

王 迪,牛 梅,王 健,等. 淮稻 5 号化学诱变突变体库的构建与基因快速定位[J]. 江苏农业科学,2021,49(4):26-31.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.04.005

# 淮稻 5 号化学诱变突变体库的构建与基因快速定位

王 迪<sup>1,2</sup>,牛 梅<sup>3</sup>,王 健<sup>1,2</sup>,程保山<sup>1,2</sup>,李 刚<sup>1,2</sup>,徐卫军<sup>1</sup>,袁彩勇<sup>1</sup>

(1. 江苏徐淮地区淮阴农业科学研究所,江苏淮安 223001; 2. 江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室/淮阴师范学院,江苏淮安 223300;

3. 农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程/中国农业科学院作物科学研究所,北京 100081)

**摘要:**淮稻 5 号是江苏地区粳稻主栽品种之一,该品种具有灌浆速度快、出糙率高、千粒质量高、抗倒能力强、耐低温等特点。但由于缺少适宜的研究材料,淮稻 5 号中优良农艺性状的调控机制一直没有得到解析。突变体是研究基因功能最直接、最有效的途径之一,本研究利用 *N*-甲基-*N*-亚硝脒(MNU)化学诱变构建了包含 3 562 个家系的淮稻 5 号突变体库,并从中筛选获得了 512 个表型稳定的突变体,包括株型、叶色、育性、抽穗期、早衰、类病斑等 8 种类型,利用 MutMap 技术完成了 2 个株型突变体的突变位点初步定位,该突变体库的构建及 MutMap 技术的应用,以期为淮稻 5 号优良性状的解析提供突变体资源。

**关键词:**淮稻 5 号;MNU;突变体库;MutMap

**中图分类号:** S511.032 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)04-0026-06

突变体和相对应的突变基因之间有直接的因果关系,对于基因功能的研究最具说服力,因此突变体是研究基因功能最直接、最有效的途径之一<sup>[1-2]</sup>。但自然发生突变的频率极低,高等生物的

自发突变率为  $1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-5}$ ,因此通过诱变方法获得大量的突变体材料,构建水稻突变体库,识别与鉴定突变性状的变异基因,进而明确其功能,是水稻功能基因组学研究的重要途径<sup>[3-5]</sup>。目前构建突变体的方法主要有插入突变、基因编辑、物理诱变和化学诱变等<sup>[6]</sup>。

插入突变是指将 T-DNA<sup>[3,7-8]</sup>、转座子系统<sup>[9-10]</sup>、逆转座子<sup>[11-13]</sup>等 DNA 元件插入植物基因组中,破坏插入位点内基因的功能,同时 DNA 元件又可作为标签协助从植物基因组中分离出相应基因。基因编辑是一种新兴的比较精确的能对生物体基因组特定目标基因进行修饰的基因工程技术,主要包括转录激活样效应因子核酸酶(TALEN)和

收稿日期:2020-10-23

基金项目:江苏省自然科学基金青年基金(编号:BK201902239);淮安市农业科学研究院高层次人才引进人才科研启动发展基金(编号:0062019016B);淮安市农业科学研究院院长科研基金(编号:HNY201702);江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室自主研发课题(编号:17HZHL009)。

作者简介:王 迪(1988—),男,山东昌邑人,博士,助理研究员,主要从事水稻遗传育种研究。E-mail:wangdirice@163.com。

通信作者:袁彩勇,研究员,主要从事水稻遗传育种研究。E-mail:hysdyey@163.com。

predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3[J]. Fly, 2012, 6(2): 80-92.

[11] Tian T, Liu Y, Yan H, et al. AgriGO v2.0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update [J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(1): 122-129.

[12] Stuber C W, Lincoln S E, Wolff D W, et al. Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers[J]. Genetics, 1992, 132(3): 823-839.

[13] Lu H, Romero-Severson J, Bernardo R. Genetic basis of heterosis explored by simple sequence repeat markers in a random-mated maize population[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 107(3): 494-502.

[14] Frascaroli E, Canè M A, Landi P, et al. Classical genetic and quantitative trait loci analyses of heterosis in a maize hybrid between two elite inbred lines[J]. Genetics, 2007, 176(1): 625-644.

[15] Thiemann A, Fu J, Seifert F, et al. Genome-wide meta-analysis of maize heterosis reveals the potential role of additive gene expression at pericentromeric loci[J]. BMC Plant Biology, 2014, 14: 88.

