

缺失OSR结构域功能的GS3蛋白正向调控 水稻籽粒大小

谷玉娟, 梁大安, 郝天琪, 高倩, 刘磊
(淮阴师范学院生命科学学院, 江苏淮安 223300)

摘要: 水稻种子粒型是影响产量的重要因素。GS3基因是水稻第一个被克隆的粒型基因, 主要调控籽粒的粒长和粒重。GS3蛋白包含N端的OSR(Organ size regulation)和C端的Cys-rich功能结构域。GS3基因主要存在4种自然变异类型, 分别为GS3-1至GS3-4。其中, GS3-1编码全长GS3蛋白; GS3-2编码的蛋白质插入1个氨基酸; GS3-3导致GS3完整蛋白缺失, 表现为籽粒变长; GS3-4编码N端的OSR结构域, 表现为籽粒明显变短。截至目前, 在水稻自然变异中仍未发现仅编码C端的Cys-rich结构域的GS3变异类型, 其对籽粒大小的调控也不清楚。本研究利用CRISPR/Cas9基因编辑技术在DNA序列两侧设计靶点删除大片段序列, 创制出仅编码C端Cys-rich功能结构域的突变类型gs3-5, 并获得纯合突变株系。与受体背景中花11相比, gs3-5纯合突变株系表现为粒长和千粒重增加。上述结果表明OSR结构域是GS3蛋白作为籽粒大小的负调控因子所必需的, 为进一步解析OSR结构域对籽粒大小的调控以及探索新的育种改良方法提供了参考。

关键词: CRISPR/Cas9; GS3; 粒长; 粒重; 水稻

GS3 Protein Lacking OSR Structural Domain Function Positively Regulates Rice Seed Size

GU Yu-juan, LIANG Da-an, HAO Tian-qi, GAO Qian, LIU Lei
(School of Life Sciences, Huaiyin Normal University, Huaian 223300, Jiangsu)

Abstract: Grain size is an important factor affecting yield production in rice. GS3, as the firstly cloned grain size gene in rice, mainly functions in regulation of the grain length and grain weight. GS3 protein contains OSR (Organ size regulation) domain at the N-terminal and Cys-rich domain at the C-terminal. There are four main natural variants of GS3, namely GS3-1 to GS3-4. GS3-1 encodes a full-length GS3 protein, GS3-2 encodes a protein with one amino acid missing, GS3-3 abolishes full-length GS3 protein (associating with longer seeds), GS3-4 only encodes the N-terminal OSR domain (associating with significantly shorter seeds). Up to now, the GS3 variant type encoding only the Cys-rich domain remains yet identified in the natural populations, and the consequence on seed size also remains unclear. In this study, by deployment of the CRISPR/Cas9 genome editing technology to delete large DNA fragments by two target sequences flanking the target DNA, we generated a new mutation variant gs3-5 that encodes only the C-terminal Cys-rich domain. The gs3-5 mutant showed increase on seed length and thousand grain weight, thus indicating that the OSR domain is necessary for the GS3 protein to act as a negative regulator of grain size. Collectively, these results provided a reference for further analysis of the regulation of the OSR structural domain on grain size and exploration of new breeding improvement methods.

Key words: CRISPR/Cas9; GS3; grain length; grain weight; rice

收稿日期: 2023-01-27 修回日期: 2023-02-24 网络出版日期: 2023-03-30

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230127001>

第一作者研究方向为植物遗传改良研究, E-mail: guyuajuan1001@163.com

通信作者: 刘磊, 研究方向为植物遗传改良研究, E-mail: leiliu_cell@163.com

基金项目: 江苏省高等学校大学生创新创业训练计划项目(202210323028Z)

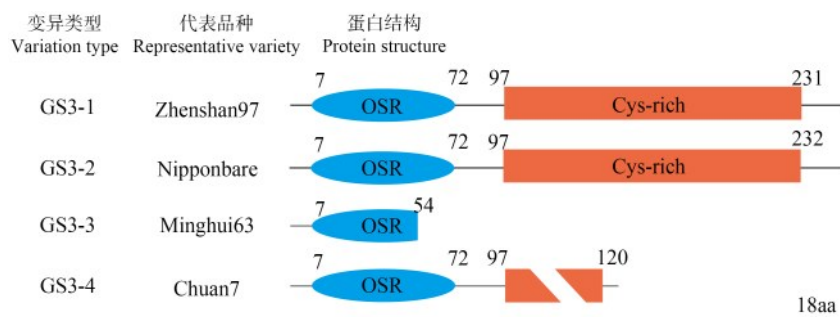
Foundation project: The Innovation Program Foundation of Colleges of Jiangsu Province(202210323028Z)

水稻(*Oryza sativa* L.)是世界上主要粮食作物之一,高产、稳产是水稻育种工作的主要目标。水稻产量由亩穗数、穗粒数和粒重三要素构成。粒重与籽粒大小正相关,因此籽粒大小影响着水稻产量。籽粒大小由粒长、粒宽、粒厚等因素决定。据报道,在分子水平上,籽粒大小主要受G蛋白信号、MAPK信号、泛素-蛋白酶体途径、激素信号和转录因子等在转录水平、转录后水平和翻译后水平等多层面精细调控^[1]。

G蛋白在细胞信号转导过程中发挥重要作用,参与植物一系列生长发育过程。因此,G蛋白相关研究一直是植物生长发育关注的热点^[2]。G蛋白包含 α 、 β 和 γ 3个亚基,其中植物G γ 亚基表现出结构上的多样性,进化出多个特异性亚基^[3]。

