

拟南芥低温黑暗发芽基因鉴定及 QTL 定位

孟平红^{1,2} 杨正安¹ 万发香¹ 李苍山¹ 张兴国¹

(¹西南大学园艺园林学院/南方山地园艺学教育部重点实验室 重庆 400715; ²贵州省农业科学院园艺研究所 贵阳 550006)

摘要: 低温发芽是一个重要农艺性状,提高作物的耐寒性并确定控制低温发芽的基因是一个全球性的重大育种课题。通过对 300 多份拟南芥种子进行发芽试验,鉴定了低温黑暗下发芽的自然变异,并比较了两种生态型 Bay-0 和 Shahdara 低温黑暗下的发芽特性,这种自然变异被用来鉴定低温黑暗中发芽基因的遗传位点;利用这两个生态型杂交产生的重组近交系,结合分子标记和 QTL 方法,检测到种子在低温黑暗下发芽至少受 6 个 QTL 所控制,其中 3 个为主效位点,它们所解释的自然变异为 61%。利用异源近亲代(HIF)验证了这 3 个主要 QTL,为低温黑暗发芽基因的精细定位和基因克隆等研究奠定了基础。

关键词: 拟南芥; 低温黑暗发芽; 重组近交系; 异源近亲代; 分子标记; QTL 定位

Identification of Genes Involved in Low Temperature Germination in the Dark in *Arabidopsis* by Mapping Quantitative Trait Loci

MENG Ping-hong^{1,2}, YANG Zheng-an¹, WAN Fa-xiang¹, LI Cang-shan¹, ZHANG Xing-guo¹

(¹ Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education/College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715; ² Institute of Horticulture, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550006)

Abstract: Low temperature germination is an important agricultural trait. Improvement of crop tolerance to low temperature and identification of target genes are a major goal for crop breeders worldwide. By testing seed germination of over 300 *Arabidopsis* accessions, we identified a natural variation in germinability at low temperature in the dark among these accessions and compared the germination characteristics between Bay-0 and Shahdara. This natural variation was exploited to identify genetic loci responsible for cold-tolerant and dark germination. The molecular markers and a quantitative trait loci approach were used on recombinant inbred lines of a cross between Bay-0 and Shahdara. Six distinct quantitative trait loci were identified, three of which were major loci responsible for 61% of this natural variation. Validation of the three major loci using heterogeneous inbred families confirmed the feasibility of fine mapping and cloning the genes at the quantitative trait loci responsible for cold-tolerant and dark germination.

Key words: *Arabidopsis Thaliana*; Cold-tolerant and dark germination; Recombinant inbred line; Heterogeneous inbred families; Molecular markers; QTL mapping

低温发芽是一个非常重要的农艺性状。提高种子发芽的耐寒性和低温发芽能力可以使农作物幼苗提早生长,这有利于幼苗与杂草竞争光和养分^[1]。对于在冬春直接播种的农作物,对 6℃ 低温敏感不仅严重影响出苗率,也影响了作物的整齐度和一致性,降低产量。提高作物的耐

寒性并确定控制低温发芽的基因是一个全球性的重大研究课题^[2]。

据报道,环境是打破种子休眠和发芽机制的综合因素,其中光照和温度是两个制约种子发芽的主要因素^[3]。光照对种子发芽的影响主要是由光敏色素的感光器来实现的,光敏色素脱辅基蛋白

收稿日期:2011-10-31 修回日期:2012-03-08

基金项目:西南大学博士后基金(102060-207107);国家自然科学基金(31160238);贵州省优青人才项目(黔科合人字(2009)03号);贵州省省长基金项目(黔省专合字[2009]61号)

作者简介:孟平红,博士,研究员。研究方向:蔬菜分子生物学与遗传育种。E-mail: 164931596@qq.com

通讯作者:张兴国,博士,教授。研究方向:蔬菜分子生物学与遗传育种。E-mail: zhangxg63@163.com

杨正安,博士,副教授。研究方向:蔬菜分子生物学与遗传育种。E-mail: dyangza@yahoo.com.cn

PhyA、PhyB 和 PhyE 已被证明可刺激发芽,种子在黑暗中发芽主要是通过 PhyB 实现的^[4-5]。一些植物激素起到内部调节种子发芽或保持休眠的作用,例如赤霉素、乙烯、芸苔素类固醇促进发芽,而脱落酸抑制发芽^[6]。一些研究也表明,光参与调节了一些基因包括通过光敏色素调节赤霉素和脱落酸的代谢^[7]。此外已经证明,通过转录调控基因 *GA3ox*,光加速了赤霉素的生物合成^[8]。

种子低温下发芽可能会导致冷害,阻止幼苗发育,但拟南芥种子在吸胀期间短期冷处理可刺激发芽^[2]。虽然发芽中对低温的反应机制还没有完全被人们了解,但在低温条件下发芽能力极有可能与冷适应机制有关。冷适应机制普遍与基因表达水平有关^[9];受冷诱导的 C-重复结合因子基因 CBF1、CBF2 和 CBF3 已被证明是关键转录调控因子^[10]。CBF1~3 的表达是由 PhyB 调控的,而 CBF 对冷感应的转录水平在完全黑暗中降低了^[11]。最近的一项研究表明,光敏色素活性直接受温度影响,因此,可能在发芽调控机制中有温度和光两个信号参与^[12]。

