

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2022.12030

广西水稻地方品种核心种质芽期耐盐性全基因组关联分析

夏秀忠^{1,**} 张宗琼^{1,**} 杨行海¹ 莊洁¹ 曾宇² 邓国富² 宋国显³
黄欲晓³ 农保选^{1,*} 李丹婷^{1,*}

¹ 广西农业科学院水稻研究所 / 广西水稻遗传育种重点实验室, 广西南宁 530007; ² 广西农业科学院, 广西南宁 530007; ³ 钦州市农业科学研究所, 广西钦州 535000

摘要: 水稻属盐敏感的作物, 盐胁迫会导致产量显著减少。我国盐渍地总面积大, 并且呈迅速增长趋势, 因此, 筛选水稻耐盐种质, 培育耐盐水稻品种十分必要。本研究在 1.5% NaCl 盐胁迫条件下评价 419 份广西水稻地方品种核心种质种子芽期的相对盐害率, 并利用全基因组关联分析鉴定耐盐位点。研究结果表明: 盐胁迫下, 种子芽期平均发芽率为 57.67%, 显著低于对照 92.55%, 且夏皮罗-威尔克检验(0.9301)不符合正态分布。基于 208,993 个 SNP 标记, 将 419 份核心种质资源分为 6 个亚群, 利用一般线性模型(general linear model, GLM)和混合线性模型(mixed linear model, MLM)分析分别获得 129 个和 1 个显著关联 SNP, 分布在 1 号、2 号、3 号、4 号、5 号、6 号、8 号、9 号和 12 号染色体上。在 14 个与水稻耐盐性显著关联区域, 有 13 个区域与前人定位或克隆的耐盐基因重叠。显著关联区域 Chr. 8: 10,564,948~10,733,175 为首次报道, 命名为 *qGR8*。*qGR8* 区域内含有 53 个基因, 其中 34 个经转录组数据比对获得表达谱, 比对结果推测 *LOC_Os08g17370* 为候选基因, 该基因为跨膜 9 超家族成员, 在耐盐亲本的根部和叶部上调表达, 可能为 *qGR8* 区域内水稻芽期耐盐的新基因。这些研究结果为耐盐新基因的克隆奠定基础, 为培育耐盐水稻品种提供新的基因资源。

关键词: 水稻; 核心种质; 芽期; 耐盐; 全基因组关联分析

Genome wide association study of salt tolerance at the germination stage for core Germplasm of rice landrace in Guangxi, China

XIA Xiu-Zhong^{1,**}, ZHANG Zong-Qiong^{1,**}, YANG Xing-Hai¹, ZHUANG Jie¹, ZENG Yu², DENG Guo-Fu², SONG Guo-Xian³, HUANG Yu-Xiao³, NONG Bao-Xuan^{1,*}, and LI Dan-Ting^{1,*}

¹ Rice Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences / Guangxi Key Laboratory of Rice Genetics and Breeding, Nanning 530007, Guangxi, China; ² Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, Guangxi, China; ³ Qinzhou Institute of Agricultural Sciences, Qinzhou 535000, Guangxi, China

Abstract: Rice is a salt-sensitive crop, and salt stress can cause significant reduction in rice yield. China's total saline area is large and growing rapidly. Therefore, it is necessary to screen for the salt-tolerant rice germplasm and cultivate these varieties. In this study, we evaluated the relative salt damage rate of 419 core germplasm of Guangxi rice landraces at seed germination stage under 1.5% NaCl salt stress, and identified the salt-tolerant loci by whole-genome association analysis. The results showed that the average germination rate under salt stress was 57.67%, which was significantly 92.55% lower than that of control group, and the

本研究由水稻生物学国家重点实验室开放课题(170102), 广西重大科技创新基地开放课题(2018-05-Z06-CX04), 广西农业科学院发展基金项目(桂农科 2021JM07, 桂农科 2021JM49)和广西农业科学院基本科研业务专项(桂农科 2021YT030)资助。

This study was supported by the Open Project Program of State Key Laboratory of Rice Biology (170102), the Opening Project of Major Science and Technology Innovation Base for Guangxi (2018-05-Z06-CX04), the Development Fund of Guangxi Academy of Agricultural Sciences (Gui Nong Ke 2021JM07, Gui Nong Ke 2021JM49), and the Special Funds of Basic Scientific Research Foundation of Guangxi Academy of Agricultural Sciences (Gui Nong Ke 2021YT030).

* 通信作者(Corresponding authors): 李丹婷, E-mail: ricegl@163.com; 农保选, E-mail: nongbaoxuan88@gxaas.net

** 同等贡献(Contributed equally to this work)

第一作者联系方式: 夏秀忠, E-mail: xiaxiuzhong@163.com; 张宗琼, E-mail: zhangzongqiong@gxaas.net, Tel: 0771-3244040

Received (收稿日期): 2021-04-26; Accepted (接受日期): 2021-11-29; Published online (网络出版日期): 2021-12-24.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20211223.1819.004.html>

Shapiro-Wilk test (0.9301) found that the distribution did not conform to normal distribution. Based on 208,993 SNP markers, 419 core germplasm was divided into 6 subgroups. We used general linear model (GLM) and mixed linear model (MLM) analysis to identify 129 and 1 significantly associated SNPs, respectively, which were distributed on chromosomes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, and 12. Among the 14 regions that were significantly associated with rice salt tolerance, 13 regions overlapped with previously identified or cloned salt tolerance genes. The significantly associated region Chr. 8:10,564,948–10,733,175 was reported for the first time and named *qGR8*. There were 53 genes in *qGR8* region, 34 of which were compared with transcriptome data to obtain the expression profiles. We compared the expression profiles and speculated that *LOC_Os08g17370* was a candidate gene. This gene is a member of transmembrane 9 superfamily and is up-regulated in roots and leaves of salt-tolerant parent. Thus, this gene might be a novel salt-tolerant gene in *qGR8* region at germination stage in rice. These results lay a foundation for cloning new genes of salt-tolerant and provide new genetic resources for breeding salt-tolerant rice varieties.

