

OsNramp5 基因变异影响水稻重要农艺性状的研究进展

李小秀¹ 吕启明^{1,2} 袁定阳^{1,2,*}

(¹ 湖南大学 研究生院隆平分院, 长沙 410125; ² 湖南杂交水稻研究中心/杂交水稻国家重点实验室, 长沙 410125; *通信联系人, email: yuandingyang@hhrcc.ac.cn)

Research Progress on the Effects of *OsNramp5* Mutation on Important Agronomic Traits in Rice

LI Xiaoxiu¹, LÜ Qiming^{1,2}, YUAN Dingyang^{1,2,*}

(¹ Longping Branch of Graduate School, Hunan University, Changsha 410125, China; ² Hunan Hybrid Rice Research Center / State Key Laboratory of Hybrid Rice, Changsha 410125, China; *Corresponding author, email: yuandingyang@hhrcc.ac.cn)

Abstract: Developing low-cadmium (Cd) rice cultivars is the most economical and effective way to solve the problem of “Cadmium Rice”. Previous studies have shown that *OsNramp5* is the major transport gene for Cd uptake in rice. The functional deficiency of *OsNramp5* leads to a significant decrease in the content of Cd in rice grains, and the uptake of manganese (Mn) is also affected. However, in previous studies on the effect of *OsNramp5* variation on rice growth and development, the conclusions were inconsistent. The systematic understanding of the effects of *OsNramp5* mutation on important agronomic traits in rice will promote the development of new rice cultivars with low-Cd and high-quality. This manuscript focuses on the effects of *OsNramp5* mutation on the content of metal ions, growth and development, yield and quality of rice, so as to provide scientific guidance for the breeding of new rice cultivars with low Cd accumulation by *OsNramp5* mutation.

Key words: rice; *OsNramp5*; cadmium; manganese; agronomic trait

摘要: 筛选和培育镉(Cd)低积累水稻品种是解决稻米镉污染问题最经济、有效的办法。现有研究表明 *OsNramp5* 是介导水稻 Cd 吸收最重要的基因, 其功能缺失后, 水稻籽粒 Cd 含量极显著下降, 但同时会影响水稻必需元素锰(Mn)的吸收, 而前人关于 *OsNramp5* 变异影响水稻生长发育的研究中, 结论并不一致。系统了解 *OsNramp5* 基因变异对水稻重要农艺性状的影响有助于推动低 Cd 优质水稻新品种的培育。本文重点对 *OsNramp5* 基因变异对水稻中金属离子的含量, 水稻的生长发育、产量性状及米质的影响进行了综述, 以期利用 *OsNramp5* 基因突变选育低 Cd 积累水稻品种提供参考。

关键词: 水稻; *OsNramp5*; 镉; 锰; 农艺性状

植物在生长发育过程中, 除需要一定的光照、水分、空气和热量外, 还必须不断地从外界吸收所必需的各种营养元素并进行同化, 以维持其正常的生命活动。植物通过各种类型的离子转运通道, 利用根部从外界吸收并转运这些必需矿质元素, 维持正常的生长发育。与此同时, 有一些非必需矿质元素也会利用这些通道进入植物体内, 如镉(Cd)、铅(Pb)、砷(As)等, 这些元素不参与构成植物体的生物结构, 也不参与植物体的正常代谢活动, 不仅会对植物本身造成伤害, 还能通过食物链进入人体, 诱发人体疾病, 影响人体健康。水稻是世界

上重要的粮食作物之一, 在我国农业生产中占据着重要地位, 超过 60% 的人口以大米为主食, 我国每年水稻的消耗量占谷物消耗量的 55%^[1]。与玉米、小麦和大豆等作物相比, 水稻极易富集 Cd^[2-3], 并且耕地酸化或污染可导致土壤中活性 Cd 含量增加, 这又加剧了水稻中 Cd 的积累, 使稻米 Cd 超标事件频繁发生。

人类摄入过量的 Cd 会严重危害身体健康^[4], 长期接触 Cd 会导致肾功能障碍和骨质疏松症等疾病^[5-6]。例如, 日本的“痛痛病”事件, 即属最严重的慢性 Cd 中毒事件。在我国南方部分地区, 稻米 Cd

收稿日期: 2022-03-31; 修改稿收到日期: 2022-06-06。

基金项目: 湖南省科技创新团队资助项目(2021RC4066); 湖湘青年英才计划资助项目(2021RC3113)。

超标已然成为引起社会广泛关注的食品安全问题。如何减少 Cd 在水稻籽粒中的积累已经成为水稻生产中亟待解决的关键问题。

目前,水稻 Cd 污染的控制途径主要有四种:一是通过优化栽培管理措施来抑制土壤中可交换 Cd 的形成^[7-9];二是通过化学或者生物学方法,改变土壤中 Cd 的现有形态或去除土壤中的 Cd,从而阻碍稻田土壤中的 Cd 通过根系进入植物体内^[10-13];三是利用高积累作物将 Cd 转移到地上部,从而减少土壤中 Cd 的含量^[14-15];四是培育 Cd 低积累水稻品种^[16-21]。其中,培育 Cd 低积累水稻品种是解决稻米 Cd 超标问题最直接和经济的方法。

现有研究表明,在水稻众多参与调控 Cd 积累的相关基因中,天然抗性相关巨噬细胞蛋白(NRAMP)家族中的 *Nramp5* 是最主要的调控蛋白。本文就水稻 *OsNramp5* 蛋白编码基因 *OsNramp5* 变异对水稻重要农艺性状的影响进行综述,以期为今后利用 *OsNramp5* 基因变异资源培育 Cd 低积累水稻品种提供参考。

