中国农业科学院 学位论文

水稻耐盐 QTL 表达的遗传背景 与环境效应研究

Study on Effects of Genetic Background and Environment on Expression of Salt Tolerant QTL in Rice

硕 士 研 究 生: 孙 勇
指 导 教 师: 徐建龙 研究员
申请学位类别: 农学硕士
专 业: 作物遗传育种
研 究 方 向: 作物基因组与分子育种
培 养 单 位: 作物科学研究所
研究生院

提交日期 2007年6月

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences Master Dissertation

Study on Effects of Genetic Background and Environment on Expression of Salt Tolerant QTL in Rice

Candidate:	Sun Yong
Supervisor:	Xu Jian-Long
Major:	Agricultural Sciences
Specialty:	Crop Genetics & Breeding

Chinese Academy of Agricultural Sciences June 2007

独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成 果。尽我所知,除了文中特别加以标注和致谢的地方外,论文中不包含其他人已经发 表或撰写过的研究成果,也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证 书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了 明确的说明并表示了谢意。

研究生签名:

时间: 年 月 日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定,即:中国农业科 学院有权保留送交论文的复印件和磁盘,允许论文被查阅和借阅,可以采用影印、缩 印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不 同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

论文作者签名:时间:年月日导师签名:时间:年月日

摘要

水稻是重要的粮食作物,盐害严重限制着水稻的生产。提高水稻的耐盐性是水稻的重要育种 目标之一。运用分子生物学手段,通过耐盐相关基因作图和克隆,不仅为水稻耐盐分子机制的研 究提供理论依据,而且为分子标记辅助选择培育耐盐水稻品种奠定坚实基础。本研究应用遗传背 景基本一致的高代回交导入系群体,结合 SSR 分子标记,进行水稻耐盐性 QTL 定位,初步剖析 遗传背景和环境对耐盐 QTL 表达的影响。

以 IRRI 培育的中等感盐籼稻 IR64 和我国广东育成的高产籼稻特青为轮回亲本, 伊朗农家品 种 Tarom molaii 为供体亲本培育两个 BC₂F₈ 回交导入系群体为供试材料,分别在温室和人工气候 室两个环境条件下,定位水稻苗期在140mM NaCl 胁迫下影响盐分胁迫10天、16天后叶片盐害 级别、幼苗存活天数、胁迫 8 天后地上部和根部的 K⁺、Na⁺浓度等 7 个耐盐相关性状的 QTL。相 关分析表明叶片盐害主要是由于地上部 Na⁺积累过多造成的,与根部 K⁺、Na⁺的状态无关,根对 K⁺、Na⁺的吸收与向地上部运输存在不同的机制。两个回交导入系群体,共检测到在温室和人工 气候室两种环境条件下影响 7 个耐盐相关性状的 57 个 QTL,分布在除第 10 染色体外的其他 11 条染色体上。其中影响地上部 K⁺、Na⁺浓度的 QTL 与影响根部 K⁺、Na⁺浓度的 QTL 分布在不同 基因组区域,进一步证实了根和茎对 K⁺、Na⁺的吸收存在不同的遗传机制。通过比较图谱,发现 影响耐盐相关性状的 57 个 QTL 中, 有 1/4 的 QTL 在以往不同群体中被检测到, 其中在第 1 染色 体的 RM583-RM23 区间、第 2 染色体 RM240-RM112 区间和第 3 染色体 RM60-RM231 区间,存 在影响叶片盐害级别、幼苗存活天数和(或)钾钠离子浓度的多个 QTL,是耐盐 QTL 的重要基 因组区域。通过比较相同供体在不同遗传背景条件下和同一群体在温室和人工气候室不同环境条 件下耐盐 OTL 的定位结果,表明耐盐 OTL 的表达受遗传背景和环境影响较大,在不同遗传背景 或环境条件下的检测到的相同 QTL 的基因效应大小和方向不完全相同。从中鉴别出一些对环境 条件不敏感的主效 QTL 如 OPsnc2 和 OGsnc3。上述这些重要的 QTL 或基因组区域在标记辅助选 择育种中具有应用价值。

关键词:水稻,耐盐性,数量性状位点,回交导入系,遗传背景效应,环境效应,分子标记辅助育种

I

Abstract

Rice is the staple food for most Asian people. Salinity is considered one of the most major abiotic stresses limiting rice productivity throughout the world. Improving salt tolerance of rice is one of the most important objectives of rice breeding programs, which can be better to mapping QTLs related to salt tolerance for MAS-based rice breeding. In this study, two advanced backcross populations were evaluated for morphological and physiological traits related to salt tolerance at the seedling stage under the green house and phytotron conditions. QTLs affecting salt tolerance and their expressions in different genetic backgrounds and environments were exammed and compared.

Two moderate salt-susceptible indica varieties, IR64 (from IRRI) and Teqing (from China) were used as the recurrent parents, a japonica landrace, Tarom molaii (from Iran) was used as the donor parent. Two BC₂F₈ populations were developed by random consecutive backcrossing, and were evaluated under salt stress with the concentration of 140mM NaCl at the seedling stage under the green house and phytotron conditions. Correlation analysis indicated that survival days of seedlings (SDS) was highly negatively correlated with shoot Na^+ concentration (SNC), positively with shoot K^+ concentration (SKC), and had no correlation with root K^+ concentration (RKC) and root Na⁺ concentration (RNC), indicating salt toxicity of leaves or salt tolerance resulted from over-accumulation of Na⁺ in the shoots and had nothing to do with ions situation in the roots. RKC was highly positively correlated with RNC and both of them had no correlations with SKC and SNC, respectively, suggesting different mechanisms existed between uptake of K⁺ and Na⁺ in the roots and their transportation from the roots to the shoots. Fifty-seven QTLs affecting the seven salt-tolerance related traits including score of salt toxicity at 10 and 16 days after salinisation (S10D, S16D), SDS, SKC, SNC, RKC and RNC were identified in two BC_2F_8 backcrossing introgression populations under the two environments, which distributed on the 11 chromosomes except chromosome 10. The QTLs affecting SKC and SNC were not observed to distribute in the same genomic regions with the QTLs of RKC and RNC, respectively, which further showed different genetic mechanisms involved in uptake of K⁺ and Na⁺ between the roots and the shoots. Compared to the previous mapping results in different mapping populations by same markers, 1/4 of 57 QTLs for the seven related traits were located to the same or near genome regions. The regions of RM583-RM23 on chromosome 1, RM240-RM112 on chromosome 2, and RM60-RM231 on chromosome 3 were identified for QTLs affecting S10D, S16D, SDS, SKC and/or SNC in the green house and /or phytotron, which are considered as important genomic regions related to salt-tolerance for MAS-based breeding.

By comparison of QTLs detected in different populations derived from same donor in different recurrent parent (IR64 and Teqing) backgrounds, and in the same genetic background under different environments (green house and phytotron), significant effects of genetic background and environment on expressions of the ST QTLs were revealed. The same QTLs detected in two different genetic backgrounds or environments may have different effect values or/and directions of gene effect. Some

main-effect QTLs insensitive to environment, e.g. *QPsnc2* and *QGsnc3* for SNC were identified. These important QTLs and genomic regions mentioned above will be greatly beneficial to the MAS-based breeding for salt tolerance in rice.

Key words: Rice Salt-tolerance QTL Backcrossing introgression lines Genetic background effect environment effect MAS

第一	-章 引言	1
1	1.1 研究意义	1
1	1.2 植物耐盐机理研究进展	1
	1.2.1 盐胁迫下植物的生理反应	1
	1.2.2 植物的耐盐机理	3
1	1.3 作物 QTL 研究进展	6
	1.3.1 QTL 定位群体	6
	1.3.2 主要的 QTL 定位方法	7
	1.3.3 QTL 表达的遗传背景和环境效应	8
	1.3.4 水稻耐盐 QTL 定位与育种研究进展	9
第二	二章 材料与方法	11
2	2.1 供试材料	11
2	2.2 幼苗培养	11
2	2.3 盐分胁迫处理	11
2	2.4 耐盐相关性状的测定	11
	2.4.1 盐害级别	11
	2.4.2 秧苗存活天数	12
	2.4.3 地上部和根系中 K ⁺ 、Na ⁺ 浓度的测定	12
2	2.5 基因型分析	13
	2.5.1 DNA 提取	13
	2.5.2 PCR 扩增	14
	2.5.3 扩增产物的电泳分离	14
2	2.6 数据处理与 QTL 定位	15
第三	E章 结果与分析	16
3	3.1 亲本及群体耐盐性状的表现	16
3	3.2 耐盐性状间的相关	21
	3.2.1 温室条件下性状间的相关分析	21
	3.2.2 人工气候室条件下性状间的相关分析	

目 录

3.3	遗传连锁图	22
3.4	耐盐性状的 QTL 定位	24
	3.4.1 IR64/Tarom molaii BC ₂ F ₈ 群体检测到的耐盐 QTL	24
	3.4.2 TQ/Tarom molaii BC ₂ F ₈ 群体检测到的耐盐 QTL	27
	3.4.3 不同遗传背景和环境条件下检测到耐盐 QTL 的比较	29
第四章	〔 讨论	32
4.1	耐盐 QTL 定位的遗传背景效应及不同群体检测到耐盐 QTL 比较	32
4.2	耐盐相关性状的 QTL 分布及 K ⁺ 和 Na ⁺ 的关系	33
4.3	K ⁺ 和 Na ⁺ 浓度与水稻幼苗的耐盐性	33
4.4	不同 QTL 的耐盐机制	34
4.5	耐盐 QTL 表达的环境效应	34
4.6	种质资源耐盐 QTL 的发掘与不同耐盐 QTL 的聚合	35
第五章	5 结论	36
参考文	こ	37
附录		45
致谢		48
作者管	育历	49

英文缩写	英文全称	中文名称
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
CTAB	Cetyltrimethyl Ammonium Bromide	溴化十六烷三甲基铵
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
SSR	Simple sequence repeats	简单序列多态性
QTL	Quantitative trait locus	数量性状基因座
MAS	Marker-assisted selection	标记辅助选择育种
RIL	Recombinant inbred line	重组自交系
NIL	Near-isogenic lines	近等基因系
DH	Doubled haploid	加倍单倍体
BC	Backcross	回交
ST	Salt tolerance	耐盐性
SST	Score of salt toxity	盐害级别
cM	centiMorgans	厘摩

英文缩略表

第一章 引言

1.1 研究意义

全世界约有 3.8 亿公顷不同程度的盐渍化土壤,约占可耕地面积的 10%左右(赵可夫等, 1999)。我国有 2700 万公顷盐碱地,其中约有 700 万公顷分布在农田(翟风林等,1989)。在沿 海和广大的干旱或半干旱地区,日益严重的土壤或灌溉水盐渍化趋势已成为包括水稻在内的农作 物生产的主要障碍。增加作物耐盐性是保持粮食产量的主要措施。对于灌溉农业而言,改良作物 耐盐性可以减少喷灌需求,从而降低灌溉预算,既可以节约淡水资源,又可以利用盐水(Pitman et al., 2002)。

水稻属中等感盐作物,当土壤中可溶性盐达 0.3%时即表现出受害症状,最终导致显著减产 (Akbar et al., 1972)。研究和利用作物资源的遗传变异改良作物品种对盐逆境的适应能力是减轻 作物盐害和提高盐渍土生产力的一项经济而有效的措施。水稻植株耐盐性是一个很复杂的生理过 程,加之大田盐害分布的不均匀及存在着其它土壤胁迫。因此,在大田条件下对耐盐性表型直接 选择的效率很低(Yeo et al., 1990)。这种以表型选择为基础的作物耐盐育种,难度大、效率低、 进展慢,远不能满足生产需要。分子标记及其辅助选择技术的发展,已为包括水稻耐盐性在内的 一些复杂性状的遗传改良提供了崭新的技术(Paterson et al., 1988)。因此,运用统计软件结合耐 盐相关表型数据和分子标记基因型数据进行耐盐 QTL 定位,是开展标记辅助选择培育耐盐品种 和进行主效 QTL 图位克隆的先决条件,为合理利用盐碱地和提高作物产量奠定基础。

1.2 植物耐盐机理研究进展

1.2.1 盐胁迫下植物的生理反应

1.2.1.1 离子毒害

盐逆境下,植物地上部分积累高浓度的 Na⁺或 Na⁺/K⁺比例太高对植物产生毒害作用(赵可夫等,1999)。高浓度 Na⁺可置换质膜和细胞内膜系统所结合的 Ca²⁺,另一方面消弱质膜上的膜保 护系统,致使膜脂过氧化加剧,膜所结合的离子中 Na⁺/Ca²⁺比增加,膜结构完整性及膜功能受到 破坏,致使细胞内 K⁺、磷和有机质外渗,细胞 K⁺/Na⁺下降,抑制液泡膜 H⁺-焦磷酸酶活性和胞质 中的 H⁺跨液泡膜运输,跨液泡膜运输的 pH 值梯度下降,液泡碱化,不利于 Na⁺在液泡内积累。

1.2.1.2 活性氧伤害

在盐胁迫等逆境条件下,植物体内活性氧代谢系统的平衡受到影响,增加活性氧 O²⁻、过氧 化氢 (H₂O₂)、氢氧根负离子 (OH)、羟基自由基 (·OH) 的产生量,破坏和降低活性氧清除剂,如 SOD、CAT、POD、VitE、GSH 等的活性和含量水平。体内活性氧含量增高能启动膜质过氧化 或膜质脱脂作用,膜质过氧化和膜质脱脂作用导致膜的完整性降低,差别透性丧失,电解质及小 分子有机物大量渗漏,细胞物质交换平衡破坏,进而导致一系列生理生化代谢紊乱,使植物受到 伤害。

1.2.1.3 光合作用受抑制

盐胁迫下植物叶绿体酶活性增加,促进了叶绿素 b 分解,捕光色素蛋白复合体的结构与功能 受到损害甚至发生降解和破坏,盐分过多使 PEP 羧化酶和 RuBP 羧化酶活性降低,RuBPCase 活 性和含量降低,削弱叶绿素吸收能力且抑制其碳同化。叶绿体趋于分解,叶绿素被破坏。叶绿素 和类胡萝卜素的生物合成受阻,气孔关闭,使光合速率下降,影响作物产量。同时盐胁迫还会降 低 C3 循环的中间产物磷酸甘油酸和磷酸三糖磷酸甘油醛含量,不利于 C 同化的正常运转。有关 NaC1 胁迫对 PS II 活性的影响,虽然报道比较多,但至今还没有形成统一的认识(朱新广等,1999)。 如,Aro (1993)等认为盐胁迫可以改善 PS II 的功能,Everald (1994)等则认为盐胁迫可以抑制 PS II 的功能。这可能与实验中所用的植物材料不同,或虽用同种植物材料,但实验期植物所处的 生育期不同有关.因不同植物或植物的不同发育阶段,其光合作用对盐胁迫的敏感度各不相同(朱 新广等,2002)。钱琼秋等 (2004)研究表明,在 NaCl 胁迫下,黄瓜幼苗叶片 Fv/Fm 几乎没有变 化,0 mmol/L 和 25 mmol/L NaC1 胁迫时,PS II 值没有明显差异,但在 50 mmol/L NaC1 胁迫时, PS II 值显著降低,津研 4 号 PS II 值明显大于津绿 4 号。这说明 NaC1 胁迫对 PS II 的破坏可能是 影响 PS II,由于 PS II 的高低直接影响光合作用,其降低将阻止植物同化力 (NADPH、ATP)的 生产,结果是直接影响植物对碳的固定和同化,使植物生长受到明显不利的影响。

1.2.1.4 呼吸作用改变

一般来说,低盐时植物呼吸受到促进,呼吸作用随盐度增加而提高;而高盐时受到抑制,呼吸作用随盐度增加而降低。盐分过多时总的趋势是呼吸消耗量多,净光合生产率低,不利于植物 生长。

1.2.1.5 蛋白质合成受抑制

盐分过多对蛋白质代谢影响比较明显,抑制合成促进分解。抑制蛋白质合成的直接原因可能 是由于破坏了氨基酸的合成,如蚕豆在盐胁迫下叶内半胱氨酸和蛋氨酸合成减少,从而使蛋白质 含量减少。

1.2.1.6 积累有毒物质

盐胁迫使植物体内积累有毒的代谢产物,如蛋白质分解的产物—游离的氨基酸、胺、氨等的 积累,这些物质对植物有毒害作用,致使植物叶片生长不良,抑制根系生长,组织变黑坏死等。 毒素积累是盐害的重要原因(曾洪学等,2005)。

1.2.1.7 渗透胁迫

土壤盐分过多使土壤溶液渗透势降低,造成植物吸水困难,以致产生生理干旱状态,如一般 植物在土壤盐分超过 0.2%~0.5%时出现吸水困难,盐分高于 0.4%时植物体内水分易外渗,生长 速率显著下降,甚至导致植物死亡。植物根系向地上部分输送的盐分大于叶片对离子的吸收。盐 离子会在细胞质外体积累,细胞失水,造成水分胁迫,使细胞质膜受到伤害。膜的结构组成发生 改变,透性增加,被动渗透增加(马丽清,2005)。

1.2.2 植物的耐盐机理

耐盐品种的特性包括 Na⁺的排出、区分 K⁺/Na⁺、叶片及茎部保留离子的能力、组织耐性、离 子在新老叶片中的重新分配、吸收和积累无机盐、合成有机物进行渗透调节、改变代谢途径、渗 透调节等(Colmer et al., 2005, 2006)

1.2.2.1 渗透调节

渗透调节是植物生长在渗透胁迫条件下,其细胞中在渗透上有活性和无毒害作用的溶质的主动净增长过程。有活性溶质净增长的结果是细胞浓度增加,渗透势降低,使其在低渗透势生境中能够吸收水分。植物有2种渗透调节方式:一是在细胞中积累和吸收 Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Cl⁻等无机离子,二是植物对盐渍适应的同时还能在细胞中积累一定数量的可溶性有机物质,作为渗透调节剂共同进行渗透调节,以适应外界的低水势。可溶性有机物质包括以下几类:氨基酸、有机酸、可溶性碳水化合物、糖醇类(林栖凤, 2004)。

