

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。目前水稻中可利用的分蘖角度调控基因主要有 *TAC1* (*Tiller Angle Control 1*) 和 *TIG1* (*Tiller Included Growth 1*),需进一步挖掘新的可用基因资源和分子标记以促进水稻理想株型育种。本研究中以大角度的野生稻为供体,小角度的栽培稻珍汕97为受体构建了 BC_3F_2 群体,在第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* 为候选基因。根据 *TIG1* 启动子-449 bp 处 C→T 的关键变异设计 KASP 功能性分子标记,并在定位群体和育成品种中进行了验证,证实利用该 KASP 标记可以准确地鉴定出 *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*, 对水稻株型改良有着重要的潜在利用价值。该 KASP 标记的开发为水稻分蘖角度的分子标记辅助改良提供了新工具,有望加快水稻理想株型的育种进程。

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. At present, the major tiller angle genes in rice are *TAC1* (*Tiller Angle Control 1*) and *TIG1* (*Tiller Included Growth 1*). It is necessary to further explore new loci and molecular markers to promote ideal plant architecture breeding in rice. In this study, a BC_3F_2 population was developed using large-angled wild rice as the donor and small-angled cultivar Zhenshan 97 as the recipient, and tiller angle separation was observed in the 54th line. QTL mapping of tiller angle was performed using QTL-seq, and a QTL was detected on chromosome 8. *TIG1* was identified as the candidate gene through sequence comparison of known genes within the interval. A KASP functional molecular marker was designed based on the causal variation of C→T at -449 bp in the promoter of *TIG1*. The marker was verified in the mapping population and varieties, and it was confirmed that the KASP marker can accurately identify the genotype of the *TIG1* locus. In Geng/*Japonica* *TIG1* with large angle is dominant, while 61.40% and 38.40% of *Xian/Indica* varieties carry *tig1* with small angle and *TIG1* with large angle, respectively. This marker has significant potential utilization value

收稿日期: 2022-11-08 修回日期: 2022-12-26 网络出版日期: 2023-02-01

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20221108001>

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

通信作者: 刘海洋, 研究方向为水稻环境适应性的遗传机制, E-mail: hylu@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)

for improvement of rice plant architecture. The development of this KASP marker provides a new tool for molecular marker-assisted improvement of rice tiller angle and is expected to speed up the breeding process for the ideal rice plant architecture.

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^[1-3]。

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) 定位之后,大大加速了水稻分蘖角度基因的定位和克隆。

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 3 种类型^[4]: (1) 通过影响向地性调节水稻分蘖角度: *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^[5]; *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^[6]; *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 *LAZY1* 介导的生长素的侧向运输进行分蘖角度的调控^[7]。(2) 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: *LAZY1* 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, *lazy1* 突变体因为向地性降低表现出大分蘖角度表型^[8]。 *Brevis Radix-Like 4 (BRXL4)* 通过影响 *LAZY1* 的核定位来调节水稻的向地性和分蘖角度^[9]。 *HEAT STRESS TRANSCRIPTION FACTOR 2D (HSEA2D)* 诱导 *LAZY1* 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 HOMEBOX6 (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^[10]。 *OsHOX1* 和 *OsHOX28* 作用于 *HSEA2D* 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^[11]。 *OsPIN1* 和 *OsPIN2* 与 *HSEA2D* 作用,通过影响生长素的不对称分布来调节水稻分蘖角度^[12-13]。 *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^[14-15]。(3) 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%^[16-17]。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^[18]。此外, *RICE PLANT ARCHITECTURE DOMESTICATION (RPAD)* 基因座的 110 kb 和 113 kb 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^[19]。 *Tiller Angle Control 1 (TAC1)* 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^[20]。 *Tiller Angle Control 3 (TAC3)* 位于 3 号染色体上,与 *D2* 和 *TAC1* 一起作用,通过调节 *LOC_Os03g51660* 的表达来调控水稻分蘖角度^[21]。 *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* 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 1329 bp 启动子、801 bp 编码区和 502 bp 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位于启动子区域的 SNP7 (-648 bp)、SNP9 (-449 bp)、SNP12 (-310 bp) 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^[22]。

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^[22]。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

本研究以普通野生稻 (*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(分蘖角度为33.1°),珍汕97表现为小分蘖角度(分蘖角度为4.6°)。其中第54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。4713份种质资源材料的 *TIG1* 基因型结果来自 RiceVarMap2 网站 http://ricevarmap.ncpgr.cn/vars_info/?var=vg0820930849。选取20个种质资源进行 KASP 标记验证,包含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。