1 NRAMP 蛋白家族及水稻 *OsNramp5* 基因

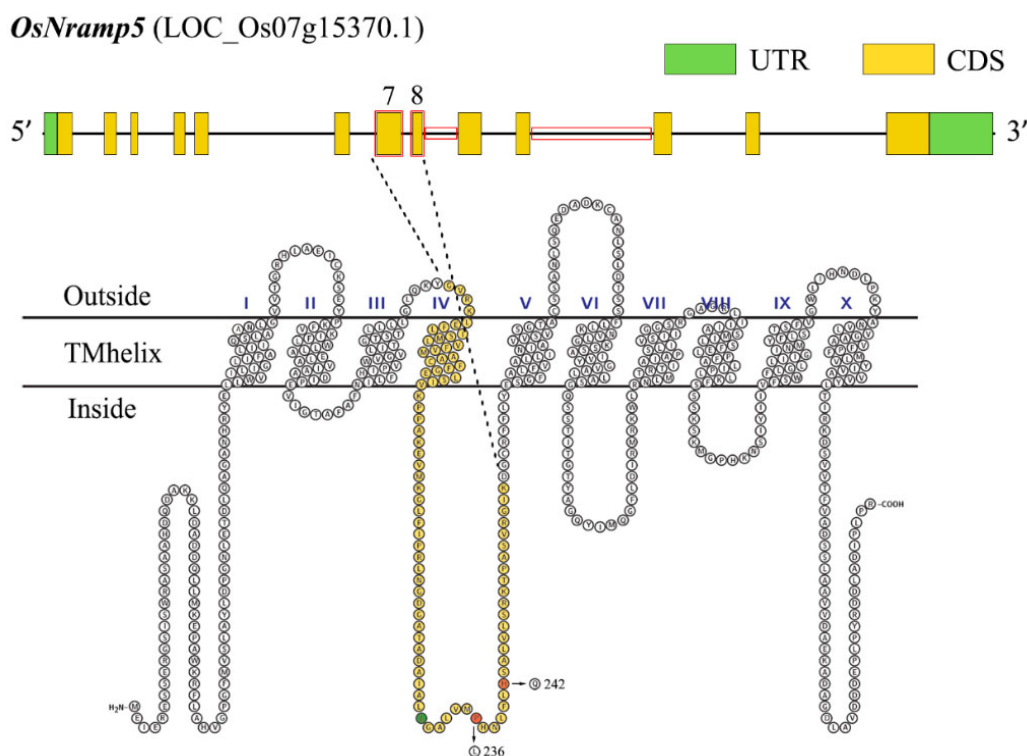
天然抗性相关巨噬细胞蛋白(NRAMP)家族成员作为膜蛋白与金属离子转运密切相关。NRAMP 家族基因在包括细菌、酵母、藻类、植物和动物在内的所有生物体进化中都比较保守^[22],大约具有 25%~35%的序列同源性^[23]。这种保守性说明选择压力使生物体中 NRAMP 家族基因实现了相同的功能,即跨细胞膜运输金属离子。NRAMP 蛋白家族作为一种二价金属转运体,参与多种金属离子的运输,如铁(Fe^{2+})、锰(Mn^{2+})和镉(Cd^{2+})离子^[24-25]。

科学家已在多种植物中鉴定到 NRAMP 家族基因^[26-29]。在水稻中共鉴定到 7 个,分别为 *OsNramp1*、*OsNramp2*、*OsNramp3*、*OsNramp4*、*OsNramp5*、*OsNramp6* 和 *OsNramp7* (表 1)。其中, *OsNramp1* 在质膜上充当 Cd 内流转运体,在 Cd 从根到茎的转运过程中起关键作用,主要在水稻根系中表达,且不受 Cd 诱导,但在缺 Fe 条件下表达高度上调^[30-31]。*OsNramp2* 定位于液泡膜,参与水稻 Fe 稳态,将 Fe 从液泡运输到细胞质中,在种子萌发过程中起着关键作用^[32]。*OsNramp3* 编码质膜定位蛋白,在维管束特别是韧皮部细胞中特异表达,是一种响应环境中 Mn 含量变化的 Mn 转运调节器,并参与了 Mn 从老叶到幼叶的再分配^[33, 34]。*OsNramp4* 编码一个定位于根细胞质膜的三价铝(Al)转运蛋白,参与 Al^{3+} 的转运^[35-36]。*OsNramp6* 定位于质膜,具有 Fe 和 Mn 转运蛋白的功能,且与水稻生长及抗病性相关^[37]。而 *OsNramp7* 可能与非生物胁迫及 Fe、Zn 转运相关^[38-39]。

日本冈山大学马建锋团队从水稻品种中花 11 中克隆了 *OSNRAMP5* 的全长 cDNA^[40],该基因具有 13 个外显子和 12 个内含子,编码区全长 6874 bp,其中 CDS 全长 1617 bp (图 1)。*OsNRAMP5* 编码蛋白定位在质膜上,分布于根外皮层和根内皮层的远端,是水稻根部细胞参与吸收二价金属阳离子的主要转运蛋白,参与外源 Cd^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Fe^{2+} 的吸收,也负责这些离子从根向地上部的运输^[41-43]。*OsNramp5* 是近年来水稻中发现的唯一一个具有高亲和能力的 Cd 吸收转运子,该基因的突变能极大地限制水稻对 Cd 的吸收^[40]。近年来,利用该基因突变阻断水稻根系细胞对土壤 Cd 的吸收来降低水稻 Cd 含量引起水稻遗传育种家的关注(表 2)。

表 1 水稻 NRAMP 蛋白家族基因
Table 1. NRAMP protein family genes in rice.

基因符号 Gene symbol	组织表达 Tissue expression	亚细胞定位 Subcellular localization	金属转运功能 Metal transport function	参考文献 Reference
<i>OsNramp1</i>	根、叶 Root, leaf	质膜 Plasma membrane	Cd	[30, 31]
<i>OsNramp2</i>	地上部 Aboveground part	液泡膜 Tonoplast	Fe	[32]
<i>OsNramp3</i>	维管束 Vascular bundle	质膜 Plasma membrane	Mn	[33, 34]
<i>OsNramp4</i>	根 Root	质膜 Plasma membrane	Al	[35, 36]
<i>OsNramp5</i>	根 Root	质膜 Plasma membrane	Cd, Mn, Fe	[40-43]
<i>OsNramp6</i>	不详 Unavailable	质膜 Plasma membrane	Fe, Mn	[37]
<i>OsNramp7</i>	根、茎、幼穗 Root, culm, young panicle	不详 Unavailable	Fe, Zn	[38, 39]



OsNramp5 蛋白根据预测具有 10 个跨膜结构, 第 7 及第 8 外显子编码的氨基酸序列在第 4 及第 5 跨膜结构域之间, 其中绿色和红色标注的氨基酸残基是在部分农艺性状无显著改变的突变体所携带的突变位点; 绿色指 *OsNramp5* 基因 1 bp 碱基插入导致在该位置后的氨基酸序列改变, 红色指 *OsNramp5* 基因单碱基突变导致该位置的氨基酸残基替换。

According to the prediction, *OsNramp5* protein has 10 transmembrane helices, and the amino acid sequence encoded by exon 7 and exon 8 is between transmembrane domain 4 and 5. The green and red labeled amino acid residues are mutant sites with no significant change in agronomic traits in some previous studies. Green means that the insertion of the 1 bp base of the *OsNramp5* gene leads to the change of the amino acid sequence after this position, and red means that the SNP mutation of the *OsNramp5* gene leads to the substitution of the amino acid residue at this position.

图 1 *OsNramp5* 基因结构及其编码蛋白跨膜结构模式图

Fig. 1. *OsNramp5* gene structure and transmembrane structure pattern of the protein.

