

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.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.06.001

水稻耐低温基因 *bZIP73* 分子标记的开发与验证

田孟祥¹, 张时龙¹, 何友勋¹, 余本勋¹, 余莉¹, 宫彦龙², 雷月², 张大双², 叶永印¹

(1. 毕节市农业科学研究所, 贵州 毕节 551714; 2. 贵州省水稻研究所, 贵州 贵阳 550006)

摘要: 为能够对耐低温基因 *bZIP73* 的不同类型进行准确鉴别, 根据粳稻 *bZIP73*^{Jap} 与籼稻 *bZIP73*^{Ind} 在编码区的一个碱基差别, 开发了由 4 条引物组成的分子标记, 并应用 7 份籼稻、7 份粳稻及 3 份籼粳杂交的 F₁ 材料对分子标记进行检测验证。电泳检测图显示, 粳稻 *bZIP73*^{Jap} 扩增出 681 bp 和 342 bp 2 种条带, 籼稻 *bZIP73*^{Ind} 扩增出 681 bp 和 387 bp 2 种条带, 而籼粳杂合子 F₁ 则扩增出 681 bp、342 bp 及 387 bp 3 种条带, 所有材料的扩增条带大小与预测目的片段均一致, 说明所开发出的分子标记能对基因 *bZIP73* 的不同类型进行准确判断。该方法具有费用低廉、操作简便、快速高效等优点, 可在资源鉴定和育种中推广应用。

关键词: 水稻; 耐低温; *bZIP73* 基因; 分子标记

中图分类号: S511.032 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)06-1265-06

Development and verification of molecular markers of chilling tolerance gene *bZIP73* in rice

TIAN Meng-xiang¹, ZHANG Shi-long¹, HE You-xun¹, YU Ben-xun¹, YU Li¹, GONG Yan-long², LEI Yue², ZHANG Da-shuang², YE Yong-yin¹

(1. Bijie Institute of Agricultural Sciences, Bijie 551714, China; 2. Guizhou Rice Institute, Guiyang 550006, China)

Abstract: In order to accurately identify the different types of chilling tolerance gene *bZIP73*, a molecular marker consisting of four primers was developed according to the difference of single base in coding region between *japonica bZIP73*^{Jap} and *indica bZIP73*^{Ind}. The molecular markers were tested by seven *indica* rice, seven *japonica* rice and three *indica-japonica* hybrid F₁ materials. Electrophoretic detection results showed that 681 bp and 342 bp bands were amplified from *bZIP73*^{Jap}, 681 bp and 387 bp bands were amplified from *bZIP73*^{Ind}, and 681 bp, 342 bp and 387 bp bands were amplified from *indica* and *japonica* heterozygote F₁. The size of amplified bands of all rice materials was consistent with that of the predicted target fragments, indicating that the developed molecular markers could accurately judge the different types of gene *bZIP73*. This method has the advantages of low cost, simple operation, fast and high efficiency, and can be widely

used in resource identification and breeding.

Key words: rice; chilling tolerance; *bZIP73* gene; molecular marker

收稿日期: 2019-07-17

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFD0100205); 贵州省科技
成果应用及产业化计划项目[黔科合成果(2018)4306];
毕节试验区特色优势作物资源研发平台建设黔科合条中
补地项目[(2015)4003]; 毕节市科技支撑计划项目[毕科
合字(2016)20号]

作者简介: 田孟祥(1983-), 男, 贵州麻江人, 硕士, 助理研究员, 主要
从事水稻育种及栽培研究。(E-mail) tmengxiang@126.
com

通讯作者: 张时龙, (E-mail) bjrice@163.com

在中国, 水稻在农作物中占有重要地位, 属于最
主要的粮食作物之列, 种植面积约占粮食作物面积
的 3 成, 产量接近粮食总产量的一半, 为中国 60% 以
上人口提供口粮^[1]。水稻为喜温作物^[2], 因而一般
对低温胁迫较敏感, 易发生冷害, 特别是抽穗后遇到

