

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2024.02.002

刘金艳, 张朔语, 宗涵颖, 等. 基于水稻大粒染色体片段代换系 Z29 的鉴定及 QTL 定位 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2024, 46(2): 13-23.

基于水稻大粒染色体片段代换系 Z29 的 鉴定及 QTL 定位

刘金艳, 张朔语, 宗涵颖, 陈文博, 韦秘, 吴如会,
母建妍, 张记超, 凌英华, 张长伟, 何光华, 赵芳明, 张婷

西南大学 农学与生物科技学院/南方山地农业教育部工程中心, 重庆 400715

摘要: 千粒质量作为水稻产量的三要素之一, 对产量的影响较大, 其中千粒质量主要受水稻粒型的影响, 因此挖掘新的粒型基因在生产中具有重要的意义. 研究选育到 1 个以日本晴为受体亲本、自育优良籼稻恢复系 R225 为供体亲本的水稻染色体片段代换系(CSSL)Z29. Z29 含有来自 R225 的 10 个代换片段, 平均代换长度 2.90 Mb. Z29 粒长和粒宽均极显著增加, 表现为大粒表型, 且其籽粒变大是由颖壳细胞数量极显著增多、增大引起. 利用日本晴与 Z29 杂交构建的次级 F₂ 群体进行 QTL 定位, 共检测到 8 个粒型相关 QTL. 进一步利用 MAS 法在 F₃ 群体中选育出 14 个次级染色体片段代换系, 包括 4 个单片段代换系、5 个双片段代换系、2 个三片段代换系和 3 个四片段代换系. 结果可为目的粒型相关 QTL 克隆和分子机制解析奠定基础, 为分子设计育种提供资源.

关键词: 水稻; 染色体片段代换系; 粒型; QTL 定位; 产量

中图分类号: S511 **文献标志码:** A

文章编号: 1673-9868(2024)02-0013-11

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Identification and Localization of QTL Based on a Rice Large Grain Chromosome Segment Substitution Line Z29

LIU Jinyan, ZHANG Shuoyu, ZONG Hanying, CHEN Wenbo,
WEI Mi, WU Ruhui, MU Jianyan, ZHANG Jichao, LING Yinghua,
ZHANG Changwei, HE Guanghua, ZHAO Fangming, ZHANG Ting

College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University/Engineering Research Center of
South Upland Agriculture (Ministry of Education), Chongqing 400715, China

Abstract: As one of the three elements of rice yield, grain size has an important impact on yield. It is im-

收稿日期: 2023-06-30

基金项目: 重庆市技术创新与应用发展专项(CSTB2022TIAD-KPX0018); 中央高校基本科研业务费项目(SWU-KT22041); 国家级大学生创新创业训练计划项目(202310635055).

作者简介: 刘金艳, 硕士研究生, 主要从事水稻分子育种研究.

通信作者: 张婷, 副教授, 硕士研究生导师.

portant to explore new genes for grain development. In this study, a rice chromosomal segment substitution line Z29 was selected from a cross with Nipponbare as the recipient and the self-bred indica rice restorer line R225 as the donor parent. Z29 contains 10 substitution segments from R225 with an average substitution length of 2.90 Mb. Both grain length and width of Z29 were increased significantly, showing a large grain phenotype, and its grain enlargement was caused by the highly significant increase in the number and size of glume cells. A total of eight grain shape-related QTLs were detected in the secondary F₂ population constructed by crossing Z29 with Nipponbare. Fourteen secondary chromosome segment substitution lines were selected from F₃ population using MAS method, including four single segment substitution lines, five double segment substitution lines, two triple segment substitution lines and three quadruple segment substitution lines. These results lay the foundation for cloning grain shape-related QTLs and elucidation of the molecular mechanism, and provide resources for molecular design breeding.

Key words: rice (*Oryza sativa* L.); chromosome segment substitution line; grain shape; QTL localization; yield

水稻作为重要的粮食作物,其产量三要素包括穗粒数、有效穗数和千粒质量,其中千粒质量主要受水稻粒型的影响,水稻粒型又由粒长、粒宽和粒厚决定。这些因素中的任意一个发生改变,都会对籽粒的大小产生影响,从而影响水稻的产量和品质。克隆粒型发育相关基因并解析其分子机制,有利于将其应用于水稻的高产育种工作中。根据 GRAMENE 网站(<http://www.gramene.org/archive>)提供的数据,在水稻 12 条染色体上已有超过 600 个与粒型相关的 QTL 被检测到,还有部分 QTL 被精细定位和克隆。根据这些 QTL 所参与的代谢或信号途径,可以分为以下几类:G 蛋白信号通路、植物激素信号通路、泛素-蛋白酶体通路、转录调控通路、丝裂原活化蛋白激酶信号通路和表观遗传调控通路^[1]。

在 G 蛋白信号通路中, *RG1/D1* 编码 G 蛋白的 α 亚基,突变体 *d1* 中 G 蛋白失活导致细胞分裂受到抑制,从而使籽粒变小^[2]; *RGB1* 编码 G β 亚基,对细胞增殖起正向调控作用,基因突变导致植株变矮,籽粒变小^[3]; *GS3* 编码 1 个水稻 G γ 亚基,参与水稻 G $\beta\gamma$ 二聚体形成,是一个控制水稻粒长和粒质量的主效 QTL,对粒长起负调控作用^[4]。在植物激素信号通路中,生长素原初响应基因 *BG1* 参与生长素的运输与转运,功能获得性突变体生长素含量增加、颖壳细胞的数量增多,种子变大,粒长和粒宽均显著增加^[5]; *TGW6* 编码 1 个 IAA-葡萄糖水解酶,是一个粒长负调控因子^[6]; *SLG* 编码 1 个 BAHD 家族酰基转移酶蛋白,通过促进水稻中内源 BR 的合成,从而调控颖壳细胞的大小,进而控制粒长的发育^[7]。泛素-蛋白酶体通路中, *GW2* 编码 1 个 E3 泛素连接酶, *GW2* 会影响泛素分子与目标蛋白的连接,使得原本应该被降解的目的蛋白不能被蛋白酶体特异识别,进而激活颖壳外表皮细胞的分裂,增加颖壳的宽度,是一个粒宽负调节因子^[8]; *WG1* 编码 1 个谷氧还蛋白,通过促进细胞增殖来控制粒宽, *WG1* 功能缺失突变体的颖壳横向细胞数显著降低^[9]; *WTG1* 基因编码 1 个 otubain-like 蛋白酶,是一个去泛素化酶, *WTG1* 功能缺失突变体的颖壳细胞增大,表现出粒宽变宽、粒厚变厚以及每穗粒数增加的表型^[10]。转录调控通路中, *GLW7* 编码植物特异性转录因子 OsSPL13,这是一个能控制籽粒长度和宽度的主效 QTL,通过正向调控颖壳细胞大小,从而提高籽粒长度和产量^[11]; *GL8* 编码转录因子 OsSPL16,通过促进细胞分裂及灌浆速率来增加籽粒宽度^[12]。丝裂原活化蛋白激酶信号通路中, *SMG1* 编码 1 个丝裂原活化蛋白激酶 OsMKK4,基因突变后会使得水稻籽粒变小^[13]; *DSG1* 编码 1 个丝裂原活化蛋白激酶 OsMAPK6, *dsg1* 突变体粒型变小、植株矮化^[14]。表观遗传调控通路中, *OsmiR396* 调节 *GS2* 编码的生长调控因子 OsGRF4, *GS2* 突变会影响 *OsmiR396* 的调控,从而提高水稻的粒长和质量^[15]; *SDG752* 编码甲基化转移酶 H3K36,它的表达下降会导致种子变小^[16]; *GW6a* 编码具有组蛋白乙酰转移酶活性的类 GNAT 蛋白 OsgIHAT1,其通过控制细胞分裂来调控粒长^[17]。

