

冯彦钊, 朱庆锋, 薛 皞, 陈沛, 于洋. 利用 CRISPR/Cas9 技术创制水稻中花 11 号 *dwarf1* 突变体 [J]. 广东农业科学, 2022, 49 (11): 110-118.

利用 CRISPR/Cas9 技术创制水稻中花 11 号 *dwarf1* 突变体

冯彦钊, 朱庆锋, 薛 皞, 陈 沛, 于 洋

(广东省农业科学院农业生物基因研究中心 / 广东省农作物种质资源保存与利用重点实验室, 广东 广州 510640)

摘要: 【目的】水稻同源三聚体 G 蛋白 α 亚基在植物生长与逆境应答中具有重要的生物学功能, 在水稻中花 11 号品种中创制 G α 蛋白编码基因 *DWARF1* (*DI*) 的突变体, 为水稻功能基因组学研究提供材料。

【方法】在中花 11 号的 *DI* 基因座位上设计靶向其外显子的 sgRNA 序列, 构建 CRISPR/Cas9 载体, 转化中花 11 号胚愈伤组织, 经过抗性愈伤组织筛选和诱导分化后, 对再生植株进行鉴定。【结果】筛选到 3 个含有不同编辑形式的 *DI* 突变株系, 实时荧光定量 PCR 分析发现, *DI* mRNA 水平显著降低, 表明无义突变介导的 *DI* mRNA 降解过程亦被触发。在 3 个 *DI* 突变株中进一步鉴定到不含潮霉素抗性基因、不含载体骨架的植株, 繁育后可以得到无转基因痕迹、稳定遗传的 *DI* 敲除植株。对 *DI* 突变株的生长、发育情况进行观察发现, 中花 11 号背景下 *DI* 突变株显著变矮、穗明显变小, 株高和穗长为中花 11 号野生型的 50%~60%。种子变小及变圆, 同时, 种子长宽比和千粒重降低约 40%。【结论】获得有效移码突变的中花 11 号背景 *DI* 突变株系, 为进一步研究 G 蛋白及其相关基因的功能创制遗传材料。

关键词: G α 亚基; 水稻; 中花 11 号; 突变体; CRISPR-Cas9

中图分类号: S511

文献标志码: A

文章编号: 1004-874X (2022) 11-0110-09

Construction of *Dwarf1* Mutants in Zhonghua 11 (*Oryza sativa* L.) by CRISPR/Cas9

FENG Yanzhao, ZHU Qingfeng, XUE Jiao, CHEN Pei, YU Yang

(Agro-biological Gene Research Center, Guangdong Academy of Agricultural Science / Guangdong Key Laboratory for Crop Germplasm Resources Preservation and Utilization, Guangzhou 510640, China)

Abstract: 【Objective】Heterotrimeric G protein α subunit in rice (*Oryza sativa* L.) plays important biological roles in plant growth and stress response. Null mutants of G α protein encoding gene *DWARF1* (*DI*) in Zhonghua 11 (*japonica* cv.) are created, with a view to providing materials for the studies of functional genomics in rice. 【Method】sgRNA was designed to target the exon at *DI* locus in Zhonghua 11, and CRISPR/Cas9 vector was constructed to transform the embryonic calli of Zhonghua 11. After selection by adding hygromycin, the calli were induced to differentiate and the regenerated plants were identified. 【Result】Three mutant lines harbouring different *DI* alleles were identified. Real-time quantitative PCR showed

收稿日期: 2022-09-30

基金项目: 广东省农业科学院新兴团队项目 (202131TD); 广东省农业科学院科技人才引进专项 (R2021YJ-QG005, R2021YJ-YB3011); 广东省自然科学基金 (2021A1515110103)

作者简介: 冯彦钊 (1991—), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向为作物遗传资源发掘与利用, E-mail: fengyanzhao@gdaas.cn

通信作者: 于洋 (1987—), 男, 博士, 副研究员, 研究方向为作物遗传资源发掘与利用, E-mail: yuyang@gdaas.cn

a remarkable decrease in *DI* mRNA level, suggesting that nonsense-mediated mRNA decay was also triggered. Progenies without hygromycin resistance or vector backbone were further identified, representing transgene-free and stably inherited *dl* mutants. According to the observation results of the growth and development of *dl* mutants, *dl* mutants in Zhonghua 11 showed significantly shorter plant height and smaller panicles. The plant height and panicle length were only 50%–60% compared with those of the wild-type Zhonghua 11. Smaller and rounder seeds were also shown in *dl* mutants, meanwhile, the length/width ratio and 1000-grain weight were decreased by about 40%. 【 Conclusion 】 Effective frame-shift *dl* mutants in Zhonghua11 are obtained, Which creates the genetic materials for functional studies of G protein and other related genes in the future.

Key words: G α subunit; rice; Zhonghua 11; mutant; CRISPR-Cas9

【研究意义】随着人口的迅速增长与全球气候变化,植物的生长、抗性和品质等受到严峻挑战。分子育种是改良目标性状、获得更加优质作物的强力手段。基因编辑是一种利用核酸酶对目标基因进行碱基定点删除、插入、替换或修饰的技术,利用该技术对特定的基因进行改造可以创制新的种质^[1-2]。水稻中花 11 号是由中国农业科学院作物科学研究所育成的优质水稻品种,不仅具有良好的产量和抗逆性,同时也是植物分子生物学基础研究领域最具代表性、使用最广泛的模式品种之一。*DWARF1* (*DI*) 是编码水稻三聚体 G 蛋白 α 亚基的基因,调控水稻多种生命活动过程^[2-3]。然而,在中花 11 号中仍缺少对应的 *dl* 缺失突变体,给 G 蛋白相关通路的遗传学研究带来诸多不便。

【前人研究进展】早期的基因编辑技术利用大范围核酸内切酶诱发双链断裂,从而产生随机的碱基插入/缺失或同源重组。然而这种内切酶切割效率较低,且需要长片段的识别序列^[4-5]。随后出现的锌指核酸内切酶(Zinc Finger Nucleases, ZFN)利用氨基酸模块与 DNA 三连续碱基一一对应的关系进行靶向的 DNA 切割,基因编辑效率大大提高^[6-8]。不久,人们从侵染植物的黄单孢菌中获得启发,利用类转录激活效应因子核酸酶(Transcription Activator-like Effector Nucleases, TALEN)作为内切酶进行碱基编辑^[9-10]。与之前的 ZFN 相比,TALEN 中一个氨基酸模块只对应一个碱基对,使设计更加简易^[11]。尽管如此,ZFN 和 TALEN 均需要针对不同的靶点序列设计合成相应的蛋白,较耗时耗精力。CRISPR/Cas9 则是新一代基因编辑技术,最突出的优点是不依赖于蛋白质识别靶点 DNA 序列,而是通过引导 RNA (single guide RNA, sgRNA)