1.2.2.2 吸收和积累无机盐

盐分胁迫条件下,植物主要依靠从外界吸收和积累无机盐离子进行渗透调节,增加细胞浓度, 降低细胞渗透势,从而避免脱水,防止盐害。植物吸收和积累的离子种类多种多样,主要有 Na⁺、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cl^- 、 SO_4^{2-} 、 NO_5 等。不同植物对离子的选择性有差别,有些非盐生植物选择 K⁺排斥 Na⁺。盐生植物体内积累大量 Na⁺很可能与盐生植物抗盐能力有关。非盐生植物体内积累 大量 K⁺,抗盐能力显著提高。离子的选择吸收、质膜的 K⁺-Na⁺交换和液泡膜的 K⁺-Na⁺交换,在 调节植物体内的离子平衡、盐分运输和细胞区隔化过程中都起着重要作用。在低盐浓度下,K⁺ 优先被根系吸收,不受 Na⁺的抑制,而 K⁺总是抑制 Na⁺的进入。在高盐浓度下,离子吸收的选择 '性下降,K⁺、Na⁺相互抑制吸收。耐盐品种 K⁺优先向地上部及枝条韧皮部积累,叶片中 K⁺-Na⁺ 比值较高,表现出耐盐性,这是因为土壤介质中的 Na⁺和 K⁺需经过根系韧皮部的选择吸收,内皮 层选择性地向木质部释放,木质部薄壁细胞有选择性地再吸收以及枝条木质部有选择性地将 Na⁺、 K⁺运输到韧皮部 (Durand et al., 1994)。这一系列过程中 K⁺-Na⁺选择性相当重要。郭房庆等 (1999) 认为保持胞质中低 Na⁺水平的能力是检验植物抗盐性提高的一个重要指标。这是因为盐渍化土壤 中 Na⁺是主要的毒害离子,细胞许多代谢活动对 Na⁺的累积非常敏感。Na⁺浓度的升高会引起其它 离子吸收的抑制效应,且对细胞代谢活动有直接伤害。因此在盐胁迫下保持细胞质中较低的 Na⁺ 浓度对许多植物是十分重要的。(Nakamura et al., 1996 等)研究表明, K⁺在植物体内的不同部位 的吸收与分布是受不同的基因控制的; 植物除了在细胞水平上调节 K⁺的吸收以外, 还在植株水 平上,对 K⁺的分布进行调节和控制,以充分利用植物根部所吸收的 K⁺。Zhu 等采用拟南芥 SOS1、 SOS2、SOS3 突变体分析耐盐性基因时发现: SOS1、SOS2、SOS3 突变体的耐盐性与其组织中 K⁺含量密切相关,而与 Na⁺含量无关,从而推断 K⁺营养而不是 Na⁺的均衡化或渗透调节是非盐生 植物耐盐性的关键性因素。他们认为:可能在 NaCl 胁迫下,只有当 K⁺营养(包括内流、外流、 利用)得以满足时,其他一些过程如低的胞质 Na⁺含量、亲和性溶质的积累和保护性胁迫蛋白的

合成等才成为主要的过程。近年来,K⁺营养与植物耐盐性的关系研究进展很快 (Zhu et al., 1999, 2000, 2001)。

1.2.2.3 合成有机物进行渗透调节

植物在抗盐中,除了可以吸收和积累大量无机盐离子进行渗透调节适应盐渍环境外,还可以 在细胞中合成大量不同有机物质。植物吸收的盐分多数储存在液泡中。液泡中盐分增多必然对细 胞质产生渗透胁迫,故在细胞质中要合成一些可溶性有机物质以抵消液泡的渗透势,使其与液泡 渗透势相等。这些有机物质包括糖类如蔗糖、果糖、糖醇类如甘油、肌醇,复合糖类如海藻糖、 果聚糖,此外还有甜菜碱、脯氨酸等。

对脯氨酸与盐胁迫的关系至今尚有争议。大多数学者认为脯氨酸积累是植物对盐分胁迫的适应机制。Elsamad (1997)发现大豆耐盐品种 Clark 和 Forest 在盐胁迫下体内的脯氨酸、可溶性蛋白等含量升高,而敏感品种 Kint 体内这些物质含量并不增加。有实验证明脯氨酸作为渗透调节物质的功能可能是次要的,且脯氨酸的积累与耐盐程度呈负相关。即认为脯氨酸积累可能是植物受到盐害的结果。认为脯氨酸的积累可能是植物受害的标志。大多数研究者认为植物积累脯氨酸是一种对抗盐胁迫的措施。但是 Lutts (1996)等发现,脯氨酸的积累对细胞质水势影响很小,可能并不参与渗透调节,至少不是主要因素。最新观点认为脯氨酸在逆境中的作用不是单一的。在一定盐度范围内具有促进水稻根系的发育作用,而本身对水稻幼苗具有抑制作用。有研究还指出:这些有机物质具有防止自由基的产生或者清除细胞内活性氧;防止酶变性;调节细胞质 pH 值等作用。

1.2.2.4 调渗蛋白

调渗蛋白的功能主要是通过其定位、结构特征和一些生理现象来推测的。自 Singh (1987) 首先在烟草中分离以来,相继在其他种属的植物,如番茄、土豆、胡萝卜、棉花、大豆、小米、 水稻和矮牵牛等植物中也发现。以 26KDa 蛋白质含量显著。可占总蛋白的 10%~20%,其合成和 积累发生在细胞对高盐或干旱胁迫进行渗透调节的过程中,因此定名为调渗蛋白。Sigh 等认为: 1 调渗蛋白是一种逆境适应蛋白,不是胁迫蛋白; 2 ABA 也能诱导调渗蛋白,而且诱导的水平与 内源 ABA 的水平紧密相关,因此调渗蛋白可能涉及渗透调整或降低离子毒害; 3 细胞的调渗蛋 白定位于液泡,这是离子区域化积累的场所。调渗蛋白可能是一种盐适应过程中形成的贮藏蛋白 (余叔文等,1998)。目前研究表明盐胁迫确实诱导产生新的蛋白,但因实验材料基因型和组织 的不同,新多肽诱导往往表现各异。

1.2.2.5 膜转运蛋白

Na⁺/H⁺逆向转运蛋白(Na⁺、H⁺ antiporter, NHA)是细菌、酵母、藻类、动物和高等植物的膜 系统上均存在的一种转运蛋白,参与细胞质内的 pH、Na⁺浓度调节及细胞体积变化等生命活动。 自第一次在甜菜贮藏组织的液泡膜囊泡检测到液泡 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白的活性后,已在许多植物 如兼性 CAM 植物冰叶日中花、甜菜、碱蓬中检测到液泡膜 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白活性。拟南芥基 因组测序鉴定出与酵母 NHX1 非常相似的 AtNHX1,随之,水稻、冰叶日中花、碱蓬等高等植物 液泡 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白基因相继克隆,分别为 OSNHX1、McNHX1、SsNHX1。用 TMpred 软 件分析 OsNHXI, SsNHX1 序列,可推测到 12 个跨膜区域,这些跨膜区高度保守,对 Na⁺/H⁺逆向 转运蛋白的转运功能非常重要。Apse M P (1999)等在拟南芥中过量表达 AtNHX1 基因发现:转 基因植株液泡膜 Na⁺/H⁺逆向转运活性比野生型植株要高得多,并且这种 Na⁺/H⁺逆向转运蛋白活性 的升高和 AtNHX1 蛋白表达量增加是一致的,在 200mmol/L NaC1 胁迫条件下,转基因植株的生 长未受影响。AtNHX1 和 AtCHX23 除有转运 Na⁺、H⁺跨膜运输外,还有调整 K⁺跨膜运输的作用 (Zhang et al., 2001; Venema et al., 2002; Zhang et al., 2004; Song et al., 2004),提高的液泡 Na⁺转运 活性伴随着液泡中区域化的 Na⁺浓度的升高,有力地支持了 Na⁺区域化在耐盐中的作用。利用基 因工程手段 Blumwald 等在番茄(Zhang et al., 2001)、油菜(Zhang et al., 2001)中过量表达 AtNHX1-Na⁺/H⁺逆向转运蛋白,得到了世界上第一批真正意义上的耐盐作物,用 200mmol/L NaC1 浇灌转基因植株,仍可正常生长并结实。这些结果充分证明 AtNHX 在液泡 Na⁺区域化中的重要 功能。

1.2.2.6 水孔蛋白

质膜上存在的可以让水分通过的通道蛋白,是一类膜内嵌蛋白。其功能包括促进水的长距离运输、细胞内外的跨膜水运输、调节细胞胀缩及运输其他小分子物质。水孔蛋白的调控主要有三种:不同水孔蛋白在不同的特定组织与细胞表达,这是调节功能的最直接方式;改变水孔蛋白的含量;调节水孔蛋白的活性。植物水孔蛋白的功能包括:促进水的长距离运输;促进细胞内外的跨膜水运输;调节细胞的胀缩及运输其他小分子物质。水孔蛋白的活力对于植物耐盐极为重要,有证据表明:在受到盐胁迫时,植物通过控制水孔蛋白的活性来抵御逆境,水孔蛋白功能的开放与关闭是通过蛋白磷酸化来控制其构象的变化而实现的,而构象之间的动态平衡则受到由生长调节剂所介导的某种信号的调节 (Maurel. et al., 1995)。

1.2.2.7 改变代谢途径

盐分胁迫下,植物的代谢就会受到干扰而发生紊乱,而一些盐生植物则能够通过改变其自身的代谢途径适应高盐分生境。獐毛和日中花经高盐胁迫后分别将本身的 C3 途径改变 C4 和 CAM 途径。C3 型植物白天开放气孔进行 CO₂的吸收和固定,夜晚关闭气孔,这样不利于在胁迫下保 持水分;而 CAM 型植物是夜间开放气孔进行 CO₂的吸收和固定,白天气孔关闭减少水分散失,C4 和 C3 型植物的不同不是代谢时间的变化而是结构上的变化,在渗透胁迫下 C4 植物能在不影响 CO₂固定的同时缩小气孔的导度,保持水分。

1.2.2.8 膜抗氧化防御系统

氧自由基是植物代谢过程中产生的,细胞内氧自由基过多会引起质膜过氧化而产生伤害。活 性氧在体内存在的时间取决于其抗氧保护系统的活力。所有植物都具有抗氧化的过氧化酶系统。 主要分为酶促防御和非酶促防御系统两类,酶促防御系统主要有超氧化物岐化酶(SOD)、抗过 氧化物酶(ARX)、过氧化氢酶(CAT)等酶;非酶促防御系统主要包括抗坏血酸(AsA)和谷胱 甘肽(GSH)。另外,糖、多元醇、甜菜碱、脯氨酸等物质有保护细胞免受自由基伤害的作用。 一些膜保护酶已经被克隆(Wang et al., 2002)并进行了转基因,烟草的 Mn-SOD cDNA 导入苜蓿 后,转基因抗旱能力提高,大田实验表明烟草的 Mn-SOD 在苜蓿中的表达能通过调控叶绿素荧光、 电解质渗漏和茎尖再生来减弱渗透胁迫对苜蓿的伤害从而提高抗性(Mckersie et al., 1996)。

1.2.2.9 盐胁迫与信号转导

盐胁迫下,植物叶片中积累 ABA,引起气孔关闭,水分散失降低,降低光合速率,减少体 内干物质的积累,进而抑制植物的生长。有人认为这是盐胁迫在植物体内产生的一种信号。与盐 胁迫有关的信号主要有 Ca²⁺/CaM、ABA、H₂O₂等现已确定,细胞内 Ca²⁺信号是最重要的信号分 子之一,处于调节细胞代谢和生长发育的多种信号途径的交叉点上。钙离子可以减缓植物盐害、 增强植物耐盐性,其重要作用在于能维持细胞膜完整性,并调节离子运输等。盐胁迫下,细胞游 离 Ca²⁺浓度的增加显著减少了细胞内 Na⁺的浓度,这可能是通过 Na⁺吸收和运输两方面完成的, 有证据表明: Ca²⁺是通过降低质膜透性来减少 Na⁺进入细胞的。当植物受到盐胁迫时,细胞内的 Ca²⁺浓度增加,Ca²⁺通过与其主要受体CaM结合,从而进一步激活适当的蛋白激酶,激发细胞产 生应激反应,这是 Ca²⁺的一般作用方式。在盐胁迫下,ABA 在细胞中的含量增加,从而促进气 孔关闭以减少因蒸发作用而造成的水分的损失。在胁迫下表达的许多基因同时也可受到外源 ABA 的诱导,这表明 ABA 参与了植物逆境信号的传递过程。Shinozaki(1997, 1998)等的研究表明, 在脱水胁迫启始信号与基因表达之间至少存在 4 条独立的信号传递途径,其中 2 条依赖 ABA。 近年来的研究表明,H₂O₂在植物逆境生理中可能起到信号分子的作用。人们首先发现O²可以通 过影响脂膜流动性而促进气孔的关闭;外源低浓度 H₂O₂处理可引起细胞游离 Ca²⁺浓度增加,从 而导致气孔关闭; H₂O₂还可引起细胞游离 Ca²⁺浓度增加, 启动 Ca 信使系统。ABA 可以诱导 H₂O₂ 的产生,同时在 ABA 诱导的气孔关闭过程中也发现了过氧化氢酶相关基因的表达,这说明 H₂O₂ 可能是信号传导链的一个中间环节(Shinozaki et al., 1998)在盐胁迫条件下,活性氧含量同许多 与抗盐相关的生理反应有着直接的关系,因此推测活性氧可能与胁迫信号传导有一定关系。盐胁 迫下,活性氧损伤细胞质膜、蛋白质及核酸,而对 DNA 的损伤是可以积累并可遗传的,植物体 内积存过多的受损细胞将影响植物组织的正常功能。当机体不能承受这些积累的损伤时,将启动 细胞凋亡机制清除这些受损细胞,以新的正常细胞取而代之。细胞凋亡是生物体在诱导下,由基 因控制的一种细胞主动死亡的途径,也是生命活动的基本特征之一。

1.3 作物 QTL 研究进展

1.3.1 QTL 定位群体

进行数量性状的 QTL 定位,首先要建立目标性状的分离群体,测定群体中各个体的数量性 状表型值和分子标记基因型,通过共分离分析,找出与目标性状连锁的分子标记,从而定位 QTL, 然后可进一步估算各因子的效应,分析各因子的作用方式。目前几种主要的定位群体有 F₂、加倍 单倍体(DH)、重组自交系(RIL)和回交群体等。暂时性分离群体有 F₂群体。永久群体包括来源于 F₁ 代花药培养和染色体加倍的 DH 系,以及采用"一粒传"或姊妹交产生的重组自交系(方宣钩, 2002)。

1.3.2 主要的 QTL 定位方法

利用分子标记正确进行 QTL 定位及其效应的估算有赖于 QTL 作图的统计模型方法。20 世纪 80 年代末以来,这方面的研究十分活跃,已经发展了 20 余种作图的统计方法,根据个体分组依 据的不同,现有的 QTL 定位方法可以分为两大类。一类是以标记基因型为依据进行分组的,称 为基于标记的分组分析方法 (Soller & Beckmann, 1990);另一类是以数量性状表型为依据进行分 组的,称为基于性状的分析方法 (Keightley & Bulfield, 1993)。目前常用的 QTL 定位方法主要有 方差分析法,区间作图法 (Lander et al., 1989),多元回归法 (Bridgesm, 1993),精确作图法 (Zeng, 1994)及用已知完整连锁图作图法 (Wu et al., 1994)。用这些方法可把数量性状定位在连锁图上, 找到与其连锁的分子标记。

1.3.2.1 方差分析法

以传统的单因素方差分析测验被研究数量性状在标记基因型间的差异显著性,即通过方差分 析,回归分析或似然比检验,比较不同标记基因型数量性状均值的差异,如存在显著差异,则说 明控制该数量性状的 QTL 与标记有连锁。由于单一标记分析不需要完整的分子标记连锁图谱, 因而早期的 QTL 定位研究多采用这种方法。其具有简单直观的优点,但是,单标记均值差检验 法不能估计 QTL 的具体位置和效应,灵敏度较低,且一般不适用于一条染色体上存在多个 QTL 的情形。将同一染色体上各标记的 t 测验或方差分析联合于一个回归分析之中,成为联合定位法 (Wu & Li, 1994)是对单标记均值差检验法的一种改进方法。

1.3.2.2 区间作图法

分子标记技术出现以后,Lander & Botstein (1989)提出更准确的 QTL 定位方法,以正态混 合分布的最大似然函数和简单回归模型,借助于完整的分子标记连锁图谱,计算基因组的任一相 邻标记之间的任一位置上存在 QTL 和不存在 QTL 的似然函数比值的对数(LOD 值)。根据整个 染色体上各点的 LOD 值可以绘出一个 QTL 在该染色体上存在与否的似然图谱。当 LOD 值超过 某一给定的临界值时,QTL 的可能位置可用 LOD 支持区间表示出来。区间作图法提出以后,得 到了广泛应用,对 QTL 定位研究的发展起到了重要的推动作用。但当一条染色体上同时存在一 个以上的 QTL 时,也会出现漏检和错误检测的问题,有时还会出现标错 QTL 位置的可能。

1.3.2.3 复合区间作图法

这是 Zeng (1994) 在区间作图的基础上发展起来的新的作图方法。其要点是,对某一特定标记区间进行检测时,将与其他 QTL 连锁的标记也拟合在模型中以控制背景遗传效应。假定不存在上位性效应和基因型与环境的互作效应,用类似于区间作图的方法获得各参数的最大似然估计值,计算似然比,绘制各染色体的似然图谱,根据似然比统计量的显著性,获得 QTL 可能位置的标记区间。该方法保留了区间作图的优点,同时在较大程度上控制了遗传背景效应,提高了作图的精度和效率。但此方法不能分析上位性和 QTL 与环境互作等复杂的遗传问题以及 QTL 定位和 QTL 效应估计易出现偏差等。