水稻粒型的遗传机理十分复杂,目前克隆的基因还不足以揭示粒型的遗传多样性和分子机理。水稻染色体片段代换系可以提供丰富的自然变异,且仅存在少量代换片段的差异,有清晰的遗传背景,因此是复杂性状研究的理想材料。本研究以日本晴为受体亲本、恢复系 R225 为供体亲本,鉴定到 1 个携带

10 个代换片段的水稻染色体片段代换系 Z29(CSSL-Z29),通过对水稻染色体片段代换系 Z29 进行农艺性状的测量与细胞学分析,探究籽粒变化的原因,再利用构建的次级 F_2 群体进行粒型相关 QTL 定位,进一步结合 MAS 法在 F_3 代中选育了 14 个次级代换系片段. 研究结果对于目标 QTL 的分子机制研究和分子设计育种有重要的意义.

1 材料与方法

1.1 材料

水稻 CSSL-Z29 是以测序粳稻品种日本晴为受体亲本、西南大学自育的优良籼稻恢复系 R225 为供体亲本,经过高代回交以及自交,结合全基因组 SSR 分子标记辅助选择选育而成的 10 片段优良代换系. QTL 定位群体材料由日本晴和 Z29 杂交构建的由 124 个单株组成的次级 F_2 分离群体.

1.2 水稻大粒 CSSL-Z29 培育及代换片段鉴定

利用在水稻基因组中均匀分布的 429 个 SSR 标记,对日本晴和 R225 进行多态性分析,筛选出 253 个多态性标记^[18];然后将这些多态性标记从 BC_2F_1 代开始进行分子辅助选择,从中选择 20 株进行自交;最后每个株系的每代取 10 株继续进行分子标记辅助选择^[19],在日本晴/ BC_2F_4 自交的 F_7 代选育出含 10 个代换片段的水稻长粒染色体片段代换系 Z29. 水稻染色体代换片段的鉴定参考 Zhou 等^[20]的方法. 当某个标记的带型与受体亲本相同时,表明该片段的 DNA 来自于日本晴;当某个标记的带型与供体亲本相同时,表明该片段的 DNA 来自于 R225. 连续的供体亲本带型所在区段表示为代换片段,代换片段长度的计算参照 Paterson 等^[21]的方法.

1.3 材料种植方法

2019 年将日本晴与 Z29 杂交产生 F_1 代,收获 F_1 代种子并在夏末季于海南种植,收获 F_2 代种子. 2020 年 3 月,将日本晴、Z29 以及 F_2 群体的种子在西南大学水稻研究所歇马试验基地播种. 4 月中旬,首先规划试验田(株距 16.67cm, 26.67cm),再将 30 株日本晴、30 株 Z29 和 124 株 F_2 单株移栽至试验田并进行常规处理. 2021 年 4 月,在西南大学水稻研究所歇马试验基地以同样的规格和管理方式种植 F_2 代,从中选出目标株系及其受体亲本进行次级代换片段的选育.

1.4 表型分析和农艺性状统计

在水稻成熟后,试验基地取 10 株日本晴、10 株 Z29 和 124 株 F_2 群体,统计每株的株高、有效穗数、穗长、一次枝梗数、二次枝梗数、粒长、粒宽、籽粒长宽比、每穗实粒数、每穗总粒数、千粒质量、结实率和单株产量共 13 个性状. 粒长和粒宽使用 20 cm 直尺测量连续排列整齐的 10 粒种子的总长和总宽,重复 3 次,然后取平均值;结实率为每穗实粒数占每穗总粒数的百分比;长宽比为粒长和粒宽的比. 最后使用 Microsoft Excel 2019 统计 10 株日本晴和 10 株 Z29 及 F_2 群体 13 个性状的最大值、最小值、平均值、标准差、偏度和峰度,并进行 t 检验.

1.5 QTL 定位

采用 CTAB 法提取 DNA^[22],然后进行 PCR 扩增,聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染法显色,日本晴带型、Z29 带型、杂合带型、缺失带型分别用“-1”,“1”,“0”,“.”来表示基因型的赋予值. 根据 F_2 代 124 个单株对应的指定值,在 SAS 统计软件上使用 HPMIXED 程序的限制最大似然法来进行 QTL 定位^[23].

1.6 次级代换片段系选育

根据 QTL 定位结果,在日本晴和 Z29 的 F_2 群体中选择有目标 QTL 的单株进行种植,发展成 F_3 群体(每个株系种植 20 株),利用 MAS 法进一步筛选出含少量或不合杂合标记的次级单片段或多片段代换系.

1.7 扫描电镜

取抽穗期同一部位的日本晴和 Z29 水稻颖壳,Hitachi SU3500 扫描电子显微镜和 $-40\text{ }^\circ\text{C}$ 冷却台进行新鲜样品的观察拍照.

