携带主效落粒基因的水稻染色体片段代换系 Z481 的鉴定及 *SH6(t)* 定位

郑丽媛, 魏霞, 周可, 向佳, 李燕, 刘宝玉, 何光华, 凌英华, 赵芳明*

西南大学水稻研究所, 转基因植物与安全控制重庆市重点实验室, 重庆 400716

* 联系人, E-mail: zhaofangming2004@163.com

2015-10-08 收稿, 2015-10-31 修回, 2015-11-03 接受, 2015-11-27 网络版发表

重庆市重点实验室能力提升项目(cstc2014pt-sy80001)和重庆市科技攻关计划重大项目(CSTC2012ggC80002)资助

摘要 落粒性是水稻非常重要的农艺性状, 适度落粒有利于减少产量损失和水稻机械化收割, 提高生产效率. 因此鉴定落粒基因对水稻生产具有重要意义. 本研究以日本晴为受体亲本、优良恢复系R225为供体亲本, 采用高代回交和SSR标记辅助选择相结合的方法, 鉴定了一个携带易落粒主效单基因的水稻染色体片段代换系Z481. Z481含有4个染色体代换片段, 位于第1, 3, 6染色体上, 其代换片段长度分别为8.30, 6.17, 3.12和10.79 Mb, 平均为7.10 Mb. 与受体日本晴相比, Z481的株高、穗长、倒一节间长、倒二叶宽显著降低, 剑叶宽和结实率显著增加, 其他重要农艺性状如叶长、有效穗数、每穗粒数和千粒重均无显著差异. 扫描电子显微镜观察表明Z481的护颖和枝梗之间的离层在成熟时期已被完全降解, 而日本晴的离层完整, 在细胞学上解释了Z481易落粒性产生的原因. 进一步利用日本晴与Z481杂交产生的F₁和F₂群体对易落粒基因进行了遗传分析和分子定位. 该易落粒性状受单基因隐性调控, 最终将该基因定位于第6染色体RM253和ZTQ53之间824 kb的区域, 暂命名为*SH6(t)*. 目前, 在第6染色体尚无落粒基因克隆的报道. 由于染色体片段代换系除代换片段外与受体亲本的遗传背景一致, 且Z481易落粒遗传行为简单, 基本未携带育种不利性状. 因此, 本研究无论对*SH6(t)*的克隆, 还是进行基因聚合育种培育适度落粒新品种均具有重大利用价值.

关键词 水稻, 落粒性, 染色体片段代换系, 基因定位

水稻(*Oryza sativa* L.)是世界上重要的粮食作物之一, 约1/2以上人口以稻米为主食, 因此提高水稻的产量和生产效率具有重要意义^[1,2]. 落粒性是作物栽培和育种中非常重要的农艺性状^[3], 与水稻机械化收获密切相关. 易落粒品种在稻谷成熟时期容易在田间掉落, 因而造成产量的损失; 而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^[4,5]. 在稻属中, 一般是野生稻容易落粒, 籼稻居中, 粳稻落粒性最差^[6]. 通过人类驯化, 现代栽培品种一般均具有适口性较好、出苗整齐和不易落粒等特点. 对水稻

落粒形成的生理基础已有研究, 水稻种子的落粒性受护颖和枝梗之间的离层的形成所控制^[7,8]. 离层是由小而圆的紧密薄壁细胞组成, 其形成发生在抽穗前16~20 d, 穗长5~30 mm时期^[9,10]. 不同的水稻品种具有不同的水稻离层形态. 在易落粒品种中, 具有从表皮到接近维管束的发育良好的离层. 有些品种具有从表皮到维管束向上倾斜的离层, 在这些情况下, 在2个离层之间由不降解部分组成的支持区, 比易落粒品种的宽, 从而导致出现了中度到难落粒的性状^[11]. 通常, 乙烯促进种子脱离过程, 生长素抑制这

引用格式: 郑丽媛, 魏霞, 周可, 等. 携带主效落粒基因的水稻染色体片段代换系 Z481 的鉴定及 *SH6(t)* 定位. 科学通报, 2016, 61: 748–758

Zheng L Y, Wei X, Zhou K, et al. Identification of a rice chromosome segment substitution line Z481 carrying a major gene for seed shattering and mapping of *SH6(t)* (in Chinese). Chin Sci Bull, 2016, 61: 748–758, doi: 10.1360/N972015-01121

种脱离过程, 出于对特定信号和环境的响应, 水解酶的活性在离层细胞中被激活, 从而引起离层细胞中的胞间层和细胞壁降解^[12]。在种子脱离过程中, 离层首先在脱离器官的边沿形成。当种子成熟时, 离层细胞降解, 使得水稻谷粒很容易从母体植株上脱离下来。因而水稻落粒性的相关研究对水稻人工驯化及培育落粒性适度的品种具有重要意义。

进行水稻落粒性基因的遗传、定位和克隆研究, 对阐明水稻落粒的遗传分子机制至关重要。水稻落粒性的遗传较为复杂, 多数研究表明, 落粒性是由多基因控制或由少数主效基因和微效基因控制的数量性状^[3]。目前, 基于初级作图群体分子定位的水稻落粒性QTL(quantitative trait locus)分布在除第10染色体外的其他11条染色体上, 其中第1, 3和4染色体检出落粒QTL的频率最高^[3-5, 13-16]。并在此基础上克隆了5个落粒性基因, 分别为*qSH1*(*QTL of seed shattering in chromosome 1*)^[17], *SH4*(*shattering 4*)/*SHA1*(*shattering 1*)^[18, 19], *SHAT1*(*shattering abortion 1*)^[9], *SH5*(*shattering 5*)^[20]和*OsCPL1*(*Oryza sativa CTD phosphatase-like 1*), 也称为*SH-H*(*shattering locus sh-h*)^[10], 位于第1, 4, 4, 5和7染色体。通过这些基因的克隆, 初步揭示了由*qSH1*, *SH4*, *SH5*和*SHAT1*调控的水稻落粒进化的分子调控机制^[9, 20]。

