

水稻抗 ACCase 抑制剂类除草剂两系不育系种质资源的创制

郭金梦¹ 陶开亮¹ 朱俊¹ 赵学宇¹ 李康² 甘泉² 林翠香² 汪楠胜² 于豪²
宋丰顺² 李娟² 石英尧^{1,*} 倪大虎^{2,*}

(¹ 安徽农业大学 农学院, 合肥 230036; ² 安徽省农业科学院 水稻研究所, 合肥 230031; *通信作者, email: Shiyy123@163.com; dahuni1974@163.com)

Creation of Germplasm Resources of Two-line Sterile Rice Resistant to ACCase-inhibiting Herbicides

GUO Jinmeng¹, TAO Kailiang¹, ZHU Jun¹, ZHAO Xueyu¹, LI Kang², GAN Quan², LIN Cuixiang²,
WANG Nansheng², YU Hao², SONG Fengshun², LI Juan², SHI Yingyao^{1,*}, NI Dahu^{2,*}

(¹ College of Agriculture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; ² Institute of Rice, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China; *Corresponding author, email: Shiyy123@163.com; dahuni1974@163.com)

Abstract: 【Objective】The creation of herbicide-resistant rice germplasm is essential for breeding new herbicide-resistant rice varieties. By using CRISPR/Cas9 gene editing technology, the acetyl-CoA carboxylase *OsACCI* gene was edited with the sterile line An 9S as the material, and a two-line sterile rice germplasm with herbicide resistance was created. 【Method】By using CRISPR/Cas9 technology, a single-base mutation vector, ePE2-ACC-I1879V, was constructed with acetyl-CoA carboxylase *OsACCI* as the target gene. With An 9S as the transformation material, transgenic plants were obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. The genotypes and phenotypes were identified by sequencing the mutation sites of transgenic plants, conducting herbicide spraying tests and agronomic traits analysis. 【Result】Twenty-four ACC1^{I1879V} mutant plants were obtained as confirmed by molecular detection in T₀ generation; A total of 96 homozygous mutant plants were obtained from 24 lines in the T₁ generation through segregation and screening, all of which had herbicide resistance. High-throughput sequencing showed that the three tested lines (NS512, NS513, NS514) contained no exogenous transgenic elements. Furthermore, the survival rate after spraying with 4% haloxyfop-P-methyl was 100%. Compared with the control An 9S, the NS512 line had increased plant height and wider flag leaf; the NS513 line had increased plant height and longer and wider flag leaf; and the NS514 line had a narrower flag leaf; the fertility of the three tested lines remained unchanged, and there was no significant difference in the number of effective panicles per plant and the panicle length. The transgenic safety evaluation indicated that the OsACCI protein shares no sequence similarity with any known toxic proteins, antinutritional factors or allergens. Therefore, it is considered safe for human consumption. 【Conclusion】Using CRISPR/Cas9 gene editing technology, we obtained homozygous mutant lines that are resistant to ACCase inhibitor herbicides. These lines are genetically stable, free of transgenic components, exhibit unaltered fertility, and are safe, providing fundamental materials for herbicide-resistant breeding in rice.

Key words: CRISPR/Cas9; gene editing; acetyl coenzyme a carboxylase; sterile line

摘要: 【目的】创制抗除草剂水稻新种质是培育抗除草剂水稻新品种的前提。利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 以安 9S 不育系为材料, 编辑乙酰辅酶 A 羧化酶 *OsACCI* 基因, 创制具有抗除草剂特性的两系不育系水稻新种质。【方法】利用 CRISPR/Cas9 技术, 以乙酰辅酶 A 羧化酶 *OsACCI* 为靶基因, 构建单碱基突变载体 ePE2-ACC-I1879V, 以安 9S 为转化材料, 利用农杆菌介导法转化获得转基因植株, 通过对转基因植株的突变位点进行测序结合除草剂喷施试验、农艺性状分析, 鉴定基因型及表型。【结果】经分子水平检测验证, T₀ 代获得 ACC1^{I1879V} 突变植株 24 株; 经分离筛选, T₁ 代 24 个株系共获得 96 株纯合突变单株, 均具有除草剂抗性。高通量测序结果显示, 三个试验组株系(NS512、NS513、NS514)均不含外源转基因成分, 且喷施 4%甲禾灵存活率仍

收稿日期: 2024-11-15; 修改稿收到日期: 2025-01-19。

基金项目: 安徽省重点研究与开发计划资助项目 (2023n06020006); 芜湖市科技计划资助项目 (2022hg19)。

达到 100%。与对照安 9S 相比, NS512 株系株高增加, 剑叶变宽; NS513 株系株高增高, 剑叶变长变宽; NS514 株系剑叶变窄; 三个试验组株系的育性未发生改变, 单株有效穗数、穗长、均没有显著差异。转基因安全性评价分析表明, *OsACC1* 基因编码蛋白与已知毒蛋白、抗营养因子及过敏原均无相似序列, 不存在毒性、致敏性问题。【结论】利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 能够获得具有抗 ACCase 抑制剂类除草剂特性、稳定遗传、不含转基因成分、育性不发生改变、安全无害的纯合株系, 可为水稻抗除草剂育种提供材料基础。

关键词: CRISPR/Cas9; 基因编辑; 乙酰辅酶 A 羧化酶; 不育系

水稻作为主要粮食作物之一, 对保障社会经济稳定具有重要意义。但随着中国现代化进程的快速推进, 农村劳动力由第一产业迅速向第二产业、第三产业转移, 直接从事农业生产的劳动力越来越少^[1, 2], 水稻生产由传统的人工栽插快速向直播、机插秧等轻简化方向发展^[3]。然而, 直播、机插秧等轻简化栽培由于土表裸露面积大、封行晚等因素使得草害频发^[4, 5]。此外, 近年来免耕、少耕技术的推广使用, 也导致了田间杂草种子数量逐年累积, 杂草量远大于耕翻田块, 加重杂草危害^[5, 6]。研究表明, 双稗草密度为 49 株/m² 时, 水稻产量损失率大于 20%^[7]; 千金子密度为 20 株/m² 时, 水稻的单位面积有效穗数、实粒数、千粒重均显著下降, 产量损失率高达 37.46%^[8]; 稗草密度仅为 1.6 株/m² 时, 水稻单位面积内的分蘖数、有效穗数均显著下降, 产量损失率达到 16.48%^[9]。草害已成为影响水稻产量的主要因素之一^[10]。合理使用除草剂能够有效杀死杂草, 特别是在农村劳动力短缺、从事农作物生产的农民逐渐减少的情况下, 除草剂除草已经逐渐取代传统的人工除草, 成为经济高效的除草方式。但是, 除草剂的不合理使用, 在消灭杂草的同时, 也会对农作物造成损害。培育抗除草剂的新品种, 可在高效地防除杂草的同时, 保证农作物不受损害。

目前市面上存在多种除草剂, 根据其作用机理, 可以分为以下几种: 1) 抑制光合作用^[11]; 2) 干扰呼吸作用和能量代谢; 3) 扰乱植物激素平衡; 4) 干扰和抑制蛋白质、脂肪和核酸的形成; 5) 抑制细胞的分裂、伸长和分化; 6) 阻碍营养物质运输; 7) 阻碍辅酶 A 的形成; 8) 夺去植株生长必需的金属离子^[12, 13]。ACCase 抑制剂类除草剂能够抑制乙酰辅酶 A (Acetyl coenzyme A, Acetyl-CoA) 转化为脂肪酸合成和油脂代谢所必需的丙二酰辅酶 A (Malonyl CoA), 从而抑制脂肪合成, 进一步抑制细胞膜系统的形成, 导致细胞死亡^[14, 15]。ACCase 抑制剂类除草剂(如高效氟吡甲禾灵)常用于防除禾本科杂草, 作用于茎、叶部位, 易被杂草吸收, 从而传导至整个植株, 使植物死亡, 具有高效、

