

CRISPR/Cas9 介导的高效四倍体马铃薯试管薯基因编辑体系的建立

宋倩娜^{1, 2} 段永红¹ 冯瑞云^{1, 2}

(1. 山西农业大学农学院, 太谷 030801; 2. 山西省农业科学院作物科学研究所, 太原 030031)

摘要: 【目的】基因编辑技术的发展使得马铃薯实现精准分子育种成为了可能, 试管薯作为遗传转化的理想材料, 但其诱导和转化具有基因型依赖性, 建立高效且普遍适用的试管薯基因编辑技术体系可为其精准分子育种提供技术支持。【方法】以四倍体栽培马铃薯品种青薯9号和并薯6号为材料, 对试管薯诱导及其遗传转化体系进行摸索; 同时, 转化CRISPR/Cas9基因编辑载体进行基因组编辑。另外, 利用筛选的条件对其他3个马铃薯品种进行测试。【结果】全黑暗条件下, 采用2叶/段的扩繁方式, 在含有10%蔗糖和5 mg/L激动素的培养基上, 5个马铃薯品种均可成功诱导出试管薯, 但诱导效果存在差异。青薯9号的最佳分化激素配方为0.5 mg/L 6-苄氨基腺嘌呤、0.2 mg/L 吲哚-3-乙酸、0.2 mg/L 赤霉素、2 mg/L 玉米素, 再生效率、转化频率和基因编辑效率分别为41.5%、51.9%和82.1%。利用上述筛选的激素配方, 在其他4个四倍体马铃薯品种中均可高效地实现试管薯的遗传转化再生, 其中并薯6号、Desiree和晋薯16号的编辑效率分别为63.2%、33.3%和10%。【结论】建立了5个不同基因型四倍体马铃薯高效的试管薯遗传转化再生体系, 其中的4份材料成功地实现了基因组编辑。

关键词: 马铃薯; 试管薯诱导; 遗传转化再生; GFP; 基因组编辑

DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2024-0536

Establishment of CRISPR/Cas9-mediated Highly Efficient Gene Editing System in Microtubers of Potatoes

SONG Qian-na^{1, 2} DUAN Yong-hong¹ FENG Rui-yun^{1, 2}

(1. College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801; 2. Institute of Crop Sciences, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031)

Abstract: 【Objective】The development of gene editing technology has made it possible to achieve precise molecular breeding in potato. Microtubers are ideal materials for genetic transformation, but its induction and genetic transformation are of genotype-dependence. Thus, establishing an efficient and widely used gene editing technology may provide technical support for precise molecular breeding for potatoes in future. 【Method】Cultivated tetraploid potato variety Qingshu No. 9 and Bingshu No. 6 were used to explore microtuber induction and genetic transformation. Concurrently, the CRISPR/Cas9 gene editing vector was transformed for genome editing. In addition, the screening system was tested in another three potato varieties. 【Result】The efficient tuberizations of five potato varieties were obtained using stem segment with two leaves on solid media including 10% sucrose and 5 mg/L kinetin under dark condition, while induction effect varied. The optimal ratio of hormones for the regeneration of Qingshu No.9 was 0.5 mg/L 6-benzylaminopurine, 0.2 mg/L indole-3-acetic acid, 0.2 mg/L gibberellin, and 2 mg/L zeatin, under which the regeneration rate, the transformation frequency, genome editing rate was 41.5%, 51.9%, and 82.1%, respectively. Using the above screened the formula of hormones, genetic transformation and regeneration was efficiently achieved in another four potato

收稿日期: 2024-06-07

基金项目: 山西省农业科学院作物科学研究所博士基金项目(ZB1102), 山西农业大学博士科研启动项目(2021BQ44), 山西省博士毕业生来晋工作奖励资金科研项目(SXBYKY2021084), 山西省基础研究计划项目(202203021211272)

作者简介: 宋倩娜, 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 植物基因组编辑; E-mail: songqianna1007@126.com

通信作者: 冯瑞云, 男, 博士, 研究员, 研究方向: 农作物遗传改良; E-mail: fengruiyun1970@163.com

varieties, and the genome editing rate was 63.2%, 33.3%, and 10% for Bingshu No.6, Desiree, and Jingshu No. 16, respectively. 【Conclusion】 We established the highly efficient genetic transformation and regeneration system for five potato varieties, and genome editing can be completed for four potato varieties.

Key words: potato; microtubers inducing; genetic transformation and regeneration; GFP; genome editing

马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 是一种营养价值和经济价值较高的农作物^[1-2]。绝大多数的栽培马铃薯为四倍体, 常规传统育种周期长、效率低^[3]。基因工程加快了马铃薯的育种进程^[4], 但无法实现基因的定向修饰。基因编辑技术可对靶基因进行定点敲除、插入、替换、大片段删除、染色体重组等修饰, 是一种精准的分子育种手段^[5]。近年来, 基因编辑技术已经发展成为农作物精准育种的重要技术手段。马铃薯基因组测序的完成使得实现其精准分子育种成为了可能^[6]。CRISPR/Cas9 是目前应用最广泛的基因编辑技术, 在马铃薯定向遗传改良和精准育种方面发挥了重要的作用^[7-11]。然而马铃薯精准分子育种依赖于遗传转化, 尽管马铃薯遗传转化体系相对比较成熟, 但是针对不同基因型马铃薯的最适转化条件及转化频率存在较大的差异, 极大的限制了基因编辑技术在马铃薯改良中的应用。

