水稻剑叶形态QTL定位及候选基因分析

王盛¹, 叶涵斐¹, 李三峰², 姜嘉骥¹, 张月¹, 潘晨阳¹, 周维永³, 陈维嫻¹, 王珂欣¹,
戴高兴³, 方媛^{1*}, 饶玉春^{1*}, 王跃星^{2*}

1. 浙江师范大学化学与生命科学学院, 金华 321004;

2. 中国水稻研究所, 水稻生物学国家重点实验室, 杭州 310006;

3. 广西农业科学院, 南宁 530000

* 联系人, E-mail: fy0579@zjnu.cn; ryc@zjnu.cn; wangyuexing@caas.cn

收稿日期: 2020-11-12; 接受日期: 2021-02-03; 网络版发表日期: 2021-04-02

国家自然科学基金(批准号: 31971921)、浙江省自然科学基金(批准号: LR20C130001)、浙江省万人计划青年拔尖人才(批准号: ZJWR0108023)、国家科技重大专项(批准号: 2016ZX08009003-003-008)、广西水稻遗传育种重点实验室开放基金(批准号: KYZ04Y21009)和中国水稻生物学国家重点实验室(批准号: 20200102)资助

摘要 叶片是水稻的重要器官, 是进行光合作用的主要场所, 而叶长、叶宽、叶面积等剑叶形态相关性状能够直接影响叶片的光合效率. 研究水稻剑叶形态相关性状的QTL(quantitative trait loci)位点, 并通过遗传育种的手段对水稻剑叶形态进行改良, 可以为培育理想株型的水稻提供理论依据. 本研究以籼稻品种华占(HZ)为父本, 粳稻品种热研2号(Nekken2)为母本, 杂交获得F1代后, 连续自交多代得到120个重组自交系(recombinant inbred lines, RIL)群体, 将其作为实验材料. 在相同且适宜的条件下培养后, 对水稻分蘖期和成熟期剑叶叶长、叶宽、叶面积等性状进行考察分析, 同时利用该RIL群体构建遗传图谱, 对水稻分蘖期和成熟期剑叶叶长、叶宽、叶面积性状的QTL进行定位分析, 共检测到35个剑叶形态相关性状的QTL. 其中包含6个与剑叶叶长相关的QTL(分蘖期5个、成熟期1个), 其中一个的LOD值高达6.92; 8个与剑叶叶宽相关的QTL(只在分蘖期检测到), 其中一个的LOD值高达4.51; 21个与剑叶叶面积相关的QTL(分蘖期12个、成熟期9个), 其中两个的LOD值分别高达6.37和4.06. 对这些QTL区间内与剑叶叶长、叶宽、叶面积相关的候选基因进行定量分析, 发现LOC_Os02g52040, LOC_Os03g46610, LOC_Os04g52230, LOC_Os04g44150, LOC_Os04g52479, LOC_Os09g37400, LOC_Os12g42020这7个基因在双亲间的表达量差异显著, 结合亲本剑叶叶长、叶宽、叶面积的数据结果, 推测LOC_Os04g52230, LOC_Os04g44150, LOC_Os09g37400, LOC_Os12g42020的高表达可能会促进水稻剑叶的增宽增长, 叶面积增大, 而LOC_Os02g52040, LOC_Os03g46610, LOC_Os04g52479的高表达可能抑制水稻剑叶的生长. 本研究通过QTL分析, 挖掘了调控水稻剑叶叶长、叶宽及叶面积的QTL位点, 为培育株型优良的水稻新品种提供了参考.

关键词 水稻, 剑叶, 叶片形态, QTL定位, SNP

水稻是中国乃至世界的重要粮食作物, 中国约有65%的人口以水稻作为主食^[1]. 中国是水稻生产和消

费的大国, 2016年中国水稻生产量约占全世界总产量的28%^[2]. 随着中国人口的持续增长, 城市化进程的不

引用格式: 王盛, 叶涵斐, 李三峰, 等. 水稻剑叶形态QTL定位及候选基因分析. 中国科学: 生命科学, 2021, 51: 567–578

Wang S, Ye H F, Li S F, et al. QTL mapping and analysis of candidate genes in flag leaf morphology in rice (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2021, 51: 567–578, doi: 10.1360/SSV-2020-0375

断加快, 耕地面积的持续减少以及气候环境的不利变化, 水稻生产面临着新的挑战。

光合作用是植物获得能量的重要途径, 而水稻的光合作用离不开它的叶片, 叶片是水稻产量之“源”, 是挖掘产量提升潜力重要方向。研究表明, 水稻籽粒中大部分碳水化合物来自于上三叶(剑叶、倒二叶、倒三叶)的光合作用^[3], 上三叶形态与水稻产量之间存在明显的正向关联, 即存在“源-库”协作关系^[4,5]。叶片也是水稻株型的重要组成部分, 叶片的形态结构是影响水稻种植群体的叶面积指数和光能利用率的重要因素, 高产的水稻往往具备良好的株型^[6]。借助分子标记改良水稻的叶形以及整体株型, 有利于水稻产量的提升。

水稻的叶型性状包括叶片的直立性、叶片厚度和叶面积, 其中直立性和叶面积是影响叶片光合效率的直接因素^[7]。叶片的直立性能够影响叶片的叶面积指数, 研究表明, 在一定程度上提高叶片直立性, 有利于提高叶片的叶面积指数; 提高上部叶片的直立, 可以提高冠层的光合速率, 增加物质的生产量。

