



· 技术方法 ·

水稻两性生殖细胞的N-甲基-N-亚硝基脲诱变方法

田怀东^{1,3*}, 李菁¹, 田保华¹, 牛鹏飞¹, 李珍¹, 岳忠孝¹, 屈雅娟¹
姜建芳¹, 王广元², 岑慧慧¹, 李南¹, 闫枫¹

¹山西大学生命科学学院植物种质与作物遗传资源实验室, 太原 030006; ²山西省农业科学院作物科学研究所, 太原 030031

³山西景康农业技术推广有限公司, 晋中 030600

摘要 N-甲基-N-亚硝基脲(MNU)被用于水稻(*Oryza sativa*)受精卵的诱变。通过水稻辽盐6号成熟生殖器官的MNU体内同步处理及后代群体筛选, 确立了水稻两性生殖细胞的MNU诱变方法。与辽盐6号受精卵的MNU处理相比, 各组条件下两性生殖细胞的MNU处理明显使M₁群体生长发育的指标降低及M₁-M₂群体中突变性状的发生率升高。两性生殖细胞在含有1.5 mmol·L⁻¹ MNU和10 mmol·L⁻¹ PO₄³⁻的缓冲液(pH4.8)中处理60分钟, 突变性状发生率是基于受精卵MNU处理的3倍。进一步筛选M₃群体, 获得了包含新型植株和籽粒突变体的纯合突变体系列。研究结果表明, 水稻两性生殖细胞的MNU诱变可显著提高广谱诱变效率。该技术的应用可为水稻的未知功能基因鉴定和育种所需的各种突变体规模化开发提供高效的技术支撑。

关键词 水稻, 两性生殖细胞, N-甲基-N-亚硝基脲, 诱变

田怀东, 李菁, 田保华, 牛鹏飞, 李珍, 岳忠孝, 屈雅娟, 姜建芳, 王广元, 岑慧慧, 李南, 闫枫 (2019). 水稻两性生殖细胞的N-甲基-N-亚硝基脲诱变方法. 植物学报 54, 625–633.

诱变是作物种质创新的有效途径。作物诱变方法的确立和应用对于遏制作物品种培育与生产活动中的种质多样性弱化、栽培环境恶化以及营养品质单一化的不良趋势具有重要意义。水稻(*Oryza sativa*)是主要的粮食作物, 随着生命科学进入后基因组学时代, 以水稻科学为引领的作物科学已开始跨入旨在揭示功能基因组表达及其性状调控机制的后基因组研究, 作物育种目标也在趋向多样化。在此背景下, 水稻基因诱变方法的确立, 可为获得作物功能基因组和育种研究所需突变体开辟有借鉴意义的技术路径。

作物诱变包括物理诱变、生物诱变和化学诱变。物理诱变基于射线等物理诱变因子对染色体的损伤诱发突变(Wu et al., 2005)。生物诱变主要基于T-DNA和Ac/Ds、Tos17转座子插入的转基因技术及CRISPR/Cas9基因编辑技术, 诱发植物基因突变(Wang et al., 2013; Mao et al., 2018)。基于T-DNA和转座子插入创制的作物突变体利用前景, 在转基因

生物安全方面经受着严峻的考验。CRISPR/Cas9对外来DNA有定点编辑功能, 已用于特定作物基因位点的靶向修饰(Shan et al., 2013); 同时, CRISPR/Cas9及其衍生的单碱基编辑系统具有脱靶效应(王影等, 2018), 可在水稻基因组范围诱发脱靶性变异(Jin et al., 2019)。化学诱变是使用化学诱变剂随机诱发作物内源性突变的方法(Suzuki et al., 2008), 具有成本低、操作简单、诱变谱广及基因变异率高的优点, 是开发作物基因突变材料的有效方法。

MNU (N-methyl-N-nitrosourea)是一种可诱导碱基转换(GC-AT)的高效基因诱变剂。为了解决水稻种子诱变中嵌合体的发生问题, Satoh等(2010)逐步确立了水稻受精卵的MNU诱变方法; 通过对水稻受精卵MNU诱变突变体进行研究, 鉴定了一些关于胚乳贮藏蛋白和淀粉性状的基因突变(Nishi et al., 2001; Takemoto et al., 2002; Qu et al., 2002, 2003; Tian et al., 2004; Satoh et al., 2008; Kumamaru et al.,

收稿日期: 2018-11-13; 接受日期: 2019-06-18

基金项目: 山西省科技创新计划(No.2014101025)

* 通讯作者。E-mail: huaidongt@sxu.edu.cn

2010; Fukuda et al., 2011, 2013, 2016; Miura et al., 2018)。籼稻和粳稻的基因组分别包含46 022–55 615和32 000–50 000个基因(Yu et al., 2002; Goff et al., 2002)。肖景华等(2015)指出水稻基因组的39 045个基因位点具有编码蛋白质的能力, 已克隆水稻基因的数目约为2 000个。水稻突变体的利用促进了部分功能基因的鉴定, 然而, 大多数水稻基因的生物功能仍然未知。其主要原因在于诱变效率低所致的水稻基因突变材料不足。

本研究通过对水稻成熟小花生殖器官进行MNU体内同步处理并筛选所得后代群体, 确立了水稻两性生殖细胞的MNU诱变方法, 可为各种水稻基因突变材料的规模化开发提供高效的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

以水稻辽盐6号(*Oryza sativa* L. cv. 'Liaoyan 6')作为野生型诱变材料。将辽盐6号分3期、间隔10日种植。将分期选取的旺粉期植株作为重复材料用于MNU处理, 所得后代群体用于性状筛查。在晋祠试验基地的温室和大田条件下分别进行育苗和成株繁育。

表1 水稻生殖细胞MNU实验设计

Table 1 Design for MNU treatments of germ cells in rice

Treatments	MNU (mmol·L ⁻¹)	Time (min)	pH	PO ₄ ³⁻ (mmol·L ⁻¹)
Germ cells	0.5	20	4.2	5
	1.0	40	4.8	10
	1.5	60	5.4	20
	2.0	80	6.0	40
Control	1.0	40	4.8	10

MNU: N-甲基-N-亚硝基脲。 MNU: N-methyl-N-nitrosourea.

