

茶陵野生稻导入系遗传分析及重要性状相关 QTL 鉴定

黄婧芬^{1,2}, 康 敏³, 殷 勤³, 王艳艳², 杨子怡², 郑晓明², 乔卫华², 杨庆文², 孙希平¹

(¹ 山西农业大学农学院, 太谷 030801; ² 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081; ³ 株洲市农业科学研究所, 湖南株洲 412007)

摘要: 普通野生稻是栽培稻的祖先种, 从野生稻中挖掘栽培稻中已丢失或削弱了的优异基因是保证水稻高产稳产的一个重要手段。本研究以茶陵野生稻染色体片段导入系群体为研究材料, 使用均匀分布于 12 条水稻染色体上的 136 个多态性分子标记, 对其遗传背景进行检测。平均每个导入系携带 24 个导入片段, 导入片段平均长度为 16.1 cM, 导入片段覆盖野生稻基因组的 87.89%。结合两个环境中的性状调查, 鉴定到与 6 个产量性状相关的 18 个 QTLs, 其中 6 号染色体上与粒宽有关的 QTL 在两个环境中被连续检测到。除此之外, 还鉴定到 5 个与发芽期耐冷性有关的 QTLs。

关键词: 茶陵野生稻; 导入系; 遗传分析; QTL 定位

Genetic Analysis of the Introgression Lines Derived from Chaling Wild Rice and Identification of Yield Related QTLs

HUANG Jing-fen^{1,2}, KANG Min³, YIN Qin³, WANG Yan-yan², YANG Zi-yi², ZHENG Xiao-ming²,
QIAO Wei-hua², YANG Qing-wen², SUN Xi-ping¹

(¹ College of Agronomy, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801; ² Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; ³ Institute of Agriculture of Zhuzhou, Hunan Zhuzhou 412007)

Abstract: *Oryza rufipogon* Griff. served as an important rice germplasm which harbors excellent yield and stress tolerance genes that have been lost or weakened in cultivated rice. Within this study, a set of introgression lines with chromosome segments derived from Chaling wild rice were used for genetic analysis and QTL identification. 136 polymorphic markers evenly distributed across the 12 chromosomes were deployed for genotyping. 87.89% of the Chaling wild rice genomes were detected. Averagely, 24 introgression segments were found in each introgression line, and the genetic distance of each segment was accounting for about 16.1 cM. By taking use of phenotypic datasets from two environments, eighteen QTLs on six yield traits were identified. Especially, a QTL associating with grain width on chromosome 6 was found in two environments. Furthermore, five QTLs related to cold tolerance at the germination stage were detected. Taken together, these introgression lines served as elite gene resources with a potential for rice breeding.

Key words: Chaling wild rice; introgression line; genetic analysis; QTL mapping

普通野生稻 (*Oryza rufipogon* Griff.) 是栽培稻的原始祖先, 是栽培稻育种的宝贵种质资源, 已被列为国家二级保护植物^[1]。野生稻中含有许多栽培稻不具有或已丢失的高产、优质、病虫害抗性和非生

物逆境的耐受性基因^[2-3], 由于野生稻异质性强, 遗传背景复杂, 与栽培稻杂交难以直接利用; 再加上野生稻中不利基因高频出现、基因互作增加、微效多基因效应被掩盖等缺点, 都限制了野生稻有利基因

收稿日期: 2019-10-11 修回日期: 2019-11-07 网络出版日期: 2020-01-09

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20191011002>

第一作者研究方向为种质创新与遗传工程, E-mail: 18404984197@163.com

通信作者: 孙希平, 研究方向为种质创新与遗传工程, E-mail: sxplj@126.com

乔卫华, 研究方向为种质资源创新利用研究, E-mail: qiaowei-hua@caas.cn

杨庆文, 研究方向为种质资源创新利用研究, E-mail: yangqingwen@caas.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (31471471)

Foundation project: Grant from the National Natural Science Foundation of China (31471471)

的发掘和利用^[4]。构建合适的遗传群体,如染色体片段置换系、导入系等,可以将复杂性状分解为单个遗传因子,能大大提高野生稻优异基因挖掘和利用的效率。

近年来,随着 QTL 定位技术的不断完善和提高,国内外的研究学者利用不同的群体和不同的方法对水稻的农艺性状和抗性性状进行了研究。钱焯俊^[5]在野生稻的 10 号染色体上精细定位到一个与水稻耐冷相关的 QTL。谭禄宾等^[6]以云南元江普通野生稻为供体亲本、特青为受体亲本构建了一套 BC₃ 高代回交群体,利用 117 个 SSR 标记分析,检测到 6 个控制抽穗期 QTLs,同时在 1 号染色体上定位到一个与株高相关的 QTL。李静^[7]用一套野生稻染色体片段置换系材料,定位到 4 个穗长相关 QTLs,其中 *qPL7.1*、*qPL10.2* 连续两年被鉴定到,遗传效应稳定。Qi 等^[8]利用野生稻染色体片段置换系群体定位到 37 个与粒型相关的 QTLs,其中 *qGL12* 是与粒长相关的 QTL,定位于 RM28621 标记附近,且能在 4 个环境中检测到。孙妍等^[9]利用栽培稻 9311 为受体、普通野生稻为供体的染色体单片段置换系群体,检测到一个与粒宽相关的 QTL。仅与水稻粒型相关的 QTL 位点,目前报道的已超过 600 个,其中包括 139 个粒宽 QTLs、136 个粒长 QTLs、53 个粒厚 QTLs、74 个长宽比 QTLs 和 220 个粒重 QTLs 等^[10-15]。

