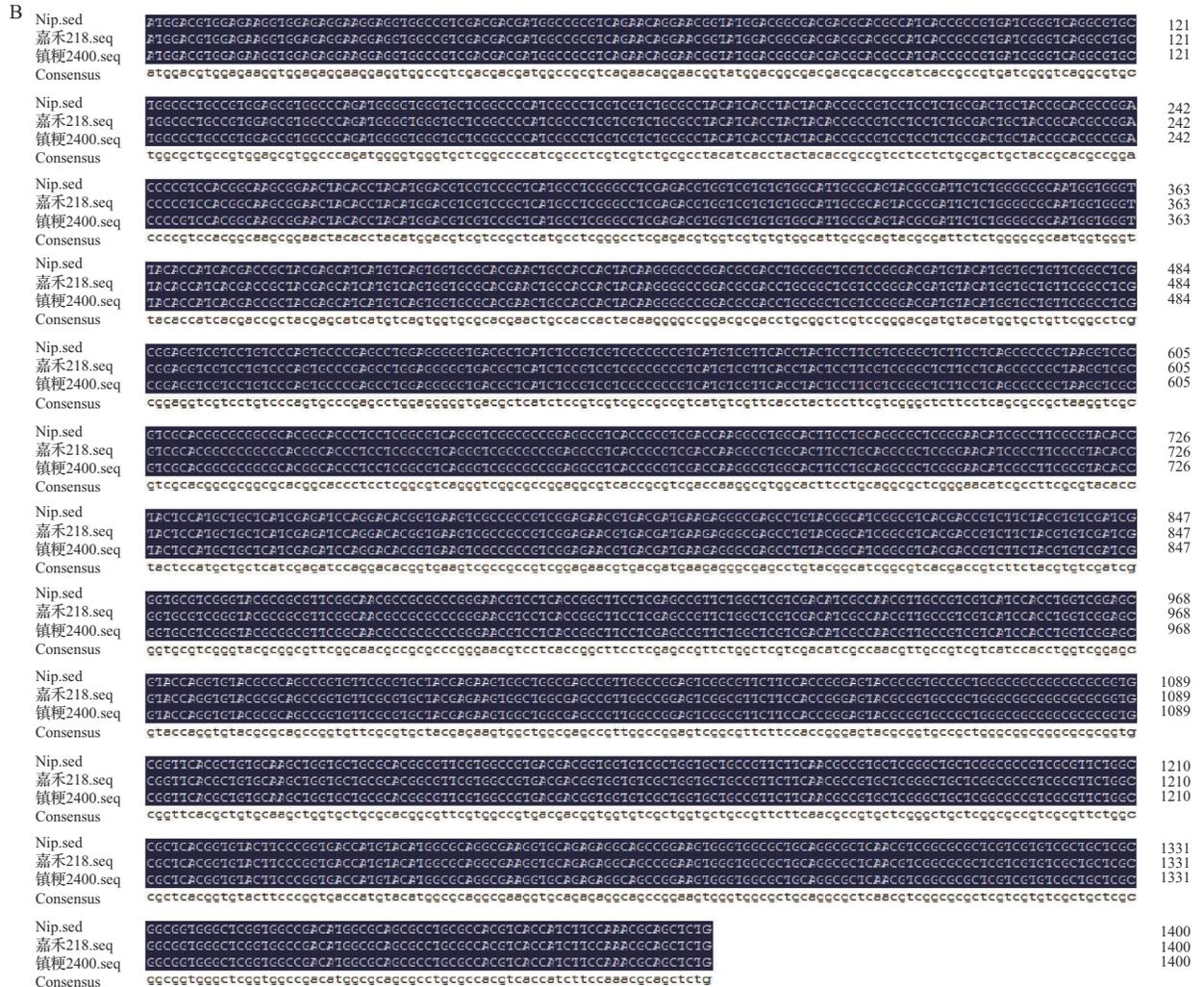


图4 $qGPC1$ 在染色体上的位置及遗传效应

Fig. 4 Location and genetic effect of $qGPC1$

的5'UTR区的顺式调控元件中存在两个自然变异可能与水稻中籽粒蛋白质含量的多样性相关。为检测该基因是否在双亲之间存在差异,本研究对镇粳2400和嘉禾218的OsAAP6基因进行测序,结果发现该基因的5'UTR区已报道的两个自然变异在双



