水稻籼粳交 DH 群体苗期的耐冷性 QTLs 分析

钱 前^④ 曾大力^④ 何 平 郑先武 陈 英 朱立煌^{*}

(中国科学院遗传研究所, 北京 100101; ④中国水稻研究所, 杭州 310006. * 联系人)

摘要 采用典型的籼粳交、ZY08/JX17 的 DH 群体为材料, 在小型人工气候箱中对水稻苗期的耐冷性进行了研究. 发现该 DH 群体的籼、粳双亲苗期耐冷性存在明显差异; 整个群体苗期耐冷性动态分析表明: 冷处理的第 6, 7 d, 受冷害伤害致死的株系迅速上升, 而此前的低温处理和此后的常温恢复的株系死苗数表现相对较少. 用该群体构建的分子连锁图谱进行了苗期耐冷性逐日数量性状座位(QTLs)的分析, 在第 1, 2, 3, 4 染色体上分别检测到与苗期耐冷性有关的 4 个 QTLs, 第 1, 2, 3 染色体 *qSCT-1*, *qSCT-2*, *qSCT-3* 的加性效应均为正, 即来自 JX17 的 QTLs 对耐冷性表现影响大, 位于第 4 染色体 *qSCT-4* 的加性效应为负, 即来自 ZYQ8 的 QTLs 对耐冷性表现影响大, 4 个 QTLs 表现时间不同, 显示了耐冷性遗传机制的复杂. 进一步对 DH 群体中几个超亲分离的株系耐冷性 QTLs 基因型进行分析, 发现超耐冷的带有 4 个或 3 个 QTLs, 这种耐冷性 QTLs 聚合、重组可为育种提供选择依据.

关键词 籼粳亚种 DH 群体 苗期耐冷性 动态分析 QTLs 检测

水稻属喜温作物, 对温度变动极为敏感, 低温冷害可引起明显减产, 是世界水稻生产地区带有普遍性的问题^{[1~4]1, 2)}. 尤其是在我国南方双季稻区, 早籼稻秧苗期的“寒潮”常常造成烂秧, 仅 1980 年杭州地区春播时因寒潮烂秧而损失谷种就达 150 万斤, 而因此造成的生育期延迟对产量的影响更是难以估算^[3], 为确保水稻生产抵御低温危害, 最经济有效的措施是培育耐冷性强的水稻新品种. 一般来说, 籼稻的耐冷性弱于粳稻, 将粳稻的耐冷基因导入籼稻之中, 有可能提高籼稻的耐冷性. 为此, 必须开展籼粳品种间苗期耐冷性的研究, 为探索改良籼稻苗期的耐冷性提供基础.

籼粳杂交后代耐冷性分析一般都采用杂种 F₂ 或其后代分离世代, 已得到了水稻苗期耐冷性性状受 1 到 2 对主效基因和数个微效基因控制的不同结果^{[4]3, 4)}. 严长杰等人^[5] 用南京 11 与巴里拉的 F₁ 花培产生的 DH 群体尝试进行了 QTLs 定位, 发现了 1 个 QTL 与耐冷性有关. 以往的试验大多采用某一天的耐冷性数据进行静态分析, 事实上水稻耐冷性是一个动态过程, 因此必须分析与这一动态过程有关的基因. 耐冷性的鉴定方法是开展耐冷性研究的基础, 目前的鉴定方法主要有以下 5 种: (1) 利用自然低温的耐冷性鉴定; (2) 长期深冷水灌溉鉴定; (3) 循环恒温冷水灌溉; (4) 短期深冷水鉴定; (5) 利用人工气候室的控温鉴定²⁾. 人工气候室

1) Chung G C. The rice cold tolerance program in Korea. Rice Cold Tolerance Workshop. Manila: International Rice Research Institute, 1979, 7~ 20

2) Kakio S. Cold tolerance. Science of Rice Plant Volume ④Genetics. Tokyo: Japan Food Research Center, 1997, 534~ 549

3) Shahi B B, Khush G S. Genetic analysis of cold tolerance in rice. Rice Genetics iv. Manila: International Rice Research Institute, 1986, 424~ 435

4) Nagamine T, Nakagahra M. Genetic control of chilling injury in rice seedlings detected by low-temperature treatment. Rice Genetics

⑤ Manila: International Rice Research Institute, 1991, 737~ 739

的控温鉴定方法,避免了自然鉴定的受地区、季节、气候等条件的限制,可提高结果的稳定性和重演性.

