

· 研究报告 ·

## 水稻叶绿素含量QTL定位与候选基因表达分析

金佳怡<sup>1</sup>, 罗悻婷<sup>1</sup>, 杨惠敏<sup>1</sup>, 芦涛<sup>1</sup>, 叶涵斐<sup>1</sup>, 谢继毅<sup>1</sup>, 王珂欣<sup>1</sup>  
陈芊羽<sup>1</sup>, 方媛<sup>1</sup>, 王跃星<sup>2\*</sup>, 饶玉春<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>浙江师范大学生命科学学院, 金华 321004; <sup>2</sup>中国水稻研究所, 水稻生物学国家重点实验室, 杭州 310006

**摘要** 水稻(*Oryza sativa*)是我国主要粮食作物之一。提高水稻叶片叶绿素含量, 进而提高其光合作用效率是实现高产稳产的重要途径之一。该研究以父系籼稻品种华占(HZ)、母系粳稻品种热研2号(Nekken2)及其构建的120个重组自交系(RILs)为实验材料, 在分蘖期和成熟期分别对亲本及其后代剑叶的叶绿素含量(SPAD值)进行测定, 同时基于已构建的高密度遗传连锁图谱进行QTL定位。结果共挖掘到20个与叶绿素含量相关的QTLs(分蘖期7个, 成熟期13个), LOD值最高达4.77。利用qRT-PCR方法检测QTL区间内与叶绿素含量相关的候选基因的表达, 发现LOC\_Os06g11780、LOC\_Os06g12360、LOC\_Os06g39716、LOC\_Os08g42610、LOC\_Os02g18500、LOC\_Os03g21240、LOC\_Os03g21400、LOC\_Os03g21780、LOC\_Os03g30950及LOC\_Os03g40550基因的表达量在双亲间差异显著。结合基因表达量及亲本叶绿素表型数据, 推测LOC\_Os06g11780、LOC\_Os06g12360和LOC\_Os08g42610的高表达极大地提高了水稻叶绿素含量, 进而有效提高植物光合产能。研究结果为筛选和培育高光能利用效率的水稻新品种提供了有利的遗传资源, 并为揭示水稻叶绿素含量的动态变化规律及分子调控机制奠定了重要基础。

**关键词** 候选基因, 叶绿素含量, 遗传图谱, 水稻, 光合作用, QTL定位

金佳怡, 罗悻婷, 杨惠敏, 芦涛, 叶涵斐, 谢继毅, 王珂欣, 陈芊羽, 方媛, 王跃星, 饶玉春 (2023). 水稻叶绿素含量QTL定位与候选基因表达分析. 植物学报 58, 394–403.

随着世界人口不断增长, 耕地面积逐年缩减, 粮食安全问题日益严峻(王春华, 2018)。近年来, 水稻(*Oryza sativa*)总产量出现波动, 单产徘徊不前, 培育高产稳产的优质稻种仍是现阶段育种工作的重要目标。

光合作用是植物合成有机物的主要途径, 为水稻产量的形成奠定物质基础, 并在很大程度上决定水稻产能的发挥(周振翔, 2016)。而水稻叶片作为光合作用的重要源器官和物质载体, 其产生的干物质约占水稻产量的90%–95%。其中, 叶绿素作为最关键的光合色素, 其含量直接决定水稻光合作用的提高空间(杨凯如等, 2022; 赵凌等, 2022)。在一定范围内, 植株的叶绿素含量与其光合速率呈正比, 对提高产量至关重要(王红梅等, 2008; 梅银国等, 2012)。此外, 叶绿素的合成与降解在水稻生长发育期间呈现动态变

化, 不同生长阶段的叶绿素含量变化与水稻单产关联紧密。探明各关键生育时期叶绿素含量的变化及其遗传机制, 对于水稻高光效育种及提高产量均具有重要意义。

截至目前, 水稻的光合作用研究大多停留在生理水平上。近几年, 随着数量性状基因座研究的不断深入, 有关水稻叶片叶绿素含量的QTL定位分析取得较大进展, 但利用同一群体探究不同生育期叶绿素含量的动态变化, 并剖析其遗传基础的研究相对较少(姚晓云等, 2022)。在以往研究中, Dong等(2007)以Koshihikari/Kasalath构建182个回交重组自交系(backcross inbred line, BIL), 共检测到7个调控分蘖期和抽穗期叶绿素含量的QTLs, 分别定位在第1、2、3、4、6和8号染色体上, 且单个QTL的贡献率为5.1%–14.8%, 其中仅有3个QTLs (*qLCC-1-I*、*qLCC-1-2*和

收稿日期: 2022-11-08; 接受日期: 2023-02-09

基金项目: 浙江省自然科学基金重点项目(No.LZ23C130003)、国家级大学生创新创业训练计划(No.202210345029)和浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划(No.2022R404A005)

\* 通讯作者。E-mail: wangyuexing@caas.cn; ryc@zjnu.cn

*qLCC-4*) 在 2 个时期同时被检测到, 说明不同时期叶绿素含量的调控位点存在差异。Zuo 等(2007) 利用 *Asominori* 与 *IR24* 杂交获得重组自交系(recombinant inbred line, RIL) 群体, 检测到 45 天苗期、分蘖末期及抽穗期控制叶绿素含量的 10 个 QTLs, 分别定位在第 1、3、4、5、7、11 和 12 号染色体上, 贡献率为 9.7%–25.7%, 且未发现在 3 个时期能同时被检测到的 QTL。Jiang 等(2010) 以丽江新团黑谷和沈农 265 构建的重组自交系为实验材料, 探究水稻不同时期叶绿素含量的遗传调控机制, 结果检测到 22 个控制水稻分蘖期、抽穗期及成熟期叶绿素含量的 QTLs, 其中仅位于 LTH 的第 4 号染色体 RM255–RM3494 区间内的 *qCTH4* 具有加性效应, 在水稻分蘖期至抽穗期均可调控叶绿素含量, LOD 值为 19.41, 贡献率为 61.42%。此外, Jiang 等(2010) 通过对比发现, 生育后期调控叶绿素合成与降解途径的基因表达量显著高于生育前期。范淑秀等(2010) 以粳稻秋光和籼稻七山占为亲本, 对构建的  $F_{10}$  重组自交系开展 QTL 定位, 共挖掘到 22 个控制孕穗期剑叶叶绿素含量的相关位点, 分别位于第 3、7、10 和 12 号染色体上。刘进等(2012) 以粳稻 *Sasanishiki* 与籼稻 *Habataki* 及其衍生的回交重组自交系(BILs) 遗传群体为研究对象, 对水稻 8 个生长发育阶段内叶绿素含量进行动态 QTL 剖析, 共定位到 39 个 QTLs, 单个 QTL 的贡献率为 6.64%–30.83%。其中, 生育前期和中后期检测到的 QTL 位点较少, 仅为 1–3 个; 生育中期检测到的位点较多, 平均为 4–5 个。Zhang 等(2014) 对籼/粳交(籼稻 93-11 和粳稻日本晴) 构建的 RIL 群体开展研究, 获得 7 个与抽穗期及成熟期水稻剑叶叶绿素含量相关的 QTLs, 分别位于第 1、4、7 和 12 号染色体上, 贡献率为 8.1%–20.8%, 并且在 2 个时期均检测到主效 QTL *qLSCHL4*, 经鉴定发现 *qLSCHL4* 与窄叶突变体基因 *NAL1* 等位, 具有多效性。Huang 等(2015) 利用粳稻春江 06 (CJ06) 与籼稻台充原种(TN1) 杂交的 DH 群体, 对水稻灌浆期 4 个发育阶段的顶三叶叶绿素含量进行 QTL 分析, 共检测到 61 个控制叶绿素含量的 QTLs, 贡献率为 2.9%–26.9%, 同时检测到 27 个具有上位性互作的 QTLs, 表现出明显的时空特异性。杨树明等(2017) 以水稻十和田与丽江新团黑谷杂交所得的 105 个耐冷近等基因系为材料, 对孕穗期叶绿素含量进行 QTL 定位, 共检测到 7 个主效 QTLs, 分别位于第 1、4、5 和 7 号染色体

