

利用 CRISPR-Cas9 技术编辑 *ZmSh2* 基因 创制超甜玉米新种质

吕庆雪¹, 汤继超², 周德龙¹, 周迎鑫¹, 吴广宇³, 孙蕾¹, 宋广树¹

(1. 吉林省农业科学院, 长春 130033; 2. 吉林吉农高新技术发展股份有限公司, 吉林 公主岭 136100;

3. 公主岭市苇子沟街道综合服务中心农机科, 吉林 公主岭 136106)

摘要: 选取玉米 *ZmSh2* 基因, 利用 CRISPR-Cas9 技术构建基因编辑载体 pBUE411-*ZmSh2*, 以玉米 C01 未成熟的幼胚组织为受体, 利用农杆菌介导法将目的基因转入到玉米幼胚中, 以草铵膦为选择剂进行筛选获得 *ZmSh2* 基因编辑的突变体株系。通过表型观察发现, 编辑的纯合突变体材料明显比对照玉米自交系 C01 褶皱, 使用手持式糖度仪检测突变体植株的甜度可达到 25%。结果表明, 利用 CRISPR-Cas9 技术能够创制出超甜玉米新种质材料, 为 CRISPR-Cas9 介导玉米其他性状定向遗传改良提供了重要的理论和实践依据。

关键词: 玉米; CRISPR-Cas9 技术; *ZmSh2* 基因; 遗传转化

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Using CRISPR-Cas9 Technique to Edit *ZmSh2* Gene to Create New Germplasm of Super Sweet Maize

LÜ Qing-xue¹, TANG Ji-chao², ZHOU De-long¹, ZHOU Ying-xin¹, WU Guang-yu³, SUN Lei¹, SONG Guang-shu¹

(1. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033; 2. Jilin Hongde Seed Industry Co., Ltd.,

Gongzhuling 136100; 3. Gongzhuling Weizigou Street Integrated Service Center Agricultural

Machinery Division, Gongzhuling 136106, China)

Abstract: The *ZmSh2* gene of maize was selected and CRISPR-Cas9 technology was used to construct the gene editing vector pBUE411-*ZmSh2*. Immature embryos of maize C01 were used as receptors and the target gene was transferred into young embryos of maize by tumefaciens-mediated method. Mutant lines with edited *ZmSh2* gene were screened using phosphine oxalate as the selector. Phenotypic observation showed that the edited homozygous mutant material was significantly more wrinkled than the control maize inbred line C01. The sweetness of the mutant plants measured by a handheld sugar meter reached 25%. The results showed that CRISPR-Cas9 technology can be used to create new germplasm materials of super sweet maize and provide an important theoretical and practical basis for CRISPR-Cas9 to mediate the directed genetic improvement of other traits of maize.

Key words: Maize; CRISPR-Cas9 technology; *ZmSh2* gene; Genetic transformation

甜玉米是由普通玉米自然突变产生的, 由 1 个或多个基因的存在导致其胚乳中的糖含量增加, 是

为数不多起源于北美洲的蔬菜品种之一。甜玉米富含多糖、膳食纤维、微量元素(铁、锰、铜、锌、硼等)、维生素(A、B1、B2、B3、B4、E)、亚油酸等营养成分, 共同构成甜玉米的独特风味, 使甜玉米甜脆柔嫩, 还带有一定黏性, 深受大众喜爱^[1-3]。此外, 甜玉米中不饱和脂肪酸及人体必需氨基酸含量相对较高, 能同时满足人体所需的多种营养物质, 其子粒不完全成熟时可作为鲜食玉米食用, 还可以作为罐头和冷冻甜玉米粒等各种加工途径, 具有很高的食用、营养、经济和加工价值^[4,5]。

甜玉米表型是受 1 个或多个隐性基因共同控制

录用日期: 2023-03-15

基金项目: 吉林省农业科技创新工程国际科技合作项目“玉米子粒品质改良种质材料创制研究”(CXGC202104GH)

