

综述 Reviews

CRISPR/Cas9基因编辑技术在果蔬作物中的应用

舒攀, 崔席席, 李富军*, 闵德栋, 张新华*, 董路路, 任春涛

山东理工大学农业工程与食品科学学院, 山东淄博255000

摘要: 成簇的规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)及其相关蛋白(CRISPR-associated, Cas)是存在于细菌和古细菌中的获得性免疫系统, 可以对外来某一特定单链或双链DNA实施高特异性地沉默或降解。近年来, CRISPR/Cas9系统已快速发展为一种基因组定向编辑技术。由于该技术操作简单、快速、突变诱导率高等优点, 已在多种果蔬作物中实现了基因的编辑, 在果蔬作物性状改良、基因表达、代谢过程调控及逆境胁迫抗性相关基因的挖掘等研究中发挥了重要作用。本文就CRISPR/Cas9系统的结构、作用原理、在果蔬作物基因编辑研究中的应用及存在的问题等进行了分析和总结。

关键词: CRISPR/Cas9; 果蔬作物; 应用; 基因编辑

近年来, 随着测序技术的不断完善, 多种果蔬作物的全基因组测序工作正陆续完成, 但是由于基因的种类复杂多样, 接下来需要对基因的功能进行深入研究。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。基因编辑技术是指对特定的DNA位点进行精确的“编辑”, 造成靶位点碱基的缺失、插入、替换等的一项新技术。目前最常见的基因编辑技术包括: 锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs) (Carroll等2011)、转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs) (Christian等2010; Bedell等2012)及近几年发展起来的成簇的规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)及其相关蛋白(CRISPR-associated, Cas)系统(Sander和Joung 2014)。ZFNs与TALENs系统主要通过DNA结合蛋白来靶定目标位点, 特异性蛋白的构建既耗时又昂贵, 而且遗传操作复杂, 因此该技术的发展受到了一定的限制。CRISPR/Cas系统是广泛存在于原核生物中的一种适应性防御系统, 研究发现, 87%的古细菌和超过40%的细菌中都含有此蛋白免疫系统(Grissa等2007)。基于该系统发展起来的基因组编辑技术不需要设计蛋白, 只需要改变引导RNA的20 nt的特殊片段, 并借助Cas9蛋白的切割来实现对靶基因的定点编辑。与ZFN和TALEN技术相比, CRISPR/Cas9系统在设计、合成和筛选上都非常

简便、易于操作、成本低, 构建周期短并且可以实现同时对多个基因的编辑, 迅速实现了对前两代基因编辑技术的替代(马兴亮和刘耀光2016; Ma等2016)。目前, 该系统在番茄、马铃薯、葡萄、柑橘等多种果蔬作物中实现了基因组的定向编辑。本文主要介绍了该基因编辑系统的工作原理、在果蔬作物中的应用现状、存在的问题及应用前景。

1 CRISPR/Cas9系统的基本结构和工作原理

1.1 CRISPR/Cas9基本结构

CRISPR/Cas系统主要由CRISPR序列元件与Cas基因家族蛋白组成(图1)。CRISPR序列由一个前导区、多个高度保守的重复序列和长度相似的间隔序列间隔排列组成(Shan等2013)。前导序列可以促使CRISPR转录产生crRNA前体(pre-CRISPR-derived RNA, pre-crRNA), 在RNA酶III帮助下pre-crRNA可以形成成熟的crRNA (CRISPR-derived RNA, crRNA); CRISPR序列中的重复序列区转录后形成具有发卡结构的反式激活RNA (trans-activating RNA, tracrRNA) (Wang等2015)。CRISPR/Cas系统根据单亚基和多亚基的crRNA效应复合物

收稿 2018-07-09 修定 2019-02-18

资助 国家自然科学基金(31772024)。

* 共同通讯作者: 李富军(lifujun@sdut.edu.cn)、张新华(zxh@sdut.edu.cn)。

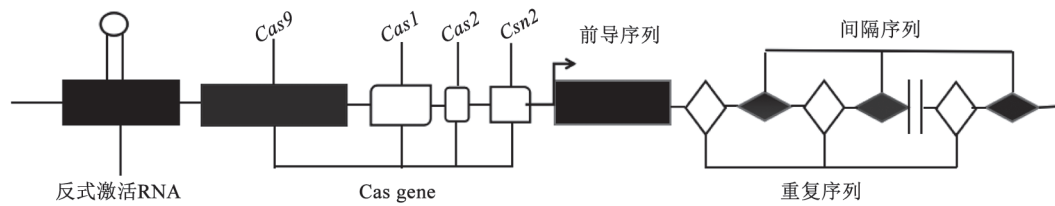


图1 CRISPR/Cas9的基本结构

Fig.1 Basic structure of CRISPR/Cas9

的不同可以分为两大类: Class 1和Class 2 (Makarova等2017a; 2017b)。Class 1包括3种类型(I、III、IV)和12种亚型(Makarova等2017a), Class 2包括3种类型(II、V、VI)和9种亚型(Makarova等2017b), 大多数Class 1和Class 2系统基因座都包括效应蛋白Cas1和Cas2, 以及辅助蛋白, 如Cas4。目前使用范围较广的II型CRISPR/Cas9系统还需要在Cas9蛋白的协助下对外源DNA进行靶向切割(Deltcheva等2011)。Cas9含有HNH和RucV样两个结构域, HNH结构域切割crRNA的互补链, 而RucV样结构域切割非互补链, 造成DNA双链断裂(double-strand break, DSB) (Doudna和Charpentier 2014)。

