

# 利用 CRISPR/Cas9 敲除 *OsNramp5* 基因创制低镉籼稻

龙起樟 黄永兰 唐秀英 王会民 芦明 袁林峰 万建林\*

[江西省超级水稻研究发展中心/水稻国家工程实验室(南昌)/江西省绿色水稻种质重点实验室, 南昌 330200; \*通讯联系人, E-mail: ncwanjl@163.com]

## Creation of Low-Cd-accumulating *indica* Rice by Disruption of *OsNramp5* Gene via CRISPR/Cas9

LONG Qizhang, HUANG Yonglan, TANG Xiuying, WANG Huimin, LU Ming, YUAN Linfeng, WAN Jianlin\*

[Jiangxi Super-rice Research and Development Center/National Rice Engineering Laboratory (Nanchang) / Jiangxi Key Laboratory for Green Rice Germplasm, Nanchang 330200, China; \*Corresponding author, E-mail: ncwanjl@163.com]

**Abstract:** 【Objective】 To accelerate the breeding process of low-Cd-accumulating rice, 【Methods】 the widely applied *indica* pure-line cultivars, Wushansimiao and Zhongzao 35, and the popular parents of hybrids, Huazhan and Wufeng B were used as materials to create *OsNramp5* knockout lines via CRISPR/Cas9. The marker-free *OsNramp5* mutants together with the wild types were grown either in a Cd-contaminated field (Field A) or in a non-Cd-contaminated field (Field B) for subsequent experiments. The changes of the grain Cd content were investigated for plants grown in both Field A and Field B. The changes of the contents of other related minerals were also examined but only for those plants grown in Field A. The agronomic changes of the mutants were further assessed by examining those plants grown in Field B. 【Results】 Rice lines with mutations at *OsNramp5* were successfully generated for all the four cultivars. On one hand, the grain Cd level in *OsNramp5* mutants grown in Field B was reduced by 85.5% on average (<0.02 mg/kg); as a result of *OsNramp5* mutation, the Cd level in plants grown in Field A, was reduced by 94.8% (<0.1 mg/kg), meanwhile, the Mn level was decreased by 52.7%; on the contrary, the Cr level was elevated by 59.5% on average for the four cultivars and an increase of 79.1% in the Pb level was also observed but only in *OsNramp5* mutants of Huazhan; the levels of other mineral elements including Fe, Cu, Zn, Ca, Se and As were slightly or hardly affected. On the other hand, a slight decrease in plant height and an average yield loss of 6.9% were observed due to *OsNramp5* mutation for all cultivars; the yield loss could be ascribed to a reduction in seed setting rate and seed weight and was compensated by a slight increase in effective tiller number. 【Conclusion】 Low-Cd-accumulating rice plants can be generated by *OsNramp5* disruption at the cost of an acceptable yield loss and the low-Cd-accumulating rice lines produced in the present study may serve as promising cultivars to eliminate rice Cd contamination in many areas.

**Key words:** *indica* rice; cadmium; genetic editing; breeding

**摘要:** 【目的】为了尝试快速培育低镉籼稻, 【方法】选取广泛应用的杂交水稻亲本华占和五丰 B 以及常规品种五山丝苗和中早 35 为材料, 通过 CRISPR/Cas9 技术创制 *OsNramp5* 基因突变株系, 在镉污染及正常土壤中种植并测定突变株系籽粒(糙米)镉含量, 其他相关元素含量亦同时在镉污染土壤种植条件下测定, 在非镉污染土壤种植条件下考查 *OsNramp5* 基因敲除对农艺性状的影响。【结果】成功获得了前述品种的 *OsNramp5* 基因敲除株系; 非镉污染条件下种植的 4 个品种 *OsNramp5* 基因敲除株系籽粒镉含量低于 0.02 mg/kg, 平均较野生型降低 85.5%; 而在镉污染土壤种植时, 不同品种 *OsNramp5* 基因敲除株系籽粒镉含量低于 0.1 mg/kg, 平均比野生型降低 94.8%; 锰含量也降低 52.7%, 铬含量增加 59.5%, 铅含量在华占中增加 79.1%, 而在其他品种中无变化; 铜、铁、锌、钙、硒和砷含量(后 4 种元素只在华占及衍生品系中检测)受影响较小或不受影响; *OsNramp5* 基因敲除株系株高、结实率和千粒重较野生型小幅降低, 而有效分蘖略微增加, 产量平均减少 6.9%。【结论】通过 *OsNramp5* 基因敲除, 可以显著降低镉积累, 但在某些种植条件下, 代价为小幅产量损失; 通过本研究获得的低镉 *OsNramp5* 基因敲除品系在镉污染地区具有较好利用潜力。

**关键词:** 籼稻; 镉; 基因编辑; 育种

中图分类号: Q755; S511.034

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2019)05-0407-14

收稿日期: 2019-03-05; 修改稿收到日期: 2019-05-24。

基金项目: 国家重点研发计划资助项目(2016YFD0102102); 江西现代农业科研协同创新专项(JXXTCX2015001-003); 江西省科技计划项目农业领域重点项目(20141BBF60001)。

水稻是一种易于富集镉的作物<sup>[1]</sup>,而耕地酸化或污染导致土壤中活性镉含量增加,又加剧了水稻中镉的积累<sup>[2]</sup>,导致稻米镉超标事件频发。过量摄入镉严重危害身体健康<sup>[3]</sup>,在我国南方部分地区,稻米镉超标已经成为引起社会广泛关注的食品安全问题。耕作方式的变革以及污染土壤的修复是解决稻米镉污染问题的根本途径,而选择种植镉低积累水稻品种可起到立竿见影的效果,是目前低成本快速解决稻米镉污染问题的最佳选择。研究者从现有水稻品种资源中筛选获得了一些镉低积累水稻品种<sup>[4-7]</sup>,这可以解决部分稻米镉污染的问题,然而受水稻品种的生态适应性限制,获得的低镉品种资源不适合在所有镉污染区推广,或者获得的资源降镉幅度有限,不适合在镉污染程度较重的地区种植,因此生产中迫切需要适应不同地区生产需求的低镉水稻新品种。

水稻中镉吸收转运相关蛋白及调控因子的鉴定为育种家通过分子手段快速培育低镉水稻新品种奠定了基础<sup>[2,8-9]</sup>。研究显示一些关键的镉吸收转运蛋白编码基因可作为分子操作对象以创制低镉水稻品种。*OsHMA2*<sup>[10-12]</sup>是一种锌的转运蛋白,参与镉从根部向茎部的转移,同时在茎节中通过韧皮部向发育器官转运镉,其功能缺失可使镉和锌同时减少,而且严重影响生长和产量,但过表达*OsHMA2*可增加籽粒中锌含量并一定程度降低镉积累;*OsHMA3*<sup>[13]</sup>是一种镉的转运蛋白,位于液泡膜上向液泡内转运镉,其功能是限制镉从根向茎叶转移从而将其截留在根内液泡中,此基因的超量表达可大幅降低籽粒镉含量,而功能缺失将使地上部分镉猛增;*OsLCT1*<sup>[14]</sup>亦是一种镉的细胞膜离子外排转运蛋白,同时可转运钙、镁、钾和锰,其参与镉从茎叶向籽粒转移过程,通过RNA干涉抑制其功能可使籽粒中镉含量减少约50%,同时铁含量增加,而且不影响植物生长及产量,亦不影响其他有益矿物元素的积累;*OsLCD*<sup>[15]</sup>的具体功能未知,其功能缺失可降低籽粒中约50%的镉含量,不影响生长和产量;*OsNramp5*<sup>[16-18]</sup>是一种锰和铁的转运蛋白,是根中镉吸收的主要蛋白,其功能缺失可使籽粒中镉含量大幅降低(含量不到对照的3%),同时锰含量也降低一半以上,因品种或种植条件不同,*OsNramp5*功能缺失突变体可表现出大幅减产或产量不受影响两种截然不同的结果。

CRISPR/Cas9等基因编辑技术的快速发展使得植物基因功能缺失突变体的创制变得十分便利<sup>[19]</sup>,因此,可以通过基因编辑技术创制镉吸收蛋白编码

基因的突变体以快速培育低镉水稻品种。由前所述,*OsLCT1*、*OsLCD*和*OsNramp5*基因功能缺失可使水稻籽粒镉积累减少,而且在一定条件下对其他有益元素的积累和产量无影响或影响较小,因而可以作为基因敲除靶标以创制低镉水稻品种。本研究旨在解决南方稻米严重镉超标(如镉含量1 mg/kg以上)地区的水稻生产问题,故选择缺失可大幅降镉的*OsNramp5*基因作为靶标,通过CRISPR/Cas9方法对其进行基因敲除,检测*OsNramp5*基因失活对镉和其他元素积累的影响,并考查突变体株高、产量和品质性状的变化,评价其利用价值。

## 1 材料与方法

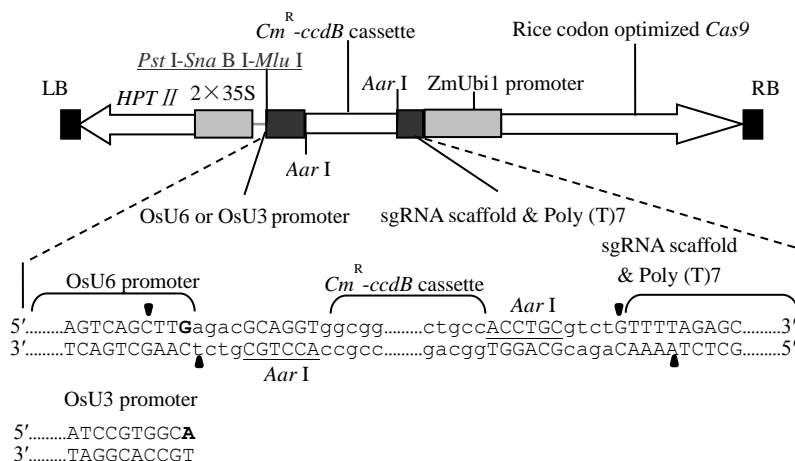
### 1.1 水稻品种

Kasalath 由南京农业大学水稻研究所提供;华占和五丰B分别源于中国水稻研究所和广东农业科学院水稻研究所;五山丝苗和中早35购自种子公司。

### 1.2 载体构建

CRISPR/Cas9载体为自行构建,载体以双元载体pCubi1390(由pCambia1390骨架上添加玉米Ubiquitin 3启动子构建而成)<sup>[20]</sup>为基础,在*Kpn*I和*Bam*H I位点处插入水稻密码子优化过的Cas9基因,继续在Ubiquitin 3启动子前的*Hind*III位点插入方向与Cas9基因同向的水稻U6或U3启动子和sgRNA骨架构件(构件中启动子和sgRNA框架之间插入一段两端为*Aar*I位点的*Cm<sup>R</sup>-ccdB*基因表达盒以便于克隆sgRNA向导序列片段;构件中包含U6或U3启动子的转录起始位点碱基G或A),最终载体命名为pCubi1390Cas9-U6和pCubi1390Cas9-U3(图1),载体在大肠杆菌*ccdB*Survival™ 2 T1<sup>R</sup>菌株(Invitrogen公司)中保存。其中,含有水稻密码子优化过的Cas9基因原始载体由翟礼嘉实验室惠赠<sup>[21]</sup>;水稻U6和U3启动子扩增自日本晴基因组DNA,分别参考Feng等<sup>[22]</sup>和Miao等<sup>[21]</sup>的数据;sgRNA骨架来自张峰实验室<sup>[23]</sup>;*Cm<sup>R</sup>-ccdB*基因表达盒来自从Invitrogen公司购置的gateway载体pENTR1A。

