

利用东乡普通野生稻染色体片段置换系 定位水稻苗期耐盐性 QTL

程怡冰^{1,2}, 黄倩^{2,3}, 韩冰², 崔迪², 邱先进¹, 马小定², 韩龙植²

(¹长江大学农学院, 湖北荆州 434025; ²中国农业科学院作物科学研究所/作物基因资源与育种全国重点实验室, 北京 100081;

³重庆师范大学生命科学学院, 重庆 401331)

摘要: 本实验室前期以东乡普通野生稻和日本晴为亲本创制了强耐盐染色体片段置换系 CSSL91, 本研究将其与日本晴和强耐盐种质 Pokkali 比较, 结果显示 CSSL91 耐盐性与 Pokkali 相当。以 CSSL91 与日本晴构建的 F_{2,3} 群体为试验材料, 日本晴和 CSSL91 为对照, 以耐盐等级和幼苗存活率为指标。结果表明 2 个指标均成正态分布, QTL 连锁定位分析共检测到 5 个耐盐相关 QTL, 分别分布于第 4、9、10 号染色体上, LOD 值介于 2.95~3.97, 表型贡献率为 9.83%~18.48%; 其中耐盐等级 QTL-*qST4* 的表型贡献率最高, 其定位在第 4 号染色体 DX-C4-1~DX-S4-16 标记间。分离群体分组分析法 (BSA, bulked segregation analysis) 分析检测到第 4 号染色体 0~5.0 Mb 区间有一个超过阈值的 QTL, 该区间与 QTL-*qST4* 重合, QTL 连锁分析方法和 BSA 方法均在第 4 号染色体的 0~5.0 Mb 区间定位到耐盐等级 QTL, 说明 QTL-*qST4* 是可靠的耐盐位点; 耐盐等级 QTL-*qST4-1* 和幼苗存活率 QTL-*qSSR4* 均定位在第 4 号染色体 DX-C4-12 和 DX-C4-13 标记间, LOD 值分别为 3.36 和 3.92, 表型贡献率分别为 13.97% 和 9.49%; 在第 9 号、10 号染色体还定位到两个耐盐等级 QTL-*qST9* 和 QTL-*qST10*; 其中 QTL-*qST4-1*、QTL-*qSSR4* 和 QTL-*qST10* 是本研究新定位的耐盐性 QTL。本研究结果将为水稻耐盐性相关基因克隆和分子标记辅助改良水稻品种的耐盐性奠定基础。

关键词: 耐盐等级; 幼苗存活率; 分离群体分组分析

QTLs Analysis for Salinity Tolerance at Seedling Stage Using Chromosome Segment Substitution Lines of Dongxiang Common Wild Rice (*Oryza rufipogon* Griff.)

CHENG Yibing^{1,2}, HUANG Qian^{2,3}, HAN Bin², CUI Di², QIU Xianjin¹, MA Xiaoding², HAN Longzhi²

(¹College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou 434025, Hubei; ²Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences/ State Key Laboratory of Crop Gene Resources and Breeding, Beijing 100081;

³College of Life Science, Chongqing Normal University, Chongqing 401331)

Abstract: In our laboratory, we created a chromosome fragment substitution line CSSL91, with high salinity-tolerance, using Dongxiang common wild rice and Nipponbare as parents. In this study, it was compared with Nipponbare and Pokkali, a strong salt-tolerant germplasm, and the results showed that the salt tolerance of CSSL91 was comparable to that of Pokkali. Using the F_{2,3} population constructed by CSSL91 and Nipponbare, the phenotypes were normally distributed with salt tolerance grade and seedling survival rate as indicators. QTL linkage location analysis showed that a total of five salinity tolerance-related QTLs were detected, which were distributed on chromosomes 4, 9, and 10, with the LOD values ranging from 2.95 to

收稿日期: 2023-11-01 网络出版日期: 2023-11-29

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20231101003>

第一作者研究方向为水稻新基因发掘与新种质创制, E-mail: cybgzxy@163.com

通信作者: 韩龙植, 研究方向为水稻种质资源, E-mail: hanlongzhi@caas.cn

马小定, 研究方向为水稻种质资源, E-mail: maxiaoding@caas.cn

邱先进, 研究方向为水稻分子育种, E-mail: xjqiu216@yangtzeu.edu.cn

基金项目: 科技创新 2030 - 重大项目 (2022ZD04017); 中国农业科学院科技创新工程项目

Foundation projects: STI 2030-Major Projects (2022ZD04017); The Chinese Academy of Agricultural Sciences Science and Technology Innovation Program

3.97, and the phenotypic contribution rates ranging from 9.83% to 18.48%. Among that QTL-*qST4* is the highest phenotypic contribution in the salt tolerance grade, which was located between DX-C4-1 and DX-S4-16 markers on chromosome 4. Simultaneously, the bulked segregation analysis (BSA) detected a QTL exceeding the threshold value in the interval of 0-5.0 Mb on chromosome 4, which was overlapped with QTL-*qST4*, indicating that QTL-*qST4* was a reliable salinity tolerance locus; QTL-*qST4-1* and QTL-*qSSR4* based on salt tolerance grade and seedling survival, respectively, were both located between markers DX-C4-12 and DX-C4-13 on chromosome 4, with LOD values of 3.36 and 3.92, and phenotypic contributions of 13.97% and 9.49%, respectively. Two QTLs based on salt tolerance grades, QTL-*qST9* and QTL-*qST10*, were located on chromosomes 9 and 10, respectively. QTL-*qST4-1*, QTL-*qSSR4* and QTL-*qST10* are the new QTLs with salinity tolerance in this study. The results of the present study will lay a foundation for the cloning of salinity tolerance-related genes and molecular markers to assist in the improvement of rice varieties in terms of salt tolerance.

