

潘俊峰, 崔克辉, 刘彦卓, 王昕钰, 严博宇, 梁开明. 利用高密度 Bin 图谱定位水稻叶绿素含量 QTL [J]. 广东农业科学, 2022, 49 (9): 132–140.

利用高密度 Bin 图谱定位水稻叶绿素含量 QTL

潘俊峰¹, 崔克辉², 刘彦卓¹, 王昕钰^{1,2}, 严博宇^{1,2}, 梁开明¹

(1. 广东省农业科学院水稻研究所 / 广东省水稻育种新技术重点实验室 / 广东省水稻工程实验室 /

农业农村部华南优质稻遗传育种重点实验室, 广东 广州 510640;

2. 华中农业大学植物科技学院 / 作物遗传改良国家重点实验室 /

农业农村部长江中游作物生理生态与耕作重点实验室, 湖北 武汉 430070)

摘 要:【目的】探索水稻叶绿素含量及其对氮肥响应的遗传机理, 为氮高效、高光效的水稻品种培育提供新的标记区段。【方法】以珍汕 97 × 明恢 63 重组自交系 RIL (F_{11}) 113 个家系为 QTL 分析的试验材料, 在大田栽培条件下, 以施氮量为主区、家系为裂区, 设计低氮处理 (不施氮肥) 和正常氮处理 (纯氮 130、135 kg/hm²), 分别于水稻移栽后 30 d 测定 1.5 叶的 SPAD 值, 于抽穗期测定剑叶的 SPAD 值。利用包含 1 619 个 Bin 标记的高密度遗传图谱, 使用 IciMapping V3.4 软件和完备区间作图法, 定位控制水稻叶片叶绿素含量的 QTL。【结果】在两年、两个氮处理和两个发育时期共检测到 15 个调控叶片叶绿素含量的 QTL, 分别分布在第 1、2、3、6、7、10、11 号染色体上。单一 QTL 贡献率为 1.21%~40.74%。通过物理位置比较, 发现其中 6 个 QTL 已经被克隆或前人定位到的叶绿素含量相关位点在同一区间。其中, 在第 6 染色体的 8.45~9.12 Mb 处定位到 1 个调控抽穗期剑叶叶绿素的位点, 命名为 *qHDCHL6-1*, 该位点在两年和两个氮处理下均被检测到, 贡献率为 1.55%~28.01%。结合功能注释, 共筛选到 4 个与叶绿素代谢密切相关的基因, 分别为 *LOC_Os06g15370* (*OsNPF3.1*)、*LOC_Os06g15420* (*OsAS2*)、*LOC_Os06g15620* (*GAST*) 和 *LOC_Os06g15590*, 其中前 3 个基因已被鉴定克隆。【结论】共检测到 15 个控制水稻移栽后 30 d 和抽穗期叶片叶绿素含量的 QTL, 鉴定了 1 个稳定表达的 QTL 位点 *qHDCHL6-1*, 在该区间筛选到 4 个候选基因。

关键词: 水稻; 重组自交系; 高密度 Bin 图谱; 叶绿素含量; QTL

中图分类号: S511.01; Q37

文献标志码: A

文章编号: 1004-874X (2022) 09-0132-09

Mapping of QTL for Chlorophyll Content in Rice on High-Density Bin Map

PAN Junfeng¹, CUI Kehui², LIU Yanzhuo¹, WANG Xinyu^{1,2}, YAN Boyu^{1,2}, LIANG Kaiming¹

(1. Rice Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences / Guangdong Key Laboratory of New Technology for Rice Breeding / Guangdong Rice Engineering Laboratory / Key Laboratory of Genetics and Breeding of High Quality Rice in Southern China (Co-construction by Ministry and Province), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510640, China; 2. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University / National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement / Key Laboratory of Crop Ecophysiology and Farming System in the Middle Reaches of the Yangtze River, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wuhan 430070, China)

Abstract: 【Objective】The research explored the genetic mechanism for regulating chlorophyll content and its

收稿日期: 2022-07-18

基金项目: 广州市科技计划项目“珠江科技新星”专题 (201806010094); 广东省科技计划项目 (2021B1212050020)

作者简介: 潘俊峰 (1983—), 男, 博士, 副研究员, 研究方向为水稻高产高效生理, E-mail: junfeng401@163.com

通信作者: 崔克辉 (1967—), 男, 博士, 教授, 研究方向为作物生理与栽培, E-mail: cuikehui@mail.hzau.edu.cn

承蒙华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室水稻研究团队提供重组自交系材料、群体 Bin 遗传图谱信息和标记相关数据, 谨此致谢。

response to nitrogen (N) fertilizer in rice, and provide new molecular marker segments for breeding of high-yield and nitrogen-efficient rice varieties. 【Method】 The 113 family lines of ZS 97 × MH 63 recombinant inbred lines (RIL, F_{11}) were adopted as tested materials for QTL analysis. Field experiments were performed with split-plot design, N fertilizer rate being the main plots and RIL being subplots. The low N (no N) and normal N (130, 135 N kg/hm²) fertilizer treatments were established in the fields. The chlorophyll meter was used to determine SPAD values of leaves at 30 days after transplanting (30 DAT) and at heading (HD) stage. By using a high-density genetic map containing 1 619 Bin markers, IciMappingv3.4 software and complete interval mapping, QTL for controlling leaf chlorophyll content at two growth stages was mapped. 【Result】 In two N treatments at two growth stages within two years, a total of 15 QTLs for controlling leaf chlorophyll content were detected and they were located on chromosomes 1, 2, 3, 6, 7, 10 and 11. Each single QTL could explain 1.21%–40.74% of genetic contributions to traits. Through comparison of their physical loci, 6 QTLs were found to have been cloned or have the same loci being known previously for chlorophyll content. Among them, a locus, named *qHDCHL6-1*, regulating the chlorophyll content of flag leaf at heading stage was detected at 8.45–9.12Mb of chromosome 6. It was stably detected under two N treatments in two years, which explained 1.55%–28.01% of contributions to traits. Through functional annotation, 4 candidate genes related to chlorophyll content of flag leaf were found in the *qHDCHL6-1* chromosome interval. These genes were *LOC_Os06g15370 (OsNPF3.1)*, *LOC_Os06g15420 (OsAS2)*, *LOC_Os06g15620 (GAS)* and *LOC_Os06g15590*, and the first three of these genes have been cloned. 【Conclusion】 15 QTLs controlling leaf chlorophyll content of rice at 30 DAT and HD stage are detected, and a QTL locus *qHDCHL6-1* with stable expression was identified, which contains 4 candidate genes.

