

引用格式: 吴凌珺, 盛淑婕, 单欣兰, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术敲除 *OsAAP13* 改良稻米品质[J]. 浙江农林大学学报, 2025, 42(4): 694–702. WU Lingjun, SHENG Shujie, SHAN Xinlan, *et al.* Improving rice grain quality by knocking out *OsAAP13* using CRISPR/Cas9 technology[J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2025, 42(4): 694–702.

利用 CRISPR/Cas9 技术敲除 *OsAAP13* 改良稻米品质

吴凌珺¹, 盛淑婕¹, 单欣兰¹, 周 恺¹, 卞天宇¹, 董雨泽¹, 杨宜豪^{1,2,3}

(1. 扬州大学 农学院/江苏省作物基因组学和分子育种重点实验室/植物功能基因组学教育部重点实验室, 江苏 扬州 225009; 2. 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; 3. 扬州现代种子创新研究所, 江苏 高邮 225600)

摘要: 【目的】水稻 *Oryza sativa* 品质改良已成为中国现代育种研究的核心课题。解析相关基因对稻米蛋白质、淀粉及蒸煮食味特性的调控作用, 对稻米品质改良的遗传效应具有重要意义。【方法】利用 CRISPR/Cas9 技术, 对 3 个粳稻品种 ‘武运粳 30’ ‘Wuyungeng 30’、‘南粳 9108’ ‘Nangeng 9108’、‘扬粳 158’ ‘Yanggeng 158’ 胚乳中高效表达的 *OsAAP13* 基因 (*LOC_Os04g39489*) 进行了敲除, 构建了相应的突变体。综合测定农艺性状、蛋白质与淀粉质量分数及食味值, 结合多遗传背景验证基因功能。【结果】*OsAAP13* 在花后第 5 天的种子中表达较强。农艺性状及稻米理化特性测定发现: *OsAAP13* 敲除并未影响水稻的主要农艺性状, 但显著降低了稻米中总蛋白质量分数 (7.8%~15.8%) 及部分组分蛋白质量分数 (球蛋白 5.5%~21.1% 和谷蛋白 9.0%~15.8%); 总淀粉质量分数在各突变体中有一定上升 (2.1%~8.7%), 直链淀粉质量分数呈下降趋势 (4.0%~6.9%); 突变体米饭食味测定表明: 稻米适口性获得了有效改善 (2.9%~11.6%)。【结论】敲除 *OsAAP13* 可在保证水稻品种优良农艺性状的基础上, 有效改良稻米多个理化指标并改善稻米食味值, 为未来水稻品质性状的改良提供了重要的理论依据。图 5 表 2 参 31

关键词: 水稻; 稻米品质; CRISPR/Cas9; *OsAAP13*

中图分类号: S503 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2025)04-0694-09

Improving rice grain quality by knocking out *OsAAP13* using CRISPR/Cas9 technology

WU Lingjun¹, SHENG Shujie¹, SHAN Xinlan¹, ZHOU Kai¹, BIAN Tianyu¹, DONG Yuze¹, YANG Yihao^{1,2,3}

(1. Agricultural College/Jiangsu Key Laboratory of Crop Genomics and Molecular Breeding/Key Laboratory of Plant Functional Genomics of the Ministry of Education, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China; 2. Jiangsu Co-Innovation Center for Modern Production Technology of Grain Crops, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China; 3. Yangzhou Modern Seed Innovation Institute, Gaoyou 225600, Jiangsu, China)

Abstract: [Objective] Quality improvement of rice (*Oryza sativa*) has become a core topic in modern breeding research in China. Understanding the regulatory roles of relevant genes in rice protein, starch and eating and cooking quality is crucial for the genetic improvement of rice quality. [Method] The CRISPR/Cas9 technology was utilized to knockout the *OsAAP13* gene (*LOC_Os04g39489*), which has high expression levels in the endosperm of three japonica rice cultivars ‘Wuyungeng 30’, ‘Nangeng 9108’ and ‘Yanggeng 158’, constructing the corresponding mutants. Agronomic traits, protein and starch content, as well as eating quality, were comprehensively evaluated, and gene function was validated across multiple genetic backgrounds.

收稿日期: 2025-03-07; 修回日期: 2025-07-05

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划 (202411117081Z); 国家自然科学基金资助项目 (32301827); 中国博士后基金 (2023M733005, 2024T170754)

作者简介: 吴凌珺 (ORCID: 0009-0004-5100-8704), 从事稻米品质遗传改良研究。E-mail: wlj20030927@163.com。

通信作者: 杨宜豪 (ORCID: 0000-0002-2827-4439), 副教授, 博士, 从事稻米品质遗传改良研究。
E-mail: yihao.yang@yzu.edu.cn

[**Result**] *OsAAP13* exhibited peak expression in grains at 5 days after flowering. Measurements of agronomic traits and rice physicochemical properties revealed that the knockout of *OsAAP13* did not affect major agronomic traits of rice, but significantly reduced total protein content (7.8%–15.8%) and certain protein fractions (globulin 5.5%–21.1% and glutelin 9.0%–15.8%). Total starch content increased in the mutants (2.1%–8.7%), while amylose content decreased (4.0%–6.9%). Eating quality assessments of the mutant rice showed a significant improvement in palatability (2.9%–11.6%). [**Conclusion**] Knocking out *OsAAP13* can effectively improve multiple physicochemical traits and eating quality of rice while maintaining excellent agronomic traits, providing important theoretical support for future rice quality improvements. [Ch, 5 fig. 2 tab. 31 ref.]

