水稻籽粒砷、铜、铁、汞、锌含量QTL挖掘及候选基因分析

朱鸿宇^{1†}, 王盛^{1†}, 张月¹, 林晗¹, 路梅¹, 吴先美², 李三峰², 朱旭东², 饶玉春^{1*}, 王跃星^{2*}

1. 浙江师范大学, 浙江省特色经济植物生物技术研究重点实验室, 金华 321004;

2. 中国水稻研究所, 水稻生物学国家重点实验室, 杭州 310006

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: ryc@zjnu.cn; wangyuxing@caas.cn

收稿日期: 2020-02-26; 接受日期: 2020-05-18; 网络版发表日期: 2020-06-04

国家自然科学基金(批准号: 31971921)、浙江省自然科学基金(批准号: LR20C130001)和浙江省“万人计划”青年拔尖人才(批准号: ZJWR0108023)资助

摘要 水稻是关键的粮食作物, 金属污染是影响水稻产量和品质的重要因素. 挖掘与水稻籽粒金属含量积累相关的数量性状基因座(quantitative trait locus, QTL), 并分析其候选基因, 再通过遗传育种手段提高水稻耐金属离子胁迫的能力, 可有效减少土壤金属污染所造成的损失. 本研究以粳稻品种热研(Nekken)为母本, 籼稻品种华占(HZ)为父本, 杂交获得F1代后, 连续自交多代, 得到的120个重组自交系(recombination inbred line, RIL)群体为实验材料. 在相同且适宜的条件下培养, 常规管理, 在成熟期对各株系水稻籽粒内的金属离子含量进行测定. 利用该RIL群体构建遗传图谱, 对水稻耐金属离子胁迫的QTL进行定位分析, 结果共检测到9个水稻金属离子含量QTL. 其中包含1个与Cu、Hg积累相关的多效QTL; 3个与As积累相关的QTLs; 2个与Fe积累相关的QTLs, 其中一个的likelihood of odd(LOD)值高达5.53; 2个与Zn积累相关的QTLs, 其中一个的LOD值高达7.29. 对这些QTLs区间内与耐金属离子胁迫相关的候选基因进行定量分析发现, *LOC_Os01g14440*, *LOC_Os01g18584*, *LOC_Os01g20160*, *LOC_Os04g34600*这4个基因在双亲间的表达量差异显著, 结合亲本对不同金属离子的浓度积累数据结果, 本团队推测, *LOC_Os01g14440*, *LOC_Os01g18584*, *LOC_Os01g20160*的高表达可能会极大提高水稻对Zn离子胁迫的吸收和耐受能力, 而*LOC_Os04g34600*的高表达可能增加水稻对Fe胁迫的吸收和耐受能力. 通过本次QTL的挖掘和分析发现, 这些基因与水稻籽粒的金属离子积累有关, 可能会影响水稻耐金属离子胁迫的能力, 为进一步培育和筛选耐金属离子胁迫的水稻品种创造了条件.

关键词 水稻, 抗性, 金属离子含量, QTL分析, 候选基因

引用格式: 朱鸿宇, 王盛, 张月, 等. 水稻籽粒砷、铜、铁、汞、锌含量QTL挖掘及候选基因分析. 中国科学: 生命科学, 2020, 50
Zhu H Y, Wang S, Zhang Y, et al. QTL excavation and analysis of candidate genes in contents of As, Cu, Fe, Hg and Zn in rice grain (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2020, 50, doi: [10.1360/SSV-2020-0052](https://doi.org/10.1360/SSV-2020-0052)

水稻是亚洲人的主要粮食作物,也是世界三大粮食作物之一,在农业生产中占据了关键地位^[1]。近年来,随着人口的快速增长和城市工业化进程的加快,土壤的金属污染已经成为威胁作物生长、农产品安全和国民健康的重要因素^[2]。中国耕地土壤重金属污染发生概率为16.7%,受污染的土壤约2000万 hm^2 ,占耕地总面积的1/6左右^[3]。土壤中的重金属污染存在隐蔽性、滞后性、不可逆性和后果严重性等特点^[4],其潜在的毒性会阻碍水稻的生长发育,显著降低水稻的产量和品质,甚至会通过食物链危害人类的生命和健康^[5]。例如,随着铜浓度的增加,水稻株高、生物产量和经济产量均明显下降^[6]。研究发现,汞污染可引发水俣病等严重疾病,汞被认为是毒性最大的重金属之一^[7]。砷的毒性依赖于其不同的化学形态,不同存在形态的砷会在不同程度上造成多种器官的细胞毒性,对人体组织和器官造成不可逆的伤害,而且和多种癌症的发生密切相关^[8]。铁和锌虽然是水稻生长必需的微量元素,但在厌氧环境中,铁主要以二价形式存在,极易被水稻吸收并过量积累,从而造成亚铁毒害^[9]。在二价铁污染的土壤中,水稻也容易发生锌离子毒害^[10]。土壤中过量的铁和锌会抑制水稻的生长,导致产量下降^[11]。

