

基于高密度遗传图谱定位水稻籽粒性状QTL

孙志广¹, 徐婷婷², 刘艳¹, 邢运高¹, 徐波¹, 迟铭¹, 李景芳¹,
周群¹, 王德荣¹, 张雅馥¹, 王宝祥¹, 徐大勇¹

(¹连云港市农业科学院/江苏省现代作物生产协同创新中心, 连云港 222000; ²江苏省农业科学院种质资源与生物技术研究所, 南京 210014)

摘要: 籽粒性状直接影响水稻的产量和品质, 因此, 解析水稻籽粒性状的遗传机制对提高水稻产量和品质至关重要。本研究以籽粒性状差异较大的籼稻和广百香占为亲本构建定位群体, 利用水稻 1 K mGPS SNP 芯片对定位群体进行基因分型, 构建了包含 770 个 Bin 标记的高密度遗传图谱, 通过 QTL 定位分析, 最终鉴定出 17 个调控籽粒性状的 QTLs, 其中粒长 QTL 4 个, 粒宽 QTL 3 个, 粒厚 QTL 3 个, 长宽比 QTL 2 个, 千粒重 QTL 5 个, LOD 值介于 2.55~42.44 之间, 表型贡献率介于 4.73%~29.63% 之间。在这 17 个 QTLs 中, 9 个为已知粒型基因位点, 8 个可能是新鉴定位点, 分别为粒长 *qGL6*, 粒宽 *qGW5*、*qGW10* 和 *qGW12*, 粒厚 *qGT10*, 长宽比 *qGLWR5-2*, 千粒重 *qTGW10* 和 *qTGW11*。根据新发现粒宽 QTL (*qGW5*) 定位区间内的基因注释、与拟南芥的同源基因比对、时空表达分析、激素响应分析和序列分析, 最终筛选到 1 个编码 CCCH 类锌指蛋白的调控水稻粒宽的候选基因 *Os05g0195101*。本研究为进一步开展水稻籽粒性状基因的克隆和遗传调控的解析奠定了基础。

关键词: 籽粒性状; 千粒重; QTL; 高密度遗传图谱

QTL Mapping for Grain Traits Based on a High-Density Genetic Map in Rice

SUN Zhiguang¹, XU Tingting², LIU Yan¹, XING Yungao¹, XU Bo¹, CHI Ming¹, LI Jingfang¹, ZHOU Qun¹,
WANG Derong¹, ZHANG Yafu¹, WANG Baoxiang¹, XU Dayong¹

(¹Lianyungang Academy of Agricultural Sciences/Jiangsu Collaborative Innovation Center for Modern Crop Production, Lianyungang 222000; ²Institute of Germplasm Resources and Biotechnology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014)

Abstract: Grain traits have a direct impact on the yield and quality of rice. Therefore, understanding the genetic mechanism underlying these traits is crucial for improving rice yield and quality. In this study, Ludao and Guangbaixiangzhan (GBXZ), which exhibit significant differences in grain traits, were used as parent plants to create a segregating population. Using the 1 K mGPS rice SNP chip, the targeted population was genotyped and a high-density genetic map containing 770 Bin markers was constructed. Through QTL mapping analysis, a total of 17 QTLs related grain traits were detected, including 4 QTLs for grain length, 3 QTLs for grain width, 3 QTLs for grain thickness, 2 QTLs for length-to-width ratio of grain, and 5 QTLs for 1000-grain weight. The phenotypic variation explained by these QTLs ranged from 4.73% to 29.63% with the LOD values ranging from 2.55 to 42.44. Of these 17 QTLs, 9 QTLs were known loci related to grain size, and 8 QTLs might be newly

收稿日期: 2023-11-20 网络出版日期: 2024-05-07

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20231120002>

第一作者研究方向为水稻遗传育种, E-mail: zhiguangsun@126.com; 徐婷婷为共同第一作者

通信作者: 徐大勇, 研究方向为农作物新品种选育和推广, E-mail: xudayong3030@sina.com

王宝祥, 研究方向为水稻遗传育种, E-mail: wbxrice@163.com

基金项目: 国家现代农业产业技术体系项目 (CARS-01-61); 江苏省种业振兴项目 (JBGS[2021]039, JBGS[2021]043); 江苏省现代农业重点项目 (BE2021321); 江苏省农业自主创新资金 (CX[23]1001); 连云港市财政专项 (QNJJ2203, QNJJ2306)

Foundation projects: National Project for Modern Agricultural Technology System (CARS-01-61); Revitalization of the Seed Industry Project of Jiangsu Province (JBGS [2021] 039, JBGS [2021] 043); Key Projects of Modern Agriculture in Jiangsu Province (BE2021321); Jiangsu Agricultural Science and Technology Innovation (CX[23]1001); Financial Grant Support Program of Lianyungang City (QNJJ2203, QNJJ2306)

identified. Among the 8 new QTLs, *qGL6* was related to grain length, *qGW5*, *qGW10* and *qGW12* were related to grain width, *qGT10* was related to grain thickness, *qGLWR5-2* was related to length-to-width ratio of grain, *qTGW10* and *qTGW11* were related to 1000-grain weight. Based on the gene annotation, *Arabidopsis* homologous gene comparison, spatiotemporal expression analysis, hormone response analysis, and sequence analysis of the candidate genes in the definite *qGW5* region, a candidate gene *Os05g0195101* encoding a CCCH-like zinc-finger protein for regulating rice grain width was finally screened. This study lays the foundation for further cloning of rice grain trait genes and analyzing the genetic regulation of grain traits.

Key words: grain traits; 1000-grain weight; QTL; high density genetic map

水稻是世界上最重要的粮食作物之一,水稻的安全生产受耕地面积减少、极端气候频繁和战争等因素的影响,正逐渐成为一个严重的社会问题,因此不断提高水稻的产量已成为各国育种家的当务之急^[1-2]。籽粒性状是水稻产量和品质的重要组成部分,由粒长、粒宽、粒厚、充实度、千粒重等组成,具有多样性变化,是水稻高产、稳产、外观品质、加工品质等的重要目标性状^[3],由数量性状位点调控。向思茜等^[4]利用 Z66/日本晴构建的 F₂ 群体定位到 12 个调控籽粒性状的 QTLs,并通过聚合效应分析证明 QTLs 间会产生上位性效应。高方远等^[5]利用 BC₃F₂ 群体对调控粒厚的 QTL(*qGT8*)进行了精细定位,将其定位在 11.2 kb 的区间。Ruan 等^[6]利用 PA64s 和 93-11 构建的 RIL 群体精细定位并克隆了 1 个调控籽粒宽度和粒重的半显性 QTL *qTGW2*,该基因编码 1 个质膜定位的细胞数量调控因子 OsCNR1,通过影响籽粒的细胞增殖和扩张进而改变谷粒宽度和重量。Shi 等^[7]克隆了 1 个调控粒宽的 QTL 位点 *GW6*,它编码 1 个受赤霉素(GAs)调控的 GAST 家族蛋白,通过促进颖壳细胞的扩张增加谷粒宽度,并正向调控谷粒重量。Zhan 等^[8]克隆了 1 个调控粒长的 QTL *GL10*,编码一个 MADS-box 家族转录因子 MADS56,通过促进内稃细胞的纵向生长来调控谷粒长度。籽粒性状相关基因的挖掘一直是水稻研究的热点,在过去的 20 年里,已经克隆了超过 30 个调控粒型和粒重的基因,如 *GS3*^[9]、*GW2*^[10]、*GL7*^[11]、*TGW3*^[12]、*SWG1*^[13]和 *GSW3*^[14]等,在籽粒相关性状的分子机制研究方面取得了一些重要进展,然而籽粒性状调控基因的挖掘仍然是水稻研究的重要内容。因此,有必要利用新的种质资源和群体挖掘更多调控水稻籽粒性状的基因/QTLs,为进一步解析水稻粒重和粒型的遗传机制奠定基础。