在水稻中,Fan等^[4]利用小粒品种Chuan7和大粒品种Minghui63构建近等基因系群体,首次克隆到植物特有的G γ 亚基GS3,其可以解释粒重和粒长80%~90%的表型变异。GS3基因编码一个由232个氨基酸组成的跨膜蛋白,该蛋白主要包含N端的植

物特有的调节器官大小的结构域OSR(Organ size regulation)和C端的Cys-rich结构域。进一步利用核心种质进行GS3基因序列分析,结果表明GS3基因主要包含4种自然变异类型,分别命名为GS3-1至GS3-4^[5]。其中,GS3-1编码全长GS3蛋白,籽粒大小表现为中等长度,代表品种为Zhenshan97;GS3-2基因在3'末端插入3bp,导致编码的蛋白质插入1个氨基酸,籽粒大小也表现为中等长度,代表品种为Nipponbare;GS3-3编码的第55位半胱氨酸的密码子TGC突变成终止密码子TGA,造成蛋白翻译提前终止(缺失了178个氨基酸),从而造成N端的OSR结构域残缺、C端的Cys-rich结构域完全缺失,粒长明显变长,代表品种为Minghui63;GS3-4在起始密码子下游357bp处缺失1bp,导致移码,仅正确编码N端的OSR结构域,籽粒表现为非常短,代表品种为Chuan7^[5](图1)。上述遗传证据表明GS3负调控籽粒大小,并且OSR结构域足够使其作为一个负调节子发挥作用,即OSR结构域是GS3负调控籽粒大小的充分条件。



图形上方的数字表示在此处的氨基酸排列顺序;白色斜框表示缺失氨基酸;下同

The number above the graphic indicates the order of the amino acids in this domain; The white diagonal boxes indicate the missing amino acids; The same as below

图1 GS3蛋白自然变异类型结构示意图

Fig.1 Schematic structure of the natural variant type of GS3 protein

CRISPR/Cas9基因编辑技术的快速发展和应用为植物功能基因组研究和作物遗传改良提供了重要的技术保障。CRISPR/Cas9基因编辑技术具有操作简单、效率高等优势,目前已在拟南芥、水稻、小麦等多个植物中得到应用,可以实现基因敲除、染色体重组以及基因定点插入或替换等^[6-10]。在植物细胞中,靶点处切割产生DNA双链断裂主要经由细胞内的非同源末端连接(NHEJ, non-homologous end-joining)进行修复,这种修复方式往往导致1个或几个核苷酸的缺失或者插入,从而达到基因功能丧失的目的^[11-13]。然而,由于这种易错的修复方式产生的插入或删除的碱基数目较小,很难有效地插

入或者敲除基因功能结构域或者调控元件。为有效地删除大片段碱基序列,可以在目标DNA序列的两侧分别设计靶点,以达到将目标序列删除的目的^[13]。

截止目前,GS3蛋白在转录水平、转录后水平和翻译后水平调控水稻籽粒大小的研究得到深入解析^[14-16]。GS3基因存在两种主要的可变剪接形式,分别为编码全长蛋白的GS3和只编码OSR结构域的GS3.2,并且GS3.2与GS3竞争性地与G β 亚基RGB1相互作用^[14]。然而,缺失OSR结构域功能的GS3蛋白对水稻籽粒大小的调控作用及其相关种质材料均未见报道。本研究利用CRISPR/Cas9基因

编辑技术创制 *GS3* 新的种质材料 *gs3-5*, 证明了缺失 OSR 结构域功能的 *GS3* 蛋白正向调控水稻籽粒大小。研究结果不仅进一步解析了 OSR 结构域对籽粒大小的调控作用, 并且为探索利用双靶点删除基因大片段开展功能研究或者创制种质材料提供了参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究以中花 11(ZH11)为遗传转化受体, 开展 *GS3* 基因编辑试验。ZH11 的 *GS3* 基因单倍型属于 *GS3-2* 的类型, 即在 *GS3* 基因 3' 末端插入 3 bp, 蛋白功能未受影响。获得的基因编辑后代材料于 2021 年和 2022 年种植于淮阴师范学院生命科技

园试验田, 种植管理同常规田间。其中, 用于进行表型分析的遗传材料 *gs3-5* 不含 Cas9 等转基因元件。

1.2 GS3 基因编辑载体构建

根据水稻数据网站 (<https://www.ricedata.cn/gene/>) 中 *GS3* (*Os03g0407400*) 的基因序列, 在 CRISPR-GE 网站 (<http://skl.scau.edu.cn/home/>) 设计一对靶点^[13], 分别为“GCCCCGGCCCAAGTCGCCGCCGG”和“CCGCGAGATCGGATTCCTCGAGG”(图 2)。通过基因合成方式, 构建至多靶点基因编辑载体 pYLCRISPR/Cas9Pubi-H 上, 并利用载体通用引物 SP1 和 SP2 进行序列检测。所使用的引物 SP1 和 SP2 由南京金斯瑞生物科技有限公司合成, 具体引物序列如表 1 所示。

