植物学通报 *Chinese Bulletin of Botany* 2008, **25** (4): 443–448, www.chinbullbotany.com

·实验简报·

利用染色体片段置换系定位水稻落粒性主效 QTL

朱文银, 杨德卫, 林静, 赵凌, 张亚东, 朱镇, 陈涛, 王才林*

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

摘要 水稻落粒性是与其生产密切相关的重要性状之一。以7个染色体片段置换系为材料, 采用重叠群代换作图法对控制落粒性的2个主效QTL进行定位。结果表明, 104个SSR标记在亲本间具有多态性, 多态率为68.0%; 4个置换系的落粒性与亲本日本晴的落粒性相似, 表现难落粒。3个置换系与亲本93-11的落粒性相似, 表现易落粒; 7个染色体片段置换系在第1和第6染色体上检出7个置换片段, 其长度分别为23.6、16.5、6.6、9.9、10.4、20.2和7.1 cM; *qSH-1-1*被定位在第1染色体RM472－RM1387之间, 遗传距离约为6.6 cM。*qSH-6-1*为新发现的落粒性主效QTL, 被定位在第6染色体RM6782－RM3430之间, 遗传距离约为4.2 cM。利用染色体片段置换系能准确地定位水稻落粒性QTL, *qSH-1-1*与*qSH-6-1*的鉴定和初步定位为其进一步的精细定位、图位克隆及分子标记辅助选择奠定了基础。

关键词 染色体片段置换系, 置换片段, 水稻, 落粒性, 代换作图

朱文银, 杨德卫, 林静, 赵凌, 张亚东, 朱镇, 陈涛, 王才林 (2008). **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 25**, 443–448.

落粒性是与水稻生产密切相关的重要性状之一, 易落粒或难落粒的水稻品种都不宜在生产上使用。一般来说, 野生稻极易落粒, 籼稻的落粒性又强于粳稻。现代作物品种大多是通过人类的活动, 从野生植物中选择出适口性好、出苗整齐和落粒性差的类型进行栽培种植, 逐渐驯化而来。水稻也是通过不断减少落粒率而得以驯化(Li et al., 2006)。因此, 研究水稻落粒性遗传基因, 并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。

多数遗传研究结果表明, 控制水稻落粒性的基因主要有 2 类: 主基因和 QTL。在主基因方面, 落粒性的遗传主要是由单基因或寡基因控制的质量性状。在野生稻和栽培稻杂交试验中, 易落粒表现为显性遗传; 在栽培稻中, 易落粒与难落粒品种间进行杂交时, 二者均可能表现为显性。通过对野生稻与栽培稻及栽培稻之间杂交后代的遗传研究, 迄今已定位 5 个落粒性基因, 即 *sh-1*、*sh-2*、*sh-3*、*sh-4* 和 *sh-h*, 分别被定位在水稻第 11、1、4、3 和 7 染色体上(Kinoshita, 1995; Ji et al., 2006)。其中, *sh-2* 被认为是籼稻和粳稻亚种中主要的落粒性基因, *sh-3* 则来源于普通野生稻。李平等(1996)利用籼粳交产生的加倍单倍体群体, 将 *sh-2* 定位在第 1 染色体 RFLP 标记 RGI72b 与 RG152b 之间。随后, Konishi 等(2006)克隆了该基因。Sobrizal 等(1999)利用 BC_4F_2 群体和 RFLP 标记对 *sh-3* 进行了定位, *sh-3* 位于第 4 染色体 R1427 和 C107 之间, 与标记的遗传距离均为 2.3 cM。随后, 该基因被克隆(Li et al., 2006; Lin et al., 2007)。在 QTL 方面, Fukuta 等(1996)利用籼粳交后代 F_2 分离群体, 对落粒性进行了 QTL 分析, 在第 1、2、5、11 和 12 染色体上检测到 5 个 QTL, 其中第 1 染色体上的 QTL 为主效基因, 推测它可能位于 *sh-2* 附近。Xiong 等(1999)利用 Aijiaonante/P16 的 F_2 分离群体, 共检测出 5 个落粒性 QTL, 分别位于水稻第 1、3、4、6 和 8 染色体上。Cai 和 Morishima(2000)利用重组自交系群体在水稻第 1、4、8 和 11 染色体上

