



水稻籽粒镉积累QTL定位及候选基因分析

潘晨阳¹, 叶涵斐¹, 周维永³, 王盛¹, 李梦佳¹, 路梅¹, 李三峰², 朱旭东²
王跃星², 饶玉春^{1*}, 戴高兴^{3*}

¹浙江师范大学化学与生命科学学院, 金华 321004; ²中国水稻研究所水稻生物学国家重点实验室, 杭州 310006

³广西农业科学院, 南宁 530007

摘要 水稻(*Oryza sativa*)是全世界重要的经济作物之一, 稻田镉(Cd)污染和镉积累问题严重威胁世界水稻的产量和品质以及人类健康, 如何降低水稻中镉积累已成为热点问题。以籼稻品种华占(HZ)为父本、粳稻品种热研2号(Nekken2)为母本, 连续自交多代后得到120个重组自交系群体, 对其镉积累进行检测和分析, 同时利用遗传图谱进行QTL作图。结果共检测到7个QTLs, 分别位于水稻第2、3、9和12号染色体上, 其中1个LOD值高达4.97。对这些QTL区间内与耐金属离子胁迫相关的候选基因进行定量分析, 发现LOC_Os02g50240、LOC_Os02g52780、LOC_Os09g31200、LOC_Os09g35030和LOC_Os09g37949这5个基因在双亲间的表达量差异显著, 结合亲本对不同金属离子的浓度积累数据, 推测LOC_Os02g50240、LOC_Os09g31200及LOC_Os09g35030的高表达可能极大地提高了水稻对镉离子的吸收和胁迫耐受能力。通过QTL挖掘和分析, 发现这些基因与水稻籽粒的镉积累有关, 可能影响水稻耐镉胁迫的能力。研究结果为进一步筛选和培育耐镉胁迫的水稻品种创造了条件, 为阐明水稻镉积累的分子调控机制奠定了基础。

关键词 水稻, 镉积累, QTL定位, 候选基因, 离子胁迫, 遗传图谱

潘晨阳, 叶涵斐, 周维永, 王盛, 李梦佳, 路梅, 李三峰, 朱旭东, 王跃星, 饶玉春, 戴高兴 (2021). 水稻籽粒镉积累QTL定位及候选基因分析. 植物学报 56, 25–32.

镉(Cd)在土壤中移动性高, 毒性极强, 是最具危害的重金属元素之一, 极易被植物吸收并运输储存至不同部位, 通过食物链进入生物体并在体内累积, 引起人畜慢性中毒, 给动物及人类的生存带来巨大威胁(Florijn and van Beusichem, 1993)。当人摄入过量Cd时会引起肾小管功能障碍、骨质疏松、骨痛(itai-itai)等疾病(Horiguchi et al., 1994; Arisawa et al., 2007), 甚至可能增加癌症的发病率(Satarug et al., 2010)。20世纪以来, 随着工业的快速发展, 过度施肥和污染物排放等问题不断恶化, 稻田Cd污染程度日益加剧(Yu et al., 2006; Shi et al., 2011)。随着土壤pH值的下降, 水稻(*Oryza sativa*) Cd污染问题愈加重(Mao et al., 2019), 世界许多地区均出现水稻Cd含量严重超标的情况。稻田Cd污染的治理包括人为

Cd排放量的控制和水稻中Cd积累的抑制两方面。鉴于我国人多地少, 在中、轻度污染土壤上进行低Cd积累作物的种植, 符合经济与生态双重效益, 边生产边修复的新理念成为共识(黄新元和赵方杰, 2018)。要实现这一目标, 需挖掘作物阻控Cd相关基因, 深入剖析水稻Cd元素累积的遗传机制, 以阻滞Cd通过食物链富集。

近年来, 调控水稻中Cd转运和积累的基因逐渐被发现。Nakanishi等(2006)通过研究铁的吸收和转运, 发现铁转运子(OsIRT1和OsIRT2)和锌转运子(OsZIP1)参与水稻体内Cd的转运。随后, Takahashi等(2007)又发现了水稻金属转运子(OsNRAMP1和OsNRAMP5)也参与水稻体内Cd的转运。Ueno等(2009b)利用146个种质挖掘Cd积累相关QTL, 在7号

收稿日期: 2020-08-26; 接受日期: 2020-11-11

基金项目: 国家自然科学基金(No.31971921)、浙江省自然科学基金杰出青年基金(No.LR20C130001)、浙江省万人计划青年拔尖人才(No.ZJWR0108023)和国家级大学生创新创业训练计划(No.202010345067, No.202010345051)