持续低温,极有可能影响正常灌浆,造成粒粒增多,产量大幅度下降^[3-4]。据不完全统计,在中国,由于冷害因素,每年稻谷减产超过 3×10^8 t^[5]。因此,培育耐低温水稻品种,已成为当前水稻育种工作者普遍关注的焦点。

随着水稻分子生物学研究的不断进步,依据 DNA 序列设计的分子标记被广泛用于辅助育种,弥补了传统育种依赖于表型的形态学鉴定带来的效率低、准确率难以保证等不足,可实现简便高效地对目的基因进行判断。基因的挖掘及其功能的阐明,又为利用分子标记进行辅助育种奠定了基础和前提条件。水稻低温耐受性主要由数量性状 QTL 控制,遗传机制较为复杂。相对于水稻其他大多数农艺性状,耐低温基因的研究步伐较慢。迄今为止,在水稻中已发现并进行定位的耐低温 QTL 已超过 200 余个^[6-14],然而,遗憾的是大都只停留在初步定位阶段,能够进行精细定位或克隆分析的并不多见。从从现有文献报道来看,精细定位的水稻耐低温 QTL 约 12 个,涉及到水稻种子萌发期、秧苗期、孕穗期及成熟期等多个时期的低温耐受性^[5]。克隆且开展功能研究的耐低温基因约有 8 个,*Ctb1* 耐冷性基因与花药长度相关联,编码一类含有 F-box 结构域的蛋白质,通过同泛素连接酶亚基 *Skp1* 的互作,参与孕穗期的低温耐受性过程^[15]。*GSTZ2* 编码马来酰乙酰乙酸异构酶,该酶属于可溶性谷胱甘肽 S-转移酶(*GST*)的高度保守亚家族,参与酪氨酸分解代谢途径,同水稻苗期低温敏感性相关^[16]。*qLTG3-1* 编码一个定位在胞质和细胞核中功能未知的蛋白质,与水稻种子萌发期的低温耐受性有关^[17]。*LTG1* 编码酪蛋白激酶,参与生长素的运输、合成和信号传导途径,调节水稻营养生长期的低温耐受性^[18]。*COLD1* 编码一个定位于质膜和内质网上的信号传导蛋白调节因子,通过与 G 蛋白 α 亚基 *RGA1* 互作,应答低温胁迫机制,作用发生于水稻苗期^[19]。*qCTS-9* 的启动子区域存在的一个 InDel,导致水稻苗期对低温耐受性的差异^[20]。*CTB4a* 编码一个保守的类受体激酶,与 ATP 合酶的 β 亚基 *AtpB* 互作,调节 ATP 的活性和含量以应对水稻孕穗期的低温胁迫^[21]。而与以上已克隆的水稻耐低温基因不同,*bZIP73* 基因是一个具有多重功效,参与脱落酸(ABA)依赖的低温信号途径,在水稻苗期和孕穗期均发生作用,粳型 *bZIP73^{Jap}* 较籼型 *bZIP73^{Ind}* 具有更

强的低温耐受性,其作用主要通过与 *bZIP71* 互作来实现,另外,*bZIP73^{Jap}* 还调控另一低温耐受性基因 *qLTG3-1* 的表达^[22-23]。可见,*bZIP73* 基因在水稻耐冷性方面有着出色的表现,一因多效,具有极为重要的育种利用价值。因此,可将粳稻 *bZIP73^{Jap}* 基因引入籼稻品种,以提高籼稻的低温耐受性,更好地应对极端低温恶劣天气。

已有研究结果证实,水稻耐低温基因 *bZIP73* 编码区第 511 位在粳稻与籼稻间存在一个单核苷酸的差异,粳稻 *bZIP73^{Jap}* 为 G,籼稻 *bZIP73^{Ind}* 为 A,这种碱基差异,致使其编码的氨基酸类型发生变化,决定了其低温的耐受性差异。本研究根据这一单核苷酸多态性(SNP)差别,结合 4 引物扩增受阻 PCR 原理,开发相应的分子标记,以期为该基因的鉴定和分子辅助选择育种提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试水稻材料

