

利用 CRISPR/Cas9 技术创制高油酸甘蓝型油菜新种质

高谢旺, 谭安琪, 胡信畅, 祝孟洋, 阮 颖, 刘春林

(作物表观遗传和分子生物学湖南省重点实验室 / 湖南农业大学农学院 / 作物代谢调控与代谢工程实验室, 长沙 410128)

摘要: 在低硫苷低芥酸的双低甘蓝型油菜基础上, 培育稳定的高油酸油菜是当前重要的育种目标之一, 本研究通过利用 CRISPR/Cas9 基因编辑对湖南农业大学选育的品种湘油 15 号 (XY15) 进行品种改良。*BnaFAD2* 和 *BnaFAE1* 是油酸合成不饱和脂肪酸和超长链脂肪酸的两个关键基因。利用 CRISPR/Cas9 基因编辑系统与高效油菜转化技术相结合, 对甘蓝型油菜 XY15 的 *BnaFAD2.A05*、*BnaFAD2.C05*、*BnaFAE1.A08* 和 *BnaFAE1.C03* 同时进行基因编辑, 获得了 7 株 T0 代转基因植株, 通过靶基因克隆测序, 发现均未发生基因编辑。然而, 在 T1 代植株中发现并检测到了基因编辑的发生, *BnaFAD2.A05*、*BnaFAD2.C05*、*BnaFAE1.A08* 和 *BnaFAE1.C03* 的总基因编辑效率分别为 38.89%、27.78%、22.22%、30.56%。在 T2 代植株中, 筛选到了 5 株 4 个靶基因均发生了突变, 且无外源基因的突变体材料 Cas9-1-12-4、Cas9-1-12-5、Cas9-2-7-11、Cas9-5-5-3、Cas9-6-6-1, 它们的相对油酸含量为 68.69%、80.16%、75.82%、75.97%、74.37%, 相比于野生型 XY15 (相对油酸含量为 62.04%) 均有显著提高。

关键词: 甘蓝型油菜; *BnaFAD2*; *BnaFAE1*; CRISPR/Cas9; 基因编辑; 高油酸种质

Creation of New Germplasm of High-oleic Rapeseed Using CRISPR/Cas9

GAO Xie-wang, TAN An-qi, HU Xin-chang, ZHU Meng-yang, RUAN Ying, LIU Chun-lin

(Hunan Provincial Key Laboratory of crop Epigenetic Regulation and Development/Agricultural College of Hunan Agricultural University/Laboratory of Crop Metabolism Control and Metabolism Engineering, Changsha 410128)

Abstract: On the basis of low-glucosinolate and low-erucic rapeseed (*Brassica napus*), to obtain stable high-oleic rapeseed is one of the current important breeding objectives. In this study, CRISPR/cas9 system was used to improve the variety XY15 selected by Hunan Agricultural University. *BnaFAD2* and *BnaFAE1* are two key genes for the conversion of oleic acid to unsaturated fatty acids and ultra-long-chain fatty acids. The CRISPR/Cas9 system was introduced into XY15 by using highly efficient rapeseed transformation technology. with *BnaFAD2.A05*, *BnaFAD2.C05*, *BnaFAE1.A08* and *BnaFAE1.C03* simultaneously edited. Through target gene cloning and sequencing, it was found that no gene editing occurred in the 7 T0 transgenic plants. However, gene editing was found and detected in T1 plants. The total gene editing efficiency of *BnaFAD2.A05*, *BnaFAD2.C05*, *BnaFAE1.A08* and *BnaFAE1.C03* were 38.89%, 27.78%, 22.22% and 30.56%, respectively. In the T2 plants, 5 mutant plants with no exogenous genes and 4 target genes edited were selected, named *Cas9-1-12-4*, *Cas9-1-12-5*, *Cas9-2-7-11*, *Cas9-5-5-3* and *Cas9-6-6-1*, and their relative oleic acid content was 68.69%, 80.16%, 75.82%, 75.97% and 74.37%, respectively, which were significantly higher than that of the wild type XY15 (62.04%).

Key words: *Brassica napus* L.; *BnaFAD2*; *BnaFAE1*; CRISPR/Cas9; gene editing; high-oleic germplasm

收稿日期: 2019-12-11 修回日期: 2020-03-07 网络出版日期: 2020-05-13

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20191211001>

第一作者研究方向为油菜高油酸育种, E-mail: 1242173613@qq.com

通信作者: 刘春林, 研究方向为油菜品质育种, E-mail: liucl@hunau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31571707)

Fundation project: On National Natural Fund Project (31571707)

甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.) 是我国主要的油料作物之一, 随着生活水平的提高, 人们对高品质菜油的需求不断增加^[1]。Matthaus 等^[2]研究表明, 菜油中的脂肪酸组分主要有 7 种, 包括棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、亚麻酸、二十碳烯酸、芥酸。油酸含量越高, 代表菜油品质越好。高油酸菜油中的高油酸成分不仅有利于降低血液中胆固醇含量, 促进心血管健康, 还可使高油酸菜油不易氧化变质, 保质期长, 耐贮存, 且兼具发烟点高, 煎炸食物时不易冒烟等优点^[3]。在植物中, 油酸主要有两个代谢去向: 一是通过脂肪酸去饱和酶 FAD2 (Fatty acid desaturase 2) 作用催化油酸合成亚油酸, FAD2 是产生不饱和脂肪酸的关键酶; 二是借助脂肪酸延长酶 FAE (Fatty acid elongase) 产生链长大于十八碳的长链脂肪酸。Katavic 等^[4]和 Ohlrogge 等^[5]将长链脂肪酸合成所涉及的多种酶统称为脂肪酸延长酶 (FAE), 其中脂肪酸延长酶 1 (FAE1) 是长链脂肪酸合成的限速酶^[6]。*BnaFAE1* 是油菜中已报道的控制芥酸等超长链脂肪酸合成的关键基因^[7]。因此, 同时突变甘蓝型油菜 *BnaFAD2* 与 *BnaFAE1* 基因极大可能提高甘蓝型油菜中的油酸含量。

目前, CRISPR/Cas9 基因编辑技术已得到广泛运用。Jiang 等^[8]通过靶向突变 *BnaSDG8* 获得了具有早花表型的甘蓝型油菜。Yang 等^[9]利用基因编辑技术研究 *BnaCLACATA* 对油菜果荚籽粒发育的影响。Okuzaki 等^[10]对 *BnaFAD2* 进行编辑获得了油酸高达 80.0% 的甘蓝型油菜单株。Abe 等^[11]对 *OSFAD2* 进行基因编辑提高了水稻中油酸含量, Amin 等^[12]对 *GmFAD2* 进行基因编辑来提高大豆中油酸的含量。本研究中采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术对甘蓝型油菜 XY15 中的 *BnaFAD2* 与 *BnaFAE1* 同时进行基因编辑, 以期获得基因型稳定的高油酸油菜新种质资源。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

载体构建所需的 pYLCRISPR/Cas9Pubi-H 双元表达载体, 以及 pYLsgRNA-AtU3b, pYLsgRNA-AtU3d 中间载体, 大肠杆菌感受态 Trance-T1, 根癌农杆菌菌株 GV3101 感受态细胞, XY15 种子由湖南农业大学植物代谢调控与代谢工程实验室提供。引物的合成、DNA 测序均由擎科生物技术 (湖南) 股份有限公司完成。

1.2 *BnaFAD2* 与 *BnaFAE1* 敲除靶位点序列的设计

在油菜数据库 (<http://www.genoscope.cns.fr/brassicaplanus/>) 中分别检索到 *BnaFAD2.A05* (*BnaA05g26900D*)、*BnaFAD2.C05* (*BnaC05g40970D*)、*BnaFAE1.C03* (*BnaC03g65980D*)、*BnaFAE1.A08* (*BnaA08g11130D*) 全基因序列。通过 CRISPR 靶位点设计在线网站 (<http://skl.scau.edu.cn/targetdesign/>) 选取一段位于上游 CDS 区域内, CG% 较高的 19nt+PAM (NGG) 作为靶点。

1.3 *BnaFAE1* 与 *BnaFAD2* 双敲除载体的构建

通过设计引物 (详见 <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20191211001>, 附表 1), 根据曾栋昌等^[13]提供的方法构建载体。各自靶点双链多聚体的制备: 1 μ L *BnaFAE1.F/R* (100 μ mol/L), 1 μ L *BnaFAD2.F/R* (100 μ mol/L), 各加 1 μ L T4 连接酶 buffer 和 8 μ L ddH₂O, 37 $^{\circ}$ C 30 min, 95 $^{\circ}$ C 5 min, 移至室温冷却完成退火。sgRNA 表达盒制备: Bsa I 酶切 pYLsgRNA-AtU3b 与 pYLsgRNA-AtU3d 载体, 产物回收后按 U3b-*BnaFAE1*, U3d-*BnaFAD2*, T4 连接酶连接靶点接头, 连接产物转入大肠杆菌, 提取质粒。双元载体与 sgRNA 表达盒的酶切-连接反应: Bsa I 酶切 pYLsgRNA-AtU3b-*BnaFAE1*, pYLsgRNA-AtU3d-*BnaFAD2* 与 pYLCRISPR/Cas9Pubi-H 质粒, 产物回收后, 利用 T4 连接酶连接, 连接产物转入感受态大肠杆菌, 提取质粒。测序, 将质粒通过冻融法转化感受态农杆菌 (GV3101), 用 SP-L1/R 进行菌落 PCR 确认。

1.4 甘蓝型油菜的遗传转化

将 XY15 种子浸泡于 75% 乙醇中 1 min, 加入 25 mL 0.1% 升汞溶液、1 滴吐温, 浸泡 15 min。灭菌水洗净后, 铺在装有 1/2 MS 培养基的玻璃瓶中, 暗培养 7 d。取幼苗, 切取 6 mm 左右的下胚轴作为外植体, 用含有重组质粒的农杆菌菌液 (OD=0.4) 浸染外植体 20 min, 转入共生培养基中, 置于 24 $^{\circ}$ C 暗培养 2 d; 将共培养的外植体转入到含潮霉素的愈伤组织诱导培养基中培养, 约 21 d; 将黄色膨大的愈伤组织转入到含潮霉素的诱导不定芽分化的培养基中培养, 约 30 d; 切取幼芽转入诱导根分化的培养基中, 待生根后移植到营养土中; 炼苗, 并转至室外^[14]。

