

却志群,黄贵忠,沈春修. 东乡野生稻苗期耐冷 QTL *qCTS3.3* 候选基因 *LOC_Os03g54970* 冷胁迫下荧光定量表达分析及克隆[J]. 江苏农业科学,2020,48(12):39-44.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.12.009

东乡野生稻苗期耐冷 QTL *qCTS3.3* 候选基因 *LOC_Os03g54970* 冷胁迫下荧光定量表达分析及克隆

却志群,黄贵忠,沈春修

(宜春学院生命科学与资源环境学院/江西省作物生长发育调控重点实验室,江西宜春 336000)

摘要:为了验证东乡野生稻苗期耐冷 QTL *qCTS3.3* 的功能,结合笔者所在课题组前期完成的转录组分析数据,将落在 *qCTS3.3* QTL 2 个最近侧翼分子标记 MK149624 和 MK137032 之间区域的差异表达基因 *LOC_Os03g54970-DX* 作为 *qCTS3.3* 的候选基因,并通过反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)对不同低温处理时间长度该基因在东乡野生稻叶片中的表达水平进行了相对定量分析,结果表明,该基因在低温胁迫处理前后表达量呈现出低—高一低—高的变化趋势,随后,参照测序水稻品种日本晴对应的该基因位点的序列信息设计引物,通过 RT-PCR 技术从东乡野生稻中成功扩增到了 *LOC_Os03g54970-DX* 基因的全长 cDNA,构建了该基因位点的过表达载体。测序分析结果表明,东乡野生稻中的 *LOC_Os03g54970-DX* 基因序列与日本晴中的对应位点序列完全一致,进一步利用农杆菌介导法,将东乡野生稻中的 *LOC_Os03g54970-DX* 的过表达载体转入水稻受体品种 TP309,最终获得了 48 株转基因植株,研究结果为下一步研究东乡野生稻 *LOC_Os03g54970-DX* 基因位点在冷胁迫作用条件下的功能机制奠定了材料基础。

关键词:东乡野生稻;RT-PCR;荧光定量;QTL

中图分类号:S511.901 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)12-0039-06

冷害(倒春寒和寒露风)是水稻生产遇到的一个普遍问题,我国每年因低温冷害损失稻谷 30 ~ 50 亿 kg^[1-2]。近年来,随着我国土地流转政策的实施、城镇化进程的加快以及农村劳动力的转移,在

农业机械化和轻简栽培技术背景下,直播技术以及免耕加直播技术逐渐被推广,对水稻品种的耐寒性提出了更高的要求,迫切需要强抗寒的水稻品种。如何提高水稻抗寒性已成为全国水稻科研工作者普遍关注的问题,而提高水稻抗寒能力最有效的方法就是挖掘和利用水稻自身耐冷基因^[3]。

东乡野生稻(*Dongxiang Oryza rufipogon* Griff.)属于普通野生稻的一种,原生地位于江西省抚州市东乡县(28°14'N,116°36'E),是目前为止发现的起源地分布位置最靠北的野生稻。东乡野生稻的地

收稿日期:2019-06-21

基金项目:国家自然科学基金(编号:31660379);江西省教育厅科学技术研究项目(编号:GJJ180845);江西省作物生长发育调控重点实验室开放课题项目(编号:KFJJ201804);江西省作物生长发育调控重点实验室开放课题项目(编号:KFJJ201802)。

作者简介:却志群(1980—),女,湖北仙桃人,硕士,讲师,主要从事水稻抗逆性研究。E-mail:zhiquanque@163.com。

2125.

[7]Barz W, Reinhar E, Zenk. Plant tissue culture and its bio-technological application [M]. Berlin: Sprinser - Verlag Berlin Heidelberg,1977:277-343.

[8]Chaudhury A, Qu R D. Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type bermudagrass; effect of 6-benzyladenine in callus induction medium[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture,2000,60(2):113-120.

[9]李明军,杨建伟,张嘉宝,等. 怀山药的茎段培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,1997,33(4):275-276.

[10]夏 赞,谭文丽,陈银华,等. 参薯组织培养快繁技术[J]. 热带

生物学报,2012,3(3):271-275.