籼稻材料:9311、培矮 64S、南京 11、贵农简恢、莲香早、遵义大粒香、黔香 B。粳稻材料:日本晴、大方五里香、南粳 9108、纳雍五里香、毕粳 43、毕粳 45、NR210。籼粳 F_1 材料:9311/日本晴、贵农简恢/大方五里香、遵义大粒香/纳雍五里香。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计及合成 从 NCBI 网站下载水稻耐低温基因 *bZIP73* 的碱基序列(NCBI: AP006169 \ BAD34342)(国家水稻数据库中心: <http://www.ricedata.cn/gene/list/2194.htm>),根据 *bZIP73* 在粳籼间的碱基序列第 511 位存在一个碱基差异(粳稻为 G,籼稻为 A)进行分析,依据扩增受阻突变体系理论,设计由 2 条外引物和 2 条内引物组合而成的 4 引物标记^[24],利用斯坦福大学的在线引物设计软件(<https://www.yeastgenome.org/primer3>)进行外引物标记开发,内引物则人工设计确定。引物由上海生工生物公司合成。

1.2.2 DNA 的提取 取新鲜水稻叶片约 0.4 g,用液氮冷冻,然后研磨成粉细。参照传统 CTAB 法提取 DNA。

1.2.3 PCR 扩增及电泳检测 经优化,PCR 反应体系如下(总体积 20 μ l):DNA 2.0 μ l (10~100 ng/L),4 引物 Primer 混合液 2.0 μ l (*bZIP73*-O-F: 2 μ mol/L; *bZIP73*-O-R: 2 μ mol/L; *bZIP73*-I-F: 8

$\mu\text{mol/L}$; *bZIP73*-I-R: $4\ \mu\text{mol/L}$), $10\times\text{Taq Buffer}$ $2.0\ \mu\text{l}$, $\text{Mg}^{2+}\text{ Buffer}$ $1.2\ \mu\text{l}$, $d\ \text{NTP Mixture}$ $0.4\ \mu\text{l}$ ($2.5\ \text{mmol/L}$), *Taq DNA 聚合酶* $0.4\ \mu\text{l}$ ($2.5\ \text{U}/\mu\text{l}$), ddH_2O $12.0\ \mu\text{l}$ 。所有 PCR 组分来自上海生工生物公司。反应程序为: $94\ ^\circ\text{C}$, $5\ \text{min}$; $94\ ^\circ\text{C}$, $30\ \text{s}$, $60\ ^\circ\text{C}$, $30\ \text{s}$, $72\ ^\circ\text{C}$, $30\ \text{s}$, 循环 31 次, 在 $72\ ^\circ\text{C}$ 下再延伸 $10\ \text{min}$, $10\ ^\circ\text{C}$ 下 $1\ \text{min}$, 产物取出备用。

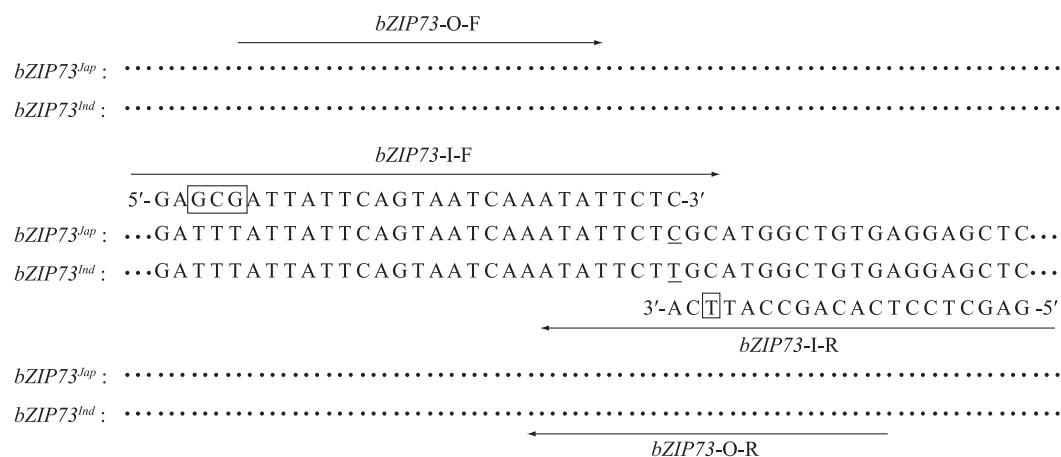
PCR 产物在 $1.5\%\sim 2.0\%$ 琼脂糖凝胶中进行电泳, 电泳电压 $120\ \text{V}$, 时间 $35\sim 45\ \text{min}$ 。电泳完毕, 用核酸染料染色, 在凝胶成像系统中查看及拍照。

