

基因编辑技术及其在园艺作物中的应用和展望

崔霞*, 张率斌

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 北京 100081)

摘要: 基因编辑 (genome editing) 是对生物体基因组进行靶向修饰的一项新技术。该技术利用核酸酶在特定位置产生的双链 DNA 损伤, 通过非同源末端连接和同源重组修复机制, 实现在特异的位点 DNA 的插入、删除或特定 DNA 片段的替换。本文介绍了不同基因编辑体系的工作原理, 并对基因编辑技术在不同植物, 包括多种园艺作物中的应用进行了综述。作为精准和高效的基因工程方法, 基因编辑技术在作物性状改良方面具有巨大的应用潜力。

关键词: 基因编辑; 园艺作物; 应用; 展望

中图分类号: S 6

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2017) 09-1787-09

The Utilization and Prospect of Genome Editing in Horticultural Crops

CUI Xia* and ZHANG Shuaibin

(Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops of the Ministry of Agriculture, Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Genome editing is a new technology based on programmable nucleases to make precise changes in the genomes of cells. These nucleases create site-specific double-strand breaks (DSBs) at desired locations in the genome. The induced double-strand breaks are repaired through nonhomologous end-joining (NHEJ) or homologous recombination (HR), resulting in targeted mutations including deletion, insertion and exchange of specific DNA fragment. Here, we explained the principle of ZNF, TALEN and CRISPR/Cas9 and mainly summarized their usage in plants, especially in horticultural plants. As a precise and efficient method of genetic engineering, genome editing was developed rapidly in recent years, which will be utilized widely to improve agronomic traits of plant in the future.

Keywords: genome editing; horticultural crops; utilization; prospect

近年来, 越来越多的新技术被应用于包括园艺作物在内的农作物遗传改良中, 这些技术推动了新品种的开发, 加速了品种改良的进程, 也增加了改良的目的性。基因编辑 (genome editing) 技术就是其中发展最为迅猛, 应用前景也最为广阔的工具之一。基因编辑是对生物体特定靶基因进行精确修饰的一项新技术。该技术通过利用序列特异性核酸酶在基因组特定位点产生 DNA 双链断裂 (double-strand breaks, DSBs), 进而诱导细胞启动 DNA 修复机制。真核生物中 DSBs 的修复机制主要包括两种途径: 非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 和同源重组 (homologous recombination, HR)。通过非同源末端连接方式, 断裂的染色体会重新连接, 但这种修复过程并不

收稿日期: 2017-07-04; **修回日期:** 2017-09-05

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31572140)

* E-mail: cuixia@caas.cn

精确, 在 DNA 断裂处往往容易产生核苷酸的插入或缺失, 从而造成基因突变; 而同源重组方式则是以一段与断裂处两端序列同源的 DNA 序列为模板进行合成修复, 从而产生精确的基因替换或者插入 (Symington & Gautier, 2011)。因此, 基因编辑技术的使用可以在特定位置产生插入、删除、替换等, 最终造成 DNA 序列的改变。

1 基因编辑技术的种类及其原理

基因编辑技术根据序列特异性核酸酶的不同, 可以分为 3 个系统: 锌指核酸酶 (zinc finger nucleases, ZFNs) 系统, 类转录激活子效应蛋白核酸酶 (transcription activator like effector nuclease, TALEN) 系统, 以及成簇的规律间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 及其相关基因 (CRISPR-associated, Cas) 系统, 也称为 CRISPR/Cas9 系统 (程曦 等, 2015)。

ZFN 系统由能特异识别 DNA 双链的锌指结构域与具有序列非特异性切割活性的 FokI 核酸酶结构域两部分构成。DNA 结合域通常由 3 ~ 4 个 C2H2 锌指蛋白串联而成, 每个锌指蛋白能够识别并结合 1 个特异的三碱基 DNA 序列, 因此 DNA 结合域能够特异地识别一段 9 ~ 12 bp 的碱基序列。核酸酶 FokI 具有核酸内切酶活性, 以二聚体的形式发挥作用, 可以切割双链 DNA (Kim et al., 1996)。因此对于每一个靶位点都需要一对核酸酶, 这对核酸酶识别位点之间通常需要间隔 5 ~ 7 bp, 以确保 FokI 二聚体的正确形成并在该位点进行切割从而产生双链 DNA 断裂 (Bibikova et al., 2003)。锌指核酸酶设计很复杂, 不同锌指模块位置和次序会影响其基因打靶的特异性, 容易造成脱靶。