分子标记特别是 SSR 标记,已经成功地用于鉴定多个物种的复杂性状基因/QTL。由于 SSR 标记

具有多个等位基因,且难以进行多重 SSR 标记的筛选,同时 SSR 标记也因实验室、种质和群体大小的不同而产生差异^[15],此外,SSR 标记也很难在数据库中对不同的等位基因进行对齐,以上因素限制了 SSR 标记的应用和发展。随着分子生物学技术的不断进步,水稻基因组中已识别出数以百万计的 SNPs 标记,从而可以构建高质量的遗传连锁图谱对 QTL 进行检测和精细定位^[16]。所有这些 SNP 标记都是双等位基因,因此不同研究的结果可以很容易地结合在一起,并在不同研究者之间共享。SNP 标记改进了 QTL/基因鉴定的方法,近年来已广泛应用于标记辅助选择、全基因组关联分析和多样性分析等。宋博文等^[17]利用基于 SNP 标记的高密度遗传图谱对来源于魔大穗与航恢 315 的籽粒性状进行 QTL 定位,检测到 6 个 QTL 簇,其中 *Loci5*、*Loci7*和 *Loci9* 能被重复定位到,表型贡献率分别为 15.7%、54.1%、15.9%,证实了 SNP 标记在 QTL 鉴定中的重要作用。本研究利用粳型杂草稻江苏鲁稻和常规籼稻广百香占为亲本,鲁稻/广百香占 F₂ 定位群体为研究材料,对粒长、粒宽、粒厚、长宽比和千粒重进行 QTL 检测,并对新发现粒宽 QTL(*qGW5*)进行候选基因预测,以期发掘新的调控水稻籽粒相关性状的基因,为进一度拓宽籽粒性状的调控机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

定位群体为江苏鲁稻和广百香占杂交构建的 F₂ 分离群体,该群体包含 96 个单株。其中鲁稻是江苏省连云港市云台山地区特有的粳型杂草稻种质资源,广百香占为广东省的常规籼稻品种。定位群体及双亲于 2021 年 5-10 月种植于连云港市农业科学院东辛农场试验基地(119°32' E, 34°56' N)。行、株距为 26.65 cm×16.65 cm,均单本种植于同一试验田,常规肥水管理。

1.2 稻谷籽粒性状调查

在成熟期, 收获籼稻、广百香占及其分离群体的种子, 自然晒干后去除瘪粒及不完整种子后保存于连云港市农业科学院中心实验室待用。参照《水稻种质资源描述规范和数据标准》进行水稻籽粒性状的测量, 将所有试验材料去芒后, 选取约 200 粒饱满健康的种子, 利用万深 SC-E 种子大米外观品质检测分析仪系统 (杭州万深检测科技有限公司) 进行粒数、粒长和粒宽的分析, 随后利用美国丹佛 (TP-114) 电子天平将扫描种子进行称重, 根据粒数与粒重折算成千粒重。使用高精度电子数显游标卡尺随机选取 10 粒种子进行种子粒厚的测量, 长宽比为粒长与粒宽平均值的比值。以上所有性状重复 3 次测量, 取平均值作为表型值进行后续分析。

1.3 连锁图谱构建及 QTL 分析

采集亲本及 96 个 F_2 单株的幼嫩叶片, 利用柱提法进行 DNA 提取, DNA 样本经质控后, 进行文库构建。文库质量检测采用 Agilent 2200 Bioanalyzer System, 文库质检合格后, 采用 Illumina PE150 高通量测序平台进行样本的检测与深度分析, 最终得到 5420 个优质 SNP 分型数据位点。利用 QTL IciMappingV4.1 软件将所有样本中同一段序列上 2 个交换点自检不发生重组的 SNP 位点看作 1 个 Bin 标记, 以 Bin 标记的起点确定其所在的物理位置, 随后利用 Kosambi 函数将重组率转换为遗传距离, 最终获得由 770 个 Bin 标记组成的高密度遗传图谱。利用 QTL IciMappingV4.1 软件中的完备区间作图法 (ICIM, inclusive composite interval mapping)^[18], 以 LOD 值 2.5 为阈值判定 QTL 是否存在, 定位结果以 LOD 值的峰值作为该 QTL 的 LOD 值, 以 LOD 峰值位置的 Bin 标记进行该 QTL 的效应分析, 以 LOD 值下降 1.0 的区域作为 QTL 的置信区间。

1.4 数据分析

利用 Microsoft Excel 2010 软件进行数据录入和三线表的绘制; 利用 GraphPad Prism8.3.0 软件进行柱状图、频率分布直方图的绘制和统计分析; 利

用 Origin 2021 软件里的 correlation plot 插件, 根据 Pearson's 相关系数检验籽粒性状间的相关性; 利用 MapGene2Chromosome v2.0 (http://mg2c.iask.in/mg2c_v2.0) 进行连锁图谱的绘制, 随后利用 Adobe Illustrator CS6 软件对连锁图谱进行优化; 在 RiceXPro Version 3.0 数据库 (<https://ricexpro.dna.affrc.go.jp>) 中提取注释基因的表达谱和激素响应数据, 使用 Chiplot (<https://www.chiplot.online>) 中的 heatmap 绘制注释基因的表达谱热图。

1.5 候选基因筛选

参考 RGAP 数据库 (<http://rice.uga.edu>) 对 QTL 定位区间内的基因进行功能注释和分析, 使用拟南芥 TAIR (<https://www.arabidopsis.org>) 中的 BLAST 功能查找候选基因同源序列的基因功能, 随后将目标基因提交到 RiceXPro Version 3.0 数据库 (<https://ricexpro.dna.affrc.go.jp>), 获得这些基因在水稻品种日本晴叶片、叶鞘、根、茎、花序、花药、雌蕊、内稃、外稃、子房、胚和胚乳中的时空表达数据和激素响应数据, 根据分析结果, 确定候选基因。随后在 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中下载候选基因序列, 用 Primer5 软件设计测序引物对候选基因进行扩增和测序, 并对候选基因进行双亲间的序列差异分析。

2 结果与分析

2.1 亲本与群体的表型变异及相关性分析

对双亲籽粒性状进行统计分析发现, 双亲在 5 个籽粒相关性状上均存在显著性差异, 籼稻在粒宽、粒厚和千粒重上比广百香占分别增加了 33.8%、7.9% 和 22.8%, 广百香占在粒长和长宽比上较籼稻分别增加 8.6%、39.3%。分离群体中各籽粒性状均呈现出广泛的变异, 其中千粒重的变异系数最高, 达到 15.48%, 粒长和粒厚的变异系数最小, 均为 4.75%, 这些性状均表现为正态或近似正态的连续分布, 且存在超亲分离现象, 表现出数量性状的遗传特征, 符合 QTL 区间作图的要求 (表 1 和图 1A~E)。

表 1 亲本及后代群体的籽粒性状描述性统计分析

Table 1 Descriptive statistical analysis of grain traits in parents and their offspring