与靶点 DNA 互补配对,Cas9 识别前间隔序列邻近基序(Protospacer Adjacent Motif, PAM)并行使核酸酶活性对靶基因进行切割^[12-14]。至今,基于 Cas9 的技术已经被开发出多种形式,可以实现基因激活、荧光定位、单碱基编辑、定向编辑等^[15-18]。Cas9 的同家族蛋白 Cas12 和 Cas13 也相继被开发用作编辑 DNA 和 RNA^[19-20]。由于该技术的简易性,CRISPR/Cas9 已成为应用最广的基因编辑技术,在基础研究和应用领域创制了大量宝贵材料^[21-25],在改良农艺性状上有广阔的应用前景^[26-27]。

异源三聚体 G 蛋白是定位于动植物细胞膜表面的重要信号转导因子,作用于受体下游。它由 α 、 β 和 γ 共 3 个亚基组成,在植物中参与激素信号转导、离子通道调控、免疫应答、细胞分裂等关键生理进程。与动物不同的是,植物基因组 G 蛋白 α 亚基拷贝数非常少,水稻只有一个编码 G 蛋白 α 亚基的基因 *DI*。*DI* 基因有许多重要功能,与 G β 和 G γ 组成复合体,调控水稻对氮素的利用和种子大小^[34-38]。此外,*DI* 在稻瘟病的抗性中,与 *OsRac1* 共同调控 *OsMAPK6* 的蛋白水平,影响下游防御基因的表达^[39]。在淹水胁迫环境中,*DI* 在乙烯诱导缺氧薄壁细胞程序性死亡的过程中是必需的^[40-42]。同时,*DI* 也是油菜素内酯和赤霉素中信号转导通路中的一员^[43]。运用突变体对 *DI* 进行研究已有相当长的历史,但其突变体遗传背景局限于日本晴、Taichung65 (T65) 和 Kinmaze 中^[2,44]。日本晴背景的 *dl* 突变体 DK22 第 5 个外显子 G1721T 的点突变产生终止密码,导致较短和较圆的籽粒以及对赤霉素和油菜素内酯的敏感性降低^[45]。同为日本晴背景的 H0541 有 833 bp 缺失,出现短且深绿的叶片,花序变得更紧凑^[2]。Kinmaze 背

景下的 CM1361-1 在 *DI* 的第 5 个外显子中发生 19 bp 插入, 导致节间变短^[3, 45]。T65 背景 *dl* 突变体中的 *DI* 基因最后一个外显子发生 2 个碱基缺失, 对稻瘟病更易感^[3]。中花 11 号作为我国水稻基础研究常用的品种之一, 遗传转化体系非常成熟, 许多基因在此背景中都有相应的突变体, 极大促进了水稻基因功能研究。

【本研究切入点】构建有效的中花 11 号背景下的 *dl* 突变植株, 将为水稻基因功能研究提供便利。利用 CRISPR/Cas9 技术对中花 11 号野生型植株 *DI* 基因位点进行编辑, 可以在中花 11 号背景中产生新的 *DI* 等位突变, 丰富现有的 *dl* 突变体种质。【拟解决的关键问题】本研究利用 CRISPR/Cas9 技术编辑水稻中花 11 号的 *DI* 基因, 筛选及鉴定无抗、有效移码突变的 *dl* 突变植株, 并分析 *dl* 突变体的表型, 以期为进一步研究 *DI* 的未知功能提供宝贵材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究所用水稻材料为中花 11 号, 为广东省农业科学院农业生物基因研究中心分子育种技术研究室保存; 所用大肠杆菌感受态为 Trans1-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell, 购自北京全式金生物技术有限公司; 所用农杆菌感受态为 EHA105, 购自上海唯地生物技术有限公司。试验地点为广东省农业科学院农业生物基因研究中心, 试验时间为 2021 年 3 月至 2022 年 9 月。

1.2 靶向 *DI* 的 CRISPR/Cas9 载体构建与遗传转化

利用 He 等^[46]报道的 pEntry A 与 pRHCas9 载体进行构建。基因编辑靶点用 CRISPR-P 2.0 进行筛选 (<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/>), 选择的靶点为 5'GCTTTGATGAGGCAGAACTT3', 靶点在基因组中的位置为 625 ~ 644 (图 1B), 合成引物 (表 1)。以 pEntry A 为模板, 用 ENTRY-F/D1-gRNA-41R、D1-gRNA-41F/ENTRY-R 扩增成两个片段。将这两个片段以摩尔比 1 : 1 混合, 再以 ENTRY-F/ENTRY-R 引物进行第二轮扩增。反应程序为 98 °C 3 min; 98 °C 10 s、60 °C 30 s、68 °C 30 s, 35 个循环; 68 °C 终延伸 5 min。第二轮扩增的产物经琼脂糖凝胶回收后, 按照 He 等^[46]方法连接至 pRHCas9 中。构建好的载体转入大肠杆菌感受态, 提取质粒, 测

序比对后再转入农杆菌感受态, 参照崔莹等^[47]方法侵染水稻胚愈伤组织, 获得转化植株。

1.3 DNA 提取及 PCR 检测

DNA 提取参考王齐红等^[48]方法进行。基因型检测的引物为 D1-CRISPR-926F71/D1-CRISPR-926R69, 利用 KOD FX 聚合酶扩增, 反应程序为 98 °C 3 min; 98 °C 10 s、68 °C 60 s, 35 个循环; 68 °C 终延伸 5 min。潮霉素、载体骨架和 *ACTIN* 基因检测引物分别为 HPT-F/HPT-R、VEC39-315F74/VEC39-315R75、ACTIN-F/ACTIN-R, 序列如表 1 所示。反应程序为 98 °C 3 min; 98 °C 10 s, 62 °C 30 s, 68 °C 60 s, 35 个循环; 68 °C 终延伸 5 min。

