

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2025.07.006

赵晓玉, 金笛, 蒋雨桐, 等. CRISPR/Cas9 技术介导水稻 *Gn1a* 突变体创制及其育种应用 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2025, 47(7): 70-81.

CRISPR/Cas9 技术介导水稻 *Gn1a* 突变体 创制及其育种应用

赵晓玉, 金笛, 蒋雨桐, 杨朝越, 彭柏然,
刘晓, 王柳静, 李云峰, 庄慧

西南大学 水稻研究所/农业科学研究院/转基因植物与安全控制重庆市重点实验室, 重庆 400715

摘要: 每穗粒数是决定水稻产量的重要因素, *Gn1a* 作为主效 QTL 可通过调控细胞分裂素代谢影响穗粒数。利用 CRISPR/Cas9 技术在籼稻品种渝金香(YJX^{WT})*Gn1a* 基因第 1 外显子上 FAD 结合结构域编码区进行双靶点敲除, 筛选并鉴定获得无外源基因的纯合突变体 YJX^{Gn1a-1}。结构域预测表明: 与野生型 YJX^{WT} 相比, YJX^{Gn1a-1} 突变体 FAD 结合结构域缺失 26 个氨基酸。农艺性状调查显示: 突变体植株株高显著增加, 一次、二次枝梗数显著增加, 每穗粒数显著提升, 单株产量显著提高。基因表达分析表明: *Gn1a* 在茎和不同长度幼穗中特异表达, 提示其在水稻株高和花序发育中发挥着重要作用。单倍型分析进一步验证了 FAD 结合结构域的缺失可显著增加水稻株高和穗粒数。

关键词: 水稻; CRISPR/Cas9 技术; *Gn1a* 基因; 种质资源

中图分类号: S511

文献标识码: A

文章编号: 1673-9868(2025)07-0070-12

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Creation of Rice *Gn1a* Mutants via CRISPR/Cas9 System and Their Application in Breeding

ZHAO Xiaoyu, JIN Di, JIANG Yutong,
YANG Chaoyue, PENG Boran, LIU Xiao,
WANG Liujing, LI Yunfeng, ZHUANG Hui

Rice Research Institute, Southwest University/Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of
Application and Safety Control of Genetically Modified Crops, Chongqing 400715, China

收稿日期: 2025-03-31

基金项目: 重庆市现代农业产业技术体系项目(CQMAITS202301); 国家自然科学基金青年科学基金项目(32100287); 国家自然科学基金项目(31971919, 32172044); 重庆市自然科学基金项目(cstc2020jcyj-jqX0020, cstc2021ycjh-bgzxm0066)。

作者简介: 赵晓玉, 硕士研究生, 主要从事水稻花器官发育和分子设计育种研究。

通信作者: 庄慧, 博士, 副教授。

Abstract: The number of grains per panicle is an important factor determining the yield of rice. *Gn1a*, as the main effective QTL, can affect the number of grains per panicle by regulating cytokinin metabolism. Double-target knockout was performed in the coding region of the FAD binding domain of exon 1 of the *Gn1a* gene in indica rice variety Yujinxiang (YJX^{WT}) using CRISPR/Cas9 technology. The homozygous editing mutant YJX^{Gn1a-1} without exogenous genes was screened and identified. Domain prediction indicates that compared with the wild-type YJX^{WT}, the FAD binding domain of the YJX^{Gn1a-1} mutant is missing 26 amino acids. The investigation of agronomic traits showed that the height of the mutant plants and the yield per plant were increased significantly, and the number of primary and secondary branches, the number of grains per panicle were increased. Gene expression analysis indicated that *Gn1a* was specifically expressed in culm and young panicles of different lengths, suggesting that it plays an important role in the plant height and inflorescence development of rice. Haplotype analysis further verified that the absence of the FAD binding domain could significantly increase the plant height and the number of grains per panicle of rice.

Key words: rice(*Oryza sativa* L.); CRISPR/Cas9 technology; *Gn1a*; germplasm resources

水稻是我国最重要的粮食作物之一,提高其产量和品质对于保障我国粮食安全、增进民生福祉具有极为重要的意义^[1]。随着粮食缺口的逐步扩大和生物技术的不断发展,传统的杂交选育方法已经很难满足水稻生产的实际需要,种质创新成为亟待解决的重要课题。近年来,CRISPR/Cas9 等基因编辑技术的出现,为水稻等作物的遗传改良提供了新的工具^[2]。利用基因编辑技术创新种质,通过对选定的基因进行特定修饰,可以有针对性地引入理想性状,实现作物的改良^[3-8]。*Gn1a*(*Grain number 1a*)是水稻第 1 染色体短臂上的主效 QTL,通过调控细胞分裂素(Cytokinin, CK)代谢影响每穗粒数,在高产育种中具有重要的应用价值^[6-7, 9]。*Gn1a* 编码的 OsCKX2 蛋白由 FAD 结合结构域和 CKX 催化结构域组成,其中 FAD 结合结构域负责结合 FAD(黄素腺嘌呤二核苷酸),作为电子受体介导细胞分裂素侧链的氧化反应,而 CKX 催化结构域是酶的催化核心,两者协同作用,特异性降解细胞分裂素,从而调控水稻的生长发育^[4, 6]。*Gn1a* 表达量的降低可导致花序分生组织中细胞分裂素的积累,促进一次、二次枝梗的分化,最终提升每穗粒数和产量^[9-10]。*Gn1a* 是水稻产量性状改良的重要基因编辑靶点,重穗型恢复系蜀恢 498 *Gn1a* 基因第 3 外显子上 11 bp 碱基缺失会引起 CKX 催化结构域编码序列的移码突变,使蛋白失活并显著增加每穗粒数^[7]。此外,在籼稻中花 11 的遗传背景下,将 *Gn1a* 基因序列前端的第 135~157 位碱基敲除,也能引起类似效应^[6, 10]。一方面,在转基因水稻中利用 RNA 干扰(shRNA)抑制 *Gn1a* 表达,可以显著增加分蘖数和穗粒数并提升水稻的产量^[11];另一方面,OsMPK6 与锌指转录因子 DST 的相互作用可以激活 *Gn1a* 的转录,使水稻的每穗粒数显著减少^[12]。这些研究表明,通过 *Gn1a* 关键位点的精确编辑可用于改良水稻的产量性状。当前 *Gn1a* 研究主要集中在 CKX 催化结构域,而 FAD 结合结构域的功能解析仍较少,限制了该位点在种质创新中的应用^[9-16]。本研究利用 CRISPR/Cas9 技术在籼稻渝金香(YJX^{WT})中 *Gn1a* 基因的第 1 外显子上 FAD 结合结构域的编码序列进行靶向敲除,筛选、鉴定出不含有外源基因的纯合单株,成功创制出穗粒数增加、具有实际应用价值的突变体,并系统分析其农艺性状、基因表达模式及单倍型变异,为进一步筛选适宜的基因编辑位点、优化水稻高产育种策略提供理论依据和种质资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

