

受体细胞胚胎发生体系促进 CRISPR/Cas 基因编辑



吴晗*, 张旷野, 王佳旭, 张志鹏, 段有厚, 刘志强, 李佳

辽宁省农业科学院高粱研究所, 辽宁沈阳 110161

摘要: 体细胞胚胎发生 (Somatic Embryogenesis, SE) 是植物再生途径之一, 可用于构建基因编辑受体系统。构建并优化 SE 体系, 对转化后的体细胞再生植株尤为重要。本研究以拟南芥野生型 Col-0 和 ABA 生物合成双突变体 *Nced6/9* 为实验材料, 构建并优化了 2,4-D 诱导的成熟种子体细胞胚胎发生体系。另一方面, 用含有载体 Pbi121-U6-26-Cas9-sgRNA-ELF6-FastR 的农杆菌 C58 蘸花转化拟南芥。利用 FastR 荧光标记选出转基因阳性种子, 通过体细胞胚胎发生体系或直接播种获得植株, 测序比较两者的基因编辑效率。结果显示, 始花后 25 °C 条件下生长的 *Nced6/9* 采种植株, 其种子胚胎发生率显著低于 15 °C 生长的植株。转基因阳性种子直接播种, 其植株并未发现目标序列被编辑; 而阳性种子通过体细胞胚胎发生体系再生后, 其植株 PAM 附近发生了基因编辑事件。结果表明, 低温条件下生长的采种植株, 可能通过 ABA 含量影响种子的体胚诱导率。成熟种子体细胞胚胎发生体系可促进获得基因编辑突变体。

关键词: 体细胞胚胎发生; CRISPR; 基因编辑; 受体系统

DOI: [10.57237/j.life.2023.03.001](https://doi.org/10.57237/j.life.2023.03.001)

Recipient Somatic Embryogenesis System Promotes CRISPR/Cas Genome Editing

Wu Han*, Zhang Kuang-ye, Wang Jia-xu, Zhang Zhi-peng, Duan You-hou, Liu Zhi-qiang, Li Jia

Sorghum Research Institute, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang 110161, China

Abstract: Somatic embryogenesis (SE) is an important type of plant regeneration, which can be used as a recipient system of genome editing. It is vital to optimize the SE system to improve the mutated somatic cells regenerated into fertile plants after transformation. 2,4-D was used as inducer of somatic embryogenesis from mature seeds. Arabidopsis wild type Col-0 and ABA biosynthesis double mutant *nced6 / 9* were grown in 15 °C and 25 °C respectively, to investigate the effect of sampled plants growth conditions on the SE rate of their seeds and to optimize SE protocol. On the other hand, construct Pbi121-U6-26-Cas9-sgRNA-ELF6-FastR was used for genome editing. The positive seeds after floral dip were separated into two parts: some for sowing and the rest seeds went through SE induction. The efficiency of gene editing was compared by sequencing. Our results show that the SE rate of *nced6 / 9* seeds from 25 °C was significantly lower than that from 15 °C. When transgenic positive seeds were sown directly, the target sequence was not found to be edited; However, when seeds went through somatic embryogenesis protocol, gene editing were found around

基金项目: 中国博士后科学基金面上项目 (2021M693846).

*通信作者: 吴晗, wuhan8453@sina.com

收稿日期: 2023-03-28; 接受日期: 2023-05-23; 在线出版日期: 2023-06-15

<http://www.lifescitech.org>

PAM sequence, suggesting that SE system could improve gene editing after transformation. The sampled plants grown at low temperature (15 °C) may affect SE ability of their seeds by ABA level. The mature seed somatic embryogenesis system can improve the efficiency of gene editing.

