

谢留杰,段敏,黄善军. 基于 CRISPR/Cas9 技术创制抗稻瘟病基因 *pi21* 突变体[J]. 上海农业学报,2025,41(2):8-15.

基于 CRISPR/Cas9 技术创制抗稻瘟病基因 *pi21* 突变体

谢留杰,段敏,黄善军*

(台州市农业科学研究院作物研究所,台州 318000)

摘要: 利用 CRISPR/Cas9 技术对台 15-7 糯的抗稻瘟病基因 *pi21* 进行编辑。选择位于 *pi21* 基因第一、第二外显子上的 2 段序列作为靶点构建二元表达载体 pHUE411-*pi21*-Cas9,通过农杆菌侵染法获得 21 个以台 15-7 糯为背景的 T₀ 代单株。加代后在 149 个 T₁ 代单株中检测出 6 个不含载体的纯合突变体,包含 3 种突变类型,分别命名为 *pi21-t1*、*pi21-t2*、*pi21-t3*,每种突变分别导致 *pi21* 基因编码的蛋白缺失 227、239、99 个氨基酸。稻瘟病鉴定结果表明:成熟期时,3 种突变体中仅 *pi21-t3* 的病斑数量和面积较台 15-7 糯显著降低,其他 2 种突变体发病水平与台 15-7 糯基本相同。除抗稻瘟病能力有所提高外,突变体 *pi21-t3* 在成熟期的其他农艺性状,如株高、每穗粒数、结实率等,与台 15-7 糯没有显著差异。本研究可为抗稻瘟病水稻育种提供借鉴。

关键词: CRISPR/Cas9 技术;*pi21* 基因;稻瘟病;纯合突变体

中图分类号: S511.03 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3924(2025)02-008-08

Creation of rice blast resistant gene *pi21* mutants based on CRISPR/Cas9 technology

XIE Liu jie, DUAN Min, HUANG Shan jun*

(Crop Research Institute, Taizhou Academy of Agricultural Sciences, Taizhou 318000, China)

Abstract: The rice blast resistant gene *pi21* of Tai 15-7 Nuo was edited by CRISPR/Cas9 technology. Two sequences located on the first and second exons of *pi21* gene were selected as targets to construct a binary expression vector pHUE411-*pi21*-Cas9. Twenty one T₀ individual plants with Tai 15-7 Nuo as the background were obtained by *Agrobacterium* infection. After generation addition, 6 homozygous mutants without vector were detected in 149 T₁ plants, including 3 types of mutations named *pi21-t1*, *pi21-t2*, *pi21-t3*. Each mutation resulted in the deletion of 227, 239, and 99 amino acids in the protein encoded by *pi21* gene. The identification results of rice blast showed that during the mature stage, only the number and area of disease spots in *pi21-t3* among the 3 mutants were significantly reduced compared to Tai 15-7 Nuo, while the incidence level of the other 2 mutants was basically the same as that of Tai 15-7 Nuo. Except for improved resistance to rice blast, the mutant *pi21-t3* showed no significant difference in other agronomic traits such as plant height, number of grains per spike, and seed setting rate during the mature stage compared to Tai 15-7 Nuo. This study could provide some reference for breeding rice varieties resistant to rice blast.

Key words: CRISPR/Cas9 technology;*pi21* gene; Rice blast; Homozygous mutant

稻瘟病是水稻上发病最广泛的三大病害之一,它是一种由子囊真菌 *Magnaporthe oryzae* (无性态: *Pyricularia grisea* Sacc)引起的大范围水稻病害,严重时可导致水稻绝收,对水稻生产造成极大威胁。每年全球各水稻种植区因稻瘟病造成的产量损失达 10%~30%^[1]。2013—2017 年,我国稻瘟病年平均危害面积约为 7 500 万 hm² (<https://www.natesc.org.cn>)。在水稻品种审定过程中,稻瘟病抗性鉴定是必不可少的因素,具有“一票否决权”^[2]。

收稿日期:2024-04-28

基金项目:浙江省自然科学基金项目(LTGN24C13002);台州市农业科技计划项目(23nya09);台州市农业科技计划项目(23nya18)

作者简介:谢留杰(1986—),男,硕士,农艺师,主要从事水稻抗病育种及耐盐品种选育研究。E-mail:xieliujie@126.com

* 通信作者,E-mail:sjhuang219@126.com

挖掘抗病基因、培育抗病品种是防治水稻稻瘟病最经济有效的措施。近年来,科学家利用图位克隆、分子标记等方法定位到 100 多个稻瘟病抗性基因,已克隆的有 35 个^[3]。其中,种类最多的是编码 NBS-LRR 蛋白的基因,包括 *Pi2*、*Pi5*、*Pi9*、*Pib*、*Pigm* 等基因^[4-8]。*pi21* 是目前唯一一个被定位的隐性抗瘟性基因位点。*pi21* 基因编码产物富含脯氨酸,包含重金属结合结构域和蛋白互作结构域等功能域^[9]。与感病品种‘Aichiasahi’中的等位基因相比,抗病品种‘Owarihatamochi’中的 *pi21* 基因所编码蛋白的第一和第二个脯氨酸结构域分别缺失 7 个和 16 个氨基酸,即 DNA 序列分别缺失 21 bp 和 48 bp,这是造成抗感差异的原因所在^[10]。

