

CRISPR/Cas9 技术编辑 *MPK7* 和 *MPK14* 基因创制抗穗发芽水稻新种质

毛兴学, 柳武革, 郑晓钰, 范芝兰, 陈文丰, 潘大建, 李 晨, 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, 广州 510640)

摘要: 穗发芽对籼稻生产危害严重。编辑休眠调控基因, 创制高休眠性新种质, 进而提高穗发芽抗性, 是探索改良穗发芽抗性的新途径。泰丰 B (TB) 是籼型优质杂交稻保持系, 主要缺点是种子休眠性偏低, 易受穗发芽危害。*MPK7/14* 具有抑制梗稻种子休眠作用, 尚不清楚是否适用于籼稻品种。本研究利用 CRISPR/Cas9 技术编辑泰丰 B (TB) 的 *MPK7* 和 *MPK14* 基因, 通过测序筛选获得纯合变异株系, 并利用发芽试验分析变异种子的休眠特性。共获得 6 个转基因株系, 从其后代中筛到 2 个纯合移码突变株系。纯合变异后代种子休眠性大幅提高, 杂合变异后代的休眠性也有明显改善。与泰丰 B (TB) 相比, 变异纯合后代株高、分蘖数、穗粒数差异不显著。综上所述, 同时敲除 *MPK7* 和 *MPK14* 可以提高泰丰 B (TB) 种子休眠性, 抑制穗发芽和解决水稻穗发芽问题。这些结果为进一步解析穗发芽的抗性机制以及探索新的育种改良方法提供了参考。

关键词: 水稻 (*Oryza sativa* L.); 穗发芽; 种子休眠性; CRISPR/Cas9

Generating Pre-harvest Sprouting Resistant Germplasms by Editing *MPK7* and *MPK14* via CRISPR/Cas9 Technology

MAO Xing-xue, LIU Wu-ge, ZHENG Xiao-yu, FAN Zhi-lan, CHEN Wen-feng,

PAN Da-jian, LI Chen, WANG Feng

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

Abstract: Pre-harvest sprouting (PHS) is one of the most serious problems in *indica* rice production. Generating new germplasm with elevated PHS resistance is applicable by editing dormancy-related gene. Taifeng B (TB) is a maintainer line of *indica* hybrid rice showing high eating quality, whereas this line shows higher PHS. Two genes *MPK7* and *MPK14* negatively regulates seed dormancy in japonica rice, but whether both result in elevated PHS resistance in *indica* rice remains unclear. In this study, in order to generate the germplasms with PHS resistance, we deployed CRISPR/Cas9 technology to edit *MPK7* and *MPK14* in TB via *Agrobacterium*-guided transformation. Six lines harboring modified target sequences were screened from the transgenic offspring by sequencing, and two were selected for analyzing the seed dormancy. The results showed that the homozygous

收稿日期: 2021-05-18 修回日期: 2021-06-10 网络出版日期: 2021-07-08

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20210518001>

第一作者研究方向为水稻休眠性, E-mail: maoxingxue@qq.com; 柳武革为共同第一作者

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

李晨, 研究方向为水稻种质资源, E-mail: lic11111@sina.com

基金项目: 国家自然科学基金 (31971999); 广东省自然科学基金 (2019A1515011208, 2017A030313151); 广东省重点领域研发计划项目 (2018B020202004); 广东农业科学院农业优势产业学科团队建设项目 (202101TD); 广东省学科类重点实验室运行项目 (2020B1212060047); 广东乡村振兴战略专项 (2018-36)

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China (31971999), Guangdong Provincial Natural Science Foundation (2019A1515011208, 2017A030313151), Research and Development Program in Key Areas of Guangdong Province (2018B020202004), Agricultural Competitive Industry Discipline Team Building Project of Guangdong Academy of Agricultural Sciences (202101TD), Project of Guangdong Key Laboratory (2020B1212060047), Guangdong Rural Revitalization Strategy Project (2018-36)

mutant significantly delayed the seed germination, rather than heterozygous mutants which also exhibited improved PHS resistance if compared to the wild type TB. No significant difference in plant height, number of tillers and grains per spike between the homozygous mutant and TB was observed. As a result, this study generated PHS resistant lines by CRISPR/Cas9 strategy, which provided theoretical technology and material support for the PHS resistance research and rice breeding.

Key words: rice (*Oryza sativa* L.); pre-harvest sprouting; seed dormancy; CRISPR/Cas9

穗发芽(穗萌,胎萌)是种子收获前在母体植株上发芽的现象。穗发芽对水稻、小麦、玉米、大麦、高粱等作物造成不同程度的危害,是一种世界性的自然灾害,主要是由种子休眠水平低或迅速丧失引起的,是造成许多谷类作物质量问题的重要原因^[1-2]。稻米主产区的长江流域和华南一带,早籼稻的收获季节正好赶上当地的梅雨季节,高温、高湿的环境条件更易导致穗发芽。我国每年水稻生产因穗发芽造成的损失率达5%以上^[3]。通过籼粳交培育出来的高产品种中,有很大一部分穗发芽抗性弱,导致生产上的穗发芽现象呈上升趋势^[4]。杂交稻制种过程中,由于赤霉素的使用,导致穗发芽率增多。一般年份穗发芽率为10%~30%,最高可达60%~80%^[5]。随着全球变暖和气候异常现象增加,穗发芽危害可能更为严重。因此,穗发芽抗性是影响水稻生产的重要性状之一,适当增强休眠性有利于农业生产^[6-7]。