作者简介: 吕庆雪(1989-), 女, 黑龙江鹤岗人, 硕士, 主要从事玉米育种研究工作。E-mail: lvqingxue1989919@126.com

汤继超为并列第一作者。E-mail: 286188531@qq.com

孙蕾和宋广树为本文通信作者。

E-mail: blueheart_2011@126.com

E-mail: songguangshusunlei@126.com

的胚乳突变体,在突变体子粒发育过程中由于蔗糖向淀粉转化的途径受阻,所以子粒中积累了大量糖分,子粒表现出较高的甜度和较低的淀粉含量。甜玉米根据基因的不同可分为普通型甜玉米 *Zmsu1*、超甜型玉米 *Zmsh2* 和加强型甜玉米 *Zmsu1Zmse*。控制甜玉米性状的基因主要包括 *Zmsu1*、*Zmsh1*、*Zmsh2*、*Zmsh4*、*Zmbt1*、*Zmbt2* 等隐性基因,其中 *Zmsh2* 控制的超甜性状为甜玉米育种应用的最为广泛的隐性基因^[6]。1921年,Hutchison 最早发现控制超甜玉米的基因是位于第9染色体的S-29位点的凹陷-1基因(即 *sh1*)^[7]。Laughnan 报道了一种相似的突变体,受凹陷-2(*sh2*)基因控制,位于第3染色体的L-127位点,提出了在甜玉米育种中利用 *sh2* 基因的可能性,1959年育成第1个超甜玉米杂交种“伊利诺斯 Xtra”^[8]。*sh2* 突变体的主要基因效应的研究表明,淀粉含量进一步降低,可溶性糖含量进一步增加。*sh2* 突变子粒的含糖量是普通玉米的10倍,其中大部分是蔗糖,水溶性多糖的积累较少^[9],因此仅有少量的淀粉,种子凹陷干瘪。

当前甜玉米种质培育多数为传统育种方法,育种效率较低、耗时长同时不可避免地产生连锁累赘等问题影响甜玉米品质。基于CRISPR-Cas9基因编辑技术提高玉米产量改善品质具有重要生产意义。Shi等利用CRISPR-Cas9技术将1个玉米具有中度组成型启动子 *pGOS2* 插入到玉米内源他基因5' UTR区域,在干旱胁迫条件下被编辑的植株产量与野生型相比明显增高^[10]。本研究基于CRISPR-Cas9基因编辑定点突变技术对控制玉米子粒可溶性含糖量基因 *ZmSh2* 基因进行定向突变,以玉米自交系C01为研究材料,利用CRISPR-Cas9技术敲除控制超甜性状的玉米 *Sh2* 基因,进而获得突变株系,为超甜玉米品种开发提供种质资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

植物材料优良玉米自交系C01,由中国种子集团有限公司提供。载体质粒和菌株、试验所用大肠杆菌感受态细胞DH5 α 、农杆菌菌株LBA4404均为本实验室保存。植物表达载体 *pBUE411* 由中国农业大学生物学院惠赠;引物合成和测序由上海生物工程技术服务公司完成。

1.2 *ZmSh2*基因编辑载体的构建

针对玉米基因 *ZmSh2*,下载玉米靶基因组序列,标注外显子和内含子,选择待设计靶点的外显子,尽量选中间较长的外显子。在 <http://crispor.tefor.net/>网

站上筛选作用位点的靶点序列,根据所选的编辑位点以及载体 *pBUE411* 多克隆位点处的酶切位点设计引物, *ZmSh2* 基因编辑引物序列为 *ZmSh2*-CRISPR-F: 5' - AATAATGGTCTCAGGCGC- CCTTCG-GAAGCCGAGCTTCTAA- 3' ; *ZmSh2*-CRISPR-R: 5' - GCCCTTCGGAAGCCGAGCTTCTAAGTT-TTAGAGCTAGAAATAGC-3'。反应体系为,1 μ L 模板 *MT₁T₂*, 1 μ L *ZmSh2*-CRISPR-F, 1 μ L *ZmSh2*-CRISPR-R, 10 μ L 2 \times mix, 7 μ L ddH₂O, Total 20 μ L。PCR反应程序为,98 $^{\circ}$ C预变性3 min;98 $^{\circ}$ C变性30 s, 57 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min,共进行35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸5 min,4 $^{\circ}$ C ∞ 。纯化回收PCR产物,将获得的目的片段与载体 *pBUE411* 进行酶切连接,建立酶切-连接体系和反应体系,2 μ L 目的片段、2 μ L *pBUE411*、1.5 μ L 10 \times NEB T4 Buffer、1.5 μ L 10 \times BSA、1 μ L *BsaI*(NEB)、1 μ L T4 Ligase(NEB)/高浓度、6 μ L ddH₂O,总体系为15 μ L。反应程序为,37 $^{\circ}$ C连接5 h;50 $^{\circ}$ C连接5 min,80 $^{\circ}$ C连接10 min。连接产物转化大肠杆菌感受态细胞DH5 α ,并涂布于含卡那霉素的固体培养基平板进行阳性克隆筛选。挑取单菌落进行PCR检测、阳性条带测序。扩播测序正确的菌液提质粒,获得重组质粒 *pBUE411-ZmSh2*, -20 $^{\circ}$ C保存^[11]。

