水稻分蘖角度基因 TIG1 功能性分子标记的开发

和应用

李珍珠, 彭清祥, 邱先进, 徐俊英, 李志新, 刘海洋

(农业农村部长江中游作物绿色高效生产重点实验室(部省共建)/主要粮食作物产业化湖北省协同创新中心/长江大学农学院,湖北荆州 434000)

摘要:水稻分蘖角度是水稻株型建成的重要性状之一,对水稻产量有着重要的贡献。在野生稻导入栽培稻珍汕 97 的 BC₃F₂ 群体第 54 号家系中分蘖角度存在分离,利用 QTL-seq 技术进行水稻分蘖角度的 QTL 定位,在 8 号染色体上检测到一个 QTL 位点。通过对区间内已知基因的序列比对提出 TIG1 (TILLER INCLIDED GROWTH 1) 为候选基因。根据启动子-449bp 处 C→ T 的关键变异设计 KASP 功能性分子标记,并在定位群体和自然品种中进行了验证,证实利用该 KASP 标记可以准确的鉴定出 TIG1 位点的基因型。TIG1 在粳稻中以大角度基因型 TIG1 占绝对优势,而在籼稻中 61.40%的品种为小角度基因型 tig1,38.40% 的品种为大角度基因型 TIG1。该 KASP 标记的开发将使水稻株型的分子标记辅助选择育种更为简单有效。

关键词:水稻;分蘖角度;KASP分子标记;TIG1

Development and Application of Functional Molecular Marker of Rice

Tiller Angle Gene TIG1

LI Zhen-zhu, PENG Qing-xiang, QIU Xian-jin, XU Jun-ying, LI Zhi-xin, LIU Hai-yang (Ministry of Agriculture and Rural Affairs Key Laboratory of Sustainable Crop Production in the Middle Reaches of the Yangtze River (Co-construction by Ministry and Province)/ Hubei Collaborative Innovation Center for Grain Industry/ College of Agriculture, Yangtze University, Hubei Jingzhou 434000)

Abstract: The tiller angle is one of the most important traits in the plant architecture of rice, which significantly determines the rice yield. We developed a BC₃F₂ population by using wild rice as the donor parent and cultivar zhenshan 97 as the recurrent parent. With QTL-seq we detected a QTL on chromosome 8 that modulates the tiller angle. After comparing the gene sequences in this region, the gene *TIG1 (TILLER INCLIDED GROWTH 1)* was identified as the candidate gene. In this study, a KASP molecular marker was developed based on the variation of the -449 bp (C \rightarrow T) in the promoter of *TIG1* gene. The marker was further tested in the mapping population and cultivars, thus approving its usage of genotyping. In japonica rice *TIG1* with large angle is dominant, while 61.40% and 38.40% of indica rice varieties carry *tig1* with small angle and *TIG1* with large angle, respectively. The development of this functional KASP marker would improve the efficiency of conventional rice plant architecture breeding via marker-assisted selection.

Key words: rice;tiller angle; KASP molecular maker;TIG1

近年来,随着世界人口的不断增加,人类对粮食的需求量也不断攀升。水稻是全球近 50%人口的主要粮 食,水稻产量的高低影响着世界粮食安全,高产成为水稻遗传育种长期以来的主要追求目标。株型是影响 水稻产量的重要因素之一,分蘖角度对株型有着显著影响,因此通过优化分蘖角度培育具有理想株型的品 种是作物在单位面积土地上实现高产的重要手段^[1-2]。

水稻分蘖角是分蘖和垂直线之间的夹角,主要取决于基生分蘖节的生长。当分蘖节的近轴生长大于其 远轴生长时,分蘖角较大,反之,分蘖角较窄。自从水稻基因组测序的完成开发出大量 DNA 标记并应用 到水稻 QTL(Quantitative Trait Locus)的定位之后,大大加速了水稻分蘖角度基因的定位和克隆。

URL;

收稿日期: 2022-11-08 修回日期: 网络出版日期:

第一作者研究方向为水稻遗传育种, E-mail: 202072737@yangtzeu.edu.cn; 彭清祥为共同第一作者

通讯作者:刘海洋,研究方向为水稻环境适应性的遗传机制, E-mail: hyliu@yangtzeu.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金(32071989);湖北省重点研发计划(2022BBA002)

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China (32071989); The Key Research and Development Program of Hubei Province (2022BBA002)