利用在线工具CRISPR-P(<http://cbi.hzau.edu.cn/crispr/>)<sup>[24,25]</sup>设计用于敲除*OsNramp5*基因(RAP ID: Os07g0257200)的sgRNA向导序列。选择两个靶位点,均位于基因第10外显子的正义链上[基因组ORF位置:3673-3692(位点1)和3685-3704(位点2),mRNA CDS位置:1006-1025(位点1)和1018-1037(位点2)]。构建载体时,先根据载体



LB、RB 分别为 T-DNA 的左、右边界; *HPT II*—潮霉素抗性标记; 2×35S—串联的 35S 启动子; *Cm<sup>R</sup>-ccdB* cassette—氯霉素抗性基因及自杀基因表达盒; sgRNA scaffold & Poly (T)7—sgRNA 骨架及 7 个 T 碱基组成的终止子; *ZmUbi1* promoter—玉米 *Ubi1* 基因启动子; Rice codon optimized *Cas9*—水稻密码子优化的 *Cas9* 基因; *Aar I*—供向导序列克隆的 Type II 限制性酶识别位点 (黑色三角示剪切点); *Pst I-Sna B I-Mlu I*—三个单一限制性内切酶识别位点; 图中省略了 *HPT* 和 *Cas9* 基因各自表达所需的终止子 CaMV 3' UTR 和 Nos polyA 信号序列; pCubi1390Cas9-U6 和 pCubi1390Cas9-U3 载体的区别仅在于 sgRNA 启动子及转录起始碱基不同。

LB, T-DNA left border; RB, T-DNA right border; *HPT II*, Hygromycin resistant gene; 2×35S, Duplicated 35S promoter; *Cm<sup>R</sup>-ccdB* cassette, Chloramphenicol resistant gene and *ccdB* suicide gene; *Aar I*, type II restriction enzyme recognition site for guide DNA cloning (the cut sites were indicated by black triangles); *Pst I-Sna B I-Mlu I*, Restriction enzyme sites for further use; The CaMV 3' UTR and Nos polyA signal of the *HPT II* and the *Cas9* genes are not shown; The only difference between the vectors pCubi1390Cas9-U6 and pCubi1390Cas9-U3 is that the two vectors use different sgRNA promoters together with different transcription start bases.

图 1 农杆菌转化使用的 CRISPR/Cas9 Ti 质粒双元载体 pCubi1390Cas9-U6/U3 T-DNA 区结构

Fig. 1. Structure of the T-DNA region of the CRISPR/Cas9 Ti binary vectors pCubi1390Cas9-U6/U3.

构建要求合成针对两个靶位点的向导序列 DNA 接头寡核苷酸, 针对位点 1 为 ctgGGCAGAGCTCC ACTATTAC (5'-3'; 正义链) 和 aaacGTAATAGTGGA GCTCTGCC (5'-3'; 反义链); 针对位点 2 为 ctagACTATTACCGGCACATACGCTGG (5'-3'; 正义链) 和 tcgaCCAGCGTATGTGCCGGTAATAGT (5'-3'; 反义链)。将两条寡核苷酸退火后即为接头, 将接头连接到用 *Aar I* 酶 (Thermo scientific™; 货号 ER1581) 线性化的 CRISPR/Cas9 载体 (第一个位点使用 pCubi1390Cas9-U6, 第二个位点使用 pCubi1390Cas9-U3) 后转化大肠杆菌, 挑单克隆测序, 测序引物为 OsU6-F (TTGAGCGATTACAGGC GAAAGTG; 用于 pCubi1390Cas9-U6 载体, 检测向导序列的正确性), OsU3-F (GGCATGCATG GATCTTGAGGAAT; 用于 pCubi1390Cas9-U3 载体, 检测向导序列正确性), 35S-F (TGACGCA CAATCCCACTATCCTTC; 检测载体完整性), Cas9-R-1 (TCGAGCCTGCGGGACTTAGAG; Cas9 5' 端引物, 检测载体完整性); C126 (TCGTGA AGAAGACCGAGGTT; Cas9 3' 端引物, 检测载体完整性, 此引物由 Miao 等设计<sup>[21]</sup>), 选取正确克隆扩大繁殖并提取质粒备用。

### 1.3 遗传转化

将构建好的 Ti 二元质粒载体转化至 EHA105 农杆菌中, 农杆菌感受态细胞制备方法采用  $\text{CaCl}_2$  法, 转化采用反复冻融法<sup>[26]</sup>。对于品种 Kasalath, 遗传转化采用 Toki 等的方法进行<sup>[27]</sup>; 华占、五丰 B、五山丝苗和中早 35 的转化委托武汉伯远生物科技有限公司完成。

### 1.4 水稻 DNA 提取

DNA 提取用 CTAB 法<sup>[28]</sup>, 省略部分纯化步骤。

### 1.5 转基因阳性株筛选

用叶片切段潮霉素水溶液浸泡法<sup>[29]</sup>检测 T-DNA 是否插入  $T_0$  再生苗中, 接着检测筛选  $T_1$  代转基因阳性植株。

### 1.6 CRISPR/Cas9 靶位点突变检测

通过 PCR 产物直接测序的方法对转基因阳性植株中的基因敲除靶位点进行初步检测, 若测序结果峰图中有套峰则认为存在突变, 继续将片段克隆至质粒载体中进行测序, 每个样品至少 5 个阳性克隆, 从中分析出两个等位基因各自的基因型, 若测序结果无套峰, 则与对照进行序列比对, 获悉基因型。PCR 引物为 TTCGTGGCGCTGCTGATAAAC (正向) 和 AGAGCGGAGAAATATGGACGAAAGT

(反向)。PCR体系包括5  $\mu$ L 10 $\times$ PCR缓冲液(含 $Mg^{2+}$ ; TaKaRa), 4  $\mu$ L dNTP混合液(各2.5 mmol/L), 5  $\mu$ L 引物(正反向混合, 各5 pmol/ $\mu$ L), 0.5  $\mu$ L TaKaRa *Taq* (5 U/ $\mu$ L), 2  $\mu$ L 二甲基亚砷(浓度不低于99.5%), 2  $\mu$ L DNA, 31.5  $\mu$ L  $H_2O$ , 总体积50  $\mu$ L。PCR程序: 95 $^{\circ}C$ 下2 min; 94 $^{\circ}C$ 下30 s, 58 $^{\circ}C$ 下30 s, 72 $^{\circ}C$ 下60 s, 35个循环; 72 $^{\circ}C$ 下2 min。PCR产物直接测序所用引物为(扩增片段内, 位于反义链) GTGCACCCCTACAATTCGTCAGT。测序委托杭州擎科生物技术有限公司完成。

### 1.7 元素含量分析

镉、锰、铁、铜、铅、铬、汞、砷、硒、锌和钙元素含量测定委托具有资质的专业第三方检测机构青岛科创质量检测有限公司完成。田间按株系及姊妹系各自混收稻谷, 脱壳成糙米(晒干, 水分12%左右)后检测, 每份样品不少于20 g, 将样品进行粉碎(过100目筛)后送检。Cd测定样品中部分抽取2个重复样检测, 最后取其均值作测定值, 其余样品只测定一份样品。元素检测方法采用ICP-MS(电感耦合等离子体质谱)法。

### 1.8 材料繁殖及农艺性状测定

$T_0$ 代植株温室内盆钵种植;  $T_1$ 分离群体在有防护措施的网室内种植, 开花前筛选后拔除转基因植株; 已去除转基因成分的 $T_2$ 或 $T_3$ 植株在大田种植, 并用塑料薄膜墙围住隔离; 供镉测定材料在晚季种植(2017年6–11月), 供农艺性状考查的中早35和五丰B品系作早稻(2018年4–7月)种植, 华占和五山丝苗作中稻种植(2018年5–10月)。所有世代种植行距20 cm、株距17 cm, 每行8株。元素含量测定所用材料种植时野生型对照设3次重复, 在田间均匀排布, 基因敲除株系按株系顺序种植, 同一转化事件后代携相同变异姊妹系视为重复; 农艺性状调查所用材料种植时不设重复。所有材料均按大田常规方法进行肥水管理。株高测定取茎秆基部至最长穗顶部的长度, 有效分蘖测定取穗子实粒不少于5粒的分蘖, 株高和有效分蘖数同时测定, 连续测定一定株数(一般大于40株), 边株不测定; 每穗总粒数和实粒数测定取样10株, 取样时连续选10行, 每行取一株, 逐行错位选株(即第1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9和10行分取第2, 3, 4, 5, 6, 7, 6, 5, 4和3株), 边株不取, 穗子混合, 每穗分别统计; 千粒重测定取晒干稻谷去除空瘪粒和杂质后用自动数粒仪数1000粒, 重复2次; 米质测定采用株系内所有植株的混合稻谷, 经研磨成精米后测定, 外观品质指标通过万深SC-E

大米外观品质检测分析仪进行测定, 其中, 垩白度指垩白米粒中垩白面积与整粒米面积的比值, 水分、蛋白含量、直链淀粉含量和食味分用近红外分析仪检测, 仪器为Infratec<sup>TM</sup> 1241 (Foss), 定量模型为厂商提供并经过用户矫正, 数值仍为估计值。

