

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, 李赓觅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; 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复系 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, 均降低了 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能在 Cd 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 Tao,
JIANG Kaifeng², YANG Li²

(¹ Biotechnology and Nuclear Technology Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066; ² Rice and Sorghum Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Deyang 618000)

Abstract: The problem of cadmium pollution in rice grains seriously threatens human health. Disrupting the function of the cadmium transport gene *OsNramp5* in rice can effectively reduce the accumulation of Cd in rice. To rapidly create low Cd-accumulating rice germplasm. In this study, we used CRISPR/Cas9 gene editing technology to knock out the cadmium transport gene *OsNramp5* under the background of ChuanHui491 (R491), an *indica* restorer line of three-line hybrid rice with high-quality and disease-resistant. Various edited plants with different mutations were obtained, and two homozygous mutant lines (KO1 and KO2) without transgenic elements with single-target mutations were screened. Compared with wild-type R491, the cadmium content of brown rice in knockout lines KO1 and KO2 was significantly reduced by about 90% when planted in cadmium-polluted soil fields. The results of the agronomic trait investigation showed

收稿日期: 2023-11-23

修回日期:

网络出版日期:

URL:

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 (32001531); Sichuan Provincial Financial “1+3” Project (2021ZYGG); Sichuan Science and Technology Program (2021YFYZ0016、2021YFYZ0027)

that there was no significant difference in the KO1 plants compared with wild-type R491, however, the KO2 plants had significant decreases in plant height, seed setting rate, and 1000-grain weight. Therefore, knockout of the cadmium transporter gene *OsNramp5* by CRISPR/Cas9 gene editing technology can rapidly create new rice germplasm with low cadmium accumulation, and the new germplasm created in this study provides a new genetic resource for accelerating the breeding of safe rice varieties that can be planted in the cadmium-polluted field.

Keywords: 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，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问题最简单、最经济、最有效的方式。

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，研究发现水稻中吸收转运镉相关的基因主要有 *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%左右^[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，其编码蛋白定位在细胞质膜上，能把锌和镉从水稻的根转运到植株体内，在水稻中过表达 *OsHMA2* 能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* 是低亲和阳离子转运蛋白，定位于质膜，是粳稻中特有的基因，该基因的功能缺失会使籽粒镉含量降低一半左右，而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 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，并筛选出其中两个不含转基因成份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 水稻材料

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，编辑后代中无转基因成分的植株种植于四川省农业科学院试验基地，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，具体参照 Ma 等^[18]的方法，将 OsU6a-SG1 和 OsU6b-SG2 片段连到 pYLCRISPR/Cas9-P_{ubi}-H 载体上，构建好的多基因敲除表达载体 PYLCRISPR/Cas9-P_{ubi}-H/OsU6a-SG1/OsU6b-SG2 经测序鉴定正确后，转入农杆菌 EHA105 用于遗传转化实验。

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，潮霉素筛选获得转化植株。

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 T₀ 代水稻 DNA，用潮霉素 Hpt 特异引物 (Hpt-F: TACACAGGCCATCGGTCCAGA, Hpt-R: TAGGAGGGCGTGATATGTC) 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 (F1: TGACCGTTCGTCTTATGC, R1: AAGCGATGATGATGAGGC) 和靶点 2 检测引物 (F2: TGCACATGCCCAAACAGT, R2: CAGGGTGAAGACCAGCT) 对所有 T₀ 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 T₀ 代植株进行种植，在 T₁ 代提取单株叶片 DNA，用潮霉素 Hpt 和 Cas9 特异引物 (Cas9-F: CACCATCTACCACCTGAGAA, Cas9-R: CGAAGTTGCTCTTGAAGTTG) 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。

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 (ICP-MS) 进行。样品粉碎后过 100 目筛网, 称取固体样品 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; 打开赛默飞 ICP-MS 机器预热 1 个小时, 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, 计算出每个样品中含量。每个样品送三个样本进行重复检测, 取平均值作为测定结果。