2 *OsNramp5* 基因变异对水稻中 Cd 及其他金属离子含量的影响

水稻籽粒中 Cd 的积累主要经历 3 个过程: 根转运体从根际土壤吸收 Cd^{2+} 进入根细胞, 木质部装载介导 Cd^{2+} 从根转移到茎, Cd^{2+} 经过韧皮部从茎转运到籽粒^[44]。*OsNramp5* 在水稻对 Cd 的吸收和转运中都发挥着重要的作用。Sasaki 等^[40]针对粳稻品种中花 11 的 *OsNramp5* 第 12 内含子 T-DNA 插入突变体进行研究, 结果表明突变体的根部和地上部的 Mn、Cd 含量均显著低于野生型, Zn、Cu 含量差异不显著。将野生型及敲除系的幼苗在 25 °C 和 4 °C 下用不同浓度的 Cd 或 Mn 溶液处理 30 min, 测定根部对 Cd 和 Mn 的吸收, 结果显示突变体几乎丧失了吸收 Cd 和 Mn 的能力。Ishikawa 等^[41]在粳稻越光背景下利用碳离子束辐射诱变获得了 3 个水稻 *osnramp5* 突变体 (*osnramp5-1*、*osnramp5-2* 和

osnramp5-3) , 其中 *osnramp5-1* 为第 10 外显子 433 bp 插入, *osnramp5-2* 为第 9 外显子缺失 1 bp, *osnramp5-3* 为整个 *OsNramp5* 缺失。研究表明, 突变体编码的缺陷转运蛋白极大地降低了根系对 Cd 的吸收, 导致茎叶和籽粒中 Cd 的减少, 而 Fe、Zn、Cu 的含量没有显著差异。这三个突变体降低 Cd 吸收的同时也降低了对 Mn 的吸收, 这说明 Cd 可能是通过 Mn 的根系吸收途径被吸收, 但其他矿质营养元素的吸收没有受到影响。当在 Cd 污染的稻田中生长时, 突变体的籽粒中几乎检测不到 Cd, 并且没有表现出不利的农艺或经济性状。Yang 等^[43, 45]从水稻突变数据库 (RMD) 中获得了一个中花 11 *OsNramp5* 第 5 内含子 T-DNA 插入突变体 *osnramp5*, *OsNramp5* 完全不表达, 该突变体在根和地上部的 Cd 浓度显著降低, 且减少了 Mn 从根向地上部的运输, 导致地上部 Mn 无法累积。较高的 Mn 供应可以弥补突变体根系吸收能力的丧失, 但不能弥补 Mn 从根向地上部的转运。野生型对 Cd 的吸收与

表 2 *OsNramp5* 不同变异类型对水稻植株金属含量及农艺性状的影响

Table 2. Effects of different mutation types of *OsNramp5* on metal content and agronomic traits of rice.

变异位置 Mutation site	变异来源 Mutation method	遗传背景 Genetic background	变异类型 Mutation type	籽粒 Cd、Mn 含量 Contents of Cd and Mn in grains	其他金属含量 Other metal content	产量及其他性状 Yield and other traits	参考文献 Reference
第 1 外显子	CRISPR/Cas9 技术	南粳 46、淮稻 5 号	1 bp 插入	Cd、Mn 显著下降	对 Fe 无显著影响	产量、株高、每穗粒数、结实率均显著降低，穗数增加	[47]
			17 bp 插入	Cd、Mn 显著下降	对 Fe 无显著影响	产量、株高、每穗粒数、结实率均显著降低	[47]
			11 bp 插入	Cd、Mn 显著下降	对 Fe 无显著影响	产量、株高、每穗粒数、结实率均显著降低	[47]
		中花 11	4 bp 缺失	Cd、Mn 显著下降	—	生长严重受阻，根及地上部干质量显著降低	[57]
第 2 外显子	CRISPR/Cas9 技术	黄华占	1 bp 插入	Cd、Mn 显著下降	对 Fe、Zn 无显著影响	产量、每穗粒数、结实率、秸秆产量均显著降低，米质变劣，分蘖数增加	[20]
第 6 外显子	CRISPR/Cas9 技术	黄华占	2 bp 插入	Cd、Mn 显著下降	对 Fe、Zn 无显著影响	产量、每穗粒数、结实率、秸秆产量均显著降低，米质变劣	[20]
第 7 外显子	CRISPR/Cas9 技术	锡稻 1 号	1 bp 插入	Cd 显著下降	—	产量、其他性状无显著影响	[48]
	EMS 诱变	9311	SNP 变异	Cd 显著下降	对 Fe、Zn、Cu 无显著影响	其他性状无显著影响	[52]
第 8 外显子	EMS 诱变	Hitomebore	SNP 变异	Cd、Mn 显著下降	—	产量、其他性状无显著影响	[51]
第 9 外显子	碳离子束辐射诱变	越光	1 bp 缺失	Cd<0.05 mg/kg, Mn 显著下降	对 Fe、Zn、Cu 无显著影响	产量、其他性状无显著影响	[41]
	CRISPR/Cas9 技术	华占	3 bp 缺失+1 bp 插入	Cd<0.05 mg/kg, Mn 极显著下降	对 Cu、Zn 无显著影响，Fe 显著上升	产量、其他性状无显著影响	[46]
			5 bp 缺失	Cd<0.05 mg/kg, Mn 极显著下降	对 Cu、Zn 无显著影响，Fe 显著上升	产量、其他性状无显著影响	[46]
			锡稻 1 号	33 bp 缺失	Cd 显著下降	—	减产 44.3%，生长严重受阻，株高降低
		黄华占	1 bp 插入	均显著下降	对 Fe、Zn 无显著影响	产量、每穗粒数、结实率、秸秆生物量均显著降低	[20]
	中花 11	2 bp 缺失+1 bp 插入	—	—	产量、千粒重极显著降低，米质变劣	[58]	
中花 11	5 bp 缺失+1 bp 插入	—	—	产量、千粒重极显著降低，米质变劣	[58]		
第 10 外显子	碳离子束辐射诱变	越光	433 bp 插入	Cd<0.05 mg/kg, Mn 显著下降	对 Fe、Zn、Cu 无显著影响	产量、其他性状无显著影响	[41]
	CRISPR/Cas9 技术	华占、五丰 B、五山丝苗、中早 35	1-3 bp 缺失+1 bp 插入	Cd、Mn 显著下降	对 Fe、Zn、Cu、Ca、As、Se 无显著影响	减产 6.9%，株高、结实率、千粒重小幅降低，有效分蘖略微增加	[49]
第 5 内含子	T-DNA 插入	中花 11	大片段插入	—	对 K、Ca、Mg、Zn、Cu 无显著影响	生长受阻，叶片变黄	[43]
第 8 内含子	碳离子束辐射诱变	隆臻 36S、华恢 8612	18 bp 缺失	Cd、Mn 显著下降	—	产量、其他性状无显著影响	[63]
第 10 内含子	碳离子束辐射诱变	隆臻 36S、华恢 8612	3 bp 缺失	Cd、Mn 显著下降	—	产量、其他性状无显著影响	[63]
第 12 内含子	T-DNA 插入	中花 11	大片段插入	Cd、Mn 显著下降	对 Fe、Zn、Cu 无显著影响	减产 89%，生长受阻，叶片严重失绿	[40]
全基因缺失	碳离子束辐射诱变	越光	227 kb 缺失	Cd<0.05 mg/kg, Mn 显著下降	对 Fe、Zn 无显著影响，Cu 显著上升	产量显著降低，抽穗早，株型小，穗数多，但秸秆产量低	[41]
全基因缺失	⁶⁰ Co 辐射诱变	粤泰 B	408 kb 缺失	Cd 显著下降	—	—	[61-62]

