

# 水稻苗期耐高 $\text{Cu}^{2+}$ 胁迫的 QTL 定位和上位性分析

沈圣泉<sup>1</sup>, 庄杰云<sup>2</sup>, 舒庆尧<sup>1</sup>, 夏英武<sup>1</sup>

(1 浙江大学农业与生物技术学院, 浙江杭州 310029; 2 中国水稻研究所国家水稻改良中心, 浙江杭州 310006)

**摘要:** 用珍汕 97B/密阳 46 构建 RIL 群体及其遗传图谱, 对其种子采用沙培法育苗和培养, 试验设置 2 个高浓度 (100 mg/L 和 200 mg/L)  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫处理, 以处理 20 d 后的幼苗相对根长 (%) 和相对苗高 (%) 作为苗期耐  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫指标, 并用于 QTL 定位分析。结果表明, 试验共检测到苗期耐  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫的主效应 QTL 4 个, 以相对根长为指标, 检测到  $qRCC(r)6$  (100 mg/L) 和  $qRCC(r)9$  (200 mg/L), 以相对苗高为指标, 也检测到  $qRCC(s)1-2$  (100 mg/L 和 200 mg/L) 和  $qRCC(r)6-1$  (200 mg/L), 有效基因分散于双亲中。试验还检测到苗期耐  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫的上位性互作 8 对, 以相对根长为指标时, 检测到 2 对互作; 以相对苗高为指标时, 检测到 6 对上位性互作。表明水稻苗期耐高浓度  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫, 其上位性互作也起到较为重要作用。

**关键词:** 水稻; RIL 群体; QTL 定位; 上位性效应; 耐  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫

中图分类号: S511

文献标识码: A

文章编号: 1008-505X (2006) 03-0352-06

## Main and epistasis analysis of QTLs for tolerant to high $\text{Cu}^{2+}$ stress at seedling stage of rice (*Oryza Sativa* L.)

SHEN Sheng-quan<sup>1</sup>, ZHUANG Jie-yun<sup>2</sup>, SHU Qing-yao<sup>1</sup>, XIA Ying-wu<sup>1</sup>

(1 College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

2 Chinese National Center for Rice Improvement, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China)

**Abstract:** The recombinant inbred line (RIL) populations derived from Zhenshan 97B/Miyang 46 (ZS97B/MY46) and their genetic linkage maps were employed to map QTLs controlling tolerant to high  $\text{Cu}^{2+}$  stress at the seedling stage by culturing the seedling in two concentration of  $\text{Cu}^{2+}$  (100 mg/L and 200 mg/L) on the sand medium. After 20 days of treatment, the relative root length (%) and relative seedling height (%) was measured as index for tolerant to high  $\text{Cu}^{2+}$  stress. The results indicated that a total of four main effect QTLs were detected under high  $\text{Cu}^{2+}$  stress. Two were significant for the relative root length,  $qRCC(r)6$  (100 mg/L) and  $qRCC(r)9$  (200 mg/L), the other two were significant for relative seedling height,  $qRCC(s)1-2$  (100 mg/L and 200 mg/L) and  $qRCC(r)6-1$  (200mg/L). The positive allele were distributed in both the parents. A total of eight pairs of epistasis were detected for tolerant to high  $\text{Cu}^{2+}$  stress. Two were for relative root length; the other six for relative seedling height, indicating that epistasis were important genetic basis for the tolerant to high  $\text{Cu}^{2+}$  stress at the seedling stage.

**Key words:** rice; RIL population; QTLs mapping; main effect; epistasis effects; tolerant to high  $\text{Cu}^{2+}$  stress

铜是具有潜在毒性的元素, 低浓度的铜是植物生长所必需的, 能提高秧苗叶绿素的含量。但过量的铜能抑制植物对养分吸收, 阻滞作物生长发育<sup>[1]</sup>。我国土壤铜的本底值在  $15 \times 10^{-6} \sim 60 \times 10^{-6}$  之间。

近年来由于污灌、污泥农用的增加及含铜农药的使用, 致使土壤表层内铜浓度大幅度增高, 已成为主要重金属污染物之一。

有关铜对水稻的危害, 苏流坤等<sup>[2]</sup>报道, 随着铜

收稿日期: 2005-03-18 修改稿收到日期: 2005-07-04

基金项目: 国家“863”计划分子标记辅助育种重大专项(2003AA207030); 国家“863”超级稻和分子育种重大专项(2002AA2070002);

