

利用 CRISPR/CAS9 基因编辑 技术创制香型郑稻 19 新种质

王付华¹ 薛华政¹ 王亚¹ 王生轩¹ 王越涛¹
付景¹ 杨文博¹ 白涛¹ 李俊周² 尹海庆¹

(¹ 河南省农业科学院粮食作物研究所, 450002, 河南郑州; ² 河南农业大学农学院, 450002, 河南郑州)

摘要 有特殊香味的稻米深受我国消费者欢迎, 是优质水稻的重要指标之一, 本研究通过基因编辑创制香型优质水稻新种质。水稻中甜菜碱醛脱氢酶基因 *Badh2* 是控制香味的关键基因, 以适于直播品种郑稻 19 为供体材料, 利用 CRISPR/CAS9 技术定点突变水稻 *Badh2* 基因。获得 T0 代转基因阳性植株 11 株, 其中 9 株子粒有香味, 检测 6 个香型 T1 株系靶点序列, 6 个株系均发生突变, 发现 7 种突变类型, 5 种是缺失类型, 2 种插入类型, 其中 3 个株系 (T1-2、T1-3 和 T1-7) 出现双等位突变。6 个 T1 代株系共测序 22 个单株, 检测到纯合突变 10 株; T2 代检测 28 株, 其中纯合突变 21 株。以潮霉素抗性基因引物检测 T1-2、T1-6 和 T1-7 株系后代单株载体脱落情况, T1 代 3 个株系未获得无载体纯合突变单株, T2 代中获得 8 株无载体纯合突变单株, 来源于 T1-2 株系有 3 株, 来源于 T1-7 株系 5 株。T0 代 9 株香型单株子粒 2-AP 含量 $1.259 \pm 0.072 \mu\text{g/g}$, T1 代 8 个突变株系 2-AP 含量 $0.537 \pm 0.111 \mu\text{g/g}$, 均显著高于对照郑稻 19。考察中选 T1-2、T1-7 株系的农艺性状, 与郑稻 19 无显著差异。这些无载体突变单株可作为香型种质在种质创新和育种中应用。

关键词 水稻; 郑稻 19; 香味; *Badh2*; CRISPR/CAS9

水稻是世界近四分之一人口的食物来源, 也是我国的主要粮食作物。当前随着生活水平提高, 稻米品质的优质化渐成我国水稻生产的发展方向^[1-2]。稻米品质包括外观品质、加工品质和食味品质等几个主要方面, 食味品质决定米饭的口味, 直接关系消费者对稻米的评价, 与稻米的商品价值紧密相关。米饭的香味是影响食味品质的重要因素之一, 具有怡人香味的稻米历来受我国消费者的欢迎, 如东北稻花香、泰国香米在我国受到普遍好评, 因此稻米香味也非常受水稻研究者、生产商和销售商的重视。

已有的研究表明, 稻米香味挥发性物质有很多种, 迄今的研究证实绝大多数香稻和普通稻在 2-乙酰-1-吡咯啉 (2-AP) 的含量上存在显著差异,

2-AP 含量也被认为是香稻区别于普通稻的主要成分, 也是常用评价和鉴定稻米香味的主要指标^[3]。2-AP 主要存在于种子、叶片中, 许多香稻苗期就能散发出香味。

多个稻米香味相关基因定位研究在第 8 号染色体上定位到水稻香味相关的主效基因^[4-11]。Bradbury 等^[12]克隆了第 8 染色体上的香味相关基因 *fgr*, 该基因编码甜菜碱醛脱氢酶 (*Badh2*), 序列分析发现, 相对野生型基因序列, 突变体在第 7 外显子上有 8 碱基缺失, 致使蛋白表达提前终止, 翻译的 *Badh2* 蛋白功能异常^[13]。Chen 等^[14]的研究证实: 野生型水稻 *Badh2* 基因编码一个含有 503 个氨基酸的功能蛋白, 该蛋白有很强的甜菜碱醛脱氢酶活性, 能氧化甜菜醛 (Betald) 及其结构类似物, 其中其结构类似物之一 γ -氨基丁醛 (GABald) 与香味物质 2-AP 前体间存在动态平衡, *Badh2* 基因突变使得 *Badh2* 蛋白功能缺失导致 GABald 累积, GABald 的累积使 2-AP 的前体积聚, 从而使香味物质 2-AP 含量增加, 产生香味。多数香稻种质材料都是 *Badh2* 基因第 7 外显子突变类型, 有些水稻材料 *Badh2* 基因在第 2 外显子上突变, 产生 7 个碱基