[11]张宗勤,撒文清,刘建才. 叉蕊薯蓣的繁殖及微型薯蓣的离体诱导[J]. 生物技术,1998,8(1):18-26.

[12]李明军. 怀山药茎段愈伤组织的诱导与多芽体的形成[J]. 华北农学报,2000,15(2):85-87.

[13]陈艳莉,刘艳萌,张学英. 薯蓣茎段组织培养的研究[J]. 长江蔬菜,2008(10):32-34.

[14]林贵美,牟海飞,李 邦,等. 菊叶薯蓣茎段组织培养研究[J]. 广西农业科学,2006,37(6):710-712.

[15]郑晓琴,梁国鲁. 薯蓣的快速繁殖及零余子的离体诱导[J]. 西南园艺,2003(2):20-21.

下茎部分能够耐受 $-12.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的低温冷害^[4],它或许能成为一个改良栽培稻耐寒性的宝贵遗传资源。目前,已经有一些关于东乡野生稻耐寒性遗传分析和潜在的耐冷分子机制方面的研究报道,不同研究者以东乡野生稻为材料,分别将控制东乡野生稻苗期、孕穗期和花期的耐冷数量性状基因座(quantitative trait locus,简称 QTL)定位在 1、3、4、6、8、10、11 号染色体上^[5-9]。但由于受东乡野生稻遗传背景复杂和以简单重复序列(SSR)为代表的老一代分子标记在染色体特定区段数目有限的制约,目前,通过这种定位克隆方法依然还没有从东乡野生稻中克隆到耐冷基因,直到 Li 等通过对东乡野生稻中的一个类 bHLH(basic helix-loop-helix)蛋白基因 *OrbHLH001* 进行过表达分析,发现了该基因能够增强拟南芥的耐冷性^[10],这也是目前唯一从东乡野生稻中克隆到的耐冷基因,然而没有证据表明该基因可以解释东乡野生稻的所有强耐冷性表现。另外,值得一提的是,Mao 等利用东乡野生稻与协青早 B 杂交后的回交重组自交系(BILs)和重组自交系(RILs)2 个后代群体^[11],借助特异性位点扩增片段测序(specific-locus amplified fragment sequencing,简称 SLAF-Seq)技术构建高密度遗传图谱,通过区间作图和单一位点分析相结合的方法在东乡野生稻多条染色体上鉴定到了 15 个与苗期耐冷相关的 QTL,由于这一研究基于第 2 代测序技术开发了大量特异性位点扩增片段(SLAF)分子标记用于构建东乡野生稻苗期耐冷 QTL 的高密度遗传图谱,因此,该研究相对准确、完整地鉴定了东乡野生稻所携带的苗期耐冷 QTL 数目及其在染色体上的位置信息。笔者前期通过比较转录组分析获得了冷胁迫条件($4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理 3 d)下在 2 个耐冷水稻材料中[包括耐冷东乡野生稻以及东乡野生稻与冷敏感籼稻 93-11 杂交产生的 F_2 代可越冬混合群体(over-wintered offspring population,简称 OOP),由 20 株能够在湖南长沙成功越冬的 F_2 后代植株组成]出现差异表达而在冷敏感水稻材料 93-11 中未表现出差异表达的 462 个东乡野生稻苗期耐冷相关差异表达基因(differentially expression genes,简称 DEGs)^[12]。

本研究基于 Mao 等发表的 15 个东乡野生稻苗期耐冷 QTL 侧翼标记的序列信息^[11],结合笔者前期的比较转录组分析结果^[12],将落在 *qCTS3.3* QTL 的 2 个最近侧翼分子标记之间区域的耐冷相关差异