Key words: rice; recombinant inbred line; high-density Bin map; chlorophyll content; QTL

【研究意义】水稻是我国主要粮食作物，其高产与稳产对我国粮食安全意义重大。氮是植物需求量最大的养分之一。在水稻生长发育过程中，合理施用氮肥可增加产量，氮营养供应不充足则会导致水稻减产^[1]，而过量施用氮肥会导致环境污染等问题^[2-3]。水稻叶绿素含量是对氮肥施用最为敏感的表型性状之一，与植株光合作用密切相关；研究水稻叶绿素含量的遗传机制，对氮高效的高产水稻品种选育具有重要意义^[4-6]。【前人研究进展】水稻叶片叶绿素属于多基因调控的数量性状，其合成与降解易受环境影响^[7]。利用不同遗传群体分析苗期、抽穗期和灌浆期等时期不同部位叶片的水稻叶绿素含量，已成功定位了超过 600 个 QTL，分布于 12 条染色体上^[7-10]。QTL 定位最终目的是用于基因鉴定和育种应用，以往研究大多采用 RFLP、SSR 和 STS 标记构建遗传连锁图谱，鉴定的主效 QTL 检出率偏低且鉴定位点数量也较少^[9]。随着基因组测序技术的快速发展与应用，构建 Bin 图谱用于 QTL 检测、候选基因筛选和分子标记开发逐步受到关注^[9,11-12]。已有研究在同一试验点经 2 年重复试验，利用 Bin 图谱检测到 2 个控制叶绿素含量的 QTL，并筛选到 9 个候选基因^[9]。前人也在不同氮处理下定位到 14 个控制叶宽的 SNP 位点，并鉴定出 20 个与高氮和低氮响应有关的 SNP 位点，同时研究者建议，对易受环境影响的性状开展高密度 Bin

图谱定位分析时，结合多处理、多年、异地环境的分析更能提高 QTL 定位的精准度^[13]。利用高密度 Bin 图谱开展 QTL 定位，精确度高，是深入研究重要复杂生理性状遗传规律的有效方法^[9]。

【本研究切入点】叶绿素含量是容易受环境因素影响的数量性状^[14]，尤其易受氮肥施用量的影响。然而经多年份、多时期开展不同氮肥施用量条件下的有关叶绿素含量精细 QTL 定位的研究仍鲜有报道。【拟解决的关键问题】本研究采用不同年份、地点的珍汕 97 和明恢 63 水稻重组自交系群体为材料，测定不施氮和正常施氮条件下水稻叶片叶绿素含量，开展不同发育时期叶片叶绿素含量高密度 Bin 图谱 QTL 定位分析，旨在寻找一些新的、稳定的叶绿素含量相关位点，期为水稻叶绿素含量相关基因的鉴定和高光效水稻分子标记育种改良提供有利靶标。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试水稻材料为珍汕 97 (ZS97) 和明恢 63 (MH63) 重组自交系 (RIL)，由华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室水稻研究团队提供。该群体共 210 个家系，从 F_{11} 中随机选取 113 个家系用于本研究。

RIL 高密度图谱包括 1 619 个重组 Bin 标记，各染色体 Bin 标记数为 79~217 个，总长

1 625.5 cM, 平均约 1.0 cM/bin, 标记间平均物理距离约为 230 kb^[11]。本研究采用的 Bin 标记详细数据和图谱均由华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室水稻研究团队提供。

1.2 大田试验

本试验分别于 2006 年 5—10 月在湖北省孝感市新铺镇 (30°56" N、113°54" E)、2007 年 5—10 月在湖北省武穴市大山镇 (29°51" N、115°33" E) 进行。两地稻田表层 25 cm 土壤主要养分分别为: 新铺镇 pH 值 (1 : 1 土水比) 5.01, 有机质含量 30.06 g/kg, 全氮含量 1.39 g/kg (2006 年); 大山镇 pH 值 (1 : 1 土水比) 5.37, 有机质含量 22.76 g/kg, 全氮含量 1.09 g/kg (2007 年)。

采用秧盘育秧, 种植密度 16.7 cm × 20.0 cm, 划行移栽, 每个家系种植 1 个小区, 小区面积 4.8 m² (2.0 m × 2.4 m)。小区采用随机区组排列, 设置正常氮水平 (2006: 130 kg/hm²; 2007: 135 kg/hm²) 和低氮水平 (0 kg/hm²) 处理, 每个处理 3 次重复, 肥料运筹参照文献 [15]。精细管理并全程防治病虫害, 成熟期挂防鸟网避免产量损失。两年的试验设计与管理措施保持一致。

1.3 叶绿素含量测定

分别于移栽后 30 d (30 Days after transplanting, 30 DAT) 和抽穗期 (Heading, HD), 采用 502 型 SPAD (Soil and Plant Analyzer Development) 叶绿素仪进行水稻叶片叶绿素含量测定。移栽后 30 d, 测定各小区除边行外植株的主茎 1.5 叶, 分别测定叶片的中部和中部上、下 3.0 cm 处, 取 3 处平均值表示该叶片 SPAD 值, 每小区重复测定 10 片叶。由于 RIL 群体家系的抽穗期相差较大, 各

小区抽穗 10% 定义为抽穗期。抽穗期直接测定植株主茎剑叶的 SPAD 值, 其他操作与移栽后 30 d 的检测方法相同。

采用 Statistix 9.0 软件进行数据分析, 差异显著性检验用独立样本 t 检验和单因子方差分析 (one-way ANOVA, LSD)。

1.4 QTL 定位

利用 QTL IciMapping V3.4 软件, 采用完备区间作图法 (Inclusive Composite Interval Mapping, ICIM) 在全基因组范围内进行扫描^[16], 扫描步长为 1.0 cM, 分别检测不同处理和不同发育时期控制叶绿素含量的 QTL。以 LOD ≥ 2.5 作为阈值检测 QTL, 计算每个 QTL 的贡献率和加性效应。QTL 的命名方法参照 McCouch 等^[17]公布的规则。

2 结果与分析

2.1 不同氮处理下 RIL 群体和亲本不同发育时期的叶绿素表型变异

由表 1 可知, 2006、2007 年 RIL 群体和亲本均表现为低氮条件下的叶片叶绿素含量显著低于正常氮处理。亲本叶片叶绿素含量两年均表现为母本珍汕 97 高于父本明恢 63; 在移栽后 30 d, 同一亲本相同处理的不同年份差异不大; 在抽穗期, 2007 年明恢 63 的叶片叶绿素含量显著高于 2006 年。RIL 群体中的叶绿素含量分布均表现为连续的正态分布, 并且有超亲分离现象, 呈现数量性状的特点 (图 1)。

2.2 不同年份和不同发育时期水稻叶片叶绿素含量相关性分析

移栽后 30 d、抽穗期的水稻叶片叶绿素含量

表 1 不同氮处理 RIL 群体及其亲本的叶绿素含量分析
Table 1 Analysis of chlorophyll contents in RIL population and its parents under different nitrogen treatments