1.2 CRISPR/Cas9的工作原理

CRISPR/Cas系统是细菌和古生菌用来抵抗入侵的病毒及外源DNA的一种适应性免疫系统。其工作的过程主要通过以下3个步骤: (1)外源入侵DNA片段的获取。当外源DNA入侵时, 间隔序列会识别入侵核酸中紧邻靶区域下游的几个原始相邻碱基基序(protospacer adjacent motif, PAM), 并把临近PAM的序列整合到CRISPR基因座中(Bhaya等

2011), PAM通常由NGG三个碱基构成(N为任意碱基)。(2) CRISPR基座表达的成熟产物crRNA与tracrRNA通过碱基互补配对形成单链引导RNA (single-guide RNA, sgRNA) (Pougach等2010)。(3) CRISPR/Cas9特异性靶向切割。sgRNA与PAM上游的序列碱基互补配对, 引导Cas9核酸酶稳定地结合到入侵的DNA PAM处的靶位点上, 造成DSB。一旦产生DSB, 机体自身就会启动易错非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)或同源重组(homology directed repair, HDR)修复机制。在大多数情况下, DSB通常由NHEJ修复, 该过程会造成基因插入、突变或缺失, 从而导致基因敲除(图2)。

2 CRISPR/Cas9在果蔬作物基因编辑中的应用

2.1 性状相关基因的编辑

CRISPR/Cas9这种高效、便捷的基因编辑技术自2013年3家实验室(Shan等2013; Nekrasov等2013; Li等2013)同时在《Nature Biotechnology》发表研究结果以来, 该技术在植物上得到了广泛

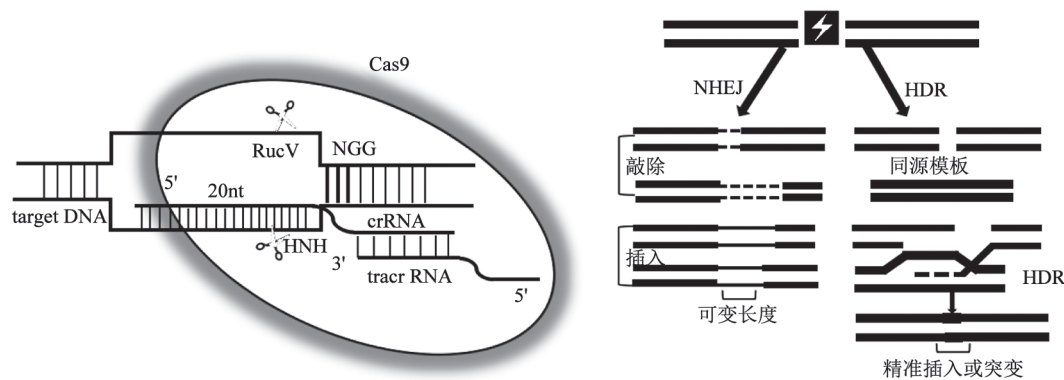


图2 CRISPR/Cas9的工作原理

Fig.2 Mechanism of CRISPR/Cas9

地应用。研究发现,番茄*ARGONAUTE (SLAG07)*基因功能的缺失会导致番茄叶片由扁平状变为针状(Yifhar等2012)。为了探究CRISPR/Cas9在番茄中的编辑效率, Brooks等(2014)利用该技术编辑了*SLAG07*第二个外显子的临近序列,通过农杆菌介导的叶盘转化法培养番茄植株。实验结果表明,在敲除*SLAG07*的植株中能够明显观察到叶片由扁平状变为针状,经测序证实, T_0 代的突变率为48%。该实验首次证实CRISPR/Cas9技术能有效地应用于番茄作物中。

果蔬生产力的高低与花序的复杂程度有关,复杂花序主要由封顶花基因(*TERMINATING FLOWER, TMF*)介导分生组织的成熟而产生,在番茄中的研究发现, *TMF*的缺失导致初级花序转化为单花,而且*TMF*可以与*SIBOP*相互作用形成转录复合物。为了进一步鉴定*SIBOP*的作用, Xu等(2016)利用CRISPR/Cas9系统对番茄*SIBOP*基因进行了编辑,结果发现突变植物的花器脱落、叶片形状改变,其中最显著的是花序结构简化为单花序,与*TMF*突变体花序相似;在*SIBOP-TMF*突变体中花的缺陷更加明显,该研究证实*SIBOP*也是影响花序结构的基因。最近,借助于CRISPR/Cas9系统, *tmf-1*和*ALOG*家族的*tfam1*和*tfam2*基因也进一步被证实番茄的花序发育中发挥重要作用(Huang等2018)。Soyk等(2017)通过CRISPR/Cas9敲除了番茄中开花抑制基因(*SELF-PRUNING 5G, SP5G*), 研究结果发现, *SP5G*突变体的开花过程加快,番茄果实的产量得到了快速提升,该研究为利用CRISPR/Cas9系统快速提高作物产量提供了借鉴。另外,在番茄中的研究还发现,利用CRISPR/Cas9技术敲除决定类黄酮积累的*SIMYB12*基因,可以高效地获得粉红色果实(Deng等2018);敲除控制番茄果实无籽性状的关键基因*SIIA9*,可以获得与野生型果实一致的无籽果实,而且 T_0 代植株的突变效率可达到100%(Ueta等2017)。这种精确、快速地培育单性结实的方法也可以用于西瓜、黄瓜、苦瓜等需要无籽的果蔬作物中,为果蔬作物无籽相关性状方面的研究奠定了基础。

