

## 香蕉 CRISPR/Cas9 基因编辑技术体系的建立

胡春华, 邓贵明, 孙晓玄, 左存武, 李春雨, 邝瑞彬, 杨乔松, 易干军

(广东省农业科学院果树研究所/农业部南亚热带果树生物学和种质资源利用重点实验室, 广州 510640)

**摘要:** 【目的】建立香蕉 CRISPR/Cas9 基因编辑技术体系, 为在香蕉上利用 CRISPR/CAS9 技术开展香蕉基因功能研究和香蕉育种工作开辟新的路径。【方法】根据香蕉 A 基因组八氢番茄红素脱氢酶 (phytoene dehydrogenase, PDS) 基因组序列, 利用在线工具 ZiFiT Targeter Version 4.2 确定合适的 CRISPR/Cas9 靶标序列, 选择其中一个位点作为靶标位点, 设计包含靶标基因 *MaPDS* 序列的 sgRNA。利用一套改良的 CRISPR/Cas9 多靶点载体系统, 以 pYLgRNA-*LacZ*-U6a 质粒为模版, Overlapping PCR 法构建 U6a-sgRNA 表达盒, 再利用 Golden Gate Cloning 法将 U6a-sgRNA 表达盒克隆到 pYLCRISPR/Cas9 载体中, 构建以 *MaPDS* 为靶标基因的 pYLCRISPR/Cas9-sgRNA 载体。构建的质粒含 *Cas9p* 和 sgRNA 表达盒, 其中 *Cas9p* 由  $P_{\text{ubi}}$  启动子驱动, sgRNA 由水稻来源的 RNA 启动子 U6a 驱动。将构建好的载体转入农杆菌 EHA105, 转化香蕉主栽品种巴西蕉胚性细胞悬浮系, 获得抗性再生植株。设计 PCR 引物扩增包含靶标序列的 *MaPDS* 序列片段, 检测和分析再生植株 *MaPDS* 被编辑的情况。【结果】试验选择 *MaPDS* 作为 CRISPR/Cas9 靶标基因, 设计一个靶标位点, 利用 Overlapping PCR 法获得了 U6a-sgRNA 表达盒, 利用 Golden Gate Cloning 法将其克隆到 pYLCRISPR/Cas9 的 *Bsa* I 位点, 成功构建了针对 *MaPDS* 的 pYLCRISPR/Cas9-sgRNA 载体。经过农杆菌浸染、抗性筛选、抗性胚诱导、萌发及生根, 最终获得抗性独立转化株系 129 个。其中, 71 个株系出现白化表型, 产生白化表型的几率达 55%。失绿突变体的出现意味着 *MaPDS* 蛋白功能丧失。随机取转化株系中的白化表型株系 33 个和正常表型株系 14 个, 提取其叶片基因组 DNA, 扩增含有 *MaPDS* 的靶位点片段, 序列分析结果表明, 白化表型株系的 *MaPDS* 靶位点序列发生了基因编辑。主要是在靶位点附近增加 1 个碱基 T 或 A, 或是在靶位点附近或下游发生碱基颠换或转换, 出现非靶标位点突变。这些突变形式均能导致 *MaPDS* 蛋白翻译错误, 从而使 *MaPDS* 蛋白丧失功能, 表现为白化。转化株系中表型正常植株的 *MaPDS* 靶位点序列与野生型一致, 未检测到变异。【结论】成功在香蕉体内实现了对内源 *MaPDS* 的定点敲除, 获得了基因定点敲除的突变体株系, 为进一步利用基因编辑技术在香蕉上的应用奠定了基础。

**关键词:** 香蕉; CRISPR/Cas9; *MaPDS*; 基因编辑

## Establishment of an Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Gene Editing System in Banana

HU ChunHua, DENG GuiMing, SUN XiaoXuan, ZUO CunWu, LI ChunYu, KUANG RuiBin,  
YANG QiaoSong, YI GanJun

(Fruit Tree Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Science/Key Laboratory of Biology and Genetic Resource Utilization of Fruit Trees in South Subtropics, the Ministry of Agriculture, Guangzhou 510640)

**Abstract:** 【Objective】 The objective of this study is to establish a CRISPR/Cas9-mediated gene editing system in order to find a new way for revealing gene function and breeding of banana. 【Method】 According to the *Musa* genomic (A genome) sequence of phytoene desaturase gene 8 (*MaPDS*), online tools ZiFiT Targeter Version 4.2 was used to determine the appropriate

收稿日期: 2016-11-08; 接受日期: 2017-01-06

基金项目: 农业部“948”项目(2016-X22)、广州市科技计划项目(201707010154)、国家香蕉产业体系(CARS-32-01)、广东省科技计划项目(2014B070706018, 2015A030302046)、农业部物质资源保护项目(16RZZY-13)

