

李雨欣, 李 静, 赵 洁, 等. 水稻低温发芽和穗发芽特性相关分子标记 *qLTG3-1* 的开发与应用[J]. 江苏农业学报, 2026, 42(6): 1125-1134.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2026.06.005

水稻低温发芽和穗发芽特性相关分子标记 *qLTG3-1* 的开发与应用

李雨欣^{1,2}, 李 静^{2,3}, 赵 洁^{2,3}, 黄 奕^{2,3}, 吴莹莹^{2,4}, 王芳权^{2,5}, 李 霞^{1,2,3,5}, 杨 杰^{2,5}, LÓPEZ LÁZARO A Maqueira⁶

(1. 南京农业大学生命科学学院, 江苏 南京 210095; 2. 江苏省农业科学院粮食作物研究所/生物育种钟山实验室/农业农村部淮河流域种质创新重点实验室, 江苏 南京 210014; 3. 南京林业大学生命科学院, 江苏 南京 210037; 4. 江苏大学生物科学与技术学院, 江苏 镇江 212013; 5. 江苏省粮食作物现代产业技术协同创新中心, 江苏 扬州 225009; 6. 古巴国家农业科学研究所, 圣何塞·德拉拉斯 CG32700)

摘要: 为了筛选水稻 (*Oryza sativa* L.) 对低温发芽 (Low temperature germination, LTG) 和穗发芽 (Pre-harvest sprouting, PHS) 的抗性, 本研究对 29 份水稻品种 (品系) 的低温发芽特性和穗发芽特性表型进行分析, 并用 *K*-均值聚类法对各水稻品种 (品系) 进行分类; 基于水稻低温发芽相关主效基因 *qLTG3-1* 编码区的 71 bp 缺失变异, 开发特异性分子标记, 通过表型-基因型关联分析验证标记的准确性; 应用开发的特异性分子标记对 646 份水稻品种 (品系) [含 557 份亲本品种 (品系) 和 89 份江苏迟熟中粳品种 (品系)] 进行抗性筛选。聚类分析结果显示, 48% 的水稻品种 (品系) 属于耐 LTG、易 PHS 型 (聚类 1), 52% 的水稻品种 (品系) 属于不耐 LTG、耐 PHS 型 (聚类 2)。经表型-基因型关联验证, 发现标记 *qLTG3-1* 的区分准确率达 75%~86%。646 份水稻品种 (品系) 的筛选结果显示, 85.5% 的水稻品种 (品系) 为耐 LTG、易 PHS 型, 14.5% 的水稻品种 (品系) 为不耐 LTG、耐 PHS 型。本研究开发的分子标记可同步筛选水稻的 LTG、PHS 特性, 从而为抗性水稻品种 (品系) 的选育提供技术参考。

关键词: 水稻; 低温发芽; 穗发芽; *qLTG3-1*

中图分类号: S511.032

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2026)06-1125-10

Development and application of the molecular marker *qLTG3-1* associated with low-temperature germination and pre-harvest sprouting traits in rice

LI Yuxin^{1,2}, LI Jing^{2,3}, ZHAO Jie^{2,3}, HUANG Yi^{2,3}, WU Yingying^{2,4}, WANG Fangquan^{2,5}, LI Xia^{1,2,3,5}, YANG Jie^{2,5}, LÓPEZ LÁZARO A Maqueira⁶

(1. College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Food Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Zhongshan Biological Breeding Laboratory/Key Laboratory of Germplasm Innovation in Downstream of Huaihe River (Nanjing), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210014, China; 3. College of Life Sciences, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 4. School of Biological Science and Technology, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 5. Collaborative Innovation Center for Modern Production Technology of Grain Crops of Jiangsu Province, Yangzhou 225009, China; 6. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), San José de las Lajas CG32700, Cuba)

收稿日期: 2025-05-26

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目 [CX(23) 1001]; 江苏省重点研发计划 (现代农业) 项目 (BE2021359); 国家自然科学基金项目 (31571585); 江苏省种业创新“揭榜挂帅”项目 [JBGS(2021) 038、JBGS(2021) 039]; 生物育种钟山实验室项目 (BM2022008-03、ZSBBL-KY2023-01、ZSBBL-KY2003-06-1-2、ZSBBL-KY2024-01); 国际合作重点项目 (2023YFE01117000)

作者简介: 李雨欣 (2001-), 女, 江苏宿迁人, 硕士研究生, 研究方向为作物遗传育种。(E-mail) 1311807704@qq.com

通讯作者: 李 霞, (E-mail) jsplpx@jaas.ac.cn

Abstract: To screen rice (*Oryza sativa* L.) for resistance to low-temperature germination (LTG) and pre-

harvest sprouting (PHS), this study analyzed the phenotypic characteristics of LTG and PHS in 29 rice varieties (lines), and classified these varieties (lines) using *K*-means clustering analysis. Based on a 71 bp deletion in the coding region of the major LTG-related gene *qLTG3-1*, a specific molecular marker was developed, and the accuracy of the marker was validated through phenotype-genotype association analysis. The developed specific molecular marker was applied to screen 646 rice varieties (lines), including 557 parental varieties (lines) and 89 late-maturing medium *japonica* varieties (lines) from Jiangsu province, for resistance. The clustering analysis results showed that 48% of the rice varieties (lines) belonged to the LTG-tolerant/PHS-susceptible type (Cluster 1), and 52% belonged to the LTG-susceptible/PHS-tolerant type (Cluster 2). After phenotype-genotype association validation, it was found that the discrimination accuracy of marker *qLTG3-1* reached 75%–86%. The screening results of 646 rice varieties (lines) showed that 85.5% were LTG-tolerant/PHS-susceptible, and 14.5% were LTG-susceptible/PHS-tolerant. The molecular marker developed in this study can simultaneously screen for LTG and PHS characteristics in rice, thus providing a technical reference for breeding resistant rice varieties (lines).