1.8 石蜡切片

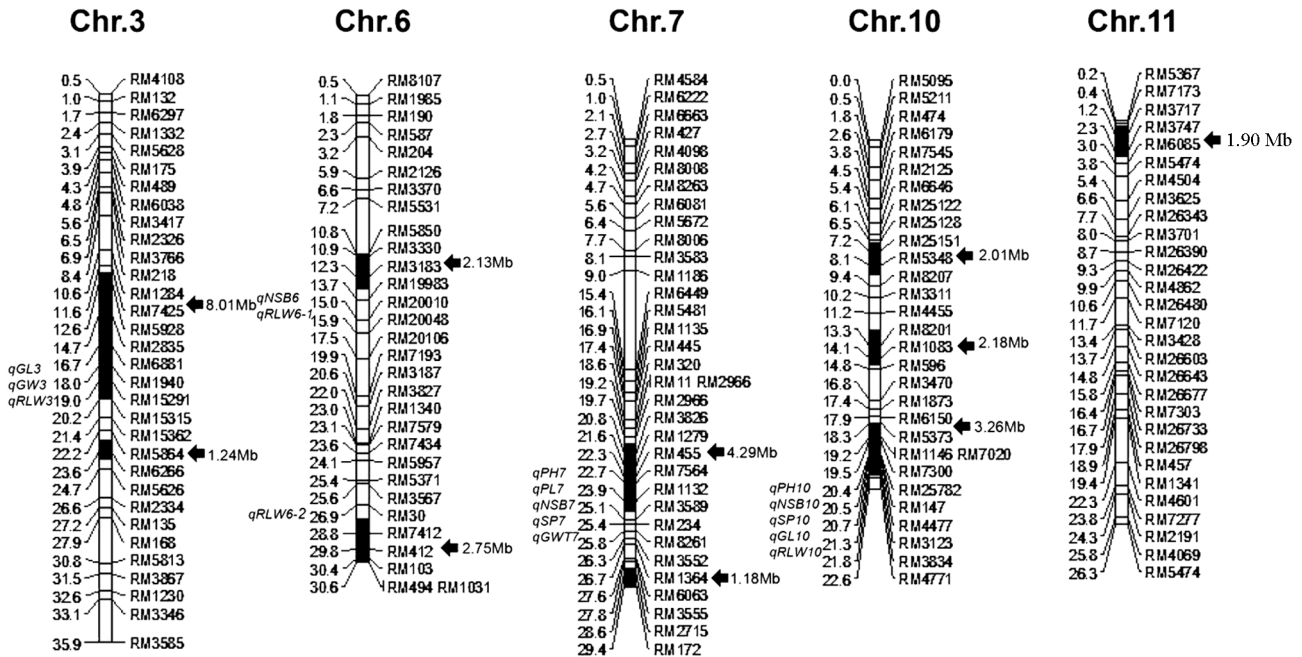
取抽穗期同一部位的日本晴和 Z29 水稻颖壳,在 FAA 溶液(50%乙醇,0.9 mol/L 冰醋酸和 3.7%甲

醛)中抽真空, 50 °C 条件下固定过夜; 然后将它们在一系列乙醇溶液中脱水, 用二甲苯取代, 并包埋在石蜡中; 对样品进行切片, 转移到聚赖氨酸涂层的玻璃载玻片上, 用二甲苯脱脂, 并通过一系列的乙醇溶液脱水; 用 1% 的番红和 1% 的固绿对切片进行染色, 通过一系列的乙醇溶液进行脱水, 用二甲苯浸润, 并安装在盖玻片下面; 用二甲苯对载玻片上的样品进行脱蜡, 依次用 0.1% 番红和 0.5% 固绿对样品进行染色, 用二甲苯浸润封片, 并用 Nikon Eclipse E600 显微镜进行光镜观察。

2 结果与分析

2.1 Z29 代换片段的鉴定

以粳稻测序品种日本晴作为受体, 自育优良籼稻恢复系 R225 作为供体, 选育出 1 个 10 片段代换系 (图 1), 代换片段分布于第 3, 6, 7, 10 和 11 号染色体上, 总代换长度为 28.95 Mb, 最长代换片段为 8.01 Mb, 最短代换片段长度为 1.18 Mb, 平均代换长度为 2.90 Mb。



每个染色体的右侧为代换片段长度和分子标记, 左侧为代换片段鉴定出的 QTL 和标记的物理距离, 黑色部分代表片段。GL 为粒长, GW 为粒宽, RLW 为长宽比, NSB 为二次枝梗数, PH 为株高, PL 为穗长。

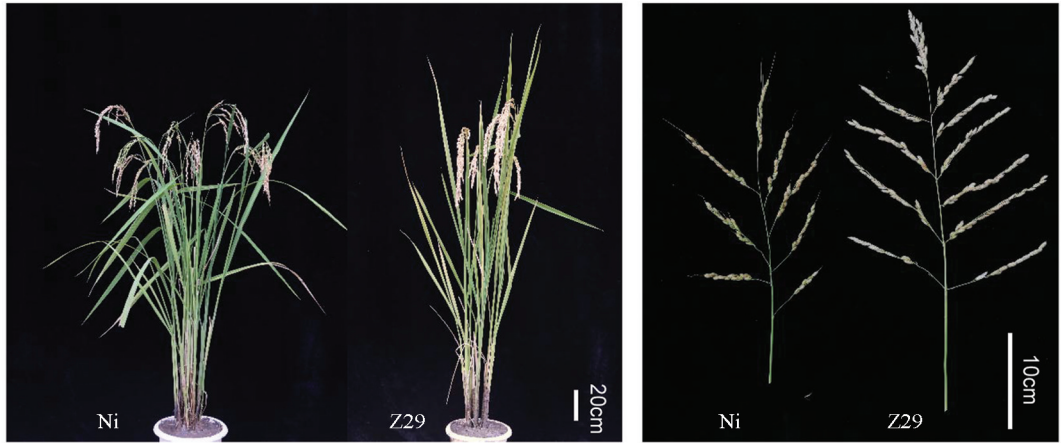
图 1 Z29 的代换片段

2.2 表型鉴定

Z29 与受体亲本日本晴(Ni)相比株型差异不明显(图 2a), 但粒长极显著增加了 38.83%(图 2d 和 2e), 粒宽极显著增加了 11.52%(图 2c 和 2f), 千粒质量极显著增加了 24.01%(图 2g), 每穗总粒数极显著增加了 22.54%(图 2h), 每穗实粒数极显著增加了 21.66%(图 2i), 穗长极显著增加了 16.58%(图 2j), 一次枝梗数差异无统计学意义(图 2k), 但二次枝梗数极显著增加了 32.21%(图 2l)。此外, 株高极显著增加了 11.88%(图 2m), 有效穗数极显著降低了 32.21%(图 2o), 结实率和单株产量差异无统计学意义(图 2n 和 2p)。大粒、大穗是 Z29 最主要的特征, 说明 Z29 是一个在水稻育种中具有重要价值的品种材料。

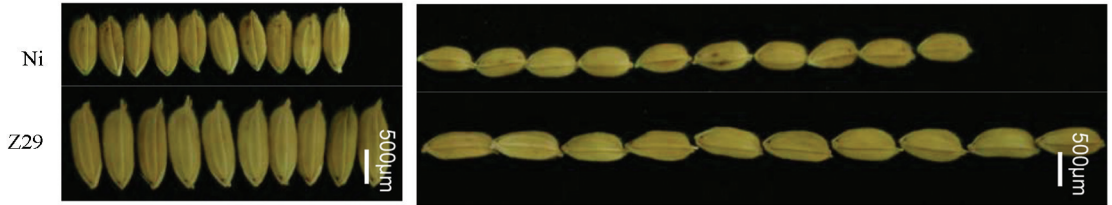
2.3 细胞学分析

为探究 Z29 籽粒变大的原因, 利用扫描电镜观察 Z29 与受体亲本日本晴抽穗期颖壳中间部位内外表面的细胞形态(图 3), 利用 ImageJ 软件测量内表皮细胞的长度、宽度以及颖壳外表皮单位面积细胞数。统计结果发现, 与日本晴相比, Z29 在颖壳外表皮纵向细胞数极显著增加了 31.48%(图 3a 和 3i), 横向细胞数极显著增加了 46.07%(图 3a 和 3j); Z29 颖壳外表皮单位面积细胞数极显著增加了 62.82%(图 3b 和 3h); Z29 颖壳内表皮细胞长度极显著增加了 22.45%(图 3c 和 3f), 颖壳内表皮细胞宽度显著增加了 0.05%(图 3c 和 3g), 因此, Z29 籽粒变大主要是由于颖壳细胞的增殖和伸长共同引起的。



