

应用 CRISPR/Cas9 技术创制低直链淀粉含量水稻种质

毛兴学, 郑晓钰, 孙炳蕊, 李 晨, 陈文丰, 潘大建, 柳武革, 范芝兰, 王 丰

(广东省农业科学院水稻研究所 / 广东省水稻育种新技术重点实验室 / 广东省水稻工程实验室, 广州 510640)

摘要: *Wx* 基因直接控制水稻胚乳直链淀粉的合成, 进而影响胶稠度等多个品质指标, 是控制稻米食味的主效基因。适当降低稻米的直链淀粉含量可改善稻米品质。吉丰 B 是籼型优质杂交稻保持系, 直链淀粉含量偏高, 影响组配后代的食味品质。本研究以吉丰 B 为试验材料, 对 *Wx* 基因编码区上游序列进行编辑, 以期获得 *Wx* 基因表达下调, 直链淀粉含量降低的水稻种质。以农杆菌为介导进行转基因, 获得 9 个转基因株系, 从后代中筛选到 2 个大片段缺失的变异株系 L8 和 L9。它们的 *Wx* 基因表达大幅下调, 直链淀粉含量极显著降低, 胶稠度和食味品质也有所改善。L8 和 L9 糙米外观有很大差异, L8 与糯米相近, L9 与粘米类似。综上所述, 本研究利用 CRISPR/Cas9 技术编辑 *Wx* 基因编码区上游序列, 获得两份低直链淀粉含量水稻种质, 该结果为稻米品质改良研究提供了参考。

关键词: 水稻 (*Oryza sativa* L.); *Wx* 基因; 直链淀粉含量; CRISPR/Cas9

Creating Novel Rice Germplasms with Low Amylose Content by Editing Upstream Sequence of *Wx* Gene Coding Region via CRISPR/Cas9 Technology

MAO Xing-xue, ZHENG Xiao-yu, SUN Bing-rui, LI Chen, CHEN Wen-feng, PAN Da-jian, LIU Wu-ge, FAN Zhi-lan, WANG Feng

(Rice Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences / Guangdong Key Laboratory of New Technology in Rice Breeding / Guangdong Rice Engineering Laboratory, Guangzhou 510640)

Abstract: *Wx* gene directly controls the synthesis of amylose in rice endosperm, and thus affects many cooking quality traits such as gel consistency, which is the major gene controlling the eating quality of rice. It can significantly improve the rice eating quality by moderately reducing amylose content (AC). Jifeng B (JB) is a maintainer line of indica hybrid rice with high AC, which reduces the eating quality of the progeny. CRISPR/Cas9 technology has been applied more and more in rice molecular breeding. In this study, four target sites were selected from the upstream sequence of coding region of *Wx* gene, and the editing vector was constructed and introduced into JB by *Agrobacterium tumefaciens*. A total of 9 transgenic lines, L1-L9, were obtained. Among

收稿日期: 2021-09-26 修回日期: 2021-10-20 网络出版日期: 2021-11-05

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20210926001>

第一作者研究方向为稻米品质, E-mail: maoxingxue@qq.com

通信作者: 王丰, 研究方向为水稻遗传育种, E-mail: 13609012231@163.com

范芝兰, 研究方向为水稻种质资源, E-mail: zhilanfan@163.com

柳武革, 研究方向为水稻遗传育种, E-mail: liuwuge1974@163.com

基金项目: 广东省发展和改革委员会、农业农村厅投资项目 [2021]272 号; 广东农业科学院农业优势产业学科团队建设项目 (202101TD); 广东省重点领域研发计划项目 (2020B0202090003); 广东省自然科学基金 (2019A1515011208、2021A1515011226); 广东省重点实验室运行费 (2020B1212060047)

Foundation projects: The Investment Project of Department of Agriculture and Rural Affairs, Development and Reform Commission, Guangdong Province (2021), No. 272, Agricultural Competitive Industry Discipline Team Building Project of Guangdong Academy of Agricultural Sciences (202101TD), Research and Development Program in Key Areas of Guangdong Province (2020B0202090003), Guangdong Provincial Natural Science Foundation (2019A1515011208, 2021A1515011226), Project of Guangdong Key Laboratory (2020B1212060047)

them, L8 and L9 had a large fragment deletion mutation, in which the expression of *Wx* gene and AC were down-regulated. The gel consistency and eating quality were also improved. There is a great difference in the appearance of brown rice between L8 and L9. L8 is similar to glutinous rice and L9 is similar to sticky rice. To sum up, we used CRISPR/Cas9 technology to edit the upstream untranslated region of *Wx* gene in order to reduce the AC in rice, and achieved success. These results provide a reference for the study of rice quality improvement.

Key words: rice (*Oryza sativa* L.); *Wx* gene; amylose content; CRISPR/Cas9

水稻是世界上重要的粮食作物之一,随着社会的发展,人们对稻米品质的要求越来越高,培育优质的水稻品种已经成为育种工作的一个重要方向。现有的大多数杂交稻稻米品质不尽人意,其中直链淀粉含量偏高是影响籼稻杂交稻品质的一个重要因素。直链淀粉含量 >20% 的稻米食味品质通常较差;直链淀粉含量位于 15%~20% 的食味品质较好;直链淀粉含量位于 5%~15% 的材料为介于粘米和糯米之间的中间类型,属低直链淀粉含量种质,也称软米种质,米饭质地柔软、富有弹性,受到广大消费者的青睐^[1-2]。多个控制低直链淀粉含量性状的 *Wx* (*Waxy*) 等位基因被克隆^[3-4],国内低直链淀粉含量育种也在云南和长江中下游地区获得长足发展^[2, 5-6]。