* 通讯作者。E-mail: ryc@zjnu.cn; 2526620@qq.com

染色体上鉴定了1个新的Cd主效积累QTL。Ueno等(2009a)在11号染色体的RM663标记附近发现了1个LOD值高达8.25的Cd积累重要位点。Fujimaki等(2010)利用正电子发射示踪剂成像系统清晰观察到水稻中Cd转运和积累过程,发现其主要受P1b型ATP酶调控,包含水稻根共生体的吸收、木质部与韧皮部的运输及籽粒的转运与积累全过程。Ishikawa等(2010)将低Cd积累品种Sasanishiki和高积累品种Habataki杂交组成85个回交自交系群体,在2号染色体上发现了2个增加籽粒Cd浓度的QTLs,在7号染色体的短臂上检测到1个主效QTL *qGCd7*。Zhang等(2011)利用日本粳稻AJX17与印度籼稻ZYQ8的双单倍体群体,初定位了2个分别位于3号和6号染色体上与籽粒镉/锌比值相关的QTLs。Miyadate等(2011)利用定位克隆技术,发现*OsHMA3*基因可调控二价金属转运蛋白,能够利用液泡区域化作用限制Cd在根茎间运输,进而对芽中Cd积累量发挥调控作用。Uraguchi等(2011)发现*OsLCT1*基因可调控韧皮部Cd转运蛋白,很大程度地影响Cd在韧皮部的运输和谷粒中的积累。Satoh-Nagasawa等(2012)检测到*OsHMA3*基因的同源基因*OsHMA2*在Cd的木质部运输环节中起重要作用,且*OsHMA2*调控水稻根芽转运相关重要蛋白,过表达*OsHMA2*以及*OsSUT1*启动子的水稻Cd浓度降低50%。Abe等(2013)发现QTL *qIGCd3*可稳定降低水稻谷粒中Cd含量。Wang等(2015)通过对比谷粒中高Cd积累和低Cd积累水稻的耐受性,确定了*OsPCR1*表达水平与根系Cd转运呈正相关。Hu等(2018)在5个不同的盆栽和田间试验DH群体中发现了18个糙米和14个精米QTLs,分别定位于2、3、4、5、7、9和11号染色体上,其中包括3对重要基因座,即*qCCBR2-2*和*qCCMR2-2*、*qCCBR4-2*和*qCCMR4-1*以及*qCCBR9-1*和*qCCBR9-2*。Liu等(2019)在2、3、6、7、8和10号染色体上鉴定到7个QTLs,其中5个QTLs可增加籽粒Cd浓度,2个可降低籽粒Cd浓度。上述研究表明,水稻Cd积累是一个复杂的过程,但水稻调控Cd积累的具体机制及其相关控制基因尚不明确,亟待研究。

水稻品种华占具有稳产、高产等优点,热研2号是日本在20世纪90年代选育的1份粳型常规水稻品种,具有广谱亲和性且亲和力较强,被广泛用于亲和研究和育种。本研究以华占和热研2号作为亲本进行

典型籼粳交,再通过单粒传法(王兰等, 2014)构建重组自交系(recombinant inbred line, RIL)群体,旨在探明水稻耐Cd胁迫的遗传和抗性机制。通过检测RIL群体及其亲本对Cd胁迫的耐受性,同时进行复合QTL模型分析,筛选出相应的候选基因,并考察它们在双亲间的表达情况,以期低Cd积累水稻品种的培育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验以籼稻品种华占(*Oryza sativa* L. subsp. *indica* cv. 'HZ')为父本、粳稻品种热研2号(*Oryza sativa* L. subsp. *japonica* cv. 'Nekken2')为母本进行杂交,取F₁代通过单粒传法套袋自交,获得120个稳定遗传的重组自交系,组成RIL群体(图1)。于2018年10月完成群体的收种。

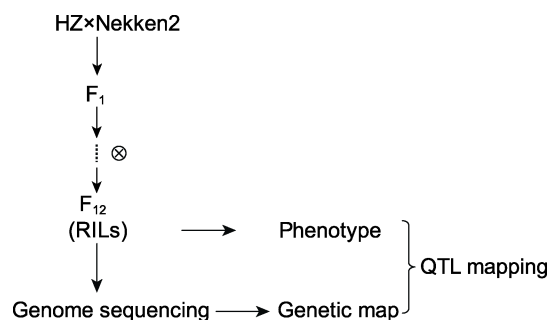


图1 水稻亲本与重组自交系(RIL)群体的构建原理

Figure 1 Schematic diagram of the rice recombinant inbred line (RIL) population and its parents

1.2 实验方法

1.2.1 种植与管理

在F₁₂代的120个稳定遗传的株系中各取80粒种子用于萌发。催芽前依次用70%乙醇和10%次氯酸钠对种子进行消毒,整个过程在10分钟内完成,然后用去离子水将种子表面冲洗数次以保证无消毒液残留。种子消毒后开始正式催芽,先将种子浸没在水中放置2天,隔天换1次水;用湿毛巾将种子包裹好并放入恒温培养箱中催芽,设置温度为37°C,48小时后观察种子发芽情况,取露白一致的种子播种于育秧田中进行育种。1个月,观察秧苗长势,各株系分别挑选24株长势一致的秧苗移栽到常规大田中,每株系插4行,每