低毒、施用期长、对后茬作物安全、受环境影响(低温、干旱、降雨等)较小等优点^[16, 17]。

已有研究表明, *OsACC1* 基因特定位点发生突变能够使水稻获得对 ACCase 抑制剂类除草剂的抗性。张保龙等^[18-20]发现, 水稻 *OsACC1* 基因第 1792, 2015, 2038, 2052, 2089, 1796, 1797, 1835, 1875, 2010, 2050, 2060, 2070, 2106, 2099 位氨基酸发生突变, 能够使水稻植株对 ACCase 抑制剂类除草剂产生抗性。吴丹丹等^[21]通过 EMS 诱变 R1010 水稻种子, 获得 *OsACC1* 基因第 2125 位氨基酸由色氨酸突变为半胱氨酸的突变体, 该突变体植株在喷施 6 倍剂量(180mL/667 m²)的能高效氟吡甲禾灵(高品名: 盖草能)后仍能正常生长, 且与野生型相比, 其主要农艺性状无显著差异。江群等^[22]通过 EMS 诱变镇糯 19 水稻种子得到了对高效盖草能、精喹禾灵和唑啉草酯同时具有抗性的突变体材料, 测序发现该突变体 *OsACC1* 基因第 1792 位氨基酸由异亮氨酸突变为亮氨酸导致了抗药性的产生。刘小双等^[23]利用植物碱基编辑和引导编辑技术, 开发高密度碱基编辑文库技术, 并将这些文库导入水稻中, 通过除草剂抗性筛选, 在所创制的突变中发现 *OsACC1*^{I1879V}、*OsACC1*^{C2186R} 和 *OsACC1*^{W2125S} 植株对芳氧苯氧丙酸酯类除草剂的抗性均得到提升, 并且 *OsACC1*^{I1879V} 突变在提升抗性的同时, 主要农艺特征(株高、剑叶长度、结实率)并未受到影响^[24]。

因具有配组自由、生产程序简单、无细胞质负效应等特点, 两系杂交水稻种植面积持续快速扩大^[25, 26]。国家水稻数据中心(<http://www.ricedata.cn/variety/>)的数据显示, 2001 年 36 个国审品种中仅有 4 个两系杂交水稻品种, 2023 年 409 个国审品种中共有 182 个两系杂交水稻品种。因此, 创制两系不育系抗除草剂资源, 对培育具有抗除草剂功能的两系杂交水稻新品种具有重要意义。

传统方法选育新品种, 要么依靠自然群体的随机突变再进行人为筛选, 要么将具有优良性状的双亲进行杂交在后代中筛选。然而, 自然环境下植物材料的自发变异率极低, 后代筛选周期长、难度大、劳动强度高等制约了农业生产对优

良育种资源丰富度的快速需求^[27]。诱变育种(化学、物理、太空、多倍体、组合诱变)能够提高植物材料的变异率,但诱变的随机性大,诱变性状难以确定,且有益突变频率低^[28]。基因编辑技术能够精准编辑生物自身的基因,从而快速准确地创造优良变异,培育理想性状,相较于传统育种能够缩短年限,快速得到材料。

本研究根据刘小双等^[24]编辑方法,利用 CRISPR/Cas9 及植物碱基编辑技术^[29, 30],以优质不育系安 9S 为研究材料,对 *OsACCI* 基因进行单碱基编辑,以期获得抗除草剂两系不育系新种质^[31],为水稻抗除草剂两系杂交水稻新品种培育奠定材料基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究以安徽省农业科学院水稻研究所培育的优质高配合力两系不育系安 9S 作为受体转化材料。试验所用载体为 ePE2,转化所用的大肠杆菌感受态为 X-BLUE,农杆菌感受态为 EHA105。

1.2 载体构建

查询水稻基因数据库(Rice Genome Annotation Project, <http://rice.uga.edu/cgi-bin/>),发现靶基因 *OsACCI*(LOC_Os05g22940.1)位于水稻 5 号染色体上,编码核苷酸序列长度为 7245 bp,氨基酸长度为 2414 aa,包含 35 个外显子。利用刘小双等^[24]构建的 ePE2 引导编辑载体和设计的位于第 34 外显子区域的 sgRNA 引物(图 1),对 *OsACCI* 进行碱基编辑,构建 ePE2-ACC-I1879V 载体。

1.3 T₀代阳性植株的获取

通过农杆菌介导法,将构建好的 ePE2-ACC-I1879V 载体转入安 9S 的愈伤组织中,经过潮霉素筛选抗性愈伤组织,再转移至含有 0.25 mg/L 盖草能高效氟吡甲禾灵(江苏中旗科技股份有限公司,农药登记证号:PD20081980)除草剂的筛选培养基上,后分化培养出苗生根获得 T₀代植株。对每株 T₀代植株提取叶片的全基因组 DNA,利用 ACC-1

引物(表 1)对靶位点进行 PCR 扩增并送 Sanger 测序,筛选含有目标突变的 T₀代阳性植株,种植于海南陵水规定区域,成熟后单株收获。

1.4 T₁代纯合植株的筛选

T₀代单株收获的种子,T₁代发生分离,能够筛选到纯合突变植株。每个株系的种子分别发苗,苗期每株剪取少量叶片,CTAB 法提取全基因组 DNA,使用 4 对 T-DNA 分离引物 T-1、T-2、T-3、T-4(表 1)(引物 T-1 在载体上位于 zmBUI 启动子与 Cas9 之间;引物 T-2 在载体上位于 zmBUI 启动子与 U6 之间;引物 T-3 在载体上位于 35S 终止子与 M-MLV RT-ΔRNase H 之间;引物 T-4 在载体上位于 Cas9 与 M-MLV RT-ΔRNase H 之间)进行 PCR 扩增,扩增产物用 1%琼脂糖电泳,筛选 4 对引物扩增产物电泳后均无条带的单株,即为不含外源 DNA 成分的单株。

在不含外源载体 DNA 成分的单株中,使用 HITOM 引物(表 1)进行扩增,取 5 μL 扩增产物用 2%琼脂糖电泳,有明亮条带即进行 Hi-Tom 测序,据测序结果筛选纯合突变单株。经过 T-DNA 分离和 Hi-Tom 筛选后,最终获得无转基因成分的 T₁代纯合突变单株。种植于安徽省农业科学院岗集试验基地,喷施 1%甲禾灵(1 L 水中加入 1 mL 有效含量为 108 g/L 的高效氟吡甲禾灵)验证其除草剂抗性。

1.5 转基因成分鉴定

对筛选后的 T₁代无 T-DNA 成分的部分纯合单株进行高通量测序:挑选试验组中三个株系(NS512、NS513、NS514)提取叶片的基因组 DNA,进行 Illumina HiSeq 测序。送测样品经样品检测、文库构建、库检、上机测序等步骤进行生物信息学分析。

1.6 除草剂耐受剂量观察

对照组安 9S 和试验组 3 个 T₃代纯合株系(NS512、NS513、NS514)2024 年夏季播种于安徽省农业科学院岗集试验基地。对照组和试验组 3 个株系分别设置 6 个小区用于观察除草剂耐受剂量,每个小区按照 6 株×4 行种植,6 个小区在 3~5