然而, 鉴于初级作图群体复杂的遗传背景和易落粒性状的复杂性, 定位和克隆其QTL较费时费力^[21]。染色体片段代换系等次级作图群体具有高通量和遗传效应稳定等特点, 是目前最有应用前景的群体^[22, 23]。染色体片段代换系(chromosome segment substitution lines, CSSL)是在F₁代与轮回亲本进行多代的回交, 通过分子标记选择得到的一套覆盖供体亲本不同染色体片段的株系群。CSSL与受体亲本只存在代换片段的差异, 可将复杂性状分解为单个孟德尔因子, 是用于各种数量性状QTL定位的良好材料, 尤其作为一个强大的工具, 这些代换系可很好地将基于优良品种遗传背景下鉴定出的高产、优质、抗性基因与水稻育种计划紧密结合^[24, 25]。尽管有一些水稻染色体片段代换系群体已构建^[24-29], 但优良的等位基因往往分散于广泛的遗传资源, 有限的杂交难以覆盖广泛的自然变异, 因而为了鉴定更多的优良等位基因和开展聚合育种的需要, 有必要构建新的水稻染色体片段代换系。

本研究以日本晴为受体亲本, 自育恢复系R225

为供体亲本鉴定了一个携带主效易落粒基因的水稻染色体片段代换系Z481。本文对该染色体片段代换系进行了全面分析、对该易落粒基因*SH6(t)*进行了遗传分析和精细定位, 研究结果对*SH6(t)*克隆及培育落粒性适中的水稻品种具有重要意义。

1 材料与方法

(i) 试验材料与种植。采用连续回交和自交, 并结合分子标记辅助选择(marker-assisted selection, MAS), 构建了一套以日本晴为受体亲本、自育优良恢复系R225为供体亲本的水稻染色体片段代换系(chromosome segment substitution line, CSSL), 其中鉴定了1个含有4个代换片段的水稻易落粒染色体片段代换系Z481。2014年, 将日本晴与Z481杂交, 收获F₁杂交种子并于同年秋季在海南种植F₁群体, 收获F₂种子。2015年, 在重庆西南大学水稻研究所实验基地种植亲本(日本晴和Z481各30株)和F₂群体, 常规栽培和管理。

(ii) 易落粒水稻染色体片段代换系Z481的鉴定。选用本实验室均匀分布并覆盖水稻全基因组的425个SSR(simple sequence repeat)标记对日本晴和R225进行多态性筛选, 然后用筛选出来的254个多态性标记从BC₂F₁开始进行全基因组分子标记选择, 2011年在50株的Z2株系(BC₂F₂代)群体中发现易落粒株接近1/4(13株), 收取了3株极易落粒株连续自交并结合分子标记辅助选择, 2012年在BC₂F₄选出10片段的稳定易落粒株系12Z33(含32个标记), 同年以日本晴/12Z33杂交并自交, 并在后代中进行分子标记和表型双重鉴定, 最终在其F₄代选出了一个含有4个代换片段的易落粒染色体片段代换系14Z481(简称Z481), 具体培育过程见图1。代换片段检测时, 若某一标记的检测结果显示与日本晴的带型一致, 则认为该段DNA为日本晴基因组; 若某一标记的检测结果显示与R225的带型一致, 则认为该段DNA来自于R225基因组。当相邻连续标记带型均为R225带型时, 认为这几个标记之间的区段为供体R225的代换片段。按照Young和 Tanksley^[30]的方法计算代换片段的估计长度。

(iii) 落粒性鉴定。在两亲本和F₂群体成熟时, 参照应存山^[31]介绍的落粒性鉴定方法, 根据落粒性判断标准^[32], 调查并记录日本晴和Z481各10株以及F₂群体每一株的落粒性(易落粒或难落粒)。具体操作如下: 左手握住取样穗的基部, 将整个稻穗放于手掌

图1 Z481的选育流程示意图

Figure 1 Development process of Z481

内, 尽量保证谷粒受力均匀, 手指弯曲握住稻穗缓缓匀速拉至稻穗顶端. 每株测定3个稻穗来判断其落粒性. 根据落粒率将落粒性划分为难落粒(落粒率 $\leq 25.5\%$)和易落粒(落粒率 $> 25.5\%$). 落粒率(%)=落粒数/全部实粒数 $\times 100\%$ ^[32].

(iv) Z481的农艺性状调查. 在水稻成熟期, 分别测量10株日本晴和10株Z481的株高、穗长、节间长度、功能叶长度和宽度. 株高用米尺测量植株地上部分的拉直最长高度; 每株的穗长、倒一节间、倒二节间和倒三节间长度, 以及每株的剑叶、倒二叶和倒三叶的叶长用50 cm直尺测量; 叶宽用20 cm直尺测量其叶片中部最宽部位. 水稻成熟后, 在日本晴和Z481的小区中间各收取10株考查单株有效穗数, 每穗总粒数, 每穗实粒数, 结实率及千粒重等重要农艺性状, 然后用Excel对每株的平均数进行 t 测验统计

分析.