### 1.9 HRM 分析

高分辨率溶解曲线分析利用LightScanner 96系统(Idaho 科技公司)进行, 采用小片段扩增法。PCR引物及扩增子为CTGGGCAAGTCGAGTGCGAT(正向)和ATTACCTGCATGATGTACTGTCC(反向), 扩增产物104 bp。PCR体系包括1  $\mu$ L 10 $\times$ PCR缓冲液(含 $Mg^{2+}$ ; TaKaRa), 0.8  $\mu$ L dNTP混合液(各2.5 mmol/L), 1  $\mu$ L 引物(正反向各5 pmol/ $\mu$ L), 0.1  $\mu$ L TaKaRa *Taq* (5 U/ $\mu$ L), 0.4  $\mu$ L 二甲基亚砷(浓度不低于99.5%), 1  $\mu$ L DNA, 1  $\mu$ L LC-Green 荧光染料, 4.7  $\mu$ L  $H_2O$ , 总体积10  $\mu$ L, 上加20  $\mu$ L 矿物油。PCR程序: 94 $^{\circ}C$ 下2 min; 95 $^{\circ}C$ 下5 s, 60 $^{\circ}C$ 下20 s, 72 $^{\circ}C$ 下20 s, 共50个循环; 72 $^{\circ}C$ 下1 min; 95 $^{\circ}C$ 下3 min; 16 $^{\circ}C$ 下2 min。将PCR体系连同石蜡油全部转入专用PCR板(Bio-rad, 货号hsp9665)中进行HRM分析, 分析温度范围为65 $^{\circ}C$ ~95 $^{\circ}C$ 。用系统自带软件分析数据。

### 1.10 数据分析

数据分析利用Microsoft Excel 2010及其共享Real Statistics统计插件(<http://www.real-statistics.com/>)进行。统计分析时, 除特殊注明外, 若比较分析中只含2组样本数据, 直接进行 $F$ 测验检测方差同质性后利用Excel自带函数进行 $t$ 检测(根据 $F$ 测验结果选等方差或异方差模式); 若包含3组以上样本数据, 则进行多重比较, 利用Real Statistics统计插件行中位数版Levene检验检测方差同质性, 若同质后行方差分析(ANOVA)检测组间差异, 若结果显著, 采用Dunnett  $t$ 检验检测突变体与对照差异; 若方差不同质, 采用Welch ANOVA检测组间差异, 若显著, 则采用Games Howell test检测突变体与对照的差异显著性。

不同品种突变体与对照相比的不同指标增减率数据为品种内各株系的平均值与各自野生型对照的平均值比较而得, 4个品种总的增减率为4个品种各自平均增减率的均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 *OsNramp5* 基因编辑水稻品系的获得

先以品种Kasalath为材料试验CRISPR/Cas9系

统对 *OsNramp5* 基因两个靶位点的编辑效果。结果显示在两个靶位点中均成功创制突变, 选择位点 1 (CRISPR/Cas9 系统中使用 U6 启动子) 作为进一步试验的基因编辑靶位点, 扩大试验对象至纯系品种五山丝苗和中早 35 以及杂种亲本华占和五丰 B。在针对靶位点 1 的试验中, 5 个品种一共获得 97 个独立转基因株系, 对 T<sub>0</sub> 代 (转基因当代定义为 T<sub>0</sub> 代) 植株的测序显示, 不同品种基因突变效率不同, 突变率 (突变转化子数/总转化子数×100%) 为 39%~90%, 平均为 58% (表 1)。对这 5 个品种一共 56 个独立基因编辑株系中的 106 个突变事件进行了分析, 结果显示一共出现了 32 种突变基因型 (图 2-A), 理论上其中 25 种突变类型为移码突变, 导致蛋白功能失活, 7 种突变类型 (即当缺失或插入的碱基造成的总的碱基变化数为 3 的整倍数时, 包括#05, #07, #12, #13, #17, #22 和#24) 导致部分氨基酸残基发生改变, 蛋白功能是否受影响未知。每个基因编辑株系所携突变基因型见表 2。针对靶位点 2 的基因编辑结果也在表 1、表 2 和图 2-B 中显示。

进一步对靶位点 1 所有突变基因型的发生频率进行了统计 (图 2-C), 发现主要发生的突变类型为缺失 1~3 个碱基和插入 1 个碱基的突变, 占所有突变的 66%, 而且在这 3 种缺失突变中缺失的碱基位置并不具随机性, 而是缺失特定位置的碱基, 而在插入 1 个碱基的突变类型中又以插入碱基 A 和 T 最为常见, 未发现插入碱基 C 的突变类型; 缺失 5 个碱基及以上的缺失突变以及插入缺失型的突变中每一种突变类型一般只发生 1 次, 极少数发生 2 次。

在转基因 T<sub>1</sub> 代通过叶片潮霉素抗性筛选获得去除转基因成分的植株, 对这些植株中的 *OsNramp5* 靶位点进行测序检测, 筛选获得纯合突

变株, 利用这些纯合株的后代 (T<sub>2</sub> 或 T<sub>3</sub>) 进行后续试验。目前为止除品种 Kasalath 外, 所有品种的多数突变基因型都获得了纯合后代, 详细信息见表 2。

2.2 *OsNramp5* 基因敲除降低水稻籽粒中镉积累

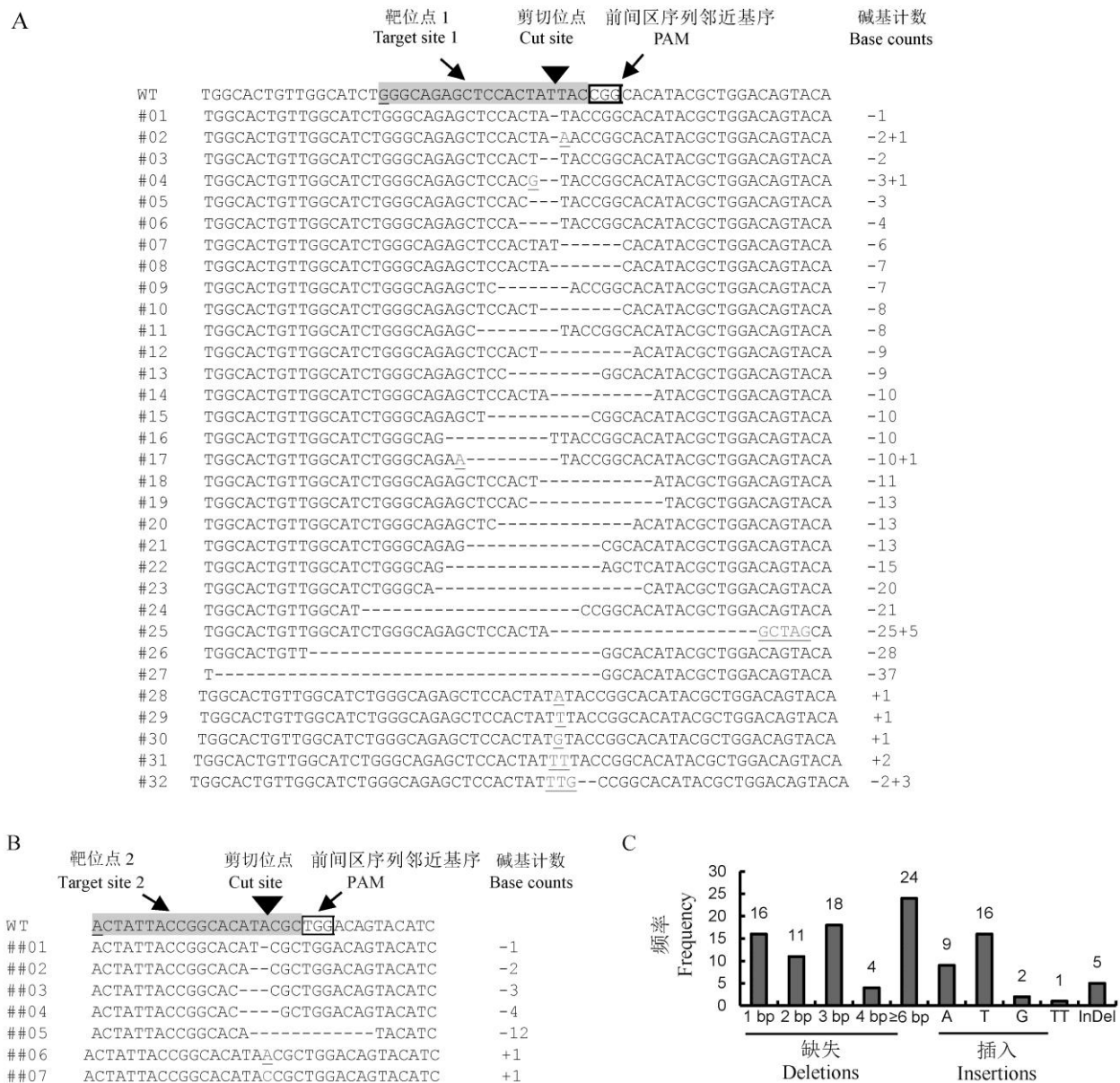
在获得去除转基因成分的 *OsNramp5* 基因突变株系后, 将品种华占、五丰 B、五山丝苗和中早 35 的部分基因突变株系 (T<sub>2</sub> 代, 除华占品系 L01-#05/#05 外余均为移码突变) 及其野生型对照分别在江西省 A、B 两地种植 (A 地为镉中等污染土壤, 而 B 地为非污染土壤)。分别对从两地种植获得的种子 (糙米) 进行镉含量测定, 测试结果见表 3。由表中数据可知, A、B 两地种植基因编辑株系种子镉含量较对照均大幅下降。在 A 地种植时, 在对照品种镉含量严重超标——约 5~10 倍于国标限定值 (0.2 mg/kg; GB2762-2017) 的情况下, 不同品种 *OsNramp5* 敲除株系的镉含量不及限定值的 1/2, 比对照降低 91.7%~96.9% (4 个品种的均值为 94.8%); 在 B 地种植时, 对照和基因敲除株系镉含量均低于国标限定值, 其中不同品种基因敲除株系比对照降低 76.2%~91.1% (均值 85.5%), 不到国标限定值的 1/10。值得一提的是, 华占品系 L01-#05/#05 镉含量的降低与在其他品系相同, 因此, 虽然此株系内 *OsNramp5* 氨基酸序列只发生几个氨基酸残基的改变, 同样造成了基因功能的失活。总而言之, 对于不同类型的水稻品种, 敲除 *OsNramp5* 基因均可有效降低籽粒镉积累。

表 3 数据亦显示, 无论在何地种植, 不同品种野生型本身镉积累存在一定差异, 尤其是中早 35, 其镉含量明显比其他 3 个品种低, 而敲除 *OsNramp5* 基因后, 不同品种的镉积累量变得相对一致。这一结果暗示了 *OsNramp5* 基因的功能差异可能是引起

表 1 不同品种阳性转化株基因突变情况统计

Table 1. Occurrence frequency of the four genotypes among the positive transgenic lines of the five cultivars.

