

利用 CRISPR/Cas9 技术编辑 *Badh2* 基因 改良水稻优质恢复系 QR79 的香味

吴钱蓉^{1,2} 吴 娴² 姜 雪² 王 倩^{2,3} 官彦龙² 王忠妮² 朱速松⁴ 宋 莉¹

(¹贵州大学生命科学学院/贵州大学农业生物工程研究院/山地植物资源保护与种质创新教育部重点实验室, 550000, 贵州贵阳;

²贵州省水稻研究所, 550000, 贵州贵阳; ³农业农村部喀斯特山区作物基因资源与种质创新重点实验室, 550000, 贵州贵阳;

⁴贵州省农作物品种资源研究所, 550000, 贵州贵阳)

摘 要 以优质恢复系 QR79 为受体材料, 采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 针对其 *Badh2* 基因的第 1 外显子和第 2 外显子区域, 设计 2 个靶向位点, 旨在获得具有香味、无转基因成分且主要农艺性状保持稳定的纯合突变体。对野生型和突变体的 *Badh2* 基因表达量、2-乙酰-1-吡咯啉 (2AP) 含量、 γ -氨基丁酸 (GABA) 含量及主要农艺性状进行了系统测定与分析。结果表明, 与野生型相比, 纯合突变体植株 QR79-*badh2-1* 和 QR79-*badh2-2* 中 *Badh2* 基因表达量显著降低, 2AP 含量显著增加, 而 GABA 含量显著减少; 同时, 粒长、千粒重、整精米率和结实率等主要农艺性状保持稳定, 但产量构成因子受到一定程度影响。综上所述, 通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术成功实现了对优质水稻恢复系 QR79 的香气特性遗传改良, 显著提升了香味成分 2AP 的含量, 为加速香型籼稻新品种的研发提供了理论依据和遗传资源。

关键词 香稻; *Badh2*; CRISPR/Cas9; 2-乙酰-1-吡咯啉; γ -氨基丁酸

水稻作为全球粮食供应的重要基石, 其品质的提升已成为育种领域的研究热点。在众多品质特性中, 香味是衡量水稻品质的关键指标之一^[1]。香稻凭借其独特的香气深受消费者喜爱, 市场价格也相对较高^[2-4]。自 20 世纪 80 年代以来, 科学家们开始深入探究大米香味的挥发性成分。迄今为止, 已在多种香稻品种中鉴别出 300 多种挥发性芳香物质^[5-6]。其中, 2-乙酰-1-吡咯啉 (2-acetyl-1-pyrroline, 2AP) 是稻米中爆米花香气的主要化合物^[7-11]。除 2AP 外, 还有烃类、醛类、酮类、酯类、醇类和酚类等多种挥发性物质对稻米香味有贡献^[12]。早期研究^[13-14]表明, 水稻香气是由 1 个单隐性基因控制的。随着科学家们对香味基因的深入研究, 遗传分析结果表明, 水稻中香味主要受位于第 8 号染色体上的 1 个单隐性基因 *Badh2* 控制^[15-16], 包含 15 个外显子和 14 个内含子, 编码 1 个由 503 个氨基酸残基组成的蛋白质, 该蛋白质具有 NAD 结合结构域、底物结合结构域及低聚体化结构域^[17]。此外, *Badh2* 基因编码的蛋白质具有醛脱氢酶活性, 能够催化甜菜碱醛、 γ -氨基丁醛

(AB-ald) 以及 3-氨基丙醛的氧化过程^[18]。在非香米水稻品种中, BADH2 蛋白主要催化 AB-ald 的氧化, 而 AB-ald 正是香米中香味主要成分 2AP 的关键前体; 当 BADH2 蛋白正常发挥功能时, 将 AB-ald 氧化为 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA), 阻断 2AP 的合成路径, 导致稻米失去香味^[3,16-18]; 相反, 在香米品种中, 由于 *Badh2* 基因发生了功能缺失型突变, 导致 BADH2 蛋白失去催化活性, AB-ald 无法转化为 GABA, 这一变化促使了 2AP 的合成, 赋予了稻米独特的香味^[2,19]。

传统水稻育种主要采用杂交育种和系统选育等方法, 这些方法存在育种周期漫长、受环境影响大、性状易因环境改变而鉴定难、劳动强度高、基因资源利用局限、育种效率低等缺点。相比之下, CRISPR/Cas 基因编辑技术作为一种前沿的生物技术, 具有高效性和高度精确性。该技术能够通过特定的引导 RNA 与目标 DNA 序列的精准互补配对, 在较短的时间周期内培育出具有特定优良性状的新水稻种质资源。Hui 等^[20]以粳稻宁粳 1 号 (NJ1) 和籼稻黄华占 (HHZ) 为受体材料, 利用 CRISPR/

作者简介: 吴钱蓉, 主要从事水稻分子遗传育种研究, E-mail: 3426853382@qq.com

朱速松为通信作者, 主要从事水稻分子遗传育种研究, E-mail: susongzhu@139.com; 宋莉为共同通信作者, 主要从事植物发育生物学和生物技术方面的研究, E-mail: lpsssl@126.com

基金项目: 贵州省农业科学院青年基金项目[黔农科青年基金 (2023) 30]; 贵州省科技计划项目 (课题) [黔科合基础-ZK (2022) 一般 284]; 贵州省优质特色水稻研发与转化及园区技术服务能力建设[黔科合平台人才 (2017) 5719 号]

收稿日期: 2025-02-18; 修回日期: 2025-04-04; 网络出版日期: 2025-05-24

Cas9 基因编辑技术创建 *Badh2* 的新等位基因, 将获得的新等位基因材料与不育系桃农 1A 杂交, 成功获得了具有香味的三系杂交品种 B-桃优香占。韦新宇等^[21]利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术对无香水稻明太 B 的香味基因 *Badh2* 进行编辑, 在 T₂ 代通过测交和回交转育的方法, 成功培育出高产且具有香味的三系不育系。张文婷等^[22]利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术以无香水稻日本晴为背景构建了 *Badh2* 基因的敲除株系, 成功获得了 2 株具有香味的突变体植株。

本研究以非香型恢复系 QR79 为受体材料, 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术针对其 *Badh2* 基因的第 1 和第 2 外显子进行精准编辑, 旨在获得具有香味、不含转基因成分且主要农艺性状保持不变的纯合突变体, 为加速香型优质籼稻新品种的培育提供理论依据和材料支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

水稻遗传转化受体材料为优质恢复系 QR79, 该材料是贵州省水稻研究所选育的国家审定通过、符合市场需求的优质稻新品种泰丰优 79 的亲本材料, 具有恢复力强、配合力高、穗大、花粉量足及制种产量高等特点, 属于典型的非香稻材料。香味表型鉴定香稻对照材料为大粒香, 该材料是贵州省水稻研究所采用粳籼杂交于 2002 年选育而成的优质、大粒、香型常规水稻品种, 属于典型的香稻材料。转基因材料于 2023 年冬季种植在海南三亚南繁育种试验田, 2024 年夏季种植在江西省农业科学院水稻研究所试验基地, 按正常水稻生长季节在田间栽培, 根据标准田间栽培方法施用水和肥料。