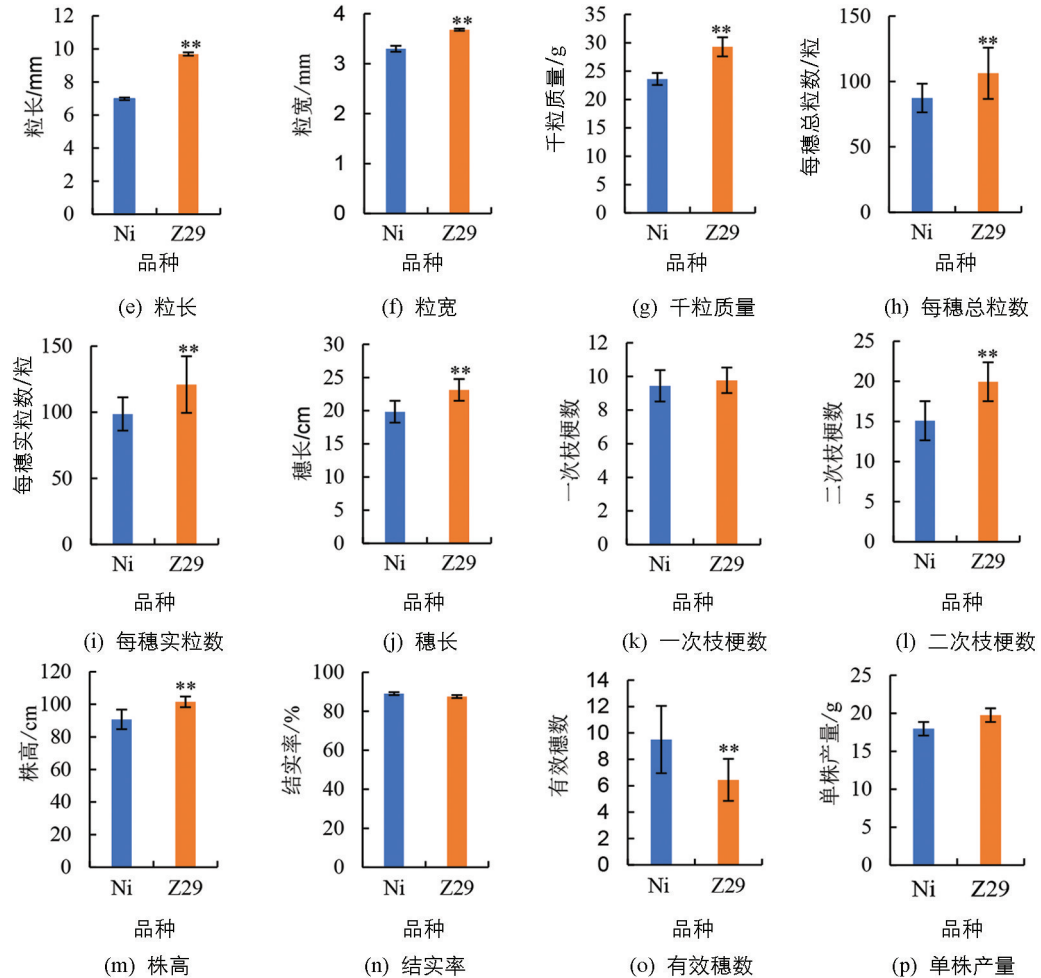
(a) 成熟期株型

(b) 成熟穗型



(c) 10粒宽

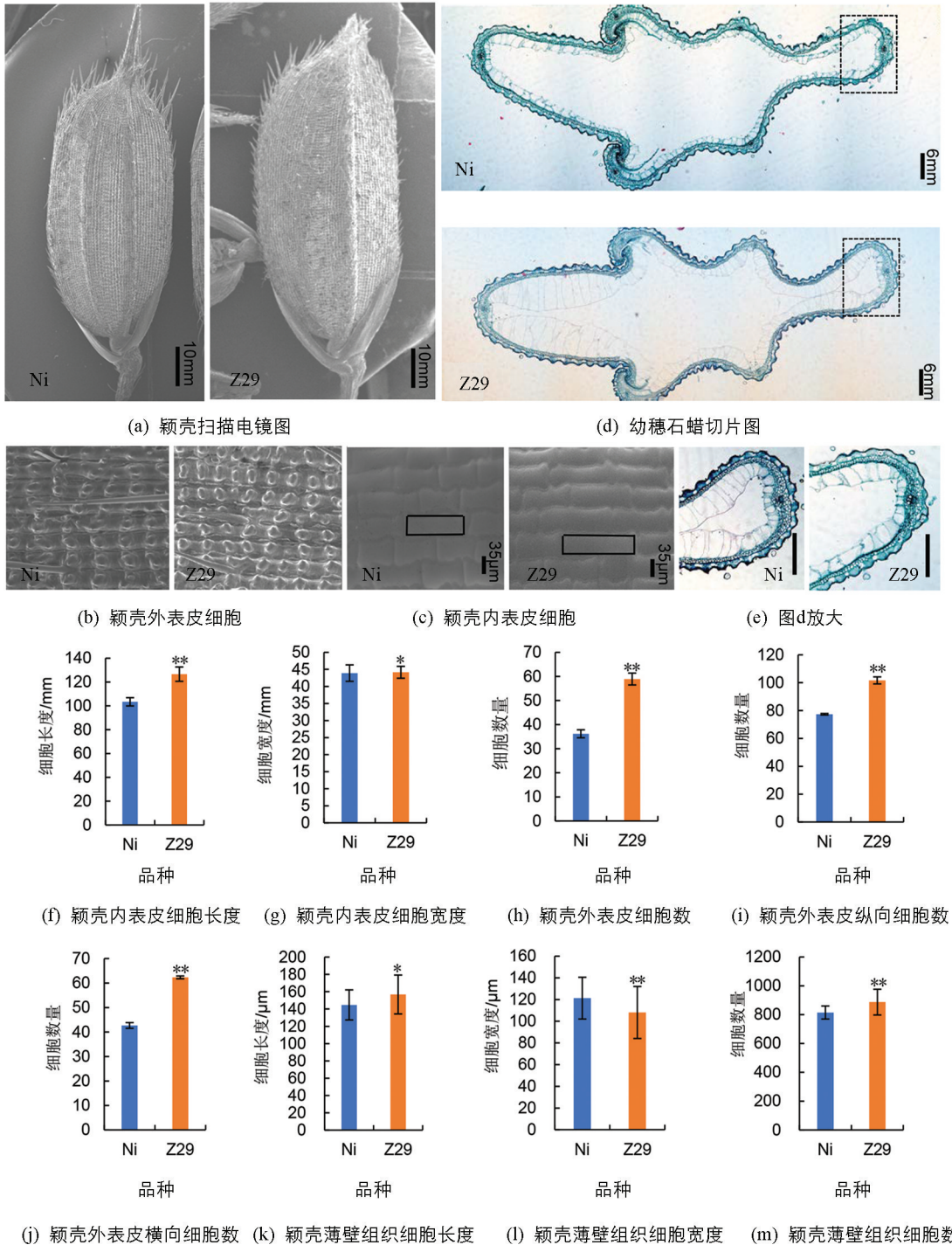
(d) 10粒长



* 表示 $p < 0.05$, ** 表示 $p < 0.01$, 差异有统计学意义.

图 2 Z29 和日本晴(Ni)的表型分析

石蜡切片分析结果发现,与日本晴相比,Z29 颖壳的薄壁组织细胞长度显著增加了 8.36%(图 3d, 3e 和 3k),但宽度极显著降低了 10.08%(图 3d 和 3l);同时发现 Z29 颖壳的薄壁组织的细胞数极显著增加了 8.92%(图 3d, 3e 和 3m),进一步从细胞学的层面上证实了 Z29 细胞增殖和伸长能共同促进 Z29 籽粒增大。

