

种子休眠基因 *Sdr4* 的生物信息学分析与分子标记开发和应用

黄奇娜 姜鸿瑞 杨婕 于坤宇 杨长登 梁燕*

(中国水稻研究所, 杭州 311401; *通讯作者, email: ricebreeding_cnrri@163.com)

Bioinformatics Analysis, Development and Application of Molecular Markers for Seed Dormancy Gene *Sdr4* in Rice

HUANG Qina, JIANG Hongrui, YANG Jie, YU Kunyu, YANG Changdeng, LIANG Yan*

(China National Rice Research Institute, Hangzhou 311401, China; *Corresponding author, email: ricebreeding_cnrri@163.com)

Abstract: 【Objective】 Pre-harvest sprouting (PHS) severely compromises rice yield and grain quality, which is strongly influenced by seed dormancy genes. This study aims to elucidate the biological function of the seed dormancy gene *Sdr4* and develop molecular markers for germplasm improvement, providing theoretical and practical insights for PHS-resistant rice breeding. 【Method】 A combination of bioinformatics analysis, molecular marker development, and marker-assisted selection was employed to systematically investigate *Sdr4* functionality. Allelic variations between the strong-dormancy accession Kasalath and the weak-dormancy accession Nipponbare were analyzed to design genotype-specific markers. 【Result】 The *Sdr4* promoter harbors core regulatory elements (e.g., TATA-box) and ABA-responsive *cis*-elements. The encoded protein is hydrophobic, exhibits low stability, and is extensively phosphorylated (25.93% within amino acids 101–150). Tertiary structure prediction indicated a composition of 15.50% α -helices, 15.50% β -sheets, and 66.37% random coils. Haplotype analysis of the 3K Rice Genome panel combined with AlphaFold modeling revealed that *Sdr4* comprises six functional mutation-associated haplotypes. Furthermore, multiple amino acid sequence differences were identified in the *Sdr4* protein between Kasalath and Nipponbare. Phylogenetic analysis demonstrated high conservation with *Oryza glaberrima* and *Zizania palustris*. Two functional markers (*Sdr4*-KF/KR and *Sdr4*-PF/PR) were developed to discriminate dormancy *strength*, and their efficacy was validated across 25 rice cultivars. Application of these markers in improving Zhongzhu 18 successfully generated novel lines with enhanced seed dormancy. 【Conclusion】 *Sdr4* plays a critical role in regulating PHS resistance through the modulation of seed dormancy. Molecular screening confirmed weak dormancy phenotypes in 20 commercial varieties. The improved lines K17 and K88, developed via *Sdr4*-specific markers, exhibited significantly enhanced PHS resistance. This study establishes a framework for *Sdr4* functional analysis and accelerates the molecular breeding of PHS-resistant rice germplasm.

Key words: pre-harvest sprouting; *Sdr 4*; rice; bioinformatics analysis; molecular marker-assisted selection

摘要: 【目的】水稻收获前穗发芽严重制约产量与品质形成, 该性状主要受种子休眠基因调控。解析种子休眠分子机制对改良水稻穗萌抗性具有重要理论价值与育种意义。【方法】综合运用生物信息学分析、分子标记开发及标记辅助选择技术, 系统解析种子休眠基因 *Sdr4*(Seed dormancy 4)的生物学功能, 探究其分子标记在多基因型种质改良中的应用潜力。【结果】*Sdr4* 启动子区含 TATA-box 等核心元件及 ABA 响应元件等多种顺式作用元件, 其编码蛋白为低稳定性疏水蛋白(101~150 氨基酸区段磷酸化修饰占比 25.93%), 三级结构以 α -螺旋(15.50%)、 β -折叠(15.50%)和无规则卷曲(66.37%)为主。3K 单倍型数据库与 AlphaFold 分析表明 *Sdr4* 基因具有 6 种功能性突变的单倍型, 且在强休眠种质 Kasalath 与弱休眠种质日本晴(Nipponbare)的 *Sdr4* 氨基酸序列存在多个位点差异。系统发育分析显示 *Sdr4* 在非洲栽培稻(*Oryza glaberrima*)与沼生荩(*Zizania palustris*)中具有高度保守性。通过 Kasalath 与日本晴的 *Sdr4* 等位变异, 开发了 *Sdr4*-KF/KR 与 *Sdr4*-PF/PR 两对功能标记, 可精准区分种子休眠强度。基于 25 个水稻品种的分检测筛选出休眠性显著差异的种质, 并利用上述标记成功创制了强休眠型中组 18 改良系。

收稿日期: 2025-02-25; 修改稿收到日期: 2025-03-21。

基金项目: 浙江省农业(水稻)新品种选育重大科技专项(2021C02063-4); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(CPSIBRF-CNRI-202306); 国家重点研发计划资助项目(2022YFD1201505)。

【结论】*Sdr4* 通过调控种子休眠深度影响水稻穗萌抗性。分子标记筛选表明 20 个主栽品种均呈种子弱休眠表型, 利用 *Sdr4* 特异性标记选育的 K17 与 K88 新品系具有显著穗萌抗性。本研究为 *Sdr4* 功能解析及水稻抗穗萌分子育种提供了理论支撑与技术储备。

关键词: 穗发芽; *Sdr4*; 水稻; 生物信息学; 分子标记辅助选择

种子休眠是谷类作物一个重要的农艺性状, 其复杂的生理和生化过程受内在种子休眠机制和外部环境信号的共同调控^[1, 2]。脱落酸(Abscissic acid, ABA)和赤霉素(Gibberellin, GA)是主要的内源性调节因子, 在多种植物物种中拮抗性控制种子休眠与萌发^[3, 4]。此外, 乙烯、一氧化氮、油菜素内酯、光照、温度和湿度等外部环境因素也对种子休眠和萌发产生重要影响^[5]。种子休眠不足或减弱引起种子过早萌发, 即谷穗仍附着在植株茎秆上, 种子就萌发的现象被称为收获前发芽(Pre-harvest sprouting, PHS)。这一现象在潮湿气候条件下尤为显著, 是造成水稻(*Oryza sativa*)、玉米(*Zea mays*)和小麦(*Triticum aestivum*)等多种粮食作物品质和产量损失严重的主要原因^[6, 7]。尤其是在水稻成熟期, 长时间的降雨和高湿环境会导致稻穗在收获前种子萌发, 从而造成严重的产量下降和经济损失^[8, 9]。在雨水丰沛的长江流域和华南地区, 每年有超过 6% 的常规稻种植面积受穗发芽影响^[10]。作为种子休眠的主要内源激素, ABA 主要通过 ABA/GA 比例的平衡来调节种子休眠^[11], 其信号通路的主要关键因子在不同植物中已有报道: 小麦中的 TaMFT 和 TaPHS1 等^[12]; 大麦中的 MKK3 和 AlaAT 等^[13, 14]; 拟南芥中的 AtSdr4L/ODR1、ABI3、DOG1 和 LEC2 等^[15-18]; 玉米中的 VP1^[19]; 水稻中的 *Sdr4*、SD6、OsVP1、OsPDS (PHS1)、PHS8、PHS9、OsAB13、OsAB15、OsMFT2、CCT30 等^[2, 4, 20-23]。这些与种子休眠或萌发相关的调控因子在 ABA 的生物合成和代谢信号转导途径中起关键作用, 但其分子调控机制尚不清楚。

