

镉低积累优质常规稻韶香100的培育及试验示范

李进^{1,2}, 韶也², 尹合兴³, 余丽霞⁴, 黄国龙⁵, 彭彦², 邵德意³, 周利斌⁴, 毛毕刚^{1,2}, 赵炳然²

(¹海南大学热带农林学院, 海口 570228; ²湖南杂交水稻研究中心杂交水稻全国重点实验室, 长沙 410125; ³华智生物技术有限公司, 长沙 410000; ⁴中国科学院近代物理研究所重离子加速器国家实验室, 兰州 730000; ⁵株洲市农业科学研究所, 湖南株洲 412007)

摘要: 通过重离子诱变香型优质稻材料 44-5, 结合 M₁TDS 技术, 培育出 *OsNRAMP5* 基因突变镉低积累水稻韶香 100。2021-2023 年韶香 100 在湖南多地进行了试验示范, 并参加国家镉低积累品种自主试验。*OsNRAMP5* 基因突变降镉(Cd)的同时锰(Mn)的积累也显著降低, 而 Mn 是植物生长必须的微量元素。本研究比较了韶香 100 及其原始品系 44-5 的籽粒镉积累特性、产量、品质及低温耐受性等。研究结果表明: 韶香 100 在多地试验示范中表现出稳定的稻谷镉低积累特性, 植株 Mn 的积累下降, 但产量相比原始品系 44-5 无显著差异, 除株高外, 其他主要农艺性状也无明显差异。随着播期推迟, 韶香 100 与原始品系 44-5 结实率均明显下降, 相对耐冷系数和品种耐冷指数分别为 0.75 和 0.75, 47.2% 和 49.2%, 孕穗期低温耐受性均为 4 级(敏冷)。韶香 100 相比原始品系 44-5 并未因 *OsNRAMP5* 基因突变引起植株 Mn 积累降低而造成低温耐受性下降, 鉴定结果表明两者都是耐冷性一般的品种。鉴于此, 韶香 100 在湖南、江西作为双季晚稻种植时, 建议适时早播, 避免生长后期因低温胁迫造成产量损失。

关键词: 水稻; 镉低积累; 韶香 100; 试验示范; 低温耐受性

Breeding and Experimental Demonstration of Cadmium Low Accumulation High Quality Conventional Rice Shaoxiang 100

LI Jin^{1,2}, SHAO Ye², YIN Hexing³, YU Lixia⁴, HUANG Guolong⁵, PENG Yan², SHAO Deyi³, ZHOU Libin⁴, MAO Bigang^{1,2}, ZHAO Bingran²

(¹School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570228; ²National Key Laboratory of Hybrid Rice, Hunan Hybrid Rice Research Center, Changsha 410125; ³Huazhi Biotechnology Co., Ltd, Changsha 410000; ⁴National Laboratory of Heavy Ion Accelerator of Lanzhou, Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Science, Lanzhou 730000; ⁵Zhuzhou Agricultural Sciences Institute, Zhuzhou 412007, Hunan)

Abstract: The rice variety Shaoxiang100 with low cadmium accumulation was developed through heavy-ion mutagenesis of the aromatic high-quality rice material 44-5, through applying the M₁TDS technology and the mutation of the *OsNRAMP5* gene. The variety Shaoxiang100 underwent multi-location testing in Hunan province from 2021 to 2023, and has also been part of national independent trials for varieties with low cadmium (Cd) accumulation. The mutation of the *OsNRAMP5* gene reduces Cd accumulation, and also manganese (Mn), which is essential for plant growth. This study investigated the Cd accumulation characteristics, yield, quality, and low-temperature tolerance of Shaoxiang100 and its original strain 44-5. These multi-location experiments revealed that Shaoxiang 100 exhibited stable, low levels of Cd in rice grains, with a reduced accumulation of Mn in plants. However, no significant difference was observed in yield when

收稿日期: 2024-02-28 网络出版日期: 2024-05-20

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240228003>

第一作者研究方向为镉低积累水稻栽培生理, E-mail: jnli711189@163.com

通信作者: 毛毕刚, 研究方向为水稻低镉、优质机理研究与分子育种, E-mail: mbg@hhrrc.ac.cn

赵炳然, 研究方向为水稻遗传育种, E-mail: brzhao652@hhrrc.ac.cn

基金项目: 科技“揭榜挂帅”湖南省重大科技攻关项目(2022NK1010); 湖南省岳麓山种业创新项目(2021NK1003)

Foundation projects: Science and Technology “Reveal the List” Major Science and Technology Research Projects in Hunan Province (2022NK1010); Hunan Yuelu Mountain Seed Industry Innovation Project(2021NK1003)

compared to the original variety, 44-5. For main agronomic traits, except for plant height, no significant difference was detected. Both Shaoxiang 100 and the original line 44-5 exhibited a significant decrease in fruiting rate when delay sowing applied. However, late sowing didn't affect yield or other main agronomic traits, except for plant height. Additionally, the relative cold tolerance coefficient and variety cold tolerance index were 0.75 and 0.75, respectively, indicating a decrease of 47.2% and 49.2%. The low-temperature tolerance at the spikelet stage was classified as level 4, indicating sensitivity to cold. Compared to the original strain 44-5, Shaoxiang 100 did not show a decrease in Mn accumulation or low-temperature tolerance. Both strains were found to have general cold tolerance. Collectively, it is recommended that Shaoxiang 100 as double-crop late rice, can be planted in Hunan and Jiangxi to prevent yield loss from low-temperature stress during the late growth period.