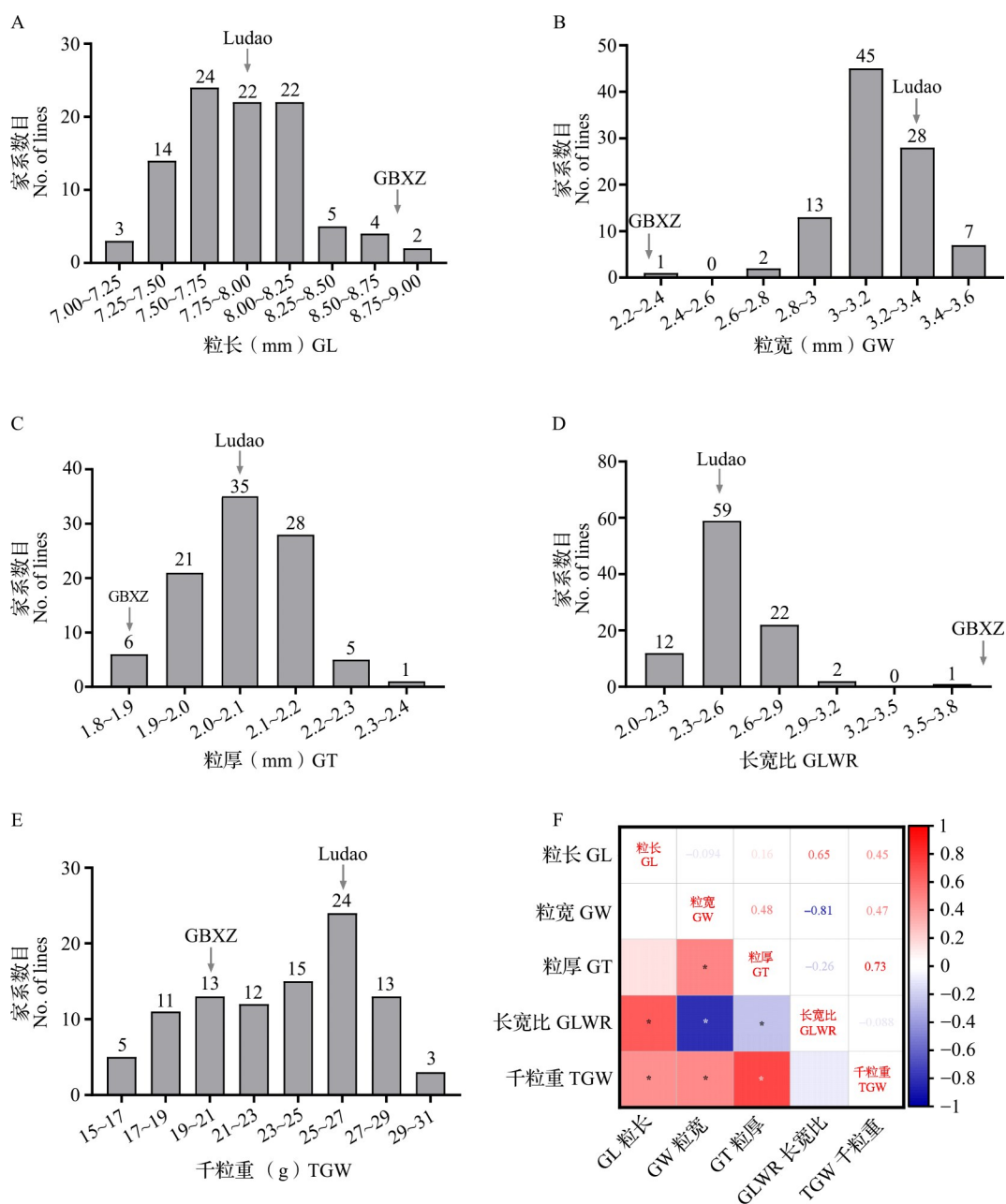
性状 Traits	籼稻 Ludao	广百香占 GBXZ	群体 Population				
			均值±标准差 Mean±SD	变幅 Range	变异系数 (%) CV	峰度 Kurtosis	偏度 Skewness
粒长(mm) GL	8.00*	8.75	7.86±0.37	7.16~8.89	4.75	-0.06	0.44
粒宽(mm) GW	3.28**	2.17	3.14±0.19	2.39~3.55	5.99	2.09	-0.70

表 1 (续)

性状 Traits	籼稻 Ludao	广百香占 GBXZ	群体 Population				
			均值±标准差 Mean±SD	变幅 Range	变异系数 (%) CV	峰度 Kurtosis	偏度 Skewness
粒厚(mm) GT	2.03*	1.87	2.06±0.10	1.83~2.34	4.75	-0.02	-0.11
长宽比 GLWR	2.44**	4.02	2.51±0.21	2.13~3.69	8.55	8.38	1.80
千粒重(g) TGW	26.35**	20.33	23.34±3.61	15.55~29.83	15.48	-1.05	-0.30

*表示在 0.05 水平差异显著;**表示在 0.01 水平差异显著;下同

*: Significant differences at $P<0.05$; **: Significant differences at $P<0.01$; The same as below; GL: Grain length; GW: Grain width; GT: Grain thickness; GLWR: Length-to-width ratio of grain; TGW: 1000-grain-weight; GBXZ: Guangbaixiangzhan

图 1 籼稻/广百香占 F_2 群体籽粒性状直方图分布及相关性分析Fig.1 Histogram distribution and correlation analysis of grain traits in the F_2 population derived from Ludao and Guangbaixiangzhan

相关性分析表明, F_2 群体籽粒性状间存在高度的相关性, 粒长与长宽比呈显著正相关(0.65); 粒宽与粒厚呈显著正相关(0.48), 与长宽比呈显著负相关(-0.81); 粒厚与长宽比呈显著负相关(-0.26)。千粒重与粒长、粒宽、粒厚均呈显著正相关, 相关系数分别为0.45、0.47、0.73, 可见粒厚对千粒重的影响最大(图1F)。

2.2 多态性SNP位点的分布及连锁图谱构建

利用水稻1K mGPS SNP芯片对双亲及定位群体进行基因分型, 在水稻12条染色体上共获得5420个优质SNP数据位点, 其中在双亲间呈良好多态性

的SNP标记有1859对, 占比34.3%, 每条染色体上平均携带154.9对, 在水稻12条染色体上的变幅为106对(Chr.12)至221对(Chr.1)(图2A)。根据子代重组断点划分Bin标记, 最终获得由770个Bin标记组成的高密度遗传图谱, 平均每条染色体上包含64.2个, 在水稻12条染色体上的变幅为34个(Chr.12)至92个(Chr.1)(图2B)。构建的连锁图谱总长度为3207.02 cM, Bin标记平均间隔为4.17 cM, 所有标记的排列顺序与水稻品种日本晴基因组的物理顺序一致。