(v) Z481护颖和枝梗之间的离层扫描电子显微镜观察. 水稻成熟后, 分别取日本晴和Z481单个稻穗, 采用冷冻法用日立SU3500型扫描电子显微镜(日本)观察日本晴和Z481护颖和枝梗之间的离层.

(vi) *SH6(t)*基因定位. 以日本晴/Z481杂交产生的556株 F_2 群体中的128株易落粒单株作为定位群体. 首先选用Z481代换片段上的标记对20株易落粒单株作连锁分析, 若发现某一标记可能与易落粒基因连锁时, 取群体中的10株难落粒和10株易落粒单株进一步验证. 若验证该标记确实与易落粒基因连锁时, 继续扩大群体, 用该标记所在代换片段上的所有标记进行基因初定位.

用于代换片段检测的Z481单株、日本晴及供体亲本R225的模板DNA采用CTAB(cetyl trimethyl am-

monium bromide)法提取, 参照McCouch等人^[33]方法稍加改进. 用于连锁分析和基因定位的F₂分离群体的模板DNA采用简易碱煮法提取^[34].

PCR反应总体积12.5 μ L, 包括1.25 μ L的10 $\times$ PCR buffer, 0.65 μ L的25 mmol L⁻¹ MgCl₂, 0.5 μ L的2.5 mmol L⁻¹ dNTPs, 8.0 μ L的ddH₂O, 1.0 μ L的10 μ mol L⁻¹ 引物, 1.0 μ L的模板DNA和0.1 μ L的5 U μ L⁻¹ Taq DNA聚合酶. PCR反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. 扩增出的PCR产物经10%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和快速银染后进行观察^[34]. 将具有日本晴带型的单株记为A, 具有Z481带型的单株记为B, 具有双亲带型的单株记为H. 用Mapmaker 3.0进行数据分析和作图, 用Kosambi函数将重组率转化为遗传距离.

2 结果与分析

2.1 Z481代换片段鉴定

在前期研究的基础上, 本文用62个亲本间有多

态性的SSR标记对5株Z481进行了代换片段鉴定和供体残留片段检测. 结果发现它们的所有代换片段一致, 且没有检出供体的其他残留片段, 从而确定Z481已经纯合.

Z481含有4个代换片段, 分别位于第1染色体的RM11694~RM6292、第3染色体的RM5864~RM15709、第6染色体的RM6734~RM276和RM3330~RM3187区间, 估计长度分别为8.30, 6.17, 3.12和10.79 Mb, 代换总长度为28.38 Mb, 平均为7.10 Mb(图2).

2.2 Z481的形态特征和农艺性状分析

(i) Z481的形态特征. 受体日本晴和代换系Z481的落粒性存在极显著差异, 其落粒率分别为5.3%和94.1%(图3(a)~(g)). 根据“0 $\leq$ 落粒率 $\leq$ 25.5%为难落粒, 25.5% $<$ 落粒率 $\leq$ 100%为容易落粒”的判断标准, Z481为极易落粒, 而受体日本晴为难落粒. 从离地面相同的高度落下稻穗或用合适的相同力度拍打稻穗, 结果一致显示: 日本晴几乎不落粒; 而Z481落粒数较多(图3(c), (d)). 与日本晴相比, Z481的株高、穗

图2 Z481的代换片段. 距离为物理距离(Mb)

Figure 2 Substitution segments of Z481. Distance in Figure 2 is physical distance (Mb)

图3 日本晴和Z481的表型。(a)成熟期的日本晴植株;(b)成熟期的Z481植株;(c)在(a)图中红色方框部分的特显;(d)在(b)图中红色方框部分的特显;(e)日本晴的稻穗;(f)Z481的稻穗;(g)日本晴和Z481的落粒率

Figure 3 Phenotype of Nipponbare and Z481. (a) Plant of Nipponbare at maturity stage; (b) Plant of Z481 at maturity stage; (c) Special offer of red boxed area in panel (a); (d) Special offer of red boxed area in panel (b); (e) Panicle of Nipponbare; (f) Panicle of Z481; (g) Seed shattering ratio of Nipponbare and Z481

长和倒一节间长极显著降低,分别降低了16.53%, 12.89%, 24.51%,倒二节间长和倒三节间长则无差异(表1),暗示了Z481的株高显著降低是穗长和倒一节间长共同减小的结果.Z481的剑叶宽极显著增加23.19%;倒二叶宽显著降低10.45%,而剑叶长、倒二叶长、倒三叶长和倒三叶宽均没有显著差异(表2).这一结果表明,在Z481的代换片段上,除携带了易落粒主基因外,还可能含有控制株高、穗长、倒一节间长、剑叶宽和倒二叶宽的QTL.

(ii) Z481的产量相关性状分析.与日本晴相比,Z481的结实率显著增加5.27%;而有效穗数减少1

穗、每穗总粒数减少4.67粒、每穗实粒数增加10.47粒和千粒重增加1.01 g,但均无显著差异(表3).由此可见,Z481具有许多育种有利的性状,在基因聚合育种中具有重大利用价值.

2.3 护颖和枝梗之间的离层扫描电子显微镜分析

水稻成熟时,用扫描电子显微镜观察受体日本晴和Z481护颖和枝梗之间的离层.发现日本晴在成熟时期具有较为完整的离层,未被降解(图4(a), (c));而Z481未观察到离层(图4(b), (d)),可能已经被完全降解,使得Z481很容易从穗部上脱落下来.

