

基于 CRISPR/Cas9 技术的水稻抗稻瘟病基因 *Pita* 突变体的创制

吴凡, 王月, 陈闽, 刘佳, 杭悦宇, 孙小芹^①

[江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏南京 210014]

摘要: 以粳稻品种‘日本晴’(*Oryza sativa* subsp. *japonica* ‘Nipponbare’)为转基因受体,利用 CRISPR/Cas9 技术对抗稻瘟病基因 *Pita* 的第 6 至第 25 位碱基进行定点编辑,对突变体进行鉴定,筛选出不含 T-DNA 区的纯合突变体,并对该基因纯合突变体的稻瘟病抗性及其 6 个稻瘟病相关基因的表达水平进行分析。结果表明:在获得的 8 株 T₀ 代阳性转基因植株中,有 7 株为突变体植株,包括 1 株杂合体和 6 株纯合体,突变率和纯合突变率分别为 87.5% 和 85.7%,突变类型包括碱基置换、碱基插入和碱基缺失。通过 PCR 检测获得 42 株 T₁ 代 T-DNA 阴性植株,全部为纯合突变体。纯合突变体的稻瘟病抗性分析结果表明:接种稻瘟病菌小种 CH199 (*Magnaporthe oryzae* strain CH199) 后,*Pita* 基因编辑材料 V1-38-5 的 T₂ 代植株叶片病斑面积明显大于野生型‘日本晴’,平均病级为 4.1±0.2,极显著 ($P<0.01$) 高于野生型‘日本晴’(3.0±0.2)。此外,与野生型‘日本晴’相比,V1-38-5 的 T₂ 代植株 *PR2* 和 *PR1b* 基因的相对表达量在接种稻瘟病菌小种 CH199 12 h 时较低,其 *PR2*、*PR1b*、*PR3* 和 *E2F* 基因的相对表达量在接种稻瘟病菌小种 CH199 24 h 时也较低。研究结果显示:利用 CRISPR/Cas9 技术对水稻 *Pita* 基因进行定点编辑能够获得稳定遗传且更易感病的纯合突变体材料,这些材料可用于水稻抗性品种选育和品质改良,在一定程度上加速水稻定向分子育种的进程。

关键词: 水稻; 抗稻瘟病基因 *Pita*; CRISPR/Cas9 技术; 基因编辑; 纯合突变体

中图分类号: Q786; S511.034 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2020)02-0001-07

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2020.02.01

Creation of mutant of blast resistance gene *Pita* in *Oryza sativa* based on CRISPR/Cas9 technology WU Fan, WANG Yue, CHEN Min, LIU Jia, HANG Yueyu, SUN Xiaoqin^① (Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2020, 29(2): 1-7

Abstract: Taking *Oryza sativa* subsp. *japonica* ‘Nipponbare’ as transgenic acceptor, the fixed-point editing of the 6th to 25th bases of blast resistance gene *Pita* was performed by CRISPR/Cas9 technology, and the mutants were identified, the homozygous mutants without T-DNA region were screened out, and the blast resistance and the expression levels of six blast pathogenesis-related genes in homozygous mutants of this gene were analyzed. The results show that among eight T₀ positive transgenic plants obtained, there are seven mutant plants, including one heterozygote and six homozygotes, and the mutation rate and homozygous mutation rate are 87.5% and 85.7%, respectively, and the mutation types include base substitution, base insertion, and base deletion. Forty-two T-DNA negative plants of T₁ generation are obtained by using PCR detection, and all of them are homozygous mutants. Analysis result of blast resistance of homozygous mutants shows that after inoculating *Magnaporthe oryzae* strain CH199, leaf spot area of T₂ generation plants of *Pita* gene editing material V1-38-5 is evidently larger than that of wild type of ‘Nipponbare’, and the average disease grade is 4.1±0.2, which is extremely significantly

收稿日期: 2019-08-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31470448); 江苏省中国科学院植物研究所博士人才科研启动基金项目(011900610)

作者简介: 吴凡(1994—),女,江苏南京人,硕士研究生,主要从事植物分子遗传与进化方面的研究。

^①通信作者 E-mail: xiaoqinsun@cnbg.net

($P < 0.01$) higher than that of wild type of 'Nipponbare' (3.0 ± 0.2). Besides, compared with wild type of 'Nipponbare', relative expression levels of *PR2* and *PR1b* genes in T_2 generation of V1-38-5 are relatively low when inoculating *M. oryzae* strain CH199 for 12 h, and those of *PR2*, *PR1b*, *PR3*, and *E2F* genes are also relatively low when inoculating *M. oryzae* strain CH199 for 24 h. It is suggested that the fixed-point editing *Pita* gene in *O. sativa* by CRISPR/Cas9 technology can obtain homozygous mutant materials with stable inheritance and more susceptible to diseases, these materials can be used for resistant variety breeding and quality improvement of *O. sativa*, and accelerate the process of directional molecular breeding of *O. sativa* to a certain extent.