近些年来,已经克隆了多个影响水稻分蘖角度的基因。这些基因可以根据其调控方式分为三种类型[3]: 一. 通过影响向地性来调节水稻分蘖角度: Loose Plant Architecture 1 (LPA1) 通过影响淀粉质体的沉积速率来 调节分蘖角度和茎的向地性^[4]; OsAGPL1 和 OsAGPL3 编码 ADP-glucose pyrophosphorylase (AGP) 的大亚 基,通过影响水稻叶鞘、叶枕中的淀粉合成来调节水稻茎向地性和分蘖角^[5]; LAZY2 编码一种新的叶绿体蛋 白,可以和 Oryza sativa plastidic phosphogluc-omutase (OspGM)相互作用来调节重力感应细胞中的淀粉合 成,影响 LAZYI 介导的生长素的侧向运输进行分蘖角度的调控^[6]。二.通过影响生长素的含量和分布来调节 水稻分蘖角度的基因: LAZYI 通过介导重力刺激时生长素的不对称分布来调节水稻分蘖角度和向地性, lazyI 突变体因为向地性降低表现出大分蘖角度表型[7]。Brevis Radix-Like 4 (BRXL4)通过影响 LAZYI 的核定位来 调节水稻的向地性和分蘖角度^[8]。HEAT STRESS TRANSCRIPTION FACTOR 2D (HSFA2D)诱导 LAZYI 的转录 来影响生长素的不对称分布,进而调节水稻分蘖角度^[9]。WUSCHEL-RELATED HOMEOBOX6 (WOX6)和 WOX11 这两个转座子基因通过影响生长素的不对称分布来调节水稻分蘖角度^[9]。OsHOX1 和 OsHOX28 作用 于 HSFA2D 的上游,减弱了植物生长素的横向转运,从而抑制了 WOX6 和 WOX11 在接受重力刺激的植物茎 基下部的表达[10]。OsPIN1和 OsPIN2与 HSFA2d 作用,通过影响生长素的不对称分布来调节水稻分蘖角度[11-12]。 PLANT ARCHITECTURE AND YIELD1 (PAY1)和 Tiller Angle Control 4 (TAC4)都通过调节生长素的运输和分布 来调节水稻分蘖角度^[13-14]。三.调控途径未知的基因: PROSTRATE GROWTH 1 (PROG1)的人工选择导致水 稻植株结构发生巨大变化,不仅导致生长习性从匍匐生长转变为直立生长,而且提高了水稻产量,匍匐生 长植株的主穗粒数仅为直立生长植株的主穗粒数的 57.6%[15-16]。非洲野生稻由匍匐生长向直立生长的非洲栽 培稻的转化是由 PROG7 的选择导致[17]。此外, RICE PLANT ARCHITECTURE DOMESTICATION (RPAD), 基因座的 110kb 和 113kb 的缺失,分别促进了亚洲栽培水稻和非洲栽培稻从匍匐生长向直立生长的转变^[18]。 Tiller Angle Control 1 (TACI)位于 9 号染色体上,是粳稻和籼稻分蘖角度不同的关键调控因子^[19]。Tiller Angle Control 3 (TAC3)位于 3 号染色体上, 与 D2 与 TAC1 一起作用, 通过调节 LOC Os03g51660 的表达来调控水 稻分蘖角度^[20]。TILLER INCLINED GROWTH 1 (TIG1)位于8号染色体上,编码TCP转录激活因子,主要在 分蘖基部进行表达。TIG1 基因通过正向调控细胞扩张基因 EXPA3, EXPB5 和 SAUR39 去促进远地侧细胞伸 长导致近地侧和远地侧细胞伸长不平衡来使分蘖角度增大。根据 TIG1 基因 1329bp 启动子、801bp 编码区和 502bp 非编码区的序列变异,将 216 份材料的序列分为 9 种单倍型。进一步通过表型和表达量的分析发现 H1 单倍型为小角度,比较不同单倍型序列发现 SNP7(-648bp), SNP9(-449bp), SNP12(-310bp)这三个位 点的变异为 H1 单倍型所特有,推测为导致 TIG1 基因功能分化的关键变异。[21]。

目前虽然已经克隆了多个水稻分蘖角度调控基因,并构建了水稻株型调控网络,但能在水稻育种中应用的基因很少。向地性途径和生长素途径的基因主要通过突变体克隆,其是否具有功能性的自然变异不清楚;明确具有功能性自然变异的基因仅有 *PROG1、TAC1*和 *TIG1*。其中 *PROG1*在栽培稻中已经固定为无功能型,仅 *TAC1*和 *TIG1*在水稻栽培品种中具有明确的功能变异位点。遗传分析表明 *TIG1*和 *TAC1* 对分蘖

角度的调控具有加性互作^[21]。因此, *TAC1* 和 *TIG1* 是目前水稻品种中分蘖角度差异的重要调控基因, 也是分子辅助选择育种的主要位点。

功能性分子标记是进行分子标记辅助选择育种最为精准的工具。*TIG1* 是 2019 年克隆的主效基因,在近等基因系中成熟期分蘖角度相差约 30°,对水稻株型改良有着较大的应用前景,但目前尚缺乏 *TIG1* 的功能 性标记^[21]。本研究利用 *TIG1* 的变异位点开发出准确、便捷的 KASP (Kompetitive Allele Specific PCR)标记, 为水稻分蘖角及株型改良提供了有效的工具。