本研究以茶陵野生稻导入系为材料。供体亲本茶陵野生稻地处 26° 50'N,是我国分布较北的野生稻,具有耐冷、优质等优良性状。利用 SSR 标记和 InDel 标记对多个产量性状和发芽期耐冷性状进行 QTL 定位,旨在挖掘出野生稻中更多的优异基因,为水稻育种提供新的优异基因资源。

1 材料与方法

1.1 材料与种植

本研究的野生稻导入系群体由湖南省株洲市农业科学研究所构建。茶陵野生稻 YS09001 材料为供体亲本, R9810 为受体亲本,共包含 50 个株系。供体亲本取自茶陵野生稻原生境保护点居群,受体亲本 R9810 系株洲市农科所用湘晚粳 6 号/明恢 82,改良后的育种中间晚稻恢复系材料。

试验材料于 2018 年在北京(顺义)和海南(三亚)两个环境下种植,试验采用随机区组设计,每个导入系种植 4 行,每行 10 株,株行距是 10 cm × 25 cm,田间管理采用常规管理方法。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取及 PCR 扩增 在分蘖盛期,采集亲本和导入系材料的叶片。将其用液氮冷冻后,置于研磨仪(SPEX Sample Prep Geno/Grinder)中将叶片打碎成粉末。采用 CTAB 法提取基因组 DNA^[16]。PCR 体系为 15 μL: ddH₂O 4.3 μL, 正引物 各 0.6 μL, DNA 2 μL, 2 × Es Taq MasterMix 7.5 μL。PCR 反应程序为: 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 35 个循环, 72 °C 终延伸 2 min。

1.2.2 分子标记的选择及电泳检测 本试验的 SSR 标记来源于美国 Cornell 大学公布的研究成果^[17-18]。InDel 引物是由中国农业科学院野生稻课题组设计并保存的。选择在亲本间多态性良好且均匀分布于 12 条染色体上的 SSR 标记和 InDel 标记进行导入系基因型的检测。电泳检测时将 R9810 一致的条带标记为 0, 将与茶陵野生稻一致的条带标记为 2, 同时具有两亲本的杂合条带标记为 1, 缺失的条带标记为 -1。

1.2.3 田间性状的测量方法 每个导入系随机选取中间的 5 株, 对分蘖数目、穗长进行测量。分蘖数目是指有效分蘖的数目。按照《水稻种质资源描述规范和数据标准》, 穗长的测量标准是水稻成熟后, 稻穗的穗颈节至穗顶(不包括芒)之间的距离^[19]。

1.2.4 粒型和粒重的测量方法 待导入系群体田间成熟后, 对导入系群体进行单株收获, 自然晒干, 去除空瘪粒种子, 只留饱满种子, 用万深 SC-G 自动考种仪及千粒重仪(杭州万深检测科技有限公司)测定籽粒的粒长、粒宽、长宽比以及千粒重。每个导入系重复测量 3 次, 每次测量 150~200 粒种子。

1.2.5 发芽期耐冷鉴定 将种子在 50 °C 恒温箱内高温处理 48 h, 将其充分干燥和打破休眠。挑选饱满种子 50 粒, 均匀放置于垫滤纸的培养皿中, 设置 3 次重复。用消毒液浸种 10 min 后, 用自来水洗涤 3~4 次。加入少量水浸种 24 h 后, 再用自来水洗涤 2~3 次, 放入 14 °C 低温恒温箱中处理 11 d, 第 8 天起连续 5 d 统计种子发芽率。以芽长达到种子长度的一半、根长达到种子长度作为发芽标准。以发芽率作为发芽期耐冷性的评价指标, 分 1~9 级评价。当发芽率大于 80% 时, 耐冷级别为 1, 耐冷性强; 当发芽率为 60%~80% 时, 耐冷级别为 5, 耐冷性中等; 当发芽率小于或者等于 60% 时, 耐冷级别为 9, 耐冷性弱。

1.3 数据分析

利用 QTL 分析软件 QTL IciMapping 4.2 对导入系群体的基因型数据和表型数据进行分析,采用的是完备区间加性模型 (ICIM-ADD) 定位方法, LOD 阈值为 2.5, 在全基因组范围内进行扫描, 判断可能存在的 QTL。按照 McCouch 方法命名^[20]。供体亲本染色体置换片段长度以及覆盖比率, 根据 Young 等^[21]的方法计算。当染色体上 2 个连续的分子标记为相同基因型时, 则认为它们之间片段基因型与之相同; 当 2 个连续的标记为不同基因型时, 则认为它们之间的染色体片段各有 1/2 与相邻标记基因型相同。所有假设的基础都是标记区间不存在双交换。

2 结果与分析

2.1 分子标记连锁图谱的构建

选取 216 对 SSR 和 175 对 InDel 分子标记, 在供体亲本与受体亲本间进行多态性检测, 共筛选出 136 对多态性分子标记, 包括 68 对 SSR 和 68 对 InDel 标记 (详见 <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20191011002>, 附表 1)。这些标记均匀覆盖水稻 12 条染色体。借助 NCBI 在线 BLAST 工具 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 确定分子标记在染色体上的位置, 得到用于茶陵野生稻导入系群体遗传背景检测的分子标记连锁图谱 (图 1)。