1.5 转基因植株的鉴定与编辑位点的检测

CTAB 法提取 T0 代抗性苗植株总 DNA, 用 SP-L1/R 引物检测是否为转基因苗 (图 1)。靶位点编辑情况的初步鉴定: 用 SP-L1/R 引物进行 PCR 检测敲除系统后代的分离情况。用相应的引物高保真酶扩增 4 个靶

基因片段后,连接克隆载体,转入感受态大肠杆菌,挑取 4 个单菌落进行测序,测序的数据用 DNASTar7.1 进行序列对比,结果一致为纯合,不一致则为杂合。靶点编辑较为理想的 T1 代单株进行套袋留种。在 T2 代植株中筛选出靶点编辑较为理想且敲除背景已分离的单株,检测其种子脂肪酸含量和相对含油量。

1.6 油菜种子脂肪酸的提取与相对含油量的测定

将植株套袋自交收种,取 100 mg 油菜种子于 1.5 mL 离心管中,加入两粒钢珠,高通量组织研磨器 (60 HZ, 90 s) 破碎;加入 800 μ L 乙醚:石油醚 (1:1)、400 μ L 0.4 mol/L KOH-甲醇溶液,放置 4 h;加入 500 μ L 水,10000 r/min,1 min,离心分层;取 200 μ L 上清,向其中加入 400 μ L 乙醚,进行气相色谱分析。

脂肪酸含量 = 峰面积 / (峰面积总和 - 内标峰面积) $\times$ 100%。

2 结果与分析

2.1 转基因苗的鉴定与靶点编辑检测

用 SP-L1/R 引物 PCR 电泳检测 (图 1), 本试验通过浸染 715 个外植体, 获得了 24 株抗性苗, 其中转基因苗为 7 株, 转化率约为 0.98%。对 7 株转基因植物的 4 个目的片段分别进行高保真扩增、测序, 发现 T0 代植株中靶位点均未发生编辑。在 7 个独立株系的 84 个 T1 代植株中, 检测到部分植株的外源基因已经被自交分离出去, 由于上一代没有检测到靶序列发生编辑, 我们从仍然保留外源基因的植株中挑选部分植株进行靶序列的编

辑情况检测 (详见 <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20191211001>, 附表 2、3、4、5、6)。在筛选出的单株中, 有 1 对等位基因均发生编辑的只有 Cas9-5-5 的 *BnaFAD2.A05*, 其他发生编辑的靶序列均为杂合编辑 (其中 1 个等位基因仍为未编辑状态), 甚至是 1 对等位基因均未发生编辑。4 个株系的各靶基因的编辑效率高低不一, 为 12.50%~50.00% (表 1)。T1 代中 *BnaFAD2.A05* 的靶序列总的编辑效率为 38.89%, *BnaFAD2.C05* 的为 27.78%, *BnaFAE1.A08* 的为 22.22%, *BnaFAE1.C03* 的为 30.56%。在 4 个株系中选取基因型比较理想的植株 *Cas9-1-12-4* (AaCce1e1E2e2)、*Cas9-1-12-5* (aace1e1e2e2)、*Cas9-2-7-11* (aaCce1e1E2e2)、*Cas9-5-5-3* (aaCce1e1E2e2) 和 *Cas-6-6-1* (aaCcE1e1E2e2), 进行套袋留种。