CRISPR/Cas9 敲除载体 *pEGCas9Pubi-H* 和模板由华南农业大学刘耀光院士惠赠。

1.2 *Badh2* 靶点设计及 CRISPR/Cas9 敲除载体构建

根据 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 提供的 *Badh2* 基因序列信息, 下载水稻香味基因 *Badh2* (登陆号: LOC_Os08g32870) DNA 序列。结合 CRISPR-GE(<http://skl.scau.edu.cn/>) 在线分析网站中“target Design”模块在 *Badh2* 第 1 和第 2 外显子设计靶点, 靶点序列见图 1。使用 BLAST 比对分析靶位点, 排除潜在脱靶的可能,

确保合成 sgRNA 序列的正确性。载体构建过程依据 Gao 等^[23]的方法进行, 具体步骤概述如下: 首先, 采用含有 U6 表达框的载体 *pEGCas9Pubi-H/U6* 作为模板, 执行 2 轮聚合酶链式反应 (PCR) 扩增。在第 1 轮 PCR 中, 利用引物对 U-F 与 OsU6-R 以及 gRNA-R 与 gR-F 分别进行扩增; 进入第 2 轮 PCR 时, 则采用引物对 Pps-R 与 Pgs-L 进行进一步的扩增, 引物见表 1。随后, 将 2 轮 PCR 所得的扩增产物加以混合, 并连接到经过 *Bsa* I 限制性内切酶切割处理后的 *pEGCas9Pubi-H* 载体骨架上, 从而获取最终的重组表达载体 *pEGCas9Pubi-H-Badh2*。采用酶切分析和测序鉴定方法验证载体是否构建成功, 将确认无误的表达载体导入农杆菌 *EHA105* 中。植物受体材料的遗传转化过程由武汉艾迪晶生物科技有限公司完成。

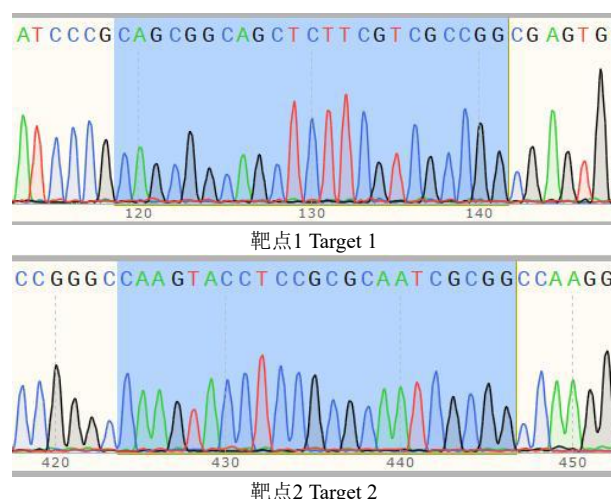


图 1 试验所用靶点序列

Fig.1 The target sequence used in the experiment

1.3 转基因材料的创建与检测

在幼苗期, 采用改良的 CTAB 方法^[24]从 T₀ 代转基因植株的叶片中提取 DNA。使用 Cas9 核酸酶的特异性引物 Cas9 F/R (表 1) 进行 PCR 扩增。扩增产物通过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳进行了检测, 其中显示出明显条带的植株被确认为转基因阳性, 而未见条带的则为阴性。对于 T₁ 代材料, 也采用了相同的方法, 以筛选出不含转基因成分的单株。

1.4 突变类型分析

根据水稻香味基因 *Badh2* 序列, 在其靶点位置上下游设计特异性测序引物 *Badh2*-F/R, 利用 DNA 聚合酶 2×Magic Green Taq SuperMix (TOLOBio) 对基因编辑后代 *Badh2* 基因靶点相邻序列进行

表 1 试验所用引物序列
Table 1 The primer sequences used in this test

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence	引物用途 Purpose
gR-F-T ₁	CAGCGGCAGCTCTTCGTCGCgttttagagctagaaat	载体构建
OsU6a-R-T ₁	GCGACGAAGAGCTGCCGCTGCggcagccaagccagca	载体构建
gR-F-T ₂	CAAGTACCTCCGCGCAATCGgttttagagctagaaat	载体构建
OsU6b-R-T ₂	CGATTGCGCGGAGGTACTTGCaacacaagcggcagc	载体构建
U-F	CTCCGTTTTACCTGTGGAATCG	载体构建
gRNA-R	CGGAGGAAAAATCCATCCAC	载体构建
Pps-R	TTCAGAggtctcT accg ACTAGTATGGAATCGGCAGCAAAGG	载体构建
Pgs-L	AGCGTGggtctcG ctgc ACGCGTATCCATCCACTCCAAGCTC	载体构建
SP-L	GCGGTGTCATCTATGTTACTAG	菌落 PCR 检测
SP-R	TGCAATAACTTCGTATAGGC	菌落 PCR 检测
Cas9-F	AGATGATCGCCAAGTCCGAGC	转基因阳性株检测
Cas9-R	CTTGATGATGAGGTCTCTCTTG	转基因阳性株检测
Badh2 -F	TCCATCTCCGTATCTCTCAC	<i>Badh2</i> 基因扩增、测序
Badh2-R	TATGGGGGGCTTATACCGAA	<i>Badh2</i> 基因扩增、测序
Badh2-RP-F	TTATGGTCTGGCTGGTGCTGT	<i>Badh2</i> 基因的荧光定量 PCR 扩增
Badh2-RP-R	TGCTTGACGCTTAGGTAGTTGT	<i>Badh2</i> 基因的荧光定量 PCR 扩增
Actin-RP	GTACAGTGTCTGGATTGGAGGAT	水稻内参基因扩增
Actin-FP	GGGTCCGAAGAATTAGAAGCA	水稻内参基因扩增

PCR 扩增。经过 1.5%琼脂糖凝胶电泳验证 PCR 扩增产物中的目的条带后，将 PCR 产物提交至重庆擎科生物技术有限公司进行测序。以野生型优质恢复系 QR79 的 *Badh2* 基因序列为对照，利用 Snapgene 和 DNAMAN 等软件工具，对测序数据进行比对与解析。

1.5 通过感官评价试验筛选 T₀ 和 T₁ 代的香气

香味表型鉴定方法参考文献[14]，具体步骤如下：首先，将大约 4 g 水稻叶片剪碎后置入试管，随后向试管中加入 15~20 mL 浓度为 1.7%的 KOH 溶液。接着用橡胶塞紧密封闭试管口，在室温（约 25 ℃）下浸泡 20 min。打开橡胶塞，由 5 位鉴定人员依次嗅闻其气味，判断是否存在香味。根据 5 次鉴定结果，若大于 3 次鉴定结果为香，则汇总记为“香”；若大于 3 次鉴定结果为不香，则汇总记为“不香”。该方法也被应用于鉴定 T₁ 代材料，以确定无转基因成分单株的香味表型。