行6株。在秧苗生长期进行常规田间管理, 及时除草除虫, 注意避免雨天水位上涨淹没秧苗。

1.2.2 籽粒米粉的制备

在水稻成熟期收种, 将水稻籽粒晒干后保存于4°C储藏柜中, 通过脱壳、碾米、粉碎及过筛4个步骤将水稻籽粒制备成米粉。使用JDMZ 100型稻谷出米率检测仪进行脱壳; 糙米经JNMJ3型检验碾米机进行碾米; 分别用FS-II型旋风式粉碎机和GB/T 6003.1-2012型标准检验筛进行粉碎和过筛。将获得的水稻米粉样品分装到10 cm×6 cm的纸袋中保存。

1.2.3 米粉中Cd含量的测定

粗制备样品 用分析天平精确称取0.500 g米粉样品, 用10 mL量筒量取8 mL硝酸, 将两者加入SC475型样品消化管中, 轻轻摇晃多次, 使其混合均匀, 并将混匀的样品放置在通风柜中冷消化过夜。

样品的精加工 将制备得到的样品装入DigiBlock ED54型石墨消解仪中, 在120°C下消化2–3小时, 注意消化过程中不需要加盖子, 观察消化管中液体的变化, 当消化管中溶液仅剩1–2 mL时将其取出, 于室温冷却, 加入3 mL过氧化氢。混合后的溶液继续放入消解仪中消化, 直至液体低于1 mL时取出。整个消化过程均在通风柜中进行, 需要50–60分钟。最后转移到容量瓶中直接用超纯水定容至25 mL, 摇匀。

上机测定 测定样品Cd含量时需做空白对照, 将Cd离子处理后的实验组和空白对照组样品转移至玻璃管中, 使用XSERIES 2型感应耦合等离子体质谱仪测定Cd元素含量, 将获得的数据进行整理和分析。

1.2.4 遗传图谱的构建

提取第12代双亲及120个后代株系的DNA, 纯化后进行基因组测序。整理和分析获得的重组自交系测序数据, 得到均匀分布在12条染色体上的4 858个标记, 以此构建相应的遗传图谱。

1.2.5 QTL定位

实验室前期已完成高密度SNP分子标记连锁图谱的构建。在此基础上, 通过复合区间作图法, 用Map-maker/QTL1.1B软件对Cd积累量进行QTL定位分析, 设置阈值为LOD=2.5, 以此判断QTL是否存在。QTL的命名方法遵循McCouch等(1997)的原则。

1.2.6 基因表达定量分析

取新鲜的成熟期水稻亲本叶片, 提取植株的总RNA, 保存于–80°C冰箱中。提取方法参考Trizol总RNA提取试剂盒使用说明书(Invitrogen, 美国)。按照逆转录试剂盒ReverTra Ace® qRT-PCR Kit (Toyobo, 上海)的说明书将DNase I处理后的RNA样品反转录成cDNA。结合QTL定位结果, 在第2、3、9和12号染色体的区间内选取与Cd积累相关的基因, 利用实时荧光定量PCR (qRT-PCR)方法检测候选基因在双亲中的表达量。实验采用7500实时PCR体系(ABI, 上海), 以OsActin为内参基因。每个反应包括3个平行复孔, 共重复3次。

qRT-PCR反应体系包括2 μL cDNA模板, 10 μL SYBR qPCR Mix (Toyobo), 10 μmol·L⁻¹正反向引物各0.8 μL, 最后加ddH₂O补足至20 μL, 上离心机混匀。

qRT-PCR扩增程序: 95°C30秒; 95°C5秒, 55°C10秒, 72°C15秒, 共40个循环。qRT-PCR反应所用引物序列见表1。

将获得的数据导入Excel软件, 用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析, 并用2^{-ΔΔCT}方法(Livak and Schmittgen, 2001)对基因表达量进行相对定量分析。采用t检验法比较不同数据在0.01和0.05水平上的差异显著性。

表1 qRT-PCR所用引物序列

Table 1 Primer sequences for qRT-PCR

Primer name	Sequence (5'–3')	T _m (°C)	Length (bp)
LOC_Os02g50240-F-qrt	CTTCAAGGACCCA-TTCAGGA	60.04	113
LOC_Os02g50240-R-qrt	TGAAGATCTTGGC-AGCATTG	59.95	
LOC_Os02g52780-F-qrt	GTTTTCAAAGGTG-GGCTGAG	59.71	148
LOC_Os02g52780-R-qrt	CCTCAGCTTCCAA-TTCCATC	59.68	
LOC_Os09g31200-F-qrt	GCGACAAGAAGG-ATCAGGAG	59.95	117
LOC_Os09g31200-R-qrt	AGAAGCAGTTCT-GGCAGAGG	59.75	
LOC_Os09g35030-F-qrt	GGATCAAGCAGG-AGATGAGC	59.92	135
LOC_Os09g35030-R-qrt	GCCTCGTCTCCC-TGAACCT	59.39	
LOC_Os09g37949-F-qrt	GGAAATCTGCCG-ATCAGTGT	60.08	123
LOC_Os09g37949-R-qrt	GGGTCCCTTCGATG-GGTTTAT	60.02	

