

水稻 RIL 群体芽期耐冷性基因的分子标记定位*

陈玮**, 李炜**

(武汉大学生命科学院生物学实验教学中心, 武汉 430072)

摘要: 水稻芽期冷害是我国长江中下游的早稻种植区和东北、西北稻区及云贵高原的一季稻区水稻生产中的重要限制因子之一。研究中利用纸卷法测定 1 个水稻重组自交系群体对 10℃ 低温的芽期耐冷性, 结合 1 张高密度分子遗传图谱, 进行 QTL 定位分析。检测到控制水稻芽期耐冷性的 4 个 QTL, 分别位于 1、3、7 和 11 号染色体上。其中, 位于 11 号染色体上的 QTL *qSCT-11* 的效应最大, 在 10℃ 低温处理 13 d 时, 对性状的贡献率达 26%~30%, 被检测到的 LOD 值也高达 16~19, 其加性效应值为正, 增效等位基因存在于亲本 Lemont 中, RM202 为与 QTL *qSCT-11* 紧密连锁的 SSR 标记。该主效 QTL 的增效基因, 可作为分子标记辅助选择的操作对象用于水稻芽期耐冷性的遗传改良。

关键词: 水稻 (*Oryza sativa* L.); 芽期耐冷性; 分子标记; QTL

中图分类号: Q943

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2005)02-0116-05

Mapping of QTL Conferring Cold Tolerance at Early Seedling Stage of Rice by Molecular Markers*

CHEN Wei**, LI Wei**

(Experimental Center of Biology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: Cold stress is one of the major restraints for stable stand establishment at the early seedling stage of rice (*Oryza sativa* L.) for much of the production area. A recombinant inbred line population derived from a *japonica/indica* cross were assessed for cold tolerance at early seedling stage by the paper-roll tests at 10°C. Main-effect QTL for the trait were mapped via composite interval mapping using a linkage map with 198 marker loci. Four putative QTL for the trait were identified, which were mapped to chromosomes 1, 3, 7 and 11, respectively. Among these QTL, *qSCT-11* showed a large additive effect on the trait, explaining 26%—30% of the phenotypic variation in the treatment of 13 d at 10°C with a LOD of 16—19. This QTL was closely linked to SSR marker RM202 and its positive allele came from the parent Lemont. This allele would be useful for the improvement of rice cold tolerance via marker-assisted selection.

Key words: Rice (*Oryza sativa* L.); Cold tolerance at early seedling stage; Molecular marker; Quantitative trait loci (QTL)

水稻 (*Oryza sativa* L.) 起源于热带或亚热带, 对环境低温反应较敏感。在我国, 水稻种植地区跨越热带、亚热带、暖温带、中温带、寒温带等 5 个气候带, 包括从北纬 53°27' 至 18°90' 的广大地域。因此, 我国的大部分稻区均不同程度地遭遇到低温冷

害^[1,2]。根据低温冷害发生的时期, 水稻冷害可分为芽期冷害、苗期冷害、孕穗期冷害、开花期冷害和灌浆期冷害。其中, 芽期冷害是指从播种到第一完全叶期间受到低温侵袭, 导致出芽困难或烂芽的一种冷害^[1,2]。水稻芽期冷害在我国长江中下游的早稻种植

收稿日期: 2004-07-02, 修回日期: 2004-09-13。

基金项目: 国家 973 计划项目 (2001CB108806); 湖北省 2004 年高等学校教学研究项目; 武汉大学 2004 年度实践教学改革研究项目 (200430)。

作者简介: 陈玮 (1983—), 女, 李炜 (1983—), 女, 均为武汉大学生命科学院 2001 级生物科学基地班学生。

* 本研究在章志宏副教授的指导下完成。

** 同为第一作者。

区和东北、西北稻区及云贵高原的一季稻区常有发生,是这些地区水稻减产的主要原因之一^[1,2]。

对水稻芽期耐冷性,过去在经典遗传学方面已有一些研究。如日本学者^[3]的研究表明,水稻芽期耐冷性是受 3~5 对基因控制的数量性状。近年来,随着 DNA 标记技术的发展,QTL (quantitative trait loci) 分析已成为对数量性状进行遗传剖分的重要工具^[4]。正是利用这一技术,严长杰等^[5]从水稻 DH (doubled haploid) 群体中发现了 1 个芽期耐冷性的主效 QTL,并将其定位在第 7 染色体上。此外,尚未见有其它关于水稻芽期耐冷性 QTL 研究的报道。相比之下,对水稻苗期耐冷性和孕穗期耐冷性的 QTL 研究则较多^[6-11],而且,Saito 等^[11]还对孕穗期耐冷性 QTL 作了进一步的精细定位。