基因型 Genotype	靶位点 1 Target site 1						靶位点 2 Target site 2
	华占 Huazhan	五丰 B Wufeng B	五山丝苗 Wushansimiao	中早 35 Zhongzao 35	Kasalath	合计 Sum	Kasalath
野生型 Wild type	5(36%)	6(30%)	22(61%)	7(41%)	1(10%)	41(42%)	0
杂合 Heterozygous	0	0	3(8%)	0	1(10%)	4(4%)	2(50%)
双等位基因 Biallelic	9(64%)	14(70%)	11(31%)	10(59%)	8(80%)	52(54%)	1(25%)
纯合 Homozygous	0	0	0	0	0	0	0
嵌合体 Chimeric	0	0	0	0	0	0	1(25%)
合计 Sum	14(100%)	20(100%)	36(100%)	17(100%)	10(100%)	97(100%)	4(100%)



A和B, 靶位点1和2的序列突变情况。WT-野生型; ###或###, 突变类型编号; 野生型序列中Cas9靶位点、Cas9系统中U6和U3启动子A图和B图分别为靶位点1和靶位点2的突变情况。起始转录碱基以及PAM位点分别用灰色阴影、加下划线及加框标示, 黑色倒三角指示Cas9切割位点, 所有序列方向均为5'-3'; 突变体序列中缺失碱基用短线代替, 插入碱基加下划线显示, 其余为与野生型相同者; 图右边数字表示缺失(用“-”表示)或插入(用“+”表示)的碱基数。C-靶位点1不同突变类型发生频率统计。突变体类型分3类, 即包含缺失1 bp、2 bp、3 bp、4 bp和≥6 bp六种类型的缺失突变, 包含插入1个碱基A、T或G及插入2个碱基TT四种类型的插入突变, 以及同时含有缺失和插入即InDel; 一共统计56个独立转化株系, 106个突变等位基因。

A and B, The sequence changes in Target sites 1 and 2 of the *OsNramp5* gene, respectively. WT, Wild type; ### or ###, Mutation type numbers; In the WT sequence, the target site, the cut site and the PAM site are indicated with the bases highlighted in grey (The underlined base “G” or “A” indicates the transcription start site of the rice U6 or U3 promoter in the CRISPR/Cas9 system), reverse black triangle and the bases in underlined bold font, respectively; In the mutation sequences, the deleted bases are indicated by dashed lines, the inserted ones are underlined, and those identical with the wild type are shown normally; The numbers on the right indicate the counts of the deleted or inserted bases. C, The occurrence frequency of various mutation types in Target site 1. The mutations were summarized as three types, which are deletions, insertions and InDels. The deletion type includes five subtypes, which are those with 1 bp, 2 bp, 3 bp, 4 bp and ≥6 bp deletion respectively. The insertion type includes four subtypes, which are those with one A, one T, one G and double T insertion, respectively. The data are derived from the analysis of 106 mutation alleles from 56 independent transgenic lines.

图2 基因编辑株系中 *OsNramp5* 基因靶位点突变情况

Fig. 2. Target site mutations of *OsNramp5* in the genetically edited lines.

表 2 五个品种基因编辑株系中 *OsNramp5* 靶位点的基因型

Table 2. Genotypes of all *OsNramp5* edited lines derived from five cultivars.

株系号 Line number	等位 基因 Allele	基因型 Genotype					
		靶位点 1 Target site 1				靶位点 2 Target site 2	
		华占 Huazhan	五丰 B Wufeng B	五山丝苗 Wushansimiao	中早 35 Zhongzao 35	Kasalath	Kasalath
L01	1	#05	#26	WT	#03	#05	WT
	2	#31	#30	#28	#29	#29	##04
L02	1	#06	#03	#15	#03	#03	##01
	2	#09	#05	#28	#29	#13	##06
L03	1	#05	#02	#05	#29	WT	WT
	2	#28	#29	#24	?	#21	##07
L04	1	#01	#06	#03	#05	#01	##02
	2	#09	#27	#05	#25	#29	##03
	3	—	—	—	—	—	##05
L05	1	#01	#05	#05	#01	#05	—
	2	#29	#29	#18	#05	?	—
L06	1	#01	#01	#18	#11	#01	—
	2	#05	#32	#28	#17	#10	—
L07	1	#07	#05	WT	#01	#01	—
	2	#15	#28	#16	#09	#04	—
L08	1	#03	#03	#05	#03	#12	—
	2	#19	#08	#10	#14	#29	—
L09	1	#05	#01	#03	#01	#03	—
	2	#28	#29	#29	#05	#20	—
L10	1	—	#05	#01	#06	—	—
	2	—	#28	#29	#29	—	—
L11	1	—	#06	#23	—	—	—
	2	—	#29	#29	—	—	—
L12	1	—	#03	#01	—	—	—
	2	—	#30	#28	—	—	—
L13	1	—	#01	#22	—	—	—
	2	—	#05	#28	—	—	—
L14	1	—	#01	WT	—	—	—
	2	—	#29	#01	—	—	—

灰色底纹标识的单元格表示该基因型已经分离到去除标记且纯合的植株；其他基因型正在分离纯合植株；？，未确定；—，不适用。

The grey shading contents show that marker-free homozygous plants are available for the genotypes. For the other genotypes, the work to seek such plants was in progress; ?, Not resolved; —, Not applicable.

这些品种镉积累差异的关键原因。

### 2.3 *OsNramp5* 基因敲除对籽粒中其他元素积累的影响

对镉污染土壤(A地)种植的 *OsNramp5* 基因敲除株系及对照进行籽粒镉含量测定的同时,也对锰、铁、铜、铅和铬元素含量进行了测定。由表 3

可知, *OsNramp5* 基因敲除后,所有品种锰含量均显著降低,减幅 34.2%~63.1% (均值 52.7%);与此相反,铁和铬含量一定程度增加,不同品种铁含量增幅 11.4%~34.5% (均值 21.4%),而铬含量增幅更大,达到 45.6%~75.5% (均值 59.5%),但是,差异显著性测验结果显示,无论是铁还是铬,这种增加

表 3 *OsNramp5* 基因敲除株系籽粒的矿物元素含量变化

Table 3. Changes of mineral element contents in the grains of the *OsNramp5* knockout lines.

样品编号 Sample number	镉 <sup>1</sup> Cd <sup>1</sup> /(μg·kg <sup>-1</sup> )	镉 <sup>2</sup> Cd <sup>2</sup> /(μg·kg <sup>-1</sup> )	锰 <sup>1</sup> Mn <sup>1</sup> /(mg·kg <sup>-1</sup> )	铁 <sup>1</sup> Fe <sup>1</sup> /(mg·kg <sup>-1</sup> )	铜 <sup>1</sup> Cu <sup>1</sup> /(mg·kg <sup>-1</sup> )	铅 <sup>1</sup> Pb <sup>1</sup> /(μg·kg <sup>-1</sup> )	铬 <sup>1</sup> Cr <sup>1</sup> /(μg·kg <sup>-1</sup> )
HZ-WT	2010.3±400.5(3)	134.7±22.5(3)	60.1±3.9(3)	10.4±1.1(3)	4.7±0.4(3)	114.2±40.4(3)	80.8±39.1(3)
HZ-L01-#05/#05	137.6(1)	11.0(1)	25.0(1)	13.3(1)	5.4(1)	211.0(1)	153.0(1)
HZ-L01-#31/#31	46.4(1)	13.5(1)	24.2(1)	27.5(1)	5.4(1)	344.3(1)	169.1(1)
HZ-L04-#09/#09	39.1±11.2(2)	11.8±0.2(2)	20.5±1.5(2)	13.3±1.5(2)	5.1±0.2(2)	165.1±15.5(2)	97.2±6.7(2)
HZ-L08-#03/#03	47.4±10.6(3)	11.7±1.0(3)	20.3(1)	11.7±2.1(3)	5.4±1.1(3)	191.0±58.2(3)	109.2±19.7(3)
HZ-L08-#19/#19	91.0±64.2(2)	12.6±5.3(2)	22.5±0.7(2)	11.9±0.1(2)	4.7±0.1(2)	191.3±48.2(2)	173.5±42.2(2)
HZ-MUT <sup>3</sup>	65.2±41.4(9)*	12.0±2.1(9)*	22.2±2.0(7)*	14.0±5.2(9)	5.2±0.6(9)	204.6±64.2(9)*	132.3±38.9(9)
WF-WT	1753.7±167.5(3)	123.7±31.3(3)	42.6±7.0(3)	12.8±0.9(3)	4.5±0.3(3)	168.0±34.7(3)	60.8±5.0(3)
WF-L03-#02/#02	30.5(1)	13.3(1)	22.9(1)	13.8(1)	4.7(1)	138.6(1)	124.4(1)
WF-L03-#29/#29	29.1(1)	14.6(1)	21.1(1)	14.8(1)	3.9(1)	100.9(1)	54.6(1)
WF-L04-#27/#27	42.0(1)	14.1(1)	16.8(1)	14.2(1)	4.4(1)	183.4(1)	104.8(1)
WF-L05-#29/#29	68.3±33.5(2)	15.9±0.7(2)	16.0±0.6(2)	13.6±0.1(2)	4.5±0.2(2)	161.7±32.5(2)	108.7±39.5(2)
WF-L08-#03/#03	82.2±0.3(2)	18.9±0.2(2)	17.9±0.6(2)	14.5±0.6(2)	5.1±0.2(2)	166.4±43.7(2)	66.6±5.0(2)
WF-L08-#08/#08	29.1(1)	15.0(1)	17.1(1)	14.9(1)	4.7(1)	149.0(1)	73.9(1)
WF-MUT <sup>3</sup>	53.9±26.9(8)**	15.8±2.1(8)*	18.2±2.5(8)*	14.2±0.6(8)**	4.6±0.4(8)	153.5±32.4(8)	88.5±30.0(8)
WS-WT	1765.6±246.4(6)	129.2±32.3(3)	37.1±5.1(3)	9.5±0.7(3)	4.6±0.2(3)	133.9±41.5(3)	74.0±23.9(3)
WS-L01-#28/#28	134.2±150.4(2)	17.7±1.4(2)	16.6±1.3(2)	12.3±1.1(2)	4.3±0.1(2)	124.9±4.9(2)	114.0±29.6(2)
WS-L02-#15/#15	42.6±8.2(2)	15.6±0.4(2)	15.8±0.6(2)	12.4±2.1(2)	4.6±0.1(2)	170.2±60.7(2)	119.6±3.1(2)
WS-L02-#28/#28	187.3(1)	13.6(1)	16.9(1)	11.9(1)	4.6(1)	128.2(1)	100.1(1)
WS-MUT <sup>3</sup>	108.2±98.6(5)**	16.0±1.9(5)*	16.3±0.9(5)*	12.2±1.2(5)*	4.5±0.2(5)	143.7±38.9(5)	113.4±18.0(5)*
ZZ-WT	1140.3±143.0(3)	69.9±12.7(3)	29.1±1.2(3)	14.4±1.3(3)	5.0±0.1(3)	123.7±3.2(3)	56.9±9.5(3)
ZZ-L01-#03/#03	121.5(1)	13.6(1)	23.8(1)	17.4(1)	4.5(1)	196.6(1)	85.5(1)
ZZ-L01-#29/#29	31.9(1)	14.1(1)	16.7(1)	14.8(1)	4.7(1)	131.9(1)	109.0(1)
ZZ-L08-#03/#03	99.4±89.9(2)	18.9±4.7(2)	17.0±0.6(2)	14.4±1.3(2)	4.2±0.2(2)	139.6±8.8(2)	109.4±13.4(2)
ZZ-L08-#14/#14	107.2±95.7(2)	17.3±1.3(2)	20.3±2.8(2)	17.5±2.7(2)	4.2±0.1(2)	119.0±7.1(2)	93.1±8(2)
ZZ-MUT <sup>3</sup>	94.4±66.7(6)**	16.7±3.2(6)*	19.2±3.1(6)**	16.0±2.1(6)	4.4±0.2(6)**	140.9±30.1(6)	99.9±12.7(6)**