直链淀粉含量是用来衡量稻米品质的重要指标,可以影响糊化温度和胶稠度,从而影响稻米品质^[7-8]。稻米直链淀粉的合成是由 *Wx* 基因编码的颗粒结合型淀粉合成酶 (GBSSI, granule-bound starch synthase I) 控制的^[9],已有多个 *Wx* 等位基因被克隆^[10]。在我国主推粘稻品种中,主要存在 *Wx^a* 和 *Wx^b* 两种等位类型。大部分籼稻含 *Wx^a* 等位基因,直链淀粉含量较高,一般在 25% 以上^[11]。相对于 *Wx^a*, *Wx^b* 等位基因在第 1 内含子剪接位点处发生了 G-T 变异,导致前体 mRNA 错误剪切率升高,虽然该剪接不直接影响编码区序列,但是成熟 mRNA 表达水平大幅下降,GBSSI 蛋白含量下降,最终导致种子中的直链淀粉含量降低^[9, 11-12]。错误剪接的发生机制还不清楚,但是编码区上游序列对 *Wx* 基因正常表达的重要性不言而喻,通过编辑这些区域来调控 *Wx* 基因的表达是切实可行的^[13-14]。

CRISPR/Cas9 是近年来兴起的基因编辑技术,编辑效率高,定向准确,实验周期较短,受到很多研究人员青睐^[14-17]。基因编辑系统通常需要一个短链 sgRNA 来引导 Cas9 元件到达特定靶位进行切割,引发靶位点的 DNA 双链断裂,再通过非同源末端连接来修复断裂的 DNA 双链,修复过程中常常发生个别碱基的插入或缺失,产生多种变异类

型^[17-18]。编码区引入变异导致目标基因功能丧失,是变异材料创制的重要手段,常用于基因功能研究。近年在植物界已广泛应用基因编辑技术进行遗传改良或种质创制,例如,油菜^[19]、玉米^[20]、大豆^[21]。水稻育种者利用该技术也改良了糯性^[10, 13]、抗性^[22]、粒长^[15]和香味^[23]性状,加速了育种进程。CRISPR/Cas9 技术造成的切割经常引入少量碱基的插入或缺失,也可引起部分序列的丢失,或者造成大片段的倒位^[24-25],相关机制值得深入探讨。

吉丰 B 是广东省农科院育成的新型优质杂交稻亲本,携带有稻瘟病抗性基因 *Pi-1*,开花习性好,配合力高,制种产量高^[26]。主要缺点是直链淀粉含量高,米质不够软糯,限制了组配杂交种的使用。本研究在 *Wx* 基因编码区上游选取 4 个靶点,构建编辑载体,通过农杆菌介导转化吉丰 B,筛选转基因后代,获得了无潮霉素基因且直链淀粉含量下降的株系,为改良直链淀粉含量提供了新方法。研究结果既为 *Wx* 基因功能研究创制了不同类型的材料,也为应用现代生物技术创制种质材料提供了一个范例。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究的亲本材料吉丰 B 是广东省农科院水稻研究所选育的、在生产上广泛应用的抗病三系不育系吉丰 A 的保持系。本研究以吉丰 B 为遗传转化受体,开展基因编辑实验,得到的转基因后代种植于广东农科院水稻所转基因实验田,常规田间种植管理。

主要试剂有 *Bsa* I -HF (NEB)、T4 DNA 连接酶 (NEB)、KOD FX (Toyota)、Trizol、反转录试剂盒 (艾科瑞,货号: AG11706)、荧光定量 PCR 试剂盒 (艾科瑞,货号: AG11701) 等。多靶点基因编辑载体 pYLCRISPR/Cas9Pubi-H、pYLG RNA-OsU6a、pYLG RNA-OsU6b 由刘耀光院士馈赠。本研究中所使用的引物均由上海生工生物有限公司合成,具体引物序列如表 1 所示。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer Name	序列 (5' -3') Sequence	目的 Purpose
U-F	CTCCGTTTACCTGTGGAATCG	载体构建
gR-R	CGGAGGAAAATTCCATCCAC	
Pps-GGL	TTCAGAGGTCTCTCTCGACTAGTATGGAATCGGCAGCAAAGG	
Pgs-GG2	AGCGTGGGTCTCGTCAGGGTCCATCCACTCCAAGCTC	
Pps-GG2	TTCAGAGGTCTCTCTGACACTGGAATCGGCAGCAAAGG	
Pgs-GG3	AGCGTGGGTCTCGTCTTCACTCCATCCACTCCAAGCTC	
Pps-GG3	TTCAGAGGTCTCTAAGACTTTGGAATCGGCAGCAAAGG	
Pgs-GG4	AGCGTGGGTCTCGAGTCCTTCCATCCACTCCAAGCTC	
Pps-GG4	TTCAGAGGTCTCTGACTACATGGAATCGGCAGCAAAGG	
Pgs-GGR	AGCGTGGGTCTCGACCGACGCGTATCCATCCACTCCAAGCTC	
E1-6aF	CGCATGTGCATCGTCGACACCGGCAGCCAAGCCAGCA	
E1-6aR	GTGTCGACGATGACATGCGGTTTTAGAGCTAGAAAT	
E2-6bF	GATGAACAACAGAACAACACAACACAAGCGGCAGC	
E2-6bR	TGTTGTTCTGTTGTTTCATCGTTTTAGAGCTAGAAAT	
E3-6aF	GGATATTTATTGTGCAGTAACGGCAGCCAAGCCAGCA	
E3-6aR	TTACTGCACAATAAAATATCCGTTTTAGAGCTAGAAAT	
E4-6bF	AAGAAACTGCTCCTTAAGTCAACACAAGCGGCAGC	
E4-6bR	ACTTAAGGAGCAGTTTCTTGTTTTAGAGCTAGAAAT	
wxF	GAGATCCACCGATGGTTTACG	变异后代鉴定
wxR	ACATGGTGTTGTCTAGCTGTTG	
HPTF	ATTTGTGTACGCCGACAGT	
HPTR	GTGCTTGACATTGGGGAGTT	
EF1 α -F	TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT	表达分析
EF1 α -R	GACTTCCTTCACGATTTTCATCGTAA	
wxreF	ATCGACGGGTATGACACGC	
wxreR	GTGAGCCGCATGATGTTGTC	