穗发芽与多种因素有关,是受多基因控制的复杂性状^[8]。具体影响因素可分为作物自身因素和外部环境因素两大类,自身因素包括种子休眠性、 α -淀粉酶活性、种皮厚度、颖壳厚度、颖壳闭合紧实度等方面;外部环境因素则包括温度、湿度等生长条件^[9-10]。其中种子休眠性与穗发芽抗性密切相关,已明确的抗穗发芽基因多是从种子休眠性着手进行克隆的^[11]。脱落酸(ABA)促进休眠,赤霉素(GA)拮抗ABA的生物活性,促进发芽,ABA/GA平衡调控种子休眠。其他信号(激素、一氧化氮、过氧化氢等)通过调节ABA/GA平衡来影响种子休眠性。虽然很多因素影响种子休眠性,ABA仍是种子休眠性的主要调控激素^[12-14]。已克隆的很多休眠相关基因都是ABA信号相关基因,如*Sdr4*是从水稻中克隆的第一个控制穗发芽的基因,*Sdr4*的表达受*OsVPI*正向调控,又调控*OsDOG1-like*(*DOG1*在水稻中的同源基因)的表达,*DOG1*控制拟南芥种子休眠性^[15],*Sdr4*可能通过调控ABA信号来调控穗发芽抗性^[16]。*PHS8*基因调控糖代

谢,影响ABI3和ABI5(ABA信号下游的转录因子)的表达,进而调节ABA信号和穗发芽表型^[17]。*PHS9*与*OsGAP*互作,*OsGAP*是ABA受体的互作伴侣,因此*PHS9*也是通过ABA信号影响穗发芽表型^[18]。*MAPK*级联MKKK62-MKK3-MPK7/14负调控ABA敏感性,打断后可增强种子休眠性^[19]。

目前,CRISPR/Cas9基因编辑技术已得到广泛运用,可以快速创建变异种质,用于基因功能研究^[18-19],也可用于改良性状^[20-21]、创制新种质^[22-23]。水稻中有很多通过基因编辑进行改良的案例,迄今尚未见到改良籼稻种子休眠性的报道,主要是因为以往克隆的休眠性基因大多数是正调控穗发芽抗性,难以通过基因编辑技术加以利用^[16,24]。泰丰B(TB)是籼型优质杂交稻母本,已育成多个优质杂交稻^[25],主要缺点是种子休眠性弱,易受穗发芽危害。*MPK7*和*MPK14*蛋白序列相近,功能可相互替代,负调控种子休眠性^[19]。本研究利用CRISPR/Cas9技术同时编辑泰丰B(TB)的*MPK7*和*MPK14*基因,以期获得基因型稳定的新休眠型籼稻种质,为解析水稻穗发芽抗性提供新的研究材料,积累水稻种子休眠特性调控机理方面的知识,并初步评价该方法改良水稻穗发芽抗性的应用前景。

1 材料与方法

1.1 试验材料

泰丰B(TB)是广东省农业科学院水稻研究所选育的三系杂交稻优质保持系亲本材料。本研究以泰丰B(TB)为遗传转化受体,开展基因编辑实验,获得的转基因后代种植于广东农科院水稻所内转基因试验田,种植管理同常规田间。

本研究中主要试剂和材料有KOD FX(Toyota)、*Bsa* I-HF(NEB)、T4 DNA连接酶(NEB)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。所使用的全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 引物列表

Table 1 List of primers used in this study

引物名称 Primer Name	引物序列 (5'-3') Sequence	目的 Purpose
U-F	CTCCGTTTACCTGTGGAATCG	CRISPR/Cas9 载体构建第一轮扩增
gR-R	CGGAGGAAAATTCCATCCAC	
MPK7-6aF	TGTGGATGCACTGAGGACCcggcagccaagccagca	
MPK7-6aR	GGTCCTCAGTGCATCCACAgttttagagctagaat	
MPK14-6bF	TCGGGCGAGGAGCTTATGGGcaacacaagcgcgcgc	
MPK14-6bR	CCCATAAGCTCCTCGCCCGAgttttagagctagaat	CRISPR/Cas9 载体构建第二轮扩增
Pps-GGL	TTCAGAggtctcTctcgACTAGTATGGAATCGGCAGCAAAGG	
Pgs-GG2	AGCGTGggtctcGtcagggTCCATCCACTCCAAGCTC	
Pps-GG2	TTCAGAggtctcTctgacacTGGAATCGGCAGCAAAGG	
Pgs-GGR	AGCGTGggtctcGaccgACGCGTATCCATCCACTCCAAGCTC	
SP1	CCCGACATAGATGCAATAACTTC	载体序列检测
SP2	GCGCGGTGTCTATCTATGTTACT	
MPK7-decF	AACTGTTGGAATCTGGGTTGGA	MPK7 靶点序列分析
MPK7-decR	TGGGATGGGTAACCAAGGGA	
MPK14-decF	GGGTGCCCTTAGGTGTTTCAG	MPK14 靶点序列分析
MPK14-decR	CATGGTGGAACCGCTGCTT	
HPTF	ATTGTGTACGCCGACAGT	潮霉素基因检测
HPTR	GTGCTTGACATTGGGGAGTT	

1.2 转基因材料创建

根据水稻数据网站 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>) 中 *MPK7* (*LOC_Os06g48590*) 和 *MPK14* (*LOC_Os02g05480*) 的基因序列, 参照 Xie 等^[26]方法, 在 CRISPR-GE 网站 (<http://skl.scau.edu.cn/home/>) 设计靶点。在基因第 1 外显子区域分别选 1 个靶点序列 (要求筛选脱靶率低, GC 含量为 50%~65%)。

