DOI: 10.3724/SP.J.1006.2020.92059

利用 CRISPR/Cas9 技术编辑水稻温敏不育基因 *TMS5*

陈日荣^{1,**} 周延彪^{2,3,**} 王黛君⁵ 赵新辉³ 唐晓丹³ 许世冲⁴
唐倩莹³ 符星学³ 王 凯³ 刘选明^{1,*} 杨远柱^{1,2,3,4,*}

¹ 湖南大学生物学院 / 植物功能基因组学与发育调控湖南省重点实验室, 湖南长沙 410082; ² 袁隆平农业高科技股份有限公司 / 农业农村部南方水稻品种创制重点实验室, 湖南长沙 410001; ³ 湖南亚华种业科学研究院, 湖南长沙 410119; ⁴ 华中农业大学植物科学技术学院, 湖北武汉 430070; ⁵ 湖南师范大学生命科学学院, 湖南长沙 410081

摘 要: *tms5* 是生产上应用最广泛的温敏不育基因。为创制新型水稻温敏核不育系, 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术将 6 个优良的粳稻和 4 个优良的籼稻的 *TMS5* 基因敲除, 获得了温敏核不育系。比较发现, 粳稻温敏不育系 ZG75S、CYGS、YG0618S、ZG07S、T0361S、7679S 的不育起点温度在 28~32°C 之间, 籼稻温敏核不育系 2537S、6150S、6379S 的不育起点温度在 24~28°C 之间, 而籼稻温敏核不育系 1109S 的不育起点温度低于 23.5°C。说明不同遗传背景材料获得的 *tms5* 突变体的不育起点温度不一样, 通过 *TMS5* 的敲除可能获得不育起点温度较低的温敏核不育系。利用 1109S 与优质父本 8048 选配出优质高产杂交稻组合 1109S/8048。大田试验表明, 1109S/8048 比区试对照丰两优 4 号增产 13.1%。温敏核不育系 1109S 及高产杂交稻组合 1109S/8048 的创制为高产育种提供了新的途径。

关键词: 水稻; CRISPR/Cas9; 温敏不育; *TMS5*; 杂交组合

CRISPR/Cas9-mediated editing of the thermo-sensitive genic male-sterile gene *TMS5* in rice

CHEN Ri-Rong^{1,**}, ZHOU Yan-Biao^{2,3,**}, WANG Dai-Jun⁵, ZHAO Xin-Hui³, TANG Xiao-Dan³, XU Shi-Chong⁴, TANG Qian-Ying³, FU Xing-Xue³, WANG Kai³, LIU Xuan-Ming^{1,*}, and YANG Yuan-Zhu^{1,2,3,4,*}

¹ Hunan Province Key Laboratory of Plant Functional Genomics and Developmental Regulation / College of Biology, Hunan University, Changsha 410082, Hunan, China; ² Yuan Longping High-Tech Agriculture Co. Ltd. / Key Laboratory of Rice Germplasm Enhancement in Southern China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Changsha 410001, Hunan, China; ³ Yahua Seeds Science Academy of Hunan, Changsha 410119, Hunan, China; ⁴ College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China; ⁵ College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China

Abstract: Thermo-sensitive genic male-sterile (TGMS) gene *tms5* is most widely used in the two-line hybrid breeding system in China. To develop novel rice thermo-sensitive male sterile lines, we knocked out the *TMS5* genes of six elite *japonica* and four *indica* rice varieties by using CRISPR/Cas9 gene editing technology. By analyzing the critical sterility-inducing temperature (CIST) of the newly TGMS lines, it was found that the CIST of *japonica* TGMS lines ZG75S, CYGS, YG0618S, ZG07S, T0361S, and 7679S were between 28°C and 32°C, the CIST of *indica* TGMS lines 2537S, 6150S and 6379S were between 24°C and 28°C, and the CIST of *indica* TGMS line 1109S was lower than 23.5°C. These results indicated that the CIST of *tms5* mutant from different genetic background materials was different. The TGMS lines with lower CIST could be obtained by knocking out the *TMS5* from different genetic background materials. A hybrid rice combination 1109S / 8048 had high quality and high yield. The yield of 1109S/8048 was 13.1% higher than that of Fengliangyou 4. The creation of the TGMS 1109S and the high-yield cross combination 1109S/8048 provides a new way for high-yield breeding.

本研究由国家自然科学基金项目(31901516), 国家转基因生物新品种培育重大专项(2016ZX08001-004)和湖南省自然科学基金项目(2019JJ50414)资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (31901516), the National Major Project for Developing New GM Crops (2016ZX08001-004), and the Project of Hunan Natural Science Youth Foundation (2019JJ50414).

