

敲除 *TMS5* 基因获得温敏不育粳稻新材料

杜茜^{1,2,#} 费云燕^{1,2,#} 王芳权^{1,2} 许扬^{1,2} 王军^{1,2} 李文奇^{1,2} 赵凌^{1,2} 陈智慧^{1,2}
梁国华^{1,2} 周勇^{1,2} 杨杰^{1,2,*}

(¹扬州大学 江苏省粮食作物现代产业技术协同创新中心, 江苏 扬州 225009; ²江苏省农业科学院 粮食作物研究所 / 国家水稻改良中心南京分中心/ 江苏省优质水稻工程技术研究中心, 南京 210014; #共同第一作者; *通讯联系人, E-mail: yangjie168@aliyun.com)

Thermo-sensitive Male Sterile Line Created by Editing *TMS5* Gene in *japonica* Rice

DU Xi^{1,2,#}, FEI Yunyan^{1,2,#}, WANG Fangquan^{1,2}, XU Yang^{1,2}, WANG Jun^{1,2}, LI Wenqi^{1,2}, ZHAO Ling^{1,2},
CHEN Zhihui^{1,2}, LIANG Guohua^{1,2}, ZHOU Yong^{1,2}, YANG Jie^{1,2,*}

(¹ Jiangsu Co-Innovation Center for Modern Production Technology of Grain Crops, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; ² Institute of Food Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences / Nanjing Branch of Chinese National Center for Rice Improvement / Jiangsu High Quality Rice R & D Center, Nanjing 210014, China; #These authors contributed equally to this work; *Corresponding author, E-mail: yangjie168@aliyun.com)

Abstract: 【Objective】 The breeding of thermo-sensitive male sterile rice lines is a key step in the breeding of two-line hybrid rice. *TMS5* is the key gene that modulates pollen fertility of rice at different temperatures and has been widely used in rice breeding. In order to accelerate the breeding process of thermo-sensitive sterility lines, **【Method】** CRISPR/Cas9 technology was used to edit *TMS5* with a *japonica* rice variety Wuyunjing 7 as a material. **【Results】** Sequencing analysis showed that six homozygous mutants screened from 22 strains of T₀ generation produced the same genetic variation, and one base “A” was inserted between 44 bp and 45 bp of the second exon of *TMS5* of all the six mutants, resulting in pre-maturation of translation. Cytological observation and artificial pollination confirmed that the pollen of *tms5* mutant was aborted and the development of female gametes was normal. **【Conclusion】** These results indicated that the thermo-sensitive male sterile lines could be obtained rapidly by knocking out the thermo-sensitive male sterile gene *TMS5* in *japonica* rice.

Key words: *japonica* rice; CRISPR/Cas9; thermo-sensitive male sterile line

摘 要: 【目的】水稻温敏不育系的选育是两系杂交稻育种工作中的关键环节。*TMS5* 是控制温敏不育的重要基因, 在生产上也应用较广。为了加快水稻温敏不育系的选育进程, **【方法】**利用 CRISPR/Cas9 技术, 在武运粳 7 号背景下对 *TMS5* 基因进行编辑。**【结果】**通过测序从 22 株 T₀ 代中筛选获得 6 株纯合的突变体, 分析发现 6 个纯合的突变体产生了相同的遗传变异, 都在 *TMS5* 基因第 2 外显子 44 bp 和 45 bp 之间插入碱基“A”, 导致翻译提前终止。通过细胞学观察和人工辅助授粉证实获得的株系花粉败育而雌配子正常发育。**【结论】**这些结果表明对温敏不育基因 *TMS5* 基因进行编辑可以快速获得粳型温敏雄性不育系。

关键词: 粳稻; CRISPR/Cas9; 温敏雄性不育系

中图分类号: Q945.78; S511.034

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2019)05-0429-07

水稻是世界上最重要的粮食作物之一, 大约一半以上的人口以大米为主食^[1]。利用杂种优势培育杂交稻是实现高产的重要途径, 而选育两系不育系配制杂交组合是目前最有效最便捷的方法之一。两系杂交水稻已成为我国推广的主流杂交稻^[2-3]。因此, 加快两系不育系的选育进程具有重要的生产实践意义。

CRISPR/Cas9 定点编辑技术以 DNA 双链为靶标, 在动植物中的运用越来越广泛, 它可以实现对基因组的精确编辑。2012 年, Jinek 等^[4]在体外证明了 Cas9 核酸酶结合 gRNA 即可切割双链 DNA, 为 CRISPR/Cas9 系统的应用奠定了坚实的基础。2013 年, Cong 等^[5]和 Mali 等^[6]分别实现了在人类细胞中的基因编辑, 掀起了基因编辑的高潮。近年来, 基

收稿日期: 2019-03-28; 修改稿收到日期: 2019-04-23。

基金项目: 国家重点研发计划资助项目(2017YFD0100403); 江苏省农业科技自主创新资金资助项目[CX(18)2022]; 江苏省现代农业重点研发计划资助项目(BE2017345); 国家转基因生物新品种培育科技重大专项(2018ZX0800102); 江苏省自然科学基金资助项目(BK20170610)。

