

东乡野生稻苗期耐冷性的 QTL 定位

夏瑞祥¹, 肖宁², 洪义欢¹, 张超¹, 苏琰¹, 张小蒙¹, 陈建民¹

(¹扬州大学生物科学与技术学院, 江苏扬州 225009; ²江苏里下河地区农业科学研究所/国家水稻改良中心南京分中心, 江苏扬州 225000)

摘要: 【目的】研究东乡野生稻苗期耐冷性的 QTL 和连锁标记, 为水稻耐冷种质资源的利用及分子标记辅助选择育种提供理论和实践依据。【方法】以东乡野生稻作为非轮回亲本, 南京 11 号为轮回亲本, 构建 144 株 BC₂F₁ 分离群体。通过 SSR 标记以根电导率作为耐冷性指标, 以复合区间定位法对东乡野生稻苗期耐冷性进行 QTL 定位。【结果】检测到 2 个 QTL *qRC10-1* 和 *qRC10-2* 均位于第 10 染色体, 对表型的贡献率分别为 34.13% 和 37.02%, 是两个主效的 QTL。在与 2 个 QTL 的连锁标记 RM171 周围发展分子标记进一步定位, 检测到 3 个 QTL 位于标记 RM171 附近。【结论】东乡野生稻第 10 染色体上的 2 个 QTL *qRC10-1*, *qRC10-2* 与苗期耐冷性有关, 并位于 SSR 标记 RM304 - RM1108 区间, 可用于水稻耐冷性分子标记辅助选择育种。

关键词: 东乡野生稻; 苗期耐冷性; 根电导率; QTL 定位

QTLs Mapping for Cold Tolerance at Seedling Stage in Dongxiang Wild Rice (*Oryza rufipogon* Griff.)

XIA Rui-xiang¹, XIAO Ning², HONG Yi-huan¹, ZHANG Chao¹, SU Yan¹, ZHANG Xiao-meng¹, CHEN Jian-min¹

(¹College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu; ²Lixiahe Region Agricultural Research Institute of Jiangsu/Nanjing Sub-center of National Rice Improvement Center, Yangzhou 225000, Jiangsu)

Abstract: 【Objective】 The objective of the study is to identify quantitative trait loci (QTLs)controlling cold tolerance at seedling stage and linkage SSR markers in Dongxiang wild rice. 【Method】 Cross was made between cold tolerant Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) and cold susceptible rice variety Nanjing11. Nanjing 11 was then used as the recurrent parent to construct a backcross segregation population (BC₂F₁) which includes 144 plants. This population was used to detect QTLs for cold tolerance at seedling stage. Root conductivity was used as the index of cold tolerance. The molecular map was constructed with SSR markers and the QTLs for cold tolerance were identified by multiple trait composite intervals mapping. 【Result】 The two QTLs for cold tolerance (*qRC-10-1* and *qRC-10-2*) were detected on chromosome 10, explaining 34.13% and 37.02% of phenotypic variances, respectively. More SSR markers were screened around the region RM171 marker where these two QTLs were located. Three QTLs in regions *qRC-10-1* and *qRC-10-2* were detected on chromosome 10. 【Conclusion】 *qRC-10-1* and *qRC-10-2* may be the major QTLs for cold tolerance at seedling stage in Dongxiang wild rice. The location of two QTLs was at the interval RM304 and RM1108 on chromosome 10. The markers in the region between RM304 and RM1108 may be used to select for cold tolerance in rice.

Key words: Dongxiang wild rice; cold tolerance at seedling stage; root conductivity; QTL mapping

0 引言

【研究意义】东乡野生稻是普通野生稻的一种, 分布在东经 116°36', 北纬 28°14', 是迄今世界上最北的野生稻。东乡野生稻在 -12.8—0°C 低温条件下能安全越冬, 耐冷性极强^[1], 它还具有耐旱等丰富的抗逆

特性^[2], 并具有胞质不育基因^[3]、育性恢复基因^[4-5]和高产基因^[6], 是宝贵的稻种资源, 已成为水稻抗冷育种的优异种质资源^[7-8]。东乡野生稻自发现至今 30 多年以来, 引起了植物学家和水稻育种家的广泛关注^[9-10]。但目前对东乡野生稻耐冷基因的遗传定位报道较少, 对其进行耐冷性基因的定位, 可为耐冷性基因克隆分

收稿日期: 2009-03-04; 接受日期: 2009-10-21

基金项目: 国际原子能机构项目 (12228/RO)

作者简介: 夏瑞祥, 硕士。Tel: 0514-87979286; E-mail: yzuxrx@gmail.com; 共同第一作者肖宁, 硕士。Tel: 0514-87302225; E-mail: xn_yzu@126.com。通信作者陈建民, 教授, 博士。Tel: 0514-87979286; Fax: 0514-87991794; E-mail: jmchen@yzu.edu.cn

