



水稻叶片水势的QTL定位与候选基因分析

潘晨阳, 张月, 林晗, 陈芊羽, 杨凯如, 姜嘉骥, 李梦佳, 芦涛
王珂欣, 路梅, 王盛, 叶涵斐, 饶玉春*, 胡海涛*

浙江师范大学化学与生命科学学院, 金华 321004

摘要 为探究叶片水势(LWP)相关基因在水稻(*Oryza sativa*)抗旱中的作用及其遗传机制, 以热研2号(Nekken2)和华占(HZ)为亲本以及构建的120个重组自交系(RILs)群体为实验材料, 对水稻分蘖期叶片水势进行检测, 并利用前期基于高通量测序构建的分子遗传连锁图谱进行数量性状基因座(QTL)分析。结果表明, 共检测到5个与水稻分蘖期叶片水势相关的QTLs, 分别位于第2、3、4、11和12号染色体上, LOD值均达2.5以上, 其中位于4号染色体物理距离24 066 261–30 847 136 bp内QTL的LOD值高达5.15。对这些QTL区间内与水势相关的候选基因进行定量分析, 发现LOC_Os02g56630、LOC_Os02g57720、LOC_Os02g57580、LOC_Os04g43730、LOC_Os04g46490、LOC_Os04g44570和LOC_Os04g44060这7个基因在双亲间表达量差异显著。位于4号染色体QTL区间内LOC_Os04g46490基因的表达在两亲本间存在显著差异。对基因LOC_Os04g46490进行测序分析, 发现该基因在两亲本间共存在6处差异, 从而导致氨基酸序列的改变。通过QTL挖掘及相关基因表达分析, 发现这些基因与水稻叶片水势调控相关, 可能间接影响水稻的抗旱性。检测到的QTL位点对水势相关基因精细定位和克隆具有重要参考价值, 有助于进一步理解水稻叶片水势的遗传基础, 并为培育耐旱水稻新品种提供有利的基因资源。

关键词 水稻, 叶片水势, 抗旱, 遗传图谱, QTL定位

潘晨阳, 张月, 林晗, 陈芊羽, 杨凯如, 姜嘉骥, 李梦佳, 芦涛, 王珂欣, 路梅, 王盛, 叶涵斐, 饶玉春, 胡海涛 (2021). 水稻叶片水势的QTL定位与候选基因分析. 植物学报 56, 275–283.

水稻(*Oryza sativa*)是中国乃至世界最重要的粮食作物之一, 水稻育种是解决粮食短缺难题的有效途径。21世纪以来, 随着全球气候变化加剧, 降水在时间和空间上分布不均, 极端干旱天气不断增多, 对水稻产量及其稳定性造成巨大影响(Wang et al., 2018)。培育在水分缺乏条件下依旧保持高产稳产的水稻品种成为育种工作者研究的新方向。

叶片是水稻最重要的器官之一, 在光合作用中发挥重要作用。光合作用过程需要消耗大量的水分, 因此叶片高含水状态和高水势是保证光合作用顺利进行的基础(Pivovarov et al., 2016)。叶片水势是叶片吸水 and 保水能力的综合体现, 反映了水稻体内水势能的高低(穆平, 2004), 其与水稻的抗旱能力密切相关,

也是水稻抗旱性的重要指标之一。在干旱胁迫下, 水稻叶片水势会相应降低(邱泽森等, 1993; 曲延英等, 2008)。Zhou等(2017)发现叶片水势与光合作用显著相关, 二者的变化趋势相同, 说明叶片水势影响植物的新陈代谢以及叶片的伸长。叶片水势与其渗透调节能力紧密相关, 研究表明具有较高叶片水势的水稻品种渗透调节能力较强, 在水分缺乏时, 具有较高叶片水势的水稻品种长势良好且产量较高(Jongdee et al., 2002; 高世斌等, 2005)。因此, 通过遗传育种手段改良叶片水势以提高水稻的抗旱性(Jongdee et al., 2002)有望实现水稻高产稳产。

目前, 有关叶片水势的研究大多集中在生理特性方面, 在遗传学方面取得的成果相对较少。在已往研

收稿日期: 2021-02-22; 接受日期: 2021-03-26

基金项目: 广西水稻遗传育种重点实验室开放基金(No.2018-15-Z06-KF12)、中国水稻生物学国家重点实验室研究基金(No.20200102)、浙江省教育厅项目(No.Y202045759)、2020年国家级大学生创新创业训练计划(No.202010345067)和2021年国家级大学生创新创业训练计划(No.202110345010)

