

# 基于染色体置换系的普通野生稻耐盐性 QTL 定位

许 睿<sup>1</sup>, 张莉珍<sup>1</sup>, 谢先芝<sup>2</sup>, 王艳艳<sup>1</sup>, 黄婧芬<sup>1</sup>, 郑晓明<sup>1</sup>,  
张丽芳<sup>1</sup>, 程云连<sup>1</sup>, 郑崇珂<sup>2</sup>, 乔卫华<sup>1</sup>, 杨庆文<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081; <sup>2</sup> 山东省水稻研究所, 济南 250000)

**摘要:** 本研究分别利用 SSR 标记、InDel 标记以及简化基因组测序技术对一套以普通野生稻为供体亲本, 9311 为受体亲本的染色体置换系进行基因型鉴定, 并通过对其不同生育期的耐盐性鉴定, 共发掘 2 个与发芽期耐盐相关的 QTL, 13 个与苗期耐盐性相关的 QTL。其中与苗期存活率相关的 QTL *qSSR5.1*、苗期耐盐等级相关的 QTL *qSSG5.1* 均被定位于同一位点, 该位点对苗期存活率、苗期耐盐等级均具有增效作用, 贡献率分别为 6.36%、8.13%。在此 QTL 内包含与非生物胁迫相关基因 *OsDi19-1*。经序列比对发现, *OsDi19-1* 启动子区域在两亲本间存在较大差异, 且受到盐胁迫时该基因表达量上升。同时, 鉴定出水稻芽期耐盐的优异种质资源 CSSL72、苗期耐盐的优异种质资源 CSSL23、CSSL153, 为水稻育种中耐盐性的改良提供了新的种质资源。

**关键词:** 普通野生稻; 耐盐; 染色体片段置换系

## QTL Mapping Revealed Salt Tolerance Traits from *Oryza rufipogon* using Chromosome Segment Substitution Lines

XU Rui<sup>1</sup>, ZHANG Li-zhen<sup>1</sup>, XIE Xian-zhi<sup>2</sup>, WANG Yan-yan<sup>1</sup>, HUANG Jing-fen<sup>1</sup>, ZHENG Xiao-ming<sup>1</sup>,  
ZHANG Li-fang<sup>1</sup>, CHENG Yun-lian<sup>1</sup>, ZHENG Chong-ke<sup>2</sup>, QIAO Wei-hua<sup>1</sup>, YANG Qing-wen<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; <sup>2</sup>Shandong Rice Research Institute, Ji'nan 250000)

**Abstract:** Within this study, a QTL mapping of salt tolerance was conducted by using a population of chromosome segment substitution lines ( CSSLs ), which were generated from common wild rice as donor parent and cultivated rice ( 9311 ) as receive parent. Genotyping for CSSLs were performed with types of markers ( SSR, InDel and genotyping-by-sequencing markers ). The phenotypic datasets were assessed by systemically evaluating the salt tolerance at different growth periods. As a result, two QTLs at germination stage and 13 QTLs at seedling stage were obtained. Among QTLs, *qSSR5.1* and *qSSG5.1* were found at the same locus, which synergistically contributed to the seedling survival rate ( 6.36% ) and salt tolerance grade ( 8.13% ). Within the target interval, one candidate gene *OsDi19-1* which associated with abiotic stress was found. Sequence alignment showed an obvious sequence variation between 9311 and wild rice in the promoter region of *OsDi19-1*. Notably, the line CSSL72 showed a higher germination rate, while CSSL23 and CSSL153 exhibited higher seedling rates. A down-regulation on gene expression was observed in CSSL23 and CSSL153, if relative to 9311 under salt treatment. Taken together, our data indicated that *OsDi19-1* from wild rice might contribute to the salt tolerance, and these elite lines might become useful in future rice salt tolerance breeding.

**Key words:** wild rice; salt-tolerance; CSSL, QTL

收稿日期: 2019-06-27 修回日期: 2019-07-29 网络出版日期: 2019-10-28

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190627004>

第一作者研究方向为种质资源创新利用研究, E-mail: 15003911820@163.com

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

郑崇珂, 研究方向为水稻育种, E-mail: zhengck1983@163.com

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

基金项目: 国家自然科学基金 ( 31471471 )

Foundation project: Grant from the National Natural Science Foundation of China ( 31471471 )

水稻既是我国第一大粮食作物又是盐敏感作物。据统计,全球不同程度的盐碱化土地约 9 亿 hm<sup>2</sup>,且由于灌溉方法的不当和干旱的发生,使得次生盐碱化的土地面积不断扩大<sup>[1-3]</sup>。发掘水稻品种中优异的耐盐种质资源,创新水稻耐盐种质,使得盐土资源得到最大限度的利用,是保证粮食安全的重中之重。

当植物体处于高浓度盐分土壤中时,细胞内渗透压升高产生渗透胁迫,随着活性氧不断增加,引起膜脂过氧化、蛋白损伤等一系列伤害。同时,大量钠离子和氯离子被根系吸收,导致微量元素和营养元素吸收受阻产生离子胁迫<sup>[4-6]</sup>。在盐胁迫下水稻各项生理活动受到抑制,新陈代谢速率降低,从而表现出一系列盐害症状,如叶片卷曲、分蘖减少、产量下降、植株死亡等<sup>[7]</sup>。通常将膜脂过氧化的产物——丙二醛(MDA, malonic dialdehyde),用于反映膜脂过氧化的程度;超氧化物岐化酶(SOD, superoxide dismutase)、过氧化氢酶(CAT, catalase)、过氧化物酶(POD, peroxidase)等抗氧化酶活性以及 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>离子比等指标,用于反映植物耐盐的能力。

野生稻作为重要的稻种资源,具有很强的抗胁迫能力。现如今,越来越多的胁迫耐受性基因从野生稻种质资源中被挖掘利用,如来自 *Oryza rufipogon* Griff. 的褐飞虱抗性基因基因 *Bph 19(t)*<sup>[8]</sup>,来自 *O. nivara* Sharma & Shastry 的草地特技病毒抗性基因<sup>[9]</sup>,以及能够提高盐胁迫耐受性的来自野生稻 *O. coarctata* Roxb. 肌醇-1-磷酸合酶基因 *OsINO1-1* 等。然而野生稻复杂的遗传背景,严重影响了野生稻中有益等位基因的挖掘。染色体片段置换系的每个株系仅包含一个或几个来自供体亲本的纯合置换片段,有效解决了遗传噪音、不利基因连锁等一系列问题,成为鉴定作物野生近缘种中优异等位基因的有力工具<sup>[10]</sup>。