离和开展耐冷性水稻分子育种提供理论基础和技术支持。【前人研究进展】陈大洲等^[11]利用协青早 B/东乡野生稻的 BC₁F₁ 群体定位了东乡野生稻的苗期耐冷基因, 认为耐冷性是由多个基因控制的数量性状, 在第 4、8 染色体上发现与耐冷性连锁的 SSR 标记 RM280、RM337, 其贡献率分别为 3.6%、2.7%。利用桂朝 2 号和东乡野生稻构建的高代回交群体, 对东乡野生稻孕穗开花期耐冷性进行 QTL 分析, 在第 1、6 和 11 染色体上定位了贡献率在 4%—7% 之间的 3 个孕穗开花期耐冷性 QTL^[12]。从东乡野生稻克隆到了编码完整胆碱激酶、富含甘氨酸脯氨酸的蛋白和类脯氨酸伸展蛋白受体激酶 3 个蛋白的基因序列, 序列特征和基因表达分析表明它们可能与耐冷有关^[13]。栽培稻的苗期耐冷性基因定位已有较多研究, 用二九青和 Yuki hikari 杂交后再经 8 代自交得到的 79 个重组自交系(RIL)群体为材料, 以枯萎死苗作为指标的水稻苗期耐冷性 QTL 定位共获得 5 个 QTL, 分别位于染色体 3、4、7、8 和 11 上, 各 QTL 控制的表型变异范围为 7.7%—49.3%^[14]。除此之外, 在第 1、5、6 染色体^[15]和 3、7、11 染色体上也发现苗期耐冷性的 QTL, 贡献率分布为 4%—24%^[16]。以低温处理后的存活率确定苗期耐冷性的 QTL 在 1、2、3、4 染色体^[17], 以幼苗的叶赤枯度在 1、5、9 染色体, 其中 *qCTS1* 的贡献率最大为 15.5%^[18]; 以死苗率为指标在 2、3 染色体上分别检测到与苗期耐冷性相关的 QTL, 贡献率分别为 13.7%和 9.3%^[19]。【本研究切入点】水稻耐冷性的遗传具有较大的复杂性, 其机制还未完全了解。不同研究者使用的耐冷性鉴定方法及评价指标有所不同, 目前没有技术标准可依。就苗期耐冷性而言, 常用的方法为将常温下生长的 3—4 叶龄秧苗放置在 12—13℃ 的 3 cm 深冷水池, 处理 10 d, 或在 5—12℃ 人工气候箱处理 2—7 d 后, 在自然条件下放置 5—7 d, 以叶赤枯度作为苗期耐冷性指标^[20]。而形态学的分级指标在实际评价耐冷性时较难准确掌握, 鉴于低温胁迫引起细胞膜结构变化等生理生化表现^[21], 以低温胁迫处理东乡野生稻幼苗, 通过根电导率为评价指标, 既对东乡野生稻的苗期耐冷性基因进行定位, 进一步了解东乡野生稻耐冷性的遗传基础, 又能寻求可靠的水稻耐冷研究鉴定评价方法。【拟解决的关键问题】野生稻种质中具有栽培稻所没有的一些优良基因, 目前野生稻的研究已成为水稻品种改良的重要种质资源和生物技术研究的物质基础^[22]。本研究利用极耐冷的东乡野生稻作为供体亲本, 采用回交的方法构建分离群体, 利用低温胁迫后

的根电导率作为鉴定指标, 对苗期的耐冷基因进行 SSR 标记定位分析, 寻找与耐冷基因连锁的分子标记。

1 材料与方法

1.1 试验材料

东乡野生稻, 南京 11 (N₁₁) 和它们的 F₁, 以 N₁₁ 为轮回亲本获得 144 个单株组成的 BC₂F₁ 群体以及其衍生的 BC₂F₂, BC₃F₂ 群体。

1.2 引物

部分 SSR 标记引物由扬州大学严长杰教授惠赠, 其余 SSR 引物的序列通过数据库 <http://www.gramene.org> 获得(由上海捷瑞生物工程公司合成)。供试 SSR 标记重复性好, 大部分标记为单位点标记, 数据库中可以预知扩增产物片段的大小。

1.3 水稻基因组 DNA 的小量制备

以 Devos 等^[23]改进的 SDS 酚-氯仿法提取供试 BC₂F₁ 等群体及亲本分蘖期叶片基因组 DNA。PCR 扩增筛选具多态性的 SSR 标记及对分离群体进行检测的具体反应体系为: 1×buffer (20 mmol·L⁻¹ Tris pH 8.0, 50 mmol·L⁻¹ KCl, 2.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 0.1 mmol·L⁻¹ EDTA, 1 mmol·L⁻¹ DTT, 50% glycerol), 200 mmol·L⁻¹ dNTPs, 1.0 U *Taq* 酶, 150 nmol 引物, 75 ng 模板 DNA, 总体积为 10 μL。一般情况下反应条件为 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 45 s, 55℃ 复性 40 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。根据不同的引物对适当调整退火温度和延伸的时间。PCR 产物利用 3.5% 琼脂糖 (agarose) 或 6% 聚丙烯酰胺 (PAGE) 凝胶电泳进行检测。

1.4 苗期耐冷性鉴定

通过根电导率测定水稻苗期(三叶一心)耐冷性。由于 BC₂F₁ 需要田间种植用于继续回交或自交, 而根电导率需要剪取一定数量的根进行测量, 所以不能直接用 BC₂F₁ 群体的单株幼苗进行测定。理论上 BC₂F₁ 群体由具有或没有东乡野生稻耐冷性的 2 种基因型组成, 各 BC₂F₁ 单株自交产生的相对应 BC₂F₂ 株系之间在耐冷性表现上将发生分离。利用 BC₂F₂ 株系之间的根电导率差别可间接表示 BC₂F₁ 单株的 2 种基因型的差别, 从而确定 BC₂F₁ 各单株的耐冷表现型。从各 BC₂F₁ 单株自交后代随机选取 50 粒 BC₂F₂ 种子, 放置光照培养箱生长至三叶一心, 然后模拟昼夜交替进行低温处理。具体条件为光照 12 h, 光强度为 25 000 lx, 温度 (4±1) °C, 低温处理 2 d 后立刻剪取株系中各单株的根混合并称重 0.1 g, 切成 1 cm 节段, 放入盛有

100 mL 蒸馏水的锥形瓶中, 抽真空 0.5 h, 然后用 METTLER TOLEDO 326 型电导率仪测量各株系的根电导率值 (us/cm), 同时测定蒸馏水的电导率值作为空白对照, 各株系根电导率值 = 根部细胞渗出液测量值 - 空白对照值。根据获得的 BC₂F₂ 各株系根电导率确定对应 BC₂F₁ 单株的耐冷表现。

