

# 水稻籽粒 VB6 含量的调控位点挖掘及分析

唐璐瑶<sup>1#</sup>, 连锦瑾<sup>1#</sup>, 赵蓓蓓<sup>1</sup>, 沈芷琦<sup>1</sup>, 朱哲楠<sup>1</sup>, 叶语涵<sup>1</sup>, 张芷宁<sup>1</sup>,  
路梅<sup>1</sup>, 王跃星<sup>2</sup>, 饶玉春<sup>1\*</sup>

1 浙江师范大学 生命科学学院, 浙江 金华 321004

2 中国水稻研究所 水稻生物学国家重点实验室, 浙江 杭州 310006

唐璐瑶, 连锦瑾, 赵蓓蓓, 沈芷琦, 朱哲楠, 叶语涵, 张芷宁, 路梅, 王跃星, 饶玉春. 水稻籽粒 VB6 含量的调控位点挖掘及分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3485-3499.

TANG Luyao, LIAN Jinjin, ZHAO Beibei, SHEN Zhiqi, ZHU Zhenan, YE Yuhan, ZHANG Zhining, LU Mei, WANG Yuexing, RAO Yuchun. Mining and analysis of regulatory loci for VB6 content in rice grains[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3485-3499.

**摘要:** 维生素 B6 (vitamin B6, VB6) 作为参与动植物多项生命活动的重要组成成分, 体现了水稻等粮食经济作物的营养品质。目前对于控制水稻籽粒 VB6 含量的相关基因的挖掘较少且不深入。本研究以‘华占(HZ)’和‘热研 2 号(Nekken2)’为亲本所构建的重组自交系为材料, 在数量性状基因座 (quantitative trait loci, QTL) 定位的基础上进行候选基因初步筛选, 共获得 10 个候选基因, 其中 *LOC\_Os01g52450*、*LOC\_Os01g52500*、*LOC\_Os05g09500*、*LOC\_Os05g09440*、*LOC\_Os05g20570* 和 *LOC\_Os05g36270* 基因的表达量在双亲间差异显著。结合基因表达量和亲本 VB6 含量数据, 推测 *LOC\_Os05g09500* 是影响水稻籽粒 VB6 含量的关键基因, 其高表达显著影响水稻籽粒 VB6 含量。本研究填补了水稻籽粒 VB6 性状 QTL 定位研究的空白, 为进一步阐明水稻 VB6 合成的分子遗传机理、克隆相关基因提供了理论支持, 在鉴定、筛选和培育高 VB6 含量的水稻新品种方面具有一定意义。

**关键词:** 水稻; 维生素 B6; 数量性状基因座定位; 营养品质

资助项目: 浙江省自然科学基金重点项目(LZ23C130003); 2023 年度金华市科技局公益性技术应用研究项目(2023-4-059); 浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划(2024R404A037)

This work was supported by the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation Key Project (LZ23C130003), 2023 Annual Jinhua Science and Technology Bureau Public Welfare Technological Application Research Project (2023-4-059), and the Zhejiang Provincial University Students Science and Technology Innovation Activity Plan and New Talent Plan (2024R404A037).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this study.

\*Corresponding author. E-mail: ryc@zjnu.cn

Received: 2024-04-28; Accepted: 2024-06-25; Published online: 2024-06-28

# Mining and analysis of regulatory loci for VB6 content in rice grains

TANG Luyao<sup>1#</sup>, LIAN Jinjin<sup>1#</sup>, ZHAO Beibei<sup>1</sup>, SHEN Zhiqi<sup>1</sup>, ZHU Zhenan<sup>1</sup>, YE Yuhan<sup>1</sup>, ZHANG Zhining<sup>1</sup>, LU Mei<sup>1</sup>, WANG Yuexing<sup>2</sup>, RAO Yuchun<sup>1\*</sup>

1 College of Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, Zhejiang, China

2 State Key Laboratory of Rice Biology, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, Zhejiang, China

**Abstract:** Vitamin B6 (VB6), as an essential component involved in numerous biological activities of animals and plants, reflects the nutritional quality of cereal crops such as rice. Few studies have been conducted to mine the genes controlling the VB6 content in rice grains, and the available studies remain to be deepened. In this study, the recombinant inbred lines created from parents ‘HZ’ and ‘Nekken2’ served as the experimental materials. Based on QTL mapping, the initial screening identified ten candidate genes. The expression levels of *LOC\_Os01g52450*, *LOC\_Os01g52500*, *LOC\_Os05g09500*, *LOC\_Os05g09440*, *LOC\_Os05g20570*, and *LOC\_Os05g36270* showed significant differences between the parents. According to the gene expression and parental VB6 content, we hypothesized *LOC\_Os05g09500* as the key gene affecting the VB6 content in rice grains, and the high expression of this gene significantly influenced the VB6 content. The results of this study fill a gap in the QTL mapping on the VB6 content of rice grains and provide theoretical support for elucidating the molecular genetic mechanisms and cloning the related genes of VB6 synthesis in rice. In addition, the findings have significant implications for identifying, screening, and breeding new rice cultivars with high VB6 content.

**Keywords:** rice; vitamin B6; quantitative trait loci (QTL) localization; nutritional quality

水稻(*Oryza sativa* L.)是世界上主要的粮食作物之一,不仅能够为人类提供所需的碳水化合物和能量,而且还可以提供蛋白质、维生素和矿物质等营养。随着生活水平和消费观念的提高,人们对食品的需求不再仅仅停留在填饱肚子的层面,而是更加关注食品的品质、口感和营养价值<sup>[1]</sup>。目前,我国对于水稻育种的研究不再集中于产量性状,而是开始关注稻米的营养品质,在保证粮食安全的前提下改善水稻的营养品质已逐渐成为水稻育种研究的热点。水稻虽然含有维生素、蛋白质以及矿物质等人体必需的重要营养元素,但目前普通水稻中这

些营养元素的含量相对较低,且大多数元素主要储存在稻米的外壳、糊粉和胚中,在对稻米进行抛光等加工时极易被除去,其中就包括维生素 B6 (vitamin B6, VB6)<sup>[2]</sup>。

VB6 也称为吡哆素,包括 3-羟基-2-甲基吡啶的 6 种衍生物:吡哆醇(pyridoxine, PN)、吡哆醛(pyridoxal, PL)、吡哆胺(pyridoxamine, PM)及其磷酸衍生物磷酸吡哆醇(pyridoxine phosphate, PNP)、磷酸吡哆醛(pyridoxal phosphate, PLP)、磷酸吡哆胺(pyridoxamine phosphate, PMP)<sup>[3]</sup>。在不同生物体内,各组成成分差异显著。温其标等<sup>[4]</sup>利用高效液相色谱法测定了不同谷物的 VB6 含量,发

现在大麦、小麦、玉米中 VB6 主要以 PN 的形式存在,而在其他谷物中则以 PN 糖化物为主。

在自然界中,植物和微生物能自主合成 VB6,动物则必须从食物中获取<sup>[5]</sup>。至今已发现两种 VB6 从头合成途径——1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate, DXP)依赖途径和 DXP 非依赖途径(图 1),两者酶促反应的三要素均不相同,且每一生物体内仅存在一种 VB6 从头合成途径。前者只存在于大肠杆菌及少数细菌中,以 DXP 和 4-磷酸羟基-苏氨酸(4-phospho-hydroxy-threonine, 4PHT)为底物合成 PNP,经由 PNP 氧化酶反应,转变为 PLP<sup>[6]</sup>。后者主要存在于植物体内,以谷氨酰胺、3-磷酸甘油醛(或磷酸二羟丙酮)、5-磷酸核糖(或 5-磷酸核酮糖)为底物,经由 PLP 合酶复合体,直接合成 PLP<sup>[7]</sup>。由于 DXP 非依赖途径能将 VB6 合成与氨基酸代谢、糖代谢联系起来,且直接产物 PLP 能直接用于细胞生命活动,因而被认为是自然界合成 VB6 的主要方式。此外,所有生物体都存在一条 PLP 补救途径,通过吡哆醛激酶(pyridoxal kinase, PLK)、磷酸吡哆醇氧化酶(pyridoxine phosphate oxidase, PNPO)、

吡哆醛还原酶(pyridoxal reductase, PLR)等多种酶的相互作用,可直接摄取外源 VB6 合成 PLP,使得生物体内各类型 VB6 的含量达到平衡<sup>[8]</sup>。