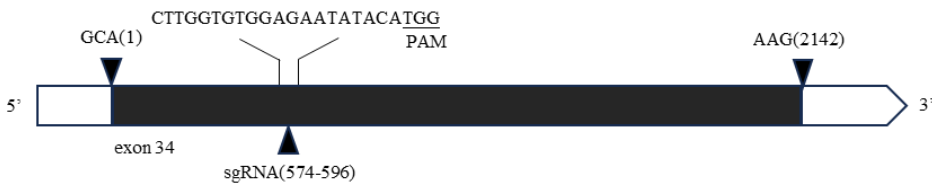


图 1 *OsACCI* 在第 34 外显子上的靶位点

Fig. 1. Target site of *OsACCI* on exon 34

表 1 本研究中所用的引物

Table 1. Primers used in this study

引物名称 Primer name	正向引物 Forward primer (5'-3')	反向引物 Reverse primer (5'-3')
ACC-1	GGACCTTGAAGATGTCCACTCC	GCAGGAACATAACTGAGCCACC
T-1	GATATACTTGGATGATGGCA	GAGCCTGTGGAAGAAGCTG
T-2	TAGACATGCAATGCTCATTATC	ACAGGTAAGAGCTAAGCATC
T-3	GAATTCTGCAGGTCACTGGATT	TGACCCACTACCAGGCCCTG
T-4	CGCCACCCTCATCCACCAGTCT	CTCCTGAGACATTGGGTACTGC
HITOM	ggagtgtgtagctgtgtgcCTGTCATAGCACATAAGATGCA	gagttgtagctgtgtgtTCCAACAGTTCTTCCAGTCACA

叶期分别喷施 0%、2%、4%、6%、8%、10%浓度的甲禾灵(其中 2%浓度药液的配制: 每 1 L 水中加入 2 mL 有效含量为 108 g/L 的高效氟吡甲禾灵乳油, 其余浓度依此类推)。喷施一周后观察植株生长情况, 比较对照组和试验组抗药性, 一个月后统计喷施不同浓度除草剂的植株存活率。植株正常生长或长出绿色新分蘖的单株统计为存活单株; 整株枯萎发黄且不再长出新分蘖的单株统计为死亡单株。

1.7 农艺性状分析

对照组和试验组 3 个株系分三期播种, I、II、III期分别播种于 2024 年 6 月 7 日、6 月 18 日、6 月 25 日。I、II、III期的对照组和试验组每个株系随机选择 3 个单株, 取开花前一天的颖花保存在诺丁固定液中, 经 I₂-KI 染色后, 在显微镜下观察花粉粒育性。开花结束后, 对照组和试验组的每个株系取中间 5 株考察其株高, 单株有效穗数、穗长、剑叶长度等性状, 考察后割茬使其再次生长恢复育性, 收获种子。通过 SPSS 27.0 分析比较试验组株系与对照组农艺性状是否具有显著性差异。

1.8 安全性评价

1.8.1 OsACC1 与 NCBI 毒蛋白、抗营养因子相关数据库比对

利用 NCBI 数据库, 以 toxin 等作为关键词, 将 *OsACC1* 与已知毒蛋白和抗营养因子进行比对。

1.8.2 OsACC1 过敏性生物信息学分析

根据联合国粮农组织和世界卫生组织 (FAO/WHO) 确立的专门程序, 对转基因食品的潜在致敏性进行评估时, 主要依据对基因来源的分析以及蛋白质序列相似性的比对。本研究将目的基因 *OsACC1* 所编码的蛋白序列与现有致敏原数据库(<http://www.allergenonline.com/>)中的已知过敏原进行比对, 以评估其致敏性风险。

2 结果与分析

2.1 T₀代阳性植株的获取

T₀代编辑植株经 Sanger 测序, 发现有 24 株编辑株获得目标变异, 即 *OsACC1* 基因第 34 外显子区域本研究将目的基因 *OsACC1* 所编码的蛋白序列第 5635 位碱基 A 替换为 G, 导致第 1879 位氨基酸由异亮氨酸(Ile)突变成缬氨酸(Val), 变异植株均为杂合子(图 2)。这 24 株突变体分别编号为 NS502~NS525。

2.2 T₁代纯合突变株筛选

T₀代获得的 24 株杂合植株成熟后, 分别单株收获种子, 24 个株系共收获约 8000 粒种子。经 T-DNA 分离筛选, 从这 24 个株系中共获得 138 株不含 T-DNA 元件的植株(图 3)。进一步利用 Hi-Tom 技术筛选获得 94 株纯合突变植株。94 株纯合突变

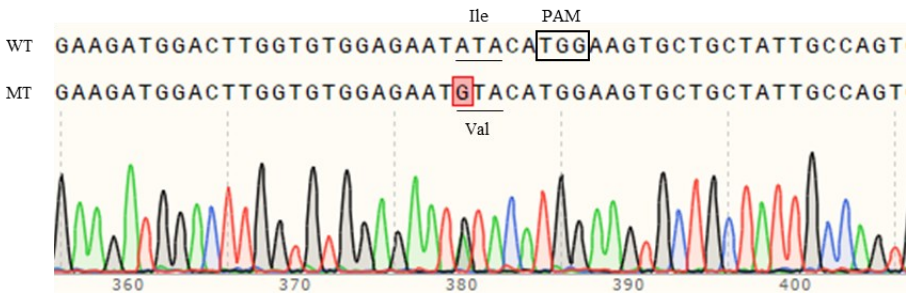
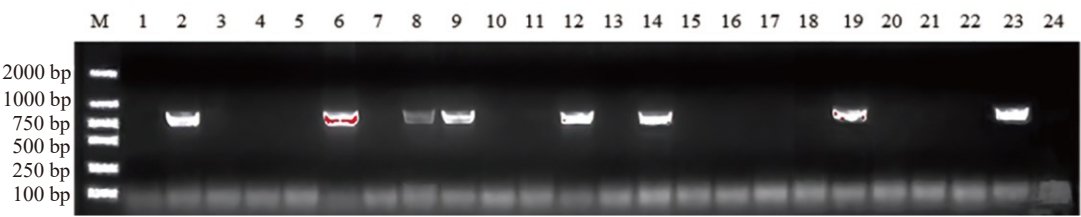


图 2 T₀代转基因植株 (部分) 测序结果
Fig. 2. Sequencing results of T₀ transgenic plants (partial)



M: 标记；1~22: T₁ 代单株；23: 阳性对照；24: 阴性对照。
M, Marker; Lanes 1-22, T₁ plants; Lane 23, Positive control; Lane 24, Negative control.

图 3 T₁ 代 T-DNA 分离（部分）检测结果
Fig. 3. T-DNA isolation (partial) test results of T₁ generation

表 2 喷施不同浓度甲禾灵后的存活率

Table 2. Survival rate after spraying different concentrations of haloxyfop-P-methyl					%
甲禾灵浓度 ¹⁾ Concentrations of haloxyfop-P-methyl ¹⁾	对照组存活率 Survival rate of control group		试验组存活率 Survival rate of experimental group		
	安 9S An 9S		NS512	NS513	NS514
0	100.0		100.0	100.0	100.0
2	0		100.0	100.0	100.0
4	0		100.0	100.0	100.0
6	0		91.6	75.0	79.2
8	0		66.7	87.5	91.6
10	0		33.3	25.0	79.2

¹⁾ 0, 2, 4, 6, 8 和 10 分别指每 1 L 水中加入 0, 2, 4, 6, 8 和 10 mL 有效含量为 108 g/L 的高效氟吡甲禾灵乳油。
¹⁾ 0, 2, 4, 6, 8, and 10 refer to the addition of 0, 2, 4, 6, 8, and 10 mL of haloxyfop-P-methyl EC with an active ingredient content of 108 g/L per liter of water, respectively.