年份 Year	发育时期 Development stage	处理 Treatment	亲本 Parent		LSD _{0.05}	重组自交系 RIL			
			珍汕 97 ZS 97	明恢 63 MH 63		平均值 ± 标准差 Mean ± SD	范围 Range	偏度 Skewness	峰度 Kurtosis
2006	移栽后 30 d	低氮	34.15 ± 0.46	33.60 ± 2.07	4.56	31.91 ± 1.89	26.94~38.17	0.18	0.21
		正常氮	38.20 ± 1.53*	36.32 ± 2.51	4.71	35.53 ± 1.62***	32.21~40.32	0.36	-0.19
	抽穗期	低氮	39.54 ± 0.49	34.04 ± 2.19	3.59	33.60 ± 2.50	28.34~41.91	0.48	0.78
		正常氮	42.95 ± 0.69**	37.25 ± 0.71	1.57	37.14 ± 2.53***	31.93~46.13	0.75	1.23
2007	移栽后 30 d	低氮	36.37 ± 1.96	33.30 ± 2.39	4.95	33.45 ± 1.62	29.71~39.50	0.76	1.62
		正常氮	41.97 ± 0.50**	39.65 ± 0.94*	1.69	40.15 ± 1.09***	37.45~44.37	0.56	1.63
	抽穗期	低氮	39.75 ± 0.44	39.33 ± 0.94	1.65	37.79 ± 2.11	32.24~45.06	0.23	1.02
		正常氮	41.51 ± 0.92*	40.67 ± 1.10	2.30	39.61 ± 1.87***	35.79~45.84	0.61	0.70

注: *, **, *** 分别表示在 0.05、0.01、0.001 水平上差异显著。
Note: *, ** and *** represent significant differences at P=0.05, P=0.01 and P= 0.001, respectively.

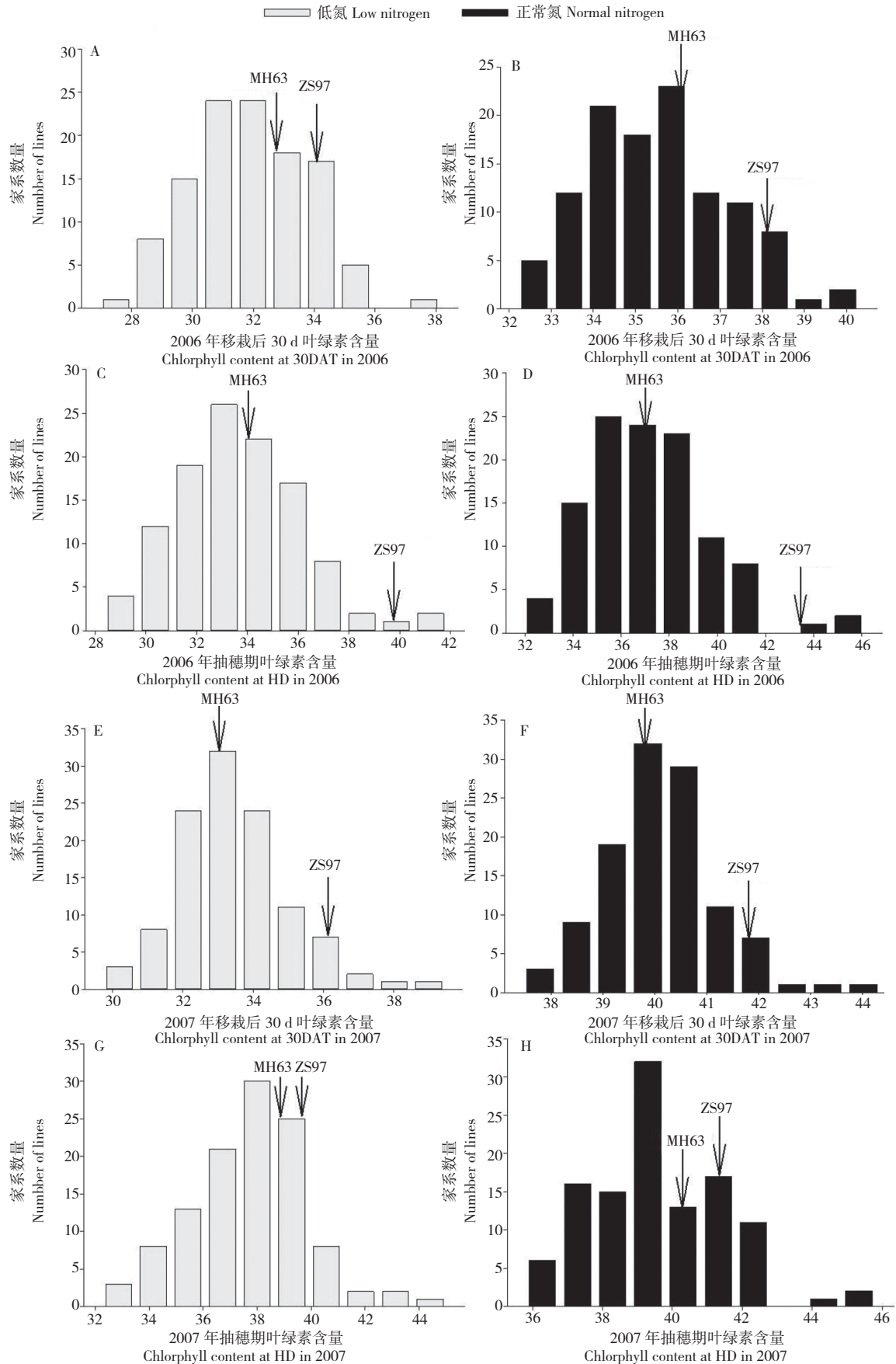


图 1 不同氮处理 RIL 群体及其亲本在不同发育时期的叶绿素含量分布
Fig. 1 Distribution of chlorophyll contents in RIL population and its parents at different development stages under different nitrogen treatments

相关系数分别达到极显著水平（表2）。此外，叶绿素含量在不同氮处理、不同发育时期均表现出显著相关性，两年表现一致，表明两年叶绿素含量的环境稳定性较好。

表2 不同氮处理水稻叶片叶绿素含量的相关系数
Table 2 Correlation coefficients of chlorophyll contents in leaves of rice under different nitrogen treatments

性状 Trait	处理 Treatment	移栽后 30 d 叶绿素含量 SPAD-30DAT	抽穗期叶绿素含量 SPAD-HD
移栽后 30 d 叶绿素含量 SPAD-30DAT	低氮	0.56**	0.64**
	正常氮	0.58**	0.61**
抽穗期 叶绿素含量 SPAD-HD	低氮	0.70**	0.73**
	正常氮	0.66**	0.81**

注：*、**、*** 分别表示在 0.05、0.01、0.001 水平上差异显著。表格中对角线加粗数据表示两年间相同性状的相关性；对角线右侧为 2006 年性状相关系数，左侧为 2007 年性状相关系数。

Note: *, ** and *** represent significant difference at $P=0.05$, $P=0.01$, and $P=0.001$, respectively. The bold value in diagonal indicates correlation coefficient of the same trait between two years. Data on the right and left sides of the diagonal are the correlation coefficients of traits in 2006 and 2007, respectively.

