

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.01101

水稻苗期耐盐突变体的遗传分析及基因定位

汪斌^{1,2}, 刘婷婷^{1,3}, 张淑君^{1,2}, 兰涛^{1,3}, 官华忠^{1,3}, 周元昌^{1,3}, 吴为人^{1,3}

1. 福建农林大学, 作物遗传育种与综合利用省部共建教育部重点实验室, 福州 350002;
2. 福建农林大学生命科学学院, 福州 350002;
3. 福建农林大学作物科学学院, 福州 350002

摘要: 在籼稻品种 R401 辐射诱变的 M₂ 群体中筛选到一个苗期耐盐突变体, 在 150 mmol/L 的 NaCl 溶液处理下对照植株枯萎死亡, 而突变体植株依然存活。以粳稻品种 Nipponbare(不耐盐)和耐盐突变体作亲本, 构建了一个 F₂ 群体, 调查该群体在 150 mmol/L 的 NaCl 溶液胁迫下的表现, 发现 Nipponbare 和耐盐突变体苗期耐盐性的差异受单个主基因控制, 耐盐为隐性, 将该基因暂时命名为 *SST(t)*。利用该 F₂ 群体, 采用集团分离分析 (Bulked segregant analysis, BSA) 法将 *SST(t)* 定位在第 6 染色体上, 进一步对 F₂ 群体中 137 个典型的耐盐单株的分子标记进行分析, 将该基因定位在 InDel 标记 ID26847 和 ID27253 之间, 约 2.3 cM (或 406 kb) 的区间内, 与两标记分别相距 1.2 cM 和 1.1 cM。

关键词: 水稻; 苗期; 耐盐性; 遗传; 基因定位

Genetic analysis and gene mapping for a salt tolerant mutant at seedling stage in rice

WANG Bin^{1,2}, LIU Ting-Ting^{1,3}, ZHANG Shu-Jun^{1,2}, LAN Tao^{1,3}, GUAN Hua-Zhong^{1,3}, ZHOU Yuan-Chang^{1,3}, WU Wei-Ren^{1,3}

1. Key Laboratory of Ministry of Education for Genetics, Breeding and Multiple Utilization of Crops, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;
2. College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;
3. College of Crop Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract: A salt tolerant mutant at seedling stage was obtained from an M₂ population of radiation mutagenesis of an indica rice cultivar R401. The mutant seedlings could survive under the treatment of sodium chloride solution at the concentration of 150 mmol/L, while the wild-type control seedlings withered and died. An F₂ population was developed from a cross between a japonica cultivar Nipponbare and the salt tolerant mutant. By investigating the performance of the F₂ population under the stress of 150 mmol/L NaCl solution, we found that the mutant phenotype was caused by the recessive mutation of a single gene, temporarily designated *SST(t)*. Bulk segregant analysis (BSA) based on the F₂ mapping population

收稿日期: 2013-04-15; 修回日期: 2013-05-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31071399), 福建省自然科学基金项目(编号: 2011J01078)和福建省教育厅科技计划项目(编号: JK2012014)资助

作者简介: 汪斌, 博士, 副教授, 研究方向: 植物分子遗传。E-mail: wangbin_doc@163.com

通讯作者: 吴为人, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 分子数量遗传、植物基因组与分子育种。E-mail: wuwr@fafu.edu.cn

网络出版时间: 2013-7-29 19:19:18

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130729.1919.003.html>

revealed that *SST(t)* is located on chromosome 6. By analyzing 137 typical salt-tolerant F_2 plants using molecular markers, *SST(t)* was mapped in a 2.3 cM (or 406 kb) interval between InDel markers ID26847 and ID27253, with genetic distances of 1.2 cM and 1.1 cM to the two markers, respectively.