联系方式: 胡春华, Tel: 13660062169; E-mail: huchunhua007@126.com. 通信作者易干军, Tel: 020-87596278; E-mail: yiganjun@vip.163.com

designing of CRISPR/Cas9 target sites, one of the output target sites was selected for designing the sgRNA. The sgRNA and U6a promoter sequences were linked by overlapping PCR to produce U6a-sgRNA expression cassette, then the fragment was cloned into the binary pYLCRISPR/Cas9 multiplex genome targeting vector system based on Golden Gate Cloning, a pYLCRISPR/Cas9 vector carrying sgRNA cassette named pYLCRISPR/Cas9-sgRNA was generated. The plant expression binary vector, containing a *Cas9* (*Cas9p*) expression cassette, driven by the maize ubiquitin promoter (*Pubi*), and the sgRNA with target sequence of *MaPDS* was transcribed under the control of the U6a promoter from rice. The constructed plasmid was then transformed into EHA105 strain of *Agrobacterium tumefaciens*, which was subsequently used to infect embryogenic cell suspensions (ECS) of banana to obtain resistant plantlets. PCR amplifications were carried out using primer pairs flanking the designed target site. The PCR products were sequenced for detection of mutation. **【Result】** *MaPDS* was selected as the target of Cas9 endonuclease, and a sgRNA was designed as the target site for CRISPR/Cas9. The sgRNA with target sequence was firstly inserted into the sgRNA expression cassette by using overlapping PCR, then the cassette was combined with the pYLCRISPR/Cas9 in a single plant binary vector. The results of identification by enzyme digestion and sequencing showed that the pYLCRISPR/Cas9-sgRNA vector aiming at *MaPDS* was successfully constructed, and the vector harbors a *Cas9* expression cassette driven by *Pubi*, and a sgRNA expression cassette under the U6a promoter. Using this system and *Agrobacterium*-mediated transformation, 129 independently transformed lines with visible albino, chimerism mutant phenotypes and normal phenotypes were regenerated from ECS after transformation, resistance screening, resistant embryo induction, germination and rooting process. The ratio of albino and chimerism phenotype occurred in transgenic banana was more than 55% (71 out of 129). Albino phenotype in these transgenic plants indicates the loss of PtoPDS function. To further verify whether the loss of green in the transgenic banana was caused by generation of mutations in the *MaPDS* by the CRISPR/Cas9 system, 33 mutant phenotypes and 14 normal phenotypes from 129 independent transgenic plants were randomly selected for sequencing. The results confirmed that all of these transgenic plants with albino phenotype contained mutants in the *MaPDS*, insertion (a “A” or “T”) and displacement were found in the target sites of *MaPDS* in the mutants. And it was also found the displacement in downstream of the target sites of *MaPDS* in the experiments, no mutation was detected in the normal phenotypes of transgenic and control plants. **【Conclusion】** The CRISPR/Cas9 system was successfully applied to knock out the endogenous phytoene dehydrogenase (PDS) gene in banana. The results demonstrate that the Cas9/sgRNA system can be exploited to targeted mutagenesis and effectively create knockout mutations in banana.

**Key words:** banana; CRISPR/Cas9; *MaPDS*; gene editing

## 0 引言

**【研究意义】**香蕉 (*Musa spp.*) 是一种重要的热带水果和粮食作物。近年来, 随着病虫害对香蕉产业威胁的加剧, 迫切需要培育新的抗性品种, 因此, 了解香蕉基因组信息及其功能成为重要前提。香蕉 A 基因组序列测定的完成, 为香蕉基因组改造提供了至关重要的基础<sup>[1]</sup>, 对香蕉基因功能的研究起到了极大的推动作用。但香蕉多为三倍体, 高度不育, 基因功能的研究存在诸多技术困难。新的技术手段如 CRISPR/Cas9 基因编辑技术体系的快速发展, 为开展香蕉基因功能研究和香蕉育种工作开辟了一条新的路径, 在香蕉上建立 CRISPR/Cas9 技术体系, 实现高效的香蕉基因突变, 对香蕉的遗传改良研究具有重要意义。**【前人研究进展】**基因组编辑技术是新近发展起来的对基因组进行定向精确修饰的一种技术, 主要包括人工核酸酶介导的锌指核酸酶 (zinc-finger nucleases, ZFN)<sup>[2]</sup>、转录激活样效应因子核酸酶 (transcription

activator-like effector nucleases, TALEN)<sup>[3]</sup>及 RNA 引导的 CRISPR/Cas 核酸酶 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR) 技术<sup>[4]</sup>。基因组编辑技术在基础研究和作物遗传改良等方面展示出了巨大的潜力, 其中最新发展起来的 CRISPR/Cas9 技术, 有着其他基因编辑技术无可比拟的优势, 该系统只需设计和目标核酸对应的 RNA 序列, 操作手段简单, 效率高, 成本低, 为基因组编辑提供了新的平台<sup>[4]</sup>。目前, CRISPR/Cas9 系统作为一种高效的基因定点编辑技术, 已成功应用于拟南芥<sup>[5]</sup>、水稻<sup>[4,6-10]</sup>、玉米<sup>[11-12]</sup>、小麦<sup>[13]</sup>、大豆<sup>[14-15]</sup>、烟草<sup>[16-18]</sup>以及杨树<sup>[19-20]</sup>等植物, 实现了基因组编辑。**【本研究切入点】**目前, 尚未有 CRISPR/Cas9 技术在果树上的报道。本研究拟以 CRISPR/Cas9 技术为切入点, 以香蕉主栽品种为研究对象, 利用一套改良的 CRISPR/Cas9 多靶点载体系统<sup>[21]</sup>, 在香蕉体内同时表达 Cas9 蛋白和针对八氢番茄红素脱氢酶 (phytoene dehydrogenase, PDS) 基因的 sgRNA, 在香蕉体内实现对内源基因的高效定点