除了番茄, CRISPR/Cas9技术也成功地应用于甘蓝(*Brassica oleracea*) (Lawrenson等2015)、莴苣

(*Lactuca sativa*) (Woo等2015)等发育相关基因的编辑中。研究发现,甘蓝赤霉素合成关键基因*GA4*敲除以后,植株明显矮小;莴苣油菜素内酯不敏感基因(*BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 2, BIN-2*)敲除以后增强了油菜素内酯信号途径。

2.2 物质合成及代谢途径的研究

γ -氨基丁酸(GABA)是一种广泛存在于细菌、植物、动物中的非蛋白氨基酸,具有多种生理活性。经研究发现,番茄在生长过程中会产生GABA (Takayama和Ezura 2015),琥珀酸半醛脱氢酶(SS-ADH)、 γ -氨基丁酸转氨酶(GABA-T)、运输蛋白CAT-9及谷氨酸脱羧酶(GAD)在GABA的代谢过程中起关键作用(Bao等2015; Koike等2013; Snowden等2015)。Nonaka等(2017)通过农杆菌介导转化将Cas9和靶基因*SIGAD2*和*SIGAD3*的sgRNA表达盒导入番茄植株内,得到的GAD羧基末端敲除突变体中的GABA含量显著提高。该实验首次利用CRISPR/Cas9在番茄中实现了GABA含量的增加。另外,通过构建GABA代谢途径中的5个关键基因*GABA-TP1*、*GABA-TP2*、*GABA-TP3*、*CAT9*和*SSADH*的sgRNA表达盒,对 T_0 代的植株检测发现, CRISPR/Cas9系统除在*GABA-TP2*的位点没产生突变外,其它编辑位点都产生了突变。突变率分别为44%、50%、41%、6%和8%,增加了番茄叶片和果实中的GABA含量,进一步验证了CRISPR/Cas9编辑的有效性(Li等2017)。

长链非编码RNA (long non-coding RNAs, lncRNA)是一类转录本长度超过200 nt的RNA分子,它们不编码蛋白,但参与细胞内多种过程调控。目前,大多数植物lncRNA的生物学功能仍然未知。Li等(2018a)在番茄中克隆了*lncRNAs1459*基因的全长,并利用CRISPR/Cas系统构建了*lncRNA1459*突变体。与野生型果实相比,突变体的乙烯产量、番茄红素积累显著减少,成熟过程受到限制。结果证实, *lncRNAs1459*在番茄成熟过程中起着积极的作用,为研究其他水果的lncRNA功能提供了一种新的方法。

番茄红素是一种具有多种生理功能的类胡萝卜素,最近有研究报道,利用包含6个sgRNA表达盒的CRISPR/Cas9系统敲除与类胡萝卜素代谢途

表1 CRISPR/Cas9对果蔬作物基因组编辑列表

Table 1 List of CRISPR/Cas9 gene editing in fruit and vegetable crops

果蔬品种	靶定基因	靶基因功能	参考文献
番茄(<i>Lycopersicon esculentum</i>)	<i>AGO7</i>	调控叶片发育	Brook等2014
	<i>BOP</i>	调控花序结构	Xu等2016
	<i>TFAM1, TFAM2</i>	调控花序结构	Huang等2018
	<i>MYB12</i>	参与果肉色泽调控	Deng等2018
	<i>IAA9</i>	控制单性结实	Ueta等2017
	<i>GABA-TP1, GABA-TP2, GABA-TP3, CAT9, SSADH</i>	参与γ-氨基丁酸的合成	Li等2017
	<i>LNCRNA1459</i>	参与果实成熟调控	Li等2018a
	<i>SGR1, LCY-E, LCY-B1, LCY-B2, BLC</i>	参与番茄红素的合成	Li等2018b
	<i>PDS</i>	参与类胡萝卜素的合成	Li等2017; Parkhi等2018
	<i>MLO1</i>	灰霉病易感基因	Nekrasov等2017
	<i>TYLCV</i>	黄叶卷曲病易感基因	Mahfouz等2017
	<i>DMR6</i>	霜霉病易感基因	Thomazella等2016
	<i>MAPK3</i>	参与干旱胁迫响应	Wang等2017
	<i>SP5G</i>	调控植株开花	Soyk等2017
	胡萝卜(<i>Daucus carotat</i>)	<i>F3H</i>	参与花青素的合成
牵牛花(<i>Ipomoea nil</i>)	<i>CCD4</i>	参与类胡萝卜素的合成	Watanabe等2018
甘蓝(<i>Brassica oleracea</i>)	<i>GA4.a</i>	调控植株高低	Lawrenson等2015
莴苣(<i>Lactuca sativa</i>)	<i>BIN-2</i>	参与油菜素类脂的调控	Woo等2015
黄瓜(<i>Cucumis sativus</i>)	<i>EIF4E</i>	RNA病毒易感基因	Chandrasekaran等2016
马铃薯(<i>Solanum tuberosum</i>)	<i>MSX914-10, ALS1</i>	除草剂易感基因	Bulter等2015
矮牵牛(<i>Petunia hybrida</i> Vilm)	<i>PDS</i>	参与类胡萝卜素的合成	Zhang等2016
西瓜(<i>Citrullus lanatus</i>)	<i>PDS</i>	参与类胡萝卜素的合成	Tian等2017
	<i>ALS</i>	除草剂易感基因	Tian等2018
苹果(<i>Malus domestica</i>)	<i>PDS</i>	参与类胡萝卜素的合成	Nishitani等2016
	<i>DIPM-1, DIPM-2, DIPM-4</i>	火疫病易感基因	Malnoy等2016
葡萄(<i>Vitis vinifera</i>)	<i>IdnDH</i>	参与酒石酸合成	Ren等2016
	<i>MLO-7</i>	白粉病易感基因	Malnoy等2016
柑橘(<i>Citrus reticulata</i>)	<i>LOB1</i>	溃疡病易感基因	Jia 等2017
	<i>EBEPthA4</i>	溃疡病易感基因	Peng等2017
香蕉(<i>Musa nana</i>)	<i>PDS</i>	参与类胡萝卜素的合成	Kaur等2018

