

海南杂草稻的落粒基因 *SH4* 和 *qSH1* 落粒 SNP 位点的序列分析

夏启玉^{1,2}, 孔 华^{1,2}, 邹玲敏¹, 吴清娟¹, 姜晓琦^{1,2}, 贺萍萍^{1,2}, 曹 扬^{1,2},
张雨良^{1,2*}, 赵 辉^{1,2*}

1. 中国热带农业科学院三亚研究院, 海南三亚 572025; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所/海南省南繁生物安全与分子育种重点实验室, 海南海口 571101

摘 要: 种子的落粒性是导致杂草稻在水稻田不断自我繁衍和扩散的主要原因。*SH4* 和 *qSH1* 基因被认为是控制水稻种子落粒的主效基因, 本研究旨在测定海南杂草稻的 *SH4* 和 *qSH1* 的落粒 SNP 位点的基因型。本研究以临高县和崖州区水稻田中的杂草稻为研究材料, 采集 13 块水稻田中的杂草稻及其对应栽培稻种子, 从中选择 144 株表型有差异的杂草稻种子及 13 株对应栽培稻种子进行萌发种植, 测定它们的种子落粒率, 并对 *SH4* 和 *qSH1* 的落粒 SNP 位点进行 PCR 扩增及序列分析。结果表明: *SH4* 基因的落粒 SNP 位点为野生落粒型 G 的杂草稻有 77 株, 突变难落粒型 T 的杂草稻有 48 株, 杂合型 G/T 的有 19 株; 所有栽培稻的 *SH4* 的落粒 SNP 位点均为 T。落粒率测定发现, *SH4* 基因的落粒 SNP 位点为 G 和 G/T 的 96 株杂草稻都具有极高的落粒率, 而 *SH4* 基因的落粒 SNP 位点为 T 的 48 株杂草稻中, 40 株为中度落粒率, 8 株为低落粒率。所有杂草稻和栽培稻样品的 *qSH1* 落粒 SNP 位点均为野生落粒型 G。以上结果表明, 海南杂草稻和栽培稻之间的落粒率差异与 *qSH1* 基因的落粒 SNP 位点无关, 而与 *SH4* 基因的落粒 SNP 位点显著相关; *SH4* 基因的落粒 SNP 位点均为 T 型的杂草稻和栽培稻间的落粒率差异可能由其他未知的基因或位点的差异导致。本研究结果可为海南杂草稻种子落粒的分子机制提供分子依据。

关键词: 杂草稻; *SH4*; *qSH1*; 落粒 SNP 位点; 序列分析

中图分类号: S511 文献标志码: A

Sequence Analysis of Seed Shattering SNP Locus at *SH4* and *qSH1* Genes of Weedy Rice in Hainan

XIA Qiyu^{1,2}, KONG Hua^{1,2}, ZOU Lingmin¹, WU Qingjuan¹, JIANG Xiaoqi^{1,2}, HE Pingping^{1,2}, CAO Yang^{1,2},
ZHANG Yuliang^{1,2*}, ZHAO Hui^{1,2*}

1. Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Sanya, Hainan 572025, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Hainan Key Laboratory for Biosafety Monitoring and Molecular Breeding in Off-season Reproduction Regions, Haikou, Hainan 571101, China

Abstract: Seed shattering is the main reason for the continuous self-reproduction and spread of weedy rice in rice fields. Genes *SH4* and *qSH1* are considered to be the main genes controlling rice seed shattering. The aim of this study was to determine the genotype of the seed shattering SNP locus at *SH4* and *qSH1* of weedy rice in Hainan. Using weedy rice from rice fields in Lingao and Yazhou District as research materials, this study collected weedy rice and corresponding cultivated rice seeds from 13 rice fields. 144 Weedy rice seeds with different phenotypes and 13 corresponding cultivated rice seeds were selected for germination and planting, and the seed shattering rates were measured. PCR amplification and sequence analysis were performed on the seed shattering SNP locus at *SH4* and *qSH1*. The results showed

收稿日期 2025-03-18; 接受日期 2025-03-30

基金项目 海南省自然科学基金面上项目 (No. 322MS127); 国家自然科学基金地区科学基金项目 (No. 32460527)。

作者简介 夏启玉 (1983—), 女, 硕士, 副研究员, 研究方向: 热带及南繁作物育种。*通信作者 (Corresponding author): 张雨良 (ZHANG Yuliang), E-mail: zhangyuliang@itbb.org.cn; 赵 辉 (ZHAO Hui), E-mail: zhaohui@itbb.org.cn。

that there were 77 wild type (G) weedy rice plants, 48 mutant type (T) weedy rice plants, and 19 heterozygous type (G/T) weedy rice plants with the locus at *SH4* gene; Seed shattering SNP locus of *SH4* gene in all cultivated rice samples were T. The determination of seed shattering rate found that 96 weedy rice samples with G and G/T genotype seed shattering SNP at *SH4* gene had extremely high seed shattering rates, while among 48 weedy rice samples with T genotype seed shattering SNP locus at *SH4* gene, 40 weedy rice samples had moderate seed shattering rates and 8 weedy rice samples had low seed shattering rates. Seed shattering SNP locus of *qSH1* in all weedy rice and cultivated rice samples were wild-type seed shattering G genotype. The above results indicate that the difference in seed shattering rate between Hainan weedy rice and cultivated rice is not related to the seed shattering SNP locus at *qSH1* gene, but significantly correlated with the seed shattering SNP locus at *SH4* gene. The difference in seed shattering rate between weedy rice and cultivated rice with T genotype SNP locus at *SH4* gene may be caused by differences in other unknown genes or locus. This study would provide a molecular basis for the seed shattering mechanism of weedy rice in Hainan.