1.5 数据收集和分析

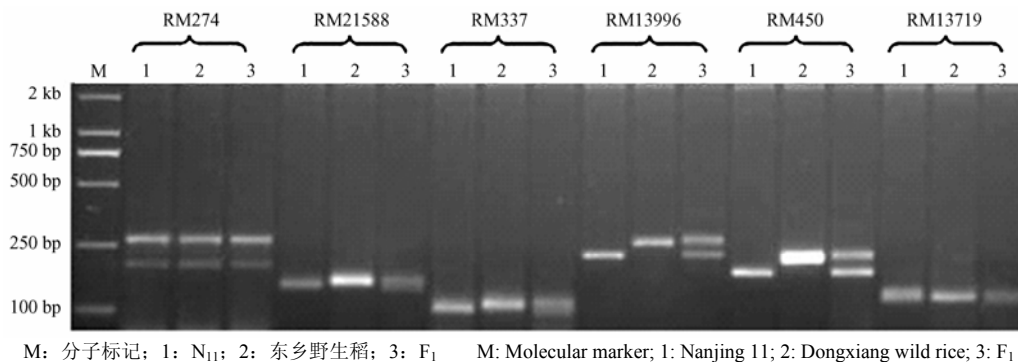
多态性的 SSR 在 BC₂F₁ 分离群体中具有不同的扩增带型, 与 N₁₁ 扩增带型相同的记为“1”, 与东乡野生稻相同记为“2”, 缺失或者无法判断的记为“0”。以复合区间定位法进行 QTL 定位^[24], 所获结果以 Mapmaker/EXP3.0 软件进行连锁分析, 重组值用 Kosambi 函数转换成遗传距离 (cM), 通过 Windows

QTL Cartographer 2.5 软件绘制成连锁图。应用 Windows QTL Cartographer 2.5 软件检测耐冷性的 QTL 和绘制成图, 以 LOD>2.5 判断 QTL 的存在与否, QTL 的命名遵循 McCouch 等^[25]提出的规则。

2 结果

2.1 多态性的 SSR 分子标记的筛选

通过 411 对 SSR 引物对亲本进行多态性检测, 结果有 104 对引物在亲本间表现多态性 (图 1), 多态率为 25.3%。东乡野生稻和桂朝 2 号间 SSR 标记的多态率约为 30%左右^[6], 与本文结果相当。为满足各染色体的引物数分布均衡性, 每条染色体合成的引物数量相当, 结果在第 3、5 染色体上表现的多态性引物数较少。



M: 分子标记; 1: N₁₁; 2: 东乡野生稻; 3: F₁ M: Molecular marker; 1: Nanjing 11; 2: Dongxiang wild rice; 3: F₁

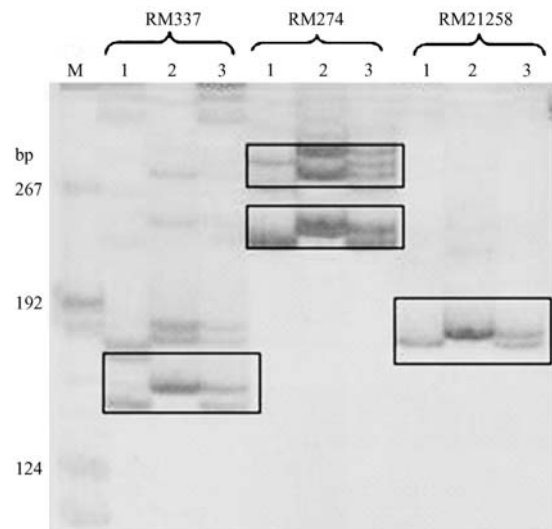
图 1 SSR 标记在亲本和 F₁ 中的扩增结果

Fig. 1 The polymorphism of SSR markers in parents and their F₁

从图 1 可以看出, RM13996 和 RM450 具有明显的多态性和表现共显性, 可以用于分离群体的检测, 而 3.5% 琼脂糖电泳不能分辨标记 RM337、RM274、RM21588 的扩增片段多态性, 将这些不能分辨的扩增产物进行 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 (图 2)。RM337、RM274 的扩增片段在琼脂糖分别为 160、230 和 260 bp, RM21588 为 192 bp。在聚丙烯酰胺凝胶中, RM337 则在 160 bp 出现多态性, RM274 在 230 和 260 bp 处分别出现多态性, RM21588 在 192 bp 处出现多态性, 条带大小和琼脂糖大小一致, 琼脂糖未能分辨的条带可利用聚丙烯酰胺凝胶进行分辨。104 对引物中有 66 对通过 3.5% 琼脂糖可分辨多态性, 38 对引物在 3.5% 琼脂糖不易分辨的通过 6% 聚丙烯酰胺凝胶可分辨亲本间多态性, 占总多态性引物的 36.5%。

2.2 多态性 SSR 标记的检测及连锁图构建

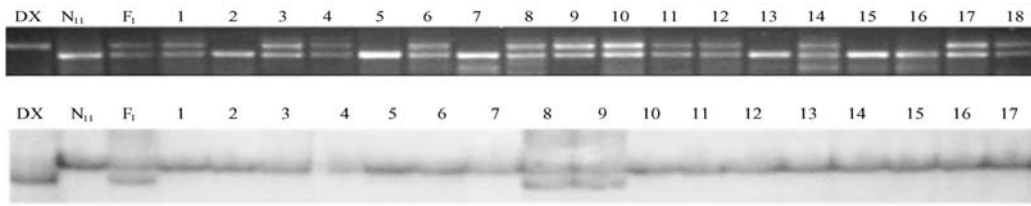
BC₂F₁ 分离群体的 2 种带型很容易区分, 和理论预期一致, 一种和轮回亲本 N₁₁ 相同, 另一种为具有亲本 2 条带的杂合带型, 和 F₁ 相同。图 3 以 RM13296



M: 分子标记; 1: N₁₁; 2: 东乡野生稻; 3: F₁
M: Molecular marker; 1: Nanjing 11; 2: Dongxiang wild rice; 3: F₁