1.2 新材料创制

根据序列信息,利用软件 CRISPR-P2.0(<http://cbi.hzau.edu.cn/crispr/>)设计靶点序列。合成相应的引物,用重复叠加法(Overlapping PCR)构建 sgRNA 表达盒;将 4 个表达盒一起插入 pYLCRISPR/Cas9Pubi-H,构建编辑载体^[27]。通过农杆菌介导的遗传转化法将载体导入吉丰 B。在 T₁ 代苗期,利用潮霉素引物(HptF/HptR)扩增筛选,获得无潮霉素基因单株;再用引物(wxF/wxR)扩增测序,扩增编码

区上游区段,筛选出纯合变异株系。

1.3 qRT-PCR 分析

田间标记抽穗日期,抽穗后 14 d,取水稻籽粒,液氮保存。使用 Trizol 提取种子总 RNA;用反转录试剂盒进行反转录获得第一链 cDNA;以 cDNA 为模板,EF1 α 基因为内源参照基因,使用荧光定量 PCR 试剂盒进行基因表达分析。

1.4 直链淀粉含量、胶稠度和食味品质测定

无筛选标记的纯合变异株系和野生型,完全

成熟后收获种子,烘干并存放 3 个月以上,待理化性质稳定后,参照国家标准 GB/T 15683-2008、GB/T 22294-2008 和 GB/T 15682-2008,由广东省质量监督粮油检验站测定直链淀粉含量、胶稠度和食味品质。

1.5 粗脂肪含量测定

粗脂肪含量的测定采用索氏抽提法。精密称取烘干后的米粉、干燥至恒重的接收瓶重量,记为 m_2 、 m_0 ,将米样放入滤纸筒,再放入索氏抽提器,连接干燥后的接受瓶,加入石油醚至瓶内容积的 2/3 处,水浴加热,使石油醚不断回流提取,抽提 8 h;结束后,取下接受瓶,回收石油醚,待接受瓶内石油醚剩 1~2 mL 时在水浴上蒸干,再于 95~105 ℃ 干燥 2 h,放干燥器内冷却 0.5 h,精密称重,重量记为

m_1 ,利用公式粗脂肪含量 = $(m_1 - m_0) / m_2 \times 100\%$ 计算粗脂肪含量,3 次重复,取平均值作为最终结果。

2 结果与分析

2.1 变异材料创制

参考日本晴基因组设计引物 wxF/wxR (表 1),以吉丰 B 基因组 DNA 为模板,扩增 *Wx* 基因编码区上游片段并测序。根据测序结果,利用软件 CRISPR-P2.0,在这个区段设计 4 个编辑靶点 (E1~E4),具体位置见图 1。构建编辑载体,通过农杆菌介导的遗传转化方法导入受体品种吉丰 B,获得 9 个转基因株系 (L1~L9)。

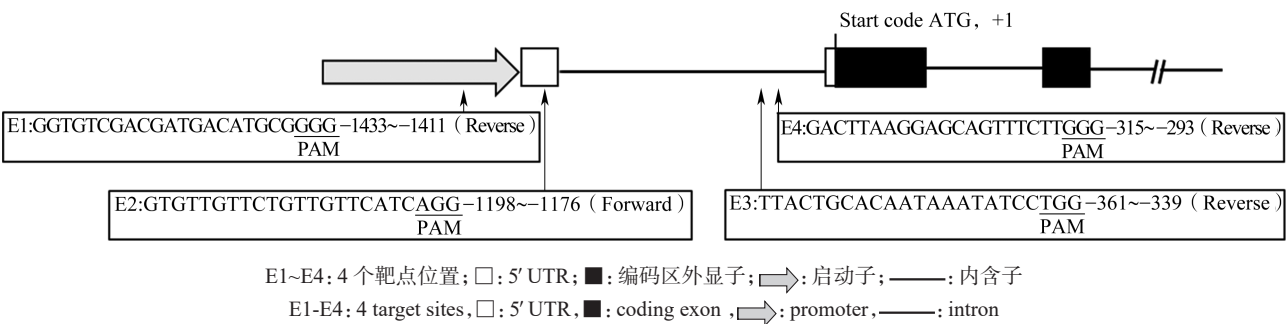
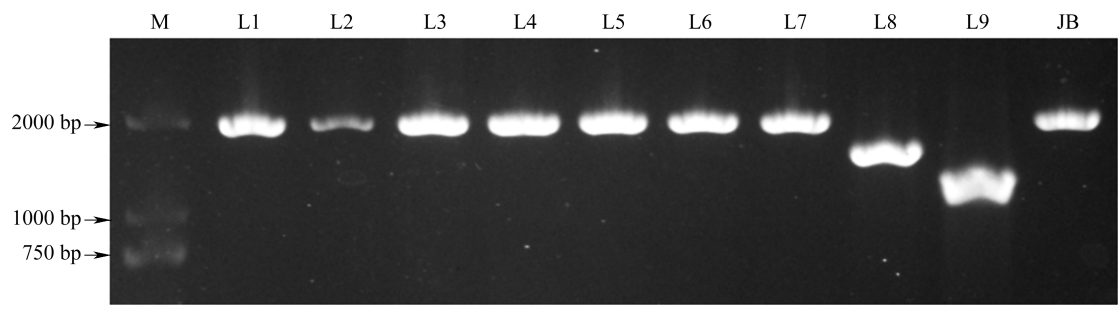


图 1 靶点序列与位置信息
Fig.1 Target sequences and target sites information

2.2 变异类型分析

T_1 代苗期,筛选无潮霉素基因单株,再用引物 wxF/wxR 扩增无潮霉素基因单株的 DNA。结果显示,在 9 个转基因株系中,检测到两个株系 (L8 和 L9) 的扩增产物明显变短 (图 2)。根据扩增产物测序结果,共筛选到 9 个纯合变异株系 L1~L9,其中 L2~L7 株系中的变异均为小片段变异,主要是 guide