收稿日期: 2007-11-06; **接受日期**: 2008-01-24
基金项目: 863 计划(No.2006AA100101)、国家科技支撑计划(No.2006BAD01A01-5)、农业部行业科研专项(No.nyhyzx07-001-006)和江苏省农业科技自主创新基金(No.CX[07]603)
* **通讯作者**。E-mail: clwang@jaas.ac.cn

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t27-401

检测到4个落粒性QTL。沈圣泉等(2004)利用珍汕97B/密阳46所构建的RIL群体，分别在第1、2、3、6、7和11染色体上检测到7个落粒性QTL，并分析了每个QTL的效应大小。许旭明等(2005)利用重组自交系群体，检测到与籼稻落粒性相关的7个QTL，分别位于第1、2、4、6和7染色体上。

染色体片段置换系与其受体亲本之间只存在染色体置换片段的差异，通过染色体片段置换系与其受体亲本之间以及染色体片段置换系之间的性状比较，就可以鉴定出置换片段上的QTL，并可对其遗传效应进行分析(Howell et al., 1996; Ramsay et al., 1996)。由于染色体片段置换系消除了遗传背景的干扰，能将复杂性状分解成简单性状，因此受到国内外研究者的广泛关注(Zhang et al., 2004; Wan et al., 2005)。本研究以93-11、日本晴以及7个染色体片段置换系为材料，采用代换作图法，利用SSR标记对2个水稻落粒性QTL进行了鉴定和初步定位。

1 材料与方法

1.1 实验材料

以籼稻品种93-11为轮回亲本，粳稻品种日本晴为供体，二者杂交获得F_1，F_1再与93-11连续回交至BC_4F_1。用覆盖水稻全基因组的亲本间有多态性的SSR标记检测BC_4F_1单株的基因型，选择基因组内含有少量杂合片段的单株的种子种植得到BC_4F_2群体。通过对BC_4F_2群体分子标记基因型检测获得染色体片段置换系，从中选出7个染色体片段置换系进行水稻落粒性QTL分析。所有实验均在江苏省农业科学院实验农场完成。

1.2 水稻落粒性鉴定

落粒性鉴定按照应存山(1993)介绍的方法进行(略加修改)。在亲本及各置换系群体植株成熟时，用手握住成熟的稻穗，以手指与掌心用力搓揉，连续测定3次，以93-11为易脱粒对照。将水稻的落粒性分为3个等级：难(用力搓揉稻穗不落粒或少落粒，落粒率＜5.5%)、中(5.5%≤落粒率＜25.5%)和易(落粒率≥25.5%)。

1.3 DNA的提取及PCR扩增

DNA的提取按照SDS提取法进行。PCR扩增采用每管20 μL反应体系，包括：0.15 μmol·L^{-1} SSR引物、200 μmol·L^{-1} dNTP、1×PCR反应缓冲液、50-100 ng模板DNA、1 U Taq酶。反应程序为：94°C变性5分钟；94°C 1分钟，55°C 1分钟，72°C 1分钟，循环35次；72°C延伸5分钟。

1.4 分子标记及遗传图谱

参照已发表的分子标记遗传图谱(McCouch et al., 2002)，选用均匀分布于水稻全基因组的亲本间有多态性的SSR标记对染色体片段置换系置换片段进行分析。

1.5 置换片段长度的计算

按照Young和Tanksley(1989)的方法计算置换片段的长度。首先，不考虑2个相邻标记间发生的双交换事件，当相邻标记基因型均为供体亲本基因型时，认为这2个标记之间的区段为供体的置换片段；然后，在每个置换片段两端增加分子标记进行检测，直至亲本间有多态性的标记表现为受体亲本的纯合基因型为止；最后，以置换片段末端标记基因型与相邻的受体纯合基因型标记之间的中点为该末端边界点，两末端边界点之间的距离就是该置换片段的长度。

