CRISPR/Cas9编辑棉花精氨酸酶基因促进侧根形成和发育

王艳玲^{1,2†}, 孟志刚^{2†}, 李妍妍^{2†}, 孟钊红², 王远², 孙国清², 朱涛², 梁成真², 蔡永萍¹, 郭三堆^{2*}, 张锐^{2*}, 林毅^{1*}

1. 安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230061;

2. 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: guosandui@caas.cn; zhangrui@caas.cn; yjsc01@ahau.edu.cn

收稿日期: 2017-09-10; 接受日期: 2017-09-20; 网络版发表日期: 2017-11-16

国家自然科学基金(批准号: 31301373, 31601349)和中国农业部项目(批准号: 2016ZX08009003-003-004)资助

摘要 基因敲除是植物功能基因组研究和农艺性状定向遗传改良的关键步骤, 近年来, CRISPR/Cas9介导的目标基因敲除在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)等植物中取得飞速的发展, 然而在棉花(*Gossypium* spp.)中目前尚没有成功的报道. 陆地棉(*G. hirsutum* L.)是典型的异源四倍体模式作物, 包括A亚基因组和D亚基因组. 利用CRISPR/Cas9技术同时成功地敲除A和D亚基因组精氨酸酶编码基因(*GhARG*), *Gh_A05G2143*和*Gh_D05G2397*. 无论高氮还是低氮条件下, T₁代双基因纯和株系侧根生长发育显著地提高. 因此, 本研究的CRISPR/Cas9系统可以同时高效地编辑棉花中多个同源基因, 从而实现关键农艺性状简单快速得改良.

关键词 CRISPR/Cas9, 精氨酸酶, *GhARG*, 侧根发育, 棉花

根系是植物重要的器官, 不但为植物地上部分的生长发育提供水分和养分, 而且对地上部分的固定具有基础的支撑作用, 同时根系又是植物重要的储藏器官^[1]. 因为直接和土壤接触, 根系直接感知环境变化, 并对生物和非生物逆境做出快速反应^[2]. 研究表明, 提高植物侧根的生长和发育不但能促进植株的营养生长, 而且对产量的形成具有重要的贡献. 棉花(*Gossypium* spp.)是最重要的经济作物之一, 为纺织工业提供基础的纤维原料. 棉花根系是由主根和侧根构成的典型直根系, 其侧根的形成和发育与根系统功能紧密相关.

提高侧根的数量、促进侧根的发育, 意味着增加根系的表面积, 从而增强水分和养分的供应, 对棉花地上部分的生长尤其是干旱贫瘠条件下棉花生长和纤维产量具有显著的促进作用^[3]. 因此, 培育具有强大根系系统的棉花, 不但可以促进滨海盐碱地和干旱贫瘠地植棉, 扩大棉花种植面积; 而且可以提高棉花品质和产量, 促进棉花产业的发展和升级.

精氨酸(arginine, Arg)是植物体内重要的氨基酸, 不仅是蛋白构成的重要成分, 而且是一氧化氮(NO)、脲、多胺等分子的合成前体^[4]. NO是促进根系发育

引用格式: 王艳玲, 孟志刚, 李妍妍, 等. CRISPR/Cas9编辑棉花精氨酸酶基因促进侧根形成和发育. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 1200–1203, doi: 10.1360/N052017-00203

英文版见: Wang Y L, Meng Z G, Liang C Z, et al. Increased lateral root formation by CRISPR/Cas9-mediated editing of arginase genes in cotton. Sci China Life Sci, 2017, 60: 524–527, doi: 10.1007/s11427-017-9031-y

的重要信号分子. 植物体细胞中, Arg在一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化下合成NO是一氧化氮的主要合成形式. 有意思的是, 精氨酸酶(arginase, ARG)和NOS有共同的底物精氨酸, NOS的活性受ARG活性的影响, 当ARG活性增高时, NOS活性降低. 研究表明, 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) *argah1-1*和*argah2-1*突变体内NO含量显著增加, 伴随侧根和不定根数目增加, 与野生型相比较, 突变体植株侧根数量增长了近1倍^[4]. 本课题组前期的研究发现, 过表达水稻(*Oryza sativa*)精氨酸酶编码基因(*OsARG*)转基因棉花NO含量显著降低, 侧根生长和发育受到明显的抑制^[5]. 这一结果暗示, 精氨酸酶表达水平在对棉花侧根的生长发育中具有显著的生物学意义. 因此, 人工调控棉花精氨酸酶基因表达水平可以控制棉花侧根系统生长发育, 具有潜在的应用前景.

CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)是一种新型基因编辑技术, 在多个物种基因组定点编辑中均取得了成功^[6-8]. 该技术由Cas9核酸内切酶和20 nt特异性的靶向RNA片段组成^[9]. 目前, 在小麦(*Triticum aestivum*)、烟草(*Nicotiana tabacum* L.)、水稻等作物中, 已经实现利用CRISPR/Cas9技术进行特异性基因编辑. 然而, 目前为止, 该技术在棉花遗传改良中尚未见报道. 经过5年的摸索, 本课题组成功利用CRISPR/Cas9技术定点敲除棉花精氨酸酶编码基因*GhARG*, 实现对棉花侧根系统发育进行改良. *GhARG*基因编辑棉花侧根系统的数量和表面积都显著提高, 可作为营养高效、抗旱耐盐、优质高产棉花培育的优良种植资源.

陆地棉(*G. hirsutum* L.)是典型的异源四倍体植物, 其AD型基因组由A基因组祖先与D基因组祖先杂交后染色体加倍而形成, 因此陆地棉中众多功能基因在A-和D-亚基因组存在高度同源的拷贝. 与拟南芥、水稻等植物相比较, 棉花富含酚类和色素类化合物, 为棉花原生质体的制备造成了很大的困难, 限制了利用棉花原生质体验证CRISPR/Cas9对靶点的编辑效率. 为了突破这一困难, 构建了可直接用于农杆菌介导棉花遗传转化的高效表达载体, 表达载体融合绿色荧光蛋白编码基因(green fluorescent protein, *GFP*)和卡那霉素筛选基因(neomycin phosphotransferase gene, *NPTII*), 通过愈伤组织卡那霉素筛选和荧光信号鉴定, 可快速、高效、精准地获得阳性转基因棉花再生植株.

陆地棉A-和D-亚基因组各含有一个精氨酸编码基因*GhARG*: *Gh_A05G2143*和*Gh_D05G2397*, 二者核苷酸序列具有高度的相似性. 为了实现双基因同时编辑, 在*Gh_A05G2143*和*Gh_D05G2397*第一个外显子高度一致的编码区域设计长度20 nt的sgRNA, 并转化陆地棉地研究通用受体品种Coker312 (图1A和B).

通过对愈伤组织基因组DNA编辑位点PCR产物测序分析发现, 所有阳性愈伤组织靶位点均发生了染色体编辑, 并在编辑位点进行了非同源重组修复. 凝胶电泳分析显示, sgRNA1和sgRNA2的编辑效率分别在10%~98%和10%~75%, 而且愈伤组织中sgRNA1编辑效率显著高于sgRNA2. 其中15个sgRNA1转化愈伤组织中5个编辑效率达到80%~98% (图1C, sgRNA1中5, 6, 7, 9和14泳道), 而转化sgRNA2愈伤中仅有3个转基因事件编辑效率超过70%, 且最高仅75% (图1C, sgRNA2中1, 7和13泳道). 基于sgRNA1在愈伤组织中表现出较高的编辑效率, 选择sgRNA1介导的高效编辑愈伤组织进行继代培养, 诱导获得再生植株, 并筛选*Gh_A05G2143*和*Gh_D05G2397*双基因突变株系.

分析不同愈伤组织再生的15株转化sgRNA1 T₀代转基因株系发现, 转基因棉花中精氨酸基因*Gh_A05G2143*和*Gh_D05G2397*靶标位点均发生了编辑, 且编辑类型表现为多样化, 包括单碱基替换、片段缺失和插入(图1D和网络版附图1~3). 以L6和L9两个独立的转基因株系为例子, 测序结果表明他们分别含有7种和3种不同的突变类型, 包括1 bp碱基的插入, 1~44 bp碱基的缺失等(图1D). 同时, 对田间栽培的T₀代转基因植株进行严格的自交培育, 并追踪检测T₁代目标位点编辑情况. 分析发现, *Gh_A05G2143*和*Gh_D05G2397*基因突变类型在T₁代转基因株系中仍可以检测到(网络版附图4), 证明sgRNA1介导的基因突变在转基因后代中能够稳定遗传.