维生素作为维持生物体基本代谢功能的重要有机物,也是稻米的重要营养组分。VB6 作为 B 族维生素中的重要一员,常作为辅酶参与动植物多种细胞代谢。研究发现,无论在发达国家还是欠发达国家,均有近 30%–60%的人口表现出 VB6 缺乏的症状,人类的膳食中 VB6 的来源主要为肉类和新鲜蔬菜,但肉类与蔬菜无法作为主食<sup>[9-10]</sup>。在世界五大主粮中,水稻、小麦、木薯 VB6 含量较低,日常食用这 3 种粮食很难达到 VB6 推荐摄入量<sup>[11]</sup>。因此,利用作物强化手段,以 VB6 为指标对主要作物进行生物强化,选育富含 VB6 的功能型稻米,对于提高食源性植物的 VB6 含量、缓解 VB6 隐性饥饿具有重大意义。

然而,当前与 VB6 相关的研究多集中在拟南芥和烟草上,在粮食作物中研究较少。此外,除 VB6 补救途径中已知的转化过程,对于植物体内 VB6 代谢转化途径以及 VB6 降解过程的相关研究仍较少。动物与微生物中均已发现了

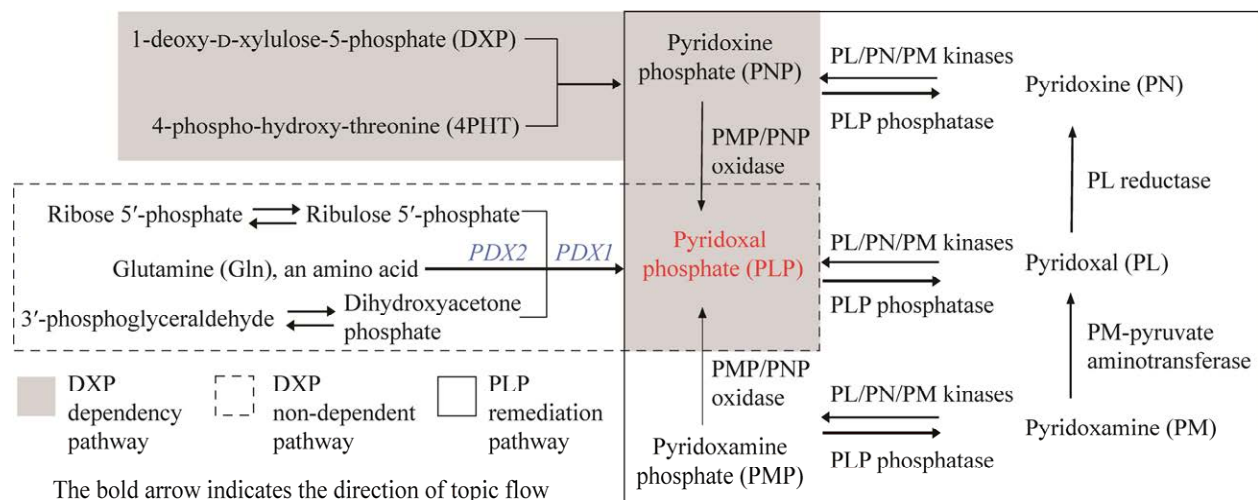


图 1 VB6 从头合成途径与代谢转换途径

Figure 1 *De novo* synthesis pathway and metabolic conversion pathway of VB6.

VB6 代谢的最终产物,前者为可随尿液排出的 4-吡哆酸,后者为自身可利用的化合物,但在植物体内,PLP 降解最终产物相关路径尚未被研究,且只存在于植物中的吡哆醇葡萄糖苷(pyridoxine glucoside, PNG),是 VB6 的衍生物之一,可为人类提供 VB6,其生化代谢途径也值得继续探索研究。水稻品种‘华占(HZ)’作为中国水稻研究所培育的优质籼稻,是近几年来最受青睐的杂交父本,具有高产稳产的优点,而粳稻品种‘热研 2 号(Nekken2)’亲和力较强、农艺性状较好且与籼稻花时同步,被广泛应用于水稻功能基因的挖掘及育种<sup>[12-13]</sup>。本研究以籼稻品种‘HZ’和粳稻品种‘Nekken2’作为亲本进行杂交,采用单粒传法(single seed descend method, SSD)<sup>[14]</sup>,即自 F<sub>2</sub>代每株收 1 粒种子混合种植,构建重组自交系群体(recombinant inbred lines, RILs),以此为材料检测亲本与 RILs 水稻籽粒的 VB6 含量,同时结合均匀分布在水稻 12 条染色体上的 4 858 个分子标记的高密度单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)遗传图谱,进行数量性状基因座(quantitative trait loci, QTL)定位与分析,寻找与调控水稻籽粒 VB6 含量相关的 QTL 位点或主基因,后续再利用分子标记辅助育种技术进行营养强化,为培育高 VB6 含量的优质水稻奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

本研究选用籼稻‘HZ’为父本,粳稻‘Nekken2’为母本进行杂交,获得的 F<sub>1</sub>代采用单粒传法套袋自交至第 12 代,构建纯合且稳定的重组自交系群体作为本研究的实验材料<sup>[15]</sup>。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 种植与管理

挑选亲本‘HZ’‘Nekken2’和 120 个稳定株

系的成熟水稻种子各 100 粒用于催芽。催芽前先用 75%的乙醇浸泡 30 s,然后倒掉乙醇,并用去离子水冲洗 3 次,再用 2%的次氯酸钠浸泡种子 10 min,其间不停搅拌,确保充分消毒,最后用去离子水冲洗表面数次,以清洗掉残余的次氯酸钠溶液<sup>[16]</sup>。消毒后的种子浸种 48 h,隔天换水,然后在 37 °C恒温培养箱中催芽 48 h。随后挑选露白一致的种子播种。1 个月后,从各株系中选择长势良好且一致的 24 株秧苗移栽到试验田中,各株系按照 4 行 6 列种植,期间常规管理以确保水稻正常生长<sup>[17]</sup>。

#### 1.2.2 制备籽粒米粉

在进行水稻籽粒中 VB6 含量的测定之前,需要将稻米脱粒、净种、干燥、脱壳,然后再经过碾压、粉碎和过筛等一系列操作加工成米粉。整个过程使用的仪器有:JDMZ 100 型稻谷出米率检测仪、JNMJ3 型检验碾米机、FS-II 型旋风式粉碎机和 GB/T 6003.1-2012 型标准检验筛。米粉制备好后分装到纸袋中,放入保温箱保存<sup>[18]</sup>。

#### 1.2.3 水稻籽粒 VB6 含量的测定

根据 VB6 与 4-氨基安替比林在强氧化剂作用下生成稳定黄色化合物、能够于 390 nm 处测得特定吸收峰的原理,测定米粉的 VB6 含量<sup>[19]</sup>。为了操作的便捷和结果的准确性,本研究采用 VB6 测定试剂盒(苏州科铭生物技术有限公司)测定米粉样品中的 VB6 含量,期间严格按照试剂盒说明书操作,测定 390 nm 处吸光值,代入样本质量换算公式:VB6 含量( $\mu\text{g/g}$ )= $(\Delta A - 0.020 5) \div 0.363 59 \times V_{\text{反应}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) = 13.76 \times (\Delta A - 0.020 5) \div W$ ,计算 VB6 含量( $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ )。每份样品测定重复 3 次,取平均值。

#### 1.2.4 遗传图谱的构建

提取亲本‘HZ’‘Nekken2’以及 RILs 群体的 DNA,经纯化处理后进行高通量测序。随后,对所

得数据进行整理和深入分析,最终得到 4 858 个均匀分布在水稻 12 条染色体上的分子标记,并以此构建对应的高密度分子遗传图谱<sup>[20]</sup>。

### 1.2.5 QTL 定位

利用复合区间作图法,在含有 4 858 个高密度 SNP 分子标记的遗传图谱上使用 Mapmaker/QTL1.1B 软件对水稻籽粒中 VB6 含量进行 QTL 定位分析,充分挖掘调控水稻籽粒 VB6 的 QTL。设置 LOD (likelihood of odd)=2.0 为阈值,若 LOD 大于 2.0,那么认为此处存在相应的 QTL<sup>[21]</sup>。将检测到的 QTL 按照“QTL-性状-染色体号”的方式来命名,QTL 简写为小写的 q,遵循 McCouch 等<sup>[22]</sup>的原则。