1.6 水稻落粒性QTL的定位

采用重叠群代换作图法对水稻落粒性QTL进行定位。如果在含有重叠置换片段的不同置换系中都鉴定出落粒性QTL，则认为该QTL位于置换片段的重叠区段上；如果在某个置换系的置换片段上检测出了落粒性QTL，而在与其有部分重叠的另一个置换系中未检测出，则认为该QTL位于这2个置换系非重叠的区段上。

2 结果与分析

2.1 亲本及7个染色体片段置换系的落粒性表现

两亲本的落粒性存在明显差别：籼稻93-11易脱粒，粳稻日本晴较难脱粒。在7个染色体片段置换系中，置换系

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t27-401

1、2、3 和 5 的落粒率均小于 5.5%，与日本晴的落粒性相似，表现难脱粒；置换系 4、6 和 7 的落粒率与受体亲本 93-11 基本相同，表现为易脱粒。

2.2 染色体片段置换系置换片段的分布

选用 153 对 SSR 标记对 93-11 与日本晴之间多态性进行检测，有 104 个标记在亲本间具有多态性，多态率为 68.0%。以轮回亲本 93-11 为对照，利用多态性标记对 7 个染色体片段置换系中来自日本晴的置换片段进行分析(图 1)。经过连续 4 代回交后，各染色体片段置换系的置换片段数显著减少，其中染色体片段置换系 1 中有 3个置换片段来自供体亲本日本晴，染色体片段置换系4中有 2 个置换片段，其它 5 个染色体片段置换系的置换片段均为1个，平均每个染色体片段置换系有1.4个置换片段(图 2)。

2.3 染色体片段置换系中置换片段的长度

如 2.2 节所述，7 个染色体片段置换系在第 1 和 6 染色体上分别有 4 个和 3 个置换片段。为了得到这 7 个置换片段的精确长度，在置换片段区域进一步加密SSR分子标记，对置换片段的基因型及长度进行分析(表 1，图 3)。结果表明，7 个置换片段位于分子标记的区间分别为 RM265 - RM804、RM472 - RM8048、RM472 - RM1387、RM1068 - RM8048、RM6782 - RM340、RM528 - RM494 和 RM3430 - RM412，其长度分别为 23.6、16.5、 6.6、 9.9、10.4、20.2 和 7.1 cM，平均长度为 13.5 cM。

2.4 水稻落粒性QTL *qSH-1-1*和*qSH-6-1*的定位

通过对 7 个置换系的落粒性鉴定，共检测出 2 个主效 QTL。其中 1 个 QTL 位于水稻第 1 染色体上，在置换系 1、2 和 3 中检测到，在置换系 4 中没有检测到；另 1 个 QTL 位于水稻第 6染色体上，在置换系 5中检测到，在置换系 6 和 7 中没有检测到。通过代换作图，*qSH-1-1* 被定位在第 1 染色体 RM472 - RM1387 之间，遗传距离为 6.6 cM 的置换片段上；*qSH-6-1* 被定位在第 6 染色体 RM6782 - RM3430 之间，遗传距离为 4.2 cM 的置换片段上(图 3)。