1.3 *ZmSh2*基因幼胚法转化玉米

取胚材料为玉米自交系C01,在授粉后第9天开始观察玉米幼胚,待其长到1.5 mm左右时,将幼胚加入重悬的OD值为0.3~0.4的农杆菌菌液浸泡20~30 min。将侵染过后的幼胚转移到共培养培养基,幼胚的盾片朝上,胚轴与培养基表面接触,在20 $^{\circ}$ C培养箱中暗培养3 d。把幼胚从共培养培养基转移到静息培养基,放在28 $^{\circ}$ C条件下暗培养7 d。再将所有的幼胚转移到选择培养基 I、28 $^{\circ}$ C暗培养两周。将所有的幼胚转移到选择培养基 II上,此时可以进行挑选,挑选颜色鲜艳的幼胚28 $^{\circ}$ C暗培养两周。经过两次选择之后,开始进行再生,在再生培养基中进行发芽生根,待见到明显叶片及根生长出来时转移到再生培养基 II上。从此步骤开始,进行光照培养。待再生苗长出3~4片叶时,将其转移至温室,并进行检查,阳性植株保留,缓苗2~3 d后转移到土中,而后进行正常的玉米生长管理。

1.4 基因编辑玉米植株的检测

经过草铵膦筛选后成活的玉米叶片采用CTAB法提取DNA,用 *ZmSh2* 基因特异性引物进行PCR鉴定,扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳进行检测。*ZmSh2* 基因检测引物序列:*ZmSh2*-F:5'-GCTCCT-

GTTGATGAGAGG -3'; *ZmSh2*-R: 5' - GCTCCTGT-TGATGAGAGG -3'。反应体系, 1 μ L DNA, 1 μ L *ZmSh2*-F, 1 μ L *ZmSh2*-R, 10 μ L 2 \times mix, 7 μ L ddH₂O, Total 20 μ L。PCR反应程序为, 94 $^{\circ}$ C预变性 5 min; 98 $^{\circ}$ C变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸 1 min, 共进行 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C ∞ 。分别将扩增产物条带大小正确的 PCR 产物送去测序, 测序结果与对照 C01 进行比对。

2 结果与分析

2.1 构建基因编辑载体 pBUE411-*ZmSh2*

把 *ZmSh2* 连接到 pBUE411 载体上, 然后用 *Bsa*I 进行酶切, 电泳鉴定, 并用胶回收试剂盒回收 964 bp 目的片段和 17.34 kbp 载体大片段, 用 T4-DNA 连接酶把目的片段和载体片段连接起来, 形成重组子, 重组鉴定后的质粒命名 pBUE411-*ZmSh2*, 得到鉴定后的重组质粒载体 pBUE411-*ZmSh2* 图谱 (图 1)。