表1 日本晴与Z481的株高、穗长和节间长^{a)}

Table 1 Plant height, length of panicle and internode of Nipponbare and Z481

材料	株高(cm)	穗长(cm)	倒一节间长(cm)	倒二节间长(cm)	倒三节间长(cm)
Nipponbare	92.54±2.52	22.03±1.82	39.90±3.27	19.34±1.41	8.43±1.08
Z481	77.24±2.88**	19.19±1.56**	30.12±2.94**	18.04±1.22	8.72±0.63

a) **表示两材料在0.01水平上差异显著

表 2 成熟期的日本晴与Z481 的叶片形态^{a)}

Table 2 Leaf morphology of Nipponbare and Z481 at maturity stage

材料	剑叶长(cm)	剑叶宽(cm)	倒二叶长(cm)	倒二叶宽(cm)	倒三叶长(cm)	倒三叶宽(cm)
Nipponbare	37.34±5.49	1.38±0.08	48.12±5.07	1.34±0.11	43.46±7.18	1.26±0.05
Z481	33.76±3.71	1.70±0.07**	40.06 ±7.08	1.20 ±0.07*	38.46±5.27	1.17±0.06

a) *和**表示两材料在0.05和0.01水平上差异显著

表 3 日本晴与Z481 的产量相关性状分析^{a)}

Table 3 Yield-related traits of Nipponbare and Z481

材料	有效穗数	每穗总粒数	每穗实粒数	结实率(%)	千粒重(g)
Nipponbare	11.00±3.08	126.13±21.35	93.00±24.64	86.64±7.85	23.78±0.76
Z481	10.00±1.00	121.46±19.28	103.47±26.55	91.46±3.82*	24.79±3.52

a) *表示两材料在0.05水平上差异显著

图 4 离层扫描电子显微镜观察. (a), (c) 成熟期日本晴离层特征; (b), (d) 成熟期Z481 离层特征

Figure 4 Scanning electron microscopy observation of abscission zone. (a), (c) Characteristic of abscission zone of Nipponbare at maturity stage; (b), (d) characteristic of abscission zone of 481 at maturity stage

2.4 落粒率在F₂群体中的频率分布及遗传分析

以日本晴为母本与Z481杂交, F₁植株的落粒率(8.7%)与日本晴基本一致, 表现出难落粒性状, 初步判断控制该易落粒性状的基因为隐性遗传. 在556株的F₂群体中, 群体的落粒率成双峰分布, 易落粒峰值集中在61%~100%, 合计128株, 难落粒峰值集中在0%~40%, 合计423株(图5). 经卡方检验, 难落粒(423):易落粒(128)符合3:1分离比($\chi^2=0.87<\chi^2_{(0.05,1)}=3.84$), 进一步表明该易落粒性状受单基因隐性调控.

2.5 易落粒基因的分子定位

鉴于Z481仅含有4个染色体代换片段, 先用各代换片段上的标记对20株易落粒隐性单株进行初步连锁分析. 结果发现, 位于第6染色体代换片段上的SSR标记RM6734可能与该易落粒基因连锁(图6), 而其他3个染色体代换片段上的标记均不连锁. 然后, 用F₂中10株易落粒株和10株难落粒株对该标记进行了进一步验证, 结果表明该标记确实与易落粒基因连锁. 最后, 以128株易落粒隐性单株将该基因初步定位于第6染色体分子标记RM19478和ZTQ53(ZTQ53为本实验室设计合成的SSR标记, 其序列见表4)之间13.28 cM的区域(图7).

为了进一步对该易落粒基因进行精细定位, 根据已公布的位于RM19478和ZTQ53之间的SSR标记, 合成18对SSR引物, 其中5个SSR标记RM4608, RM3408, RM6176, RM19556和RM253在亲本之间具有多态性(表4). 然后用这5个标记进行128个易落粒单株的连锁分析, 发现分别有17, 16, 14, 12和8个重组单株, 最终将该基因定位在RM253和ZTQ53之间824 kb的区域(图7).

3 讨论与结论

3.1 讨论

水稻落粒性与生产密切相关, 极易落粒品种在成熟时谷粒容易自然掉落在田间, 从而造成产量的损失; 难落粒品种则影响成熟时期种子的收获, 尤其给机械化收割带来了极大困难, 这两类品种在生产上都不受欢迎^[4,5]. 我们的祖先很早就从降低落粒性

图5 日本晴和Z481杂交的F₂群体落粒率分布. N, 日本晴; Z, 代换系Z481; F₁, 日本晴与Z481杂交的F₁群体

Figure 5 Distribution of seed shattering rate of F₂ population from cross of Nipponbare and Z481. N, recipient Nipponbare; Z, CSSL Z481; F₁: F₁ population from cross of Nipponbare/Z481

图6 RM6734对F₂群体20株隐性单株的连锁分析. P₁, 日本晴; P₂, Z481; 1~20, F₂群体中的20个隐性单株; 箭头指向为亲本特异条带; 2, 5, 6, 7, 8, 11, 13, 14, 15 为交换株

Figure 6 Linkage analysis of RM6734 for 20 recessive plants in F₂ population. P₁, Nipponbare; P₂, Z481; 1~20, 20 recessive plants in F₂ population; arrowhead pointed to the specific band of parents; 2, 5, 6, 7, 8, 11, 13, 14, 15 are recombinants

图7 (网络版彩色)SH6(t)基因的分子定位

Figure 7 (Color online) Molecular mapping of SH6(t)

