

利用 CRISPR/Cas9 技术高效创制长粒香型水稻

徐善斌¹ 郑洪亮¹ 刘利锋³ 卜庆云² 李秀峰^{2,*} 邹德堂^{1,*}

(¹东北农业大学 寒地粮食作物种质创新与生理生态教育部重点实验室, 哈尔滨 150030; ²中国科学院东北地理与农业生态研究所, 哈尔滨 150081;

³黑龙江省种业技术服务中心, 哈尔滨 150008; *通信联系人, E-mail: lixiufeng@iga.ac.cn; 13603609603@163.com)

Improvement of Grain Shape and Fragrance by Using CRISPR/Cas9 System

XU Shanbin¹, ZHENG Hongliang¹, LIU Lifeng³, BU Qingyun², Li Xiufeng^{2,*}, ZOU Detang^{1,*}

(¹Key Laboratory of Germplasm Enhancement, Physiology and Ecology of Food Crops in Cold Region, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; ²Northeast Institute of Geography and Agroecology, Key Laboratory of Soybean Molecular Design Breeding, Chinese Academy of Sciences, Harbin 150081, China; ³Heilongjiang Seed Industry Technical Service Center, Harbin 150008; *Corresponding author, E-mail:

lixiufeng@iga.ac.cn; 13603609603@163.com)

Abstract: 【Objective】 CRISPR/Cas9-mediated genome editing has become an important way for molecular breeding in rice. To promote rice breeding, the non-fragrant *japonica* rice variety Longjing11 was used as the test material. This study aims to edit *GS3*, *GS9* and *Badh2* genes for obtaining valuable and stable long-grain fragrant rice materials.

【Method】 The target genes *GS3*, *GS9* and *BADH2* were selected to construct the vector pYLCRISPR/Cas9-*GS3/GS9/Badh2*-gRNA by using CRISPR/Cas9 gene editing technology. The *Agrobacterium*-mediated transformation was used to transform Longjing11. Specific mutations were introduced into the *GS3*, *GS9* and *Badh2* genes in Longjing 11.

【Result】 The grain length of the transgenic free homozygote *gs3/gs9/badh2* increased by 26.43% to 27.01%, yield per plant by 10.82% to 12.11%, 1000-grain weight by 18.34% to 41.36%, rice became fragrant as compared with wild type of Longjing 11. This study efficiently transformed round-grain rice into long-grain fragrant rice. **【Conclusion】** The homozygous mutant lines featured by stable inheritance and long-grain fragrant quality were obtained by using CRISPR/Cas9 system. This study provides a convenient and effective way of combining multiple quality traits together, which could significantly accelerate breeding process from a breeding perspective.

Key words: rice; grain shape; quality breeding; fragrant rice; CRISPR/Cas9

摘要: 【目的】 CRISPR/Cas9 基因编辑技术已成为水稻分子育种的重要手段。为了促进水稻育种的发展,本研究以非香型粳稻品种龙粳 11 为试验材料,对 *GS3*、*GS9* 和 *Badh2* 基因进行编辑,以期获得能稳定遗传的长粒香水稻材料。**【方法】**利用 CRISPR/Cas9 技术,以 *GS3*、*GS9* 和 *Badh2* 为靶基因,构建敲除载体 pYLCRISPR/Cas9-*GS3/GS9/Badh2*-gRNA,通过农杆菌介导法,在龙粳 11 的 *GS3*、*GS9* 和 *Badh2* 基因中引入了特定的突变。**【结果】**T₂ 代无转基因的 *gs3/gs9/badh2* 纯合突变体与野生型龙粳 11 相比,粒长增加 26.43%~27.01%,单株产量增加 10.82%~12.11%,千粒重增加 18.34%~41.36%,稻米变香,高效地将圆粒水稻变成长粒香型水稻。**【结论】**利用 CRISPR/Cas9 技术获得能够稳定遗传并具有长粒香品质的纯合突变株系,为组合多个品质性状提供了一种方便有效的方法,从育种角度加快了新品系创制过程。

关键词: 水稻; 粒型; 品质育种; 香米; CRISPR/Cas9

中图分类号: Q755; S511.032

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2020)05-0406-07

水稻作为全球最重要的粮食作物之一,全世界半数以上的人口均食用稻米,水稻是保障中国粮食安全与实现农业可持续发展的主粮作物^[1]。近年来,

人们对高产优质稻米的需求量越来越大,特别是长粒香型稻米,如稻花香的价格是一般非香型大米的 2~4 倍,长粒香米更易受到农民和消费者们的青

收稿日期: 2020-01-10; 修改稿收到日期: 2020-04-16。

基金项目: 转基因生物新品种培育专项(2018ZX0800102B); 国家重点研发专项(2017YFD0100501); 黑龙江省自然科学基金(面上项目)(C2018065); 国家自然科学基金青年基因资助项目(31801327); 黑龙江科技厅重点研发项目(GA18B101)。