籼稻品种渝金香(YJX^{WT})由西南大学水稻研究所提供,种植于歇马实验基地,所有材料常规管

理。Cas9 载体 PC1300-UBI-Cas9^[14] 由王克剑老师提供。大肠杆菌菌株 (*Escherichia coli*) DH5 α 和农杆菌菌株 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 由武汉艾迪晶生物科技有限公司 (<http://www.edgene.com.cn/>) 保存。

1.2 CRISPR/Cas9 靶点设计及 PC1300-UBI-Cas9 基因编辑载体构建

利用 CRISPR/Cas9 技术进行定向基因编辑, 依据 *Gn1a* (*LOC_Os01g10110*) 基因序列特征, 利用 CRISPR-GE 网站 (<http://skl.scau.edu.cn/>) 设计靶点^[17], 在第 1 外显子区选择 583~585 bp 处的 GGC 作为靶点 1 的 PAM 序列, 586~605 bp 处 20 bp 作为靶点 1; 660~662 bp 处的 GGC 作为靶点 2 的 PAM 序列, 663~682 bp 处 20 bp 作为靶点 2 (图 1a)。参照刘建国等^[18]的方法, 在正反向引物 5' 端分别添加接头 GGCA 和 AAAC (表 1), 引物双链化经 AarI 酶进行酶切后的 PC1300-UBI-Cas9 载体进行连接获得重组植物表达载体 PC1300-UBI-Cas9-*Gn1a*-gRNA (图 1b)。通过农杆菌介导法转化籼稻品种渝金香 (YJX^{WT}) 的成熟胚愈伤组织, 并通过潮霉素抗性筛选获得阳性转基因单株。遗传转化、潮霉素抗性筛选步骤均由武汉艾迪晶生物科技有限公司 (<http://www.edgene.com.cn/>) 完成, 获得的水稻组培苗种植于田间用于后续试验。

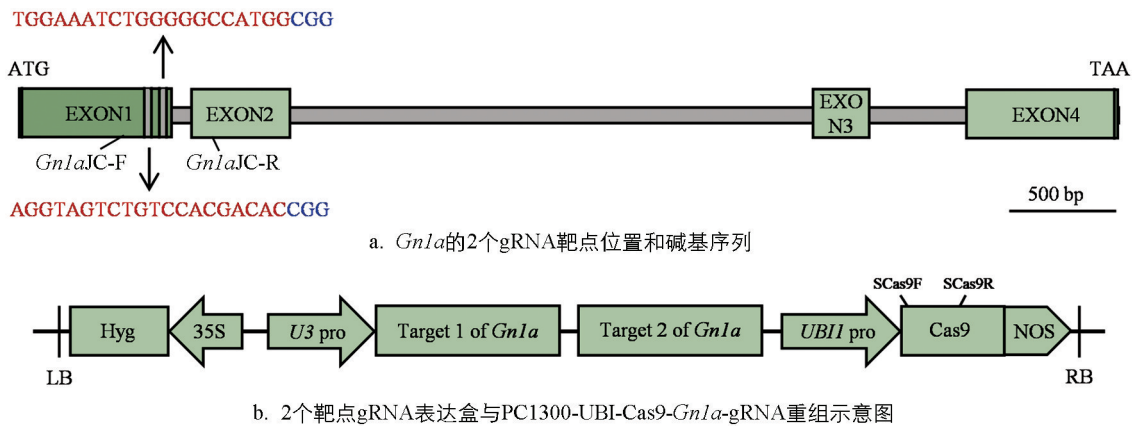


图 1 *Gn1a* 的 gRNA 靶点和 PC1300-UBI-Cas9-*Gn1a*-gRNA 表达载体重组示意图

1.3 CRISPR/Cas9 靶点特异性分析

利用 The Gramene Database 植物基因组学数据库 (<https://www.gramene.org/>) 鉴定和分析本研究中基因编辑靶点在籼稻全基因组序列中的特异性, 导入双靶点序列, 结合 The Gramene Database 中现有的籼稻基因组序列进行分析。综合以上分析结果进一步确定双靶点是否在全基因组中具有特异性。

1.4 转基因突变体的检测鉴定

为了检测水稻基因敲除株系中 *Gn1a* 突变的具体类型, 针对包含双靶点所在区域附近 500 bp 的碱基序列设计了 *Gn1a*JC-F 和 *Gn1a*JC-R 引物 (图 1a、表 1), 引物由北京擎科生物科技股份有限公司重庆分公司 (<https://www.tsingke.com.cn/>) 合成。使用 CTAB 法^[4] 提取野生型水稻渝金香 (YJX^{WT}) 和基因敲除单株水稻植株的叶片 DNA 作为模板进行 PCR 扩增, 通过分析扩增产物的片段长度确定基因的不同突变类型; 进一步将扩增产物送至北京擎科生物科技股份有限公司重庆分公司进行测序, 以 YJX^{WT} 的 DNA 测序结果为对照, 分析编辑植株中 *Gn1a* 基因的突变情况。

1.5 编辑植株的 T-DNA 插入鉴定

检测基因敲除成功的水稻单株在基因编辑过程中 T-DNA 的插入情况, 针对转基因载体上 800 bp 左右的碱基序列设计 SCas9F 和 SCas9R 引物 (图 1b、表 1), 由北京擎科生物科技股份有限公司重庆分公司合成。利用基因敲除单株的叶片 DNA 为模板, 同步设置阴、阳对照进行 PCR 扩增, 通过观察琼脂糖凝胶电泳的条带判断 T-DNA 的插入情况。

1.6 结构域分析

提取野生型水稻渝金香(YJX^{WT})的 DNA 进行测序,获得完整的 *Gn1a* 基因编码区序列。使用 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 平台上的 ORFFinder 工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)进行开放阅读框(ORF)的查找及翻译;将 *Gn1a* 基因的核苷酸序列粘贴至输入框,选择合适的遗传密码表翻译得到可能的蛋白质序列;选择最长且符合生物学意义的开放阅读框对应的蛋白质序列用于后续结构域预测。进入 NCBI 的 CDD 搜索页面(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>),在搜索框中粘贴上述操作获得 *Gn1a* 基因对应的蛋白质序列,启动结构域预测分析。

1.7 YJX^{Gn1a-1} 突变体的农艺性状考察

经测序鉴定后将基因编辑成功的植株幼苗单本移栽到歇马实验基地中,依据常规稻田管理方式进行栽培。待水稻成熟时,选择野生型水稻渝金香(YJX^{WT})和 *Gn1a* 编辑植株,使用单反相机(CANON EOS 70D)进行拍摄,收集表型数据。在成熟野生型水稻渝金香(YJX^{WT})和 YJX^{Gn1a-1} 突变体中选取 40 株长势基本一致的植株考察株高,选取 10 株长势基本一致的植株考察分蘖数、穗长、一次枝梗数、二次枝梗数、每穗颖花数、粒长、粒宽、千粒质量、单株总小穗数、单株总籽粒数、结实率和单株产量等田间农艺性状,采用 *t* 检验进行统计分析。

