

于江辉, 李焱瑶, 秦冠男, 等. 水稻 *OsNRAMP5* 基因低镉积累突变位点功能标记的开发与验证[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(2): 289-295.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2022.02.001

水稻 *OsNRAMP5* 基因低镉积累突变位点功能标记的开发与验证

于江辉¹, 李焱瑶¹, 秦冠男¹, 翁绿水¹, 蒋显斌², 邓力华¹

(1. 中国科学院亚热带农业生态研究所/亚热带农业生态过程重点实验室, 湖南 长沙 410125; 2. 广西农业科学院水稻研究所/广西水稻遗传育种重点实验室, 广西 南宁 530007)

摘要: 为了对水稻低镉积累基因进行精准检测和世代跟踪, 提高低镉积累水稻品种的分子标记辅助育种 (MAS) 选育效率, 基于籼稻品种 9311 及其低镉积累突变体 lcd1 材料 7 号染色体上 *OsNRAMP5* 基因第 7 外显子单核苷酸的突变, 参照四引物扩增受阻突变 PCR (Tetra-primer amplification refractory mutation system-PCR, Tetra-primer ARMS-PCR) 原理设计了共显性功能标记 *nra5fun*, 且采用 PCR 方法分别对 18 份籼稻、18 份粳稻及金 23B/lcd1 杂交 F₁ 代材料进行分子标记特异性验证。电泳结果表明, 含 *OsNRAMP5* 基因 SNP 突变材料 lcd1 可扩增出大小为 723 bp、210 bp 的条带, 含野生型 *OsNRAMP5* 基因的材料 9311 可扩增出大小为 723 bp、557 bp 的条带, 金 23B/lcd1 F₁ 代杂合型材料可扩增出大小为 723 bp、557 bp、210 bp 的条带, 共显性标记 *nra5fun* 得到的电泳条带与引物设计时预测的目标片段完全吻合; Sanger 测序结果表明, 电泳扩增条带片段的序列与目的基因的 DNA 序列和 SNP 突变位点的序列一致; 18 份籼稻和 18 份粳稻种质资源均能扩出大小为 723 bp、557 bp 2 个目的条带, 说明这些材料均不含有 *OsNRAMP5* 基因的单个 SNP 突变, 表明该标记特异性较高。因此, 开发的功能标记 *nra5fun* 能够准确、高效地识别水稻低镉积累基因的纯合突变型、纯合野生型和杂合型, 可在水稻低镉积累分子育种中推广应用。

关键词: 水稻; 低镉; 分子标记; 分子育种; *OsNRAMP5* 基因

中图分类号: S511.035.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2022)02-0289-07

Development and validation of functional markers of low-cadmium accumulation mutation sites in rice *OsNRAMP5* gene

YU Jiang-hui¹, LI Yan-yao¹, QIN Guan-nan¹, WENG Lü-shui¹, JIANG Xian-bin², DENG Li-hua¹

(1. Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences/Key Laboratory of Agro-ecological Processes in Subtropical Region, Changsha 410125, China;
2. Rice Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences/Guangxi Key Laboratory of Rice Genetics and Breeding, Nanning 530007, China)

Abstract: The purpose of this study is to achieve accurate detection and generation tracking of low cadmium accumulation genes in rice, and improve the efficiency of molecular marker assisted selection (MAS). There was a single nucleotide mutation in exon 7 of *OsNRAMP5* gene on chromosome 7 between the *indica* rice 9311 and the mutation lcd1, and the co-dominance functional marker *nra5fun* was developed according to tetra-primer amplification refractory mutation system-PCR. PCR was used to verify the molecular marker specificity of 18 *indica* rice, 18 *japonica* rice and Jin23B/lcd1 hybrid F₁

materials. Electrophoretic detection results showed that the mutant material lcd1 containing *OsNRAMP5* gene could be amplified 723 bp and 210 bp bands, the 9311 containing wild-type *OsNRAMP5* gene could be amplified 723 bp and 557 bp bands, and the heterozygote Jin23B/lcd1 could be amplified 723 bp, 557 bp and 210 bp bands. The electrophoresis bands obtained by co-dominant marker *nra5fun*