2 结果与讨论

2.1 双亲和群体的表现

双亲(HZ和Nekken2)的Cd离子积累量检测结果表明,两者间存在显著差异,HZ的Cd离子浓度为0.139 3 mg·kg⁻¹,Nekken2的Cd离子浓度为0.095 3 mg·kg⁻¹,推测HZ耐Cd离子胁迫的能力强于Nekken2。RIL群体各株系的Cd离子积累量数据呈连续正态分布,且广泛分布于0–0.44 mg·kg⁻¹的11个区间,其中还存在着较多的超亲个体,主要集中在0.16–0.20 mg·kg⁻¹之间(图2)。Cd离子积累量同时表现出数量性状的遗传特点,符合QTL区间作图要求。

2.2 QTL定位

我们利用该重组自交系构建的含有4 858个标记的水稻分子标记连锁图谱进行QTL定位分析,该图谱的标记均匀分布于水稻12条染色体上,符合QTL区间作

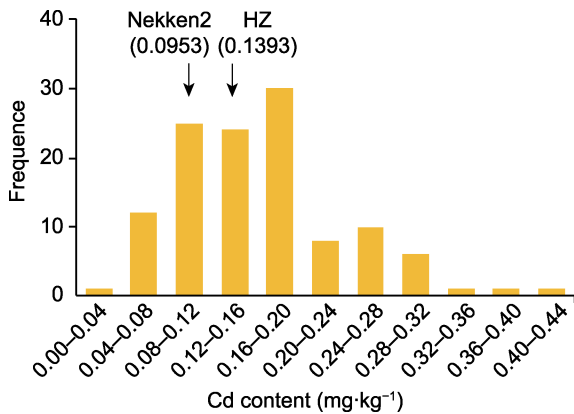


图2 水稻重组自交系中镉含量的分布情况

Figure 2 Distribution of Cd content in the rice recombinant inbred line (RIL) population

表2 水稻重组自交系(RIL)群体籽粒中镉含量的QTL分析

Table 2 QTL analysis of Cd contents in rice grains of the recombinant inbred line (RIL)

QTL	Chromosome	Physical distance (bp)	Position of support (cM)	Limit of detection
<i>qRCd-1</i>	2	30302111–35902152	129.90–153.90	4.48
<i>qRCd-2</i>	3	5112031–5335542	21.91–22.87	2.51
<i>qRCd-3</i>	3	6338887–6654517	27.17–28.53	2.61
<i>qRCd-4</i>	9	13883217–15424344	59.51–66.12	4.32
<i>qRCd-5</i>	9	16779765–22230863	71.93–95.30	4.97
<i>qRCd-6</i>	9	22748818–22938953	97.52–98.33	2.60
<i>qRCd-7</i>	12	21976412–22336740	94.21–95.75	2.66

图要求。本研究共检测到7个Cd积累相关QTLs,分别位于第2、3、9和12号染色体上。其中,第2号染色体上1个,第3号染色体上2个,第9号染色体上3个,第12号染色体上1个。LOD值最大的QTL位于9号染色体上物理距离为16 779 765–22 230 863 bp的区间内,LOD值高达4.97(表2;图3)。

2.3 候选基因分析

根据QTL定位结果确定该区间在染色体上的位置,查阅水稻基因组注释网站(<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)上目的染色体区间内的基因信息,对其中LOD较大的QTL所在区间的候选基因进行分析,对其中可能与Cd积累相关的基因进行初步总结,具体的基因信息见表3。

这些基因包括bZIP转录因子和AP2/EREBP转录因子基因、受体蛋白激酶和谷氨酰胺合成酶基因以及OSISAP1胁迫相关基因等。我们通过选择性地对这些基因在成熟期双亲间的表达量进行对比,结果(图4)表明,LOC_Os02g50240、LOC_Os09g31200和LOC_Os09g35030在父本HZ中的表达量显著高于母本Nekken2;LOC_Os02g52780和LOC_Os09g37949在父本HZ中的表达量显著低于母本Nekken2,其中LOC_Os09g37949为差异极显著。综上,LOC_Os02g50240、LOC_Os02g52780、LOC_Os09g31200、LOC_Os09g35030和LOC_Os09g37949基因在成熟期双亲中表达量差异明显,说明它们与水稻耐Cd胁迫存在相关性,可能影响水稻籽粒的Cd积累量。

