

籼稻 93-11 辐射诱变突变体库的创建及其筛选

龙湍^{1,2} 安保光^{1,2} 李新鹏^{1,2} 张维^{1,2} 李京琳^{1,2} 杨瑶华^{1,2} 曾翔^{1,2} 吴永忠^{1,2}
黄培劲^{1,2,*}

(¹海南波莲水稻基因科技有限公司,海口 570125; ²海南神农大丰种业科技股份有限公司,海口 570125; * 通讯联系人, E-mail: bolianrgt2015@aliyun.com)

Construction and Screening of an Irradiation-induced Mutant Library of indica Rice 93-11

LONG Tuan^{1,2}, AN Bao-guang^{1,2}, LI Xin-peng^{1,2}, ZHANG Wei^{1,2}, LI Jing-lin^{1,2}, YANG Yao-hua^{1,2},
ZENG Xiang^{1,2}, WU Yong-zhong^{1,2}, HUANG Pei-jin^{1,2,*}

(¹Hainan Bolian Rice Gene Technology Co., Ltd., Haikou 570125, China; ²Grand Agriseeds Technology, Inc., Haikou 570125, China; * Corresponding author, E-mail: bolianrgt2015@aliyun.com)

LONG Tuan, AN Baoguang, LI Xinpeng, et al. Construction and screening of an irradiation-induced mutant library of indica rice 93-11. *Chin J Rice Sci*, 2016, 30(1): 44-52.

Abstract: Mutant libraries are powerful tools for plant germplasm creation and functional analysis of genome. Using 93-11 (*O. sativa* ssp. *indica* cv. 93-11), an elite variety with complete genome sequences available, we established an irradiation-induced mutant library containing 3617 lines. Three hundred and eight mutant lines were obtained from M₂ and M₃ generations and classified into 15 types of mutation, including plant height, tiller number, plant architecture, inflorescence architecture, spikelet architecture, fertility, leaf color, leaf shape, heading date, and bentazon resistance. The mutation frequencies ranged from 0.03% to 2.74%. Using reverse genetics approach, we found that *CYP704B2* is the causal gene for two male sterile mutants and *CYP81A6* is responsible for two bentazon-lethal mutations. For the two male sterile mutants, nucleotide substitution and deletion were detected in the third and fourth exons of *CYP704B2*, respectively. For the two bentazon-lethal mutants, a 7-bp and a 23-bp deletion were detected in the first and second exons of *CYP81A6*, respectively. Genetic studies revealed that wild-type plants and mutant plants segregated at 3 : 1 ratio, suggesting that these mutant traits were controlled by single recessive genes. Our study showed that this mutant library is a useful resource for rice genome functional analysis and rice genetic improvement.

Key words: indica; mutagenesis by irradiation; mutant library; male sterility; bentazon-lethal

龙湍, 安保光, 李新鹏, 等. 籼稻 93-11 辐射诱变突变体库的创建及其筛选. 中国水稻科学, 2016, 30(1): 44-52.

摘要: 人工诱变突变体库是植物种质资源创新和基因组功能分析的有力工具。本研究以具有优异农艺性状且已完成基因组测序的籼稻常规品种 93-11 (*O. sativa* ssp. *indica* cv. 93-11) 为材料, 创建了一个包含 3617 个家系的辐射诱变突变体库。通过在 M₂ 和 M₃ 代各生育期的筛选, 从该突变体库中获得 308 个表型稳定的突变体。这些突变体的表型可以分成 15 类, 包括株高、分蘖数、株型、穗型、小穗结构、育性、叶色、叶型、抽穗期、苯达松抗性等, 突变频率为 0.03%~2.74%。使用反向遗传学策略, 鉴定出了 2 个雄性不育突变体和 2 个苯达松敏感突变体中的基因突变位点。其中, 2 个雄性不育突变体的突变表型是由于 *CYP704B2* 分别在第 3 和第 4 外显子发生碱基替换和片段缺失造成的, 而 2 个苯达松敏感突变体的突变表型是由于 *CYP81A6* 中第 1 和第 2 外显子分别缺失了一个 7 bp 和一个 23 bp 的片段造成的。4 个突变体家系中野生型和突变体植株的分离比均符合 3 : 1, 属单基因隐性突变。这一籼稻突变体库将有助于籼稻基因组的功能分析, 并且为水稻遗传改良提供了有价值的材料。

关键词: 籼稻; 辐射诱变; 突变体库; 雄性不育; 苯达松敏感

中图分类号: Q343.5; S511.0352

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2016)01-0044-09

水稻(*Oryza sativa*) 是世界上最重要的粮食作物之一, 也是我国粮食生产和消费中占主导地位的口粮作物。同时, 水稻还以其较小的基因组、高效的

遗传转化体系、丰富的遗传资源以及与其他禾本科作物较高的基因组共线性被选为禾本科作物基因组研究的模式植物, 并成为第一个完成基因组测序的

收稿日期: 2015-08-18; 修改稿收到日期: 2015-10-27。

基金项目: 海南省重大科技项目(ZDZX2013010)。

农作物^[1-3]。以粳稻品种日本晴(*O. sativa* ssp. *japonica* cv. Nipponbare)为参考,水稻基因组大小约为 389 Mb,编码超过 50,000 个基因,其中蛋白编码基因超过 39,000 个^[4-5]。译解水稻基因组编码的全部基因的功能不仅能阐明调控水稻生长发育的分子机制,也将为水稻的遗传改良提供理论基础。