3 讨论

有关水稻落粒性基因定位方面，早期的研究主要通过落粒性与性状标记的连锁分析将其定位在染色体的不同区

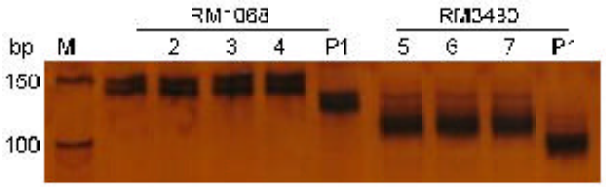


图 1 SSR标记 RM1068 和 RM3430 在染色体片段置换系中的扩增带型

P1: 93-11; 1-7: 染色体片段置换系; M: DNA 分子标记

Figure 1 The band patterns of RM1068 and RM3430 in CSSLs

P1: 93-11; 1-7: Chromosome segment substitution lines; M: DNA marker

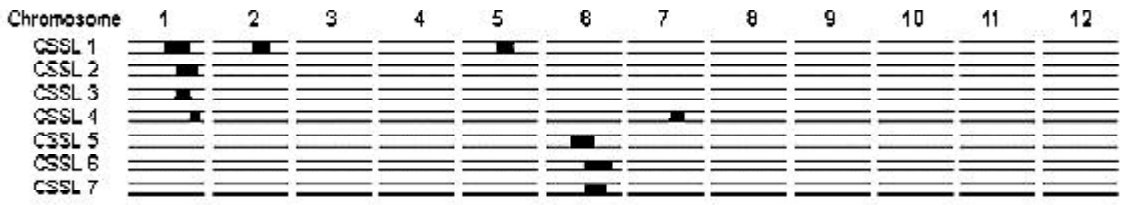


图 2 7个染色体片段置换系中置换片段在水稻 12 条染色体上的分布

图中涂黑部分表示置换片段，空白部分表示轮回亲本 93-11的基因组

Figure 2 Distribution of introgressed segments in seven CSSLs on rice chromosomes

Black parts refer to introgressed segments, and blank parts refer to recurrent parent (93-11) genome

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t27-401

表 1 染色体片段置换系中置换片段的分子标记基因型

Table 1 Genotypes of molecular markers of substitution segment in CSSLs

CSSLs	Chromo-some	Genotypes of molecular markers in CSSLs' populations											
		RM265	RM5389	RM472	RM1068	RM1387	RM8048	RM6782	RM528	RM3430	RM340	RM412	RM494
1	1	I	J	J	J	J	I	I	I	I	I	I	I
2	1	I	I	I	J	J	I	I	I	I	I	I	I
3	1	I	I	I	J	I	I	I	I	I	I	I	I
4	1	I	I	I	I	J	I	I	I	I	I	I	I
5	6	I	I	I	I	I	I	I	J	J	I	I	I
6	6	I	I	I	I	I	I	I	I	J	J	J	J
7	6	I	I	I	I	I	I	I	I	I	J	I	I

CSSLs: **染色体片段置换系**; I: 93-11 **的基因型**; J: **日本晴的基因型**

CSSLs: Chromosome segment substitution lines; I: Genotype of 93-11; J: Genotype of Nipponbare