Keywords: Somatic Embryogenesis; CRISPR; Genome Editing; Recipient System

1 引言

高等植物具有多种再生途径, 包括创伤后器官再生、器官的诱导再生、体细胞胚胎发生等[1]。多样的再生体系广泛应用于作物分子育种[2, 3]同时也为了解植物细胞全能性提供了研究模型[4]。体细胞胚胎发生指植物胚胎从营养细胞而非受精卵发育而来的过程, 是植物再生的重要类型[5-7]。一般而言, 体细胞胚胎发生效率受基因型、外植体类型和培养条件等诸多因素影响。本质上, 这些实验参数会使外植体在表观遗传学、遗传学和生理学方面发生改变, 从而诱导再生[8-10]。大多数拟南芥 SE 系统利用 2,4-D 诱导体细胞胚[11-13], 亲本植株的生长环境、种子后熟过程中活性氧激增等都是影响体细胞胚胎发生的重要因素[7]。

农杆菌在自然界中普遍存在, 是一种革兰氏阴性细菌。自然条件下, 农杆菌能够经伤口侵染植物, 并诱导侵染部位形成冠瘿瘤或发状根。农杆菌胞质中含有环形的 Ti 质粒, 其上左右边界之间有一段可以转移的 DNA (transferred DNA), 即 T-DNA。农杆菌侵染受体后在毒性蛋白的作用下, T-DNA 能够整合到受体细胞的基因组中稳定遗传。因此, 农杆菌被视为天然的遗传转化载体。技术上讲, 植物的分生组织、愈伤组织是遗传转化的理想受体。将目的基因连接到经优化的质粒后, 借助农杆菌的自然侵染过程, 便能将目的基因整合到受体细胞的基因组中; 继而通过细胞培养或组织培养, 获得稳定遗传的转化子。目前, 农杆菌转化法是转基因研究普遍采用的方法[19]。农杆菌介导的蘸花转化法也被广泛应用于拟南芥基础研究中。

近年来, CRISPR/Cas9 介导的基因编辑使得靶向产生突变材料成为可能[14, 15]。目前, 这一技术一般基于遗传转化体系。如何将转化的体细胞再生成植株尤为重要。因此, 优化体细胞胚胎发生体系, 也是减少 CRISPR 基因编辑嵌合体 (chimeric), 固定有利基因型的重要方法[16, 17]。本文初步揭示了采种植株生长的温度对成熟种子胚胎发生的影响; 并利用体细

胞胚胎发生体系, 促进了拟南芥蘸花后获得基因编辑突变体。

2 材料与方法

2.1 植物材料及突变体

本研究使用了拟南芥野生型 Col-0、及其背景下的 ABA 生物合成双突变体 *Nced6/9* [18] 为实验材料。使用的种子都取自同批生长和收获的植株, 避免了种子批次对体细胞胚胎发生的影响。

2.2 2,4-D 诱导的拟南芥体细胞胚胎发生方法

60-120 粒种子经 75% EtOH 消毒 1min, 1:1 稀释的 84 消毒液处理 20min, 无菌水洗 4 次后, 播种在 30 ml 含 1μM 2,4-D 的液体 1/2MS 培养基中。4 °C 层积处理 2d 后, 转移至 130rpm 的摇床上, 在 3 只 50W 日光灯下连续培养 14d, 解剖镜下统计 SE 数量[7]。

2.3 采种植株生长的温度环境

将拟南芥种子播种到放有滤纸的培养皿上, 4 °C 层积处理 4 d。再将幼苗移至 rockwool 固体培养基上, 置于气候室内 (相对湿度 70%、16h 光周期 (150 μmol m⁻² s⁻¹), 昼夜温度 20 °C/18 °C)。始花后, 将植株分别置于 15 °C、25 °C 二种不同的温度条件下处理。成熟后分别采种, -80 °C 保存。

2.4 载体结构

蘸花转化所用的载体为 Pbi121-U6-26-Cas9-sgRNA-ELF6-FastR, 靶标基因为拟南芥早花基因 ELF6 (GenBank: AY664500.1)。其 tDNA 结构如下:



