DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.02088

水稻苗期根部性状的遗传分析和最长根长 QTL *qLRL4* 的精细定位

田彪 丁仕林 刘朝雷 阮班普 姜洪真 郭锐 董国军
胡光莲 郭龙彪 钱前 高振宇*

中国水稻研究所, 浙江杭州 310006

摘要: 为了解析水稻苗期根系相关性状的遗传调控, 以籼稻 9311 和粳稻日本晴(Nipponbare, NPB)为亲本的 148 个株系构成的重组自交系群体为材料, 对水稻幼苗根系相关性状开展 QTL 分析。在 2 次重复中共检测到 26 个控制最长根长、总根长、根表面积、根体积和根直径的 QTL, 分布在水稻第 1、2、4、7、9、10、11 号共 7 条染色体上, 发现了水稻第 2、4、7 和 10 号染色体上的 4 个 QTL 簇, 包括第 4 号染色体上控制最长根长的 QTL *qLRL4*。为了精细定位该 QTL, 我们构建了以 9311 为背景、插入缺失标记 IND4-1 和 IND4-4 间来自 NPB 的近等系 NIL-*qLRL4*。利用 NIL-*qLRL4* 和 9311 构建的 F₂ 群体, 最终将 *qLRL4* 精细定位在标记 IND4-1 和 IND4-3 之间约 68.23 kb 的区间内并预测了候选基因。此根长 QTL 的精细定位将有助于水稻根长遗传机理的研究, 为探究水稻根系形态建成的分子机制奠定了基础。

关键词: 水稻; 根部性状; 最长根长; *qLRL4*; 精细定位

Genetic analysis of seedling root traits and fine mapping of the QTL *qLRL4* for the longest root length in rice

TIAN Biao, DING Shi-Lin, LIU Chao-Lei, RUAN Ban-Pu, JIANG Hong-Zhen, GUO Rui, DONG Guo-Jun, HU Guang-Lian, GUO Long-Biao, QIAN Qian, and GAO Zhen-Yu*

China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, Zhejiang, China

Abstract: In order to analyze the genetic basis of root traits at seedling stage, we performed QTL analysis of root morphology with 148 recombinant inbred lines derived from *indica* variety 9311 and *japonica* variety Nipponbare (NPB). In two repetitions, a total of 26 QTLs were detected for the longest root length, total root length, root surface area, root volume, and root diameter, distributed on chromosomes 1, 2, 4, 7, 9, 10, and 11 in rice. Four QTL clusters on chromosomes 2, 4, 7, and 10 were found, including a major QTL *qLRL4* controlling the longest root length. To fine mapping of the major QTL, we constructed a near isogenic line NIL-*qLRL4* with a segment from NPB between markers IND4-1 and IND4-4 with 9311 background. With a F₂ population derived from the NIL-*qLRL4* and 9311, we fine mapped the *qLRL4* within ~68.23 kb region between markers IND4-1 and IND4-3, where eight candidate genes located. Fine mapping of this QTL for root length will help explore genetic mechanism of root elongation and morphogenesis in rice.

Keywords: rice; root trait; the longest root length; *qLRL4*; fine mapping

水稻是人类最主要的粮食作物之一^[1], 而根系作为水稻主要的器官, 具有固定水分、吸收养分、合成与分泌激素、酶和有机酸等功能^[2]。虽然根系研究与其他性状相比相对薄弱^[3], 但是植物学家对

根系相关性状已开展了大量遗传研究。徐吉臣等^[4]以窄叶青 8 号和京系 17 的 F₁ 代花培加倍的 127 个双单倍体(double haploid, DH)群体为材料, 测定了营养液培养条件下亲本及 DH 株系的最大根长、根

本研究由国家自然科学基金项目(32061143039, 31671761)资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (32061143039, 31671761).

* 通信作者(Corresponding author): 高振宇, E-mail: gaozhenyu@caas.cn, Tel: 0571-63370211

第一作者联系方式: E-mail: 82101186057@caas.cn, Tel: 0571-63370483

Received (收稿日期): 2020-12-13; Accepted (接受日期): 2021-03-19; Published online (网络出版日期): 2021-04-13.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20210413.1521.006.html>

干重和根茎干重比, 检测到 4 个最大根长 QTL, 分别位于第 2、4、9、10 号染色体; 检测到水稻第 2 号染色体的 1 个根干重 QTL; 根茎干重比共检测到 3 个 QTL, 分别位于第 3、5、6 号染色体上。滕胜等^[5]和胡兴明等^[6]也用相同群体进行了根部性状的 QTL 分析。前者在抽穗期对根系活力进行 QTL 分析, 在第 4 号染色体的分子标记 RG449 和 RG809 间检测到 1 个 QTL (*qRV4*)。后者对水稻苗期发根力进行了 QTL 和上位性分析, 在水稻第 3 号染色体的 C63~CT125 之间检测到 1 个发根力主效 QTL; 同时检测到影响水稻发根力的 5 对上位性效应基因座, 分别位于第 2、3、5、6、7、12 号染色体上, 其中影响根长和根数的上位性效应各有 2 对 QTL, 有一对 QTL 同时影响根长和根数。迄今, 国内外科学家已定位了多个水稻根长相关 QTL。Mitsuhiro 等^[7]用粳稻品种 Koshihikari 和籼稻品种 Kasalath 杂交和回交得到的 38 个染色体片段替代系(CSSL)检测生长在 $5\ \mu\text{mol L}^{-1}$ 或 $500\ \mu\text{mol L}^{-1}\ \text{NH}_4^+$ 中的水稻幼苗根长 QTL, 共检测到 8 个 QTL, 分别位于第 1、2、4、6、8、11 和 12 号染色体, 并将 6 号染色体的根长主效 QTL *qRL6.1* 精细定位在长臂 337 kb 区间内。王汝慈等^[8]利用协青早 B 与中恢 9308 杂交构建的 RIL 群体在水稻第 4 号染色体长臂的分子标记 RM307 与 RM1205 之间定位到一 QTL 簇, 控制不同时期的相对根长、相对根冠比、相对根干质量等性状, 其中包括控制水稻根长的主效 QTL——*qRL4*。Obara 等^[9]以水稻 WAB56-104 和 NERICA7 品系的杂交 F_2 群体为材料, 在高 NH_4^+ 环境下于水稻第 1 号染色体检测到 2 个水稻根长相关 QTL, 分别命名为 *qRL1.3-NERICA7* 和 *qRL1.4-NERICA7*, 其中 *qRL1.4-NERICA7* 的定位区间进一步缩小至 0.7 Mb。Kitomi 等^[10]为了鉴定与水稻最大根长相关的基因组区间, 用来自 IR64 和 KinandangPatong 间杂交回交得到的 26 个 CSSL 进行 QTL 分析, 得到 2 个最大根长 QTL: 2 号染色体的 *qRO1* 和 6 号染色体的 *qRO2*。将 *qRO1* 精细定位在 SSR 标记 RM5651 和 RM6107 之间的 1.7 Mb 区间, 将 *qRO2* 定位在 SSR 标记 RM20495 和 RM3430-1 之间 884 kb 的区间。到目前为止, 科学家已成功克隆了一些控制水稻根系性状的基因^[11-12], 如 *Srt5*^[13]和 *OsSPR1*^[14]基因调控水稻根长, *CRL1*^[15]基因影响冠状根的发生和不定根的形成, *ARL1*^[16]基因影响不定根的形成, *WOX11*^[17]基因促进冠根的