径相关的5个基因(*SGR1*、*LCY-E*、*Blc*、*LCY-B1*和*LCY-B2*),可使番茄果实中番茄红素的含量增加,其中*SGR1*敲除的果实中番茄红素增加了5.1倍(Li等2018b)。而敲除类胡萝卜素合成中的2个关键基因*CrtR-b2*和*Psy1*的第一个外显子的临近序列后,番茄植物会出现白花表型和黄肉表型(D'Ambrosio等2018)。八氢番茄红素脱氢酶基因(*PHYTOENE DESATURASE*, *PDS*)也是类胡萝卜素生物合成途径中的关键基因,该基因功能的丧失会阻碍类胡萝卜素的形成,使植株表现出光漂白的现象。以*PDS*为标记基因,利用CRISPR/Cas9系统也成功地

在番茄(Li等2017; Parkhi等2018)、矮牵牛(Zhang等2016)、西瓜(Tian等2017)、香蕉(Kaur等2018)及苹果(Nishitani等2016)幼苗中实现了*PDS*的编辑。黄烷酮3-羟化酶(flavanone-3-hydroxylase, *F3H*)是植物花青素生物合成早期阶段的重要催化酶,通过对*F3H*外显子序列靶定敲除,根据愈伤组织的颜色变化和测序结果证实CRISPR/Cas9也能够有效地用于胡萝卜基因的编辑(Klimek-Chodacka等2018)。在白花型牵牛花中敲除类胡萝卜素裂解双加氧酶基因*InCCD4*,可使花瓣转变为淡黄色,同时花瓣中类胡萝卜素的积累量可提高20倍。该研究证实,

白花瓣中类胡萝卜素含量低,可能与类胡萝卜素的降解有关(Watanabe等2018)。

编码L-艾杜糖脱氢酶的基因 $IdnDH$ 是葡萄酒石酸合成的限速基因, Ren等(2016)利用CRISPR/Cas9系统靶向编辑葡萄的 $IdnDH$ 基因,构建的2个sgRNA表达盒中sgRNA1成功造成该基因位点1~3 bp的缺失,突变频率达到100%,该结果对于改良葡萄酒的品质具有借鉴作用。以上研究结果表明,CRISPR/Cas9技术在果蔬体内物质合成及代谢途径的研究中应用前景广阔。

2.3 CRISPR/Cas9在果蔬作物抗逆性中的应用研究

2.3.1 生物胁迫

果蔬作物生长发育过程中经常遭受细菌、真菌、病毒或害虫的侵害,因此,基于CRISPR/Cas9技术的诸多优点,其在果蔬作物抗病相关基因功能的研究中得到了迅速发展。Jia等(2017)在柑橘中设计了6个sgRNA靶定柑橘易染溃疡病基因 $CsLOB1$ 的不同位点。通过分析发现,其中有2个编辑位点效率达到89.36%、88.79%。另外,接种病原体黄单胞菌(*pathogen Xanthomonas citri* subsp. *citri*, Xcc)以后,高突变率的柑橘与野生柑橘相比感染溃疡病的程度明显降低,并且没有其它的负面影响。柑橘溃疡病易感基因 $CsLOB1$ 含有效应物结合元件(EBEPthA4),可被致病基因 $PthA4$ 识别,并激活 $CsLOB1$ 表达。Peng等(2017)将 $CsLOB1$ 启动子中的效应物结合元件作为靶标,利用CRISPR/Cas9进行敲除,破坏了响应于Xcc感染过程 $CsLOB1$ 基因的表达,与野生型相比,其对柑橘溃疡病的抗性得到了增强。

在葡萄品种‘霞多丽’和苹果品种‘金冠’中,利用CRISPR/Cas9技术首次实现了对葡萄中白粉病易感基因 $MLO-7$ 和苹果中火疫病易感基因 $DIPM-1$ 、 $DIPM-2$ 和 $DIPM-4$ 的敲除,所获得的转基因植株分别对白粉病和火疫病的抗性得到了增强,并在实验中发现sgRNA与Cas9的比例会影响目的基因的敲除效率(Malnoy等2016)。利用CRISPR/Cas9构建的番茄抗毒素基因 $SIMlo1$ 敲除植株能够有效地抵抗由真菌引起的白粉病(Nekrasov等2017);番茄黄化曲叶病毒(*Tomato yellow leaf curl virus*, $TYLCV$)基因敲除株系对黄化曲叶病毒的抗性增强,并且能

够稳定地遗传到 T_2 和 T_3 代(Mahfouz等2017);番茄霜霉病抗性基因6 (*downy mildew resistance 6*, $DMR6$)外显子区域编辑株系表现出对细菌病原体的抗性,且植株的生长发育不受影响,与拟南芥中的研究结果相似(Zeilmaier等2015),证实了该基因在不同物种间的保守性(Thomazella等2016)。