叶片的形态建成起源于茎顶端分生组织(shoot apical meristem, SAM), SAM分化成叶原基, 以叶原基为基础朝着三个不对称轴向进行极性分化, 最终形成成熟的叶片。基顶轴的分化决定了叶片的长度, 近远轴的分化决定了叶片的厚度和卷曲度, 中侧轴的分化决定了叶片的宽度^[8,9]。目前已有较多的水稻叶宽调控基因被克隆, 如*NAL7*, *NAL1*和*NRL1*等, 这些基因主要参与生长素等内源激素合成与极性运输的调控, 影响叶片维管束数目和宽度, 与维管组织的发育和分布相关^[10-12]。目前研究发现的这些基因大多由突变体材料获得, 常与一些不利于水稻生产育种的农艺性状连锁, 较难投入到实际生产育种工作中, 而与调控水稻剑叶叶长、叶面积相关基因的克隆相对较少, 相关形态调控分子机制仍需进一步深入研究。

挖掘水稻产量相关基因以及充分利用杂种优势是促进水稻增产的根本途径。目前一类全新的依赖于核隐性雄性不育基因的第三代杂交水稻正处于研发或品种审定过程中, 有望实现水稻产量的进一步提升^[13]。叶形相关基因及其功能的研究虽有一些进展, 但仍落后于实际育种实践。借助分子标记技术, 成功分离控制数量性状的基因位点数目已成为可能。目前有多个与叶形相关的QTL(quantitative trait loci)已被鉴定。例

如, Tagle等人^[14]利用IR64和YTH288杂交组成334个回交自交系群体, 在4号染色体上检测到2个与剑叶长度和宽度相关的QTL, 在2号染色体上检测到一个与剑叶长度相关的QTL。Wang等人^[15]利用籼稻优良杂交亲本9311和真山97建立了一套回交重组自交系, 在1, 6, 7和8号染色体上鉴定出4个与剑叶长度、宽度和面积相关的QTL。Chen等人^[16]利用*javanica*品种D50(窄叶型)与籼稻品种HB277(宽叶型)杂交得到的重组自交系群体进行QTL定位, 确定了控制剑叶宽度的5个QTL, 分别位于1, 4, 7, 10号染色体上。Jiang等人^[17]利用2个粳稻品种——神农265(SN265)和丽江心*tuanheigu*(LTH)杂交的F₂群体, 鉴定出3个控制剑叶长度的QTL, 分别位于3, 6, 9号染色体。Marathi等人^[18]利用310个重组自交系(recombinant inbred lines, RILs)的新株型(new plant type, NPT), 在4号染色体的标记区间RM3276~RM5709上, 检测到一个控制剑叶宽度的主效QTL *qFLW4-2*, LOD值范围为21.69~46.49。Zhan等人^[19]利用籼稻大粒系(BG1)与粳稻小粒系(XLJ)杂交获得的一套RILs, 共检测到11个与剑叶形态性状相关的QTL, 其中与剑叶长度相关的有2个, 与剑叶宽度相关的有9个, 与剑叶角度相关的有6个, 分别位于2, 3, 4, 5, 8号染色体上。前人利用不同水稻群体在不同环境下对水稻剑叶的相关性状进行了遗传分析和基因定位, 大部分结果表明, 水稻剑叶叶长、叶宽等性状是数量性状, 由多基因控制。上述研究虽取得了较大的进展, 但受研究条件不同的限制, 不同研究者定位的结果相互比较的参考价值不大, 且部分位点贡献率不高。

本研究利用以热研2号和华占为亲本的RIL群体, 通过考察水稻分蘖期和成熟期剑叶叶长、叶宽、叶面积性状, 借助高密度的SNP(single nucleotide polymorphism)遗传图谱, 进行了剑叶叶形QTL的定位及分析, 并对效应值较高的QTL簇进行了候选基因的筛选和表达分析测定, 以期挖掘出更多的剑叶叶形调控相关的QTL和基因, 为水稻剑叶形态改良和理想株型培育提供分子基础和理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

以粳稻品种热研2号(Nekken2)为母本, 籼稻品种华占(HZ)为父本, 杂交产生F₁代, 对F₁代采取单粒传代

的方式开展套袋自交, 连续自交多代后得到基因型和表型相对稳定的120个RILs, 组成遗传群体(图1).

1.2 实验方法

(1) 水稻种植与管理. 收取 F_{12} 中各株系的种子, 各挑选60粒用于催芽. 催芽前需对种子表面进行消毒处理, 先用70%的酒精处理10 min, 用去离子水冲洗, 重复多次; 再用10%的次氯酸钠处理10 min, 用去离子水清洗干净后置于水中浸种2天, 隔一天换一次水. 浸种后用湿毛巾将种子完全包裹住, 放置于37℃恒温培养箱中进行催芽, 48 h后观察种子发芽情况, 挑选其中露白一致的种子播种到育秧田中. 1个月后, 选择长势相同的水稻秧苗每株系各24株, 按照行距×株距20 cm×20 cm的间距进行移苗插秧, 每株系以4行6列的方式种植. 在秧苗生长期间进行常规田间管理, 除草除虫等.

(2) 叶片性状的考察. 在水稻分蘖期和成熟期分别展开剑叶性状调查. 每个株系选取中间6株无边际效应的植株, 对主穗上的剑叶长度、宽度和面积进行测量. 测量仪器为CI-203便携式激光叶面积仪(美国CID公司), 测量时需将叶片扶直, 手持仪器并将叶面积仪激光扫描区域落位于叶枕处, 顺着叶片扫描至叶尖, 仪器可自动生成并记录叶长、叶宽、叶面积数据.

(3) 遗传图谱的构建. 通过亲本华占和热研2号杂交后代以单粒遗传的方式连续套袋自交12代获得120个重组自交系遗传群体, 对 F_{12} 的亲本和120个RILs的基因组进行测序, 分析整理基因测序的结果, 根据均匀分布在12条染色体上的4858个标记构建遗传图谱.