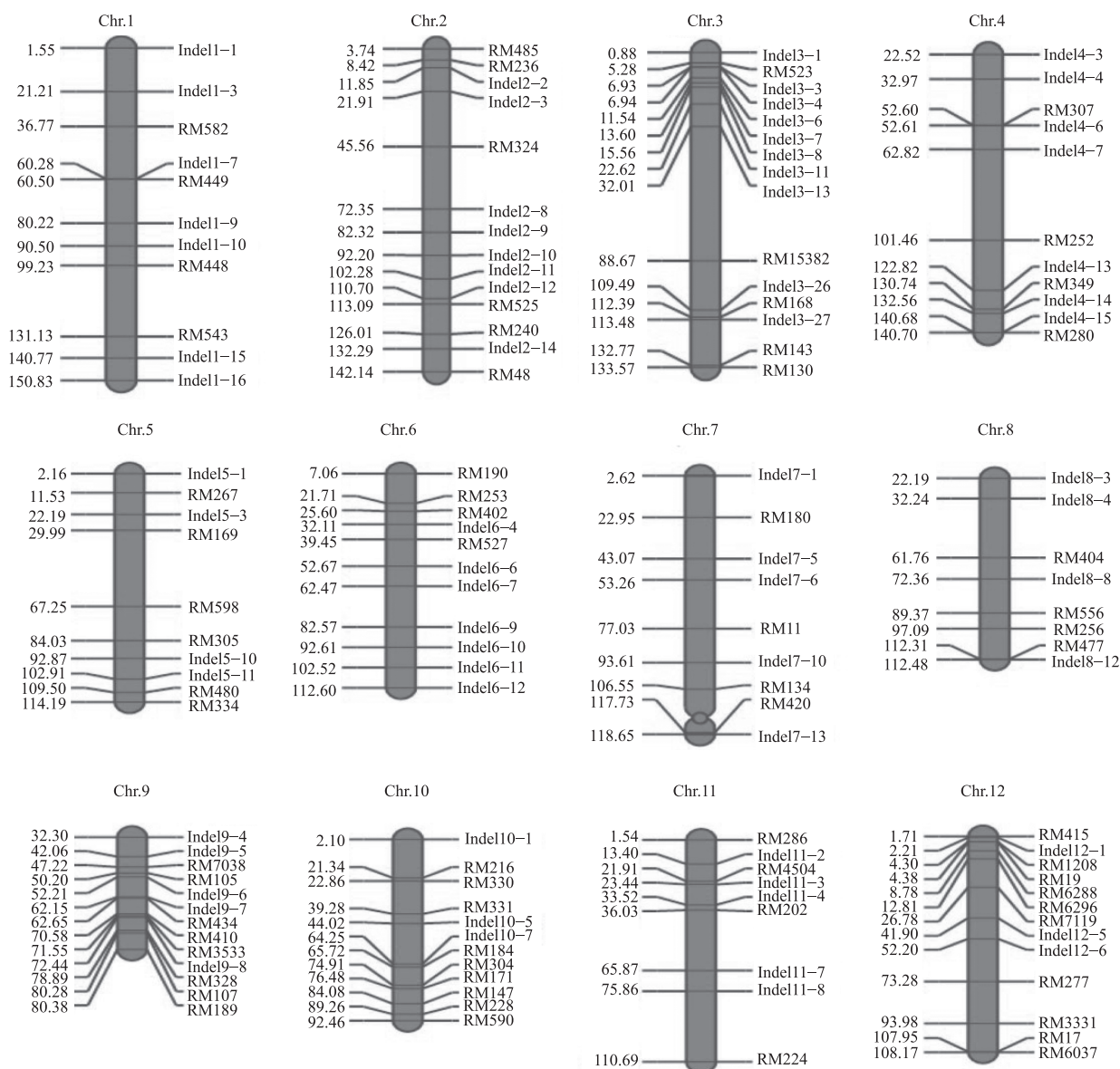


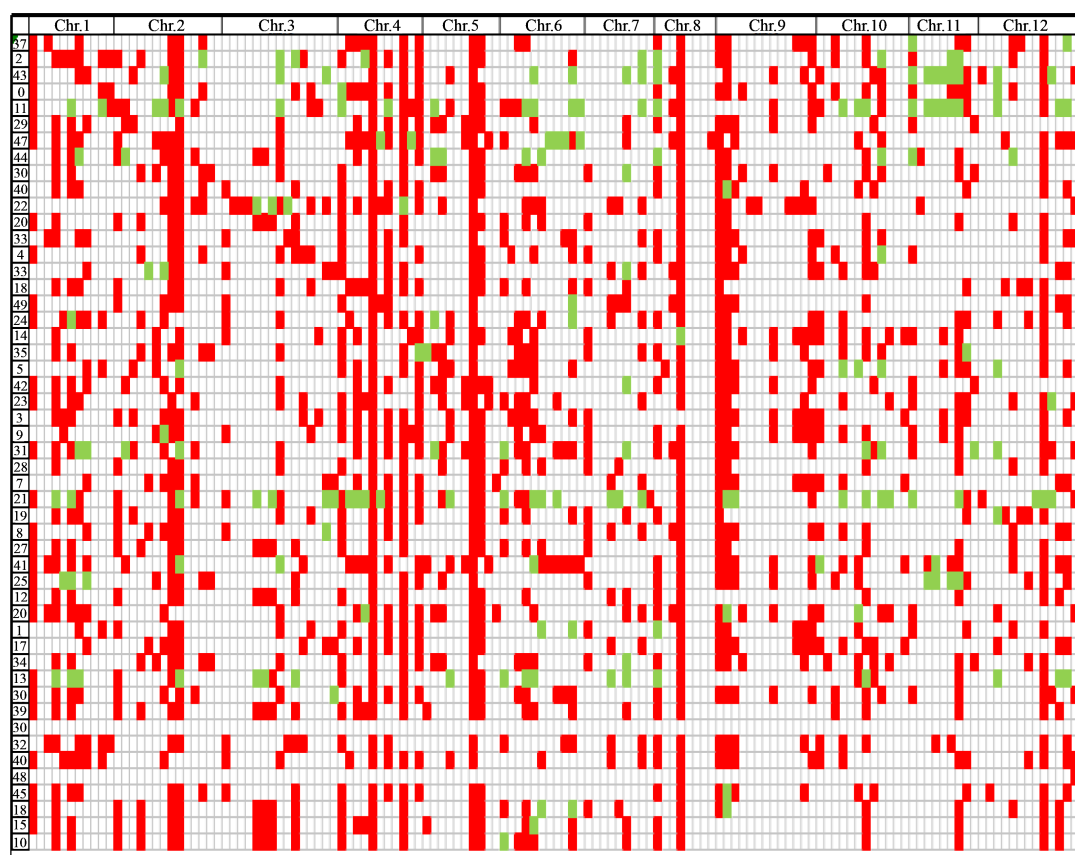
图 1 用于茶陵野生稻导入系群体遗传分析的分子标记图谱

Fig.1 136 polymorphic markers using for genetic analysis of Chaling wild rice introgression lines (ILs)

