

水稻籼粳交 DH 群体耐热性的 QTLs 定位*

曹立勇^{1,2} 朱 军¹ 赵松涛³ 何立斌² 颜启传¹

(1. 浙江大学农业与生物技术学院, 杭州 310029; 2. 中国水稻研究所, 杭州 310006; 3. 南京农业大学, 南京 210095)

摘要 耐热性是水稻(*Oryza sativa* L.)抗逆研究中最重要性状之一。应用典型的籼(*Oryza sativa* L.spp.*indica*)、粳(*Oryza sativa* L.spp.*japonica*)交组合 IR64×Azucena 花药培养的 DH 群体及其已构建的分子连锁图谱,在田间及温室高温条件下对该 DH 群体的结实率性状进行考查。采用 QTL mapper 1.0 软件检测控制结实率的加性和上位性效应的数量性状位点(QTL),在第 1、3、4、8 和 11 等 5 条染色体上,共检测到 6 个具有加性效应的 QTLs。其中位于第 1、3 染色体的 2 个加性效应 QTLs 来自父本 Azucena 的等位基因,是耐热的 QTL,能提高结实率 9.50%和 6.46%,其贡献率为 19.15%和 2.86%。位于其余 3 条染色体的 4 个加性效应的 QTLs 来自母本 IR64 的等位基因,能提高结实率 4.33%~10.37%。在第 1、2、3、4、5、7、8、11 等 8 条染色体之间还检测到 8 对加性×加性上位性效应,其贡献率为 2.27%~8.13%。讨论了应用分子标记辅助育种选育耐热性水稻的可能性。

关键词 DH 群体;耐热性;QTL;上位性

Mapping QTLs for Heat Tolerance in a DH Population from *indica-japonica* Cross of Rice(*Oryza sativa*)

Cao Liyong^{1,2} Zhu Jun¹ Zhao Songtao³ He Libin² Yan Qichuan¹

(1. Agricultural and Biotechnology College, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

2. China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China; 3. Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Heat tolerance is one of the most important traits in rice (*Oryza sativa* L.). A double haploid (DH) population derived from a cross between a *japonica* male parent Azucena and *indica* female parent IR64, was used for detecting additive effect (A) of quantitative trait loci (QTLs) and their additive×additive epistasis (AA) under field and greenhouse experimental environments for rice heat tolerance. The spikelet fertility (SF) of 109 DH lines was measured. QTL analysis was conducted based on the constructed molecular linkage map and software QTL mapper 1.0. Six additive effect QTLs were detected on chromosomes 1, 3, 4, 8 and 11 respectively, among which two additive effect QTLs for heat tolerance on rice chromosomes 1, 3 were coming from Azucena, which enhancing 9.5% and 6.64% of SF, their variance explained was 19.15% and 2.86%. Four additive effect QTLs on other three rice chromosomes were coming from IR64, which enhancing 4.33%~10.37% of SF. Eight pairs epistasis effects QTLs were detected on chromosomes 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8 and 11. Their variance explained was 2.27%~8.13%. Molecular marker-assisted selection for heat tolerance in rice is also discussed.

Key words: DH population; heat tolerance; QTL; epistasis analysis

水稻是我国的主要粮食作物,水稻产量性状尤其是结实率易受环境条件特别是外界高温的影响。随着工业化进程的加速,全球产生了越来越明显的“温室效应”^[1],使得世界各水稻生产地区在水稻抽穗开花期或灌浆期经常遭受热害的影响。因此对水稻耐热性的遗传研究及其选育耐热品种,对促进水

稻生产持续、稳定的发展有重要意义。

水稻幼穗分化及开花结实期是高温胁迫的敏感期,热害主要影响结实及灌浆,其中结实率下降是热害最为敏感的指标之一,可综合反映水稻颖花开放、散粉和受精的综合受害程度,高温下结实率的稳定性是耐热性的重要指标。研究表明,抽穗后 3 d 平均

* 基金项目:浙江省自然科学基金(301254)和浙江省重大项目资助。

曹立勇:男,1966年生,博士,副研究员。E-mail:<caolycgf@mail.hz.zj.cn>.