因编辑在改良水稻性状与水稻分子育种等方面发挥了巨大的作用。2017年, Shen等^[7]利用CRISPR/Cas9多基因编辑技术同时敲除水稻中8个基因(3个穗型基因、2个粒型基因、一个株型基因、一个香味基因和一个生育期基因), 获得了不同的突变体组合。2018年, 汪秉坤等^[8]对 *Waxy(Wx)* 基因进行敲除, 成功培育出低直链淀粉含量的糯稻新品种。这些研究表明基因组编辑是水稻快速定向遗传改良的重要手段。

目前, 与水稻光温敏不育相关的主效基因已经在不同的染色体中定位^[9-17], 并且在不同的染色体上也检测到不同的QTL位点^[18-19]。*TMS5*基因是控制水稻温敏不育的主效基因之一, 它能够通过编码RNase Z^{S1}降解花粉母细胞中表达的Ub_{L40} mRNA。野生型水稻中, 高温诱导Ub_{L40} mRNA积累, RNase Z^{S1}可以通过降解Ub_{L40} mRNA维持花粉育性; *tms5*温敏不育系中, 基因编码区第1外显子中第71位碱基均发生由C到A的点突变, 形成终止密码子, 导致翻译提前终止, RNase Z^{S1}功能缺失, Ub_{L40} mRNA积聚, 导致水稻花粉不育, 我国主要的25个光温敏不育系中有24个含有*tms5*基因^[20-21]。截至2018年, 我国通过国家审定的两系法杂交水稻品种130个, 通过省级审定的两系杂交水稻1431个(<http://www.ricedata.cn/variety/>)。因此, *tms5*在我国两系育种的应用中有着极其重要的地位。

近几年来, 编辑*TMS5*基因获得了系列温敏雄性不育新资源。Zhou等^[22]以中花11为背景, 运用CRISPR/Cas9技术对不同类型的粳稻、籼稻和三系保持系的*TMS5*基因的10个靶位点进行基因编辑, 获得了不同突变类型的温敏不育突变体材料, 并在一年内获得无外源基因成分的温敏不育株系。黄忠明等^[23]培育出粳稻*tms5*突变体。同年, 吴明基^[24]等利用CRISPR/Cas9技术转化优良中间材料GH89获得*tms5*不育系材料。Barman等^[25]对籼稻品种中嘉早17的*TMS5*基因进行敲除, 获得了具有产量潜力的籼型温敏核雄性不育系YK17S。Li等^[26]编辑了具有华占血缘的中间材料Pinzhan的*TMS5*、*Pi21*和*Xa13*基因, 并成功获得了抗病性增强的温敏雄性不育材料PinzhanS。

武运粳7号是由江苏省武进市农业科学研究所选育的早熟晚粳常规稻品种, 并且在2000年通过国家农作物品种审定委员会审定。该品种综合品质优良, 适合长江中下游地区种植, 仅用5年时间种植面积突破66.7 hm², 创造同类品种之最。2000年, 王小虎等^[27]以BT型矮A为母本, 与武运粳7号杂

交并连续回交6代后育成三系不育系新品种“武运粳7号A”。利用该不育系配制的三系杂交种杂种优势强, 但由于制种产量低, 未能在生产上推广应用。为探索武运粳7号两系法杂种优势利用途径, 我们运用CRISPR/Cas9技术敲除武运粳7号中的*TMS5*基因, 以期获得粳型温敏不育新种质。

1 材料与方法

1.1 实验材料

转化背景材料为早熟晚粳品种武运粳7号, 种植于江苏省农业科学院人工气候箱(PRX-1000D)。所用引物(表1)的合成及测序由南京擎科生物技术有限公司完成, *Bsa* I、T₄ DNA连接酶和KOD FX分别购自NEB、TaKaRa和TOYOBO公司, 其他试剂购自天根生化科技有限公司。

1.2 基因编辑靶点设计

通过CRISPR-P网站(<http://cbi.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR>)对*TMS5*进行靶点分析。在第2外显子上挑选了一段特异性较高的20 bp碱基序列*TMS5-1*作为CRISPR的靶点。由于PAM序列TGG上游第20位碱基处与U3启动子的转录起始点一样都是A, 因此优先使用U3启动子。

1.3 载体构建

根据刘耀光实验室的方法^[28], 在靶点序列正义链和反义链的5'端分别添加*Bsa* I酶切位点GGCA和AAAC, 使其与pUC18骨架经2个*Bsa* I切割后形成黏性末端。将靶点接头引物*TMS5-U3-F*/*TMS5-U3-R*混合均匀(终浓度1 μmol/L), 95℃下变性3 min后退火形成二聚体。配制10 μL *Bsa* I-连接反应液(1 μL引物二聚体, 1 μL pYL-U3-gRNA载体, 0.5 μL *Bsa* I, 1 μL T₄ DNA连接酶缓冲液, 0.2 μL T₄ DNA连接酶和6.3 μL ddH₂O), 通过边切边连的方法将接头连接到pYL-U3-gRNA上。通过两轮巢式PCR, 扩增含有*TMS5-1*的gDNA表达盒U3-*TMS5-1*-gRNA(第一轮PCR扩增使用通用引物U-F/U-R, 第二轮PCR扩增使用特异性引物Uctcg-B1'/gRcgg-BL)。最后, 将扩增出的靶标gDNA盒通过*Bsa* I和T₄ DNA连接酶组装到pYLCRISPR/Cas9-MH载体上(酶切连接同时进行), 并转化大肠杆菌DH5α。引物SP1/SP2用于检测生长出的克隆中是否含有sgRNA表达盒连接片段。挑选含有目的条带的克隆进行测序分析。具体引物序列见表1。所有引物均由南京擎科生物技术有限公司合成。

表 1 本研究所用的引物

Table 1. Primers used in this study.