Key words: salt tolerant grade; seedling survival rate; bulked segregation analysis (BSA)

目前,全球约有9.6亿 hm^2 的盐渍化土地^[1],土壤盐渍化影响作物生长,严重时甚至导致作物死亡,危害世界粮食安全^[2]。水稻作为中度盐敏感作物,当土壤中可溶性盐浓度达到0.3%时,即对水稻的主要代谢活动产生不利影响,导致产量下降^[3];改良水稻耐盐性是增强品种抵御盐渍胁迫和提高盐渍化土地利用效率的有效途径。利用强耐盐种质资源,定位和发掘耐盐主效QTL,克隆耐盐性状关键调控基因,是利用分子育种方法提高水稻耐盐性的基础。

水稻耐盐性是由多基因控制的数量性状^[4-7]。近年来,许多研究人员利用不同分离群体定位了水稻不同生长时期的耐盐性相关QTL。目前,已定位的大部分耐盐QTL分布在第1号、2号、6号、7号染色体上,而第10号、11号染色体上较少^[8];在种子萌发期,Wang等^[4]、Prasad等^[6]、Mardani等^[9]分别利用IR64、韭菜青和Gharib耐盐亲本,构建了重组自交系(RIL, recombinant inbred lines)、双单倍体群体(DH, doubled haploid)和 $F_{2,3}$ 群体,以发芽势、发芽率、吸胀率、幼苗根长等性状为耐盐鉴定指标,检测到许多与种子萌发期耐盐相关的QTL,如QTL-*qSRTL-6*、QTL-*qGP-2*。幼苗期和生殖生长期是水稻对盐比较敏感的时期^[10],其中,苗期定位到的耐盐QTL居多^[11-12],主要是针对盐害等级、存活天数及茎干 Na^+/K^+ 浓度等相关性状^[13]。Lin^[7]利用耐盐籼稻品种Nona Bokra,对水稻苗期耐盐性进行了QTL定位,共定位到11个QTL,其中与幼苗存活率相关的QTL有3个,QTL-*qSNC7*和QTL-*qSKC1*是其中的两个主效QTL,表型贡献率分别为48.5%和40.1%;此外,还检测到8个与地上部和地下部 Na^+ 、 K^+ 浓度相关的QTL。Gong等^[14]利用窄叶青8号/京系17构建的双单倍体群体,检测到8个与幼苗存活

天数相关的QTL。段敏等^[11]利用以ST1050和越光为亲本构建的 F_2 群体,在第8号、12号染色体上检测到2个与幼苗存活率相关的QTL,命名为QTL-*qSR8*和QTL-*qSR12*,表型贡献率分别为13.57%和6.91%;Takehisa等^[15]针对分蘖数、茎长苗期耐盐性状检测到3个相关的QTL,表型贡献率在14%~24%之间。耿雷跃^[16]利用吉冷1号/密阳23构建的RIL群体,检测到12个耐盐相关QTL位点,其中6个可在不同环境下重复检测到。

虽然已定位了很多水稻耐盐性相关QTL,但是目前仅有少数耐盐基因被克隆。*SKC1*是第一个被克隆的耐盐基因, Ren等^[17]利用Nona Bokra与Koshihikari构建的 F_2 群体,检测到一个控制地上部 K^+/Na^+ 动态平衡的主效QTL-*qSKC-1*,该QTL能解释总表型变异的40.1%,*SKC1*编码HKT家族的离子转运蛋白,通过把地上部过量的 Na^+ 回流到根部,减轻 Na^+ 毒害,增强水稻耐盐性。*OsWRKY53*是利用包括286份水稻种质资源的自然群体进行全基因组关联分析(GWAS, genome-wide association study)鉴定出的耐盐基因^[18],*OsWRKY53*作为耐盐的负调控因子,直接调控MPK激酶(MKK, MPK kinase) *OsMKK10.2*和高亲和 K^+ 转运载体蛋白(HKT, high-affinity K^+) *OsHKT1*的表达,保护水稻免受盐胁迫危害。虽然水稻耐盐基因克隆取得了一些进展,但是可直接应用于耐盐育种的基因资源较少。因此,继续挖掘水稻耐盐相关QTL和新基因,可为耐盐品种选育提供更多可选择的新基因源。

前期,实验室从东乡普通野生稻染色体片段置换系中筛选到1个强耐盐家系CSSL91,本研究以东乡普通野生稻和日本晴(Nip, Nipponbare)为亲本创制的强耐盐染色体片段置换系CSSL91为材料,开

展水稻耐盐相关 QTL 定位分析,旨在为后续耐盐基因精细定位与克隆奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究材料包括强耐盐种质 Pokkali^[19]、CSSL91、日本晴以及 F_{2,3} 分离群体。CSSL91 来自以东乡普通野生稻为供体亲本、日本晴为受体亲本构建的染色体片段置换系; F_{2,3} 分离群体是 CSSL91 与轮回亲本日本晴杂交构建的 F₂ 群体自交产生的包含 512 个株系的群体; 以上所有材料均由中国农业科学院作物科学研究所水稻种质资源团队创制。

1.2 水稻苗期耐盐性鉴定

将以上所有试验材料种子在 45℃ 烘箱中放置 1 周,以打破休眠。每个材料挑选 30 粒籽粒饱满的种子用 1% 的次氯酸钠溶液消毒 15 min,蒸馏水冲洗 3 次后置于 35℃ 烘箱催芽,直至种子刚露出芽尖。每个材料挑选 15 粒发芽一致的种子播种在 96 孔板置于光照培养箱中培养(光照和黑暗各 12 h,光照温度 29℃,黑暗温度 25℃,相对湿度均为 50%),种子先在蒸馏水中培养 4 d,后转移至 Yoshida 营养液上继续生长,每 2 d 更换一次营养液;生长至三叶一心期(大约 15 d)时在含有 0.9% NaCl 和无 NaCl 的 Yoshida 营养液中盐胁迫处理 7 d,每 2 d 更换 1 次 NaCl 溶液,盐处理 7 d 后调查耐盐等级和幼苗存活率,上述试验重复 3 次。耐盐等级调查标准参照《水稻种质资源描述规范和数据标准》^[20],耐盐等级分为 5 级,1 级为耐盐性极强,3 级为耐盐性较强,5 级为中等耐盐,7 级为耐盐性较弱,9 级为耐盐性极弱。幼苗存活标准按照有绿叶即为存活,幼苗存活率为存活株数与总株数的比值,以 3 次重复的幼苗存活率平均值作为统计数据。以盐处理和无盐处理的日本晴和 Pokkali 作为对照,来评价盐处理和无盐处理的 CSSL91 耐盐特性;以盐处理后的日本晴和 CSSL91 苗期作为对照,来评价盐处理后的 F_{2,3} 分离群体苗期耐盐性。

