DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.02035

水稻氮高效、耐冷基因 *OsGRF4* 功能标记的开发及其利用

孙平勇¹ 张武汉¹ 张莉² 舒服¹ 何强¹ 彭志荣¹ 邓华凤^{1,3,*}

¹ 湖南杂交水稻研究中心杂交水稻国家重点实验室, 湖南长沙 410125; ² 湖南省核农学与航天育种研究所, 湖南长沙 410125; ³ 湖南省农业科学院, 湖南长沙 410125

摘要: 通过分子标记辅助选择(molecular marker-assisted selection, MAS)培育氮高效水稻品种是减少氮肥使用量、发展绿色农业和可持续农业的一个重要途径。水稻 *OsGRF4* 基因编码生长调节因子蛋白, 编码区第 487 和 488 碱基由 TC 变异为 AA, 导致丝氨酸突变为赖氨酸, 使得水稻具有氮高效利用、高产和耐冷的特性。为了提高 *OsGRF4* 基因在育种中的选择效率, 本研究根据功能 SNP (single nucleotide polymorphism)位点设计和筛选出等位基因特异 PCR (polymerase chain reaction)功能标记 PF+DMR+PR 和 PF+XMR+PR。利用此功能标记对不同品种(品系)和川大粒/巨穗稻的 F₂ 群体进行基因型检测, 结合测序分析验证, 能准确快速鉴定 *OsGRF4* 的纯合显性、纯合隐性和杂合基因型, 且具有操作简单、成本低的特点。本研究开发的功能标记为通过 MAS 方法利用 *OsGRF4* 基因培育氮高效、高产和耐冷水稻新品种提供了技术支撑。

关键词: 水稻; 氮高效利用; 耐冷; *OsGRF4* 基因; 等位基因特异性 PCR

Development and application of functional marker for high nitrogen use efficiency and chilling tolerance gene *OsGRF4* in rice

SUN Ping-Yong¹, ZHANG Wu-Han¹, ZHANG Li², SHU Fu¹, HE Qiang¹, PENG Zhi-Rong¹, and DENG Hua-Feng^{1,3,*}

¹ State Key Laboratory of Hybrid Rice, Hunan Hybrid Rice Research Center, Changsha 410125, Hunan, China; ² Nuclear Agriculture and Space Breeding Research Institute, Changsha 410125, Hunan, China; ³ Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, Hunan, China

Abstract: The use of molecular marker-assisted selection (MAS) to breed rice with high nitrogen-use efficiency is one of the most effective methods to reduce the amount of nitrogen fertilizer quantity and to develop the green and sustainable agriculture. The gene growth-regulating factor 4 (*OsGRF4*) encodes a growth regulatory factor protein, and the mutation in the coding region from the nucleotides TC to AA in 487 and 488 substituted the amino acid serine for lysine, which resulting in enhancing nitrogen-use efficiency, increasing grain yield, and improving chilling tolerance in rice. In order to improve the selection efficiency of *OsGRF4* in rice breeding, an allele-specific PCR (AS-PCR) marker combination, PF+DMR+PR and PF+XMR+PR, was developed based on the single nucleotide polymorphism in the functional region of the *OsGRF4* alleles. The functional marker was used to identify genotypes of different varieties and an F₂ population derived from Chuandali/Jusuidao. The three different genotypes of *OsGRF4* locus could be accurately distinguished, which was further confirmed by sequencing. This functional marker is simple to operate and low-cost, and could provide a technical support when using MAS to breed new rice varieties of high nitrogen-use efficiency, high yields, and increased chilling tolerance.

Keywords: rice; high nitrogen-use efficiency; chilling tolerance; *OsGRF4* gene; AS-PCR

本研究由湖南省自然科学基金项目(2019JJ50427, 2020JJ5287), 湖南省科技重大专项项目(2018NK1020-1)和湖南农业科技创新资金项目(2020CX08, 2019TD06)资助。

This study was supported by the Natural Science Foundation of Hunan (2019JJ50427, 2020JJ5287), the Hunan Province Key Research and Development Program Project (2018NK1020-1), and the Hunan Agricultural Science and Technology Innovation Project (2020CX08, 2019TD06).

* 通信作者(Corresponding author): 邓华凤, E-mail: dhf@hhrc.ac.cn

第一作者联系方式: E-mail: zlsy23@126.com

Received (收稿日期): 2020-05-22; Accepted (接受日期): 2020-08-19; Published online (网络出版日期): 2020-09-10.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20200908.1547.002.html>

2020年5月,世界实时统计数据显示全球人口已达77.85亿。按照每年1亿的增长速度,到2050年,全球人口总数将接近100亿。据预测,到本世纪中叶全世界的农业水平要比2005年提高60%~120%才能养活100亿人口。水稻是最重要的粮食作物之一,稻谷的增产与稳产对我国乃至世界的粮食安全至关重要。适量的氮肥使用对于提高水稻产量和改善稻米品质起着重要作用。然而,近年来我国在追求水稻高产过程中,过量施用氮肥及氮肥利用率低已成为普遍现象^[1-2]。这不仅增加水稻生产成本,影响稻米品质,而且对生态环境造成严重的影响。因此,提高水稻的氮利用率刻不容缓。研究表明,不同施氮水平下,氮高效水稻“库”大、“源”足、“流”畅,其库容量和产量均明显高于氮低效水稻^[3]。因此,挖掘水稻氮高效基因并通过分子标记辅助选择(molecular marker-assisted selection, MAS)培育氮高效水稻品种是发展绿色、高效和可持续发展农业的一个重要途经^[4]。