Keywords: rice; seedling; salt tolerance; genetic analysis; gene mapping

作物生长需要一个良好的环境, 恶劣的环境对作物的产量和品质都有影响。逆境包括生物逆境和非生物逆境。非生物逆境主要包括作物生长所需的光、温、水、气、土壤、肥料等条件, 其中土壤中的盐浓度对作物生长的影响巨大。目前, 全世界 6% 以上的陆地表现出盐碱化; 可耕地中 19.5% 的水田和 2.1% 的旱地受到不同程度的盐害。水田盐害主要是人类不当灌溉引起的次级盐害, 我国水田的 15% 受到次级盐害的影响^[1]。

研究表明水稻的耐盐性是一个复杂性状, 对该性状已进行了许多遗传研究, 其中苗期耐盐性 QTL 定位的研究报道较多^[2]。评价水稻苗期耐盐性的指标有很多, 包括盐胁迫处理后幼苗的存活天数、幼苗地上部 Na^+ 含量和 K^+ 含量、根部的 Na^+ 含量和 K^+ 含量^[3,4]、幼苗高度、地上部和根的干物质含量、 Na^+/K^+ 比率^[5]、幼苗叶片叶绿素荧光参数^[6]等。水稻苗期耐盐性的遗传和 QTL 定位研究使用了多种群体, 包括 F_2 ^[3]、 BC_1 ^[7]、 BC_2F_8 自交系^[4]、重组自交系(RIL) 等群体^[5,6,8]。

已检测到许多水稻苗期耐盐性 QTL。其中第 2 染色体 RM240-RM112 区间内存在一个主效 QTL, 它影响了地上部 4 个耐盐相关性状^[9]; 第 1 染色体 Xpsr754-RM315 区间内也发现一个主效 QTL, 它可以解释盐胁迫下幼苗地上部 Na^+ 含量变异的 45%^[8]; 第 7 染色体 C1057-R2401 和第 1 染色体 C1211-S2139 区间分别检测到一个幼苗地上部 Na^+ 含量和 K^+ 含量的主效 QTL^[3]。

目前, 已克隆的水稻耐盐基因还很少。*SKCI* 是第一个通过 QTL 定位而克隆的水稻耐盐基因, 位于第 1 染色体^[10]。而 *DST* 则是利用突变体而克隆到的水稻耐盐基因, 它编码一个新的锌指蛋白, 突变后会增加水稻气孔的关闭程度和气孔的数量和密度, 从而提高了耐旱性和耐盐性^[11]。

2011 年, 本实验室在对籼稻品种 R401 辐射 M_2 代进行盐水处理时筛选到一株耐盐突变体。本研究

对其耐盐性状进行了观察验证、遗传分析和基因定位。

1 材料和方法

1.1 材料

籼稻品种 Nipponbare, 来源于籼稻品种 R401 辐射诱变的耐盐突变体(M_3 株系), Nipponbare 和耐盐突变体杂交得到的 F_1 及其 F_2 群体, 包含 532 个单株。

1.2 性状观察及遗传分析

2011 年将突变体 M_3 株系播种于塑料托盘泥土中, 置于光照培养箱中培养, 12 h 光照, 白天 25 °C, 黑夜 21 °C。14 d 后进行盐水处理, 每天浇 150 mmol/L 的 NaCl 水溶液 200 mL, 持续 7 d, 然后浇清水 3 d, 共进行两轮处理。每天观察并记录幼苗生长状况。同时种植了一些其它水稻材料作为对照, 包括 3 个水稻品种(R401、Nipponbare 和籼稻品种 93-11)和 4 个不耐盐的 M_3 株系。

2011 年晚季种植 Nipponbare 和耐盐突变体并进行杂交, 获得 F_1 种子。2012 年早季种植 F_1 , 获得 F_2 种子。

2012 年播种两亲本、 F_1 和 F_2 群体, 光照培养箱中培养, 培养条件及盐胁迫处理同突变体 M_3 株系实验。观察亲本、 F_1 、 F_2 的性状表现并进行数据处理。