浙江省重点项目(“8812”计划)(001112030-3)。

作者简介: 沈圣泉(1962-), 男, 浙江桐乡人, 博士, 副教授, 主要从事水稻生物技术和分子育种研究。

处理浓度的增加,株高、生物产量和经济产量均明显下降。马忠明等<sup>[3]</sup>研究认为,铜浓度增高,对种子发芽率影响较小,但根的生长受到强烈抑制,芽的生长也受到影响,幼苗体内的淀粉酶活性下降,过氧化物酶活性却升高,脯氨酸含量增加。至于铜胁迫条件下,水稻不同基因型对其耐性差异和耐铜毒的遗传机理,很少见到报道。为此,本试验应用珍汕 97B/密阳 46 构建的 RIL 群体及其相应遗传图谱,对水稻苗期耐高浓度铜胁迫特性进行 QTL 定位分析,旨在揭示水稻耐铜的分子机理,为培育适应于受铜污染区种植的水稻品种提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

配制珍汕 97B/密阳 46 (ZS97B/MY46)组合,应用单粒传法构建了由 252 个  $F_8$  代株系组成的 RIL 群体和相应水稻分子图谱。它包括 165 个分子标记,覆盖 12 条水稻染色体,总图距 1387.6 cM,标记平均距离为 8.41 cM。用该图谱已定位了若干控制产量相关性状的 QTL<sup>[4-6]</sup>。

将双亲及其 RIL 群体于 2002 年在海南陵水种植试验。11 月 25 日播种,12 月 25 日移栽;单行区,每行 12 株,2 次重复,行株距 30 cm × 20 cm。田间管理同生产大田。每份材料待抽穗后约 35 d 时,收取成熟种子,晒干并室温贮藏。

### 1.2 苗期耐高 $\text{Cu}^{2+}$ 胁迫的测定

每份取洁净稻谷约 100 粒,室温浸种(36 h)和恒温(30 ℃)催芽(36 h),挑选生长一致的芽谷采用沙培法育苗,每培养皿存放 30 粒,重复 2 次,整个试验在 28 ℃恒温、相对湿度为 80%、14 h 光长、1500 lx 光照强度的人工气候室内进行。

育苗用的基本营养液按国际水稻研究所配方配制<sup>[7]</sup>。以基本营养液培养作为对照(CK),在基本营养液中加入硫酸铜( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ),配成  $\text{Cu}^{2+}$  达 100 mg/L 和 200 mg/L 的处理营养液作为 2 个高浓度  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫处理。培养液每天少量添加一次,并保持 pH 为 5.0 左右。育苗 20 d 后,每培养皿取幼苗 20 株,测量每株最大根长和苗高,将平均值再换算成相对根长(%) (处理最大根长/对照最大根长 × 100%) 和相对苗高(%) (处理苗高/对照苗高 × 100%),以此 2 项作为考察该材料苗期耐  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫指标,用于 QTL 定位分析。

### 1.3 QTL 定位分析

应用 QTLMAPPER1.0b 分析方法<sup>[8-9]</sup>,对 RIL 群体的高  $\text{Cu}^{2+}$  处理下的幼苗相对根长和相对苗高,进行 QTL 定位和上位性分析。选用  $\text{LOD} \geq 2.0$  作为阈值来判断 QTL 的存在与否,加性效应和上位性效应分析均用  $P < 0.001$  为显著水平进行检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 苗期耐高 $\text{Cu}^{2+}$ 胁迫表现

试验结果表明,双亲耐  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫的特性相近,在 100 mg/L  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫时,母、父本相对根长为 78.5% 和 76.9%; 相对苗高为 85.5% 和 80.8%。而在 200 mg/L  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫时,母、父本相对根长则降到 61.4% 和 57.4%; 相对苗高也降到 72.4% 和 75.2% (表 1)。表明随着  $\text{Cu}^{2+}$  浓度增高,双亲根和苗的生长受抑制程度也相应加强;高  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫对根抑制程度也明显大于对苗抑制作用。