(4) QTL定位. 利用Excel和SPSS 23.0分析数据, 使用复合区间作图法和Mapmaker/QTL1.1B进行QTL定位及效应分析. 设置LOD阈值为2.5, 若检测到LOD>2.5的SNP标记, 则认为LOD值最高处对应的2个SNP标记间存在1个QTL. QTL的命名原则遵循McCouch等人^[20]提出的规则.

(5) 基因表达定量分析. 取分蘖期和成熟期的华占和热研2号的新鲜叶片样品, 使用TRIzol总RNA提取试剂盒(Invitrogen, 美国)提取RNA, 按照说明书上步骤操作. 将提取得到的RNA用ReverTra-Plus-反转录试剂盒(Toyobo, 上海)进行反转录后备用. 根据QTL定位结果, 在第2~9和12号染色体的区间内选取与剑叶形态性状相关的基因进行表型分析. 利用实时荧光定量PCR

图1 本文QTL分析技术路线图

Figure 1 QTL analysis technology roadmap

(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)对相关基因表达量进行检测. 以基因*OsActin*作为内参(GenBank登录号: NM_001058705). 反应体系为: 2 μ L cDNA模板、10 μ L 2×SYBR qPCR mix、正反引物(10 μ mol/L)各0.8 μ L、ddH₂O补足至20 μ L. 反应程序为95℃ 30 s; 95℃ 5 s; 55℃ 10 s; 72℃ 15 s, 40个循环. 每个反应做3次重复, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算相关基因的表达量. 实时PCR仪器为德国耶拿荧光定量基因扩增仪qTOWER3G. 利用SPSS 19.0软件和Excel分析数据. 采用*t*测验进行差异显著性分析, qRT-PCR所需的引物序列见表1. 不同处理组与对照组的基因表达量采用Duncan多重比较法进行差异显著性分析.

2 结果与讨论

2.1 剑叶形态相关性状在双亲及重组自交系群体中的表现

双亲和RIL群体剑叶表型及性状参数如表2、图2和图3所示. 热研2号和华占的剑叶叶长、叶宽、叶面积在分蘖期均无显著性差异, 而在成熟期却存在极显

表 1 实时荧光定量PCR所用引物序列

Table 1 Primer sequences for qRT-PCR

引物名称	序列	温度(℃)	长度(bp)
<i>LOC_Os12g42020</i> -F-qrt	5'-GCCATCGAGTACCTCCACAT-3'	59.96	107
<i>LOC_Os12g42020</i> -R-qrt	3'-GAGAGGTCGAAGTCGGTGAG-5'	59.99	
<i>LOC_Os04g52230</i> -F-qrt	5'-TGCAGATGGACTACGACCTG-3'	59.95	129
<i>LOC_Os04g52230</i> -R-qrt	3'-CTCCTCCTTCTTGACACCTTG-5'	59.98	
<i>LOC_Os04g44150</i> -F-qrt	5'-TATCGGTGGCCTACTTCCTG-3'	60.09	117
<i>LOC_Os04g44150</i> -R-qrt	3'-CGTCTTCCTGCACCTTCTTC-5'	59.99	
<i>LOC_Os04g52479</i> -F-qrt	5'-AGCTGACGGTGCATTTATCC-3'	60.10	188
<i>LOC_Os04g52479</i> -R-qrt	3'-CCATCACAGTCCCAGTTGTG-5'	60.00	
<i>LOC_Os09g37400</i> -F-qrt	5'-GGAGGAGTTTGGTTTCACGA-3'	60.09	125
<i>LOC_Os09g37400</i> -R-qrt	3'-AGCTCAGCAATGCTTTCTCC-5'	59.72	
<i>LOC_Os03g46610</i> -F-qrt	5'-CTTTGTCCGGACCTGTGAAT-3'	59.97	251
<i>LOC_Os03g46610</i> -R-qrt	3'-CCACCCGATGAACATAATCC-5'	60.01	
<i>LOC_Os02g52040</i> -F-qrt	5'-CCCATCACAATGACGTACCA-3'	60.24	76
<i>LOC_Os02g52040</i> -R-qrt	3'-AGTTGCCGTACCAGATGAGG-5'	60.13

图 2 水稻成熟期剑叶对比图. 标尺=5 cm

Figure 2 Comparison of flag leaves at mature stage of rice. Scale bar=5 cm

著差异,在成熟期,华占的剑叶长、剑叶宽和剑叶面积分别是热研2号的1.4倍、1.2倍和1.7倍。在RIL群体中,无论是分蘖期还是成熟期,水稻剑叶各性状均呈连续正态分布,表现出明显的超亲分离现象,表明该群体

的剑叶长度、宽度和面积均为多基因控制的数量性状。

相关性分析表明,分蘖期剑叶性状之间以及分蘖期与成熟期剑叶性状之间均呈显著正相关(表3)。成熟期剑叶叶长、叶宽和叶面积之间呈极显著正相关,成熟期剑叶面积与剑叶长的相关系数为0.995,大于成熟期剑叶面积与剑叶宽的相关系数0.976,大于成熟期剑叶长与剑叶宽的相关系数0.970,这表明成熟期剑叶面积大小主要受剑叶长度的影响。这一结论与王兰^[21]以及邹德堂等人^[5]的研究结果一致。