本研究利用实验室构建的 200 个野生稻染色体置换系,通过不同生育期的耐盐性鉴定,共发掘 2 个与芽期耐盐相关的 QTL,13 个与苗期耐盐性相关的 QTL。同时,鉴定出水稻耐盐的优异种质,通过耐盐种质发掘野生稻中的耐盐候选基因,为水稻耐盐性的改良提供了新的种质资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以栽培稻 9311 为受体亲本、普通野生稻为供体亲本的染色体片段置换系群体为试验材料<sup>[11]</sup>。选取能够覆盖野生稻染色体全基因组的 200 个家系,

利用 98 个 SSR 标记和 60 个 InDel 标记,并对 200 个野生稻染色体片段置换系进行简化基因组测序,用于耐盐性 QTL 定位。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 发芽期耐盐性检测** 水稻种子放置于 50 ℃恒温箱处理 48 h, 打破休眠。随机挑拣出饱满种子 50~100 粒, 均匀置于垫滤纸的培养皿内。加入 1.30% 浓度的 NaCl 溶液浸泡, 盖好皿盖, 放入 30 ℃恒温箱里催芽, 每日使用 1.30% NaCl 溶液洗涤 1 次。处理后第 4 天和第 10 天分别观察记载种子萌发数以及发芽数(当芽长达种子长度的一半, 根长达种子长度时记为发芽), 并计算相对盐害率。设置重复 3 次, 以去离子水培养作为对照。

**1.2.2 苗期耐盐性检测** 将种子置于 50 ℃恒温箱高温处理 48 h, 打破休眠。随机挑选足量的饱满种子, 均匀置于垫滤纸的培养皿中, 去离子水浸泡, 放入 30 ℃恒温箱里催芽 48 h。移至 96 孔播种板, 于 Yoshida 培养液(40 mmol/L 氮浓度)中培养至两叶一心后, 选取长势均一的 50 株幼苗使用 0.7%NaCl 浓度的 Yoshida 培养液进行培养。分别观察记载幼苗存活天数, 并在处理后第 6 天统计幼苗存活率, 同时单株调查盐害症状和盐害指数, 作为耐盐性指标, 分 1~9 级评价(表 1)。随后随机挑选 5 株取其地上部和地下部称取干重, 为消除株系间差异, 以盐处理干重与对照干重的比率为耐盐测试指标。设置重复 3 次, 并选取长势均一的 50 株幼苗使用 Yoshida 培养液进行培养作为对照。

表 1 耐盐等级

Table1 Scoring method for salt tolerance

级别 Grade	盐害症状 Phenotype of salt damage	耐盐性 Salt tolerance
1	生长发育正常, 不表现任何盐害症状	极强
3	生长发育基本正常, 有 4 片以上绿叶	强
5	生长发育接近正常或受阻, 有 2、3 片以上绿叶	中
7	生长发育严重受阻, 仅有 1 片绿叶	弱
9	植物死亡或临近死亡	极弱

**1.2.3 QTL 分析和候选基因的预测** 利用 QTL IciMapping<sup>[12]</sup>分析软件对后代遗传群体进行基因型数据和表型数据的处理,采用完备区间加性模型(ICIM-ADD), LOD 阈值界定为 3, 即当 LOD ≥ 3, 说明该位点存在有效 QTL, 按照 McCouch<sup>[13]</sup>方法命名。

根据 QTL 定位结果, 在 Rice Genome Browser

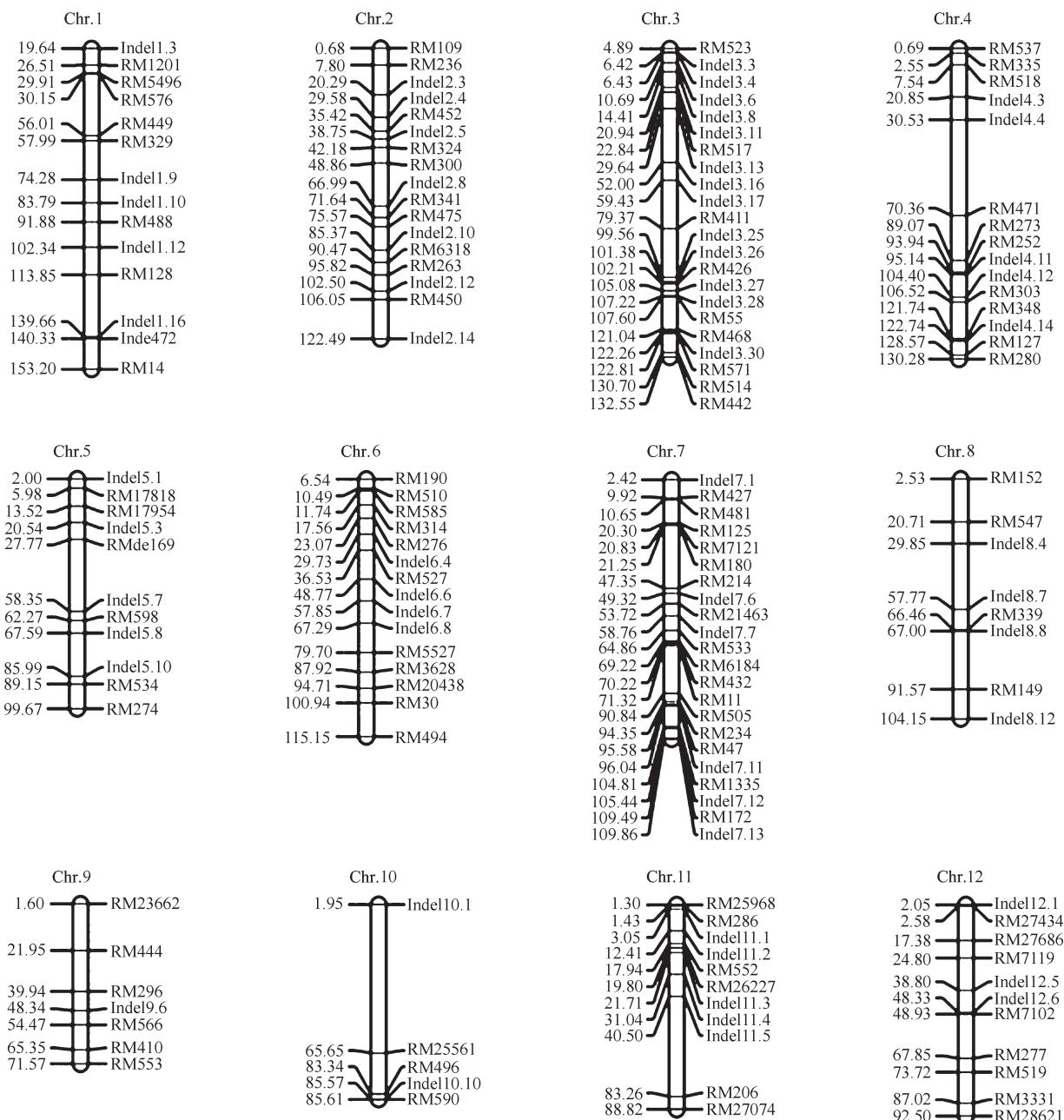
网站上找到区段内所有基因，并根据 Rice Genome Annotation Project 的基因注释筛选出与耐盐相关的基因。在 NCBI 中下载 9311 参考序列，设计引物扩增序列并使用 DNAMAN 软件进行拼接。