真核翻译起始因子 $eIF4E$ 是RNA病毒繁殖所需要的主要宿主因子, Chandrasekaran等(2016)利用CRISPR/Cas9敲除黄瓜 $eIF4E$ 基因中的片段,与野生型黄瓜相比抗RNA病毒的特性明显加强。以上结果显示,CRISPR/Cas9系统是研究植物抗病相关基因功能的强有力的工具。

2.3.2 非生物胁迫

促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)是一种重要的信号分子,它在植物生长、发育以及生物和非生物胁迫条件下的多种细胞信号传导途径中起关键作用(曹红利等2017)。番茄中包含有 $SIMAPK3$ 在内的16个 $MAPK$ 基因, Wang等(2017)利用CRISPR/Cas9技术研究了 $SIMAPK3$ 在番茄干旱胁迫抗性中的作用,试验结果表明, $SIMAPK3$ 突变体在干旱胁迫下表现出更严重的萎靡症状,过氧化氢含量明显增加,抗氧化酶活性降低,细胞膜损伤加剧,该研究利用CRISPR/Cas9技术明确了 $SIMAPK3$ 在番茄抗旱中的作用。利用该技术敲除二倍体马铃薯 $MSX914-10$ 和四倍体马铃薯Desiree的内源乙酰乳酸合成酶($ALS1$)基因,所获得的突变体表现出较强的抗除草剂特性(Butler等2015)。Tian等(2018)利用CRISPR/Cas9单碱基编辑技术,成功地实现了西瓜 ALS 基因单碱基突变,研究出全球首个由CRISPR/Cas9介导的抗除草剂西瓜。 T_0 代23%的植株具有成功编辑的位点,并在 T_1 代获得了不含转基因元件且具有纯合编辑位点的植株, T_2 植株对苯磺隆除草剂具有很高的抗性。这些研究表明,CRISPR/Cas9基因编辑技术可以成功地用于果蔬作物非生物胁迫响应的研究。

3 CRISPR/Cas9系统的局限性与改进措施

3.1 PAM序列的依赖性改进

CRISPR/Cas9系统中,sgRNA所结合的外源基因必须具备PAM位点,Cas蛋白能够准确切割的位

点也必须是在PAM位点之前。识别更多的PAM位点或者减弱Cas蛋白对于PAM位点的依赖性就能够更有效地利用CRISPR/Cas技术。Kleinstiver等(2015)通过对Cas9蛋白进行改造,成功扩增了PAM位点的识别碱基,在斑马鱼和人类内源性基因位点中找到了野生型SpCas9无法编辑的位点。Cpf1蛋白最初于2015年被发现,它隶属于type II类型的CRISPR系统,是现存的比Cas9蛋白更小更简单的核酸内切酶,CRISPR/Cpf1系统是当时发现的最简单的CRISPR免疫系统(Zetsche等2015)。不同于常用的Cas9, Cpf1的PAM识别位点为TTTN,另外Cpf1系统仅仅需要单个RNA分子即crRNA就能够切割DNA序列,在一定程度上简化了CRISPR/Cas系统的操作、提高了编辑效率、降低了脱靶风险。但是,由于PAM位点的限制,并没有使该系统广泛应用于基因编辑的研究。Li等(2018c)定点突变了毛螺科菌(*Lachnospiraceae bacterium*) Cpf1的2个关键氨基酸位点,获得的突变体LbCpf1(RR)成功实现了对水稻基因组的编辑,进一步扩大了Cpf1的编辑范围。Hua等(2019)通过使用化脓性链球菌Cas9 (*Streptococcus pyogenes* Cas9, SpCas9)和金黄色葡萄球菌Cas9 (*Staphylococcus aureus* Cas9, Sa-Cas9)开发了新的胞嘧啶碱基编辑器和腺嘌呤碱基编辑器变体,改变了以前胞嘧啶和腺嘌呤编辑器对于(NGG) PAM序列的依赖性,进而大大增加了水稻基因组中碱基编辑的目标范围。另外,研究还发现两种碱基编辑器可以同时应用于水稻基因组编辑。Hu等(2018)利用噬菌体辅助持续化进程(PACE)的方法获得了Cas9的变体xCas9,其能够识别更多的PAM位点(NG、GAA、GAT),虽然xCas9的应用范围扩大了,但是其特异性反而比Cas9更好。因此,进一步开发或改造Cas9蛋白,可以明显改善该技术的特异性及适用范围。

3.2 脱靶现象及其改造

与ZFNs和TALENs相似,CRISPR/Cas9系统也存在脱靶问题。(1) Cas9和sgRNA不恰当的比例会导致脱靶效应的产生,比例越高脱靶情况越严重(Hsu等2013; Pattanayak等2013)。Li等(2013)通过对拟南芥中*AtPDS3*和*AtFLS2*基因进行编辑,得出达到最佳突变效果的Cas9和sgRNA的比例为