<sup>1</sup> 在镉污染土壤种植; <sup>2</sup> 在正常土壤种植; <sup>3</sup> 数据为相同品种不同突变基因型观测值的均值。样品编号格式为“品种名缩写-株系号-基因型”,具体信息见表 2 和图 2。HZ-华占; WF-五丰 B; WS-五山丝苗; ZZ-中早 35; WT-野生型; MUT-*OsNramp5* 基因敲除株系。

数据格式为“均值±标准差(n)”或“均值(n)”; \*,  $P<0.05$ ; \*\*,  $P<0.01$ ; 差异显著性通过  $t$  测验(双样本等方差或双样本异方差)进行检测(先进行  $F$  测验检测方差齐性),统计分析时假设相同品种不同株系相互之间等同。

<sup>1</sup>Grown in a Cd-contaminated field; <sup>2</sup>Grown in a non-Cd-contaminated field; <sup>3</sup>Means of all the observed values of the genetic editing lines. The sample name is “cultivar name abbreviation-line number-genotype”, and one may refer to Table 2 and Fig. 2 for the information of the line numbers and genotypes. HZ, Huazhan; WF, Wufeng B; WS, Wushansimiao; ZZ, Zhongzao 35; WT, Wild type; MUT, Mutants(All the *OsNramp5* mutation lines).

Values are “Mean±SD(n)” or “Mean(n)”; \*,  $P<0.05$ ; \*\*,  $P<0.01$ ; The significance was determined by Student's  $t$  test (types: equal variances or unequal variances) after  $F$  test for variance homogeneity. In the analysis of statistical significance, all the genetic editing lines within one cultivar were considered to be identical.



只在部分品种中显著；铅元素含量在华占中显著增加，增幅达 79.1%，由于其值已略微超出国家限定值（0.2 mg/kg；GB2762–2017），这种变化值得关注，而其他品种铅含量并未因 *OsNramp5* 基因敲除而显著改变；铜元素含量变化较小（仅在中早 35 基因敲除株系中减少了 13.3%）。此外，对华占基因敲除株系及野生型的汞、砷、硒、锌和钙元素含量进行检测（数据未显示），其中汞元素含量在所有样品中均低于所用方法的检测下限（30 μg/kg），因而 *OsNramp5* 基因敲除对汞积累的影响未知，而砷、

硒、锌和钙的含量也无显著变化。

*OsNramp5* 被敲除后，水稻籽粒中镉含量的大幅下降，锰含量亦减少一半左右，而铬含量增加一半以上，铁、锌、钙、硒、砷和铜积累受影响较小或不受影响，铅可能在个别品种中有一定程度增加。

2.4 *OsNramp5* 基因敲除对农艺性状的影响

为了检测 *OsNramp5* 敲除对农艺性状的影响，对大田（非镉污染土壤）种植的部分低镉 *OsNramp5* 基因敲除株系（T<sub>3</sub> 代）及野生型对照的株高和产量性状进行了测定（表 4）。4 个品种基因敲除株系（同

表 4 *OsNramp5* 基因敲除对株高、产量性状的影响

Table 4. Effects of *OsNramp5* disruption on plant height and yield traits.

样品编号 Sample number	株高 Plant height /cm	有效分蘖数 Effective tiller number	每穗总粒数 Total grain number per panicle	每穗实粒数 Filled grain number per panicle	结实率 Seed setting rate/%	千粒重 1000-grain weight/g	理论产量 Theoretical yield /(kg·hm <sup>-2</sup> )	增产率 Yield increasing rate/%
HZ-WT	115.3±3.6(68)	8.8±2.4(68)	239.1±91.5(115)	192.9±75.0(115)	81±11(115)	19.6±0.1(2)	9009.0	—
HZ-L01-#31/#31	111.4±3.1(57)**	9.2±2.2(57)	257.1±97.6(89)	178.7±69.9(89)	70±12(89)**	18.9±0.1(2)*	8376.0	-7.0
HZ-L04-#09/#09	112.1±2.6(71)**	8.8±2.3(71)	235.9±63.7(105)	181.9±53.7(105)	77±9(105)**	19.4±0.0(2)	8418.0	-6.6
HZ-L08-#19/#19	107.9±4.4(70)**	9.7±2.6(70)	—	—	—	18.6±0.2(2)*	—	—
P 值 P value	0.000	0.129	0.211	0.322	0.000	0.003	—	—
WF-WT	78.9±2.1(46)	7.3±1.6(46)	129.8±26.1(73)	121.3±26.5(73)	93±5(73)	24.0±0.1(2)	5760.0	—
WF-L03-#02/#02	74.6±1.8(46)**	7.6±1.5(46)	120.8±26.2(81)	109.5±27.5(81)*	90±7(81)**	23.6±0.1(2)	5310.0	-7.8
WF-L03-#29/#29	77.7±2.4(46)*	7.3±2.1(46)	130.8±24.2(75)	117.4±24.4(75)	89±6(75)**	23.7±0.0(2)	5512.5	-4.3
P 值 P value	0.000	0.664	0.028	0.018	0.000	0.083	—	—
WS-WT	116.2±3.8(45)	8.7±2.4(45)	223.8±70.2(103)	201.7±61.7(103)	90±4(103)	20.4±0.0(2)	9660.0	—
WS-L01-#28/#28(1)	110.4±2.9(46)**	8.5±1.6(46)	229.2±92.1(104)	190.4±75.7(104)	84±9(104)**	19.6±0.1(2)**	8596.5	-11.0
WS-L01-#28/#28(2)	110.8±3.3(46)**	9.6±2.6(46)	211.6±58.0(96)	187.8±50.7(96)	89±7(96)	19.3±0.0(2)**	9435.0	-2.3
WS-L02-#15/#15	109.6±4.1(46)**	9.2±1.8(46)	183.5±68.3(103)**	164.7±61.0(103)**	90±3(103)	20.1±0.1(2)*	8220.0	-14.9
WS-L02-#28/#28	111.1±3.2(38)**	9.6±2.2(38)	—	—	—	19.9±0.0(2)**	—	—
P 值 P value	0.000	0.034	0.000	0.000	0.000	0.000	—	—
ZZ-WT	83.8±3.1(46)	7.2±1.9(46)	115.2±42.7(83)	101.0±41.3(83)	86±8(83)	29.4±0.2(2)	5770.5	—
ZZ-L08-#14/#14	78.1±2.3(45)**	7.8±1.9(45)	106.6±41.7(88)	92.7±35.6(88)	87±6(88)	27.8±0.1(2)**	5458.5	-5.4

数据格式为均值±标准差 (n)；\*，P<0.05；\*\*，P<0.01；—，未检测或不适用；突变体与野生型之间显著性测验视适用情况采用 *t* 测验（含两组数据时用；行 *F* 测验比较方差同质性后进行）或方差分析加多重比较（含三组以上数据时用；等方差时用 ANOVA+Dunnett *t* 检验，异方差时用 Welch ANOVA +Games-Howell test，组间方差齐性用中位数版 Levene 检验进行检测，千粒重数据因 *n*<3 未检测方差齐性，视为等方差）；结实率数据经平方根反正弦转换后进行方差分析；产量依据“实粒数×有效分蘖数×千粒重/1000×270 000 株/1000”估算；样品编号格式为“品种名缩写-株系号-基因型”，基因型 WS-L01-#28/#28 测试两个姊妹系。品种名缩写：HZ—华占；WF—五丰 B；WS—五山丝苗；ZZ—中早 35；WT—野生型。株系号见表 2，基因型编号见图 2。

Values are Mean±SD (n); \*, P<0.05; \*\*, P<0.01; —, Not applicable or not determined; the significances between mutants and wild types were determined by *t* tests after *F* tests for variance homogeneity (for comparisons with two groups of samples and for comparisons of the 1000-grain weight trait) or by ANOVA with post hoc multiple comparison analysis (for comparisons with three or more groups of samples; ANOVA + Dunnett’s *t* tests for groups with equal variances; Welch’s ANOVA + Games-Howell tests for groups with unequal variance; Median-edition Levene’s test was used to determine the homogeneity of group variances expect those of 1000-grain weight because of *n*<3; groups of 1000-grain weight data were viewed as having equal variances); arcsine square root transformation for the data of seed setting rate was performed before ANOVA; the theoretical yield was estimated by “filled grain number per panicle × effective tiller number × 1000-grain weight / 1000 × 270 000 / 1000”. The sample name is “cultivar name abbreviation-line number-genotype”, and the information of the line numbers and genotypes is available in Table 2 and Fig. 2. Two sister lines were analyzed for the genotype WS-L01-#28/#28. Abbreviations of cultivar names: HZ, Huazhan; WF, Wufeng B; WS, Wushansimiao; ZZ, Zhongzao 35; WT, Wild type. The sample name is “cultivar name abbreviation-line number-genotype”. One may refer to Table 2 and Fig. 2 for the information of the line numbers and genotypes.

