

· 农业生物技术 ·

# 水稻资源芽期和苗期耐盐碱性综合评价及耐盐基因分析

孙平勇<sup>1</sup>, 张武汉<sup>1</sup>, 舒服<sup>1</sup>, 何强<sup>1</sup>, 张莉<sup>2</sup>, 阳祝红<sup>1</sup>, 彭志荣<sup>1</sup>, 谢芸<sup>1</sup>, 邓华凤<sup>1,3</sup>

1 湖南杂交水稻研究中心 杂交水稻国家重点实验室, 湖南 长沙 410125

2 湖南省核农学与航天育种研究所, 湖南 长沙 410125

3 湖南省农业科学院, 湖南 长沙 410125

孙平勇, 张武汉, 舒服, 何强, 张莉, 阳祝红, 彭志荣, 谢芸, 邓华凤. 水稻资源芽期和苗期耐盐碱性综合评价及耐盐基因分析. 生物工程学报, 2022, 38(1): 252-263.

SUN PY, ZHANG WH, SHU F, HE Q, ZHANG L, YANG ZH, PENG ZR, XIE Y, DENG HF. Comprehensive evaluation of salt-alkali tolerance of rice germplasm at germination and seedling stages and analysis of salt-tolerant genes. Chin J Biotech, 2022, 38(1): 252-263.

**摘要:** 培育耐盐碱水稻品种是应对全球人口日益增长的重要途径之一。文中以 21 份耐盐碱性不同的水稻品种 (系) 为材料, 在芽期和苗期设置 6 个不同盐碱浓度处理, 测定了发芽势、发芽率、芽长、根长、根数、芽鲜重和苗鲜总重等指标, 以各指标盐害率的平均值作为耐盐碱性的综合评价标准。结果表明随着盐碱浓度的提升, 对种子萌发和生长的抑制越明显。在 1% NaCl 加 0.25% NaHCO<sub>3</sub> 溶液处理下, 发芽率盐害率变异最大, 为 0%–89.80%。在所有浓度处理下, 各性状指标的盐害率都具有相似的变化趋势。筛选到 4 份综合耐盐碱能力强 (大酒谷、日本晴、魔王谷和 02428) 和 7 份弱的种质资源。比较了 4 份耐盐碱强和 3 份耐盐碱弱的资源耐盐基因序列: *OsHAL3* 和 *OsRR22* 基因在 7 份材料中没有差异, *SKC1* 和 *DST* 基因在耐盐碱强和耐盐碱弱的品种之间有明显的变异。研究结果为进一步挖掘水稻耐盐碱基因和培育耐盐碱水稻新品种提供了种质资源和理论基础。

**关键词:** 水稻; 种质资源; 盐碱胁迫; 耐盐基因

**Received:** May 31, 2021; **Accepted:** July 21, 2021; **Published online:** August 5, 2021

**Supported by:** Hunan Agricultural Science and Technology Innovation Project, China (2020CX08); Natural Science Foundation of Hunan Province, China (2019JJ50427); Hunan Province Key Research and Development Program Project, China (2018NK1020-1)

**Corresponding author:** DENG Huafeng. Tel: +86-731-84690906; E-mail: dhf@hrrc.ac.cn

**基金项目:** 湖南农业科技创新资金 (2020CX08); 湖南省自然科学基金 (2019JJ50427); 湖南省重大专项 (2018NK1020-1)

# Comprehensive evaluation of salt-alkali tolerance of rice germplasms at germination and seedling stages and analysis of salt-tolerant genes

SUN Pingyong<sup>1</sup>, ZHANG Wuhan<sup>1</sup>, SHU Fu<sup>1</sup>, HE Qiang<sup>1</sup>, ZHANG Li<sup>2</sup>, YANG Zhuhong<sup>1</sup>, PENG Zhirong<sup>1</sup>, XIE Yun<sup>1</sup>, DENG Huafeng<sup>1,3</sup>

1 State Key Laboratory of Hybrid Rice, Hunan Hybrid Rice Research Center, Changsha 410125, Hunan, China

2 Nuclear Agriculture and Space Breeding Research Institute, Changsha 410125, Hunan, China

3 Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, Hunan, China

**Abstract:** Cultivating salt-alkali tolerant rice varieties is one of the important ways to meet the increasing food demand of growing global population. In this study, twenty-one rice germplasms with different salt-alkali tolerance were treated with six salt-alkali concentrations at germination and seedling stages. The germination potential, germination rate, shoot length, root length, root number, fresh weight of shoot and seedlings were measured. The average value of salt damage rate was used to evaluate the salt-alkali tolerance. As the salt-alkali concentration increases, the inhibition on seed germination and growth became more obvious. Upon treatment with 1% NaCl plus 0.25% NaHCO<sub>3</sub>, the salt damage rate of germination rate has the largest variation, ranging from 0% to 89.80%. The salt damage rate of each trait shows a similar trend at all concentrations. Four germplasm resources with strong salt-alkali tolerance (Dajiugu, Nippobare, Mowangu and 02428) and 7 sensitive germplasms were screened. The salt-tolerant gene sequence of 4 salt-alkali tolerant varieties and 3 sensitive germplasms were analyzed. *OSHAL3* and *OsRR22* were identical among the 7 germplasms, but *SKC1* and *DST* showed clear variations between the salt-alkali tolerant and sensitive germplasms. Besides the salt-alkali tolerant germplasm resources, this study can also serve as a reference for mining of genes involved in salt-alkali tolerance and breeding of salt-alkali tolerant rice varieties.

**Keywords:** rice; germplasm resource; salt-alkaline stress; salt-tolerant gene

截至 2021 年 5 月,世界实时统计数据显示全球人口已达 78.67 亿,比去年 5 月份大约增加 1 亿,如果按照这个速度增长,到 2050 年全球人口总数预计达到 100 亿。要满足全球日益增长人口的需求,粮食产量也需要大幅增长。土壤盐碱化程度日趋严重,严重制约了粮食生产。截至 2019 年,我国盐碱地总面积高达 9 913 万 hm<sup>2[1-2]</sup>。袁隆平院士表示:如果将其中 1 亿亩盐碱地种上水稻,则有望每年产出能多养活 8 000 多万人

口的粮食。因此,筛选水稻耐盐碱种质资源、挖掘相关耐盐碱基因,并通过基因工程技术培育耐盐碱水稻品种,对于保障全球粮食安全具有重要的意义。

斯里兰卡是最早开展耐盐水稻资源筛选和培育工作的国家,并在 1939 年选育出世界上首个耐盐水稻品种 Pokkali<sup>[3]</sup>。20 世纪 50 年代,我国开始进行水稻耐盐性研究,并取得了一定的进展<sup>[4]</sup>。近年来的研究主要聚焦在耐盐品种