水稻是我国主要粮食来源, 其产量和品质对确保国家粮食安全和可持续生产具有重要作用。在水稻中超过 140 个数量性状基因座(QTL)/基因被证实与水稻的穗萌发或种子休眠有关, 但只有少数的几个被克隆^[2]。其中, *Sdr4* 是水稻种子休眠的中枢调节因子, 在转录水平上整合了 ABA 和 GA 信号通路^[20]。*Sdr4* 还是 OsVP1 下游的靶标, OsVP1 能与 *Sdr4* 启动子特定基序 CACCTG 结合激活其表达, 还可以通过 ABA 信号通路激活 *Sdr4* 表达正向调控水稻种子休眠^[4]。*Sdr4* 还可影响初级休眠 OsDOG1L-1 途径调节水稻种子休眠, 该途径在拟南

芥中已被证实^[16, 22]。值得注意的是, Magwa 等^[24]通过全基因组关联分析(GWAS)共鉴定了 54 个与种子休眠相关的候选位点, 其中多个位点与已克隆的赤霉素/吲哚乙酸失活基因(如 *GH3-2*、*GA2ox3* 和 *EUI1*)存在显著关联; 此外, 还在抗穗发芽基因 *Sdr4* 附近也发现了一个关联位点。当前大部分水稻品种由野生稻驯化而来, 基于对水稻发芽率的要求, 人为选择导致种子休眠逐渐减弱或丧失^[25]。本研究将在此基础上, 以 *Sdr4* 基因为研究对象, 通过生物信息学解析、分子标记开发、种质资源筛选与抗穗发芽新材料创制等, 为水稻抗穗萌分子标记辅助育种提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 实验材料与表型鉴定

供试水稻材料包括 Kasalath、日本晴(Nipponbare, Nip)、IR24、IR36、IR64、中组 1 号、中组 3 号、中组 9 号、中早 22、中早 35、中早 39、中冷 23、中佳早 10 号、浙 106、浙农 131、浙农 135、甬粳 15、甬粳 57、甬粳 378、温 723、台早 502、台早 816、金早 47、早粳 310 和中组 18 及其改良品系。

将上述水稻材料室温浸种 48 h, 35℃下催芽萌发 24 h 后, 进行表型鉴定并拍照记录, 将萌发的种子分别均匀播种在塑料盆中, 放置于中国水稻研究所富阳试验基地网室(119°57'E, 30°03'N)培养。

1.2 实验方法

1.2.1 不同水稻品种叶片的 DNA 提取

采用 CTAB 法分别提取上述水稻幼嫩叶片基因组 DNA^[26]。

1.2.2 *Sdr4* 基因扩增和测序

通过国家水稻数据中心(<https://www.ricedata.cn/>)下载日本晴(Nipponbare, Nip) *Sdr4*(LOC_Os07g39700)基因序列。通过 Primer 3(<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)设计可用于全长扩增的 *Sdr4* 基因的引物 Sdr4-F(5'-CTTCTTAACCCACCACC-3')与 Sdr4-R(5'-TTTGCTCCGGCTTGATGCA TC-3')(目的条带长度为 1161 bp)(表 1), 由浙江尚亚生物科技有限公司合成。以 Kasalath、Nip 水稻材料

表 1 *Sdr4* 全基因组扩增引物与开发的分子标记

Table 1. Whole-genome amplification primers for *Sdr4* and functionally validated molecular markers

引物名称 Primer	引物序列(5'-3') Sequence(5'-3')	片段长度 Length(bp)	基因组位点 Location
Sdr4-F	CTTCTTAACCCACCCACCCC	1161	引物 5'端距离 ATG 上游 102 bp 102 bp upstream of ATG
Sdr4-R	TTTGCTCCGGCTTGATGCATC		引物 3'端距离 TGA 下游 27 bp 27 bp downstream of TGA
Sdr4-KF	AAGGTCATCTCGCCGCGCG	197	距离 ATG 493~511 bp 编码区 Coding region 493~511 bp from ATG
Sdr4-KR	GTTGCTGGAGTCCGAGACC		距离 ATG 702~720 bp 编码区 Coding region 702~720 bp from ATG
Sdr4-PF	AAGCTGCTGGAGCCG <u>TGG</u>	227	距离 ATG 493~509 bp 编码区(画横线为引入的错配碱基) Coding region 493~509 bp from ATG (underlined bases are introduced mismatches)
Sdr4-PR	CTGTACGCGTCGTTACCC		距离 ATG 672~690 bp 编码区 Coding region 672~690 bp from ATG

的基因组 DNA 为模板进行聚合酶链式反应(PCR), 反应体系为 50 μ L: KOD OneTM PCR 预混液(日本 ToYoBo)为 25 μ L, 正反向引物各 1 μ L, DNA 模板为 1 μ L, ddH₂O 补齐至 50 μ L; 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 下预变性 2 min; 98 $^{\circ}$ C 下变性 10 s、55 $^{\circ}$ C 下退火 5 s、68 $^{\circ}$ C 下延伸 6 s, 36 次循环; 68 $^{\circ}$ C 下延伸 2 min, 6 $^{\circ}$ C 下保持 10 min。扩增后 PCR 产物送浙江尚亚生物科技有限公司测序。

1.2.3 序列比对与分子标记开发

依据上述下载的日本晴 *Sdr4* 基因序列设计引物, 扩增 Nip、Kasalath、IR36 和中组 18 等材料的 *Sdr4* 基因序列, 采用软件对测序结果进行序列比对。在碱基差异位点处设计错配碱基合成引物 Sdr4-KF 与 Sdr4-KR(目的片段长度为 227 bp), 用于筛选种子弱休眠基因型; 设计特异性位点扩增引物 Sdr4-PF 与 Sdr4-PR(目的片段长度为 197 bp), 便于筛选种子强休眠基因型(表 1)。

1.2.4 基因型检测引物的 PCR 扩增

以提取的 DNA 为模板, 用 KOD FX 高保真酶扩增目的片段。反应体系为 50 μ L: 25 μ L 2 $\times$ PCR 缓冲液, 10 μ L 2 mmol/L dNTPs, 正反引物各 1.5 μ L, 2.5 μ L DNA 模板, 8.5 μ L ddH₂O, 1 μ L 高保真 KOD FX 酶, 旋涡均匀、离心后上机扩增, 具体扩增步骤: 95 $^{\circ}$ C 下预变性 5 min; 98 $^{\circ}$ C 下变性 10 s, 65 $^{\circ}$ C 下退火 10 s(每次循环降低 0.2 $^{\circ}$ C), 68 $^{\circ}$ C 下延伸 10 s, 36 次循环; 72 $^{\circ}$ C 下延伸 10 min。扩增产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 用凝胶成像仪拍照记录。

1.3 生物信息学分析

蛋白质磷酸化分析采用 NetPhos-3.1 在线网站

(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>)进行 *Sdr4* 氨基酸序列的蛋白磷酸化预测; *Sdr4* 基因的启动子分析采用在线预测网站 Plant CARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>); *Sdr4* 氨基酸序列一级结构预测运用 PROTPARAM(<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线网站; 采用在线预测网站(https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_sopma.html)进行二级结构预测; 运用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)开展三维结构预测。