用重叠加法 (Overlapping PCR) 构建 sgRNA 表达盒^[27]。第 1 轮 PCR 用接头引物 U-F/MPK7-6aF 和 U-F/MPK14-6bF 扩增 U6a、U6b 启动子; 用接头引物 gR-R/MPK7-6aR 和 gR-R/MPK14-6bR 扩增 U6a、U6b 终止子。PCR 反应条件: 95 ℃ 10 s, 60 ℃ 15 s, 68 ℃ 20 s, 20 个循环。取第 1 轮 PCR 产物 3 μL 进行琼脂糖凝胶电泳, 检查其片段大小、质量以及是否有其他杂带。如检查无误, 则把第 1 轮产物稀释 10 倍, 各取 1 μL 作为第 2 轮 PCR 模板, 用位置特异引物 Pps-GGL/Pgs-GG2 和 Pps-GG2/Pgs-GGR 分别进行第 2 轮扩增, PCR 反应条件: 95 ℃ 10 s, 58 ℃ 15 s, 68 ℃ 20 s, 25 个循环。通过琼脂糖凝胶电泳检查扩增结果, 使用 PCR 产物纯化试剂盒纯化第 2

轮 PCR 产物, 得到构建好的表达盒。每个表达盒取 20 ng, 添加 80 ng pYLCRISPR/Cas9Pubi-H 质粒, 在 1×Cutsmart Buffer 中加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 ATP, 0.2 U/μL *Bsa* I, 3 U/μL T4 DNA 连接酶。连接条件: 37 ℃ 5 min, 10 ℃ 5 min, 20 ℃ 5 min, 10~15 循环; 37 ℃ 5 min。利用热激法将连接产物导入 DH5α 感受态大肠杆菌, 培养过夜后挑单菌落, 用引物对 SP1/SP2 进行 PCR 验证。PCR 反应条件为: 94 ℃ 150 s; 94 ℃ 30 s, 58 ℃ 30 s, 68 ℃ 1 min, 30 个循环; 68 ℃ 5 min。琼脂糖凝胶电泳检查扩增结果。

通过农杆菌介导将敲除载体转入籼稻泰丰 B (TB)。采用十六烷基三甲基溴化铵法 (CTAB) 提取 T₀ 代转基因植株叶片 DNA, 然后用潮霉素基因引物 Hpt-F/Hpt-R 对 DNA 进行 PCR 检测, PCR 反应条件: 94 ℃ 150 s; 94 ℃ 30 s, 56 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 30 个循环; 72 ℃ 5 min。经琼脂糖凝胶电泳后出现明显条带的即为转基因阳性植株, 无条带的为阴性植株。T₁ 代用同样方法筛选无潮霉素基因单株。

1.3 变异类型检测

用引物对 (MPK7-decF/MPK7-decR 和 MPK14-

decF/MPK14-decR) 分别扩增包含 MPK7 靶点或 MPK14 靶点的片段, PCR 反应条件为 94 °C 预变性 150 s, 随后按 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s 的程序进行 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 5 min, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检查无误后送生工进行测序。使用 Snap gene 对测序结果进行分析, 观察峰图并与泰丰 B(TB) 序列进行比对, 两条染色体均未发生变异为野生型; 两条染色体发生相同变异为纯合变异; 只有一条染色体发生变异为杂合变异; 两条染色体发生不同类型变异为双等位变异。

1.4 发芽分析

以芽长或根长约 1 mm 作为发芽标准。将至少 30 粒(带壳或脱壳) T₂ 代基因编辑株系种子加水浸泡 24 h, 置于铺有一层湿润滤纸的 9 cm 培养皿中, 放入培养箱(30 °C, 湿度 >95%) 中保温保湿, 在指定的时间统计发芽率。

1.5 主要特征特性观察

2020 年 7 月下旬, 在广州播种, 于 8 月初将 T₂ 代幼苗移栽到试验田, 每个品系插 7 行, 每行 7 株, 株距和行距均为 20 cm, 田间管理同大田生产。在植株成熟后期, 分别测量株高和分蘖数。抽穗后 1 个月, 进行收获, 测定穗粒数、粒长和千粒重等主要农艺性状, 使用 Excel 软件对数据进行统计和显著性分析。

2 结果与分析

2.1 靶点选择

根据 Xie 等^[26] 方法, 针对 MPK7(LOC_Os06g48590) 和 MPK14(LOC_Os02g05480) 各设 1 个靶点, 均位于第 1 外显子区(图 1)。提取 TB 的叶片 DNA, 用引物 MPK7-decF/MPK7-decR 和 MPK14-decF/MPK14-decR 分别扩增靶点区, 测序证实靶点区序列没有变异。

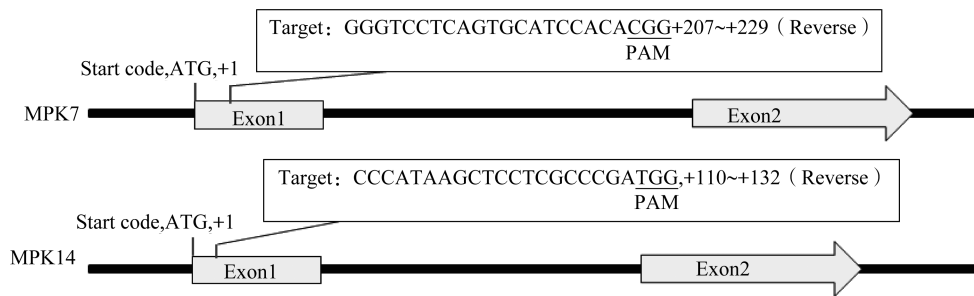


图 1 靶点序列与位置信息

Fig.1 Target sequences and target sites information

2.2 CRISPR-CAS9 表达载体的构建

利用重叠 PCR 方法构建含有靶点序列水稻 sgRNA 表达盒, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 第一轮扩增的启动子扩增带明亮, 终止子扩增带较弱(图 2A)。第二轮扩增的 U6a-MPK7 表达盒大小为 629 bp, U6b-MPK14 表达盒大小为 515 bp, 扩增条带都很明显(图 2B)。将表达盒串联接入 pYLCRISPR/Cas9Pubi-H 载体中, 用连接产物转化到感受态大肠杆菌(DH5 α), 挑取单克隆菌进行 PCR 扩增, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后显示约 1100 bp 的条带(图 2C)。提取质粒, 送公司验证靶序列与 pYLCRISPR/Cas9Pubi-H 表达载体组装情况, 并确保序列正确。