CRISPR(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)是原核生物基因组内的一段保守序列,当外源 DNA 入侵时,该序列能够特异性识别外源 DNA 并对其切割,以达到沉默外源基因的目的,是一种获得性免疫机制^[11]。CRISPR/Cas9 基因编辑系统利用蛋白 Cas9 对多个目标 DNA 进行识别并切除,目前应用最广泛的 Type II 型包含 1 个 Cas9 蛋白和 sgRNA 元件,机制简单^[12-13]。CRISPR/Cas9 技术最大的特点是只对生物自身的内源基因进行编辑和改造,改造后没有外源基因转入。作为新兴的基因编辑系统,CRISPR/Cas9 已广泛应用于水稻品种改良,其中包括增强水稻对生物胁迫的抗性^[14]。鉴于 *pi21* 基因突变属于功能缺失型突变,近几年已有不少研究者使用 CRISPR/Cas9 技术定点改造 *pi21* 基因,以期在短时间内获得具有抗病性的水稻材料^[15-17]。有研究表明,*pi21* 基因与高垩白相关基因紧密连锁^[10],因此相较于传统杂交方法,通过基因编辑技术定点突变 *pi21* 基因的另一优势是可以保持受体材料的原有特性,不影响稻米品质。

本研究以自主选育的糯稻品系台 15-7 糯为材料,通过 CRISPR/Cas9 技术定点突变 *pi21* 基因,以期获得无外源载体、综合性状优良且抗稻瘟病的糯稻材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料及载体

水稻材料台 15-7 糯为台州市农业科学研究院自主选育的糯稻品系,产量稳定、米质较好,但易感稻瘟病。CRISPR/Cas9 载体 pHUE411、中间载体 pCBC-MT1T2 由南京农业大学张红生教授实验室馈赠。

1.2 双靶点 pHUE411-*pi21*-gRNA 载体的构建

1.2.1 选择靶位点

水稻抗稻瘟病基因 *pi21* (*Os04g0401000*) 编码富含脯氨酸结构域的蛋白。登录网址 <http://chopchop.cbu.uib.no/>,选择 2 个 PAM(Protospacer adjacent motif)序列(NGG)前 20 nt 的寡核苷酸作为靶点,其分别位于 *pi21* 基因的第一、第二外显子上,并登录网址 <http://www.rgenome.net/cas-offinder/>评估脱靶情况。

1.2.2 构建 pHUE411-*pi21*-gRNA 载体

参照 Chen 等^[18]的方法稍作修改。(1)PCR 扩增。以中间载体 pCBC-MT1T2 质粒为模板,设计双重引物 PiT1-BsF/BsR 及 PiT1-F0/RO(表 1)扩增 gDNA。(2)建立酶切-连接体系。反应体系为 15 μ L,包括:3.0 μ L 回收产物,1.0 μ L 载体质粒 pHUE411,1.5 μ L 10 \times T4 DNA 连接酶缓冲液,1.5 μ L 10 \times BSA,1 μ L *Bsa* I 内切酶,1 μ L T4 DNA 连接酶,加水补足至 15 μ L。在 37 $^{\circ}$ C 下反应 5 h。(3)转化及阳性验证。连接液转化大肠杆菌 DH10B 感受态,卡那霉素(Kan)板筛选。设计引物 PiU3-F/R 验证单克隆阳性与否,阳性质粒送南京思普金生物科技有限公司测序。阳性验证引物序列见表 1。

1.3 转基因植株的创制及阳性验证

测序正确的大肠杆菌质粒转化农杆菌 EHA105,经根癌农杆菌侵染台 15-7 糯愈伤组织得到转基因植株。参考 Duan 等^[19]的方法进行转基因植株验证。

验证为阳性的 T_0 代转基因单株,经自交结实获得 T_1 代种子。待 T_1 代种子播种成苗后,提取叶片 DNA,继续扩增潮霉素基因以寻找不含载体的 Cas9-free 单株^[19]。针对 Cas9-free 单株,以引物 Pi-NF/NR 扩增 *pi21* 基因全长序列并测序,寻找靶序列发生纯合突变的单株。使用生物软件 BioXM 2.6 及 DNAMAN 对纯合突变体及野生型的 *pi21* 基因全长序列、编码蛋白的氨基酸序列进行比对分析。扩增潮霉素及 *pi21* 基因全长序列的引物序列见表 1。