2 结果与分析

2.1 *Sdr4* 结构解析与启动子作用元件分析

Sdr4 基因(*Os07g0585700*) CDS 全长 1032 bp, 含 1 个外显子, 编码一个由 343 氨基酸(aa)组成的锌指蛋白, N 端具有双核定位信号^[22]。通过启动子在线预测网站 PlantCARE 对 *Sdr4* 基因进行启动子顺式作用元件解析。结果表明, 在 *Sdr4* 基因启动子区域含有核心元件、功能性应答元件(表 2)。其中启动子核心元件包括 CAAT-box、G-box 和 TATA-box; 功能性应答元件主要有激素响应元件(ABRE, TCA-element, CGTCA/TGACG-motif)、逆境胁迫应答元件(ARE, MYB/MYC)以及生长发育相关作用元件(RY-element, Sp1)。ABRE、TCA-element、CGTCA/TGACG-motif 分别是脱落酸(ABA)响应元件、水杨酸(Salicylic acid)途径响应元件, 以及茉莉酸甲酯(Methyl jasmonate)调控元件; ARE、MYB/MYC 是厌氧诱导调控元件和干旱诱导响应

表 2 *Sdr4* 基因启动子顺式作用元件
Table 2. *cis*-acting elements in the promoter region of *Sdr4*

类别 Type	顺式作用元件 <i>cis</i> -acting element	序列 Sequence	数量 Number	功能 Function
激素相关作用元件 Hormone-related response elements	ABRE	ACGTG/CACGTG	11	脱落酸响应元件 Absciscic acid response element
	TCA-element	CCATCTTTT	1	水杨酸途径响应元件 Salicylic acid pathway response element
	CGTCA/TGACG-motif	CGTCA	10	茉莉酸甲酯调控元件 Methyl jasmonate regulatory element
逆境相关作用元件 Stress-related response elements	ARE	AAACCA	3	厌氧诱导调控元件 Anaerobic induction regulatory element
	MYB/MYC	CAACCA/CATGTG	4	干旱诱导响应元件 Drought-induced response element
生长发育相关作用元件 Growth and development-related response elements	RY-element	CATGCATG	4	种子特异性调控元件 Seed-specific regulatory element
	Sp1	GGGCGG	7	光照响应元件 Light-responsive element

元件; RY-element、Sp1 分别为种子特殊调控元件和光照响应元件。脱落酸响应元件(ABRE)数量最多为 11 个, 与 *Sdr4* 基因调控种子休眠的生物学功能相对应。

2.2 系统进化树构建与分析

通过 NCBI 数据库搜索不同物种中 *Sdr4* 氨基酸同源序列, 利用 Blast 比对分析。依据对比结果选取 14 个物种, 主要包括: 水稻(*Oryza sativa*)、看麦娘(*Alopecurus aequalis*)、非洲稻 (*Oryza glaberrima*)、芦苇(*Phragmites australis*)、狗尾草(*Setaria viridis*)、小米 (*Setaria italica*)、芒草(*Miscanthus lutarioriparius*)、高粱(*Sorghum bicolor*)、小麦(*Triticum aestivum*)、精子草(*Digitaria exilis*)、大麦 (*Hordeum vulgare*)、二粒小麦 (*Triticum dicoccoides*)、黑麦草(*Lolium rigidum*), 以及沼生荻(*Zizania palustris*), 运用 MAGA7 构建系统发育进化树。结果显示, 在众多不同物种间 *Sdr4* 具有一定的保守性, 从亲缘关系上显示出水稻 *Sdr4* 蛋白与非洲稻、沼生荻等物种具有较高的同源性(图 1-A)。

2.3 蛋白磷酸化水平分析

利用 NetPhos-3.1 在线网站, 对 *Sdr4* 蛋白的磷酸化水平进行分析。结果表明, *Sdr4* 包含 27 个蛋白质磷酸化位点, 占总氨基酸残基数目的 7.87%, 在 101-150 位氨基酸区间内, 蛋白质磷酸化的程度最高为 7 个, 占总磷酸化位点的 25.93%, 表明 *Sdr4* 拥有较多的蛋白质磷酸化位点(图 1-B)。

2.4 *Sdr4* 基因单倍型分析

为了进一步解析 *Sdr4* 单倍型的进化动力, 本研

究整合了 3K 数据库中水稻亚种(*indica*、*japonica*、*Aus*、*Aromatic* 等)进行单倍型分析(图 1-C, D), 结果表明 *Sdr4* 基因编码区共发现 6 种不同类型的功能性突变单倍型(H001 至 H006), 其单倍型包含水稻品种数目分别为 1221, 721, 224, 213, 81 和 34。这 6 种单倍型所含的 SNP 位点分布在基因序列的第 270, 352, 513, 515, 516, 518, 519, 520, 595, 605 和 819 位点。在 6 种不同单倍型中 H001 和 H004 在 *indica* 亚种中的优势分布, 其次是 *Aus*; 但 H002、H005 和 H006 单倍型在 *japonica* 亚种中分布最高, *Aus* 类型其次; 单倍型 H003 中除去在 *Indica* 亚种中分布最多外, 在其他类型水稻中也存在一定占比。

2.5 *Sdr4* 序列比对与蛋白结构预测

采用 *Sdr4*-F 和 *Sdr4*-R 引物对 *Kasalath*、*Nip* 的 *Sdr4* 基因全长进行 DNA 扩增, 以 *Nip* 的 *Sdr4* 基因编码序列为对照进行差异位点比对。结果表明, *Nip* 与 *Kasalath* 的 *Sdr4* 基因组序列不同, 表现为 3 个碱基(CGG)的缺失(490-492), 6 个单碱基的差异(第 496, 498, 499, 501, 502, 503 位点), 导致编码的氨基酸存在显著差异(图 2-A, B)。

运用 PROTPARAM 在线网站进行 NIP 中 *Sdr4* 蛋白一级结构预测, 结果表明 *Sdr4* 蛋白含有 343 氨基酸, 相对分子质量(Molecular weight)为 35.99 kD, 等电点(Theoretical pI)为 8.89, 其中丙氨酸含量最高, 为 18.1%。该蛋白分子式为 C₁₅₅₈H₂₅₅₆N₄₇₆O₄₇₄S₁₄, 原子总数为 5078, 不稳定系数为 61.96(表明该蛋白不稳定), 脂肪质指数为 84.84, 亲水性平均值(Grand