1.3 DNA 提取与 PCR 扩增

采用 CTAB 法提取试验材料 DNA^[21]。根据 CSSL91 家系中野生稻插入的片段和位置信息^[22],选择 CSSL91 与日本晴样本间有多态性的引物^[22](表 1)检测 F_{2,3} 分离群体的基因型。PCR 扩增体系为 10.0 μL,包括 DNA 1.0 μL (200 μmol/L),正反向引物各 0.5 μL (10 μmol/L),2×Taq PCR Mix (Vazyme) 5.0 μL, ddH₂O 3.0 μL。PCR 扩增程序: 94℃ 预变性

5 min; 94℃ 变性 30 s, 59℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物利用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,考察并记录每个样品的带型。

1.4 QTL 连锁分析与 BSA 分析

用 QTL IciMapping (V4.1) 软件分析耐盐性相关 QTL^[23], LOD 阈值设定为 2.5^[24], 采用逐步回归的加性 QTL 似然比检验法检测 QTL、计算每个 QTL 解释的表型贡献率 (PVE, phenotypic variation explained by the marker) 以及估算 QTL 的加性效应。QTL 的命名采用 McCouch 等^[25]提出的规则。

用分离群体分组分析法 (BSA, bulked segregation analysis) 定位耐盐相关 QTL。根据 F_{2,3} 分离群体耐盐等级鉴定结果,将分离群体中 30~50 株极端表型的单株叶片等量混合,提取基因组 DNA,构建极端表型 DNA 混池。基因组高通量测序在 Illumina 测序平台上进行,测序深度为 50×; 后续数据质控、参考基因组比对和变异检测按等照常流程进行^[26]。采用欧几里得距离 (ED, euclidean distance) 法进行 BSA 分析^[247],为了降低背景噪音,按照滑窗的方法对计算获得的欧几里得距离结果进行拟合,滑窗窗口大小为 1 Mb,步长大小为 10 Kb,取窗口内的平均值作为拟合后的值。最后以曼哈顿图展示每个 SNP 的欧几里得距离平方值在染色体上的分布情况。

2 结果与分析

2.1 CSSL91 耐盐性分析

在没有盐处理条件下,日本晴、CSSL91 和 Pokkali 均生长正常, Pokkali 植株较高; 在盐处理条件下 (0.9% NaCl 溶液处理 7 d), 日本晴叶片全部干枯死亡, CSSL91 和 Pokkali 只有少数植株下部叶片干枯死亡, 新叶生长正常 (图 1A); 根据耐盐等级指标, 日本晴耐盐等级为 8.5, CSSL91 为 4.5, Pokkali 为 3.0 (图 1B), CSSL91 耐盐等级显著小于日本晴, 而稍高于 Pokkali; 根据幼苗存活率指标, 日本晴存活率为 30%, CSSL91 为 90%, Pokkali 为 100%, CSSL91 和 Pokkali 间的存活率没有显著差异, 但显著高于日本晴 (图 1C)。因此, CSSL91 耐盐性明显强于日本晴, 与 Pokkali 耐盐能力相当。

2.2 分离群体苗期耐盐性分析

为了定位 CSSL91 耐盐相关基因, 对中国农业科学院作物科学研究所水稻种质资源团队创制的 CSSL91 与日本晴杂交后构建的 F_{2,3} 分离群体进行

了耐盐性分析(图2A,C)。根据耐盐鉴定结果,日本晴耐盐等级为8.5, CSSL91为3.5, $F_{2,3}$ 分离群体介于3~9之间(图2D);日本晴幼苗存活率为30%, CSSL91为90%, $F_{2,3}$ 分离群体介于0~100%之间

(图2E)。耐盐等级和幼苗存活率表型均呈连续正态分布,耐盐等级存在单向超亲分离,幼苗存活率存在双向超亲分离,说明耐盐等级和幼苗存活率性状是受多基因控制的数量性状。

表1 CSSL91与日本晴之间的多态性引物

Table 1 Primers complement with polymorphism between CSSL91 and Nipponbare

标记 Marker	染色体 Chromosome	正向引物(5'-3') Forward sequence (5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse sequence (5'-3')
DX-S4-16	4	CGTTAACCATGTGGGCTTGGGAAA	AGCAGCAAGTGCTCGCAAACA
DX-S4-13	4	TGCAGTTGCATGGCACAGTCAC	ATCGTCTCGGTACACCTGAGTAACA
DX-S4-6	4	GTGCATCGGGACAGGGTA	CACCGTCCCCACGGTGATA
DX-S4-9	4	GCAATCGATCCAGGCATCC	TTCGATCTGGAGCTCGCAA
DX-S4-10	4	AAACTAGCATTGGAAGACTTGAGTG	TTCAATGTGTAATTTTATTTTCGTGGT
DX-S9-3	9	GCCAAAACACGAGATTTTCGA	CATGTTCCACCAAATTTAAGTCCT
DX-S9-6	9	GCCTATGGCATTCTTTTCGC	TCCTTTCCACCAAATATAGCTT
DX-S9-7	9	ACCACCGTAACAGGACCGG	GCATGTGTGCACCCCTCAATA
DX-S9-5	9	CTGCTTCTCTGTAAATTTTCAGCTT	CTTCGAGGAAACTCGAGATTCTAAG
DX-S10-1-1	10	CACCCGACCAACATCACCA	CTCCGCTGCTCTGCCTGAC
DX-S10-3-2	10	TCCTGAATCCTGCCGTACAAA	CCAGGAGGAGAGGTATTGATC
DX-S10-4-2	10	CAATAGCGTGGTGACCCCTACT	CAAACCATCTTAATGCACTATCACA
DX-S10-5-2	10	CGCCGTTCTCGTGCCAT	AGTATCCTGCATGCCACAACAA
DX-S10-8-3	10	TAGTGCTAAGGTGTGACATCTTGG	CCTCCCGAAATTGTGAAGAATT
DX-S10-8-1	10	GGTCCACGACAGCAGCAAGT	GAGCTCGAAGCCATGGACAA
DX-S10-8-s4	10	CACACGTAGTGACGTAGACGCC	TGAGATGTACCAAGAGGTATCAATTC
DX-S10-8-6	10	AAAAACTGCAGTGGAAGAGGT	ACCTTTGTGCTACTGTGATGGC
DX-S10-9-5	10	TCGATTCCAAGCCGTCTAGC	TCCATCACAAGTGCACACTTCA
DX-S10-9-6	10	GCACGGCAGACCACATCACT	TGCAACCTATGCAACGTGTCA
DX-S10-9-7	10	AATTTTTGCGCCATCGGG	GCGCAGGAAATAGCTCAGCT