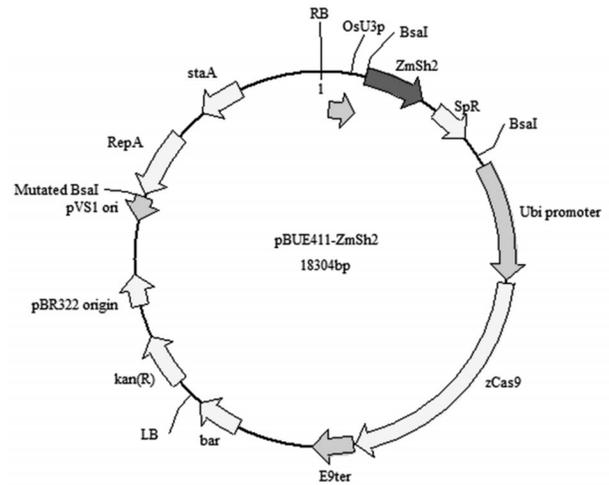
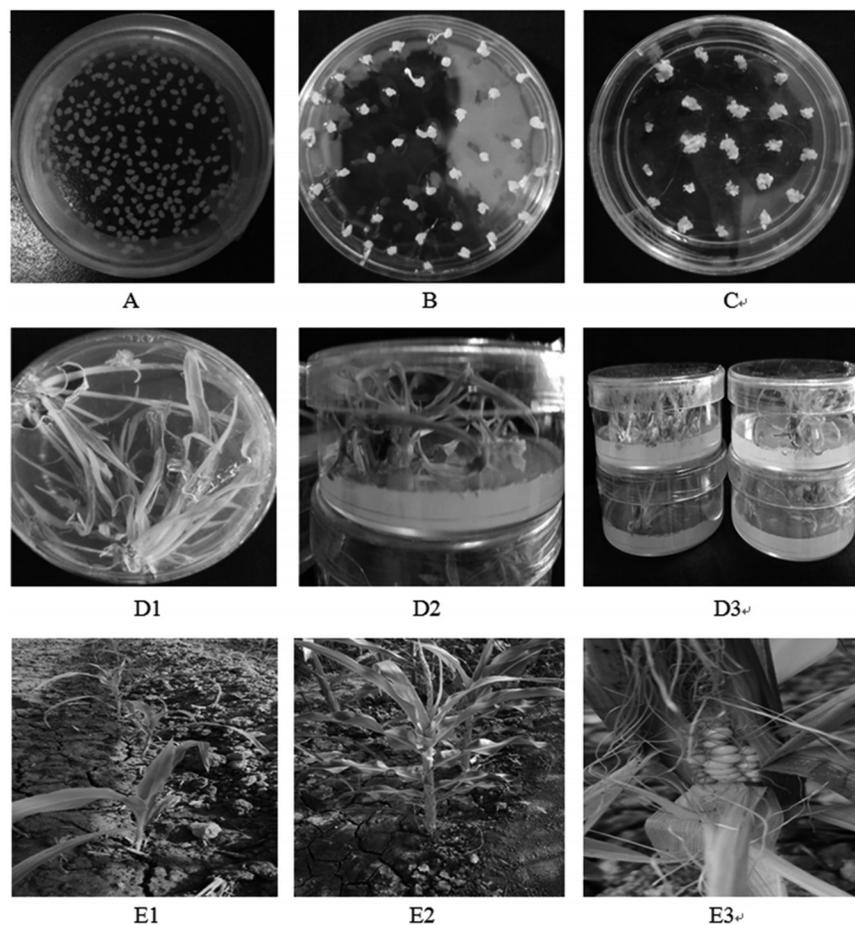


图 1 pBUE411-*ZmSh2*载体结构

Fig.1 Structure of pBUE411-*ZmSh2* vector

2.2 农杆菌介导法对玉米幼胚组织的遗传转化

以玉米自交系 C01 的愈伤组织为试验材料, 采用农杆菌介导法侵染愈伤组织, 经过预培养、共培养、筛选培养、分化培养、生根培养、炼苗、移苗这些



注: A: 侵染; B: 筛选; C: 分化; D1~D3: 生根; E1~E3: 大田。

Note: A, Infection; B, Screening; C, Differentiation; D1-D3, Rooting; E1-E3, Field.

图 2 农杆菌介导玉米幼胚的遗传转化

Fig.2 Agrobacterium-mediated genetic transformation of maize immature embryos

过程后得到的25株幼苗种到田间(图2)。

2.3 发生编辑的转基因玉米植株鉴定

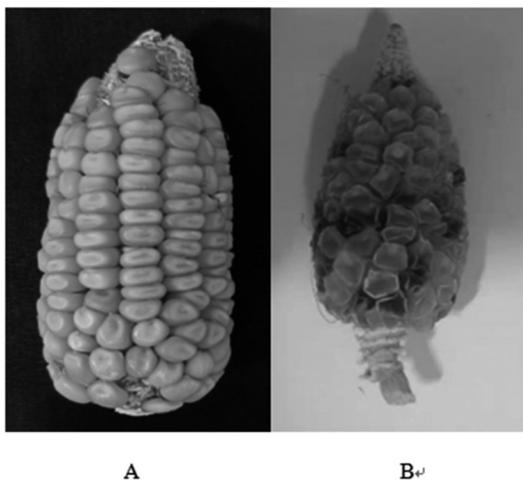
经过草铵膦筛选后成活的玉米叶片采用CTAB法提取DNA,用*ZmSh2*基因特异性引物进行PCR鉴定,扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳进行检测。引物*ZmSh2*-F/R用于扩增靶点突变,将扩增产物条带大小正确的PCR产物送去测序,测序结果与玉米自交系C01进行比对,筛选到的*ZmSh2*基因编辑的突变体株系(图3)。用CRISPR-Cas9基因编辑技术将*ZmSh2*基因敲除得到的超甜玉米纯合突变体材料明