起始和伸长, *REL2*^[18]和 *OsWRKY74*^[19]基因影响不定根的数目和长度, *SRT6*^[20]基因抑制初生根的发育, *LRT2*^[21]基因控制侧根发生。为了深入了解水稻根系性状的遗传基础, 我们以 9311 和日本晴 (Nipponbare, NPB) 构建的重组自交系 (recombinant inbred lines, RIL) 群体为材料, 利用水培技术和数量遗传学手段对水稻根系性状相关 QTL 进行了分析和鉴定。

1 材料与方法

1.1 试验材料

研究采用籼稻品种 9311 和粳稻品种 NPB 杂交获得的 148 个株系构成的 RIL 群体。我们选择了 *qLRL4* 区域具有 NPB 基因型的 RIL 与亲本 9311 回交, 并在插入缺失 (InDel) 标记 IND4-1 和 IND4-4 之间选择目标 QTL 区域携带 NPB 纯合等位基因的近等基因系 (near isogenic lines, NIL) NIL-*qLRL4*。

1.2 试验方法

在黑暗条件下, 水稻种子于 37°C 去离子水中浸泡 2 d, 然后转移至漂浮在去离子水上的网格, 培养 3 d。将幼苗培养在正常浓度的 Kimura B 营养液中 (pH 5.4), 每 3 d 更换一次营养液。然后, 将幼苗转移至 30°C 温室中培养 21 d, 用尺子测量 5 株幼苗的主根长, 然后用 i800 扫描仪扫描总根长, 用 LA-S 根分析系统 (万深, 中国杭州) 进行分析。用亚甲基蓝比色法 (Leagene, 中国北京) 测定根系活性 (总吸收面积和比表面积), 每 3 株幼苗为 1 次重复, 3 个重复, 总体进行 2 次重复实验, 记为重复 I (Repeat I) 和重复 II (Repeat II)。

用均匀分布于水稻 12 条染色体的 166 个在 9311 和 NPB 之间存在多态的 SSR 和 STS 标记构建了 RIL 群体的遗传连锁图谱。使用 MultiQTL 软件 (www.multiqtl.com) 对 RIL 群体采用最大似然区间映射方法进行 QTL 分析, 根据每个数据集的排列测试 (1000 个排列, $P=0.05$) 获得 LOD 阈值。根据 McCouch 等^[22]的方法命名 QTL。利用 Microsoft Excel 软件分析根部形状的表型值与频数分布, 并绘制相关图表; 利用 IBM SPSS Statistics 24 软件进行显著性差异检验和相关性分析。

通过近等系 NIL-*qLRL4* 与 9311 的杂交和自交, 构建了用于精细定位的 830 个植株构成的 F_2 群体, 测量了单株根长表型, 在已定位的 *qLRL4* 区间内开发了 4 个 InDel 标记 (表 1) 检测单株基因型, 用于 *qLRL4* 的精细定位。

表 1 *qLRL4* 精细定位的 InDel 标记引物
Table 1 Primers of InDel markers for fine mapping of *qLRL4*

分子标记 Marker	正向引物 Forward primer (5'–3')	反向引物 Reverse primer (5'–3')
IND4-1	TTGGCAGGTAGAGTCCAAAGG	TGGCTTAAGAGACGTCCCTAAC
IND4-2	TGCCCTGGAAGTATAAGGATG	ATGTCTGCATACCAGAACAAAAG
IND4-3	GCGACCACATAAATACTGTTG	AGGTGGGACTATATATTAATGG
IND4-4	AGTTGTTATTTCATCGCCATCGG	TGATATACCCGAGACCAAAAGTAGC

采用 Axygen 公司的 AxyPrep 总 RNA 小量制备试剂盒(AP-MD-MS-RNA-50)提取 9311、NPB 和 NIL-*q LRL4* 的根部 RNA 并使用 TOYOBO 公司的 cDNA 逆转录试剂盒(fsq-101)反转录得到 cDNA 后,用候选基因引物和内参 *Histone H3* 引物(表 2)在 ABI7900HT Real-time PCR 仪上对样品的候选基因表达量进行相对定量检测。

表 2 候选基因实时定量 PCR 引物
Table 2 Primers of candidate genes and reference for qRT-PCR

基因 Gene	正向序列 Forward primer (5'–3')	反向序列 Reverse primer (5'–3')
<i>LOC_Os04g58870</i>	AATCACTTGAGCAAGCTCTTGG	ATGCAAACATGCACAATGCAG
<i>LOC_Os04g58880</i>	AAGAGCTGCGGTCAAAGAGAG	ACTCACGCAACTCCGTATCTGG
<i>LOC_Os04g58890</i>	TCGTCGCCGACAGGGTG	AGGTCGGTCCCCTCCTCG
<i>LOC_Os04g58900</i>	ACGTATGATTTCCTGTTGATGTG	ACCTCATCTTCCTCCCAAGTAAATC
<i>LOC_Os04g58910</i>	AGAAATGGAAGCCTGTGAACGAC	TCATGCTGGCCTCTGCGTC
<i>LOC_Os04g58920</i>	AGCTGTGCGTGGTGGCGC	CTGCAAGCAGGGCGAGTTCC
<i>LOC_Os04g58940</i>	AGGCTCTTCGGCTACCTGC	ATCAGCTCATCCCCATCACC
<i>LOC_Os04g58960</i>	AGCAGATGACCAATGGTGGG	TGGTTGTGGGTGAGCTAGAAC
<i>Histone H3</i>	GGTCAACTTGTTGATTCCCCTCT	AACCGCAAAATCCAAAGAACG