2 结果与分析

2.1 *bZIP73* 分子标记的设计

粳稻 *bZIP73*^{Jap} 与籼稻 *bZIP73*^{Ind} 在编码区的第 511 位分别是碱基 G 与 A, 编码不同的氨基酸, 导致基因功能产生较大差异, 粳稻 *bZIP73*^{Jap} 具有更强的

低温耐受性。基于 *bZIP73* 基因在籼粳间存在的 SNP, 结合扩增受阻突变体系 PCR 方法, 设计 4 引物标记。外引物采用斯坦福大学提供的在线引物设计软件对标记进行开发, 正向外引物用 *bZIP73*-O-R 表示, 反向外引物则用 *bZIP73*-O-F 表示。而内引物则通过人工设计, 正、反内引物的 3' 端位于籼粳 SNP 位点, 且与该位点碱基相同或互补。反向内引物用 *bZIP73*-I-R 表示, 为了提高引物的特异性, 引入错配碱基, 把反向内引物 3' 端的第 3 个碱基 G 变为 T。在设计正向内引物时发现, 正向内引物碱基 G、C 含量太低, 仅为 20% 左右, 易导致 PCR 扩增失败。因此, 相对于反向内引物, 适当加长了正向内引物的长度, 以提高引物的 T_m 值; 同时, 将引物 5' 端第 3~5 位碱基进行碱基类型变换, 即由 TTT 变为 GCG, 以提高该引物的 G、C 含量。用 *bZIP73*-I-F 表示正向内引物。4 引物标记设计思路如图 1 所示。



下划线的字母为等位差异碱基, 省略号表示相同的碱基, 箭头表示引物位置和扩增方向, 方框内为引入的错配碱基。

图 1 检测 *bZIP73* 基因的标记开发策略

Fig.1 Development strategies for the primers to detect *bZIP73* gene

根据开发的 4 引物标记在 DNA 序列中所处的位置, 可预测: 所有水稻材料能够扩增出大小为 681 bp 的条带, 扩增引物为 *bZIP73*-O-F 与 *bZIP73*-O-R; 而含纯合粳稻 *bZIP73*^{Jap} 基因的材料特征带为 342 bp 大小的条带, 扩增引物为 *bZIP73*-I-F 与 *bZIP73*-O-R; 含纯合籼稻 *bZIP73*^{Ind} 基因的特征带为 387 bp, 扩增引物为 *bZIP73*-O-F 与 *bZIP73*-I-R; 而籼粳杂合 F₁ 材料可扩增出 681 bp、342 bp 及 387 bp 3 种条带类型。以上引物序列见表 1。