图 1 看出,RIL 株系间对不同  $\text{Cu}^{2+}$  浓度的胁迫反应差异较大。处理后的相对根长和相对苗高表现出连续变异,出现较多超亲株系。当  $\text{Cu}^{2+}$  为 100 mg/L 时,RIL 群体相对根长降至 76.6%,但仍有约 23% 株系的根长保持了原对照水平;相对苗高降到了 82.9%,也有约 16% 株系的苗高与原对照相似。随着  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫浓度加大,对 RIL 根长和苗高抑制程度也加剧。在 200 mg/L  $\text{Cu}^{2+}$  时,RIL 群体相对根长仅为原来的 58.8%,相对苗高也只有原来的 72.5%,经观察,此时虽尚无明显死苗迹象,但对于根系抑制程度很严重的株系,已难于继续生长而完成整个生活史。

表 1 珍汕 97B/密阳 46 的双亲和 RIL 在高浓度  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫下的苗期性状表现

Table 1 The tolerant to high  $\text{Cu}^{2+}$  stress at the seedling stage of parents and RIL population derived from ZS97B/MY46

$\text{Cu}^{2+}$ (mg/L)	性状 Trait	珍汕 97B ZS97B	密阳 46 MY46	RIL 群体 RIL population
100	RRL	78.5 ± 3.2	76.9 ± 2.6	76.6 ± 19.3
	RSH	85.5 ± 2.2	80.8 ± 2.8	82.9 ± 10.7
200	RRL	61.4 ± 2.5	57.4 ± 3.3	58.8 ± 21.2
	RSH	72.4 ± 2.6	75.2 ± 2.8	72.5 ± 11.2

注(Note): RRL—相对根长 Relative root length; RSH—相对苗高 Relative seedling height; 下同 Same as follows.

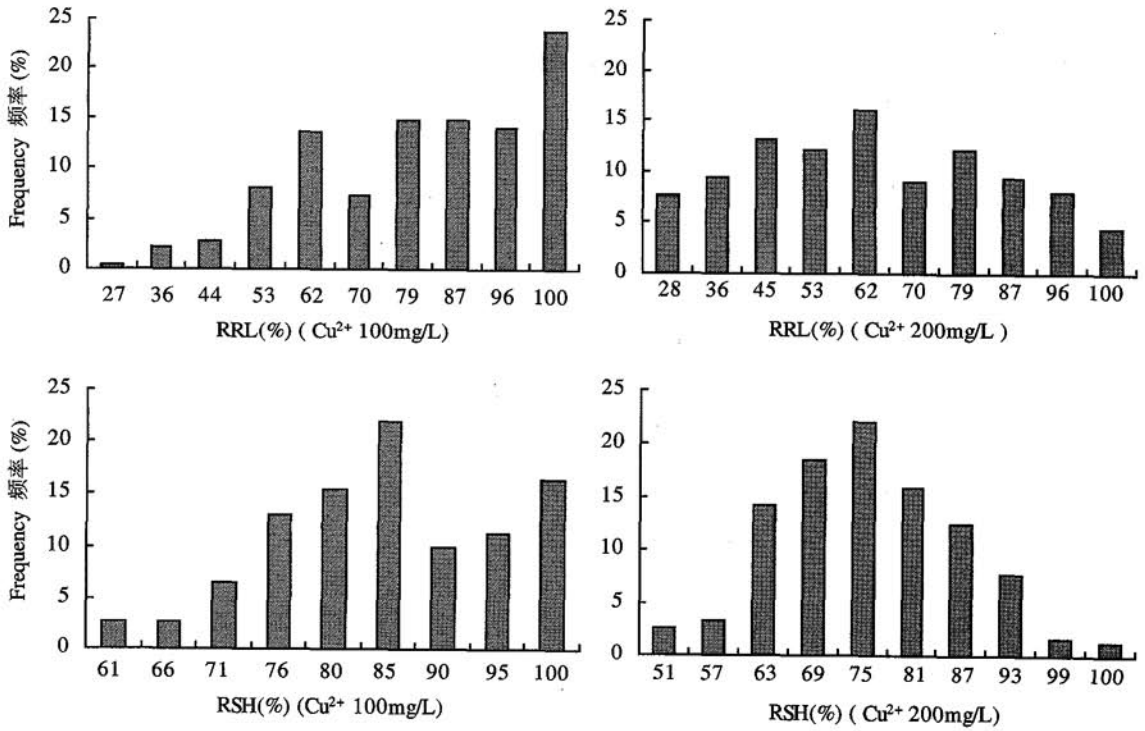


图 1 珍汕 97B/密阳 46 RIL 在高浓度 Cu<sup>2+</sup> 胁迫下的苗期性状表现分布图

Fig.1 The distribution of tolerant to high Cu<sup>2+</sup> stress at the seedling stage of the ZS97B/ MY46 RILs