Key words: *Oryza sativa*; rice quality; CRISPR/Cas9; *OsAAP13*

水稻 *Oryza sativa* 是全世界最主要的粮食作物之一，随着经济的快速发展以及人们生活品质的提高，水稻育种的核心目标已由单一追求高产逐渐转向优质稻米品质的协同提升。稻米品质是由外观品质、加工特性、营养组分、蒸煮食味与卫生安全等多维度性状构成的复杂表型系统。在消费升级和“大食物观”的战略驱动下，蒸煮食味已成为决定稻米市场竞争力和居民膳食结构优化的核心指标。蛋白质作为水稻胚乳中的第二大贮藏物质，其含量、组成与理化性质是决定稻米蒸煮食味品质的关键因素^[1-2]。研究表明：在直链淀粉含量相近的情况下，稻米蛋白质含量与蒸煮食味品质存在显著的负相关关系^[3-4]。

氨基酸是稻米蛋白质合成的重要底物，也是植物运输有机氮的主要形式。氨基酸转运蛋白在植物生长发育中起着关键作用。目前，水稻中已报道多个氨基酸转运蛋白基因。影响水稻产量性状的基因有 *OsAAP1*、*OsAAP3*、*OsAAP4*、*OsAAP5*、*OsAAP7*、*OsAAP13*、*OsAAP15*、*OsATL4*、*OsLHT1*，其中 *OsAAP1* 通过在水稻生殖生长期调控小穗育性来影响水稻产量^[5-6]，*OsLHT1* 通过调控穗粒数和千粒重来影响水稻产量^[7-8]，*OsAAP15* 正向调控小穗的枝梗数与穗粒数的形成，它的功能在低氮及中氮环境下尤为显著^[9]，*OsAAP3*、*OsAAP4*、*OsAAP5*、*OsAAP7*、*OsAAP13*、*OsATL4* 则通过调控水稻分蘖数来影响水稻产量^[10-15]。值得注意的是，*OsAAP13* 的启动子序列中含有脱落酸和水杨酸等激素响应元件和胁迫响应元件，说明 *OsAAP13* 很可能参与非生物胁迫调控^[16]；*OsAAP3*、*OsLHT1* 被证实参与调控水稻叶片的衰老进程，这一过程间接关联光合产物的分配与产量稳定性^[17-18]。*OsAAP6*、*OsAAP8* 是水稻籽粒中淀粉含量的正调控因子和贮藏蛋白含量的负调控因子，对水稻的营养品质有一定影响作用，且 *OsAAP8* 在影响籽粒营养物质累积的同时还参与籽粒大小的调控^[19-20]。在蒸煮与食味品质方面，敲除 *OsAAP10*、*OsAAP11* 可改善水稻的食味值^[21-22]。*OsATL6*^[23] 负调控谷氨酰胺和 NH_4^+ 从根系到茎的转运，敲除后可促进茎的生长。

综上，现有研究多聚焦于一些氨基酸转运蛋白基因对水稻产量相关性状的影响，而对水稻品质性状调控的研究较少。目前，虽已有研究解析了 *OsAAP13* 的时空表达特性及其对水稻产量性状的调控作用，但关于该基因对稻米理化性质及蒸煮食味品质的调控机制尚不清楚。本研究利用 CRISPR/Cas9 技术，在 3 个不同的粳稻栽培品种背景下，对在水稻胚乳中高表达的 *OsAAP13* (*LOC_Os04g39489*) 进行了敲除，重点解析 *OsAAP13* 对稻米蛋白质、淀粉及蒸煮食味特性的调控作用，为水稻优质育种提供理论基础和重要材料。

1 材料与方法

1.1 材料

供试水稻为 3 个粳稻品种：‘武运粳 30’ ‘Wuyungeng 30’ (WYG30)、‘南粳 9108’ ‘Nangeng 9108’ (NG9108)、‘扬粳 158’ ‘Yanggeng 158’ (YG158)。分别种植在江苏省扬州市和海南省陵水县，各基因型双行种植，每行种植 10 株，株行距统一为 20 cm×20 cm。全生育期实施标准化田间管理措施。

1.2 靶位点设计与突变检测

OsAAP13 (*LOC_Os04g39489*) 的编码序列获取自 RGAP 网站 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)。于 *OsAAP13* 第 1 个外显子中设计了一个靶基因序列: CCGCCGTTCTCTCATCTCGG, 该序列位于转录起始密码子 ATG 下游 37 bp 处。利用 CRISPR-GE 网站 (<http://skl.scau.edu.cn/offtarget/>) 对该靶位点进行脱靶分析。载体的构建方法和过程参考了文献^[21]。利用美国国家生物技术信息中心 (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库设计合适的检测引物 *OsAAP13*-jc-F: AATCGATCGCCTCCAGTAGA 和 *OsAAP13*-jc-R: GGAGATGAAATCACGAGTGG。采用十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法提取转基因植株基因组 DNA 后, 通过 PCR 扩增及测序分析鉴定突变体类型。

1.3 转基因成分检测

通过农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 介导法 (武汉伯远生物科技有限公司) 获得 T_0 转基因植株。将获得的 T_0 阳性单株种植成 T_1 。针对 T_1 群体, 按单株采集叶片并进行 DNA 提取, 采用特异性引物 Cas9-F: ACCAGACACGAGACGACTAA; Cas9-R: ATCGGTGCGGGCCTCTTC (用于检测 Cas9 基因) 与 Hyg-F: GCTGTTATGCGGCCATTGTC; Hyg-R: GACGTCTGTCGAGAAGTTTC (用于检测潮霉素抗性基因) 进行 PCR 验证。通过目标条带缺失判定为无外源基因整合的纯合突变体。

1.4 稻米中蛋白质分析

将各水稻品种不同类型的纯合阴性突变单株种植成 T_3 株系, 成熟后按系进行混合收种, 研磨成粉。使用 kjeltec 2300 自动氮分析仪 (FOSS) 测定米粉总氮含量, 并基于氮转换系数 (6.25) 计算蛋白质含量。通过分级提取法分离贮藏蛋白组分, 具体操作流程如下: 称取 100 mg 的米粉置于 2.0 mL 的离心管中。使用 1 mL ddH₂O 提取清蛋白, 使用 1 mL 1 mol·L⁻¹ NaCl 提取球蛋白, 使用 1 mL 乙二醇溶液提取醇溶蛋白, 使用 1 mL 0.05 mol·L⁻¹ NaOH 提取谷蛋白。各组分经 30 ℃、200 r·min⁻¹ 的摇床中振荡 2 h 后, 上清液转移至 10 mL 的离心管中, 在 4 ℃ 条件下以 10 000 r·min⁻¹ 的速度离心 15 min, 重复 3 次提取上清液。定量前, 上清液冷冻于 -20 ℃ 的环境下。提取完后使用 BCA 蛋白质定量试剂盒 (北京天根公司) 进行测定。