敲除。【拟解决的关键问题】建立香蕉 CRISPR/Cas9 基因编辑技术体系, 获得突变体香蕉株系。为进一步利用基因编辑技术在香蕉遗传改良上的应用奠定基础。

## 1 材料与方法

试验于 2015 年在广东省农业科学院果树研究所进行。

### 1.1 试验材料

香蕉品种巴西蕉 (*Musa spp.* AAA Cavendish group cv 'Boxi') 胚性细胞悬浮系为 HU 等<sup>[22]</sup>通过雄花序途径诱导获得。胚性悬浮细胞系继代保持在 M2 液体培养基中<sup>[23]</sup>, 27°C 黑暗培养, 每 2 个星期继代一次。根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 EHA105 由本实验室保存。pYLCRISPR/Cas9-DH 植物表达载体系统由华南农业大学刘耀光教授惠赠。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 Cas9 靶点设计及 pYLCRISPR/Cas9-gRNA 植物表达载体构建** 根据香蕉 A 基因组八氢番茄红素脱氢酶 (phytoene dehydrogenase, PDS) 基因组序列 (JQ762260.1), 利用在线工具 ZiFiT Targeter Version 4.2<sup>[24]</sup> 选择合适的 Cas9 靶点序列 T1: cctctgaaggtgtcatagc, 依据靶位点及 sgRNA 构建方法设计原则来设计引物: U-F: ctccgttttacctgtggaatcg; U6aTpds1-: gctatgacaacctcagagggcggcagccaagccagca; gRTpds1+: cctctgaaggtgtcatagcgttttagagctagaaat; gR-R: cggaggaaaattccatccac。以 pYLgRNA-LacZ-U6a 质粒<sup>[21]</sup> 为模版, 利用 Overlapping PCR 往 sgRNA 表达盒导入靶序列, 在一个反应中使用 4 种引物: U-F 和 gRTpds1+ 各 0.2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , U6aTpds1- 和 gR-R 各 0.1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。25 个循环: 94°C 10 s, 58°C 15 s, 68°C 20 s。本 sgRNA 由水稻来源的 RNA 启动子 U6a 驱动, 二元载体 pYLCRISPR/Cas9-DH 与 sgRNA 表达盒载体采用 Golden Gate Cloning 方法<sup>[21]</sup> 构建。构建好的 pYLCRISPR/Cas9-gRNA 质粒经测序验证正确后转入农杆菌 EHA105 中。

**1.2.2 香蕉遗传转化** 采用农杆菌介导法转化巴西蕉性细胞悬浮系, 香蕉的遗传转化参照刘凯等<sup>[23]</sup>的方法进行。以未转化巴西蕉的胚性细胞悬浮系再生植株为对照。

**1.2.3 转基因香蕉检测** 取再生香蕉苗叶片, 采用 CTAB 法提取对照和抗性再生香蕉苗叶片基因组 DNA。为确认外源 DNA 是否插入至香蕉基因

组中, 根据潮霉素 (hygromycin B) 抗性基因序列设计特异性引物: 5'-gacgattgcgctgcacgcac-3'; 5'-gtcc tgcgggtaaatagctg-3', PCR 扩增片段长度为 740 bp。确认外源 DNA 片段插入到香蕉基因组后, 为了检测目标基因是否发生突变, 设计包含香蕉内源 *MaPDS* 靶点序列在内的 PCR 引物。PCR 引物如下: PDS1F: 5'-caagaagccaagacatggtgc-3'; PDST1R: 5'-ggacatctct agcctccaagac-3'。扩增长度大约为 550 bp, PCR 扩增产物经胶回收后连接到 pMD19-T (宝生物工程 (大连) 有限公司) 载体上, 挑选单克隆进行测序, 并对测序结果进行分析。

