

郑加兴, 张月雄, 覃宝祥, 等. 普通野生稻苗期耐冷性 QTLs 的互作和聚合效应分析[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(1): 29-36.

普通野生稻苗期耐冷性 QTLs 的互作和聚合效应分析

郑加兴^{1,2,3}, 张月雄^{1,4}, 覃宝祥^{1,2}, 邱永福^{1,2}, 蒙姣荣^{2,4}, 刘芳^{1,2},
马增凤³, 刘驰³, 李容柏^{1,2}, 陈保善^{2,4}

(1 广西大学农学院, 广西南宁 530005; 2 广西大学, 亚热带农业生物资源保护利用国家重点实验室, 广西南宁 530005;
3 广西农业科学院水稻研究所, 广西南宁 530007; 4 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530005)

摘要:【目的】普通野生稻 *Oryza rufipogon* Griff. 蕴含丰富的遗传多样性, 对其进行耐冷性数量性状位点 (QTLs) 的挖掘和效应分析, 可为水稻耐冷性分子育种提供宝贵的基因资源和理论支持. 【方法】以籼稻品种 9311 为受体亲本、普通野生稻品系 DP15 和 DP30 为供体亲本, 构建染色体片段代换系, 鉴定了 18 个水稻苗期耐冷 QTLs, 将其中分别包含 4 个耐冷 QTL 且遗传背景一致的 4 个代换系 qSCT-1-CSSL、qSCT-4-CSSL、qSCT-8-CSSL 和 qSCT-12-CSSL 分别两两杂交得到 2 个聚合系 (qSCT-1/qSCT-12)-CSSL 和 (qSCT-4/qSCT-8)-CSSL, 对聚合系中各耐冷 QTL 的互作效应及聚合效应进行研究. 【结果和结论】4 个耐冷 QTL 对水稻耐冷性有加性效应; 互作分析显示各耐冷 QTL 间在聚合系中均存在正向互作. 聚合效应在 qSCT-4 与 qSCT-8 间表现为 QTL 间明显的累加效应, 而 qSCT-1 与 qSCT-12 间聚合的累加效应不明显, 表现为 qSCT-12 对 qSCT-1 有上位作用.

关键词: 普通野生稻; 耐冷性; 数量性状位点 (QTLs); 染色体片段代换系; 聚合效应
中图分类号: S336 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2014)01-0029-08

Pyramiding and interacting effects of QTLs for cold tolerance at the seedling stage in common wild rice, *Oryza rufipogon* Griff.

ZHENG Jiaying^{1,2,3}, ZHANG Yuexiong^{1,4}, QIN Baoxiang^{1,2}, QIU Yongfu^{1,2}, MENG Jiaorong^{2,4},
LIU Fang^{1,2}, MA Zengfeng³, LIU Chi³, LI Rongbai^{1,2}, CHEN Baoshan^{2,4}
(1 College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530005, China; 2 State Key Laboratory of Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Guangxi University, Nanning 530005, China;
3 Institute of Rice Research, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China;
4 College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract:【Objective】There is a rich genetic diversity in common wild rice, *Oryza rufipogon* Griff.. Exploitation and effective analysis of cold tolerance quantitative trait loci (QTLs) from the wild rice could provide gene resources and theoretical support for rice cold tolerant molecular breeding. 【Method】In our previous study, a total of 18 cold tolerant QTLs distributing throughout all 12 chromosomes of rice genome were discovered using 230 chromosome segment substitution lines (CSSLs) which were developed from two crosses between the cultivar, 9311 as recipient parent and two lines of core resources of the common wild rice, DP15 and DP30 as donor parents. In this study, the interacting and pyramiding effects of four cold tolerant QTLs qSCT-1, qSCT-4, qSCT-8 and qSCT-12 which were previously identified in the CSSLs were

收稿日期: 2013-03-22 优先出版时间: 2013-11-07
优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20131107.1609.010.html>
作者简介: 郑加兴 (1978—), 男, 博士研究生, E-mail: jiaxing007@126.com; 通信作者: 李容柏 (1957—), 男, 研究员, 博士, E-mail: lirongbai@126.com; 陈保善 (1959—), 男, 教授, 博士, E-mail: chenyaoyao@gxu.edu.cn
基金项目: 国家自然科学基金 (30860142); 国家转基因生物新品种培育科技重大专项 (2009ZX08009-070B); 广西科学技术与开发项目 (桂科攻 1123001-3B); 广西大学科研基金项目 (XDZ 11008); 广西农业科学院基本业务费 (201005 基)

studied using two pyramiding lines, (qSCT-1/qSCT-12)-CSSL and (qSCT-4/qSCT-8)-CSSL obtained from two crosses between qSCT-1-CSSL and qSCT-12-CSSL, and qSCT-4-CSSL and qSCT-8-CSSL respectively against a uniform genetic background. 【Result and conclusion】The results indicated that four cold-tolerance QTLs with an additive effect could significantly improve the resistance to rice cold stress separately; there might exist positive interaction effect among these cold tolerance QTLs in pyramiding lines. There was a significant addition effect between qSCT-4 and qSCT-8, but no significant epistasis effect between qSCT-12 and qSCT-1.