### 1.2.6 基因表达定量分析

使用 TRIzol 总 RNA 提取试剂盒(Invitrogen corporation)提取两亲本籽粒的总 RNA,保存于 -80 °C 冰箱中备用。再使用逆转录试剂盒 ReverTra Ace<sup>®</sup> qRT-PCR Kit (Toyobo, 东洋纺生物科技有限公司)将提取的 RNA 样品反转录成 cDNA。结合 QTL 定位结果,在中国水稻基因组注释数据库(<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)中,筛选到了可能与调控水稻籽粒 VB6 含量相关的基因,位于 1、5 号染色体区间内。最后利用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time

polymerase chain reaction, qRT-PCR)技术检测候选基因在双亲中的表达量差异<sup>[23]</sup>。

qRT-PCR 的反应体系为: cDNA 模板 (500 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 2  $\mu$ L, SYBR qPCR Mix 5  $\mu$ L, 正、反向引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, 相关引物序列见表 1。

qRT-PCR 的扩增程序为: 95 °C 5 min; 95 °C 10 s, 55 °C 20 s, 72 °C 20 s, 共 40 个循环。

### 1.3 数据处理

应用 Microsoft excel 和 GraphPad Prism 9 软件,利用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法<sup>[24]</sup>对数据进行处理,分析候选基因在双亲间的表达量差异。运用双尾 *t* 检验分别在 0.01 和 0.05 显著性水平上比较不同数据之间的差异。 $P < 0.05$  表示显著差异, $P < 0.01$  表示极显著差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 双亲及 RILs 群体籽粒中 VB6 含量差异

实验所得的籽粒 VB6 性状的量化数据显示: ‘HZ’和‘Nekken2’的 VB6 含量分别为 12.11  $\mu$ g/g、10.85  $\mu$ g/g, 父本的数据高于母本,反映出两亲本在该性状上存在一定差异。通过绘制 RILs 遗传群体的 VB6 性状数据统计图(图 2),发现各株系 VB6 含量数值近乎呈连续的正态分布,群

表 1 qRT-PCR 所用引物序列

Table 1 Primer sequences for qRT-PCR

| Primer name           | Forward primer (5'→3') | Reverse primer (5'→3') |
|-----------------------|------------------------|------------------------|
| <i>OsActin</i>        | TGGCATCTCAGCACATTCC    | TGCACAATGGATGGGTCAGA   |
| <i>LOC_Os01g52450</i> | ATGGTCGGCAAGGATGTTGT   | ATTTCAGACTTGGGCAGGG    |
| <i>LOC_Os01g52500</i> | TCCAGGAGGGGAATGAGAGG   | TGGCAGCCAAGATCTCCAAG   |
| <i>LOC_Os05g09500</i> | GCGGCAGCAAGATCAAGATG   | CCAAACAGCTCCGAGGAGTT   |
| <i>LOC_Os05g09440</i> | CGGAGAGGAATACCACGAGC   | TCTGCAAGAGTTCCACCGAC   |
| <i>LOC_Os05g20570</i> | ATGAACACCCAGGACACCAT   | TATCATGCTGGCCAGTGTC    |
| <i>LOC_Os05g32544</i> | GACGCACTTCTCTTCATGC    | TTCTTTCATCTCCCACCACCC  |
| <i>LOC_Os05g36270</i> | GAGGAGGCCATTATCGTCTGA  | CCAAGGGAAGGATCAAGGGT   |
| <i>LOC_Os05g35110</i> | CAGAGCTTTGCAGGCCATAG   | GCCTAAAGATCGCAGGTGTG   |
| <i>LOC_Os05g32210</i> | CCATGTGCTGAAAAGGCCA    | ACCCATCTCCTTGAACACGT   |
| <i>LOC_Os05g45590</i> | GGGGTGTTTTATGCGCTTGA   | AAGCCAAGTTCTCTCTGCCT   |

体内存在一定数量的超亲个体,且分布范围广,由此表明该性状符合数量遗传特性,其后代分离不受单一的主效基因控制,而是受多基因调控,故符合 QTL 区间作图的要求,适合进行进一步的 QTL 定位分析。

## 2.2 水稻籽粒 VB6 含量 QTL 定位分析

基于实验室前期建立的遗传图谱,本研究充分挖掘了水稻籽粒 VB6 含量的相关 QTL,总

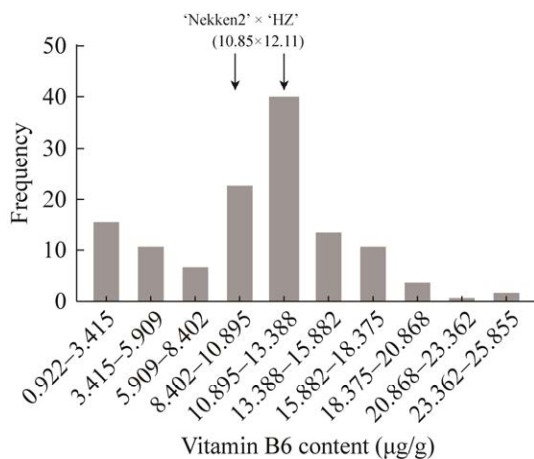


图 2 水稻重组自交系籽粒 VB6 含量分布  
Figure 2 Distribution of VB6 content in rice recombinant inbred lines.

表 2 水稻籽粒 VB6 含量 QTL 分析

Table 2 QTL analysis of VB6 content in rice grains

| QTL             | Chromosome | Physical distance (bp) | Position of support (cM) | Likelihood of odd |
|-----------------|------------|------------------------|--------------------------|-------------------|
| <i>qVB61-1</i>  | 01         | 29 366 871-30 402 322  | 125.89-130.33            | 2.88              |
| <i>qVB65-1</i>  | 05         | 5 017 354-5 350 624    | 21.51-22.94              | 3.70              |
| <i>qVB65-2</i>  | 05         | 7 059 585-7 289 610    | 30.26-31.25              | 2.76              |
| <i>qVB65-3</i>  | 05         | 11 078 454-11 237 729  | 47.49-48.17              | 2.09              |
| <i>qVB65-4</i>  | 05         | 12 045 036-12 200 779  | 51.63-52.30              | 2.66              |
| <i>qVB65-5</i>  | 05         | 13 776 389-14 891 458  | 59.06-63.84              | 2.15              |
| <i>qVB65-6</i>  | 05         | 16 020 128-16 549 021  | 68.67-70.94              | 2.53              |
| <i>qVB65-7</i>  | 05         | 17 040 874-17 582 036  | 72.05-75.37              | 3.31              |
| <i>qVB65-8</i>  | 05         | 18 494 867-22 226 529  | 79.28-95.28              | 3.70              |
| <i>qVB65-9</i>  | 05         | 23 496 172-24 242 158  | 100.72-103.92            | 2.40              |
| <i>qVB65-10</i> | 05         | 26 405 284-27 082 669  | 113.19-116.10            | 2.21              |
| <i>qVB611-1</i> | 11         | 2 579 515-2 797 777    | 11.06-11.99              | 2.69              |
| <i>qVB612-1</i> | 12         | 9 372 890-9 519 633    | 40.18-40.81              | 2.05              |
| <i>qVB612-2</i> | 12         | 10 040 411-14 071 703  | 43.04-60.62              | 2.70              |

共在 4 条染色体(1、5、11 和 12 号染色体)上定位到 14 个 QTLs, 详见表 2 和图 3, LOD 值介于 2.00-3.70 之间。其中, 5 号染色体上存在 2 个效应值最大的数量性状位点, 物理距离在 5 017 354-5 350 624 bp 之间和 18 494 867-22 226 529 bp 之间的 *qVB65-1* 和 *qVB65-8*, LOD 值均高达 3.70, 推测这两个 QTL 区间内很可能存在较为可靠的调控水稻籽粒 VB6 含量的基因。

## 2.3 候选基因表达量分析

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, 并参考前人的研究成果<sup>[25-30]</sup>, 对前期得到的 14 个 QTL 区间进行了候选基因的初步筛选, 最终选出 10 个可能与水稻籽粒 VB6 含量相关的候选基因(表 3)。这些基因包括己糖激酶基因、参与水稻糖酵解和糖异生代谢通路基因、NAD 激酶基因以及 NADP-苹果酸酶基因等, 再利用 qRT-PCR 测定其在双亲间的表达量。结果表明, 水稻籽粒中 *LOC\_Os05g32544*、*LOC\_Os05g35110*、*LOC\_Os05g32210*、*LOC\_*



