

水稻苗期耐低温基因 *COLD1* 新功能标记的设计与验证

田孟祥¹ 官彦龙² 张时龙¹ 何友勋¹ 雷月²
余本勋¹ 余莉¹ 李佳丽² 张大双² 叶永印¹

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

摘 要 籼稻和粳稻在苗期耐低温基因 *COLD1* 的第 4 外显子存在 1 个功能性单碱基变异 SNP2, 粳型 *COLD1*^{Jap} 等位基因低温耐受性表现更强, 具有重要的育种利用价值。通过粳籼杂交, 可将粳型 *COLD1*^{Jap} 等位基因导入籼稻品种, 提高其低温耐受力。为提高 *COLD1* 基因的选择效率, 根据粳型 *COLD1*^{Jap} 与籼型 *COLD1*^{Ind} 基因存在的单核苷酸差异, 结合扩增受阻突变体系 PCR 的技术原理设计功能标记。应用 5 个籼稻品种、5 个粳稻品种、1 个粳籼杂交 F₁ 个体以及 1 个粳籼杂交 F₂ 群体对功能标记进行检测验证。结果表明, 所设计的功能标记可准确区分纯合粳型 *COLD1*^{Jap}、纯合籼型 *COLD1*^{Ind} 和杂合基因型, 其扩增带型与基因型完全一致, 是一种鉴定 *COLD1* 基因的有效方法。该标记弥补了前人设计的衍生型酶切扩增多态性序列功能标记费用昂贵、操作复杂及费工费时等不足, 可广泛应用于水稻 *COLD1* 基因的资源鉴定和分子标记辅助选择育种。

关键词 水稻; 耐低温; *COLD1* 基因; 功能标记

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



水稻是我国最主要的粮食作物之一。依据植物学分类, 我国种植的水稻品种属于亚洲栽培稻 (*Oryza sativa* L.), 包括粳稻 (*O. sativa* L. ssp. *japonica*) 和籼稻 (*O. sativa* L. ssp. *indica*) 2 个亚种^[1], 它们在形态、发育与生理等方面都表现出较大的差异。粳稻产量往往不及籼稻, 但大都比籼稻具有更强的低温耐受性。尽管全球气候总体变暖, 但近年来极端气候频繁, 如在我国南方籼稻种植地区倒春寒和寒露风等低温灾害常有发生, 导致水稻产量损失严重。将粳稻耐低温基因导入籼稻, 是改良籼稻抗寒性的有效途径。

借助现代分子生物学技术, 人们对于粳稻具有的低温耐受性有了一定的认识, 但耐低温胁迫是一个复杂性状, 其遗传机理研究进展相对缓慢。据统计, 在水稻 12 条染色体上, 超过 250 个耐低温 QTL 被定位^[2-10], 然而, 大都停留在初定位阶段, 精细定位和克隆的基因较少。目前已完成精细定位的 QTL 约 12 个, 涉及萌发期耐低温的 1 个 (*qLTG-9*)、苗期耐低温的 5 个 (*qCTS4*、*qCtss11*、*qSCT1*、

qSCT11、*qLOP2/qPSR2-1*)、孕穗期耐低温的 5 个 (*qCTB8*、*qCTB7*、*qCT-3-2*、*qLTB3*、*qCTB10-2*)、苗期和成熟期耐低温的 1 个 (*qRC10-2*)^[11]。克隆并进行功能研究的耐低温基因仅有 9 个, 包括 *Ctb1*^[12]、*GSTZ2*^[13]、*qLTG3-1*^[14]、*LTG1*^[15]、*COLD1*^[16]、*qCTS-9*^[17]、*CTB4a*^[18]、*bZIP73*^[19] 和 *HANT*^[20] 等。其中, *COLD1* 基因编码一个 G 蛋白信号调节因子, 其与 G 蛋白 α 亚基 RGA1 互作以感知低温, 激活 Ca²⁺ 通道, 以增强 G 蛋白的鸟苷三磷酸酶 (guanosine triphosphatase, GTP) 活性, 从而提高水稻的耐寒性能。粳型 *COLD1*^{Jap} 较籼型 *COLD1*^{Ind} 具有更强的低温耐受性, 有重要的育种利用价值^[16]。将粳型 *COLD1*^{Jap} 基因导入籼稻品种, 可以提高籼稻的耐寒性。基于粳型 *COLD1*^{Jap} 与籼型 *COLD1*^{Ind} 存在的 SNP2 位点 DNA 序列差异, 杨佳等^[21] 开发了用于鉴定该基因的衍生型酶切扩增多态性序列 (derived cleaved amplified polymorphic sequence, dCAPS) 的功能标记。然而, dCAPS 功能标记需使用限制性内切酶, 且扩增片段较小, 需采用聚丙烯酰胺凝胶电泳