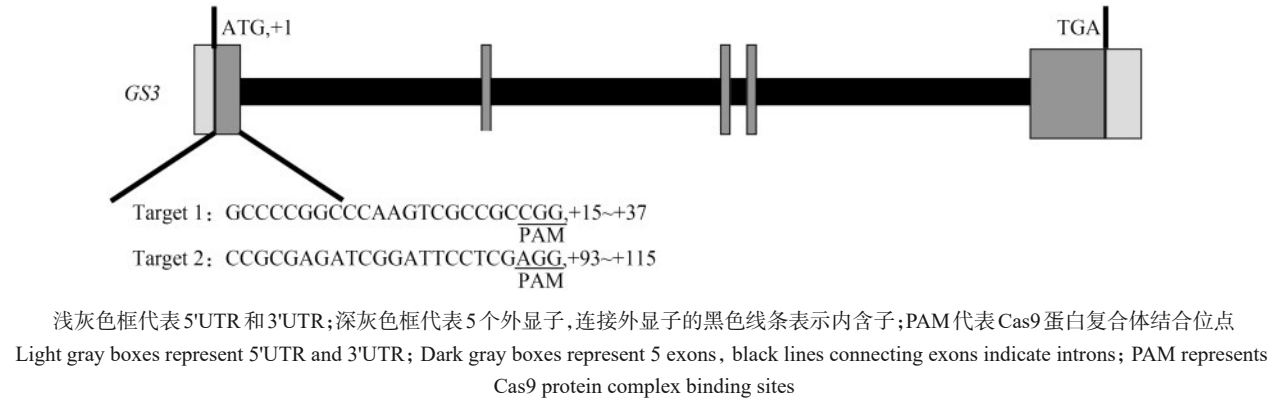


图 2 靶点序列与位置信息

Fig.2 Target sequence and location information

表 1 引物列表

Table 1 List of primers

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequences(5'-3')	用途 Application
SP1	CCCGACATAGATGCAATAACTTC	载体序列检测
SP2	GCGCGGTGTCATCTATGTTACT	
gs3-F	GATCATCTCCATTATCGGAAC	GS3 靶位点变异分析
gs3-R	CGAAGGAGTATGAATGGTAGTG	
M13F	TGTA AACGACG GCCAGT	单克隆测序检测
M13R	CAGGAAACAGCTATGACC	
pGADT7-GS3-F	GGAATTCCATATGATGGCAATGGCGGCGGCGCC	构建载体 pGADT7-GS3
pGADT7-GS3-R	CGAGCTCGTCACAAGCAGGGGGGGCAGC	
pGADT7-GS3.2-F	GGAATTCCATATGATGGCAATGGCGGCGGCGCC	构建载体 pGADT7-GS3.2
pGADT7-GS3.2-R	CGAGCTCGTCAAGAAGTGGTGAGAATGATCAT	
pGADT7-GS3-5-F	GGAATTCCATATGATGGCAATGGCGGCGGCGCC	构建载体 pGADT7-GS3-5
pGADT7-GS3-5-R	CGAGCTCGTCACAAGCAGGGGGGGCAGC	
pGBKT7-RGB1-F	GGAATTCCATATGATGGCGTCCGTGGCGGAG	构建载体 pGBKT7-RGB1
pGBKT7-RGB1-R	GCGTCGACTCAAATAATTTCCGGTGTCGCT	
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	菌体 PCR 鉴定
3-AD	AGATGGTGCACGATGCACAG	

1.3 水稻 DNA、RNA 的提取和 cDNA 的合成

参照 TIANGEN 的植物基因组 DNA 提取试剂盒 (Cat.#DP305-03) 说明书提取 ZH11 和基因编辑后代幼苗 DNA。参照 TIANGEN 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (Cat.#DP441) 说明书提取水稻幼苗总 RNA。参照 TaKaRa 的 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 反转录试剂盒 (Cat.#RR047Q) 说明书合成水稻 cDNA。

1.4 基因编辑水稻变异类型检测

设计靶位点检测引物 *gs3-F* 和 *gs3-R* (表 1), 以 *GS3* 基因编辑后代材料 DNA 为模板, 利用 KOD FX DNA 聚合酶扩增 *GS3* 靶位点区间片段。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 3 min; 98 °C 15 s, 57 °C 30 s, 68 °C 1 min, 35 个循环; 68 °C 延伸 10 min。利用 *gs3-F* 和 *gs3-R* 对 PCR 产物进行测序并进行突变序列分析。对非纯合突变体 PCR 产物进一步连接 T 载体, 利用通用引物 M13F 和 M13R 对单克隆进行测序明确变异类型。上述引物序列如表 1 所示。

1.5 酵母双杂交载体构建

根据 *GS3* 基因 CDS 序列并结合多克隆位点及酵母载体阅读框, 通过软件 OMIGA 分析设计引物对 pGADT7-*GS3-F*/pGADT7-*GS3-R*、pGADT7-*GS3.2-F*/pGADT7-*GS3.2-R*、pGADT7-*GS3-5-F*/pGADT7-*GS3-5-R*、pGBKT7-*RGB1-F*/pGBKT7-*RGB1-R* (表 1), 并以水稻 cDNA 为模板, 利用 KOD FX DNA 聚合酶分别扩增 *GS3*、*GS3.2*、*GS3-5* 和 *RGB1*。使用限制性内切酶 *NdeI* 和 *SacI* 酶切目的片段和载体, 并通过 T4 连接酶进行连接反应; 随后, 将连接产物转入大肠杆菌感受态细胞 DH5 α , 涂布于含相应抗生素的 2-YT 平板进行 37 °C 培养。利用引物 T7 和 3-AD (表 1) 对单克隆菌斑进行 PCR 鉴定并测序。