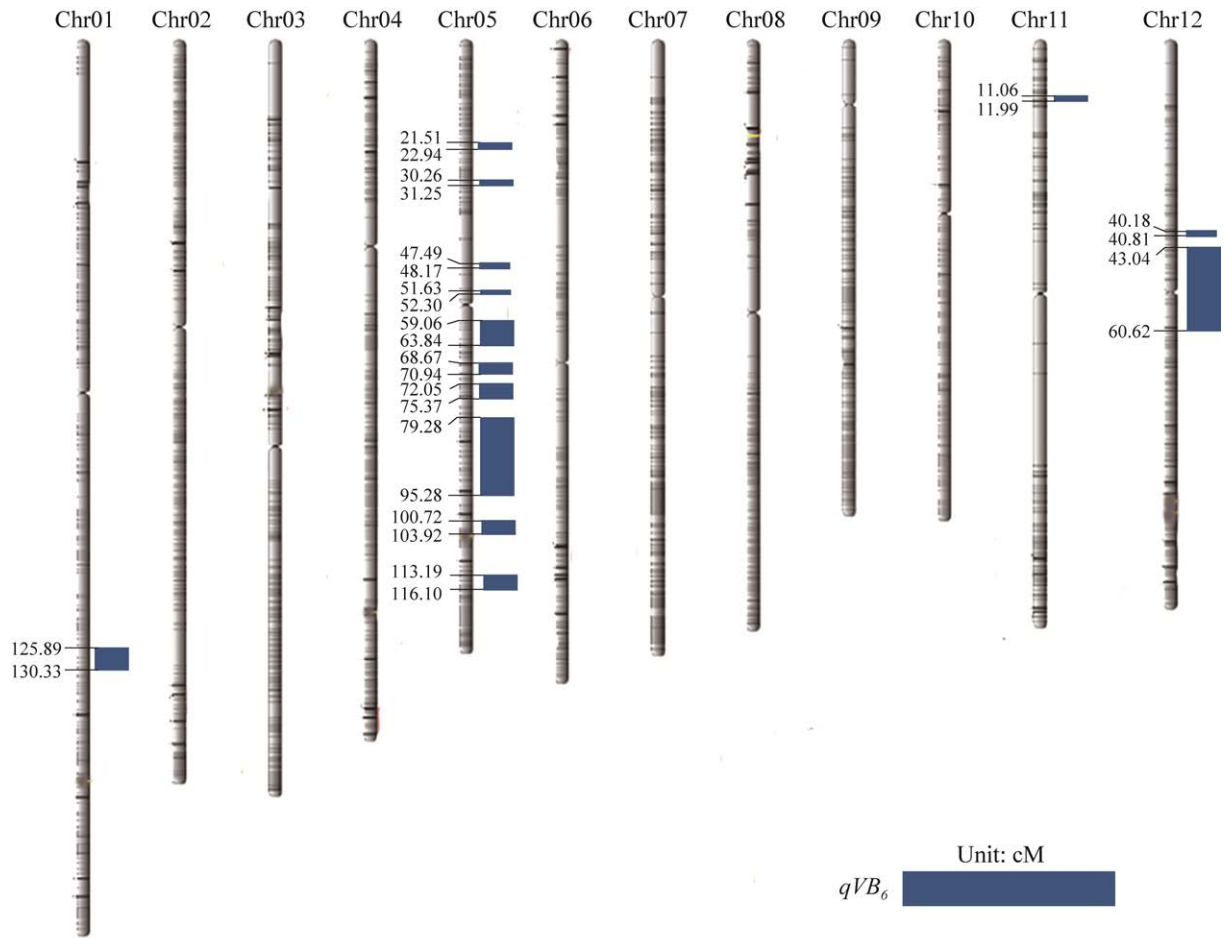


图 3 水稻重组自交系籽粒 VB6 含量 QTL 定位

Figure 3 QTL mapping of VB6 content in rice recombinant inbred lines.

表 3 水稻籽粒 VB6 含量相关候选基因功能

Table 3 Functions of candidate genes related to VB6 content in rice grains

| Chromosome | QTL locus       | Gene ID               | Functional annotation  | References |
|------------|-----------------|-----------------------|--|------------|
| 1          | <i>qVB61-1</i>  | <i>LOC_Os01g52450</i> | Hexokinase   | [25]       |
| 1          | <i>qVB61-1</i>  | <i>LOC_Os01g52500</i> | NADP-malic enzyme  | [26]       |
| 5          | <i>qVB65-1</i>  | <i>LOC_Os05g09500</i> | Cytosolic hexokinase   | [27]       |
| 5          | <i>qVB65-1</i>  | <i>LOC_Os05g09440</i> | NADP malic enzyme  | [28]       |
| 5          | <i>qVB65-4</i>  | <i>LOC_Os05g20570</i> | Invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein, putative, expressed            |            |
| 5          | <i>qVB65-8</i>  | <i>LOC_Os05g32544</i> | Glycosyltransferase, putative, expressed   |            |
| 5          | <i>qVB65-8</i>  | <i>LOC_Os05g36270</i> | Fructose-1,6 bisphosphatase 2  | [29]       |
| 5          | <i>qVB65-8</i>  | <i>LOC_Os05g35110</i> | Involved in the mTOR signaling pathway, which regulates cellular synthesis of vitamin B6 |            |
| 5          | <i>qVB65-8</i>  | <i>LOC_Os05g32210</i> | NAD kinase gene  | [30]       |
| 5          | <i>qVB65-10</i> | <i>LOC_Os05g45590</i> | Hexokinase activity, involved in glycolysis/gluconeogenesis pathway of rice              |            |

*Os05g45590* 在双亲间的表达量并无明显差异。*LOC\_Os01g52450* 在父本‘HZ’中的表达量显著低于母本‘Nekken2’，*LOC\_Os01g52500*、*LOC\_Os05g09440*、*LOC\_Os05g20570*、*LOC\_Os05g36270* 在父本‘HZ’中的表达量均极显著高于母本‘Nekken2’，而 *LOC\_Os05g09500* 在‘HZ’中的表达量极显著低于‘Nekken2’，表达量差异达到 4.66 倍(图 4)。

因此，对‘HZ’和‘Nekken2’中的 *LOC\_Os05g09500* 进行测序，发现共存在 3 处单碱基差异，分别位于第 861 位(‘HZ’为 T，‘Nekken2’为 A)、第 2 149 位(‘HZ’为 G，‘Nekken2’为 A)、第 3 181 位(‘HZ’为 T，‘Nekken2’为 C)，3 处单碱基差异均位于内含子区域(图 5)。内含子是真核生物基因组的重要组成部分，它们虽然不参与蛋白质的编码但可以调节基因的表达，内含

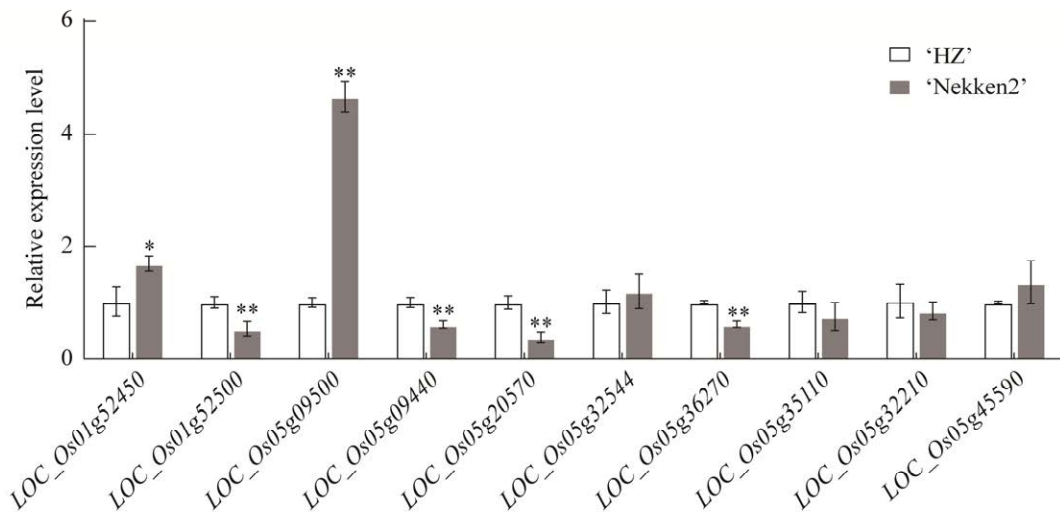


图 4 水稻籽粒 VB6 含量相关基因表达量差异

Figure 4 Differences in expression of genes related to VB6 content in rice grains. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