近年来,随着测序技术、基因编辑和功能基因组学的飞快发展,加速了水稻氮吸收与调控基因的克隆及其分子机理的解析。目前, *OsNRT1*^[5]、*DEP1*^[6]、*TONDI*^[7]、*OsPTR6*^[8]、*OsNAR2.1*^[9]、*NRT1.1B*^[10-11]、*OsNRT2.3*^[12]、*OsGRF4*^[13]、*OsNR2*^[14]、*OsNPF6.1*^[15]、*OsNAC42*^[15]等参与氮吸收和转运的基因被成功克隆。其中, *OsGRF4*是氮高效利用的一个关键基因,通过平衡生长调节因子*OsGRF4*与生长抑制因子*DELLA*之间的关系,可以同时增加“绿色革命”水稻品种的氮利用效率和产量^[13]。*OsGRF4*是一个多效基因,本团队最先将粒形基因*GS2/OsGRF4*精确定位在水稻第2染色体33 kb的区间^[16]。后来发现水稻*OsGRF4*基因编码区序列全长1185 bp,有5个外显子。第3外显子的SNP3位点由TC突变为AA,导致丝氨酸变异为赖氨酸,使得水稻籽粒落粒性降低、产量增加、氮利用率提高和苗期耐冷性增强。此突变正好位于*miR396*的调控结合部位,为功能位点^[13,17-22]。

为了通过MAS方法培育氮高效、耐冷和高产水稻新品种,加快育种进程,本研究根据*OsGRF4*基因功能位点的碱基差异,设计了2组功能标记。进一步利用该标记对水稻种质资源和川大粒/巨穗稻F₂群体的*OsGRF4*基因进行了鉴定,结合测序数据证明了该功能标记只需通过PCR (polymerase chain reaction) 扩增和琼脂糖电泳即可快速准确鉴定出*OsGRF4*纯合型、杂合型和*Osgrf4*纯合型3种基因型。本研究开发的功能标记为*OsGRF4*基因的分子育种奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试水稻材料包括携带*OsGRF4*功能基因的对照品种川大粒与近等基因系NIL-*OsGRF4*,不携带功能基因的对照品种巨穗稻与NIL-*Osgrf4*,不同来源的20个品种资源,以及川大粒/巨穗稻的F₂群体22个单株。所有材料均于2019年正季种植于湖南杂交水稻研究中心试验田。供试引物:与*OsGRF4*共分离的分子标记GL2-11-F: 5'-GAGAAAGCCATTAGTCA-3', GL2-11-R: 5'-TCTACCAAACCAAAACAA-3'^[16]。

1.2 *OsGRF4* 基因功能标记的设计与合成

根据*OsGRF4*基因序列和功能位点的差异,通过Primer Premier 5软件设计了6条引物。引物序列为PF: 5'-CTGTGAACCAACACCCTG-3', PR: 5'-CGGC AATAGCAGGGTAAA-3', DR: 5'-CGTTTCCACAG GCTTTCTTTT-3', XR: 5'-CGTTTCCACAGGCTTT CTTGA-3', DMR: 5'-CGTTTCCACAGGCTTTCCTT T-3', XMR: 5'-CGTTTCCACAGGCTTTCCTGA-3', 其中下划线的碱基C是人为引入的错配碱基。引物由北京擎科新业生物技术有限公司合成。

1.3 DNA 提取、PCR 扩增和电泳检测

取水稻幼苗期叶片,CTAB法提取基因组DNA。利用T3 Super Mix体系(北京擎科新业生物技术有限公司)进行PCR扩增:98 预变性2 min;98 变性10 s、57 复性10 s、72 延伸10 s,35个循环;72 延伸2 min;4 冷却,反应产物在1.5%的琼脂糖凝胶上100 V电泳40 min;染色后于凝胶成像系统下观察分析。

2 结果与分析

2.1 *OsGRF4* 基因功能标记的开发策略

根据*OsGRF4*基因功能位点SNP3 (TC-AA)的突变设计功能标记,总共开发了6条引物。首先,设计一对外引物PF和PR用作参考对照,无论是哪种基因型都能扩增出488 bp的条带,其扩增产物包含SNP3位点;再根据SNP3的多态性设计2条反向内引物DR和XR,其3'端分别对应碱基AA和TC,DR与*OsGRF4*基因完全匹配,XR与*Osgrf4*完全匹配;此外,为了增强PCR扩增的特异性,分别在引物DR和XR的3'端第4位人为引入错配碱基C,设计了引物DMR和XMR。根据设计引物的原理进行预测:如果含有*OsGRF4*基因,引物组合PF、DR (或DMR)和PR则能扩增出488 bp和370 bp两条目的带,而PF、XR (或XMR)和PR组合则只能扩增出488 bp的目的带;如果含有等位基因*Osgrf4*,引物组合PF、DR (或DMR)