表 1 *bZIP73* 基因标记的引物序列

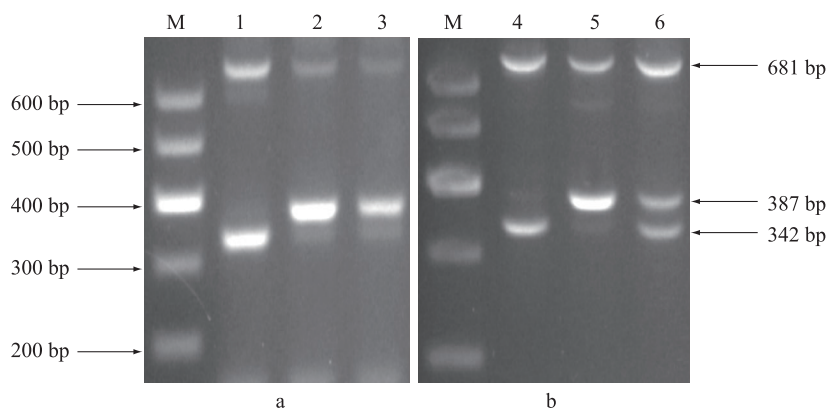
Table 1 The primer sequences of marker for *bZIP73*

引物名称	引物序列 (5'→3')
<i>bZIP73</i> -O-F	CCATCAAGGCATCAAACACATC
<i>bZIP73</i> -O-R	CACAGATGACGCCTACCAGA
<i>bZIP73</i> -I-F	GAGCGATTATTCAGTAATCAAATATTCTC
<i>bZIP73</i> -I-R	GAGCTCCTCACAGCCATTCA

2.2 *bZIP73* 基因分子标记的验证

将 4 条引物以 1 : 1 : 1 : 1 的比例 (摩尔质量比) 加入同一管中进行基因 PCR 扩增, 检测结果发现, 含纯合粳稻 *bZIP73*^{Jap} 的日本晴扩增出了大致为 681 bp 和 342 bp 的条带类型, 含纯合籼稻 *bZIP73*^{Ind} 的 9311 扩增出了大致为 681 bp 和 387 bp 的条带类型, 与预测目的片段大小相吻合; 然而粳、籼杂合子

F₁ 却没有扩增出以上所有条带类型, 粳稻特征带没有在杂合子中出现。调整引物比例, 经过探索, 最终按 *bZIP73*-O-F : *bZIP73*-O-R : *bZIP73*-I-F : *bZIP73*-I-R 为 1 : 1 : 4 : 2 的比例 (摩尔质量比), 扩增得到所有基因类型的特征谱带, 与预测目标片段大小一致, 共显性标记特征得以体现 (图 2)。



a: 引物 *bZIP73*-O-F、*bZIP73*-O-R、*bZIP73*-I-F、*bZIP73*-I-R 摩尔质量比为 1 : 1 : 1 : 1; b: 引物 *bZIP73*-O-F、*bZIP73*-O-R、*bZIP73*-I-F、*bZIP73*-I-R 摩尔质量比为 1 : 1 : 4 : 2。M: Marker B (100~600 bp); 1, 4: 日本晴; 2, 5: 9311; 3, 6: F₁ (日本晴/9311)。

图 2 *bZIP73* 标记的优化与验证

Fig.2 Optimization and verification of *bZIP73* markers

在 4 引物扩增受阻突变体系 PCR 中, 针对于靶 DNA 序列, 非特异性内引物 3' 端只是个别碱基不能与 DNA 模板配对, 因此, 其设计及其摩尔质量比不合理就可能难以达到试验目的。特异性综合评价相对较差的引物, 在试验时适当增加其比例, 有利于增强其扩增特异性, 如本研究的正向内引物 *bZIP73*-I-F。另外, 在对序列匹配要求不高的引物 5' 端引入适当错配碱基, 不影响引物与模板的特异性结合 (本研究的正向内引物中, TTT 变成 GCG), 证明对引物 5' 端的修饰是可行的。