突变体是承载和表达遗传变异的载体,通过创建突变体库可以对水稻基因组进行系统的功能分析。创建水稻突变体库的方法主要有插入突变以及物理和化学诱变两类。插入突变是利用 T-DNA、*Ac/Ds*、*En/Spm*、*Tos17*、*nDART/aDART* 等水稻内外源插入元件插入到基因组中,通过敲除或激活基因功能来创制突变体^[6]。插入突变最大的优势在于插入元件的序列已知,可以便捷地通过分离和分析插入元件的侧翼序列来确定插入位点和突变基因。目前,国内外研究者已使用不同插入元件创建了多个水稻插入突变体库^[7-13]。这些突变体库包含了约 675,000 个突变株系,从这些株系中 76.9% 的水稻蛋白编码基因可以通过检索侧翼序列找到相应突变体^[14]。然而,由于插入突变体的产生一般要经过组织培养和转基因过程,现有主要插入突变体库都选择了粳稻品种建库。因为组织培养造成了大量体细胞变异,真正由插入元件造成的突变只占到 5%~10%,这降低了后续基因鉴定工作的效率^[6, 14]。此外,大部分插入突变体因包含外源转基因元件而涉及转基因品种商业化问题,无法直接用作育种材料。

物理诱变主要是用快中子、 γ 射线、离子束照射植物干种子诱导突变;化学诱变则是用甲基磺酸乙酯(EMS)、N-甲基-N-亚硝基脲(MNU)、双环氧丁烷(DEB)、叠氮化钠(SA)等化学试剂浸泡植物种子诱导突变。物理和化学诱变都能在植物基因组中产生单碱基突变、DNA 片段插入缺失、染色体重排等变异。用物理和化学诱变创建水稻突变体库有两大优点:一是不需要转基因步骤,操作简便,不受籼粳基因型限制;二是能在基因组中造成随机分布的多个突变,只需较小的群体就能完成基因组饱和突变。过去,利用物理和化学诱变突变体鉴定基因需要用费时费力的图位克隆方法,极大限制了物理和化学诱变突变体的使用效率。但随着定向诱导基因组局部突变(TILLING)、MutMap、MutMap⁺等高通量基因型鉴定技术的出现,这一限制已被有效解除^[15-18]。目前已有多家研究单位建立起了物理和化

学诱变突变体库,并且突变体数量还在继续增长^[6, 14-16, 19]。但总体而言理化诱变突变体数量依然远少于插入突变体,并且其中籼稻基因型的比例依然较低^[14]。

在本研究中,我们使用了一个在我国具有广泛适应性且已完成基因组测序的优良籼稻品种 93-11(*O. sativa* ssp. *indica* cv. 93-11)来产生辐射诱变突变体库^[3]。通过对 3617 个突变家系的筛选共获得了 308 个表型稳定的突变体。我们进一步对其中的隐性核雄性不育突变体和苯达松敏感突变体进行了分子鉴定。该突变体库为水稻基因组的功能分析和遗传改良提供了有价值的籼稻突变体资源。

1 材料与方法

1.1 突变群体的产生和种植

2013 年 6 月在湖南省农业科学院用钴 60 对 10 kg 93-11(*O. sativa* ssp. *indica* cv. 93-11)干种子进行辐射,辐射剂量 250 GY。辐射后的种子于 2013 年 7 月播种获得 M₁ 植株。M₁ 分单株收种获得 M₂。每个 M₂ 家系种植 50 株,随机挑选 6 株分单株收种获得 M₃。所有诱变材料均按正常大田条件种植于海南神农大丰种业科技股份有限公司海南临高育种基地,单本插,株行距 16.3 cm×19.8 cm。93-11 干种子由湖南省水稻研究所提供。

1.2 突变体筛选

在 M₂ 代全生育期目测筛选具有明显表型变异的突变体。对其中可能的雄性不育突变体取成熟小穗用碘-碘化钾溶液(0.6% KI, 0.3% I₂)进行花粉染色并镜检以确定花粉育性。随机挑选 1326 个 M₂ 编号,取每个编号收获的 M₃ 种子等量混合播种,种植 100 株,在苗期按 100 mL/m² 喷施 1 g/L 的苯达松溶液(常州精度生物科技有限公司)至叶片表面筛选苯达松敏感突变体。种植苯达松敏感突变体后代,在分蘖期按 450 mL/m² 喷施 1 g/L 的苯达松溶液至叶片表面对苯达松敏感表型进行验证。

1.3 DNA 抽提和保存

DNA 抽提参照 CTAB 法^[20],有所改动:取 3 cm 长的水稻叶片,在 800 μ L 抽提缓冲液[15 g/L CTAB, 1.05 mol/L NaCl, 75 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 15 mmol/L EDTA (pH 8.0)]中磨碎,收集到一个 1.5 mL 离心管中。65℃ 水浴 30 min,其间颠倒混匀。加入 800 μ L 氯仿与异戊醇的混合液(V_{氯仿}:V_{异戊醇} 为 24:1),颠倒混匀 15 min。1 2000

r/min、室温下离心 10 min。吸上清 450 μ L, 转移到一个新的 1.5 mL 离心管中, 加入 2 倍体积 95% 乙醇, 混匀后 -20 $^{\circ}$ C 下沉淀 30 min。1 2000 r/min 下离心 15 min。倒掉 95% 乙醇, 用 75% 乙醇洗沉淀。倒掉 75% 乙醇, 干燥后加 100 μ L 灭菌 ddH₂O 溶解 DNA。DNA 溶解后编号装入 96 孔板于 -20 $^{\circ}$ C 下保存备用。

1.4 CYP704B2 和 CYP81A6 的测序与分析

根据 CYP704B2 (GenBank: NM_001055627.2) 和 CYP81A6 (GenBank: DQ341412.1) 的基因组序列设计 PCR 引物(表 1), 并分别用来扩增无花粉型不育突变体、苯达松敏感突变体和野生型对照中的相应基因。PCR 反应体系为 2 \times Taq 酶反应母液 (Sinobio) 25 μ L, 10 μ mol/L 引物各 2 μ L, 模板 DNA 40 ng, 补 ddH₂O 至 50 μ L。PCR 程序如下: 94 $^{\circ}$ C 下预变性 10 min; 94 $^{\circ}$ C 下变性 30 s, 57 $^{\circ}$ C 下退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 下延伸 90 s, 42 个循环; 72 $^{\circ}$ C 下延伸 10 min, 16 $^{\circ}$ C 下 10 min。PCR 产物直接送深圳华大基因科技有限公司测序。序列返回后用 DNAMAN 6.0 进行分析。

表 1 本研究使用的引物

Table 1. Primers used in this study.