Keywords: weedy rice; *SH4*; *qSH1*; seed shattering SNP locus; sequence analysis

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.07.006

杂草稻 (*Oryza sativa* f. *spontanea*) 是一类在水稻田不断自生且具有很强入侵性和环境可塑性的水稻变种或变型, 具有杂草特性, 早熟、易落粒、多数红米粒, 是水田中仅次于稗草、千金子的第三大恶性杂草^[1]。杂草稻有与野生稻一样的落粒和休眠性状, 使其在稻田中持续繁衍生存并入侵栽培稻田, 难以治理。杂草稻与栽培稻在外形上极难区分, 它往往与栽培稻相伴而生, 具有较强生物竞争性, 与栽培稻竞争光、水分和营养, 严重影响水稻产量和质量。

落粒性强几乎是所有杂草稻共有的特征。杂草稻的种子落粒性是杂草稻入侵和扩散的最主要原因。*SH4*^[2]和 *qSH1*^[3]是最早被鉴定的控制水稻落粒性状的基因。由于水稻不同品种的落粒性状差异较大, 研究人员又陆续发现了多个与水稻落粒相关的基因 (*OsCPL1*^[4]、*Ossh1*^[5]、*SHAT1*^[6]、*SH5*^[7]、*OsGRF4*^[8]、*SH6*^[9]、*OSH15*^[10]、*SNB*^[11]、*SH11*^[12]和 *RHS1*^[13])。

目前研究认为, *SH4* 和 *qSH1* 基因是控制水稻落粒性状的主效基因。2006 年, LI 等^[2]利用籼稻品种和普通野生稻作为亲本得到 F₂ 群体, 在水稻第 4 染色体发现了 1 个贡献率为 69% 的主效 QTL 位点 *SH4*, 该基因编码 1 个与 Myb3 同源的未知功能转录因子, 其第 1 个外显子中存在 1 个单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphysim, SNP) 位点, 即第 237 个核苷酸替换 (G→T) 导致了 1 个氨基酸替换 (赖氨酸→天冬酰胺), 使得离层不能正常发育, 从而导致表型从落粒变为不落粒。来自野生稻的 *SH4* 等位基因是显性的。KONISHI 等^[3]也发现了 1 个对籼梗杂交 F₂ 代的落粒性贡献率极高的主效基因 *qSH1*, 能解释籼稻品

种 Kasalath 与粳稻品种日本晴之间 68.6% 的表型变异。*qSH1* 编码 1 个 BEL1 型同源盒的转录因子, 其上游 12 kb 的 5' 端调节区存在一个 SNP, Kasalath 中为 G, 日本晴中为 T。该 SNP (G→T) 引起了功能的改变, 导致离层无法形成, 进而导致其落粒性丧失。该 SNP 位点正好位于 RY 重复序列, RY 重复序列是 ABI3 型转录因子的结合位点, Kasalath 和日本晴在该位点上的差异可能影响了转录因子与 RY 重复序列的结合, 造成 *qSH1* 表达部位的差异, 从而影响离层的形成, 引起落粒性的差异。

海南一直都有杂草稻的发生, 九十年代就有在海南发现零星分布的杂草稻的报道^[14], 邵菁^[15]在海南省不同地区采集到了 11 个杂草稻种群。近几年来, 本课题组也在三亚的水稻研究基地发现了杂草稻的发生, 因此本研究对海南全省的水稻种植区域的水稻田进行了杂草稻调查, 在临高发现了一处大规模的杂草稻发生。本研究对三亚和临高采集到的杂草稻种子进行了种植收获, 鉴定它们的 *SH4* 和 *qSH1* 基因的落粒功能 SNP 位点的基因型和种子落粒率, 为研究海南杂草稻的种子落粒的分子机制提供分子依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料采集 通过水稻植株的分蘖角度、种子的落粒性、颖壳颜色和果皮颜色等来采集杂草稻种子。杂草稻种子材料 WR1~WR12 为 2023 年采自海南省临高县临城镇临美路左右两侧的 12 块农户水稻田; 材料 WR13 为 2023 年采自海南省三亚市崖州区的 1 块水稻科研田。同时采集每块

稻田的栽培稻的种子，命名为 CV1~CV13。

1.1.2 试剂 植物 DNA 快提试剂盒（RaPure Plant DNA Mini Kit D3187）购自广州美基生物科技有限公司；2× Super pfx Master Mix（Dye）、2× Taq Plus Master Mix（Dye）和 SuperStain 安全型核酸染料均购自江苏康为世纪生物科技股份有限公司；其他试剂均为国产分析纯。引物合成及 PCR 产物测序均由海南楠山生物技术有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 杂草稻材料的种植 从采集的杂草稻种子中选择一些表型不同的种子在培养皿中进行萌发，对应的栽培稻种子也进行萌发，1 周后移栽到花盆里并于 30 ℃ 温室种植。其中，WR1 共 14 株，WR2 共 10 株，WR3 共 8 株，WR4 共 9 株，WR5 共 16 株，WR6 共 9 株，WR7 共 8 株，WR8 共 12 株，WR9 共 11 株，WR10 共 13 株，WR11 共 14 株，WR12 共 13 株，WR13 共 7 株，杂草稻共 144 株，栽培稻 CV1~CV13 均只种 1 株，共 13 株。

1.2.2 DNA 提取 待温室的 144 株杂草稻及 13 株栽培稻生长至约 20 cm 高时，剪取约 8 cm 的叶片，加入液氮研磨后，采用 RaPure Plant DNA Mini Kit 进行 DNA 提取，采用琼脂糖电泳检测，并用超微量紫外分光光度计测定提取样品 DNA 的浓度和纯度，浓度在 10 ng/μL 以上，且 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.7~1.9 之间的样品 DNA 视为合格，否则重新剪取叶片提取基因组 DNA。将提取的所有样品的 DNA 溶液放置于-20 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.3 PCR 扩增及序列分析 根据 Phytozome13 植物基因组数据库（<https://phytozome-next.jgi.doe.gov>）中水稻模式品种日本晴的 *SH4* 基因（LOC_Os04g57530）的基因组序列，在 *SH4* 基因的落粒 SNP 位点的上、下游 200 bp 范围内的基因组序列上设计多对 PCR 鉴定引物，经 PCR 扩增筛选合适的引物，对 PCR 产物进行 2% 的琼脂糖凝胶电泳，根据 PCR 产物的目的条带的亮度和特异性，选择 PCR 产物送测序公司测序。根据测序能否成功及测序的峰图质量筛选出 1 对较好的引物对 SH4-F1 和 SH4-R2，并使用反向引物 SH4-R2 作为测序引物。*qSH1*（LOC_Os01g62920）基因的上游调控区的落粒 SNP 位点的 PCR 鉴定引物则参照 NUNES 等^[16]报道的引物 qSH1-TK-F 和 qSH1-TK-R，并使用正向引物 qSH1-TK-F 作为测序引物。引物序列及预期片段大小见表 1。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primers used in this study