收稿日期: 2021-09-05

基金项目: 国家自然科学基金联合基金项目 (U19A2025)

作者简介: 于江辉 (1986-), 男, 内蒙古乌兰察布人, 硕士, 助理研究员, 主要从事水稻分子育种研究。(E-mail) yujianghai@isa.ac.cn。李焱瑶为共同第一作者。

通讯作者: 蒋显斌, (E-mail) 350139343@qq.com; 邓力华, (E-mail) denglihua@isa.ac.cn

were consistent with those of the predicted target fragments. Sanger sequencing results showed that the sequence of amplified fragment was consistent with the DNA sequence of the target gene and the sequence of single nucleotide polymorphism (SNP) sites. Two target bands with lengths of 723 bp and 557 bp were amplified from 18 *indica* and 18 *japonica* germplasm resources, indicating that these cultivars did not contain single SNP mutation of *OsNRAMP5* gene. So, the marker had high specificity. In conclusion, the functional marker *nra5fun* can accurately and efficiently identify homozygous mutant, homozygous wild type and heterozygous type of low cadmium accumulation genes in rice, and it can be widely used in the breeding of low cadmium rice cultivars.

Key words: rice; low-cadmium; molecular marker; molecular breeding; *OsNRAMP5* gene

水稻(*Oryza sativa* L.)是全球近半数人口的主要粮食作物,是中国仅次于玉米的主要粮食作物,广泛分布于中国六大稻区。随着工农业的高速发展和城市化进程的推进,土壤重金属污染已经成为世界范围内的一个重要环境问题,中国面临的形势更加严峻^[1]。同时,由于工业“三废”的不合理排放、污水的大量灌溉、污泥的大量利用、农药及化肥的过量使用等原因,使得土壤中的重金属镉(Cd)含量持续增加,Cd污染日益严重^[2]。研究发现,水稻比其他谷类作物更容易积累Cd,且Cd可以通过根系在植株中运输和积累,尤其是在可食用的稻米部分,而Cd在稻米中的积累威胁到了粮食安全^[3-4]。特别是近年来,中国南方出现的“镉大米”引起了人们对大米等农产品Cd污染的极大关注^[5]。此外,相关研究发现,高浓度的土壤Cd污染会导致水稻减产^[6]。2005年的调查数据显示,中国受Cd污染的耕地面积近 1.33×10^4 hm²,由此每年造成粮食减产在 1×10^7 t以上,受Cd污染的稻谷近 2×10^6 t,直接经济损失超过 2×10^{10} 元^[7]。为了避免水稻中Cd积累过量,近年来科学家们提出并研究了一些降低水稻籽粒中Cd积累量的技术措施,主要包括使用物理、化学和生物方法阻碍稻田Cd经根系进入植株体内、适当配施有机肥和化肥、采用间作或作物轮作、适当采用田间淹水管理等农艺调控措施,以及利用分子生物学和遗传学方法培育低Cd积累水稻品种的育种调控措施等^[8]。其中,培育低Cd积累水稻品种被认为是减少稻米Cd含量效果最好和最经济的方法^[9]。可以看出,低Cd积累水稻品种的选育,对人体健康、食品安全、粮食稳产和环境保护等具有重大意义。

近年来,研究人员在探索植物吸收Cd的生理、生化及分子生物学的过程中,相继挖掘、研究了许多调控或参与调控水稻Cd吸收、运输和积累的相关蛋白质。目前,研究者至少已经克隆了34个相关基因,其中一些关键基因的发现对水稻低Cd积累育种具有重要的应用价值^[5, 10]。*OsHMA3*是一个位于7号染色体上的