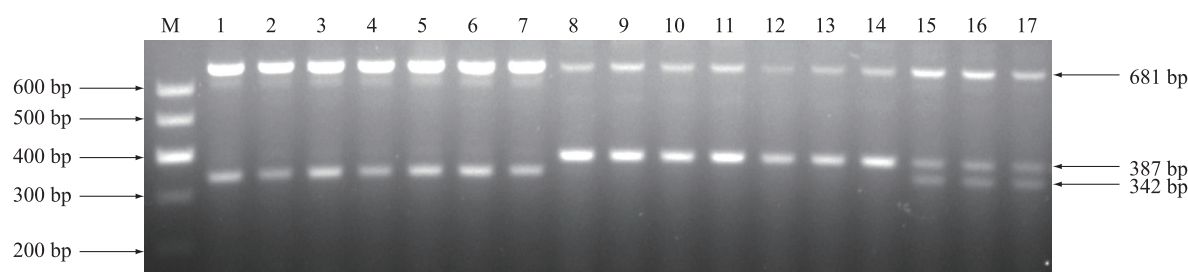
2.3 *bZIP73* 基因分子标记对多个水稻品种的进一步验证

为了进一步验证 *bZIP73* 标记对不同水稻品种鉴定的准确性, 又增加了 6 个粳稻、6 个籼稻和 2 个粳籼交 F₁ 进行测试。所有材料加入 4 引物标记在同一管中进行 PCR 扩增, 电泳检测结果表明, 6 个粳稻品种均呈现约 681 bp 和 342 bp 的谱带类型, 6 个籼稻品种呈现约 681 bp 和 387 bp 的谱带类型, 粳

籼交 F₁ 也扩增出了粳、籼 2 亚种类型的所有特征谱带, 即 681 bp、342 bp 和 387 bp 3 种谱带类型 (图 3)。所开发引物标记的可靠性得到进一步证实, 说明 *bZIP73*-O-F、*bZIP73*-O-R、*bZIP73*-I-F、*bZIP73*-I-R 4 引物能很好地用于区分水稻品种 *bZIP73* 的粳籼属性, 可用于资源鉴定和辅助育种。

2.4 *bZIP73* 基因分子标记对高世代籼粳杂交后代的检测

为了解本项目组近年来选育的高世代籼粳杂交品系 (品种) 的 *bZIP73* 基因类型, 用 *bZIP73* 引物标记对这些材料进行 PCR 扩增检测, 在 Me86 与 KR001/筒恢//红零杂交的 10 份 F₁₈ 高世代材料中, 检测到 6 份含粳型 *bZIP73*^{Jap} 基因; 从 C418 与 K5/合系 24//C418 杂交的 30 份 F₁₉ 材料中, 鉴定出 18 份含粳型 *bZIP73*^{Jap} 基因。分子标记检测鉴别结果, 为下一步利用 *bZIP73*^{Jap} 基因提供了重要参考, 也说明籼粳杂交是改良籼稻 *bZIP73* 基因类型, 提高其低温耐受性的有效途径。



M: Marker B (100~600 bp); 1~7: 日本晴、大方五里香、南梗 9108、纳雍五里香、毕梗 43、毕梗 45 和 NR210; 8~14: 9311、培矮 64S、南京 11、贵农简恢、莲香早、遵义大粒香和黔香 20B; 15~17: F_1 (9311/日本晴)、 F_1 (贵农简恢/大方五里香) 和 F_1 (遵义大粒香/纳雍五里香)。

图3 *bZIP73* 引物标记对水稻 DNA 的扩增检测

Fig.3 Amplification and detection of rice DNA with *bZIP73* primer markers

3 讨论

粳稻和籼稻在特征特性上存在明显的差别,在地理分布上也存在一定的差别。籼稻主要分布在生长季节高温多湿的南方,而粳稻主要分布在温度较低的东北、西北及云贵高原高海拔地区。造成籼、粳稻分布不同的重要原因是对低温的耐受性存在差异,粳稻具有更强的低温耐受性。水稻耐低温性状大都受 QTL 控制,由基因本身以及调控因子共同参与作用,分子遗传机理较为复杂。在已发现的耐低温相关 QTL 中,能够精细定位或克隆的基因很少。尽管全球总体变暖,然而极端不正常的恶劣天气仍时常出现,开展耐低温分子机制研究可为培育耐低温水稻品种提供参考依据。Liu 等深刻阐述了低温耐受性基因 *bZIP73* 的分子机理^[22-23]。*bZIP73* 是一个调节基因,通过与另一个 *bZIP71* 基因相互作用来调节水稻体内相关基因的表达水平,从而提高水稻对低温的耐受性^[25]。*bZIP73* 基因的调控作用在水稻苗期和孕穗期均可发生,而且,该调控基因还调控了一个同类基因 *qLTG3-1* 的表达,显而易见,*bZIP73* 基因在育种上有着重大效用。序列分析结果显示,*bZIP73* 基因在粳、籼稻中编码序列第 511 位存在 SNP 变异,导致对低温耐受性的差别,粳稻 *bZIP73^{Jap}* 比籼稻 *bZIP73^{Ind}* 更耐受低温。*bZIP73* 基因机理的阐明,为利用其进行有目的的育种及分子标记的开发设计奠定了基础。