鉴定那些感应光照和温度、影响种子发芽的基因很重要,了解这些基因位点有助于选择耐低温发芽的作物品种。种子低温发芽是个复杂的数量性状,适宜用 QTLs(Quantitative Trait Loci)分析。有报道称在水稻和番茄中检测到低温发芽 QTL 3 个^[2],但利用 QTL 方法研究拟南芥低温黑暗发芽的报道极少,拟南芥和这些作物在低温发芽中是否存在共同机制值得深入研究。本研究将利用两个拟南芥生态型 Bay-0 和 Shahdara 杂交产生的重组近交系(Recombinant Inbred Line,简称 RIL)进行 QTL 分析,确定其主效基因,利用来自异源近亲代(Heterogeneous Inbred Families,简称 HIF)的同源基因近亲系(Near-isogenic lines,简称 NIL),从遗传学和生理学上验证这些基因。

1 材料与方法

1.1 植物材料

不同生态型的种子来自法国凡尔赛生物资源中心(<http://dbsgap.versailles.inra.fr/vnat/>)。同时在温室(18~28℃)营养钵里播种这些材料,最低光周期 13h。重组近交系(RIL)来自 Bay-0 和 shahdara 杂交后代 F₇ 种子。异缘近亲系(HIF)来自重组近交系 F₇ 的单株留种^[13-14]。播种每个重组近交系(例如 RIL046),对应的基因型分别注明。每个基因

型固定选择 2~3 个单株并自交单独留种。

1.2 试验方法

1.2.1 低温下发芽的表型鉴定 试验设 6℃ 低温下黑暗和光照两个处理。将 50~100 粒种子进行表面消毒后播种在含 0.5%(w/v)的琼脂糖的培养皿里,一组播种后立即用铝箔纸包裹避光并放置在一个避光的盒子里,置于 6℃ 冰箱里;另一组播种后直接放置在 6℃ 光照下(5mmol/m²·s)培养。第 16 天后,分别统计有胚根破口而出的种子的发芽率。417 个重组近交系的表型(发芽率)统计在 6 周内内进行 5 次重复试验。在 6℃ 黑暗中发芽率高于 20% 的材料均被重新测试。

植株培养和采种。在含 29mmol/L 蔗糖的 B5 固体培养基上播种,在光照培养箱里培养 1 周后移植到温室生长,光周期是 20℃ 16h 光/18℃ 8h 黑暗,相对湿度 70%,光照 250mmol/m²·s。种子成熟后单株分别采收种子。

1.2.2 统计分析和 QTL 定位 利用重组近交系,用方差分析模型(ANOVA)确定具体的基因型和环境因素,量化广义遗传性(遗传方差/总表型变异)。发芽试验进行 3 次重复。方差分析获得了使用 *aov* 函数的 S-PLUS 3.4 版本统计学数据包(Statistical Sciences,Seattle,Washington)。

一套 38 个分子标记和遗传图谱已使用 MAPMAKER 3.0 软件获得,详细分子标记如 Loudet 等^[15]所述(网址:<http://dbsgap.versailles.inra.fr/vnat/>)。QTL 分析使用 Unix 版的 CAR-TOGRAPHER 1.14 软件^[16]。标准的区间作图法(IM)和复合区间作图法(CIM)如 Loudet 等^[15]所描述。用方差分析并使用 web QTL 工具 'Pair-Scan' 软件(<http://www.genenetwork.org/>)研究 QTL 之间的相互作用。

2 结果与分析

2.1 拟南芥在低温黑暗中发芽的多样性

通过对 309 份种子的发芽试验,大多数种子在 6℃ 低温黑暗中并没有明显发芽;只有其中 15 份种子发芽率大于 20%,这些种子都通过栽培后采收种子重新测试发芽率,有 14 份种子被证实低温黑暗中发芽率超过 20%(表 1)。在 6℃ 低温和黑暗下生态型 Bay-0 无法发芽,而来自不同种子库的 Shahdara 生态型的不同单株后代表现不同,编号为 236 和 271 的种子在 6℃ 黑暗中有不同的发芽率,其中 236 号始终显示较高的发芽水平(表 1、图 1a)。

表 1 拟南芥不同生态型在低温和黑暗下发芽的能力

Table 1 Arabidopsis accessions capable of germinating in the cold and dark

种子编号 Code	3	25	46	107	110	116	119	168	170	180	181	236	255	271
生态型 Biotype	Arg-4	Jea	Ko-2	Kl-2	Bs-1	Do-0	Li-2	Su-0	Mc-0	Blh-1	Blh-2	Shahdara	Niigata	Shahdara
6°C 黑暗中的发芽率 (%) Germination at 6°C in the dark ± SE)	66 ± 4	64 ± 3	42 ± 3	28 ± 3	26 ± 4	98 ± 1	36 ± 1	64 ± 3	45 ± 3	89 ± 5	70 ± 6	54 ± 1	95 ± 2	28 ± 2