Key words: *Oryza sativa* Linn.; blast resistance gene *Pita*; CRISPR/Cas9 technology; gene editing; homozygous mutant

水稻 (*Oryza sativa* Linn.) 的稻瘟病是由稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 引起的一种真菌性病害^[1]。目前, 研究人员已经鉴定出约 100 个抗稻瘟病基因, 定位于除 3 号染色体外的其他 11 条染色体上^[2], 并成功克隆出 *Pib*、*Pita*、*Pb1*、*Pi9*、*Pi2*、*Pizt* 和 *Pid2* 等 27 个抗稻瘟病基因^[3-4]。*Pita* 基因是继 *Pib* 基因之后第 2 个被克隆出来的抗稻瘟病基因, 其表达产物与稻瘟病菌的无毒基因 *AVR-Pita* 的表达产物相互作用, 激活抗病防御基因表达, 从而抑制水稻稻瘟病发生^[5]。*Pita* 基因是一个包含 2 个外显子和 1 个内含子的单拷贝显性基因, 定位于水稻 12 号染色体近着丝点的区域^[6]; *Pita* 基因编码 NBS-LRR 类蛋白, 其功能受到氨基酸位点的控制, 当第 918 位氨基酸由丙氨酸突变为丝氨酸时, 该基因功能丧失^[6]。此外, 不同水稻个体的 *Pita* 基因存在大量的单核苷酸多态性位点, 导致水稻对稻瘟病菌的抗性存在个体间差异^[7-8]。

CRISPR/Cas9 是一种基因编辑系统, 能够为农作物遗传改良提供高效、快速的遗传操作工具^[9], 已应用于多种模式植物和农作物的基因敲除^[10-14]。杨海河等^[15]利用 CRISPR/Cas9 技术对粳稻品种 '日本晴' (*O. sativa* subsp. *japonica* 'Nipponbare') 的 *pi21* 基因进行编辑, 从 T_1 代转基因株系中筛选获得 *pi21* 纯合突变体; 韩娇等^[16]利用 CRISPR/Cas9 技术对水稻 *Pht3* 亚家族磷转运蛋白基因 *OsPht* 进行编辑, 成功获得目标基因碱基缺失突变体; 黄忠明等^[17]利用 CRISPR/Cas9 技术对粳稻温敏不育基因 *TMS5* 进行编辑, 获得 *tms5* 突变体; 白建江等^[18]利用 CRISPR/Cas9 技术对水稻 2 号染色体上的淀粉分支酶基因 *SBE3* 进行编辑, 获得高抗性淀粉纯合突变体。*Pita* 基因为稻瘟病抗性基因, 对 *Pita* 基因进行研究有利于研究者对水稻抗稻瘟病机制的了解, 然而, 目前尚未见利用 CRISPR/Cas9 技术编辑水稻抗稻瘟病基因

Pita 的研究报道。

鉴于此, 本研究利用 CRISPR/Cas9 技术对粳稻品种 '日本晴' *Pita* 基因的第 6 至第 25 位碱基进行定点编辑, 对突变体进行鉴定, 筛选出不含 T-DNA 区的纯合突变体, 并对该基因纯合突变体的稻瘟病抗性及其 6 个稻瘟病病程相关基因的表达水平进行分析, 以期明确 *Pita* 基因在水稻抵御稻瘟病中的作用, 为水稻良种选育及品质改良提供材料。

1 材料和方法

1.1 材料

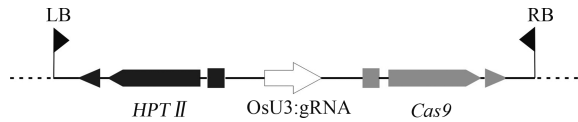
本研究以稻瘟病感病品种 '日本晴' 为转基因受体材料; 供试的粳稻品种 '日本晴' 和籼稻品种 '9311' (*O. sativa* subsp. *indica* '9311') 均由南京大学生命科学学院田大成教授馈赠。实验使用的真核表达载体 pGREB31 购自美国 Addgene 公司; 大肠杆菌 DH5 α 购自宝日医生物技术(北京)有限公司, 农杆菌 LBA4404 为本实验室保存的菌株; 稻瘟病菌小种 CH199 (*Magnaporthe oryzae* strain CH199) 由中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所何祖华教授提供。实验涉及的所有引物均由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 *Pita* 基因靶位点设计 利用 CRISPR-P 在线工具 (<http://crispr.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR2/SCORE>) 设计 *Pita* 基因的靶位点^[19-21], 选择评分较高且位于 *Pita* 基因 5' 端的第 6 至第 25 位碱基序列 (5'-GCCGCGCTCAGTGCATCGC-3') 作为靶位点。根据 Cas-OFFinder 和 BLAST 分析结果确认不存在脱靶效应。