的耐盐性评价方面,例如 20 世纪 70 年代江苏省农业科学院开始鉴定、评价水稻耐盐种质资源,筛选一批具有应用价值的水稻材料——乌咀子和白谷子等<sup>[5]</sup>。近期,海南大学对 30 份耐盐性不同的水稻品种,在苗期以不同浓度的盐溶液进行胁迫处理,测定了相关耐盐指标,并运用相关性分析、隶属函数和系统聚类等方法,把 30 份供试品种分成耐盐型、中间型和盐敏感型<sup>[6]</sup>。孙现军等设置淡水、0.3%和 0.5%的盐溶液浇灌处理,对不同来源的水稻资源进行了全生育期耐盐性鉴定,并调查了结实率和单株产量等 6 项农艺性状以及耐盐表型。以产量耐盐系数 $\geq 0.8$  为标准,共筛选出了 121 份耐盐水稻资源<sup>[1]</sup>。田蕾等以 125 mmol/L NaCl 溶液对 64 份粳稻资源进行盐胁迫处理,并调查其发芽势、发芽率、芽长、根长和盐害率等。结果表明水稻芽期对盐胁迫较为敏感,并将这些种质划分成盐敏感型、弱耐盐和耐盐类群等 4 个类群<sup>[7]</sup>。我国育种家也通过耐盐资源的发现、筛选和改良,培育出了许多综合性质优良的耐盐品种,诸如广盐 1 号、海稻 86 和盐粳 68 等<sup>[8]</sup>。实际生产中多为盐碱共胁迫,然而目前的研究大多是针对盐胁迫<sup>[2]</sup>,对于水稻在盐和碱同时胁迫下的研究较少。

本研究搜集了不同来源的 21 份水稻种质资源(包括审定的耐盐品种),在芽期和苗期对其进行不同浓度的盐碱胁迫处理,并计算发芽率盐害率、芽长盐害率、根数盐害率、根长盐害率、芽鲜重盐害率和苗鲜总重盐害率。以平均盐害率作为耐盐碱性的综合评价指标,最终筛选出 4 份耐盐碱能力较强的水稻资源,并明确了一些特异基因的序列在不同品种之间的差异,研究结果为通过分子辅助育种培育耐盐碱水稻新品种以及深入研究耐盐碱调控分子机制提供重要的材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试水稻材料

水稻种质资源 21 份:盐稻 3931,广盐 1 号,日本晴,9311,CO39,田糯,白丝糯,川 7,大酒谷,魔王谷,02428,中嘉早 17,中早 39,中早 35,IR64,明恢 63,桂朝 2 号,Lemont,YLCH,NIL-GRF4 和 NIL-grf4。供试材料于 2020 年正季种植在湖南杂交水稻研究中心试验田,所收种子用于耐盐碱性鉴定。

### 1.2 芽期盐碱胁迫处理

江苏省农业科学院的研究表明,1.0%和 0.5%的盐浓度分别为水稻芽期和苗期耐盐性鉴定的最适浓度<sup>[4]</sup>,本研究在此基础上设置了不同的处理浓度。每份水稻材料分别选取 50 粒成熟度好、饱满的种子,用 75%的乙醇消毒 15 min 后用无菌水冲洗 3 遍。处理分为 2 个部分:处理一、分别用 1.0%的 NaCl 溶液,pH 6.60 (B)、1.0% NaCl 加 0.25% NaHCO<sub>3</sub> 溶液,pH 8.23 (C)、1.12% NaCl 加 0.28% NaHCO<sub>3</sub> 溶液,pH 8.26 (G) 和 1.2% NaCl 加 0.3% NaHCO<sub>3</sub>,pH 8.30 (F) 溶液直接浸种催芽,盐碱比 (NaCl : NaHCO<sub>3</sub>) 为 4 : 1 是根据滨海盐碱地的特征确定<sup>[9-10]</sup>,以无菌水处理作为对照。在第 4 天和第 10 天分别调查发芽势与发芽率。处理二、用无菌水催芽,将 30 粒发芽的种子(芽长有种子粒长的一半长)播种于铺有 2 层滤纸的培养皿中,在 28 °C 培养室(光照 12 h,黑暗 12 h)用 1.0%的 NaCl 溶液处理,以无菌水处理作为对照,10 d 后调查芽长、根长和根数,每个材料调查 5 株,求平均值。处理期间每天更换相应的溶液以保持盐碱浓度不变。

### 1.3 苗期盐碱胁迫处理

每份材料选取 50 粒成熟度好、饱满的种子,消毒催芽之后,选取发芽一致的种子播种

于底部带孔的 PCR (polymerase chain reaction) 板中, 每板播种 2 个材料, 将 PCR 板放置在盛满营养液的培养盒中。在 28 °C 培养室培育成 3 叶期的苗子, 分别用 0.6% NaCl 加 0.15% NaHCO<sub>3</sub> 溶液, pH 8.13 (A) 和 0.7% NaCl 加 0.175% NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.15 (H) 溶液处理, 以营养液处理作为对照。处理期间每 3 天更换相应的处理溶液, 14 d 后调查芽鲜重和苗鲜总重, 每个材料称量 5 株, 求平均值。

#### 1.4 耐盐碱性评价指标

以相对发芽势、相对发芽率、相对芽长、相对根数、相对根长、相对芽鲜重、相对苗鲜总重和相对盐害率作为水稻芽期和苗期耐盐碱性的评价指标。

相对发芽势 (%) = 盐碱处理发芽势 / 水处理种子发芽势 × 100;

发芽势盐害率 (%) = (水处理发芽势 - 盐碱处理发芽势) / 水处理发芽势 × 100;

相对发芽率 (%) = 盐碱处理发芽率 / 水处理发芽率 × 100;

发芽率盐害率 (%) = (水处理发芽率 - 盐碱处理发芽率) / 水处理发芽率 × 100;

相对芽长 (%) = 盐碱处理芽长 / 水处理芽长 × 100;

芽长盐害率 (%) = (水处理芽长 - 盐碱处理芽长) / 水处理芽长 × 100;

相对根数 (%) = 盐碱处理根数 / 水处理根数 × 100;

根数盐害率 (%) = (水处理根数 - 盐碱处理根数) / 水处理根数 × 100;

相对根长 (%) = 盐碱处理根长 / 水处理根长 × 100;

根长盐害率 (%) = (水处理根长 - 盐碱处理根长) / 水处理根长 × 100%;

相对芽鲜重 (%) = 盐碱处理芽鲜重 / 营养液处理芽鲜重 × 100;