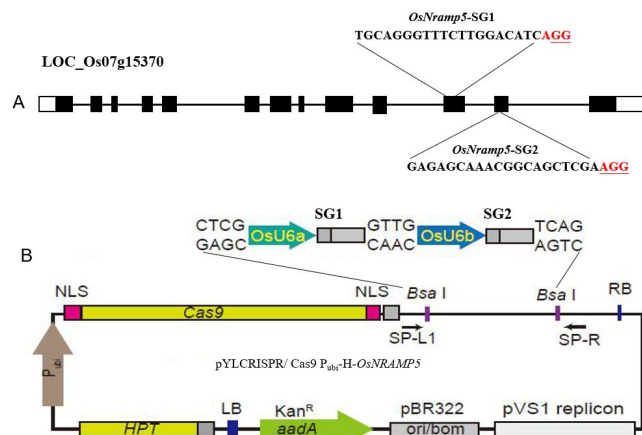
1.6 农艺性状测定

在水稻成熟后测定野生型和敲除突变体的株高、有效穗、穗长、穗粒数、结实率、粒长、粒宽和千粒重等主要农艺性状, 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 *OsNramp5* 靶位点的设计及 CRISPR/Cas9 载体的构建

为创制镉低积累的水稻新种质, 我们在 *OsNramp5* 基因的第 11 和 12 外显子上分别设计了两个靶点 *OsNramp5*-SG1 和 *OsNramp5*-SG2 (图 1A); 两个靶位点分别通过巢式 PCR 构建 *OsU6a*-SG1 和 *OsU6b*-SG2 表达框 (表 1), 表达框两端都加入 *Bsa*I 酶切位点, 通过 *Golden Gate* 系统中 *Bsa*I 限制性酶切位点的序列特异性, 将其和载体骨架 pYL_{CRISPR}/Cas9-*P_{ubi}*-H 同时用 *Bsa*I 酶切, 在 T₄ DNA 连接酶的作用下, 构建成最终载体 pYL_{CRISPR}/Cas9_{*P_{ubi}*}-H-*OsNramp5* (图 1B)。



注: (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、黑线代表内; 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。(B) 2 个靶点 gRNA 表达盒连接在 pYL_{CRISPR}/Cas9 上组成的表达载体。

Note: (A) *OsNramp5* gene structure and of 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.

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

2.2 转化植株 T₀ 代突变情况检测

构建好的 *OsNramp5* 敲除表达载体通过农杆菌介导的遗传转化法导入籼稻优质恢复系 R491 愈伤组织，转化后共获得 24 株 T₀ 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，其中 23 个株系发生突变，编辑突变效率 95.8%，其中，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%，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失去功能。

```

                                OsNRAMP5-SG1
WT  ATGTATGTGCAGGGTTTCTTGGACATCAGGATGAGGAAGTGGCTTCGGAACCTG
KO1 ATGTATGTGCAGGGTTTCTTGGACATCAGGATGAGGAAGTGGCTTCGGAACCTG
KO2 ATGTATGTGCAGGGTTTCTTGG-----AACCTG -26 bp
KO3 ATGTATGTGCAGGGTTTCTTGG-----TGAGGAAGTGGCTTCGGAACCTG -8 bp
KO4 ATGTATGTGCAGGGTTTCTTGGATCATCAGGATGAGGAAGTGGCTTCGGAACCTG +1 bp
KO5 ATGTATGTGCAGGGTTTCTTGGACATCAGGATGAGGAAGTGGCTTCGGAACCTG +1 bp

                                OsNRAMP5-SG2
WT  GCAGATGATACTGTCCTTCGAGCTGCCGTTTGCT
KO1 GCAGATGATACTGTCCTTCGAAAGCTGCCGTTTGCTCT +1bp
KO2 GCAGATGATACTGTCCTTCGAGCTGCCGTTTGCTCT
KO3 GCAGATGATACTGTCCTTCGATGCTGCCGTTTGCTCT +1bp
KO4 GCAGATGATACTGTCCTTCG-----CCGTTTGCTCT -5bp
KO5 GCAGATGATACTGTCCTTCGAAAGCTGCCGTTTGCTCT +1bp

```

图 2 *OsNramp5* 编辑植株部分测序结果

Fig.2 Partial sequencing results of *OsNramp5* genome editing T₀ plants

2.3 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，我们根据 T₀ 代测序结果分析，利用潮霉素和 Cas9 标记对 T₁ 代单株进行转基因成分的筛选和测序鉴定，从 T₂ 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）。