1.2 混池测序与 QTL 作图

在54号家系中选取分蘖角度小于5°的30个单株构成小角度混合池,选取分蘖角度大于35°的30个单株构建大角度混合池。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30×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^[23],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 Δ SNP-index 进行计算作图。

1.3 候选基因的序列比对

将两个混池的测序数据对比到日本晴 RGAP 第7版参考基因组后(<http://rice.uga.edu/index.shtml>),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/ESPrift 网站中进行作图。

1.4 *TIG1* 的 KASP 标记和紧密连锁 InDel 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-449 bp 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 (GACGTGTGTACAAGTGTAGTACTCT)。在设计好的上游分型引物 F1 和 F2 的 5' 末端,分别加上 FAM (GAAGGTGACCAAGTTCATGCT)、VIC (GAAGGT CGGAGTCAACGGATT) 接头。再设计下游共同引物 PR25 (ATGAATATGAGCAAAAGTCTTACATTA CG),其 3' 端避开 A 碱基。最终产物长度为 83 bp。针对距 *TIG1* 基因约 5.8 kb 处的一个 9 bp 缺失设计 InDel 分子标记,扩增产物大小为 108 bp/117 bp,该标记与 *TIG1* 启动子-449 bp 处 C→T 的突变位点紧密连锁,用于 KASP 分子标记结果的验证。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^[24]。对提取的叶片 DNA,利用设计好的 KASP 分子标记进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 5.0 μ L,包含 2.5 μ L FLU-ARMS 2×PCRMix V4 (广州固德生物技术有限公司),0.05 μ L 上游分型引物 F1,0.05 μ L 上游分型引物 F2,0.15 μ L 下游通用引物 R,0.5 μ L DNA Template, ddH₂O 补充至 5.0 μ L。PCR 反应程序为: 95°C 预变性 10 min,10 个循环的降落 PCR [95°C 15 s, 61°C → 55°C (-0.6°C/循环)], 35 个循环的扩增 (95°C 15 s, 55°C 1 min), 25°C 1 min 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 10.0 μ L,包含 7.14 μ L ddH₂O,1.0 μ L 10×Taq Buffer,0.2 μ L dNTP Mix,0.3 μ L 上游引物 ZZp1,0.3 μ L 下游引物 ZZp2,0.06 μ L Taq DNA Polymerase (南京诺唯赞生物科技股份有限公司

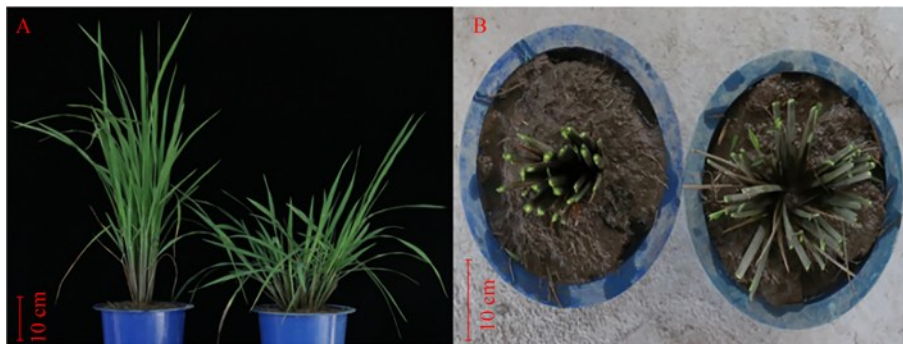
司), 1.0 μ L DNA Template。PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 35 个循环的扩增 (95 $^{\circ}$ C 15 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s), 72 $^{\circ}$ C 5 min, 25 $^{\circ}$ C 1 min 降温至室温。通过 4% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳来进行结果的查看。

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 $^{\circ}$) 和珍汕 97 (分蘖角度为 4.6 $^{\circ}$) 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 54 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。极端大分蘖角度混合池和极端小角度混合池中分别有 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 8 号染色体后方区段 18408519~25985552 bp 处有明显的 Δ SNP-index 指示峰, 暗示了该位置存在 1 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 bp^[22]。8 号染色体上的分蘖角 QTL 位点包含了已知基因 *TIG1*。



