

基因组编辑技术在马铃薯精准分子育种中的应用及研究展望

叶明旺¹ 李灿辉² 龚明¹

(1. 云南师范大学生命科学学院 生物能源持续开发利用教育部工程研究中心 云南省生物质能与环境生物技术重点实验室, 昆明 650500;
2. 云南师范大学马铃薯科学研究院 云南省高校马铃薯生物学重点实验室, 昆明 650500)

摘要: 基因组编辑技术经过近十年的快速发展, 已成为基因功能研究及精准分子育种强有力的工具。该技术主要是通过造成靶位点双链 DNA 断裂, 引发机体的修复机制, 从而在特定位点引入 DNA 的插入或缺失突变。目前, 随着国家实行的马铃薯主粮化战略, 人们对于马铃薯品种的需求更加的多样化, 而基因组编辑技术将会为马铃薯的定向遗传改良和精准分子育种提供一条高效快捷的技术实现途径。综述了 3 类主流基因组编辑技术的原理, 回顾了基因组编辑技术在马铃薯品种改良和精准分子育种中的应用, 讨论了基因组编辑对于马铃薯精准分子育种的意义和目前存在的问题, 并对基因组编辑技术在马铃薯精准分子育种中的应用进行了展望, 旨在为该技术在以后的马铃薯精准分子育种中的应用提供借鉴和新思路。

关键词: 马铃薯; 基因组编辑; 精准分子育种; 应用

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2019-1272

Applications and Prospect of Genome Editing Techniques in Precise Potato Molecular Breeding

YE Ming-wang¹ LI Can-hui² GONG Ming¹

(1. School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Engineering Research Center of Sustainable Development and Utilization of Biomass Energy of Ministry of Education, Key Laboratory of Biomass Energy and Environmental Biotechnology of Yunnan Province, Kunming 650500; 2. Joint Academy of Potato Sciences, Yunnan Normal University, Key Laboratory of Potato Biology in Universities of Yunnan Province, Kunming 650500)

Abstract: After nearly a decade of rapid development, genome editing techniques have become powerful tools for gene function research and precise molecular breeding. These technologies mainly result in the DNA insertion or deletion mutation at the target site by causing double-stranded DNA fracture at these sites and triggering the repair mechanisms of the cells. With the implementation of the national strategy of using potato as staple diet, people's demand for potato varieties will become more and more multi-faceted, and genome editing will provide efficient and fast technical approaches for directed genetic improvement and precise molecular breeding in potato. In this paper, the principles of three mainstream genome editing techniques were briefly reviewed, their applications in improvement and precise molecular breeding of potato varieties were retrospected, significance and present problems of these techniques in potato precision molecular breeding were discussed, and the future application of genome editing in potato molecular breeding was prospected, aimed at providing reference and new ideas for future potato precision molecular breeding.

Key words: potato; genome editing; precise molecular breeding; application

马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 是世界上最重要的块茎类粮食作物, 其在单位土地和时间内所提

供的糖类、蛋白质、矿物质以及维生素超过了其他任何作物^[1]。除了可以鲜食之外, 马铃薯还可以通

收稿日期: 2019-12-18

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31860062, 31460059)

作者简介: 叶明旺, 男, 博士研究生, 研究方向: 生物化学与分子生物学; E-mail: yemingwang0312@foxmail.com

通讯作者: 龚明, 男, 博士, 教授, 研究方向: 植物逆境生物学; E-mail: gongming6307@163.com

过工业加工成许多商品,如薯片、酒精、淀粉、动物饲料等^[2-3]。由于马铃薯栽培种绝大多数为四倍体,常规育种方法周期漫长,费时费工。尽管传统育种方法已经成功育成了许多品种,但是绝大多数马铃薯栽培种是高度杂合的同源四倍体,要想将有益突变集中到一个品种当中相当困难,通常育成一个成熟的品种需要十几年的时间^[4]。然而,随着全球气候变化、新病原体的出现以及提高马铃薯品质、储藏性、抗逆性等的需要,要求培育出具有理想农艺性状的马铃薯新品种。目前,通过多种分子辅助育种方法来进行马铃薯性状的改良,进而提高产量、加工品质以及储藏品质等方面已取得了一些进展^[5]。随着马铃薯的基因组测序完成^[6],以及基因组编辑技术的迅猛发展,使得马铃薯的育种改良进程得以加快,定向设计和精准分子育种成为可能。本课题组在2018年通过CRISPR/Cas9基因组编辑体系对自交不亲和的二倍体马铃薯*S-RNase*基因进行了编辑敲除,成功获得了自交亲和的二倍体马铃薯突变材料,为后续的二倍体马铃薯杂交育种体系建立奠定了重要的基础^[7]。本文简要综述了3类主流基因组编辑技术的原理,回顾了基因组编辑技术在马铃薯品种改良和精准分子育种中的应用,讨论了基因组编辑技术对于马铃薯精准分子育种的意义和目前存在的问题,并对基因组编辑技术在马铃薯精准分子育种中的应用进行了展望,旨在为该技术在以后的马铃薯精准分子育种中的应用提供借鉴和新思路。

