

CRISPR/Cas9 编辑 *GS3* 和 *qGL3* 基因创制大粒水稻新种质

赵春芳, 梁文化, 赫 磊, 姚 姝, 赵 凌, 周丽慧, 赵庆勇,
陈 涛, 朱 镇, 路 凯, 王才林, 张亚东

(江苏省农业科学院粮食作物研究所 / 国家耐盐碱水稻技术创新中心华东中心 / 江苏省优质水稻工程技术研究中心, 南京 210014)

摘要: CRISPR/Cas9 基因编辑技术已成为植物新种质创制和性状定向改良的重要手段。*GS3* 和 *qGL3* 是调控水稻籽粒伸长的主效基因, 功能缺失后产生大粒表型。本研究拟以小粒型粳稻品种南粳 5055 为试验材料, 对 *GS3* 和 *qGL3* 基因进行编辑, 以期获得能稳定遗传的大粒水稻新种质。利用 CRISPR/Cas9 系统构建了分别携带 *GS3*-gRNA 和 *qGL3*-gRNA 双靶点的 *pYLCRISPR/Cas9* 编辑载体, 通过农杆菌介导的遗传转化法, 成功获得了 *GS3* 和 *qGL3* 基因编辑植株, 编辑效率分别为 90.0% 和 88.9%。与南粳 5055 相比, *GS3* 编辑植株在 T_2 、 T_3 世代中平均粒长增幅约 9.0%, 千粒重增幅平均为 12.7%, 每穗粒数降低约 9.3%, 穗数、穗长、结实率和单株产量差异不明显; *qGL3* 编辑植株的粒长增幅约 21.0%, 千粒重增幅平均为 31.7%, 每穗粒数降低约 31.5%, 且穗数表现出增加而结实率表现降低趋势, 而穗长和单株产量差异不明显。*qGL3* 基因对粒形和粒重的贡献明显大于 *GS3*。综上所述, 通过 CRISPR/Cas9 技术编辑南粳 5055 的 *GS3* 和 *qGL3* 基因, 获得了一系列大粒水稻新种质, 该结果为水稻粒形改良研究提供了重要参考。

关键词: 水稻; 粒形; *GS3*; *qGL3*; CRISPR/Cas9

Creating Novel Rice Germplasms with Enlarged Grain Size by Editing *GS3* and *qGL3* Genes via CRISPR/Cas9

ZHAO Chun-fang, LIANG Wen-hua, HE Lei, YAO Shu, ZHAO Ling,
ZHOU Li-hui, ZHAO Qing-yong, CHEN Tao, ZHU Zhen,
LU Kai, WANG Cai-lin, ZHANG Ya-dong

(Institute of Food Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/East China Branch of National Center of Technology Innovation
for Saline-Alkali Tolerant Rice/Jiangsu High Quality Rice Research and Development Center, Nanjing 210014)

Abstract: CRISPR/Cas9-guided gene editing technology has become a popular and precision strategy in innovation of new plant germplasms and directional improvement of agronomic traits. The *GS3* and *qGL3* genes are the major regulating factors contributing rice grain elongation, and loss-of-function mutants result in enlarged grain size. To obtain new inheritable large grain rice germplasms, this study deployed CRISPR/Cas9 genome editing technology to edit *GS3* and *qGL3* genes in the *japonica* rice variety Nanjing 5055 showing small grain shape. Through agrobacterium-mediated genetic transformation of *pYLCRISPR/Cas9* editing vector that carries *GS3*-gRNA and *qGL3*-gRNA, we obtained the *GS3*- and *qGL3*-edited plants, with the editing efficiency of 90.0% and 88.9%, respectively. In comparison with the wild-type Nanjing 5055, the *GS3*-edited lines showed about 9.0% increase on grain length, 12.5% increase on 1000-grain weight, as well as about 9.3% decrease on grain number

收稿日期: 2022-04-19 修回日期: 2022-05-05 网络出版日期: 2022-06-10

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20220419006>

第一作者研究方向为水稻遗传育种, E-mail: czhao@jaas.ac.cn

通信作者: 张亚东, 研究方向为水稻遗传育种, E-mail: zhangyd@jaas.ac.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (31771761); 江苏省重点研发计划 (BE2019339); 现代农业产业技术体系 (CARS-01)

Foundation projects: The National Natural Science Foundation (31771761); The Key Research and Development Programs of Jiangsu Province (BE2019339); The Modern Agricultural Industry Technology System (CARS-01)

per panicle from the analysis of average values of T_2 and T_3 generations. Interestingly, there was no significant difference in panicle number, panicle length, seed setting rate and yield per plant. For *qGL3*-edited lines, ca. 21.0% and 31.7% increases on grain length and 1000-grain weight, respectively, and ca. 31.5% decrease on grain number per panicle were observed. An increase on panicle number and a decrease on seed setting rate in *qGL3* edited lines were detected if compared to those of Nanjing 5055, while no differences on panicle length and yield per plant were found. The contribution of *qGL3* gene to grain shape and grain weight was significantly greater than those of *GS3*. Collectively, this study identified a series of new rice germplasms with enlarged grain size via genome editing of the *GS3* and *qGL3* genes in Nanjing 5055, which might have significant implications for grain size improvement in rice.

Key words: *Oryza sativa* L.; grain size; *GS3*; *qGL3*; CRISPR/Cas9

我国是世界上最大的稻米生产国和消费国,水稻年种植面积 0.3 亿 hm^2 左右,年产稻谷 1.95 亿吨左右,占全国粮食总产的 40% 左右,水稻生产在我国粮食安全中的地位至关重要。水稻产量是一个复杂的农艺性状,由穗数、每穗粒数、结实率和千粒重决定,其中千粒重的遗传最稳定,变异系数为 40%~60%,国际水稻研究所研究证实,增加粒重可使水稻产量提高 30% 以上,是提高产量的最有效途径^[1-2]。

水稻的粒重由粒形(粒长、粒宽、粒厚)决定,是由多基因控制的数量性状,截止目前,已有 60 多个粒形调控基因被克隆^[3-5],如 *TGW6*、*GS3*、*GW2*、*GS5*、*qSW5/GW5*、*GW8/SPL16*、*GL3.1/qGL3/qGL3-1*、*GIF1*、*EP2/DEP2/SRS1*、*FLO(a)/FLO2* 等。这些基因通过调控细胞增殖和细胞扩展来决定籽粒大小,功能涉及到植物激素、G 蛋白信号、MAPK 信号、表观修饰等信号转导途径^[6-7]。粒形基因的克隆为水稻分子设计育种提供了基因资源,对指导水稻高产育种具有重要意义^[8-9]。