作者简介: 田孟祥, 主要从事水稻遗传育种研究, E-mail: tmengxiang@126.com

张时龙为通信作者, 主要从事作物育种及栽培研究, E-mail: bjrice@163.com

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFD0100402); 贵州省科技成果应用及产业化计划项目 (黔科合成果 [2018]4306); 毕节市科技支撑计划项目 (毕科合字 [2016]20 号)

收稿日期: 2019-07-28; 修回日期: 2019-12-18; 网络出版日期: 2020-01-17

才能取得较好的基因型鉴定效果，这使得在实际应用中存在费用昂贵、操作繁琐及费时费工等缺点。本研究根据扩增受阻突变体系 PCR 技术原理^[22]，结合 *COLD1* 基因在籼、粳稻功能区存在的序列差异，设计检测该基因的新标记，旨在建立快捷、准确及价格低廉的基因分型法来鉴定 *COLD1* 基因的籼粳属性，为该基因的分子标记辅助育种及资源鉴定提供高效分子标记。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试籼稻品种：9311、特青、明恢 63、珍汕 97 和南京 6 号；粳稻品种：日本晴、越光、空育 131、稻花香 2 号和松粳 9 号；籼粳杂交 F_1 ：9311/越光。籼粳杂交 F_2 群体：南京 6 号/稻花香 2 号。

1.2 试验方法

1.2.1 功能标记的设计 水稻籼、粳亚种在 *COLD1* 基因第 4 外显子处存在 1 个功能单碱基差异 SNP2。在低温敏感的籼稻品种中，该碱基为 T 或 C，而在耐低温的粳稻品种中该碱基为 A。从 NCBI 中下载相应的 DNA 序列（登录号：AP014960 \ BAS90836，国家水稻数据中心：http://www.ricedata.cn/gene/list/2781.htm），结合扩增受阻突变体系 PCR 技术原理进行功能标记设计。功能标记由 5 条引物组成，即正反向外引物各 1 条，正向内引物 2 条，反向内引物 1 条。

1.2.2 DNA 的提取 取水稻的新鲜叶片约 0.4g，按照传统的 CTAB 方法进行 DNA 提取。

1.2.3 DNA 的 PCR 扩增及产物检测 仅检测 *COLD1* 基因的籼粳性，即耐低温性与不耐低温性。PCR 扩增体系为 20 μ L：DNA 2 μ L（10~100ng/L），引

物 Primer 混合液 2 μ L（正反向外引物各 2 μ mol/L，两正向内引物各 4 μ mol/L，反向内引物 8 μ mol/L），10 \times *Taq* Buffer 2 μ L， Mg^{2+} Buffer 1.2 μ L，dNTP Mixture 0.4 μ L（2.5mmol/L），*Taq* DNA 聚合酶 0.4 μ L（2.5U/ μ L），ddH₂O 12 μ L。

当检测到为籼型 *COLD1*^{Ind} 时，若需进一步鉴定其差异性位点碱基（T 或 C），则只需将上述引物混合液组分构成更改为 2 μ L（正反向外引物各 2 μ mol/L，任一正向内引物 4 μ mol/L，反向内引物 4 μ mol/L）。