1.2 实验方法

1.2.1 处理方案的设计

从待处理组织细胞和处理液体系两方面设计处理方案是确立化学诱变方法的关键环节。使用MNU缓冲液对辽盐6号活体植株的成熟小花两性生殖器官进行体内同步处理, 以达到对卵细胞和大量雄性生殖细胞的同步诱变效果。将MNU浓度、处理时间、pH值及磷酸盐浓度设置为处理环节中影响诱变效果的全要素。参考水稻受精卵的MNU诱变条件(Satoh et al., 2010), 将MNU浓度1.0 mmol·L⁻¹、处理40分钟、pH4.8、磷

酸盐浓度10 mmol·L⁻¹作为对照条件, 用于辽盐6号受精卵的处理。对各因素分别设置4个水平, 使其适用于辽盐6号成熟两性生殖细胞的MNU体内同步处理(表1)。设计1个单因素变量的水平时, 将其它3因素水平设定为不变量。

1.2.2 体内同步处理

按照设计方案, 配制MNU缓冲液。将各组条件下分期选取的旺粉期植株移栽至花盆。根据水稻两性生殖器官的发育模式, 处理前对所选植株的穗部小花进行诱导性修整。处理当日下午, 将受精卵处理条件下待处理植株的未开小花和处理当日之前已完成授粉的小花剪除, 保留处理当日授粉结束的小花; 将两性生殖细胞处理条件下处理当日未成熟小花与已完成授粉的小花剪除, 保留第2日开花的成熟小花。于处理当日24:00至次日6:00, 在避光、20℃条件下将修剪后的植株穗部浸入MNU缓冲液, 处理结束后进行充分的流水置换。培育处理后植株, 获得M₁代籽粒群体。

1.2.3 M₁-M₃群体筛查

从各处理条件下3组重复所得的M₁籽粒群体中随机选取等量的M₁籽粒, 进行M₁代植株群体繁育。

以M₁代籽粒群体结实率、种子群体出苗率、幼苗群体成株率和成株群体可育率为考察指标, 调查M₁群体的生长发育情况。从M₁群体中筛选籽粒与植株性状的候补突变系; 通过M₁植株群体自交获得M₂代籽粒群体并繁育M₂植株群体, 筛查M₂群体的籽粒和植株性状, 确定M₂群体中籽粒与植株性状的候补突变系; 通过M₂候补突变系自交获得M₃代籽粒群体并繁育M₃植株群体, 分析M₃群体中突变性状的遗传稳定性。对两性生殖细胞MNU处理与受精卵MNU处理后的M₁植株生长发育指标及M₁-M₂群体中突变性状的发生率进行差异显著性分析。

2 结果与讨论

2.1 处理因素对M₁群体生长发育的影响

基于设计方案, 进行各组条件下辽盐6号水稻两性生殖细胞和受精卵的MNU处理, 分析各处理因素对所得M₁群体生长发育的影响(表2)。与辽盐6号受精卵的MNU处理相比, 各组条件下两性生殖细胞的MNU处

理导致M₁群体的结实率、出苗率、幼苗成株率和成株可育率明显降低。两性生殖细胞MNU处理后, M₁群体的生长发育指标随着MNU浓度的增加与处理时间的延长呈降低趋势, 随着pH值与磷酸盐浓度的增大, 呈现先降低后升高的变化趋势。这些生长发育指标的变化与M₁群体中的不结实、无胚、畸形胚、发育不良胚乳以及白化苗、黄化苗、弱化苗、畸形苗与成株不育现象有关。

2.2 处理因素对M₁-M₂群体中性状表达的影响

将M₁-M₂群体中性状的变化与表型分离作为突变性状的评价依据, 我们解析了各处理因素对M₁-M₂群体性状表达的影响(表3)。各组条件下的MNU处理导致M₁-M₂群体中的幼苗致死以及秆形、叶形与叶色、穗形与穗色、颖形与颖色、种子形态与颜色等类型突变性状的表达。与辽盐6号相比, 秆形突变体(图1)、叶突变体(图2)、穗突变体(图3)、颖突变体(图4)和种子突变体(图5)均显示多样化。与辽盐6号受精卵的MNU处理相比, 各组条件下两性生殖细胞的MNU处理导致突变性状发生率显著升高。当使用含有1.5 mmol·L⁻¹ MNU和10 mmol·L⁻¹磷酸盐的MNU缓冲液(pH4.8)对两性生殖细胞处理60分钟, 突变性状的发生率达到最大值(9.9%), 是基于受精卵MNU处理的3倍(表3)。