2 结果与分析

2.1 9311、NPB 及其 RIL 群体的根系性状

亲本 9311 和 NPB 之间的根系形态存在显著差异(表 3 和图 1)。9311 的最长根长(the longest root length, LRL)、总根系长(total root length, TRL)、根表面积(root surface area, RSA)、根体积(root volume, RV)和根直径(root diameter, RD)均显著大于 NPB。考察 9311 和 NPB 构建的 RIL 群体的最长根长、总根系长、根表面积、根体积和根直径这 5 个性状,统计 2 次重复的平均值,最长根长为 14.8 cm 和 14.3 cm,总根系长为 296.35 cm 和 331.61 cm,根表面积为 25.26 cm² 和 25.62 cm²,根体积为 0.22 cm³ 和 0.26 cm³,根直径为 0.25 mm 和 0.23 mm。RIL 的 5 个性状与两亲本相比,最长根长和平均直径均小于两亲本。RIL 的平均总根系长、根表面积和根体积介于 NPB 和 9311 之间(表 4)。在 2 次重复中,5 个根系性状在 RIL 群体中均呈连续正态分布(图 2),且大部分呈现出明显的超亲分离,表明这些性状由多基因控制,适合进行 QTL 分析。2 次重复之间比较后发现,

重复 I 和重复 II 的最长根长、根表面积和根体积的分布范围基本一致。然而,重复 I 的总根长和平均直径的变化范围大于重复 II。

2.2 RIL 群体各根系性状间的相关性分析

将 RIL 群体各根系性状进行相关性分析发现(表 5),在重复 I 中,最长根长与总根系长、根表面积、根体

图 1 9311 和 NPB 在营养液中培养 21 d 的根系形态
Fig. 1 Root morphology of 9311 and NPB cultured in nutrient solution for 21 days
NPB: 日本晴; 标尺为 3 cm。NPB: Nipponbare; Bar: 3 cm.

积均呈显著正相关, 相关系数为 0.359~0.399, 与根直径没有显著相关性。总根系长与根表面积和根体积的相关系数为 0.946 和 0.859, 远大于与最长根长和根直径的 0.359 和 0.408。同样, 根表面积与根体积间具有显著相关性。总的来说, 这 5 个性状, 最长根长与根直径没有显著的相关性, 其他性状之间都存在显著正相关。而在重复 II 中, 最长根长与其他 4 个性状间均无明显相关性, 其他性状相互之间都存在显著正相关。

2.3 RIL 群体根系性状的 QTL 分析

利用一些 SSR 和 STS 标记引物进行 QTL 定位(表 6), 然后对 9311 和 NPB 构建的 RIL 群体的最长根长、总根系长、根表面积、根体积和根直径这 5 个性状进行 QTL 分析(图 3 和表 7)。重复 I 共检测到 15 个 QTL, 分布在水稻第 1、2、4、7、10 和 11 染色体上。控制最长根长的 QTL 有 3 个, 分布在第 1、

4 和 10 号染色体, 变异贡献率幅度为 4.8%~10.3%。其中, 贡献率超过 5% 的位点有 2 个: *qLRL1* 和 *qLRL10*, 贡献率分别为 10.3% 和 6.3%, 前者效应来自 NPB, 后者效应来自 9311。我们检测到控制总根系长的 QTL 4 个, 分布在水稻第 1、2、7 和 11 号染色体上, LOD 值为 2.92~8.47。这些 QTL 的表型变异贡献率均超过 5%, 幅度为 7.8%~42.5%。*qTRL1* 的效应来自 NPB, 其余 3 个 QTL 的效应来自 9311。控制根表面积的 QTL 有 3 个, 分布于水稻第 2、7 和 11 号染色体, 3 个 QTL 的表型变异贡献率均超过 5%。控制根体积的 QTL 有 4 个, 分布于水稻第 2、7、10 和 11 号染色体, 贡献率(除 *qRV10* 外)都超过 5%。控制根直径的 QTL 有 2 个, 分布在水稻第 1 和 4 号染色体, 这 2 个 QTL 的贡献率均超过 5%。*qRD1* 的效应来自 9311, *qRD4* 的效应来自 NPB。

图 2 在 2 次重复中 9311 和 NPB 构建的 RIL 群体 5 个根系性状的频数分布

Fig. 2 Frequency distribution of five root traits in the RIL population from 9311 and NPB in two repetitions

NPB: 日本晴; 倒三角指示亲本的平均值; LRL: 最长根长; TRL: 总根系长; RSV: 根表面积; RV: 根体积; RD: 根直径。

NPB: Nipponbare; the inverted triangle indicates the average value of the parent. LRL: the longest root length; TRL: total root length; RSV: root surface area; RV: root volume; RD: root diameter.

表 3 9311 和 NPB 的根系性状

Table 3 Root traits of 9311 and NPB

重复	品种	最长根长	总根系长	根表面积	根体积	根直径
Repeat	Variety	LRL (cm)	TRL (cm)	RSA (cm ²)	RV (cm ³)	RD (mm)
I	9311	17.3 ± 0.4**	331.38 ± 30.07**	34.23 ± 3.93**	0.36 ± 0.05**	0.32 ± 0.01**
	NPB	15.9 ± 0.8	253.08 ± 36.76	27.33 ± 1.65	0.20 ± 0.06	0.25 ± 0.03
II	9311	17.9 ± 0.5**	360.36 ± 31.64**	34.46 ± 0.99**	0.37 ± 0.01**	0.33 ± 0.01**
	NPB	15.6 ± 0.6	277.22 ± 28.44	24.44 ± 2.27	0.21 ± 0.02	0.26 ± 0.01

NPB: 日本晴; 值表示均值 ±SD; **表示达 0.01 显著水平差异。LRL: 最长根长; TRL: 总根系长; RSV: 根表面积; RV: 根体积; RD: 根直径。
NPB: Nipponbare; values represent means ± SD; ** indicates significant difference at the 0.01 probability level. LRL: the longest root length; TRL: total root length; RSV: root surface area; RV: root volume; RD: root diameter.