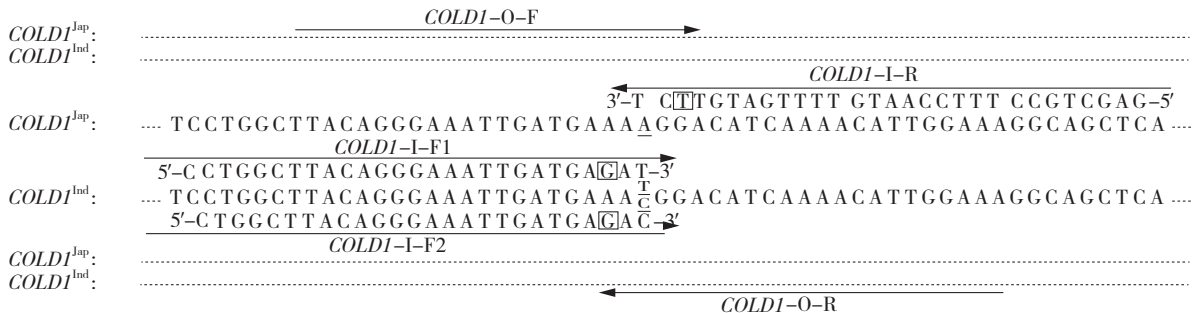
反应程序：94℃ 5min；94℃ 30s，60℃ 30s，72℃ 1min，循环 31 次；在 72℃ 延伸 10min，10℃ 1min，产物取出备用。

电泳检测：扩增产物在约 2% 的琼脂糖凝胶中进行电泳检测。

2 结果与分析

2.1 *COLD1* 基因功能标记的设计

根据基因在籼型 *COLD1*^{Ind} 为碱基 T 或 C，在粳型 *COLD1*^{Jap} 为碱基 A，结合扩增受阻突变体系 PCR 技术原理，设计内外向引物。外引物用斯坦福大学的在线引物设计软件进行设计，正反引物均位于保守区域编码区，正向外引物用 *COLD1*-O-F 表示，反向外引物用 *COLD1*-O-R 表示；内引物由人工设计，3' 端落在 SNP 差异位点上，检测粳型 *COLD1*^{Jap} 的反向内引物为 *COLD1*-I-R。由于籼型的 *COLD1*^{Ind} 在 SNP 位点是碱基 T 或 C，因此，检测籼型 *COLD1*^{Ind} 的正向内引物有 2 条，即 *COLD1*-I-F1 和 *COLD1*-I-F2；为增强特异性，在 3 条内引物的 3' 端的第 3 个碱基各引入 1 个错配碱基。上述引物设计策略见图 1。



序列中字母下划线表示单核苷酸差异位点 SNP2；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
The underlines indicate the functional polymorphism SNP2 in the *COLD1* gene; the ellipses indicate the same base; the arrows indicate the position and amplification direction of the corresponding primers; the letters in the box present the mismatched bases

图 1 *COLD1* 基因功能标记设计策略

Fig.1 Design strategies for the primers to detect *COLD1* gene

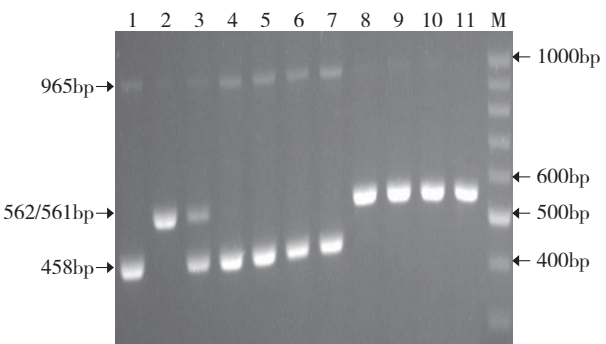
根据引物设计策略, 5 条引物在同一 PCR 反应体系里进行扩增。理论预计: 所有水稻品种均可由外引物 *COLD1*-O-F 和 *COLD1*-O-R 扩增出长度为 965bp 的片段, 并作为阳性对照; 含纯合粳型 *COLD1*^{Jap} 水稻品种可由正向外引物 *COLD1*-O-F 和反向内引物 *COLD1*-I-R 扩增出长度为 458bp 的片段; 含纯合籼型 *COLD1*^{Ind} 水稻品种能扩增出长度为 562bp (正向内引物 *COLD1*-I-F1 和反向外引物 *COLD1*-O-R) 或 561bp (正向内引物 *COLD1*-I-F2 和反向外引物 *COLD1*-O-R) 的片段; 而籼粳杂合子可扩增出 965、562 (或 561) 及 458bp 3 种类型的条带。引物序列如表 1 所示。