Key words: *Oryza rufipogon* Griff.; cold tolerance; quantitative trait loci (QTLs); chromosome segment substitution lines; pyramiding effects

水稻的低温冷害在世界上许多国家均有发生,是全球性自然灾害。在水稻广泛种植的温带以及热带亚热带地区,冷害频繁发生,严重影响了水稻生产的稳定与发展,对世界粮食供给的安全与协调也产生了不小的影响。我国所有稻区均有冷害发生,每 2~3 年就发生一次较大冷害,每逢灾害年稻谷损失达 50 亿~100 亿 kg^[1]。在中国南方双季稻区早稻播种后,幼苗生长期常遇上寒潮天气,导致秧苗黄叶卷叶、生长迟钝、植株矮小,严重者甚至导致植株死苗,冷害不仅严重影响早稻的产量,而且还会延长早稻生育期而影响晚稻的生产计划,使得晚稻产量降低和稻米品质变差^[2]。为此,研究水稻耐冷性的遗传基础和遗传规律,对于提高水稻的耐冷能力、提高水稻产量等具有重要的理论和现实意义。

随着分子生物学相关技术的发展,对水稻耐冷性遗传分析和分子定位的研究已相继报道^[3-18]。但是由于不同研究者所用的遗传群体、分子标记和试验环境等方面的不同,研究结果差异较大,主要表现在不同群体、相同群体不同环境或不同鉴定方法所定位的耐冷 QTL 数目、染色体区域和效应大小有较大差异,导致这些 QTLs 难以被育种家利用。育种家最关心的是这些 QTL 的真实性、效应大小、不同 QTL 之间的互作关系以及它们潜在的育种价值。用分子标记辅助 QTL 聚合程序能够将感兴趣的 QTL 合并到一个群体中分析 QTLs 之间的作用方式及各自的效应大小,能够将多个有利的 QTLs 快速精确地聚合到一个个体中供育种利用^[19-22],从而有效提高育种效率和精度。

早期的聚合育种一般利用携带优良目的基因的材料进行杂交,其遗传背景复杂,虽然分子标记辅助选择可在短时间内实现多个基因的聚合,但非目的基因仍会出现大量分离,因此要获得多基因聚合系仍需经过常规的育种程序^[23]。染色体片段代换系 (Chromosome segment substitution line, CSSL) 是基因

组内部只有一个纯合染色体片段来自供体亲本、其他部分与受体亲本相同的品系^[24]。利用染色体片段代换系进行 QTLs 聚合研究,由于它消除了置换片段外其他基因区域的干扰,大大提高了对目标 QTLs 选择的精确性和效率。

郑加兴等^[25]以广西普通野生稻核心种质材料 DP15 和 DP30 为供体亲本、低温敏感的籼稻品种 9311 为受体亲本,通过连续回交和 SSR 分子标记辅助选择,建立了 2 套普通野生稻染色体片段代换系,利用这 2 套普通野生稻染色体片段代换系鉴定了 18 个耐冷 QTLs。本研究用分子标记辅助选择,选取 4 个遗传背景回复到轮回亲本 9311 背景较多的耐冷 QTL-CSSLs 分别进行杂交,获得了 2 个 QTLs 聚合系,分析了聚合系中耐冷 QTLs 间的作用方式及聚合效应。

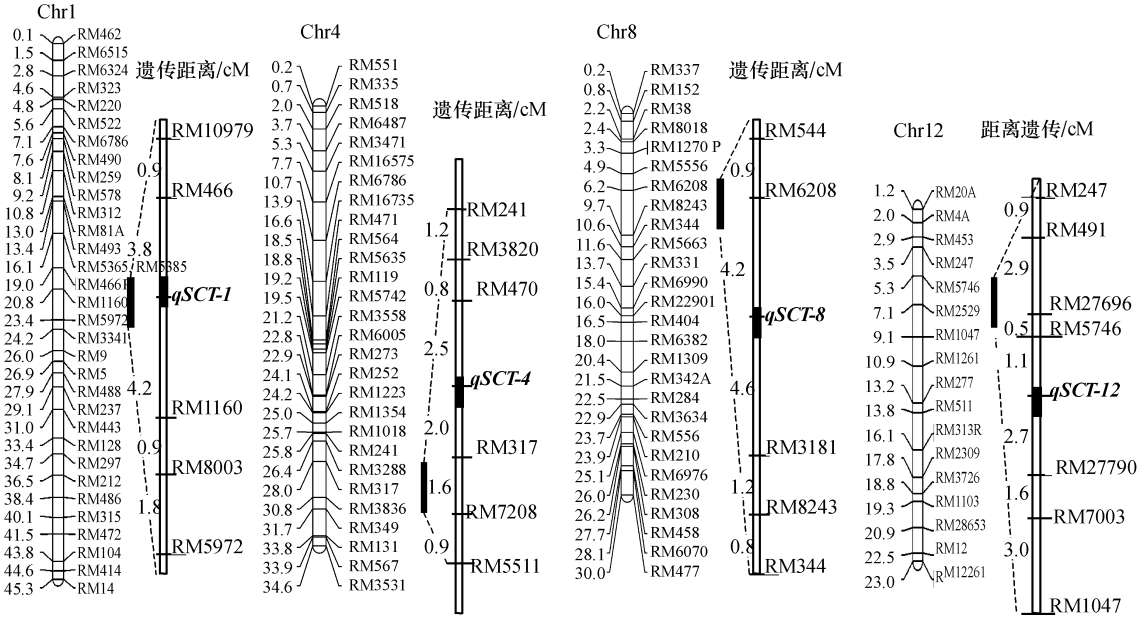
1 材料与方法

1.1 材料

受体亲本为对低温敏感的籼稻品种 9311,供体亲本为广西普通野生稻耐冷品系 DP15 和 DP30。通过与轮回亲本连续回交结合 SSR 分子标记辅助选择至 BC₄F₂ 世代,构建了一套由 230 个株系组成的、含导入片段相互重叠、最大程度覆盖野生稻基因组的普通野生稻染色体片段代换系。用这套染色体片段代换系 BC₄F₂ 代的 230 个株系进行苗期耐冷性筛选鉴定,获得 4 个耐冷性较强的株系 DC866、DC1006、DC1046 及 DC1081^[25]。用这 4 个耐冷株系建立作图群体,经连锁分析鉴定了 qSCT-1、qSCT-4、qSCT-8 和 qSCT-12 共 4 个耐冷 QTLs,与其相连锁的最近分子标记分别是位于第 1 染色体的 RM466、第 4 染色体的 RM317、第 8 染色体的 RM6208 和第 12 染色体的 RM5746,遗传距离分别为 3.8、2.0、4.2 和 1.1 cM (图 1)。利用这些连锁标记通过分子标记辅助选择,在 BC₄F₂ 分离群体中含有目标耐冷 QTL 的单株继续与轮回亲本 9311 回交并自交,产生 BC₅F₂ 群体,在