和PR只能扩增出488 bp的目的带, PF、XR (或XMR)和PR组合能扩增出488 bp和370 bp两条目的带; 假如是杂合型, PF、DR (或DMR)和PR组合以及PF、XR (或XMR)和PR组合均能扩出370 bp和488 bp两目标带(图1)。因此, 利用2种引物组合通过2次PCR扩增就可以区分2种纯合和1种杂合基因型。

图1 *OsGRF4* 基因功能标记设计策略

Fig. 1 Strategy of functional markers design for *OsGRF4*

SNP3 为功能性多态位点, PF 和 PR 为外引物, DR 和 XR 为反向内引物, 分别与碱基 AA 和 TC 匹配。分别在 DR 和 XR 的 3'端引入错配碱基 C 开发了 DMR 和 XMR。箭头表示扩增方向。SNP3 indicates functional polymorphic sites; PF and PR are outer primers; DR and XR are reverse inner primers, which matching the bases AA and TC, respectively. A mismatch base C was introduced in the 3' end of DR and XR to develop DMR and XMR. The arrows indicate amplification direction of the primers.

2.2 *OsGRF4* 基因功能标记的筛选和验证

为了筛选最优的功能标记, 以川大粒(携带功能基因*OsGRF4*)和巨穗稻(携带*Osgrf4*)的DNA为模板, 通过不同引物组合进行PCR扩增。图2所示, PF+PR引物在川大粒和巨穗稻中均能扩出488 bp的目标带(泳道1和泳道2); PF+DR或PF+DMR在川大粒中能扩出370 bp的目标带(泳道3和泳道11), 而在巨穗稻中扩不出(泳道4和泳道12); PF+XR或PF+XMR在巨穗稻中能扩出370 bp的目标带(泳道6和泳道14), PF+XR在川大粒中能扩出淡淡的目的带(泳道5, 理论上应该扩不出), 而PF+XMR在川大粒中扩不出(泳道13), 因此 PF+XMR 优于 PF+XR 组合; PF+DR+PR 或 PF+DMR+PR组合在川大粒中能扩出370 bp和488 bp的两目标带(泳道7和泳道15), 而在巨穗稻中只能扩出一条488 bp的带(泳道8和泳道16); PF+XR+PR或PF+XMR+PR在巨穗稻中能扩出370 bp和488 bp的两目标带(泳道10和泳道18), 但是PF+XMR+PR的扩增效果要优于PF+XR+PR, 2种组合在川大粒中均只能扩出一条488 bp的带(泳道9和泳道17)。因此, 确定 PF+DMR+PR和PF+XMR+PR为最优的功能标记组合。

图2 不同引物组合对川大粒和巨穗稻的 PCR 扩增效果

Fig. 2 PCR amplification of Chuandali and Jusuidao using different primer pairs

单数泳道为川大粒; 双数泳道为巨穗稻; M: 100 bp marker; 1, 2: PF+PR; 3, 4: PF+DR; 5, 6: PF+XR; 7, 8: PF+DR+PR; 9, 10: PF+XR+PR; 11, 12: PF+DMR; 13, 14: PF+XMR; 15, 16: PF+DMR+PR; 17, 18: PF+XMR+PR.

The singular lane is 'Chuandali', the dual lane is 'Jusuidao'. M: 100 bp marker; 1, 2: PF+PR; 3, 4: PF+DR; 5, 6: PF+XR; 7, 8: PF+DR+PR; 9, 10: PF+XR+PR; 11, 12: PF+DMR; 13, 14: PF+XMR; 15, 16: PF+DMR+PR; 17, 18: PF+XMR+PR.

2.3 功能标记对不同品种 *OsGRF4* 基因型的鉴定

以川大粒、巨穗稻以及近等基因系NIL-*OsGRF4*和NIL-*Osgrf4*为对照, 利用设计的功能标记对20份不同来源的种质资源进行检测。结果显示: 川大粒与NIL-*OsGRF4*的扩增结果一致, 巨穗稻与NIL-*Osgrf4*的结果一致。当以PF+DMR+PR组合进行扩增时, 20份资源均只能得到1条488 bp的目标带(图3-A); 当以PF+XMR+PR组合进行扩增时, 20份资源均能扩出370 bp和488 bp两目标带(图3-B)。说明这些品种均不含有*OsGRF4*功能基因, 这与文献报道的*OsGRF4*突变位点为稀有变异一致^[19,21]。此外, 功能标记PF+DMR+PR和PF+XMR+PR的检测方法与测序结果^[21]完全一致, 因此, 利用此功能标记可以准确快速鉴定水稻资源中是否含有氮高效、耐冷基因*OsGRF4*。