表 1 试验中涉及的 PCR 引物
Table 1 PCR primers involved in the experiment

引物名称	引物序列(5'-3')
PiT1-BsF	ATATATGGTCTCTGGCGT <u>TCGGATGCCAAGATCAGGA</u>
PiT1-BsR	ATTATTGGTCTCTAAACCTGCCCGGCGTACGGGTACC
PiT1-F0	GTGGATGCCAAGATCAGGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
PiT1-R0	AACCTGCCCGGCGTACGGGTACCGCTTCTTGGTGCC
PiU3-F	GACAGGCGTCTTCTACTGCTGCTA
PiU3-R	TCACAAATTATCAGCAGGCTAGTC
HYG-F	GCGTCTGCTGCTCCATACAA
HYG-R	TGACATTGGGGAGTTTAGCG
Pi-NF	GACCAAAGCCTGTCTATCTGC
Pi-NR	ACATCGATCAGCCTCGTGT

注:下划线表示 2 个 19 nt 大小的靶位点。

1.4 无载体 *pi21* 纯合突变糯稻表型及抗稻瘟病能力田间鉴定

2023 年正季,将 3 种 *pi21* 纯合突变糯稻与野生型台 15-7 糯种植于台州市农业科学研究院小溪基地,每个株系种 7 行,每行 7 株,单本插,成熟期时取中间 5 株统计农艺性状。同年 6 月,采用直播方式将 4 个株系种植于浙江省淳安县文昌镇东树坑村的稻瘟病鉴定基地,每个株系约 15 株,2 次重复。同时,在所有鉴定材料(包含本研究的 4 个株系)周围播种稻瘟病诱发品种‘宁 81’,诱导自然发病。2023 年 8 月底孕穗期时,每个株系选取 3 个植株,每株 5 张剑叶,根据《水稻稻瘟病病级分级标准》统计剑叶上的病斑数量和面积,定级病级^[20]。

2 结果与分析

2.1 台 15-7 糯 *pi21* 基因型及双元表达载体 pHUE411-*pi21*-Cas9 的构建

台 15-7 糯是一个感病的糯稻品系,以其基因组 DNA 为模板,用引物 Pi-NF/NR 扩增 *pi21* 基因全长序列并测序。与抗稻瘟病品种‘Owarihatamochi’的序列比对后发现,台 15-7 糯的 *pi21* 基因属于感病等位基因,其编码蛋白的第一、第二个脯氨酸结构域分别多出 7 个和 16 个氨基酸,即 DNA 序列分别多出 21 bp 和 48 bp(图 1)。

‘Owarihatamochi’ 台 15-7 糯	MGILVILVDLQCCRCDAKIRKVLGCLLEEEYCIEKVEYDVKNRNVIVRGKFDPEKLCCKKIW MGILVILVDLQCCRCDAKIRKVLGCLLEEEYCIEKVEYDVKNRNVIVRGKFDPEKLCCKKIW *****
‘Owarihatamochi’ 台 15-7 糯	CKAGKI I KEILIVDVWPP-----PCKPPPCEKPPEDCKPKPCHCCSCEKPKPKPKPCH CKAGKI I KEILIVDVWPP <u>PLPQPPP</u> PCKPPPCEKPPEDCKPKPCHCCSCEKPKPKPKPCH *****
‘Owarihatamochi’ 台 15-7 糯	CEKPKPCHCEKPKPCEKPP-----PKPECKLVYPYPVPYPYAGQWCCP CEKPKPCHCEKPKPCEKPP <u>PCKPEEPPKPPPEKPPP</u> PKPECKLVYPYPVPYPYAGQWCCP *****
‘Owarihatamochi’ 台 15-7 糯	KPEPPKPPPEPPKEPEPPKPCGSHAFVCVCKPAPPPPPCGCSGGHNGCGGIRPWPWPQ KPEPPKPPPEPPKEPEPPKPCGSHAFVCVCKPAPPPPPCGCSGGHNGCGGIRPWPWPQ *****
‘Owarihatamochi’ 台 15-7 糯	VWPPPPVCPPPPWCYTEDNANACSIM VWPPPPVCPPPPWCYTEDNANACSIM *****

图 1 台 15-7 糯与抗病品种‘Owarihatamochi’的 *pi21* 基因编码蛋白的氨基酸比对

Fig. 1 Amino acid comparison of *pi21* gene encoded protein between Tai 15-7 Nuo and disease resistant variety ‘Owarihatamochi’

选择第一、第二外显子上的 2 个 PAM 序列(NGG)前 20 nt 的寡核苷酸作为靶点,2 个靶点之间相距 583 bp(图 2)。参照 Xing 等^[21]的方法(Golden gate cloning),将 2 个目标序列连入终载体 pHUE411,组成双元表达载体 pHUE411-*pi21*-Cas9。