表 1 <i>COLD1</i> 基因功能标记的引物序列	
Table 1 The primer sequences of functional marker for <i>COLD1</i> gene	
引物 Primer	序列 (5' -3') Sequence (5' -3')
<i>COLD1</i> -O-F	CATTTCCTCCATGCCTTCTCC
<i>COLD1</i> -O-R	CAACTGTCCCAACGATACGC
<i>COLD1</i> -I-F1	CCTGGCTTACAGGAAATTGATGAGAT
<i>COLD1</i> -I-F2	CTGGCTTACAGGAAATTGATGAGAC
<i>COLD1</i> -I-R	GAGCTGCCTTTCCAATGTTTGTGATGTTCT

2.2 *COLD1* 基因功能标记验证

选用 Ma 等^[16]对 *COLD1* 基因已经测序的 9311、特青、明恢 63、珍汕 97、南京 6 号、日本晴、越光、空育 131、稻花香 2 号、松粳 9 号及 F₁ (9311/越光) 等 11 个材料对功能标记进行验证。将所设计的 5 个引物在同一 PCR 反应体系里对上述水稻材料进行扩增。电泳图谱 (图 2) 显示, 日本晴、越光、空育 131、稻花香 2 号和松粳 9 号粳稻品种扩增出了约 458bp 的片段, 特异性扩增 *COLD1* 基因编码区 SNP2 位点的核苷酸碱基 A, 为正向外引物 *COLD1*-O-F 和反向内引物 *COLD1*-I-R 扩增的产物; 9311、特青、明恢 63、珍汕 97 及南京 6 号 5 个籼稻品种扩增出了约 562bp 的片段, 特异性扩增 *COLD1* 基因编码区 SNP2 位点的核苷酸碱基 T, 为正向内引物 *COLD1*-I-F1 和反向外引物 *COLD1*-O-R 所扩增。籼粳 F₁ 扩增出了以上籼粳品种的所有特征性条带 (图 2)。供试材料均得到了有效扩增, 且所扩增条带的类型与测序的碱基差异相吻合。

COLD1-I-F2 引物的作用没有得到体现, 那是由于该引物针对检测 SNP2 位点的差异碱基 C, 而所检测的水稻材料不存在与之相应的差异碱基的缘故。上述结果表明所设计的功能标记可以对粳型



M: Ladder H1 (100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000bp), 下同; 1-11 分别为日本晴、9311、F₁ (9311/越光)、越光、空育 131、稻花香 2 号、松粳 9 号、特青、明恢 63、珍汕 97 和南京 6 号
M: Ladder H1 (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000bp), the same below; 1-11 are Nipponbare, 9311, F₁ (9311/Koshihikari), Koshihikari, Kongyu 131, Daohuaxiang 2, Songjing 9, Teqing, Minghui 63, Zhenshan 97, and Nanjing 6, respectively

图 2 *COLD1* 基因功能标记对水稻材料的检测
Fig.2 Detection of rice materials by functional marker of *COLD1* gene

COLD1^{Jap} 和籼型 *COLD1*^{Ind} 及其杂合子进行鉴定区分。理论上, 所有的供试材料还应出现由正向外引物 *COLD1*-O-F 和反向外引物 *COLD1*-O-R 扩增的大小为 965bp 的条带, 然而, 从图 2 不难看出, 有的材料仅出现了微弱的长度为 965bp 的条带, 有些材料甚至没有显示该条带, 很可能是由于在多引物扩增的反应体系中, 存在明显的竞争效应, 小片段扩增所需条件相对较低, 获得扩增优势, 扩增效率高, 而与之相反, 大片段处于扩增劣势, 扩增效率低, 产物量少, 条带不明显。值得指出的是, 965bp 条带为所有材料共有条带, 不属于特征条带, 其是否出现, 并不影响对 *COLD1* 基因籼粳属性的鉴定。