马铃薯试管薯作为遗传转化的理想材料, 其具有取材方便、不需要预培养、操作简单、不经愈伤化可直接诱导芽再生等优点^[12]。但是马铃薯试管薯的形成和发育受多种因素的影响, 不同基因型的马铃薯对同样培养条件反应存在差异。因此, 针对特定品种马铃薯试管薯的诱导需要研究相应的配方^[13]。另外, 受基因型等因素的影响, 马铃薯遗传转化体系存在转化频率较低、重复性不强等问题, 尽管人们对其遗传转化体系进行了详细的研究, 但这些转化体系仍高度依赖基因型^[14-17]。此外, 利用抗生素筛选获得的阳性植株, 后期需要利用 PCR 等技术进行再次鉴定来评估转化效率, 工作量大。可视化筛选标记基因具有操作便捷、可直接观察等优点, 其中绿色荧光蛋白 (GFP) 报告基因在植物遗传转化效率评估中有着广泛的应用^[18]。

本研究以 2 个优良栽培马铃薯品种青薯 9 号和并薯 6 号为研究对象, 通过设置蔗糖浓度、茎段长度、植物激素配比等条件对试管薯诱导及其遗传转化再生体系进行探索。以试管薯为受体材料, 利用农杆

菌转化含有 GFP 报告基因的基因编辑载体进行基因组编辑, 建立四倍体马铃薯基因组编辑技术体系。利用筛选到的条件对其他 3 个不同基因型四倍体马铃薯进行测试, 分析不同基因型对遗传转化再生及转化频率的影响。旨在建立一种高效且普遍适用的 CRISPR/Cas9 介导的马铃薯试管薯基因编辑技术体系, 为马铃薯精准分子育种提供更好的技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用的马铃薯品种青薯 9 号、并薯 6 号、Desiree、并薯 26 号和晋薯 16 号均由本实验室保存。DH5 α 大肠杆菌感受态细胞和 GV3101 农杆菌感受态细胞购自于全式金生物技术有限公司。pKSE402 植物表达载体由云南师范大学惠赠。引物合成和测序均由上海生工生物工程股份有限公司完成。其他没有特殊说明的试验试剂和耗材均为国内或国外生物公司产品。

1.2 方法

1.2.1 马铃薯壮苗培养 将马铃薯无菌试管苗剪成带有单片叶子的茎段, 转移至 MS 培养基中, 每瓶接入 10 个茎段。置于组织培养室中培养 30 d 进行壮苗, 培养条件为 25℃、光周期 16 h / 8 h、光照强度 2 000 lx。

1.2.2 马铃薯试管薯的诱导条件 参照陈广侠和 Hossain 等^[19-20]方法, 设计以下诱导条件。(1) 不同蔗糖浓度: 将带有单片叶子的茎段分别置于含有 6%、8%、10%、12% 和 15% 蔗糖的固体培养基上进行试管薯的诱导;(2) 不同植物激素: 将含有单片叶子的茎段分别置于含有 4 mg/L 6-苄氨基腺嘌呤 (6-BA)、4 mg/L 6-BA 和 3.5 mg/L 萘乙酸 (NAA)、5 mg/L 激动素 (KT) 的固体培养基上进行试管薯的诱导;(3) 不同部位茎段长度: 将马铃薯试管苗的顶端和底端分别剪成带有单片、两片叶子长度的茎段, 并置于固体培养基上进行试管薯的诱导。以上试验

每瓶接种 8 个茎段, 设 3 次重复。置于 25℃, 全黑暗条件下培养 4 周进行诱导结薯。统计结薯个数、试管薯重、大薯重和大薯直径。

1.2.3 sgRNA 表达载体的构建 以 *StuPPO2* (GenBank: U22921.1) 基因作为靶基因, 设计 sgRNA 靶位点, 靶位点的序列为: 5'-CCT-GCTCATGAAGCTAATGAGGA-3'。根据 pKSE402 植物表达载体构建方法, 在 sgRNA 位点需添加 *Bsa* I 酶切接头 (F: 5'-ATTGTCCTCATTAGCTTCATGAGC-3'; R: 5'-AAACGCTCATGAAGCTAATGAGGA-3')。sgRNA 的退火反应: PCR 仪中设定程序 95℃ 4 min; 每 1 s 降低 0.1–20℃, 将混合单链引物形成双链 DNA。利用 *Bsa* I 酶切载体, 将其与退火后的双链 DNA 进行连接, 构建 *StuPPO2* 基因的 CRISPR/Cas9 敲除载体。将构建好的载体转化 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞, 置于含有卡那霉素的培养基上筛选阳性克隆。利用上游引物: 5'-TGTCCCAGGATTAGAATGATTAGGC-3', 与 sgRNA 位点的反向引物进行 PCR 扩增筛选阳性克隆, 挑选阳性克隆进行测序验证。

1.2.4 马铃薯试管薯的遗传转化 将测序正确的敲除载体转化 GV3101 农杆菌感受态细胞, 挑取单菌落接种于含有 50 mg/L 卡那霉素和 25 mg/L 利福平的培养基中进行振荡培养至 OD₆₀₀ 值为 0.5 后离心, 弃上清液。用 MS 液体培养基稀释沉淀至 OD₆₀₀ = 0.5, 加入 50 μ mol/L 的乙酰丁香酮备用。参照司徒怀军等^[21]方法, 在无菌条件下, 将试管薯取下, 去掉外皮和芽点, 然后切成约 1 mm 的薄片。将薄片置于农杆菌悬浮液中浸染 10 min 后晾干, 置于培养基上共培养 2 d。然后置于含有不同植物激素配比的培养基上诱导分化。分化培养基参考齐恩芳等^[22]方法, 设计 2 种培养基, 即 K1 包括 0.5 mg/L 6-BA; 1 mg/L 吲哚乙酸 (IAA); 0.2 mg/L 赤霉素 (GA₃); 1 mg/L 玉米素 (ZT); K2 包括 0.5 mg/L 6-BA; 0.2 mg/L IAA; 0.2 mg/L GA₃; 2 mg/L ZT。以上所有培养基中均再加入 150 mg/L 卡那霉素和 100 mg/L 特美汀。每两周更换一次培养基, 在此期间观察试管薯薄片的生长分化状态。待分化出芽后, 将芽剪下置于含有 50 mg/L 卡那霉素的 MS 培养基中进行生根培养。