1.4 RNA 提取与 qRT-PCR 检测

按照 Simms 等^[49]方法进行 RNA 提取, 利用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (RR047) 进行反转录, 以 TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (RR820) 进行荧光定量 PCR, *DI* 的 qRT-PCR 引物为 D1-qF/D1-qR, 内参基因引物为 UBQ5-qF/UBQ5-qR, 序列如表 1 所示。反应程序为 95 °C 30 s; 95 °C 10 s、60 °C 30 s, 40 个循环。相对表达量用 $2^{-[dI(GID1-GIUBQ5)-WT(GID1-GIUBQ5)]}$ 计算。显著性分析采用 Student's *t*-test。

表 1 供试引物及其序列

Table 1 Primers and their sequences used in this study

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'-3')
ENTRY-F	GACACCTGCAGCTCTAGAGGATC
ENTRY-R	GCGCCATGCATACTAGTAGATC
D1-gRNA-41F	GCTTTGATGAGGCAGAACTTGTITTTAGAGCTAGAAATA
D1-gRNA-41R	AAGTTCTGCCTCATCAAAGCAACACAAGCGCCGACG
D1-CRISPR-926F71	CAGTCTGCAGACATTGACAGGCCG
D1-CRISPR-926R69	GAGCCGAGCACAGTCTACAAGGTC
D1-qF	GGCTCATCCTGTAGCAGATCTC
D1-qR	CTCCAATTTCTGGTTATCTGG
HPT-F	GTCTCCGACCTGATGCAG
HPT-R	AAGCTGCATCATCGAAATTG
VEC39-315F74	CACGACCGGGTCCAGCTGC
VEC39-315R75	ACGCCCCAGCACTCGTCCG
UBQ5-qF	ACCTTCATGGCCAACCACTT
UBQ5-qR	CTAAGCCTGCTGGTTGTAGA
ACTIN-F	TCGAGGTCATTATATGCTTGAG
ACTIN-R	TTTAAGTATGTTTCACTTTTGACC

1.5 表型测量与统计

株高用自地面到主穗顶长度的平均值表示,

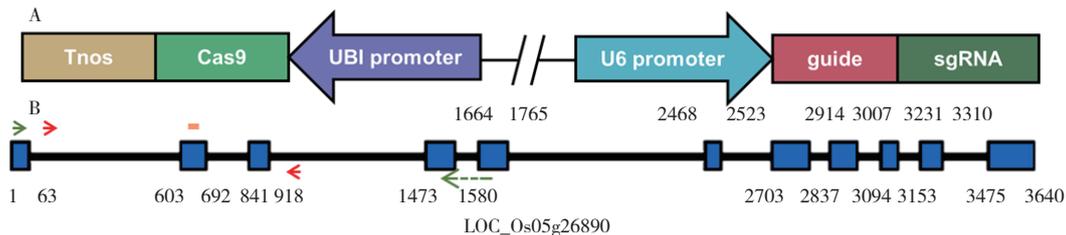
$n=10$ 。穗长用穗颈节到穗顶的长度平均值表示， $n=15$ 。粒长、粒宽分别为饱满种子的长度和宽度平均值 $n=12$ 。千粒重用 1000 粒饱满种子的质量平均值换算而成， $n=20$ 。显著性分析采用 Student's *t*-test。

2 结果与分析

2.1 水稻中花 11 号 *dl* 突变体的创制

为创制中花 11 号背景下的 *dl* 突变体，我们采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术对 *DL1* 基因进行

突变。首先选取位于第二个外显子上的一段序列为靶点序列（见 1.2）作为靶点，此位置与已报道的 *DL1* 突变位点均不相同。将靶点序列正向引物与下游 gRNA 的 5' 端序列融合，sgRNA 反向引物与上游 U6 启动子的 3' 端融合，再与 pEntry A 载体上的引物进行融合 PCR，得到 U6 启动子-靶点-gRNA 表达盒。将扩增产物与 pRHCas9 载体用 *Pst*I 和 *Spe*I 双酶切，再进行连接得到 D1-Cas9 载体（图 1A）。将 D1-Cas9 载体导入农杆菌 EHA105 中，侵染 ZH11 愈伤组织，随后通过



A: *D1*-Cas9 载体局部示意。蓝色箭头表示 U6 启动子，红色矩形表示 *D1* 靶序列，深绿矩形表示 gRNA 骨架，紫色箭头表示 Ubiquitin 启动子，浅绿矩形表示 Cas9 编码序列，金色矩形表示 Nos 终止子；

B: *D1* 基因结构示意图。绿色箭头为 D1-qF 与 D1-qR 引物位置，其中 D1-qR 横跨第 4、5 个外显子。

红色箭头为 D1-CRISPR-926F71 与 D1-CRISPR-926R69 引物。橙色线为 CRISPR/Cas9 靶点位置。数字为各外显子起始和终止的碱基序数

A: Local schematic of *D1*-Cas9 vector, blue arrow: promoter of U6; red box: *D1* target sequence; dark green box: gRNA scaffold; purple arrow: promoter of Ubiquitin; light green box: coding sequence of Cas9; gold box: terminator of Nos

B: Schematic of *D1* genomic structure, green arrows: primer pairs of D1-qF and D1-qR, and D1-qR spans the 4th and 5th exons; red arrows: primer pairs of D1-CRISPR-926F71 and D1-CRISPR-926R69; orange line: target site for CRISPR/Cas9. Numbers indicate the initial and terminal bases in accordance to the genomic sequences

图 1 *D1* CRISPR/Cas9 载体的构建及 *D1* 基因结构示意图

Fig. 1 Vector construction of *D1* CRISPR/Cas9 and schematic of *D1* gene structure

共培养、筛选、分化等步骤得到 *dl* 突变体幼苗。

2.2 突变体基因型分析及表达水平检测

为分析 Cas9 是否对 *DL1* 基因位点进行编辑，我们对 *dl* 突变体 T₁ 代植株进行 DNA 提取，以其为模板，在编辑位点上下游 400~500 bp 处设计引

物进行 PCR 扩增（图 1B），对产物进行 Sanger 测序，将测序结果与 WT 进行比对。发现突变体的 *DL1* 基因位点发生编辑，3 个株系均为纯合移码突变，其中 *dl*-#1 为 -17+7 bp，*dl*-#2 为 +2 bp，*dl*-#3 为 +1 bp（图 2A）。为了解突变株中 *DL1* 的



A: *dl* 各突变株系的基因型测序分析; B: *dl* 各突变株系中 *DL1* 的 mRNA 表达量检测，** 表示与 WT 极显著差异

A: Sanger sequencing chromatograms of *DL1* mutants;

B: Detection of expression level of *DL1* mRNA in *dl* mutants Asterisks indicate significant difference compared with WT.