[16] Ledent V, Vervoort M. The basic helix-loop-helix protein family: comparative genomics and phylogenetic analysis [J]. Genome Research, 2001, 11(5): 754-770.

[17] Varagona M J, Schmidt R J, Raikhel N V. Nuclear localization signal(s) required for nuclear targeting of the maize regulatory protein Opaque-2[J]. The Plant Cell, 1992, 4(10): 1213-1227.

[18] 刘 欣,李 云. 转录因子与植物抗逆性研究进展[J]. 中国农学通报, 2006, 22(4): 61-65.

成簇规律间隔短回文重复(CRISPR/Cas9)系统等方法<sup>[14-16]</sup>。物理诱变是指通过快中子、质子、 $\gamma$ 射线、X射线等方法处理植物种子,对植物染色体造成损伤,进而诱发变异<sup>[5,17]</sup>。化学诱变是指利用碱基类似物、烷化剂、嵌入剂等化学诱变剂处理种子或植株器官等诱发突变<sup>[18]</sup>。与其他方法相比,化学诱变具有操作简单、成本较低、受试验条件限制小、诱变效率高等特点。*N*-甲基-*N*-亚硝脒(MNU)是一种单碱基诱变剂,主要对DNA上的鸟嘌呤起烷化作用。Satoh等首次确立了利用MNU处理水稻受精卵的诱变方法,并指出MNU在水稻诱变中的效率高于甲基磺酸乙酯(EMS)<sup>[19]</sup>。

利用物理和化学诱变获得的突变体,如果通过传统图位克隆的办法定位突变基因,存在耗时长、效率低的缺点,极大地限制了理化诱变突变体库的发展和利用。但随着水稻基因组测序工作的完成以及二代测序技术的不断发展,MutMap技术的出现极大地提高了水稻突变体基因的克隆效率。MutMap技术通过对 $F_2$ 分离群体中突变表型个体进行混池测序,而后与野生型基因组序列进行比对,进而发现突变基因。同时MutMap技术所需要的 $F_2$ 分离群体较小,因此减少了杂交工作量,非常适用于水稻理化诱变突变体库的突变基因克隆<sup>[20]</sup>。

淮稻5号是江苏徐淮地区淮阴农业科学研究所育成的迟熟中粳品种,该品种具有株型适宜、灌浆速度快、出糙率高、千粒质量高、抗倒能力强、耐低温等特点<sup>[21]</sup>。淮稻5号尤其适宜直播,直播中丰产性、抗逆性、稳产性和品质等综合性状均较好,自推广以来一直占据江苏省水稻品种市场重要份额,根据全国水稻数据中心统计,淮稻5号目前累计推广面积超过175.2万 $\text{hm}^2$ (<http://www.ricedata.cn/variety/varis/604604.htm>)。但由于缺少适宜的研究材料,淮稻5号优良农艺性状的分子调控机制一直没有得到解析。因此,构建淮稻5号的突变体库,选取适宜的突变体材料解析调控淮稻5号株型、抗倒、灌浆快、耐低温、高出糙率等优良性状的分子机制,能够为后续品种的开发提供新的基因资源和理论基础。本研究利用MNU诱变构建淮稻5号的突变体库,通过对3562个突变家系的筛选获得了512个表型稳定的突变体。此外,利用MutMap技术对其中的2个矮秆突变体进行了突变基因的定位。该突变体库以期淮稻5号优良性状的解析提供突变体资源,具有一定的生产意义和理论意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 MNU 诱变

2017年正季于江苏徐淮地区淮阴农业科学研究所水稻育种基地选取分蘖较多、生长旺盛的淮稻5号盛花期植株进行MNU诱变,当天下午剪除已开花的颖花,第2天下午剪除未开花的颖花同时修剪多余分蘖及叶片,第2天23:00将预备的穗子浸泡在1mmol/L的MNU溶液中1h,之后用流水冲洗15min,第3天将处理过的植株种植于田间,自交结实获得 $M_1$ 种子。

### 1.2 突变体种植及筛选

收获的 $M_1$ 种子同年冬天送至海南陵水南繁育种基地加代,单株收种获得 $M_2$ 种子。2018年正季将 $M_2$ 种子种植于江苏徐淮地区淮阴农业科学研究所水稻基地,每个 $M_2$ 家系种植30株。对 $M_2$ 家系进行全生育期筛选分离出有明显突变表型的家系,出现突变植株的家系按单株分别收取突变植株与野生型植株的种子。对未分离出突变表型的家系单株收种磨米鉴定米质与出糙率。同时所有 $M_2$ 家系分家系混收一部分种子储存于种子库中。所有诱变材料均按正常大田条件管理,单株插秧。