1.5 稻米中直链淀粉和总淀粉的分析

直链淀粉采用碘蓝比色法测定, 参考 NY/T 2639—2014《稻米直链淀粉的测定 分光光度法》, 并对实验体系做了部分修改, 操作流程如下: 以 4 个已知直链淀粉质量分数分别为 1.5%、10.4%、16.2%、26.5% 的样品作为标准样品。称取 20.0 mg 待测样品与标准样品置于 2.0 mL 离心管中, 重复称取 3 次。离心管中依次加入 100 μ L 无水乙醇和 1.8 mL 1.0 mol·L⁻¹ 的 NaOH 溶液, 充分混匀后用保鲜膜固定在离心管板上, 垂直放置于 60 ℃ 摇床中以 200 r·min⁻¹ 的速度振荡 1 h 完成糊化。取 100 μ L 混合液转移至含有 9.0 mL 蒸馏水的 10 mL 离心管, 依次添加 200 μ L 1.0 mol·L⁻¹ 乙酸钠溶液 (pH 4.3) 和 200 μ L 质量浓度为 0.02% 的碘试剂, 充分摇匀并静置显色 15 min, 使用酶标仪 (BioTek) 于波长为 620 nm 下测定混合液的吸光度。利用标准样品计算标准曲线, 根据公式计算待测样品的直链淀粉质量分数。

总淀粉采用蒽酮比色法测定^[24], 并在体系方面做了修改, 测定方法如下: 预先配制质量浓度为 0.4% 的蒽酮-硫酸显色剂, 在待测样品与标准样品分别加入体积分数为 52% 的高氯酸 30 mL, 完全振荡溶解后将溶液滴定至 50 mL, 并稀释 25 倍。采用梯度稀释法, 将标准淀粉溶液分别稀释至体积分数 12.5%、25.0%、50.0%、75.0% 和 100.0%, 各取 1 mL 稀释液与 6 mL 显色剂混匀置于 10 mL 的离心管中, 沸水浴显色 5 min 后在室温中静置放凉。最后, 使用蒸馏水对分光光度计进行调零, 于波长 640 nm 处测定混合液吸光度。

1.6 稻米食味评分分析

称取精米 30 g, 用自来水清洗, 加水, 至精米:水 (质量比)=1.0:1.3, 用滤纸和橡皮筋密封容器后浸泡 30 min, 转入蒸锅蒸煮 30 min, 断热后焖制 10 min。打开蒸锅翻动米饭防止粘壁, 放置于冷装箱吹风 10 min 后关盖静置 90 min。在此期间预热食味仪 (STA1A) 30 min, 软件设定为日本粳米模式进行校准。称取冷却好的米饭 8 g 装入金属环中置于仪器测定稻米食味值。该设备基于近红外光谱技术, 通过分析直链淀粉、蛋白质、水分及脂肪酸含量等指标与感官数据的关联模型, 最终输出食味值。

1.7 水稻植株主要农艺性状调查

在水稻成熟期，分别从 3 个遗传背景下的各突变体及野生型株系中分别选取 5 个单株，调查统计其株高、分蘖数、每穗粒数、结实率、粒长、粒宽、百粒重。其中粒长和粒宽使用种子测量仪 (SC-G 型，杭州万深检测科技有限公司) 进行分析。

1.8 基因表达分析

在水稻花后第 5 天分别对 3 个品种的根、茎、叶、叶鞘组织及种子 (5DAF) 进行取样，并相继对花后第 10 天 (10DAF)、第 15 天 (15DAF)、第 20 天 (20DAF) 的种子进行取样，使用 RNA 提取试剂盒 (A0705A，天根生化科技有限公司) 提取总 RNA，并使用反转录试剂盒 (S20924，全式金生物) 合成 cDNA。以 cDNA 为模板，使用 CFX96 Real-Time PCR 系统 (Bio-Rad) 和 SYBR qPCR Master Mix (Q412-00，Vazyme) 进行实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测。所有检测都至少设置了 3 个生物学重复。以水稻 *Actin* 基因 (*Actin*-F: TGCTATGTACGTCGCCATCCAG; *Actin*-R: AATGAGTAACCACGCTCCGTCA) 作为内参。*OsAAP13* 的 qPCR 的引物为 *OsAAP13*-qF: CAAACGGCCTTGTTTCGGCT; *OsAAP13*-qR: GCAGT TGGACCTCAGGATCG。

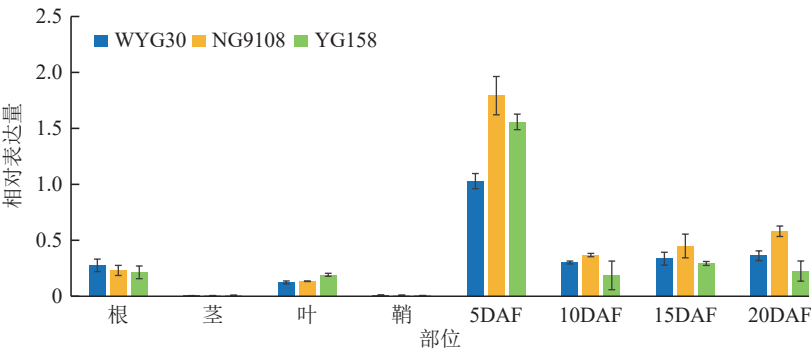
1.9 数据分析

使用 Excel 2021 整理数据和作图，SPSS 25.0 对数据进行方差分析，显著性水平为 0.05。所有数据均以平均值±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 *OsAAP13* 表达模式分析