2.3 分离群体苗期耐盐QTL连锁定位

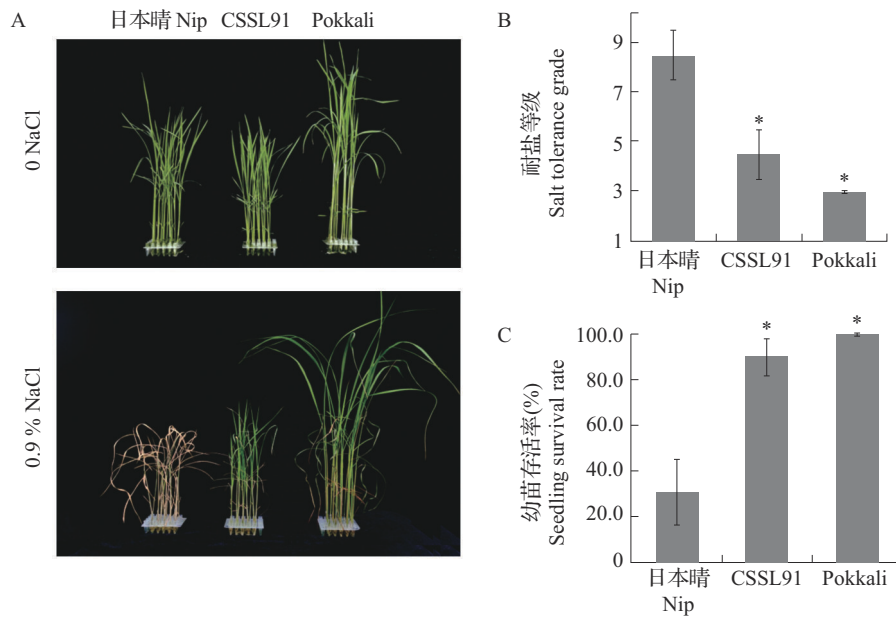
根据 $F_{2,3}$ 分离群体鉴定的基因型,结合苗期耐盐等级和幼苗存活率,通过 Icimapping 软件共鉴定到5个耐盐相关QTL(表2),其中耐盐等级相关QTL 4个,幼苗存活率1个,这两个性状有一个共定位区间(图3)。耐盐等级QTL-*qST4*位于第4号染色体DX-C4-1和DX-S4-16标记之间,LOD值为3.97,表型贡献率最大,为18.48%,该位点为主效位点;*qST4-1*位于第4号染色体DX-C4-12和DX-C4-13标记之间,LOD值为3.36,表型贡献率为13.97%;*qST9*位于第9号染色体DX-C9-5和DX-S9-7标记之间,LOD值为3.02,表型贡献率为9.83%;*qST10*位于第10号染色体DX-C10-7和DX-S10-8-3标记之间,LOD值为2.95,表型贡献率为9.93%。幼苗存活率QTL-*qSSR4*位于第4号染色体DX-C4-12和DX-C4-13标记之间,LOD值为3.92,表型贡献率为9.49%,

该QTL定位区间与耐盐等级QTL-*qST4-1*相同。5个QTL中*qST4-1*、*qSSR4*和*qST10*是本研究新定位的耐盐性QTL。

2.4 BSA分析

通过高通量测序,极端耐盐混池获得58712964个Reads,极端耐盐混池获得88698194个Reads,检测到573944个高质量SNP,欧几里得距离平方值在染色体上的分布如图4,仅在第4号染色体的0~5.0 Mb区间检测到1个超过阈值的QTL,该位点与*qST4*区间重合。

综合QTL连锁分析和BSA方法,均在第4号染色体的0~5.0 Mb区间定位到耐盐等级QTL,说明*qST4*是可靠的耐盐位点。此外,耐盐等级和幼苗存活率两个指标均能定位到第4号染色体标记DX-C4-12~DX-C4-13区间,说明该区间也可能存在1个可靠的耐盐相关QTL位点。