* 通讯作者。E-mail: ryc@zjnu.cn; haitao-hu@zjnu.cn

究中,研究者曾以旱稻IRAT109为实验材料。曲延英等(2008)以越富和旱稻IRAT109为亲本构建了120个重组自交系,进行叶片水势与抗旱相关性分析及QTL定位,共挖掘到6个与叶片水势相关的加性QTLs,其中控制旱田叶片水势变化的QTL位点LOD值最大(5.05)。穆平(2004)利用相同的材料构建DH群体,以植株旺盛分蘖期叶片水势为考察指标,在水田条件下检测到2个叶片水势性状加性QTLs,贡献率均在14%以上;利用相同亲本构建的RIL群体在水田条件下检测到3个水势相关加性QTLs,分别位于第6、8和12号染色体上。刘鸿艳等(2005)以水稻珍汕97B和旱稻IRAT109杂交F₉代构建的RIL群体为实验材料,共检测到8个QTLs,贡献率在4.65%–23.17%之间;其中在水分充足条件下检测到1个与水稻叶片水势相关的QTL位点,在干旱胁迫下检测到7个影响水势的QTLs,分别位于第4、5、8和12号染色体上。聂元元等(2012)以供体IRAT109导入到珍汕97B背景的覆盖第2号染色体目标区段的87个近等基因系为实验材料,在第2号染色体上RIO 02037–RIO 02038 (长度为8.2 kb)区间内精细定位到1个与叶片水势相关的QTL,其加性效应为–1.0361,贡献率为13.03%。王辉等(2008)则选用以籼稻IR64和粳稻Azucena为亲本构建的DH株系进行QTL定位,共检测到8对调控水稻水势的加性×加性上位性互作效应QTLs,分别位于第1、2、3、4、5、7、9和12号染色体上;其中在干旱胁迫下检测到3对,在正常灌溉条件下检测到5对,位于第3号染色体的*qLWP-33*与第5号染色体的*qLWP51*两个位点的互作贡献率达27.39%。赵秀琴等(2008)采用不同的实验材料,利用粳稻品种Lemont导入籼稻品种特青构成的高代回交导入系定位到7个与黎明前叶片水势相关的QTLs,分别位于第2、3、5、6、8和12号染色体上;其中*QLwp2*和*QLwp5*加性效应为负值,其余位点加性效应均为正值,因此除*QLwp2*和*QLwp5*之外,其余位点Lemont等位基因均能提高叶片水势。此外,由于水稻叶片水势是由多基因控制的数量性状,且受环境等因素影响较大,其分子机制也相对复杂,研究难度较大,因此对相关基因的精细定位和克隆一直进展缓慢。目前检测到的水稻叶片水势相关QTLs的效应值均较小,故在实际生产及育种中未能得到广泛应用。

本实验以水稻分蘖期叶片水势为考察指标,选用

籼稻品种华占(HZ)、粳稻品种热研2号(Nekken2)及其RIL群体为实验材料,对各株系分蘖期叶片水势进行测定,基于叶片水势的表型数据和实验室前期已构建的遗传图谱进行QTL定位,以期检测到水稻叶片水势相关的QTL位点或基因,为培育耐旱水稻品种提供有利的基因资源。

1 材料与方法

1.1 实验材料

以热研2号(*Oryza sativa* L. subsp. *japonica* cv. 'Nekken2')和华占(*Oryza sativa* L. subsp. *indica* cv. 'HZ')为亲本,采取单粒传法(王兰等, 2014),经过连续12代套袋自交,获得基因型和表型比较稳定的120个重组自交系,作为本研究所用的遗传群体(图1)。实验群体于2018年6月播种,10月完成群体收种。

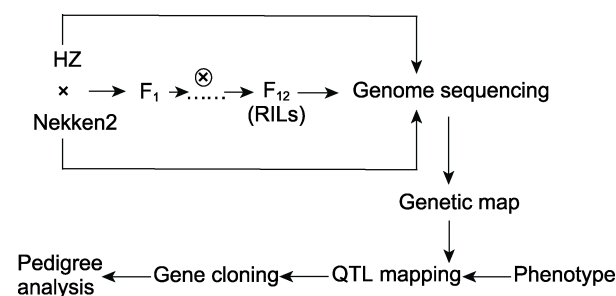


图1 水稻亲本与重组自交系(RILs)群体的构建过程

Figure 1 Schematic diagram of the rice parents and its recombinant inbred lines (RILs) population

1.2 方法

1.2.1 种子萌发与培养

取亲本和各个株系健康饱满且大小相近的水稻种子各50粒,先对种子表面进行消毒处理。用70%乙醇处理1分钟,再用10% NaClO溶液处理30分钟,最后用去离子水冲洗数次。将种子置于清水中浸种2天,期间每天换1次水。浸种后用湿润的毛巾包裹种子,置于37°C恒温培养箱中催芽2天,期间每天换1次水。挑选露白一致的种子铺种于育秧田中,培育水稻幼苗。

1.2.2 叶片水势测定

当水稻处于分蘖期时,在天气晴朗的早晨5:30–6:30,取各株系完全舒展的3片剑叶,放入自封袋密封,用

冰盒带回实验室, 利用WP4C露点水势仪(Decagon, 美国)测定叶片水势(潘琰等, 2017)。重复测定3次以排除偶然误差, 并以3片剑叶的平均值作为该株系的剑叶水势值。