1 基因组编辑技术

基因组编辑技术是通过位点特异性核酸酶(Site-specific nucleases, SSNs)对靶位点造成DNA的双链断裂(Double strand breaks, DSBs),从而引发机体的修复机制,修复机制包括两种:非同源末端连接和同源重组修复^[8]。非同源末端连接是一种高效的修复方式,能够快速在断口完成修复,但是重复的修复会引入错配,导致断裂位点产生缺失或者插入突变;这些突变使得基因的阅读框发生了变化,进而翻译出无功能或功能变异的蛋白,从而达到敲除该基因的目的。同源重组修复指的是断裂位点在修复的时候直接以转入细胞的与断裂位点同源的外源片段作为修复模板,使得在断口位置插入特

定的基因或片段^[9]。在此基础上,人们可以对任何已知序列的基因进行敲除以研究其功能,同时也可以对目的基因进行定点修复,使之恢复或者替换基因功能。目前主要用于基因组编辑的有3种SSNs:锌指核酸酶(Zinc finger nucleases, ZFNs)、类转录激活因子效应物核酸酶(Transcription activator-like effector nucleases, TALENs)以及RNA介导的规律的成簇间隔短回文重复序列(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/ clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated protein 9, CRISPR/Cas9)。

1.1 ZFNs

ZFNs是由人工合成的核酸酶,包括了两个结构域:一个是由多个锌指结构组成的DNA结合结构域,每个锌指结构能结合3bp的DNA序列^[10-11];另一个是由非特异性核酸内切酶*Fok I*组成的DNA断裂结构域^[12]。*Fok I*需要以二聚体的形式才能够行使断裂功能^[13],因此需要在靶点两端单独设计ZFN,使与之相连的*Fok I*核酸酶能够在靶点聚集,增加形成二聚体的概率,完成切割DNA双链并引发细胞的修复机制。

早在2001年,Bibikova等^[14]就通过人工合成的ZFNs和外源质粒注射到非洲蟾蜍的卵母细胞中,成功获得了经过切割修复的质粒。随后,Bibikova等^[15]又在果蝇中实现了对Y(*yellow*)基因进行定向突变,催生了ZFNs在基因组编辑中的应用。ZFNs已被报道应用于一些植物基因组编辑当中,如拟南芥^[16]、玉米^[17]、大豆^[18]等,但未见以马铃薯为材料的报道。

虽然ZFNs能够大大提高基因的编辑效率,但是由于公开的锌指模块较少,构建一个能够识别特定靶位点的ZFNs需要通过大量的筛选获得能够特异结合靶位点的锌指蛋白。此外,ZFNs对细胞的毒性也限制了该技术的广泛应用^[19]。

1.2 TALENs

人工改造的TALENs和ZFNs原理相似,其断裂结构域同样由非特异性核酸内切酶*Fok I*组成;其DNA结合结构域是黄单胞菌入侵植物时所分泌的转录激活因子效应物^[20](Transcription activator-

like effector, TALEs)。TALEs 能够进入细胞核, 结合特定的 DNA 序列, 激活部分基因的表达, 增加植物对病毒的敏感性, 也有可能引发植物防御机制。TALEs 是由多个 33–35 个氨基酸组成的串联重复序列组成, 每个重复大部分氨基酸的序列是不变的, 只有在 12/13 位的氨基酸 (重复可变双残基, Repeat-variable diresidues, RVDs) 是可变的。含有不同 RVDs 的重复序列能够一对一的识别不同的碱基, 利用特定的 TALEs 模块组合, 能够实现识别任何 DNA 序列的目的。连接在 TALEs 上的核酸酶 *Fok I* 在局部形成二聚体, 就能在靶位点进行精确 DSBs, 实现基因组编辑的目的^[21–22]。相对 ZFNs 来说, TALENs 省去了大规模筛选锌指结构的程序, 加大了靶向任何序列的能力, 但是实现 TALENs 模块的组装比较费时费力, 影响了该技术的大规模推广。

自 2010 年以来, TALENs 在酵母中完成了对外源质粒的 DSBs 以及同源重组修复后, 该技术已经在一些农作物上进行了应用, 如烟草^[23]、大豆^[24]等。TALENs 在马铃薯中也有几个成功的例子, 2015 年, Nicolia 等^[25]建立了马铃薯原生质体的基因组编辑体系, 其编辑效率达到了 10%。同样, TALENs 介导的同源重组修复在马铃薯中也成功实现, Butler 等^[26]2016 年通过双生病毒提供了大量的修复模板, 成功提高了在马铃薯中的同源重组效率。