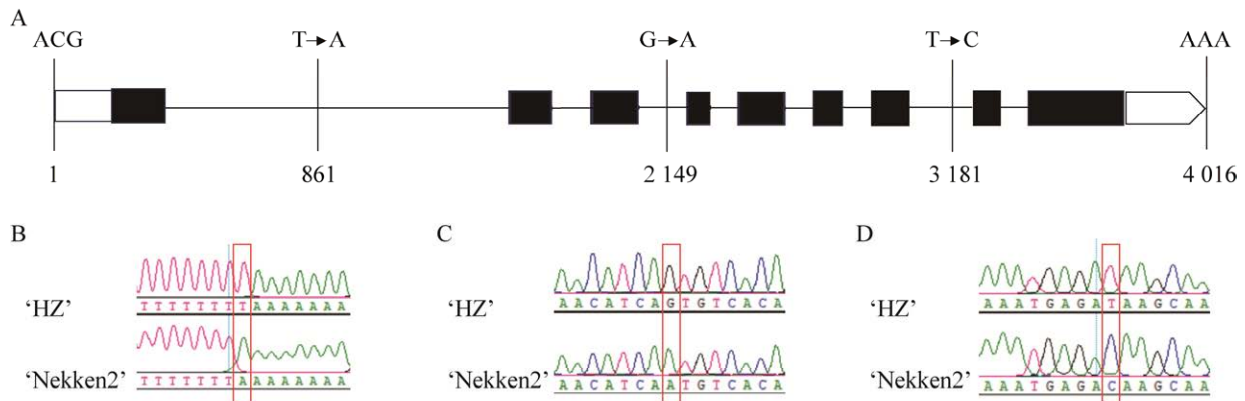


图 5 *LOC\_Os05g09500* 差异位点及测序结果分析 A: *LOC\_Os05g09500* 位点分析. B: 位点 1. C: 位点 2. D: 位点 3

Figure 5 *LOC\_Os05g09500* differential sites and analysis of sequencing results. A: *LOC\_Os05g09500* site analysis. B: Site 1. C: Site 2. D: Site 3.



子及被剪接体切除的内含子会影响 mRNA 代谢的许多过程,包括基因的初始转录、前体 mRNA 的编辑、成熟 mRNA 的核输出、翻译效率和 mRNA 降解等<sup>[31]</sup>。由此推测‘HZ’与‘Nekken2’间籽粒 VB6 含量的差异可能是由于基因 *LOC\_Os05g09500* 的碱基突变所致,可能对剪切位点的活性及 mRNA 的成熟加工等一系列修饰造成了影响,进而对最终蛋白产生影响,但有关内含子的分子机制还有待更深入的探索。

#### 2.4 验证候选基因的表达与 VB6 性状的关系

为了验证候选基因的表达与 VB6 性状的关系,从 120 个稳定遗传的 RILs 中挑选了 3 株 VB6 含量较高的单株和 3 株 VB6 含量较低的单株,提取其 RNA 并进行反转录,再选择亲本间表达量差异最显著的候选基因 *LOC\_Os05g09500* 进行定量分析,结果显示,在 3 株 VB6 含量高的单株中 *LOC\_Os05g09500* 的表达量低,在 3 株 VB6 含量低的单株中 *LOC\_Os05g09500* 的表达量高,与 *LOC\_Os05g09500* 在亲本‘HZ’和‘Nekken2’中的表达趋势完全一致,即‘HZ’中的籽粒 VB6 含量高于‘Nekken2’,而 *LOC\_Os05g09500* 的表达量低于‘Nekken2’(图 6)。这进一步证明了本研究结果的可靠性。

### 3 讨论

水稻籽粒是 VB6 积累的主要部位,籽粒 VB6 含量的调控方式较为复杂,由多个基因共同调控。VB6 不仅对植物自身的生长发育和逆境适应有着重要意义,而且也是人体一种必不可少的微量营养物质,对于体内的正常代谢活动发挥具有不可替代的作用<sup>[32]</sup>。从人体健康方面来看,VB6 作为重要的膳食营养素,能有效应对先天性或适应性的免疫反应,同时 PLP 依赖性酶能参与人体众多神经递质如色氨酸、多

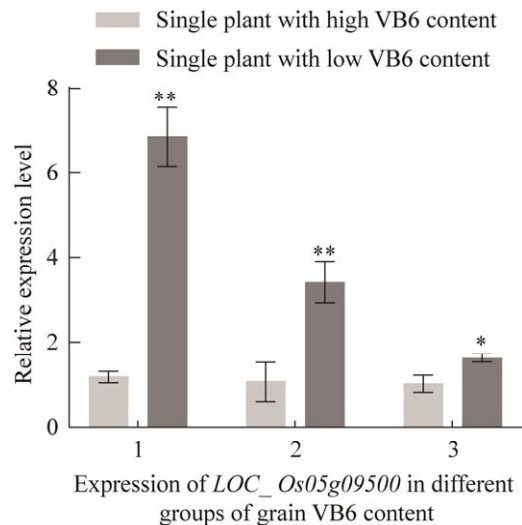


图 6 *LOC\_Os05g09500* 在不同 VB6 含量植株中的表达

Figure 6 Expression of *LOC\_Os05g09500* in different groups of grain VB6 content. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

巴胺等的合成,影响机体的认知水平和精神状态,促进人体神经系统发育、保护神经系统。除此之外,足量 VB6 具有抗氧化防御作用,能有效淬灭活性氧,同时作为谷胱甘肽防御系统辅酶,参与人体的炎症反应,起到抗炎作用<sup>[33]</sup>。研究发现<sup>[34]</sup>,在疾病治疗与预防方面,VB6 的足量摄入能有效减少心血管疾病、神经性疾病的发生,对于维持机体免疫功能正常乃至增强具有重要作用,如 PLP 依赖性辅酶参与免疫系统代谢过程,对延缓肿瘤发展有积极影响。因此 VB6 的临床医学用途也在不断拓展,除常规用于治疗急性乳腺炎、缓解呕吐症状或辅助治疗缺铁性贫血外,VB6 也被应用于辅助治疗肺癌、直肠癌等疾病<sup>[35]</sup>。

截至目前,关于作物维生素 QTL 的相关报道主要集中在维生素 A、维生素 C 和维生素 E,而关于 VB6 的研究主要是其含量的提取与测定,与 QTL 挖掘相关的研究较少。周大虎等<sup>[36]</sup>通过完备区间作图法对水稻‘紫宝香糯 1 号’与

‘明恢 63’构建的 RIL 群体糙米维生素 A 性状进行 QTL 定位分析, 最终在 5 号和 6 号染色体上共挖掘了 3 个维生素 A 相关 QTLs, 最大贡献率达 18.95%。郝艳娟<sup>[37]</sup>采用简单重复序列(simple sequence repeats, SSR)标记、扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)技术挖掘出与辣椒维生素 C 含量紧密联系的 QTL 共 5 个, 位于第 1、2、3、6 连锁群中, 可以解释 9.64%–15.07%的表型变异。陈俊<sup>[38]</sup>以大豆芽菜为研究材料, 通过 QTL 定位软件程序挖掘了 10 个涉及该作物的维生素 C 含量 QTL, 其贡献率最低为 4.3%, 最高为 9.86%。王彦华<sup>[39]</sup>在番茄维生素 C 含量的 QTL 研究中, 共鉴定出 4 个相关 QTL, 其贡献率分别为 4.88%、18.39%、7.94%和 26.04%, LOD 值分别为 4.09、2.54、3.99、3.21。Li 等<sup>[40]</sup>在大豆籽粒中检测出 21 个与维生素 E 总量及其异构体分量相关的 QTL, 解释了不同环境下个体和总维生素 E 的 2.8%–16.7%的表型变异。刘焕成<sup>[41]</sup>以大豆为实验材料, 利用复合区间作图法共挖掘到 66 个与籽粒维生素 E 及其异构体相关的 QTL, 其中与维生素 E 总量相关的 15 个 QTL 分布在 6 条不同的染色体上, 表型变异贡献率范围为 2.4%–32.6%。叶涵斐等<sup>[42]</sup>以籼稻‘华占’和粳稻‘热研 2 号’为亲本, 采用复合区间作图法共定位了 122 个与水稻籽粒维生素 E 和各成分相关 QTL, 在 12 条染色体上均有分布。故此, 本研究试图通过测定水稻籽粒中的 VB6 含量, 展开相应的 QTL 定位分析研究, 为提高水稻的 VB6 含量奠定遗传基础, 希望在分子标记育种选育高 VB6 含量的优质水稻新品种方面提供一定的帮助。

VB6 参与多种代谢途径, 其中一些途径可能受到己糖激酶活性的调节<sup>[43]</sup>。前人的研究表明 *LOC\_Os01g52450*、*LOC\_Os05g09500* 和 *LOC\_Os05g45590* 均是己糖激酶(hexokinase,

