



植物遗传资源学报

Journal of Plant Genetic Resources

ISSN 1672-1810, CN 11-4996/S

《植物遗传资源学报》网络首发论文

题目：水稻核心种质耐盐鉴定与分子标记开发应用
作者：王世壮, 聂亚敏, 黄婧芬, 张巧玲, 郑崇珂, 谢先芝, 王艳艳, 邢梦, 陈文熹, 陈子易, 郑晓明, 王文生, 杨庆文, 乔卫华
收稿日期：2024-06-02
网络首发日期：2024-08-09
引用格式：王世壮, 聂亚敏, 黄婧芬, 张巧玲, 郑崇珂, 谢先芝, 王艳艳, 邢梦, 陈文熹, 陈子易, 郑晓明, 王文生, 杨庆文, 乔卫华. 水稻核心种质耐盐鉴定与分子标记开发应用[J/OL]. 植物遗传资源学报.
<https://link.cnki.net/urlid/11.4996.s.20240808.1603.004>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

水稻核心种质耐盐鉴定与分子标记开发应用

王世壮^{1#}, 聂亚敏^{1#}, 黄婧芬¹, 张巧玲³, 郑崇珂⁴, 谢先芝⁴, 王艳艳^{1,2}, 邢梦^{1,2}, 陈文熹^{1,2},
陈子易¹, 郑晓明¹, 王文生^{1,2}, 杨庆文^{1,2}, 乔卫华^{1,2}

(¹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; ²三亚中国农业科学院国家南繁研究院, 海南三亚 572024; ³济宁市农业科学院, 272007 山东济宁; ⁴山东省水稻研究所, 济南 250100)

摘要: 水稻是盐敏感植物, 土壤盐渍化对于水稻产量影响巨大。发掘并聚合耐盐基因的优异单倍型, 创制耐盐种质, 对于水稻耐盐品种选育及我国盐碱地的高效利用都具有重要意义。本实验首先对水稻 3K 数据库的 236 份核心种质进行苗期及大田耐盐鉴定, 筛选出一份来自澳大利亚的强耐盐种质 '71011', 其在 150mmol/L NaCl 处理条件下存活天数 25.5, 耐盐等级 5.2; 大田盐胁迫浓度为 0.3%~0.5% 条件下耐盐存活率 100%; 利用 236 份核心种质对已报道的、功能清晰的 20 个耐盐基因进行单倍型分析, 筛选出 *AKT1*、*CPK12*、*MYB48*、*P5CS1*、*SIK1*、*SKC1*、*SNAC1*、*HKT1* 共 8 个与耐盐性状相关联的基因单倍型。然后利用耐盐品种 '盐丰 47' 与普通品种 '农垦 57' 作为亲本, 分析序列差异, 表达量验证以及构建重组自交系, 最终开发出 *AKT1*、*MYB48* 以及 *HKT1* 这三个耐盐相关基因的分子标记, 利用分子标记聚合耐盐基因优异单倍型, 创制出强耐盐的新品系。研究结果为水稻耐盐育种创制了可利用的分子标记、耐盐品种资源与创新种质。

关键词: 水稻种质资源; 耐盐鉴定; 单倍型分析; 分子标记

Identification of salt tolerance in rice core germplasm and development and application of molecular markers

WANG Shizhuang¹, NIE Yamin¹, HUANG Jingfen¹, ZHANG Qiaoling³, ZHENG Chongke⁴, XIE Xianzhi⁴, WANG Yanyan^{1,2}, XING Meng^{1,2}, CHEN Wenxi^{1,2}, CHEN Ziyi¹, ZHENG Xiaoming¹, WANG Wensheng^{1,2}, YANG Qingwen^{1,2}, QIAO Weihua^{1,2}

(¹ State Key Laboratory of Crop Gene Resources and Breeding/ Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; ² National Nanfan Research Institute (Sanya), Chinese Academy of Agricultural Sciences, Sanya, Hainan, 572024; ³ Jining Academy of Agricultural Sciences, Jining, Shandong, 272007; ⁴ Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan, Shandong, 250100)

Abstract: Rice is a salt sensitive plant, and soil salinization has a significant impact on rice yield. Therefore, exploring excellent haplotypes of salt tolerant genes and creating excellent salt tolerant germplasm are of great significance for rice breeding. This study firstly identified 236 core germplasm samples from the 3K rice database for salt tolerance investigation during seedling stage and whole growth period in the field. A strong salt tolerant germplasm '71011' from Australia was identified. This germplasm survived for 25.5 days and had a salt tolerance level of 5.2 under 150mmol/L NaCl treatment conditions, 100% survival rate under 0.3%-0.5% salt treatment in the paddy field. Using the 236 core germplasm population, haplotype analysis was conducted on 20 reported salt tolerance genes. A total of 8 genes, including *AKT1*, *CPK12*, *MYB48*, *P5CS1*, *SIK1*, *SKC1*, *SNAC1*, and *HKT1*, was identified that had haplotypes associated with salt tolerance. Then, one salt tolerant rice variety 'Yanfeng 47' and one normal variety 'Nongken 57' were selected as parents for recombinant inbred lines construction. Finally, three molecular markers were designed for elite haplotypes of three genes, *AKT1*, *MYB48*, and *HKT1*. These molecular markers were confirmed by PCR and qRT-PCR. We innovated three high salt tolerance lines by aggregating elite haplotypes of salt tolerant genes by molecular marker assistance breeding. Our results provided available germplasm resources, molecular markers and innovative lines for breeding new salt-tolerant rice varieties.

Keywords: rice germplasm resources; salt tolerance identification; haplotype analysis; molecular markers

收稿日期: 2024-06-02

第一作者: 王世壮, 研究方向为种质资源创新利用研究, E-mail: wangshizhuang2021@163.com; 聂亚敏为共同第一作者

通信作者: 乔卫华, 研究方向为种质资源创新利用研究, E-mail: qiaoweihua@caas.cn

杨庆文, 研究方向为种质资源创新利用研究, E-mail: yangqingwen@caas.cn

王文生, 研究方向为种质资源创新利用研究, E-mail: wangwensheng@caas.cn

基金项目: 国家重点研发项目(2021YFD1200100); 中国农业科学院南繁专项"YYLH2402"

Foundation projects: the National Key R&D Program of China(2021YFD1200100); Nanfan Special Project of Chinese Academy of Agricultural Sciences (YYLH2402)

盐碱地是国家后备的农业耕地资源，具有重要的战略意义。现如今盐渍化影响了全球超过三分之一的灌溉土地^[1]，我国有近 1 亿 hm^2 盐碱地，并且面积还在逐渐扩大^[2]。栽培稻是中度盐敏感的作物，盐胁迫也是水稻生产中最主要的非生物胁迫之一^[3]。水稻在种子萌发期以及苗期对盐胁迫极为敏感，在生殖生长阶段受到盐胁迫则严重影响产量，并造成稻米品质的下降^[4]。我国目前约有五分之一的水稻田已经受到盐渍化的危害^[5]，近年来，耐盐碱水稻已成为盐碱地与滩涂地改良与利用的首选粮食作物，种植耐盐水稻在国内外多地得到了实践^[6]。发掘优异抗性基因，创制综合农艺性状优良且具有强盐碱耐性的水稻新种质是利用盐碱地生产粮食的有效途径。