1.8 *Gn1a* 表达模式分析

在孕穗期,分别取常规籼稻品种渝金香(YJY^{WT})的根、茎、叶和不同长度的幼穗于液氮中速冻,提取 RNA 进行反转录合成 cDNA 用于实时荧光定量 PCR。利用荧光定量 PCR 的预混体系和 Bio-RadX96 PCR 仪,以 *Actin* 作为内参(表 1),设 3 次重复,PCR 扩增程序为:95 ℃预变性 60 s;95 ℃变性 15 s;60 ℃退火 15 s;70 ℃延伸 60 s,共 40 个循环。所得数据使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对定量值(RQ)与误差值,结合数据分析 *Gn1a* 在植株不同部位的表达模式。

表 1 本研究采用的核苷酸序列及相应引物

引物名称	引物序列	用途
<i>Gn1a</i> -fwd	GGCAGGTAGTCTGTCCACGACAC	靶点 1 序列
<i>Gn1a</i> -rev	AAACGTGTCGTGGACAGACTACC	
<i>Gn1a</i> -2-fwd	GGCAGGAAATCTGGGGGCCATGG	靶点 2 序列
<i>Gn1a</i> -2-rev	AAACCCATGGCCCCCAGATTTCC	
<i>Gn1a</i> JC-F	CTCGCCGTGTCAGTGGA	转基因植株鉴定
<i>Gn1a</i> JC-R	TGATGACGCCGAAGCTGCC	
SCas9F	GCATGACGTTATTTATGAGGTGGGT	<i>Gn1a</i> 基因编辑植株的 T-DNA 插入检测
SCas9R	CTGCTCTAGCATTCGCCATTACG	
<i>Actin</i> -qF	TGCTATGTACGTCGCCATCCAG	<i>Gn1a</i> 的表达模式分析
<i>Actin</i> -qR	AATGAGTAACACGCTCCGTCA	
<i>Gn1a</i> -qF	CCTCATCTACCCCATGAACC	
<i>Gn1a</i> -qR	CTCCTCCAGCCTCCCCACGT	

1.9 单倍型分析

利用 Rice SNP-Seek Database(<https://snp-seek.irri.org/>)、Rice Variation Map v2.0(<http://rice-varmap.ncpgr.cn/>) 鉴定和分析单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)及插入/删除(Insertion/Deletion, InDel)位点,结合 Rice SNP-Seek Database 中现有的水稻表型数据进行单倍型分析^[19-20]。综合以上分析结果进一步对目标性状和 SNP、InDel 标记位点进行关联性分析。

2 结果与分析

2.1 CRISPR/Cas9 靶点特异性分析

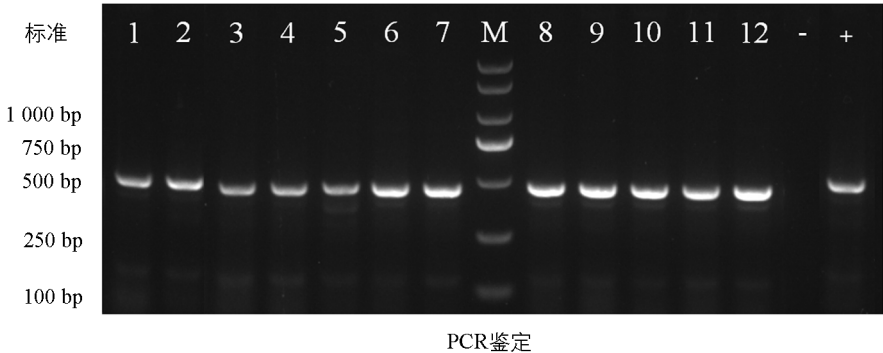
在籼稻全基因组序列中对靶点展开特异性分析, 结果显示: 两个靶点的期望值(*E-val*)均为 0.001 4, 说明双靶点在籼稻基因组中无随机匹配, 匹配高度特异(表 2)。

表 2 两个靶点在全基因组中的特异性检测

靶点	基因组定位	重叠基因	方向	长度	得分	<i>E-val</i>
靶点 1	1: 5676359-5676378	<i>BGIOSGA002195</i>	反向	20	20	0.001 4
	9: 8049769-8049782		反向	14	14	5.4
	4: 32536280-32536297	<i>BGIOSGA017272</i>	反向	18	14	5.4
	5: 28156149-28156162		反向	14	14	5.4
靶点 2	1: 5676282-5676301	<i>BGIOSGA002195</i>	反向	20	20	0.001 4
	4: 3248145-3248158		反向	14	14	5.4
	12: 9665519-9665532		反向	14	14	5.4

2.2 FAD 结合结构域缺失突变体 *YJX^{Gn1a-1}* 的鉴定

由图 2 可知, 从 T₀ 代 69 个单株中提取叶片 DNA, 利用 PCR 扩增和测序分析 *Gn1a* 基因第 1 外显子靶点区段(500 bp), 结果显示, 双靶点设计有效提高了编辑效率和位点突变的准确性。在 69 个检测单株中, 62 株(89.9%)发生了 *Gn1a* 缺失突变, 其中 28 株(45.2%)为纯合缺失突变体, 34 株(54.8%)为杂合缺失突变体。



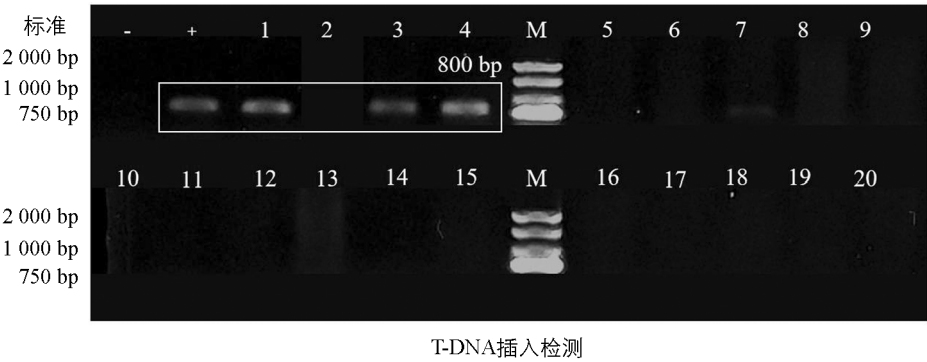
M 为 DNA 分子量标准; 1~2 为野生型渝金香(*YJX^{WT}*)单株; 3~12 为 T₀ 代转基因单株; “-”为等体积水模板阴性对照; “+”为等体积质粒模板阳性对照。

图 2 部分 T₀ 代转基因单株 *Gn1a* 的 PCR 检测

为避免外源载体在 T₀ 代植株基因组中的整合导致 Cas9 蛋白的持续表达, 进一步对单株进行 T-DNA 插入检测。由于后续农艺性状鉴定所需的单株数为 10 株, 故随机选择 28 株纯合缺失突变体中的 20 株利用 PCR 扩增检测 T-DNA 序列, 并通过琼脂糖凝胶电泳分析其插入情况(图 3)。结果显示, 20 株纯合缺失突变体中, 仅 3 株(1、3、4 号)检测到 T-DNA 插入, 其余 17 株未检测到。17 株不含外源 T-DNA 的突变体可用于后续试验, 并可作为稳定遗传的种质资源加以利用。

