基于高密度遗传图谱定位水稻抽穗期耐热性QTL

刘 进1,周慧颖1,马小定2,孟冰欣1,崔 迪2,胡佳晓1,

涂 夯1,余丽琴1,韩龙植2,黎毛毛1

(1江西省农业科学院水稻研究所/水稻国家工程研究中心(南昌)/江西省农作物种质资源研究中心,南昌 330200;

²中国农业科学院作物科学研究所,北京 100081)

摘要:随着全球气候变暖日益加剧,高温严重威胁水稻生产和粮食安全,发掘耐热基因、培育耐高温新品种是应对高温危害的关键途径之一。以热敏感品种周南稻与耐热品种赖早籼58号杂交构建的RIL群体为材料,利用2022年极端自然高温鉴定水稻抽穗期耐热性,基于高密度遗传图谱鉴定抽穗期耐热相关的QTL。自然高温胁迫下RIL群体结实率显著降低,不同家系高温结实率存在较大变异,RIL群体自然高温结实率呈现连续的近似正态分布;检测到6个调控每穗颖花数、每穗实粒数和结实率的QTL,检测到5个耐热相关QTL,分别为qHTSF14、qHTSF114、qHTC2、qHTC4和qHTC6,其中qHTSF14、qHTSF114、qHTC2、qHTC4和qHTC6,其中qHTSF14、qHTSF114、qHTC2、qHTC4和qHTC6,其中qHTSF14、qHTSF114、qHTC2、qHTH4;基于高密度遗传图谱和极端家系基因型确定qHTC2、qHTH4和qHTC6具有调控抽穗期耐热性的功能且存在累加效应,聚合2个以上主效QTL的RIL株系耐热性显著增强,利用生物信息学分析3个主效QTL目标区域候选基因,筛选出14个调控生长发育和抗逆响应相关的候选基因,为水稻耐热遗传改良和关键基因克隆及功能解析奠定了基础。

关键词:水稻;高密度遗传图谱;耐热性;QTL定位;候选基因

QTL Mapping for Heat Tolerance at Heading Stage Based on High Density Genetic Maps in Rice (*Oryza sativa* L.)

LIU Jin¹, ZHOU Huiying¹, MA Xiaoding², MENG Bingxin¹, CUI Di², HU Jiaxiao¹, TU Hang¹, YU Liqin¹, HAN Longzhi², LI Maomao¹

(¹Rice Research Institute, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences/National Engineering Laboratory for Rice (Nanchang)/Research Center of Jiangxi Crop Germplasm Resources, Nanchang 330200; ²Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: Global warming poses a serious threat to rice production and food security through increasing high-temperature stress. Identification of heat-tolerant genes and development of new heat-resistant varieties are crucial to mitigate the harm of high temperature. A set of RIL population, derived from the cross between the heat-sensitive variety Junambyeo (JNB) and the heat-tolerant variety Ganzaoxian58 (GZX58), were developed to identify heat tolerance traits at the heading stage under natural extreme high-temperature stress conditions in 2022 year using a high-density genetic map. Natural high-temperature stress significantly reduced seed setting rate, with the RIL population showing continuous, approximately normal distribution, exhibiting highly significant correlations with control seed-setting rates and heat tolerance coefficients. Genetic mapping revealed

收稿日期:2024-10-07 网络出版日期:2024-11-12

URL: https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20241007002

第一作者研究方向为水稻种质资源鉴定与创新利用, E-mail: riceliujin@163.com

通信作者:黎毛毛,研究方向为作物种质资源保护与鉴定评价,E-mail:Lmm3056@163.com

基金项目:江西省技术创新引导类计划项目科技合作专项(20212BDH81009),江西省重大科技研发专项项目(20232ACF01001);江西现代农 业科研协同创新专项(JXXTCXQN202205);江西省自然基金项目(20232BAB205036)

Foundation projects: The Technology Innovation Guidance Program Project Science and Technology Cooperation Special Program of Jiangxi Province (20212 BDH81009); The Major Science and Technology Research and Development Special Project of Jiangxi Province (20232ACF01001); The Collaborative Innovation Special Project of Jiangxi Modern Agricultural Research (JXXTCXQN202205); The Natural Science Foundation of Jiangxi Province (20232BAB205036)

six QTLs for spikelet number per panicle, filled grain number per panicle and spikelet fertility under control environment, and five heat tolerance QTLs (*qHTSF14*, *qHTSF114*, *qHTC2*, *qHTC4* and *qHTC6*) under natural high temperature environment. These QTLs (*qHTSF14*, *qHTSF114* and *qHTC4*) formed a major cluster *qHTH4* on chromosome 4. High-density map analysis of extreme lines confirmed that *qHTC2*, *qHTH4* and *qHTC6* function in regulating heat tolerance with additive effects. The RIL lines stacking more than two major QTL had significantly enhanced heat resistance. Bioinformatics analysis identified 14 candidate genes within the target region, providing the foundation for the genetic improvement of heat tolerance and molecular characterization of underlying mechanisms in rice.

Key words: rice; high-density genetic map; heat tolerance; QTL mapping; candidate gene

受温室气体排放不断增加和人类活动的影响, 全球气候变暖加剧,2011-2020年全球地表平均温度 比1850-1900年升高了1.09℃,其中与2002年之前 相比,2003-2012年平均气温上升0.1℃,已突破每十 年升温0.1℃的上限阈值^[1]。随着全球气候变暖,我 国长江流域夏季遭遇高温热害的机率日益增加,夏 季高温严重影响我国水稻等农作物的安全生产^[24]。 水稻起源于低纬度区域,喜温不耐热,外界气温超 过其生长发育上限温度时将危害植株生长发育、产 量和品质的形成^[57]。在全球气候变暖、高温热害频 发背景下,鉴定耐热性种质是培育耐高温新品种并 减轻高温危害的关键,对保障国家粮食安全具有举 足轻重的作用^[89]。