收稿日期:2001-10-24

最高温度 $\geq 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 可作为早籼稻品种热害的临界温度^[2],开花期对高温最为敏感^[3],耐高温筛选以 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 较好^[4];水稻乳熟前期(抽穗后 6~10 d)是高温影响结实率的重要时期,乳熟后期(抽穗后 11~15 d)是高温影响千粒重的重要时期^[3,4]。国外从 20 世纪 70 年代开始以高温胁迫后结实率与常温下结实率的比值为指标进行了耐热品种的筛选以及耐热性的数量遗传分析,但由于种种原因,对水稻耐热性的遗传没有作深入研究^[5,6]。尽管影响水稻结实率和千粒重是一个复杂的综合过程,但品种是否耐热,即品种的热稳定性是一个关键性因素,因此有必要对耐热性的遗传机理、耐热基因的定位等问题进行研究。本研究应用一对典型的籼粳交花药培养的 DH 群体及其构建的分子连锁图谱,在田间及温室高温条件下对该群体的结实率性状进行考查,以研究水稻耐热性的基因位点(QTL)数目、分布以及基因的加性、上位性等效应及其与环境的互作关系,以期建立水稻耐热的分子标记辅助育种的技术体系。

1 材料和方法

1.1 DH 群体的产生

以典型的籼稻(*Oryza sativa* L.spp.*indica*) IR64 与粳稻(*Oryza sativa* L.spp.*japonica*) Azucena(热带粳稻品种)为亲本进行杂交,对 F_1 代花药进行离体培养,共获得纯合二倍体(DH 系)135 个,并构建含 175 个 RFLP 标记的遗传连锁图谱,以上工作由国际水稻研究所完成^[7],本研究选取其中的 109 个 DH 系进行研究。

1.2 耐热性实验

分 2 年进行,全部材料分别于 1999 年和 2000-04-01~05-01,每隔 10 d 播种一期,秧龄 25 d 时选取秧苗素质好的移植于盆钵中,并且每一期每

个 DH 株系种植 4 个盆钵,盆钵置于大田中,于 08-01 选择各分期播种中刚抽穗的同一 DH 株系的材料 2 盆移入温室,2 盆仍放于大田,并使温室温度在 9:00~16:00 时保持在 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以上,气温测量分 3 个时段(9:00,13:00,16:00)进行,温室平均温度为 $35\sim 39\text{ }^{\circ}\text{C}$,而大田气温则为 $28\sim 33\text{ }^{\circ}\text{C}$,处理 7 d 后,移出温室放于大田作常规处理,成熟时分别选取温室和大田的单株考种结实率,为了减去结实率在不同的 DH 株系中的遗传背景的差异,以大田环境中的结实率减去高温下的结实率再除以大田环境中相应株系的的结实率作为耐热性的鉴定指标。

1.3 QTL 定位及上位性分析

在已构建的 DH 群体遗传图谱的基础上,采用 QTL mapper 1.0 软件检测控制结实率的加性效应和上位性 QTL,将不同年份当作环境因子处理,进行耐热性 QTL 定位、上位性分析及其与环境的互作效应的分析,以 $\text{LOD} \geq 2.4$ 作为阈值来判断 QTL 的存在与否。互作效应分析以 $P < 0.005$ 为显著水平进行显著性检验^[8]。QTL 的命名原则遵循文献^[9]。

2 结果和分析

2.1 耐热性在双亲及 DH 群体中的表现

DH 群体的籼型亲本为 IR64,粳型亲本为 Azucena,在大田与温室中结实率变化相差较大,1999 年 IR64 在大田与温室中结实率相差 6.21%,而粳型亲本 Azucena 在大田与温室中结实率相差 38.08%;2000 年 IR64 在大田与温室中结实率相差 8.97%,而粳型亲本 Azucena 在大田与温室中结实率相差 31.74%,差异达显著水平。IR64/Azucena 群体各株系在 2 年中的结实率呈连续分布,表现数量性状的特点,其偏斜度和峰值均小于 1,适合于进行耐热性 QTL 分析(表 1)。