表 4 RIL 群体的根系性状

Table 4 Root traits of RIL population

重复	统计参数	最长根长	总根系长	根表面积	根体积	根直径
Repeat	Parameter	LRL (cm)	TRL (cm)	RSA (cm ²)	RV (cm ³)	RD (mm)
I	均值 Mean	14.8	296.35	25.26	0.22	0.25
	标准差 SD	2.3	86.90	7.40	0.08	0.04
	变幅 Range	8.9–24.0	132.88–562.92	9.26–45.12	0.06–0.45	0.15–0.34
	偏度 Skewness	0.50	0.85	0.40	0.31	–0.44
	峰度 Kurtosis	0.90	0.72	–0.09	–0.27	–0.08
II	均值 Mean	14.3	331.61	25.62	0.26	0.23
	标准差 SD	2.9	57.19	7.27	0.08	0.07
	变幅 Range	8.9–24.0	186.30–481.50	9.82–45.33	0.09–0.62	0.08–0.59
	偏度 Skewness	0.39	0.01	0.39	0.62	0.85
	峰度 Kurtosis	0.24	0.03	–0.08	1.45	3.53

LRL: 最长根长; TRL: 总根系长; RSV: 根表面积; RV: 根体积; RD: 根直径。
LRL: the longest root length; TRL: total root length; RSV: root surface area; RV: root volume; RD: root diameter.

表 5 RIL 群体根系性状间的相关系数

Table 5 Correlation coefficients among root traits of RIL population

重复	性状	最长根长	总根系长	根表面积	根体积
Repeat	Trait	LRL (cm)	TRL (cm)	RSA (cm ²)	RV (cm ³)
I	总根系长 TRL	0.359**			
	根表面积 RSA	0.399**	0.946**		
	根体积 RV	0.365**	0.859**	0.975**	
	根直径 RD	0.011	0.408**	0.571**	0.671**
II	总根系长 TRL	0.041			
	根表面积 RSA	0.030	0.684**		
	根体积 RV	0.043	0.749**	0.831**	
	根直径 RD	0.084	0.799**	0.737**	0.914**

** 表示 0.01 显著水平相关。LRL: 最长根长; TRL: 总根系长; RSV: 根表面积; RV: 根体积; RD: 根直径。
** indicates significant difference at the 0.01 probability level. LRL: the longest root length; TRL: total root length; RSV: root surface area; RV: root volume; RD: root diameter.

表 6 QTL 定位的 SSR 和 STS 标记引物

Table 6 SSR and STS primers of markers for QTL mapping

分子标记	正向引物	反向引物
Marker	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (5'–3')
M1-2	ACAATTGGAGCAAGAAAGA	CTTGTCGCAGTACAGTTTGT
M1-4	AACATCGAGAATGTGAATCC	TGCTGATTTCGTATAGCTTTG
M1-16	AGAGAGCTGTACCAAAGCTG	TACATCATATGCCACCAAAC

(续表 6)

分子标记 Marker	正向引物 Forward primer (5'-3')	反向引物 Reverse primer (5'-3')
M1-18	CCTAAATGACAAAGTTTGGG	TGTTTGGACTTAGAAATCTCG
M1-19	TTTCCATGGCTATTGCTAAC	ATCTTGGGGATCATGAATTG
M1-20	TGCATTTATGCATCTACTGG	TCACTGCATTTGCAAGTTAC
M1-21	AAGATGATGAGGTTTCATTGG	TATACGACGTGGCTGTATCA
M1-22	GATGTCACCTTAGCGGTAGC	AAAATTTTCTTTCTCGAGGG
M2-10	TGCTGCTTCTGTCCAGTGAG	GGATCATAACAAGTGCCTCG
M2-13	ACAAGGAAATCCAAAAGCTG	CTTCTTCAAAAATTGACGGT
M2-14	GTAGCAGAAACCAATGCTC	ATTGCGATAAATATGGACT
M4-10	AAAGAAGAAGATGAGTCCCC	AGACATATTCCTGCTGTTG
M4-13	AATTGGAGCTAGTAGTTGGCT	AGCGAAGTAAACAAGAGCTG
M7-1	TATGTCCTTAGCATGGAAGACC	CGTTGTTGATCATCTGGTACG
M7-3	GTCCATGCATCCATCTCTAG	ACGGAAGGAATACGTCTGTA
M9-7	GATTAATTAAGGAAAAAGTTACACA	TTTAAGAAACACAGTCCATAACA
M9-10	CTCGTTTATTACCTACAGTACC	CTACCTCCTTTCTAGACCGATA
M10-4	TTTGTACTGTGAGTGCCAAG	AACACCCAACTTGTGAAAC
M10-7	AATGGTGCATATTTAATGGG	ATTGTTTGTTCCTTGTTGG
M11-2	TTGTCAGGAACAACCTTAGC	ACCGAGCCTAGCAACTTAG
M11-6	CGCTTGAAAGGACTCCAGAC	CCATCTACTACCAAACGTTC
M11-9	CGGCATGTCATGGACTACG	CAGGAAATCTGTAACCAGAGG
M11-11	TGAACCTGCTCTTCTGAGTC	AAAGAAGATATGAAGGCACCG
M11-13	TGCTTGATCTGTGTTCTGCTC	TAGCAGCACCAGCATGAAAG