BC₃F₂ 群体中选择目标耐冷 QTL 位点纯合的单株自交,获得目标耐冷 QTL 位点纯合的 BC₅F₃ 株系 qSCT-1-CSSL、qSCT-4-CSSL、qSCT-8-CSSL 和 qSCT-12-CSSL。另外,在 BC₅F₂ 代利用分子标记辅助选择

具有目标耐冷 QTL 的纯合单株进行 2 个 QTLs 间的杂交聚合,聚合后的 F₂ 世代再通过分子标记检测选择 2 个目标 QTLs 位点均纯合的单株自交构建纯合 QTL-CSSL 聚合系。



粗黑色线条表示染色体代换片段。

图1 4个苗期耐冷性 QTLs 的分子图谱

Fig. 1 Linkage maps of four cold tolerant QTLs at the seedling stage

1.2 苗期耐冷性鉴定方法

种子在清水中泡种 48 h 后在人工气候箱催芽至根长 2 cm,播种于 44 cm × 34 cm 的托盘中. 托盘中的泥土取自稻田,充分混合使土质均一,每托盘均匀地播 12 行,每行 30 株,中间 2 行设置为对照,对照品种分别为冷敏感的籼稻受体亲本 9311 和耐冷粳稻品种藤坂 5 号. 幼苗在温室培育至“3 叶”或“3 叶 1 心”期转移至人工气候箱中冷处理,设置条件为温度 10 ℃、湿度 70%,光照 12 000 lx,白天/黑夜各 12 h,连续处理 5 d 后,转移至 26 ℃气候箱恢复 7 d. 统计活苗数和死亡苗数并计算活苗率,活苗率 = 活苗数/总苗数 × 100%. 重复 3 次.

水稻苗期耐冷级别鉴定参考国际水稻所的分级方法^[26]略有改动. 1 级:所有叶片青绿或接近青绿;2 级:第 1 叶枯黄,其余叶片青绿;3 级:第 1 叶枯黄,第 2 叶 1/2 叶片枯黄,第 3 和第 4 叶片青绿;4 级:第 1 叶和第 2 叶片枯黄,第 3 和第 4 叶片青绿;5 级:第 1 叶、第 2 叶和第 3 叶 1/4 叶片枯黄,第 4 叶片青绿;6 级:第 1 叶、第 2 叶和第 3 叶 1/2 叶片枯黄,第 4 叶青绿;7 级:第 1、第 2 叶和第 3 叶 1/2 叶片枯黄,或第 1、第 3 叶和第 2 叶 1/2 叶片枯黄,第 4 叶 1/4 叶片枯黄;8 级:第 1、第 2、第 3 和第 4 叶 1/4 叶片枯黄;9 级:苗全部死亡. 1 ~ 6 级的为耐冷材料;7 ~ 9 级的为

冷敏感材料。

1.3 SSR 标记引物

参照 McCouch 等^[27] 2002 年公布的 2 240 对新增 SSR 标记,从中选取覆盖水稻全基因组的 715 个 SSR 标记,合成相应引物(引物序列见 <http://www.gramene.org>),对 2 个亲本进行多态性分析. 根据亲本间多态性分析结果选取多态性好、在水稻遗传图谱上均匀分布的 232 个标记作为构建染色体单片段代换系(CSSL)的全基因组检测标记,标记间的平均遗传距离是 9.83 cM.

1.4 DNA 提取、PCR 反应及电泳分析

每个单株样本取约 5 mg 叶片放入 2.0 mL 离心管中用莱驰 MM400 (Retsch, Germany) 组织研磨仪磨碎. DNA 提取参照《精编分子生物学实验指南》中的 CTAB 制备方法^[28]. PCR 反应体系:0.1 μL 5 U/μL Taq DNA 聚合酶,2 μL 模板 DNA,1 μL 10 μmol/L 引物,1 μL 2 mmol/L dNTP,1 μL 10 × Buffer (100 μmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L KCl, 15 mmol/L MgCl₂, 0.1 g/L 的明胶, pH8.3),用 ddH₂O 补足 10 μL. PCR 扩增反应条件:先 95 ℃ 预变性 5 min;然后 94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,反应 30 个循环;最后 72 ℃ 延伸 5 min. PCR 扩增产物加入 6 × Loading Buffer 后在 70 g/L 的聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 中进

行电泳,银染检测.

1.5 数据分析

采用 SPSS17.0 统计分析软件分析数据. 通过 *t* 测验比较染色体片段代换系与轮回亲本 9311 之间耐冷性的差异,统计测验时以亲本 9311 的 3 个重复观察值合并为 1 个群体作对照, $P\leq 0.001$ 时认为代换片段上有耐冷 QTL 存在. 参照 Eshed 和 Zamir^[29] 的分析方法估算各个 QTL 的加性效应,加性效应值 = (染色体片段代换系的表型值 - 亲本 9311 的表型值)/2. QTL 的命名遵循 McCouch 等^[30] 制定的原则.

对聚合系 F₂ 世代 2 个 QTLs 2 种基因型植株的耐冷级别差异显著性采用双因素方差分析和 Duncan's 多重比较. 对聚合系与 QTL-CSSLs 植株间的耐冷性差异显著性采用 Duncan's 多重比较分析.