表 1 1999 年和 2000 年 IR64/Azucena 群体的结实率变化

Table 1 Phenotypic behavior of spikelet fertility of IR64/Azucena population in 1999 and 2000 /%

环境 Environment	亲本 Parents		DH 群体 DH population					
	IR64	Azucena	平均数 Mean	最大值 Max	最小值 Min	标准差 SD	偏斜度 Skewness	峰值 Kurtosis
Hangzhou in 1999	6.21	38.08	32.64	91.1	0.11	23.81	0.83	-0.17
Hangzhou in 2000	8.97	31.74	34.68	91.9	0.30	24.50	0.65	-0.51

2.2 耐热性 QTL 分析

已构建的连锁遗传图谱含 175 个 RFLP 标记,该图谱各标记均匀分布于全部 12 条水稻染色体上

^[8],适合于 QTL 定位及上位性分析,应用统计软件 QTL mapper 1.0 进行耐热性 QTLs 定位,共检测到 20 个耐热性 QTLs,分布于除第 6、9、10、12 染色体

的其余8条染色体上,其中,有3个只具有加性效应(qhr8-1、qhr11-1和qhr11-2,称为I型),有14个只具有上位性效应(称为III型),有3个既具有加性效应又参与上位性效应的形成(qhr1、qhr3-1和qhr4-3,称为II型);具有显著加性效应的6个耐热性QTLs分布于第1、3、4、8和11等5条染色体,其中位于第1、3染色体的2个耐热性加性效应QTLs

来自父本Azucena的等位基因,能提高结实率9.50%和6.46%,其表型贡献率为19.15%和2.86%,位于其余3条染色体的4个控制耐热性的加性效应QTLs来自母本IR64的等位基因,它能提高结实率4.33%~10.37%;没有检测到耐热性加性效应与环境的互作效应(表2)。

表2 IR64/Azucena DH群体中检测到的具有显著耐热性的加性效应QTLs
Table 2 QTLs of additive effects for heat tolerance in IR64/Azucena DH population

数量性状位点 QTL	标记区间 Marker interval	遗传距离/cM ¹⁾ Distance	LOD值 LOD score	加性效应 Additive effect(A)	贡献率/% Contribution rate (H ² (A))
qhr1	RG381-RZ19	23	10.18	-9.50	19.15
qhr3-1	RZ892-rg100	2	6.35	-6.46	2.86
qhr4-3	RG214-RG143	0	6.35	4.33	1.28
qhr8-1	RG978-RG1G978	11	5.22	5.03	1.73
qhr11-1	RZ400-RG118	13	6.96	8.49	4.94
qhr11-2	RG118-Adh	1	10.65	10.37	22.81

1) QTL最高LOD值处与左侧标记的距离。

1) genetic distance between the most likely positive of the LOD score of the putative QTL and the left-hand side marker.

2.3 上位性互作分析

在DH群体中共检测到8对耐热性加性×加性上位性互作效应(表3),其贡献率为2.27%~8.13%,涉及第1、2、3、4、5、7、8、11等8条染色体,其中位于第7条染色体的qhr-1与第11条染色体

的qhr11-4 2个位点的互作贡献率达8.13%,其重组型互作能提高结实率10.89%。在所构成的上位性效应中,有6对发生在III×III型之间,而发生在III×II之间和II×II型之间的分别只有1对(图1)。

表3 IR64/Azucena DH群体中检测到的耐热性加性×加性上位性互作效应
Table 3 Additive×additive epistasis effects for heat tolerance in IR64/Azucena DH population