Key words: rice; low-temperature germination; pre-harvest sprouting; *qLTG3-1*

水稻(*Oryza sativa* L.)是重要的粮食作物,中国有一半以上的人口以大米为主食。在生产过程中,低温发芽(Low temperature germination, LTG)特性是直播水稻的重要性状之一,决定着发芽的整齐度和基本苗的数量。随着水稻种植区域的扩大,在温带和高海拔热带地区,由低温引起的水稻种子发芽和生长迟缓的现象更加突出^[1]。在中国南方双季稻早稻区及东北高纬度稻区,由于水稻播种时遭受了低温冷害,因而造成水稻发芽时间不一致、成苗率下降及断垄、缺苗等严重影响,进而导致水稻大幅度减产^[2]。同时,因全球变暖和极端天气频发,在中国南方乃至北方寒凉地区,夏季也会遭遇连续的高温阴雨天气,导致水稻种子在穗上发芽,即穗发芽(Pre-harvest sprouting, PHS),也严重影响了水稻产量、品质及种子活力^[3-8]。因此,选育耐低温发芽且抗穗发芽的水稻品种,是保证水稻早期成苗整齐稳定、抵御生育后期穗发芽的有效途径,对于保障中国乃至全球粮食的安全生产均具有深远的意义。

水稻种子的萌发不仅是一个简单的生物学过程,而且涉及一系列复杂的生理生化反应,这些反应在胁迫条件下尤为敏感,特别是低温、高温都会造成水稻产量或品质下降。关于低温发芽的数量性状基因座(Quantitative trait locus, QTL)很早就有报道,大部分来自对籼稻、粳稻杂交群体的鉴定^[9-12]。目前,研究者已经明确,水稻与 LTG 或 PHS 相关的 QTL 在水稻的 12 条染色体上均有分布,但不少 QTL 的影响相对较小^[13-22]。其中,*qLTG3-1*是个例外,它不仅对水稻低温发芽特性的变异有 35% 的贡献率,而且对种子发芽具有普遍的调节功效^[16];它是第 1

个从具有强低温休眠特性的意大利温带粳稻种质 *Italica Livorno* 中克隆的低温发芽 QTL,位于第 3 染色体上,编码 1 个由 184 个氨基酸组成的功能未知的蛋白质。与强休眠品种 *Italica Livorno* 相比,具有弱低温发芽特性的日本粳稻品种 *Hayamasari* *qLTG3-1* 基因的编码区在第 46 位发生了 71 bp 片段的缺失,造成移码突变^[14]。进一步的研究发现,*qLTG3-1* 与穗发芽抗性相关的 QTL 位于同一染色体区域,即在日本晴第 3 染色体短臂的 474 kb 区^[17]。研究者随后对 62 份来自 19 个地区的粳稻地方核心种质 *qLTG3-1* 的 1 735 bp 区域进行测序比较发现,*Hayamasari* 与 *Italica Livorno* 品种的 *qLTG3-1* 编码区分别第 50 位、第 183 位有 1 个非同义替换、3 个片段插入/缺失(Indel),即除了 *Hayamasari* 的 71 bp 缺失,在中抗低温发芽类型日本晴与 *Italica Livorno* 之间还存在单碱基替换^[1]。在随后的全基因组关联研究(GWAS)中发现,与野生稻(*O. rufipogon*)的 *LTG3-1* 编码区相比,在弱低温发芽的韩国粳稻品种 *Hwaseong* 的 *qLTG3-1* 中存在 3 个序列变异,除了 18 bp 的缺失外,涉及核苷酸替换(A/T 和 TTC/CGG)的 2 个变异可能会改变氨基酸序列^[14]。由此可见,水稻 *LTG3-1* 存在较多变异^[19],提示 *qLTG3-1* 可能是筛选穗发芽、低温发芽 2 种特性的重要基因^[20]。广东省农业科学院杨梯丰等^[21]无法用 *qLTG3-1* 编码区的 18 bp 缺失开发的分子标记有效区分华南籼稻的低温发芽力,提示低温发芽特性具有复杂性。目前,关于其他地区的低温发芽特性的分子标记尚未见报道。

本研究基于水稻 *qLTG3-1* 基因编码区的核苷酸

多态性^[1-20],针对缺失序列设计侧翼引物,并开发新的 Indel 分子标记,对中国南方稻区的水稻进行低温发芽特性和穗发芽特性的筛选。首先,选取在江苏南京种植的 29 份不同类型的水稻品种(品系),在开花后 35 d 取穗,以鉴定人工穗发芽特性。同时,通过人工、自然方式进行破除休眠处理,以同步筛选低温发芽特性。随后,借助 *K*-均值聚类方法对筛选的品种(品系)进行分型,并根据自行设计的 *qLTG3-1* 基因编码区第 46 位的 71 bp 缺失基因突变位点共分离的共显性功能标记,验证所设计的分子标记与低温发芽、穗发芽特性的关联性,从而验证所开发的分子标记的有效性。最后,利用 *qLTG3-1* 基因编码区第 46 位 71 bp 缺失设计的分子标记,筛

选 646 份不同水稻种质资源或品种(品系),以评估所筛选品种(品系)的低温发芽、穗发芽的分布特征,从而为筛选具有耐低温发芽和耐穗发芽特性的水稻新品种(品系)提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验水稻品种(品系)

本研究选取的水稻品种(品系)均由江苏省农业科学院粮食作物研究所常规水稻育种团队保存,共 646 份,包含水稻种质资源、审定品种和正在参试的水稻新品系。选取 29 份品种(品系)用于分子标记的验证,供试水稻品种(品系)的信息见表 1。

表 1 29 份供试水稻品种(品系)的基本信息
Table 1 Basic information of the 29 tested rice varieties (lines)

品种(品系) 编号	品种(品系)名称/亚型	始穗期	品种(品系) 编号	品种(品系)名称/亚型	始穗期
1	9108/[淮稻 5 号(快)/NJ45HR](BC1F8)(粳型)	8 月 7 日	16	南粳 49(粳型)	8 月 20 日
2	日本晴(粳型)	8 月 2 日	17	常农粳 4 号(粳型)	8 月 18 日
3	扬辐粳 1 号(粳型)	8 月 16 日	18	扬粳 823(粳型)	8 月 18 日
4	镇稻 99(粳型)	8 月 18 日	19	武运粳 7 号(粳型)	8 月 27 日
5	南粳 53013(粳型)	8 月 16 日	20	武育粳 3 号(粳型)	8 月 18 日
6	南粳 40(粳型)	8 月 20 日	21	淮稻 10 号(粳型)	8 月 18 日
7	淮稻 5 号(粳型)	8 月 18 日	22	盐粳 18(粳型)	8 月 16 日
8	盐粳 9 号(粳型)	8 月 16 日	23	关东 194(粳型)	8 月 16 日
9	苏垦 118(粳型)	8 月 17 日	24	淮稻 9 号(粳型)	8 月 16 日
10	南粳 505(粳型)	8 月 9 日	25	南粳 9108(粳型)	8 月 14 日
11	南粳 12055(粳型)	8 月 7 日	26	淮稻 5 号[灌浆快(粳型)]	8 月 20 日
12	南粳 12056(粳型)	8 月 7 日	27	南粳 03075(粳型)	8 月 16 日
13	Kasalath(籼型)	8 月 3 日	28	南粳 93083(粳型)	8 月 18 日
14	9108//淮 5 快/NJ45HR(F9)(粳型)	8 月 16 日	29	苏秀 10 号(粳型)	8 月 20 日
15	扬中稻 1 号(籼型)	8 月 16 日			