图 1 tDNA 结构图

Figure 1 tDNA structure

2.5 蘸花转化

配制含维生素 1/2 MS 液体接种培养基，蔗糖含量 5%。121 ℃ 高压蒸汽灭菌 20min。蘸花前加入 0.03% Silwet L-77。

在 9 x 9 cm 的方形培养钵中播种待转化拟南芥植株，保留 4 株/钵。将培养钵放入 4 ℃ 层积处理 3d。转入短日照人工气候室（12 hrs light, RV 57%, 16 ℃）。4 周后，莲座叶片直径约 3cm 时，将培养钵转入长日照条件人工气候室继续培养（16 hrs light, 22 ℃）。转化实验前一周，剪掉主花序。转化前一天浇水，并套好塑料袋保持湿度。转化当天剪掉次生花序轴上已开放花朵。将含有待转载体的农杆菌 5ml 菌液 28 ℃，300 rpm 过夜活化。将 5ml 菌液加入 250ml 含有相应抗生素的 LB 培养基中，置于 1L 大三角瓶内 28 ℃、300 rpm 过夜培养。

测定 OD600 吸光值（OD600 约 1.5）。将菌液分装至 250ml 大离心瓶中，室温离心 10min，5000 rpm 收集细胞。在液体接种培养基中重新悬浮农杆菌细胞，调节 OD600 至 1.0。将菌液倒入敞口塑料盒中，将植物倒扣入菌液中，使得花序的每一朵花都浸润在菌液中，约 15 秒后取出植株。将培养钵放入大塑料袋中，水平放置过夜促进侵染。次日将植株扶正，提起塑料袋并浇水。4 周后收获种子。蘸花过程避免使用 crossflow 超净台，而要选择 downflow 工作台，运输过程要保持容器密闭。准备好纸巾和 70% 乙醇，及时清理。

2.6 Fast R 阳性种子挑选

转化种子含有 FastR 荧光标签，可通过荧光显微镜筛选。当用红色荧光照射种子时，阳性的 FastR 转化子会呈现明显的红色荧光。用湿牙签逐一蘸取阳性种子，干燥后 -80 ℃ 保存，准备体细胞胚胎发生实验。

3 结果与讨论

3.1 2,4-D 诱导的拟南芥体细胞胚胎发生体系

本研究利用 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 诱导拟南芥幼苗体细胞胚胎发生。直接将拟南芥 Col-0 种子培养在 30ml 含有 1μM 2,4-D 的 1/2MS 液体培养基中，持续培养 14 天后，在幼苗的茎尖生长点附近可见具完整形态结构的翠绿色体细胞胚（图 1A、B）。千余次重复发现，不同种子批次间，体细胞胚胎发生率也会在 20%~50% 波动。未诱导出体细胞胚的幼苗，在茎尖生长点附近未发现任何增生组织（图 1B 左侧幼苗）；而成功诱导的体细胞胚胎具有完整胚的形态结构（图 1B 右侧外植体）。本研究的体细胞胚胎发生过程未见任何愈伤组织，属典型的直接性体细胞胚胎发生（direct somatic embryogenesis）。此流程是一种简单、快速诱导体细胞胚胎的方法，是深入探究体细胞胚胎发生过程的优良模型。

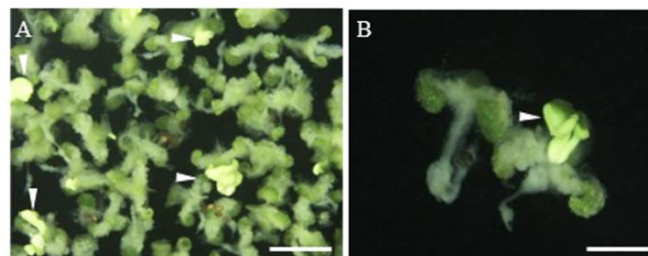


图 2 2,4-D 诱导拟南芥幼苗体细胞胚胎发生 A、体细胞胚诱导 14d 的培养情况比例尺 5mm；B、无体细胞胚胎的幼苗（左）、典型的体细胞胚胎（右）比例尺 2.5mm；三角形箭头表明体细胞胚胎

Figure 2 2-4 D induced somatic embryogenesis from Arabidopsis seedling. A: somatic embryo culture. Scale bar, 5 mm. B: Non-embryogenic (left) and embryogenic (right) explants. Arrowheads indicate somatic embryos. Scale bars, 2.5 mm