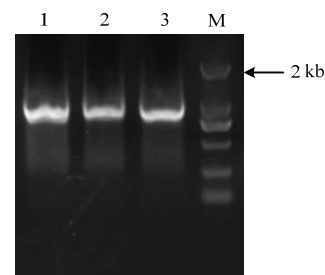
## 2 结果

### 2.1 pYLCRISPR/Cas9-gRNA 植物表达载体构建

以 pYLgRNA-LacZ-U6a 质粒为模版, 用 Overlapping PCR 法获得大小约 830 bp 的条带, 与预期大小相符 (图 1), 回收 PCR 产物, 利用 Golden Gate Cloning 方法将其克隆到 pYLCRISPR/Cas9 的 *Bsa* I 位点, 用 *Mlu* I 酶切进行鉴定, 切出预期大小的目的片段 (图 2)。构建好的质粒最后经测序验证完全正确, 说明 pYLCRISPR/Cas9-gRNA 敲除载体构建成功。构建好的质粒含 *Cas9p* 和 gRNA 表达盒, 其中 *Cas9p* 由  $P_{\text{Ubi}}$  启动子驱动, sgRNA 由水稻来源的 RNA 启动子 U6a 驱动, 植物筛选以抗生素为潮霉素, 图谱如图 3。将构建好的质粒利用冻融法转入至根癌农杆菌菌株 EHA105。

### 2.2 转 *MaPDS* 基因敲除香蕉的获得

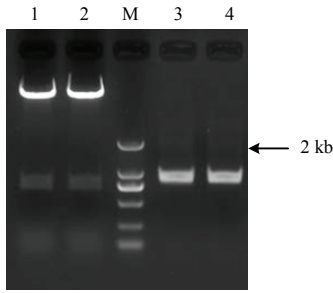
采用农杆菌介导法进行 pYLCRISPR/Cas9-gRNA 转化巴西香蕉胚性细胞悬浮系, 共进行 6 次遗传转化。巴西香蕉胚性细胞悬浮细胞经侵染、筛选、抗性胚诱



1—3: gRNA PCR 扩增; M: DL 2000 DNA marker  
1-3: PCR products of gRNA; M: 2000 bp DNA marker

图 1 gRNA Overlapping PCR 扩增片段的电泳检测

Fig. 1 PCR of the gRNA with the specific primers



1—2: pYLCRISPR/Cas9-gRNAM *Mlu* I酶切; M: DL 2000 DNA marker; 3—4: gRNA PCR 产物  
 1-2: plasmid restricted by *Mlu* I; M: 2000 bp DNA marker; 3-4: gRNA PCR products

图 2 pYLCRISPR/Cas9-gRNA 酶切鉴定

Fig. 2 Identification of pYLCRISPR/Cas9-gRNA plasmid with *Mlu* I digestion

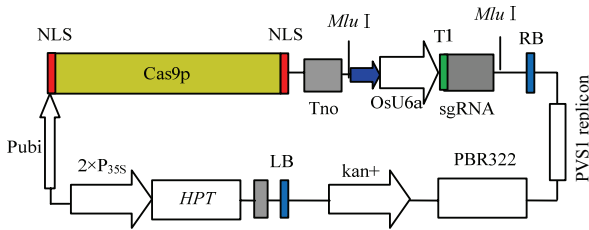


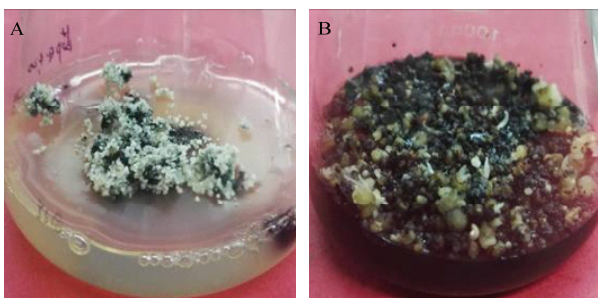
图 3 pYLCRISPR/Cas9-gRNA 载体图谱

Fig. 3 Construction of the pYLCRISPR/Cas9-gRNA vector

导、萌发和生根等过程 (图 4), 获得 129 个抗性株系。

2.3 pYLCRISPR/Cas9-gRNA 转基因香蕉的检测

通过构建 *MaPDS* 的 pYLCRISPR/Cas9-gRNA 敲

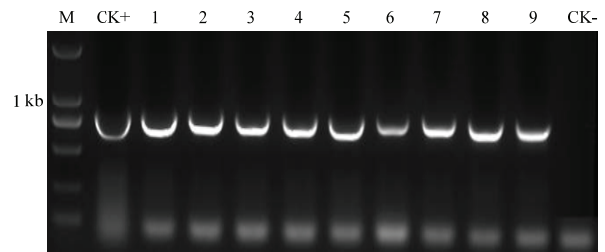


A: 成熟抗性胚; B: 抗性胚萌发  
 A: Mature resistance embryos; B: Germination of resistance embryos

图 4 转基因香蕉的再生

Fig. 4 Somatic embryos germination and regeneration

除载体和对巴西蕉胚性细胞的遗传转化, 获得了具有潮霉素抗性的阳性转化苗。为检测外源基因是否整合至香蕉基因组中, 任取阳性再生苗白化型和正常表型各 15 个株系, 以未转化的经过相同再生过程获得的再生植株为对照, 提取再生香蕉叶片基因组 DNA, 以潮霉素抗性基因为检测基因, 进行 PCR 扩增, 以检测外源插入 DNA 片段。电泳结果如图 5 所示, 表明阳性材料的叶片 DNA 均扩增出大小为 740 bp 目的片段, 未转化香蕉则无, 初步表明在抗性培养基上生长的香蕉苗, 其基因组内均插入敲除载体序列, 即 *MaPDS* 敲除载体已成功转入到香蕉植株中。