1.3.2.4 QTL 定位的混合线形模型方法

1998年,朱军提出用随机效应的预测方法获得基因型效应及基因×环境互作效应的预测值, 然后再用区间作图法或复合区间作图法分别进行遗传主效应及基因×环境互作效应的QTL定位分析,并给出了发育性状的条件QTL定位分析法。Yan et al. (1997, 1999)用该法对水稻分蘖数和株 高进行了发育QTL定位研究。与基于多元回归分析的复合区间作图方法比较,用混合线形模型 方法QTL定位可避免所选标记对QTL效应分析的影响,还能无偏地分析QTL与环境的互作效应。 基于混合线形模型的复合区间作图方法,可以扩展到分析具有加×加,加×显,显×显上位性的各 项遗传主效应及其与环境互作效应的QTL。利用这些效应估计值可预测基于QTL主效应的普通 杂种优势和基于QTL与环境互作效应的互作杂种优势,并可直接估算个体的育种值,从而提高 遗传育种效率。

1.3.3 QTL 表达的遗传背景和环境效应

1.3.3.1 QTL 表达的遗传背景效应

首先,遗传背景对性状的选择效率有很大的影响。Ungerer et al. (2003)利用不同遗传背景的 拟南芥 (Arabidopsis thaliana)作图群体,在生长箱内高密度种植条件下连续调查了3个世代的存 活率和结实率,通过检测等位基因频率与预期理论频率的变化,发现对选择响应大的基因组区域 在不同的遗传背景下表现出相似的选择结果,而选择响应较弱的基因组区域的选择效果因不同遗 传背景差异很大,而且发现1个基因组区域在不同的遗传背景下的选择效应出现相反的情况。徐 建龙等(2005)发现11个供体导入IR64、特青和NPT(新株型)的回交后代对耐盐性的选择效 率存在极显著的差异,IR64背景与绝大多数供体的回交后代的耐盐性的选择效率都较高,其次是 特青背景,NPT背景的选择效率最低。究其原因,不同遗传背景的轮回亲本之间耐盐性存在差异, IR64 的耐盐水平高于特青,特青高于 NPT。因此,一方面,轮回亲本之间耐盐有利基因数目的 差异是导致与同一供体回交后代耐盐水平和选择效率不同的主要原因;另一方面,轮回亲本与供 体亲本之间的耐盐基因的等位性差异越大,在同一遗传背景下互补程度越高,其回交后代就有可 能出现更多的耐盐个体,这种基因互补的程度在一定程度上也影响了后代个体性状表达的强度。

供体性状的表现取决于供体等位基因的导入情况,遗传背景对供体性状选择效率的影响实际 上是通过影响供体等位基因的导入来实现的。因此,遗传背景对 QTL 定位的影响是显而易见的。 通常情况下,影响某一性状的 QTL 能否被检出主要取决于该位点上双亲等位基因表型效应差异 的大小。在一种遗传背景下如果双亲间在某一位点上等位基因表型效应差异显著,可能就被作为 QTL 检出。反之,同一供体在另一种遗传背景下,如果该位点上双亲间等位基因表型效应差异不 明显,就不能作为 QTL 被检出。Mei et al. (2006)利用 Lemont/特青双向回交导入系定位了水稻一 次枝梗数、二次枝梗数和每穗总粒数的 QTL,发现供体等位基因的导入具有很强的遗传背景效应, 在总共 14 个 QTL 中仅 4 个 (30%)QTL 在两种不同背景下被检测到,而且在两种不同背景下未 能检测到相同的互作效应,说明遗传背景对 QTL 表达有显著的影响。

1.3.3.2 QTL 表达的环境效应

个体性状的表现不仅受控于基因型,而且也受到基因型与环境互作的影响。这表明在一个环境中重要的QTL 未必在另一个环境中同样重要。标记辅助选择需要鉴定出在各种不同环境下均表现一致的QTL。有关QTL 与环境互作近来有许多报道(Zhuang et al., 1997; Yan et al., 1997, 1999; Lu et al., 1996;廖春燕等,2000;林建荣等,2003; Hittalmani et al., 2003;沈圣泉等,2005; Qiao et al., 2006)。研究发现只有那些在一个环境中表现效应最大的QTL 很可能在另一环境中同样被检测到。以往多数有关QTL 与环境互作的研究方法都是通过比较采用单一环境的表型均值或若干环境表型均值的QTL定位结果,认为不同环境下同一性状的QTL定位结果有差异,就表明存在QTL与环境的互作。Wang (1999)的模拟研究结果表明这一推断是不可靠的。即使不存在QTL与环境的互作,在不同环境下能同时检测到某一个特定的QTL的机率仍然是很小的。另一方面,不同环境下能检测到相同的QTL也并不能表明不存在QTL与环境互作效应。采用区间作图和复合区间作图方法很难对QTL与环境互作进行无偏估计,因为有些QTL尤其是一些微效QTL可能在某一特定环境中被漏检。Yan et al. (1997, 1999)采用混合模型的复合区间作图方法对水稻分蘖数和株高进行QTL与环境互作效应的研究,获得更多的有关QTL与环境互作的真实信息。

不同性状的 QTL 受环境影响的程度不同。对于大多数性状来讲,只有一部分 QTL,特别是 效应较大的 QTL,能在不同环境条件下得到稳定检测。其次,基因型×环境互作只影响 QTL 效应 值,多数情况下不影响其效应的方向(庄杰云等,1998)。在各种产量组分性状中,影响结实率 的 QTL 是在不同环境条件下检出率最低的,其它组分性状如每穗总粒数、每穗实粒数及单株产 量等都有在不同环境下同时被检出的情况(Lu et al., 1997; Zhuang et al., 1997; Xiao et al., 1995)。 认为当一个 QTL 在两种以上环境下得到检测,其加性效应方向一致,效应值也大多非常接近。 即使在具有基因型×环境互作的情况下,也只影响 QTL 的效应值,极端情况表现为在有的环境下 发挥效应,在其它环境下不发挥效应,但不导致 QTL 效应方向的逆转(庄杰云等,1998)。

1.3.4 水稻耐盐 QTL 定位与育种研究进展

水稻种质耐盐性的遗传变异丰富(Gregorio et al., 1997),而且在不同的生育阶段的耐盐力不同(秦忠彬等,1989;方先文等,2004),通常以二叶一心期最敏感(IRRI, 1997)。除在突变体或转基因植株中发现有单个主基因控制的耐盐性以外(Zhang et al., 1995;郭岩等,1997;Fukuda et al., 1999),大多数水稻耐盐性受多基因控制。近年来,DNA标记技术的发展加速了水稻耐盐性的遗传研究。

顾兴友(1998, 1999)等对水稻耐盐性的数量性状位点进行了初步检测,从水稻 12 条染色体上共检出 15 个连锁标记,在所涉及的基因组范围内存在 4 个影响苗期耐盐性的 QTL,其增效等位基因均来自耐盐品种 Pokkali。丁海媛(1998)等运用 RAPD 分析标记水稻耐盐突变系的耐盐主效基因,认为水稻耐盐突变系的性状变异虽呈现数量性状遗传特征,但不排除存在主效基因。 龚继明(1998)等应用 MAPMAKER/QTL1.1 和 PLABQTL1.0 软件将水稻耐盐主效基因 Std 定位于第 1 染色体的 RQ612 和 C131 之间,其加性效应来源于亲本籼稻窄叶青 8 号,而定位的另外 7 个 QTL 位点的耐盐等位基因多数来源于亲本粳稻京系 17。林鸿宣等(1998)利用"特三矮 2 号/CB" 组合构建了重组自交系群体(RIL),在 NaCl 胁迫强度 12ds/m 的培养液鉴定发现 RIL 群体出现 超亲分离现象。以 60 个 RFLP 标记检测 142 个纯系基因型,构建了一张覆盖 11 条染色体,含 52 个标记位点的连锁图。林鸿宣等(1998)和 Lang et al. (2003)采用盐胁迫后秧苗存活天数等性 状为指标,从"特三矮2号/CB"的重组自交系群体中分别在第5和第12染色体上检测到贡献率 为 11.6%和 17.5%的主效 QTL。龚继明等(1998)则利用窄叶青 8 号/京系 17 的 DH 群体, 在第 1 染色体上检测到 1 个表型贡献率为 15.6% 苗期耐盐主效 QTL。顾兴友等(2000)利用 Pokkali 与 Peta 配制的回交后代, 检测到 4 个影响苗期耐盐性和 7 个影响成熟期耐盐性的 OTL。Prasad et al. (2000) 在第6染色体上检测到1个影响耐盐性和茎干重的QTL。Takehisa et al. (2004) 在第2、3 和 7 染色体上检测到在 50~120mM 盐水灌溉条件下影响分蘖和茎长的 QTL。Koyama et al. (2001) 定位到影响 Na⁺和 K⁺浓度、Na⁺和 K⁺吸收量和 Na⁺/K⁺的多个 QTL, 有的 QTL 的贡献率高达 19.6%。 Lin et al. (2003) 利用耐盐品种 Nona Bokra 与感盐品种 Koshihikari 构建的 F₂、F₃群体,定位到 3 个影响秧苗存活天数的 OTL,贡献率为 13.9%~18.0%,同时在第7和第1染色体上检测到影响 茎 Na⁺和 K⁺浓度的主效 QTL,分别解释了 48.5%和 40.1%的表型变异。不同学者均在第 1 染色体 长臂上的一个区域发现一个影响 Na⁺排出和区分 K⁺/Na⁺的 QTL (OsHKT8) (Koyama et al., 2001; Bonilla et al., 2002; Lin et al., 2004)。目前已利用图位克隆技术克隆了第1染色体上影响 K⁺浓度的 主效 QTL (SKC1),其分子机制是一种参与控制 Na⁺和 K⁺动态平衡的膜蛋白,并且认定 OsHKT8 是 *SKC1* 的一个候选基因(Ren et al. 2005)。

综上所述,水稻种质中存在着一些效应较大的耐盐主效 QTL。因此,从现有种质中寻找与鉴 定耐盐主效 QTL 并将其聚合是提高品种耐盐性的有效的育种策略(Yeo & Flowers, 1986; Flower et al., 2000)。

水稻耐盐性育种的进展已经有过综述(Gregorio et al., 2002; Yoshida, 2002; Flowers, 2004)。改 良现代水稻品种耐盐性的方法主要有体细胞克隆、花药培养、分子标记辅助选择和转基因技术 (Gregorio et al., 2002)。目前通过转基因技术虽获得了一些耐盐转基因植株,但通过转基因和分 子标记辅助选择手段至今还没有育成在大田水平表现耐盐的品种。水稻耐盐品种例如 Pokkali 和 Nona Bokra 起源于印度的沿海地区,是大部分水稻育种项目的耐盐性育种的主要资源。但由于 综合性状差,目前还没有直接利用这两个供体育成耐盐水稻品种的报道。Senadhira et al. (2002) 利用花培技术,将 IR5657-33-2 的高产性状与 IR4630-22-2-5-2-3 的耐盐性状有机整合在一起,育 成了世界上第一个耐盐水稻品种 PSBRc 50。

第二章 材料与方法

2.1 供试材料

以国际水稻所育成的中等感盐籼稻品种 IR64 以及我国广东省育成的高产籼稻品种特青为轮 回亲本,来自伊朗的粳稻农家品种 Tarom molaii 为供体亲本,通过杂交和回交的方法,分别培育 出 IR64 背景的 85 个和特青背景的 72 个 BC₂F₈ 回交导入系作为定位群体,并以耐盐品种 Pokkali 和感盐品种 IR29 为对照。供试材料中大部分株系,经过极端品质的筛选,一小部分经历过抗旱 性筛选。

2.2 幼苗培养

精选籽粒饱满的种子在 50℃下烘干 5 天打破休眠, 浸种前用 0.5%的次氯酸钠处理 10 分钟进 行表面消毒, 然后用清水冲洗后于 28℃浸种 24 小时, 同样温度条件下催芽 18 小时左右, 将露白 种子播种于底部带有尼龙网的泡沫板小孔中, 每孔播两粒种子, 待长出 1 叶后, 去除未发芽种子, 调整个别根部朝上芽朝下生长的种子, 保留生长整齐一致叶片无病症的幼苗。每株系播 1 排 10 孔, 3 次重复, 不同株系采用完全随机排列。泡沫板置于容积为 20 升的蓝色塑料盒子上(泡沫板 和塑料盒播种前 1~2 天均用多菌灵消毒, 预防苗期病害), 盒子中注清水, 用盐酸调节水的 pH 值在 5.5 左右。泡沫板漂浮在清水表面。

2.3 盐分胁迫处理

盐分胁迫处理分别在温室和人工气候室进行。清水培养至两叶一心期,将清水换成含 140mM NaCl 的 Yoshida 营养液(盐分胁迫处理前 2 天用低浓度杀虫剂处理水稻幼苗,预防苗期虫害)。 秧苗在温室中培养,通过湿帘和排气扇来调节温湿度,在整个生长和胁迫期间的昼夜平均温度分 别为 30℃和 25℃左右,湿度约为 60~70%。在人工气候室中培养,气候室保持 25℃恒温,光照/ 黑暗均 12 小时/天,湿度设定为 70%。每隔一周换一次营养液,每天调整 pH 至 5.5 左右。

2.4 耐盐相关性状的测定

记载每个株系盐害级别和整个盐分胁迫过程中的秧苗存活天数;测定盐分胁迫后,植株地上部分和根系中的 K⁺、Na⁺浓度。

2.4.1 盐害级别

分别在盐分胁迫后第 10 天和第 16 天评价每个株系秧苗叶片的盐害级别(score of salt toxicity at 10 days, S10D; score of salt toxicity at 16 days, S16D)。参考国际水稻所 SES 评价标准划分 5 级 (1-高度耐盐, 9-高度感盐)(IRRI, 2002),分级标准见表 1。

表 1. 影响水稻耐盐性的评价系统标准

Table 1. Standard evaluation system	m for salt tolerance of rice
-------------------------------------	------------------------------

盐害级别 Scores	症状表现 Suffering symptoms	抗性评价 Resistance evaluation
1	正常生长,叶片无病症 Growth and tillering nearly normal	高抗/HR
3	几乎生长正常,叶尖或少数叶发白和卷曲 Growth nearly normal but there is some reduction in tillering and some leaves discolored (alkali)/whitish and rolled (salt)	抗/R
5	生长严重受阻,多数叶片卷曲,只有少数叶呈伸展状态 Growth and tillering reduced; most leaves discolored (alkali)/whitish and rolled (salt); only a few elongating	中抗/MR
7	完全停止生长,多数叶枯干,有些植株死亡 Growth completely ceases; most leaves dry; some plants dying	感/S
9	几乎所有植株死亡或即将枯死 Almost all plants dead or dying	高感/HS

2.4.2 秧苗存活天数

记载自两叶一心期开始胁迫之日起,至株系中大部分秧苗死亡为止,调查整个株系的秧苗在 盐分胁迫后的存活天数(survival days of seedlings, SDS)。

2.4.3 地上部和根系中 K⁺、Na⁺浓度的测定

为测定地上部和根部 K⁺和 Na⁺浓度,首先对双亲进行 140mM NaCl 处理,进行不同处理时间 取样测定离子浓度的预备试验,确定双亲 K⁺、Na⁺浓度差异最大时的取样时间(一般感盐品种刚 表现盐害症状时取样,双亲间的差异可能最大)。预备试验结果表明处理 8 天后取样双亲间地上 部和根部 K⁺、Na⁺离子浓度差异达最大。

双亲和群体按上述完全相同的实验程序进行处理,处理 8 天后分别收获地上部和根部,经蒸 馏水浸洗数次后,分开地上部分(剪掉根部以上 1cm 的茎基部,这部分 Na⁺含量很高)和根部, 分别放入信封,在 80℃烘箱烘干至恒重(大约 6 小时),用分析天平称重后装入密闭性好的 30ml 离心管中,酌情加入 100mM 醋酸,于 90℃水浴恒温振荡器中提取 2 小时,将提取液分成两组, 测定前将原液转移至 2ml 离心管中,离心,再根据原液浓度,稀释一定倍数,稀释 3 次重复,减 少操作误差,分别用 S2 型火焰原子吸收光谱仪(S2 型火焰原子吸收光谱仪,美国热电公司生产) 测定地上部 K⁺浓度(shoot K⁺ concentration, SKC)和 Na⁺浓度(shoot Na⁺ concentration, SNC)及 根部的 K⁺(root K⁺ concentration, RKC)和 Na⁺浓度(root Na⁺ concentration, RNC),浓度单位为 µM/mg。测定 K⁺浓度的光波长为 766.5nm,测定 Na⁺的光波长为 589.0nm,火焰为空气-乙炔优级

纯火焰。

温室和人工气候室两个环境条件下,进行 140mM NaCl 浓度的盐分胁迫实验,测定植株中离子 浓度。其相应的离子浓度分别用温室条件下地上部 K⁺浓度(shoot K⁺ concentration in the greenhouse, GSKC)和人工气候室条件下地上部分 K⁺浓度(shoot K⁺ concentration in the phytotron, PSKC)表示,性状名称的缩写列于表 2。