睐。传统的水稻品种改良过程中, 主要通过杂交、回交的方式实现优良基因的聚合, 但传统育种具有育种周期长、效率低等缺点, 而基因编辑技术可以为水稻品种的快速改良带来新的契机。

目前, CRISPR/Cas9 技术作为新一代的基因编辑技术, 在作物遗传育种研究中应用较广泛^[2-7], 该技术可在水稻基因组水平上进行基因定向编辑改造^[8-11]。水稻中已经鉴定出许多与籽粒大小相关的数量性状位点(QTL), 如负调控因子 *GW2*^[12]、*GS3*^[13]、*GS9*^[14]、*qW5/GW5*^[15]和 *TGW6*^[16], 正调控因子 *GL2*^[17]、*GL3.1*^[18]、*GS5*^[19]、*GL7*^[20]、*GLW7/OsSPL13*^[21]和 *GW8/OsSPL16*^[22]。Li 等^[23]利用该技术编辑水稻中的 *GS3* 基因, T₂ 代的粒长和粒重增加, 产量得到提高。Zhao 等^[14]使用 CRISPR/Cas9 技术, 在 *GS9* 第 1 外显子处插入 1 bp, 造成移码突变, 破坏 *GS9* 正常表达, 使粒长增加。

香味是水稻重要的品质性状之一, 由第 8 染色体上的 *Badh2* 基因控制。*Badh2* 编码一个由 503 个氨基酸组成的蛋白产物^[24]。Chen 等^[25]研究发现, 在香稻品种中, 由于 *Badh2* 基因发生突变, 使得香味的主要成分 2-乙酰-1-吡咯啉 (2-AP) 含量增加, 稻米产生香味。Shan 等^[26]通过 TALEN 技术, 对 *Badh2* 进行基因组编辑, 稻米的 2-AP 含量从无增加至 0.35~0.75 mg/kg, 获得具有香味的稻米。孙慧宇等^[27]利用 CRISPR/Cas9 技术对 *Badh2* 进行编辑, 使寒地粳稻东农 425 香味获得了改良, 但东农 425 适应积温区较小。因此, 我们拟利用 CRISPR/Cas9 技术对黑龙江省第二、三积温带品种龙粳 11 进行香味改良, 从而扩大香稻的种植面积。龙粳 11 属早熟品种, 其抗稻瘟病较强, 抗倒伏, 前、后生育时期耐寒性强。同时, 龙粳 11 的稻米品质优良, 各项指标均达到国家优质米标准。

本研究利用 CRISPR/Cas9 技术, 以龙粳 11 为研究材料, 对 *GS3*、*GS9* 和 *Badh2* 基因同时进行敲除, 能够高效地将圆粒水稻变成长粒香型水稻, 可为加快水稻的种质资源改良提供一定的理论指导。

1 材料与方

1.1 试验材料

本研究以粳稻龙粳 11 为试验材料。在黑龙江哈尔滨(北纬 45°)和海南(北纬 19°), 均以 25 cm×25 cm 的株行距种植, 自然长日照条件下生长。

试验所用 pYL-U6a-gRNA 和 pYLCRISPR/Cas9Pubi-H 二元载体^[28]由华南农业大学刘耀光院士惠赠。

1.2 gRNA 靶点接头设计及载体构建

通过 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获得 *GS3* (Os03g0407400)、*GS9* (Os09g0448500)、*Badh2*(Os08g0424500)的基因序列, 利用 CRISPR-GE 在线网站 (<http://skl.scau.edu.cn/>)^[29], 分别在 *GS3* 第 1 外显子、*GS9* 第 1 外显子和 *Badh2* 第 2 外显子处设计 1 对靶点接头引物, B1-F/R、B2-F/R 及 B3-F/R (表 1)。利用软件 CRISPR Primer Designer 设计 *GS3*、*GS9* 和 *Badh2* 基因靶序列, 比对水稻序列, 检测设计靶点是否特异, 排除潜在脱靶序列。

参照 Ma 等^[30]的实验方法进行载体构建, 将连接好的载体通过热激法转入大肠杆菌 Match1-T1 中, 菌落 PCR 检测后, 选取阳性菌落摇菌后提取质粒。利用检测引物 NOSF/M13F-47(表 1)对载体质粒进行 PCR 扩增, 对产物进行测序, 将检测无误的质

表 1 本研究中所用的引物

Table 1. Primers used in this research.