1.6 酵母双杂交

将重组质粒 pGADT7-*GS3*、pGADT7-*GS3.2*、pGADT7-*GS3-5* 分别与 pGBKT7-*RGB1* 共转酵母感受态细胞, 并将转化产物均匀涂布在 SD/-Trp/-Leu 营养缺陷型培养基上, 于 30 °C 生化培养箱倒置培养 5 d, 至菌落长出。挑取 SD/-Trp/-Leu 营养缺陷型培养基上单克隆酵母菌落划线于 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 营养缺陷型培养基生长, 观察生长情况。随后, 挑取 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 生长的酵母菌落接种于 SD/-Trp/-Leu 液体培养基中, 30 °C 200 rpm 摇床中震荡培养 16 h, 调菌液 OD \approx 0.6 进行梯度稀释生长观察。

1.7 农艺性状测量方法

在水稻成熟收获时期, 从水稻茎秆连接地面处割

取整株水稻, 每种类型的水稻突变体各取 10 株用于测量粒长、粒宽、千粒重、分蘖数、每穗粒数、单株产量、株高等农艺性状。粒长、粒宽和千粒重由考种仪 (万深, SC-G) 测量。在水稻进入生殖生长期后, 每天观察水稻是否抽穗, 以主穗抽出 2 cm 作为单株始穗的标准, 以播种到始穗的天数作为抽穗期。使用 Graphpad prism 8 软件对数据进行差异显著性分析并作图。

2 结果与分析

2.1 CRISPR/Cas9 编辑 *GS3* 的靶点选择

根据单奇伟等^[1]的方法, 针对 *GS3* (*Os03g0407400*) 第 1 个外显子区设计靶位点, 分别为靶点序列 1 和靶点序列 2 (图 2)。通过基因合成构建编辑载体, 并利用引物 SP1 和 SP2 扩增靶点区, 测序证实靶点区序列完全正确。

2.2 CRISPR/Cas9 编辑 *GS3* 突变体后代的靶点变异类型分析

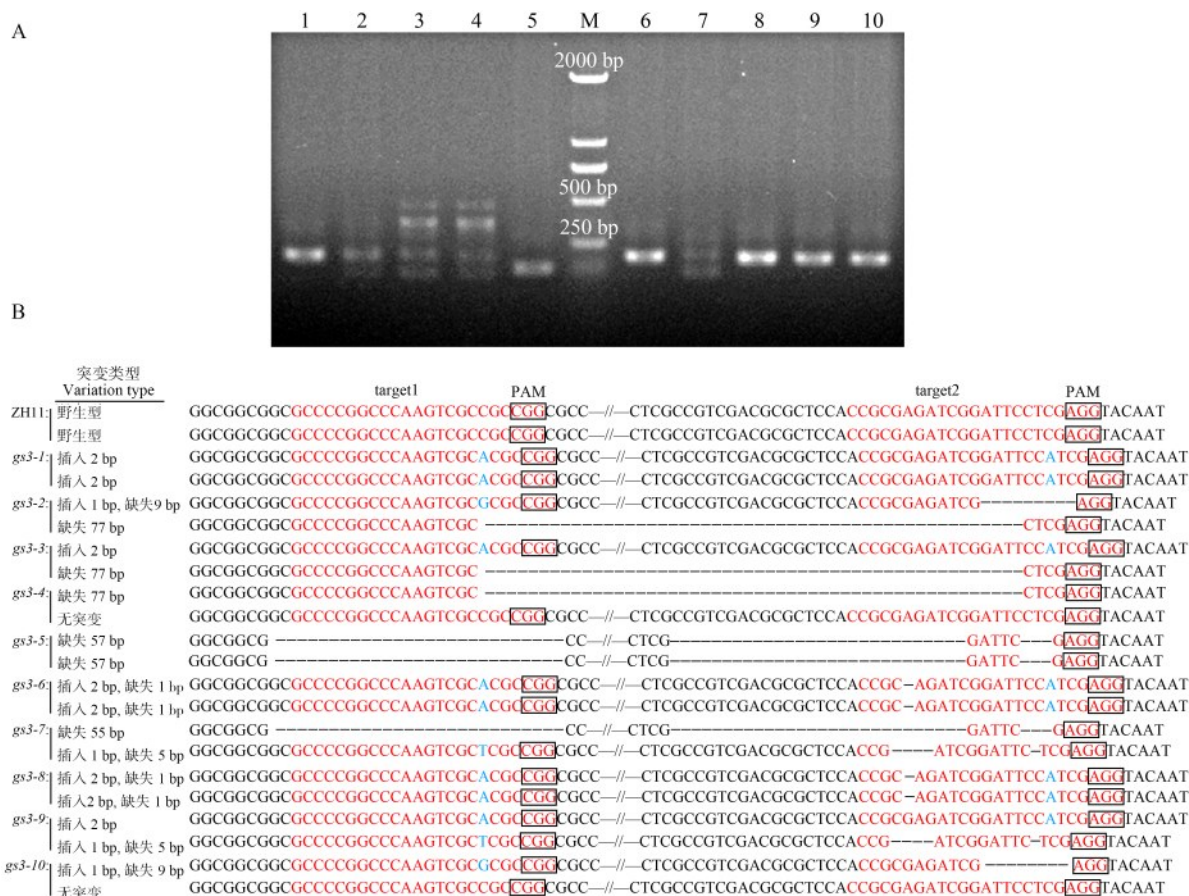
选取 10 株 T₀ 代基因编辑株系分别命名为 *gs3-1* 至 *gs3-10*, 提取其 DNA 并以此为模板, 利用引物 *gs3-F* 和 *gs3-R* 扩增 T₀ 代基因编辑株系的靶位点序列, 发现 *gs3-1*、*gs3-6*、*gs3-8*、*gs3-9* 和 *gs3-10* 株系扩增的条带大小接近野生型 ZH11 中 *GS3* 基因大小 (198 bp), *gs3-2*、*gs3-3*、*gs3-4* 和 *gs3-7* 扩增片段不单一, *gs3-5* 扩增片段明显小于目的片段 (图 3A)。为明确靶位点变异类型和变异序列, 进一步将上述植株扩增得到的 PCR 产物进行 TA 克隆后转化 DH5 α , 挑取单菌落进行菌体 PCR 扩增, 将 PCR 产物测序并分析突变序列类型。测序结果表明, 10 个 T₀ 代基因编辑株系中包含 3 种突变类型, 共 6 种靶位点序列突变类型。其中, *gs3-1*、*gs3-5*、*gs3-6*、*gs3-8* 为突变纯合体, *gs3-4*、*gs3-10* 为突变杂合体, *gs3-2*、*gs3-3*、*gs3-7*、*gs3-9* 为双等位突变体 (图 3B)。