Keywords: *Oryza sativa* L.; core germplasm; germination; salt tolerance; genome-wide association study

水稻(*Oryza sativa* L.)是世界 50%人口的主要食物来源,是所有谷物作物中对土壤盐分最敏感的作物之一,盐分影响了 20%以上的灌溉耕地^[1]。全球水稻总产量主要受水稻种植面积及水稻单产的影响^[2]。我国水稻种植面积约占粮食作物总面积的 30%^[3]。增加水稻种植面积,是提高水稻总产量的主要途径之一。我国有 9913 万公顷盐碱地待开发利用,主要分布在沿海地带^[4]。盐分对水稻从种子萌发到成熟的各个阶段的生长都有不同程度的影响,过量的盐分会对水稻的主要代谢活动产生不利影响,也会导致种子萌发率和幼苗生长高度的总体下降^[5]。广西沿海盐害以咸农田为主,咸农田面积约占广西沿海地区耕地面积的 10.5%,占水田面积的 24.0%,是限制水稻产量提高的第一个关键制约因子^[6]。利用现有耐盐资源挖掘耐盐基因,培育耐盐品种,可以为利用盐碱地资源和增加粮食产量提供了有利的保障。

对现有稻种资源的耐盐性鉴定评价和筛选,是耐盐基因挖掘前提和基础。广西的海水稻,也称“沿海深水稻”,是广西栽培稻资源重要的类型之一^[7]。许多研究学者已经利用全基因组 QTL 分析检测到大量耐盐的相关位点^[8-13]。目前,利用双亲定位群体,在水稻上定位了约 70 个耐盐 QTL^[14];在统计的 47 个水稻耐盐 QTL 分析研究中,共检测到 964 个耐盐相关 QTL,其中种子萌发期 31 个^[15];据国家水稻数据中心(<https://www.ricedata.cn/>)统计,与耐盐性相关且已经被定位和克隆的相关基因就有 180 多个。这些研究为耐盐基因的克隆奠定了基础,有助于快速推动水稻耐盐分子辅助选择育种进程。

种子萌发是作物生命周期中最关键的步骤之一^[16]。研究表明,种子萌发开始于水分吸收,而盐分阻止水分吸收,从而抑制种子萌发,盐度的增加推迟了种子萌发的时间,从而导致了种子萌发发芽率降低^[17]。本研究中利用 SLAF-Seq 技术^[18]对 419 份

广西水稻地方品种核心种质进行测序,对芽期的相对盐害率进行全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS),挖掘种子芽期耐盐基因,为水稻的耐盐品种培育提供重要的基因资源和技术支持。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为广西农业科学院水稻研究所构建的水稻地方品种核心种质 419 份^[19],来源于广西桂南、桂中、桂北和高寒山区 4 个稻作区;其中,籼稻 330 份,粳稻 78 份,中间类型 11 份,耐盐对照为广西沿海深水稻品种赤禾、广东耐盐品种海稻 86。

1.2 芽期耐盐鉴定

选择 30 粒饱满种子,置于放置 2 张滤纸的玻璃培养皿中,10 mL 的 1.5% NaCl 溶液浸泡,设置 3 个重复;以 10 mL 蒸馏水处理为对照。在 30℃培养箱中,12 h 光暗交替培养。每天使用等量同浓度溶液进行清洗,10 d 后记录发芽率。相对盐害率计算公式:

$$SI = \frac{G_1 - G_2}{G_1} \times 100\%$$

式中,SI 为相对盐害率(%);G1 为对照发芽率(%);G2 为处理发芽率(%)。

1.3 基因型测定及数据分析

提取样品 DNA,用 *Hae* III 和 *Rsa* I 限制性内切酶组合,将酶切片段末端进行平端修复,5'端进行磷酸化修饰;3'端加 A,使之与 solexa 接头 5'端加 T 互补,提高接头连接效率,阻止 solexa 接头自连。3'和 5'端分别修饰完成之后,继续连接 solexa 测序接头,便于将连接产物锚定在 flowcell 上,进行桥式扩增。用琼脂糖凝胶电泳进行 300~500 bp 片段大小选择,通过 PCR 扩增,增大文库量。建好的文库用 Illumina HiSeq 2000 测序^[20]。根据最小等位基因频率(minor allele frequency, MAF) ≥ 0.05 和完整度(非

N 的 SNP 位点数/总 SNP 位点数) > 0.5, 共获得 208,993 个 SNP。

1.4 全基因组关联分析

基于 SNP, 利用 TASSEL 5.0 软件的一般线性模型(GLM)和混合线性模型(MLM-Q+K)方法计算。通过 Admixture 软件计算样品群体结构 Q 值, SPAGeDi 软件计算样品间亲缘关系 K 值, 基于公式($Y = X\alpha + Q\beta + K\mu + e$) (X 为基因型, Y 为表型), 计算最终每个 SNP 位点所对应的关联值 $P^{[20]}$ 。假阳性使用 Bonferroni 校正, 设置阈值设为 0.1 水平($0.1/208993 = 4.78E-07$, 在显著水平为 10%时)和 0.01 水平($0.01/208993 = 4.78E-08$, 在极显著水平为 1%时)。结果通过 Manhattan plot 和 Quantile-Quantile plot 展示。以位点间相关系数(R^2)作为参数, 利用 TASSEL 5.0 软件计算 LD 衰减距离, 分析确定峰值 SNP 左右 100 kb 范围内为鉴定的候选基因区域。

1.5 重要候选基因分析

候选基因关联区间参考条件为: (1) 接近已经克隆耐盐基因区域(< 1 Mb)或精细定位的 QTL 区域; (2) 对表型贡献率大于 10%, $-\log_{10}(P) > 3$; (3) 最小等位基因频率 MAF > 0.05 且峰值 SNP 位置 100 kb 范围内显著 SNP 数量大于等于 2。将关联区域内峰值 SNP 上下游 100 kb 范围内基因与 KEGG、GO、COG、nr、Swissprot 等数据库比对, 进行基因功能注释。

利用粳稻日本晴基因组注释网站(<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)预测候选基因关联区间的基因; 利用转录组数据挖掘比对云平台 GENEVESTIGATOR (<https://genevestigator.com/gv/>)的 3116 个 Affymetrix 基因芯片和 1385 个 RNA-Seq

序列分析了候选基因在种子萌发过程中的表达谱(显著性水平 $P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 表型变异统计

419 份核心种质材料发芽率鉴定结果表明: 对照发芽率 92.55%, 标准差 8.94%, 变异系数为 0.10; 处理发芽率 57.67%, 标准差 24.64%, 变异系数 0.43, 方差分析结果表明, 发芽率在耐盐处理与对照之间呈极显著差异(图 1-a)。419 份核心种质芽期相对盐害率均值为 38.2%, 标准差 25.4%, 变异系数为 0.66, 正态性检验结果 Shapiro-Wilk = 0.9301, $P = 4.30E-13$, 不符合正态分布(图 1-b)。

2.2 SNP 标记

利用 SLAF-seq 对 419 份水稻核心种质进行测序分析, 每份资源获得原始 reads 数 602,270 条, 与参考基因组 Soap 比对, 基因组为 MSU-RGAP 数据库上下载的最新水稻基因组(MSU, version_7.0), 共获得 67,665 条 SLAF, 每条 SLAF 平均深度为 8.75x, 多态性片段数量为 56,768 条, 多态性比例为 83.90%。根据 SLAF 检测 SNP, 总计获得 1,090,071 个 SNP 位点, 所有 SNP 平均完整度 44.11%, 杂合率 8.01%。根据 MAF > 0.05 和完整度 > 0.5 进行筛选, 结果获得 208,993 个有效 SNP, SNP 标记用于后续关联分析^[21]。