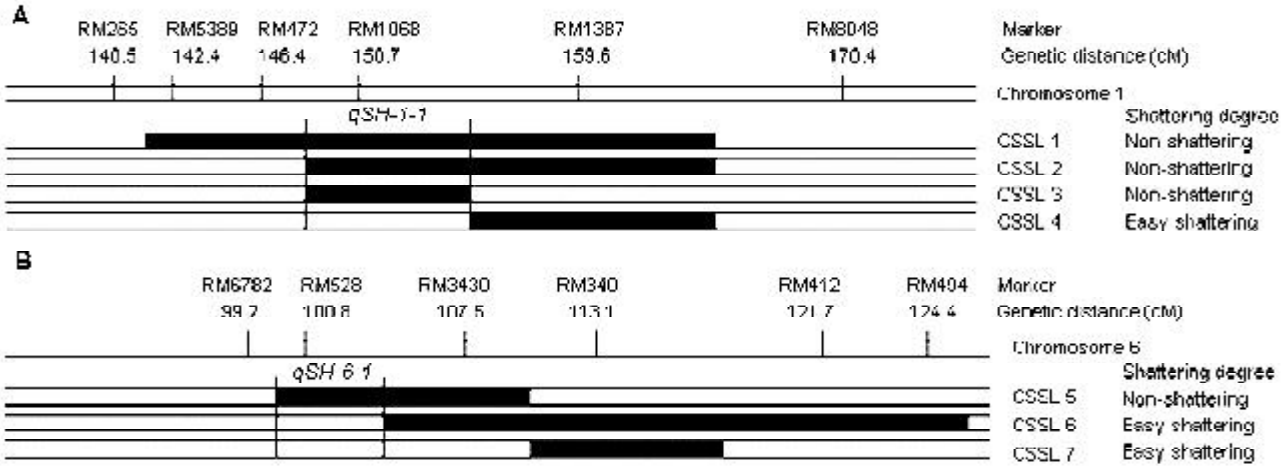


图 3 水稻落粒性基因 *qSH-1-1*(A)和 *qSH-6-1*(B)的代换作图

Figure 3 Substitution mapping of *qSH-1-1* **(A)** and *qSH-6-1* **(B)** for seed shattering on rice chromosomes

段上。其中 *sh-1*、*sh-2* 和 *sh-3* 就是利用与其紧密连锁的性状标记得以定位的(Fukuta et al., 1996)**。随着分子标记的产生和遗传图谱的发展, 利用分子标记定位水稻落粒性基因已有较多报道**(**李平等**, 1996; Sobrizal et al., 1999; Ji et al., 2006)**。上述研究多采用性状连锁或** RFLP **标记, 利用** SSR **标记定位水稻落粒性基因的报道较少。本研究利用** SSR **标记将来自日本晴的难落粒基因 *qSH-1-1* 定位在第** 1 **染色体** RM472-RM1387 **之间遗传距离为** 6.6 cM **的区段上, 将 *qSH-6-1* 定位在第** 6 **染色体** RM6782-RM3430 **之间遗传距离为** 4.2 cM **的区段上, 这** 2 **个落粒性** QTL **的鉴定及定位为其下一步的精细定位、图位克隆及分子标记辅助选择奠定了基础。**

水稻落粒性的鉴定有多种方法(应存山, 1993; Li et al., 2006; Ji et al., 2006), **各有特色。下落法和揉搓法操作简单且快捷, 但有时会受到用力不均等人为因素的干扰。借助仪器或其它工具对水稻落粒率进行测量的方法, 虽然在一定程度上消除了人为主观因素引起的误差, 但操作相对繁琐。本研究认为, 对于由数量性状基因座引起的效应较小的落粒性** 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, 因此在应存山**(1993) **所用方法的基础上略加修改, 采用用力揉搓的方法可以非常快速地区分难易** 2 **个不同的质量性状, 该法在利用大群体精细定位落粒性基因时尤为适用。**

代换作图法是 QTL **定位的重要方法**(Wissuwa et al., 2002)**。以代换系为实验材料, 应用图位克隆法对 *Hd1*、*Hd6* 和 *Hd3a* 等抽穗期** QTL **已进行了分子克隆**

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t27-401

(Yano et al., 2000; Takahashi et al., 2001; Kojima et al., 2002)。由于染色体片段置换系只在个别区段与受体亲本有差异, 所有与受体亲本不同的性状都可能和这些区段有关。因此, 染色体片段置换系是代换作图定位 QTL 的优良材料。本研究通过鉴定 7 个染色体片段置换系的落粒性, 利用SSR标记置换片段进行基因型和长度分析并采用代换作图的方法, 将落粒性基因 *qSH-1-1* 定位在水稻第 1 染色体, 将落粒性基因 *qSH-6-1* 定位在水稻第 6 染色体。综合前人研究结果, 至今在水稻第 6 染色体与本研究相近的区域还没有发现水稻落粒性主效 QTL。因此本研究定位的 *qSH-6-1* 是一个新发现的落粒性基因。Konishi 等(2006)将水稻落粒性基因 *qSH1* 精细定位在第 1 染色体 RFLP 标记 C283 和 R3265 之间。通过 blast 比对, 将这 2 个 RFLP 标记及本研究用到的 SSR 标记 RM1068 整合到水稻物理图谱上, 发现 RM1068 与 C283 和 R3265 的物理距离很近, 推测本研究定位的 *qSH-1-1* 与 *qSH1* 可能为来自日本晴的同一个落粒性基因。有关 *qSH-1-1* 和 *qSH-6-1* 的作用方式、精细定位及图位克隆等还有待进一步研究。

参考文献

李平, 陆朝福, 周开达, 陈英, 李仁端, 朱立煌 (1996). 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. 中国科学(C 辑) **26**, 257-263.