发芽率是 3 次重复的平均值, 分别来自 3 次试验

Germination percentages are means of three individual measurements. Similar results were obtained in three individual experiments

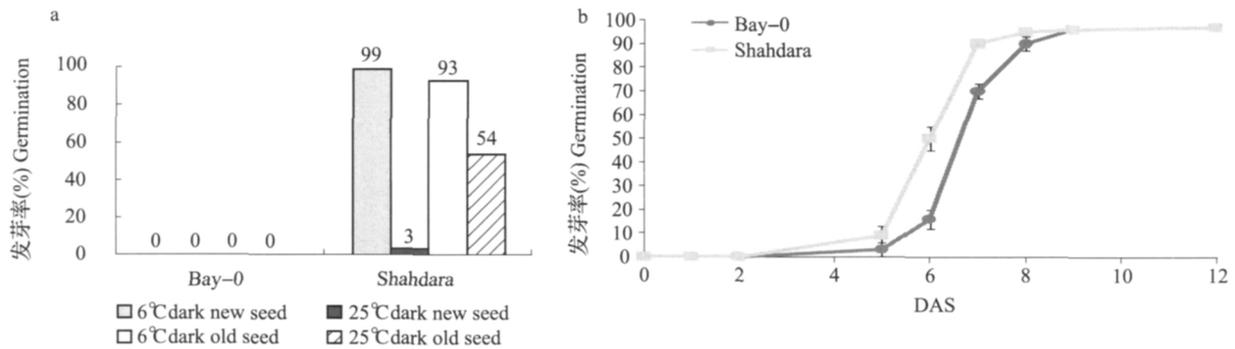


图 1 光照和低温对 Bay-0 和 Shahdara 种子发芽的影响

Fig. 1 Effects of light and low temperature on the germination of Bay-0 and Shahdara

a: 种子在 6°C 和 25°C 黑暗中培养后检测发芽率; b: 种子在 6°C 光照中培养后检测发芽率。统计有胚根破口而出的种子占播种总数的比率。使用的种子分别是重组近交系的 F₇ 新种子 (a, b) 和经过后熟 3 年或 4 年的旧种子 (4°C, 相对湿度 30% 保存) (a)。

Bay-0: 圆形标记; Shahdara: 正方形标记; DAS: 播种后天数。误差线代表 SE 值 (n = 3), 不可见是小于数据符号

a. Germination rate was determined after incubation at either 6°C or 25°C in the dark. b. Germination rate was determined after incubation at 6°C under constant light. Rates were scored based on the number of seeds with protruding radicles compared to the total number of seeds sown. Seed lots were obtained from plants cultivated with F₇ RILs (a and b) or had been stored for after-ripened (4°C, 30% relative humidity) (a) 3 years (open symbols) or 4 years (closed symbols). Bay-0: circles; Shahdara: squares; DAS: days after sowing. Error bars represent standard errors (n = 3) and where not visible are smaller than the data symbol

2.2 Bay-0 和 Shahdara 两种生态型发芽特性比较

对于其中的一个生态型 Bay-0 (Bayreuth, 编号 41), 在 6°C 黑暗中培养 16d 仍不发芽, 而 Shahdara 有极高的发芽率 (图 1a)。在转移到 6°C 黑暗环境之前, Bay-0 种子在光照中保留不同时间 (5 min ~ 1h) 并不能显著刺激其发芽 (最高发芽率 4% ± 2%)。不过, 两个生态型在 6°C 低温光照下都能够完全发芽, 9d 后发芽率均达 100%, 虽然 Bay-0 发芽率一直比 Shahdara 略有迟缓 (图 1b)。新鲜的 Shaldara 种子多数在 25°C 黑暗中难以发芽 (发芽率仅 3%), 而在 6°C 黑暗中发芽率极高 (发芽率 99%, 图 1a)。因此, 低温处理可以打破种子休眠。种子在干燥中贮藏就失去了休眠——一个称为后熟的过程; 对两种不同时期的种子进行了研究。对 Bay-0 而言, 在 25°C 黑暗中新鲜的和后熟的种子都不能发芽; 但对 Shaldara 而言, 25°C 黑暗中新

鲜的种子也难以发芽, 而后熟的种子则能够发芽 (发芽率 54%, 图 1a); 而且后熟时期越长, 发芽程度越高。

为了确定 Bay-0 种子发芽时对光的需求是否与赤霉素的生物合成或在黑暗中感应的差异有关, 研究了植物激素的影响。研究结果表明, 在低温黑暗中赤霉素刺激了 Bay-0 的发芽 (图 2), 也增加 Shaldara 的发芽能力。