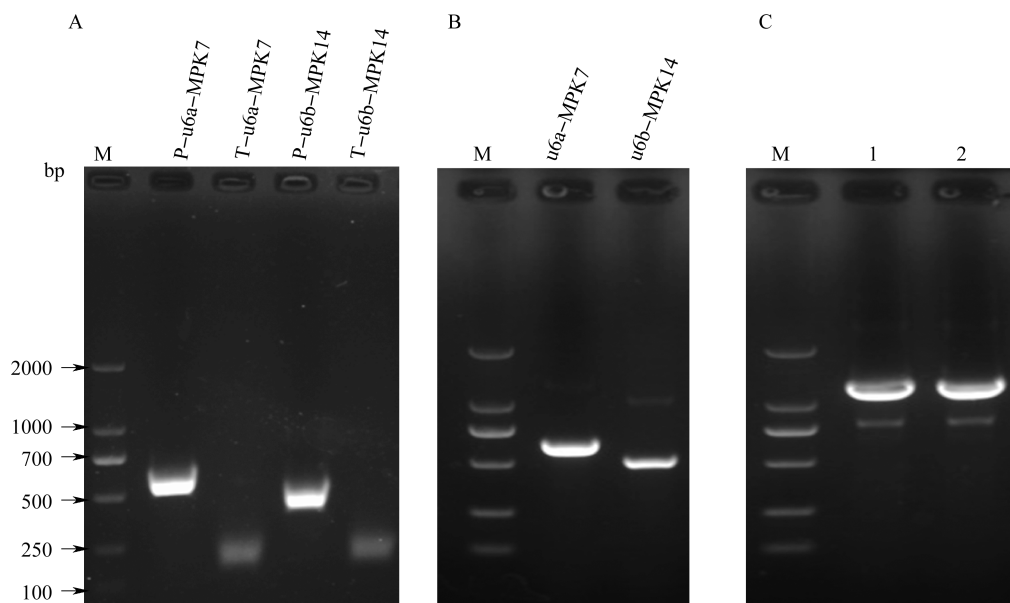
2.3 转基因后代鉴定

以 TB 为受体, 进行遗传转化, 获得 10 个 T₀ 代转基因单株 L1~L10, 单株提取幼苗嫩叶 DNA, 用潮霉素基因(HPT)引物 HPTF/HPTR 对 DNA 进行

PCR 扩增, 单株 L2、L5、L7、L8、L9、L10 得到明亮条带(约 577 bp), 是转基因阳性植株, L1、L3、L4、L6 为阴性植株, 转化阳性率达到 60%(图 3)。

2.4 靶点变异类型分析

对筛选出的 6 株转基因阳性水稻植株进行靶位点变异分析。扩增靶点所在片段, 进行测序, 比对分析结果显示, 共出现 3 种变异类型, 转基因后代中 MPK7 靶点的全部变异, MPK14 靶点的仅有部分发生变异(4 株)(表 2)。转基因株系结实率均较低, 推测可能是组培变异导致了结实率下降, L8 和 L10 的结实率较高, 从其后代中分离到 2 个位点均发生纯合变异的单株。L8 和 L10 的 MPK7 位点分别缺失了 7 个和 4 个碱基, MPK14 位点均插入了 1 个碱基(图 4), 表明这 2 个株系中的 2 个位点均发生移码突变, 所编码蛋白功能完全丧失, 后续工作用这 2 个株系进行。

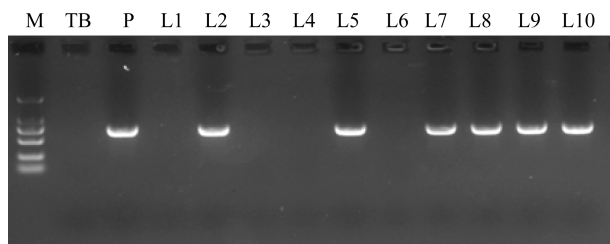


A: 第一轮扩增结果; B: 第二轮扩增结果; C: 大肠杆菌 PCR 鉴定结果; M: DL2000 Marker; P: 启动子; T: 终止子; u6a-MPK7、u6b-MPK14: 2 个表达盒; 1、2: 挑取的大肠杆菌克隆, 下同

A: Results of the first PCR, B: Results of the second PCR, C: Results of PCR identification of monoclonal bacteria, M: DL2000 Marker, P: Promoter, T: Terminator, u6a-MPK7、u6b-MPK14: two sgRNA expression cassette, 1、2: The monoclonal bacteria, the same as below

图 2 载体构建

Fig.2 Construction of a CRISPR/Cas9 expression vector



TB: 用 TB DNA 扩增产物作阴性对照; P: 用质粒扩增产物作阳性对照

TB: A Negative control amplified with TB DNA as template,

P: A Positive control amplified with plasmid DNA as template

图 3 PCR 鉴定 T_0 代转基因阳性植株

Fig.3 PCR-based identification of T_0 transgenic plants

表 2 T_0 代植株靶点变异类型

Table 2 Mutation types of transgenic plants in T_0 generation

靶点 Target	变异类型 Mutation type					
	L2	L5	L7	L8	L9	L10
MPK7	1	3	2	2	3	2
MPK14	2	0	0	2	2	2