RT-qPCR 检测结果表明：*OsAAP13* 在不同水稻品种中均呈现相似的表达趋势，在花后第 5 天的种子中表达量较高，随后随着种子成熟的进程显著下调；而在根、叶中则维持较低表达水平，在茎和鞘中基本不表达 (图 1)。表明 *OsAAP13* 在水稻种子发育前期扮演着重要作用。



取不同背景下水稻花后第5天的根、茎、叶、叶鞘组织及不同发育部位阶段的种子进行检测，5DAF、10DAF、15DAF、20DAF 分别表示花后第5、10、15、20 天的种子。所有检测都设置了3个生物学重复。

图 1 *OsAAP13* 表达模式分析
Figure 1 RT-qPCR analysis of *OsAAP13*

2.2 靶点设计与突变类型分析

脱靶分析结果如表 1 所示：*OsAAP13* 靶标在全基因组上的脱靶风险较低。对 3 个粳稻品种进行

表 1 *OsAAP13* 脱靶分析

Table 1 <i>OsAAP13</i> off-target analysis					
染色体	位置/bp	序列	脱靶/%	基因	区域
Chr 10	1 934 247	CGACTCCCTTCCTCTCCTCT	0.028	<i>Os03g0862300</i>	基因间
Chr 1	41 363 176	CGCCGCCGTTTCGTCACATCT	0.006		基因间
Chr 3	36 409 463	CGCCGCCGTTTCGTCACATCT	0.006		内含子
Chr 2	25 001 697	CGCCGCCGTTTCGTCACATCT	0.006		基因间
Chr 2	660 940	CGCCGCCATTTCGTCACATCT	0.006		基因间

OsAAP13 进行单独敲除, T_0 分别获得 10、13 和 13 株阳性单株, 将获得的 T_0 阳性单株种植成 T_1 株系。利用 Cas9 引物与潮霉素引物进行阴性单株筛选, 对筛选出的阴性单株再进行靶位点序列扩增和测序。最终, WYG30 和 NG9108 分别找出了插入 1 bp 和缺失 2 bp 的 2 种突变类型, YG158 找出缺失 7 bp 的敲除类型 (图 2)。以上核苷酸的突变均可能造成氨基酸的移码突变。

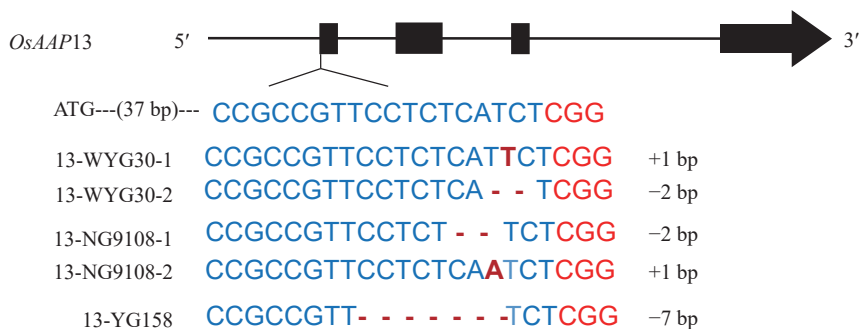
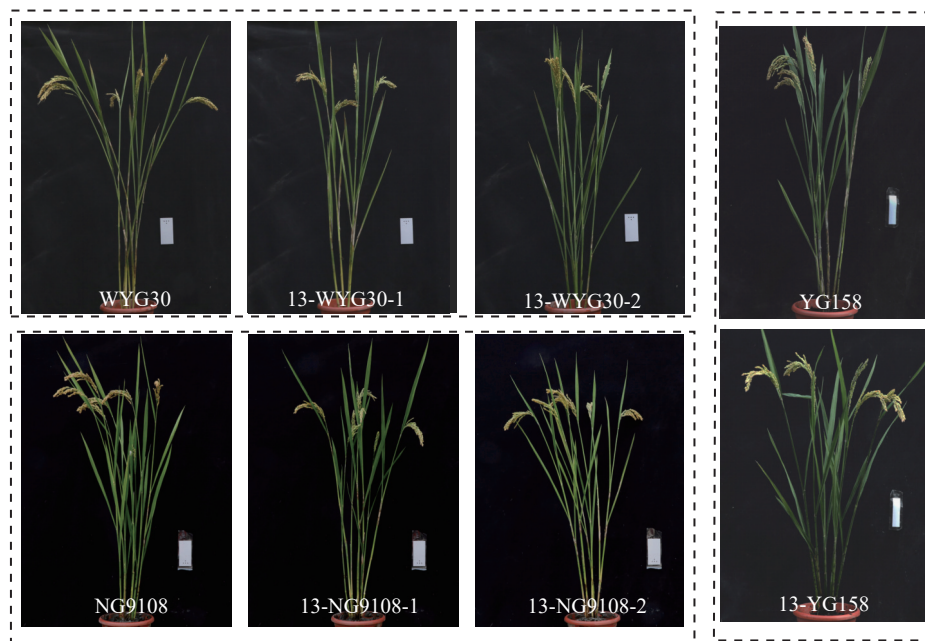


图 2 *OsAAP13* 在不同粳稻品种中的突变类型
Figure 2 Mutation types of *OsAAP13* in different japonica rice cultivars

2.3 *OsAAP13* 突变体的农艺性状调查

为阐明 *OsAAP13* 基因的缺失对水稻农艺性状的影响, 考察了 3 个品种突变体的农艺性状 (图 3 和表 2)。结果表明: 除 13-WYG30-1 突变体表现为粒长和百粒重的显著增加外, 其余突变体在各农艺性状参数与野生型均无统计学差异。综上, *OsAAP13* 基因敲除对水稻主要农艺性状并无太大影响。



比例尺为 10 cm。

图 3 野生型和 *OsAAP13* 突变体的植株形态
Figure 3 Plants morphology of WT and the *OsAAP13* mutants