1.6 *Badh2* 基因表达水平及 GABA 含量测定

采用 Trizol 试剂从野生型和转基因突变体植株的分蘖期叶片中提取总 RNA，使用反转录试剂盒（Takara）获得第 1 链 cDNA，将 cDNA 模板稀释至适当倍数后，应用于荧光定量 qRT-PCR 分析香味基因 *Badh2* 的相对表达水平，*Actin* 作为内参基因，通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式计算基因的相对表达量。采用液相色谱—质谱联用技术（HPLC-MS/MS）检测和分析野生型和突变体植株成熟籽粒中 GABA 的

含量。

1.7 香味物质 2AP 含量测定

采用气相色谱—质谱联用（GC-MS）仪测定香味物质 2AP 的含量，以 2,4,6,-三甲基吡啶（TMP）作为内标。收获野生型和转基因材料成熟种子，脱壳成糙米，称取 3 g 大米样品添加到 20 mL 顶空瓶中，加入 3 mL 饱和氯化钠进行萃取，同时加入内标（TMP，相对密度 1.215 g/mL）盖紧盖子，使用三重四级杆气质联用仪（Trace1310/TSQ 9000，Thermo Scientific）进行检测。气相色谱毛细管色谱柱为 TG-5MS（长 30 m×内径 0.25 mm×膜厚 0.25 μm），色谱及质谱条件参照文献[25]，检测工作由中山大学生命科学学院水产动物疫病防控与健康养殖全国重点实验室完成。

1.8 突变体株系主要农艺性状考察

2024 年夏，在水稻成熟期，分别随机选取野生型和 T₁ 代纯合突变且不含 *Cas9* 基因的植株，对粒长、粒宽、长宽比、有效穗数、每穗总粒数、千粒重、结实率、整精米率主要农艺性状进行考察和分析。

1.9 数据处理

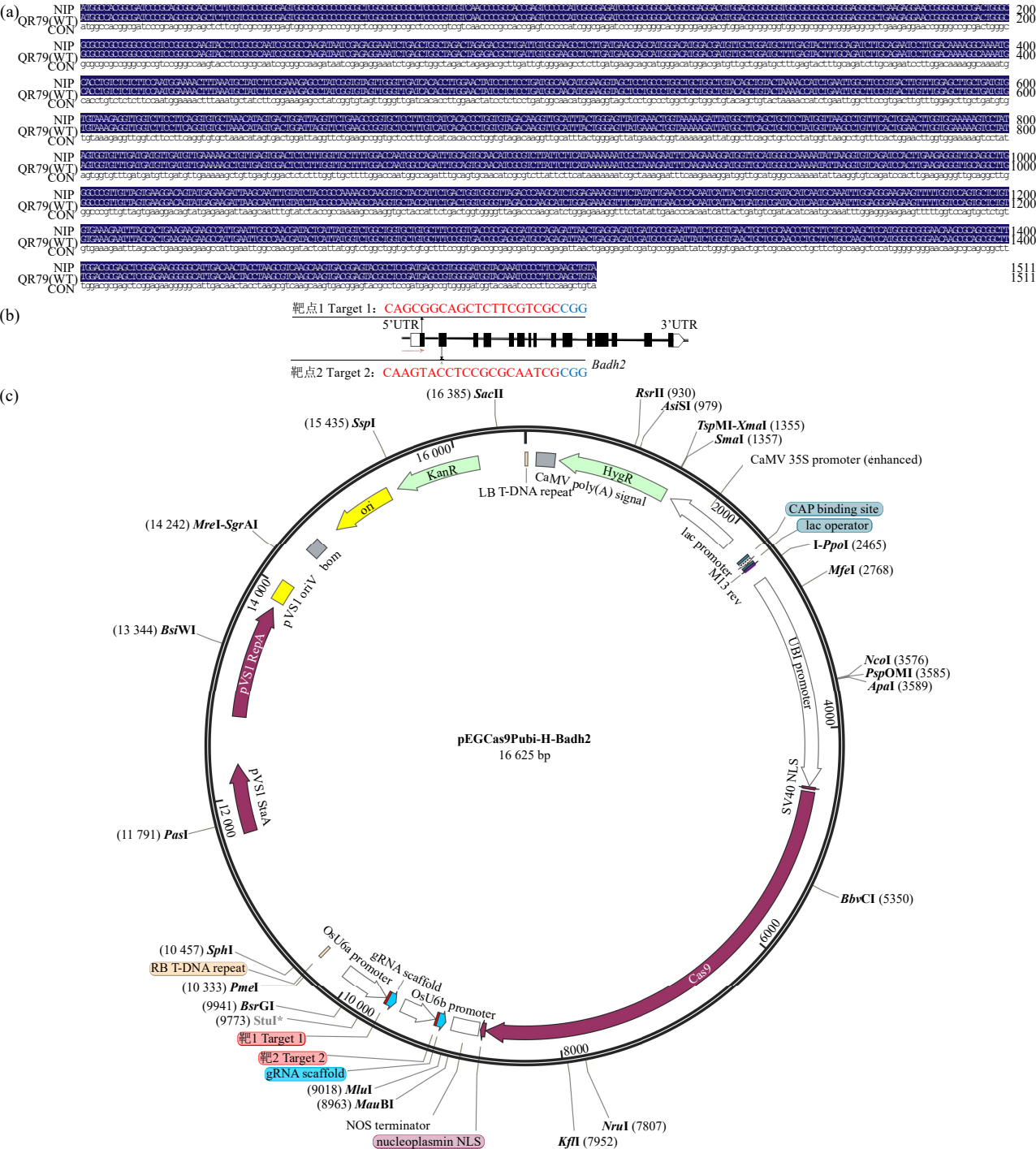
通过 Microsoft Excel 进行数据统计和分析。

2 结果与分析

2.1 CRISPR/Cas9 表达载体的构建

利用 *Badh2/badh2* 位点特异性引物（*Badh2*P₁-P₁₀）^[16]对优质恢复系 QR79 香味基因 *Badh2* 全长

序列进行克隆和测序分析。研究结果（图 2a）显示，优质恢复系 QR79 香味基因 *Badh2* 不存在突变，属于典型的非香籼稻品种。在其 *Badh2* 基因的第 1 和第 2 外显子上设计 2 个特异性靶点（图 2b）。将这 2 个靶点的 sgRNA 表达盒构建至载体 pEGCas9Pubi-H-*Badh2* 上（图 2c），并通过 PCR



(a) 优质恢复系 QR79 香味基因 *Badh2* 全长序列对比图，NIP：日本晴，CON：共识序列，下同；(b) 2 个靶点在 *Badh2* 基因上的位置，黑色区域为外显子区域，左一为第 1 外显子，左二为第 2 外显子，红色序列为靶点序列，蓝色序列为 PAM 序列；(c) U6a 驱动的 T₁ 和 U6b 驱动的 T₂ 2 个表达盒在 pEGCas9Pubi-H-*Badh2* 载体上的连接顺序。

(a) full-length sequence alignment of fragrance gene *Badh2* in elite restorer line QR79, NIP: Nipponbare, CON: consensus, the same below; (b) positions of two target sites on the *Badh2* gene. Black regions represent exons (the leftmost one is Exon 1, the second from the left is Exon 2); red sequences indicate target sequences, and blue sequences denote PAM sequences; (c) assembly order of two expression cassettes (T₁ driven by U6a and T₂ driven by U6b) on vector pEGCas9Pubi-H-*Badh2*.