GS3 和 *qGL3* 是两个负调控粒长和粒重的主效基因。*GS3* 编码 1 个由 232 个氨基酸组成的跨膜蛋白,通过 G 蛋白偶联信号转导途径调控水稻粒形,该基因功能缺失促使籽粒变长^[10-11]。*GL3.1/qGL3/qGL3-1* 编码含有两个 Kelch 功能域的蛋白磷酸酶 OsPPKL1,参与油菜素内酯(BR)信号转导途径,负调控水稻粒长,功能缺失基因型表现超大粒^[12-13]。*GS3* 大粒基因型普遍存在于长粒籼稻品种中,在粳稻品种中很少^[11];而 *qGL3* 大粒基因型来源于大粒种质的一个稀有突变,在一般栽培品种中不存在^[13]。近年来,CRISPR/Cas9 基因编辑技术已经成为水稻育种界的新型手段,相比传统回交育种,该技术不仅克服了周期长、费时耗力等问题,而且避免了不利基因的连锁累赘。水稻中已有很

多通过基因编辑技术进行粒形或产量相关性状的案例^[14-18],*GS3* 和 *qGL3* 的遗传效应曾借助 RIL 群体进行了比较,但是由于遗传背景不一致,表型性状存在较大差异^[19-20]。目前尚未有在同一背景材料中对 *GS3* 和 *qGL3* 敲除植株的粒形进行比较的报道。

南粳 5055 是江苏省农业科学院粮食作物研究所育成的一个优良食味粳稻品种^[21],该品种食味品质优异,综合性状较好,但籽粒小呈短圆型,千粒重低,仅 23 g 左右。本研究以长粒形基因 *GS3* 和 *qGL3* 为目标基因,通过构建 CRISPR/Cas9 编辑载体,在南粳 5055 背景下分别对其进行敲除,以期获得粒形和粒重改良的优良食味粳稻新种质,并评价 *GS3* 和 *qGL3* 基因的遗传效应。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究以优良食味粳稻品种南粳 5055 为遗传转化受体,开展基因编辑试验。转基因植株及受体均种植于江苏省农业科学院人工气候室内。试验所用载体 pYL-U3-gRNA、pYL-U6a-gRNA 和 pYLCRISPR/Cas9Pubi-H 由华南农业大学刘耀光院士惠赠。

1.2 gRNA 靶点设计与 CRISPR/Cas9 编辑载体构建

通过 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获得 *GS3* (Os03g0407400) 和 *qGL3* (Os09g0448500) 的基因组和 CDS 序列,利用 CRISPR-GE 在线网站 (<http://skl.scau.edu.cn/>),在 *GS3* 和 *qGL3* 的第 1 外显子处各设计 U3 和 U6 两对靶点接头引物:*GS3*-U3-F/R、*GS3*-U6a-F/R、*qGL3*-U3-F/R、*qGL3*-U6a-F/R (表 1)。利用软件 CRISPR Primer Designer^[22],与水稻测序基因组进行比对,检测靶点的特异性,避免脱靶效应。

表 1 本研究中所用引物
Table 1 Primers used in this study

名称 Name	序列 (5' -3') Sequence (5' -3')	用途 Purpose
GS3-U3-F	GGCAGCTGCCTCAGCTACCTCTCC	gRNA 接头
GS3-U3-R	AAACGGAGAGGTAGCTGAGGCAGC	
GS3-U6a-F	GCCGTTGCAGTTGCAGCAGCAGCT	
GS3-U6a-R	AAACAGCTGCTGCTGCAACTGCAA	gRNA 接头
qGL3-U3-F	GGCACTCCCGCATGACGACGGAGT	
qGL3-U3-R	AAACACTCCGTCGTCATGCGGGAG	
qGL3-U6a-F	GCCGCAGCGCTGTGATCGAGAAGA	gRNA 接头
qGL3-U6a-R	AAACTCTTCTCGATCACAGCGCTG	
Hyg-F	GCTTTCAGCTTCGATGTAGGAG	
Hyg-R	CTACACAGCCATCGGTCCAGA	潮霉素检测引物
Cas9-F	GATCCTTACTTTCCGTATTCCTTACTACG	Cas9 检测引物
Cas9-R	ATACCCTCCTCAATCCTCTTCATG	
GS3seq-F	ATTTCCTTGCGTTGCTTCCG	GS3 靶点测序引物
GS3seq-R	CATCAGTTCAACTTGCTCGTTT	
qGL3seq-F	GAATCCCCACGCAATTCCCAA	qGL3 靶点测序引物
qGL3seq-R	AATATCCACGAGACACGACCA	
B1'	TTCAGAGGTCTCTCTCGACTAGTGGAATCGGCAGCAAAGG	载体构建引物
B2	AGCGTGGGTCTCGTCAGGGTCCATCCACTCCAAGCTC	
B2'	TTCAGAGGTCTCTTGACACTGGAATCGGCAGCAAAGG	
BL	AGCGTGGGTCTCGACCGACGCGTCCATCCACTCCAAGCTC	
U-F	CTCCGTTTACCTGTGGAATCG	
gRNA-R	CGGAGGAAAATTCCATCCAC	

CRISPR/Cas9 载体构建参照 Ma 等^[23]的方法, 首先制备靶点接头、与 gRNA 克隆载体连接, 再利用二轮 PCR 扩增的方法, 得到包含 U3、U6a 启动子和 gRNA 的骨架结构, 最后与 CRISPR/Cas9 表达载体连接, 构建的载体骨架如图 1 所示。利用检测引物 B1'/BL (表 1) 进行载体转化菌液的 PCR 扩增, 选取阳性菌落, 摇菌后提取质粒, 获得含双靶点的基因编辑载体。