1 材料与方法

1.1 植物材料

本实验以普通野生稻(O. rufipogon Griff.)为供体,栽培稻"珍汕 97"为受体构建 BC₃F₂群体。野生稻表现为大分蘖角度,栽培稻(Oryza sativa L.)表现为小分蘖角度。其中 LHY54 号家系出现分蘖角度分离,将该家系种植 500 株以进行基因定位工作。

1.2 混池测序与 QTL 作图

将LHY54 号家系中具有大分蘖角度和直立极端表型的个体各 30 株,分别组成两个极端混合池。每个 混合池中的个体均取等量叶片样品抽提 DNA 构成混池 DNA,运用二代测序法对两个混池 DNA 样品进行 30X 全基因组测序(建库测序由北京诺禾致源科技股份有限公司完成)。测序数据用 fastp 处理后使用 SIMPLE Pipeline 流程进行 QTL 定位分析^[30],主要包括用 Burrow-Wheeler aligner(BWA)进行 reads 比对、Genome Analysis Toolkit4(GATK4)进行变异位点提取、在 R 语言中用滑窗对∆SNP-index 进行计算作图。

1.3 候选基因的序列比对

在两个混池的测序数据对比到参考基因组后,在比对结果 bam 文件中提取出候选基因的序列,通过 ClustalW 网站进行序列比对,确定 SNP 位点的存在,并将比对的结果在 ENDscript/ESPript 网站中进行作图。 1.4 分子标记的开发

根据此前报导的 *TIG1* 功能性变异位点,在 *TIG1* 启动子-449bp 处 C→T 的突变为功能性变异位点之一。 在 SNP 位点左侧设计上游分型引物 F1 (GACGTGTGTACAAGTGTAGTACTCC) 和 F2(GACGTGTGTACA AGTGTAGTACTCT)。在设计好的上游分型引物 F1 和 F2 的 5'末端,分别加上 FAM (GAAGGTGACCAA GTTCATGCT) VIC(GAAGGTCGGAGTCAACGGATT)接头。再设计下游共同引物 R (ATGAATATGAGC AAAAGTCTTACATTACG),其 3'端避开 A 碱基,引物长度选择 29bp。最终产物长度选择 60-120bp。在 *距 TIG1* 基因约 5.8kb 处的一个 9bp 缺失设计 InDel 分子标记,扩增产物大小为 117bp。引物由生工生物工程 (上海)股份有限公司合成。

1.5 基因型鉴定

用十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法提取 DNA,并将 DNA 的浓度调整为 40-60 ng/ µ L^[22]。对提取好的 叶片 DNA,利用设计好的 KASP 分子标记进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 5 µ L,包含 2.5 µ L FLU-ARMS

2×PCRMix V4, 0.05 µL 上游分型引物 F1, 0.05 µL 上游分型引物 F2, 0.15 µL 下游通用引物 R, 0.5 µL DNA Template。PCR 反应程序为: 95℃预变性 10min, 10 个循环的降落 PCR【95℃ 15s, 61℃→55℃(-0.6℃/循环)】, 35 个循环的扩增(95℃ 15s, 55℃ 1min), 25℃ 1min降温至室温。利用荧光定量 PCR 仪进行结果观察与记录。

利用设计的 InDel 分子标记对提取的 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 10μ L,包含 7.14 μ L ddH2O, 1 μ L 10 × Taq Buffer, 0.2 μ L dNTP Mix, 0.3 μ L 上游引物 F, 0.3 μ L 下游引物 R, 0.06 μ L Taq DNA Polymerase, 1 μ L DNA Template。 PCR 反应程序为: 95°C预变性 3min, 35 个循环的扩增(95°C 15s, 58°C 30s, 72°C 30s), 72°C 5min, 25°C 1min 降温至室温。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳仪, 4%的聚丙烯酰胺凝胶 来跑胶进行结果的查看。

2 结果与分析

2.1 BSA-Seq 获得 QTL 候选位点

野生稻(分蘖角度为 33.1°)和珍汕 97(分蘖角度为 4.6°)分蘖角度差异显著,T 检验 P=2.83E-0.6<0.05(图 1)。以野生稻为供体亲本,珍汕 97 为轮回亲本构建 BC₃F₂ 群体。并在 LHY54 号家系中发现分蘖角度的分离,构建极端混池进行全基因组测序,在去除低质量 reads 之后,以日本晴为参考基因组进行比对。大分蘖角度和直立中分别有 3247986 和 2702916 条 reads 被比对到日本晴参考基因组上。经过 SIMPLE Pipeline 进行分析,发现 chr8 号染色体上后方区段 18408519-25985552 处有明显的ΔSNP-index 指示峰,暗示了该位置存在一个 QTL *qTAC8*(图 2)。此前的研究表明,水稻分蘖角度主效基因 *TIG1* 位于 8 号染色体上的 20931298-20932089。8 号染色体上的分蘖角 QTL 包含了已知基因 *TIG1*。