秧苗的自身条件往往也影响鉴定的准确性,Yoshida 营养液是目前常用的并可精确控制水稻栽培的营养液,可保证供试材料的均质性和健壮生长.

近年来,以分子标记为基础的 QTLs 分析技术的不断完善,使得耐冷性这样复杂的性状分析成为可能. 本实验考虑了上述因素,以一个永久性典型籼粳交 DH 群体为材料,在小型人工气候室中利用营养液栽培的方法,对耐冷性 QTLs 进行了动态的分析.

1 材料与方法

() DH 群体的产生. 以典型的籼稻窄叶青 8 号(ZYQ8)与粳稻京系 17(JX17)为亲本进行杂交,对 F₁ 代花药进行离体培养,诱导培养基为 SK3 培养基,再经自然加倍或用秋水仙素处理,形成加倍单倍体(DH, doubled haploid)的再生植株.

() 耐冷性试验. 于 1998 年 4 月 24 日开始,对照亲本和 DH 群体按株系播在泡沫板中,每株系 8 粒,泡沫板浸在盛水的盘中. 播后放入温室培养(日均温度 20~22℃). 5 月 4 日开始使用 Yoshida 全营养液培养并定期更换,材料转至室内培养箱进行培养,温度调到 25℃,培养至三叶期. 温度下调至 6~10℃,进行低温处理. 培养箱中相对湿度为 75%~86%,与自然条件基本相同. 以死苗作为耐冷性强弱的指标,处理 7 d 后将上述低温处理材料经缓慢升温到 25℃,试验材料处理 4 d 后分株系逐日进行鉴定登记,株系内按株计算其存活天数,按株系统计存活率,以便了解冷处理后的耐冷性动态变化规律.

() QTLs 分析. 在业已构建的 DH 群体遗传图谱的基础上,采用区间作图法 Mapmaker/QTL 软件对低温处理 4 d 后逐日存活率进行 QTLs 定位分析. 采用 LOD 值 2.0 作为阈值来判断 QTL 的存在,若标记区间 LOD>2.0,则认为该区间 LOD 值最高处所对应的位点即为该性状的 1 个 QTL. 同时还计算了每个 QTL 对耐冷性的贡献率和加性效应,QTLs 的命名原则遵循文献[6].

2 结果和分析

2.1 DH 群体双亲苗期的耐冷性表现

该 DH 群体的籼型亲本 ZYQ8 和粳型亲本 JX17 在苗期的耐冷性上表现很大的差异,籼型亲本 ZYQ8 比粳型亲本 JX17 表现了更弱的耐冷性,对低温的反应也更为敏感(表 1). ZYQ8 出现冷害的表现比 JX17 早,在进行 4 d 的低温处理后,ZYQ8 的成活率为 42.9%,而 JX17 的成活率达 100%,JX17 在经 5 d 处理后才开始表现出冷害;在经过 7 d 的低温处理后,JX17 的成活率为 75%,ZYQ8 仅为 28.6%;同样,在后期的常温恢复过程中,ZYQ8 因受冷害的程度较为严重而造成了难以恢复的伤害,而 JX17 却还有 50% 的成活率. 粳型的 JX17 耐冷性比籼型的 ZYQ8 强,不仅反映在耐冷强度上,而且还反映在对冷害的敏感程度上,这与前人的研究结果相一致.

表 1 ZYQ8 和 JX17 苗期耐冷性的差异

亲本	冷处理成活率/%				升温后的成活率/%								
	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d	15d	16d
ZYQ8	42.9	42.9	28.6	28.6	28.6	28.6	28.6	28.6	28.6	28.6	14.3	0.0	0.0
JX17	100.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0

2.2 DH 群体耐冷性方差分析

由于 DH 群体中株系内的单株遗传组成一致, 故各 DH 系的 8 个单株本身构成了重复, 根据处理结束时(16 d)各单株的实际存活天数, 对 128 个 DH 株系进行了方差分析. 由表 2 可知, 株系间的差异远远大于株系内的差异, 这种由不同基因型(株系间)引起的差异占总差异的 83.6%.