2.3 水稻叶片叶绿素含量的 QTL 检测

低氮处理下叶片叶绿素含量，两年共检测到 5 个 QTL（2006 年 1 个、2007 年 4 个），分别位于第 3、6、10 号染色体；正常氮处理下叶片叶绿素含量，两年共检测到 10 个 QTL（2006 年 4 个、

2007 年 11 个），分别位于第 1、2、3、6、7、10、11 号染色体（表 3），正常氮处理下检测到的 QTL 明显多于低氮处理。在第 4、5、8、9 号染色体上没有检测到控制叶绿素含量的 QTL。15 个 QTL 在染色体上的分布如图 2 所示。

第 1、2、11 号染色体上分别检测到 1 个 QTL。其中，*q30CHL1* 位于第 1 染色体，在 2006 年低氮处理水稻叶片中被检测到，影响移栽后 30 d 的叶绿素含量，解释 14.57% 的表型变异，增效基因来自珍汕 97；*qHDCHL2* 位于第 2 号染色体，在 2007 年正常氮处理水稻叶片中被检测到，等位基因来自明恢 63，解释 8.50% 的表型变异；*qHDCHL11* 位于第 11 号染色体，在 2007 年正常氮处理水稻叶片中被检测到，对表型的贡献率为 7.41%。

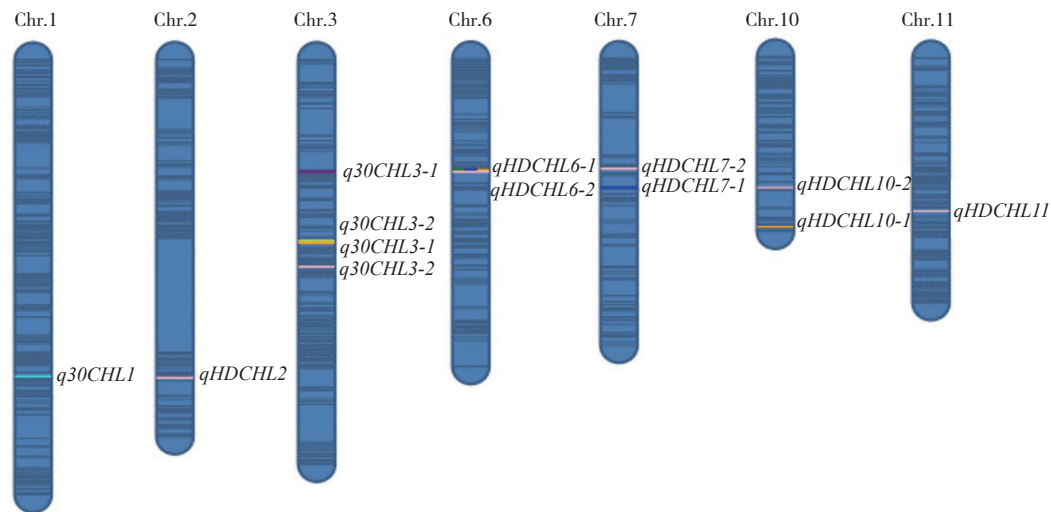
第 3 染色体上共检测到 4 个 QTL，均于 2007 年的水稻叶片中被检测到，等位基因均来自明恢 63；在低氮处理叶片中检测到 2 个 QTL，*q30CHL3-1* 影响移栽后 30 d 的叶绿素含量，解释 11.75% 的表型变异，*qHDCHL3-1* 影响抽穗期的叶绿素含量，解释 1.21% 的表型变异。另外两个 QTL（*q30CHL3-2* 和 *qHDCHL3-2*）在正常氮处理水稻叶片中被检测到，分别解释 11.38% 和 11.46% 的表型变异。

表3 不同氮处理下水稻叶片叶绿素含量的 QTL 检测结果
Table 3 QTL detection for chlorophyll contents in leaves of rice under different nitrogen treatments

处理 Treatment	位点 QTL	染色体 Chr.	标记区间 Interval	置信区间 Confidence interval (Mb)		LOD	2006		2007	
							加性效应 Additive effect	贡献率 PVE (%)	加性效应 Additive effect	贡献率 PVE (%)
低氮 Low nitrogen	<i>q30CHL3-1</i>	3	Bin385~Bin386	7.88	8.66	3.00			0.55	11.75
	<i>qHDCHL3-1</i>	3	Bin423~Bin424	14.72	14.88	4.20			0.68	1.21
	<i>qHDCHL6-1*</i>	6	Bin890~Bin891	8.45	9.12	9.10	-1.35	28.01		
	<i>qHDCHL6-1*</i>	6	Bin890~Bin891	8.45	9.12	5.30			-0.77	1.55
	<i>qHDCHL10-1</i>	10	Bin1384~Bin1385	22.30	22.52	48.10			-3.97	40.74
正常氮 Normal nitrogen	<i>q30CHL1</i>	1	Bin166~Bin167	33.84	34.74	5.00	-0.66	14.57		
	<i>q30CHL3-2</i>	3	Bin420~Bin421	14.35	14.60	2.60			0.35	11.38
	<i>qHDCHL2</i>	2	Bin330~Bin331	31.65	32.26	4.00			0.55	8.50
	<i>qHDCHL3-2</i>	3	Bin445~Bin446	17.83	18.08	5.40			0.66	11.46
	<i>qHDCHL6-1*</i>	6	Bin890~Bin891	8.45	9.12	5.90	-1.14	19.46		
	<i>qHDCHL6-2</i>	6	Bin893~Bin894	9.37	9.89	4.50			-0.58	9.35
	<i>qHDCHL7-1</i>	7	Bin1011~Bin1012	16.61	16.66	2.70	-0.75	8.42		
	<i>qHDCH7-2</i>	7	Bin1002~Bin1003	7.26	8.41	4.20			-0.57	8.74
	<i>qHDCHL10-2</i>	10	Bin1369~Bin1370	19.67	19.93	3.70			-0.52	7.53
	<i>qHDCHL11</i>	11	Bin1475~Bin1476	19.06	19.14	3.60			-0.55	7.41