M: DL 2000 DNA marker; CK+: PCR product of pYLCRISPR/Cas9-gRNA; 1—9: 转基因植株的 PCR 扩增 CK-: 非转基因植株的 PCR 扩增  
 M: 2000 bp DNA marker; CK+: PCR product of pYLCRISPR/Cas9-gRNA; 1-9: PCR product of transformed plants; CK-: PCR product of non-transformed

图 5 部分转基因植株的 PCR 检测

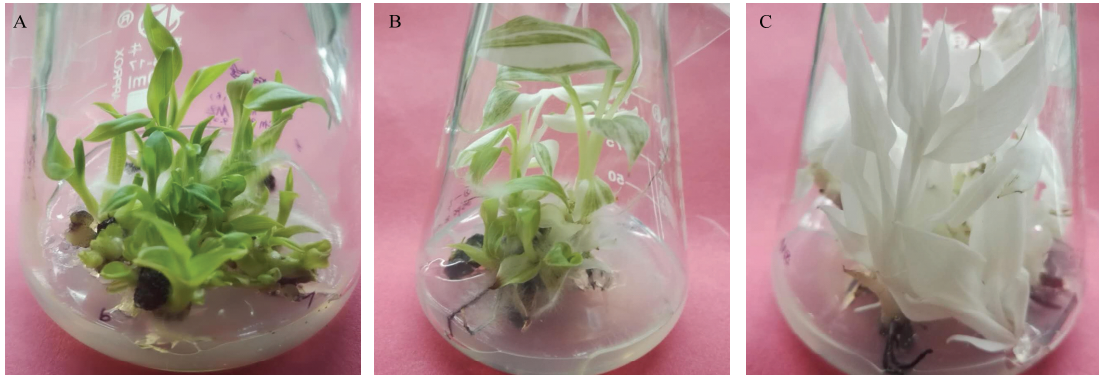
Fig. 5 PCR identification of the transgenic plants

2.4 CRISPR/Cas9 系统敲除效率分析

对获得的 129 个抗性再生组培幼苗株系分单株进行 2 代组培快繁, 统计单株表型, 发现 71 个株系出现白化表型, 白化率达到 61.2%, 其中出现花白叶嵌合体表型株系 40 个。其他 58 个株系均为正常的绿色 (图 6-A、B、C)。未经转化的对照再生后代植株中未发现白化表型的单株。

为进一步确认白化表型与 CRISPR/Cas9 相关, 在获得的 129 株抗性植株中, 任取其中的 33 个白化表型和 14 个表型正常的植株, 提取其叶片基因组 DNA, 以其为模板, 用 PDS1F 和 PDST1R 引物扩增含有 *PDS* 的靶位点片段。测序后序列比对结果表明, 在 33 株白化苗中, 所测得的 *MaPDS* 靶位点序列均出现不同形式的突变, 第 1 种是在靶位点附近增加 1 个碱基 T 或者 A, 第 2 种是在靶位点附近或下游发生碱基颠换或转换 (图 7), 出现非靶标位点突变。这 2 种突变形





A: 叶色正常的转基因香蕉苗; B: 呈花白叶嵌合体转基因香蕉苗; C: 呈白化转基因香蕉苗  
 A: Normal phenotype of the transformed plants; B: Chimerism phenotype in regenerated plants; C: Albino phenotype of the regenerated plants