从混合池基因组测序结果中提取 *TIG1* 基因序列,通过 ClustalW 网站比较大分蘖角度混合池与小分蘖角 度混合池在 *TIG1* 基因处的序列差异,并在 ENDscript/ESPript 网站中作图(附件 1)。序列比较发现在 LHY54 号群体中存在 *TIG1* 基因的三个功能性 SNP 突变: -648bp A→G, -449bp C→T, -3110bp C→T, (附件 1), 与已报导 *TIG1* 的功能突变位点一致,因此我们推测 *TIG1* 为候选位点。



注: a 图和 b 图左边为珍汕 97,右边为野生稻。 Note: a and b show Zhenshan 97 on the left and *Oryza rufipogon* Griff. on the right **图 1 两亲本分蘖角度表型**

2.2 TIG1 功能性 KASP 分子标记的开发和验证

根据 4713 份种质资源的测序数据表明, *TIG1* 基因的三个 SNP 位点紧密连锁,基本不存在分离。通过 对三个突变位点前后的碱基序列分析,选择 *TIG1* 基因启动子区域-449bp 处的功能性突变位点 C→T 设计 K ASP 功能性分子标记,以 SNP 位点上下游序列为标准,设计一条反向通用引物 PR25: TGTATGTTCAGAG GAGATCGAGG,两条等位基因特异引物 PF23: GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGACGTGTGTACAAGT GTAGTACTCC 和 PF24: GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGACGTGTGTACAAGTGTAGTACTCT。其中 P F23 和 PF24 引物中下划线标识的序列分别为试剂盒所带 FAM 荧光接头和 VIC 荧光接头。根据 8 号染色体 20936731 处的 9bp 缺失,设计 InDel 分子标记,以缺失上下游序列为标准,设计正向特异性引物 ZZp1: A TGAATATGAGCAAAAGTCTTACATTACG 和反向特异性引物 ZZp2: AATTCGCCGATGTGCTTTCTG (表 1)。



图 2 水稻分蘖角 QTL 检测 Fig.2 QTL detection of rice tiller angle

表 1 分子标记 Table 1 Molecular marker

名称	序列(5-3)	产物大小
Name	Sequence(5-3)	product size
PF23	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGACGTGTGTACAAGTGTAGTACTCC	
PF24	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGACGTGTGTACAAGTGTAGTACTCT	62bp
PR25	TGTATGTTCAGAGGAGATCGAGG	
ZZp1	ATGAATATGAGCAAAAGTCTTACATTACG	117ha /109ha
ZZp2	AATTCGCCGATGTGCTTTCTG	11/0p/1080p

由测序结果得知 C 为大角度基因型, T 为小角度基因型。利用 KASP 分子标记对亲本和 BC₃F₂ 群体中 第 54 号家系随机 46 个 DNA 样品进行基因分型(图 3)。结果表明两个亲本野生稻为 C/C 基因型,珍汕 97 为 T/T 基因型,在 LHY54 号家系中存在分蘖角度基因 *TIG1* 的分离,12 个单株表示 C/C 基因型;9 个单株 表示 T/T 基因型;25 个单株表示 C/T 基因型,符合 1:2:1 的分离定律(χ²=0.74 < 5.99)。

利用设计的 InDel 分子标记 ZZp1 和 ZZp2 对 TIG1 功能性 KASP 分子标记鉴定的亲本和46个单株的 DNA 样品进行基因分型验证,实验表明亲本中野生稻为大片段(A-TIG1),珍汕 97 为小片段(B-tig1),46 个 单株中 12 个单株显示为大片段(A-TIG1);9 个单株显示为小片段(B-tig1);25 个单株显示为杂合(H-TIG1/tig1) (图 4)。这个结果与 TIG1 的功能性 KASP 分子标记的基因分型结果完全一致(表 2),证明了 KASP 分 子标记的准确性。



注:利用 TIG1 功能性 KASP 分子标记对 BC3F2 群体中第 54 号家系随机 46 个 DNA 样品进行基因分型,图中每个圆点代表一个单株,蓝色表示该样品 基因型为 C/C,红色表示该样品基因型为 T/T,绿色表示该样品基因型为 C/T。

Note: Using the functional KASP molecular markers of *TIG1*, 46 random DNA samples from line 54 in BC₃F₂ population were genotyped. Each dot in the figure represents a single plant. Blue represents the sample genotype as C/C, Red represents the sample genotype as T/T, and green represents the sample genotype as C/T. 图 3 KASP 分子标记在亲本和 BC₃F₂群体中 46 个单株的基因分型结果

Fig.3 Genotyping results of 46 individual plants of KASP molecular markers in parents and BC_3F_2 populations