2.3 新变异类型 *GS3-5* 蛋白对 *GS3* 蛋白功能的影响

上述靶位点突变均位于 *GS3* 蛋白的 OSR 结构域。值得注意的是, *gs3-5* 突变体植株缺失 57 bp, 不会造成移码突变 (图 4A)。研究表明, *GS3* 蛋白以及 *GS3* 的可变剪接形式 *GS3.2* 蛋白均与 G β 亚基 *RGB1* 相互作用, 且 OSR 结构域是相互作用所必须的^[14]。为进一步探究 *GS3-5* 蛋白的 OSR 结构域功能是否完整, 本研究以 *GS3* 和 *GS3.2* 蛋白作为阳性对照, 利用酵母双杂交手段检测了 *GS3-5* 蛋白与 *RGB1* 之间是否存在相互作用。四缺 (SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade) 划线结果表明, 与阳性对照相比, 共转化 AD-*GS3-5*

与 BD-RGB1 的菌落在营养缺陷培养基上的生长能力明显减弱(图 4B)。进一步定量生长试验结果显示,与对照组相比,共转化 AD-GS3-5 与 BD-RGB1 在营养缺陷培养基上几乎不生长(图 4C)。综上结

果表明,GS3-5 突变蛋白的 OSR 结构域功能缺失。由于 GS3-5 基因序列缺失 57 bp,并不导致移码突变,因此,gs3-5 突变体是研究 GS3 蛋白 OSR 结构域生物学功能的理想试验材料。

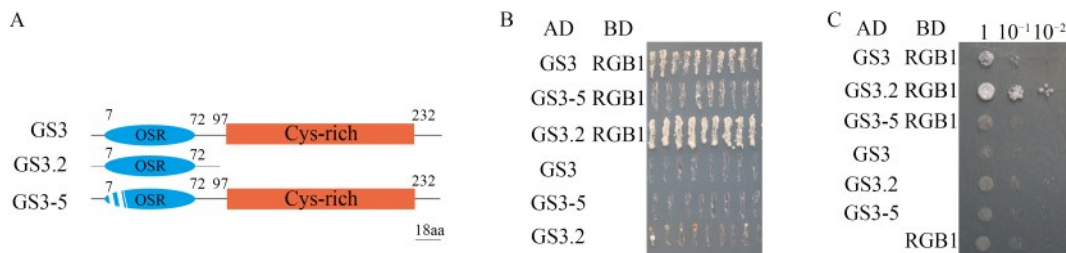


A: 10 株基因编辑阳性水稻靶位点 PCR 电泳图, 1~10 分别对应 gs3-1 至 gs3-10, M 为 DNA marker 2000; B: gs3-1~gs3-10 突变株系测序结果示意图, 红色字体表示靶点序列, 蓝色字体表示插入碱基, - 表示缺失碱基, ZH11 表示水稻品种中花 11 的 GS3 序列, 10 株基因编辑株系均以 ZH11 为转化背景

A: PCR detection of the target loci in 10 editing lines, 1~10 represent gs3-1 to gs3-10 respectively, M: DNA marker 2000; B: Sequencing results of gs3-1~gs3-10 mutant strains, red font indicates target sequences, blue font indicates insertion bases, - indicates deletion bases, ZH11 represents the GS3 sequence of the rice variety Zhong Hua 11, and all 10 editing lines were transformed with ZH11 as the background

图 3 gs3 突变体株系靶位点变异分析

Fig.3 Analysis of target locus variation in gs3 mutant strains



A: GS3、GS3.2 和 GS3-5 蛋白结构示意图; B: 酵母菌落在四缺培养基划线生长 5 d 情况, 标尺: 1 cm; C: OD 值均为 0.6 的酵母菌在四缺培养基生长 2 d 情况, 标尺: 1 cm

A: Schematic structure of GS3, GS3.2 and GS3-5 proteins; B: Yeast colonies in four-deficient medium delineated for 5 days of growth, Bar: 1 cm;

C: Saccharomyces cerevisiae with OD values of 0.6 were grown in four-deficiency medium for 2 days, Bar: 1 cm