作者简介: 王付华, 副研究员, 研究方向为水稻遗传育种; 薛华政为共同第一作者, 助理研究员, 主要从事作物遗传育种研究

尹海庆为通信作者, 研究员, 研究方向为水稻育种; 李俊周为共同通信作者, 副教授, 主要从事作物遗传育种研究

基金项目: 国家“七大农作物育种专项”长江中下游优质高产高效粳稻新品种培育项目 (2017YFD0100400/3); 河南省水稻产业技术创新团队首席专家项目 (S2012-04); 河南省重大科技专项 (171100110300); 河南省农业科学院自主创新专项 (2018ZC11)

收稿日期: 2018-08-24; 修回日期: 2018-11-06

司完成。

1.4 突变体表型分析

1.4.1 香味物质测定 香味物质在中种集团生命科学技术中心测定，检测仪器为气相色谱－质谱联用仪（GCMS-QP2010 Ultra，日本岛津公司），测定糙米粉香味物质含量，所测主要香味物质是 2-乙酰基-1-吡咯啉（2-acetyl-1-pyrroline，2-AP），以非编辑郑稻 19 为无香味对照。

1.4.2 农艺性状考察 考察 T1 代突变株系产量相关性状，包括株高、分蘖数、结实率、穗粒数和千粒重，每株系考查 5 个单株。

1.4.3 数据统计分析 用 Excel 对表型相关数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 *Badh2* 的编辑突变位点的鉴定分析

Badh2 基因编辑载体转化郑稻 19，提取 T0 代单株基因组 DNA，以潮霉素抗性基因引物扩增鉴定获得 11 株转基因阳性植株，T0 代 2016 年正季（5

月初播种）种植在郑州，种子成熟后人工品尝初步鉴定香味，11 株中 9 株有明显香味，香味物质 2-AP 含量检测结果与人工品尝一致。收获 T1 代种子，分两份，一份同年冬温室加代获得 T2 代。2017 年本地种植另 1 份 T1 代株系，同时种植温室加代所得 T2 代株系，选择稳定纯合突变单株，加快选择进度。

在 9 个香型 T1 代株系中选取 6 个株系 T1-2（2 号株系的 T1 代，其他类推）、T1-3、T1-6、T1-7、T1-8 和 T1-9 进行测序鉴定，选择农艺性状与供体材料郑稻 19 一致的单株，每个株系取 3~5 株，扩增 *Badh2* 基因编辑检测靶点基因组 DNA 并测序，检测靶点序列突变情况（表 2），6 个株系均发生突变；有 7 种突变类型，5 种是缺失类型，相比 PAM 序列分别缺失 1、2、5、8 和 12 个碱基，1 种突变类型在 PAM 序列中插入 1 个 A，另 1 种 PAM 序列后端发生长片段改变。3 个株系（T1-2、T1-3 和 T1-7）出现两种突变类型，是双等位突变，另 3 个株系（T1-6、T1-8 和 T1-9）只有一种突变类型，是单等

表 2 T1 和 T2 代靶点序列突变分析
Table 2 Analysis of mutation in target sequences

T1 株系号 No. of T1 line	T1 测序株 Sequenced of T1		T2 测序株 Sequenced of T2		靶点序列 Target sequence	突变情况 Mutation
	总株数/突变体 Total/Mutant	纯合/杂合 Homozygote/Heterzygote in mutants	总株数/突变体 Total/Mutant	纯合/杂合 Homozygote/Heterzygote in mutants		
WT					CAAGTACCTCCGCGCAATCGCGGCC	
T1-2	3/3	0/3	6/6	6/0	CAAGTACCTCCGCGC--TCGCGGCC	-2
					CAAGTACCTCCGCG-----CGGCC	-5
T1-3	3/3	2/1	6/6	3/3	CAAGTACCTCCGCG-----GCC	-8
					CAAGTACCTCCGCGCA-TCGCGGCC	-1
T1-6	5/4	2/2	5/4	2/2	CAAGTACCTCCGCGCAAaTCGCGGCC	+1
T1-7	5/5	3/2	5/5	5/0	CAAGTACCTCCGC-----	-12
					CAAGTACCTCCGCGCAAaTCGCGGCC	+1
T1-8	3/2	0/2	3/3	3/0	CAAGTACCTCCGCGCAAacacttgat	+9
T1-9	3/3	3/0	3/2	2/0	CAAGTACCTCCGCGCAAaTCGCGGCC	+1
小计 Total	22/20	10/10	28/26	21/5		