0: 野生型; 1: 纯合变异; 2: 杂合变异; 3: 双等位变异

0: Wild type, 1: Homozygous mutant, 2: Heterozygous mutant,

3: Biallelic mutant

2.5 基因编辑后代休眠性分析

种子发芽速度是休眠性鉴定的常用标准: 休眠性强的材料发芽慢、发芽不整齐或不发芽; 休眠性弱的材料发芽快且整齐。2020 年 11 月上旬, 收获 T_2 代植株的种子进行发芽分析。自然条件下, 2 个靶点均是纯合变异的单株, 所结种子几乎不发芽; 2 个靶点均是杂合变异的单株, 所结种子的发芽速度也明显低于 TB (图 5A、B)。为进一步考察变异是否影响种子发芽潜力, 我们进行了脱壳发芽实验。脱壳后, 纯合的 L8 和 L10 T_2 代植株种子的发芽率上调, 分别为 65.6% 和 72.2% (图 5C、D), 说明 *MPK7/14* 变异并没有导致种子丧失发芽潜力, L8、L10 纯合变异种子脱壳前发芽率低是由于休眠性强。

2.6 主要农艺性状分析

在相同生长条件下, 对基因编辑 T_2 代纯合株系和野生型对照 TB 的株高、有效穗数、千粒重、结实率和粒长进行农艺性状分析 (表 3)。结果显示, L8 纯合株系仅在结实率方面与 TB 存在显著差异, 其他性状与 TB 差异不显著; L10 纯合株系则在千粒重、结实率和粒长等性状上与 TB 的差异均达到显著或极显著水平。2 个株系的结实率分别比 TB 下降了 4.5% 和 6.0%。

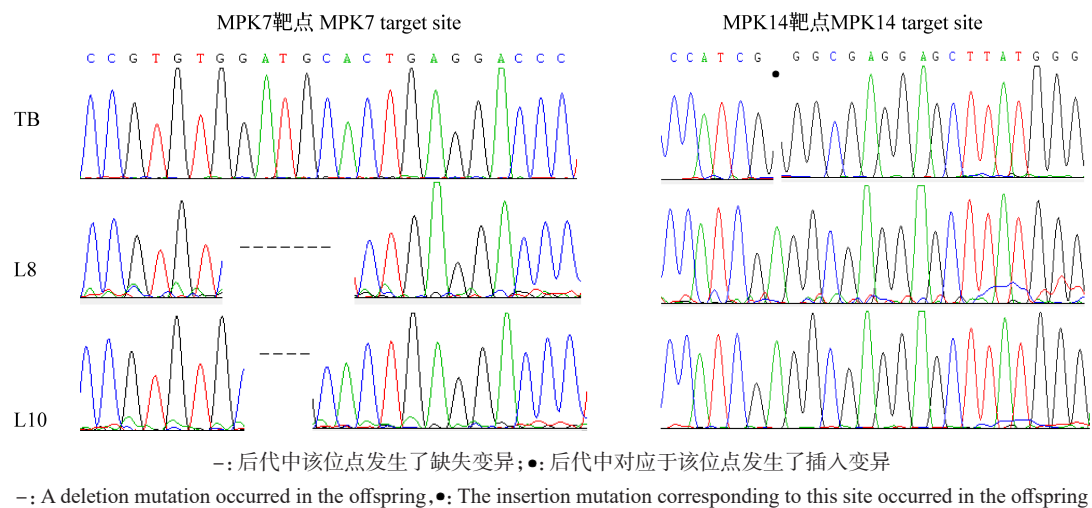
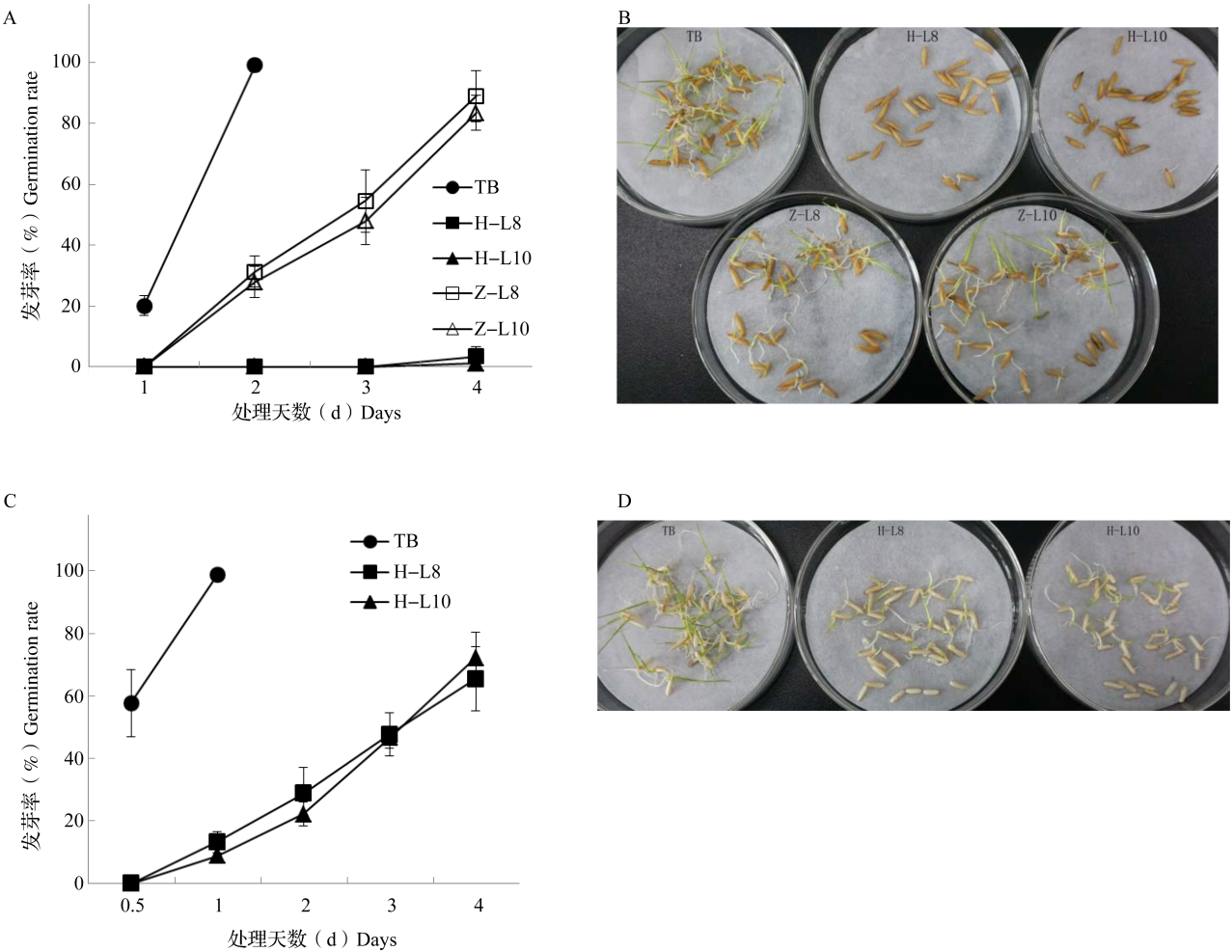