国内外育种家进行了大量耐盐碱水稻品种的选育和收集，斯里兰卡在 1939 年最早培育出一份耐盐水稻品种 Pokkali，随后，印度、菲律宾、日本等也相继培育出耐盐水稻品种，如 Nona Bokra、Kalarata 1-24、SR 26B、Chin. 13、349 Jhona 等^[7-9]。我国于 20 世纪 50 年代开展水稻耐盐性鉴定研究工作，20 世纪 70 年代江苏省农业科学院等多家单位对国内水稻种质进行耐盐鉴定，先后筛选出长毛谷、韭菜青等耐盐性较强的地方水稻品种^[10]，随着对耐盐水稻品种的重视，我国陆续培育出盐粳 927、辽盐 2 号、盐丰 47、盐稻 21 号等耐盐水稻品种^[11]。此外国内外学者已经鉴定了很多与水稻耐盐相关的基因，同时也发现一些影响其功能的变异位点^[12]。但是大部分基因是利用反向遗传学或者突变体进行功能研究，在水稻育种与生产中难以利用。鉴定出的具有自然变异位点的耐盐基因更是极其有限，其中 *SKCI* 编码一个 HKT 家族的钠离子转运蛋白，耐盐材料 Nona Bokara 携带的 *SKCI* 优异等位基因序列在+418、+551、+994 和+1183 处具有 4 个非同义 SNP，从而导致水稻的耐盐性显著提高^[13]；*OsARF18* 编码一个生长素响应因子，在优异等位基因中+1743、+1830、+1986、+2102 处具有 4 个非同义 SNP，促进水稻耐盐性^[14]。鉴定强耐盐的水稻种质资源，尤其是地方品种资源，确定耐盐基因中具有自然变异的优异单倍型，设计分子标记，聚合优异单倍型创新种质，对于培育耐盐水稻新品种、保障国家粮食安全具有非常重要的意义。本研究对国内外的 200 多份水稻核心种质进行耐盐鉴定，筛选出强耐盐的种质资源；对水稻中已报导的 20 个耐盐基因进行单倍型分析，鉴定优异单倍型，设计案例开发分子标记并在育种中应用。研究结果为水稻育种提供了基础材料，同时为水稻耐盐育种的分子辅助选择提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究材料包括来自水稻 3K 数据库的 236 份水稻核心种质，包括 79 份粳稻、146 份籼稻以及 11 份其他品种材料，来自 33 个国家，其中 160 份来自中国，具体来源信息见附表 1。这些种质包括部分中国微核心种质^[15,16]，代表了世界范围内栽培稻种质资源的遗传多样性。用于开发分子标记的两个亲本材料是国内的耐盐品种盐丰 47、常规粳稻品种农垦 57，以及盐丰 47 与农垦 57 的重组自交系群体。

1.2 水稻耐盐性鉴定与产量性状调查

将待鉴定种子在 50℃烘箱中处理 72 h 打破休眠。随机挑选饱满的种子放入垫有滤纸的培养皿中，去离

子水浸泡，放于 30°C 培养箱中催芽 48 h。待种子发芽后，随机选取健康且生长状态一致的种子（30 粒）移至 96 孔播种板中，使用 Yoshida 水稻营养液培养 4 周左右（两叶一心时期），换为 150 mmol/L NaCl 的 Yoshida 水稻营养液培养 7~15 天，再用正常的 Yoshida 水稻营养液水培恢复 7~15 天。观察表型，拍照并统计存活率；随机选取 5 株测量株高、根长、地上部鲜重、地下部鲜重、地上部干重和地下部干重并取平均值。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》^[17]，具体将耐盐等级分为 9 级，1 级为耐盐性最强，9 级最弱。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的平均值作为统计数据。大田耐盐试验在山东东营耐盐鉴定基地进行鉴定，盐胁迫浓度为 0.3%~0.5%；正常插秧 20 天后调整盐浓度为 0.3%，抽穗前调整盐浓度为 0.5%至完成生育期。水稻单株产量调查利用在三亚基地南繁季生长的材料，每份材料种植 4 行 3 次重复。取中间 2 行 20 株单株测产。

1.3 DNA 提取与 PCR 扩增

采用 DNA 提取试剂盒（TIANGEN）对试验材料进行 DNA 提取。采用 KOD-FX 高保真酶进行 PCR 扩增，PCR 扩增体系为 50 μ L，包括 DNA 2 μ L（50 ng），引物（正向+反向）各 1.5 μ L（10 μ mol/L），Buffer 25 μ L，ddH₂O 10 μ L，dNTP 10 μ L。PCR 扩增程序为 98°C 预变性 5 min；98°C 变性 10 s，58°C 退火 30 s，68°C 延伸 30 s，35 个循环；68°C 延伸 10 min。PCR 反应结束后，取产物于 1.0% 的琼脂糖凝胶 200V 电压下电泳分离。

1.4 RNA 提取与 qRT-PCR 分析

首先，利用 RNA 提取试剂盒（TIANGEN）对试验材料进行 RNA 提取，然后使用 HiScript IV RT SuperMix for qPCR（+gDNA wiper）（Vazyme）反转录试剂将 RNA 反转录为 cDNA，反转录体系分为两步，第一步体系包含 RNase-free ddH₂O 7 μ L，5 \times gDNA wiper Mix 3 μ L，模板 RNA 5 μ L；反应程序为 42°C，2 min；第二步体系包含 4 \times HiScript IV qRT SuperMix 5 μ L，第 1 步的反应液 15 μ L；反应程序：37°C 15 min，85°C 5 s。利用 Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix（Vazyme）进行 qRT-PCR 实验，反应体系为 20 μ L，包括 2 \times Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 10.0 μ L，Forward primer（10 μ mol/L）0.4 μ L，Reverse primer（10 μ mol/L）0.4 μ L，cDNA 4 μ L，ddH₂O 5.2 μ L；反应程序 95°C、15 min、1 个循环；95°C，10 s，60°C，30 s，72°C，30 s，40 个循环；熔解曲线设定默认为 95°C，15 s；60°C，1 min；95°C，30 s；60°C，15 s。数据分析采用 2- $\Delta\Delta$ CT 法，利用 T 检验的方法判断显著性。

1.5 单倍型分析

基于 Rice SNP-Seek Database 网站提供的水稻基因分型数据集 3K RG 1M GWAS SNP Dataset 下载 3024 份水稻的 SNP 数据，根据测序编号利用 plink 软件包从中提取本研究中用到的 236 份材料的 SNP 信息，为保证数据质量和分析结果的准确性，按照样本间 SNP 缺失率小于 0.05、次等位基因频率 MAF \geq 0.05 进行筛选，共获得 338112 个 SNP 标记用于提取材料中耐盐基因编码区的多态性 SNP 位点；利用 Launch DnaSP6

进行单倍型分析。

1.6 分子标记开发

根据单倍型分析以及亲本间基因序列比对的结果，确定优势单倍型携带的特有变异位点，并针对这些位点开发分子标记。本实验开发了 *AKT1*、*MYB48*、*HKT1* 这 3 个基因的分子标记。首先根据存在的 SNP 位点，利用 Primer Premier 3 软件设计引物，开发扩增片段在 100~300 bp 的 SNP 分子标记。在 KASP 分子标记开发中，根据目的 SNP 位点上下游各 100 bp 的 DNA 序列，利用网站 <https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/> 设计 3 条分子标记引物，包括一条反向通用引物，两条正向特异性引物，正向引物 3'端为 SNP 位点，5'端加上 2 种检测探针序列，扩增产物长度一般为 70~150 bp。