表 4 *SH6(t)* 基因连锁的分子标记引物序列
Table 4 Primer sequences linked with *SH6(t)*

标记	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
RM6734	GGGCTTGGACTTGGAGTCTTGG	GACCAGGACCGATCCATCTCC
RM19478	CGTACATCGCGACGCAGAGC	CTCCATCGTCAAGCTGCCAACG
RM4608	ACCCAATATGGTGCAATAGAGACC	CACCTCCACCAACTATTGACAGG
RM3408	AGTGAATCCCATCAGATCACTCC	CATATCAAATCGCCGAGAAGG
RM6176	AAATTCTCTCCTCTCTCTCTCG	CCAACAACCAAAATCAGACATCC
RM19556	TTCTGGCCTATGAGGGATGATCG	ACCAAATATCAAGCCTGCACAGC
RM253	CCATCTCTGCCTCTGACTCACC	TCCTTCAATGGTCGTATCTTCTCC
ZTQ53	CGACCTGTAGCTGCCACC	TGGGCTCCTTCTGAGATAGTTG

角度开始了对水稻的驯化^[19]。现代栽培稻品种的种子落粒性差别很大,说明落粒是一项受多基因控制的复杂性状。深入全面地了解水稻落粒调控机制,对减少因落粒带来的产量损失具有重要的生产意义。

鉴定水稻落粒性的方法有很多种,如下落法^[5]、揉搓法^[31,32]和仪器测量法^[9,17,19]等。到目前为止,在国际上没有统一的方法或标准。下落法是将水稻的稻穗水平放置于空中且距离地面相同的高度,自由下落于地面或平板上,计算落粒数占总粒数的百分数,即落粒率^[5]。揉搓法是用手握住成熟的稻穗用相同的力度揉搓,统计落粒数并计算落粒率^[31,32]。仪器测量法通过测量使谷粒从枝梗脱落的作用力大小判断落粒难易程度,该方法在一定程度上能够消除人为等主观因素引起的误差,但操作起来较为繁琐,费时费力^[9,17,19]。下落法和揉搓法操作简单、快捷方便,但容易受到受力不均等人为因素影响。一般来说,由微效多基因控制的落粒性鉴定宜采用下落法和仪器测量法^[6],揉搓法适用于由质量性状基因和主效QTL控制的大群体测量。本实验中,水稻染色体片段代换系Z481和受体日本晴的落粒性差异非常显著,分别为94.1%和5.3%。定位群体F₂单株之间落粒性差异也较明显,而且鉴定数量较多,因此本实验采用揉搓法对每个单株选取3个稻穗进行快速鉴定是可行的。

水稻落粒性与谷粒离层发育有关^[7,8]。不同的水稻品种具有不同的离层形态,从而导致了不同程度的落粒性^[35]。在本研究中,受体亲本日本晴具有较为完整的离层,而来自其供体R225的等位基因使水稻染色体片段代换系Z481护颖和枝梗之间的离层被完全降解,从而使得Z481籽粒很容易从穗部上脱落下来。这一结果丰富和映证了前人的理论^[9~12]。

近年来随着研究的不断深入,已有5个水稻落粒性相关的基因被克隆。*SH4*基因是一个贡献率为69%的主效QTL,编码1个与Myb3同源的未知功能转录因子,该基因第1外显子中的碱基T替换了G导致Myb3 DNA结合域上的天冬酰胺替换赖氨酸,使得离层不能正常发育形成,从而使得表型从落粒变为了不落粒^[19]。*SH4*是*SH4*的等位基因,有98%氨基酸序列的一致性。通过对96份粳稻和112份籼稻的检测,发现它们均含有不落粒等位基因*SH4*,但在25份野生材料中均为野生型的*SH4*^[36],表明通过长期的人工选择,*SH4*非落粒性等位基因在籼粳亚种中得到固定^[37]。尽管籼稻与粳稻均含有相同的*SH4*基因型,但这2个水稻亚种的落粒性却存在明显差异,通常粳稻难落粒而籼稻较易落粒,这暗示了水稻籼粳亚种间还存在其他主要控制落粒性的基因,*qSH1*就是其中的1个主效基因。该基因编码一个BEL1型同源异型蛋白(BEL1-type home box gene),与拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)的RPL同源结构域蛋白(REPLUMLESS homeodomain protein)高度同源,其5'端调节区的一个单碱基突变(single nucleotide polymorphism, SNP)引起离层不能形成而导致落粒性丧失。*qSH1*能解释易落粒的籼稻品种Kasalath与日本晴之间近70%的表型变异^[17,38]。*SH5*与*qSH1*高度同源,都属于BEL1型同源异型基因,通过增强离层发育和抑制木质素生物合成来诱导种子落粒^[20]。*SHAT1*是一个未被人工选择的基因,编码APETALA2转录因子,通过参与离层(abscission zone, AZ)发育,也为落粒性所必需^[9]。经过深入研究,这几个基因的调控关系已初步清晰,*SH4*和*qSH1*在水稻的人工驯化过程中扮演着重要的角色,*SHAT1*在离层的表达受*SH4*正向调节,