1.3 SSLP 分析及基因定位

采用 SDS 小量法提取亲本及 F_2 群体中 137 个典型的耐盐幼苗的基因组 DNA^[12]。采用集团分离分析法(Bulked segregant analysis, BSA)^[13]快速寻找与目标基因连锁的分子标记。在 F_2 耐盐群体中随机挑选 10 株耐盐幼苗, 将其 DNA 等量混合构成耐盐幼苗的 DNA 池。根据已发表的水稻微卫星遗传连锁图谱^[14], 在每条染色体上大约每隔 20 cM 选取一个微卫星标记对两个亲本和耐盐幼苗 DNA 池同时进行简单序列长度多态性(Simple sequence length polymorphism,

SSLP)分析。在耐盐幼苗 DNA 池中只显示突变体的带型而不显示 Nipponbare 带型的标记则可能与目标基因连锁, 利用该标记及其周围标记对 F_2 群体中耐盐幼苗进行 SSLP 分析。亲本间没有多态性 SSLP 标记的区域, 设计插入/缺失(Insertion / deletion, InDel)标记进行分析。

PCR 扩增体系为 20 μ L, 包括 1 \times 缓冲液, 0.1 mmol/L dNTP(Bioteke 公司), 0.375 μ mol/L 引物(Sangon 公司), 0.75 U *Taq* 酶(Bioteke 公司), 50 ng 模板 DNA。扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共进行 35 个循环; 最后再 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物在 6% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离, 银染显色拍照。

F_2 群体中与亲本 Nipponbare 带型一致的单株记

为“1”, 与亲本突变体带型一致的单株记为“2”, 杂合的单株记为“3”, 缺失的单株记为“0”。微卫星标记的分析结果用软件 Mapmaker/Exp 3.0^[15]进行连锁分析及遗传距离计算。

2 结果与分析

2.1 耐盐突变体的表型

在进行第二轮的盐水处理时, 突变体(M_3 株系)及对照植株都表现出老叶片萎蔫的现象, 并随着处理时间的推移而开始枯萎。但在盐水处理一个月后, 突变体(M_3 株系)表现出对盐胁迫的适应, 停止枯萎, 幼苗保持绿色挺立, 而对照植株则不可逆转地枯萎, 最终死亡(图 1)。该结果说明, 该突变体具有明显的耐盐性。