RNA 引发的剪切位点附近发生了碱基缺失 (表 2)。L1 株系的 E3 靶点和 E4 靶点间区段发生缺失。L8 株系发生了两个较大片段的缺失:(1) E1 和 E2 靶点间区段缺失,(2) E4 上游区段缺失;L9 株系的 E2 和 E4 靶点间区段发生缺失变异,导致 *Wx* 基因 5' UTR 的 3' 端和第一内含子 5' 端发生大片段缺失变异 (图 3)。



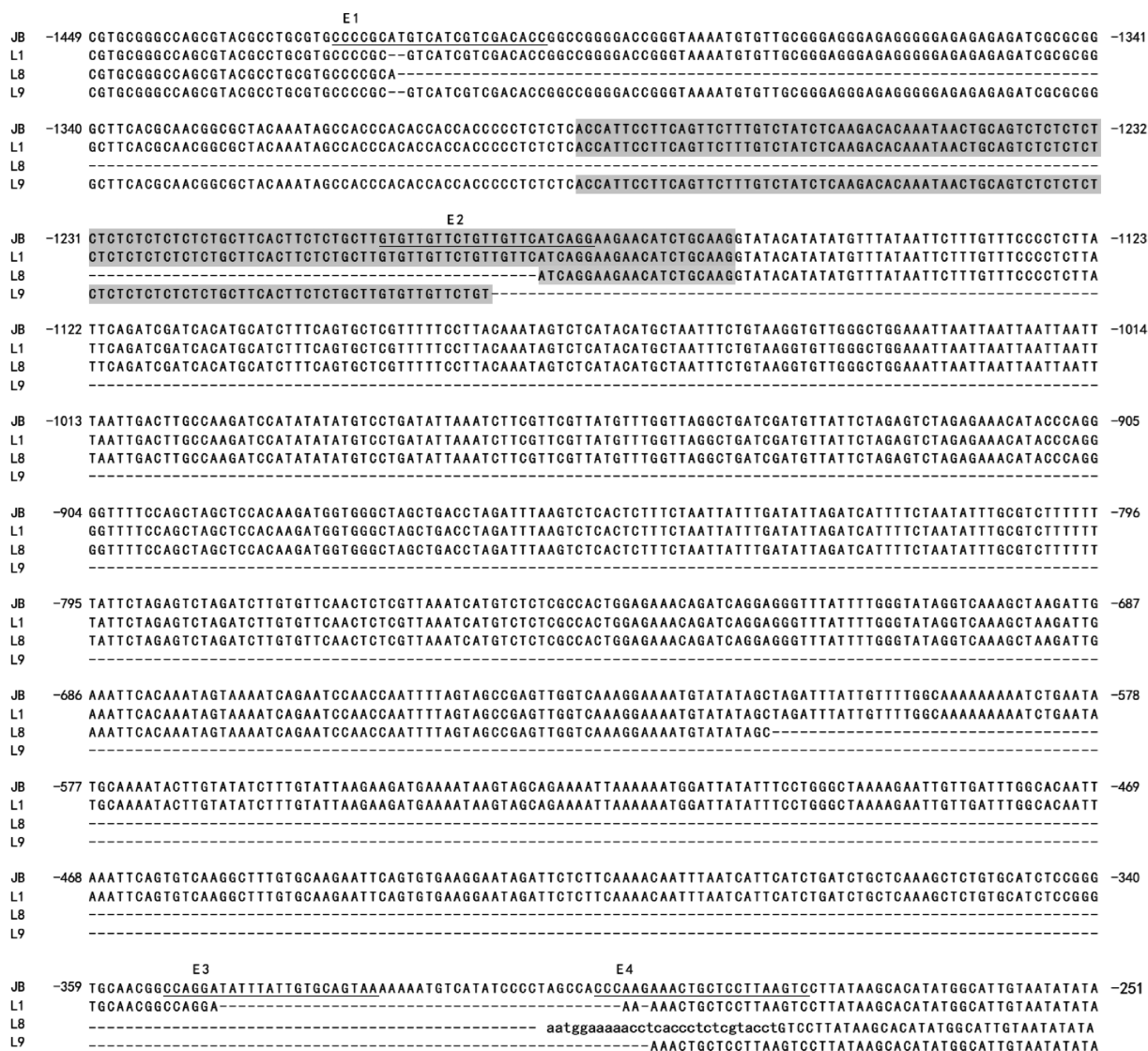
M: DL2000; JB: 野生型吉丰 B; L1~L9: 9 个纯合变异后代
M: DNA marker DL2000, JB: the wild type of Jifeng B, L1-L9: 9 transgenic lines

图 2 转基因后代的 PCR 扩增结果
Fig.2 PCR result of transgenic lines

Table 2 Results of mutation analysis of L2-L7

株系	E1 靶点	E2 靶点	E3 靶点	E4 靶点
Line	E1 target sequence	E2 target sequence	E3 target sequence	E4 target sequence
JB	CCCCGCATGTCATCGTCGACACC	GTGTTGTTCTGTTGTTTCATCAGG	CCAGGATAATTATTGTGCAGTAA	CCCAAGAAACTGCTCCTTAAGTC
L2	CCCCGC-TGTCATCGTCGACACC	GTGTTGTTCTGT- --- -ATCAGG	CCAGG- -ATTATTTGTGCAGTAA	CCCAAG- -tCTGCTCCTTAAGTC
L3	CCCCGCA- -TCATCGTCGACACC	GTGTTGTTCTGTT- --- -ATCAGG	CCAGG- -ATTATTTGTGCAGTAA	CCCAAG- - ---- -TCCTTAAGTC
L4	CCCCGC-TGTCATCGTCGACACC	GTGTTGTTCTGTTGTTTCATCAGG	CCAGGATAATTATTGTGCAGTAA	CCCA- -AAACTGCTCCTTAAGTC
L5	CCCCGCA- -TCATCGTCGACACC	GTGTTGTTCTGTT- --- -ATCAGG	CCAGG- -ATTATTTGTGCAGTAA	CCCAAG- - ---- -TCCTTAAGTC
L6	CCCCGC-TGTCATCGTCGACACC	GTGTTGTTCTGTTG- - -ATCAGG	CCAGG- -ATTATTTGTGCAGTAA	CCCAAG- -ACTGCTCCTTAAGTC
L7	CCCCGC-TGTCATCGTCGACACC	GTGTTGTTCTGTTGT- -ATCAGG	CCAGGA-ATTATTTGTGCAGTAA	CCCAAG- - ---- -TCCTTAAGTC