图 1 CRISPR/Cas9-gRNA 载体骨架
Fig.1 The vector skeleton of CRISPR/Cas9-gRNA

1.3 转基因材料获得与阳性植株的分子检测

通过农杆菌介导法, 将基因编辑载体转化南粳 5055 的愈伤组织, 愈伤组织经过潮霉素抗性筛选, 分化成 T₀ 植株。利用 CTAB 法, 提取 T₀ 转化植株叶片 DNA, 利用潮霉素基因标记 Hyg-F/R 和 Cas9 基因标记 Cas9-F/R 进行转基因阳性植株检测。在目标基因的靶点两侧设计扩增引物 GS3seq-F/R 和 qGL3seq-F/R, 分别扩增 *GS3* 和 *qGL3* 基因靶点及其附近的序列, 测序结果使用兼并序列解码 (DSDecode) 进行分析^[24]。

1.4 T₁ 无转基因成分的纯合编辑植株筛选

将 T₀ 阳性植株收获的种子进行 T₁ 单株种植, 提取叶片基因组 DNA, 利用引物 Hyg-F/R 和 Cas9-F/R 筛选无转基因成分的植株, 每个株系检测 24 株。再利用测序引物 GS3seq-F/R 和 qGL3seq-F/R 对无转基因成分植株进行 PCR 扩增, 测序结果通过 DSDecode 分析, 筛选出无转基因成分的靶点纯合的编辑植株。

1.5 农艺性状考察与统计分析

对后续世代 (T₂ 和 T₃) 纯合编辑植株进行粒长、粒宽、单株穗数、每穗总粒数和空粒数、单株产量

及千粒重等农艺性状考察。以 5 个单株的平均值作为表型值,每个单株选取 10 粒饱满籽粒进行粒长和粒宽测定。

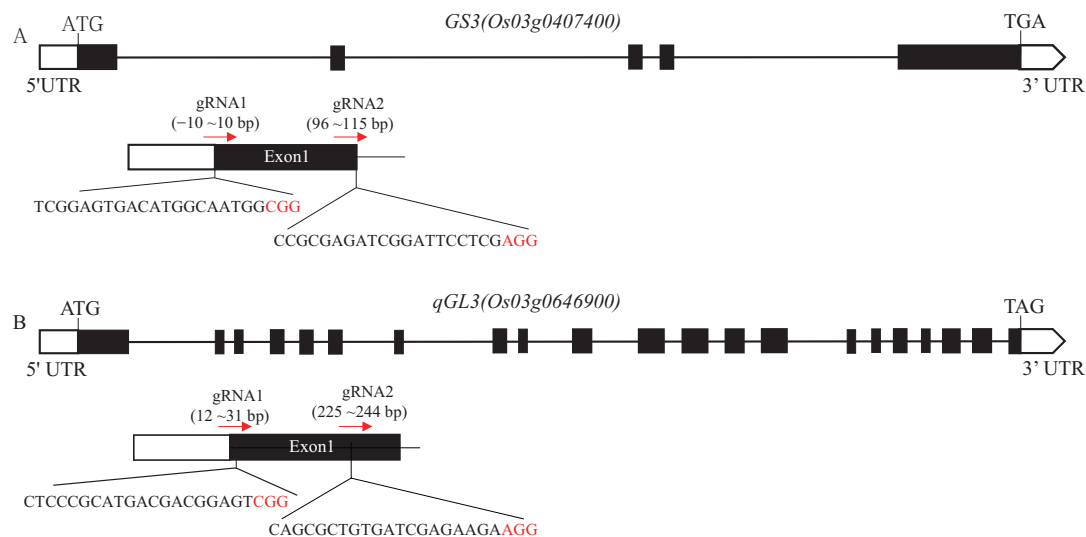
用 Excel 2016 处理数据和绘制图表,利用 *t* 检验比较编辑株系与南粳 5055 间的粒形性状(粒长、粒宽和长宽比)差异,利用 SPSS 18.0 对不同编辑株系间农艺性状进行多重比较分析。

2 结果与分析

2.1 水稻 *GS3* 和 *qGL3* 基因编辑靶点设计及表达载体构建

根据 NCBI 网站预测, *GS3* 基因有 5 个外显

子, *qGL3* 基因有 21 个外显子,均位于水稻第 3 染色体上,经测序分析小粒品种南粳 5055 的 *GS3* 和 *qGL3* 基因的 CDS 序列均与日本晴相同。本研究在 *GS3* 和 *qGL3* 的第 1 外显子上均设计两个 gRNA 靶点,每个靶点分别设计了 20 bp 保守的特异序列,靶点位置及 gRNA 序列如图 2 所示,通过制备 Oligo 二聚体后,将 gRNA1 与 OsU3 质粒载体连接、gRNA2 与 OsU6 质粒载体连接,通过两轮 PCR 扩增获得 U3-gRNA1-U6-gRNA2 的 DNA 片段,将其与 CRISPR/Cas9 表达载体连接,成功构建了 *GS3* 和 *qGL3* 双靶点编辑载体。



黑框表示外显子,红色序列表示 gRNA 靶点 PAM 序列
The black box represented gene exon and red sequence is the PAM of gRNA

图 2 *GS3* (A) 和 *qGL3* (B) 基因结构和靶点位置

Fig.2 Gene structure and target site of *GS3* (A) and *qGL3* (B)

2.2 *T*₀ 转基因植株鉴定及编辑效率分析

利用农杆菌介导的水稻转基因方法,将 *GS3* 和 *qGL3* 编辑载体转化至南粳 5055 成熟胚愈伤组织,通过潮霉素筛选,分化出 23 株和 20 株独立的 *T*₀ 转化株系。利用引物 Hyg-F/R 和 Cas9-F/R 进行 PCR 检测,筛选阳性植株。结果显示, *GS3* 编辑载体的转化株系中有 20 株阳性苗,阳性率为 87.0%; *qGL3* 编

辑载体的转化株系中有 18 株为阳性苗,阳性率为 90.0%。利用引物 *GS3*seq-F/R 和 *qGL3*seq-F/R,分别对 *GS3* 和 *qGL3* 阳性转化植株的靶点邻近序列进行 PCR 扩增和测序,经 DSDecode 分析, *GS3* 阳性转化植株中有 18 株发生突变, *qGL3* 阳性转化植株中有 16 株发生突变,基因编辑效率均在 88% 以上(表 2),绝大多数编辑株系的编辑位点表现为杂合型。

表 2 *T*₀ 转基因植株的鉴定

Table 2 Identification of *T*₀ transgenic plants

编辑基因	转化出苗数	阳性苗数	突变株数	纯合编辑株数	阳性率 (%)	编辑效率 (%)
Edited gene	No. of transgenic plants	Positive seedlings	Mutated plants	Homozygous edited plants	Positive rate	Edited efficiency
<i>GS3</i>	23	20	18	2	87.0	90.0
<i>qGL3</i>	20	18	16	0	90.0	88.9