2.4 讨论

实时荧光定量PCR检测结果表明,水稻Cd积累由多基因控制,多种内外源因素都会影响相关基因的表

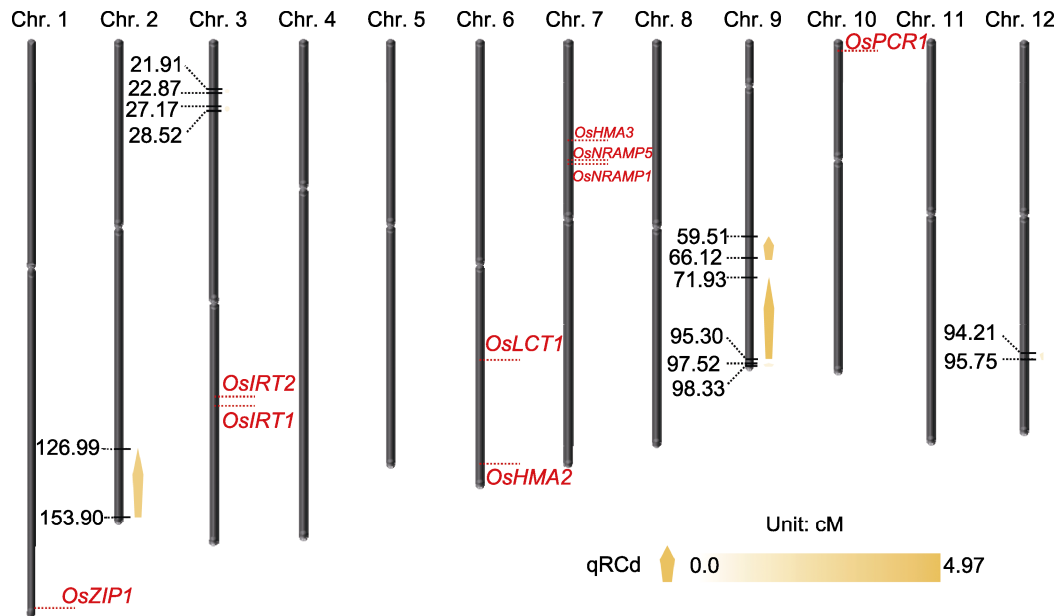


图3 水稻重组自交系镉积累量的QTL定位

Figure 3 QTL mapping of cadmium accumulation in recombinant inbred lines of rice

表3 水稻镉积累候选基因的功能

Table 3 The function of candidate genes related to the accumulation of cadmium in rice

Chromosome	Gene	Function	Object
2	<i>LOC_Os02g50240</i>	It participates in the regulation of various biological processes and stress response	Cytoplasmic glutamine synthetase
2	<i>LOC_Os02g52780</i>	It regulates ABA-dependent stress-related gene expression to enhance the plant tolerance of drought and salt	Transcription factors bZIP
9	<i>LOC_Os09g31200</i>	A major determinant of plant response to stress	Zinc finger protein
9	<i>LOC_Os09g35030</i>	It specifically combines with drought response elements and controls many stress-induced genes	Transcription factors AP2/EREBP
9	<i>LOC_Os09g37949</i>	It plays an important role in salt stress response	Receptor protein kinase

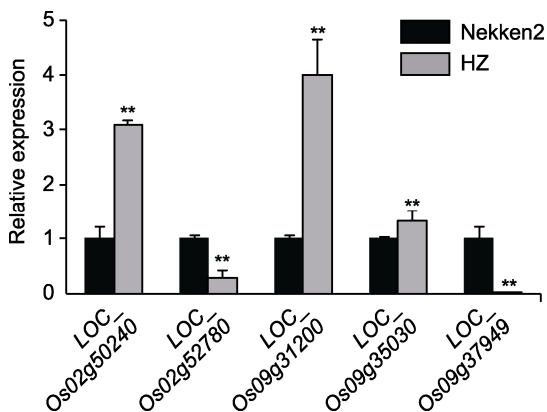


图4 水稻镉积累候选基因表达量差异

** 表示差异极显著 ($P < 0.01$).

Figure 4 Differences in the expression level of candidate genes involved in cadmium accumulation in rice

** indicate extremely significant differences ($P < 0.01$).

达, 进而影响水稻的耐Cd能力。对于本研究, 选材差异、生长环境不同及Cd含量测定时不同的处理方式都会对QTL定位结果造成不同程度的影响。本研究以水稻籽粒中的Cd积累量作为QTL检测的唯一指标, 根据QTL定位结果, 结合实时荧光定量PCR技术探究可能存在的调控水稻耐Cd胁迫能力的基因。