引物名称	引物序列(5'-3')
Primer name	Primer sequence(5'-3')
TMS5-U3-F	GGCAAGCTCAAGCCAGAGTATCT
TMS5-U3-R	AAACAGATACTCTGGCTTGAGCT
U-F	CTCCGTTTTACCTGTGGAATCG
U-R	CGGAGGAAAATTCCATCCAC
Uctcg-B1'	TTCAGAGGTCTCTCTCGCACTGGAATCGGCA GCAAAGG
gRcgt-BL	AGCGTGGGTCTCGACCGGGTCCATCCACTCC AAGCTC
SP1	CCCACATAGATGCAATAACTTC
SP2	GCGCGGTGTCATCTATGTTA
TMS5-TF	AGTTCCTCTTCATCTCCAC
TMS5-TR	CAATCTCAGGCACCGTCAAT
Hpt-F	TCCGGAAGTGCTTGACATT
Hpt-R	GTCGTCCATCACAGTTTGC
Cas9-F	AGCGGCAAGACTATCCTCGACT
Cas9-R	TCAATCTCTTCAATGCGCTCCC

1.4 农杆菌介导水稻遗传转化

测序正确的 pYLCRISPR/Cas9-MH-*TMS5*-gRNA 通过热击法转化农杆菌 EHA105(*A. tumefaciens*)。通过农杆菌介导侵染水稻愈伤组织的方法,将鉴定正确的克隆转化水稻品种武运粳 7 号。具体步骤参考 Hiei 等^[29]的方法。

1.5 T_0 代植株突变位点分析

采用 CTAB 法提取 T_0 转基因植株的叶片基因组 DNA,并使用引物 TMS5-TF 和 TMS5-TR(表 1)对 *TMS5* 靶序列附近的片段进行扩增。扩增片段送公司进行测序分析。通过比较转基因植物和野生型品种武运粳 7 号的序列差异来确定转基因植株的氨

基酸变化和突变类型。

1.6 T_1 代植株 T-DNA 检测

不同变异类型的 T_0 代转基因植株自交结实后获得的 T_1 代种子种植于江苏省农业科学院温室大棚。幼苗提取 T_1 代转基因植株的叶片基因组 DNA,并用潮霉素特异引物 Hpt-F/Hpt-R 和 Cas9 基因特异引物 Cas9-F/Cas9-R(表 1)进行 PCR 扩增和琼脂糖凝胶进行电泳检测。两者均扩增不出目的条带的植株即为无 T-DNA 的 T_1 代转基因植株。

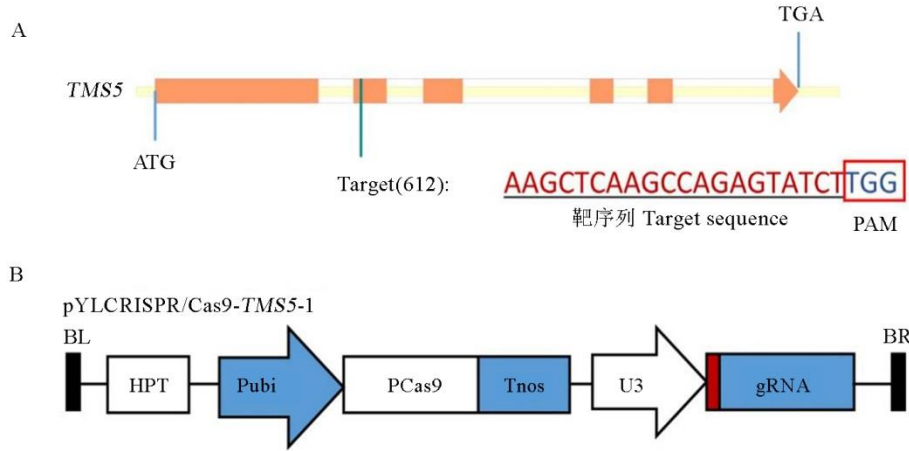
1.7 碘-碘化钾染色检测花粉育性

随机选取当日开花前野生型和突变体的颖花,于卡诺固定液($V_{乙醇} : V_{冰醋酸} = 3 : 1$)中固定,4℃下保存。镜检时滴加 1% I_2 -KI 染液于载玻片上,用镊子夹取一枚颖花并小心夹碎花药,去掉残余花药壁,盖上盖玻片,在显微镜下观察并拍照。通过观察花粉粒染色情况和细胞形态来判断花粉粒的育性。可育花粉粒呈黑色、圆形,败育花粉粒则染色不完全或不上色,并且形状为不规则或者圆形。