基于 SNP 差异设计分子标记,常用的是限制性内切酶酶切标记及扩增受阻突变体系等方法,以扩增受阻突变体系最为经济实惠,应用也最为广泛。扩增受阻突变体系的内引物要求 3' 末端位于 SNP

差异位点,并且与该位点碱基一致或互补,通常在内引物 3' 端倒数第 3 位碱基处进行错配设计,以增强引物特异性。本研究根据 *bZIP73* 基因在粼、粳稻间的 SNP 差异,参照 PCR 扩增受阻突变体系原理,设计了用于鉴定该基因的分子标记。在设计反向内引物(*bZIP73-I-R*)时,将 3' 末端倒数第 3 位碱基 G 变为 T,以达到错配目的,增强特异性;而在设计正向内引物(*bZIP73-I-F*)时,鉴于设计位置的序列 G、C 百分比太低(仅 20%左右),于是在对引物序列匹配性要求不高的 5' 端引入错配碱基,将几个 A、T 碱基变为 G、C 碱基,增大引物序列的 G、C 含量,以此提高引物 PCR 扩增的准确性和成功率。试验结果表明,在设计引物时,根据需要可对引物序列 5' 端附近的碱基进行适当修饰,不会影响引物与模板结合的特异性。当然,各引物的比例也至关重要,在本研究中,各引物以相等的比例进行扩增时,效果欠佳,经过修正比例后,才获得了预期效果。但需注意,以综合评价结果相对较差的引物所占的比例最高为宜。

粳稻 *bZIP73^{Jap}* 比籼稻 *bZIP73^{Ind}* 对低温有着更强的耐受性,因此,可利用籼粳杂交,将 *bZIP73^{Jap}* 引入籼稻,提高籼稻的耐低温性能。本研究开发的 *bZIP73* 分子标记,能对 *bZIP73^{Jap}* 进行准确鉴定,可用于育种与资源鉴定,提高育种成效。

参考文献:

- [1] 田孟祥,余本勋,张时龙,等. 一种水稻高氮利用率 *NRT1.1B* 基因功能标记的开发与应用[J]. 分子植物育种, 2016, 14(2): 410-416.
- [2] 孙彦坤,李浩然,兰倩,等. 黑龙江省热量资源变化特征及对水稻不同发育期生长的影响[J]. 南方农业学报, 2018, 49