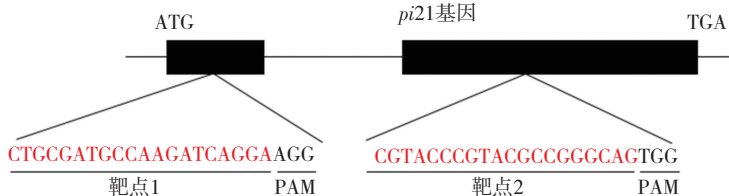
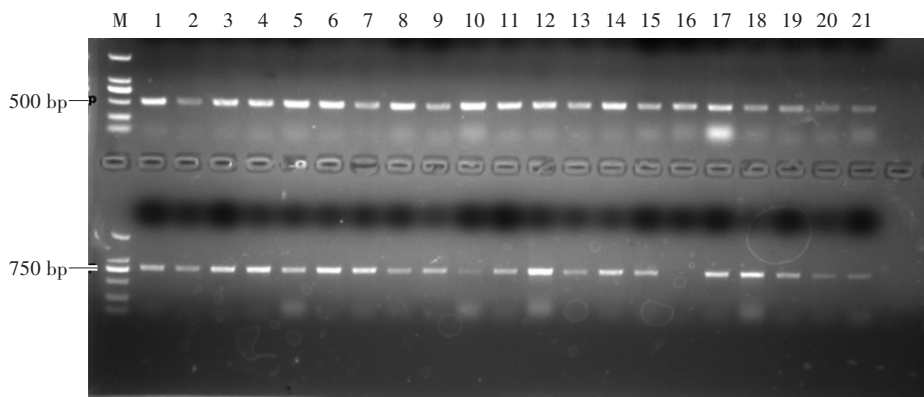


图2 gRNA 的靶点位置
Fig.2 Target sites of gRNA

2.2 无载体的 *pi21* 纯合突变株的筛选与鉴定

以台 15-7 糯成熟水稻种子诱导的胚性愈伤组织为受体,将构建好的表达载体 pHUE411-*pi21*-Cas9 经根癌农杆菌侵染转入其中,得到 21 个 T_0 代植株。提取 T_0 代转基因水稻叶片的 DNA,分别利用 PiU3-F/R 引物及潮霉素引物 HYG-F/R 进行阳性验证。电泳结果显示:21 个 T_0 代单株均能扩增出 506 bp 大小的潮霉素片段,除 16 号单株外,其余植株均能扩增出 831 bp 大小的载体 + 基因片段(图 3)。综合来看,所有 T_0 代单株均为突变杂合型。



M, marker; 1~21, T_0 代单株。上一行为潮霉素片段,大小 506 bp;下一行为载体 + 基因片段,大小 831 bp,扩增出片段表示植株为阳性。

图3 T_0 代转基因植株阳性检测结果
Fig.3 Positive identification results of T_0 transgenic plants

21 个 T_0 代植株选留正常结实单株,共收回 15 个单株。将 T_1 代种子按照株系加代种植,共计 149 个单株。继续以引物 PiU3-F/R 及 HYG-F/R 进行分析,发现 T_1 代单株中有 30 株不含表达载体。对 30 个无载体单株的 *pi21* 基因进行测序,共获得 6 个纯合突变株,包含 3 种类型的突变,分别命名为 *pi21-t1*、*pi21-t2*、*pi21-t3*。与台 15-7 糯相比,这 3 种突变均在靶点 2 上有 1 个碱基插入,靶点 1 的序列变化则各不相同。其中,*pi21-t1* 和 *pi21-t2* 突变在靶点 1 分别缺失、插入 1 个碱基,*pi21-t3* 突变在靶点 1 之前缺失 48 个碱基(图 4)。比较突变体与野生型的氨基酸序列得知,3 种突变体比台 15-7 糯分别缺失 227、239、99 个氨基酸。利用 SWISS-MODEL 网站 (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 预测蛋白质二级结构,显示突变体的蛋白质二级结构也发生了变化,其中 *pi21-t2* 突变体由于编码的氨基酸数量过少无法预测出结构域(图 5,图 6)。

2.3 *pi21* 突变体农艺性状及抗稻瘟病表型鉴定

2023 年 6 月初,将 3 种 *pi21* 纯合突变体及台 15-7 糯于播种于浙江省淳安县文昌镇东树坑村的稻瘟病鉴定基地,8 月底调查孕穗期发病情况。结果显示:台 15-7 糯叶片上存在较多的纺锤形病斑,突变体中只有 *pi21-t3* 表现出较高的抗稻瘟病能力,剑叶上的病斑数量和面积较野生型明显减少,病级为中抗(图 7);而 *pi21-t1* 和 *pi21-t2* 的病斑情况与野生型类似,稻瘟病抗性没有明显提升。

对台 15-7 糯及 *pi21-t3* 突变体的成熟期性状进行考种分析。如图 8 所示,*pi21-t3* 突变体在株高、每穗粒数、穗长、结实率等方面与台 15-7 糯没有显著差异。可见,该突变体的 *pi21* 基因突变提高了台 15-7 糯的抗稻瘟病能力,但没有改变其他农艺性状。