2.3 纯合基因型突变体的获得

通过进一步分析M₃群体中突变性状的遗传稳定性,

表2 MNU处理因素对辽盐6号水稻生殖细胞M₁群体生长发育的影响

Table 2 Effects of MNU-treatment factors on growth and development of M₁ populations of germ cells of Liaoyan 6 rice cultivar

Treatments of germ cells		Setting rate (%)	Seedling rate (%)	Adult plant rate (%)	Fertility rate(%)
Variable	0.5	86.1	82.3	82.4	89.3
MNU	1.0	78.6	74.5	77.1	80.4
(mmol·L ⁻¹)	1.5	73.5	68.3	70.4	76.7
	2.0	62.2	59.8	61.7	68.2
Variable	20	88.5	83.1	83.2	91.0
time	40	78.6	74.5	77.1	80.4
(min)	60	74.7	69.3	72.3	73.8
	80	65.8	60.8	66.9	67.6
Variable	4.2	85.3	80.3	85.3	89.6
pH	4.8	78.6	74.5	77.1	80.4
	5.4	74.5	79.6	81.0	85.2
	6.0	82.9	83.7	84.9	87.9
Variable	5	83.7	82.4	86.3	89.7
PO ₄ ³⁻	10	78.6	74.5	77.1	80.4
(mmol·L ⁻¹)	20	82.5	78.1	70.6	85.3
	40	87.4	85.0	82.8	86.9
Control treatment		89.5	87.3	90.4	92.8

MNU同表1。 MNU see Table 1.

表3 辽盐6号水稻生殖细胞的MNU处理因素对M₁-M₂群体中突变性状表达的影响

Table 3 Effects of MNU-treatment factors on mutant-character expression in M₁-M₂ populations of germ cells of Liaoyan 6 rice cultivar

Treatments of germ cells		Number of mutant characters							Incidences (%)
		Seedling	Culm	Leaf	Panicle	Glume	Seed	Total	
Variable	0.5	3	2	3	1	1	8	18	4.6
MNU	1.0	4	4	4	2	1	15	30	7.6
(mmol·L ⁻¹)	1.5	8	6	5	3	2	15	39	9.9
	2.0	5	3	2	1	—	6	17	4.3
Variable	20	3	2	3	2	—	5	15	3.8
time	40	4	4	4	2	1	15	30	7.6
(min)	60	5	3	5	1	2	15	31	7.9
	80	5	3	3	2	1	6	20	5.1
Variable	4.2	5	3	2	1	1	9	21	5.3
pH	4.8	4	4	4	2	1	15	30	7.6
	5.4	5	3	3	1	1	10	23	5.9
	6.0	3	3	3	—	1	6	16	4.1
Variable	5	5	2	3	2	1	7	20	5.1
PO ₄ ³⁻	10	4	4	4	2	1	15	30	7.6
(mmol·L ⁻¹)	20	6	3	4	1	2	7	23	5.9
	40	5	3	2	1	1	6	18	4.6
Control treatment		3	2	2	1	1	4	13	3.3

MNU同表1。 MNU see Table 1.

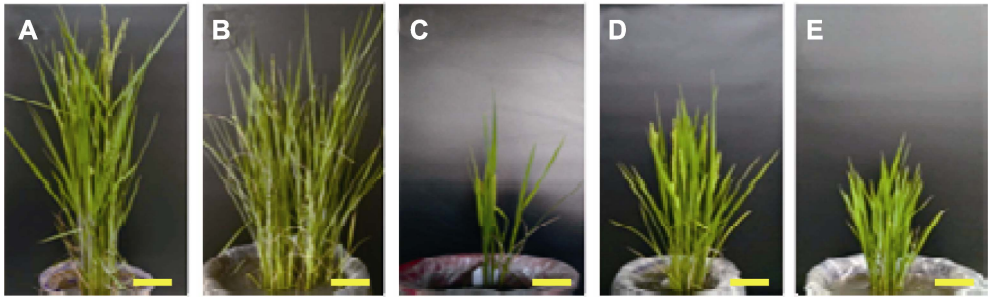


图1 辽盐6号水稻生殖细胞经MNU处理所得的M₁-M₃群体中的秆形突变性状
(A) 野生型秆; (B) 多分蘖秆; (C) 少分蘖秆; (D), (E) 矮化秆。Bars=10 cm。MNU同表1。

Figure 1 Mutant characters for culm form in M₁-M₃ populations obtained by the MNU treatments of germ cells of Liaoyan 6 rice cultivar

(A) The wild type culm; (B) Multiple-tiller culm; (C) Less-tiller culm; (D), (E) Dwarf culm. Bars=10 cm. MNU see Table 1.