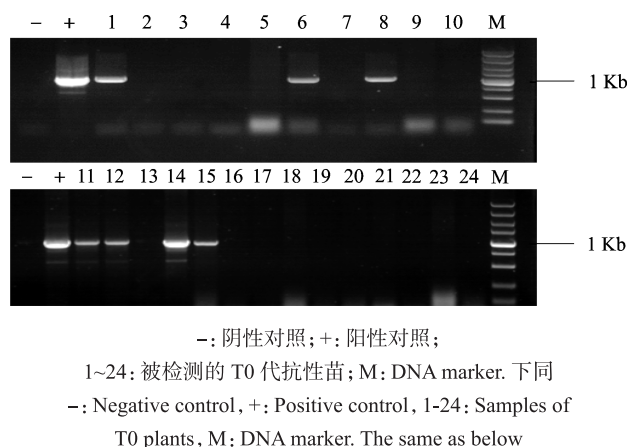


图 1 T0 代转基因苗 PCR 鉴定

Fig.1 PCR identification of transgenic plants about T0 generation

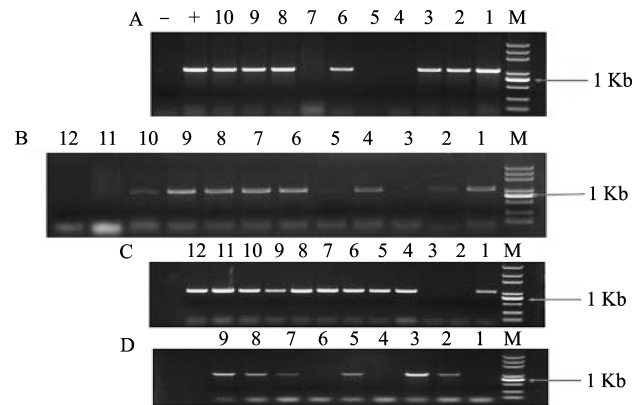
表 1 T1 代靶点编辑情况

Table 1 Targeted mutation in T1 plants

靶基因 Target gene	T1 代株系 T1 lines	检测植株数 Number of plants examined	转基因植株数 Number of transgenic plants examined	测序植株数 Number of sequenced plants	等位基因个数 Numbers of alleles	编辑基因个数 Number of mutated alleles	编辑效率 (%) Mutation rates
<i>BnaFAD2.A05</i>	1	12	7	5	10	3	30.00
	2	12	8	4	8	3	37.50
	5	12	7	5	10	4	40.00
	6	12	9	4	8	4	50.00
<i>BnaFAD2.C05</i>	1	12	7	5	10	2	20.00
	2	12	8	4	8	3	37.50
	5	12	7	5	10	3	30.00
	6	12	9	4	8	2	25.00
<i>BnaFAE1.A08</i>	1	12	7	5	10	1	10.00
	2	12	8	4	8	3	37.50
	5	12	7	5	10	3	30.00
	6	12	9	4	8	1	12.50
<i>BnaFAE1.C03</i>	1	12	7	5	10	3	30.00
	2	12	8	4	8	2	25.00
	5	12	7	5	10	3	30.00
	6	12	9	4	8	3	37.50

2.2 筛选无外源转基因成分且靶基因发生编辑的突变体植株

首先利用引物 SP-L1/R 对 T2 代植株进行普通 PCR 检测敲除背景自交分离情况, 选取外源基因已被自交分离的植株 (图 2); 其次对 T2 代植株进行靶点编辑的鉴定, 筛选靶点编辑情况较好的, 从上一代保留下来的突变体植株: *Cas9-1-12-4*、*Cas9-1-12-5*、*Cas9-2-7-11*、*Cas9-5-5-3* 和 *Cas-6-6-1*。从图 3 不难发现, 我们获得了 1 株无外源转基因成分且发生有效基因编辑的纯合突变体材料: *Cas9-1-12-5*, 其基因编辑情况如下: *BnaFAD2.A05* 缺失了 2 个碱基 (2d); *BnaFAD2.C05* 插入了 1 个碱基 (1i); *BnaFAE1.A08* 缺失了 2 个碱基 (2d); *BnaFAE1.C03* 替换了 2 个碱基 (2t)。此外, 其余 4 株突变体材料均存在有基因靶点编辑非纯合的情况。



A: *Cas9-1-12* 株系的样本; B: *Cas9-2-7* 株系的样本;
C: *Cas9-5-5* 株系的样本; D: *Cas9-6-6* 株系的样本
A: Samples of *Cas9-1-12* line, B: Samples of *Cas9-2-7* line,
C: Samples of *Cas9-5-5* line, D: Samples of *Cas9-6-6* line

图 2 T2 代转基因苗 PCR 鉴定
Fig.2 PCR identification of transgenic plants about T2 generation