株种植于安徽省农业科学院岗集试验基地，缓苗期过后喷施 1%甲禾灵后均正常生长，证明其具有除草剂抗性。

2.3 转基因成分鉴定报告

将三个试验组株系(NS512、NS513、NS514)测序结果与 26,921 个载体序列(包含 46,695 个转基因成分结构)的数据库进行比对分析，鉴定所包含的外源成分序列。经过分析，试验组三个样品均不包含外源转基因成分(附表 1，NS512 编号为 FED139，NS513 编号为 FED140，NS514 编号为 FED141)。

2.4 除草剂耐受剂量评价

对照组(安 9S)和试验组(NS512、NS513、NS514)在 3~5 叶期喷施不同浓度的甲禾灵，存活率见表 2。2%及 4%浓度下对照组第 4 天观察到心叶卷缩、叶尖枯黄，随后枯黄叶面积逐渐增加直至死亡；试验组 3 个株系均无明显变化。6%、8%、10%浓度下对照组和试验组株系第 4 天均观察到心叶卷缩、叶尖枯黄，对照组枯黄叶面积逐渐增加直至死亡；试验组枯黄叶逐步萎缩的同时，一部分植株死亡，另一部分植株能够长出新叶片(图 4)。

3 个株系在经 4%甲禾灵处理后，存活率均达到 100%，具有较高的除草剂抗性。其中，NS514

株系对甲禾灵的抗性最高，经 10%甲禾灵处理后存活率仍能达到 79.2%。较高浓度的甲禾灵处理相比较低浓度甲禾灵的处理整体生长较为迟缓，NS514 株系在清水处理(0%甲禾灵)小组几乎全部抽穗时，4%甲禾灵处理小组每株仅抽 1~2 穗，8%甲禾灵处理小组没有抽穗(图 5)。

2.5 纯合突变株农艺性状分析

2.5.1 育性分析

I期播种植株(安 9S、NS512、NS513、NS514)的抽穗期均为 2024 年 8 月 15 日左右，II期播种植株(安 9S、NS512、NS513、NS514)的抽穗期均为 2024 年 8 月 28 日左右，III期播种植株(安 9S、NS512、NS513、NS514)的抽穗期均为 2024 年 9 月 2 日左右，对照组与试验组抽穗期无显著差异。对照组和试验组中 3 个株系的花粉粒在I期、II期、III期均表现为完全不育；割茬后，对照组和试验组在显微镜下观察到花粉粒大部分可育，少数败育(图 6)。因此，编辑前后植株的花粉育性未发生改变。

安 9S 及其转基因株系在安徽区域生育期约为 110 d。NS512 株系平均株高为 84.05 cm，平均剑叶宽度为 1.68 cm，相较野生型安 9S 株高增加 20.7%，剑叶宽度增加 12.8%。NS513 株系株高为 82.63 cm，平均剑叶长度为 39.59 cm，平均剑叶宽

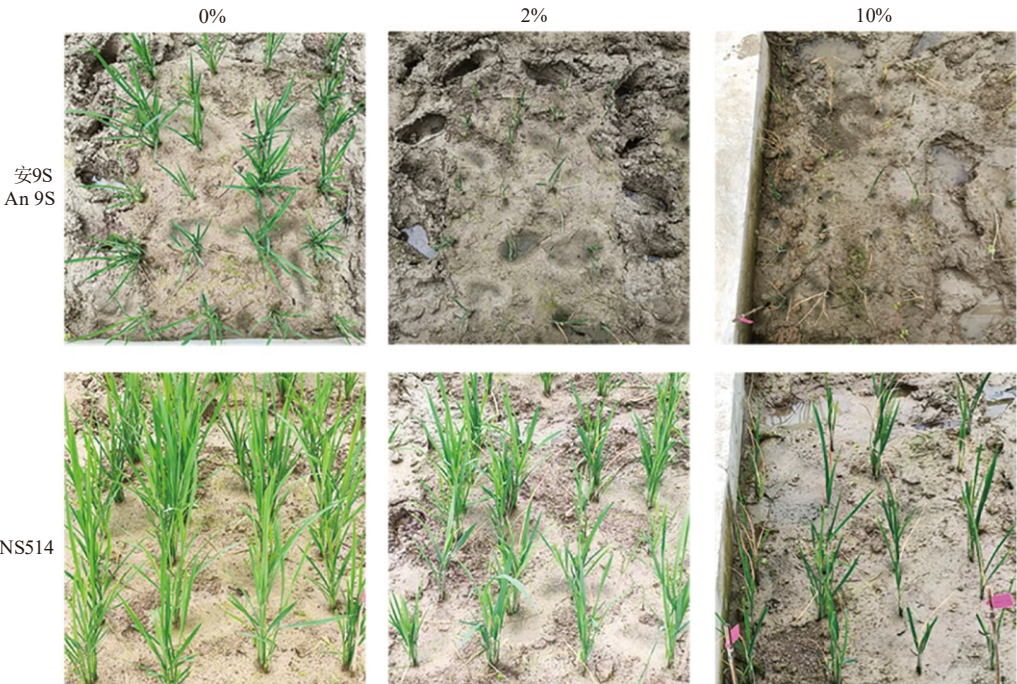


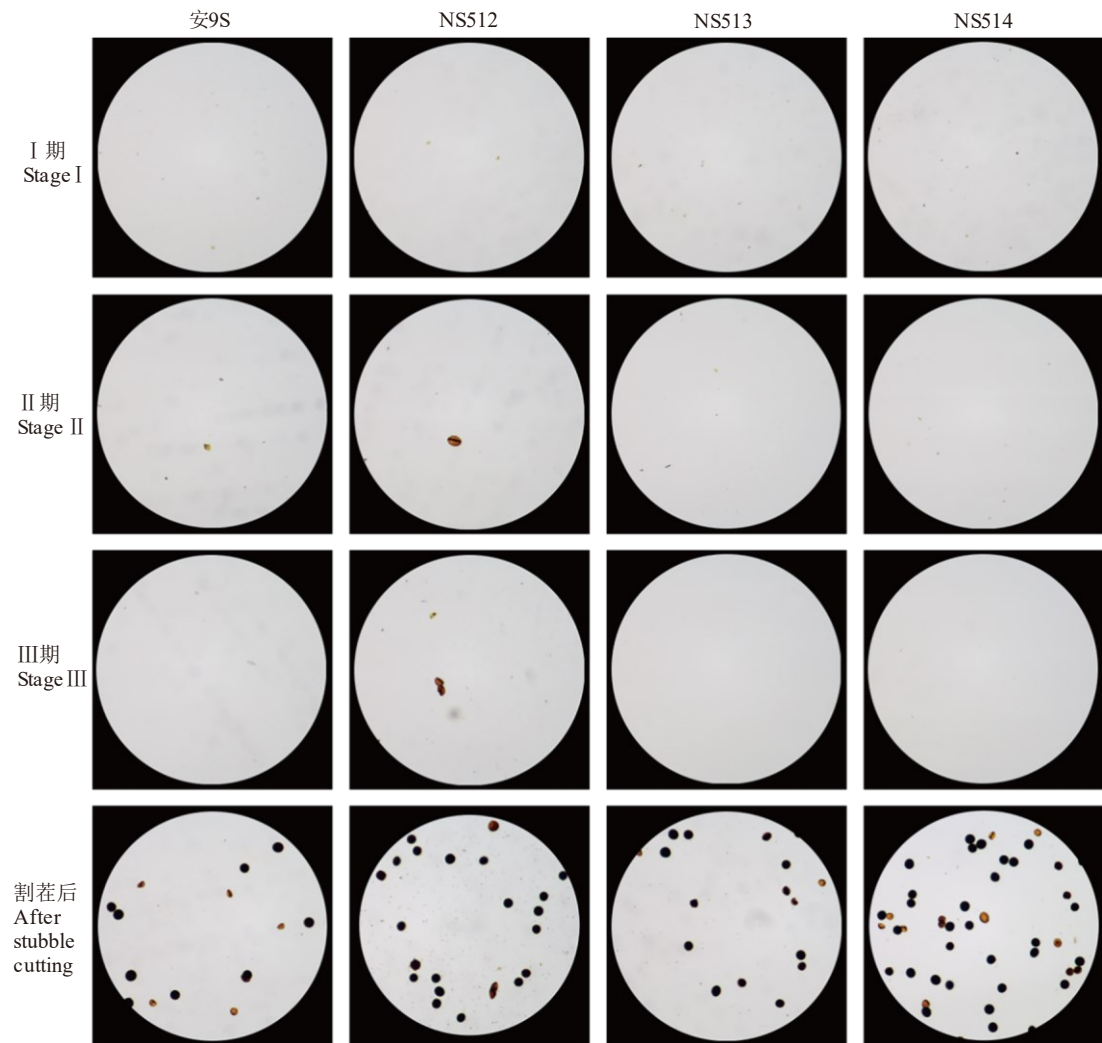
图 4 对照组和试验组 NS514 经不同浓度甲禾灵处理后对比图（田间）
Fig. 4. Comparison of control group and experimental group NS514 treated with different concentrations of haloxyfop-P-methyl (field)