注：加性效应值为正值，表明增效等位基因来源于明恢 63。* 表示在两年间重复检测到的 QTL。

Note: Positive additive effect shows that source of favorable allele comes from MH 63. * represents the QTL was detected in both two years.



qHDCHL6-1 被重复检测到 3 次，图中仅标注 1 次
qHDCHL6-1 was repeatedly detected three times, and was marked only one time

图 2 水稻叶绿素含量 QTL 在染色体上的分布

Fig. 2 Locations of QTL for chlorophyll content in rice on chromosomes

第 6 染色体上共检测到 4 个 QTL，均影响抽穗期剑叶的叶绿素含量，且等位基因均来自珍汕 97；在 2006 年的水稻叶片中检测到 2 个 QTL，低氮和正常氮处理下各 1 个，均位于染色体 8.45~9.12 Mb 处，命名为 *qHDCHL6-1*，低氮和正常氮处理检测到的 QTL 分别解释 28.01% 和 19.46% 的表型变异；在 2007 年的水稻叶片中也检测到 2 个 QTL，*qHDCHL6-1* 在低氮水平下同样被检测到，解释 1.55% 的表型变异，*qHDCHL6-2* 在正常氮水平下检测到，解释 9.35% 的表型变异。*qHDCHL6-1* 在 2 年低氮处理下和 2006 年正常氮水平下均被检测到，表现出较强的稳定性。

第 7 染色体上共检测到 2 个 QTL，均为正常氮水平下影响抽穗期剑叶叶绿素含量的 QTL，且等位基因均来自珍汕 97；*qHDCHL7-1* 于 2006 年的水稻叶片中被检测到，可解释 8.42% 的表型变异；*qHDCH7-2* 于 2007 年的水稻叶片中被检测到，可解释 8.74% 的表型变异。

第 10 染色体上共检测到 2 个 QTL，均于 2007 年的水稻叶片中被检测到，增效等位基因均来自珍汕 97；*qHDCHL10-1* 在低氮处理下被

检测到，是所有 QTL 中效应最大的位点，解释 40.74% 的表型变异；*qHDCHL10-2* 在正常氮处理下被检测到，可解释 7.53% 的表型变异。

2.4 主效 QTL 区段中候选基因的筛选

利用水稻基因组注释数据库 (<http://rice.uga.edu/>) 对重复检测到的 *qHDCHL6-1* 区间内的基因进行功能注释。*qHDCHL6-1* 位于第 6 号染色体的 8.45~9.12 Mb 处，经查询，该区间内共有 113 个注释基因，除去不转录蛋白、逆转录转座子蛋白、修复蛋白、假定蛋白等相关基因 89 个，共筛选到 4 个有关叶绿素代谢和影响水稻叶色的候选基因（表 4）。

LOC_Os06g15370 已被克隆，为硝酸盐转运子 / 肽转运蛋白基因 *OsNPF3.1*，该基因通过调控水稻株高、抽穗期和千粒重，影响水稻氮肥利用效率。*LOC_Os06g15420* 已被克隆，为天冬酰胺合成酶基因 *OsAS2*。*LOC_Os06g15590* 注释为类似细胞数目调节蛋白，影响细胞增殖和生长，负向调控器官的形态发育。*LOC_Os06g15620* 注释为受赤霉素诱导的基因家族蛋白（GAST），GAST 家族在植物激素信号转导、叶片发育及

表 4 *qHDCHL6-1* 区间内的基因预测
Table 4 Predicted genes in interval of *qHDCHL6-1*

QTL	染色体 Chr.	位置 Position (bp)	基因 Gene	基因功能注释 Annotation of gene function
<i>qHDCHL6-1</i>	6	8739431~8744022	<i>LOC_Os06g15370</i>	硝酸盐转运蛋白 1/ 肽转运家族蛋白
<i>qHDCHL6-1</i>	6	8758769~8765753	<i>LOC_Os06g15420</i>	天冬氨酸合成酶
<i>qHDCHL6-1</i>	6	8834948~8835629	<i>LOC_Os06g15590</i>	细胞数目调节蛋白
<i>qHDCHL6-1</i>	6	8847702~8848847	<i>LOC_Os06g15620</i>	受赤霉素诱导的基因家族蛋白

生物与非生物胁迫响应等方面发挥重要调控作用^[18]。

3 讨论

3.1 本研究定位的 QTL 中已鉴定的功能基因

前人利用不同的定位群体和标记类型检测到大量控制不同时期、不同处理以及不同部位叶片叶绿素含量的 QTL，但这些位点对表型的贡献率均较低、主效基因较少，表明水稻叶片叶绿素含量的遗传背景较为复杂^[7-8]。本研究采用高密度 Bin 连锁图谱，从两年的水稻叶片中共检测到 15 个控制移栽后 30 d 和抽穗期叶片叶绿素含量的 QTL，其中 7 个对表型的贡献率超过 10%，表明设置不同氮肥处理更有利于揭示叶绿素含量的遗传规律。

本研究检测到的 QTL 与前人定位或克隆的 QTL 有交叉重叠（表 5）。例如，*q30CHL1* 位于第 1 染色体 33.84~34.74 Mb 处，在该区域已经克隆 S- 磺基半胱氨酸合酶基因（*GRA78*），该基因主要功能是直接调控叶绿体内基粒和类囊体的生长发育，在水稻苗期和分蘖期分别调控 Chla、Chlb 和总叶绿素含量性状，突变体的叶绿素含量在苗期和分蘖期分别比野生型降低 63.6% 和 32.5%^[19]。前人在 *qHDCHL2* 区域发现了 1 个光系统 I（PSI）色素结合膜蛋白（Lhca），该蛋白与 PSI 结合形成的复合体对太阳能具有极高

的转化效率^[20]。*qHDCHL6-1* 位于第 6 染色体 8.45~9.12 Mb 处，前人利用 F₂ 群体在该区段定位到一个与氮肥利用效率密且相关的 *qNUE6* 位点，利用近等基因系进行生理分析发现，该位点存在 2 个与拟南芥 *AtNPF3.1* 和 *ASN2* 高度同源的基因^[21]。*qHDCH7-2* 位于第 7 染色体 7.26~8.41 Mb 处，该区域已经克隆了亮氨酸羧基甲基转移酶基因（*OsMTS1*），该基因突变会导致水稻叶倾角增大、叶片叶绿素含量降低 40%、叶片早衰和产量显著降低^[22]，过表达则能够提高水稻产量 15.69%^[23]。*qHDCHL10-1* 对表型的贡献率为 40.74%，前人在该区段鉴定到 2 个 Chla 加氧酶基因 *OsCAO1* 和 *OsCAO2*，它们在染色体上是串联的，Chla 加氧酶承担催化 Chla 合成 Chlb 的功能，*OsCAO1* 在有光条件下起主要作用，而 *OsCAO2* 主要在黑暗或无光照条件下发挥作用^[24]。本研究中，*qHDCHL10-1* 仅在低氮条件下检测到，该基因是否受到低氮处理的强烈诱导目前仍不清楚。*qHDCHL10-2* 在正常氮处理下检测到，前人用籼粳交群体在该区域定位到拔节期和抽穗期叶绿素含量稳定表达的 *qCJ10* 和 *qCH10*。前人利用粳粳交 RIL 在第 11 号染色体定位到成熟期剑叶叶绿素含量相关的 QTL，与 *qHDCHL11* 有重叠片段^[25]。