2.4 *OsAAP13* 突变体的贮藏蛋白质量分数变化

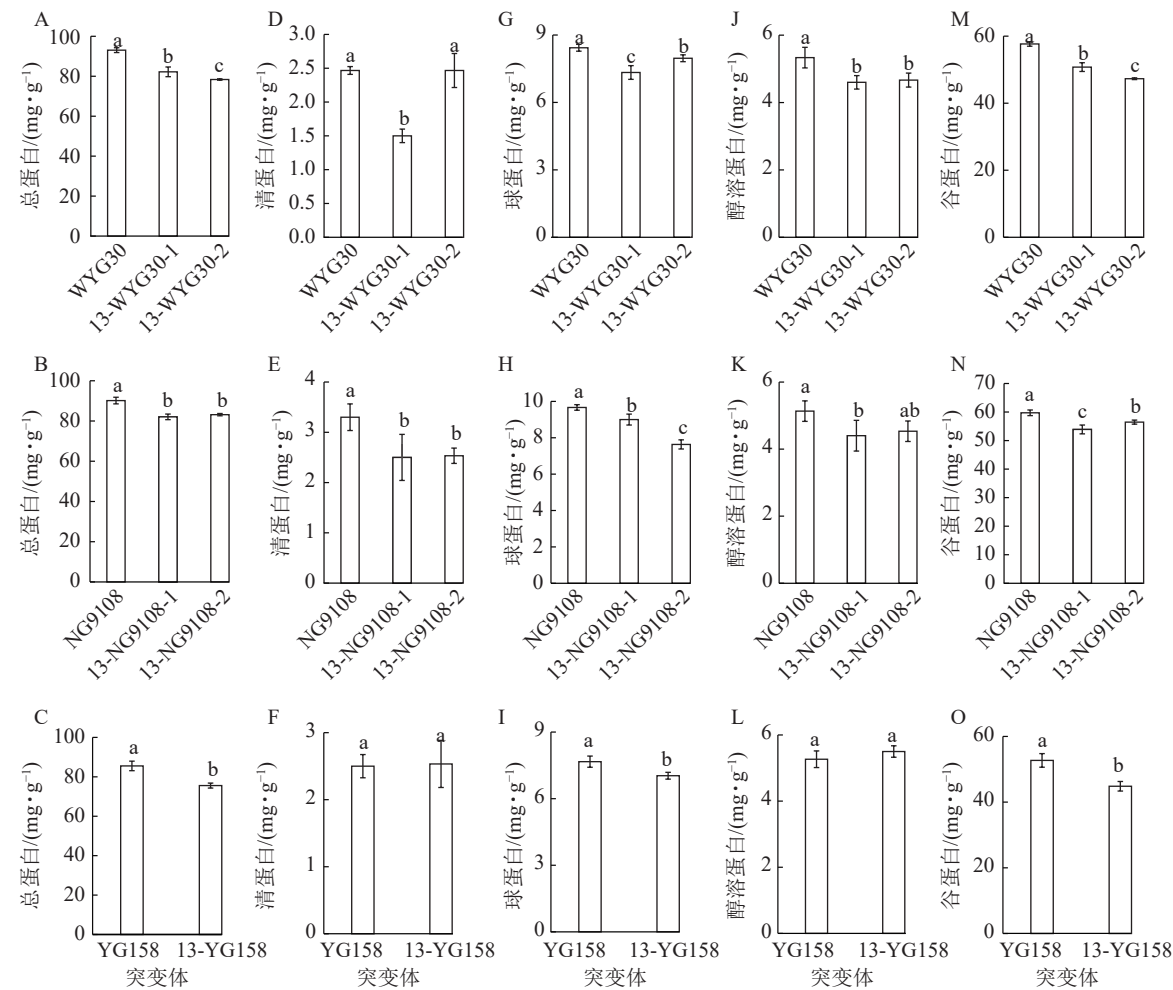
测定 3 个品种野生型与突变体稻米总蛋白以及组分蛋白, 结果表明: WYG30、NG9108 和 YG158 的突变体中的总蛋白质量分数均显著下降 ($P < 0.05$), 其中 WYG30 的 2 个突变体分别降低 11.7% 和 15.8% (图 4A), NG9108 的 2 个突变体分别下降 9.0% 和 7.8% (图 4B), YG158 的突变体下降 11.6% (图 4C)。4 类贮藏蛋白均呈不同程度的下调: 清蛋白在 NG9108 的 2 个突变体及 13-WYG30-1 中显著下降 ($P < 0.05$, 图 4D~F); 醇溶蛋白在 WYG30 的 2 个突变体及 13-NG9108-1 中显著下降 ($P < 0.05$, 图 4J~L); 在贮藏蛋白中占比最多的谷蛋白以及球蛋白在所有突变体中均显著下降 ($P < 0.05$),

表 2 野生型和 *OsAAP13* 突变体的农艺性状分析

Table 2 Analysis of agronomic characteristics of the wild-type and <i>OsAAP13</i> mutant lines							
突变体	株高/cm	分蘖数	每穗粒数	结实率/%	粒长/mm	粒宽/mm	百粒重/g
WYG30	100.9±1.3 a	10.0±0.9 a	192.2±16.0 a	93.1±1.4 a	7.21±0.05 b	3.65±0.04 a	2.77±0.14 b
13-WYG30-1	99.8±2.2 a	9.3±2.0 a	185.3±7.1 a	89.3±2.7 a	7.28±0.05 a	3.69±0.07 a	2.82±0.04 a
13-WYG30-2	99.3±1.2 a	10.0±0.8 a	189.3±10.1 a	91.3±1.7 a	7.23±0.15 ab	3.65±0.05 a	2.72±0.14 b
NG9108	94.1±2.1 a	10.5±1.4 a	176.8±10.7 a	90.5±1.7 a	7.11±0.1 a	3.85±0.03 a	2.78±0.07 a
13-NG9108-1	92.1±2.4 a	10.7±1.6 a	179.0±19.1 a	88.9±2.6 a	7.16±0.06 a	3.77±0.05 a	2.71±0.05 a
13-NG9108-2	92.3±2.4 a	10.4±1.5 a	185.3±9.5 a	89.3±2.0 a	7.11±0.04 a	3.80±0.01 a	2.71±0.06 a
YG158	77.9±3.5 a	8.3±0.6 a	130.2±6.9 a	91.7±2.0 a	7.06±0.29 a	3.64±0.04 a	2.78±0.12 a
13-YG158	78.8±3.1 a	9.0±1.0 a	140.3±23.1 a	89.3±2.9 a	6.98±0.03 a	3.69±0.05 a	2.72±0.04 a