* 通信作者(Corresponding authors): 杨远柱, E-mail: yzhuyah@163.com; 刘选明, E-mail: xml05@hnu.edu.cn

** 同等贡献(Contributed equally to this work)

第一作者联系方式: E-mail: 641605686@qq.com

Received (收稿日期): 2019-11-09; Accepted (接受日期): 2020-04-15; Published online (网络出版日期): 2020-04-26.

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20200426.1442.012.html>

Keywords: rice; CRISPR/Cas9; thermo-sensitive genic male sterile; *TMS5*; cross combination

水稻是我国第一大粮食作物, 持续保持或提高水稻产量是关系国计民生的头等大事和保障国家粮食安全的迫切需求。杂交水稻的产量一般比常规水稻增产 20%~30%, 为我国和世界粮食安全做出了重要贡献^[1]。

两系法杂交水稻是我国发明的水稻杂种优势利用方法, 与三系法杂交稻相比, 两系法杂交水稻配组自由, 选育优质高产的组合几率大, 并且种子生产成本低、育种环节减少, 已经成为我国杂交水稻的主要栽培类型^[2]。水稻两系不育系分为光敏核不育系(PGMS)和温敏核不育系(TGMS), 其中温敏核不育系是应用最广泛的两系不育系。2014 年, Zhou 等^[3]克隆了安农 S-1 和株 1S 的温敏不育基因 *TMS5* 并阐明了其分子机理。*TMS5* 编码具有前体 tRNA 3'端内切酶活性的 RNase Z^{S1} 蛋白, 通过调控受温度诱导的 *Ubl40* mRNA 的表达量, 控制水稻花粉发育。在 *tms5* 温敏不育系中, 由于 RNase Z^{S1} 功能缺失, 高温诱导表达的 *Ubl40* mRNA 过度积累, 导致花粉败育。

CRISPR/Cas9 基因编辑技术是指在基因组水平上对 DNA 序列进行定点改造的遗传操作技术, 由于操作简单、靶基因突变效率高等特点, 已广泛应用于基因功能研究和作物遗传改良方面^[4-6]。Li 等^[7]以中花 11 为受体, 通过 CRISPR/Cas9 技术对负调控水稻产量基因 *Gn1a* (每穗实粒数)、*DEP1* (直立型密穗)、*GS3* (粒长和粒重)和 *IPA1* (穗粒数、分蘖相关)进行定点编辑, 发现 *gn1a* 突变体每穗实粒数增加,

depl 突变体每穗着粒密度增加的同时有半矮化现象, *gs3* 突变体在粒长增加的同时芒也增长。Sun 等^[8]利用 CRISPR/Cas9 技术对水稻淀粉分支酶 IIb 基因 *BEIIb* 进行定点编辑, 与野生型相比, *BEIIb* 缺失突变体的粒形显著变小、直链淀粉和总淀粉含量都显著增加, 直链淀粉最高可达 25%。周延彪等^[2]利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除粳稻 *CSA* 基因, 获得了反光敏不育水稻新种质。

本研究以 *TMS5* 为靶基因, 运用 CRISPR/Cas9 技术进行基因的定点编辑, 分析了 *TMS5* 功能缺失突变体在不同温度处理下的花粉育性, 并对不育起点温度低于 23.5°C 的 1109S 进行测配, 为两系不育系和高产杂交水稻组合的选育提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 水稻材料和 CRISPR/Cas9 载体构建

选用 6 个粳型常规稻浙粳 75 (ZG75)、川引粳 (CYG)、越粳 0618 (YG0618)、ZG07、T0361、7679, 5 个籼型常规稻 2537、6150、6379、1109 和 8048, 2 个杂交稻组合 1109S/8048 和区试对照丰两优 4 号。

TMS5 (LOC_Os02g12290)靶点序列参照已有研究设计的靶位点^[1], 在第 1 外显子上设计 20 bp 的靶点序列 5'-CAGCGGCAAGTCATCGCCGG-3', PAM 序列为 CGG (图 1-A)。利用合成引物 TMS5-target-F/TMS5-target-R (表 1)制成靶位点接头。18T-Cas9 基因编辑中间载体为中国科学院上海植物生理生态研究所李来庚研究员馈赠。通过 *Bbs* I 酶切, 并将 *TMS5*

图 1 CRISPR/Cas9-TMS5 载体构建示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the CRISPR/Cas9-TMS5 vector construction

A: *TMS5* 靶点位置。红色字母为靶点序列, 蓝色字母为 PAM 序列。B: pCambia1301-Cas9-TMS5-gRNA 重组载体结构示意图。LB: 左边界; RB: 右边界。

A: Schematic diagram of the targeted site in *TMS5*. The red letters are the target genome sequences. The blue letters are the protospacer adjacent motif (PAM) sequences. B: Schematic diagram of the pCambia1301-Cas9-TMS5-gRNA construct. LB: left border; RB: right border.