沈圣泉, 庄杰云, 王淑珍, 包劲松, 郑康乐, 苏庆尧, 夏英武 (2004). 籼稻落粒性 QTL 定位与环境互作效应检测. 分子植物育种 **2**, 627-632.

许旭明, 周元昌, 吴为人 (2005). 利用分子标记定位籼稻落粒性 QTL. 福建农林大学学报 **34**, 344-348.

应存山 (1993). 中国稻作资源. 北京：中国农业科技出版社. pp. 164-185.

Cai HW, Morishima H (2000). Genomic regions affecting seed shattering and seed dormancy in rice. *Theor Appl Genet* **100**, 840-846.

Fukuta Y, Harushima Y, Yano M (1996). Using quantitative trait locus analysis for studying genetic regulation of shattering. In: Khush GS ed. Rice Genetics III. Proceeding of the 3rd International Rice Genetic symposium. Manila, Philippines: IRRI. pp. 657-662.

Howell PM, Lydiate DJ, Marshall DF (1996). Towards developing intervarietal substitution lines in *Brassica napus* using marker-assisted selection. *Genome* **39**, 348-358.

Ji HS, Chu SH, Jiang WZ, Cho YI, Hahn JH, Eun MY, McCouch SR, Koh HJ (2006). Characterization and mapping of a shattering mutant in rice that corresponds to a block of domestication genes. *Genetics* **173**, 995-1005.

Kinoshita T (1995). Report of the committee on gene symbolization. *Rice Genet Newsl* **12**, 9-153.

Kojima S, Takahashi Y, Kobayashi Y, Monna L, Sasaki T, Araki T, Yano M (2002). *Hd3a*, a rice ortholog of the Arabidopsis *FT* gene, promotes transition to flowering downstream of *Hd1* under short-day conditions. *Plant Cell Physiol* **43**, 1096-1105.

Konishi S, Izawa T, Lin SY, Ebana K, Fukuta Y, Sasaki T, Yano M (2006). An SNP caused loss of seed shattering during rice domestication. *Science* **312**, 1392-1396.

Li CB, Zhou AL, Sang T (2006). Rice domestication by reducing shattering. *Science* **311**, 1936-1939.

Lin ZW, Griffith ME, Li XR, Zhu ZF, Tan LB, Fu YC, Zhang WX, Wang XK, Xie DX, Sun CQ (2007). Origin of seed shattering in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* **226**, 11-20.

McCouch SR, Teytelman L, Xu YB, Lobos KB, Clare K, Walton M, Fu B, Maghirang R, Li ZK, Xing YZ, Zhang QF, Kono I, Yano M, Fjellstrom R, DeClerck G, Schneider D, Cartinhour S, Ware D, Stein L (2002). Development and mapping of 2 240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res* **9**, 199-207.

Ramsay LD, Jennings DE, Bohuon EJR, Arthur AE, Lydiate DJ, Kearsey MJ, Marshall DF (1996). The construction of a substitution library of recombinant backcross lines in *Brassica oleracea* for the precision mapping of quantitative trait loci. *Genome* **39**, 558-567.

Sobrizal K, Ikeda P, Sanchez L, Yoshimura A (1999). RFLP mapping of a seed shattering gene on chromosome 4 in rice. *Rice Genet Newsl* **16**, 74-75.

Takahashi T, Shomura A, Sasaki T, Yano M (2001). *Hd6*, a rice quantitative trait locus involved in photoperiod sensitivity, encodes the α subunit of protein kinase CK2. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 7922-7927.