一品种内所有株系的指标均值)与对照相比发生了如下变化:株高稍降低,降幅 3.5%~6.8% (4 个品种的降幅均值为 4.9%),所有株系与对照相比均差异显著;有效分蘖呈增加趋势,增幅 1.9%~9.0% (均值 5.5%),但由于分蘖性状误差较大,可能差异为误差所掩盖,差异并不显著,但由于调查的样本较大,我们认为这种增加是真实存在的;每穗总粒数变化无明显规律;每穗实粒数、结实率和千粒重均呈下降趋势,降幅分别为 6.5%~10.3% (均值 7.9%)、3.2%~9.0% (中早 35 基因敲除株系除外;均值 5.3%) 和 1.4%~5.5% (均值 3.4%),不过这种下降并非所有株系都差异显著。通过计算理论产量,发现 4 个品种减产 5.4%~9.4% (均值 6.9%)。概而言之,*OsNramp5* 敲除可引起株高、实粒数、结实率和千粒重轻度下降,而有效分蘖小幅增加,最终导致不容忽视的小幅减产。

为了检测 *OsNramp5* 敲除对大米品质的影响,我们亦对 *OsNramp5* 敲除突变体及对照米样的外观

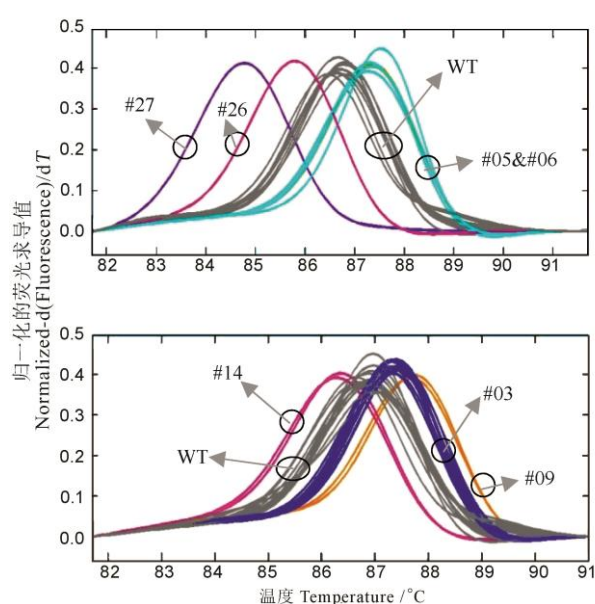
品质进行了测定,同时利用近红外分析对蛋白含量、直链淀粉含量及食味进行了估计(表 5)。4 个品种 *OsNramp5* 敲除株系与对照相比,粒长轻微增加(增幅 0.4%~2.7%,均值 1.5%),粒宽略微变窄(减幅 0.9%~3.9%,均值 2.5%),最终所有株系均表现出长宽比轻微增加(增幅 1.8%~5.0%,均值 4.0%),而这种长宽比的增加引起垩白粒率和垩白度的小幅下降(降幅分别为 6.7%~22.6%和 0.6%~17.6%,均值分别为 13.3%和 10.0%)。食味指标测定结果显示,与对照相比,4 个品种 *OsNramp5* 敲除株系中蛋白质含量轻微增加(增幅 1.8%~4.3%,均值 3.2%),直链淀粉含量除品种五山丝苗外,其余品种均不同程度下降(降幅 3.5%~12.6%,均值 9.5%),而食味分几乎不受 *OsNramp5* 敲除的影响(只有五山丝苗品种数据)。总之, *OsNramp5* 敲除能引起籽粒长宽比小幅增加并一定程度降低垩白发生,同时引起蛋白含量轻微增加,而且在一些品种中导致直链淀粉含量小幅下降,对食味分几乎无影。从应用角度来

表 5 *OsNramp5* 基因敲除株系的米质变化  
Table 5. Quality change of the milled rice from the *OsNramp5* knockout lines relative to those from the wild type.

样品编号 Sample number	整精米长 Head rice length /mm	整精米宽 Head rice width /mm	长宽比 Length/width	垩白粒率 Chalky grain percentage/%	垩白度 Chalkiness degree/%	蛋白质含量 Protein content/%	直链淀粉含量 Amylose content/%	食味分 Taste score
HZ-WT	5.59±0.02	1.80±0.00	3.11±0.02	4.50±0.12	1.25±0.06	8.20±0.03	12.18±0.25	—
HZ-L04-#09/#09	5.67±0.01	1.74±0.01**	3.27±0.01**	3.85±0.45	1.18±0.12	8.47±0.02**	12.05±0.27	—
HZ-L08-#19/#19	5.55±0.03	1.72±0.00**	3.23±0.02**	4.06±0.65	0.97±0.18	8.41±0.03**	11.54±0.17	—
HZ-L01-#31/#31	5.61±0.01	1.73±0.01**	3.25±0.01**	3.27±0.51	0.94±0.19	8.77±0.01**	11.66±0.18	—
P 值 P value	0.015	0.000	0.000	0.400	0.402	0.000	0.202	—
WF-WT	5.28±0.01	2.21±0.00	2.39±0.00	37.36±1.03	6.94±0.50	9.02±0.01	9.00±0.63	—
WF-L03-#02/#02	5.46±0.01**	2.17±0.00**	2.52±0.00**	34.45±0.54	6.99±0.02	9.33±0.01**	7.85±0.21	—
WF-L03-#29/#29	5.38±0.00**	2.15±0.00**	2.50±0.00**	35.17±1.96	6.80±0.61	9.03±0.01	7.93±0.27	—
P 值 P value	0.000	0.000	0.000	0.338	0.952	0.000	0.166	—
WS-WT	5.74±0.01	1.81±0.00	3.19±0.01	3.96±0.47	0.82±0.05	8.43±0.04	18.10±0.27	88.03±0.16
WS-L02-#15/#15	5.91±0.01**	1.81±0.00	3.26±0.01**	2.82±0.31	0.45±0.04**	8.72±0.02**	17.93±0.11	88.16±0.30
WS-L01-#28/#28	5.70±0.01	1.77±0.01**	3.24±0.01**	3.69±0.34	1.18±0.18	8.87±0.01**	18.51±0.17	86.11±0.24**
WS-L02-#28/#28	5.81±0.00**	1.80±0.00	3.24±0.00**	2.68±0.68	0.55±0.08	8.63±0.04**	18.52±0.01	87.88±0.01
P 值 P value	0.000	0.000	0.000	0.229	0.001	0.000	0.106	0.000
ZZ-WT	5.50±0.01	2.56±0.01	2.16±0.00	98.22±0.35	40.92±0.87	9.10±0.01	34.68±0.94	—
ZZ-L08-#14/#14	5.60±0.01**	2.49±0.00**	2.26±0.01**	91.65±0.74**	36.60±0.68*	9.38±0.01*	30.32±0.49*	—

数据格式为均值±标准误,重复 3~4 次,外观品质每次分析整精米 500 粒以上,食味品质每次测定取 5 个次级样品的平均值;—,含量超出模型检测范围;\*,  $P<0.05$ ; \*\*,  $P<0.01$ 。数据分析及样品编号格式同表 4,其中垩白粒率数据经平方根反正弦转换后进行方差分析,同一品种样品水分含量基本相同。品种名缩写:HZ-华占;WF-五丰 B;WS-五山丝苗;ZZ-中早 35;WT-野生型。株系号见表 2,基因型编号见图 2。

Values are Mean±SE,  $n=3$  or 4, for appearance quality more than 500 head rice grains were analyzed in each determination, and for eating quality five subsamples were included in each analysis; —, Data out of the model range; \*,  $P<0.05$ ; \*\*,  $P<0.01$ . Methods for data analysis are the same as those described in Table 4 and arcsine square root transformation for the data of seed setting rate was performed before ANOVA; The samples within the same cultivar had nearly identical water content. Abbreviations: HZ, Huazhan; WF, Wufeng B; WS, Wushansimiao; ZZ, Zhongzao 35; WT, Wild type. One may refer to Table 2 and Fig. 2 for the information of the line numbers and genotypes.



其中基因型 WT (上图)、WT (下图)、#03、#05、#06、#09、#14、#26 和 #27 的样品数 ( $n$ ) 分别为 9、13、11、2、4、2、2、1 和 1。The sample sizes ( $n$ ) for the genotypes WT (upper panel), WT (lower panel), #03, #05, #06, #09, #14, #26 and #27 are 9, 13, 11, 2, 4, 2, 2, 1 and 1, respectively.

图 3 几种突变类型与野生型在 HRM 分型时的溶解曲线  
Fig. 3. Melting curves of various mutation alleles and the wild type in HRM analysis.