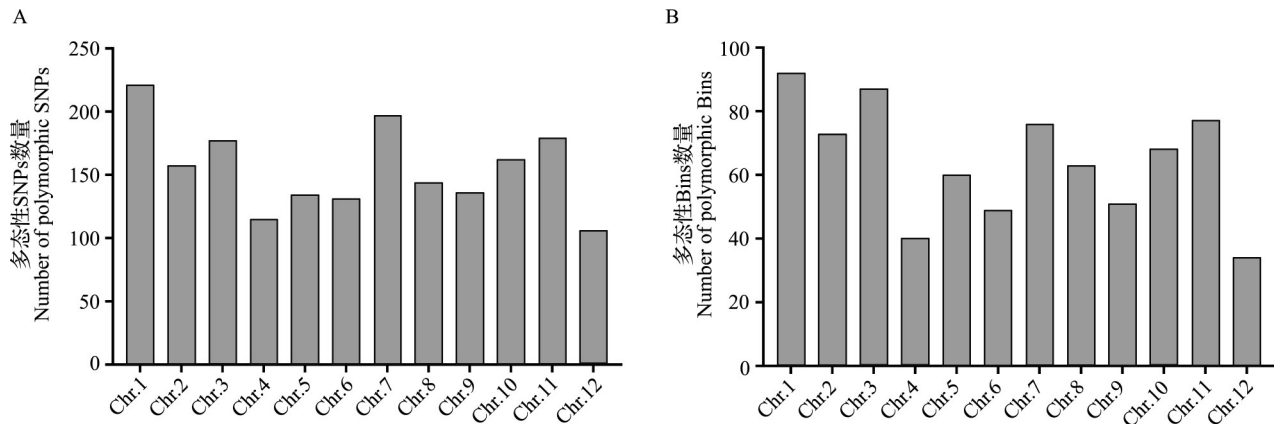


图2 多态性标记在水稻染色体上的分布

Fig.2 Distribution of polymorphic markers on rice chromosomes

2.3 水稻籽粒性状QTL检测

利用籼稻与广百香占构建的分离群体共鉴定到17个籽粒性状相关QTLs, 分布于水稻第1、2、4、5、6、10、11和12号染色体上(图3), LOD值介于2.55~42.44之间, 表型贡献率介于4.73%~29.63%之间(表2)。

调控籽粒长度的QTL有4个, 其中 $qGL1$ 和 $qGL2-2$ 来自广百香占的等位位点, 具有正加性效应, 分别可增加粒长0.07 mm和0.06 mm, 对粒长的贡献率分别为10.26%、4.73%; $qGL2-1$ 和 $qGL6$ 来自籼稻的等位位点, 具有负的加性效应, 分别可减少粒长0.04 mm和0.22 mm, 对粒长的贡献率分别为10.36%、18.86%。

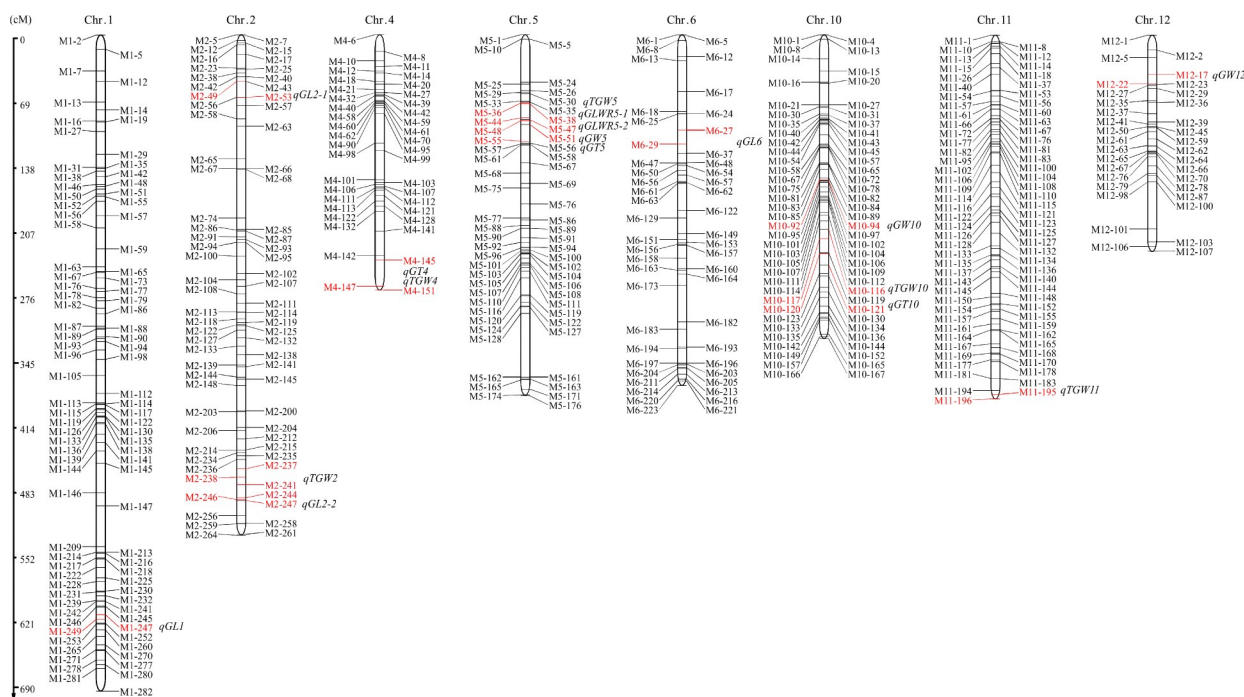
调控籽粒宽度的QTL有3个, 分别命名为 $qGW5$ 、 $qGW10$ 和 $qGW12$, 增效等位位点均来自籼稻, 分别能增加粒宽0.12 mm、0.10 mm和0.08 mm, LOD值分别为8.06、4.74和4.19, 贡献率分别为23.88%、12.35%和11.51%。

调控籽粒厚度的QTL有3个, 其中, $qGT4$ 和

$qGT10$ 来自广百香占的等位位点, 具有负的加性效应, 分别能减少粒厚0.04 mm和0.004 mm, 对粒厚的贡献率分别为10.30%和10.80%, $qGT5$ 来自籼稻的等位位点, 具有正的加性效应, 能增加粒厚0.01 mm, 贡献率为15.27%。

调控籽粒长宽比的QTL有2个, 均定位于水稻第5号染色体上, 其中, $qGLWR5-1$ 来自广百香占的等位位点, 具有正的加性效应, LOD值为38.30, 表型贡献率为12.38%; $qGLWR5-2$ 来自籼稻的等位位点, 具有负的加性效应, LOD值为42.44, 表型贡献率为17.94%。

调控千粒重的QTL有5个, 分布于水稻第2、4、5、10和11号染色体上, 其中 $qTGW2$ 、 $qTGW5$ 、 $qTGW10$ 和 $qTGW11$ 均来自籼稻的等位位点, 对籽粒的千粒重有正向的调控作用, 分别能增加千粒重0.69 g、1.28 g、0.75 g和1.20 g, 表型贡献率分别为10.26%、7.28%、7.62%和6.83%; $qTGW4$ 来自广百香占的等位位点, 对籽粒的千粒重有负的调控作用, 该位点能降低千粒重2.52 g, 表型贡献率为29.63%。



连锁群左侧是以cM为单位的遗传图谱距离,染色体两侧是分子标记名称,红色字体的分子标记指示相应QTL的位置

Genetic map distances are shown on the left side of the linkage groups in cM and marker names are shown on both side of each chromosome,

markers in red font indicate the location of corresponding QTL

图3 QTLs在水稻染色体上的分布

Fig.3 Distribution of QTLs on rice chromosomes

表2 籼稻/广百香占F₂群体检出的水稻籽粒相关性状QTLs

Table 2 QTLs for grain size-related traits detected in F₂ population from Ludao/GBXZ