表达基因 *LOC_Os03g54970* 作为 *qCTS3.3* 的候选基因,以东乡野生稻作为试验材料,运用实时荧光定量 PCR 技术分析了东乡野生稻幼苗叶片中该基因在低温处理条件下的表达量情况,并通过反转录 PCR(reverse transcription PCR,简称 RT-PCR)方法克隆东乡野生稻 *LOC_Os03g54970-DX* 基因位点的全长 cDNA,构建该全长 cDNA 基因过表达载体,然后借助农杆菌介导转化方法导入水稻受体品种 TP309 中,获得了成功导入该目标基因的转基因植株,本研究内容旨在为后续研究东乡野生稻中 *LOC_Os03g54970-DX* 基因在冷胁迫作用下的功能机制奠定材料基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试植物材料 供试水稻材料为东乡野生稻,转基因受体材料为粳稻品种 TP309。

1.1.2 供试菌株和载体 农杆菌(EHA105);大肠杆菌(DH5 α);T 载体(pEASY®-Blunt Zero Cloning-Kit);植物二元过表达载体 pCambia1301M(图 1)。

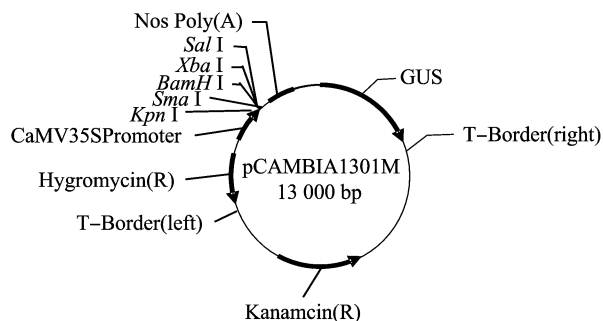


图1 植物二元过表达载体 pCambia1301M

1.2 试验方法

1.2.1 提取水稻材料 RNA 在正常生长条件下将耐冷东乡野生稻幼苗培养至 3~4 叶期,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏箱中处理 24、48、72 h 后剪取叶片材料置于液氮中研磨成粉末,通过四川成都福际生物技术有限公司生产的 Plant Total RNA Isolation Kit 抽取试剂盒提取植物总 RNA。

1.2.2 引物设计和 cDNA 第一链合成 全长 cDNA 基因扩增引物 54970-F 和 54970-R、实时荧光定量 PCR 扩增引物 DL-54970-F 和 DL-54970-R 以及 T 载体阳性克隆鉴定用引物 M13F 和 M13R,均委托深圳华大基因股份有限公司进行合成,引物序列见表 1。cDNA 第一链的合成依据北京全式金生

物技术有限公司的 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒说明进行。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')
MI3 - F	TGTAAAACGACGGCCAGT
MI3 - R	CAGGAAACAGCTATGAC
54970 - F	AATGGTACCATGCAATCTGGGCTCCTGAGTCAGC
54970 - R	AATGGATCCCTAGTTCAGGAGCGACAACGAACAC
DL - 54970 - F	TACCGCACTTCTCGACTGGC
DL - 54970 - R	CGCTCCAAATCCCGTGTCTC
<i>Tubulin</i> - F	GAGGGACTATGGCCGTTTAGG
<i>Tubulin</i> - R	CACTTCACCCGACCATTCAATGG

1.2.3 实时荧光定量 PCR 本研究首先利用 qRT-PCR 引物 DL-54970-F 和 DL-54970-R, 以生长至 3~4 叶期的东乡野生稻鲜嫩叶片的 cDNA 第一链为模板进行退火温度的梯度 PCR, 摸索该引物特异性扩增的退火温度, 然后按照购自天根生化科技(北京)有限公司的 SuperReal PerMix Plus 试剂盒说明进行预混, 于荧光定量 PCR 仪 StepOnePlus™ 中进行 3 步法反应程序实时荧光定量 PCR 扩增, 使用 $\Delta\Delta C_T$ 值方法来分析该基因的相对表达水平。采用微管蛋白基因(*Tublin*)作为内参, 生物学重复和技术重复均为 3 次。反应体系为 20 μL : 该体系加入上游引物 DL-54970-F 和下游引物 DL-54970-R 各 0.5 μL , 模板 cDNA 用量