2 结果与分析

2.1 QTL-CSSLs 耐冷性验证

利用已鉴定的 *qSCT-1*、*qSCT-4*、*qSCT-8* 和 *qSCT-12* 这 4 个耐冷 QTLs 通过分子标记辅助轮回选择在 BC₃F₃ 代获得 4 个耐冷 QTL-CSSLs 纯合家系 *qSCT-1*-CSSL、*qSCT-4*-CSSL、*qSCT-8*-CSSL 和 *qSCT-12*-CSSL. 将这 4 个 QTL-CSSLs 各培养 300 株幼苗至“3 叶”期,以轮回亲本 9311 做对照进行苗期耐冷性鉴定. 结果显示:4 个 QTL-CSSLs 的活苗率均显著高于轮回亲本 9311 ($P\leq 0.001$),表明 4 个 QTL-CSSLs 所包含的 QTLs 对耐冷性有很强加性效应(表 1). 亲本 9311 几乎所有植株已枯黄,藤坂 5 号植株仍然保持青绿,4 个 QTL-CSSLs 植株大部分叶片仍保持青绿(图 2).

这些结果与之前 QTLs 鉴定的结果基本一致,稍有不同的是之前鉴定耐冷效应并非最大的 *qSCT-12* 发展来的纯系 *qSCT-12*-CSSL 在 4 个 QTL-CSSLs 中表现出最强的耐冷性,可能与其在回交过程中排除了某些对耐冷性有负效应的背景 QTL 有关. 鉴定结果再次验证了 4 个耐冷 QTLs 有较强的耐冷效应,由其发展来的 4 个 QTL-CSSLs 是分子标记辅助选择聚合育种良好材料.

2.2 背景分析

选取均匀覆盖水稻全基因组的 144 个 SSR 标记,检测 4 个耐冷 QTL-CSSLs 的背景(引物序列见 <http://www.gramene.org>). 从图 3 可以看出,4 个耐冷代换系 *qSCT-1*-CSSL、*qSCT-4*-CSSL、*qSCT-8*-CSSL 和 *qSCT-12*-CSSL 基因组在亲本 9311 的背景均超过 95%,除目标 QTL 区段外,其他残留野生稻片段均少于 5%. 在 *qSCT-1*-CSSL 中的第 11 染色体有 3.6 Mb 其他残留片段,在 *qSCT-12*-CSSL 中的第 2 和第 4 染色体分别有 1.7 Mb 和 2.6 Mb 其他残留片段,在 *qSCT-4*-CSSL 中的第 6 染色体有 2.9 Mb 其他残留片段,在 *qSCT-8*-CSSL 中的第 7 染色体有 3.3 Mb 其他残留片段. 4 个耐冷 QTL-CSSLs 经冷处理鉴定和分子标记检测残留片段的基因型,结合耐冷表型和基因型结果,用 QTL 分析软件 Windows QTL Cartographer V2.5 对 4 个耐冷代换系目标片段以外的其他残留片段进行 QTL 连锁分析发现,4 个耐冷代换系的其他残留片段与耐冷性不相关. 这表明,4 个耐冷 QTL-CSSLs 的残留片段对耐冷 QTL 的表达没有影响.

表 1 4 个 QTL-CSSLs 上检测出的耐冷性 QTL 的耐冷效应
Tab.1 Additive effects of QTLs for cold tolerance detected using CSSL of rice

材料	QTL	染色体位置	代换区间	活苗率 ¹⁾ /%	加性效应	显著性(<i>P</i>)
9311				13.2 ± 3.2		
qSCT-1-CSSL	<i>qSCT-1</i>	1	RM466 – RM5972	57.9 ± 3.7	0.224	0.94 × 10 ⁻⁴
qSCT-4-CSSL	<i>qSCT-4</i>	4	RM241 – RM317	47.6 ± 4.1	0.172	3.28 × 10 ⁻⁴
qSCT-8-CSSL	<i>qSCT-8</i>	8	RM6208 – RM8243	47.4 ± 6.4	0.171	1.20 × 10 ⁻⁴
qSCT-12-CSSL	<i>qSCT-12</i>	12	RM5746 – RM1047	62.1 ± 2.5	0.245	0.58 × 10 ⁻⁴

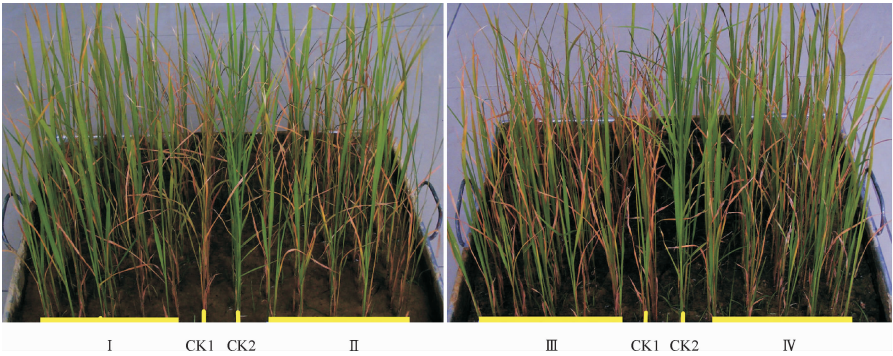
1) 活苗率为平均值 ± 标准差.

2.3 互作分析

根据 4 个耐冷 QTLs 所在代换片段两端标记的基因型,通过分子标记辅助选择,在代换系 BC₅F₂ 群体中选择目标代换片段均纯合的 *qSCT-1*-CSSL 与 *qSCT-12*-CSSL 杂交获得聚合系 (*qSCT-1*/*qSCT-12*)-CSSL,目标代换片段均纯合的 *qSCT-4*-CSSL 与 *qSCT-8*-CSSL 杂交获得聚合系 (*qSCT-4*/*qSCT-8*)-CSSL. 将 2 个聚合系 (*qSCT-1*/*qSCT-12*)-CSSL 和 (*qSCT-4*/*qSCT-8*)-CSSL 的 F₂ 群体分别培养 312 和 306 株幼苗,至“3 叶”期经冷处理鉴定分别获得 126 和 102 株活苗,用水稻苗期耐冷级别鉴定法统计各存活单株的耐冷级别,利用距离 4 个耐冷 QTL *qSCT-1*、*qSCT-4*、*qSCT-8* 和 *qSCT-12* 最近的 SSR 标记 RM466、RM317、RM6208 和 RM5746 检测 2 个聚合系各种基因型的单株数,结果见表 2. 结合 2 个聚合系各自 F₂ 的基因型及其相应平均耐冷级别,用双因素方差分析