图 2 靶点在 *Badh2* 基因上的位置及载体构建图

Fig.2 The position of the target site on the *Badh2* gene and the vector construction diagram

扩增及测序验证。验证无误后，将携带 sgRNA 的 Cas9 表达载体转移至农杆菌 EHA105 的感受态细胞中，进而开展后续的转基因试验。

2.2 T₀代阳性转基因植株鉴定及靶点突变类型分析

通过农杆菌介导的水稻转化法进行遗传转化，共获得 12 个独立的 T₀代转基因植株。分别提取每个转基因植株苗期叶片全基因组 DNA，并利用核酸酶 Cas9 特异性引物 Cas9-F/R 对 DNA 进行 PCR 扩增检测外源基因。根据琼脂糖胶图看出，其中有 9 个单株为转基因阳性植株，转化率达到 75.0%

(图 3a)。通过设计特异性测序引物 *Badh2* J-F/R 对筛选出的 9 个阳性转基因植株 *Badh2* 基因靶点位置相邻序列进行 PCR 扩增和测序分析。通过序列对比得出，在 9 个转基因阳性植株中，有 4 个单株为杂合突变，分别是 J-19（缺失 19 个碱基）、J-22（插入 1 个碱基 A）、J-23（插入 1 个碱基 T）和 J-27（插入 1 个碱基 T）；有 3 个单株为双杂合突变，分别是 J-25（插入 1 个碱基 T，缺失 8 个碱基）、J-26（插入 2 个碱基 T 和 A）和 J-32（插入 2 个碱基 C 和 A）；2 个单株为双等位基因纯合突变，分别为 J-18（缺失 1 个碱基）和 J-29（靶点上