1.2.5 马铃薯 *StuPPO2* 突变体的筛选 将筛选生根后的马铃薯植株置于 LUYOR-3415 手持式荧光

灯下进行观察, 筛选根部发出绿色荧光的植株并统计数目, 同时统计总的再生植株数目。提取阳性植株的叶片基因组 DNA, 利用载体上的特异引物 (35S-F: 5'-CTCGGATTCCATTGCCAGCT-3'; Cas9-R: 5'-AGATCCCCCTCGATCAGGAAATG-3') 进一步确定 T-DNA 是否插入基因组上。另外, 设计包含靶位点在内的长度约为 500 bp 的特异引物 (F: 5'-GAATTTTCCCACGATTCTCTCGTG-3'; R: 5'-CCATTAGCTGCATCCGCTG-3') 进行 PCR 扩增, 将扩增得到的 PCR 片段经 *Bsp*HI 酶切后进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后拍照。未被切割的条带别视为突变条带, 将其切割回收, 连接至克隆载体上进行测序, 分析在 *StuPPO2* 靶位点处核苷酸序列的变化。

1.2.6 不同基因型马铃薯试管薯基因编辑体系的测试 利用上述筛选的最适试管薯诱导及其遗传转化再生体系, 对其他 3 个不同基因型四倍体马铃薯品种进行测试, 分析基因型对马铃薯试管薯遗传转化再生及转化频率的影响。同时结合转化的基因编辑载体, 统计分析基因编辑的效率。

1.2.7 数据统计分析 所有试验数据至少进行 3 次独立的重复, 采用 Adobe Illustrator CS6 (64 Bit) 软件作图, 利用 SPSS 18.0 软件进行数据统计分析, 采用 LSD 和 Waller-Duncan (W) 进行单因素方差分析和多重比较, 数据以平均值 \pm 标准差 ($n=3$) 的形式表示。显著性差异用不同小写字母表示, 显著性检验的统计学标准为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 蔗糖浓度对马铃薯试管薯诱导的影响

前期研究结果表明, 不添加蔗糖时, 青薯 9 号和并薯 6 号几乎无法诱导试管薯的形成。当添加不同浓度蔗糖后试管薯诱导结果如表 1 所示, 随着蔗糖浓度的增加, 每瓶平均试管薯的个数和试管薯的重量呈先增加后下降的趋势。当添加蔗糖浓度增加至 10% 时, 试管薯的诱导效果最佳, 并薯 6 号和青薯 9 号的每瓶平均结薯个数分别为 3.5 粒和 2.6 粒, 试管薯平均重量分别为 0.48 g 和 0.28 g。但是当蔗糖浓度增加至 12% 和 15% 时, 2 个马铃薯品种的每瓶平均试管薯的个数和试管薯的重量均呈急剧下降趋

势。另外,添加 10% 蔗糖诱导的青薯 9 号的试管薯个数和并薯 6 号的试管薯重量较其他处理呈显著水

平。因此证明,添加适当浓度的蔗糖可以促进试管薯的形成和发育。

表 1 不同蔗糖浓度处理下 2 个马铃薯品种试管薯的诱导

Table 1 Micro tuberization under different sucrose concentrations for two potato varieties

蔗糖浓度 Sucrose concentration/%	并薯 6 号 Bingshu No. 6		青薯 9 号 Qingshu No.9	
	单瓶平均薯数 Number of microtubers per bottle/ 粒	单瓶平均薯重 Weight of microtubers per bottle/g	单瓶平均薯数 Number of microtubers per bottle/ 粒	单瓶平均薯重 Weight of microtubers per bottle/g
6	0.17±0.40b	0.02±0.04c	0.20±0.45c	0.02±0.03b
8	2.83±1.17a	0.29±0.19ab	1.80±0.84ab	0.19±0.06a
10	3.50±1.64a	0.48±0.20a	2.60±1.34a	0.28±0.13a
12	0.67±0.82b	0.09±0.10bc	0.80±0.84bc	0.05±0.05b
15	0.67±1.03b	0.06±0.11c	0.40±0.55c	0.02±0.03b

注:不同小写字母表示 $P<0.05$,下同

Note: The different lowercase letters indicate $P<0.05$, the same below

2.2 植物激素对马铃薯试管薯诱导的影响

在添加 10% 蔗糖浓度的基础上,经不同激素处理后的试管薯诱导结果如表 2 所示,与未添加植物激素相比,当仅添加 4 mg/L 6-BA 或同时添加 4 mg/L 6-BA 和 3.5 mg/L NAA 时,2 个马铃薯品种的平均试

管薯的个数和试管薯的重量均下降。当添加 5 mg/L KT 时,试管薯的个数和试管薯的重量均有所增加。并薯 6 号和青薯 9 号的每瓶平均试管薯的个数分别为 4.67 粒和 3.30 粒,试管薯的重量分别为 0.62 g 和 0.37 g。因此可知,添加适合浓度的 KT 对试管薯的

表 2 不同激素配比处理下 2 个马铃薯品种试管薯的诱导

Table 2 Micro tuberization under different hormone combinations for two potato varieties