1 μL , 2 \times SuperReal PreMix 10 μL , 50 \times Ro \times Reference Dye 1 μL , RNase-free ddH₂O 7 μL 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s, 40 个循环; 16 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.4 植物过表达载体转化受体水稻品种 采用热击转化法将植物过表达载体 pCambia1301M-54970-DX 导入农杆菌感受态菌株 EHA105 中, 鉴定正确的阳性克隆用于转化水稻胚性愈伤组织, 农杆菌介导转化水稻受体品种 TP309 各时期培养所使用培养基的具体配制方法参照李丁的试验方法^[13]进行。

2 结果与分析

2.1 东乡野生稻苗期耐冷 QTL *qCT3.3* 候选基因 *LOC_Os03g54970-DX* 的确定

根据 Mao 等公开的东乡野生稻苗期耐冷 QTL *qCT3.3* 所在染色体的物理位置信息^[11], 将笔者所在课题组前期通过转录组测序分析统计发现的 462 个东乡野生稻和 OOP 共同的耐冷相关的差异表达基因着落到 *qCT3.3* QTL 所在染色体区域^[12], 结果表明, 在 462 个与耐冷相关的差异表达基因中 *LOC_Os03g54970-DX* 基因位点刚好位于 *qCT3.3* 定位的染色体区段(表 2), 因此, 本研究将该基因确定为东乡野生稻苗期耐冷 QTL *qCT3.3* 的候选基因。

表 2 东乡野生稻苗期耐冷 QTL *qCT3.3* 信息

QTL	染色体	遗传距离 (cM)	物理距离 (kb)	侧翼标记	QTL 区域的 DEGs
<i>qCT3.3</i>	3	8.1	1 309	MK149624、MK137032	<i>LOC_Os03g54970-DX</i>

2.2 *LOC_Os03g54970-DX* 实时荧光定量表达分析

为了进一步验证笔者所在课题组先前通过 RNA-Seq 技术完成的, 冷胁迫条件下 *LOC_Os03g54970-DX* 的表达数据(表 3), 本研究对 3~4 叶期东乡野生稻叶片中 *LOC_Os03g54970-DX* 基因位点在冷处理前后的相对表达量进行了实时荧光定量 qRT-PCR 分析, 在进行 qRT-PCR 之前, 进行了普通 PCR 和电泳跑胶对荧光定量 PCR 引物 DL-54970-F 和 DL-54970-R 的退火温度进行了摸索, 结果表明该引物在 58 $^{\circ}\text{C}$ 时扩增特异性好, 且无引物二聚体(图 2)。接下来, 本研究使用 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火进行了 *LOC_Os03g54970-DX* 的实时荧光定量

PCR 实验, 检测了在不同低温处理时间(4 $^{\circ}\text{C}$ 处理 1、2、3 d)条件下 *LOC_Os03g54970-DX* 基因的表达情况, 结果(图 3)表明, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷处理 1、2、3 d 后 *LOC_Os03g54970-DX* 的相对表达量分别是冷处理之前的 13.9、1.4、3.6 倍, *LOC_Os03g54970-DX* 冷处理后的表达量相比冷处理之前均表现出一定程度的上调, 其中以冷处理 1 d 的表达水平最高, 总之, 在冷处理 3 d 时间内 *LOC_Os03g54970-DX* 基因的表达水平表现出了低—高一低—高的变化规律。