1.7 分子标记分析

对于 KASP 分子标记，反应条件为：预变性阶段 95°C 反应 15 min；循环阶段 95°C 变性 10 s；65°C~55°C 退火延伸 60 s(每个循环降低 1°C，10 个循环后退火延伸温度保持在 55°C)；95°C，10 s，57°C，60 s（30 个循环）；然后对 PCR 产物进行荧光值检测(PHERAstar PLUS 酶标仪)，并根据荧光检测结果判断基因型。

对于 SNP 分子标记，PCR 反应为采用 KOD-FX 高保真酶进行 PCR 扩增，PCR 扩增体系为 50 μ L，包括 DNA 2 μ L（50 ng），引物（正向+反向）各 1.5 μ L（10 μ mol/L），Buffer 25 μ L，ddH₂O 10 μ L，dNTP 10 μ L。PCR 扩增程序为 98°C 预变性 5 min；98°C 变性 10 s，58°C 退火 30 s，68°C 延伸 30 s，35 个循环；68°C 延伸 10 min。PCR 产物利用 1.0% 的琼脂糖凝胶 200V 电压下电泳分离，观察并记录每个样品的带型。

2 结果与分析

2.1 水稻核心种质耐盐鉴定

水稻核心种质群体苗期与大田耐盐性鉴定统计结果如表 1 所示。群体耐盐性存在较大的变异幅度，其中苗期存活率变异系数最大为 45.36%。筛选出一份来自澳大利亚的籼稻种质 71011，苗期存活率 100%，苗期存活天数 25.5，苗期耐盐等级 5.2，大田耐盐存活率 100%，均为群体材料中的最高值。可作为强耐盐种质应用于我国水稻育种。此外，综合评价苗期耐盐指标，以及大田耐盐存活率，筛选出强耐盐的种质 5 份和盐敏感种质 5 份，详细信息列于表 2。同时，我们将 236 份水稻种质做了耐盐综合评估并排序，前 20 名定义为耐盐种质，后 20 名定义为盐敏感种质，用于以下研究。

表 1 236 份水稻核心种质的耐盐表型统计

Table 1 Statistics for salt tolerance related traits of 236 rice core germplasm resources in seedling stage and paddy conditions.

指标	均值	标准差	范围	变异系数 (%)	峰度	偏度
Traits	Mean	SD	Range	CV	Kurtosis	Skewness
苗期-存活天数	15.97	3.68	9.60-25.49	23.07	-0.39	0.56
Survival days						
苗期-耐盐等级	7.17	1.07	4.60-9.00	14.9	-0.87	-0.03
Salt-tolerant Grade						
苗期-存活率	0.66	0.3	0.00-1.00	45.36	-0.89	-0.55
Survival rate						

大田-存活率	0.81	0.2	0.00-1.00	24.52	3.85	-1.85
Field survival rate						

表 2 236 份水稻核心种质中筛选出的耐盐种质和盐敏感种质的耐盐表型统计

Table 2 The phenotypes of selected salt-tolerance and salt-sensitive germplasm from 236 rice core germplasms

田间编号 Field number	品种名 Name	地区 Origin	分组 Group	苗期-存活天 数 Seedling survival days	苗期-耐盐等级 Seedling salt-tolerant grade	苗期-存活率 Seedling survival rate	大田-存活率 Field survival rate	大田-耐盐等 级 Field salt-tolerant grade
2049	71011	澳大利亚 Australia	XI-1A	25.50	5.20	1.00	1.00	3.40
2141	加巴拉 Jiabala	孟加拉 Bangladesh	XI-1A	22.15	5.40	1.00	0.81	4.20
2172	湘晚籼 3 号 Xiangwanxian 3	中国 China	XI-ad m	24.90	5.60	1.00	1.00	5.00
2173	镇籼 232 Zhendao 232	中国 China	XI-1A	25.10	4.60	1.00	0.87	4.20
2213	献改 B Xiangai B	中国 China	XI-ad m	24.40	6.10	1.00	0.93	5.00
2057	CHANH 148	越南 Viet Nam	XI-ad m	10.10	9.00	0.028	0.86	8.20
2093	秕五升 Biwusheng	中国 China	XI-ad m	9.80	9.00	0.02	0.07	3.20
2091	光亮香糯 Guangkexiang nuo	中国 China	GJ-tmp	9.60	9.00	0.01	0.80	3.80
2107	一支香 Yizhixiang	中国 China	GJ-tmp	9.60	9.00	0.01	0.85	4.00
2028	高丽秋 Gaoliqiu	朝鲜 DPRK	GJ-tmp	10.40	9.00	0.00	0.35	6.80

2.2 水稻耐盐基因单倍型分析

通过国家水稻数据库 (<http://www.ricedata.cn/gene/>) 查询, 目前发掘到的水稻耐盐相关基因共约 300 个, 分布于 12 条染色体上。选取已有相关文献报导、耐盐功能以及耐盐调控机理清晰的 20 个基因 (附表 2), 作为下一步研究的目标。从 3K 数据库中提取 236 份核心种质中 20 个基因的基因组序列, 包括编码区序列、启动子区序列 (2-kb 5'UTR)、1-kb 3'UTR。随后我们进行了每个基因的序列比对和单倍型分析, 与耐盐相关联的单倍型命名为 Hap-A, 盐敏感相关联的单倍型命名为 Hap-B。其中, *AKT1*^[18]、*CPK12*^[19]、*MYB48*^[20]、*P5CS1*^[21]、*SIK1*^[22]、*SKC1*^[23]、*SNAC1*^[24]、*HKT1*^[25], 这 8 个基因存在与耐盐性状相关联的单倍型, 其他基因未找到与耐盐相关联的单倍型。这 8 个基因单倍型在 236 份种质中的分布如图 1 所示。