<http://xuebao.scau.edu.cn>

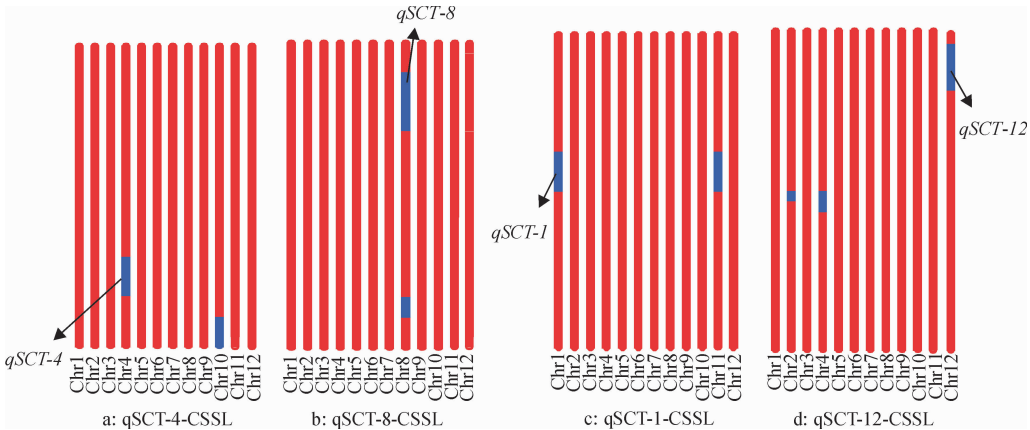
这些结果与之前 QTLs 鉴定的结果基本一致,稍有不同的是之前鉴定耐冷效应并非最大的 *qSCT-12* 发展来的纯系 *qSCT-12*-CSSL 在 4 个 QTL-CSSLs 中表现出最强的耐冷性,可能与其在回交过程中排除了某些对耐冷性有负效应的背景 QTL 有关. 鉴定结果再次验证了 4 个耐冷 QTLs 有较强的耐冷效应,由其发展来的 4 个 QTL-CSSLs 是分子标记辅助选择聚合育种良好材料.



CK1:冷敏感的籼稻品种 9311;CK2:耐冷粳稻品种藤坡 5 号; I :qSCT-12-CSSL; II :qSCT-1-CSSL; III :qSCT-8-CSSL; IV :qSCT-4-CSSL.

图 2 4 个耐冷 QTL-CSSLs 和轮回亲本 9311 的耐冷性表型

Fig. 2 Phenotypes of the parents and four QTL-CSSLs for cold tolerance



红色代表 9311 纯合等位基因;蓝色代表野生稻纯合等位基因.

图 3 4 个耐冷 QTL-CSSLs 遗传背景

Fig. 3 Graphical genotypes of cold tolerance QTL-CSSLs

表 2 聚合系 F₂ 群体各种基因型的单株数

Tab. 2 The individual plant number of different genotypes in two pyramiding lines

聚合系名称	各基因型的单株数 ¹⁾ /株								合计
	AaBb	AABb	AaBB	AABB	AAbb	aaBB	Aabb	aaBb	
(qSCT-1/qSCT-12)-CSSL	42	22	23	14	8	7	5	5	126
(qSCT-4/qSCT-8)-CSSL	38	21	18	12	5	4	2	2	102

1) 在聚合系 (qSCT-1/qSCT12)-CSSL 中 Aa 代表 *qSCT-1* 的基因型,Bb 代表 *qSCT-12* 的基因型;在聚合系 (qSCT-4/qSCT8)-CSSL 中 Aa 代表 *qSCT-4* 的基因型,Bb 代表 *qSCT-8* 的基因型.

($P < 0.05$) 方法分析 *qSCT-1* 与 *qSCT-12* 之间的互作 (图 4). 从图 4a 可以看出,在聚合系 (qSCT-1/qSCT-12)-CSSL 中,当 *qSCT-1* 是野生稻纯合等位基因时, *qSCT-12* 是野生稻纯合等位基因和杂合等位基因间均值存在显著差异;而当 *qSCT-12* 是野生稻纯合等位基因时, *qSCT-1* 是野生稻纯合等位基因与杂合等位基因之间均值没有显著差异. 同样用双因素方差分析 ($P < 0.05$) 对 *qSCT-4* 与 *qSCT-8* 进行互作分析, 从图 4b 可以看出,在聚合系 (qSCT-4/qSCT-8)-CSSL 中,当 *qSCT-4* 是野生稻纯合等位基因时, *qSCT-8* 是野生稻纯合等位基因与杂合等位基因间均值存在显著差异;同样,当 *qSCT-8* 是野生稻纯合等位基因时,

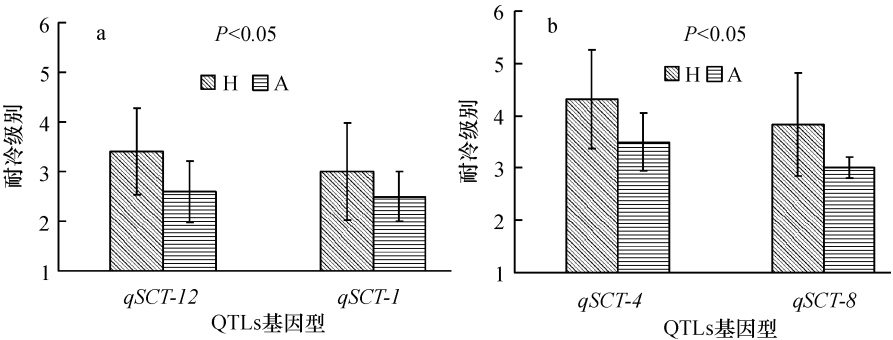
qSCT-4 是野生稻纯合等位基因与杂合等位基因间均值有显著差异.