表 2 KASP 分子标记对亲本和 LHY54 号家系随机 46 个单株基因分型结果

编号	KASP 分型	InDel 分型	编号	KASP 分型	InDel 分型
numebr	KASP genotyping	InDel genotyping	numebr	KASP genotyping	InDel genotyping
野生稻	C/C	А	BC ₃ F ₂ 54-23	C/C	А
珍汕 97	T/T	В	BC ₃ F ₂ 54-24	C/T	Н
BC ₃ F ₂ 54-1	C/T	Н	BC ₃ F ₂ 54-25	C/T	Н
BC ₃ F ₂ 54-2	C/T	Н	BC ₃ F ₂ 54-26	C/C	А
BC ₃ F ₂ 54-3	C/T	Н	BC ₃ F ₂ 54-27	T/T	В
BC ₃ F ₂ 54-4	T/T	В	BC ₃ F ₂ 54-28	T/T	В
BC ₃ F ₂ 54-5	T/T	В	BC ₃ F ₂ 54-29	C/T	Н
BC ₃ F ₂ 54-6	C/T	Н	BC ₃ F ₂ 54-30	C/T	Н
BC ₃ F ₂ 54-7	C/T	Н	BC ₃ F ₂ 54-31	T/T	В
BC ₃ F ₂ 54-8	C/C	А	BC ₃ F ₂ 54-32	C/C	А
BC ₃ F ₂ 54-9	C/T	Н	BC ₃ F ₂ 54-33	C/C	А
BC ₃ F ₂ 54-10	C/C	А	BC ₃ F ₂ 54-34	C/T	Н
BC ₃ F ₂ 54-11	C/C	А	BC ₃ F ₂ 54-35	C/T	Н
BC ₃ F ₂ 54-12	C/C	А	BC ₃ F ₂ 54-36	C/T	Н
BC ₃ F ₂ 54-13	C/C	А	BC ₃ F ₂ 54-37	C/T	Н
BC ₃ F ₂ 54-14	C/T	Н	BC ₃ F ₂ 54-38	T/T	В
BC ₃ F ₂ 54-15	C/T	Н	BC ₃ F ₂ 54-39	C/T	Н
BC ₃ F ₂ 54-16	T/T	В	BC ₃ F ₂ 54-40	C/T	Н
BC ₃ F ₂ 54-17	C/T	Н	BC ₃ F ₂ 54-41	C/C	А
BC ₃ F ₂ 54-18	C/T	Н	BC ₃ F ₂ 54-42	C/T	Н
BC ₃ F ₂ 54-19	T/T	В	BC ₃ F ₂ 54-43	C/C	А
BC ₃ F ₂ 54-20	C/C	А	BC ₃ F ₂ 54-44	C/T	Н
BC ₃ F ₂ 54-21	C/T	Н	BC ₃ F ₂ 54-45	C/T	Н
BC ₃ F ₂ 54-22	T/T	В	BC ₃ F ₂ 54-46	C/T	Н

Table 2 Genotyping results of parents and 46 random individual plants from line LHY54by KASP molecular markers



Note: P1 is wild rice, P2 is Zhenshan 97, 1-46 correspond to 46 individual plants in BC3F2 selected by KASP molecular marker respectively.

图 4 InDel 分子标记在亲本和 BC3F2 群体 LHY54 家系中 46 个单株的基因分型结果

Fig. 4 Genotyping results of parents and 46 individual plants from line LHY54 of BC3F2 population by InDel molecular marker

2.3 TIG1 等位基因型分析以及功能性分子标记对水稻不同种质资源的鉴定

根据 RiceVarMap2 对 4713 份种质资源的测序结果,我们将 TIG1 基因分为 TIG1 大角度基因型和 tig1 小角度基因型。在 2759 个籼稻品种中 TIG1 基因频率占 38.40%, tig1 基因频率占 61.40%;在 1512 个粳稻品种中 TIG1 基因频率占 99.10%, tig1 基因频率占 0.90%(表 3)。可以看出 TIG1 在粳稻中基本固定为 TIG1 大角度基因型,在籼稻品种中则存在分离。用 TIG1 功能性 KASP 分子标记对部分水稻种质资源进行基因型 鉴定(图 5)。在 10 个粳稻品种中除了 CX32, CX277 是 tig1 小角度基因型,其他都是 TIG1 大角度基因型;在 10 个籼稻中除了 IRIS 313-11245,CX347 是 TIG1 大角度基因型,其他都是 tig1 小角度基因型,与种质资源中测序结果一致(表 4)。TIG1 功能性 KASP 标记能够准确的鉴定出种质资源中分蘖角度基因 TIG1 的 基因型。

表 3 TIG1 等位基因型分类与 TIG1 在籼稻和粳稻中的分布

等位基因型		突变位点		数量	粳稻中的分布频率	籼稻中的分布频率
alleles	Mutation sites		number	distribution frequency in	distribution frequency in	
	SNP7	SNP9	SNP12		Xian/indica	Geng/japonica
	-648	-449	-310			
tig1	G	Т	Т	1731	0.90%	61.40%
TIG1	А	С	С	2982	99.10%	38.40%

Table 3 Classification of TIG1 alleles and distribution of TIG1 in indica rice and japonica rice

注: 4713 份种质资源的测序结果来自于 RiceVarMap2(<u>http://ricevarmap.ncpgr.cn/vars_info/?var=vg0820930849</u>).