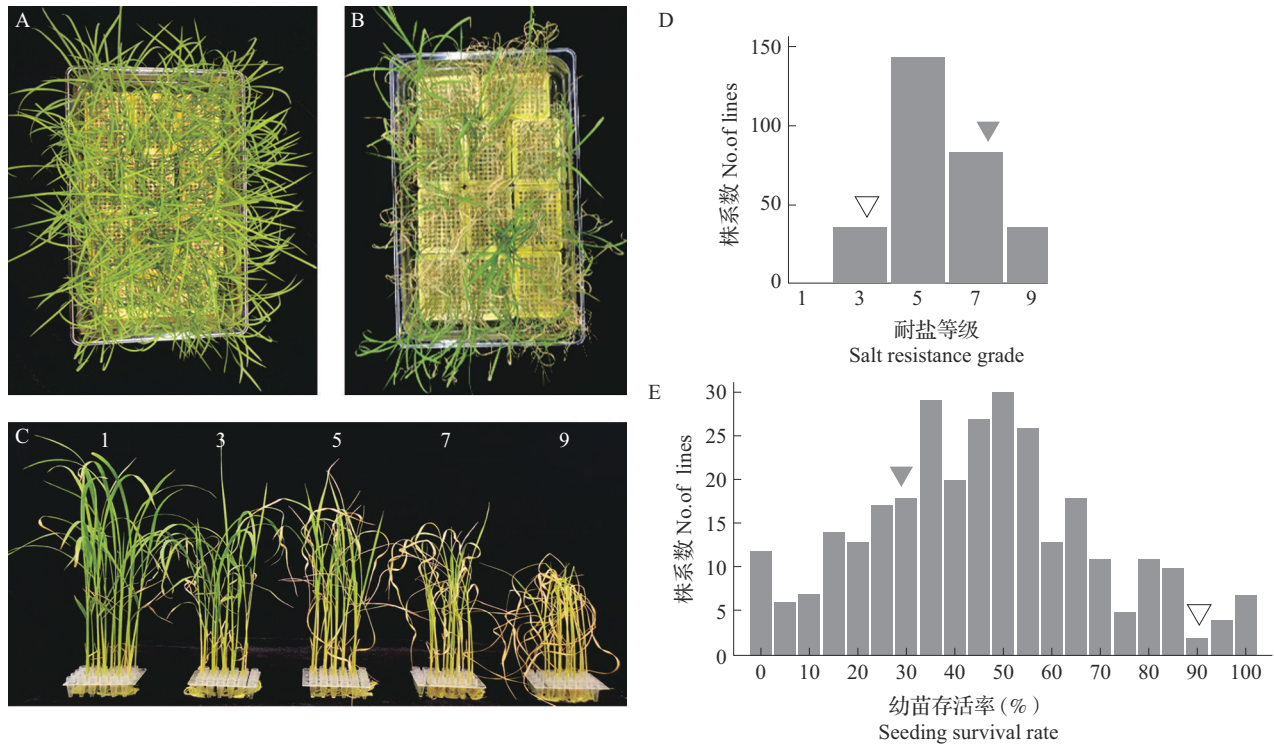


A: 植株的表型; *表示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著

A: Phenotypes of plants ; * indicates significant difference at the $P < 0.05$ level

图1 日本晴、CSSL91和Pokkali苗期耐盐性比较

Fig. 1 Comparison of salt tolerance of Nip, CSSL91 and Pokkali at seedling stage



A和B分别代表无盐处理与盐处理后 $F_{2,3}$ 群体表型; C: 苗期耐盐等级鉴定标准; 黑色和白色三角形分别代表日本晴和CSSL91的耐盐等级与幼苗存活率

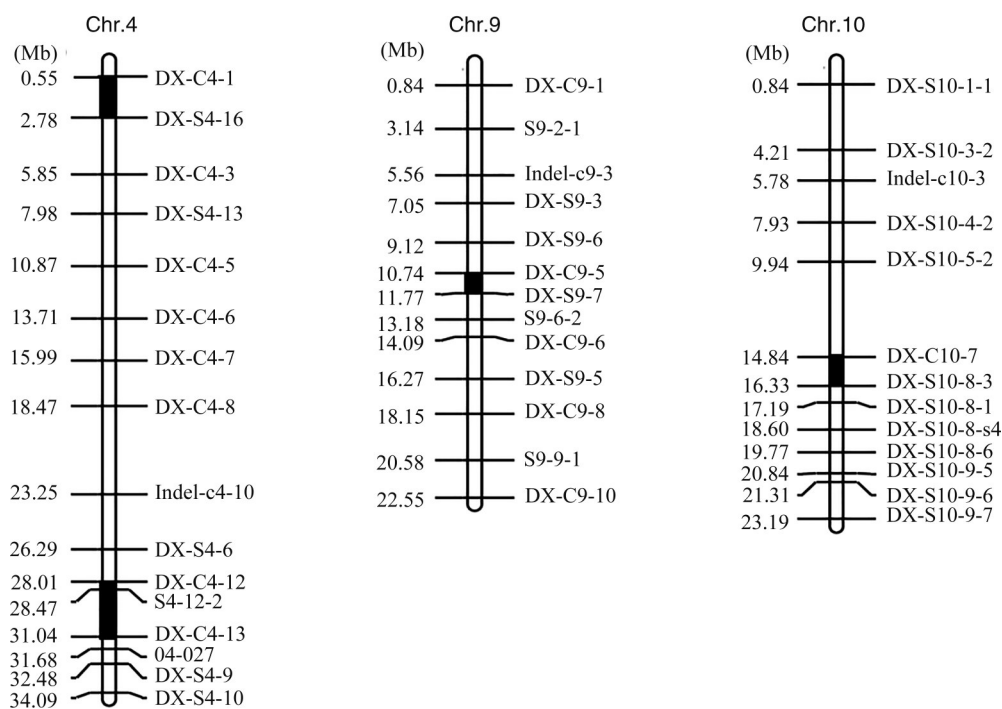
A-B: Represent the phenotypes of $F_{2,3}$ population after salt treatment and salt treatment, respectively; C: The identification standard of salt tolerance grade at seedling stage; Black and white triangles represent salt tolerance grade and seedling survival rate of Nip and CSSL91, respectively

图2 $F_{2,3}$ 群体苗期耐盐性鉴定

Fig. 2 Evaluation of salt tolerance in $F_{2,3}$ population at seedling stage

表2 水稻 $F_{2,3}$ 分离群体苗期耐盐性相关 QTL 检测结果及其遗传效应Table 2 Summary of detection and genetic effects of QTL related salt tolerance at seedling stage in $F_{2,3}$ isolated populations of rice

性状 Character	位点名称 Locus name	染色体 Chromosome	标记区间 Marker interval	LOD 值 LOD value	表型贡献率(%) Phenotypic variation explained	
					Phenotypic variation explained	加性效应 Additive effect
耐盐等级 Salt tolerance grade	<i>qST4</i>	4	DX-C4-1~DX-S4-16	3.97	18.48	0.92
	<i>qST4-1</i>	4	DX-C4-12~DX-C4-13	3.36	13.97	0.77
	<i>qST9</i>	9	DX-C9-5~DX-S9-7	3.02	9.83	0.62
	<i>qST10</i>	10	DX-C10-7~DX-S10-8-3	2.95	9.93	-0.23
幼苗存活率 Seeding survival rate	<i>qSSR4</i>	4	DX-C4-12~DX-C4-13	3.92	9.49	0.04