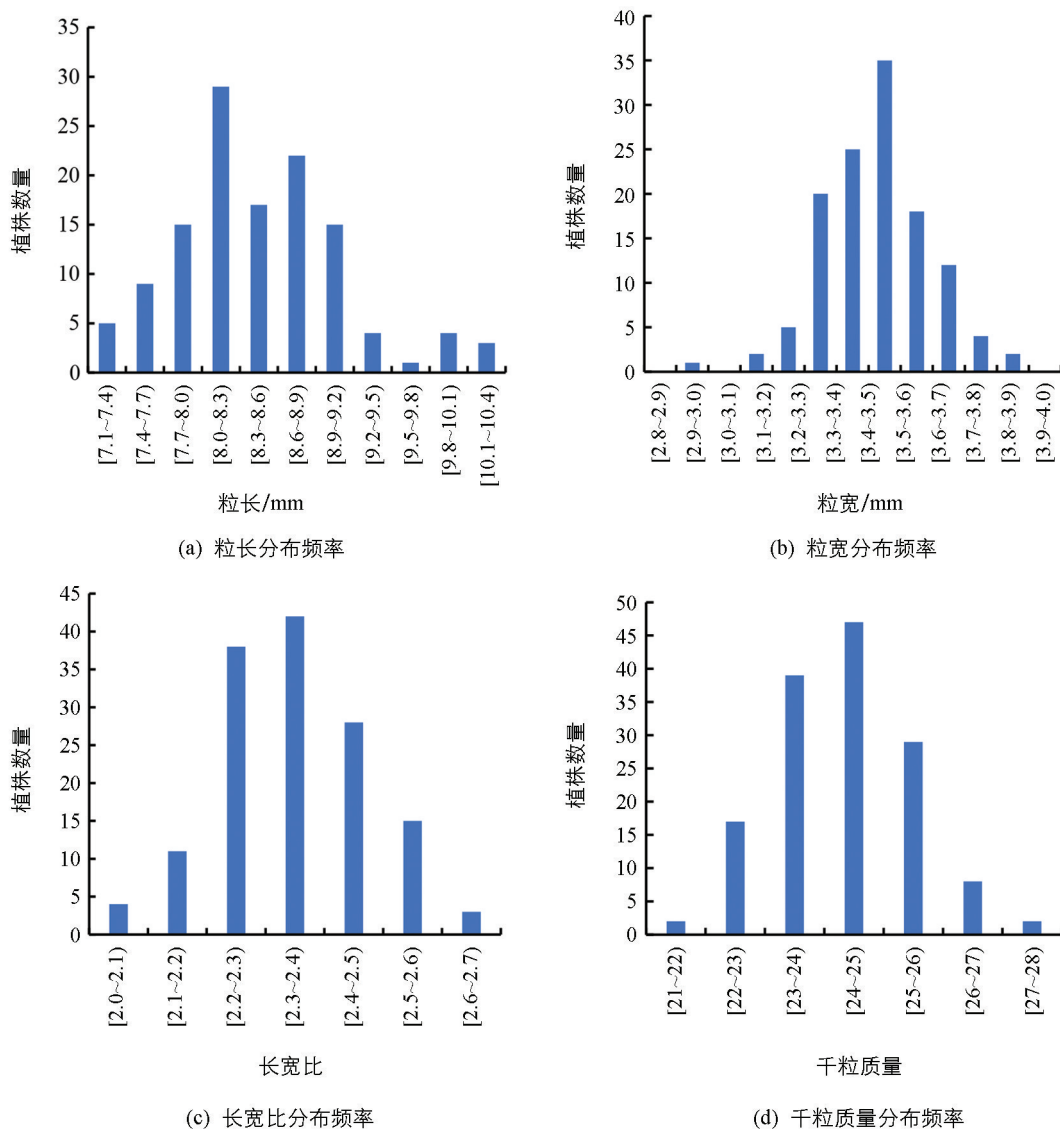


* 表示 $p < 0.05$, ** 表示 $p < 0.01$, 差异有统计学意义。

图 3 Z29 和日本晴(Ni)的细胞学分析

2.4 粒型性状在日本晴/Z29 的次级 F_2 群体中的频率分布

随机取 F_1 代 125 颗籽粒进行形态分析,Z29 的长粒相对短粒呈显性遗传.根据在日本晴/Z29 的次级 F_2 群体中的频率分布可知,其粒长(图 4a)、粒宽(图 4b)、长宽比(图 4c)以及千粒质量(图 4d)的分布均呈现出非标准正态分布,表明这些性状由多基因控制,可进行 QTL 分析。