2.2 茶陵野生稻导入系群体遗传分析

茶陵野生稻导入系群体由 50 个株系组成。利用 136 对多态性分子标记进行遗传背景检测, 结果表明: 整套群体共有 16 个标记未检测到野生稻导入片段, 分别是 1 号染色体 InDel1-3 和 RM543, 2 号染色体 Indel2-12 和 RM48, 4 号染色体 RM349, 5 号染色体 RM598, 7 号染色体 RM180、InDel7-5 和 RM134, 8 号染色体 RM556、RM256 和 RM477, 9 号染色体 RM434 和 RM3533, 10 号染色体 InDel10-5 和 RM228。50 个导入系共携带 1032 个纯合基因渗入的染色

体片段和 146 个杂合片段, 单个导入系携带染色体片段数为 2~31 个, 平均每个导入系携带 24 个导入片段; 片段长度为 0.1~115.5 cM, 导入片段平均长度为 16.1 cM; 10% 的导入片段小于 5 cM, 22% 的导入片段为 5~10 cM, 23% 的导入片段为 10~15 cM, 21% 的导入片段为 15~20 cM, 14% 的导入片段为 20~30 cM, 10% 的导入片段超过 30 cM。这些数据表明, 该套导入系群体导入片段比较多, 导入片段长度较大。导入片段覆盖供体亲本茶陵野生稻基因组 87.89% (图 2、图 3、表 1)。



行和列分别代表导入系编号和水稻 12 条染色体上的分子标记。红色小格代表来自于茶陵野生稻的基因型, 白色小格代表受体亲本的遗传背景, 绿色小格代表杂合基因型

Each row represents one IL and each column represents a marker locus. Regions with a red background represent homozygous segments from wild rice, white regions indicate homozygous segments from receptor parent, green regions indicate heterozygous segments of the two parents

图 2 导入系基因型

Fig.2 The genotype of the introgression lines

2.3 亲本和导入系重要性状表型变异

与亲本 R9810 相比, 6 种表型在 2 个环境中都有较大的变异幅度 (表 2)。其中分蘖数目的变异幅度最大, 在北京的变异系数高达 28.60%。粒宽的变异幅度最小, 在海南的变异系数仅为 6.74%。

2.4 导入系群体 6 个性状在 2 个环境中的相关性分析

导入系群体 6 个性状在 2 个环境中的相关性分析见表 3, 分蘖数目与千粒重呈显著负相关, 千粒重与粒长、粒宽均呈极显著正相关, 且千粒重与粒长的相关系数高达 0.664, 说明籽粒长度可在一定程度

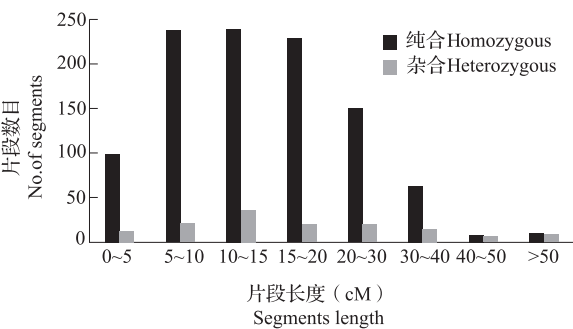


图3 纯合导入片段和杂合导入片段的遗传长度频率
Fig.3 Frequency of substituted homozygous and heterozygous chromosome segments according to genetic length

上作为粒重选择标准。长宽比与粒长呈极显著正相关,而与粒宽呈极显著负相关。且长宽比与粒长的相关性最高,达到了 0.821。

2.5 QTL 定位与分析

SSR/InDel 分子标记结果结合表型对茶陵野生稻导入系群体在 2 个环境进行 QTL 定位分析,6 个相关性状共检测到 18 个 QTLs(表 4)。

千粒重性状 QTL 分析结果显示,两个环境共检测到 2 个 QTLs,分布在 2 号、7 号染色体上, LOD 值分别为 2.885、2.611,贡献率分别为 23.33%、17.45%,位于 2 号染色体的 *qTGW2* 加性效应为负

表 1 多态性分子标记分布及置换系覆盖率
Table 1 Distribution of polymorphic markers on the 12 chromosomes and percent cover length in ILs

染色体	染色体总长 (cM)	标记间距离 (cM)	标记个数	覆盖长度 (cM)	覆盖比率 (%)
Chr.	Total chr. length	Distance between markers	No. of markers	Cover length	Percent cover length
1	194.10	17.65	11	155.72	80.23
2	195.70	13.98	14	158.59	81.04
3	179.70	11.98	15	179.70	100.00
4	190.80	17.35	11	185.93	97.45
5	126.00	12.60	10	98.98	78.56
6	145.20	13.20	11	145.20	100.00
7	115.30	12.81	9	67.86	58.85
8	128.60	16.08	8	97.07	75.48
9	100.10	7.70	13	94.95	94.86
10	117.20	9.77	12	100.52	85.77
11	118.30	13.14	9	118.30	100.00
12	108.20	8.32	13	108.20	100.00
总计 Total	1719.20	12.64	136	1511.02	87.89