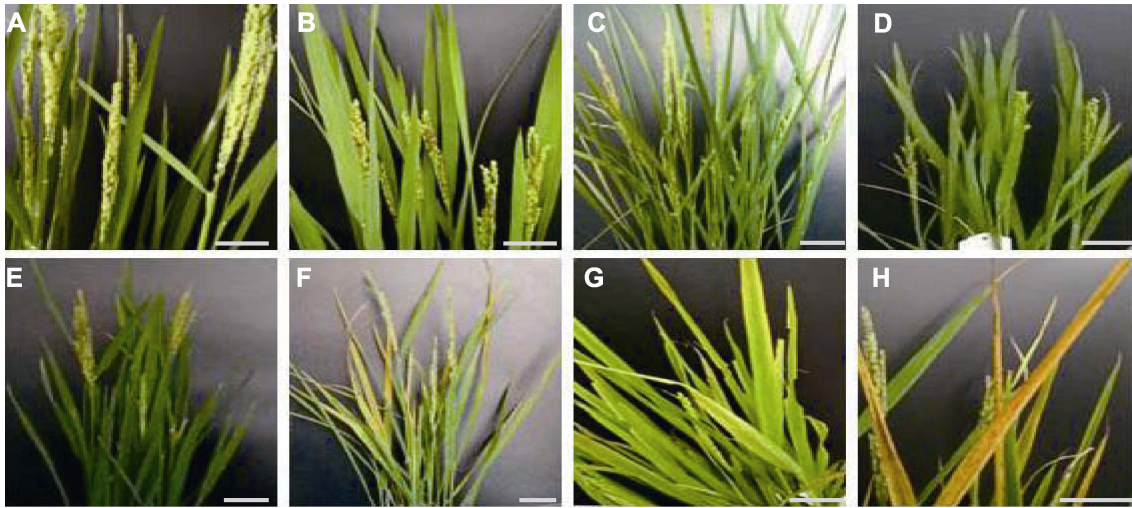


图2 辽盐6号水稻生殖细胞经MNU处理所得M₁-M₃群体中的叶形与叶色突变性状
(A) 野生型叶; (B) 宽叶; (C) 细卷叶; (D) 竖叶; (E) 深绿叶; (F) 浅绿叶; (G) 黄叶缘; (H) 斑点叶。Bars=5 cm。MNU同表1。

Figure 2 Mutant characters for leaf form and leaf color in M₁-M₃ populations obtained by the MNU treatments of germ cells of Liaoyan 6 rice cultivar

(A) The wild type leaf; (B) Wide leaf; (C) Narrow and rolled leaf; (D) Vertical leaf; (E) Deep-green leaf; (F) Light-green leaf; (G) Yellow margin; (H) Spotted leaf. Bars=5 cm. MNU see Table 1.

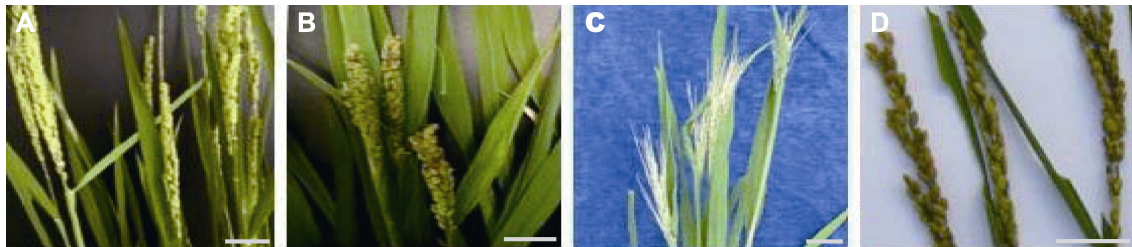


图3 辽盐6号水稻生殖细胞经MNU处理所得M₁-M₃群体中的穗形与穗色突变性状
(A) 野生型穗; (B) 短穗; (C) 不育穗; (D) 泛红穗。Bars=5 cm。MNU同表1。

Figure 3 Mutant characters for panicle form and panicle color in M₁-M₃ populations obtained by the MNU treatments of germ cells of Liaoyan 6 rice cultivar

(A) The wild type panicle; (B) Short panicle; (C) Sterile panicle; (D) Reddish panicle. Bars=5 cm. MNU see Table 1.

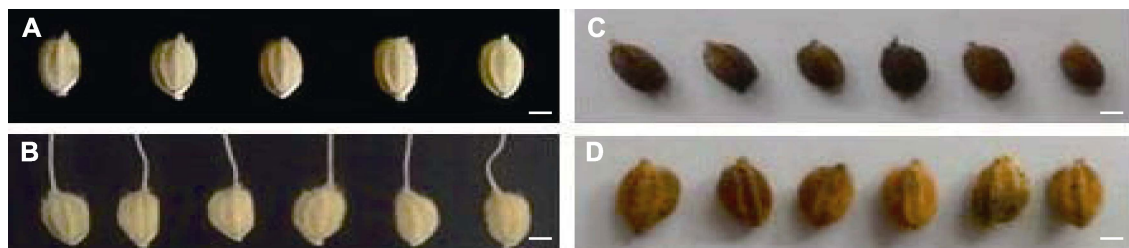


图4 辽盐6号水稻生殖细胞经MNU处理所得M₁-M₃群体中的颖形与颖色突变性状
(A) 野生型颖; (B) 有芒颖; (C) 紫黑颖; (D) 红棕颖。Bars=5 mm。MNU同表1。

Figure 4 Mutant characters for glume form and glume color in M₁-M₃ populations obtained by the MNU treatments of germ cells of Liaoyan 6 rice cultivar

(A) The wild type glume; (B) Awning glume; (C) Purple-black glume; (D) Reddish-brown glume. Bars=5 mm. MNU see Table 1.