2.2 苗期耐高 Cu<sup>2+</sup> 胁迫的 QTL 加性效应分析

从参试 RIL 群体中检测到苗期耐高 Cu<sup>2+</sup> 胁迫的加性效应 QTL 共 4 个(表 2 和图 2)。其中,以相对根长为指标,找到 2 个 QTL,即 *qRCC(r)6* (第 6 染色体)和 *qRCC(r)9* (第 9 染色体),LOD 值分别为 3.51 和 2.63,表型贡献率分别为 9.07% 和 6.37%。*qRCC(r)6* 是在较低 Cu<sup>2+</sup> (100 mg/L)胁迫试验中检测到,加性效应为 5.80%,有效基因来源于珍汕 97B;*qRCC(r)9* 则在较高 Cu<sup>2+</sup> (200 mg/L)胁迫试验中检测到,加性效应为 -5.45%,有效基因来自于密

阳 46。

以相对苗高为指标,也发现了 2 个主效应 QTL,即 *qRCC(s)1-2* (第 1 染色体)和 *qRCC(r)6-1* (第 6 染色体)。其中,*qRCC(s)1-2* 在 2 种 Cu<sup>2+</sup> 胁迫处理浓度试验中均检测到,其加性效应值也较接近,且有效基因均来自于珍汕 97B。*qRCC(r)6-1* 是在 Cu<sup>2+</sup> (200 mg/L)胁迫试验中检测到,加性效应为 -2.69%,有效基因来自于密阳 46,表型贡献率为 6.40%。

表 2 珍汕 97B/密阳 46 RIL 苗期耐高 Cu<sup>2+</sup> 胁迫 QTL 加性效应

Table 2 QTLs showing significant additive effects for tolerant to high Cu<sup>2+</sup> stress at the seedling stage of ZS97B/ MY46 RILs

Cu <sup>2+</sup> (mg/L)	性状 Trait	QTL	染色体 Chr.	区间 Interval	LOD 值 LOD score	加性效应 <sup>1)</sup> A <sub>i</sub>	贡献率 <sup>2)</sup> H <sub>ai</sub> <sup>2</sup> (%)
100	RRL	<i>qRCC(r)6</i>	6	RG138 ~ RM253	3.51	5.80	9.07
	RSH	<i>qRCC(s)1-2</i>	1	RG532 ~ RM81A	2.58	2.35	5.33
200	RRL	<i>qRCC(r)9</i>	9	RM242 ~ RZ12	2.63	-5.45	6.37
	RSH	<i>qRCC(s)1-2</i>	1	RG532 ~ RM81A	3.78	2.91	7.48
		<i>qRCC(r)6-1</i>	6	RM253 ~ RZ667	2.50	-2.69	6.40

1) A<sub>i</sub>, Additive effect, i. e., the genetic effect of the putative QTL when a paternal allele was replaced by a maternal allele;

2) H<sub>ai</sub><sup>2</sup>, Relative contributions to the phenotype variation due to A<sub>i</sub>.