图A中方框代表已报道的变异位点

The boxes in figure A represent the reported mutation sites

图5 亲本的OsAAP6基因启动子区(A)和编码区(B)测序分析

Fig. 5 Sequencing analysis of the promoter region (A) and CDS (B) of OsAAP6 gene in parents

表5 定位区间内候选基因及其可能的功能

Table 5 Candidate gene and their putative functions in the location interval

基因 Gene	突变类型 Mutation type	功能注释 Annotation
LOC_Os01g65169	SNP	质子依赖性寡肽转运蛋白
LOC_Os01g65200	SNP	硝酸盐转运蛋白
LOC_Os01g65470	SNP	保守假定蛋白
LOC_Os01g65480	SNP	热激蛋白DnaJ家族蛋白
LOC_Os01g65560	SNP	保守假定蛋白
LOC_Os01g65690	SNP	类4,5-DOPA双加氧酶外二醇蛋白
LOC_Os01g65720	SNP	糖苷水解酶
LOC_Os01g65770	SNP	保守假定蛋白
LOC_Os01g65780	SNP	糖基转移酶
LOC_Os01g65810	SNP	表达蛋白
LOC_Os01g65920	SNP/InDel	富含亮氨酸重复、含半胱氨酸的蛋白
LOC_Os01g66060	SNP	保守假定蛋白

2.6 优异种质镇稻1818的创制

通过前期对RIL各家系农艺性状、稻米食味品质及理化特性调查^[26],从RIL家系中筛选出低蛋白含量种质,其与镇稻18号杂交创制出镇稻1818, qGPC1位点来自镇粳2400,因此大米外观与对照品种武运粳23号和南粳5055相比,表现为更透明(图6),镇稻1818株高、结实率和千粒重比两对照显著增加,每穗粒数与南粳5055无显著差异,生育期和每公顷有效穗数与两对照无显著差异(表6)。通过稻米食味品质和理化特性分析发现,镇稻1818的蛋白质含量、垩白粒率和垩白度均显著低于武运粳23号和南粳5055,而米饭食味分、胶稠度和直链淀粉含量均显著高于两对照品种(表7),说明通过降低蛋白质含量可以提高中等直链淀粉含量类型的食味品质,这与前人研究的结果^[3]一致。