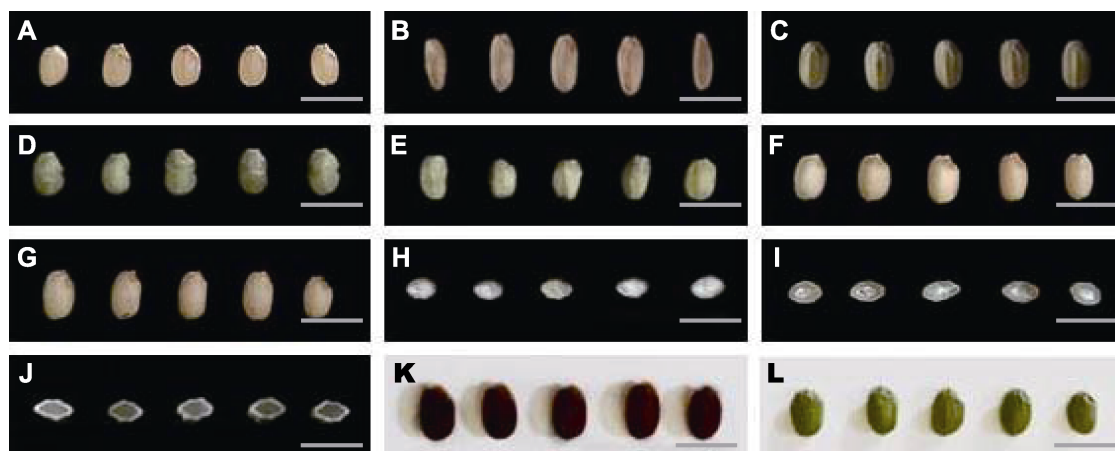


图5 辽盐6号水稻生殖细胞经MNU处理所得M₁-M₃群体中的种子突变性状

(A) 野生型种子; (B) 细长种子; (C) 皱纹胚乳; (D) 腹部凹陷胚乳; (E) 皱缩胚乳; (F) 蜡质胚乳; (G) 暗浊色胚乳; (H) 粉质胚乳; (I) 心白胚乳; (J) 周白胚乳; (K) 红褐色胚乳; (L) 绿色胚乳。Bars=5 mm。MNU同表1。

Figure 5 Mutant characters of seed in M₁-M₃ populations obtained by the MNU treatments of germ cells of Liaoyan 6 rice cultivar

(A) The wild type seed; (B) Slender seed; (C) Wrinkled endosperm; (D) Abdomen-sunken endosperm; (E) Shrunken endosperm; (F) Waxy endosperm; (G) Dull endosperm; (H) Floury endosperm; (I) Core-white endosperm; (J) Periphery-white endosperm; (K) Reddish-brown endosperm; (L) Green endosperm. Bars=5 mm. MNU see Table 1.

我们获得了纯合基因型的秆形突变体32份、叶突变体34份、穗突变体6份及籽粒突变体60份。所得的突变材料包括多分蘖、少分蘖与矮化突变体(图1B-E), 宽叶、细卷叶、深绿叶、浅绿叶、黄叶缘与斑点叶突变体(图2B, C, E-H), 短穗与泛红穗突变体(图3B, D), 有芒颖与紫黑颖突变体(图4B, C)以及细长粒(图5B)与腹部凹陷、皱缩、蜡质、暗浊、粉质、心白、周白、红褐色、绿色胚乳突变体(图5D-L)。

2.4 讨论

2.4.1 MNU处理的高效诱变效应

辽盐6号水稻两性生殖细胞经MNU处理所得M₁代

籽粒群体结实率、种子群体出苗率、幼苗群体成株率及成株群体可育率均与MNU浓度及处理时间呈负相关, 随着pH值与磷酸盐浓度的增大呈先降低后升高的变化(表2)。M₁群体生长发育指标的变化表现在不结实、无胚、畸形胚、发育不良胚乳以及白化苗、黄化苗、畸形苗、弱化苗与成株不育现象, 起因是MNU的毒性及其诱发的显性突变致死效应。在两性生殖细胞MNU处理所得的M₁-M₂群体中, 观察到多样化的植株和籽粒突变性状(图1-图5)。与受精卵的MNU处理相比, 各组条件下两性生殖细胞的MNU处理导致M₁群体生长发育指标明显降低、M₁-M₂群体中突变性状发生率显著升高(表3)。上述结果表明, 水稻两性

生殖细胞的MNU处理可显著提高广谱诱变效率,适宜的MNU浓度、处理时间、pH值和磷酸盐浓度是两性生殖细胞的MNU诱变效率最大化的必要条件。

突变体的利用是鉴定功能基因的有效途径。基于水稻两性生殖细胞的MNU处理可诱发秆型(图1)、叶型(图2)、穗型(图3)、颖型(图4)和粒型(图5)突变性状。关于这些类型的性状,已鉴定的突变基因主要包括30个矮化基因(张敏娟等, 2018)、11个窄卷叶基因(周亭亭等, 2018)、一些叶色基因(涂政军等, 2017)、19个斑点叶基因(郭丹等, 2016)、20个与籽粒长度及细胞分裂相关的基因(谢佳等, 2018)以及一些粉质、糖质、皱缩与心白胚乳性状突变基因(刘艺等, 2018; 刘子文等, 2018)。然而,调控水稻植株与籽粒性状的遗传机制错综复杂,大量的未知功能基因有待鉴定。本研究获得的纯合基因型突变体中,宽叶(图2B)、深绿叶(图2E)与黄叶缘(图2G)突变体,泛红穗(图3D)突变体,有芒颖(图4B)与紫黑颖(图4C)突变体,腹部凹陷胚乳(图5D)、红褐色胚乳(图5K)与绿色胚乳突变体(图5L),都是鲜见报道的新型突变材料,可用于未知功能基因的鉴定。与已报道性状同型的突变体也是适用于阐明相关性状遗传机制的有用素材。