本研究证实了部分前人研究结果。Ueno等(2009b)利用146种不同的种质, 在水稻第2号染色体RM5465–RM5300区间内检测到1个控制Cd积累的QTL, 这个QTL与本研究得到的*qRCd-1*区间存在部分重叠。Hu等(2018)在水稻第2号染色体RM13530–RM6307区间内检测到2个控制Cd积累的QTLs *qCC-BR2-1*和*qCCBR2-2*, 在第12号染色体RM28546–RM1227区间内也检测到2个控制Cd积累的QTLs

*qCCBR12-1*和*qCCBR12-2*, 与本研究得到的*qRCd-1*和*qRCd-7*区间存在部分重叠。Liu等(2019)在水稻第2号染色体RM250–RM207区段检测到1个控制Cd积累的QTL *qCd-2*, 与本研究得到的*qRCd-1*区间存在部分重叠。

本研究还得到许多新的位点, 其中在第9号染色体上物理距离为16 779 765–22 230 863 bp的区间内定位到1个LOD值高达4.97的*qRCd-5*, 说明该区间很可能存在1个主效基因。同时, 在9号染色体上新发现1个LOD值高达4.32的位点, 位于物理距离13 883 217–15 424 344 bp范围内。

已有研究表明, 基因LOC_Os02g52780和LOC_Os09g35030分别属于bZIP转录因子和AP2/EREBP转录因子, 前者正向调控*OsPP2C49*和9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶基因*OsNCED4*, 是ABA信号合成及抗旱性的中心调控因子(Zong et al., 2016), 通过ABA依赖途径调节胁迫相关基因的表达, 增强抗旱耐盐性; 后者与干旱响应元件特异结合, 控制许多胁迫诱导基因的表达, 具有培育抗旱耐盐和耐冷转基因水稻的潜力(Dubouzet et al., 2003)。基因LOC_Os02g50240编码胞质谷氨酰胺合成酶, 参与多种生物过程的调控, 进而调节胁迫应答。干旱条件下, LOC_Os02g50240的表达可能对Khitish品种的耐旱性有贡献(Singh and Ghosh, 2013)。基因LOC_Os09g31200编码一种锌指蛋白, 过表达该基因的转基因烟草(*Nicotiana tabacum*)对冷、干旱和盐胁迫具有耐受性(Mukhopadhyay et al., 2004)。基因LOC_Os09g37949编码一种受体蛋白激酶, 其表达受低温、干旱与脱落酸诱导, 可能在响应盐等逆境胁迫中起重要作用(Cheng et al., 2009)。

在*qRCd-1*的QTL上包含LOC_Os02g50240和LOC_Os02g52780基因; 在*qRCd-4*、*qRCd-5*及*qRCd-6*的QTL上包含LOC_Os04g34600、LOC_Os09g35030和LOC_Os09g37949基因, 这些基因可能参与水稻体内Cd离子运输, 与调控水稻Cd离子积累相关。采用实时荧光定量PCR技术分析成熟期双亲各基因的表达量, 发现LOC_Os02g50240、LOC_Os02g52780、LOC_Os09g31200、LOC_Os09g-35030和LOC_Os09g37949这5个基因的表达在双亲间差异极显著。LOC_Os02g50240、LOC_Os09g-31200和LOC_Os09g35030在父本HZ中的表达量显

著高于母本Nekken2 (图4)。由图2可知, 父本HZ的Cd积累量明显高于母本Nekken2。综合分析, 我们可以得出初步结论, 这3个基因的高表达可能对提高水稻对Cd的富集能力和耐受能力有正向调控作用, 尚待进一步实验验证。

3 结论

综上所述, 本研究表明, LOC_Os02g50240、LOC_Os02g52780、LOC_Os09g31200、LOC_Os09g-35030和LOC_Os09g37949的表达量在成熟期的华占和热研2号间差异显著, 说明上述基因在水稻耐Cd胁迫能力调控中可能发挥重要作用, 是造成华占和热研2号籽粒耐Cd离子胁迫能力差异的主要原因。本研究进一步挖掘了与水稻Cd积累相关的QTL位点, 揭示了与水稻耐Cd胁迫相关基因的功能, 为阐明水稻耐Cd胁迫机制提供了新的理论依据。同时, 本研究成果后续如能应用到水稻分子育种中, 将为提高水稻耐Cd胁迫的能力提供技术支持, 并有望促进水稻的产量和质量提升, 对于优良水稻品种的培育也具有重要意义。