3.2 *qHDCHL6-1* 是控制叶绿素含量的主效 QTL

本研究结果显示，在正常氮处理水稻叶片中检测到的 QTL 数量明显多于低氮处理，表明低氮处理限制了部分 QTL 的表达。前人研究建议，

表 5 本研究定位的 QTL 和已知叶绿素含量相关位点 / 基因的位置比较
Table 5 Comparison of known QTL/genes contributed to chlorophyll content with QTL detected in this study

本研究 This study			已知的相关位点 / 基因 Known QTLs/Genes			
QTL	染色体 Chr.	位置 Position (Mb)	性状 / 基因 Character/Gene	定位群体 / 基因登录号 Population/Acc. No.	位置 Position (Mb)	参考文献 Reference
<i>q30CHL1</i>	1	33.84~34.74	S- 磺基半胱氨酸合酶	<i>LOC_Os01g59920</i>	34.65	[19]
<i>qHDCHL2</i>	2	31.65~32.26	PS I 色素结合膜蛋白	<i>LOC_Os02g52650</i>	32.20	[20]
<i>qHDCHL6-1</i>	6	8.45~9.12	氮肥利用效率	广恢 998/NIL-13B4 构建的 F ₂ 群体	8.65~8.91	[21]
<i>qHDCH7-2</i>	7	7.26~8.41	亮氨酸羧基甲基转移酶	<i>LOC_Os07g14350</i>	8.20	[23]
<i>qHDCHL10-1</i>	10	22.30~22.52	叶绿素 a 加氧酶	<i>LOC_Os10g41760</i>	22.40	[24]
<i>qHDCHL10-2</i>	10	19.67~19.93	拔节期和抽穗期叶绿素含量	沈农 0530-9/ 北陆 129 F _{2:3} 群体	19.16~21.57	[7]
<i>qHDCHL11</i>	11	19.06~19.14	成熟期剑叶叶绿素含量	沈农 265/ 丽江新团黑谷 RILs	18.13~28.28	[25]

对氮肥敏感的数量性状应加强在多环境下的分析^[13]。*qHDCHL6-1* 在 2006 年抽穗期的两个氮处理中均被检测到，在 2006 年的正常氮处理中也被检测到，表明该位点属于控制抽穗期叶绿素含量的稳定表达的 QTL。通过水稻基因组注释数据库比对发现，该区间中存在 4 个候选基因，其

中 *LOC_Os06g15370* 和 *LOC_Os06g15420* 两个基因已克隆，分别为硝酸盐转运子 / 肽转运蛋白基因 *OsNPF3.1* 和天冬酰胺合成酶基因 *OsAS2*，两个基因均对氮素吸收利用具有重要作用^[26-27]；低氮处理会刺激 *OsAS2* 和 *OsNPF3.1* 表达，增加水稻对氮素的吸收利用^[26,28]，本研究结果也验证

了这一点。*LOC_Os06g15620* 是 GAST 家族基因, 该基因已在 2009 年克隆, 被命名为 *OsGSRI*, 是 GA 信号的正调节因子, 在油菜素内酯 (BR) 和 GA 信号通路中起重要作用, 并介导两者互作, 在器官形态建成中正向调控细胞分裂, 此外还密切参与植物组织抵抗生物胁迫和氧化还原反应^[18,29], 但 *LOC_Os06g15620* 对叶片叶绿素含量的调控机理目前仍不清楚。*LOC_Os06g15590* 为类似细胞数目调节蛋白基因, 该基因仍未被克隆, 但在第 2 染色体上的同源基因 *OsCNR1* (*LOC_Os02g52550*) 已被克隆, 其负调控器官细胞的数量和大小^[30], 该基因是否调控叶绿体大小或叶片厚度, 目前仍不清楚。因此, 推测 *qHDCHL6-1* 作为控制叶绿素含量的主效 QTL, *OsGSRI* 和 *LOC_Os06g15590* 有可能参与调控叶片细胞的分化、排布和器官形态建成。综上所述, *qHDCHL6-1* 是多方面调控水稻叶片叶绿素含量的热点区间, 具有深入挖掘的潜力, 同时对高光效、氮高效水稻品种改良也具有重要应用价值。

4 结论

本研究以珍汕 97 × 明恢 63 重组自交系 (F_{11}) 113 个家系为 QTL 分析的试验材料, 在大田栽培条件下, 设置低氮和正常氮两种氮肥处理, 分别在两年和两个发育时期测定叶片叶绿素含量, 利用高密度 Bin 遗传图谱和完备区间作图法共检测到 15 个控制叶片叶绿素含量的 QTL。其中, 低氮处理共检测到 5 个 QTL, 正常氮处理共检测到 10 个 QTL。发现 1 个低氮和正常氮水平下稳定表达的 QTL *qHDCHL6-1*, 等位基因来自珍汕 97, 控制抽穗期剑叶叶绿素含量, 在该区段筛选到 4 个候选基因。

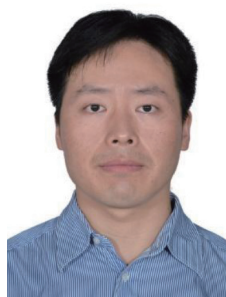
参考文献 (References):

- [1] 潘俊峰, 钟旭华, 黄农荣, 刘彦卓, 田卡, 梁开明, 彭碧琳, 傅友强, 胡香玉. 不同栽培模式对华南双季晚稻产量和氮肥利用率的影响[J]. 浙江农业学报, 2019, 31(6): 857–868. DOI:10.3969/j.issn.1004–1524.2019.06.01.
PAN J F, ZHONG X H, HUANG N R, LIU Y Z, TIAN K, LIANG K M, PENG B L, FU Y Q, HU X Y. Effects of different cultivation patterns on grain yield and nitrogen use efficiency of rice in South China [J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2019, 31(6): 857–868. DOI:10.3969/j.issn.1004–1524.2019.06.01
- [2] GUO J H, LIU X J, ZHANG Y, SHEN J L, HAN W X, ZHANG W F, CHRISTIE P, GOULDING K W T, VITOUSEK P M, ZHANG F S. Significant acidification in major Chinese croplands [J]. *Science*, 2010, 327(5968): 1008–1010. DOI:10.1126/science.1182570.
- [3] LIANG K M, ZHONG X H, JUNFENG PAN J F, HUANG N R, LIU