芽鲜重盐害率 (%) = (营养液处理芽鲜重 - 盐碱处理芽鲜重) / 营养液处理芽鲜重 × 100%;

相对苗鲜总重 (%) = 盐碱处理苗鲜总重 / 营养液处理苗鲜总重 × 100%;

苗鲜总重盐害率 (%) = (营养液处理苗鲜总重 - 盐碱处理苗鲜总重) / 营养液处理苗鲜总重 × 100。

#### 1.5 水稻芽期和苗期耐盐碱性综合评价

根据水稻品种 (系) 耐盐性鉴定技术规程, 可以将水稻资源的耐盐碱能力分为极强、强、中、弱和极弱 5 个级别, 其相对盐害率依次为 0.0%–20.0%、20.0%–40.0%、40.0%–60.0%、60.0%–80.0% 和 80.0%–100.0%<sup>[11]</sup>, 本研究将其依次与等级 A、B、C、D 和 E 相对应。以芽期和苗期的发芽率盐害率、芽长盐害率、根数盐害率、根长盐害率、芽鲜重盐害率和苗鲜总重盐害率的平均值作为耐盐碱性的综合评价指标。此外, 统计每份材料各种耐盐碱评价指标的 A、B、C、D 和 E 等级以展示其耐盐碱能力的强弱。

#### 1.6 耐盐基因序列的比较分析

根据已克隆的水稻主要耐盐基因 *SKC1*、*OsHAL3*、*DST* 和 *OsRR22* 的功能变异位点分别设计引物 (表 1), 对筛选到的 4 份耐盐碱强和 3 份耐盐碱弱的水稻资源采用 CTAB 法提取其 DNA。利用擎科生物公司的 T3 Super Mix 体系进行 PCR 扩增: 98 °C 2 min; 98 °C 10 s, 55 °C 10 s, 72 °C 20 s, 35 个循环; 72 °C 2 min; 4 °C 冷却。扩增产物通过 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 然后送至擎科生物技术公司测序, 测序结果利用 Sequencher 软件比对分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 盐碱胁迫下水稻资源芽期各评价指标的表现

用不同浓度的盐碱溶液直接处理催芽的种子, 然后调查其发芽势与发芽率。结果发现 4 种处理下的发芽势盐害率在 45.45%–100% 之间, 说明盐碱胁迫严重影响了水稻种子的萌发。在盐碱液 B (1.0% 的 NaCl)、C (1.0% NaCl 加 0.25% NaHCO<sub>3</sub>)、G (1.12% NaCl 加 0.28% NaHCO<sub>3</sub>) 和 F (1.2% NaCl 加 0.3% NaHCO<sub>3</sub>) 处理下, 所

有测试品种的平均发芽势盐害率分别为 79.20%、90.82%、94.43% 和 98.85%, 说明随着盐碱浓度的提升, 对种子萌发的影响越明显。相比发芽势, 盐碱胁迫对发芽率的影响要小很多。在盐碱液 B、C、G 和 F 处理下, 所有测试品种的平均发芽率盐害率分别为 3.20%、37.69%、73.39% 和 83.49%, 变幅分别为 -4.16%–14.89%、0%–89.80%、14%–100% 和 42%–100% (图 1)。说明 B 浓度对各品种的发芽率影响较小; 而在 C 浓度处理下, 发芽率盐害率表现出最大的变异范围, 能很好区分水稻资源耐盐碱的强弱。

表 1 耐盐基因引物序列

Table 1 Primers used for amplification of salt-tolerant genes

Primers	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Product size (bp)	Genes
SKA	GCATCCTTGGCTCTACTTC	ATATGTCCCAGGCCAGAGTA	1 074	<i>SKC1</i>
HA	GACCGCTACATCAATCCAAG	TTTGCTGTAGTCCCATGCTC	802	<i>OsHAL3</i>
DS	GGCTGTTCCCGTGCTTGTTTC	CGCCTCCAGTTGAGCATGTCGA	622	<i>DST</i>
RR	GAGGAAGTTCGGTAATCGTG	TGTACTACATTTCTGTGCAGGT	839	<i>OsRR22</i>

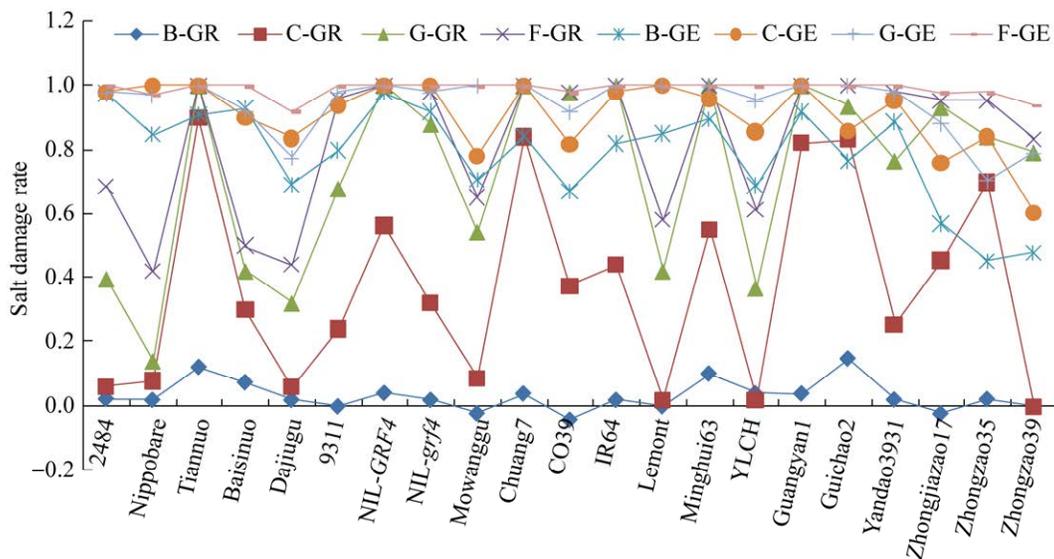


图 1 不同浓度盐碱液处理对发芽势与发芽率的影响

Figure 1 Effect of different salt-alkali concentrations on germination potential and germination rate. B, C, G and F represent 1.0% NaCl solution, 1% NaCl plus 0.25% NaHCO<sub>3</sub> solution, 1.12% NaCl plus 0.28% NaHCO<sub>3</sub> solution, and 1.2% NaCl plus 0.3% NaHCO<sub>3</sub> solution, respectively. GR and GE represent the salt damage rate of germination rate and the salt damage rate of germination potential, respectively.