反过来 $SHAT1$ 也起到维持 $SH4$ 在离层表达的作用, $qSH1$ 作用于 $SH4$ 和 $SHAT1$ 下游(可能还有其他基因的参与),维持 $SHAT1$ 和 $SH4$ 在离层的持续表达,从而促进离层的形成^[9]. $SH5$ 通过 $qSH1$ 也可以影响 $SH4$ 的表达. $SH5$ 必须在 $qSH1$ 的帮助下才能增强离层的发育^[20].落粒基因 $SH-H$ 编码1个水稻carboxy-terminal domain(CTD) phosphatase 类蛋白($OsCPL1$),基因突变后功能失活促进离层的形成,导致易落粒. CTD磷酸酯酶在细胞分化中起重要作用^[10],但是 $SH-H$ 基因的功能及其与上述基因的互作机制还有待于进一步研究. 尤其令人惊异的是, $qSH1$ 所在位置(36.4 Mb)也包含在本研究鉴定的水稻染色体片段代换系Z481的第1染色体代换区间内,但该代换片段内标记却均不与易落粒性状连锁,而且Z481的易落粒由单基因隐性调控,说明Z481存在另一个控制易落粒的位点. 经定位发现该水稻易落粒主效基因 $SH6(t)$,位于第6染色体RM253和ZTQ53之间824 kb的区域,该基因也与离层形成有关. 这一结果暗示了水稻籼粳亚种间至少存在2个主要控制落粒性的基因($qSH1$ 和 $SH6(t)$). 目前在第6染色体还未有落粒性基因被克隆的报道. 然而,鉴于 $SH6(t)$ 定位的区间仍较大,在该区间尚有交换株,还需进一步设计其他分子标记缩小定位区间,便于快速找到目的基因. 究竟 $SH6(t)$ 与上述基因有着怎样的调控关系,有待进一步克隆该基因. 因此该结果对进一步完善落粒性的分子调控机制具有十分重要的意义.

尤其,本研究发现的易落粒基因是基于水稻染色体片段代换系鉴定的. 代换系鉴于与受体亲本仅存在代换片段的差异,是一种不需要借助复杂统计

学分析模型就可直接找到QTL的方法,而且定位的QTL可直接应用于育种实践^[22,23]. 该方法具有高通量的特点,且遗传效应稳定,找到相关位点后回交一代即可形成精细定位群体并快速产生近等基因系,构建一套代换系可以对多种复杂性状进行分析^[39]. 本研究鉴定了一个以日本晴为受体亲本, R225为供体亲本的水稻染色体片段代换系Z481,该染色体片段代换系除易落粒外,其株高(77.24 cm)、穗长、倒一节间长、倒二叶宽显著降低,剑叶宽和结实率显著增加,而其他重要农艺性状如叶长、有效穗数、每穗粒数和千粒重均无显著差异. 因而该代换系无论对于分离其他QTL,还是应用于基因聚合育种都有非常重大的利用价值.

3.2 结论

本研究鉴定了一个以日本晴为受体亲本,优良恢复系R225为供体亲本的水稻易落粒染色体片段代换系Z481. Z481含有4个代换片段,分布于第1, 3, 6染色体上,代换平均长度为7.10 Mb. 在成熟时期Z481的护颖和枝梗之间的离层完全降解,导致谷粒很容易脱落. 其株高、穗长、倒一节间长和倒二叶宽显著降低;剑叶宽和结实率显著增加,其他重要农艺性状如叶长、有效穗数、每穗粒数和千粒重均无显著差异. 该易落粒性状受单基因隐性调控,位于第6染色体RM253和ZTQ53之间824 kb的区域,暂命名为 $SH6(t)$,在该区域尚未发现有落粒性基因被克隆的报道. 因此本研究无论对 $SH6(t)$ 的克隆,还是用于基因聚合育种均具有重要利用价值.

参考文献

- 1 Khush G S. Productivity improvements in rice. *Nutr Rev*, 2003, 61: 8114–8116
- 2 Khush G S. Challenges for meeting the global food and nutrient needs in the new millennium. *Proc Nutr Soc*, 2001, 60: 15–26
- 3 Zhu W Y, Zhu Z, Yang D W, et al. Mapping of $SH1$, a dominant gene controlling seed shattering using SSR markers in rice (*Oryza sativa* L.) (in Chinese). *Chin Agric Sci Bull*, 2008, 24: 84–87 [朱文银, 朱镇, 杨德卫, 等. 一个水稻落粒性基因 $SH1$ 的 SSR 标记定位. 中国农学通报, 2008, 24: 84–87]
- 4 Li S G, Feng Y Q, He P, et al. Genetic analysis and mapping the shattering habit in rice. (*Oryza sativa* L.) (in Chinese). *Southwest China J Agric Sci*, 1999, 12: 77–80 [李仕贵, 冯玉清, 何平, 等. 水稻籼粳杂交落粒性的遗传分析和基因定位. 西南农业学报, 1999, 12: 77–80]
- 5 Shen S Q, Zhuang J Y, Wang S Z, et al. Mapping QTLs for rice shattering trait and analysis major effect (in Chinese). *Mol Plant Breed*, 2004, 2: 627–632 [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. 分子植物育种, 2004, 2: 627–632]
- 6 Zhu W Y, Yang D W, Lin J, et al. Mapping of the main effect of rice grain by chromosome substitution lines QTL (in Chinese). *Chin Bull Bot*, 2008, 25: 443–448 [朱文银, 杨德卫, 林静, 等. 利用染色体片段置换系定位水稻落粒性主效 QTL. 植物学通报, 2008, 25: 443–448]
- 7 Oba S, Sumi N, Fujimoto F, et al. Association between grain shattering habit and formation of abscission layer controlled by grain shattering gene $sh-2$ in rice (*Oryza sativa* L.). *Jpn J Crop Sci*, 1995, 64: 607–615