图 5 NS514 在 0%、4%、8%甲禾灵处理下的生长状况（标尺=10 cm）
Fig. 5. Growth of NS514 under 0%, 4% and 8% haloxyfop-P-methyl treatments (bar=10 cm)

度为 1.70 cm，与野生型相比株高增加 18.6%，剑叶长度增加 18.1%，剑叶宽度增加 14.1%。NS514 株系剑叶宽度为 1.37 cm，相比野生型剑叶宽度降低 8.1%。对于试验组株系，随着喷施除草剂浓度的上升，株高(图 7-A)和穗粒数(图 7-B)总体呈现下

降趋势。
2.6 安全性评价
2.6.1 毒蛋白、抗营养因子分析
利用 NCBI 数据库将 OsACC1 与已知毒蛋白和抗营养因子进行比对(图 8)。同时，在 NCBI 数据



I、II、III期分别指播种于 2024 年 6 月 7 日、18 日和 25 日。
The sowing dates for stage I, II, and III were June 7, 18 and 25, 2024, respectively.

图 6 试验组在 I 期、II 期、III 期及割茬后的花粉育性

Fig. 6. Pollen fertility of the experimental group in the first, second and third stages and after stubble cutting

库搜索 OsACC1 同源性蛋白，搜索结果显示数据库中有 100 个蛋白与 OsACC1 有同源性，其中 75 个为乙酰辅酶 A 相关的基因，2 个为 ACCase 相关，

19 个为假定蛋白，4 个为未命名的蛋白质(图 8)。此外，OsACC1 已在传统水稻育种中被广泛应用，没有中毒现象的发生；因此，OsACC1 不会给水稻

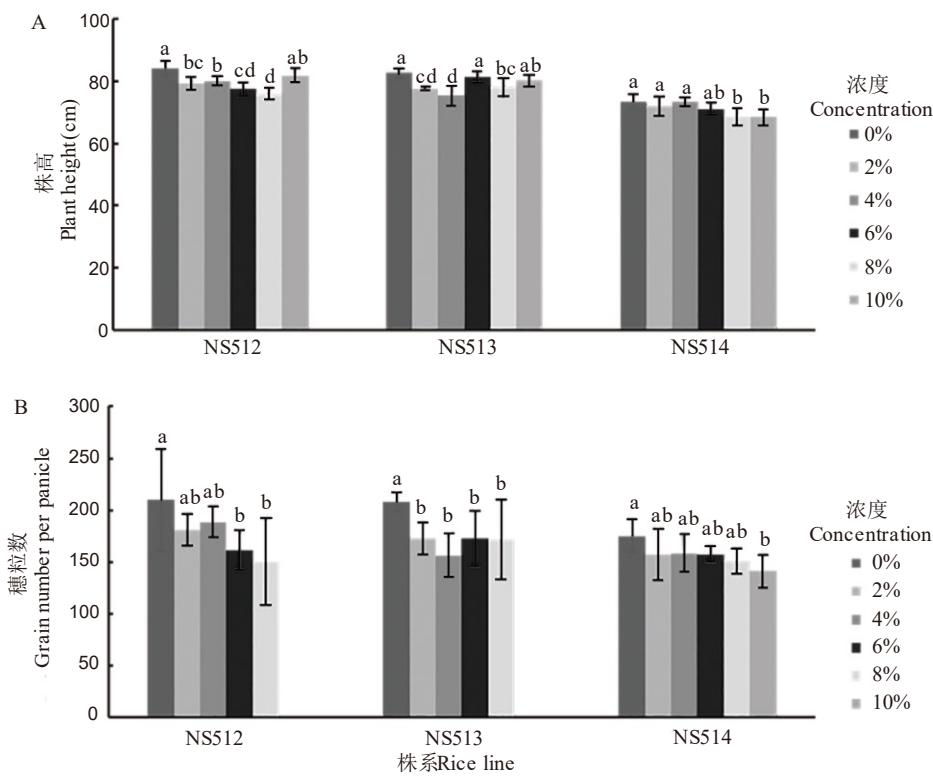
表 3 T₃代纯合株系农艺性状

Table 3. Agronomic traits of T₃ homozygous lines

农艺性状 Agronomic trait	对照组 Control group	试验组 Experimental group		
	安 9S An 9S	NS512	NS513	NS514
株高 Plant height(cm)	69.65±5.10	84.05±2.47**	82.63±1.59**	73.30±2.35
抽穗期 Heading date(d)	70	70	70	70
单株有效穗数 Effective panicle number per plant	9.37±1.85	9.75±1.67	10.88±1.13	9.33±0.52
穗长 Panicle length(cm)	25.00±0.51	23.12±2.28	24.40±0.90	24.62±0.43
剑叶长度 Flag leaf length(cm)	33.52±1.52	34.60±3.74	39.59±1.53**	32.81±3.02
剑叶宽度 Flag leaf width(cm)	1.49±0.06	1.68±0.08**	1.70±0.10**	1.37±0.07*

数值用平均数±标准差表示；*,**分别表示差异达到了 0.05, 0.01 和 0.001 水平。

Values are listed as mean ± standard deviation; *,** indicate that the difference between the control and experimental groups was significant at 0.05, 0.01 and 0.001 level, respectively.



不同小写字母表示同一株系在不同处理之间差异显著 ($P<0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant difference among different treatments ($P < 0.05$).