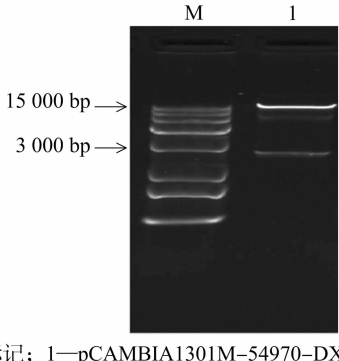
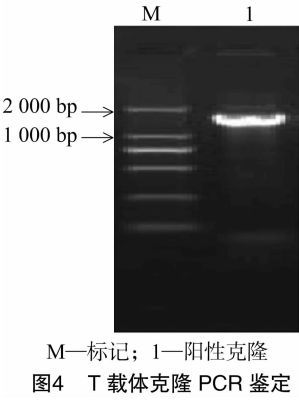
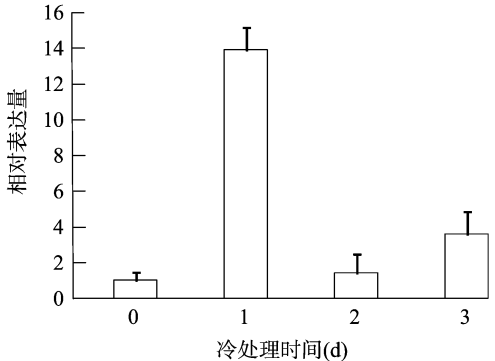
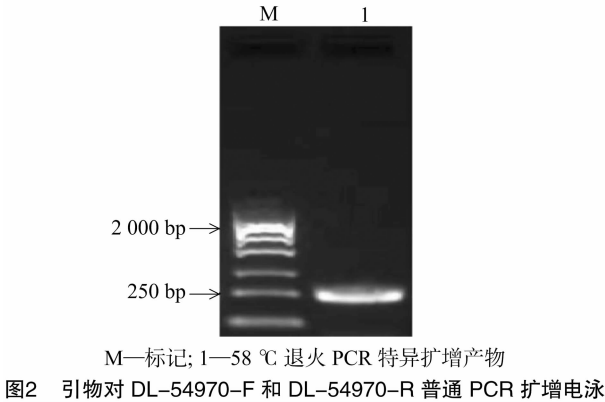
2.3 *LOC_Os03g54970-DX* 克隆及载体构建

以东乡野生稻叶片为材料, 使用 RT-PCR 方法扩增 *LOC_Os03g54970-DX* 的全长 cDNA, 将其与 T 载体 pEASY®-Blunt Zero Cloning-Kit 连接, 热激

表 3 冷处理前后 *LOC_Os03g54970-DX* 基因的 RNA-seq 测序

QTL	基因	读段 1	读段 2	RPKM - 1	RPKM - 2	log ₂ Ratio	上调/下调
<i>qCTS3.3</i>	<i>LOC_Os03g54970-DX</i>	167	298	18.471 438	39.501 259	1.096 602 3	上调

注:读段 1、读段 2 分别表示冷处理前、后在 *LOC_Os03g54970-DX* 位点表达谱测序检测到的读段数目; RPKM - 1、RPKM - 2 分别表示冷处理前、后的表达量; Ratio 表示同一基因处理组与对照组的 RPKM 的比值。



转化至大肠杆菌感受态细胞 DH5 α ,挑取单菌落并通过 M - 13F 和 M - 13R 进行菌液鉴定,结果表明,PCR 扩增出了与目的基因大小一致的 DNA 片段,约 1.5 kb 左右(图 4),说明全长 cDNA 基因可能已成功连接到 T 载体上。随后,使用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Bam*H I 对构建好的 T 载体阳性克隆进行双酶切,回收带有黏性末端的 *LOC_Os03g54970-DX* 的全长 cDNA 基因片段,与同样经限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Bam*H I 酶切后的植物双元表达载体 pCAMBIA1301M 连接,而后转化大肠杆菌,挑取阳性克隆摇菌并抽提质粒,质粒酶切鉴定结果表明,重组质粒 pCAMBIA1301M - 54970 - DX 酶切电泳后出现了 1 条大小约 13 kb 的载体大片段和 1 条大小约 1.5 kb 的插入片段(图 5),说明 *LOC_Os03g54970-DX* 的过表达载体可能已成功构建,后续重组克隆测序后与水稻品种日本晴的对应位点的序列比对分析进一步验证了这一结果。

2.4 *LOC_Os03g54970-DX* 基因的全长 cDNA 与日本晴对应位点的氨基酸序列比对

重组质粒 pCAMBIA1301M - 54970 - DX 测序结果表明,*LOC_Os03g54970-DX* 基因的 cDNA 全长共 1 524 bp,首先使用 DNA 序列分析软件 DNASTAR 将东乡野生稻中克隆到的 *LOC_Os03g54970-DX* 全长 cDNA 序列和 Rice Genome Annotation project 公共数据库中公布的水稻品种日本晴的对应位点序列分别转换成氨基酸序列,然后在序列分析软件 DNAMAN 中进行氨基酸序列的同源比较分析。结果表明,该基因位点在东乡野生稻和日本晴中都编码 507 个氨基酸,且二者在这一基因位点编码的氨基酸呈现出了 100% 的同源性(图 6)。