控制水稻Cd积累的基因,是P1B类型的重金属ATP酶(*HMA*)基因家族成员,该基因的表达主要在根部,相关研究发现,水稻中有9个*HMA*基因,过表达*OsHMA3*会抑制Cd从水稻根系向植株的运输,因此过表达*OsHMA3*基因能显著降低稻米Cd含量,而不影响其他微量元素含量^[11-13]。*OsCd1*是位于水稻3号染色体上的一个与谷粒Cd积累相关的基因,它属于膜转运蛋白质的主要协同转运蛋白超家族(Major facilitator superfamily, MFS)基因,主要在根细胞的质膜中表达。粳稻的主要基因为*OsCd1^{V449}*,籼稻的主要基因为*OsCd1^{D44}*,在籼稻中导入粳稻*OsCd1^{V449}*基因可显著降低谷粒Cd含量,且对植株生殖生长和产量等性状无显著影响^[14]。水稻自然抗性相关巨噬细胞蛋白(Natural resistance-associated macrophage protein, NRAMP)基因是一种高度保守的二价金属离子转运蛋白质家族基因成员,目前在水稻基因组中发现的NRAMP基因有7个,其中*OsNRAMP5*位于其根、外皮层的远端,因此在根内具有较高表达量,其编码的蛋白质位于细胞质膜上,主要参与根系对锰(Mn)和Cd的吸收^[15]。研究发现,*OsNRAMP5*基因敲除或表达量的减少会显著降低水稻对Cd、Mn的吸收量,从而导致其对Cd的积累量减少,但在低Mn环境下会影响植株的生长,同时也会影响植株产量^[16-20]。而Chang等^[21]研究发现,虽然过量表达*OsNRAMP5*基因促进了根系对Cd和Mn的吸收,但是由于Cd在木质部径向运输的中断,使得Cd从根到茎的运输量减少,导致稻米中的Cd含量降低了49%~94%。有研究发现,通过水稻*OsNRAMP5*基因的突变亦可显著降低稻谷中Cd含量^[22-23]。Ishikawa等^[22]利用碳离子束辐射日本水稻品种越光获得了3个低Cd突变体,研究发现,由于*OsNRAMP5*基因突变,导致Cd的积累量显著减少。Cao等^[23]利用甲磺酸乙酯(Ethyl methanesulfonate, EMS)对籼稻品种9311进行诱变,获得低Cd积累突变体lcd1,进一步鉴定发现,在不同Cd污染试验田,突变体lcd1稻谷Cd含量仅为0.02~0.13 mg/kg,而野

生型 9311 稻谷 Cd 含量达 1.02~4.44 mg/kg, 可能由于 *OsNRAMP5* 基因的 1 个碱基的突变, 导致稻谷 Cd 积累量的大幅度降低。本研究基于突变材料 lcd1 中 *OsNRAMP5* 基因 1 个碱基的单核苷酸突变, 参照四引物扩增受阻突变 PCR (Tetra-primer amplification refractory mutation system-PCR, Tetra-primer ARMS-PCR) 原理, 设计出含 4 条引物、与 *OsNRAMP5* 基因突变位点共分离的共显性功能标记, 进一步利用该标记对不同水稻种质资源和金 23B/lcd1 的杂种 F_1 代植株通过 PCR 扩增进行验证, 以期开发出功能标记为低 Cd 积累水稻材料的分子育种研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 参试材料

供试水稻材料: 含有 *OsNRAMP5* 基因 SNP 突变的材料 lcd1^[23], 由湖南省水稻研究所提供; 18 份来自不同地区的籼稻品种 (R1044、R43-02、R1269、华占、荃 9311B、野香 B、金 23B、农香 42、R106、R299、R900、广恢 390、农香 39、岳恢 9113、珞红 5B、望恢 006、黄华占、湘早籼 45), 包括常规籼稻、野生型保持系、红莲型保持系; 18 份来自不同地区常规粳稻品种 (长粒香、吉梗 1、吉梗 88、辽梗 287、龙梗 5 号、宁梗 4 号、千重浪 2 号、中花 11、东稻 2 号、东稻 3 号、东稻 4 号、绥梗 4 号、越光、长白 10 号、长选 10、东农 416、龙梗 21、长白 9 号); 金 23B/lcd1 (杂交 F_1 代材料)、对照籼稻品种 9311。上述籼稻、粳稻、杂交 F_1 代材料由笔者所在课题组保存或改造。