2.3 利用重组近交系 (RIL) 群体进行 QTL 定位

采用 417 份 RIL 的 F₇ 种子, 分析它们在 6°C 低温和黑暗中的发芽能力。有趣的是 Shaldara 种子在低温黑暗中表现出高发芽率 (表 1, 图 1a), 而 Bay-0 的发芽却保持不变, 几乎不发芽。表现型 (发芽率) 的 L 形分布显示了倾向于 Bay-0 的表型, 其中 38% 的种子在低温黑暗中只有 10% 或以下的发芽率 (图 3), RIL 群体平均发芽率为 35%。

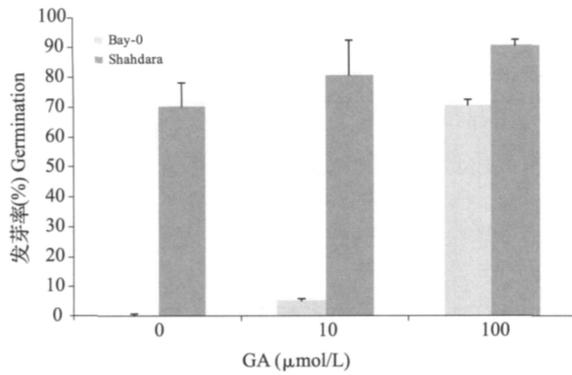


图2 赤霉素促进 Bay-0 和 Shahdara 在低温黑暗中发芽的刺激作用

Fig. 2 Stimulation of Bay-0 and Shahdara cold and dark germination by gibberellins

种子在 6℃ 黑暗中培养 16d 后统计发芽率, 即有胚根破口而出的种子占播种总数的比率。GA: 赤霉素。误差线代表 SE 值 (n = 3) Germination percentages were scored after 16d in the dark based on the number of seeds with protruding radicles compared to the total numbers of seeds sown. GA: gibberellins 4 and 7. Error bars represent standard errors (n = 3)

利用 RIL 的 F₆ 群体和 38 个标记绘制了遗传图谱^[15], 一系列标记在染色体中的分布见图 4。使用 411 个 RIL 群体, 被称为 CDG (Cold-tolerant Dark Germination) 的 6 个 QTL 被定位, 它们的 LOD 值大于 2.2 (表 2); 总的来说, 他们解释了总体 67% 的表型变异, 其中 3 个为主效 QTL (大于 17% 的总变异), 差异极显著 (LOD 值高于 20), 这 3 个主要 QTL 是降低 Bay-0 发芽的原因。在 6 个 QTL 中有 4 个 (CDG-1 ~ 4) 被检测, 相当于解释总数 63% 的变异 (表 2)。剩下的 2 个 QTL (CDG-5 和 CDG-6) 影响

表 2 Bay-0 × Shahdara 群体低温黑暗发芽性状的 QTL 定位遗传参数

Table 2 Characteristics of mapped QTLs that account for germination at low temperature in the dark in the Bay-0 × Shahdara population

QTL 基因 QTL	染色体 Chr.	分子标记 Markers	LOD 间隔距离 Interval (cM)	LOD 统计值 LOD score	变异率 (%) Percentage of variance	加性效应 Additive effect
CDG-1	1	MSAT1-10	9 ~ 14	32	25	-33.6
CDG-2	2	MSAT2-36	21 ~ 37.5	24.3	19	-29.2
CDG-3	4	MSAT4-15	35 ~ 41	22.3	17	-28.4
CDG-4	3	MSAT3-21	43 ~ 63	3.3	2	-10.2
CDG-5	5	MSAT5-9	44 ~ 58	3.3	2	+9.4
CDG-6	4	MSAT4-8	0 ~ 12.5	2.3	2	+9.2
总变异					67	

CDG: 低温黑暗发芽。位置(厘摩)是从染色体上第 1 个标记开始算。加性效应代表在数量性状位点中 Shahdara 被 Bay-0 等位基因置换的发芽率平均效应

CDG: cold-tolerant dark germination. The position in centiMorgans (cM) is that from the first marker on the chromosome. The additive effect represents the mean effect in germination (%) of the replacement of both Shahdara alleles by Bay-0 alleles at the QTL

非常小。由于在 1% 误差内没有检测到显著的相互作用, 故而没有明确的解释为何在 RIL 群体中 Bay-0 未发芽 (图 3)。然而, 3 个 CDG 位点相互作用的详细分析确实显示一个阈值效应可能会出现; 在 Bay-0 中, 3 个数量性状基因 CDG 中 2 个等位基因已固定的遗传背景下加入 1 个等位基因, 这种影响微乎其微。这极有可能是 1 级相互作用 (CDG1 × CDG3) 和 2 级相互作用 (CDG1 × CDG2 × CDG3) 接近于 0.05 阈值, 而明显高于 0.01 的原因。