<i>pi21-t1.seq</i>	ATGGGTATATTGGTCATCTTGCTGGACCTGCAATGCTGCC	40	
<i>pi21-t2.seq</i>	ATGGGTATATTGGTCATCTTGCTGGACCTGCAATGCTGCC	40	
<i>pi21-t3.seq</i>	0	
WT.seq	ATGGGTATATTGGTCATCTTGCTGGACCTGCAATGCTGCC	40	
Consensus	靶点1		
<i>pi21-t1.seq</i>	GCTGCGATGCCAAGAC..AGGAAGGTCCTGGGCTGCCTTG	78	缺失/插入
<i>pi21-t2.seq</i>	GCTGCGATGCCAAGATCAAGGAAGGTCCTGGGCTGCCTXG	80	+1
<i>pi21-t3.seq</i>ATGGGTATA..TGGTCACTCTGGGCTGCCXG	31	-48
WT.seq	GCTGCGATGCCAAGATC..AGGAAGGTCCTGGGCTGCCTTG	79	
Consensus	a g——t c t g g g c t g c e e t t g		
	PAM		
	靶点2		
<i>pi21-t1.seq</i>	GGTGCCGTACCCGTACGCCGGGTCAGTGGTGCCTGCCAAA	678	+1
<i>pi21-t2.seq</i>	GGTGCCGTACCCGTACGCCGGGTCAGTGGTGCCTGCCAAA	680	+1
<i>pi21-t3.seq</i>	GGTGCCGTACCCGTACGCCGGGTCAGTGGTGCCTGCCAAA	631	+1
WT.seq	GGTGCCGTACCCGTACGCCGGGTCAGTGGTGCCTGCCAAA	678	
Consensus	g g t g c c g t a c c c g t a c g c c g g g c a g t g g t g c t g c c e e a a a		
	PAM		

图 4 *pi21* 突变体与野生型目标基因靶点序列比对

Fig. 4 Comparison of target gene sequences between *pi21* mutants and wild-type (WT)

<i>pi21-t1-Aa.seq</i>	MGILVIL.....VDLQCC.....RCDAK	18	
<i>pi21-t2-Aa.seq</i>	MGILVIL.....VDLQCC.....RCDAK	18	
<i>pi21-t3-Aa.seq</i>	MGILVIL.....GCLEEEYIEKVEYDVK	24	
WT-Aa.seq	MGILVILVDLQCCRCDAKIRKVLGCLEEEYIEKVEYDVK	40	
Consensus	m g i l v i l c d k		
<i>pi21-t1-Aa.seq</i>	TGRSWAALKRST...ASRRWSTT.....	38	
<i>pi21-t2-Aa.seq</i>	I..KEGPGLP.....	26	
<i>pi21-t3-Aa.seq</i>	NNRVIVRGKFDPEKLCCKKIWCKAGKIIKEILIVDVWPPPL	64	
WT-Aa.seq	NNRVIVRGKFDPEKLCCKKIWCKAGKIIKEILIVDVWPPPL	80	
Consensus			
<i>pi21-t1-Aa.seq</i>	38	
<i>pi21-t2-Aa.seq</i>	26	
<i>pi21-t3-Aa.seq</i>	KLVPPYPVPYPYAGSVVLPKA.....	166	
WT-Aa.seq	KLVPPYPVPYPYACQWCCPKPEPPKPPPEPPKEPEPPK	200	
Consensus			
<i>pi21-t1-Aa.seq</i>	38	缺失
<i>pi21-t2-Aa.seq</i>	26	-227
<i>pi21-t3-Aa.seq</i>	166	-239
WT-Aa.seq	VWPPPPVCPPPPWCYTEDNANACSI	265	-99
Consensus			

图 5 *pi21* 突变体与野生型目标基因编码氨基酸序列比对

Fig. 5 Comparison of amino acid sequences encoded by target genes between *pi21* mutants and WT

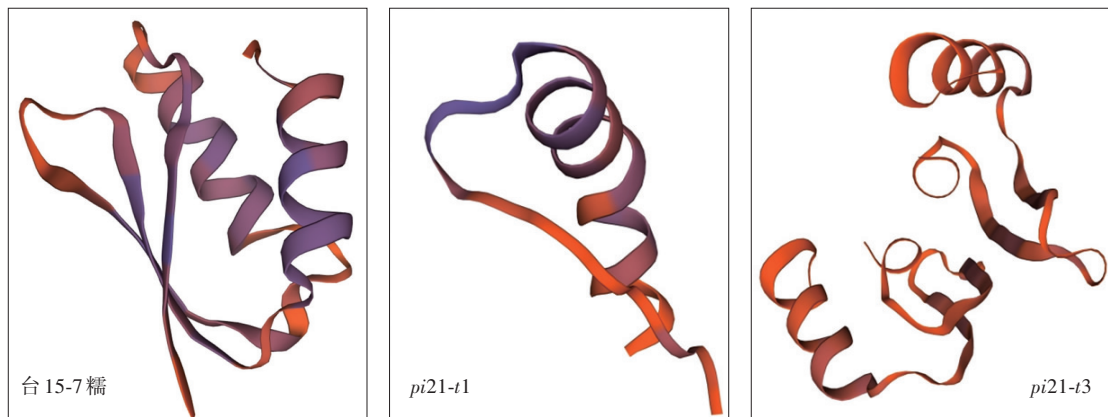


图 6 *pi21* 突变体与野生型预测 *pi21* 基因编码蛋白二级结构比对

Fig. 6 Comparison of predicted secondary structure of *pi21* gene encoded protein between *pi21* mutants and WT