2.2 QTL定位分析

利用高密度的SNP标记遗传图谱,共检测到35个与水稻剑叶长度、剑叶宽度、剑叶面积相关的QTL,分别位于除1, 10和11号染色体之外的其余染色体上(表4、图4)。其中,剑叶长度相关QTL 6个(分蘖期5个、成熟期1个),剑叶宽度相关QTL 8个(只在分蘖期检测到),剑叶面积相关QTL 21个(分蘖期12个、成熟期9个)。同时,本研究还发现多个QTL簇,分布于第3, 4, 7, 8, 9和12号染色体上,分别同时控制水稻剑叶长、剑叶宽、剑叶面积两种以上的性状,表明这些QTL簇可能存在一因多效或多基因连锁现象,也表明水稻剑叶形态建成的过程受到复杂的调控。

图 3 水稻剑叶相关性状在重组自交系中的分布

Figure 3 Distribution of morphological traits of the flag leaf in the recombination inbred line population in rice

2.3 水稻剑叶形态相关性状相关基因的表达分析

通过水稻基因组注释网站(<http://rice.plantbiology.msu.edu>)对定位到的QTL所在区间进行候选基因的分析,并作了初步的总结(表5)。

本研究挖掘出的多个QTL位点包含多个基因,根据基因的功能注释,本团队从中筛选出了可能与控制

剑叶性状相关的基因进行分析,筛选出的基因主要包括内根-贝壳杉烯合酶基因、赤霉素2氧化酶基因、丝氨酸/半胱氨酸蛋白酶基因、丝氨酸苏氨酸蛋白激酶、SAUR生长素上调小RNA基因、水稻*Aux/IAA*基因等。由于涉及基因数量多,且亲本间本身存在籼粳稻的差异,因此本研究利用检查表达量的方式分析这些候选基因是否参与调控表型。通过实时荧光定量PCR选

表 2 水稻分蘖期和成熟期剑叶性状表现^{a)}

Table 2 Performance of flag leaf traits in tillering period and maturing period in rice^{a)}

性状	热研2号	华占	重组自交系群体	变幅
分蘖期				
剑叶长(cm)	34.23±4.88	37.07±4.18	34.34±3.80	24.73~44.06
剑叶宽(cm)	1.39±0.28	1.40±0.22	1.35±0.23	0.81~1.92
剑叶面积(cm ²)	34.75±8.08	37.38±7.02	34.18±7.85	18.67~54.57
成熟期				
剑叶长(cm)	28.92±2.77	39.84±5.93**	36.72±7.34	22.77~60.48
剑叶宽(cm)	1.60±0.07	1.94±0.09**	1.90±0.19	1.41~2.34
剑叶面积(cm ²)	34.47±4.40	58.81±10.87**	52.21±13.12	25.85~91.41

a) *和**分别表示热研2号和华占之间的差异在0.05和0.01水平上显著

表 3 水稻分蘖期和成熟期剑叶性状相关性分析^{a)}

Table 3 Correlation analysis on flag leaf traits in tillering period and maturing period in rice^{a)}

性状	分蘖期剑叶长	分蘖期剑叶宽	分蘖期剑叶面积	成熟期剑叶长	成熟期剑叶宽
分蘖期剑叶宽	0.498**				
分蘖期剑叶面积	0.790**	0.882**			
成熟期剑叶长	0.479**	0.741**	0.697**		
成熟期剑叶宽	0.472**	0.742**	0.695**	0.970**	
成熟期剑叶面积	0.482**	0.756**	0.707**	0.995**	0.976**

a) *和**分别表示热研2号和华占之间的差异在0.05和0.01水平上显著

择性地对这些基因在分蘖期和成熟期双亲间的表达量进行了对比,结果显示于图5。在分蘖期和成熟期,位于FLL/FLW/FLA的QTL重叠区的LOC_Os04g52230, LOC_Os04g44150, LOC_Os12g42020, LOC_Os09g37400在父本HZ中的表达量显著高于母本Nekken2; 而LOC_Os02g52040, LOC_Os03g46610, LOC_Os04g52479在父本HZ中的表达量显著低于母本Nekken2。综上所述, LOC_Os02g52040, LOC_Os03g46610, LOC_Os04g52230, LOC_Os04g44150, LOC_Os09g37400, LOC_Os12g42020, LOC_Os04g52479基因在分蘖期或成熟期双亲中表达量存在显著差异,说明它们有可能参与水稻剑叶形态的调控,影响水稻剑叶的叶长、叶宽和叶面积。

2.4 讨论

水稻的剑叶形态由多个基因控制,其表达受多因素的影响,所以研究过程中水稻的选材不同、生长环境不同、处理方式不同等,都会影响QTL定位的结果。

本实验以水稻剑叶的长、宽和面积作为QTL检测指标,结合实时定量PCR技术,通过分析基因的表达量,来探究调控水稻剑叶形态的可能潜在基因。与前人研究成果比较,本研究的结果在证实了部分先前研究的基础上,也有了新的发现。

Chen等人^[16]在4号染色体标记区间RM17483~RM17486之间74.8 kb内精细定位到了一个调控剑叶宽度的 $qFW4$,与本研究定位到的QTL簇($qFLL4$, $qFLW4$, $qFLA4.2$)区间重叠; Bian等人^[22]在4号染色体标记区间RM3534内检测到了一个调控剑叶宽度和剑叶面积的QTL簇($qFLW4$, $qFLA4$),该区间有克隆的Nal1基因,说明该部分很可能存在一个能调控水稻剑叶宽度和剑叶面积的主效QTL。王德荣等人^[23]在2号染色体标记区间RM6519~RM14172内检测到一个调控剑叶长度的 $qFLL2-2$,该位点与本研究定位到的 $qFLA2$ 区间重叠,推测该部分可能存在一个能调控水稻剑叶长度和剑叶面积的多效位点。刘欣等人^[24]在3号染色体的标记区间RM341~M024内检测到了一个