2.4 功能标记对 F_2 分离群体 *OsGRF4* 基因型的鉴定

为了进一步验证功能标记对杂合基因型的鉴定效果, 对川大粒/巨穗稻 F_2 群体的22个单株进行检测。首先, 利用与*OsGRF4*共分离标记GL2-11对 F_2 的22个单株进行基因型分析, 结果显示有5个单株(泳道3、泳道6、泳道8、泳道11和泳道16)为*OsGRF4*纯合型, 8个单株为*Osgrf4*纯合型(泳道17~24), 9个单株能扩出2种亲本条带为杂合型(图4)。然后, 利用功能标记对这22个单株进行PCR扩增, 为了便于观察分析, 根据GL2-11的结果将样品以*OsGRF4*纯合型、杂合型和*Osgrf4*纯合型的顺序排列。结果显示, 如果是*OsGRF4*纯合型(泳道3~7), 当以PF+DMR+PR组合进行扩增时, 能扩出370 bp和488 bp的2条目标带, 而

PF+XMR+PR组合则只能得到1条488 bp的目标带;*Osgrf4*纯合型(泳道17~24)的结果与*OsGRF4*纯合型恰好相反;而杂合型(泳道8~16), PF+DMR+PR组合和PF+XMR+PR组合均能扩出370 bp和488 bp两条目

标带(图5), 检测结果与预期的结果完全一致。因此, 本文设计的功能标记可以有效对*OsGRF4*纯合、杂合型和*Osgrf4*纯合3种基因型进行准确鉴定, 适合用于*OsGRF4*基因的MAS育种。

图3 功能标记对不同水稻品种 *OsGRF4* 基因型的检测

Fig. 3 Molecular detection of *OsGRF4* genotypes by functional markers in different rice varieties

A: PF+DMR+PR 引物组合; B: PF+XMR+PR 引物组合; M: 100 bp marker; 1: 川大粒; 2: 巨穗稻; 3: NIL-*OsGRF4*; 4: NIL-*Osgrf4*; 5~24: 农香 99, 玉针香, 湘晚粳 17, 冈 46B, BL122, 佳辐占, 农香 18, 明恢 86, 新银占, 玉柱香, R700, 丰源 B, 农香 29, 南洋占, R299, 02428, C418, P7144, 农香 16, CY016。

A: PF+DMR+PR; B: PF+XMR+PR; M: 100 bp marker; 1: Chuandali; 2: Jusuidao; 3: NIL-*OsGRF4*; 4: NIL-*Osgrf4*; 5~24: Nongxiang 99, Yuzhenxiang, Xiangwanxian 17, Gang 46B, BL122, Jiafuzhan, Nongxiang 18, Minghui 86, Xinyinzhan, Yuzhuxiang, R700, Fengyuan B, Nongxiang 29, Nanyangzhan, R299, 02428, C418, P7144, Nongxiang 16, CY016。

图4 与 *OsGRF4* 共分离标记 GL2-11 对川大粒/巨穗稻部分 F_2 群体基因型的检测

Fig. 4 Molecular detection of genotypes by co-separation marker GL2-11 in F_2 population derived from Chuandali/Jusuidao

M: 100 bp marker; 1: 川大粒; 2: 巨穗稻; 3~24: F_2 分离单株。

M: 100 bp marker; 1: Chuandali; 2: Jusuidao; 3~24: individual plants isolated from F_2 population。

图5 功能标记对川大粒/巨穗稻部分 F_2 群体 *OsGRF4* 基因型的检测

Fig. 5 Molecular detection of *OsGRF4* genotypes by functional markers in F_2 population derived from Chuandali/Jusuidao

M: 100 bp marker; A: PF+DMR+PR; B: PF+XMR+PR; 1: 川大粒; 2: 巨穗稻; 3~24: F_2 分离单株。

M: 100 bp marker; A: PF+DMR+PR; B: PF+XMR+PR; 1: Chuandali; 2: Jusuidao; 3~24: individual plants isolated from F_2 population。

3 讨论

MAS育种是利用与目标基因紧密连锁或者来自目标基因内部的分子标记, 对杂交后代的基因型进行快速准确鉴定, 达到选择目标性状的目的。它不受外界环境的干扰, 因此能显著提高育种的效率, 已成为作物遗传改良的重要辅助工具。根据基因组测序数据库预测, 水稻大约有4~5万个功能基因, 目前有1000多个控制产量、品质、株型以及抗生物逆境与非生物逆境的基因被克隆^[23]。虽然已克隆的基因较多, 但是通过MAS手段在水稻育种中得以利用的却是少数, 主要是缺乏简单实用的分子标记^[24]。

开发简便、经济和实用的分子标记是高效开展作物MAS育种的基础。早期开发的大多是与目标基因紧密连锁或共分离的分子标记, 这种标记与目标基因之间会发生重组交换, 容易导致假阳性和选择效率低。如程保山等^[25]利用连锁SSR标记对育性恢复基因*Rf-1*进行选择, 结果表明3726R系列的育性恢复力只有94.1%。梁毅等^[26]利用共显性InDel标记对广谱抗稻瘟基因*Pigm*进行选择, R640×谷梅4号组合的稻瘟病抗性选择率只有95%。后来Andersen等^[27]提出功能标记的概念, 它是根据等位基因功能位点的DNA序列差异设计的标记。由于来自基因本身,