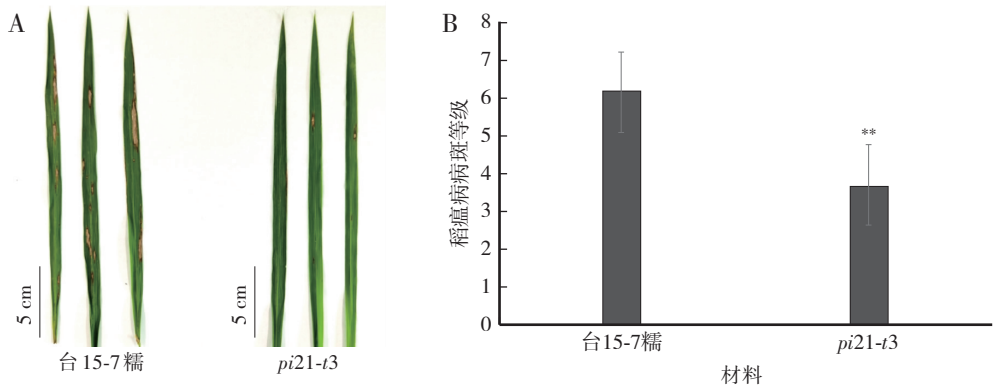
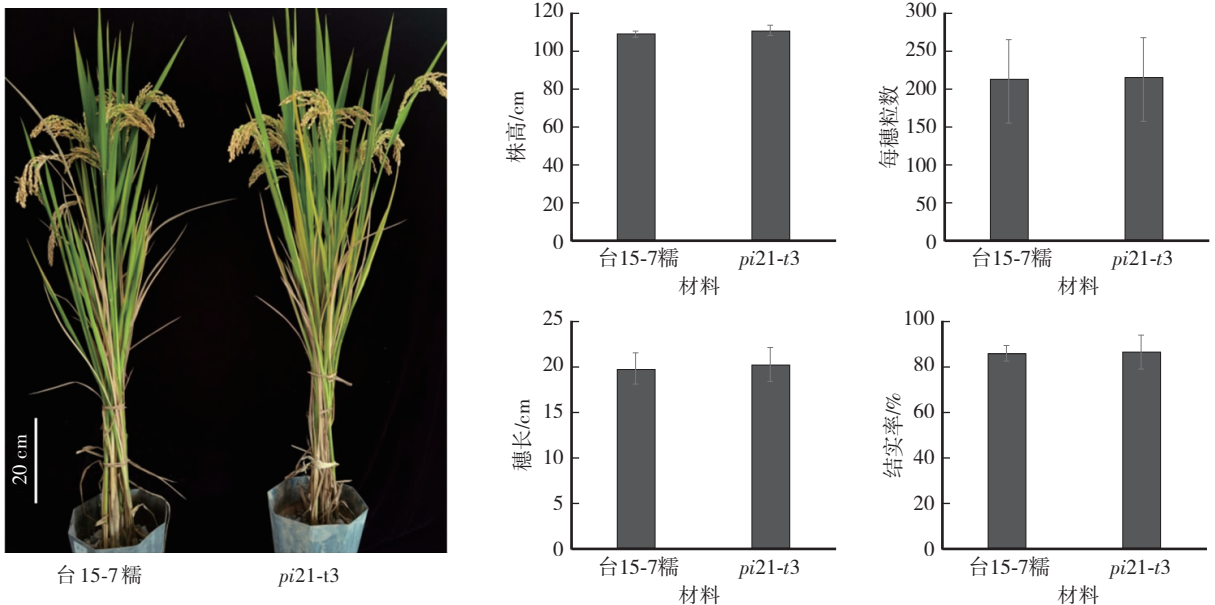


图7 稻瘟病田间鉴定结果

Fig. 7 Field identification results of rice blast

图8 台15-7糯与*pi21-t3*突变体成熟期表型对比及性状分析Fig. 8 Phenotype comparison and traits analysis during the mature stage between Tai 15-7 Nuo and *pi21-t3* mutant

3 讨论

基因编辑依赖于经基因工程改造的核酸酶,在基因组中特定位置产生位点特异性双链断裂(Double strand break, DSB)。目前,主要有4种核酸酶可以介导靶向识别与切割,即巨型核酸酶^[22]、转录激活样效应因子核酸酶TALEN^[23]、锌指核酸酶蛋白ZFN^[24]以及成簇规律间隔短回文重复CRISPR/Cas9系统^[25]。相较于前3种核酸酶,CRISPR/Cas9系统设计简单,仅需合成一个sgRNA就能实现对基因的特异性修饰^[26],因此在水稻、小麦等作物中得到广泛应用。