不同激素配比 Different hormone combination	并薯 6 号 Bingshu No. 6		青薯 9 号 Qingshu No.9	
	单瓶平均薯数 / 粒 Number of microtubers per bottle	单瓶平均薯重 Weight of microtubers per bottle/g	单瓶平均薯数 Number of microtubers per bottle/ 粒	单瓶平均薯重 Weight of microtubers per bottle/g
0	3.50±1.64a	0.48±0.20a	2.60±1.34a	0.28±0.13a
4 mg/L 6-BA	0.67±0.58b	0.04±0.03b	0.33±0.58b	0.02±0.03b
4 mg/L 6-BA + 3.5 mg/L NAA	0.67±0.58b	0.03±0.03b	0.00±0.00b	0.00±0.00b
5 mg/L KT	4.67±0.58a	0.62±0.07a	3.30±0.82a	0.37±0.15a

诱导形成有促进作用,而并薯 6 号较青薯 9 号的效果更好。

2.3 不同部位茎段长度对马铃薯试管薯诱导的影响

在添加 10% 蔗糖和 5 mg/L KT 的基础上,不同部位茎段长度诱导试管薯的结果如表 3 所示,在 2 个马铃薯品种中,2 节段的平均结薯个数、平均试管薯重、大薯重和大薯直径均优于 1 节段。青薯 9 号底部节段的以上 4 个表型特征均优于顶部节段,并且底部 2 节段优于顶部 2 节段。并薯 6 号除试管

薯的个数外,其他 3 个表征特征,底部 2 节段均优于顶部 2 节段。其中,并薯 6 号底部 2 节段诱导的大薯重较其他处理呈显著水平,青薯 9 号底部 2 节段诱导的薯重较其他处理呈显著水平。因此可知,试管苗不同部位茎段长度对试管薯诱导的影响存在差异,其中,底部 2 节段长度最有利于试管薯的形成。

2.4 *StuPPO2* 基因敲除载体的构建及试管薯的遗传转化

以马铃薯内源基因 *StuPPO2* 作为研究对象,在其外显子上设计 sgRNA 靶位点,并将其连接到

表 3 2 个马铃薯品种不同部位茎段长度处理下试管薯的诱导

Table 3 Induction of tuberization under different segment lengths for two potato varieties

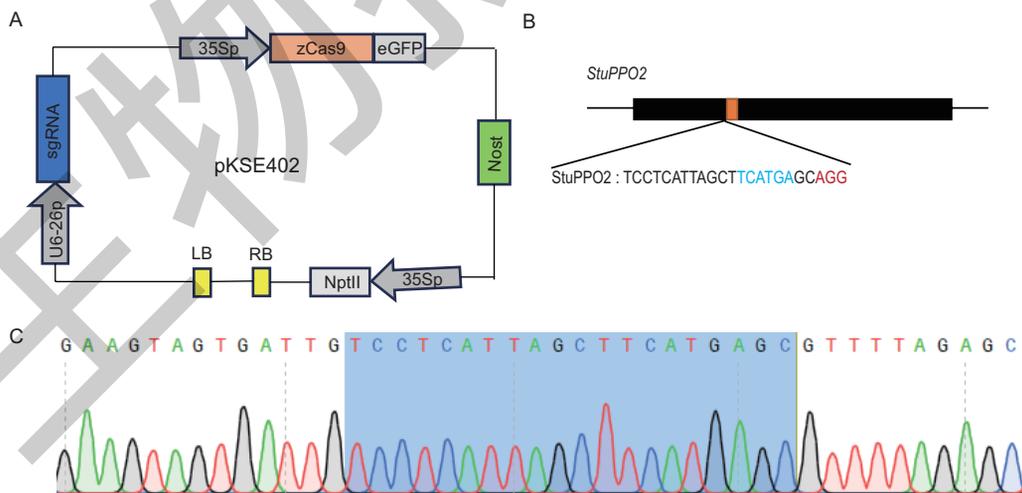
品种 Variety	处理 Treatment	单瓶平均结薯数 Number of microtubers per bottle/ 粒	单瓶平均薯重 Weight of microtubers per bottle/g	大薯重 Weight of the large tuber/g	大薯直径 Diameter of the large tuber/cm
并薯 6 号	顶部 1 个节段	2.00±2.00a	0.13±0.15a	0.08±0.08ab	0.43±0.38a
	底部 1 个节段	0.67±0.58a	0.04±0.04a	0.04±0.04b	0.38±0.34a
	顶部 2 个节段	3.33±0.58a	0.23±0.05a	0.09±0.05ab	0.65±0.09a
	底部 2 个节段	2.67±1.53a	0.45±0.37a	0.22±0.13a	0.80±0.18a
青薯 9 号	顶部 1 个节段	1.33±2.16a	0.10±0.20b	0.02±0.04b	0.18±0.29b
	底部 1 个节段	2.83±1.72a	0.20±0.17ab	0.10±0.07ab	0.44±0.06ab
	顶部 2 个节段	3.17±1.60a	0.21±0.13ab	0.10±0.04ab	0.55±0.07a
	底部 2 个节段	3.33±0.82a	0.37±0.15a	0.15±0.05a	0.59±0.06a

载体上，通过测序筛选含有正确 sgRNA 靶序列的 CRISPR/Cas9 敲除载体。在表达载体中，来自拟南芥的 U6-26 启动子驱动 sgRNA 的表达，来自花椰菜花叶病毒的 35S 启动子驱动 Cas9 和 eGFP 的表达（图 1）。将构建好的敲除载体转化农杆菌，利用农杆菌浸染试管薯薄片法进行遗传转化，分别置于 K1 和 K2 培养基上进行诱导及分化。由表 4 可以看出，青薯 9 号在 K1 和 K2 培养基上的再生能力差异较大，最适分化培养基为 K2，芽分化率可达 41.5%；并薯 6 号在 K1 和 K2 培养基上的再生能力也存在差异，最适分化培养基为 K1，芽分化率可达 44.8%。因此