1:1。(2)大量干扰的PAM位点会导致非目的DNA区域被切割导致脱靶(Sternberg等2014)。为了避免这种情况的发生,可以利用生物信息学工具E-CRISPR、CasOT辅助sgRNA的设计(Xie等2014; Yan等2015; Cradick等2014)。(3)启动子的选择,目前大多数的CRISPR/Cas9系统都是使用外源启动子来表达Cas9和sgRNA,因此启动子的选择也非常重要。在双子叶植物中,花椰菜花叶病毒的35S启动子能够很好的表达Cas9, U6启动子能够表达sgRNA。在单子叶植物中,35S和Ubi都能够很好的表达Cas9,但是sgRNA的表达则不同,OsU3启动子可以用于水稻的sgRNA表达, TaU6启动子可以用于小麦的sgRNA表达。另外, Mikami等(2015)发现在提高水稻突变率方面OsU6比OsU3更好。因此,为了减少脱靶效应,选择恰当的启动子也非常重要。(4) Cas9蛋白的优化, Ran等(2013)通过突变Cas9核酸酶的DNA切割结构域,将CRISPR/Cas9系统改造为切口酶,并且证明使用配对切口酶可以在细胞中将脱靶活动减少50~1 500倍,并且在不影响靶向切割效率的情况下成功敲除了小鼠受精卵中的基因。Guilinger等(2014)将催化失活的Cas9和FokI核酸酶融合为变体fCas9。fCas9对DNA切割需要两个fCas9单体同时结合靶位点15~25个碱基对。在人类细胞中, fCas9修饰的靶DNA位点的特异性比Cas9高140倍。另外, Kleinstiver等(2016)通过对SpCas9进行改造,构建出变体SpCas9-HF1,减少了与非特异性DNA的接触,并在人体细胞中成功验证了SpCas9-HF1打靶的高精确性。Chen等(2017)发现Cas9中的非催化结构域REC3能够识别目标错配,并利用REC3中涉及错配传感的残基设计了一种超精确Cas9变体(HypaCas9),其在人体细胞中保留了强大的靶向活性,并且能对基因组进行精确的编辑。上述研究与改进措施虽然还没有在果蔬作物中开展,但为CRISPR/Cas9系统在果蔬作物基因组编辑中的改进提供了重要的参考。

4 展望

果蔬作物种类繁多、性状各异,而且目前大量的果蔬作物仍然缺乏充足的序列信息,对于决定果蔬作物性状的主要基因还没有被挖掘,因此

在不同果蔬作物中建立高效的CRISPR/Cas9基因编辑体系还存在许多局限和挑战。另外, CRISPR/Cas9系统仍具有如目的基因脱靶、多余突变、基因编辑的效率低等问题。因此, 该技术在果蔬作物中的应用有巨大的研究空间。近年来, 研究人员将Cas9蛋白和gRNA在体外组装成核糖核蛋白复合体(RNP), 导入小麦细胞中, 成功创新了一种避免了外源DNA片段整合到基因组中的DNA-free的基因组编辑方法(Liang等2017)。另外, 有研究人员为了解决HDR修复效率低的问题, 在水稻中开发了单碱基替换编辑系统(Lu和Zhu 2017)。相信, 随着研究人员对CRISPR/Cas9系统研究的不断深入, 目前存在的一些局限终将被攻克。另外, 与传统的转基因作物相比, 人们对利用该技术改良的果蔬作物的接受度可能会更高, 如2014年加拿大卫生部批准通过基因编辑改良的抗除草剂油菜作为商业作物, 美国农业部2016年批准在蘑菇中使用CRISPR/Cas9防褐变。因此, 随着果蔬作物基因组测序研究的快速进展, 该技术一定会成为未来果蔬作物基因功能研究的重要工具, 并在果蔬作物品种改良以及防止病虫害等方面的研究中发挥更大的作用。

参考文献(References)

- Bao H, Chen X, Lü S, et al (2015). Virus-induced gene silencing reveals control of reactive oxygen species accumulation and salt tolerance in tomato by γ -aminobutyric acid metabolic pathway. *Plant Cell Environ*, 38 (3): 600–613
- Bedell VM, Wang Y, Campbell JM, et al (2012). In vivo genome editing using high efficiency TALENs. *Nature*, 491: 114–118
- Bhaya D, Davison M, Barrangou R (2011). CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet*, 45 (45): 273–297
- Brooks C, Nekrasov V, Lippman ZB, et al (2014). Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. *Plant Physiol*, 166 (3): 1292–1297
- Butler NM, Atkins PA, Voytas DF, et al (2015). Generation and inheritance of targeted mutations in potato (*Solanum tuberosum* L.) using the CRISPR/Cas system. *PLoS One*, 10: e0144591
- Cao HL, Chen D, Ye NX, et al (2017). Cloning and abiotic stress expression analysis of *CsMAPK3* gene in tea plant. *Acta Horti Sin*, 44 (11): 2203–2214 (in Chinese with English abstract) [曹红利, 陈丹, 叶乃兴等(2017). 茶树 *CsMAPK3*的全长克隆及其逆境表达分析. *园艺学报*, 44 (11): 2203–2214]
- Carroll D (2011). Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*, 188: 773–782
- Chandrasekaran J, Brumin M, Wolf D, et al (2016). Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Mol Plant Pathol*, 17 (7): 1140–1153
- Chen JS, Dagdas YS, Kleinstiver BP, et al (2017). Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy. *Nature*, 550 (7676): 407–410
- Christian M, Cermak T, Doyle EL, et al (2010). Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 186: 757–761
- Cradick TJ, Qiu P, Lee CM, et al (2014). COSMID: A web-based tool for identifying and validating CRISPR/Cas off-target sites. *Mol Ther-Nucl Acids*, 3 (12): e214
- D'Ambrosio C, Stigliani AL, Giorio G (2018). CRISPR/Cas9 editing of carotenoid genes in tomato. *Transgenic Res*, 27 (4): 367–378
- Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, et al (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471 (7340): 602–607
- Deng L, Wang H, Sun C, et al (2018). Efficient generation of pink-fruited tomatoes using CRISPR/Cas9 system. *J Genet Genomics*, 45 (1): 51–54
- Doudna JA, Charpentier E (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346 (6213): 1258096
- Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C (2007). The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*, 8 (1): 172–182
- Guilinger JP, Thompson DB, Liu DR (2014). Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nat Biotechnol*, 32 (6): 577–582
- Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, et al (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*, 31 (9): 827–832
- Hu JH, Miller SM, Geurts MH, et al (2018). Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature*, 556 (7699): 57–63
- Hua K, Tao X, Zhu JK (2019). Expanding the base editing scope in rice by using Cas9 variants. *Plant Biotechnol J*, 17 (2): 499–504