2 结果与分析

2.1 *TMS5* 靶位点设计和 pYLCRISPR/Cas9-*TMS5*-gRNA 表达载体构建

根据 *TMS5* 基因的编码区序列,结合 CRISPR-P 网站(<http://cbi.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR>)进行靶位点序列分析。经过筛选,在 *TMS5* 基因第 2 外显子区域选择了一个特异性较好的 20 bp 碱基序列 *TMS5*-1 作为基因靶位点序列(图 1-A)。使用 *Bsa* I 和 T_4 DNA 连接酶边切边连的方法将 *TMS5*-1 连接到 pYL-U3-gRNA 上,通过两轮巢式 PCR 扩增得到



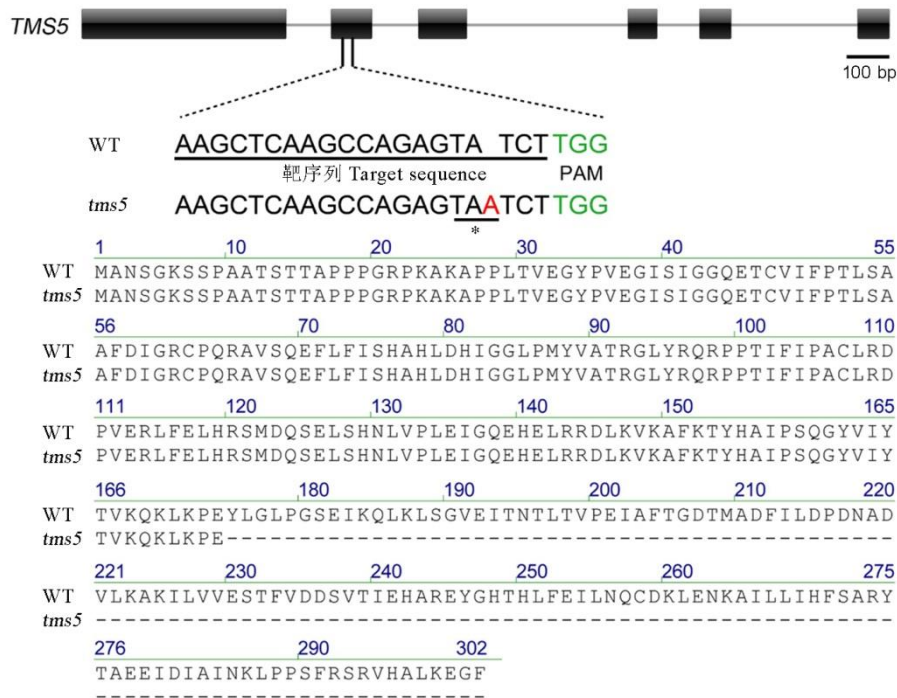
A-靶序列在 *TMS5* 基因中的位置;红色方框代表 PAM 结构;B- pYLCRISPR/Cas9-*TMS5*-1 表达载体。
A, Target sequence in *TMS5* gene; PAM structure is shown in red box; B, The expression vector of pYLCRISPR/Cas9-*TMS5*-1.

图 1 *TMS5* 靶序列位置和 pYLCRISPR/Cas9-*TMS5*-1 表达载体

Fig. 1. Schematic diagram of the targeted sequence in *TMS5* and pYLCRISPR/Cas9-*TMS5*-1 vector.

表 2 T₀代转基因植株中的突变率统计
Table 2. Mutation rate in T₀ transgenic plants.

突变类型 Mutation type	株数 No. of plants	突变率 Mutation rate / %
纯合突变 Homozygous	6	27.3
杂合突变 Heterozygous	3	13.6
双等位突变 Bi-allelic	9	40.9
野生型 Wild type	4	18.2



*为终止密码子。
* presents the termination codon.

图 2 野生型和突变体的氨基酸序列差异

Fig. 2. Amino acid sequence variance between wild type(WT) and *tms5* mutant.

的启动子 gRNA 表达盒 (U3-gRNA) 组装到 pYLCRISPR/Cas9-MH 载体上(图 1-B)。组装好的表达载体 TMS5-1-gRNA 表达盒由 OsU3 启动子驱动, Cas9 由 Ubi 启动子驱动。构建成功的 CRISPR/Cas9 表达载体通过热击转化农杆菌 EHA105。最后, 通过根癌农杆菌侵染水稻愈伤组织的方法转化水稻粳稻品种武运粳 7 号。

2.2 T₀代转基因植株突变类型分析

2018 年共获得 22 株 T₀ 代转基因植株。利用 TMS5 靶位点序列附近的检测引物 TMS5-TF 和 TMS5-TR 扩增转基因植株基因组 DNA 并进行测序分析。测序结果分析表明, 22 株 T₀ 代转基因植株中共有 18 株发生不同类型的突变, 突变率为 81.8%。其中大部分的突变类型为双等位突变, 约占 40.9%;