Key words: rice; cadmium low accumulation; Shaoxiang 100; pilot demonstration; low temperature tolerance

中国是水稻生产和消费大国, 稻米是中国近半数以上人口的主要食物来源^[1]。随着工业化的发展和大量的人类活动, 农业用地重金属污染面积逐年扩张, 成为当今世界多个国家和地区所面临的挑战。耕地重金属污染对粮食生产和人类健康带来不利影响。在这种背景下, 粮食安全越来越得到人们的重视。早期 Rizwan 等^[2] 研究报道镉 (Cd, cadmium) 是一种有毒的重金属, 水稻是一种高积累 Cd 的作物。长期食用 Cd 超标大米会对身体造成严重伤害。例如 20 世纪 60 年代, 日本富士县曾经流行过一种“痛痛病”, 调查发现是当地稻田 Cd 污染严重, 居民长期食用“镉大米”而造成的中毒症状。有调查显示, 我国受重金属污染的耕地面积达 2000 万 hm^2 , 占全国耕地面积的 1/6^[3]。根据环境保护部和国土资源部 2014 年公布的《全国土壤污染状况调查公报》(<https://www.mee.gov.cn/gkml/sthjbgw/qt/201404/W020140417558995804588.pdf>) 披露中国 10 多个省(市) 近 25 个地区, 重金属镉的点位超标率为 7.0%。“镉大米”问题已成为当下中国南方水稻生产亟待解决的重大问题^[4-5]。培育镉低吸收、优质、广适的水稻品种是解决该问题的最有效手段。

物理诱变育种是作物育种的重要途径之一, 主要有 X 射线、 γ 射线、高能电子、重离子等诱变手段。重离子束的能量传输密度较 γ 射线和 X 射线更高, 相对生物学效应大, 多产生不易修复的 DNA 双链断裂及团簇损伤。重离子束对遗传背景影响较小, 仅破坏其径迹经过的染色体区域, 对基因组的其他区域不产生直接影响。重离子诱变获得的突变种质能够快速成为遗传稳定并可直接应用的新品种、新品系^[6]。韶也等^[7] 发明了 M_1 TDS 技术 (ZL20191223356.0), 建立了“重离子诱变+ M_1 TDS”诱变育种定向改良技术体系, 实现了 Cd 吸收基因 *OsNRAMP5* 高效诱变与精

准筛选, 将优异“底盘品种”臻两优 8612 (国审稻 20206139) 的亲本进行重离子诱变, 筛选获得 *OsNRAMP5* 基因突变体, 组配后培育出镉低积累新品种莲两优 1 号 (低镉型臻两优 8612)。通过该技术体系同期创制了本研究中的镉低积累优质香型常规稻韶香 100。

OsNRAMP5 是水稻根系和茎秆中吸收和转运 Cd、锰 (Mn, manganese) 的关键蛋白^[8]。前人研究表明, *OsNRAMP5* 基因突变导致水稻稻谷 Cd 含量减少 90% 以上, 是培育镉低积累水稻的重要目标基因^[9-12]。Mn 是植物生长发育所必需的营养元素, 缺 Mn 会削弱植物的光合作用和抗氧化功能, 引起植株生长衰弱, 产量下降, 可能也会使植株抗逆性降低^[13]。Tang 等^[10] 的研究表明, *OsNRAMP5* 基因突变植株秸秆中的 Mn 含量相比原始品系降低了 80.6%~82.6%, 但高于 150 mg/kg , 仍能满足植株正常生长所需 Mn 含量。水稻幼苗期及生殖生长期对低温的反应最敏感, 25 $^{\circ}\text{C}$ ~30 $^{\circ}\text{C}$ 是其最适生长温度; 孕穗期 17 $^{\circ}\text{C}$ 以下的气温对育性有影响, 特别是在花粉母细胞减数分裂时期^[14]; 传粉期若是有持续 3 d 的气温在 20 $^{\circ}\text{C}$ 以下, 则会对胚囊造成不可逆的伤害^[15-16]。裴峰等^[17] 的研究表明, *OsNRAMP5* 基因敲除系与对照在温室极端高温和低温条件下结实率变化趋势一致。说明因 *OsNRAMP5* 基因突变导致的 Mn 下降可能不足以影响水稻的高、低温耐受性, 进而降低结实率, 这为生产上培育广适的镉低积累水稻提供了参考。目前关于水稻 *OsNRAMP5* 基因突变系的田间自然低温耐受性研究鲜有报道。

本研究利用重离子诱变结合 M_1 TDS 技术创制了镉低积累优质香型常规稻韶香 100, 开展了韶香 100 大田试验示范, 与其原始品系 44-5 的镉积累特性和农艺性状, 特别是低温耐受性进行了比较研

究,为韶香100及其他*OsNRAMP5*基因突变镉低积累水稻品种的应用提供科学参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

本试验所用的品种韶香100是通过重离子诱变香型优质稻材料44-5,并结合M₁TDS技术筛选获得的*OsNRAMP5*基因突变镉低积累水稻。原始品系44-5由湖南杂交水稻研究中心选育并保存,玉针香购自湖南农丰种业有限公司,分期播种耐低温鉴定对照品种创两优丰占(耐冷强)和农香32(耐冷弱)由华智生物技术有限公司提供。

1.2 试验方法

1.2.1 韶香100的创制 2020年原始品系44-5的种子送到中国科学院近代物理研究所,利用重离子加速器装置进行诱变。种植M₁代诱变群体,100株构建混池,送北京贝瑞和康生物技术有限公司开发*OsNRAMP5*基因液体捕获探针高深度测序,分析混池低频嵌合突变株,开发韶香100*OsNRAMP5*基因突变位点的一代测序引物SX100-F(5'-CGAAGCGATGATGATGAGGCG-3'),SX100-R(5'-GGTTCTTGACATCAGGATGAGG-3')确定嵌合突变株,在M₂代进行基因分型确定纯合突变株,KASP分型引物FAM(5'-GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCTGATGACAAGAACCATCGCCA-3'),HEX(5'-GAGGTCGGAGTCAACGGATTCTGATGACAAGAACCATCGTCG-3'),COMMON(5'-ATGCTGACCGAAGCGATGATGA-3')。