TALEN 系统也由 DNA 结合域与核酸酶活性域两部分组成, 其中核酸酶活性域依然由 FokI 构成, 而 DNA 结合域则由黄单胞菌属 (*Xanthomonas*) 植物病原菌分泌的一类被称为 TALE (Transcription activator-like effector) 的效应蛋白的 DNA 结合域构成。TALE 蛋白的 DNA 结合域由 13 ~ 28 个串联重复单元组成, 每个重复单元含有大约 34 个氨基酸 (Boch et al., 2009; Moscou & Bogdanove, 2009)。不同单元的氨基酸序列高度保守, 仅第 12 位和第 13 位氨基酸存在差异 (Deng et al., 2012)。这两个可变氨基酸的不同组合与 4 种碱基具有对应关系, 即 NG 识别 T, HD 识别 C, NI 识别 A, NN 识别 G (Mahfouz et al., 2011)。因此, 为获得识别某一特定核酸序列的 TALEN, 只需按照 DNA 序列将对应重复单元串联组装即可。与锌指核酸酶一样, 对于每一个靶位点也需要在其上、下游各设计 1 个 TALEN, 其间隔序列比锌指核酸酶长一些, 大约需要 12 ~ 21 bp (Mahfouz et al., 2011)。与锌指核酸酶系统相比, 该系统的特异性和易用性都得到了一定的改善, 但是由于该体系所用载体过大, 遗传操作复杂, 限制了其在植物上的广泛应用。

CRISPR/Cas 系统最早是作为细菌的适应性免疫系统被发现的, 超过 40% 的真细菌和 90% 的古细菌中都存在 CRISPR/Cas 系统, 其主要功能是通过特异性识别入侵的病毒和核酸, 并利用 Cas 蛋白对其进行切割, 帮助细菌对抗入侵的病毒及外源 DNA (Godde & Bickerton, 2006; Sapranaukas et al., 2011; 李君 等, 2013; 严芳和周焕斌, 2016)。CRISPR/Cas 系统由 CRISPR 序列元件与 Cas 基因家族组成。其中 CRISPR 由一系列高度保守的重复序列 (repeat) 与同样高度保守的间隔序列 (spacer) 相间排列组成。Cas 是指在 CRISPR 附近存在着的一部分高度保守的基因 (CRISPR-associated gene, Cas gene), 这些基因编码的蛋白具有核酸酶功能域, 可以对 DNA 序列进行切割 (Gasiunas et al., 2012)。根据 Cas 基因核心元件序列的不同, CRISPR/Cas 系统被分为 3 种类型, 其中 I 型和 III 型都需要多个 Cas 蛋白才能完成靶位点的切割, 而 II 型只需要一个 Cas 蛋白便可以完成对靶位点的

破坏, 因此属于 II 型的 CRISPR/Cas9 系统也是目前最为常用的基因编辑系统 (Sorek et al., 2013)。CRISPR/Cas9 系统由 Cas9 蛋白与 sgRNA (single-guide RNA) 组成, 通过 sgRNA 与靶序列 DNA 的碱基配对招募 Cas9 蛋白切割 DNA 双链, 产生 DNA 双链断裂。该系统的靶序列通常由 23 个碱基组成, 其中前 20 个碱基能够与 sgRNA 进行配对, 而 3' 端则包含了能够被 Cas9 蛋白识别的 3 个核苷酸 NGG, 又被称为 Protospacer Adjacent Motif (PAM) 序列。Cas9 的切割位点则位于 PAM 上游 3 nt 处, 而靶位点的序列特异性由 sgRNA 和 PAM 序列共同决定 (Jinek et al., 2012)。与 TALEN 和 ZFN 技术不同, CRISPR/Cas9 利用一段较短的序列特异性向导 RNA 分子引导核酸内切酶到靶点处完成基因组的编辑, 非常简单方便, 因此自问世以来便得到了迅猛发展和广泛应用。

2 基因编辑技术在拟南芥和大田作物中的应用

基因编辑系统可在特定位点产生 DNA 双链断裂, 通过非同源末端连接修复机制, 在修复过程中导致碱基的插入或缺失, 从而使蛋白质翻译发生移码突变甚至提前终止, 造成基因的定点敲除, 因此造成基因突变是基因组编辑在植物生物学中最直接的应用。

锌指核酸酶 (ZFN) 系统是最早被使用的基因编辑技术。2005 年利用 ZFN 在拟南芥中实现了对基因的定点突变, 平均突变效率达到了 7.9%; 在 ZFN 诱导产生的 106 个突变中, 有 83 个产生了 1~52 bp 的碱基缺失, 14 个产生了 1~4 bp 的碱基插入, 其余 9 个则兼具碱基的缺失与插入; 其中大约 10% 的突变可以被遗传至下一代 (Lloyd et al., 2005)。除了模式植物拟南芥外, ZFN 技术在大豆和玉米等作物中也成功实现了基因的定点敲除 (Shukla et al., 2009; Curtin et al., 2011)。但由于锌指蛋白识别并结合的 DNA 序列特异性相对较低, 因此非特异性敲除, 即脱靶的概率较大, 在一定程度上限制了该技术的使用。此外, ZFN 系统的构建过程相当繁琐, 阻碍了该技术的进一步发展。