2.5 *LOC_Os03g54970-DX* 基因过表达载体遗传转化

将携有 pCAMBIA1301M - 54970 - DX 的农杆菌克隆在含利福平和卡那霉素的固体平板上接种

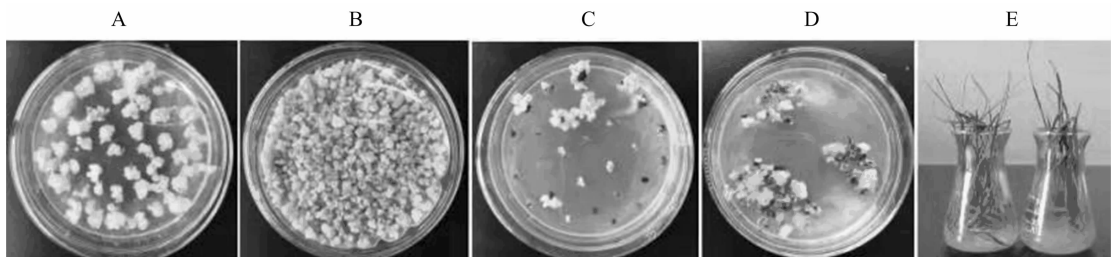
RBQ	1	MQSGAPESAISDGSSCHQQYNSTSQVTDLFYTSASQWATTSSSVLPLPFCGSNPVSLGA
DX	1	MQSGAPESAISDGSSCHQQYNSTSQVTDLFYTSASQWATTSSSVLPLPFCGSNPVSLGA
RBQ	61	NGEDHLLTDDHTLLHEQRRVCGTSYDLTDNVANPVLEFTNILDGQSSLNKTYISHDGLV
DX	61	NGEDHLLTDDHTLLHEQRRVCGTSYDLTDNVANPVLEFTNILDGQSSLNKTYISHDGLV
RBQ	121	ATNGVWKGHRDVMENHPLGVYSSSHARHPQMELPMTCTSHVLLPPPNSLNNPNSSSFVRGT
DX	121	ATNGVWKGHRDVMENHPLGVYSSSHARHPQMELPMTCTSHVLLPPPNSLNNPNSSSFVRGT
RBQ	181	ELKKAELMGAYSTTENYLDLNSERKGIICPKSSEQNVAENICNKAAYQCNDYSQIVCN
DX	181	ELKKAELMGAYSTTENYLDLNSERKGIICPKSSEQNVAENICNKAAYQCNDYSQIVCN
RBQ	241	QQTVLLPLNKASHFGGLPTKKFDGKLVSQRQKRKRATSLLSWHAQVMSGCSKTHHTRKPE
DX	241	QQTVLLPLNKASHFGGLPTKKFDGKLVSQRQKRKRATSLLSWHAQVMSGCSKTHHTRKPE
RBQ	301	LDWAHATRRLVEKVDAENMKTKNSTFVSQAQKRLAFTTKLMQYILPVLPRLLAANAIDS
DX	301	LDWAHATRRLVEKVDAENMKTKNSTFVSQAQKRLAFTTKLMQYILPVLPRLLAANAIDS
RBQ	361	CETIVYRTSRLALPDAFNPAISSVSDANNFIPTESMPQNQTSTSEKEDDKLVPEVLETFT
DX	361	CETIVYRTSRLALPDAFNPAISSVSDANNFIPTESMPQNQTSTSEKEDDKLVPEVLETFT
RBQ	421	MRFDELQNSFSRAERATTFQDLATETRDLERWSILHHFIKLHKYSRLHEDDVSNIIRPKPC
DX	421	MRFDELQNSFSRAERATTFQDLATETRDLERWSILHHFIKLHKYSRLHEDDVSNIIRPKPC
RBQ	481	RSTIRKHAGPDQVSVDFLNSVRCRLLN*
DX	481	RSTIRKHAGPDQVSVDFLNSVRCRLLN*