功能标记不会发生重组交换而导致假阳性,对目标基因的选择效率可以达到100%,因此功能标记在水稻MAS中被广泛应用^[28-29]。胡雪娇等^[30]根据水稻耐高温基因*TTI*功能SNP (single nucleotide polymorphisms)的差异设计了dCAPS标记,可以对F₂群体的不同基因型进行准确鉴定。陈涛等^[31]根据除草剂抗性基因*ALS*编码区碱基差异开发的功能标记,可以准确区分3种不同的基因型,并且选择的结果与苗期除草剂的抗性完全一致。

水稻很多基因的功能是由于SNP的变异造成的,比如水稻香味基因*OsBADH2*^[32]、稻瘟病抗性基因*Bsr-dl*^[33]、粒重主效基因*GS3*^[34]、抗除草剂基因*bel*^[35]、氮高效基因*NRT1.1B*^[36]、耐冷基因*COLD1*^[37],以及本研究的氮高效、耐冷基因*OsGRF4*^[17-22]。SNP检测的主要方法是通过PCR扩增,然后对扩增产物进行回收测序。另一种方法是根据SNP信息开发CAPS或者dCAPS标记,它受酶切位点的限制,同时需要增加酶切的步骤。测序和酶切的方法增加了检测成本和劳动强度,不适合检测大量的遗传材料。扩增阻滞突变系统PCR (amplification refractory mutation system PCR, ARMS-PCR)又称等位基因特异性PCR (allele-specific PCR, AS-PCR),其原理是根据目的基因SNP的差异分别设计特异引物,只在匹配的基因型中有扩增产物,可以鉴定出包括杂合型的3种基因型。AS-PCR省去了测序和酶切的步骤,具有快速和费用低的特点,已广泛用于水稻MAS育种。王军等根据水稻稻瘟病抗性基因*Bsr-dl*功能区域的核苷酸差异开发了AS-PCR功能标记,可以准确鉴定出*Bsr-dl*的不同基因型^[38]。后来在ARMS-PCR的基础之上开发了四引物扩增受阻突变PCR (tetra-primer ARMS-PCR),通过1次PCR扩增就可以区分3种基因型^[39]。然而Tetra-Primer ARMS-PCR的4条引物在同一PCR体系中,引物的浓度比、酶的浓度以及退火温度都会影响扩增效率和特异性,因此很难避免扩增效率低和非特异延伸的问题,最终导致检测准确性降低,限制了其在MAS中的应用^[39-40]。

氮素是水稻生长发育所必需的营养元素,水稻产量与氮肥的施用量密切相关。研究表明粳稻比籼稻的氮肥利用率要低^[41]。过量施用氮肥会造成严重的生态环境问题,解决此问题的关键是通过MAS培育氮高效利用的水稻品种。*OsGRF4*是氮高效利用的一个重要基因,利用*OsGRF4*可以实现产量和氮肥利用率的双增长^[13]。此外,*OsGRF4*的突变类型属于

稀有变异^[19,21],是一种新的遗传资源,因此它在水稻遗传育种中具有较大的应用前景。Makoto Matsuoka在*Nature*上评论说,*OsGRF4*将在可持续农业中发挥巨大的作用^[42]。开发*OsGRF4*基因的功能标记是开展该基因MAS育种的前提。本研究对AS-PCR进行了改进,增加了1对外引物用作参考对照,无论是哪种基因型都能扩增出488 bp的条带;此外,根据*OsGRF4*功能位点SNP3 (TC-AA)的突变开发了相应的内引物。通过优化筛选证明,在3'端第4位引入错配碱基的引物组合比没有引入错配的组合的扩增效果要好,最终确定PF+DMR+PR和PF+XMR+PR为*OsGRF4*基因最优的功能标记组合。通过2次PCR扩增,对水稻不同品种资源以及F₂群体的*OsGRF4*进行鉴定,结合测序的结果,证明本研究开发的功能标记可以同时*OsGRF4*纯合、杂合型和*Osgrf4*纯合3种基因型进行精准快速鉴定。在利用*OsGRF4*基因进行回交选育的过程中,大多情况只需把目标基因型AA纯合和AA/TC杂合型筛选出来就可以,利用本研究的PF+DMR+PR引物组合进行1次PCR反应就可以准确快速筛选出2种目标基因型。因此本研究开发的功能标记组合可以很好的应用于相关资源*OsGRF4*基因鉴定与MAS育种。

4 结论

根据氮高效、耐冷基因*OsGRF4*功能区域存在的单核苷酸差异(TC-AA),并在3'端第4位引入1个错配碱基,开发了AS-PCR功能标记组合PF+DMR+PR和PF+XMR+PR。PF+DMR+PR能特异扩增*OsGRF4*纯合基因型;PF+XMR+PR能特异扩增*Osgrf4*纯合基因型;PF+DMR+PR与PF+XMR+PR均能扩增出2条带的为杂合型。该标记可以对水稻品种资源以及F₂群体的*OsGRF4*进行精准快速鉴定,因此能用于分子育种培育氮高效、高产和耐冷水稻新品种。