### 1.3 遗传分析

*hwa5*、*hwa7*突变体与淮稻5号做正反交构建遗传分析群体,同年冬季于海南陵水加代获得 $F_2$ 种子,第2年正季将 $F_2$ 分离群体种植于淮安,成熟期统计 $F_2$ 群体中野生型表型和突变体表型植株数量,计算分离比,进行卡方( $\chi^2$ )测验。

### 1.4 基因定位

从*hwa5*×淮稻5号与*hwa7*×淮稻5号的 $F_2$ 分离群体中分别取野生型表型单株和突变表型单株叶片各30个,分别提取DNA后,取等量混合形成DNA混池。采用MutMap方法克隆株型基因,获得基因序列和突变位点信息,MutMap由成都天成未来科技有限公司完成。

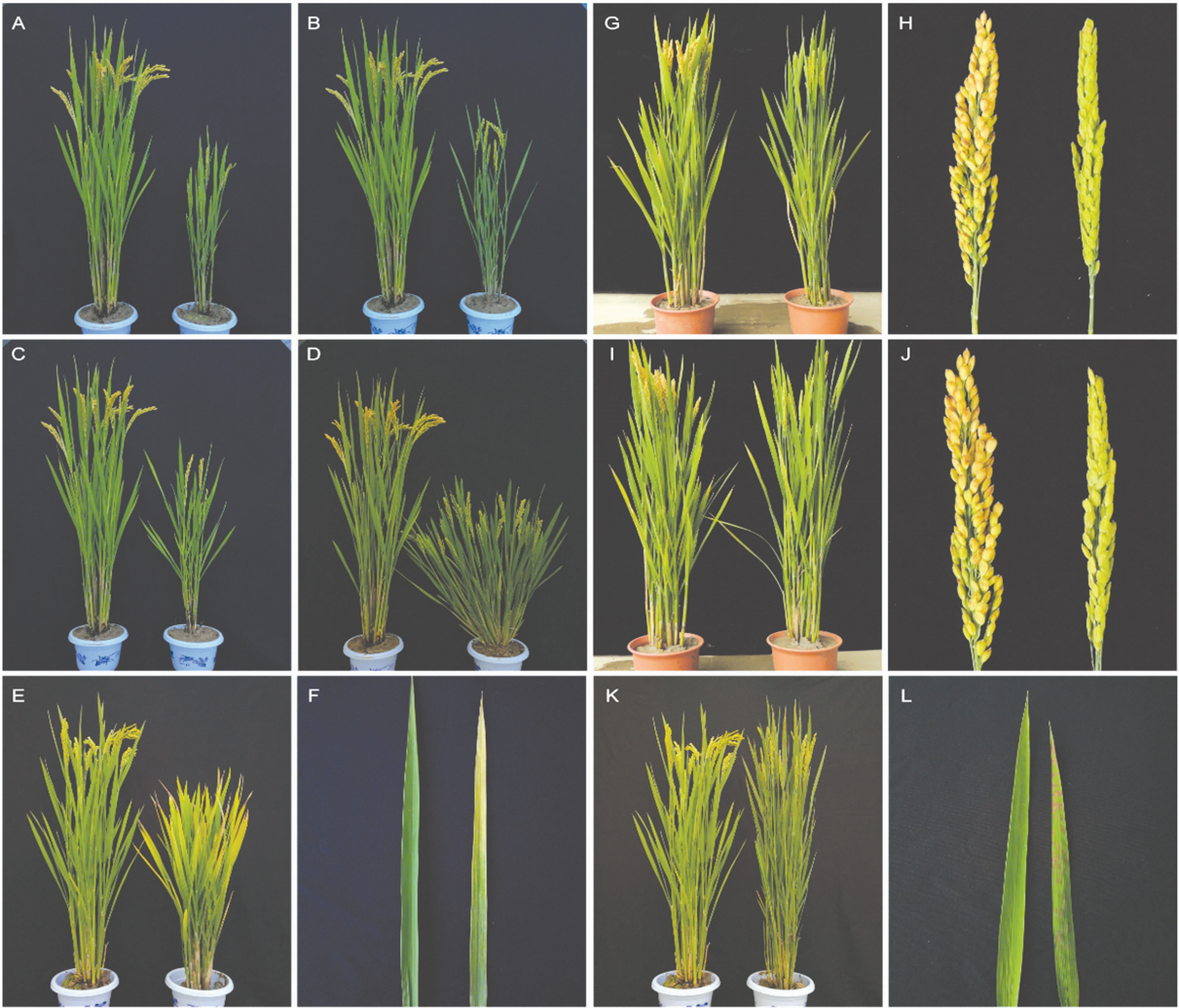
## 2 结果与分析

### 2.1 突变体库的创建和筛选

30株只保留当天开花颖花的淮稻5号植株经MNU处理后结实收获 $M_1$ 种子,将 $M_1$ 种子种植于海南,共获得 $M_1$ 植株4887株,其中完全不育的 $M_1$ 植株174株,分单株收种获得 $M_2$ 种子。 $M_2$ 种子种植后共获得 $M_2$ 家系3562个。对 $M_2$ 家系进行全生

育期观察,筛选株型、叶色、抽穗期、育性等方面的突变体材料,共获得 512 个突变家系,包括株型、叶色、育性、抽穗期、早衰、类病斑等 8 种类型,占总家系数量的 14.37%。其中株型突变体出现频率最

高,为 203 个,占总家系数量的 5.70%;脆秆突变体出现频率最低,为 2 个,占总家系数量的 0.06%(图 1、表 1)。



A~D—株型突变体; E、F—叶色突变体; G、I—育性突变体; H、J 分别为二者的穗子; K、L—类病斑

图1 M<sub>2</sub>家系中不同类型的突变体

表 1 M<sub>2</sub> 家系中突变类型统计

表型	家系数量 (个)	频率 (%)
株型	203	5.70
叶色	126	3.54
育性	84	2.36
抽穗期	52	1.46
早衰	17	0.48
类病斑	15	0.42
叶型	13	0.36
脆秆	2	0.06
合计	512	14.37

2.2 株型突变体遗传分析

