

# 一个水稻落粒性基因 *SH1* 的 SSR 标记定位

朱文银,朱 镇,杨德卫,林 静,赵 凌,张亚东,陈 涛,王才林

(江苏省农业科学院粮食作物研究所,江苏省优质水稻工程技术研究中心,南京 210014)

**摘 要:**以籼稻品种 93-11 为轮回亲本,与粳稻品种日本晴杂交并回交的高世代分离群体为研究材料,选用 104 个多态性的 SSR 标记对水稻的落粒性基因进行定位。结果表明,在  $BC_4F_2$  群体中,6 个标记的基因型来自于日本晴;在  $BC_4F_3$  定位群体中,难落粒植株数与易落粒植株数的分离比例为 3:1,落粒性受 1 对显性基因控制,命名为 *SH1*;分子标记与落粒性共分离分析将 *SH1* 定位在 SSR 标记 RM5389 和 RM1068、RM1387 之间,与 3 个标记的遗传距离分别为 0.7cM、5.5cM 和 13.1cM,此结果为该基因的分标记辅助选择奠定了基础。

**关键词:**水稻;SSR 标记;落粒性基因;分子标记辅助选择

中图分类号:S41-39 文献标识码:A

## Mapping of *SH1*, A Dominant Gene Controlling Seed Shattering Using SSR Markers in Rice (*Oryza sativa* L.)

Zhu Wenyin, Zhu Zhen, Yang Dewei, Lin Jing, Zhao Ling, Zhang Yadong, Chen Tao, Wang Cailin

(Institute of Food Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences,

Jiangsu High Quality Rice Research&Development Center, Nanjing 210014)

**Abstract:** In the paper, with an indica variety 93-11 as recipient and a japonica variety Nipponbare as donor, high generation backcross segregation populations were constructed. Using 104 SSR markers which display polymorphism bands between 93-11 and Nipponbare, the genetic background of  $BC_4F_2$  and seed shattering of  $BC_4F_3$  mapping population were analyzed. The results showed that in  $BC_4F_2$  population, the genetic background analysis detected 6 markers, which distributed on rice chromosomal 1, 2 and chromosomal 5 derived from donar Nipponbare; In  $BC_4F_3$  mapping population, non-shattering plants and easy shattering plants segregated in a ratio of 169:52, fitting the expected ratio of 3:1, suggesting that the seed shattering in the population was controlled by a dominant gene, named *SH1*; Linkage analyses suggested that the gene *SH1* was linked with SSR marker RM5389, RM1068 and RM1387, the genetic distance between these markers and *SH1* were 0.7cM, 5.5cM and 13.1cM, respectively. The mapping of the gene *SH1* would be useful for its molecular marker-assisted selection.

**Key words:** rice, SSR marker, seed shattering gene, molecular marker-assisted selection

落粒性是作物栽培和育种中非常重要的农艺性状,易落粒品种容易造成产量的损失,难落粒品种则影响后期种子的收获,在生产上都不适合栽种。一般来

说,野生稻极易落粒,籼稻次之,粳稻的落粒性较差。在水稻进化过程中,通过人类的活动从野生稻中选择出适口性好、出苗整齐和不易落粒的类型进行栽培种植,

**基金项目:**国家高技术研究发展计划(863 计划)项目“植物分子与细胞高效育种技术与品种创制”(2006AA100101);国家科技支撑计划项目“长江中下游粳稻育种技术研究及新品种选育”(2006BAD01A01-5);江苏省农业科技自主创新基金“优质超高产水稻品种选育、配套栽培技术示范与推广”(CX[07]603)。

**第一作者简介:**朱文银,男,1975 年出生,博士,主要从事水稻分子育种研究。通信地址:210014 江苏省南京市钟灵街 50 号江苏省农科院粮食作物研究所,Tel: 025-84390307,E-mail:wyzhu0321@163.com。

**通讯作者:**王才林,男,1959 年出生,博士,研究员,主要从事水稻遗传育种研究。通信地址:210014 江苏省南京市钟灵街 50 号江苏省农科院粮食作物研究所,Tel: 025-84390307,E-mail:clwang@jaas.ac.cn。