1.2.2 pTGE1 表达载体的构建 利用 CRISPR-P 在

线工具设计 *Pita* 基因的 gRNA 序列 (g11S 序列为 5'-GGCAGCCGGCGGTCACTGCATCGC-3', g11AS 序列为 5'-AAACGCGATGCACTGACCGCCGGC-3'); 将合成的 g11S 和 g11AS 等量混合, 制备双链接头; 与经过 *Bsa* I 酶切的 pGREB31 载体连接, 获得 pTGE1 表达载体 (图 1)。



LB: T-DNA 的左边界 Left boundary of T-DNA; *HPT II*: 潮霉素磷酸转移酶基因 *Hygromycin B phosphotransferase gene*; OsU3:gRNA: OsU3 启动子与引导 RNA 的融合结构 Fusion structure of OsU3 promoter and guide RNA; *Cas9*: CRISPR 相关蛋白核酸酶 9 基因 *CRISPR-related protein nuclease 9 gene*; RB: T-DNA 的右边界 Right boundary of T-DNA.

图 1 *Pita* 基因编辑载体 pTGE1 的 T-DNA 区
Fig. 1 T-DNA region of *Pita* gene editing vector pTGE1

1.2.3 T_0 代阳性转基因植株的获得与验证 以野生型‘日本晴’的成熟胚为外植体, 将构建的 pTGE1 表达载体转化到农杆菌 LBA4404 中并进行侵染, 采用质量浓度 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 潮霉素进行筛选, 获得再生组培苗, 炼苗后移栽到土壤中, 置于温室内进行培养, 培养条件为昼温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 、夜温 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 、空气相对湿度 70%、光照度 $30\ 000 \text{ lx}$ 、光照时间 $16 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

取移栽后存活再生苗的新鲜叶片, 采用 CTAB 法^[22] 提取总 DNA。以 T-DNA 区域的 *Cas9* 基因序列为模板设计 1 对 PCR 扩增引物进行阳性鉴定。其中, 引物 *Cas9S* 的序列为 5'-TGGTGGAAGAGGATAA GAAGC-3', 引物 *Cas9AS* 的序列为 5'-TCAAACAGT GTCAGGGTCAGC-3'。扩增条件: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 4 min; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s, $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 40 s, 35 个循环; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。

1.2.4 突变体鉴定 设计 1 对跨越靶位点的引物对 T_0 代阳性转基因植株的 *Pita* 基因进行扩增。其中, 引物 *Pita787* 的序列为 5'-TGCCTACTTCTTTCCACAT CA-3', 引物 *Pita1900* 的序列为 5'-ATCCGAAGACTG ATGCTGATGTT-3'。将扩增产物进行测序, 用 Sequencher 4.5 软件对测序结果进行序列比对, 统计突变类型和突变体类型。

1.2.5 不含 T-DNA 区的纯合突变体筛选 利用引物 *Pita787* 和 *Pita1900* 扩增 *Pita* 基因编辑位点上、下游的 DNA 片段, 对 T-DNA 阴性植株进行 *Pita* 基因

突变位点鉴定。具体操作如下: 播种 T_0 代纯合突变体植株自交获得的 T_1 代种子, 根据 PCR 扩增结果确定 T-DNA 阴性植株, 从 T_1 代 T-DNA 阴性植株各株系材料中分别随机选择 3 株植株, 对其 DNA 进行 PCR 扩增, 将扩增产物进行 TA 克隆, 随机选取 4 个单克隆进行测序。若 4 个单克隆中 *Pita* 基因编辑位点的碱基突变完全一致, 则判定为纯合突变体。按照上述方法对 T_2 代植株进行检测, 确定 *Pita* 基因编辑材料是否稳定遗传。

