

利用CRISPR/Cas9技术敲除*OsNramp5* 创制镉低积累水稻新种质

胡彬华¹, 蒲志刚¹, 何志渊¹, 王平¹, 白玉路¹, 李赓霓², 张涛², 蒋开锋², 杨莉²
(¹四川省农业科学院生物技术核技术研究所, 成都610066; ²四川省农业科学院水稻高粱研究所(四川省农业科学院德阳分院), 德阳618000)

摘要: 大米镉超标问题严重威胁人体健康。水稻镉吸收转运基因*OsNramp5*的功能缺失可有效降低镉在稻米中的积累。为了快速创制镉低积累的水稻新种质, 本研究利用CRISPR/Cas9基因编辑技术敲除三系杂交稻优质抗病恢系川恢491(R491)中的镉吸收转运基因*OsNramp5*, 获得了多种不同突变方式的编辑植株, 并筛选出单靶点突变无转基因成份的两种纯合突变株系(KO1和KO2)。在镉污染土壤中种植并测定野生型和敲除植株糙米的镉含量, 结果显示, 相比于野生型R491, 敲除株系KO1和KO2糙米中的镉含量显著下降, 均降低约90%左右。农艺性状调查结果发现, 相比野生型R491, KO1突变株系的农艺性状没有显著差异, 但KO2突变株系的株高、结实率和千粒重显著降低。因此, 利用CRISPR/Cas9基因编辑技术敲除镉吸收转运基因*OsNramp5*可快速创制镉低积累的水稻新种质, 本研究创制的新种质为加速培育可在镉污染区种植的安全水稻品种提供了新的遗传资源。

关键词: 水稻; 镉; *OsNramp5*; CRISPR/Cas9; 育种

Generating Low Cadmium Accumulation New Rice Germplasms by Editing *OsNramp5* using CRISPR/Cas9 Technology

HU Binhua¹, PU Zhigang¹, HE Zhiyuan¹, WANG Ping¹, BAI Yulu¹, LI Gengmi², ZHANG Tao²,
JIANG Kaifeng², YANG Li²

(¹Biotechnology and Nuclear Technology Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066;

²Rice and Sorghum Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences (Deyang Branch of Sichuan Academy of Agricultural Sciences), Deyang 618000)

Abstract: The problem of excessive cadmium in rice grains seriously threatens human health. Disrupting the function of the cadmium transport gene *OsNramp5* in rice can effectively reduce cadmium accumulation in rice. To rapidly create new rice germplasm with low cadmium accumulation, this study used CRISPR/Cas9 gene editing technology to knock out the cadmium transport gene *OsNramp5* in the high-quality disease-resistant restorer line Chuanhui491 (R491) of three-line hybrid rice. Various edited plants with different mutations were obtained, and two homozygous mutant lines (KO1 and KO2) with single-target mutations without transgenic elements were selected. Compared with wild-type R491, the cadmium content of brown rice in knockout lines KO1 and KO2 were significantly reduced by about 90% when planted in cadmium-polluted soil fields. Agronomic trait investigation revealed no significant difference between the KO1 plants and wild-type R491, whereas the plant height, seed setting rate, and 1000-grain weight of KO2 mutant lines were significantly reduced. Therefore, knocking out the cadmium transporter gene *OsNramp5* by CRISPR/Cas9 gene editing technology can

收稿日期: 2023-11-23 网络出版日期: 2024-05-09

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20231123002>

第一作者研究方向为水稻分子育种, E-mail: binhuahu515@163.com

通信作者: 杨莉, 研究方向为水稻遗传育种, E-mail: yangli732@126.com

蒲志刚, 研究方向为水稻遗传育种, E-mail: zhigangpu@126.com

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(32001531); 四川省财政“1+3”项目(2021ZYGG); 四川省科技计划项目(2021YFYZ0016, 2021YFYZ0027)

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China Young Scientists Fund (32001531); Sichuan Provincial Financial “1+3” Project (2021ZYGG); Sichuan Science and Technology Program (2021YFYZ0016, 2021YFYZ0027)

quickly create new rice germplasm with low cadmium accumulation. The new germplasm created in this study provides novel genetic resources for accelerating the breeding of safe rice varieties that can be planted in the cadmium-polluted field.

Key words: rice; cadmium; *OsNramp5*; CRISPR/Cas9; breeding

水稻是我国重要的口粮作物,约60%的人口以稻米为主食。镉是一种具有高度毒性的重金属元素,而水稻是一种容易富集镉的作物,在中、重度镉污染的农田中种植水稻会导致稻米中镉含量超标而形成“镉大米”^[1]。“镉大米”不仅会引发“痛痛病”、肾衰竭、慢性肾病等疾病严重危害人体健康^[2-3],同时影响国家粮食安全。因此,在镉污染土壤中生产出安全可食用的稻米,对水稻产业的发展和保障粮食安全具有重要的意义。通过对重金属土壤进行修复及在镉污染稻田开展栽培配套技术,虽然能在一定程度上缓解稻米镉超标问题^[4],但通过培育低镉积累的水稻品种是解决大米镉超标最简单、经济和有效的方式。