1.2.2 幼苗CdCl₂溶液水培试验 2021年纯合突变单株和原始品系在人工气候室生长至2叶1心期,在含有0.5 μmol/L Cd(CdCl₂溶液)的Yoshida水稻营养液中处理14 d后,分别取根系烘干磨粉,消解处理,利用电感耦合等离子体质谱仪(Thermo Scientific™ iCAP™ RQ ICP-MS,美国)测定Cd的含量,设置3个生物学重复。根系Cd含量由湖南杂交水稻全国重点实验室检测中心完成。

1.2.3 Cd污染大田农艺性状比较试验 2022年5月至10月分别在株洲市醴陵市(土壤Cd 0.71 mg/kg, pH 5.1)、岳阳市湘阴县(土壤Cd 1.05 mg/kg, pH 5.4)、湘潭市湘潭县(土壤Cd 1.52 mg/kg, pH 5.6)等不同镉污染程度的大田开展试验示范。土壤污染程度参照《全国土壤污染调查公报》(2014)划分为5个等级:无污染(Cd≤0.3 mg/kg),轻微污染(0.3 < Cd≤0.6 mg/kg),轻度污染(0.6 < Cd≤0.9 mg/kg),中度污染

(0.9 < Cd≤1.5 mg/kg),重度污染(Cd > 1.5 mg/kg)^[18]。肥水管理、病虫害防治等参照常规划田间管理施行。醴陵市采用的对照品种是原始品系44-5,湘阴县和湘潭县采用的对照品种是玉针香。Cd积累特性测试品种分小区种植,每个品种设3个重复,每个重复种植192株。成熟后收获韶香100、44-5、玉针香稻谷各30 g,稻谷脱壳成糙米,用于测定稻谷Cd含量。2022年5-10月和2023年5-10月,在醴陵市(该试验点2023年韶香100、44-5的重复设置、种植规模、常规田间管理与2022年一致)于抽穗期对韶香100、44-5每个重复随机挑选3株摘取剑叶叶片,每株摘取6~7片剑叶,用清水洗净,放置80℃烘箱烘48 h,用于测定叶片样品Cd、Mn含量。糙米和叶片样品经过高通量粉碎机粉碎均匀,消解处理,利用电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS)测定Cd、Mn含量。糙米Cd含量、叶片Cd、Mn含量均由湖南杂交水稻全国重点实验室检测中心完成。

在株洲市醴陵市试验点调查韶香100与原始品系44-5综合农艺性状。每个重复取6株水稻,测定农艺性状,包括株高、有效穗数、穗长、每穗总粒数、结实率、千粒重等。每个重复收割100株测定百株产量。取300 g稻谷样本检测米质,包括糙米率、精米率、整精米率、垩白度、垩白粒率、透明度、碱消值、胶稠度、直链淀粉含量、粒长、长宽比等指标。米质性状由湖南杂交水稻全国重点实验室检测中心完成。

1.2.4 国家镉低积累水稻品种自主试验 2022年至2023年韶香100(代号:也香100)参与了国家镉低积累水稻品种自主试验,试验方法参照《低镉水稻品种自主试验技术规程》(湖南省地方标准DB43/T2599-2023)。

1.2.5 大田分期播种耐低温鉴定试验 2022年6月至10月,在长沙市长沙县明月村稻作公园基地(113°22'94" E, 28°42'13" N)开展大田耐低温试验。参试品种为韶香100、44-5、创两优丰占和农香32。通过分期播种,利用当地每年9月中下旬至10月初自然低温条件,结合4个参试品种不同温度下的结实率进行田间自然低温耐受性鉴定。分5期(6月11日、6月21日、7月1日、7月11日、7月21日)播种,5叶期左右移栽,栽插规格20 cm×20 cm,每个品种设2次重复,每重复栽100株,每穴插单苗。记录每期参试品种的播种、抽穗等生育时期。从始穗期开始,每个参试品种分别挂牌20个分蘖,黄熟期每个品种收割挂牌的20个单穗作为考种样,并同时收

割 3 株水稻也作为考种样, 分别考察结实率。肥水管理、病虫害防治参照常規田间管理施行。利用高集成农业气象站(HZ-QXZ01)采集气象数据, 每隔 1 h 进行一次大气温度($^{\circ}\text{C}$)实时记录。始穗期连续或超过 3 天 T_{ave} (每日平均气温) 小于或等于 23°C 作为已受到冷害胁迫的标准, 将抽穗期当天以及之后的一段时间内受到冷害胁迫的播期平均结实率作为低温的结实率, 而其他播期的最高结实率作为常温下的结实率。

采用 2 种评价体系评价品种耐冷性。相对耐冷系数 R (供试材料与耐低温对照品种在低温条件下的平均结实率的比值): $R \geq 1.10$ 为强, 级别为 1 级; $0.90 \leq R < 1.10$ 为较强, 级别为 3 级; $0.70 \leq R < 0.90$ 为一般, 级别为 5 级; $0.50 \leq R < 0.70$ 为较弱, 级别为 9 级^[19]。品种耐冷指数 (低温冷害下品种结实率/常温下品种结实率 $\times 100$): 低温结实率 $\geq 85\%$, 耐冷 (1 级); $75\% \leq$ 低温结实率 $< 85\%$, 中等耐冷 (2 级); $60\% \leq$ 低温结实率 $< 75\%$, 感冷 (3 级); 低温结实率 $< 60\%$, 敏冷 (4 级)^[20]。