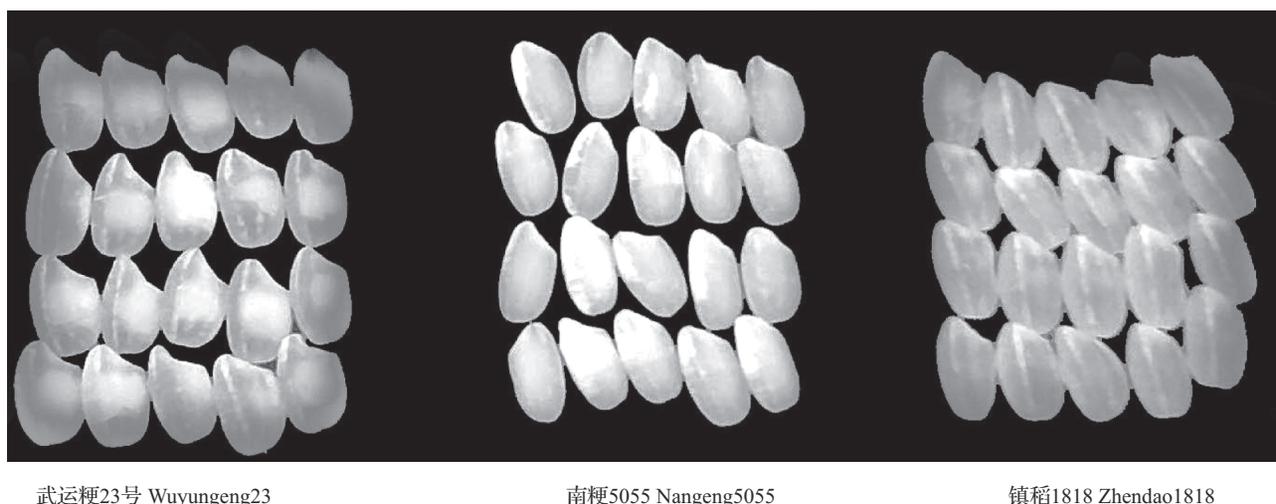


图 6 镇稻 1818 与对照品种大米外观分析

Fig. 6 Rice appearance analysis of Zhendao 1818 and control varieties

表 6 镇稻 1818 与对照品种农艺性状分析

Table 6 The agronomic traits of Zhendao 1818 and control varieties

品种名称 Variety	株高(cm) Plant height	每公顷有效穗数 ($\times 10^4$) Effective panicles per hm^2	每穗总粒数 Spikelets per panicle	结实率(%) Seed setting rate	千粒重(g) Thousand-grain weight	生育期(d) Growth period
镇稻 1818 Zhendao 1818	101.2 \pm 0.84 ^a	325.7 \pm 32.58 ^a	113.6 \pm 11.19 ^b	92.8 \pm 2.32 ^a	26.7 \pm 0.21 ^a	160.8 \pm 1.92 ^a
武运粳 23 号 Wuyungeng 23	97.6 \pm 1.52 ^b	321.0 \pm 20.10 ^a	135.2 \pm 16.75 ^a	89.8 \pm 0.47 ^b	26.0 \pm 0.40 ^b	159.2 \pm 1.30 ^a
南粳 5055 Nangeng 5055	96.0 \pm 1.41 ^b	309.0 \pm 24.60 ^a	130.8 \pm 15.22 ^{ab}	90.2 \pm 0.75 ^b	24.6 \pm 0.29 ^c	159.4 \pm 1.67 ^a

小写字母表示不同品种间差异在 $P < 0.05$ 的显著性水平; 下同

Lower case letters indicated the level of significance at $P < 0.05$ of differences between different varieties; The same as below

表 7 镇稻 1818 与对照品种的米饭食味特性及稻米理化指标分析

Table 7 Eating quality of rice and physicochemical indicators of Zhendao 1818 and control varieties

品种名称 Variety	米饭食味分 Overall eating quality	垩白粒率(%) Rate of chalky kernel	垩白度(%) Chalkiness	蛋白质含量(%) Protein content	胶稠度(mm) Gel consistence	直链淀粉含量(%) Amylose content
镇稻 1818 Zhendao 1818	84.85 \pm 0.39 ^a	14.21 \pm 0.85 ^c	3.73 \pm 0.22 ^c	5.63 \pm 0.04 ^c	81.50 \pm 0.41 ^a	17.94 \pm 0.25 ^a
武运粳 23 号 Wuyungeng 23	79.70 \pm 0.65 ^c	27.63 \pm 0.48 ^b	9.93 \pm 0.46 ^a	6.50 \pm 0.04 ^b	65.63 \pm 0.31 ^c	17.30 \pm 0.13 ^b
南粳 5055 Nangeng 5055	82.60 \pm 0.25 ^b	34.60 \pm 2.06 ^a	8.50 \pm 1.29 ^b	7.27 \pm 0.06 ^a	76.33 \pm 0.43 ^b	8.61 \pm 0.14 ^c

3 讨论

光温对稻米蛋白质含量的积累有显著影响,特别是在抽穗至成熟期的有效积温和光照时间对稻米蛋白质含量积累存在显著影响,表现为随有效积

温减少蛋白质含量提高^[27]。本研究中 RIL 家系的抽穗期变异幅度较大,蛋白质含量与抽穗期呈负相关,抽穗期越早,蛋白质含量越高,但在相同的 *Hd1* 和 *Ehd1* 基因型内,各家系的蛋白质含量仍表现出多样化,这说明该 RIL 家系的蛋白质含量存在稳定