Note: The sequencing results of 4713 germplasm resources are from RiceVarMap2

(http://ricevarmap.ncpgr.cn/vars_info/?var=vg0820930849) .



注: 所选种质资源包括: 10 个粳稻, 10 个籼稻。在 3,000 Rice Genomes Project 中 10 个粳稻的品种编号: IRIS 313-10430、IRIS 313-9438、CX165、CX139、 CX356、IRIS 313-9002、IRIS 313-8168、IRIS 313-8118、CX32、CX277; 10 个籼稻品种编号: IRIS 313-11245、CX50、IRIS 313-8914、IRIS 313-7815、

IRIS 313-7816, CX270, IRIS 313-11622, IRIS 313-7807, IRIS 313-9822, CX347.

Note: The selected germplasm resources include 10 japonica cultivars and 10 indica cultivars. Accession numbers of 10 japonica rice varieties in 3000 Rice Genomes Project: IRIS 313-10430, IRIS 313-9438, CX165, CX139, CX356, IRIS 313-9002, IRIS 313-8168, IRIS 313-8118, CX32, CX277. Accession numbers of 10 indica rice varieties IRIS 313-11245, CX50, IRIS 313-8914, IRIS 313-7815, IRIS 313-7816, CX270, IRIS 313-11622, IRIS 313-7807, IRIS

313-9822、CX347。

图 5 TIG1 KASP 标记对部分水稻种质资源基因型鉴定的结果

Fig. 5 Genotyping results of rice germplasm accessions by TIG1 KASP marker

表 4 KASP 分子标记对 20 个种质资源 TIG1 基因进行鉴定

Table 4 Genotyping of <i>TIGT</i> gene in ZU germplasm accessions by KASP molecul	lar marke
---	-----------

品种编号	KASP 分型	测序分型	表型(°)	亚种
Variety number	KASP genotyping	Sequencing genotyping	Phenotype (°)	subspecies
IRIS 313-10430	C/C	C/C	7.72	粳稻
IRIS 313-9438	C/C	C/C	8.18	粳稻
CX165	C/C	C/C	8.22	粳稻
CX139	C/C	C/C	8.46	粳稻
CX356	C/C	C/C	8.48	粳稻
IRIS 313-9002	C/C	C/C	8.72	粳稻
IRIS 313-8168	C/C	C/C	9.42	粳稻
IRIS 313-8118	C/C	C/C	10.04	粳稻
CX32	T/T	T/T	4.86	粳稻
CX277	T/T	T/T	5.04	粳稻
IRIS 313-11245	C/C	C/C	9.16	籼稻
CX50	C/C	C/C	8.06	籼稻
IRIS 313-8914	T/T	T/T	4.80	籼稻
IRIS 313-7815	T/T	T/T	4.70	籼稻
IRIS 313-7816	T/T	T/T	4.68	籼稻
CX270	T/T	T/T	4.54	籼稻
IRIS 313-11622	T/T	T/T	4.46	籼稻
IRIS 313-7807	T/T	T/T	4.18	籼稻
IRIS 313-9822	T/T	T/T	4.08	籼稻
CX347	T/T	T/T	3.66	籼稻

注:种质资源测序结果来自 RFGB-3K GROUP(<u>https://www.rmbreeding.cn/pages/haplotype.php</u>)。

Note: Germplasm resource sequencing results are from RFGB-3K GROUP (https://www.rmbreeding.cn/pages/haplotype.php).

3 讨论

KASP 是一种基于荧光检测的基因分型技术,最初由英国的 KBioscience 公司所开发,针对 SNP 位点设 计标记,具有容易,方便,准确等特点^[23]。目前随着测序技术的不断发展,各种类型的基因组数据库被建 立,其中单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点被检测到的最多,KASP 分子标记因 高通量,简单,可重复性高,成本低,具有一定灵活度等特点将成为分子标记的主流^[24]。*TIG1* 的功能性变 异位点为 3 个 SNP 位点,无法设计 InDel/SSR 标记等,只能选择针对 SNP 位点的分子标记,因此我们设计 了 *TIG1* 基因的 KASP 分子标记。 水稻分蘖角度是水稻株型的重要构成因素之一,影响着植株密度、光合效率、倒伏和抗病性,在决定 水稻产量方面起着重要作用。水稻分蘖角度的调控是复杂的,其不仅设计多个基因的控制,也受环境和激 素的影响^[28]。仅凭表型来判断分蘖角度的大小容易产生较大的误差,通过分子标记则可以准确的鉴定分蘖 角度调控基因的基因型,进行分子标记辅助选择育种。我们针对 *TIG1* 功能性 SNP 位点开发的 KASP 分种 子标记能够准确的鉴定出 *TIG1* 基因功能的强弱,并且操作便捷、成本较低,为分子标记辅助选择育种提供 了有效的工具。