类转录激活子效应蛋白核酸酶 (TALEN) 系统是继锌指核酸酶系统之后被用于基因突变的又一基因编辑技术。利用该技术首先在拟南芥原生质体中实现了对植物内源靶基因的定点敲除, 证明了其在植物细胞内的可行性 (Cermak et al., 2011)。随后, 利用该技术定向破坏了水稻感白叶枯病基因 *OsSWEET14*, 有效提高了水稻对白叶枯病的抗性 (Li et al., 2012)。近年来, TALEN 技术先后在二穗短柄草、大豆和玉米等作物中实现了基因的定点突变 (Shan et al., 2013a; Haun et al., 2014; Liang et al., 2014)。

CRISPR/Cas9 系统的第一篇研究论文于 2012 年 6 月在《科学》杂志上发表, 该研究发现 CRISPR/Cas9 系统可以在体外切割双链 DNA, 指出该系统在活细胞中进行基因编辑的可能性 (Jinek et al., 2012)。2013 年 8 月, 3 个科研团队同时在《自然·生物技术》杂志发表论文, 他们利用 CRISPR/Cas9 系统分别在双子叶植物拟南芥、烟草及单子叶植物水稻和小麦中成功实现了对内源靶基因的定点编辑 (Li et al., 2013; Nekrasov et al., 2013; Shan et al., 2013b)。此后, CRISPR/Cas9 系统在多种植物中得到应用, 包括高粱 (Jiang et al., 2013)、玉米 (Liang et al., 2014) 和番茄 (Brooks et al., 2014) 等。与 ZFN 或 TALEN 系统相比, CRISPR/Cas9 系统最大的优势在于其对靶位点的特异性识别是由一段短的 sgRNA 所决定的, 操作极为方便。

基因编辑技术还可以实现对多个基因的同时突变 (Xing et al., 2014; Xie et al., 2015)。利用 CRISPR/Cas9 系统, 通过一对 sgRNA 靶向拟南芥中两个不同的 *TT4* 基因, 在 58 个 T_1 代转基因植株中这两个基因的突变率分别达到了 84% 和 74% (Mao et al., 2013)。利用 TALEN 技术对小麦 A、B 和 D 基因组上 3 个不同拷贝的 *MLO* 基因进行突变, 获得的纯合突变体表现出对白粉病菌的持久和广谱抗性 (Wang et al., 2014)。因此利用基因编辑实现对多个同源基因的同时突变不仅可以推动

多倍体材料的遗传改良,也为研究植物复杂性状及复杂功能途径提供了重要工具。

基因编辑系统也可以实现在特定位置的 DNA 插入和替换。核酸酶所造成的 DNA 双链损伤,可以通过同源重组途径进行修复。同源重组需要一段与切口两侧序列同源的供体 DNA 作为模板指导修复,在此过程中供体 DNA 与双链断裂处的序列发生同源重组,从而目标基因可以特异地替换或是插入该位置。在烟草和水稻原生质体中,通过转化线性 DNA 作为供体 DNA 模板,利用 ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas9 技术都实现了对目标基因的替换 (Townsend et al., 2009; Shan et al., 2013b; Zhang et al., 2013)。但是由于在转基因植株中很难表达作为修复模板的大量供体 DNA,通过遗传转化获得定点插入和替换的 DNA 片段一直是一个难题。2014 年明尼苏达大学的研究者巧妙地利用植物双生病毒能够在植物体内大量复制这一特性,通过将供体 DNA 整合到双生病毒的复制元件中,使供体 DNA 在植物细胞中大量复制,然后利用 TALEN 和 CRISPR/Cas9 系统在拟南芥和番茄中成功实现了对目标片段的替换和插入 (Baltes et al., 2014)。而中国科学家另辟蹊径,以目标基因外显子两侧的内含子区域为靶位点设计一对 sgRNA,同时在供体 DNA 两侧设计同样的内含子序列,利用这对 sgRNA 对目标基因的内含子和供体 DNA 同时进行切割,从而在水稻中实现了对目标基因的定点替换 (Li et al., 2016)。该方法中 Cas9 核酸酶在 sgRNA 的引导下可以同时目标基因和供体 DNA 的两侧进行切割,之后借助植物非同源末端连接修复机制将切割过的供体 DNA 连接至目标基因位置。虽然该方法在 sgRNA 的靶位点附近仍会造成碱基缺失或插入,但由于其在内含子区域,因此不会影响目标基因的编码序列。基因组定点插入和替换的实现为利用基因编辑技术对植物基因组进行改良提供了可能,也为抗病育种应用提供了新的手段。