基因 Gene	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	片段大小 Fragment size/bp
SH4	SH4-F1	5'-ACTACCGCAAGGGGAAGT GGAC-3'	192
	SH4-R2	5'-GGCAGCCGTTCTTCCAGC AGT-3'	
qSH1	qSH1-TK-F	5'-GTAACCTTTCTCTGGCACAG C-3'	510
	qSH1-TK-R	5'-GCGGTAGCACACTAGCAT GA-3'	

SH4 基因的落粒 SNP 位点的 PCR 扩增使用 2×Super pfx Master Mix（Dye），*qSH1* 基因的落粒 SNP 位点的 PCR 扩增使用 2×Taq Plus Master Mix（Dye）。*SH4* 基因和 *qSH1* 基因的反应体系（25 μL）均为：灭菌双蒸水 9.5 μL，2×Super pfx Master Mix 12.5 μL，正反向引物（10 μmol/L）各 1 μL，模板 DNA 1 μL。*SH4* 基因的 PCR 扩增反应程序为：95 ℃ 预变性 5 min；95 ℃ 30 s，60 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，共 35 个循环；72 ℃ 延伸 7 min。*qSH1* 基因的 PCR 扩增反应程序为：94 ℃ 预变性 5 min；94 ℃ 30 s，58 ℃ 30 s，72 ℃ 45 s，共 35 个循环；72 ℃ 延伸 5 min。将 *SH4* 基因和 *qSH1* 基因的 PCR 产物在 2% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测，扩增成功的产物送测序公司测序，扩增失败的样品重新进行 PCR 扩增并测序。查看测序成功的序列峰图是否清晰明确，并使用 DNAMAN 软件将 *SH4* 基因和 *qSH1* 基因的测序序列分别与日本晴的 *SH4* 和 *qSH1* 目标序列进行比对分析。

1.2.4 杂草稻和栽培稻种子落粒率的测定 待 157 株杂草稻及栽培稻成熟后，每株收集 10 个稻穗测量种子的落粒率，取 10 个穗子的落粒率的平均值。由于杂草稻的落粒性较高，无法使用拉力计测量落粒性，故采用重力法测量落粒率。落粒率的测定方法为：将杂草稻及栽培稻的穗子于 2 m 高处自由落下，统计脱落粒数和未脱落粒数，空壳不计数，落粒率=（即落粒数/总粒数）×100%。

2 结果与分析

2.1 SH4 落粒 SNP 位点的序列分析

将 144 株杂草稻和 13 株栽培稻的 *SH4* 落粒 SNP 位点的测序序列与日本晴的 *SH4* 目标序列进行比对，并查看所有测序序列峰图的落粒 SNP 位点是否存在双峰，若出现双峰，说明该位点为杂

合型。全部样品的测序序列比对及峰图结果表明，144 株杂草稻中，落粒 SNP 位点处为野生落粒 G 型的杂草稻有 77 株，落粒 SNP 位点处为突变难落粒 T 型的杂草稻有 48 株，落粒 SNP 位点处为落粒/难落粒 G/T 杂合型的有 19 株；所有栽培稻的 *SH4* 的落粒 SNP 位点均为难落粒 T 型。

此外，*SH4* 基因落粒 SNP 位点的上游 1 bp 处的碱基在野生稻和栽培稻中均为 A，尚未见有其他类型碱基的报道。本研究首次发现，部分落粒 SNP 位点为 T 的杂草稻中的该位点碱基由 A 突变为 G，且存在 A/G 杂合型，该位点突变后 *SH4* 基因的第 79 个氨基酸由天冬酰胺变为丝氨酸，将该 SNP

位点命名为 SNP2。144 株海南的杂草稻中，SNP2 为 A 型的杂草稻有 119 株，G 型的有 15 株，A/G 杂合型的有 10 株，所有栽培稻均为 A 型。

结合 *SH4* 基因的 SNP2 位点和落粒 SNP 位点的基因型，可以将海南 144 株杂草稻的 *SH4* 基因分为 6 种基因型：A G、A T、G T、A G/T、A/G T 和 A/G G/T，测序峰图见图 1。其中，A G/T 是 A G 和 A T 的杂合型，A/G T 是 A T 和 G T 的杂合型，A/G G/T 是 A G 和 G T 的杂合型。144 株杂草稻中，A G 型最多，有 77 株杂草稻，其次是 A T 型，A/G T 型最少，只有 3 株杂草稻（表 2）。13 株栽培稻均为 A T 型。在 *SH4* 基因的 6 种基因