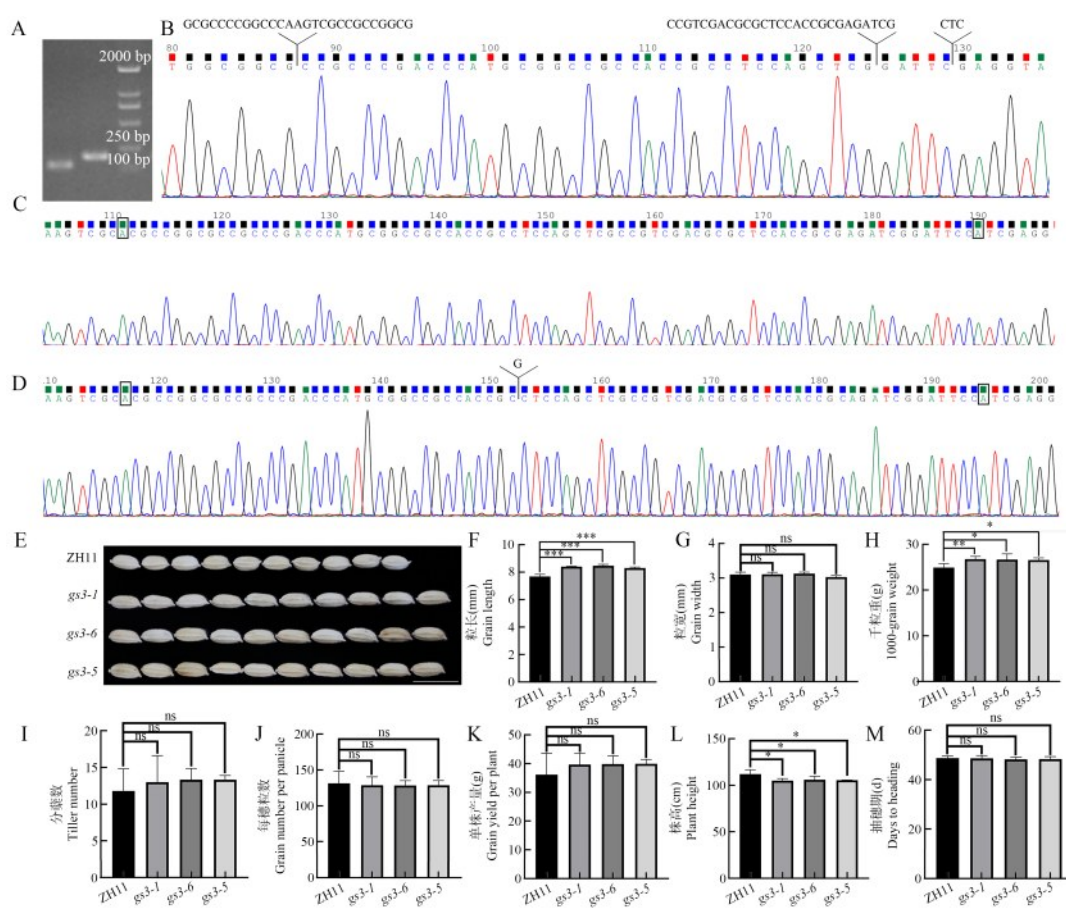
图 4 GS3-5 新型变异蛋白功能验证

Fig.4 Functional validation of GS3-5 novel variant protein

2.4 *gs3-5* 突变体籽粒大小等性状的表型鉴定

混提 *gs3-5* 突变体的水稻幼苗叶片 DNA 进行 PCR 鉴定, 结果显示 *gs3-5* 突变体的扩增片段明显小于对照, 表明 *gs3-5* 突变体为纯合突变 (图 5A)。测序结果显示, 与对照相比, *gs3-5* 突变体缺失 57 bp, 为纯合突变 (图 5B)。同时, 基于 PCR 产物测序鉴定获得 *gs3-1* 和 *gs3-6* 的纯合突变体 (图 5C、D)。以 ZH11 为对照, 利用上述突变体材料, 测量粒长、粒宽和千粒重等重要农艺性状。统计结果显示, ZH11 粒长为 7.69 ± 0.15 mm, *gs3-1* 粒长为 8.40 ± 0.04 mm, *gs3-6* 粒长为 8.47 ± 0.10 mm, *gs3-5* 粒长为

8.30 ± 0.06 mm, 表明 *gs3-1*、*gs3-6* 和 *gs3-5* 粒长均大于 ZH11 (图 5E), 且统计数据差异显著 (图 5F)。与粒长相比, 粒宽统计数据差异不显著 (图 5G)。然而, ZH11 千粒重为 24.91 ± 0.88 g, *gs3-1* 千粒重为 26.76 ± 0.62 g, *gs3-6* 千粒重为 26.70 ± 1.23 g, *gs3-5* 千粒重为 26.57 ± 0.48 g, 表明 *gs3-1*、*gs3-6* 和 *gs3-5* 籽粒千粒重均大于 ZH11, 且统计数据差异显著 (图 5H)。另外, 与对照相比, *gs3-5* 的分蘖数、每穗粒数以及单株产量差异不显著 (图 5I-K)。除产量性状外, *gs3-5* 的株高显著降低 (图 5L), 但抽穗期差异不显著 (图 5M)。



A: *gs3-5* 纯合体鉴定胶图; 1: *gs3-5* 电泳条带; 2: ZH11 电泳条带; M: DNA Maker 2000; B: *gs3-5* 纯合体测序图, Y 字型标志表示缺失碱基位置, Y 字型标志上方表示缺失碱基序列; C: *gs3-1* 纯合体测序图, 黑色框处表示插入碱基及所在位置; D: *gs3-6* 纯合体测序图, Y 字型标志表示缺失碱基位置, Y 字型标志上方表示缺失碱基序列, 黑色框处表示插入碱基及所在位置; E: ZH11 和 *gs3-1*、*gs3-6*、*gs3-5* 粒长表型观察, 标尺: 1 cm; F-M: 利用 t 检验对 ZH11 和 *gs3-1*、*gs3-6*、*gs3-5* 在粒长、粒宽、千粒重、分蘖数、每穗粒数、单株产量、株高和抽穗期进行统计分析; ns: 差异不显著; *, **, ***: 分别在 $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$ 水平上差异显著