2.3 T₁ 无转基因成分的纯合编辑株系筛选

为获得无转基因成分的纯合编辑株系,对 T₀ 编辑株系后代开展进一步分析。每个株系种植 24 株 T₁ 植株,利用 Hyg-F/R 和 Cas9-F/R 标记进行分子鉴定,在 *GS3* 和 *qGL3* 编辑株系中均检测到一系列不含转基因成分的 T₁ 植株。通过对植株靶点临近序列的 DSDecode 分析,在 *GS3* 纯合编辑 T₁ 植株中

检测到 7 种突变方式,在 *qGL3* 纯合编辑 T₁ 植株中检测到 5 种突变方式,主要为片段缺失或碱基插入,其中 *GS3* 编辑植株中检测到 133 bp 的大片段缺失。比较发现,T₁ 靶点的突变类型均与 T₀ 株系一致,说明基因编辑可以进行稳定遗传。图 3 分别列举了 *GS3* 和 *qGL3* 编辑株系的突变方式及 PCR 扩增结果。

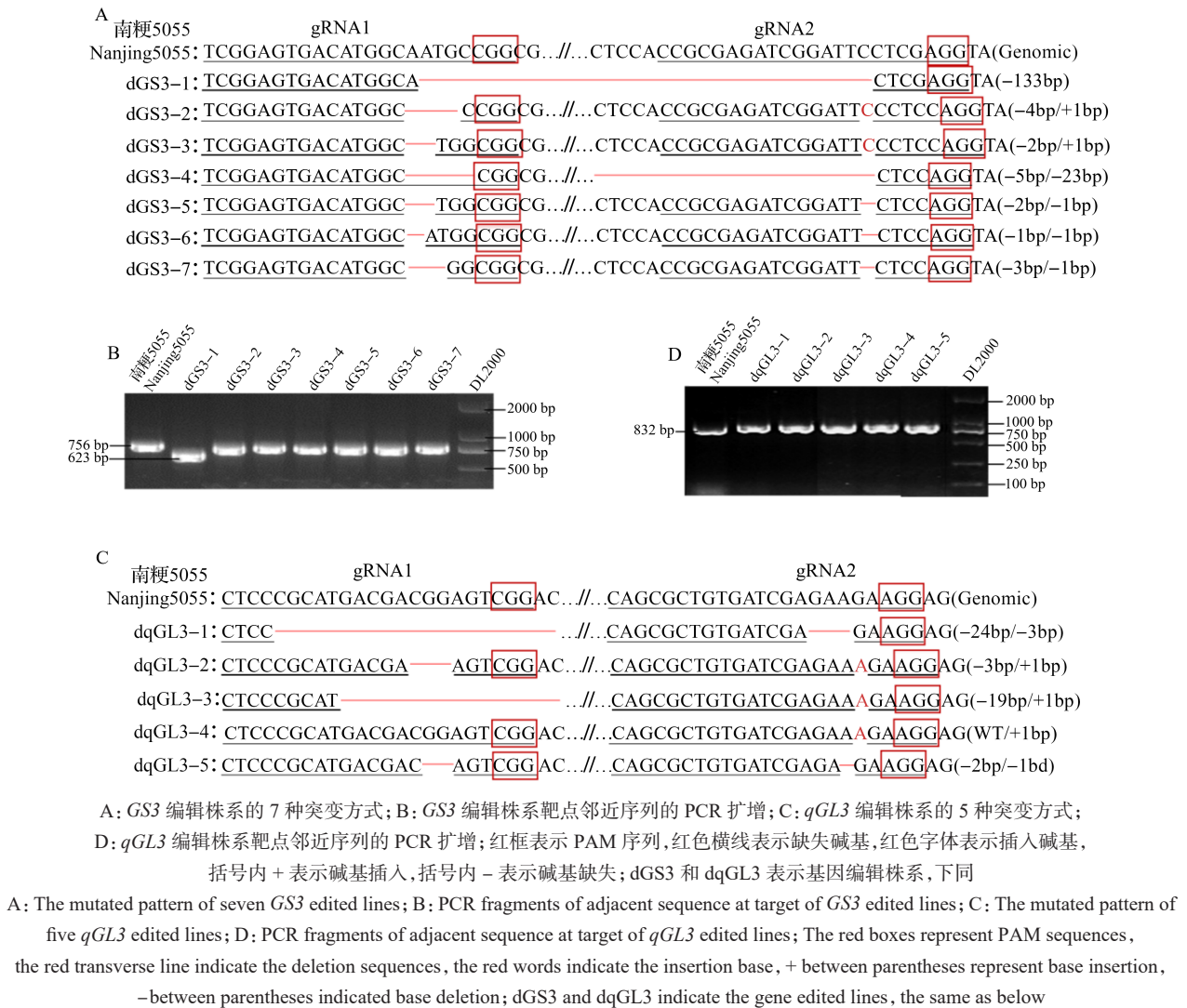


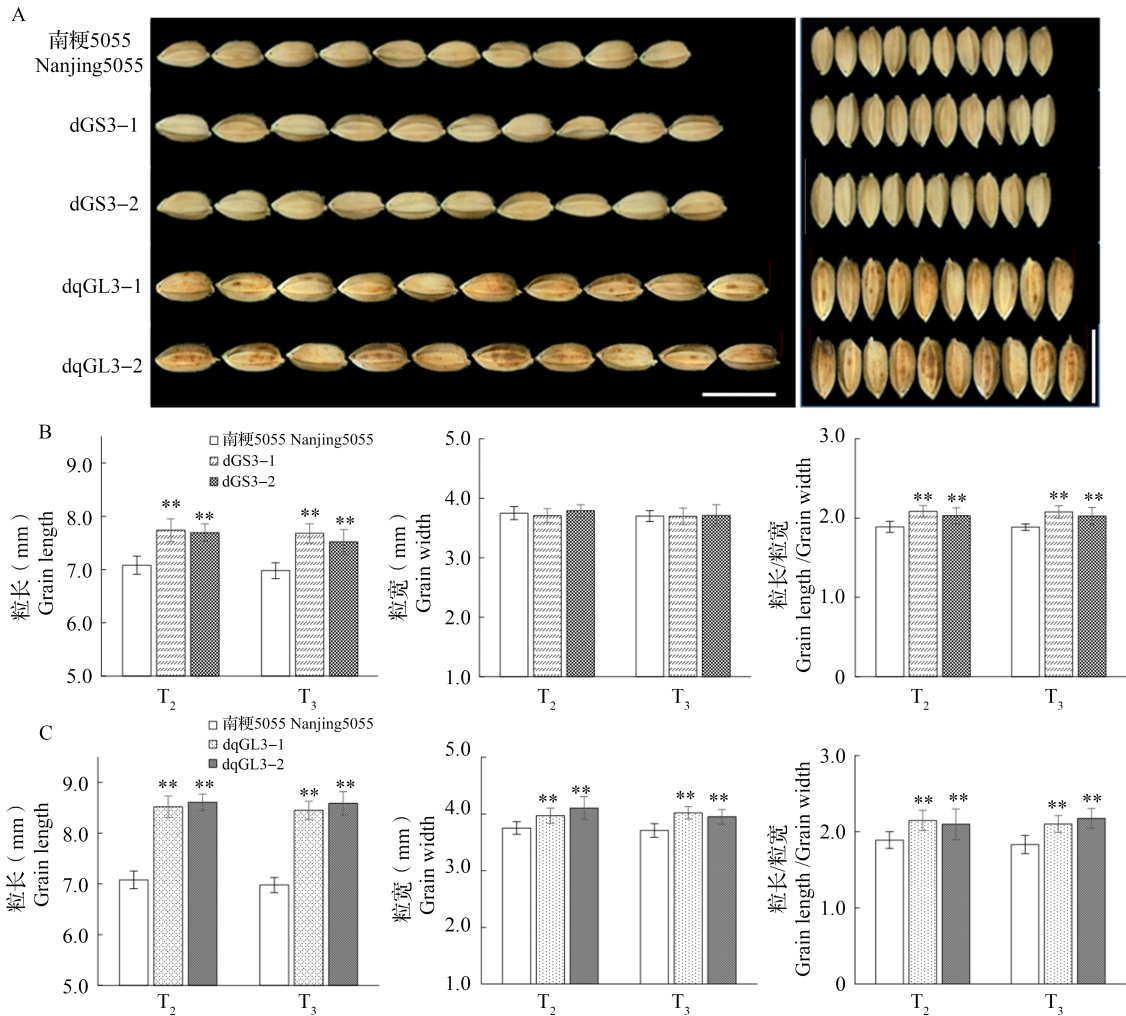
图 3 *GS3* 和 *qGL3* 基因编辑材料突变类型分析

Fig.3 Analysis of mutation types of rice edited lines of *GS3* and *qGL3* genes

2.4 粒形性状分析

在 T₂ 和 T₃ 无标记转基因植株中,分别统计分析 *GS3* 和 *qGL3* 纯合编辑植株的粒形性状。与南粳 5055 相比, *GS3* 编辑植株在两个世代中平均粒长增幅约 9.0%,长宽比增幅约 8.9%,均达到极显著水平,而粒宽增加不显著(图 4A、B); *qGL3* 编辑植株在两个世代中平均粒长增幅约 21.0%,粒宽增幅约 6.9%,

长宽比增幅约 13.1%,均达到极显著水平(图 4A、C)。以 T₂ 和 T₃ 世代粒形性状平均值为表型值,将南粳 5055、*GS3* 和 *qGL3* 编辑植株的粒形性状进行多重比较,结果表明, *qGL3* 编辑植株的粒长 > *GS3* > 南粳 5055,均达到极显著水平,而 *qGL3* 编辑植株的粒宽显著大于 *GS3* 和南粳 5055,在长宽比上, *qGL3* 和 *GS3* 无显著差异,但均显著大于南粳 5055(图 5)。