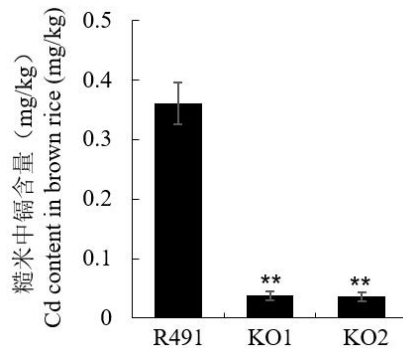
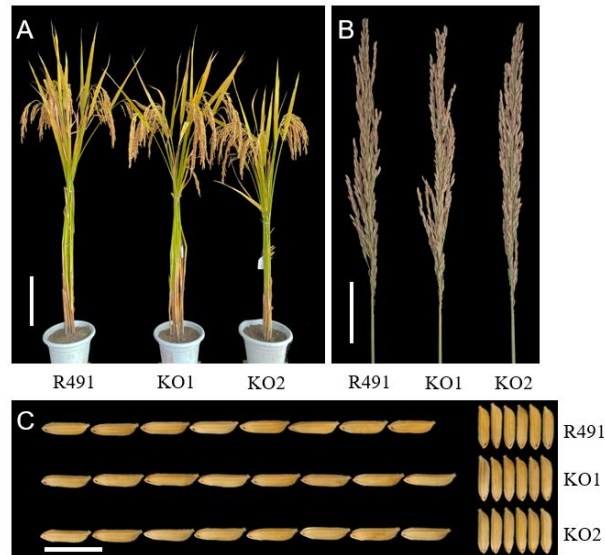


图3 野生型和突变体植株糙米中镉含量比较

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

2.4 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，我们将T₂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进行在大田种植，成熟后进行田间农艺性状考查，结果发现，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1）；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、穗长、穗粒数、粒长和粒宽等指标无显著差异（图4和表1）



(A-C) 分别为野生型和敲除突变体成熟期的植株形态比较，标尺为20厘米（A）；穗长表型，标尺为5厘米（B）；和粒型，标尺为1厘米（C）。

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

图4 *OsNramp5* 敲除突变体植株表型

Fig. 4 The phenotypes of *OsNramp5* knockout plants

表 1 野生型 R491 和 *OsNramp5* 敲除突变体的主要农艺性状比较

Table 1 Comparison of the major agronomic traits of wild-type R491 and the two knockout lines

株系 Line	株高 (cm) Plant height (cm)	有效穗 Number of effective panicles	穗长 (cm) Panicle length (cm)	穗粒数 Grain number per panicle	结实率 (%) Seed setting rate (%)	粒长 (mm) Grain length (mm)	粒宽 (mm) Grain width (mm)	千粒重 (g) 1 000-grain weight (g)
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**

注: *: 在 0.05 水平上差异显著; **: 在 0.01 水平上差异显著

Note: *: Significant difference at 0.05 level; **: Significant difference at 0.01

2.5 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。我们在线 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 2); 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 CSD 区, 其中脱靶效应最高的是 *LOC_Os07g15460* 基因 (脱靶率为 0.336), 其余基因脱靶的概率低于 0.036 (表 2); 因此, 我们对位于 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), 结果说明 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 2 *OsNramp5* 基因两个敲除靶点的脱靶效应分析

Table 2 Analysis of off-target effects of two knockout targets of the *OsNramp5* gene

Chr	Position	Sequence	Off-score	Gene	Region	Target
Chr8	21712827	TGC GGG TTT TT TGGAAATC GGG	0.09		intergenic	SG1
Chr1	20295468	TGCAG TG TTT TT CGACATC AGG	0.088		intergenic	SG1
Chr3	21926989	TTCTTGA TTTCTTGGATATC AGG	0.057		intergenic	SG1
Chr8	123595	TGCAGG TTTTTT TGCACATC AGG	0.048		intergenic	SG1
Chr6	20600047	TG GAGGGTAT TTTGGACAT T AGG	0.043		intergenic	SG1
Chr4	10846726	TGCA TGGT CCTTGGAA ATA AGG	0.037		intergenic	SG1
Chr8	12800927	TGCAG TGTTT CGTGG GA ATC AGG	0.03	LOC_Os08g21474	intron	SG1
Chr1	31673901	TGCAG TGTG ATTGGACAT G TGG	0.018	LOC_Os01g55090	CDS	SG1
Chr11	10265343	TGCT TGCGG TCTTGGACT T ACG	0.017	LOC_Os11g18194	intron	SG1
Chr1	36738645	CGCGGG TTTCTTGGACAT G AGG	0.009		intergenic	SG1

表 2 (续)