自然界中,作物种质资源的遗传多样性很大程度上是由单核苷酸多态性 (SNP) 所贡献的,因此在生物体内简单高效地实现单碱基替换也是基因编辑领域的一个重要突破。通过改造 CRISPR/Cas9 系统,在哺乳动物细胞内率先实现了 DNA 的单碱基替换。该技术通过突变 Cas9 蛋白的两个氨基酸位点,使之完全丧失核酸酶活性,但保留其识别并结合靶位点的能力;然后将一个胞嘧啶脱氨酶与突变的 Cas9 蛋白融合在一起,与靶位点特异的 sgRNA 共同转染细胞,突变的 Cas9 蛋白在 sgRNA 的引导下仍然能够结合在靶位点上,但是不会对 DNA 产生切割,而胞嘧啶脱氨酶则可以将靶位点附近的胞嘧啶变为胸腺嘧啶 (Plosky, 2016)。在哺乳动物细胞系中,该系统造成 C→T 单碱基替换的效率可达 15%~75% (Komor et al., 2016)。通过对该方法进行优化,目前已经在水稻、小麦和玉米中成功实现了高效精确的单碱基替换,替换效率最高达到了 43.48% (Zong et al., 2017)。

鉴于国际上对于转基因作物的商业推广仍然十分谨慎,因此快速获得不含转基因片段的基因编辑作物将会大大推动其在性状改良中的应用。虽然利用序列特异核酸酶在作物基因组的整合位点与基因编辑的靶位点通常并不连锁的特征,通过后代的自交分离也可获得无转基因痕迹的遗传材料,但是这种方法需要耗费至少两代的时间才能得到所需要的植株。目前通过在体外将原核表达的 Cas9 蛋白与 sgRNA 组装成复合体转化小麦原生质体,然后通过原生质体再生已经获得了无转基因插入的小麦突变体植株 (Liang et al., 2017)。通过在原生质体中瞬时表达 Cpf1 然后诱导植株再生,在大豆和烟草中也获得了基因定点突变但没有转基因痕迹的后代 (Kim et al., 2017)。Cpf1 也是一个核酸酶,分子量更小,CRISPR/Cpf1 系统中的 sgRNA 骨架序列也相对较短,更有利于体外表达与组装 (Zetsche et al., 2015)。CRISPR/Cpf1 系统在原生质体转化中的应用,为在更多的作物中快速获得没有转基因痕迹的突变后代提供了可能。

3 基因编辑技术在园艺作物中的应用

近些年,越来越多的园艺作物基因组测序完成,如何解读这些序列信息和诠释基因的功能,并利用基因组信息指导和促进其农艺性状的改良,将成为所有研究者需要探索的问题和将要迎接的挑战。无疑,基因编辑技术的发展为大规模和高效率的解决这个问题提供了可能。

TALEN 是在园艺作物中最早使用的基因编辑技术。在烟草中,研究者瞬时表达组装好的 TALEN 核酸酶,实现了对靶位点的定向突变 (Mahfouz et al., 2011)。之后在烟草中通过转基因实现了对 *ACETOLACTATE SYNTHASE* (*ALS*) 基因的敲除,在大约 1/3 的再生植株中成功检测到了 *ALS* 基因的突变 (Zhang et al., 2013)。番茄中也成功利用 TALEN 技术敲除了 GA 信号通路中的一个负调控因子 *PRO* (Lor et al., 2014)。但由于 TALEN 技术在设计和使用上较为复杂,其在农作物中的应用一直发展缓慢。

近两年,CRISPR/Cas9 系统简单和易于操作的特点极大地促进了其在园艺作物中的应用。*PHYTOENE DESATURASE* (*PDS*) 基因是叶绿素合成通路中的一个关键基因,该基因突变可以导致植物无法正常合成叶绿素从而显现出白化的表型。由于该突变表型易于观察,*PDS* 基因成为很多研究者用于检测基因编辑系统在植物中工作效率的首选靶基因。在矮牵牛中,以 *PhPDS* 基因的两个不同区域为靶位点,通过转化自交系 MD,获得了转基因 T₀ 代植株,两个靶位点的转基因后代中分别有 87.5% 和 58.1% 的植株呈现出白化的表型 (Zhang et al., 2016)。通过原生质体转化,在西瓜中对 *CIPDS* 基因的突变效率达到了 40.7% ~ 52.0%。通过转化西瓜自交系 PI17987,所得到的 16 株转基因 T₀ 代植株中均出现了不同程度的白化表型 (Tian et al., 2017)。在苹果中也获得了 *PDS* 基因缺失的具有白化表型的转化体 (Nishitani et al., 2016)。这些研究结果表明,基因编辑技术在多种园艺作物中已经被成功应用。