品种大酒谷和日本晴在 B、C 和 G 处理下的发芽率盐害率均低于 40%，说明它们的耐盐碱能力很强。

待催好芽之后用 B 溶液 (1.0%的 NaCl) 处理水稻资源，调查发现所有测试品种的平均芽长盐害率、根数盐害率和根长盐害率分别为 53.19%、53.51%和 55.38%，说明盐碱胁迫对水稻萌发期的芽长、根数和根长的影响相当。其变幅分别为 34.88%–73.86%、3.23%–76.92%和 15.35%–82.53%，说明根数盐害率的变异范围最大、芽长盐害率的变异范围最小。从图 2 可以看出，各盐害率主要集中在 40%–70%之间。从各资源的表现来看，大酒谷的芽长盐害率、根数盐害率和根长盐害率分别为 34.88%、3.23%和 41.22%，前两个盐害率在测试的资源中是最低的，说明其具有很强的耐盐碱能力。

## 2.2 盐碱胁迫对水稻资源苗期各性状的影响

用不同浓度的盐碱溶液处理 3 叶期的幼苗，在 A 溶液 (0.6% NaCl 加 0.15% NaHCO<sub>3</sub> 溶液) 处理下，所有测试品种的平均芽鲜重盐害

率和苗鲜总重盐害率分别为 40.36%和 26.47%，变幅分别为 4.58%–66.35%和 6.43%–58.62%；在 H 溶液 (0.7% NaCl 加 0.175% NaHCO<sub>3</sub>) 处理下，所有测试品种的平均芽鲜重盐害率和苗鲜总重盐害率分别为 59.54%和 34.62%，变幅分别为 34.78%–100%和 8.48%–59.11%。说明随着盐碱浓度的提升，对水稻资源苗期生长的影响越明显；在 H 溶液处理下，芽鲜重盐害率的变异范围最大。各盐害率主要分布在 40%左右，不管是 A 溶液或者 H 溶液处理，各水稻资源的苗鲜总重盐害率大多小于 40%，说明各处理对苗鲜总重的影响较小。从水稻资源的表现来看，大酒谷和日本晴在 A 和 H 处理下的芽鲜重和苗鲜总重盐害率均低于 40% (图 3)，说明它们的耐盐碱能力很强，这与上述芽期处理的结果一致。

## 2.3 水稻资源盐碱胁迫下芽期和苗期耐盐碱性的综合评价

计算芽期和苗期的发芽率盐害率、芽长盐害率、根数盐害率、根长盐害率、芽鲜重盐害

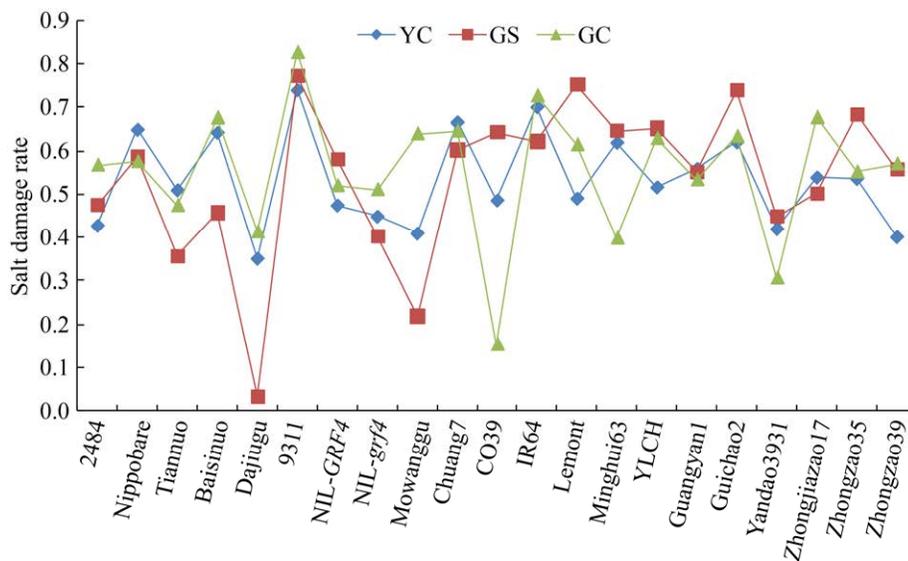


图 2 盐碱液处理对芽长、根数和根长的影响

Figure 2 Effect of treatments with salt-alkali solution on shoot length, root length and root number. YC, GS and GC represent the salt damage rate of shoot length, root number and root length, respectively.

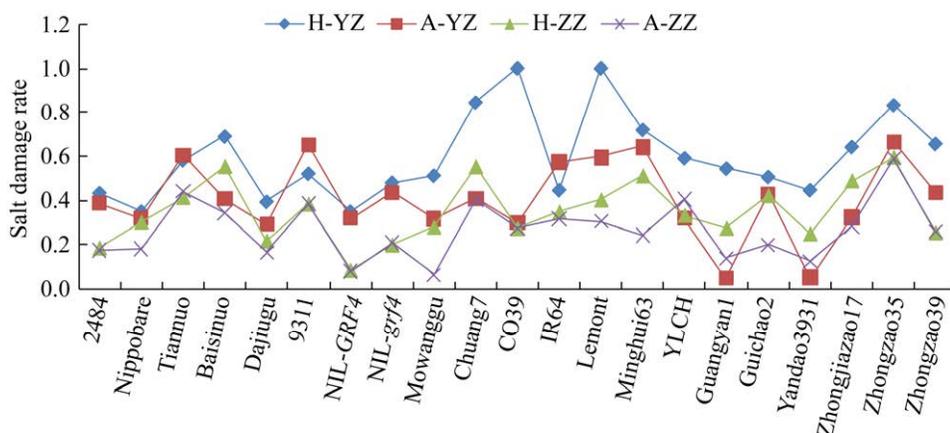


图3 不同浓度盐碱液处理对苗期各性状的影响

Figure 3 Effect of different salt-alkali concentrations on various traits at seedling stage. A and H represent 0.6% NaCl plus 0.15% NaHCO<sub>3</sub> solution and 0.7% NaCl plus 0.175% NaHCO<sub>3</sub> solution, respectively. YZ and ZZ respectively represent the salt damage rate of shoot fresh weight and the salt damage rate of seedlings fresh weight.