1.2.3 遗传图谱的构建

通过对华占和热研2号两亲本及构建的RIL群体进行全基因组重测序, 获得均匀分布于水稻12条染色体上的4 858个高密度单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)分子标记, 以此构建高密度的遗传连锁图谱, 用于QTL定位研究(朱鸿宇等, 2020)。

1.2.4 QTL定位

基于高密度SNP标记的遗传图谱, 利用软件R-QTL. 1.41-6进行叶片水势的QTL定位分析。采用复合区间作图法, 并将LOD (likelihood of odd)=2.5设置为阈值来判断QTL是否存在。QTL的命名遵循McCouch等(1997)的原则。

1.2.5 基因表达定量分析及测序

取新鲜的水稻分蘖期亲本叶片, 利用Trizol总RNA提取试剂盒(Invitrogen, 美国)提取总RNA, 按照反转录试剂盒ReverTra Ace® qRT-PCR Kit (Toyobo, 上

海)说明书所述的操作步骤将DNase I处理后的RNA样品反转录成cDNA。结合QTL定位结果, 在2号和4号染色体区间内选取与叶片水势调控相关的候选基因, 设计引物(表1), 利用qRT-PCR分析各候选基因在分蘖期双亲叶片中的表达量。用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法(Livakkj and Schmittgent, 2001)对基因表达量进行相对定量分析。每个反应包括4个平行复孔, 实验重复3次。用Excel和SPSS19.0软件对实验数据进行统计分析, 采用t检验法比较不同数据间在0.01和0.05水平上的差异显著性。根据候选基因在两亲本间的表达差异, 筛选出可能性较高的候选基因进行测序。利用高保真DNA聚合酶KOD-Plus-Ve.2扩增候选基因的基因组DNA片段, 并对PCR产物进行测序。

2 结果与讨论

2.1 双亲及RIL群体的表现

经实验检测, 双亲(华占和热研2号)分蘖期叶片水势差异显著(图2)。华占叶片水势为-4.54 MPa, 热研2号叶片水势为-2.87 MPa, 热研2号叶片水势高于华占, 推测热研2号的抗旱能力可能高于华占。RIL群体分蘖期叶片水势数据均表现为连续正态分布, 且分布范围较为广泛, 存在较多超亲个体(图2), 表现出数量性状的遗传特点, 符合QTL区间的作图要求。

表1 实时荧光定量PCR的引物序列
Table 1 The primer sequences of real-time quantitative PCR

Primer name	Sequence (5'-3')	Tm (°C)	Length (bp)
LOC_Os02g56630-F-qrt	GATGCTACGGAGACTGCACA	60.02	182
LOC_Os02g56630-R-qrt	GAGCCAGAAGCACATGAACA	59.99	
LOC_Os02g57720-F-qrt	CTGACGTCGTGGTCGTTCTA	59.90	
LOC_Os02g57720-R-qrt	GACTTGTTACCCCCATCAC	60.22	101
LOC_Os04g43730-F-qrt	ACCAAAGTGGGTGTTTCTCG	60.01	
LOC_Os04g43730-R-qrt	TCGAGATCTGGCTTGTGTTG	59.98	
LOC_Os04g44060-F-qrt	CGGTGTTTCATGGTTCACTTG	60.00	182
LOC_Os04g44060-R-qrt	CCTCAGGACGTACTGGTGGT	60.03	
LOC_Os04g46490-F-qrt	GCCTCGTCCTCCACTACATC	59.69	
LOC_Os04g46490-R-qrt	CCGTGTACACCACCATGAAC	59.73	123
LOC_Os02g57580-F-qrt	ACCTCTTCAGATGGGGTGTG	59.96	
LOC_Os02g57580-R-qrt	CCAGTCAGTTTTGCAGACCA	59.87	
LOC_Os04g48230-F-qrt	GGGCACTACAAGTCCGTGAT	60.00	199
LOC_Os04g48230-R-qrt	CTTGGTAGCTTCCGATGAGC	59.98	
LOC_Os04g44570-F-qrt	CGCCACCACTGGGTTTACT	60.96	
LOC_Os04g44570-R-qrt	CACGGGAAGCCGAGTATCT	60.23	123

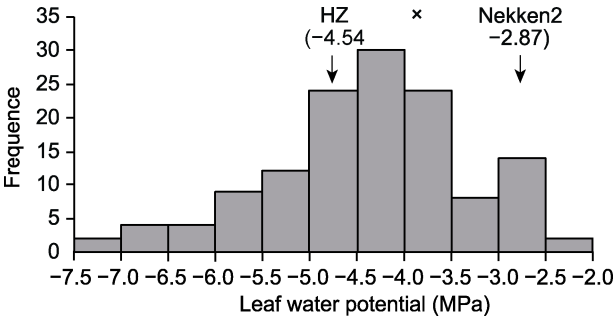


图2 水稻亲本与重组自交系(RILs)的叶片水势

Figure 2 Leaf water potential of rice parents and its recombinant inbred lines (RILs)