图 4 粒型性状在日本晴/Z29 构建的次级 F₂ 群体中的分布频率

2.5 基于日本晴/Z29 的次级 F₂ 群体的粒型 QTL 鉴定

在次级 F₂ 分离群体中共鉴定出 8 个粒型 QTL, 分别为 2 个粒长 QTL($qGL-3$, $qGL-10$), 1 个粒宽 QTL($qGW-3$), 4 个长宽比 QTL($qRLW-3$, $qRLW-6-1$, $qRLW-6-2$, $qRLW-10$)和 1 个千粒质量 QTL($qGWT-7$), 这些 QTL 分布在第 3, 6, 7, 10 号染色体的相应代换片段上(表 1 和图 1). $qGL-3$ 和 $qGL-10$ 与 Z29 的粒长性状连锁, 分别分布于 3 号、10 号染色体的代换片段上, 其中 $qGL-3$ 的表型贡献率为 13.28%, 使粒长增加 0.20 mm, 表现为主效 QTL(贡献率大于 10%). $qGL-10$ 表型贡献率为 9.43%, 使粒长增加了 0.17 mm, 表现为微效 QTL. $qGW-3$ 与 Z29 的粒宽性状连锁, 对粒宽变异的贡献率为 10.17%, 使粒宽减少 0.06 mm, 表现为主效 QTL. 影响谷粒长宽比的 QTL 为 $qRLW-3$, $qRLW-6-1$, $qRLW-6-2$ 和 $qRLW-10$, 对表型的贡献率依次 28.49%, 5.64%, 7.92% 和 8.89%, 其中 $qRLW-3$ 和 $qRLW-10$ 增加长宽比, 加性效应分别为 0.12 和 0.06, 而 $qRLW-6-1$, $qRLW-6-2$ 分别减小长宽比 0.05 和 0.06. $qGWT-7$ 与 Z29 的千粒质量性状连锁, 对表型变异的贡献率为 5.88%, 使千粒质量增加 0.61 g. 此外, 粒长和千粒质量 QTL 均表现出增加性状值的正向加性效应, 4 个长宽比 QTL 中 2 个增加、2 个减少, 因而 Z29 的长粒主要由粒长和长宽比增加所致. 长粒由 1 个主效 QTL($qGL-3$)和 1 个微效 QTL($qGL-10$)共同控制. $qGL-3$, $qGW-3$, $qRLW-3$ 共同连锁于分子标记 RM6266, 可能属于一因多效或 QTL 紧密连锁.

表 1 Z29 所鉴定出的粒型 QTL(2021 年)

性状	QTL	染色体	连锁标记	估计效应±标准差	贡献率/%	<i>p</i> 值
粒长	<i>qGL-3</i>	3	RM6266	0.20±0.06	13.28	0.000 7
粒长	<i>qGL-10</i>	10	RM147	0.17±0.07	9.43	0.022 5
粒宽	<i>qGW-3</i>	3	RM6266	-0.06±0.01	10.17	0.000 8
长宽比	<i>qRLW-3</i>	3	RM6266	0.12±0.02	28.49	<0.000 1
长宽比	<i>qRLW-6-1</i>	6	RM3183	-0.05±0.02	5.64	0.025 2
长宽比	<i>qRLW-6-2</i>	6	RM412	-0.06±0.03	7.92	0.029 4
长宽比	<i>qRLW-10</i>	10	RM8201	0.06±0.03	8.89	0.021 9
千粒质量	<i>qGWT-7</i>	7	RM172	0.61±0.23	5.88	0.008 4

2.6 次级染色体片段代换系的选育

在 QTL 定位的基础上, 结合 MAS 法, 在 F_3 代中选育了 14 个次级片段代换系(表 2), 包括单片段代换系 4 个(S1-S4)、双片段代换系 5 个(D1-D5)、三片段代换系 2 个(T1-T2)和四片段代换系 3 个(FS1-FS3)。为进一步研究数量性状遗传机理提供了理想材料。

表 2 F_3 选育出的次级染色体片段代换系

编号	染色体	代换片段	携带 QTL(2021 年)
S1	3	RM5864-RM6266-RM5626	<i>qGW-3</i> , <i>qGL-3</i> , <i>qRLW-3</i>
S2	6	RM3300-RM3183-RM19983	<i>qNSB-6</i> , <i>qRLW-6-1</i>
S3	6	RM30-RM7412-RM412-RM103-RM494	<i>qRLW-6-2</i>
S4	10	RM6150-RM1146-RM7020-RM7300-RM147-RM3834	<i>qPH-10</i> , <i>qNSB-10</i> , <i>qSP-10</i> , <i>qGL-10</i>
D1	3	RM5864-RM6266-RM5626	<i>qGW-3</i> , <i>qGL3</i> , <i>qRLW-3</i> , <i>qRLW-10</i>
	10	RM4455-RM8201-RM596	
D2	6	RM30-RM7412-RM412-RM103-RM494	<i>qRLW-6-2</i> , <i>qPH-10</i> , <i>qNSB-10</i> , <i>qSP-10</i> , <i>qGL-10</i>
	10	RM6150-RM1146-RM7020-RM7300-RM147-RM3834	
D3	6	RM30-RM7412-RM412-RM103-RM494	<i>qRLW-6-2</i> , <i>qRLW-10</i>
	10	RM4455-RM8201-RM596	
D4	10	RM6150-RM1146-RM7020-RM7300-RM147-RM3834	<i>qRLW-10</i> , <i>qPH-10</i> , <i>qNSB-10</i> , <i>qSP-10</i> , <i>qGL-10</i>
	10	RM4455-RM8201-RM596	
D5	7	RM2715-RM172-RM22182	<i>qPH-7</i> , <i>qPL-7</i> , <i>qNSB-7</i> , <i>qSP-7</i> , <i>qGWT-7</i> , <i>qPH-10</i> , <i>qNSB-10</i> , <i>qSP-10</i> , <i>qGL-10</i>
	10	RM6150-RM1146-RM7020-RM7300-RM147-RM3834	
T1	6	RM3300-RM3183-RM19983	<i>qNSB-6</i> , <i>qRLW-6-1</i> , <i>qRLW-6-2</i> , <i>qPH-10</i> , <i>qNSB-10</i> , <i>qSP-10</i> , <i>qGL-10</i>
	6	RM30-RM7412-RM412-RM103-RM494	
	10	RM6150-RM1146-RM7020-RM7300-RM147-RM3834	
T2	6	RM30-RM7412-RM412-RM103-RM494	<i>qRLW-6-2</i> , <i>qPH-10</i> , <i>qNSB-10</i> , <i>qSP-10</i> , <i>qGL-10</i> , <i>qRLW-10</i>