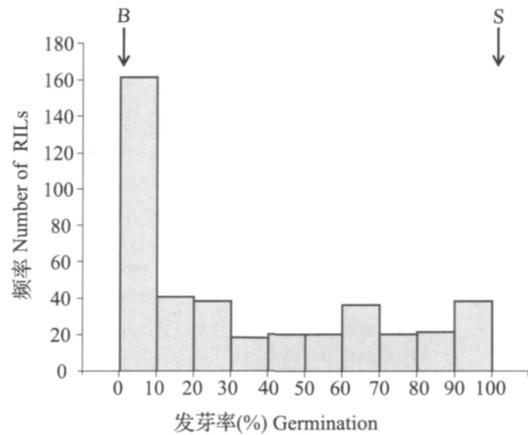


图 3 Bay-0 × Shahdara 的重组近交系在 6℃ 黑暗中平均发芽率的频率分布

Fig. 3 Frequency distribution of the mean germination percentage for Bay-0 × Shahdara recombinant inbred lines at 6°C in the dark

箭头所指为父母本的平均值 (S: Shahdara;

B: Bay-0)。RILs: 重组近交系

Arrows depict the means of the parental lines

(S: Shahdara; B: Bay-0). RILs: recombinant inbred lines

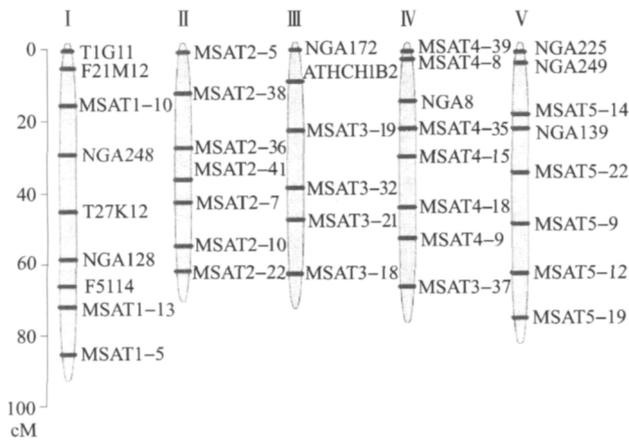


图 4 Bay-0 × Shahdara RIL 群体的遗传图谱

Fig. 4 Genetic map obtained from the Bay-0 × Shahdara RIL population

2.4 使用同源基因近亲系 (NIL) 验证 3 个主效 QTL

选择重组自交系 (RIL) F_6 , 它们的杂合子靠近 CDG-1、CDG-2 和 CDG-3, 但在其余的基因组中固定为纯合子。这相当于 RIL046、128、194 为 CDG-1; RIL010、102、422 为 CDG-2; RIL090、156 为 CDG-3 (图 5a-c)。正如 Loudet 等^[13]所描述的一样, 从这些 RIL 的 F_7 以适当的标记在感兴趣的区域标记基因; 异源近亲代 HIF 被固定为标记, 这些标记或以 Bay-0、或以 Shaldara 的等位基因来测试。通过从每个单株采集的种子 (F_8), 这些同源基因近亲系 (NILs) 随后表现在低温黑暗中发芽 (图 5d-f)。在 Bay-0 和 Shaldara 等位基因之间 3 个为 CDG-1 的异源近亲代 (HIF) 全都显示了在低温黑暗中发芽水平的差异。不过只有 HIF046 展示了预期中较高的与 Shaldara 等位基因相应的发芽水平, 与 QTL 分析结果相一致, 这说明了 Bay-0 等位基因在这个点上发芽降低。因此该 HIF046 将是 QTL 精细定位的适当选择。同样地, CDG-2 和 CDG-3 的 QTL 分别被 HIF010、HIF422 和 HIF156 证实。而且, 通过 QTL 分析发现, 纯合子 Bay-0 和 Shaldara 的 4 个 HIF 基因型的区别与预计每个点的等位基因影响相类似。

3 讨论与结论

光照和温度是两个制约种子发芽的主要因素, 但目前对这些环境因素如何综合影响发芽的机制还不够清楚。为确定在何种程度上拟南芥在低温黑暗中发芽能力上存在多样性, 对来自 12 个不同地理位置的 300 多份拟南芥资源材料进行了研究。早先 Schmuths 等^[17]对 73 份种子在长日照下分别在

10℃、18℃和 26℃发芽的分析, 表明了大部分拟南芥种子发芽的自然变异与温度有关。相反, 本研究只有少数种子在 6℃有明显发芽, 只有 14 份种子的发芽率大于 20%。在 Schmuths 等^[17]的发芽试验中, 最低试验温度是 10℃, 因而本研究观察到的相对有限的发芽差异反映了低温对发芽的强烈限制作用。尽管如此, Bay-0 种子在 6℃低温黑暗中没有出现发芽, 却在 6℃光照下出现了高水平的发芽; 相反在 25℃黑暗中没有出现发芽。因此, 大多数种子没有发芽极可能反映了拟南芥发芽对强光的要求。