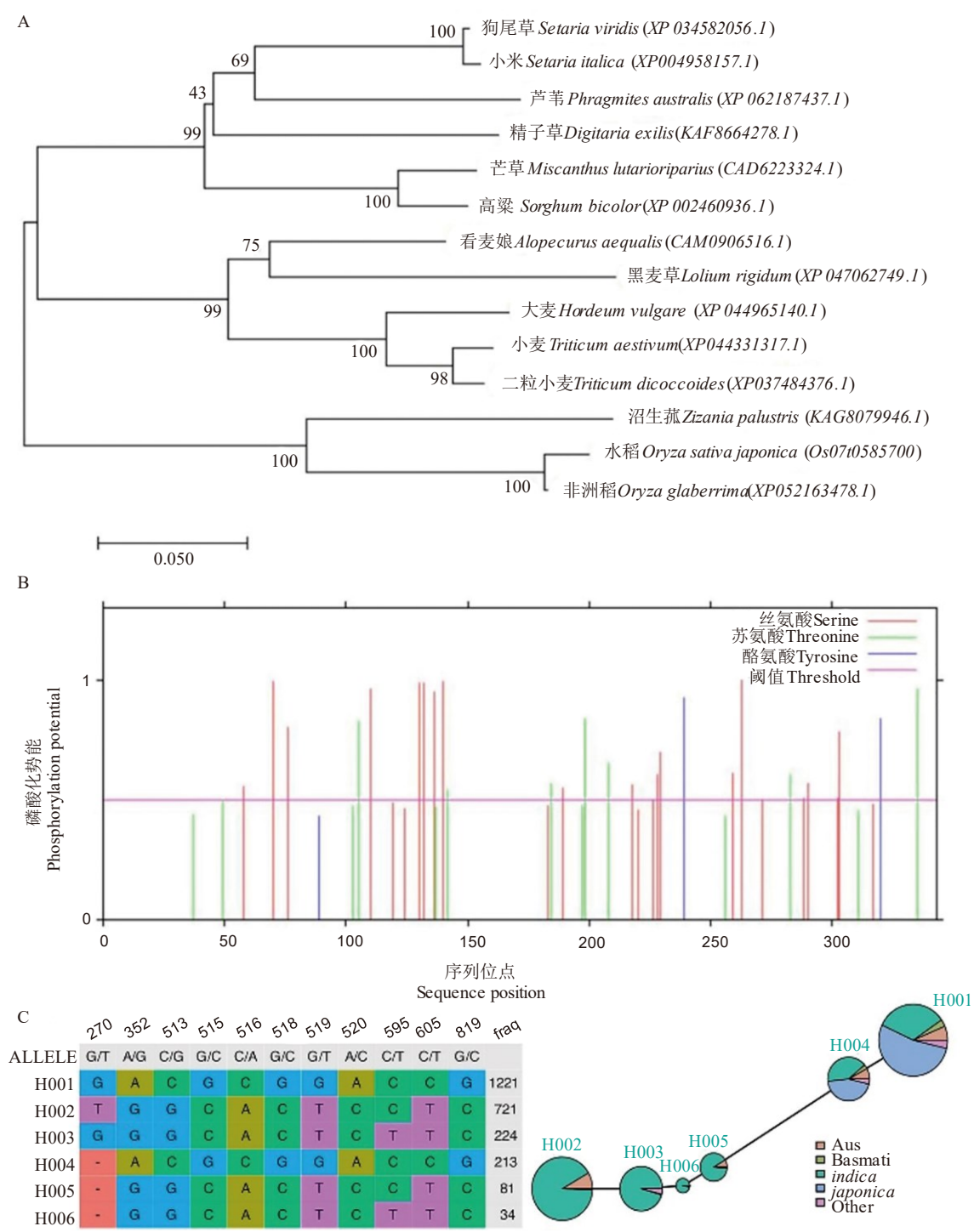
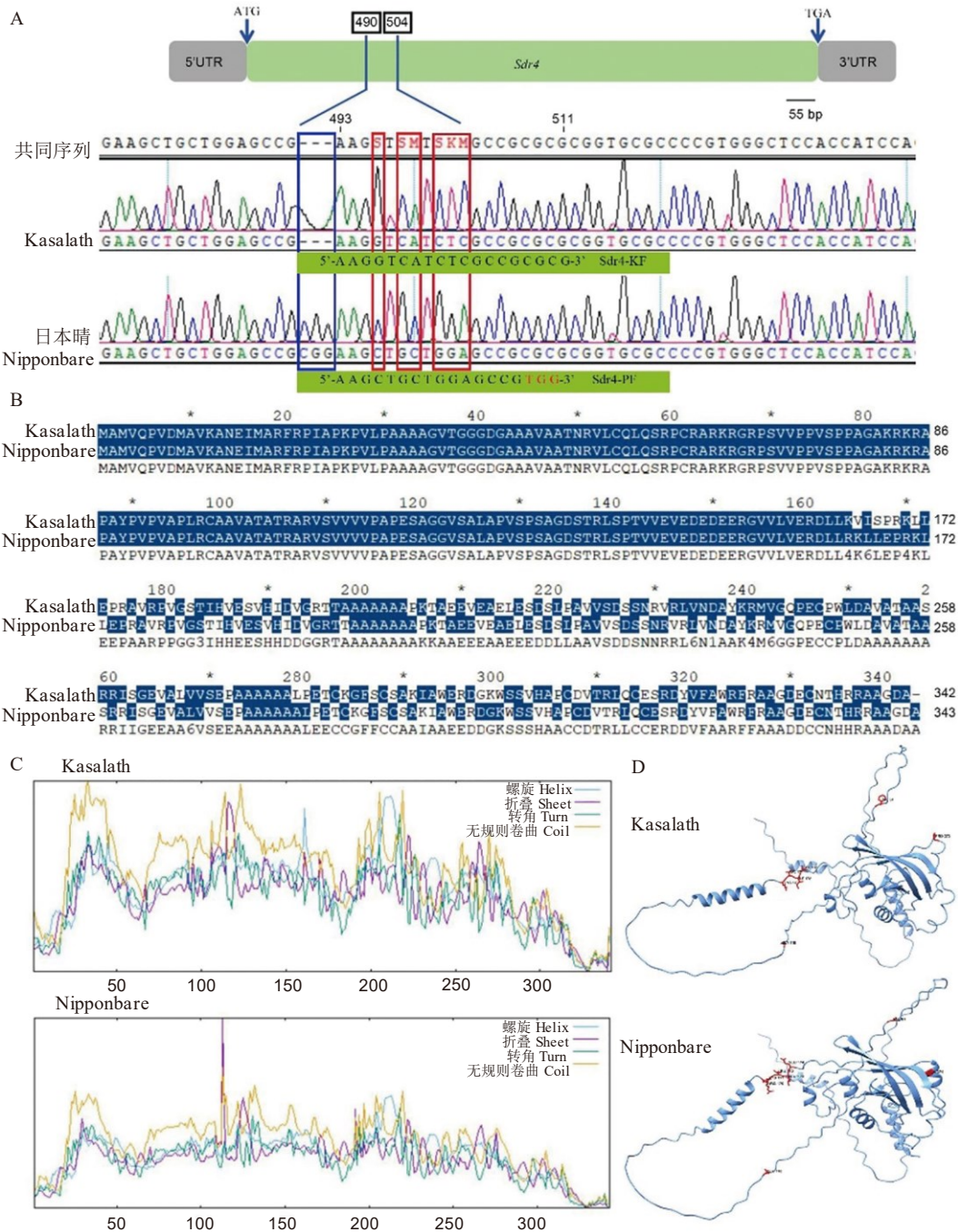


图 1 *Sdr4* 系统进化树 (A)、蛋白质磷酸化解析 (B) 与 3K 数据库单倍型分析 (C, D)
Fig. 1. Phylogenetic tree (A), protein phosphorylation (B) and haplotype analysis (C, D) with 3K of *Sdr4*

average of hydropathicity)为-0.087。由此可见 *Sdr4* 蛋白稳定性较差, 属于疏水性蛋白。进一步开展二级结构预测发现, *Sdr4* 蛋白由 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规卷曲组成。其中 Kasalath 和 Nip 中 *Sdr4* 的 α -螺旋分别为 15.50%和 13.70%, β -折叠分别为 15.50%和 15.45%, β -转角分别占比为 2.63%和 2.04%, 无规则卷曲分别为 66.37%和 68.80%(图 2-