表 2 DH 株系耐冷性的方差分析

变异来源	自由度 DF	协方和 SS	均方 MS	F	F _{0.01}
株系内	127	9 579. 7	69. 93	7. 193	1. 33
株系间	1 015	1 878. 8	1. 85		
总差异	1 142	11 458. 5			

2.3 DH 群体苗期耐冷性的动态变化

低温处理后受危害的幼苗开始萎缩卷曲, 渐扩及全株, 从青绿色转为黄色、黄褐色, 直至枯死; 耐冷性强的株系秧苗处理后无上述变化, 有部分株系甚至在低温处理中没表现出受冷害的症状, 后期的恢复状态良好, 苗叶生长正常. 但从整个 DH 群体说, 随着低温处理时间的延长, 冷害的表现愈严重(图 1 中 4~ 7d). 在低温处理的第 4, 5 d, 受冷害伤害致死的有 6 个和 10 个株系, 而在低温处理的第 6, 7 d, 受冷害伤害致死的株系迅速上升至 22 个和 31 个株系, 在随后的常温恢复过程中, 仍有部分株系死亡, 表明了低温处理产生危害后, 在随后的恢复过程中仍有后遗效应, 但总体变化趋势没有冷处理过程中激烈, 逐步趋向缓和(图 1 中 9, 11, 13, 15 d).

图 1 DH 群体在低温处理及常温恢复过程中成活率的动态变化

2.4 QTLs 定位

利用该 DH 群体已构建的一张水稻 RFLP 连锁图谱进行 QTLs 定位分析, 该图谱包括 243

个分子标记, 均匀分布于水稻的 12 条染色体上, 适合于 QTL 区间作图^[7].

表 3 列出了对 128 个 DH 株系中逐日检测到的与耐冷性有关最大 LOD 值的 4 个 QTLs, 即 *qSCT-1*, *qSCT-2*, *qSCT-3* 和 *qSCT-4*, 分别定位于第 1, 2, 3 和 4 染色体上(图 2). 其中第 1, 2 和 3 染色体上的 *qSCT-1*, *qSCT-2* 和 *qSCT-3* 的加性效应均为正, 即来自 JX17 的 QTLs 对耐冷性表现影响大, 而位于第 4 染色体 *qSCT-4* 的加性效应为负, 即来自 ZYQ8 的 QTLs 对耐冷性表现影响大. 逐日对 QTLs 检测的结果显示(表 4), 从低温处理后第 4~5d 可检测到第 2 和第 4 染

表 3 水稻 DH 群体苗期耐冷性 QTLs 定位

位点	染色体	标记区间	LOD 值	贡献率/%	加性效应
<i>qSCT-1</i>	1	RG233-RG345	2.87	12.1	0.73
<i>qSCT-2</i>	2	C132-G1327	2.56	11.1	0.79
<i>qSCT-3</i>	3	C63-CT125	2.41	10.6	0.78
<i>qSCT-4</i>	4	G271-C975	2.75	10.3	-19.16

图 2 与耐冷性有关的 4 个 QTLs 在分子图谱上的位置

表 4 耐冷性 QTLs 的动态分析^{a)}

	低温 (6~ 10℃)				常温 (25℃)								
	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d	15d	16d
<i>qSCT-1</i>	—	—	+	+	—	—	—	—	—	+	+ *	+	+
<i>qSCT-2</i>	+	+	+ *	+	—	—	—	—	+	+	+	+	+
<i>qSCT-3</i>	—	—	—	—	+	+ *	+	+	—	—	—	—	—
<i>qSCT-4</i>	+ *	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

a) + 示检测到 QTLs; - 示未检测到 QTLs; * 示最大的 LOD 值

染色体上的 QTLs; 其中第 4 染色体上的 QTL 在处理后的第 4 d 的 LOD 值最高. 在第 6~7 d, 可检测到第 1 和第 2 染色体上的 QTLs; 第 2 染色体上的 QTL 在第 6 d 的 LOD 值最高. 在常温恢复的当天到此后的第 3 d, 即处理后的第 8~11 d, 仅检测到了在第 3 染色体上的 QTL, 处理后的第 9 d 其 LOD 值达到最高. 在处理后的第 12~16 d(结束调查), 可检测到第 1 和第 2 染色体上的 QTLs, 其中第 1 染色体上的 QTL 的 LOD 值在第 13 d 达到最大.