2.3 *COLD1* 基因功能标记对南京 6 号/稻花香 2 号 F₂ 个体的基因型鉴定

利用 *COLD1* 基因的引物功能标记对 F₂ (南京 6 号/稻花香 2 号) 群体进行 SNP2 位点基因型检测。从 F₂ 代群体中随机选择 112 株水稻植株, 用 *COLD1* 基因功能标记进行鉴定。检测结果表明, 在该 F₂ 群体被检测材料中, 33 株出现 *COLD1*^{Ind} 基因型特征条带 (562bp), 25 株出现 *COLD1*^{Jap} 基因型特征条带 (458bp), 54 株出现杂合型特征条带 (458bp 和 562bp), 部分植株电泳图谱见图 3。在 F₂ 群体中, 籼型 *COLD1*^{Ind}、杂合型 *COLD1*^{Ind}/*COLD1*^{Jap}、粳型 *COLD1*^{Jap} 3 种基因型的分离比例符合 1:2:1 ($\chi^2=1.286$), 进一步证实了本研究中所设计的 *COLD1* 基因新功能标记能准确鉴定该基因 3 种不

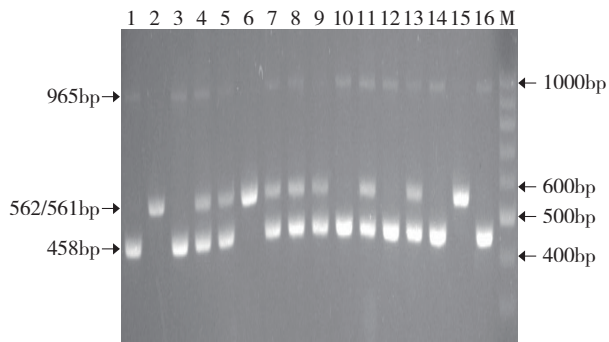


图3 使用功能标记对南京6号/稻花香2号
F₂群体16个植株的检测

Fig.3 Identification of the genotypes of SNP2 site at *COLD1* in 16 F₂ individuals from the cross Nanjing 6/ Daohuaxiang 2 using functional marker

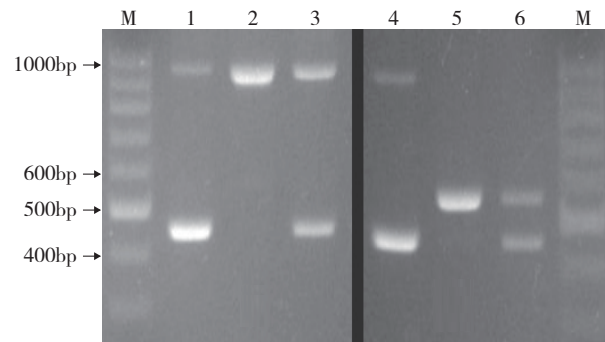
同的类型，可用于鉴定相关的资源和标记辅助选择育种。

2.4 籼型 *COLD1*^{Ind} 基因 SNP2 位点突变碱基的鉴定

研究证实，*COLD1* 基因的第4外显子区域 SNP2 的突变位点在粳型 *COLD1*^{Jap} 中为碱基 A，而在籼型 *COLD1*^{Ind} 中为碱基 T 或 C，导致了籼粳材料对低温耐受性的差异。本研究根据这些碱基的差异，设计了5个引物组成的功能标记对目的基因进行鉴定。在5条引物中，其中3条内引物是针对3种不同差异碱基而设计的，*COLD1*-I-R 是鉴定粳型 *COLD1*^{Jap} 碱基 A 的特异性内引物；而 *COLD1*-I-F1 和 *COLD1*-I-F2 分别是鉴定籼型 *COLD1*^{Ind} 中碱基 T 和 C 的特异性引物。一般只需将5条引物混合在同一 PCR 反应体系中扩增来对 *COLD1* 基因的籼、粳型进行鉴定，无论籼型 *COLD1*^{Ind} 中的 SNP2 是碱基 T 或 C，在约 560bp (562bp 或 561bp) 处均有条带产生，能很好地与特征带为 458bp 的粳型 *COLD1*^{Jap} 区分。