说明：通过单因素方差分析和邓肯多重检验，不同小写字母表示同一品种不同突变体间差异显著 ($P<0.05$)。所有检测都设置了 5 个生物学重复。

WYG30 突变体谷蛋白和球蛋白下降幅度为 5.5%~18.0%，NG9108 突变体谷蛋白和球蛋白下降幅度为 5.5%~21.1%，YG158 突变体谷蛋白和球蛋白下降幅度为 8.3%~15.0% (图 4G~I, M~O)。综上，*OsAAP13* 主要通过调控稻米中的谷蛋白及球蛋白影响总蛋白的积累。



通过单因素方差分析和邓肯多重检验，不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。所有检测都设置了3个生物学重复。

图 4 *OsAAP13* 突变体的贮藏蛋白与总蛋白质量分数

Figure 4 Grain protein contents in wild-type and *OsAAP13* mutants

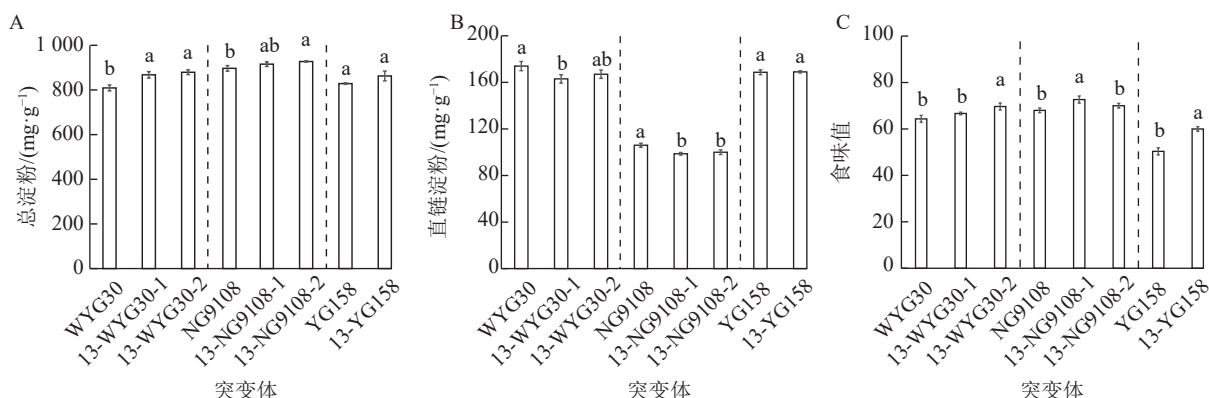
2.5 *OsAAP13* 突变体的总淀粉与淀粉组成的变化

各突变体的总淀粉质量分数有一定的提升：NG9108 的 2 个突变体分别增加了 2.1% 和 3.4%；YG158

突变体提升 4.1%；WYG30 的 2 个突变体增幅最为显著，达 7.3% 和 8.7% (图 5A)。与之相反的是，各突变体直链淀粉质量分数总体却呈小幅度下调趋势，下降幅度为 4.0%~6.9%，在 13-WYG30-1、13-NG9108-1 和 13-NG9108-2 突变体中下调达显著水平 ($P<0.05$, 图 5B)。虽然不同品种突变体的变化幅度略有差异，但整体变化趋势一致，表现为总淀粉质量分数上升，直链淀粉质量分数下降。综上，*OsAAP13* 对稻米淀粉合成与代谢具有重要影响。

2.6 *OsAAP13* 突变体的食味值测定

进一步评估不同遗传背景突变体的稻米食味值表明：所有突变体的稻米食味值均发生不同程度提升：WYG30 的 2 个突变体分别提升 3.6% 和 8.3%，NG9108 的 2 个突变体增幅为 6.7% 和 2.9%，YG158 的突变体显著提升了 11.6% ($P<0.05$, 图 5C)。表明 *OsAAP13* 基因的缺失可有效改善稻米食味值。



通过单因素方差分析和邓肯多重检验，不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。所有检测都设置了3个生物学重复。

图 5 *OsAAP13* 突变体的总淀粉、直链淀粉质量分数及食味值

Figure 5 Total starch and amylose contents, and taste scores of *OsAAP13* mutants

3 讨论

氨基酸是植物运输有机氮的主要形式，膜定位氨基酸转运体 (AATs) 可介导氨基酸从根瘤到种子的移动，在许多生物过程中起到了重要的作用^[25]。已有研究表明：不同植物物种之间的氨基酸转运蛋白的氨基酸序列是非常保守的，AATs 的同源基因相似性可高达 98%，尤其在跨膜结构域的保守性高度一致，对维持转运活性至关重要^[10, 26-27]。在本研究中，虽然 YG158 未获得 2 个向上的突变体类型，但由于 *OsAAP13* 在 3 个品种中具有相似的表达模式，缺失 *OsAAP13* 对 3 个品种稻米品质的影响也具有相似的变化趋势。因此，可以认为 *OsAAP13* 对稻米品质改良具有重要影响。