A <i>Cas9-1-12-4</i> <i>BnaFAD2.A05</i> Allele1:CCCTACGTCAG--AGCTCA<u>AGG</u> 2d Allele2:CCCTACGTCAGCCAGCTCA<u>AGG</u> WT <i>BnaFAD2.C05</i> Allele1:CCCTACGTCAGCCAGCCTCA<u>AGG</u> 1i Allele2:CCCTACGTCAGCCAGCTCA<u>AGG</u> WT <i>BnaFAE1.A08</i> Allele1:CGTCGCCGGAAG-G-CTAT<u>CGG</u> 2d Allele2: CGTCGCCGGAAG-G-CTAT<u>CGG</u> 2d <i>BnaFAE1.C03</i> Allele1:TGTC<u>CCCGGAAAAGCCTATCGG</u> 2t Allele2:CGTCGCCGGAAGCCTAT<u>CGG</u> WT	B <i>Cas9-1-12-5</i> <i>BnaFAD2.A05</i> Allele1:CCCTACGTCAG--AGCTCA<u>AGG</u> 2d Allele2:CCCTACGTCAG--AGCTCA<u>AGG</u> 2d <i>BnaFAD2.C05</i> Allele1:CCCTACGTCAGCCAGCCTCA<u>AGG</u> 1i Allele1:CCCTACGTCAGCCAGCCTCA<u>AGG</u> 1i <i>BnaFAE1.A08</i> Allele1:CGTCGCCGGAAG-G-CTAT<u>CGG</u> 2d Allele2: CGTCGCCGGAAG-G-CTAT<u>CGG</u> 2d <i>BnaFAE1.C03</i> Allele1:TGTC<u>CCCGGAAAAGCCTATCGG</u> 2t Allele2:TGTC<u>CCCGGAAAAGCCTATCGG</u> 2t
C <i>Cas9-2-7-11</i> <i>BnaFAD2.A05</i> Allele1:CCCTACGTCAGCCAGCCTCA<u>AGG</u> 1i Allele2:CCCTACGTCAGCCAGCCTCA<u>AGG</u> 1i <i>BnaFAD2.C05</i> Allele1:CCCTACGTCAGCCAGCCTCA<u>AGG</u> 1i Allele2:CCCTACGTCAGCCAGCCTCA<u>AGG</u> WT <i>BnaFAE1.A08</i> Allele1:CGTCGCCGGAAGTATAT<u>CGG</u> 2t Allele2: CGTCGCCGGAAGTATAT<u>CGG</u> 2t <i>BnaFAE1.C03</i> Allele1:CGTCGCCGGAAGCCTAT<u>CGG</u> 1i Allele2:CGTCGCCGGAAGCCTAT<u>CGG</u> WT	D <i>Cas9-5-5-3</i> <i>BnaFAD2.A05</i> Allele1:CCCCCTACGTCAGCCAGCTCA<u>AGG</u> 2i Allele2:CCCCCTACGTCAGCCAGCTCA<u>AGG</u> 2i <i>BnaFAD2.C05</i> Allele1:CCCTACATCACACACCTCA<u>AGG</u> 4t Allele2:CCCTACGTCAGCCAGCCTCA<u>AGG</u> WT <i>BnaFAE1.A08</i> Allele1:GTCGCCG--AAGCCTAT<u>CGG</u> 3d Allele2: -GTCGCCG--AAGCCTAT<u>CGG</u> 3d <i>BnaFAE1.C03</i> Allele1:TGTCG--GCAAAAAGCCTAT<u>CGG</u> 3t,1d Allele2:CGTCGCCGGAAGCCTAT<u>CGG</u> WT
E <i>Cas9-6-6-1</i> <i>BnaFAD2.A05</i> Allele1:CCCTACGTCAGC--GCTCA<u>AGG</u> 2d Allele2:CCCTACGTCAGC--GCTCA<u>AGG</u> 2d <i>BnaFAD2.C05</i> Allele1:CCCTACGTCAGCAGCTCA<u>AGG</u> 1i Allele2:CCCTACGTCAGCAGCTCA<u>AGG</u> WT <i>BnaFAE1.A08</i> Allele1:CGTCGCCGGAAGTATAT<u>CGG</u> 1i Allele2:CGTCGCCGGAAGCCTAT<u>CGG</u> WT <i>BnaFAE1.C03</i> Allele1:CGCCGCCGAAAAGTCTAT<u>CGG</u> 3t Allele2:CGTCGCCGGAAGCCTAT<u>CGG</u> WT	

红色为突变位点, 绿色斜体下划线为 PAM (NGG) 位点; d: 缺失; i: 插入; t: 替换; WT: 对照 (湘油 15 号);

A、B、C、D、E 分别为部分株系中选出植株的靶点编辑情况

The mutation sites are indicated in red, The PAM (NGG) sites are underlined and indicated in italics, d: delete, i: insert, t: submit, WT: control (XY15), A, B, C, D, E are transgenic plants we choose and their mutation types

图 3 T2 代选出植株的靶点编辑情况

Fig.3 Target mutagenesis of each target genes about select plants in T2 generation

2.3 种子含油量与部分脂肪酸组分的分析

通过测定突变体植株种子的含油量发现:所选突变体植株的种子中,棕榈酸的含量相对稳定,与 XY15 无显著差异;油酸含量均极显著高于 XY15;亚油酸含量均极显著低于 XY15;而除 Cas9-1-12-5 突变体植株中二十碳烯酸的含量极显著低于 XY15 外,其余各突变体植株中二十碳烯酸的含量均与 XY15 无差异(表 2)。此外,纯合突变体植株 Cas-1-12-5 的部分脂肪酸组分分析显示,其油酸含量最高,为 80.16%;亚油酸、二十碳烯酸含量最低,分别为 10.89% 和 1.15%,说明在纯合突变体植株 Cas-1-12-5 中, *BnaFAD2* 突变可以使亚油酸含量降低; *BnaFAE1* 突变可以使二十碳烯酸的含量降低;进而通过减少油酸的消耗,提高油酸含

量。基因型为 AaCc、aaCc 和 aacc 的突变体,其种子油酸相对含量显著高于 XY15(AACC),且亚油酸含量均显著低于 XY15。AaCc 基因型的突变体相比于 aaCc 和 aacc 的突变体而言,其油酸、亚油酸的相对含量增减幅度都要缓和些,很有可能是每对 *BnaFAD2* 并非完全显性,且 *BnaFAD2.A05* 与 *BnaFAD2.C05* 之间互作关系偏向于累加效应。只有 Cas9-1-12-5(aacce1e1e2e2)的二十碳烯酸极显著低于 XY15,可能因为 *BnaFAE1.A08* 和 *BnaFAE1.C03* 之间的互作为叠加作用。Cas9-1-12-5、Cas9-2-7-11、Cas9-5-5-3、Cas9-6-6-1 的含油量均显著高于 XY15,可能是由于突变体的多不饱和脂肪酸含量减少,减少了碳源向蛋白质转化,而向油脂转化。