本研究利用 1 个来源于粳/籼交的水稻 RIL (recombinant inbred line) 群体和 RFLP、SSR 分子标记,对水稻芽期耐冷性进行了 QTL 分析,目的在于鉴定水稻芽期耐冷性的有利基因及其分子标记,以便通过分子标记辅助选择(marker assisted selection, MAS)进行水稻芽期耐冷性的遗传改良,并为水稻芽期耐冷性 QTL 的克隆奠定基础。

1 材料与方法

1.1 水稻 RIL 群体及其芽期耐冷性测定

本研究采用的 RIL 群体为通过“一粒传”来源于粳/籼杂交组合 Lemont / 特青的 269 个 F₁₂ RILs。其中,Lemont 为在美国南部种植的一个半矮秆优质粳稻品种,特青为在我国广东省种植的一个高产籼稻育成品种。

采用纸卷法作发芽试验,测定水稻 RIL 群体及其亲本的芽期耐冷性。纸卷法发芽试验的具体操作详见 Zhang 等^[12]的描述。通过手工选出上年度收获的饱满种子 50 粒/RIL,50℃处理 3 d 除休眠,再经表面消毒后 30℃浸种 36 h,采用纸卷法^[12]于 28℃

培养箱中培养 2~3 d。选留已发芽且芽长 8~12 mm 的带种芽苗(实际选留的芽苗数为 28~41 株/RIL),继续采用纸卷法将其转移到 10℃恒温培养箱中进行冷处理。本实验设置冷处理时间分别为 10 d 和 13 d 2 个处理。冷处理完成后,将培养箱的温度调高至 28℃,让幼芽恢复生长。分别在恢复培养 7 d 和 12 d 各统计 1 次芽苗存活率(成活芽苗数/冷处理芽苗数,%),以此作为芽期耐冷性的鉴定指标。每个冷处理各设 2 次重复实验,取 2 次重复的平均值用于 QTL 分析。

1.2 DNA 分子标记及其连锁图谱的构建

利用 Lemont/特青 RIL 群体构建 RFLP 和 SSR 分子连锁图谱的详细过程见 Zhang 等^[12]。该图谱包含有覆盖水稻全基因组 12 条染色体的 198 个标记。其中 RFLP 标记 91 个,SSR 标记 106 个,另有 1 个光叶单基因形态标记 *gl-1*。连锁图谱全长 1 980.1 cM (Kosambi 函数),标记间平均距离为 10.7 cM。

1.3 QTL 定位

采用作图软件 QTLMapper 1.0^[13]对各性状进行复合区间作图。以 LOD 值 2.4 为阈值判定 QTL 的存在,并计算各 QTL 的加性效应值和对性状的贡献率。依照 McCouch 等^[14]提出的原则命名各 QTL。

2 结果与分析

2.1 性状的表型变异分析

本实验中,2 个亲本的芽期耐冷性差异显著(表 1)。在冷处理 10 d 时,Lemont 的芽苗存活率为 88.7%~95.6%,而特青的芽苗存活率为 70.8%~72.3%;当冷处理时间延长到 13 d 时,Lemont 的芽苗存活率仍为 86.0%~90.3%,但特青的芽苗存活率大幅度下降为 28.9%~33.9%,二者之间的差异大幅增加。很显然,粳稻亲本 Lemont 具有极强的芽期耐冷性,而籼稻亲本特青对芽期低温很敏感。

表 1 水稻 RIL 群体及其亲本芽期耐冷性的表型分析

Table 1 Phenotypic analysis of cold tolerance of rice at early seedling stage in the RIL population