注：“-”表示碱基缺失，“+”表示碱基插入；小写字母表示碱基或序列插入
Note: “-” indicate deleted bases; “+” indicate inserted bases; Lowercase letters indicate inserted bases or sequences

位突变。

6 个 T1 代株系共测序 22 个单株，检测到突变单株 20 株，其中纯合突变 10 株，杂合突变 10 株。6 个 T2 代株系共检测 28 株，其中纯合突变 21 株，杂合突变 5 株，6 个株系都出现纯合单株，其中来源于 T1-2、T1-8 和 T1-7 株系的单株都是纯合突变株。

2.2 T1、T2 代转基因载体检测和无标记突变单株的选择

选择农艺性状与郑稻 19 长相一致且 2-AP 含量较高的株系 T1-2、T1-6 和 T1-7，以载体检测引物（Vector_identify）PCR 扩增潮霉素抗性基因，以检测测序单株载体脱落情况，选择出无标记基因的突变单株，能扩增出载体序列为阳性（含载体序列），

不能扩增出载体序列为阴性（无载体序列）。T1 代结果（图 2A、2B）：T1-2 株系检测 3 株，2 单株呈阳性，1 株呈阴性，3 单株都是杂合突变；T1-6 株系检测 5 株，全阳性单株，2 纯合突变单株，2 杂合突变单株，1 株野生型；T1-7 株系检测 5 株，4 株阳性单株，1 株阴性单株，该阴性单株是杂合突变。

T2 代株系检测结果（图 2C、2D）：T1-2 株系后代检测 6 株，3 株阳性，3 株阴性，3 株阴性单株是纯合突变单株；T1-6 株系后代检测 5 株，5 株全阳性，无阴性纯合突变单株。T1-7 株系后代检测 5 株，5 株全阴性，5 株都是纯合突变单株。

总之，检测 T1 代 3 个株系后代，出现 PAM 位点突变且不含载体的单株，T2 代中来源于 T1-2 株系有 3 株无载体纯合突变单株，来源于 T1-7 的 5 株 T2 代单株都是无载体纯合突变单株。因此 T1-2、T1-7 及后代突变无载体单株可作为香型种质在种质创新和育种中应用。

2.3 T0、T1 代香味物质测定

T0 代种子成熟后，人工品尝初步鉴定香味，11 株中 9 株香味明显，测定 T0 代单株 2-AP 的含量，9 个香味单株的 2-AP 含量在 1.195~1.394μg/g，平均 1.259 ± 0.072μg/g，显著高于未编辑对照郑稻 19（0.003μg/g）（图 3A）。

T1 代株系种子分两份，1 份温室加代，1 份保留备用，温室加代成熟后收获种子继续检测香味物质 2-AP 含量，检测 10 个株系，8 个株系 2-AP 含量在 0.440~0.756μg/g，平均 0.537 ± 0.111μg/g，显著