## 2 结果与分析

### 2.1 染色体片段置换系基因型鉴定

通过对本实验室库存的 192 个 SSR 标记和 75 个 Indel 标记进行筛选，挑选出在该染色体片段

置换系 (CSSL, schromosome segment substitution lines,) 父母本间显示出良好多态性，且能够覆盖水稻全基因组的 98 个 SSR 标记和 60 个 Indel 标记。158 个 SSR/Indel 分子标记遗传图谱覆盖全基因组 1348.95 cM，标记间平均间距 9.37 cM (图 1)。随后利用这 158 个标记对染色体片段置换系群体进行基因型鉴定 (图 2A)，同时，利用简化基因组测序对该染色体片段置换系进行基因型鉴定 (图 2B)，共获得 2722 个等位基因频率大于 0.1 的 SNP 标记。

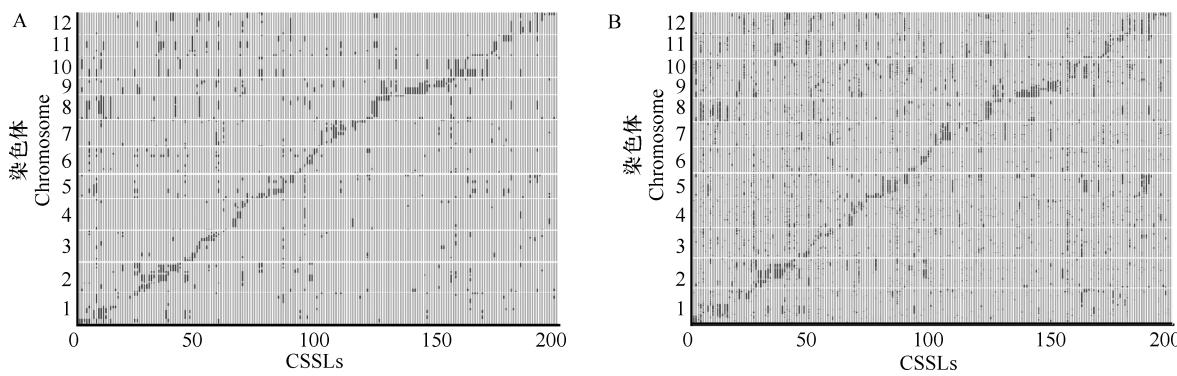


分子标记引物对应的遗传距离标注在所在染色体的左边

Molecular markers are shown at the right side of chromosomes, and the respective genetic distance (cM) are at the left side

图 1 CSSLs 连锁图谱

Fig. 1 The linkage map of CSSLs



A: CSSL 基因型 (SSR/InDel 标记); B: CSSL 基因型 (SNP 标记)  
A: The genotype of CSSL (SSR/InDel marker), B: The genotype of CSSL (SNP marker)

图 2 CSSL 的基因型鉴定结果展示

Fig. 2 Graphical representation of CSSL genotyping result

## 2.2 染色体片段置换系耐盐 QTL

对染色体片段置换系分别进行芽期、苗期的耐盐性鉴定, 调查其苗期存活率、耐盐等级、存活天数以及地上部、地下部干重以及芽期发芽率(表 2), 利用 QTL Icimapping 软件进行 QTL 初步定位, 共定位到 15 个 QTL(表 3), 分布于 1、2、5、6、7、8、11 号染色体。

其中位于 6 号染色体的 *qSSR6.I* 被两种不同的分子标记 (RM30, S6\_29003916) 同时定位; *qSSR5.I*, *qSSG5.I* 被同时定位于 5 号染色体 S5\_27886769 位点处。本研究定位的 11 个来自野生稻的 QTL 对水稻耐盐性起到增益作用, 仅有 4 个 QTL 的加性效应为负值, 表明野生稻中存在着大量优异的耐盐基因。

表 2 CSSL 耐盐性表型数据

Table 2 Phenotypic datasets of CSSLs upon salt treatment

耐盐指标 Indices of salt tolerance	亲本 9311 Parents 9311	置换系 CSSL		
		最小值 Min.	最大值 Max.	平均值 Mean
发芽率 (%) Germination rate	4.72 ± 2.48	0.00	74.23	24.12
苗期存活率 (%) Seedling survival rate	54.17 ± 6.80	16.67	88.89	55.41
苗期耐盐等级 Seedling salt-tolerant grade	1	9	1	3.32
苗期存活天数 (d) Seedling survival days	8.7 ± 0.02	6.6	11.5	9.3
地上部干重 (g) Seedling dry weight of above-ground parts	0.85 ± 0.10	0.56	1.52	1.00
地下部干重 (g) Seedling dry weight of under-ground parts	0.83 ± 0.03	0.55	1.37	1.00

表 3 CSSL 耐盐 QTLs (SSR/InDel 标记)

Table 3 Salt-tolerant QTLs of CSSL (SSR/InDel marker)