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
B1-F	GCCGAGTGACATGGCAATGGCGG
B1-R	AAACCCGCCATTGCCATGCTACT
B2-F	GCCGCGATTGCTTCTCTGCTCGGTT
B2-R	AAACAACCGAGCAGGAAGCAATCG
B3-F	GCCGCAAGTACCTCCGCGCAATCG
B3-R	AAACCGATTGCGCGGAGGTACTTG
U-F	CTCCGTTTTACCTGTGGAAATCG
gRNA-R	CGGAGGAAAATCCATCCAC
B1'	TTCAGAGGTCTCTCTCGCACTGGAATCGGCAG CAAAGG
B2	AGCGTGGGTCTCGTCAGGGTCCACTCCA AGCTC
B2'	TTCAGAGGTCTCTCTGCACTGGAATCGGCAG CAAAGG
B3	AGCGTGGGTCTCGTCTTGGTCCACTCCA AGCTC
B3'	TTCAGAGGTCTCTAAGACACTGGAATCGGCAG CAAAGG
BL	AGCGTGGGTCTCGACCGGGTCCACTCCA AGCTC
Seq1-F	TTCAAAGCAAAGCACCAAGC
Seq1-R	GCTGGGGAAAACCTTACAATG
Seq2-F	TCCACTCGACTCCTCACTCA
Seq2-R	GATTAGCGTAGGCCCTCACG
Seq3-F	ATCCATCTCCGTATCTCT
Seq3-R	GGTAGTACCACCCTA
Hyg-F	ACGGTGTCTCCATCACAGTTTGGC
Hyg-R	TCCCGAAGTGCTTGACATTGGGGA
NOSF	GCGGTGTCTATCTATGTTACTAG
M13F-47	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC

粒通过热激法转入 EHA105 农杆菌感受态细胞中。

1.3 T₀代阳性植株的获得

通过农杆菌介导法,将 CRISPR/Cas9 表达载体转入龙粳 11 的愈伤组织中,经过潮霉素抗性筛选愈伤组织,分化成 T₀代植株。在 T₀代植株成熟期时,采用 CTAB 的方法提取叶片的全基因组 DNA,通过引物 Hyg-F/R 进行检测,PCR 产物大小为 289 bp 的植株为阳性转基因植株,筛选出阳性苗。设计引物 Seq1-F/R、Seq2-F/R 和 Seq3-F/R,分别扩增 GS3、GS9 和 Badh2 基因靶点及其附近的序列,使用兼并序列解码 (DSDecode) 法^[31]分析测序结果。

1.4 T₁代无 T-DNA 元件的纯合突变植株的筛选

T₁代植株成熟时期,提取叶片基因组 DNA,利用引物 Hyg-F/R (表 1) 筛选出无 T-DNA 元件插入的植株。再利用测序引物 Seq1-F/R、Seq2-F/R 和 Seq3-F/R,对无 T-DNA 元件插入的植株进行 PCR 扩增,测序结果通过 DSDecode 方法,筛选出无 T-DNA 元件的三基因纯合突变的植株,将其自交繁殖至 T₂代。

1.5 T₂代植株农艺性状考查

在大田环境下种植龙粳 11 野生型和 T₂代植株,成熟时期分别测量粒长、粒宽、结实率、单株产量及千粒重,并采用气相色谱-质谱联用技术,分析水稻籽粒中的 2-乙酰-1-吡咯啉 (2-AP) 含量。利用 SPSS 18.0 软件对农艺性状数据进行 t 检验。

2 结果与分析

2.1 水稻 GS3、GS9 和 Badh2 敲除靶点设计

GS3 基因位于第 3 染色体,有 5 个外显子,编码 232 个氨基酸。GS9 基因位于第 9 染色体,有 4 个外显子,编码 345 个氨基酸。Badh2 基因位于第 8 染色体上,有 15 个外显子,编码 503 个氨基酸。GS3、GS9 和 Badh2 基因 CDS 序列均与日本晴相同,

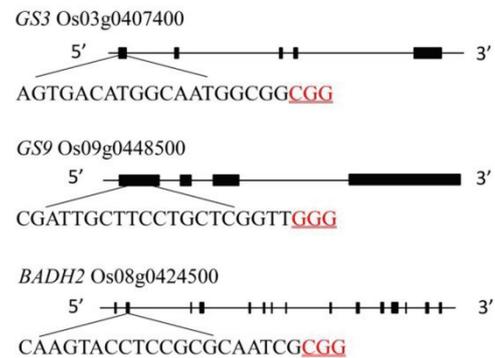
本研究分别在 GS3 第 1 外显子、GS9 第 1 外显子、Badh2 第 2 外显子处设计 1 对 gRNA 靶点接引物,分别对 GS3、GS9、Badh2 基因进行编辑(图 1)。

2.2 GS3、GS9 和 Badh2 基因表达载体的构建

根据“金门”克隆法将带有 3 个靶点的 gRNA 表达盒连接到 pYLCRISPR/Cas9Pubi-H 载体骨架上,构建好的载体即为 pYLCRISPR/Cas9-GS3/GS9/Badh2-gRNA 载体(图 2)。