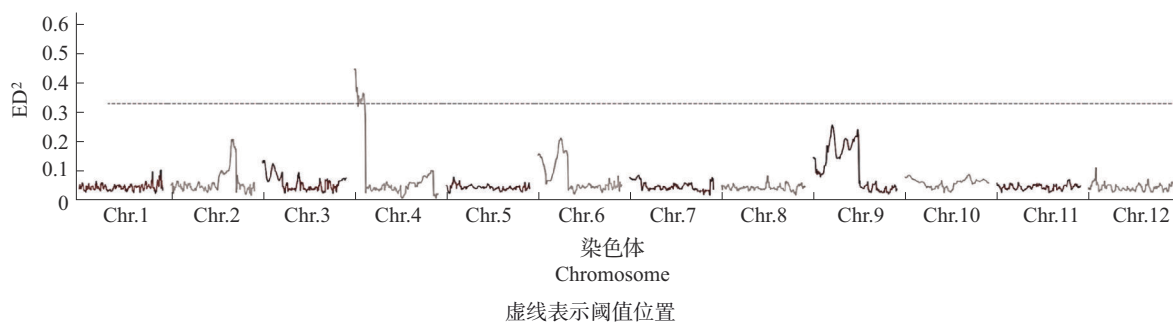
染色体左侧标记的是物理位置,右侧标记的是标记;黑色方块标记的是定位到的QTL

The left side of the chromosome is marked with the physical location, and the right side is marked with the marker;

The thick black square marks the QTL that is located

图3 苗期耐盐相关性状 QTL 在染色体上的分布

Fig.3 Mapping locations of QTLs associated with salt tolerant related traits at seedling stage in rice



The dotted line indicates the threshold position

图4 每个SNP的欧几里得距离平方值在染色体上的分布

Fig.4 The distribution of square values of the Euclidean distance for each SNP on the chromosomes

3 讨论

由于不同育种时期与稻作生态区的育种目标差异,人们在培育新品种过程中,丢失了野生稻中原来的一些优异性状和抗性基因。东乡野生稻具有丰富的遗传性,而且携带耐寒、耐旱、耐贫瘠、广亲和性、野败育性恢复性、胞质雄性不育、抗病虫和高产等相关基因^[28]。因此,利用东乡普通野生稻作为供体资源是找回栽培稻中丢失优异基因的有效途径之一。本实验室前期利用东乡普通野生稻作为供体亲本,栽培稻日本晴为受体亲本,构建了一套东乡普通野生稻染色体片段置换系^[28];本研究的 CSSL91 就是从该套置换系中经过多年室内和大田耐盐性鉴定筛选到的强耐盐材料。

水稻耐盐性是复杂的数量性状,不同生长时期的植株对盐胁迫反应不同,采用的耐盐鉴定指标各异。针对水稻芽期、苗期和分蘖期,已报道了一些耐盐性相关鉴定方法^[6, 13-14, 30-31],这些方法除了考虑遗传因素外,鉴定的环境条件选择也非常重要。在室内水培条件下,盐浓度容易控制,温、湿度等一致性较高,但受营养液限制,分蘖期后将发育不良,该方法多用于水稻芽期和苗期的耐盐性鉴定。室外大田鉴定主要是在盐渍化土壤上,或者通过灌溉一定浓度的海水创制盐胁迫环境,与水稻自然生长环境相似,可以进行大规模鉴定筛选,但不同区域盐浓度一致性相对较差,而且还受鉴定材料的生育期、生态适应性等影响,该方法需要经过多点、多年重复鉴定才能取得较好结果,常用于分蘖期和全生育期等耐盐性鉴定。由于苗期耐盐性鉴定环境条件相对一致,性状考察容易,操作简单,实验周期短,因此水稻苗期耐盐性的研究最多^[32-34]。本研究主要针对 CSSL91 家系和分离群体的苗期耐盐性进行了研究,采用的耐盐指标为耐盐等级和幼苗存活率。

本研究定位的5个苗期耐盐相关 QTL 中,有3个 QTL 是新位点,其余2个位点与已报道耐盐相关位点位置相近。郑洪亮等^[35]以长白10号(耐盐亲本)与东农425(轮回亲本)构建的 BC₂F_{2,3} 群体为材料,在第4号染色体 RM518 标记定位到1个苗期耐盐 QTL-*qRSH4*, LOD 值为3.24,可解释总耐盐表型变异的16.8%;Mohammadi 等^[36]利用 Sadri/FL478 杂交的 F₂ 群体,在第4号染色体 RM551~RM518 标记之间定位到分蘖期耐盐相关位点秸秆干重 QTL-*qSTW4* 和单株产量 QTL-*qGY4*, LOD 值分别为5.1和4.2,表型贡献率分别是9.6%和7.9%;Wang 等^[37]以

韭菜青/IR26 构建的重组自交系群体为材料,在第4号染色体 RM518~RM16535 标记之间定位到芽期耐盐 QTL-*qGP-4-1*, LOD 值为2.6,表型贡献率为9.0%;Gao 等^[38]利用 SR86×日本晴和 SR86×9311 两套定位群体,定位到11个苗期和孕穗期耐盐相关候选基因,其中位于第4号染色体的候选基因 *LOC_Os04g03320* 在 SR86 中的表达量高于日本晴和 9311。上述定位的耐盐性相关 QTL 和候选基因,均在第4号染色体0~5.0 Mb 区间内,与本研究 QTL-*qST4* 位置相当,说明该区间有一个稳定的耐盐性 QTL,值得进一步深入研究。此外,Wang 等^[37]利用韭菜青/IR26 群体还在第9号染色体 RM219~RM7048 标记之间定位到芽期耐盐 QTL-*qGP-9*, LOD 值为26.6,表型贡献率为43.7%,与本研究的耐盐等级位点 QTL-*qST9* 位置相近。而本研究位于第4号染色体的 QTL-*qST4-1*、QTL-*qSSR4* 和位于10号染色体的 QTL-*qST10* 还未见报道,可能是新发现位点。