2.4.2 MNU处理的高效诱变机理

水稻受精卵的形成与发育涉及小花生殖器官的形成、受精和种子形成。水稻花序的结构单元是小穗。1个小穗由小枝梗、小穗轴、2枚颖片和3朵小花组成(Itoh et al., 2005; 淳雁和李学勇, 2017)。其中,顶部小花是可孕小花,2朵下位小花严重退化。每朵小花由花托、1个外稃、1个内稃、2个浆片、6个雄蕊和1个雌蕊构成。经8个阶段的花药发育,在花药中生成大量的成熟花粉。每个成熟花粉包含1个无定型营养核和2个精子。经10个阶段的胚珠发育,在胚珠中生成成熟胚囊。每个成熟胚囊由1个卵细胞、2个助细胞、1个中央细胞与3个反足细胞构成。1个精子与卵细胞融合形成受精卵,另一精子与中央细胞融合成胚乳原核。与受精卵相比,两性生殖细胞处于分裂和DNA合成的活跃阶段,易受诱变效应产生变异。使用MNU缓冲液对水稻两性生殖器官进行体内同步处理,实质上启动了MNU对卵细胞与大量精子的同步诱变,极大地增强了MNU对两性生殖细胞基因的诱变强度和频度,显著提高了突变性状的发生率。

水稻的化学诱变起始于MNU、EMS (ethyl-methylsulfone)对种子的诱变研究。MNU和EMS的诱变机理在哺乳动物和微生物中已被报道(Swain and Scott, 1953; Neale, 1976; Engelbergs et al., 2000; Cooke et al., 2003)。其中,EMS是具有较高的斯温-斯科特底物常数(S常数)的 S_N2 型诱变剂,主要攻击DNA中高亲核性位点环氮原子,很少在氧原子位点引起烷基化,依赖修复系统的易错途径诱导突变。与EMS不同,MNU是有较低S常数的 S_N1 型诱变剂,对DNA中低亲核性中心氧原子位点具有高反应性,独立于易错修复系统、基于碱基转换(GC-AT)诱发点突变。由于MNU与EMS的诱变机理不同,因此水稻两性生殖细胞的MNU处理在提高诱变率的同时,能够拓展基因的诱变谱。

2.4.3 MNU诱变方法的应用前景

本研究确立的诱变方法可显著提高基因突变诱变效率,该方法可为水稻突变材料的规模化开发提供高效的技术支撑。将规模化开发的水稻突变体应用于遗传分析、蛋白组表征、转录组/cDNA鉴定、基因克隆/编码蛋白解析及新品种培育等遗传育种学技术途径,有望促进水稻未知功能基因的鉴定、性状表达遗传机制的阐明以及多样化育种目标的实现。

参考文献

- 淳雁, 李学勇 (2017). 水稻穗型的遗传调控研究进展. 植物学报 52, 19–29.
- 郭丹, 施勇峰, 王惠梅, 张晓波, 宋莉欣, 徐霞, 贺彦, 郭梁, 吴建利 (2016). 一个水稻显性斑点叶突变体的鉴定和基因精细定位. 作物学报 42, 966–975.
- 刘艺, 朱小品, 刘喜, 田云录, 刘世家, 王云龙, 张文伟, 江玲, 王益华, 万建民 (2018). 水稻胚乳粉质突变体 $fla9$ 的表型分析和基因定位. 南京农业大学学报 41, 616–624.
- 刘子文, 胡曼曼, 王致远, 张瑜竣, 谷晗, 游佳, 王益华, 江玲, 刘玲珑 (2018). 水稻心白突变体 whc 的理化性质和基因定位. 南京农业大学学报 41, 231–239.
- 涂政军, 邹国兴, 黄李超, 陈龙, 代丽萍, 高易宏, 冷语佳, 朱丽, 张光恒, 胡江, 任德勇, 高振宇, 董国军, 陈光, 郭龙彪, 钱前, 曾大力 (2017). 水稻淡绿叶基因 $PGL11$ 的鉴定与精细定位. 中国水稻科学 31, 489–499.
- 王影, 李相敢, 邱丽娟 (2018). CRISPR/Cas9基因组定点编