2.3 群体结构分析

基于 SNP, 通过 MEGA 5.0 软件的 Neighbor-Joining 算法进行进化分析, 结果显示 419 份水稻核心种质主要分为: 籼稻亚群 330 份、粳稻亚群 78 份和其他类型 11 份。通过主成分分析, 结果表明 PCA1

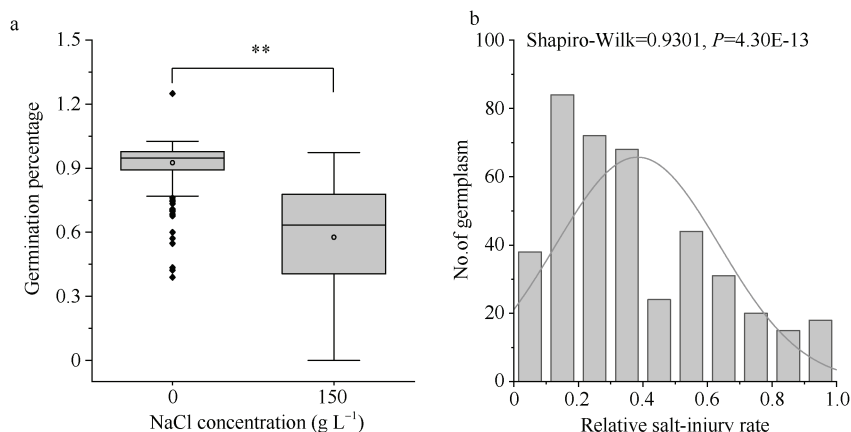


图1 419份水稻核心种质芽期耐盐鉴定结果

Fig. 1 Salt tolerance of 419 core rice germplasm at germination stage

** $P < 0.01$.

和 PCA2 分别解释 5.65% 和 3.92% 的遗传变异^[21]。通过 admixture 软件进行结构分析, 假设 $K = 1 \sim 10$, 根据软件的输出结果, 结合分析后验证概率 $\ln P(D)$ 值的方差以及变化速率。根据 ΔK 峰值的位置来确定分群数, 当 $K = 6$ 时, 模型中 ΔK 值最低, 确定当把样品分为 6 个群^[22], 为最优分组。因此, 把 419 份核心种质样品分为 6 个亚群。

2.4 全基因组关联分析

基于 208,993 个有效 SNP, 分析总群体的 LD 水平, 取 1/2 最大相关系数值 (R^2) 所对应的物理距离, 结果发现在全基因组水平上总群体的 LD 衰减距离为 100 kb (图 2)。

通过 GLM 和 MLM 对芽期相对盐害率的全基因组关联分析, 一般线性模型 (GLM) 共检测到 129 显著关联 SNP 位点, 其中包括 52 个极显著相关 SNP 位点 ($P < 4.78E-08$) 和 77 个显著 SNP 位点 ($P < 4.78E-07$), 分别分布在 1 号、2 号、3 号、4 号、5 号、6 号、8 号、9

号和 12 号染色体上。其中, 4 号染色体上分布最多为 54 个, 其次为 3 号染色体 31 个, 最少为 2 号和 9 号染色体上各 1 个 (图 3-a, b); 混合线性模型 (MLM) 只检测到 1 个显著 SNP, 位于 6 号染色体 (SNP: 1,822,395, $P = 1.03E-7 < 4.78E-07$) (图 3-c, d)。依据候选基因关联区间的筛选标准, 排除 1 个 SNP 关联的 QTL 区域, 本研究共检测到 14 个关联的 QTL 区域。通过在显著 SNP