图 7 不同浓度甲禾灵处理后的株高和穗粒数

Fig. 7. Plant height and grain number per panicle of mutants treated with different concentrations of haloxyfop-P-methyl

造成毒性，且不会干扰水稻对营养物质的利用。

2.6.2 过敏性分析

过敏性分析结果表明 *OsACCI* 与任何已知的致敏原都没有 8 个以上连续氨基酸或高于 35% 的相似性(图 9)。按照 FAO/WHO 决策树的评价策略，基因表达产物具有过敏性的判定标准是至少有 8 个连续氨基酸与已知过敏原相同，或与已知

过敏原存在 35%以上的相似性，参照这个标准，*OsACCI* 不存在过敏性问题。

3 讨论

相较于传统育种，基因编辑技术可以定向改良作物性状，同时极大缩短育种年限，提高育种

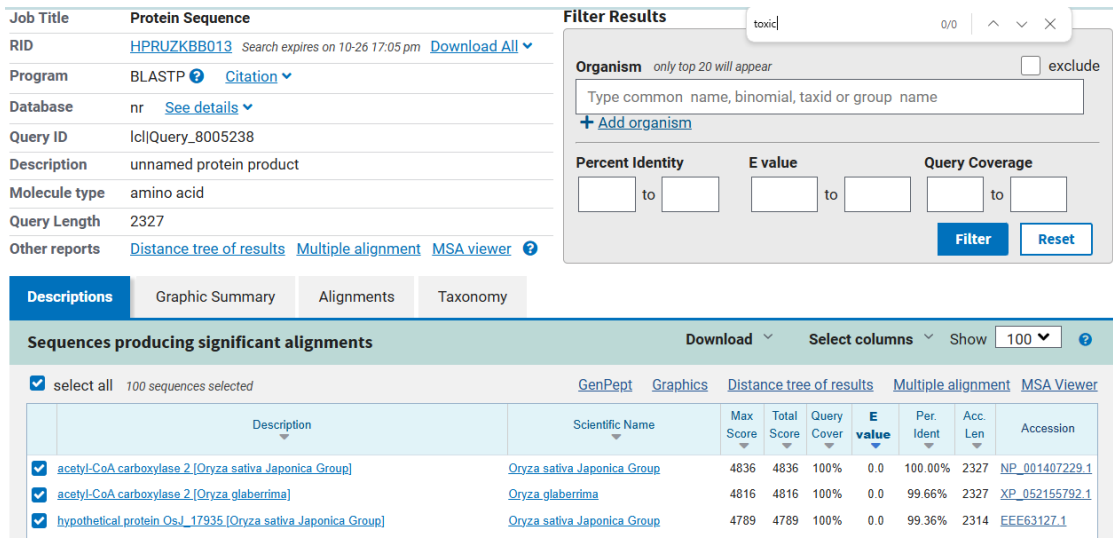


图 8 *OsACCI* 蛋白在 NCBI 中与已知毒蛋白序列同源性比对结果

Fig. 8. Results of homology comparison between *OsACCI* protein and known toxic protein sequence in NCBI

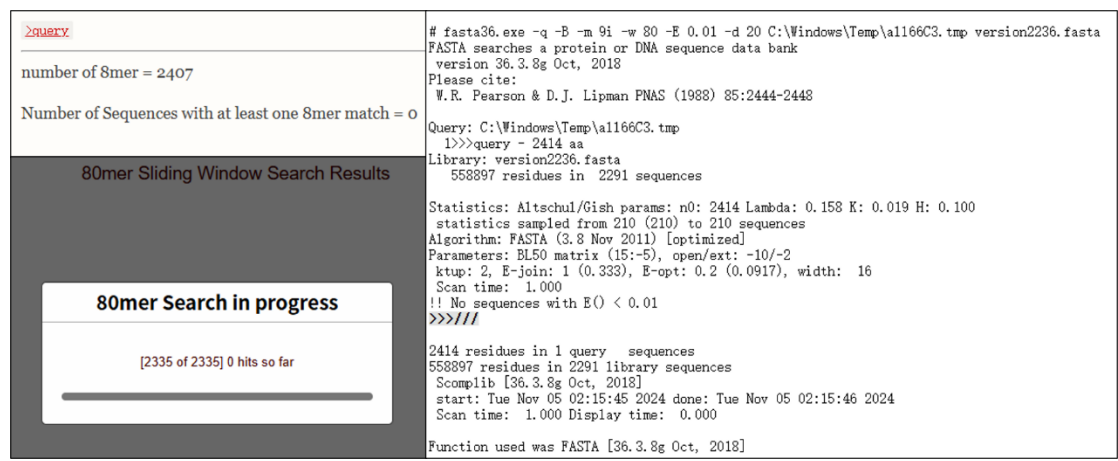


图 9 OsACC1 在 Allergen Online 中的检索结果
Fig. 9. Search results of OsACC1 in Allergen Online

效率，为创制新的种质资源提供了技术支持。本研究利用 CRISPR/Cas9 技术，以两系不育系安 9S 为实验材料，对 *OsACC1* 基因进行定点突变，成功获得具有除草剂抗性的两系不育系材料。3 个突变株系在喷施 4% 的甲禾灵后存活率均为 100%，其中 NS514 株系在喷施 10% 的高效氟吡甲禾灵乳剂后存活率仍能达到 79%，具有较高的除草剂抗性。在实际生产中，由于农户绿色农业意识差以及除草剂使用监管不严等原因，常常造成除草剂的过度使用，喷施的剂量远超推荐剂量，容易对农作物造成危害^[32]。本研究所获得的抗除草剂水稻两系不育系突变材料，抗性水平高，不易出现因除草剂使用过量而造成危害，应用前景广阔。抗除草剂的不育系材料未来将与其他优质恢复系进行配组，培育具有抗除功能的两系杂交水稻新品种。

基因编辑在育种中广泛应用，用于改善品种的抗病性、抗虫性、不良性状等，但在改良目标性状的同时，可能也会改变其他农艺性状。覃玉芬等^[33]利用 CRISPR/Cas9 技术创制了新型水稻温敏雄性核不育系，与野生型相比，突变体在改变育性的同时，其株高变矮、有效穗数增多。王新等^[34]利用基因编辑技术定向编辑 *SD1* 基因，改良易倒伏的优质糯稻品种靖西香糯，获得的半矮秆突变体穗数增加、穗长缩短、剑叶长度变短、穗粒数减少、单株产量增加。孔铭^[35]利用 CRISPR/Cas9 技术创制抗穗腐病玉米，突变体在获得穗腐病抗性的同时，株高、穗位高等农艺性状方面存在差异，但未对综合农艺性状产生显著的负面影响。在前人的研究中，利用 CRISPR/Cas9 技术改良品种性状，编辑位点多会导致其他性状发生改变。刘小双^[24]研究认为，

OsACC1^{I1879V} 突变在提升抗性的同时，株高、剑叶长度、结实率并不受到影响。本研究对 *OsACC1*^{I1879V} 位点进行编辑，但未获得与对照组农艺性状完全一致的株系，3 个试验组株系在农艺性状方面均发生了一定的改变。由此推测，对不同背景材料，可能需要更高世代、更大的群体和更多性状的评价，才能全面反映此位点编辑后是否对综合农艺性状产生显著影响。

当前，抗除草剂育种发展迅速，抗草甘膦、草铵膦、五氟磺草胺等种质资源的创制均有报道。抗单一类型除草剂的种质资源只能使用该类型除草剂进行除草，然而，长期单一使用某种(类)除草剂，会导致农田杂草长期处于同一选择压下，加速抗性杂草的产生^[36]。迄今，全球已在 273 个物种(156 个双子叶植物和 117 个单子叶植物)中发现 533 个独特的抗除草剂杂草案例(物种×作用部位)，72 个国家在 101 种作物中发现存在抗除草剂杂草。据统计，杂草已经对 168 种不同的除草剂产生了不同程度的抗药性^[37]。培育多种类型的抗除草剂种质资源，在同一地区使用抗不同类型除草剂的种质资源进行轮作，并交替使用不同作用机理的除草剂，实现对杂草稻和其他一年生杂草的可持续防控，减少抗性杂草的产生和流动。除抗性杂草问题以外，部分除草剂残留期长，容易危害后茬作物，ALS 抑制剂类除草剂和咪唑啉酮类除草剂长期使用所产生的农药残留易对土壤环境及后茬敏感作物造成影响^[38]。已有研究表明，土壤 pH 值为 7 时，甲氧咪草烟的半衰期为 1.4 周，咪唑乙酸烟的半衰期为 16 周，咪唑啉酸的半衰期高达 191 周^[39]。谢勇波^[40]使用高效氟吡甲禾灵 10% 的乳油兑水使其浓度为推荐浓度的 1.5 倍