因各种外在因素,如水稻种植方式、所处环境不同等,金属污染造成的影响往往存在差异性^[12]。水稻籽粒中的金属含量与其耐金属离子胁迫能力密切相关,前者可在一定程度上体现水稻植株对金属离子的忍耐能力,因而可用作研究耐胁迫能力的重要指标。加强相关性状基因或相关抗性的数量性状基因座(quantitative trait locus, QTL)的鉴定、分离、克隆、组织结构及其启动子活性研究,利用基因工程的方法改良水稻,提高水稻的耐重金属逆境胁迫能力,可有效减少重金属污染所造成的损失^[13,14]。水稻耐金属离子胁迫是由多基因控制的数量性状,在遗传育种中,功能基因组学的快速发展有助于人们了解控制重要农艺性状的数量性状基因,从而加速改良育种的进程^[15]。目前,已有多个水稻的金属含量或耐金属离子胁迫相关的QTLs位点被成功鉴定。例如,姚盟成等人^[16]利用栽培稻优良品种“特青”与普通野生稻“元江普野”构建了双单倍体(doubled haploid, DH)群体,考察其苗期耐 Cu^{2+} 胁迫指标, QTL定位分析检测到11个与硫酸铜胁迫相关的QTLs,分别位于1, 2, 6, 7, 8, 9和10号染色体

上。饶玉春等人^[17]以典型籼粳杂交(春江06/台中本地1号(TN1))的DH群体为材料,对其双亲及DH群体进行 CuSO_4 胁迫处理,考察群体的耐铜性,共检测到与铜胁迫有关的QTLs共7个,分别位于水稻1, 2, 3和7号染色体上。Pradhan等人^[18]用关联作图法测定了水稻籽粒铁含量的 $q\text{Fe}3.3$ 和 $q\text{Fe}7.3$ 和锌含量的 $q\text{Zn}2.2$, $q\text{Zn}8.3$ 和 $q\text{Zn}12.3$ 。他们还发现了4个共定位的QTLs(即籽粒铁含量的 $q\text{Fe}3.3$, $q\text{Fe}7.3$, $q\text{Fe}8.1$ 和 $q\text{Fe}12.2$)与控制籽粒锌含量的 $q\text{Zn}3.1$, $q\text{Zn}7$, $q\text{Zn}8.3$ 和 $q\text{Zn}12.3$ 共定位。他们对 OsZIP6 和 OsZIP8 基因进行了Fe-Zn缺乏处理后的定量实验,发现这两个基因表达量在铁锌缺乏条件下均显著上调。赵春芳等人^[19]以籼稻品种9311为遗传背景携带日本晴置换片段的119个染色体片段置换系(chromosome segment substitution lines, CSSL)群体为实验材料,以相对根长为耐性指标,利用代换作图方法对水稻苗期耐 Fe^{2+} 胁迫的QTL进行了定位,共鉴定出9个耐 Fe^{2+} 胁迫的QTLs,分布于水稻2, 5, 6, 7和12号染色体上。黄莹莹等人^[20]以粳型红香黏品种红香1号与早熟长粒优质粳稻品系松98-131杂交后代 $\text{F}_{2,3}$ 家系群的140个株系为材料,定位到与水稻籽粒Zn含量相关的QTLs共4个,分布于2, 5, 9, 12号染色体上;在3号染色体和7号染色体上检测到与籽粒Fe含量相关的QTLs共2个;在3, 4和9号染色体上都检测到与籽粒Cu含量相关的QTLs。Norton等人^[21]以一个 F_6 的RIL群体(亲本分别为籼稻Bala和粳稻Azucena)为实验材料,检测到与水稻叶片As积累相关的6个QTLs;在1, 3, 6号染色体上定位到3个与水稻叶片Fe积累相关的QTLs位点;7号染色体上定位到1个与水稻叶Zn积累相关的QTL;在1, 6, 8染色体上定位到6个与水稻叶Cu积累相关的QTLs。林晗等人^[22]利用粳稻品种春江06和籼稻品种台中本地1号的DH群体,对水稻耐 Fe^{2+} , Al^{3+} , Cd^{2+} 和 Na^+ 的QTLs进行检测分析,发现了8个耐各种金属离子胁迫的QTLs,分别位于水稻第1, 2, 4, 6, 9, 10和11染色体上。

虽然近年有关水稻中籽粒金属离子含量或耐金属离子胁迫QTLs定位的研究取得了一定进展,但由于水稻抗逆性的遗传机制较为复杂,存在复杂的上位性互作等遗传机制,且目前检测到的耐金属离子胁迫的QTLs效应值较小,所以对相关基因的精细定位和克隆研究一直进展较慢^[22]。本研究以华占(HZ)、热研(Nekken)及其后代群体120个重组自交系为材料,以籽粒的金属离子含量为检测指标,系统考察双亲及其RIL群

体耐各种金属离子胁迫的情况, 并对其进行了遗传分析和QTLs定位, 期望能找到稳定、有效的QTLs, 为培育耐金属胁迫的水稻品种提供新的位点.