2.3 T₀代转基因阳性苗检测及突变情况

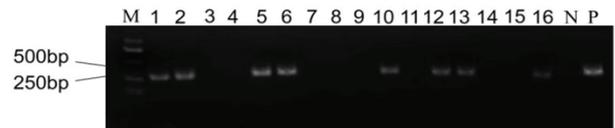
16 株 T₀代再生苗中有 8 株为阳性苗,阳性率为 50% (图 3)。利用测序引物 Seq1-F/R、Seq2-F/R 和 Seq3-F/R 扩增 8 株阳性植株的靶点区域序列,并



黑色序列为靶点序列,红色下划线序列为 PAM 序列。
The black sequence is the target sequence and the red underlined sequence is the PAM sequence.

图 1 GS3、GS9 和 Badh2 基因结构和靶点位置

Fig. 1. Gene structure and target site of GS3, GS9 and Badh2.



M-DM2000 DNA 标记; N-阴性对照; P-阳性对照; 1-16 代表 T₀ 植株。
M, DM2000 DNA marker; N, Negative control; P, Positive control; Lanes 1-16, T₀ generation plants.

图 3 T₀代植株转基因检测

Fig. 3. Transgenic detection of T₀ generation plants.

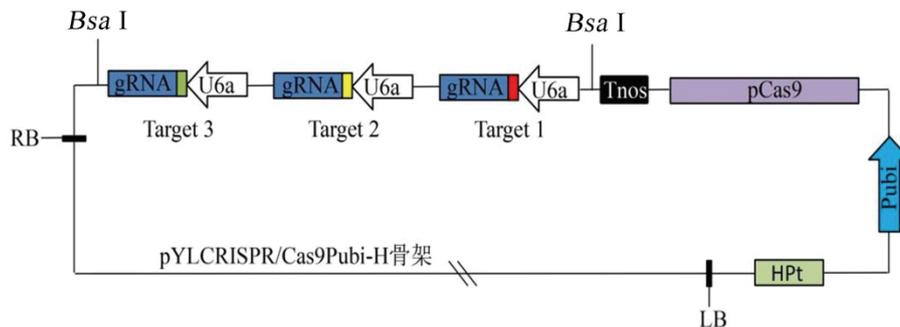


图 2 pYLCRISPR/Cas9-GS3/GS9/Badh2-gRNA 载体

Fig. 2. pYLCRISPR/Cas9-GS3/GS9/Badh2-gRNA vector.