“—”表示数据不详。

Mn 的施用量之间呈现显著的负相关, 而突变体 *osnramp5* 不存在这样的趋势。笔者认为水稻植株对 Mn 和 Cd 的吸收存在拮抗关系, 且该拮抗由 *OsNramp5* 介导。Tang 等^[46]利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术对籼稻华占和隆科 638S 的 *OsNramp5* 第 9 外显子进行基因敲除, 突变类型鉴定结果显示除 1 个突变体是跨越两个靶点的 225 bp DNA 片段缺失类型外, 其余均为短插入或短缺失(InDel)。水培试验表明 *osnramp5* 突变体的地上部和根部的 Cd 和 Mn 含量均显著低于野生型。在高 Cd 处理条件下, 野生型的生长受到严重抑制, 而突变体的生长未受影响。Cd 污染大田试验进一步表明, 基因敲除水稻籽粒中 Cd 含量始终低于 0.05 mg/kg, 远远低于 0.2 mg/kg 的国家标准, 为培育籽粒 Cd 低积累的籼稻品种提供了一条切实可行的途径。Yang 等^[47]选用两个粳稻品种南粳 46 和淮稻 5 号对 *OsNramp5* 进行基因编辑, 在 *OsNramp5* 的第 1 外显子上分别有 1 bp、17 bp 和 11 bp 的缺失, 得到 3 个移码突变的 *osnramp5* 突变体, 突变体剑叶和籽粒中的 Cd 含量显著降低。另外, 在有 Mn 条件下, 突变体的根和地上部的 Mn 浓度显著低于野生型, 并且两者的 Mn 浓度差异随着 Mn 供应量的增加而变大, 但改变外源 Mn 浓度对 Cd 的积累无明显影响。而低 Mn 供应时突变体的根中 Fe 含量增加。Liu 等^[48]利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除粳稻锡稻 1 号 *OsNramp5* 获得两个分别为第 7 外显子上插入 1 bp, 第 9 外显子上缺失 33 bp 的突变株系。Cd 污染田间试验及盆栽高 Cd 处理试验显示, 突变体均表现出较低的籽粒 Cd 含量 (<0.06 mg/kg)。Wang 等^[20]以籼稻品种黄华占作为受体材料进行 *OsNramp5* 基因敲除, 获得转基因植株 *LCH1*、*LCH2* 和 *LCH3*。其中 *LCH1* 为第 2 外显子上插入 T, 产生移码突变, 导致 *Nramp* 结构域完全缺失; *LCH2* 为第 6 外显子上插入 AA, 编码一个由 100 个氨基酸残基组成的 *Nramp* 结构域, *LCH3* 为第 9 外显子上插入 G, 编码一个有 202 个氨基酸残基的 *Nramp* 结构域。研究表明, 随着 *OsNramp5* 突变程度的降低, 其对绿色组织 Mn 积累的影响逐渐减弱, *OsNramp5* 的功能缺失可以降低籽粒中 Cd 和 Mn 的含量, Cd 和 Mn 的积累趋势一致。龙起樟等^[49]选取华占和五丰 B 以及五山丝苗和中早 35 为材料, 通过 CRISPR/Cas9 技术靶向 *OsNramp5* 第 10 外显子创制低 Cd 籼稻, 突变类型大多为缺失 1~3 bp 和插入 1 bp, 占所有突变的 66%。*OsNramp5* 被敲除后, 水稻籽粒中 Cd 含量大幅下降, Mn 含量减少一半左右, 而 Cr 含量

增加一半以上, Fe、Zn、Ca 和 Cu 等含量受影响较小或不受影响。胡黎明等^[50]针对 *OsNramp5* 第 1 内含子、第 2 外显子和香味基因 *OsBadh2* 第 3 外显子设计靶点进行基因编辑, 结果显示敲除 *OsNramp5* 基因可有效降低籽粒 Cd 的积累, 且大多数突变体 Mn 含量也显著降低, 而 Fe 含量会相应增高, 此法可快速创制具有 Cd 低积累和香味的水稻种质。有研究人员从 Hitomebore 的 EMS 诱变群体中分离到地上部及籽粒 Cd 水平较低的突变株系 1281-m, 分析 *OsNramp5* 基因组序列显示, 第 8 外显子的第 242 位氨基酸由组氨酸替换为谷氨酰胺, 突变体的农艺性状及产量与野生型无显著差异^[51]。Cao 等^[52]利用 EMS 诱变籼稻品种 9311 获得水稻植株和籽粒 Cd 积累量极低的突变体 *lcd1*。该突变体中 *OsNramp5* 第 7 外显子高度保守区的第 236 位氨基酸脯氨酸被亮氨酸替换。因此, 第 236—242 位氨基酸所在区域附近可能和 Cd 转运直接相关, 当 SNP 位点突变发生在该区域时, 水稻籽粒 Cd 含量显著降低且对其他农艺性状无明显影响(图 1)。另外, 突变位点发生在 *OsNramp5* 基因第 8 和第 10 内含子时, 突变体的产量及其他农艺性状也无显著变化^[63]。Tang 等^[53]发现, 对 *OsNramp5* 进行基因敲除有效地补充了突变体植株地上部缺乏的矿质营养, 从而间接地提高了水稻对高 Cd 胁迫的耐受性。也有研究人员发现 *OsNramp5* 的 RNAi 敲低突变体的根、地上部和木质部汁液中的 Mn 均显著低于野生型^[42, 54]。此外, 许多研究表明 *OsNramp5* 突变对水稻中 Fe、Zn、Cu 等金属元素含量几乎没有影响^[42-43, 46-47, 55]。

值得一提的是, 多数研究发现敲除 *OsNramp5* 后能降低水稻中的 Cd 含量, 而 Chang 等^[21]在 BG367 和中花 11 的背景下, 利用 *OsActin1* 和玉米 *Ubiquitin* 启动子驱动 *OsNramp5* 基因, 发现过表达株系在根尖和侧根原基积累了更多的 Cd, 但减少了其分配到地上部的比例, 显著降低了地上部的 Cd 含量, 籽粒中 Cd 含量比野生型降低了 49%~94%, 推测 *OsNramp5* 过表达植株是由于 Cd 向中柱的径向运输被破坏, 从而减少了 Cd 从根到地上部的转运。