已有大量研究论述了蛋白质含量对稻米食味值的影响。如 YANG 等^[28] 系统测定了近 100 个粳稻品种的总蛋白含量、组分蛋白含量和食味值，相关分析表明稻米总蛋白和谷蛋白含量与食味值均呈极显著负相关。CAI 等^[29] 分析了近 30 a 南方稻区籼稻、粳稻主栽品种及骨干亲本的食味品质性状，结果表明，蛋白质含量的降低是南方水稻品种食味品质获得改良的关键因素。以上研究均直接或间接表明稻米蛋白质含量过高对米饭食味具有负面效应。一般情况下优质稻米的蛋白质质量分数低于 7%，如日本优质粳稻品种‘越光’‘Koshihikari’，携带一个编码颗粒结合型淀粉合成酶 I (Granule-Bound Starch Synthase I, GBSS I) 的 *Wx^b* 等位基因^[30]，其稻米蛋白质质量分数低于 7%，不仅口感出众，且外观透明，备受欢迎。‘稻花香’‘Daohuaxiang’和‘空育 131’‘Kongyu 131’等中国优质水稻品种也表现出类似的品质特性。生产实践中，由于中国施氮水平较高和品种特性等原因，普通稻米的蛋白质含量普遍较高，严重影响了稻米的食味品质。因此，亟待挖掘调控稻米蛋白质含量的基因资源和开发快速改良稻米蛋白质含量的方法。

CRISPR/Cas9 技术是近 10 a 发展起来的革命性技术，可对植物基因组特定位置产生可预见和可遗传的改变，从而实现对植物性状的精准改良，且无转基因争议，应用前景十分广阔^[31]。YANG 等^[28] 利用 CRISPR/Cas9 系统，在 2 个高产粳稻背景下同时敲除胚乳特异表达的 8 个谷蛋白合成基因，从而特异性降低了水稻胚乳中谷蛋白的合成，成功筛选出多个稻米蛋白质含量显著下调、米饭食味品质显著提升的

新种质材料。此外, 在 4 个高产粳稻品种/品系中水稻氨基酸转运蛋白 *OsAAP6*、*OsAAP10* 和 *OsAAP13* 的敲除实验表明, 基因敲除可实现快速降低稻米蛋白质含量并改善其蒸煮食味品质^[21-22]。本研究利用 CRISPR/Cas9 技术, 在不同粳稻背景下对在胚乳中高表达的 *OsAAP13* 基因进行敲除, 结果显示: *OsAAP13* 敲除可提升稻米总淀粉含量, 降低贮藏蛋白含量, 提升米饭适口性。

4 结论

OsAAP13 基因主要在水稻花后第 5 天的种子中高效表达。本研究通过 CRISPR/Cas9 技术对不同材料进行 *OsAAP13* 基因的定向敲除, 能抑制种子中贮藏蛋白的积累、促进淀粉的合成和稻米食味值提升。本研究为稻米蒸煮食味品质改良提供重要基因资源和理论基础。

5 参考文献

- [1] LI Pei, CHEN Yuhao, LU Jun, *et al.* Genes and their molecular functions determining seed structure, components, and quality of rice[J/OL]. *Rice*, 2022, **15**(1): 18[2025-02-20]. DOI: [10.1186/s12284-022-00562-8](https://doi.org/10.1186/s12284-022-00562-8).
- [2] GUO Xiaoqian, WANG Luqi, ZHU Guanglong, *et al.* Impacts of inherent components and nitrogen fertilizer on eating and cooking quality of rice: a review[J/OL]. *Foods*, 2023, **12**(13): 2495[2025-02-20]. DOI: [10.3390/foods12132495](https://doi.org/10.3390/foods12132495).
- [3] 周翌城, 郭哈伦, 陆尧, 等. 胚乳蛋白质对稻米品质影响的研究进展[J]. *中国稻米*, 2023, **29**(1): 27-34, 43.
ZHOU Yicheng, GUO Halun, LU Yao, *et al.* Research progress for the effect of endosperm protein on rice quality [J]. *China Rice*, 2023, **29**(1): 27-34, 43.
- [4] 翁雪莲, 姜丽秋, 唐树鹏, 等. 稻米淀粉、蛋白质和脂质与蒸煮食味品质关系研究进展[J]. *华中农业大学学报*, 2024, **43**(3): 121-131.
WENG Xuelian, JIANG Liqui, TANG Shupeng, *et al.* Progress on relationship between starch, protein, lipids and taste quality of steaming and cooking in rice [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2024, **43**(3): 121-131.
- [5] PEREIRA E G, BUCHER C P C, BUCHER C A, *et al.* The amino acid transporter *OsAAP1* regulates the fertility of spikelets and the efficient use of N in rice [J]. *Plant and Soil*, 2022, **480**(1/2): 507-521.
- [6] PEREIRA E G, SANTOS L A, CHAPETA A C O, *et al.* Disruption of amino acid transporter *OsAAP1* impairs rice seedling establishment and nitrate uptake and assimilation [J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2024, **43**(8): 2841-2854.
- [7] GUO Nan, QU Hongye, ZHI Yue, *et al.* Knock out of amino acid transporter gene *OsLHT1* accelerates leaf senescence and enhances resistance to rice blast fungus [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2023, **74**(14): 4143-4157.
- [8] WANG Xiaohu, YANG Guangzhe, SHI Mingxing, *et al.* Disruption of an amino acid transporter *LHT1* leads to growth inhibition and low yields in rice[J/OL]. *BMC Plant Biology*, 2019, **19**(1): 268[2025-02-20]. DOI: [10.1186/s12870-019-1885-9](https://doi.org/10.1186/s12870-019-1885-9).
- [9] YANG Xiuyan, YANG Guo, WEI Xilin, *et al.* *OsAAP15*, an amino acid transporter in response to nitrogen concentration, mediates panicle branching and grain yield in rice[J/OL]. *Plant Science*, 2023, **330**: 111640[2025-02-20]. DOI: [10.1016/j.plantsci.2023.111640](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2023.111640).
- [10] GUO Nan, ZHANG Shunan, GU Mingji, *et al.* Function, transport, and regulation of amino acids: what is missing in rice? [J]. *The Crop Journal*, 2021, **9**(3): 530-542.
- [11] FANG Zhongming, WU Bowen, JI Yuanyuan. The amino acid transporter *OsAAP4* contributes to rice tillering and grain yield by regulating neutral amino acid allocation through two splicing variants[J/OL]. *Rice*, 2021, **14**(1): 2[2025-02-20]. DOI: [10.1186/s12284-020-00446-9](https://doi.org/10.1186/s12284-020-00446-9).
- [12] WANG Jie, WU Bowen, LU Kai, *et al.* The amino acid permease 5 (*OsAAP5*) regulates tiller number and grain yield in rice [J]. *Plant Physiology*, 2019, **180**(2): 1031-1045.
- [13] JIN Feng, XIE Pengfei, LI Zhenghan, *et al.* Blocking of amino acid transporter *OsAAP7* promoted tillering and yield by determining basic and neutral amino acids accumulation in rice[J]. *BMC Plant Biology*, 2024, **24**(1): 447[2025-02-20]. DOI: [10.1186/s12870-024-05159-5](https://doi.org/10.1186/s12870-024-05159-5).
- [14] AMIN B, LUO Jun, SHI Jian, *et al.* Physiological and transcriptomic analysis provides novel insight into growth in Kam sweet rice under different nitrogen supplies[J/OL]. *Physiologia Plantarum*, 2024, **176**(1): e14162[2025-02-20]. DOI: [10.1111/pp1.14162](https://doi.org/10.1111/pp1.14162).