1 材料与方法

1.1 实验材料

以粳稻品种热研为母本, 籼稻品种华占为父本, 杂交产生F₁代, 对F₁代采取单粒传代的方式开展套袋自交, 连续自交多代后得到基因型和表型相对稳定的120个重组自交系, 组成遗传群体(图1).

1.2 实验方法

(1) 水稻种植与管理. 取各株系的种子各60粒, 用70%浓度的酒精与10%浓度的次氯酸钠依次对水稻种子的表面进行10 min消毒处理, 接着用去离子水冲洗数次, 彻底洗去消毒液后, 将种子置于水中浸润24 h, 在浸种期间换水一次. 然后用湿毛巾包裹住种子, 将其置于37℃恒温培养箱中催芽48 h, 挑选露白一致的种子在水稻育秧田进行播种. 1个月后, 选择长势一致的水稻秧苗每株系各24株进行移苗插秧, 每株系4行6列. 在水稻的生长发育期间进行常规田间管理, 除草除虫等.

(2) 籽粒米粉制备及金属含量上机测定. 在水稻籽粒完熟期收获籽粒, 晒干后储存, 用JDMZ 100型稻谷出米率检测仪脱壳. 糙米经JNMJ3型检验碾米机磨成精米, 再使用FS-II型旋风式粉碎磨磨成米粉. 将米粉经过GB/T 6003.1-2012型标准检验筛筛粉后装入10 cm×6 cm型纸袋. 称取0.500 g水稻米粉样品, 于SC475型样品消化管中, 加入8 mL硝酸, 轻轻摇晃混匀, 在通风柜中冷消化过夜. 利用DigiBlock ED54型石墨消解仪消化样品(消化时不加盖子): 120℃, 2~3 h, 当管内消化溶液剩余1~2 mL后取出, 室温冷却, 加入3 mL双氧水; 继续消化至液体低于1 mL(约50~60 min); 取出, 直接用超纯水定容到25 mL, 摇晃均匀. 做空白和标准米粉对照, 整个消化过程均需在通风柜中处理, 并取各金属离子前处理后和对照空白组的溶液样品, 转移至玻璃管, 用于上机测样. 使用XSERIES 2型感应耦合等离子体质谱仪测定不同处理组的金属元素含量.

(3) 遗传图谱的构建. 利用华占/热研杂交, 通过单

图1 亲本与RIL群体的构建原理图

Figure 1 Schematic overview of the parents-RIL population and material construction

粒传代的方法连续套袋自交, 最终获得120个重组自交系遗传群体, 在第12代对双亲及120个RILs进行基因组重测序. 将获得的重组自交系测序数据进行整理, 获得均匀分布在12条染色体的4858个标记, 构建遗传图谱.

(4) QTL定位分析. 在实验室前期已构建的高密度单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)分子标记连锁图谱的基础上, 采用区间作图法, 用Mapmaker/QTL1.1B软件分别对各株系中As, Cu, Fe, Hg, Zn的含量进行QTL定位分析, 将likelihood of odd(LOD)=2.5设置为阈值来判断QTL的存在. QTL的命名遵循McCouch等人^[23]原则.

(5) 基因表达定量分析. 利用TRIzol总RNA提取试剂盒(Invitrogen, 美国)提取成熟期水稻植株的总RNA, 用DNase I处理RNA样品, 再按照逆转录试剂盒ReverTra Ace® qPCR RT Kit (Toyobo, 上海)的说明书把RNA反转录成cDNA(complementary DNA). 根据QTL定位结果, 在第1, 2和4号染色体区间内选取与金属离子吸收或转运相关的候选基因, 设计引物(表1), 开展定量实验. 利用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)方法, 分析各候选基因在成熟期双亲叶片中的表达量. 以*OsActin*作为内参基因, 每个反应做3个平行复孔, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行相对定量分析. 重复3次独立反应. 使用的仪器为7500实时PCR体系(ABI, 上海), 用Excel和SPSS19.0软件对所得到的数据进行统计分析, 采用t检验比较不同数据间的差异显著性. 本实验中的qRT-PCR反应体系如下: 总体积20 μ L, cDNA模板2 μ L, SYBR qPCR Mix (Toyobo) 10 μ L, 正反引物(10 μ mol/L)各0.8 μ L, 加ddH₂O补足至20 μ L. qRT-PCR的仪器中设置的扩增程序为: 先98℃加热2 min; 然后运行40个循环, 单个循环程序为98℃ 10 s, 60℃ 10 s, 68℃ 30 s.