率和苗鲜总重盐害率的平均值，以客观反映各水稻资源芽期和苗期耐盐碱能力的强弱，数值越小说明耐盐碱能力越强。由于发芽势盐害率整体偏高，而 1.0% NaCl 处理下的发芽率盐害率整体偏低，因此这些盐害率不参与平均值的计算。此外，统计每份资源各评价指标的耐盐碱等级以直观展示其耐盐碱能力。总共筛选到 4 份综合耐盐碱能力强的种质资源：大酒谷、日本晴、魔王谷和 02428。其中大酒谷的平均盐害率只有 26.76%，在测试的资源中综合耐盐碱能力最强。大酒谷的耐盐碱等级为 3A5B2C，即在调查的 10 个耐盐碱评价指标中，有 3 个极强、5 个强和 2 个中等，这也说明其综合耐盐碱能力很强。耐盐碱能力中等的种质资源有 10 份，占总测试资源的 47.62%。耐盐碱能力弱的种质资源有 7 份，其中川 7 最弱，平均盐害率达 69.48% (表 2)。

#### 2.4 筛选到的耐盐碱资源的耐盐基因变异分析

为了明确本研究筛选到的耐盐碱强的水稻资源可能由哪些耐盐基因控制其表型，比较了

表 2 水稻资源耐盐碱性的综合评价

Table 2 Comprehensive evaluation of rice germplasm for salt-alkali tolerance

Rice germplasm	Average salt damage ( $\bar{x} \pm s$ , %)	Salt-alkali tolerant grade	Salt-alkali tolerant ability
Dajiugu	26.76±13.70	3A5B2C	Strong
Nippobare	35.92±18.62	3A3B3C1D	Strong
Mowangu	37.12±20.29	2A3B3C2D	Strong
02428	37.84±18.01	3A2B4C1D	Strong
Yandao3931	40.35±26.94	2A3B3C1D1E	Moderate
YLCH	44.31±18.63	1A3B3C3D	Moderate
Zhongzao39	47.47±24.62	1A3B3C2D1E	Moderate
NIL-grf4	48.57±24.47	1A3B4C2E	Moderate
NIL-GRF4	49.60±30.29	2A2B4C2E	Moderate
Baisinuo	49.73±13.06	2B5C3D	Moderate
Lemont	51.69±24.96	1A2B4C2D1E	Moderate
CO39	54.51±31.47	1A4B1C1D3E	Moderate
Guangyan1	54.59±31.29	2A1B4C3E	Moderate
Zhongjiazao17	57.80±21.61	2B4C2D2E	Moderate
9311	61.48±21.60	3B1C4D2E	Weak
IR64	61.61±23.25	2B3C3D2E	Weak
Tiannuo	62.66±23.41	1B5C1D3E	Weak
Guichao2	63.02±23.89	1A3C3D3E	Weak
Minghui63	63.19±22.53	2B2C4D2E	Weak
Zhongzao35	69.34±13.33	4C3D3E	Weak
Chuang7	69.48±20.81	4C2D4E	Weak

Grades A, B, C, D and E represent the salt damage rate of 0.0%–20.0%, 20.0%–40.0%, 40.0%–60.0%, 60.0%–80.0% and 80.0%–100.0%, respectively.

4份耐盐碱强(大酒谷、日本晴、魔王谷和02428)和3份耐盐碱弱(川7、明恢63和田糯)水稻资源的耐盐基因 *SKC1* (shoot  $K^+$  concentration 1)、*OsHAL3* (*Oryza sativa* halotolerance protein 3)、*DST* (drought and salt tolerance) 和 *OsRR22* (B-type response regulator 22) 的功能变异位点。测序结果显示(图4), *OsHAL3* 基因在所测7份材料中无差异。*OsRR22* 基因除了大酒谷在编码区第597位由碱基T突变为C(不造成氨基酸变异)之外,其余材料无变异。*DST* 基因有两处变异:川7、明恢63和田糯的第374 bp插入18个碱基(造成9个氨基酸的插入),大酒谷、日本晴、魔王谷和02428没有变异;明恢63和田糯的第599 bp插入3碱基(造成1个氨基酸的插入),魔王谷的第602 bp缺失6碱基(造成

2个氨基酸的缺失),大酒谷、日本晴、02428和川7没有变异。*SKC1* 基因有4处变异:大酒谷、日本晴、魔王谷和2428的第418位为碱基C(脯氨酸),川7、明恢63和田糯的为G(丙氨酸);大酒谷、日本晴、魔王谷,2428,明恢63的第551位、第994位和第1183位分别为G(精氨酸)、C(组氨酸)和C(亮氨酸),川7和田糯的分别为A(组氨酸)、G(天冬氨酸)和G(缬氨酸)。

### 3 讨论

在水稻生长的不同发育时期,盐碱胁迫对其影响不同<sup>[12]</sup>。萌发期与幼苗期是水稻生长发育的最初阶段,也是最早响应外界逆境胁迫的时期,水稻在此期间的耐逆能力会影响其最终