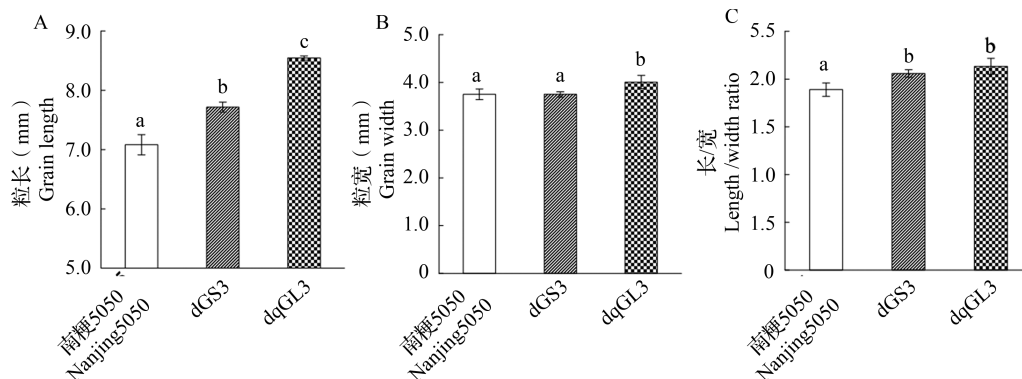


A: *GS3* 和 *qGL3* 编辑株系的籽粒表型 (标尺 = 1cm); B: 南梗 5055 与 *GS3* 编辑株系间的粒形性状比较; C: 南梗 5055 与 *qGL3* 编辑株系间的粒形性状比较; ** 表示编辑株系与南梗 5055 在 $P < 0.01$ 水平上达到显著性差异 (t 检验)

A: The phenotype of grain shape of *GS3* and *qGL3* edited lines (Bar=1cm); B: Comparison of grain size between Nanjing 5055 and *GS3* edited lines; C: Comparison of grain size between Nanjing 5055 and *qGL3* edited lines;
** presents significant difference between edited lines and Nanjing 5055 at $P < 0.01$ level by t -test

图 4 *GS3* 和 *qGL3* 编辑植株粒形性状分析

Fig.4 Grain size investigation of *GS3* and *qGL3* edited lines



图中不同字母表示在 $P < 0.01$ 水平上的差异显著性

Different letters show significantly different at $P < 0.01$ level

图 5 *GS3* 和 *qGL3* 编辑植株及南梗 5055 间的粒长 (A)、粒宽 (B) 和长宽比 (C) 间的比较

Fig.5 The comparison of grain length (A), grain width (B) and length/width ratio (C) of *GS3* and *qGL3* edited lines and Nanjing 5055