2.3 *YJX^{Gn1a-1}* 突变体 *Gn1a* 基因编辑位点分析及结构域变化预测

为精确解析编辑靶点的突变情况, 对 T₀ 代测序数据进行深入分析, 以确定 *YJX^{Gn1a-1}* 突变体 FAD 结合结构域编码区的具体缺失位点。结果显示, *Gn1a* 第 1 外显子编码区存在 78 bp 碱基缺失(表 3), 起始于第 589 位碱基, 终止于 666 位碱基, 该缺失属于整码缺失突变。



M 为 DNA 分子量标准；1~20 为不同的 T_0 代转基因单株；“—”为等体积水模板阴性对照；“+”为等体积 T-DNA 序列插入模板阳性对照。

图 3 不同 T_0 代转基因单株 T-DNA 插入的 PCR 检测

表 3 T_0 代编码区第 1 外显子上缺失的突变类型

品种	序列	碱基缺失/bp
YJX ^{WT}	GGCTCACGCCGGTGTCTGTG(60 bp)GGCCTTCCGCCATGGCCCC	
YJX ^{Gn1a-1}	GGCTCACGCCGGTGTG——(—78 bp)——GGCCCC	78

注：破折号表示碱基缺失。

进一步通过蛋白结构域分析，预测 FAD 结合结构域的缺失对蛋白功能的影响。结果表明，在野生型 YJX^{WT} 中共鉴定出两个功能结构域，分别为 FAD 结合结构域(81~238 aa，共 158 aa)和 CKX 催化结构域(269~581 aa，共 313 aa)。相比野生型，YJX^{Gn1a-1} 突变体因 78 bp 碱基缺失，导致 FAD 结合结构域内 26 个氨基酸(197~222 aa)缺失(图 4)。

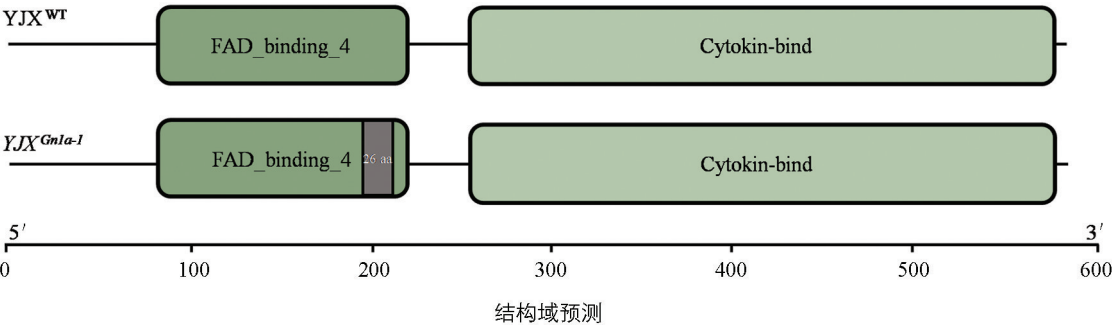
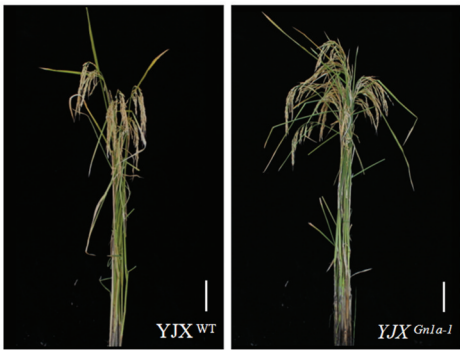


图 4 Gn1a 蛋白的保守结构域预测

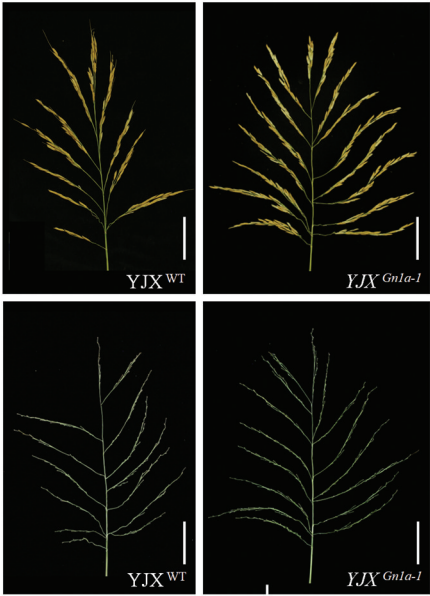
2.4 FAD 结合结构域缺失突变体 YJX^{Gn1a-1} 的农艺性状分析

为探究 Gn1a 蛋白 FAD 结合结构域缺失对表型的影响，首先对野生型和 YJX^{Gn1a-1} 突变体的株高及分蘖数进行测量和统计分析。结果显示，与野生型相比，YJX^{Gn1a-1} 突变体的株高显著增加，平均株高由 125.0 cm 提高至 139.8 cm($p<0.01$)(图 5a、5b)。分蘖数在突变体与野生型间差异无统计学意义($p>0.05$)，均维持在 7 个左右(图 5a、5c)。YJX^{Gn1a-1} 突变体的穗长与野生型间差异无统计学意义($p>0.05$)(图 5d、5e)，但一次枝梗数和二次枝梗数均显著增加($p<0.01$)。突变体平均一次枝梗数为 16 个，显著高于野生型的 12 个($p<0.01$)；二次枝梗数为 46 个，显著高于野生型的 30 个($p<0.01$)(图 5d、5f、5g)。一次、二次枝梗数的显著增加进一步导致每穗颖花数的大幅提升，由野生型的 164 个增加至 229 个($p<0.01$)(图 5d、5h)。

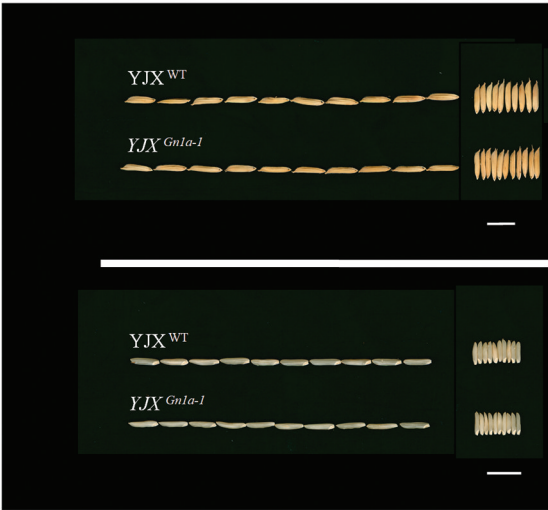
水稻穗粒数增加通常会导致粒型减小^[2, 6, 21-22]。为探究 YJX^{Gn1a-1} 突变体穗粒数增加是否影响粒型，对野生型和突变体的籽粒及糙米性状进行了统计分析。结果显示，野生型与突变体的 10 粒籽粒长约