本文的体细胞胚胎诱导方法基于[7]的研究方案, 使用 2,4-D 作为诱导剂, 从幼苗中直接诱导体细胞胚。在本体系中, 体细胞胚胎发生会在茎尖生长点附近。SE 相关转录因子基因一般在培养 4-5 天后开始表达。培养 14 天后, 可进行统计。具有胚结构的幼苗约占总数的 20-50% (图 2)。在胚性幼苗中, 具极性结构的体胚占比约 25%; 而不形成体细胞胚的幼苗则在 SAM 附近无细胞增殖现象 (图 2B)。形成的体细胞胚均不经过愈伤阶段, 属典型的直接型体细胞胚胎发生[4]。

3.2 采种植株生长温度对体细胞胚胎发生的影响

始花后, 不同温度下的 Col-0、*nced6/9* 种子, 经 2,4-D 诱导胚胎发生, 结果见图 2。在野生型 Col-0 中, 未发现不同温度条件下所结种子的体细胞胚胎发生率存在显著差异; 而在 ABA 生物合成双突变体 *nced6/9* 中差异显著。前人研究表明, *nced6/9* 干种子 ABA 含量仅相当于野生型的 60%。本结果表明, 低温条件下生长的亲代植株, 可能通过 ABA 水平影响子代的胚胎发生率。

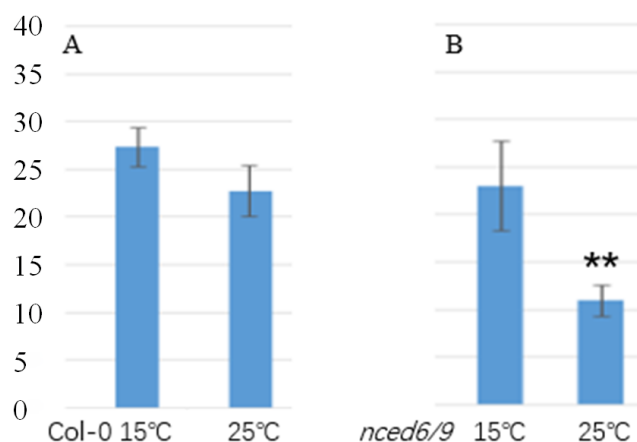


图 3 温差处理采种植株对其种子体细胞胚胎发生的影响

A, Col-0 采种植株始花后 25 °C 或 15 °C 处理, 对其种子体细胞胚胎发生率无显著影响; B, 始花后 25 °C 条件下 *nced6/9* 的种子体细胞胚胎发生率显著低于 15 °C 处理

Figure 3 Somatic embryogenesis rate from 25 °C or 15 °C treated sampled plantlets.

A: Col-0 seedlings from 25 °C or 15 °C sampled plants growth condition showed no significant difference on SE rate. B: *nced6/9* seeds from 25 °C shows higher SE rate than that from 15 °C.

成熟种子是易得的转化受体, 其转化频率与本身的体细胞胚胎发生率密切相关。采种植株开花后的生长条

件与其种子的体细胞胚胎发生有关, 这一过程很可能与 ABA 信号通路存在互作。本研究使用的 *nced6/9* 双突变体与野生型 Col-0 相比, ABA 含量低 33% [18]。图 3 表明, *nced6/9* 双突变体采种植株在开花后置于 25 °C 环境下, 会显著降低其种子的体细胞胚胎发生率。ABA 含量更低的突变体 *aba2-1*, 体细胞胚胎发生率亦极显著低于对照, 而外源添加 ABA 不能挽救体细胞胚胎发生率的下降[7]。这些结果表明, ABA 是体细胞胚胎诱导过程所必需, 起到非互补性作用 (non-complementary role)。较低 ABA 含量的采种植株若置于高温下生长, 会降低其种子的体细胞胚胎发生率。

3.3 SE 体系促进获得 CRISPR 基因编辑植株

2,4-D 介导的拟南芥体细胞胚胎发生体系, 不仅能为受体再生效率的提高提供理论基础和研究模型, 还可以直接获得基因编辑植株。蘸花转化后, 利用 FastR 筛选出全部 Cas9 阳性的种子, 一部分直接播种, 统计基因编辑效率; 另一部分通过 2,4-D 介导的体细胞胚胎发生, 获得再生植株后, 再统计基因编辑效率。结果如图 4, 仅通过蘸花的阳性种子并没有发现预期的基因编辑, 与野生型无差异; 另一部分种子通过体细胞胚胎发生诱导, 对其再生苗测序后发现 PAM 序列附近发现了序列的变化。结果表明, 2,4-D 介导的 SE 体系可促进获得基因编辑植株。