表 1 相关基因的引物序列

Table 1 The primer sequence of related genes

引物名称	序列(5'-3')	温度(℃)	长度(bp)
LOC_Os01g46800-F-qrt	CCGTGCAAGAAGAGGAAGAC	59.99	240
LOC_Os01g46800-R-qrt	GTACACGACGTCGAAGAGCA	60.06	
LOC_Os01g47560-F-qrt	TGCAGATGGACTACGACCTG	59.86	242
LOC_Os01g47560-R-qrt	CTCCTCCTTCTTGCACCTTG	59.98	
LOC_Os01g14440-F-qrt	AAAGGCCTCAAATGATGCAG	60.21	217
LOC_Os01g14440-R-qrt	CCACGTTCTTGGTCCTTGTT	60.01	
LOC_Os01g18584-F-qrt	GGGCTAGACTTGCTGACCAC	59.87	226
LOC_Os01g18584-R-qrt	GCGTGACCTGCAGATACTGA	60.02	
LOC_Os01g20160-F-qrt	CCTGCCACCTTACACCACCTT	60.03	199
LOC_Os01g20160-R-qrt	GCTGTAGTTGATGGGGTCGT	60.00	
LOC_Os01g15340-F-qrt	GGTGAGATTGGTGAGAAGC	59.66	167
LOC_Os01g15340-R-qrt	GGGAGGGGTCCTCGTAGTAG	59.95	
LOC_Os04g34600-F-qrt	AACAACAGGTCAGGGGCTAA	59.59	151
LOC_Os04g34600-R-qrt	GTGCTCCTTCTCCTCCTTCC	60.34	

2 结果与讨论

2.1 金属含量在双亲及重组自交系群体中的表现

检测后, 双亲(HZ和Nekken)的金属离子积累量差异明显(图2)。在Zn的离子积累量上, HZ浓度为28.24 mg/kg, Nekken浓度为32.65 mg/kg, HZ的Zn金属离子积累量低于Nekken, 推测HZ耐Zn离子胁迫的能力不如Nekken。但在As, Cu, Fe, Hg四种金属离子的积累量上, HZ分别为0.2225 mg/kg, 3.70 mg/kg, 3.24 mg/kg和0.0046 mg/kg, Nekken为0.2023 mg/kg, 2.35 mg/kg, 2.72 mg/kg和0.0010 mg/kg。HZ对这四种金属离子的积累量明显高于Nekken, 推测HZ耐这四种金属离子胁迫的能力强于Nekken。RIL群体对五种金属离子积累如图3所示, 所获的数据均表现为连续正态分布, 且分布范围较为广泛, 存在较多超亲个体, 表现出数量性状的遗传特点, 符合QTL区间作图的要求。

2.2 QTL定位分析

利用前期构建的SNP分子标记连锁图谱进行QTLs定位分析, 共检测到9个耐金属离子胁迫相关QTLs(表2), 标记于遗传图谱上(图4)。其中, 对于As, 共检测到3个QTLs, 均位于2号染色体上, 彼此之间的物理距离较近, 分布在24275512~25829695 bp的距离

内。对于Cu, 在1号染色体26202736~27114866 bp物理距离内检测到1个QTL, LOD值为3.59。对于Hg, 检测到1个位于1号染色体上的QTL, 处于物理距离为26384440~28310699 bp的区间内, 与耐Cu胁迫的QTL存在重叠区间。对于Fe, 共检测到2个QTLs, 1个位于2号染色体10928729~11091849 bp的物理距离内, 1个位于4号染色体20846301~20998643 bp的物理区间内, 其中位于2号染色体的QTL的LOD值较大, 达到了5.53。对于Zn, 检测到2个QTLs, 均位于1号染色体, 且物理距离较近, 其中物理距离在5561170~11899375 bp之间的QTL的LOD值达到了7.29。

2.3 耐金属离子胁迫相关基因的表达分析

本团队通过水稻基因组注释网站(<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)对上述LOD较大的QTLs所在的区间进行候选基因分析, 并对筛选到的候选基因的功能信息进行了初步整理(表3)。

这些基因主要包括WRKY转录因子、HKT基因家族, HAK1胁迫响应基因、ASR5调控基因等。本团队进一步通过实时荧光定量PCR选择性地对这些基因在成熟期双亲间的表达量进行了对比, 结果见图5。位于Cu/Hg的QTLs重叠区的LOC_Os01g46800在亲本间的表达量没有显著性差异; 位于Zn的QTLs定位区的基因

图2 水稻亲本中不同金属的含量. *和**分别表示HZ与Nekken在0.05和0.01水平上差异显著

Figure 2 Differences in metal content between parents of rice. * And ** indicate significant differences between HZ and Nekken at 0.05 and 0.01 level, respectively

图3 水稻重组自交系中砷, 铜, 铁, 汞, 锌五种金属含量的分布情况

Figure 3 Distribution of As, Cu, Fe, Hg and Zn in rice recombinant inbred line (RIL) population

LOC_Os01g14440, *LOC_Os01g18584*, *LOC_Os01g20160*在父本HZ中的表达量显著低于母本Nekken; 而位于Fe的QTLs定位区基因*LO-*

*C_Os04g34600*在父本HZ中的表达量显著高于母本Nekken. 综上, *LOC_Os01g14440*, *LOC_Os01g18584*, *LOC_Os01g20160*和*LOC_Os04g34600*基因在成熟期

图 4 水稻重组自交系金属含量的QTLs定位
Figure 4 Mapping of mental content QTLs in rice recombinant inbred line (RIL) population