为进一步了解本研究突变体库的质量,从中选取 *hw5* 及 *hw7* 2 个株型突变体进行 MutMap 基因定位。其中 *hw5* 表型为半矮秆,*hw7* 表型为矮秆、分蘖角增大(图 1 - C、图 1 - D、表 2)。分别将 *hw5*、*hw7* 突变体与淮稻 5 号正反交,构建 F<sub>2</sub> 分离群体。2 组试验 F<sub>1</sub> 均表现为野生型表型,F<sub>2</sub> 中出现野生型表型和突变体表型 2 种分离,分别统计各个 F<sub>2</sub> 群体中野生型表型和突变体表型植株的数量,进行卡方测验。结果表明,*hw5*、*hw7* 分离群体的分离比均符合 3 : 1(表 3)。说明,*hw5*、*hw7* 的表型均受隐性单核基因控制。

表 2 淮稻 5 号与 *hw5*、*hw7* 突变体农艺性状分析

材料	株高 (cm)	有效分蘖 (个)	剑叶长 (cm)	穗长 (cm)	一次枝梗 (个)	二次枝梗 (个)	每穗粒数 (粒)
淮稻 5 号	90.83 ± 2.35	19.3 ± 1.7	25.36 ± 3.74	15.81 ± 2.12	14.0 ± 1.2	35.5 ± 2.4	184.2 ± 12.7
<i>hw5</i>	69.65 ± 1.72 **	13.6 ± 2.4 **	26.77 ± 2.34	14.83 ± 1.03	10.2 ± 0.7 **	30.5 ± 1.7 **	151.4 ± 15.6 **
<i>hw7</i>	64.23 ± 2.33 **	15.7 ± 5.6 **	17.93 ± 1.72 **	13.33 ± 1.67 **	14.9 ± 0.9	28.9 ± 1.1 **	156.3 ± 9.6 **

注: \*\* 表示与淮稻 5 号相比在 0.01 水平上差异显著。

表 3 遗传分析

杂交组合	总数 (株)	正常表型植株 (株)	突变表型植株 (株)	$\chi^2(3:1)$
淮稻 5 号/ <i>hw5</i>	340	249	91	0.477
<i>hw5</i> /淮稻 5 号	293	217	76	0.092
淮稻 5 号/ <i>hw7</i>	440	326	114	0.148
<i>hw7</i> /淮稻 5 号	370	274	96	0.130