上。李永洪等(2018) 利用籼稻岗 46B 和 A232 杂交构建的重组自交系, 历时 2 年共检测到 30 个控制水稻分蘖期与抽穗期顶三叶叶绿素含量的 QTLs, 单个位点的表型贡献率为 5.91%–38.69%, 其中在 3 号染色体 RM231–RM3392 分子标记区间内的 QTL 位点受环境影响较小且较为稳定。

前人在水稻叶绿素相关 QTL 的定位研究中取得了一系列进展, 具有一定的参考价值, 但由于不同 QTL 之间和 QTL 与环境之间的互作效应, 以及受传统遗传图谱标记密度小、定位不精准的影响, 相关基因的精细定位与克隆受限, 并且多数 QTL 具有一因多效的作用, 故仍然难以真正将其应用于水稻高产高光效育种改良, 亟需挖掘更为精准的主效 QTL 及主基因。

鉴于此, 本实验选用籼稻华占(HZ)、粳稻热研 2 号(Nekken2) 及其构建的重组自交系(RIL) 群体为材料, 以水稻分蘖期和成熟期叶片叶绿素含量(SPAD 值) 为考查指标, 结合叶片叶绿素的表型数据, 并根据已构建的高密度遗传图谱进行 QTL 定位分析, 以期挖掘出控制水稻叶片叶绿素含量的新位点或基因, 并进一步揭示叶绿素含量的动态变化规律, 为高产高光效分子育种提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

分别以籼稻品种华占(*Oryza sativa* L. subsp. *indica* cv. 'HZ') 和粳稻品种热研 2 号(*O. sativa* L. subsp. *japonica* cv. 'Nekken2') 作为父本和母本, 通过单粒传法(王兰等, 2014) 套袋自交至第 12 代, 以获得表型和基因型均稳定遗传的 120 个重组自交系(RILs), 组成本研究所用的遗传群体。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 种植与管理

从  $F_{12}$  代稳定遗传的 120 个株系中, 每株系选取 100 颗籽粒饱满且大小接近的种子用于萌发。对种子表面进行消毒处理(先用 70% 乙醇处理 10 分钟, 再用 10%  $\text{NaClO}$  溶液处理 30 分钟, 最后用去离子水反复冲洗)。催芽时, 将种子在水中浸泡 2 天, 每天更换 1 次水; 然后用湿纱布将种子包裹并置于 37°C 恒温培养箱中, 48 小时后观察催芽情况。催芽完成后, 将露白一致的

种子播于育秧田中进行育苗。1个月后,选取各株系长势良好且一致的24株秧苗移栽到常规水稻田中。各株系均种植4行,每行6株,培养期间按常规田间管理,及时除草除虫。同时定期观察水稻的生育期,判定分蘖期和成熟期的准确时间。

### 1.2.2 叶绿素含量测定

在水稻分蘖期或成熟期,使用SPAD-502 PLUS便携式叶绿素仪对剑叶叶绿素含量(flag leaf chlorophyll content) (SPAD值)进行实地测量(姚晓云等, 2022)。每个株系随机选取生长状况良好且相似的5枚剑叶进行测定,每枚剑叶需要在叶片中部的叶脉两侧测定3次SPAD值。实验数据取3次测定的平均值。

### 1.2.3 遗传图谱构建

提取双亲及RILs遗传群体的DNA,纯化后进行全基因组重测序并构建测序文库,比较RILs之间的变异位点。利用隐马尔可夫模型(Xie et al., 2010)确定遗传群体的基因型,并将相同基因型的高密度单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点集中成区块,筛选出小于100 kb的SNP位点,统计数据并分析结果。得到4 858个均匀分布于水稻12条染色体上的分子标记,以此为依据,构建相应的高密度分子遗传图谱(叶涵斐等, 2022)。

### 1.2.4 QTL定位

针对实验前期建立的高密度SNP遗传图谱,应用Mapma-ker/QTL1.1B软件的复合区间作图法,设定LOD=2.0为阈值,进行叶片叶绿素QTL定位分析。QTL命名方法遵从McCouch等(1997)的准则。

### 1.2.5 基因表达定量分析

使用TRIzol总RNA提取试剂盒(Invitrogen, 美国),按照说明书对水稻分蘖期和成熟期双亲新鲜叶片进行处理。提取全部RNA后,于-80°C冰柜中保存,备用。样品RNA经DNase I处理后,依照逆转录试剂盒ReverTra AceR qRT-PCR Kit (Toyobo, 上海玉博生物科技有限公司)说明书反转录为cDNA。根据QTL定位结果,筛选与叶片叶绿素含量相关的候选基因,采用实时荧光定量PCR (qRT-PCR)方法测定候选基因在双亲分蘖期和成熟期的表达量。实验采用7500实时

PCR体系(ABI, 上海),以OsActin为内参基因。每个基因包括4个平行复孔,即4次技术重复。分别检测华占和热研2号各候选基因的表达量,进行2次生物学重复。qRT-PCR反应体系: 1  $\mu$ L cDNA模板, 5  $\mu$ L SYBR qPCR Mix (Toyobo), 10  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>正、反向引物各1  $\mu$ L, 加ddH<sub>2</sub>O补足至10  $\mu$ L。用离心机混匀。qRT-PCR反应所用引物序列见表1。qRT-PCR扩增程序: 95°C 30秒; 95°C 5秒, 55°C 10秒, 2°C 15秒, 40个循环(周纯等, 2019)。