性状 Treatments	染色体 Chr.	峰值标记 Peak marker	标记区间 Flanking markers	LOD 值 LOD value	贡献率 (%) PVE	加性效应 Add effect	QTL 名称 QTL name
<b>发芽率 Germination rate</b>							
1.3% NaCl 溶液	7	S7_23160626	S7_23077850-S7_23293939	6.0353	11.0283	0.1168	<i>qGR7.I</i>
	11	S11_16987307	S11_16849537-S11_17292444	6.7571	12.4518	0.0760	<i>qGR11.I</i>
<b>苗期存活率 Seedling survival rate</b>							
0.7% NaCl 溶液	2	Indel2-10	RM475-RM6318	3.9369	8.7851	7.0447	<i>qSSR2.I</i>
	2	S2_1049672	S2_989128-S2_1227422	4.2003	6.3572	7.5950	<i>qSSR2.2</i>
	2	S2_24278397	S2_24128850-S2_24387301	3.6938	5.5573	6.3315	<i>qSSR2.3</i>
	5	S5_27886769	S5_27733816-S5_27973430	5.6221	8.6531	6.8374	<i>qSSR5.I</i>
	6	RM30	RM20438-RM494	3.9455	8.8056	7.9058	<i>qSSR6.I</i>
	6	S6_29003916	S6_28999115-S6_29194924	7.3310	11.5132	11.9654	<i>qSSR6.I</i>

表3(续)

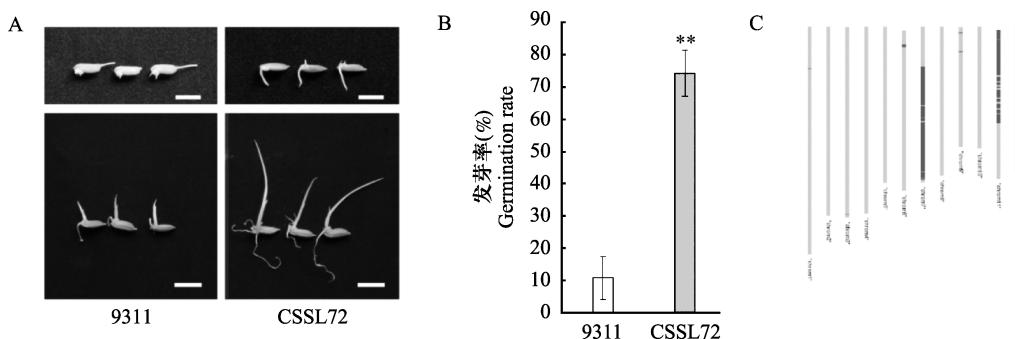
性状 Treatments	染色体 Chr.	峰值标记 Peak marker	标记区间 Flanking markers	LOD 值 LOD value	贡献率 (%) PVE	加性效应 Add effect	QTL 名称 QTL name
苗期耐盐等级 Seedling salt-tolerant grade							
0.7% NaCl 溶液	5	S5_27886769	S5_27733816-S5_27973430	3.6025	8.1340	0.7271	<i>qSSG5.1</i>
苗期存活天数 Seedling survival days							
0.7% NaCl 溶液	1	Indel1-16	RM128-RM472	3.0878	7.2669	-0.4618	<i>qSSD1.1</i>
	1	S1_38368329	S1_38292070-S1_38409107	6.0902	9.7907	-0.4110	<i>qSSD1.2</i>
	8	S8_2689486	S8_2513855-S8_2786791	6.6480	10.7585	0.4111	<i>qSSD8.1</i>
	11	S11_24264059	S11_24103036-S11_24349408	3.4826	5.4272	-0.5131	<i>qSSD11.1</i>
地下部干重 Seedling dry weight of underground							
0.7% NaCl 溶液	1	S1_35391843	S1_35267727-S1_35428764	5.1812	7.3688	0.0764	<i>qUDW1.1</i>
	1	S1_38409107	S1_38368329-S1_38524922	3.1496	4.3755	-0.0854	<i>qUDW1.2</i>
	11	S11_14555474	S11_14492837-S11_14682925	4.4734	6.3103	0.0779	<i>qUDW11.1</i>

### 2.3 苗期耐盐种质资源 CSSL72

鉴定出苗期耐盐优异种质资源 CSSL72, 如图所示(图 3A), 在盐处理下, CSSL72 的发芽率、芽长、根长与亲本 9311 均有显著差异。在 1.30%NaCl 溶液处理下, CSSL72 发芽率高达 74.23%, 而亲本 9311 发芽率仅为 4.72% (图 3B); 芽长方面, 9311 处理 10 d 后的平均芽长仅为 11 mm, 而 CSSL72 的平均芽长高达 36.4 mm, 高出 69.78%; 根长方面, CSSL72 平均根长为 25.3 mm, 比亲本 9311 高 83.79% (图 3A)。

CSSL72 株系基因型如图 3C 所示, 包含 2 个来

自野生稻的置换片段, 分别位于第 7、11 染色体。该系基因组中含有两个来自野生稻的耐盐相关 QTL: *qGR7.1*、*qGR11.1*。其中 *qGR7.1* 贡献率较高, 且与 Wang 等<sup>[14]</sup>所定位的水稻发芽率 QTL *qGL7-1* 位置相同, 但其通过部分水稻公开引物仅将其定位至 875 kb 区间内, 本研究通过更为密集的 SNP 标记将其范围缩小至 108 kb 区间。该范围内共有 14 个基因, 其中含有部分与核苷酸单糖转运蛋白、赖氨酸缺乏蛋白激酶、阿拉伯半乳聚糖蛋白相关的基因, 与水稻发芽期相关的耐盐基因仍待发掘。