为了验证*GhARG*基因敲除对于棉花侧根生长和发育的影响, 选择两个独立的T₁代转基因株系L24 (选育自转基因T₀代L6自交后代)和L28 (选育自转基因T₀代L9自交后代)分别在低氮(1/2MS培养基)和高氮(4倍氮素的1/2MS培养基)条件下培养. 在低氮条件下, 两个转基因株系L24和L28侧根数分别比对照增加25%和46%, 根系总表面积相应的增加52%和74% (图1E, G和H). 类似的, L24和L28转基因棉花在高氮条件下, 侧根数目和根总表面积也显著高于对照(图1F~H). 进一

图1 利用CRISPR/Cas9编辑棉花精氨酸酶编码基因(*GhARG*)促进棉花侧根生长和发育

A: 棉花精氨酸酶基因sgRNAs目标靶点, 红色字母表示PAM序列。紫色与黄色突出显示字母为*GhARG*在A-和D-亚基因组上的不同拷贝; B: CRISPR/Cas9载体示意图; C: 凝胶电泳分析转基因棉花愈伤编辑效率。1~15泳道为转基因愈伤系PCR产物酶切图(*Bsl* I), 16和17泳道为酶切和未酶切野生愈伤系的PCR产物。图下方数字代表目标靶点sgRNA1和sgRNA2的编辑效率; D: sgRNA1转化的T₀代植株的PCR产物测序分析。前两行为*GhARG*基因原始序列。横杠和紫色字母分别表示碱基的插入和删除。序列比对结果显示, L6和L9分别有7种和3种编辑类型。E和F: T₁代幼苗在高氮和低氮水平下的根系生长和发育情况。WT: 陆地棉转基因受体Coker312; L24和L28: 转基因棉花T₁代两个独立的转基因株系; G和H: 侧根生长发育统计分析。G: 侧根数; H: 根总表面积。HN: 高氮培养基, LN: 低氮培养基。误差线表示3个重复实验的SD。*: $P < 0.1$; **: $P < 0.05$

步生化分析发现, 所有*GhARG*突变株系中精氨酸酶活性显著降低(网络版附图5), NOS活性急剧升高(网络版附图6)和NO含量显著增加(网络版附图7)。综合分子检测和生化分析结果, 利用CRISPR/Cas9技术可以同时突变陆地棉基因组A-和D-亚基因组中两个高度同源的*GhARG*编码基因*Gh_A05G2143*和*Gh_D05G2397*, 能够有效地抑制精氨酸酶活性, 从而使棉花精氨酸酶

部分或者全部丧失其生物学功能; 精氨酸酶活性的降低可以刺激NOS酶活性升高, 催化ARG合成大量NO, 最终NO促进侧根系统的生长和发育。

综上所述, 本研究成功利用CRISPR/Cas9技术同时敲除异源四倍体陆地棉A-和D-亚基因组*GhARG*两个同源基因*Gh_A05G2143*和*Gh_D05G2397*。无论高氮还是低氮生长条件下, 双基因突变棉花株系侧根的生

长发育得到显著提升; 其发达的侧根系统为培育适应不同的生长环境下优良农艺性状的转基因棉花奠定了技术基础, 尤其是培育耐干旱、盐渍、贫瘠等土地的转基因棉花提供了新材料. 自然界存在大量的多倍体植物, 利用 CRISPR/Cas9 技术同时编辑多倍体物种

中多个同源基因, 对于快速实现作物特定农艺性状的分子遗传改良具有重要的价值. 因此, 四倍体棉花中 CRISPR/Cas9 技术的成功将为利用基因编辑技术同时编辑数个多倍体同源基因, 进而实现重要农艺性状快速改良提供重要参考.

参考文献

- 1 Zhang D, Li Z, Yan B, et al. A novel RNA-guided RNA-targeting CRISPR tool. *Sci China Life Sci*, 2016, 59: 854–856
- 2 Wolters H, Jürgens G. Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development. *Nat Rev Genet*, 2009, 10: 305–317
- 3 Li B, Liu D, Li Q, et al. Overexpression of wheat gene *TaMOR* improves root system architecture and grain yield in *Oryza sativa*. *J Exp Bot*, 2016, 67: 4155–4167
- 4 Flores T, Todd C D, Tovar-Mendez A, et al. Arginase-negative mutants of *Arabidopsis* exhibit increased nitric oxide signaling in root development. *Plant Physiol*, 2008, 147: 1936–1946
- 5 Meng Z, Meng Z, Zhang R, et al. Expression of the rice arginase gene *OsARG* in cotton influences the morphology and nitrogen transition of seedlings. *PLoS ONE*, 2015, 10: e0141530
- 6 Chen K, Gao C. Targeted genome modification technologies and their applications in crop improvements. *Plant Cell Rep*, 2014, 33: 575–583
- 7 Shan Q, Wang Y, Li J, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 686–688
- 8 Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, et al. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 691–693
- 9 Zhang Y, Chen H, Zhang Y, et al. Root morphology in response to nitrogen supply in mid-season indica rice cultivars released in different decades. *Sci China Life Sci*, 2017, 60: 439–442