续表 2

编号	染色体	代换片段	携带 QTL(2021 年)
	10	RM4455-RM8201-RM596	
	10	RM6150-RM1146-RM7020-RM7300-RM147-RM3834	
FS1	3	RM5864-RM6266-RM5626	<i>qGW-3</i> , <i>qGL-3</i> , <i>qRLW-3</i> , <i>qNSB-6</i> , <i>qR- LW-6-1</i> , <i>qRLW-6-2</i> , <i>qRLW-10</i>
	6	RM3300-RM3183-RM19983	
	6	RM30-RM7412-RM412-RM103-RM494	
	10	RM4455-RM8201-RM596	
FS2	3	RM5864-RM6266-RM5626	<i>qGW-3</i> , <i>qGL-3</i> , <i>qRLW-3</i> , <i>qNSB-6</i> , <i>qR- LW-6-1</i> , <i>qRLW-6-2</i> , <i>qPH-7</i> , <i>qPL-7</i> , <i>qNSB-7</i> , <i>qSP-7</i> , <i>qGWT-7</i>
	6	RM3300-RM3183-RM19983	
	6	RM30-RM7412-RM412-RM103-RM494	
	7	RM2715-RM172-RM22182	
FS3	6	RM3300-RM3183-RM19983	<i>qNSB-6</i> , <i>qRLW-6-1</i> , <i>qRLW-6-2</i> , <i>qPH- 7</i> , <i>qPL-7</i> , <i>qNSB-7</i> , <i>qSP-7</i> , <i>qGWT-7</i> , <i>qPH-10</i> , <i>qNSB-10</i> , <i>qSP-10</i> , <i>qGL-10</i>
	6	RM30-RM7412-RM412-RM103-RM494	
	7	RM2715-RM172-RM22182	
	10	RM6150-RM1146-RM7020-RM7300-RM147-RM3834	

3 讨论

本研究鉴定了 1 个以日本晴为受体亲本、恢复系 R225 为供体亲本的大粒染色体片段代换系 Z29, 携带 10 个来自供体亲本 R225 的代换片段, 平均代换长度 2.90 Mb. 其粒长、粒宽和千粒质量均极显著增加, 同时具有株高、穗长也显著增加等表型. 组织学分析表明 Z29 籽粒变大与细胞增殖和细胞伸长有关; 粒型相关农艺性状在 F_2 群体中呈非标准正态分布, 表明这些性状均由多基因控制.

水稻产量由千粒质量、穗粒数和有效穗数决定, 千粒质量主要受粒型的影响, 粒型由粒长、粒宽和厚度决定. 我们以日本晴与 Z29 杂交后构建的 F_2 群体作为 QTL 定位群体, 共鉴定到 8 个粒型相关的 QTL, 分布在第 3, 6, 7, 10 号染色体上, 包括 2 个粒长 QTL, 1 个粒宽 QTL, 4 个长宽比 QTL, 1 个千粒质量 QTL, 这些聚集在同一标记上的 QTL 可能属于一因多效或紧密连锁. 在已报道的研究中, *OsSGL* 是 1 个一因多效的关键基因, 能调节细胞的轴向性生长, 最终使水稻的籽粒变大并且产量增加, 过量表达 *OsSGL* 基因能显著增加粒长和粒质量. 细胞学观察发现, 颖壳细胞数目的增加、细胞体积纵向增大是粒长增加的主要原因^[24]. *SLG7* 编码与 *LONGIFOLIA 1* 和 *LONGIFOLIA 2* 同源的蛋白质, 通过增加纵向细胞长度、减小细胞横向宽度, 产生细长籽粒^[25]. *GS5* 编码 1 个丝氨酸羧肽酶, 其表达量的升高会促进水稻颖壳的细胞分裂, 使粒宽增加^[26]. *GL7* 编码拟南芥 *LONGIFOLIA* 蛋白的同源蛋白, 而 *LONGIFOLIA* 能调节细胞的纵向伸长, *GL7* 表达水平上调会增加水稻粒长并改善稻米外观品质^[11]. 这些基因均通过调控细胞增殖与细胞大小来影响籽粒的大小. 与之相比, Z29 同样通过影响颖壳细胞的数目与大小来影响籽粒大小, Z29 籽粒增大是由于颖壳细胞增殖和伸长共同引起. 这些研究结果为粒型相关 QTL 的进一步分解和功能分析奠定了基础, 也为水稻分子设计育种提供了理论依据.

水稻籽粒增大的原因可能是由于颖壳细胞增殖、细胞扩张或增殖与扩增共同作用所致. *GL3.1* 编码 1 个丝氨酸/苏氨酸磷酸酶, 该激酶对水稻粒长起负调控作用, 并且 *GL3.1* 能直接去磷酸化底物 T1; 3(细胞

周期蛋白), 而 T1; 3 表达下调会导致籽粒变短^[27]. *GW6a* 编码 1 个拥有组蛋白乙酰转移酶类的 GNAT 蛋白 OsglHAT1, *GW6a* 表达上调, 通过增加细胞数目使籽粒增大^[17]. *GW5* 在种子的发育过程中参与泛素化蛋白酶体的降解过程, 该基因功能缺失后, 不能正常参与蛋白质泛素化降解途径, 从而促进水稻颖壳的细胞分裂过程, 导致颖壳的细胞宽度增加, 最终影响水稻的籽粒宽度^[28]. 大多数基因都是通过调控水稻颖壳的细胞数目来调节水稻籽粒大小的, 而 *GLW7* 缺失突变以及过量表达对水稻颖壳的细胞数目并无明显影响, 其主要是通过控制细胞的扩张从而影响籽粒大小^[25]. *SMG11* 是 *DWARF2(D2)* 的新的等位基因, 编码 1 个参与油菜素内酯 BR 生物合成途径的细胞色素 P450 家族成员; *SMG11* 通过促进籽粒颖壳的细胞扩张来控制籽粒大小, 在一定程度上影响了细胞扩张中涉及籽粒大小的相关基因的表达, 从而调控细胞扩张; *SMG11* 的适当表达增加了谷粒的大小、粒质量和产量^[29]. 此外还有一些基因能够同时影响细胞的增殖和扩张, *BG1* 编码 1 个膜定位蛋白, 通过增加颖壳细胞增殖与扩张正向调控籽粒大小^[14]. *OsmiR396-GS2/OsGRF4-OsGIFs* 调控途径通过调节细胞扩展和细胞增殖, 进而对水稻的粒型和粒质量产生影响^[15]. 本研究中, Z29 籽粒的大小由颖壳细胞的大小和数量共同调控, 这有利于深入研究水稻调控籽粒大小的分子机理, 为挖掘提高水稻产量及品质的优良品种提供重要材料.

4 结论

本研究选育了 1 个以日本晴为受体、自育优良籼稻恢复系 R225 为供体亲本的水稻染色体片段代换系 Z29. Z29 含有来自 R225 的 10 个代换片段, 平均代换长度 2.90 Mb. 农艺性状调查发现, 相较于日本晴, Z29 粒长极显著增加了 38.83%, 粒宽极显著增加 11.52%, 表现为大粒表型. 扫描电镜观察和细胞学分析结果表明, Z29 籽粒变大是由细胞数量极显著增多、增大引起. 利用日本晴与 Z29 杂交构建的次级 F₂ 群体进行 QTL 定位, 共检测到 8 个与粒型相关的 QTL, 包括 2 个粒长 QTL(*qGL-3*, *qGL-10*), 1 个粒宽 QTL(*qGW-3*), 4 个长宽比 QTL(*qRLW-3*, *qRLW-6-1*, *qRLW-6-2*, *qRLW-10*) 和 1 个千粒质量 QTL(*qGWT-7*). 进一步利用 MAS 法在 F₃ 群体中选育出 14 个次级染色体片段代换系, 包括 4 个单片段代换系、5 个双片段代换系、2 个三片段代换系和 3 个四片段代换系.