进行 PCR 扩增, 测序比对后, 8 株阳性植株中有 4 株发生了突变, 突变率为 50%。

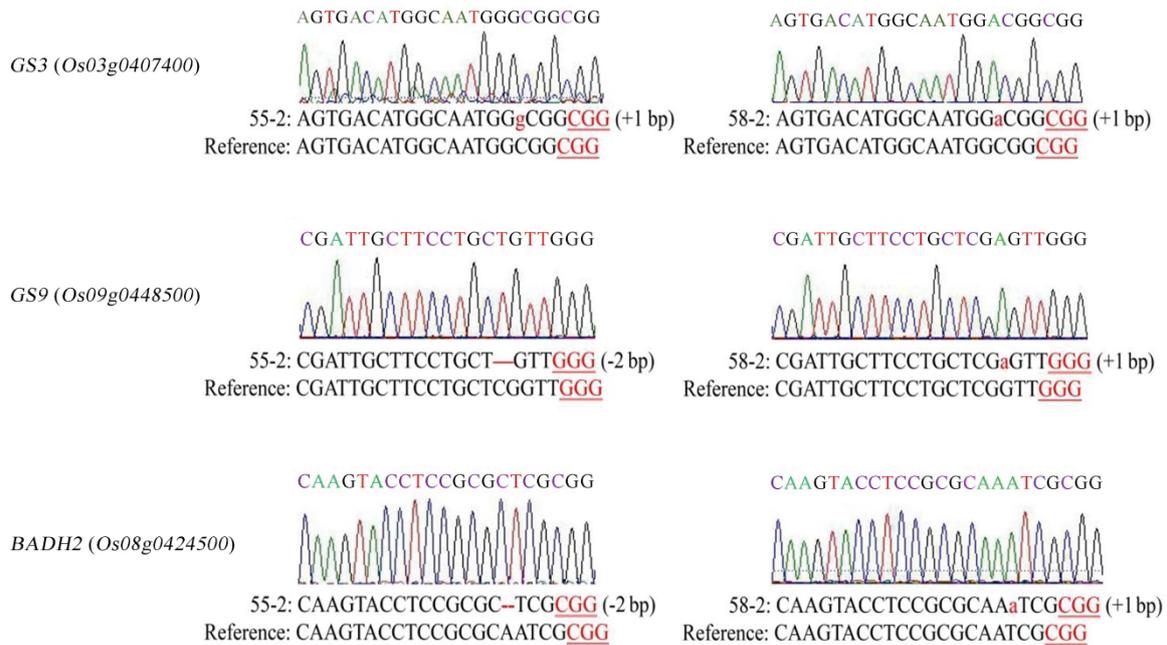
2.4 T₁代无 T-DNA 元件三基因纯合突变植株的筛选

将三基因突变植株自交繁殖获得 T₁代植株, 于成熟期提取叶片基因组 DNA, 利用引物 *Hyg-F/R* 筛选出无 T-DNA 元件插入的植株。再利用引物

Seq1-F/R、Seq2-F/R 和 Seq3-F/R 进行扩增, 通过 DSDcode 方法分析测序结果, 筛选出 2 株无 T-DNA 元件的三基因纯合突变植株 (55-2、58-2), 分析 *GS3*、*GS9*、*Badh2* 基因突变的具体情况 (图 4)。

2.5 T₂代植株农艺性状分析及香味鉴定

将野生型龙粳 11 与 55-2 株系、58-2 株系的农艺性状进行比较 (图 5), 发现 55-2 株系和 58-2 株系

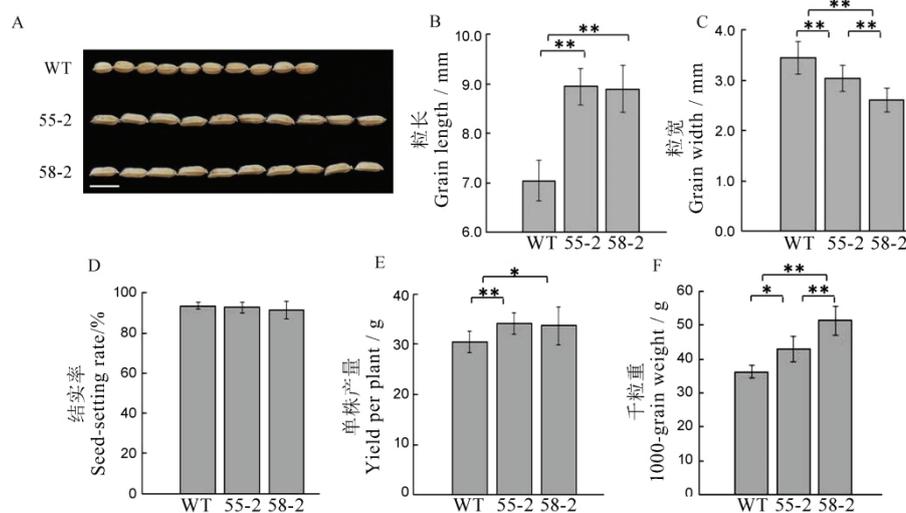


红色小写字母表示插入 1 bp 的突变, 红色连字符表示缺失的序列。

Red lowercase letters represent 1 bp insertions and the deleted sequences are shown by red hyphens.

图 4 三基因纯合突变植株测序结果

Fig. 4. Sequencing result of homozygous plants with triple gene mutation.



数值用平均数±标准差表示, *, **分别表示在 0.05 和 0.01 水平上显著差异(*t* 检验)。

Values are shown as mean ± SD. *,**Significantly different at 0.05 and 0.01 levels by *t*-test, respectively.

图 5 T₂代植株农艺性状考查

Fig. 5. Agronomic traits of T₂ generation plants.

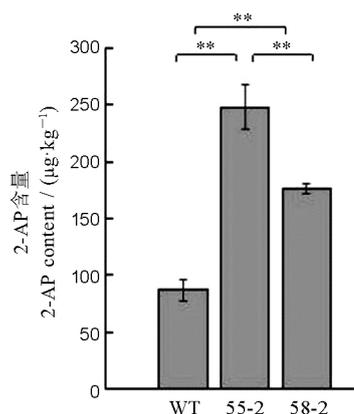


图6 龙粳11及突变体中香味物质2-AP的含量
Fig. 6. 2-acetyl-1-pyrroline(2-AP) content of Longjing 11 and mutant plants.