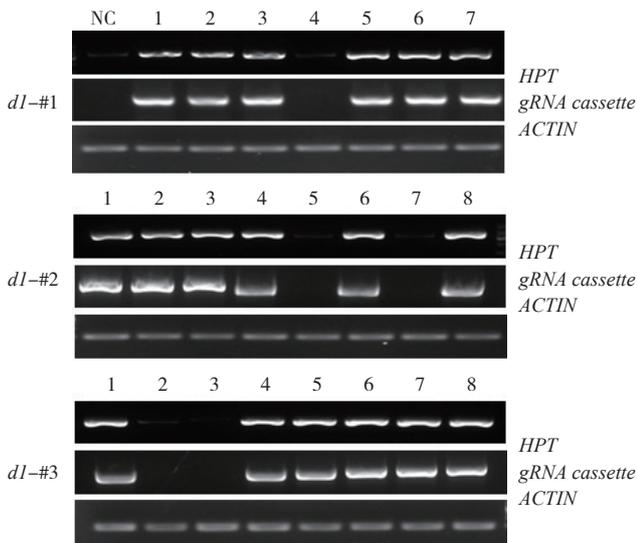
图 2 *dl* 突变株的基因型鉴定及 *DL1* 表达量检测

Fig. 2 Genotyping of *dl* mutants and detection of expression level of *DL1*

表达水平,我们对 T_2 代纯合突变植株的幼苗进行RNA提取并采用荧光定量PCR检测 DI 的mRNA水平。结果显示,3个突变株系 DI 的mRNA水平均显著下调,下调幅度高达80%~90%(图2B)。这说明 dl 突变株在mRNA和蛋白两个水平上抑制 DI 的功能,成功获得有效的 dl 突变植株。

2.3 无潮霉素抗性突变体筛选

转基因标记是作物向农业生产应用的障碍,易引发公众对转基因安全性的忧虑。同时,转基因产生抗性标记的存在可能为以后基础研究所需的杂交带来不便。如两亲本抗性相同,难以用抗性准确筛选杂交成功的后代植株。因此,筛选无潮霉素抗性的 dl 突变株具有重要意义。农杆菌介导转基因通常以单拷贝形式随机插入到基因组中,通过自交产生 T_1 代时,抗性基因可通过同源重组或自由组合分离,得到无抗性的突变体。利用该原理,我们对 T_2 代植株叶片的DNA进行提取,并且通过PCR扩增 HPT 外源基因片段,同时扩增了 $ACTIN$ 启动子片段作为内源基因的参照。结果显示,每个株系随机选取的若干植株中,均分离出不含外源基因的突变株(图3),为后续研究与应用奠定基础。



HPT 为潮霉素抗性基因, $gRNA$ cassette 为载体骨架的一部分,
 $ACTIN$ 为内源基因, NC 为野生型阴性对照
 HPT indicates the transgene marker conferring hygromycin resistance;
 $gRNA$ cassette indicates parts of vector backbone;
 $ACTIN$ indicates an endogenous gene for DNA quality control
and NC indicates negative control from WT

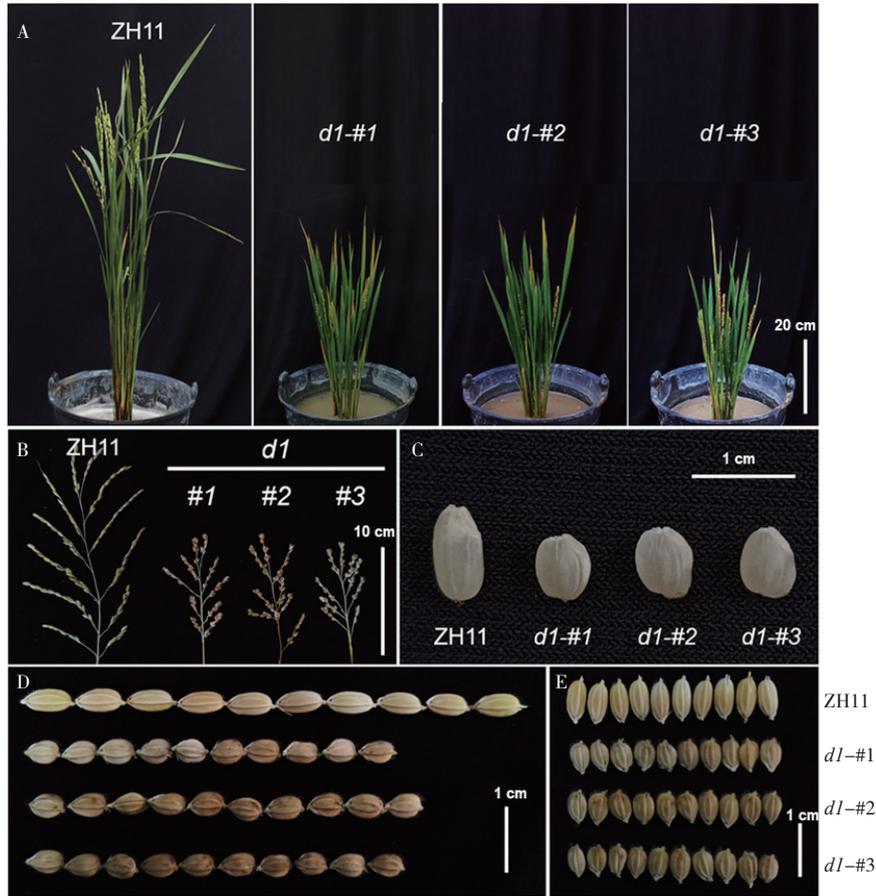
图3 dl 各突变株系不同植株 DNA 中转基因标记的 PCR 检测
Fig. 3 Detection of transgenes in genomic DNA of dl mutants by PCR