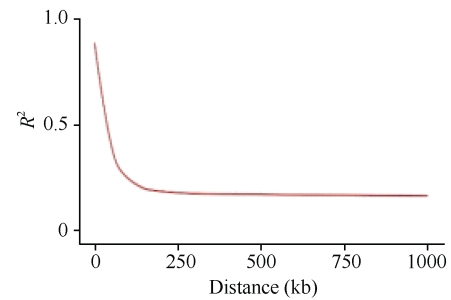


图 2 连锁不平衡衰减图

Fig. 2 Linkage disequilibrium plot

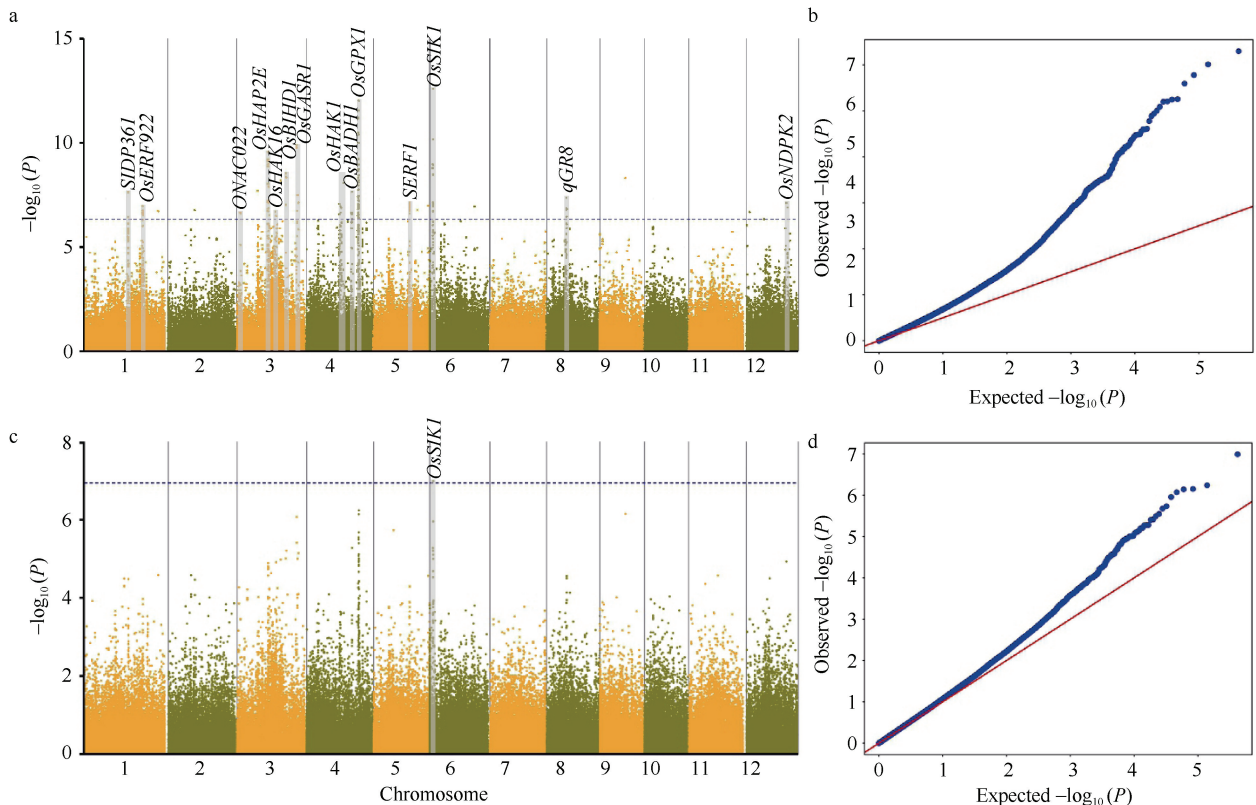


图 3 种子芽期全基因组关联分析曼哈顿和 QQ-plot 图

Fig. 3 Genome-wide association analysis (GWAS) of seed germination in Manhattan and QQ plot

(a) 和 (b) 一般线性模型的全基因组关联分析; (c) 和 (d) 混合线性模型的全基因组关联分析。(a) 和 (c) 为曼哈顿图, 图中横坐标为染色体, 纵坐标为关联值的 $-\log_{10}(P)$ 值; 虚线位置 ($P = 4.78E-07$) 为显著性阈值; (b) 和 (d) 为 Q-Q 图, 图中 X 轴为 P 值零假设下的期望值, Y 轴表示 P 值的观测值。

(a) and (b) GWAS using the GLM, (c) and (d) GWAS using the MLM, X axis indicates physically mapped chromosomes. Y axis indicates significance as calculated by $-\log_{10}(P)$, (a) and (c) Manhattan plots, The horizontal dashed line indicates the genome-wide significance threshold ($P = 4.78E-07$); (b) and (d) quantile-quantile (Q-Q) plot, X axis represents expected null distribution of P -values, Y axis represent observed distribution of P -values.

上、下游各 100 kb 范围内的基因进行注释, 发现 13 个关联的 QTL 区域与已经报道的耐盐基因相关, 1 个关联的 QTL 区域与已知区域不相关, 可能为新的耐盐 QTL 区域, 为 *qGR8*。该关联区域的 4 个 SNP 在其上下游 100 kb 的区域内包含 53 个基因, 基因注释结果表明这些基因没有与已知报道 QTL 和克隆的耐盐性基因区域重叠, 因此推测, 这些基因可能是水稻耐盐性的重要关联基因。

2.5 候选基因分析

基于粳稻日本晴基因组注释网站和转录组数据挖掘比对云平台, 从 53 个基因当中获得 34 个基因在

水稻 10 个发育阶段的表达谱。比对结果显示, 在芽期和苗期 *LOC_Os08g17370* 等 10 个基因具有高转录丰度 (mRNA 丰度百分比 $\geq 40\%$), *LOC_Os08g17150* 等 8 个基因具有低转录丰度 ($0 < \text{mRNA 丰度百分比} < 40\%$), *LOC_Os08g17120* 等 16 个基因无转录丰度 (mRNA 丰度百分比=0) (表 1 和图 4-a)。进一步对高表达的 10 个基因进行分析, 发现 *LOC_Os08g17370* 在芽期厌氧胁迫下的胚芽鞘和苗期耐盐胁迫下的根和叶部显著上调表达 (图 4-b)。且 *LOC_Os08g17370* 在盐胁迫下的耐盐品种 Baldo 根部中高表达, 敏盐品种 Vialone Nano 中不表达 (图 4-c)。

表 1 34 个基因在芽期的转录丰度
Table 1 Transcriptional abundance of 34 genes at germination stage

基因名称 Gene ID	转录丰度 Transcript abundances	描述 Description
<i>LOC_Os08g17160</i>	高 High	Plastocyanin-like domain containing protein, putative, expressed
<i>LOC_Os08g17294</i>	高 High	PSF3-Putative GINS complex subunit, expressed
<i>LOC_Os08g17320</i>	高 High	Protein kinase family protein, putative, expressed
<i>LOC_Os08g17370</i>	高 High	Transmembrane 9 superfamily member, putative, expressed
<i>LOC_Os08g17410</i>	高 High	BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 precursor, putative, expressed
<i>LOC_Os08g17510</i>	高 High	Sulfotransferase domain containing protein, expressed
<i>LOC_Os08g17600</i>	高 High	SNARE domain containing protein, putative, expressed
<i>LOC_Os08g17610</i>	高 High	Expressed protein
<i>LOC_Os08g17650</i>	高 High	LYR motif containing protein, putative, expressed
<i>LOC_Os08g17680</i>	高 High	Stromal cell-driven factor 2-like protein precursor, putative, expressed
<i>LOC_Os08g17150</i>	低 Low	Expressed protein
<i>LOC_Os08g17390</i>	低 Low	Expressed protein
<i>LOC_Os08g17400</i>	低 Low	WRKY89, expressed
<i>LOC_Os08g17430</i>	低 Low	Expressed protein
<i>LOC_Os08g17450</i>	低 Low	Retrotransposon protein, putative, undassified, expressed
<i>LOC_Os08g17500</i>	低 Low	Cinnamoyl-CoA reductase, putative, expressed
<i>LOC_Os08g17520</i>	低 Low	Flavanol sulfotransferase-like, putative, expressed
<i>LOC_Os08g17655</i>	低 Low	Expressed protein
<i>LOC_Os08g17110</i>	无 No	Expressed protein
<i>LOC_Os08g17120</i>	无 No	Transposon protein, putative, CACTA En/Spm sub-dass
<i>LOC_Os08g17210</i>	无 No	Transposon protein, putative, CACTA En/Spm sub-dass
<i>LOC_Os08g17220</i>	无 No	Uncharacterized PE-PGRS family protein PE PGRS54 precursor, putative, expressed
<i>LOC_Os08g17270</i>	无 No	Expressed protein
<i>LOC_Os08g17330</i>	无 No	Expressed protein
<i>LOC_Os08g17340</i>	无 No	Hypothetical protein
<i>LOC_Os08g17350</i>	无 No	Expressed protein
<i>LOC_Os08g17360</i>	无 No	Hypothetical protein
<i>LOC_Os08g17440</i>	无 No	Expressed protein
<i>LOC_Os08g17560</i>	无 No	Expressed protein
<i>LOC_Os08g17580</i>	无 No	Hypothetical protein
<i>LOC_Os08g17620</i>	无 No	Expressed protein
<i>LOC_Os08g17630</i>	无 No	Expressed protein
<i>LOC_Os08g17640</i>	无 No	Z0S8-02-C2H2 zinc finger protein, expressed
<i>LOC_Os08g17690</i>	无 No	Retrotransposon protein, putative, unclassified