表 7 RIL 群体的根系性状 QTL

Table 7 QTLs for root traits in the RIL population

重复 Repeat	性状 Trait	染色体 Chromosome	QTL	LOD	P 值 P-value	分子标记 Marker	遗传位置 Genetic position (cM)	贡献率 PEV (%)	加性效应 Additive effect
I	最长根长 LRL	1	<i>qLRL1</i>	2.30	0.01	M1-16-M1-19	173.3-188.0	10.3	-1.48
		4	<i>qLRL4</i>	2.38	0.01	M4-10-M4-13	161.1-190.6	4.8	1.47
		10	<i>qLRL10</i>	2.33	0.01	M10-4-M10-7	15.2-43.4	6.3	1.16
	总根系长 TRL	1	<i>qTRL1</i>	4.62	0.01	M1-20-M1-22	224.4-256.0	42.5	-102.52
		2	<i>qTRL2</i>	12.92	0.01	M2-10-M2-13	153.9-178.1	17.0	64.91
		7	<i>qTRL7</i>	5.84	0.01	M7-1-M7-3	0.0-18.6	9.1	47.36
		11	<i>qTRL11</i>	8.47	0.01	M11-11-M11-13	126.5-136.0	7.8	43.95
	根表面积 RSA	2	<i>qRSA2</i>	4.59	0.01	M2-10-M2-13	153.9-178.1	15.7	5.67
		7	<i>qRSA7</i>	3.60	0.01	M7-2-M7-4	18.6-62.2	17.7	6.03
		11	<i>qRSA11</i>	3.19	0.01	M11-9-M11-13	92.0-136.0	7.1	3.81
	根体积 RV	2	<i>qRV2</i>	3.49	0.01	M2-10-M2-13	153.9-178.1	11.3	0.05
		7	<i>qRV7</i>	3.27	0.01	M7-2-M7-4	18.6-62.2	15.9	0.06
		10	<i>qRV10</i>	2.37	0.01	M10-4-M10-7	15.2-43.4	4.6	0.03
		11	<i>qRV11</i>	3.77	0.01	M11-2-M11-6	24.1-41.2	9.4	0.05
	根直径 RD	1	<i>qRD1</i>	4.38	0.01	M1-2-M1-4	15.1-49.3	8.7	0.02
		4	<i>qRD4</i>	4.04	0.01	M4-10-M4-13	161.1-190.6	26.3	-0.04
II	最长根长 LRL	4	<i>qLRL4</i>	2.03	0.04	M4-10-M4-13	161.1-190.6	8.3	1.99
	总根系长 TRL	1	<i>qTRL1</i>	13.53	0.01	M1-18-M1-21	185.0-254.8	22.1	-53.10

(续表 7)

重复 Repeat	性状 Trait	染色体 Chromosome	QTL	LOD	<i>P</i> 值 <i>P</i> -value	分子标记 Marker	遗传位置 Genetic position (cM)	贡献率 PEV (%)	加性效应 Additive effect
根表面积 RSA	根表面积 RSA	7	<i>qTRL7</i>	16.84	0.01	M7-2-M7-4	18.6-62.2	18.6	48.80
		9	<i>qTRL9</i>	10.29	0.01	M9-7-M9-10	86.2-97.6	11.7	-38.67
		11	<i>qTRL11</i>	6.95	0.01	M11-9-M11-13	92.0-136.0	24.7	56.19
		2	<i>qRSA2</i>	4.61	0.01	M2-10-M2-14	153.9-192.0	15.6	16.63
		7	<i>qRSA7</i>	3.64	0.01	M7-2-M7-4	18.6-62.2	17.9	17.84
		11	<i>qRSA11</i>	3.36	0.01	M11-9-M11-13	92.0-136.0	7.4	11.48
根体积 RV	根体积 RV	10	<i>qRV10</i>	2.00	0.04	M10-4-M10-7	15.2-43.4	6.5	0.03
根直径 RD	根直径 RD	4	<i>qRD4</i>	3.10	0.01	M4-10-M4-13	161.1-190.6	9.4	-0.04
		11	<i>qRD11</i>	2.83	0.01	M11-4-M11-7	29.0-60.2	8.1	0.04

LRL: 最长根长; TRL: 总根系长; RSV: 根表面积; RV: 根体积; RD: 根直径。
LRL: the longest root length; TRL: total root length; RSV: root surface area; RV: root volume; RD: root diameter.

图 3 RIL 群体根系性状 QTL 的遗传图谱位置
Fig. 3 Map locations of QTLs for root traits in RIL population
每条染色体的左边列出为分子标记。
Molecular markers for QTLs are listed on the left along each chromosome.

重复 II 共检测到 11 个 QTL, 分布在第 1、2、4、7、9、10 和 11 号染色体上。我们只在 4 号染色体上发现了一个控制最长根长的 QTL, 贡献率为 8.3%, 加性效应来自于 9311。控制总根长的 QTL 有 4 个, 分布在水稻第 1、7、9 和 11 号染色体上, LOD 值为

6.95~16.84。这些 QTL 的表型变异贡献率均超过 5%, 幅度为 11.7%~24.7%。*qTRL7* 和 *qTRL9* 的效应来自 NPB, 其余 2 个 QTL 的效应来自 9311。控制根表面积的 QTL 有 3 个, 分布于水稻第 2、7 和 11 号染色体, 3 个 QTL 的表型变异贡献率均超过 5%。控制根

体积的 QTL 有 1 个, 在 10 号染色体上。控制根直径的 QTL 有 2 个, 分布在水稻第 4 和 11 号染色体, 这 2 个 QTL 的贡献率均超过 5%。其中, *qRD4* 的效应来自 NPB, *qRD11* 的效应来自 9311。

对 2 个重复进行分析发现, 有 5 个控制相同性状的 QTL 在同一位置被重复检测到。包括 4 号染色体上的 *qLRL4* 和 *qRD4*, 7 号染色体上的 *qRSA7*, 10 号染色体上的 *qRV10* 和 11 号染色体上的 *qRSA11*。*qLRL4*、*qRSA7*、*qRV10* 和 *qRSA11* 这 4 个 QTL 的效应在 2 个重复中均来自 9311, 说明 RIL 的最长根长、根表面积和根体积的正效应来自 9311 等位型。*qRD4* 的效应在 2 个重复中来自 NPB, 说明 RIL 根直径受 NPB 等位型的正调控。综合 2 个重复鉴定的 QTL 来看, 在 7 条染色体上共分布有 4 个 QTL 簇, 分别位于水稻第 2、4、7 和 10 号染色体, 只有 4 号染色体上检测到的最长根长和根直径相关 QTL, 在 2 次重复中定位的染色体相同位置。因此, 我们对 QTL *qLRL4* 开展精细定位。