参考文献

- 黄新元, 赵方杰 (2018). 植物防御素调控水稻镉积累的新机制. 植物学报 53, 451–455.
- 王兰, 黄李超, 代丽萍, 杨窑龙, 徐杰, 冷语佳, 张光恒, 胡江, 朱丽, 高振宇, 董国军, 郭龙彪, 钱前, 曾大力 (2014). 利用日本晴/9311重组自交系群体定位水稻成熟期叶形相关性状QTL. 中国水稻科学 28, 589–597.
- Abe T, Nonoue Y, Ono N, Omoteno M, Kuramata M, Fukuoka S, Yamamoto T, Yano M, Ishikawa S (2013). Detection of QTLs to reduce cadmium content in rice grains using LAC23/Koshihikari chromosome segment substitution lines. *Breed Sci* 63, 284–291.
- Arisawa K, Uemura H, Hiyoshi M, Takeda H, Saito H, Soda M (2007). Cadmium-induced renal dysfunction and mortality in two cohorts: disappearance of the association in a generation born later. *Toxicol Lett* 169, 214–221.
- Cheng YW, Qi YC, Zhu Q, Chen X, Wang N, Zhao X, Chen HY, Cui XJ, Xu LL, Zhang W (2009). New changes in the plasma-membrane-associated proteome of rice roots under salt stress. *Proteomics* 9, 3100–3114.
- Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet EG,

- Miura S, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003). *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant J* **33**, 751–763.
- Florijn PJ, van Beusichem ML (1993). Uptake and distribution of cadmium in maize inbred lines. *Plant Soil* **150**, 25–32.
- Fujimaki S, Suzui N, Ishioka NS, Kawachi N, Ito S, Chino M, Nakamura S (2010). Tracing cadmium from culture to spikelet: noninvasive imaging and quantitative characterization of absorption, transport, and accumulation of cadmium in an intact rice plant. *Plant Physiol* **152**, 1796–1806.
- Horiguchi H, Teranishi H, Niiya K, Aoshima K, Katoh K, Sakuragawa N, Kasuya M (1994). Hypoproduction of erythropoietin contributes to anemia in chronic cadmium intoxication: clinical study on Itai-itai disease in Japan. *Arch Toxicol* **68**, 632–636.
- Hu DW, Sheng ZH, Li QL, Chen W, Wei XJ, Xie LH, Jiao GA, Shao GN, Wang JL, Tang SQ, Hu PS (2018). Identification of QTLs associated with cadmium concentration in rice grains. *J Integr Agric* **17**, 1563–1573.
- Ishikawa S, Abe T, Kuramata M, Yamaguchi M, Ando T, Yamamoto T, Yano M (2010). A major quantitative trait locus for increasing cadmium-specific concentration in rice grain is located on the short arm of chromosome 7. *J Exp Bot* **61**, 923–934.
- Liu WQ, Pan XW, Li YC, Duan YH, Min J, Liu SX, Liu LC, Sheng XN, Li XX (2019). Identification of QTLs and validation of *qCd-2* associated with grain cadmium concentrations in rice. *Rice Sci* **26**, 42–49.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**, 402–408.
- Mao CP, Song YX, Chen LX, Ji JF, Li JZ, Yuan XY, Yang ZF, Ayoko GA, Frost RL, Theiss F (2019). Human health risks of heavy metals in paddy rice based on transfer characteristics of heavy metals from soil to rice. *Catena* **175**, 339–348.
- McCouch SR, Cho YG, Yano M, Paul E, Blinstrub M, Morishima H, Kinoshita T (1997). Report on QTL nomenclature. *Rice Genet Newsl* **14**, 11–13.
- Miyadate H, Adachi S, Hiraizumi A, Tezuka K, Nakazawa N, Kawamoto T, Katou K, Kodama I, Sakurai K, Takahashi H, Satoh-Nagasawa N, Watanabe A, Fujimura T, Akagi H (2011). OsHMA3, a P1B-type of ATPase affects root-to-shoot cadmium translocation in rice by mediating efflux into vacuoles. *New Phytol* **189**, 190–199.
- Mukhopadhyay A, Vij S, Tyagi AK (2004). Overexpression of a zinc-finger protein gene from rice confers tolerance to cold, dehydration, and salt stress in transgenic tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 6309–6314.
- Nakanishi H, Ogawa I, Ishimaru Y, Mori S, Nishizawa NK (2006). Iron deficiency enhances cadmium uptake and translocation mediated by the Fe^{2+} transporters OsIRT1 and OsIRT2 in rice. *Soil Sci Plant Nut* **52**, 464–469.
- Satarug S, Garrett SH, Sens MA, Sens DA (2010). Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. *Environ Health Perspect* **118**, 182–190.
- Satoh-Nagasawa N, Mori M, Nakazawa N, Kawamoto T, Nagato Y, Sakurai K, Takahashi H, Watanabe A, Akagi H (2012). Mutations in rice (*Oryza sativa*) heavy metal ATPase 2 (OsHMA2) restrict the translocation of zinc and cadmium. *Plant Cell Physiol* **53**, 213–224.
- Shi JC, Yu XL, Zhang MK, Lu SG, Wu WH, Wu JJ, Xu JM (2011). Potential risks of copper, zinc, and cadmium pollution due to pig manure application in a soil-rice system under intensive farming: a case study of Nanhu, China. *J Environ Qual* **40**, 1695–1704.
- Singh KK, Ghosh S (2013). Regulation of glutamine synthetase isoforms in two differentially drought-tolerant rice (*Oryza sativa* L.) cultivars under water deficit conditions. *Plant Cell Rep* **32**, 183–193.
- Takahashi A, Agrawal GK, Yamazaki M, Onosato K, Miyao A, Kawasaki T, Shimamoto K, Hirochika H (2007). Rice Pti1a negatively regulates *RAR1*-dependent defense responses. *Plant Cell* **19**, 2940–2951.
- Ueno D, Kono I, Yokosho K, Ando T, Yano M, Ma JF (2009a). A major quantitative trait locus controlling cadmium translocation in rice (*Oryza sativa*). *New Phytol* **182**, 644–653.
- Ueno D, Koyama E, Kono I, Ando T, Yano M, Ma JF (2009b). Identification of a novel major quantitative trait locus controlling distribution of Cd between roots and shoots in rice. *Plant Cell Physiol* **50**, 2223–2233.
- Uraguchi S, Kamiya T, Sakamoto T, Kasai K, Sato Y, Nagamura Y, Yoshida A, Kyojuka J, Ishikawa S, Fujiwara T (2011). Low-affinity cation transporter (OsLCT1) regulates cadmium transport into rice grains. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 20959–20964.
- Wang FJ, Wang M, Liu ZB, Shi Y, Han TQ, Ye YY, Gong N, Sun JW, Zhu C (2015). Different responses of low grain-Cd-accumulating and high grain-Cd-accumulating rice cultivars to Cd stress. *Plant Physiol Biochem* **96**, 261–