始穗期为 2024 年每个品种(品系)第 1 个主茎的开花日期。

1.2 试验品种(品系)种植

供试品种(品系)于 2023–2024 年在江苏省农业科学院南京水稻试验基地种植,均于 5 月上旬播种,6 月上旬移栽。试验地区地势平整,土质为壤土,灌溉方便,肥力均匀,按照大田常规方法进行水肥、病虫害管理。

1.3 水稻取样

选取不同类型的试验品种(品系),每个品种(品系)均取开花当天的单穗挂牌,在花后 35 d 取 4~5 个单穗。将离体穗放在塑料袋中保湿,并在室内开展人工整穗发芽试验。

1.4 低温发芽试验

在低温发芽试验过程中,选取 2 个处理的水稻种子,其中 1 组选取开花后 35 d 的种子,按照 Yang 等^[16]的方法进行人工破除休眠处理(将种子在 45 ℃ 恒温箱中保存 96 h 以打破休眠);另外 1 组将新收获的水稻种子在常温条件下保存 3 个月,进行自然破除休眠处理。

参照 Yang 等^[16]的方法分别进行如下种子萌发试验,并进行适当修改:每个品种(品系)选取 240 粒饱满的种子,置于培养箱内进行培养,每 30 粒种子排列于 1 个铺有滤纸的 9.0 cm 培养皿内,在培养

皿中加入 12 mL 蒸馏水后在人工气候箱(购自宁波赛福实验仪器有限公司,型号为 PRX-1000C)中进行常温(30 ℃)、低温(13 ℃)条件下的发芽试验。以芽长或根长 ≥ 1 mm 为萌发标准,在萌发的第 11 d 检测种子发芽率,然后将低温萌发处理组的处理方法调整为 30 ℃处理 3 d,记录各时间的种子发芽率。每个处理设置 4 个重复,按照如下公式计算低温发芽力、低温发芽指数和低温发芽势:

低温发芽力 = 13 ℃培养第 11 d 的发芽率/
30 ℃培养第 3 d 的发芽率 $\times 100\%$

低温发芽指数 = $\sum(t/\text{第 } t \text{ d 的发芽数})$

低温发芽势 = 13 ℃培养第 7 d 的发芽种子数/
供试种子数 $\times 100\%$

1.5 穗发芽抗性的鉴定

参照李静等^[23]的方法,将离体整穗置于塑料袋中,第 1 d 用无菌水浸泡 12 h,之后每隔 12 h 喷水 1 次,以保持湿润。随后,将保湿稻穗转移至人工气候箱(购自宁波赛福实验仪器有限公司,型号为 PRX-

1000)内,进行人工发芽试验。试验参数设置如下:光照培养温度 30 ℃,光照时间 16 h/d;黑暗培养温度 25 ℃,黑暗培养时间 8 h/d;相对湿度 95%。营造通风且保湿的环境,每隔 2 d 记录 1 次每穗发芽籽粒数、总籽粒数,记录到第 8 d,并在取样的起始阶段和培养第 8 d 对稻穗进行拍照,记录整穗发芽状态。每个品种(品系)设置 4 个重复,参照前人的方法计算发芽率(GP)^[24],相关公式如下:穗发芽率 = (发芽的籽粒数/饱满籽粒总数) $\times 100\%$ 。

1.6 引物设计

针对 *qLTG3-1* 编码区变异的关键核苷酸区域,从 RAP-DB 网站(<https://rapdb.dna.affrc.go.jp/>)下载以日本晴为参考基因组的 *Os03g0103300* 序列。找到目标变异位点后,截取上游、下游各 250 bp 序列,用 Primer Premier 5 软件设计引物,并通过美国国家生物技术信息中心(NCBI)网站(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)上的 Primer Blast 功能进行引物的特异性检测,引物序列见表 2。

表 2 *qLTG3-1* 基因的分子标记信息

Table 2 *qLTG3-1* gene molecular marker information

基因	标记类型	引物序列(5'→3')
<i>qLTG3-1</i>	Indel(插入/缺失)	Gltg3-1F:GGCCATAGATCGAGATCGATCTGCAG Gltg3-1R:ACCACCTCCACGCCCTCCAC

1.7 分子标记检测

选取每个供试品种(品系)的叶片,用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取基因组 DNA。用开发的 *qLTG3-1* 基因分子标记检测供试品种(品系),引物均由南京擎科生物科技有限公司合成。PCR 反应体系为 10.0 μL ,其中模板(50~100 ng/ μL) 1.0 μL ,2 $\times$ PCR Mix 混合液 5.0 μL ,引物各 0.4 μL (10 $\mu\text{mol/L}$),ddH₂O 3.2 μL 。PCR 扩增程序:94 ℃预变性 2 min;94 ℃变性 30 s,59 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 40 s,34 个循环;72 ℃延伸 5 min。取 3.0 μL PCR 反应产物,用 3.0%琼脂糖凝胶进行电泳分离检测,电泳缓冲液为 1 $\times$ TBE(三羟甲基氨基甲烷-硼酸-乙二胺四乙酸缓冲液)。于 120 V 电泳 20~40 min 后,用 Bio-RAD 凝胶成像系统拍照、成像并保存。