看, *OsNramp5* 敲除对米质的影响是有利的。

## 2.5 通过 HRM 法对 *OsNramp5* 基因突变体和野生型进行基因分型

高分辨率溶解曲线 (HRM) 分析是对 SNP 和短片段 InDel 变异进行基因分型的高通量低成本方法。本研究获得的 *OsNramp5* 基因突变体可用作低镉基因供体以进行其他低镉新品种的培育。为了在进一步的低镉性状转育工作中采用 HRM 方法进行基因分型以提高分子标记辅助选择的效率, 本研究进行试验, 以筛选出易于分型的 *OsNramp5* 基因突变类型。结果显示, 在粗放检测条件下 (DNA 粗放提取、PCR 模板浓度不调为一致以及 HRM 分析时不加温度内标), 编号为 #3, #05, #06, #09, #14, #26 和 #27 (图 3) 的 *OsNramp5* 突变基因型溶解曲线仍然能与野生型较好区分, 解链温度 ( $T_m$  值) 差异为  $0.5^{\circ}\text{C} \sim 1^{\circ}\text{C}$ 。因此在将来的低镉性状转育工作中若使用 HRM 进行基因分型, 可选择含有前述几种基因型的株系作为供体亲本。

## 3 讨论

在低镉水稻创制中, 理想的情形是, 获得的低

镉水稻籽粒镉含量降低的同时其他有害元素含量不增加, 有益元素含量不减少, 同时农艺性状较少或不受负面影响, 而 *OsNramp5* 功能失活突变体似乎符合此种要求。

*OsNramp5* 是水稻根部 Mn 和 Cd 吸收的关键离子转运蛋白, 亦在 Fe 吸收中发挥作用, 这一发现分别由日本 3 个独立研究团队<sup>[16-18]</sup>所揭示。其中 Ishikawa 等<sup>[16]</sup>的研究显示 *OsNramp5* 突变体在低镉品种培育中具有重要应用价值, 作者利用从粳稻品种越光离子束诱变突变体库中鉴定获得的 *OsNramp5* 基因功能失活突变体进行研究, 发现 *OsNramp5* 突变能大幅度降低籽粒及稻草镉积累 (含量  $<0.1 \text{ mg/kg}$ ) 的同时不改变 Fe、Cu 和 Zn 含量, 亦不影响包含株高、产量和食味等在内的农艺性状。而 Sasaki 等<sup>[18]</sup>利用粳稻品种中花 11 T-DNA 插入突变体进行的研究显示, 虽然 *OsNramp5* 功能失活使得籽粒及稻草镉含量大幅度降低, 但对农艺性状的影响与 Ishikawa 等<sup>[16]</sup>报道的截然不同, 其植株生长受到严重抑制并大幅减产 (最高减产 89%)。 *OsNramp5* 突变导致农艺性状严重劣变的现象也为 Ishimaru 等<sup>[17]</sup>所报道。作者利用品种 Tsukinohikari 的 *OsNramp5* RNA 干扰株系进行研究, 发现 Mn 缺乏时 RNA 干扰植株与野生型对照相比生长受到抑制, 但 Mn 正常时无差异, 揭示 Mn 的缺乏是导致农艺性状劣变的原因。同样, Sasaki 等<sup>[18]</sup>通过补充 Mn 部分逆转苗期生长抑制表型, 进一步确认了 Mn 的缺乏导致了农艺性状劣变。Ishikawa 等<sup>[16]</sup>和 Sasaki 等<sup>[18]</sup>的研究都是在非 Cd 污染土壤大田条件下评价 *OsNramp5* 基因敲除对农艺性状的影响, 显然两个团队的研究结果相互矛盾, 这一点虽然 Ishikawa 等在其论文中已经提及, 但并没有给出解释。我们认为, 这种不一致可能是不同品种对 Mn 的需求不同所致, 提示了当利用 *OsNramp5* 功能缺失突变基因对不同品种进行低镉化改造时应该逐例评价其对农艺性状的影响。

Tang 等<sup>[30]</sup>通过 CRISPR/Cas9 技术创制了杂交稻品种亲本华占及 638S 的 *OsNramp5* 基因敲除株系, 并利用华占基因敲除品系及其与 638S 基因敲除品系配制获得的杂种评价了 *OsNramp5* 突变对 Cd、Mn、Fe、Zn 和 Cu 元素积累以及株高、产量等农艺性状的影响。在本研究中, 我们亦在不同类型的籼稻 (即早籼中早 35、晚籼五山丝苗、三系恢复系华占和三系保持系五丰 B; 其中华占品种与 Tang 等研究中使用的相同) 中展示了敲除 *OsNramp5* 后水稻籽粒中的 Cd 含量大幅下降, 同时

较大幅度下降的还有 Mn 含量,而 Fe、Zn 和 Cu 含量因品种不同而略微改变或不受影响,这与前述日本研究者在粳稻中的研究结果以及 Tang 等<sup>[30]</sup>在籼稻中的结果基本一致。与前人的研究不同,我们还测定了 *OsNramp5* 基因敲除株系中元素 Pb、Cr、As、Se 和 Ca 的含量变化,发现 Pb 在个别品种(华占)中含量呈增加趋势,Cr 在 4 个品种中亦不同程度增加,As、Se 和 Ca 含量在检测的品种华占中并无变化,由于 Pb 和 Cr 的转运机制研究较少,尚不清楚其含量增加的具体原因。本研究显示个别品种基因敲除株系中 Pb 含量的增加已经略微超过国标限定值(0.2 mg/kg; GB2762-2017),因而将来利用 *OsNramp5* 功能突变基因进行品种低镉化改造时应该关注 Pb 含量的变化。Cr 是人体必需的元素,由于本研究中籽粒本底 Cr 水平较低,我们认为 *OsNramp5* 基因敲除引起的 Cr 含量增加并不足以对健康造成危害(中国营养学会发布的 2013 版《中国居民膳食营养素参考摄入量》中推荐我国成年人总铬适宜摄入量为 30 µg/d; GB2762-2017 食品中污染物限量标准规定稻米铬含量须低于 1 mg/kg),但是在 Cr 污染地区,若本底 Cr 含量比较高,这种效应就不能忽视,可能导致稻米 Cr 含量超标。

本研究进一步展示了 *OsNramp5* 基因敲除对水稻农艺性状的负面影响,发现不同品种中株高和产量都小幅度降低,这一结果与 Ishikawa 等<sup>[16]</sup>以及 Tang 等<sup>[30]</sup>的结果矛盾,而与 Sasaki 等<sup>[18]</sup>和 Ishimaru 等<sup>[17]</sup>的结果一定程度吻合,只是本研究中产量减少的程度比 Sasaki 等<sup>[18]</sup>报道的小得多。值得注意的是,我们和 Tang 等<sup>[30]</sup>的研究使用了相同的品种华占为试验材料,只是敲除靶位点不同,显然敲除靶位点的差异不大可能是产生这种差异的原因,我们认为可能是种植条件的不同导致了这种矛盾结果。在本研究中,检测对农艺性状影响的植株种植在非 Cd 污染土壤(与 Sasaki 等<sup>[18]</sup>和 Ishikawa 等<sup>[16]</sup>的研究相同),而 Tang 等<sup>[30]</sup>的试验在严重 Cd 污染土壤上进行,在镉污染土壤种植时,一方面,由于 Cd 超量积累对水稻生长不利<sup>[31]</sup>,野生型植株农艺性状可能受到负面影响,而突变体因镉积累较低而得以避免,另一方面,突变体株系中存在 *OsNramp5* 基因敲除导致的生长抑制效应,而野生型不存在这种效应,因而突变体与野生型中各自遭受的生长抑制程度相似,导致两者农艺性状表现无差别,而在一般土壤种植时,由于没有 Cd 毒害,突变体与野生型对照的差别就只剩下基因敲除株系因 *OsNramp5* 功能失活而引起的生长抑制,因此差异得以显现。此

外,其他种植条件的不同(如 Mn 的供应)也可能是产生差异结果的原因。事实上,我们将华占和五山丝苗的各自两个 *OsNramp5* 基因敲除株系在地点 C 种植时(正文提及的地点 A、B 之外的另一地点;该地稻米镉含量只是轻微超标),小区测产方产量测定结果显示突变体与野生型对照几乎无差别(数据未显示)。当然,以上猜想需要进一步试验验证。总之,不同品种及不同种植条件下, *OsNramp5* 功能突变株系可能较野生型减产或无变化,提示生产中推广通过 *OsNramp5* 基因敲除创制低镉水稻品种时须谨慎,需要按照新品种的标准重新通过多年多点试验确定推广地域。需要指出的是,对于 Cd 严重超标稻米产区,一定程度的减产以换取稻米食用安全也是值得的。

本研究还揭示了当 *OsNramp5* 基因敲除导致减产时,产量的降低主要由实粒数、结实率和千粒重降低所致,并为有效分蘖数的增加所部分补偿,这是 Sasaki 等<sup>[18]</sup>和 Ishikawa 等<sup>[17]</sup>的研究中未曾提及的。吴平等<sup>[32]</sup>利用 F<sub>2</sub> 分离群体进行分析的结果显示,水稻株高和分蘖呈负相关关系。本研究发现 *OsNramp5* 基因敲除材料中伴随株高小幅度降低分蘖略微增多,与前人报道吻合。

Allen 等<sup>[33]</sup>通过在人体细胞中对 40 000 多个靶位点切割产生的大于  $1 \times 10^9$  个突变序列进行分析揭示了 CRISPR/Cas9 切割基因组 DNA 产生双链断裂后细胞修复产生突变的规律,发现突变结果与切割位点邻近序列特征息息相关,并可依据靶位点序列信息准确预测突变结果。我们通过该报道作者提供的网络工具 FORECasT (<https://partslab.sanger.ac.uk/FORECasT>) 对本研究采用的 *OsNramp5* 基因靶位点突变结果进行了预测,预测结果中概率最高的前三种突变类型与本研究的实际结果完全吻合(数据未显示)。因此,本研究结果还验证了 FORECasT 在植物基因敲除突变结果预测中的准确性。

总之,虽然水稻中 *OsNramp5* 功能缺失可能导致不同程度减产,但是到目前为止,若想通过改良品种的办法使严重镉超标(如 >1 mg/kg)稻米产区的大米镉含量降至较低水平(如 <0.2 mg/kg),除非通过转基因过表达 *OsHMA3*<sup>[13]</sup>、*OsO3L2* 或 *OsO3L3* 基因片段<sup>[34]</sup>,否则利用 *OsNramp5* 功能缺失突变体仍然是唯一的选择。而对于稻米 Cd 轻微污染(如含量低于 0.5 mg/kg)产区低镉品种的培育,更优的选择可能是利用 *OsLCT1*<sup>[14, 35]</sup>、*OsLCD*<sup>[15]</sup> 和 *OsCCX2*<sup>[36]</sup>等基因的突变体,因为这些基因功能缺失后能使镉含量减少约 50%的同时对其他元素含