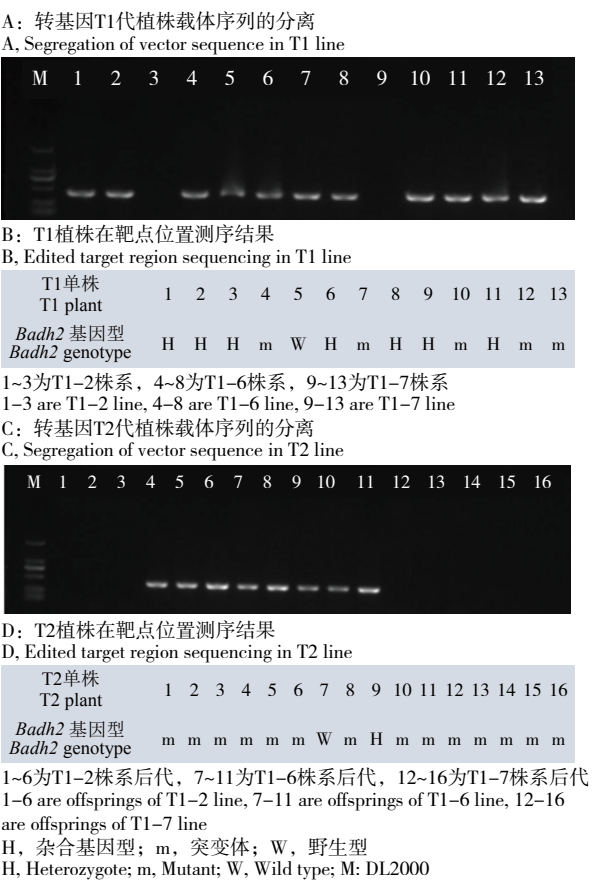


图2 转基因 T1、T2 代单株编辑位点
基因型及载体 PCR 检测
Fig.2 Genotype of edited site and vector
segregation in T1 & T2 generation

高于对照（0.002μg/g），但 2-AP 普遍比 T0 代（郑州正季种植）低（图 3B）。

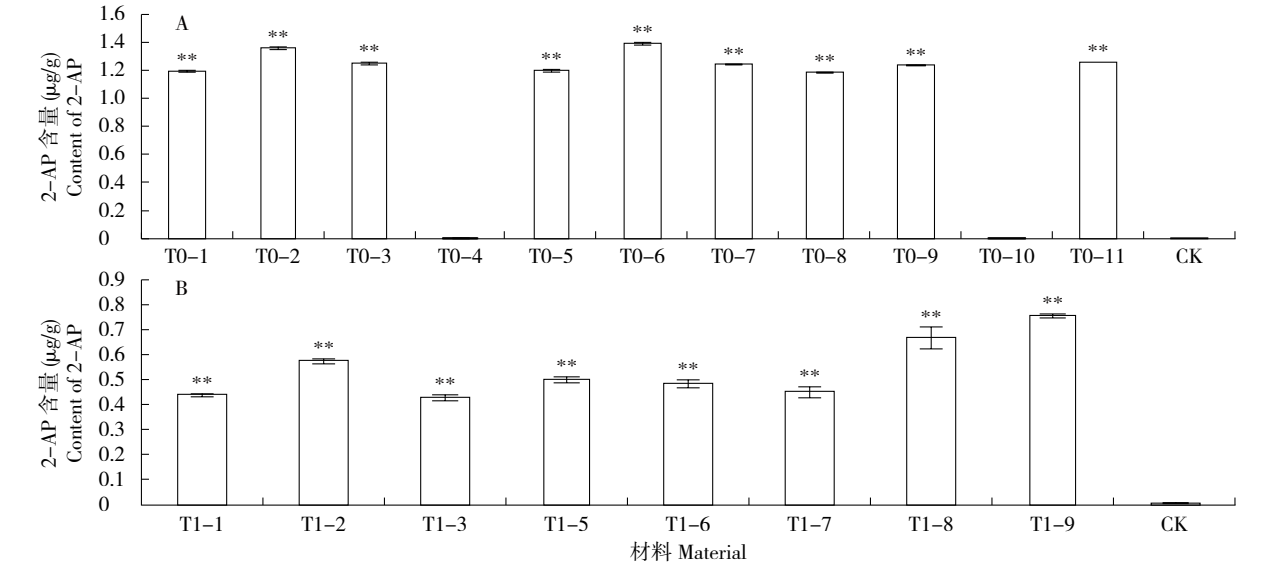


图3 T0、T1 代株系香味物质 2-AP 的含量
Fig.3 2-acetyl-1-pyrroline (2-AP) content of T0 and T1 lines

2.4 *Badh2* 基因编辑后代农艺性状

中选 T1 代突变株系的农艺性状与对照郑稻 19 一致，考察其产量构成因素，包括株高、分蘖数、千粒重、每穗粒数及结实率（图 4），发现主要产

量构成因素未见显著差异（ $P>0.05$ ）；说明基因经编辑后的突变株系产量性状无明显改变。总体说来，郑稻 19 经 *Badh2* 编辑后突变，产生明显香味，对稻谷生产性能无明显影响。