2.4 dl 突变体表型分析

以往研究表明, dl 突变体的株型、穗型、籽粒形态与大小等与野生型有明显差异。为全面了解中花 11 号背景下 dl 突变体的表型,我们对植株形态、穗形和种子大小进行观察(图 4)与统计(图 5)。统计结果显示,3 个 dl 突变株系均显著矮化,株高仅有野生型的约 50%。此外,穗长只占野生型的约 60%。 dl 突变体的种子大小、形态同样发生明显变化,其中粒长变得更短,野生型平均粒长为 $0.74 (\pm 0.05)$ cm,而 3 个 dl 突变株系分别为 $0.55 (\pm 0.06)$ 、 $0.62 (\pm 0.03)$ 、 $0.55 (\pm 0.04)$ cm。然而,粒宽在 dl 突变体中无明显变化,因此, dl 突变体种子变得更圆,长宽比为 $1.29 (\pm 0.16)$ 、 $1.46 (\pm 0.12)$ 、 $1.34 (\pm 0.15)$,中花 11 号的种子长宽比则为 $1.85 (\pm 0.10)$ 。同时, dl 植株千粒重显著降低,约为野生型的 60%(图 5F),可见中花 11 号背景下 dl 突变体产生严重的生长缺陷。

3 讨论

DI 是植物生长发育过程中一个重要的调控基因,日本在 20 世纪初期已有该基因的水稻突变体。 DI 基因功能具有多效性,近年陆续出现其他背景下的 DI 等位突变体,如 T65、Shiokari、Kinmaze。这些突变体突变形式各异,包括点突变、碱基插入/缺失导致蛋白翻译提前终止、结构域失活等,也有剪接位点改变和反义转录本导致的 RNA 水平降低^[44]。此外,科学家还发现了天然的表现遗传 dl 突变体,其 DNA 序列并没有发生变化,然而矮化的 dl 表现突变体转录起始位点附近 DNA 发生甲基化,同时,在 DI 基因座内,组蛋白 H3K9 乙酰化水平降低而 H3K9 二甲基化水平升高,表明 dl 表现突变体 DI 的表达被沉默^[50]。在双子叶模式植物拟南芥中, DI 同源基因的缺失突变体已有 4 个株系被报道,它们属于 Ws 和 Col 背景^[51-52]。其他植物种类如大豆、烟草、西红柿等的 DI 同源基因功能研究并不深入,多数仅停留在基因的克隆、鉴定阶段,缺乏相应的功能缺失突变体^[53]。本研究采用 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑技术对中花 11 号的 DI 基因目标位置进行编辑,鉴定出 3 个等位突变株系,丰富了现有的 dl 突变体类型。

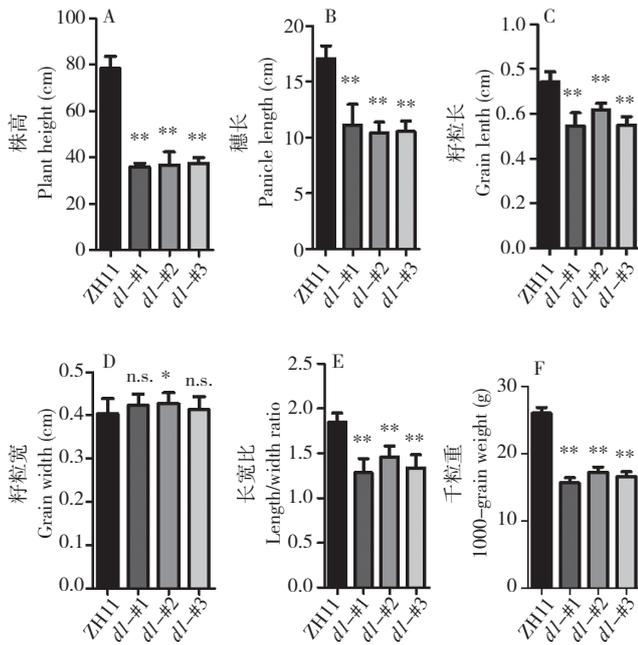


A: 植株; B: 穗; C: 籽粒; D: 籽粒粒长; E: 籽粒粒宽

A: Overview of plant architectures; B: Overview of panicles; C: Grain shape; D: Grain length; E: Grain width

图 4 *dl* 突变株的形态特征

Fig. 4 Morphological characteristics of *dl* mutants



* 表示差异显著; ** 表示差异极显著; n.s. 表示无显著差异

* represents significant difference, ** represents extremely significant difference and n.s. represents no significant difference

图 5 *dl* 突变株的表型统计

Fig. 5 Phenotype statistics of *dl* mutants

现有研究表明, 水稻 *dl* 突变体会导致植株矮小、直立, 叶长变短且深绿、谷粒变短变圆、节间变短、对 GA 和 BR 敏感性降低、免疫应答改变等多效表型^[44]。我们创制的中花 11 号背景下的 *dl* 突变体也出现植株矮小、穗小、籽粒变短、籽粒变薄等表型, 与前人报道的其他背景下的 *dl* 突变体表型相吻合, 表明 *D1* 在不同水稻品种中的功能高度保守, 也证明本研所得到的材料可有效应用于相关领域研究。

CRISPR/Cas9 基因编辑产生的移码插入或缺失突变通常引起翻译提前终止, 导致无义 RNA 降解 (Nonsense mRNA Decay, NMD)^[54]。本研究创制的 *dl* 突变体材料中, *D1* 基因的 mRNA 水平下调约 80%, 我们分析 *dl* 突变体的编辑情况发现, *dl*-#1 和 *dl*-#2 突变体均使 D1 蛋白在第 94 位氨基酸位置处提前终止, 而 *dl*-#3 突变体会使 D1 蛋白翻译在第 35 氨基酸处提前终止, 这些因素很可能触发 mRNA 质量监控机制, 导致

DI mRNA 经历 NMD 而下调, 这些结果与我们之前在其他基因的 CRISPR 敲除植株上观察到的相似^[55]。然而, CRISPR/Cas9 导致 NMD 并不是绝对的, 与 sgRNA 到下游外显子或终止子的距离远近有关^[56]。可见, CRISPR/Cas9 介导的基因编辑有可能从 mRNA 水平和蛋白水平两方面导致基因功能失活。

4 结论

本研究利用 CRISPR/Cas9 技术在中花 11 号背景中创制出 3 个移码突变的 *dI* 突变株系, qRT-PCR 结果显示, *DI* mRNA 水平显著下调。中花 11 号背景的 *dI* 敲除植株出现植株矮小、穗小、籽粒变小、变圆等表型, 千粒重也显著减少, 株高、穗长、粒长、长宽比和千粒重均下降 40%~50%, 而粒宽无明显变化, 这些表型与其他背景中现有的 *dI* 突变体相似, 说明 *DI* 基因功能已经失活。我们还从 T₂ 代植株筛选出不含转基因标记的植株。鉴于中花 11 号基因组已被研究得非常透彻, 被广泛用于基因功能研究, 现有的突变体库也以它为背景创制^[22, 23], 拥有中花 11 背景的 *dI* 突变株对创制 *DI* 与其他基因的多重突变株更加便利。因此, 本研究结果可以为后续的水稻基础研究及育种应用提供安全、有效的遗传材料。