水稻耐热性是典型数量性状,受多基因、环境 及互作共同决定。近年来,有关水稻耐热性遗传研 究较多,鉴定了一批耐热性QTL,并精细定位或克 隆了少数几个基因,水稻耐热性调控分子机制研究 已取得较好的进展^[9-11]。Ye等^[12]利用IR64/N22杂 交衍生的F,和BC,F,群体检测到8个结实率相关的 QTL,其中主效 QTL qHTSF1.1 和 qHTSF4.1 具有较 高的表型贡献率,随后精细定位并验证了 gHTSF4.1 调控耐热性的功能;曹志斌等[13]以高温结实率为耐 热性状检测到1个抽穗扬花期耐热性QTL,并利用 次级群体将 gHTH5 锁定在 RM592~RM17921 标记 之间,物理距离为304.2 kb;郑剑等^[14]构建了一张含 140个SSR标记的遗传图谱,共检测3个耐热相关 QTL,其中qHT4贡献率达39.07%,是调控耐热性关 键位点。以往水稻耐热QTL/基因定位多依赖于 SSR、InDel等低密度遗传图谱,存在遗传标记少、覆 盖度低的缺陷;虽然已鉴定多个水稻耐热性QTL, 但发掘主效QTL的能力受限且置信区间较大,在高 效快速获取目标区域关键候选基因等方面仍存在 明显不足,而全基因组测序构建高密度遗传图谱在 关键QTL发掘及目标基因筛选中具有明显的优 势^[1416]。本研究以周南稻(热敏感)和赣早籼58号 (耐热)杂交衍生的RIL群体为试验材料,基于高密 度遗传图谱,利用极端自然高温鉴定耐热主效QTL 并筛选候选基因,以期为水稻耐高温遗传改良提供 基因资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以热敏感品种周南稻(JNB,junambyeo)和耐热 品种赣早籼58号(GZX58,ganzaoxian58)杂交获得 F₁,F₂开始自交并利用单粒传获得稳定的F₈重组自 交系(RIL,recombinant inbred lines)群体。于2022 年在宜春市江西省农业科学院高安综合试验基地 进行大田中季种植试验,亲本和173个RIL家系材 料均在I期(5月8日)、II期(5月20日)播种,25 d秧 龄移栽,亲本与每个家系均栽3行,每行8穴,每穴1 苗,行株距为20 cm×16.5 cm,其他田间管理同当地 生产田。2022年晚季和2023年中季分别种植亲本 周南稻、赣早籼58号及F₈RIL群体,其中2022年晚季 7月1日播种,7月27日移栽,2023年中季5月10播 种,6月5日插秧,其他田间管理同2022年中季大田 生产管理。

1.2 高温胁迫处理及耐热性鉴定评价

依据2012-2021年气象数据,江西省宜春市每年 8月1日至8月20日最高气温一般超过35℃。通过 2022年分期播种(I期、II期)使亲本和RIL群体各家 系抽穗-开花期(7~10 d)介于高温时段,2022年I期播 种的RIL群体家系抽穗期分布于7月15日至8月10 日,II期播种的RIL群体抽穗期分布于7月23日至8 月18日。气象数据表明,2022年为极端高温年份, 除7月17至18日强降雨高温危害减弱外,7月9日至 8月30日最高气温均超过35℃且平均气温超过 30℃,高温危害持续40 d(图1,表1)。2022年自然高 温I期、II期亲本和每个RIL家系于始穗期选取5个 植株,每株选3~5个稻穗挂牌,成熟后每份材料收获 10个挂牌典型高温危害稻穗(目测结实率偏低稻 穗),分别测定自然高温I期和II期每穗颖花数、实粒 数,计算高温结实率和耐热系数。为探究高温危害 的稳定性,将2022年I期、II期视为2个独立试验,其

高温结实率分别记为高温结实率I、高温结实率II。 结实率(%)=实粒数/颖花数×100%,耐热系数=(高温 结实率I/对照结实率+高温结实率II/对照结实率)/2。 以耐热系数为指标判定亲本及RIL群体家系耐热性, 每个试验处理设置2次重复,取均值作为统计单元。



抽穗日期 Heading date 图 1 2022 年中稻抽穗-开花期和温度环境统计分析



表1	202	22-2023年抽穗期试验基地自然高温环境气温情况
Table	1	The temperature of heading date at the field station in 2022 and 2023

年份 Years	月份 Months	最低气温范围(℃) Range of min. temperature	最低气温均值(℃) Average min. temperature	最高气温范围(℃) Range of max. temperature	最高气温均值(℃) Average max. temperature	超过35℃日数(d) Number of days exceeding 35℃
2022	7月	26.0~29.0	27.6	29.0~39.0	35.5	22
	8月	23.0~31.0	28.2	31.0~39.0	37.4	29
	9月(CK)	21.0~26.0	23.4	28.0~36.0	33.1	3
2023	7月	25.0~29.0	27.2	33.0~38.0	35.1	15
	8月	22.0~29.0	26.0	30.0~38.0	34.4	16

以2022年晚季作为对照环境,晚稻抽穗期集中 在9月5日至20日之间,日最高气温均值低于32℃, 无高温胁迫,亲本和每个家系随机取5个稻穗,测定 每穗颖花数、实粒数,计算结实率。2023年中季环 境下,于抽穗期7月20日至8月15日挖取亲本和 RIL群体每份材料3~5株移入温棚高温处理7d,温 湿度记录仪检测日最高温度在40~45℃,日最低气 温在29~32℃,2023年中季试验环境下性状视为自 然高温表型,挖入温棚高温胁迫的视为人工高温表 型。其中对照结实率为2022年对照环境下亲本和 RIL群体结实率。

1.3 高密度遗传图谱构建与QTL分析

利用全基因组重测序的方法构建周南稻与赣 早籼58号杂交衍生RIL群体的高密度Bin标记遗传 图谱,RIL群体家系测序平均深度为8.65×,获取 318339个高质量多态性SNP,获取RIL群体各家系 基因型,采用滑动窗口策略将多态性SNP转换成 3321个Bin标记,图谱覆盖基因组1703.09 cM,平均 每条染色体标记数为276.8个,每条染色体遗传距 离均值为195.3 cM,标记间遗传距离和物理距离均 值分别为0.51 cM和106 kb^[17](图2)。采用QTL ICI Mapping 4.2 软件^[18]完备区间作图(ICIM, inclusive composite interval mapping)方法定位加性 效应QTL,LOD阈值设为2.50,当实际LOD值大于 该阈值时判定该区域存在1个QTL,并估算QTL加 性效应和表型贡献率;QTL命名方法遵循McCouch^[19] 的原则。