A: *gs3-5* homologous mutant identification gel chart; 1: *gs3-5* electrophoresis bands; 2: ZH11 electrophoresis bands; M: DNA Maker 2000; B: Sequencing diagram of *gs3-5* homologous mutant, the Y marker indicates the position of the missing base, and above the Y marker indicates the sequence of the missing base; C: Sequencing diagram of the *gs3-1* homologous mutant, black boxes indicate inserted bases and their locations; D: Sequencing diagram of *gs3-6* homologous mutant, the Y marker indicates the position of the missing base, above the Y marker indicates the sequence of the missing base, the black box indicates the inserted base and its location; E: ZH11 and *gs3-1*, *gs3-6*, *gs3-5* grain length phenotype observation, Bar: 1 cm; F-M: Statistical data of ZH11 and *gs3-1*, *gs3-6* and *gs3-5* in terms of grain length, grain width, 1000-grain weight, tiller number, grain number per panicle, grain yield, plant height and days to heading; ns: Not significant; *, **, ***: Significant differences at the levels of $P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.001$, respectively

图 5 *gs3-5* 表型鉴定

Fig.5 Identification of *gs3-5* phenotype

综合上述结果,表明 GS3 蛋白 OSR 结构域功能丧失突变体 *gs3-5* 与 ZH11 相比,其粒长和千粒重均明显增加,表明 OSR 结构域是 GS3 发挥负调控功能的必要条件。

3 讨论

GS3 基因是水稻中第 1 个被克隆的控制粒型和千粒重的主效位点,编码植物特有的 G γ 亚基。GS3 蛋白由 N 端的 OSR 结构域和 C 端的 Cys-rich 结构域组成^[15]。根据 C 端结构的不同, G γ 亚基被分为 A~C 3 种类型,而 GS3 属于 C 类型^[17]。GS3 基因主要存在 4 种自然变异类型,分别编码全长功能蛋白(GS3-1 和 GS3-2)、功能完全缺失蛋白(GS3-3)和 OSR 结构域(GS3-4),表型数据证明 GS3 功能的完全缺失导致粒长以及千粒重增加,而 GS3 的 OSR 结构域导致粒长和千粒重降低,表明 GS3 负调控籽粒大小,并且 OSR 结构域是 GS3 发挥负调控功能的充分条件。转基因过表达表型数据表明,与受体 Minghui 63 相比,过表达 OSR 结构域籽粒大小平均降低 29.1%,单独过表达 Cys-rich 结构域的株系籽粒大小没有明显变化,而 GS3 全长基因过表达株系籽粒大小平均降低 9.5%,表明在 OSR 结构域和 Cys-rich 结构域共表达情况下,Cys-rich 结构域对 OSR 结构域的负调控功能具有一定的抑制作用^[5]。然而,仅保留 C 端的 Cys-rich 结构域功能的种质籽粒表型还不清楚,OSR 结构域是否是 GS3 发挥负调控功能的必要条件也未可知。

本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在第 1 个外显子区域设计靶点创制 GS3 功能结构域新种质(图 2)。通过筛选 T₀ 代基因编辑阳性苗,测序发现有 5 株(占比 50%)阳性苗存在长片段(57 bp 和 77 bp)缺失(图 3B)。*gs3-5* 缺失 57 bp 并不导致移码,保留了 C 端 Cys-rich 功能结构域(图 4A)。为检测 *gs3-5* N 端 OSR 结构域功能是否丧失,开展酵母双杂交试验检测 GS3-5 与 G β 亚基 RGB1 之间的相互作用。结果显示,与对照组相比,GS3-5 与 RGB1 之间的相互作用明显减弱(图 4B~C),表明 *gs3-5* 株系中 GS3 的 OSR 结构域功能丧失。因此,*gs3-5* 是保留 C 端的 Cys-rich 结构域功能的理想种质材料。遗传表型分析表明,与受体对照相比,*gs3-5* 的粒长、千粒重显著增加。然而,与 GS3 功能完全缺失突变体相比,*gs3-5* 的粒长、千粒重没有明显变化(图 5E~H),表明 GS3 的 Cys-rich 结构域对籽粒大小几乎没有影响,也说明 OSR 结构域是 GS3 发挥负调

控功能的必要条件。

通过生物工程手段创制新型种质已获得广泛认可。基因编辑 CRISPR/Cas 系统的发现和应用为高效基因敲除提供了有力工具。随着 CRISPR/Cas 系统的发展,基因敲除、定点突变、大片段删减等编辑方式也被广泛应用,使得种质创新更为稳定、精准、高效和安全。为有效地删除大片段碱基序列,可以在目标 DNA 序列的两侧分别设计靶点,以达到将目标序列删除的目的^[18-19]。本研究利用该方法,成功创制出大片段删减的 GS3 新种质,一方面验证了该方法的可行性,另一方面也为精准、高效育种改良提供了新途径。

本研究通过在 DNA 片段两端设计靶位点,利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术成功删除了目的基因大片段碱基序列,证实了该方法的可操作性。同时,利用该方法创制了 GS3 蛋白 N 端 OSR 结构域功能丧失、C 端 Cys-rich 结构域功能保留的新种质,证明了 OSR 结构域是 GS3 发挥负调控功能的必要条件,丰富了 GS3 负调控水稻粒型的分子机理的理论知识。