的粒长比野生型植株分别增加27.01%、26.43%，都达到了极显著的水平，粒宽较野生型植株降低13.4%、24.6%，结实率没有显著变化，单株产量分别增加10.82%、12.11%，千粒重分别增加18.34%、41.36%，58-2株系千粒重增加比例显著(图5)。研究表明，通过CRISPR/Cas9技术同时对*GS3*、*GS9*基因进行编辑，高效地将圆粒水稻变长，在育种方面加速了新品系的创制。

采用气相色谱-质谱联用技术，对野生型龙粳11、突变体55-2、58-2株系中籽粒的2-AP含量进行分析(图6)。野生型龙粳11中2-AP含量约87.13 µg/kg，与龙粳11对照相比，55-2株系中香味物质2-AP含量增加至248.22 µg/kg，58-2株系中2-AP增加至176.43 µg/kg。55-2株系和58-2株系分别在*Badh2*基因第2外显子处缺失2 bp、插入1 bp，均产生移码突变。结果表明，通过对*Badh2*基因进行编辑，能有效创制香型水稻种质新资源。

3 讨论

CRISPR/Cas9技术与传统育种相比，因其具有操作简单、编辑效率高和成本低等优点，正广泛应用于水稻的种质改良中^[32-35]，极大地缩短了培育高产优质水稻品种的周期。本研究以粒型负调控基因*GS3*、*GS9*和香味负调控基因*Badh2*为目标基因，构建pYLCRISPR/Cas9-*GS3/GS9/Badh2*-gRNA载体，对*GS3*、*GS9*、*Badh2*基因进行敲除，筛选出两个无T-DNA元件的三基因纯合突变株系。

*GS3*和*GS9*是粒长的负调控因子。Nan等^[36]利用具有*gs3*等位基因的供体GKBR与黑龙江省优

良栽培品种空育131杂交后，以空育131为轮回母本，经过回交3代改善了空育131的*GS3*位点，籽粒增加12.05%，千粒重和单株总粒数提高，进而产量增加，但改良周期过长，效率低。通过CRISPR/Cas9技术可以极大地缩短育种年限，还大幅度提高粒长。Li等^[23]利用CRISPR/Cas9技术对*GS3*基因进行编辑，破坏*GS3*正常表达，粒长增加20%。Zhao等^[14]使用CRISPR/Cas9技术，在*GS9*第1外显子处插入1 bp，使粒长增加5.5%。本研究通过将两个基因连入同一载体，同时对*GS3*和*GS9*进行编辑。通过对*GS3*和*GS9*基因进行编辑，粒长与野生型相比差异达到极显著水平，增幅为26.43%~27.01%，增幅大于通过CRISPR/Cas9技术分别敲除*GS3*和*GS9*的效果，单株产量增加10.82%~12.11%，结实率没有显著变化，千粒重增加18.34%~41.36%。研究结果表明，利用CRISPR/Cas9技术可以培育出长粒型且高产的品种，加快长粒种质资源的创制。

传统的香稻育种主要通过杂交和回交选育，但因其后代分离不稳定、试验周期漫长、抗逆性较弱、产量较低等因素，使得培育出稳定遗传的优良香稻品种较为困难。本研究对*Badh2*基因进行编辑后，通过对籽粒的2-AP含量进行分析，*Badh2*基因功能缺失后香味物质2-AP含量由87.13 µg/kg增加至176.43~248.22 µg/kg，香味物质2-AP显著提高。孙慧宇等^[27]通过CRISPR/Cas9技术对*Badh2*基因进行编辑，在香味检测时采用咀嚼法和氢氧化钾浸泡法，主观干扰性大。本研究采用气相色谱-质谱联用技术，定量分析水稻籽粒中的2-AP含量，结果更客观准确。

综上所述，本研究以龙粳11为材料，通过CRISPR/Cas9技术对*GS3*、*GS9*和*Badh2*基因进行定点敲除并获得了无T-DNA元件的三基因纯合突变体材料，使龙粳11粒型变长，单株产量增加，千粒重增加，同时香味物质2-AP含量增加，创制出长粒香型水稻品种，为培育产量与品质均提高的水稻品种提供了理论和材料基础，加速了高产优质香稻品种的选育进程。

谢辞：中国科学院东北地理与农业生态研究所对本研究给予了极大帮助，在此表示感谢。

参考文献：

- [1] 郭韬, 余泓, 邱杰, 李家洋, 韩斌, 林鸿宣. 中国水稻遗传学研究进展与分子设计育种[J]. 中国科学: 生命科学, 2019, 49(10): 1185-1212.