1.4 主效 QTL 鉴定及候选基因筛选

为验证主效QTL鉴定结果的可靠性和准确性, 利用姜树坤等^[20]"选择作图"策略验证主效QTL功 能与效应。首先依据目标主效QTL区域基因型对 其他QTL进行非增效基因固定,然后在RIL群体中 筛选目标QTL区域关键重组单株,验证目标QTL功 能和累加效应,同时利用生物信息学网站(https:// rapdb.dna.affrc.go.jp、https://www.ricedata.cn/gene/) 对耐热关键QTL区域的注释基因进行功能分析,以 期筛选调控水稻耐热性的目标基因。

2 结果与分析

2.1 水稻 RIL 群体耐热性表型鉴定

高温胁迫处理的RIL群体家系结实率显著降 低。与2022年晚季环境(下文简称对照环境)相比, 2022年极端自然高温环境 RIL 群体家系结实率显 著降低,极端自然高温Ⅰ和Ⅱ处理无显著结实率差 异;与对照环境相比,2023年自然高温、人工高温结 实率均显著降低,人工高温胁迫结实率降幅大于自 然高温处理(图3)。对照环境下,双亲间每穗颖花 数、每穗实粒数和结实率均存在极显著差异,RIL群 体各家系每穗颖花数、每穗实粒数和结实率呈连续 的近似正态分布。与对照环境相比,自然高温和人 工高温胁迫明显降低了亲本和RIL群体家系结实 率,赣早籼58号结实率降幅较小,耐热系数极显著 高于周南稻,说明赣早籼58号耐热性强于周南稻。 RIL群体不同家系高温结实率和耐热系数存在较大 变幅,表现为近似连续的正态分布。以上结果表明 水稻抽穗期耐热性是数量性状,受多基因调控,符 合QTL作图要求(表2,图3~4)。





A represents the spikelet fertility (SF) of the control environment, extreme natural high temperature I and II in 2022 year; B represents the SF of the control environment in 2022 years, natural high temperature and artificial high temperature in 2023 year; * and ** represent significant and highly significant differences at the *P*<0.05 and *P*<0.01 level, respectively, ns represent for no significant; SF: Spikelet fertility; The same as below **B3** 不同温度处理下水稻 RIL 群体 171 个家系结实率情况



表2 亲本和RIL群体水稻抽穗期耐热性表型分析

 Table 2
 Phenotype of heat tolerance from the parents and RIL populations at heading stage

环座	性状 Traits	亲本 Parents		RIL 群体 RIL population				
下現 Environments		周南稻 JNB	赣早籼58 GZX58	均值±标准差 Mean±SD	变幅 Range	峰度 Skewness	偏度 Kurtosis	
对照环境	每穗颖花数 GNP	135.70±16.40	230.50±24.00**	211.66±81.21	68.58~633.33	1.88	1.61	
Control	每穗实粒数FGNP	128.00±12.00	174.25±15.50**	137.28±56.91	36.50~400.00	1.79	1.45	
	结实率(%) SF	94.30±4.20	75.60±9.50**	66.32±11.24	33.55~94.67	0.10	-0.28	
自然高温	高温结实率I(%) HTSF I	52.88±5.50	54.33±5.30*	31.01±16.09	0.34~79.55	0.02	0.48	
Natural high temperature	高温结实率II(%) HTSF II	55.57±4.50	59.70±6.50*	29.73±16.40	0.88~73.58	-0.47	0.32	
	耐热系数HTC	0.62 ± 0.06	0.75±0.05**	0.46±0.20	0.03~1.03	-0.32	0.30	

JNB: Junambyeo; GZX58: Ganzaoxian58; GNP: Grain number per panicle; FGNP: Filled grain number per panicle; HTSFI: Spikelet fertility under high temperature I; HTSFII: Spikelet fertility under high temperature II; HTC: Heat tolerance coefficient; The same as below





Fig. 4 Phenotype distribution of the relative heat tolerance traits at heading stage for RIL populations

2.2 耐热主效 QTL 鉴定及聚合效应分析

对照环境下,检测到 6个与每穗颖花数、每穗实 粒数和结实率相关QTL,分布于第 2、3、6和10 染色 体上,LOD 值范围为 2.67~3.20,表型贡献率范围为 4.80%~9.07%,加性效应介于-3.14%~24.73%之间 (表 3、图 5)。其中,qGNP6和qFGNP6位于第 6染 色体 Block10295~Block10302标记间,物理距离约 为104.24 kb,是调控每穗颖花数和每穗实粒数的主 效QTL,增效等位基因来自大穗亲本赣早籼 58号; qFGNP2和qSF2位于第 2染色体相邻区域,该位点 是调控每穗实粒数和结实率的主效位点,增效等位 基因来自赣早籼58号。自然高温环境下,检测到5 个高温结实率、耐热系数相关QTL,分布于第2、4和 6染色体,其中qHTSF14、qHTSF114和qHTC4成簇分 布在第4染色体Block7164~Block7181标记之间,贡 献率或加性效应较大,形成调控高温结实率和耐热 系数的主效QTL簇qHTH4,表明来源于赣早籼58 号的等位基因可明显提升抽穗期耐热性;位于第2 染色体Block3417~Block3418区间的qHTC2和位于 第6染色体Block10246~Block10249染色体区域的 qHTC6增效等位基因均来自赣早籼58号,对高温胁 迫具有明显的响应作用。

五本	41/44	合占	長河	LOD值	贡献率	加性效应	基因	物理距离
	但从	121. 1	你小吃	LOD	(%)	(%)	木你	(KD)
Environments	Traits	Locus	Marker	value	PVE	Additive	Gene	Physical
						effect	source	distance
对照环境	每穗颖花数 GNP	qGNP6	Block10298~Block10302	2.86	6.42	20.81	GXZ58	55.47
Control		qGNP10	Block15171~Block15223	2.84	9.07	24.73	GXZ58	445.90
	每穗实粒数 FGNP	qFGNP2	Block4300~Block4307	2.67	5.29	13.24	GXZ58	177.42
		qFGNP6	Block10295~Block10298	3.12	6.93	15.15	GXZ58	48.77
	结实率 SF	qSF2	Block4211~Block4226	2.98	4.80	2.49	GXZ58	304.64
		qSF3	Block4760~Block4764	3.20	7.60	-3.14	JNB	53.29
自然高温	高温结实率IHTSF I	qHTSF14	Block7164~Block7181	3.46	5.86	4.01	GXZ58	272.5
Natural high	高温结实率II HTSF II	qHTSFII4	Block7164~Block7181	3.12	8.99	4.88	GXZ58	272.5
temperature	耐热系数HTC	qHTC2	Block3417~Block3418	4.42	8.86	20.49	GXZ58	69.2
		qHTC4	Block7164~Block7181	2.38	2.85	11.62	GXZ58	272.5
		qHTC6	Block10246~Block10249	3.74	6.70	17.82	GXZ58	151.4