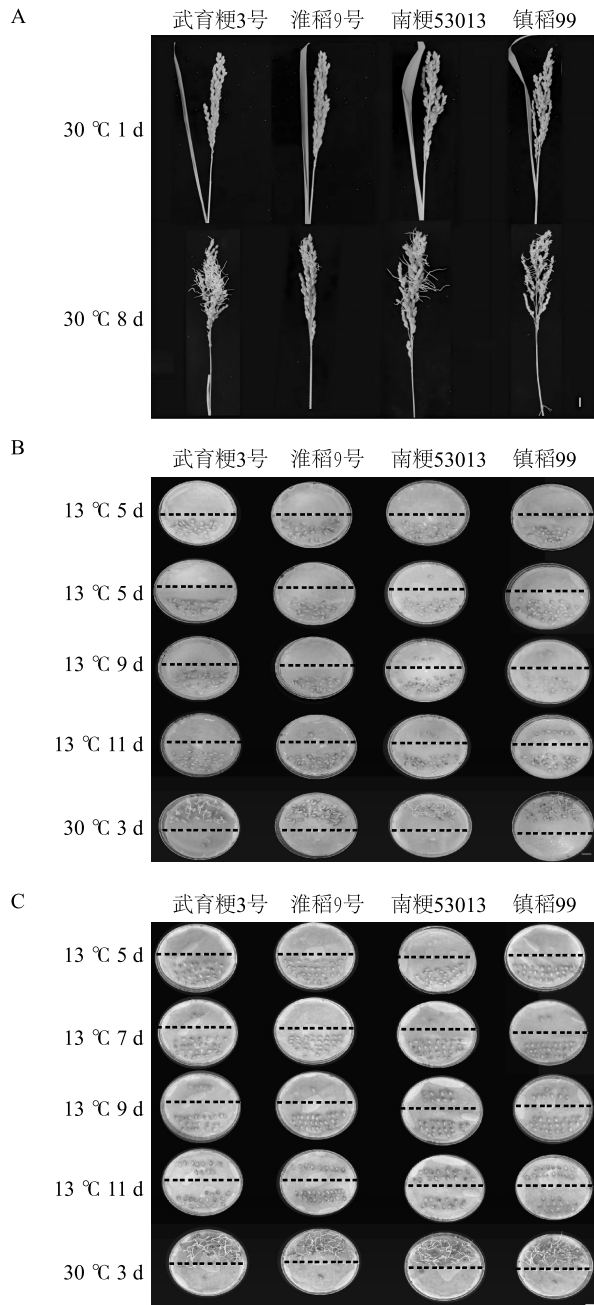
1.8 数据分析

用 Excel 2019 数据分析工具对表型数据进行统计分析,用 GraphPad Prism 9 进行分析和作图,使用 SPSS 软件进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 水稻种质资源的表型分析

图 1 显示,本研究通过对 30 ℃休眠前后的萌发率进行比较发现,31.03%供试品种(品系)的发芽率在打破休眠前与打破休眠后没有显著改变,均较容易发芽,属于弱休眠或无休眠水稻类型(部分穗发芽表型见图 1A),而 68.97%的供试品种(品系)只有经过人工打破休眠处理才会发芽,这部分品种(品系)属于强休眠品种(品系)类型(部分人工打破休眠的低温处理表型见图 1C),多数也为抗穗发芽类型(图 1A)。由此可见,对水稻种子进行破除休眠处理,不仅是与穗发芽抗性密切相关的重要处理,而且是准确鉴定低温发芽特性的关键环节。为了全面探究种子休眠差异对低温发芽能力的影响,本研究将 29 份水稻品种(品系)在常温下保存 3 个月,以通过自然方式打破休眠,并再次评估其在低温下的发芽能力。



A: 开花后 35 d 常温处理第 1 d 和第 8 d 的表型 (比例尺为 1 cm); B: 部分打破休眠后低温处理 11 d 和恢复常温处理后 3 d 的水稻表型 (白色虚线上方是发芽种子, 比例尺为 1 cm); C: 部分保存 3 个月、低温处理 11 d 和恢复常温处理后 3 d 的表型 (白色虚线上方是发芽种子, 比例尺为 1 cm)。

图 1 水稻穗发芽和低温发芽的表型分析

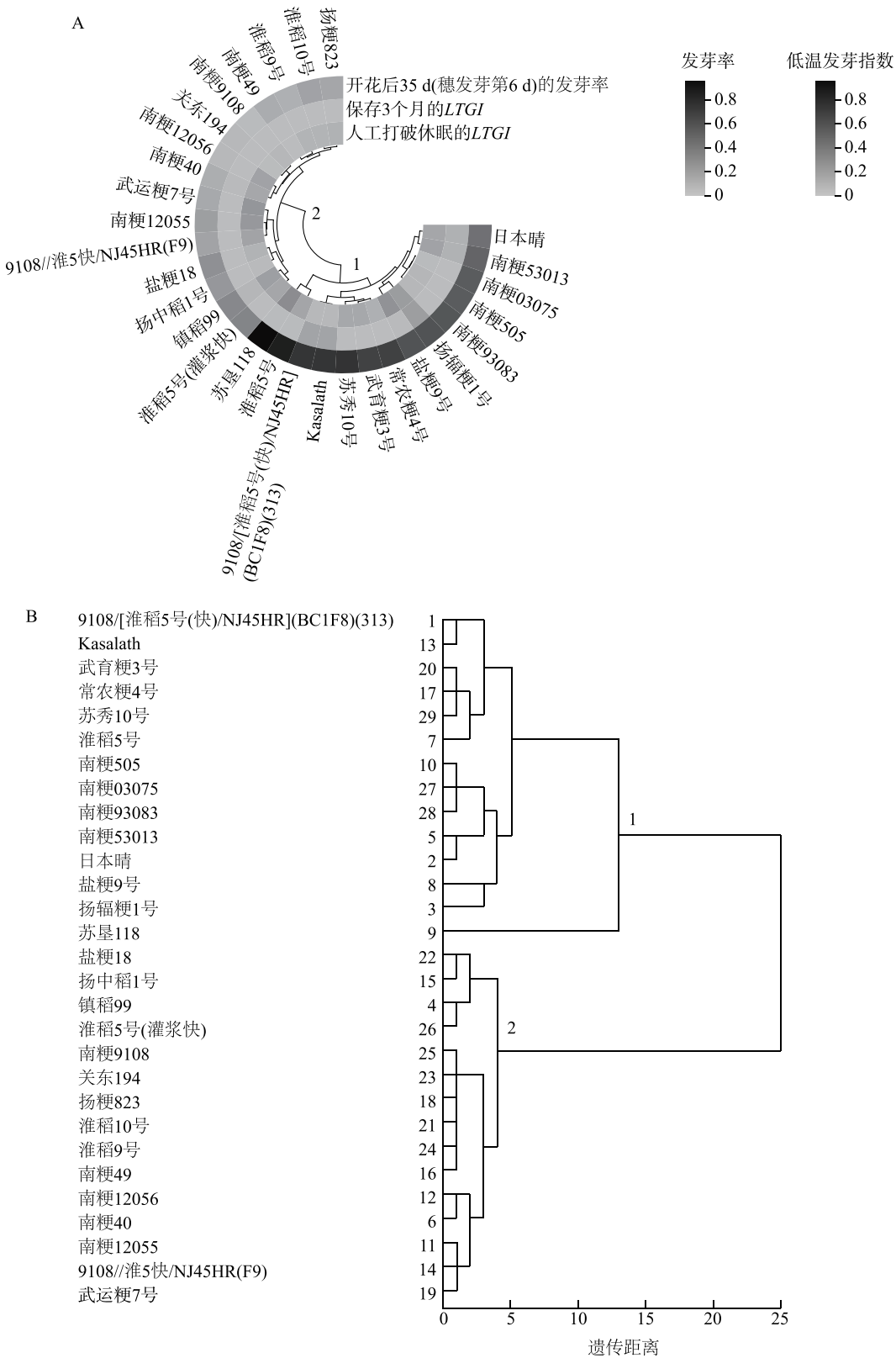
Fig.1 Phenotypic analysis of pre-harvest sprouting and low-temperature germination in rice