3 *OsNramp5* 变异对水稻生长发育的影响

OsNramp5 是水稻根中 Cd 吸收与转运的蛋白, 同时也是 Mn 的转运蛋白。Mn 是植物必需的微量元素, 与许多酶的活性有关, 是多种酶的成分和活化剂, 能促进碳水化合物代谢和氮的代谢, 与作物生长发育和产量有关。Mn 与水稻的光合作用、

呼吸作用以及硝酸还原作用都有密切的关系。缺 Mn 时,水稻的光合作用明显受到抑制。Mn 能加速水稻萌发和成熟,增加磷(P)和钙(Ca)的有效性。许多研究表明,敲除 *OsNramp5* 不单单是降低 Cd 积累,也会降低水稻对 Mn 的吸收及转运,从而对植株生长发育产生影响。缺 Mn 的水稻叶片叶脉间断失绿,出现棕褐色小斑点,严重时斑点连成条状,扩大成斑块^[56]。在低 Mn 条件下, *OsNramp5* 敲除系地上部及根系的生长受到抑制,叶片出现严重的失绿症状,而随着 Mn 供应量的增加,苗期生长抑制表型被部分逆转,证明低 Mn 条件下 *OsNramp5* 基因敲除系生长受阻是由缺 Mn 引起的^[40, 43]。而在 Ishikawa 等^[41]的研究中,野生型和突变体 *lcd-kmt1* 及 *lcd-kmt2* 的植株生长几乎没有差异。但水培试验中,在 Mn 充足的情况下,可能是由于突变类型的不同导致其表型有差异, *lcd-kmt3* 的生长受到抑制,株型小,且抽穗时间明显早于野生型。Tang 等^[46]研究显示,突变体的地上部和根部 Cd 和 Mn 含量均显著低于野生型。在低 Mn 条件下,突变体表现出严重的生长发育迟缓和叶片变黄。然而,在 2 $\mu\text{mol/L}$ 或更高的 Mn 浓度下,突变体的生长与野生型类似。Yang 等^[47]发现在低 Mn 条件下,与野生型植株相比, *OsNramp5* 突变体除了根和地上部生长受到严重抑制外,还表现出叶绿素含量降低和黄化症状。而随着 Mn 浓度的增加,植株生长和叶绿素含量逐渐恢复。并且当 Mn 浓度达到 12.5 mol/L 时,缺陷生长和叶绿素缺乏表型在突变体中得到完全拯救。龙起樟等^[49]发现 *OsNramp5* 基因敲除材料的株高小幅度降低。Chang 等^[57]将 *OsNramp5* 与 *OsNramp1* 进行双基因敲除,在缺 Mn 处理中突变体发育迟缓甚至死亡。另有研究发现 *OsNramp5* 编码区不同位置的敲除对水稻植株生长可能产生不同影响。敲除位点在基因第 7 外显子的植株生长正常,而敲除位点在第 9 外显子的植株生长严重受抑、植株变矮^[48]。另外,随着 *OsNramp5* 突变程度的升高,对植株的生长情况影响也越大^[20]。值得注意的是,过表达 *OsNramp5* 则对水稻植株的生长发育几乎不产生影响^[21]。

4 *OsNramp5* 变异对水稻产量性状的影响

OsNramp5 基因变异可显著降低水稻籽粒 Cd 含量,但对水稻产量性状的影响也同样值得关注。到目前为止,不同研究的结果不尽相同。Sasaki 等^[40]发现敲除 *OsNramp5* 基因会导致产量严重下降,仅

为野生型的 11%。Ishikawa 等^[41]发现,当在 Cd 污染的稻田中生长时,突变体 *lcd-kmt1*、*lcd-kmt2* 与野生型的产量无显著差异,而突变体 *lcd-kmt3* 的产量低于野生型。Yang 等^[47]对两个粳稻品种进行 *OsNramp5* 基因敲除,突变体的株高、结实率和每穗粒数等农艺性状都有一定程度的降低,最终导致籽粒产量略有下降,突变体植株生长的减慢可以归因于 Mn 含量的显著减少。作者认为在评估 *osnramp5* 突变体的适用性时,需要考虑稻田的土壤 pH 和土壤含水量,因为它们可能会影响土壤中有有效 Mn 的水平,从而决定突变对粮食产量的影响。Tang 等^[46]利用华占基因敲除品系及其与隆科 638S 基因敲除品系配制获得的杂种评价了 *OsNramp5* 突变对农艺性状的影响,结果显示敲除 *OsNramp5* 不影响水稻产量。Liu 等^[48]研究中,敲除位点在 *OsNramp5* 基因第 7 外显子,植株正常生长且产量不受影响,而敲除位点在第 9 外显子时植株的产量显著降低,仅为野生型的 55.7%。在 Wang 等^[20]研究中,产量随着 *OsNramp5* 突变程度的降低而增加,但分蘖数降低。董家瑜等^[58]研究发现华占、中花 11 这 2 种不同遗传背景、同一位点突变的 *osnramp5* 突变株系即使在相同的种植条件下,产量表现也较野生型不同,说明遗传背景对 *osnramp5* 突变株系的环境适应性影响很大。在龙起樟等^[49]研究中, *OsNramp5* 敲除株系有效分蘖略微增加,结实率和千粒重小幅降低,产量平均减少 6.9%。说明对 *OsNramp5* 进行基因敲除可以显著降低籽粒 Cd 积累,但在某些种植条件下,代价为小幅产量损失。因此, *OsNramp5* 功能缺失突变体产量性状表现不一,表现为产量减少或不受影响的主要原因可归结于基因变异类型的不同,同时与遗传背景及种植条件也有一定关系。

5 *OsNramp5* 基因变异对水稻米质的影响

随着消费水平的提高,人们对稻米品质的要求也越来越高,安全、健康营养的稻米已成为最基本的需求。Cd 富集在水稻中会影响稻米的品质,经人体摄入后会影健康。有研究表明 *OsNramp5* 变异几乎对米质没什么影响,在该研究中突变体的垩白粒率和垩白度小幅下降,蛋白含量轻微增加,而且在一些品种中直链淀粉含量小幅下降,几乎不影响稻米的食味品质^[49]。Wang 等^[20]研究表明 *OsNramp5* 突变对籽粒中糙米率、精米率、直链淀粉含量、胶稠度和蛋白质含量没有显著影响。随着 *OsNramp5*

突变程度的增加,整精米率显著降低,垩白度和垩白粒率显著增加。通过改变 *OsNramp5* 的突变位点可以来缓解垩白度和垩白粒率等品质性状。董家瑜等^[58]研究表明在正常 Mn 浓度的大田条件下,以华占为背景的 *osnramp5* 突变体的稻米品质较野生型均无显著差异,但以中花 11 为背景的突变体的胶稠度降低;且开花期高温造成以中花 11 为背景的 *osnramp5* 突变体的垩白粒率和垩白度上升;在低 Mn 浓度大田条件下,2 种遗传背景的 *osnramp5* 突变体的垩白粒率和垩白度上升。在水稻中, *OsNramp5* 同时影响 Cd 和 Mn 的吸收和转运, *OsNramp5* 变异降低水稻植株中 Cd 积累量的同时,也会降低 Mn 的含量。研究结果显示,高 Mn 环境可以一定程度改善由 *OsNramp5* 变异导致的米质变劣问题^[58]。因此,在后续利用 *OsNramp5* 基因变异选育 Cd 低积累水稻品种及实际生产应用中,应当将土壤 Mn 含量纳入品种适用性的考虑范围。