269.

Yu H, Wang JL, Fang W, Yuan JG, Yang ZY (2006). Cadmium accumulation in different rice cultivars and screening for pollution-safe cultivars of rice. *Sci Total Environ* **370**, 302–309.

Zhang XQ, Zhang GP, Guo LB, Wang HZ, Zeng DL, Dong GJ, Qian Q, Xue DW (2011). Identification of quantitative

trait loci for Cd and Zn concentrations of brown rice grown in Cd-polluted soils. *Euphytica* **180**, 173–179.

Zong W, Tang N, Yang J, Peng L, Ma SQ, Xu Y, Li GL, Xiong LZ (2016). Feedback regulation of ABA signaling and biosynthesis by a bZIP transcription factor targets drought-resistance-related genes. *Plant Physiol* **171**, 2810–2825.

QTL Mapping of Candidate Genes Involved in Cd Accumulation in Rice Grain

Chenyang Pan¹, Hanfei Ye¹, Weiyong Zhou³, Sheng Wang¹, Mengjia Li¹, Mei Lu¹, Sanfeng Li²
Xudong Zhu², Yuexing Wang², Yuchun Rao^{1*}, Gaoxing Dai^{3*}

¹College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China; ²State Key Laboratory of Rice Biology, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China; ³Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China

Abstract Rice is one of the world's most important crops, but cadmium (Cd) pollution and Cd accumulation in rice fields pose a serious threat to its yield and quality as well as to human health. How to reduce Cd accumulation in rice has become a major concern. In this study, a *japonica* rice variety Nekken2 was used as the maternal parent, and an *indica* rice variety HZ was used as the paternal parent. After F₁ generation was obtained by cross-breeding, successive selfings were performed for 120 recombinant inbred lines (RILs) population as the QTL mapping populations. We measured the Cd content in rice grains of each line at the maturity stage. Meanwhile, QTL mapping was performed using genetic map. As a result, a total of 7 QTLs were detected, which were located on chromosome 2, 3, 9, and 12 of rice, with the highest LOD score of 4.97. The qRT-PCR analysis on the candidate genes involved in metal ion stress resistance in these QTL regions showed that the expression level of *LOC_Os02g50240*, *LOC_Os02g52780*, *LOC_Os09g31200*, *LOC_Os09g35030* and *LOC_Os09g37949* was significantly different from the parents. Combined with the data of concentration of different metal ions in the parents, we speculated that the high expression of *LOC_Os02g50240*, *LOC_Os09g31200* and *LOC_Os09g35030* might greatly improve the absorption and tolerance of rice to Cd ion stress. And these genes may be related to the accumulation of Cd in rice grains, and may affect the ability of rice to tolerate Cd stress, which could help for further breeding and screening for rice varieties to tolerate Cd stress, and exploring the molecular regulation mechanism of Cd accumulation in rice.

Key words rice, cadmium accumulation, QTL mapping, candidate genes, ion stress, genetic map

Pan CY, Ye HF, Zhou WY, Wang S, Li MJ, Lu M, Li SF, Zhu XD, Wang YX, Rao YC, Dai GX (2021). QTL mapping of candidate genes involved in Cd accumulation in rice grain. *Chin Bull Bot* **56**, 25–32.

* Authors for correspondence. E-mail: ryc@zjnu.cn; 2526620@qq.com

(责任编辑: 白羽红)