表型分析结果显示, 72.41% 的水稻品种 (品系)

的低温发芽力在自然破除休眠后显著升高, 24.13% 的水稻品种 (品系) 在低温条件下发芽, 可见低温条件下的发芽表现与人工方式促进发芽的表现大体一致。具体分析发现, 低温处理 6 d 后, 供试品种 (品系) 的发芽率均未超过 20%, 然而随着处理时间的延长, 不同品种 (品系) 间的发芽能力差异越发明显。本研究选取低温处理第 11 d 的发芽率与恢复 30 °C 的条件下第 3 d 的发芽率作为低温发芽力的鉴定指标。此外, 我们还对人工破除休眠后的低温发芽指数、自然条件破除休眠 (保存 3 个月) 的低温发芽指数、穗发芽第 6 d (开花后 35 d) 的发芽率进行系统聚类 and K-均值聚类分析, 以曼哈顿距离为度量标准、以阈值 15 为聚类标准, 将供试品种 (品系) 分为如图 2A、图 2B 所示的 2 类, 图 2A 为聚类环形热图, 其中聚类 1 有 14 份品种 (品系) (占 48%), 为耐低温、易穗发芽的类型; 聚类 2 有 15 份品种 (品系) (占 52%), 为不耐低温、耐穗发芽的类型 (表 3), 由此可见, 穗发芽、低温发芽特性均与品种 (品系) 的休眠性密切相关, 有效破除种子休眠是准确鉴定水稻 LTG、PHS 表型的关键。

2.2 分子标记的开发

分别选择用于聚类分析的 2 种典型品种 (品系), 即聚类 1 的日本晴和聚类 2 的南梗 12055, 并参照 *qLTG3-1* 的基因序列设计引物。由图 3 可以看出, 与日本晴相比, 南梗 12055 的 *qLTG3-1* 基因编码区在第 46 位发生了 71 bp 片段的缺失, 造成移码突变。参照测序的 *qLTG3-1* 基因序列设计 Indel 的功能标记, 针对插入序列设计侧翼引物, 扩增出唯一且完整包含该插入序列的片段, 以达到区分 71 bp 碱基缺失的目的。使用设计好的 *qLTG3-1* 引物对 8 份水稻品种 (品系) (南梗 12056、南梗 12055、武运梗 7 号、南梗 505、淮稻 5 号、南梗 49、Kasalath、扬中稻 1 号) 进行 PCR 扩增和电泳检测, 结果见图 4。本研究设计的功能标记基因 *qLTG3-1* 在编码区第 46 位存在 71 bp 的纯合体, 可以扩增出 1 个大小为 211 bp 的条带, 而缺失 71 bp 的纯合体可以扩增出 1 个大小为 140 bp 的条带。图 4 显示, 南梗 12055、南梗 12056、武运梗 7 号能扩增出大小为 140 bp 的目标条带, 而其他品种 (品系) 则可以扩增出大小为 211 bp 的目标条带。由此可见, *qLTG3-1* 基因的功能标记能特异性区分存在 71 bp、不存在 71 bp 的 *qLTG3-1* 的差异。



A:不同水稻品种(品系)低温发芽指数与穗发芽的环形聚类热图;B:不同水稻品种(品系)低温发芽指数与穗发芽的层次聚类树状图。
图 2 不同水稻品种(品系)低温发芽指数(LTGI)与穗发芽率的聚类分析结果
Fig.2 Cluster analysis results of low-temperature germination index (LTGI) and pre-harvest sprouting rate in different rice varieties (lines)

表 3 不同水稻品种(品系)低温发芽指数(LTGI)与穗发芽率聚类分析

Table 3 Cluster analysis of low-temperature germination index (LTGI) and pre-harvest sprouting rate in different rice varieties (lines)

聚类	品种(品系)名称	类别	人工打破休眠的 LTGI	保存 3 个月的 LTGI	开花后 35 d 穗发芽率	聚类占比 (%)	分类类型
1	苏垦 118、盐粳 9 号、扬辐粳 1 号、南粳 53013、淮稻 5 号、南粳 03075、苏秀 10 号、武育粳 3 号、常农粳 4 号、日本晴、南粳 505、南粳 93083、9108/[淮稻 5 号(快)/NJ45HR](BC1F8)(313)、Kasalath	平均值	0.045	0.118	0.663	48	耐低温发芽、 易穗发芽类型
		范围	0~0.180	0.013~0.279	0.400~0.958		
		变异系数	1.411	0.750	0.222		
2	扬粳 823、盐粳 18、淮稻 10 号、淮稻 9 号、淮稻 5 号(灌浆快)、南粳 49、南粳 9108、武运粳 7 号、南粳 12055、扬中稻 1 号、南粳 40、关东 194、镇稻 99、9108//淮 5 快/NJ45HR(F9)、南粳 12056	平均值	0.003	0.094	0.143	52	不耐低温发芽、 耐穗发芽类型
		范围	0~0.037	0~0.220	0~0.331		
		变异系数	2.936	0.766	0.702		