目前栽培稻中鉴定出水稻分蘖角度基因功能变异位点较少,仅有有 TIG1 和 TAC1。TAC1 为 2007 年克隆的主效基因,位于 9 号染色体上,是粳稻和籼稻分蘖角度不同的关键调控因子,其第四内含子 3'端剪接位点的单碱基突变降低了 tac1 的水平,导致粳稻表现为紧凑的株型,并已开发出功能性分子标记^[19-29]。TIG1 为 2019 年克隆的主效基因,其存在 3 个功能性 SNP 突变位点,在籼稻驯化过程中通过调节细胞伸长来控制分蘖角度,但是尚缺乏有效的功能标记进行快速鉴定^[21]。我们针对分蘖角度调控基因 TIG1,根据启动子上导致功能差异的 SNP 突变设计 KASP 分子标记,对 TIG1 基因功能的强弱进行鉴定。对 4713 份种质资源调查发现籼稻中 38.40% 的品种为 TIG1 大角度基因型,籼稻新品种培育和籼粳杂交稻新品种培育中 tig1 有巨大的应用空间。本研究中开发出水稻分蘖角调控基因 TIG1 的功能性标记,为水稻的株型改良提供了一个新的工具。

参考文献

- Wang L, Xu Y Y, Zhang C, Ma Q, Joo SH, Kim SK, Xu Z, Chong K... OsLIC, a novel CCCH-type zinc fnger protein with transcription activation, mediates rice architecture via brassinos teroids signaling. PLoS One, 2008,3(10):e3521.
- [2] 王文广,王永红. 作物株型与产量研究进展与展望. 中国科学, 2021,51(10):1366-1375.

Wang W G, Wang Y H, Crop plant architecture and grain yields. Science China, 2021, 51(10): 1366-1375.

- [3] Gao, Wang W G, Gao H B, Liang Y, Li J Y, Wang Y H. Molecular basis underlying rice tiller angle: Current progress and future perspectives. Molecular Plant, 2022,15(1):125-137.
- [4] Wu X R, Tang D, Li M, Wang K J, Cheng Z K. Loose Plant Architecture1, an INDETERMINATE DOMAIN protein involved in shoot gravitropism, regulates plant architecture in rice. Plant Physiology, 2013,161(1):317-329.
- [5] M. Okamura, T. Hirose, Y. Hashida, R. Ohsugi, N. Aoki. Suppression of starch synthesis in rice stems splays tiller angle due to gravitropic insensitivity but does not affect yield. Functional Plant Biology, 2014,42(1):31-41.
- [6] Huang L Z, Wang W G, Zhang N, Cai Y Y, Liang Y, Meng X B, Yuan Y D, Li J Y, Wu D X, Wang Y H. LAZY2 controls rice tiller angle through regulating starch biosynthesis in gravity-sensing cells. New Phytologist, 2021,231(3):1073-1087.
- [7] Li P G, Wang Y H, Qian Q, Fu Z M, Wang M, Zeng D L, Li B H, Wang X J, Li J Y. *LAZY1* controls rice shoot gravitropism through regulating polar auxin transport. Cell Research, 2007,17(5):402-10.
- [8] Li Z, Liang Y, Yuan Y D, Wang L, Meng X B, Xiong G S, Zhou J, Cai Y Y, Han N P, Hua L K, Liu G F, Li J Y, Wang Y H.OsBRXL4 regulates shoot gravitropism and rice tiller angle through affecting *LAZY1* nuclear localization. Molecular Plant, 2019,12(8):1143-1156.