DX—东乡野生稻；RBQ—日本晴；*—终止密码子

图6 东乡野生稻与日本晴中 *LOC_Os03g54970-DX* 位点的氨基酸比对

活化,培养 2~3 d 后将农杆菌使用含乙酰丁香酮的液体共培养基洗下,然后侵染预培养 3 d 的 TP309 愈伤组织,经后续农杆菌克隆与愈伤组织共培养、于含潮霉素的筛选培养基中进行抗性愈伤组织选择培养、在含潮霉素的分化培养基上见光培养以及生根培养(图 7),最后,进行转基因植株叶片的 GUS (β -葡萄糖苷酸酶)染色鉴定,图 8 所示为本研究中部分转基因植株的 GUS 染色检测结果,5 株转基因

植株的叶片在叶尖部位和剪切过的切口处都染上了明显的蓝色,而野生型转基因受体水稻 TP309 的叶片则没有能够被染上蓝色,表明被检测的转化植株都为成功导入了 *LOC_Os03g54970-DX* 基因的阳性植株。最终,本研究获得了 48 株成功导入重组质粒 pCAMBIA1301M-54970-DX 的转基因阳性植株。



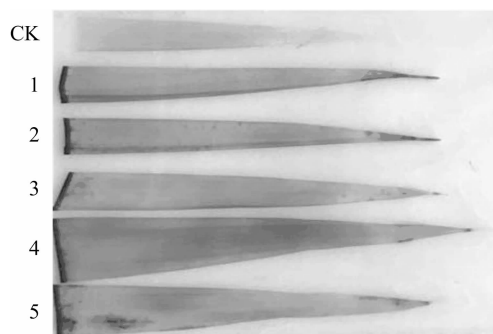
A—愈伤组织培养；B—pCAMBIA1301M-54970-DX 农杆菌克隆与愈伤组织共培养；C—抗性愈伤组织筛选培养；D—抗性愈伤组织分化培养；E—转基因植株生根炼苗

图7 过表达质粒 pCAMBIA1301M-54970-DX 遗传转化实物

3 讨论

Weiser 研究表明,植物的耐冷性表现被诱导的过程其实是植物通过调控自身基因表达发生改变的过程^[14]。换句话说,植物携带的与寒冷逆境相关

基因是一种冷诱发表达基因,耐冷基因的表达往往是在低温和短日照等特定条件诱导下才得以启动,耐冷相关基因冷诱发表达之后才赋予了细胞抵御寒冷的能力。因此,植物在本身的耐冷相关基因表达之前,其抗寒能力仅仅只是植物的一种潜能^[15]。



CK—野生型 TP309; 1、2、3、4、5—转基因植株

图8 野生型和转基因植株叶片 GUS 活性检测

所以,从强耐冷的植物材料中挖掘克隆冷诱导表达基因,导入冷敏感植物中,或许可以作为一种增强冷敏感植物抗寒能力的有效手段。本研究利用 Mao 等公布的东乡野生稻苗期耐冷 QTL 所在染色体上的位置信息^[10],将低温处理之后(4 ℃ 处理 3 d)在东乡野生稻和 OOP 中都出现上调表达且刚好落在 *qCTS3.3* QTL 区段的差异表达基因 *LOC_Os03g54970-DX* 作为东乡野生稻 *qCTS3.3* 中的一个耐冷候选基因,由于水稻耐冷相关基因往往都是冷诱导表达基因,所以,这种将水稻耐冷基因 QTL 定位与转录组测序分析结果相结合的基因克隆策略具有一定的合理性,在很大程度上便利了 QTL 区段耐冷候选基因的筛选,有可能加快水稻耐冷基因的挖掘进程。