众所周知在种子吸胀时低温会解除种子休眠^[18], 冷处理一个可能的作用是通过消除休眠而刺激 Shahdara 发芽。实际上, 新鲜 Shahdara 种子在黑暗中 25℃仍没有发芽现象, 但在 6℃时却有始终如一的高发芽率 (图 1a)。相应的, 后熟的 Shahdara 种子在 25℃显示更高水平的发芽, 而且随着后熟期而增加。冷处理可以调节 Shahdara 的脱落酸和赤霉素之间的平衡, 因而使没有光刺激下发芽成为可能, 这也暗示对光的要求的改变。此外, 使用赤霉素能刺激 Bay-0 和 Shahdara 在黑暗中发芽, 赤霉素是一个影响种子黑暗中发芽的因素。

为了确定一些拟南芥在低温黑暗中发芽能力的基因特性, 本研究分析了 Bay-0 和 Shadara 杂交产生的重组近交系 (RIL) 群体。这些数据显示了在低温黑暗中种子发芽能力有显著差异: Bay-0 无法发芽, 而 Shadara 具有 28% ~ 100% 的发芽率。这很清楚地从遗传学上解释了 6 个 QTL CDG-1 ~ 6 图谱中大多数呈负等位基因的影响; 相对于 Bay-0 等位基因, Shadara 等位基因提高了发芽能力, 这导致了复杂的遗传背景, 在父母本之间可能出现一个简单性状变异。本试验构建的遗传连锁图谱标记数量偏少, 但因本试验在法国进行, 群体未带回, 无法加密。如果使用大量的重组近交系群体, 额外的也可能被发现。

RIL 种子的发芽与不发芽表明了明显的多样性, 正如所表现出来的 L 形频率分布情况。在性状变异范围较低时发现的大量个体显示了主要 QTL 之间的上位性作用; 不过, 通过从 WebQTL 程序配对扫描功能的重组近交系分析并未发现有任何显著的上位性作用。另一个对这种表型分配的解释是, 测量的发芽百分率多变性, 与个体数量性状基因的作用不成线性关系, 而且表现出阈值效应, 使该 0 ~ 10% 的表型实际上综合了不同的基因型个体。这也可能伴随着母本基因组的相互作用, 它们可参与性状相关的种子发