CRISPR/Cas9 技术已经成为园艺作物中基因功能研究的有力工具。利用该技术在番茄中敲除 *ARGONAUTE7* (*SlAGO7*) 基因,获得的 29 株 T₀ 代转基因植株中,有 14 株转基因后代表现出了明显的 *AGO7* 缺失的突变体表型,即叶片呈现针状或须状。对其中 8 株转基因后代测序发现,*AGO7* 基因编码区在这些植株中存在不同长度的碱基插入或缺失 (Brooks et al., 2014)。该研究表明 *ARGONAUTE7* 作为小 RNA 合成通路中的一个蛋白,在番茄器官的极性发育过程中也发挥重要的调控作用。通过定点敲除番茄 *CLV3* 基因,发现该基因突变可以造成番茄分生组织增大,心室数增多等表型,证明该基因在番茄分生组织决定中发挥重要功能 (Xu et al., 2015)。通过对番茄 *BOP1*、*BOP2* 和 *BOP3* 的定点突变发现这 3 个基因在番茄花序发育过程中的重要调控作用 (Xu et al., 2016)。而番茄 *SP5G* 基因的定点敲除突变体揭示了该基因在长日照条件下具有抑制番茄开花的功能 (Soyk et al., 2017)。在马铃薯中,以 *StIAA2* 为靶标基因,通过 CRISPR/Cas9 在单双倍 DM 中实现了对该基因的定点突变,获得的 12 株转基因 T₀ 代植株中,有 5 株转基因后代中 *StIAA2* 基因编码区存在纯合、杂合或嵌合的碱基缺失,缺失长度 2 ~ 18 bp 不等 (Wang et al., 2015)。利用 CRISPR/Cas9 在四倍体马铃薯 Desiree 中对 *StMYB44* 基因进行了定点敲除,证实了 *StMYB44* 可以通过抑制靶基因 *StPHO1* 的转录来负调控对磷的转运 (Zhou et al., 2017)。

近两年,CRISPR/Cas9 技术已经被用于多种园艺作物重要性状的改良。在二倍体马铃薯材料 MSX914-10 和四倍体马铃薯品种 Desiree 中利用 CRISPR/Cas9 技术实现了对除草剂敏感基因 *ALS1* 的定点敲除,突变率分别达到了 55% 和 60%,所获得的突变体表现出较强的除草剂抗性 (Butler et al., 2015)。利用 CRISPR/Cas9 技术,通过转化葡萄品种 Chardonnay 的悬浮细胞,所获得的 3 株葡萄转

基因植株中, L-idonate 脱氢酶基因 *IdnDH* 被定向敲除, 实现了对葡萄中酒石酸合成的调控, 对于改良葡萄酒的品质具有重要意义 (Ren et al., 2016)。在铁皮石斛中, 利用该技术分别敲除木质纤维素合成通路中的 5 个关键基因 *C3H*、*C4H*、*4CL*、*CCR* 和 *IRX*, 所获得的转化体中这 5 个基因都发生了突变, 使中草药的口感得到了一定程度的改善 (Kui et al., 2016)。CRISPR/Cas9 介导的基因定点敲除在园艺作物抗病性改良中也发挥着重要作用。通过对柑橘溃疡病感病基因 *CsLOB1* 在葡萄柚品种 Duncan 中的定点敲除, 共获得了 6 株 T_0 代转基因植株, 其突变效率从 10.64% 到 76.20% 不等。通过对这些突变的转基因植株进行抗病性试验发现, 其中 4 株转基因植株的感病程度与野生型相比均有不同程度的减轻 (Jia et al., 2017)。

除了基因定点敲除外, 基于同源修复的基因替换和插入在园艺作物中也同样获得了成功。番茄的 *ANTI* 基因是花青素合成通路中的一个关键基因, 其过量表达可导致花青素大量积累从而使植株呈现紫色。研究人员构建了靶位点位于番茄 *ANTI* 基因启动子区的 CRISPR 系统, 通过双生病毒的复制元件将含有 35S 启动子的模板 DNA 在番茄体内大量复制, 之后通过同源修复机制将 35S 启动子插入到 *ANTI* 基因编码区之前, 使 *ANTI* 基因在番茄中过量表达, 在 216 个转化体中, 有 19 个转化体表现出了 *ANTI* 基因过表达所导致的紫色表型 (Cermak et al., 2015)。在马铃薯中通过同源重组也实现了对 *ALSI* 基因的替换突变。*ALSI* 是除草剂咪唑甲氧甲基烟酸的敏感基因, 其失活后可使植物对除草剂产生抗性。该研究通过构建具有两个氨基酸突变的 *ALSI* 基因片段 (W563L 和 S642T), 利用双生病毒的复制元件将 DNA 模板大量复制, 在 8 株马铃薯转基因阳性植株中, 有 1 株植株的 *ALSI* 基因片段被成功替换为突变型序列, 该植株表现出对除草剂的明显抗性 (Butler et al., 2016)。

4 展望

基因编辑技术作为基因组编辑的有力工具, 能够通过基因突变改良作物性状, 也可以通过外源基因的定点插入, 实现对作物显性性状如植物抗病性等的改善。利用该技术对作物性状进行改良, 其转基因后代不需要进行大规模的基因型与表型筛选, 与常规育种相比, 可以极大地节省时间和成本。该技术所展现的良好的靶向性, 也为解决常规育种中因连锁累赘所造成的不良性状等问题提供了可靠的分子改良工具。由于基因编辑所造成的靶基因位点的改变通常与带有核酸酶的转化载体整合到基因组的位点不连锁, 因此通过后代自交分离可获得没有转基因痕迹的遗传材料。基于这些优点, 基因编辑技术已经在作物基因功能研究和性状改良等方面发挥着重要的作用。