2.4 最长根长 QTL *qLRL4* 的精细定位和候选基因确定

位于水稻第 4 号染色体的 QTL *qLRL4* 是控制最长根长的 QTL。9311 背景下 InDel 标记 IND4-1 和 IND4-4 间约 158 kb 来自 NPB 的近等系 NIL-*qLRL4* 与 9311 相比, 最长根长缩短, 根直径略微变大, 总吸收面积和活跃吸收面积减少, 其他性状基本无变化(图 4 和表 8)。利用近等系 NIL-*qLRL4* 和 9311 构建的大规模 F₂ 群体, 结合个体的 InDel 标记基因型和根长表型, 我们进一步精细定位这一最长根长 QTL *qLRL4*, 最终将其定位于标记 IND4-1 和 IND4-3 之间约 68.23 kb 的物理距离内(图 5 和表 1)。依据水稻基因组注释数据库(<http://rice.plantbiology.msu.edu/cgi-bin/gbrowse/rice/>), 该区间包含了 8 个候选基因, 其中有 7 个基因存在引起氨基酸改变的单核苷酸多态(SNP)或 InDel(表 9)。qRT-PCR 检测 8 个候选基因相对表达量(图 6), 在 NPB 和 NIL-*qLRL4* 中, 基因

图 4 9311 和 NIL-*qLRL4* 在营养液中培养 21 d 的根系形态
Fig. 4 Root morphology of 9311 and NIL-*qLRL4* cultured in nutrient solution for 21 days
标尺为 3 cm。Bar: 3 cm.

LOC_Os04g58890、*LOC_Os04g58920* 和 *LOC_Os04g58940* 的相对表达量较 9311 极显著上升; 而基因 *LOC_Os04g58870* 的相对表达量极显著下降。其他 4 个基因除 *LOC_Os04g58960* 的相对表达量在 NPB 中极显著上升外, *LOC_Os04g58880*、*LOC_Os04g58900* 和 *LOC_Os04g58910* 的相对表达量在 NPB 或 NIL-*qLRL4* 中与 9311 间无显著差异。

3 讨论

在 QTL 分析中, 同一染色体区间存在多个 QTL 控制多个根系性状, 这可能是一因多效的作用。姜树坤等^[23]以甬锦和北陆 129 杂交衍生的重组自交系群体为材料, 对水稻移栽后的新生根相关性状进行研究, 共检测到 10 个 QTL, 分别控制根平均直径、总根长、平均根表面积、平均根长和根数等性状。并且对第 11 号染色体的分子标记 C477 和 G320B 之间的新主效 QTL——同时控制根长、根表面积和根数的 QTL *qRL11.1*、*qRSA11* 和 *qRN11.1* 进行了验证。这些 QTL 簇体现了 QTL 的一因多效作用。由于一因多效 QTL/基因的存在, 在开展水稻分子育种时, 我们可以考虑选择单个 QTL/基因同时改良多个性状。徐晓明等^[24]以超级稻协优 9308 衍生的重组自交系与轮回亲本中恢 9308 回交多代群体为材料, 采

表 8 9311 和 NIL-*qLRL4* 的根系性状和活性

Table 8 Root traits and vitality of 9311 and NIL-*qLRL4*

品种/品系 Variety/Line	最长根长 Longest root length (cm)	总根系长 Total root length (cm)	根表面积 Root surface area (cm ²)	根体积 Root volume (cm ³)	根直径 Root diameter (mm)	总吸收面积 Total absorbing area (m ²)	比表面积 Specific surface area (cm ² cm ⁻³)
9311	17.3 ± 0.4	331.38 ± 30.07	34.23 ± 3.93	0.36 ± 0.05	0.32 ± 0.01	0.636 ± 0.032	4243.3 ± 210.2
NIL- <i>qLRL4</i>	14.6 ± 0.1**	340.40 ± 19.91	34.44 ± 3.15	0.36 ± 0.04	0.35 ± 0.02	0.535 ± 0.023**	3566.9 ± 150.3**

**表示达 0.01 显著水平差异。

** indicates significant difference at the 0.01 probability level.

图 5 *qLRL4* 的精细定位

Fig. 5 Fine mapping of *qLRL4*

qLRL4 被缩小到标记 IND4-1 和 IND4-3 之间的 68.23 kb 区间内。图例的黑色条块代表 9311 基因型，白色条块代表 NPB 基因型。NPB: 日本晴。最长根长表示为均值±标准差。*和**分别表示 0.05 和 0.01 显著水平差异。LRL: 最长根长。

qLRL4 was narrowed down to a 68.23 kb interval defined by markers IND4-2 and IND4-3. Black box represents 9311 genotype, and white box represents NPB genotype. NPB: Nipponbare. Values represent means ± SD. * and ** indicate significant difference at the 0.05 and 0.01 probability levels compared with NIL-*qLRL4*, respectively. LRL: the longest root length.

表 9 *qLRL4* 精细定位区间的候选基因和候选基因中引起氨基酸改变的序列变化

Table 9 Candidate genes in the interval of fine mapped *qLRL4* and sequence variation resulted in amino acid changes

基因 Gene	注释 Annotation	SNP	INDEL	NPB	9311	CDS
<i>LOC_Os04g58870</i>	exo70 exocyst complex subunit, putative, expressed	4	0	G	T	487
				T	C	514
				A	G	632
				T	G	1529
<i>LOC_Os04g58880</i>	exo70 exocyst complex subunit, putative, expressed	1	0	A	G	1279
<i>LOC_Os04g58890</i>	Expressed protein	1	0	T	G	416
<i>LOC_Os04g58900</i>	Hydrolase, NUDIX family, domain containing protein, expressed	1	0	C	T	142
<i>LOC_Os04g58910</i>	Receptor protein kinase TMK1 precursor, putative, expressed	3	1	G	T	223
				A	G	1630
				A	G	1909
				+TCC	0	14
<i>LOC_Os04g58920</i>	U-box domain-containing protein, putative, expressed	1	0	G	T	338
<i>LOC_Os04g58940</i>	Expressed protein	0	0	0	0	
<i>LOC_Os04g58960</i>	Regulator of chromosome condensation, putative, expressed	3	0	T	G	1148
				C	T	1116
				C	T	2582

SNP 和 InDel 为引起氨基酸改变的 SNP 数目和 InDel 数目。字母为改变的碱基，数字为 CDS 上的位点。

SNP and InDel represent the number of SNPs and InDels that cause amino acid changes. The letters are changed bases and the numbers are positions on the CDS.