### 1.3 数据处理

采用GraphPad Prism 9和Excel 2010软件对数据进行处理。利用2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup>法(Livak and Schmittgen, 2001)分析基因相对表达量。采用双尾t检验分别比较不同数据在0.01和0.05水平上的差异显著性。

表1 qRT-PCR所用引物序列

Table 1 Primer sequences for qRT-PCR

Primer name	Sequence (5'-3')
LOC_Os06g11780-F-qrt	TGTTGGTCCCTGAAAACCTCC
LOC_Os06g11780-R-qrt	TCAAGCAAATTCACCCATGA
LOC_Os06g12360-F-qrt	ATGCAAAAAGGAGAGGCTGA
LOC_Os06g12360-R-qrt	ATGCCGATCAGGAATCTCAC
LOC_Os06g39650-F-qrt	GTGCTCTTCAACCAGTGCAA
LOC_Os06g39650-R-qrt	AGATTGGCACAGCATGTCAG
LOC_Os06g39716-F-qrt	CAACCTTTTCGTAGGCATCC
LOC_Os06g39716-R-qrt	TTGAAATTGACTGGGCTTGA
LOC_Os08g42610-F-qrt	GCTCGCACACTGAAAACAAA
LOC_Os08g42610-R-qrt	ATGGGATAGGCCCAATAG
LOC_Os02g18500-F-qrt	AGGAGGAGGTGTTGGGAACT
LOC_Os02g18500-R-qrt	ATGCAGTTGTTGATGGCGTA
LOC_Os03g21240-F-qrt	TATGCCTTTCACCCAGAGTG
LOC_Os03g21240-R-qrt	CAGCATTGACGACTGAGAA
LOC_Os03g21400-F-qrt	AGGAAAGCGGAGAAGAAAGG
LOC_Os03g21400-R-qrt	TTAGACACCAGGCAGCTGTG
LOC_Os03g21780-F-qrt	CTCCCTTCCACTCCTCCTTC
LOC_Os03g21780-R-qrt	CTTCTCCTCCTCGACACCAG
LOC_Os03g30950-F-qrt	TCTTCTTCTCCATGGCCTGT
LOC_Os03g30950-R-qrt	AGCAGGAAGGAAGTCGTG
LOC_Os03g40550-F-qrt	CTTTGCTCCCTGCCTTGTAG
LOC_Os03g40550-R-qrt	CACGTCTCGGAGCTCTTTTC

## 2 结果与讨论

### 2.1 双亲及RILs群体叶绿素含量差异

双亲(HZ和Nekken2)和RILs群体分蘖期及成熟期的

叶片叶绿素含量分布如图1所示。结果表明, 无论是分蘖期还是成熟期, 双亲叶片叶绿素含量均差异显著(图2A-D)。华占(HZ)分蘖期和成熟期叶片SPAD均值分别为38.93和42.01, 热研2号(Nekken2) 2个时期的