1.3 数据处理

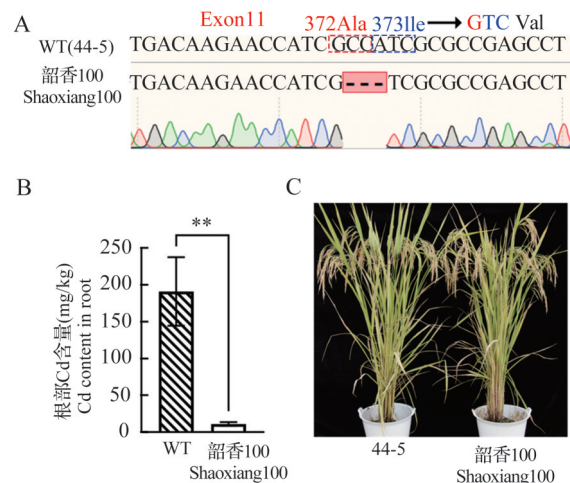
利用 Microsoft Excel 2016 和 SPSS 23.0 软件进行数据处理及方差分析。将考察的农艺性状数据和检测的稻谷 Cd 含量及剑叶 Cd、Mn 含量数据利用 Microsoft Excel 2016 整理成表, 确保每组数据至少有 3 组重复, 再将数据导入到 SPSS 23.0, 采用独立样本 T 检验, 各播期结实率比较采用单因素 (ANOVA) 方差分析; 绘图采用 Graphpad Prism 8.0.2 软件完成, 同样利用 Microsoft Excel 2016 整理后导入软件绘制折线图, 图表中数据均为各处理的平均值 \pm 标准差。

2 结果与分析

2.1 镉低积累香型优质常规稻韶香 100 的培育

2020 年 3 月在兰州中科院近代物理研究所, 利用高能重离子束辐照 (80 MeV/U 碳离子 $^{12}\text{C}^{6+}$, 剂量为 120 Gy) 处理具有玉针香血缘的优质香稻材料 44-5 种子约 5000 粒。诱变第一代 (M_1) 种子于 5 月在长沙本部试验田播种, 种植了 4200 株。分蘖后期分单株取样, 以 30 株构建混池提取叶片 DNA, 靶向深度测序检测到 1 个 *OsNRAMP5* 基因突变株。其 11 号外显子缺失 3 个碱基, 没有发生移码, 但导致 372 位丙氨酸 (Ala) 和 373 位 L-异亮氨酸 (Ile) 突变为缬氨酸 (Val) (图 1A)。利用 Sanger 测序分析每个穗

剑叶的基因型, 收获突变剑叶对应的穗子, 分单穗收取 M_1 代种子。2021 年春季在海南陵水种植 M_2 代, 进行 KASP 基因分型筛选纯合突变株, 筛选出纯合突变单株分苑扩繁, M_3 代纯合系定名“也香 100”, 后改名韶香 100。纯合突变单株和原始品系植株经含 CdCl_2 溶液水稻营养液处理 14 d 后, 根系 Cd 含量分别为 11.1 mg/kg 和 192.2 mg/kg。韶香 100 相比原始品系根系 Cd 含量下降 94.2%, 差异达到极显著水平 ($P < 0.01$), 表现出显著的镉低积累特性 (图 1B)。2021 年在株洲醴陵基地进行了示范种植, 韶香 100 与 44-5 成熟期植株的表型无明显差异 (图 1C)。



A: 突变位点比较; B: 根部 Cd 积累量比较; C: 植株表型比较; **表示在 $P < 0.01$ 水平上差异显著

A: Comparison of mutation loci; B: Comparison of Cd accumulation in roots; C: Comparison of plant phenotypes; ** denotes significant difference at $P < 0.01$ level

图 1 原始品系 44-5 与韶香 100 比较

Fig.1 Comparison between the original strain 44-5 and Shaoxiang 100

2.2 韶香 100 多点试验及国家镉低积累品种自主试验情况

2.2.1 韶香 100 多点试验情况 韶香 100 稻谷 Cd 含量在醴陵市、湘阴县和湘潭县分别为 0.03 mg/kg、0.04 mg/kg、0.05 mg/kg, 对照品种稻谷 Cd 含量分别为 0.38 mg/kg、0.89 mg/kg、1.35 mg/kg, 韶香 100 稻谷 Cd 含量相比对照品种 (44-5 或玉针香) 分别下降 92.1%、95.5%、96.3%, 差异达到极显著水平 ($P < 0.001$), 均远低于国家稻米安全标准的上限 0.20 mg/kg (表 1)。对醴陵市的韶香 100 和 44-5 的农艺性状进行比较, 两者间除株高外的主要农艺性状无明显差异; 韶香 100 相比 44-5 稻谷 Cd 显著下降, 但产量无显著差异 (表 2)。

表1 3个试验示范点土壤背景及试验材料稻谷Cd含量

Table 1 Soil background and Cd content of rice grains of test materials at three experimental demonstration sites

试验地点 Test site	土壤含镉量 (mg/kg) Soil Cd content	土壤pH值 Soil pH value	土壤污染程度 Level of soil contamination	韶香100稻谷Cd 含量(mg/kg) Shaoxiang 100 rice Cd content	对照品种稻谷Cd 含量(mg/kg) Control variety rice grain Cd content	对照品种 Control variety
醴陵市 Liling city	0.71	5.1	轻度	0.03±0.01***	0.38±0.05	44-5
湘阴县 Xiangyin county	1.05	5.4	中度	0.04±0.03**	0.89±0.13	玉针香
湘潭县 Xiangtan county	1.52	5.6	重度	0.05±0.01**	1.35±0.02	玉针香

、*分别表示在 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 水平上差异显著;下同

** , *** indicate significant differences at the $P < 0.01$ and $P < 0.001$ levels, respectively; The same as below

表2 韶香100与原始品系44-5农艺性状比较

Table 2 Comparison of agronomic traits between Shaoxiang 100 and the original line 44-5

品种名称 Variety name	株高(cm) Plant height	有效穗数 Number of effective ear	穗长(cm) Ear length	每穗总粒数 Total number of grains per ear	结实率(%) Fruiting rate	千粒重(g) Thousand kernel weight	百株产量(kg) Yield per 100 plants
SX100	109.9±3.11*	14.4±1.63	23.7±0.42	133±5.20	74.2±0.04	24.9±0.65	3.43±0.16
44-5	116.7±2.49	13.1±1.86	23.8±0.43	128±7.00	77.3±0.06	25.9±0.29	3.46±0.28