表 2. 耐	盐相关性状缩写说明
--------	-----------

性状缩写	性状描述	单位	
Traits	Traits description	Units	
abbreviation			
S10D	盐分胁迫 10 天后秧苗盐害级别		
S16D	Score of salt toxicity at 10 days after salinity 盐分胁迫 16 天后秧苗盐害级别		
	Score of salt toxicity at 16 days after salinity		
SDS	秧苗存活天数	天	
GSKC	Survival days of seedlings after salinity 温室条件下水稻植株地上部分钾离子浓度	Days 微摩/毫克	
GSNC	Shoot K ⁺ concentration in the greenhouse 温室条件下水稻植株地上部分钠离子浓度	μmol/mg 微摩/毫克	
GRKC	Shoot Na ⁺ concentration in the greenhouse 温室条件下水稻植株根部钾离子浓度	μmol/mg 微摩/毫克	
GRNC	Root K ⁺ concentration in the greenhouse 温室条件下水稻植株根部钠离子浓度	μmol/mg 微摩/毫克	
PSKC	Root Na ⁺ concentration in the greenhouse 人工气候室条件下水稻植株地上部分钾离子浓度	μmol/mg 微摩/毫克	
PSNC	Shoot K ⁺ concentration in the phytotron 人工气候室条件下水稻植株地上部分钠离子浓度	μmol/mg 微摩/毫克	
PRKC	Shoot Na ⁺ concentration in the phytotron 人工气候室条件下水稻植株根部钾离子浓度	μmol/mg 微摩/毫克	
PRNC	Root K ⁺ concentration in the phytotron 人工气候室条件下水稻植株根部钠离子浓度	μmol/mg 微摩/毫克	
	Root Na^+ concentration in the phytotron	u mol/mg	

	Table 2.	Salt	tolerant	related	trait	abbre	viation
--	----------	------	----------	---------	-------	-------	---------

2.5 基因型分析

2.5.1 DNA 提取

采用改进的 CTAB 法提取水稻 DNA 步骤(分子克隆, 2002)

- 1. 液氮研磨叶片,加 CTAB 提取液, 65℃ 水浴 1 小时(每 20 分钟晃动一次)
- 2. 离心(6000rmp, 15分钟),吸上清到新管。
- 3. 加等体积氯仿: 异戊醇(24:1), 摇 5 分钟, 离心(12000mp, 10 分钟)。
- 吸上清到新管,加 2/3 体积冰冷的异丙醇(异丙醇预先放置在-20°C 冰箱里),缓慢摇动直至 有絮状物出现,放置在-20°C 约 30 分钟。
- 5. 离心(12000rmp, 10分钟), 70%酒精两次(每次5分钟, DNA 在 70%酒精中可长期保存), 100%酒精洗两次(每次5分钟)
- 缓慢将 100%酒精倒出,晾干 DNA(可以在真空干燥仪里干燥约 5~10 分钟),加 100ul ddH₂O 或 1×TE 溶解 DNA,加 RNAse(10mg/ml),放置在 37°C, 30 分钟。

7. 1%琼脂糖胶电泳检测浓度。

2.5.2 PCR 扩增

模板DNA的浓度调整到大约25纳克/微升, 扩增反应体系为10微升。具体如下:

Sterile ddH₂O 4.5ul

10×Taq buffer 1ul

dNTP-mix 10mM/each 1ul

Primer1 (10uM) 0.5ul

Primer2 (10uM) 0.5ul

Taq polymerase (2U/ul) 0.5ul

DNA (50ng/ul) 2ul

10×Taq buffer: 500mmol/L KCl 100mmol/L Tris·HCl (pH8.3,室温) 15mmol/L MgCl₂ 0.1% 明胶

PCR 扩增程序为:

- 1. 预变性: 94℃, 5分钟
- 2. 变性: 94℃, 1分钟
- 3. 退火: 55℃ (或61℃, 67℃等)1分钟
- 4. 延伸: 72℃, 1分钟
- 5. 循环: 从2到4共35个循环;
- 6. 在72℃下延伸10分钟; 扩增产物在4℃冰箱保存。

2.5.3 扩增产物的电泳分离

聚丙烯酰胺胶非变性胶操作程序: 8%聚丙烯酰胺胶 加入缓冲液(1×TAE) 电泳(电压100V)90~120分钟后下板 用 Genefinder 花青素类荧光染料染色30分钟 蓝光下,用kodar成相系统成像

聚丙烯酰胺胶变性胶电泳步骤: 扩增产物的变性:加入5ul甲酰胺上样液后,95℃下变性5分钟迅速用冰冷却; 4%聚丙烯酰胺胶制备流程: 中国农业科学院硕士学位论文

- 1. 洗板 酒精擦3遍
- 凹板:用500~1000ul sigma cot 硅化
 平板:酒精擦洗3遍,涂5ul Binding+5ul HAC+990ulETOH(晾10分钟)
- 3. 合板,灌胶,插梳子,等待凝胶

准备缓冲液(1×TBE);

将梳子拔出,加入缓冲液; 预电泳(衡功率100W)30分钟 点样,电泳(衡功率80W) 拆板,并及时将凹板,边条及梳子洗净;

凝胶染色

- 1. 固定10%HAC(100ml HAC+900ml H₂O)30分钟
- 2. 漂洗dd水中10分钟
- 3. 染色银染液中(1gAgNO3+1.5ml甲醛+1000ml水)30分
- 4. 漂洗dd水中冲洗
- 5. 显色显影液(20~30gNa₂CO₃+1.5ml甲醛+1000ml水)中至谱带清晰
- 6. 固定10%HAC中定影3分钟
- 7. dd水冲洗

2.6 数据处理与 QTL 定位

表型数据以 3 次重复的平均值进行不同耐盐性状间的相关分析,结合回交导入系群体的 SSR 标记基因型数据进行 QTL 定位。利用 SAS PROC GLM (SAS Institute, 1996)分析不同性状间的相关。采用 SAS PROC GLM 的单向方差分析方法检测影响各性状的 QTL,以 P<0.005 显著水平作为取舍 QTL 的临界值。当1个 QTL 与两个或多个标记连锁时(标记间间距在 50cM 内即认为其存在连锁),以 F 值最高的标记作为与 QTL 连锁标记列出(Xu et al., 2005)。

第三章 结果与分析

3.1 亲本及群体耐盐性状的表现

在盐胁迫条件下, IR64/Tarom molaii BC₂F₈回交导入系群体及其亲本耐盐相关性状表现列于 表 3。双亲间除温室条件下 S10D、S16D、SDS 和人工气候室条件下 PSNC、PRKC、存在显著或 极显著差异外,其余 6 个性状均没有显著差异。虽然两个亲本表现中等感盐,但导入系群体的耐 盐相关性状在两种不同环境条件下均表现出明显的双向超亲分离(表 3,图 1)。在温室条件下, 群体盐胁迫 10 天和 16 天的平均盐害级别分别为 4.84 和 8.28,均明显低于双亲,平均 SDS 为 21.21 天,显著长于双亲,其中群体中盐胁迫 10 天盐害级别小于 4 级的个体有 24 个株系,占 28.2%, 存活天数在 20 天以上的株系有 52 个,占 61.2%,因而群体中有较多的株系表现出较强的耐盐性。

表 3. 亲本及 IR64/Tarom molaii $\mathrm{BC}_2\mathrm{F}_8$ 回交导入系群体在温室和人工气候室条件下耐盐相关性状的表现

Table 3. Performance of salt-tolerance related traits in the introgression population of IR64/Tarom molaii BC_2F_8 in the

	IR64 (P ₁)	Tarom molaii (P ₂)	双亲差值	BC_2F_8	回交导入系群(体 (BILs)
性状 Traits	平均数 Mean ± SD	平均数 Mean ± SD	Difference between the parents	平均数 Mean ± SD	变异系数 CV%	极差 Range
S10D	5.42±0.97	8.55±0.66	3.13**	4.84±1.24	25.6	3.00-7.67
S16D	8.67±0.70	9.00±0	0.33*	8.27±0.83	10.1	5.67-9.00
SDS	19.04±3.93	11.41±0.79	-7.63**	21.21±4.17	19.7	11.67-31.00
GSKC	0.5422±0.04	0.5488±0.03	0.0066	0.5494±0.10	18.7	0.4065-0.8890
GSNC	1.3786±0.10	1.7110±0.29	0.3324	1.6088±0.31	19.3	0.6621-2.3950
GRKC	0.1097±0.02	0.1151±0.05	0.0054	0.1573±0.07	46.5	0.0559-0.3257
GRNC	0.2655±0.05	0.3634±0.26	0.0979	0.4616±0.25	54.8	0.0948-1.0230
PSKC	0.5337±0.06	0.4962 ± 0.08	-0.0375	0.4974±0.06	12.2	0.3501-0.6559
PSNC	2.2808±0.06	1.0784±0.12	-1.2024**	1.8730±0.29	15.9	1.1230-2.5680
PRKC	0.0580 ± 0.02	0.1578±0.06	0.0998*	0.0813±0.02	25.1	0.0396-0.1444
PRNC	0.4098±0.16	0.4734±0.11	0.0636	0.5973±0.13	21.5	0.2997-0.9013

greenhouse and phytotron

*, **分别表示差异显著水平为 0.05 和 0.01。

*, ** represent significant difference at the level of P < 0.05 and 0.01.

在盐胁迫条件下,TQ/Tarom molaii BC₂F₈回交导入系群体及其亲本耐盐相关性状表现列于表 4。双亲间除温室条件下 S10D、SDS 和人工气候室条件下 PSKC、PSNC 存在显著差异外,在其 余 7 个性状均没有显著差异。TQ/Tarom molaii BC₂F₈回交导入系群体的耐盐相关性状在两种环境 下均表现出明显的双向超亲分离(表 4,图 1)。群体平均的 S10D 和 S16D 分别为 5.92 和 8.63, 均明显低于双亲,平均 SDS 为 18.69 天,显著长于双亲,其中 S10D 小于 5 级的 10 个 (13.9%) 株系,SDS 长于 20 天的有 27 个 (37.5%)株系,表明群体中分离出许多耐盐性较强的株系,但 群体的总体耐盐性不如 IR64/Tarom molaii 群体强。

表 4. 亲本及 TQ/Tarom molaii $\mathrm{BC}_2\mathrm{F}_8$ 回交导入系群体在温室和人工气候室条件下耐盐相关性状的表现

Table 4. Performance of salt-tolerantce related traits in the introgression population of TQ/Tarom molaii BC_2F_8 in the

		gre	enhouse and phyto	otron		
	TQ (P_1)	Tarom molaii (P_2)	双亲差值	BC_2F_8]交导入系群体	(BILs)
性状 Traits	平均数 Mean ± SD	平均数 Mean ± SD	Difference between the parents	平均数 Mean ± SD	变异系数 CV%	极差 Range
S10D	7.55±1.32	8.55±0.66	1*	5.92±1.14	19.3	4.33-8.67
S16D	9.00±0	9.00±0	0	8.63±0.60	7.0	6.33-9.00
SDS	13.10±1.80	11.41±0.79	-1.69**	18.75±3.65	19.5	13.67-30.33
GSKC	0.5340±0.02	0.5488±0.03	0.0148	0.5831±0.07	12.7	0.4446-0.7909
GSNC	1.8435±0.07	1.7110±0.29	-0.1325	1.7033±0.25	14.7	1.1737-2.3225
GRKC	0.0874 ± 0.02	0.1151±0.05	0.0277	0.1161±0.06	48.9	0.0458-0.2812
GRNC	0.2404 ± 0.09	0.3634±0.26	0.1230	0.4741±0.27	57.1	0.1258-1.2752
PSKC	0.6689±0.04	0.4962±0.08	-0.1727**	0.6415±0.07	11.0	0.4588-0.8056
PSNC	2.2638±0.07	1.0784±0.12	-1.1854**	1.7764±0.27	15.3	1.3553-3.1207
PRKC	0.1005±0.04	0.1578 ± 0.06	0.0573	0.1017±0.02	19.8	0.0651-0.1689
PRNC	0.4937±0.17	0.4734±0.11	-0.0203	0.5196±0.09	17.4	0.3457-0.6855

*, **分别表示差异显著水平为 0.05 和 0.01。

*, ** represent significant difference at the level of P < 0.05 and 0.01.



SDS



第三章 结果与分析





S16D

🗌 IR64 🎆 TQ









Fig.1 Frequency distribution of S10D, S16D, SDS in the green house and SKC, SNC, RKC, RNC under the green house and phytotron conditions for the two population of IR64/Tarom molaii and TQ/Tarom molaii

3.2 耐盐性状间的相关

3.2.1 温室条件下性状间的相关分析

温室条件下调查了两个回交导入系群体的 3 个耐盐相关表型性状(S10D、S16D 和 SDS)和 4 个耐盐相关的离子性状(SKC、SNC 和 RKC、RNC),性状间的相关分析结果列于表 5。

IR64/Tarom molaii 和 TQ/Tarom molaii 两个群体分别有 11 对和 9 对性状间的相关达到显著或极显著水平(表 5)。从地上部的性状相关来看,SDS 与 S10D、S16D 在两个群体中均呈极显著负相关,表明盐胁迫下苗期叶片盐害级别越轻,存活天数就越长,植株的耐盐性也就越强。 IR64/Tarom molaii 群体的 GSKC 与 S16D 呈极显著负相关,与 SDS 呈显著正相关,表明苗期叶片盐害级别越低,地上部钾离子浓度越高,秧苗存活时间就越长。但这种相关关系在 TQ/Tarom molaii 群体中正好相反。IR64/Tarom molaii 群体的 GSNC 与叶片盐害级别(S10D 和 S16D)呈显著正相关,与 SDS 和 GSKC 呈极显著负相关,表明地上部钠离子浓度低的植株具有较好的耐盐性,而且地上部钾、钠离子的吸收存在竞争机制。TQ/Tarom molaii 群体也存在同样的趋势,只是相关的程度不如 IR64/Tarom molaii 群体高。从根部性状的相关来看,两群体的 GRNC 与 GRKC 极显著正相关,表明根部钾离子和钠离子的吸收机制可能完全不同于植株的地上部分,两者之间具有协同作用,不存在竞争。两个群体的地上部与根部之间基本上不存在相关性,表明秧苗的耐盐性主要取决于地上部钾钠离子的状况,与根部离子的状况无关,而且同种离子(如钾离子或钠离子)在地上部和根部之间完全独立,属于不同的吸收机制。唯有 IR64/Tarom molaii 群体的 GSKC 与GRNC 和 TQ/Tarom molaii 群体 GSNC 与 GRKC 之间存在微弱的显著相关,暗示地上部和根部不同离子之间存在某种联系,而且这种联系因不同群体而异。

1401		i ullul jois of su		area traits of the	e the population	ono in une gree	mouse
Traits	S10D	S16D	SDS	GSKC	GSNC	GRKC	GRNC
S10D		0.477***	-0.564***	0.119	0.238*	-0.175	-0.183
S16D	0.686***		-0.792***	0.273*	0.160	0.034	0.001
SDS	-0.690***	-0.789***		-0.237*	-0.166	-0.119	-0.018
GSKC	-0.112	-0.379**	0.240*		-0.225*	0.101	0.089
GSNC	0.322*	0.515***	-0.510***	-0.669***		-0.246*	-0.083
GRKC	-0.046	-0.051	0.109	-0.070	-0.147		0.760***
GRNC	-0.032	-0.117	0.185	0.231*	-0.137	0.799***	

	表 5.	温室条件下两	「个回交导入	系群体耐盐	相关性状间的	的相关性分析	
Table 5	Correlation	analysis of sa	lt-tolerantce	related traits	of the two poi	oulations in the	oreenhouse

表注: 左下角为 IR64/Tarom molaii 群体各耐盐相关性状间的相关性, 右上角表示 TQ/Tarom molaii 群体。

*,**和***分别表示差异在 0.05, 0.01 和 0.001 的概率显著水平;性状缩写见表 2

Notes: Data in left below corner are from IR64/Tarom molaii population, and data in right up corner from TQ/Tarom molaii population. *, **

and *** represent significant differences levels at P<0.05, 0.01 and 0.001; Trait abbreviations are shown in the Table 2.

3.2.2 人工气候室条件下性状间的相关分析

人工气候室条件下测定了 4 个影响耐盐性的生理性状(SKC、SNC 和 RKC、RNC),性状间的相关性列于表 6。地上部和根部钾、钠离子浓度间的相关性在 IR64/Tarom molaii 和 TQ/Tarom molaii 两个群体中完全一致,即 PSKC 与 PSNC 呈极显著负相关,PRKC 与 PRNC 呈极显著正相关,进一步验证了温室的结果。地上部与根部性状间的相关仅 IR64/Tarom molaii 群体的 PSKC 与 PRNC 达到显著水平,与温室条件下该群体相关性完全一致,其余的地上部与根部性状的相关性 在两个群体中均不显著。

表 6. 人工气候室条件下两个回交导入系群体耐盐相关性状间的相关性分析

Table 6. Correlation analysis of salt-tolerantce related traits of	of the two populations in the phytotron
--	---

Traits	PSKC	PSNC	PRKC	PRNC
PSKC		-0.311**	-0.158	-0.105
PSNC	-0.451***		-0.151	-0.116
PRKC	-0.013	-0.142		0.625***
PRNC	0.241*	-0.106	0.563***	

表注: 同表 3.