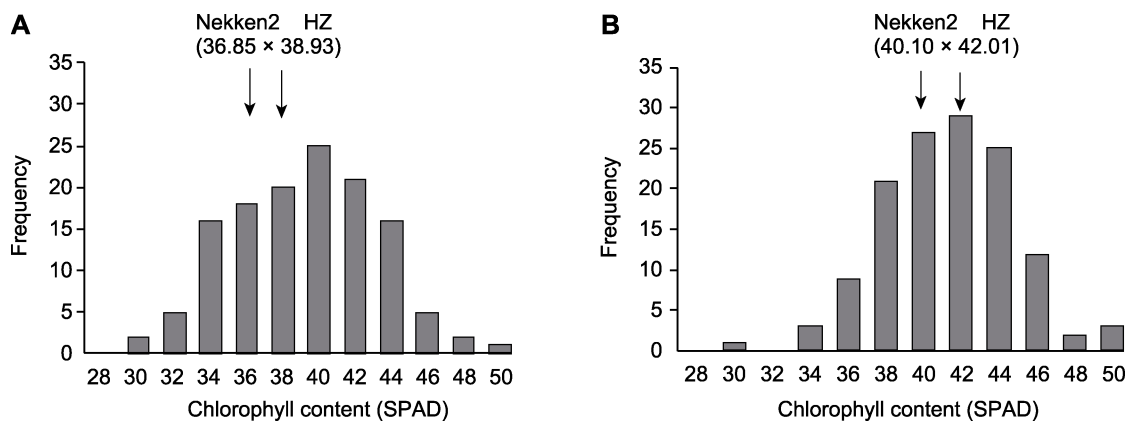


图1 水稻重组自交系中叶绿素含量分布

(A) 分蘖期; (B) 成熟期

Figure 1 Distribution of chlorophyll content in recombinant inbred lines of rice

(A) Tillering stage; (B) Maturing stage

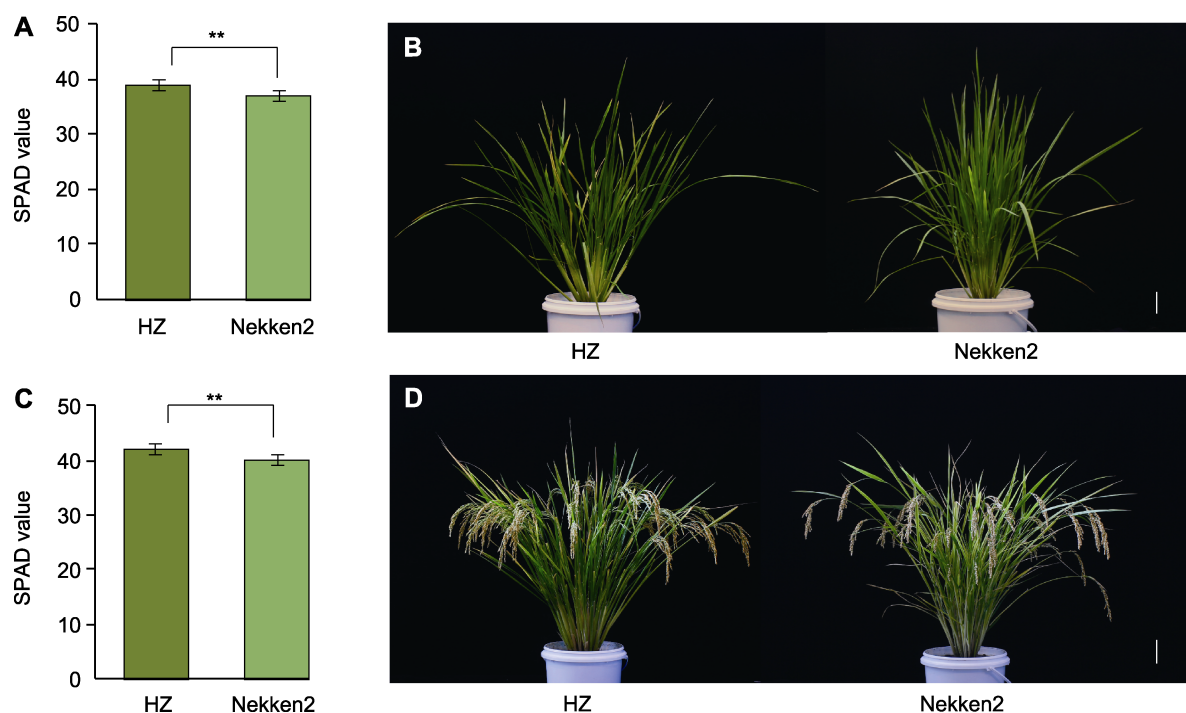


图2 父本华占与母本热研2号的SPAD值及表型

(A) 分蘖期水稻植株的SPAD值; (B) 分蘖期水稻植株的表型(bar=10 cm); (C) 成熟期水稻植株的SPAD值; (D) 成熟期水稻植株的表型(bar=10 cm)

Figure 2 SPAD value and phenotype of the male parent HZ and the female parent Nekken2

(A) SPAD value of rice plant at tillering stage; (B) Phenotype of rice plant at tillering stage (bar=10 cm); (C) SPAD value of rice plant at maturing stage; (D) Phenotype of rice plant at maturing stage (bar=10 cm)

SPAD均值分别为36.85和40.10,表明华占的光合效能高于热研2号。同一亲本在不同时期的SPAD值也存在显著差异,表明水稻叶绿素含量随生育进程的推进呈动态变化。在2个时期内,RILs群体各株系叶绿素含量均呈连续正态分布,SPAD值分布于28–50的11个区间内,且存在明显的超亲现象,表明水稻叶绿素含量属于多基因控制的数量性状,符合QTL区间作图要求。

## 2.2 水稻分蘖期和成熟期叶绿素含量QTL定位

利用RILs群体构建高密度SNP遗传连锁图谱并进行叶片叶绿素含量的QTL定位分析,图谱共包含4 858个分子标记,平均分布于水稻12条染色体上,符合QTL区间作图要求。本研究以LOD=2.0作为QTL存在与否的阈值,结果共检测到20个与水稻叶绿素含量相关的QTLs,LOD值介于2.00–4.77之间。其中,在分蘖期检测到7个QTLs,分别位于第6、8和9号染色体上;在成熟期检测到13个QTLs,分别位于第1、2、3、4、7和11号染色体上。位于3号染色体物理距离为

11 602 077–12 505 077 bp范围内的 $qFLCC3.2$ ,其LOD值高达4.77,是控制水稻成熟期叶绿素含量的主效QTL。而在6号染色体上检测到的 $qFLCC6.1$ 则为控制分蘖期叶绿素含量的主效QTL,其LOD值为3.13(表2;图3)。

## 2.3 候选基因表达量分析

根据QTL在水稻染色体上的位置,查阅水稻基因组注释项目网站(<http://rice.plantbiology.msu.edu>)和国家水稻数据中心基因库(<http://www.ricedata.cn/gene/>)的基因注释信息,并结合前人研究成果,我们初步筛选出可能与叶绿体发育以及不同时期叶绿素生物合成及降解相关的11个候选基因(表3,表4)。这些基因包括MYB转录因子基因、三角状五肽重复蛋白基因以及 $pfkB$ 型碳水化合物激酶蛋白基因等。利用实时荧光定量PCR方法对这11个基因在双亲间的表达量进行测定,结果表明,当水稻处于分蘖期时,除 $LOC\_Os-06g39650$ 在双亲间的表达量无明显差异外, $LOC\_Os06g11780$ 、 $LOC\_Os06g12360$ 、 $LOC\_Os-$

表2 水稻重组自交系群体叶绿素含量的QTL分析

Table 2 QTL analysis of chlorophyll content of rice recombinant inbred lines

Trait	QTL	Chromosome	Physical distance (bp)	Position of support (cM)	Likelihood of odd (LOD)
Chlorophyll content at tillering stage	$qFLCC6.1$	6	6015262–6720585	25.79–28.81	3.13
	$qFLCC6.2$	6	22337450–23745958	95.75–101.79	2.92
	$qFLCC6.3$	6	24051716–24198880	103.10–103.73	2.13
	$qFLCC6.4$	6	25991018–26126806	111.42–111.99	2.12
	$qFLCC8.1$	8	26687999–27132649	114.40–116.31	2.50
	$qFLCC8.2$	8	27513012–27730624	117.94–118.87	2.28
	$qFLCC9.1$	9	20982305–21030827	89.95–90.15	2.09
Chlorophyll content at maturing stage	$qFLCC1.1$	1	2407127–2649258	10.32–11.36	2.63
	$qFLCC2.1$	2	10729809–10871055	45.99–46.60	2.01
	$qFLCC3.1$	3	8989609–9140871	38.54–39.18	2.00
	$qFLCC3.2$	3	11602077–12505077	49.73–53.61	4.77
	$qFLCC3.3$	3	17425033–18170152	74.70–77.90	2.38
	$qFLCC3.4$	3	19142858–20859360	82.06–89.42	2.29
	$qFLCC3.5$	3	22349012–22880743	95.80–98.08	2.59
	$qFLCC3.6$	3	23094070–24507431	98.99–105.06	3.25
	$qFLCC4.1$	4	867957–1087636	3.72–4.66	2.40
	$qFLCC4.2$	4	2647701–3012559	11.35–12.91	2.30
	$qFLCC4.3$	4	6230638–6599549	26.71–28.29	2.46
	$qFLCC7.1$	7	9758981–9899583	41.83–42.68	2.45
	$qFLCC11.1$	11	3100542–3229790	13.29–13.85	2.27