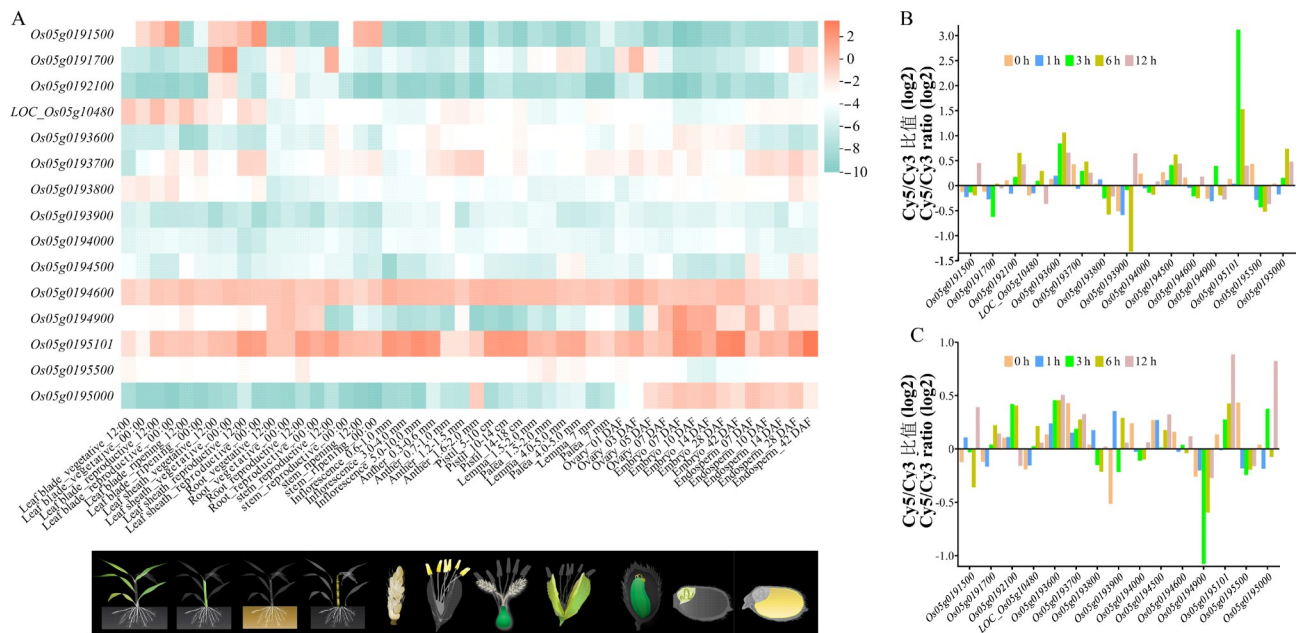
性状 Traits	性状位点 Trait locus	染色体 Chr.	标记区间 Marker interval	物理位置 (bp) Physical position	LOD值 LOD score	表型贡献率 (%) PVE	加性效应 Additive effect
粒长 GL	<i>qGL1</i>	1	M1-247~M1-249	38071600~38384186	4.81	10.26	0.07
	<i>qGL2-1</i>	2	M2-49~M2-53	9390988~9522378	3.20	10.36	-0.04
	<i>qGL2-2</i>	2	M2-246~M2-247	33882074~33882090	2.55	4.73	0.06
粒宽 GW	<i>qGL6</i>	6	M6-27~M6-29	6752887~7468174	7.05	18.86	-0.22
	<i>qGLW5</i>	5	M5-48~M5-51	5622115~5864159	8.06	23.88	0.12
	<i>qGLW10</i>	10	M10-92~M10-94	13528116~13697787	4.74	12.35	0.10
粒厚 GT	<i>qGLW12</i>	12	M12-17~M12-22	2967494~4033357	4.19	11.51	0.08
	<i>qGT4</i>	4	M4-145~M4-147	31579302~34369506	3.05	10.30	-0.04
长宽比 GLWR	<i>qGT5</i>	5	M5-51~M5-55	5864159~6882067	2.60	15.27	0.01
	<i>qGT10</i>	10	M10-120~M10-121	17073329~17676114	2.82	10.80	-0.004
	<i>qGLWR5-1</i>	5	M5-44~M5-47	5376335~5622064	38.30	12.38	0.54
千粒重 TGW	<i>qGLWR5-2</i>	5	M5-48~M5-51	5622115~5864159	42.44	17.94	-0.64
	<i>qTGW2</i>	2	M2-237~M2-244	33108703~33780161	3.48	10.26	0.69
	<i>qTGW4</i>	4	M4-147~M4-151	34369506~35126298	13.59	29.63	-2.52
	<i>qTGW5</i>	5	M5-36~M5-38	3340447~3439916	4.28	7.28	1.28
	<i>qTGW10</i>	10	M10-116~M10-117	16082917~16082999	3.53	7.62	0.75
	<i>qTGW11</i>	11	M11-195~M11-196	27781543~27993044	4.04	6.83	1.20

PVE: Phenotypic variation explained

2.4 *qGW5* 定位区间注释基因预测分析

本研究鉴定的籽粒相关性状QTL中贡献率超过20%的主效位点有2个,分别为调控千粒重的*qTGW4*和调控籽粒宽度的*qGW5*, LOD值分别为13.59和8.06,贡献率分别为29.63%和23.88%。通过与前人报道的籽粒性状基因/QTL物理位置比对,发现*qTGW4*与已克隆调控籽粒大小和粒重的基因*OsBSK3*位置重叠^[19],二者可能为同一基因,而*qGW5*为本研究新发现的调控粒宽的主效QTL,其所在区间为M5-48~M5-51,基于日本晴参考基因组序列,对应物理位置为Chr.5: 5622115~5864159 bp,该区间包含41个注释基因。根据基因注释及拟南芥同源基因的比较,筛选到15个可能影响籽粒大小的相关基因,利用水稻基因表达数据库获得上述15个基因在日本晴不同器官、组织和发育阶段中的时空表达数据,表达谱分析表明,*Os05g0194600*和*Os05g0195101*在不同发育阶段的器官或组织中均

高量表达,尤其是在内稃、外稃、胚和胚乳中的表达量更高,而其余基因在内稃、外稃、胚和胚乳中的表达量多为负值(图4A)。在植物激素中,生长素和油菜素内酯是影响籽粒相关性状的主要激素,分析这些基因对外施生长素和油菜素内酯处理的响应发现,15个基因中*Os05g0195101*对生长素和油菜素内酯处理的响应都是最高的,分别是其余基因的3.7~33.1倍(图4B、C)。测序后发现,*Os05g0195101*在两亲本编码区内有6个SNP,其中5个导致氨基酸发生改变。第68个碱基中G/A碱基发生替换导致甘氨酸替换成天冬氨酸;第109个碱基中A/G碱基发生替换导致丝氨酸替换成甘氨酸;第122个碱基中G/A碱基发生替换导致精氨酸替换成谷氨酰胺;第316个碱基中A/G碱基发生替换导致苏氨酸替换成丙氨酸;第385个碱基中T/C碱基发生替换导致酪氨酸替换成组氨酸,因此,将*Os05g0195101*暂定为*qGW5*的候选基因。



A: *qGW5* 定位区间内候选基因表达谱分析,左下方图片指示基因表达分析时取样的组织或器官;B: *qGW5* 定位区间内候选基因生长素响应分析;C: *qGW5* 定位区间内候选基因油菜素内酯响应分析