图 2 RM337、RM274 和 RM21588 在亲本和 F₁ 中的多态性

Fig. 2 The polymorphism of RM337, RM274, and RM21588 in parents and their F₁



DX: 东乡野生稻; 1—18: BC₂F₁ 群体的部分单株 DX: Dongxiang wild rice; 1-18: Partial plants of BC₂F₁ population

图 3 SSR 标记 RM13296 (上) 和 RM337 (下) 在 BC₂F₁ 群体中的分离

Fig. 3 The segregation of RM13296 (up) and RM337 (down) in BC₂F₁ population

和 RM337 为例展现了多态性 SSR 标记在 BC₂F₁ 群体中检测的部分结果。

利用 104 对多态性引物对 BC₂F₁ 群体 144 个单株进行扩增检测, 所获连锁图谱全长 1 140.1 cM, 除第 3、5 染色体外, 其余染色体各标记分布较均匀, 可以用于水稻 QTL 的定位和与耐冷性连锁分子标记的分析 (图 4)。

2.3 根电导率作为耐冷指标的 QTL 定位

根电导率在亲本之间表现明显的差异, 东乡野生稻为 2.4, 而 N₁₁ 为 10.8, 各 BC₂F₁ 单株自交的 BC₂F₂ 群体各株系间也表现明显的差别, 变异幅度从 1.30 到 11.57, 平均值为 4.06, 接近正态分布 (图 5-A)。利用低温胁迫 BC₂F₂ 群体后的根电导率作为耐冷性指标, 间接获得 BC₂F₁ 群体 144 个单株的耐冷性表现型结果, 结合各 BC₂F₁ 单株 SSR 标记的基因型进行连锁分析, 共检测到 2 个位于第 10 染色体的 QTL (图 5-B),

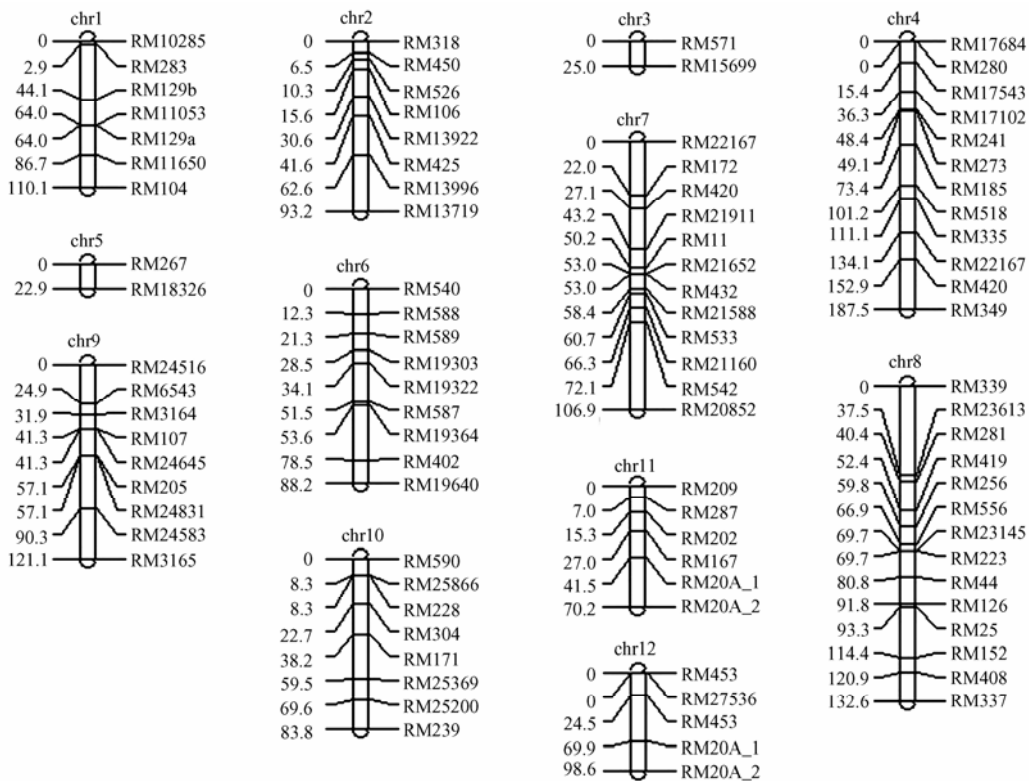


图 4 水稻 SSR 标记连锁图谱

Fig. 4 The rice linkage map of SSR markers in this study

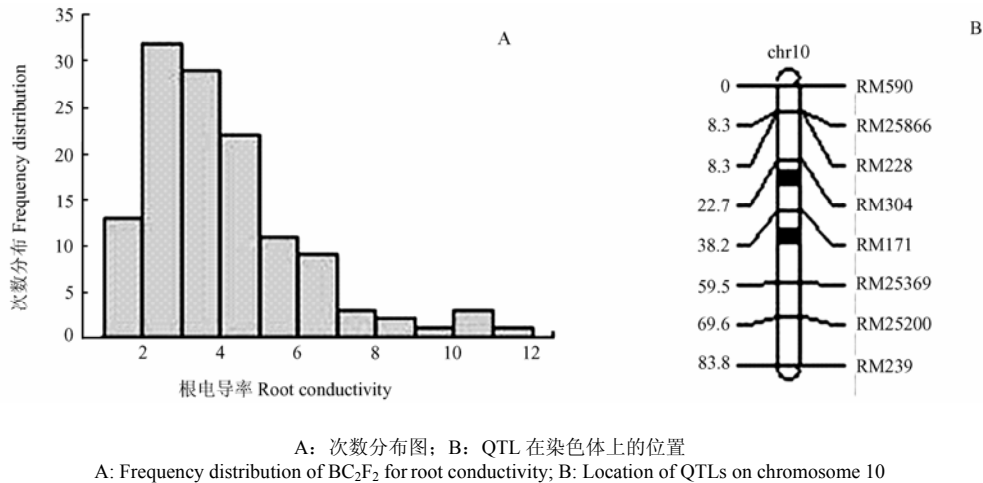


图 5 以根电导率为指标的东乡野生稻苗期耐冷性 QTL 定位

Fig. 5 The QTLs associated with the cold tolerance of Dongxiang wild rice at seedling stages by root conductivity