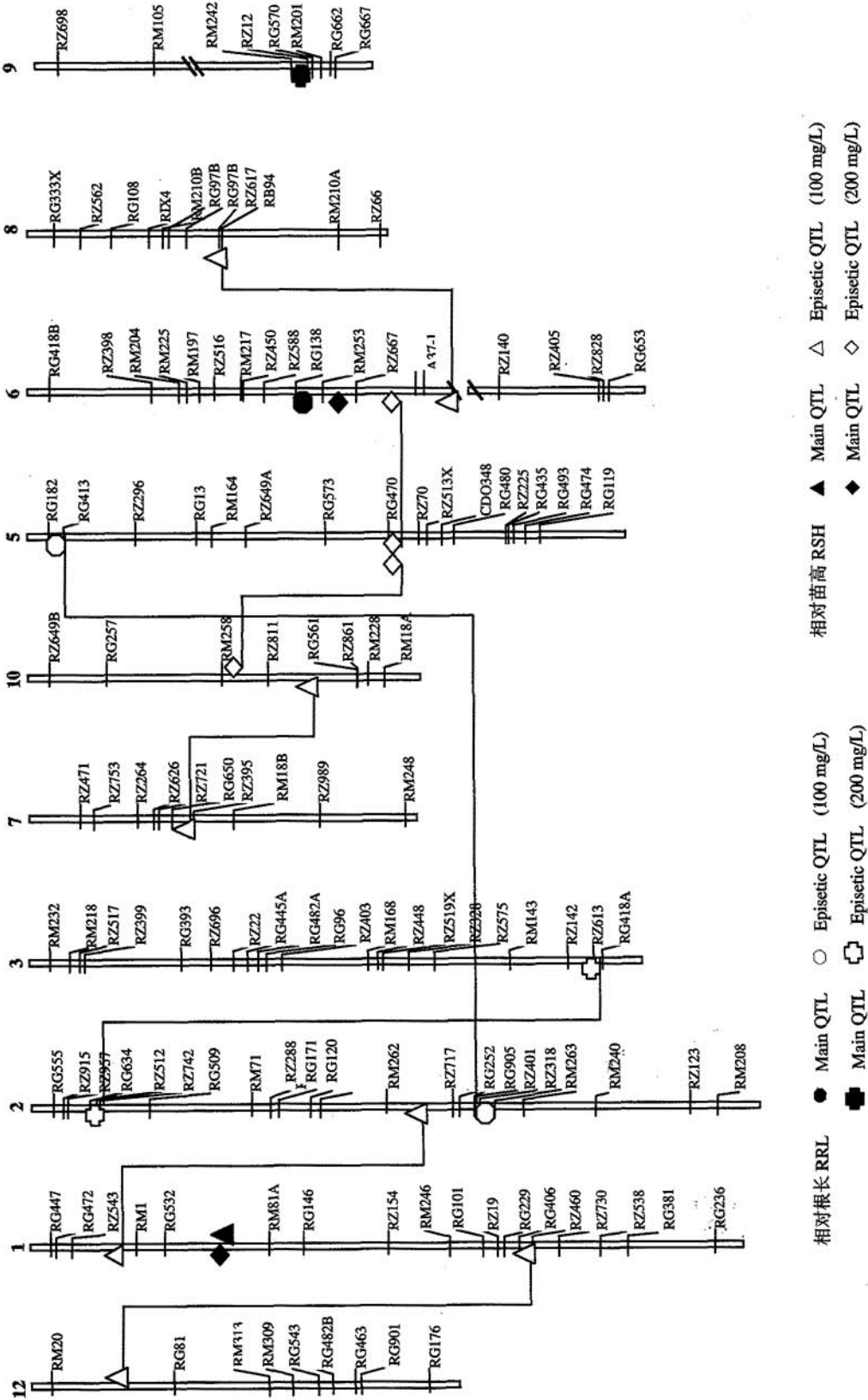


图 2 珍汕 97B/密阳 46 RIL 耐高 Cu<sup>2+</sup> 胁迫的 QTL 图谱

Fig. 2 QTLs for tolerant to high Cu<sup>2+</sup> stress at the seedling stage of ZS97B/MY46 RILS

### 2.3 苗期耐高 Cu<sup>2+</sup> 胁迫的 QTL 上位性效应分析

试验还检测到苗期耐高 Cu<sup>2+</sup> 胁迫的加性 × 加性上位性互作 8 对(表 3 和图 2)。其中,以相对根长为指标时,检测到 2 对,即 100 mg/L Cu<sup>2+</sup> 胁迫下检测到 1 对[*qRCC(r)2-2* 和 *qRCC(r)5* ],表型贡献率为 8.74%; 200 mg/L Cu<sup>2+</sup> 胁迫下也检测到 1 对[*qRCC(r)2-1* 和 *qRCC(r)3* ],表型贡献率为 9.10%; 这

2 对互作均表现为亲本型互作大于重组型互作。

以相对苗高为指标时,还检测到 6 对上位性互作,4 对是 100 mg/L Cu<sup>2+</sup> 胁迫试验中检测到,总表型贡献率达 29.07%; 2 对则是 200 mg/L Cu<sup>2+</sup> 胁迫试验中检测到,总表型贡献率为 17.85%。从而可见,水稻苗期耐高 Cu<sup>2+</sup> 胁迫,其上位性互作也起到较为重要作用。

表 3 珍汕 97B/密阳 46 RIL 苗期耐高 Cu<sup>2+</sup> 胁迫 QTL 上位性效应

Table 3 Significant digenic interactions for tolerant to high Cu<sup>2+</sup> stress at the seedling stage of ZS97B/ MY46 RILs