注:  $\chi^2(0.05,1) = 3.84$ 。

2.3 MutMap 定位

在 *hw5*、*hw7* 的 F<sub>2</sub> (*hw5*/淮稻 5 号, *hw7*/淮稻 5 号) 分离群体中, 分别取野生型表型单株和突变表型单株叶片各 30 个, 分别提取 DNA 后, 取等量混合构建 DNA 池, 利用 MutMap 方法克隆突变基因。根据 SNP 密度图选择 SNP 密度大的区域为候选区段(图 2), 利用 varBScore 算法, 将方差进行对数处理, 获得最显著的变异连锁区段, 通过计算不同混池间各突变型的频率距离, 采用距离差异来反映标记与目标区域的连锁强度, 根据得到的混池间的 SNP 位点集及基因型的深度信息, 计算不同混池间的突变频率差异, 最终获得候选基因(表 4)。

3 结论与讨论

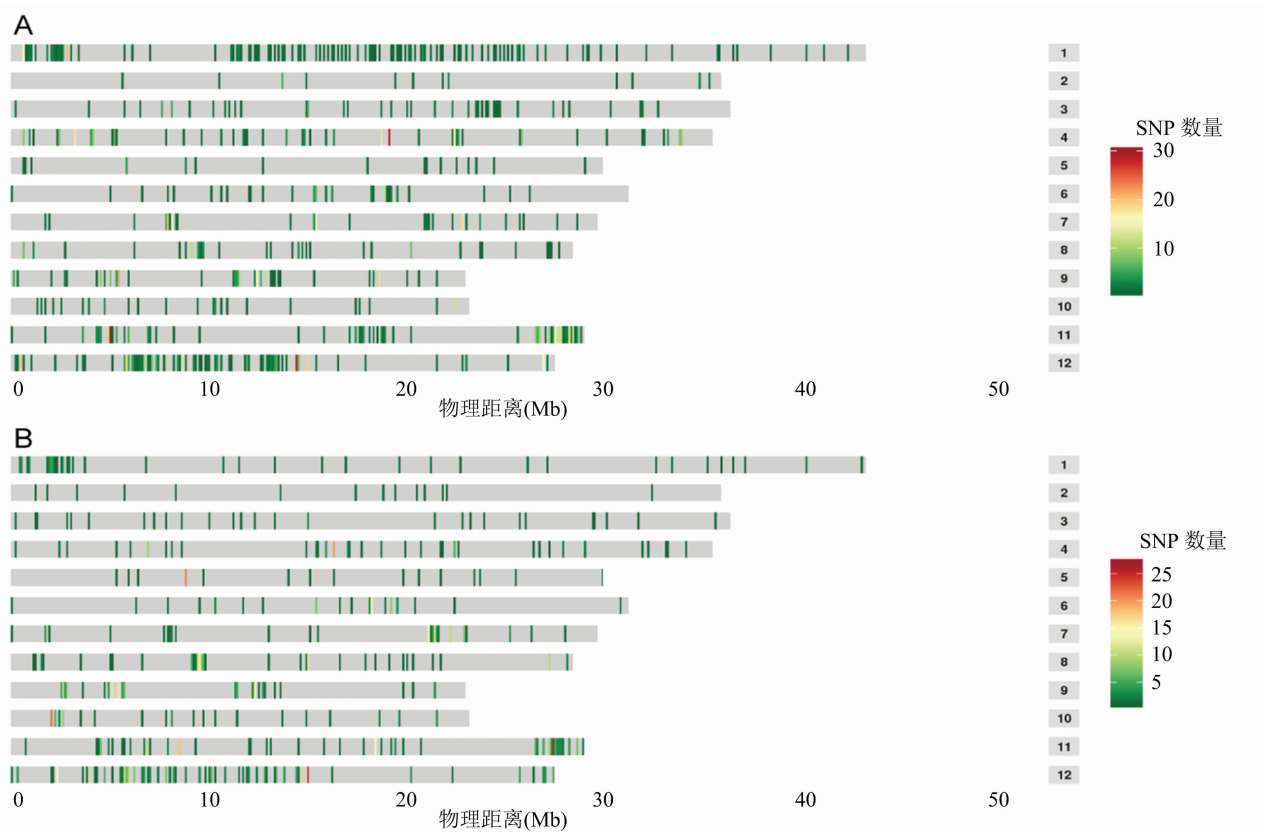
本研究通过 MNU 诱变构建 1 个包含 3 562 个家系的淮稻 5 号突变体库, 从该突变体库中共筛选获得 512 个突变家系, 总诱变概率为 14.37%。其中包括株型、叶色、育性、抽穗期、早衰、类病斑等多种类型, 不同类型突变体出现的频率为 0.06% ~ 5.70%。该突变体库突变类型丰富, 通过对该库中相关突变体的基因定位和功能研究有助于解析淮稻 5 号优良农艺性状的分子调控机制, 能够为后续品种的开发提供新的基因资源和理论基础。尽管已从该突变体库中筛选获得了大量突变体, 但是介于筛选手段及试验条件的限制, 未能从该突变体库中筛选到灌浆快、灌浆期耐低温相关性状的突变体, 这意味着该突变体库中仍然有大量未被筛选出