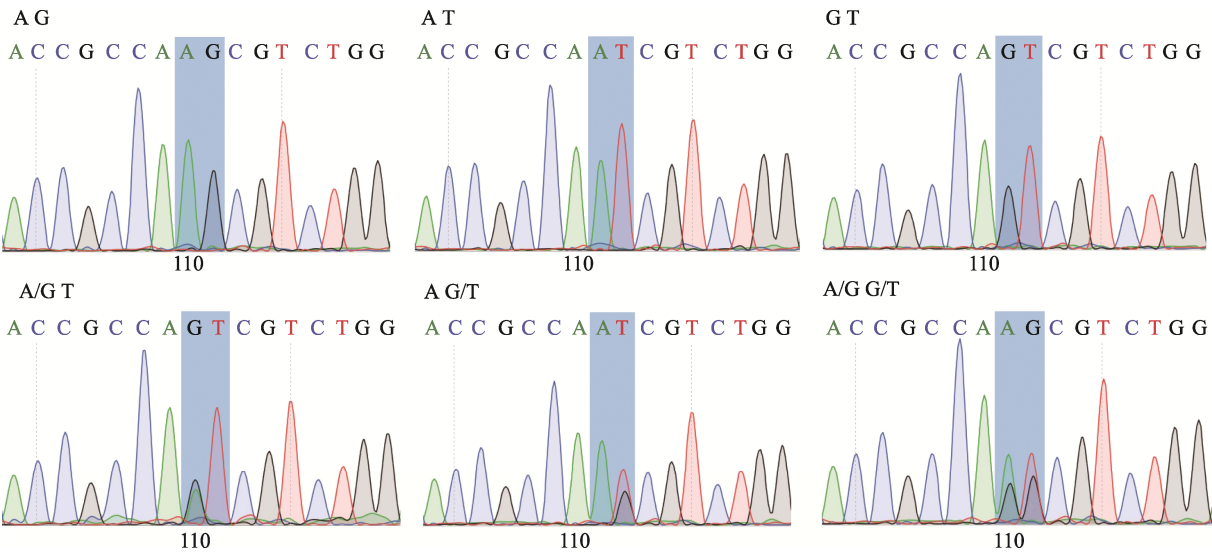


图 1 *SH4* 基因的 6 种 SNP 基因型的测序峰图

Fig. 1 Sequencing peak maps of six SNP genotypes at *SH4* gene

表 2 海南杂草稻 *SH4* 基因的 SNP 基因型类型分布

Tab. 2 SNP genotype distribution of *SH4* of weedy rice in Hainan

群体 Population	杂草稻数量 Number of weedy rice	<i>SH4</i> 基因的 SNP 基因型 SNP genotypes at <i>SH4</i> gene					
		A G	A T	G T	A G/T	A/G T	A/G G/T
WR1	14	9	3	0	1	1	0
WR2	10	10	0	0	0	0	0
WR3	8	8	0	0	0	0	0
WR4	9	2	6	0	1	0	0
WR5	16	7	4	2	3	0	0
WR6	9	3	0	3	1	0	2
WR7	8	3	3	1	0	0	1
WR8	12	1	5	1	3	2	0
WR9	11	7	1	0	2	0	1
WR10	13	13	0	0	0	0	0
WR11	14	13	0	0	0	0	1
WR12	13	1	1	8	1	0	2
WR13	7	0	7	0	0	0	0
Total	144	77	30	15	12	3	7

型中, 只有落粒 SNP 位点为 T 型时, SNP2 位点才有突变的 G 型, 这说明 SNP2 位点的突变只在落粒 SNP 位点为 T 的杂草稻中发生, 表明落粒 SNP2 位点的突变要晚于落粒 SNP 位点的突变。

2.2 *qSH1* 上游调控区落粒 SNP 位点的序列分析

将 144 株杂草稻和 13 株栽培稻的 *qSH1* 落粒 SNP 位点的测序序列与日本晴的 *qSH1* 目标序列进行比对, 并查看所有测序序列峰图的落粒 SNP 位点是否存在双峰, 若出现双峰, 说明该位点为杂合型。全部样品的测序序列比对及峰图结果表明, 144 株杂草稻和 13 株栽培稻的 *qSH1* 的落粒 SNP 位点均为易落粒型 G, 与籼稻的基因型一致, 说明海南的杂草稻之间及其与对应栽培稻的落粒性差异与 *qSH1* 的 SNP 位点无关。

此外, 海南杂草稻 *qSH1* 落粒 SNP 位点的测序结果发现, 在 *qSH1* 的落粒 SNP 位点的下游 147 bp 和 151 bp 处还有 2 个 SNP 位点, 将 2 个位点分别命名为 SNP2 和 SNP3。SNP2 在野生稻 W1943 和日本晴中均为 A, 而本研究大部分海南杂草稻中该位点为 G。144 株海南杂草稻中, SNP2 为 A 型的杂草稻只有 5 株, G 型的有 129 株, A/G 杂合型的有 10 株。13 株栽培稻中有 2 株为 A 型, 2 株为 G 型, 其余均为 A/G 杂合型。SNP3 在野生稻 W1943 和日本晴中均为 G, 而本研究大部分海南杂草稻中该位点为 T。144 株海南杂草稻中, SNP3 为 G 型的杂草稻只有 11 株, T 型的有 116 株, G/T 杂合型的有 17 株, 而 13 株栽培稻均为 G 型。

结合 *qSH1* 基因的 SNP2 位点和落粒 SNP3 位点的基因型, 可以将海南 144 株杂草稻的 *qSH1* 基因分为 6 种基因型: AG、GG、GT、GG/T、A/GG 和 A/GG/T, 测序峰图见图 2。其中, GG/T 是 GG 和 GT 的杂合型, A/GG 是 AG 和 GG 的杂合型, A/GG/T 是 AG 和 GT 的杂合型。144 株杂草稻中, 基因 GT 最多, 有 116 株杂草稻, 其余的基因型都较少, 基因型 A/GG 最少, 只有 2 株杂草稻 (表 3)。13 株栽培稻中, 有 9 株为 A/GG 杂合型, 2 株为 GG 型, 2 株为 AG 型, 未见 GT 型。在 *qSH1* 基因的 6 种基因型中, 只有落粒 SNP2 位点为 G 型时, SNP3 位点才有突变的 T 型, 这表明 SNP3 位点的突变只在落粒 SNP2 位点为 G 的杂草稻中发生, 表明落粒 SNP3 位点的突变要晚于 SNP2 位点的突变。

2.3 杂草稻及栽培稻种子落粒率的测量

对 144 株杂草稻和对应的栽培稻进行种子落粒率的测量, 大部分杂草稻的种子落粒率都极高, 栽培稻的种子落粒率较低。本研究中将杂草稻的种子落粒率分为 3 个等级: 低 (落粒率<30%)、中 (30%≤落粒率≤75%)、高 (落粒率>75%)。其中, 落粒率高的有 96 株, 落粒率中等的有 40 株, 落粒率低的有 8 株, 13 株栽培稻都为低落粒率 (图 3, 表 4)。13 个杂草稻群体中, 不同群体的杂草稻的种子落粒率也不同, 其中, WR2、WR3、WR10 和 WR11 全部为高落粒率的杂草稻, WR1 和 WR9 主要为高落粒率的杂草稻, WR4-WR8 和 WR12 中, 高落粒率和中落粒