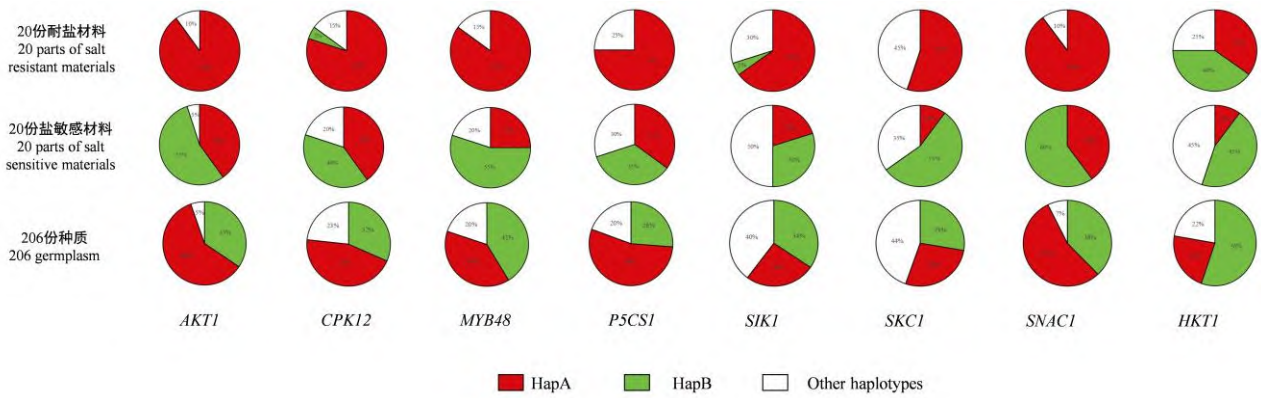
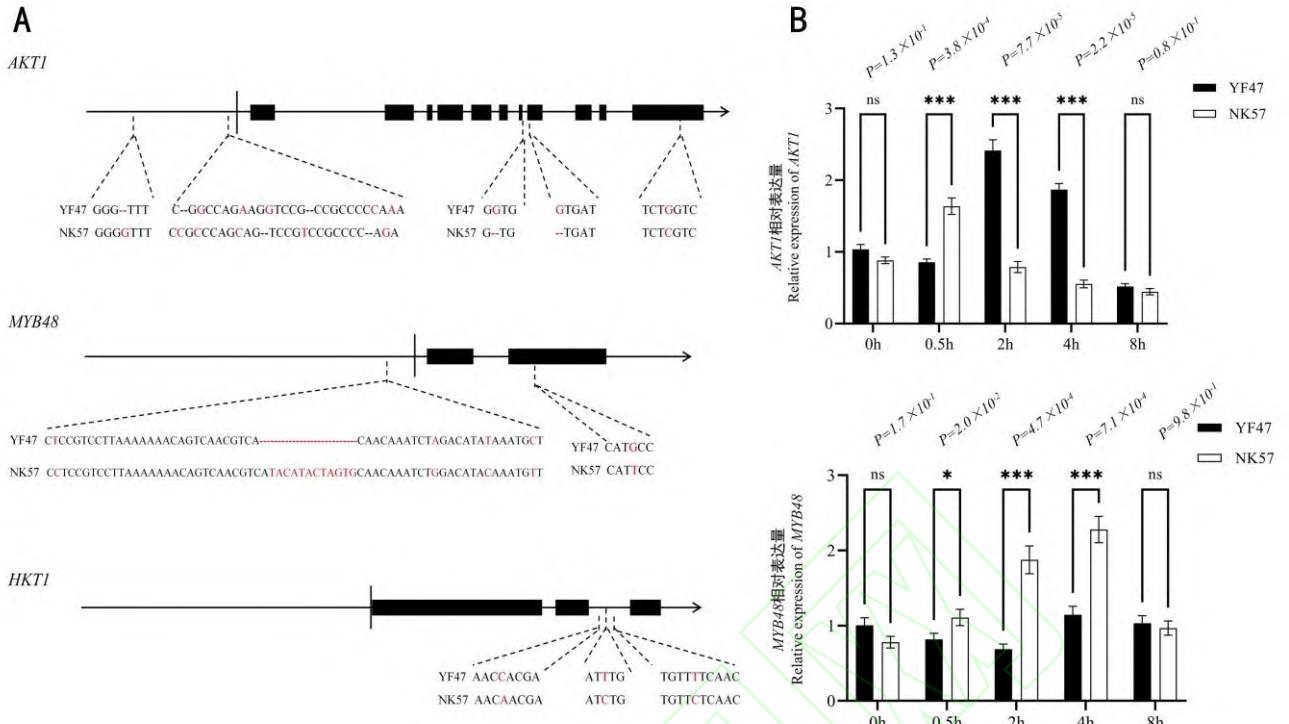


图 1 8 个耐盐基因在 236 份核心种质群体中的单倍型分布

Fig.1 Distribution of haplotypes of eight genes in 236 rice core germplasm

2.3 耐盐基因分子标记开发

选择强耐盐水稻品种盐丰 47 (YF47)，普通品种农垦 57 (NK57) 作为两个亲本。测序鉴定上述 20 个耐盐相关基因在两亲本间的序列差异位点。结果表明，在此两份育成品种中，*AKT1*、*HKT1*、*MYB48*、*ONAC022*^[26]、*HAK5*^[27]、*CPK12*、*NHX1*^[28] 这 7 个基因存在可能影响其功能的变异位点。其中，*AKT1* 在启动子区存在多个 InDel，*MYB48* 在启动子区域存在一个 12 bp 的 InDel，*HKT1* 在编码区存在 3 个非同义突变的 SNP (图 2A)，*CPK12* 在编码区只存在 1 个 SNP 位点的非同义突变。为了验证 *AKT1*、*MYB48* 这两个基因启动子区的变异是否对基因表达量产生影响，对盐处理下的两个亲本材料进行 *AKT1*、*MYB48* 基因的表达量分析。结果显示，盐胁迫处理前，两个基因的表达量在 YF47 与 NK57 中均没有显著差异，处理 2~4 小时后，*AKT1* 在 YF47 中的表达量显著高于 NK57。而 *MYB48* 则相反，盐处理后在 NK57 中的表达量显著高于 YF47 (图 2B)。鉴于 *AKT1* 与 *MYB48* 都是正调控耐盐的基因，我们将高表达量的基因型定义为耐盐基因型，即 *AKT1* 的 YF47 基因型定义为耐盐基因型，*MYB48* 的 NK57 基因型定义为耐盐基因型，*HKT1* 的 YF47 基因型为耐盐基因型。



A: *AKT1*、*MYB48* 和 *HKT1* 在两亲本间的变异位点分布图；B: *AKT1* 和 *MYB48* 在两亲本间的表达量模式图，20 天幼苗分别在 150mmol/L NaCl 处理 0, 0.5, 2, 4, 8 小时后，取叶片提取 RNA。YF47, 盐丰 47; NK57, 农垦 57。ns: 无显著差异; *: 在 $P < 0.05$ 水平差异显著; ***: 在 $P < 0.001$ 水平差异极显著。数据比较采用双尾 t 检验

A: Variations of *AKT1*, *MYB48* and *HKT1* between two parents. B: Expression patterns of *AKT1* and *MYB48* in two parents under salt treatments. 20-days seedlings were treated with 150mmol/L NaCl, RNA was extracted after treatments 0, 0.5, 2, 4, 8 hours respectively. ns: no significant difference; *: Significant difference at $P < 0.05$ level; ***: Extremely significant difference at the $P < 0.01$ level. Data comparisons are made by two-tailed Student's t-test