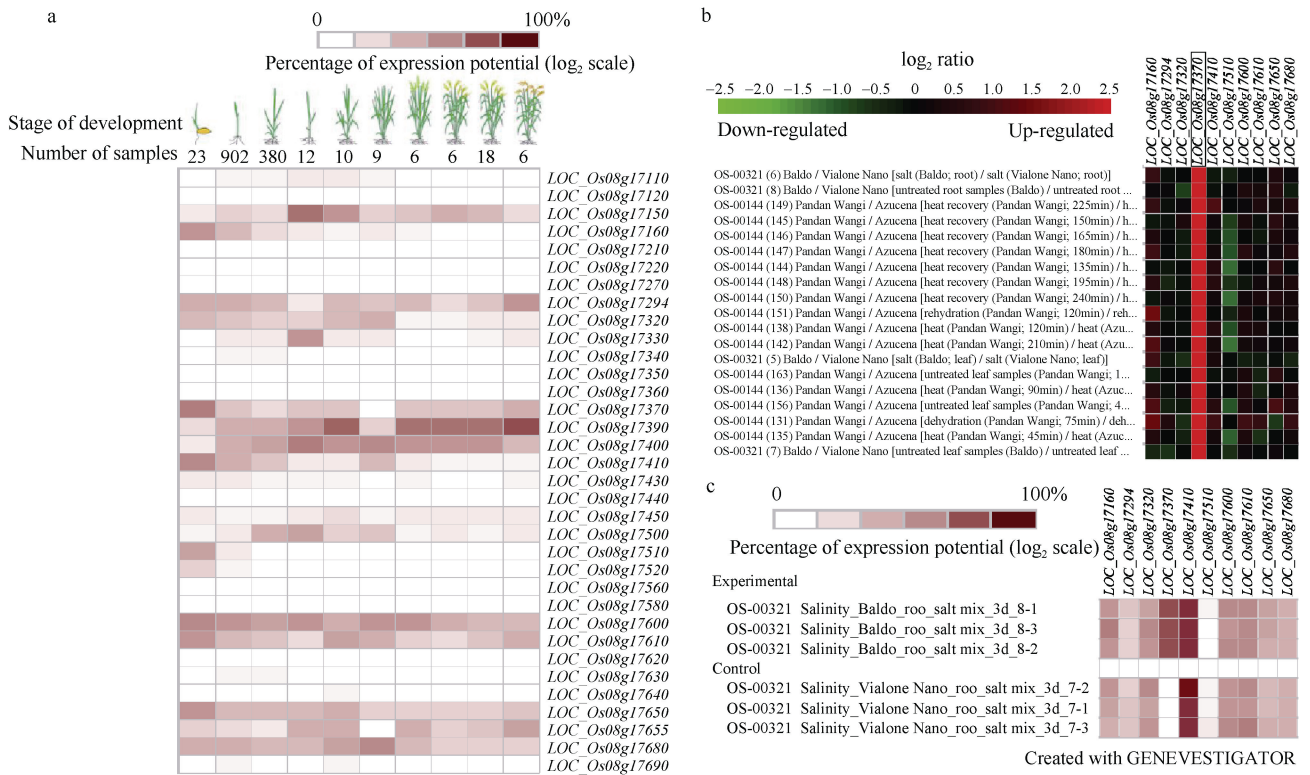


图 4 不同发育阶段候选基因的表达模式

Fig. 4 Relative expression patterns of candidate genes at various developmental stages

(a) 34 个基因对种子芽期的反应; (b) 基于来自 GENEVESTIGATOR 的 mRNA-seq 数据和 Affymetrix 微阵列数据集, “OS-nnnnn”是指实验 ID; (c) 详细查看选择扰动(绝对表达水平)。

(a) response to seed imbibition of 34 genes; (b) base on mRNA-seq data and Affymetrix microarray datasets from GENEVESTIGATOR, and the ‘OS-nnnnn’ refers to the experiments ID; (c) detailed view of selected perturbations (absolute expression levels).

3 讨论

基于大规模重测序的 GWAS 为寻找可直接用于作物改良的遗传变异提供了一个强大的平台。精准的表型鉴定是 GWAS 的一个重要部分。利用盐度 1.5% NaCl 对 419 份水稻种质材料进行耐盐性鉴定评价, 对照和盐胁迫下的表型差异说明盐胁迫对水稻种子芽期的生长有明显的抑制作用, 导致发芽率极低。这可能会抑制水稻种子的发芽, 尤其在水稻直播时, 严重影响水稻种植密度和产量。研究认为在水稻芽期耐盐性与水稻亚种之间无相关性^[13]。因此, 培育芽期耐盐水稻品种势在必行, 在水稻生长初期可保护前期生长和产量损失。

本研究利用一组水稻核心种质, 研究了水稻种子芽期盐胁迫下调控重要表型。通过 2 种模型对水稻芽期相对盐害率性状进行全基因组关联分析比较, 结果表明, GLM 获得的显著 SNP 数量显著高于 MLM, 因 MLM 综合考虑群体结构和亲缘关系的原因, 检测位点较少, 2 种模型只在 6 号染色体上有 1 个共同的显

著 SNP 位点。

本研究利用 1.5% NaCl 胁迫条件下进行鉴定, 这些材料表现出种子萌发相关性状分布频率的连续分离。经全基因组关联分析, 关联到的 14 个 QTL 区域中, *qGR1.1* 关联 *SIDP361* 基因, 编码 DUF1644 蛋白, 过表达 *SIDP361* 可增强转基因水稻对盐胁迫的抗性^[23]; *qGR1.2* 关联 *OsERF922* 基因, 编码 ERF 转录因子, 水稻 ERF 转录因子 *OsERF922* 对稻瘟病抗性和耐盐性具有负调控作用^[24]; *qGR3.1* 关联 *ONAC022* 基因, 编码 NAC 转录因子, *ONAC022* 的过表达提高了水稻的耐旱性和耐盐性, 根和地上部积累 Na⁺ 比野生型少^[25]; *qGR3.2* 关联 *OsHAP2E* 基因, *OsHAP2E* 的过表达增强了水稻对病原菌、盐分和干旱的抗性, 增加了光合作用和分蘖数^[26]; *qGR3.3* 关联 *OsHAK16* 基因, 编码钾转运蛋白, 参与根部 K⁺ 的吸收^[27-28]; *qGR3.4* 关联 *OsBIHD1* 基因, 属水稻同源结构域基因, 转基因烟草中的过表达揭示了水稻同源结构域基因 *OsBIHD1* 在生物和非生物胁迫反应中的不同作用, 使盐胁迫和氧化胁迫的