表3 水稻抽穗期耐热性QTL分析

 Table 3
 Putative QTLs for heat tolerance were detected at heading stage

PVE: Percentage of explained phenotypic variation



蓝色表示对照环境调控每穗穗粒数的多效性 QTL,红色表示自然高温环境下结实率并重叠形成主效 QTL簇 *qHTH4* Blue color QTL indicates the pleiotropic QTL for regulates grain number per panicle under control environment, while the red color indicates the QTL associated with SF under natural high temperature conditions, which form the major QTL cluster *qHTH4*, respectively

图5 水稻抽穗期耐热性QTL染色体分布

Fig. 5 Chromosome location of putative QTL for heat tolerance at heading stage

QTL定位鉴定到3个影响抽穗期耐热性的主效 QTL,为了验证*qHTC2、qHTH4*和*qHTC6*真实性及 功能,进一步利用"选择作图"策略鉴定主效QTL聚 合效应。依据*qHTC2、qHTH4*和*qHTC6*将亲本和 RIL分为8种基因型Hap1~Hap8。其中,Hap1基因型包括不含耐热主效QTL的周南稻及RIL家系,耐热性较差,高温结实率、耐热系数均值分别为26.32%和0.39,表现为热敏感。Hap8基因型包括同

时含有 qHTC2、qHTH4 和 qHTC6 的赣早籼58 号及 RIL 家系, 耐热性最强, 高温结实率、耐热系数均值 分别为34.51% 和0.54, 耐热性明显强于其他基因型 家系, 表现为强耐热。Hap2~Hap4 基因型包括含3 个主效 QTL 中任一位点的家系, 高温结实率和耐热 系数分别在32.04%~32.50% 和0.46~0.49, 耐热性高 于不含主效 QTL 簇的家系, 表现为中间型。 Hap5~Hap8 基因型为含任意2个及以上主效 QTL 的家系,其耐热系数高于不含或含单一主效QTL簇 的家系(Hap1~Hap4),且Hap5、Hap6和Hap8高温 结实率高于Hap1~Hap4,均表现出较强耐热性(图 6)。这表明,3个主效QTL具有调控RIL群体家系 耐热性的功能,主效QTL聚合呈现明显累加效应, 随着主效QTL聚集数量的增加,耐热性明显增强, 含2个以上主效QTL的家系耐热性较强。



A为依据3个主效QTL将亲本RIL群体和家系分为8种基因型Hapl~Hap8,n表示基因型家系数;B和C分别表示不同基因型高温结实率和耐热系数,红色虚线表示不同基因型高温结实率和耐热系数趋势

A indicates that parent and RIL lines divide to *Hap1-Hap8* genotype, according to *qHTC2*, *qHTH4* and *qHTC6*, n represents to the number of lines from this genotype; B-C showed that the phenotype of HTSF and HTC from these genotype, the red dotted line represents the trend of HTSF and HTC from different genotypes, respectively

图6 水稻抽穗期耐热主效QTL聚合效应和验证分析

Fig. 6 Analysis of aggregation effect and verification of the major QTLs for heat tolerance at heading stage in rice

2.3 主效QTL目标区域关键基因筛选

利用 https://rapdb.dna.affrc.go.jp 和 https://www. ricedata.cn/gene/网站在主效QTL qHTC2、qHTH4和 qHTC6目标区域搜索注释基因,共发现148个注释 基因,其中14个候选基因可能参与生长发育、逆境 响应(表4)。主效QTL qHTC2位于第2染色体 Block3417~Block3418标记间69.2 kb内,包含13个 注释基因;其中,5个基因可能参与生长发育及抗逆 响应,LOC Os02g32110编码一个外泌素家族蛋白 结构域,LOC Os02g32120 编码一个细胞色素 b-c1 复合物亚基,LOC Os02g32140 编码一个 AP2 类转 录因子, LOC Os02g32160 编码一个 OsBON1 并依 赖钙的脂质结合蛋白,LOC Os02g32200编码一个 硫酯酶家族蛋白,而其他8个注释基因编码预测蛋 白、转座子或反转座子蛋白及假定蛋白。主效QTL 簇 qHTH4(qHTSFI4、qHTSFII4和 qHTC4)位于第4 染色体 Block 7164~Block 7182 标记间 272.5 kb 内,包

含108个注释基因;其中,4个基因参与生长发育和 逆境胁迫响应,LOC Os04g35800 编码一个锌指蛋 白结构域,LOC Os04g36040编码一个小肽转运蛋 白 PTR2, LOC Os04g36054 编码一个生长素应答因 子,LOC Os04g36070编码一个OsRR1蛋白,为A型 响应调节因子,而其他104个注释基因编码预测蛋 白、转座子或反转座子蛋白、F-box等结构域蛋白及 假定蛋白。qHTC6位于第6染色体 Block10246~ Block10249标记间151.4 kb内,包含27个注释基 因;其中,5个候选基因可能参与生长发育和逆境胁 追响应, LOC Os06g34620、LOC Os06g34640、 LOC Os06g34650 串联编码 C3HC4 型锌指蛋白, LOC Os06g34830 编码一个氨基酸转运家族蛋白 OsAAP,LOC Os06g34840编码一个蛋白酶抑制、脂 质转运蛋白,其他22个基因编码预测蛋白、转座子 或反转座子蛋白、X8结构域蛋白及假定蛋白。