Note: the same as Table 3

3.3 遗传连锁图

共从水稻 12 条染色体上挑选均匀分布且亲本间有多态的 196 个 SSR 标记,对回交导入系群体进行基因型分析。除两个群体共有的 151 个 SSR 标记以外,IR64/Tarom 群体特有 22 个标记,TQ/Tarom 群体特有 23 个标记。各标记在染色体上的位置及遗传距离参考 Cornell 大学的图谱(Temnykh et al., 2001),本实验两个群体所有标记覆盖水稻基因组全长 1763.4 cM,相邻标记间的平均距离为 9 cM;图 2 为应用 Mapplotter 2.10 绘制的两个群体整合后的遗传连锁图谱。





3.4 耐盐性状的 QTL 定位

3.4.1 IR64/Tarom molaii BC2F8 群体检测到的耐盐 QTL

在温室和人工气候室条件下, IR64/Tarom molaii 群体中共检测到 29 个影响水稻耐盐相关性状的 QTL,主要分布在除第 8 和第 10 染色体外的其余 10 条染色体上,包括温室条件下的 23 个和人工气候室条件下的 6 个 (表 7,图 2)。

3.4.1.1 温室条件下检测到的耐盐 QTL

温室条件下检测到 23 个影响耐盐相关性状的 QTL,包括影响 S10D 的 4 个、S16D 的 3 个、SDS 的 6 个、GSKC 的 3 个、GSNC 的 4 个、GRKC 的 1 个和 GRNC 的 2 个(表 7,图 2)。

定位到影响 S10D 的 4 个 QTL,分别分布在第 2、3、4 和 7 染色体上,除 *QS10d2* 位点上供体 Tarom molaii 的等位基因降低叶片盐害级别即增加耐盐性外,在另 3 个位点(*QS10d3、QS10d4a*和 *QS10d7*) 受体 IR64 的等位基因降低叶片盐害级别。

定位到影响 S16D 的 3 个 QTL,分布在第 2 和 9 染色体上,第 2 染色体上的 *QS16d2b* 和第 9 染色体上的 *QS16d9a* 位点上供体 Tarom molaii 的等位基因降低叶片盐害级别,另 1 个位点(*OS16d2a*)受体 IR64 等位基因降低叶片盐害级别即增加水稻耐盐性。

检测到影响 SDS 的 6 个 QTL,分别定位在第 2、3、4、7 和 9 染色体上,第 2 染色体上的 *QSds2b* 和第 9 染色体上 *QSds9a* 位点的 Tarom molaii 等位基因延长存活天数,而其他 4 个位点 (*QSds2a、QSds3、QSds4a* 和 *QSds7*)的 IR64 等位基因延长存活天数。

在第 1、2 和 3 染色体上检测到影响地上部 K⁺浓度的 3 个 QTL(QGSkc1、QGSkc2 和 QGSkc3), 所有 3 个位点的供体等位基因都提高地上部 K⁺浓度。

在第 2、3、11 和 12 染色体上检测到影响地上部 Na⁺浓度的 4 个 QTL,除 *QGSnc2* 位点外, 其余 3 个位点(*QGSnc3、QGSnc11* 和 *QGSnc12a*)供体 Tarom molaii 的等位基因均增加地上部 Na⁺浓度。

此外,在第6染色体上检测到影响根部 K⁺浓度的1个QTL(*QGRkc6*),在第6和7染色体上检测到影响根部 Na⁺浓度的2个QTL(*QGRnc6*和*QGRnc7*),除*QGRnc7*外,其它两个位点减小性状值的等位基因均来自供体 Tarom molaii。

3.4.1.2 人工气候室条件下检测到的耐盐 QTL

人工气候室条件下检测到的 6 个 QTL,分布在第 1,2,3,5,9 染色体上,包括影响 PSKC 的 1 个、PSNC 的 3 个和 PRNC 的 2 个,没有检测到影响 PRKC 的 QTL (表 7,图 2)。

影响地上部分 K⁺浓度的 1 个 QTL (*QPskc1*) 被定位在第 1 染色体上,该位点受体 IR64 的等 位基因起到提高地上部分 K⁺浓度的作用。第 2,3,9 染色体上定位了 3 个影响地上部分 Na⁺浓度 的 QTL,除第 2 染色体的 *QPsnc2* 外,其他 2 个 QTL (*QPsnc3* 和 *QPsnc9a*) 位点供体 Tarom molaii 均起到增加地上部分 Na⁺浓度的作用。在第 1 和 5 染色体上定位到影响根部 Na⁺浓度的 2 个 QTL (*OPrnc1* 和 *OPrnc5*),这 2 个位点上 Tarom molaii 的等位基因均起到降低根部 Na⁺浓度的作用。

表 7. IR64/Tarom molaii BC2F8 群体在温室和人工气候室条件下检测到耐盐相关性状的 QTL

Table7. The QTLs of salt-tolerant related traits detected in the introgression population of IR64/Tarom moalii BC_2F_8 in

			the two	environments			
环境	性状	性状 QTL 染色体 标记区间 统计参数		参数	加性效应		
Environment	Traits		Chr.	Marker interval	Statistic parameters		$a^{1)}$
					F	Р	
温室	S10D	QS10d2	2	RM240- <u>RM112</u>	14.47	0.0003	-0.6252
Greenhouse	S10D	QS10d3	3	<u>RM22</u> -RM231	11.04	0.0013	0.6535
	S10D	QS10d4a	4	<u>RM518</u> -RM261	11.27	0.0012	1.0187
	S10D	QS10d7	7	<u>RM436</u> -RM481	13.1	0.0005	0.7848
	S16D	QS16d2a	2	<u>RM423</u> -RM555	15.45	0.0002	0.348
	S16D	QS16d2b	2	RM240- <u>RM112</u>	18.86	0.0001	-0.472
	S16D	QS16d9a	9	<u>RM316</u> -RM219	12.07	0.0008	-0.3204
	SDS	QSds2a	2	RM279- <u>RM423</u>	11.13	0.0013	-1.5343
	SDS	QSds2b	2	RM240- <u>RM112</u>	8.87	0.0038	1.703
	SDS	QSds3	3	<u>RM22</u> -RM231	11.22	0.0012	-2.1885
	SDS	QSds4a	4	RM335- <u>RM518</u>	11.64	0.0010	-3.4047
	SDS	QSds7	7	<u>RM436</u> -RM481	13.03	0.0005	-2.6048
	SDS	QSds9a	9	<u>RM316</u> -RM219	12.24	0.0008	1.6115
	GSKC	QGskc1	1	<u>RM583</u> -RM23	18.9	0.0001	0.0507
	GSKC	QGskc2	2	RM240- <u>RM112</u>	12.15	0.0008	0.0472
	GSKC	QGskc3	3	<u>RM60</u> -RM3202	16.72	0.0001	0.0534
	GSNC	QGsnc2	2	RM240- <u>RM112</u>	13.82	0.0004	-0.1533
	GSNC	QGsnc3	3	OSR13-RM7	9.91	0.0023	0.2404
	GSNC	QGsnc11	11	RM224- <u>RM144</u>	11.5	0.0011	0.1712
	GSNC	QGsnc12a	12	RM20A- <u>RM4A</u>	11.42	0.0011	0.2533
	GRKC	QGrkc6	6	RM510- <u>RM204</u>	9.55	0.0027	-0.0363
	GRNC	QGrnc6	6	<u>RM204</u> -RM217	11.79	0.0009	-0.1379
	GRNC	QGrnc7	7	<u>RM7338</u> -RM336	14.75	0.0002	0.1173
气候室	PSKC	QPskc1	1	RM246- <u>RM473A</u>	21.34	0.0001	-0.0358
Phytotron	PSNC	QPsnc2	2	RM240- <u>RM112</u>	9.75	0.0025	-0.1255
	PSNC	QPsnc3	3	<u>RM545</u> -OSR13	9.77	0.0025	0.18944
	PSNC	QPsnc9a	9	RM219- <u>RM105</u>	12.87	0.0006	0.1711
	PRNC	QPrnc1	1	RM220- <u>RM283</u>	14.24	0.0003	-0.0723
	PRNC	QPrnc5	5	RM161-RM421	9.53	0.0027	-0.0636

表注:¹⁾加性效应表示受体 IR64 等位基因被供体 Tarom molaii 等位基因取代后的效应。

Note: Additive effect means the gene effect resulting from the substitution of IR64 allele by Tarom molaii allele

3.4.2 TQ/Tarom molaii BC₂F₈ 群体检测到的耐盐 QTL

在温室和人工气候室条件下,TQ/Tarom molaii 群体中共检测到 28 个影响水稻耐盐相关性状的 QTL,分布在除第 1、7 和 10 染色体外的其它 9 条染色体上,包括温室条件下的 19 个和人工 气候室条件下的 9 个 (表 8,图 2)。

3.4.2.1 温室条件下检测到的耐盐 QTL

温室条件下检测到的 19 个 QTL,包括影响 S10D 的 2 个,S16D 的 6 个,SDS 的 4 个,GSKC 和 GSNC 各 1 个、GRKC 的 2 个和 GRNC 的 3 个(表 8,图 2)。

定位到影响 S10D 的 2 个 QTL (*QS10d4b* 和 *QS10d6*),分别分布在第 4 和 6 染色体上,两个 位点供体 Tarom molaii 的等位基因均增加叶片盐害级别。

定位到影响 S16D 的 6 个 QTL (*QS16d2c、QS16d4、QS16d6、QS16d9b、QS16d11* 和 *QS16d12*), 分布在第 2、4、6、9、11 和 12 染色体上,这 8 个 QTL 位点上供体 Tarom molaii 的等位基因均降 低叶片盐害级别,增加了水稻的耐盐性。

检测到影响 SDS 的 4 个 QTL (*QSds2c、QSds4b、QSds6、QSds9b*),分别定位在第 2、4、6 和 9 染色体上,这 4 个 QTL 位点的 Tarom molaii 等位基因均延长存活天数。

在第8染色体上检测到影响地上部 K⁺浓度的1个 QTL (*QGskc8*),来自受体 IR64 的等位基因提高地上部 K⁺浓度。

在第 12 染色体上检测到影响地上部 Na⁺浓度的 1 个 QTL (*QGSnc12b*),供体等位基因提高 地上部分 Na⁺浓度。

在第 3 和第 11 染色体上检测到影响根部 K⁺浓度的 2 个 QTL(*QGRkc3* 和 *QGRkc11*),在第 3、 5 和 11 染色体检测到影响根部 Na⁺浓度的 3 个 QTL(*QGRnc3、QGRnc5* 和 *QGRnc11*),上述 5 个 位点增加性状的等位基因均来自供体 Tarom molaii。

3.4.2.2 人工气候室条件下检测到的耐盐 QTL

人工气候室条件下检测到的 9 个 QTL,包括影响 PSKC 的 3 个、PSNC 的 3 个、PRKC 的 2 个和 PRNC 的 1 个(表 8,图 2)。

影响地上部分 K⁺浓度的 3 个 QTL (*QPskc2、QPskc11* 和 *QPskc12*) 被定位在第 2、11 和 12 染色体上,这 3 个位点上供体 Tarom molaii 的等位基因起到提高地上部 K⁺浓度的作用。定位了 3 个影响地上部分 Na⁺浓度的 QTL,分布在第 5、6 和 11 染色体上,除 *QPsnc5* 外,其它 2 个位点 (*QPsnc6* 和 *QPsnc11*) 的供体等位基因均降低地上部 Na⁺浓度。定位到影响 PRKC 的 2 个 QTL (*QPrkc2* 和 *QPrkc6*) 和影响 PRNC 的 1 个 QTL (*QPrnc4*),除 *QPrkc2* 外,其余 2 个位点的供体 等位基因均降低根部 K⁺和 Na⁺浓度。

表 8. TQ/Tarom molaii BC2F8 群体在温室和人工气候室条件下检测到耐盐相关性状的 QTL

Table8. The QTLs of salt-tolerant related traits detected in the introgression population of TQ/Tarom moalii BC_2F_8 in the

			two en	WIIOIIIIIeiits			
环境	性状	QTL	染色体	标记区间	参	数	加性效应
Environment	Traits		Chr.	Marker interval	Statistic	parameters	$a^{1)}$
					F	Р	
温室	S10D	QS10d4b	4	<u>RM335</u> -RM518	10.67	0.0018	1.0372
Greenhouse	S10D	QS10d6	6	<u>RM30</u> -RM340	22.11	0.0001	1.0890
	S16D	QS16d2c	2	RM324- <u>RM262</u>	30.97	0.0001	-0.6428
	S16D	QS16d4	4	RM307- <u>RM401</u>	21.10	0.0001	-1.1716
	S16D	QS16d6	6	<u>RM253</u> -RM539	19.35	0.0001	-0.7754
	S16D	QS16d9b	9	<u>RM242</u> -RM201	24.53	0.0001	-1.1871
	S16D	QS16d11	11	<u>RM120</u> -RM479	16.77	0.0001	-0.4739
	S16D	QS16d12	12	RM20A- <u>RM4A</u>	14.53	0.0004	-0.4346
	SDS	QSds2c	2	RM324- <u>RM262</u>	13.13	0.0006	3.2727
	SDS	QSds4b	4	<u>RM401</u> -RM537	10.59	0.002	5.8689
	SDS	QSds6	6	<u>RM253</u> -RM539	11.02	0.0015	4.3016
	SDS	QSds9b	9	<u>RM242</u> -RM201	10.83	0.0017	6.0183
	GSKC	QGskc8	8	<u>RM210-</u> RM556	8.60	0.0047	-0.0351
	GSNC	QGsnc12b	12	RM235- <u>RM17</u>	8.57	0.0048	0.2547
	GRKC	QGrkc3	3	<u>RM55</u> -RM514	25.68	0.0001	0.1675
	GRKC	QGrkc11	11	<u>RM120</u> -RM479	18.03	0.0010	0.1051
	GRNC	QGrnc3	3	<u>RM55</u> -RM514	18.47	0.0001	0.2581
	GRNC	QGrnc5	5	RM480- <u>RM334</u>	9.94	0.0025	0.2809
	GRNC	QGrnc11	11	<u>RM120-</u> RM479	9.72	0.0028	0.1425
气候室	PSKC	QPskc2	2	<u>RM485</u> –RM211	10.24	0.0022	0.0614
Phytotron	PSKC	QPskc11	11	RM224- <u>RM144</u>	9.38	0.0033	0.0499
	PSKC	QPskc12	12	<u>RM235</u> -RM17	11.39	0.0013	0.0767
	PSNC	QPsnc5	5	<u>RM421</u> -RM87	11.46	0.0012	0.1085
	PSNC	QPsnc6	6	RM225- <u>RM314</u>	8.65	0.0046	-0.0827
	PSNC	QPsnc11	11	<u>RM21</u> -RM206	10.73	0.0017	-0.1231
	PRKC	QPrkc2	2	RM262- <u>RM341</u>	9.91	0.0026	0.0120
	PRKC	QPrkc6	6	<u>RM217</u> -RM225	10.07	0.0024	-0.0094
	PRNC	QPrnc4	4	<u>RM280</u> -RM559	9.66	0.0028	-0.0975

表注:¹⁾加性效应表示受体特青等位基因被供体 Tarom molaii 等位基因取代后的效应。

Notes: Additive effect means the gene effect resulting from the substitution of Teqing allele by Tarom molaii allele.

3.4.3 不同遗传背景和环境条件下检测到耐盐 QTL 的比较

3.4.3.1 不同遗传背景下检测到耐盐 QTL 比较

为比较不同遗传背景对耐盐 QTL 定位的影响,分别在温室和人工气候室条件下比较 IR64/Tarom molaii 和 TQ/Tarom molaii 两个 BC₂F₈ 群体耐盐 QTL 的定位结果。从表 7 和表 8 可知, 在温室条件下两个群体共定位到影响所有耐盐相关性状的 42 个 QTL,仅有 6 个 (14.3%)影响相 同性状的 QTL 在两种不同遗传背景下都被检测到,包括位于第 2 染色体相邻区间 RM324-RM262 和 RM423-RM555 影响 S16D 的 2 个 QTL (*QS16d2a* 和 *QS16d2c*)、位于第 4 染色体相邻区间 RM401-RM537 和 RM335-RM518 影响 SDS 的 2 个 QTL (*QS16d2a* 和 *QSds4b*)及位于第 4 染色体 相邻区间 RM335-RM518 和 RM518-RM261 影响 S10D 的 2 个 QTL (*QS10d4a* 和 *QS10d4b*),表明 耐盐 QTL 的表达受遗传背景影响较大。在上述 3 个相邻区间上,仅影响 S10D 的 2 个 QTL 在两种不同遗 传背景下的基因效应的大小和方向都相同,而影响 S16D 和 SDS 的 QTL 在两种不同遗 传背景下的基因效应的方向相反,而且效应的大小差异明显,在 IR64 背景下影响 S16D 的基因效 应是在特青背景下的近 2 倍,然而在特青背景下影响 SDS 的基因效应则是在 IR64 背景下的 1.7 倍(表 7, 8),表明即使受遗传背景干扰较小的 QTL,其在不同遗传背景下的基因效应大小和方 向不尽相同。

在人工气候室条件下两个群体共定位到影响地上部和根部离子性状的 15 个 QTL,其中没有 1 对 QTL 被定位在同一或相邻区间,表明在人工气候室条件下影响钾、钠离子浓度的 QTL 受遗 传背景影响很大。

3.4.3.2 不同环境条件下检测到耐盐 QTL 比较

在温室和人工气候室条件下检测到影响 IR64/Tarom molaii BC₂F₈ 群体地上部和根部钾、钠离 子浓度的 16 个 QTL 中(表 7),影响同一性状有 4 个(1/4)QTL 被定位在同一或相邻区间,即 位于第 2 染色体 RM240-RM112 区间影响地上部钠离子浓度的 1 个 QTL(*QPsnc2*)在两种环境中 都被检测到,基因效应的大小和方向一致。另 1 个在两种环境条件下被检测到的影响地上部钠离 子浓度的 QTL 位于第 3 染色体的相邻区间 OSR13-RM7 和 RM545-OSR13,基因效应的方向相同, 大小基本一致(表 7),表明上述影响地上部钠离子浓度的 2 个主效 QTL 对环境条件不敏感,其 表达相对比较稳定。特青/Tarom molaii BC₂F₈ 群体在两种环境条件下检测到影响地上部和根部钾、 钠离子浓度的 16 个 QTL 中,没有一个影响同一性状的 QTL 在两种环境下被定位在同一或相邻 区间(表 8)。

QTL 定位过程中任意给定一个 QTL 的临界值去检测 QTL,其结果可能在一个环境下检测到的 QTL 在另一个环境下就未必能检测到。为检验由于统计学上第二类错误(即实际上存在的 QTL 由于判断 QTL 的临界值过高而被排除在外)导致的不同环境下影响同一性状 QTL 定位结果的不一致性,对所有在一个环境下检测到的 QTL 检测其另一环境下在 P<0.05 水平的显著情况,结果列于表 9。在影响 IR64/Tarom molaii BC₂F₈ 群体地上部和根部钾、钠离子浓度的 16 个 QTL 中, 在温室条件下影响地上部钾、钠离子浓度的 2 个 QTL (*QGskc3* 和 *QGsnc12a*)在人工气候室条件