为了验证 *LOC_Os03g54970-DX* 转录组测序结果的可靠性,本研究对东乡野生稻中 *LOC_Os03g54970-DX* 基因在低温胁迫条件下的表达做了进一步的荧光定量分析,通过 qRT-PCR 技术研究发现东乡野生稻中 *LOC_Os03g54970-DX* 在低温胁迫处理 3 d 的时间内表达量都出现不同程度的上调。其中以低温处理 24 h 内 *LOC_Os03g54970-DX* 基因上调幅度最高,当冷处理时间长达 48 h 和 72 h 时, *LOC_Os03g54970-DX* 的表达量与冷处理 24 h 时相比都有明显降低,但依然比冷处理前要高。这说明, *LOC_Os03g54970-DX* 可能主要是在东乡野生稻遭受冷胁迫后的前期(24 h 内)起作用,通过在低温胁迫的前期大幅度提高自身表达量,以正调控的方式参与东乡野生稻对低温胁迫的响应过程,帮助东乡野生稻抵御低温胁迫环境。

另外,本研究通过与日本晴中对应位点的 cDNA 编码的氨基酸序列进行比较发现,东乡野生

稻中的 *LOC_Os03g54970-DX* 基因序列与日本晴中对应位点的序列完全一致,说明该基因位点的编码区在东乡野生稻和日本晴中具有较强的保守性,或许行使某种相同的功能作用。当然,也存在这样的可能性, *LOC_Os03g54970-DX* 基因的启动子区域或许与日本晴的对应位点存在差异, *LOC_Os03g54970-DX* 由于在启动子区域与其他常规水稻品种的不同而在东乡野生稻中行使某种特定功能。

参考文献:

- [1] 中国农业科学院. 中国稻作学[M]. 北京:农业出版社,1986.
- [2] 熊振民, 闵绍楷, 王国梁, 等. 早粳品种苗期耐冷性的遗传研究[J]. 中国水稻科学, 1990, 4(2): 75-78.
- [3] 沈明晨, 薛超, 乔中英, 等. CRISPR/Cas9 系统在水稻中的发展和利用[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(10): 5-10.
- [4] 陈大洲, 肖叶青, 赵社香, 等. 东乡野生稻苗期和穗期的耐寒性研究[J]. 江西农业学报, 1996, 8(1): 1-6.
- [5] 陈大洲, 钟平安, 肖叶青, 等. 利用 SSR 标记定位东乡野生稻苗期耐冷性基因[J]. 江西农业大学学报, 2002, 24(6): 753-756.
- [6] 夏瑞祥, 肖宁, 洪义欢, 等. 东乡野生稻苗期耐冷性的 QTL 定位[J]. 中国农业科学, 2010, 43(3): 443-451.
- [7] 刘凤霞, 孙传清, 谭禄宾, 等. 江西东乡野生稻孕穗开花期耐冷基因定位[J]. 科学通报, 2003, 48(17): 1864-1867.
- [8] 左佳, 高婧, 贺荣华, 等. 东乡野生稻苗期抗寒性 QTL 的初步定位[J]. 杂交水稻, 2012, 27(3): 56-59.
- [9] Xiao N, Huang W N, Zhang X X, et al. Fine mapping of *qRC10-2*, a quantitative trait locus for cold tolerance of rice roots at seedling and mature stages[J]. PLoS One, 2014, 9(5): e96046.
- [10] Li F, Guo S Y, Zhao Y A, et al. Over expression of a homopeptide repeat-containing *bHLH* protein gene (*OrbHLH001*) from Dongxiang wild rice confers freezing and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. Plant Cell Reports, 2010, 29(9): 977-986.
- [11] Mao D H, Yu L, Chen D Z, et al. Multiple cold resistance loci confer the high cold tolerance adaptation of Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon*) to its high-latitude habitat[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2015, 128(7): 1359-1371.
- [12] Shen C X, Li D, He R H, et al. Comparative transcriptome analysis of RNA-seq data for cold-tolerant and cold-sensitive rice genotypes under normal and cold stress[J]. Journal of Plant Biology, 2014, 57(6): 337-348.
- [13] 李丁. 以潮霉素为筛选标记的水稻叶绿体转化体系的建立[D]. 长沙:中南大学, 2013.
- [14] Weiser C J. Cold resistance and injury in woody plants[J]. Science, 1970, 169(3952): 1269-1278.
- [15] 简令成. 植物冻害和抗冻性的细胞生物学研究[J]. 植物生理生化进展, 1987, 13(5): 1-16.