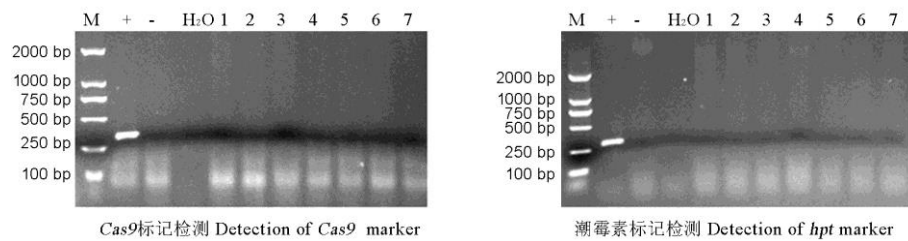
纯合突变的共有 6 株占 27.3%, 均为单碱基的插入; 杂合突变较少, 仅为 13.6%(表 2)。

2.3 野生型与突变体氨基酸序列分析

TMS5 基因位于第 2 染色体, cDNA 全长 1895 bp, 包含 6 个外显子和 5 个内含子, 编码全长为 303 个氨基酸的蛋白(图 2)。通过测序分析发现, 6 个 TMS5 纯合突变体植株都属于同一突变类型, 均在第 2 外显子处插入一个碱基“A”, 导致第 175 位氨基酸酪氨酸(TAT)变成终止密码子 TAA, 翻译提前终止。

2.4 T₁代 T-DNA 剔除

提取了 T₁ 代植株苗期 DNA, 利用潮霉素和 Cas9 基因特异性引物进行扩增。结果发现, T₁ 代转基因植株中共获得了 7 株既没有潮霉素抗性标记基因也没有 Cas9 标记基因的植株(图 3)。



M-DNA 标记; +: 阳性对照; -: 日本晴。

M, DNA marker; +, Positive control; -, Nipponbare.

图 3 T_1 代突变系无 T-DNA 植株的 PCR 检测筛选

Fig. 3. Screening for T-DNA-free plants of T_1 mutation lines by PCR analysis.

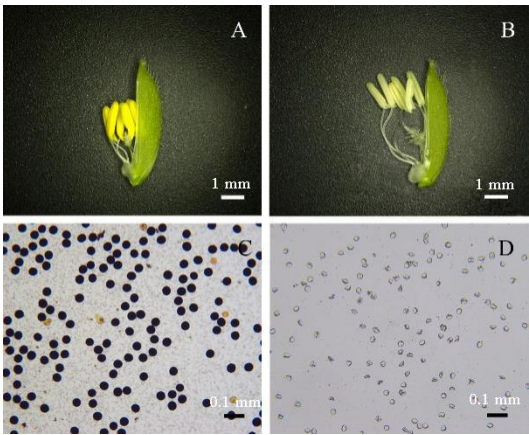
2.5 *tms5* 突变体表型观察

tms5 突变体和野生型武运粳 7 号的农艺性状调查结果表明, 灌浆时期的野生型武运粳 7 号能够正常灌浆结实, *tms5* 突变体却不能正常结实(图 4)。因此, *TMS5* 突变会导致不结实。

2.6 花粉育性观察

为了解析 *TMS5* 基因突变后造成水稻不育的原因, 我们分别在显微镜上观察了野生型和 *tms5* 突变体的花药形态。在人工气候箱平均温度为 28℃ 的条件下, 野生型花药饱满并且呈明黄色, 而 *tms5* 突变体的花药瘦弱泛白(图 5-A、B)。I₂-KI 花粉染色的观察结果表明, 育性正常的野生型武运粳 7 号花粉呈典型的饱满圆粒, 并且能够被 I₂-KI 染成深黑色, 而 *tms5* 突变体植株花粉颗粒呈现不规则形状并且不能被染色, 其中 90% 以上为碘败, 其余均为圆败(图 5-C、D)。因此, 花药形态和花粉 I₂-KI 染色的结果都表明在 28℃ 条件下 *tms5* 突变体的不育性是由花粉败育引起的。以武运粳 7 号和籼稻 9311 的

花粉授予 *tms5* 突变体, *tms5* 突变体能够灌浆结实(图 6), 表明 *tms5* 突变体的雌蕊发育正常。



A-野生型花药形态; B-*tms5* 突变体花药形态; C-野生型花粉染色; D-*tms5* 突变体染色。

A, Anthers of WT; B, Anthers of *tms5* mutant; C, Pollen grains of WT stained with I₂-KI; D, Pollen grains of *tms5* stained with I₂-KI.

图 5 野生型和 *tms5* 突变体花粉育性比较

Fig. 5. Comparison of pollen fertility between wild type (WT) and *tms5* mutant.