2.4 聚合效应分析

将 4 个耐冷 QTL-CSSLs 及其相对应的聚合系各培养 400 株幼苗至“3 叶”期,以 9311 为对照经冷处理鉴定,统计活苗率,结果见图 5. 由图 5 可见,2 个聚合系 (qSCT-4/qSCT-8)-CSSL 和 (qSCT-1/qSCT-12)-CSSL 的活苗率分别为 60.3% 和 62.8%,4 个耐冷代换系 qSCT-1-CSSL、qSCT-4-CSSL、qSCT-8-CSSL 和 qSCT-12-CSSL 的活苗率分别为 57.5%、47.2%、47.1% 和 61.6%. 对各家系的活苗率进行方差分析和多重比较的结果表明,4 个耐冷 QTL-CSSLs 及 2 个聚合系的活

苗率均显著高于受体亲本 9311,可见 4 个耐冷 QTLs 对提高水稻苗期耐冷性有很大作用. 比较 4 个耐冷 QTL-CSSLs 的耐冷性差异,qSCT-1-CSSL 与 qSCT-12-CSSL 间以及 qSCT-4-CSSL 与 qSCT-8-CSSL 间均没有显著差异,但 qSCT-1-CSSL 或 qSCT-12-CSSL 的活苗率显著高于 qSCT-4-CSSL 或 qSCT-8-CSSL. 聚合系 (qSCT-4/qSCT-8)-CSSL 的活苗率显著高于 qSCT-4-CSSL 和 qSCT-8-CSSL. 聚合系 (qSCT-1/qSCT-12)-

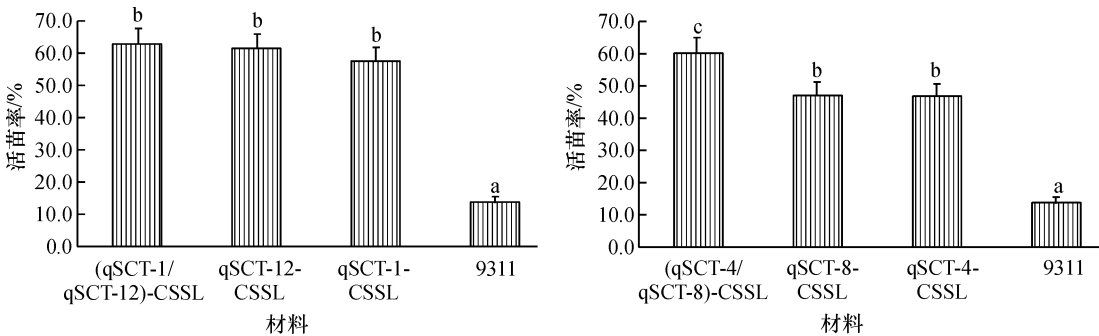
CSSL 与 qSCT-1-CSSL 及 qSCT-12-CSSL 的活苗率没有显著差异. 有意思的是 qSCT-4-CSSL 与 qSCT-8-CSSL 聚合而得的 (qSCT-4/qSCT-8)-CSSL 活苗率与 (qSCT-1/qSCT-12)-CSSL 的活苗率没有明显差异. 说明耐冷 QTLs *qSCT-4* 与 *qSCT-8* 的聚合效应明显,表现为 QTLs 间很强的累加效应,显著提高了其聚合系 (qSCT-4/qSCT-8)-CSSL 的耐冷性;而 *qSCT-1* 与 *qSCT-12* 的聚合系 (qSCT-1/qSCT-12)-CSSL 耐冷性提高并不明显.



A 代表野生稻纯合等位基因;H 代表杂合基因型.

图 4 聚合系 F₂ 群体耐冷 QTLs 不同基因型的耐冷级别

Fig. 4 Differences in cold tolerance scores for different genotypes in F₂ populations derived from crosses between QTL-CSSLs



柱子上凡是有一个相同小写字母者,表示差异不显著(P>0.05, Duncan's 法).

图 5 耐冷 QTL-CSSLs 及聚合系的活苗率

Fig. 5 Survival rates of QTL-CSSLs and pyramiding lines for cold tolerance

3 讨论与结论

传统的育种方法要将分散于各个种质中的多个优良基因聚合于同一个体来培育优良新品种的过程缓慢、难度较大,而将分子标记技术与常规育种相结合进行作物多基因(QTL)聚合的育种方法更加快速、高效. 随着作物分子图谱的密度不断加大,以及越来越多的目标性状基因(QTL)的定位与克隆,分子标记辅助多基因聚合正日益体现出巨大的优势和应用前景^[22,31-33]. 特别是在抗病虫方面,分子标记辅助选择多基因(QTL)聚合,能同时有效地将多个抗性基因(QTL)聚合于同一个体,能有效提高作物抗性、拓宽抗谱、获得持久抗性^[34-38]. 在水稻耐冷 QTLs 定位方面已有不少研究报道^[3-18],其中 Saito 等^[10]用

耐冷粳稻品种 Silewah 和冷敏感商业品种 Hokkai241 杂交构建的近等基因系在第 4 染色体长臂 OSR15-RM317 区域内定位并已克隆的一个抽穗期耐冷 QTL *Ctb1* 与本研究定位的耐冷 QTL *qSCT-4* 处于同一区间内. Kuroki 等^[13]用耐冷品系 Hokkai-PL9 和冷敏感品系 Hokkai287 构建近等基因系将一个抽穗期耐冷 QTL *qCTB8* 定位在第 8 染色体短臂 RM5647-RM9028 区域内,与本研究定位的耐冷 QTL *qSCT-8* 所在区间很接近. Andaya 等^[12]用耐冷粳稻品种 M202 与冷敏感籼稻品种 IR50 杂交构建的 F₅~F₁₀重组自交系在第 12 染色体 BAC 克隆 OSJNBb0071117 上 87 kb 区域内定位的一个苗期耐冷 QTL *qCTS12* 与本研究定位的耐冷 QTL *qSCT-12* 所在区间很接近. 前人已报道的耐冷 QTLs 往往只是对单个 QTL 的遗

传效应进行分析,没有将多个耐冷 QTLs 聚合到一个重组体中,分析各 QTL 相互间的作用方式及其聚合效应. 本研究首次将普通野生稻耐冷 QTLs 聚合到冷敏感籼稻品种 9311 背景中,分析各 QTL 相互间的作用方式及其聚合效应,为研究 QTL 间互作机理及 QTL 聚合育种打下一定的理论基础.