**收稿日期:**2008-04-23,修回日期:2008-05-30。

逐渐驯化成现代栽培品种。研究水稻落粒性遗传、定位和克隆水稻落粒性基因对培育落粒性适中的水稻品种,阐明水稻的遗传进化具有重要意义<sup>[1]</sup>。

水稻落粒性遗传较为复杂,多数研究结果表明落粒性由主基因及 QTL 控制。迄今为止,已有 5 个落粒性基因被定位,即位于第 1 染色体的 *sh-2*、第 4 染色体的 *sh-3*、第 3 染色体的 *sh-4*、第 7 染色体的 *sh-h* 和位于第 11 染色体上的 *sh-1*<sup>[2-7]</sup>。其中,*sh-2* 和 *sh-3* 是 2 个主要的落粒性基因。*sh-2* 来源于亚洲栽培稻,*sh-3* 来源于普通野生稻。李平等<sup>[8]</sup>利用 RFLP 标记将 *sh-2* 定位在第 1 染色体 RG172b 与 RG152b 之间。Konishi 等<sup>[9]</sup>在第 1 染色体定位到 *qSH-1*, 并克隆了该基因。Sobrizar 等<sup>[10]</sup>将 *sh-3* 定位在 R1427 和 C107 之间,与标记的遗传距离均为 2.3cM。最近,该基因已经被克隆<sup>[11]</sup>。在水稻落粒性 QTL 方面,Fukuta 等<sup>[12]</sup>较早地对落粒性进行 QTL 定位,在第 1、2、5、11 和 12 染色体上检测到 5 个落粒性 QTL, 其中第 1 染色体上的 QTL 效应较大,推测它可能位于 *sh-2* 附近。Xiong 等<sup>[13]</sup>在水稻第 1、3、4、6 和第 8 染色体上检测出 5 个落粒性 QTL。沈圣泉等<sup>[14]</sup>利用珍汕 97B/ 密阳 46 所构建的 RIL 群体,在第 1、2、3、6、7 和第 11 染色体上检测到 7 个落粒性 QTL。许旭明等<sup>[15]</sup>检测到与籼稻落粒性有关的 7 个 QTL, 分别位于第 1、2、4、6、7 染色体上。Cai 等<sup>[16]</sup>利用 RIL 群体检测到 4 个落粒性 QTL, 分别位于水稻第 1、4、8 和第 11 染色体上。

在水稻落粒性基因定位和 QTL 分析方面,早期的研究主要以 F<sub>2</sub>、RIL 等初级分离群体为材料, 利用落粒性与标记性状的连锁关系确定它们相关的连锁群, 并将其定位在染色体的不同区间。同时, 研究中用到的分子标记大多为 RFLP 标记, 利用 RFLP 进行分析具有技术复杂、工作量大和成本高等不足。该研究以日本晴为供体亲本, 93-11 为轮回亲本, 在构建染色体片段置换系的过程中, 发现其中 1 个 BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub> 群体中一些单株表现出落粒性明显较 93-11 难落粒, 利用从该群体选择的 1 个单株发展的 BC<sub>4</sub>F<sub>3</sub> 群体及 SSR 标记将落粒性基因 SH1 进行了分子定位, 为该基因分子标记辅助选择奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

供试材料为籼稻品种 93-11 和粳稻品种日本晴。以 93-11 为受体亲本, 与日本晴做供体亲本杂交, 并与 93-11 连续回交至 BC<sub>4</sub>F<sub>1</sub>。2007 年 5 月在江苏省农科院试验场(南京)种植 BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub>, 收种时发现其中 1 个由 48 个单株组成的 BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub> 群体存在落粒性分离, 大多数植

株的落粒性与日本晴相似, 表现难落粒。利用分布于水稻 12 条染色体上的 104 个多态性分子标记对该群体遗传背景进行分析, 并从中单株收获表现难落粒的植株种子, 2007 年 11 月在海南(三亚)播种, 获得 BC<sub>4</sub>F<sub>3</sub> 定位群体。

### 1.2 分子标记的利用

研究中所用到的分子标记均为 SSR 标记, 共 104 个<sup>[17]</sup>。

### 1.3 DNA 的提取及 PCR 扩增

DNA 的提取按 Zheng 等<sup>[18]</sup> 的简易 SDS 提取法。PCR 扩增每管 20μl 反应体系包括: 0.15μM SSR 引物、200μM dNTP、1×PCR 反应缓冲液、50~100ng 模板 DNA、1U Taq 酶; 反应程序为: 94℃ DNA 变性 5min、循环 (94℃ 1min, 55℃ 1min, 72℃ 1min) 35 次、72℃ 延伸 5min。