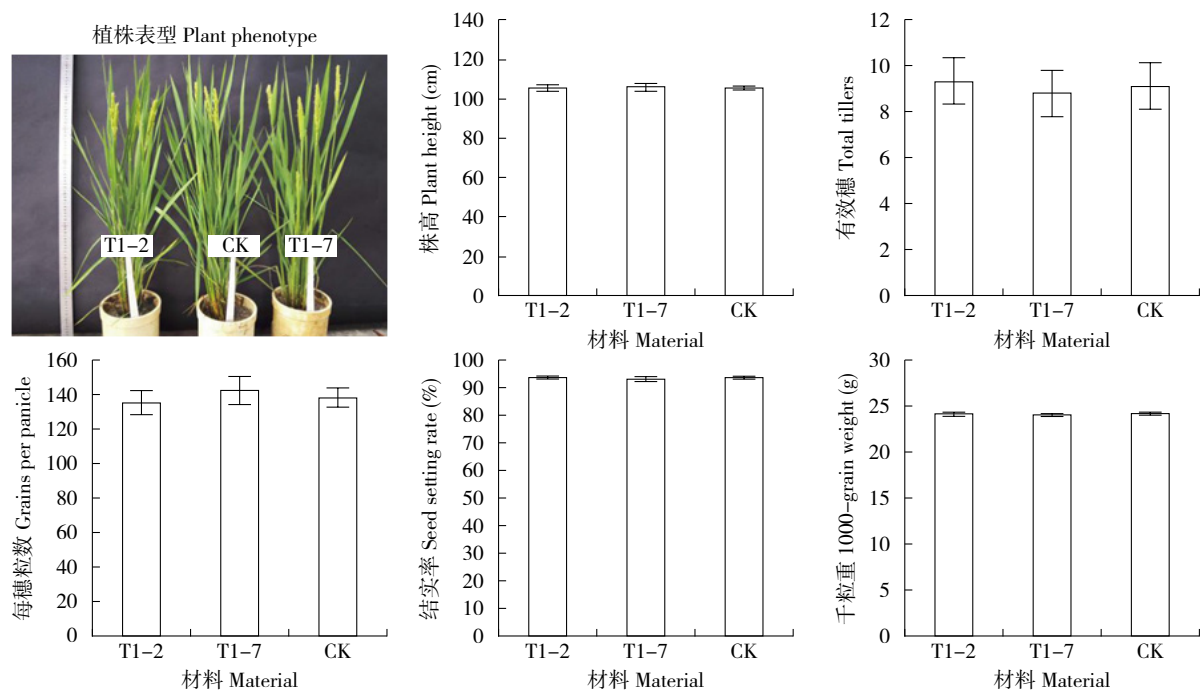


图 4 中选 T1 株系植株表型及产量相关农艺性状
Fig.4 Phenotype and performance of agronomic traits related to yield in desirable T1 line

3 讨论

香稻在我国栽培区域广泛，有很多的知名香稻品种，如云南的螃蟹谷、鸡血糯等，贵州的“香禾”等，其他如四川、广东、湖南、江西、江苏等省都有香稻种植^[23]，河南本地的息县香稻丸也久负盛名。传统的香稻品种选育都是通过非香品种与香稻品种杂交转育而来，育种周期长，费时费工；香味相关基因 *Bahd2* 的定位和克隆，使得香稻选育可以利用分子标记辅助育种技术，MAS 技术的应用可以省时省工，可以通过 MAS 加速香味基因转育，加快香稻选育的育种进程，已有多个单位通过开发分子标记实现香味基因的分子标记辅助选择^[24-28]。但如果非轮回亲本是古老香稻品种，可能会存在与香味基因紧密连锁的不良农艺性状，清除这些连锁累赘会比较困难。

基于 CRISPR/CAS9 基因编辑技术可以实现对基因组的精确定点编辑，CRISPR/CAS9 基因编辑

技术的应用使得香味水稻品种选育非常方便，优良品种通过编辑 *Bahd2* 基因可以直接突变为香型品种，且一般不改变其他农艺性状，大大加速了香稻品种的育种进程。

本试验以已有优良品种郑稻 19 为供体，针对 *Bahd2* 进行基因编辑，获得 9 株香味 T0 代单株，经对 T0、T1 代株系稻谷主要香味物质 2-AP 检测，发现香味物质显著高于对照。通过对 T1 代和 T2 代单株 *Bahd2* 编辑位点测序和 PCR 检测，获得 *Bahd2* 无功能纯合突变且无载体 T2 代单株，来源于 T1-2 株系的 T2 代单株 3 株，来源于 T1-7 株系的 T2 代单株 5 株。获得的无载体序列的香味株系后代农艺性状与供体材料基本保持一致，说明利用基因编辑创制香型材料成功，该材料可作为香稻新品种选育的基础和新种质，为已有优良品种快速香味品质改良提供有效技术参考。