References

- [1] Ju C X, Buresh R J, Wang Z Q, Zhang H, Liu L J, Yang J C, Zhang J H. Root and shoot traits for rice varieties with higher gain yield and higher nitrogen use efficiency at lower nitrogen rates application. *Field Crops Res*, 2015, 175: 47-55.
- [2] 霍中洋, 李杰, 张洪程, 戴其根, 许轲, 魏海燕, 龚金龙. 不同种植方式下水稻氮素吸收利用的特性. *作物学报*, 2013, 38: 1908-1919.
- Huo Z Y, Li J, Zhang H C, Dai Q G, Xu K, Wei H Y, Gong J L. Characterization of nitrogen uptake and utilization in rice under different planting methods. *Acta Agron Sin*, 2013, 38: 1908-1919

- (in Chinese with English abstract).
- [3] 陈琛, 张家星, 李万元, 唐东, 罗刚, 王祥菊, 莫兰婧, 吕旻珈, 周娟, 梁国华, 黄建晔, 王余龙, 姚友礼, 董桂春. 氮高效水稻主要源库性状的基本特点及其调控. 中国水稻科学, 2017, 31: 185–194.
Chen C, Zhang J X, Li W Y, Tang D, Luo G, Wang X J, Mo L J, Lyu M J, Zhou J, Liang G H, Huang J Y, Wang Y L, Yao Y L, Dong G C. Fundamental features of source-sink characters and their regulation in high nitrogen efficiency rice lines. *Chin J Rice Sci*, 2017, 31: 185–194 (in Chinese with English abstract).
 - [4] 蒋志敏, 王威, 储成才. 植物氮高效利用研究进展和展望. 生命科学, 2018, 30: 1060–1071.
Jiang Z M, Wang W, Chu C C. Towards understanding of nitrogen use efficiency in plants. *Chin Bull Life Sci*, 2018, 30: 1060–1071 (in Chinese with English abstract).
 - [5] Lin C M, Koh S, Stacey G, Yu S M, Lin T Y, Tsay Y F. Cloning and functional characterization of a constitutively expressed nitrate transporter gene, *OsNRT1*, from rice. *Plant Physiol*, 2000, 122: 379–388.
 - [6] Sun H, Qian Q, Wu K, Luo J, Wang S, Zhang C, Ma Y, Liu Q, Huang X, Yuan Q, Han R, Zhao M, Dong G, Guo L, Zhu X, Gou Z, Wang W, Wu Y, Lin H, Fu X. Heterotrimeric G proteins regulate nitrogen-use efficiency in rice. *Nat Genet*, 2014, 46: 652–656.
 - [7] Zhang Y J, Tan L B, Zhu Z F, Yuan L X, Xie D X, Sun C Q. *TOND1* confers tolerance to nitrogen deficiency in rice. *Plant J*, 2015, 81: 367–376.
 - [8] Fan X, Xie D, Chen J, Lu H, Xu Y, Ma C, Xu G. Over-expression of *OsPTR6* in rice increased plant growth at different nitrogen supplies but decreased nitrogen use efficiency at high ammonium supply. *Plant Sci*, 2014, 227: 1–11.
 - [9] Liu X, Huang D, Tao J, Miller A J, Fan X, Xu G. Identification and functional assay of the interaction motifs in the partner protein *OsNAR2.1* of the two-component system for high-affinity nitrate transport. *New Phytol*, 2014, 204: 74–80.
 - [10] Hu B, Wang W, Ou S, Tang J, Li H, Che R, Zhang Z, Chai X, Wang H, Wang Y, Liang C, Liu L, Piao Z, Deng Q, Deng K, Xu C, Liang Y, Zhang L, Li L, Chu C. Variation in *NRT1.1B* contributes to nitrate-use divergence between rice subspecies. *Nat Genet*, 2015, 47: 834–838.
 - [11] Zhang J Y, Liu Y X, Zhang N, Hu B, Jin T, Xu H R, Qin Y, Yan P X, Zhang X N, Guo X X, Hui J, Cao S Y, Wang X, Wang C, Wang H, Qu B Y, Fan G Y, Yuan L X, Ruben G O, Chu C C, Bai Y. *NRT1.1B* is associated with root microbiotic composition and nitrogen use in field-grown rice. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 676–684.
 - [12] Fan X, Tang Z, Tan Y, Zhang Y, Luo B, Yang M, Lian X, Shen Q, Miller A J, Xu G. Overexpression of a pH-sensitive nitrate transporter in rice increases crop yields. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 7118–7123.