### 1.4 电泳检测

扩增出的 PCR 产物用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳: 电压 200V, 室温下电泳约 2h, 取出凝胶银染, 记录带型的结果或凝胶成像。

### 1.5 落粒性调查

落粒性鉴定按应存山等<sup>[19]</sup>介绍的方法稍加修改: 在亲本及分离群体各植株成熟时, 用手握住成熟的稻穗, 以手指与掌心搓揉, 连续二次测定, 以 93-11 为易脱粒对照。将水稻的落粒性分为 2 个等级: 难(搓揉稻穗不落粒或少落粒, 落粒率 < 5.5%)、易(落粒率 ≥ 25.5%)。

## 2 结果与分析

### 2.1 亲本的落粒性表现

考查了 93-11 和日本晴的落粒性表现: 93-11 表现为易脱粒, 日本晴表现为难脱粒。

### 2.2 BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub> 中来自日本晴基因组背景的检测

在 BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub> 群体中随机选择 10 个植株组成混合池, 选用 104 个亲本间有多态的 SSR 标记对群体遗传背景进行检测。通过连续 4 代回交, 群体的遗传背景逐渐趋于纯合, 104 个标记中, 94 个标记的基因型与受体亲本 93-11 相同, 6 个标记的基因型为杂合型, 分布在第 1、2 和第 5 染色体上(图 1), 遗传背景率为 5.8%。由于在背景检测过程中只对混合池检测, 而不是对单株检测, 因此在 BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub> 各单株中, 实际的遗传背景率小于 5.8%。

### 2.3 BC<sub>4</sub>F<sub>3</sub> 群体落粒性的遗传分离

在 BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub> 群体中选择 1 株编号为 18-2 的植株发展成由 221 个单株组成的 BC<sub>4</sub>F<sub>3</sub> 定位群体。水稻成熟后, 记录了各植株的落粒性表现。221 个植株的落粒性

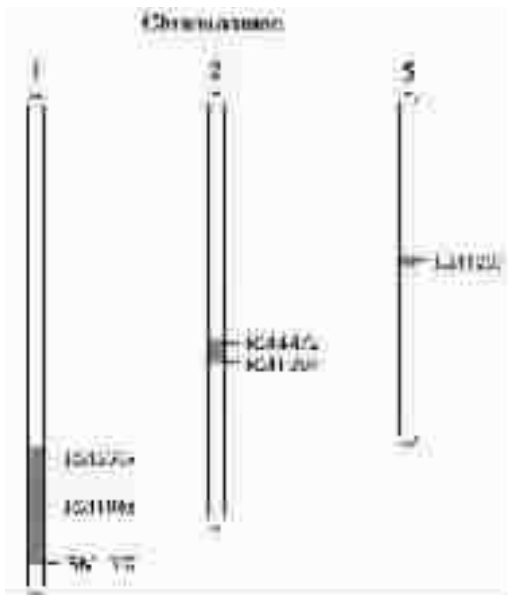


图1 BC4F2 群体中基因型来自于日本晴的 SSR 标记在染色体上的分布

分两类,即落粒率小于 5.5%的难落粒植株,其落粒性表现与日本晴相似,共 169 株;落粒率大于 25.5%的易落粒植株,其落粒性表现与 93-11 相似,共 52 株。对两类植株进行卡方测验表明难落粒株和易落粒株符合 3:

M P1 P2 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

150bp

1 孟德尔分离规律,说明分离群体的落粒性受单基因控制,且难落粒对易落粒完全显性,该研究将该显性落粒性基因命名 SH1。

2.4 落粒性基因 SH1 的 SSR 标记定位

通过对检测到的 6 个 SSR 标记与分离群体中各单株落粒性共分离分析,表明 RM5389、RM1068 和 RM1387 与显性落粒性基因 SH1 紧密连锁。其中 RM5389 在分离群体各单株的扩增基因型中,62 株与日本晴相同,107 株为杂合型,52 株与 93-11 的基因型相同(图 2);RM1068 在分离群体各单株的基因型中,62 株与日本晴相同,109 株为杂合型,50 株与 93-11 的基因型相同;对于 RM1387,57 株的基因型与日本晴相同,111 株为杂合型,53 株与 93-11 的基因型相同。 $\chi^2$  测验表明 3 个 SSR 标记的基因型均符合 1:2:1 的孟德尔分离规律。将分离群体各单株落粒性表型和 RM5389、RM1068、RM1387 的基因型数据输入计算机,利用分析软件 MAPMAKER3.0 对显性落粒性基因 SH1 进行定位,遗传连锁分析表明, RM5389、RM1068、RM1387 与 SH1 之间的遗传距离分别为 0.7cM、5.5cM 和 13.1cM(图 3)。