遗传。

本研究中,利用镇粳2400和嘉禾218的RIL群体,在 $F_{8,9}$ 检测到4个QTL,分别位于第1、2和12染色体, $F_{9,10}$ 检测到8个QTL,分布于第1、2、6、7、8、9和11染色体上。与前人研究结果相比较,钟明等^[6]检测到的位于第1染色体的 $qpc1$ 位于标记RM472~RM104,日本晴中物理距离为37889084~40167060 bp;Wang等^[7]检测到一个控制多个氨基酸含量的主效QTL,位于标记RM315~RM104,物理距离为36734135~40167060 bp,这两个QTL与本研究中的位于第1染色体的 $qGPC1$ (36072210~39871484 bp)位点属于同一位点,说明该QTL确实存在且稳定遗传。王小雷等^[18]定位到的位于第12染色体的 $qPaT12$ 位于分子标记RM3331~RM5479,物理距离为23460827~24379166 bp,与 $F_{8,9}$ 检测到的位于第12染色体的QTL(物理位置21143708~24994311 bp)位点部分重合。杨亚春等^[12]检测到的控制糙米蛋白质含量的QTL位点 $qBRPC6.2$ 位于分子标记RM20076~RM3827(物理位置16811995~22297320 bp)与 $F_{9,10}$ 检测到的位于第6染色体的QTL(物理位置21023225~24999963 bp)部分重合。本研究中 $F_{8,9}$ 检测到4个QTL和 $F_{9,10}$ 检测到8个QTL中,只有第1染色体的 $qGPC1$ 被重复检测到,其他位点均不相同,这说明稻米蛋白质含量的遗传变异受主效基因调控的同时,还受到微效基因和环境因素的影响。有研究表明,蛋白质含量与直链淀粉含量存在相关性^[28],本研究中 $qGPC1$ 靠近 wx^b 基因 $WCR1$ ^[29]; $F_{9,10}$ 检测到的位于第6染色体的QTL靠近 $Du13$ 基因, $Du13$ 基因编码 C_2H_2 锌指蛋白,通过影响 Wx^b 的剪接效率进一步调控稻米胚乳中直链淀粉含量^[30]。 $F_{9,10}$ 检测到的第2染色体QTL与 $OsBE11b$ 基因紧密连锁, $OsBE11b$ 基因编码淀粉分支酶IIb,对水稻胚乳中淀粉结构起重要作用^[31]; $F_{9,10}$ 检测到的第8染色体QTL与淀粉去分支酶基因 $OsISA1$ 连锁, $ISA1$ 影响淀粉合成和胚乳发育^[32],这些结果验证蛋白质含量与淀粉合成相关基因的遗传关系密切,其遗传调控机制需进一步研究。

通过与前人研究结果相比较发现, $qGPC1$ 位点含有已克隆的基因 $OsAAP6/qPC1$,该基因编码一个假定的氨基酸通透酶,能够正向调控籽粒蛋白质含量,该基因5'端潜在的顺式作用元件的2个自然变异导致了籼稻蛋白质含量的多样性^[21]。通过对镇粳2400和嘉禾218的 $OsAAP6$ 基因测序,结果发现该基因的5'端已报道的两个自然变异在双亲间无

差异,且该基因的编码区和编码区上游2 kb也未检测到差异,这暗示着该QTL可能存在一个新的基因调控粳稻籽粒蛋白质含量。进一步将 $qGPC1$ 定位到516 kb区间,通过双亲全基因组重测序分析发现,共有12个基因发生了SNP或InDel变异,其中 $LOC_Os01g65200$ 编码硝酸盐转运蛋白,该基因过表达会增加水稻叶鞘中的硝酸盐含量和总氮量^[33],该基因对籽粒蛋白质含量的调控作用未知,因此候选基因的筛选与功能验证还需进一步的实验证明。此外,本研究利用筛选出的低蛋白质种质做亲本创制的镇稻1818,与生产上大面积推广的对照品种武运粳23号(推广面积 66.67×10^4 hm²以上)和半糯型优质食味品种南粳5055(推广面积 133.33×10^4 hm²以上)相比,表现出更好的食味品质,说明利用低蛋白种质结合分子标记辅助选择可以高效地改良食味品质。