图 2 三个基因序列在两亲本间的变异位点及表达量分析图

Fig.2 Variations and expression patterns of three genes in two parents

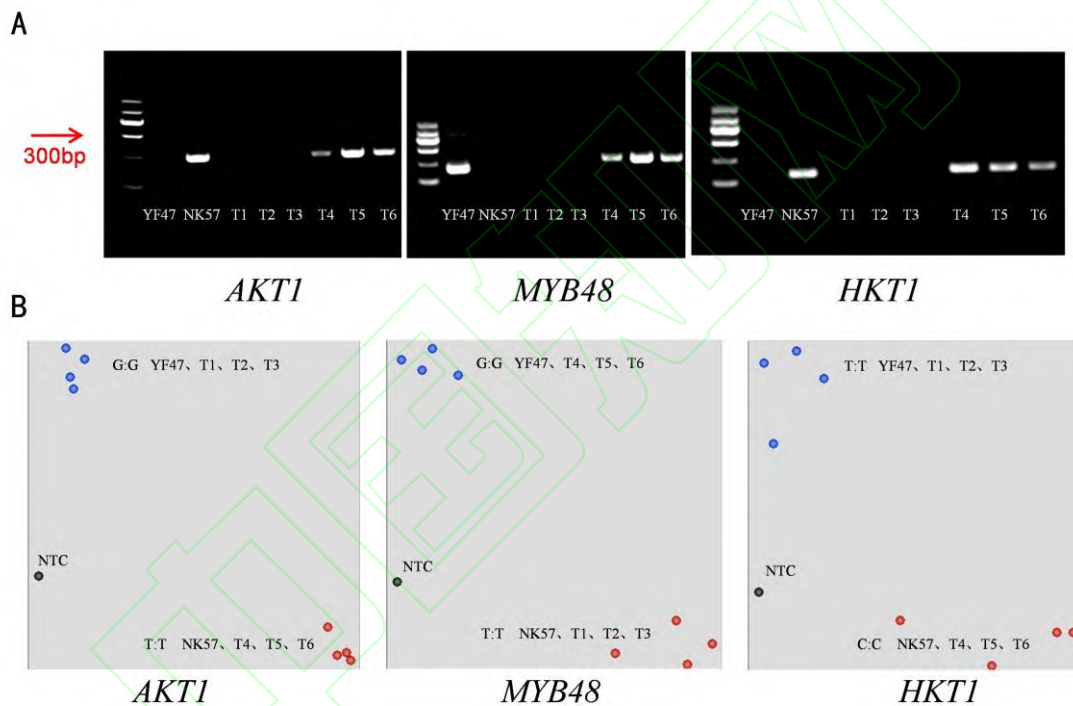
根据在核心种质中鉴定的存在优异单倍型的基因，以及YF47、NK57两亲本之间的基因型差异。最终筛选了*AKT1*、*MYB48*、*HKT1*这三个基因开发SNP分子标记和KASP分子标记。根据SNP位点或InDel位点设计引物（表3），*HKT1*、*AKT1*这两个基因的SNP分子标记引物在NK57中分别扩增出278 bp、238 bp的条带，而YF47中不能扩增出条带。*MYB48*分子标记引物在YF47中扩增出253 bp条带，而在NK57中不能扩增出条带。琼脂糖凝胶电泳结果表明，3个分子标记多态性良好，均可以用于区分双亲基因位点的基因型（图3A）；KASP分子标记中，两亲本间均呈现差异分型结果（图3B）。

表3 分子标记引物序列信息

Table 3 Information of molecular markers developed in this study

引物名称	引物序列
Primer name	Primer sequence
AKT1-S-F1	CCGATTCGTCGCCGCCAGC
AKT1-S-R1	CACAAGGCCACAAATCTGG
MYB48-S-F1	TCAACGTCACAACAAATCTA
MYB48-S-R1	AGCAAGTATCAAGGTTAGTA

HKT1-S-F1	CAAGTAGTAAGATCCACATC
HKT1-S-R1	CGGCTTGTCTGGCAGATGC
AKT1-FAM1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCTAAATATGATAACTTGAATTCTGCAGG
AKT1-HEX1	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCTAAATATGATAACTTGAATTCTGCAGT
AKT1-COM1	TGTTCGAACTGTGAATAGCTGAGG
MYB48-FAM1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCATCGCCCAAGAGCATG
MYB48-HEX1	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGCATCGCCCAAGAGCATT
MYB48-COM1	GCCAGTAGTCTTGATCTCGTTGTC
HKT1-FAM1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCAAGCCAAGTAGTAAGATCCACATT
HKT1-HEX1	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGCAAGCCAAGTAGTAAGATCCACATC
HKT1-COM1	TGTCTTCTGAAAGATTCTGAGGTGTC



A: SNP 分子标记引物扩增两亲本、6 个重组自交系后的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图；T1-T6 为盐丰 47 (YF47) /农垦 57 (NK57) 重组自交系；B: 利用 KASP 标记对两亲本和重组自交系后代进行 3 个等位基因分型，图中每个圆点代表一个样品；蓝色圆点表示该基因携带 HEX 标签序列，红色表示该基因携带 FAM 标签序列，黑色圆点为空白对照

A: T1-T6 is a recombinant inbred line of YF47/NK57; B: The blue dots indicate that the gene carries a HEX tag sequence; Red indicates that the gene carries the FAM tag sequence; Black dots are blank controls

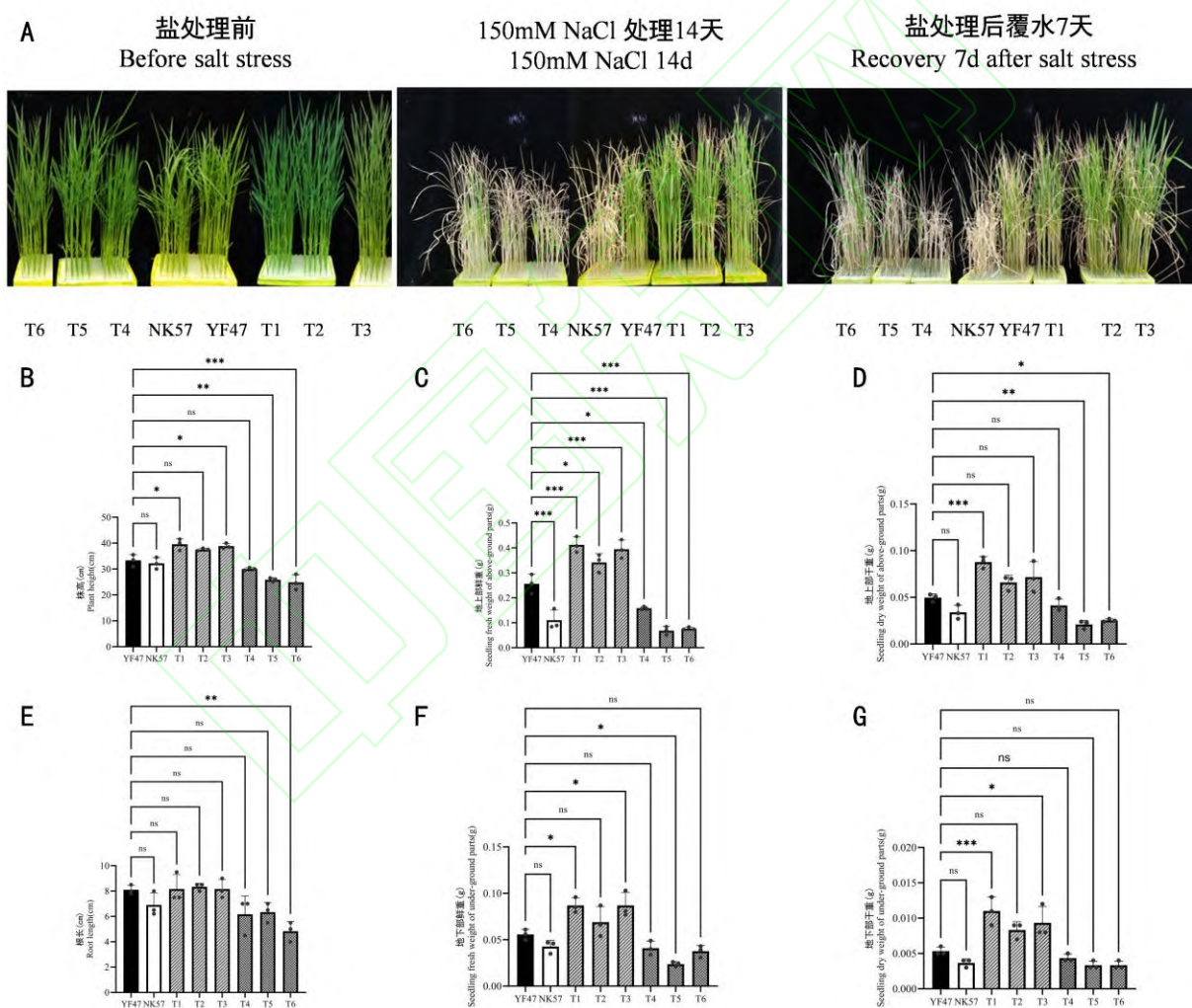
图 3 *AKT1*、*MYB48* 和 *HKT1* 分子标记开发验证

Fig.3 Development and validation of molecular markers of *AKT1*, *MYB48* and *HKT1*