表 2 T2 代种子含油量及部分脂肪酸组分分析

Table 2 Analysis of oil content and some fatty acids in T2 seeds

(%)

转基因植株 Transgenic plant	基因型 Genotype	棕榈酸 Palmitic	油酸 Oleic	亚油酸 Linoleic	二十碳烯酸 Eicosenoic	含油量 Oil content	蛋白质 Protein
XY15	AACCE1E1E2E2	4.58 ± 0.06	62.04 ± 1.57	24.43 ± 0.55	3.73 ± 0.77	40.09 ± 1.61	20.13 ± 0.38
Cas9-1-12-4	AaCce1e1E2e2	4.82 ± 0.65	68.69 ± 0.59**	21.80 ± 1.36**	3.10 ± 0.49	39.28 ± 1.13	22.89 ± 0.19
Cas9-1-12-5	aacce1e1e2e2	4.28 ± 0.19	80.16 ± 1.17**	10.89 ± 0.74**	1.15 ± 0.22**	42.28 ± 0.53*	19.20 ± 1.25
Cas9-2-7-11	aaCce1e1E2e2	4.52 ± 0.04	75.82 ± 0.36**	15.13 ± 1.09**	3.40 ± 0.93	43.90 ± 0.26*	20.94 ± 0.83
Cas9-5-5-3	aaCce1e1E2e2	4.31 ± 0.09	75.97 ± 1.10**	14.05 ± 1.14**	3.07 ± 0.51	45.13 ± 0.19**	19.20 ± 0.17
Cas9-6-6-1	aaCCE1e1e2e2	4.80 ± 0.90	74.37 ± 1.27**	17.26 ± 0.48**	3.09 ± 0.35	42.92 ± 0.81*	22.14 ± 0.67

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

3 讨论

早期研究中,王瑾等^[15]和向妮艳等^[16]利用 SSR 标记检测一系列油酸含量有极显著差别的油料作物品种,发现它们的遗传多态性较低。利用诱变育种可以创造更多的变异类型。通过 EMS 处理甘蓝型油菜,获得了油酸含量达 71% 的高油酸突变体^[17];利用 ⁶⁰Co 辐射诱变 XY15 干种子,获得了油酸含量高达 91.5% 的突变体^[18],但是这两个突变体材料存在高油酸特性不稳定,农艺性状不佳的缺陷。刘芳等^[19]通过 RNA 干扰技术同时沉默 *BnaFAD2*、*BnaFAD3* 和 *BnaFATB*,也获得了油酸含量高于 80% 的转基因油菜。通过 RNA 干扰技术获得的突变体材料均含有转基因成分,不能够推广种植;锌指核酸酶是最早被广泛使用的基因编辑技术,能识别 9~12 bp,有一定的特异性,但是脱靶严重^[20]。而 CRISPR/Cas9 基因编辑技术不仅可以使目的基因功

能缺失,还可以从后代分离群体中获得不含任何外源基因成分的突变体。

多倍体作物由于同源基因的功能互补作用,使得获得目标性状完全改善且稳定的突变体要比一般二倍体作物更为困难。而甘蓝型油菜作为异源四倍体作物,其同源基因之间的相互作用会更为多样。利用 CRISPER/Cas9 实现目标性状的品种改良是完全可行的,而能否在 T1 代,甚至是 T0 代就能够获得纯合的突变体,是评价这一敲除系统是否完善的标准。Wang 等^[21]通过在 1 个基因上同时设计 4 个敲除靶点,在 T0 代转基因葡萄成苗中,4 个靶序列的突变频率为 5.55%~27.28%。Yang 等^[22]在甘蓝型油菜中,比较了对 1 个多拷贝基因使用单靶点和使用双靶点的区别:单靶点情况下,3 个靶基因的不同拷贝的突变植株占检测植株的比例达 5.00%~100%,其中绝大多数为杂合突变(与本研究的编辑结果相似),纯合突变只占 0.6%;双靶

点情况下, 3 个靶基因的不同拷贝的突变植株占检测植株的比例达 27.6%~96.6%, 纯合突变比例上升至 5.9%~20.7%。这为以后的快速获得纯合突变体提供思路。靠近 PAM 区域突变类型多为缺失和插入, 而远离 PAM 区突变发生得少但多为替换^[12]。