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	目的基因 Target locus
704B2-1F	CAAAGATTGCTCAAGGTTGGTAG	CYP704B2
704B2-1R	GGTATTAGGCAAGGAATTCAGTTG	
704B2-2F	TCGAAGGACAGGACGGTGAC	CYP704B2
704B2-2R	TTTGAGCAAGAGAGGAAGGATC	
704B2-3F	GCAAGAATAACCAAAATTCAGG	CYP704B2
704B2-3R	GGTCAGACGGAGGTGGAGA	
81A6-F1	CAAACCTCCAACCTTTCCCGT	CYP81A6
81A6-R1	CTGACGCCTGAAACGCAG	
81A6-F2	GCAACGGAGTGAGTAGAAGTAATC	CYP81A6
81A6-R2	CAGAAAGGTAAAACAGCAGAAGA	
81A6-F3	GGGCGAGAAGAAGAGCATG	CYP81A6
81A6-R3	GGCACGACCTTGGGGAT	
81A6-F4	GGTGCGACGGCAATCTC	CYP81A6
81A6-R4	GAGCAGAAAGCCCTTCCTC	
1907_F	AGGTCGGGTTTGGGGTT	1907 株系中 CYP704B2 的突变位点
1907_R	GATGTTGGCAGCGTCGAA	CYP704B2 in the line 1907
2245_F	AGCTTCGGGGACGACAAGA	2245 株系中 CYP704B2 的突变位点
2245_R	TGCGTCATCGCCATGTACGT	CYP704B2 in the line 2245
3522-F	ATGAAATCTTAGTTCCACCCTCTTGCCG	3522 株系中 CYP81A6 的突变位点
3522-R	CTCCCTGACGATGCACTGGAGGT	CYP81A6 in the line 3522
3622-F	TGTTTCGAGGTCTCCCTCAGCGTG	3622 株系中 CYP81A6 的突变位点
3622-R	CCTGCTTAAACTCCTGGGCTTCCA	CYP81A6 in the line 3622