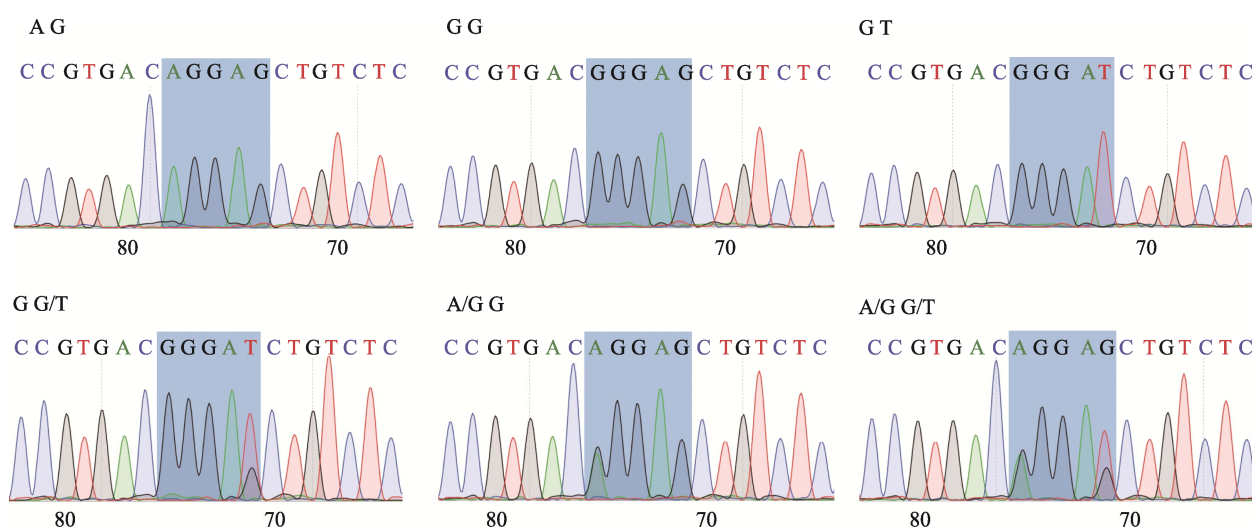
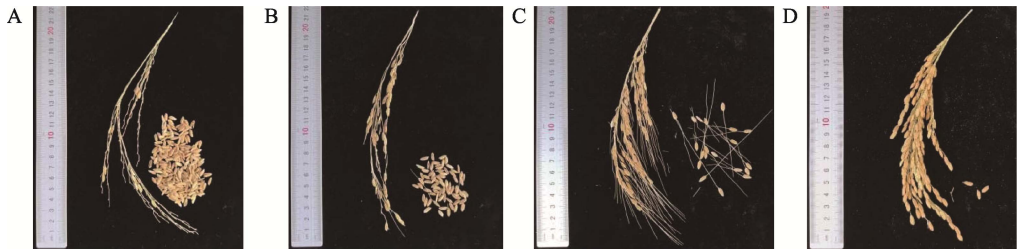


图 2 *qSH1* 基因的 6 种 SNP 基因型的测序峰图

Fig. 2 Sequencing peak maps of six SNP genotypes at *qSH1* gene

表 3 海南杂草稻 *qSH1* 基因的 SNP 基因型类型分布
Tab. 3 SNP genotype distribution of *qSH1* of weedy rice in Hainan

群体 Population	杂草稻数量 Number of weedy rice	<i>qSH1</i> 基因的 SNP 基因型 SNP genotypes at <i>qSH1</i> gene					
		A G	G G	G T	G G/T	A/G G	A/G G/T
WR1	14	0	0	8	5	0	1
WR2	10	0	0	10	0	0	0
WR3	8	0	0	8	0	0	0
WR4	9	1	3	3	0	2	0
WR5	16	1	0	12	1	0	2
WR6	9	1	0	6	0	0	2
WR7	8	0	0	8	0	0	0
WR8	12	0	0	8	3	0	1
WR9	11	2	0	9	0	0	0
WR10	13	0	0	12	0	0	1
WR11	14	0	0	14	0	0	0
WR12	13	0	1	11	0	0	1
WR13	7	0	0	7	0	0	0
Total	144	5	4	116	9	2	8



A：高落粒率的杂草稻；B：中落粒率的杂草稻；C：低落粒率的杂草稻；D：栽培稻。
A: Weedy rice with high seed shattering; B: Weedy rice with moderate seed shattering;
C: Weedy rice with low seed shattering; D: Cultivated rice.

图 3 海南杂草稻

Fig. 3 Weedy rice collected from Hainan

表 4 海南杂草稻种子的落粒率
Tab. 4 Seed shattering rate of weedy rice in Hainan

群体 Population	杂草稻数量 Number of weedy rice		
	高落粒率 High seed shattering rate	中落粒率 Moderate seed shattering rate	低落粒率 Low seed shattering rate
WR1	10	3	1
WR2	10	0	0
WR3	8	0	0
WR4	3	6	0
WR5	10	6	0
WR6	6	3	0
WR7	4	4	0
WR8	4	8	0
WR9	10	1	0
WR10	13	0	0
WR11	14	0	0
WR12	4	9	0
WR13	0	0	7
合计	96	40	8

率的杂草稻各占一定比例，WR13 全部为低落粒率的杂草稻。

将杂草稻的种子落粒率与落粒 SNP 位点的基因型结合分析，发现 *SH4* 基因的落粒位点为 G 型的 77 株杂草稻和为 G/T 杂合型的 19 株杂草稻的种子落粒率都非常高 (>95%)；而 *SH4* 基因的落粒位点为 T 型的杂草稻的种子落粒率则为中等或低等，其中，40 株杂草稻的种子落粒率介于 30%~75%之间，8 株杂草稻的种子落粒率小于 30%，13 株栽培稻的种子落粒率均很低，小于 10%。这表明当 *SH4* 基因的落粒 SNP 位点为 G 型，且 *qSH1* 基因的落粒 SNP 位点也为 G 型时，杂草稻的种子落粒率极高，接近 100%，而当 *SH4* 基因的落粒 SNP 位点为 T 型，*qSH1* 基因的落粒 SNP 位点为 G 型时，杂草稻的种子落粒率有高有低，范围较大，但均小于 75%，且对应的栽培稻也均为此基因型，但种子落粒率很低，这说明 *SH4* 基因对杂

草稻的极高种子落粒率有较大的贡献，且除了 *SH4* 基因和 *qSH1* 基因以外，还存在其他基因的差异，导致杂草稻之间及杂草稻和栽培稻之间的种子落粒率的差异。

在 *SH4* 基因和 *qSH1* 基因的所有 SNP 位点为纯合型的 112 株海南杂草稻中，共有 7 种组合类型，(表 5)，其中 70 株杂草稻的 *SH4* 基因为 AG 型且 *qSH1* 基因为 GGT 型，为主要的组合类型，均表现为高落粒率；4 株栽培稻有 2 种组合类型，均为低落粒率。将这 112 株杂草稻和 4 株栽培稻的 *SH4* 基因和 *qSH1* 基因的所有除落粒 SNP 位点