表 2 导入系群体和受体亲本在 2 个环境中的性状鉴定
Table 2 Statistics of traits of ILs and recipient parent in the two environments

性状 Trait	环境 Environment	R9810	导入系群体 Introgression lines			
			茶陵野生稻 YS09001 Chaling wild rice	平均值 ± 标准差 Mean ± SD	范围 Range	变异系数 (%) CV
千粒重 (g)	北京	28.43	18.56	23.89 ± 3.46	17.13~34.72	14.49
1000-grain weight	海南	32.47		25.79 ± 3.29	20.27~32.68	12.76
长宽比 Grain length-width ratio	北京	3.55	3.54	3.30 ± 0.40	2.48~4.21	12.16
	海南	3.49		3.23 ± 0.36	2.59~4.14	11.23
粒长 (mm)	北京	9.43	8.37	8.88 ± 0.75	7.77~10.55	8.40
Grain length	海南	9.75		8.79 ± 0.70	7.68~10.40	7.95
粒宽 (mm)	北京	2.67	2.37	2.72 ± 0.21	2.29~3.24	7.71
Grain width	海南	2.81		2.76 ± 0.19	2.42~3.21	6.74
分蘖数目	北京	7.00	—	7.97 ± 2.28	5.20~17.80	28.60
Tiller number	海南	9.20		12.25 ± 2.75	7.40~19.80	22.42
穗长 (cm)	北京	24.54	—	26.81 ± 2.51	20.76~34.44	9.35
Panicle length	海南	21.90		22.75 ± 2.36	15.60~26.60	10.37

--: 未做统计
--: No statistics

表 3 6 个性状在 2 个环境中的相关性分析
Table 3 six traits in combined environments

性状 Trait	分蘖数目 Tiller number	穗长 Panicle length	千粒重 1000-grain weight	粒长 Grain length	粒宽 Grain width	长宽比 Grain length-width ratio
分蘖数目 Tiller number	1					
穗长 Panicle length	-0.229	1				
千粒重 1000-grain weight	-0.316*	0.009	1			
粒长 Grain length	-0.237	0.096	0.664**	1		
粒宽 Grain width	-0.151	0.009	0.396**	-0.194	1	
长宽比 Grain length-width ratio	-0.067	0.069	0.243	0.821**	-0.714**	1

*: 有显著差异; **: 有极显著差异
*: Correlation is significant, **: Correlation highly significant

表 4 导入系群体 6 个性状在 2 个环境中 QTL 定位结果
Table 4 QTLs affecting eight trait-related detected using introgression lines population across two environments

性状 Trait	位点 QTL	标记 Marker	染色体 Chr.	环境 Environment	LOD 值 LOD	贡献率(%) PVE	效应 Add
千粒重	<i>qTGW2</i>	Indel2-11	2	海南	2.885	23.33	-2.495
1000-grain weight	<i>qTGW7</i>	RM11	7	北京	2.611	17.45	2.641
粒长 Grain length	<i>qGL3</i>	RM168	3	北京	2.860	23.15	0.483
粒宽 Grain width	<i>qGW5.1</i>	Indel5-3	5	海南	7.536	31.03	0.115
	<i>qGW5.2</i>	RM169	5	北京	2.891	14.97	-0.104
	<i>qGW6</i>	Indel6-10	6	海南	2.794	9.09	0.086
	<i>qGW7</i>	RM420	7	北京	4.835	27.53	0.125
		RM420	7	海南	3.671	12.46	0.070
	<i>qGW11</i>	Indel11-7	11	海南	4.242	15.40	-0.075
长宽比	<i>qLWR1.1</i>	Indel1-7	1	海南	6.645	11.10	-0.135
Grain length-width ratio	<i>qLWR1.2</i>	RM488	1	海南	10.350	24.51	-0.204
	<i>qLWR5</i>	RM169	5	海南	12.320	27.75	0.250
	<i>qLWR7</i>	Indel7-1	7	海南	2.614	2.81	0.070
	<i>qLWR12</i>	RM6296	12	海南	5.468	8.61	0.243
分蘖数目	<i>qTN6</i>	Indel6-9	6	北京	3.845	21.53	1.674
Tiller number	<i>qTN9</i>	RM410	9	北京	3.042	24.03	1.227
	<i>qTN11</i>	RM286	11	海南	2.679	20.98	1.284
穗长	<i>qPL3</i>	Indel3-6	3	海南	3.544	22.34	-1.353
Panicle length	<i>qPL12</i>	RM6037	12	海南	2.775	16.85	-1.176

值,说明来自茶陵野生稻的等位基因起减效作用。而位于 7 号染色体的 *qTGW7* 加性效应为正值,说明来自茶陵野生稻的等位基因起增效作用。

鉴定到 1 个水稻籽粒长度相关的 QTL,位于 3 号染色体上 RM168 标记附近,LOD 值为 2.860,贡献率为 23.15%,该 QTL 的加性效应为正值,说明来

自茶陵野生稻的等位基因对粒长有增效作用。

水稻籽粒宽度性状相关 QTL 分析结果显示,在 2 个环境共检测到 5 个与水稻粒宽相关的 QTLs,分布于 5 号、6 号、7 号、11 号染色体上,其中位于 7 号染色体 RM420 附近的 *qGW7* 在 2 个环境中被连续检测到,说明该 QTL 在不同环境中能够稳定表