数量性状的复杂性是基因组内多基因相互作用的结果,要明晰各基因间的相互作用,就要排除背景中控制或影响相同性状的基因的干扰,在一致的遗传背景下加以分析,才能更清楚地认识各 QTL 间的作用方式. 因此,我们不仅需要了解各个 QTL 所能提供的耐冷性效应,而且需要对不同 QTL 之间的互作方式有清晰地认识. 只有这样,育种家才能有目的地向需要改良的品种导入目标 QTL,以提高育种效率. 在本研究聚合系(qSCT-1/qSCT-12)-CSSL 的 F_2 分离群体中,qSCT-1 和 qSCT-12 是野生稻纯合等位基因或是杂合等位基因对提高耐冷性均有一定作用,但当 2 个 QTL 都是野生稻纯合等位基因比是杂合等位基因其聚合系耐冷性级别要低,即耐冷效应更强,表现出一定的正向互作效应. 在聚合系(qSCT-4/qSCT-8)-CSSL 的 F_2 分离群体中,当 qSCT-4 和 qSCT-8 是野生稻纯合等位基因或是杂合等位基因均能够提高聚合系的耐冷性,而当 2 个 QTL 都是野生稻纯合等位基因其聚合系耐冷性级别显著低于杂合等位基因,即耐冷效应更强,QTL 间的互作方式表现为显著正向互作效应.

本研究所涉及的 2 个聚合系中不同的 QTLs 两两组合的形式其聚合效应存在明显差异. qSCT-4 与 qSCT-8 聚合的效应明显,表现为 QTLs 间明显的正向累加效应,聚合系(qSCT-4/qSCT-8)-CSSL 的耐冷性显著提高,推测这 2 个耐冷 QTLs 可能属于不同作用途径的 2 个基因,且相互间作用方式可能存在正向互补,在育种上可以优先考虑把这 2 个 QTLs 聚合到一起产生强耐冷的品系;而 qSCT-1 与 qSCT-12 的聚合效应并不明显,其聚合系(qSCT-1/qSCT-12)-CSSL 的耐冷表型接近于 qSCT-12-CSSL 的表型值,没有发现明显的累加效应,推测这 2 个耐冷 QTLs 可能属于相同作用途径的 2 个基因,一个效应强的 QTL 掩盖了另一个 QTL 的效应,表明 qSCT-12 对 qSCT-1 有上位作用,预示在育种上不适合将这 2 个 QTLs 单独聚合到一起. 为了更全面地认识耐冷 QTLs 间的作用方式,我们配制了更多的不同 QTLs 间聚合以及多个 QTLs 聚合在一起的聚合系,为研究耐冷 QTLs 的作用机制及耐冷育种打下良好的材料基础.

4 个耐冷 QTL 在各自的聚合系中相互间有普遍

的互作关系,互作方式表现为正向互作效应,能够有效提高聚合系的耐冷性. 2 个聚合系中,qSCT-4 与 qSCT-8 的聚合效应明显,表现为 QTLs 间明显的累加效应;而 qSCT-1 与 qSCT-12 聚合后 QTLs 间的累加效应不明显,qSCT-12 对 qSCT-1 有上位作用. 正向累加效应的耐冷 QTLs 间适于优先聚合产生强耐冷品系.

参考文献:

- [1] 黄力士,刘凌峰,刘之熙. 稻耐冷性研究进展与前景[J]. 湖南农业科学, 2008(1):3-6.
- [2] 詹庆才,曾曙珍,熊伏星,等. 水稻苗期耐冷性 QTLs 的分子定位[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 2003, 29(1):7-11.
- [3] NAGAMINE T, NAKAGAHARA M. Genetic variation of chilling injury at seedling stage in rice, *Oryza sativa* L. [J]. Japan J Breed, 1990, 40(4):4549-4551.
- [4] BERTIN P, KINET J M, BOUHARMONT J. Evaluation of chilling sensitivity in different rice varieties. Relationship between screening procedures applied during germination and vegetative growth[J]. Euphytica, 1996, 89(2):201-210.
- [5] QIAN Qian, ZENG Dali, HE Ping, et al. QTL analysis of the rice seedling cold tolerance in a double haploid population derived from anther culture of a hybrid between indias and japonica rice[J]. Chinese Sci Bull, 2000, 45(5):448-453.
- [6] KIM K M, SOHN J K, CHUNG I K. Analysis of OTP8511 RAPD fragments closely linked with cold sensitivity at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Mol Cell, 2000, 10(4):382-385.
- [7] ANDAYA V C, MACKILL D J. QTLs conferring cold tolerance at the booting stage of rice using recombinant inbred lines from a japonica $\times$ indica cross[J]. Theor Appl Genet, 2003, 106: 1084-1090.
- [8] LIU Fengxia, SUN Chuanqing, TAN Lubin, et al. Identification and mapping of quantitative trait loci controlling cold-tolerance of Chinese common wild rice (*O. rufipogon* Griff.) at booting to flowering stages[J]. Chinese Sci Bull, 2003, 48(19):2068-2071.
- [9] ANDAYA 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] SAITO K, HAYANO-SAITO W, MARUYAMA-FUNATSUKI Y, et al. Physical mapping and putative candidate gene identification of a quantitative trait locus Cth1 for cold tolerance at the booting stage of rice[J]. Theor Appl Genet, 2004, 109(3):515-522.
- [11] ZHANG Zhihong, SU Li, CHEN Wei, et al. A major QTL conferring cold tolerance at early seedling stage using re-