- Guo T, Yu H, Qiu J, Li J Y, Han B, Lin H X. Advances in rice genetics and breeding by molecular design in China[J]. *Science in China: Life Sciences*, 2019, 49(10): 1185-1212. (in Chinese with English abstract)
- [2] Wang M G, Mao Y F, Lu Y M, Wang Z D, Tao X P, Zhu J K. Multiplex gene editing in rice with simplified CRISPR-Cpf1 and CRISPR-Cas9 systems[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2018, 60(8): 626-631.
- [3] Cai Y P, Chen L, Liu X J, Guo C, Sun S, Wu C X, Jiang B J, Han T F, Hou W S. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of *GmFT2a* delays flowering time in soya bean[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(1): 176-185.
- [4] Qi W W, Zhu T, Tian Z R, Li C B, Zhang W, Song R T. High-efficiency CRISPR/Cas9 multiplex gene editing using the glycine tRNA-processing system-based strategy in maize[J/OL]. *BMC Biotechnology*, 2016, 16(1): 58.
- [5] Zhang S J, Zhang R Z, Song G Q, Gao J, Li W, Han X D, Chen M L, Li Y L, Li G Y. Targeted mutagenesis using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR-Cas9 system in common wheat[J/OL]. *BMC Plant Biology*, 2018, 18(1): 302.
- [6] Wang P C, Zhang J, Sun L, Ma Y Z, Xu J, Liang S J, Deng J W, Tan J F, Zhang Q H, Tu L L, Daniell H, Jin S X, Zhang X L. High efficient multisites genome editing in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*) using CRISPR/Cas9 system[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(1): 137-150.
- [7] Liu G Q, Li J Q, Godwin I D. Genome editing by CRISPR/Cas9 in sorghum through biolistic bombardment[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2019, 1931: 169-183.
- [8] Samanta M K, Dey A, Gayen S. CRISPR/Cas9: An advanced tool for editing plant genomes[J]. *Transgenic Research*, 2016, 25(5): 561-573.
- [9] Ji X, Zhang H W, Zhang Y, Wang Y P, Gao C X. Establishing a CRISPR-Cas-like immune system conferring DNA virus resistance in plants[J/OL]. *Nature Plants*, 2015, 1: 15144.
- [10] Hsu P D, Lander E S, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering[J]. *Cell*, 2014, 157(6): 1262-1278.
- [11] Smih F, Rouet P, Romanienko P J, Jasin M. Double strand breaks at the target locus stimulate gene targeting in embryonic stem cells[J]. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23(24): 5012-5019.
- [12] Song X J, Huang W, Shi M, Zhu M Z, Lin H X. A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase[J]. *Nature Genetics*, 2007, 39(5): 623-630.
- [13] Fan C C, Xing Y Z, Mao H L, Lu T T, Han B, Xu C G, Li X H, Zhang Q F. *GS3*, a major QTL for grain length and weight and minor QTL for grain width and thickness in rice, encodes a putative transmembrane protein[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, 112(6): 1164-1171.
- [14] Zhao D S, Li Q F, Zhang C Q, Zhang C, Yang Q Q, Pan L X, Ren X Y, Lu J, Gu M H, Liu Q Q. *GS9* acts as a transcriptional activator to regulate rice grain shape and appearance quality[J/OL]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 1240.
- [15] Liu J F, Chen J, Zheng X M, Wu F Q, Lin Q B, Heng Y Q, Tian P, Cheng Z J, Yu X W, Zhou K N, Zhang X, Guo X P, Wang J L, Wang H Y, Wan J M. *GW5* acts in the brassinosteroid signalling pathway to regulate grain width and weight in rice[J/OL]. *Nature Plants*, 2017, 3: 17043.
- [16] Ishimaru K, Hirotsu N, Madoka Y, Murakami N, Hara N, Onodera H, Kashiwagi T, Ujiie K, Shimizu B I, Onishi A, Miyagawa H, Katoh E. 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.
- [17] Che R H, Tong H N, Shi B H, Liu Y Q, Fang S R, Liu D P, Xiao Y H, Hu B, Liu L C, Wang H R, Zhao M F, Chu C C. Control of grain size and rice yield by *GL2*-mediated brassinosteroid responses[J/OL]. *Nature Plants*, 2015, 2: 15195.
- [18] Qi P, Lin Y S, Song X J, Shen J B, Huang W, Shan J X, Zhu M Z, Jiang L, Gao J P, Lin H X. The novel quantitative trait locus *GL3.1* controls rice grain size and yield by regulating Cyclin-T1;3[J]. *Cell Research*, 2012, 22(12): 1666-1680.
- [19] Li Y B, Fan C C, Xing Y Z, Jiang Y H, Luo L J, Sun L, Shao D, Xu C J, Li X H, Xiao J H, He Y Q, Zhang Q F. Natural variation in *GS5* plays an important role in regulating grain size and yield in rice[J]. *Nature Genetics*, 2011, 43(12): 1266-1269.
- [20] Wang Y X, Xiong G S, Hu J, Jiang L, Yu H, Xu J, Fang Y X, Zeng L J, Xu E B, Xu J, Ye W J, Meng X B, Liu R F, Chen H Q, Jing Y H, Wang Y H, Zhu X D, Li J Y, Qian Q. Copy number variation at the *GL7* locus contributes to grain size diversity in rice[J]. *Nature Genetics*, 2015, 47(8): 944-948.
- [21] Si L Z, Chen J Y, Huang X H, Gong H, Luo J H, Hou Q Q, Zhou T Y, Lu T T, Zhu J J, Shang G Y, Chen E W, Gong C X, Zhao Q, Jing Y F, Zhao Y, Li Y, Cui L L, Fan D L, Lu Y Q, Weng Q J, Wang Y C, Zhan Q L, Liu K Y, Wei X H, An K, An G, Han B. *OsSPL13* controls grain size in cultivated rice[J]. *Nature Genetics*, 2016, 48(4): 447-456.
- [22] Wang S K, Wu K, Yuan Q B, Liu X Y, Liu Z B, Lin X Y, Zeng R Z, Zhu H T, Dong G J, Qian Q, Zhang G Q, Fu X D. Control of grain size, shape and quality by *OsSPL16* in rice[J]. *Nature Genetics*, 2012, 44(8): 950-954.
- [23] Li M R, Li X X, Zhou Z J, Wu P Z, Fang M C, Pan X P, Lin Q P, Luo W B, Wu G J, Li H Q. Reassessment of the four yield-related genes *Gn1a*, *DEP1*, *GS3*, and *IPAI* in rice using a CRISPR/Cas9 system[J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 377.