2.5 耐冷性产生超亲分离的 DH 株系基因型分析

选择 6 个耐冷性表现超亲分离的 DH 株系, 对它们的耐冷性及基因型进行比较. 由表 5 可见, 在这 6 个 DH 株系中, 耐冷性有比 JX17 强的, 也有与 ZYQ8 类似或弱的. 在低温处理过程中, 071, 007 和 DH33 株系的耐冷性比双亲的强耐冷性品种 JX17 还要强, 也即出现了超亲现象, 但这三者之间也存在差别, 尤其是在冷处理后的恢复过程中, 如 DH33 表现冷处理后效应最弱, 它的基因组中带有上述 4 个所在染色体的 QTLs 片段, 其中 *qSCT-1*, *qSCT-2* 和 *qSCT-3* 来自 JX17, *qSCT-4* 来自 ZYQ8, 007 表现冷处理的后效应程度与 DH33 相似, 它的耐冷性基因型与 DH33 完全相同, 即带有 4 个 QTLs, 但它出现的后效应反应更早. 而 071 尽管在低温处理时表现耐冷性比 JX17 强, 但冷处理后的恢复能力比 JX17 弱, 它只带有来自 JX17 的 3 个 QTLs 区段. 另外 DH37, DH24 和 DH36 的耐冷性与 ZYQ 类似或较弱, DH37 基因组中只带有来自 ZYQ8 的 1 个苗期耐冷性 QTL, DH24 则不含耐冷性 QTL 区段, 耐冷性表现最弱, DH36 只带有来自 JX17 的 2 个 QTLs 区段(*qSCT-2*, *qSCT-3*). 由此可见, DH 群体中出现类型丰富的分离现象, 是基因重组的结果, 为开展耐冷性育种选择提供了基础.

表 5 6 个 DH 株系的耐冷性差异

材料	冷处理时的成活率/%				升温后的成活率/%								
	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d	15 d	16 d
ZYQ8	42.9	42.9	28.6	28.6	28.6	28.6	28.6	28.6	28.6	0.0	0.0	0.0	0.0
JX17	100.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	75.0	50.0	50.0	50.5	50.0	50.0
DH37	33.3	33.3	16.7	16.7	16.7	16.7	16.7	16.7	16.7	16.7	0.0	0.0	0.0
DH24	42.6	28.6	14.3	14.3	14.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
DH36	42.9	42.9	28.6	28.6	28.6	28.6	28.6	28.6	28.6	28.6	28.6	14.3	14.3
071	100.0	85.7	85.7	71.4	71.4	57.1	57.1	57.1	57.1	57.1	14.3	14.3	14.3
007	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	83.3	83.3	83.3	83.3	83.3	83.3	83.3	83.3
DH33	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	85.7	85.7	85.7

3 讨论

苗期耐冷性直接鉴定的方法主要采用卷叶、黄叶和死苗作为鉴定指标, 叶片卷曲、黄化和死亡是不耐冷植株在低温处理及其后恢复生长过程的不同阶段中发生的现象. 卷曲是受低温伤害的最初表现, 以往的研究对水稻品种耐冷性分析大多是在自然条件下进行的, 其结果受外界环境影响较大. 本试验以死苗作为鉴定指标, 简便而直观, 这也是目前耐冷性研究中采用最多的一种, 另外结合人工气候箱稳定的控温条件, 采用营养液培养, 增强了试验条件的一致性, 本试验还选用性状稳定的 DH 群体, 以遗传背景完全一致的株系代替杂种 F₂ 单株, 以稳定的量化形式表现群体的个体性状, 使处理的结果更加准确.