芽^[1]。该重组近交系产生于由 Bay-0 作为母本的植株杂交 因此都具有 Bay-0 的细胞质。这也可以解释

为何只有一小部分具有 3 个主效基因的 Shadara 等位基因的重组近交系接近该 Shadara 表型。

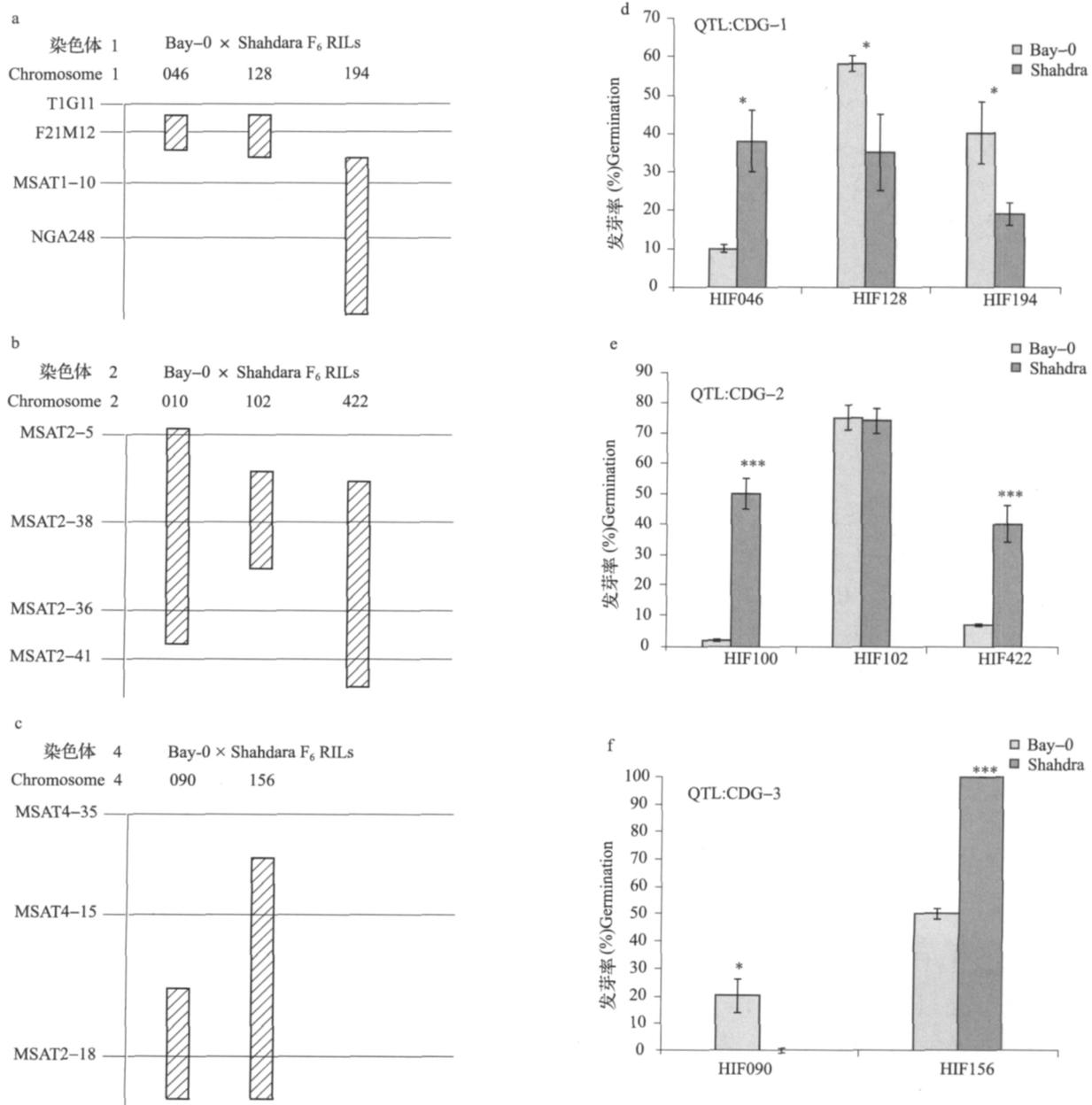


图5 通过比较来自异缘近亲系(HIF)的同缘基因近亲系(NIL)的发芽表型来验证主效QTL CDG-1、CDG-2和CDG-3

Fig. 5 Confirmation of the major QTLs CDG-1, CDG-2 and CDG-3 by comparison of the phenotypes of near-isogenic lines derived from heterogeneous inbred families

(a-c) 分别是来自 Bay-0 和 Shadara 杂交的 F₆ 重组近交系中 QTL 区域内 CDG-1、CDG-2 和 CDG-3 的杂合体。黑线代表带有引物分子标记的染色体, 间隔距离在右边。分子标记和鉴定见 MSAT 数据库(网址: www.inra.fr/vast/)。重组近交系(RILs)编号下面, 阴影线部分代表的仍是杂合体。重组断点界限杂合区域在分子标记间隔中间是随意划的。(d-f) 对应(a-c)的异缘近亲系(HIF)在 6°C 低温黑暗中的发芽率, HIF 已固定为 Bay-0 或 Shadara 的等位基因。误差线代表 SE 值(n=3)。显著性差异* 代表 5% 水平、*** 代表 0.1% 水平

(a-c) F₆ recombinant inbred lines(RILs) from the Bay-0 × Shadara cross which show residual heterozygosity in the region of the QTL for CDG-1, CDG2 and CDG3 respectively. Black lines represent chromosomes with markers and intervals indicated to the right. Marker positions and identity can be found at www.inra.fr/vast/ in the MSAT database. Numbers designate the RIL, with the hatched bar beneath indicating the region which is still heterozygous. Recombination breakpoints delimiting heterozygous regions are arbitrarily depicted in the middle of the marker interval. (d-f) Comparison of germination at 6°C in the dark for HIFs which segregated in the region shown in (a) to (c) and had been fixed for the Bay-0 or the Shadara allele. Error bars represent standard errors(n=3). Single and triple asterisks indicate significance in t-tests at the levels of 5% or 0.1%

本研究观察到, Shadara 在黑暗中发芽需要冷处理或后熟, 以及 Bay-0 在低温和黑暗中处于休眠, 光照对发芽是必需的。因此, 鉴定 CDG 基因位点涉及到休眠机制和对应前面在分析休眠和发芽中确定的 QTL。控制黑暗中发芽的 1 个 QTL 已经在较早前被确定在拟南芥的 2 号染色体上, 这是在规模较小的且在光照中发芽的 QTL 定位^[19]。这个 QTL 位于 39 和 59cM 之间, 因此, 不可能与 CDG-2 相对应。尽管如此, CDG-1 也被定位在与拟南芥延迟发芽位点 DOG-2 和 DOG-3 相同的基因组区域^[20], 以及控制发芽速度的 QTL 基因组区域^[21]。以前从来没有将影响发芽特性的基因位点分派到相应的 CDG-2 或 CDG-3 区域。此外, 低温发芽在以前是水稻和番茄的 QTL 研究主题^[2, 22]。5 个 QTL 中 3 个已经被分别确定。本研究对拟南芥和这些物种在低温发芽中是否存在共同机制的研究很有意义。

本研究对来自 12 个不同地理位置的超过 300 份的拟南芥材料进行分析, 已明确其中的 14 份材料在 6°C 低温和黑暗中的发芽率超过 20%, 其中生态型 Bay-0 无法发芽, 而 Shadara 具有较高的发芽率。这种自然变异被用来识别低温和黑暗中影响发芽的基因遗传位点。通过 QTL 方法, 利用 Bay-0 和 Shadara 杂交产生的重组近交系(RIL) 后代, 已经完成了 QTL 分析, 鉴定了 6 个不同的 QTL, 其中 3 个被确定为主效 QTL, 分别是 CDG-1、CDG-2 和 CDG-3, 它们可解释这种自然变异的 61%。本研究鉴定了这些 QTL 对低温发芽的重要性, 从遗传学和生理学上验证了这些基因的功能, 潜在的候选 QTL 和精细定位及这些基因的克隆正在进行中。