在5种引物混合鉴定确定是籼型 *COLD1*^{Ind} 后，若要具体鉴定差异碱基是 T 或 C，则将鉴定该位点的特征内引物 *COLD1*-I-F1 或 *COLD1*-I-F2 分别与另外3条引物组成4条引物在同一 PCR 反应体系扩增即可 (图4)。从图4中可看出，在 *COLD1*-I-F1 参与的4条引物中，籼型 *COLD1*^{Ind} 中 SNP2 位点为碱基 T 的 9311 扩增出了 562bp 的特征条带，与预测扩增片段大小一致 (图4泳道5)；而 *COLD1*-I-F2 参与的4条引物中，由于 9311 中 SNP2 位点不是碱基 C，因而没有扩增出 561bp 的特征条带 (图4泳道2)，这说明 *COLD1*-I-F1 和 *COLD1*-I-F2 这两个内引物能独立且准确地鉴定籼型 *COLD1*^{Ind}

中 SNP2 位点具体碱基类型 T 或 C (即在有引物 *COLD1*-I-F1 参与的反应体系中，SNP2 位点碱基类型为 T，可扩增出 562bp 的条带，而碱基类型是 C 的无此条带；同理，在 *COLD1*-I-F2 参与的反应体系中，SNP2 位点碱基类型为 C，可扩增出 561bp 的条带，而碱基类型是 T 的无此条带)。此外，从图4泳道编号为2中还能看出，由于内引物没有得到有效扩增，竞争效应消除，两条外引物组成的大片段 (965bp) 能进行较好的扩增，验证了上文提及的竞争效应，即小片段优先获得扩增优势的猜测。



1和4为越光；2和5为9311；3和6为F₁ (9311/越光)

1和4: Koshihikari; 2 and 5: 9311; 3 and 6: F₁ (9311/Koshihikari)

图4 使用4条引物对籼型 *COLD1*^{Ind} 基因差异碱基的鉴定
Fig.4 Identification of differential bases of *COLD1*^{Ind} gene in *Indica* rice by four primers

以上试验结果表明，本研究所开发的新功能标记不需限制性内切酶，不仅能简便快速地对 *COLD1* 的籼粳属性进行鉴定，还弥补了不能对籼型 *COLD1*^{Ind} 的 SNP2 位点具体碱基类型鉴定^[21] 的不足。

3 讨论

近年来，水稻受到低温冷害导致严重减产的事件常有发生，特别是籼稻对低温更为敏感。鉴于此，人们加大了对低温冷害的关注，如在贵州，耐低温性鉴定成为该省籼稻品种审定的一个重要环节，所有参加区试的籼稻新品系 (组合) 均需在几个海拔较高的冷凉粳稻区进行耐低温性鉴定。随着分子生物学的不断发展，凭借分子技术手段，对耐低温基因的研究取得了较大的进展，特别是近几年，通过籼粳的低温耐受性对比研究，一些重要的耐低温基因被挖掘，为育种利用提供前提和基础条件。

已有的研究^[16]表明，*COLD1* 是一个优秀的耐冷性基因，粳型基因 *COLD1*^{Jap} 具有较好的耐冷性能，可将 *COLD1*^{Jap} 导入籼稻，提高籼稻耐冷性。功能标记是属于共分离的分子标记，依据基因本身的