用琼脂无土栽培技术开展了水稻根长主效 QTL *qLRL4* 的精细定位，最终将其定位在水稻第 4 号染色体分子标记 RM5687 与 InDel149 之间约 624.6 kb 的范围内。我们定位的 *qLRL4* 是控制最长根长的新

QTL，其位置与报道的 *qRL4* 在 4 号染色体上的位置并不相同，这可能是所用亲本和群体不同所致。幼苗期根的生长为作物获取水和营养物质提供了保障^[25]。近等系 NIL-*qLRL4* 在发芽后根的生长受到抑制，根的

图 6 候选基因的相对表达量

Fig. 6 Relative expression level of candidate genes

相对表达量数据为平均数±标准差, $n = 3$ 。**表示与 9311 比较达到 0.01 的差异显著水平。

Data represent means $\pm$ SD of three biological replicates. ** indicates significant difference at the 0.01 probability level compared with 9311.

总吸收面积和活跃吸收面积相对 9311 也显著减小(图 4 和表 8)。Raffaele 等^[26-27]在拟南芥中研究发现,具有较大根分生组织的突变体往往根较长,而根分生组织的大小受生长素和细胞分裂素的共同调节。水稻中已克隆了一些与根发育相关的基因,例如 *CRL1* 基因调控不定根的数目^[15], *REL2* 基因调控不定根的数目与长短^[18], *OsCKII* 基因调控侧根和不定根的数量^[28], *SOR1* 通过根系与乙烯的特异性反应来影响根的生长发育^[29]。调控水稻根长的基因也有报道, *Rfla/Rf-1/Rf5* 基因影响水稻主根长短^[30]; *Srt5* 基因通过外源性蔗糖、葡萄糖和果糖的调控影响水稻根系的长短^[13]; *OsSPR1* 基因通过影响根细胞的长短与数目影响水稻根系的长短^[14]; *SRT6* 基因影响水稻苗期根长与直径的作用可能与 ABA 的感知或信号传导有关^[20]。我们的研究最终将最长根长 QTL *qLRL4* 精细定位到约 68.23 kb 的区间内,依据基因注释发现该区间包含 8 个候选基因,其中有 7 个基因存在引起氨基酸改变的 SNP 或 InDel,包括编码水解酶、受体蛋白激酶和染色质结构调节因子的基因。根部转录水平的表达分析显示,4 个候选基因的相对表达量在 NIL-*qLRL4* 或 NPB 与 9311 之间存在显著差异。因此,这 4 个基因作为 *qLRL4* 候选基因的可能性更大。当然,候选基因的最终确定还有待进一步基因克隆和功能验证。

4 结论

利用籼稻 9311 和粳稻日本晴为亲本的 RIL 群体对水稻苗期根系相关性状开展 QTL 分析,共检测到

26 个控制最长根长、总根系长、根表面积、根体积和根直径的 QTL,发现水稻第 2、4、7 和 10 号染色体上的 4 个 QTL 簇,包括第 4 号染色体上控制最长根长的 QTL *qLRL4*。精细定位将 *qLRL4* 定位于 InDel 标记 IND4-1 和 IND4-3 之间约 68.23 kb 的区间,包含了 8 个候选基因。其中 7 个基因在亲本间有引起氨基酸改变的 SNP 或 InDel,4 个基因在近等基因系 NIL-*qLRL4* 和 9311 之间的转录水平相对表达量上存在显著差异。此最长根长 QTL 的精细定位为水稻根系发育相关基因的克隆奠定了基础。

References

- [1] 范楚玉. 西周农事诗中反映的粮食作物选种及其发展. 自然科学史研究, 1982, 3: 267–272.
Fan C Y. Selection and development of grain crops reflected in the poetry of agriculture in the Western Zhou Dynasty. *Stud Hist Nat Sci*, 1982, 3: 267–272 (in Chinese with English abstract).
- [2] 陶荣荣, 蔡晗, 朱庆权, 周益雷, 王康平, 余超, 侯丹平, 刘海浪, 张耗. 水稻高产高效的根-冠互作机制研究进展. 中国农学通报, 2018, 34(5): 1–4.
Tao R R, Cai H, Zhu Q Q, Zhou Y L, Wang K P, Yu C, Hou D P, Zhang H. Research progress on root-crown interaction mechanism of high-yield and high-efficiency rice. *Chin Agric Sci Bull*, 2018, 34(5): 1–4 (in Chinese with English abstract).
- [3] 丁仕林, 刘朝雷, 钱前. 水稻根系遗传研究进展. 中国稻米, 2019, 25(5): 24–29.
Ding S L, Liu C L, Qian Q. Advances in rice root genetics. *China Rice*, 2019, 25(5): 24–29 (in Chinese with English abstract).
- [4] 徐吉臣, 李晶昭, 郑先武, 邹亮星, 朱立煌. 苗期水稻根部性状的 QTL 定位. 遗传学报, 2001, 28: 433–438.
Xu J C, Li J Z, Zheng X W, Zou L X, Zhu L H. QTL mapping of