HXK)基因家族成员, 可能参与调控己糖激酶活性。己糖除了能够作为能量来源维持植物生长发育外, 还可以参与植物的光合作用、病原体防御等一系列生命活动<sup>[44]</sup>。己糖激酶是一种双功能酶, 可以将己糖磷酸化为 6-磷酸己糖, 并在糖酵解和糖异生途径中扮演重要角色<sup>[45]</sup>。水稻的抗缺氧能力与糖酵解之间存在密切的联系。当水稻长期处于缺氧条件下, 会引起一系列的代谢紊乱, 对水稻细胞的结构和功能造成损伤, 此时, 水稻细胞会感知并转导该信号来调节厌氧基因的表达, 从而缓解厌氧生理<sup>[46]</sup>。根据实时荧光定量 PCR 检测结果, *LOC\_Os01g52450* 和 *LOC\_Os05g09500* 在‘Nekken2’中的表达量均显著高于‘HZ’, 而 *LOC\_Os05g45590* 在双亲间的表达量无显著差异, 因此推测 *LOC\_Os01g52450* 和 *LOC\_Os05g09500* 更有可能参与水稻籽粒 VB6 含量的调控。其中更值得注意的是, *LOC\_Os05g09500* 编码表达胞质己糖激酶, *OsHXK7* 是缺氧萌发水稻种子胚中诱导最活跃的己糖激酶基因, 正常条件下, *OsHXK7* 通过糖酵解介导的方式在糖信号中发挥功能, 但当种子在缺氧条件下萌发时, 其信号作用被抑制, *OsHXK7* 的表达量将显著上调, 可能通过加强缺氧条件下水稻中葡萄糖介导的发酵作用, 在水稻糖代谢和种子萌发中发挥重要的作用<sup>[27]</sup>。因此, 水稻籽粒中的己糖激酶活性的改变可能会影响 VB6 的代谢和含量, 但其具体机制还需要进一步探索。前人研究发现, VB6 能够提高植物逆境胁迫下的抗性。Nan 等<sup>[45]</sup>鉴定获得一个具有耐盐表型的 *Osmdh1* 突变体, 盐胁迫下突变体 VB6 积累量高于野生型, 该基因通过改变 VB6 合成途径关键酶基因的表达水平, 如 *OsPLR1*、*OsPDX1.1*、*OsPDX1.2* 等, 从而负调控盐胁迫下的吡哆醇积累, 但盐胁迫下 VB6 生物合成和转运的确切机制还有待进一步研

究。齐悦彤等<sup>[47]</sup>使用 CRISPR/Cas9 技术敲除水稻 *OsMDH1* 基因,也得到了 VB6 含量显著提高且耐盐性加强的功能型水稻,在长期盐胁迫处理后,其千粒重和 VB6 含量均高于野生型。*LOC\_Os01g52500* 和 *LOC\_Os05g09440* 都编码 NADP-苹果酸酶(NADP-malic enzyme, NADP-ME),该酶在植物许多不同的途径中都发挥功能,能参与植物的防御反应,如响应机械损伤和紫外线辐射等。此前,有关 *LOC\_Os01g52500* 和 *LOC\_Os05g09440* 的研究主要集中在对于拟南芥响应盐胁迫的方面。在 NaCl、NaHCO<sub>3</sub> 和 PEG 胁迫条件下, *NADP-ME3* 随胁迫处理时间的不同表达量呈现不同程度的变化<sup>[28]</sup>。同样, *NADP-ME2* 的表达也受盐胁迫、渗透胁迫和 pH 值变化的诱导,在拟南芥中过量表达 *NADP-ME2* 能够提高其对盐胁迫和渗透胁迫的耐受性<sup>[48]</sup>。*Os-NADP-ME2* 参与 PAMP 触发的活性氧迸发,对水稻的先天免疫是不可或缺的,稻瘟病菌通过抑制 *Os-NADP-ME2*,破坏活性氧迸发和寄主先天免疫。抗性水稻品种中敲除 *Os-NADP-ME2* 基因,破坏了对稻瘟病菌的先天免疫<sup>[26]</sup>。qRT-PCR 结果显示, *LOC\_Os01g52500* 和 *LOC\_Os05g09440* 在‘HZ’中表达量极显著高于‘Nekken2’,提示其可能是引起亲本籽粒 VB6 含量差异的原因,能调节水稻籽粒 VB6 含量。本研究的结果将水稻抗逆性和抗病性与水稻 VB6 代谢过程联系起来,挖掘到了新的调控水稻籽粒 VB6 含量的基因。黄龙全等<sup>[7]</sup>以烟草为材料解析了植物体内的 VB6 转换途径,发现 PLP→PL→PN 是植物体 VB6 代谢流向的主体途径,PL 转换为 PN 的过程中需要 PL 还原酶以及 NADPH 的参与, *LOC\_Os05g32210* 编码的 NAD 激酶是生物体内唯一的可使 NAD+磷酸化生成 NADP+的酶,对于维持 NADH 与 NADPH 平衡具有重要作用,推测该基因可能通过影响 NADPH 的代

谢平衡间接影响 VB6 的代谢途径。另外,在植物体内还存在有 PN 糖苷这一特有的 VB6 衍生物,其代谢途径可能依赖糖基转移酶的参与,在控制糖代谢的候选基因中,发现了编码糖基转移酶的基因 *LOC\_Os05g32544*,推测该基因也参与调控水稻籽粒中 VB6 的含量。*LOC\_Os05g36270* 参与水稻细胞腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK)信号通路,AMPK 的激活通过调节与水稻 VB6 合成相关的基因表达来影响其合成速率,例如 PDX 家族基因等,还可能通过影响水稻细胞内的能量状态来调节 VB6 的合成途径,例如通过调节 ATP/ADP 和 AMP 水平来影响相关代谢途径的活性。*LOC\_Os05g35110* 参与水稻细胞中的 mTOR 信号通路。其主要组成成分包括 mTOR 复合物 1(mTORC1)、mTOR 复合物 2(mTORC2)及其上游的 LKB1 和 AMPK 信号通路。这些成分共同构成了一个复杂的调控网络,对细胞生长和代谢进行精细调控。其中,mTORC1 是 mTOR 信号通路的主要调节者,其下游效应包括翻译调控、核糖体生物合成、脂肪酸合成、糖酵解等。但 mTOR 信号通路调节细胞对 VB6 合成的具体机制尚不明确,需要进一步研究以揭示 mTOR 信号通路在水稻中对 VB6 含量的调节作用及其相关的分子机制。目前少见有关 *LOC\_Os05g20570* 的研究报道,但 qRT-PCR 结果显示,在‘HZ’中其表达量呈极显著上调,据此推测,其高表达可能是‘HZ’籽粒 VB6 含量高于‘Nekken2’的原因之一,后续可开展等位基因分析、探索基因变异的机制和影响等研究。

## 4 结论

综上所述,本研究共定位到分布在水稻的 1、5、11 和 12 号染色体上的 14 个与水稻籽粒

VB6 含量相关的 QTL, 5 号染色体上的位点显示最高的 LOD 值, 达 3.70。在父本‘HZ’和母本‘Nekken2’中, 候选基因 *LOC\_Os01g52450*、*LOC\_Os01g52500*、*LOC\_Os05g09500*、*LOC\_Os05g09440*、*LOC\_Os05g20570* 和 *LOC\_Os05g36270* 的表达量差异显著, 这与双亲的表型差异相符, 说明这 6 个基因在调控水稻籽粒 VB6 含量中发挥重要作用, 进而对水稻的产量和营养含量产生影响。本研究在前人的研究基础上, 进一步深入挖掘水稻维生素含量相关 QTLs, 解析了调控 VB6 合成及降解相关基因的功能, 为丰富水稻维生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品质水稻分子设计育种, 从而培育富含 VB6 的优质水稻品种, 缓解 VB6 含量隐性饥饿的现象, 满足人们对高品质稻米的追求。

## 致谢

感谢中国水稻研究所李三峰副研究员为实验材料提供杭州地区种植基地, 感谢五常市商博士米业有限公司商文楠博士为实验材料提供北方地区种植基地, 并测定水稻籽粒中 VB6 含量。感谢浙江师范大学生命科学学院卢钿钿、葛亦筠为撰写手稿提出了宝贵的建议。