6 展望

Cd 是对人体健康危害最大的有毒重金属之一,通过降低粮食作物中的 Cd 含量实现减少人体的 Cd 摄入,对于确保食品安全具有重要意义。近年来,稻米 Cd 污染问题越来越受到国内外科学家和育种工作者的重视。修复土壤 Cd 污染、优化栽培管理措施、培育 Cd 低积累的水稻品种等一系列降 Cd 措施被应用。其中培育 Cd 低积累水稻新品种又被认为是相对简单且有效的方法。

目前的研究表明,通过 *OsNramp5* 基因功能缺失和组成型过量表达 *OsHMA3*^[59]是培育 Cd 低积累水稻品种最有效的途径。尽管过表达 *OsHMA3* 基因能显著降低 Cd 含量,且对 Mn 无影响,利用这一措施降 Cd 本应该是最优的选择,但该途径涉及到转基因,短时间内无法生产应用。相较于 *OsNramp5* 突变体创制,通过非转基因的方式创制 *OsHMA3* 表达量升高的种质工作难度非常大。*OsNramp5* 基因功能缺失在显著降低 Cd 的同时也会影响 Mn 的吸收,在缺 Mn 的条件下会表现出不利的表型,限制了其在低 Mn 农田中的应用。但在我国南方一些地区 Cd、Mn 复合污染的情况下,利用 *OsNramp5* 基因功能缺失具有巨大的潜力。由于受我国转基因政策的限制,这些优异种质还不能用于生产。迄今只有 *lcd1* 突变体、珞红 3A、珞红 4A 及对应的保持系以及利用重离子诱变获得的莲 1S、R001 和韶香 100 等少数几个 Cd 低积累资源能被直接应用^[52, 59-63]。

目前利用 *lcd1* 突变体、珞红 3A、珞红 4A 转育的湘安早系列、安优系列、西子系列、DY 系列等低镉水稻品系已进入湖南省农业科学院组织开展的 Cd 低积累水稻品种自主区域试验,其中一些材料综合表现优异,成功进入续试;而莲 1S 和 R001 分别是通过诱变隆臻 36S 和华恢 8612 获得,其配组的低 Cd 杂交组合莲两优 1 号表现出非常高的产量潜力。一般情况下, *OsNramp5* 基因功能缺失水稻能够在中、重度 Cd 污染稻田中生产 Cd 含量达标的稻米,但其能够耐受 Cd 污染的浓度还没有一个明确范围,需进一步探索;同时, *OsNramp5* 基因功能缺失导致 Mn 含量降低,是否会影响水稻对病、虫、草害以及高温、低温等逆境的耐受还有待深入研究。

利用 *OsNramp5* 基因功能缺失培育低 Cd 水稻品种是解决“镉大米”问题极具潜力的途径。*OsNramp5* 基因功能缺失后稻米 Cd 含量稳定降低,但由于 Mn 含量的降低,可能会带来不良影响,因此,在低 Cd 水稻大面积推广前应该进行比较全面的评价。此外,由于水稻对 Mn 的需求是微量的,可以挖掘利用 *OsNramp5* 弱功能等位基因,降低 Cd 含量的同时保证一定的 Mn 含量,结合 *OsHMA3* 低镉等位基因的利用,实施多基因聚合育种,也是培育低 Cd 水稻品种值得尝试的途径。还可开发与低 Cd 基因紧密连锁的分子标记,将分子标记辅助育种与常规育种有机结合,可以加快 Cd 低积累水稻品种的培育,最终实现 Cd 污染农田的安全利用,为培育能稳定遗传且安全优质的低 Cd 水稻新品种奠定坚实基础。

参考文献:

- [1] Ye X X, Ma Y B, Sun B. Influence of soil type and genotype on Cd bioavailability and uptake by rice and implications for food safety[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2012, 24(9): 1647-1654.
- [2] Grant C A, Clarke J M, Duguid S, Chaney R L. Selection and breeding of plant cultivars to minimize cadmium accumulation[J]. *The Science of the Total Environment*, 2008, 390(2): 301-310.
- [3] Sui F Q, Chang J D, Tang Z, Liu W J, Huang X Y, Zhao F J. Nramp5 expression and functionality likely explain higher cadmium uptake in rice than in wheat and maize[J]. *Plant and Soil*, 2018, 433: 377-389.
- [4] Järup L, Akesson A. Current status of cadmium as an environmental health problem[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2009, 238(3): 201-208.
- [5] Rikans L E, Yamano T. Mechanisms of cadmium-mediated acute hepatotoxicity[J]. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2000, 14(2): 110-117.