- Huang X, Tang L, Yu Y, et al (2018). Control of flowering and inflorescence architecture in tomato by synergistic interactions between ALOG transcription factors. *J Genet Genomics*, 45 (10): 557–560
- Jia H, Zhang Y, Orbović V, et al (2017). Genome editing of the disease susceptibility gene *CsLOB1* in citrus confers resistance to citrus canker. *Plant Biotechnol J*, 15 (7): 817–823
- Kaur N, Alok A, Shivani, et al (2018). CRISPR/Cas9-mediated efficient editing in phytoene desaturase (*PDS*) demonstrates precise manipulation in banana cv. Rasthali genome. *Funct Integr Genomic*, 18 (1): 89–99
- Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, et al (2016). High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*, 529 (7587): 490–495
- Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, et al (2015). Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature*, 523 (7561): 481–485
- Klimek-Chodacka M, Oleszkiewicz T, Lowder LG, et al (2018). Efficient CRISPR/Cas9-based genome editing in carrot cells. *Plant Cell Rep*, 37 (4): 575–586
- Koike S, Matsukura C, Takayama M, et al (2013). Suppression of γ -aminobutyric acid (GABA) transaminases induces prominent GABA accumulation, dwarfism and infertility in the tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant Cell Physiol*, 54 (5): 793–807
- Lawrenson T, Shorinola O, Stacey N, et al (2015). Induction of targeted, heritable mutations in barley and brassica oleracea using RNA-guided Cas9 nuclease. *Genome Biol*, 16 (1): 258–271
- Li JF, Aach J, Norville JE, et al (2013). Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol*, 31 (8): 688–691
- Li R, Fu D, Zhu B, et al (2018a). CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of *lncRNA1459* alters tomato fruit ripening. *Plant J*, 94 (3): 513–524
- Li R, Li R, Li X, et al (2017). Multiplexed CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering of γ -aminobutyric acid levels in *Solanum lycopersicum*. *Plant Biotechnol J*, 16 (2): 415–427
- Li S, Zhang X, Wang W, et al (2018c). Expanding the scope of CRISPR/Cpf1-mediated genome editing in rice. *Mol Plant*, 11 (7): 995–998
- Li X, Wang Y, Chen S, et al (2018b). Lycopene is enriched in tomato fruit by CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing. *Front Plant Sci*, 9: 559
- Liang Z, Chen K, Li T, et al (2017). Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun*, 8: 14261
- Lu Y, Zhu JK (2017). Precise editing of a target base in the rice genome using a modified CRISPR/Cas9 System. *Mol Plant*, 10 (3): 523–525
- Ma X, Zhu Q, Chen Y, et al (2016). CRISPR/Cas9 platforms for genome editing in plants: developments and applications. *Mol Plant*, 9 (7): 961–974
- Ma XL, Liu YG (2016). CRISPR/Cas9-based genome editing systems and the analysis of targeted genome mutations in plants. *Hereditas*, 38 (2): 118–125 (in Chinese with English abstract) [马兴亮, 刘耀光(2016). 植物CRISPR/Cas9基因组编辑系统与突变分析. *遗传*, 38 (2): 118–125]
- Mahfouz MM, Tashkandi M, Ali Z, et al (2018). Engineering resistance against *Tomato yellow leaf curl virus* via the CRISPR/Cas9 system in tomato. *Plant Signal Behav*, 13 (10): e1525996
- Makarova KS, Zhang F, Koonin EV, et al (2017a). SnapShot: class 2 CRISPR-Cas systems. *Cell*, 168 (1): 328–328.e1
- Makarova KS, Zhang F, Koonin EV, et al (2017b). SnapShot: class 1 CRISPR-Cas systems. *Cell*, 168 (5): 946–946.e1
- Malnoy M, Viola R, Jung MH, et al (2016). DNA-free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. *Front Plant Sci*, 7: 1904
- Mikami M, Toki S, Endo M, et al (2015). Comparison of CRISPR/Cas9 expression constructs for efficient targeted mutagenesis in rice. *Plant Mol Biol*, 88 (6): 561–572
- Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, et al (2013). Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, 31 (8): 691–693
- Nekrasov V, Wang C, Win J, et al (2017). Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. *Sci Rep*, 7 (1): 482–488
- Nishitani C, Hirai N, Komori S, et al (2016). Efficient genome editing in apple using a CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*, 6: 31481
- Nonaka S, Arai C, Takayama M, et al (2017). Efficient increase of γ -aminobutyric acid (GABA) content in tomato fruits by targeted mutagenesis. *Sci Rep*, 7 (1): 7057–7071
- Parkhi V, Bhattacharya A, Choudhary S, et al (2018). Demonstration of CRISPR-cas9-mediated *pds* gene editing in a tomato hybrid parental line. *Indian J Genet*, 78 (1): 132–137
- Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, et al (2013). High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat Biotechnol*, 31 (9): 839–843
- Peng A, Chen S, Lei T, et al (2017). Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene *CsLOB1* promoter in citrus. *Plant*