1.3 CRISPR/Cas9

早在 1987 年, 日本科学家 Ishino 等^[27]在研究大肠杆菌的 *iap* 基因的时候, 在其侧翼发现了一连串由 29 个碱基组成的串联重复序列, 其间由 32 个特异碱基间隔开。在之后的研究中发现, 这类结构存在于许多的原核生物中^[28]。这种结构在 2002 年被正式命名为 CRISPR, 其间的间隔特异序列被称之为 Spacer。2005 年, Bolotin^[29]通过比较嗜热链球菌的 CRISPR 序列和噬菌体的基因组时发现, 噬菌体的序列与 Spacer 的序列是部分匹配的, 同时证实了 CRISPR 系统与嗜热链球菌抵抗病毒相关。科学家们在对 CRISPR 的进一步研究中发现, 细菌可以扫描噬菌体中在序列 3' 端含有 NGG 也就是 PAM 序列的 DNA 序列并进行切割, 然后整合到细菌自身的 CRISPR 序列当中, 形成新的 Spacer; 当噬菌体再次

入侵的时候, CRISPR 序列转录成 CRISPR RNA, 经加工成熟后与 Cas 蛋白结合, 引导 Cas 蛋白切割与之匹配的噬菌体 DNA 序列, 达到防御的目的。

CRISPR 根据基因的保守性和组织排列特异性分为 3 种类型: I 型和 III 型需要 6 到 7 种蛋白质才能发挥作用, 目前通常用的是 II 型的 CRISPR, 只需要一种 Cas9 蛋白就能发挥作用^[30]。2012 年, Jinek 等^[31]首先构建了 CRISPR/Cas9 载体, 完成了环状 DNA 以及线性化 DNA 的体外切割。该系统主要含有两部分: Cas9 蛋白以及导向靶基因的单链引导 RNA (Single guide RNA, sgRNA)。因为潜在的靶点很多, 以及载体构建方便, CRISPR/Cas9 系统开始大规模应用于各种生物的研究。

目前, CRISPR/Cas9 系统已经成功应用于多种植物基因组编辑上^[32]。在马铃薯中, Butler 等^[33]利用 CRISPR/Cas9 系统分别对二倍体和四倍体马铃薯的乙酰乳酸合成酶基因 (*Acetolactate synthase1*, *StALS1*) 进行了敲除, 其中突变效率最高达到了 60%。Hiroaki 等^[34]利用水稻的 *OsMac3* 的翻译增强子插入到启动子和 Cas9 基因之间, 能够明显增加马铃薯等位基因的突变效率。Nadakuduti 等^[35]还对比了 CRISPR/Cas9 和 TALENs 在马铃薯原生质体中的突变效率, 研究表明 Cas9 的编辑效率 (27.4%) 明显高于 TALENs 的编辑效率 (12.6%)。另外, Veillet 等^[36]通过胞嘧啶单碱基核苷酸编辑使 *StALS1* 突变, 使马铃薯获得了除草剂抗性, 结合农杆菌侵染方法, 从而获得不含外源 DNA 片段的基因组编辑植株。

2 基因组编辑在马铃薯品种改良和精准分子育种中的应用

2.1 降低马铃薯块茎中糖苷生物碱含量

糖苷生物碱 (Steroidal glycoalkaloids, SGAs) 是一种存在于马铃薯中的有毒物质^[37], 是影响马铃薯品质的重要性状。在马铃薯育种过程中, 通过与野生种马铃薯杂交, 能够带来一些优异的抗病性状, 但同时也会提高 SGAs 的含量^[38], 所以控制 SGAs 的含量对于马铃薯育种来说是非常重要的。

甾醇侧链还原酶 2 (SSR2) 是合成胆固醇的关键酶, 与 SGAs 的合成密切相关。Sawai 等^[39]首先通过 RNAi 技术对马铃薯的 *StSSR2* 进行干涉, 在

StSSR2 转录本显著降低的转基因植株中, SGAs 的含量无论在试管苗或是块茎皮中都低于非转基因的 10% 以下, 且胆固醇的含量也显著降低。同时, 下调 *StSSR2* 的表达量并不会影响薯块的产量。然后通过 TALENs 载体在 *StSSR2* 上引入突变, 获得的突变体中 SGAs 的含量同样下降到野生型的 10% 左右。利用这种人工创制的低 SGAs 的马铃薯材料, 能够加速低 SGAs 品种定向改良及精准育种的进程。此外, 在龙葵碱合成通路中, 还有一个 2- 酮戊二酸依赖性双加氧酶 (2-oxoglutarate dependent dioxygenase, 16DOX) 基因, 在 RNAi 植株中被证实能够强烈抑制 SGAs 的产生^[40], 同时不会影响马铃薯的产量。随后, Nakayasu 等^[41] 利用 CRISPR/Cas9 基因组编辑体系在马铃薯根中对 *St16DOX* 进行了敲除, 之后对转基因植株进行检测, 发现在 *St16DOX* 不能正常表达的植株当中 SGAs 的含量几乎为零。因此, *St16DOX* 能够成为创制不含 SGAs 的马铃薯品种潜在的基因组编辑位点。显然, 经过多组学手段, 进一步弄清马铃薯 SGAs 的详细代谢途径及关键调控酶基因, 而后通过基因组编辑技术, 可为降低马铃薯块茎 SGAs 含量的精准分子育种提供一条强有力而快捷的技术实现途径。