Lowercase letters indicate inserted base, - indicates deletion of nucleotide from corresponding site, the same as below



The shadow indicates 5' UTR, the underscore indicates the target sequence

Fig.3 Sequence alignment of L1, L8 and L9

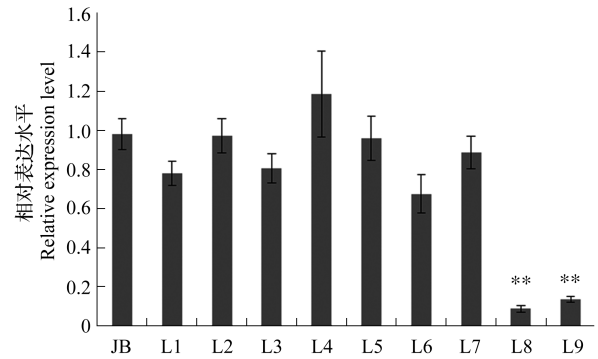
2.3 序列变异对 *Wx* 基因表达的影响

本研究中对 *Wx* 基因的编码区上游区段进行编辑,推测变异会影响 *Wx* 基因的转录。基因表达分析和直链淀粉含量测定结果表明:扬花后两周,直链淀粉含量基本稳定, *Wx* 基因表达水平较高^[28-29]。于扬花后两周取种子进行 *Wx* 基因表达量分析,结果表明 L8 和 L9 株系的 *Wx* 基因表达量极显著下降(分别是野生型吉丰 B 的 8.9% 和 13.8%),其他变异株系 *Wx* 基因的表达变化幅度较小(图 4)。

2.4 变异后代种子的相关性状分析

参照已有的 *Wx* 基因表达研究结果,只有 *Wx* 表达水平明显下降时,直链淀粉含量才会下调^[14]。根据 *Wx* 基因表达分析结果,选取 3 个变异株系(L6、L8、L9)进行后续分析。L6 和 L9 的糙米外观与粘米类似,横断面呈半透明状,与吉丰 B 相近。L8 的糙米外观呈现乳白色,横断面不透明,与糯米类似(图 5A)。以吉丰 B 为对照,L8 和 L9 的直链淀粉含量均极显著下降,分别下调至 10.3% 和 8.2% (图 5B); L8 和 L9 的胶稠度极显著上调,分别上调

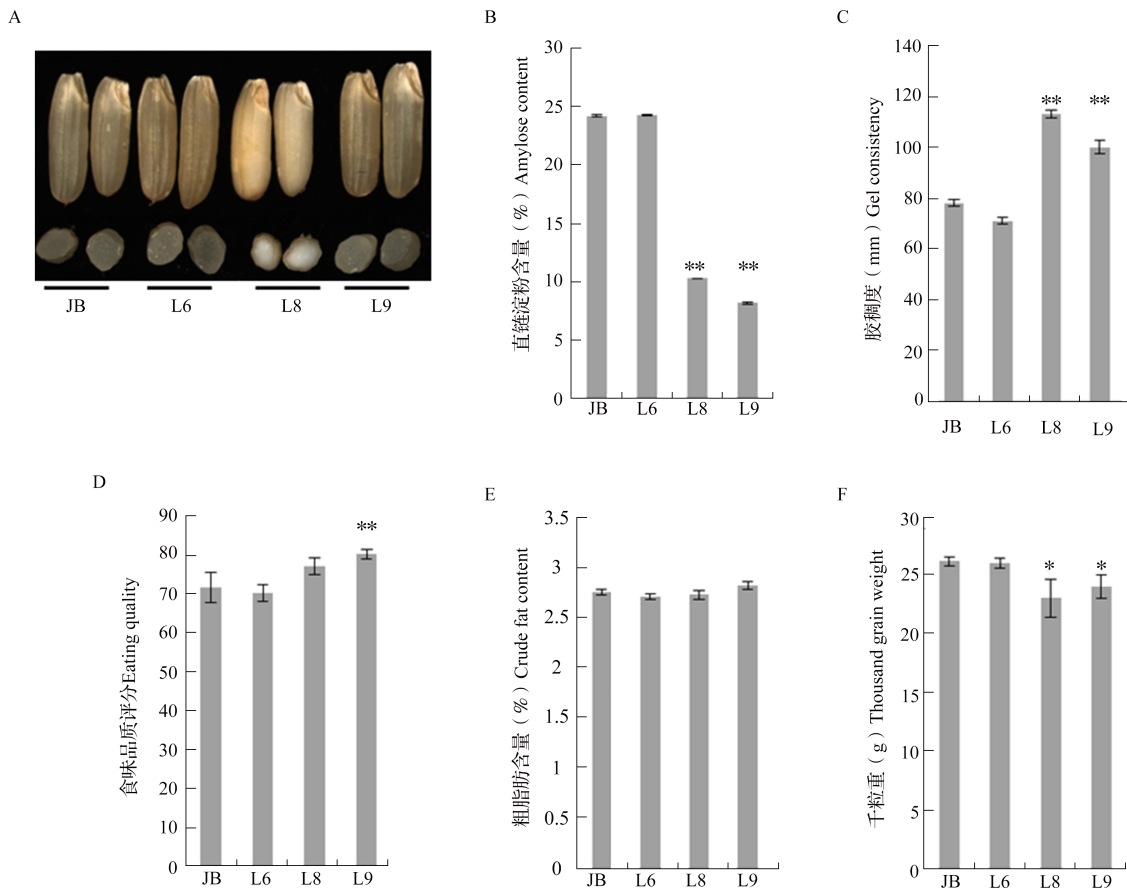
至 113 mm 和 100 mm (图 5C); L9 的食味品质极显著上调(图 5D),与吉丰 B 相比,上调了 8.6 分,表明通过编辑 *Wx* 基因编码区上游序列可以改善稻米品质。此外,变异后代的粗脂肪含量差异不显著(图 5E),暗示 *Wx* 基因可能不直接影响脂肪代谢; L8、L9 的千粒重显著低于吉丰 B 野生型,分别下降了 11.9% 和 8.3% (图 5F),暗示 *Wx* 基因可能对籽粒灌浆有影响。