qRC10-1 定位于第 10 染色体 28.72 cM 处, 位于标记 RM304—RM171 间, LOD 值为 6.19, 贡献率为 34.13%; *qRC10-2* 定位于 46.22 cM 处, 位于标记 RM171—RM25369 间, LOD 值为 7.39, 贡献率为 37.02%, 这 2 个 QTL 的贡献率都大于 30%, 是 2 个主效的 QTL, 而且都位于 RM171 附近, 有进一步研究的价值。

已经定位的 2 个 QTL 都和 RM171 标记有关。通过数据库中的 SSR 引物信息(<http://www.gramene.org>) 在 RM171 两侧附近选择 30 对 SSR 标记引物进行 PCR 扩增, 共获得 11 个在亲本间具有多态性的 SSR 标记, 将筛选到的 11 个多态性的标记对 BC₂F₁ 群体 144 个单株进行检测, 结合之前的 SSR 标记的分离数据, 对第 10 染色体重新构建连锁图, 11 个新的 SSR 标记在连锁图中位于标记 RM304 与 RM25369 之间 (图 6-A)。在该区间共检测到 3 个 QTL, 在 *qRC10-1* 基础上发现了 *qRC10-1-1* (RM304—RM25570)、*qRC10-1-2* (RM25570—RM171), 贡献率分别为 23.2% 和 10.8%, 而在 *qRC10-2* 基础上发现的 *qRC10-2-1* (RM1180—RM25661) 贡献率为 9.8% (图 6-B)。进一步定位获得的 QTL 的所在染色体和标记位置没有发生变化, 但缩小了目标区段, 为进一步研究苗期耐冷性和基因克隆提供了基础。

在高代回交后代群体中, 能够扩增出东乡野生稻相应 SSR 标记的单株, 继续进行根电导率的表型检测, 如表型结果与分子标记的结果相一致, 表明与耐冷性相关 QTL 与 SSR 标记有连锁关系, 则耐冷性的选择

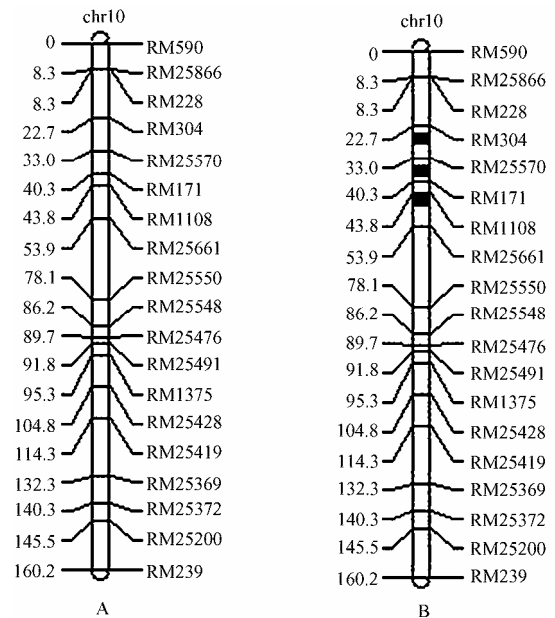


图 6 东乡野生稻第 10 染色体连锁图和苗期耐冷性 QTL 定位

Fig. 6 The linkage map and QTLs of cold tolerance of Dongxiang wild rice at seedling stages on chromosome 10

就可以通过相应的分子标记进行, 从而达到对复杂数量性状的分子标记辅助选择。以 RM171、RM1108 等标记对 BC₃F₂ 群体的部分单株进行 PCR 扩增 (图 7), 对 BC₃F₂ 群体的部分 PCR 扩增单株进行了根电导率的

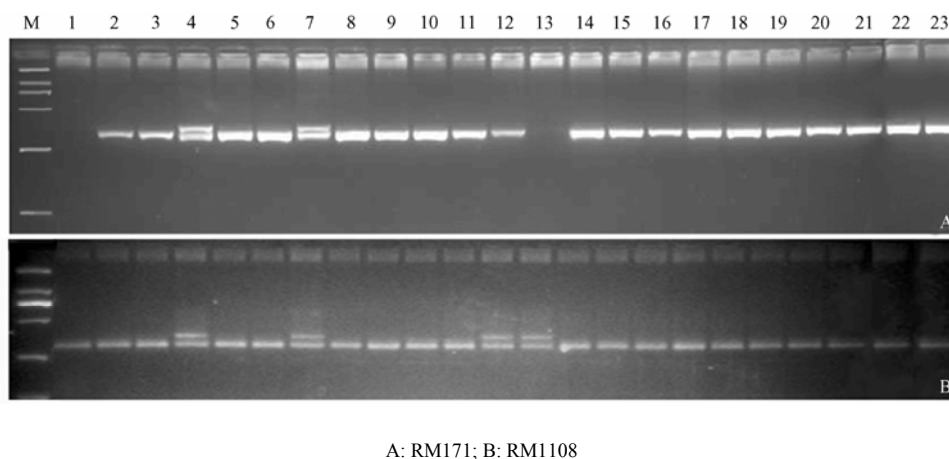


图 7 BC₃F₂ 中部分单株 RM171、RM1108 标记的扩增结果

Fig. 7 The amplification results of marker RM171, RM1108 for partial plants in BC₃F₂ population

表 部分 BC₃F₂ 单株 SSR 标记扩增和根电导率检测结果

Table The results of SSR amplification and root conductivity of partial plants in BC₃F₂ population