1.2 *OsNRAMP5* 基因 SNP 突变功能标记的设计与合成

突变材料 lcd1 7 号染色体上 *OsNRAMP5* 基因的第 7 外显子的 8 887 787 位单核苷酸的隐性突变, 会导致 lcd1 籽粒 Cd 含量急剧降低。研究发现, 突变体 lcd1 中该位点的碱基为 T, 而野生型籼稻 9311 中该位点的核苷酸为 C^[23]。因此, 笔者针对 *OsNRAMP5* (基因位点: BGIOGA024510、Os07g0257200) 基因编码区 8 887 787 位点存在的单个 SNP, 参照 ARMS-PCR 的分子标记原理, 设计了由 4 引物 (表 1) 组成的功能标记 *nra5fun*, 在引物 *nra5fun-af*、*nra5fun-ar*、*nra5fun-bf* 中各设计了 1 个错配碱基, 在引物 *nra5fun-br* 中分别设计了 2 个错配碱基 (表 1 中的小写字母)。使用在线工具 Primer3web (<http://primer3.ut.ee/>)、Primer BLAST 进行

引物设计、引物 T_m 值 (指在模板 DNA 过量的情况下, 有 50% 的引物与模板精确配对, 50% 的引物处于解离状态时的温度) 筛选及引物特异性评估等。由北京擎科新业生物技术有限公司完成 *nra5fun* 功能标记引物的合成和目的 DNA 片段的测序。

表 1 *nra5fun* 标记引物序列

Table 1 Primer sequences of *nra5fun*

引物名称	引物序列 (5'→3')	碱基数 (bp)
<i>nra5fun-af</i>	ACAGGTGAGtAAGCTGGAGTT	21
<i>nra5fun-ar</i>	GGAGAtGACGGCGATGTTTATC	22
<i>nra5fun-bf</i>	CTCGGAiCTCTTGTCTATGCC	20
<i>nra5fun-br</i>	GTATGgATGgATGTAAAAGCGTACA	25

引物序列中小写字母代表引入的错配碱基, 有下划线的核苷酸表示功能 SNP。

1.3 DNA 提取与分子标记检测

水稻移栽 14 d 后取供试材料的叶片, 用十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法提取 DNA。用 10 μ l PCR 扩增体系对供试材料的目的片段进行扩增, 体系组分: 5 μ l 2×Rapid Taq Master Mix (由南京诺唯赞生物科技有限公司合成), 1 μ l 10 μ mol/L 表 1 中的 4 种引物等量混合物 (经验证调整后, 4 种引物按 1:1:1:2 的比例进行混合 PCR 效果较好), 1 μ l DNA 模板, 3 μ l ddH₂O。在 55.0~62.0 $^{\circ}$ C 进行最适退火温度探索, 最后确定最佳退火温度为 61 $^{\circ}$ C。用质量分数为 3.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测本试验的 PCR 扩增产物。

2 结果与分析

2.1 *nra5fun* 功能标记的开发

根据 *OsNRAMP5* 基因单个 SNP 的突变 (C→T), 本研究开发了 4 条引物的突变功能标记 *nra5fun* (图 1)。首先设计 1 对外引物 *nra5fun-af* 和 *nra5fun-ar* 作为对照, 并各引入 1 个错配碱基, 野生型和突变型水稻材料均可以扩增出大小为 723 bp 的条带, 且扩增产物都包含功能性 SNP 位点, 然后根据 SNP 突变位点设计 2 条反向内引物 *nra5fun-br* 和 *nra5fun-bf*, 其中引物 *nra5fun-br* 与突变型基因匹配, 其 3' 端对应突变碱基 T, 引物 *nra5fun-bf* 与野生型基因匹配, 其 3' 端对应碱基 C。同时为了进一步增强 PCR 目的条带的特异性扩增, 在引物 *nra5fun-br* 5' 端第 6、10 位分别设计错配碱基 G, 在引物 *nra5fun-ar* 5' 端第 6 位设计错配碱基 T。参照 4 条引物设计策略进行预测: 引物

nra5fun-br/nra5fun-af 可扩增出大小为 210 bp 的条带,为突变型材料 *lcd1* 特有条带;引物 *nra5fun-bf/nra5fun-ar* 可扩增出大小为 557 bp 的条带,为野生型水稻 9311 特有条带。由此可见,突变型纯合体可扩