C)。依据 SWISS-MODEL 三维结构预测, *Sdr4* 氨基酸序列主要由 α -螺旋、 β -折叠和无规则卷曲组成。同时, AlphaFold 分析发现(图 2-D), Kasalath 与 Nip 的 *Sdr4* 蛋白结构存在差异, 其中 Kasalath 中 *Sdr4* 的 PHE 91、GLY118、LYS 170、VAL 171、ILE172、SER 173 和 PRO 273 位点, 与 Nip 的 *Sdr4* 蛋白结构 VAL 91、GLU 118、ARG 170、LYS 171、LEU



A: 差异位点 DNA 序列比对与分子标记引物 Sdr4-KF 和 Sdr4-PF (绿色部分) 的位点; B: Kasalath 和日本晴中 Sdr4 氨基酸序列比对结果; C: Kasalath 和日本晴中 Sdr4 二级结构预测; D: AlphaFold 分析 Kasalath 和日本晴的 Sdr4 蛋白结构。

A, Alignment of DNA sequences at different sites and the location of the forward primer F (highlighted in green) for molecular marker development; B, Alignment of the Sdr4 amino acid sequences in Kasalath and Nipponbare; C, Prediction of the secondary structure of Sdr4 in Kasalath and Nipponbare; D, AlphaFold analysis of the three-dimensional structure of Sdr4 in Kasalath and Nipponbare.

图 2 Sdr4 序列比对与蛋白结构预测

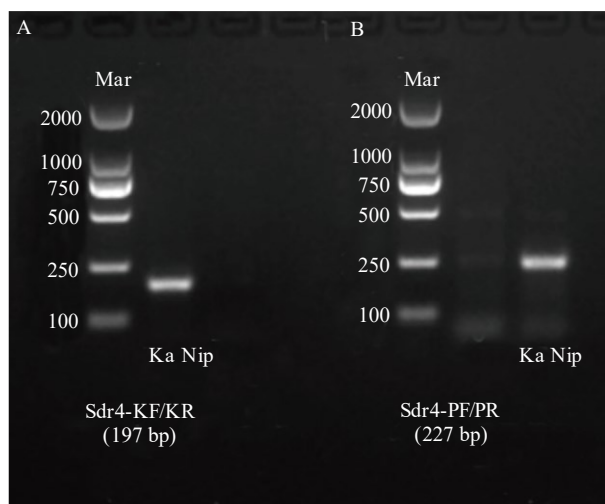
Fig. 2. Sequence alignment and protein structure prediction of Sdr4

172/173、GLU 174、ALA 274 位点具有显著差异。

2.6 特异性引物的开发和检测

开发种子休眠差异基因型特异性引物，在 Nip 和 Kasalath 水稻材料的 Sdr4 基因序列差异位点设计特异性引物。基于 6 个单碱基差异位点设计抗穗

萌基因型特异引物 Sdr4-KF(5'-AAGGTCATCTCG CCGCGCG-3') 和 Sdr4-KR(5'-GTTGCTGGAGTCC GAGACC-3')，扩增条带长度为 197 bp。为了便于区分抗、不抗穗萌基因型，在差异位点后引入错配碱基设计不抗穗萌基因型引物 Sdr4-PF (5'-



Ka, Kasalath; Nip, Nipponbare; Mar, Easy 2K DNA marker.

图 3 分子标记 Sdr4-KF/KR (A) 与 Sdr4-PF/PR (B) 检测结果分析

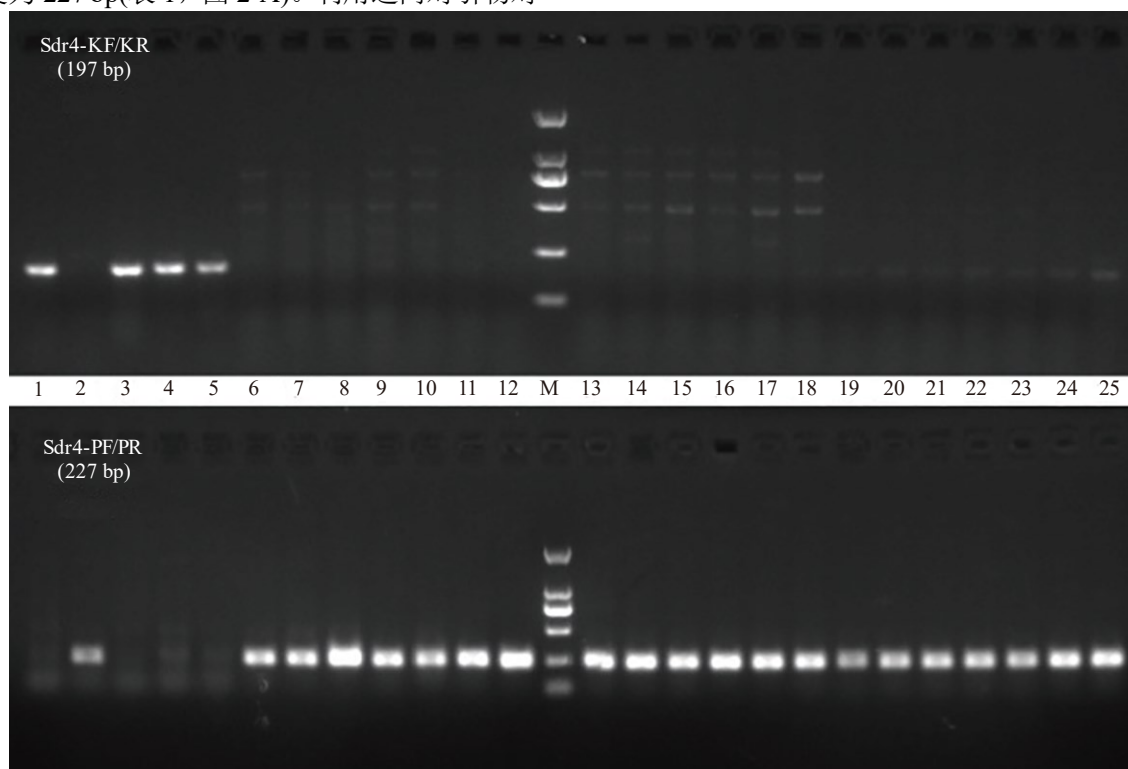
Fig. 3. Analysis of detection results of molecular markers Sdr4-KF/KR (A) and Sdr4-PF/PR (B)

AAGCTGCT GGAGCCGTGG-3') 和 Sdr4-PR(5'-CTTGTACGC GTCGTTACACC-3'), 扩增后 DNA 序列长度为 227 bp(表 1, 图 2-A)。利用这两对引物对

Kasalath、Nip 的 DNA 进行 PCR 扩增。结果显示, Kasalath 中的特异性分子标记(Sdr4-KF/KR)目的片段大小为 197 bp, Nip 中(Sdr4-PF/PR)则为 227 bp。这两个标记可在强休眠性水稻材料 Kasalath 与弱休眠性材料 Nip 中稳定扩增出特异性条带, 具有良好的区分能力。(图 3)。由此, 表明开发的两对分子标记 Sdr4-KF/KR 和 Sdr4-PF/PR, 可以快速区分水稻材料穗萌抗性/无抗性的基因型。