图 6 转基因植株表型

Fig. 6 Phenotypes of the mutants generated from the CRISPR/Cas9 targeting

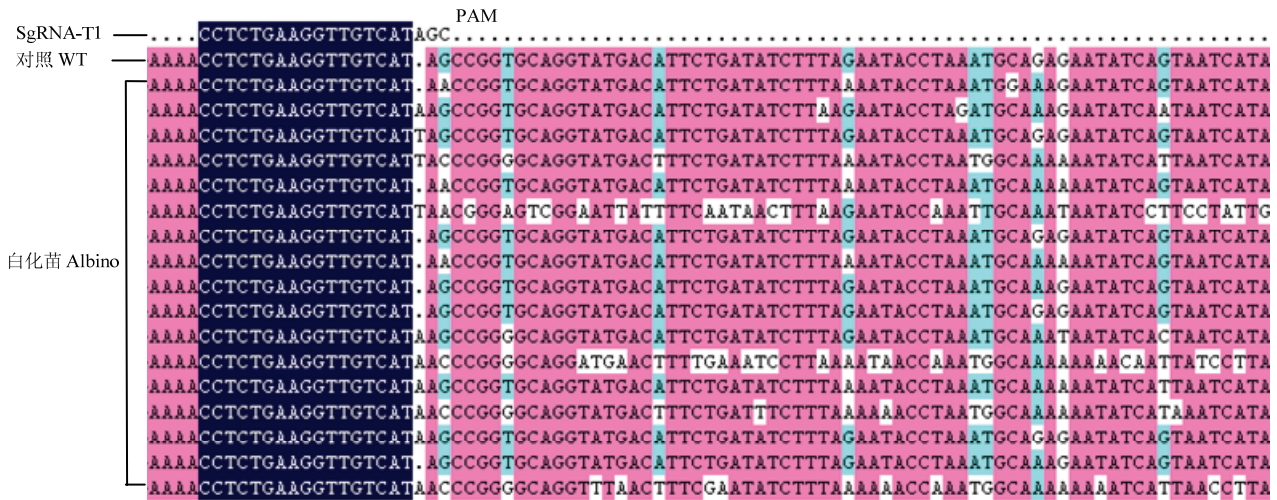


图 7 转基因香蕉突变体内源 *MuPDS* 序列分析

Fig. 7 Sequence analysis of *MuPDS* from mutation plants

式均能导致 MaPDS 蛋白翻译错误,从而使 MaPDS 蛋白丧失功能,表现为白化。对 14 个表型正常的植株检测结果表明,其 *MaPDS* 靶位点序列与野生型一致,未检测到变异。

### 3 讨论

CRISPR/Cas9 作为新近发展起来的基因编辑技术,在植物中已经有较多的关于该系统验证以及应用的报道。本研究利用一套改良的 CRISPR/Cas9 多靶点

载体系统<sup>[21]</sup>,以香蕉 *MaPDS* 作为靶标基因,成功地在香蕉体内实现了对内源基因的定点敲除,获得了 *MaPDS* 定点敲除的白化突变体株系,白化表型与已报道的类似<sup>[19-21,25-27]</sup>。CRISPR/Cas9 技术在水稻<sup>[21]</sup>、杨树<sup>[19-20]</sup>、烟草<sup>[25]</sup>、番茄<sup>[26]</sup>、苹果<sup>[27]</sup>等植物基因功能研究中,*PDS* 被选择作为靶标目的基因,均成功获得了基因定点编辑突变体。但在不同植物中编辑效率存在较大差异,这可能是由于 sgRNA 设计时,对目标 DNA 的靶位点不同而引起,或者与 sgRNA 对目标 DNA

结合力及染色体的结构、染色体的甲基化等遗传特性有关。

目前尚没有利用 CRISPR/Cas9 技术对三倍体植物进行基因编辑的报道,本研究以三倍体香蕉主栽品种巴西蕉为材料,*MaPDS* 作为 CRISPR/Cas9 编辑的靶标基因。与二倍体植物相比,靶标基因在香蕉基因组中虽然只有一个拷贝,但存在 3 个等位基因,若能利用 CRISPR/Cas9 技术对香蕉基因成功编辑获得突变体,将会为其他三倍体或多倍体植物应用该技术提供重要参考。本研究结果表明,CRISPR/Cas9 系统在香蕉体内引起的突变,主要在基因靶位点引起碱基颠换、转换、插入,从而导致目标蛋白翻译错误,使其功能丧失。获得的白化表型突变率达到 55%,突变率高于拟南芥<sup>[25]</sup>等其他植物,说明 CRISPR/Cas9 系统同样能应用于三倍体香蕉的基因编辑,在本研究中,出现了花白叶表型的嵌合体,在利用 CRISPR/Cas9 编辑的报道中,也存在这一现象<sup>[10,20-21]</sup>。对三倍体香蕉而言,可能是 *MaPDS* 3 个等位基因的其中 1 个或 2 个被编辑,转基因材料以杂合形式存在,表型上出现花白叶现象。本试验在对抗性芽快繁过程中,发现刚再生出来的表型正常的株系中,有部分株系在快繁过程中出现了白化表型的分离现象,产生该现象的可能原因是,表型正常的转基因香蕉体内存在的 Cas9 蛋白和含靶标基因片段的 sgRNA,在新芽的分化过程中,仍能对其基因组中的靶标基因进行编辑,从而产生白化表型的新芽。

脱靶现象普遍存在于 CRISPR/Cas9 系统中,本研究中,在靶位点之外同样也检测到了非靶位点的突变。由于该系统引起基因组非靶位点的突变,增加了研究结果的不确定性,要实现该技术的更广泛的应用,在未来的研究中,需要进一步改进和完善。

随着人类对多种植物基因组测序的完成,现在的生物研究已进入到功能基因组时代,突变体是功能基因组学非常重要的研究材料,因此创建突变体库是研究功能基因组的重要技术平台<sup>[28]</sup>。香蕉 A 基因组序列测定的完成,对香蕉基因功能的研究起到了极大的推动作用。但长期以来,因为缺乏突变体,又由于香蕉多为三倍体,高度不育,同时也由于香蕉的遗传转化体系还不完善,香蕉的功能基因组研