水稻中镉吸收转运相关基因的发掘和克隆,为镉低积累水稻材料的遗传改良和新品种培育奠定了理论基础^[5]。近年来,研究发现水稻中镉吸收转运相关的基因主要有 *OsNramp5*^[6-8]、*OsNramp1*^[9-10]、*OsHMA2*^[11-12]、*OsHMA3*^[13-14]、*LCD*^[15] 和 *OsLCT1*^[16]。其中,*OsNramp5* 编码自然抗性相关巨噬细胞蛋白,是镉、锰和铁等离子从水稻根部进入体内的主要转运蛋白,控制从根部向地上部的运输,该基因的功能缺失可以显著降低水稻茎和籽粒中锰和镉的含量,籽粒中镉的降低幅度高达90%^[6-7]。*OsNramp1* 也是编码天然抗性相关巨噬细胞蛋白的基因,主要在水稻根和叶中表达,参与镉在水稻中柱和木质部装载,敲除该基因也会显著减少水稻根系对镉和锰的吸收,从而降低水稻地上部和籽粒中镉和锰的含量,但其对镉和锰吸收的影响小于 *OsNramp5*^[17]。*OsHMA2* 是编码重金属 ATP 酶的基因,主要在水稻根部表达,其编码的蛋白定位在细胞质膜上,能把镉和锰从水稻的根转运到植株体内,在水稻中过表达 *OsHMA2* 可降低稻米中近一半的镉含量^[11-12]。*OsHMA3* 也是编码重金属 ATP 酶家族成员的基因,主要在根部表达,编码的蛋白定位在根部液泡膜上,调控镉在根细胞液泡中的转运;过表达该基因能显著减少镉在水稻茎秆和籽粒中的积累,而敲除该基因能提高镉从根到茎的转运速率,导致镉在水稻茎秆和籽粒中的积累增加^[14]。低镉基因 *LCD* 编码的蛋白定位于细胞质和细胞核内,主要在根和叶

片中表达,敲除该基因可以显著降低水稻籽粒中43%~55%的镉含量^[15]。*OsLCT1* 是粳稻中特有的基因,编码低亲和阳离子转运蛋白,定位于质膜,该基因的功能缺失可使籽粒镉含量降低50%左右,但不影响植株的生长和农艺性状^[16]。

OsNramp5 是编码天然抗性相关巨噬细胞蛋白的基因,直接调控镉的吸收转运,该基因的功能缺失可显著降低稻米中镉的含量。因此,本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在三系杂交稻恢复系川恢491(R491)中敲除 *OsNramp5* 基因,成功创制了多个不同突变方式的水稻新材料,并从中筛选出两个不含转基因成分的突变株系在镉中度污染稻田种植,测定其糙米中的镉含量,并调查主要农艺性状。本研究可为镉低积累水稻新种质的快速创制和遗传改良以及杂交稻新品种的培育提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

遗传转化受体材料川恢491(R491)是四川农业科学院生物技术核技术研究所选育的三系杂交水稻优质抗病恢复系,具有穗粒数多,配合力好,结实率高等特点。遗传转化所获得的 T₀ 转基因材料种植于温室,R491 和编辑后代中无转基因成分的植株于2023年种植在四川省农业科学院试验基地,按随机区组设计,每份材料重复种植3个小区,每个小区种4行,每行10株,株行距16 cm×25 cm,常规水肥管理。

1.2 靶位点的设计及 CRISPR/Cas9 载体的构建

利用华南农业大学刘耀光院士团队开发的 CRISPR/Cas9 敲除系统,在 CRISPR-GE 网站(<http://skl.scau.edu.cn/targetdesign/>)进行靶位点设计,在 *OsNramp5* 基因第11和12外显子上选取2个特异性的 sgRNA 靶位点 SG1 和 SG2,分别用 OsU6a 和 OsU6b 启动子驱动,引物序列见表1。具体参照 Ma 等^[18]的方法,利用 Golden Gate 系统将 OsU6a 和 OsU6b 启动子分别与两个 sgRNA 表达框进行串联;通过巢式 PCR 反应在 OsU6a-SG1 和 OsU6b-SG2 上下游分别加上 *Bsa* I 限制性酶切位点,带有不同序列的 *Bsa* I 酶切位点的 OsU6a-SG1 和 OsU6b-SG2 片

段、 T_4 连接酶、*Bsa* I 内切酶和载体骨架 pYLCRISPR/Cas9-Pubi-H 按照一定浓度的体积比加入 200 μ L 的 EP 管中, 反应条件为: 37 $^{\circ}$ C 5 min, 20 $^{\circ}$ C 5 min, 5 个循环; 取 10 μ L 连接体系转入大肠杆菌感受态 DH5 α , 挑取单克隆提取质粒, 将构建好的多基因敲

除表达载体 PYLCRISPR/Cas9-P_{ubi}-H/OsU6a-SG1/OsU6b-SG2 质粒送北京擎科生物成都分公司用 SP-L1 和 SP-R 引物(表 1)进行测序鉴定, 将测序正确的终载体质粒 PYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H-*OsNramp5* (图 1B) 转入农杆菌 EHA105 用于遗传转化实验。