表 1 本研究所用的引物
Table 1 Primer sequences used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')
TMS5-target-F	TGGCCAGCGGCAAGTCATCGCCGG
TMS5-target-R	AAACCCGGCGATGACTTGCCGCTG
M13F	GTAAACGACGGCCAG
GUS-F	CGTCCGTCCTGTAGAAACCC
GUS-R	GTGCGGATTCACTTGC
TMS5-CX-F	TCCAACGCATAGCAGTAGTCG
TMS5-CX-R	TGCCATCGTATCTCCGGTAAA
Cas9-F	ACCGAGGGAATGAGAAAGCC
Cas9-R	CCTTCTGGGTGGTCTGGTTC
HPT-F	GAAGTGCTTGACATTGGGAGT
HPT-R	AGATGTTGGCGACCTCGTATT

接头与酶切后的 18T-Cas9 通过 T₄ 连接酶连接, 转化大肠杆菌 DH5a。M13F (表 1) 与 TMS5-target-R 进行菌液 PCR 检测, 阳性菌液提取重组质粒 18T-Cas9-TMS5。pCAMBIA1301 和 18T-Cas9-TMS5 载体通过双酶切(*Kpn* I 和 *Hind* III)回收目的片段, 再通过 T₄ DNA 连接酶构建植物表达载体 pCAMBIA1301-Cas9-TMS5-gRNA (图 1-B), 并电击转化农杆菌 EHA105。通过农杆菌介导法转化浙粳 75 (ZG75)、川引粳(CYG)、越粳 0618 (YG0618)、ZG07、T0361、7679、2537、6150、6379、1109 成熟胚诱导的愈伤组织, 通过潮霉素抗性筛选 T₀ 代组培苗。

1.2 阳性转基因植株的获得及靶点测序分析

阳性农杆菌转化粳稻品种 ZG75、CYG、YG0618、ZG07、T0361、7679 以及籼稻品种 2537、6150、6379、1109 成熟胚的愈伤组织, 获得 T₀ 代组培苗。利用载体上 GUS 的特异性引物 GUS-F/GUS-R 进行 T₀ 代阳性转基因植株检测, 扩增产物 718 bp 的片段为阳性转基因植株。同时, 通过 GUS 组织化学染色^[9]快速鉴定阳性转基因植株。为了检测 *TMS5* 靶位点的突变情况, 在靶点的 5'端和 3'端分别设计测序引物 TMS5-CX-F/TMS5-CX-R (表 1), 扩增目的片段后送测序公司测序。

1.3 无 T-DNA 元件 *tms5* 突变株的获得

T₀ 代阳性转基因植株通过自交获得 T₁ 代种子。T₁ 代种子播种成苗后, 取幼嫩的叶片进行 GUS 组织化学染色。为了鉴定无 T-DNA 元件的单株, 分别选取每个品种的亲本作为阴性对照, GUS 染色呈蓝色的样品为阳性对照, 以及 GUS 染色不呈蓝色的 5 个单株, 通过 CTAB 法提取 DNA^[10], 用引物 HPT-F/

HPT-R、Cas9-F/Cas9-R 以及 GUS-F/GUS-R 进行 PCR 扩增, 3 对引物都不能扩增出目的条带的植株为不携带载体序列的突变株, *Actin* 基因为对照。筛选的不携带载体序列的突变株通过 TMS5-CX-F/TMS5-CX-R 引物进行 PCR 扩增, 将 PCR 产物送测序公司测序, 分析 *TMS5* 的突变类型。

1.4 *tms5* 突变体育性光温处理与花粉育性鉴定

将 T₁ 代无 T-DNA 元件的 *tms5* 突变体以及对照, 于 2019 年 5 月 14 日大田播种, 6 月 8 日移栽, 参照丁颖的水稻幼穗分化八期划分标准^[11], 当 *tms5* 突变体主茎幼穗发育至六期(温敏核不育系育性敏感期为幼穗分化四至六期, 其中以五至六期最为敏感)的时候, 从大田移到人工培养箱进行光温处理, 分别设置 24℃、28℃ 和 32℃, 光照条件为 12 h 光照/12 h 黑夜, 处理 14 d 后, 在自然条件下生长, 取主茎外的其他茎节上的花粉用碘-碘化钾染色^[1-2], 调查花粉育性。