增出 2 个条带,大小分别为 723 bp 和 210 bp;而野生型纯合体亦可扩增出 2 个条带,大小分别为 723 bp 和 557 bp;杂合型材料可扩增出 3 个条带,大小分别为 723 bp、557 bp、210 bp。



图 1 功能标记 *nra5fun* 引物设计策略

Fig.1 Primer design strategy of functional marker *nra5fun*

2.2 *nra5fun* 功能标记的验证和退火温度对标记检测效果的影响

相关研究结果表明,退火温度对 PCR 反应的影响较大,提高目的条带的特异性需要较高的退火温度,但会降低其扩增量,而退火温度较低会因 PCR 反应目的片段的特异性不够高而导致假阳性^[24]。为了验证 *nra5fun* 分子标记的准确性及确定最佳退火温度,本研究将 4 条引物按相同组成比例进行 PCR 扩增,且在不同退火温度下扩增特异性条带。由图 2 可以看出,当退火温度为 55~62 ℃ 时,引物 *nra5fun-af/nra5fun-ar* 均能扩增出大小为 723 bp 的条带,引物 *nra5fun-bf/nra5fun-ar* 均可扩增出大小为 557 bp 的条带,可见外引物 *nra5fun-af/nra5fun-ar* 和内引物 *nra5fun-bf* 对退火温度不敏感。由于内引物 *nra5fun-br* 中设计了 2 个错配碱基,因此 PCR 反应目的条带的特异性扩增需要较高的退火温度。结果表明,当退火温度为 55~60 ℃ 时,突变型、野生型、杂合型水稻均可扩增出大小为 210 bp 左右的条带,当退火温度达到 61 ℃ 或 62 ℃ 时,突变型(*lcd1*)和杂合型(金 23B/*lcd1*)水稻均扩增出了大小为 210 bp 左右的条带,而野生型水稻(9311)未扩增出条

带,表明 *nra5fun* 功能标记最适的退火温度约为 61 ℃。综上所述,当退火温度为 61 ℃ 时,含 *Os-NRAMP5* 基因 SNP 突变材料 *lcd1* 扩增出了大小为 723 bp、210 bp 的条带,含野生型 *Os-NRAMP5* 基因的 9311 水稻材料扩增出了大小为 723 bp、557 bp 的条带,杂合型金 23B/*lcd1* 水稻材料扩增出了大小为 723 bp、557 bp、210 bp 的条带。由此可见,共显性标记大小与预测的目标片段大小一致。

为了进一步确认 *nra5fun* 功能标记物在 61 ℃ 或 62 ℃ 退火条件下 PCR 产物的准确性,对退火温度为 61 ℃ 时突变型、野生型材料 PCR 产物中的最大片段(723 bp)分别进行切胶回收,并进行 Sanger 测序,由图 3 可以看出,*lcd1* 突变型、9311 野生型水稻材料 7 号染色体上的 8 887 787 位核苷酸分别对应 A 和 G(互补链为 T、C),DNA 序列其他碱基无差异,与图 1 的结果一致。

2.3 *nra5fun* 功能标记对不同水稻种质资源的验证

由于本研究在设计内部引物时,与突变型基因匹配的 *nra5fun-br* 引物内部引入了 2 个错配碱基,导致目标条带扩增效率降低,条带较浅(210 bp 大小,图 2)。因此为了提高内引物 *nra5fun-br* 的扩增效率,在进行 PCR 扩增时,将 4 条引物 *nra5fun-af/nra5fun-ar*、