近年来, CRISPR/Cas9 介导的基因编辑使得靶向产生突变材料成为可能[14, 15]。这一技术一般基于遗传转化体系, 所以将被编辑的体细胞再生成植株尤为重要。拟南芥蘸花转化法简便可重复。然而 Cas9 在不同细胞中具有不同的编辑效率, 导致基因型嵌合。在双 sgRNA 介导的片段删除研究中, 大量体细胞变异 (somatic deletion) 很难稳定遗传到子代[16]。体细胞胚胎发生体系可减少基因编辑产生嵌合体 (chimeric), 是固定体细胞有利突变的重要方法。本研究发现, 仅通过蘸花的 Cas9 阳性种子并没有获得预期编辑结果, 序列与野生型无差异 (图 4); 而 Cas9 阳性种子通过体细胞胚胎发生后, PAM 序列附近发现了预期突变 (图 4)。结果表明, 2, 4-D 介导的体细胞胚胎发生体系, 提高了 CRISPR 介导的基因编辑效率。与前人研究结果一致[16, 17], 利用体细胞胚胎发生体系可促进体细胞变异遗传到子代。

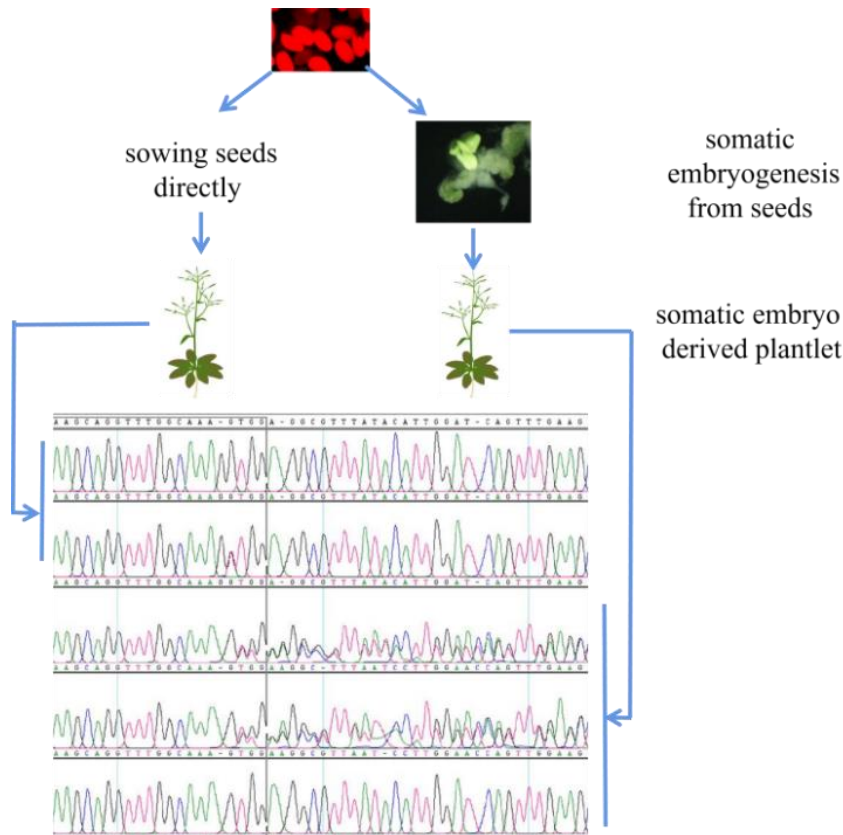


图 4 体细胞胚胎发生体系提高转化后的基因编辑效率

Figure 4 Somatic embryogenesis may improve gene editing efficiency after flower dip