另外, 采用冷灌池鉴定法详细调查 1109 的 *tms5* 突变体的不育起点温度。即当 1109 的 *tms5* 突变体主茎幼穗发育至六期时, 移至人工冷灌池, 设定 21.5℃、22.5℃ 和 23.5℃ 三个梯度, 处理 10 d 后移至自然条件下生长, 取主茎外的其他茎节上的花粉进行碘-碘化钾染色^[1-2], 调查花粉育性。

1.5 大田农艺性状调查

参考 Zhou 等^[12]关于农艺性状的方法, 于 2019 年 5 月 14 日大田播种父本 8048、杂交组合 1109S/8048 和丰两优 4 号, 6 月 8 日移栽。在成熟期分别选择父本 8048、杂交组合 1109S/8048 和丰两优 4 号各 20 株, 考察株高、分蘖数、千粒重、穗长、穗粒数、结实率和产量。采用 *t* 检验统计分析数据。

2 结果与分析

2.1 转基因植株的鉴定及突变位点分析

通过 GUS 的特异性引物 GUS-F/GUS-R (表 1) 对 T_0 代组培苗进行 PCR 扩增, 以及叶片进行 GUS 组织化学染色筛选阳性转基因植株(图 2)。PCR 能扩增出目的片段并且叶片呈蓝色的为阳性转基因植株。对阳性转基因植株的 *TMS5* 测序, 筛选纯合

突变的 T_0 代植株。纯合突变主要来自 PAM 前第 3 和第 4 碱基之间有单碱基 A、T 和 G 的插入, 以及单碱基和 2 个碱基的缺失(图 3)。ZG75、CYG、YG0618、ZG07、T0361、7679、2537、6150、6379 和 1109 的纯合突变率分别为 25.0%、13.0%、11.8%、19.2%、18.8%、21.1%、8.0%、10.3%、9.4%和 18.8%。

图 2 T_0 代转基因植株的鉴定

Fig. 2 Identification of the T_0 transgenic plants

ZG75(A)、CYG(B)、YG0618(C)、ZG07(D)、T0361(E)、7679(F)、2537(G)、6150(H)、6379(I)、1109(J) 阳性转基因植株的 PCR 鉴定(上)和 GUS 组织化学染色(下)。M: DNA marker; 1~10: 转基因植株。

Identification of the positive transgenic plants by PCR (upper) and GUS histochemical staining (lower) in ZG75(A), CYG(B), YG0618(C), ZG07(D), T0361(E), 7679(F), 2537(G), 6150(H), 6379(I), and 1109(J). M: DNA marker; 1~10: transgenic plants.

	Varieties	Sequence	Mutations
WT	Nipponbare	ATGGCGAA CAGCGGCAAGTCATCGCGG CGGCGACCTCC	
	ZG75S	ATGGCGAA CAGCGGCAAGTCATCGC CGGCGGCGACCTCC	+1 bp
	CYGS	ATGGCGAA CAGCGGCAAGTCATCG -CGGCGGCGACCTCC	-1 bp
	YG0618S	ATGGCGAA CAGCGGCAAGTCATCGC CGGCGGCGACCTCC	+1 bp
	ZG07S	ATGGCGAA CAGCGGCAAGTCATCGC CGGCGGCGACCTCC	+1 bp
	T0361S	ATGGCGAA CAGCGGCAAGTCATCGC CGGCGGCGACCTCC	+1 bp
	7679S	ATGGCGAA CAGCGGCAAGTCATCGC CGGCGGCGACCTCC	+1 bp
	2537S	ATGGCGAA CAGCGGCAAGTCATC --CGGCGGCGACCTCC	-2 bp
	6150S	ATGGCGAA CAGCGGCAAGTCATCGC CGGCGGCGACCTCC	+1 bp
	6379S	ATGGCGAA CAGCGGCAAGTCATCGC CGGCGGCGACCTCC	+1 bp
	1109S	ATGGCGAA CAGCGGCAAGTCATCGC CGGCGGCGACCTCC	+1 bp

图 3 T_0 代纯合突变类型Fig. 3 Homozygous mutation types of T_0 generation

红色字母为靶点序列; 蓝色字母为 PAM 序列; 绿色字母为插入的碱基; 横线表示碱基缺失; +表示插入; -表示缺失; WT 表示野生型。

The red letters are the target genome sequences; the blue letters are PAM; the green letters are the insert base; the horizontal line indicates the missing base; +: insertion; -: deletion; WT: wild-type.