表 2 水稻籽粒中五种金属含量的QTL分析
Table 2 QTL analysis of five metal contents in rice grains

QTL	染色体	物理距离(bp)	遗传距离(cM)	LOD
<i>qRAs2-1</i>	02	24275512~24537712	104.06~105.19	3.48
<i>qRAs2-2</i>	02	24993700~25286447	107.14~108.40	2.91
<i>qRAs2-3</i>	02	25588232~25829695	109.70~110.70	2.93
<i>qRCu1-1</i>	01	26202736~27114866	112.32~116.23	3.59
<i>qRFe2-1</i>	02	10928729~11091849	46.85~47.55	5.53
<i>qRFe4-1</i>	04	20846301~20998643	89.36~90.02	3.11
<i>qRHg1-1</i>	01	26384440~28310699	113.10~121.36	3.46
<i>qRZn1-1</i>	01	5561170~11899375	23.84~51.01	7.29
<i>qRZn1-2</i>	01	12419128~12660078	53.24~54.27	2.50

双亲中表达量存在显著差异,说明它们有可能参与水稻耐重金属胁迫的调控,影响水稻籽粒的金属积累量.

2.4 讨论

水稻的耐重金属胁迫是数量性状,由多个基因共同控制,其表达受多种因素的影响,实验过程中水稻

群体、生长环境以及处理方法等的不同,都会影响QTLs定位的结果.非生物胁迫和土壤养分限制是降低植物生长、生产力和质量的主要环境条件,植物已经进化出机制以感知这些环境挑战,例如在细胞内以及细胞与组织之间传递胁迫信号,并对其生长和发育进行适当调整以生存和繁殖^[24].本次实验以水稻籽粒中

表 3 候选基因的功能

Table 3 The function of candidate gene

染色体	基因名称	功能	调控对象
1	<i>LOC_Os01g46800</i>	参与多种生物进程的调控, 调节胁迫应答	<i>WRKY</i> 基因转录因子
1	<i>LOC_Os01g47560</i>		
1	<i>LOC_Os01g14440</i>		
1	<i>LOC_Os01g18584</i>		
1	<i>LOC_Os01g20160</i>	促进Na ⁺ 从根或叶鞘的韧皮部伤流中排出, 防止叶片中Na ⁺ 的过度积累	<i>HKT</i> 基因家族
1	<i>LOC_Os01g15340</i>	促进K ⁺ 的转运, 使植物体表现出更高水平的对水分胁迫的耐受性, 积累更多的K ⁺	胁迫响应基因 <i>HAK1</i>
4	<i>LOC_Os04g34600</i>	保护水稻细胞免受铝诱导胁迫应答基因的表达	ASR家族蛋白

图 5 亲本的基因表达量差异分析图。*和**分别表示HZ与Nekken在0.05和0.01水平上差异显著。

Figure 5 Analysis of differences in gene expression levels of parents. * and ** indicate significant differences between HZ and Nekken at 0.05 and 0.01 level, respectively

的金属含量作为QTLs检测指标, 结合实时定量PCR技术, 来探究调控水稻耐金属胁迫能力的可能潜在基因。与前人研究成果比较, 本实验的研究结果在证实了部分先前研究的基础上, 也有了新的发现。

饶玉春等人^[17]在2号染色体上RM526~RM525标记区间内检测到一个铜盐胁迫下芽质量相关的QTL位点*qTSW-2*, 与本次研究的*qRAs2-1*位点存在重叠, 推测该区间内可能存在一个多效位点, 同时影响水稻的耐As和耐Cu胁迫。赵春芳等人^[19]以籼稻品种9311为遗传背景携带日本晴置换片段的119个CSSL群体为实验材料, 以相对根长为耐性指标, 在2号染色体

RM5390~RM3795标记区间内检测到了一个亚铁离子胁迫下控制相对根长的*qRRL2-2*, 该QTL与本研究中的*qRFe2*具有重叠部分, 说明该部分很可能存在一个能调控水稻耐Fe离子胁迫的QTL。姚盟成等人^[16]在位于第1染色体的RM1附近定位到一个耐硫酸铜胁迫QTL位点, 与本次研究的*qRZn1-1*有重叠部分, 推测该QTL可能是一个调控水稻耐Cu和Zn的多效位点。林晗等人^[22]用春江06和台中本地1号的DH群体作为研究对象, 在1号染色体RM1297~RM1061区间发现水稻耐Fe的胁迫位点, 贡献率达到24.47%, 通过比较发现, 该区间与本次QTLs的Hg位点存在重叠, 推测在此处可能存在一个同时调控水稻耐Fe和Hg胁迫的多效位点。本研究证实了先前研究的一些结果, 从而证明了本研究得到的QTLs的价值。

本研究也得到了许多新的研究成果。例如, 在1号染色体上, 物理距离为5561170~11899375 bp的区间内定位到一个LOD值高达7.29的*qRZn1-1*, 说明这个区间内很可能存在一个影响水稻籽粒Zn离子含量的主效基因, 可利用这段QTL进行水稻品种的耐Zn毒害能力的改良。另有1个LOD值较大的QTL为*qRFe2*, 其LOD值达5.53, 位于第2号染色体上物理距离为10928729~11091849 bp的区间内。如(图4)所示, 1号染色体上检测到的QTLs位点不仅较多, 而且其中存在一些LOD值极大的QTLs, 包括LOD值达到7.29的位点*qRZn1-1*。此外, 一号染色体上的*qRCu1*和*qRHg1*区间存在重叠, *qRHg1-1*的区间较大, 包含了*qRCu1-1*的区间, 说明在这个区间内很可能存在同时控制水稻耐Cu和Hg胁迫的多效基因。