** 表示在 $P < 0.01$ 水平上差异极显著,下同
** indicates extremely significant difference at $P < 0.01$, the same as below

图 4 *Wx* 基因表达分析

Fig.4 Expression analysis of *Wx* gene



* 表示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著

* indicates significant difference at $P < 0.05$

图 5 L6、L8 和 L9 的种子外观、米质性状与千粒重

Fig.5 Grain appearance, grain quality and thousand grain weight in L6, L8 and L9

3 讨论

稻米可食用部分主要由直链淀粉和支链淀粉构成,二者的相互比值是影响稻米品质的关键因素,直链淀粉含量是反映这一比值的常用参数。大多数籼稻材料的直链淀粉含量偏高,改良直链淀粉含量是籼稻育种的重要目标之一。本研究以杂交稻保持系吉丰 B 为受体,利用 CRISPR/Cas9 系统进行编辑,期望通过改变编码区上游序列,降低 *Wx* 基因的表达水平,进而降低直链淀粉含量,既能改良米质,又可获得新型水稻种质。

本研究中设计了 4 个靶点, E1 位于启动子区, E2 位于 5' UTR, E3 和 E4 位于第一内含子。通过转基因,最终得到 2 个大片段缺失株系, L8 和 L9; 它们的 *Wx* 基因表达水平大幅下降,直链淀粉含量也极显著下调。L8 和 L9 株系的 *Wx* 基因表达水平的下降幅度远大于直链淀粉含量下降幅度,类似现象在前人结果中也有报道^[14],说明在高直链淀粉含量材料中, *Wx* 基因的转录水平不是直链淀粉含量的限制因素,水稻中存在其他因素影响直链淀粉含量。

L9 株系中, *Wx* 基因的 5' UTR 的 3' 端和第一内含子 5' 端发生了缺失,其 RNA 水平明显下降,直链淀粉含量也下降至 8.2%; 前人利用附近的另一个靶点进行编辑得到类似结果^[14],这表明破坏第一内含子的 5' 端的剪切位点可能是改良直链淀粉含量的一个捷径。同时发现, L9 的多项品质指标都有改善,与软米材料类似^[5,30]。粳稻软米系列(半糯型)品种的食味品质好,已累计推广超过 40000 hm²^[31]。通过基因编辑方法创制籼稻软米品种的研究报道还较少, L9 作为籼稻软米材料,可以直接与吉丰 A 进行回交转育,有望培育成软米型三系不育系。但其育种价值和市场应用前景,尚有待进一步研究。

L8 株系中, *Wx* 基因的 5' UTR 大片段缺失,第一内含子两端剪切位点并未发生变异;推测其 RNA 水平下降可能是 5' UTR 变异引起的。*Wx* 基因的 5' UTR 可能控制 mRNA 的加工或稳定性,进而影响直链淀粉含量。一般来说,糙米的透明度与直链淀粉含量呈负相关^[32]。与吉丰 B 相比, L8 的 *Wx* 基因表达水平极显著下降,直链淀粉含量(10.3%)与软米类似^[5,30],糙米外观却与糯稻类似;与同步实验的 L9 相比,二者直链淀粉含量相近,但外观明显不同,造成这种现象的深层原因,值得进一步

研究。

启动子区通常存在多个同类顺式元件,这些元件在转录调控过程中发挥相似作用。通过单个靶点进行编辑难以同时破坏这些顺式元件的功能,通过多个靶点同时作用,创制大片段缺失变异可以删除部分区段,这对改良育种有重要意义^[25,33]。然而这种删除的效率不高,本研究中 L8 和 L9 株系均发生了这种类型的删除事件,这为后续相关研究提供了重要参考。

参考文献

- [1] 朱昌兰,沈文彪,翟虎渠,万建民. 水稻低直链淀粉含量基因育种利用的研究进展. 中国农业科学, 2004, 37(2): 157-162
Zhu C L, Shen W B, Zhai H Q, Wan J M. Advances in research of the application of low-amylose content rice gene for breeding. Scientia Agricultura Sinica, 2004, 37(2): 157-162
- [2] 陈智慧,王芳权,许扬,王军,李文奇,范方军,仲维功,杨杰. 软米基因 *Wx-mp* 在部分粳稻品种资源中的分布. 植物遗传资源学报, 2019, 20(4): 975-981
Chen Z H, Wang F Q, Xu Y, Wang J, Li W Q, Fan F J, Zhong W G, Yang J. The distribution of low amylose content allele *Wx-mp* in japonica rice. Journal of Plant Genetic Resources, 2019, 20(4): 975-981
- [3] Yang J, Wang J, Fan F J, Zhu J Y, Chen T, Wang C L, Zheng T Q, Zhang J, Zhong W G, Xu J L. Development of AS-PCR marker based on a key mutation confirmed by resequencing of *Wx-mp* in Milky Princess and its application in japonica soft rice (*Oryza sativa* L.). Plant Breeding, 2013, 132(6): 595-603
- [4] Sato H, Suzuki Y, Sakai M, Imbe T. Molecular characterization of *Wx-mq*, a novel mutant gene for low-amylose content in endosperm of rice (*Oryza sativa* L.). Breeding Science, 2002, 52(2): 131-135
- [5] 赵春芳,岳红亮,黄双杰,周丽慧,赵凌,张亚东,陈涛,朱镇,赵庆勇,姚姝,梁文化,路凯,王才林. 南粳系列水稻品种的食味品质与稻米理化特性. 中国农业科学, 2019, 52(5): 909-920
Zhao C F, Yue H L, Huang S J, Zhou L H, Zhao L, Zhang Y D, Chen T, Zhu Z, Zhao Q Y, Yao S, Liang W H, Lu K, Wang C L. Eating quality and physicochemical properties in Nanjing rice varieties. Scientia Agricultura Sinica, 2019, 52(5): 909-920
- [6] 陈丹,汤翠凤,董超,甘树仙,李俊,阿新祥,张斐斐,杨雅云,牛赛赛,戴陆园. 云南软米地方品种籽粒淀粉品质特性研究. 浙江农业学报, 2021, 33(2): 203-214
Chen D, Tang C F, Dong C, Gan S X, Li J, A X X, Zhang F F, Yang Y Y, Niu S S, Dai L Y. Grain starch quality characteristics of yunnan soft rice landraces. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2021, 33(2): 203-214
- [7] 陈能,罗玉坤,朱智伟,谢黎虹. 食用稻米米饭质地及适口性的研究. 中国水稻科学, 1999, 13(3): 152-156
Chen N, Luo Y K, Zhu Z W, Xie L H. Studies on the texture and palatability of cooked rice. Chinese Journal of Rice Science, 1999, 13(3): 152-156
- [8] 杨勇,陆彦,郭淑青,石仲慧,赵杰,范晓磊,李钱峰,刘巧泉,