下以较弱的显著水平被检测到;同样,在人工气候室条件下分别影响地上部钾、钠离子浓度和根部钠离子浓度的3个QTL(*QPskc1、QPsnc9a*和*QPrnc1*)在温室条件下以较弱的显著水平也被检测到。TQ/Tarom molaii BC₂F₈群体在两种环境条件下也有类似情况,在温室条件下影响地上部钾、钠离子浓度的2个QTL(*QGskc2*和*QGsnc12b*)在人工气候室条件下以较弱的显著水平被检测到,其中*QGskc2*在两种环境下的基因效应大小和方向都一致,但*QGsnc12b*在两种环境下的基因效应大小和方向都一致,但*QGsnc12b*在两种环境下的基因效应大小和方向都一致,但*QGsnc12b*在两种环境下的

表 9. 两个群体中由于概率显著水平不同导致不同环境条件下影响同一性状 QTL 的检出情况评估 Table9. Evaluation of QTL examination affecting the same trait under different environments resulting from various

群体	环境	性状	染色	QTL	标记区间	统计	十参数	加性效应
Pop ¹⁾	EN ²⁾	Traits	体		Marker interval	F	Р	<i>a</i> ³⁾
			Ch.					
IR64/Tarom	温室	GSKC	3	QGskc3	<u>RM60</u> -RM3202	16.72	0.0001	0.0534
molaii	气候	PSKC	3		RM60- <u>RM3202</u>	4.08	0.0467	0.0154
	温室	GSNC	12	QGsnc12a	RM20A- <u>RM4A</u>	11.42	0.0011	0.2533
	气候	PSNC	12		RM4A- <u>RM19</u>	5.82	0.0180	0.3517
	气候	PSKC	1	QPskc1	RM246- <u>RM473A</u>	21.34	0.0001	-0.0358
	温室	GSKC	1		<u>RM246</u> -RM473A	5.14	0.0262	-0.0386
	气候	PSNC	9	QPsnc9a	RM219- <u>RM105</u>	12.87	0.0006	0.1711
	温室	GSNC	9		RM316- <u>RM219</u>	4.76	0.0321	0.1016
	气候	PRNC	1	QPrnc1	RM220- <u>RM283</u>	14.24	0.0003	-0.0723
	温室	GRNC	1		RM220- <u>RM283</u>	6.84	0.0108	-0.1022
Teqing/	温室	GSKC	8	QGskc2	<u>RM210</u> -RM556	8.6	0.0047	-0.0351
Tarom molaii	气候	PSKC	8		<u>RM210</u> -RM556	5.55	0.0221	-0.0278
	温室	GSNC	12	QPsnc12b	RM235- <u>RM17</u>	8.57	0.0048	0.2547
	气候	PSNC	12		RM235- <u>RM17</u>	4.11	0.0473	-0.1679

significant levels for QTL claiming in the two populations

¹⁾ Pop-population

2) EN-environment

³⁾ 加性效应表示受体特青等位基因被供体 Tarom molaii 等位基因取代后的效应。

Additive effect means the gene effect resulting from the substitution of Teqing allele by Tarom molaii allele.

3.4.3.3 影响耐盐相关性状的重要基因组区域

通过两个群体在温室和人工气候室条件下耐盐 QTL 的比较,发现以下一些基因组区域可能 是影响水稻耐盐性的一些重要区域(图 2):一是第 1 染色体的 RM583-RM23 区间,定位到来自 IR64/Tarom molaii 群体在温室条件下影响地上部钾离子浓度的 1 个主效 QTL,增效等位基因来自 供体 Tarom molaii;二是第 2 染色体 RM240-RM112 区间,同时影响 IR64/Tarom molaii 群体在温 室条件下地上部钾钠离子浓度、盐胁迫 10 天和 16 天叶片盐害级别、幼苗存活天数和人工气候室 条件下地上部钠离子浓度等性状,而且耐盐有利等位基因(降低地上部钠离子浓度和叶片盐害级 别、增加地上部钾离子浓度和延长幼苗存活时间)均来自供体 Tarom molaii,供体的等位基因对 这些性状的作用方向相同(表 7);三是第 3 染色体起点的 2 个相邻区间 RM60-RM3202 和 RM22-RM231,定位到影响 IR64/Tarom molaii 群体在温室条件下叶片盐害级别、幼苗存活天数和地上部 钾离子浓度等性状,供体等位基因在增加地上部钾离子浓度的同时增加了叶片盐害级别和缩短了 幼苗存活的时间(表 7)。上述第一个区间只定位到影响钾离子浓度的 QTL,后面两个区间虽然 同时定位到影响钾离子浓度和叶片盐害级别及幼苗存活天数的 QTL,但基因对钾离子与盐害级别 和存活天数的作用方向在两个区间正好相反,暗示上述 3 个区域的耐盐机制可能各不相同。

第四章 讨论

4.1 耐盐 QTL 定位的遗传背景效应及不同群体检测到耐盐 QTL 比较

遗传背景对 QTL 尤其是微效 QTL 的检测存在干扰(Tanksley et al., 1996)。以往相当多的研 究者使用遗传背景不一致的分离群体(F2、RIL、DH等)进行耐盐 QTL 定位。在盐胁迫条件下, 分离群体中用于度量耐盐性的间接指标包括形态性状如苗期叶片盐害级别、生理性状如幼苗 K⁺、 Na⁺浓度等的表型变异固然包含耐盐性遗传变异的部分,但又不可避免地带有这些性状本身的遗 传变异(相当于本底变异),而且这两种变异对总变异的相对贡献会随着盐胁迫强度的变化而改 变(顾兴友, 1998)。为减少这类性状的本底影响,有人采用相对生长量作耐盐性指标,但每一 指标获得最大变异的盐浓度范围不完全一致(顾兴友, 1999)。因此,要有效地消除定位群体本 身遗传变异对耐盐鉴定所产生的本底影响,提高耐盐鉴定的准确性,必须将定位群体的遗传背景 纯化。本实验采用的 BC₂F₈ 回交导入系群体的每个株系只带有少量来自供体的染色体片段,遗传 背景与轮回亲本基本一致,因而能最大程度地消除遗传背景对 QTL 尤其是微效 QTL 检测的干扰, 提高 QTL 检测的准确性(Tanksley et al., 1996; Eshed et al., 1994)。

有关遗传背景对 QTL 定位影响的报道并不多。本研究分别在温室和人工气候室条件下比较 了同一供体(Tarom molaii)在两种不同遗传背景(IR64 和 TQ)下耐盐相关性状 QTL 的表达效 应,发现温室条件下仅有 14.3%的影响同一性状的 QTL 在两种不同遗传背景下被检测到,而在人 工气候室条件下未能检测到两种背景下影响同一性状的相同 QTL,表明遗传背景对耐盐 QTL 定 位的影响既取决于定位群体遗传背景的差异,也与性状鉴定的环境有很大的关系。此外,遗传背 景对耐盐 QTL 定位的影响还表现在基因效应大小和方向上的变化,有在两种不同遗传背景下的 基因效应大小和方向都相同的,如 QS10d4a 和 QS10d4b;也有基因效应方向相反、效应大小差异 明显的,如 QS16d2a 和 QS16d2c、QSds4a 和 QS10d4b;也有基因效应方向相反、效应大小差异 明显的,如 CS16d2a 和 QS16d2c、QSds4a 和 QS10d4b;也有基因效应方向相反、效应大小差异 明显的,如 CS16d2a 和 QS16d2c、QSds4a 和 QS10d4b;也有基因效应方向相反、效应大小差异 的复杂性。因此,在标记辅助选择育种中,为避免遗传背景对目标 QTL 鉴定的影响,最好将 QTL 定位与标记辅助选择结合在同一个群体中进行。在利用作图群体的 QTL 定位信息进行品种改良 时,要选择那些在不同遗传背景下基因效应的大小和方向比较稳定的、受遗传背景影响较小的主 效 QTL 用作标记辅助选择育种,充分考虑到供体有利等位基因的方向和效应大小,才有可能收 到预期的效果。

本研究采用 BC₂F₈两个回交导入系群体, 共检测到 57 个 QTL, 分别被定位在除第 10 染色体 外的 11 条水稻染色体上。借助相同的 SSR 标记或比较图谱(Temnykh et al., 2001; Kurata et al., 1994; Ware et al., 2002), 将本研究定位到的耐盐 QTL 与以往其它群体定位的结果进行比较,发现第 1 染色体 RM583-RM23 区间上影响 SKC 的 *QGskc1* 与影响茎 K⁺浓度的 *qSKC-1*(Lin et al., 2004; Ren et al., 2005)、耐盐主效基因 *Std* (龚继明等, 1998)、盐响应 cDNA 克隆 *TS1* (Qian et al., 2003) 和影响 K⁺及 Na⁺/K⁺比的 QTL (Koyama et al., 2001) 定位在同一染色体区域;位于第 2 染色体 RM240-RM112 区间影响 S10D、S16D、SDS、GSKC、GSNC 和 PSNC 的主效 QTL 与影响盐胁迫 下分蘖数 (Takehisa et al., 2004) 及 Na⁺浓度的 QTL (Lang et al., 2003) 定位在一起;位于第 3 染 色体 RM60-RM3202 区间影响 GSKC 的 QTL 及相邻区间 RM22-RM231 上影响 S10D 和 SDS 的 QTL, 与盐响应 cDNA 克隆 *TS2* (Qian et al., 2003)、Na⁺/K⁺比及盐胁迫下影响秧苗活力的 *qSV-3*

(Prasad et al., 2000)和根重的QTL(Lang et al., 2003)定位在一起;第7染色体RM436-RM481 区间上影响S10D和SDS的QTL与影响幼苗存活天数的qSDS-7(Lin et al., 2004)、盐胁迫下干 物重qSDM-7(Prasad et al., 2000)和K⁺浓度的QTL(Lang et al., 2003)定位同一染色体区域,该 染色体RM7338-RM336区间上影响GRNC的QTL与盐响应cDNA克隆TS3(Qian et al., 2003)、 影响盐胁迫下种子发芽率qSGM-7(Prasad et al., 2000)及与RFLP标记RG4连锁的1个耐盐主基 因(Zhang et al., 1995)定位在同一区域;位于第9染色体RM316-RM219区间影响SDS的QSds9a、 影响S16D的QS16d9a与影响Na⁺/K⁺及盐胁迫下根重的QTL(Qian et al., 2003)定位在一起。尽 管上述各种形态和生理性状是水稻耐盐性的其中一个组份性状,可能仅从单个组份性状反映各组 分与耐盐性的关系,但是,如果影响多个耐盐相关的组分性状的QTL定位在一起,而且能在不 同群体背景下重现,这些区域很可能是控制水稻耐盐性的重要基因组的区域,在耐盐基因克隆和 标记辅助水稻耐盐育种中具有应用价值。

4.2 耐盐相关性状的 QTL 分布及 K⁺和 Na⁺的关系

控制表型相关性状的 QTL 通常被定位在同一或相似的染色体区域(Albert et al., 1991; Lebreton et al., 1995; Lin et al., 1996; Xiao et al., 1996; Yeo et al., 1988; Shailaja et al., 2002)。影响 IR64/Tarom molaii 和特青/Tarom molaii 群体于温室条件下 S10D、S16D 和 SDS 的 QTL 在第 2、3、 4、7 和 9 染色体上定位在同一区间,而且基因效应的方向 S10D 与 S16D 一致, S10D、S16D 与 SDS 相反(表 7、8,图 2),与这 3 个性状间相关相吻合。温室条件下影响 SKC、SNC 的 QTL 与人工气候室条件下影响 SNC 的 QTL 定位在第 2 染色体的同一区间(RM240-RM112),基因效 应方向与性状间的相关性一致。影响 RKC 和 RNC 的 QTL 分别被定位在第 3 染色体 RM55-RM514 区间、第 6 染色体的相邻区间(RM510-RM204 和 RM204-RM217)及第 11 染色体上 RM120-RM479 区间,基因效应方向一致,与两者间的正相关相吻合。一因多效或控制不同相关性状基因的紧密 连锁构成了这些相关性状的遗传基础。

有报道认为在盐胁迫下 K⁺和 Na⁺的吸收是一个平行而相互独立的过程,彼此不存在竞争 (Koyama et al., 2001; Yeo et al., 1988; Garcia et al., 1997)。本研究的温室和人工气候室两种环境 条件下,两个不同的回交导入系群体中,RKC 与 RNC 之间均呈极显著正相关支持了上述观点。 但 SKC 与 SNC 之间存在显著负相关,表明根部的 K⁺和 Na⁺向茎部运输时存在某种选择的竞争机 制。本研究中检测到影响 SKC 和 RKC 的 QTL 以及影响 SNC 和 RNC 的 QTL 分别被定位在不同 基因组区域,进一步表明根部对 K⁺和 Na⁺的吸收与向地上部运输存在不同的遗传机制。

4.3 K⁺和 Na⁺浓度与水稻幼苗的耐盐性

Na⁺在水稻苗期整株或器官水平上区域化分配的数量差异与品种的耐盐性有关,认为耐盐品种根部钠离子在整株中所占的比例较高,不耐盐品种地上部积累的钠离子较多。减少 Na⁺吸收和维持较高水平的 K⁺是盐胁迫条件下植株正常生长的一个重要特征(Yeo et al., 1989)。盐胁迫条件下幼苗存活天数是衡量耐盐性强弱的一个最终指标,它是各种耐盐机制的综合体现。无论是在温室还是在人工气候室条件下,两个群体的 SDS 与 SKC 呈显著正相关,与 SNC 呈显著负相关,而且与 RKC 和 RNC 无关,表明水稻苗期耐盐性主要取决于地上部 K⁺、Na⁺浓度的高低,与根部

的 K⁺和 Na⁺浓度无关。在盐胁迫条件下,根部吸收的 Na⁺运送至茎部继而积累在叶片,由于从茎 部返回至根部的离子量很小(Yeo et al., 1982),最终导致叶片出现盐害。由此可见,地上部较 低的 Na⁺和较高的 K⁺或 K⁺/Na⁺比是耐盐品种的一个明显指征。

4.4 不同 QTL 的耐盐机制

了解植物适应盐害的机制是鉴别植物的耐盐特性和培育耐盐植物品种的重要途径。植物盐害 是离子、渗透和营养等多种生理过程综合作用的结果。植物的耐盐机制通常发生在三种组织水平, 即植株水平(Jeschke & Hartung, 2000; Munns et al., 1983)、细胞水平(Munns et al., 1983)和分子水 平(Blumwald, 2000; Munns et al., 2002)。各种不同的耐盐相关性状如苗期叶片盐害级别、幼苗存 活天数、地上部和根部钾钠离子含量等可能与各种耐盐的生理过程或不同层次的耐盐机制相关 联,各种耐盐机制最终受基因调控,因此在基因水平上可能反映出不同的基因参与不同耐盐机制 的调控。本研究在多个基因组区域定位到影响不同耐盐相关性状的QTL,这些区域对不同耐盐相 关性状的基因作用方向存在多样性,如第 2 染色体 RM240-RM112 区间和第 3 染色体起点 RM60-RM3202和RM22-RM231的2个相邻区间都同时存在影响地上部钾钠离子浓度、叶片盐害 级别、幼苗存活天数等多个耐盐相关性状,两个区间的QTL 对钾钠离子和叶片盐害级别与幼苗 存活天数的基因作用方向不一致,而第 1 染色体的 RM583-RM23 区间只存在 1 个影响地上部钾 离子浓度的主效QTL,表明这 3 个区域的QTL 参与的耐盐机制可能各不相同。

由于任何一个耐盐品种可能只具备一种或二种耐盐机制,而不可能具备所有的耐盐机制(Yeo & Flowers, 1984),因此将各种不同独立的耐盐机制进行组合,有可能进一步提高品种的耐盐性。如果能进一步证实上述 3 个区域涉及不同的耐盐机制或生理过程,就可以通过分子标记辅助选择将这 3 个区域的 QTL 进行聚合来提高植株的耐盐水平。

4.5 耐盐 QTL 表达的环境效应

植物育种就是通过选择不断累积有利基因的过程。基因与环境的互作是影响数量性状选择和 育种进展的主要因素。不同的数量性状或影响同一性状的不同 QTL 对环境具有不同的敏感性 (Li et al., 2003; Hittalmani et al., 2003)。数量性状 QTL 定位的其中一个重要的目的就是要鉴别出对环 境敏感程度不同的 QTL。标记辅助选择育种更关注那些对不同环境不敏感的主效 QTL,对那些 环境敏感的主效 QTL,可以在定位该 QTL 相类似的环境下对其实施标记辅助选择。本研究利用 两个群体检测了在温室和人工气候室环境下影响植株钾、钠离子浓度的 QTL,发现在 IR64/Tarom molaii BC₂F₈ 群体中有 1/4 的 QTL (如 *QPsnc2* 和 *QGsnc3*)在两种环境条件下同样被检测到,而 且不同环境下的基因效应的大小和方向基本一致,表明这些 QTL 对环境相对不敏感,在标记辅 助选择中可能具有应用价值。而在 TQ/Tarom molaii BC₂F₈ 群体中未能在两种环境条件下检测到影 响同一性状的相同 QTL。

同一位点的 QTL 在不同环境中能否被检出在很大程度上取决于 QTL 的表达程度。受 QTL 表达程度的影响,有些 QTL 在某一环境下被检出,而在另一环境下未能达到给定的显著水平如 P<0.005 的临界值,未能作为 QTL 检出,但实际上其可能达到 P<0.01 或 0.05 的显著水平,暗示 这些 QTL 在该环境下可能对性状的表达也起作用,只不过是表达量较小而已。本研究检测到在