- 辑中脱靶现象的研究进展. 植物学报 **53**, 528–541.
- 肖景华, 吴昌银, 袁猛, 王妮丽, 范优荣, 杨猛, 欧阳亦聘, 阮一骏, 张启发 (2015). 中国水稻功能基因组研究进展与展望. 科学通报 **60**, 1711–1722.
- 谢佳, 张孝波, 陶怡然, 熊毓贞, 周倩, 孙莹, 杨正林, 钟秉强, 桑贤春 (2018). 水稻短穗小粒突变体 *sps1* 的鉴定与基因精细定位. 中国农业科学 **51**, 1617–1626.
- 张敏娟, 李帅军, 陈琼琼, 景秀清, 陈坤明, 石春海, 李文强 (2018). 水稻矮化少穗突变体 *dlt3* 的基因定位和蛋白质组学分析. 中国水稻科学 **32**, 529–537.
- 周亭亭, 饶玉春, 任德勇 (2018). 水稻卷叶细胞学与分子机制研究进展. 植物学报 **53**, 848–855.
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* **17**, 1195–1214.
- Engelbergs J, Thomale J, Rajewsky MF (2000). Role of DNA repair in carcinogen-induced *ras* mutation. *Mutat Res* **450**, 139–153.
- Fukuda M, Kawagoe Y, Murakami T, Washida H, Sugino A, Nagamine A, Okita TW, Ogawa W, Kumamaru T (2016). The dual roles of the Golgi transport 1 (GOT1B): RNA localization to the cortical endoplasmic reticulum and the export of proglutelin and α -globulin from the cortical ER to the golgi. *Plant Cell Physiol* **57**, 2380–2391.
- Fukuda M, Satoh-Cruz M, Wen LY, Crofts AJ, Sugino A, Washida H, Okita TW, Ogawa M, Kawagoe Y, Maeshima M, Kumamaru T (2011). The small GTPase Rab5a is essential for intracellular transport of proglutelin from the golgi apparatus to the protein storage vacuole and endosomal membrane organization in developing rice endosperm. *Plant Physiol* **157**, 632–644.
- Fukuda M, Wen LY, Satoh-Cruz M, Kawagoe Y, Nagamura Y, Okita TW, Washida H, Sugino A, Ishino S, Ishino Y, Ogawa M, Sunada M, Ueda T, Kumamaru T (2013). A guanine nucleotide exchange factor for Rab5 proteins is essential for intracellular transport of the proglutelin from the golgi apparatus to the protein storage vacuole in rice endosperm. *Plant Physiol* **162**, 663–674.
- Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang RL, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, Hadley D, Hutchison D, Martin C, Katagiri F, Lange BM, Moughamer T, Xia Y, Budworth P, Zhong JP, Miguel T, Paszkowski U, Zhang SP, Colbert M, Sun WL, Chen LL, Cooper B, Park S, Wood TC, Mao L, Quail P, Wing R, Dean R, Yu Y, Zharkikh A, Shen R, Sahasrabudhe S, Thomas A, Cannings R, Gutin A, Pruss D, Reid J, Tavtigian S, Mitchell J, Eldredge G, Scholl T, Miller RM, Bhatnagar S, Adey N, Rubano T, Tusneem N, Robinson R, Feldhaus J, Macalma T, Oliphant A, Briggs S (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* **296**, 92–100.
- Itoh JI, Nonomura KI, Ikeda K, Yamaki S, Inukai Y, Yamagishi H, Kitano H, Nagato Y (2005). Rice plant development: from zygote to spikelet. *Plant Cell Physiol* **46**, 23–47.
- Jin S, Zong Y, Gao Q, Zhu ZX, Wang YP, Qin P, Liang CZ, Wang DW, Qiu JL, Zhang F, Gao CX (2019). Cytosine, but not adenine, base editors induce genome-wide off-target mutations in rice. *Science* **364**, 292–295.
- Kumamaru T, Uemura Y, Inoue Y, Takemoto Y, Siddiqui SU, Ogawa M, Hara-Nishimura I, Satoh H (2010). Vacuolar processing enzyme plays an essential role in the crystalline structure of glutelin in rice seed. *Plant Cell Physiol* **51**, 38–46.
- Mao YF, Yang XX, Zhou YT, Zhang ZJ, Botella JR, Zhu JK (2018). Manipulating plant RNA-silencing pathways to improve the gene editing efficiency of CRISPR/Cas9 systems. *Genome Biol* **19**, 149.
- Miura S, Crofts N, Saito Y, Hosaka Y, Oitome NF, Watanabe T, Kumamaru T, Fujita N (2018). Starch synthase Ila-deficient mutant rice line produces endosperm starch with lower gelatinization temperature than *japonica* rice cultivars. *Front Plant Sci* **9**, 645.
- Neale S (1976). Mutagenicity of nitrosamides and nitrosamidines in micro-organisms and plants. *Mutat Res* **32**, 229–266.
- Nishi A, Nakamura Y, Tanaka N, Satoh H (2001). Biochemical and genetic analysis of the effects of *amylose-extender* mutation in rice endosperm. *Plant Physiol* **127**, 459–472.
- Qu LQ, Wei XL, Satoh H, Kumamaru T, Ogawa M, Takaiwa F (2002). Inheritance of alleles for glutelin α -2 subunit genes in rice and identification of their corresponding cDNA clone. *Theor Appl Genet* **105**, 1099–1108.
- Qu LQ, Wei XL, Satoh H, Kumamaru T, Ogawa M, Takaiwa F (2003). Biochemical and molecular characterization of a rice glutelin allele for the *GluA-1* gene. *Theor Appl Genet* **107**, 20–25.
- Satoh H, Matsusaka H, Kumamaru T (2010). Use of N-methyl-N-nitrosourea treatment of fertilized egg cells for saturation mutagenesis of rice. *Breed Sci* **60**, 475–485.
- Satoh H, Shibahara K, Tokunaga T, Nishi A, Tasaki M, Hwang SK, Okita TW, Kaneko N, Fujita N, Yoshida M,