可知，不同基因型马铃薯对相同激素处理的响应存在一定的差异。

2.5 *StuPPO2* 基因阳性植株的筛选及敲除突变体的检测

将上述获得的再生植株置于含有卡那霉素的 MS 培养基中进行生根培养，生根后的植株置于荧光灯下观察 GFP 的表达情况。将根部发出绿色荧光的标记为阳性再生植株，反之亦然（图 2）。为了进一步确认遗传转化的效率，将上述筛选得到的再生植株提取 DNA 进行 PCR 扩增，所有荧光植株均可扩增出条带，说明荧光筛选得到的植株均为阳性。其中



A: pKSE402 载体示意图；B: 位于 *StuPPO2* 基因上的靶位点。红色表示 PAM 序列；蓝色表示限制性酶切位点；C: 靶位点序列测序验证
A: Schematic diagram of pKSE402 vector. B: The target site in gene *StuPPO2*. Red is PAM sequence; blue is restriction enzyme site. C: Correct target sequence is confirmed by sequencing

图 1 CRISPR/Cas9 敲除载体的构建

Fig. 1 Construction of CRISPR/Cas9 deletion vector

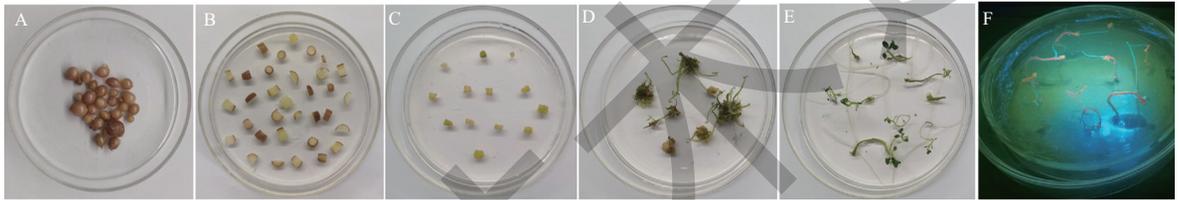
表 4 2 个马铃薯品种试管薯薄片的诱导分化再生

Table 4 Induction and differentiation of microtuber for two potato varieties

品种 Variety	培养基类型 Media types	接种薯片数 Microtubers/ 个	芽分化薯片数 Differentiation microtubers/ 个	分化效率 Differentiation efficiency/%
青薯 9 号	K1	106	8	7.5
	K2	94	39	41.5
并薯 6 号	K1	58	26	44.8
	K2	63	22	34.9

青薯 9 号和并薯 6 号的遗传转化效率分别为 51.9% 和 41.3% (表 5)。进一步使用 *StuPPO2* 基因的特异引物扩增靶向区域, 经 *BspH I* 酶切或直接测序法筛选 *StuPPO2* 基因敲除的转基因植株。其中青薯 9 号和并薯 6 号的基因编辑效率分别为 82.1% 和 63.2% (表 5)。对得到的部分突变体进行一代测序分析突

变类型, 在青薯 9 号中, 共检测到 4 株纯合突变体, 纯合突变效率为 14.3%。T0-1、T0-3 和 T0-4 为碱基删除突变体, 分别缺失了 4 个、6 个和 6 个碱基; T0-2 是碱基插入突变体, 插入了 1 个碱基 A (图 3)。其中 T0-1 和 T0-2 为移码突变, 转录 mRNA 后会出现提前终止密码子, 从而可能导致蛋白功能的



A: 试管薯的诱导; B: 试管薯薄片的浸染; C: 试管薯薄片的诱导; D: 芽的分化; E: 再生植物的生根; F: GFP 荧光筛选阳性再生植株

A: Induction of microtuber. B: Infection of microtuber thin slices. C: Induction of microtuber thin slices. D: Differentiation of buds. E: Rooting of regenerated plants. F: Positive regenerated plants are selected by GFP

图 2 农杆菌介导的马铃薯试管薯薄片遗传转化体系

Fig. 2 *Agrobacterium*-mediated potato microtuber genetic transformation system表 5 荧光再生植株中 *StuPPO2* 基因编辑的鉴定与分析Table 5 Identification and analysis of *StuPPO2* gene editing for fluorescent regenerated plants

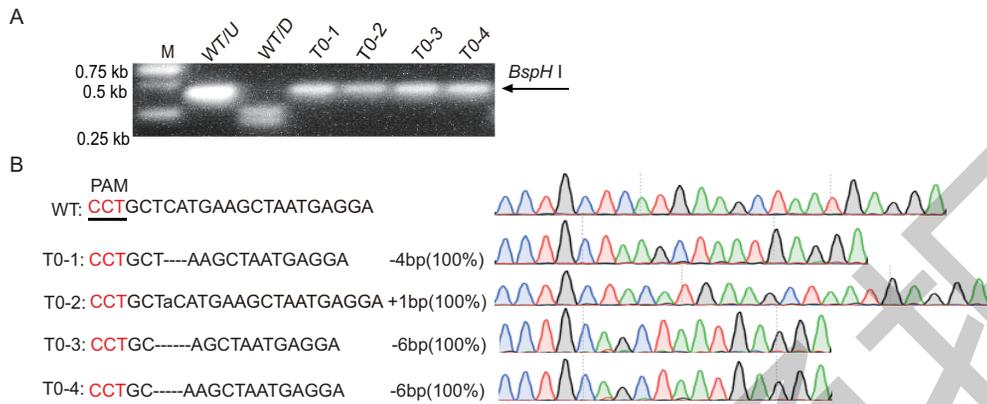
品种 Variety	再生植株 Regenerated plants/ 株	荧光植株 Fluorescent plants/ 株	转化效率 Transformation frequency/%	突变植株数 Mutant plants/ 株	突变效率 Mutation frequency/%
青薯 9 号	54	28	51.9	23	82.1
并薯 6 号	46	19	41.3	12	63.2