显比对照玉米自交系C01褶皱(图4)。通过基因编辑将*ZmSh2*基因敲除后,使得子粒淀粉的合成途径受阻,使葡萄糖、蔗糖等可溶性糖类在玉米子粒中大量积累,因此,可溶性总糖含量、蔗糖含量、葡萄糖含量均显著增加。使用手持式糖度仪检测突变体植株的甜度可达到25%,其野生型玉米自交系C01可溶性总糖、蔗糖、葡萄糖含量均随着灌浆期延续呈逐渐下降的趋势,这个玉米超甜材料具有重要的育种价值,为新品种选育提供理论依据。

ZmSh2参考序列.txt	ACACAGGATGCATATGGTCTAATCTGCTTTCCTTTTTTC	400
靶点.txtC	1
C01.seq	ACACAGGATGCATATGGTCTAATCTGCTTTCCTTTTTTC	77
18036-1-1.seq	ACACAGGATGCATATGGTCTAATCTGCTTTCCTTTTTTC	77
18036-1-2.seq	ACACAGGATGCATATGGTCTAATCTGCTTTCCTTTTTTC	77
18036-3-1.seq	ACACAGGATGCATATGGTCTAATCTGCTTTCCTTTTTTC	75
18036-3-2.seq	ACACAGGATGCATATGGTCTAATCTGCTTTCCTTTTTTC	75
18041-1-2.seq	ACACAGGATGCATATGGTCTAATCTGCTTTCCTTTTTTC	76
18042-3-1.seq	ACACAGGATGCATATGGTCTAATCTGCTTTCCTTTTTTC	77
18042-3-2.seq	ACACAGGATGCATATGGTCTAATCTGCTTTCCTTTTTTC	76
18043-1-1.seq	ACACAGGATGCATATGGTCTAATCTGCTTTCCTTTTTTC	77
18043-1-2.seq	ACACAGGATGCATATGGTCTAATCTGCTTTCCTTTTTTC	77
Consensus	c	
ZmSh2参考序列.txt	CCTTCGGAAGCCGAGCTTCTAAAAATGGGCTAGTGAAGAT	440
靶点.txt	23
C01.seq	CCTTCGGAAGCCGAGCTTCTAAAAATGGGCTAGTGAAGAT	117
18036-1-1.seq	CCTT.....CCGAGCTTCTAAAAATGGGCTAGTGAAGAT	111
18036-1-2.seq	CCTT.....CCGAGCTTCTAAAAATGGGCTAGTGAAGAT	111
18036-3-1.seq	CCTT.....CCGAGCTTCTAAAAATGGGCTAGTGAAGAT	109
18036-3-2.seq	CCTT.....CCGAGCTTCTAAAAATGGGCTAGTGAAGAT	109
18041-1-2.seq	CCTT.....CCGAGCTTCTAAAAATGGGCTAGTGAAGAT	110
18042-3-1.seq	CCTT.....CCGAGCTTCTAAAAATGGGCTAGTGAAGAT	111
18042-3-2.seq	CCTT.....CCGAGCTTCTAAAAATGGGCTAGTGAAGAT	110
18043-1-1.seq	CCTT.....CCGAGCTTCTAAAAATGGGCTAGTGAAGAT	111
18043-1-2.seq	CCTT.....CCGAGCTTCTAAAAATGGGCTAGTGAAGAT	111
Consensus	cctt ccgagcttctaa	

图3 部分序列比对结果示意图

Fig.3 Partial sequence comparison between mutant lines and control plant C01



注:A为玉米自交系C01;B为基因编辑玉米突变体材料。

Note: A, Maize inbred line C01; B, Gene edited maize mutant material.

图4 基因编辑玉米材料的表型鉴定

Fig.4 Phenotypic identification of gene-edited maize materials

3 讨论

基于CRISPR-Cas9突变技术的超甜玉米育种技术,将设计好的CRISPR-Cas9编辑载体转入受体材料,对材料的 $Sh2$ 基因进行突变形成突变材料。当突变材料与育种受体材料杂交时,由于突变材料中含有转基因成分CRISPR-Cas9系统,该系统可高效地将新引入的育种受体材料中甜的显性基因 $Sh2$ 定点突变成隐性基因 $sh2$,由于受体材料中的隐性基因是通过基因编辑技术直接突变得来,而非经过回交重组得到的无连锁累赘,遗传背景经过数代回交即可恢复。转入的基因编辑元件在回交过程中即可分离出不含该元件的育种材料或亲本,亲本遗传背景恢复快,未来可以进一步加快甜糯等玉米性状的遗传改良。