参考文献

- [1] Xie L H, Chen N, Duan B W, Zhu Z W, Liao X Y. Impact of proteins on pasting and cooking properties of waxy and non-waxy rice. *Journal of Cereal Science*, 2008, 47 (2): 372-379
- [2] Saleh M I. Protein-starch matrix microstructure during rice flour pastes formation. *Cereal Science*, 2017, 74: 183-186
- [3] Ning H F, Qiao J F, Liu Z H, Lin Z M, Li G H, Wang Q S, Wang S H, Ding Y F. Distribution of proteins and amino acids in milled and brown rice as affected by nitrogen fertilization and genotype. *Journal of Cereal Science*, 2010, 52(1): 90-95
- [4] 王琦. 粳稻蒸煮食味品质形成的理化基础研究. 南京: 南京农业大学, 2016
Wang Q. Physical and chemical foundation for cooking and eating quality of Japonica rice. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016
- [5] 钱春荣, 冯延江, 杨静, 刘海英, 金正勋. 水稻籽粒蛋白质含量选择对杂种早代蒸煮食味品质的影响. *中国水稻科学*, 2007, 21(3): 323-326
Qian C R, Feng Y J, Yang J, Liu H Y, Jin Z X. Effects of protein content selection on cooking and eating properties of rice in early-generation of crosses. *Chinese Journal of Rice Science*, 2007, 21(3): 323-326
- [6] 钟明, 王令强, 罗利军, 何予卿. 利用RIL群体比较定位糙米和精米蛋白质含量的QTL. *分子植物育种*, 2007, 5(5): 631-638
Zhong M, Wang L Q, Luo L J, He Y Q. Comparison of quantitative trait loci controlling the protein content of brown and milled rice using a recombinant inbred line population. *Molecular Plant Breeding*, 2007, 5(5): 631-638
- [7] Wang L Q, Zhong M, Li X H, Yuan D J, Xu Y B, Liu H F, He Y Q, Luo L J, Zhang Q F. The QTL controlling amino acid content in grains of rice (*Oryza sativa*) are co-localized