图 4 纯合变异后代靶点序列分析

Fig.4 Target sites of homozygous mutant plants



A: 带壳种子不同时间的发芽率; B: 带壳发芽第 4 天表现; C: 脱壳种子不同时间的发芽率; D: 脱壳发芽第 4 天表现; H: 纯合植株所结种子; Z: 杂合植株所结种子

A: Germination result of seeds with husk , B: Germination performance of seeds with husk after 4 days of treatment, C: Germination result of seeds without husk , D: Germination performance of seeds without husk after 4 days of treatment, H: Seeds of homozygous plants, Z: Seeds of heterozygous plants

图 5 变异后代发芽特性分析

Fig.5 Germination results of mutants

表 3 基因编辑变异株系 L8 和 L10 的农艺性状

Table 3 Agronomic traits of gene-edited lines L8 and L10

品系 Line	株高 (cm) Plant height	有效分蘖 Tiller number	千粒重 (g) 1000-kernel weight	结实率 (%) Seed setting rate	穗粒数 Spikelets per panicle	粒长 (mm) Kernel length
TB	74.9 ± 3.7	6.2 ± 0.6	22.6 ± 0.8	50.5 ± 2.5	136.9 ± 6.2	11.2 ± 0.3
L8	73.9 ± 2.5	5.8 ± 0.9	21.8 ± 0.9	46.0 ± 4.9*	131.4 ± 7.6	11.47 ± 0.9
L10	74.5 ± 3.5	5.9 ± 1.2	19.9 ± 1.1*	44.5 ± 5.9*	129.7 ± 9.0	10.13 ± 0.5**

数据用平均数 ± 标准差表示; *: 在 $P < 0.05$ 水平上差异显著; **: 在 $P < 0.01$ 水平上差异极显著

Values are shown as mean ± SD, *: Significant difference, **: Extremely significant difference

3 讨论

本研究以杂交稻保持系泰丰 B (TB) 为受体, 通过 CRISPR/Cas9 基因编辑系统创制高休眠性种质。通过编辑 *MPK7* 和 *MPK14*, 对 T_0 代转化植株进行阳性植株鉴定和靶点变异检测, 筛选到 *MPK7* 和 *MPK14* 功能缺失的纯合变异株系, 对其进行了初步评价。

一般水稻种子处理 2 d 看到部分萌发, 很多种子 3 d 还不能全部露白^[28]。TB 种子处理 1 d 就有部分种子发芽, 处理 2 d 就全部萌发, 生产中也发现 TB 易穗发芽。TB 穗发芽表型明显, 暗示其具有弱休眠基因。MKK3-*MPK7/14* 是典型 MAPK 级联, 通常 MAPK 成员通过磷酸化修饰将上游信号放大并传递至下游应答分子^[29]。该级联在拟南芥中的相关研究结果中没有关于休眠性的报道^[30-31], 粳稻中同时敲除 *MPK7* 和 *MPK14* 后种子休眠性大幅升高^[19], 结合本研究结果, *MPK7/14* 是水稻种子休眠性调控的一个重要节点。杂合变异株所结种子的发芽速率下降, 是否可用于改善杂交稻穗发芽抗性, 有待进一步研究。

TB 本身体休眠性弱, *MPK7* 和 *MPK14* 同时变异后, 休眠性大幅上调, 表明 *MPK7/14* 上位于 TB 的休眠性弱化基因, TB 及其变异后代为休眠性研究的优异材料。脱壳可以促进种子萌发^[32-33], 纯合 L8、L10 T_2 代植株种子脱壳后的发芽速率明显上调, 暗示 *MPK7* 和 *MPK14* 靶点均发生纯合变异导致种胚突破障碍的能力减弱。包围谷壳、种皮及胚乳组织对胚萌发产生机械阻力, 这种阻力主要由细胞壁产生; 赤霉素可促进胚乳细胞的弱化, 增加透性, 促进发芽^[9, 33-34]; 本研究结果似乎暗示 *MPK7/14* 正调控 GA 信号, 这为后续研究提供了新思路。

同时编辑 *MPK7* 和 *MPK14* 可以提高水稻穗发芽抗性, 但是 L10 的粒长和千粒重都显著下降, 而 L8 的粒长和千粒重与 TB 差异不显著。这些结果

表明, 通过基因编辑技术进行改良, 由于必经组培再生的转基因过程, 从而会引入一些不需要的非目标性状变异。因此, 要去除这些非目标性状变异, 必须将基因编辑改良株系与受体材料继续进行回交和筛选, 以利用编辑技术进行育种改良。

通过基因工程手段创制新型种质已获得广泛认可^[35-36], 已有团队尝试通过基因工程使野生稻快速进化为栽培稻。近年, 利用 CRISPR/Cas9 编辑技术改造指定基因, 进行基因功能研究^[19, 26]、辅助改良育种^[20-21]的尝试很多。刘耀光团队利用改良的 CRISPR/Cas9 多靶点系统, 同时编辑 8 个靶点^[37], 为高效编辑提供了有利的工具, 是快速获得稳定编辑材料的有效方法^[19]。已有的结果充分证明基因编辑技术可以加速种质创新, 是更为精准、高效的育种改良新途径。