- 张昌泉. 籼稻背景下导入 *Wxⁱⁿ* 等位基因改良稻米食味和理化品质. 作物学报, 2019, 45(11): 1628-1637
- Yang Y, Lu Y, Guo S Q, Shi Z H, Zhao J, Fan X L, Li Q F, Liu Q Q, Zhang C Q. Improvement of rice eating quality and phsicochemical properties by introgression of *Wxⁱⁿ* allele in indica varieties. Acta Agronomica Sinica, 2019, 45(11): 1628-1637
- [9] Wang Z Y, Zheng F Q, Shen G Z, Gao J P, Snustad D P, Li M G, Zhang J L, Hong M M. The amylose content in rice endosperm is related to the post-transcriptional regulation of the waxy gene. Plant Journal, 1995, 7(4): 613-622
- [10] 黄李春, 顾正文, 谈红艳, 赵微, 肖颖, 储睿, 范晓磊, 张昌泉, 李钱峰, 刘巧泉. CRISPR/Cas9 技术编辑 *Wx* 基因创制新型糯稻种质. 植物遗传资源学报, 2021, 22(3): 789-799
- Huang L C, Gu Z W, Tan H Y, Zhao W, Xiao Y, Chu R, Fan X L, Zhang C Q, Li Q F, Liu Q Q. Creating novel glutinous rice germplasms by editing *Wx* gene via CRISPR/Cas9 technology. Journal of Plant Genetic Resources, 2021, 22(3): 789-799
- [11] Isshiki M, Morino K, Nakajima M, Okagaki R J, Wessler S R, Izawa T, Shimamoto K. A naturally occurring functional allele of the rice waxy locus has a GT to TT mutation at the 5' splice site of the first intron. The Plant Journal, 1998, 15(1): 133-138
- [12] 蔡秀玲, 刘巧泉, 汤述翥, 顾铭洪, 王宗阳. 用于筛选直链淀粉含量为中等的籼稻品种的分子标记. 植物生理与分子生物学学报, 2002, 28(2): 137-144
- Cai X L, Liu Q Q, Tang S Z, Gu M H, Wang Z Y. Development of a molecular marker for screening the tice cultivars with intermediate amylose content in *Oryza sativa* subsp. *indica*. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2002, 28(2): 137-144
- [13] Huang L, Li Q, Zhang C, Chu R, Gu Z, Tan H, Zhao D, Fan X, Liu Q. Creating novel *Wx* alleles with fine-tuned amylose levels and improved grain quality in rice by promoter editing using CRISPR/Cas9 system. Plant Biotechnology Journal, 2020, 18(11): 2164-2166
- [14] Zeng D, Liu T, Ma X, Wang B, Zheng Z, Zhang Y, Xie X, Yang B, Zhao Z, Zhu Q, Liu Y G. Quantitative regulation of *Waxy* expression by CRISPR/Cas9-based promoter and 5'UTR-intron editing improves grain quality in rice. Plant Biotechnology Journal, 2020, 18(12): 2385-2387
- [15] 徐善斌, 郑洪亮, 刘利峰, 卜庆云, 李秀峰, 邹德堂. 利用 CRISPR/Cas9 技术高效创制长粒香型水稻. 中国水稻科学, 2020, 34(5): 1-10
- Xu S B, Zheng H L, Liu L F, Bu Q Y, Li X F, Zou D T. Improvement of grain shape and fragrance by using CRISPR/Cas9 system. Chinese Journal of Rice Science, 2020, 34(5): 1-10
- [16] Mao X, Zhang J, Liu W, Yan S, Liu Q, Fu H, Zhao J, Huang W, Dong J, Zhang S, Yang T, Yang W, Liu B, Wang F. The MKKK62-MKK3-MAPK7/14 module negatively regulates seed dormancy in rice. Rice, 2019, 12(1): 2
- [17] Ma X, Zhang Q, Zhu Q, Liu W, Chen Y, Qiu R, Wang B, Yang Z, Li H, Lin Y, Xie Y, Shen R, Chen S, Wang Z, Chen Y, Guo J, Chen L, Zhao X, Dong Z, Liu Y G. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. Molecular Plant, 2015, 8(8): 1274-1284
- [18] Shan Q, Zhang Y, Chen K, Zhang K, Gao C. Creation of fragrant rice by targeted knockout of the *OsBADH2* gene using TALEN technology. Plant Biotechnology Journal, 2015, 13(6): 791-800
- [19] 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
- [20] 张翔, 史亚兴, 卢柏山, 武莹, 刘亚, 王元东, 杨进孝, 赵久然. 利用 CRISPR/Cas9 技术编辑 *BADH2-1/BADH2-2* 创制香味味道玉米新种质. 中国农业科学, 2021, 54(10): 2064-2075
- Zhang X, Shi Y X, Lu B S, Wu Y, Liu Y, Wang Y D, Yang J X, Zhao J R. Creation of new maize variety with fragrant rice like flavor by editing *BADH2-1* and *BADH2-2* using CRISPR/Cas9. Scientia Agricultura Sinica, 2021, 54(10): 2064-2075
- [21] 王超凡, 张大健. 基因编辑技术在大豆种质资源研究中的利用. 植物遗传资源学报, 2020, 21(1): 26-32
- Wang C F, Zhang D J. Application of gene editing in studies of soybean germplasm resources. Journal of Plant Genetic Resource, 2020, 21(1): 26-32
- [22] 郝巍, 纪志远, 郑凯丽, 孙宏达, 王福军, 唐永超, 张明伟, 赵开军, 王春连. 利用基因组编辑技术创制水稻白叶枯病抗性材料. 植物遗传资源学报, 2018, 19(3): 523-530
- Hao W, Ji Z Y, Zheng K L, Sun H D, Wang F J, Tang Y C, Zhang M W, Zhao K J, Wang C L. Enhancing rice resistance to bacterial blight by genome editing. Journal of Plant Genetic Resources, 2018, 19(3): 523-530
- [23] 邵高能, 谢黎虹, 焦桂爱, 魏祥进, 圣忠华, 唐绍清, 胡培松. 利用 CRISPR/CAS9 技术编辑水稻香味基因 *Badh2*. 中国水稻科学, 2017, 31(2): 216-222
- Shao G N, Xie L H, Jiao G A, Wei X J, Sheng Z H, Tang S Q, Hu P S. CRISPR/CAS9-mediated editing of the fragrant gene *Badh2* in rice. Chinese Journal of Rice Science, 2017, 31(2): 216-222
- [24] Schwartz C, Lenderts B, Feigenbutz L, Barone P, Llaca V, Fengler K, Svitashv S. CRISPR-Cas9-mediated 75.5-Mb inversion in maize. Nature Plants, 2020, 6(12): 1427-1431
- [25] 谢先荣, 曾栋昌, 谭健韬, 祝钦洸, 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. Chinese Bulletin of Botany, 2021, 56(1): 44-49
- [26] 李金华, 廖亦龙, 王丰, 柳武革, 朱满山, 刘振荣, 刘迪林, 付崇允, 曾学勤, 黄慧君. 高产抗病杂交水稻新组合吉丰优 512. 杂交水稻, 2014, 29(2): 91-92
- Li J H, Liao Y L, Wang F, Liu W G, Zhu M S, Liu Z R, Liu D L, Fu C Y, Zeng X Q, Huang H J. Jifengyou 512, a new hybrid rice combination with high yield and blast resistance. Hybrid Rice, 2014, 29(2): 91-92
- [27] 曾栋昌, 马兴亮, 谢先荣, 祝钦洸, 刘耀光. 植物 CRISPR/Cas9 多基因编辑载体构建和突变分析的操作方法. 中国科学: 生命科学, 2018, 48(7): 783-794 (转下页)