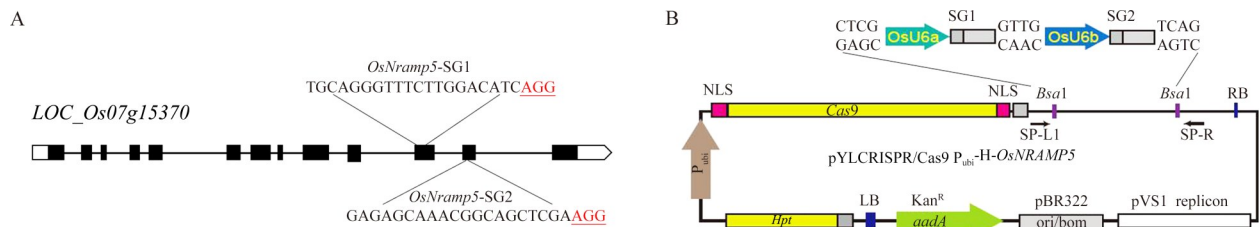
表 1 用于本研究的引物序列

Table 1 Primer sequence for this study

引物 Primer	正向序列(5'-3') Forward sequence (5'-3')	反向序列(5'-3') Reverse sequence (5'-3')	用途 Application
SG1	gccgTGCAGGGTTTCTTGACATC	aaacGATGTCCAAGAAACCCTGCA	敲除载体构建
SG2	gttgAGAGCAAACGGCAGCTCGA	aaacTCGAGCTGCCGTTTGTCT	
SP-L1	GCGGTGTCATCTATGTTACTAG		CRISPR/Cas 9 载体测序
SP-R	CGACATAGATGCAATAACTTCG		
KO-D1	TGACCGTTTCGTCTTATGC	AAGCGATGATGATGAGGC	突变位点测序分析
KO-D2	TGCACATGCCCAAACAGT	CAGGGTGAAGGACCAGCT	
Hpt	TACACAGGCCATCGGTCCAGA	TAGGAGGGCGTGATATGTC	转基因元件检测
Cas9	CACCATCTACCACCTGAGAA	CGAAGTTGCTCTTGAAGTTG	

序列中小写字母: *Bsa* I 限制性酶切位点

The lowercase letters in the sequence: *Bsa* I restriction enzyme site



A: *OsNramp5* 基因结构及靶点 SG1 和 SG2 所在位置; 非编码区、外显子和内含子分别用白色框、黑色框、黑线代表; 黑色大写字母和下划线标记的红色大写字母分别代表敲除的靶序列和 PAM 序列 (AGG); B: 2 个靶点 gRNA 表达盒连接在 pYLCRISPR/Cas9 上组成的表达载体; NLS: 核定位信号, Hpt: 潮霉素筛选标记, Kan^R: 卡纳霉素抗性, LB 和 RB 分别为二元载体的左边界和右边界, ori (pBR322): pBR322 二元载体的复制起始点, pVS1 replicon: 假单胞菌质粒 pVS1 的复制子

A: *OsNramp5* gene structure and two targets SG1 and SG2 location; Non-coding regions, exons, and introns are represented by white boxes, black boxes, and black lines, respectively; The target site sequences are shown in black uppercase letters and the protospacer adjacent motif (PAM) sequences (AGG) are indicated in red and are underlined; B: Two target gRNA expression cassettes ligated on pYLCRISPR/Cas9 to form an expression vector; NLS: Nuclear localization signal, HPT: Hygromycin selection marker, Kan^R: Kanamycin resistance, LB and RB are the left and right borders of the binary vector, respectively, Ori (pBR322): Origin of replication from the BR322 binary vector, pVS1 replicon: The replicon from the Pseudomonas plasmid pVS1

图 1 *OsNramp5* gRNA 靶位点及敲除表达载体示意图

Fig.1 Schematic diagram of *OsNramp5* gRNA target sites and knock-out expression vector

1.3 水稻遗传转化

将构建好的多基因敲除载体通过农杆菌介导的愈伤组织遗传转化法导入籼稻恢复系 R491, 用含潮霉素的筛选培养基筛选, 并通过潮霉素特异引物 Hpt 检测获得阳性转化植株。

1.4 转基因阳性植株突变位点检测与无转基因成分植株筛选

采用 CTAB 法提取 T_0 代水稻叶片 DNA, 用潮霉素 Hpt 特异引物对转基因植株进行 PCR 扩增检测, 利用包含 *OsNramp5* 靶点 1 的检测引物 KO-D1 和靶

点 2 检测引物 KO-D2 对所有 T_0 代阳性植株进行扩增测序, PCR 产物送至北京擎科生物成都分公司进行测序, 通过序列比对分析并根据测序峰图确定敲除植株的突变方式。对纯合突变的 T_0 代植株进行种植, 在 T_1 代提取单株叶片 DNA, 用潮霉素引物 Hpt 和特异引物 Cas9 检测转基因元件, 挑选不含转基因成分的敲除纯合植株进行后续研究。检测所用 PCR 体系为 20 μ L: DNA 1 μ L, 正反向引物各 1 μ L (10 μ mol/L), PCR mix 10 μ L, ddH₂O 7 μ L; 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 50~65 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C

45 s, 30个循环; 72 °C 5 min。PCR产物用1%的琼脂糖凝胶电泳检测。所用引物见表1。

1.5 重金属镉含量的测定

糙米以及土壤中的重金属镉含量测定采用金属电感耦合等离子质谱法(赛默飞 ICP-MS)进行。野生型和两个敲除株系分别3个样品,共9个样品粉碎后过100目筛网,称取固体样品各0.2~0.3 g(精确至0.0001 g)于微波消解罐中,加入5 mL硝酸过夜,旋紧罐盖,按照微波消解仪标准操作步骤进行消解。冷却后取出,缓慢打开罐盖排气,用少量水冲洗内盖,将消解罐放在恒温电热板上,于100 °C加热30 min,定容体积50 mL,混匀备用,同时做空白试验;打开ICP-MS机器预热1 h,将消解好的待测液和空白溶液分别注入电感耦合等离子体质谱仪中,然后由机器读出相应的含量浓度,计算出每个样品中镉含量,取平均值作为测定结果。