缺失。

2.6 试管薯基因编辑体系在其他四倍体马铃薯中的测试

依据上述建立的马铃薯试管薯基因编辑体系流程, 对其在另外 3 个不同基因型四倍体马铃薯中的应用进行测试。结果如表 6 所示, 采用 2 叶/段的扩繁方式, Desiree 的诱导结薯效率最高, 接种的 48 个茎段均可结薯, 效率达 100%; 其次是并薯 26 号, 其中有 31 个茎段可结薯, 效率为 64.6%; 晋薯 16

号的结薯效率最低, 仅有 15 个茎段可结薯, 效率为 31.3%。3 个不同基因型马铃薯的试管薯在 K1 或 K2 分化培养基上均可诱导植株的再生, 其中晋薯 16 号的芽分化效率和遗传转化频率最高, 分别为 58.8% 和 40%, 其次为 Desiree, 并薯 26 号最低。最后, 在 9 株 Desiree 和 10 株晋薯 16 号再生荧光植株中, 其中分别有 3 株和 1 株再生植株被编辑, 基因编辑的效率为 33.3% 和 10%。而在并薯 26 号中并未检测到突变的发生。



A: PCR/RE 检测突变体。WT/D 表示野生型被酶切；WT/U 表示野生型未被酶切；T0-1-T0-4 表示突变体植株；B: *stuipo2* 突变体的突变类型分析。红色序列表示 PAM 序列

A: PCR/RE assay for mutants. WT/D indicates that wild is cut by the enzyme; WT/U indicates that wild can not be cut by the enzyme; T0-1-T0-4 are mutant plants. B: Mutation type analysis of *stuipo2* mutants. The PAM sequence is highlighted in red

图 3 *StuPPO2* 基因敲除植株的检测

Fig. 3 Detection of *StuPPO2* knockout plants

表 6 其他 3 个四倍体马铃薯品种基因编辑体系的测试

Table 6 Testing of gene editing system for another three tetraploid potato varieties

品种 Variety	结薯效率 Potato yield/%	最适再生培养基 Optimal medium	芽分化效率 Differentiation efficiency/%	遗传转化频率 Transformation frequency/%	基因编辑效率 Mutation frequency/%
Desiree	(48/48) 100	K1	(27/104) 25.9	(9/28) 32.1	(3/9) 33.3
晋薯 16 号	(15/48) 31.3	K2	(30/51) 58.8	(10/25) 40.0	(1/10) 10
并薯 26 号	(31/48) 64.6	K2	(28/154) 18.2	(7/28) 25.0	(0/7) 0

3 讨论

马铃薯试管薯的形成和发育受光照强度、碳源、激素、切断、蔗糖浓度和培养方式等因素的影响^[23]，并且不同基因型马铃薯对同样生长因子的反应存在差异。添加 80 g/L 的蔗糖可以促进 Asterix 品种试管薯的形成，但过高的蔗糖浓度会影响试管薯的诱导效果^[24]。有研究表明，黑暗条件处理更有利于微型试管薯的形成^[25]。此外，外源植物激素也会影响马铃薯试管薯的诱导。添加合适浓度的 NAA 和 6-BA 可以调控费乌瑞它试管薯的诱导^[26]，但有些马铃薯品种对 6-BA 不敏感，添加后对试管薯的诱导无促进作用^[27]。赵佐敏^[28]研究表明，单独添加 5 mg/L 6-BA 或 KT 可以显著提高威芋 3 号试管薯的大薯率。最后，试管苗节段的长度和部位同样也会影响试管薯的诱导。在添加 2.5 mg/L KT 和 8% 蔗糖的培养基上，Red Norland 品种 3 节段较 1 节段结薯的质量更

好^[29]。在本研究中，添加 100 g/L 的蔗糖，完全黑暗条件处理可以促进青薯 9 号和并薯 6 号试管薯的诱导。添加 4 mg/L 6-BA 和 3.5 mg/L NAA 对 2 个品种马铃薯试管薯的诱导并无明显的促进作用。而当添加 5 mg/L KT 时则可以促进 2 个品种马铃薯试管薯的诱导，但并薯 6 号的效果较青薯 9 号更好。此外，并薯 6 号和青薯 9 号的 2 节段诱导的试管薯的数量、试管薯的重量、大薯重和大薯直径均优于 1 节段。青薯 9 号的底部节段诱导的试管薯质量优于顶部节段，并薯 6 号顶部节段诱导试管薯的数量优于底部节段，而底部节段诱导的试管薯的重量优于顶部节段。另外，利用筛选的诱导体系可以使其他 3 个不同基因型马铃薯成功诱导出试管薯，但诱导效率存在差异。

遗传转化过程中的再生难、转化频率低是制约马铃薯基因编辑育种的主要瓶颈。尽管众多研究学

者对马铃薯遗传转化过程中的外植体种类、抗生素种类及浓度等多种因素进行了优化,但对于不同基因型马铃薯而言,再生频率低和转化频率低的问题仍然存在。前人研究表明,以陇薯11号、甘单花9号和甘农薯2号的试管薯为受体材料,利用75 mg/L卡那霉素进行筛选,芽分化频率和遗传转化效率最高分别为38%和30%^[30-31]。以并薯6号的茎段为受体材料,遗传转化的效率为20.3%^[32]。杜静雅等^[33]研究表明,GFPuv筛选标记基因可用于马铃薯常规遗传转化的筛选。本研究以试管薯作为外植体,利用2种不同的诱导分化激素配方,采用150 mg/L卡那霉素的选择压,青薯9号和并薯6号的芽分化频率分别为41.5%和44.8%。同时转化CRISPR/Cas9基因编辑载体,利用载体上携带的GFP标记基因再次筛选阳性再生植株,青薯9号和并薯6号的转化频率分别为51.9%和41.3%,其中基因敲除效率分别为82.1%和63.2%。此外,利用筛选到的最适诱导分化激素配比,其他3个不同基因型马铃薯的试管薯均可高效地诱导植株的再生,并实现基因组编辑。