- with the regions involved in the amino acid metabolism pathway. *Molecular Breeding*, 2008, 21: 127-137
- [8] Kapiro J L, McClung A M, Chen M H, Yeater K M, Fjellstrom R G. Mapping QTLs for milling yield and grain characteristics in a tropical japonica long grain cross. *Journal of Cereal Science*, 2008, 28 (2): 477-485
- [9] 张涛, 郑家奎, 吴先军, 蒋开锋, 杨乾华, 陈温福, 杨莉. 水稻糙米蛋白质含量的 QTL 定位. *分子植物育种*, 2009, 7(1): 67-72
- Zhang T, Zheng J K, Wu X J, Jiang K F, Yang Q H, Chen W F, Yang L. QTL mapping of brown rice protein content in a RIL population of rice. *Molecular Plant Breeding*, 2009, 7 (1): 67-72
- [10] 黄覃, 于波, NASSIROU Tondi-yacouba, 高冠军, 张庆路, 何予卿. 水稻糙米蛋白质和粗脂肪含量的 QTLs 分析. *湖北农业科学*, 2012, 51(21): 4709-4713
- Huang Q, Yu B, NASSIROU T Y, Gao G J, Zhang Q L, He Y Q. QTLs mapping of protein content and crude fat content in rice. *Hubei Agricultural Sciences*, 2012, 51(21): 4709-4713
- [11] 鄢宝, 王岩, 高冠军, 张庆路, 刘鑫, 何予卿. 水稻糙米蛋白质含量 QTL 定位及上位性分析. *分子植物育种*, 2012, 10(5): 594-599
- Yan B, Wang Y, Gao G J, Zhang Q L, Liu X, He Y Q. QTL mapping and epistasis analysis of the protein content in brown rice. *Molecular Plant Breeding*, 2012, 10 (5): 594-599
- [12] 杨亚春, 倪大虎, 宋丰顺, 李莉, 冯光, 李泽福, 杨剑波. 两个环境下糙米和精米蛋白质含量的 QTL 分析. *中国水稻科学*, 2012, 26 (3): 351-355
- Yang Y C, Ni D H, Song F S, Li L, Feng G, Li Z F, Yang J B. Identification of QTL for protein content in brown and milled rice in two environments. *Chinese Journal of Rice Science*, 2012, 26(3): 351-355
- [13] 张杰, 郑蕾娜, 蔡跃, 尤小满, 孔飞, 汪国湘, 燕海刚, 金洁, 王亮, 张文伟, 江玲. 稻米淀粉 RVA 谱特征值与直链淀粉、蛋白含量的相关性及其 QTL 定位分析. *中国水稻科学*, 2017, 31 (1): 31-39
- Zhang J, Zheng L N, Cai Y, You X M, Kong F, Wang G X, Yan H G, Jin J, Wang L, Zhang W W, Jiang L. Correlation analysis and QTL mapping for starch RVA profile properties and amylose and protein contents in rice. *Chinese Journal of Rice Science*, 2017, 31 (1): 31-39
- [14] Park S G, Park H S, Baek M K, Jeong J M, Cho Y C, Lee G M, Lee C M, Suh J P, Kim C S, Kim S M. Improving the glossiness of cooked rice, an important component of visual rice grain quality. *Rice*, 2019, 12(1): 87
- [15] Yang Y, Guo M, Li R, Shen L, Wang W, Liu M, Zhu Q, Hu Z, He Q, Xue Y, Tang S, Gu M, Yan C. Identification of quantitative trait loci responsible for rice grain protein content using chromosome segment substitution lines and fine mapping of *qPC-1* in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular Breeding*, 2015, 35: 130
- [16] 赵琳琳, 李楠, 吕志伟, 吴姗姗, 赵志超, 张文会. 野栽渗入系水稻籽粒储藏蛋白质含量的 QTL 遗传解析. *江苏农业科学*, 2015, 43(3): 50-53
- Zhao L L, Li N, Lyu Z W, Wu S S, Zhao Z C, Zhang W H. QTL genetic analysis of storage protein content in wild planted infiltrating rice grains. *Jiangsu Agricultural Science*, 2015, 43 (3): 50-53
- [17] Takayuki K, Jun M. Identification and characteristics of quantitative trait locus for grain protein content *TGPI2*, in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*, 2018, 214(9): 165
- [18] 王小雷, 刘杨, 孙晓棠, 欧阳林娟, 潘锦龙, 彭小松, 陈小荣, 贺晓鹏, 傅军如, 边建民, 胡丽芳, 徐杰, 贺浩华, 朱昌兰. 不同环境下稻米品质性状 QTL 的检测及稳定性分析. *中国水稻科学*, 2020, 34 (1): 17-27
- Wang X L, Liu Y, Sun X T, Ouyang L J, Pan J L, Peng X S, Chen X R, He X P, Fu J R, Bian J M, Hu L F, Xu J, He H H, Zhu C L. Identification and stability analysis of QTL for grain quality traits under multiple environments in rice. *Chinese Journal of Rice Science*, 2020, 34 (1): 17-27
- [19] Xu F F, Bao J S, He Q, Park Y J. Genome-wide association study of eating and cooking qualities in different subpopulations of rice (*Oryza sativa* L.). *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 663
- [20] Wang X Q, Pang Y L, Zhang J, Wu Z C, Chen K, Ali J, Ye G Y, Xu J L, Li Z K. Genome-wide and gene-based association mapping for rice eating and cooking characteristics and protein content. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 17203
- [21] Peng B, Kong H, Li Y, Wang L, Zhong M, Sun L, Gao G, Zhang Q, Luo L, Wang G, Xie W, Chen J, Yao W, Peng Y, Lei L, Lian X, Xiao J, Xu C, Li X, He Y. *OsAAP6* functions as an important regulator of grain protein content and nutritional quality in rice. *Nature Communications*, 2014, 5: 4847
- [22] Yang Y, Guo M, Sun S, Zou Y, Yin S, Liu Y, Tang S, Gu M, Yang Z, Yan C. Natural variation of *OsGluA2* is involved in grain protein content regulation in rice. *Nature Communications*, 2019, 10: 1949
- [23] Sun L, Lin T, Jing D, Yu B, Zeng S, Li C, Qian H, Du C, Hu Q, Yang J, Zhou Y, Wu Z, Gong H. Preponderant alleles at *Hdl* and *Ehd1* lead to photoperiod insensitivity in japonica rice varieties. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 2023, 23(3): e44842338
- [24] Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 2009, 14 (1) : 1754-1760
- [25] Mckenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernysky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M. The genome analysis toolkit: A mapreduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*, 2010, 20(9): 1297-1303
- [26] Mansfeld B N, Grumet R. QTLseqr: An R package for bulk segregant analysis with next-generation sequencing. *Plant Genome*, 2018, 11(2): 1-5