目前已有研究发现, 基因*LOC_Os01g46800*, *LO-*

C_Os01g47560, *LOC_Os01g14440*和*LOC_Os01g18584*属于*WRKY*基因转录因子。*WRKY*基因编码转录因子,参与多种生物进程的调控,其中的一些锌指蛋白会在植物体中得到特有扩增^[25]。基因*LOC_Os01g20160*属于*HKT*基因家族,在禾本科中这类转运蛋白的*HKT*_{1.4}和*HKT*_{1.5}负责参与光合组织中Na⁺的外排,Na⁺从根或叶鞘的韧皮部伤流中排出,防止叶片中Na⁺的过度积累,这是植物耐盐的一个重要机制^[26]。基因*LOC_Os01g15340*可调节胁迫响应基因*HAK1*,促进K⁺的转运,使植物体表现出更高水平的对水分胁迫的耐受性,积累更多的K⁺^[27]。基因*LOC_Os04g34600*调控ASR家族蛋白表达,ASR5蛋白作为一个转录因子能调控那些保护水稻细胞免受铝诱导胁迫应答基因的表达^[28]。

在qZn1-1的QTL上包含*LOC_Os01g20160*基因和*LOC_Os01g15340*基因,这两个基因也可能与水稻体内Zn离子的转运有关;在qFe4的QTL上包含*LOC_Os04g34600*基因,该基因可能与水稻体内Fe离子的转运有关。对成熟期双亲进行目的基因定量PCR发现,基因*LOC_Os01g14440*, *LOC_Os01g18584*, *LOC_Os01g20160*, *LOC_Os04g34600*这4个基因在双亲间

表达出现极显著的差异。基因*LOC_Os01g14440*, *LOC_Os01g18584*, *LOC_Os01g20160*在父本HZ中的表达量显著低于母本Nekken(图5),结合父本HZ对Zn的积累明显低于母本Nekken的数据结果(图2),本团队得出初步结论,这3个基因的高表达可能会极大提高水稻对Zn的富集能力和耐受能力;此外还发现,*LOC_Os04g34600*在HZ的表达高于Nekken(图5),结合HZ对Fe的积累浓度高于Nekken的结果(图2),本团队认为,*LOC_Os01g20160*的高表达可能会提高水稻植株对Fe的吸收积累能力和耐受性。上述相关结论有待进一步验证。

综上,*LOC_Os01g14440*, *LOC_Os01g18584*, *LOC_Os01g20160*, *LOC_Os04g34600*这些基因在两个亲本间确实存在表达量差异,说明这些基因可能是影响华占和热研籽粒中各种金属离子含量差异的原因,可能对水稻耐金属胁迫能力起调控作用。研究结果为进一步验证水稻耐金属胁迫相关基因的功能及分子育种实践提供了物质基础,一旦被证实,这些基因就可通过分子标记辅助和遗传育种方法用于调控水稻耐金属胁迫能力,对水稻产量和质量的提升具有重要的意义。

参考文献

- 1 Duan G L, Zhang H M, Liu Y X, et al. Impact of rice genotype and growing environment on arsenic accumulation in rice polished grains (in Chinese). *Asian J Ecotoxicol*, 2013, 8: 156–162 [段桂兰, 张红梅, 刘云霞, 等. 水稻基因类型与生长环境对精米中砷积累的影响. *生态毒理学报*, 2013, 8: 156–162]
- 2 Li W X, Ouyang L J, Wen W, et al. Identification of QTL for cadmium tolerance at seedling stage of rice (*Oryza sativa* L.) (in Chinese). *Acta Agric Univ Jiangxiensis*, 2019, 41: 19–24 [李炜星, 欧阳林娟, 文文, 等. 水稻幼苗耐镉胁迫QTL的定位研究. *江西农业大学学报*, 2019, 41: 19–24]
- 3 Sun T, Lu K P, Wang H L. Advance in washing technology for remediation of heavy metal contaminated soils: effects of eluants and washing conditions (in Chinese). *J Zhejiang A&F Univ*, 2015, 32: 140–149 [孙涛, 陆扣萍, 王海龙. 不同淋洗剂和淋洗条件下重金属污染土壤淋洗修复研究进展. *浙江农林大学学报*, 2015, 32: 140–149]
- 4 Mei B Z, Zhang Q, Wang R X. Discussion on the technology of remediation of heavy metal contaminated soil and its repair practice (in Chinese). *Environ Dev*, 2018, 30: 85–87 [梅宝中, 张强, 王端鑫. 重金属污染土壤修复技术及其修复实践. *环境与发展*, 2018, 30: 85–87]
- 5 Liu S T, Li Q, Wang X L. Progress in research of the resistance to heavy metal toxicity in rice by silicon nutrient (in Chinese). *Hubei Agric Sci*, 2017, 56: 405–408+417 [刘松涛, 李茜, 王小玲. 硅素营养对水稻抗重金属毒害的研究进展. *湖北农业科学*, 2017, 56: 405–408+417]
- 6 Su L K, Yuan H X. Effect of Cu and As on growth of rice (in Chinese). *Trop Subtrop Soil Sci*, 1997, 6: 194–197 [苏流坤, 袁焕祥. 土壤中铜、砷对水稻生长发育影响的研究. *热带亚热带土壤科学*, 1997, 6: 194–197]
- 7 Patrick L. Mercury toxicity and antioxidants: part I: role of glutathione and alpha-lipoic acid in the treatment of mercury toxicity.(Mercury Toxicity). *Altern Med Rev*, 2002, 7: 456–472
- 8 Gu S Y, Luo J Y, Liu H, et al. Determination of arsenic speciation in 17 commonly used traditional Chinese herbal medicines by HPLC-ICP-MS (in Chinese). *China J Chin Mater Med*, 2019, 44: 3078–3086 [谷善勇, 骆骄阳, 刘好, 等. 高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法检测17种大宗常用中草药中砷元素形态. *中国中药杂志*, 2019, 44: 3078–3086]