1.2.6 纯合突变体对稻瘟病的抗性分析 将稻瘟病菌小种 CH199 进行活化培养, 待培养至第 12 天时洗脱并收集稻瘟病菌的孢子, 调整至 1 mL 溶液中包含 2.5×10^5 个孢子^[23], 用于样株的稻瘟病菌喷雾接种。分别以抗稻瘟病的籼稻品种‘9311’和野生型‘日本晴’为对照进行稻瘟病抗性分析。取健康饱满的‘9311’、野生型‘日本晴’和基因编辑材料 V1-38-5 的 T_2 代植株种子进行萌发, 发芽 5 d 后移栽到土壤中, 在同一盆中分区种植, 每个区种植 10 株; 移栽 8 d 后进行稻瘟病菌喷雾接种, 接种稻瘟病菌 5 d 后对每个区的样株分别进行病级调查及评定, 最终计为样株的平均病级^[24]。

1.2.7 纯合突变体稻瘟病病程相关基因的相对表达量分析 分别在接种稻瘟病菌小种 CH199 的 0 (未接种)、12 和 24 h 时采集基因编辑材料 V1-38-5 的 T_2 代植株和野生型‘日本晴’植株的嫩叶, 用 TRIzol 试剂 (美国 Invitrogen 公司) 提取总 RNA, 并反转录成 cDNA; 以 *EF-257* 基因为内参基因^[15], 采用 qRT-PCR 技术检测水稻稻瘟病菌病程相关基因 *PR2*^[25]、*PR1b*^[26]、*PR3*^[27]、*PDR* (引物 F 的序列为 5'-ATCC ACTCACC GCAAGTAACAG-3', 引物 R 的序列为 5'-CTC CAGGAAGACCAACTAAAGCA-3')、*PBZ1*^[28] 和 *E2F*^[29] 的表达水平。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各基因的相对表达量。

1.3 数据统计分析

使用 SPSS 16.0 统计分析软件对病级和各病程相关基因的相对表达量进行差异显著性分析。

2 结果和分析

2.1 水稻 *Pita* 基因突变体鉴定

利用 CRISPR/Cas9 技术对‘日本晴’的 *Pita* 基因进行编辑, 利用农杆菌介导的水稻转化方法将 *Pita*

基因编辑载体 pTGE1 转化到野生型‘日本晴’的成熟胚中,经过潮霉素筛选及 PCR 扩增,共获得 8 株 T₀ 代阳性转基因植株。

使用引物 Pita787 和 Pita1900 对获得的 8 株 T₀ 代阳性转基因植株进行 PCR 扩增,测序和鉴定结果

(表 1) 显示:有 7 株 T₀ 代阳性转基因植株的 *Pita* 基因发生了突变,突变率为 87.5%;经鉴定,在这 7 株突变体中,有 1 株为杂合体,6 株为纯合体,纯合突变率为 85.7%。突变类型包括碱基置换、碱基插入和碱基缺失。

表 1 粳稻品种‘日本晴’*Pita* 基因突变体的测序和鉴定结果

Table 1 Sequencing and identification results of mutants of *Pita* gene in *Oryza sativa* subsp. *japonica* ‘Nipponbare’

编号 No.	突变位置 ¹⁾ Mutation position ¹⁾	突变情况 Mutation status	突变类型 Mutation type	突变体类型 Mutant type
V1-26	21st,22nd	AT 替换成 G AT substituting to G	碱基置换 Base substitution	纯合体 Homozygote
V1-29	21st,22nd	AT 替换成 G AT substituting to G	碱基置换 Base substitution	纯合体 Homozygote
V1-35	20th,21st	T 插入 T insertion	碱基插入 Base insertion	纯合体 Homozygote
V1-38	20th,21st	T 插入 T insertion	碱基插入 Base insertion	纯合体 Homozygote
V1-39	20th,21st	T 插入 T insertion	碱基插入 Base insertion	纯合体 Homozygote
V1-47	20th,21st	T 插入 T insertion	碱基插入 Base insertion	纯合体 Homozygote
V3-55	20th,21st	CA 缺失 CA deletion	碱基缺失 Base deletion	杂合体 Heterozygote

¹⁾ 从起始密码子开始的碱基位置 Base position from start codon.

2.2 不含 T-DNA 区的纯合突变体筛选

根据 PCR 扩增结果共获得 42 株 T₁ 代 T-DNA 阴性植株(部分检测结果见图 2),经鉴定这 42 株 T₁ 代 T-DNA 阴性植株全部为纯合突变体。同样,从来源于基因编辑材料 T₁ 代 V1-38-5 自交的 T₂ 代植株中,随机选取 8 株进行 PCR 扩增及测序分析,结果(图 3)显示这 8 株 T₂ 代植株全部为纯合突变体,说明 *Pita* 基因编辑材料遗传稳定。