2.2 改良低温储藏马铃薯块茎的品质

为了延长马铃薯的储藏时间, 生产上一般都会采取冷藏的方式, 但是冷藏会导致马铃薯的蔗糖大量裂解产生还原糖, 使得马铃薯在高温加工时产生黑色苦味产物, 降低品质^[42-44]。还原糖还能够与游离氨基酸如天冬酰胺反应生成致癌物质丙烯酰胺^[45]。所以在冷藏马铃薯中, 还原糖的含量是一个很重要的指标。

液泡转化酶 (VInv) 定位在液泡中, 在低温冷藏马铃薯产生还原糖中扮演着重要的角色^[46], 通过 RNAi 下调 *StVlnv* 的表达能够显著降低薯块中的还原糖浓度, 使得薯片中丙烯酰胺的含量下降到野生型薯片的 1/15。之后, Clasen 等^[47] 通过 PEG 介导, 把包含靶向 *StVlnv* 的 TALENs 载体导入马铃薯原生质体中, 成功获得了 *StVlnv* 敲除的再生植株。在 4 个等位基因都突变的冷藏马铃薯当中, 葡萄糖和果糖的含量低于该实验的极限检测值 (<0.1 mg/g), 同

时蔗糖的含量明显上升。在 *StVlnv* 敲除的冷藏马铃薯加工成薯片之后, 其中丙烯酰胺的含量相较于野生型的下降了 73.3%, 且薯片的颜色明显要优于野生型的薯片。这为解决冷藏马铃薯的品质变差提供了很好的解决方法。

2.3 修改马铃薯块茎中的淀粉组成成分

马铃薯淀粉在食品和工业上都有着非常广泛的应用。通常可以通过化学或者物理的方式来改变淀粉的性质, 但是这些手段或多或少都会影响环境^[48]。所以, 如果在马铃薯块茎中能够直接完成淀粉合成特性的转变将会非常有应用价值。淀粉有两种组成成分: 直链淀粉和支链淀粉。其中, 马铃薯中含有一个合成直链淀粉关键的酶: 颗粒结合淀粉合成酶 (GBSS1)。高支链淀粉马铃薯 (蜡质马铃薯) 已经通过 RNAi 技术干涉 *StGBSS1* 成功实现^[49]。随后, Andersson 等^[50] 通过在四倍体马铃薯中瞬时表达靶向 *StGBSS1* 的 CRISPR/Cas9 编辑载体, 使得该基因的 4 个等位基因全部突变, 实现了马铃薯中合成的淀粉全部成为支链淀粉, 并且没有任何外源 DNA 片段插入马铃薯基因组的情况, 这为定向改变马铃薯块茎中的淀粉组成成分, 进而为特定食品和工业用途的马铃薯品种的精准分子育种提供了一个很好的范例。

2.4 改变马铃薯自交不亲和性

目前, 栽培种马铃薯都是四倍体, 一个马铃薯品种要育成每个显性抗病基因存在 3 个或者 4 个等位基因的话, 可能需要时间长达 15 年^[51], 这对于马铃薯的品种改良是很不利的。而如果用二倍体马铃薯的近交系进行杂交育种的话可能是一个高效的育种方式^[4, 52]。但是二倍体马铃薯存在着自交不亲和 (Self-incompatibility, SI) 现象。马铃薯中, 自交不亲和由高多态性的 S 位点所控制, 在野生马铃薯 *Solanum chacoense* 中含有显性的 S 位点抑制基因 (*Sli*), 能够实现马铃薯的自交^[53]。但是, 导入该基因会使得 *S. chacoense* 中的一系列未驯化位点, 如长匍匐茎、高龙葵碱等带入到育种材料中, 增加筛选的工作量^[38, 54]。本课题组在 2018 年, 通过转录组测序获得了控制二倍体马铃薯自交不亲和的雌蕊决定基因 *S-RNase* 序列全长, 之后通过 CRISPR/Cas9

基因组编辑体系,对该基因进行了编辑,成功获得了 *S-RNase* 双等位基因突变的且自交亲和的二倍体马铃薯材料^[7]。该研究开辟了二倍体马铃薯育种的新途径,拓展了自交亲和和马铃薯资源,将加速马铃薯的遗传改良^[55]。不久之后,Enciso-Rodriguez 等^[56]也对 *S-RNase* 进行敲除,同样获得了能够自交亲和的二倍体马铃薯,进一步证实了对 *S-RNase* 的编辑能够获得自交亲和的二倍体马铃薯材料。