2.2 QTL定位分析

利用前期构建的SNP分子标记连锁图谱进行QTL定

位,共检测到5个与叶片水势相关的QTLs (表2),标记分别位于第2、3、4、11和12号染色体上(图3),且LOD值均较大。其中位于4号染色体物理距离24 066 261–30 847 136 bp 内的 QTL *qLpw4-8* 的LOD值高达5.15。

2.3 叶片水势相关候选基因的表达

通过查阅水稻基因组注释网站(<http://rice.plantbiology.msu.edu/>),获得上述QTLs所在染色体区间内的基因信息,并对筛选到的候选基因的功能信息进行初步整理(表3)。这些基因主要包括蛋白激酶、花青素渗透酶、水孔蛋白和脱水反应相关蛋白调控基因。通过qRT-PCR选择性地对这些基因在双亲间的表达量进行对比(图4),并采用*t*检验分析差异显著性。在4号染

表2 水稻分蘖期叶片水势的QTL分析

Table 2 QTL analysis of leaf water potential in rice at tillering stage

QTL	Chromosome	Physical distance (bp)	Position of support (cM)	Likelihood of odd (LOD)
<i>qLpw2-8</i>	2	34636269–35675126	148.48–152.93	3.27
<i>qLpw3-8</i>	3	30389734–30481217	130.27–130.66	2.93
<i>qLpw4-8</i>	4	24066261–30847136	103.17–132.23	5.15
<i>qLpw11-8</i>	11	2051418–2119803	8.79–9.09	3.06
<i>qLpw12-8</i>	12	25396321–25626163	108.87–109.85	3.34