之外的 SNP 位点的基因型与其种子落粒率进行结合分析发现，当 *SH4* 基因的 SNP2 为 A 或 G 时，落粒率均可表现为高、中和低；当 *qSH1* 基因的 SNP2 为 A 或 G 时，落粒率均可表现为高、中和低；当 *qSH1* 基因的 SNP3 为 T 或 G 时，落粒率也均可表现为高、中和低；当 *qSH1* 基因的 SNP2 和 SNP3 分别为 AG 和 GT 时，落粒率均可表现为高、中和低；当 *qSH1* 基因的 SNP2 和 SNP3 分别为 AG 和 GT 时，落粒率也均可表现为高、中和低；由此可推测这几个落粒 SNP 位点之外的 SNP 位点均与种子落粒率的高低无关。

表 5 海南杂草稻种子落粒率与 *SH4* 和 *qSH1* 的 SNP 基因型
Tab. 5 Seed shattering rate and SNP genotypes at *SH4* and *qSH1* of weedy rice in Hainan

品种 Variety	<i>SH4</i>		<i>qSH1</i>			数量 Number	落粒率等级 Seed shattering rate level
	SNP2	落粒 SNP Seed shattering SNP	落粒 SNP Seed shattering SNP	SNP2	SNP3		
野生稻 (W1943)	A	G	G	A	G	—	—
籼稻 (Shuhui498)	A	T	G	A	G	—	—
粳稻 (日本晴)	A	T	T	A	G	—	—
海南杂草稻	A	G	G	A	G	2	高
	A	G	G	G	T	70	高
	A	T	G	A	G	1	中
	A	T	G	G	G	4	中
	A	T	G	G	T	14	中
						7	低
	G	T	G	A	G	1	中
海南栽培稻	G	T	G	G	T	13	中
	A	T	G	A	G	2	低
	A	T	G	G	G	2	低

3 讨论

3.1 杂草稻种子落粒率与 *SH4* 的落粒 SNP 基因型的关系

研究表明，利用基因编辑技术将落粒率极高的雷州杂草稻的 *SH4* 基因敲除后，杂草稻的枝梗连接处的离层缺失，种子难落粒，这说明 *SH4* 基因对杂草稻的落粒性至关重要，是杂草稻落粒的主效基因^[17]。一般认为，*SH4* 基因的第 237 个核苷酸由 G 突变为 T 导致了落粒性由落粒变成不落粒。然而，ISHIKAWA 等^[18]研究发现，单独的 *SH4* 基因的第 237 个核苷酸的 G-T 突变并不会导致野生稻离层的改变，不会导致种子落粒率的变化。因此，*SH4* 基因的第 237 个核苷酸的突变是否为功能性的突变，目前还未有定论。

为了探究杂草稻的落粒机制，国内外学者对

杂草稻的 *SH4* 基因的落粒 SNP 位点进行了基因型鉴定。THURBER 等^[19]发现美国杂草稻都易落粒，但其 *SH4* 的落粒 SNP 位点均为 T 型；ZHU 等^[20]对野生稻、杂草稻和栽培稻的 *SH4* 序列分子进化分析发现，亚洲杂草稻的 *SH4* 基因的落粒 SNP 位点均为 T 型；王军等^[21]研究发现，江苏省和东北三省的 33 株杂草稻在 *SH4* 基因的落粒 SNP 位点处也均为 T。以上杂草稻的 *SH4* 的落粒 SNP 位点均为难落粒 T 型，却仍有较高的落粒率，由此推测这些杂草稻的落粒性可能与 *SH4* 基因无关，或者 *SH4* 基因的落粒 SNP 位点的突变对落粒的降低作用不大甚至无作用。然而，对更多区域的杂草稻的研究发现，杂草稻的 *SH4* 基因落粒 SNP 位点还存在易落粒 G 型及 G/T 杂合型。SONG 等^[22]研究发现，178 株马来西亚杂草稻中，104 株的

SH4 基因的落粒 SNP 位点为 T 型, 63 株为 G 型, 11 株为杂合 G/T 型。WEDGER 等^[23]对泰国杂草稻的 *SH4* 基因的落粒 SNP 位点鉴定发现, 111 株杂草稻中, 95 株为 T 型, 15 株为 G 型, 1 株为杂合 G/T 型。在马来西亚和泰国等有野生稻分布的地方, *SH4* 有野生型的 G 型, 说明这些地方的杂草稻存在野生稻的基因渗入。这说明不同地区的杂草稻具有不同的种子落粒机制。

本课题组前期对雷州 100 株杂草稻的 *SH4* 基因的落粒 SNP 位点的基因型鉴定发现, 57 株杂草稻为 G 型, 15 株为杂合 G/T 型, 28 株为 T 型, G 型和杂合 G/T 型的杂草稻均具有极高的种子落粒率 (>95%), T 型的杂草稻则为中度或低度落粒^[24]。本研究对 144 株海南杂草稻的 *SH4* 基因的落粒 SNP 位点的鉴定发现, 77 株为 G 型, 48 株为 T 型, 19 株为 G/T 杂合型。其中, G 型和 G/T 型的 96 株杂草稻都具有极高的种子落粒率 (>95%), 而 48 株 T 型杂草稻则为中度和低度落粒, 这与雷州杂草稻的研究结果一致, 说明 *SH4* 为易落粒 G 型对杂草稻极高的种子落粒率有显著的贡献, *SH4* 基因的第 237 个核苷酸由 G 突变为 T 导致了杂草稻种子落粒率降低。然而, 本研究与 ISHIKAWA 等^[18]的研究结果不一致, 推测有 2 种可能, 一种是 *SH4* 基因的第 237 个核苷酸的突变确实导致了杂草稻种子落粒率的部分降低, 但没有从落粒变成难落粒; 另一种是 *SH4* 基因的第 237 个核苷酸的单独突变并不能改变杂草稻的落粒率, 在这些 T 型杂草稻中还存在其他落粒基因或未知基因的突变, 才导致落粒性的变化; 或者 2 个突变同时存在才会导致落粒性的变化。