量和产量影响甚微。

**谢辞:**感谢江西省超级水稻研究发展中心蔡耀辉研究员、江西省农业科学院土壤肥料与资源环境研究所徐昌旭研究员和谢杰博士在镉污染耕地信息提供及材料种植中的帮助。

## 参考文献:

- [1] Grant C A, Clarke J M, Duguid S, Chaney R L. Selection and breeding of plant cultivars to minimize cadmium accumulation. *Sci Total Environ*, 2008, 390: 301-310.
- [2] Sebastian A, Prasad M N V. Cadmium minimization in rice. A review. *Agron Sustain Dev*, 2014, 34(1): 155-173.
- [3] Järup L, Åkesson A. Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, 238: 201-208.
- [4] Arao T, Ae N. Genotypic variations in cadmium levels of rice grain. *Soil Sci Plant Nutr*, 2003, 49(4): 473-479.
- [5] Liu J, Zhu Q, Zhang Z, Xu J, Yang J, Wong M H. Variations in cadmium accumulation among rice cultivars and types and the selection of cultivars for reducing cadmium in the diet. *J Sci Food Agric*, 2005, 85: 147-153.
- [6] 王林友, 竺朝娜, 王建军, 张礼霞, 金庆生, 石春海. 水稻镉、铅、砷低含量基因型的筛选. *浙江农业学报*, 2012, 24(1): 133-138.  
Wang L Y, Zhu C N, Wang J J, Zhang L X, Jin Q S, Shi C H. Screening for rice (*Oryza sativa* L.) genotypes with lower Cd, Pb and As contents. *Acta Agric Zhejiang*, 2012, 24(1): 133-138. (in Chinese with English abstract)
- [7] 叶新新, 周艳丽, 孙波. 适于轻度 Cd、As 污染土壤种植的水稻品种筛选. *农业环境科学学报*, 2012, 31(6): 1082-1088.  
Ye X X, Zhou Y L, Sun B. Screening of suitable rice cultivars for the adaptation to lightly contaminated soil with Cd and As. *J Agro-Environ Sci*, 2012, 31(6): 1082-1088. (in Chinese with English abstract)
- [8] Uraguchi S, Fujiwara T. Rice breaks ground for cadmium-free cereals. *Curr Opin Plant Biol*, 2013, 16(3): 328-334.
- [9] Uraguchi S, Fujiwara T. Cadmium transport and tolerance in rice: Perspectives for reducing grain cadmium accumulation. *Rice*, 2012, 5(1): 5.
- [10] 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 Cell Physiol*, 2012, 53(1): 213-224.
- [11] 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 Environ*, 2012, 35(11): 1948-1957.
- [12] Yamaji N, Xia J, Mitani-Ueno N, Yokosho K, Feng M J. Preferential delivery of zinc to developing tissues in rice is mediated by P-type heavy metal ATPase OsHMA2. *Plant Physiol*, 2013, 162(2): 927-939.
- [13] Ueno D, Yamaji N, Kono I, Huang C F, Ando T, Yano M, Ma J F. Gene limiting cadmium accumulation in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(38): 16 500-16 505.
- [14] Uraguchi S, Kamiya T, Sakamoto T, Kasai K, Sato Y, Nagamura Y, Yoshida A, Kyoizuka J, Ishikawa S, Fujiwara T. Low-affinity cation transporter (OsLCT1) regulates cadmium transport into rice grains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(52): 20 959-20 964.
- [15] Shimo H, Ishimaru Y, An G, Yamakawa T, Nakanishi H, Nishizawa N K. Low cadmium (LCD), a novel gene related to cadmium tolerance and accumulation in rice. *J Exp Bot*, 2011, 62(15): 5727-5734.
- [16] Ishikawa S, Ishimaru Y, Igura M, Kuramata M, Abe T, Senoura T, Hase Y, Arao T, Nishizawa N K, Nakanishi H. Ion-beam irradiation, gene identification, and marker-assisted breeding in the development of low-cadmium rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(47): 19 166-19 171.
- [17] Ishimaru Y, Takahashi R, Bashir K, Shimo H, Senoura T, Sugimoto K, Ono K, Yano M, Ishikawa S, Arao T, Nakanishi H, Nishizawa N K. Characterizing the role of rice NRAMP5 in manganese, iron and cadmium transport. *Sci Rep*, 2012, 2: 286.
- [18] 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.
- [19] Belhaj K, Chaparro-Garcia A, Kamoun S, Nekrasov V. Plant genome editing made easy: Targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods*, 2013, 9(1): 39.
- [20] Peng H, Zhang Q, Li Y, Lei C, Zhai Y, Sun X, Sun D, Sun Y, Lu T. A putative leucine-rich repeat receptor kinase, OsBRR1, is involved in rice blast resistance. *Planta*, 2009, 230(2): 377-385.
- [21] Miao J, Guo D, Zhang J, Huang Q, Qin G, Zhang X, Wan J, Gu H, Qu L J. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell Res*, 2013, 23(10): 1233-1236.
- [22] Feng Z, Zhang B, Ding W, Liu X, Yang D L, Wei P, Cao F, Zhu S, Zhang F, Mao Y, Zhu J K. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2013, 23(10): 1229-1232.
- [23] Cong L, Ran F A, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu P D, Wu X, Jiang W, Marraffini L A, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [24] Liu H, Ding Y, Zhou Y, Jin W, Xie K, Chen L L. CRISPR-P 2.0: An improved CRISPR-Cas9 tool for genome editing in plants. *Mol Plant*, 2017, 10(3): 530-532.
- [25] Lei Y, Lu L, Liu H Y, Li S, Xing F, Chen L L. CRISPR-P: A web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants. *Mol Plant*, 2014, 7(9): 1213-1226.

- 1494-1496.
- [26] Holsters M, de Waele D, Depicker A, Messens E, van Montagu M, Schell J. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Gen Genet*, 1978, 163(2): 181-187.
- [27] Toki S, Hara N, Ono K, Onodera H, Tagiri A, Oka S, Tanaka H. Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. *Plant J*, 2006, 47(6): 969-976.
- [28] Allen G C, Flores-Vergara M A, Krasynanski S, Kumar S, Thompson W F. A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide. *Nat Protoc*, 2006, 1(5): 2320-2325.
- [29] 刘巧泉, 陈秀花, 王兴稳, 彭凌涛, 顾铭洪. 一种快速检测转基因水稻中潮霉素抗性的简易方法. *农业生物技术学报*, 2001, 9(3): 264-268.
- Liu Q Q, Chen X H, Wang X Y, Peng T L, Gu M H. A rapid simple method of assaying hygromycin resistance in transgenic rice. *J Agric Biotechnol*, 2001, 9(3): 264-268. (in Chinese with English abstract)
- [30] Tang L, Mao B, Li Y, Lv Q, Zhang L, Chen C, He H, Wang W, Zeng X, Shao Y, Pan Y, Hu Y, Peng Y, Fu X, Li H, Xia S, Zhao B. Knockout of *OsNramp5* using the CRISPR/Cas9 system produces low Cd-accumulating indica rice without compromising yield. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 14 438.
- [31] Rizwan M, Ali S, Adrees M, Rizvi H, Zia-Ur-Rehman M, Hannan F, Qayyum M F, Hafeez F, Ok Y S. Cadmium stress in rice: Toxic effects, tolerance mechanisms, and management: A critical review. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2016, 23(18): 17 859-17 879.
- [32] 吴平. 应用 RFLP 标记分析水稻株高与分蘖的遗传相关性. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 1996, 26(3): 264-270.
- Wu P. Genetic correlation analysis of rice plant height and tiller number using RFLP markers. *Sci China: Ser C*, 1996, 26(3): 264-270. (in Chinese; the title was translated into English by us)
- [33] Allen F, Crepaldi L, Alsinet C, Strong A J, Kleshchevnikov V, De Angeli P, Pedenkov A P, Khodak A, Kiselev V, Kosicki M, Bassett A R, Harding H, Galanty Y, Muñoz-Martínez F, Metzákopian E, Jackson S P, Parts L. Predicting the mutations generated by repair of Cas9-induced double-strand breaks. *Nat Biotechnol*, 2018, 37: 64-72.
- [34] Wang C, Guo W, Ye S, Wei P, Ow D W. Reduction of Cd in rice through expression of *OXS3*-like gene fragments. *Mol Plant*, 2016, 9(2): 301-304.
- [35] Uruguchi S, Kamiya T, Clemens S, Fujiwara T. Characterization of *OsLCT1*, a cadmium transporter from indica rice (*Oryza sativa*). *Physiol Plant*, 2014, 151(3): 339-347.
- [36] Hao X, Zeng M, Wang J, Zeng Z, Dai J, Xie Z, Yang Y, Tian L, Chen L, Li D. A node-expressed transporter *OsCCX2* is involved in grain cadmium accumulation of rice. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 476.

## 《植物遗传资源学报》2020 年征订启事

《植物遗传资源学报》是中国农业科学院作物科学研究所和中国农学会主办的学术刊物, 中国科技核心期刊、全国中文核心期刊、中国科学引文数据库 (CSCD) 核心期刊, 被国内多家数据库收录, 被 CA 化学文摘 (美)、JST 日本科学技术振兴机构数据库收录, 荣获 2015 年度中国自然资源学会高影响力十佳期刊。据《中国科技期刊引证报告》(核心版) 统计: 2018 年影响因子 1.159, 居农艺学科期刊的第二位。

在 2018 年中国科学文献计量评价研究中心发布的《世界学术期刊学术影响力指数 (WAJCI) 年报》中, 《植物遗传资源学报》在世界农艺学 102 种期刊中排名 49, 入选 Q2 区。

报道内容为大田、园艺作物, 观赏、药用植物, 林用植物、草类植物及其一切经济植物的有关植物遗传资源基础理论研究、应用研究方面的研究成果、创新性学术论文和高水平综述或评论。如种质资源的考察、收集、保存、评价、利用、创新, 信息学、管理学等; 起源、演化、分类等系统学; 基因发掘、鉴定、克隆、基因文库建立、遗传多样性研究。

双月刊, 大 16 开本, 288 页, 彩色铜版纸印刷。每期定价 68 元, 全年 408 元。各地邮局发行。邮发代号: 82-643。国内连续出版物号 CN 11-4996/S, 国际连续出版物号 ISSN 1672-1810。本刊编辑部常年办理订阅手续, 如需邮挂每期另加 3 元。

地址: 北京市中关村南大街 12 号《植物遗传资源学报》编辑部; 邮编: 100081; 电话: 010-82105795; 网址: www.zwyczy.cn; E-mail: zwyczyxb2003@163.com; zwyczyxb2003@sina.com。

微信 ID: 植物遗传资源学报; 作者 QQ 群: 372958204。