基因编辑技术尤其是CRISPR/Cas9技术已经成为作物改良的重要手段,其在水稻、小麦和玉米等重要农作物的定向遗传改良方面已经得到了成功的应用^[34]。尽管基因编辑技术在马铃薯定向遗传改良中也得到了成功的应用,但尚为有限^[35]。遗传转化是马铃薯基因编辑成功应用的一个必须的条件。受马铃薯品种的影响,很多马铃薯品种遗传转化体系的建立比较困难,难以获得转基因再生植株^[36]。因此,本研究建立的高效马铃薯试管薯基因编辑技术体系一方面可为马铃薯的遗传转化提供技术支撑,同时也为将来马铃薯的精准分子育种奠定基础。

4 结论

通过对5个不同基因型四倍体马铃薯的试管薯诱导及其遗传转化再生体系进行摸索,成功建立了高效的马铃薯试管薯遗传转化再生体系,同时以试管薯为受体材料,结合基因编辑载体上的GFP筛选标记基因,建立了CRISPR/Cas9介导的马铃薯试管薯基因编辑技术体系,在其中的4份马铃薯材料中成功实现了基因组编辑,效率最高可达82.1%。

参考文献

- [1] Zaheer K, Akhtar MH. Potato production, usage, and nutrition—a review [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2016, 56 (5): 711-721.
- [2] Scott G, Suárez V. The rise of Asia as the centre of global potato production and some implications for industry [J]. *Potato J*, 2012.
- [3] Stemerding D, Beumer K, Edelenbosch R, et al. Responsible innovation in plant breeding: the case of hybrid potato breeding [J]. *Plants*, 2023, 12 (9): 1751.
- [4] Halterman D, Guenther J, Collinge S, et al. Biotech potatoes in the 21st century: 20 years since the first biotech potato [J]. *Am J Potato Res*, 2016, 93 (1): 1-20.
- [5] Wang HF, La Russa M, Qi LS. CRISPR/Cas9 in genome editing and beyond [J]. *Annu Rev Biochem*, 2016, 85: 227-264.
- [6] Consortium PGS, Xu X, Pan SK, et al. Genome sequence and analysis of the tuber crop potato [J]. *Nature*, 2011, 475 (7355): 189-195.
- [7] Butler NM, Atkins PA, Voytas DF, et al. Generation and inheritance of targeted mutations in potato (*Solanum tuberosum* L.) using the CRISPR/cas system [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (12): e0144591.
- [8] Kieu NP, Lenman M, Wang ES, et al. Mutations introduced in susceptibility genes through CRISPR/Cas9 genome editing confer increased late blight resistance in potatoes [J]. *Sci Rep*, 2021, 11 (1): 4487.
- [9] Ye MW, Peng Z, Tang D, et al. Generation of self-compatible diploid potato by knockout of S-RNase [J]. *Nat Plants*, 2018, 4 (9): 651-654.
- [10] Zhao X, Jayarathna S, Turesson H, et al. Amylose starch with no detectable branching developed through DNA-free CRISPR-Cas9 mediated mutagenesis of two starch branching enzymes in potato [J]. *Sci Rep*, 2021, 11 (1): 4311.
- [11] Zheng ZZ, Ye GJ, Zhou Y, et al. Editing sterol side chain reductase 2 gene (*StSSR2*) via CRISPR/Cas9 reduces the total steroidal glycoalkaloids in potato [J]. *Life*, 2021, 14 (1): 401-413.
- [12] Sheerman S, Benan MW. A rapid transformation method for *Solanum tuberosum* using binary *Agrobacterium tumefaciens* vectors [J]. *Plant Cell Rep*, 1988, 7: 13-16.
- [13] Gopal J, Minocha JL, Dhaliwal HS. Microtuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.) [J]. *Plant Cell Rep*, 1998, 17 (10): 794-798.
- [14] Heeres P, Schippers-Rozenboom M, Jacobsen E, et al. Transformation of a large number of potato varieties: genotype-dependent variation in efficiency and somaclonal variability [J]. *Euphytica*, 2002, 124 (1): 13-22.
- [15] Kamrani M, Ebadi A, Shiri M. Effect of explant, genotype and plant growth regulators on regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of potato [J]. *J Agronomy*, 2015, 14 (4): 227-233.
- [16] Banerjee AK, Prat S, Hannapel DJ. Efficient production of transgenic potato (*S. tuberosum* L. ssp. *andigena*) plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation [J]. *Plant Sci*, 2006, 170 (4): 732-738.