2.3 纯合突变体对稻瘟病的抗性分析

以抗稻瘟病粳稻品种‘9311’和野生型‘日本晴’为对照,对 *Pita* 基因编辑材料 V1-38-5 的 T₂ 代(即纯合突变体)进行稻瘟病菌小种 CH199 接种,并对其稻瘟病抗性进行分析,结果(图 4)显示:接种稻瘟病

菌小种 CH199 后,‘9311’的叶片没有出现病斑,平均病级为 0.0±0.0,说明‘9311’未感病;野生型‘日本晴’的叶片病斑面积较小,平均病级为 3.0±0.2,表现为轻度至中度感病;V1-38-5 的 T₂ 代植株叶片病斑面积较大,平均病级为 4.1±0.2,表现为重度感病。V1-38-5 的 T₂ 代植株的平均病级与野生型‘日本晴’和‘9311’在统计学上存在极显著($P<0.01$)差异,说明 *Pita* 基因被编辑后‘日本晴’对稻瘟病菌的抗性降低。

2.4 纯合突变体稻瘟病病程相关基因的相对表达量分析

qRT-PCR 分析结果(图 5)表明:与未接种稻瘟病菌(0 h)时相比,基因编辑材料 V1-38-5 的 T₂ 代植

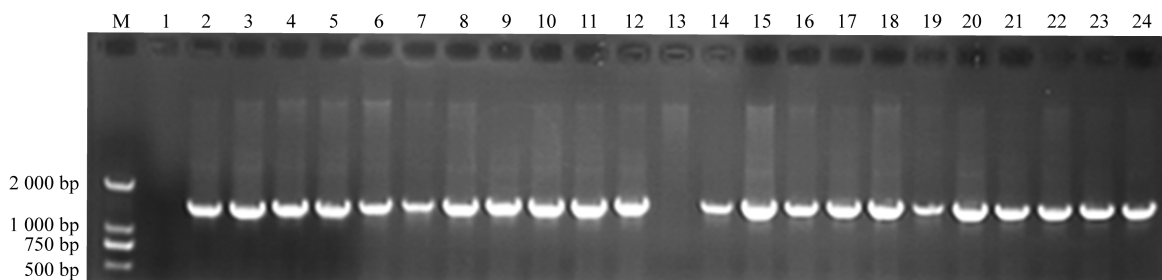
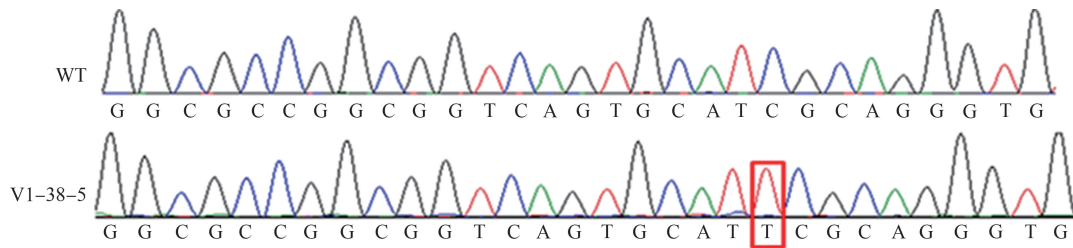
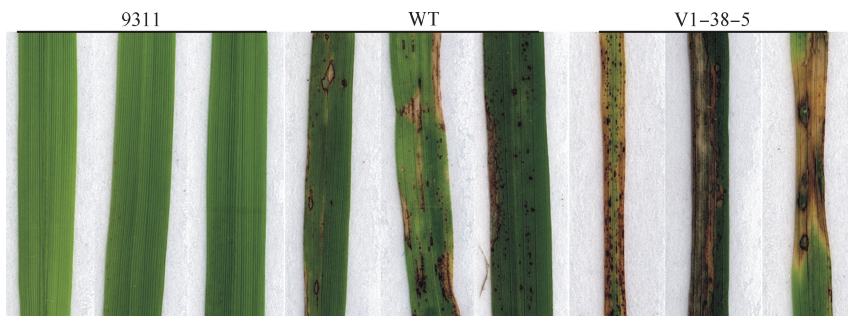


图 2 粳稻品种‘日本晴’*Pita* 基因编辑材料 V1-38-5 的 T-DNA 阴性植株的部分检测结果
Fig. 2 Partial detection result of T-DNA negative plants of *Pita* gene editing material V1-38-5 of *Oryza sativa* subsp. *japonica* ‘Nipponbare’