Table 4 Analysis of important candidate genes within the major QTL cluster

主效QTL	候选基因	功能
Major QTL	Candidate gene	Function
qHTC2	LOC_Os02g32110	外泌素家族蛋白结构域
	LOC_Os02g32120	细胞色素b-cl复合物亚基
	LOC_Os02g32140	AP2类转录因子
	LOC_Os02g32160	编码 OsBONI 并依赖钙的脂质结合蛋白
	LOC_Os02g32200	硫酯酶家族蛋白
qHTH4	LOC_Os04g35800	锌指蛋白结构域
(qHTSFI4/qHTSFII4/qHTC4)	LOC_Os04g36040	小肽转运蛋白PTR2
	LOC_Os04g36054	生长素应答因子
	LOC_Os04g36070	A型响应调节因子
qHTC6	LOC_Os06g34620	C3HC4型锌指蛋白
	LOC_Os06g34640	C3HC4型锌指蛋白
	LOC_Os06g34650	C3HC4型锌指蛋白
	LOC_Os06g34830	氨基酸转运家族蛋白OsAAP
	LOC_Os06g34840	蛋白酶抑制、脂质转运蛋白

基于高密度遗传图谱有效锁定水稻耐热性的 主效QTL簇 qHTH4目标区域,利用生物信息学在 候选区域筛选108个注释基因,为继续探明 qHTH4 定位区间相关候选基因的功能,对目标区域注释基 因功能进行分类。qHTH4区域候选基因功能分为 18个类,主要聚集于转录调控(Transcription),复 制、重组及修复(Replication, recombination and repair),信号转导(Signal transduction mechanisms)、 翻译后修饰、调控蛋白及分子伴侣(Post translational modification, protein turnover, chaperones)、能量代谢(Energy production and conversion)和预测基因类别(General function prediction only)(图7)。这表明,转录调控、信号转导、蛋白修饰调控和能量代谢相关基因可能是调控水稻耐热性的分子基础,这也为主效QTL定位目标区域关键候选基因的筛选提供理论基础。



Fig. 7 Functional classification analysis of annotated genes for the major QTL qHTH4 mapping regions

3 讨论

3.1 水稻抽穗期耐热相关QTL定位

随着全球气候变暖日益加剧,高温危害已成为 影响作物生长发育、产量和品质形成的瓶颈因 素[21-22],耐热种质和耐热基因的发掘与利用是应对 高温危害的关键途径,已成为分子生物学和育种学 的研究热点[23-24]。近年来,国内外研究者利用自然 群体和遗传材料精细定位了32个耐热主效QTL/基 因,并克隆了 TT1、TT2、TT3、HTH5 等耐热基 因[10, 24-25]。尽管水稻耐热性优异种质鉴定筛选和基 因发掘及利用已取得较大进展,但耐热性调控分子 网络十分复杂,有关水稻耐热调控的机制与途径尚 不清晰^[26-27]。Li等^[28]鉴定到5个耐热性QTL,并克 隆了苗期耐热基因 OsTT1。Liu 等^[29]克隆了一个编 码E3泛素连接酶的苗期耐热基因OsHTAS,该基因 诱导气孔关闭进而提高水稻耐热性。Wang等^[30]克 隆了一个编码 DEAD-BoxRNA 解旋酶的 TOGR1,该 基因表达受高温胁迫诱导,调控细胞增殖和生长发 育。Kan等^[31]鉴定了一个编码G蛋白γ亚基的耐热 基因TT2,该基因功能缺失将增强水稻全生育期的 耐热性,TT2功能正常时植株表现为高温敏感。 Zhang等^[32]克隆耐高温基因TT3,含TT3的非洲栽培 稻CG14呈现强耐热性,TT3基因内部存在相互拮抗 的 TT3.1 和 TT3.2, 且位于遗传上游的 TT3.1 正调控 耐热性。本研究利用热敏感周南稻与较耐热的赣 早籼58号杂交构建RIL群体,构建高密度遗传图谱 并利用极端自然高温鉴定耐热表型,共检测到5个 控制水稻耐热性主效QTL,分别为qHTC2、 qHTSFI4、qHTSFII4、qHTC4和 qHTC6,同时聚合2 个以上主效位点可以显著提高RIL群体家系耐热 性;其中,qHTC2与Ravikiran等^[33]发现的qSFht2染 色体区域相近,具有较强调控耐热性的效应,该位 点在不同环境下重复性较好,可能是一个耐热主效 QTL; qHTH4和 qHTC6 为新发现的主效 QTL, 其中 主效 QTL 簇 qHTH4 包含 qHTSFI4、qHTSFII4 和 gHTC4,该区域对水稻抽穗期耐热性具有明显影响, 与Ye等[12]发现的qHTSF4.1位于相同染色体但物理 位置不同,是一个新的调控水稻抽穗期耐热性的主 效QTL簇,具有明显调控水稻耐热性的功能。

3.2 水稻抽穗期耐热候选基因发掘

以往传统QTL定位常采用RFLP、SSR、InDel等标记构建遗传图谱,由于标记密度较低,鉴定QTL

数量少且定位区间较大,影响目标基因的精细定位 与克隆[17,3435]。近年来,随着全基因测序技术的发 展与完善,基于高通量测序构建遗传图谱具有标记 高密度、覆盖度好、高通量、省时省力等优势,可快 速精准锁定主效QTL区间及候选基因,已成为快速 高效定位主效QTL的关键技术^[36-37]。张健等^[34]利 用构建的高密度遗传图谱检测出5个QTL簇qGS1、 qGS2、qGS3-1、qGS3-2和qGS7,联合生物信息学基 因功能注释、表达谱信息筛选确定 qGS2、qGS3-1 目 标基因分别为LOC Os02g42314和LOC Os03g39020。 董骥驰等[38]利用高密度遗传图谱定位了14个抽 穗期QTL,在稳定表达的qHD2.2目标区域筛选 到 33 个注释基因,其中 LOC Os02g46450、LOC Os02g46710和LOC Os02g46940功能相关且存在 多个变异,是调控抽穗期的关键候选基因。赵凌 等[39]利用高密度遗传图谱检测到19个叶绿素含量 QTL,其中qCHL2-1和qCHL5-1稳定表达,最终将 天冬氨酸氨基转移酶基因和叶面斑点蛋白基因确 定为目标基因。高密度遗传图谱具有高效、精准定 位、筛选主效 QTL 和目标基因的功能, 这将为分子 标记辅助选择育种奠定良好的基础^[39-40]。本研究基 于构建的高密度遗传图谱鉴定到11个主效QTL,目 标OTL定位区段物理距离在48.77~445.90 kb范围, 利用生物信息学快速鉴定筛选多个关键候选基因, 这与已往利用传统方法构建遗传图谱定位QTL的 研究存在明显差异。本研究共鉴定到5个耐热性主 效 QTL, 其中 qHTC2 被定位在第2 染色体 69.2 kb (18961014~19030194 bp)区域、qHTH4 (qHTC4、 qHTSFI4、qHTSFII4)被定位在第4染色体272.5 kb (21834003~22086708 bp)区域、gHTC6被定位在第 6染色体151.4 kb(20108296~20259658 bp)区域,目 标区域共筛选出148个注释基因,结合主效QTL簇 候选基因功能和qHTH4候选基因COG富集分类分 析,共挑选出调控生长发育和逆境响应相关基因14 个,包括 LOC Os02g32110、LOC Os02g32120、 LOC Os02g32140 LOC Os02g32160 LOC Os02g3 2200、LOC Os04g36040、LOC Os04g36054、LOC Os04g36070、LOC Os04g35800、LOC Os06g34620、 LOC Os06g34640, LOC Os06g34650, LOC Os06g3 4830和LOC Os06g 34840,这些候选基因与高温等 抗逆响应密切相关,可能是调控水稻耐热性的关键 因子,这为后续开展水稻耐热基因鉴定和分子机制 研究奠定了基础。