DNA 序列差异而设计, 因此, 能准确鉴定出目标等位基因, 高效率地对目标基因进行鉴定筛选, 是分子标记中最为理想的标记类型。杨佳等^[21]依据 *COLD1* 基因在籼粳间存在单核苷酸差异特性, 开发了基于酶切的功能分子标记, 能对 *COLD1* 基因的籼粳类型进行准确鉴定。然而, 在实践应用中, 该标记还存在一些不足, 一是涉及内切酶的应用费用较高; 二是扩增片段较小, 不适合操作简便的琼脂糖凝胶电泳检测, 而聚丙烯酰胺凝胶操作复杂; 三是不能对籼型 *COLD1* 基因的具体突变碱基类型进行鉴定等。鉴于 *COLD1* 基因在育种中具有重要的应用价值, 有必要开发操作简便高效且费用低廉的替代标记, 更好地促进该基因在育种中的推广应用。本研究基于扩增受阻突变体系 PCR 技术原理, 结合 *COLD1* 基因在籼粳的第 4 条染色体第 4 外显子 SNP2 存在的碱基差异, 粳型 *COLD1*^{Jap} 为 A, 而籼型 *COLD1*^{Ind} 为 T 或 C, 设计了针对 3 个不同碱基差异的特异性内引物, 其中, *COLD1*-I-R 为粳型 *COLD1*^{Jap} 特异性内引物, 其与正向外引物 *COLD1*-O-F 引物组成标记, 扩增 458bp 大小的特征条带; *COLD1*-I-F1、*COLD1*-I-F2 分别为籼型碱基 T 和 C 的特异性内引物, 与反向外引物 *COLD1*-O-R 组成标记, 扩增出 562bp 或 561bp 的特征条带; 而籼粳杂合子 F₁ 扩增出 458bp 和 562bp (或 561bp) 的特征条带。所设计引物均选择在基因的外显子区域, 保证了引物的适用性和可靠性。经检测验证, 以上 5 条引物在同一体系中进行 PCR 扩增, 能准确区分粳型 *COLD1*^{Jap}、籼型 *COLD1*^{Ind} 及其杂合类型。与先前报道的衍生型酶切扩增多态性序列的功能标记相比, 该方法省去了内切酶的使用, 降低了成本, 也省去了酶切时间, 避免了使用聚丙烯酰胺凝胶电泳操作复杂等问题, 提高了检测效率。同时, 利用其中的 4 条引物进行检测, 还弥补了先前不能鉴定籼型 *COLD1*^{Ind} 具体变异碱基的不足, 是一种简便、高效、快捷的 *COLD1* 基因鉴定方法, 可用于水稻种质资源 *COLD1* 基因籼粳属性的鉴定和分子辅助选择育种, 有较好的推广应用价值。

4 结论

根据水稻苗期耐低温基因 *COLD1* 在籼粳中的第 4 外显子存在的 SNP2 差异, 结合扩增受阻突变体系 PCR 技术原理, 设计了用于鉴定该基因的新

功能标记。研究结果表明, 利用 2 条正反向外引物和 3 条正反向内引物组成的 5 条引物混合在同一反应体系里进行 PCR 扩增, 可准确快速地区分纯合粳型 *COLD1*^{Jap}、纯合籼型 *COLD1*^{Ind} 及其杂合基因型。进一步, 针对籼型 *COLD1*^{Ind} 在 SNP2 处的两种不同碱基类型, 可用 2 条正反向外引物和各 1 条正反向内引物组成的 4 引物混合在同一反应体系里进行 PCR 扩增鉴定。本研究所设计的新功能标记检测方法操作简便, 费用低廉, 弥补了先前报道的衍生型酶切扩增多态性序列功能标记存在的费用昂贵、操作复杂及难以对籼型 *COLD1*^{Ind} 具体差异碱基类型鉴别等的不足, 可广泛应用于水稻 *COLD1* 基因的资源鉴定和分子标记辅助选择育种。

参考文献

- [1]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. 作物杂志, 2015(6): 48-53.
- [2]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. Chinese Science Bulletin, 2003, 48(19): 2068-2071.
- [3]Andaya V C, Mackill D J. QTLs conferring cold tolerance at the booting stage of rice using recombinant inbred lines from a japonica × indica cross. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 106(6): 1084-1090.
- [4]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. Plant Science, 2008, 174(3): 340-347.
- [5]Kuroki M, Saito K, Matsuba S, et al. Quantitative trait locus analysis for cold tolerance at the booting stage in a rice cultivar, hatsushizuku. Japan Agricultural Research Quarterly, 2009, 43(2): 115-121.
- [6]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. Crop and Pasture Science, 2018, 69(3): 278-283.
- [7]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.. Theoretical and Applied Genetics, 2012, 124(5): 937-946.
- [8]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). 3 Biotech, 2017, 7(6): 359.
- [9]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. 华北农学报, 2019, 34(1): 83-88.
- [10]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. 植物学报, 2015, 50(3): 338-345.
- [11]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. 遗传, 2018, 40(3): 171-185.
- [12]Saito K, Hayano-Saito Y, Kuroki M, et al. Map-based cloning of the rice cold tolerance gene *Ctb1*. Plant Science, 2010, 179(1/2): 97-102.
- [13]Kim S I, Andaya V C, Tai T H. Cold sensitivity in rice (*Oryza sativa* L) is strongly correlated with a naturally occurring I99V mutation in the multifunctional glutathione transferase isozyme GSTZ2. Biochemical