3 展望

基因组编辑技术效率高,可对靶标基因进行定点敲除、插入、替换等,是非常实用的基因功能研究以及精准分子育种工具,已成为农作物改良的重要技术。目前基因组编辑技术在重要农作物如水稻、小麦、玉米等基因功能验证及定向遗传改良方面已有许多成功的案例,但是在马铃薯定向遗传改良方面的成功运用尚有限。

马铃薯栽培品种通常是高度杂合的同源四倍体,遗传背景复杂,涉及到产量、品质、抗性等诸多重要农艺性状的重要代谢途径和关键控制基因尚不清楚,进而或为通过基因组编辑来进行马铃薯精准分子育种的核心限制因素。因此,通过多组学联合分析,弄清控制马铃薯重要农艺性状的代谢途径和阐明关键控制基因的功能,将会为基因组编辑技术运用于马铃薯精准分子育种奠定坚实的基础。

此外,基因组编辑技术用于改良重要农作物对生物和非生物胁迫抗性已有不少成功的案例^[57-58],但在马铃薯方面尚未见到报道。马铃薯晚疫病是公认的对马铃薯最严重的病害,能够在感染后 10 d 完全摧毁马铃薯植株^[59]。Oliva 等^[60]在水稻上已经通过基因组编辑技术编辑了感病基因(*Susceptible gene*) *SWEET11*、*SWEET 13* 和 *SWEET 14* 的启动子的 EBE 结合元件,进而提高了水稻对细菌性白叶枯病广泛的抵抗力。而在马铃薯上同样存在着许多 S 基因,如 *StUBK*^[61]、*StBSL* 家族基因^[62] 和 *StVIK*^[63] 等,沉默这些基因能够获得抗病性增强的表型。可以推测,利用基因组编辑技术能够使得这些 S 基因应用于马铃薯抗晚疫病的精准分子育种,这将会是一个很有前景的研究方向。

因马铃薯品种的原因,很多品种的马铃薯遗传

转化体系建立起来比较困难^[64],使得一部分品种的马铃薯难以获得所需要的转基因植株;此外,由于目前转基因作物在公众中的接受程度不高,想要推广基因组编辑马铃薯最好在完成编辑的马铃薯中不含外源 DNA 片段。对于含有外源片段的基因组编辑植株来说,想要去除转基因植株的外源片段,可以通过自交的方式进行筛选^[7, 56]。另外,也可以通过载体在马铃薯原生质体中瞬时编辑来达到不含外源 DNA 片段的目的。但是,马铃薯的原生质体游离以及再生过程十分繁琐,耗费时间长达 6-7 个月^[25]。因此,进一步改良和完善基因组编辑技术,以获得不含外源 DNA 片段的无转基因且能稳定遗传的基因组编辑马铃薯品种,这将会具有很大的应用价值。

CRISPR/Cas9 基因组编辑体系因其结构简单且编辑效率高,在 3 种基因组编辑工具中应用最为广泛,但是其对于靶位点的识别可以容忍几个碱基对的不匹配,这意味着某些靶位点可能存在着数千的潜在脱靶位点,所以会造成脱靶现象,进而对细胞产生遗传损害作用^[65-67]。Upadhyay 等^[68]通过对小麦的肌醇加氧酶基因(*Inositol oxygenase*, *INOX*),八氢番茄红素基因(*Phytoene desaturase*, *PDS*)的靶位点进行了筛选,发现在 gRNA 的近 5' 部分不匹配并不会完全破坏 Cas9 的编辑效率。Xie 等^[69]通过对水稻的 PS3 基因进行编辑时,对 11 个潜在的脱靶位点进行了分析,发现了一个被成功编辑的潜在脱靶位点。这对于 CRISPR/Cas9 应用于作物精准分子育种是非常不利的。目前主要有 3 种降低脱靶率的方法:一是改变野生型的 Cas9 酶活性中心的关键催化残基,使其由内切酶转化为切口酶,在靶位点使用两个毗邻的 gRNA,能够显著的降低脱靶效应且不损坏其编辑效率^[70-71];而在单碱基突变的体系当中,Zhou 等^[72]通过把腺嘌呤编辑器(*Adenine base editors*7.10, ABE7.10)中的腺嘌呤脱氢酶 148 位的脯氨酸置换为精氨酸后,能够完全去除对 RNA 的脱靶效应,且并不会降低对靶位点 DNA 的编辑效率。二是通过在 gRNA 的 5' 缩短 2-3 bp,同样能够降低脱靶效应^[73]。三是通过在线工具如(<http://cbi.hzau.edu.cn/CRISPR2/>)来指导设计靶位点,达到降低脱靶效应的目的^[74]。Xie 等^[75]对几个重要的模式作物以及农作物的全基因组进行了分析,发现含