温室和人工气候室条件下影响两个群体地上部和根部钾、钠离子浓度的 32 个 QTL 中,有 1/4 (7 个)的 QTL 在一个环境中被检测到,在另一个环境中以较弱的显著水平同样被检测到,这些 QTL 在不同环境中同样存在着基因效应或方向的多样性,在标记辅助选择主效耐盐 QTL 的同时,对这部分不同程度表达的 QTL 的选择也应予以重视。

4.6 种质资源耐盐 QTL 的发掘与不同耐盐 QTL 的聚合

经过人类长期驯化和人工选择,现代许多作物品种的遗传基础变得越来越窄,从而增加育成品种对不良逆境的脆弱性(Tanksley, 1997)。水稻种质资源存在包括耐盐性在内的各种抗逆基因(Tanksley, 1997)。一直以来育种家都片面追求利用高水平抗逆材料作亲本,但不幸的是具备极端抗逆性的种质材料数量寥寥无几,而且综合农艺性状很差。例如印度农家品种 Pokkali 作为少数几个高度耐盐亲本之一被用于品种耐盐性改良计划,但至今还未见利用该种质直接育成的耐盐品种。近几十年来,随着对复杂数量性状 QTL 定位研究的深入,人们逐渐认识到即便种质资源本身的目标性状不突出,但可能存在着高产(Xiao et al. 1997; He et al., 2006)、耐盐(Lee et al., 2006)等目标性状的优良基因,即不好的品种未必不是一个好亲本的概念逐渐被人们所认识。本研究的供体 Tarom molaii 为来自伊朗的中等感盐品种,IR64/Tarom molaii 群体中,从其回交后代鉴定出1个耐盐主效 QTL,其耐盐等位基因来自 Tarom molaii,同时影响温室条件下 S10D、S16D、SDS、SKC、SNC和人工气候室体条件下 SNC 等多个耐盐相关性状,具有育种应用价值。对这种以"隐蔽"方式存在于种质资源中的优良基因,培育回交导入系结合分子标记技术是挖掘这类"隐蔽"基因的有效途径(Li et al., 2005; Xu et al., 2005; Ali et al., 2006)。

水稻耐盐等复杂数量性状受多个 QTL 控制,通常每个 QTL 对性状的贡献率有限。将不同位 点具有相似效应的 QTL 进行聚合是提高抗逆水平的有效途径(Yeo et al., 1986; Flowers et al., 2000)。本研究 IR64/Tarom molaii 群体的 85 个株系中,2 个株系在盐胁迫下苗期最长存活天数 分别为 31 天和 28 天,表现高度耐盐性。在这 2 个株系中,分别聚合了来自 Tarom molaii 的 2 个 染色体区间上的耐盐 QTL(第 2 染色体 RM240-RM112 和第 9 染色体(RM316-RM219)和 3 个 染色体区间上的耐盐 QTL(第 2 染色体 RM240-RM112、第 3 染色体 RM60-RM3202 和第 9 染色 体 RM316-RM219)。这一结果显示了基于 DNA 标记的 QTL 聚合育种是培育具有高度耐盐新品种 的有效方法。

第五章 结论

- 一、相关分析表明叶片盐害主要是由于地上部 Na⁺积累过多造成的,根对 K⁺、Na⁺的离子吸收与 向地上部运输存在不同的机制。
- 二、两个回交导入系群体,共检测到在温室和人工气候室两种环境条件影响7个耐盐相关性状的 57个QTL,其中影响地上部K⁺、Na⁺浓度的QTL与影响根部K⁺、Na⁺浓度的QTL分布在不 同基因组区域,进一步表明根和茎对K⁺、Na⁺的吸收存在不同的遗传机制。
- 三、本研究检测到的影响水稻耐盐性的 57 个 QTL 中,有 1/4 的 QTL 在以往不同群体中被检测到, 其中在第1染色体的 RM583-RM23 区间、第2染色体 RM240-RM112 区间和第3染色体 RM60-RM231 区间,存在影响叶片盐害级别、幼苗存活天数和(或)钾钠离子浓度的多个 QTL, 是耐盐 QTL 的重要基因组区域。可能具有不同的耐盐机制。
- 四、通过比较相同供体在不同遗传背景条件下和同一群体在温室和人工气候室不同环境条件下 耐盐 QTL 的定位结果,表明耐盐 QTL 的表达受遗传背景和环境影响较大,在不同遗传背景 或环境条件下的检测到的相同 QTL 的基因效应大小和方向可能各不相同,从中鉴别出一些 对环境条件不敏感的主效 QTL 如 *QPsnc2* 和 *QGsnc3*。上述这些重要的 QTL 或基因组区域在 标记辅助选择育种中具有应用价值。

参考文献

- 1. 丁海媛, 张耕耘, 郭岩. 运用 RAPD 分析标记水稻耐盐突变系的耐盐主效基因. 科学通报. 1998, 43 (2): 418-421
- 2. 方先文,汤陵华,王艳平. 耐盐水稻种质资源的筛选. 植物遗传资源学报. 2004, 5 (3): 295-298
- 3. 方宣钧, 吴为人, 唐纪良. 作物 DNA 标记辅助育种. 北京: 科学出版社 2002: 22-42
- 4. 龚继明,何平,钱前,沈利爽,朱立煌,陈受宜.水稻耐盐性QTL定位.科学通报,1998,43(17): 1847-1850
- 5. 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
- . 顾兴友,梅曼彤,严小龙,郑少玲,盐胁迫对水稻农艺性状遗传变异的影响.中国农业科学, 1999,32(1):1-7
- 7. 顾兴友, 严小龙, 郑少玲. NaCl对水稻苗期耐盐指标变异度的影响. 华南农业大学学报, 1998, 19 (1): 30-34
- 郭房庆,汤章城. NaCl胁迫下抗盐突变体和野生型小麦Na⁺、K⁺累积的差异分析. 植物学报. 1999, 41(5): 515-518
- 郭岩,陈少麟,张耕耘,陈受宜.应用细胞工程获得受主效基因控制的水稻耐盐突变体.遗 传学报.1997,24(2):122-126
- 10. 廖春燕,吴平,易可可.不同遗传背景及环境中水稻穗长的QTLs和上位性分析.遗传学报, 2000,27(7):599-607
- 11. 林鸿宣,柳原城司,庄杰云.应用分子标记检测水稻耐盐性的 QTL.中国水稻科学, 1998, 12(2):72-78
- 12. 林建荣,石春海,吴明国.不同环境条件下粳型杂交稻稻米外观品质性状的遗传效应.中国水稻科学,2003,17(1):16-20
- 13. 林栖凤. 耐盐植物研究. 北京: 科学出版社, 2004.
- 14. 马丽清. 小麦耐盐相关基因的作图和克隆. [博士论文] 北京, 中国农业大学, 2005
- 15. 钱琼秋,魏国强,朱祝军,李军. 不同品种黄瓜幼苗光合机构对盐胁迫的响应. 科技通报. 2004, Vol.20 No.5.
- 秦忠彬,赵守仁,张月平. 耐盐水稻不同生育期耐盐性的研究. 作物抗逆性鉴定的原理与方法. 北京:北京农业大学出版社,1989,279-288.
- 17. 沈圣泉, 庄杰云, 王淑珍, 舒庆尧, 包劲松, 夏英武. 水稻米粒延伸性QTLs定位和基因型与 环境互作分析. 中国水稻科学, 2005, 19(4): 319-322
- 18. 徐建龙,高用明,傅彬英,黎志康. 回交导入后代水稻种质有利基因的鉴定与筛选研究.分子 植物育种. 2005, 3(5): 619-628
- 19. 余叔文,汤章程. 植物生理与分子生物学. 北京:科学出版社, 1998: 52-767
- 20. 曾洪学,王俊. 盐害生理与植物抗盐性. 生物学通报. 2005, 30(4): 1-3
- 21. 翟凤林. 植物的耐盐性及其改良. 北京:农业出版社, 1989.

- 22. 赵可夫,李法曾.中国盐生植物.北京:科学出版社,1999.
- 23. 朱新广, 王强, 张其德等. 冬小麦光合功能对盐胁迫的响应. 植物营养与肥料学报. 2002, 8(2): 177-180.
- 24. 朱新广,张其德, 匡廷云. NaC1胁迫对PSII光能利用和耗散的影响. 生物物理学报. 1999, 15(4):787-791.
- 25. 庄杰云,郑康乐. 水稻产量性状遗传机理及分子标记辅助高产育种. 生物技术通报. 1998, 1: 1-9
- 26. Akbar M, Yabuno T, Nakao S. Breeding for saline-resistant varieties of rice Variability for salt tolerance among some rice varieties. *Japananese Journal of Breeding*. 1972, 22: 277-284
- 27. Albert B S B, Edwards M D, Stuber C W. Isoenzymatic identification of quantitative trait loci in crosses of elite maize inbreds. *Crop Sci* 1991, 31: 267-274
- Ali A J, Xu J L, Ismail A M, Fu B Y, Vijaykumar C H M, Gao Y M, Domingo J, Maghirang R, Yu S B, Gregorio G, Yanaghihara S, Cohen M, Carmen B, Mackill D, Li Z K. Hidden diversity for abiotic and biotic stress tolerances in the primary gene pool of rice revealed by a large backcross breeding program. *Field Crops Research*, 2006, 97: 66-76
- 29. Apse M P, Aharon G S,Snedden W A, Blumwald E. Salt tolerance conferred by over expression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in Arabdopsis. *Science*. 1999, 285: 1256-1258
- Aro E. M., Virgin J, Anderson B. Photoinhibition and D1 protein degradation in peas acclimated to different growth irradiance. *Plant Physiol*.1993, 103: 835-843
- 31. Blumwald E. Sodium transport and salt tolerance in plant cells. *Curr Opin. Cell Bidi.* 2000, 12: 431-434
- Bonilla P, Dvorak J, Mackill D, Deal K, Gregorio G. RFLP and SSLP mapping of salinity genes in chromosome 1 of rice (Oryza Sativa L.) using inbred lines. *Philippine Agricultral Scientist* 2002, 85: 68-76
- 33. Bridgesm W C. Proceeding of tile statistical education section. American Statistical ASSU. 1993.
- 34. Chun-Peng Song, Guo Y, Qiu q, Lambert G, Galbraith DW, Jagendorf A, Zhu J-K A probable Na⁺ (K⁺)/H⁺ exchanger on the chloroplast envelope functions in pH homeostasis and chloroplast in Arabidopsis thalina. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101 (27): 10211-10216
- 35. Colmer T D, Munns R, Flower T J. Improving salt tolerance of wheat and barley: future prospects. *Australian Journal of experimental Agriculture*. 2005, 45: 1425-1443
- 36. Colmer TD, Flower TJ, Munns R. Use of wild relatives to improve salt tolerance in wheat. *Journal of Experimental Botany* 2006, 57: 1059-1078
- 37. Durand M. & lacan D. Sodium partitioning within the shoot of soybean. *Physiol Plant.* 1994, 91:6-71
- Elsamad H M A, Shadad M A K. Salt tolerance of soybean cultivars. *Biol Plantarum*. 1997, 39: 263-269
- 39. Eshed Y, Zamir D. Introgressions from *Lycopersicon pennellii* can improve the soluble-solids yield of tomato hybrids. *Theor Appl Genet*. 1994, 88: 891-897

- 40. Everard J D, Gucci R, Kann S C. Gas exchange and carbon partitioning in the leaves of celery (Aptium Graveolens L.) at various leaves of root zone salinity. *Plant physiol.* 1994, 106: 281-292
- 41. Flowers T J, Koyama M L, Flowers S A, Sudhakar C, Singh K P, Yeo A R. QTL: their place in engineering tolerance of rice to salinity. *Journal of Experimental Botany*. 2000, 51(342): 99-106
- 42. Flowers T J. Improving crop salt tolerance. Journal of Experimental Botany, 2004, 55: 307-319
- 43. Fukuda A, Nakamura A, Tanaka Y. Molecular cloning and expression of the Na⁺/H⁺ exchanger gene in Oryza sativa. *Biochim Biophys Acta*. 1999, 1446: 149-155
- 44. Garcia A, Rizzo C A, Ud-Din J, Bartos S L, Senadhira D, Flowers T J, Yeo A R.. Sodium and potassium transport to the xylem are inherited independently in rice, and the mechanism of sodium: potassium selectivity differs between rice and wheat. *Plant Cell Environ*. 1997, 20: 1167-1174
- 45. Gregorio G B, Senadhira D, Mendoza R D, Manigbas N L, Roxas J P, Guerta C Q. Progress in breeding for salinity tolerance and associated abiotic stresss in rice. *Field Crops Research* 2002, 76: 91-101
- 46. Gregorio G B, Senadhira D, Mendoza R D. Screening rice for salinity tolerance. IRRI discussion paper series No. 22. International Rice Research Institute. 1997, Manila 1099, Philippines.
- 47. Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ. Plant cellular and molecular responses to high salinity. 2000, *Plant Mol Bio*, 51: 463-499.
- 48. He G M, Luo X J, Tian F, Li K G, Zhu Z F, Su W, Qian X Y, Fu Y C, Wang X K, Sun C Q, Yang J S. Haplotype variation in structure and expression of a gene cluster associated with a quantitative trait locus for improved yield in rice. *Genome Research*, 2006, 16: 618-626
- 49. Hittalmani S, Courtois B. Identification of QTL for growth-and grain yield-related traits in rice across nine locations of Asia. *TAG* 2003, 107: 679-690
- 50. IRRI. Standard evaluation system for rice. IRRI, Manila, Philippines, 1996
- Jeschke W D & W. Hartung. Root-shoot interactions in mineral nutrition. *Plant Soil*, 2000, 226: 310-314
- 52. K. Venema, F. J. Quintero, J. M. Pardo, and J. P. Donaire. The Arabidopsis Na⁺/H⁺ exchanger AtNHX1 catalyzes low affinity Na⁺ and K⁺ transport in reconstituted liposomes. *J Biol Chem.* 2002, 277: 2413-2418
- 53. Keightly P D, Bufield G. Detection of quantitative trait loci from sequence changes of marker alleles under selection. *Genet. Res. Camb*, 1993, 62: 195-203
- Koyama M L, Levesley A, Koebner R M D, Flowers T J, Yeo A R. Quantitative trait loci for component physiological traits determining salt tolerance in rice. *Plant Physiol.* 2001, 125: 406-422
- 55. Kurata-N, Nagamura-Y, Yamamoto-K, Harushima-Y, Sue-N, Wu-J, Antonio-B-A, Shomura-A, Shimizu-T, Lin-S-Y, Inoue-T, Fukuda-A, Shimano-T, Kuboki-Y, Toyama-T, Miyamoto-Y, Kirihara-T, Hayasaka-K, Miyao-A, Monna-L, Zhong-H-S, Tamura-Y, Wang-Z-X, Momma-T, Umehara-Y, Yano-M, Sasaki-T, Minobe-Y. A 300 kilobase interval genetic map of rice including 883 expressed sequences. *Nature genetics*. 1994, 8:365-372

- 56. Lander ES, Bostein D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*. 1989, 121: 185-199
- 57. Lang NT, Masood S, Yanagihara S, Buu BC. Mapping QTLs for salt tolerance in rice. In: Khush GS, Brar DS, Hardy B. Advances in Rice Genetics. Supplement to Rice Genetics IV. Proceedings of the Fourth International Rice Genetics Symposium, 22-27 October 2000. Los Banos, Philippines. International Rice Research Institute. 2003, pp: 294-298
- Lebreton C, Lazic-Jancic V, Steed A, Pekic S, Quarrie S A. Identification of QTL for drought responses in maize and their use in testing causal relationships between traits. *J Exp Bot* 1995, 46: 853–865
- 59. Lee S Y, Ahn J H, Cha Y S, Yun D W, Lee M C, Ko J C, Lee K S, Eun M Y. Mapping of quantitative trait loci for salt tolerance at the seedling stage in rice. *Mol Cells*, 2006, 21(2): 192-196
- 60. Li Z K, Fu B Y, Gao Y M, Xu J L,Ali L, Lafitte H R, Jiang T Z, Rey J D, Vijayakumar C H M, Maghirang R, Zheng T Q, Zhu L H. Genome-wide introgression lines and a forward genetics strategy for functional genomic research of complex phenotypes in rice. *Plant Molecular Biology*, 2005, 59: 33-52
- Lin H X, Qian H R, Zhuang J Y, Lu J, Min S K, Xiong Z M, Huang N, Zheng K L. RFLP mapping of QTLs for yield and related characters in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 1996, 92: 920-927
- 62. Lin H X, Zhu M Z, Yano M, Gao J P, Liang Z W, Su W A, Hu X H, Ren Z H, Chao D Y. QTLs for Na⁺ and K⁺ uptake of the shoots and roots controlling rice salt tolerance. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108: 253-260
- 63. Lu C et al. Comparative mapping of QTLs for agronomic traits of rice across environments by using a double haploid population. *Theor App, Genet.* 1997, 94: 145-150
- 64. Lu C, Shen L, Tan Z, et al. Comparative mapping of QTLs for agronomy traits of rice across environments using a doubled haploid population. *Theor Appl Genet*. 1996, 93:1211-1217.
- 65. Lutts S, Kinet J M, Bouharmont J. Effects of salt stress on growth, mineral nutrition and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (Oryza sativa L.) cultivars differing in salinity resistance. *Plant Growth Regulation*. 1996, 19: 207-218
- 66. Maurel C, Kado RT, Gueren J, Chrispeels MJ. Phosphorylation regulates the water channel activity of the seed-specific aquaporin γ-TIP. *EMBO J*. 1995, 14: 3028-3035
- 67. Mckersie B D, Bowley S R, Harjanto E, et al. Water-Deficiet Tolerance and Field Performance of Transgenic Alfalfa Overexpressing Superoxide Dismutase, Plant Physiol. 1996, 111: 1177-1181
- Mei H W, J L Xu, Z K Li, X Q Yu, L B Guo, Y P Wang, C S Ying, L J Luo. QTLs influencing panicle size detected in two reciprocal introgressive line (IL) populations in rice (Oryza sativa L.). *TAG*. 2006, 112: 648-656
- 69. Munns R., H. Greenway and G.O, Kirst. Halotolerant eukaryotes: In: Physiological Plant Ecology. III. Responses to the Chemical and Biological Environment. Eds. O.L. Lange, P.S.