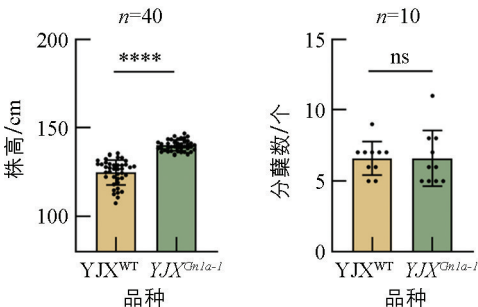
a. 成期株高、分蘖数



d. 穗部性状

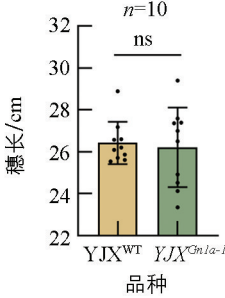


i. 籽粒及谷粒性状观察

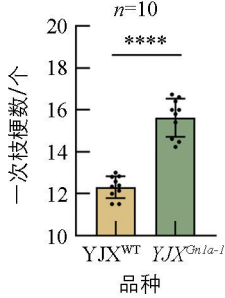


b. 株高

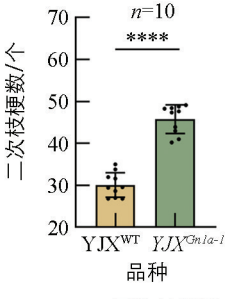
c. 分蘖数



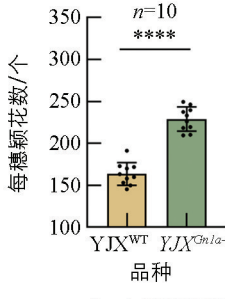
e. 穗长



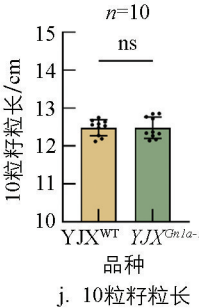
f. 一次枝梗数



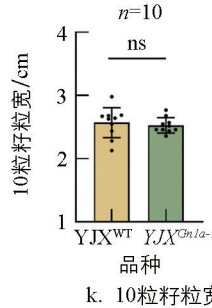
g. 二次枝梗数



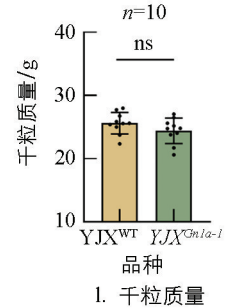
h. 每穗颖花数



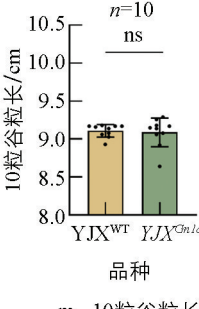
j. 10粒籽粒长



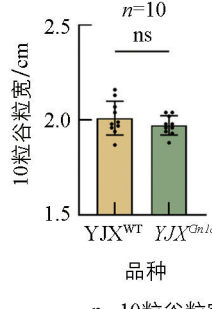
k. 10粒籽粒宽



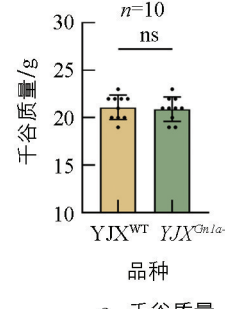
l. 10粒质量



m. 10粒谷粒长



n. 10粒谷粒宽



o. 10粒质量

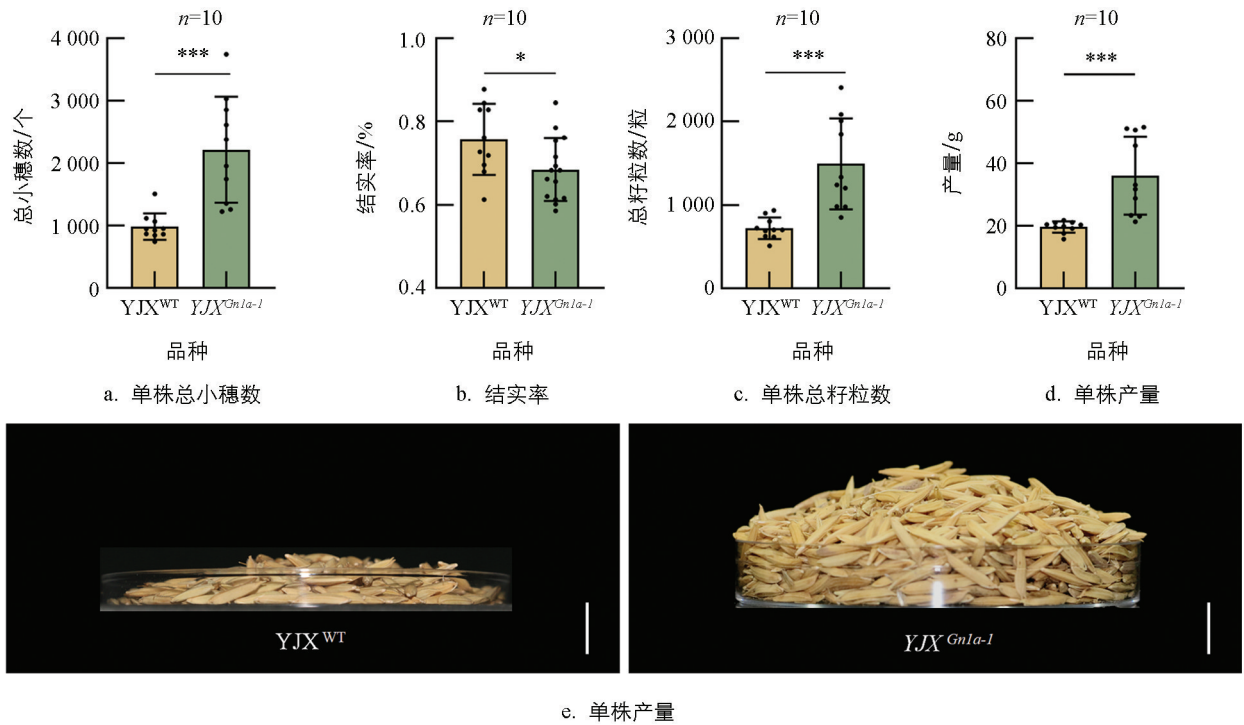
****表示 $p < 0.0001$, 差异有统计学意义; ns 表示 $p > 0.05$, 差异无统计学意义。标尺: a 为 10 cm, d 为 5 cm, i 为 1 cm。

图 5 野生型渝金香(YJX^{WT})和 YJX^{Gn1a-1} 的农艺性状分析

12.5 cm, 10 粒籽粒宽约 2.5 cm, 千粒质量约 25 g, 二者差异无统计学意义($p>0.05$)(图 5i-5l)。进一步去除谷壳后分析, 10 粒谷粒长约 9.0 cm, 10 粒谷粒宽约 2.0 cm, 千谷质量约 21 g, 野生型与突变体间差异也无统计学意义($p>0.05$)(图 5j、5m-5o)。YJX^{Gn1a-1} 突变体每穗粒数的显著增加并未引起籽粒性状的显著改变。