1.6 农艺性状测定

在水稻成熟后测定野生型和敲除突变体的株高、有效穗数、穗长、穗粒数、结实率、粒长、粒宽和千粒重等主要农艺性状,其中株高和穗长分别用塔尺(3 m)和钢尺(300 mm)测量;穗粒数、结实率、粒

长、粒宽和千粒重等性状用四川杰莱美科技有限公司自动考种分析仪(Mini 1600)进行考种分析。每个性状调查10个单株,并采用 t -检验法分析突变体与野生型之间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 转化植株 T_0 代突变情况检测

构建好的 $OsNramp5$ 敲除表达载体PYLCRISPR/Cas9P_{ubi}-H- $OsNramp5$ 通过农杆菌介导的遗传转化法导入籼稻优质恢系R491愈伤组织,转化后共获得24株 T_0 代转化苗。分别用引物F1/R1和F2/R2扩增包含两个靶位点的DNA片段,根据PCR测序结果比对分析发现,共23个株系发生突变,编辑突变效率95.8%。编辑靶点1发现有T/C插入以及不同长度片段缺失的突变;编辑靶点2发现有A/T插入以及不同长度片段缺失的突变(图2);其中,两个靶点的编辑效率分别为83.3%和75.0%,靶点1和靶点2同时编辑的效率为66.7%。进一步比对分析敲除突变后的氨基酸序列,发现这几种突变方式均导致 $OsNramp5$ 编码的氨基酸移码后发生突变而失去功能。

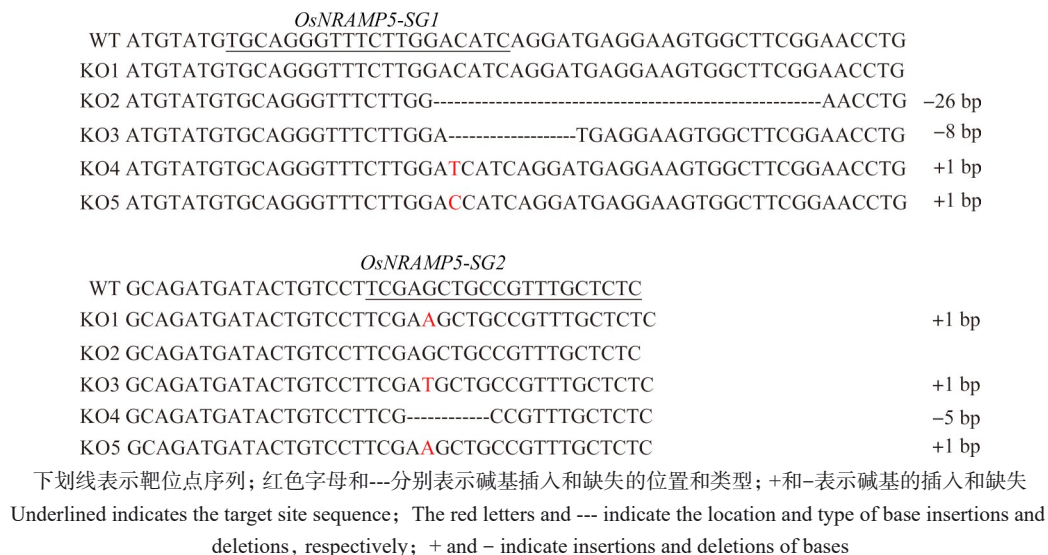


图2 $OsNramp5$ 编辑植株部分测序结果

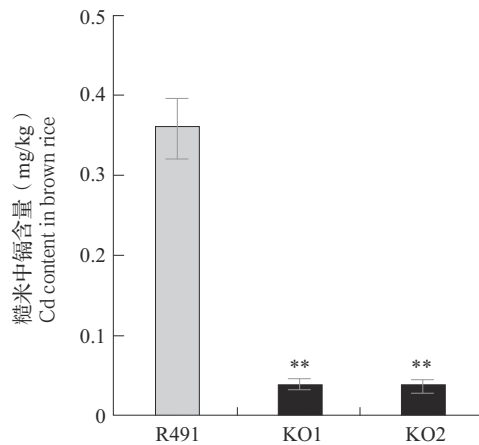
Fig.2 Partial sequencing results of $OsNramp5$ genome editing T_0 plants

2.2 敲除突变体稻米中重金属镉含量测定

为了明确 $OsNramp5$ 基因敲除后对水稻籽粒中镉含量的影响,根据 T_0 代测序结果,利用潮霉素和Cas9标记对 T_1 代单株进行转基因成分的筛选和测序鉴定,从 T_2 代植株中筛选出不含转基因成分的两个单靶点纯合突变株系(KO1和KO2),其中,KO1突变株系在第12外显子上插入了1个A碱基,KO2

突变株系在第11外显子上缺失了26 bp。KO1和KO2突变株系与野生型同时种植在镉污染的试验田(土壤镉含量为0.86 mg/kg, pH为5.8)。水稻成熟后收获野生型和敲除突变的种子,将糙米磨成米粉后测定镉的含量,结果发现,与野生型R491相比,在镉污染土壤中KO1和KO2两个突变株系糙米中镉含量低于0.038 mg/kg,较野生型糙米中0.37 mg/kg