 - [13] Li S, Tian Y H, Wu K, Ye Y F, Yu J P, Zhang J Q, Liu Q, Hu M Y, Li H, Tong Y P, Harberd N P, Fu X D. Modulating plant growth-metabolism coordination for sustainable agriculture. *Nature*, 2018, 560: 595–600.
 - [14] Gao Z Y, Wang Y F, Chen G, Zhang A P, Yang S L, Shang L G, Wang D Y, Ruan B, Liu C L, Jiang H Z, Dong G J, Zhu L, Hu J, Zhang G H, Zeng D, Guo L B, Xu G H, Teng S, Harberd N P, Qian Q. The *indica* nitrate reductase gene *OsNR2* allele enhances rice yield potential and nitrogen use efficiency. *Nat Commun*, 2019, 10: 5207.
 - [15] Tang W J, Ye J, Yao X M, Zhao P Z, Xuan W, Tian Y, Zhang Y Y, Xu S, An H Z, Chen G M, Yu J, Wu W, Ge Y, Liu X L, Li J, Zhang H Z, Zhao Y Q, Yang B, Jiang X Z, Peng C, Zhou C, Terzaghi W L, Wang C M, Wan J M. Genome-wide associated study identifies NAC42-activated nitrate transporter conferring high nitrogen use efficiency in rice. *Nat Commun*, 2019, 10: 5279.
 - [16] Zhang W H, Sun P Y, He Q, Shu F, Wang J, Deng H F. Fine mapping of *GS2*, a dominant gene for big grain rice. *Crop J*, 2013, 1: 160–165.
 - [17] Che R H, Tong H N, Shi B H. Control of grain size and rice yield by GL2-mediated brassinosteroid responses. *Nat Plants*, 2016, 2: 15195.
 - [18] Duan P G, Ni S, Wang J M, Zhang B L. Regulation of *OsGRF4* by *OsmiR396* controls grain size and yield in rice. *Nat Plants*, 2016, 2: 15203.
 - [19] Hu J, Wang Y X, Fang Y X. A rare allele of *GS2* enhances grain size and grain yield in rice. *Mol Plant*, 2015, 8: 1455–1465.
 - [20] Li S C, Gao F Y, Xie K L. The *OsmiR396c*-*OsGRF4*-*OsGIF1* regulatory module determines grain size and yield in rice. *Plant Biotechnol J*, 2016, 14: 2134–2146.
 - [21] Sun P Y, Zhang W H, Wang Y H, Deng H F. *OsGRF4* controls grain shape, panicle length and seed shattering in rice. *J Integr Plant Biol*, 2016, 58: 836–847.
 - [22] Chen X L, Jiang L R, Zheng J S, Chen F Y, Wang T S, Wang M L, Tao Y, Wang H C, Hong Z L, Huang Y M, Huang R Y. A missense mutation in large grain size 1 increases grain size and enhances cold tolerance in rice. *J Exp Bot*, 2019, 70: 3851–3866.
 - [23] 胡海涛, 郭龙彪. 我国水稻分子生物学发展现状及展望. 中国稻米, 2019, 25(5): 12–18.
Hu H T, Guo L B. Present situation, progress and prospects of development of rice molecular biology in China. *Chin Rice*, 2019, 25(5): 12–18 (in Chinese with English abstract).
 - [24] 黎裕, 王建康, 邱丽娟, 马有志, 李新海, 万建民. 中国作物分子育种现状与发展前景. 作物学报, 2010, 36: 1425–1430.
Li Y, Wang J K, Qiu L J, Ma Y Z, Li X H, Wan J M. Crop molecular breeding in China: current status and perspectives. *Acta Agron Sin*, 2010, 36: 1425–1430 (in Chinese with English abstract).
 - [25] 程保山, 洪德林, 万志兵, 郭媛. 与粳稻 BT 型细胞质育性恢复基因连锁的实用 SSR 标记的筛选. 南京农业大学学报, 2011, 34(1): 1–7.
Cheng B S, Hong D L, Wan Z B, Guo Y. Screening of applicable SSR marker linked to restorer gene for BT-type cytoplasm in *japonica* rice. *J Nanjing Agric Univ*, 2011, 34(1): 1–7 (in Chinese with English abstract).
 - [26] 梁毅, 杨婷婷, 谭令辞, 文婷, 吴俊, 江南, 李智强, 戴良英, 王国梁, 刘雄伦. 水稻广谱抗瘟基因紧密连锁分子标记开发及其育种应用. 杂交水稻, 2013, 28(4): 63–68.
Liang Y, Yang T T, Tan L G, Wen T, Wu J, Jiang N, Li Z Q, Dai L Y, Wang G L, Liu X L. Development of the molecular marker tightly-linked with the broad-spectrum blast resistance gene *Pigm* and its breeding practice in rice. *Hybrid Rice*, 2013, 28(4): 63–68