达,其平均贡献率为 20.00%,该 QTL 的加性效应为正值,说明茶陵野生稻携带的等位基因对粒宽有增效作用。

鉴定到 5 个水稻籽粒长宽比相关的 QTLs,分布于 1、5、7、12 号染色体上,其中 1 号染色体鉴定到两个相关 QTLs,LOD 值分别为 6.645、10.350,贡献率分别为 11.10%、24.51%,加性效应均为负值,说明来自野生稻的等位基因起减效作用。位于 5、7、12 号染色体上的 QTL 的 LOD 值分别为 12.320、2.614、5.468,贡献率分别为 27.75%、2.81%、8.61%,效应值均为正值,表明野生稻携带的等位基因起增效作用。

分蘖数目性状 QTL 分析结果显示,2 个环境中共鉴定到 3 个与水稻有效分蘖数目相关的 QTL,分布在 6、9、11 号染色体上。贡献率分别为 21.53%、24.03%、20.98%,效应值均为正值,表明这些位点上来自野生稻的等位基因能够使有效分蘖数目增加。

鉴定到 2 个与水稻穗长相关的 QTLs,分布在 3 号、12 号染色体上,LOD 值分别为 3.544、2.775,贡献率分别为 22.34%、16.85%,效应值均为负值,表明在这两个位点上来自茶陵野生稻的等位基因起减效作用。

2.6 发芽期耐冷 QTL 与耐冷种质资源鉴定

测定茶陵野生稻导入系群体的种子在 14 ℃低温下的发芽率、耐冷级别,将试验数据结合基因型数据,利用 QTL IciMapping 软件进行定位,共检测到 2 个与发芽期耐冷相关的 QTLs,其中与发芽期耐冷级别有关的 QTL 被定位在 5 号染色体上 InDel5-1 标记附近 1.4 M 的区间内,命名为 *qLGG5*,LOD 值为 2.779,贡献率为 23.40%,加性值为 -0.167,表明该位点上来自茶陵野生稻的等位基因能够降低耐冷级别,即增强耐冷性。与发芽率相关的耐冷 QTL 被定位于 12 号染色体上 RM19 标记附近 560 kb 的区间内,命名为 *qLGR12*,LOD 值为 3.440,贡献率为 22.68%,加性值为 -8.743。在该区间内共有 79 个基因,其中已克隆的基因有 4 个,分别是 *ONAC131*、*ONAC300*、*OsCML3*、*RIP1*。*ONAC131* 与稻瘟病抗性有关;*ONAC300* 可能与生殖细胞的发育有关;*OsCML3* 是与钙离子结合相关的基因;*RIP1* 基因是水稻花粉发育晚期的调节因子。这 79 个基因中,与应对胁迫和非生物刺激有关的基因有 6 个,分别是 *Os12g0125000*、*Os12g0127800*、*Os12g0131701*、*Os12g0132200*、*Os12g0132500*、*Os12g0132800*。当 LOD 阈值设为 2.0 时,还可检测到 3 个与耐冷级别有关的且加性效应为负值的 QTLs,表明这 3 个

位点上来自茶陵野生稻的等位基因能够增强耐冷性。这 3 个 QTLs 分别被定位于 2 号染色体的 InDel2-14、6 号染色体的 RM402、11 号染色体的 RM224 标记附近,分别被命名为 *qLGG2*、*qLGG6*、*qLGG11*。

基于 14 ℃低温处理 7 d 后茶陵野生稻导入系群体的发芽情况,选择了两个耐冷性较强和两个冷敏感的品系,并检测这些品系中的 QTLs 以确认 QTL 分析的结果。两个发芽率比较高的株系编号分别是 35 和 42,两个发芽率较低的株系编号分别是 18 和 19(表 5)。株系 35 中包含 *qLGG2*、*qLGG5*、*qLGG6*,株系 42 中包含 *qLGG11*;而株系 18 和 19 中含有 *qLGR12*,耐冷性减弱。与受体亲本 R9810 相比,株系 35 和 42 耐冷性明显增加,可作为水稻育种的优良资源。

表 5 耐冷材料和冷敏感材料的发芽率以及所包含的 QTL
Table 5 Germination rate of cold-resistant and cold-sensitive materials and QTLs included

株系 Line	发芽率(%) Germination rate	正向 QTL Positive QTL	负向 QTL Negative QTL
R9810	8.00		
35	42.50	<i>qLGG2</i> 、 <i>qLGG5</i> 、 <i>qLGG6</i>	
42	45.00	<i>qLGG11</i>	
18	0.50		<i>qLGR12</i>
19	0		<i>qLGR12</i>

3 讨论

野生稻优异基因往往和不利基因连锁存在,增加了利用的难度。构建合适的遗传定位群体是鉴定野生稻新 QTL/基因的关键。前人的研究已经鉴定出大量野生稻中与产量及抗性相关的 QTLs,如 Koseki 等^[22]通过对普通野生稻 W1943 与冷敏感籼稻 GLA4 构建的回交重组自交系群体进行研究,定位到 3 个苗期耐冷 QTLs。本研究利用构建的茶陵野生稻为供体亲本的导入系群体,减小了野生稻复杂的遗传背景,大大提高野生稻优异基因挖掘和利用的效率。利用该套导入系群体共定位到 18 个与分蘖数目、穗长、千粒重、粒长、粒宽、长宽比相关的 QTLs。其中,12 个来自茶陵野生稻的 QTLs 在 R9810 的遗传背景下能使相关性状增加。这些 QTLs 的发现对于发掘和利用来自茶陵野生稻的产量性状相关基因具有重要的研究意义。同时也说明尽管本研究中的导入系群体没有单片段置换系和