对于园艺作物而言, 由于种类繁多, 在不同园艺作物中建立高效的基因编辑体系还需要大量的实践探索。目前只有能够进行转基因的作物才可以利用基因编辑对其基因功能进行研究或对性状进行改良, 很多园艺作物不能够进行转基因, 极大地制约了基因编辑系统在这些作物中的应用。建立和完善不同园艺作物中转基因技术体系, 努力探索不依赖于转基因的高效基因编辑系统是园艺作物中基因编辑技术广泛应用的前提。尽管国际上对于基因编辑产生的植物新品种是否为遗传修饰生物体 (genetically modified organism, GMO) 还存在争议, 但就其所造成的突变来说, 通过自交分离, 与自然和化学诱变的所获得的材料并没有区别。但是园艺作物非常复杂, 一些园艺作物具有自交不亲和的特性, 还有一些多年生园艺作物童期很长, 这些作物都难以通过自交对转基因插入进行快速分离。因此如何高效快速获得没有转基因痕迹的后代, 将是在多种园艺作物中利用基因编辑进行性状改良的关键。目前通过体外组装的 Cas9 蛋白与 sgRNA 的复合体转化原生质体可以在多种植物中实现在特定位点的 DNA 序列的插入和缺失, 如在葡萄和苹果中实现了对白粉病感病基因 *MLO-7* 和

火疫病感病基因 *DIPM-1*、*DIPM-2*、*DIPM-4* 的敲除 (Malnoy et al., 2016)。因此在不同园艺作物中利用原生质体转化实现对基因的定点突变然后再生成突变植株的方法是解决这些问题的一种思路。但是目前如何筛选靶基因被成功敲除的原生质体并使之再生出植株, 对多数园艺作物来说仍是一个比较难以解决的问题。

虽然基因编辑技术在园艺作物中的应用还有很多问题需要解决, 但基因编辑技术本身的易用性及在性状改良中所表现出的良好的靶向性, 一定会成为未来园艺作物基因功能研究和分子育种中不可或缺的重要工具, 并在园艺作物性状改良中发挥重要作用。

References

- Baltes N J, Gil-Humanes J, Cermak T, Atkins P A, Voytas D F. 2014. DNA replicons for plant genome engineering. *Plant Cell*, 26: 151 - 163.
- Bibikova M, Beumer K, Trautman J K, Carroll D. 2003. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science*, 300: 764.
- Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U. 2009. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 326: 1509 - 1512.
- Brooks C, Nekrasov V, Lippman Z B, van Eck J. 2014. Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. *Plant Physiol*, 166: 1292 - 1297.
- Butler N M, Atkins P A, Voytas D F, Douches D S. 2015. Generation and inheritance of targeted mutations in potato (*Solanum tuberosum* L.) using the CRISPR/Cas system. *PLoS ONE*, 10: e0144591.
- Butler N M, Baltes N J, Voytas D F, Douches D S. 2016. Geminivirus-mediated genome editing in potato (*Solanum tuberosum* L.) using sequence-specific nucleases. *Front Plant Sci*, 7: 1045.
- Cermak T, Baltes N J, Cegan R, Zhang Y, Voytas D F. 2015. High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biol*, 16: 232.
- Cermak T, Doyle E L, Christian M, Wang L, Zhang Y, Schmidt C, Baller J A, Somia N V, Bogdanove A J, Voytas D F. 2011. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res*, 39: e82.
- Cheng Xi, Wang Wen-yi, Qiu Jin-long. 2015. Genome editing: the opportunities and challenges for plant biotechnology. *Biotechnology Bulletin*, 31 (4): 25 - 33. (in Chinese)
- 程曦, 王文义, 邱金龙. 2015. 基因组编辑: 植物生物技术的机遇与挑战. *生物技术通报*, 31 (4): 25 - 33.
- Curtin S J, Zhang F, Sander J D, Haun W J, Starker C, Baltes N J, Reyon D, Dahlborg E J, Goodwin M J, Coffman A P, Dobbs D, Joung J K, Voytas D F, Stupar R M. 2011. Targeted mutagenesis of duplicated genes in soybean with zinc-finger nucleases. *Plant Physiol*, 156: 466 - 473.
- Deng D, Yan C, Pan X, Mahfouz M, Wang J, Zhu J K, Shi Y, Yan N. 2012. Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science*, 335: 720 - 723.
- Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. 2012. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 2579 - 2586.
- Godde J S, Bickerton A. 2006. The repetitive DNA elements called CRISPRs and their associated genes: evidence of horizontal transfer among prokaryotes. *J Mol Evol*, 62: 718 - 729.
- Haun W, Coffman A, Clasen B M, Demorest Z L, Lowy A, Ray E, Retterath A, Stoddard T, Juillerat A, Cedrone F, Mathis L, Voytas D F, Zhang F. 2014. Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. *Plant Biotechnol J*, 12: 934 - 940.
- Jia H, Zhang Y, Orbovic V, Xu J, White F F, Jones J B, Wang N. 2017. Genome editing of the disease susceptibility gene *CsLOB1* in citrus confers resistance to citrus canker. *Plant Biotechnol J*, 15: 817 - 823.
- Jiang W, Zhou H, Bi H, Fromm M, Yang B, Weeks D P. 2013. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res*, 41: e188.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna J A, Charpentier E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in