抗性降低^[29]; *qGR3.5* 关联 *OsGASR1* 基因, 为赤霉素刺激转录基因, *OsGASR1* 的异位表达增强了转基因植株的耐盐性^[30]; *qGR4.1* 关联 *OsHAK1* 基因, 钾离子转运蛋白, *OsHAK1* 参与维持钾离子介导的生长以及过低或过高钾离子浓度范围时抗盐性中的功能^[31]; *qGR4.2* 关联 *OsBADH1* 基因, *OsBADH1*-RNAi 植株与对照相比, 活性氧和丙二醛含量增加, 对 NaCl、甘露醇和冷胁迫的耐受性显著降低^[32]; *qGR4.3* 关联 *OsGPXI* 基因, *GPXI* 敲除株系 *GPXI_s* 与非转化植株相比, 在非盐胁迫条件下生长减弱, 表现为鲜茎重降低^[33]; *qGR5* 关联 *SERF1* 基因, 是盐应答的 *ERF* 转录因子, 与野生型相比, 缺乏 *SERF1* 的植物对盐胁迫更为敏感, 而 *SERF1* 的结构性过表达提高了植物的耐盐性^[34]; *qGR6* 关联 *OsSIK1* 基因, *OsSIK1* 过表达植株表现出比对照更

好的耐盐和耐旱能力^[35]; *qGR12* 关联 *WSL12* 基因, 为白色条纹叶基因; *WSL12* 编码 *OsNDPK2*, 通过调节相关基因的表达水平, 在叶绿体和叶绿素合成中发挥重要作用, 影响水稻对 ABA 和盐胁迫的响应^[36] (表 2)。

进一步的候选基因分析表明, 8 号染色体上获得的显著区域 *qGR8*, 与已经报道耐盐相关基因及 QTL 进行比较分析, 该位点 4 个 SNP 未落于任何一个已知定位和克隆的与耐盐关联基因区域之内, 可能为新的耐盐基因位点。 *qGR8* 上下游 100 kb 范围内含有 53 个基因, 基于在转录组数据挖掘比对云平台中的 Affymetrix 数据和 RNA-Seq 数据, 获得 34 个基因表达谱, 其中有 10 个基因在芽期和苗期高表达, 8 个基因低表达, 16 个基因不表达。其中, *LOC_Os08g17370* 在盐胁迫条件下耐盐品种 Baldo

表 2 芽期耐盐相关的 14 个显著关联 QTL 及候选基因分析

Table 2 14 Associated QTLs and candidate genes related to salt tolerance at germination stage

QTL	SNP 数量 Number of SNPs	范围 Range	峰值 SNP Peak SNP	P 值 P-value	候选基因 Candidate gene	基因描述 Gene description
<i>qGR1.1</i>	2	23,752,956–23,786,838	23,752,956	2.33E-08	<i>SIDP361</i> ^[23]	DUF1644 蛋白 DUF1644 protein gene
<i>qGR1.2</i>	6	31,534,965–31,593,365	31,534,965	1.09E-07	<i>OsERF922</i> ^[24]	ERF 转录因子 ERF transcription factor
<i>qGR3.1</i>	3	1,874,033–1,874,036	1,874,033	2.22E-07	<i>ONAC022</i> ^[25]	胁迫响应型 NAC 转录因子基因 Overexpression of a stress-responsive NAC
<i>qGR3.2</i>	16	16,671,741–17,432,153	16,671,952	2.81E-10	<i>OsHAP2E</i> ^[26]	血红素激活蛋白; 核因子 Y; CCAAT 结合因子 Heme activator protein gene; nuclear factor Y; CCAAT binding factor
<i>qGR3.3</i>	2	20,621,667–20,925,341	20,621,667	2.00E-07	<i>OsHAK16</i> ^[27,28]	钾转运蛋白 Potassium transporter
<i>qGR3.4</i>	3	26,339,090–26,393,672	26,339,090	2.89E-09	<i>OsBIHD1</i> ^[29]	同源异型基因 Rice homeodomain gene
<i>qGR3.5</i>	5	31,937,083–32,488,239	31,982,396	1.32E-10	<i>OsGASR1</i> ^[30]	赤霉素刺激转录基因 GA-stimulated transcript-related gene; <i>Oryza sativa</i> gibberellic acid stimulated rice 1
<i>qGR4.1</i>	5	17,564,210–19,871,791	17,626,425	8.53E-08	<i>OsHAK1</i> ^[31]	钾离子转运蛋白 Potassium transporter
<i>qGR4.2</i>	5	24,215,216–24,282,470	24,282,470	2.26E-08	<i>OsBADH1</i> ^[32]	甜菜碱醛脱氢酶 Betaine aldehyde dehydrogenase
<i>qGR4.3</i>	43	27,473,283–27,958,451	27,907,711	9.60E-13	<i>OsGPXI</i> ^[33]	线粒体谷胱甘肽过氧化物酶 Mitochondrial glutathione peroxidase
<i>qGR5</i>	9	19,208,151–19,330,003	19,329,999	7.44E-08	<i>SERF1</i> ^[34]	盐应答的 ERF 转录因子 Salt-responsive ERF 1
<i>qGR6</i>	12	1,607,061–1,822,395	1,661,829	1.07E-09	<i>OsSIK1</i> ^[35]	类受体激酶基因; 胁迫诱导的蛋白激酶基因 Receptor-like kinase; stress-induced protein kinase gene 1
<i>qGR8</i>	4	10,564,948–10,733,175	10,564,948	4.24E-08	New gene	未知 Unknown
<i>qGR12</i>	3	21,374,803–22,039,414	21,374,803	7.63E-08	<i>WSL12</i> ^[36]	白色条纹叶基因 White stripe leaf 12

的根和叶片部位高差异表达, 在敏盐品种 Vialone Nano 中不表达^[37], *LOC_Os08g17370* 为跨膜 9 超家族成员表达, 该基因与前人定位于 8 号染色体上的苗期耐盐 QTL 未重叠^[38-40], 初步认定为 *qGR8* 区域芽期耐盐的候选基因。进一步可通过序列分析和实时定量 PCR 进行验证分析。

4 结论

本研究利用 419 份广西水稻地方品种核心种质, 基于 SLAF-seq 测序的 SNP 结果进行芽期相对盐害率的全基因组关联分析, 结果获得 14 个 QTL 位点, 其中 13 个位点与前人研究的耐盐相关基因位置重叠, 8 号染色体上的位点(*qGR8*)为本研究首次报道, 可能为新的耐盐基因位点。本研究为水稻芽期耐盐相关基因的克隆和种子耐盐遗传机制的研究奠定了基础, 而且鉴定获得的强耐盐性种质, 对水稻生产和直播品种的改良具有重要意义。