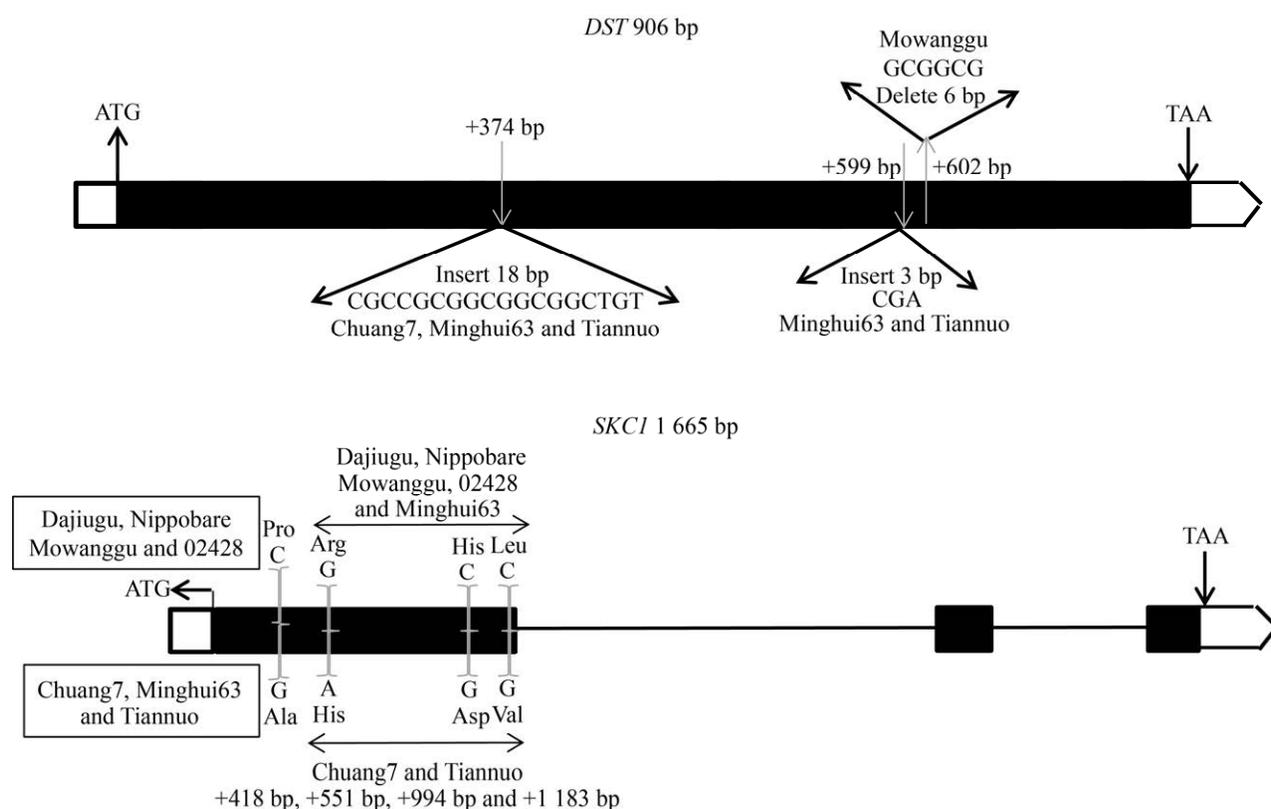


图4 DST和SKC1基因的变异类型

Figure 4 Allelic variation types of DST and SKC1.

产量<sup>[13]</sup>。在某种程度上苗期可以作为全生育期耐盐性水平的参考<sup>[14]</sup>。现有的研究主要集中在盐胁迫，而实际生产中是盐碱共同胁迫。因此，需要同时在盐碱胁迫下进行水稻耐盐碱品种的筛选才能满足生产的需求<sup>[10,15]</sup>。此外，水稻的耐盐碱性是由自身基因型和外界环境共同影响的复杂性状<sup>[16]</sup>，通过调查单一性状指标不能真实、全面地评价水稻的耐盐碱能力，需要对多项指标进行综合评价<sup>[10,17-18]</sup>。本研究对 21 份水稻种质资源的芽期和苗期进行不同浓度的盐碱胁迫处理，并综合评价了发芽势、发芽率、芽长、根数、根长、芽鲜重和苗鲜总重等多项指标。本试验研究结果表明，只有在 1.0% 的 NaCl 处理下对少数几个品种的发芽势有促进，其他浓度处理对发芽率、芽长、根数、根长、芽鲜重和苗鲜总重均有明显的抑制作用。并且品种间的耐盐碱性状存在显著差异，这与前人研究结果基本一致<sup>[7,13,19]</sup>。在所有盐碱浓度处理下，本研究中各性状指标的盐害率都具有相似的变化趋势，说明这些指标之间具有很强的相关性。

通过综合性状评价，最终筛选出 4 份耐盐碱能力强的水稻资源，其平均盐害率均小于 40%。盐稻 3931 的平均盐害率接近 40%，在测试的材料中排名第 5，说明其综合耐盐碱能力也比较强。广盐 1 号的平均盐害率为 54.59%，属于中等耐盐碱水稻。4 份耐盐碱能力强的资源均为粳稻，而 7 份耐盐碱能力弱的种质资源大多为籼稻。转录因子 *OsGRF4* 是一个多功能基因，其第 3 外显子的碱基由 TC 突变为 AA，打破了 miR396 对其表达的调控抑制，使得水稻氮利用率提高、产量增加、籽粒落粒性降低和苗期耐冷性增强<sup>[20-24]</sup>。为了明确 *OsGRF4* 基因是否也控制耐盐碱性状，对其近等基因系 NIL-*GRF4* 和 NIL-*grf4* 进行盐碱胁迫，结果显示其平均盐害率分别为 49.60% 和 48.57%，两者

差异不大，均属于中等耐盐碱材料。说明 *OsGRF4* 基因不影响耐盐碱性状。

水稻耐盐碱性是由多基因控制的数量性状<sup>[25]</sup>，随着高通量芯片技术、现代测序技术和分子生物学的飞速发展，一批耐盐 QTL (quantitative trait locus) 相继被定位和挖掘。而水稻耐碱基因的克隆和利用相对来说要落后很多，其研究大多还停留在 QTL 定位阶段<sup>[2]</sup>。2016 年，印度学者报道了一种利用 50K SNP 芯片通过 BSA 方法分析重组自交系群体的极端分离池来快速鉴定水稻生殖期耐盐 QTL 的方法。通过这种方法总共鉴定到 5 021 个多态位点和 34 个 QTL<sup>[26]</sup>。2020 年我国东北农业大学的邹德堂研究组以盐敏感水稻品种 IR36 和耐盐材料 Weiguo 为亲本构建了 F<sub>2:3</sub> 群体，通过全基因组 QTL-Seq 测序技术对 40 株极端分离池进行 QTL 鉴定，挖掘到 1 个主效 QTL 位点 *qRSL7*，并利用包含 199 个单株的后代分离群体将 *qRSL7* 精细定位到 222 kb 的区间。后期通过 RNA-seq 技术在候选区间发现 5 个在盐胁迫下有显著差异表达的基因，并经过比较测序发现亲本间 Os07g0569700 (*OsSAP16*) 基因有 1 bp 的缺失突变，*OsSAP16* 编码一个胁迫相关蛋白<sup>[27]</sup>。本研究中日本晴的综合耐盐碱能力排名第 2，其 *OsSAP16* 基因也有 1 bp 的缺失，与耐盐材料 Weiguo 的变异一致<sup>[27]</sup>。孙健研究组在盐、碱胁迫条件下，分析水稻重组自交系苗期的根数和根长，表明水稻对碱胁迫比对盐胁迫更为敏感，定位到 18 个加性效应 QTL 位点，对表型变异的贡献率为 6.02%–20.06%<sup>[28]</sup>。

在耐盐基因克隆以及分子调控机制研究方面，中国科学院植物生理生态研究所林鸿宣团队取得了一系列重要进展。2005 年，该团队首次克隆了编码钠离子特异性转运蛋白的耐盐基因 *SKC1*，该基因只在维管束中表达。在盐胁迫下 *SKC1* 把地上部分过量的 Na<sup>+</sup> 运输到根部，从