参考文献 (References) :

- [1] MAO Y, BOTELLA J R, LIU Y, ZHU J K. Gene editing in plants: progress and challenges [J]. *National Science Review*, 2019, 6(3): 421-437. DOI:10.1093/nsr/nwz005.
- [2] ASHIKARI M, WU J, YANO M, SASAKI T, YOSHIMURA A. Rice gibberellin-insensitive dwarf mutant gene Dwarf 1 encodes the α -subunit of GTP-binding protein [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, 96(18): 10284-10289. DOI:10.1073/pnas.96.18.10284.
- [3] UEGUCHI-TANAKA M, FUJISAWA Y, KOBAYASHI M, ASHIKARI M, IWASAKI Y, KITANO H, MATSUOKA M. Rice dwarf mutant d1, which is defective in the α subunit of the heterotrimeric G protein, affects gibberellin signal transduction [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97(21):11638-11643. DOI: 10.1073/pnas.97.21.11638.
- [4] CHOULIKA A, PERRIN A, DUJON B, NICOLAS J F. Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1995, 15(4): 1968-1973. DOI:10.1128/MCB.15.4.1968.
- [5] ROUET P, SMIH F, JASIN M. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1994, 14(12):8096-8106. DOI: 10.1128/mcb.14.12.8096-8106.1994.
- [6] KIM Y G, CHA J, CHANDRASEGARAN S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93(3):1156-1160. DOI: 10.1073/pnas.93.3.1156.
- [7] LLOYD A, PLAISIER C L, CARROLL D, DREWS G N. Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in *Arabidopsis* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102(6):2232-2237. DOI: 10.1073/pnas.0409339102.
- [8] WRIGHT D A, TOWNSEND J A, WINFREY JR R J, IRWIN P A, RAJAGOPAL J, LONOSKY P M, HALL B D, JONDLE M D, VOYTAS D F. High-frequency homologous recombination in plants mediated by zinc-finger nucleases [J]. *The Plant Journal*, 2005, 44(4): 693-705. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2005.02551.x.
- [9] CHRISTIAN M, CERMAK T, DOYLE E L, SCHMIDT C, ZHANG F, HUMMEL A, BOGDANOVA A J, VOYTAS D F. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases [J]. *Genetics*, 2010, 186(2):757-761. DOI: 10.1534/genetics.110.120717.
- [10] MILLER J C, TAN S, QIAO G, BARLOW K A, WANG J, XIA D F, MENG X, PASCHON D E, LEUNG E, HINKLEY S J. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing [J]. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(2):143-148. DOI: 10.1038/nbt.1755
- [11] TRÖDER S E, ZEVIK B. History of genome editing: From meganucleases to CRISPR [J]. *Laboratory Animals*, 2022, 56(1): 60-68. DOI:10.1177/0023677221994613.
- [12] JINEK M, EAST A, CHENG A, LIN S, MA E, DOUDNA J. RNA-programmed genome editing in human cells [J]. *elife*, 2013, 2: e00471. DOI:10.7554/eLife.00471.
- [13] CONG L, RAN F A, COX D, LIN S, BARRETTO R, HABIB N, HSU P D, WU X, JIANG W, MARRAFFINI L A. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121):819-823. DOI:10.1126/science.1231143.
- [14] MALI P, YANG L, ESVELT K M, AACH J, GUELL M, DICARLO J E, NORVILLE J E, CHURCH G M. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. *Science*, 2013, 339(6121):823-826. DOI:10.1126/science.1232033.
- [15] LI Z, ZHANG D, XIONG X, YAN B, XIE W, SHEEN J, LI J F. A potent Cas9-derived gene activator for plant and mammalian cells [J]. *Nature Plants*, 2017, 3(12): 930-936. DOI: 10.1038/s41477-017-0046-0.
- [16] DENG W, SHI X, TJIAN R, LIONNET T, SINGER R H. CASFISH:CRISPR/Cas9-mediated in situ labeling of genomic loci in fixed cells [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 112(38):11870-11875. DOI:10.1073/pnas.1515692112.
- [17] ZONG Y, WANG Y, LI C, ZHANG R, CHEN K, RAN Y, QIU J-L, WANG D, GAO C. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion [J]. *Nature Biotechnology*, 2017, 35(5):438-440. DOI:10.1038/nbt.3811.
- [18] LIN Q, ZONG Y, XUE C, WANG S, JIN S, ZHU Z, WANG Y, ANZALONE A V, RAGURAM A, DOMAN J L. Prime genome editing in rice and wheat [J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(5):582-585. DOI:10.1038/s41587-020-0455-x.
- [19] SCHINDELE P, WOLTER F, PUCHTA H. Transforming plant biology