究相对落后,对香蕉基因功能的研究主要还是采用异源表达的方式,其结果的可靠性常受到质疑。本研究在前期建立的高效香蕉遗传转化技术体系的基础上<sup>[29]</sup>,率先在香蕉上建立了 CRISPR/Cas9 基因编辑技术体系,成功获得了香蕉 *MaPDS* 突变体,在此基础上选择敲除香蕉中具有重要功能的基因,建立了香蕉功能基因的突变体库,对于深入研究香蕉基因的生物学功能和其调控机理都具有重要的意义。

随着商业化转基因植物新品种的不断出现,其所带来的生物安全性问题极大地限制了作物新品种的市场推广和应用。利用 CRISPR/Cas9 技术系统,可以方便地获得靶基因突变植物材料,然后通过一代杂交或自交,将转基因成分与突变靶基因分离,从而获得无转基因成分的突变新材料,而且突变基因及其相应性状也能够像突变体一样稳定遗传。最近, WOO 等<sup>[30]</sup>将纯化的 Cas9 蛋白和 sgRNA 直接导入到拟南芥、烟草及水稻的原生质体中,并获得了相应基因编辑的再生突变体,利用该方法获得的突变体不含任何转基因成分,这为利用 CRISPR/Cas9 技术获得非转基因突变体提供了新的选择。由于香蕉高度不育,无法通过杂交或自交获得无转基因成分的突变新材料,但香蕉的原生质体再生已有成功的报道<sup>[31]</sup>,参照 WOO 等<sup>[30]</sup>的方法,同样有望获得非转基因突变体应用于生产。

## 4 结论

本研究利用一套改良的 CRISPR/Cas9 多靶点载体系统,构建了针对香蕉 *MaPDS* 的 pYLCRISPR/Cas9-gRNA 基因编辑载体。以巴西蕉的胚性细胞悬浮系为受体,利用农杆菌介导,获得了 129 个独立的抗潮霉素的抗性再生株系,其中 71 个株系出现白化表型,产生白化表型几率达 55%。被检测的白化株系的 *MaPDS* 靶位点及下游附近发生了碱基插入或碱基颠换及转换。本研究成功地在香蕉体内实现了对内源 *MaPDS* 的定点敲除,获得了基因定点敲除的突变体株系,为进一步利用基因编辑技术在香蕉上的遗传改良应用奠定了基础。

## References

- [1] D'HONT A, DENOEUDE F, AURY J M, BAURENS F C, CARREEL

- F, GARSMEUR O, NOEL B, BOCS S, DROC G, ROUARD M, *et al.* The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature*, 2012, 488(7410): 213-217.
- [2] PETOLINO J F. Genome editing in plants via designed zinc finger nucleases. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 2015, 51(1): 1-8.
- [3] LI T, LIU B, SPALDING M H, WEEKS D P, YANG B. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nature Biotechnology*, 2012, 30: 390-392.
- [4] NEKRASOV V, STASKAWICZ B, WEIGEL D, JONES J D G, KAMOUN S. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(8): 691-693.
- [5] MAO Y F, ZHANG H, XU N F, ZHANG B T, GOU F, ZHU J K. Application of the CRISPR-Cas system for efficient genome engineering in plants. *Molecular Plant*, 2013, 6(6): 2008-2011.
- [6] SHAN Q W, WANG Y P, LI J, ZHANG Y, CHEN K L, LIANG Z, ZHANG K, LIU J X, XI J J, QIU J L, GAO C X. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(8): 686-688.
- [7] MIKAMI M, TOKI S, ENDO M. Parameters affecting frequency of CRISPR/Cas9 mediated targeted mutagenesis in rice. *Plant Cell Reports*, 2015, 34(10): 1807-1815.
- [8] XU R F, LI H, QIN R Y, LI J, QIU C H, YANG Y C, MA H, LI L, WEI P C, YANG J B. Generation of inheritable and "transgene clean" targeted genome-modified rice in later generations using the CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports*, 2015, 5: 11491.
- [9] ZHOU H B, LIU B, WEEKS D P, SPALDING M H, YANG B. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(17): 10903-10914.
- [10] ENDO M, MIKAMI M, TOKI S. Multigene knockout utilizing off-target mutations of the CRISPR/Cas9 system in rice. *Plant Cell Physiology*, 2015, 56(1): 41-47.
- [11] LIANG Z, ZHANG K, CHEN K L, GAO C X. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *Journal of Genetics and Genomics*, 2014, 41(2): 63-68.
- [12] SVITASHEV S, YOUNG J K, SCHWARTZ C, GAO H, FALCO S C, CIGAN A M. Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. *Plant Physiology*, 2015, 169(2): 931-945.
- [13] UPADHYAY S K, KUMAR J, ALOK A, TULI R. RNA Guided genome editing for target gene mutations in wheat, *G3-Genes Genomes Genetics*, 2013, 3(12): 2233-2238.
- [14] LI Z S, LIU Z B, XING A Q, MOON B P, KOELLHOFFER J P, HUANG L X, WARD R T, CLIFTON E, FALCO S C, CIGAN A M. Cas9-Guide RNA directed genome editing in soybean. *Plant Physiology*, 2015, 169(2): 960-970.
- [15] SUN X J, HU Z, CHEN R, JIANG Q Y, SONG G H, ZHANG H, XI Y J. Targeted mutagenesis in soybean using the CRISPR-Cas9 system. *Scientific Reports*, 2015, 5: 10342.
- [16] NEKRASOV V, STASKAWICZ B, WEIGEL D, JONES J D G, KAMOUN S. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(8): 691-693.
- [17] JOHNSON R A, GUREVICH V, FILLER S, SAMACH A, LEVY A A. Comparative assessments of CRISPR-Cas nucleases' cleavage efficiency in plants. *Plant Molecular Biology*, 2014, 87(1): 143-156.
- [18] GAO J P, WANG G H, MA S Y, XIE X D, WU X W, ZHANG X T, WU Y Q, ZHAO P, XIA Q Y. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology*, 2015, 87(1): 99-110.
- [19] 刘婷婷, 范迪, 冉玲玉, 姜渊忠, 刘瑞, 罗克明. 应用 CRISPR/Cas9 技术在杨树中高效敲除多个靶基因. *遗传*, 2015, 37(10): 1044-1052.
- LIU T T, FAN D, RAN L Y, JIANG Y Z, LIU R, LUO K M. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of multiple genes in *Populus*. *Hereditas*, 2015, 37(10): 1044-1052. (in Chinese)
- [20] FAN D, LIU T T, LI C F, JIAO B, LI S, HOU Y S, LUO K M. Efficient CRISPR/Cas9-mediated Targeted Mutagenesis in *Populus* in the first generation. *Scientific Reports*, 2015, 5: 12217.
- [21] 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. *Molecular Plant*, 2015, 8(8): 1274-1284.
- [22] HU C H, WEI Y R, HUANG Y H, YI G J. An efficient protocol for the production of chit42 transgenic Furenzhi banana (*Musa* spp. AA group) resistant to *Fusarium oxysporum*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2013, 49: 584-592.
- [23] 刘凯, 胡春华, 杜发秀, 张玉娥, 魏岳荣, 易干军. 东莞大蕉超表