总之, 本研究利用弱休眠种质 TB 为对象, 通过 CRISPR/Cas9 编辑技术创制了高休眠种质, 既为生理生化机制研究创制了新材料, 也进一步证实水稻中 *MPK7/14* 基因控制种子休眠性; 同时本研究还明确了 *MPK7/14* 基因上位于 TB 自身的弱休眠基因, 丰富了解析水稻休眠性分子机理的理论知识。

参考文献

- [1] Tai L, Wang H J, Xu X J, Sun W H, Chen K M. Cereal pre-harvest sprouting: a global agricultural disaster regulated by complex genetic and biochemical mechanisms. *Journal of Experimental Botany*, 2021, 72 (8) : 2857 -2876
- [2] 李婷, 陈杰, 陈锋, 崔党群. 黄淮麦区地方小麦品种种子粒颜色相关基因 *Tamyb10-1* 等位变异检测. *植物遗传资源学报*, 2014, 15 (5) : 1089-1095
- [3] Li T, Chen J, Chen F, Cui D Q. Molecular identification of the *Tamyb10-1* gene controlling the grain color in landrace wheat cultivars from Huanghuai wheat region. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2014, 15 (5) : 1089-1095
- [3] 颜见恩, 胡泽生, 宋富根, 肖尚华, 喻吉生, 罗来保. 早籼稻穗发芽对粮食生产的影响及防治措施. *江西农业学报*, 2005, 17 (4) : 84-85
- Yan J N, Hu Z S, Song F G, Xiao S H, Yu J S, Luo L B.

- Influence of pre-harvest sprouting of early Indica Rice on production and its control measures. Jiangxi Journal of Agricultural Sciences, 2005, 17(4): 84-85
- [4] 江玲, 张文伟, 翟虎渠, 万建民. 水稻种子休眠性基因座的定位和分析. 中国农业科学, 2005, 38(4): 650-656
Jiang L, Zhang W W, Zhai H Q, Wan J M. Mapping and analysis of quantitative trait loci controlling seed dormancy in rice. Scientia Agricultura Sinica, 2005, 38(4): 650-656
- [5] 黄四齐, 徐建中. 汕优晚 3 制种高产综合配套技术总结. 杂交水稻, 1996(S2): 37-39
Huang S Q, Xu J Z. Summary of comprehensive techniques for high yield in seed production of Shanyouwan3. Hybrid Rice, 1996(S2): 37-39
- [6] 张海萍, 常成, 司红起, 卢杰, 马传喜. 小麦抗穗发芽分子标记开发及育种应用. 科技导报, 2016, 34(22): 81-86
Zhang H P, Chang C, Si H Q, Lu J, Ma C X. Developing of molecular marker for pre-harvest sprouting resistance and its application in wheat Mas breeding. Science & Technology Review, 2016, 34(22): 81-86
- [7] 陈明江, 刘贵富, 余泓, 王冰, 李家洋. 水稻高产优质的分子基础与品种设计. 科学通报, 2018, 63(14): 1276-1289
Chen M J, Liu G F, Yu H, Wang B, Li J Y. Towards molecular design of rice plant architecture and grain quality. Chinese Science Bulletin, 2018, 63(14): 1276-1289
- [8] 张静, 林泽川, 曹立勇, 沈希宏. 水稻种子穗发芽与休眠性遗传研究进展. 核农学报, 2013, 27(8): 1136-1142
Zhang J, Lin Z C, Cao L Y, Shen X H. Genetic research progress on pre-harvest sprouting and dormancy rice. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 2013, 27(8): 1136-1142
- [9] Finch-Savage W E, Leubner-Metzger G. Seed dormancy and the control of germination. New Phytologist, 2010, 171(3): 501-523
- [10] 陈兵先, 刘军. 水稻穗萌及其调控的研究进展. 种子, 2017, 36(2): 49-55
Chen B X, Liu J. Research progress of rice vivipary and its regulation. Seed, 2017, 36(2): 49-55
- [11] 郑安俭, 王州飞, 张红生. 作物种子萌发生理与遗传研究进展. 江苏农业学报, 2017, 33(1): 218-223
Zheng A J, Wang Z F, Zhang H S. Advances in research on physiological and genetic mechanism of seed germination. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2017, 33(1): 218-223
- [12] Shu K, Liu X D, Xie Q, He Z H. Two faces of one seed: hormonal regulation of dormancy and germination. Molecular Plant, 2016, 9(1): 34-45
- [13] Kucera B, Cohn M A, Leubner-Metzger G. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. Seed Science Research, 2005, 15(4): 281-307
- [14] 倪浩凌, 吴文诗, 颜艳敏, 方亦圆, 王嘉茵, 陈碧湖, 李芷怡, 唐晓艳, 吴建新. 水稻穗发芽突变体的筛选及候选基因鉴定. 植物遗传资源学报, 2020, 21(5): 1214-1220
Ni H L, Wu W S, Yan Y M, Fang Y Y, Wang J Y, Chen B H, Li Z Y, Tang X Y, Wu J X. Screening and gene mapping of pre-harvest sprouting mutants in rice. Journal of Plant Genetic Resources, 2020, 21(5): 1214-1220
- [15] Bentsink L, Jowett J, Hanhart C J, Koornneef M. Cloning of *Dog1*, a quantitative trait locus controlling seed dormancy in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Science, 2006, 103(45): 17042-17047
- [16] Sugimoto K, Takeuchi Y, Ebana K, Miyao A, Hirochika H, Hara N, Ishiyama K, Kobayashi M, Ban Y, Hattori T, Yano M. Molecular cloning of *Sdr4*, a regulator involved in seed dormancy and domestication of rice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(13): 5792-5797
- [17] Du L, Xu F, Fang J, Gao S, Tang J, Fang S, Wang H, Tong H, Cao S, Zhang F, Chu J, Wang G, Chu C. Endosperm sugar accumulation caused by mutation of *Phs8/Isa1* leads to pre-harvest sprouting in rice. The Plant Journal, 2018, 95(3): 545-556
- [18] Xu F, Tang J, Gao S, Cheng X, Du L, Chu C. Control of rice pre-harvest sprouting by glutaredoxin-mediated abscisic acid signaling. The Plant Journal, 2019, 100(5): 1036-1051
- [19] 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 *Mkk62-Mkk3-Mapk7/14* module negatively regulates seed dormancy in rice. Rice, 2019, 12(1): 2
- [20] 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
- [21] 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
- [22] 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
- [23] 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
- [24] 高永峰, 刘继恺, 范晶, 彭奕, 黄科, 张敦房, 刘永胜. 水稻穗发芽调控基因 *OsVPI* 的 RNA 干扰载体构建及遗传转化研究. 中国农业科学, 2010, 43(7): 1321-1327
Gao Y F, Liu J K, Fan J, Peng Y, Huang K, Zhang D F, Liu Y S. Construction and transformation of RNAi vector of *OsVPI* for a regulatory gene of pre-harvest. Scientia Agricultura Sinica, 2010, 43(7): 1321-1327
- [25] 王丰. 杂交水稻育种成就与展望—广东省农业科学院杂交水稻研究 50 年回顾. 广东农业科学, 2020, 47(12): 1-11