A: 芽期盐处理表型,上方为处理 4d,下方为处理 10d; B: 盐处理下发芽率; C: CSSL72 基因型

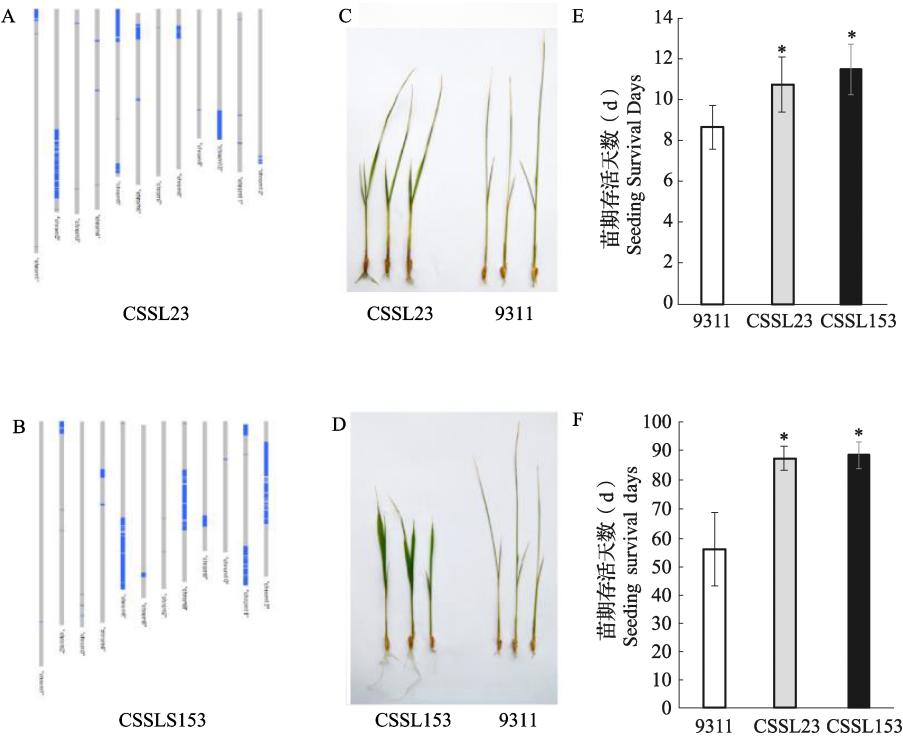
A: Salt treatment phenotype of 9311 and CSSL72 line at germination stage, the upper panel is seed treated with 1.30% NaCl solution for 4 days, the lower panel is seed treated with 1.30% NaCl solution for 10 days. B: Germination rate of CSSL72 and 9311 under salt treatment. C: The genotype of CSSL72

图 3 CSSL72 表型及基因型  
Fig. 3 Phenotype and genotype of CSSL72 line

### 2.4 苗期耐盐种质资源 CSSL23、CSSL153

鉴定出苗期耐盐优异种质 CSSL23 和 CSSL153。对其两叶一心时期的幼苗盐胁迫处理 6d 后, CSSL23 叶片轻微卷曲, 顶端失绿, 根部略长于亲本 9311; CSSL153 除叶片顶端存在卷曲和失色外, 叶片整体呈现正常舒展状态, 根部生长基本正常, 根部明显长

于 9311 (图 4C、D)。CSSL23、CSSL153 的存活率分别为 88.64%、83.33%, 明显高于亲本 9311 的存活率 55.56% (图 4F); 且 CSSL23、CSSL153 在盐处理下分别能够存活 10.75d 和 11.5d, 显著优于 9311 (图 4E)。数据表明 CSSL23、CSSL153 在苗期具有强耐盐性。



A~B: CSSL23、CSSL153 的基因型; C~D: 盐处理 6d CSSL23、CSSL153 和 9311 的表型; E: 盐处理下苗期存活天数; F: 盐处理下苗期存活率

A-B: The genotype of CSSL23 and CSSL153, C-D: Germination rate of CSSL23 and 9311 under salt treatment,

E: Seeding survival days under salt treatment, F: Seeding survival rate under salt treatment

图 4 CSSL23、CSSL153 基因型及表型

Fig. 4 CSSL23 and CSSL153's genotype and phenotype

CSSL23 基因组含有 7 个野生稻置换片段(图 4A), 包含 5 个与存活率、耐盐等级以及存活天数相关的 QTL, 分别是 *qSSR2.1*、*qSSR2.3*、*qSSR5.1*、*qSSG5.1*、*qSSD6.1*(表 3)。CSSL153 基因型如图 4B 所示, 包含苗期耐盐相关 QTL *qSSR2.2*、*qSSR5.1*、*qSSR6.1*、*qSSG5.1*、*qSSD11.1*、*qUDW1.1*(表 3)。

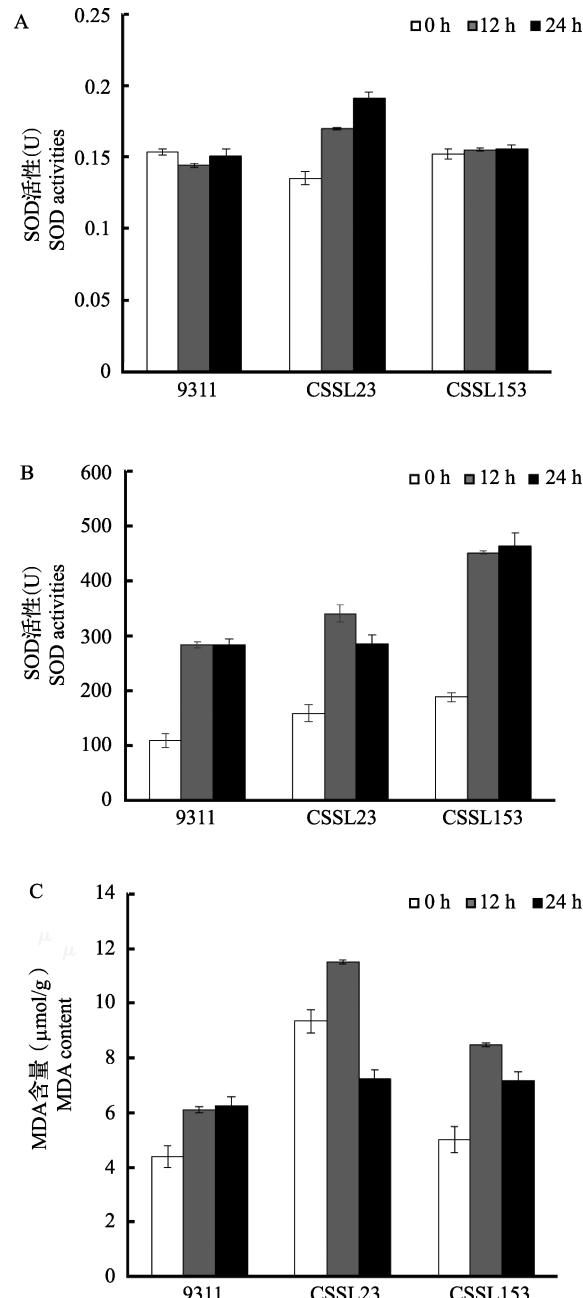
对 POD 和 SOD 两种过氧化物酶活性检测发现, 盐胁迫处理后 CSSL23、CSSL153 体内的过氧化物酶活性均高于 9311(图 5A, B)。MDA 含量测定结果表明, 未处理前 CSSL23、CSSL153 体内的 MDA 含量高于 9311, CSSL23 更是显著高于 9311; 盐胁迫处理 24h 后, CSSL23、CSSL153 的 MDA 含量均有所下降, 而 9311 的 MDA 含量仍在增加(图 5C)。这些结果表明, 盐胁迫下, CSSL23 和 CSSL153 株系可能具有较强的过氧化物清除能力。