A 图和 B 图左边为珍汕 97, 右边为野生稻

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

Fig.1 Tiller angle phenotype of two parent

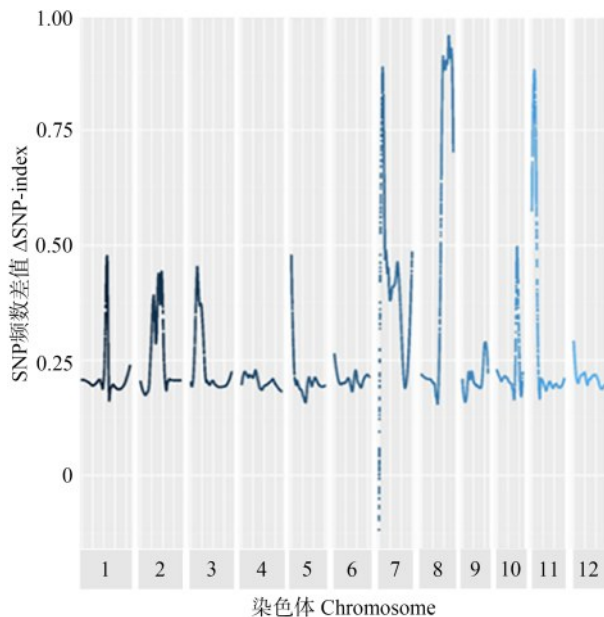


图 2 水稻分蘖角 QTL 检测

Fig.2 QTL detection of rice tiller angle

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/ESPrpt 网站中作图。序列比较发现 54 号家系中存在 *TIG1* 基因的 3 个功能性 SNP 突变: -648 bp A \rightarrow G, -449 bp C \rightarrow T, -310 bp C \rightarrow T, 与已报道 *TIG1* 的功能突变位点一致, 因此推测 *TIG1* 为候选基因 (图 3)。

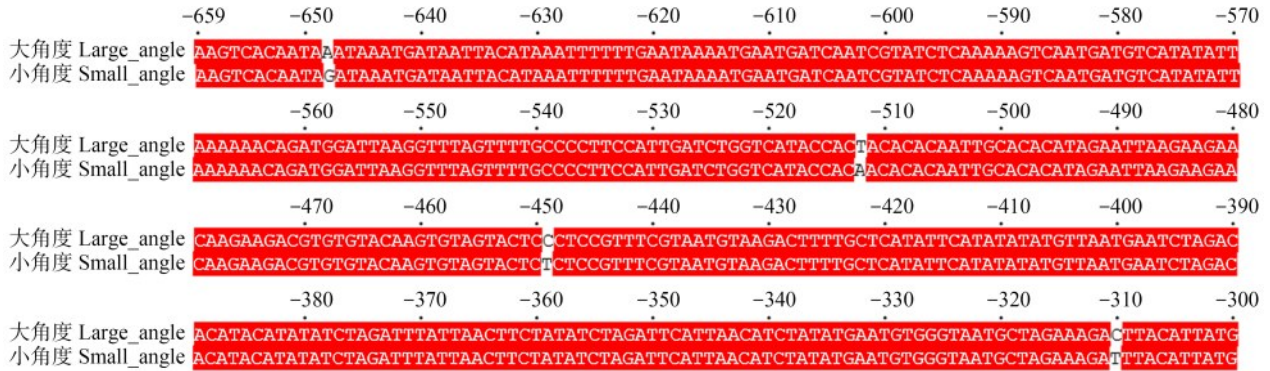
2.2 *TIG1* 功能性 KASP 分子标记的开发和验证

对 4713 份种质资源的测序数据分析表明, *TIG1* 基因的 3 个 SNP 位点紧密连锁, 基本不存在分离。通过对 3 个突变位点前后的碱基序列分析, 选择 *TIG1* 基因启动子区域 -449 bp 处的功能性突变位点 C \rightarrow T 设计 KASP 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、两条等位基因特异引物 PF23 和 PF24。根据 8 号染色体 20936731 bp 处的 9 bp 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 和反向特异性引物 ZZp2 (表 1)。

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 54 号家系随机 46 个单株的 DNA 样品进行基因分型 (图 4)。结果表明亲本野生稻为 C/C 基因型,

珍汕97为T/T基因型,在54号家系中存在分蘖角度基因 *TIG1* 的分离,12个单株为C/C基因型;9个单

株为T/T基因型;25个单株为C/T基因型,符合1:2:1的分离定律($\chi^2 = 0.74 < c_{0.05,2}^2 = 5.99$)。



图中3个突变位点-648 bp, -449 bp, -310 bp与已报道 *TIG1* 的功能突变位点一致

The three mutation sites in the figure are -648 bp, -449 bp and -310 bp, which are consistent with the functional mutation sites of *TIG1* reported