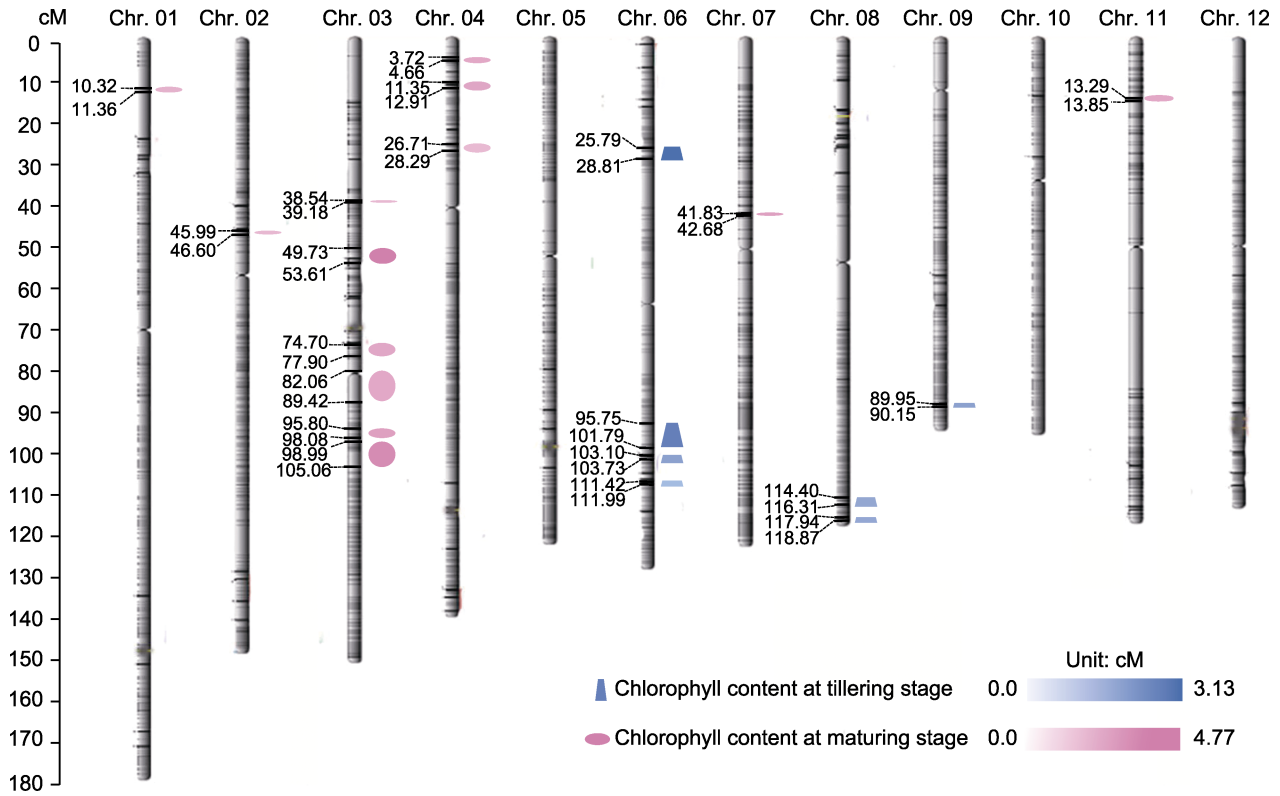


图3 水稻重组自交系群体叶绿素含量的QTL定位

Figure 3 QTL mapping of chlorophyll content of rice recombinant inbred lines

表3 水稻分蘖期叶绿素含量相关候选基因的功能

Table 3 The function of candidate genes related to chlorophyll content of rice at tillering stage

Chromosome	QTL locus	Gene ID	Functional annotation	Reference
6	<i>qFLCC6.1</i>	<i>LOC_Os06g11780</i>	MYB family transcription factor, putative, expressed	
6	<i>qFLCC6.1</i>	<i>LOC_Os06g12360</i>	Pentatricopeptide, putative, expressed	
6	<i>qFLCC6.2</i>	<i>LOC_Os06g39650</i>	Pentatricopeptide repeat protein	Jiang et al., 2014
6	<i>qFLCC6.2</i>	<i>LOC_Os06g39716</i>	Chloroplast 30S ribosomal protein S18, putative, expressed	
8	<i>qFLCC8.1</i>	<i>LOC_Os08g42610</i>	Pentatricopeptide, putative, expressed	

表4 水稻成熟期叶绿素含量相关候选基因的功能

Table 4 The function of candidate genes related to chlorophyll content of rice at maturing stage

Chromosome	QTL locus	Gene ID	Functional annotation	Reference
2	<i>qFLCC2.1</i>	<i>LOC_Os02g18500</i>	Chlorophyllase-2, chloroplast precursor, putative	
3	<i>qFLCC3.2</i>	<i>LOC_Os03g21240</i>	Transcription factor with a MYB domain; PHOS- PHATE RESPONSE 1	Guo et al., 2015
3	<i>qFLCC3.2</i>	<i>LOC_Os03g21400</i>	Cytochrome P450 gene; gibberellin 13-oxidase	
3	<i>qFLCC3.2</i>	<i>LOC_Os03g21780</i>	Pentatricopeptide repeat domain containing protein, putative, expressed	
3	<i>qFLCC3.3</i>	<i>LOC_Os03g30950</i>	Acyl-desaturase, chloroplast precursor, putative, expressed	
3	<i>qFLCC3.5</i>	<i>LOC_Os03g40550</i>	pfkB-type carbohydrate kinase family protein	

06g39716及LOC\_Os08g42610在父本华占中的表达量均显著高于母本热研2号(图4A); 在成熟期, LOC\_Os03g21240、LOC\_Os03g21400、LOC\_Os03g21780、LOC\_Os03g30950和LOC\_Os03g40550在父本华占中的表达量显著高于母本热研2号, 而LOC\_Os02g18500在华占中的表达量显著低于热研2号(图4B)。综上, 10个基因在双亲间的表达量存在显著差异, 说明它们可能参与叶绿素的合成和降解过程, 进而影响叶绿素含量的变化。

## 2.4 讨论

叶绿素是植物进行光能吸收、传递和转换的重要物质载体(甄晓宇等, 2019)。在一定范围内, 叶绿素的含量直接影响水稻光合产量及品质形成(Mae, 1997), 已成为水稻高产品种选育的通用指标。在不同的生长阶段, 叶绿素的合成与降解呈动态变化, 该变化过程对水稻穗部产量及品质性状有重要影响。在分蘖期, 叶绿素能够提高有效分蘖数量和质量, 并确保生育前期有机物的积累, 为产量形成奠定物质基础; 在灌浆成熟期, 叶绿素则为籽粒灌浆、结实和粒重形成提供关键物质来源(姚晓云等, 2022)。水稻叶绿素含量为多基因控制的数量性状, 调控网络复杂且内外源影响因素较多, 因此, 发掘不同时期水稻叶绿素含量相关QTL及主效基因是选育高产优质品种的有效方法之一。

本研究选取水稻分蘖期及成熟期相关检测指标,

以叶片叶绿素含量(SPAD值)为表型对象进行QTL定位, 共检测到20个QTLs (分蘖期7个, 成熟期13个), 且在不同生育时期检测到的叶绿素含量QTL分布于不同位点, 区间重合率低, 这与叶绿素合成与降解的动态过程相符。