图2 SSR 标记 RM5389 在亲本及 BC<sub>4</sub>F<sub>3</sub> 定位群体中的扩增

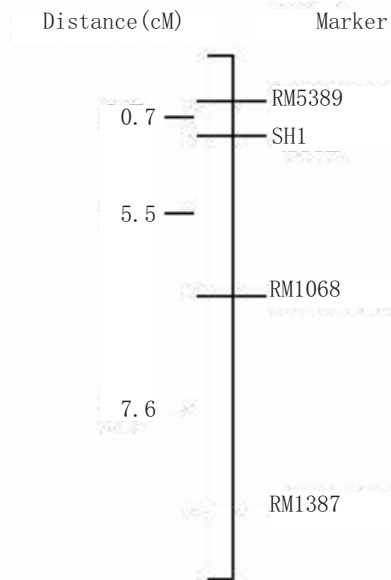


图3 落粒性基因 SH1 在水稻第 1 染色体上的遗传连锁图

3 讨论

水稻的落粒性鉴定有多种方法<sup>[1,6,15,19]</sup>,目前国际上没有统一的标准。下落法是将稻穗水平地置于空中,自由落到水泥地板或平铺在地面的铁板上,以落粒数占

总粒数的百分率计算落粒率。揉搓法则是双手握住成熟的稻穗揉搓,统计落粒数,计算落粒率。下落法和揉搓法虽然操作简单、快捷,但容易受到用力不均等人为因素的干扰。借助于数字仪器对水稻落粒率进行测量

的方法, 虽然一定程度上消除了人为的主观因素引起的误差, 但操作起来相对麻烦。该研究认为, 对于效应较小的落粒性 QTL, 可以采用辅以仪器的较为客观的方法。但对于由基因或主效 QTL 引起的水稻落粒性, 由于其遗传效应明显, 在后代分离群体中易落粒和难落粒的植株极易区分, 因此采用用力揉搓的方法可以非常快速地区分难易两个不同的质量性状, 这种方法在大群体精细定位落粒性基因时比较适用。

传统的基因定位和 QTL 分析通常利用 F<sub>2</sub>、RIL 等初级分离群体, 这类群体遗传背景相对复杂, 对结果均有一定的影响。高世代回交分离群体由于遗传背景大部分与受体亲本相同, 只有少部分来源于供体, 是基因定位和 QTL 分析的良好材料。李文涛等<sup>[20]</sup>研究表明, 在没有分子标记辅助选择的情况下, 随着回交代数的增加, 供体基因组片段数逐渐减少, 当回交代数高于 BC<sub>3</sub> 以后, 供体片段数一般少于 4 个, 其片段平均长度均在 20 cM 以下。此研究在培育 93-11 的染色体片段置换系时, 发现其中一个 BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub> 群体中各植株表现出落粒性难和易的分离, 多数单株的落粒性与供体亲本日本晴相似。推测可能有 1 个来自日本晴的显性落粒性基因。对该群体的遗传背景筛选, 检测到 3 个片段, 推测显性落粒性基因可能与这 3 个片段有关。进一步对 BC<sub>4</sub>F<sub>3</sub> 的遗传连锁分析, 将显性落粒性基因 SH1 定位在水稻第 1 染色体上, 距离 SSR 标记 RM5389、RM1068 和 RM1387 的遗传距离分别为 0.7cM、5.5cM 和 13.1cM。利用这些分子标记, 可以有选择性的获得该区段的染色体片段置换系, 从而进一步精细定位和克隆 SH1 基因, 同时为 SH1 的分子辅助选择打下基础。