- [9] Zhang N, Yu H, Yu H, Cai Y Y, Huang J Y, Xu C, Xiong G S, Meng X B, Wang J Y, Chen H F, Liu G F, Jing Y H, Yuan Y D, Liang Y, Li S J, M Smith S, Li J Y. A core regulatory pathway controlling rice tiller angle mediated by the *LAZY1*-dependent asymmetric distribution of auxin. Plant Cell, 2018,30(7):1461-1475.
- [10] Hu Y, Li S L, Fan X W, Song S, Zhou X, Weng X Y, Xiao J H, Li X H, Xiong L Z, You A Q, Xing Y Z .OsHOX1 and OsHOX28 redundantly shape rice tiller angle by reducing HSFA2D expression and auxin Content. Plant Physiology, 2020,184(3):1424-1437.
- [11] Xu M, Zhu L, Shou H X, Wu P. A PIN1 family gene, OsPIN1, involved in auxin-dependent adventitious root emergence and tillering in rice. Plant and Cell Physiology, 2005,46(10):1674-81.
- [12] Sun H W, Guo X L, Xu F G, Wu D X, Zhang X H, Lou M M, LUO F F, Xu G H, Zhang Y L. Overexpression of OsPIN2 regulates root growth and formation in response to phosphate deficiency in rice. International Journal of Molecular Sciences, 2019,20(20):5144.
- [13] Zhao L, Tan L B, Zhu Z F, Xiao L T, Xie D X, Sun C Q. PAYI improves plant architecture and enhances grain yield in rice. Plant Journal, 2015,83(3):528-36.
- [14] Li H, Sun H Y, Jiang J H, Sun X Y, Tan L B, Sun C Q. TAC4 controls tiller angle by regulating the endogenous auxin content and distribution in rice. Plant Biotechnology Journal, 2021,19(1):64-73.
- [15] Jin J, Huang W, Gao J P, Shi M, Zhu M Z, Luo D, Lin H X.Genetic control of rice plant architecture under domestication. Nature Genetics, 2008,40(11):1365-1369.
- [16]Tan L B, Li X R, Liu F X, Sun X Y, Li C G, Zhu Z F, Fu Y C, Cai H W, Wang X K, Xie D X, Sun C Q. Control of a key transition from prostrate to erect growth in rice domestication. Nature Genetics, 2008,40(11):1360-1364.
- [17]Hu M, Lv S W, Wu W G. The domestication of plant architecture in African rice. Plant Journal, 2018,94(4):661-669.
- [18].Wu Y Z, Zhao S S, Li X R, Zhang B S, Jiang L Y, Tang Y Y, Zhao J, Ma X, Cai H W, Sun C Q, Tan L B. Deletions linked to PROG1 gene participate in plant architecture domestication in Asian and African rice. Nature Communications, 2018,9:4157.
- [19].Yu B S, Lin Z W, Li H X, Li X J, Li J Y, Wang Y H, Zhang X, Zhu Z F, Zhai W X, Wang X K, Xie D X, Sun C Q. TACI, a major quantitative trait locus controlling tiller angle in rice. The Plant Journal, 2007, 52(5):891-898.
- [20].Dong H J, Zhao H, Xie W B, Han Z M, Li G W, Yao W, Bai X F, Hu Y, Guo Z L, Lu K, Yang L, Xing Y Z. A novel tiller angle gene, TAC3, together with TAC1 and D2 largely determine the natural variation of tiller angle in rice cultivars. PLoS Genetics, 2016,12(11):e1006412.
- [21].Zhang W F, Tan L B, Sun H Y. Natural variations at *TIG1* encoding a TCP transcription factor contribute to plant architecture domestication in rice. Molecular Plant, 2019,12(8):1075-1089.
- [22] M.G.Murray, W.F.Thompson. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research, 1980,8(19):4321-5.
- [23]. K. Semagn, R. Babu, M. Olsen. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR(KASP): overview of the technology and its application incrop improvement. Molecular Breeding, 2014,33(1):1-14.
- [24] 杨青青, 唐家琪, 张昌泉等. KASP 标记技术在主要农作物中的应用及展望. 生物技术通报, 2022, 38(04):58-71.

Yang Q Q, Tang J Q, Zhang C Q, Gao J P, Liu Q Q. Application and Prospect of KASP Marker Technology in Main Crops. Biotechnology Bulletin, 2022.38(04):58-71.

- [25].Yang Z M, Huang D Q, Tang W Q, Zheng Y, Liang K J, Cutler A J, Wu W R. Mapping of quantitative trait loci underlying cold tolerance in rice seedlings via high-throughput sequencing of pooled extremes. PLOS ONE, 2013,8(7):e68433.
- [26].Wang C S, Tang S C, Zhan Q L, Hou Q Q, Zhao Y, Zhao Q, Feng Q, Zhou C C, Lyu D F, Cui L L, Li Y, Miao J S, Zhu C R, Lu Y Q, Wang Y C, Wang Z Q, Zhu J J, Shangguan Y Y, Gong J Y, Yang S H, Wang W Q, Zhang J F, Xie H A, Huang X H, Han B. Dissecting a heterotic gene through GradedPool-Seq mapping informs a rice-improvement strategy. Nature Communications, 2019,10(1):2982.
- [27] McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, DePristo MA. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. Genome Research, 2010,20(9):1297-303.
- [28] He Y, Li L Y, Jiang D G. Understanding the Regulatory Mechanisms of Rice Tiller Angle, Then and Now. Plant Molecular Biology Reporter,

2021,39:640-647.

[29] Gao J, Liang H, Huang J, Qing D, Wu H, Zhou W, Chen W, Pan Y, Dai G, Gao L, Deng G. Development of the PARMS marker of the *TAC1* gene and its utilization in rice plant architecture breeding. Euphytica, 2021,217:3.

[30] Wachsman G, Modliszewski JL, Valdes M, Benfey PN. A SIMPLE Pipeline for Mapping Point Mutations. Plant Physiology, 2017, 174(3): 1307-1313.