- Wang F. Achievements and prospects of hybrid rice breeding—review of 50 Years' research on hybrid rice by Rice Research Institute of Guangdong Academy of Agricultural Sciences. *Guangdong Agriculture Science*, 2020, 47(12): 1-11
- [26] Xie X, Ma X, Zhu Q, Zeng D, Li G, Liu Y G. CRISPR-GE: A convenient software toolkit for CRISPR-based genome editing. *Molecular Plant*, 2017, 10(9): 1246-1249
- [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
- 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] 倪万潮, 束红梅, 郭书巧, 蒋璐, 何晓兰, 崔晓霞, 巩元勇. 不同水稻品种种子萌发生理特性差异研究. *中国农学通报*, 2020, 36(2): 1-5
- Ni W C, Shu H M, Guo S Q, Jiang L, He X L, Cui X X, Gong Y Y. Seed germination of rice cultivars: differences in physiological characteristics. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2020, 36(2): 1-5
- [29] Ichimura K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A, Kreis M, Zhang S, Hirt H, Wilson C, Heberle-Bors E, Ellis B E, Morris P C, Innes R W, Ecker J R, Scheel D, Klessig D F, Machida Y, Mundy J, Ohashi Y, Walker J C. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science*, 2002, 7(7): 301-308
- [30] Danquah A, Zélicourt A, Boudsocq M, Neubauer J, Nicolas F D F, Leonhardt N, Pateyron S, Gwinner F, Tamby J P, Ortiz-Masia D. Identification and characterization of an ABA-activated MAP kinase cascade in *Arabidopsis Thaliana*. *The Plant Journal*, 2015, 82(2): 232-244
- [31] Mitula F, Tajdel M, Ciela A, Kasprówicz-Maluki A, Kulik A, Babula-Skowrońska D, Michalak M, Dobrowolska G, Sadowski J, Ludwików A. *Arabidopsis* ABA-activated kinase Mapkkk18 is regulated by protein phosphatase 2c Abi1 and the ubiquitin-proteasome pathway. *Plant & Cell Physiology*, 2015, 56(12): 2351-2367
- [32] 邓伟, 李松克, 岑爱华, 肖朝锋, 江厚成, 王娇. 不同处理方法对白壳薏苡种子发芽特性的影响. *种子*, 2016, 35(4): 100-102
- Deng W, Li K S, Cen A H, Xiao C F, Jiang H C, Wang J. Effects of different treatments on white shell coix seed germination characteristics. *Seed*, 2016, 35(4): 100-102
- [33] Debeaujon I, Léon-Kloosterziel K M, Koornneef M. Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2000, 122(2): 403-414
- [34] 宋松泉, 刘军, 黄荟, 伍贤进, 徐恒恒, 张琪, 李秀梅, 梁娟. 赤霉素代谢与信号转导及其调控种子萌发与休眠的分子机制. *中国科学: 生命科学*, 2020, 50(6): 599-615
- Song S Q, Liu J, Huang H, Wu X J, Xu H H, Zhang Q, Li X M, Liang J. Gibberellin metabolism and signaling and its molecular mechanism in regulating seed germination and dormancy. *Scientia Sinica Vitae*, 2020, 50(6): 599-615
- [35] Zhu Q, Zeng D, Yu S, Cui C, Li J, Li H, Chen J, Zhang R, Zhao X, Chen L, Liu Y G. From golden rice to aSTARice: bioengineering Astaxanthin biosynthesis in rice endosperm. *Molecular Plant*, 2018, 11(12): 1440-1448
- [36] 高东尧, 夏兰琴, 马有志, 徐兆师, 徐惠君, 杜丽璞, 聂丽娜, 李彦舫, 原亚萍, 李连城, 陈明, 孙金海. 小麦 *Vp-1* 基因 RNA 干扰表达载体的构建及遗传转化. *植物遗传资源学报*, 2009, 10(1): 9-15
- Gao D Y, Xia L Q, Ma Y Z, Xu Z S, Xu H J, Du L P, Nie L N, Li Y F, Yuan Y P, Li L C, Chen M, Sun J H. Construction of the RNAi vector of *Vp-1* gene from wheat and its genetic transformation. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2009, 10(1): 9-15
- [37] 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