2.5 T_2 和 T_3 植株农艺性状分析

以南粳 5055 为对照, 分别将 *GS3* 和 *qGL3* 的 2 个纯合编辑株系, 进行 T_2 和 T_3 世代种植, 比较其农艺性状差异。结果表明, *GS3* 编辑植株千粒重为 24.6~25.7 g, 相比南粳 5055 的增幅约为 12.7%; 而 *qGL3* 编辑植株千粒重为 28.8~30.2 g, 相比南粳 5055 的增幅约 31.7%。在每穗粒数上, *qGL3* 和

GS3 编辑植株均显著低于南粳 5055, 其中 *GS3* 编辑植株降低率约 9.3%, *qGL3* 编辑植株降低率约 31.5%。此外, 不同世代中 *qGL3* 编辑植株的穗数比 *GS3* 编辑植株和南粳 5055 有增加趋势, 而结实率比 *GS3* 编辑植株和南粳 5055 有降低趋势, 但多数未达到显著水平; 在穗长和单株产量上, *GS3* 和 *qGL3* 编辑植株与南粳 5055 相比均无显著差异(表 3)。

表 3 T_2 和 T_3 编辑植株的农艺性状分析

Table 3 Analysis of agronomic traits of T_2 and T_3 edited plants

世代 Generation	材料 Materials	穗数 Panicle number	穗长 (cm) Panicle length	每穗粒数 Grain number per panicle	结实率 (%) Seed setting rate	单株产量 (g) Yield per plant	千粒重 (g) 1000-grain weight
T_2	dGS3-1	8.7 ± 0.8a	18.2 ± 2.7a	163.7 ± 20.1bc	91.2 ± 1.2ab	31.5 ± 0.6a	24.6 ± 0.4b
	dGS3-2	9.0 ± 1.0ab	17.9 ± 3.5a	159.6 ± 13.3bc	90.0 ± 1.5ab	32.2 ± 0.5a	25.7 ± 0.8b
	dqGL3-1	11.1 ± 1.2b	18.3 ± 2.1a	117.2 ± 12.8a	89.8 ± 0.5a	32.9 ± 0.3a	28.8 ± 0.1c
	dqGL3-2	10.8 ± 0.8b	17.7 ± 1.2a	115.3 ± 15.6a	89.8 ± 1.0a	32.7 ± 1.5a	30.2 ± 0.3c
	南粳 5055	9.2 ± 0.8ab	17.7 ± 2.8a	176.4 ± 20.7bc	92.5 ± 0.6b	32.8 ± 1.1a	22.6 ± 0.4a
T_3	dGS3-1	9.1 ± 1.4ab	16.5 ± 1.7a	161.0 ± 18.4bc	91.0 ± 0.5ab	32.6 ± 0.4a	25.3 ± 0.4b
	dGS3-2	9.2 ± 0.7ab	17.3 ± 2.4a	162.5 ± 10.7bc	89.2 ± 1.1a	32.8 ± 1.3a	25.1 ± 0.6b
	dqGL3-1	10.5 ± 0.7ab	18.0 ± 1.4a	123.0 ± 15.6a	88.9 ± 1.5a	32.5 ± 1.2a	29.0 ± 0.3c
	dqGL3-2	10.0 ± 1.4ab	16.3 ± 3.4a	124.0 ± 11.3a	89.2 ± 1.1a	31.8 ± 1.0a	29.7 ± 0.6c
	南粳 5055	9.3 ± 1.1ab	18.3 ± 2.3a	180.2 ± 12.3c	92.1 ± 1.2ab	33.0 ± 1.2a	22.1 ± 0.8a

数据用平均数 ± 标准差表示, 同一列中的不同字母表示在 0.05 水平上差异显著

Values are shown as mean ± SD; Different letters in the same column show significantly different at 0.05 level

3 讨论

CRISPR/Cas9 技术与传统育种相比, 因其具有操作简单、编辑效率高、周期短、成本低等优点, 正广泛应用于水稻性状改良和新种质创制中^[14-16, 25-28]。本研究, 为研究粒长基因 *GS3* 和 *qGL3* 的效应, 定向改良小粒型优良食味粳稻品种南粳 5055 的粒长和千粒重, 利用 CRISPR/Cas9 技术分别对南粳 5055 的 *GS3* 和 *qGL3* 基因进行了敲除, 成功获得功能缺失的纯合突变体, 并考察了不同世代的粒形和产量相关性状。发现编辑株系的粒长和千粒重均比南粳 5055 显著增加, *GS3* 株系在 T_2 、 T_3 世代中平均粒长增幅约 9.0%、千粒重增幅约 12.7%; *qGL3* 株系粒长增幅约 21.0%、粒宽增幅约 6.9%、千粒重增幅约 31.7%, 表明 *qGL3* 基因对粒长和粒重的贡献明显大于 *GS3*。

与前人研究比较发现, 不同遗传背景敲除 *GS3* 基因产生的效应不同。Li 等^[17]报道的 *GS3* 编辑突变体的粒长比野生型增幅达 20%。Shen 等^[29]

对 5 个江浙粳稻品种进行 *GS3* 和 *GS3/Gn1a* 敲除, 突变体粒长比野生型仅增加 1%~4%、千粒重增幅为 0~8%。而在 4 个东北水稻品种的 *GS3* 和 *GS3/Gn1a* 编辑突变体比野生型的粒长增幅为 8%~18%、千粒重增幅为 2%~21%^[15]。因此, 本研究中 *GS3* 编辑株系的粒长和千粒重增幅均与 4 个东北品种^[15]接近, 远大于 5 个江浙品种^[29]。通过比较 *GS3* 编辑位点, 本研究与已有报道均选择在基因第一外显子上设计靶点, 使用了两个 gRNA 靶点进行编辑, 除了能确保基因编辑效率, 还获得了从 gRNA1 至 gRNA2 间 133bp 的大片段缺失材料, 这种突变类型可以使基因功能完全丧失。而在使用单个 gRNA 靶点时, 不仅经常出现无编辑状况, 而且在发生编辑时只能产生单个或少数碱基的插入或缺失, 导致目标基因的功能部分保留, 达不到基因功能编辑的效果。因此, 本研究构建的 CRISPR/Cas9 载体在打靶效率和精确性上具有一定优势。