- [6] Åkesson A, Barregard L, Bergdahl I A, Nordberg G F, Nordberg M, Skerfving S. Non-renal effects and the risk assessment of environmental cadmium exposure[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2014, 122(5): 431-438.
- [7] Li H, Luo N, Li Y W, Cai Q Y, Li H Y, Mo C H, Wong M H. Cadmium in rice: Transport mechanisms, influencing factors, and minimizing measures[J]. *Environmental Pollution*, 2017, 224: 622-630.
- [8] Jiang M, Jiang J, Li S, Li M, Tan Y Y, Song S Y, Shu Q Y, Huang J Z. Glutamate alleviates cadmium toxicity in rice via suppressing cadmium uptake and translocation[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 384: 121319.
- [9] Shan A, Kang K J, Xu H Z, Wu L, Lu M T, Lin Q, Pan M H, Wang G, He Z L, Yang X E. Cadmium accumulation in rice straws and derived biochars as affected by metal exposure, soil types and rice genotypes[J]. *International Journal of Phytoremediation*, 2021(1): 1-10.
- [10] Cattani I, Romani M, Boccelli R. Effect of cultivation practices on cadmium concentration in rice grain[J]. *Agronomy for Sustainable Development*, 2008, 28(2): 265-271.
- [11] Zhang Q, Li Z W, Huang B, Luo N L, Long L Z, Huang M, Zhai X Q, Zeng G M. Effect of land use pattern change from paddy soil to vegetable soil on the adsorption-desorption of cadmium by soil aggregates[J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2017, 24(3): 2734-2743.
- [12] Mortensen L H, Rønn R, Vestergård M. Bioaccumulation of cadmium in soil organisms: With focus on wood ash application[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 156: 452-462.
- [13] Yang Y, Li Y L, Wang M E, Chen W P, Dai Y T. Limestone dosage response of cadmium phytoavailability minimization in rice: A trade-off relationship between soil pH and amorphous manganese content[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 403: 123664.
- [14] Shao J F, Fujii-Kashino M, Yamaji N, Fukuoka S, Shen R F, Ma J F. Isolation and characterization of a rice line with high Cd accumulation for potential use in phytoremediation[J]. *Plant and Soil*, 2017, 410(1): 357-368.
- [15] Acosta J A, Abbaspour A, Martínez G R, Martínez-Martínez S, Zornoza R, Gabarrón M, Faz A. Phytoremediation of mine tailings with *Atriplex halimus* and organic/inorganic amendments: A five-year field case study[J]. *Chemosphere*, 2018, 204: 71-78.
- [16] 王林友, 竺朝娜, 王建军, 张礼霞, 金庆生, 石春海. 水稻镉、铅、砷低含量基因型的筛选[J]. *浙江农业学报*, 2012, 24(1): 133-138.
Wang L Y, Zhu C N, Wang J J, Zhang L X, Jin Q S, Shi C H. Screening for rice (*Oryza sativa* L.) genotypes with lower Cd, Pb and As contents[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2012, 24(1): 133-138. (in Chinese with English abstract)
- [17] 叶新新, 周艳丽, 孙波. 适于轻度Cd、As污染土壤种植的水稻品种筛选[J]. *农业环境科学学报*, 2012, 31(6): 1082-1088.
Ye X X, Zhou Y L, Sun B. Screening of suitable rice cultivars for the adaptation to lightly contaminated soil with Cd and As[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2012, 31(6): 1082-1088. (in Chinese with English abstract).
- [18] Tang G H, Xie H J, Zhu M D, Xiao Y, Fu H R, Ling C Q, Yu Y H. Preliminary study on rice varieties with low cadmium accumulation by mixed planting[J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2018, 4: 17-20.
- [19] Shao J F, Xia J, Yamaji N, Shen R F, Ma J F. Effective reduction of cadmium accumulation in rice grain by expressing *OsHMA3* under the control of the *OsHMA2* promoter[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(10): 2743-2752.
- [20] Wang T K, Li Y X, Fu Y F, Xie H J, Song S F, Qiu M D, Wen J, Chen M W, Chen G, Tian Y, Li C X, Yuan D Y, Wang J L, Li L. 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.
- [21] Chang J D, Huang S, Konishi N, Wang P, Chen J, Huang X Y, Ma J F, Zhao F J. Overexpression of the manganese/cadmium transporter *OsNRAMP5* reduces cadmium accumulation in rice grain[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2020, 71(18): 5705-5715.
- [22] Nevo Y, Nelson N. The NRAMP family of metal-ion transporters[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, 1763(7): 609-620.
- [23] Bozzi A T, Gaudet R. Molecular mechanism of NRAMP-family transition metal transport[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2021, 433(16): 166991.
- [24] Petre B, Major I, Rouhier N, Duplessis S. Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin-like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar[J]. *BMC Plant Biology*, 2011, 11(1): 33.
- [25] Nelson N. Metal ion transporters and homeostasis[J]. *The EMBO Journal*, 1999, 18(16): 4361-4371.
- [26] Mizuno T, Usui K, Horie K, Nosaka S, Mizuno N, Obata H. Cloning of three ZIP/Nramp transporter genes from a Ni hyperaccumulator plant *Thlaspi japonicum* and their Ni²⁺-transport abilities[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2005, 43(8): 793-801.
- [27] Oomen R J, Wu J, Lelièvre F, Blanchet S, Richaud P, Barbier-Brygoo H, Aarts M G, Thomine S. Functional characterization of NRAMP3 and NRAMP4 from the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*[J]. *The New Phytologist*, 2009, 181(3): 637-650.
- [28] Wei W, Chai T Y, Zhang Y X, Han L, Xu J, Guan Z Q. The *Thlaspi caerulescens* NRAMP homologue TcNRAMP3 is capable of divalent cation transport[J]. *Molecular Biotechnology*, 2009, 41(1): 15-21.
- [29] Xiao H H, Yin L P, Xu X F, Li T Z, Han Z H. The iron-regulated transporter, MbNRAMP1, isolated from