的突变体, 随着筛选手段和试验条件的改善, 该突变体库还有巨大的潜力可以挖掘。

MutMap 技术基于近些年日趋完善的测序技术而产生, 通过将突变群体的测序结果与野生型相对比, 可以快速定位突变基因。为了满足分子标记多态性的需求, 传统的图位克隆一般采用籼粳杂交构建分离群体, 所需分离群体数量大, 且分离群体容易受到遗传背景差异的影响从而增加表型判断的难度。与传统图位克隆相比, MutMap 所需群体较小, 且定位群体遗传背景一致, 可以避免父母本之间遗传背景差异的影响, 降低基因克隆成本的同时, 大大缩短了基因定位所需的时间。

本研究利用 MutMap 技术对 *hw5* 和 *hw7* 2 个株型突变体进行了基因定位。通过遗传分析证明 *hw5* 和 *hw7* 的突变表型均受隐性单核基因控制, 适用于通过 MutMap 的方法定位突变基因。通过将 *hw5*、*hw7* 与淮稻 5 号分别杂交后构建约 300 ~ 400 个单株的 F<sub>2</sub> 分离群体, 从中分别筛选野生型表型和突变型表型单株各 30 个, 提取 DNA 后等量混合构建混池, 经过重测序和比对分析后获得候选基因。其中 *hw5* 筛选获得 5 个导致氨基酸序列变化的 SNP 位点, 而 *hw7* 筛选到 1 个导致氨基酸序列变化的 SNP 位点, 后续可以通过在分离群体中验证突变位点是否与突变表型共分离获得突变基因。

本研究利用 MNU 诱变获得了包含 3 562 个家系的淮稻 5 号的突变体库, 并从中筛选获得 512 个突变家系。随着筛选技术手段的改进, 该突变体库



hw5 F<sub>2</sub> 群体(A)和 hw7 F<sub>2</sub> 群体(B)的 SNP 密度图, 红色的区域表示该区域 SNP 密度大, 可视为候选区段

图2 SNP密度

还有巨大的潜力可以挖掘。同时利用 MutMap 技术对 hw5 和 hw7 2 个株型突变体进行基因定位。借助 MutMap 技术,对该库中相关突变体的基因定位和功能研究有助于解析淮稻 5 号优良农艺性状的分子调控机制,能够为后续品种的开发提供新的基因资源和理论基础。

参考文献:

[1] Krysan P J, Young J C, Sussman M R. T - DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 1999, 11 ( 12 ) : 2283 - 2290.

[2] Peters J L, Cnudde F, Gerats T. Forward genetics and map - based cloning approaches [J]. Trends in Plant Science, 2003, 8 ( 10 ) : 484 - 491.

[3] Sallaud C, Gay C, Larmande P, et al. High throughput T - DNA insertion mutagenesis in rice; a first step towards in silico reverse genetics [J]. The Plant Journal, 2004, 39 ( 3 ) : 450 - 464.

[4] Kurata N, Miyoshi K, Nonomura K, et al. Rice mutants and genes related to organ development, morphogenesis and physiological traits [J]. Plant & Cell Physiology, 2005, 46 ( 1 ) : 48 - 62.

[5] 叶 俊, 吴建国, 杜 婧, 等. 水稻 9311 突变体筛选和突变体库构建 [J]. 作物学报, 2006, 32 ( 10 ) : 1525 - 1529.

[6] Thang N B, Wu J, Zhou W H, et al. The screening of mutants and construction of mutant library for *Oryza sativa* cv. Nipponbare via

ethyl methane sulphonate inducing [J]. Biologia, 2010, 65 ( 4 ) : 660 - 669.