971

4 结论

采用热敏感品种周南稻与耐热品种赣早籼58 号杂交衍生的RIL群体为试验材料,基于高密度遗 传图谱和2022年极端自然高温检测到5个抽穗期 耐热性QTL(qHTSF4、qHTSFII4、qHTC2、qHTC4和 qHTC6),其中qHTSFI4、qHTSFII4和qHTC4形成调 控耐热性的主效QTL簇qHTH4;利用高密度遗传图 谱、极端家系基因型和生物信息学确定qHTC2、 qHTH4和qHTC6具有调控耐热性的功能且存在累 加效应,聚合2个以上主效QTL的RIL株系耐热性 显著增强,在3个主效QTL目标区域筛选到14个调 控生长发育和逆境响应候选基因,为水稻耐热遗传 改良和关键基因克隆及功能解析奠定了基础。

参考文献

- [1] Lee T, Romero J. IPCC, 2023//IPCC, Climate change 2023.
 Geneva: IPCC, 2023: 35-115
- [2] 杨沈斌,申双和,赵小艳,赵艳霞,许吟隆,王主玉,刘娟,张玮 玮.气候变化对长江中下游稻区水稻产量的影响.作物学报, 2010,36(9):1519-1528

Yang S B, Shen S H, Zhao X Y, Zhao Y X, Xu Y L, Wang Z Y, Liu J, Zhang W W. Impacts of climate changes on rice production in the middle and lower reaches of the Yangtze River. Acta Agronomica Sinica, 2010, 36(9): 1519-1528

[3] 王小波,关攀锋,辛明明,汪永法,陈西勇,赵爱菊,刘曼双,李 红霞,张明义,逯腊虎,魏亦勤,刘旺清,张金波,倪中福,姚颖 垠,胡兆荣,彭惠茹,孙其信.小麦种质资源耐热性评价.中国 农业科学,2019,52(23):4191-4200
Wang X B, Guan P F, Xin M M, Wang Y F, Chen X Y, Zhao A J, Liu M S, Li H X, Zhang M Y, Lu L H, Wei Y Q, Liu W Q, Zhang J B, Ni Z F, Yao Y Y, Hu Z R, Peng H R, Sun Q

X. Evaluation of heat tolerance in wheat germplasm resources. Scientia Agricultura Sinica, 2019, 52(23): 4191-4200

[4] 江珊,吴龙英,赵宝生,黄佳惠,蒋宇喆,焦元,黄进.植物耐受高温胁迫的分子机制研究进展.中国农学通报,2024,40
 (9):132-138

Jiang S, Wu L Y, Zhao B S, Huang J H, Jiang Y Z, Jiao Y, Huang J. Molecular mechanism of heat stress tolerance in plants: A Review. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2024, 40(9): 132-138

- [5] 刘鸣,李玉花,解莉楠.水稻非生物胁迫相关QTL研究进展. 植物生理学报,2013,49(12):1301-1308
 Liu M, Li Y H, Xie L N. Progress in QTL research for abiotic stress in rice. Plant Physiology Journal, 2013, 49(12):1301-1308
- [6] 凌霄霞,张作林,翟景秋,叶树春,黄见良.气候变化对中国水 稻生产的影响研究进展.作物学报,2019,45(3):323-334 Ling X X, Zhang Z L, Zhai J Q, Ye S C, Huang J L. Areview

for impacts of climate change on rice productionin China. Acta Agronomica Sinica, 2019, 45(3): 323-334

- [7] 胡菊芳,占龙飞,谢远玉.江西省近60年极端高温变化特征及其对水稻的影响.湖北农业科学,2022,61(9):27-32,40
 Hu J F, Zhan L F, Xie Y Y. Variation characteristics of extreme high temperature in Jiangxi province in recent 60 years and its impact on rice. Hubei Agricultural Sciences, 2022, 61 (9): 27-32, 40
- [8] 刘刚,夏快飞,吴艳,张明永,张再君,杨金松,邱东峰.水稻耐 热新种质 R203 的创制与应用.中国农业科学,2023,56(3): 405-415
 Liu G, Xia K F, Wu Y, Zhang M Y, Zhang Z J, Yang J S, Qiu D F. Breeding and application of a new thermo-tolerance rice germplasm R203. Scientia Agricultura Sinica, 2023, 56
- [9] Jagadish S V K, Craufurd P Q, Wheeler T R. High temperature stress and spikelet fertility in rice (*Oryza sativa* L.). Journal of Experimental Botany, 2007, 58(7): 1627-1635