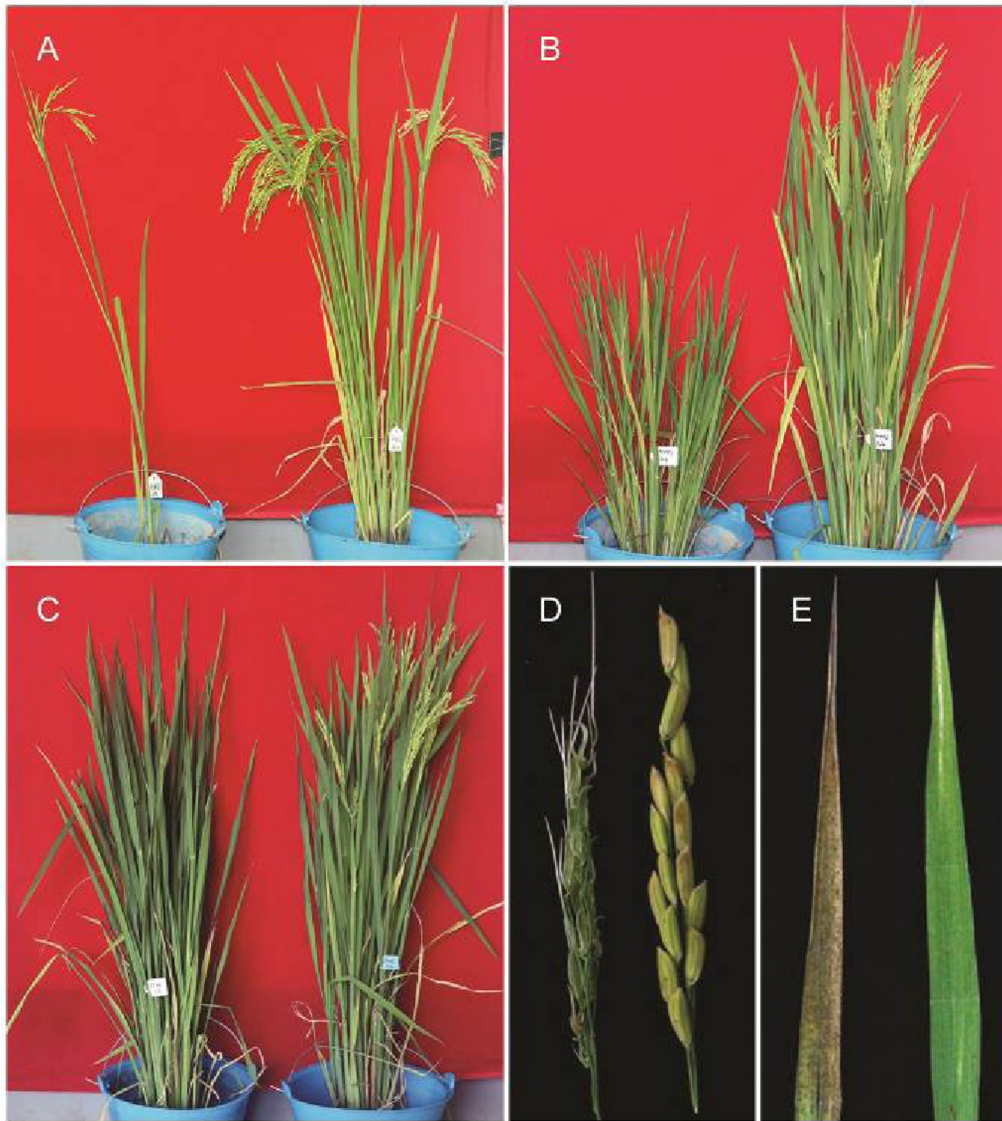
1.5 CYP704B2 和 CYP81A6 突变位点基因型检测

在 CYP704B2 和 CYP81A6 突变位点两侧根据基因组序列设计引物(表 1)用来鉴定相应基因在野生型和突变体中的基因型。PCR 反应体系为 10 \times 反应缓冲液 1 μ L, 10 mmol/L dNTP 0.25 μ L, 10 μ mol/L 引物各 0.25 μ L, 5 U/ μ L Taq 酶(中科瑞泰)0.1 μ L, 模板 DNA 40 ng, 补 ddH₂O 至 10 μ L。PCR 程序为 94 $^{\circ}$ C 下预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 下变性 20 s, 55 $^{\circ}$ C 下退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 下延伸 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 下延伸 7 min, 16 $^{\circ}$ C 下 10 min。CYP704B2 和 CYP81A6 扩增产物分别在 12% 和 6% 的聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳检测。

2 结果与分析

2.1 突变体库的创建和筛选

10 kg 93-11 种子经钴 60 辐射后大田种植, 共获得 M₁ 植株 8947 株。M₁ 植株成熟后分单株收种, 从中选取有 100 粒以上种子的材料 3617 份种成 M₂ 株系, 共种植约 18 万株。从每个 M₂ 株系中随机选取 6 个单株, 分单株取叶片抽提 DNA 并收种, 分别



A—单蘖；B—矮化；C—迟抽穗；D—小穗变形；E—假病斑。左边为突变体，右边为野生型。

A, Monoculm; B, Dwarfism; C, Late heading; D, Malformed spikelet; E, Lesion mimic. Mutant plants or samples are on the left, and wild type plants or samples are on the right.

图 1 M_2 家系中不同类型的突变体

Fig. 1. Different mutant phenotypes in M_2 families.

作为辐射诱变突变体库的 DNA 池和种质资源长期保存。

在 M_2 代对突变体材料的株高、株型、分蘖数、穗型、小穗结构、育性、叶色、叶型、抽穗期等性状进行全生育期观察筛选，在 M_3 代对突变体材料的苯达松抗性进行筛选。结果共选中包括分蘖减少(图 1-A)、矮化(图 1-B)、迟抽穗(图 1-C)、小穗变形(图 1-D)、假病斑(图 1-E)等在内的 15 种类型共 308 个突变家系，占被观察家系总数的 8.52%(表 2)。如表 2 所示，育性相关突变出现的频率最高，为 2.74%

(99 个)，株型紧凑和早衰突变出现的频率最低，均为 0.03%(各 1 个)。其他类型突变出现的频率除矮化和分蘖少高于 1.00% 以外，其余均低于 1.00%(表 2)。

2.2 不育突变体的分子鉴定

为了进一步了解本突变体库的质量及其在水稻基因功能分析中的效用，我们以不育突变体和苯达松敏感突变体作材料开展了基因鉴定工作。水稻 *CYP704B2* 编码一个细胞色素 P450 家族的蛋白，该基因缺失后导致水稻不能产生成熟花粉^[21]。我

表2 M₂和M₃家系中突变表型统计Table 2. Summary of mutant phenotypes in M₂ and M₃ families.

表型 Phenotype	家系数 Number of lines	频率 ^a Frequency ^a /%
株高增加 Increased plant height	3	0.08
矮化 Dwarfism	65	1.80
株型紧凑 Reduced tiller angle	1	0.03
分蘖少 Reduced tiller number	52	1.44
分蘖多 Increased tiller number	2	0.06
穗型变异 Malformed panicle	6	0.17
小穗变异 Malformed spikelet	19	0.53
育性 Fertility	99	2.74
叶色 Leaf color	2	0.06
叶片变宽 Broad leaf	2	0.06
假病斑 Lesion mimic	12	0.33
早衰 Premature senescence	1	0.03
早抽穗 Early heading	12	0.33
迟抽穗 Late heading	30	0.83
苯达松敏感 Bentazon-lethal	2	0.15 ^b
总数 Total	308	8.52

^a突变家系在被筛选的3617个家系中出现的频率;^b苯达松敏感家系在被筛选的1326个家系中出现的频率。

^a Mutation frequency in 3617 lines; ^b Mutation frequency in 1326 lines.