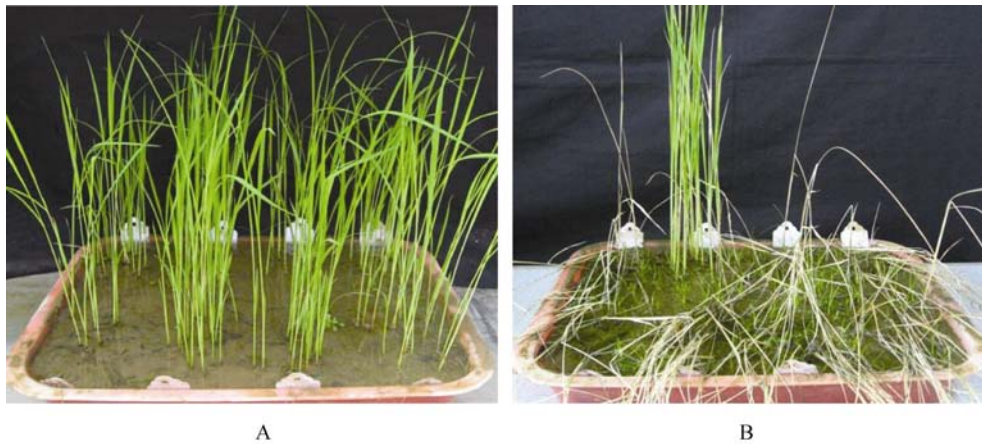


图 1 水稻苗期耐盐突变体 M_3 代的耐盐表现

A: 盐水处理前; B: 盐水处理后。后排: 从左到右依次为 R401、耐盐突变体、Nipponbare 和 93-11; 前排: 4 个不耐盐的 M_3 株系

2.2 耐盐突变性状的遗传表现

亲本 Nipponbare 和耐盐突变体杂交产生的 F_1 代苗期在盐胁迫下表现为枯萎死亡, 与亲本 Nipponbare 一致。 F_2 群体幼苗在盐胁迫下, 有 395 株枯萎死亡, 137 株表现耐盐(图 2), 两者之比为 2.88:1, 符合 3:1 分离比例($P > 0.7$)。以上结果显示, 该耐盐性状为单基因隐性突变所致。本研究将该基因暂时命名为苗期耐盐基因(Seedling salt tolerance), 缩写为 *SST(t)*。

2.3 耐盐突变基因的定位

BSA 分析显示, 第 6 染色体上的微卫星标记 RM528 在耐盐幼苗 DNA 池中只扩增出突变体的带



图 2 水稻苗期耐盐突变体及其 F_2 群体的分离表现 左边为 Nipponbare, 中间为 Nipponbare 和突变体杂交产生的 F_2 群体, 右边为突变体。

型, 暗示该标记与 *SST(t)* 基因连锁。利用 *RM528* 周围标记对 F_2 群体中 120 株表现典型的耐盐幼苗进行 SSLP 分析, 然后进行连锁分析。结果将 *SST(t)* 基因定位在标记 *RM528* 和 *RM20566* 之间, 与两标记的遗传距离分别为 9.7 cM 和 8.6 cM。进一步在这两个

标记之间寻找 SSR 标记和 InDel 标记, 对 F_2 群体中的耐盐突变体进行基因型分析和连锁分析。最终将 *SST(t)* 基因定位在水稻第 6 染色体长臂上 2.3 cM 的区域内, 分别与 InDel 标记 *ID26847* 和 *ID27253* 相距 1.2 cM 和 1.1 cM (图 3)。两标记之间的物理距离为 406 kb。

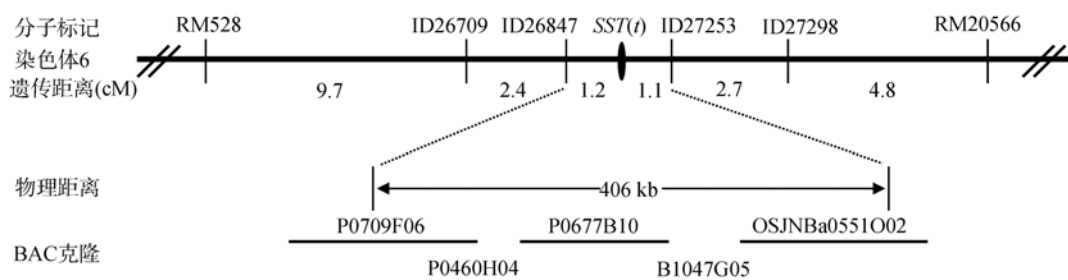


图 3 水稻苗期耐盐基因 *SST(t)* 在第 6 染色体的局部连锁图

3 讨论

本研究利用一个水稻苗期耐盐隐性突变体, 将一个耐盐基因 *SST(t)* 定位在第 6 染色体长臂上一个 406 kb 的区间内。目前尚无在该区间发现耐盐基因的报道, 所以该基因是一个新的水稻苗期耐盐基因。水稻耐盐性是一个复杂性状, 易受环境的影响, 所以实验必须在严格的条件下进行。本研究根据盐胁迫处理后幼苗的存活与否来判断其耐盐性。为了可靠起见, 本研究在处理过程的 3 个时期, 连续对单株耐盐性进行判断和统计, 最终鉴定出耐盐植株。