- rice root traits at seedling stage. *J Genet Genomics*, 2001, 28: 433–438 (in Chinese with English abstract).
- [5] 滕胜, 曾大力, 钱前, 国广泰史, 藤本宽, 黄大年, 朱立煌. 水稻根系活力的遗传分析. 中国水稻科学, 2002, 16: 119–123.
Teng S, Zeng D L, Qian Q, Kunihiro Y, Fujimoto K, Huang D N, Zhu L H. Genetic analysis of root vigor in rice. *Chin J Rice Sci*, 2002, 16: 119–123 (in Chinese with English abstract).
- [6] 胡兴明, 郭龙彪, 曾大力, 高振宇, 滕胜, 李浩戈, 朱立煌, 钱前. 水稻苗期发根力的 QTL 和上位性分析. 中国水稻科学, 2004, 18: 396–400.
Hu X M, Guo L B, Zeng D L, Gao Z Y, Teng S, Li H G, Zhu L H, Qian Q. QTL mapping and epistasis analysis of rice root growth ability at seedling stage. *Chin J Rice Sci*, 2004, 18: 396–400 (in Chinese with English abstract).
- [7] Mitsuhiro O, Wataru T, Takeshi E. Fine-mapping of *qRL6.1*, a major QTL for root length of rice seedlings grown under a wide range of NH_4^+ concentrations in hydroponic conditions. *Theor Appl Genet*, 2010, 121: 535–547.
- [8] 王汝慈. 两个生育时期水稻耐低磷胁迫相关性状的 QTL 定位. 中国农业科学院硕士学位论文, 北京, 2009.
Wang R C. QTL Mapping of Low Phosphorus Stress-related Traits in Rice during Two Growth Periods. MS Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, China, 2015 (in Chinese with English abstract).
- [9] Obara M, Fukuta Y, Yanagihara S. Genetic variation and QTLs related to root development in upland new rice for *Africa* (NERICA) varieties. *Breed Sci*, 2019, 69: 94–103.
- [10] Kitomi Y, Nakao E, Sawako K. Fine mapping of quick rooting 1 and 2, quantitative trait loci increasing root length in rice. *G3: Genes Genom Genet*, 2018, 8: 727–735.
- [11] 章怡兰, 林雪, 吴仪, 李梦佳, 张晟婕, 路梅, 饶玉春, 王跃星. 水稻根系遗传育种研究进展. 植物学报, 2020, 55: 382–393.
Zhang Y L, Lin X, Wu Y, Li M J, Zhang S J, Lu M, Rao Y C, Wang Y X. Research progress on rice root genetics and breeding. *Chin Bull Bot*, 2020, 55: 382–393 (in Chinese with English abstract).
- [12] 梁永书, 周军杰, 南文斌, 段东东, 张汉马. 水稻根系研究进展. 植物学报, 2016, 51: 98–106.
Liang Y S, Zhou J J, Nan W B, Duan D D, Zhang H M. Research progress of rice root system. *Chin Bull Bot*, 2016, 51: 98–106 (in Chinese with English abstract).
- [13] Yao S G, Mushika J, Taketa S, Ichii M. The short root mutation *srt5* defines a sugar-mediated root growth in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci*, 2004, 167: 49–54.
- [14] Jia L, Zhang B, Mao C. OsCYT-INV1 for alkaline/neutral invertase is involved in root cell development and reproductivity in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta*, 2008, 228: 51–59.
- [15] Inukai Y, Sakamoto T, Ueguchitanka M. Crown rootless1, which is essential for crown root formation in rice, is a target of an auxin response factor in auxin signaling. *Plant Cell*, 2005, 17: 1387–1396.
- [16] Liu H, Wang S, Yu X, Yu J, He X, Zhang S, Shou H, Wu P. ARL1, a LOB-domain protein required for adventitious root formation in rice. *Plant J*, 2005, 43: 47–56.
- [17] Zhao Y, Hu Y F, Dai M G, Huang L M, Zhou D Y. The WUSCHEL-related homeobox gene *WOX11* is required to activate shoot-borne crown root development in rice. *Plant Cell*, 2009, 21: 736–748.
- [18] Yang S Q, Li W Q, Miao H, Gan P F, Qiao L, Chang Y L, Shi C H, Chen K M. *REL2*, a gene encoding an unknown function protein which contains DUF630 and DUF632 domains controls leaf rolling in rice. *Rice*, 2016, 9: 1–14.
- [19] Dai X Y, Wang Y Y, Zhang W H. OsWRKY74, a WRKY transcription factor, modulates tolerance to phosphate starvation in rice. *J Exp Bot*, 2016, 67: 947–960.
- [20] Ao S G, Shin T, Masahiko I. Isolation and characterization of an abscisic acid-insensitive mutation that affects specifically primary root elongation in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci*, 2003, 164: 971–978.
- [21] Jing H W, Yang X L, Zhang J, Liu X H, Zheng H K, Dong G J, Nian J Q, Feng J, Xia B, Qian Q, Li J Y, Zuo J R. Peptidyl-prolyl isomerization targets rice Aux/IAAs for proteasomal degradation during auxin signaling. *Nat Commun*, 2015, 6: 7395.
- [22] McCouch S, Cho Y, Yano M, Paul E, Blinstrub M, Morishima H, Kinoshita T. Report on QTL nomenclature. *Rice Genet Newsl*, 1997, 14: 11–131.
- [23] 姜树坤, 张凤鸣, 白良明, 孙世臣, 王彤彤, 丁国华, 姜辉, 张喜娟. 水稻移栽后新生根系相关性状的 QTL 分析. 中国水稻科学, 2014, 6: 598–604.
Jiang S K, Zhang F M, Bai L M, Sun S C, Wang T T, Ding G H, Jiang H, Zhang X J. QTL analysis of the related traits of new roots after transplanting rice. *Chin J Rice Sci*, 2014, 6: 598–604 (in Chinese with English abstract).
- [24] 徐晓明, 张迎信, 王会民, 任翠, 王汝慈, 沈希宏, 占小登, 吴玮勋, 程式华, 曹立勇. 一个水稻根长 QTL *qRL4* 的分离鉴定. 中国水稻科学, 2016, 30: 363–370.
Xu X M, Zhang Y X, Wang H M, Ren C, Wang R C, Shen X H, Zhan X D, Wu W X, Cheng S H, Cao L Y. Isolation and identification of a QTL *qRL4* of rice root length. *Chin J Rice Sci*, 2016, 30: 363–370 (in Chinese with English abstract).
- [25] Rogers E D, Benfey P N. Regulation of plant root system architecture: implications for crop advancement. *Curr Opin Biotechnol*, 2015, 32: 93–98.
- [26] Raffaele D I, Francisco S L, Emanuele S. Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. *Curr Biol*, 2007, 17: 678–682.
- [27] Raffaele D I, Kinu N, Laila M. A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science*, 2008, 322: 1380–1384.
- [28] Liu W, Xu Z H, Luo D. Roles of OsCKII, a rice casein kinase I, in root development and plant hormone sensitivity. *Plant J*, 2003, 36: 189–202.
- [29] Chen H, Ma B, Zhou Y, He S J, Tang S Y, Lu X, Xie Q, Chen S Y, Zhang J S. E3 ubiquitin ligase SOR1 regulates ethylene response in rice root by modulating stability of Aux/IAA protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: 4513–4518.
- [30] Zhang H G, Zhang L J, Si H, Ge Y S, Liang G H, Gu M H, Tang S Z. *Rf5* is able to partially restore fertility to Honglian-type cytoplasmic male sterile *japonica* rice (*Oryza sativa*) lines. *Mol Breed*, 2016, 36: 1–10.