图3 54号家系中 *TIG1* 基因的3处功能性突变位点

Fig.3 Three functional mutation sites of *TIG1* gene in line 54

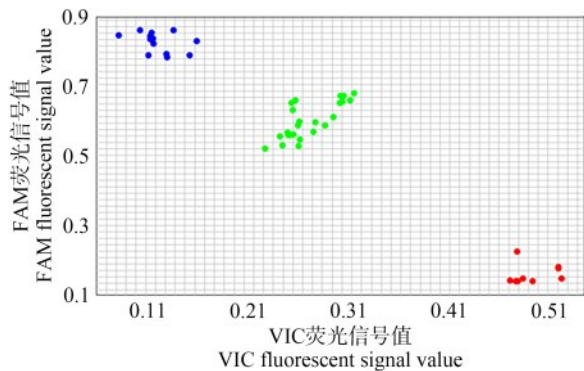
表1 分子标记

Table 1 Molecular marker

| 引物名称 Primer name | 序列(5'-3') Sequence(5'-3') | 产物大小(bp) Product size |
|---------------------|---|--|
| PF23 | <u>GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGACGTGTGTACAAGTGTAGTACTCC</u> | 83 |
| PF24 | <u>GAAGGTGGAGTCAACGGATTGACGTGTGTACAAGTGTAGTACTCT</u> | |
| PR25 | ATGAATATGAGCAAAAAGTCTTACATTACG | 117(大分蘖角度, <i>TIG1</i>) 108(小分蘖角度, <i>tig1</i>) |
| ZZp1 | ATGAATATGAGCAAAAAGTCTTACATTACG | |
| ZZp2 | AATTCGCCGATGTGCTTTCTG | |

PF23和PF24引物中下划线标识的序列分别为FAM荧光接头和VIC荧光接头

The underlined sequences in PF23 and PF24 primers are FAM fluorescent adaptor and VIC fluorescent adaptor, respectively



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;下同
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; Green represents the sample genotype as C/T; The same as below

图4 KASP分子标记在亲本和BC₃F₂群体46个单株的基因分型结果

Fig.4 Genotyping results of 46 individual plants of KASP molecular markers in parents and BC₃F₂ populations

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

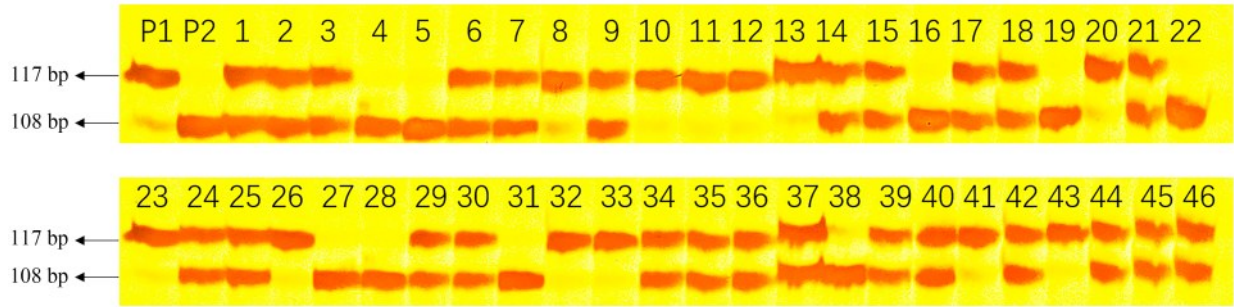
株的DNA样品进行基因分型验证,结果表明亲本中野生稻为大片段(*TIG1*, 117 bp),珍汕97为小片段(*tig1*, 108 bp),46个单株中12个单株显示为大片段(*TIG1*);9个单株显示为小片段(*tig1*);25个单株显示为杂合基因型(*TIG1/tig1*)(图5)。这一结果与 *TIG1* 的功能性KASP分子标记的基因分型结果完全一致(表2),证明了本研究设计的KASP分子标记的准确性。