目前已有许多水稻苗期耐盐 QTL 定位的报道, 检测到的水稻耐盐 QTL 达到 70 多个, 其中第 6、2 染色体上检测到最多, 其次是第 1、7 染色体, 第 10、11 染色体上最少^[16]。有些 QTL 所覆盖的染色体区域包含或接近 *SST(t)* 基因所在的位置。顾兴友等^[7]检测到 4 个影响水稻苗期耐盐性的 QTL, 其中一个“苗鲜干重比” QTL 连锁的标记 *RZ828* 与 *SST(t)* 的物理位置相近。Lin 等^[3]在第 6 染色体 *RZ276* 标记附近检测到一个控制盐胁迫下幼苗存活天数的 QTL, 该标记的物理位置也与 *SST(t)* 接近。钱益亮等^[17]定位的 1 个控制盐胁迫下幼苗存活天数的 QTL (*qsds6a*), 其连锁标记 *RM3307* 也与 *SST(t)* 位置相近。Wang 等^[5]在标记 *RM6818* 和 *RM6811* 之间定位到 1 个控制盐胁迫下幼苗地上部干重的 QTL (*qDSW6.1*), 该区间覆盖了 *SST(t)* 的标记区间。Zang 等^[4]以分蘖数为指

标, 在标记 *RM528* 和 *RM30* 之间定位到 1 个耐盐相关性状的 QTL, 位置更靠近 *RM30*, 该区域包含了 *SST(t)* 的定位区域 *ID26847*-*ID27253*, 且 *RM30* 与这两个标记距离较近。这些研究结果暗示, *SST(t)* 基因的自然变异可能表现为 QTL, 在许多试验群体中都能被检测到。

苗期和成熟期的耐盐性具有一定的相关性^[2]。Zang 等^[4]认为苗期和分蘖期的遗传基础有部分重叠。可见, 对水稻苗期耐盐性的研究为水稻全生育期耐盐性的研究提供了基础。本研究为 *SST(t)* 基因的精确定位、图位克隆和标记辅助选择奠定了基础, *SST(t)* 基因有望在水稻育种中具有重要的应用前景。

参考文献(References):

- [1] Munns R. The impact of salinity stress. [Http://www.plantstress.com/Articles/index.asp](http://www.plantstress.com/Articles/index.asp), 2013-3-6. DOI
- [2] 胡婷婷, 刘超, 王健康, 丁成伟, 郭荣良, 吴玉玲, 徐家安, 王友霜. 水稻耐盐基因遗传及耐盐育种研究. 分子植物育种, 2009, 7(1): 110-116. DOI
- [3] Lin HX, Zhu MZ, Yano M, Gao JP, Liang ZW, Su WA, Hu XH, Ren ZH, Chao DY. QTLs for Na^+ and K^+ uptake of the shoots and roots controlling rice salt tolerance. *Theor Appl Genet*, 2004, 108(2): 253-260. DOI
- [4] Zang JP, Sun Y, Wang Y, Yang J, Li F, Zhou YL, Zhu LH, Jessica R, Mohammadhosein F, Xu JL, Li ZK. Dissection of genetic overlap of salt tolerance QTLs at the seedling and tillering stages using backcross introgression lines in rice. *Sci China Life Sci*, 2008, 51(7): 583-591. DOI