其他的关于甘蓝型油菜基因编辑实验研究报道中, Sun 等^[23]、Jiang 等^[8]均使用 *ATU6* 启动子去启动 sgRNA, *CaMV 35S* 启动子驱动 Cas9, 在 T1 代就获得了纯合的突变体材料。而本试验需要在 T1 代的基础上, 继续自交筛选。Feng 等^[24]、Morineau 等^[25]和 Wang 等^[26]的报道中, *CaMV 35S* 启动子或 *Ubi* 启动子驱动 Cas9 时, 突变主要发生在拟南芥体细胞中, 但是 T1 代不存在纯合或双等位基因突变; Cas9 由胚细胞特异性启动子时, T1 代的纯合或双等位基因突变的频率上升到 8.3%。Zhang 等^[27]对于需要组织培养的植物, 使用 *35S* 启动子启动 Cas9 时, T0 代纯合突变体和双等位基因突变的比例要更高。Bortes 等^[28]通过对比大量文献结果总结出一些影响基因编辑频率的因素: gRNA/Cas9 的表达水平, DNA 修复能力。本试验中, 基于 *Ubi* 启动子启动 Cas9, 且油菜转化需要经过组织培养, 7 株 T0 代转基因植株在幼苗期和成熟期的靶序列敲除状态一致(均未检测到编辑), 而在 T1 代中靶序列敲除状态却发生了变化, 可能是由于体细胞与生殖细胞 DNA 修复能力的差异造成。

参考文献

- [1] 范成明, 田建华, 胡赞民, 王珏, 吕慧颖, 葛毅强, 魏珣, 邓向东, 张蕾颖, 杨维才. 油菜育种行业创新动态与发展趋势. 植物遗传资源学报, 2018, 19(3): 447-454
Fan C M, Tian J H, Hu Z M, Wang J, Lv H Y, Ge Y Q, Wei X, Deng X D, Zhang L Y, Yang W C. Advances of oilseed rape breeding. Journal of Plant Genetic Resources, 2018, 19(3): 447-454
- [2] Matthaus B, Özcan M M, Al Juhaimi F. Some rape/canola seed oils: fatty acid composition and tocopherols. Journal of Bioscience, 2016, 71(3-4): 73-79
- [3] 张秀英, 皇甫海燕, 陈菁菁, 官春云. 高油酸油菜的研究进展及前景. 作物研究, 2017(S1): 654-657
Zhang X Y, Huangfu H Y, Cheng J J, Guan C Y. Research progress and prospect of high oleic acid rapeseed. Crop Research, 2017(S1): 654-657
- [4] Katavic V, Mietkiewska E, Barton D L, Giblin E M, Reed D W, Taylor D C. Restoring enzyme activity in nonfunctional low erucic acid *Brassica napus* fatty acid elongase 1 by a single amino acid substitution. European Journal of Biochemistry, 2002, 269(22): 5625-5631
- [5] Ohlrogge J B, Browse J A. Lipid biosynthesis. Plant Cell, 1995, 7: 957-970
- [6] 武玉花, 卢长明, 吴刚. 植物芥酸合成代谢与遗传调控研究进展. 中国油料作物学报, 2005, 27(2): 82-86
Wu Y H, Lu C M, Wu G. Advances in erucic acid metabolism and genetic regulation in plants. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2005, 27(2): 82-86
- [7] 官春云. 油菜染色体的数目、形态和行为. 中国油料作物学报, 1983, 5(1): 10-15
Guan C Y. Number, morphology and behavior of chromosomes in rapeseed. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 1983, 5(1): 10-15
- [8] Jiang L, Li D H, Jin L, Ruan Y, Shen W H, Liu C L. Histone lysine methyltransferases BnaSDG8.A and BnaSDG8.C are involved in the floral transition in *Brassica napus*. The Plant Journal, 2018, 95(4): 672-685
- [9] Yang Y, Zhu K Y, Li H L, Han S Q, Meng Q W, Khan S U, Fan C C, Xie K B, Zhou Y M. Precise editing of *CLAVATA* genes in *Brassica napus* L. regulates multilocular silique development. Plant Biotechnology Journal, 2017, 40(2): 141-151
- [10] Okuzaki A, Ogawa T, Koizuka C, Kaneko K, Inaba J, Imamura J, Koizuka N. CRISPR/Cas9-mediated genome editing of the fatty acid desaturase 2 gene in *Brassica napus*. Plant Physiology & Biochemistry, 2018, 4: 25-32
- [11] Abe K, Araki E, Suzuki Y, Toki S, Saika H. Production of high oleic/low linoleic rice by genome editing. Plant Physiology and Biochemistry, 2019, 131: 58-62
- [12] Amin N A, Ahmad N, Wu N, Pu X M, Ma T, Du Y Y, Bo X X, Wang N, Sharif R, Wang P U. CRISPR-Cas9 mediated targeted disruption of FAD2-2 microsomal omega-6 desaturase in soybean (*Glycine max.* L.). BMC Biotechnology, 2019, 19: 9-19
- [13] 曾栋昌, 马兴亮, 谢先荣, 祝钦波, 刘耀光. 植物 CRISPR/Cas9 多基因编辑载体构建和突变分析的操作方法. 中国科学, 2018, 48(7): 783-794
Zeng D C, Ma X L, Xie X R, Zhu Q L, Liu Y G. A protocol for CRISPR/Cas9-based multi-gene editing and sequence decoding of mutant sites in plants (in Chinese). Science China, 2018, 48(7): 783-794
- [14] 刘询, 张斌, 李浪, 刘春林, 阮颖. 甘蓝型油菜 BnaLCCR23 基因 CRISPR-Cas9 表达载体的构建及遗传转化. 分子植物育种, 2017, 15(8): 128-133
Liu X, Zhang B, Li L, Liu C L, Ruan Y. Construction and genetic transformation of BnaLCCR23 Gene CRISPR/Cas9 expression vector in *Brassica napus* L. Molecular Plant Breeding, 2017, 15(8): 128-133
- [15] 王瑾, 李玉荣, 程增书, 陈四龙, 宋亚辉, 刘义杰, 张朋娟. 高油酸花生品种(系)ahFAD 鉴定及遗传多样性分析. 植物遗传资源学报, 2020, 21(1): 208-214
Wang J, Li Y R, Cheng Z S, Chen S L, Song Y H, Liu Y J, Zhang P J. ahFAD genotype identification and genetic diversity analysis of high oleic acid peanut cultivars. Journal of Plant Genetic Resources, 2020, 21(1): 208-214
- [16] 向妮艳, 湛蔚, 陈贤军, 黄稳, 覃尔岱, 李刚, 严兴, 覃瑞. 红花油脂相关性状与 SSR 分子标记的关联分析. 植物遗传资源学报, 2019, 20(6): 1506-1516
Xiang N Y, Zhan W, Chen X J, Huang W, Qing E D, Li G, Yan X, Qin R. Association analysis of oil-related traits with