2.5 FAD 结合结构域缺失突变体 YJX^{Gn1a-1} 的产量性状分析

YJX^{Gn1a-1} 突变体在分蘖数无显著变化的情况下, 一次枝梗数和二次枝梗数均显著增加, 导致单株总小穗数由野生型的 989 颖粒显著增加至 2 218 颖($p<0.01$)(图 6a), 突变体的结实率相较于野生型显著下降($p<0.05$)(图 6b), 单株总籽粒数和产量极显著提升(图 6c、6d), 其中单株总籽粒数由 725 颖增至 1 496 颖($p<0.01$), 单株产量由 20 g 提高至 36 g($p<0.01$)(图 6d、6e)。综上表明, Gn1a 蛋白 FAD 结合结构域的缺失可显著提高水稻产量。



* 表示 $p<0.05$, * * * 表示 $p<0.001$, 差异有统计学意义。标尺: e 为 1 cm。

图 6 野生型渝金香(YJX^{WT})和 YJX^{Gn1a-1} 突变体的产量性状分析图

2.6 Gn1a 基因在水稻中的表达模式分析

为探究 YJX^{Gn1a-1} 突变体株高和穗粒数增加的潜在机制, 利用 qRT-PCR 分析 Gn1a 在水稻不同组织中的表达模式。结果显示, Gn1a 主要在茎及不同长度幼穗中表达(图 7), 表明其可能参与了株高和花序的发育调控。

2.7 Gn1a 自然单倍型的表型分析

FAD 结合结构域编码序列的缺失能够使突变体的株高和单株产量极显著提升。为进一步探究 Gn1a 缺失区段(Chr1: 5274920-5274997)是否存在具有类似敲除效应的自然单倍型, 利用 Rice SNP-Seek Database 和 Rice Variation

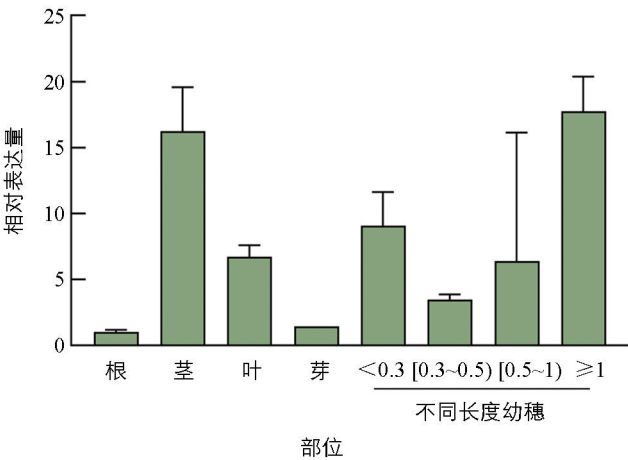


图 7 Gn1a 表达模式的 qRT-PCR 分析

Map v2.0 对 3 024 份水稻种质资源进行分析。结果显示, *Gn1a* 基因序列中共鉴定出 43 个 SNP 位点和 29 个 InDel 位点。在缺失区段内, 仅包含 1 个 SNP 位点(Chr1: 5274962), 导致氨基酸由丙氨酸变为苏氨酸, 对应两种不同的单倍型, 且未发现 InDel 变异。进一步分析该 SNP 变异对水稻枝梗数、结实率及株高的影响, 发现两种不同单倍型的表现具有一致性, 其中大部分品种枝梗数的量化指标为 1, 结实率的量化指标为 3, 平均株高约 112.5 cm($p>0.05$)(图 8)。上述结果表明, 该 SNP 变异可能对水稻穗粒数和株高的提升无显著贡献, 暗示 *Gn1a* 功能的实现可能依赖于其 FAD 结合结构域的完整性。