- adaptive bacterial immunity. *Science*, 337: 816 – 821.
- Kim H, Kim S T, Ryu J, Kang B C, Kim J S, Kim S G. 2017. CRISPR/Cpf1-mediated DNA-free plant genome editing. *Nat Commun*, 8: 14406.
- Kim Y G, Cha J, Chandrasegaran S. 1996. Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 1156 – 1160.
- Komor A C, Kim Y B, Packer M S, Zuris J A, Liu D R. 2016. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 533: 420 – 424.
- Kui L, Chen H, Zhang W, He S, Xiong Z, Zhang Y, Yan L, Zhong C, He F, Chen J, Zeng P, Zhang G, Yang S, Dong Y, Wang W, Cai J. 2016. Building a genetic manipulation tool box for orchid biology: identification of constitutive promoters and application of CRISPR/Cas9 in the orchid, *Dendrobium officinale*. *Front Plant Sci*, 7: 2036.
- Li J, Meng X, Zong Y, Chen K, Zhang H, Liu J, Li J, Gao C. 2016. Gene replacements and insertions in rice by intron targeting using CRISPR-Cas9. *Nat Plants*, 2: 16139.
- Li Jun, Zhang Yi, Chen Kun-ling, Shan Qi-wei, Wang Yan-peng, Liang Zhen, Gao Cai-xia. 2013. CRISPR/Cas: a novel way of RNA-guided genome editing. *Hereditas (Beijing)*, 35 (11): 1265 – 1273. (in Chinese)
- 李 君, 张 毅, 陈坤玲, 单奇伟, 王延鹏, 梁 振, 高彩霞. 2013. CRISPR/Cas 系统: RNA 靶向的基因组定向编辑新技术. *遗传*, 35 (11): 1265 – 1273.
- Li J F, Norville J E, Aach J, McCormack M, Zhang D, Bush J, Church G M, Sheen J. 2013. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol*, 31: 688 – 691.
- Li T, Liu B, Spalding M H, Weeks D P, Yang B. 2012. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nat Biotechnol*, 30: 390 – 392.
- Liang Z, Chen K, Li T, Zhang Y, Wang Y, Zhao Q, Liu J, Zhang H, Liu C, Ran Y, Gao C. 2017. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun*, 8: 14261.
- Liang Z, Zhang K, Chen K, Gao C. 2014. Targeted mutagenesis in zea mays using TALENs and the CRISPR/Cas system. *J Genet Genomics*, 41: 63 – 68.
- Lloyd A, Plaisier C L, Carroll D, Drews G N. 2005. Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 2232 – 2237.
- Lor V S, Starker C G, Voytas D F, Weiss D, Olszewski N E. 2014. Targeted mutagenesis of the tomato PROCERA gene using transcription activator-like effector nucleases. *Plant Physiol*, 166: 1288 – 1291.
- Mahfouz M M, Li L, Shamimuzzaman M, Wibowo A, Fang X, Zhu J K. 2011. De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 2623 – 2628.
- Malnoy M, Viola R, Jung M H, Koo O J, Kim S, Kim J S, Velasco R, Nagamangala Kanchiswamy C. 2016. DNA-free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. *Front Plant Sci*, 7: 1904.
- Mao Y, Zhang H, Xu N, Zhang B, Gou F, Zhu J K. 2013. Application of the CRISPR-Cas system for efficient genome engineering in plants. *Mol Plant*, 6: 2008 – 2011.
- Moscou M J, Bogdanove A J. 2009. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 326: 1501.
- Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, Jones J D, Kamoun S. 2013. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, 31: 691 – 693.
- Nishitani C, Hirai N, Komori S, Wada M, Okada K, Osakabe K, Yamamoto T, Osakabe Y. 2016. Efficient genome editing in apple using a CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*, 6: 31481.
- Plosky B S. 2016. CRISPR-mediated base editing without DNA double-strand breaks. *Mol Cell*, 62: 477 – 478.
- Ren C, Liu X, Zhang Z, Wang Y, Duan W, Li S, Liang Z. 2016. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Sci Rep*, 6: 32289.
- Sapranaukas R, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. 2011. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system