2.7 新分子标记在不同水稻资源中的验证与应用

为了测定不同早稻品种中穗萌发基因型差异, 利用上述两对分子标记扩增 24 份水稻 DNA(IR24、IR36、IR64、中组 1 号、中组 3 号、中组 9 号、中早 22、中早 35、中早 39、中组 18、中冷 23、中佳早 10 号、浙 106、浙农 131、浙农 135、甬粳 15、甬粳 57、甬粳 378、温 723、台早 502、台早 816、金早 47、早粳 310), 以强休眠水稻材料 Kasalath 与弱休眠材料 Nip 分别为抗、不抗穗萌基因型对照, 引物 Sdr4-KF/KR 目的片段为 197 bp, Sdr4-PF/PR 目的条带为 227 bp。电泳结果显示: Kasalath(对照)、IR24、IR36 和 IR64 的基因组 DNA 通过 Sdr4-KF/KR



1: Kasalath; 2: Nip; 3: IR24; 4: IR36; 5: IR64; 6: 中组 1 号; 7: 中组 3 号; 8: 中组 9 号; 9: 中早 22; 10: 中早 35; 11: 中早 39; 12: 中组 18; 13: 中冷 23; 14: 中佳早 10 号; 15: 浙 106; 16: 浙农 131; 17: 浙农 135; 18: 甬粳 15; 19: 甬粳 57; 20: 甬粳 378; 21: 温 723; 22: 台早 502; 23: 台早 816; 24: 金早 47; 25: 早粳 310; M: Easy 2K DNA marker.

1, Kasalath; 2, Nip; 3, IR24; 4, IR36; 5, IR64; 6, Zhongzu 1; 7, Zhongzu 3; 8, Zhongzu 9; 9, Zhongzao 22; 10, Zhongzao 35; 11, Zhongzao 39; 12, Zhongzu 18; 13, Zhongleng 23; 14, Zhongjiazao 10; 15, Zhe 106; 16, Zhenong 131; 17, Zhenong 135; 18, Yongxian 15; 19, Yongxian 57; 20, Yongxian 378; 21, Wen 723; 22, Taizao 502; 23, Taizao 816; 24, Jinzao 47; 25, Zaoxian 310; M, Easy 2K DNA marker.

图 4 不同水稻资源分子标记检测结果

Fig. 4. Analysis of molecular marker detection results in diverse rice varieties

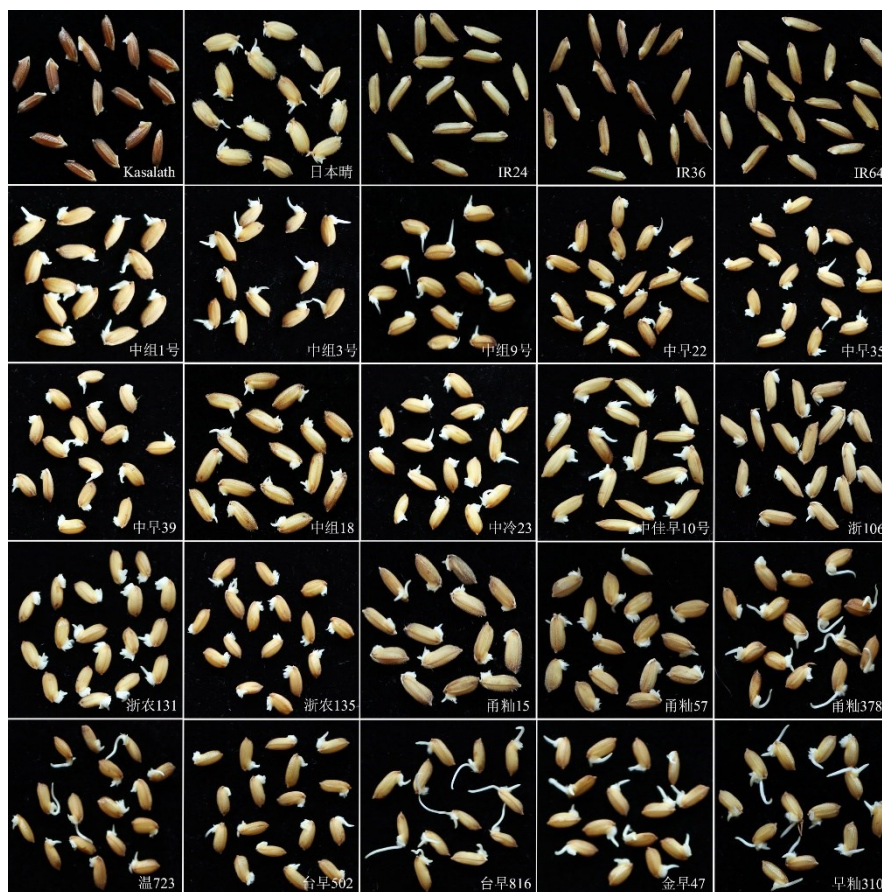


图 5 不同水稻资源的种子萌发表型

Fig. 5. Seed germination phenotypes of different rice varieties

引物扩增可以获得 197 bp 的目的片段; 日本晴(对照)、中组 1 号、中组 3 号、中组 9 号、中早 22、中早 35、中早 39、中组 18、中冷 23、中佳早 10 号、浙 106、浙农 131、浙农 135、甬粳 15、甬粳 57、甬粳 378、温 723、台早 502、台早 816、金早 47、早粳 310 等 21 个水稻品种则无该目的条带。同理, 21 个不同水稻品种采用 Sdr4-PF/PR 引物扩增出 227 bp 的 DNA 片段, 但 Kasalath、IR24、IR36 和 IR64 则无该目的条带(图 4)。此外, 通过种子萌发实验分析表型发现, 在相同催芽萌发条件下, 相对于包括日本晴在内的 21 个水稻品种, Kasalath、IR24、IR36 和 IR64 种子萌发较慢(图 5)。综上所述, 与 Nip 相似的 20 个水稻品种(中组 1 号、中组 3 号、中组 9 号、中早 22、中早 35、中早 39、中组 18、中冷 23、中佳早 10 号、浙 106、浙农 131、浙农 135、甬粳 15、甬粳 57、甬粳 378、温 723、台早 502、台早 816、金早 47、早粳 310)属于弱休眠水稻材料。