们从99个育性突变体中挑选出11个无花粉型雄性不育突变体,用基因特异引物分别扩增这些无花粉型雄性不育突变体中的*CYP704B2*,将PCR产物测序后与野生型*CYP704B2*的基因组序列做比对。结果表明在1907(图2-A,B)和2245(图2-C,D)两个家系的无花粉型雄性不育突变体(图2-B,D)中,*CYP704B2*的基因组序列均发生了改变(图2-E)。其中1907的突变体(1907m)在*CYP704B2*编码区第794个碱基后的GGG被替换为T,造成了移码突变和翻译提前终止,导致野生型*CYP704B2*蛋白C端339个氨基酸被Tyr-Ala-Val-Thr所取代。而2245的突变体(2245m)在*CYP704B2*编码区第1267个碱基后的GG发生缺失,也造成了移码突变和翻译提前终止,导致*CYP704B2*蛋白C端的220个氨基酸被丙氨酸(Ala)取代。

为了进一步证实*CYP704B2*突变和表型的关系,我们分别根据1907m和2245m中的突变位点设计引物鉴定其M₂家系植株的基因型。结果表明1907(图2-F)和2245(图2-G)家系的植株都可以分为3种基因型,其中野生基因型和突变基因型分别只能扩增出一条带,并且前者大于后者,杂合基因型可以扩增出两条带,并且大小分别与野生基因型和

突变基因型一致。育性调查表明所有野生和杂合基因型的植株都能正常结实,而所有突变基因型的植株均不育,即不育表型和突变基因型共分离。这表明两个家系中的不育表型均由*CYP704B2*的突变造成。

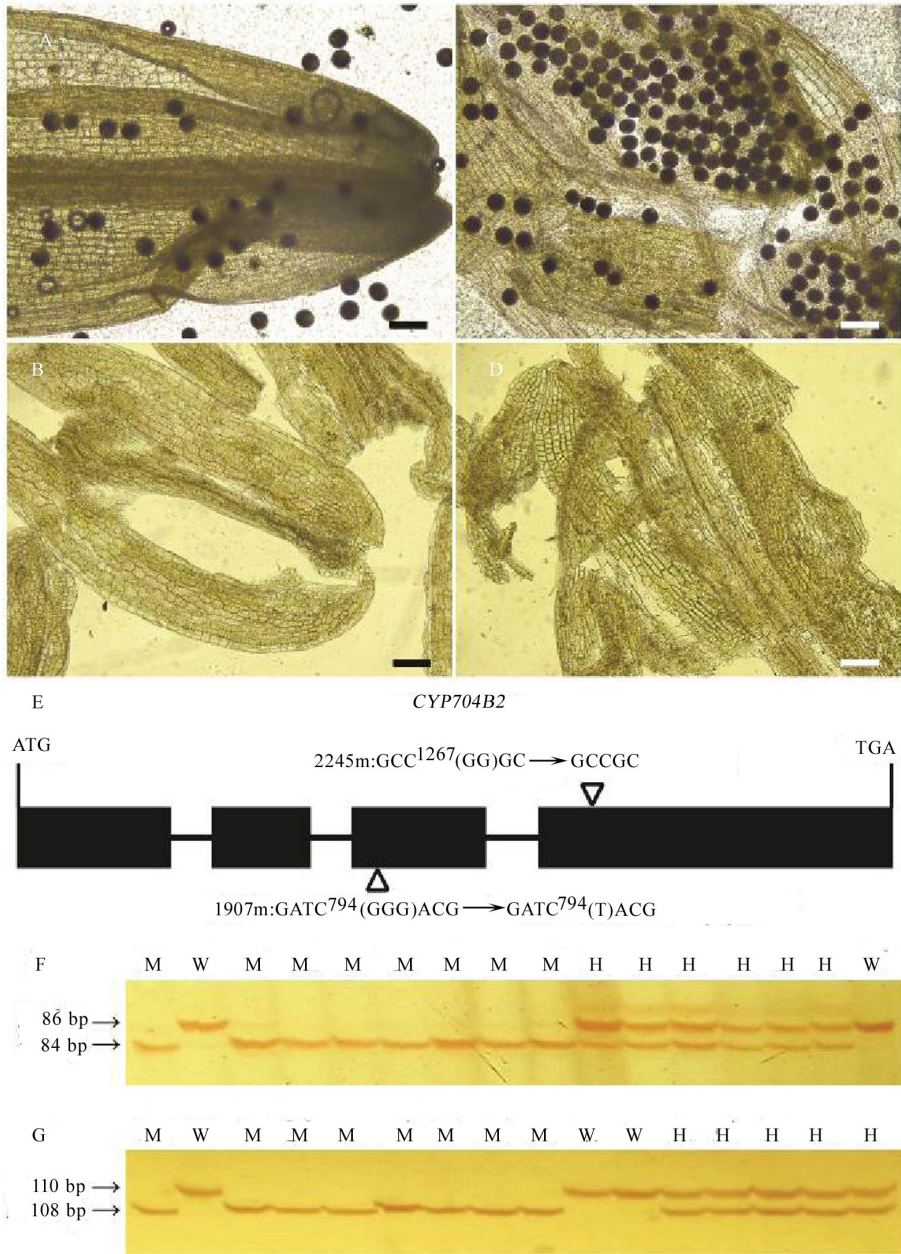
对1907家系中*CYP704B2*突变位点杂合植株后代的遗传分析表明,可育与不育株分别为94株和29株,符合3:1分离($\chi^2 = 0.07$, $P > 0.05$)。2245家系中*CYP704B2*突变位点杂合植株后代中可育与不育株分别为110株和34株,也符合3:1分离($\chi^2 = 0.08$, $P > 0.05$)。这说明两个家系中的不育性状仅由*CYP704B2*位点控制。

2.3 苯达松敏感突变体的分子鉴定

*CYP81A6*编码一个细胞色素P450家族的蛋白,该基因突变后导致水稻对苯达松敏感^[22]。我们用特异引物分别扩增3522(图3-A)和3622(图3-B)两个家系中苯达松敏感突变体(3522m和3622m)的*CYP81A6*,PCR产物经测序后与野生型*CYP81A6*的基因组序列进行比对。结果表明在3522m和3622m中,*CYP81A6*编码区分别在第1747bp和第586bp后发生了23bp和7bp的碱基缺失(图3-C),两种缺失都造成了移码突变,导致翻译提前终止。