参考文献

- [1] 杨帆,王志春,马红媛,杨福,田春杰,安丰华.东北苏打盐碱地生态治理关键技术研发与集成示范.生态学报,2016,36(22):7054-7058
Yang F, Wang Z C, Ma H Y, Yang F, Tian C J, An F H. Research and integrated demonstration of ecological amelioration techniques of saline-sodic land in northeast China. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(22): 7054-7058
- [2] 杨真,王宝山.中国盐渍土资源现状及改良利用对策.山东农业科学,2015,47(4):125-130
Yang Z, Wang B S. Present status of saline soil resources and countermeasures for improvement and utilization in China. Shandong Agricultural Sciences, 2015, 47(4): 125-130
- [3] 赵春芳,张善磊,赵庆勇,周丽慧,赵凌,姚姝,张亚东,王才林.基于 CSSL 的水稻芽期耐盐性 QTL 定位.华北农学报,2017,32(5):106-111
Zhao C F, Zhang S L, Zhao Q Y, Zhou L H, Zhao L, Yao S, Zhang Y D, Wang C L. Mapping of QTLs for bud-stage salinity tolerance based on chromosome segment substitution line in rice. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2017, 32(5): 106-111
- [4] Wang Z F, Wang J F, Bao Y M, Wu Y Y, Zhang H S. Quantitative trait loci controlling rice seed germination under salt stress. Euphytica, 2011, 178: 297-307
- [5] Tiwari S, Si K, Kumar V, Singh B, Rao A R, Mithra S A, Rai V, Singh A K, Singh N K. Mapping QTLs for salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) by bulked segregant analysis of recombinant inbred lines using 50K SNP chip. PLoS ONE, 2016, 11(4): e0153610
- [6] Prasad S R, Bagali P G, Hittalmani S, Shashidhar H E. Molecular mapping of quantitative trait loci associated with

- seedling tolerance to salt stress in rice (*Oryza sativa* L.). *Current Science*, 2000, 78: 162-164
- [7] Lin H X. Identification of QTL for salt tolerance in rice via molecular markers. *Chinese Journal of Rice Science*, 1998, 12(2): 72-78
- [8] 林静, 张云辉, 陈海元, 朱晓妹, 张所兵, 汪迎节, 方先文. 水稻地方品种苗期耐盐QTL的定位. *华北农学报*, 2019, 34(S1): 1-5
Lin J, Zhang Y H, Chen H Y, Zhu X M, Zhang S B, Wang Y J, Fang X W. Mapping of salt tolerance QTLs at seedling stage of landrace rice. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2019, 34(S1): 1-5
- [9] Mardani Z, Rabiei B, Sabouri H, Sabouri A. Identification of molecular markers linked to salt-tolerant genes at germination stage of rice. *Plant Breeding*, 2014, 133: 196-202
- [10] Negrão S, Courtois B, Ahmadi N, Abreu I A, Saibo N J, Oliveira M M. Recent updates on salinity stress in rice: From physiological to molecular responses. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2011, 30: 329-377
- [11] 段敏, 谢留杰, 朱亚军, 黄善军, 潘晓飏, 徐建龙. 盐胁迫下水稻幼苗存活率的QTL定位. *中国农业科技导报*, 2019, 21(9): 25-35
Duan M, Xie L J, Zhu Y J, Huang S J, Pan X B, Xu J L. QTL mapping of seedling survival rate under salt stress in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2019, 21(9): 25-35
- [12] 井文, 章文华. 水稻耐盐基因定位与克隆及品种耐盐性分子标记辅助选择改良研究进展. *中国水稻科学*, 2017, 31(2): 111-123
Jing W, Zhang W H. Research progress on gene mapping and cloning for salt tolerance and variety improvement for salt tolerance by molecular marker-assisted selection in rice. *Chinese Journal of Rice Science*, 2017, 31(2): 111-123
- [13] 胡时开, 陶红剑, 钱前, 郭龙彪. 水稻耐盐性的遗传和分子育种的研究进展. *分子植物育种*, 2010, 8(4): 629-640
Hu S K, Tao H J, Qian Q, Guo L B. Progresses on genetics and molecular breeding for salt-tolerance in rice. *Molecular Plant Breeding*, 2010, 8(4): 629-640
- [14] Gong J M, He P, Qian Q, Shen L S, Zhu L H, Chen S Y. Identification of salt-tolerance QTL in rice (*Oryza sativa* L.). *Chinese Science Bulletin*, 1999, 44(1): 68-71
- [15] Takehisa H, Shimodate T, Fukuta Y, Ueda T, Yano M, Yamaya T, Kameya T, Sato T. Identification of quantitative trait loci for plant growth of rice in paddy field flooded with salt water. *Field Crops Research*, 2004, 8: 85-95
- [16] 耿雷跃. 基于连锁和关联分析的水稻耐盐性QTL定位与候选基因发掘. 北京: 中国农业科学院, 2021
Geng L Y. Linkage analysis and GWAS reveal QTL controlling salt tolerance in rice and candidate genes discovery. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021
- [17] Ren Z H, Gao J P, Li L G, Cai X L, Huang W, Chao D Y, Zhu M Z, Wang Z Y, Luan S, Lin H X. A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nature Genetics*, 2005, 37(10): 1141-1146
- [18] Yu J, Zhu C S, Xuan W, An H Z, Tian Y L, Wang B X, Chi W C, Chen G M, Ge Y W, Li J, Dai Z Y, Liu Y, Sun Z G, Xu D Y, Wang C M, Wan J M. Genome-wide association studies identify OsWRKY53 as a key regulator of salt tolerance in rice. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 3550
- [19] Fernando L H. The performance of salt resistant paddy, Pokkali in Ceylon. *Tropical Agriculturist*, 1949, 105: 124-126
- [20] 韩龙植, 魏兴华. 水稻种质资源描述规范和数据标准. 北京: 中国农业出版社, 2006: 15-18
Han L Z, Wei X H. Rice germplasm resource description specifications and data standards. Beijing: China Agriculture Press, 2006: 15-18
- [21] Mccouch S R, Kochert G, Yu Z H, Wang Z Y, Khush G S, Coffman W R, Tanksley S D. Molecular mapping of rice chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics*, 1988, 76(6): 815-29
- [22] 马小定, 唐江红, 张佳妮, 崔迪, 李慧, 黎毛毛, 韩龙植. 东乡野生稻与日本晴多态性标记的开发. *作物学报*, 2019, 45(2): 316-321
Ma X D, Tang J H, Zhang J N, Cui D, Li H, Li M M, Han L Z. Development of molecular markers polymorphic between Dongxiang wild rice and Geng rice cultivar 'Nipponbare'. *Acta Agronomica Sinica*, 2019, 45(2): 316-321
- [23] Meng L, Li H, Zhang L, Wang J. QTL IciMapping: Integrated software for genetic linkage map construction and quantitative trait locus mapping in bi-parental populations. *The Crop Journal*, 2015, 3: 269-283
- [24] 龚继明, 郑先武, 杜保兴, 钱前, 陈受宜, 朱立煌, 何平. 控制水稻重要农艺性状的QTL在盐胁迫与非胁迫条件下的对比研究. *中国科学: C辑*, 2000, 30(6): 561-569
Gong J M, Zheng X W, Du B X, Qian Q, Chen S Y, Zhu L H, He P. Control of important agronomic traits of rice under salt stress comparative studies with non-stressed conditions. *Science in China: Series C*, 2000, 30(6): 561-569
- [25] Mccouch S, Cho Y, Yun M, Paul E, Blinstrub M, Morishima H, Kinoshita H. Report on QTL nomenclature. *Rice Genetics Newsletter*, 1997, 14: 11-13
- [26] 罗兰, 雷丽霞, 刘进, 张瑞华, 金桂秀, 崔迪, 黎毛毛, 马小定, 赵正武, 韩龙植. 利用东乡普通野生稻染色体片段置换系定位产量相关性状QTL. *作物学报*, 2021, 47(7): 1391-1401
Luo L, Lei L X, Liu J, Zhang R H, Jin G X, Cui D, Li M M, Ma X D, Zhao Z W, Han L Z. Mapping QTLs for yield-related traits using chromosome segment substitution lines of Dongxiang common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) and Nipponbare (*Oryza sativa* L.). *Acta Agronomica Sinica*, 2021, 47(7): 1391-1401
- [27] Hill J T, Demarest B L, Bisgrove B W, Gorski B, Su Y C, Yost H J. MMAPPR: Mutation mapping analysis pipeline for pooled RNA-seq. *Genome Research*, 2013, 23(4): 687-697