3 讨论

分子标记辅助育种(Molecular marker-assisted selection, MAS)利用与目的基因共分离的连锁标记或目的基因自身的功能标记来鉴定杂交改良后代的基因型,因其操作快速且准确,可提高育种效率和缩短品种稳定的年限,目前已成为水稻等农作物重要性状改良的有效方法。但是,连锁标记与目的基因之间可能发生重组交换,因假阳性导致目的基因丢失,而目的基因自身的功能标记与其完全耦合,避免了连锁标记存在的遗传冗余和重组问题,提高了 MAS 选择的效率和准确性^[25]。目前,针对基因内碱基突变差异设计分子标记的方法主要有 2 种,分别为限制性内切酶酶切(CAPS 或者 dCAPS)和扩增受阻突变 PCR(Amplification refractory mutation system PCR, ARMS-PCR),其中 ARMS-PCR 是最经济且应用最广泛的方法^[26],且在此基础上开发的四引物扩增受阻突变 PCR(Tetra-primer amplification refractory polymorphism system-PCR, Tetra-primer ARMS-PCR),通过单次 PCR 扩增就可将野生纯合型、突变纯合型、杂合型进行有效区分^[27-28]。本研究利用来自籼稻 9311 的突变体材料 lcd1 的 7 号染色体上 *OsNRAMP5* 基因第 7 外显子的 8 887 787 位单个 SNP 突变^[23],参照 Tetra-primer ARMS-PCR 原理,利用四引物扩增受阻法设计了功能标记 *nra5fun*,可以将突变型、野生型、杂合型水稻材料有效区分,并且对来自不同地区的籼稻、粳稻各 18 份种质资源进行 PCR 验证。电泳结果表明,扩增出与野生型 9311 同样的条带类型,证明该标记的准确性和特异性,且该标记方法操作简单、扩增快速准确,在实际应用中优势明显,可以实现对 *OsNRAMP5* 基因材料的准确检测,从而可以广泛应用于水稻低 Cd 积累资源的鉴定和 MAS 育种中。此外,参照前人的引物设计策略^[26, 29],本研究在设计外引物时,分别引入单个错配碱基,结果没有影响引物与模板 DNA 的特异性结合和目的片段的 PCR 扩增效果。据报道,由于 Tetra-primer ARMS-PCR 引物在同一个扩增体系中,导致目的片段扩增效率和特异性受引物用量比、酶浓度和退火温度的影响^[27]。由于本研究在设计突变基因匹配的内引物 *nra5fun-br* 时引入了 2 个错配碱基,导致目的条带扩增效率降低,条带较浅。基于前人的研究结果^[25-27],本试验将引物 *nra5fun-br* 摩尔质量比提高了 1 倍后再次进行 PCR,结果表明,目的条带扩增效率明显提高,达到了基因检测的预期效果。同

时,*nra5fun* 功能标记对退火温度的特异性较高,在退火温度达到 61 ℃或 62 ℃时才可避免假阳性,为此,对 61 ℃退火温度的扩增产物进行测序的结果证实了所扩增目的片段的准确性。前人对 SNP 突变基因分子标记的开发也有相同的试验结果^[27]。