- (9):1794-1803.
- [3] 杨文飞, 杜永林, 顾大路, 等. 4种调节物质对水稻耐低温能力的影响[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(4): 739-746.
- [4] 伍晓玲, 于堃, 罗艳, 等. 安徽省水稻关键生育期低温冷害特征分析[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(6): 68-71.
- [5] 刘次桃, 王威, 毛毕刚, 等. 水稻耐低温逆境研究: 分子生理机制及育种展望[J]. 遗传, 2018, 40(3): 171-185.
- [6] LIU F X, SUN C Q, TAN L B, et al. Identification and mapping of quantitative trait loci controlling cold-tolerance of Chinese common wild rice (*O. rufipogon* Griff.) at booting to flowering stages[J]. Chinese Science Bulletin, 2003, 48(19): 2068-2071.
- [7] ANDAYA V, MACKILL D. QTLs conferring cold tolerance at the booting stage of rice using recombinant inbred lines from a japonica×indica cross[J]. Theor Appl Genet, 2003, 106(6): 1084-1090.
- [8] XU L M, ZHOU L, ZENG Y W, et al. Identification and mapping of quantitative trait loci for cold tolerance at the booting stage in a japonica rice near-isogenic line[J]. Plant Sci, 2008, 174(3): 340-347.
- [9] KUROKI M, SAITO K, MATSUBA S, et al. Quantitative trait locus analysis for cold tolerance at the booting stage in a rice cultivar, Hatsushizuku[J]. Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ, 2009, 43(2): 115-121.
- [10] LEI J G, ZHU S, SHAO C H, et al. Mapping quantitative trait loci for cold tolerance at the booting stage in rice by using chromosome segment substitution lines[J]. Crop and Pasture Science, 2018, 69(3): 278-283.
- [11] SHIRASAWA S, ENDO T, NAKAGOMI K, et al. Delimitation of a QTL region controlling cold tolerance at booting stage of a cultivar, 'Lijiangxintuanheigu', in rice, *Oryza sativa* L.[J]. Theoretical & Applied Genetics, 2012, 124(5): 937-946.
- [12] BISWAS P S, KHATUN H, DAS N, et al. Mapping and validation of QTLs for cold tolerance at seedling stage in rice from an indica cultivar Habiganj Boro VI (Hbj.BVI)[J]. Biotech, 2017, 7(6): 359.
- [13] 王棋, 范淑秀, 郭江华, 等. 利用籼粳交 RIL 群体对水稻发芽期和苗期耐冷性的 QTL 分析[J]. 华北农学报, 2019, 34(1): 83-88.
- [14] 朱金燕, 杨梅, 嵇朝球, 等. 利用染色体单片段代换系定位水稻芽期耐冷 QTL[J]. 植物学报, 2015, 50(3): 338-345.
- [15] SAITO K, HAYANO-SAITO Y, KUROKI M, et al. Map-based cloning of the rice cold tolerance gene *Ctb1*[J]. Plant Science (Oxford), 2010, 179(1/2): 97-102.
- [16] KIM S, ANDAYA V, TAI T. Cold sensitivity in rice (*Oryza sativa* L.) is strongly correlated with a naturally occurring Ile99Val mutation in the multifunctional glutathione transferase isozyme *GSTZ2*[J]. Biochemical Journal, 2011, 435(2): 373-380.
- [17] 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.
- [18] LU G, WU F Q, WU W, et al. Rice *LTG1* is involved in adaptive growth and fitness under low ambient temperature[J]. The Plant Journal, 2014, 78(3): 468-480.
- [19] MA Y, DAI X Y, XU Y Y, et al. *COLD1* Confers chilling tolerance in rice[J]. Cell, 2015, 160(6): 1209-1221.
- [20] ZHAO J, ZHANG S, DONG J, et al. A novel functional gene associated with cold tolerance at the seedling stage in rice[J]. Plant Biotechnology Journal, 2017, 15(9): 1141-1148.
- [21] ZHANG Z Y, LI J J, PAN Y H, et al. Natural variation in *CTB4a* enhances rice adaptation to cold habitats[J]. Nature Communications, 2017, 8: 14788.
- [22] LIU C T, OU S J, MAO B G, et al. Early selection of *bZIP73* facilitated adaptation of japonica rice to cold climates[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 3302.
- [23] LIU C T, SCHLAPPI M, MAO B G, et al. The *bZIP73* transcription factor controls rice cold tolerance at the reproductive stage[J]. Plant Biotechnology Journal, 2019, 17(9): 1834-1849.
- [24] 田孟祥, 张时龙, 余本勋, 等. 基于四引物扩增受阻突变体系 PCR 快速鉴定水稻 S5 基因的籼粳属性[J]. 作物杂志, 2015(6): 48-53.
- [25] 刘次桃, 区树俊, 储成才. *bZIP73*: 影响粳稻耐低温的关键基因[J]. 遗传, 2018, 40(9): 789-790.

(责任编辑: 张震林)