- and breeding with CRISPR/Cas9, Cas12 and Cas13 [J]. *FEBS Letters*, 2018,592(12):1954–1967. DOI: 10.1002/1873-3468.13073.
- [20] 张爱霞, 朱庆锋, 陈沛, 于洋, 魏文康, 晏石娟, 刘文华. 基于CRISPR/Cas13的RNA编辑系统及其在核酸检测中的应用[J]. *广东农业科学*, 2020, 47(11): 243–251. DOI: 10.16768/j.issn.1004-874X.2020.11.027.
- ZHANG A X, ZHU Q F, CHEN P, YU Y, WEI W K, YAN S J, LIU W H. RNA editing system based on CRISPR/Cas13 and its application in nucleic acid detection [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2020,47(11):243–251. DOI: 10.16768/j.issn.1004-874X.2020.11.027.
- [21] 李兆伟, 零东兰, 孙聪颖, 曾慧玲, 刘凯基, 蓝颖珊, 范凯, 林文雄. 利用CRISPR/Cas9技术定向编辑水稻OsIAA11[J]. *中国农业科学*, 2021, 54(13): 2699–2709. DOI: 10.3864/j.issn.0578-1752.2021.13.001.
- LI Z W, LING D L, SUN C Y, ZENG H L, LIU K J, LAN Y S, FAN K, LIN W X. CRISPR/Cas9 Targeted Editing of OsIAA11 in Rice [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2021,54(13):2699–2709. DOI: 10.3864/j.issn.0578-1752.2021.13.001.
- [22] MENG X, YU H, ZHANG Y, ZHUANG F, SONG X, GAO S, GAO C, LI J. Construction of a genome-wide mutant library in rice using CRISPR/Cas9 [J]. *Molecular Plant*, 2017,10(9):1238–1241. DOI: 10.1016/j.molp.2017.06.006.
- [23] LU Y, YE X, GUO R, HUANG J, WANG W, TANG J, TAN L, ZHU J K, CHU C, QIAN Y. Genome-wide targeted mutagenesis in rice using the CRISPR/Cas9 system [J]. *Molecular Plant*, 2017,10(9):1242–1245. DOI:10.1016/j.molp.2017.06.007.
- [24] 林春姿, 谢华斌, 黄其伟, 高上, 王加峰. 利用CRISPR/Cas9技术定向编辑水稻*OsIQD1*基因[J]. *广东农业科学*, 2022, 49(8): 1–10. DOI: 10.16768/j.issn.1004-874X.2022.08.001.
- LIN C Z, XIE H B, HUANG Q W, GAO S, WANG J F. Targeted editing of *OsIQD1* gene in rice based on CRISPR/Cas9 technology [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2022,49(8):1–10. DOI: 10.16768/j.issn.1004-874X.2022.08.001.
- [25] 任代胜, 刘浩, 乔保建. 基于CRISPR/Cas9基因编辑技术靶向敲除*OsFAD2*创制高油酸水稻突变体[J]. *广东农业科学*, 2021,48(11): 1–7. DOI:10.16768/j.issn.1004-874X.2021.11.001.
- REN D S, LIU H, QIAO B J. Creation of high oleic acid rice mutant by targeted knockout of *OsFAD2* via CRISPR/Cas9 genome editing technology [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2021,48(11):1–7. DOI: 10.16768/j.issn.1004-874X.2021.11.001.
- [26] HINGE V R, CHAVHAN R L, KALE S P, SUPRASANNA P, KADAM U S. Engineering resistance against viruses in field crops using CRISPR–Cas9 [J]. *Current Genomics*, 2021,22(3):214–231. DOI: 10.2174/1389202922666210412102214. DOI: 10.2174/1389202922666210412102214.
- [27] ZHENG Y, LI Q, YE M, CEHN A, WANG H. Applications of CRISPR/Cas9-based genome editing in the plant biology [J]. *Turkish Journal of Botany*, 2021,45(4): 253–268. DOI: 10.3906/bot-2103-50.
- [28] TEMPLE B R, JONES A M. The plant heterotrimeric G-protein complex [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2007,58: 249–266. DOI:10.1146/annurev.arplant.58.032806.103827.
- [29] PENG P, GAO Y, LI Z, YU Y, QIN H, GUO Y, HUANG R, WANG J. Proteomic analysis of a rice mutant sd58 possessing a novel d1 allele of heterotrimeric G protein alpha subunit (rgal1) in salt stress with a focus on ROS scavenging [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019,20(1): 167. DOI: 10.3390/ijms20010167.
- [30] LIU Y T, LI T, JIANG Z S, ZENG C H, HE R, QIU J, LIN X L, PENG L M, SONG Y P, HOU D H, CAI Y C, ZHU C L, FU J R, HE H H, XU J. Characterization of a novel weak allele of RGA1/D1 and its potential application in rice breeding [J]. *Rice Science*, 2022,29(6): 522–534. DOI: 10.1016/j.rsci.2022.03.001.
- [31] ISHIKAWA A, TSUBOUCHI H, IWASAKI Y, ASAH T. Molecular cloning and characterization of a cDNA for the α subunit of a G protein from rice [J]. *Plant and Cell Physiology*, 1995,36(2):353–359. DOI:10.1093/oxfordjournals.pcp.a078767.
- [32] SEO H S, KIM H Y, JEONG J Y, LEE S Y, CHO M J, BAHK J D. Molecular cloning and characterization of RGA1 encoding a G protein α subunit from rice (*Oryza sativa* L. IR-36) [J]. *Plant Molecular Biology*, 1995,27(6): 1119–1131. DOI:10.1007/BF00020885.
- [33] WU L, WANG X, YU Z, CUI X, XU Q. Simultaneous improvement of grain yield and quality through manipulating two type CG protein gamma subunits in rice [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022,23(3): 1463. DOI: 10.3390/ijms23031463.
- [34] SUN H, QIAN Q, WU K, LUO J, WANG S, ZHANG C, MA Y, LIU Q, HUANG X, YUAN Q. Heterotrimeric G proteins regulate nitrogen-use efficiency in rice [J]. *Nature Genetics*, 2014. 46(6): 652–656. DOI:10.1038/ng.2958.
- [35] SUN S, WANG L, MAO H, SHAO L, LI X, XIAO J, OUYANG Y, ZHANG Q. A G-protein pathway determines grain size in rice [J]. *Nature Communications*, 2018,9(1):1–11. DOI:10.1038/s41467-018-03141-y.
- [36] CUI Y, JIANG N, XU Z, XU Q. Heterotrimeric G protein are involved in the regulation of multiple agronomic traits and stress tolerance in rice [J]. *BMC Plant Biology*, 2020,20(1): 90. DOI:10.1186/s12870-020-2289-6.
- [37] DUAN P, LI Y. Size matters: G protein signaling is crucial for grain size control in rice [J]. *Molecular Plant*, 2021, 14(10): 1618–1620. DOI: 10.1016/j.molp.2021.08.010.
- [38] PATHAK R R, MANDAL V K, JANGAM A P, SHARMA N, MADAN B, JAISWAL D K, RAGHURAM N. Heterotrimeric G-protein α subunit (RGA1) regulates tiller development, yield, cell wall, nitrogen response and biotic stress in rice [J]. *Scientific Reports*, 2021,11(1): 1–19. DOI: 10.1038/s41598-021-81824-1.
- [39] SUHARSONO U, FUJISAWA Y, KAWASAKI T, IWASAKI Y, SATOH H, SHIMAMOTO K. The heterotrimeric G protein α subunit acts upstream of the small GTPase Rac in disease resistance of rice [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002,99(20): 13307–13312. DOI:10.1073/pnas.192244099.
- [40] STEFFENS B, SAUTER M. G proteins as regulators in ethylene-mediated hypoxia signaling [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2010,5(4): 375–378. DOI:10.4161/psb.5.4.10910.
- [41] ZAIT Y, FERRERO-SERRANO Á, ASSMANN S M. The α subunit of the heterotrimeric G protein regulates mesophyll CO₂ conductance and drought tolerance in rice [J]. *New Phytologist*, 2021,232(6):2324–2338. DOI: 10.1111/nph.17730.
- [42] LIU Y, DU Q, BAI L, SUN M, LI Y, HE C, WANG J, YU X, YAN Y. Interference of CsGPA1, the α -subunit of G protein, reduces drought