位点 QTL	标记区间 Marker interval	遗传距离/cM ¹⁾ Distance	位点 QTL	标记区间 Marker interval	遗传距离/cM ¹⁾ Distance	LOD值 LOD score	上位性效应 ²⁾ Epistasis effect(AA)	贡献率/% Contribution rate(H ² (AA))
qhr1R	G381-RZ19	23	qhr11-3	Npb44-RG247	0	11.47	-5.76	2.27
qhr2-1	CDO686 AmyAC	6	qhr4-2	RG190-RG908	9	5.45	-10.14	7.04
qhr2-2	RG95-RG654	8	qhr7-2	RZ978-CDO38	2	5.89	10.09	6.98
qhr2-3	RG654-RG256	5	qhr4-1	RG218-RZ262	0	4.51	6.53	2.92
qhr3-1	RZ892-rg100	1	qhr4-3	RG214-RG143	0	6.35	7.33	3.68
qhr3-3	RG179-CDO337	3	qhr5-1	Rg13-CDO105	1	4.32	-6.77	3.14
qhr5-2	CDO105-RZ649	0	qhr8-2	Amp_2-CDO99	0	5.22	8.04	4.44
qhr7-1	RZ337B-CD0497	2	qhr11-4	RG247-RG103	1	5.38	-10.89	8.13

1) QTL最高LOD值处与左侧标记的距离;2) 效应方向:正值,亲本型>重组型;负值,重组型>亲本型。

1) genetic distance between the most likely positive of the LOD score of the putative QTL and the left-hand side marker;2) direction of effect: positive value expresses parent type> recombinant type; negative value expresses recombinant type>parent type.

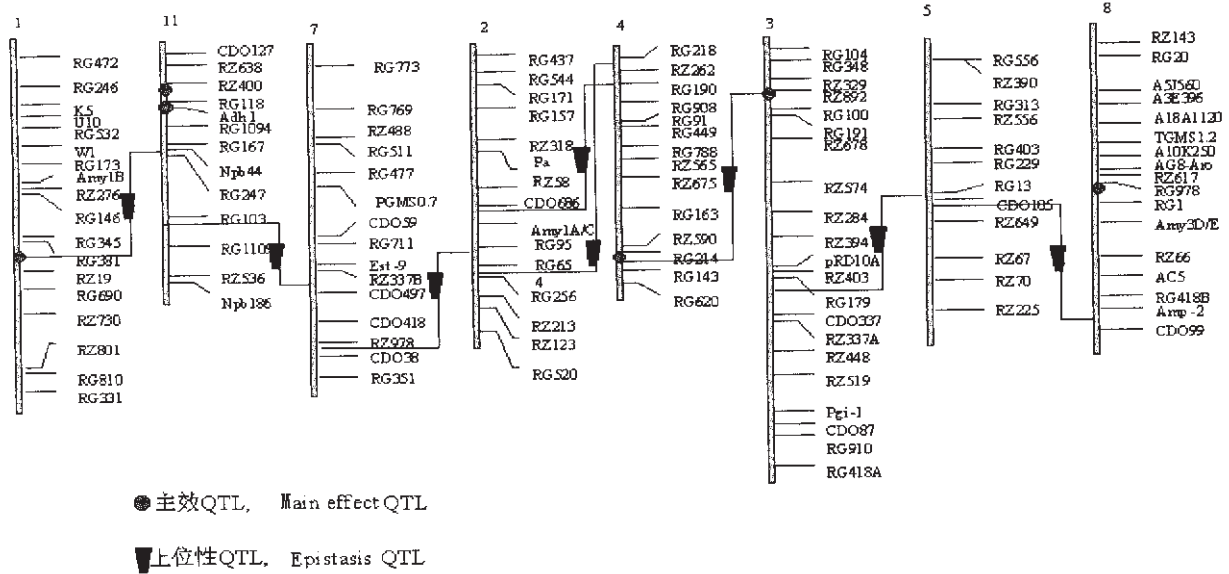


图 1. 耐热性的 QTL 图谱

Fig.1. The QTL map of heat resistance

从表 2、3 中还可见,在各种效应中,以耐热性加性效应的贡献率最高,达 52.77%。其次为耐热性加性×加性上位性效应,贡献率为 38.60%。而耐热性加性效应与环境的互作效应及加性×加性上位性效应与环境的互作效应均未检测到,说明这个群体结实率数量性状基因受加性效应和上位性效应的影响较大,在 1999 年和 2000 年两种环境下,结实率变异较小。