- [15] WANG Chuanbo, HUANG Weiting, MIAO Rui, *et al.* Two splicing variants of amino acid transporter-like 4 (*OsATL4*) negatively regulate rice tillering and yield by mediating the transport of amino acids [J]. *The Crop Journal*, 2024, **12**(6): 1583–1596.
- [16] 聂圣松, 李泓雨, 张林, 等. 水稻氨基酸透性酶基因 *OsAAP13* 的时空表达特性分析[J]. 分子植物育种, 2023, **21**(23): 7667–7676.
- NIE Shengsong, LI Hongyu, ZHANG Lin, *et al.* Spatiotemporal expression characterization of rice amino acid permease gene *OsAAP13* [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2023, **21**(23): 7667–7676.
- [17] WEI Qilang, YAN Zhenwei, XIONG Yifan, *et al.* Altered expression of *OsAAP3* influences rice lesion mimic and leaf senescence by regulating arginine transport and nitric oxide pathway[J/OL]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, **22**(4): 2181 [2025-02-20]. DOI: 10.3390/ijms22042181.
- [18] GUO Nan, GU Mingji, HU Jinqi, *et al.* Rice OsLHT1 functions in leaf-to-panicle nitrogen allocation for grain yield and quality[J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, **11**: 1150 [2025-02-20]. DOI: 10.3389/fpls.2020.01150.
- [19] PENG Bo, KONG Huili, LI Yibo, *et al.* OsAAP6 functions as an important regulator of grain protein content and nutritional quality in rice[J/OL]. *Nature Communications*, 2014, **5**: 4847 [2025-02-20]. DOI: 10.1038/ncomms5847.
- [20] PENG Bo, ZHANG Qingxi, LIU Yan, *et al.* OsAAP8 mutation leads to significant improvement in the nutritional quality and appearance of rice grains[J/OL]. *Molecular Breeding*, 2024, **44**(5): 34 [2025-02-20]. DOI: 10.1007/s11032-024-01473-w.
- [21] WANG Shiyu, YANG Yihao, GUO Min, *et al.* Targeted mutagenesis of amino acid transporter genes for rice quality improvement using the CRISPR/Cas9 system [J]. *The Crop Journal*, 2020, **8**(3): 457–464.
- [22] YANG Yihao, ZHANG Yi, SUN Zixing, *et al.* Knocking out OsAAP11 to improve rice grain quality using CRISPR/Cas9 system[J/OL]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, **24**(18): 14360 [2025-02-20]. DOI: 10.3390/ijms241814360.
- [23] OGASAWARA S, EZAKI M, ISHIDA R, *et al.* Rice amino acid transporter-like 6 (*OsATL6*) is involved in amino acid homeostasis by modulating the vacuolar storage of glutamine in roots [J]. *The Plant Journal*, 2021, **107**(6): 1616–1630.
- [24] 代立刚, 何煜, 王浩, 等. 谷物中总淀粉含量的测定方法[J]. 中国食物与营养, 2013, **19**(6): 38–42.
- DAI Ligang, HE Yu, WANG Hao, *et al.* Determination methods of total starch content in grain [J]. *Food and Nutrition in China*, 2013, **19**(6): 38–42.
- [25] JI Yuanyuan, HUANG Weiting, WU Bowen, *et al.* The amino acid transporter AAP1 mediates growth and grain yield by regulating neutral amino acid uptake and reallocation in *Oryza sativa* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2020, **71**(16): 4763–4777.
- [26] ZHAO Heming, MA Haoli, YU Li, *et al.* Genome-wide survey and expression analysis of amino acid transporter gene family in rice (*Oryza sativa* L.) [J/OL]. *PLoS One*, 2012, **7**(11): e49210 [2025-02-20]. DOI: 10.1371/journal.pone.0049210.
- [27] WAN Yongfang, KING R, MITCHELL R A C, *et al.* Spatiotemporal expression patterns of wheat amino acid transporters reveal their putative roles in nitrogen transport and responses to abiotic stress[J/OL]. *Scientific Reports*, 2017, **7**: 5461 [2025-02-20]. DOI: 10.1038/s41598-017-04473-3.
- [28] YANG Yihao, SHEN Ziyang, LI Youguang, *et al.* Rapid improvement of rice eating and cooking quality through gene editing toward glutelin as target [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2022, **64**(10): 1860–1865.
- [29] CAI Yue, CHEN Zichun, LIU Jianju, *et al.* Genetic improvement of eating and cooking quality of rice cultivars in southern China [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2025, **23**(2): 518–531.
- [30] 朱霁晖, 张昌泉, 顾铭洪, 等. 水稻 *Wx* 基因的等位变异及育种利用研究进展[J]. 中国水稻科学, 2015, **29**(4): 431–438.
- ZHU Jihui, ZHANG Changquan, GU Minghong, *et al.* Progress in the allelic variation of *Wx* gene and its application in rice breeding [J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2015, **29**(4): 431–438.
- [31] CHEN Kunling, GAO Caixia. Targeted genome modification technologies and their applications in crop improvements [J]. *Plant Cell Report*, 2014, **33**(4): 575–583.