- Zeng D C, Ma X L, Xie X R, Zhu Q L, Liu Y G. A protocol for CRISPR/Cas9-based multi-gene editing and sequence decoding of mutant sites in plants. *Scientia Sinica Vitae*, 2018, 48(7): 783-794
- [28] 何秀英, 吴东辉, 伍时照, 甄海. 水稻直链淀粉形成积累动态的研究. *华南农业大学学报*, 2003, 24(3): 9-12
- He X Y, Wu D H, Wu S Z, Zhen H. Studies on the formation and accumulation of amylose content in rice. *Journal of South China Agricultural University*, 2003, 24(3): 9-12
- [29] Sato Y, Takehisa H, Kamatsuki K, Minami H, Namiki N, Ikawa H, Ohyanagi H, Sugimoto K, Antonio B A, Nagamura Y. RiceXPro version 3.0: expanding the informatics resource for rice transcriptome. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41: D1206-D1213
- [30] 于梅梅, 陶权丹, 华杰, 王时超, 计文, 刘岩, 刘康伟, 张建祥, 于恒秀. 香软米水稻的研究进展. *江苏农业科学*, 2019, 47(10): 11-15
- Yu M M, Tao Q D, Hua J, Wang S C, Ji W, Liu Y, Liu K W, Zhang J X, Yu H X. Research progress on fragrant and soft rice. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2019, 47(10): 11-15
- [31] 姚姝, 张亚东, 刘燕清, 赵春芳, 周丽慧, 陈涛, 赵庆勇, 朱镇, Balakrishna Pillay, 王才林. 水稻 *Wx^{mp}* 背景下 *SS IIa* 和 *SS IIIa* 等位变异及其互作对蒸煮食味品质的影响. *作物学报*, 2020, 46(11): 1690-1702
- Yao S, Zhang Y D, Liu Y Q, Zhao C F, Zhou L H, Chen T, Zhao Q Y, Zhu Z, Pillay B, Wang C L. Effects of *SS IIa* and *SS IIIa* alleles and their interaction on eating and cooking quality under *Wx^{mp}* background of rice. *Acta Agronomica Sinica*, 2020, 46(11): 1690-1702
- [32] Li Q F, Huang L C, Chu R, Li J, Jiang M Y, Zhang C Q, Fan X L, Yu H X, Gu M H, Liu Q Q. Down-regulation of *SSSII-2* gene expression results in novel low-amylose rice with soft, transparent grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(37): 9750-9760
- [33] Zhang Y, Massel K, Godwin I D, Gao C. Applications and potential of genome editing in crop improvement. *Genome Biology*, 2018, 19(1): 210