Cu <sup>2+</sup> (mg/L)	性状 Trait	QTL <sub>i</sub>	区间 Interval	QTL <sub>j</sub>	区间 Interval	LOD 值 LOD score	上位性效应 <sup>1)</sup> AA <sub>ij</sub>	贡献率 <sup>2)</sup> H <sup>2</sup> <sub>AAij</sub> (%)
100	RRL	<i>qRCC(r)2-2</i>	RZ401 ~ RZ318	<i>qRCC(r)5</i>	RG182 ~ RG413	3.74	5.70	8.74
	RSH	<i>qRCC(s)1-1</i>	RZ543 ~ RM1	<i>qRCC(s)2</i>	RM262 ~ RZ717	5.86	3.63	11.19
		<i>qRCC(s)1-3</i>	RG229 ~ RG406	<i>qRCC(s)1-2</i>	RM20 ~ RG81	3.17	-2.63	5.88
		<i>qRCC(r)6-3</i>	A37 ~ RZ140	<i>qRCC(s)8</i>	RZ617 ~ R1394	6.99	3.01	7.70
		<i>qRCC(s)7</i>	RZ721 ~ RG650	<i>qRCC(s)10</i>	RZ811 ~ RG561	3.93	2.25	4.30
200	RRL	<i>qRCC(r)2-1</i>	RG634 ~ RZ512	<i>qRCC(r)3</i>	RZ613 ~ RG418A	4.18	6.55	9.10
	RSH	<i>qRCC(s)5-1</i>	CD0348 ~ RG480	<i>qRCC(r)6-2</i>	B10B ~ A37	-15.74	-2.93	7.38
		<i>qRCC(s)5-2</i>	RG119 ~ RG346	<i>qRCC(s)10-1</i>	RM258 ~ RZ811	5.22	-3.49	10.47

1) AA<sub>ij</sub>: Additive × additive epistatic effect; Positive value, parental type > recombinant type; Negative value, parental type < recombinant type.

2) H<sup>2</sup><sub>AAij</sub>: Relative contributions to the phenotype variation due to AA<sub>ij</sub>.

## 3 讨论

铜是水稻生长不可缺少的微量元素之一,它参与光合作用中电子传递,又是呼吸链中细胞色素氧化酶的组分之一,因此,水稻生长发育离不开铜,铜的不足导致生长受抑制。但高浓度铜也会产生对水稻生长危害,这通常发生在一些受铜污染的地区。国外研究发现,土壤受铜轻度污染时,铜主要富集在表层土壤。这些表层土的铜,不能被生物降解,只能通过食物链富集,从而对人类产生危害。已有研究表明,尽管生长在受铜污染地区的水稻,在生长过程中能吸收大量铜,但这些铜通常大量积累在根、茎和叶中,糙米中铜的吸收量积累很少,原因可能与吸收的铜不容易向子粒转移有关。结果是种植水稻可通过其植株营养器官带走大量铜,而生产出的大米仍未超过食品卫生标准<sup>[2,10]</sup>。因而,选育耐铜水稻品种,并以它在生产粮食的同时逐步修复被铜污染的生态环境就具有良好的现实意义。

应用铜胁迫试验来进行 RIL 群体的耐铜性遗传研究,选择适当的培养方式和合适浓度是试验成败的关键。根据前人试验资料和预备试验,确定了 2

个浓度进行砂培试验。目的在于研究不同强度铜胁迫条件下,水稻苗期对铜毒害的遗传耐性机理上的差异。不同水稻材料耐铜胁迫的反应差异可能涉及因素很多,总不外乎是由于植株吸收过量铜而直接或间接对某些生理代谢过程产生了毒害作用。这种危害程度可能与不同个体所具有的遗传和生理特性有关,从而表现出对根长和苗高等形态抑制程度的差异。

试验以幼苗的相对根长和相对苗高作为研究苗期耐铜胁迫指标,此方法在国内外植物营养胁迫 QTL 定位研究中已很常用<sup>[11-12]</sup>。众所周知,控制和影响幼苗根长和苗高的基因很多,胁迫条件下用生长幼苗的根长和苗高进行 QTL 分析,其结果将难于确切反映耐营养胁迫的基因位点;而用相对根长和相对苗高进行分析,则可以在很大程度上检测出与耐营养胁迫有直接关系的 QTLs。本试验检测到 4 个与其耐铜性有关的 QTL 主效应位点和 8 对加性上位性互作,可见控制耐铜性遗传及其表达的复杂性。尽管试验找到了这些遗传基因对铜胁迫能起到一定的耐性作用,也估计了其耐铜性程度大小,但它们是通过何种生理代谢过程如提高幼苗体内的淀粉