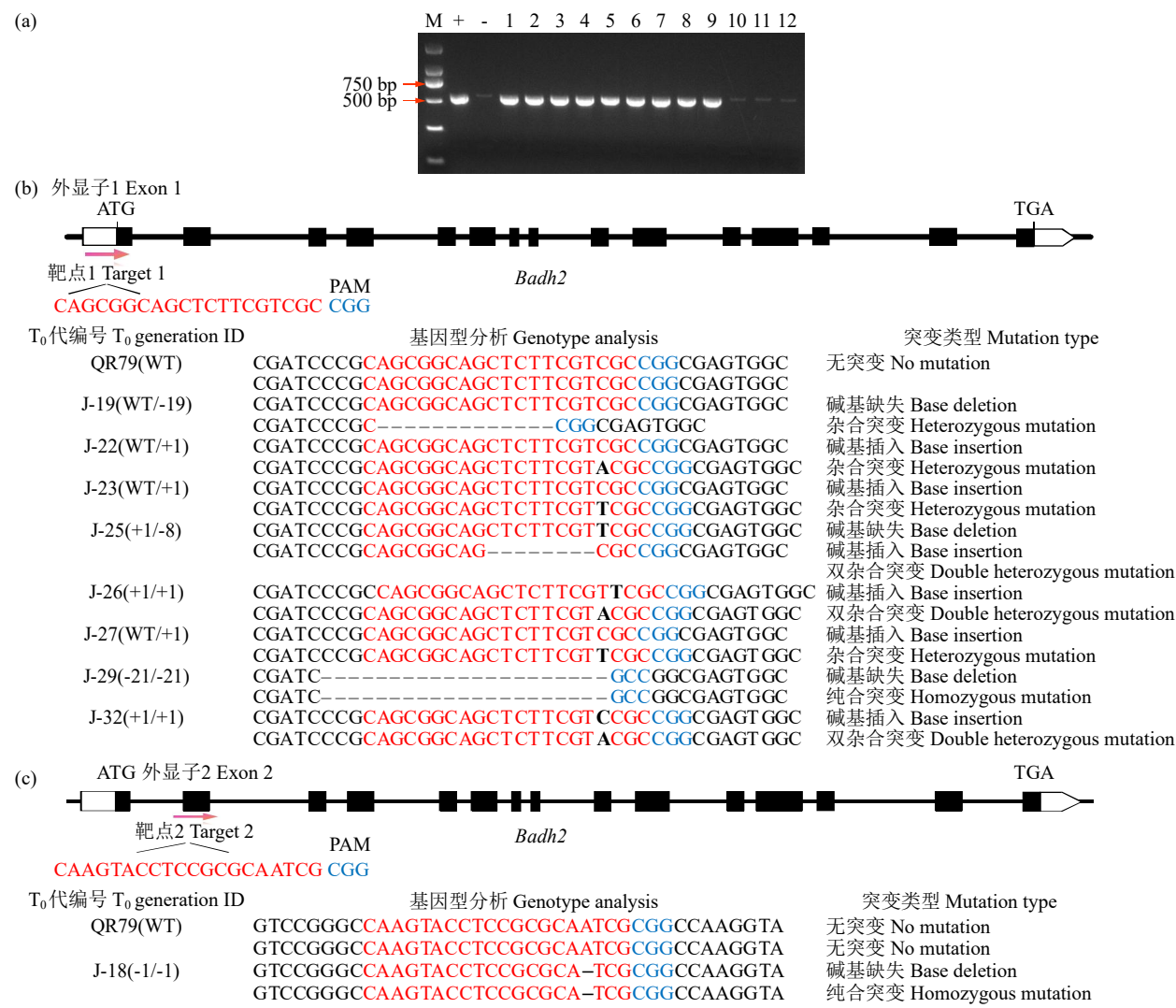


图 3 T₀代转基因阳性植株鉴定及其突变类型分析

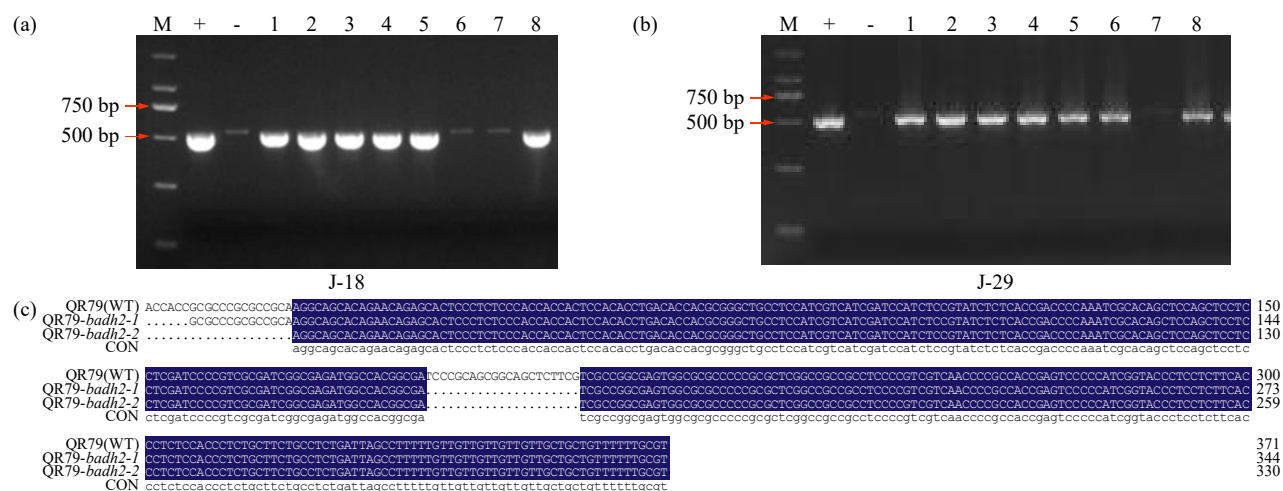
Fig.3 Identification of T₀ generation transgenic positive plants and analysis of their mutation types

缺失 18 个碱基, 靶点之前缺失 3 个碱基, 共计缺失 21 个碱基) (图 3b~c)。

2.3 筛选 T₁ 代不含 *Cas9* 基因的纯合突变植株

为获得有香味且无转基因载体成分的基因编辑株系, 分别单独收取 2 个 T₀ 代纯合突变植株 J-18 和 J-29 成熟种子, 于 2024 年夏在转基因试验田种植 T₁ 代分离材料, 每个株系分别种植 16 个单株。抽穗期, 在 2 个株系中, 分别挑选与野生型长势一致的 8 个单株提取基因组 DNA, 利用核酸酶 *Cas9* 特异性引物来筛选不含外源转基因载体, 在 J-18 株系挑选的 8 株中, 有 1 株不含 *Cas9* 外源基因; 而在 J-29 株系中挑选的 8 株中, 有 2 株不含 *Cas9*

外源基因 (图 4a~b)。随后, 以野生型作为非香稻对照, 大粒香为香稻材料对照, 对筛选出来的 3 株不含外源基因的植株进行香味表型鉴定, 结果表明 J-18 株系中筛选到的 1 株不含 *Cas9* 外源基因植株不具有香味, J-29 株系中筛选到的 2 株不含 *Cas9* 外源基因植株具有香味。接着对 J-29 株系中的 2 株无 *Cas9* 基因有香味的植株对其 *Badh2* 基因靶点位置 DNA 序列进行 PCR 扩增和测序分析。测序结果 (图 4c) 显示, 2 株都为纯合突变, 与 T₀ 代突变一致, 在后续的研究中, 将其命名为 QR79-*badh2-1* 和 QR79-*badh2-2*。在抽穗期, 对这 2 株进行套袋, 防止飞花, 等到种子成熟后, 分别收取进行进一步



(a) 编号 1~8 对应 J-18 株系; (b) 编号 1~8 对应 J-29 株系; (c) T₁ 代纯合突变植株序列对比图。

(a) Number 1-8 correspond to line J-18; (b) Number 1-8 correspond to line J-29; (c) Sequence alignment of homozygous mutant plants in the T₁ generation.

图 4 Cas9-F/R 引物对 T₁ 代基因编辑株系中 *Cas9* 基因 PCR 检测图

Fig.4 The PCR detection diagram of the *Cas9* gene in the T₁ generation gene-edited lines using the *Cas9*-F/R primer pair

加代繁殖, 并用于后续的功能研究和表型分析。

2.4 T₁ 代纯合突变植株 *Badh2* 基因表达水平及 GABA 含量

为了深入探究香味基因 *Badh2* 在转基因植株后代的功能特性及其 RNA 转录层面的表达模式, 分别提取野生型 QR79 和纯合突变体 QR79-*badh2-1*、QR79-*badh2-2* 材料叶片总 RNA, 并通过荧光定量 qRT-PCR 技术对 *Badh2* 基因进行表达水平分析。根据数据分析 (图 5a) 得出, 相较于野生型 QR79, 突变体中 *Badh2* 基因的相对表达量显著降低。表明突变体 QR79-*badh2* 材料中 *Badh2* 基因的突变是直接导致该基因 RNA 水平降低的原因。用 HPLC-MS/MS 对 GABA 含量检测的结果 (图 5b) 显示, 野生型中的 GABA 含量显著高于突变体中的, 表明 *Badh2* 基因发生了功能缺失型突变, 导致

BADH2 蛋白失去催化活性, 使得 AB-ald 无法转化为 GABA。

2.5 转基因后代香味物质 2AP 含量

为测定基因编辑品系中香气成分 2-AP 的浓度, 收取纯合突变体植株 QR79-*badh2-1*、QR79-*badh2-2* 与野生型植株的成熟籽粒样本, 并利用 GC-MS 对样本中的 2AP 含量进行了定量与分析。在此分析过程中, 选用了 TMP 作为内标物, 因其分子量及化学属性与 GC-MS 检测中的 2AP 相近。检测结果 (图 6) 显示, 在野生型 QR79 的成熟籽粒中, 未检测到香气成分 2AP 的存在; 相比之下, 编辑品系 QR79-*badh2-1* 的成熟籽粒中 2AP 含量达到了 2.2923 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 显著高于野生型 ($P < 0.05$); 而在 QR79-*badh2-2* 的成熟籽粒中, 2AP 含量更是高达 3.4847 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 与野生型相比呈现出极显著差异

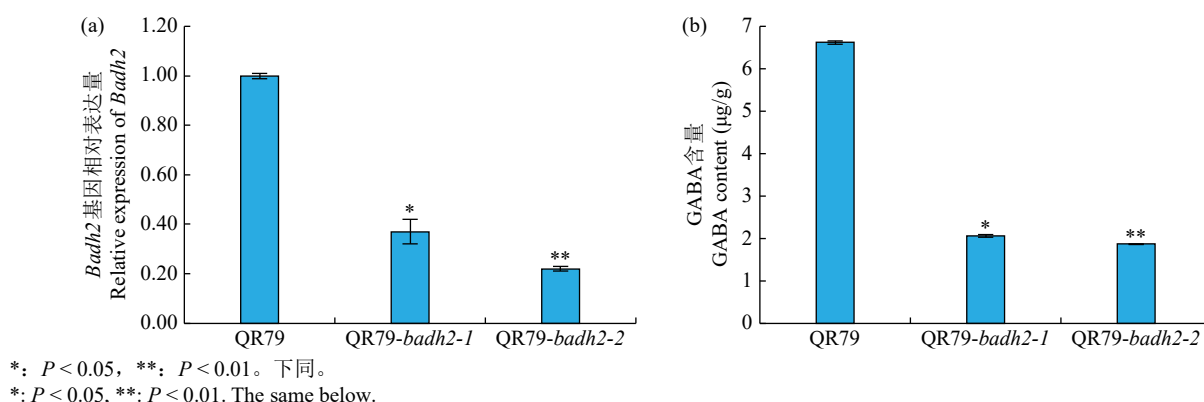

 图 5 转基因后代中 *Badh2* 基因表达水平及 GABA 含量检测

 Fig.5 Detection of the expression level of the *Badh2* gene and the content of GABA in the transgenic offspring