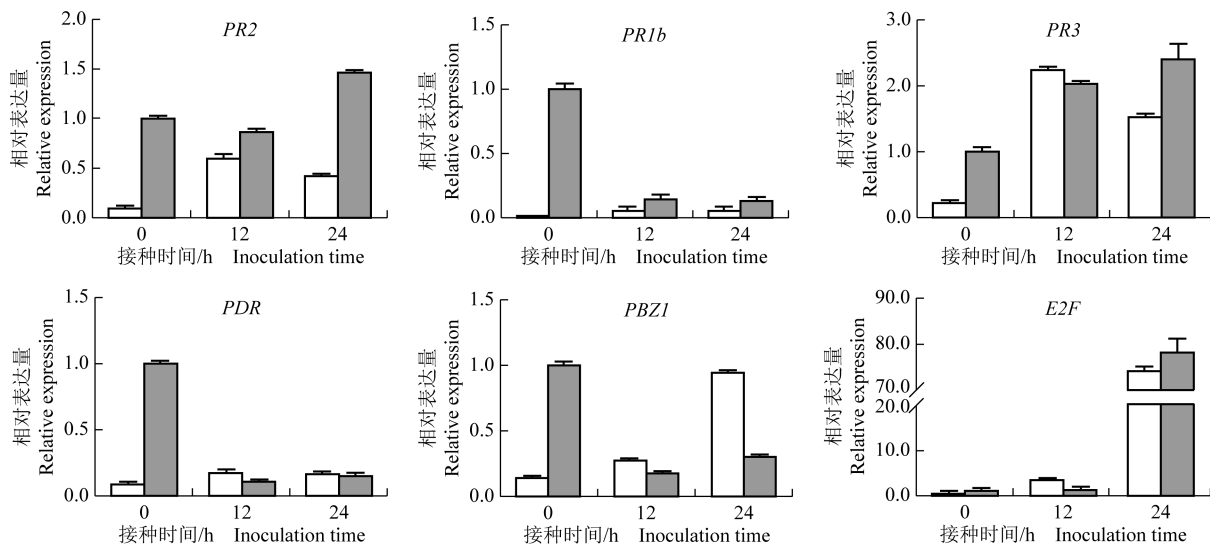
WT: 野生型 ‘日本晴’ Wild type of ‘Nipponbare’; V1-38-5: *Pita* 基因编辑材料 V1-38-5 的 T₂ 代植株 T₂ generation plants of *Pita* gene editing material V1-38-5. T: 突变的碱基 Mutant base.

图 3 粳稻品种 ‘日本晴’ *Pita* 基因编辑材料 V1-38-5 的 T₂ 代植株纯合突变体鉴定
 Fig. 3 Homozygous mutant identification of T₂ generation plants of *Pita* gene editing material V1-38-5 of *Oryza sativa* subsp. *japonica* ‘Nipponbare’



9311: 籼稻品种 ‘9311’ *Oryza sativa* subsp. *indica* ‘9311’; WT: 野生型 ‘日本晴’ Wild type of ‘Nipponbare’; V1-38-5: *Pita* 基因编辑材料 V1-38-5 的 T₂ 代植株 T₂ generation plants of *Pita* gene editing material V1-38-5.

图 4 接种稻瘟病菌小种 CH199 后粳稻品种 ‘日本晴’ *Pita* 基因编辑材料 V1-38-5 的 T₂ 代植株抗性分析
 Fig. 4 Resistance analysis on T₂ generation plants of *Pita* gene editing material V1-38-5 of *Oryza sativa* subsp. *japonica* ‘Nipponbare’ after inoculating *Magnaporthe oryzae* strain CH199



□: *Pita* 基因编辑材料 V1-38-5 的 T₂ 代植株 T₂ generation plants of *Pita* gene editing material V1-38-5; ■: 野生型 ‘日本晴’ Wild type of ‘Nipponbare’.

图 5 接种稻瘟病菌小种 CH199 后粳稻品种 ‘日本晴’ *Pita* 基因编辑材料 V1-38-5 的 T₂ 代植株病程相关基因的表达分析
 Fig. 5 Analysis on expression of pathogenesis-related genes in T₂ generation plants of *Pita* gene editing material V1-38-5 of *Oryza sativa* subsp. *japonica* ‘Nipponbare’ after inoculating *Magnaporthe oryzae* strain CH199

株 *PR2*、*PR1b*、*PR3*、*PDR*、*PBZ1* 和 *E2F* 6 个稻瘟病病程相关基因的相对表达量均在接种稻瘟病菌 12 和 24 h 时明显升高;野生型‘日本晴’*PR2* 基因的相对表达量在接种稻瘟病菌 24 h 时明显升高,其 *PR3* 和 *E2F* 基因的相对表达量在接种稻瘟病菌 12 和 24 h 时也明显升高,而其 *PR2* 基因的相对表达量在接种稻瘟病菌 12 h 时明显降低,其 *PR1b*、*PDR* 和 *PBZ1* 基因的相对表达量在接种稻瘟病菌 12 和 24 h 时也明显降低。