钠钾离子含量检测结果发现, 盐胁迫条件下 CSSL23、CSSL153、9311 均有大量  $\text{Na}^+$  积累(图 6B)。盐胁迫下, 9311 幼苗中的  $\text{K}^+$  含量显著降低, CSSL153 幼苗中的  $\text{K}^+$  含量没有明显变化, 然而 CSSL23 株系中  $\text{K}^+$  含量反而略有升高(图 6A)。CSSL23、CSSL153 与 9311 受盐胁迫后  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  均

有显著性上升, 9311 升高了 45.67 倍, 而 CSSL23、CSSL153 分别升高了 24.94 倍和 19.43 倍(图 6C)。推测在盐胁迫下, CSSL23 和 CSSL153 株系均有较强的保钾能力。

## 2.5 苗期耐盐基因 *OsDi19-1*

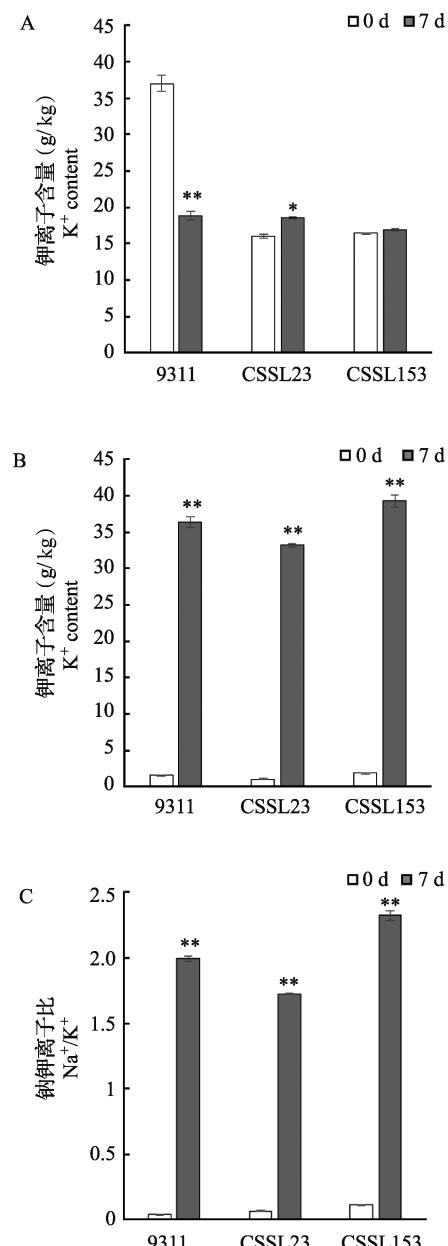
CSSL23、CSSL153 均包含 *qSSR5.1*、*qSSG5.1*, 两个被定位于 SNP 标记 S5\_27886769 附近的苗期耐盐相关 QTL, 该区域内存在已定位的非生物胁迫相关基因 *OsDi19-1*<sup>[15]</sup>, 对其序列分析发现, 野生稻与 9311 在该基因编码区无差异, 但启动子区存在较大差异。如图 7 所示, CSSL23、CSSL153(野生稻片段)与 9311 存在 7 个插入缺失, 23 处核苷酸变异。利用在线软件 plantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)对启动子区域进行分析发现, CSSL23、CSSL153 与 9311 间特有的顺式作用元件有 3 个, 分别为与应激反应相关的转录结合基序 WUN-motif<sup>[16]</sup>、参与光反应的保守基序 ATC-motif、阻遏蛋白结合的重要基序 CTAG-motif<sup>[17]</sup>(表 4)。Real-time PCR 结果表明, 盐胁迫条件下, 该基因在 9311 中的表达量显著高于 CSSL23、CSSL153(图 8)。



A~C: CSSL23、CSSL153 和 9311 的 SOD 活性、POD 活性、MDA 含量  
A-C: CSSL23, CSSL153 and 9311's SOD activity,  
POD activity and MDA content

图 5 CSSL23、CSSL153 盐胁迫相关生理指标

Fig. 5 Physiological indicators related to salt stress responses of CSSL23 and CSSL153



A~C: CSSL23、CSSL153 和 9311 的钠钾离子含量以及钠钾比  
A-C: CSSL23, CSSL153 and 9311's content of  
 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$

图 6 CSSL23、CSSL153 钠钾离子含量

Fig. 6  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  contents of CSSL23,  
CSSL153 and 9311