SX100:韶香100;*表示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著;下同

SX100:Shaoxiang100;*Indicates significant differences at the $P < 0.05$ level; The same as below

Mn是植物重要的微量元素,植物生长对Mn的需求一般大于50 mg/kg、不超过100 mg/kg,但是水稻对Mn有很大的耐受性,能累积5000 mg/kg的Mn且不会表现中毒症状。对醴陵市试验点2022年和2023年韶香100和原始品系44-5剑叶金属元素含量分析表明:韶香100剑叶Cd元素含量分别为0.05 mg/kg, 0.06 mg/kg,相比原始品系44-5分别下降80%和

77.8%,差异均达到极显著水平($P < 0.01$);韶香100剑叶Mn元素含量分别为1519.26 mg/kg, 1618.24 mg/kg,相比原始品系44-5分别下降39.5%和47.3%,达极显著水平($P < 0.001$),但是韶香100剑叶的Mn含量均远高于植物需要Mn的最低限度(表3)。在土壤Mn含量适宜的地区种植镉低积累水稻,Mn吸收量降低但并不影响正常生长。

表3 韶香100与原始品系44-5的剑叶Cd、Mn含量比较

Table 3 Comparison of Cd and Mn contents of flag leaves between Shaoxiang 100 and the original strain 44-5

年份 Year	剑叶Cd含量(mg/kg) Cd content in flag leaf		剑叶Mn含量(mg/kg) Mn content in flag leaf	
	SX100	44-5	SX100	44-5
2022	0.05±0.01**	0.25±0.01	1519.26±219.00***	2511.89±228.62
2023	0.06±0.01**	0.27±0.01	1618.24±184.22***	3070.53±192.98

2.2.2 韶香100与原始品系44-5稻米品质检测 对2022年株洲市试验点韶香100和原始品系44-5的稻米进行检测。结果显示,韶香100与原始品系44-5稻米品质各项指标没有明显差异。按照NY/T 593-2021《食用稻品种品质》标准评定,两者均达到了优质一级食用长粒形籼稻品质标准(表4),说明在OsNRAMP5基因突变之后,韶香100米质并未受影

响。韶香100镉低积累、优质,满足市场需求,具有大面积推广的价值。

2.2.3 韶香100在国家镉低积累水稻自主试验中的表现 2021-2023年,韶香100(参试名称“也香100”)参加了国家镉低积累水稻品种自主试验长江中下游晚稻中迟熟组试验。13个区域试验点分布在湖南、江西、广东、浙江、广西等5个省区。2021年

初试平均亩产 549.21 kg, 比天优华占(CK)减产 4.78%, 减产达极显著水平, 增产点比例 38.5%; 全生育期 111.8 d, 比天优华占早熟 4.0 d。2022 年续试平均亩产 536.66 kg, 比天优华占减产 3.28%, 减产达极显著水平, 增产点比例 53.8%; 全生育期 117.0 d, 比天优华

占早熟 2.4 d。两年区域试验平均亩产 542.94 kg, 比天优华占减产 4.03%, 增产点比例 36.4%; 全生育期 114.4 d, 比天优华占早熟 3.2 d。2023 年生产试验平均亩产 515.74 kg, 比天优华占减产 3.07%, 增产点比例 14.3%; 全生育期 117.0 d, 比天优华占早熟 3.0 d。

表 4 韶香 100 与 44-5 稻米品质性状比较

Table 4 Comparison of quality traits between Shaoxiang 100 and 44-5 rice

品种名称 Variety name	糙米率 (%) Rough rice rate	精米率 (%) Refined rice rate	整精米率 (%) Ratio of polished rice	垩白度 (%) Chalkiness	垩白粒率 (%) Chalky grain percentage	透明度 Transparency	碱消值 Alkali elimination value	胶稠度 (mm) Gel consistency	直链淀粉含量 (%) Rectilinear starch content	粒长 (mm) Grain length	长宽比 Aspect ratio	综合判定 Synthesize judgment
SX100	77.3	71.3	65.3	0.1	1	1	6.8	63	16.9	7.8	4.3	一级
44-5	77.1	70.2	63.0	0.4	3	1	6.1	67	16.0	7.7	4.2	一级

主要农艺性状两年区域试验综合表现为每亩有效穗数 18.9 万穗, 株高 113.0 cm, 穗长 24.5 cm, 每穗总粒数 138.3 粒, 结实率 81.1%, 千粒重 26.4 g。结实率小于 65% 的试验点 2021 年为 1 个, 2022 年为 0 个。倒伏试验点比例两年均为 0。抗性两年综合表现为稻瘟病综合指数 5.2 级, 穗瘟损失率最高级 7 级; 白叶枯病最高级 5 级, 平均级 5 级; 褐飞虱最高级 9 级, 平均级 8 级。米质主要指标两年综合表现为糙米率 79.0%, 精米率 69.5%, 整精米率 55.0%, 粒长 8.1 mm, 长宽比 4.5, 垩白粒率 4%, 垩白度 0.6%, 透明度 1 级, 碱消值 6.5 级, 胶稠度 62 mm, 直链淀粉含量 15.4%。综合评级为部标优质稻 2 级。池栽鉴定两年区域试验结果为有镉低积累特性。两年区域试验及生产试验检测结果显示糙米中镉含量最高值为 0.09 mg/kg。区试结果表明韶香 100 作为优质香型常规稻品种, 镉低积累特性稳定, 适应性好、丰产性好、米质优。