- combinant inbred lines of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant Sci, 2005, 168(2): 527-53.
- [12] ANDAYA V C, TAI T H. Fine mapping of the qCTS12 locus, a major QTL for seedling cold tolerance in rice [J]. Theor Appl Genet, 2006, 113(3): 467-475.
- [13] KUROKI M, SAITO K, MATSUBA S, et al. A quantitative trait locus for cold tolerance at the booting stage on rice chromosome 8 [J]. Theor Appl Genet, 2007, 115(5): 93-600.
- [14] LOU Qiaojun, CHEN Liang, SUN Zongxiu, et al. A major QTL associated with cold tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Euphytica, 2007, 158(1): 87-94.
- [15] JIANG Ling, XUN Meimei, WANG Jiankang, et al. QTL analysis of cold tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.) using recombination inbred lines [J]. J Cereal Sci, 2008, 48(1): 173-179.
- [16] KOSEKI M, NORIYUKI K, YONEBAYASHI S, et al. Identification and fine mapping of a major quantitative trait locus originating from wild rice, controlling cold tolerance at the seedling stage [J]. Mol Genet Genomics, 2010, 284(1): 45-54.
- [17] SUH J P, JEUNG J U, LEE J I, et al. Identification and analysis of QTLs controlling cold tolerance at the reproductive stage and validation of effective QTLs in cold-tolerant genotypes of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Theor Appl Genet, 2010, 120(5): 985-995.
- [18] SUH J P, LEE C K, LEE J H, et al. Identification of quantitative trait loci for seedling cold tolerance using RILs derived from a cross between japonica and tropical japonica rice cultivars [J]. Euphytica, 2012, 184(1): 101-108.
- [19] CHEN Sheng, LIN Hongxuan, ZHANG Qifa. Improvement of bacterial blight resistance of 'Minghui 63', an elite restorer line of hybrid rice, by molecular marker-assisted selection [J]. Crop Sci, 2000, 40: 239-244.
- [20] ZHOU P H, TAN Y F, HE Y Q, et al. Simultaneous improvement for four quality traits of Zhenshan 97, an elite parent of hybrid rice, by molecular marker-assisted selection [J]. Theor Appl Genet, 2003, 106(2): 326-331.
- [21] ASHIKARI M, MATSUOKA M. Identification, isolation and pyramiding of quantitative trait loci for rice breeding [J]. Trends Plant Sci, 2006, 11(7): 344-350.
- [22] ZONG Guo, WANG Ahong, HAN Bin, et al. A pyramid breeding of eight grain-yield related quantitative trait loci based on marker-assistant and phenotype selection in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. J Genet Genomics, 2012, 39(7): 335-350.
- [23] 刘冠明, 李文涛, 张桂权, 等. 水稻单片段代换系代换片段的 QTL 鉴定 [J]. 遗传学报, 2004, 31(12): 1395-1400.
- [24] 曾瑞珍, 施军琼, 张桂权, 等. 籼稻背景的单片段代换系群体的构建 [J]. 作物学报, 2006, 32(1): 88-95.
- [25] 郑加兴, 李容柏, 陈保善, 等. 普通野生稻 (*Oryza rufipogon* Griff.) 苗期耐冷性 QTL 的鉴定和分子定位 [J]. 中国水稻科学, 2011, 25(1): 52-58.
- [26] IRRI. Standard evaluation system for rice [M]. Manila: IRRI, 1988.
- [27] MCCOUCH S R, TEYTELMA N L, XU Y B, et al. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.) [J]. DNA Res, 2002, 9 (Suppl.): 257-279.
- [28] 奥斯伯 F, 金斯顿 R E, 塞得尔 J G, 等. 精编分子生物学实验指南 [M]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 2001: 37-38.
- [29] ESHED Y, ZAMIR D. An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL [J]. Genetics, 1995, 141: 1147-1162.
- [30] MCCOUCH S R, CHO Y G, YANO M, et al. Report on QTL nomenclature [J]. Rice Genet Newslett, 1997, 14: 11-13.
- [31] ASHIKARI M, SAKAKIBARA H, LIN S, et al. Cytokinin oxidase regulates rice grain production [J]. Science, 2005, 309: 741-745.
- [32] TWARDOW S M, MASOJC P, MILCZARSKI P. Pyramiding genes affecting sprouting resistance in rye by means of marker assisted selection [J]. Euphytica, 2005, 143(3): 257-260.
- [33] 杨梯丰, 曾瑞珍, 张桂权, 等. 水稻粒长基因 GS3 在合育种中的效应 [J]. 分子植物育种, 2010, 8(1): 59-66.
- [34] SING S, SIDHU J S, HUANG N, et al. Pyramiding three bacterial blight resistance genes (xa5, xa13 and Xa21) using marker assisted selection into indica rice cultivar PR106 [J]. Theor App Genet, 2001, 102: 1011-1015.
- [35] NARAYANANA N, BAISAKHA N, VERA C M, et al. Molecular breeding for the development of blast and bacterial blight resistance in rice cv. IR50 [J]. Crop Sci, 2002, 42(6): 2072-2079.
- [36] QIU Yongfu, GUO Jianping, HE Guangcun, et al. Development and characterization of japonica rice lines carrying the brown planthopper-resistance genes BPH12 and BPH6 [J]. Theor Appl Genet, 2012, 124: 485-494.
- [37] 倪大虎, 易成新, 李莉, 等. 分子标记辅助培育抗白叶枯病和稻瘟病三基因聚合系 [J]. 作物学报, 2008, 34(1): 100-105.
- [38] 邓其明, 周宇燊, 蒋昭雪, 等. 白叶枯病抗性基因 Xa21、Xa4 和 Xa23 的聚合及其效应分析 [J]. 作物学报, 2005, 31(9): 1241-1246.

【责任编辑 周志红】