## REFERENCES

- [1] 张涛, 王子瑞, 毛鑫晨, 唐家琪, 张超, 于恒秀. 影响稻米品质性状的相关基因研究进展[J]. 安徽农业科学, 2023, 51(19): 17-22.  
ZHANG T, WANG ZR, MAO XC, TANG JQ, ZHANG C, YU HX. Research progress of genes affecting rice grain quality[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2023, 51(19): 17-22 (in Chinese).
- [2] STROBBE S, VAN DER STRAETEN D. Toward eradication of B-vitamin deficiencies: considerations for crop biofortification[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 443.
- [3] ROSENBERG J, ISCHEBECK T, COMMICHAU FM. Vitamin B6 metabolism in microbes and approaches for fermentative production[J]. Biotechnology Advances, 2017, 35(1): 31-40.
- [4] 温其标, D.A.Sampson. 应用高效液相色谱分析谷物中的维生素 B<sub>6</sub>[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 1997, 25(11): 99-102.  
WEN QB, SAMPSON DA. Analysis of B<sub>6</sub> vitamers in cereals by high performance liquid-phase chromatography[J]. Journal of South China University of Technology (Natural Science), 1997, 25(11): 99-102 (in Chinese).
- [5] 孙茂霖, 孙健, 石尚, 刘化龙, 郑洪亮, 赵宏伟, 谢冬微, 王敬国, 邹德堂. 水稻维生素 B<sub>6</sub> 与 SSR 标记的关联分析[J]. 西北农业学报, 2019, 28(1): 51-58.  
SUN ML, SUN J, SHI S, LIU HL, ZHENG HL, ZHAO HW, XIE DW, WANG JG, ZOU DT. Association mapping of vitamin B<sub>6</sub> with SSR markers in rice[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2019, 28(1): 51-58 (in Chinese).
- [6] MITTENHUBER G. Phylogenetic analyses and comparative genomics of vitamin B6 (pyridoxine) and pyridoxal phosphate biosynthesis pathways[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2001, 3(1): 1-20.
- [7] 黄龙全, 张剑韵. 植物维生素 B<sub>6</sub> 从头合成与代谢转换研究进展[J]. 西北植物学报, 2015, 35(10): 2124-2131.  
HUANG LQ, ZHANG JY. Review on the denovoSynthesis and metabolic conversions of vitamin B<sub>6</sub> in plants[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2015, 35(10): 2124-2131 (in Chinese).
- [8] VANDERSCHUREN H, BOYCHEVA S, LI KT, SZYDŁOWSKI N, GRUISSEM W, FITZPATRICK TB. Strategies for vitamin B6 biofortification of plants: a dual role as a micronutrient and a stress protectant[J]. Frontiers in Plant Science, 2013, 4: 143.
- [9] MOONEY S, CHEN LY, KÜHN C, NAVARRE R, KNOWLES NR, HELLMANN H. Genotype-specific changes in vitamin B6 content and the PDX family in potato[J]. BioMed Research International, 2013, 2013: 389723.
- [10] O'NEIL CE, KEAST DR, FULGONI VL, NICKLAS TA. Food sources of energy and nutrients among adults in the US: NHANES 2003–2006[J]. Nutrients, 2012, 4(12): 2097-2120.

- [11] FUDGE J, MANGEL N, GRUISSEM W, VANDERSCHUREN H, FITZPATRICK TB. Rationalising vitamin B<sub>6</sub> biofortification in crop plants[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2017, 44: 130-137.
- [12] 张佳, 王慧杰, 何正权, 刘文真. 农杆菌介导的籼稻 9311 和华占遗传转化体系的研究[J]. *中国水稻科学*, 2023, 37(2): 213-224.
- ZHANG J, WANG HJ, HE ZQ, LIU WZ. Analysis of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation system of indica rice 9311 and Huazhan[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2023, 37(2): 213-224 (in Chinese).
- [13] 孙明, 张培江, 白一松, 李成荃. 热研 1 号、2 号与我国水稻的亲合性研究[J]. *安徽农业科学*, 1992, 20(3): 198-201.
- SUN M, ZHANG PJ, BAI YS, LI CQ. The compatibility of REYAN 1, REYAN2 with rice in China[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 1992, 20(3): 198-201 (in Chinese).
- [14] 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. 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[J]. *中国水稻科学*, 2014, 28(6): 589-597.
- WANG L, HUANG LC, DAI LP, YANG YL, XU J, LENG YJ, ZHANG GH, HU J, ZHU L, GAO ZY, DONG GJ, GUO LB, QIAN Q, ZENG DL. QTL analysis for rice leaf morphology at maturity stage using a recombinant inbred line population derived from a cross between nipponbare and 9311[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2014, 28(6): 589-597 (in Chinese).
- [15] 殷文晶, 陈振概, 高佩慧, 芦涛, 叶涵斐, 叶润乐, 杨茜, 路梅, 王跃星, 饶玉春. 水稻根系性状 QTL 定位及候选基因表达分析[J]. *浙江师范大学学报(自然科学版)*, 2022, 45(4): 419-426.
- YIN WJ, CHEN ZG, GAO PH, LU T, YE HF, YE RL, YANG X, LU M, WANG YX, RAO YC. QTL mapping and expression analysis of candidate genes for root traits in rice[J]. *Journal of Zhejiang Normal University (Natural Sciences)*, 2022, 45(4): 419-426 (in Chinese).
- [16] 钟芊芊, 黄佳慧, 殷文晶, 芦涛, 顾育嘉, 陈振概, 叶涵斐, 饶玉春. 水稻种子耐储藏性状 QTLs 挖掘及候选基因分析[J]. *浙江师范大学学报(自然科学版)*, 2023, 46(4): 425-432.
- ZHONG QQ, HUANG JH, YIN WJ, LU T, GU YJ, CHEN ZG, YE HF, RAO YC. QTLs mapping and expression analysis of candidate genes for root traits in rice[J]. *Journal of Zhejiang Normal University (Natural Sciences)*, 2023, 46(4): 425-432 (in Chinese).
- [17] 芦涛, 叶涵斐, 褚晓洁, 林晗, 王盛, 潘晨阳, 李三峰, 王跃星, 饶玉春. 水稻糙米率 QTL 检测及候选基因分析[J]. *浙江师范大学学报(自然科学版)*, 2022, 45(3): 323-328.
- LU T, YE HF, CHU XJ, LIN H, WANG S, PAN CY, LI SF, WANG YX, RAO YC. Identification of QTL brown rice rate to submergence in rice[J]. *Journal of Zhejiang Normal University (Natural Sciences)*, 2022, 45(3): 323-328 (in Chinese).
- [18] 潘晨阳, 叶涵斐, 周维永, 王盛, 李梦佳, 路梅, 李三峰, 朱旭东, 王跃星, 饶玉春, 戴高兴. 水稻籽粒镉积累 QTL 定位及候选基因分析[J]. *植物学报*, 2021, 56(1): 25-32.
- PAN CY, YE HF, ZHOU WY, WANG S, LI MJ, LU M, LI SF, ZHU XD, WANG YX, RAO YC, DAI GX. QTL mapping of candidate genes involved in Cd accumulation in rice grain[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2021, 56(1): 25-32 (in Chinese).
- [19] 董君暘, 汪宝根, 吴晓花, 鲁忠富, 汪颖, 王尖, 李国景, 吴新义. 之甬系列长豇豆品种营养成分分析[J]. *浙江农业科学*, 2022, 63(5): 1042-1047.
- DONG JY, WANG BG, WU XH, LU ZF, WANG Y, WANG J, LI GJ, WU XY. Nutritional quality analysis of asparagus bean varieties[J]. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 2022, 63(5): 1042-1047 (in Chinese).
- [20] 贾绮玮, 钟芊芊, 顾育嘉, 陆天麒, 李玮, 杨帅, 朱超宇, 胡程翔, 李三峰, 王跃星, 饶玉春. 水稻茎秆细胞壁相关组分含量 QTL 定位及候选基因分析[J]. *植物学报*, 2023, 58(6): 882-892.
- JIA QW, ZHONG QQ, GU YJ, LU TQ, LI W, YANG S, ZHU CY, HU CX, LI SF, WANG YX, RAO YC. Mapping of QTL for cell wall related components in rice stem and analysis of candidate genes[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2023, 58(6): 882-892 (in Chinese).
- [21] 徐云碧, 申宗坦, 陈英, 朱立煌. QTL 区间作图的统计理论和计算机软件及其应用[J]. *作物学报*, 1995, 21(1): 1-8.
- XU YB, SHEN ZT, CHEN Y, ZHU LH. A statistical