(3):405-415

- [10] 杨军,章毅之,贺浩华,李迎春,陈小荣,边建民,金国花,李翔 翔,黄淑娥.水稻高温热害的研究现状与进展.应用生态学报,2020,31(8):2817-2830
 Yang J, Zhang Y Z, He H H, Li Y C, Chen X R, Bian J M, Jin G H, Li X X, Huang S E. Current status and research advances of high-temperature hazards in rice. Chinese Journal of Applied Ecology, 2020, 31(8): 2817-2830
- [11] 刘进,崔迪,余丽琴,张立娜,周慧颖,马小定,胡佳晓,韩冰, 韩龙植,黎毛毛.水稻苗期耐热种质资源筛选及QTL定位. 中国水稻科学,2022,36(3): 259-268
 Liu J, Cui D, Yu L Q, Zhang L N, Zhou H Y, Ma X D, Hu J X, Han B, Han L Z, Li M M. Screening and QTL mapping of heat-tolerant rice (*Oryza sativa* L.) germplasm resources at seedling stage. Chinese Journal of Rice Science, 2022,36(3): 259-268
- [12] Ye C, Tenorio F A, Redona E D, Cortezano P S M, Cabrega G A, Jagadish K S V, Gregorio G B. Fine-mapping and validating qHTSF4.1 to increase spikelet fertility under heat stress at flowering in rice. Theoretical and Applied Genetics, 2015, 128: 1507-1517
- [13] 曹志斌,谢红卫,聂元元,毛凌华,李永辉,蔡耀辉.水稻抽穗 扬花期耐热QTL(qHTH5)定位及其遗传效应分析.中国水稻 科学,2015,29(2):119-125
 Cao Z B, Xie H W, Nie Y Y, Mao L H, Li Y H, Cai Y H. Mapping a QTL (qHTH5) for heat tolerance at the heading stage on rice chromosome 5 and its genetic effect analysis. Chinese Journal of Rice Science, 2015, 29(2): 119-125
- [14] 郑剑,李兴星,苏华英,周军杰,秦小健,南文斌,杨永清,张汉 马,李贤勇,梁永书. 粳稻资源热粳35遗传图谱构建与耐热 QTL分析. 核农学报,2017,31(5): 844-851
 Zheng J, Li X X, Su H Y, Zhou J J, Qin X J, Nan W B, Yang Y Q, Zhang H M, Li X Y, Liang Y S. Construction of a genetic linkage map and QTL location for heat tolerance in japonica rice resources Rejing35. Journal of Nuclear Agricultural

Sciences, 2017, 31(5): 844-851

- [15] 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 G L, Liao B, Tang W B, Chen L Y, Xiao Y H. Identifying QTLs for thermo-tolerance of grain chalkiness trait in rice. Chinese Journal of Rice Science, 2017, 31 (3): 257-264
- [16] 张亚东,梁文化,赫磊,赵春芳,朱镇,陈涛,赵庆勇,赵凌,姚 妹,周丽慧,路凯,王才林.水稻RIL群体高密度遗传图谱构 建及粒型QTL定位.中国农业科学,2021,54(24):5163-5176

Zhang Y D, Liang W H, He L, Zhao C F, Zhu Z, Chen T, Zhao Q Y, Zhao L, Yao S, Zhou L H, Lu K, Wang C L. Construction of high-density genetic map and QTL analysis of grain shape in rice RIL population. Scientia Agricultura Sinica, 2021, 54(24): 5163-5176

[17] 刘进,胡佳晓,马小定,陈武,勒思,Jo Sumin,崔迪,周慧颖,张 立娜,Shin Dongjin,黎毛毛,韩龙植,余丽琴.水稻 RIL 群体 高密度遗传图谱的构建及苗期耐热性 QTL 定位.中国农业 科学,2022,55(22):4327-4341

Liu J, Hu J X, Ma X D, Chen W, Le S, Jo S, Cui D, Zhou H Y, Zhang L N, Shin D, Li M M, Han L Z, Yu L Q. Construction of high density genetic map for RIL population and QTL analysis of heat tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.). Scientia Agricultura Sinica, 2022, 55(22): 4327-4341

- [18] Wang J K, Li H H, Zhang L Y, Meng L. QTL IciMapping Version 4.2. (2019-07-24) [2024-10-07]. https://isbreeding. caas.cn/rj/index.htm
- [19] McCouch S R. Gene nomenclature system for rice. Rice, 2008, 1: 72-84
- [20] 姜树坤,王立志,杨贤莉,李伟杰,董世晨,车韦才,李忠杰,迟 力勇,李明贤,张喜娟,姜辉,李锐,赵茜,李文华.基于高密度 SNP遗传图谱的粳稻芽期耐低温QTL鉴定.作物学报,2020, 46(8):1174-1184

Jiang S K, Wang L Z, Yang X L, Li W J, Dong S C, Che W C, Li Z J, Chi L Y, Li M X, Zhang X J, Jiang H, Li R, Zhao Q, Li W H. Detection of QTLs controlling cold tolerance at bud bursting stage by using a high-density SNP linkage map in japonica rice. Acta Agronomica Sinca, 2020, 46(8): 1174-1184

[21] 段骅,唐琪,剧成欣,刘立军,杨建昌.抽穗灌浆早期高温与干 旱对不同水稻品种产量和品质的影响.中国农业科学, 2012,45(22):4561-4573

> Duan H, Tang Q, Ju C X, Liu L J, Yang J C. Effect of high temperature and drought on grain yield and quality of different rice varieties during heading and early grain filling periods. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(22): 4561-4573

 [22] 万丙良,查中萍. 气候变暖对水稻生产的影响及水稻耐高温 遗传改良. 中国农学通报, 2012, 28(36): 1099-1105
 Wan B L, Zha Z P. Effects of climate warming on rice production and genetic improvement for rice heat tolerance. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(36): 1099-1105