有特异性的 gRNA 的转录单元数量达到了 83.4%–98.6%。因此,大部分基因都可以通过精心挑选靶位点,来避免脱靶效应。另外, Cas9 蛋白在细胞内的持续表达也会对细胞造成持续的损伤, Jiang 等^[76]对莱茵衣藻进行研究,发现 Cas9 蛋白的持续表达能够对莱茵衣藻产生毒害作用。在人体细胞中,通过注射 gRNA 和 Cas9 蛋白可以显著的降低 Cas9 蛋白对细胞造成的毒害作用^[77]。目前, Cas9 蛋白在马铃薯中的持续表达所造成的细胞毒害以及解决方法尚未见到报道。这就需要大量的实验来论证并克服 Cas9 蛋白对马铃薯的毒害作用,为基因组编辑技术应用于马铃薯的精准分子育种提供支撑。

总之,基因组编辑技术将会给马铃薯的精准分子育种提供一个重要的技术解决手段,使马铃薯的重要农艺性状如低 SGAs 含量、营养与品质、风味、对生物和非生物胁迫的抗性等得以进行精准的定向遗传改良。目前需要通过多组学手段,全面解析控制马铃薯重要农艺性状的代谢途径和关键基因,进一步开发精准高效的基因组编辑技术,并与常规育种方法相结合,以最终育成更多性状优良的马铃薯品种。

参考文献

- [1] Zaheer K, Akhtar MH. Potato production, usage, and nutrition-a review [J]. *Critical Reviews in Food Technology*, 2016, 56 (5): 711-721.
- [2] Scott G, Suarez V. The rise of Asia as the centre of global potato production and some implications for industry [J]. *Potato Journal*, 2012, 39 (1): 1-22.
- [3] Liang S, McDonald AG. Chemical and thermal characterization of potato peel waste and its fermentation residue as potential resources for biofuel and bioproducts production [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62 (33): 8421-8429.
- [4] 李颖, 李广存, 李灿辉, 等. 二倍体杂种优势马铃薯育种的展望 [J]. *中国马铃薯*, 2013 (2): 38-41.
- [5] Halterman D, Guenther J, Collinge S, et al. Biotech potatoes in the 21st century: 20 years since the first biotech potato [J]. *American Journal of Potato Research*, 2015, 93 (1): 1-20.
- [6] Consortium PGS. Genome sequence and analysis of the tuber crop potato [J]. *Nature*, 2011, 475 (7355): 189-195.
- [7] Ye MW, Peng Z, Tang D, et al. Generation of self-compatible diploid potato by knockout of *S-RNase* [J]. *Nature Plants*, 2018, 4 (9): 651-654.
- [8] Shalem O, Sanjana NE, Zhang F. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9 [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2015, 16 (5): 299-311.
- [9] Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32 (4): 347-355.
- [10] Desjarlais JR, Berg JM. Toward rules relating zinc finger protein sequences and DNA binding site preferences [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89 (16): 7345-7349.
- [11] Berg JM, Desjarlais JR. Use of a zinc-finger consensus sequence framework and specificity rules to design specific DNA binding proteins [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, 90 (6): 2256-2260.
- [12] Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to *Fok I* cleavage domain [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93 (3): 1156-1160.
- [13] Smith J, Bibikova M, Whitby FG, et al. Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains [J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28 (17): 3361-3369.
- [14] Bibikova M, Carroll D, Segal DJ, et al. Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases [J]. *Molecular & Cellular Biology*, 2001, 21 (1): 289-297.
- [15] Bibikova M, Golic M, Golic KG, et al. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in drosophila using zinc-finger nucleases [J]. *Genetics*, 2002, 161 (3): 1169-1175.
- [16] Lloyd A, Plaisier CL, Carroll D, et al. Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in arabidopsis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102 (6): 2232-2237.
- [17] Shukla VK, Doyon Y, Miller JC et al. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases [J]. *Nature*, 2009, 459 (7245): 437-441.
- [18] Curtin SJ, Zhang F, Sander JD, et al. Targeted mutagenesis of duplicated genes in soybean with zinc-finger nucleases [J]. *Plant Physiology*, 2011, 156 (2): 466-473.
- [19] Cornu TI, Thibodeau-Beganny S, Guhl E, et al. DNA-binding