- Malus baccata* is involved in Fe, Mn and Cd trafficking[J]. *Annals of Botany*, 2008, 102(6): 881-889.
- [30] Ishikawa S, Abe T, Kuramata M, Yamaguchi M, Ando T, Yamamoto T, Yano M. A major quantitative trait locus for increasing cadmium-specific concentration in rice grain is located on the short arm of chromosome 7[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 61(3): 923-934.
- [31] Takahashi R, Ishimaru Y, Senoura T, Shimo H, Ishikawa S, Arao T, Nakanishi H, Nishizawa N K. The OsNRAMP1 iron transporter is involved in Cd accumulation in rice[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(14): 4843-4850.
- [32] Li Y, Li J J, Yu Y H, Dai X, Gong C Y, Gu D F, Xu E D, Liu Y H, Zou Y, Zhang P J, Chen X, Zhang W. The tonoplast-localized transporter OsNRAMP2 is involved in iron homeostasis and affects seed germination in rice[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2021, 72(13): 4839-4852.
- [33] Yamaji N, Sasaki A, Xia J X, Yokosho K, Ma J F. A node-based switch for preferential distribution of manganese in rice[J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 2442.
- [34] Yang M, Zhang W, Dong H X, Zhang Y Y, Lü K, Wang D J, Lian X M. OsNRAMP3 is a vascular bundle-specific manganese transporter that is responsible for manganese distribution in rice[J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(12): e83990.
- [35] Xia J, Yamaji N, Kasai T, Ma J F. Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(43): 18381-18385.
- [36] Li J Y, Liu J, Dong D, Jia X, McCouch S R, Kochian L V. Natural variation underlies alterations in Nramp aluminum transporter (NRAT1) expression and function that play a key role in rice aluminum tolerance[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(17): 6503-6508.
- [37] Peris-Peris C, Serra-Cardona A, Sánchez-Sanuy F, Campo S, Ariño J, San Segundo B. Two NRAMP6 isoforms function as iron and manganese transporters and contribute to disease resistance in rice[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2017, 30(5): 385-398.
- [38] 吴天昊, 李曜魁, 孙远涛, 董家瑜, 莫伊凡, 唐丽, 赵炳然. 水稻OsNRAMP7基因的克隆、表达及生物信息学分析[J]. 分子植物育种, 2021, 19(7): 2103-2110.
- Wu T H, Li Y K, Sun Y T, Dong J Y, Mo Y F, Tang L, Zhao B R. Cloning, expression and bioinformatical analysis of OsNRAMP7 gene in rice[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 19(7): 2103-2110. (in Chinese with English abstract).
- [39] Sperotto R A, Boff T, Duarte G L, Santos L S, Grusak M A, Fett J P. Identification of putative target genes to manipulate Fe and Zn concentrations in rice grains[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2010, 167(17): 1500-1506.
- [40] Sasaki A, Yamaji N, Yokosho K, Ma J F. Nramp5 is a major transporter responsible for manganese and cadmium uptake in rice[J]. *The Plant Cell*, 2012, 24(5): 2155-2167.
- [41] 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[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(47): 19166-19171.
- [42] Ishimaru Y, Bashir K, Nakanishi H, Nishizawa N K. OsNRAMP5, a major player for constitutive iron and manganese uptake in rice[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2012, 7(7): 763-766.
- [43] Yang M, Zhang Y Y, Zhang L J, Hu J T, Zhang X, Lu K, Dong H X, Wang D J, Zhao F J, Huang C F, Lian X M. OsNRAMP5 contributes to manganese translocation and distribution in rice shoots[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(17): 4849-4961.
- [44] Uruguchi S, Fujiwara T. Cadmium transport and tolerance in rice: Perspectives for reducing grain cadmium accumulation[J]. *Rice*, 2012, 5(1): 5.
- [45] 杨猛. 水稻NRAMP家族基因在Mn和Cd转运中的功能研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- Yang M. Functional Analysis of Rice NRAMP Genes in Mn and Cd Transport[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014. (in Chinese with English abstract).
- [46] Tang L, Mao B G, Li Y K, Lü 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[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 14438.
- [47] 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: 688-697.
- [48] Liu S M, Jiang J, Liu Y, Meng J, Xu S L, Tan Y Y, Li Y F, Shu Q Y, Huang J Z. Characterization and evaluation of *OsLCT1* and *OsNramp5* mutants generated through CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis for breeding low Cd rice[J]. *Rice Science*, 2019, 26(2): 88-97.
- [49] 龙起樟, 黄永兰, 唐秀英, 王会民, 芦明, 袁林峰, 万建林. 利用CRISPR/Cas9敲除*OsNramp5*基因创制低镉籼稻[J]. 中国水稻科学, 2019, 33(5): 407-420.
- Long Q Z, Huang Y L, Tang X Y, Wang H M, Lu M, Yuan L F, Wan J L. Creation of Low-Cd-accumulating indica rice by disruption of *OsNramp5* gene via CRISPR/Cas9[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2019, 33(5): 407-420. (in Chinese with English abstract).
- [50] 胡黎明, 彭彦, 郑文杰, 周凯, 毛慧, 唐丽, 毛毕刚. 利用CRISPR/Cas9技术创制低镉积累香型水稻[J]. 杂交水稻, 2021, 36(6): 77-83.
- Hu L M, Peng Y, Zheng W J, Zhou K, Mao H, Tang L, Mao B G. Using CRISPR/Cas9 technology to create low

- cadmium accumulation and aromatic rice[J]. *Hybrid Rice*, 2021, 36(6): 77-83. (in Chinese with English abstract)
- [51] Tanaka N, Nishida S, Kamiya T, Fujiwara T. Large-scale profiling of brown rice ionome in an ethyl methanesulphonate-mutagenized hitomebore population and identification of high- and low-cadmium lines[J]. *Plant and Soil*, 2016, 407(1): 109-117.
- [52] Cao Z Z, Lin X Y, Yang Y J, Guan M Y, Xu P, Chen M X. 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): 250.
- [53] Tang L, Dong J, Qu M, Lü Q, Zhang L, Peng C, Hu Y, Li Y, Ji Z, Mao B, Peng Y, Shao Y, Zhao B. Knockout of *OsNRAMP5* enhances rice tolerance to cadmium toxicity in response to varying external cadmium concentrations via distinct mechanisms[J]. *The Science of the Total Environment*, 2022, 832: 155006.
- [54] Ishimaru Y, Takahashi R, Bashir K, Shimo H, Senoura T, Sugimoto K, Ono K, Yano M, Ishikawa S, Arai T, Nakanishi H, Nishizawa N K. Characterizing the role of rice NRAMP5 in manganese, iron and cadmium transport[J]. *Scientific Reports*, 2012, 2: 286.
- [55] 刘松梅. 水稻镉运输基因*OsLCT1*和*OsNramp5*的特征与突变分析[D]. 杭州: 浙江大学, 2019.
- Liu S H. Characterization and mutational analysis of cadmium transport genes *OsLCT1* and *OsNramp5* in rice[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019. (in Chinese with English abstract)
- [56] Tsunemitsu Y, Yamaji N, Ma J F, Kato S I, Iwasaki K, Ueno D. Rice reduces Mn uptake in response to Mn stress[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2018, 13(1): 2476-2491.
- [57] Chang J D, Huang S, Yamaji N, Zhang W W, Ma J F, Zhao F J. OsNRAMP1 transporter contributes to cadmium and manganese uptake in rice[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2020, 43(10): 2476-2491.
- [58] 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状的影响[J]. 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[J]. *Hybrid Rice*, 2021, 36(2): 79-88. (in Chinese with English abstract)
- [59] Sasaki A, Yamaji N, Ma J F. Overexpression of *OsHMA3* enhances Cd tolerance and expression of Zn transporter genes in rice[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(20): 6013-6021.
- [60] Lu C, Zhang L X, Tang Z, Huang X Y, Ma J F, Zhao F J. Producing cadmium-free Indica rice by overexpressing *OsHMA3*[J]. *Environment International*, 2019, 126: 619-626.
- [61] Lü Q M, Li W G, Sun Z Z, Ouyang N, Jing X, He Q, Wu J, Zheng J K, Zheng J T, Tang S Q, Zhu R S, Tian Y, Duan M J, Tan Y N, Yu D, Sheng X B, Sun X W, Jia G F, Gao H Z, Zeng Q, Li Y F, Tang L, Xu Q S, Zhao B R, Huang Z Y, Lu H F, Li N, Zhao J, Zhu L H, Li D, Yuan L P, Yuan D Y. Resequencing of 1,143 indica rice accessions reveals important genetic variations and different heterosis patterns[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 4778.
- [62] 王天抗, 李懿星, 宋书锋, 傅岳峰, 余应弘, 柏连阳, 李莉. 水稻籽粒镉低积累资源挖掘及其新材料创制[J]. 杂交水稻, 2021, 36(1): 68-74.
- Wang T K, Li Y X, Song S F, Fu Y F, Yu Y H, Bai L Y, Li L. Excavation of rice resources with low cadmium accumulation in grains and development of new materials[J]. *Hybrid Rice*, 2021, 36(1): 68-74. (in Chinese with English abstract)
- [63] 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. M_1TDS技术及镉低积累杂交水稻亲本创制与组合选育[J]. 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. M_1TDS technology and creation of low-cadmium accumulation parents for hybrid rice breeding[J]. *Hybrid Rice*, 2022, 37(1): 1-11. (in Chinese with English abstract)