2.4 耐盐分子标记应用及耐盐新种质创制

构建 YF47/NK57 重组自交系至 F6 代，对 30 份重组自交系进行 SNP 分子标记鉴定，如图 3A 所示，T1、T2、T3 中 *AKT1* 为 YF47 基因位点，*MYB48* 为 NK57 基因位点，*HKT1* 为 YF47 基因位点，均为耐盐基因型。T4、T5、T6 株系中，3 个基因全部为非耐盐基因型（图 3A）；在 KASP 分子标记基因分型验证中，基因 *AKT1* 中 YF47、T1、T2、T3 为一种分型，NK57、T4、T5、T6 为另一种分型；基因 *MYB48* 中 NK57、T1、

T2、T3 为一种分型，YF47、T4、T5、T6 为另一种分型；基因 *HKT1* 中 YF47、T1、T2、T3 为一种分型，NK57、T4、T5、T6 为另一种分型，结果与 SNP 分子标记鉴定结果相一致（图 3B）。随后，对 6 个株系进行了苗期耐盐鉴定，如图 4 所示，T1-T3 与 T4-T6 耐盐性差异极显著，T1-T3 表现出了比耐盐亲本 YF47 更强的耐盐性，苗期盐处理后的存活率、株高、根长、地上部鲜重与干重、地下部的鲜重与干重，都高于耐盐亲本 YF47。与之相反的是，T4、T5、T6 这 3 个株系耐盐能力显著下降，各种耐盐指标均低于 YF47，部分指标低于 NK57。同时，将上述 T1-T6 株系盐处理后，检测了 *AKT1*、*MYB48* 基因的表达量，qPCR 结果显示，在耐盐株系 T1、T2 和 T3 中，*AKT1* 基因表达模式与 YF47 趋于一致，而 *MYB48* 基因表达模式与 NK57 趋于一致（图 5A）。在正常栽培条件下对 T1-T3 耐盐株系进行产量测试，三个株系除 T1 株系外，其他株系的单株产量与高产亲本 YF47 相比，并未有显著的变化（图 5B）。



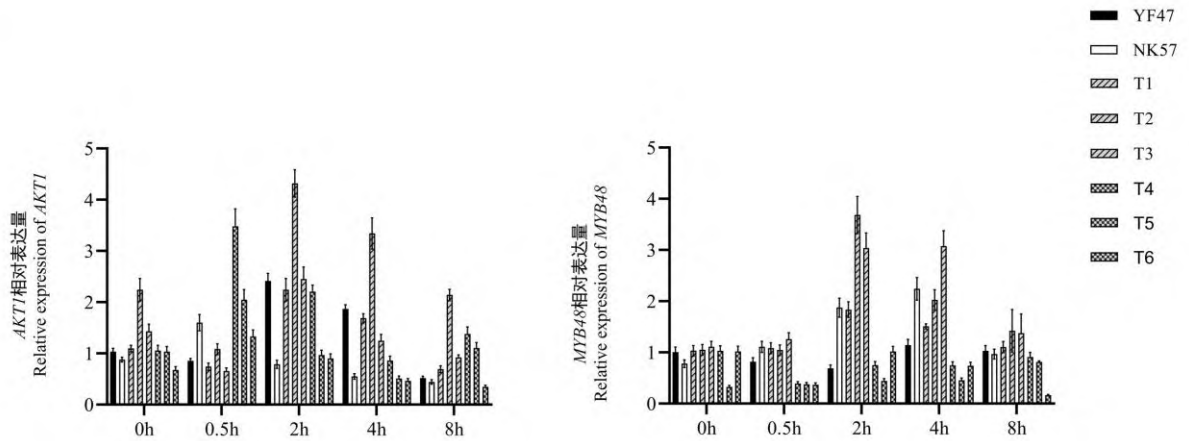
A: YF47、NK57 及 6 个株系耐盐表型图; B-G: YF47、NK57 及 6 个株系盐处理 14 天，覆水 7 天后耐盐相关表型调查。B: 株高; C: 地上部鲜重; D: 地上部干重; E: 根长; F: 地下部鲜重; G: 地下部干重柱形图; T1-T6 为盐丰 47 (YF47)/农垦 57 (NK57) 重组自交系

A: Salt tolerance phenotypes of YF47, NK57, and 6 strains; B-G: YF47, NK57, and 6 strains were treated with salt for 14 days; B: Plant height after 7 days of covering with water; C: Fresh weight of aboveground parts; D: Dry weight of aboveground parts; E: Root length; F: Fresh weight underground; G: Underground dry weight bar chart; T1-T6 is a recombinant inbred line of YF47/NK57.

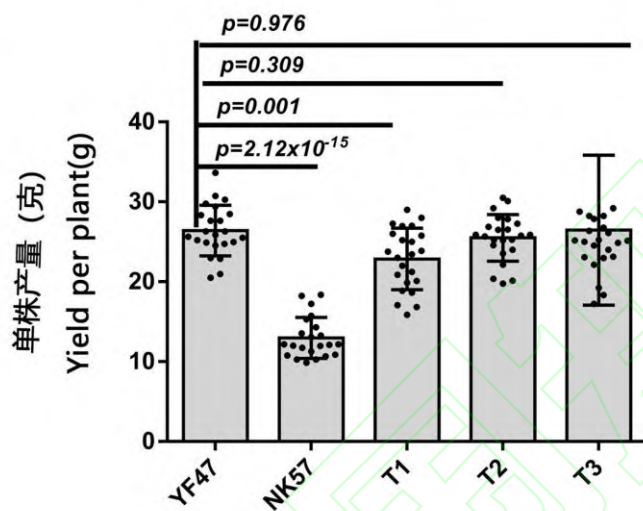
图 4 盐丰 47 与农垦 57 重组自交系耐盐表型鉴定

Fig.4 Salt tolerance identification of six recombinant inbred lines from YanFeng47 and NongKen57

A



B



A: *AKT1* 和 *MYB48* 基因在两亲本和 6 个重组自交系中的表达模式，20 天幼苗 150 mmol/L NaCl 分别处理 0, 0.5, 2, 4, 8 小时后，去叶片提取 RNA； B: 盐丰 47 与农垦 57，以及三个耐盐株系 T1-T3 在田间的单株产量统计，样本数>20 株，各株系单株产量与高产亲本盐丰 47 比较的 p 值列于上方
 A: The expression patterns of *AKT1* and *MYB48* genes in two parents and six recombinant inbred lines were observed. After 20 days of treatment with 150 mmol/L NaCl at 0, 0.5, 2, 4, and 8 hours, RNA was extracted from the leaves of the seedlings; B: The yield statistics of Yanfeng 47 and Nongken 57, as well as three salt tolerant plant lines T1-T3 in the field, showed a sample size of more than 20 plants. The p-values of the yield comparison between each plant line and its high-yielding parent Yanfeng 47 are listed above