本研究构建的双元表达载体pHUE411-*pi21*-Cas9使用的是中国农业大学陈其军教授课题组研发的pHUE411载体体系^[18],可以进行双靶点或者多靶点同时编辑,针对单靶点编辑效率低下的缺点进行了有效的改进^[27]。获得的突变体*pi21-t1*、*pi21-t2*在靶点1分别缺失、插入1个碱基,*pi21-t3*在靶点1之前缺失48个碱基。对于*pi21-t1*、*pi21-t2*,由于靶点1缺失或插入1个碱基,已在靶点2前形成移码突变,蛋白质翻译提前终止,因此靶点2的变化可以不作分析。*pi21-t3*在靶点1之前的突变形式是非移码的,结合靶点2的单碱基插入,导致蛋白质翻译至166位时终止。从序列分析结果来看,3个突变体的*pi21*基因编辑都是成功的。

感病株的*pi21*基因编码一个由5个保守的PxxPxxP组成的脯氨酸富集的互作蛋白,已克隆的抗病株*pi21*则缺失了2个脯氨酸富集元件,这2个基因的表达都受到稻瘟病菌的诱导,*Pi21/pi21*在早期的防卫反应中扮演重要角色^[10]。本研究中*pi21-t1*和*pi21-t2*突变体的移码突变导致翻译提前终止,缺失了所有

脯氨酸富集元件。因此,推断这 2 个突变体在稻瘟病菌侵染后,初始防卫反应未能启动,故而表现出感病型。相比之下,*pi21-t3* 的基因序列在靶点 1 之前缺失 48 bp,保留了 1 个脯氨酸富集元件,防卫反应能够正常启动,表现出抗病性增强。

Fukuoka 等^[10]研究发现,栽培稻中 *pi21* 基因位点的等位性变异非常丰富,共有 12 个单倍型,其中在 2 个外显子区域分别缺失 21 bp 和 48 bp 的单倍型表现出了抗病能力。Feng 等^[28]在东北的一个粳稻品系 GKGH 中发现了 *pi21* 基因的新抗性等位位点,并以 GKGH 为供体,通过构建染色体片段置换系将该位点导入主栽品种‘空育 131’中,增强了‘空育 131’的抗稻瘟病水平。基因编辑创制的 *pi21* 突变材料,在接种稻瘟病菌后叶片病斑面积占比为 4%~9%^[29-30],与野生型相比,其病斑扩展速率下降,但病原菌仍然繁殖,表现出具有部分抗性的典型特征。

随着基因编辑技术的发展与优化,研究者通过对 *pi21* 基因位点的编辑获得非转基因性质的抗性植株,同时不改变其他农艺性状^[16,31]。本研究得到的 *pi21-t3* 突变体田间抗稻瘟病能力相较于台 15-7 糯有显著提高,而其他农艺性状没有显著变化,达到了预期的目标。另外,也有研究者将 *pi21* 基因与其他目标基因同时突变,以期获得多种目标性状的突变体^[17]。需要注意的是,尽管基因编辑的高效率扩大了 *pi21* 基因的应用范围,但 *pi21* 基因具有部分抗性的特性,在抗稻瘟病性育种中,*pi21* 基因的应用需要聚合主效抗病基因,以达到培育高抗、广谱、持久抗病新品种的目的。

4 结论

本研究利用 CRISPR/Cas9 技术对台 15-7 糯的抗稻瘟病基因 *pi21* 进行编辑,获得了 3 种突变体 *pi21-t1*、*pi21-t2*、*pi21-t3*;每种突变分别导致 *pi21* 基因编码的蛋白缺失 227、239、99 个氨基酸;突变体的株高、每穗粒数、结实率等农艺性状与野生型台 15-7 糯无显著差异;成熟期调查稻瘟病病斑,显示仅 *pi21-t3* 的病斑数量和面积相较台 15-7 糯有显著降低,其他 2 种突变体发病水平与野生型基本相同。研究表明,对感病水稻材料台 15-7 糯的 *pi21* 基因位点进行编辑后,成功获得了 1 个稻瘟病抗性提升的突变株系。

致谢:

感谢南京农业大学张红生教授实验室提供本研究中的载体 pHUE411、pCBC-MT1T2 以及相应的技术支持。

参 考 文 献

- [1] SKAMNIOTI P, GURR S J. Against the grain; safeguarding rice from rice blast disease[J]. Trends in Biotechnology, 2009, 27(3):141-150.
- [2] 曹妮, 陈渊, 季芝娟, 等. 水稻抗稻瘟病分子机制研究进展[J]. 中国水稻科学, 2019, 33(6):489-498.
- [3] WANG B H, EBBOLE D J, WANG Z H. The arms race between *Magnaporthe oryzae* and rice: Diversity and interaction of *Avr* and *R* genes[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2017, 16(12):2746-2760.
- [4] CHEN D H, ZEIGLER R S, AHN S W. Phenotypic characterization of the rice blast resistance gene *Pi-2(t)* [J]. Plant Disease, 1996, 80(6): 52-56.
- [5] LEE S K, SONG M Y, SEO Y S, et al. Rice *Pi5*-mediated resistance to *Magnaporthe oryzae* requires the presence of two coiled-coil-nucleotide-binding-leucine-rich repeat genes[J]. Genetics, 2009, 181(4):1627-1638.
- [6] WU J, KOU Y J, BAO J D, et al. Comparative genomics identifies the *Magnaporthe oryzae* avirulence effector *AvrPi9* that triggers *Pi9*-mediated blast resistance in rice[J]. The New Phytologist, 2015, 206(4):1463-1475.
- [7] ZHANG S L, WANG L, WU W H, et al. Function and evolution of *Magnaporthe oryzae* avirulence gene *AvrPib* responding to the rice blast resistance gene *Pib*[J]. Scientific Reports, 2015, 5:11642.
- [8] DENG Y W, ZHU X D, SHEN Y, et al. Genetic characterization and fine mapping of the blast resistance locus *Pigm(t)* tightly linked to *Pi2* and *Pi9* in a broad-spectrum resistant Chinese variety[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2006, 113(4):705-713.
- [9] 袁熹, 李大勇, 宋凤鸣. 水稻对稻瘟病的广谱抗性: 分子机制及其育种应用[J]. 植物生理学报, 2017, 53(8):1348-1358.
- [10] FUKUOKA S, SAKA N, KOGA H, et al. Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in rice[J]. Science, 2009, 325(5943):998-1001.
- [11] MOJICA F J M, DÍEZ-VILLASEÑOR C, GARCÍA-MARTÍNEZ J, et al. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements[J]. Journal of Molecular Evolution, 2005, 60(2):174-182.
- [12] SHAN Q W, WANG Y P, LI J, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(8):686-688.
- [13] SHEN L, HUA Y F, FU Y P, et al. Rapid generation of genetic diversity by multiplex CRISPR/Cas9 genome editing in rice[J]. Science China Life Sciences, 2017, 60(5):506-515.

- [14] 任俊,曹跃炫,黄勇,等. 基因编辑技术及其水稻中的发展和应用[J]. 中国稻米,2021,27(4):92-100.
- [15] 王芳权,范方军,李文奇,等. 利用 CRISPR/Cas9 技术敲除水稻 *Pi21* 基因的效率分析[J]. 中国水稻科学,2016,30(5):469-478.
- [16] 杨海河,毕冬玲,张玉,等. 基于 CRISPR/Cas9 技术的水稻 *pi21* 基因编辑材料的创制及稻瘟病抗性鉴定[J]. 分子植物育种,2017,15(11):4451-4465.
- [17] LI S F, SHEN L, HU P, et al. Developing disease-resistant thermosensitive male sterile rice by multiplex gene editing[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2019, 61(12):1201-1205.
- [18] CHEN Y Y, WANG Z P, NI H W, et al. CRISPR/Cas9-mediated base-editing system efficiently generates gain-of-function mutations in *Arabidopsis*[J]. Science China Life Sciences, 2017, 60(5):520-523.
- [19] 段敏,谢留杰,高秀莹,等. 利用 CRISPR/Cas9 技术创制广亲和水稻温敏雄性不育系[J]. 中国水稻科学,2023,37(3):233-243.
- [20] 陶荣祥,陈建明,廖琴. 水稻病虫田间手册:病虫害鉴别与抗性鉴定[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2006.
- [21] XING H L, DONG L, WANG Z P, et al. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants[J]. BMC Plant Biology, 2014, 14:327.
- [22] KHALIL A M. The genome editing revolution:review[J]. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 2020, 18(1):68.
- [23] BOGDANOVA A J, VOYTAS D F. TAL effectors:customizable proteins for DNA targeting[J]. Science, 2011, 333(6051):1843-1846.
- [24] BIBIKOVA M, BEUMER K, TRAUTMAN J K, et al. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases [J]. Science, 2003, 300(5620):764.
- [25] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339(6121):819-823.
- [26] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. Science, 2012, 337(6096):816-821.
- [27] XU R F, LI H, QIN R Y, et al. Generation of inheritable and “transgene clean” targeted genome-modified rice in later generations using the CRISPR/Cas9 system[J]. Scientific Reports, 2015, 5:11491.
- [28] FENG X M, LIN K X, ZHANG W Q, et al. Improving the blast resistance of the elite rice variety Kongyu-131 by updating the *Pi21* locus[J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1):249.
- [29] 徐鹏,王宏,涂燃冉,等. 利用 CRISPR/Cas9 系统定向改良水稻稻瘟病抗性[J]. 中国水稻科学,2019,33(4):313-322.
- [30] 梁敏敏,张华丽,陈俊宇,等. 利用 CRISPR/Cas9 技术创制抗稻瘟病香型早籼温敏核不育系[J]. 中国水稻科学,2022,36(3):248-258.
- [31] NAWAZ G, USMAN B, PENG H W, et al. Knockout of *Pi21* by CRISPR/Cas9 and iTRAQ-based proteomic analysis of mutants revealed new insights into *M. oryzae* resistance in elite rice line[J]. Genes, 2020, 11(7):735.

(责任编辑:闫其涛)