- [24] Sakthivel K, Sundaram R M, Rani N S, Balachandran S M, Neeraja C N. Genetic and molecular basis of fragrance in rice[J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(4): 468-473.
- [25] Chen S H, Yang Y, Shi W W, Ji Q, He F, Zhang Z D, Cheng Z K, Liu X N, Xu M L. *Badh2*, encoding betaine aldehyde dehydrogenase, inhibits the biosynthesis of 2-acetyl-1-pyrroline, a major component in rice fragrance[J]. *Plant Cell*, 2008, 20(7): 1850-1861.
- [26] Shan Q W, Zhang Y, Chen K L, Zhang K, Gao C X. Creation of fragrant rice by targeted knockout of the *OsBadh2* gene using TALEN technology[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2015, 13(6): 791-800.
- [27] 孙慧宇, 宋佳, 王敬国, 刘化龙, 孙健, 莫天宇, 徐善斌, 郑洪亮, 邹德堂. 利用 CRISPR/Cas9 技术编辑 *Badh2* 基因改良粳稻香味[J]. 华北农学报, 2019, 34(4): 1-8.
Sun H Y, Song J, Wang J G, Liu H L, Sun J, Mo T Y, Xu S B, Zheng H L, Zou D T. Editing *Badh2* gene to improve the fragrance of *japonica* rice by CRISPR/Cas9 technology[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2019, 34(4): 1-8. (in Chinese with English abstract)
- [28] 曾栋昌, 马兴亮, 谢先荣, 祝钦泷, 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[J]. 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 [J]. *Science in China: Life Sciences*, 2018, 48(7): 783-794. (in Chinese with English abstract)
- [29] Xie X R, Ma X, Zhu Q L, Zeng D C, Li G S, Liu Y G. CRISPR-GE: A convenient software toolkit for CRISPR-based genome editing[J]. *Molecular Plant*, 2017, 10(9): 1246-1249.
- [30] 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 S F, Wang Z, 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[J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(8): 1274-1284.
- [31] Liu W Z, Xie X R, Ma X L, Li J, Chen J H, Liu Y G. DSDecode: A web-based tool for decoding of sequencing chromatograms for genotyping of targeted mutations[J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(9): 1431-1433.
- [32] Zhang Y C, Li S M, Xue S J, Yang S H, Huang J, Wang L. Phylogenetic and CRISPR/Cas9 studies in deciphering the evolutionary trajectory and phenotypic impacts of rice *ERECTA* genes[J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 473.
- [33] Wang M, Mao Y F, Lu Y M, Wang Z D, Tao X P, Zhu J K. Multiplex gene editing in rice with simplified CRISPR-Cpf1 and CRISPR-Cas9 systems[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2018, 60(8): 626-631.
- [34] Zhang J S, Zhang H, Botella J R, Zhu J K. Generation of new glutinous rice by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the *Waxy* gene in elite rice varieties[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2018, 60(5): 369-375.
- [35] Wang Y, Geng L Z, Yuan M L, Wei J, Jin C, Li M, Yu K, Zhang Y, Jin H B, Wang E, Chai Z J, Fu X D, Li X G. Deletion of a target gene in *indica* rice via CRISPR/Cas9[J]. *Plant Cell Reports*, 2017, 36(8): 1333-1343.
- [36] Nan J Z, Feng X M, Wang C, Zhang X H, Wang R S, Liu J X, Yuan Q B, Jiang G Q, Lin S Y. Improving rice grain length through updating the *GS3* locus of an elite variety Kongyu 131[J]. *Rice*, 2018, 11(1): 21.