- technique and generalized computer software for interval mapping of quantitative trait loci and its application[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 1995, 21(1): 1-8 (in Chinese).
- [22] MCCOUCH SR, CHO YC, YANO M, PAUL E, BLINSTRUB M, MORISHIMA H, KINOSHITA T. Report on QTL no-menclature[J]. *Rice Genet Newsl*, 1997, 14: 11-13.
- [23] 乐巧娜, 黄梓雯, 戴若惠, 李三峰, 李梦佳, 方媛, 王跃星, 饶玉春. 水稻蒸煮品质相关 QTL 定位及候选基因分析[J]. *生物工程学报*, 2024, 40(1): 122-136. LE QN, HUANG ZW, DAI RH, LI SF, LI MJ, FANG Y, WANG YX, RAO YC. Mapping of QTL associated with rice cooking quality and candidate gene analysis[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2024, 40(1): 122-136 (in Chinese).
- [24] LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [25] CHO JI, RYOO N, KO S, LEE SK, LEE J, JUNG KH, LEE YH, BHOO SH, WINDERICKX J, AN G, HAHN TR, JEON JS. Structure, expression, and functional analysis of the hexokinase gene family in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Planta*, 2006, 224(3): 598-611.
- [26] SINGH R, DANGOL S, CHEN YF, CHOI J, CHO YS, LEE JE, CHOI MO, JWA NS. Magnaporthe oryzae effector AVR-pii helps to establish compatibility by inhibition of the rice NADP-malic enzyme resulting in disruption of oxidative burst and host innate immunity[J]. *Molecules and Cells*, 2016, 39(5): 426-438.
- [27] KIM HB, CHO JI, RYOO N, SHIN DH, PARK YI, HWANG YS, LEE SK, AN G, JEON JS. Role of rice cytosolic hexokinase *OsHXX7* in sugar signaling and metabolism[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2016, 58(2): 127-135.
- [28] 李秀峰, 张欣欣, 高野哲夫, 柳参奎. 水稻(*Oryza sativa* L.)苹果酸酶(*OsNADP-ME3*)基因在逆境下的表达特性研究[J]. *基因组学与应用生物学*, 2012, 31(4): 327-332. LI XF, ZHANG XX, TAKANO TETSUO, LIU SK. Expression characteristics of rice (*Oryza sativa* L.) malic enzyme (*OsNADP-ME3*) gene under environmental stress[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2012, 31(4): 327-332 (in Chinese).
- [29] OHASHI M, ISHIYAMA K, KUSANO M, FUKUSHIMA A, KOJIMA S, HAYAKAWA T, YAMAYA T. Reduction in sucrose contents by downregulation of fructose-1,6-bisphosphatase 2 causes tiller outgrowth cessation in rice mutants lacking glutamine synthetase1;2[J]. *Rice*, 2018, 11(1): 65.
- [30] 吴丽丽, 周丛义, 高永生, 丛悦玺, 陈坤明, 郭万里. 水稻 *OSNADK3* 基因的克隆及其遗传转化[J]. *核农学报*, 2011, 25(5): 863-870. WU LL, ZHOU CY, GAO YS, CONG YX, CHEN KM, GUO WL. Cloning and genetic transformation of *OSNADK3* gene in rice[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2011, 25(5): 863-870 (in Chinese).
- [31] 唐馨, 苟萍. 内含子的功能[J]. *生命的化学*, 2019, 39(4): 772-777. TANG X, GOU P. The inteons function[J]. *Chemistry of Life*, 2019, 39(4), 772-777 (in Chinese).
- [32] 孙茂霖. 水稻维生素 B<sub>6</sub> 含量与 SSR 标记和 *OsPDX1.1* 基因的关联分析[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2019. SUN ML. Association analysis of vitamin B<sub>6</sub> content with SSR markers and *OsPDX1.1* gene in rice[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [33] 孔维漂, 芦鑫荣, 侯琳琳, 孙秀发, 孙桂芹, 陈力. 维生素与免疫系统健康[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2023, 54(1): 7-13. KONG WL, LU XR, HOU LL, SUN XF, SUN GQ, CHEN L. Vitamins and immune system health[J]. *Journal of Sichuan University (Medical Sciences)*, 2023, 54(1): 7-13 (in Chinese).
- [34] BIRD RP. The emerging role of vitamin B6 in inflammation and carcinogenesis[J]. *Advances in Food and Nutrition Research*, 2018, 83: 151-194.
- [35] 郑建华, 张国祥. 维生素 B6 的临床新用途[J]. *首都医药*, 1998, 5(3): 34. ZHENG JH, ZHANG GX. New clinical use of vitamin B6[J]. *Capital Medicine*, 1998, 5(3): 34 (in Chinese).
- [36] 周大虎, 杜慧, 黎毛毛, 谢薇, 边健民, 彭小松, 傅军如, 贺浩华. 功能稻‘紫宝香糯 1 号’维生素 A 合成相关 QTL 定位[J]. *分子植物育种*, 2022, 20(3): 873-879. ZHOU DH, DU H, LAI MM, XIE W, BIAN JM, PENG XS, FU JR, HE HH. Vitamin A synthesis related QTL mapping in functional rice ‘Zibaoxiangnuo 1’[J].



- Molecular Plant Breeding, 2022, 20(3): 873-879 (in Chinese).
- [37] 郝艳娟. 辣椒果实维生素 C 含量的遗传分析及 QTL 定位[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2016.
- HAO YJ. QTL mapping of Vc content in pepper fruit and genetic analysis[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [38] 陈俊. 大豆芽菜中游离氨基酸和维生素 C 含量的遗传分析及 QTL 定位研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2010.
- CHEN J. QTL mapping and genetic analysis of amino acids and vitamin C content in soybean sprouts[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2010 (in Chinese).
- [39] 王彦华. 番茄果实维生素 C 含量 QTL 定位及种质资源筛选[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2014.
- WANG YH. Quantitative trait loci affecting fruit ascorbic acid content in tomato and germ plasm screening[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [40] LI HY, LIU HC, HAN YP, WU XX, TENG WL, LIU GF, LI WB. Identification of QTL underlying vitamin E contents in soybean seed among multiple environments[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2010, 120(7): 1405-1413.
- [41] 刘焕成. 大豆维生素 E 遗传变异、QTL 及环境互作效应分析[D]. 哈尔滨: 东北农业大学博士学位论文, 2017.
- LIU HC. Genetic variation, QTL and QTL-by-environment interactions for seed vitamin E in soybean[D]. Harbin: Doctoral Dissertation of Northeast Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [42] 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. 水稻籽粒维生素 E QTL 挖掘及候选基因分析[J]. 植物学报, 2022, 57(2): 157-170.
- YE HF, YIN WJ, GUAN YA, YANG KR, CHEN QY, YU SY, ZHU XD, XIN DD, ZHANG W, WANG YX, RAO YC. QTL mapping and candidate gene analysis of vitamin E in rice grain[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2022, 57(2): 157-170 (in Chinese).
- [43] LIU ZG, FARKAS P, WANG K, KOHLI MO, FITZPATRICK TB. B vitamin supply in plants and humans: the importance of vitamer homeostasis[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2022, 111(3): 662-682.
- [44] JANG JC, SHEEN J. Sugar sensing in higher plants[J]. The Plant Cell, 1994, 6(11): 1665-1679.
- [45] NAN N, WANG J, SHI YJ, QIAN YW, JIANG L, HUANG SZ, LIU YT, WU Y, LIU B, XU ZY. Rice plastidial NAD-dependent malate dehydrogenase 1 negatively regulates salt stress response by reducing the vitamin B6 content[J]. Plant Biotechnology Journal, 2020, 18(1): 172-184.
- [46] LIM MN, LEE SE, YIM HK, KIM JH, YOON IS, HWANG YS. Differential anoxic expression of sugar-regulated genes reveals diverse interactions between sugar and anaerobic signaling systems in rice[J]. Molecules and Cells, 2013, 36(2): 169-176.
- [47] 齐悦彤, 金戈, 尹小雨, 王韵舒, 吴沛泽, 王松涛, 邸小骅, 李慧, 于晓明. 利用 CRISPR/Cas9 技术提高水稻维生素 B6 含量与耐盐性[J/OL]. 分子植物育种, 1-11 (2023-03-02) [2024-03-24]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230301.1521.021.html>
- QI YT, JIN G, YIN XY, WANG YS, WU P, WANG ST, DI XH, LI H, YU XM. Creation of enhanced vitamin B6 content and salt tolerance rice using CRISPR/Cas9 technology[J/OL]. Molecular Plant Breeding, 1-11 (2023-03-02) [2024-03-24]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230301.1521.021.html> (in Chinese).
- [48] LIU SK, CHENG YX, ZHANG XX, GUAN QJ, NISHIUCHI S, HASE K, TAKANO T. Expression of an NADP-malic enzyme gene in rice (*Oryza sativa*. L) is induced by environmental stresses; over-expression of the gene in *Arabidopsis* confers salt and osmotic stress tolerance[J]. Plant Molecular Biology, 2007, 64(1): 49-58.

(本文责编 陈宏宇)