性 状 [*] Traits	Lemont	特 青 Teqing	重组自交系群体 RIL population				
			Mean	S. D.	Range	Skewness	Kurtosis
SCT 10~7 d [†]	95.6	72.3	84.42	12.04	41.5~100	-0.926	0.498
SCT 10~12 d	88.7	70.8	77.41	16.48	26.1~99.0	-0.815	-0.133
SCT 13~7 d	90.3	33.9	66.46	19.91	16.6~100	-0.465	-0.535
SCT 13~12 d	86.0	28.9	60.16	21.80	7.7~97.9	-0.351	-0.723

* SCT 10~7 d 和 SCT 10~12 d 分别表示经过 10℃冷处理 10 d 后,恢复培养 7 d 和 12 d 时观察到的芽苗存活率;SCT 13~7 d 和 SCT 13~12 d 分别表示经过 10℃冷处理 13 d 后,恢复培养 7 d 和 12 d 时观察到的芽苗存活率。

† SCT 10~7 d 和 SCT 10~12 d denote the seedling survival percentages of the 10 d cold treatment recorded at 7 d and 12 d after recovery incubation, respectively. SCT 13~7 d and SCT 13~12 d represent the seedling survival percentages of the 13 d cold treatment investigated at 7 d and 12 d after recovery incubation, respectively.

在 RIL 群体中,2 个冷处理的芽期耐冷性均呈连续变异,其均值介于 2 亲本值之间;性状在 2 个方向上都表现出超亲分离。变异分布的偏度和丰度系数的绝对值均小于 1,表明实验数据符合 QTL 定位的要求。

2.2 芽期耐冷性的 QTL 定位

对水稻全基因组扫描共检测到控制水稻芽期耐冷性的 4 个 QTL(表 2,图 1),分别位于水稻的 1、3、7 和 11 号染色体上。进一步的分析可得出如下几点规律性的结论:

(1) 在冷处理 10 d 时,4 个 QTL 对芽期耐冷性均有影响,但这 4 个 QTL 的效应均较小,对性状的贡献率都在 10%以下(4.4%~9.1%),表明在 10℃ 10 d 的冷处理强度下,水稻芽期耐冷性受微效多基因控制。当冷处理时间延长到 13 d 时,只能检测到上述 4 个 QTL 中的 2 个,即分别位于 3 号和 11 号染色体上的 *qSCT-3* 和 *qSCT-11*;其中,*qSCT-11* 对性状的贡献率高达 25.6%~29.8%,其 LOD 值也显著地增大到 16~19。

(2)不同QTL受低温诱导的特性不同。2个微

表 2 控制水稻芽期耐冷性的 QTLs 及其效应分析
Table 2 Putative QTL controlling cold tolerance at early seedling stage of rice

QTL	Chr.	标记区间 Intervals	性状 Traits	LOD	a *	R ² **
<i>qSCT-1</i>	1	RM5-RM246	SCT 10~7 d	2.96	2.51	4.4
<i>qSCT-3</i>	3	RM156-RM16	SCT 10~7 d	4.26	-3.23	7.3
			SCT 10~12 d	3.25	-3.69	5.5
			SCT 13~7 d	3.52	-4.20	5.6
			SCT 13~12 d	4.53	-4.47	5.8
<i>qSCT-7</i>	7	RM336-RM10	SCT 10~7 d	3.32	-3.14	6.9
			SCT 10~12 d	3.33	-4.16	6.9
<i>qSCT-11</i>	11	RZ53-RM202	SCT 10~7 d	6.52	3.61	9.1
			SCT 10~12 d	4.20	4.07	6.6
			SCT 13~7 d	16.16	9.01	25.6
			SCT 13~12 d	19.19	10.11	29.8

* 加性效应值,正值表示增效等位基因来自 Lemont; ** 各 QTL 对性状的贡献率。
* Additive effect is the effect associated with substitution of a Teqing allele by the corresponding Lemont allele; ** Variance explained by individual QTL.