A: Expression profiling of genes in *qGW5* locus, the lower left pictures indicate organs/tissues sampled for gene expression analysis;

B: Auxin response analysis of genes in *qGW5* locus; C: Brassinolide response analysis of genes in *qGW5* locus

图4 *qGW5* 定位区间内基因表达谱及激素响应分析

Fig.4 Expression profiling and hormone response analysis of genes in *qGW5* locus

3 讨论

3.1 籽粒性状相关性分析

籽粒性状相关性分析表明,千粒重与粒长、粒宽、粒厚均呈显著正相关,其中与粒厚的相关系数最高(0.73),表明在该群体中千粒重和粒厚之间有

着相同的遗传基础,同时也说明粒厚是影响千粒重最重要的性状,这与张健等^[20]、黄涛等^[21]的结果一致。本研究鉴定出的3个粒厚QTL均与千粒重QTL成簇分布,分别分布于水稻第4、5、10号染色体上,这也从侧面证明粒厚与千粒重相关性较高。由于粒厚难以进行机械化和自动化测量,前人在粒型

研究中往往只关注籽粒的长度和宽度,近年来水稻粒长、粒宽基因的克隆已有多处报道,但迄今为止粒厚基因的克隆还较少。经比对发现,本研究检测到的3个粒厚QTL中,*qGT10*是新发现的调控粒厚的位点,可解释的表型贡献率为10.80%,该位点的发现为粒厚基因的克隆和机理解析奠定了一定的基础。

3.2 籽粒相关性状QTL定位

水稻籽粒性状是评价水稻产量和品质的重要指标,一直受到科研工作者的广泛关注,目前已有许多籽粒相关性状QTL的定位或克隆被报道。本研究检测到的大部分QTL与前人定位的区间有重叠或距离较近,部分QTL定位区间内已有调控水稻籽粒相关性状的基因被克隆。如本研究在水稻第1号染色体上鉴定到的调控粒长的*qGL1*,其在染色体上的物理位置(参照日本晴序列,下同)为Chr. 1: 38071600~38384186,区间大小约为312.6 kb,该区间包含已克隆的水稻半矮秆基因*sd1*。作为第一个水稻绿色革命矮秆基因,*sd1*通过赤霉素生物合成途径调控水稻的株高^[22],在水稻矮化育种中得到了广泛应用,实现了水稻育种的第一次突破,但是该基因对穗型、粒型、粒重均有一定的影响^[23]。本研究在水稻第2号染色体长臂检测到1个调控千粒重的QTL *qTGW2*,贡献率为10.26%,其所在区间包含已克隆调控粒宽和粒重的基因*TGW2/OsCNR1*,该基因编码1个细胞数目调控因子OsCNR1,*TGW2*蛋白通过与调控细胞周期的KRP1蛋白互作,影响细胞的增殖生长,负向调控水稻粒宽和粒重^[6]。本研究在水稻第4号染色体长臂末端检测到1个调控千粒重的QTL *qTGW4*,该区间与张波等^[24]鉴定到的*qTGW4*: 34714843~35174829位置部分重叠,重叠区间约为411.5 kb,通过定位区间内基因比对,发现编码BR信号激酶的基因*OsBSK3*在该区间内,它是BR信号的正向调控因子,其TPR结构域可与其激酶结构域互作,阻止*OsBSK3*与*BSU1*互作,负调控籽粒大小和粒重^[19]。本研究在水稻第5号染色体短臂上检测到1个调控千粒重的QTL *qTGW5*,该位点在染色体上的物理位置为Chr. 5: 3439916~3340447,大小约为99.5 kb,已克隆的粒型基因*GS5*在该区间内,*GS5*编码1个丝氨酸羧基酶,是一个调控水稻粒宽、充实度和千粒重的数量性状基因^[25]。本研究同时在*GS5*附近检测到1个调控粒厚的QTL *qGT5*,贡献率为15.27%,定位区间内包含已克隆的调控籽粒大小基因*GSK2*,它是BR信号传导的

中枢负调节因子,通过负向调节BR应答基因的表达而间接影响籽粒大小^[26]。Shomura等^[27]利用日本晴和Kasalath杂交构建的F₂群体,在第5号染色体定位到1个调控粒宽的主效QTL,命名为*qSW5*。随后Liu等^[28]将*qSW5*克隆,命名为*GW5*,该基因编码1个钙调素结合蛋白,是油菜素内酯信号传导的新型正向调节因子,*GW5*通过抑制GSK2的自磷酸化及GSK2对OsBZR1和DLT的磷酸化,进而影响细胞核中未磷酸化的OsBZR1和DLT蛋白的积累,从而调节油菜素内酯响应基因的表达水平,进而影响粒宽以及粒重。通过区间比较发现,*GW5*与本研究检测到的调控籽粒长宽比的QTL(*qGLWR5-1*)区间一致,两者可能受同一基因调控。通过与已报道粒型基因/QTL比对发现,本研究检测到的17个粒型相关QTLs中,9个为已知粒型基因/位点,8个可能是新鉴定位点,分别为粒长*qGL6*,粒宽*qGW5*、*qGW10*和*qGW12*,粒厚*qGT10*,长宽比*qGLWR5-2*,千粒重*qTGW10*和*qTGW11*。

3.3 *qGW5*候选基因预测

水稻籽粒性状是受数量性状位点调控的复杂性状,主要由粒长、粒宽、粒厚、充实度和千粒重等组成。从目前已克隆籽粒相关性状基因的功能研究来看,参与调控籽粒相关性状的途径主要有G蛋白信号、泛素蛋白酶体、转录调节因子、丝裂原活化蛋白激酶信号传导和植物激素信号传导途径^[29]。本研究在水稻第5号染色体上检测到1个调控粒宽的QTL *qGW5*,LOD值为8.06,贡献率为23.88%,通过与前人研究比较,*qGW5*可能是1个新的调控籽粒宽度的位点。首先对QTL *qGW5*定位区间内的基因进行基因注释及同源对比,筛选到15个可能调控粒宽的基因;其次利用基因表达数据库分析了这些基因在植物不同组织、器官及不同生育阶段的表达量,结果表明*Os05g0194600*和*Os05g0195101*在水稻籽粒中高量表达,可能参与了籽粒性状的调控。植物激素在籽粒的发育过程中起着直接或间接的作用,尤其是生长素和油菜素内酯,本研究分析了15个基因对生长素和油菜素内酯的响应,在所有基因中*Os05g0195101*对这两种激素的响应都是最强的,通过测序分析发现,*Os05g0195101*在两亲本编码区内有6个SNP,其中5个导致氨基酸发生改变。因此,将*Os05g0195101*列为*qGW5*的候选基因。*Os05g0195101*编码1个具有CCCH锌指结构域的转录因子*OsTZF1*,它是水稻光形态建成的负向调节因子,参与光敏色素介导的光应答过程,全基因