Nobel, C.B Osmond and H. Zeigler. Encycl. *Plant Physiol.*, 1983, New Series, Vol. 12C. Springer, Berlin. pp. 59-135

- Munns R., S. Hussain, A.R. Rivelli, R.A. James, A.G. Condon, M.P. Lindsay, E.S. Lagudh, D.P. Schachtman and R.A. Hare. Avenues for increasing salt tolerance of crops, and the role of physiologically based selection traits. *Plant and Soil*. 2002, 247: 93-105
- 71. Nakamura T, Osaki M, Ando M, et al. Differences in mechanisms of salt tolerance between rice and barley *Plants. Soil Sci Plant Nutr.* 1996, 42(2): 303-314
- Paterson A H, Lander E S, Had J D, et al. Resolution of quantitative trait into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature*. 1988, 335: 721-726
- 73. Pitman M G, Lauchili A. Global impact of salinity and agricultural ecosystems. Salinity environment-plants-molecures. 2002, Dordrecht: Kluwer, 3-20
- 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). *Curr Sci*, 2000, 78: 162-164
- 75. 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. *Nature Genetics*. 2005, 37(10): 1141-1146
- SAS Institute Inc. SAS guide to macro processing. Version 6.12 North Carolina: SAS Institute Inc, 1996.
- 77. Senadhira D, Zapata-Arias F J, Gregorio G B, Alekar M S, Cruz H C, Padolina T F, Galvez A M. Development of the first salt-tolerant rice cultivar through indica/indica anther culture. *Field Crops Research*, 2002, 76: 103-110
- 78. Shailaja Hittalmani, N. Huang B. Courtois, R. Venuprasad, H. E. Shashidhar, J-Y. Zhuang, K-L. Zheng, G-F. Liu, G-C. Wang, J. S. Sidhu, S. Srivantaneeyakul, V. P. Singh, P. G. Bagali, H. C. Prasanna, G. McLaren, G. S. Khush. Identification of QTL for growth- and grain yield-related traits in rice across nine locations of Asia. *Theor Appl Genet*. 2003, 107: 679–690
- 79. Shailaja Hittalmani, Shashidhar HE, Prashanth G. Bagali, Ning Huang, Sidhu JS, Singh VP, Khush GS, Molecular mapping of quantitative trait loci for plant growth, yield and yield related traits across three diverse locations in a doubled haploid rice population. Euphytica 2002, 125: 207–214
- 80. Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Mizoguchi T, et al. Molecular responses to water stress in Arabidopsis thaliana. *J Plant Res.* 1998, 111(3): 345-351.
- 81. Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.* 1997, 115(1): 327-334.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular responses to drought stress. In: Sato K, Murata N, eds. Stress Responses of Photosynthetic Organisms. Amsterdam: Elsevier, 1998: 141-163
- 83. Singh N K, Characterization of osmotin. Plant Physiol, 1987, 90: 1096

- 84. Soller M, Beckmann JS. Marker-based mapping of quantitative trait loci using replicated progenies. *TAG*. 1990, 67: 25-33
- 85. 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, 89: 85-95
- 86. Tanksley S D, McCouch S R. Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science*, 1997, 277: 1063-1066
- Tanksley S D, Nelson J C. Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. *Thero Appl Genet*, 1996, 92: 191-203
- Temnykh S, et al.2001.Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (Oryza sativa L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential.*Genome Res*.11:1441-1452.
- 89. Ungerer M, C R Linder, L H Rieseberg. Effects of Genetic Background on Response to Selection in Experimental Populations of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*. 2003, 63: 277-286
- 90. Wang D.L., Zhu J., Li Z. K. Paterson, A.H., Mapping QTLs with epistatic effects and QTL×enviornment interactions by mixed model approaches. *Theor Appl Genet*, 1999, 99: 1255-1264
- 91. Wang L P, Qi Y C, Zhao Y X. Cloning and sequencing of GST gene of auade salsa and its expression characteristics. *Plant Physiol Mol. Biol.* 2002, 28(2): 133-136
- 92. Ware, D., P. Jaiswal, J. J. Ni, X. Pan, K. Chang, Gramene: a Resource for Comparative Grass Genomics. *Nucleic Acid Research*, 2002, 30: 103-105
- 93. Wu W R, Li W M. A new approach for mapping quantitative trait loci using complete genetic marker linkage maps. *TAG*. 1994, 89: 535-539
- 94. Xiao J, Grandillo S, Ahn S N. Genes from the wild boost rice rice yield. *Nature*, 1997, 241: 225-235
- Xiao J, Yuan L P, Tanksley S D. Identification of QTLs affecting traits of agronomic important in a recombinant inbred population derived from a subspecific rice cross. *Theor Appl Genet*, 1996, 92: 230-244
- 96. Xiao J, Yuan L. P. Dominance is the major genetic basis of heterosis in rice as revealed by QTL analysis using molecular markers. *Genetics*. 1995, 140: 745-754
- 97. Xu J L, Lafitte H R, Gao Y M, Fu BY, Torres R, Li Z K. QTLs for drought avoidance and tolerance identified in a set of random introgression lines of rice. *Theor Appl Genet*, 2005, 111: 1642-1650
- 98. Yan J Q, Zhu J, He C X, et al. Molecular marker-assisted dissection of genotype×enviornment interaction for plant type traits in rice. *Crop Science*, 1999, 39: 538-544
- 99. Yan J Q, Zhu J. Developmental quantitative genetics, conditional epigenetic variability and growth in rice. *Genetics*. 1997, 147: 765-776

- 100. Yeo A R, Flowers T J. Accumulation and localization of sodium ions within the shoots of rice (Oryza sativa) varieties differing in salinity resistance. *Physiol Plant*, 1982, 56: 343–348
- 101. Yeo A R, Flowers T J. Salinity resistance in rice (*Oryza sativa* L.) and a pyramiding approach to breeding varieties for saline soils. *Aust J Plant Physiol*, 1986, 13: 161-173
- 102. Yeo A R, Flowers T J. Selection for physiological characters- examples from breeding for salt tolerance. In: Jones H G, Flowers T J, Jones M B. Plants under Stress. *Cambridge University Press*, Cambridge, 1989, pp: 217–234
- 103. Yeo A R, Yeo M E, Flower S A, Flowers T J. Screening of rice (Oryza sativa L.) genotypes for physiological characters contributing to salinity resistance and their relationship to overall performance. *TAG*. 1990,79: 377–384
- 104. Yeo A R, Yeo M E, Flowers T J. Selection of lines with high and low sodium transport from within varieties of an inbreeding species: rice (Oryza sativa). *New Phytol*, 1988, 110: 13-19
- 105. Yeo A.R. and T.J. Flowers. Mechanism of Salinity Resistance in Rice and their Role as Physiological Criteria in Plant Breeding. In: Salinity Tolerance in Plants: Strategies for Crop Improvement, John Wiley & Sons, 1984, New York. Pp: 151-170
- 106. Yoshida K. Plant Biotechnology—Genetic Engineering to Enhance Plant Salt Tolerance. *Journal* of bioscience and bioengineering, 2002, 94(6): 585-590
- 107. Yoshida S, Forno D A, Cock J H, Gomez K A. Laboratory manual for physiological studies of rice. IRRI, Manila, 3rd ed., 1976, pp: 1–83
- 108. Yu Xin-Qiao, Mei Han-Wei, Luo Li-Jun, Liu Guo-Lan, Liu Hong-Yan, Zou Gui-Hua, Hu Song-Ping, Li Ming-Sou, Wu Jin-Hong. Dissection of Additive, Epistatic Effect and $Q \times E$ Interaction of Quantitative Trait Loci Influencing Stigma Exsertion Under Water Stress in Rice. *Acta Genetica Sinica*, June 2006, 33 (6): 542–550
- 109. Z K Li, S B Yu, H R Lafitte, N Huang, B Courtois, S Hittalmani, G S Khush, CHM Vijayakumar, G F Liu, G C Wang, H E Shashidhar, J Y Zhuang, K L Zheng, V P Singh, J S Sidhu, and S Srivantaneeyakul. QTL×Environment Interactions in Rice: I Heading Date and Plant Height. *TAG*. 2003,108(1): 141-153
- 110. Zeng Z B. Precision mapping of quantitative trait loci. Genetics. 1994, 136: 1457-1468
- 111. Zhang G, Yan G, Chen S. RFLP tagging of a salt tolerance gene. *Plant Science*. 1995, 110(2): 227-234
- 112. Zhang H X, Blumwald E.Transgenic salt-tolerance tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nat. Biotechnol*. 2001, 19: 765-768
- 113. Zhang H X, Hodson J N, Willames J P, Blumwald E. Engineering salt-tolerant Brassica plants: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *PANS*. 2001, 98: 12832-12836
- 114. Zhang JZ, Creelman RA, Zhu JK. From laboratory to field. Using information from Arabidopsis to engineer salt, cold, and drought tolerance in crops. *Plant Physiol*, 2004, 135: 615-621
- 115. Zhu J K. Plant salt tolerance. Trends in Plant Science. 2001, 6: 66-71

- 116. Zhu J K. Understanding and improving plant tolerance to salinity stress. Agbiotech Net. 1999, 1: 1-3
- 117. Zhuang et al. Analysis of QTL×environment interaction for yield components and plant height in rice. *Theor Appl Genet*, 1997

附 录

主要试剂配方:

1. Yoshida 营养液原液配制:

各营养元素先配成原液贮藏,原液配方及 360 升营养液中各成份的终浓度见表 1。原液须保持新鲜,一般二个月配一次。按 18 盆(每盆大小 20L 计)连续使用 2 个月计算,各成份原液用量大约为 4L。原液配制流程如下:

(1)大量元素: 按表 1 称量后置于 1000ml 烧杯中加 750ml 蒸馏水溶解, 定容到 4L, 磁棒 搅拌 15 分钟后转移至综色瓶中贮藏。

(2) 微量元素: 微量元素的配制很关键,浓度过低导致缺素,过高引起毒害。各种成份必须分开配制。按表1称量,除氯化铁用100ml 蒸馏水溶解外,其余均用50ml 蒸馏水溶解,按Mn, Mo, Zn, B, Cu, Fe 和柠檬酸溶液顺序倒入盛有1L 蒸馏水的2L 容量瓶中搅拌15分钟,再加100ml 硫酸混匀后定容到4L,搅拌10分钟后倒入综色瓶中贮藏,溶液的最终呈浅褐色。所有原液必须用标签标明并单独贮藏。

	Table10. The constituent, conte	ent & final concentratio	n of the stock solution	
成份	试剂名称	克/4 升原液	360升营养液中各原	终浓度
大量元素	(分析纯级)		液量(ml)	(ppm)
N	(NH ₄) ₂ SO ₄	603.2	450	40
Р	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	160.9	450	10
К	K_2SO_4	285.6	450	40
Ca	CaCL ₂ .2H ₂ O	469.4	450	40
Mg	MgSO ₄ .7H ₂ O	1296.0	450	40
微量元素				
Mn	MnCL ₃ .4H ₂ O	6.000	450	0.50
Мо	(NH4) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0.296		0.05
Zn	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.140		0.01
В	H ₃ BO ₃	3.736		0.20
Cu	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.124		0.01
Fe	FeCL ₃ .6H ₂ O	30.800		2.00
柠檬酸	C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O	47.600		

表 10 配制原液的组份、含量及终浓度

Composition of Buffers and Solutions (来自 IRRI PBGB GML 和 GAMMA LAB)

2. 40% Acrylamide/bisacrylamide (38:2)

(100 ml) Acrylamide 38 g Bisacrylamide 2 g

adjust the volume to 100 ml with ultrapure water. Store at 4^{0} C. 3. 8% Acrylamide/bisacrylamide (80ml) 40% Acrylamide/bisacrylamide 16ml $50 \times TAE$ buffer 0.8ml 10% APS 0.8ml **TEMED 65ul** Ultrapure water 62.4ml (1000 ml) 4. 4% acrylamide solution Urea 420 g $10 \times TBE$ 100 ml 40% Acrylamide/bisacrylamide (38:2) 100 ml Dissolved the solution in approximately 500 ml ultrapure water, then adjust the volume to 1000 ml with ultrapure water. Filter through Whatman 3MM paper and store at 4 ^oC. (60ml) 4% Acrylamide/bisacrylamide 60ml 10% APS 200ul TEMED 50ul Safety note: Acrylamide and bisacrylamide are potent neurotoxins and absorbed through skin. Their effects are cumulative. 5. 0.5% acetic acid in 95% ethanol (200 ml) Glacial acetic acid 1 ml199 ml 95% ethanol 6. 10% APS (ammonium persulfate) (10ml) APS 1.0 g Ultrapure water 10 ml 7. 1% Sodium Thiosulfate (100 ml) Sodium Thiosulfate 1.0 g Ultrapure water 100 ml 8. Fix/Stop solution (2 liters) Glacial acetic acid 200 ml Ultrapure water 1800 ml 9. Staining solution

Dissolved the acrylamide and bisacrlamide in approximately 50 ml of ultrapure water, then

- (2 liters)
 - lers)

Silver nitrate 2 g

Ultrapure water 2000 ml

37% Formaldehyde 3 ml (add to solution just before use)

Note: Staining solution can be reused up to three times. Precipitate silver by adding approximately 10g sodium chloride. Collect the silver chloride precipitate by filtration.

10. Developing solution

(2 liters)

Sodium carbonate60.0 gUltrapure water2000 ml37% Formaldehyde3 ml

1% Sodium thiosulfate solution $400 \ \mu l$

Note: Sodium carbonate solution should be chilled to 4^{0} C or lower. Add 37% Formaldehyde and 1% Sodium thiosulfate solution just before use.

11. STR $3 \times$ loading buffer

(100 ml)

4M NaOH 0.25

95% formamide 95ml

Bromophenol blue 50mg

Xylene cyanol FF 50 mg

Add ultrapure water up to 100 ml

12. $10 \times \text{TBE}$ buffer

(1000 ml) Tris base 108 g EDTA 9.2 g Boric acid 55.2 Add ultrapure water to final volume of 1000ml.

13. $50 \times TAE$ buffer

1000ml

Tris base	242g

Glacial acetic acid 57.1 ml

0.5m EDTA (pH8.0) 100ml

14. 100mM Glacial acetic acid:

11.438ml Glacial acetic acid (Guarantee reagent)

Add ultrapure water to final volume of 2000ml

15. 1×TE pH8.0

10mmol/L Tris·Cl (pH8.0)

```
1mmol/L EDTA (pH8.0)
```

致 谢

本论文是在导师徐建龙研究员的悉心指导下完成的。导师渊博的专业知识、宽阔的思路、忘 我的工作精神、严谨的治学态度激励我不断前进,其对事业的执著精神深深地感染了我,使我终 身受益。三年来,导师在生活、学习和科研等方面都给予了无微不至的关怀和帮助,在论文完成 过程中,精心审改。在此向导师表示深深的谢意。

在校三年期间得到黎志康研究员、朱苓华老师对我学习和生活上大力的指导和帮助。在此表 示深深的感谢!

在校期间得到高用明研究员、傅彬英研究员、周永力研究员对我的学习及研究工作给予的耐 心指导和帮助。论文撰写过程中,胡凤仪研究员为论文的修改提出宝贵的意见。在实验实施期间 得到实验室邓建利老师的支持和帮助;实验期间江云珠、康乐、熊建华、刘三宏、潘雅娇、何云 霞博士都给予了大力帮助,使我很快解决在实验中出现的问题,在生活上也都给予了最热忱的帮 助。

另外,上海植物生理生态研究所的林鸿宣博士对离子测定实验提供了许多技术指导和帮助, 在此表示感谢!

在实验过程中,硕士研究生臧金萍、李芳都给了我很大帮助。同学徐敏、王迪在试验和生活 上也给予了热情帮助,并在论文修改中提出宝贵意见。本实验室研究生张帆、王利锋、徐化学、 于晶、王梅、陈冰旭、崔金腾、谢学文、张子佳,实验室工作人员蒋先丽,刘慧斌等在论文完成 过程中也给予大力关心和帮助!

值此论文完成之际,特向培养我、关心我的导师致以最诚挚的谢意!向所有关心和帮助过我 的老师、同学、朋友和家人一并致以最衷心的感谢!

本研究受到国家 973 (2006CB100100),国家基金项目(30570996)的资助。在此一并致谢!

孙勇 2007年6月

作者简历

出生年月: 1980年12月

籍贯:辽宁昌图人

简历:

2004/9-2007/7 中国农科院作物科学研究所 作物遗传育种专业 攻读硕士学位 1999/9—2003/7 沈阳农业大学 农学专业 获学士学位

发表论文情况:

- Yong Sun, Jinping Zang, Linghua Zhu, Binying Fu, Yongming Gao, M. Arif, Zhikang Li and Jianlong Xu. Effects of genetic background on salt tolerance QTL detected in introgression lines of rice. 第七届全国植物基因组学大会会议摘要. 2006.7: 219.(荣获优秀墙报三等奖)
- 2. 孙勇、臧金萍、朱苓华、王韵、周永力、徐建龙、黎志康. 2007.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(已接收)

参加课题情况:

- 1. 国家基金项目"水稻耐盐基因的精细定位与基因效应的精细分析"(2006-2008)
- 2. 国家 973"水稻耐盐遗传网络解析与重要耐盐 QTL 的克隆研究"(2006-2010)
- 国家与广东省联合基金"水稻高产、抗旱、耐盐的遗传基础及其分子标记辅助聚合育种研究" (2007-2010)