- [5] Wang ZF, Cheng JP, Chen ZW, Huang J, Bao YM, Wang JF, Zhang HS. Identification of QTLs with main, epistatic and QTL × environment interaction effects for salt tolerance in rice seedlings under different salinity conditions. *Theor Appl Genet*, 2012, 125(4): 807–815. [DOI](#)
- [6] 沈波, 蒋靛, 於卫东, 樊叶杨, 庄杰云. 水稻苗期盐胁迫下叶绿素荧光参数的QTL分析. *中国水稻科学*, 2009, 23(3): 319–322. [DOI](#)
- [7] 顾兴友, 梅曼彤, 严小龙, 郑少玲, 卢永根. 水稻耐盐性数量性状位点的初步检测. *中国水稻科学*, 2000, 14(2): 65–70. [DOI](#)
- [8] 汪斌, 兰涛, 吴为人. 盐胁迫下水稻苗期 Na⁺含量的QTL定位. *中国水稻科学*, 2007, 21(6): 585–590. [DOI](#)
- [9] 孙勇, 藏金萍, 王韵, 朱苓华, Mohammadhosein F, 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. [DOI](#)
- [10] Ren ZH, Gao JP, Li LG, Cai XL, Huang W, Chao DY, Zhu MZ, Wang ZY, Luan S, Lin HX. A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nat Genet*, 2005, 37(10): 1141–1146. [DOI](#)
- [11] Huang XY, Chao DY, Gao JP, Zhu MZ, Shi M, Lin HX. A previously unknown zinc finger protein, DST, regulates drought and salt tolerance in rice via stomatal aperture control. *Gene Dev*, 2009, 23(15): 1805–1817. [DOI](#)
- [12] 兰涛, 梁康逵, 陈志伟, 段远霖, 王俊兰, 叶宁, 吴为人. 水稻苗期低温失绿的遗传分析及基因定位. *遗传*, 2007, 29(9): 1121–1125. [DOI](#)
- [13] Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(21): 9828–9832. [DOI](#)
- [14] Temnykh S, Declerck G, Lukashova A, Lipovich L, Cartinhour S, Mccouch S. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome Res*, 2001, 11(8): 1441–1452. [DOI](#)
- [15] Lincoln S, Daly M, Lander E. Constructing genetics maps with MAPMAKER/EXP 3.0. Whitehead Institute Technical Report. Cambridge, MA, 1992. [DOI](#)
- [16] 谢树鹏, 李俊峰, 张广彬, 聂守军, 高世伟, 刘立超. QTL 技术在水稻耐盐育种上的应用. *黑龙江农业科学*, 2010, (4): 7–10. [DOI](#)
- [17] 钱益亮, 王辉, 陈满元, 张力科, 陈冰婧, 崔金腾, 刘海燕, 朱苓华, 石英尧, 高用明, 黎志康. 利用 BC₂F₃ 产量选择导入系定位水稻耐盐 QTL. *分子植物育种*, 2009, 7(2): 224–232. [DOI](#)

•综合信息•

《植物遗传资源学报》征订启事

《植物遗传资源学报》是中国农业科学院作物科学研究所和中国农学会主办的学术期刊, 为中国科技论文统计源期刊、中国科学引文数据库来源期刊(核心期刊)、中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊, 又被《中国生物学文摘》和中国生物学文献数据库、中文科技期刊数据库收录。据 2011 年度中国期刊引证研究报告统计, 《植物遗传资源学报》影响因子 1.396, 在自然科学与工程技术类学科排序第 9 名。

报道内容为大田、园艺作物, 观赏、药用植物, 林用植物、草类植物及其一切经济植物的有关植物遗传资源基础理论研究、应用研究方面的研究成果、创新性学术论文和高水平综述或评论。诸如, 种质资源的考察、收集、保存、评价、利用、创新, 信息学、管理学等; 起源、演化、分类等系统学; 基因发掘、鉴定、克隆、基因文库建立、遗传多样性研究。

双月刊, 大 16 开本, 196 页。定价 20 元, 全年 120 元。各地邮局发行。

邮发代号: 82-643。国内刊号 CN11-4996/S, 国际统一刊号 ISSN1672-1810。

本刊编辑部常年办理订阅手续, 如需邮挂每期另加 3 元。

地 址: 北京市中关村南大街 12 号 中国农业科学院《植物遗传资源学报》编辑部

邮 编: 100081 电 话: 010-82105794 010-82105796(兼传真)

网 址: www.zwyczy.cn

E-mail: zwyczyxb2003@163.com zwyczyxb2003@sina.com