表 4 水稻剑叶性状QTL定位及效应分析

Table 4 QTL mapping and effect analysis results of flag leaf traits in rice

性状	QTL	染色体	物理区间(bp)	遗传距离(cM)	LOD
分蘖期剑叶长	<i>qFLL2.1</i>	2	31480072~32022924	134.95~137.27	2.79
	<i>qFLL2.2</i>	2	32985884~33437467	141.40~143.34	2.97
	<i>qFLL3.1</i>	3	25648379~28465343	109.95~122.02	3.90
	<i>qFLL3.2</i>	3	28698205~29512289	123.02~126.51	3.18
	<i>qFLL4</i>	4	22019563~34047320	94.39~145.95	6.92
分蘖期剑叶宽	<i>qFLW3</i>	3	1094~1377228	0.00~5.90	4.13
	<i>qFLW4</i>	4	22019563~33965282	94.39~145.60	4.51
	<i>qFLW5</i>	5	7886106~7953781	33.81~34.10	3.21
	<i>qFLW6</i>	6	3168775~3378992	13.58~14.48	3.12
	<i>qFLW7</i>	7	28198009~28343951	120.88~121.50	2.91
	<i>qFLW8.1</i>	8	1430252~1451568	6.13~6.22	3.78
	<i>qFLW8.2</i>	8	21835074~22202508	93.60~95.18	2.59
	<i>qFLW12</i>	12	24319945~26364047	104.25~113.02	3.32
分蘖期剑叶面积	<i>qFLA2</i>	2	35381094~35525300	151.67~152.29	2.58
	<i>qFLA3.1</i>	3	704980~858167	3.02~3.67	3.11
	<i>qFLA3.2</i>	3	25942748~28465343	111.21~122.02	3.91
	<i>qFLA3.3</i>	3	30560981~30635853	131.01~131.33	2.96
	<i>qFLA4.1</i>	4	6679635~6830689	28.63~29.28	2.50
	<i>qFLA4.2</i>	4	21808212~34047320	93.49~145.95	6.37
	<i>qFLA6.1</i>	6	8768115~8917905	37.59~38.23	3.02
	<i>qFLA7</i>	7	28194737~28391395	120.86~121.71	3.14
	<i>qFLA8.1</i>	8	1206235~1531451	5.17~6.56	3.20
	<i>qFLA8.2</i>	8	21758584~22286338	93.27~95.54	3.16
	<i>qFLA12.1</i>	12	25775617~26491119	110.49~113.56	3.22
	<i>qFLA12.2</i>	12	27098731~27516085	116.16~117.95	2.98
成熟期剑叶长	<i>qFLL9</i>	9	20554623~22230863	88.11~95.30	3.67
成熟期剑叶面积	<i>qFLA3.4</i>	3	7648202~7878205	32.79~33.78	2.58
	<i>qFLA3.5</i>	3	6823986~6906793	29.25~29.60	2.65
	<i>qFLA4.3</i>	4	4739169~4886181	20.31~20.94	2.63
	<i>qFLA5</i>	5	26927610~27082669	115.43~116.10	3.75
	<i>qFLA6.2</i>	6	27486058~27581098	117.83~118.23	2.87
	<i>qFLA9.1</i>	9	16630835~16699350	71.29~71.58	2.70
	<i>qFLA9.2</i>	9	18276737~18429327	78.35~79.00	2.74
	<i>qFLA9.3</i>	9	18643272~18938534	80.08~81.18	2.98
	<i>qFLA9.4</i>	9	20416503~22230863	87.52~95.30	4.06

剑叶宽度的QTL位点*qFLW3*, 与本研究定位到QTL簇(*qFLW3*, *qFLA3.1*)区间重叠, 推测该部分可能存在一

个能调控水稻剑叶宽度和剑叶面积的多效QTL. 邓世峰等人^[25]在3号染色体标记区间RM4108~RM523内检

图4 水稻剑叶性状QTL定位图. FLL, 剑叶长; FLW, 剑叶宽; FLA, 剑叶面积

Figure 4 QTL mapping of morphological traits for flag leaf in rice. FLL, flag leaf length; FLW, flag leaf width; FLA, flag leaf area

测到了一个调控水稻抽穗期的 $qHD-3$, 与本研究定位到的QTL簇($qFLW3$, $qFLA3.1$)区间重叠, 推测该部分可能存在一个调控水稻抽穗期、剑叶宽度和剑叶面积的多效QTL. 将本研究与前人的研究成果进行比较, 发现了许多与前人成果相近的QTL簇区间, 证明了本研究所得结果的可靠性, 说明了本研究存在的科学价值.

本研究也得到了许多新的研究成果. 例如, 在4号染色体上, 物理距离为6679635~6830689 bp的区间内定位到一个LOD值为2.50的 $qFLA4.1$, 物理距离为4739169~4886181 bp的区间内定位到一个LOD值为2.63的 $qFLA4.3$, 说明该区间内很可能存在一个影响水稻剑叶面积的主效基因. 另有一个LOD较大的QTL为 $qFLW8.1$, 其LOD值达3.78, 位于第8号染色体上物理距离为1430252~1451568 bp内, 如图4所示. 此外, 4号染色体上的 $qFLL4$, $qFLW4$ 和 $qFLA4.2$ 区间存在重叠,

$qFLA4.2$ 的区间较大, 包含了 $qFLL4$ 和 $qFLW4$ 的区间, 说明在这个区间内很可能存在同时控制水稻剑叶长度、宽度和面积的多效基因.