- [23] 陈赛华,仲伟杰,薛明.植物有性生殖对高温胁迫的响应机制.作物学报,2023,49(12):3143-3153
 Chen S H, Zhong W J, Xue M. Advances in heat-stress responses at sexual reproduction stage in plants. Acta Agronomica Sinica, 2023, 49(12): 3143-3153
- [24] 刘二华,周广胜,武炳义,宋艳玲,何奇瑾,吕晓敏,周梦子.
 1981-2010年长江中下游地区单季稻生殖生长期对气候变化和技术进步的响应.作物学报,2023,49(5):1305-1315
 Liu E H, Zhou G S, Wu B Y, Song Y L, He Q J, Lyu X M, Zhou M Z. Response of reproductive growth period length to climate warming and technological progress in the middle and lower reaches of the Yangtze River during 1981-2010 in single-cropping rice. Acta Agronomica Sinica, 2023, 49(5): 1305-1315
- [25] 唐婷,陈艳艳,杨洋,杨远柱,孟桂元,周静.水稻耐高温性研究进展.分子植物育种,2017,15(9):3694-3700
 Tang T, Chen Y Y, Yang Y, Yang Y Z, Meng G Y, Zhou J. Research progress of rice resistance to high temperature. Molecular Plant Breeding, 2017, 15(9): 3694-3700
- [26] Cao Z B, Li Y, Tang H W, Zeng B H, Tang X Y, Long Q Z, Wu X F, Cai Y H, Yuan L F, Wan J L. Fine mapping of the qHTB1-1 QTL, which confers heat tolerance at the booting stage, using an *Oryza rufipogon* Griff. introgression line. Theoretical and Applied Genetics, 2020,133(4): 1161-1175
- [27] Chen L, Wang Q, Tang M, Zhang X, Pan Y, Yang X, Gao G, Lv R, Tao W, Jiang L, Liang T. QTL Mapping and identification of candidate genes for heat tolerance at the flowering stage in rice. Frontiers in Genetics, 2021, 11: 621871
- [28] 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 α2 subunit gene contribute to thermotolerance and adaptation of African rice. Nature Genetics, 2015, 47(7): 827-833
- [29] Liu J P, Zhang C C, Wei C C, Liu X, Wang M G, Yu F F, Xie Q, Tu J M. The RING finger ubiquitin E3 ligase OsHTAS enhances heat tolerance by promoting H₂O₂-induced stomatal closure in rice. Plant Physiology, 2016, 170: 429-443
- [30] Wang D, Qin B X, Li X, Tang D, Zhang Y E, Cheng Z K, Xue Y B. Nucleolar DEAD-Box RNA helicase TOGR1 regulates thermotolerant growth as a Pre-rRNA chaperone in rice. PLoS Genetics, 2016, 12(2):e1005844
- [31] Kan Y, Mu X R, Zhang H, Gao J, han J X, Ye W W, Lin H X. TT2 controls rice thermotolerance through SCT1-dependent alteration of wax biosynthesis. Nature Plants, 2022, 8: 53-67
- [32] Zhang H, Zhou J F, Kan Y, Shan J X, Ye W W, Dong N Q, Guo T, Xiang Y H, Yang Y B, Li Y C, Zhao H Y, Yu H X, Lu Z Q, Guo S Q, Lei J J, Liao B, Mu X R, Cao Y J, Yu J J, Lin Y S, Lin H X. A genetic module at one locus in rice

protects chloroplasts to enhance thermotolerance. Science, 2022, 376: 1293-1300

- [33] Ravikiran K T, Krishnan S G, Vinod K K, Dhawan G, Dwivedi P, Kumar P, Bansal V P, Nagarajan M, Bhowmick P K, Ellur R K, Bollinedi H, Pal M, Mithra A C R, Singh A K. A trait specific QTL survey identifies NL44, a NERICA cultivar as a novel source for reproductive stage heat stress tolerance in rice. Plant Physiology Reports, 2020, 25 (4): 664-676
- [34] 张健,杨靖,王豪,李冬秀,杨瑰丽,黄翠红,周丹华,郭涛,陈志强,王慧.基于高密度遗传图谱定位水稻籽粒大小相关性状QTL.中国农业科学,2020,53(2):225-238
 Zhang J, Yang J, Wang H, Li D X, Yang G L, Huang C H, Zhou D H, Guo T, Chen Z Q, Wang H. QTL mapping for grain size related traits based on a high-density map in rice. Scientia Agricultura Sinica, 2020, 53(2): 225-238
- [35] 王朝欢,宋博文,余思佳,肖武名,黄明.基于全基因组测序构 建水稻 RIL 群体遗传图谱.华南农业大学学报,2021,42(2): 44-50

Wang C H, Song B W, Yu S J, Xiao W M, Huang M. Construction of a genetic map of rice RILs based on whole genome sequencing. Journal of South China Agricultural University, 2021, 42(2): 44-50

[36] Yang J, Sun K, Li D X, Luo L X, Liu Y Z, Huang M, Yang G L, Liu H, Wang H, Chen Z Q, Guo T. Identification of stable QTLs and candidate genes involved in anaerobic germination tolerance in rice via high-density genetic mapping and RNA-Seq. BMC Genomics, 2019, 20: 15

- [37] Zhang Y, Wang L, Xin H, Li D, Ma C, Ding X, Hong W, Zhang X. Construction of a high-density genetic map for sesame based on large scale marker development by specific length amplified fragment (SLAF) sequencing. BMC Plant Biology, 2013, 13: 141
- [38] 董骥驰,杨靖,郭涛,陈立凯,陈志强,王慧.基于高密度Bin 图谱的水稻抽穗期QTL定位.作物学报,2018,44(6): 938-946
 Dong J C, Yang J, Guo T, Chen L K, Chen Z Q, Wang H. QTL mapping for heading date in rice using high-density bin
- map. Acta Agronomica Sinica, 2018, 44(6): 938-946
 [39] 赵凌,张勇,魏晓东,梁文化,赵春芳,周丽慧,姚姝,王才林, 张亚东.利用高密度Bin图谱定位水稻抽穗期剑叶叶绿素含 量QTL.中国农业科学,2022,55(5):825-836
 Zhao L, Zhang Y, Wei X D, Liang W H, Zhao C F, Zhou L H, Yao S, Wang C L, Zhang Y D. Mapping of QTLs for chlorophyll content in flag leaves of rice on high-density bin map. Scientia Agricultura Sinica, 2022, 55(5):825-836
- [40] 孙志广,卢百关,刘金波,刘艳,李景芳,迟铭,陈庭木,李健, 杨波,刘晓敏,王宝祥,徐大勇.基于高密度遗传图谱的水稻 萌发耐淹性 QTL 定位.植物遗传资源学报,2024,25(1): 21-29

Sun Z G, Lu B G, Liu J B, Liu Y, Li J F, Chi M, Chen T M, Li J, Yang B, Liu X M, Wang B X, Xu D Y. QTL analysis for germinability under submergence condition based on a high-density genetic map in rice. Journal of Plant Genetic Resources, 2024, 25(1):21-29