酶活性、过氧化物酶活性、或脯氨酸含量等作用还是别的途径均有待于深入研究。

同时,从检测的结果看,控制苗期耐铜的 QTL 数量较多,每个 QTL 的作用又相对较小,还存在着较多加性上位性互作对耐铜起作用。因而,要从遗传上改良水稻品种耐铜性并非容易,通过常规有性杂交技术难于将这些分散的有利基因集中起来,只有通过分子标记辅助选育技术才有可能做到这点。

### 参 考 文 献:

- [1] 康立娟,赵明宪,赵成爱.铜对水稻的影响及迁移积累规律的研究[J].广东微量元素科学,1999,6(4): 43-44.  
Kang L J, Zhao M X, Zhao C A. Study on effect of Cu on rice and its migration accumulation and behaviour [J]. Guangdong Microelement Science, 1999, 6(4): 43-44.
- [2] 苏流坤,袁焕祥.土壤中铜、砷对水稻生长发育影响的研究[J].热带亚热带土壤科学,1997,6(3): 194-197.  
Su L K, Yuan H X. Effect of Cu and As on growth of rice [J]. Tropical and Subtropical Soil Science, 1997, 6(3): 194-197.
- [3] 马忠明,孙宝腾,李淑兰. Cu 对水稻幼苗某些生理特性的影响[J].临沂师范学院学报,2000,33(3): 41-42.  
Ma Z M, Sun B T, Li S L. The effects of Cu on some physiological characteristics of rice seedling [J]. Journal of Linyi teacher collage, 2000,33(3): 41-42.
- [4] 庄杰云,樊叶杨,吴建利,等.水稻 CMS-WA 育性恢复基因的定位[J].遗传学报,2001,28(2): 129-134.  
Zhuang J Y, Fan Y Y, Wu J L *et al.* Mapping genes for rice CMS-WA fertility restoration [J]. Acta Genetica Sinica, 2001, 28(2): 129-134.
- [5] 庄杰云,樊叶杨,吴建利,等.应用二种定位法比较不同世代水稻产量性状 QTL 的检测结果[J].遗传学报,2001,28(5): 458-464.  
Zhuang J Y, Fan Y Y, Wu J L *et al.* Comparison of the detection yield traits in different generation of the rice cross using two mapping approaches [J]. Acta Genetica Sinica, 2001, 28(5): 458-464.
- [6] Zhuang J Y, Fan Y Y, Rao Z M *et al.* Analysis on additive effects and additive-by-additive epistatic effects of QTLs for yield traits in a recombinant inbred line population of rice [J]. Theor. Appl. Genet, 2002, 105: 1137-1145.
- [7] Yoshida S, Forno D A, Cock J H. Laboratory manual for physiological studies of rice [M]. The Philippines: IRRI, Manila, 1971. 53-57.
- [8] 朱军.运用混合线性模型定位复杂数量性状基因的方法[J].浙江大学学报(自然科学版),1999,33(3): 327-335.  
Zhu J. Mixed model approaches of mapping genes for complex quantitative traits [J]. Journal of Zhejiang University (Natural Science), 1999, 33(3): 27-335.
- [9] Wang D L, Zhu J, Li Z K. Mapping QTLs with epistatic effects and QTL  $\times$  environment interactions by mixed linear model approaches [J]. Theor. Appl. Genet, 1999, 99: 1256-1264.
- [10] 胡正义,沈宏. Cu 污染土壤—水稻系统中 Cu 的分布特征[J].环境科学,2000,21(2): 62-65.  
Hu Z Y, Shen H. Distribution of Cu in soil—crop system polluted by Cu [J]. Environment Science, 2000, 21(2): 62-65.
- [11] Wu P, Liao C Y, Hu B *et al.* QTLs and epistasis for aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) at different seedling stages [J]. Theor. Appl. Genet, 2000, 100: 1295-1303.
- [12] Ni J J, Wu P, Senadhira D, Huang N. Mapping QTLs for phosphorus deficiency tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Theor. Appl. Genet., 1998, 97: 1361-1369.