Konishi 等<sup>[9]</sup>在第 1、2、5、11 和第 12 染色体上鉴定 5 个落粒性 QTL。其中 3 个 QTL 来自于 Nipponbare, 2 个 QTL 来自于 Kasalath。5 个 QTL 均使水稻落粒率减少, 其中 qSH-1 效应最大, 能够解释 68.6% 的表型变异。通过培育近等基因系及发展 10388 个植株的定位群体, 将 qSH-1 精细定位在标记 C283 和 R3265 之间, 并最终克隆了该基因。此研究定位的基因与 qSH-1 比较, 将标记 C283、R3265、RM5389 和 RM1068 整合到水稻的物理图谱上, 发现 C283、R3265、RM5389 和 RM1068 分别位于克隆 P0446B05、P0414E03、P0460C04 和克隆 P0408G07 上。P0460C04 和 P0408G07 之间另有 23 个克隆, 其中包括 P0446B05 和 P0414E03, 4 个分子标记整合后顺序为 RM5389-C283-R3265-RM1038。可以看出, 此研究所定位的 SH1 与 qSH-1 很可能为同一基因。

## 参考文献

- [1] Li CB, Zhou AL, Sang T. Rice domestication by reducing shattering [J]. Science, 2006, 311:1936-1939.
- [2] Oba S, Kikuchi F and Maruyama K. Genetic analysis of semidwarfness and grain shattering of Chinese rice variety "Ai-Jiao-Nan-Te" [J]. Jpn J Breed, 1990, 40:13-20.
- [3] Fukuta Y, Yagi T. Mapping of a shattering resistance gene in a mutant line SR-5 induced from an indica rice variety, Nan-jing11 [J]. Breed Sci, 1998, 48:345-348.
- [4] Eiguchi M, Sano Y. A gene complex responsible for seed shattering and panicle spreading found in common wild rices [J]. Rice Genet Newsl, 1990, 7:105-107.
- [5] Nagai Y, Sobrizal PL, Sanchez T, et al. Sh3, a gene for seed shattering, commonly found in wild rices [J]. Rice Genet Newsl, 2002, 19:74-75.
- [6] Ji HS, Chu SH, Jiang WZ, et al. Characterization and mapping of a shattering mutant in rice that corresponds to a block of domestication genes [J]. Genetics, 2006, 173:995-1005.
- [7] Nagao S, Takahashi M. Trial construction of twelve linkage groups in Japanese rice [J]. J Fac Agric Hokkaido Univ, 1963, 53:72-130.
- [8] 李平, 陆朝福, 周开达, 等. 利用 RFLP 标记定位水稻重要农艺性状的主效基因与微效基因 [J]. 中国科学(C 辑), 1996, 26:257-263.
- [9] Konishi S, Izawa T, Lin SY, et al. An SNP caused loss of seed shattering during rice domestication [J]. Science, 2006, 312: 1392-1396.
- [10] Sobrizal, Ikeda K, Sanchez PL, et al. RFLP mapping of a seed shattering gene on chromosome 4 in rice [J]. Rice Genet Newsl, 1999, 16:74-75.
- [11] Lin ZW, Griffith ME, Li XR, et al. Origin of seed shattering in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Planta, 2007, 226:11-20.
- [12] Fukuta Y, Harushima Y, Yano M. Using quantitative trait locus analysis for studying genetic regulation of shattering [J]. Rice Genetics III proceedings. IRRI, 1996, 75:657-662.
- [13] Xiong LZ, Liu KD, Dai XK, et al. Identification of genetic factors controlling domestication-related traits of rice using an F<sub>2</sub> population of a cross between *Oryza sativa* and *O. rufipogon* [J]. Theor Appl Genet, 1999, 98:243-251.
- [14] 沈圣泉, 庄杰云, 王淑珍, 等. 籼稻落粒性 QTL 定位与环境互作效应检测 [J]. 分子植物育种, 2004, 2:627-632.
- [15] 许旭明, 周元昌, 吴为人. 利用分子标记定位籼稻落粒性 QTL [J]. 福建农林大学学报, 2005, 34:344-348.
- [16] Cai HW, Morishima H. Genomic regions affecting seed shattering and seed dormancy in rice [J]. Theor Appl Genet, 2000, 100:840-846.
- [17] McCouch SR, Teytelman L, Xu YB, et al. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.) [J]. DNA Research, 2002, 9:199-207.
- [18] Zheng KL, Huang N, Bennett J, et al. PCR-based marker-assisted selection in rice seeding [M]. IRRI Discussion Paper Series No.12. International Rice Research Institute, Philippines, 1995.
- [19] 应存山. 中国稻作资源 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1993: 164-185.
- [20] 李文涛, 曾瑞珍, 张泽民, 等. 水稻 F<sub>1</sub> 花粉不育性近等基因系导入片段的分析 [J]. 中国水稻科学, 2003, 17:95-99.