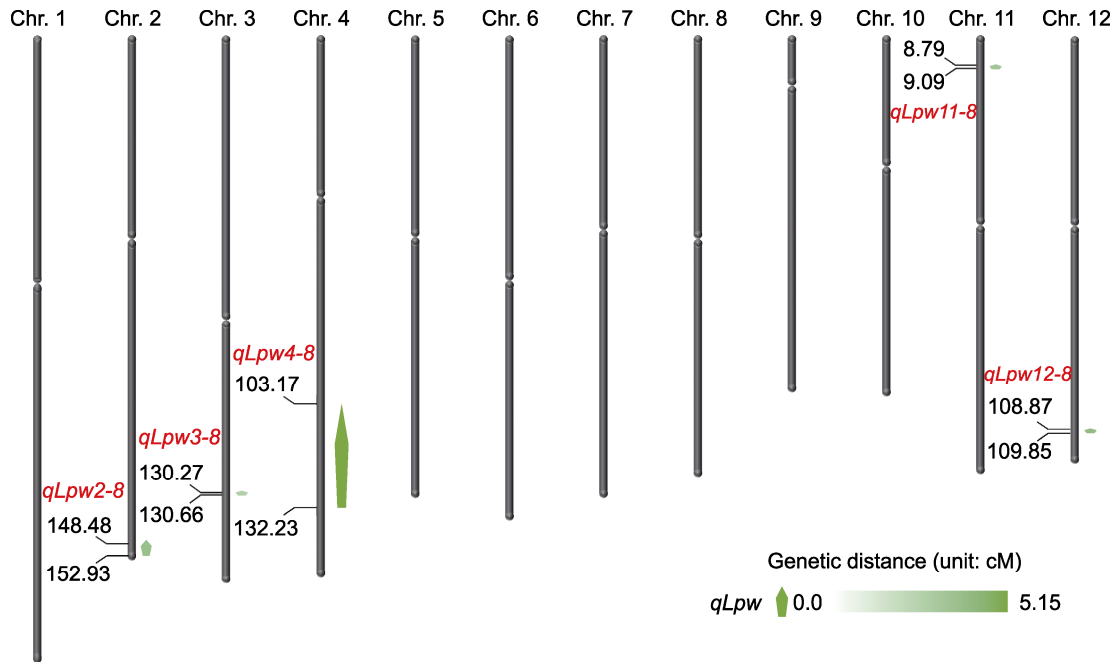


图3 水稻重组自交系叶片水势的QTL定位

Figure 3 QTL mapping of leaf water potential in rice recombinant inbred lines

表3 候选基因的功能注释

Table 3 The function annotation of candidate genes

Chromosome	Gene	Function	Regulation object	Reference
2	<i>LOC_Os02g56630</i>	Play an important regulatory role in the response of plants to abiotic stress	OsWAK24-OsWAK re- ceptor-like protein kinase	
4	<i>LOC_Os04g43730</i>	Play an important regulatory role in the response of plants to abiotic stress	OsWAK51-OsWAK re- ceptor-like protein kinase	
2	<i>LOC_Os02g57580</i>	Maybe involved in anthocyanin vacuole storage, participate in osmotic adjustment	Anthocyanin permease	Aza-González et al., 2013
2	<i>LOC_Os02g57720</i>	Mediate the transport of water across the membrane, regulate water	Aquaporin	
4	<i>LOC_Os04g46490</i>	Mediate the transport of water across the membrane, regulate water	Aquaporin	
4	<i>LOC_Os04g44570</i>	Mediate the transport of water across the membrane, regulate water	Aquaporin	
4	<i>LOC_Os04g44060</i>	Mediate the transport of water across the membrane, regulate water	Aquaporin	
4	<i>LOC_Os04g48230</i>	Maybe involved in the perception, conduction of plant dehydration and regulation of antidehydration substance synthesis	Dehydration response related protein	Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1997

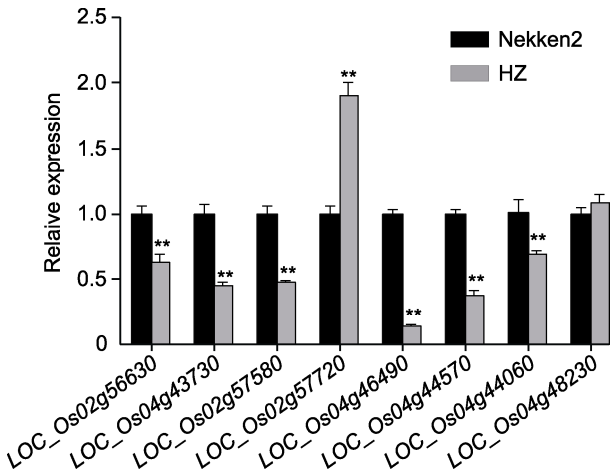


图4 水稻叶片水势相关候选基因表达量差异
**表示华占与热研2号基因表达量在0.01水平上差异显著。

Figure 4 Differences in the expression level of candidate genes involved in leaf water potential in rice
** indicate significant differences in genes expression level between HZ and Nekken2 at 0.01 level.

色体的103.17–132.23 cM区间内共筛选到5个候选基因，其中*LOC_Os04g48230*在两亲本间的表达量无显著差异，而*LOC_Os04g43730*、*LOC_Os04g-46490*、*LOC_Os04g44570*和*LOC_Os04g44060*在华占中的表达量均极显著低于热研2号，在其它QTL区间内筛选到的*LOC_Os02g56630*和*LOC_Os-02g57580*也均在父本中表达下调。而在2号染色体上筛选得到的*LOC_Os02g57720*在父本中的表达量极

显著高于母本。
综上，*LOC_Os02g56630*、*LOC_Os04g43730*、*LOC_Os02g57580*、*LOC_Os02g57720*、*LOC_Os-04g46490*、*LOC_Os04g44570*和*LOC_Os04g44060*基因在分蘖期双亲表达量存在显著差异，说明它们有可能参与调控水稻叶片水势，影响叶片水势的高低。

2.4 *LOC_Os04g46490*测序

对以华占和热研2号构建的RIL群体分蘖期叶片水势进行QTL分析，结果显示，效应最大的QTL位于4号染色体上，且qRT-PCR结果显示4号染色体上103.17–132.23 cM之间的基因*LOC_Os04g46490*在两亲本间的表达量差异极显著(图4)。因此，我们对两亲本华占和热研2号中该基因进行测序，共发现6处差异，其中4处发生在外显子部位，1处发生在内含子部位，另外1处发生在5'-UTR部位。以热研2号为参考，华占中该基因第61位碱基的位置多出AC碱基；第116位的碱基G被替换成碱基A；第157位的碱基C被替换成碱基A；第603位碱基的位置多了CAC；第722位的碱基C被替换成碱基T；在第750位碱基的位置，碱基A替换了碱基G。碱基序列的差异导致氨基酸序列的改变，第27个氨基酸由Thr变成Asn，第157个氨基酸由His变为Tyr，第166个氨基酸由Gly变为Asp(图5)。由此推测两亲本华占与热研2号间的叶片水势差异有可能是由于基因*LOC_Os04g46490*在双亲间碱基序列的差异导致氨基酸序列发生改变所致。