- Hosaka Y, Sato A, Utsumi Y, Ohdan T, Nakamura Y (2008). Mutation of the plastidial α -glucan phosphorylase gene in rice affects the synthesis and structure of starch in the endosperm. *Plant Cell* **20**, 1833–1849.
- Shan QW, Wang YP, Li J, Zhang Y, Chen KL, Liang Z, Zhang K, Liu JX, Xi JJ, Qiu JL, Gao CX (2013). Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* **31**, 686–688.
- Suzuki T, Eiguchi M, Kumamaru T, Satoh H, Matsusaka H, Moriguchi K, Nagato Y, Kurata N (2008). MNU-induced mutant pools and high performance TILLING enable finding of any gene mutation in rice. *Mol Genet Genomics* **279**, 213–223.
- Swain CG, Scott CB (1953). Quantitative correlation of relative rates. Comparison of hydroxide ion with other nucleophilic reagents toward alkyl halides, esters, epoxides and acyl halides. *J Am Chem Soc* **75**, 141–147.
- Takemoto Y, Coughlan SJ, Okita TW, Satoh H, Ogawa M, Kumamaru T (2002). The rice mutant *esp2* greatly accumulates the glutelin precursor and deletes the protein disulfide isomerase. *Plant Physiol* **128**, 1212–1222.
- Tian HD, Satoh H, Takemoto Y (2004). Inheritance of novel 57H mutations in rice and their effect on compartmentation of endosperm storage proteins. *Int J Plant Sci* **165**, 537–544.
- Wang NL, Long T, Yao W, Xiong LZ, Zhang QF, Wu CY (2013). Mutant resources for the functional analysis of the rice genome. *Mol Plant* **6**, 596–604.
- Wu JL, Wu CJ, Lei CL, Baraoidan M, Bordeos A, Madamba MRS, Ramos-Pamplona M, Mauleon R, Portugal A, Ulat VJ, Bruskiewich R, Wang GL, Leach J, Khush G, Leung H (2005). Chemical- and irradiation-induced mutants of *indica* rice IR64 for forward and reverse genetics. *Plant Mol Biol* **59**, 85–97.
- Yu J, Hu SN, Wang J, Wong GKS, Li SG, Liu B, Deng YJ, Dai L, Zhou Y, Zhang XQ, Cao ML, Liu J, Sun JD, Tang JB, Chen YJ, Huang XB, Lin W, Ye C, Tong W, Cong LJ, Geng JN, Han YJ, Li L, Li W, Hu GQ, Huang XG, Li WJ, Li J, Liu ZW, Li L, Liu JP, Qi QH, Liu JS, Li L, Li T, Wang XG, Lu H, Wu TT, Zhu M, Ni PX, Han H, Dong W, Ren XY, Feng XL, Cui P, Li XR, Wang H, Xu X, Zhai WX, Xu Z, Zhang JS, He SJ, Zhang JG, Xu JC, Zhang KL, Zheng XW, Dong JH, Zeng WY, Tao L, Ye J, Tan J, Ren XD, Chen XW, He J, Liu DF, Tian W, Tian CG, Xia HA, Bao QY, Li G, Gao H, Cao T, Wang J, Zhao WM, Li P, Chen W, Wang XD, Zhang Y, Hu JF, Wang J, Liu S, Yang J, Zhang GY, Xiong YQ, Li ZJ, Mao L, Zhou CS, Zhu Z, Chen RS, Hao BL, Zheng WM, Chen SY, Guo W, Li GJ, Liu SQ, Tao M, Wang J, Zhu LH, Yuan LP, Yang HM (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science* **296**, 79–92.

Method for N-methyl-N-nitrosourea Mutagenesis on Hermaphroditic Germ Cells of Rice

Huaidong Tian^{1, 3*}, Jing Li¹, Baohua Tian¹, Pengfei Niu¹, Zhen Li¹, Zhongxiao Yue¹, Yajuan Qu¹,
Jianfang Jiang¹, Guangyuan Wang², Huihui Cen¹, Nan Li¹, Feng Yan¹

¹Laboratory of Plant Germplasm and Genetic Resources of Crop, College of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; ²Institute of Crop Sciences, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China

³Shanxi Jingkang Agriculture Technology Promotion Co. Ltd, Jinzhong 030600, China

Abstract N-methyl-N-nitrosourea (MNU) has been used in mutagenesis of fertilized eggs of rice (*Oryza sativa*). In this study, the method for MNU mutagenesis on hermaphroditic germ cells of rice was established by *in vivo* synchronous MNU treatment of mature germ-organs in the rice cultivar Liaoyan 6 and the screening of the progeny populations. As compared with MNU treatment of fertilized eggs in Liaoyan 6, MNU treatment of hermaphroditic germ cells under each group of conditions significantly decreased the growth and development indexes of M₁ populations and increased the incidence of mutant characters in M₁-M₂ populations. When the hermaphroditic germ cells were treated for 60 min in MNU buffer (pH 4.8) containing 1.5 mmol·L⁻¹ MNU and 10 mmol·L⁻¹ phosphate, the incidence of mutant characters was about 3 times higher than that based on the MNU treatment of fertilized eggs. A series of homozygous mutants including novel plant and grain mutants were obtained by further screening M₃ populations. The method for MNU mutagenesis on mature hermaphroditic germ-cells of rice significantly improved the efficiency of broad-spectrum mutagenesis. Its application can provide efficient technical support for large-scale development of various mutants for identifying unknown functional genes and breeding rice.

Key words rice, hermaphroditic germ cells, N-methyl-N-nitrosourea, mutagenesis

Tian HD, Li J, Tian BH, Niu PF, Li Z, Yue ZX, Qu YJ, Jiang JF, Wang GY, Cen HH, Li N, Yan F (2019). Method for N-methyl-N-nitrosourea mutagenesis on hermaphroditic germ cells of rice. *Chin Bull Bot* **54**, 625–633.

* Author for correspondence. E-mail: huaidongt@sxu.edu.cn

(责任编辑: 白羽红)