比较发现,与野生型‘日本晴’相比,基因编辑材料 V1-38-5 的 T_2 代植株 *PR2* 和 *PR1b* 基因的相对表达量在接种稻瘟病菌 12 h 时较低,其 *PR2*、*PR1b*、*PR3* 和 *E2F* 基因的相对表达量在接种稻瘟病菌 24 h 时也较低。

3 讨论和结论

稻瘟病既是水稻易遭受的严重病害之一,也是限制水稻高产和稳产的重要因子。*Pita* 基因是水稻中的单拷贝抗稻瘟病基因,因此,研究 *Pita* 基因有助于人们更好地了解稻瘟病的发生机制。CRISPR/Cas9 技术可通过编辑目的基因改良农作物的农艺性状,利用 CRISPR/Cas9 技术开发的遗传材料常存在多种突变类型^[30],可为植物育种研究提供丰富的遗传材料。本研究利用 CRISPR/Cas9 技术对水稻 *Pita* 基因进行了编辑,结果表明: T_0 代阳性转基因植株的 *Pita* 基因突变率达 87.5%,且 T_0 代的纯合突变率高达 85.7%;突变类型包括碱基置换、碱基插入和碱基缺失,并且这些突变可稳定遗传。

相关研究^[5-6]表明:*Pita* 基因通过特异性识别 *AVR-Pita* 可产生超敏反应,激活抗病防御基因的表达,并且 *Pita* 基因第 918 位氨基酸的突变决定了该基因对 *AVR-Pita* 的识别特异性,当该位点的丙氨酸被丝氨酸取代后,*Pita* 基因与 *AVR-Pita* 的互作被削弱,从而导致水稻感染稻瘟病。本研究使用的转基因受体材料为‘日本晴’,其 *Pita* 基因的第 918 位为丝氨酸,接种稻瘟病菌 IC17 后表现为重度感病^[7],接种稻瘟病菌小种 81278ZB15 和 GUY11 后表现为抗病^[31],本研究接种稻瘟病菌小种 CH199 后则表现为轻度至中度感病,推测这可能是由于使用的稻瘟病菌小种不同所致。本研究中,‘日本晴’*Pita* 基因编辑材料 V1-38-5 的 T_2 代植株表现为重度感病,这可能是因

为 *Pita* 基因的 N 端发生了碱基非 3 整数倍的替代、插入或缺失,致使该基因的编码框提前终止,从而导致植株丧失抗稻瘟病菌的能力。另外,‘日本晴’*Pita* 基因编辑材料 V1-38-5 的 T_2 代植株各病程相关基因的相对表达量总体上明显低于野生型‘日本晴’,说明水稻 *Pita* 基因的突变可能影响病程相关基因对稻瘟病菌的敏感性,导致植株抗病能力下降,更易感病。

综上所述,利用 CRISPR/Cas9 技术对水稻 *Pita* 基因进行定点编辑,能够获得稳定遗传且更易感病的纯合突变体材料,这些材料为水稻抗性品种选育和品质改良奠定了材料基础,从而在一定程度上加速水稻定向分子育种的进程。

参考文献:

- [1] ZHANG Q, YANG W, SUN Z. Mechanical properties of sound and fissured rice kernels and their implications for rice breakage [J]. *Journal of Food Engineering*, 2005, 68(1): 65-72.
- [2] ZHENG W, WANG Y, WANG L, et al. Genetic mapping and molecular marker development for *Pi65(t)*, a novel broad-spectrum resistance gene to rice blast using next-generation sequencing [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2016, 129(5): 1035-1044.
- [3] LIU W, LIU J, TRIPLETT L, et al. Novel insights into rice innate immunity against bacterial and fungal pathogens [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2014, 52: 213-241.
- [4] 朱小丽, 陶跃之, 周波. 水稻抗稻瘟病基因的复等位分布特征及其在基因挖掘中的应用 [J]. *浙江农业学报*, 2015, 27(10): 1789-1796.
- [5] JIA Y, MCADAMS S A, BRYAN G T, et al. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance [J]. *The EMBO Journal*, 2000, 19(15): 4004-4014.
- [6] BRYAN G T, WU K S, FARRALL L, et al. A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta* [J]. *The Plant Cell*, 2000, 12(11): 2033-2045.
- [7] WANG X, JIA Y, SHU Q Y, et al. Haplotype diversity at the *Pi-ta* locus in cultivated rice and its wild relatives [J]. *Phytopathology*, 2008, 98(12): 1305-1311.
- [8] THAKUR S, GUPTA Y K, SINGH P K, et al. Molecular diversity in rice blast resistance gene *Pi-ta* makes it highly effective against dynamic population of *Magnaporthe oryzae* [J]. *Functional and Integrative Genomics*, 2013, 13: 309-322.
- [9] 李红, 谢卡斌. 植物 CRISPR 基因组编辑技术的新进展 [J]. *生物工程学报*, 2017, 33(10): 1700-1711.
- [10] LI J F, AACH J, NORVILLE J E, et al. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9 [J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(8): 688-691.
- [11] WANG Z P, XING H L, DONG L, et al. Egg cell-specific

- promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in *Arabidopsis* in a single generation[J]. *Genome Biology*, 2015, 16: 144.
- [12] SHAN Q, WANG Y, LI J, et al. Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system[J]. *Nature Protocols*, 2014, 9(10): 2395–2410.
- [13] GIL-HUMANES J, WANG Y, LIANG Z, et al. High-efficiency gene targeting in hexaploid wheat using DNA replicons and CRISPR/Cas9[J]. *The Plant Journal*, 2017, 89(6): 1251–1262.
- [14] MAO Y, ZHANG H, XU N, et al. Application of the CRISPR-Cas system for efficient genome engineering in plants[J]. *Molecular Plant*, 2013, 6(6): 2008–2011.
- [15] 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.
- [16] 韩娇, 王莉, 何蕊, 等. CRISPR/Cas9系统构建的水稻*OsPh1*基因突变体材料可用于养分转运评价[J]. *植物营养与肥料学报*, 2017, 23(5): 1359–1369.
- [17] 黄忠明, 周延彪, 唐晓丹, 等. 基于CRISPR/Cas9技术的水稻温敏不育基因*tms5*突变体的构建[J]. *作物学报*, 2018, 44(6): 844–851.
- [18] 白建江, 张建明, 朴钟泽, 等. 应用CRISPR/Cas9系统编辑水稻*SBE3*基因获得高抗性淀粉水稻新品系[J]. *分子植物育种*, 2018, 16(5): 1510–1516.
- [19] LEI Y, LU L, LIU H Y, et al. CRISPR-P: a web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants[J]. *Molecular Plant*, 2014, 7(9): 1494–1496.
- [20] BORTESI L, FISCHER R. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond[J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(1): 41–52.
- [21] MIAO J, GUO D, ZHANG J, et al. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system[J]. *Cell Research*, 2013, 23(10): 1233–1236.
- [22] 王慧娜, 初志战, 马兴亮, 等. 高通量PCR模板植物基因组DNA制备方法[J]. *作物学报*, 2013, 39(7): 1200–1205.
- [23] LI W, LIU Y, WANG J, et al. The durably resistant rice cultivar Digu activates defence gene expression before the full maturation of *Magnaporthe oryzae* appressorium[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2016, 17(3): 354–368.
- [24] BONMAN J M, DE DIOS T I V, KHIN M M. Physiologic specialization of *Pyricularia oryzae* in the Philippines[J]. *Plant Disease*, 1986, 70(8): 767–769.
- [25] FUKUOKA S, YAMAMOTO S I, MIZOBUCHI R, et al. Multiple functional polymorphisms in a single disease resistance gene in rice enhance durable resistance to blast[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 4550.
- [26] AGRAWAL G K, RAKWAL R, JWA N S. Rice (*Oryza sativa* L.) *OsPR1b* gene is phytohormonally regulated in close interaction with light signals[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 278(2): 290–298.
- [27] NISHIZAWA Y, NISHIO Z, NAKAZONO K, et al. Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic Japonica rice by constitutive expression of rice chitinase[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, 99(3/4): 383–390.
- [28] KIM S G, KIM S T, WANG Y, et al. The RNase activity of rice probenazole-induced protein 1 (PBZ1) plays a key role in cell death in plants[J]. *Molecules and Cells*, 2011, 31(1): 25–31.
- [29] MAGYAR Z. Keeping the balance between proliferation and differentiation by the *E2F* transcriptional regulatory network is central to plant growth and development [M] // BÖGRE L, BEEMSTER G. *Plant Growth Signaling*. Berlin: Springer-Verlag, 2008: 89–105.
- [30] MISHRA R, JOSHI R K, ZHAO K. Base editing in crops: current advances, limitations, and future implications [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18: 20–31.
- [31] 陶欢. 水稻品种CO39及其NILs基因组重测序序列的组装与SNPs分析[D]. 福州: 福建农林大学生命科学学院, 2016: 22–23.

(责任编辑: 佟金凤)