的镉含量相比,两个敲除突变株系糙米中镉含量显著降低(降低约90%)(图3)。



** : 在 0.01 水平上差异显著,下同

** : Significant different at 0.01, the same as below

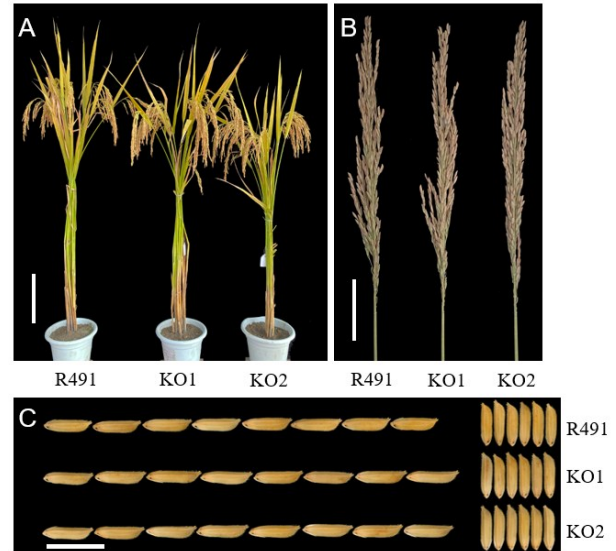
图3 野生型和突变体植株糙米中镉含量比较

Fig.3 Comparison of cadmium content in brown rice of WT and KO mutants

2.3 敲除突变体后代的农艺性状调查

为了探究 *OsNramp5* 基因不同靶位点突变后是否影响农艺性状,将 T_2 代中选择两种单靶点突变中不含转基因成分的纯合稳定突变株系 KO1 和 KO2 进行大田种植,成熟后进行田间农艺性状考查。结果显示,与受体野生型亲本 R491 相比,KO1 突变株

系的农艺性状无显著差异(图4和表2);KO2 突变株系的农艺性状中除株高、结实率和千粒重显著变化外,有效穗数、穗长、穗粒数、粒长和粒宽等指标无显著差异(图4和表2)



A~C: 分别为野生型和敲除突变体成熟期的植株形态(标尺=20 cm)、穗长(标尺=5 cm)和粒型(标尺=1 cm)比较

A-C: Comparison of plant morphology (Bar=20 cm), panicle length (Bar=5 cm), and grain shape (Bar=1 cm) at maturity between wild-type R491 and the two knockout mutant lines, respectively

图4 *OsNramp5* 敲除突变体植株表型

Fig. 4 The phenotypes of *OsNramp5* knockout plants

表2 野生型 R491 和 *OsNramp5* 敲除突变体的主要农艺性状比较

Table 2 Comparison of the major agronomic traits of wild-type R491 and the two knockout lines

株系 Line	株高 (cm) Plant height	有效穗数 Number of effective panicles	穗长 (cm) Panicle length	穗粒数 Grain number per panicle	结实率 (%) Seed setting rate	粒长 (mm) Grain length	粒宽 (mm) Grain width	千粒重 (g) 1000-grain weight
R491	123.9±1.8	10.80±1.50	24.60±2.10	162.53±16.62	93.46±2.55	8.65±0.12	2.71±0.02	23.15±0.35
KO1	122.8±2.2	11.68±1.32	24.30±2.30	172.45±9.64	92.57±2.95	8.78±0.16	2.70±0.03	22.86±0.46
KO2	114.2±2.7**	11.32±1.70	24.70±1.80	164.45±13.09	91.17±1.85*	8.73±0.18	2.68±0.02	21.92±0.43**

* : 在 0.05 水平上差异显著

* : Significant difference at 0.05 level

2.4 敲除靶点脱靶效应分析

由于 KO1 和 KO2 敲除株系的农艺性状差异较大,为了确认 KO2 突变体的农艺性状差异是否由脱靶引起其他基因突变所致,用在线脱靶效应分析网站 offTarget (scau.edu.cn)对 SG1 和 SG2 靶点进行了脱靶效应预测分析。预测结果显示 SG1 靶点有 13 个位点可能存在脱靶,但脱靶概率小于 0.09,其中在 *LOC_Os01g55090* 和 *LOC_Os08g04890* 基因上的 CDS 区可能存在脱靶的概率分别为 0.018 和 0.05(表 3)。而 SG2 靶点有 17 个位点可能存在脱靶,有 8 个

位于编码基因的 CDS 区,其中脱靶概率最高的是 *LOC_Os07g15460* 基因(脱靶率为 0.336),其余基因脱靶的概率低于 0.036(表 3)。因此,对位于 SG2 靶点中脱靶率最高的 *LOC_Os07g15460* 基因的潜在脱靶区分别在 KO1 和 KO2 敲除株系中进行了测序比对分析,测序结果发现,与野生型相比,KO1 和 KO2 植株中的潜在脱靶基因 *LOC_Os07g15460* 的序列没有发生改变(图 5),说明 KO1 和 KO2 敲除株系的农艺性状差异是由不同靶点突变导致。

表3 *OsNramp5* 基因两个敲除靶点的脱靶效应分析Table 3 Analysis of off-target effects of two knockout targets of the *OsNramp5* gene