- Y Z, PENG B L, FU Y Q, HU X Y. Reducing nitrogen surplus and environmental losses by optimized nitrogen and water management in double rice cropping system of South China [J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2019, 286:106680. DOI:10.1016/j.agee.2019.106680.
- [4] ZHANG Q F. Strategies for developing green super rice [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(42): 16402–16409. DOI:10.1073/pnas.0708013104.
- [5] MOOSE S P, MUMM R H. Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement [J]. *Plant Physiology*, 2008, 147(3): 969–977. DOI:10.1104/pp.108.118232.
- [6] MCALLISTER C H, BEATTY P H, GOOD A G. Engineering nitrogen use efficient crop plants: the current status [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2012, 10(9): 1011–1025. DOI:10.1111/j.1467–7652.2012.00700.x.
- [7] 刘进, 王嘉宇, 姜树坤, 徐正进. 水稻叶绿素含量动态 QTL 分析 [J]. 植物生理学报, 2012, 48(6): 577–583. DOI:10.13592/j.cnki.ppj.2012.06.001.
LIU J, WANG J Y, JIANG S K, XU Z J. Detection and analysis of dynamic QTL of leaf chlorophyll content in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Plant Physiology Journal*, 2012, 48(6): 577–583. DOI:10.13592/j.cnki.ppj.2012.06.001.
- [8] 阿加拉铁, 曾龙军, 薛大伟, 胡江, 曾大力, 高振宇, 郭龙彪, 李仕贵, 钱前. 水稻灌浆期不同阶段叶绿素含量的 QTL 分析 [J]. 作物学报, 2008, 34(1): 61–66. DOI:10.3724/SP.J.1006.2008.00061.
A–JIA L T, ZENG L J, XUE D W, HU J, ZENG D L, GAO Z Y, GUO L B, LI S G, QIAN Q. QTL analysis for chlorophyll content in four grain–filling stage in rice [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2008, 34(1): 61–66. DOI:10.3724/SP.J.1006.2008.00061.
- [9] 赵凌, 张勇, 魏晓东, 梁文化, 赵春芳, 周丽慧, 姚姝, 王才林, 张亚东. 利用高密度 Bin 图谱定位水稻抽穗期剑叶叶绿素含量 QTL [J]. 中国农业科学, 2022, 55(5): 825–836. DOI:10.3864/j.issn.0578–1752.2022.05.001.
ZHAO L, ZHANG Y, WEI X D, LIANG W H, ZHAO C F, ZHOU L H, YAO S, WANG C L, ZHANG Y D. Mapping of QTLs for chlorophyll content in flag leaves of rice on high–density Bin map [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2022, 55(5): 825–836. DOI:10.3864/j.issn.0578–1752.2022.05.001.
- [10] 姚晓云, 杨平, 黄永萍, 彭志勤, 刘进, 吴延寿, 邹国兴, 尹建华. 水稻叶绿素含量主效 QTL 定位 [J]. 江西农业学报, 2022, 34(2): 8–14. DOI:10.19386/j.cnki.jxnyxb.2022.02.002.
YAO X Y, YANG P, HUANG Y P, PENG Z Q, LIU J, WU Y S, ZOU G X, YIN J H. Mapping of major QTLs for chlorophyll content in rice [J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2022, 34(2): 8–14. DOI:10.19386/j.cnki.jxnyxb.2022.02.002.
- [11] YU H H, XIE W B, WANG J, XING Y Z, XU C G, LI X H, XIAO J H, ZHANG Q F. Gains in QTL detection using an ultra–high density SNP map based on population sequencing relative to traditional RFLP/SSR markers [J]. *PLOS ONE*, 2011, 6(3): e17595. DOI:10.1371/journal.pone.0017595.
- [12] 王朝欢, 宋博文, 余思佳, 肖武名, 黄明. 基于全基因组测序构建水稻 RIL 群体遗传图谱 [J]. 华南农业大学学报, 2021, 42(2): 44–50. DOI:10.7671/j.issn.1001–411X.202006039
WANG C H, SONG B W, YU S J, XIAO W M, HUANG M. Construction of a genetic map of rice RILs based on whole genome sequencing [J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2021, 42(2):44–50. DOI:10.7671/j.issn.1001–411X.202006039.
- [13] 高易宏, 燕金香, 涂政军, 冷语佳, 陈龙, 黄李超, 代丽萍, 张光恒, 朱丽, 胡江, 任德勇, 郭龙彪, 钱前, 王丹英, 曾大力. 不同氮处理下水稻剑