(1125 mL/hm²), 分别喷施在烟草和土壤表面, 测得甲禾灵在烟田土壤和烟叶中的半衰期分别为 12.6 d、3.96 d。甲禾灵、草甘膦、草铵膦与咪唑啉酮类、ALS 抑制剂类除草剂相比残留时间更短, 不影响下茬作物的种植。未来, 可以优先选用半衰期较短的除草剂以及培育具有其抗性的种质资源, 不仅能够有效防除抗性杂草的产生, 还能减少对后茬作物的危害, 对环境更安全友好。

近年来, 抗除草剂水稻品种推广面积不断增大, 随着抗除草剂材料在农业中的不断应用, 可大幅度降低农业生产成本, 提高农户经济效益, 推动农业现代化的不断进步。

在线辅助性信息: 附表 1 请见《中国水稻科学》网站(<http://www.ricesci.cn>)。

参考文献:

- [1] Zou B, Mishra A, Luo B. Aging population, farm succession, and farmland usage: Evidence from rural China[J]. *Land Use Policy*, 2018, 77(1): 437-445.
- [2] Liao L, Long H, Gao X, Ma E. Effects of land use transitions and rural aging on agricultural production in China's farming area: A perspective from changing labor employing quantity in the planting industry[J]. *Land Use Policy*, 2019, 88: 104152.
- [3] Farooq M, Siddique K H M, Rehman H, Aziz T, Lee D J, Wahid A. Rice direct seeding: Experiences, challenges and opportunities[J]. *Soil and Tillage Research*, 2011, 111(2): 87-98.
- [4] Kumar V, Ladha J K. Direct seeding of rice: Recent developments and future research needs [D]. *Advances in Agronomy*, 2011(111): 297-413.
- [5] 高婷. 水稻机插秧田杂草发生及防除研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
Gao T. Study on the occurrence and control of weeds in mechanized transplanting rice[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014. (in Chinese with English abstract)
- [6] 陆松艳. 宿迁市宿城区稻麦连作田草害加重原因及防控对策[J]. 农业科技通讯, 2024(1): 141-144.
Lu S Y. Causes and control countermeasures of grass damage in rice-wheat continuous cropping fields in Sucheng District of Suqian City[J]. *Bulletin of Agricultural Science and Technology*, 2024(1): 141-144. (in Chinese)
- [7] 袁树忠, 陈勇睿, 夏志铭, 蔡清萱, 陈月阳, 邓维. 双稗草对水稻生长和产量性状的影响及其生态经济阈值[J]. 湖北农业科学, 2022, 61(6): 69-75.
Yuan S Z, Chen Y R, Xia Z M, Cai J X, Chen Y Y, Deng W. Influences of *Diplachne fusca*(L.) Beauv. on growth and yield traits of rice and its eco-economic threshold[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2022, 61(6): 69-75. (in Chinese)
- [8] 朱文达, 周普国, 何燕红, 杨峻, 林荣华, 齐文全, 李林, 欧阳灿彬. 千金子对水稻生长和产量性状的影响及其防治经济阈值[J]. 南方农业学报, 2018, 49(5): 863-869.
Zhu W D, Zhou P G, He Y H, Yang J, Lin R H, Qi W Q, Li L, Ouyang C B. Influence of *Leptochloa chinensis*(L.) Nees. on growth and yield properties of rice and its economic threshold of control[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2018, 49(5): 863-869. (in Chinese with English abstract)
- [9] 朱文达. 稗对水稻生长和产量性状的影响及其经济阈值[J]. 植物保护学报, 2005, 32(1): 81-86.
Zhu W D. Influence of barnyardgrass, *Echinochloa crusgalli*, on the growth and yield of paddy rice and its economic threshold[J]. *Journal of Plant Protection*, 2005, 32(1): 81-86. (in Chinese with English abstract)
- [10] Juliano L M, Donayre D K M, Martin E C, Beltran J C. Weedy rice: An expanding problem in direct-seeded rice in the Philippines[J]. *Weed Biology and Management*, 2020, 20(2): 27-37.
- [11] Trebst A, Depka B, Jäger J, Oettmeier W. Reversal of the inhibition of photosynthesis by herbicides affecting hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by plastoquinone and tocopheryl derivatives in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Pest Management Science*, 2004, 60(7): 669-674.
- [12] 郭美俊. 谷子对除草剂抗性的生理特性及产量性状的影响[D]. 太谷: 山西农业大学, 2017.
Guo M J. Effects of physiological characteristics and yield traits of millet resistance to herbicide[D]. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2017. (in Chinese with English abstract)
- [13] 高峰. 化学除草剂的除草原理及应用[J]. 山西林业, 2014(1): 32-33, 42.
Gao F. Weeding principle and application of chemical herbicides[J]. *Forestry of Shanxi*, 2014(1): 32-33, 42. (in Chinese)
- [14] 王保明, 颜士华, 谭晓风. 植物 ACCase 基因的结构功能及表达调控研究[J]. 安徽农学通报, 2021, 27(1): 17-24.
Wang B M, Yan S H, Tan X F. Study of the structural function and expressing regulation of ACCase genes[J]. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2021, 27(1): 17-24. (in Chinese with English abstract)
- [15] Takano H K, Ovejero R F L, Belchior G G, Maymone G P L, Dayan F E. ACCase-inhibiting herbicides: Mechanism of action, resistance evolution and stewardship[J]. *Scientia Agricola*, 2021, 78: e20190102.
- [16] 黄乾龙, 王楚桃, 欧阳杰, 朱子超, 何永歆, 蒋刚, 管玉