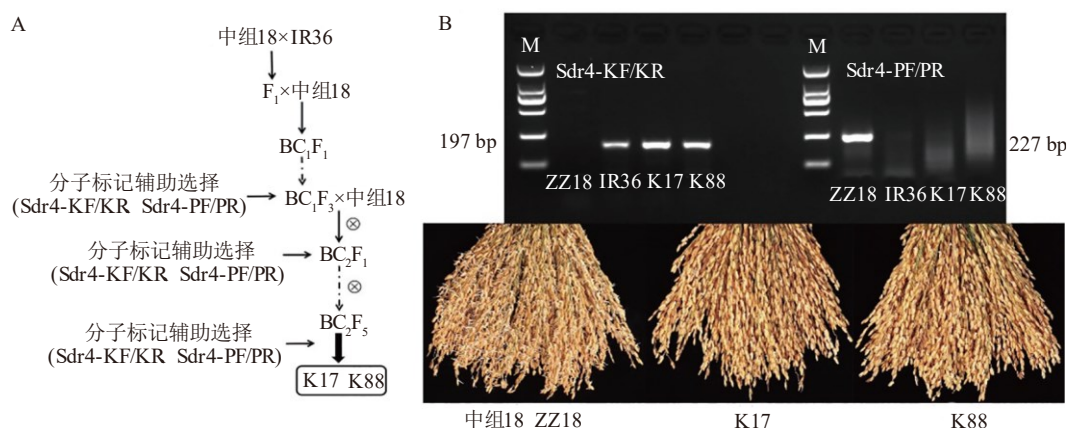
2.8 新开发分子标记在常规早粳稻品种改良中的应用

为创制抗穗萌的常规早粳稻新材料, 以强休眠

基因型 IR36 为父本, 弱休眠基因型的中组 18 为母本进行杂交(图 6-A)。F₁ 再与中组 18 回交获得 BC₁F₁ 代, 对后代株系进行分子标记检测, 同时筛选抗穗萌表型, 将筛选到的具有抗穗萌表型和强休眠基因型的 BC₁F₃ 单株与中组 18 再次回交后获得 BC₂F₁, 连续自交至 BC₂F₅ 代, 中间利用新开发的分子标记逐代进行分子标记辅助选择, 最终在 F₅ 代中筛选出 2 个具有抗穗萌表型且农艺性状良好的株系, 暂命名为 K17 和 K88。运用分子标记对 K17 和 K88 进行基因型检测, 均可以扩增出 197 bp 的强休眠基因型的目的片段, 该结果与表型鉴定一致(图 6-B)。至此, 本研究利用新开发的分子标记, 在常规早粳稻中组 18 的基础上成功创制具有抗穗萌表型的育种新材料, 为进一步的育种应用奠定了基础。

3 讨论

在植物的新陈代谢中, 种子休眠和萌发是两个独立的生化生理过程, 其中植物内源激素脱落酸(ABA)和赤霉素(GA)是调控种子休眠或萌发的主要



运用 Sdr4-KF/KR(197 bp)与 Sdr4-PF/PR(227 bp)引物分别扩增中组 18(ZZ18)、IR36、K17 与 K88 基因组 DNA。将中组 18、K17 与 K88 水稻材料种子分别室温浸种 48 h, 35°C 催芽萌发 48 h 后, 进行表型鉴定并拍照记录。M: 标记。

Genomic DNA from the rice varieties ZZ18, IR36, K17, and K88 was amplified using the Sdr4-KF/KR (197 bp) and Sdr4-PF/PR (227 bp) primers, respectively. Seeds of ZZ18, K17, and K88 were soaked for 48 h at room temperature and subsequently incubated at 37°C for 48 h to promote germination. Following germination, phenotypic characterization was performed, and images were captured for documentation. M, Marker.

图 6 抗穗萌新材料选育过程 (A) 和分子标记检测结果及其表型 (B)

Fig. 6. Breeding process of new materials resistant to panicle sprouting (A), molecular marker detection results and their phenotypes (B)

生理因素^[27, 28]。脱落酸有利于休眠的形成和持续, 而赤霉素则促进种子萌发。 *Sdr4* 基因介导种子休眠, 其受种子成熟调控基因 *OsVPI* 正向调控, 并且依次正调控种子成熟的相关蛋白并且抑制萌发后基因的表达^[22]。生物信息学分析表明, *Sdr4* 基因启动子区域除了启动子核心元件之外, 还包括 3 种与激素应答、逆境胁迫和种子生长发育相关的应答元件。这些功能性应答元件与 *Sdr4* 的介导调控作用有关联, 如 ABRE 与脱落酸(ABA)应答机制有关、MYB/MYC 与干旱诱导有关、RY-element 与种子特异性调控有关, 其中, ABA 响应元件(ABRE)数量最多(11 个)意味着 *Sdr4* 控制水稻种子休眠主要通过调控脱落酸响应机制实现。构建系统进化树发现, 在 14 个不同物种中, 水稻(*Oryza sativa*)的 *Sdr4* 蛋白与非洲稻(*Oryza glaberrima*)、沼生荩(*Zizania palustris*)的 *Sdr4* 同源性较高。此外, 在 101-150 位氨基酸区间内, *Sdr4* 蛋白质磷酸化的程度占总磷酸化位点的 25.93%(图 1-B)。而蛋白预测结果发现 *Sdr4* 蛋白稳定性较差, 主要由 α -螺旋、 β -折叠和无规则卷曲组成, 但强休眠材料 Kasalath 与弱休眠材料日本晴的 *Sdr4* 蛋白的二级结构 100-150 区域出现显著差异(图 2-C)。综上所述, 推测该位点可能是影响 *Sdr4* 介导种子休眠的主要调控区域。

在种子休眠差异材料 Kasalath 和日本晴中, 测序结果发现两个水稻材料的 *Sdr4* 基因片段存在 3 个碱基(CGG)的缺失, 6 个单碱基的差异(第 496, 498, 499, 501, 502, 503), 在 DNA 水平属于单核

苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)变异, 开发相应的分子标记难度较大, 还需要测序分析, 实验成本较高。张毛宁^[29]基于获得的 QTL 置信区间内双亲的 SNP, 设计竞争性等位基因型特异性 PCR(Kompetitive allele-specific PCR, KASP)标记区分了来自不同地区的 96 份花生栽培品种。但 KASP 检测对仪器与试剂要求较高(需具备荧光定量 PCR 仪和实时荧光定量 PCR 检测试剂盒), 实验成本较高且部分实验室并不具备该仪器设备。采用 dCAPS(cleaved amplified polymorphic sequences)和插入/缺失(InDel)标记原理开发功能性标记, 便于区分杂合基因型和纯合基因型^[20], 但 dCAPS 在检测过程中需要经过酶切消化等步骤, 过程较为繁琐; InDel 标记目的片段差异较小, 多态性的区分存在一定难度。本研究同样以 *Sdr4* 基因编码区 6 个单碱基的差异位点为主, 在设计分子标记中引入错配碱基(TGG)开发出新的功能性标记 Sdr4-KF/KR 与 Sdr4-PF/PR, 大大降低了非目标基因型的扩增效率, 利用普通 PCR 仪进行 DNA 扩增便能快速区分穗萌抗性基因型。此外, 通过 25 个水稻材料的种子萌发表型鉴定, 发现 20 个早稻品种(中组 1 号、中组 3 号、中组 9 号、中早 22、中早 35、中早 39、中组 18、中冷 23、中佳早 10 号、浙 106、浙农 131、浙农 135、甬粳 15、甬粳 57、甬粳 378、温 723、台早 502、台早 816、金早 47、早粳 310)都属于弱休眠水稻材料; Kasalath、IR24、IR36 和 IR64 属于强休眠水稻品种。由此, 种子休眠表型与 Sdr4-KF/KR

和 *Sdr4*-PF/PR 分子标记扩增的基因型相匹配。该结果也进一步说明了种子休眠相关基因在水稻品种选育和人为驯化过程中逐渐弱化甚至丧失。通过杂交育种和分子标记辅助选择选育出的 K17 和 K88, 携带强休眠 *Sdr4* 基因型。相对于轮回亲本(中组 18), K17 和 K88 表现出良好的抗穗萌表型, 有效地改良了中组 18 早稻高产品种的穗发芽性状, 为后续抗穗萌品种的选育提供了新材料。本研究开发的分子标记检测方法不仅快捷方便, 有助于快速鉴定水稻种质的种子休眠基因型, 提高筛选效率, 并且具有更好的应用价值, 可广泛应用于资源鉴定和分子标记辅助选择育种。

参考文献:

- [1] Finch-savage W E, Leubner-metzger G. Seed dormancy and the control of germination[J]. *New Phytologist*, 2006, 171: 501-523.
- [2] Sohn S I, Pandian S, Kumar T S, Zoclanclounon Y A B, Muthuramalingam P, Shilpha J, Satish L, Ramesh M. Seed dormancy and pre-harvest sprouting in rice: An updated overview[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(21): 11804.
- [3] Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, Steber C. Molecular aspects of seed dormancy[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, 59: 387-415.
- [4] Chen W, Wang W, Lyu Y, Wu Y, Huang P, Hu S, Wei X, Jiao G, Sheng Z, Tang S, Shao G, Luo J. OsVP1 activates *Sdr4* expression to control rice seed dormancy via the ABA signaling pathway[J]. *The Crop Journal*, 2021, 9: 68-78.
- [5] He D, Yang P. Proteomics of rice seed germination[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2013, 4: 246.
- [6] Liu S, Sehgal S K, Li J, Lin M, Trick H N, Yu J, Gill B S, Bai G. Cloning and characterization of a critical regulator for preharvest sprouting in wheat[J]. *Genetics*, 2013, 195(1): 263-273.
- [7] Shu K, Meng Y J, Shuai H W, Liu W G, Du J B, Liu J, Yang W Y. Dormancy and germination: How does the crop seed decide?[J]. *Plant Biology*, 2015, 17(6): 1104-1112.
- [8] Falade K O, Semon O M, Fadairo O S, Oladunjoye A O, Orou K K. Functional and physico-chemical properties of flours and starches of African rice cultivars[J]. *Food Hydrocolloids*, 2014, 39: 41-50.
- [9] Lee H S, Choi M G, Hwang W H, Jeong J H, Lee C G. Occurrence of rice preharvest sprouting varies greatly depending on past weather conditions during grain filling[J]. *Field Crops Research*, 2021, 264: 108087.
- [10] 胡伟民, 马华升, 樊龙江, 阮松林. 杂交水稻制种不育系穗上发芽特性[J]. 作物学报, 2003, 29(3): 441-446.
Hu W M, Ma H S, Fan L J, Ruan S L. Characteristics of pre-harvest sprouting in sterile lines in hybrid rice seeds production[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2003, 29(3): 441-446. (in Chinese with English abstract)
- [11] Liao Y, Bai Q, Xu P, Wu T, Guo D, Peng Y, Zhang H, Deng X, Chen X, Luo M, Ali A, Wang W, Wu X. Mutation in rice abscisic *Acid2* results in cell death, enhanced disease-resistance, altered seed dormancy and development[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 405.
- [12] Nakamura S, Abe F, Kawahigashi H, Nakazono K, Tagiri A, Matsumoto T, Utsugi S, Ogawa T, Handa H, Ishida H, Mori M, Kawaura K, Ogiwara Y, Miura H. A wheat homolog of *MOTHER OF FT AND TFL1* acts in the regulation of germination[J]. *Plant Cell*, 2011, 23(9): 3215-3229.
- [13] Nakamura S, Pourkheirandish M, Morishige H, Kubo Y, Nakamura M, Ichimura K, Seo S, Kanamori H, Wu J, Ando T, Hensel G, Sameri M, Stein N, Sato K, Matsumoto T, Yano M, Komatsuda T. Mitogen-activated protein Kinase Kinase 3 regulates seed dormancy in barley[J]. *Current Biology*, 2016, 26(6): 775-781.
- [14] Sato K, Yamane M, Yamaji N, Kanamori H, Tagiri A, Schwerdt J G, Fincher G B, Matsumoto T, Takeda K, Komatsuda T. Alanine aminotransferase controls seed dormancy in barley[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 11625.
- [15] Bentsink L, Jowett J, Hanhart C J, Koornneef M. Cloning of *DOG1*, a quantitative trait locus controlling seed dormancy in *Arabidopsis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(45): 17042-17047.
- [16] Cao H, Han Y, Li J, Ding M, Li Y, Li X, Chen F, Soppe W J, Liu Y. *Arabidopsis thaliana* *SEED DORMAN-CY 4-LIKE* regulates dormancy and germination by mediating the gibberellin pathway[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2020, 71(3): 919-933.
- [17] Carrillo-barral N, Rodríguez-gacio M D C, Matilla A J. Delay of germination-1 (*DOG1*): A key to understanding seed dormancy[J]. *Plants (Basel)*, 2020, 9(4): 480.
- [18] Liu F, Zhang H, Ding L, Soppe W J J, Xiang Y. *REVERSAL OF RDO5 1*, a homolog of rice seed dormancy4, interacts with bHLH57 and controls ABA biosynthesis and seed dormancy in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2020, 32(6): 1933-1948.
- [19] Hattori T, Terada T, Hamasuna S T. Sequence and functional analyses of the rice gene homologous to the maize *Vp1*[J]. *Plant Molecular Biology*, 1994, 24: 805-810.
- [20] Zhao B, Zhang H, Chen T, Ding L, Zhang L, Ding X, Zhang J, Qian Q, Xiang Y. *Sdr4* dominates pre-harvest sprouting and facilitates adaptation to local climatic condition in Asian cultivated rice[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2022, 64(6): 1246-1263.

- [21] Fan X, Gao F, Liu Y, Huang W, Yang Y, Luo Z, Zhang J, Qi F, Lü J, Su X, Wang L, Song S, Ren G, Xing Y. The transcription factor CCT30 promotes rice preharvest sprouting by regulating sugar signalling to inhibit the ABA-mediated pathway[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2025, 23(2): 579-591.
- [22] Sugimoto K, Takeuchi Y, Ebana K, Miyao A, Hirochika H, Hara N, Ishiyama K, Kobayashi M, Ban Y, Hattori T, Yano M. Molecular cloning of *Sdr4*, a regulator involved in seed dormancy and domestication of rice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(13): 5792-5797.
- [23] Du L, Xu F, Fang J, Gao S, Tang J, Fang S, Wang H, Tong H, Zhang F, Chu J, Wang G, Chu C. Endosperm sugar accumulation caused by mutation of *PHS8/ISA1* leads to pre-harvest sprouting in rice[J]. *Plant Journal*, 2018, 95(3): 545-556.
- [24] Magwa R A, Zhao H, Xing Y. Genome-wide association mapping revealed a diverse genetic basis of seed dormancy across subpopulations in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *BMC Genetics*, 2016, 17: 1-13.
- [25] Meyer R S, Purugganan M D. Evolution of crop species: Genetics of domestication and diversification[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2013, 14(12): 840-852.
- [26] Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis[J]. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19(6): 1349.
- [27] Hilhorst H W M, Karssen C M. Seed dormancy and germination: The role of abscisic acid and gibberellins and the importance of hormone mutants[J]. *Plant Growth Regulation*, 1992, 11: 225-238.
- [28] Omoarelojie L O, Kulkarni M G, Finnie J F, van Staden J. Smoke-derived cues in the regulation of seed germination: Are Ca^{2+} -dependent signals involved?[J]. *Plant Growth Regulation*, 2022, 97(2): 343-355.
- [29] 张毛宁. 基于花生 RIL 群体的鲜种子发芽性状 QTL 定位及分子标记开发[D]. 郑州: 郑州大学, 2022.
- Zhang M N. QTL mapping for fresh seed germination traits based on a peanut RIL population and molecular marker development[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2022. (in Chinese with English abstract)