为了验证苯达松敏感表型是否由*CYP81A6*的突变造成,我们分别根据3522m和3622m中的突变位点设计引物鉴定两家系M₃植株的基因型。如图3-D和3-E所示,3522和3622家系的植株都能分成野生、突变和杂合3种基因型,其中野生和突变基因型各有一条带且前者大于后者,杂合基因型有两条带并分别与野生和突变基因型的带一致。在3522和3622家系中所有野生和杂合基因型的植株都对苯达松不敏感,而所有突变基因型的植株均敏感,说明苯达松敏感表型与突变基因型共分离,表明苯达松敏感表型确是由*CYP81A6*的突变造成的。

挑选3522家系中*CYP81A6*突变位点杂合单株的后代进行遗传分析,苯达松不敏感与敏感株分别为222株和79株,符合3:1分离($\chi^2 = 0.19$, $P > 0.05$)。3622家系中*CYP81A6*突变位点杂合植株后代中苯达松不敏感与敏感株分别为233株和84株,也符合3:1分离($\chi^2 = 0.30$, $P > 0.05$)。这说明两个家系中的苯达松敏感表型仅由*CYP81A6*单基因控制。

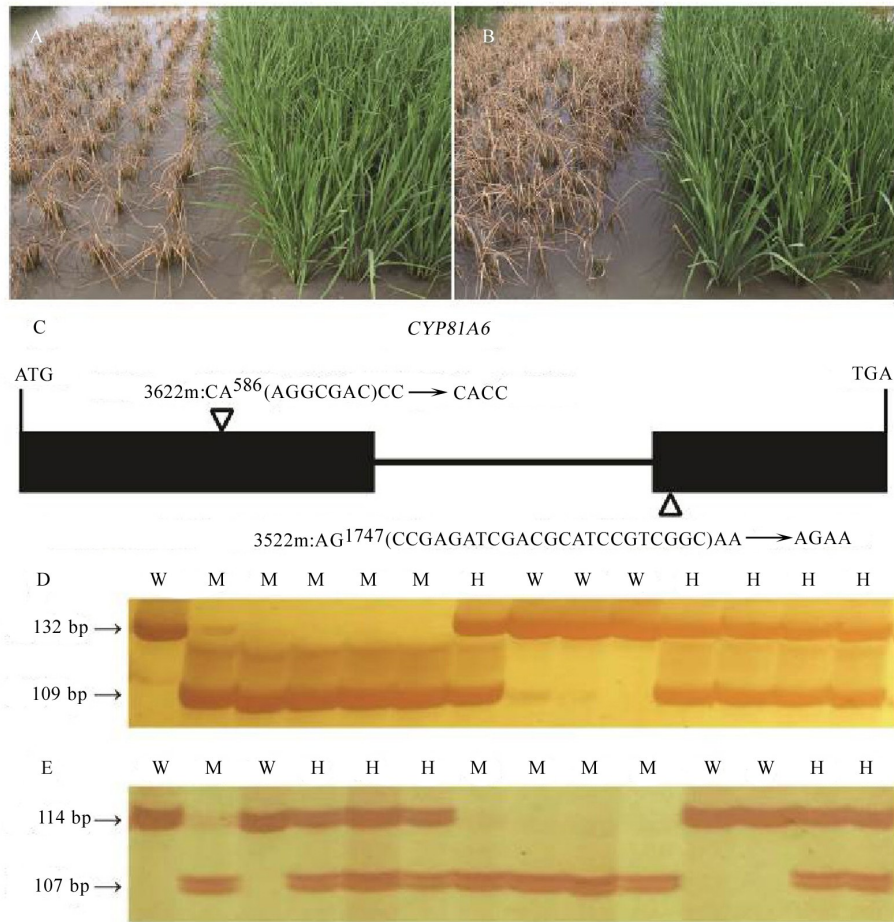


A 和 B—1907 家系中野生型(A)和无花粉型不育突变体(B)的花粉碘染,比例尺=100 μm;C 和 D—2245 家系中野生型(C)和无花粉型不育突变体(D)的花粉碘染,比例尺=100 μm;E—*CYP704B2* 的基因结构。黑框代表编码区;线条代表内含子;三角指向突变位点,其中 1907 家系突变体(1907m)中 *CYP704B2* 第 794 个碱基之后的“GGG”被替换为“T”,而 2245 家系突变体(2245m)中 *CYP704B2* 第 1267 个碱基之后的“GG”缺失;F 和 G—1907(F)和 2245(G)家系 M₃ 单株中 *CYP704B2* 突变位点的基因型检测。图片左边显示 PCR 产物大小。W—野生型;H—杂合型;M—突变型。

A and B, I₂-KI staining of pollen grains of a wild type plant (A) and a mutant (B) in the line 1907, bar = 100 μm; C and D, I₂-KI staining of pollen grains of a wild type plant (C) and a mutant (D) in the line 2245, bar = 100 μm; E, The structure of *CYP704B2*. Black boxes represent the coding region; Lines represent introns; Triangles point to the mutation loci. “GGG” following the 794th nucleotide of *CYP704B2* is substituted by “T” in mutants of the line 1907 (1907m), and “GG” following the 1267th nucleotide of *CYP704B2* is deleted in mutants of the line 2245 (2245m); F and G, Genotyping of the *CYP704B2* loci in the lines 1907 (F) and 2245 (G). The sizes (bp) of the PCR products are shown on the left. W, Wild type; H, Heterozygote; M, Mutant.

图 2 无花粉型雄性不育突变体及其分子鉴定

Fig. 2. Phenotypic and molecular characterization of two male-sterile mutants without pollen grains.