近年来,研究者关于水稻根系对 Mn、Cd 吸收的 *OsNRAMP5* 基因进行了大量研究,旨在剖析该基因的作用机制和培育低 Cd 积累水稻品种^[15-23]。Tang 等^[30]利用 CRISPR/Cas9 对隆两优华占亲本 *OsNRAMP5* 基因进行编辑,敲除该基因后培育出的两优低镉 1 号稻米的 Cd 积累量比野生型隆两优华占降低了 98%以上,而且产量间无显著差异。此外,研究者通过靶向编辑不同遗传背景水稻材料的 *OsNRAMP5* 基因,亦获得了一些低 Cd 积累的水稻品系^[17-18]。但是上述通过基因编辑手段改变 *OsNRAMP5* 基因表达量培育的“去镉”水稻属转基因材料,目前无法商业化应用,因此需要在诱变等育种技术的应用上进行创新,加快培育非转基因“去镉”水稻种质或品种^[5]。Ishikawa 等^[22]采用碳离子束辐射日本优质品种越光得到 3 个低 Cd 积累突变体,其中突变体 lcd-kmt1 与 lcd-kmt2 不仅稻米 Cd 含量显著下降,而且农艺性状和品质与越光相比无明显差异,同时 lcd-kmt2 获得新品种登记并命名为 Kan1^[31]。Cao 等^[23]用化学试剂甲磺酸乙酯(Ethyl methanesulfonate, EMS)诱变籼稻材料 9311 得到低 Cd 积累突变体 lcd1,种植于不同稻田 lcd1 材料谷粒中 Cd 含量仅为 0.02~0.13 mg/kg,且产量等重要农艺性状与 9311 无差异。由此可见,突变体 lcd1 具有极大的育种价值。本研究就突变材料 lcd1 *OsNRAMP5* 基因的单个 SNP 突变碱基设计了功能标记 *nra5fun*,在低 Cd 积累品种 MAS 的选育中具有重大应用前景。笔者认为,可以将目前各稻区的主推品种、当家品种或具有较大应用潜力的育种品系作为受体材料,将突变体 lcd1 作为供体材料,通过杂交渗入低 Cd 积累基因,通过回交利用功能标记 *nra5fun* 进行世代检测直至材料稳定,即可创制出农艺性状与受体材料无差异的低 Cd 积累新品系。而且本研究利用四引物法设计的共显性功能标记 *nra5fun* 可以区别杂交改造后代材料的纯合型或杂合型,在回交选育中材料更容易稳定,可以有效缩短育种年限,提高低镉积累水稻品种的选育效率。

参考文献:

- [1] ZHAO F J, MA Y B, ZHU Y G, et al. Soil contamination in Chi-

- na; current status and mitigation strategies[J]. Environmental Science and Technology, 2015, 49(2): 750-759.
- [2] CLEMENS S, AARTS M G M, THOMINE S, et al. Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning[J]. Trends in Plant Science, 2013, 18(2): 92-99.
- [3] CLEMENS S, MA J F. Toxic heavy metal and metalloid accumulation in crop plants and foods[J]. Annual Review of Plant Biology, 2016, 67(1): 489.
- [4] 林 华, 张学洪, 梁延鹏, 等. 复合污染下 Cu、Cr、Ni 和 Cd 在水稻植株中的富集特征[J]. 生态环境学报, 2014, 23(12): 1991-1995.
- [5] 江 南, 颜 旭, 周延彪, 等. 水稻镉积累影响因素与低镉稻米生产策略[J]. 中国水稻科学, 2021, 35(4): 342-351.
- [6] 陈彩艳, 唐文帮. 筛选和培育镉低积累水稻品种的进展和问题探讨[J]. 农业现代化研究, 2018, 39(6): 1044-1051.
- [7] 程旺大, 姚海根, 吴 伟, 等. 土壤-水稻体系中的重金属污染及其控制[J]. 中国农业科技导报, 2005, 7(4): 51-54.
- [8] 许肖博, 安鹏虎, 郭天骄, 等. 水稻镉胁迫响应机制及防控措施研究进展[J]. 中国水稻科学, 2021, 35(5): 415-426.
- [9] ZHOU J Q, JIANG Y R, MING X Q, et al. Introgressing the allelic variation of a major locus in reducing the grain cadmium accumulation in *indica* rice hybrids[J]. Molecular Breeding, 2019, 39(6): 1-11.
- [10] 胡婉茵, 王 寅, 吴殿星, 等. 低镉水稻研究进展[J]. 核农学报, 2021, 35(1): 93-102.
- [11] UENO D, YAMAJI N, KONO I, et al. Gene limiting cadmium accumulation in rice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(38): 16500-16505.
- [12] SASAKI A, YAMAJI N, MA J F. Over expression of *OsHMA3* enhances Cd tolerance and expression of Zn transporter genes in rice[J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(20): 6013-6021.
- [13] MIYADATE H, ADACHI S, HIRAIZUMI A, et al. *OsHMA3*, a P_{1B}-type of ATPase affects root-to-shoot cadmium translocation in rice by mediating efflux into vacuoles[J]. New Phytologist, 2011, 189(1): 190-199.
- [14] YAN H L, XU W X, XIE J Y, et al. Variation of a major facilitator superfamily gene contributes to differential cadmium accumulation between rice subspecies[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 1-12.
- [15] SASAKI A, YAMAJI N, YOKOSHO K, et al. *Nramp5* is a major transporter responsible for manganese and cadmium uptake in rice[J]. The Plant Cell, 2012, 24(5): 2155-2167.
- [16] ISHIMARU Y, TAKAHASHI R, BASHIR K, et al. Characterizing the role of rice *NRAMP5* in manganese, iron and cadmium transport[J]. Scientific Reports, 2012, 2: 286.
- [17] YANG C H, ZHANG Y, HUANG C F. Reduction in cadmium accumulation in japonica rice grains by CRISPR/Cas9-mediated editing of *OsNRAMP5*[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2019, 18(3): 688-697.
- [18] WANG T K, LI Y X, FU Y F, et al. Mutation at different sites of metal transporter gene *OsNRAMP5* affects Cd accumulation and related agronomic traits in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 1081.
- [19] LIU C L, CHEN G, LI Y Y, et al. Characterization of a major QTL for manganese accumulation in rice grain[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 1-12.
- [20] LYU Q M, LI W G, Sun Z Z, et al. Resequencing of 1 143 *indica* rice accessions reveals important genetic variations and different heterosis patterns[J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 4778.
- [21] CHANG J D, HUANG S, KONISHI N, et al. Overexpression of the manganese/cadmium transporter *OsNRAMP5* reduces cadmium accumulation in rice grain[J]. Journal of Experimental Botany, 2020, 71(18): 5705-5715.
- [22] ISHIKAWA S, ISHIMARU Y, IGURA, et al. Ion-beam irradiation, gene identification, and marker-assisted breeding in the development of low-cadmium rice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(47): 19166-19171.
- [23] CAO Z Z, LIN X Y, YANG Y J, et al. Gene identification and transcriptome analysis of low cadmium accumulation rice mutant (*lcd1*) in response to cadmium stress using MutMap and RNA-seq[J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1): 1-13.
- [24] 常 远, 吴苏亭, 杨毅荣, 等. 4 引物分子标记鉴定水稻高光效基因 *hd3a^{Kasa}*[J]. 杂交水稻, 2020, 35(4): 75-80.
- [25] 孙平勇, 张武汉, 张 莉, 等. 水稻氮高效、耐冷基因 *OsGRF4* 功能标记的开发及其利用[J]. 作物学报, 2021, 47(4): 684-690.
- [26] 田孟祥, 张时龙, 何友勋, 等. 水稻耐低温基因 *bZIP73* 分子标记的开发与验证[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(6): 1265-1270.
- [27] YE S, DHILLON S, KE X Y, et al. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(17): e88.
- [28] 陈 涛, 骆名瑞, 张亚东, 等. 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*[J]. 中国水稻科学, 2013, 27(5): 529-534.
- [29] 王 军, 赵婕宇, 许 扬, 等. 水稻稻瘟病抗性基因 *Bsr-d1* 功能标记的开发和利用[J]. 作物学报, 2018, 44(11): 1612-1620.
- [30] TANG L, MAO B G, LI Y K, et al. Knockout of *OsNRAMP5* using the CRISPR/Cas9 system produces low Cd-accumulating *indica* rice without compromising yield[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 1-12.
- [31] ISHIKAWA S, ABE T, KURAMATE M, et al. Development of low-cadmium-accumulating rice[M]. Cadmium Toxicity, Singapore: Springer, 2019: 139-150.

(责任编辑:徐 艳)