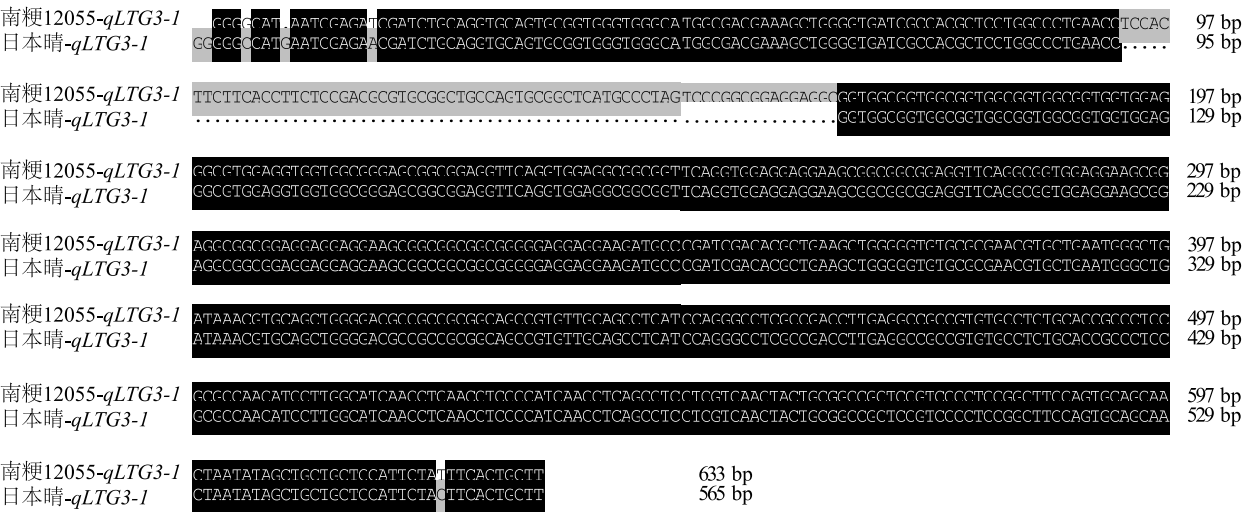
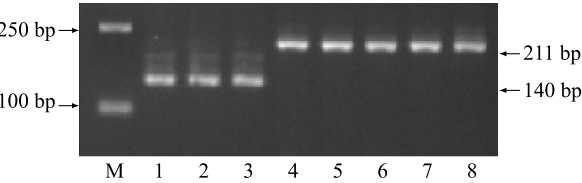


图 3 鉴定的部分水稻品种(品系) *qLTG3-1* 基因的测序峰图
Fig.3 Sequencing peak diagrams of *qLTG3-1* gene in some identified rice varieties (lines)



M: Marker; 1: 南粳 12056; 2: 南粳 12055; 3: 武运粳 7 号; 4: 南粳 505; 5: 淮稻 5 号; 6: 南粳 49; 7: Kasalath; 8: 扬中稻 1 号。

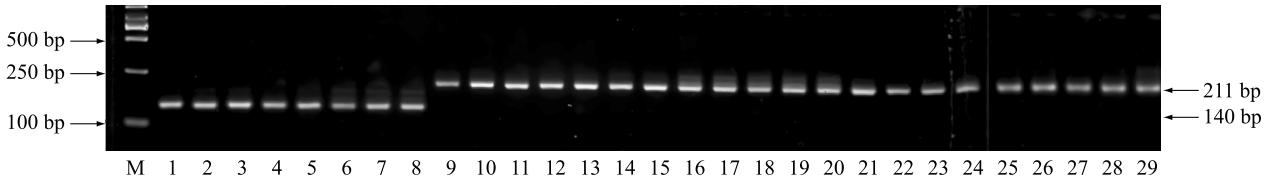
图 4 8 份水稻品种(品系) *qLTG3-1* 基因插入/缺失 (Indel) 功能标记的多态性分析

Fig.4 Polymorphism analysis of functional markers for the insertion/deletion (Indel) in the *qLTG3-1* of eight rice varieties (lines)

2.3 *qLTG3-1* 基因的分子标记验证

利用本研究开发的 *qLTG3-1* 基因的特异性引物, 对 29 份低温发芽、穗发芽表型同时筛选的水稻品种(品系)进行验证, 结果表明, 在 29 份品种(品系)中, 共发现有 8 份品种(品系)[武运粳 7 号、南粳 53013、苏秀 10 号、9108//淮 5 快/NJ45HR(F9)、南粳 12055、南粳 12056、关东 194 与南粳 9108]扩增出 1 个条带, 大小为 140 bp, 是缺失 71 bp 的纯合体; 其余品种(品系)均可扩增出大小为 211 bp 的目标条带(图 5)。结合 29 份低温发芽、穗发芽表型的聚类分析结果可知, 在扩增出的含有 71 bp 条带的 14 份水稻品种(品系)

中,有 12 份品种(品系)属于耐低温发芽且穗发芽敏感类型,占筛选品种(品系)总数的 86%,而在 8 份筛选出缺失 71 bp 条带的水稻品种(品系)中,有 6 份表现出耐穗发芽但不耐低温发芽表型,占筛选品种(品系)总数的 75%。上述结果表明,本研究开发的 *qLTG3-1* 基因的分子标记可以同时筛选出耐低温发芽和具有穗发芽抗性的水稻品种(品系)。



M:Marker;1~29 分别对应武运梗 7 号、南梗 53013、苏秀 10 号、9108// 淮 5 快 / NJ45HR (F9)、南梗 12055、南梗 12056、关东 194、南梗 9108、日本晴、扬辐梗 1 号、镇稻 99、南梗 40、盐梗 9 号、扬中稻 1 号、南梗 49、常农梗 4 号、扬梗 823、武育梗 3 号、淮稻 10 号、盐梗 18、Kasalath、淮稻 5 号(灌浆快)、苏垦 118、南梗 5055、淮稻 5 号、淮稻 9 号、南梗 03075、南梗 93093、南稻 5 号快、9108/[淮稻 5 号(快)]/NJ45 [HR] (BC1F8)。

图 5 水稻品种(品系) *qLTG3-1* 基因插入/缺失 (Indel) 功能标记的多态性分析
Fig.5 Polymorphism analysis of functional markers for the insertion/deletion (Indel) in the *qLTG3-1* of rice varieties (lines)