- 9 Gross J, Stein R J, Fett-Neto A G, et al. Iron homeostasis related genes in rice. *Genet Mol Biol*, 2003, 26: 477–497
- 10 Song A, Li P, Li Z, et al. The alleviation of zinc toxicity by silicon is related to zinc transport and antioxidative reactions in rice. *Plant Soil*, 2011, 344: 319–333
- 11 Zhang J, Aijaz A S, Chai L, et al. Mapping of QTL for iron and zinc toxicity tolerance at seedling stage using a set of reciprocal introgression lines of rice (in Chinese). *Acta Agron Sin*, 2013, 39: 1754–1765 [张建, Aijaz Ahmed SOOMRO, 柴路, 等. 利用双向回交导入系定位水稻苗期耐亚铁毒和锌毒的QTL. *作物学报*, 2013, 39: 1754–1765]
- 12 Zeng Y, Wu N, Wang N N. Research progress on variation of gene expression in rice under heavy metal stress (in Chinese). *Mol Plant Breed*, 2018, 16: 8179–8184 [曾媛, 吴楠, 王宁宁. 重金属胁迫下水稻基因表达变异相关研究进展. *分子植物育种*, 2018, 16: 8179–8184]
- 13 Lu Z H, Zhu M Y, Shi Q H, et al. Effect of sulfur and silicon fertilizer on growth and absorption of copper in rice seedling under copper stress (in Chinese). *Acta Agric Univ Jiangxiensis*, 2013, 35: 1134–1139 [卢志红, 朱美英, 石庆华, 等. 硫硅配施对铜胁迫下水稻幼苗生长及其吸收累积铜的影响. *江西农业大学学报*, 2013, 35: 1134–1139]
- 14 Rao Y C, Zheng T T, Ma B J, et al. Effects of trace elements iron, manganese and copper on rice growth and prevention of deficiency (in Chinese). *China Rice*, 2012, 18: 31–35 [饶玉春, 郑婷婷, 马伯军, 等. 微量元素铁、锰、铜对水稻生长的影响及缺素防治. *中国稻米*, 2012, 18: 31–35]
- 15 Li Y S, Li S Q, Zhu R S, et al. Application of biotechnology in rice super-high yield improvement (in Chinese). *J Shenyang Agric Univ*, 2007, 38: 701–706 [李阳生, 李绍清, 朱仁山, 等. 生物技术在水稻超高产育种中的应用. *沈阳农业大学学报*, 2007, 38: 701–706]
- 16 Yao M C, Zhang W H, Zhang X J, et al. Genetic analysis of QTLs for tolerant to high Cu^{2+} stress at seedling stage of rice (in Chinese). *Guangxi Agric Sci*, 2009, 40: 1119–1123 [姚盟成, 张文会, 张晓杰, 等. 水稻苗期耐 Cu^{2+} 胁迫QTL遗传分析. *广西农业科学*, 2009, 40: 1119–1123]
- 17 Rao Y C, Yang Y L, Li X J, et al. QTL analysis on copper-resistant at germination stage in rice (*Oryza sativa* L.) (in Chinese). *J Zhejiang Norm Univ (Nat Sci)*, 2013, 36: 198–204 [饶玉春, 杨窑龙, 李晓静, 等. 水稻萌发期耐 Cu^{2+} 胁迫的QTL定位. *浙江师范大学学报(自然科学版)*, 2013, 36: 198–204]
- 18 Pradhan S K, Pandit E, Pawar S, et al. Linkage disequilibrium mapping for grain Fe and Zn enhancing QTLs useful for nutrient dense rice breeding. *BMC Plant Biol*, 2020, 20: 1–24
- 19 Zhao C F, Zhou L H, Ding D, et al. Mapping of quantitative trait loci associated with ferrous iron toxicity tolerance at seedling stage based on chromosome segment substitution line in rice (in Chinese). *Jiangsu J Agric Sci*, 2013, 29: 461–467 [赵春芳, 周丽慧, 丁丹, 等. 基于CSSL的水稻苗期耐亚铁离子胁迫QTL定位. *江苏农业学报*, 2013, 29: 461–467]
- 20 Huang Y Y, Zou D T, Wang J G, et al. QTL mapping for Mn, Fe, Zn and Cu contents in rice grains (in Chinese). *Crops*, 2012, 28: 77–81 [黄莹莹, 邹德堂, 王敬国, 等. 水稻子粒锰、铁、锌、铜含量的QTL定位分析. *作物杂志*, 2012, 28: 77–81]
- 21 Norton G J, Deacon C M, Xiong L, et al. Genetic mapping of the rice ionome in leaves and grain: identification of QTLs for 17 elements including arsenic, cadmium, iron and selenium. *Plant Soil*, 2010, 329: 139–153
- 22 Lin H, Xu J M, Hu H Q, et al. Identifying of QTLs for resistance to metal ions stress in rice (in Chinese). *Chin J Rice Sci*, 2018, 32: 23–34 [林晗, 徐江民, 胡瑚倩, 等. 水稻耐金属离子胁迫的QTL分析. *中国水稻科学*, 2018, 32: 23–34]
- 23 McCouch S R, Cho Y G, Yano M, et al. Report on QTL nomenclature. *Rice Genet Newsl*, 1997, 14: 11–13
- 24 Gong Z, Xiong L, Shi H, et al. Plant abiotic stress response and nutrient use efficiency. *Sci China Life Sci*, 2020, 63: 635–674
- 25 Ross C A, Liu Y, Shen Q J. The *WRKY* gene family in rice (*Oryza sativa*). *J Integr Plant Biol*, 2007, 49: 827–842
- 26 Cotsaftis O, Plett D, Shirley N, et al. A two-staged model of Na^{+} exclusion in rice explained by 3D modeling of HKT transporters and alternative splicing. *PLoS ONE*, 2012, 7: e39865
- 27 Chen G, Liu C, Gao Z, et al. Driving the expression of *RAAI* with a drought-responsive promoter enhances root growth in rice, its accumulation of potassium and its tolerance to moisture stress. *Environ Exp Bot*, 2018, 147: 147–156
- 28 Arenhart R A, De Lima J C, Pedron M, et al. Involvement of *ASR* genes in aluminium tolerance mechanisms in rice. *Plant Cell Environ*, 2013, 36: 52–67