- specificity is a major determinant of the activity and toxicity of zinc-finger nucleases [J]. *Molecular Therapy*, 2008, 16 (2): 352-358.
- [20] Bogdanove AJ, Schornack S, Lahaye T. TAL effectors: finding plant genes for disease and defense [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2010, 13 (4): 394-401.
- [21] Boch J, Scholze H, Schornack S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors [J]. *Science*, 2010, 326 (5): 1509-1512.
- [22] Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors [J]. *Science*, 2009, 326 (5959): 1501-1501.
- [23] Zhang Y, Zhang F, Li X, et al. Transcription activator-like effector nucleases enable efficient plant genome engineering [J]. *Plant Physiology*, 2013, 161 (1): 20-27.
- [24] Haun W, Coffman A, Clasen BM, et al. Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2014, 12 (7): 934-940.
- [25] Nicolai A, Proux-wéra E, Åhman I, et al. Targeted gene mutation in tetraploid potato through transient TALEN expression in protoplasts [J]. *Journal of Biotechnology*, 2015 (204): 17-24.
- [26] Butler NM, Baltes NJ, Voytas DF, et al. Geminivirus-mediated genome editing in potato (*Solanum tuberosum* L.) using sequence-specific nucleases [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7(1045): 1045.
- [27] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, et al. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product [J]. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169 (12): 5429-5433.
- [28] Pourcel C, Drevet C. Occurrence, Diversity of CRISPR-Cas systems and genotyping implications [M] // Barrangou R, Van der oost J. *CRISPR-Cas Systems*. Berlin: Springer-Verlag, 2013: 33-59.
- [29] Bolotin A. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin [J]. *Microbiology*, 2005, 151 (8): 2551-2561.
- [30] Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea [J]. *Nature*, 2012, 482 (7385): 331-338.
- [31] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, 337 (6096): 816-821.
- [32] Shan Q, Wang Y, Li J, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31 (8): 686-688.
- [33] 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.
- [34] Hiroaki K, Mariko O, Hiromi MA, et al. Establishment of a modified CRISPR/Cas9 system with increased mutagenesis frequency using the translational enhancer dMac3 and multiple guide RNAs in potato [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8 (1): 13753.
- [35] Nadakuduti SS, Starker CG, Ko DK, et al. Evaluation of methods to assess *in vivo* activity of engineered genome-editing nucleases in protoplasts [J]. *Frontier in Plant Science*, 2019, 10: 110.
- [36] Veillet F, Perrot L, Chauvin L, et al. Transgene-free genome editing in tomato and potato plants using agrobacterium-mediated delivery of a CRISPR/Cas9 cytidine base editor [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20 (2): 402.
- [37] Friedman M. Potato glycoalkaloids and metabolites: roles in the plant and in the diet [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54 (23): 8655-8681.
- [38] Jansky SH, Chung YS, Kittipadukul P. M6: a diploid potato inbred line for use in breeding and genetics research [J]. *Journal of Plant Registrations*, 2014, 8 (2): 195-199.
- [39] Sawai S, Ohya K, Yasumoto S, et al. Sterol side chain reductase 2 is a key enzyme in the biosynthesis of cholesterol, the common precursor of toxic steroidal glycoalkaloids in potato [J]. *The Plant Cell*, 2014, 26 (9): 3763-3774.
- [40] Nakayasu M, Umamoto N, Ohya K, et al. A Dioxygenase catalyzes steroid 16 α -hydroxylation in steroidal glycoalkaloid biosynthesis [J]. *Plant Physiology*, 2017, 175 (1): 120-133.
- [41] Nakayasu M, Akiyama R, Lee HJ, et al. Generation of α -solanine-free hairy roots of potato by CRISPR/Cas9 mediated genome editing of the *St16DOX* gene [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018 (131): 70-77.
- [42] Dale MFB, Bradshaw JE. Progress in improving processing attributes in potato [J]. *Trends in Plant Science*, 2003, 8 (7): 310-312.
- [43] Sowokinos JR. Biochemical and molecular control of cold-induced