本研究发现的 4 个苗期耐冷性 QTLs, 3 个来自于粳稻 JX17, 只有 1 个来自于籼稻 ZYQ8;

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1999-44-22-2402>

这与 Kakio 等人¹⁾的报道的耐冷性遗传是由多基因控制的数量形状(这些耐冷性基因多数存在于粳稻中)的结论类似. 将耐冷性 QTLs 定位结果与本实验室所做的程氏指数及鉴定性状 QTLs 定位结果(待发表)比较后发现: 在定位到的4个苗期耐冷性 QTLs 之中, 有1个与控制谷粒长宽比的 QTL 同位于第3染色体的 C63-CT125 区间. 另外3个分别与第1染色体上控制穗轴第1~2节长的 QTL、第2染色体上控制谷粒长宽比的 QTL、第4染色体上控制程氏指数的 QTL 紧密连锁²⁾, 这表明耐冷性确与籼粳分化有关.

由于采用了动态分析方法, 发现4个 QTLs 在不同时期控制着苗期的耐冷性, 其基本模式可归纳为: 低温处理期控制苗期的耐冷性是粳稻的 $qSCT-1$, $qSCT-2$ 及籼稻的 $qSCT-4$. 其中 $qSCT-4$ 只在低温处理期起作用, 而 $qSCT-3$ 只在常温恢复前期控制苗期的耐冷性, 在常温恢复后期起作用的是粳稻 $qSCT-1$ 和 $qSCT-2$. 看来苗期的耐冷性受到4个 QTLs 之间的不同组合的控制(图3), 预备试验(本实验室未发表资料)亦发现 $qSCT-1 \sim qSCT-4$ 耐冷性基因在不同的时期表达, 与本研究结果类似.

图3 4个 QTLs 作用模式

值得注意的是在低温处理的第6, 7 d, 受冷害伤害致死的株系迅速上升, 即三叶期水稻秧苗的冷害最为严重, 这与前人的结果基本一致^[3]. 在该 DH 群体中, 产生了部分在耐冷性上超亲的株系, 通过对耐冷性 QTLs 的基因型分析, 我们发现4个 QTLs 聚合的个体耐冷性超过粳稻亲本 JX17, 而1个耐冷性 QTL 都没有的个体耐冷性比籼稻 ZYQ8 还要差, 这表明本实验检测到的与耐冷性有关的 QTLs, 可用于苗期耐冷性分子育种, 通过耐冷性 QTLs 的聚合、重组, 再辅之以籼粳型筛选及农艺性状的改良, 是可以把粳稻的耐冷性基因转入籼稻之中, 这将有助于解决早籼稻品种的冷害问题.

致谢 本工作为中国水稻基因组研究计划资助项目.

参 考 文 献

- 1 梁 谊. 亚洲水稻耐冷性研究现状. 云南农业大学学报, 1998, 13(1): 135~ 138
- 2 Li C C, Rutger J N. Inheritance of cool temperature seedling vigor in rice and its relationship with other agronomic characters. Crop Sci, 1980, 20: 295~ 298
- 3 熊振民, 朱旭东, 邵达夫, 等. 水稻耐冷性早期鉴定技术的研究. 浙江农业科学, 1984, 6: 276~ 280
- 4 徐云碧, 申宗坦. 籼粳稻间苗期耐冷性的遗传研究. 中国农业科学, 1989, 22(5): 14~ 18
- 5 Yan C G, Li X, Yu H X, et al. Identification of a QTL for cold tolerance at early seedling stage via RFLP markers in rice (*O Sativa* L). CRRN, 1998, 6(4): 1~ 2
- 6 McCouch S R, Cho Y G, Yano M, et al. Report on QTL nomenclature. Rice Genet Newslett, 1997, 14: 11~ 13
- 7 何 平, 沈利爽, 陆朝福, 等. 水稻花药培养力的遗传分析及基因定位, 遗传学报, 1998, 25(4): 337~ 344

(1999-04-07 收稿, 1999-07-09 收修改稿)

1) 见 2402 页脚注 2)

2) 钱 前, 何 平, 郑先武, 等. 籼粳分类的形态指数及鉴定性状的遗传分析. 中国科学, C 辑, 2000(已接收)