染色体 Chr.	位置(bp) Position	序列 Sequence	脱靶率 Off-score	基因 Gene	区域 Region	靶点 Target
Chr.8	21712827	TGC GGG TTT TTT GGAAATC GGG	0.090		intergenic	SG1
Chr.1	20295468	TGCAGT G TTT TTT CGACATC AGG	0.088		intergenic	SG1
Chr.3	21926989	TTCTTG ATTCTTGGATATC AGG	0.057		intergenic	SG1
Chr.8	123595	TGCAGG TTTTT TTG CA ATC AGG	0.048		intergenic	SG1
Chr.6	20600047	TG GAGGG AT TTT GGACAT T AGG	0.043		intergenic	SG1
Chr.4	10846726	TGCAT GGTT CCTTGGAA ATA AGG	0.037		intergenic	SG1
Chr.8	12800927	TGCAGT GTTT CGTGG AA ATC AGG	0.030	<i>LOC_Os08g21474</i>	intron	SG1
Chr.1	31673901	TGCAGT GTG TATTGGACAT G TGG	0.018	<i>LOC_Os01g55090</i>	CDS	SG1
Chr.11	10265343	TG CTGCGG TTCTTGGACT TC ACG	0.017	<i>LOC_Os11g18194</i>	intron	SG1
Chr.1	36738645	CGGCGG TTTCTTGGACAT G AGG	0.009		intergenic	SG1
Chr.11	25174511	TG TAGC ATTCTTGG GG ATC AGG	0.005		intergenic	SG1
Chr.8	2495740	TG AAGGG ATT GG TGGAGATC AGG	0.005	<i>LOC_Os08g04890</i>	CDS	SG1
Chr.1	10819788	TG AAGG ATT G TTGGAC ACC AGA	0.004	<i>LOC_Os01g19160</i>	CDS	SG1
Chr.7	8969915	CAGAGC AAAT GG TAGCT CA AGG	0.336	<i>LOC_Os07g15460</i>	CDS	SG2
Chr.2	24043045	TCTGGC AAACGGCAGCT AGA AGG	0.132		intergenic	SG2
Chr.10	4190123	TATAACA AA CC GCAGCT CTA AGG	0.124		intergenic	SG2
Chr.10	4146706	TATAACA AA CC GCAGCT CTA AGG	0.124		intergenic	SG2
Chr.10	1300848	GAT GGC AAACGG CGC ACGA CGG	0.078		intergenic	SG2
Chr.4	22530927	GAGAGCAA AC CA ACC GG A AGG	0.047	<i>LOC_Os04g37880</i>	five_prime_UTR	SG2
Chr.2	24687566	TCGAGC AA TC GCATCTCGA AGG	0.036	<i>LOC_Os02g40720</i>	CDS	SG2
Chr.11	13466068	GACATCAA CC GCAG CC GA AGG	0.035	<i>LOC_Os11g23790</i>	intron	SG2
Chr.2	28987684	GAGAGCAA CC GGTAG ACA AGG	0.023		intergenic	SG2
Chr.3	22268854	GCAAGC AAACGG AAG CT GG AGG	0.023	<i>LOC_Os03g40084</i>	CDS	SG2
Chr.2	1659286	GAGAGC GA ACGGCAGCT CAA ATG	0.020	<i>LOC_Os02g03900</i>	CDS	SG2
Chr.1	17456548	TAGAGCAAACGGCAG ACAA ATG	0.015	<i>LOC_Os01g31870</i>	CDS	SG2
Chr.10	21302778	GAGAGCAA ATAG AAGCT AGA AGA	0.014	<i>LOC_Os10g39800</i>	intron	SG2
Chr.6	26672551	GAG TG CAAACGG CAAGG CGA AGG	0.011		intergenic	SG2
Chr.9	22513894	GAGAT CAATAG GCAGCTCGA AGA	0.011	<i>LOC_Os09g39200</i>	CDS	SG2
Chr.3	30763181	GAG ACA AA AGG GAAGCTCG T AGT	0.001	<i>LOC_Os03g53650</i>	CDS	SG2
Chr.3	6959271	GAGAGCAA AGGC CG GG CGA AGG	0.001	<i>LOC_Os03g12910</i>	CDS	SG2

红色字母:表示与靶序列差异的碱基;绿色字母:表示PAM序列

Red letters: Indicate the bases that differ from the target sequence; Green letters: Indicates the PAM sequence

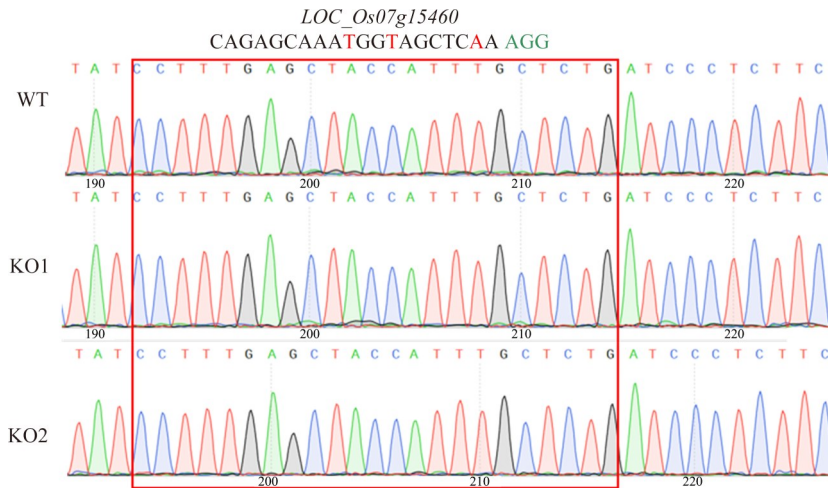


图5 敲除植株中 *LOC_Os07g15460* 潜在脱靶位置的测序分析

Fig.5 Sequencing analysis of *LOC_Os07g15460* potential off-target locations in the two knockout plants