分子标记 Markers	部分 BC ₃ F ₂ Partial plants in BC ₃ F ₂ population																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
RM304	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
RM171	0	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
RM1108	1	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
RM25661	1	1	1	2	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
RM25369	0	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1
根电导率(us/cm) Root conductivity	4.7	2.6	2.9	2.3	3.0	2.8	2.3	2.8	2.8	2.3	2.6	1.8	1.7	2.5	2.6	2.5	2.6	2.0	3.8	1.9	4.6	3.6	3.9

测定, 由表可见, 根电导率结果和标记扩增的结果比较一致, 表现东乡野生稻相应扩增片段的单株其根电导率较低。

3 讨论

3.1 水稻耐冷性鉴定指标

水稻耐冷性是复杂的数量性状, 要对数量性状的基因进行定位和克隆, 首先要对研究性状进行有效的识辨, 因此选择合适的耐冷性鉴定方法和指标就显得十分重要。根据低温胁迫下细胞生理变化的研究, 水稻幼苗在低温条件下的细胞膜结构发生了变化。细胞膜的稳定性是细胞乃至整个植物体赖以生存的基础, 它不仅调控一切营养物质的进出, 而且是细胞反应逆境因子的最先的重要屏障。植物遭遇冷害将发生细胞损伤, 生物膜首先发生脂质的物相变化, 这时脂质从液晶相变为凝胶相, 脂质的流动性变小, 膜体紧缩不

匀而出现断裂, 会造成膜的破损渗漏, 质膜、液泡膜被破坏为不连续片段^[26], 胞内可溶性物质大量向膜外渗漏。研究表明在低温逆境下细胞膜的流动性愈大, 低温对其伤害愈小^[21]。

水稻 3—4 叶期的生长最适温度是 25℃, 4—5℃ 为临界温度。本研究采用 (4±1)℃ 进行低温处理 48 h, 通过东乡野生稻和 N₁₁ 的比较, 发现双亲的根电导率和回交群体中不同单株间在低温处理后存在明显差异, 低温处理后不耐冷的单株其根中电解质泄漏增多, 导致电导率相应增大, 而耐冷植株的电导率比较小而且变化不大, 说明低温确实使细胞膜破坏, 电解质泄漏增多, 从而可根据根电导率的大小间接反映植株的耐冷性。本研究最初试验设计是进行叶片电导率的测定, 然而幼苗经低温处理后失水枯萎, 渗出液极少而难以测定, 所以改用根。利用根电导率来鉴别水稻的耐冷性还未见报道, 对供试植株进行相应的低温处理

就可获得该植株耐冷性的间接证据, 可用于苗期或其后的耐冷性鉴定及生理机制研究。

3.2 东乡野生稻耐冷性 QTL 定位

陈大洲等^[11]分别在东乡野生稻第 4、8 染色体上检测到了一个可能与苗期耐冷性有关的 QTL, 而本研究利用低温胁迫后根电导率作为苗期耐冷性鉴定指标, 共检测到 2 个 QTL 都位于第 10 染色体。水稻的 QTL 定位的研究报道众多, 一个共同的特点就是不同作者所用品种、群体不同, 表型鉴定的方法和指标不同, 所获 QTL 的数目、位置以及连锁距离、贡献率也不同。如同一重组自交系群体, 以叶绿素含量作为指标, 检测到苗期耐冷 QTL 分布于第 1、2、3、5、6、7、8、9、12 染色体上, 11 个 QTLs 各自引起的表型变异为 5.7%—27.4%; 而以枯萎死苗率作为指标, 鉴定出的 QTL 位于第 3、4、7、8、11 染色体上, 各 QTL 控制的表型变异范围为 7.7%—49.3%^[14]; 用幼苗高度作为耐冷性指标, 在染色体 1、3、4、5、6、8、9、11 和 12 发现 10 个 QTL, 解释的表型变异从 4.85% 到 22.47%^[27]。利用云南稻冲腿和农林 20 的 F₃ 进行孕穗期耐冷性 QTL 定位主要分布在第 1、3、4、5、6、7、8、10、12 染色体上^[28]。从水稻 QTL 定位研究中可见水稻所有染色体都存在相关的耐冷性 QTL, 仅贡献率大小不同而已, 表明水稻耐冷性是一复杂的多基因控制性状。东乡野生稻是强耐冷基因源, 开展东乡野生稻耐冷基因的定位研究, 弄清其耐冷基因在染色体上的具体位点, 一方面为耐冷基因的克隆, 另一方面将为水稻耐冷分子育种提供有效的标记, 以提高水稻耐冷性育种效率。陈大洲等^[11]在东乡野生稻苗期耐冷性 QTL 定位的文章中也指出, 与耐冷性连锁的 2 个基因的贡献率偏低可能是由于耐冷鉴定的不精确所引起。本研究利用低温胁迫后根电导率作为苗期耐冷性鉴定指标, 共检测到 2 个 QTL 都位于第 10 染色体, 这 2 个 QTL 的贡献率都大于 30%, 可认为是 2 个主效的 QTL。利用不同群体所获 QTL 的贡献率大小明显不同, 而且难以相互比较, 本研究发现的各 QTL 贡献率较大可能与分析群体是回交二代有关。在标记 RM171 附近发展新的分子标记来提高标记的饱和度后重新进行定位, 检测到 3 个 QTL *qRC10-1-1*、*qRC10-1-2* 和 *qRC10-2-1*, 各 QTL 解释的表型变异为 9.8%—23.2%。在高代回交群体中能够扩增出与东乡野生稻耐冷性 QTL 连锁的 SSR 标记的单株, 其根电导率也偏小, 根电导率结果与分子标记的结果相一致, 表明耐冷性 QTL 与位于第 10 染色体的相关 SSR 标记有连锁关系。