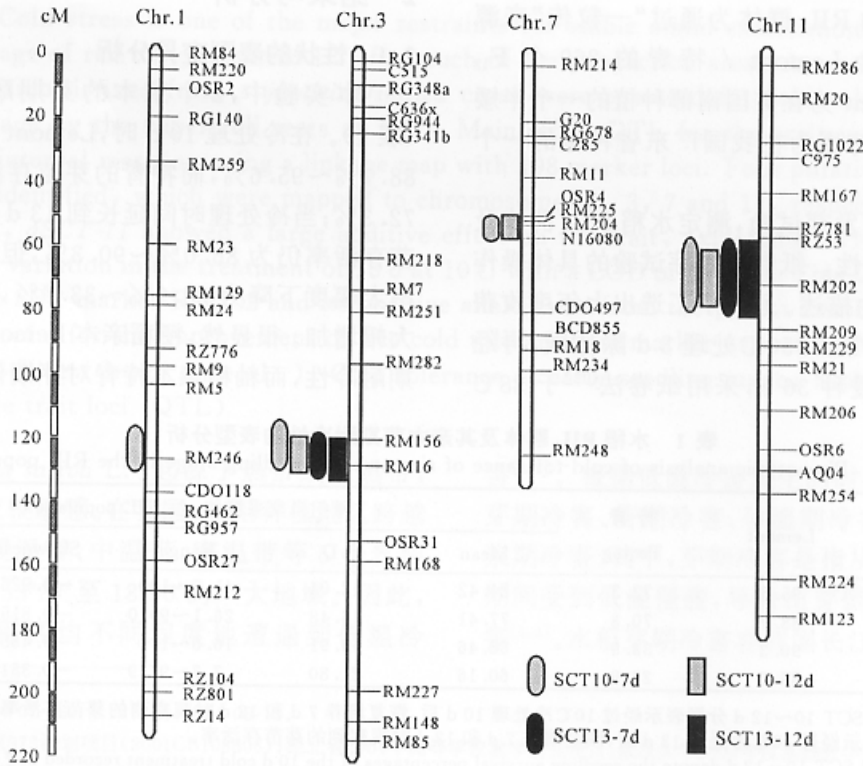


图 1 水稻芽期耐冷性 QTL 在分子遗传图谱上的位置
Fig. 1 Molecular linkage map of rice with location of putative QTL for cold tolerance of rice at early seedling stage

效 QTL(*qSCT-1* 和 *qSCT-7*)只在冷处理 10 d 时起作用;QTL *qSCT-3* 的效应在冷处理由 10 d 延长到 13 d 时仍在持续,效应方向和大小基本一致;QTL *qSCT-11* 在冷处理 10 d 和 13 d 时,加性效应的方向一致,但在冷处理 13 d 时的效应值较冷处理 10 d 时大幅增加。

(3) 在冷处理 10 d 和 13 d 均被检测到的 2 个 QTL 中,*qSCT-3* 的加性效应值为负,其增效等位基因来自亲本特青;*qSCT-11* 的加性效应值为正,其增效等位基因存在于亲本 Lemont 中。该结果表明,尽管亲本特青对低温反应很敏感,但仍可从中发掘到芽期耐冷性的有利基因。

2.3 极端耐冷性 RILs 的基因型分析

在上述 4 个 QTL 中,*qSCT-11* 的加性效应最大。RM202 为与 *qSCT-11* 紧密连锁的 SSR 标记(图 1)。以冷处理 13 d、恢复培养 12 d 观察到的芽苗存活率(SCT13~12 d)为评价指标,分别分析了水稻 RIL 群体中芽期耐冷性最强和最弱的 10 个 RILs RM202 的标记基因型(表 3)。发现在该标记位点上,耐冷性最强的 10 个 RILs 中,80%的 RILs 为亲本 Lemont 的基因型;与此相反,在耐冷性最弱的 10 个 RILs 中,80%的 RILs 为亲本特青的基因型。该分析与 QTL 定位中所表明的 *qSCT-11* 为控制水稻