- provides immunity in *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res, 39: 9275 - 9282.
- Shan Q, Wang Y, Chen K, Liang Z, Li J, Zhang Y, Zhang K, Liu J, Voytas D F, Zheng X, Zhang Y, Gao C. 2013a. Rapid and efficient gene modification in rice and *Brachypodium* using TALENs. Mol Plant, 6: 1365 - 1368.
- Shan Q, Wang Y, Li J, Zhang Y, Chen K, Liang Z, Zhang K, Liu J, Xi J J, Qiu J L, Gao C. 2013b. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. Nat Biotechnol, 31: 686 - 688.
- Shukla V K, Doyon Y, Miller J C, DeKolver R C, Moehle E A, Worden S E, Mitchell J C, Arnold N L, Gopalan S, Meng X, Choi V M, Rock J M, Wu Y Y, Katibah G E, Zhifang G, McCaskill D, Simpson M A, Blakeslee B, Greenwalt S A, Butler H J, Hinkley S J, Zhang L, Rebar E J, Gregory P D, Urnov F D. 2009. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. Nature, 459: 437 - 441.
- Sorek R, Lawrence C M, Wiedenheft B. 2013. CRISPR-mediated adaptive immune systems in bacteria and archaea. Annu Rev Biochem, 82: 237 - 266.
- Soyk S, Muller N A, Park S J, Schmalenbach I, Jiang K, Hayama R, Zhang L, Van Eck J, Jimenez-Gomez J M, Lippman Z B. 2017. Variation in the flowering gene SELF PRUNING 5G promotes day-neutrality and early yield in tomato. Nat Genet, 49: 162 - 168.
- Symington L S, Gautier J. 2011. Double-strand break end resection and repair pathway choice. Annu Rev Genet, 45: 247 - 271.
- Tian S, Jiang L, Gao Q, Zhang J, Zong M, Zhang H, Ren Y, Guo S, Gong G, Liu F, Xu Y. 2017. Efficient CRISPR/Cas9-based gene knockout in watermelon. Plant Cell Rep, 36: 399 - 406.
- Townsend J A, Wright D A, Winfrey R J, Fu F, Maeder M L, Joung J K, Voytas D F. 2009. High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. Nature, 459: 442 - 445.
- Wang S, Zhang S, Wang W, Xiong X, Meng F, Cui X. 2015. Efficient targeted mutagenesis in potato by the CRISPR/Cas9 system. Plant Cell Rep, 34: 1473 - 1476.
- Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, Qiu J L. 2014. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. Nat Biotechnol, 32: 947 - 951.
- Xie K, Minkenberg B, Yang Y. 2015. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. Proc Natl Acad Sci U S A, 112: 3570 - 3575.
- Xing H L, Dong L, Wang Z P, Zhang H Y, Han C Y, Liu B, Wang X C, Chen Q J. 2014. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. BMC Plant Biol, 14: 327.
- Xu C, Liberatore K L, MacAlister C A, Huang Z, Chu Y H, Jiang K, Brooks C, Ogawa-Ohnishi M, Xiong G, Pauly M, Van Eck J, Matsubayashi Y, van der Knaap E, Lippman Z B. 2015. A cascade of arabinosyltransferases controls shoot meristem size in tomato. Nat Genet, 47: 784 - 792.
- Xu C, Park S J, Van Eck J, Lippman Z B. 2016. Control of inflorescence architecture in tomato by BTB/POZ transcriptional regulators. Genes Dev, 30: 2048 - 2061.
- Yan Fang, Zhou Huan-bin. 2016. Overviews and applications of the CRISPR/Cas9 system in plant functional genomics and creation of new plant germplasm. Sci Sin Vitae, 46 (5): 498 - 513. (in Chinese)
- 严芳, 周焕斌. 2016. CRISPR/Cas9 技术在植物基因功能研究和新种质创制中的应用与展望. 中国科学: 生命科学, 46 (5): 498 - 513.
- Zetsche B, Gootenberg J S, Abudayyeh O O, Slaymaker I M, Makarova K S, Essletzbichler P, Volz S E, Joung J, van der Oost J, Regev A, Koonin E V, Zhang F. 2015. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. Cell, 163: 759 - 771.
- Zhang B, Yang X, Yang C, Li M, Guo Y. 2016. Exploiting the CRISPR/Cas9 system for targeted genome mutagenesis in petunia. Sci Rep, 6: 20315.
- Zhang Y, Zhang F, Li X, Baller J A, Qi Y, Starker C G, Bogdanove A J, Voytas D F. 2013. Transcription activator-like effector nucleases enable efficient plant genome engineering. Plant Physiol, 161, 20 - 27.
- Zhou X, Zha M, Huang J, Li L, Imran M, Zhang C. 2017. StMYB44 negatively regulates phosphate transport by suppressing expression of PHOSPHATE1 in potato. J Exp Bot, 68, 1265 - 1281.
- Zong Y, Wang Y, Li C, Zhang R, Chen K, Ran Y, Qiu J L, Wang D, Gao C. 2017. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. Nat Biotechnol, 35: 438 - 440.