References

- [1] FAO I. Status of the World's Soil Resources (SWSR): Main Report. Food and Agriculture Organization of the United Nations and Intergovernmental Technical Panel on Soils. Rome, 2015.
- [2] 朱德峰, 程式华, 张玉屏, 林贤青, 陈惠哲. 全球水稻生产现状与制约因素分析. 中国农业科学, 2010, 43: 474-479.
Zhu D F, Cheng S H, Zhang Y B, Lin X Q, Chen H Z. Analysis of status and constraints of rice production in the world. *Sci Agric Sin*, 2010, 43: 474-479 (in Chinese with English abstract).
- [3] Zeng L, Shannon M C. Salinity effects on seedling growth and yield components of rice. *Crop Sci*, 2000, 40: 996-1003.
- [4] 王遵亲. 中国盐渍土. 北京: 科学出版社, 1993. p 1.
Wang Z Q. China Saline Soil. Beijing: Science Press, 1993. p 1 (in Chinese).
- [5] Rao P S, Mishra B, Gupta S R, Rathore A. Reproductive stage tolerance to salinity and alkalinity stresses in rice genotypes. *Plant Breed*, 2010, 127: 256-261.
- [6] 李丹婷, 农保选, 夏秀忠, 曾宇, 刘开强, 刘义明, 林竞鸿, 杨显志, 韩龙植, 张辉, 邓国富. 广西沿海受旱与咸酸田面积的分布与抗旱、耐盐种质资源鉴定. 植物遗传资源学报, 2014, 15: 12-17.
Li D T, Nong B X, Xia X Z, Zeng Yu, Liu K Q, Liu Y M, Lin J H, Yang X Z, Han L Z, Zhang H, Deng G F. Distribution of drought disaster area, acid paddy soil area and evaluation of drought resistance, salt tolerance crop resources in Guangxi coastal area. *J Plant Genet Resour*, 2014, 15: 12-17 (in Chinese with English abstract).
- [7] 应存山. 中国稻种资源. 北京: 中国农业科技出版社, 1993. pp 223-231.
Ying C S. Rice Germplasm Resources in China. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 1993. pp 223-231 (in Chinese).
- [8] Batayeva D, Labaco B, Ye C, Li X, Usenbekov B, Rysbekova A, Dyuskaliev G, Vergara G, Reinke R, Leung H. Genome-wide association study of seedling stage salinity tolerance in temperate japonica rice germplasm. *BMC Genet*, 2018, 19: 2.
- [9] Huang X H, Zhao Y, Wei X H, Li C Y, Wang A H, Zhao Q, Li W J, Guo Y L, Deng L W, Zhu C R, Fan D L, Lu Y Q, Weng Q J, Liu K Y, Zhou T Y, Jing Y F, Si L Z, Dong G H, Huang T, Lu T T, Feng Q, Qian Q, Li J Y, Han B. Genome-wide association study of flowering time and grain yield traits in a worldwide collection of rice germplasm. *Nat Genet*, 2011, 44: 32-39.
- [10] Kumar V, Singh A, Mithra S V, Krishnamurthy S L, Parida S K, Jain S, Tiwari K K, Kumar P, Rao A R, Sharma S K, Khurana J P, Singh N K, Mohapatra T. Genome-wide association mapping of salinity tolerance in rice (*Oryza sativa*). *DNA Res*, 2015, 22: 133-145.
- [11] Nayyeripasand L, Garoosi G A, Ahmadihah A. Genome-wide association study (GWAS) to identify salt-tolerance QTLs carrying novel candidate genes in rice during early vegetative stage. *Rice (New York)*, 2021, 14: 9.
- [12] Shi Y Y, Gao L L, Wu Z C, Zhang X J, Wang M M, Zhang C S, Zhang F, Zhou Y L, Li Z K. Genome-wide association study of salt tolerance at the seed germination stage in rice. *BMC Plant Biol*, 2017, 17: 92.
- [13] Yu J, Zhao W G, Tong W, He Q, Yoon M Y, Li F P, Choi B, Heo E B, Kim K W, Park Y J. A genome-wide association study reveals candidate genes related to salt tolerance in rice (*Oryza sativa*) at the germination stage. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 3145.
- [14] 胡时开, 陶红剑, 钱前, 郭龙彪. 水稻耐盐性的遗传和分子育种的研究. 分子植物育种, 2010, 8: 629-640.
Hu S K, Tao H J, Qian Q, Guo L B. Progresses on genetics and molecular breeding for salt-tolerance in rice. *Mol Plant Breed*, 2010, 8: 629-640 (in Chinese with English abstract).
- [15] 井文, 章文华. 水稻耐盐基因定位与克隆及品种耐盐性分子标记辅助选择改良研究进展. 中国水稻科学, 2017, 31: 111-123.
Jing W, Zhang W H. Research progress on gene mapping and cloning for salt tolerance and variety improvement for salt tolerance by molecular marker-assisted selection in rice. *Chin J Rice Sci*, 2017, 31: 111-123 (in Chinese with English abstract).
- [16] Almansouri M, Kinet J M, Lutts S. Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Plant Soil*, 2001, 231: 243-254.
- [17] Rehman S, Harris P, Bourne W F, Wilkin J. The relationship between ions, vigour and salinity tolerance of acacia seeds. *Plant Soil*, 2000, 220: 229-233.
- [18] Sun X W, Liu D Y, Zhang X F, Li W B, Liu H, Hong W G, Jiang C B, Ning G, Ma C X, Zeng H P. SLAF-seq: an efficient method of large-scale de novo SNP discovery and genotyping using high-throughput sequencing. *PLoS One*, 2013, 8: e58700.
- [19] 李丹婷, 夏秀忠, 农保选, 刘开强, 张宗琼, 梁耀懋. 广西地方稻种资源核心种质构建和遗传多样性分析. 广西植物, 2012, 32(1): 94-100.
Li D T, Xia X Z, Nong B X, Liu K Q, Zhang Z Q, Liang Y M. Construction of core collection and genetic diversity of landrace rice resources (*Oryza sativa*) in Guangxi. *Guihaia*, 2012, 32(1): 94-100 (in Chinese with English abstract).
- [20] 杨行海, 农保选, 夏秀忠, 张宗琼, 曾宇, 刘开强, 邓国富, 李