2.3 韶香 100 与原始品系 44-5 低温耐受性比较

2.3.1 5 个播期温度变化情况 2022 年 6 月-11 月, 在长沙县明月村稻作公园基地开展耐低温试验。以 $T_{ave} \leq 23.0$ °C 且连续 3 天或以上为低温胁迫, 9 月 21 日-9 月 23 日和 10 月 5 日以后为低温胁迫时段, 其他时间段均为非低温胁迫时期(图 2)。按抽穗期当天以及之后的一段时间内温度情况判定是否受到低温胁迫, 韶香 100、44-5、创两优丰占、农香 32 在第 IV 期、第 V 期抽穗期间均受到低温胁迫, 而第 I、II、III 期播种时为非低温胁迫条件, 9 月 28 日-10 月 3 日出现小幅度升温, 最高平均温度达到 29.5 °C, 10 月 5 日即进入低温胁迫(表 5), 平均温度

为 15.0 °C 左右。综上, 将第 IV、V 期的结实率作重点分析比较。

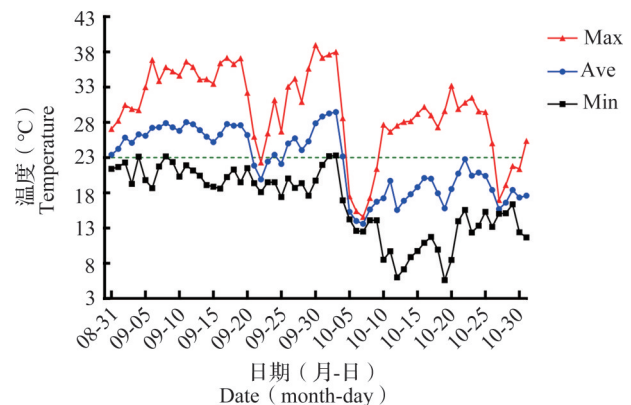


图 2 2022 年长沙县稻作公园基地 9-10 月温度变化情况
Fig.2 Changes in September-October temperatures at the Changsha County Rice Park site in 2022

2.3.2 不同播期品种结实率及耐冷性评价 第 I 期韶香 100 结实率显著高于对照创两优丰占和农香 32; 第 II 期韶香 100 结实率与创两优丰占无差异, 但仍显著高于农香 32; 第 III 期参试品种间的结实率均没有明显差异; 第 IV 期参试品种间的结实率仍然没有显著性差异, 耐冷性较强的创两优丰占结实率相比第 III 期反而升高; 第 V 期农香 32 的结实率显著低于其他参试品种。参试品种韶香 100、44-5、农香 32 等第 I 期相比其他播期结实率最高。总体来看, 第 I 期、II 期末未受到低温胁迫, 韶香 100 结实率分别为 81.3%、72.6%, 高于所有对照品种, 表明温度正常条件下其结实性好。随着播期推迟和气温逐渐下降, 第 III 期和第 IV 期结实率也明显下降, 至第 V 期达到最低值(25.2%)(表 6)。韶香 100 与 44-5 第 IV、V 期结实

率没有明显差异,韶香100与原始品系44-5的相对耐冷系数R分别为0.75、0.75,品种耐冷指数分别为47.2%、49.2%,相对耐冷系数级别均为5级,品种耐冷指数级别均为4级,都表现为敏冷。说明韶香100与

原始品系44-5的耐冷性相当,同时相对耐冷系数和耐冷指数都高于弱耐冷对照品种农香32(0.61,46.9%)。综上所述,低温胁迫下 *OsNRAMP5* 基因突变的籼低积累水稻韶香100耐冷性不变,但其耐冷性一般。

表5 参试品种各播期生育时期及低温胁迫情况

Table 5 Record of fertility period and low temperature stress of the participating varieties at each sowing stage

品种名称 Variety name	第I期 Phase I			第II期 Phase II			第III期 Phase III			第IV期 Phase IV			第V期 Phase V		
	播种期 SP	抽穗期 TS	低温胁迫 LTS	播种期 SP	抽穗期 TS	低温胁迫 LTS	播种期 SP	抽穗期 TS	低温胁迫 LTS	播种期 SP	抽穗期 TS	低温胁迫 LTS	播种期 SP	抽穗期 TS	低温胁迫 LTS
SX100	6/11	8/29	N	6/21	9/2	N	6/29	9/15	N	7/11	9/26	Y	7/21	10/10	Y
44-5	6/11	8/28	N	6/21	9/3	N	6/29	9/14	N	7/11	9/25	Y	7/21	10/8	Y
CLYFZ	6/11	9/2	N	6/21	9/7	N	6/29	9/17	N	7/11	9/28	Y	7/21	10/9	Y
NX32	6/11	9/5	N	6/21	9/5	N	6/29	9/18	N	7/11	10/1	Y	7/21	10/14	Y

SX100:韶香100;CLYFZ:创两优丰占;NX32:农香32;N表示否;Y表示是;下同

SX100;Shaoxiang100;CLYFZ:Chuangliangyoufengzhan;NX32:Nongxiang32;SP:Sowing period;TS:Tasseling stage;LTS:Low-temperature stress;N means No;Y means Yes;The same as below

表6 参试品种各播期结实率及耐冷性评价

Table 6 Evaluation of fruiting rate and cold tolerance of the participating varieties at each sowing stage

品种名称 Variety name	结实率(%) Fruiting-rate					相对耐冷系数 Relative cooling resistance					品种耐冷指数 Species cold tolerance index		
	第I期 Phase I	第II期 Phase II	第III期 Phase III	第IV期 Phase IV	第V期 Phase V	常温 OT	低温 LT	系数 Ratio	级别 Rank	耐冷性 Cold resistance	指数 (%) Index	级别 Rank	耐冷性 Cold resistance
SX100	81.3±6.0a	72.6±2.2a	56.6±7.4a	51.5±11.2a	25.2±0.7a	81.3	38.4	0.75	5	一般	47.2	4	敏冷
44-5	78.2±4.3ab	72.5±0.5a	58.4±18.0a	53.4±8.1a	23.5±0.7a	78.2	38.5	0.75	5	一般	49.2	4	敏冷
CLYFZ	67.1±6.4c	62.7±2.7ab	63.3±11.2a	69.8±6.5a	32.7±10.0a	67.1	51.3	1	/	/	76.5	2	中等耐冷
NX32	67.1±2.1bc	55.3±8.8b	58.1±3.6a	47.7±12.1a	15.2±1.8b	67.1	31.5	0.61	7	较弱	46.9	4	敏冷