Wan XY, Wan JM, Weng JF, Jiang L, Bi JC, Wang CM, Zhai HQ (2005). Stability of QTLs for rice grain dimension and endosperm chalkiness characteristics across eight environments. *Theor Appl Genet* **110**, 1334-1346.

Wissuwa M, Wegner J, Ae N, Yano M (2002). Substitution

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t27-401

mapping of *Pupl*: a major QTL increasing phosphorus uptake of rice from aphosphorus-deficient soil. *Theor Appl Genet* **105**, 890-897.

Xiong LZ, Liu KD, Dai XK, Xu CG, Zhang QF (1999). Identification of genetic factors controlling domestication-related traits of rice using an F_2 population of a cross between *Oryza sativa* and *O. rufipogon*. *Theor Appl Genet* **98**, 243-251.

Yano M, Katayose Y, Ashikari M, Yamanouchi U, Monna L, Fuse T, Baba T, Yamamoto K, Umehara Y, Nagamura Y, Sasaki T (2000). *Hdl*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the Arabidopsis flowering time gene *CONSTANS*. *Plant Cell* **12**, 2473-2483.

Young ND, Tanksley SD (1989). Restriction fragment length polymorphism maps and the concept of graphical genotypes. *Theor Appl Genet* **77**, 95-101.

Zhang GQ, Zeng RZ, Zhang ZM, Ding XH, Li WT, Liu GM, He FH, Tulukdar A, Huang CF, Xi ZY, Qin LJ, Shi JQ, Zhao FM, Feng MJ, Shan ZL, Chen L, Guo XQ, Zhu HT, Lu YG (2004). The construction of a library of single segment substitution lines in rice (*Oryza sativa* L.). *Rice Genet Newsl* **21**, 85-87.

Substitution Mapping of Quantitative Trait Loci for Seed Shattering in Chromosome Segment Substitution Lines of Rice (*Oryza sativa* L.)

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

Jiangsu High Quality Rice Research and Development Center, Institute of Food Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China

Abstract Seed shattering plays an important role in rice breeding. Using an indica variety 93-11, a japonica variety Nipponbare and seven chromosome segment substitution lines (CSSLs) with a genetic background of 93-11 introgressed from Nipponbare as the materials, we investigated seed shattering with 153 simple sequence repeat (SSR) markers on rice chromosomes, the introgressed segment and the quantitative trait loci (QTL) for seed shattering. Among the SSR markers, 104 displayed polymorphism bands between two parents, and the rate of polymorphism was 68.0%; among the CSSLs, the seed shattering of four was the same as for Nipponbare, and that of the other three was the same as for 93-11. Four CSSLs had four introgressed segments on rice chromosome 1 and three had three introgressed segments on rice chromosome 6. The genetic distance for the seven introgressed segments was 23.6, 16.5, 6.6, 9.9, 10.4, 20.2 and 7.1 cM, respectively; *qSH-1-1* was mapped in the region of RM472-RM1387, with 6.6 cM genetic distance on rice chromosome 1. *qSH-6-1* was mapped in the region of RM6782-RM3430, with 4.2 cM genetic distance on rice chromosome 6. The QTL for seed shattering in rice can be mapped primarily by use of CSSLs. Mapping the QTL has laid a foundation for fine mapping and cloning the QTL and molecular marker-assisted selection of appearance quality in rice.

Key words chromosome segment substitution lines, introgressed segment, rice, seed shattering, substitution mapping

Zhu WY, Yang DW, Lin J, Zhao L, Zhang YD, Zhu Z, Chen T, Wang CL (2008). Substitution mapping of quantitative trait loci for seed shattering in chromosome segment substitution lines of rice (*Oryza sativa* L.). *Chin Bull Bot* **25**, 443–448.

* Author for correspondence. E-mail: clwang@jaas.ac.cn

(责任编辑: 孙冬花)

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t27-401