近等基因系遗传背景清晰,但依然具有发掘新 QTL/基因的优势。

本研究在 LOD 阈值设为 2.5 时还鉴定到两个与发芽期耐冷有关的 QTLs。其中与发芽率有关的 QTL *qLGR12* 加性效应 -8.743,可解释表型变异的 22.68%。说明亲本 R9810 携带的等位基因能够增强耐冷。这与许多研究者的结果是一致的。这一结果也再次证明籼稻中也可能隐藏着一些耐冷 QTLs 位点。因此,在籼稻品种中发掘、分离、聚合耐冷基因亦是可行的^[23]。由于 NAC 类转录因子参与耐冷性相关基因的调控与表达,对植株耐冷性也起到一定作用^[24]。已有研究表明 *ONAC131* 能够提高水稻对冷害的抗性^[25],*qLGR12* 区段内含有 *ONAC131*、*ONAC300* 以及 6 个与应对压力和非生物刺激有关的基因,这些结果印证了利用本群体进行耐冷 QTL 定位的准确性。

茶陵野生稻作为我国分布最北的两个居群之一,其地下茎在极低的温度下仍然保持着十分旺盛的活力,表明其耐冷性极强,是一个理想的耐冷种质资源^[26]。本研究利用茶陵野生稻导入系群体作为定位群体,更有望定位到优异耐冷基因。在 LOD 阈值设为 2.5 时,定位到一个与发芽期耐冷级别相关的 QTL,但所定位到的 1.4 M 区间较大。定位区间较大及定位到的耐冷 QTL 数量较少的原因可能有两点:一是该导入系群体较小,而小群体用大的阈值会减少 QTL 定位数量;二是因为导入系群体导入片段比较多,导入片段长度较大,因而遗传背景不够清晰,这给耐冷性 QTL 定位增加了难度。LOD 阈值设为 2.5 可能导致贡献率较小的 QTL 难以检测出。当把 LOD 阈值调整为 2.0 时,可在 InDel 2-14、RM402、RM224 标记附近定位到 3 个加性效应为负值的与耐冷等级有关的 QTLs,这 3 个位点上来自茶陵野生稻的等位基因能够增强水稻耐冷。鉴定出的强耐冷导入系 35、42 中含有这些 QTLs (表 5),因此,导入系 35、42 可以作为新的种质资源用于水稻耐冷性的改良。下一步的研究重点,将选择置换片段较多的导入系与栽培稻亲本回交并结合分子标记辅助选择,扩大群体规模,消除过多的遗传噪音,提高群体的利用价值。同时,选择强耐冷株系如 35、42 与栽培稻亲本回交构建分离群体,发掘茶陵野生稻中新的耐冷基因。本研究为茶陵野生稻的基因组学研究,发掘新的产量性状位点提供了参考,同时也为水稻耐冷性的改良提供了新的基因资源与材料。

参考文献

- [1] 傅立国. 中国植物红皮书: 1 册. 北京: 科学出版社, 1992: 314-316
Fu L G. Red book of Chinese plants: 1st vol. Beijing: Science Publishers, 1992: 314-316
- [2] 杨庆文, 张万霞, 贺丹霞, 陈大洲, 戴陆元, 陈成斌, 黄坤德. 中国野生稻原生境保护方法研究. 植物遗传资源学报, 2003, 4 (1): 63-67
Yang Q W, Zhang W X, He D X, Chen D Z, Dai L Y, Chen C B, Huang K D. Studies on in-situ conservation methods of wild rice in China. Journal of Plant Genetic Resources, 2003, 4 (1): 63-67
- [3] 程式华, 曹立勇, 庄杰云, 吴伟明. 关于超级稻品种培育的资源和基因利用问题. 中国水稻科学, 2009, 23 (3): 223-228
Cheng S H, Cao L Y, Zhuang J Y, Wu W M. Discussion on germplasm and gene utilization in breeding of super rice. Chinese Journal of Rice Science, 2009, 23 (3): 223-228
- [4] 李德军. 江西东乡普通野生稻渗入系的构建及高产 QTL 定位. 北京: 中国农业大学, 2003
Li D J. Development of introgression lines of common wild rice (*O. rufipogon* Griff.) from Dongxiang in Jiangxi province and mapping QTLs for improving yield. Beijing: China Agricultural University, 2003
- [5] 钱焜俊. 东乡野生稻 *qRC10-2* 耐冷基因的功能研究. 扬州: 扬州大学, 2018
Qian H J. Characterization of *qRC10-2*, a major cold tolerant QTL from Dongxiang wild rice. Yangzhou: Yangzhou University, 2018
- [6] 谭禄宾, 张培江, 付永彩, 刘凤霞, 王象坤, 孙传清. 云南元江普通野生稻株高和抽穗期 QTL 定位研究. 遗传学报, 2004, 31 (10): 1123-1128
Tan L B, Zhang P J, Fu Y C, Liu F X, Wang X K, Sun C Q. Identification of quantitative trait loci controlling plant height and days to heading from Yuanjiang common wild rice (*O. rufipogon* Griff.). Acta Genetica Sinica, 2004, 31 (10): 1123-1128
- [7] 李静. 基于 CSSL 的水稻抽穗期和穗长 QTL 定位及遗传分析. 北京: 中国农业科学院, 2016
Li J. Fine mapping of quantitative trait loci and genetic analysis for heading date and panicle length in rice (*Oryza sativa* L.) using chromosome segment substitution lines. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016
- [8] Qi L, Sun Y, Li J, Su L, Zheng X M, Wang X N, Li K M, Yang Q W, Qiao W H. Identify QTLs for grain size and weight in common wild rice using chromosome segment substitution lines across six environments. Breeding Science, 2017, 67 (5): 472-482
- [9] 孙妍, 苏龙, 乔卫华, 郑晓明, 齐兰, 丁膺宾, 许睿, 张丽芳, 程云连, 兰进好, 杨庆文. 基于染色体片段置换系的野生稻粒宽 QTL-*qGW8.1* 的精细定位. 植物遗传资源学报, 2018, 19 (1): 135-142
Sun Y, Su L, Qiao W H, Zheng X M, Qi L, Ding Y B, Xu R, Zhang L F, Cheng Y L, Lan J H, Yang Q W. Fine mapping of a wild rice grain width QTL-*qGW8.1* using a chromosome segment substitution line. Journal of plant Genetic Resources, 2018, 19 (1): 135-142
- [10] Huang R Y, Jiang L G, Zheng J S, Wang T S, Wang H C,