($P < 0.01$)。上述发现表明，突变体中 *Badh2* 基因的突变导致了其表达水平的下调，进而促使香气成分 2AP 的含量上升，赋予了突变体更为浓郁的香气特征，实现了香味性状的优化。

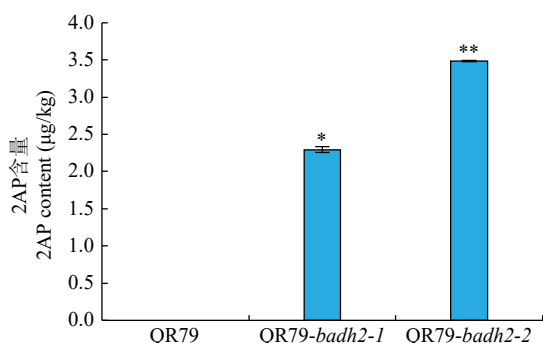

 图 6 野生型 QR79 和突变体 QR79-*badh2* 成熟籽粒中 2AP 含量

 Fig.6 2AP content in mature grains of wild-type QR79 and the mutant QR79-*badh2*

2.6 主要农艺性状考察

为研究香味基因 *Badh2* 突变后是否对主要农艺性状及产量有影响，针对野生型 QR79 及其 T₁ 代纯合突变体 (QR79-*badh2*-1 与 QR79-*badh2*-2)，进行了包括粒长、粒宽、长宽比、有效穗数、每穗总粒数、千粒重、结实率以及整精米率等农艺性状的统计分析。由图 7 可得，相对于野生型，纯合突变体 QR79-*badh2*-1 和 QR79-*badh2*-2 的千粒重、每穗总粒数、整精米率和结实率无显著差异；粒长显著降低，粒宽显著提高 ($P < 0.05$)，每穗总粒数有所降低；而突变体 QR79-*badh2*-1 长宽比则极显著降低 ($P < 0.01$)，QR79-*badh2*-2 显著降低 ($P < 0.05$)。因此，通过以上数据分析结果可以推断，利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术对优质恢复系 QR79 中的香味基因 *Badh2* 进行敲除后，可以获得

有香味的纯合突变植株，且植株的粒长和结实率等核心农艺性状保持稳定，但产量构成因子受到一定程度影响。在后续育种实践中，可采用回交育种技术与野生型亲本进行多代回交，在田间开展双重筛选：一方面针对目标性状进行定向选择，在保证受体亲本主要农艺性状（株型和产量构成因子等）稳定遗传的前提下，筛选出香味物质含量显著提升的单株；另一方面通过 SSR 分子标记辅助选择，结合 GC-MS 技术对 2AP 等特征香气成分进行定量检测，精准鉴定携带目标香味基因的纯合株系。最终通过系统选育，构建既保持 QR79 品种原有丰产性和抗逆性等优良特性，又兼具优质香味性状的新种质资源。

3 讨论

在市场经济环境下，商品的价格由供需关系决定。对于大米而言，香气出众的品种更受消费者喜爱，其市场需求通常较高。然而，由于种植条件、品种特性等因素的限制，优质香气大米的供给量相对有限。这种供不应求的市场态势使得香气优良的大米在价格上具有明显优势^[26]。*Badh2* 基因作为调控水稻香气的主要基因，其功能丧失会导致芳香族化合物 2AP 的积累，从而增强大米的香气，不同类型的 *Badh2* 突变会影响 2AP 的积累水平。CRISPR/Cas9 基因编辑技术凭借其精准高效的基因组编辑能力，在植物育种领域成为传统育种方法的有效替代方案。相较于传统的回交法和诱变育种技术，该技术能够根据实际生产需求及人类改良目标，对任意目标性状进行定向编辑与优化。该技术不仅加速了有利等位基因材料的开发，还促进了新型遗传资源的创造，为新品种的培育提供了高效且创新的策

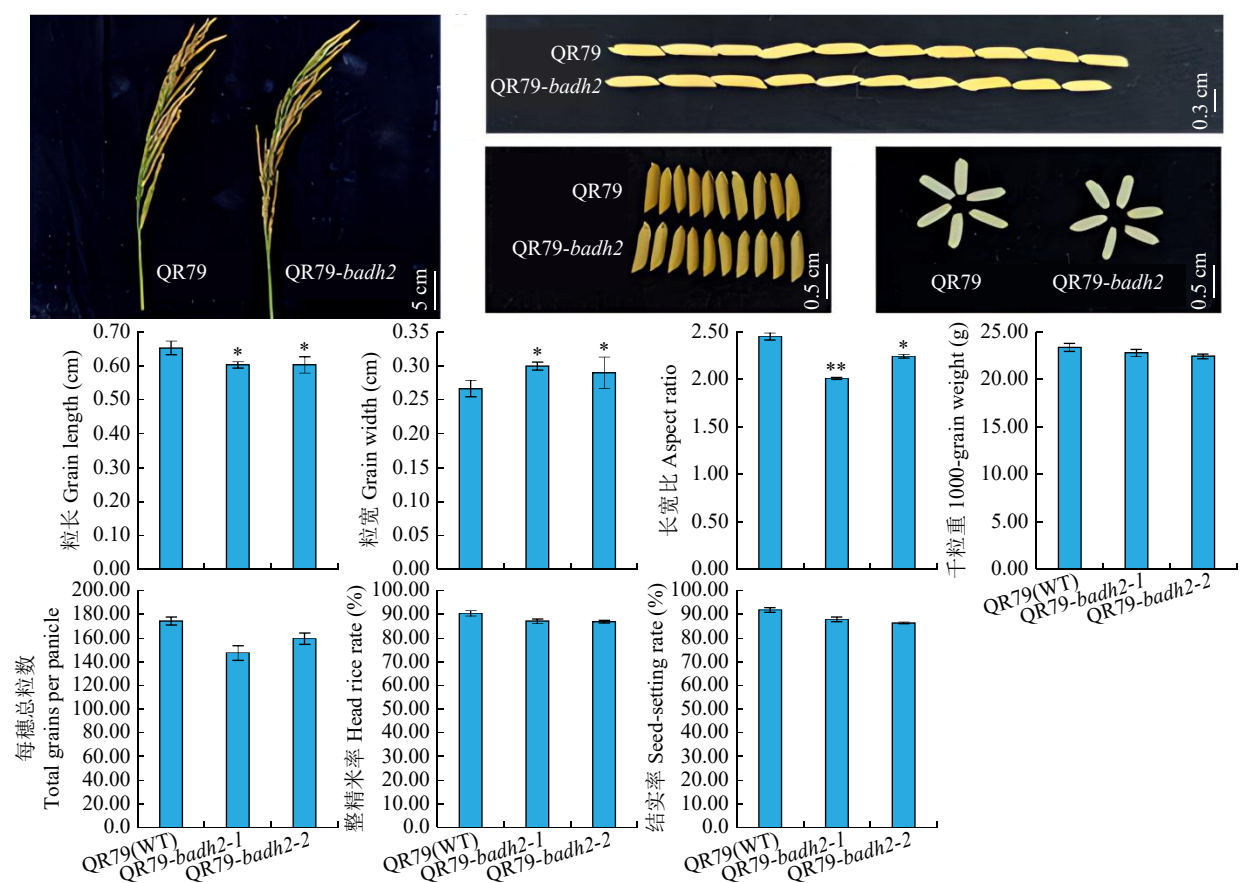


图 7 野生型 QR79 和纯合突变体植株 QR79-badh2 的表型性状
Fig.7 Phenotypic traits of wild-type QR79 and homozygous mutant plant QR79-badh2