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,将 *TIG1* 基因分为大角度基因型 *TIG1* 和小角度基因型 *tig1*。在2759个籼稻品种中 *TIG1* 基因型频率占38.40%, *tig1* 基因型频率占61.40%;在1512个粳稻品种中 *TIG1* 基因型频率占99.10%, *tig1* 基因型频率占0.90%(表3)。可以看出 *TIG1* 在粳稻中基本固定为大角度基因型 *TIG1*,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6)。在10个粳稻品种

中除了 CX32、CX277 是小角度基因型 *tig1*, 其他都是大角度基因型 *TIG1*; 在 10 个籼稻中除了 IRIS 313-11245、CX50 是大角度基因型 *TIG1*, 其他都是小

角度基因型 *tig1*, 与种质资源中测序结果一致(表 4、图 6)。结果表明 *TIG1* 功能性 KASP 标记能够准确地鉴定出种质资源中分蘖角度基因 *TIG1* 的基因型。



P1 为野生稻; P2 为珍汕 97; 1-46 分别对应 KASP 分子标记选取的 BC₃F₂ 中的 46 个单株

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

图 5 InDel 分子标记在亲本和 BC₃F₂ 群体 54 号家系 46 个单株的基因分型结果

Fig.5 Genotyping results of parents and 46 individual plants from line 54 of BC₃F₂ population by InDel molecular marker

表 2 KASP 分子标记对亲本和 54 号家系随机 46 个单株基因分型结果

Table 2 Genotyping results of parents and 46 random individual plants from line 54 by KASP molecular markers

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

A 基因型代表大分蘖角度 *TIG1* 基因型; B 基因型代表小分蘖角度 *tig1* 基因型; H 基因型表示杂合基因型

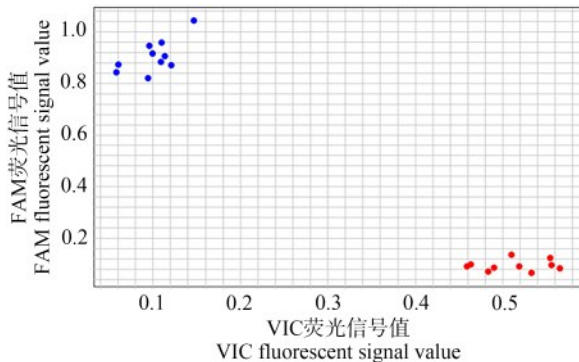
Genotype A represents the big tiller angle *TIG1* genotype; Genotype B represents the small tiller angle *tig1* genotype; Genotype H represents heterozygosity genotype

表3 *TIG1* 等位基因型分类与 *TIG1* 在籼稻和粳稻中的分布Table 3 Classification of *TIG1* alleles and distribution of *TIG1* in *Indica* rice and *Japonica* rice

| 等位基因型 Alleles | 突变位点 Mutation sites | | | 数量 Number | 粳稻中的分布频率(%) Distribution frequency in | 籼稻中的分布频率(%) Distribution frequency in |
|------------------|------------------------|---------|---------|--------------|--|--|
| | -648 bp | -449 bp | -310 bp | | <i>Indica</i> | <i>Japonica</i> |
| <i>tig1</i> | G | T | T | 1731 | 0.90 | 61.40 |
| <i>TIG1</i> | A | C | C | 2982 | 99.10 | 38.40 |

4713 份种质资源的测序结果来自于 RiceVarMap2 (http://ricevarmap.ncpgr.cn/vars_info/?var=v0820930849)

The sequencing results of 4713 germplasm resources are from RiceVarMap2 (http://ricevarmap.ncpgr.cn/vars_info/?var=v0820930849)

图6 *TIG1* KASP 标记对部分水稻种质资源基因型鉴定的结果Fig.6 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* 基因鉴定结果
Table 4 Genotyping of *TIG1* gene in 20 germplasm accessions by KASP molecular marker

| 品种编号 Variety number | KASP 分型 KASP genotyping | 测序分型 Sequencing genotyping | 分蘖角度(°) Tiller angle | 亚种 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 |

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

Germplasm resource sequencing results are from RFGB-3K GROUP (<https://www.mbreeding.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^[25]。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(SNP, single nucleotide polymorphism)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^[26]。近年来, KASP 分子标记被广泛利用,如抗稻瘟病 *Pi2* 基因的 KASP 分子标记开发可以对种质资源进行初步筛选来寻找抗源品种,加快育种进程,亚油酸相关 SNP 位点的 KASP 分子标记开发利于提高胡麻育种效率,缩短育种年限等^[27-28]。*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,因此本研究设计了 *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,其不仅涉及多个基因的控制,也受环境和激素的影响^[29]。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地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。针对 *TIG1* 功能性 SNP 位点开发的 KASP 分子标记能够准确地鉴定出 *TIG1* 的基因型,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 *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 4 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^[19,30]。*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^[22]。本研究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% 的品种为大角度基因型 *TIG1*, 籼稻新品种培育和籼粳杂交稻新品种培育中小角度基因型 *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