芽期耐冷性效应最大、对性状的贡献率高达 25.6%~29.8%、增效等位基因来自于亲本 Lemont 的结果基本一致。

3 讨论

正如其它一些与环境胁迫有关的 QTL 一样^[15],水稻芽期耐冷性 QTL 的表达有赖于环境低温的诱导。在本研究中,通过比较 2 种冷处理强度下 QTL 的定位结果,得出了一条有趣的结论,即在不同的低温处理强度下,水稻芽期耐冷性 QTL 具有不同的表达模式。在 10℃10 d 的冷处理强度下,水稻芽期耐冷性受微效多基因控制;当冷处理强度增加到 10℃13 d 时,检测到 1 个加性效应较大、贡献率高达 25.6%~29.8%的 QTL。这种 QTL 表达模式的变化,是由于不同的 QTL 具有不同的低温诱导特性所致。例如,2 个微效 QTL (*qSCT-1* 和 *qSCT-7*)只在冷处理 10 d 时起作用;QTL *qSCT-3* 在冷处理 10 d 和 13 d 时,其效应的方向和大小基本一致;而 QTL *qSCT-11* 在种冷处理强度下,虽然加性效应的方向相同,但在冷处理 13 d 时的效应显著增大。当然,水稻芽期耐冷性不同 QTL 的低温诱导特性不同,也可理解为 QTL 与环境条件之间的互作。

严长杰等^[5]曾将 1 个水稻芽期耐冷性主效 QTL 定位于 7 号染色体上。而本研究中定位到的 4 个芽期耐冷性 QTL 分别位于水稻的 1、3、7 和 11 号染色体上。通过图谱比较可以知道,本研究中定位到的位于 7 号染色体上的微效 QTL *qSCT-7* 与严长杰等^[5]定位的那个主效 QTL 不同位。可见,利用由不同亲本构建的定位群体,可以检测到控制水稻芽期耐冷性的不同 QTL,揭示了水稻芽期耐冷性 QTL 具有丰富的遗传多样性,也为水稻耐冷性的遗传改良中利用 MAS 聚合不同 QTL 的增效基因提供了丰富的基因资源。

关于水稻不同发育时期耐冷性的遗传关联,前不久,Zhang 等^[12]利用同 1 个 RIL 群体进行了水稻低温发芽性 QTL 的研究,定位到 7 个与水稻低温发芽性高度相关的染色体区段,分别位于水稻的 1、2、5、6、7、8 和 12 号染色体上。通过比较,发现这 7 个染色体区段与本研究定位到的 4 个芽期耐冷性 QTL 均不同位。与此相似,Qian 等^[7]用 1 个籼粳交(ZYQ8/JX17)DH 群体,检测到分别位于 1 至 4 号染色体上的 4 个苗期耐冷性 QTL,而这 4 个 QTL 与 Teng S(滕胜)等^[8]利用同 1 个 DH 群体检测到

表 3 极端耐冷性 RILs 的 RM202 标记基因型分析
Table 3 Marker genotype analysis of SSR marker RM202 for extreme RILs in cold tolerance at early seedling stage

耐冷性最强的 10 个 RILs Extreme RILs with low tolerance			耐冷性最弱的 10 个 RILs Extreme RILs with high tolerance		
编号 No.	性状值* Trait values	标记基因型** Genotypes	编号 No.	性状值 Trait values	标记基因型 Genotypes
W278	97.9	A	W227	7.7	B
W119	97.5	A	W248	8.1	B
W141	95.6	A	W150	10.7	A
W47	95.4	A	W6	11.0	A
W203	95.3	A	W206	11.1	B
W83	95.1	A	W228	14.3	B
W43	94.9	B	W92	14.4	B
W120	94.2	A	W149	15.0	B
W86	93.8	B	W229	17.4	B
W101	93.7	A	W131	17.9	B

* 性状值的指标为 SCT 13~12 d (表 1); ** SSR 标记 RM202 的基因型,A 表示等位基因来自于 Lemont,B 表示等位基因来自于特青。
* The showed are trait values of the criterion SCT 13—12 d (Table 1)for the extreme RILs; ** Genotypes of SSR marker RM202 with A and B indicating alleles from Lemont and Teqing, respectively.