此外, 本研究在海南杂草稻中首次发现了 *SH4* 基因的第 236 个核苷酸的 1 个 SNP 位点, 该位点由野生稻中的 A 突变为 G, 该位点的突变只在 T 型杂草稻中发现, 导致氨基酸由 T 型杂草稻的天冬酰胺变为丝氨酸。杂草稻的种子落粒率与该位点的基因型的关联分析发现, 该位点的突变与杂草稻的种子落粒率不相关。本研究中, 该位点突变的杂草稻只有 15 株, 占全部杂草稻和栽培稻的 9.55%, 且该突变在杂草稻、野生稻和栽培稻中均未见报道, 推测该位点为 T 型杂草稻中的 1 个较晚的突变。该位点的突变还存在杂合型, 且在临高不同的水稻田块中均存在, 说明杂草稻的种子可能通过收割机传播, 而且杂草稻之间存

在广泛的基因交流。

3.2 杂草稻的种子落粒率与 *qSH1* 的落粒 SNP 基因型的关系

利用基因编辑技术将种子落粒率极高的雷州杂草稻的 *qSH1* 基因敲除后, 杂草稻的枝梗连接处完全不形成离层, 种子难落粒, 这说明 *qSH1* 基因是杂草稻离层形成的关键基因, 是控制杂草稻种子落粒的主效基因^[17]。王黎明等^[25]对广东雷州地区 6 株杂草稻材料进行了 *qSH1* 的 5'端调控区的功能区片段序列分析, 发现 6 株杂草稻的 *qSH1* 的落粒 SNP 位点均为易落粒 G 型。王军等^[21]对江苏省和东北三省不同地区的 33 株杂草稻进行 *qSH1* 基因的落粒 SNP 位点的测序和比对, 结果表明, 33 株杂草稻的 *qSH1* 的落粒 SNP 位点均为 G 型。本课题组对雷州 100 株杂草稻的 *qSH1* 基因的落粒 SNP 位点鉴定发现, 所有杂草稻的 *qSH1* 均为 G 型^[24]。本研究中, 144 株海南杂草稻的 *qSH1* 基因的落粒 SNP 位点也均为 G 型。以上研究表明, 我国不同地区的杂草稻的 *qSH1* 基因的落粒 SNP 位点多为易落粒 G 型, 与籼稻一致。然而, 在 *qSH1* 基因落粒 SNP 位点都为 G 型且 *SH4* 基因的落粒 SNP 位点为 T 型的杂草稻之间, 以及部分杂草稻与籼稻之间, 仍存在巨大的种子落粒率的差异, 这说明还存在其他落粒性相关基因的差异在影响着杂草稻和籼稻的落粒率。

本研究中, 海南杂草稻的 *qSH1* 基因的落粒 SNP 位点下游还存在 2 个 SNP 位点: SNP2 (147 bp) 和 SNP3 (151 bp)。该位点在野生稻和栽培稻中主要为 A G, 突变后存在 G G 型和 G T 型。SNP2 在雷州和江苏省以及东北三省的杂草稻中都有发现^[21, 25], 而 SNP3 则在本课题组前期对雷州杂草稻的研究中已发现。前期研究的雷州杂草稻中的 SNP2 和 SNP3 的基因型主要为 A G 型, 与野生稻 W1943 和大部分栽培稻一致, 只有少量为 G T 型和 G G 型。本研究中的海南杂草稻则主要为 G T 型, 极少量为 A G 型和 G G 型, 而对应田块中的栽培稻为 A G 型和 G G 型, 说明海南杂草稻 *qSH1* 基因的 G T 型 SNP 可能不是通过与栽培稻的杂交获得的, 且海南杂草稻与雷州杂草稻的 *qSH1* 基因来源不同。将 G G 突变型的 *qSH1* 基因上游调控序列在 NCBI 数据库中搜索, 找到多个多年生野生稻、一年生野生稻及籼稻, 而将 G T 突变型的 *qSH1* 基因上游调控序列在 NCBI 数

数据库中搜索,只找到 1 个籼稻,所有落粒 SNP 为 T 型的水稻中均无这 2 个 SNP 位点,推测落粒 SNP 的突变最先发生,在野生稻时期就已突变,SNP2 的突变也发生在野生稻中,在落粒 SNP 之后发生,而 SNP3 的突变则更晚,在 SNP2 为 G 的籼稻或杂草稻中发生。对比杂草稻的种子落粒率与对应的 SNP2 和 SNP3 基因型发现,这 2 个 SNP 位点都与杂草稻的种子落粒率的高低无关,说明这 2 个突变是无义突变,这与雷州杂草稻的研究结果一致。