与前人研究相比, 本研究获得的部分QTL具有较好的重演性。刘进等(2018)利用粳稻沈农0530-9和籼稻北陆129及其杂交衍生的F<sub>2</sub>群体为实验材料, 在第3号染色体的R3M10-R3M23区间内检测到与水稻成熟期叶绿素含量相关的QTL *qCM3a*, 该区间包含本研究定位到的*qFLCC3.1*和*qFLCC3.2*。在本研究中LOD值最大的*qFLCC3.2*位点附近, 左海龙(2008)也检测到1个与成熟期剑叶叶绿素含量相关的QTL *qMFLCC-3*, 其贡献率达18.97%, 说明其可能是稳定控制水稻成熟期叶绿素含量的位点, 且区间内很可能存在1个调控水稻叶绿素含量的主效基因, 具有较高的研究价值。姚晓云等(2022)在第9号染色体STS-RM3744区间内分别检测到与水稻分蘖期和抽穗期叶绿素含量相关的QTL *qCHT9*和*qCHH9*, 与本研究定位到的分蘖期叶绿素含量相关的QTL *qFLCC9.1*部分重叠, 说明该区间确实存在控制水稻分蘖期叶绿素含量的QTL。在本研究定位到的成熟期叶绿素含量相关的QTL位点*qFLCC1.1*, 姚晓云等(2022)也检测到1个抽穗期叶绿素含量相关QTL *qHD1*, 其LOD值为2.55, 贡献率达13.99%。姜树坤等(2012)检测到1个抽穗期叶绿素含量相关位点*qCH1*, 贡献

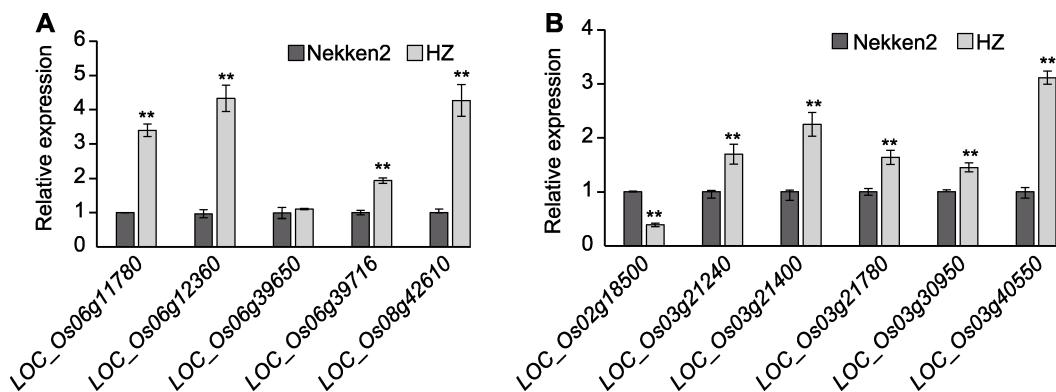


图4 水稻叶绿素含量相关基因表达量差异

(A) 分蘖期叶绿素含量相关基因表达量; (B) 成熟期叶绿素含量相关基因表达量。\*\*表示在0.01水平差异显著。

Figure 4 Differences in the expression level of the genes related to chlorophyll content in rice

(A) Expression of genes related to chlorophyll content at tillering stage; (B) Expression of genes related to chlorophyll content at maturing stage. \*\* indicate significant differences at 0.01 level.

率为11.2%。刘进(2013)检测到1个灌浆前期至中后期的条件QTL *qCPG-FL1a*, 贡献率为13.07%, 表明该位点是多效调控叶绿素含量的QTL, 能够在水稻不同发育阶段发挥调控作用。本研究进一步证实了前人的研究结果, 说明本研究所获得的QTLs具有研究价值。此外, 本研究还获得了许多新的QTL位点。例如, 在第6号染色体物理距离为6 015 262–6 720 585 bp的区间内定位到1个LOD值高达3.13的位点*qFLCC6.1*, 说明该区间内可能存在1个影响水稻分蘖期叶绿素含量的主效基因, 后续可利用该段QTL进行水稻高光合产能的品种改良。另有一区间较小且LOD值较大的QTL为*qFLCC8.1*, 位于第8号染色体物理距离为26 687 999–27 132 649 bp的区间内, 其LOD值为2.50。研究结果将为高产高光效水稻分子育种提供新的元件。

前人研究表明, *LOC\_Os03g40550*基因编码一种pfkB型碳水化合物激酶家族蛋白, 该蛋白为质体编码的RNA聚合酶(plastid-encoded RNA polymerase, PEP)的结构域之一, 在正调控叶绿体管家基因的表达中发挥重要作用。敲除该基因后, 植株表现为严重的白化表型(He et al., 2018)。*LOC\_Os06g12360*、*LOC\_Os06g39650*、*LOC\_Os08g42610*和*LOC\_Os03g21780*调控对象均为三角状五肽重复(pentatricopeptide repeat, PPR)蛋白, 该蛋白能够与细胞器基因组转录产物的特异序列结合, 参与RNA代谢的各个步骤(如RNA的编辑和剪接), 进而调控水稻一系列生长发育进程(李景芳等, 2022)。研究表明, 大多数PPR蛋白产物定位于叶绿体和线粒体中。根据实时荧光定量PCR检测结果, 我们推测*LOC\_Os06g12360*和*LOC\_Os08g42610*在叶绿体中发挥作用, 二者促进水稻生育前期叶绿体基因的表达以及叶绿体的发育进程, 从而间接影响植株的叶绿素含量。本研究表明, *LOC\_Os06g39650*在双亲间的表达量无显著差异。Jiang等(2014)利用簇生小穗突变体*sped1-D*已成功克隆该基因, 并将基因的表达产物定位于线粒体中, 其在线粒体中行使相应功能, 并且可能通过阻碍*GID1L2*、*RFL*和*WOX3*的表达影响水稻小花花粉育性, 而该基因是否具有线粒体和叶绿体双定位特性仍需进一步验证。*LOC\_Os06g11780*和*LOC\_Os03g21240*均属于MYB转录因子家族基因。MYB转录因子家族成员在结构上具有一致性, 均含有保守的MYB