的分别位于 4 和 9 号染色体上的 2 个低温发芽性 QTL 无一同位。Andaya1 和 Mackill^[9, 10]利用同一个定位群体的研究也表明水稻苗期耐冷性 QTL 与孕穗期耐冷性 QTL 大多不相同。因此,水稻不同发育时期的耐冷性的遗传基础并不完全一致,有必要针对各个不同时期进行具体的研究,并鉴定出在不同时期起作用的基因或 QTL。

从水稻芽期耐冷性的遗传改良的角度来看,在不同冷处理强度下表达较稳定的 QTL 应具有较大的实用价值^[4]。在本研究中,QTL *qSCT-3* 和 *qSCT-11* 在 2 种冷处理强度下均对水稻芽期耐冷性起作用,且加性效应的方向一致,因此,可作为 MAS 的操作对象用于水稻芽期耐冷性的遗传改良。为了提高 MAS 的选择效率,有必要对目标 QTL 作进一步的精细定位,以获得在目标 QTL 两侧与之连锁更紧密的分子标记。

致谢: 本研究中所用的 Lemont/Teqing RIL 群体及其分子标记数据由国际水稻研究所傅彬英博士和黎志康博士提供。华中农业大学作物遗传与改良国家重点实验室余四斌教授对分子标记数据的整理和遗传图谱的构建给予了热心的帮助。

参考文献:

- [1] 戴陆园,叶昌荣,余腾琼,徐福荣. 水稻耐冷性研究 I. 稻冷害类型及耐冷性鉴定评价方法概述[J]. 西南农业学报, 2002, 15(1): 41-45.
- [2] 韩龙植,高熙宗,朴钟泽. 水稻耐冷性遗传及基因定位研究概况与展望[J]. 中国水稻科学, 2002, 16(2): 193-198.
- [3] 金润洲. 日本关于水稻耐冷性鉴定及其遗传研究[J]. 水稻文摘, 1990, 9(3): 1-5.
- [4] Tanksley S D. Mapping polygenes [J]. *Annu Rev Genet*, 1993, 27: 205-233.
- [5] 严长杰,李欣,程祝宽,朱立煌. 利用分子标记定位水稻芽期耐冷性基因[J]. 中国水稻科学, 1999, 13(3): 134-138.
- [6] 屈婷婷,陈立艳,章志宏,胡中立,李平,朱立煌,朱英国. 水稻籼粳交 DH 群体苗期耐冷性基因的分子标记定位[J]. 武汉植物学研究, 2003, 21(5): 385-389.
- [7] Qian Q, Zeng D L, He P, Zheng X W, Chen Y, Zhu L H. QTL analysis of the seedling cold tolerance in a double haploid population derived from anther culture of a hybrid between *indica/japonica*[J]. *Chinese Sci Bull*, 1999, 44(22): 2402-2406 (in English).
- [8] Teng S, Zeng D L, Qian Q, Yasufumi K, Huang D L, Zhu L H. QTL analysis of rice low temperature germinability[J]. *Chinese Sci Bull*, 2001, 46(21): 1800-1804 (in English).
- [9] Andaya1 V C, Mackill D J. Mapping of QTLs associated with cold tolerance during the vegetative stage in rice [J]. *J Exp Bot*, 2003, 54: 2579-2585.
- [10] Andaya1 V C, Mackill D J. QTLs conferring cold tolerance at the booting stage of rice using recombinant inbred lines from a *japonica/indica* cross [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 106: 1084-1090.
- [11] Saito K, Miura K, Nagano K, Hayano-Saito Y, Araki H, Kato A. Identification of two closely linked quantitative trait loci for cold tolerance on chromosome 4 of rice and their association with anther length [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 862-868.
- [12] Zhang Z H, Yu S B, Yu T, Huang Z, Zhu Y G. Mapping quantitative trait loci (QTLs) for seedling-vigor using recombinant inbred lines of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Field Crops Res*, 2005, 91: 161-170.
- [13] Wang D L, Zhu J, Li Z K, Paterson A H. Mapping QTLs with epistatic effects and QTL X environment interactions by mixed linear model approaches [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 99: 1255-1264.
- [14] McCouch S R, Cho Y G, Yano M, Paul E, Blinstrub M, Morishima H, Kinoshita T. Report on QTL nomenclature [J]. *Rice Genet Newsl*, 1997, 14: 11-13.
- [15] Foolad M R, Lin G Y. Genetic analysis of cold tolerance during vegetative growth in tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill [J]. *Euphytica*, 2001, 122: 105-111.