较多研究证实 *qGL3* 基因敲除可以显著提升粒长和粒重。Gao 等^[30]利用 CRISPR/Cas9 技术在水

稻品种 Dongjin 中获得了 *qGL3* 基因编辑突变体, 其粒长和粒重较野生型极显著增加。Liu 等^[31]证实 *PPKL1* (*qGL3*) 基因上特定氨基酸 D364 突变激活了细胞分裂素反应, 从而使突变体粒形和千粒重极显著增加, 粒长增幅约 30%, 千粒重增幅约 40%。本研究中 *qGL3* 编辑株系的粒长、粒宽和千粒重较南粳 5055 有大幅增加, 与已有报道表型一致^[30-31], 进一步证实 *qGL3* 基因对粒形和粒重的调控作用。此外, 本研究 *qGL3* 编辑株系的穗数同时表现出比对照品种增加趋势, Gao 等^[30]报道的 *qGL3* 编辑突变体也出现相似表型。关于 *qGL3* 敲除株系粒形变化也有相反报道, Liu 等^[31]在中花 11 背景下编辑了参与油菜素内酯信号途径的系列基因, 获得了具有多样化农艺性状的突变体, 其中 *PPKL* 家族基因敲除突变体的粒长增加不明显, *ppkl3* 和双基因敲除突变体表现出粒长显著降低, 这些不同的表型差异极有可能是由于遗传背景或者编辑位点不同而导致的。

产量是作物最重要和最复杂的性状之一, 其决定因素主要有千粒重、每穗粒数、结实率和有效穗数^[32]。*GS3* 和 *qGL3* 基因主要控制粒长, 进而影响千粒重, 理论上通过基因编辑可以在增加千粒重的同时提升产量, 然而本研究发现两个基因编辑植株的单株产量并没有得到提升, 甚至某些编辑株系表现出降低趋势。Shen 等^[29]也检测到不同遗传背景下 *GS3* 和 *GS3/Gn1a* 敲除突变体的单株产量降低。Chen 等^[33]在日本晴背景下敲除 *GS3* 后, 突变体的粒长显著增加, 但千粒重和单株产量并没有改变。本研究中编辑植株每穗粒数显著降低, 可能是单株产量无提高的主要原因; 另一方面, 结合作物栽培学的源-库-流理论, 推测可能是因为水稻籽粒的库容量增加, 而光合作用产生的源不够充足, 使得籽粒的充实度降低、瘪粒数增加, 最终导致产量不能提升。当然, 在大规模田间试验中, 单株籽粒产量不一定与群体产量一致, 因此, 为了证实这些基因编辑材料的产量效应, 可能需要优化栽培方法, 例如确定合理的栽插密度、控制小分蘖的数量等。

综上, 通过 CRISPR/Cas9 技术对 *GS3*、*qGL3* 基因进行敲除, 获得了无转基因成分的单基因纯合编辑植株, 定向改良了南粳 5055 的粒形和千粒重, 获得一系列大粒水稻新种质, 为加速长粒种质资源的选育进程提供了材料和理论基础。

参考文献

- [1] 马丽莲, 郭龙彪, 钱前. 水稻大粒种质资源和遗传分析. 植物

学通报, 2006, 23(4): 395-401

Ma L L, Guo L B, Qian Q. Germplasm resources and genetic analysis of large grain in rice. Chinese Bulletin of Botany, 2006, 23(4): 395-401

- [2] 彭丁文. 水稻粒重遗传与育种研究进展. 南方农业学报, 2011, 42(3): 250-252

Peng D W. Research progress on the utilization of rice grain weight traits in molecular breeding. Journal of Southern Agriculture, 2011, 42(3): 250-252

- [3] 刘喜, 牟昌铃, 周春雷, 程治军, 江玲, 万建民. 水稻粒型基因克隆和调控机制研究进展. 中国水稻科学, 2018, 32(1): 1-11

Liu X, Mou C L, Zhou C L, Cheng Z J, Jiang L, Wan J M. Research progress on cloning and regulation mechanism of rice grain shape genes. Chinese Journal of Rice Science, 2018, 32(1): 1-11

- [4] 康艺维, 陈玉宇, 张迎信. 水稻粒型基因克隆研究进展及育种应用展望. 中国水稻科学, 2020, 34(6): 479-490

Kang Y W, Chen Y Y, Zhang Y X. Research progress and breeding prospects of grain size associated genes in rice. Chinese Journal of Rice Science, 2020, 34(6): 479-490

- [5] 高志强, 占小登, 梁永书, 程式华, 曹立勇. 水稻粒形性状的遗传及相关基因定位与克隆研究进展. 遗传, 2011, 33(4): 314-321

Gao Z Q, Zhan X D, Liang Y S, Cheng S H, Cao L Y. Progress on genetics of rice grain shape trait and its related gene mapping and cloning. Hereditas, 2011, 33(4): 314-321

- [6] Zheng J, Zhang Y D, Wang C L. Molecular functions of genes related to grain shape in rice. Breeding Science, 2015, 65: 120-126

- [7] Li N, Li Y. Signaling pathways of seed size control in plants. Current Opinion in Plant Biology, 2016, 33: 23-32

- [8] 朱业宝, 江川, 王金英. 水稻粒形调控基因的互作及其驯化研究进展. 福建农业学报, 2016, 31(1): 95-101

Zhu Y B, Jiang C, Wang J Y. Advance in research on interaction and domestication of genes that regulate shape of rice grains. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2016, 31(1): 95-101

- [9] 黄海洋, 钱前. 水稻粒形遗传与长粒型优质梗稻育种进展. 中国水稻科学, 2017, 31(6): 665-672

Huang H X, Qian Q. Progress in genetic research of rice grain shape and breeding achievements of long-grain shape and good quality japonica rice. Chinese Journal of Rice Science, 2017, 31(6): 665-672

- [10] 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, 2016, 112: 1164-1171

- [11] Mao H L, Sun S Y, Yao J L, Wang C Y, 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

- [12] Qi P, Lin Y S, Song X J, Shen J B, Huang W, Shan J X, Zhu M Z, Jiang L, Gao J P, Lin H X. The novel quantitative trait locus *GL3.1* controls rice grain size and yield by regulating