- [27] 周年兵. 沿淮下游地区温光要素对优质水稻产量、品质及氮素吸收利用的影响. 扬州:扬州大学, 2021
Zhou N B. Effects of temperature and light factors on yield, quality an nitrogen uptake and utilization of high-quality rice in the lower reaches of Huai River basin. Yangzhou: Yangzhou University, 2021
- [28] 张小明, 王仪春, 石春海, 鲍根良, 叶胜海. 稻米蒸煮营养品质性状的遗传研究进展. 植物遗传资源学报, 2002, 3 (2): 51-55
Zhang X M, Wang Y C, Shi C H, Bao G L, Ye S H. Progress of study on genetics of cooking and nutrient quality. Journal of Plant Genetic Resources, 2002, 3 (2): 51-55
- [29] Wu B, Yun P, Zhou H, Xia D, Gu Y, Li P B, Yao J L, Zhou Z Q, Chen J X, Liu R J, Cheng S Y, Zhang H, Zheng Y Y, Lou G M, Chen P L, Wan S S, Zhou M S, Li Y H, Gao G J, Zhang Q L, Li X H, Lian X M, He Y Q. Natural variation in *WHITE-CORE RATE 1* regulates redox homeostasis in rice endosperm to affect grain quality. The Plant Cell, 2022, 34 (5): 1912-1932
- [30] Cai Y, Zhang W W, Fu Y S, Shan Z Z, Xu J H, Wang P, Kong F, Jin J, Yan H G, Ge X Y, Wang Y X, You X M, Chen J, Li X, Chen W W, Chen X G, Ma J, Tang X J, Zhang J, Bao Y Q, Jiang L, Wang H Y, Wan J M. *Du13* encodes a C₂H₂ zinc-finger protein that regulates Wx^b pre-mRNA splicing and microRNA biogenesis in rice endosperm. Plant Biotechnology Journal, 2022, 20(7): 1387-1401
- [31] Ying Y N, Zhang Z W, Tappiban P, Xu F F, Deng G F, Dai G X, Bao J S. Starch fine structure and functional properties during seed development in BEIIb active and deficient rice. Carbohydrate Polymers, 2022, 292: 119640
- [32] Chao S F, Cai Y C, Feng B B, Jiao G A, Sheng Z H, Luo J, Tang S Q, Wang J L, Hu P S, Wei X J. Editing of rice isoamylase gene *ISA1* provides insights into its function in starch formation. Rice Science, 2019, 26(2): 77-87
- [33] Wang J, Wan R J, Nie H P, Xue S W, Fang Z M. *OsNPF5.16*, a nitrate transporter gene with natural variation, is essential for rice growth and yield. The Crop Journal, 2022, 10(2):397-406