在东乡野生稻第 10 染色体上还未见苗期耐冷性 QTL 报道, 鉴于其贡献率比较大, 初步定位和标记饱和后定位结果的一致性, 区段 RM304—RM25369 可能与苗期耐冷密切相关。标记 RM171、RM1108、RM25661 扩增结果和根电导率比较一致, 可用于水稻耐冷性分子标记辅助选择育种。

4 结论

利用低温胁迫后根电导率作为苗期耐冷性鉴定指标, 在东乡野生稻第 10 染色体检测到 2 个 QTL 位于标记 RM171 附近, 这 2 个 QTL 的贡献率都大于 30%, 可认为是 2 个主效的 QTL。与 QTL 连锁的相应 SSR 标记在高代回交群体中扩增结果与根电导率检测结果相一致的特征, 表明耐冷性 QTL 与相关 SSR 标记有连锁关系。苗期耐冷性 QTL 在东乡野生稻第 10 染色体上还未见报道, 鉴于贡献率比较大和在 RM171 附近发展新的分子标记后重新定位和初定位结果的一致性, 这个区段很可能与苗期耐冷密切相关, 有进一步研究的价值。

致谢: 感谢扬州大学农学院严长杰教授在本研究实施过程中的大力帮助。

References

- [1] 陈大洲, 肖叶青, 赵社香, 熊焕金, 皮勇华. 东乡野生稻苗期和穗期的耐寒性研究. 江西农业学报, 1996, 8(1): 1-6.
Chen D Z, Xiao Y Q, Zhao S X, Xiong H J, Pi Y H. Studies on the cold tolerance of Dongxiang wild rice at stage of seedling and heading. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 1996, 8(1): 1-6. (in Chinese)
- [2] Zhou S X, Tian F, Zhu Z F, Fu Y C, Wang X K, Sun C Q. Identification of quantitative trait loci controlling drought tolerance at seedling stage in Chinese Dongxiang common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff). *Acta Genetica Sinica*, 2006, 33(6): 551-558.
- [3] 陈大洲, 肖叶青, 赵社香, 熊焕金. 江西东乡野生稻细胞质雄性不育系的恢源探讨. 杂交水稻, 1995 (6): 4-6.
Chen D Z, Xiao Y Q, Zhao S X, Xiong H J. Studies on the restoring source for CMS lines with the cytoplasm of Jiangxi Dongxiang wild rice. *Hybrid Rice*, 1995 (6): 4-6. (in Chinese)
- [4] 余守武, 万 勇, 胡标林, 张 铮, 谢建坤. 东乡野生稻细胞质雄性不育性恢复的遗传研究. 分子植物育种, 2005, 3(6): 761-767.
Yu S W, Wan Y, Hu B L, Zhang Z, Xie J K. The inheritance of the fertility restoration for cytoplasmic male sterility in Dongxiang wild rice (*O. rufipogon*). *Molecular Plant Breeding*, 2005, 3(6): 761-767.