DNA结合结构域(邹阳, 2020), 通过结合基因组的顺式作用元件来激活或抑制下游基因的表达。研究表明MYB转录因子在响应非生物胁迫及细胞形态建成中发挥重要作用(Huang et al., 2018)。*LOC\_Os03g21240*基因表达的MYB转录因子对磷酸盐饥饿诱导基因具有转录活性, 能够有效提高磷的吸收及利用效率(Guo et al., 2015), 而磷作为构成生命的重要元素之一, 在一定范围内能够有效促进叶绿素的生物合成。目前尚未见关于*LOC\_Os06g11780*的研究报道, 推测其与*LOC\_Os03g21240*基因功能相似。*LOC\_Os06g39716*编码叶绿体30S核糖体蛋白S18, 通过参与叶绿体RNA转录后加工调节叶绿体正常发育和功能。*LOC\_Os02g18500*编码叶绿素酶2, 该酶催化叶绿素水解为脱植醇叶绿素, 是叶绿素降解通路中的关键酶之一, 在水稻成熟阶段作用显著。实时荧光定量PCR检测结果表明, *LOC\_Os06g11780*、*LOC\_Os06g12360*和*LOC\_Os08g42610*在父本华占中的表达量呈极显著上调。由此推测, 这3个基因的高表达可能是华占叶绿素含量明显高于热研2号的主要原因, 后续可进行等位基因分析及基因变异研究。

综上, 本研究共定位到20个与水稻分蘖期和成熟期叶绿素含量相关的QTLs, 分布在水稻第1、2、3、4、6、7、8、9和11号染色体上, 其中第3号染色体上的位点LOD值最大(4.77), 与成熟期叶绿素含量相关。位于区间内与分蘖期叶绿素含量相关的4个基因(*LOC\_Os06g11780*、*LOC\_Os06g12360*、*LOC\_Os06g39716*和*LOC\_Os08g42610*)以及与成熟期叶绿素含量相关的6个基因(*LOC\_Os02g18500*、*LOC\_Os03g21240*、*LOC\_Os03g21400*、*LOC\_Os03g21780*、*LOC\_Os03g30950*和*LOC\_Os03g40550*)在父本华占和母本热研2号中的表达量差异显著, 这与双亲的表型差异相符, 说明这10个基因在调控水稻叶绿素含量中发挥重要作用, 进而影响植株的光合作用和产量。本研究在前人研究的基础上进一步挖掘水稻不同时期叶绿素含量相关QTLs, 解析了调控叶绿体发育、叶绿素合成及降解相关基因的功能, 为丰富水稻叶绿素含量的分子调控网络提供了重要线索。研究结果后续可应用于高产高光效水稻分子设计育种, 从而进一步提高水稻的增产潜力, 为保障我国粮食安全夯实基础。

## 参考文献

- 范淑秀, 王嘉宇, 毛艇, 徐正进 (2010). 水稻孕穗期叶绿素含量的QTL定位. 华北农学报 25(4), 69–72.
- 姜树坤, 张喜娟, 王嘉宇, 徐正进, 陈温福, 张凤鸣 (2012). 水稻叶绿素含量的动态QTL剖析. 东北农业大学学报 43(7), 47–52.
- 李景芳, 王宝祥, 刘艳, 刘金波, 陈庭木, 孙志广, 杨波, 邢运高, 迟铭, 徐波, 徐大勇 (2022). PPR蛋白在水稻生长发育中的功能研究进展. 植物遗传资源学报 23, 358–367.
- 李永洪, 李传旭, 刘成元, 何珊, 向箭宇, 谢戎 (2018). 利用岗46B/A232重组自交系群体分析叶绿素含量相关QTL. 西南农业学报 31, 2223–2228.
- 刘进 (2013). 水稻重要农艺性状QTL分析及叶绿素含量相关基因分子定位. 硕士学位论文. 沈阳: 沈阳农业大学. pp. 40–54.
- 刘进, 王嘉宇, 姜树坤, 徐正进 (2012). 水稻叶绿素含量动态QTL分析. 植物生理学报 48, 577–583.
- 刘进, 姚晓云, 范淑秀, 黎毛毛, 郭乃辉, 王鑫瑞, 王嘉宇, 陈温福 (2018). 水稻叶绿素含量和穗部性状的QTL及其相互关系分析. 沈阳农业大学学报 49, 641–648.
- 梅银国, 唐志明, 李华军, 李信年, 华国来, 李晓方 (2012). 水稻叶片叶绿素含量与衰老的关系. 湖北农业科学 51, 2177–2179.
- 王春华 (2018). 中国粮食安全现状与应对策略分析. 粮食问题研究 (5), 40–42.
- 王红梅, 张敏, 陶诗顺 (2008). 水稻叶绿素含量与发根率的关系研究. 安徽农业科学 36, 3265–3269.
- 王兰, 黄李超, 代丽萍, 杨密龙, 徐杰, 冷语佳, 张光恒, 胡江, 朱丽, 高振宇, 董国军, 郭龙彪, 钱前, 曾大力 (2014). 利用日本晴/9311重组自交系群体定位水稻成熟期叶形相关性状QTL. 中国水稻科学 28, 589–597.
- 杨凯如, 贾绮玮, 金佳怡, 叶涵斐, 王盛, 陈芊羽, 管易安, 潘晨阳, 辛德东, 方媛, 王跃星, 饶玉春 (2022). 水稻黄绿叶调控基因YGL18的克隆与功能解析. 植物学报 57, 276–287.
- 杨树明, 刘关所, 张素华 (2017). 不同生长环境下水稻孕穗期叶绿素QTL定位. 云南大学学报(自然科学版) 39, 684–690.
- 姚晓云, 杨平, 黄永萍, 彭志勤, 刘进, 吴延寿, 邹国兴, 尹建华 (2022). 水稻叶绿素含量主效QTL定位. 江西农业学报 34(2), 8–14.
- 叶涵斐, 殷文晶, 管易安, 杨凯如, 陈芊羽, 俞淑颖, 朱旭东, 辛德东, 章薇, 王跃星, 饶玉春 (2022). 水稻籽粒维生素E QTL挖掘及候选基因分析. 植物学报 57, 157–170.
- 赵凌, 张勇, 魏晓东, 梁文化, 赵春芳, 周丽慧, 姚姝, 王才林, 张亚东 (2022). 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 55, 825–836.
- 甄晓宇, 杨坚群, 栗鑫鑫, 刘兆新, 高芳, 赵继浩, 李颖, 钱必长, 李金融, 杨东清, 李向东 (2019). 播种深度对花生生育进程和叶片衰老的影响及其生理机制. 作物学报 45, 1386–1397.
- 周纯, 焦然, 胡萍, 林晗, 胡娟, 徐娜, 吴先美, 饶玉春, 王跃星 (2019). 水稻早衰突变体LS-es1的基因定位及候选基因分析. 植物学报 54, 606–619.
- 周振翔 (2016). 水稻叶片叶绿素含量对光合生理及产量的影响. 硕士学位论文. 扬州: 扬州大学. pp. 1–10.
- 邹阳 (2020). 水稻MYB转录因子家族成员的鉴定及其抗逆境调控机制研究. 硕士学位论文. 福州: 福建农林大学. pp. 1–7.
- 左海龙 (2008). 控制水稻叶片叶绿素含量及其降解相关基因的遗传定位. 博士学位论文. 上海: 上海师范大学. pp. 28–32.
- Dong YJ, Yang ZN, Xu JL, Lin DZ, Sugimoto Y, Luo LJ, Mei HW (2007). Quantitative trait loci for leaf chlorophyll content at two developmental stages of rice (*Oryza sativa* L.). *Commun Biometry Crop Sci* 2, 1–7.
- Guo MN, Ruan WY, Li CY, Huang FL, Zeng M, Liu YY, Yu YN, Ding XM, Wu YR, Wu ZC, Mao CZ, Yi KK, Wu P, Mo XR (2015). Integrative comparison of the role of the PHOSPHATE RESPONSE 1 subfamily in phosphate signaling and homeostasis in rice. *Plant Physiol* 168, 1762–1776.
- He L, Zhang S, Qiu ZN, Zhao J, Nie WD, Lin HY, Zhu ZG, Zeng DL, Qian Q, Zhu L (2018). FRUCTOKINASE-LIKE PROTEIN 1 interacts with TRXz to regulate chloroplast development in rice. *J Integr Plant Biol* 60, 94–111.
- Huang LC, Dai LP, Wang L, Leng YJ, Yang YL, Xu J, Hu J, Rao YC, Zhang GH, Zhu L, Dong GJ, Guo LB, Qian Q, Zeng DL (2015). Genetic dissection for chlorophyll content of the top three leaves during grain filling in rice (*Oryza sativa* L.). *J Plant Growth Regul* 34, 381–391.
- Huang YJ, Zhao HX, Gao F, Yao PF, Deng RY, Li CL, Chen H, Wu Q (2018). A R2R3-MYB transcription factor gene, *FtMYB13*, from Tartary buckwheat improves salt/drought tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* 132, 238–248.
- Jiang GH, Xiang YH, Zhao JY, Yin DD, Zhao XF, Zhu LH, Zhai WX (2014). Regulation of inflorescence branch development in rice through a novel pathway involving the pentatricopeptide repeat protein *sped1-D*. *Genetics* 197, 1395–1407.
- Jiang SK, Zhang XJ, Xu ZJ, Chen WF (2010). Comparison between QTLs for chlorophyll content and genes control-