致谢: 本文作者衷心感谢国家留学委提供资助到法国从事此项研究; 感谢法国农科院凡尔赛中心种子生物学实验室所有的法国同事的合作研究和技术指导; 感谢法国凡尔赛生物资源中心提供拟南芥种子。

参考文献

- [1] Boyd E W, Dorn L A, Weing C, et al. Maternal effects and germination timing mediate the expression of winter and spring annual life histories in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Int J Plant Sci* 2007, 168: 205-214
- [2] Nomura K, Endo I, Tateishi A, et al. A chilling-insensitive stage in germination of a low-temperature-adapted radish 'rat's tail radish' (*Raphanus sativus* L.) c. v. "Pakki-hood" [J]. *Sci Hort*, 2001 90: 209-218
- [3] Donohue K, Heschel M S, Chiang G C K, et al. Phytochrome mediates germination responses to multiple seasonal cues [J]. *Plant Cell Env* 2007 30: 202-212
- [4] Shinomura T. Phytochrome regulation of seed germination [J]. *J*

- Plant Res* 1997 110: 151-161
- [5] Hennig L, Stoddart W M, Dieterle M, et al. Phytochrome E controls light-induced germination of *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2002 128: 194-200
- [6] Kucera B, Cohn M A, Leubner-Metzger G. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination [J]. *Seed Sci Res* 2005 15: 281-307
- [7] Yamauchi Y, Takeda-Kamiya N, Hanada A, et al. Contribution of gibberellin deactivation by AtGA2ox2 to the suppression of germination of dark-imbibed *Arabidopsis thaliana* seeds [J]. *Plant Cell Physiol* 2007 48: 555-561
- [8] Yamaguchi S, Ogawa M, Kuwahara A, et al. Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds [J]. *Plant Cell*, 2004 16: 367-378
- [9] Maruyama K, Sakuma Y, Kasuga M, et al. Identification of cold-inducible down-stream genes of the *Arabidopsis* DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems [J]. *Plant J*, 2004 38: 982-993
- [10] Gilmour S J, Zarka D G, Stockinger E J, et al. Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression [J]. *Plant J* 1998 16: 433-442
- [11] Fowler S G, Cook D, Thomashow M F. Low temperature induction of *Arabidopsis* CBF1, 2, and 3 is gated by the circadian clock [J]. *Plant Physiol* 2005 137: 961-968
- [12] Heschel M S, Selby J, Butler C, et al. A new role for phytochromes in temperature-dependent germination [J]. *New Phytol* 2007, 174: 735-741
- [13] Loudet O, Gaudon V, Trubuil A, et al. Quantitative trait loci controlling root growth and architecture in *Arabidopsis thaliana* confirmed by heterogeneous inbred family [J]. *Theor Appl Genet*, 2005 110: 742-753
- [14] Tuinstra M R, Ejeta G, Goldsbrough P B. Heterogeneous inbred family (HIF) analysis: a method for developing near-isogenic lines that differ at quantitative trait loci [J]. *Theor Appl Genet* 1997, 95: 1005-1011
- [15] Loudet O, Chaillou S, Camilleri C, et al. Bay-0 x Shadara recombinant inbred line population: a powerful tool for the genetic dissection of complex traits in *Arabidopsis*. [J] *Theor Appl Genet*, 2002 104: 1173-1184
- [16] Basten C J, Weir B S, Zeng ZB. QTL CARTOGRAM-PHER [M]. version 1.14. Department of Statistics, North Carolina State University Raleigh, NC 2000
- [17] Schmuths H, Bachmann K, Weber W E, et al. Effects of preconditioning and temperature during germination of 73 natural accessions of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Ann Bot* 2006 97: 623-634
- [18] Cone J W, Spruit C J P. Imbibition conditions and seed dormancy of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Physiol Plant* 1983 59: 416-420
- [19] Van Der Schaar W, Alonso-Blanco C, Leon-Kloosterziel K M, et al. QTL analysis of seed dormancy in *Arabidopsis* using recombinant inbred lines and MQM mapping [J]. *Heredity*, 1997 79: 190-200
- [20] Alonso-Blanco C, Bentsink L, Hanhart C, et al. Analysis of natural allelic variation at seed dormancy loci of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Genetics* 2003 164: 711-729
- [21] Clercx E J M, El-Lithy M E, Vierling E, et al. Analysis of natural allelic variation of *Arabidopsis* seed germination and seed longevity traits between the accessions *Landsberg erecta* and *Shadara*, using a new recombinant inbred line population [J]. *Plant Physiol* 2004 135: 432-443
- [22] Foolad M R, Chen F Q, Lin G Y. RFLP mapping of QTLs conferring cold tolerance during seed germination in an interspecific cross of tomato [J]. *Mol Breed* 1998 4: 519-529