对 T_1 代叶片 GUS 染色不呈蓝色的单株进行 PCR 检测, 筛选不含转基因元件的植株(附图 1)。结果表明, 选取的叶片 GUS 染色不呈蓝色的单株都为不携带载体序列的突变株。测序发现, T_1 代非转基因植株的 *TMS5* 都为纯合突变, 且突变类型与 T_0 代的纯合突变类型一致, 将这些非转且 *TMS5* 纯合突变的单株, 参考黄忠明等^[1]的方法用于不育起点温度的鉴定。

2.2 *tms5* 突变体不育起点温度的鉴定

将 T_1 代 *TMS5* 纯合突变且不携带载体序列的突变株的植株用于不育起点温度的鉴定。当 *tms5* 突变体的主茎幼穗发育到六期, 将 *tms5* 突变体分别置 24°C、28°C 和 32°C 恒温培养箱培养 14 d, 然后对主茎外的其他茎节上的花粉进行镜检。*tms5* 的粳稻突变体在 32°C 培养下, 花粉都表现为不育; 在 28°C 培养下, 花粉都表现为部分不育; 而在 24°C 培养下, 花粉都表现为可育(图 4-A)。说明 ZG75S、CYGS、YG0618S、ZG07S、T0361S、7679S 的不育起点温度在 28~32°C 之间。*tms5* 的籼稻突变体在 32°C 和 28°C 培养下, 花粉都表现为不育, 而在 24°C 培养下, 只有 1109S 的花粉表现为完全不育, 其他品种的花粉表现为可育(图 4-B)。说明 2537S、6150S、6379S 的不育起点温度在 24~28°C 之间。进一步, 通过冷灌池设定 21.5°C、22.5°C、23.5°C, 在 1109S 幼穗敏感期时分别处理, 处理后镜检花粉(图 4-C)表明, 在 21.5°C 冷灌条件下, 1109S 的花粉为完全可育; 22.5°C 冷灌条件下, 1109S 的花粉为部分可育; 23.5°C 条件下, 花粉为完全不育。说明 1109S 的不育起点温度在 22.5~23.5°C 之间。

2.3 籼型温敏核不育系 1109S 的配组优势

由于 1109S 的不育起点温度较低, 在长沙具有明显的可育期和不育期, 育性转换明显, 不育性稳定, 具有较高的应用价值。为了鉴定 1109S 的配合力, 我们将 1109S 与不同父本测配, 筛选了一个具有较强杂种优势的组合 1109S/8048。其生长量明显比 8048 大, 且具大穗表型(图 5-A, B)。与 8048 相比, 1109S/8048 在株高、有效穗、千粒重、穗长、穗粒数和产量等方面都显著增加, 其中产量增加 25.6%, 具有典型的超亲优势(表 2)。同时, 与区试对照丰两优 4 号相比, 1109S/8048 的株高矮, 千粒重降低, 但有效穗、穗长、穗粒数和产量明显增加, 其中产量增加 13.1% (表 2), 表明 1109S/8048 杂交组合具有较强的杂种优势。

3 讨论

基因组编辑(Genome editing)技术是指在基因组水平上对 DNA 序列进行定点修饰和改造的遗传操作技术。现有的基因编辑系统主要包括锌指核酸酶(Zinc finger nucleases, ZFNs)系统、类转录激活因子效应物核酸酶(Transcription activator-like effector nucleases, TALENs)系统以及 CRISPR/Cas (Clustered regularly interspaced short palindromic repeat-associated protein)系统^[13]。其中, CRISPR/Cas9 基因编辑技术由于载体构建过程简单、编辑效率高等优点, 成为当前主流的基因编辑系统, 并广泛应用于作物遗传改良方面^[14-17]。2014 年, *TMS5* 基因的克隆及其控制育性分子机制的阐明, 为利用基因编辑技术创制温敏两用核不育系奠定了基础^[3]。本研究通过

图 4 *tms5* 突变体在不同温度处理条件下的花粉育性

Fig. 4 Pollen fertility of *tms5* mutant under different temperatures

A: *tms5* 粳稻突变体的花粉育性; B: *tms5* 籼稻突变体的花粉育性; C: 1109S 在冷灌处理条件下的花粉育性。

A: Pollen fertility of *tms5* mutant of *japonica* rice; B: Pollen fertility of *tms5* mutant of *indica* rice; C: Pollen fertility of 1109S under cold irrigation conditions.