根据目前的研究发现, 基因LOC_Os02g52040是AP2转录因子SMOS1的下游靶基因, 主要参与细胞周期^[26]. 基因LOC_Os03g46610编码一个温度介导的DEAD-Box RNA解旋酶, 参与水稻耐热生长的调控, 该基因突变的突变体在高温条件下, 株高、根长均降低, 叶片变窄^[27]. 基因LOC_Os04g52479编码一种植物特有的蛋白, 能够影响细胞周期, 参与对植物叶宽和株高的调控^[28], 该基因的突变会导致生长素的极性运输活性显著降低. 基因LOC_Os12g42020编码一种与拟南芥中丝氨酸苏氨酸蛋白激酶同源的蛋白, 可能参与调控生长素的极性运输^[29]. 基因LOC_Os04g52230编码一个内根-贝壳杉烯合酶(ent-kaurene synthase, KS), 主要参与赤霉素生物合成的第二步反应, 起催化作用,

表 5 候选基因的功能

Table 5 The function of candidate gene

染色体	基因名称	功能	调控对象
2	<i>LOC_Os02g52040</i>	参与细胞扩增	AP2转录因子SMOS1
3	<i>LOC_Os03g46610</i>	调控水稻耐热生长	DEAD-Box RNA解旋酶
4	<i>LOC_Os04g52230</i>	与水稻地上部分生长发育相关	内根-贝壳杉烯合酶
4	<i>LOC_Os04g44150</i>	调控水稻生长和株型、分蘖的发生和不定根的生长	赤霉素2氧化酶
4	<i>LOC_Os04g52479</i>	窄叶基因, 影响水稻生长素的极性运输和维管束排列模式	丝氨酸/半胱氨酸蛋白酶
9	<i>LOC_Os09g37400</i>	生长素、盐、细胞分裂素、缺氧处理或氮水平改变都会迅速诱导表达, 是生长素合成和转运的负调节因子, 过表达则植株生长缓慢, 产量降低	生长素上调小RNA基因 <i>SAUR</i>
12	<i>LOC_Os12g42020</i>	<i>PINOID</i> 同源基因, 参与调控水稻生长素的极性运输、形态建成和器官发生的过程	丝氨酸苏氨酸蛋白激酶

图 5 相关基因表达量. A: 分蘖期相关基因在HZ和Nekken2中的表达量; B: 成熟期相关基因在HZ和Nekken2中的表达量. *和**分别表示HZ与Nekken2在0.05和0.01水平上差异显著

Figure 5 Relevant gene expression. A: Expression of related genes at tillering stage in HZ and Nekken2; B: expression of related genes at mature period in HZ and Nekken2. * and ** indicate significant differences between HZ and Nekken2 at 0.05 and 0.01 level, respectively

该基因只在叶片和茎中表达, 与水稻地上部分的生长发育相关^[30]. 基因*LOC_Os04g44150*编码赤霉素GA2氧化酶(gibberellin 2-oxidase, GA2ox), 该酶通过2β-羟基化作用参与赤霉素的分解代谢途径, 主要影响植物的株高^[31]. 基因*LOC_Os09g37400*通过抑制*OsYUCCA*和*OsPIN*基因表达, 影响生长素合成和转运, 进而参与植物生长; 过表达该基因会导致株系矮化, 主根变短, 叶片变窄, 结实率降低等^[32].

在*qFLL2.1*的QTL上包含*LOC_Os02g52040*基因;

在*qFLL3.1*和*qFLA3.1*的QTL上包含*LOC_Os03g46610*基因; 在*qFLL4*的QTL上包含*LOC_Os04g52479*, *LOC_Os04g52230*和*LOC_Os04g44150*基因; 在*qFLL9*和*qFLA9.4*的QTL上包含*LOC_Os09g37400*基因; 在*qFLA12.1*的QTL上包含*LOC_Os12g42020*基因, 这些基因可能参与调控水稻剑叶的相关性状. 采用qRT-PCR技术分析分蘖期和成熟期双亲内各基因的表达量发现, *LOC_Os02g52040*, *LOC_Os03g46610*, *LOC_Os04g52230*, *LOC_Os04g44150*, *LOC_Os04g52479*,

LOC_Os09g37400, *LOC_Os12g42020*这7个基因在双亲间的表达量差异显著. 在分蘖期和成熟期, 基因*LOC_Os04g52230*, *LOC_Os04g44150*, *LOC_Os12g42020*, *LOC_Os09g37400*在父本HZ中的表达量显著高于母本Nekken2, *LOC_Os02g52040*, *LOC_Os03g46610*, *LOC_Os04g52479*在父本HZ中的表达量低于母本Nekken2(图5). 由图3和表3可知, 成熟期父本HZ的剑叶叶长、叶宽、叶面积的大小明显高于母本Nekken2, 将两个数据结果结合起来分析, 可以得出初步结论: *LOC_Os04g52230*, *LOC_Os04g44150*, *LOC_Os09g37400*, *LOC_Os12g42020*这4个基因的高表达可能对促进水稻剑叶增宽增长, 叶面积增大有正向调控作用, 而*LOC_Os02g52040*, *LOC_Os03g46610*, *LOC_Os04g52479*可能抑制剑叶的增宽增长. 上述相关结论有待后续实验进一步验证.

3 结论

本研究发现, 在分蘖期的华占和热研2号间, *LOC_Os02g52040*, *LOC_Os03g46610*, *LOC_Os04g52230*, *LOC_Os04g44150*, *LOC_Os04g52479*, *LOC_Os09g37400*和*LOC_Os12g42020*这7个基因的表达量差异显著; 在成熟期的华占和热研2号间, *LOC_Os02g52040*, *LOC_Os03g46610*, *LOC_Os04g52230*, *LOC_Os04g44150*, *LOC_Os09g37400*和*LOC_Os12g42020*这6个基因的表达量差异显著, 说明这些基因可能与水稻剑叶形态的调控机制有关, 是导致华占和热研2号剑叶叶长、叶宽、叶面积差异的原因之一. 本研究挖掘了与调控水稻剑叶形态相关的QTL位点, 进一步证实了相关候选基因的功能, 为优良株型的水稻育种提供了一些新的理论依据和方法技术.