- Journal, 2011, 435(2): 373–380.
- [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. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(34): 12623–12628.
- [15] Lu G W, Wu F Q, Wu W X, et al. Rice *LTG1* is involved in adaptive growth and fitness under low ambient temperature. The Plant Journal, 2014, 78(3): 468–480.
- [16] Ma Y, Dai X Y, Xu Y Y, et al. *COLD1* confers chilling tolerance in rice. Cell, 2015, 160(6): 1209–1221.
- [17] Zhao J, Zhang S, Dong J, et al. A novel functional gene associated with cold tolerance at the seedling stage in rice. Plant Biotechnology Journal, 2017, 15(9): 1141–1148.
- [18] Zhang Z Y, Li J J, Pan Y H, et al. Natural variation in *CTB4a* enhances rice adaptation to cold habitats. Nature Communications, 2017, 8: 14788.
- [19] Liu C T, Ou S J, Mao B G, et al. Early selection of *bZIP73* facilitated adaptation of japonica rice to cold climates. Nature Communications, 2018, 9(1): 3302.
- [20] Mao D H, Xin Y Y, Tan Y J, et al. Natural variation in the HAN1 gene confers chilling tolerance in rice and allowed adaptation to a temperate climate. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019, 116(9): 3494–3501.
- [21] 杨佳, 曹黎明, 周继华, 等. 水稻耐低温基因 *COLD1* 功能标记的开发及应用. 分子植物育种, 2019, 17(18): 6028–6032.
- [22] 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. 分子植物育种, 2016, 14(2): 410–416.

Design and Verification of New Functional Marker of Chilling-Tolerance *COLD1* Gene in Rice Seedling Stage

Tian Mengxiang¹, Gong Yanlong², Zhang Shilong¹, He Youxun¹, Lei Yue²,
Yu Benxun¹, Yu Li¹, Li Jiali², Zhang Dashuang², Ye Yongyin¹

(¹Bijie Institute of Agricultural Sciences, Bijie 551714, Guizhou, China;

²Guizhou Rice Research Institute, Guiyang 550006, Guizhou, China)

Abstract The nucleotide variation of SNP2 in the fourth exon of *COLD1* gene associated with the difference of chilling tolerance at the seedling stage between indica and japonica rice. Individuals with japonica *COLD1*^{Jap} allele have higher chilling tolerance. Therefore, the *COLD1*^{Jap} allele of japonica rice could be introduced via hybridization, thereby enhancing the cold tolerance of indica rice. In order to improve the selection efficiency of *COLD1* gene, a new functional marker for detecting the single nucleotide polymorphism SNP2 between *COLD1*^{Jap} and *COLD1*^{Ind} was designed based on the technical principles of amplification refractory mutation system PCR. Furthermore, the availability of the functional marker was evaluated using five indica varieties, five japonica varieties, one F₁ individual and one F₂ from the indica × japonica cross. The results showed that the designed functional markers could accurately identify homozygous *COLD1*^{Jap}, homozygous *COLD1*^{Ind} and heterozygous genotypes, and amplified bands were identical to their corresponding genotypes, suggesting that it was an effective method for identifying *COLD1* gene using this marker designed in this study. The method is simple and inexpensive and could overcome the shortcoming of the *COLD1* gene functional markers previously designed based on derived cleaved amplified polymorphic sequence. In conclusion, the new functional marker could be widely used in genetic resource identification and molecular marker-assisted selection breeding of rice *COLD1* gene.

Key words Rice; Chilling-tolerance; *COLD1* gene; Functional marker