3 讨论

自“镉大米”事件爆发后,稻米中镉超标的问题引起了社会广泛的关注。如何在镉污染的土壤中生产出安全的稻米,是水稻产业发展中需要解决的一个关键问题。研究表明,培育镉低积累水稻品种是解决镉大米超标问题的最佳策略。在目前已鉴定的调控水稻镉吸收转运相关基因中, *LCD*、*OsLCT1* 和 *OsNramp5* 基因的功能突变后能较大幅度降低水稻籽粒中镉的含量,且不改变农艺性状^[6, 15-16];其中, *LCD* 基因 T-DNA 插入突变体能降低籽粒中 43%~55% 的镉含量^[14],敲除 *OsLCT1* 基因会降低水稻籽粒中约 50% 的镉含量^[16], *OsNramp5* 重离子诱变突变体植株籽粒中镉含量可降低 95% 以上^[6]。目前,育种上只有珞红 3A/4A 及其保持系、*lcd1* 突变体、韶香 100 和莲 1S 等少数几个镉低积累的种质资源可以直接进行应用^[19-22]。因此,利用不同技术方法创制 *OsNramp5* 基因突变材料培育镉低积累水稻新品种,是解决镉大米超标问题的最有效的手段。

本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在镉吸收转运基因 *OsNramp5* 第 11 和 12 外显子上设计了两个靶点,对 R491 进行定向敲除创制了籽粒中镉低积累的水稻新种质。通过对转基因 T₀ 代植株进行阳性植株鉴定和两个敲除靶点测序分析,两个靶点均获得了多种不同突变方式的变异株系;进一步筛选获得了无转基因成份的单靶点纯合突变株系 KO1 和 KO2,将其种植在镉含量为 0.86 mg/kg 的中度污染土壤中,成熟后测定野生型 R491 和 2 个突变株系糙米中的镉含量,结果显示, KO1 和 KO2 株系

糙米中镉含量低于 0.038 mg/kg,远低于食品安全标准(0.2 mg/kg),较野生型糙米中 0.37 mg/kg 的镉含量下降了 90% 左右;这一结果与 *OsNramp5* 不同突变植株籽粒中镉含量大幅下降一致^[23],说明利用基因编辑技术敲除 *OsNramp5* 基因创制的突变植株在中、重度镉污的土壤中种植,可以确保获得镉含量大幅度降低可安全食用的大米;但该基因突变材料能够耐受镉最大污染的浓度还不明确。由于 *OsNramp5* 基因功能缺失会导致 Mn 含量降低^[7, 24],在不同锰含量的田地是否会影响水稻生长发育等还有待进一步研究。

本研究中,敲除株系 KO1 和 KO2 之间的农艺性状有一定的差异,与野生型 R491 相比, KO1 株系的主要农艺性状没有显著变化,而 KO2 株系在株高、结实率和千粒重方面显著降低;对敲除靶点进行的脱靶效应分析和测序结果显示在 KO1 和 KO2 敲除株系中不存在脱靶现象,说明 *OsNramp5* 基因不同靶点的突变对植株农艺性状的影响不同。Ishikawa 等^[6]利用碳离子束辐射诱变在粳稻越光背景获得了第 9、第 10 外显子以及整个 *OsNramp5* 缺失的 3 种不同突变方式的突变体,这 3 种突变体能显著降低水稻籽粒中的镉含量而不影响农艺性状。Cao 等^[21]在籼稻品种 9311 背景通过甲基磺酸乙酯(EMS)诱变获得 *OsNramp5* 第 7 外显子上 1 个 SNP 变异的突变体 *lcd1*,突变体籽粒镉含量显著降低且对其他农艺性状无明显影响。Tang 等^[25]利用 CRISPR/Cas9 系统在 *OsNramp5* 基因第 9 外显子上敲除杂交稻恢复系华占和两系不育系 638S,其敲除突变亲本以及杂交组合糙米中的镉含量显著降低,同时对株高和产量等农艺性状没有明显影响。龙起樟等^[26]和董家

瑜等^[27]敲除 *OsNramp5* 基因研究中发现,敲除突变体在株高、结实率和产量性状上较野生型有所下降。Liu 等^[28]利用 CRISPR/Cas9 系统敲除锡稻 1 号的 *OsNramp5* 基因,第 7 外显子和第 9 外显子上的突变植株在株高、穗粒数、结实率和产量方面有不同程度降低。这些研究表明,*OsNramp5* 基因不同突变位点和不同突变方式对农艺性状的影响不一致,与本研究两个单靶点突变的 KO1 和 KO2 植株结果类似。因此,利用 CRISPR/Cas9 系统选择合适的靶点敲除 *OsNramp5* 基因可获得农艺性状不改变的镉低积累水稻突变材料,针对突变位点开发功能性分子标记,将常规育种、分子标记辅助选择与单倍体育种技术有机结合,可加快选育镉低积累水稻新材料,培育安全优质的镉低积累杂交水稻新品种,实现在镉中、重度污染的稻田生产出安全稻米。