- SSR molecular markers in safflower. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20 (6): 1506-1516
- [17] 张宏军, 肖钢, 谭太龙, 李梅, 官春云. EMS 处理甘蓝型油菜 (*Brassica napus*) 获得高油酸材料. *中国农业科学*, 2008, 41 (12): 4016-4022
- Zhang H J, Xiao G, Tan T L, Li X, Guan C Y. High oleic acid materials were obtained from *Brassica napus* treated by EMS. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41 (12): 4016-4022
- [18] 官春云, 刘春林, 陈社员, 彭琦, 李梅, 官梅. 辐射育种获得油菜 (*Brassica napus*) 高油酸材料. *作物学报*, 2006, 32 (11): 1625-1629
- Guan C Y, Liu C L, Chen S Y, Peng Q, Li X, Guan M. High oleic acid content materials of rapeseed (*Brassica napus*) produced by radiation breeding. *Acta Agronomica Sinica*. 2006, 32 (11): 1625-1629
- [19] 刘芳, 刘睿洋, 官春云. *BnFAD2*, *BnFAD3* 和 *BnFATB* 基因的共干扰对油菜种子脂肪酸组份的影响. *植物遗传资源学报*, 2017, 18 (2): 290-297
- Liu F, Liu R Y, Guan C Y. Effect of silencing of *BnFAD2*, *BnFAD3*, *BnFATB* gene on fatty acid component in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Journal of Plant Genetic Resources*, 2017, 18 (2): 290-297
- [20] 吴学闯, 曹新有, 陈明, 张晓科, 刘阳娜, 徐兆师, 李连城, 马有志. 大豆 C3HC4 型 RING 锌指蛋白基因 GmRZFP1 克隆与表达分析. *植物遗传资源学报*, 2010, 11 (3): 343-348
- Wu X C, Cao X Y, Chen M, Zhang X K, Liu Y N, Xu Z S, Li L C, Ma Y Z. Isolation and expression pattern assay of a C3HC4 -type RING zinc finger protein Gene GmRZFP1 in *Glycine max* (L.). *Journal of Plant Genetic Resources*, 2010, 11 (3): 343-348
- [21] Wang X H, Tu M X, Wang D J, Liu J W, Li Y J, Li Z, Wang Y J, Wang X P. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in grape in the first generation. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16: 844-855
- [22] Yang H, Wu J J, Tang T, Liu K D, Dai C. CRISPR/Cas9-mediated genome editing efficiently creates specific mutations at multiple loci using one sgRNA in *Brassica napus*. *Scientific Reports*, 2017, 7: 7489
- [23] Sun Q F, Lin L, Liu D X, Wu D W, Fang T J, Wu J, Wang Y P. CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing of the *BnWRKY11* and *BnWRKY70* Genes in *Brassica napus* L.. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19: 2716
- [24] Feng Z Y, Mao Y F, Xu N F, Zhang B T, Wei P L, Yang D L, Wang Z, Zhang J J, Zheng R, Yang L, Zeng L, Liu X D, Zhu J K. Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111: 4632-4637
- [25] Morineau C, Bellec Y, Tellier F, Gissot L, Kelemen Z, Nogu   F, Faure J D. Selective gene dosage by CRISPR-Cas9 genome editing in hexaploid *Camelina sativa*. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, 15 (6) 729-739
- [26] Wang Z P, Xing H L, Dong L, Zhang H Y, Han C Y, Wang X C, Chen Q J. Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in *Arabidopsis* in a single generation. *Genome Biology*, 2015, 16: 144
- [27] Zhang H, Zhang J, Wei P, Zhang B, Gou F, Feng Z, Mao Y, Yang L, Zhang H, Xu N, Zhu J K. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnology Journal*, 2014, 12 (6): 797-807
- [28] Bort  s L, Fisch  re T R. CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances*, 2014, 33: 41-52