不同字母表示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著

OT: Ordinary temperature; LT; Low temperature; Different letters indicated significant difference at $P < 0.05$

3 讨论

2021-2023年, *OsNRAMP5* 基因突变籼低积累水稻韶香100在湖南多地试验示范,表现出丰产性好、籼低积累特性稳定、米质优等优点,相比原始品系44-5在综合农艺性状(除株高)、产量、品质等方面无明显差异,并没有因为Mn转运基因突变、Mn吸收下降而引起表型发生改变。早期日本学者Sasaki等^[11]报道粳稻中花11的 *OsNRAMP5* 基因突变系产量相比原始品系下降98%,但在本研究中 *OsNRAMP5* 突变系韶香100与原始品系44-5的产量和品质无明显差异,前者是T-DNA插入突变体,插入位点在 *OsNRAMP5* 基因的第12内含子,检测不到

OsNRAMP5 基因的mRNA;而后者利用重离子诱变,突变位点位于第11外显子,同时缺失1个氨基酸和突变1个氨基酸,推测可能是突变材料的背景差异和突变位点不同导致了不同的试验结果。“重离子诱变+M₁TDS”育种技术可对目标基因高效突变并精准选择,重离子诱变对原始品种的背景影响小,可快速实现对优良“底盘品种”亲本的定向改良,大大提升了作物传统诱变育种效率。

植物对低温的响应是一个非常复杂的过程,受到多个因子的共同作用。低温胁迫可引起发芽率下降、幼苗生长发育延迟甚至死亡、结实率下降等外在物理损伤,并导致叶绿素荧光改变,电解质损失增加,活性氧、丙二醛、蔗糖、脂质过氧化物、脯氨

酸等含量增加,进而引发一系列的生理代谢变化,其变化还会影响到其他植物激素的作用^[21]。在本研究中,*OsNRAMP5*突变系韶香 100 在遭遇低温胁迫后,结实率随播期呈现出下降的趋势,韶香 100 的原始品系 44-5 也有一样的趋势。并且同期播种的韶香 100 和原始品系结实率没有明显差异,这与裴峰等^[17]关于 *OsNRAMP5* 敲除系和野生型低温胁迫下结实率变化趋势无差异的研究结果一致。在第 V 期水稻抽穗期最低温度甚至降低到了 5 ℃,远远小于 23 ℃。极端低温有可能导致花粉器官发育不良、花粉败育、激素在细胞间移动放缓或者停滞,从而导致结实率的骤然下降。经过比较鉴定,韶香 100 的耐冷性介于创两优丰占和农香 32 之间;相对耐冷系数级别为 5 级,耐冷性一般;与原始品系 44-5 的耐冷性一致,并没有因 *OsNRAMP5* 基因突变、Mn 积累减少导致低温耐受性进一步降低。

湖南北部晚稻播期通常在 6 月中旬,湖南中部和南部各推迟 2~3 d、3~5 d。结合本研究中分 5 期播种的结实率和每日温度分析,韶香 100 在湖南、江西作为双季晚稻种植时,应尽量在本试验结果中第 II 期的播种时间之前,即 6 月 20 日之前播种。湘北、赣北应提前 3~5 d 种植,以避免低温胁迫引起的产量损失,实现镉低积累、优质、稳产。