- sweetening in potatoes [J]. *American Journal of Potato Research*, 2001, 78 (3): 221-236.
- [44] Matsuuraendo C, Oharatakada A, Chuda Y, et al. Effects of storage temperature on the contents of sugars and free amino acids in tubers from different potato cultivars and acrylamide in chips [J]. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan*, 2006, 70(5): 1173-1180.
- [45] Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, et al. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50 (17): 4998-5006.
- [46] Bhaskar PB, Wu L, Busse JS, et al. Suppression of the vacuolar invertase gene prevents cold-induced sweetening in potato [J]. *Plant Physiology*, 2010, 154 (2): 939-948.
- [47] Clasen BM, Stoddard TJ, Luo S, et al. Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, 14 (1): 169-176.
- [48] Ellis RP, Cochrane MP, Dale MFB, et al. Starch production and industrial use [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1998, 77 (3): 289-311.
- [49] Andersson M, Trifonova A, Andersson AB, et al. A novel selection system for potato transformation using a mutated AHAS gene [J]. *Plant Cell Reports*, 2003, 22 (4): 261-267.
- [50] Andersson M, Turesson H, Nicolia A, et al. Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts [J]. *Plant Cell Reports*, 2017, 36 (1): 117-128.
- [51] Mendoza HA, Mihovilovich EJ, Saguma F. Identification of triplex (YYYy) potato virus Y (PVY) immune progenitors derived from *Solanum tuberosum* ssp. Andigena [J]. *American Potato Journal*, 1996, 73 (1): 13-19.
- [52] Jansky SH, Charkowski AO, Douches DS, et al. Reinventing potato as a diploid inbred line-based crop [J]. *Crop Science*, 2016, 56(4): 1412-1421.
- [53] Hosaka K, Hanneman RE. Genetics of self-compatibility in a self-incompatible wild diploid potato species *Solanum chacoense*. 2. Localization of an S locus inhibitor (Sli) gene on the potato genome using DNA markers [J]. *Euphytica*, 103 (2): 265-271.
- [54] Leisner CP, Hamilton P, Crisovan E, et al. Genome sequence of M6, a diploid inbred clone of the high glycoalkaloid-producing tuber-bearing potato species *Solanum chacoense*, reveals residual heterozygosity [J]. *Plant Journal*, 2018, 94 (3): 562-570.
- [55] Mark T. Routes to genetic gain in potato [J]. *Nature Plants*, 2018, 4 (9): 631-632.
- [56] Enciso-Rodriguez F, Manrique-Carpintero NC, Nadakuduti SS, et al. Overcoming self-incompatibility in diploid potato using CRISPR-Cas9 [J]. *Frontiers in plant science*, 2019, 10: 376.
- [57] Zhao H, Wang X, Jia Y, et al. The rice blast resistance gene Ptr encodes an atypical protein required for broad-spectrum disease resistance [J]. *Nature Communications*, 2018, 9 (1): 2039.
- [58] Yuan H, Yiming G, Yuting L, et al. 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3 regulates plant growth and enhances multi-abiotic stress tolerance in rice [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 162.
- [59] Fry W. *Phytophthora infestans*: The plant (and R gene) destroyer [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2008, 9 (3): 385-402.
- [60] Oliva R, Ji C, Atienza-Grande G, et al. Broad-spectrum resistance to bacterial blight in rice using genome editing [J]. *Nature biotechnology*, 2019, 37 (11): 1344-1350.
- [61] He Q, McLellan H, Hughes RK, et al. *Phytophthora infestans* effector SFI3 targets potato UBK to suppress early immune transcriptional responses [J]. *New Phytologist*, 2019, 222 (1): 438-454.
- [62] Turnbull D, Wang H, Breen S, et al. AVR2 targets BSL family members, which act as susceptibility factors to suppress host immunity [J]. *Plant Physiology*, 2019, 180 (1): 571-581.
- [63] Murphy F, He Q, Armstrong M, et al. The potato MAP3K StVIK is required for *Phytophthora infestans* RXLR Effector Pi17316 to promote disease [J]. *Plant Physiology*, 2018, 177 (1): 398-410.
- [64] 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): 18-26.
- [65] Hsu P, Lander E, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering [J]. *Cell*, 2014, 157 (6): 1262-1278.
- [66] Wang J, Xu ZW, Liu S, et al. Dual gRNAs guided CRISPR/Cas9 system inhibits hepatitis B virus replication [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2015 (32): 112-123.
- [67] Zhang J, Zong W, Hong W, et al. Exploiting endogenous CRISPR-Cas system for multiplex genome editing in *Clostridium*

tyrobutyricum, and engineer the strain for high-level butanol production [J] . Metabolic Engineering, 2018, 47 : 49-59.

[68] Upadhyay SK, Kumar J, Alok A, et al. RNA-guided genome editing for target gene mutations in wheat [J] . G3 (Bethesda) , 2013, 3 (12) : 2233-2238.

[69] Xie KB, Yang YN. RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system [J] . Molecular Plant, 2013, 6 (6) : 1975-1983.

[70] Trevino AE, Zhang F. Genome editing using cas9 nickases [J] . Methods in enzymology, 2014, 546C (546C) : 161-174.

[71] Schiml S, Fauser F, Puchta H. The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for in planta gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in arabidopsis resulting in heritable progeny [J] . Plant Journal, 80 (6) : 1139-1150.

[72] Zhou CY, Sun YD, Yan R, et al. Off-target RNA mutation induced by DNA base editing and its elimination by mutagenesis [J] . Nature, 2019, 571 (7764) : 275-278.

[73] Fu Y, Sander JD, Reyon D, et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs [J] . Nat Biotechnol, 2014, 32 (3) : 279-284.

[74] Liu H, Ding Y, Zhou Y, et al. CRISPR-P 2. 0 : An Improved CRISPR-Cas9 tool for genome editing in plants [J] . Molecular Plant, 2017, 10 (3) : 530-532.

[75] Xie K, Zhang J, Yang Y. Genome-wide prediction of highly specific guide RNA spacers for CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing in Model Plants and Major Crops [J] . Molecular Plant, 2014, 7 (5) : 923-926.

[76] Jiang W, Brueggeman AJ, Horken KM et al. Successful Transient Expression of Cas9 and Single Guide RNA Genes in Chlamydomonas reinhardtii [J] . Eukaryotic Cell, 2014, 13 (11) : 1465-1469.

[77] Hendel A, Bak RO, Clark JT, et al. Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells [J] . Nat Biotechnol, 2015, 33 (9) : 985-989.

(责任编辑 朱琳峰)