参考文献

- [1] Grant C, Clarke J, Duguid S, Chaney R. Selection and breeding of plant cultivars to minimize cadmium accumulation. *Science of the Total Environment*, 2008, 390(2-3):301-310
- [2] 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. *Environmental Health Perspectives*, 2014, 122(5):431-438
- [3] Järup L, Åkesson A. Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2009, 238(3):201-208
- [4] Jiang M, Jiang J, Li S, Li M, Tan Y, Song S, Shu Q, Huang J. Glutamate alleviates cadmium toxicity in rice via suppressing cadmium uptake and translocation. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 384:121319
- [5] Sebastian A, Prasad M N V. Cadmium minimization in rice. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 2014, 34(1):155-173
- [6] Ishikawa S, Lshimaru 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
- [7] Sasaki A, Yamaji N, Yokosho K, Ma J F. Nramp5 is a major transporter responsible for manganese and cadmium uptake in rice. *Plant Cell*, 2012, 24(5):2155-2167
- [8] Ishimaru Y, Takahashi R, Bashir K, Shimo H, Nishizawa N K. Characterizing the role of rice NRAMP5 in manganese, iron and cadmium transport. *Scientific Reports*, 2012, 2(1):286
- [9] 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. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(14):4843-4850
- [10] Takahashi R, Ishimaru Y, Nakanishi H, Nishizawa N K. Role of the iron transporter OsNRAMP1 in cadmium uptake and accumulation in rice. *Plant Signaling & Behavior*, 2011, 6(11):1813-1816
- [11] Satoh-Nagasawa N, Mori M, Nakazawa N, Kawamoto T, Nagato Y, Sakurai K, Takahashi H, Watanabe A, Akagi H. Mutations in rice (*Oryza sativa*) heavy metal ATPase 2 (*OsHMA2*) restrict the translocation of zinc and cadmium. *Plant and Cell Physiology*, 2012, 53(1):213
- [12] Takahashi R, Ishimaru Y, Shimo H, Ogo Y, Senoura T, Nishizawa N K, Nakanishi H. The OsHMA2 transporter is involved in root-to-shoot translocation of Zn and Cd in rice. *Plant Cell and Environment*, 2012, 35:1948-1957
- [13] Miyadate H, Adachi S, Hiraizumi A, Tezuka K, Nakazawa N, Kawamoto T, Katou K, Kodama I, Sakurai K, Takahashi H. OsHMA3, a P1B-type of ATPase affects root-to-shoot cadmium translocation in rice by mediating efflux into vacuoles. *New Phytologist*, 2011, 189(1):190-199
- [14] Sasaki A, Yamaji N, Ma J F. Overexpression of *OsHMA3* enhances Cd tolerance and expression of Zn transporter genes in rice. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(20):6013-6021
- [15] Shimo H, Ishimaru Y, An G, Yamakawa T, Nakanishi H, Nishizawa NK. Low cadmium (*LCD*), a novel gene related to cadmium tolerance and accumulation in rice. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 62(15):5727
- [16] Uruguchi S, Kamiya T, Sakamoto T, Kasai K, Sato Y, Nagamura Y, Yoshida A, Kyojuka J, Fujiwara IT. Low-affinity cation transporter (*OsLCT1*) regulates cadmium transport into rice grains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(52):20959-20964
- [17] 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. *Plant Cell and Environment*, 2020, 43(10):2476-2491
- [18] Ma X, Zhang Q, Zhu Q, Liu W, Chen Y, Qiu R, Wang B, Yang Z, Li H, Lin Y. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Molecular Plant*, 2015, 8(8):1274-1284
- [19] Lv Q, Li W, Sun Z, Ouyang N, Jing X, He Q, Wu J, Zheng J, Zheng J, Tang S. Resequencing of 1143 indica rice accessions reveals important genetic variations and different heterosis patterns. *Nature Communications*, 2020, 11(1):4478
- [20] 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. *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. *Hybrid Rice*,

- 2021, 36(1): 68-74
- [21] 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. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 1-13
- [22] 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. MITDS technology and creation of low-cadmium accumulation parents for hybrid rice breeding. *Hybrid Rice*, 2022, 37(1): 1-11
- [23] 李小秀, 吕启明, 袁定阳. *OsNramp5* 基因变异影响水稻重要农艺性状的研究进展. 中国水稻科学, 2022, 36(6): 562-571
- Li X X, Lv Q M, Yuan D Y. Research progress on the effects of *OsNramp5* mutation on important agronomic traits in rice. *Chinese Journal of Rice Science*, 2022, 36(6): 562-571
- [24] Ishimaru Y, Bashir K, Nakanishi H, Nishizawa N K. OsNRAMP5, a major player for constitutive iron and manganese uptake in rice. *Plant Signaling & Behavior*, 2012, 7(7): 763-766
- [25] Tang L, Mao B, Li Y, Lv Q, Zhang L P, Chen C, He H, Wang W, Zeng X, Shao Y. Knockout of *OsNramp5* using the CRISPR/Cas9 system produces low Cd-accumulating indica rice without compromising yield. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 14438
- [26] 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. 中国水稻科学, 2019, 33(05): 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. *Chinese Journal of Rice Science*, 2019, 33(5): 407-420
- [27] 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, 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
- [28] 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. *Rice Science*, 2019, 26(2): 88-97