- 达拟南芥 *CBF1* 基因及其抗寒性检测. 中国农业科学, 2012, 45(8): 1653-1660.
- LIU K, HU C H, DU F X, ZHANG Y E, WEI Y R, YI G J. Over-expression of the *Arabidopsis CBF1* gene in Dongguandajiao (*Musa* spp.ABB group) and detection of its cold resistance. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(8):1653-1660. (in Chinese)
- [24] SANDER J D, MAEDER M L, REYON D, VOYTAS D F, JOUNG J K, DOBBS D. ZiFiT (Zinc Finger Targeter): an updated zinc finger engineering tool. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(Suppl 2): W462-W468.
- [25] LI J F, NORVILLE J E, AACH J, NORVILLE J E, MCCORMACK M, ZHANG D D, BUSH J, CHURCH G M, SHEEN J. Multiplex and homologous recombination-mediated plant genome editing via guide RNA/Cas9. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(8): 688-691.
- [26] CHANGTIAN P, LEI Y, LI Q, XUE L, YANJUN H, JIE W, LIFEI C, GANG L. CRISPR/Cas9-mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in tomato plants in the first and later generations. *Scientific Reports*, 2016, 6: 24765.
- [27] CHIKAKO N, NARUMI H, SADA O K, MASATO W, KAZUMA O, KEISHI O, TOSHIYA Y, YURIKO O. Efficient genome editing in apple using a CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports*, 2016, 6: 31481.
- [28] WU C, LI X, YUAN W, CHEN G, KILIAN A, LI J, XU C, ZHOU D X, WANG S, ZHANG Q. Development of enhancer trap lines for functional analysis of the rice genome. *Plant Journal*, 2003, 35: 418-427.
- [29] 胡春华, 魏岳荣, 易干军, 黄秉智, 黄永红. 农杆菌介导的香蕉高效遗传转化体系的建立. 分子植物育种, 2010, 8(1): 172-178.
- HU C H, WEI Y R, YI G J, HUANG B Z, HUANG Y H. Establishment of a high efficient *agrobacterium*-mediated transformation system for banana. *Fenzi Zhiwu Yuzhong*, 2010, 8(1): 172-178. (in Chinese)
- [30] WOO J W, KIM J, KWON S I, CORVALÁN C, CHO S W, KIM H, KIM S G, KIM S T, CHOE S, KIM J S. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(11): 1162-1164.
- [31] 肖望, 黄霞, 魏岳荣, 赵杰堂, 戴雪梅, 黄学林. 过山香香蕉原生质体培养及植株再生. 园艺学报, 2008, 35(6): 873-878.
- XIAO W, HUANG X, WEI Y R, ZHAO J T, DAI X M, HUANG X L. Plant regeneration from protoplast culture of *Musa* AAB Silk 'Guoshanxiang'. *Acta Horticulturae Sinica*, 2008, 35(6): 873-878. (in Chinese)

(责任编辑 赵伶俐)