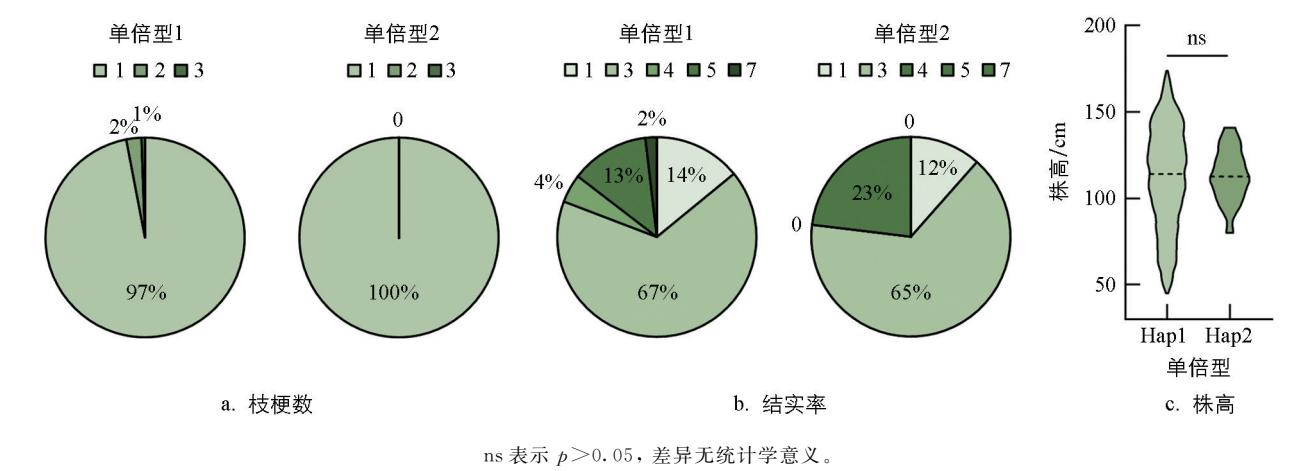


图 8 *Gn1a* 编辑区段内 SNP 位点单倍型表型分析

3 讨论与结论

3.1 讨论

水稻产量由单位面积内有效穗数、每穗粒数和粒质量等因子决定, 而这些产量决定因子则是由数量性状位点(Quantitative Trait Locus, QTLs)控制^[17, 23-24]。筛选与穗粒数相关的理想 QTL 位点有利于培育高产水稻品种^[23, 25-27]。*Gn1a* (*OsCKX2*) 是控制水稻每穗粒数的重要 QTL, 编码一种细胞分裂素氧化酶, 其表达下降会导致细胞分裂素在花序分生组织中积累, 从而增加每穗粒数, 提高产量^[9-10, 16, 23-24]。*Gn1a* 蛋白由 FAD 结合结构域和 CKX 催化结构域组成。CKX 是催化活性核心, 而 FAD 结合结构域则负责结合辅酶黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD), 作为电子受体完成细胞分裂素异戊烯基侧链的氧化反应。两个结构域相互协同, 通过 β -氧化途径特异性降解细胞分裂素从而调控水稻的生长^[9, 11, 15, 28-30]。研究发现, *Gn1a* 基因不仅能够调控穗粒数, 也影响结实率和分蘖数^[31]。Wang 等^[7]研究表明, CKX 催化结构域部分缺失可显著增加穗粒数但降低了结实率; Yeh 等^[11]利用 CRISPR/Cas9 敲除 CKX 催化结构域编码区特定位点, 发现其可提高穗粒数但减少了分蘖。本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在籼稻品种渝金香(YJX^{WT}) *Gn1a* 基因的第 1 外显子上设计双靶点敲除, 筛选、鉴定到不含外源基因的 YJX^{*Gn1a*-1} 突变体。结构域分析表明, YJX^{*Gn1a*-1} 突变体存在 78 bp 碱基缺失, 引起 FAD 结合结构域中 26 个氨基酸缺失(图 4)。相较于野生型, YJX^{*Gn1a*-1} 突变体的一次枝梗数、二次枝梗数极显著增加, 而籽粒形态和千粒质量并未发生显著变化(图 5), 最终单株产量显著提高(图 6)。值得注意的是, YJX^{*Gn1a*-1} 突变体植株高度显著增加。基因的表达分析显示, *Gn1a* 基因在茎及不同长度幼穗中均有表达(图 7), 提示其不仅调控穗粒数, 还可能影响株高, 这一功能或由 FAD 结合结构域介导。在未来研究中, 可进一步解析 *Gn1a* 在株高调控中的作用机制, 并探索利用其编辑效应提高水稻地上生物量, 以创制高光效品种用于育种^[32]。

随着 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的发展, 研究者可快速实现目标基因的定向编辑, 以加速水稻的遗传改良^[12, 33]。解析高产单倍型突变位点并结合 CRISPR/Cas9 技术, 可筛选出具有育种价值的突变

体^[25-26]。已有研究表明, *Gn1a* 基因的缺失是重穗型水稻 Shuhui498(R498)每穗粒数增加的决定性因素, 且部分携带 InDel 突变位点的水稻单倍型表现出显著的穗粒数增加^[6-7]。此外, 部分 InDel 位点与粳籼亚种分化密切相关^[33], 可能在水稻高产性状的形成中发挥着关键作用。目前对于水稻 InDel 位点与表型的关联性分析研究仍停留在不同品种 InDel 位点的鉴定层面^[34-38], 缺乏系统的突变体表型数据收集及数据库构建, 导致育种过程中难以精准筛选关键的 InDel 位点, 限制了高效创制具有目标性状的水稻种质。本研究基于 CRISPR/Cas9 技术成功敲除 *Gn1a* 蛋白的 FAD 结合结构域, 并获得 YJX^{Gn1a-1} 突变体, 可用于分析 FAD 结合结构域缺失的表型效应^[39-40]。为了进一步评估编辑位点的育种潜力, 我们在自然种质资源中筛选了编辑区段(Chr1: 5274920-5274997)携带 SNP 和 InDel 的单倍型, 用以评估其表型效力。在敲除区间内, 仅检测到 1 个 SNP 位点 Chr1: 5274962, 其编码氨基酸发生了改变(由丙氨酸变为苏氨酸), 对应两种单倍型。数据库分析显示, 这两种单倍型在株高和枝梗数方面差异无统计学意义(图 8), 表明单一 SNP 位点的变异不足以作为水稻穗粒数提升的决定性因素, 而 FAD 结合结构域的完整性对 *Gn1a* 功能行使具有重大影响。相较之下, 本研究创制出的 YJX^{Gn1a-1} 突变体表现出株高和每穗颖花数的显著提升, 因此 InDel 突变及大片段缺失可能比单点突变对 *Gn1a* 功能的影响更为深远。未来可针对 InDel 相关单倍型进行系统的表型收集, 构建 InDel 位点与水稻高产表型的关联性数据库, 以筛选 *Gn1a* 基因与表型强关联的关键 InDel 位点。结合自然种质资源的 InDel 突变体筛选及 CRISPR/Cas9 技术, 可创制具有优良特性的高产单倍型, 以加速水稻品种的改良。

3.2 结论

表达模式分析表明, *Gn1a* 在水稻茎和不同长度幼穗中特异表达, 提示其可能在水稻株高和花序发育中发挥重要作用。结构域预测表明, *Gn1a* 蛋白由 FAD 结合结构域和 CKX 催化结构域组成。本研究以籼稻品种淦金香(YJX^{WT})为受体材料, 利用 CRISPR/Cas9 技术靶向敲除 *Gn1a* 基因 FAD 结合结构域编码区段的 78 bp 碱基序列, 测序检测出无外源片段插入的纯合突变体 YJX^{Gn1a-1} 。农艺性状调查显示, 突变体植株株高显著增加, 一次、二次枝梗数显著增加, 每穗颖花数显著提升, 单株产量显著提高。单倍型分析进一步验证了 FAD 结合结构域的缺失可显著增加水稻株高和穗粒数。本研究初步解析了 FAD 结合结构域缺失对株高和穗粒数的影响, 为 *Gn1a* 基因的功能解析提供了新的视角, 创制了可用于高产育种的新种质资源, 为培育高产水稻品种提供了理论依据和实践支持。

参考文献:

- [1] 文钦, 贾思思, 王加峰, 等. 水稻单倍体诱导基因 *OsmATL* 突变体的创制与分析 [J]. 作物学报, 2021, 47(5): 816-825.
- [2] CHEN J J, MIAO Z N, KONG D Y, et al. Application of CRISPR/Cas9 Technology in Rice Germplasm Innovation and Genetic Improvement [J]. Genes, 2024, 15(11): 1492.
- [3] HU H F, ZHAO J L, THOMAS W J W, et al. The Role of Pangenomics in Orphan Crop Improvement [J]. Nature Communications, 2025, 16(1): 118.
- [4] MCGINTY E L, SMITH-KEUNE C, JERRY D R. A High Through-put Protocol for Quantifying Nucleic Acids in Individual Microcrustaceans Using New Generation RNA and DNA Specific Dyes [J]. Journal of Shellfish Research, 2008, 27(2): 449-455.
- [5] MA X L, ZHANG Q Y, ZHU Q L, et al. A Robust CRISPR/Cas9 System for Convenient, High-efficiency Multiplex Genome Editing in Monocot and Dicot Plants [J]. Molecular Plant, 2015, 8(8): 1274-1284.
- [6] 温一博, 陈淑婷, 徐正进, 等. *DEP1*、*Gn1a* 和 *qSW5* 组合应用调控水稻穗部性状 [J]. 中国农业科学, 2023, 56(7): 1218-1227.

[7] WANG S G, MA B T, GAO Q, et al. Dissecting the Genetic Basis of Heavy Panicle Hybrid Rice Uncovered *Gn1a* and *GS3* as Key Genes [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2018, 131(6): 1391-1403.

[8] 李兆伟, 莫祖意, 孙聪颖, 等. OsNAC2d 基因编辑水稻突变体的创建及其对于干旱胁迫的响应 [J]. 作物学报, 2023, 49(2): 365-376.

[9] ASHIKARI M, SAKAKIBARA H, LIN S Y, et al. Cytokinin Oxidase Regulates Rice Grain Production [J]. Science, 2005, 309(5735): 741-745.