略^[27-28]。

CRISPR/Cas9 技术已成功应用于改良水稻中的 *Badh2* 基因, 直接对不同水稻材料中的香味基因 *Badh2* 进行敲除或编辑, 不仅显著提高了香味物质含量, 还获得了适应性广、产量高且品质优良的水稻品种, 从而加快育种进程。例如, 胡黎明等^[29]利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术对镉吸收转运基因 *OsNramp5* 和香味基因 *OsBadh2* 同时进行编辑, 培育出后代性状稳定的优质低镉水稻品种; 李景芳等^[30]利用 CRISPR/Cas9 技术对 *Badh2* 和 *OsRR22* 基因编辑获得能稳定遗传且无外源基因插入的耐盐香稻材料, 加快了水稻多性状聚合的选育进程; 黄艳辉^[31]以从江老香禾为材料, 利用 CRISPR/Cas9 技术对其 *SD1* 和 *LARGE2* 基因进行编辑, 获得了 *SD1* 与 *LARGE2* 基因同时突变的从江老香禾新种质; 卫正^[32]利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 分别通过同源重组修复 (homology directed repair, HdR) 和非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 2 种途径实现了水稻抗白叶枯病优质种质的创制。

本研究对受体材料质恢系 QR79 的 *Badh2* 基因进行了全长序列测定, 并利用 CRISPR/Cas9 技术对该基因进行了编辑, 成功培育出无外源基因整合且携带香味特征的纯合突变体植株 QR79-badh2-1 与 QR79-badh2-2。2 株突变体植株的 *Badh2* 基因在第 1 外显子区域存在 18 个碱基的缺失, 使得突变体中该基因的表达水平相较于野生型显著降低, 从而促使突变体籽粒中香味成分 2AP 的含量大幅增加, 赋予了突变体植株籽粒浓郁的香气特征。在 T₀ 代中, J-18 表现为纯合突变, 在 T₁ 代中筛选出 1 株不携带 *Cas9* 外源基因的植株, 然而通过 1.7% KOH 的表型鉴定, 该植株被判定为非香型。相比之下, 同样在 T₀ 代表现为纯合突变的 J-29, 在 T₁ 代中筛选出了 2 株既无 *Cas9* 外源基因又保持纯合突变的植株, 这 2 株经 1.7% KOH 表型鉴定确认为香型。因此, 两者的检测结果呈现出明显差异。为进一步验证, 采用 GC-MS 技术对 J-29 中筛选出的 2 株无 *Cas9* 外源基因植株的香味物质进行了定量分析, 结果显示其香味物质 2AP 含量显著高于野生型 (图 6), 这与先前的 1.7% KOH 鉴定结果相

吻合。至于 J-18 与 J-29 后代在表型鉴定上出现的差异,可能源于鉴定过程中人员主观判断的不同,或是由于种植地点的生态条件及种植季节的差异所导致。研究^[26,33]表明,香稻的香气特征受生态气候条件、土壤类型、肥料种类、栽培管理实践以及储存方式等因素的影响。

基因编辑结果显示,该技术具有高效精准编辑基因、短时间培育新种质、推动新型育种技术发展等优点。但实际上它也存在脱靶效应或损伤正常基因、递送效率欠佳、部分细胞递送困难且载体可能引发免疫反应、编辑效率在不同细胞和位点不稳定、面临伦理争议等缺点^[34-35]。从当前水稻育种的发展现状以及未来农业生产对于水稻品种的多样化与优质化需求来看,在可预见的未来,鉴定、发掘与创制一批具有重要育种价值的新种质,依然是水稻育种领域中至关重要的研究方向与实践目标。

4 结论

通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术对优质恢复系 QR79 的 *Badh2* 基因进行编辑,利用 GC-MS 技术测定野生型及突变体材料籽粒中香味物质 2AP 含量,野生型成熟籽粒 2AP 的含量为 0.0000 $\mu\text{g}/\text{kg}$,纯合突变体植株 QR79-*badh2-1*、QR79-*badh2-2* 成熟籽粒中 2AP 的含量分别为 2.2923 和 3.4847 $\mu\text{g}/\text{kg}$,实现了香味物质含量的显著提高;成功获得了具有香味、无转基因成分且主要农艺性状未发生显著变化的纯合突变材料,实现了香味成分含量的显著提升,为加速香型籼稻新品种的研发提供了理论依据和遗传资源。