研究中两次测定香味物质 2-AP 的含量，第一次检测郑州正季 T0 代单株种子 2-AP 含量，9

个香型单株的 2-AP 含量为 $1.259 \pm 0.072 \mu\text{g/g}$, 在 $1.195 \sim 1.394 \mu\text{g/g}$; 第二次测定 T1 代种子 (温室加代), 8 个香型株系 2-AP 含量 $0.537 \pm 0.111 \mu\text{g/g}$, 在 $0.440 \sim 0.756 \mu\text{g/g}$; 两次测定突变单株 2-AP 含量均显著高于对照郑稻 19, 但两次测定结果相差大, 可能与种植地生态条件和种植季节不同相关。研究表明香稻的香味明显受多种因素影响, 生态气候环境、土壤、肥料、栽培措施和贮存等种种因素都会影响香稻的香味^[28-30]。气候条件对香味影响较大, 一般认为, 种植于冷凉、干燥、昼夜温差大的地域的香气浓郁的香稻, 在高温条件下成熟的稻谷香味会减弱, 反之, 灌浆结实期间如遇冷凉气候, 香味就较浓^[31-32], 说明香型基因表达与种植环境条件相关, 因此有必要加以研究, 以利于培育更优质香型稻米。

参考文献

- [1]赵步洪,戴正元,谢成林,等. 直播水稻的研究与应用进展及发展策略. 江苏农业科学, 2010, 38(5): 13-15.
- [2]王才林,张亚东,朱镇,等. 水稻优质抗病高产育种的研究与实践. 江苏农业学报, 2012, 28(5): 921-927.
- [3]Buttery R G, Ling L C, Juliano B O, et al. Cooked rice aroma and 2-acetyl-1-pyrroline. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1983, 31: 823-826.
- [4]Ali S S, Jafri S J H, Khan M G, et al. Inheritance studies for aroma in two aromatic varieties of Pakistan. IRRN, 1993, 18: 65.
- [5]Ahn S N, Bollisch C N, Tanksley S D. RFLP tagging of a gene for aroma in rice. Theoretical and Applied Genetics, 1992, 84: 825-828.
- [6]Lorieux M, Petrov M, Huang N, et al. Aroma in rice: genetic analysis of a quantitative trait. Theoretical and Applied Genetics, 1996, 93: 1145-1151.
- [7]Jin Q, Waters D, Cordeiro G M, et al. A single nucleotide polymorphism (SNP) marker linked to the fragrance gene in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Science, 2003, 165: 359-364.
- [8]Wanchana S, Kamolsukyoung W, Ruengphayak S, et al. A rapid construction of a physical contig across a 4.5 cM region for rice grain aroma facilitates marker enrichment for positional cloning. Science Asia, 2005, 31: 299-306.
- [9]李金华,王丰,柳武革,等. 水稻粤丰 B 的香味遗传分析与 SSR 标记定位. 分子植物育种, 2006, 4(1): 54-58.
- [10]任野胜,肖培村,陈勇,等. 几个香稻保持系香味的遗传研究. 种子, 2004, 23(12): 24-28.
- [11]张涛,张红宇,蒋开锋,等. 水稻香味基因的精细定位. 分子植物育种, 2008, 6(6): 1038-1044.
- [12]Bradbury L M T, Fitzgerald T L, Henry R J, et al. The gene for fragrance in rice. Plant Biotechnology Journal, 2005, 3: 363-370.
- [13]Bradbury L M T, Gillies S A, Brushett D J, et al. Inactivation of an amino-aldehyde dehydrogenase is responsible for fragrance in rice. Plant Molecular Biology, 2008, 68: 439-449.
- [14]Chen S, Yang Y, Shi W, et al. *Badh2*, encoding betaine aldehyde dehydrogenase, inhibits the biosynthesis of 2-acetyl-1-pyrroline, a major component in rice fragrance. Plant Cell, 2008, 20: 1850-1861.
- [15]Shi W W, Yang Y, Chen S H, et al. Discovery of a new fragrance allele and the development of functional markers for the breeding of fragrant rice varieties. Molecular Breeding, 2008, 22(2): 185-192.
- [16]姜达,卢小勇,王延春,等. 27 种香稻品种 *Badh2* 突变位点序列的分析. 分子植物育种, 2015, 13(2): 276-280.
- [17]Niu X L, Tang W, Huang W Z, et al. RNAi-directed down regulation of *OsBadh2*. results in aroma (2-acetyl-1-pyrroline) production in rice (*Oryza sativa* L.). BMC Plant Biology, 2008, 8: 100.
- [18]Chen M L, Wei X J, Shao G N, et al. Fragrance of the rice grain achieved via artificial micro RNA-induced down-regulation of *OsBadh2*. Plant Breeding, 2012, 131: 584-590.
- [19]Shan Q W, Zhang Y, Chen K L. Creation of fragrant rice by targeted knockout of the *OsBadh2* gene using TALEN technology. Plant Biotechnology Journal, 2015, 13: 791-800.
- [20]邵高能,谢黎虹,焦桂爱,等. 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.
- [21]周文甲,田晓杰,任月坤,等. 利用 CRISPR/CAS9 创造早熟香味水稻. 土壤与作物, 2017, 6(2): 146-152.
- [22]Xing H, Dong L, Wang Z, et al. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. BMC Plant Biology, 2014, 14(1): 327.
- [23]李林峰,李军. 香稻种质资源及研究进展. 上海农学院学报, 1997, 1(4): 305-309.
- [24]Bradbury L M T, Henry R J, Jin Q S, et al. A perfect marker for fragrance genotyping in rice. Molecular Breeding, 2005, 16(4): 279-283.
- [25]朱映东,时亚琼,周锋利,等. 分子标记辅助选育香型巨胚水稻. 上海师范大学学报 (自然科学版), 2013, 42(6): 423-428.
- [26]许言福,黄菊,王英存,等. 两种筛选水稻 *BADH2*-E2 类型香味基因分子标记的建立. 分子植物育种, 2015(11): 2441-2445.
- [27]张羽. 水稻香味基因特异标记的构建. 江苏农业科学, 2011, 39(4): 43-47.
- [28]闫影,诸光明,张丽霞,等. 水稻香味基因分子标记的开发及应用. 西北植物学报, 2015, 35(2): 269-274.
- [29]张现伟,王静,唐永群,等. 香稻香味遗传育种及其保香栽培. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(3): 550-555.
- [30]唐湘如,吴密. 施用锌、铁、硼肥对香稻米质和产量的影响. 杂交水稻, 2007, 22(2): 69-72.
- [31]孙树侠,刘书城. 水稻的香味及 N、Zn 肥对香味效应的研究. 作物学报, 1991, 17(6): 430-435.
- [32]严力蛟. 香米的香气研究综述. 中国稻米, 1995, 1(4): 27-29.