- ling chlorophyll biosynthesis and degradation in *japonica* rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Agronom Sin* **36**, 376–384.
- Livak KJ, Schmittgen TD** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* **25**, 402–408.
- Mae T** (1997). Physiological nitrogen efficiency in rice: nitrogen utilization, photosynthesis, and yield potential. *Plant Soil* **196**, 201–210.
- McCouch SR, Cho YC, Yano M, Paul E, Blinstrub M** (1997). Report on QTL no-menclature. *Rice Genet Newsl* **14**, 11–13.
- Xie WB, Feng Q, Yu HH, Huang XH, Zhao Q, Xing YZ, Yu SB, Han B, Zhang QF** (2010). Parent-independent genotyping for constructing an ultrahigh-density linkage map based on population sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 10578–10583.
- Zhang GH, Li SY, Wang L, Ye WJ, Zeng DL, Rao YC, Peng YL, Hu J, Yang YL, Xu J, Ren DY, Gao ZY, Zhu L, Dong GJ, Hu XM, Yan MX, Guo LB, Li CY, Qian Q** (2014). *LSCHL4* from *japonica* cultivar, which is allelic to *NAL1*, increases yield of indica super rice 93-11. *Mol Plant* **7**, 1350–1364.
- Zuo HL, Xiao K, Dong YJ, Xu JL, Li ZK, Luo LJ, Mei HW** (2007). Molecular detection of quantitative trait loci for leaf chlorophyll content at different growth-stages of rice (*Oryza sativa* L.). *Asian J Plant Sci* **6**, 518–522.

## QTL Mapping and Expression Analysis on Candidate Genes Related to Chlorophyll Content in Rice

Jiayi Jin<sup>1</sup>, Yiting Luo<sup>1</sup>, Huimin Yang<sup>1</sup>, Tao Lu<sup>1</sup>, Hanfei Ye<sup>1</sup>, Jiyi Xie<sup>1</sup>, Kexin Wang<sup>1</sup>  
Qianyu Chen<sup>1</sup>, Yuan Fang<sup>1</sup>, Yuexing Wang<sup>2</sup>, Yuchun Rao<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China

<sup>2</sup>State Key Laboratory of Rice Biology, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China

**Abstract** Rice (*Oryza sativa*) is one of a major food crops in China. Increasing chlorophyll content in rice leaves and thus promoting its photosynthetic efficiency is one of the most important ways to obtain high and stable yields. In this study, 120 recombinant inbred lines (RILs) were constructed from the paternal *indica* rice HZ and the maternal *japonica* rice Nekken2 and they were used as experimental materials. We measured the flag leaf chlorophyll content (SPAD) of the parents and their progeny at the tillering and maturing stages. Meanwhile, the quantitative trait locus (QTL) mapping was carried out based on the high-density genetic map. Twenty QTLs related to chlorophyll content (7 at tillering stage and 13 at maturity stage) were identified, with the highest LOD score of 4.77. The expression of candidate genes associated with chlorophyll content within these QTL regions was analyzed by qRT-PCR, which showed that *LOC\_Os06g11780*, *LOC\_Os06g12360*, *LOC\_Os06g39716*, *LOC\_Os08g42610*, *LOC\_Os02g18500*, *LOC\_Os03g21240*, *LOC\_Os03g21400*, *LOC\_Os03g21780*, *LOC\_Os03g30950*, and *LOC\_Os03g40550* were significantly different between the parents. Combining the gene expression and parental chlorophyll phenotype data, we think that the high expression of *LOC\_Os06g11780*, *LOC\_Os06g12360* and *LOC\_Os08g42610* might greatly enhance the chlorophyll content of rice, which in turn effectively promoted the photosynthetic productivity of the plants. The results provide favorable genetic resources for screening and breeding new rice varieties for efficient light energy utilization, and lay an important foundation for revealing the dynamic change pattern and the molecular regulation mechanism of chlorophyll content in rice.

**Key words** candidate genes, chlorophyll content, genetic map, *Oryza sativa* (rice), photosynthesis, QTL mapping

**Jin JY, Luo YT, Yang HM, Lu T, Ye HF, Xie JY, Wang KX, Chen QY, Fang Y, Wang YX, Rao YC** (2023). QTL mapping and expression analysis on candidate genes related to chlorophyll content in rice. *Chin Bull Bot* **58**, 394–403.

\* Authors for correspondence. E-mail: wangyuexing@caas.cn; ryc@zjnu.cn

(责任编辑: 白羽红)