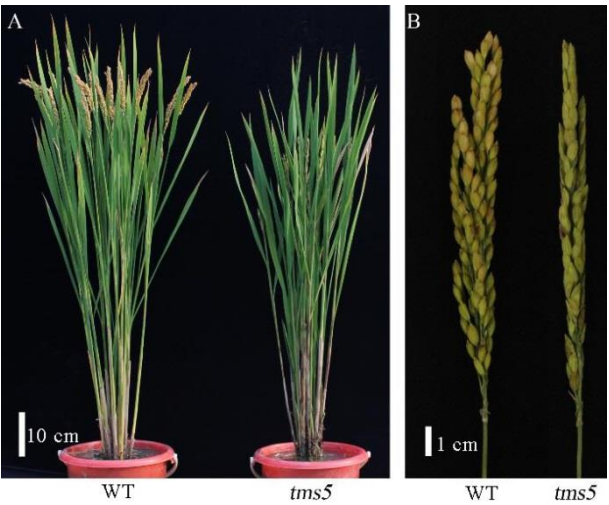
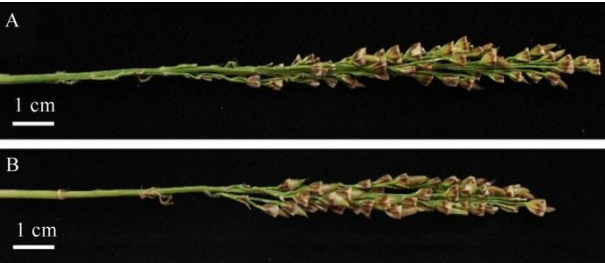


图 4 野生型和突变体的表型

Fig. 4. Phenotype of wild type(WT) and the *tms5* mutant.



A-*tms5* 突变体与 9311 杂交 F₁ 的结实情况; B-*tms5* 突变体与武运粳 7 号杂交 F₁ 的结实情况。

A, Seed setting of the F₁ plants derived from *tms5*×9311; B, The seed setting of the F₁ plants derived from *tms5*×Wuyunjing 7.

图 6 *tms5* 与 9311 和武运粳 7 号杂交 F₁ 的结实情况

Fig. 6. Seed setting of the F₁ plants derived from *tms5*×9311 and *tms5*×Wuyunjing 7.

3 讨论

水稻光温敏核雄性不育材料的发现和利用开辟了水稻杂种优势利用的新途径。目前,常见的温敏不育系大多由农垦 58S、安农 S-1 或株 1S 转育而来^[30],而国家水稻数据中心的数据表明我国应用面积最广的不育系几乎都是籼型不育系。利用传统的杂交转育,将籼稻中的不育基因转育到粳稻背景中,籼粳杂交后代难以稳定,育种周期长,成为粳稻两系杂种优势利用的主要限制因素之一。因此,探索利用基因组编辑技术创制粳型温敏不育系对于加快两系杂交粳稻育种具有重要意义。另外,相对于籼稻,粳稻遗传转化效率高,有利于快速培育粳稻温敏不育系。

本研究选用曾在江苏大面积推广应用的粳稻品种武运粳 7 号作为背景材料编辑 *TMS5* 基因。在 22 株 T_0 植株中获得突变体 18 株,突变频率高达 81.8%,其中 6 株为纯合突变,纯合突变率为 27.3%,均为 PAM 序列上游第 3 碱基处的插入。表明对粳稻 *TMS5* 基因编辑的效率较高。突变株的自交结实率为 0%,花粉染色为圆败和碘败,花药相对于野生型瘦弱并泛白,利用人工辅助授粉,能获得野生型武运粳 7 号和籼型品种 9311 杂交种,表明突变体花粉败育而雌蕊发育正常,由此获得了一个不育材料。这为快速获得粳稻不育材料奠定了基础。

由于材料条件的限制,我们尚未开展育性转换的温度研究。本研究中,*tms5* 突变体生长在 28℃ 的环境中,表现为花粉完全败育,推测起点温度低于 28℃。Zhou 等^[22]对不同水稻品种 *tms5* 突变体的研究中发现,以粳稻品种 GAZ 为背景的不育株不育起点温度约为 26℃;以籼稻品种为背景的不育株 ZZBS(中浙 B 背景)和 YJSMS(粤晶丝苗背景)不育起点温度低于 24℃,ReBS(ReB 背景)、TFBS(天丰 B 背景)和 WSSMS(五山丝苗背景)不育起点温度为 24℃,ZS97BS(珍汕 97B 背景)不育起点温度约为 26℃。黄忠明等^[23]在对以粳稻 F197 为背景的 *tms5* 纯合突变体不育起点温度的研究中发现 28℃ 是 *tms5* 突变体花粉育性的转换温度。吴明基等^[24]、Barman^[25]、Li 等^[26]对籼型品种 *tms5* 突变体花粉育性研究中发现花粉育性转化温度分别为 24℃、22℃ 和 23.5℃。这些结果表明不同遗传背景的水稻材料育性起点温度不同,并且粳稻材料背景的温敏不育系育性起点温度略高于籼稻背景材料的温敏不育系。选育起点温度低的不育系是两系制种技术的关键,可以利用不同背景的粳稻品种资源编辑 *TMS5* 基因,筛选起点温度更低的温敏不育系,加快粳稻温敏不育系选育进程。

参考文献:

- [1] Khush G S. Green revolution: The way forward. *Nat Rev Genet*, 2001, 2(10): 815-822.
- [2] Cheng S H, Zhuang J Y, Fan Y Y, Du J H, Cao L Y. Progress in research and development on hybrid rice: A super-domesticated in China. *Ann Bot*, 2007, 100(5): 959.
- [3] Chen L, Liu Y G. Male sterility and fertility restoration in crops. *Annu Rev Plant Biol*, 2014, 65(1): 579-606.
- [4] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna J A, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [5] Cong L, Ran F A, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu P D, Wu X, Jiang W, Marraffini L A, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [6] Mali P, Yang L, Esvelt K M, Aach J, Guell M, DiCarlo J E, Church G M. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823-826.
- [7] Shen L, Hua Y, Fu Y, Li J, Liu Q, Jiao X, Xin G, Wang J, Wang X, Yan C, Wang K. Rapid generation of genetic diversity by multiplex CRISPR/Cas9 genome editing in rice. *Sci China: Life Sci*, 2017, 60(5): 506-515.
- [8] 汪秉琨, 张慧, 洪汝科, 张锦文, 杨睿, 罗琼, 曾千春. CRISPR/Cas9 系统编辑水稻 *Wx* 基因. *中国水稻科学*, 2018, 32(1): 35-42.
- [9] Wang B K, Zhang H, Hong R K, Zhang J W, Yang R, Luo Q, Zeng Q C. *Wx* gene editing via CRISPR/Cas9 system in rice. *Chin J Rice Sci*, 2018, 32(1): 35-42. (in Chinese with English abstract)
- [10] 张端品, 邓训安. 农垦 58S 光敏感雄性不育基因的染色体定位. *华中农业大学学报*, 1990, 9(4): 407-419.
- [11] Zhang D P, Deng X A. Chromosomal location of the photoperiod sensitive male genic sterile gene in Nongken 58S. *J Huazhong Agric Univ*, 1990, 9(4): 407-419. (in Chinese with English abstract)
- [12] 林兴华, 余功新, 张端品, 谢岳峰, 秦发兰. 农垦 58S 光敏不育基因在水稻第 5 染色体上位置的确定. *华中农业大学学报*, 1996, 15(1): 1-5.
- [13] Lin X H, Yu G X, Zhang D P, Xie Y F, Qin F L. Location of one *PGMS* gene in Nongken 58S on chromosome 5 of rice. *J Huazhong Agric Univ*, 1996, 15(1): 1-5. (in Chinese with English abstract)
- [14] 江树业, 陈启锋, 方宜钧. 与水稻光敏核不育性相关的 cDNA 片段的鉴定和染色体定位. *科学通报*, 1999, 44(19): 2084-2088.
- [15] Jiang S Y, Chen Q F, Fang X J. The identification and chromosome position of cDNA fragments pertinent to the rice photoperiod-sensitive genetic sterility. *Chin Sci Bull*, 1999, 44(19): 2084-2088. (in Chinese with English abstract)
- [16] 梅明华, 陈亮, 章志宏, 李子银, 张启发, 徐才国. 农垦 58S 光敏不育基因突变位点的确定及 *PMS3* 区间的进一步作图. *中国科学: 生命科学*, 1999, 29(3): 310-315.