- 丹婷. 水稻糯性相关基因的全基因组关联分析. 植物学报, 2016, 51: 737–742.
- Yang X H, Nong B X, Xia X Z, Zhang Z Q, Zeng Y, Liu K Q, Deng G F, Li D T. Genome-wide association study of genes related to waxiness in *Oryza sativa*. *Chin Bull Bot*, 2016, 51: 737–742 (in Chinese with English abstract).
- [21] Yang X H, Xia X Z, Zeng Y, Nong B X, Zhang Z Q, Wu Y Y, Xiong F Q, Zhang Y X, Liang H F, Deng G F, Li D T. Identification of candidate genes for gelatinization temperature, gel consistency and pericarp color by GWAS in rice based on SLAF-sequencing. *PLoS One*, 2018, 13: e0196690.
- [22] Yang X H, Nong B X, Xia X Z, Zhang Z Q, Zeng Y, Liu K Q, Deng G F, Li D T. Rapid identification of a new gene influencing low amylose content in rice landraces (*Oryza sativa* L.) using genome-wide association study with specific-locus amplified fragment sequencing. *Genome*, 2017, 60: 465–472.
- [23] Li M, Guo L J, Guo C M, Wang L J, Chen L. Over-expression of a *DUF1644* protein gene, *SIDP361*, enhances tolerance to salt stress in transgenic rice. *J Plant Biol*, 2016, 59: 62–73.
- [24] Liu D F, Chen X J, Liu J Q, Ye J J, Guo Z J. The rice ERF transcription factor *OsERF922* negatively regulates resistance to *Magnaporthe oryzae* and salt tolerance. *J Exp Bot*, 2012, 63: 3899–3911.
- [25] Hong Y B, Zhang H J, Lei H, Li D Y, Song F M. Overexpression of a stress-responsive NAC transcription factor gene *ONAC022* improves drought and salt tolerance in rice. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 4.
- [26] Alam M M, Tanaka T, Nakamura H, Ichikawa H, Kobayashi K, Yaeno T, Yamaoka N, Shimamoto K, Takayama K, Nishina H, Nishiguchi M. Overexpression of a rice *heme activator protein gene* (*OsHAP2E*) confers resistance to pathogens, salinity and drought, and increases photosynthesis and tiller number. *Plant Biotechnol J*, 2015, 13: 85–96.
- [27] Wang H, Zhang M S, Guo R, Shi D C, Liu B, Lin X Y, Yang C W. Effects of salt stress on ion balance and nitrogen metabolism of old and young leaves in rice (*Oryza sativa* L.). *BMC Plant Biol*, 2012, 12: 194.
- [28] Shen Y, Shen L K, Shen Z X, Jing W, Ge H L, Zhao J Z, Zhang W H. The potassium transporter *OsHAK21* functions in the maintenance of ion homeostasis and tolerance to salt stress in rice. *Plant Cell Environ*, 2016, 38: 2766–2779.
- [29] Luo H, Song F, Goodman R M, Zheng Z. Up-regulation of *OsBIHDI*, a rice gene encoding BELL homeodomain transcriptional factor, in disease resistance responses. *Plant Biol*, 2005, 7: 459–468.
- [30] Lee S C, Han S K, Kim S R. Salt- and ABA-inducible *OsGASRI* is involved in salt tolerance. *J Plant Biol*, 2015, 58: 96–101.
- [31] Chen G, Hu Q D, Luo L, Yang T Y, Zhang S, Hu Y B, Yu L, Xu G H. Rice potassium transporter *OsHAK1* is essential for maintaining potassium-mediated growth and functions in salt tolerance over low and high potassium concentration ranges. *Plant Cell Environ*, 2015, 38: 2747–2765.
- [32] Tang W, Sun J Q, Liu J, Liu F F, Yan J, Gou X J, Lu B R, Liu Y S. RNAi-directed downregulation of *betaine aldehyde dehydrogenase 1* (*OsBADH1*) results in decreased stress tolerance and increased oxidative markers without affecting glycine betaine biosynthesis in rice (*Oryza sativa*). *Plant Mol Biol*, 2014, 86: 443–454.
- [33] Lima M Y, Carvalho F E L, Martins M O, Passaia G, Sousa R H V, Neto M C L, Margis P M, Silveira J A G. Mitochondrial GPX1 silencing triggers differential photosynthesis impairment in response to salinity in rice plants. *J Integr Plant Biol*, 2016, 58: 737–748.
- [34] Schmidt R, Mieulet D, Hubberten H M, Obata T, Hoefgen R, Fernie A R, Fisahn J, San S B, Guiderdoni E, Schippers J H M. Salt-responsive ERF1 regulates reactive oxygen species-dependent signaling during the initial response to salt stress in rice. *Plant Cell*, 2013, 25: 2115–2131.
- [35] Ouyang S Q, Liu Y F, Liu P, Lei G, Chen S Y. Receptor-like kinase *OsSIK1* improves drought and salt stress tolerance in rice (*Oryza sativa*) plants. *Plant J*, 2010, 62: 316–329.
- [36] Ye W J, Hu S K, Wu L W, Ge C G, Cui Y T, Chen P, Wang X Q, Xu J, Ren D Y, Dong G J, Quan Q, Guo L B. *White stripe leaf 12* (*WSL12*), encoding a nucleoside diphosphate kinase 2 (*OsNDPK2*), regulates chloroplast development and abiotic stress response in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Breed*, 2016, 36: 57.
- [37] Elide F, Cristina S, Giorgio P, Samantha R, Elisabetta B, Elena B, Enrico L, Piergiorgio S, Attilio S G, Paolo F. Transcriptome and cell physiological analyses in different rice cultivars provide new insights into adaptive and salinity stress responses. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 204.
- [38] 李锐, 郑洪亮, 张萃雯, 刘化龙, 王敬国, 孙健, 李宁, 雷蕾, 李宪伟, 邹德堂. 盐碱胁迫下水稻苗期地上部 Na^+ , K^+ 浓度的 QTL 分析. 华北农学报, 2020, 35(2): 35–42.
- Li J R, Zheng H L, Zhang C W, Liu H L, Wang J G, Sun J, Li N, Lei L, Li X W, Zou D T, Zheng H L. QTL analysis of Na^+ and K^+ concentrations in rice seedling under salt and alkaline stress. *Acta Agric Boreali-Sin*, 2020, 35(2): 35–42 (in Chinese with English abstract).
- [39] 索艺宁, 张春可, 于乔乔, 张恩源, 谢冬微, 冷月, 王亮, 孙健. 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.
- Suo Y N, Zhang C K, Yu Q Q, Zhang E Y, Xie D W, Leng Y, Wang L, Sun J. 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 with English abstract).
- [40] 王奉斌, 张燕红, 文孝荣, 袁杰, 布哈丽且木·阿布力孜, 朱小霞, 瞿毅. 两个粳稻材料芽期和苗期耐盐性的 QTL 定位. 新疆农业科学, 2012, 48: 2205–2210.
- Wang F B, Zhang Y H, Wen X R, Yuan J, Buhaliqiemu A, Zhu X X, Qu Y. QTLs mapping for salt tolerance at seed germination and seedling stage in Xinxiang rice (*Oryza sativa* L.). *Xinjiang Agric Sci*, 2011, 48: 2205–2210 (in Chinese with English abstract).