图 5 *AKT1* 和 *MYB48* 在 6 个重组自交系中的表达量模式图，以及耐盐株系 T1-T3 田间单株产量统计

Fig.5 The expression patterns of *AKT1* and *MYB48* in 6 recombinant inbred lines, as well as the yield statistics of salt tolerant T1-T3 plants in the field

3 讨论

随着我国的盐渍化土地的不断增多，培育耐盐碱水稻新品种越发显得尤为重要。目前，国内外创制的耐盐水稻材料很多，但生产中的绝大多数品种耐盐性并不高^[29]。其原因就在于抗逆性状往往与产量以及高品质性状权衡关联，强耐盐品种的其他产量性状并不突出。而大面积推广的育成品种中，强耐盐的品种并不多，难以满足高盐碱地块的种植需求。优异的地方品种资源是水稻耐盐遗传改良的基础^[30, 31]。在本实验中，对来全球的 236 份水稻核心种质进行了耐盐鉴定，包括在 0.3%~0.5% 盐胁迫下的大田全生育期耐盐鉴

定。筛选出了一批综合耐盐能力强的种质，这些种质既有中国的地方品种，也有来自国外的品种。尤其是一份来自澳大利亚的强耐盐种质，耐盐表型稳定且突出。本实验鉴定的水稻种质为我国水稻耐盐育种提供了利用的材料。同时，我们筛选了耐盐机制研究清楚的 20 个基因，在 236 份核心种质中进行单倍型分析，通过与耐盐鉴定结果关联，发现其中有 8 个基因可能存在优异单倍型。这些基因的优异单倍型为聚合耐盐基因提供了基本的数据信息，虽然其耐盐功能仍需要进一步的验证。

本研究选择了两个亲本品种，对耐盐基因优异单倍型进行验证并开发分子标记。盐丰 47 是水稻生产中推广面积较大的耐盐品种^[32]。农垦 57 为上个世纪六、七十年代育成的老品种，在现在水稻生产中已经基本上淘汰，该品种对盐胁迫敏感，产量偏低，然而具有高品质、抗病等优良特征^[33]。通过比较以上 20 个基因在两品种之间的序列差异，有 7 个基因存在可能影响功能的变异位点，与以上在核心种质群体中鉴定的可能存在优异单倍型的 8 个基因，有 4 个基因重合，既 *AKT1*、*HKT1*、*MYB48*、和 *CPK12*，而 *CPK12* 只存在一个 SNP 的变异，因此选择了 *AKT1*、*HKT1*、*MYB48* 这三个基因开发分子标记。据报道，*AKT1* 是一种 shaker 家族钾离子通道蛋白，过表达 *AKT1* 会通过增加组织中特别是根中的 K^+ 水平，提高水稻对盐胁迫的耐受性^[34]。*HKT1* 编码一个高亲和 Na^+ 转运蛋白，正向调控水稻耐盐^[25]。*MYB48* 是一个 MYB 转录因子，通过调节胁迫诱导的 ABA 合成，在水稻耐旱性和耐盐性上起着重要作用^[20]。*AKT1* 与 *MYB48* 均是在启动子区存在变异位点，且显著影响其在盐胁迫下的表达量。有意思的是，*MYB48* 在农垦 57 中的表达量显著高于盐丰 47，已有很多的研究报道 *MYB48* 是正调控水稻耐盐的转录因子^[20]，这个结果说明，即使在农垦 57 这样耐盐能力并不强的老品种里，也可能存在耐盐基因的优异基因型。随后我们构建的重组自交系证实了这一点：在三个强耐盐株系中，这三个基因的基因型趋于一致，而三个盐敏感株系中这三个基因的基因型也是趋于一致。这些结果表明本研究开发的分子标记，可用于耐盐育种中分子标记辅助选择。

聚合了 *AKT1*、*HKT1*、*MYB48* 三个基因优异基因型的三个株系，其耐盐程度高于盐丰 47。且单株产量性状并未受到影响。下一步将进一步进行盐胁迫下的大田产量试验，以及测定三个株系的稻米品质等性状，这三个株系作为创新种质，既可以作为育种改良的中间材料，也可以作为耐盐的新品系在生产中推广应用。

4 结论

本实验通过对国内外的 236 份水稻核心种质进行苗期、大田耐盐鉴定，筛选出一批耐盐种质，包括一份强耐盐的来自澳大利亚的水稻新种质。通过筛选已报道耐盐基因的优异单倍型，开发了 *AKT1*、*HKT1*、*MYB48* 这三个基因的分子标记，并利用耐盐品种盐丰 47 与常规品种农垦 57 组合，聚合耐盐基因的优异基因型，创制了三个强耐盐的新品系。本研究水稻耐盐育种提供了可利用的品种资源、分子标记以及创新种质。

参考文献

- [1] Zhao C, Zhang H, Song C, Zhu J K, Shabala S. Mechanisms of plant responses and adaptation to soil salinity. *Innovation (Camb)*, 2020,1(1):100017
- [2] 杨佳佳, 姜琦刚, 赵静, 吴阳春. 基于环境减灾卫星高光谱数据的盐碱地等级划分. *农业工程学报*, 2011,27(10):118-124
- Yang J J, Jiang Q G, Zhao J, Wu Y C. Quantitative retrieval and classification of saline soil using HJ-1A hyperspectral data. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2011,27(10):118-124
- [3] Qin H, Li Y, Huang R. Advances and challenges in the breeding of salt-tolerant rice. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020,21(21):8385
- [4] Machado R, Serralheiro R. Soil salinity: effect on vegetable crop growth. Management practices to prevent and mitigate soil salinization. *Horticulturae*, 2017,3(2):30
- [5] 徐培智, 戴文举, 黄旭, 林碧珊, 曾招兵, 张桥, 解开治. 广东省滨海盐土特征及改良策略. *广东农业科学*, 2023,50(2):87-94
- Xu P Z, Dai W J, Huang X, Lin B S, Zeng Z B, Zhang Q, Xie K Z. Characteristics of seashore saline soils in guangdong province and improvement strategies. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2023,50(2):87-94
- [6] Pardo J M. Biotechnology of water and salinity stress tolerance. *Current Opinion in Biotechnology*, 2010,21(2):185-196
- [7] 马国辉, 郑殿峰, 母德伟, 王奉斌, 戴其根, 魏中伟, 冯乃杰, 王才林. 耐盐碱水稻研究进展与展望. *杂交水稻*, 2023:1-10
- Ma G H, Zheng D F, Mu D W, Wang F B, Dai Q G, Wei Z W, Feng N J, Wang C L. Research progress and prospect of salinealkali tolerant rice. *Hybrid Rice*, 2023:1-10
- [8] Fageria N K. Salt tolerance of rice cultivars. *Plant Soil*, 1985, 88(2):237-243
- [9] 巫明明, 曾维, 翟荣荣, 叶靖, 朱国富, 俞法明, 张小明, 叶胜海. 水稻耐盐分子机制与育种研究进展. *中国水稻科学*, 2022, 36(6):551-561.
- Wu M M, Zeng W, Zhai R R, Ye J, Zhu G F, Yu F M, Zhang X M, Ye S H. Research progress in molecular mechanism and breeding status of salt tolerance in rice. *Chinese Journal of Rice Science*, 2022, 36(6):551-561
- [10] 王才林, 张亚东, 赵凌, 路凯, 朱镇, 陈涛, 赵庆勇, 姚姝, 周丽慧, 赵春芳, 梁文化, 孙明法, 严国红. 耐盐碱水稻研究现状、问题与建议. *中国稻米*, 2019, 25(1):1-6
- Wang C L, Zhang Y D, Zhao L, Lu K, Zhu Z, Chen T, Zhao Q Y, Yao S, Zhou L H, Zhao C F, Liang W H, Sun M F, Yan G H. Research status, problems and suggestions on saltalkali tolerant rice. *China Rice*, 2019, 25(1):1-6
- [11] 陈思蓉, 李晨, 孙炳蕊. 水稻耐盐分子机制研究进展. *广东农业科学*, 2023,50(12):29-42
- Chen S R, Li C, Sun B R. Research progress on molecular mechanism of salt tolerance in rice. *guangdong agricultural sciences*, 2023,50(12):29-42
- [12] Xiao F, Zhou H. Plant salt response: Perception, signaling, and tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 2022,13:1053699
- [13] 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, 10;37(10):1141-1146
- [14] Deng P, Jing W, Cao C, Sun M, Chi W, Zhao S, Dai J, Shi X, Wu Q, Zhang B, Jin Z, Guo C, Tian Q, Shen L, Yu J, Jiang L, Wang C, Chin J H, Yuan J, Zhang Q, Zhang W. Transcriptional repressor RST1 controls salt tolerance and grain yield in rice by regulating gene expression of asparagine synthetase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2022, 13 12;119(50):e2210338119
- [15] Zhang H L, Zhang D L, Wang M X, Sun J L, Qi Y W, Li J J, Wei X H, Han L Z, Qiu Z G, Tang S X, Li Z C. A core collection and mini core collection of *Oryza sativa* L. in China. *Theoretical and Applied Genetics*, 2011, 122: 49-61
- [16] Wang W, Mauleon R, Hu Z, Chebotarov D, Tai S, Wu Z, Li M. et al. Genomic variation in 3,010 diverse accessions of Asian cultivated rice. *Nature*, 2018, 557:43-48
- [17] Shen Y, Shen L, Shen Z, Jing W, Ge H, Zhao J, Zhang W. The potassium transporter OsHAK21 functions in the maintenance of ion homeostasis and tolerance to salt stress in rice. *Plant, cell & environment*, 2015, 38 12: 2766-2779