[10] LI M R, LI X X, ZHOU Z J, et al. Reassessment of the Four Yield-related Genes *Gn1a*, *DEP1*, *GS3*, and *IPA1* in Rice Using a CRISPR/Cas9 System [J]. Frontiers in Plant Science, 2016(7): 377.

[11] YE H S Y, CHEN H W, NG C Y, et al. Down-regulation of Cytokinin Oxidase 2 Expression Increases Tiller Number and Improves Rice Yield [J]. Rice, 2015, 8(1): 36.

[12] GUO T, LU Z Q, SHAN J X, et al. *ERECTA1* Acts Upstream of the OsMKKK10-OsMKK4-OsMPK6 Cascade to Control Spikelet Number by Regulating Cytokinin Metabolism in Rice [J]. The Plant Cell, 2020, 32(9): 2763-2779.

[13] 袁兴超, 黄永兰, 唐秀英, 等. *Gn1a* 基因靶向敲除对梗稻产量构成因素的影响 [J]. 江西农业大学学报, 2023, 45(1): 10-16.

[14] HU X X, MENG X B, LIU Q, et al. Increasing the Efficiency of CRISPR-Cas9-VQR Precise Genome Editing in Rice [J]. Plant Biotechnology Journal, 2018, 16(1): 292-297.

[15] TU B, TAO Z, WANG S G, et al. Loss of *Gn1a*/OsCKX2 Confers Heavy-panicle Rice with Excellent Lodging Resistance [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2022, 64(1): 23-38.

[16] 殷得所, 李进波, 万丙良, 等. 利用 *Gn1a* 基因进行梗稻穗粒数改良的研究 [J]. 湖北农业科学, 2016, 55(21): 5455-5457, 5518.

[17] XIE X R, MA X L, ZHU Q L, et al. CRISPR-GE: A Convenient Software Toolkit for CRISPR-based Genome Editing [J]. Molecular Plant, 2017, 10(9): 1246-1249.

[18] 刘建国, 陈冬东, 陈玉玉, 等. 水稻 MKKs 家族基因成员 *OsMKK4* 的不同等位基因型及自然变异对籽粒的影响 [J]. 作物学报, 2025, 51(3): 598-608.

[19] WANG W S, MAULEON R, HU Z Q, et al. Genomic Variation in 3 010 Diverse Accessions of Asian Cultivated Rice [J]. Nature, 2018, 557(7703): 43-49.

[20] ALEXANDROV N, TAI S S, WANG W S, et al. SNP-seek Database of SNPs Derived from 3000 Rice Genomes [J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43: 1023-1027.

[21] LU Z F, YU H, XIONG G S, et al. Genome-wide Binding Analysis of the Transcription Activator Ideal Plant Architecture1 Reveals a Complex Network Regulating Rice Plant Architecture [J]. The Plant Cell, 2013, 25(10): 3743-3759.

[22] HUANG X H, YANG S H, GONG J Y, et al. Genomic Architecture of Heterosis for Yield Traits in Rice [J]. Nature, 2016, 537(7622): 629-633.

[23] HUANG X H, KURATA N, WEI X H, et al. A Map of Rice Genome Variation Reveals the Origin of Cultivated Rice [J]. Nature, 2012, 490(7421): 497-501.

[24] DESCALSOTA-EMPLEO G I, AMPARADO A, INABANGAN-ASILOMA. Genetic Mapping of QTL for Agronomic Traits and Grain Mineral Elements in Rice [J]. The Crop Journal, 2019, 7(4): 560-572.

[25] ISHIMARU K, HIROTSU N, MADOKA Y, et al. Loss of Function of the IAA-Glucose Hydrolase Gene *TGW6* Enhances Rice Grain Weight and Increases Yield [J]. Nature Genetics, 2013, 45(6): 707-711.

[26] RUAN B P, SHANG L G, ZHANG B, et al. Natural Variation in the Promoter of *TGW2* Determines Grain Width and Weight in Rice [J]. The New Phytologist, 2020, 227(2): 629-640.

[27] GUO L B, YE G Y. Use of Major Quantitative Trait Loci to Improve Grain Yield of Rice [J]. Rice Science, 2014(2): 65-82.

[28] GALUSZKA P, FREBORT I, SEBELA M, et al. Cytokinin Oxidase or Dehydrogenase? Mechanism of Cytokinin Degradation in Cereals [J]. European Journal of Biochemistry, 2001, 268(2): 450-461.

[29] WERNER T, KÖLLMER I, BARTRINA I, et al. New Insights into the Biology of Cytokinin Degradation [J]. Plant Biology, 2006, 8(3): 371-381.

[30] MALITO E, CODA A, BILYEU K D, et al. Structures of Michaelis and Product Complexes of Plant Cytokinin Dehydrogenase: Implications for Flavoenzyme Catalysis [J]. Journal of Molecular Biology, 2004, 341(5): 1237-1249.

[31] 何勇, 刘耀威, 熊翔, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术编辑 *OsOFP30* 基因创制水稻粒型突变体 [J]. 中国水稻科学, 2024, 38(5): 507-515.

[32] JING F, SHI S L, KANG W J, et al. The Physiological Basis of Alfalfa Plant Height Establishment [J]. Plants, 2024, 13(5): 679.

[33] Lu B R, Cai X X, JIN X, et al. Efficient Indica and Japonica Rice Identification Based on the Indel Molecular Method; Its Implication in Rice Breeding and Evolutionary Research [J]. Prog Nat Sci, 2009, 19(10): 1241-1252.

[34] ZHAO H, LI J C, YANG L, et al. An Inferred Functional Impact Map of Genetic Variants in Rice [J]. Molecular Plant, 2021, 14(9): 1584-1599.

[35] ZHAO H, YAO W, OUYANG Y D, et al. Rice Var Map: A Comprehensive Database of Rice Genomic Variations [J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43: 1018-1022.

[36] HECHANOVA S L, BHATTARAI K, SIMON E V, et al. Development of a Genome-wide InDel Marker Set for Allele Discrimination between Rice (*Oryza sativa*) and the Other Seven AA-Genome *Oryza* Species [J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 8962.

[37] MOONSAP P, LAKSANAVILAT N, SINUMPORN S, et al. Genetic Diversity of Indo-China Rice Varieties Using ISSR, SRAP and InDel Markers [J]. Journal of Genetics, 2019, 98: 80.

[38] YONEMARU J I, CHOI S H, SAKAI H, et al. Genome-wide Indel Markers Shared by Diverse Asian Rice Cultivars Compared to Japanese Rice Cultivar ‘Koshihikari’ [J]. Breeding Science, 2015, 65(3): 249-256.

[39] SANG S, SUN X, MA T, et al. Efficient Promoter Editing of the *SBEIIb* Gene Enables Fine-tuning of the Resistant Starch Content in Rice [J]. Int J Biol Macromol, 2025, 290: 138904.

[40] 李光正, 李岩, 李建容, 等. 利用 CRISPR/Cas 9 基因编辑技术提高贵州禾产量研究 [J]. 种子, 2021, 40(6): 1-5, 13.

责任编辑 周仁惠