参考文献

- Zhang X F, Wang D Y, Fang F P, et al. China's food security and rice production (in Chinese). *Res Agric Modern*, 2005, 26: 85–88 [章秀福, 王丹英, 方福平, 等. 中国粮食安全和水稻生产. 农业现代化研究, 2005, 26: 85–88]
- Deng N, Grassini P, Yang H, et al. Closing yield gaps for rice self-sufficiency in China. *Nat Commun*, 2019, 10: 1725
- Li Z, Pinson S R M, Stansel J W, et al. Genetic dissection of the source-sink relationship affecting fecundity and yield in rice (shape *Oryza sativa* L.). *Mol Breeding*, 1998, 4: 419–426
- Zhang B. QTL analysis of morphological and yield-related characters of rice swordleaf under different conditions (in Chinese). Dissertation for Master's Degree. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2014 [张斌. 不同环境下水稻剑叶形态与产量相关性状的QTL分析. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院, 2014]
- Zou D T, Wang J, Wang J G, et al. Gene mapping analysis of leaf morphology and yield per plant in rice (in Chinese). *J Northeast Agric Univ*, 2014, 45: 23–28 [邹德堂, 王晋, 王敬国, 等. 水稻剑叶形态与单株产量的基因定位分析. 东北农业大学学报, 2014, 45: 23–28]
- Zhang L, Li X N, Wang W, et al. QTL analysis of related traits of rice plant type (in Chinese). *J Crop*, 2014, 40: 2128–2135 [张玲, 李晓楠, 王伟, 等. 水稻株型相关性状的QTL分析. 作物学报, 2014, 40: 2128–2135]
- Gao S J. Studies on upright panicle type rice (in Chinese). Dissertation for Doctoral Degree. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 1999 [高士杰. 直立穗型水稻的研究. 博士学位论文. 沈阳: 沈阳农业大学, 1999]
- Yan S, Yan C J, Gu M H. Molecular mechanism of leaf development. *Hereditas (Beijing)*, 2008, 30: 1127–1135
- Xu J, Wang L, Qian Q, et al. Research progress on molecular regulation mechanism of morphological formation in rice leaves (in Chinese). *J Crop*, 2013, 39: 767–774 [徐静, 王莉, 钱前, 等. 水稻叶片形态建成分子调控机制研究进展. 作物学报, 2013, 39: 767–774]
- Fujino K, Matsuda Y, Ozawa K, et al. NARROW LEAF 7 controls leaf shape mediated by auxin in rice. *Mol Genet Genomics*, 2008, 279: 499–507
- Qi J, Qian Q, Bu Q, et al. Mutation of the rice *narrow leaf1* gene, which encodes a novel protein, affects vein patterning and polar auxin transport. *Plant Physiol*, 2008, 147: 1947–1959
- Hu J, Zhu L, Zeng D, et al. Identification and characterization of NARROW AND ROLLED LEAF 1, a novel gene regulating leaf morphology and plant architecture in rice. *Plant Mol Biol*, 2010, 73: 283–292
- Wang H, Deng X W. Development of the “Third-Generation” hybrid rice in China. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2018, 16: 393–396
- Tagle A G, Fujita D, Ebron L A, et al. Characterization of QTL for unique agronomic traits of new-plant-type rice varieties using introgression lines of IR64. *Crop J*, 2016, 4: 12–20