- [28] 黄依南, 黄国勤. 东乡野生稻的发现、价值与保护. 农业资源与环境学报, 2012, 29: 13-15
Huang Y N, Huang G Q. The discovery, value and protection of Dongxiang wild rice. Journal of Agricultural Resources and Environment, 2012, 29: 13-15
- [29] Ma X D, Han B, Tang J H, Zhang J N, Cui D, Geng L Y, Zhou H Y, Li M M, Han L Z. Construction of chromosome segment substitution lines of Dongxiang common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) in the background of the japonica rice cultivar Nipponbare (*Oryza sativa* L.). Plant Physiology and Biochemistry, 2019, 144: 274-282
- [30] Tiwari S, Si K, Kumar V, Singh B, Rao A R, Mithra S A, Rai V, Singh A K, Singh N K. Mapping of QTL for salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) via molecular markers. China Rice Research, 1997, 5:1-2
- [31] Hossain H, Rahman M A, Alam M S, Singh R K. Mapping of quantitative trait loci associated with reproductive-stage salt tolerance in rice. Agronomy and Crop Science, 2015, 201(1): 17-31
- [32] 孙勇, 藏金萍, 王韵, 朱苓华, Fotokian Mohammadhosein, 徐建龙, 黎志康. 利用回交导入系群体发掘水稻种质资源中的有利耐盐 QTL. 作物学报, 2007, 33(10): 1611-1617
Sun Y, Zang J P, Wang Y, Zhu L H, Fotokian M, Xu J L, Li Z K. Mining favorable salt-tolerant QTL from rice germplasm using a backcrossing introgression line population. Acta Agronomica Sinica, 2007, 33(10): 1611-1617
- [33] 邢军, 常汇琳, 王敬国, 刘化龙, 孙健, 郑洪亮, 赵宏伟, 邹德堂. 盐、碱胁迫条件下粳稻 Na⁺、K⁺浓度的 QTL 分析. 中国农业科学, 2015, 48(3): 604-612
Xing J, Chang H L, Wang J G, Liu H L, Sun J, Zheng H L, Zhao H W, Zou D T. QTL analysis of Na⁺ and K⁺ concentrations in Japonica rice under salt and alkaline stress. Scientia Agricultura Sinica, 2015, 48(3): 604-612
- [34] Liang J L, Qu Y P, Yang C G, Ma X D, Cao G L, Zhao Z W, Zhang S Y, Zhang T, Han L Z. Identification of QTLs associated with salt or alkaline tolerance at the seedling stage in rice under salt or alkaline stress. Euphytica, 2015, 201(3): 441-452
- [35] 郑洪亮, 刘博文, 赵宏伟, 王敬国, 刘化龙, 孙健, 邢军, 邹德堂. 利用连锁和关联分析定位粳稻芽期及幼苗前期耐盐性 QTL. 中国水稻科学, 2014, 28(4): 358-366
Zheng H L, Liu B W, Zhao H W, Wang J G, Liu H L, Sun J, Xing J, Zou D T. Identification of QTLs for salt tolerance at the germination and early seedling stage using linkage and association analysis in japonica rice. Chinese Journal of Rice Science, 2014, 28(4): 358-366
- [36] Mohammadi R, Mendioro M S, Diaz G Q, Gregorio G B, Singh R K. Mapping quantitative trait loci associated with yield and yield components under reproductive stage salinity stress in rice (*Oryza sativa* L.). Journal of Genetics, 2013, 92: 433-443
- [37] Wang Z F, Wang J F, Bao Y M, Wu Y Y, Zhang H S. Quantitative trait loci controlling rice seed germination under salt stress. Euphytica, 2011, 178(3): 297-307
- [38] Gao Q M, Wang H Y, Yin X L, Wang F, Hu S, Liu W H, Chen L B, Dai X J, Liang M Z. Identification of salt tolerance related candidate genes in 'Sea Rice 86' at the seedling and reproductive stages using QTL-Seq and BSA-Seq. Genes, 2023, 14(2): 458