[7] Wang K, Herrera - Estrella L, van Montagu M, et al. Right 25 bp terminus sequence of the nopaline T - DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from agrobacterium to the plant genome [J]. Cell, 1984, 38 ( 2 ) : 455 - 462.

[8] Wu C Y, Li X J, Yuan W T, et al. Development of enhancer trap lines for functional analysis of the rice genome [J]. The Plant Journal, 2003, 35 ( 3 ) : 418 - 427.

[9] Qu S H, Desai A, Wing R, et al. A versatile transposon - based activation tag vector system for functional genomics in cereals and other monocot plants [J]. Plant Physiology, 2008, 146 ( 1 ) : 189 - 199.

[10] Walbot V. Saturation mutagenesis using maize transposons [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2000, 3 ( 2 ) : 103 - 107.

[11] Yamazaki M, Tsugawa H, Miyao A, et al. The rice retrotransposon Tos17 prefers low - copy - number sequences as integration targets [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2001, 265 ( 2 ) : 336 - 344.

[12] Hirochika H, Sugimoto K, Otsuki Y, et al. Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93 ( 15 ) : 7783 - 7788.

[13] Hirochika H. Contribution of the Tos17 retrotransposon to rice functional genomics [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2001, 4 ( 2 ) : 118 - 122.



表 4 候选基因

突变体	染色体	位置 (bp)	SNP	突变基因	氨基酸变化	功能注释
hu5	Chr. 1	13 776 112	G→A	LOC_Os01g24430	Ala→Thr	表达蛋白
	Chr. 1	14 679 671	G→A	LOC_Os01g25880	Pro→Leu	脱磷酸辅酶 A 激酶
	Chr. 1	14 808 743	G→A	基因间	-	
	Chr. 1	15 632 358	G→A	LOC_Os01g27960	Gly→Asp	逆转座子蛋白
	Chr. 1	15 847 519	G→A	LOC_Os01g28290	Pro→Ser	表达蛋白
	Chr. 1	16 292 340	G→A	基因间	-	
	Chr. 1	16 719 127	G→A	3' prime UTR	-	
	Chr. 1	17 900 513	G→A	基因间	-	
	Chr. 1	17 978 818	G→A	基因间	-	
	Chr. 1	18 195 862	G→A	基因间	-	
	Chr. 1	18 285 645	G→A	基因间	-	
	Chr. 1	18 377 343	A→T	基因间	-	
	Chr. 1	19 290 336	G→A	基因间	-	
	Chr. 1	19 943 547	G→A	LOC_Os01g36040	提前终止	逆转座子蛋白
	Chr. 1	20 118 028	G→A	LOC_Os01g36280	同义突变	
	Chr. 1	20 212 691	G→A	基因间	-	
hu7	Chr. 3	22 842 376	G→A	基因间	-	
	Chr. 5	20 666 060	G→A	LOC_Os05g34820	提前终止	表达蛋白

注：“-”表示无变化。

[ 14 ]Shan Q W,Wang Y P,Li J,et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR - Cas system [ J ]. Nature Biotechnology,2013,31( 8 ):686 - 688.

[ 15 ]Li T,Huang S,Jiang W Z,et al. TAL nucleases ( TALNs ):hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA - cleavage domain[ J ]. Nucleic Acids Research,2011,39( 1 ):359 - 372.

[ 16 ]Kim Y G,Cha J,Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes ;zinc finger fusions to Fok I cleavage domain [ J ]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996,93( 3 ):1156 - 1160.

[ 17 ]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[ J ]. 中国水稻科学,2016,30( 1 ):44 - 52.

[ 18 ]McCallum C M,Comai L,Green E A,et al. Targeted screening for induced mutations[ J ]. Nature Biotechnology,2000,18( 4 ):455 - 457.

[ 19 ]Sato H,Omura T. Induction of mutation by the treatment of fertilized egg cell with N - methyl - IV - nitrosourea in rice[ J ]. Journal of the Faculty of Agriculture,1979,24( 2 ):165 - 174.

[ 20 ]Abe A,Kosugi S,Yoshida K,et al. Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap [ J ]. Nature Biotechnology,2012,30( 2 ):174 - 178.

[ 21 ]袁彩勇,袁生堂,文正怀,等. 淮稻 5 号的特征特性及高产栽培技术[ J ]. 中国稻米,2002,8( 4 ):14.