- Huang Y M, Hong Z L. Genetic bases of rice grain shape: so many genes, so little known. *Trends in Plant Science*, 2013, 18 (4): 218-226
- [11] 林鸿宣, 闵绍楷, 熊振民, 钱惠荣, 庄杰云, 陆军, 郑康乐, 黄宁. 应用 RFLP 图谱定位分析籼稻粒形数量性状基因座位. *中国农业科学*, 1995, 28 (4): 1-7
- Lin H X, Min S K, Xiong Z M, Qian H R, Zhuang J Y, Lu J, Zheng K L, Huang N. RFLP mapping of QTLs for grain shape traits in indica rice (*Oryza Sativa* L. Subsp. *indica*). *Scientia Agricultura Sinica*, 1995, 28 (4): 1-7
- [12] Singh R, Singh A K, Sharma T R, Singh A, Singh N K. Fine mapping of grain length QTLs on chromosomes 1 and 7 in Basmati rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 21 (2): 157-166
- [13] 杨维丰, 詹鹏麟, 林少俊, 苟亚军, 张桂权, 王少奎. 水稻粒形的遗传研究进展. *华南农业大学学报*, 2019, 40 (5): 203-210
- Yang W F, Zhan P L, Lin S J, Gou Y J, Zhang G Q, Wang S K. Research progress of grain shape genetics in rice. *Journal of South China Agricultural University*, 2019, 40 (5): 203-210
- [14] Zuo J R, Li J Y. Molecular genetic dissection of quantitative trait loci regulating rice grain size. *Annual Review of Genetics*, 2014, 48 (1): 99-118
- [15] He N, Wu R, Pan X P, Peng L P, Sun K, Zou T, Zhu H T, Zeng R Z, Liu Z Q, Liu G F, Wang S K, Zhang G Q, Fu X L. Development and trait evaluation of chromosome single-segment substitution lines of *O. meridionalis* in the background of *O. sativa*. *Euphytica*, 2017, 213 (12): 281
- [16] Chen D H, Ronald P C. A Rapid DNA Miniprep method suitable for AFLP and other PCR applications. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1999, 17 (1): 53-57
- [17] Cho Y G, Ishii T, Temnykh S, Chen X, Lipovich L, McCouch S R, Park W D, Ayres N, Cartinhour S. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 100 (5): 713-722
- [18] McCouch S R, Teytelman L, Xu Y, Lobos K B, Clare K, Walton M, Fu B, Maghirang R, Li Z, Xing Y, Zhang Q, Kono I, Yano M, Fjellstrom R, DeClerck G, Schneider D, Cartinhour S, Ware D, Stein L. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Research*, 2002, 9 (6): 199-207
- [19] 韩龙植. 水稻种质资源描述规范和数据标准. 北京: 中国农业出版社, 2006; 14-20
- Han L Z. Descriptors and data standard for rice (*Oryza sativa* L.). Beijing: China Agricultural Publishers, 2006; 14-20
- [20] Tanksley S D, Mccouch S R. Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science*, 1997, 277 (5329): 1063-1066
- [21] Young N D, Tanksley S D. Restriction fragment length polymorphism maps and the concept of graphical genotypes. *Theoretical and Applied Genetics*, 1989, 77 (1): 95-101
- [22] Koseki M, Kitazawa N, Yonebayashi S, Machara Y, Wang Z X, Minobe Y. Identification and fine mapping of a major quantitative trait locus originating from wild rice, controlling cold tolerance at the seedling stage. *Molecular Genetics and Genomics*, 2010, 284 (1): 45-54
- [23] 王棋, 范淑秀, 郭江华, 陈兆赫, 梁银培, 刘振宇, 殷业超, 王嘉宇. 利用籼粳交 RIL 群体对水稻发芽期和苗期耐冷性的 QTL 分析. *华北农学报*, 2019, 34 (1): 83-88
- Wang Q, Fan S X, Guo J H, Chen Z H, Liang Y P, Liu Z Y, Yin Y C, Wang J Y. QTL Analysis of cold tolerance at germination and seedling stages of rice. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2019, 34 (1): 83-88
- [24] Takasaki H, Maruyama K, Kidokoro S, Ito Y, Fujita Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Nakashima K. The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor OsNAC5 regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice. *Molecular Genetics and Genomics*, 2010, 284 (3): 173-183
- [25] 黄磊. 水稻 NAC 转录因子 ONAC131、MNAC1 和 ONAC095 在抗病抗逆中的功能研究. 杭州: 浙江大学, 2015
- Huang L. Functional characterization of rice NAC transcription factors ONAC131, MNAC1 and ONAC095 in resistance to abiotic and biotic stresses. Hangzhou: Zhejiang University, 2015
- [26] 龚曼. 茶陵野生稻中两个低温诱导基因 *OrCr1* 与 *OrCr2* 的克隆与功能分析. 长沙: 湖南师范大学, 2012
- Gong M. Cloning and functional analysis of two cold induced genes *OrCr1* and *OrCr2* in Chaling wild rice. Changsha: Hunan Normal University, 2012