- [17] Han EH, Goo YM, Lee MK, et al. An efficient transformation method for a potato (*Solanum tuberosum* L. var. Atlantic) [J]. J Plant Biotechnol, 2015, 42 (2): 77-82.
- [18] Cui D, Huo SS, Wang X, et al. Establishment of canine macrophages stably expressing GFP-tagged canine LC3 protein for effectively detecting autophagy [J]. Mol Cell Probes, 2020, 49: 101493.
- [19] 陈广侠, 马伟清, 王培伦, 等. 马铃薯试管薯茎段长度对试管薯诱导的影响 [J]. 山东农业科学, 2013, 45 (12): 40-42.
Chen GX, Ma WQ, Wang PL, et al. Effect of test-tube plantlet segment length on microtuber induction [J]. Shandong Agric Sci, 2013, 45 (12): 40-42.
- [20] Hossain MA. Standardization of sucrose and 6-benzyl aminopurine for *in vitro* micro tuberization of potato [J]. Am J Agric For, 2015, 3 (2): 25.
- [21] 司怀军, 谢从华, 柳俊. 农杆菌介导的马铃薯试管薯遗传转化体系的优化及反义 class I patatin 基因的导入 [J]. 作物学报, 2003, 29 (6): 801-805.
Si HJ, Xie CH, Liu J. An efficient protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation with microtuber and the introduction of an antisense class I patatin gene into potato [J]. Acta Agron Sin, 2003, 29 (6): 801-805.
- [22] 齐恩芳, 贾小霞, 刘石, 等. 多抗转基因马铃薯植株的获得及农杆菌介导试管薯遗传转化体系优化 [J]. 甘肃农业科技, 2020 (11): 1-6.
Qi EF, Jia XX, Liu S, et al. Obtaining of multiple resistance transgenic potato plant and optimization of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation system of potato *in vitro* [J]. Gansu Agric Sci Technol, 2020 (11): 1-6.
- [23] 张薇. 马铃薯高效再生及遗传转化体系的优化 [J]. 安徽农业科学, 2024, 52 (3): 35-39.
Zhang W. Efficient regeneration of potato and optimization of genetic transformation system [J]. J Anhui Agric Sci, 2024, 52 (3): 35-39.
- [24] Hossain MS, Mofazzal Hossain M, Hossain T, et al. Varietal performance of potato on induction and development of microtuber in response to sucrose [J]. Ann Agric Sci, 2017, 62 (1): 75-81.
- [25] Zakaria M, Hossain MM, Mian MK, et al. Performance of different protocols on *in vitro* tuberization in potato (*Solanum tuberosum*) [J]. Bangladesh J Agric Res, 2014, 39 (1): 59-66.
- [26] 颀瑞霞, 张小川, 张国辉, 等. 激素配比对马铃薯试管薯诱导和块茎形成的影响 [J]. 分子植物育种, 2018, 16 (13): 4355-4362.
Xie RX, Zhang XC, Zhang GH, et al. Effect of hormone combination on induction and *Tuber* formation of potato microtuber [J]. Mol Plant Breed, 2018, 16 (13): 4355-4362.
- [27] Gautam S, Solis-Gracia N, Teale MK, et al. Development of an *in vitro* microtuberization and temporary immersion bioreactor system to evaluate heat stress tolerance in potatoes (*Solanum tuberosum* L.) [J]. Front Plant Sci, 2021, 12: 700328.
- [28] 赵佐敏. 马铃薯组培中不同因素对诱导试管薯的影响 [J]. 中国马铃薯, 2005, 19 (5): 278-280.
Zhao ZM. Impact of various factors on the induction of microtubers [J]. Chin Potato J, 2005, 19 (5): 278-280.
- [29] Aslam A, Iqbal J. Combined effect of cytokinin and sucrose on *in vitro* tuberization parameters of two cultivars i.e., diamant and red norland of potato (*Solanum tuberosum*) [J]. Pak J Bot, 2010, 42: 1093-1102.
- [30] 王清, 李静文, 戴朝曦, 等. 纯合四倍体马铃薯遗传转化体系优化及转基因块茎的褐化鉴定 [J]. 分子植物育种, 2006, 4 (4): 553-558.
Wang Q, Li JW, Dai CX, et al. Optimization transformation system of homozygous tetraploid potato and identification browning degree of transgenic *Tuber* [J]. Mol Plant Breed, 2006, 4 (4): 553-558.
- [31] 王丽, 杨宏羽, 张俊莲, 等. 根癌农杆菌介导马铃薯试管薯转化体系的优化及 *AtNHX1* 基因的导入 [J]. 西北植物学报, 2008, 28 (6): 1088-1094.
Wang L, Yang HY, Zhang JL, et al. Optimization of transformation conditions of potato by *Agrobacterium tumefaciens* and introduction of *AtNHX1* gene [J]. Acta Bot Boreali Occidentalia Sin, 2008, 28 (6): 1088-1094.
- [32] 宋倩娜, 梅超, 霍利光, 等. 马铃薯品种‘并薯6号’遗传转化体系的建立 [J]. 中国马铃薯, 2021, 35 (5): 385-396.
Song QN, Mei C, Huo LG, et al. Establishment of genetic transformation system for potato variety ‘bingshu 6’ [J]. Chin Potato J, 2021, 35 (5): 385-396.
- [33] 杜静雅, 陈凯园, 普金, 等. 高效 GFPuv 荧光筛选基因编辑载体的改造及其在马铃薯遗传转化中的应用 [J]. 中国农业科学, 2023, 56 (11): 2223-2236.
Du JY, Chen KY, Pu J, et al. The modification of gene editing vector for efficient GFPuv fluorescence screening and its application in potato genetic transformation [J]. Sci Agric Sin, 2023, 56 (11): 2223-2236.
- [34] Rao YC, Yang X, Pan CY, et al. Advance of clustered regularly interspaced short palindromic repeats-Cas9 system and its application in crop improvement [J]. Front Plant Sci, 2022, 13: 839001.
- [35] Chincinska IA, Miklaszewska M, Sołtys-Kalina D. Recent advances and challenges in potato improvement using CRISPR/Cas genome editing [J]. Planta, 2022, 257 (1): 25.
- [36] 叶明旺, 张春芝, 黄三文. 二倍体栽培马铃薯高效遗传转化体系的建立 [J]. 中国农业科学, 2018, 51 (17): 3249-3257.
Ye MW, Zhang CZ, Huang SW. Construction of high efficient genetic transformation system for diploid potatoes [J]. Sci Agric Sin, 2018, 51 (17): 3249-3257.

(责任编辑 张婷婷)