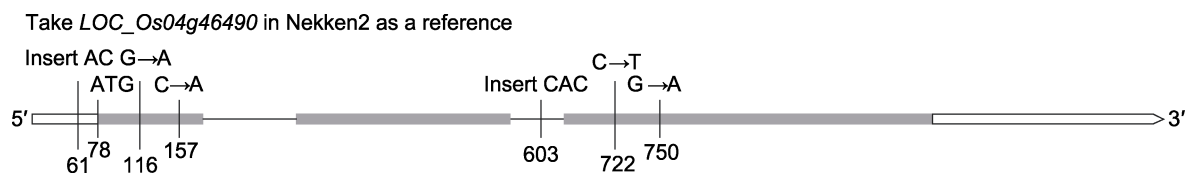


图5 华占LOC_Os04g46490突变位点及测序结果

Figure 5 Mutation sites and sequencing results of LOC_Os04g46490 in HZ

2.5 讨论

叶片水势反映了水稻体内水势能的高低,是叶片吸水 and 保水能力的综合体现,其与水稻的抗旱能力密切相关,同时叶片水势与光合作用之间显著相关,二者存在相同的变化趋势。目前,水稻叶片水势相关研究较少,因此对叶片水势的研究有重要应用价值。本研究以水稻分蘖期剑叶水势作为QTL检测指标,结合qRT-PCR技术,挖掘调控水稻叶片水势的潜在基因。本研究验证了前人的部分研究结果,并有一些新的发现。曲延英等(2008)以越富和IRAT109为亲本构建的RIL群体为实验材料,在4号染色体RM1136–RM273标记区间内检测到1个与旱田凌晨叶片水势相关的加性QTL位点 *wpiu4*, 同时在4号染色体RM567–RM1272标记区间内检测到水田中午叶片水势加性QTL位点 *wdl4*, 这两个位点均与本研究的 *qLpw4-8* 位点存在部分重合,且本研究测得其LOD值高达5.15,说明该区间内很可能存在1个调控叶片水势的主效基因。Hemamalini等(2000)利用IR64与Azucena杂交组合的56个双单倍体品系在12号染色体RG181–RG958标记区间内检测到1个与干旱相关的QTL位点 *qDRS12-1*, 该位点与本研究在12号染色体检测到的 *qLpw12-8* 有部分重叠,说明其可能通过调控叶片水势影响水稻的抗旱性。

本研究也定位到了新的调控水稻叶片水势的QTL位点。例如,在2号染色体上物理距离为34 636 269–35 675 126 bp的区间内新定位到1个LOD值达3.27的 *qLpw2-8*, 说明这个区间内可能存在1个影响水稻叶片水势的主效基因,可利用这段QTL进行水稻品种的耐旱能力改良。另有1个LOD值较大的新QTL为 *qLpw11-8*, 其LOD值达3.06, 位于11号染色体上物理距离为2 051 418–2 119 803 bp的区间内。同时在3号染色体上发现了1个新的QTL位点 *qLpw3-8*。本研究新发现的QTL位点LOD值均较高,且区间范围小,

在分子设计育种上具有一定的应用潜力。

已有研究表明, LOC_Os02g57720、LOC_Os04g46490、LOC_Os04g44570和LOC_Os04g44060调控对象均为水孔蛋白(aquaporin, AQP)。水孔蛋白是一种功能性的跨膜输水蛋白,属跨膜通道的膜内蛋白(membrane intrinsic protein, MIP)家族。水孔蛋白在水分运输和胞内渗透压调控方面发挥重要作用,其介导的水集流是植物体内水分运输的重要方式。研究表明, LOC_Os02g57720编码质膜水孔蛋白PIP, LOC_Os04g46490编码液泡膜水孔蛋白TIP, 但目前尚未见关于LOC_Os04g44570和LOC_Os04g44060编码水孔蛋白种类的研究。结合定量分析结果,推测LOC_Os04g44570和LOC_Os04g44060的功能可能与LOC_Os04g46490相同,即编码液泡膜水孔蛋白TIP。水稻的质膜水孔蛋白PIP的表达降低(Li et al., 2000)或者其磷酸化水平降低(Johansson et al., 1996, 1998)均会降低质膜的透水活性,因此为了维持较高的叶片水势,增强植株耐旱性,植物可能会降低PIP的表达和活性以防止水分从细胞流失。而增加TIP的表达活性,可以尽可能地利用液泡的缓冲力来维持胞质的渗透平衡(于利刚等, 2011)。因此,我们进一步对LOC_Os04g46490进行了基因测序分析,发现该基因在两亲本间共存在6处差异。LOC_Os02g56630和LOC_Os04g43730属于WAK受体样蛋白激酶家族,其在调控植物非生物胁迫响应过程中发挥重要作用(曹玉婷等, 2014)。渗透调节指植物在应对干旱胁迫时,细胞通过增加溶质以降低渗透势,减缓水分损失,维持植物正常形态及生理生化过程的主动性调节作用,是植物抵御干旱胁迫的重要机制。而LOC_Os02g57580调控的对象可能是花青素渗透酶。Marrs等(1995)、Mueller等(2000)以及Mathews等(2003)都提出花青素渗透酶参与花青素空泡封存,因此其有可能通过调控花青素参与渗透调节,进而调控叶片水势。结合父本华占叶片水势低于母本热研2