图 5 1109S/8048 杂交组合的表型鉴定

Fig. 5 Identification of phenotype of 1109S/8048 hybrid combination

A: 1109S/8048 杂交组合的表现, Bar = 20 cm; B: 1109S/8048 杂交组合穗的表现, Bar = 5 cm。

A: Phenotype of 1109S/8048 hybrid combination, Bar = 20 cm; B: Panicle performance of 1109S/8048 hybrid combination, Bar = 5 cm.

CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除粳稻和籼稻中 *TMS5* 基因, 比较粳稻和籼稻温敏不育系的不育起点温度, 筛选低不育起点温度的籼型温敏不育系, 并配制高产杂交稻组合, 为水稻的高产育种提供了

新的途径。

TMS5 是控制我国温敏型不育系的主要不育基因, 它编码一个保守的 RNA 酶 Z^{S1} , 具有前体 tRNA 3'端内切酶活性, 通过抑制受温度诱导的 *Ubl40* mRNA 的表达量, 控制水稻花粉发育; *TMS5* 基因 CDS 的 71 位碱基由 C 突变为 A, 导致翻译提前终止, 使 *Ubl40* mRNA 过度积累导致雄性不育^[3-4]。Zhou 等^[14]通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术对 11 个水稻品种的 *TMS5* 进行敲除, 在 1 年内获得了不含转基因成分的温敏不育系, 这些不育系材料因遗传背景的差异表现出不同的温敏不育起点温度。中花 11、GAZS、ZS97BS 在 28°C 培养条件下花粉完全不育, ReBS、WSSMS、TFBS 在 26°C 培养条件下花粉完全不育, 而 YJSMS、ZZBS 在 24°C 培养条件下花粉完全不育。本研究利用 CRISPR/Cas9 技术对 6 个粳稻和 4 个籼稻的 *TMS5* 基因进行敲除, 并对 *tms5* 突变体进行不育起点温度鉴定, 发现粳稻温敏不育系 ZG75S、CYGS、YG0618S、ZG07S、T0361S、7679S 的不育起点温度在 28~32°C 之间, 籼稻温敏不育系 2537S、

表 2 杂交组合的农艺性状

Table 2 Agronomic traits of hybrid combination

品种 Variety	株高 Plant height (cm)	有效穗 Panicle number per plant	千粒重 1000-grain weight (g)	穗长 Length of main panicle (cm)	穗粒数 Grain number per panicle	结实率 Seed-setting rate (%)	产量 Grain yield (kg hm ⁻²)
8048	110.4±3.5	10.7±1.0	16.8±1.6	27.5±1.0	229.3±15.8	74.6±8.2	8857.5±526.5
丰两优 4 号 Fengliangyou 4	133.1±4.5	11.5±1.2	27.5±2.1	25.3±1.1	193.5±14.6	75.7±5.6	9835.5±387.0
1109S/8048	120.6±4.0**	13.5±2.0**	22.6±1.5**	30.7±1.5**	258.4±23.6**	75.9±4.5	11124.0±279.0**

数据表示平均值±标准误($n = 20$), **表示 *tms5* 突变体与野生型之间存在显著差异($P < 0.01$)。

Data are presented as average values ± standard error ($n = 20$). **, significant difference between *tms5* mutant and wild-type ($P < 0.01$).

6150S、6379S 的不育起点温度在 24~28℃ 之间, 而 1109S 的不育起点温度在 22.5~23.5℃ 之间。Zhou 等^[14]通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术获得低不育起点温度的 YJSMS、ZZBS, 在 24℃ 培养条件下花粉完全不育, 本研究获得的 1109S 在 23.5℃ 条件下完全不育, 因此 1109S 比 YJSMS 与 ZZBS 具有更低的不育起点温度。温敏核不育系转育起点温度的高低是决定两系杂交水稻制种安全的重要因素, 选育不育起点温度较低的温敏核不育系可以显著提高两系杂交水稻制种的纯度。育性转换起点温度 23.5℃ 被认为是生产应用中比较安全的一个不育起点温度。因此, 通过基因编辑技术敲除 *TMS5* 基因, 筛选不育起点温度低的温敏不育系是决定能否应用的关键。由于 1109S 在 23.5℃ 培养条件下完全不育, 因此在生产上具有较大的应用价值。以上这些结果说明不同遗传背景材料获得的 *tms5* 突变体的不育起点温度不一样, 粳稻 *tms5* 突变体的不育起点温度普遍比籼稻的要高。*TMS5* 只是育性的一个开关, 而与不育起点温度无关, 不育起点温度受其他基因的调控。如何选取遗传背景材料敲除 *TMS5* 获得低不育起点温度的突变体有待进一步研究。