- (in Chinese)
- [5] 杨空松, 陈小荣, 傅军如, 朱昌兰, 彭小松, 贺晓鹏, 贺浩华. 东乡野生稻育性恢复性的鉴定与遗传分析. *中国水稻科学*, 2007, 21(5): 487-492.
- Yang K S, Chen X R, Fu J R, Zhu C L, Peng X S, He X P, He H H. Identification and genetic analysis of fertility restoration in Dongxiang wild rice. *Chinese Journal of Rice Science*, 2007, 21(5): 487-492. (in Chinese)
- [6] Li D J, Sun C Q, Fu Y C, Li C, Zhu Z F, Chen L, Cai H W, Wang X K. Identification and mapping of genes for improving yield from Chinese common wild rice (*O. rufipogon* Griff.) using advanced backcross QTL analysis. *Chinese Science Bulletin*, 2002, 47(18): 1533-1537.
- [7] 陈大洲, 肖叶青, 皮勇华, 胡兰香, 俞美娇. 东乡野生稻后代近等基因系苗期耐冷性初步研究. *江西农业学报*, 2003, 15(2): 54-57.
- Chen D Z, Xiao Y Q, Pi Y H, Hu L X, Yu M J. Preliminary study on cold-resistance of seedling of near-isogenic lines from Dongxiang wild rice. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2003, 15(2): 54-57. (in Chinese)
- [8] 陈大洲, 肖叶青, 皮勇华, 邬文昌, 胡兰香, 罗世友, 谢金水. 东乡野生稻耐冷性的遗传改良初步研究. *江西农业大学学报*, 2003, 25(1): 8-11.
- Chen D Z, Xiao Y Q, Pi Y H, Wu W C, Hu L X, Luo S Y, Xie J S. The improvement of cold tolerance in *japonica* rice. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2003, 25(1): 8-11. (in Chinese)
- [9] 陈大洲, 邓仁根, 肖叶青, 赵社香, 皮勇华. 东乡野生稻抗寒基因の利用与前景展望. *江西农业学报*, 1998, 10(1): 65-68.
- Chen D Z, Deng R G, Xiao Y Q, Zhao S X, Pi Y H. Utilization and prospect of the cold-resistance gene of Dongxiang wild rice. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 1998, 10(1): 65-68. (in Chinese)
- [10] 陈大洲, 张巴克, 熊文华. 东乡野生稻种质资源研究与利用进展. *江西农业学报*, 2008, 20(12): 12-16.
- Chen D Z, Zhang B K, Xiong W H. Advance in research and application of Dongxiang wild rice germplasm resources. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2008, 20(12): 12-16. (in Chinese)
- [11] 陈大洲, 钟平安, 肖叶青, 黄英金, 谢建坤. 利用 SSR 标记定位东乡野生稻苗期耐冷性基因. *江西农业大学学报*, 2002, 24(6): 753-756.
- Chen D Z, Zhong P A, Xiao Y Q, Huang Y J, Xie J K. Identification of QTLs for cold tolerance at seedling stage in Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) by SSR markers. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2002, 24(6): 753-756. (in Chinese)
- [12] Liu F X, Sun C Q, Tan L B, Fu Y C, Li D J, Wang X K. Identification and mapping of quantitative trait loci controlling cold-tolerance of Chinese common wild rice (*O. rufipogon* Griff.) at booting to flowering stages. *Chinese Science Bulletin*, 2003, 48(19): 2068-2071.
- [13] 申国安. 东乡野生稻耐冷基因和水稻 *ClpD* 基因的克隆与表达研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2003.
- Shen G A. Cloning and expression of cold-tolerance gene from Dongxiang wild rice and *OsClpD* gene from rice (*Oryza sativa* L.) [D]. Shanghai: Fudan University, 2003. (in Chinese)
- [14] 詹庆才, 朱克永, 陈祖武, 曾曙珍. 利用分子标记进行水稻苗期耐冷性相关性状的 QTLs 研究. *杂交水稻*, 2005, 20(1): 50-55.
- Zhan Q C, Zhu K Y, Chen Z W, Zeng S Z. Studies on the QTLs for cold tolerance related characters of rice seedlings by molecular markers. *Hybrid Rice*, 2005, 20(1): 50-55. (in Chinese)
- [15] Jiang L, Xun M M, Wang J K, Wan J M. QTL analysis of cold tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.) using recombination inbred lines. *Journal of Cereal Science*, 2008, 48: 173-179.
- [16] Zhang Z H, Su L, Li W, Chen W, Zhu Y G. A major QTL conferring cold tolerance at the early seedling stage using recombinant inbred lines of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science*, 2005, 168: 527-534.
- [17] Qian Q, Zeng D L, He P, Zheng X W, Chen Y, Zhu L H. QTL analysis of the rice seedling cold tolerance in a double haploid population derived from anther culture of a hybrid between *indica* and *japonica*. *Chinese Science Bulletin*, 2000, 45(5): 448-453.
- [18] 韩龙植, 乔永利, 曹桂兰, 张媛媛, 安永平, 芮钟斗, 高熙宗. 水稻生长早期耐冷性 QTL 分析. *中国水稻科学*, 2005, 19(2): 122-126.
- Han L Z, Qiao Y L, Cao G L, Zhang Y Y, An Y P, Ye J D, Koh H J. QTL analysis on cold tolerance during early growth period in rice. *Chinese Journal of Rice Science*, 2005, 19(2): 122-126. (in Chinese)
- [19] 寻梅梅, 江玲, 刘世家, 陈平, 王茂青, 翟虎渠, 万建民. 利用回交重组自交系群体检测水稻苗期耐冷性基因座. *南京农业大学学报*, 2006, 29(2): 123-126.
- Xun M M, Jiang L, Liu S J, Chen P, Wang M Q, Zhai H Q, Wan J M. QTL analysis of cold tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.) by using backcross inbred lines. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2006, 29(2): 123-126. (in Chinese)
- [20] 韩龙植, 张三元. 水稻耐冷性鉴定评价方法. *植物遗传资源学报*, 2004, 5(1): 75-80.
- Han L Z, Zhang S Y. Methods of characterization and evaluation of cold tolerance in rice. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2004, 5(1): 75-80. (in Chinese)
- [21] 李霞, 戴传超, 程睿, 陈婷, 焦德茂. 不同生育期水稻耐冷性的鉴定及耐冷性差异的生理机制. *作物学报*, 2006, 32(1): 76-83.
- Li X, Dai C C, Cheng Y, Chen T, Jiao D M. Identification for cold tolerance at different growth stages in rice (*Oryza sativa* L.) and

- physiological mechanism of differential cold tolerance. *Acta Agronomica Sinica*, 2006, 32(1): 76-83. (in Chinese)
- [22] 邓化冰, 邓启云, 陈立云. 野生稻种资源的研究与利用动态. 中国农学通报, 2006, 22(1): 295-299.
- Deng H B, Deng Q Y, Chen L Y. Researches and utilization on wild rice resources. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2006, 22(1): 295-299. (in Chinese)
- [23] Devos K M, Atkinson M D, Chinoy C N, Liu C J, Gale M D. RFLP-based genetic map of the homologous group 3 chromosomes of wheat and rye. *Theoretical and Applied Genetics*, 1992, 83: 931-939.
- [24] Zeng Z B. Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1993, 90: 10972-10976.
- [25] McCouch S R, Cho Y G, Yano M, Paule E, Blinstrub M, Morishima H, Kinoshita T. Report on QTL nomenclature. *Rice Genetic Newsletter*, 1997, 14: 11-13.
- [26] 陈善娜, 邹晓菊, 梁 斌. 水稻不同抗冷性品种幼苗叶细胞膜系统的电镜观察. 植物生理学通讯, 1997, 33 (3): 191-194.
- Chen S N, Zou X L, Liang B. Electronmicroscope observation on membrane system of leave cells of some varieties of rice seedlings with different cold-resistance. *Plant Physiology Communications*, 1997, 33(3): 191-194. (in Chinese)
- [27] 詹庆才, 曾曙珍, 熊伏星, 齐藤浩二, 加藤明. 水稻苗期耐冷性 QTLs 的分子定位. 湖南农业大学学报, 2003, 29(1): 7-11.
- Zhan Q C, Zeng S Z, Xiong F X, Saido K, Kato A. Molecular mapping of QTLs for seedling cold tolerance in rice. *Journal of Hunan Agricultural University*, 2003, 29(1): 7-11. (in Chinese)
- [28] Ye C R, Kato A, Saito K, Ise K, Dai L Y, Yang Q Z. QTL analysis of cold tolerance at the booting stage in Yunnan rice variety Chongtui. *Chinese Journal of Rice Science*, 2001, 15(1): 13-15.

(责任编辑 郭银巧)