3 讨论

水稻耐热性的反映指标有生化和形态指标,但耐热性的直接鉴定方法主要是考察抽穗期高温处理后结实率是否下降。本实验采用田间自然温度与温室高于 35℃两种处理相结合对水稻籼粳交 DH 群体进行结实率考查,实验方法简便直观,用该方法共检测到了 20 个耐热性 QTL,这与前人报道的耐热性遗传是由多基因控制的数量性状的结论相似^[2,5,6]。其中,有 6 个耐热性加性效应 QTLs,分别位于 1、3、4、8、11 染色体上,这与邢永忠等^[10]检测到的控制水稻结实率的 QTLs 数相同;还检测到 8 对耐热性上位性效应,但在两个环境中均未检测到耐热性加性效应与环境的互作效应和上位性与环境的互作效应。QTL 与环境互作是影响数量性状表达的重要因素,许多研究比较了不同环境下同一群体的 QTL 定位情况来分析 QTL 与环境的关系。Paterson 等^[11]和 Zhuang 等^[12]发现 QTL 对环境敏感,但 Stuber 等^[13]在

6 个环境下,定位玉米的有关性状,几乎没有找到 QTL 与环境互作的证据。邢永忠等^[10]在环境差异较大的情况下,所定位的 34 个水稻穗部性状 QTLs 中,只有 6 个与环境互作,而对遗传力稍高的每穗实粒数,没有一个 QTL 与环境互作。这并不意味着加性效应和上位性效应不受环境的影响,如果以不同地点或多个年份作为环境计算,则加性效应和上位性效应可能受环境的影响较大。但就育种而言, QTL 的遗传与环境 (GE) 互作好比一把双刃剑,没有显著 GE 互作效应的有利基因,其效应受环境影响小,可保证品种的稳定性。因此,在改良作物性状时,要特别注意 QTL 是否与环境互作。

本实验结果表明,从父母本中都发现了耐热性加性效应 QTL,在 DH 群体中也发现了比父母本更耐热的株系。这表明,控制耐热性的 QTLs 被分散在两个亲本中。耐热性 QTLs 的聚合能产生比双亲更耐热的株系,在高温下能有较高的结实率。本研究检测到的 6 个耐热性加性效应 QTLs,在分子标记辅助选择中,可以利用标记辅助选择改良水稻的耐热性,从而解决水稻的热害问题。

本研究对水稻开花期热害的临界温度未作深入研究,如采用人工气候箱稳定的控温条件,分期采用 3、5、7、10 d 及 35~39℃高温处理相结合,结果可能更为准确,同时也更能说明水稻耐热的机理。Maribel 等^[14]和 Bose 等^[15]研究表明,水稻植株受热胁迫,主要是由于 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加

氧酶 Rubisco)的活性下降所致,而 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶是水稻光合作用中的一个关键性的酶,水稻耐热品种具有较高的 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶的活性,因此如果能对该 DH 群体进行 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶的活性和光合速率的测定,则更能从分子水平上剖析水稻的耐热机理。