- 8 Watanabe N, Ikebata N. The effects of homoeologous group 3 chromosomes on grain colour dependent seed dormancy and brittle rachis in tetraploid wheat. *Euphytica*, 2000, 115: 215–220
- 9 Zhou Y, Lu D, Li C, et al. Genetic control of seed shattering in rice by the APETALA2 transcription factor *SHATTERING ABORTION1*. *Plant Cell*, 2012, 24: 1034–1048
- 10 Ji H, Kim S R, Kim Y H, et al. Inactivation of the CTD phosphatase-like gene *OsCPL1* enhances the development of the abscission layer and seed shattering in rice. *Plant J*, 2010, 61: 96–106
- 11 Ji H S, Chu S H, Jiang W Z, et al. Characterization and mapping of a shattering mutant in rice that corresponds to a block of domestication genes. *Genetics*, 2006, 173: 995–1005
- 12 Roberts J A, Elliott K A, Gonzalez-Larranza Z H. Abscission dehiscence and other cell separation processes. *Annu Rev Plant Biol*, 2002, 53: 135–158
- 13 Fukuta Y, Harushima Y, Yano M. Using quantitative trait locus analysis for studying genetic regulation of shattering. In: Third International Rice Genetics Symposium. Manila: International Rice Research Institute, 1996, 75: 657–662
- 14 Cai H W, Morishima H. Genomic regions affecting seed shattering and seed dormancy in rice. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 840–846
- 15 Xiong L Z, Liu K D, Dai X K, et al. Identification of genetic factors controlling domestication-related traits of rice using an F₂ population of a cross between *Oryza sativa* and *O. rufipogon*. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 243–251
- 16 Xu X M, Zhou Y C, Wu W R. Mapping of QTLs underlying shattering habit in *indica* rice using molecular markers (in Chinese). *J Fujian Agric For Univ*, 2005, 4: 344–348 [许旭明, 周元昌, 吴为人. 利用分子标记定位籼稻落粒性 QTL. 福建农林大学学报, 2005, 4: 344–348]
- 17 Konishi S, Izawa T, Lin S Y, et al. An SNP caused loss of seed shattering during rice domestication. *Science*, 2006, 312: 1393–1396
- 18 Lin Z, Li X, Shannon L M, et al. Parallel domestication of the *Shattering 1* genes in cereals. *Nat Genet*, 2012, 44: 720–724
- 19 Li C B, Zhou A L, Sang T. Rice domestication by reducing shattering. *Science*, 2006, 311: 1936–1939
- 20 Jinmi Y, Lae H C, Song L K, et al. The BEL1-type homeobox gene *SH5* induces seed shattering by enhancing abscission-zone development and inhibiting lignin biosynthesis. *Plant J*, 2014, 79: 717–728
- 21 Wu W R, Tang D Z, Li W M. Genetic analysis and molecular analysis of quantitative traits (in Chinese). *Acta Agron Sin*, 2000, 26: 501–507 [吴为人, 唐定中, 李维明. 数量性状的遗传剖析和分子剖析. 作物学报, 2000, 26: 501–507]
- 22 Ye G, Smith K F. Marker-assisted gene pyramiding for inbred line development: Basic principles and practical guidelines. *Plant Breed*, 2008, 2: 1–10
- 23 Gur A, Zamir D. Natural variation can lift yield barriers in plant breeding. *PLoS Biol*, 2004, 2: 1610–1615
- 24 Furuta T, Uehara K, Angeles-Shim R B, et al. Development and evaluation of chromosome segment substitution lines (CSSLs) carrying chromosome segments derived from *Oryza rufipogon* in the genetic background of *Oryza sativa* L. *Breed Sci*, 2014, 63: 468–475
- 25 Zong G, Wang A, Wang L, et al. A Pyramid breeding of eight grain-yield related quantitative trait loci based on marker-assistant and phenotype selection in rice (*Oryza sativa* L.). *J Genet Genom*, 2012, 39: 335–350
- 26 Bian J, Zhu G, Zhu C, et al. Molecular dissection of developmental behavior of tiller number and the relationship with effective panicle using indica-japonica introgression lines in rice. *Mol Breeding*, 2015, 35: 91
- 27 Wan X Y, Wan J M, Wang C M, et al. QTL detection for eating quality of cooked rice in a population of chromosome segment substitution lines. *Theor Appl Genet*, 2004, 110: 71–79
- 28 Zeng R Z, Shi J Q, Huang C F, et al. Development of a series of single segment substitution lines in indica background of rice (*Oryza sativa* L.) (in Chinese). *Acta Agron Sin*, 2006, 32: 88–95 [曾瑞珍, 施军琼, 黄朝锋, 等. 籼稻背景的单片段代换系群体的构建. 作物学报, 2006, 32: 88–95]
- 29 Zhao L, Zhou H, Lu L, et al. Identification of quantitative trait loci controlling rice mature seed culturability using chromosomal segment substitution lines. *Plant Cell Rep*, 2009, 28: 247–256
- 30 Young N D, Tanksley S D. Restriction fragment length polymorphism maps and the concept of graphical genotypes. *Theor Appl Genet*, 1989, 77: 95–101
- 31 Ying C S. Chinese ingenious rice (in Chinese). *Chin Rice Sci*, 1988, 2: 40–42 [应存山. 中国稻种资源. 中国水稻科学, 1988, 2: 40–42]
- 32 Zhu Z C, Wang C T, He Y X, et al. Genetic analysis and mapping the shattering habit in rice (in Chinese). *Hybrid Rice*, 2014, 29: 62–66 [朱子超, 王楚桃, 何永歆, 等. 水稻落粒性的遗传分析和基因定位. 杂交水稻, 2014, 29: 62–66]
- 33 McCouch S R, Kochert G, Yu Z H. Molecular mapping of rice chromosome. *Theor Appl Genet*, 1988: 148–159
- 34 Sang X C, He G H, Zhang Y, et al. The simple grain of templates of rice genomes DNA for PCR (in Chinese). *Hereditas*, 2003, 25: 705–707 [桑贤春, 何光华, 张毅, 等. 水稻 PCR 扩增模板的快速制备. 遗传, 2003, 25: 705–707]
- 35 Jin L, Lu Y, Bao J S. Progress on the mapping and clone of seeding shattering genes in rice (in Chinese). *Mol Plant Breed*, 2009, 7: 393–397 [金亮, 卢艳, 包劲松. 水稻落粒性基因定位与克隆研究进展. 分子植物育种, 2009, 7: 393–397]
- 36 Lin Z W, Griffith M E, Li X R. Origin of seed shattering in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta*, 2007, 226: 11–20
- 37 Thurber C S, Reagon M, Gross B L, et al. Molecular evolution of shattering loci in U.S. weedy rice. *Mol Ecol*, 2010, 19: 3271–3284
- 38 Zhang L B, Zhu Q H, Wu Z Q. Selection on grain shattering genes and rates of rice domestication. *New Phytol*, 2009, 184: 708–720
- 39 Zhang L, He Z H. Understanding natural variations: The source of elite agronomic traits for rice breeding (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2015, 60: 1066–1078 [张林, 何祖华. 水稻重要农艺性状自然变异研究进展及其应用策略. 科学通报, 2015, 60: 1066–1078]