- 圣, 熊英, 李贤勇. 重庆地区马唐种群对 2 种乙酰辅酶 A 羧化酶抑制剂类除草剂的敏感性[J]. 植物保护, 2024, 50(5): 267-271, 305.
- Huang Q L, Wang C T, Ouyang J, Zhu Z C, He Y X, Jiang G, Guan Y S, Xiong Y, Li X Y. Sensitivity of *Digitaria sanguinalis* population to two acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides in Chongqing area[J]. *Plant Protection*, 2024, 50(5): 267-271, 305. (in Chinese with English abstract)
- [17] 刘博宏, 叶非. 芳氧苯氧基丙酸酯类除草剂的应用进展[J]. 农药科学与管理, 2011, 32(2): 20-25.
- Liu B H, Ye F. Application of aryloxyphenoxypropionate herbicides[J]. *Pesticide Science and Administration*, 2011, 32(2): 20-25. (in Chinese with English abstract)
- [18] 张保龙, 王金彦, 凌溪铁. 使植物具有除草剂抗性的 ACCase 突变型蛋白及其应用: CN108359646A[P]. 2018-08-03.
- Zhang B L, Wang J Y, Ling X T. ACCase mutant protein with herbicide resistance in plants and its application: CN108359646A[P]. 2018-08-03. (in Chinese)
- [19] 张保龙, 王金彦, 凌溪铁, 郭冬姝. 具有除草剂抗性的 ACCase 突变型基因和蛋白及其应用: CN109082416B[P]. 2021-10-26.
- Zhang B L, Wang J Y, Ling X T, Guo D S. ACCase mutant gene and protein with herbicide resistance and applications: CN109082416B[P]. 2021-10-26. (in Chinese)
- [20] 张保龙, 王金彦, 凌溪铁. 一种水稻 ACCase 突变型基因及其在植物抗除草剂中的应用: CN109371000A[P]. 2019-02-22.
- Zhang B L, Wang J Y, Ling X T. A mutant gene of ACCase in rice and its application in plant herbicide resistance: CN109371000A[P]. 2019-02-22. (in Chinese)
- [21] 吴丹丹, 许敏敏, 刘兆明, 梁静, 马引, 李峰, 李娟. 抗 ACCase 抑制剂类除草剂水稻种质的创制与鉴定[J]. 中国种业, 2024(2): 72-76.
- Wu D D, Xu M M, Liu Z M, Liang J, Ma Y, Li F, Li J. Creation and identification of rice germplasm resistant to ACCase inhibitor herbicides[J]. *China Seed Industry*, 2024(2): 72-76. (in Chinese with English abstract)
- [22] 江群, 凌溪铁, 唐兆成, 周珍珍, 张保龙. EMS 诱变创制水稻抗乙酰辅酶 A 羧化酶抑制剂类除草剂种质[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(2): 305-312.
- Jiang Q, Ling X T, Tang Z C, Zhou Z Z, Zhang B L. EMS mutagenesis to create rice anti-acetyl-CoA carboxylase inhibitor-herbicide germplasm[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2023, 39(2): 305-312. (in Chinese with English abstract)
- [23] Xu R, Li J, Liu X, Shan T, Qin R, Wei P. Development of plant prime-editing systems for precise genome editing[J]. *Plant Communications*, 2020, 1(3): 100043.
- [24] 刘小双. CRISPR 文库筛选方法研究与水稻抗除草剂种质资源创新[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2022.
- Liu X S. Research on CRISPR library screening method and herbicide resistance in rice[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2022. (in Chinese with English abstract)
- [25] 胡忠孝, 田妍, 徐秋生. 中国杂交水稻推广历程及现状分析[J]. 杂交水稻, 2016, 31(2): 1-8.
- Hu Z X, Tian Y, Xu Q S. Review of extension and analysis on current status of hybrid rice in China[J]. *Hybrid Rice*, 2016, 31(2): 1-8. (in Chinese with English abstract)
- [26] 龙彭年. 中国两系法杂交水稻研发成就和发展策略[J]. 世界农业, 2002(8): 36-38.
- Long P N. Research achievements and development strategies of two-line hybrid rice in China[J]. *World Agriculture*, 2002(8): 36-38. (in Chinese with English abstract)
- [27] 李全林. CRISPR/Cas9 系统在水稻重要农艺性状基因筛选和分子设计育种中的应用[D]. 上海: 上海交通大学, 2016.
- Li Q L. Application of CRISPR/Cas9 system in gene screening and molecular design breeding of important agronomic traits in rice[D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2016. (in Chinese with English abstract)
- [28] 杨学智, 韩云哲, 朴雪梅, 徐伟豪, 白学峰, 柳洪良. 水稻诱变育种研究进展[J]. 北方水稻, 2024, 54(3): 41-50.
- Yang X Z, Han Y Z, Piao X M, Xu W H, Bai X F, Liu H L. Research progress of mutation breeding in rice[J]. *Northern Rice*, 2024, 54(3): 41-50. (in Chinese with English abstract)
- [29] 段敏, 谢留杰, 高秀莹, 唐海娟, 黄善军, 潘晓飏. 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.
- Duan M, Xie L J, Gao X Y, Tang H J, Huang S J, Pan X B. Creation of thermo-sensitive genic male sterile rice lines with wide compatibility based on CRISPR/Cas9 technology[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2023, 37(3): 233-243. (in Chinese with English abstract)
- [30] 李景芳, 温舒越, 赵利君, 陈庭木, 周振玲, 孙志广, 刘艳, 陈海元, 张云辉, 迟铭, 邢运高, 徐波, 徐大勇, 王宝祥. 基于 CRISPR/Cas9 技术创制耐盐香稻[J]. 中国水稻科学, 2023, 37(5): 478-485.
- Li J F, Wen S Y, Zhao L J, Chen T M, Zhou Z L, Sun Z G, Liu Y, Chen H Y, Zhang Y H, Chi M, Xing Y G, Xu B, Xu D Y, Wang B X. Development of aromatic salt-tolerant rice based on CRISPR/Cas9 technology[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2023, 37(5): 478-485. (in Chinese)
- [31] 尹丽颖, 张元野, 李荣田, 何明良, 王芳权, 许扬, 刘欣欣, 潘婷婷, 田晓杰, 卜庆云, 李秀峰. 利用 CRISPR/Cas9 技术创制高效抗除草剂水稻[J]. 中国水稻科学, 2022, 36(5): 459-466.

- Yin L Y, Zhang Y Y, Li R T, He M L, Wang F Q, Xu Y, Liu X X, Pan T T, Tian X J, Bu Q Y, Li X F. Improvement of herbicide resistance in rice by using CRISPR/Cas9 system[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2022, 36(5): 459-466. (in Chinese)
- [32] 单晓飞. 瓦房店市蔬菜种植户农药使用情况调研报告[D]. 大连: 大连海洋大学, 2024.
- Shan X F. Research report on pesticide use by vegetable growers in Wafangdian City[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2024. (in Chinese with English abstract)
- [33] 覃玉芬, 廖山岳, 郭新颖, 周海, 房耀宇, 滕开冲, 刘芳, 覃宝祥, 庄楚, 李容柏. 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑系统创制新型水稻温敏雄性核不育系[J]. *分子植物育种*, 2023, 21(5): 1551-1561.
- Qin Y F, Liao S Y, Guo X Y, Zhou H, Fang Y Y, Teng K C, Liu F, Qin B X, Zhuang C X, Li R B. Generation of a new thermo-sensitive genic male sterile line by using CRISPR/Cas9 gene editing system[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2023, 21(5): 1551-1561. (in Chinese with English abstract)
- [34] 王新, 韩悦, 冯璇, Nawaz G, 罗亮, 刘芳, 覃宝祥, 刘耀光, 李容柏. 应用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术改良传统优质糯稻品种[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(19): 6332-6342.
- Wang X, Han Y, Feng X, Nawaz G, Luo L, Liu F, Qin B X, Liu Y G, Li R B. Improvement of a traditional high-quality glutinous rice variety by CRISPR-Cas9 gene editing system[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17(19): 6332-6342. (in Chinese with English abstract)
- [35] 孔铭. 基于 CRISPR/Cas9 基因编辑技术创制抗病玉米种质[D]. 北京: 中国农业科学院, 2024.
- Kong M. Creation of disease-resistant maize germplasm using the CRISPR/Cas9 gene editing technology[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2024. (in Chinese with English abstract)
- [36] Neve P. Challenges for herbicide resistance evolution and management: 50 years after Harper[J]. *Weed Research*, 2007, 47(1): 365-369.
- [37] Heap I. The international herbicide-resistant weed database [EB/OL]. (2024-10-28). <https://weedsociety.org/Home.aspx>.
- [38] 王新, 侯佳文, 柳文睿, 鲍佳. 典型咪唑啉酮类除草剂的微生物降解研究进展[J]. *农药学学报*, 2021, 23(3): 469-475.
- Wang X, Hou J W, Liu W R, Bao J. Progress in microbial degradation of typical imidazolinone herbicides[J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2021, 23(3): 469-475. (in Chinese with English abstract)
- [39] Aichele T M, Penner D. Adsorption, desorption, and degradation of imidazolinones in soil [J]. *Weed Technology*, 2005, 19(1): 154-159.
- [40] 谢勇波. 高效氟吡甲禾灵在烟田中的残留降解及其对烤烟产质量的影响[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2011.
- Xie Y B. Residue degradation of high-efficiency haloxyfop-methyl in tobacco field and its effect on yield and quality of flue-cured tobacco[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2011. (in Chinese with English abstract)