4 结论

利用体细胞胚胎发生体系可促进获得 CRISPR 基因编辑突变体。低温条件下生长的采种植株，可能通过 ABA 水平影响其种子的胚胎发生率。

参考文献

- [1] Ikeuchi M, Ogawa Y, Iwase A, et al. Plant regeneration: Cellular origins and molecular mechanisms [J] (2016). Development, 143 (9): 1442-1451.
- [2] Bridgen MP, Houtven W Van, Eeckhaut T. Plant Tissue Culture Techniques for Breeding. [M]. 2019: 127-144.
- [3] Dwivedi SL, Britt AB, Tripathi L, et al. Haploids : Constraints and opportunities in plant breeding (2015) [J]. Biotechnol Adv., (33): 815-829.
- [4] Horstman A, Bemer M, Boutilier K. A transcriptional view on somatic embryogenesis (2017) [J]. Regeneration., 4 (4): 201-216.

- [5] Fehér A. Biochimica et Biophysica Acta Somatic embryogenesis - Stress-induced remodeling of plant cell fate (2015) [J]. 1849: 385-402.
- [6] Méndez-Hernández HA, Ledezma-Rodríguez M, Avilez-Montalvo RN, et al. Signaling overview of plant somatic embryogenesis (2019) [J]. Frontiers in Plant Science. 10: 77.
- [7] Wu H, Chen B, Fiers M, et al. Seed maturation and post-harvest ripening negatively affect arabidopsis somatic embryogenesis (2019) [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult. 139 (1): 17-27.
- [8] Lowe K, Wu E, Wang N, et al. Morphogenic regulators Baby boom and Wuschel improve monocot transformation (2016) [J]. Plant Cell. 28 (9): 1998-2015.
- [9] Motte H, Vercauteren A, Depuydt S, et al. Combining linkage and association mapping identifies RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE1 as an essential Arabidopsis shoot regeneration gene (2014) [J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 111 (22): 8305-8310.
- [10] Arrillaga I, Morcillo M, Zanón I, et al. New approaches to optimize somatic embryogenesis in maritime pine (2019) [J]. Front Plant Sci. 10 (2): 1-14.

- [11] Luo Y, Koop H, Strasse M, et al. Somatic embryogenesis in cultured immature zygotic embryos and leaf protoplasts of *Arabidopsis thaliana* ecotypes (1997) [J]. *Planta*. 202: 387-396.
- [12] Kobayashi T, Nagayama Y, Higashi K, et al. Establishment of a tissue culture system for somatic embryogenesis from germinating embryos of *Arabidopsis thaliana* (2010) [J]. *Plant Biotechnology*. 27: 359-364.
- [13] Chen B, Fiers M, Dekkers BJW, et al. ABA signalling promotes cell totipotency in the shoot apex of germinating embryos (2021) [J]. *J Exp Bot*. 72 (18): 6418-6436.
- [14] Garneau JE, Fremaux C, Horvath P, et al. The CRISPR / Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA (2010) [J]. *Nature*. 468: 67-71.
- [15] Gao C. Genome engineering for crop improvement and future agriculture (2021) [J]. *Cell*. 184 (6): 1621-1635.
- [16] Durr J, Papareddy R, Nakajima K, et al. Highly efficient heritable targeted deletions of gene clusters and non-coding regulatory regions in *Arabidopsis* using CRISPR/Cas9 (2018) [J]. *Sci Rep*. 8 (1): 1-11.
- [17] Castel B, Tomlinson L, Locci F, et al. Jones JDG. Optimization of T-DNA architecture for Cas9-mediated mutagenesis in *Arabidopsis* (2019) [J]. *PLoS One*. 14 (1): e0204778.
- [18] Lefebvre V, North H, Frey A, et al. Functional analysis of *Arabidopsis* NCED6 and NCED9 genes indicates that ABA synthesized in the endosperm is involved in the induction of seed dormancy (2006) [J]. *Plant J*. 45 (3): 309-19.
- [19] Ziemienowicz A. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: Factors, applications and recent advances. (2014) [J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3 (4): 95-102.

作者简介

吴晗

1984 年生, 博士, 助理研究员. 研究方向为植物 DNA-free 基因编辑研究.

E-mail: wuhan8453@sina.com