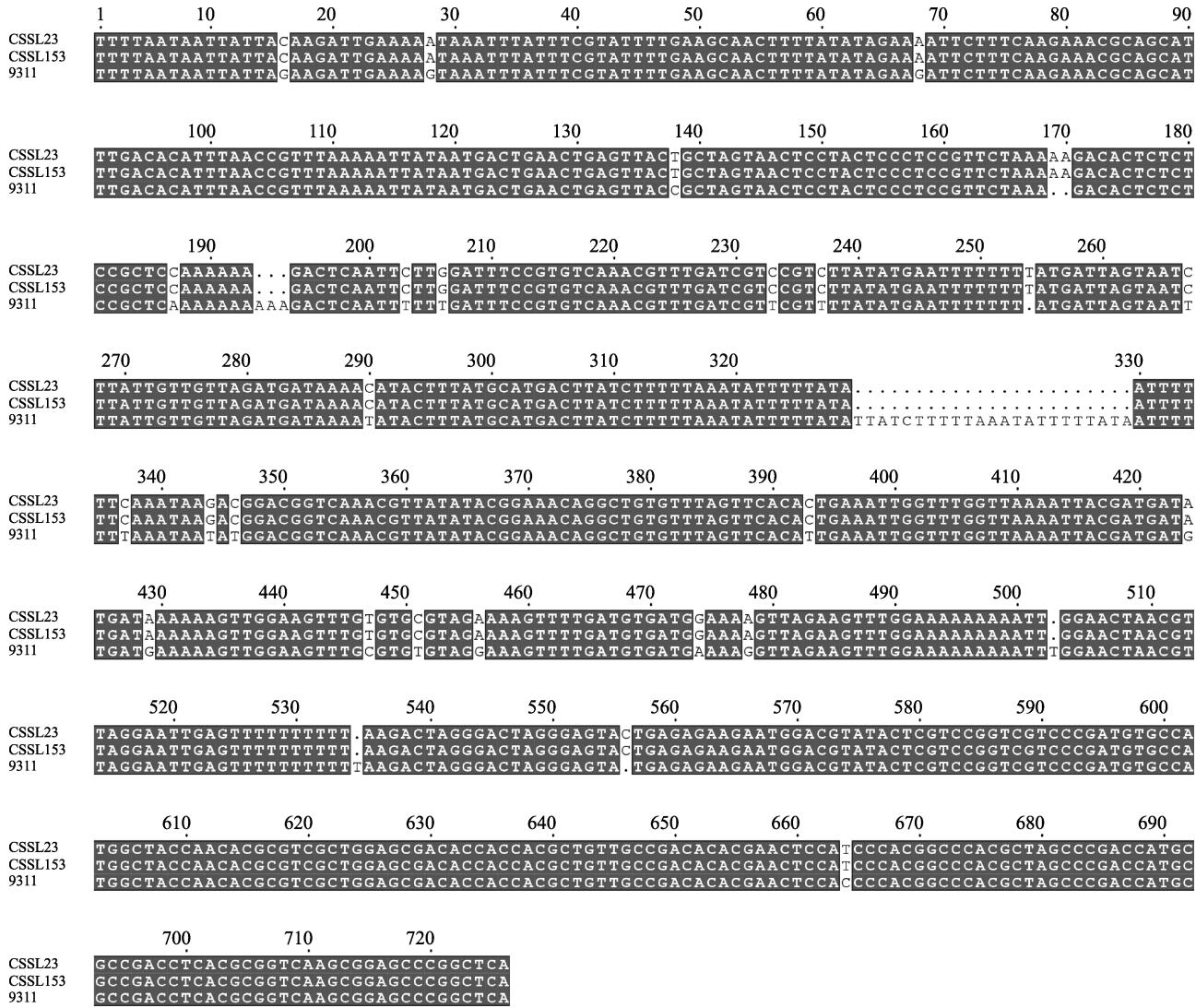


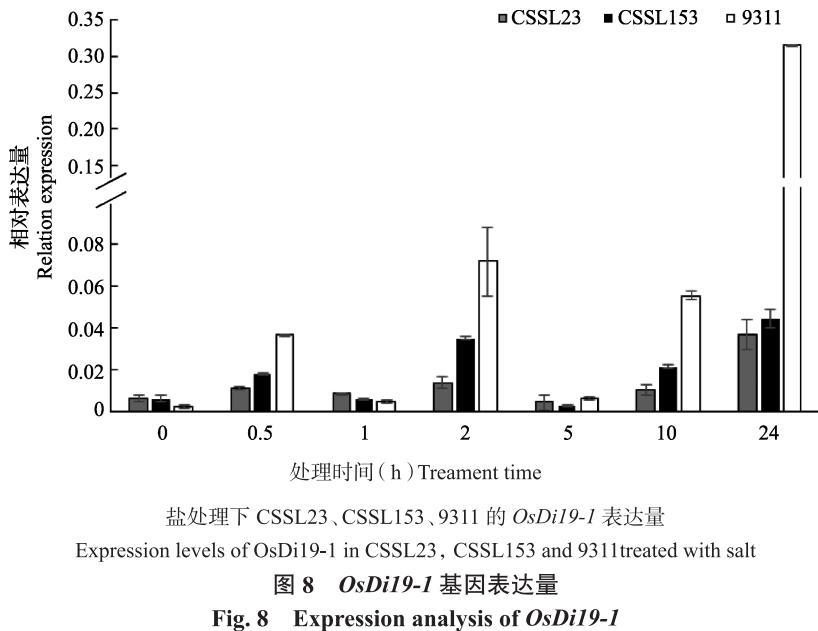
图 7 CSSL23、CSSL153、9311 的 OsDi19-1 启动子区域序列比对

Fig. 7 Sequence alignment of OsDi19-1 promoter sequence among CSSL23, CSSL153 and 9311

表 4 CSSL23、CSSL153 和 9311 启动子区特有顺式作用元件

Table 4 Cis-element in the promoter sequences specific of OsDi19-1 gene between CSSL23, CSSL153 and 9311

变异位点 Various site ( 9311/CSSL153 )	单株 Line	位点 Site	位置 Position	序列信号 Sequence signal	功能 Function
T/C	9311	WUN-motif	-	AAATTACTA	机械伤害反应元件
T/C	CSSL23/CSSL153	ATC-motif	+	AGTAATCT	与光响应性相关的 DNA 保守模块
G/A	CSSL23/CSSL153	CTAG-motif	-	ACTAGCAGAA	阻遏物结合的关键位点

图 8 *OsDi19-1* 基因表达量Fig. 8 Expression analysis of *OsDi19-1*

### 3 讨论

本研究从普通野生稻入手,利用染色体片段置换系发掘野生稻中存在的优异耐盐基因。在染色体置换系的基因型鉴定时,我们不仅使用了基于PCR的传统基因型鉴定方法,而且利用简化基因组测序获得高密度的SNP遗传图谱<sup>[18]</sup>。从芽期和苗期耐盐相关QTL定位结果来看,由SNP标记所定位的QTL共13个,而由SSR标记和InDel标记所定位的QTL仅为3个;且SNP标记所定位的QTL范围小,能够快速确定候选基因范围。染色体置换系作为基因分析的理想材料,与重测序技术相结合,大大提高了QTL或基因定位的效率与准确性。