- [18] 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
- Han L Z, Wei X H. Rice germplasm resource description specifications and data standards. Beijing: ChinaAgriculture Press, 2006: 15-18
- [19] Ahmad I, Mian A, Maathuis F J. Overexpression of the rice *AKT1* potassium channel affects potassium nutrition and rice drought tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 2016,67(9):2689-2698
- [20] Asano T, Hayashi N, Kobayashi M, Aoki N, Miyao A, Mitsuhashi I, Ichikawa H, Komatsu S, Hirochika H, Kikuchi S, Ohsugi R. A rice calcium-dependent protein kinase *OsCPK12* oppositely modulates salt-stress tolerance and blast disease resistance. *Plant Journal*, 2012,69(1):26-36
- [21] Xiong H, Li J, Liu P, Duan J, Zhao Y, Guo X, Li Y, Zhang H, Ali J, Li Z. Overexpression of *OsMYB48-1*, a novel MYB-related transcription factor, enhances drought and salinity tolerance in rice. *PLoS One*, 2014,9(3):e92913
- [22] Sripinyowanich S, Klomsakul P, Boonburapong B, Bangyeekhun T, Asami T, Gu H, Buaboocha T, Chadchawan S. Exogenous ABA induces salt tolerance in indica rice (*Oryza sativa* L.): The role of *OsP5CS1* and *OsP5CR* gene expression during salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, 2013,86:94-105
- [23] Ouyang S Q, Liu Y F, Liu P, Lei G, He S J, Ma B, Zhang W K, Zhang J S, Chen S Y. Receptor-like kinase *OsSIK1* improves drought and salt stress tolerance in rice (*Oryza sativa*) plants. *Plant Journal*, 2010,62(2):316-329
- [24] Wang H, Zhang M, Guo R, Shi D, Liu B, Lin X, Yang C. Effects of salt stress on ion balance and nitrogen metabolism of old and young leaves in rice (*Oryza sativa* L.). *BMC plant biology*, 2012,12(1):194
- [25] Liu G, Li X, Jin S, Liu X, Zhu L, Nie Y, Zhang X. Overexpression of rice NAC gene *SNAC1* improves drought and salt tolerance by enhancing root development and reducing transpiration rate in transgenic cotton. *PLoS One*, 2014,9(1):e86895
- [26] Wei H, Wang X, He Y, Xu H, Wang L. Clock component *OsPRR73* positively regulates rice salt tolerance by modulating OsHKT2;1-mediated sodium homeostasis. *EMBO Journal*, 2021,40(3):e105086
- [27] Hong Y, Zhang H, Huang L, Li D, Song F. Overexpression of a stress-responsive nac transcription factor gene *ONAC022* improves drought and salt tolerance in rice. *Frontiers in Plant Science*, 2016,7:4
- [28] Yang T, Zhang S, Hu Y, Wu F, Hu Q, Chen G, Cai J, Wu T, Moran N, Yu L, Xu G. The role of a potassium transporter *OsHAK5* in potassium acquisition and transport from roots to shoots in rice at low potassium supply levels. *Plant Physiology*, 2014,166(2):945-959
- [29] Liu S, Zheng L, Xue Y, Zhang Q, Wang L, Shou H. Overexpression of *OsVPI* and *OsNHX1* increases tolerance to drought and salinity in rice. *Journal of Plant Biology*, 2010,53(6):444-452
- [30] 陶维旭, 程生海, 冀俊超, 艾治勇. 水稻品种资源耐盐性综合评价及耐盐指标筛选. *江苏农业科学*, 2022,50(18):180-187
- Tao W X, Cheng S H, Ji J C, Ai Z Y. Comprehensive evaluation of salinity tolerance of rice variety resources and screening of salinity tolerance indexes. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2022,50(18):180-187
- [31] 张所兵, 张云辉, 林静, 方先文. 水稻全生育期耐盐资源的初步筛选. *中国农学通报*, 2013,29(36):63-68
- Zhang S B, Zhang Y H, Lin J, Fang X W. Primary screening of salt-tolerant rice germplasm in entire growth period. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013,29(36):63-68
- [32] 陈思蓉, 李晨, 孙炳蕊. 水稻耐盐分子机制研究进展. *广东农业科学*, 2023,50(12):29-42
- Chen S R, Li C, Sun B R. Research progress on molecular mechanism of salt tolerance in rice. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2023,50(12):29-42
- [33] 王志兴, 王宇, 李振宇, 陈广红, 王绍林. 水稻盐丰 47 特征特性及高产栽培技术要点. *垦殖与稻作*, 2003(6):6-8
- Wang Z X, Wang Y, Li Z Y, Chen G H, Wang S L. The character and planting keys of the new variety yanfeng47. *Reclaiming and Rice Cultivation*, 2003(6):6-8

[34] 谢庆军, 朱立宏. 粳稻若干数量性状的配合力和遗传分析. 江苏农业学报, 1985(4):6-14

Xie Q J, Zhu L H. Combining ability and genetic analysis of several quantitative traits of *Oryza sativa* L.subsp.*keng*. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 1985(4):6-14

[35] Li J, Long Y, Qi G N, Li J, Xu Z J, Wu W H, Wang Y. The *Os-AKT1* channel is critical for K^+ uptake in rice roots and is modulated by the rice CBL1-CIPK23 complex. Plant Cell, 2014,26(8):3387-3402