号的数据结果(图2), 本研究表明, 调控水孔蛋白的候选基因中, *LOC_Os04g46490*、*LOC_Os04g44570* 和 *LOC_Os04g44060* 这3个基因的高表达和 *LOC_Os02g57720* 基因的低表达可能会极大地提高水稻叶片水势, 增强水稻耐旱性。

3 结论

综上所述, 本研究定位到5个LOD值较大的QTLs, 分别位于第2、3、4、11和12号染色体上(图3), 其中位于4号染色体的QTL其LOD值最大, 高达5.15。同时, 本研究表明, *LOC_Os02g57720*、*LOC_Os04g46490*、*LOC_Os04g44570* 和 *LOC_Os04g44060* 基因在华占和热研2号两亲本间的表达量存在显著差异(图4), 而上述4个基因的表达量分析结果与亲本表型相符, 且测序结果显示基因 *LOC_Os04g46490* 在两亲本间共存在6处差异, 使编码氨基酸序列发生改变。上述基因可能是导致华占和热研2号分蘖期叶片水势差异的原因, 进而影响水稻耐旱能力。本研究为进一步揭示调控水稻叶片水势相关基因的功能及分子育种实践奠定了基础。同时, 所挖掘的QTL和基因经验证后可应用于遗传育种及后续的分子设计育种, 从而有望培育出维持高叶片水势且抗旱性强的水稻新品种, 对提升水稻产量和品质具有重要应用价值。

参考文献

- 曹玉婷, 丁艳菲, 朱诚 (2014). 类受体蛋白激酶与植物非生物胁迫应答. 中国生物化学与分子生物学报 **30**, 241–247.
- 高世斌, 冯质雷, 李晚忱, 荣廷昭 (2005). 干旱胁迫下玉米根系性状和产量的QTLs分析. 作物学报 **31**, 718–722.
- 刘鸿艳, 邹桂花, 刘国兰, 胡颂平, 李明寿, 余新桥, 梅捍卫, 罗利军 (2005). 水分梯度下水稻CT, LWP和SF的相关及其QTL定位研究. 科学通报 **50**, 130–139.
- 穆平 (2004). 水、旱稻DH和RIL群体抗旱性状相关分析及其QTL表达规律比较. 博士论文. 北京: 中国农业大学. pp. 1–115.
- 聂元元, 邹桂花, 李瑶, 刘国兰, 蔡耀辉, 毛凌华, 颜龙安, 刘鸿艳, 罗利军 (2012). 水稻第2染色体上抗旱相关性状QTL的精细定位. 作物学报 **38**, 988–995.
- 潘琰, 龚吉蕊, 宝音陶格涛, 罗亲普, 翟占伟, 徐沙, 王忆慧, 刘敏, 杨丽丽 (2017). 季节放牧下内蒙古温带草原羊草根

- 茎叶功能性状的权衡. 植物学报 **52**, 307–321.
- 邱泽森, 朱庆森, 刘建国, 巫亚东, 杨建昌 (1993). 水稻在不同土水势下的生理反应. 江苏农学院学报 **14**(2), 7–11.
- 曲延英, 穆平, 李雪琴, 田玉秀, 文峰, 张洪亮, 李自超 (2008). 水、旱栽培条件下水稻叶片水势与抗旱性的相关分析及其QTL定位. 作物学报 **34**, 198–206.
- 王辉, 曹立勇, 郭玉华, 程式华 (2008). 水稻生理特性与抗旱性的相关分析及QTL定位. 中国水稻科学 **22**, 477–484.
- 王兰, 黄李超, 代丽萍, 杨窑龙, 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.
- 于利刚, 解莉楠, 李玉花 (2011). 植物抗逆反应中水孔蛋白的表达调控研究. 生物技术通报 **27**(8), 5–14.
- 赵秀琴, 徐建龙, 朱苓华, 黎志康 (2008). 利用回交导入系定位干旱环境下水稻植株水分状况相关QTL. 作物学报 **34**, 1696–1703.
- 朱鸿宇, 王盛, 张月, 林晗, 路梅, 吴先美, 李三峰, 朱旭东, 饶玉春, 王跃星 (2020). 水稻籽粒砷、铜、铁、汞、锌含量QTL挖掘及候选基因分析. 中国科学: 生命科学 **50**, 623–632.
- Aza-González C, Herrera-Isidró L, Núñez-Palenius HG, De La Vega OM, Ochoa-Alejo N (2013). Anthocyanin accumulation and expression analysis of biosynthesis-related genes during chili pepper fruit development. *Biol Plantarum* **57**, 49–55.
- Hemamalini GS, Shashidhar HE, Hittalmani S (2000). Molecular marker assisted tagging of morphological and physiological traits under two contrasting moisture regimes at peak vegetative stage in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* **112**, 69–78.
- Johansson I, Karlsson M, Shukla VK, Chrispeels MJ, Larsson C, Kjellbom P (1998). Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *Plant Cell* **10**, 451–459.
- Johansson I, Larsson C, Ek B, Kjellbom P (1996). The major integral proteins of spinach leaf plasma membranes are putative aquaporins and are phosphorylated in response to Ca^{2+} and apoplastic water potential. *Plant Cell* **8**, 1181–1191.
- Jongdee B, Fukai S, Cooper M (2002). Leaf water potential and osmotic adjustment as physiological traits to improve drought tolerance in rice. *Field Crops Res* **76**, 153–163.
- Li LG, Li SF, Tao Y, Kitagawa Y (2000). Molecular cloning