2.4 水稻 *qLTG3-1* 的分子标记的应用

利用本研究开发的 *qLTG3-1* 分子标记对 2024 年种植于南京的 646 份水稻品种(品系)进行检测,结果显示,557 份亲本中具有不耐低温发芽但耐穗发芽基因型的品种(品系)有 81 份,占 14.5%;耐低温发芽但对穗发芽敏感的基因型品种(品系)有 476

份,占 85.5%。在 2024 年江苏省迟熟中梗的预试品种(品系)中,缺失 71 bp 的品种(品系)占总数的 14.6%,表现为不耐低温发芽但耐穗发芽;存在 71 bp 的品种(品系)占总数的 85.4%,表现为耐低温发芽但对穗发芽敏感(表 4),也有类似的趋势。

表 4 646 份水稻品种(品系) *qLTG3-1* 基因型检测统计
Table 4 Statistical analysis of *qLTG3-1* genotyping in 646 rice varieties (lines)

品种(品系)	总数 (份)	不耐低温发芽但耐穗发芽 类型(缺失 71 bp)数(份)	耐低温发芽但对穗发芽敏感 类型(存在 71 bp)数(份)
迟熟中梗预试品种(品系)	89	13	76
亲本品种(品系)	557	81	476
合计	646	94	552

3 讨论

低温萌发和穗发芽都是水稻轻简栽培过程中表现出的重要性状^[25-27]。当水稻的低温发芽力、穗发芽耐性较差时,会导致水稻的发芽率、发芽势下降,不仅会影响水稻的基本苗质量,而且会影响来年水稻的用种价值,对水稻产量、品种选育均有不良影响。本研究以 29 份水稻品种(品系)为研究材料,通过表型筛选其低温发芽特性与穗发芽情况,并结合自行开发的 *qLTG3-1* 基因编码区的特异性分子标记,可以同步有效区分水稻低温发芽特性和穗发芽特性。

低温萌发、穗发芽都是种子的萌发特性,种子萌发是一种受许多基因和环境条件共同影响的复杂性

状^[28-30]。休眠是决定种子萌发的重要内在因素,归根结底是一种受大量 QTL 位点共同调控的遗传性状,尤其在强休眠品种中,穗发芽、低温发芽可能表现出相似的延迟萌发现象。20 世纪 50 年代以来,针对水稻种子休眠、穗发芽抗性的研究从未停止,国内外研究者已定位到很多与之相关的 QTL,广泛分布于 12 条染色体上^[29]。已有研究发现, *OsNCED3*、*OsVP1*、*OsSdr4* 和 *OsSd6* 等基因均与种子休眠及穗发芽抗性密切相关^[30-33]。而 *qLTG3-1*、*OsSAP16*、*LIG5*、*OsZ-IP73* 和 *OsUBC12* 等基因均与低温萌发力有关^[34-37]。本研究结果表明,休眠会影响水稻的穗发芽抗性,强休眠品种(品系)如南梗 9108 具有较强穗发芽抗性;与此相反,与人工打破休眠处理相比,自然破除休眠

的不同品种(品系)的低温发芽率差异更明显,更有利于准确区分水稻的低温发芽特性(即解除种子休眠),有利于准确地鉴定低温发芽特性。因此,解除种子的休眠状态是准确鉴定水稻低温发芽特性的前提。本研究结果显示,供试材料依据耐低温发芽力、穗发芽抗性分化为2种明显的表型,表明不同品种(品系)在适应环境胁迫的过程中会进化出不同策略,同时也表明选育兼具低温发芽抗性和抗穗发芽2种特性的水稻新品种(品系)是一个较大的挑战。

水稻 *qLTG3-1* 可以解释 LTG 的广泛变异,在自然种群中其等位基因变异已经被利用,说明水稻 *qLTG3-1* 是控制水稻低温发芽力的主要 QTL^[13-22]。Fujino 等^[14] 研究发现, *qLTG3-1* 在编码区的第1个外显子的46 bp 位置上有1个功能性核苷酸多态性位点,编码1个未知功能的蛋白质,可能通过调节胚乳降解相关酶的活性来促进低温下的种子萌发。Hori 等^[18] 研究发现,穗发芽的抗性与低温萌发相关基因 *qLTG3-1* 位于同一染色体区域,LTG 与穗发芽抗性之间可能存在密切关系。本研究依据 *qLTG3-1* 编码区关键区域开发的 Indel 标记,能有效筛选出 LTG、PHS 的基因型,与通过人工表型筛选得到的低温发芽、穗发芽结果具有较高的一致性。需要说明的是,无论在低温还是在高温、高湿的条件下,水稻发芽是一个受多基因控制的数量性状。已知 *qLTG3-1* 中存在丰富的序列变异,其他变异位点也可能是功能位点。本研究筛选的具有较强低温发芽特性的水稻品种(品系),其序列与日本晴相同,既无弱低温发芽类型 Hayamasari 的71 bp 缺失及亮氨酸/组氨酸单碱基替换,也无与已鉴定的强低温发芽类型 Italica Livorno 相似的序列,属于中等低温发芽的类型。因此,未来还需要进一步挖掘更多与 LTG、PHS 相关的基因,深入探索各基因间的互作机制,并结合表型,通过多基因标记进行联合筛选,才能筛选或选育出既具有强低温发芽特性,又具备穗发芽抗性的水稻新品种(品系)。

参考文献:

- [1] FUJINO K, SEKIGUCHI H. Origins of functional nucleotide polymorphisms in a major quantitative trait locus, *qLTG3-1*, controlling low-temperature germinability in rice[J]. Plant Molecular Biology, 2011, 75(1/2): 1-10.
- [2] 周旭,杨梯丰,刘祖培,等. 水稻低温发芽力的研究进展与展望[J]. 中国稻米, 2024, 30(5): 41-48.
- [3] 余木兰,唐宁,夏玉梅,等. 水稻穗萌机制及调控的研究进展[J]. 杂交水稻, 2020, 35(5): 1-6.
- [4] 卢心明,牛百晓. 水稻种子休眠遗传调控机制研究进展[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2024, 45(1): 1-9.
- [5] XU F, TANG J Y, GAO S P, et al. Control of rice pre-harvest sprouting by glutaredoxin-mediated abscisic acid signaling[J]. The Plant Journal; for Cell and Molecular Biology, 2019, 100(5): 1036-1051.
- [6] 周述波,林伟,贺立静,等. 水稻穗上芽发生的生理变化初步研究[J]. 杂交水稻, 2011, 26(4): 68-71.
- [7] 赵庆勇,陈涛,赵春芳,等. 粳稻穗发芽的品种(系)间差异及其影响因素分析[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(3): 481-486.
- [8] 裘实,卫平洋,魏海燕,等. 穗发芽程度对粳稻糙米品质和蛋白质组分的影响[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(3): 523-530.
- [9] SASAKI T, KINOSHITA T, TAKAHASHI M E. Estimation of the number of genes in the germination ability at low temperature in rice: genetical studies in rice plant, LVII[J]. Journal of the Faculty of Agriculture, 1974, 57: 301-312.
- [10] FUJINO K, SEKIGUCHI H, SATO T, et al. Mapping of quantitative trait loci controlling low-temperature germinability in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 108(5): 794-799.
- [11] 侯名语,王春明,江玲,等. 水稻低温发芽力 QTL 定位和遗传分析[J]. 遗传学报, 2004(7): 701-706.
- [12] 陈亮,楼巧君,孙宗修,等. 水稻低温发芽力的 QTL 定位[J]. 中国水稻科学, 2006, 20(2): 159-164.
- [13] 杨梯丰,张子怡,董景芳,等. 水稻低温发芽力 QTL *qLTG3-1* 基因内分子标记的开发及其在华南籼稻中的应用评价[J]. 广东农业科学, 2021, 48(10): 32-41.
- [14] FUJINO K, SEKIGUCHI H, MATSUDA Y, et al. Molecular identification of a major quantitative trait locus, *qLTG3-1*, controlling low-temperature germinability in rice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(34): 12623-12628.
- [15] SHIM K C, KIM S H, LEE H S, et al. Characterization of a new *qLTG3-1* allele for low-temperature germinability in rice from the wild species *Oryza rufipogon*[J]. Rice, 2020, 13(1): 10.
- [16] YANG T F, ZHOU L, ZHAO J L, et al. The candidate genes underlying a stably expressed QTL for low temperature germinability in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Rice, 2020, 13(1): 74.
- [17] SUH J P, AHN S N, MOON H P, et al. QTL analysis of low temperature germinability in a Korean weedy rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Rice Research Newsletter, 1999, 16: 53-55.
- [18] HORI K, SUGIMOTO K, NONOUE Y, et al. Detection of quantitative trait loci controlling pre-harvest sprouting resistance by using backcrossed populations of Japonica rice cultivars[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2010, 120(8): 1547-1557.
- [19] LI L Y, CHEN H P, MAO D H. Pyramiding of rapid germination loci from *Oryza sativa* cultivar 'Xieqingzao B' and cold tolerance loci from Dongxiang wild rice to increase climate resilience of cultivated rice[J]. Molecular Breeding, 2019, 39(6): 85.

- [20] 滕 胜, 曾大力, 钱 前, 等. 低温条件下水稻发芽力 QTL 的定位分析[J]. 科学通报, 2001, 13: 1104-1108.
- [21] 杨梯丰, 张少红, 赵均良, 等. 水稻耐冷 QTL 定位的比较分析[J]. 分子植物育种, 2015, 13(1): 1-15.
- [22] FUJINO K, SEKIGUCHI H, SATO T, et al. Mapping of quantitative trait loci controlling low-temperature germinability in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 108(5): 794-799.
- [23] 李 静, 李雨欣, 赵 洁, 等. 水稻穗发芽抗性鉴定方法优化及批量筛选[J]. 江西农业大学学报, 2025, 47(3): 569-586.
- [24] FINCH-SAVAGE W E, LEUBNER-METZGER G. Seed dormancy and the control of germination [J]. New Phytologist, 2006, 171(3): 501-523.
- [25] 曹 微, 王 燕, 谭 斌, 等. 水稻品种直播相关的种子低温和低氧萌发活力评价[J]. 分子植物育种, 2018, 16(10): 3259-3268.
- [26] 景德道, 刁立平, 钱华飞, 等. 水稻直播与移栽的比较及相应育种策略[J]. 江西农业学报, 2008, 20(7): 17-20.
- [27] 汪向东, 陈再高. 水稻直播生产现状及发展对策[J]. 现代农业科技, 2019, 15: 49-51.
- [28] BENTSINK L, KOORNNEEF M. Seed dormancy and germination [J]. The Arabidopsis Book, 2008, 6: e0119.
- [29] LI C D, NI P X, FRANCKI M, et al. Genes controlling seed dormancy and pre-harvest sprouting in a rice-wheat-barley comparison [J]. Functional & Integrative Genomics, 2004, 4(2): 84-93.
- [30] CHEN Y, XIANG Z P, LIU M, et al. ABA biosynthesis gene *OsNCED3* contributes to preharvest sprouting resistance and grain development in rice [J]. Plant, Cell & Environment, 2023, 46(4): 1384-1401.
- [31] CHEN W Q, WANG W, LYU Y S, et al. OsVP1 activates *Sdr4* expression to control rice seed dormancy via the ABA signaling pathway [J]. The Crop Journal, 2021, 9(1): 68-78.
- [32] ZHAO B, ZHANG H, CHEN T X, et al. *Sdr4* dominates pre-harvest sprouting and facilitates adaptation to local climatic condition in Asian cultivated rice [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2022, 64(6): 1246-1263.
- [33] XU F, TANG J Y, WANG S X, et al. Antagonistic control of seed dormancy in rice by two bHLH transcription factors [J]. Nature Genetics, 2022, 54(12): 1972-1982.
- [34] WANG X, ZOU B H, SHAO Q L, et al. Natural variation reveals that *OsSAP16* controls low-temperature germination in rice [J]. Journal of Experimental Botany, 2018, 69(3): 413-421.
- [35] PAN Y H, LIANG H F, GAO L J, et al. Transcriptomic profiling of germinating seeds under cold stress and characterization of the cold-tolerant gene *LTG5* in rice [J]. BMC Plant Biology, 2020, 20(1): 371.
- [36] 田孟祥, 张时龙, 何友勋, 等. 水稻耐低温基因 *bZIP73* 分子标记的开发与验证[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(6): 1265-1270.
- [37] ZHANG C Z, WANG H R, TIAN X J, et al. A transposon insertion in the promoter of *OsUBC12* enhances cold tolerance during *japonica* rice germination [J]. Nature Communications, 2024, 15(1): 2211.

(责任编辑: 徐 艳)