杂种优势是指两个遗传基础有差异的亲本杂交产生的杂合子在生长势、生活力、生物量等方面优于两个亲本的现象。杂种优势现象在自然界普遍存在, 其最早于 1717 年被 Thomas Fairchild 发现^[18], Joseph Koelreuter 于 1761 年利用^[19]。我国是一个人口和农业大国, 粮食安全是关乎我国的长治久安和国计民生的重大战略性问题。杂交水稻的产量比常规水稻提高 20%~30%, 在解决我国粮食短缺的问题上发挥了重要作用^[1]。本研究通过 CRISPR/Cas9 技术敲除 *TMS5* 基因筛选到了一个低不育起点温度的温敏核不育系 1109S, 并与优异父本 8048 配制了高产杂交稻组合 1109S/8048。Zhou 等^[14]通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术获得的温敏核不育系 HNBS 与华

航 1179 配制的杂交稻组合的小区产量比父本增加 14.4%, 而本研究获得的 1109S/8048 杂交稻组合的产量比父本 8048 增产 25.6%, 同时比区试对照丰两优 4 号增产 13.1%, 因此 1109S/8048 具有更高的超亲优势与杂种优势。

4 结论

利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术对 6 个粳稻和 4 个籼稻的 *TMS5* 基因进行敲除, 获得了粳稻和籼稻的温敏核不育系, 并比较了它们的不育起点温度。筛选到不育起点温度介于 22.5~23.5℃ 之间的粳型温敏核不育系 1109S, 并配制了高产杂交稻组合 1109S/8048。不同遗传背景材料获得的 *tms5* 突变体的不育起点温度不一样, 选取不同遗传背景的材料进行定点编辑可能获得不育起点温度较低的温敏核不育材料。

References

- [1] 黄忠明, 周延彪, 唐晓丹, 赵新辉, 周在为, 符星学, 王凯, 史江伟, 李艳峰, 符辰建, 杨远柱. 基于 CRISPR/Cas9 技术的水稻温敏不育基因 *tms5* 突变体的构建. 作物学报, 2018, 44: 844–851.
Huang Z M, Zhou Y B, Tang X D, Zhao X H, Zhou Z W, Fu X X, Wang K, Shi J W, Li Y F, Fu C J, Yang Y Z. Construction of *tms5* mutants in rice based on CRISPR/Cas9 technology. *Acta Agron Sin*, 2018, 44: 844–851 (in Chinese with English abstract).
- [2] 周延彪, 赵新辉, 唐晓丹, 周在为, 庄楚雄, 杨远柱. 基于 CRISPR/Cas9 技术的水稻反光敏不育基因 *csa* 突变体的获得. 杂交水稻, 2018, 33(6): 68–74.
Zhou Y B, Zhao X H, Tang X D, Zhou Z W, Zhuang C X, Yang Y Z. Acquisition of mutants of the reverse photoperiod-sensitive genic male sterility gene *csa* in rice based on CRISPR/Cas9 technology. *Hybrid Rice*, 2018, 33(6): 68–74 (in Chinese with English abstract).
- [3] Zhou H, Zhou M, Yang Y Z, Li J, Zhu L Y, Jiang D G, Dong J F, Liu Q J, Gu L F, Zhou L Y, Feng M J, Qin P, Hu X C, Song C L, Shi J F, Song X W, Ni E D, Wu X J, Deng Q Y, Liu Z L, Chen M S, Liu Y G, Cao X F, Zhuang C X. RNase Z^{S1} processes *Ubl40* mRNAs and controls thermosensitive genic male sterility in rice. *Nat Commun*, 2014, 5: 1–9.