- Mei M H, Chen L, Zhang Z H, Li Z Y, Zhang Q F, Xu C G. Identification of mutagenic gene locus for photoperiod sensitive male sterility in the original mutant Nongken 58S and mapping in *PMS3* region. *Sci China: Life Sci*, 1999, 29(3): 310-315. (in Chinese with English abstract)
- [13] Li X H, Lu Q, Wang F L, Xu C G, Zhang Q F. Separation of the two-locus inheritance of photoperiod sensitive genic male sterility in rice and precise mapping the *pms3* locus. *Euphytica*, 2001, 119(3): 343-348.
- [14] 李仕贵, 周开达, 朱立煌. 水稻温敏显性核不育基因的遗传分析和分子标记定位. 科学通报, 1999, 44(9): 955-958.
Li S G, Zhou K D, Zhu L H. Genetic analysis and molecular marker mapping of thermo-sensitive dominant genic sterile gene. *Chin Sci Bull*, 1999, 44(9): 955-958. (in Chinese with English abstract)
- [15] Dong N V, Subudhi P K, Luong P N, Quang V D, Quy T D, Zheng H G, Wang B, Nguyen H T. Molecular mapping of a rice gene conditioning thermosensitive genic male sterility using AFLP, RFLP and SSR techniques. *Theor Appl Genet*, 2000, 100(5): 727-734.
- [16] Wang B, Xu W W, Wang J Z, Wu W, Zheng H G, Yang Z Y, Ray J D, Nguyen H T. Tagging and mapping the thermo-sensitive genic male-sterile gene in rice (*Oryza sativa* L.) with molecular markers. *Theor Appl Genet*, 1995, 91(6-7): 1111-1114.
- [17] Yamaguchi Y, Ikeda R, Hirasawa H, Minami M, Ujihara A. Linkage analysis of thermosensitive genic male sterility gene, *tms-2* in rice (*Oryza sativa* L.). *Breeding Sci*, 2010, 47(4): 371-373.
- [18] 王风平, 徐才国, 李香花. 粳型光敏不育组合(32001S/明恢 63)育性 QTL 位点的分析. 厦门大学学报, 1999, 38(3): 467-470.
Wang F P, Xu C G, Li X H. Analyses for fertility QTL loci in an *indica* PSM cross (32001S/Minhui 63). *J Xiamen Univ*, 1999, 38(3): 467-470. (in Chinese with English abstract)
- [19] 何予卿, 徐才国. 粳型光敏核不育水稻育性可转换性的基因定位和基因互作研究. 植物学报, 2001, 18(2): 202-209.
He Y Q, Xu C G. The gene mapping and interaction on the fertility reversibility in photoperiod-sensitive genic male sterile rice (*Oryza sativa* L.). *Chin Bull Bot*, 2001, 18(2): 202-209. (in Chinese with English abstract)
- [20] 周海, 周明, 杨远柱, 曹晓风, 庄楚雄. RNase Z^{S1} 加工 *Ubl40* mRNA 控制水稻温敏雄性核不育. 遗传, 2014, 36(12): 1274.
Zhou H, Zhou M, Yang Y Z, Cao X F, Zhuang C X. RNase Z^{S1} processes *Ubl40* mRNAs and controls thermosensitive genic male sterility in rice. *Hereditas*, 2014, 36(12): 1274. (in Chinese with English abstract)
- [21] Zhou H, Zhou M, Yang Y, Li J, Zhu L, Jiang D, Dong J, Liu Q, Gu L, Zhou L, Feng M, Qin P, Hu X, Song C, Shi J, Song X, Ni E, Wu X, Deng Q, Liu Z, Chen M, Liu Y G, Cao X, Zhuang C. RNase Z^{S1} processes *Ubl40* mRNAs and controls thermosensitive genic male sterility in rice. *Nat Commun*, 2014, 5(1): 4884.
- [22] Zhou H, He M, Li J, Chen L, Huang Z, Zheng S, Ni E, Jiang D, Zhao B, Zhuang C. Development of commercial thermo-sensitive genic male sterile rice accelerates hybrid rice breeding using the CRISPR/ Cas9-mediated *TMS5* editing system. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 37395.
- [23] 黄忠明, 周延彪, 唐晓丹, 赵新辉, 周在为, 符星学, 王凯, 史江伟, 李艳锋, 符辰建, 杨远柱. 基于 CRISPR/Cas9 技术的水稻温敏不育基因 *tms5* 突变体的构建. 作物学报, 2018, 44(6): 844-851.
Huang Z M, Zhou Y B, Tang X D, Zhao X H, Zhou Z W, Fu X X, Wang K, Shi J W, Li Y F, Fu C J, Yang Y Z. Construction of *tms5* mutants in rice based on CRISPR/Cas9 technology. *Acta Agron Sin*, 2018, 44(6): 844-851. (in Chinese with English abstract)
- [24] 吴明基, 林艳, 刘华清, 陈建明, 付艳萍, 杨绍华, 王锋. 利用 CRISPR/Cas-9 技术创制水稻温敏核不育系[J]. 福建农业学报, 2018, 33(10): 1011-1015.
Wu M J, Lin Y, Liu H Q, Chen J M, Fu Y P, Yang S H, Wang F. Development of thermo-sensitive male sterile rice with CRISPR/Cas9 Technology. *Fujian J Agric Sci*, 2018, 33(10): 1011-1015.
- [25] Barman H N, Sheng Z, Fiaz S, Zhong M, Wu Y, Cai Y, Wang W, Jiao G, Tang S, Wei X, Hu P. Generation of a new thermo-sensitive genic male sterile rice line by targeted mutagenesis of *TMS5* gene through CRISPR/ Cas9 system. *BMC Plant Biol*, 2019, 19(1): 109.
- [26] Li S, Shen L, Hu P, Liu Q, Zhu X, Qian Q, Wang K, Wang Y. Developing disease-resistant thermosensitive male sterile rice by multiplex gene editing. *J Integr Plant Biol* (in press). 2019.
- [27] 王小虎, 苏月红, 王雪刚, 季向东, 赵品恒, 李标, 俞良, 端木银熙, 孙菊英. 高温胁迫对武运粳 7 号 A 育性稳定性的影响研究. 中国稻米, 2011, 17(1): 28-31.
Wang X H, Su Y H, Wang X G, Ji X D, Zhao P H, Li B, Yu L, DuMu Y X, Sun J Y. Research on the effect of high temperature treatment on the stability of Wuyunjing 7A. *China Rice*, 2011, 17(1): 28-31. (in Chinese with English abstract)
- [28] Ma X L, 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 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. *Mol Plant*, 2015, 8(8): 1274-1284
- [29] Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J*, 1994, 6(2): 271-282.
- [30] 斯华敏, 付亚萍, 刘文真, 孙宗修, 胡国成. 水稻光温敏雄性核不育系的系谱分析. 作物学报, 2012, 38(3): 394-407.
Si H M, Fu Y P, Liu W Z, Sun Z X, Hu G C. Pedigree analysis of photoperiod-thermo sensitive genic male sterile rice. *Acta Agron Sin*, 2012, 38(3): 394-407. (in Chinese with English abstract)