- Biotechnol J, 15 (12): 1509–1519
- Pougach K, Semenova EE, Datsenko KA, et al (2010). Transcription, processing and function of CRISPR cassettes in *Escherichia coli*. Mol Microbiol, 77 (6): 1367–1379
- Ran FA, Hsu PD, Lin CY, et al (2013). Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. Cell, 154 (6): 1380–1389
- Ren C, Liu X, Zhang Z, et al (2016). CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). Sci Rep, 6: 32289
- Sander JD, Joung JK (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. Nat Biotechnol, 32 (4): 347–355
- Shan Q, Wang Y, Li J, et al (2013). Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. Nat Biotechnol, 31 (8): 686–688
- Snowden CJ, Thomas B, Baxter CJ, et al (2015). A tonoplast Glu/Asp/GABA exchanger that affects tomato fruit amino acid composition. Plant J, 81 (5): 651–660
- Soyk S, Müller NA, Park SJ, et al (2017). Variation in the flowering gene *SELF PRUNING 5G* promotes day-neutrality and early yield in tomato. Nat Genet, 49 (1): 162–168
- Sternberg SH, Redding S, Jinek M, et al (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. Nature, 507 (7490): 62–67
- Takayama M, Ezura H (2015). How and why does tomato accumulate a large amount of GABA in the fruit? Front Plant Sci, 6: 612
- Thomazella DP, Brail Q, Dahlbeck D, et al (2016). CRISPR-Cas9 mediated mutagenesis of a *DMR6* ortholog in tomato confers broad-spectrum disease resistance. bioRxiv, doi: <http://doi.org/10.1101/064824>
- Tian S, Jiang L, Cui X, et al (2018). Engineering herbicide-resistant watermelon variety through CRISPR/Cas9-mediated base-editing. Plant Cell Rep, 37 (9): 1353–1356
- Tian S, Jiang L, Gao Q, et al (2017). Efficient CRISPR/Cas9-based gene knockout in watermelon. Plant Cell Rep, 36 (3): 399–406
- Wang L, Chen L, Li R, et al (2017). Reduced drought tolerance by CRISPR/Cas9-mediated *SIMAPK3* mutagenesis in tomato plants. J Agric Food Chem, 65 (39): 8674–8682
- Wang T, Birsoy K, Hughes NW, et al (2015). Identification and characterization of essential genes in the human genome. Science, 350 (6264): 1096–1101
- Watanabe K, Oda-Yamamizo C, Sage-Ono K, et al (2018). Alteration of flower colour in ipomoea nil through CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of carotenoid cleavage dioxygenase 4. Transgenic Res, 27 (1): 25–38
- Woo JW, Kim J, Kwon SI, et al (2015). DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. Nat Biotechnol, 33 (11): 1162–1164
- Xie K, Zhang J, Yang Y (2014). Genome-wide prediction of highly specific guide RNA spacers for CRISPR-Cas9-mediated genome editing in model plants and major crops. Mol Plant, 7 (5): 923–926
- Xu C, Park SJ, Eck JV, et al (2016). Control of inflorescence architecture in tomato by BTB/POZ transcriptional regulators. Genes Dev, 30 (18): 2048–2061
- Yan M, Zhou SR, Xue HW (2015). CRISPR Primer Designer: Design primers for knockout and chromosome imaging CRISPR-Cas system. J Integr Plant Biol, 57 (7): 613–617
- Yifhar T, Pekker I, Peled D, et al (2012). Failure of the tomato trans-acting short interfering RNA program to regulate auxin response factor3 and ARF4 underlies the wiry leaf syndrome. Plant Cell, 24 (9): 3575–3589
- Zeilmaker T, Ludwig NR, Elberse J, et al (2015). Downy mildew resistant 6 and DMR6-LIKE oxygenase 1 are partially redundant but distinct suppressors of immunity in Arabidopsis. Plant J, 81 (2): 210–222
- Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al (2015). Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. Cell, 163 (3): 759–771
- Zhang B, Yang X, Yang C, et al (2016). Exploiting the CRISPR/Cas9 system for targeted genome mutagenesis in pe-tunia. Sci Rep, 6: 20315

Application of CRISPR/Cas9 gene editing technology in fruit and vegetable crops

SHU Pan, CUI Xi-Xi, LI Fu-Jun*, MIN De-Dong, ZHANG Xin-Hua*, DONG Lu-Lu, REN Chun-Tao
School of Agricultural Engineering and Food Science, Shandong University of Technology, Zibo, Shandong 255000, China

Abstract: Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and CRISPR-associated protein (Cas) is a prokaryotic immune system which derived from bacteria and archaea, and can be used to silence or degrade a specific foreign single-stranded or double-stranded DNA with high specificity. In recent years, the CRISPR/Cas9 system has been rapidly developed as a genome-oriented editing technology. Due to its simple, rapid, and high mutation induction rate, the technology has achieved gene editing in a variety of fruit and vegetable crops, and plays important roles in the improvement of fruit and vegetable characters, gene expression, metabolic process regulation and stress resistance related gene mining. In this review, we introduced the structure and principle of CRISPR/Cas9 system and summarized the applications of this system in fruits and vegetables. Meanwhile, the problems and its solutions of the application of CRISPR/Cas9 system were also analyzed.

Key words: CRISPR/Cas9; fruit and vegetable crops; application; gene editing

Received 2018-07-09 Accepted 2019-02-18

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31772024).

*Co-corresponding authors: Li FJ (lifujun@sdut.edu.cn), Zhang XH (zxh@sdut.edu.cn).