- (in Chinese with English abstract).
- [27] Andersen J R, Liibberstedt T. Functional markers in plants. *Trends Plant Sci*, 2003, 8: 554–560.
- [28] 姚姝, 陈涛, 张亚东, 朱镇, 赵庆勇, 周丽慧, 赵凌, 赵春芳, 王才林. 利用分子标记辅助选择聚合水稻 *Pi-ta*、*Pi-b* 和 *Wx-mq* 基因. 作物学报, 2017, 43: 1622–1631.
- Yao S, Chen T, Zhang Y D, Zhu Z, Zhao Q Y, Zhou L H, Zhao L, Zhao C F, Wang C L. Pyramiding *Pi-ta*, *Pi-b*, and *Wx-mq* genes by marker-assisted selection in rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Agron Sin*, 2017, 43: 1622–1631 (in Chinese with English abstract).
- [29] 马建, 马小定, 赵志超, 王帅, 王久林, 王洁, 程治军, 雷财林. 水稻抗稻瘟病基因 *Pi35* 功能性分子标记的开发及其应用. 作物学报, 2015, 41: 1779–1790.
- Ma J, Ma X D, Zhao Z C, Wang S, Wang J L, Wang J, Cheng Z J, Lei C L. Development and application of a functional marker of the blast resistance gene *Pi35* in rice. *Acta Agron Sin*, 2015, 41: 1779–1790 (in Chinese with English abstract).
- [30] 胡雪娇, 程灿, 涂荣剑. 水稻耐高温 *TT1* 基因的功能标记的开发与应用. 分子植物育种, 2019, 17: 7414–7419.
- Hu X J, Cheng C, Tu R J. Development and application of functional marker for thermo tolerance gene *TT1* in rice. *Mol Plant Breed*, 2019, 17: 7414–7419 (in Chinese with English abstract).
- [31] 陈涛, 张善磊, 赵凌, 张亚东, 朱镇, 赵庆勇, 周丽慧, 姚姝, 赵春芳, 梁文化, 王才林. ALS 抑制剂类除草剂抗性水稻功能标记的开发与验证. 中国水稻科学, 2018, 32: 137–145.
- Chen T, Zhang S L, Zhao L, Zhang Y D, Zhu Z, Zhao Q Y, Zhou L H, Yao S, Zhao C F, Liang W H, Wang C L. Development and verification of a functional marker associated with resistance to ALS inhibitor herbicide. *Chin J Rice Sci*, 2018, 32: 137–145 (in Chinese with English abstract).
- [32] Chen S H, Yang Y, Shi W W. *Badh2*, encoding betaine aldehyde dehydrogenase, inhibits the biosynthesis of 2-acetyl-1-pyrroline, a major component in rice fragrance. *Plant Cell*, 2008, 20: 1850–1861.
- [33] Li W T, Zhu Z W, Chern M S. A natural allele of a transcription factor in rice confers broad-spectrum blast resistance. *Cell*, 2017, 170: 114–126.
- [34] Fan C C, Yu S B, Wang C G. A causal C-A mutation in the second exon of *GS3* highly associated with rice grain length and validated as a functional marker. *Theor Appl Genet*, 2009, 118: 465–472.
- [35] Pan G, Zhang X Y, Liu K D. Map-based cloning of a novel rice cytochrome P450 gene *CYP81A6* that confers resistance to two different classes of herbicides. *Plant Mol Biol*, 2006, 61: 933–943.
- [36] Hu B, Wang W, Ou S J. Variation in *NRT1.1B* contributes to nitrate-use divergence between rice subspecies. *Nat Genet*, 2015, 47: 834–838.
- [37] Ma Y, Dai X Y, Xu Y Y. *COLD1* Confers chilling tolerance in rice. *Cell*, 2015, 160: 1209–1221.
- [38] 王军, 赵婕宇, 许扬, 范方军, 朱金燕, 李文奇, 王芳权, 费云燕, 仲维功, 杨杰. 水稻稻瘟病抗性基因 *Bsr-d1* 功能标记的开发和利用. 作物学报, 2018, 44: 1612–1620.
- Wang J, Zhao J Y, Xu Y, Fan F J, Zhu J Y, Li W Q, Wang F Q, Fei Y Y, Zhong W G, Yang J. Development and application of functional markers for rice blast resistance gene *Bsr-d1* in rice. *Acta Agron Sin*, 2018, 44: 1612–1620 (in Chinese with English abstract).
- [39] Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins A R, Day I N. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29: E88.
- [40] 陈涛, 骆名瑞, 张亚东, 朱镇, 赵凌, 赵庆勇, 周丽慧, 姚姝, 于新, 王才林. 利用四引物扩增受阻突变体系 PCR 技术检测水稻低直链淀粉含量基因 *Wx-mq*. 中国水稻科学, 2013, 27: 529–534.
- Chen T, Luo M R, Zhang Y D, Zhu Z, Zhao L, Zhao Q Y, Zhou L H, Yao S, Yu X, Wang C L. Detection of *Wx-mq* gene for low-amylose content by tetra-primer amplification refractory mutation system PCR in rice. *Chin J Rice Sci*, 2013, 27: 529–534 (in Chinese with English abstract).
- [41] Koutroubas S D, Ntanos D A. Genotypic differences for grain yield and nitrogen utilization in *indica* and *japonica* rice under Mediterranean conditions. *Field Crops Res*, 2003, 83: 251–260.
- [42] Wang F M, Matsuoka M. Improved nutrient use gives cereal crops a boost. *Nature*, 2018, 560: 563–566.