参考文献

- [1] Li N, Xu R, Li Y H. Molecular networks of seed size control in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 2019, 70: 435-463
- [2] Urano D, Miura K, Wu Q Y, Iwasaki Y, Jackson D, Jones A M. Plant morphology of heterotrimeric G protein mutants. *Plant and Cell Physiology*, 2016, 57: 437-445
- [3] Chakravorty D, Trusov Y, Zhang W, Acharya B R, Sheahan M B, McCurdy D W, Assmann S M, Botella J R. An atypical heterotrimeric G-protein γ -subunit is involved in guard cell K⁺-channel regulation and morphological development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 2011, 67: 840-851
- [4] Fan C C, Xing Y Z, Mao H L, Lu T T, Han B, Xu C G, Li X H, Zhang Q F. GS3, a major QTL for grain length and weight and minor QTL for grain width and thickness in rice, encodes a putative transmembrane protein. *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, 112: 1164-1171
- [5] Mao H L, Sun S Y, Yao J L, Wang C R, Yu S B, Xu C G, Li X H, Zhang Q F. Linking differential domain functions of the GS3 protein to natural variation of grain size in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107: 19579-19584
- [6] Chaya G, Segami S, Fujita M, Morinaka Y, Iwasaki Y, Miura K. *OsGGC2*, G γ subunit of heterotrimeric G protein, regulates plant height by functionally overlapping with *DEP1* in rice. *Plants*, 2022, 11: 422
- [7] Lee Z H, Yamaguchi N, Ito T. Using CRISPR/Cas9 system to introduce targeted mutation in *Arabidopsis*. *Methods Molecular*

- Biology, 2018, 1830: 93-108
- [8] Li J, Li Y, Ma L G. Recent advances in CRISPR/Cas9 and applications for wheat functional genomics and breeding. *Abiotech*, 2021, 2: 375-385
- [9] 于美, 唐华丽, 叶兴国. 利用转基因技术和基因编辑技术改良小麦进展. *植物遗传资源学报*, 2023, 24(1): 102-116
Yu M, Tang H L, Ye X G. Progresses on wheat improvement by using transgenic and genome editing technologies. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2023, 24(1): 102-116
- [10] 高谢旺, 谭安琪, 胡信畅, 祝孟洋, 阮颖, 刘春林. 利用 CRISPR/Cas9 技术创制高油酸甘蓝型油菜新种质. *植物遗传资源学报*, 2020, 21(4): 1002-1008
Gao X W, Tan A Q, Hu X C, Zhu M Y, Ruan Y, Liu C L. Creation of new germplasm of high-oleic rapeseed using CRISPR/Cas9. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2020, 21(4): 1002-1008
- [11] 单奇伟, 高彩霞. 植物基因组编辑及衍生技术最新研究进展. *遗传*, 2015, 37(10): 953-973
Shan Q W, Gao C X. Research progress of genome editing and derivative technologies in plants. *Hereditas*, 2015, 37(10): 953-973
- [12] 刘耀光, 李构思, 张雅玲, 陈乐天. CRISPR/Cas 植物基因组编辑技术研究进展. *华南农业大学学报*, 2019, 40(5): 38-49
Liu Y G, Li G S, Zhang Y L, Chen L T. Current advances on CRISPR/Cas genome editing technologies in plants. *Journal of South China Agricultural University*, 2019, 40(5): 38-49
- [13] 谢先荣, 曾栋昌, 谭健韬, 祝钦泷, 刘耀光. 基于 CRISPR 编辑系统的 DNA 片段删除技术. *植物学报*, 2021, 56(1): 44-49
Xie X R, Zeng D C, Tan J T, Zhu Q L, Liu Y G. CRISPR-based DNA fragment deletion in plants. *Bulletin of Botany*, 2021, 56(1), 44-49
- [14] Liu L, Zhou Y, Mao F, Gu Y J, Tang Z W, Yi X, Liu F X, Tang T, Gao H, Zhao X X. Fine-tuning of the grain size by alternative splicing of *GS3* in rice. *Rice*, 2022, 15: 1-4
- [15] Sun S Y, Wang L, Mao H L, Shao L, Li X H, Xiao J H, Ouyang Y, Zhang Q F. A G-protein pathway determines grain size in rice. *Nature Communications*, 2018, 9: 851
- [16] Yang W S, Wu K, Wang B, Liu H H, Guo S Y, Guo X Y, Luo W, Sun S Y, Ouyang Y, Fu X D, Chong K, Zhang Q F, Xu Y Y. The RING E3 ligase CLG1 targets GS3 for degradation via the endosome pathway to determine grain size in rice. *Molecular Plant*, 2021, 14: 1699-1713
- [17] Trusov Y, Chakravorty D, Botella J R. Diversity of heterotrimeric G-protein γ subunits in plants. *BMC Research Notes*, 2012, 5: 1-9
- [18] 张瑞, 高彩霞. 基于双碱基编辑系统的植物基因靶向随机突变技术. *植物学报*, 2021, 56(1): 50-55
Zhang R, Gao C X. Saturation mutagenesis using dual cytosine and adenine base editors. *Bulletin of Botany*, 2021, 56(1): 50-55
- [19] Zhang Y L, Ma X L, Xie X R, Liu Y G. CRISPR/Cas9-based genome editing in plants. *Progress in Molecular Biology Translational Science*, 2017, 149: 133-150