参 考 文 献

1 周广胜,王玉辉. 全球变化与气候 - 植被分类研究和展望. 科学通报,1999,44:2587~2593
 2 徐云碧,石春海,申宗坦. 热害对早稻结实率的影响. 浙江农业科学,1989(2):14~18
 3 上海植物生理研究所人工气候室. 高温对早稻开花结实的影响及其防治: I 高温对早稻灌浆 - 成熟期的影响. 植物学报,1976,18:250~257
 4 上海植物生理研究所人工气候室. 高温对早稻开花结实的影响及其防治: II 早稻开花期高温对开花结实的影响. 植物学报,1976,18:323~329.
 5 森谷国男. 稻的耐暑性. 农业科技,1990,4(7):328~331
 6 Mackill D J, Coffman E R, Rutger J N. Pollen shedding and combining ability for high temperature tolerance in rice. Crop Sci, 1982, 22:730~733
 7 Huang N, McCouch S R, New T, et al. Development of an RFLP map from a doubled haploid population in rice. Rice

Genet News, 1994, 11:134~137
 8 Wang D L, Zhu J, Li Z K, et al. Mapping QTLs with epistatic effects and QTL × environment interaction by mixed linear model approaches. Theor Appl Genet, 1999, 99:1255~1264
 9 McCouch S R, Cho Y G, Yano M, et al. Report on QTL nomenclature. Rice Gene Newslett, 1997, 14:11~13
 10 邢永忠,徐才国,华金平,等. 水稻穗部性状的 QTL 与环境互作分析. 遗传学报,2001,28:439~446
 11 Paterson A H, Domon S, Hewitt J D, et al. Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: comparison across species, generation, and environments. Genetics, 1991, 127:181~197
 12 Zhuang J Y, Lin H X, Lu J, et al. Analysis of QTL × environment interaction for yield components and plant height in rice. Theor Appl Gene, 1997, 95:799~808
 13 Stuber C W, Lincoln S E, Wolff D W, et al. Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite inbred lines using molecular markers. Genetics, 1992, 132:823~839
 14 Maribel L, Dionisio Sese, Mariko Shono, et al. Effects of proline and betaine on heat inactivation of ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase from rice seedlings. JIRCAS Working Rep, 1999, (14):67~75
 15 Bose A, Ghosh B. Effect of heat stress on ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase in rice. Phytochemistry, 1995,38:1115~1118

·农业生物技术研究成果·

大豆耐盐性研究与应用

Study and Application of Salt Tolerance in Soybean

从鉴定大豆种质方法入手,鉴定了国内外大豆种质 4 200 余份,筛选出一批耐盐种质。遗传研究表明大豆耐盐性受一对耐盐显性基因控制,并在分子水平上得到验证。选育了一批耐盐品系及审定推广了耐盐品种中黄 10 号,在盐碱地区累计种植面积达 2.3 万 hm²。耐盐生理及耐盐机理研究表明,盐不仅引起大豆质膜渗漏,而且存在离子毒害。大豆 SOD 有 7 条酶带,盐胁迫诱发 6 条新酶带,耐盐和盐敏感品种主要差异在叶绿体 SOD 酶谱上。离子运输研究明确了大豆的耐盐机制:(1)对离子的选择性吸收与排氯;(2)离子由根向叶运输过程中被重新分配。因而调控大豆耐盐基因可能编码了一类与离子运输相关的蛋白,已获得了大豆 Na/H 交换运输蛋白(Nhx)、钾离子通道蛋白(ATK)与氯离子通道蛋白(CLC)的部分编码基因,并克隆了特异表达基因的部分序列,鉴定出与大豆耐盐基因紧密连锁的 PCR 标记,该标记已申请国家专利。筛选出的 4 个 SSR 标记,其中之一 Satt431 定位在遗传连锁图 U01 上,与耐盐基因遗传距离仅 9.4 cM。本研究将推动我国耐盐生理、耐盐育种及耐盐生理的分子生物学深入研究。耐盐品系被科研单位及生产部门应用,产生了明显的经济效益,经联机和专家鉴定,该研究总体水平居国内领先。研究成果将有助于使我国大豆耐盐性研究总体水平进入国际先进行列。

主要研制单位:中国农业科学院作物育种栽培研究所,北京 100081 联系人:邵桂花 电话:(010)68919494