- 15 Wang P, Zhou G, Cui K, et al. Clustered QTL for source leaf size and yield traits in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Breeding*, 2012, 29: 99–113
- 16 Chen M, Luo J, Shao G, et al. Fine mapping of a major QTL for flag leaf width in rice, *qFLW4*, which might be caused by alternative splicing of *NALI*. *Plant Cell Rep*, 2012, 31: 863–872
- 17 Jiang S, Zhang X, Wang J, et al. Fine mapping of the quantitative trait locus *qFLL9* controlling flag leaf length in rice. *Euphytica*, 2010, 176: 341–347
- 18 Marathi B, Guleria S, Mohapatra T, et al. QTL analysis of novel genomic regions associated with yield and yield related traits in new plant type based recombinant inbred lines of rice (*Oryza sativa* L.). *BMC Plant Biol*, 2012, 12: 137
- 19 Zhan X, Sun B, Lin Z, et al. Genetic mapping of a QTL controlling source-sink size and heading date in rice. *Gene*, 2015, 571: 263–270
- 20 McCouch S R, Cho Y G, Yano M, et al. Report on QTL nomenclature. *Rice Genet Newsl*, 1997, 14: 11–13
- 21 Wang L. Analysis and gene mapping of leaf shape characters in early senility and late growth stage of rice (in Chinese). Dissertation for Master's Degree. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2014 [王兰. 水稻叶片早衰及生育后期叶形性状分析与基因定位. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院, 2014]
- 22 Bian J M, He H H, Shi H, et al. Quantitative trait loci mapping for flag leaf traits in rice using a chromosome segment substitution line population. *Plant Breeding*, 2014, 133: 203–209
- 23 Wang D R. Construction of genetic map of wild rice and QTLs localization of main agronomic traits (in Chinese). Dissertation for Master's Degree. Yangzhou: Yangzhou University, 2017 [王德荣. 长雄蕊野生稻遗传图谱的构建及主要农艺性状QTLs定位. 硕士学位论文. 扬州: 扬州大学, 2017]
- 24 Liu X, Wang J, Zeng W, et al. Preliminary localization analysis of QTLs for four agronomic traits in rice (in Chinese). *Genomics Appl Biol*, 2014, 33: 604–609 [刘欣, 王君, 曾伟, 等. 水稻4种农艺性状QTL的初步定位分析. 基因组学与应用生物学, 2014, 33: 604–609]
- 25 Deng S F. Construction of chromosome fragment substitution lines and QTL analysis of important agronomic traits in rice with the background of Hua Zhan (in Chinese). Dissertation for Master's Degree. Yangzhou: Yangzhou University, 2017 [邓世峰. 以华占为背景的水稻染色体片段代换系的构建及重要农艺性状的QTL分析. 硕士学位论文. 扬州: 扬州大学, 2017]
- 26 Aya K, Hobo T, Sato-Izawa K, et al. A novel AP2-type transcription factor, SMALL ORGAN SIZE1, controls organ size downstream of an auxin signaling pathway. *Plant Cell Physiol*, 2014, 55: 897–912
- 27 Wang D, Qin B, Li X, et al. Nucleolar DEAD-box RNA helicase *TOGR1* regulates thermotolerant growth as a pre-rRNA chaperone in rice. *PLoS Genet*, 2016, 12: e1005844
- 28 Jiang D, Fang J, Lou L, et al. Characterization of a null allelic mutant of the rice *NALI* gene reveals its role in regulating cell division. *PLoS ONE*, 2015, 10: e0118169
- 29 Morita Y, Kyojuka J. Characterization of *OsPID*, the rice ortholog of *PINOID*, and its possible involvement in the control of polar auxin transport. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48: 540–549
- 30 Margis-Pinheiro M, Zhou X R, Zhu Q H, et al. Isolation and characterization of a Ds-tagged rice (*Oryza sativa* L.) GA-responsive dwarf mutant defective in an early step of the gibberellin biosynthesis pathway. *Plant Cell Rep*, 2005, 23: 819–833
- 31 Huang J, Tang D, Shen Y, et al. Activation of gibberellin 2-oxidase 6 decreases active gibberellin levels and creates a dominant semi-dwarf phenotype in rice (*Oryza sativa* L.). *J Genet Genomics*, 2010, 37: 23–36
- 32 Xu Y X, Xiao M Z, Liu Y, et al. The small auxin-up RNA *OsSAUR45* affects auxin synthesis and transport in rice. *Plant Mol Biol*, 2017, 94: 97–107

QTL mapping and analysis of candidate genes in flag leaf morphology in rice

WANG Sheng¹, YE HanFei¹, LI SanFeng², JIANG JiaJi¹, ZHANG Yue¹, PAN ChenYang¹,
ZHOU WeiYong³, CHEN WeiXian¹, WANG KeXin¹, DAI GaoXing³, FANG Yuan¹,
RAO YuChun¹ & WANG YueXing²

1 College of Chemistry and Life Science, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China;

2 State Key Laboratory of Rice Biology, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China;

3 Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530000, China

Leaf is an important organ of rice, and it is the main place for photosynthesis. Leaf morphology related traits such as leaf length, leaf width and leaf area can directly affect leaf photosynthetic efficiency. The study of quantitative trait loci (QTL) sites for morphological characters of rice flag leaf and the improvement of morphological characters of rice flag leaf by means of genetic breeding can provide theoretical basis for the cultivation of ideal plant type rice. In this study, an indica rice variety HZ was used as the male parent, and a japonica rice variety Nekken2 was used as the female parent. After F1 generation was obtained by cross-breeding, 120 recombinant inbred lines (RIL populations) were obtained from successive generations of self-crossing, which were used as experimental materials in this study. Leaf length, leaf width, leaf area of rice at tillering stage and mature stage were studied and analyzed after incubation under the same and appropriate conditions. At the same time, the genetic map was constructed by using the RIL population to locate the QTLs for the traits of leaf length, leaf width and leaf area in rice at tillering stage and mature stage, 35 QTLs related to leaf morphology were detected. There were 6 QTLs related to blade length (5 at tillering stage, 1 at maturation stage), LOD value of one of them was as high as 6.92; 8 QTLs related to blade width (detected only at tillering stage), LOD value of one was as high as 4.51; 21 QTLs related to blade area (12 at tillering stage, 9 at mature stage), LOD values of two of them were as high as 6.37 and 4.06 respectively. Through quantitative analysis of the candidate genes related to leaf length, leaf width and leaf area in these QTL regions, it was found that *LOC_Os02g52040*, *LOC_Os03g46610*, *LOC_Os04g52230*, *LOC_Os04g42230*, *LOC_Os04g44150*, *LOC_Os04g52479*, *LOC_Os09g37400* and *LOC_Os12g42020* were significantly different in expression levels between the parents. Combined with the data of leaf length, leaf width and leaf area of the parents, we speculated that The high expressions of *LOC_Os04g52230*, *LOC_Os04g44150*, *LOC_Os09g37400* and *LOC_Os12g42020* may promote the growth of leaf width and leaf area, while the high expressions of *LOC_Os02g52040*, *LOC_Os03g46610* and *LOC_Os04g52479* may inhibit the growth of rice flag leaves. Through the analysis of QTL in this study, QTL regulating leaf length, leaf width and leaf area of rice flag leaf were excavated, which provided a reference for cultivating new rice varieties with excellent plant type.

rice, flag leaf, leaf morphology, QTL localization, SNP

doi: [10.1360/SSV-2020-0375](https://doi.org/10.1360/SSV-2020-0375)