- [4] 周海, 周明, 杨远柱, 曹晓风, 庄楚雄. RNase Z^{SI} 加工 *Ubl40* mRNA 控制水稻温敏雄性核不育. 遗传, 2014, 36: 1274.
Zhou H, Zhou M, Yang Y Z, Cao X F, Zhuang C X. RNase Z^{SI} processes *Ubl40* mRNA and controls thermosensitive genic male sterility in rice. *Hereditas* (Beijing), 2014, 36: 1274 (in Chinese with English abstract).
- [5] Belhaj K, Chaparro-Garcia A, Kamoun S, Patron N J, Nekrasov V. Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Curr Opin Biotech*, 2015, 32: 76–84.
- [6] Baltes N J, Voytas D F. Enabling plant synthetic biology through genome engineering. *Trends Biotechnol*, 2015, 33: 120–131.
- [7] Li M, Li X, Zhou Z, Wu P, Fang M, Pan X, Lin Q, Luo W, Wu G, Li H. Reassessment of the four yield-related genes *Gn1a*, *DEP1*, *GS3* and *IPA1* in rice using a CRISPR/Cas9 system. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 377.
- [8] Sun Y, Jiao G, Liu Z, Zhang X, Li J, Guo X, Du W, Du J, Francis F, Zhao Y, Xia L. Generation of high-amylose rice through CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of starch branching enzymes. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 298.
- [9] Zhou Y B, Liu C, Tang D Y, Lu Y, Wang D, Yang Y Z, Gui J S, Zhao X Y, Li L G, Tang X D, Yu F, Li J L, Liu L L, Zhu Y H, Lin J Z, Liu X M. The receptor-like cytoplasmic kinase STRK1 phosphorylates and activates CatC, thereby regulating H₂O₂ homeostasis and improving salt tolerance in rice. *Plant Cell*, 2018, 30: 1100–1118.
- [10] Wang H, Chu Z, Ma X, Li R, Liu Y. A high through-put protocol of plant genomic DNA preparation for PCR. *Acta Agron Sin*, 2013, 39: 1200–1205.
- [11] 姜树坤, 张喜娟, 王嘉宇, 张凤鸣. 水稻幼穗-颖花发育的研究进展. 植物遗传资源学报, 2012, 13: 1018–1022.
Jiang S K, Zhang X J, Wang J Y, Zhang F M. Research advancement on young panicle and spikelet development in rice (*Oryza sativa* L.). *J Plant Genet Resour*, 2012, 13: 1018–1022 (in Chinese with English abstract).
- [12] Zhou Y B, Liu H, Zhou X C, Yan Y Z, Du C Q, Li Y X, Liu D R, Zhang C S, Deng X L, Tang D Y, Zhao X Y, Zhu Y H, Lin J Z, Liu X M. Over-expression of a fungal NADP(H)-dependent glutamate dehydrogenase *PcGDH* improves nitrogen assimilation and growth quality in rice. *Mol Breed*, 2014, 34: 335–349.
- [13] 李希陶, 刘耀光. 基因组编辑技术在水稻功能基因组和遗传改良中的应用. 生命科学, 2016, 28: 1243–1249.
Li X T, Liu Y G. Genome editing technology for functional genomics and genetic improvement in rice. *Chin Bull Life Sci*, 2016, 28: 1243–1249 (in Chinese with English abstract).
- [14] Zhou H, He M, Li J, Chen L, Huang Z F, Zheng S Y, Zhu L Y, Ni E D, Jiang D G, Zhao B R, Zhuang C X. Development of commercial thermo-sensitive genic male sterile rice accelerates hybrid rice breeding using the CRISPR/Cas9-mediated *TMS5* editing system. *Sci Rep*, 2016, 6: 1–12.
- [15] Svitashv S, Schwartz C, Lenderts B, Young J K, Ciqan A M. Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleo-protein complexes. *Nat Commun*, 2016, 7: 13274.
- [16] Wang Y P, Cheng X, Shan Q W, Zhang Y, Liu J X, Gao C X, Qiu J L. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 947–951.
- [17] Jacobs T B, LaFayette P R, Schmitz R J, Parrott W A. Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. *BMC Biotechnol*, 2015, 15: 16.
- [18] Zirkle C. Some forgotten records of hybridization and sex in plants 1716–1739. *J Hered*, 1932, 23: 433–447.
- [19] Stiles W. A short history of the plant sciences. *Nature*, 1942, 150: 672–673.

附图 1 PCR 鉴定 *T₁* 代无选择标记基因的突变株

Supplementary Fig. 1 Identification of the marker-free *T₁* transgenic plants by PCR

ZG75(A), CYG(B), YG0618(C), ZG07(D), T0361(E), 7679(F), 2537(G), 6150(H), 6379(I), 1109(J) 非转基因植株的 PCR 鉴定。M: DNA marker; WT: 野生型; 1: 阳性对照; 2-6: *GUS* 染色不呈蓝色的 *T₁* 代植株。

Identification of the marker-free transgenic plants by PCR in ZG75(A), CYG(B), YG0618(C), ZG07(D), T0361(E), 7679(F), 2537(G), 6150(H), 6379(I), 1109(J). M: DNA marker; WT: wild-type; 1: positive control; 2-6: the leaf of *T₁* plants did not show blue by *GUS* staining.