- 叶叶宽的全基因组关联分析[J]. 中国农业科学, 2017,50(14):2635–2646. DOI:10.3864/j.issn.0578-1752.2017.14.001.
- GAO Y H, YAN J X, TU Z J, LENG Y J, CHEN L, HUANG L C, DAI L P, ZHANG G H, ZHU L, HU J, REN D Y, GUO L B, QIAN Q, WANG D Y, ZENG D L. Genome-Wide association analysis on flag leaf width under different nitrogen levels in rice [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017,50(14):2635–2646. DOI:10.3864/j.issn.0578-1752.2017.14.001.
- [14] 杨树明, 刘关所, 张素华. 不同生长环境下水稻孕穗期叶绿素 QTL 定位[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2017, 39(4): 684–690. DOI:10.7540/j.ynu.20170035.
- YANG S M, LIU G S, ZHANG S H. Identification of QTL for chlorophyll contents at booting stage of rice under different growing environments[J]. *Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition)*, 2017, 39(4): 684–690. DOI:10.7540/j.ynu.20170035.
- [15] PAN J F, CUI K H, WEI D, HUANG J L, XIANG J, NIE L X. Relationships of non-structural carbohydrates accumulation and translocation with yield formation in rice recombinant inbred lines under two nitrogen levels [J]. *Physiologia Plantarum*, 2011, 141(4): 321–331. DOI:10.1111/j.1399-3054.2010.01441.x.
- [16] MENG L, LI H H, ZHANG L Y, WANG J K. QTL IciMapping: Integrated software for genetic linkage map construction and quantitative trait locus mapping in bi-parental populations [J]. *Crop Journal*, 2015, 3(3): 269–283. DOI:10.1016/j.cj.2015.01.001.
- [17] MCCOUCH S R, CHO Y G, YANO M, PAUL E, BLINSTRUB M, MORISHIMA H, KINOSHITA T, MCCOUCH S R, CHO Y G, PAUL E, MORISHIMA H, CHO Y G, YANO M, MCCOUCH S, YANO P E, KINOSHITA T, MCCOUCH S, CHO Y, PAUL E, BLINSTRUB M, MORISHIMA H M, MCCOUCH S R, KINOSHITA T. Report on QTL nomenclature [J]. *Rice Genet Newsletter*, 1997, 14: 11–13.
- [18] 李相伯, 史双月, 朱韵, 陶亚军, 杨泽峰, 梁国华, 周勇. 植物 GAST 家族基因功能研究进展[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2019, 40(2): 25–32. DOI:10.16872/j.cnki.1671-4652.2019.02.004.
- LI X B, SHI S Y, ZHU Y, TAO Y J, YANG Z F, LIANG G H, ZHOU Y. Progress in the functions of GAST family genes in plants [J]. *Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition)*, 2019, 40(2): 25–32. DOI:10.16872/j.cnki.1671-4652.2019.02.004.
- [19] WANG Y, ZHONG P, ZHANG X Y, LIU J Q, ZHANG C Y, YANG X R, WAN C M, LIU C Q, ZHOU H, YANG B, SUN C H, DENG X J, WANG P R. GRA78 encoding a putative S-sulfocysteine synthase is involved in chloroplast development at the early seedling stage of rice [J]. *Plant Science*, 2019, 280: 321–329. DOI:10.1016/j.plantsci.2018.12.019.
- [20] UMAT P. Genome-wide analysis of the family of light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins in *Arabidopsis* and rice [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2010, 5(12):1537–1542. Doi: 10.4161/psb.5.12.13410.
- [21] YANG X H., XIA X Z, ZHANG Z Q, NONG B X, ZENG Y, XIONG F Q, WU Y Y, GAO J, DENG G F, LI D T. QTL mapping by whole genome re-sequencing and analysis of candidate genes for nitrogen use efficiency in rice [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017(8): 1634. DOI:10.3389/fpls.2017.01634.
- [22] TAMIRU M, TAKAGI H, ABE A, YOKOTA T, KANZAKI H, OKAMOTO H, SAITOH H, TAKAHASHI H, FUJISAKI K, OIKAWA K, UEMURA A, NATSUME S, JIKUMARU Y, MATSUURA H, UMEMURA K, TERRY M A, TERAUCHI R. A chloroplast-localized protein LESION AND LAMINA BENDING affects defence and growth responses in rice [J]. *New Phytologist*, 2016, 210(4): 1282–1297. DOI:10.1111/nph.13864.
- [23] HONG Y B, ZHANG Y X, SINUMPORN S, YU N, ZHAN X D, SHEN X H, CHEN D B, YU P, WU W X, LIU Q N, CAO Z Y, ZHAO C D, CHENG S H, CAO L Y. Premature leaf senescence 3, encoding a methyltransferase, is required for melatonin biosynthesis in rice [J]. *The Plant Journal*, 2018, 95(5): 877–891. DOI:10.1111/tpj.13995.
- [24] LEE S, KIM J H, YOO E S, LEE C H, HIROCHIKA H, AN G. Differential regulation of chlorophyll a oxygenase genes in rice [J]. *Plant Molecular Biology*, 2005, 57(6): 805–818. DOI:10.1007/s11103-005-2066-9.
- [25] 姜树坤, 张喜娟, 徐正进, 陈温福. 粳稻叶绿素含量 QTL 与其合成降解相关基因的比较分析[J]. 作物学报, 2010, 36(3): 376–384. DOI:10.3724/SP.J.1006.2010.00376.
- JIANG S K, ZHANG X J, XU Z J, CHEN W F. Comparison between QTLs for chlorophyll content and genes controlling chlorophyll biosynthesis and degradation in Japonica rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2010, 36(3): 376–384. DOI:10.3724/SP.J.1006.2010.00376.
- [26] OHASHI M, ISHIYAMA K, KOJIMA S, KONISHI N, NAKANO K, KANNO K, HAYAKAWA T, YAMAYA T. Asparagine Synthetase1, but not Asparagine Synthetase2, is responsible for the biosynthesis of asparagine following the supply of ammonium to rice roots [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2015, 56(4): 769–778. DOI:10.1093/pcp/pcv005.
- [27] YANG X H, NONG B X, CHEN C, WANG J R, XIA X Z, ZHANG Z Q, WEI Y, ZENG Y, FENG R, WU Y Y, GUO H, YAN H F, LIANG Y T, LIANG S H, YAN Y, LI D T, DENG G F. OsNPF3.1, a member of the NRT1/PTR family, increases nitrogen use efficiency and biomass production in rice [J]. *Crop Journal*, 2022. DOI:10.1016/j.cj.2022.07.001.
- [28] DAVID L C, BERQUIN P, KANNO Y, SEO M, DANIEL V F, FERRARIO M S. N availability modulates the role of NPF3.1, a gibberellin transporter, in GA-mediated phenotypes in *Arabidopsis* [J]. *Planta*, 2016, 244(6): 1315–1328. DOI:10.1007/s00425-016-2588-1.
- [29] WANG L, WANG Z, XU Y Y, JOO S H, KIM S K, XUE Z, XU Z H, WANG Z Y, CHONG K. OsGSR1 is involved in crosstalk between gibberellins and brassinosteroids in rice [J]. *The Plant Journal*, 2009, 57(3): 498–510. DOI:10.1111/j.1365-3113X.2008.03707.x.
- [30] RUAN B P, SHANG L G, ZHANG B, HU J, WANG Y X, LIN H, ZHANG A P, LIU C L, PENG Y L, ZHU L, REN D Y, SHEN L, DONG G J, ZHANG G H, ZENG D L, GUO L B, QIAN Q, GAO Z Y. Natural variation in the promoter of *TGW2* determines grain width and weight in rice [J]. *New Phytologist*, 2020, 227(2): 629–640. DOI:10.1111/nph.16540.

(责任编辑 崔建勋)



潘俊峰, 博士, 副研究员, 现任广东省农业科学院水稻研究所副所长, 2018 年入选广州市“珠江科技新星”。主要从事水稻高产、氮高效与抗倒伏机理研究, 主持广东省科技计划、广州市科技计划等课题项目 9 项, 作为主要参加人承担国家 863 计划、国家重点研发计划、农业行业专项、国际科技合作等项目 15 项。以第一作者在 *Physiologia Plantarum*、*Agricultural*

Water Management、《中国水稻科学》等国内外学术期刊发表科技论文 11 篇, 其中 SCI 论文 3 篇, 参编专著 1 部。参与研发水稻“三控”施肥技术, 作为主要完成人获广东省科技进步一等奖和神农中华农业科技二等奖各 1 项; 参与研发水稻低碳高产栽培技术, 该技术具有低投入、低排放、高产等优势, 2017 年被国家发改委列入重点推广技术目录。