参考文献

- [1] Sakthivel K, Sundaram R M, Rani N S, et al. Genetic and molecular basis of fragrance in rice. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(4): 468-473.
- [2] Okpala N E, Mo Z, Duan M, et al. The genetics and biosynthesis of 2-acetyl-1-pyrroline in fragrant rice. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2019, 135: 272-276.
- [3] Shan Q W, Zhang Y, Chen K L, et al. Creation of fragrant rice by targeted knockout of the *OsBADH2* gene using TALEN technology. *Plant Biotechnology Journal*, 2015, 13(6): 791-800.
- [4] Cruz N D, Khush G. Rice grain quality evaluation procedures. *Aromatic Rices*, 2000, 3: 15-28.
- [5] Verma D K, Srivastav P P. Science and technology of aroma, flavor and fragrance in rice. USA: Apple Academic Press, 2019.
- [6] Hu X Q, Lu L, Guo Z L, et al. Volatile compounds, affecting factors and evaluation methods for rice aroma: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 2020, 97: 136-146.
- [7] Buttery R G, Ling L C, Bo J O. 2-Acetyl-1-pyrroline: an important aroma component of cooked rice. *Chemistry & Industry*, 1982, 22: 958-959.
- [8] Bergman C J, Delgado J T, Bryant R, et al. Rapid gas chromatographic technique for quantifying 2-acetyl-1-pyrroline and hexanal in rice (*Oryza sativa* L.). *Cereal Chemistry*, 2000, 77 (4): 454-458.
- [9] Fitzgerald M A, McCouch S R, Hall R D. Not just a grain of rice: the quest for quality. *Trends in Plant Science*, 2009, 14(3): 133-139.
- [10] Hashemi F S G, Rafii M Y, Ismail M R, et al. The genetic and molecular origin of natural variation for the fragrance trait in an elite Malaysian aromatic rice through quantitative trait loci mapping using SSR and gene-based markers. *Gene*, 2015, 555 (2): 101-107.
- [11] Grigione A, Liberto E, Cordero C, et al. High-quality Italian rice cultivars: chemical indices of ageing and aroma quality. *Food Chemistry*, 2015, 172: 305-313.
- [12] Hinge V R, Patil H, Nadaf A. Aroma volatile analyses and 2AP characterization at various developmental stages in Basmati and Non-Basmati scented rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Rice*, 2016, 9(1): 1-22.
- [13] Huang N, McCouch S, Mew T, et al. Development of an RFLP map from a doubled haploid population in rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 1994, 89(5): 609-617.
- [14] Sood B C, Siddiq E A. A rapid technique for scent determination in rice. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 1978, 38: 268-271.
- [15] Ahn S N, Bollich C N, Tanksley S D. RFLP tagging of a gene for aroma in rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 1992, 84: 825-828.
- [16] Chen S H, Yang Y, Shi W W, et al. *Badh2*, encoding betaine aldehyde dehydrogenase, inhibits the biosynthesis of 2-acetyl-1-pyrroline, a major component in rice fragrance. *The Plant Cell*, 2008, 20 (7): 1850-1861.
- [17] 陈明亮. 人工 miRNA 干扰共转化法获得无筛选标记转基因香稻. 北京: 中国农业科学院, 2012.
- [18] Bradbury L M T, Gillies S A, Brushett D J, et al. Inactivation of an aminoaldehyde dehydrogenase is responsible for fragrance in rice. *Plant Molecular Biology*, 2008, 68: 439-449.
- [19] 于梅梅, 陶权丹, 华杰, 等. 香软米水稻的研究进展. *江苏农业科学*, 2019, 47(10): 11-15.
- [20] Hui S, Li H, Mawia A M, et al. Production of aromatic three-line hybrid rice using novel alleles of *BADH2*. *Plant Biotechnology Journal*, 2022, 20(1): 59-74.
- [21] 韦新宇, 曾跃辉, 杨旺兴, 等. 利用 CRISPR-Cas9 技术编辑 *Badh2* 基因创制优质香型籼稻三系不育系. *作物学报*, 2023, 49(8): 2144-2159.
- [22] 张文婷, 李阳, 裘实, 等. 基于 CRISPR/Cas9 基因编辑技术研究 *Badh2* 基因对稻米品质的影响. *中国农业科技导报*, 2025, 27(5): 39-48.
- [23] Gao Y B, Zhao Y D. Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs *in vitro* and *in vivo* for CRISPR-mediated genome editing. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2014, 56(4): 343-349.
- [24] 孙慧宇, 宋佳, 王敬国, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术编辑 *Badh2* 基因改良粳稻香味. *华北农学报*, 2019, 34(4): 1-8.
- [25] 应兴华, 徐霞, 陈铭学, 等. 气相色谱-质谱技术分析香稻特

- 征化合物 2-乙酰吡咯啉. 色谱, 2010, 28(8): 782-785.
- [26] 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.
- [27] 王加峰, 郑才敏, 刘维, 等. 基于 CRISPR/Cas9 技术的水稻千粒重基因 *tgw6* 突变体的创建. 作物学报, 2016, 42(8): 1160-1167.
- [28] 周冠彤, 雷建峰, 代培红, 等. 棉花 CRISPR/Cas9 基因编辑有效 sgRNA 高效筛选体系的研究. 作物学报, 2021, 47(3): 427-437.
- [29] 胡黎明, 彭彦, 郑文杰, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术创制低积累香型水稻. 杂交水稻, 2021, 36(6): 77-83.
- [30] 李景芳, 温舒越, 赵利君, 等. 基于 CRISPR/Cas9 技术创制耐盐香稻. 中国水稻科学, 2023, 37(5): 478-485.
- [31] 黄艳辉. 利用 CRISPR/Cas9 技术编辑 *SD1* 及 *LARGE2* 基因创制老香禾新种质. 贵阳: 贵州大学, 2023.
- [32] 卫正. 利用 CRISPR 介导的基因编辑技术创制水稻优质抗病新种质. 北京: 中国农业科学院, 2022.
- [33] 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.
- [34] Pattanayak V, Lin S, Guilinger J P, et al. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. Nature Biotechnology, 2013, 31(9): 839-843.
- [35] Endo M, Mikami M, Toki S. Multigene knockout utilizing off-target mutations of the CRISPR/Cas9 system in rice. Plant and Cell Physiology, 2015, 56(1): 41-47.

CRISPR/Cas9-Mediated Editing of the *Badh2* Gene Improves Aroma in Elite Restorer Line QR79

Wu Qianrong^{1,2}, Wu Xian², Jiang Xue², Wang Qian^{2,3},
Gong Yanlong², Wang Zhongni², Zhu Susong⁴, Song Li¹

(¹College of Life Sciences, Guizhou University/Institute of Agro-Bioengineering, Guizhou University/Key Laboratory of Mountainous Plant Resources Protection and Germplasm Innovation, Ministry of Education, Guiyang 550000, Guizhou, China; ²Guizhou Rice Research Institute, Guiyang 550000, Guizhou, China; ³Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Innovation in Karst Mountainous Area, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guiyang 550000, Guizhou, China; ⁴Guizhou Crop Germplasm Resources Institute, Guiyang 550000, Guizhou, China)

Abstract In this research, the elite restorer line QR79 was used as the recipient for CRISPR/Cas9-mediated editing of the *badh2* gene, with two targeting sites designed within exon 1 and exon 2. The primary aim was to obtain homozygous mutant lines characterized by a distinct aroma profile, complete absence of transgenic elements, and stable inheritance of main agronomic traits. The expression level of the *Badh2* gene, the concentration of 2-acetyl-1-pyrroline (2AP), the content of γ -aminobutyric acid (GABA), as well as the key agronomic traits of both the wild-type and mutant genotypes were systematically quantified and comprehensively analyzed. The results showed that, compared with the wild type, the expression levels of the *Badh2* gene in the homozygous mutant plants QR79-*badh2-1* and QR79-*badh2-2* were significantly reduced, the content of 2AP were significantly increased, while the content of GABA were significantly decreased. At the same time, the main agronomic traits such as grain length, 1000-grain weight, head rice rate, and the seed-setting rate remained stable, but the yield components were affected to a certain extent. In conclusion, the genetic improvement of the aroma characteristics of the high-quality rice restorer line QR79 was successfully achieved through the CRISPR/Cas9 gene editing technology, which significantly increased the content of the aroma component 2AP, provided theoretical support and genetic resources for accelerating the research and development of new fragrant *indica* rice varieties.

Key words Fragrant rice; *Badh2*; CRISPR/Cas9; 2-acetyl-1-pyrroline; γ -aminobutyric acid