组表达分析表明其可作用于激素的响应,也可通过调控相关 RNA 代谢来影响水稻生长发育^[30]。周淑芬等^[31]通过农杆菌介导法获得了过表达 *OsTZF9* 的转基因植株,发现过表达植株的株高、分蘖数和千粒重等性状显著下降。*AtC3H17* 编码 1 个拟南芥 CCCH 类锌指蛋白,在拟南芥的整个生命周期及其器官中普遍表达,相比于野生型,*AtC3H17* 过表达植株的发芽速率更快,植株更大,种子也相应增大,转录激活分析表明 *AtC3H17* 可能通过转录激活 *OLEO1*、*OLEO2* 和 *CRU3* 参与种子的发育^[32]。*OsLIC* 编码 1 个水稻 CCCH 锌指蛋白,抑制 *OsLIC* 的表达导致植株叶夹角和分蘖角度的减少以及株高降低,最终导致产量也相应减少^[33],这些研究说明 CCCH 锌指蛋白在水稻籽粒性状调节中发挥了重要的作用。

综上所述,本研究利用高密度遗传图谱,在秳稻/广百香占 F_2 定位群体中共检测到 17 个调控籽粒相关性状的 QTLs,分别位于水稻第 1、2、4、5、6、10、11 和 12 号染色体上,LOD 值介于 2.55~42.44 之间,表型贡献率介于 4.73%~29.63% 之间。在这些 QTLs 中,8 个可能是新发现的粒型相关位点,分别为粒长 *qGL6*,粒宽 *qGW5*、*qGW10* 和 *qGW12*,粒厚 *qGT10*,长宽比 *qGLWR5-2*,千粒重 *qTGW10* 和 *qTGW11*。新发现的调控粒宽的主效 QTL (*qGW5*) 定位区间内共有 41 个注释基因,根据基因注释、拟南芥同源基因对比、表达谱分析、激素响应分析和双亲序列分析,筛选了 1 个潜在的候选基因 *Os05g0195101* (*OsTZF1*),该基因编码 1 个具有 CCCH 锌指结构域的转录因子,是定位区间内最有可能调控粒宽的候选基因。

参考文献

- [1] Liu D, Zhao H, Xiao Y, Zhang G, Cao S, Yin W, Qian Y, Yin Y, Zhang J, Chen S, Chu C, Tong H. A cryptic inhibitor of cytokinin phosphorelay controls rice grain size. *Molecular Plant*, 2022, 15(2): 293-307
- [2] 孙志广, 王宝祥, 周振玲, 方磊, 迟铭, 李景芳, 刘金波, Bello Babatunde Kazeem, 徐大勇. 水稻萌发耐淹性种质资源筛选及 QTL 定位. *作物学报*, 2021, 47(1): 61-70
Sun Z G, Wang B X, Zhou Z L, Fang L, Chi M, Li J F, Liu J B, Bello B K, Xu D Y. Screening of germplasm resources and QTL mapping for germinability under submerged condition in rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Agronomica Sinica*, 2021, 47(1): 61-70
- [3] 彭强, 李佳丽, 张大双, 姜雪, 邓茹月, 吴健强, 朱速松. 不同环境基于高密度遗传图谱的稻米外观品质 QTL 定位. *作物学报*, 2018, 44(8): 1248-1255
Peng Q, Li J L, Zhang D S, Jiang X, Deng R Y, Wu J Q, Zhu S S. QTL mapping for rice appearance quality traits based on a high-density genetic map in different environments. *Acta Agronomica Sinica*, 2018, 44(8): 1248-1255
- [4] 向思茜, 李儒香, 徐光益, 邓尚莉, 余金璉, 李苗苗, 杨正林, 凌英华, 桑贤春, 何光华, 赵芳明. 基于水稻长大粒染色体片段代换系 Z66 的粒型 QTL 的鉴定及其聚合分析. *作物学报*, 2023, 49(3): 731-743
Xiang S Q, Li R X, Xu G Y, Deng K L, Yu J J, Li M M, Yang Z L, Ling Y H, Sang X C, He G H, Zhao F M. Identification and pyramid analysis of QTLs for grain size based on rice long-large-grain chromosome segment substitution line Z66. *Acta Agronomica Sinica*, 2023, 49(3): 731-743
- [5] 高方远, 罗正良, 任鄞胜, 吴贤婷, 陆贤军, 苏相文, 吕建群, 任光俊. 水稻粒厚主效位点 *qGT8* 精细定位和候选基因分析. *中国农业科学*, 2015, 48(24): 4859-4871
Gao F Y, Luo Z L, Ren J S, Wu X T, Lu X J, Su X W, Lü J Q, Ren G J. Fine mapping and candidate gene analysis of *qGT8*, a major QTL for grain thickness in rice. *Scientia Agricultura Sinica*, 2015, 48(24): 4859-4871
- [6] Ruan B, Shang L, Zhang B, Hu J, Wang Y, Lin H, Zhang A, Liu C, Peng Y, Zhu L, Ren D, Shen L, Dong G, Zhang G, Zeng D, Guo L, Qian Q, Gao Z. Natural variation in the promoter of *TGW2* determines grain width and weight in rice. *New Phytologist*, 2020, 227(2): 629-640
- [7] Shi C, Dong N, Guo T, Ye W, Shan J, Lin H. A quantitative trait locus *GW6* controls rice grain size and yield through the gibberellin pathway. *The Plant Journal*, 2020, 103(3): 1174-1188
- [8] Zhan P, Ma S, Xiao Z, Li F, Wei X, Lin S, Wang X, Ji Z, Fu Y, Pan J, Zhou M, Liu Y, Chang Z, Li L, Bu S, Liu Z, Zhu H, Liu G, Zhang G, Wang S. Natural variations in *grain length 10* (*GL10*) regulate rice grain size. *Journal of Genetics and Genomics*, 2022, 49(5): 405-413
- [9] Liu Q, Han R, Wu K, Zhang J, Ye Y, Wang S, Chen J, Pan Y, Li Q, Xu X, Zhou J, Tao D, Wu Y, Fu X. G-protein β subunits determine grain size through interaction with MADS-domain transcription factors in rice. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 852
- [10] Yan S, Zou G, Li S, Wang H, Liu H, Zhai G, Guo P, Song H, Yan C, Tao Y. Seed size is determined by the combinations of the genes controlling different seed characteristics in rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 2011, 123(7): 1173-1181
- [11] Wang Y, Xiong G, Hu J, Jiang L, Yu H, Xu J, Fang Y, Zeng L, Xu E, Xu J, Ye W, Meng X, Liu R, Chen H, Jing Y, Wang Y, Zhu X, Li J, Qian Q. Copy number variation at the *GL7* locus contributes to grain size diversity in rice. *Nature Genetics*, 2015, 47(8): 944-948
- [12] Ying J Z, Ma M, Bai C, Huang X H, Liu J L, Fan Y Y, Song X J. *TGW3*, a major QTL that negatively modulates grain