- tolerance in cucumber seedlings [J]. *Horticultural Plant Journal*, 2021,7(3):209–220. DOI: 10.1016/j.hpj.2021.02.003.
- [43] FERRERO-SERRANO Á, CANTOS C, ASSMANN S M. The role of dwarfing traits in historical and modern agriculture with a focus on rice [J]. *Cold Spring Harbor perspectives in Biology*, 2019,11(11): a034645. DOI: 10.1101/cshperspect.a034645.
- [44] PERFUS-BARBOECH L, JONES A M, ASSMANN S M. Plant heterotrimeric G protein function: insights from *Arabidopsis* and rice mutants [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004,7(6):719–731. DOI:10.1016/j.pbi.2004.09.013.
- [45] FUJISAWA Y, KATO T, OHKI S, ISHIKAWA A, KITANO H, SASAKI T, ASAHI T, IWASAKI Y. Suppression of the heterotrimeric G protein causes abnormal morphology, including dwarfism, in rice [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999,96(13):7575–7580. DOI: 10.1073/pnas.96.13.7575.
- [46] HE F, ZHANG F, SUN W, NING Y, WANG G-L. A versatile vector toolkit for functional analysis of rice genes [J]. *Rice*, 2018,11(1): 27. DOI: 10.1186/s12284-018-0220-7.
- [47] 崔莹, 蔡朝霞, 林拥军, 陈浩. 农杆菌介导水稻快速转化 [J]. *Bio-101*, 2018: e1010176. DOI: 10.21769/BioProtoc.1010176.
CUI Y, CAI Z X, LIN Y J, CHEN H. Agrobacterium-mediated rapid transformation of rice. [J]. *Bio-101*, 2018, 1010176. DOI:10.21769/BioProtoc.1010176.
- [48] 王齐红, 黄骥, 张红生. 一种快速微量提取植物叶片 DNA 的方法 [J]. *生物技术通讯*, 2004,15(5): 479–480.
WANG Q H, HUANG J, ZHANG H S. A rapid method for the isolation of small amount DNA from plant leaf [J]. *Letters in Biotechnology*, 2004, 15(5): 479–480. DOI:10.3969/j.issn.1009-0002.2004.05.016.
- [49] SIMMS D, CHOMCZYNSKI P. TRIzol™: A new reagent for optimal single-step isolation of RNA [J]. *Focus (San Francisco, Calif.)*, 1992, 15(4):99–102. DOI: 10.1016/0003-2670(61)80041-X.
- [50] MIURA K, AGETSUMA M, KITANO H, YOSHIMURA A, MATSUOKA M, JACOBSEN S E, ASHIKARI M. A metastable DWARF1 epigenetic mutant affecting plant stature in rice [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009,106(27): 11218–11223. DOI:10.1073/pnas.0901942106.
- [51] ULLAH H, CHEN J G, YOUNG J C, IM K H, SUSSMAN M R, JONES A M. Modulation of cell proliferation by heterotrimeric G protein in *Arabidopsis* [J]. *Science*, 2001,292(5524): 2066–2069. DOI:10.1126/science.1059040.
- [52] JONES A M, ECKER J R, CHEN J G. A reevaluation of the role of the heterotrimeric G protein in coupling light responses in *Arabidopsis* [J]. *Plant physiology*, 2003,131(4): 1623–1627. DOI:10.1104/pp.102.017624.
- [53] ASSMANN S M. Heterotrimeric and unconventional GTP binding proteins in plant cell signaling [J]. *The Plant Cell*, 2002,14(S1): S355–S373. DOI: 10.1105/tpc.001792.
- [54] SHALEM O, SANJANA N E, ZHANG F. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9 [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2015,16(5): 299–311. DOI: 10.1038/nrg3899.
- [55] FENG Y Z, YU Y, ZHOU Y F, YANG Y W, LEI M Q, LIAN J P, HE H, ZHANG Y C, HUANG W, CHEN Y Q. A natural variant of miR397 mediates a feedback loop in circadian rhythm [J]. *Plant Physiology*, 2020,182(1):204–214. DOI: 10.1104/pp.19.00710.
- [56] LINDEBOOM R G, VERMEULEN M, LEHNER B, SUPEK F. The impact of nonsense-mediated mRNA decay on genetic disease, gene editing and cancer immunotherapy [J]. *Nature Genetics*, 2019,51(11):1645–1651. DOI: 10.1038/s41588-019-0517-5.

(责任编辑 白雪娜)



冯彦钊, 博士, 助理研究员, 广东省农业科学院优秀博士。主要的研究方向为作物基因资源发掘与基因编辑技术。在非编码 RNA 调控开花时间、作物产量等方面取得一些重要进展。在《Plant Physiology》《Plant Biotechnology》等著名期刊发表论文 10 篇, 在 Springer 丛书 Plant Circular RNAs 撰写 1 章节文章。目前主持省基金 1 项、市基金 1 项、院科技人才引进项目和青年导师制项目各 1 项。



于洋, 博士, 副研究员, 广东省农业科学院青年科技骨干, 广东省百名博士博士后创新人物 (2020 年)。主要从事作物基因资源发掘与基因编辑技术研究, 在作物产量、抗病等复杂农艺性状的调控方面取得一些重要成果。近年来, 在《Plant Biotechnology Journal》《Plant Physiology》等重要期刊上发表学术论文 18 篇, 受邀撰写 Springer 论著 Plant Circular RNAs 一书章节 1 篇; 获 2018 年广东省科学技术奖自然科学类一等奖 (排名第 5)。主持国家自然科学基金 2 项、省自然科学基金 2 项、市自然科学基金 1 项、博士后基金 1 项, 分别以第一和第二参与人参加 NSFC-广东联合基金重点项目和国家自然科学基金重大研究计划各 1 项。