A 和 B—3522(A) 和 3622(B) 家系中苯达松敏感突变体(左边)和野生型(右边)植株分蘖期喷施苯达松后的表现; C—*CYP81A6* 的基因结构。黑框代表编码区; 线条代表内含子; 三角指向突变位点, 其中 3522 家系突变体(3522m) 中 *CYP81A6* 编码区第 1747 bp 后发生了 23 bp 缺失, 而 3622 家系突变体(3622m) 中 *CYP81A6* 编码区第 586 bp 后发生了 7 bp 缺失; D 和 E—3522(D) 和 3622(E) 家系 M₁ 单株中 *CYP81A6* 突变位点的基因型检测。图片左边显示 PCR 产物大小。W—野生型; H—杂合型; M—突变型。

A and B, Phenotypes of the bentazon-lethal mutants (left) and wild type (right) plants in the lines 3522 (A) and 3622 (B) after bentazon spraying at tillering stage; C, The structure of *CYP81A6*. Black boxes represent the coding region; Lines represent introns; Triangles point to the mutation loci. A 23-bp deletion is found following the 1747th bp of the coding region of *CYP81A6* in mutants of the line 3522 (3522m), and a 7-bp deletion is found following the 586th bp of the coding region of *CYP81A6* in mutants of the line 3622 (3622m); D and E, Genotyping of the *CYP81A6* loci in the lines 3522 (D) and 3622 (E). The sizes (bp) of the PCR products are shown on the left. W, Wild type; H, Heterozygote; M, Mutant.

图3 苯达松敏感突变体及其分子鉴定

Fig. 3. Phenotypic and molecular characterization of two bentazon-lethal mutants.

3 讨论

目前国内外创建的水稻突变体库大多数是粳稻遗传背景, 并多用转基因方法产生^[6, 14]。本研究利用辐射诱变创建了一个包含 3617 个家系的籼稻品种 93-11 的突变体库。从该库中共筛选到 308 个突变家系, 总突变频率为 8.52%。这些突变体可以分为包括育性和苯达松敏感在内的 15 种类型, 不同类

型出现的频率为 0.03%~2.74%。我们从 1326 个家系中筛选到 2 个 *CYP81A6* 突变体, 从 3617 个家系中筛选到 2 个 *CYP704B2* 突变体, 提示在本突变体库中筛选到单个目标基因突变体的概率应该不低于 0.055%~0.15%。造成 *CYP704B2* 和 *CYP81A6* 突变的原因是片段缺失和核苷酸替换, 这也是辐射诱变典型的突变类型^[19]。我们的 93-11 突变体库突变频率高, 突变类型丰富, 增加了

籼稻突变体资源并将促进籼稻基因组功能的解析。此外,93-11 基因组序列已经公布^[3],且其在我国水稻生产中表现出优质、高产、广适等特性,这有利于本突变体资源在水稻育种和生产中的直接利用。

雄性不育是水稻杂种优势利用的基础,受到复杂分子网络的调控^[23-24]。隐性核雄性不育是雄性不育的一种,可用于第三代杂交水稻技术和轮回育种群体改良技术^[25-27]。*CYP704B2* 突变后会产生无花粉型隐性核雄性不育突变体^[21],在上述两个技术中均具有重大应用潜力。目前已报道过的 *CYP704B2* 突变体是用粳稻品种 9522 经钴 60 辐射获得。在该突变体中,一段包括 *CYP704B2* 大部及其上游基因一部在内的 3102 bp 长的片段发生了缺失^[21]。由于 *CYP704B2* 上游基因序列的删除可能造成潜在的非目标性状变异,这为其利用带来不利影响。本研究鉴定了两个新的 *CYP704B2* 突变体 1907m 和 2245m。在这两个突变体中 *CYP704B2* 的第 3 和第 4 外显子分别比其野生型短 2 bp,这不但避免了上下游其他基因变异可能造成的附加效应,还能很容易地设计共显性分子标记进行检测,极大地方便了突变体的利用。

苯达松是一种苯并噻二唑类内吸性稻田除草剂,能够通过干扰光合作用中的希尔反应杀死多种阔叶类和莎草科杂草。水稻可以通过 *CYP81A6* 编码的细胞色素 P450 蛋白将苯达松羟基化而不受毒害^[22]。水稻 *CYP81A6* 突变体对苯达松敏感,在杂交水稻的除杂保纯和混植法制种中均具有极大的应用潜力。农林 8 号 m 和 8077S 是目前为止报道过的两个 *CYP81A6* 突变体,其中籼稻来源的 8077S 对苯达松的敏感性不高,粳稻来源的农林 8 号 m 的敏感程度明显高于 8077S。农林 8 号 m 和 8077S 分别在 *CYP81A6* 的 ATG 起第 507 碱基缺失一个 C 和在第 2058 碱基缺失一个 G^[22]。由于上述两个突变体中的 *CYP81A6* 都只有 1 bp 的缺失,因此难以用普通 PCR 和电泳方法进行检测。本研究新鉴定了 3622m 和 3522m 两个对苯达松高度敏感的突变体。在这两个突变体中 *CYP81A6* 的第 1 和第 2 个外显子分别缺失了一个 7 bp 和一个 23 bp 的片段,用普通的聚丙烯酰胺凝胶甚至琼脂糖凝胶电泳就能检测 *CYP81A6* 突变基因。此外,3622m 和 3522m 与农林 8 号 m 及 8077S 遗传背景不同,为杂交水稻育种和生产提供了新的种质资源。

谢辞:感谢冯玉涛、王露露、李秀琴、欧阳超、陈思兰、王会进在突变体筛选方面给予的帮助。

参考文献:

- [1] Zhang Q, Li J, Xue Y, et al. Rice 2020: A call for an international coordinated effort in rice functional genomics. *Mol Plant*, 2008, 1(5): 715-719.
- [2] Goff S A, Ricke D, Lan T H, et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science*, 2002, 296(5565): 92-100.
- [3] Yu J, Hu S, Wang J, et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science*, 2002, 296(5565): 79-92.
- [4] Kawahara Y, de la Bastide M, Hamilton J P, et al. Improvement of the *Oryza sativa* Nipponbare reference genome using next generation sequence and optical map data. *Rice*, 2013, 6(1): 4.
- [5] IRGSP. The map-based sequence of the rice genome. *Nature*, 2005, 436(7052): 793-800.
- [6] Wang N, Long T, Yao W, et al. Mutant resources for the functional analysis of the rice genome. *Mol Plant*, 2013, 6(3): 596-604.
- [7] Jeong D H, An S, Kang H G, et al. T-DNA insertional mutagenesis for activation tagging in rice. *Plant Physiol*, 2002, 130: 1636-1644.
- [8] Miyao A, Tanaka K, Murata K, et al. Target site specificity of the *Tos17* retrotransposon shows a preference for insertion within genes and against insertion in retrotransposon-rich regions of the genome. *Plant Cell*, 2003, 15: 1771-1780.
- [9] Wu C, Li X, Yuan W, et al. Development of enhancer trap lines for functional analysis of the rice genome. *Plant J*, 2003, 35(3): 418-427.
- [10] Kolesnik T, Szeverenyi I, Bachmann D, et al. Establishing an efficient *Ac/Ds* tagging system in rice: Large-scale analysis of *Ds* flanking sequences. *Plant J*, 2004, 37(2): 301-314.
- [11] Sallaud C, Gay C, Larmande P, et al. High throughput T-DNA insertion mutagenesis in rice: A first step towards *in silico* reverse genetics. *Plant J*, 2004, 39: 450-464.
- [12] Hsing Y I, Chern C G, Fan M J, et al. A rice gene activation/knockout mutant resource for high throughput functional genomics. *Plant Mol Biol*, 2007, 63: 351-364.
- [13] Fu F F, Ye R, Xu S P, et al. Studies on rice seed quality through analysis of a large-scale T-DNA insertion population. *Cell Res*, 2009, 19(3): 380-391.
- [14] Wei F J, Droc G, Guiderdoni E, et al. International consortium of rice mutagenesis: Resources and beyond. *Rice*, 2013, 6(1): 39.
- [15] Till B J, Cooper J, Tai T H, et al. Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING. *BMC Plant Biol*, 2007, 7: 19-30.

- [16] Suzuki T, Eiguchi M, Kumamaru T, et al. MNU-induced mutant pools and high performance TILLING enable finding of any gene mutation in rice. *Mol Genet Genom*, 2008, 279(3): 213-223.
- [17] Abe A, Kosugi S, Yoshida K, et al. Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(2): 174-178.
- [18] Fekih R, Takagi H, Tamiru M, et al. MutMap⁺: Genetic mapping and mutant identification without crossing in rice. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68529.
- [19] Wu J L, Wu C, Lei C, et al. Chemical- and irradiation-induced mutants of indica rice IR64 for forward and reverse genetics. *Plant Mol Biol*, 2005, 59(1): 85-97.
- [20] Rogers S O, Bendich A J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol Biol*, 1985, 5(2): 69-76.
- [21] Li H, Pinot F, Sauveplane V, et al. Cytochrome P450 family member CYP704B2 catalyzes the ω -hydroxylation of fatty acids and is required for anther cutin biosynthesis and pollen exine formation in rice. *Plant Cell*, 2010, 22(1): 173-190.
- [22] 张集文. 水稻苯达松敏感突变研究进展. 中国水稻科学, 2010, 24(5): 551-558.
Zhang J W. Progress on the study of the bentazon sensitive mutants in rice. *Chin J Rice Sci*, 2010, 24(5): 551-558. (in Chinese with English abstract)
- [23] Liu L, Fan X D. Tapetum: Regulation and role in sporopollenin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 2013, 83(3): 165-175.
- [24] 马西青, 方才臣, 邓联武, 等. 水稻隐性核雄性不育基因研究进展及育种应用探讨. 中国水稻科学, 2012, 26(5): 511-520.
Ma X Q, Fang C C, Deng L W, et al. Research progress and breeding application of recessive genic male sterility genes in rice. *Chin J Rice Sci*, 2012, 26(5): 511-520. (in Chinese with English abstract)
- [25] 邓兴旺, 王海洋, 唐晓艳, 等. 杂交水稻育种将迎来新时代. 中国科学: 生命科学, 2013, 43(10): 864-868.
Deng X W, Wang H Y, Tang X Y, et al. Hybrid rice breeding welcomes a new era of molecular crop design. *Sci Sin Vitae*, 2013, 43(10): 864-868. (in Chinese with English abstract)
- [26] 汪旭东, 周开达, 李仕贵, 等. 利用隐性核不育性进行水稻轮回育种初步研究. 西南农业学报, 2001, 14(3): 102-106.
Wang X D, Zhou K D, Li S G, et al. A preliminary study on rice recurrent breeding using recessive sterile material. *Southwest Chin J Agri Sci*, 2001, 14(3): 102-106. (in Chinese with English abstract)
- [27] Wu Y, Fox T W, Trimnell M R, et al. Development of a novel recessive genetic male sterility system for hybrid seed production in maize and other cross-pollinating crops. *Plant Biotechnol J*, 2015, doi: 10.1111/pbi.12477.