基因编辑技术的出现可有效地解决传统育种中隐性基因育种方法的缺点。通过基因编辑技术将基因编辑元件转入受体材料,表达出编辑复合物对其他基因座上的目标靶标基因进行定点修饰。修饰后的靶标基因的遗传背景不变无连锁累赘。利用基因敲除将目标基因定点定向突变成隐性基因,在 BC_2 代自交即可得到高背景恢复,与传统导入隐性基因的方法相比,缩短了育种周期,提高了效率^[12]。近年来,基因组编辑技术特别是CRISPR-Cas9技术在玉米中的成功应用对促进玉米分子遗传改良具有重要意义。

参考文献:

- [1] 李 坤,李高科,肖颖妮,等.甜玉米品质遗传改良研究进展[J].广东农业科学,2020,47(11):70-77.
LI K, LI G K, XIAO Y N, et al. Research progresses in genetic improvement of sweet corn quality[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2020, 47(11): 70-77. (in Chinese)
- [2] 卢柏山,董 会,徐 丽,等.甜玉米不同采收期子粒品质性状研究[J].中国农学通报,2020,36(24):28-33.
LU B S, DONG H, XU L, et al. Changes of grain quality characters of sweet maize at different harvesting periods[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2020, 36(24): 28-33. (in Chinese)
- [3] 王 娜,史振声,王志斌,等.甜玉米品质研究进展[J].玉米科学,2007,15(6):47-50.
WANG N, SHI Z S, WANG Z B, et al. A review of studies on sweet corn quality[J]. Journal of Maize Sciences, 2007, 15(6): 47-50. (in Chinese)
- [4] 马先红,刘 晔,李 雪.玉米饮品加工研究进展[J].保鲜与加工,2019,19(1):165-170.
MA X H, LIU Y, LI X. Research progress on corn beverage processing[J]. Storage and Process, 2019, 19(1): 165-170. (in Chinese)
- [5] 刘夫国,牛丽影,李大婧,等.鲜食玉米加工利用研究进展[J].食品科学,2012,33(23):375-379.
LIU F G, NIU L Y, LI D J, et al. Research progress in processing and utilization of fresh corn[J]. Food Science, 2012, 33(23): 375-379. (in Chinese)
- [6] 郝小琴,吴子恺,张慧英.鲜食甜糯玉米子粒可溶性总糖含量的研究[J].玉米科学,2005,13(2):72-75.
HAO X Q, WU Z K, ZHANG H Y. Studies on the soluble sugar content of sweet-waxy maize kernels in the fresh days[J]. Journal of Maize Sciences, 2005, 13(2): 72-75. (in Chinese)
- [7] HUTCHSON N C. Heritable characters of maize VII. Shrunken endosperm[J]. Journal of Heredity, 1921, 12(2): 76-83.
- [8] LAUGHNAN J R. The effect of the $sh(2)$ factor on carbohydrate reserves in the mature endosperm of maize[J]. Genetics, 1953, 38(5): 485-499.
- [9] 姚文华,韩学莉,汪燕芬,等.我国甜玉米育种研究现状与发展对策[J].中国农业科技导报,2011,13(2):1-8.
YAO W H, HAN X L, WANG Y F, et al. Research status and development strategy for sweet corn breeding in China[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2011, 13(2): 1-8. (in Chinese)
- [10] SHI J, GAO H, WANG H, et al. ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions[J]. Plant Biotechnology Journal, 2017, 15(2): 207-216.
- [11] 吕庆雪,高 嵩,何 欢,等.新型玉米种子生产技术表达载体的构建及遗传转化[J].基因组学与应用生物学,2017,36(6):2497-2501.
LÜ Q X, GAO S, HE H, et al. Construction and genetic transformation of expression vector in new-type maize seeds production technology[J]. Genomics and Applied Biology, 2017, 36(6): 2497-2501. (in Chinese)
- [12] 祁显涛,李燕敏,谢传晓.玉米甜、糯性状育种的遗传学基础[J].玉米科学,2017,25(2):1-5.
QI X T, LI Y M, XIE C X. Genetic basis for sweet and waxy maize breeding[J]. Journal of Maize Sciences, 2017, 25(2): 1-5. (in Chinese)

(责任编辑:朴红梅)