而减轻水稻  $\text{Na}^+$  毒害, 增强其耐盐性。耐盐品种 Nona 蛋白的第 140 位、第 184 位、第 332 位和第 395 位分别为丙氨酸、组氨酸、天冬氨酸和缬氨酸, 在盐敏感品种越光中分别为脯氨酸、精氨酸、组氨酸和亮氨酸, 这些变异可能是导致其耐盐性差异的原因<sup>[29]</sup>。2009 年, 林鸿宣团队克隆了 *OsHAL3* 和 *DST* 这两个耐盐基因, 分别编码转录激活因子黄素单核苷酸结合蛋白和对水稻耐盐、耐旱具有负调控作用的包含锌指结构域的转录因子<sup>[30-31]</sup>。日本的研究者在 6 000 株经 EMS 诱变的群体里筛选到 1 个耐盐突变体, 并通过 MutMap 的方法快速克隆了耐盐基因 *OsRR22*。*OsRR22* 基因第 3 外显子的碱基由 G 突变为 A 之后导致形成终止密码子, 并产生功能缺失型耐盐突变体<sup>[32]</sup>。

由于 *SKCI* 是第一个克隆的水稻耐盐基因, 与 *OsHAL3*、*DST* 和 *OsRR22* 具有重要的应用价值<sup>[29-33]</sup>, 因此比较了本研究中 4 份耐盐碱强和 3 份耐盐碱弱的资源 *SKCI*、*OsHAL3*、*DST* 和 *OsRR22* 的功能变异位点。结果显示 *OsHAL3* 和 *OsRR22* 基因在所测 7 份材料中没有氨基酸的差异。7 份材料的 *SKCI* 蛋白在第 140 位、第 184 位、第 332 位和第 395 位有 4 处变异, 与文献报道的位点一致<sup>[29]</sup>。4 份耐盐碱强的品种 (大酒谷、日本晴、魔王谷和 2428) 为同一基因型, 2 份耐盐碱弱的品种 (川 7 和田糯) 为另外一种基因型, 而耐盐碱弱的明恢 63 为中间型。此外, 通过华中农业大学测序数据库的分析表明, 明恢 63 与耐盐碱弱的 IR64 和 9311 的基因型一致, 耐盐碱弱的桂朝 2 号与上述基因型都不一致, 为主要的变异类型, 变异位点的碱基依次为 G、G、G 和 G (<http://ricevarmap.ncpgr.cn/>)。 *DST* 基因有两处变异, 基本上是 4 份耐盐碱强的品种为同一基因型, 3 份耐盐碱弱的品种为另一种基因型, 与文献报道的变异位点不一致<sup>[31]</sup>。因

此, *SKCI* 和 *DST* 基因的差异可能是导致本研究资源耐盐碱强和弱的原因, 也可能与耐盐碱的特性不相关, 还需通过基因定位和遗传转化进行验证。除了基因序列差异之外, 基因的表达水平和表观修饰水平的差异也可能导致水稻品种的耐盐碱表型不同, 有待进一步的研究。

本研究在芽期和苗期设置 6 个不同浓度鉴定了 21 份水稻品种 (系) 的耐盐碱性, 筛选到 4 份综合耐盐碱能力强的种质资源。已克隆耐盐基因序列分析表明, *SKCI* 和 *DST* 基因在耐盐碱强和耐盐碱弱的品种之间有明显的变异。筛选到的耐盐碱强的资源以及相关耐盐基因序列的分析为进一步挖掘水稻耐盐碱基因和培育耐盐碱水稻新品种提供了重要的种质资源和理论基础。

## REFERENCES

- [1] 孙现军, 姜奇彦, 胡正, 等. 水稻资源全生育期耐盐性鉴定筛选. 作物学报, 2019, 45(11): 1656-1663.  
Sun XJ, Jiang QY, Hu Z, et al. Screening and identification of salt-tolerant rice germplasm in whole growth period. Acta Agron Sin, 2019, 45(11): 1656-1663 (in Chinese).
- [2] 冷春旭, 郑福余, 赵北平, 等. 水稻耐碱性研究进展. 生物技术通报, 2020, 36(11): 103-111.  
Leng CX, Zheng FY, Zhao BP, et al. Advances on alkaline tolerance of rice. Biotechnol Bull, 2020, 36(11): 103-111 (in Chinese).
- [3] Fernando LH. The performance of salt resistant paddy, Pokkali in Ceylon. Trop Agric, 1949, 105: 124-126.
- [4] 王才林, 张亚东, 赵凌, 等. 耐盐碱水稻研究现状、问题与建议. 中国稻米, 2019, 25(1): 1-6.  
Wang CL, Zhang YD, Zhao L, et al. Research status, problems and suggestions on salt-alkali tolerant rice. China Rice, 2019, 25(1): 1-6 (in Chinese).
- [5] 吴荣生, 王志霞, 蒋荷, 等. 太湖流域稻种资源耐盐性筛选鉴定. 江苏农业科学, 1989, 17(1): 8-9.  
Wu RS, Wang ZX, Jiang H, et al. Screening and identification of salt tolerance of rice germplasm resources in Taihu lake basin. Jiangsu Agric Sci, 1989, 17(1): 8-9 (in Chinese).