Identification of a rice chromosome segment substitution line Z481 carrying a major gene for seed shattering and mapping of *SH6(t)*

ZHENG LiYuan, WEI Xia, ZHOU Ke, XIANG Jia, LI Yan, LIU BaoYu, HE GuangHua, LING YingHua & ZHAO FangMing

Chongqing Key Laboratory of Application and Safety Control of Genetically Modified Crops, Rice Research Institute, Southwest University, Chongqing 400716, China

Seed shattering is an important agronomic trait in rice. Moderate shattering is favorable to improve production efficiency by reducing rice production losses and mechanical harvesting. Therefore, identification of genes for shattering is important for rice production. Here, in 2014 a novel chromosome segment substitution line (CSSL) Z481 with easy seed-shattering was identified deriving from advanced backcrosses between Nipponbare as recipient and excellent rice restorer R225 as donor by SSR marker-assisted selection (MAS). In 2015, seed shattering ratio together with 16 other phenotypic traits were measured with 10 plants of Z481 and Nipponbare, and then t-test analysis was conducted. Furthermore, the abscission layer between lemma and branch of Z481 and Nipponbare were observed with SU3500 type scanning electron microscopy. Finally, genetic analysis and gene mapping for the easy seed-shattering were done using the F1 and F2 population obtained by Nipponbare crossed with the Z481. The results showed as follows: (i) Z481 contained four substitution segments which located on chromosomes 1, 3, 6 and 6. The length of these substitution segments was 8.30, 6.17, 3.12 and 10.79 Mb, respectively, and the average length was 7.39 Mb. CSSLs are developed by a series of backcrosses to the recipient parent until its genome is fully recovered except one or several marker-defined chromosome segment(s) from donor parents in each line. Thus, the use of CSSLs can simplify the study of complex genetic traits and are considered excellent materials for combining the identification of genes with their use in the strategic breeding of rice. (ii) The seed shattering ratio of Z481 was 5.3%, while 94.1% was Nipponbare, which was at 0.01 significance level. Compared with Nipponbare, plant height, panicle length, length of 1st internode and width of the 2nd leaf in Z481 were significantly reduced, and width of the flag leaf and seed setting ratio were significantly increased. Other important agronomic traits such as length of the leaf, panicle number, spikelets per panicle, 1000-grain weight were not significantly different. Due to carrying many advantageous traits, Z481 can be directly used in MAS breeding strategy. (iii) Abscission layer of Z481 was completely degraded at maturity stage, whereas that of Nipponbare was complete, which revealed the cytological reason of easy shattering in Z481. The result riches the conclusion of other researchers that shattering is related to the development of abscission layer of rice grains. (iv) The distribution of seed shattering ratio in the F2 population displayed bimodal. The peak values of difficult shattering were mainly distributed at 61%–100%, and those of easy shattering mainly ranged from 0% to 40%. *Chi*-square test showed that the ratio of plant number with difficult shattering (423) to that with easy shattering (128) fitted to 3:1 segregation ratio ($\chi^2=0.87<\chi^2(0.05,1)=3.84$). These results showed that the easy shattering in Z481 was controlled by a single recessive nuclear gene, named *SH6(t)*, which was mapped between SSR markers RM253 and ZTQ53 on chromosome 6, with a physical distance of 824 kb. It is different from the 5 cloned genes for shattering, such as qSH1 on chromosome1, SH4/SHA1 and SHAT1 on chromosome4, SH5 on chromosome 5, and OsCPL1/SH-H on chromosome 7. Although the location of qSH1 is within the substitution region of chromosome1 of Z481, however, it is not linked with all the markers there, which indicated that qSH1 and *SH6(t)* might be all major genes for controlling shattering between rice subspecies of indica and japonica. To date, none of genes for seed-shattering was reported yet on the chromosome 6. In conclusion, a novel CSSL named Z481 carrying 4 substituton segments was identified with easy seed-shattering and many favorable agronomic traits. The easy shattering was caused by degradation of abscission and controled by a single recessive nuclear gene *SH6(t)*, which was mapped at the region of 824 kb on chromosome 6 and has not been cloned. Consequently, it will be not only beneficial for further cloning and functional analysis of *SH6(t)*, but also important in breeding novel varieties with moderate shattering by MAS.

rice (*Oryza sativa* L.), seed shattering, chromosome segment substitution line, gene mapping

doi: 10.1360/N972015-01121