参考文献

- [1] 闵忠鹏,王之旭,孙洪义.辽宁省水稻生产育种研究现状及展望.北方水稻,2011,41(6):72-75,80
Min Z P, Wang Z X, Sun H Y. Research actuality and outlook on rice production and breeding in liaoning province. North Rice, 2011,41(6):72-75,80
- [2] Rizwan M, Ali S, Adrees M, Rizvi H, Zia-Ur-Rehman M, Hannan F, Qayyum M F, Hafeez F, Ok Y S. Cadmium stress in rice: Toxic effects, tolerance mechanisms, and management: A critical review. Environmental Science and Pollution Research, 2016,23(18):17859-17879
- [3] 王赛怡,王逸君,赵亚洲,侯燕琪.土壤重金属污染及其植物修复研究进展.农学学报,2023,13(2):20-23,32
Wang S Y, Wang Y J, Zhao Y Z, Hou Y Q. Research advances in soil heavy metal pollution and its phytoremediation. Journal of Agriculture, 2023, 13 (2) : 20-23,32
- [4] Hu Y A, Cheng H F, Tao S. The challenges and solutions for cadmium-contaminated rice in China: A critical review. Environment International, 2016,92-93:515-532
- [5] Zhao F J, Ma Y B, Zhu Y G, Tang Z, Mcgrath S P. Soil contamination in China: Current status and mitigation strategies. Environmental Science & Technology, 2015, 49 (2):750-759
- [6] Tanaka A, Shikazono N, Hase Y. Studies on biological effects of ion beams on lethality, molecular nature of mutation, mutation rate, and spectrum of mutation phenotype for mutation breeding in higher plants. Journal of Radiation Research, 2010,51(3):223-233
- [7] 韶也,彭彦,毛毕刚,余丽霞,唐丽,李曜魁,胡远艺,张丹,袁智成,罗武中,彭选明,李文建,周利斌,柏连阳,赵炳然. MITDS 技术及镉低积累杂交水稻亲本创制与组合选育. 杂交水稻, 2022,37(1):1-11
Shao Y, Peng Y, Mao B G, Yu L X, Tang L, Li Y K, Hu Y Y, Zhang D, Yuan Z C, Luo W Z, Peng X M, Li W J, Zhou L B, Bai L Y, Zhao B R. M₁TDS technology and creation of low-cadmium accumulation parents for hybrid rice breeding. Hybrid Rice, 2022,37(1):1-11
- [8] Ishikawa S, Ishimaru Y, Igura M, Kuramata M, Abe T, Senoura T, Hase Y, Arao T, Nishizawa N K, Nakanishi H. Ion-beam irradiation, gene identification, and marker-assisted breeding in the development of low-cadmium rice. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012, 109(47):19166-19171
- [9] Ishimaru Y, Takahashi R, Bashir K, Shimo H, Senoura T, Sugimoto K, Ono K, Yano M, Ishikawa S, Arao T, Nakanishi H, Nishizawa N K. Characterizing the role of rice NRAMP5 in manganese, iron and cadmium transport. Scientific Reports, 2012,2:286
- [10] Tang L, Mao B G, Li Y K, Lv Q M, Zhang L P, Chen C Y, He H J, Wang W P, Zeng X F, Shao Y, Pan Y L, Hu Y Y, Peng Y, Fu X Q, Li H Q, Xia S T, Zhao B R. Knockout of *OsNramp5* using the CRISPR/Cas9 system produces low Cd-accumulating indica rice without compromising yield. Scientific Reports, 2017,7(1):14438
- [11] Sasaki A, Yamaji N, Yokosho K, Ma J F. Nramp5 is a major transporter responsible for manganese and cadmium uptake in rice. The Plant Cell, 2012,24(5):2155-2167
- [12] 董家瑜,吴天昊,孙远涛,何含杰,李曜魁,彭彦,冀中英,孟前程,赵炳然,唐丽.不同锰浓度环境下 *OsNRAMP5* 突变对水稻耐热性和主要经济性性状的影响. 杂交水稻, 2021,36(2):79-88
Dong J Y, Wu T H, Sun Y T, He H J, Li Y K, Peng Y, Ji Z Y, Meng Q C, Zhao B R, Tang L. Effects of *OsNRAMP5* mutation on heat tolerance and main economic traits of rice under the conditions of different manganese concentration. Hybrid Rice, 2021,36(2):79-88
- [13] 张玉秀,李林峰,柴团耀,林单,张红梅. 锰对植物毒害及植物耐锰机理研究进展. 植物学报, 2010,45(4):506-520
Zhang Y X, Li L F, Chai T Y, Lin D, Zhang H M. Mechanisms of manganese toxicity and manganese tolerance in plants. Chinese Bulletin of Botany, 2010,45(4):506-520
- [14] 姜丽霞,季生太,李帅,王连敏,韩俊杰,王晾晾,朱海霞,纪仰慧. 黑龙江省水稻空壳率与孕穗期低温的关系. 应用生态学报, 2010,21(7):1725-1730
Jiang L X, Ji S T, Li S, Wang L M, Han J J, Wang L L, Zhu

- H X, Ji Y H. Relationships between rice empty grain rate and low temperature at booting stage in Heilongjiang province. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2010, 21(7): 1725-1730
- [15] Shakiba E, Edwards J D, Jodari F, Duke S E, Baldo A M, Korniliev P, Mccouch S R, Eizenga G C. Genetic architecture of cold tolerance in rice (*Oryza sativa*) determined through high resolution genome-wide analysis. *PLoS ONE*, 2017, 12(3): e0172133
- [16] Shinada H, Iwata N, Sato T, Fujino K. Genetical and morphological characterization of cold tolerance at fertilization stage in rice. *Breeding Science*, 2013, 63(2): 197-204
- [17] 裴峰, 王广达, 高鹏, 冯志明, 胡珂鸣, 陈宗祥, 陈红旗, 崔傲, 左示敏. 敲除 *OsNramp5* 基因创制低镉优质粳稻新材料的应用评价. *中国水稻科学*, 2023, 37(1): 16-28
- Pei F, Wang G D, Gao P, Feng Z M, Hu K M, Chen Z X, Chen H Q, Cui A, Zuo S M. Evaluation of new japonica rice lines with low cadmium accumulation and good quality generated by knocking out *OsNramp5*. *Chinese Journal of Rice Science*, 2023, 37(1): 16-28
- [18] 张悦妍, 郭兴强, 莫桂兰, 秦信凤. 重金属镉在土壤-水稻中迁移转化特征. *贵州农业科学*, 2021, 49(9): 143-149
- Zhang Y Y, Guo X Q, Mo G L, Qin X F. Migration transformation characteristics of heavy metal cadmium in soil-rice. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2021, 49(9): 143-149
- [19] 王林, 揭春玉, 吴尧, 韩玉, 吴双清. 水稻品种抽穗扬花期耐冷性鉴定与评价方法初探. *中国稻米*, 2019, 25(5): 75-78
- Wang L, Jie C Y, Wu Y, Han Y, Wu S Q. Preliminary research on identification and evaluation of cold tolerance of rice in head-ing-flowering Stage. *China Rice*, 2019, 25(5): 75-78
- [20] 曾跃华, 谭旭生, 管恩相, 刘立新, 伍振平, 熊赞军. 水稻新品种耐低温鉴定试验研究初报及建议. *中国稻米*, 2016(3): 21-24
- Zeng Y H, Tan X S, Guan E X, Liu L X, Wu Z P, Xiong Z J. Preliminary report and recommendations of rice qualification test to low temperature resistance. *China Rice*, 2016(3): 21-24
- [21] 刘次桃, 王威, 毛毕刚, 储成才. 水稻耐低温逆境研究: 分子生理机制及育种展望. *遗传*, 2018, 40(3): 171-185
- Liu C T, Wang W, Mao B G, Chu C C. Cold stress tolerance in rice: Physiological changes, molecular mechanism, and future prospects. *Hereditas(Beijing)*, 2018, 40(3): 171-185