- of a novel water channel from rice: its products expression in *Xenopus* oocytes and involvement in chilling tolerance. *Plant Sci* **154**, 43–51.
- 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.
- Marrs KA, Alfenito MR, Lloyd AM, Walbot V** (1995). A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2*. *Nature* **375**, 397–400.
- Mathews H, Clendennen SK, Caldwell CG, Liu XL, Connors K, Matheis N, Schuster DK, Menasco DJ, Wagoner W, Lightner J, Wagner DR** (2003). Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. *Plant Cell* **15**, 1689–1703.
- McCouch SR, Cho YG, Yano M, Paul E, Blinstrub M, Morishima H, Kinoshita T** (1997). Report on QTL nomenclature. *Rice Genet Newsl* **14**, 11–13.
- Mueller LA, Goodman CD, Silady RA, Walbot V** (2000). AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. *Plant Physiol* **123**, 1561–1570.
- Pivovarovoff AL, Pasquini SC, De Guzman ME, Alstad KP, Stemke JS, Santiago LS** (2016). Multiple strategies for drought survival among woody plant species. *Funct Ecol* **30**, 517–526.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (1997). Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol* **115**, 327–334.
- Wang YJ, Huang JK, Wang JX, Findlay C** (2018). Mitigating rice production risks from drought through improving irrigation infrastructure and management in China. *Aust J Agric Resour Econ* **62**, 161–176.
- Zhou Q, Ju CX, Wang ZQ, Zhang H, Liu LJ, Yang JC, Zhang JH** (2017). Grain yield and water use efficiency of super rice under soil water deficit and alternate wetting and drying irrigation. *J Integr Agric* **16**, 1028–1043.

QTL Mapping and Candidate Gene Analysis on Rice Leaf Water Potential

Chenyang Pan, Yue Zhang, Han Lin, Qianyu Chen, Kairu Yang, Jiayi Jiang, Mengjia Li, Tao Lu
Kexin Wang, Mei Lu, Sheng Wang, Hanfei Ye, Yuchun Rao*, Haitao Hu*

College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China

Abstract To reveal the role and genetic mechanism of genes related to leaf water potential (LWP) in rice drought resistance, the 120 recombinant inbred lines (RILs) populations derived from the cross of Nekken2 and HZ as well as the two parents were chosen as the experiment materials in this study. After testing and analyzing the leaf water potential at tillering stage, quantitative trait loci (QTL) were detected based on the molecular linkage map of these populations constructed by using high-throughput sequencing in the early stage. The experimental results showed that 5 QTLs related to leaf water potential at tillering stage were located on chromosome 2, 3, 4, 11 and 12, respectively, with LOD (likelihood of odd) value all above 2.5, one of which located on chromosome 4 with physical distance between 24 066 261 and 30 847 136 bp showed the highest LOD value of 5.15. Through quantitative analysis of these candidate genes relevant to leaf water potential within the QTL regions, 7 genes, *LOC_Os02g56630*, *LOC_Os02g57720*, *LOC_Os02g57580*, *LOC_Os04g43730*, *LOC_Os04g46490*, *LOC_Os04g44570*, *LOC_Os04g44060*, were identified to have different expression levels between the two parents. *LOC_Os04g46490*, which located within the QTL region on chromosome 4, showed significant difference in gene expression and 6 differences at DNA sequences and changes at amino acids between two parents. By QTL mining and quantitative analysis of related genes, we discovered that these genes were associated with the regulation of leaf water potential, which may indirectly affect the drought resistance of rice. The detected QTL loci have important reference value for QTL fine mapping and genes cloning associated with drought tolerance, thus facilitating our understanding of the genetic basis of rice leaf water potential, and providing genetic resources for developing new drought-tolerant rice cultivars.

Key words rice, leaf water potential, drought resistance, genetic map, QTL mapping

Pan CY, Zhang Y, Lin H, Chen QY, Yang KR, Jiang JJ, Li MJ, Lu T, Wang KX, Lu M, Wang S, Ye HF, Rao YC, Hu HT (2021). QTL mapping and candidate gene analysis on rice leaf water potential. *Chin Bull Bot* 56, 275–283.

* Authors for correspondence. E-mail: ryc@zjnu.cn; haitao-hu@zjnu.cn

(责任编辑: 白羽红)