- length and weight in rice. *Molecular Plant*, 2018, 11(5): 750-753
- [13] 朱洪慧, 李映姿, 高远卓, 林泓, 王成洋, 晏紫仪, 彭瀚平, 李田野, 熊茂, 李云峰. 水稻短宽粒基因 *SWG1* 的图位克隆. *中国农业科学*, 2023, 56(7): 1260-1274
- Zhu H H, Li Y Z, Gao Y Z, Lin H, Wang C Y, Yan Z Y, Peng H P, Li T Y, Xiong M, Li Y F. Map-based cloning of the *SHORT AND WIDEN GRAIN 1* gene in rice (*Oryza sativa* L.). *Scientia Agricultura Sinica*, 2023, 56(7): 1260-1274
- [14] Bai F, Ma H J, Cai Y C, Shahid M Q, Zheng Y B, Lang C, Chen Z X, Wu J W, Liu X D, Wang L. Natural allelic variation in *GRAIN SIZE AND WEIGHT 3* of wild rice regulates the grain size and weight. *Plant Physiology*, 2023, 193(1): 502-518
- [15] 邓伟, 吕莹, 董阳均, 徐雨然, 杨华涛, 张锦文, 张建华, 奎丽梅, 涂建, 相罕章, 管俊娇, 董维, 谷安宇, 安华, 杨丽萍, 张笑, 李小林. 云南水稻种质资源的遗传多样性分析. *植物遗传资源学报*, 2023, 24(24): 624-635
- Deng W, Lv Y, Dong Y J, Xu Y R, Yang H T, Zhang J W, Zhang J H, Kui L M, Tu J, Xiang H Z, Guan J J, Dong W, Gu A Y, An H, Yang L P, Zhang X, Li X L. The genetic diversity analysis of rice germplasm resources in Yunnan province of China. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2023, 24(24): 624-635
- [16] 张风琴, 于雪然, 李玲, 王蕊, 李培富, 马天利. 基于高密度遗传图谱对水稻抗性淀粉 QTL 定位及分析. *植物遗传资源学报*, 2023, 24(4): 1075-1084
- Zhang F Q, Yu X R, Li L, Wang R, Li P F, Ma T L. Mapping and analysis of QTL of rice resistant starch based on high density genetic map. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2023, 24(4): 1075-1084
- [17] 宋博文, 王朝欢, 赵哲, 陈淳, 黄明, 陈伟雄, 梁克勤, 肖武名. 基于高密度遗传图谱对水稻粒形 QTL 定位及分析. *作物学报*, 2022, 48(11): 2813-2825
- Song B W, Wang C H, Zhao Z, Chen C, Huang M, Chen W X, Liang K Q, Xiao W M. Mapping and analysis of QTLs for grain size in rice based on high density genetic map. *Acta Agronomica Sinica*, 2022, 48(11): 2813-2825
- [18] Li H, Ye G, Wang J. A modified algorithm for the improvement of composite interval mapping. *Genetics*, 2007, 175(1): 361-374
- [19] Zhang B, Wang X, Zhao Z, Wang R, Huang X, Zhu Y, Yuan L, Wang Y, Xu X, Burlingame A L, Gao Y, Sun Y, Tang W. *OsBRI1* activates BR signaling by preventing binding between the TPR and kinase domains of *OsBSK3* via phosphorylation. *Plant Physiology*, 2016, 170(2): 1149-1161
- [20] 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
- [21] 黄涛, 王燕宁, 钟奇, 程琴, 杨滕滕, 王鹏, 吴光亮, 黄诗颖, 李才敬, 余剑峰, 贺浩华, 边建民. 利用染色体片段置换系群体定位和分析水稻粒重和粒型 QTL. *中国水稻科学*, 2022, 36(2): 159-170
- Huang T, Wang Y N, Zhong Q, Cheng Q, Yang M M, Wang P, Wu G L, Huang S Y, Li C J, Yu J F, He H H, Bian J M. Mapping and analysis of QTLs for rice grain weight and grain shape using chromosome segment substitution line population. *Chinese Journal of Rice Science*, 2022, 36(2): 159-170
- [22] Spielmeier W, Ellis M H, Chandler P M. Semidwarf (*sd-1*), "green revolution" rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99(13): 9043-9048
- [23] 夏宝森, 大场伸哉, 菊池文雄, 武田和羲. 水稻半矮生基因 *sd-1* 的遗传性状表现. *遗传学报*, 1994, 21(1): 59-66
- Xia B S, Oba S, Kikucrhi F, Takeda K. Character expression of the semidwarfing gene *sd-1* in rice. *Journal of Genetics and Genomics*, 1994, 21(1): 59-66
- [24] 张波, 裴瑞琴, 杨维丰, 朱海涛, 刘桂富, 张桂权, 王少奎. 利用单片段代换系鉴定巴西陆稻 IAPAR9 中的水稻粒型基因. *作物学报*, 2021, 47(1): 1472-1480
- Zhang B, Pei R Q, Yang W F, Zhu H T, Liu G F, Zhang G Q, Wang S K. Mapping and identification QTL controlling grain size in rice (*Oryza sativa* L.) by using single segment substitution lines derived from IAPAR9. *Acta Agronomica Sinica*, 2021, 47(1): 1472-1480
- [25] Li Y, Fan C, Xing Y, Jiang Y, Luo L, Sun L, Shao D, Xu C, Li X, Xiao J, He Y, Zhang Q. Natural variation in *GS5* plays an important role in regulating grain size and yield in rice. *Nature Genetics*, 2011, 43(12): 1266-1269
- [26] He Y, Hong G, Zhang H, Tan X, Li L, Kong Y, Sang T, Xie K, Wei J, Li J, Yan F, Wang P, Tong H, Chu C, Chen J, Sun Z. The *OsGSK2* kinase integrates brassinosteroid and jasmonic acid signaling by interacting with *OsJAZ4*. *The Plant Cell*, 2020, 32(9): 2806-2822
- [27] Shomura A, Izawa T, Ebana K, Ebitani T, Kanegae H, Konishi S, Yano M. Deletion in a gene associated with grain size increased yields during rice domestication. *Nature Genetics*, 2008, 40(8): 1023-1028
- [28] Liu J, Chen J, Zheng X, Wu F, Lin Q, Heng Y, Tian P, Cheng Z, Yu X, Zhou K, Zhang X, Guo X, Wang J, Wang H, Wan J. *GW5* acts in the brassinosteroid signalling pathway to regulate grain width and weight in rice. *Nature Plants*, 2017, 3(5): 17043
- [29] 刘喜, 牟昌铃, 周春雷, 程治军, 江玲, 万建民. 水稻粒型基因克隆和调控机制研究进展. *中国水稻科学*, 2018, 32(1): 1-11
- Liu X, Mou C L, Zhou C L, Cheng Z J, Jiang L, Wan J M. Research progress on cloning and regulation mechanism of rice grain shape genes. *Chinese Journal of Rice Science*, 2018, 32(1): 1-11

- [30] Zhang C, Zhang F, Zhou J, Fan Z, Chen F, Ma H, Xie X. Overexpression of a phytochrome-regulated tandem zinc finger protein gene, *OsTZF1*, confers hypersensitivity to ABA and hyposensitivity to red light and far-red light in rice seedlings. *Plant Cell Reports*, 2012, 31(7): 1333-1343
- [31] 周淑芬, 刘宝, 张迪. *OsTZF9* 基因过量表达调控水稻多种生长发育表型. *福建农业科技*, 2021, 52(11): 1-6
- Zhou S F, Liu B, Zhang D. Overexpression of *OsTZF9* gene regulates various phenotypes of growth and development in rice. *Fujian Agricultural Science and Technology*, 2021, 52(11): 1-6
- [32] Seok H Y, Woo D H, Park H Y, Lee S Y, Tran H T, Lee E H, Vu Nguyen L, Moon Y H. AtC3H17, a non-tandem CCCH zinc finger protein, functions as a nuclear transcriptional activator and has pleiotropic effects on vegetative development, flowering and seed development in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 2016, 57(3): 603-615
- [33] Wang L, Xu Y, Zhang C, Ma Q, Joo S H, Kim S K, Xu Z, Chong K. OsLIC, a novel CCCH-type zinc finger protein with transcription activation, mediates rice architecture via brassinosteroids signaling. *PLoS ONE*, 2008, 3(10): e3521