参考文献

- [1] 马国兰,张帅,刘都才.轻简化栽培稻田杂草发生趋势与防控技术[J].现代农药,2024,23(3):8-12,61.
MA G L, ZHANG S, LIU D C. Occurrence trend and management strategies of weeds in paddy fields under simplified and labor-saving rice cultivation[J]. Modern Agrochemicals, 2024, 23(3): 8-12, 61. (in Chinese)
- [2] LI C B, ZHOU A L, SANG T. Rice domestication by reducing shattering[J]. Science, 2006, 311(5769): 1936-1939.
- [3] KONISHI S, IZAWA T, LIN S Y, EBANA K, YANO M. An SNP caused loss of seed shattering during rice domestication[J]. Science, 2006, 312(5778): 1392-1396.
- [4] JI H, KIM S R, KIM Y H, KIM H, EUN M Y, JIN I D, CHA Y S, YUN D W, AHN B O, LEE M C, LEE G S, YOON U H, LEE J S, LEE Y H, SUH S C, JIANG W Z, YANG J I, JIN P, MCCOUCH S R, AN G, KOH H J. Inactivation of the CTD phosphatase-like gene *OsCPL1* enhances the development of the abscission layer and seed shattering in rice[J]. The Plant Journal, 2010, 61(1): 96-106.
- [5] FUKUTA Y, YAGI T. Mapping of a shattering resistance gene in a mutant line SR-5 induced from an indica rice variety, Nan-jing 11[J]. Breeding Science, 1998, 48: 345-348.
- [6] ZHOU Y, LU D, LI C, LUO J, ZHU B F, ZHU J, SHANGGUAN Y, WANG Z, SANG T, ZHOU B, HAN B. Genetic control of seed shattering in rice by the APETALA2 transcription factor SHATTERING ABORTION1[J]. Plant Cell, 2012, 24(3): 1034-1048.
- [7] YOON J, CHO L H, KIM S L, CHOI H, KOH H J, AN G. The BEL1-type homeobox gene *SH5* induces seed shattering by enhancing abscission-zone development and inhibiting lignin biosynthesis[J]. The Plant Journal, 2014, 79(5): 717-728.
- [8] SUN P Y, ZHANG W H, WANG Y, HE Q, SHU F, LIU H, WANG J, WANG J M, YUAN L P, DENG H F. *OsGRF4* controls grain shape, panicle length and seed shattering in rice[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2016, 58(10): 836-847.
- [9] 郑丽媛,魏霞,周可,向佳,李燕,刘宝玉,何光华,凌英华,赵芳明.携带主效落粒基因的水稻染色体片段代换系 Z481 的鉴定及和 *SH6(t)* 定位[J].科学通报,2016,61(7): 748-758.
ZHENG L Y, WEI X, ZHOU K, XIANG J, LI X, LIU B Y, HE G H, LING Y H, ZHAO F M. Identification of a rice chromosome segment substitution line Z481 carrying a major gene for seed shattering and mapping of *SH6(t)*[J]. Chinese Science Bulletin, 2016, 61(7): 748-758. (in Chinese)
- [10] YOON J, CHO L H, ANTT H W, KOH H J, AN G. KNOX protein *OSH15* induces grain shattering by repressing lignin biosynthesis genes[J]. Plant Physiology, 2017, 174: 312-325.
- [11] JIANG L Y, MA X, ZHAO S S, TANG Y Y, LIU F X, GU P, FU Y, ZHU Z F, CAI H W, SUN C, TAN L B. The APETALA2-Like transcription factor SUPERNUMERARY BRACT controls rice seed shattering and seed size[J]. The Plant Cell, 2019, 31(1): 17-36.
- [12] MUN B G, SHAHID M, LEE G S, HUSSAIN A, YUN B W. A novel RHS1 locus in rice attributes seed-pod shattering by the regulation of endogenous S-nitrosothiols[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23: 13225.
- [13] NING J, HE W, WU L H, CHANG L Q, HU M, FU Y C, LIU F Y, SUN H, GU P, NDJIONDJOP M N, SUN C Q, ZHU Z. The MYB transcription factor *Seed Shattering 11* controls seed shattering by repressing lignin synthesis in African rice[J]. Plant Biotechnology Journal, 2023, 21(5): 931-942.
- [14] 许聪,吴万春.海南岛杂草稻的生态考察和鉴定[J].中国水稻科学,1996,10(4):247-249.
XU C, WU W C. Ecological investigating and identifying of weedy rices in Hainan island[J]. Chinese Journal of Rice Science, 1996, 10(4): 247-249. (in Chinese)
- [15] 邵菁.江苏、海南两省杂草稻遗传多样性及起源分析[D].南京:南京农业大学,2011.
SHAO J. Study on the genetic diversity and origin of the weedy rice in Jangsu and Hainan province[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011. (in Chinese)
- [16] NUNES A L, MARKUS C, DELATORRE C A, MEROTTO A. Nucleotide variability and gene expression reveal new putative genes related to seed shattering in weedy rice[J]. Annals of Applied Biology, 2015, 166(1): 39-52.
- [17] ZHANG Y L, XIA Q Y, JIANG X Q, HU W, YE X X, HUANG Q X, YU S B, GUO A P, LU B R. Reducing seed shattering in weedy rice by editing *SH4* and *qSH1* genes: implications in environmental biosafety and weed control through transgene mitigation[J]. Biology, 2022, 11: 1823.
- [18] ISHIKAWA R, CASTILLO C C, HTUN T M, NUM-

- AGUCHI K, INOUE K, OKA Y, OGASAWARA M, SUGIYAMA S, TAKAMA N, ORN C. A stepwise route to domesticate rice by controlling seed shattering and panicle shape[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(26): e2121692119.
- [19] THURBER C S, REAGON M, GROSS B L, OLSEN K M, CAICEDO A L. Molecular evolution of shattering loci in U.S. weedy rice[J]. *Molecular Ecology*, 2010, 19(16): 3271-3284.
- [20] ZHU Y Q, ELLSTRAND N C, LU B R. Sequence polymorphisms in wild, weedy, and cultivated rice suggest seed shattering locus *SH4* played a minor role in Asian rice domestication[J]. *Ecology and Evolution*, 2012, 2(9): 2106-2113.
- [21] 王军, 徐详, 杨杰, 王芳权, 范方军, 朱金燕, 李文奇, 仲维功. 江苏省和东北地区杂草稻落粒性基因的序列分析[J]. *分子植物育种*, 2014, 12(6): 1097-1102.
- WANG J, XU X, YANG J, WANG F Q, FAN F J, ZHU J Y, LI W Q, ZHONG W G. Sequence analysis of genes associated with seed shattering of weedy rice in region of Jiangsu and northeast of China[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2014, 12(6): 1097-1102. (in Chinese)
- [22] SONG B K, CHUAH T S, TAM S M, OLSEN K M. Malaysian weedy rice shows its true stripes: wild *Oryza* and elite rice cultivars shape agricultural weed evolution in Southeast Asia[J]. *Molecular Ecology*, 2014, 23: 5003-5017.
- [23] WEDGER M J, PUSADEE T, WONGTAMEE A, OLSEN K M. Discordant patterns of introgression suggest historical gene flow into Thai weedy rice from domesticated and wild relatives[J]. *Journal of Heredity*, 2019, 110(5): 601-609.
- [24] 夏启玉, 曹扬, 孔华, 李美英, 张丽丽, 贺萍萍, 张雨良, 郭安平. 广东雷州杂草稻 *sh4* 和 *qSH1* 基因的功能 SNP 位点序列分析[J]. *热带作物学报*, 2020, 41(1): 104-109.
- XIA Q Y, CAO Y, KONG H, LI M Y, ZHANG L L, HE P P, ZHANG Y L, GUO A P. Sequence analysis of SNP loci associated with seed shattering at *sh4* and *qSH1* genes of weedy rice in Leizhou, Guangdong province[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2020, 41(1): 104-109. (in Chinese)
- [25] 王黎明, 陈勇, 王林. 广东湛江杂草稻 *qSH1* 基因片段序列分析[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(19): 31-33.
- WANG L M, CHEN Y, WANG L. Sequence analysis of *qSH1* gene fragments of weedy rice from Zhanjiang of Guangdong province[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(19): 31-33. (in Chinese)