参考文献:

- [1] 毛祖元, 陈倩, 邸新晏, 等. 水稻粒型染色体片段代换系 Z8 的 QTL 定位与次级代换系选育 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2023, 45(1): 45-54.
- [2] WANG L, XU Y Y, MA Q B, et al. Heterotrimeric G Protein α Subunit is Involved in Rice Brassinosteroid Response [J]. Cell Research, 2006, 16(12): 916-922.
- [3] UTSUNOMIYA Y, SAMEJIMA C, TAKAYANAGI Y, et al. Suppression of the Rice Heterotrimeric G Protein β -Subunit Gene, *RGB1*, Causes Dwarfism and Browning of Internodes and Lamina Joint Regions [J]. The Plant Journal; for Cell and Molecular Biology, 2011, 67(5): 907-916.
- [4] LIU Q, HAN R X, WU K, et al. G-protein $\beta\gamma$ Subunits Determine Grain Size through Interaction with MADS-domain Transcription Factors in Rice [J]. Nature Communications, 2018, 9: 852.
- [5] LIU L C, TONG H N, XIAO Y H, et al. Activation of Big Grain1 Significantly Improves Grain Size by Regulating Auxin Transport in Rice [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(35): 11102-11107.
- [6] ISHIMARU K, HIROTSU N, MADOKA Y, et al. Loss of Function of the IAA-glucose Hydrolase Gene *TGW6* Enhances Rice Grain Weight and Increases Yield [J]. Nature Genetics, 2013, 45(6): 707-711.
- [7] FENG Z M, WU C Y, WANG C M, et al. SLG Controls Grain Size and Leaf Angle by Modulating Brassinosteroid Homeostasis in Rice [J]. Journal of Experimental Botany, 2016, 67(14): 4241-4253.
- [8] SONG X J, HUANG W, SHI M, et al. A QTL for Rice Grain Width and Weight Encodes a Previously Unknown RING-Type E3 Ubiquitin Ligase [J]. Nature Genetics, 2007, 39(5): 623-630.
- [9] HAO J Q, WANG D K, WU Y B, et al. The GW2-WG1-OsbZIP47 Pathway Controls Grain Size and Weight in Rice [J]. MolecularPlant, 2021, 14(8): 1266-1280.
- [10] HUANG K, WANG D K, DUAN P G, et al. *WIDE AND THICK GRAIN 1*, which Encodes an Otubain-like Protease

- with Deubiquitination Activity, Influences Grain Size and Shape in Rice [J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2017, 91(5): 849-860.
- [11] WANG Y X, XIONG G S, HU J, et al. Copy Number Variation at the *GL7* Locus Contributes to Grain Size Diversity in Rice [J]. *Nature Genetics*, 2015, 47(8): 944-948.
- [12] WANG S K, WU K, YUAN Q B, et al. Control of Grain Size, Shape and Quality by *OsSPL16* in Rice [J]. *Nature Genetics*, 2012, 44(8): 950-954.
- [13] DUAN P G, RAO Y C, ZENG D L, et al. *SMALL GRAIN 1*, which Encodes a Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 4, Influences Grain Size in Rice [J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2014, 77(4): 547-557.
- [14] LIU S Y, HUA L, DONG S J, et al. *OsMAPK6*, a Mitogen-activated Protein Kinase, Influences Rice Grain Size and Biomass Production [J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2015, 84(4): 672-681.
- [15] DUAN P G, NI S, WANG J M, et al. Regulation of *OsGRF4* by *OsmiR396* Controls Grain Size and Yield in Rice [J]. *Nature Plants*, 2016, 2: 15203.
- [16] SUI P F, SHI J L, GAO X Y, et al. H3K36 Methylation is Involved in Promoting Rice Flowering [J]. *Molecular Plant*, 2013, 6(3): 975-977.
- [17] SONG X J, KUROHA T, AYANOM, et al. Rare Allele of a Previously Unidentified Histone H4 Acetyltransferase Enhances Grain Weight, Yield, and Plant Biomass in Rice [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(1): 76-81.
- [18] 赵芳明, 郭超, 魏霞, 等. 日本晴与 5 个优良恢复系的多态性标记筛选及遗传差异分析 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2016, 38(11): 1-7.
- [19] ZHAO F M, TAN Y, ZHENG L Y, et al. Identification of Rice Chromosome Segment Substitution Line Z322-1-10 and Mapping QTLs for Agronomic Traits from the F_3 Population [J]. *Cereal Research Communications*, 2016, 44(3): 370-380.
- [20] ZHOU K, LI Y, WANG S M, et al. Identification of Rice Chromosome Segment Substitution Line Z519 with Pur-Ple Sheath and Candidate Gene Analysis of *PSH1* [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2017, 43(7): 974-982.
- [21] PATERSON A H, DAMON S, HEWITT J D, et al. Mendelian Factors Underlying Quantitative Traits in Tomato: Comparison across Species, Generations, and Environments [J]. *Genetics*, 1991, 127(1): 181-197.
- [22] MURRAY M G, THOMPSON W F. Rapid Isolation of High Molecular Weight Plant DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8(19): 4321-4325.
- [23] 沈文强, 赵冰冰, 于国玲, 等. 优良水稻染色体片段代换系 Z746 的鉴定及重要农艺性状 QTL 定位及其验证 [J]. *作物学报*, 2021, 47(3): 451-461.
- [24] WANG M L, LU X D, XU G Y, et al. *OsSGL*, a Novel Pleiotropic Stress-related Gene Enhances Grain Length and Yield in Rice [J]. *Scientific Reports*, 2016(6): 38157.
- [25] SI L Z, CHEN J Y, HUANG X H, et al. *OsSPL13* Controls Grain Size in Cultivated Rice [J]. *Nature Genetics*, 2016, 48(4): 447-456.
- [26] LI Y B, FAN C C, XING Y Z, et al. Natural Variation in *GS5* Plays an Important Role in Regulating Grain Size and Yield in Rice [J]. *Nature Genetics*, 2011, 43(12): 1266-1269.
- [27] QI P, LIN Y S, SONG X J, et al. The Novel Quantitative Trait Locus *GL3. 1* Controls Rice Grain Size and Yield by Regulating Cyclin-T1; 3 [J]. *Cell Research*, 2012, 22(12): 1666-1680.
- [28] WENG J F, GU S H, WAN X Y, et al. Isolation and Initial Characterization of *GW5*, a Major QTL Associated with Rice Grain Width and Weight [J]. *Cell Research*, 2008, 18(12): 1199-1209.
- [29] FANG N, XU R, HUANG L J, et al. *SMALL GRAIN 11* Controls Grain Size, Grain Number and Grain Yield in Rice [J]. *Rice*, 2016, 9(1): 1-11.