本研究所定位的QTL位点中未发现某一QTL贡献率显著高于其他QTL;且芽期优异耐盐种质CSSL72以及苗期优异耐盐种质CSSL23、CSSL153均包含多个与耐盐相关的QTL,这表明水稻的耐盐性提高可能是多个耐盐QTL的累积效应,而非单个主效基因控制<sup>[19]</sup>。定位结果表明,水稻芽期、苗期的耐盐性分别由不同基因控制,且芽期优异耐盐种质CSSL72与苗期优异耐盐种质CSSL23、CSSL153所含的耐盐QTL均不相同,这进一步表明水稻不同时期耐盐性是由不同基因控制的<sup>[20-21]</sup>。

苗期优异耐盐种质资源CSSL23、CSSL153的耐盐性增加可能是由于维持体内K<sup>+</sup>离子浓度和较强的过氧化物清除能力所导致的。耐盐鉴定试验还发现,无论是芽期还是苗期,野生稻染色体置换系整体的耐盐性均显著优于亲本9311,说明野生稻中存

在大量的耐盐基因/QTL。在水稻耐盐品种选育中,可通过分子辅助选择,聚合野生稻不同时期的多个耐盐QTL,从而快速获得优良耐盐品种。

本研究鉴定出野生稻耐盐候选基因*OsDi19-1*,与小麦基因*TaDi19A*具有高度同源性<sup>[15]</sup>。*TaDi19A*基因是盐敏感基因,盐胁迫条件下其表达量显著上升,*TaDi19A*在拟南芥中异源过表达提高了转基因植株对盐的敏感性<sup>[19]</sup>。本研究中*OsDi19-1*基因启动子区域存在变异,导致盐胁迫条件下9311中该基因表达量明显高于CSSL23和CSSL153株系,这暗示该基因可能是CSSL23和CSSL153具有较强耐盐性的原因之一。该基因的鉴定为水稻耐盐的分子机理研究和耐盐水稻育种提供了新的基因资源。

### 参考文献

- [1] Munns R. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environment*, 2002, 25(2): 239–250
- [2] 王忠. 植物生理学. 北京: 中国农业出版社, 2000: 552–556
- [3] 祁栋灵, 韩龙植, 张三元. 水稻耐盐/碱性鉴定评价方法. *植物遗传资源学报*, 2005, 6(2): 226–230
- [4] Qi D L, Han L Z, Zhang S Y. Methods of characterization and evaluation of salt or alkaline tolerance in rice. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2005, 6(2): 226–230
- [5] Tester M. Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. *Annals of Botany*, 2003, 91(5): 503–527
- [6] Deinlein U, Stephan A B, Horie T, Luo W, Xu G H, Schroeder J I. Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends in Plant Science*, 2014, 19(6): 371–379
- [7] Devasagayam T P, Tilak J C, Boloor K K, Sane K S, Ghaskadbi S S, Lele R D. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *The Journal*

- of the Association of Physicians of India, 2004, 52: 794-804
- [ 7 ] 余叔文, 汤章城. 植物生理学与分子生物学. 北京: 科学出版社, 1998: 752-769
- Yu S W, Tang Z C. Plant physiology and molecular biology. Beijing: Science Press , 1998: 752-769
- [ 8 ] Li R, Li L. The evaluation and utilization of new genes for brown planthopper resistance in common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.). Molecular Entomology, 2010, 1( 1 ): 1-7
- [ 9 ] Khush G S, Ling K C. Inheritance of resistance to grassy stunt virus and its vector in rice. Journal of Heredity, 1974, 65 ( 3 ): 135-136
- [ 10 ] Ali M L, Sanchez P L, Yu S B, Lorieux M, Eizenga G C. Chromosome segment substitution lines: a powerful tool for the introgression of valuable genes from oryza wild species into cultivated rice (*O. sativa*). Rice, 2010, 3 ( 4 ): 218-234
- [ 11 ] Qiao W, Qi L, Cheng Z, Su L, Li J, Sun Y, Ren J, Zheng X, Yang Q. Development and characterization of chromosome segment substitution lines derived from *Oryza rufipogon* in the genetic background of *O. sativa* spp. *indica* cultivar 93-11. BMC Genomics, 2016, 17 ( 1 ): 1-12
- [ 12 ] Meng L, Li H, Zhang L, Wang J. QTL IciMapping: Integrated software for genetic linkage map construction and quantitative trait locus mapping in biparental populations. The Crop Journal, 2015, 3 ( 3 ): 269-283
- [ 13 ] PhilIn M, Tim P. Guidelines for common bean QTL nomenclature. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative. Bean Improvement Cooperative, 2010, 53: 202-204
- [ 14 ] Wang Z, Wang J, Bao Y, Wu Y, Zhang H. Quantitative trait loci controlling rice seed germination under salt stress. Euphytica, 2011, 178 ( 3 ): 297-307
- [ 15 ] Wang L, Yu C, Chen C, He C, Zhu Y, Huang W. Identification of rice Di19 family reveals *OsDi19-4* involved in drought resistance. Plant Cell Reports, 2014, 33 ( 12 ): 2047-2062
- [ 16 ] Yin X, Zhao Y, Luo D, Zhang H. Isolating the promoter of a stress-induced gene encoding betaine aldehyde dehydrogenase from the halophyte *Atriplex centralasiatica* Iljin. Biochim Biophys Acta-Gene Structure and Expression, 2002, 1577 ( 3 ): 452-456
- [ 17 ] Czernik P J, Shin D S, Hurlburt B K. Functional selection and characterization of DNA binding sites for Trp repressor of *Escherichia coli*. Journal of Biological Chemistry, 1995, 269 ( 45 ): 27869-27875
- [ 18 ] Xu J, Zhao Q, Du P, Xu C, Wang B, Feng Q, Liu Q, Tang S, Gu M, Han B, Liang G. Developing high throughput genotyped chromosome segment substitution lines based on population whole-genome re-sequencing in rice (*Oryza sativa* L.). BMC Genomics, 2010, 11 ( 1 ): 656
- [ 19 ] Li S, Xu C, Yang Y, Xia G. Functional analysis of *TaDi19A*, a salt-responsive gene in wheat. Plant Cell Environment, 2010, 33 ( 1 ): 117-129
- [ 20 ] Lutts S, Kinet J M, Bouharmont J. Changes in plant response to NaCl during development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in salinity resistance. Journal of Experimental Botany, 1995, 46 ( 12 ): 1843-1852
- [ 21 ] Zeng L, Shannon M C, Grieve C M. Evaluation of salt tolerance in rice genotypes by multiple agronomic parameters. Euphytica, 2002, 127 ( 2 ): 235-245