Breeding Fragrant Rice Zhengdao19 Using CRISPR/Cas9 Mediated Gene Editing Technology

Wang Fuhua¹, Xue Huazheng¹, Wang Ya¹, Wang Shengxuan¹,
Wang Yuetao¹, Fu Jing¹, Yang Wenbo¹,
Bai Tao¹, Li Junzou², Yin Haiqing¹

(¹Institute of Cereal Crop, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, Henan, China;

²Agronomy College, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan, China)

Abstract Fragrant rice is favored by Chinese consumers. In this study, Fragrance rice mutant lines were developed with CRISPR/CAS9 by editing gene *Badh2*, a key gene determining rice fragrance of Zhengdao 19, a rice variety suitable for direct-sowing as transformation donor. Totally, 9 fragrant mutants were obtained out of 11 positive transgenic T0 plant individuals. And twenty-two individuals of six T1 lines were confirmed by editing region sequencing. Seven mutation types were discovered, including five kinds of delete, two kinds of insert. Totally, three biallelic mutation lines (T1-2, T1-3 and T1-7) and ten homozygous mutants were found. Meanwhile sequencing twenty-eight T2 individuals revealed twenty-one homozygous mutants. Utilization of selectable marker screening to T2 progeny (from T1 lines T1-2, T1-6 and T1-7) eight marker-free homozygous mutants were found, and three were from T1-2, five from T1-7, respectively. Compared with the wild type, the 2-acetyl-1-pyrroline content increased from 0.003μg/g (in the wild type) to 1.259±0.072μg/g for T0 mutants planted in field, from 0.002μg/g (in the wild type) to 0.537±0.111μg/g for T1 mutants planted in greenhouse, without significant alternation in mainly agronomic traits. All selected marker-free homozygous individuals was available to be applied in germplasm enhancement and fragrance rice breeding practice.

Key words Rice; Zhengdao19; Fragrance; *Badh2*; CRISPR/CAS9