- [1] Wang L, Xu Y Y, Zhang C, Ma Q, Joo S H, Kim S K, Xu Z H, Chong K. OsLIC, a novel CCCH-type zinc finger protein with transcription activation, mediates rice architecture via brassinosteroids 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] 蔡跃, 肖宁, 陈梓春, 吴云雨, 余玲, 刘建菊, 时薇, 潘存红, 李育红, 周长海, 季红娟, 黄年生, 张小祥, 李爱宏. 调控水稻分蘖角的分子机制研究进展. *植物遗传资源学报*, 2023, 24(2): 332-339
Cai Y, Xiao N, Chen Z C, Wu Y Y, Yu L, Liu J J, Shi W, Pan C H, Li Y H, Zhou C H, Ji H J, Huang N S, Zhang X X, Li A H. Research progress on molecular mechanisms regulating rice tiller angle. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2023, 24(2): 332-339
- [4] 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
- [5] 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
- [6] Okamura M, Hirose T, Hashida Y, Ohsugi R, Aoki N. Suppression of starch synthesis in rice stems splay tiller angle due to gravitropic insensitivity but does not affect yield. *Functional Plant Biology*, 2014, 42(1): 31-41
- [7] 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
- [8] 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): 402-410
- [9] 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
- [10] Zhang N, Yu H, Yu H, Cai Y Y, Huang L Z, 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, Smith M S, Li J Y, Wang Y H. A core regulatory pathway controlling rice tiller angle mediated by the *LAZY1*-dependent asymmetric distribution of auxin. *Plant Cell*, 2018, 30(7): 1461-1475
- [11] 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 *HSA2D* expression and auxin content. *Plant Physiology*, 2020, 184(3): 1424-1437
- [12] 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): 1674-1681
- [13] 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
- [14] Zhao L, Tan L B, Zhu Z F, Xiao L T, Xie D X, Sun C Q. *PAY1* improves plant architecture and enhances grain yield in rice. *Plant Journal*, 2015, 83(3): 528-536
- [15] 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
- [16] 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
- [17] 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
- [18] Hu M, Lv S W, Wu W G. The domestication of plant architecture in African rice. *Plant Journal*, 2018, 94(4): 661-669
- [19] 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
- [20] 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. *TAC1*, a major quantitative trait locus controlling tiller angle in rice. *The Plant Journal*, 2007, 52(5): 891-898
- [21] 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
- [22] 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
- [23] Wachsmann G, Modliszewski J L, Valdes M, Benfey P N. A simple pipeline for mapping point mutations. *Plant Physiology*, 2017,174(3):1307-1313
- [24] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 1980,8(19):4321-4325
- [25] Semagn K, Babu R, Olsen M. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP) : Overview of the technology and its application in crop improvement. *Molecular Breeding*, 2014,33(1):1-14
- [26] 杨青青, 唐家琪, 张昌泉, 高继平, 刘巧泉. 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(4):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(4):58-71
- [27] 杨义强, 朱林峰, 李晓芳, 付杰, 黄道强, 邱先进, 周少川, 王重荣. 抗稻瘟病基因 *Pi2* 的基因特异性 KASP 标记开发与应用. *植物遗传资源学报*, 2021,22(5):1314-1321
- Yang Y Q, Zhu L F, Li X F, Fu J, Huang D Q, Qiu X J, Zhou S C, Wang C R. Development and application of KASP marker specific for rice blast resistance *Pi2* gene. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2021,22(5):1314-1321
- [28] 穆艳鑫, 伊六喜, 高风云, 赵小庆, 周宇, 贾霄云, 何江峰, 苏少锋, 斯钦巴特尔. 胡麻亚麻酸亚油酸相关 KASP 标记的开发. *植物遗传资源学报*, 2023,24(1):261-278
- Mu Y X, Yi L X, Gao F Y, Zhao X Q, Zhou Y, Jia X Y, He J F, Su S F, SiQin B. Development of KASP markers for linolenic and linoleic acid in flax. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2023,24(1):261-278
- [29] 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
- [30] 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