Chr11	25174511	TG TAGCA TTTCTGG GG ATC AGG	0.005		intergenic	SG1
Chr8	2495740	TG AAGG A TT GG TGG A ATC AGG	0.005	LOC_Os08g04890	CDS	SG1
Chr1	10819788	TG AAG A TTT G TTGG A ACC AGA	0.004	LOC_Os01g19160	CDS	SG1
Chr7	8969915	CAGAG CAA A T GG TAG CT CA A AGG	0.336	LOC_Os07g15460	CDS	SG2
Chr2	24043045	TCTGG CAAACGGCAG CT AG A AGG	0.132		intergenic	SG2
Chr10	4190123	TATA CAAAC CG CAG CT TA AGG	0.124		intergenic	SG2
Chr10	4146706	TATA CAAAC CG CAG CT TA AGG	0.124		intergenic	SG2
Chr10	1300848	G ATGG CAAACGG CG CA CG	0.078		intergenic	SG2
Chr4	22530927	GAGAGCAA ACCA AC CG GA AGG	0.047	LOC_Os04g37880	five_prime_UTR	SG2
Chr2	24687566	TCGAG CA A TC GC CA T CTCG A AGG	0.036	LOC_Os02g40720	CDS	SG2
Chr11	13466068	G ACAT CAA AC CGCAG CC GA AGG	0.035	LOC_Os11g23790	intron	SG2
Chr2	28987684	GAGAGCAA CCGG TAG GA CA A AGG	0.023		intergenic	SG2
Chr3	22268854	GCA AGCAA ACGG AAG CT GG G AGG	0.023	LOC_Os03g40084	CDS	SG2
Chr2	1659286	GAGAG CG AACGGCAG CT CA A ATG	0.02	LOC_Os02g03900	CDS	SG2
Chr1	17456548	TAGAG CAAACGGCAG CA CA A ATG	0.015	LOC_Os01g31870	CDS	SG2
Chr10	21302778	GAGAGCAA TAG AAG CT AG A AGA	0.014	LOC_Os10g39800	intron	SG2
Chr6	26672551	G ATG CAAACGGCA AGG CG A AGG	0.011		intergenic	SG2
Chr9	22513894	GAG AT CA A TAGGCAG CT CG A AGA	0.011	LOC_Os09g39200	CDS	SG2
Chr3	30763181	GAGA AC AA AGG AAG CT CG T AGT	0.001	LOC_Os03g53650	CDS	SG2
Chr3	6959271	GAGAGCAA AGG CG CG CG A AGG	0.001	LOC_Os03g12910	CDS	SG2

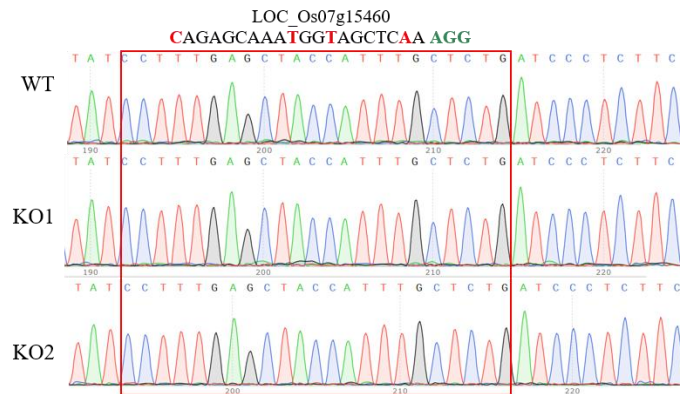


图 5 敲除植株中 *LOC_Os07g15460* 潜在脱靶位置的测序分析

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（图 1），进行定向敲除杂交稻优质抗病恢复系川恢 491（R491）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，种植在镉含量为 0.86 mg/kg 的重度污染土壤中，成熟后测定野生型 R491 和两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（图 3）；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，其中 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（图 4 和表 1）；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（表 2 和图 5），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* 缺失的三种不同突变方式的突变体，这三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 EMS 诱变获得 *OsNramp5* 第 7 外显子上一个 SNP 的变异突变体 *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。龙起樟和董家瑜等^[26, 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。这些研究发现, *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, 与我们两个单靶点突变的 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 MNV. 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 NK, 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 PIB-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] Uraguchi 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 1,143 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(01): 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(01): 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(01): 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(01): 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[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2022, 36(6): 562-571
- [24] Ishimaru Y, Bashir K, Nakanishi H, Nishizawa NK. 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(02):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(02): 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