QTL excavation and analysis of candidate genes in contents of As, Cu, Fe, Hg and Zn in rice grain

ZHU HongYu¹, WANG Sheng¹, ZHANG Yue¹, LIN Han¹, LU Mei¹, WU XianMei², LI SanFeng², ZHU XuDong², RAO YuChun¹ & WANG YueXing²

¹ Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biotechnology on Specialty Economic Plants, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China;

² State Key Laboratory of Rice Biology, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China

Rice is a key crop, and metal pollution is an important factor affecting rice yield and quality. Excavating the QTLs related to the accumulation of rice grain metal content, and analyzing its candidate genes, and then improving the ability of rice to withstand metal ion stress through genetic breeding can effectively reduce the caused by metal pollution in soil. In this study, a japonica rice variety Nekken was used as the female parent, and an indica rice variety HZ was used as the male parent. After F1 generation was obtained by cross-breeding, successive selfings were performed for 120 recombinant inbred lines (RIL population) for experimental materials. Cultured under the same and suitable conditions, routine management, then we measured the metal ion content in rice grains of each line at the maturity stage. A genetic map was constructed using the RIL population to map the QTLs resistant to metal ion stress in rice. As a result, a total of 9 QTLs related to metal ion content were detected. It contains 1 multi-effect QTL related to Cu and Hg; 3 QTLs related to As; 2 QTLs related to Fe, one of which has a LOD value as high as 5.53; 2 QTLs related to Zn accumulation, The LOD of one of them is as high as 7.29. Quantitative analysis of candidate genes related to resistance to metal ion stress in these QTL intervals found that the expression levels of the four genes *LOC_Os01g14440*, *LOC_Os01g18584*, *LOC_Os01g20160*, *LOC_Os04g34600* were significantly different between parents, Combining the results of the accumulated data of parental concentrations of different metal ions, we speculated that the high expression of *LOC_Os01g14440*, *LOC_Os01g18584*, and *LOC_Os01g20160* may greatly improve the absorption capacity and the tolerance of rice to Zn stress, while the high expression of *LOC_Os04g34600* may increase the absorption capacity and the tolerance of rice to Fe stress. Through the excavation and analysis of this QTL, it was found that these genes may affect the ability of rice to withstand metal ion stress, creating conditions for further breeding and screening of rice varieties resistant to metal ion stress.

rice, resistance, content of metal ion, analysis of QTL, candidate genes

doi: [10.1360/SSV-2020-0052](https://doi.org/10.1360/SSV-2020-0052)