- [6] 顾晓, 吴孚桂, 刘慧芳, 等. 30 份水稻材料的耐盐性鉴定与评价. 热带生物学报, 2020, 11(3): 314-323.  
Gu X, Wu FG, Liu HF, et al. Identification and evaluation of salt tolerance of 30 rice varieties/lines. J Trop Biol, 2020, 11(3): 314-323 (in Chinese).
- [7] 田蕾, 陈亚萍, 刘俊, 等. 粳稻种质资源芽期耐盐性综合评价与筛选. 中国水稻科学, 2017, 31(6): 631-642.  
Tian L, Chen YP, Liu J, et al. Comprehensive evaluation and selection of rice (*Oryza sativa Japonica*) germplasm for saline tolerance at germination stage. Chin J Rice Sci, 2017, 31(6): 631-642 (in Chinese).
- [8] 赵记伍, 雷传松, 刘永权, 等. 海稻86萌发期耐盐碱性特征初探. 中国稻米, 2018, 24(3): 87-92.  
Zhao JW, Lei CS, Liu YQ, et al. Primary exploration on saline-alkali tolerance of Haidao 86 in germination period. China Rice, 2018, 24(3): 87-92 (in Chinese).
- [9] 张鹏锐, 李旭霖, 崔德杰, 等. 滨海重盐碱地不同土地利用方式的水盐特征. 水土保持学报, 2015, 29(2): 117-121, 203.  
Zhang PR, Li XL, Cui DJ, et al. Characteristics of water and salt under different land use in heavy coastal saline-alkaline land. J Soil Water Conserv, 2015, 29(2): 117-121, 203 (in Chinese).
- [10] 陈二影, 王润丰, 秦岭, 等. 谷子芽期耐盐碱综合鉴定及评价. 作物学报, 2020, 46(10): 1591-1604.  
Chen EY, Wang RF, Qin L, et al. Comprehensive identification and evaluation of foxtail millet for saline-alkaline tolerance during germination. Acta Agron Sin, 2020, 46(10): 1591-1604 (in Chinese).
- [11] 江苏省地方标准. 水稻品种(系)耐盐性鉴定与评定技术规程: DB32/T 1845-2011. 南京: 江苏省质量技术监督局, 2011.  
Local Standard of Jiangsu Province. Examining rules for identifying and evaluating standard of rice varieties or lines resistant to salt: DB32/T 1845-2011. Nanjing: Jiangsu Quality and Technical Supervision Bureau, 2011 (in Chinese).
- [12] Zhu GY, Kinet JM, Lutts S. Characterization of rice (*Oryza sativa* L.) F3 populations selected for salt resistance. I. Physiological behaviour during vegetative growth. Euphytica, 2001, 121(3): 251-263.
- [13] 盛夏冰, 汪雪峰, 谭炎宁, 等. 盐胁迫对超级稻‘超优千号’及亲本萌发和幼苗生长的影响. 分子植物育种, 2020, 18(17): 5835-5843.  
Sheng XB, Wang XF, Tan YN, et al. Effects of salt stress on seed germination and seedling growth of hybrid rice ‘CY1000’ and its parents. Mol Plant Breed, 2020, 18(17): 5835-5843 (in Chinese).
- [14] 吴家富, 杨博文, 向珣朝, 等. 不同水稻种质在不同生育期耐盐鉴定的差异. 植物学报, 2017, 52(1): 77-88.  
Wu JF, Yang BW, Xiang XC, et al. Identification of Salt Tolerance in Different Rice Germplasm at Different Growth Stages. Chin Bull Bot, 2017, 52(1): 77-88 (in Chinese).
- [15] 韩飞, 诸葛玉平, 娄燕宏, 等. 63 份谷子种质的耐盐综合评价及耐盐品种筛选. 植物遗传资源学报, 2018, 19(4): 685-693.  
Han F, Zhuge YP, Lou YH, et al. Evaluation of salt tolerance and screening for salt tolerant accessions of 63 foxtail millet germplasm. J Plant Genet Resour, 2018, 19(4): 685-693 (in Chinese).
- [16] Gimhani DR, Gregorio GB, Kottearachchi NS, et al. SNP-based discovery of salinity-tolerant QTLs in a bi-parental population of rice (*Oryza sativa*). Mol Genet Genomics, 2016, 291(6): 2081-2099.
- [17] 段文学, 张海燕, 解备涛, 等. 甘薯苗期耐盐性鉴定及其指标筛选. 作物学报, 2018, 44(8): 1237-1247.  
Duan WX, Zhang HY, Xie BT, et al. Identification of salt tolerance and screening for its indicators in sweet potato varieties during seedling stage. Acta Agron Sin, 2018, 44(8): 1237-1247 (in Chinese).
- [18] 袁军伟, 李敏敏, 刘长江, 等. NaCl 胁迫下葡萄砧木幼苗生长及体内  $\text{Cl}^-$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  的分布动态. 核农学报, 2018, 32(12): 2448-2454.  
Yuan JW, Li MM, Liu CJ, et al. Effects of NaCl stress on seedling growth and absorption, transportation and distribution of  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  in grapevine rootstocks. J Nucl Agric Sci, 2018, 32(12): 2448-2454 (in Chinese).
- [19] 李红宇, 李逸, 司洋, 等. 北方粳稻耐盐碱相关性状主成分分析及综合评价. 核农学报, 2020, 34(8): 1862-1871.  
Li HY, Li Y, Si Y, et al. Principal component analysis and comprehensive evaluation of saline-alkaline tolerance related traits of northern *Japonica rice*. J Nucl Agric Sci, 2020, 34(8): 1862-1871 (in Chinese).
- [20] Li S, Tian YH, Wu K, et al. Modulating plant growth-metabolism coordination for sustainable agriculture. Nature, 2018, 560(7720): 595-600.
- [21] Che RH, Tong HN, Shi BH, et al. Control of grain size and rice yield by GL2-mediated brassinosteroid responses. Nat Plants, 2015, 2: 15195.
- [22] Hu J, Wang YX, Fang YX, et al. A rare allele of GS2 enhances grain size and grain yield in rice. Mol Plant, 2015, 8(10): 1455-1465.

- [23] Sun PY, Zhang WH, Wang YH, et al. *OsGRF4* controls grain shape, panicle length and seed shattering in rice. *J Integr Plant Biol*, 2016, 58(10): 836-847.
- [24] Chen XL, Jiang LR, Zheng JS, et al. A missense mutation in large grain size 1 increases grain size and enhances cold tolerance in rice. *J Exp Bot*, 2019, 70(15): 3851-3866.
- [25] Johnson DW, Smith SE, Dobrenz AK. Genetic and phenotypic relationships in response to NaCl at different developmental stages in alfalfa. *Theor Appl Genet*, 1992, 83(6/7): 833-838.
- [26] Tiwari S, Si K, Kumar V, et al. 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. DOI: 10.1371/journal.pone.0153610.
- [27] Lei L, Zheng H, Bi Y, et al. Identification of a major QTL and candidate gene analysis of salt tolerance at the bud burst stage in rice (*Oryza sativa* L.) using QTL-seq and RNA-seq. *Rice*, 2020, 13(1): 55.
- [28] 索艺宁, 张春可, 于乔乔, 等. 盐、碱胁迫下水稻苗期根数和根长的 QTL 分析. *华北农学报*, 2018, 33(5): 9-15.
- [29] Suo YN, Zhang CK, Yu QQ, et al. QTL analysis of root number and root length in rice seedling stage under salt and alkali stress. *Acta Agric Boreali-Sin*, 2018, 33(5): 9-15 (in Chinese).
- [29] Ren ZH, Gao JP, Li LG, et al. A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nat Genet*, 2005, 37(10): 1141-1146.
- [30] Sun SY, Chao DY, Li XM, et al. OsHAL3 mediates a new pathway in the light-regulated growth of rice. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(7): 845-851.
- [31] Huang XY, Chao DY, Gao JP, et al. A previously unknown zinc finger protein, DST, regulates drought and salt tolerance in rice via stomatal aperture control. *Genes Dev*, 2009, 23(15): 1805-1817.
- [32] Takagi H, Tamiru M, Abe A, et al. MutMap accelerates breeding of a salt-tolerant rice cultivar. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(5): 445-449.
- [33] 郭韬, 余泓, 邱杰, 等. 中国水稻遗传学研究进展与分子设计育种. *中国科学: 生命科学*, 2019, 49(10): 1185-1212.
- Guo T, Yu H, Qiu J, et al. Advances in rice genetics and breeding by molecular design in China. *Sci Sin Vitae*, 2019, 49(10): 1185-1212 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)