- Cyclin-T1; 3. Cell Research, 2012, 22: 1666-1680
- [13] Zhang X J, Wang J F, Huang J, Lan H, Zhang H. Rare allele of OsPPKL1 associated with grain length causes extra-large grain and a significant yield increase in rice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109: 21534
- [14] 孟帅, 徐鹏, 张迎信, 王宏, 曹立勇, 程式华, 沈希宏. 利用 CRISPR/Cas9 技术编辑粒长基因 *GS3* 改善粳稻花时. 中国水稻科学, 2018, 32(2): 119-127
- Meng S, Xu P, Zhang Y X, Wang H, Cao L Y, Cheng S H, Shen X H. CRISPR/Cas9-mediated editing of *GS3* to improve flowering time in *japonica* rice. Chinese Journal of Rice Science, 2018, 32(2): 119-127
- [15] 沈兰, 李健, 付亚萍, 王俊杰, 华宇峰, 焦晓真, 严长杰, 王克剑. 利用 CRISPR/Cas9 系统定向改良水稻粒长和穗粒数性状. 中国水稻科学, 2017, 31(3): 223-231
- Shen L, Li J, Fu Y P, Wang J J, Hua Y F, Jiao X Z, Yan C J, Wang K J. Orientation improvement of grain length and grain number in rice by using CRISPR/Cas9 system. Chinese Journal of Rice Science, 2017, 31(3): 223-231
- [16] 徐善斌, 郑洪亮, 刘利锋, 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): 406-412
- Xu S B, Zheng H L, Liu L F, Bu Q Y, Li X F, Zhou D T. Improvement of grain shape and fragrance by using CRISPR/Cas9 system. Chinese Journal of Rice Science, 2020, 34(5): 406-412
- [17] Li M R, Li X X, Zhou Z J, Wu P Z, Fang M C, Pan X P, Lin Q P, Luo W B, Wu G J, Li H Q. Reassessment of the four yield-related genes *Gn1a*, *DEP1*, *GS3*, and *IPA1* in rice using a CRISPR/Cas9 system. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 377
- [18] Nan J Z, Feng X M, Wang C, Zhang X H, Wang R S, Liu J X, Yuan Q B, Jiang G Q, Lin S Y. Improving rice grain length through updating the *GS3* locus of an elite variety Kongyu 131. Rice, 2018, 11(1): 21
- [19] Zhang Y D, Zhu Z, Zhao Q Y, Chen T, Yao S. Haplotypes of *qGL3* and their roles in grain size regulation with *GS3* alleles in rice. Genetics and Molecular Research, 2016, 15(1): gmr.15017587
- [20] Zhang Y D, Zheng J, Liang Z K, Liang Y L, Peng Z H, Wang C L. Verification and evaluation of grain QTLs using RILs from TD70 × Kasalath in rice. Genetics and Molecular Research, 2015, 14(4): 14882-14892
- [21] 王才林, 张亚东, 朱镇, 陈涛, 赵庆勇, 赵凌, 周丽慧, 姚姝. 优良食味粳稻新品种南粳 5055 的选育及利用. 农业科技通讯, 2012(2): 84-87
- Wang C L, Zhang Y D, Zhu Z, Chen T, Zhao Q Y, Zhao L, Zhou L H, Yao S. Breeding and utilization of a new japonica rice variety Nanjing 5055 with high eating quality. Bulletin of Agricultural Science and Technology, 2012(2): 84-87
- [22] Yan M, Zhou S R, Xue H W. CRISPR primer designer: Design primers for knockout and chromosome imaging CRISPR-Cas system. Journal of Integrative Plant Biology, 2015, 57(7): 613-617
- [23] Ma X, Zhang Q Y, Zhu Q L, Liu W, Chen Y, Qiu R, Wang B, Yang Z F, Li H Y, Lin Y R, Xie Y Y, Shen R X, Chen S F, Wang Z, Chen Y L, Guo J X, Chen L T, Zhao X C, Dong Z C, 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
- [24] Liu W Z, Xie X R, Ma X L, Li J, Chen J H, Liu Y G. DSDecode: A web-based tool for decoding of sequencing chromatograms for genotyping of targeted mutations. Molecular Plant, 2015, 8(9): 1431-1433
- [25] Samanta M K, Dey A, Gayen S. CRISPR/Cas9: An advanced tool for editing plant genomes. Transgenic Research, 2016, 25(5): 561-573
- [26] 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
- [27] 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. 应用 CRISPR/Cas9 技术创制低直链淀粉含量水稻种质. 植物遗传资源学报, 2022, 23(2): 583-591
- Mao X X, Zheng X Y, Sun B R, Li C, Chen W F, Pan D J, Liu W G, Fan Z L, Wang F. Creating novel rice germplasms with low amylose content by editing upstream sequence of *Wx* gene coding region via CRISPR/Cas9 technology. Journal of Plant Genetic Resources, 2022, 23(2): 583-591
- [28] Zhang Y, Massel K, Godwin I D, Gao C. Applications and potential of genome editing in crop improvement. Genome Biology, 2018, 19(1): 210
- [29] Shen L, Wang C, Fu Y, Wang J, Liu Q, Zhang X, Yan C, Qian Q, Wang K. QTL editing confers opposing yield performance in different rice varieties. Journal of Integrative Plant Biology, 2018, 60(2): 89-93
- [30] Gao X Y, Zhang J Q, Li J B, Wang Y J, Zhang R, Du H Y, Yin J, Cai G, Wang R Q, Zhang B Y, Zhao Z, Zhang H S, Huang J. The phosphoproteomic and interactomic landscape of *qGL3/OsPPKL1* mediated brassinosteroid signaling in rice. The Plant Journal, 2022, 109(5): 1048-1063
- [31] Liu D P, Zhao H, Xiao Y H, Zhang G X, Cao S Y, Yin W C, Qian Y W, Yin Y H, Zhang J S, Chen S Y, Chu C C, Tong H Y. A cryptic inhibitor of cytokinin phosphorelay controls rice grain size. Molecular Plant, 2022, 15: 293-307
- [32] Xing Y Z, Zhang Q F. Genetic and molecular bases of rice yield. Annual Review of Plant Biology, 2010, 61: 421-442
- [33] Chen Y Y, Zhu A K, Xue P P, Wen X X, Cao Y R, Wang B F, Zhang Y, Shah L, Cheng S H, Cao L Y, Zhang Y X. Effects of *GS3* and *GL3.1* for grain size editing by CRISPR/Cas9 in rice. Rice Science, 2020, 27(5): 405-413