

CRISPR/Cas9 技术在热带作物育种中的应用研究进展

王静毅¹, 甘珊珊^{1,2}, 贾彩红¹, 刘菊华¹

(¹中国热带农业科学院热带作物生物技术研究所以农业农村部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室/
三亚研究院热带作物生物育种全国重点实验室/海南热带农业资源研究院海南省热带农业生物资源保护与
利用重点实验室, 海口 571101; ²华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430000)

摘要: 在热带地区种植的香蕉、番木瓜、甘蔗、木薯、天然橡胶、油棕等热带作物, 是我国农业的重要组成部分, 不仅为我们的日常生活和工农业生产提供了重要的原材料, 而且为我国热带与亚热带地区的主要农业产量和经济增长做出了贡献。然而, 这些作物的现代分子育种受其生物学特性和遗传复杂性的严重阻碍, 多倍化、杂合性、无性繁殖、童期长和植株高大等问题导致热带作物的传统杂交育种周期长、难度大、进展慢。基因编辑技术的发展为热带作物育种带来了新途径和新机遇。CRISPR/Cas9 系统介导的基因组编辑技术以其更高的靶向效率、多功能性和易用性, 已被广泛应用于植物基因组编辑育种中。近年来, 该技术在香蕉、木薯、天然橡胶、甘蔗等热带作物上也实现了广泛应用。本文介绍了基于 CRISPR-Cas9 系统的基因组编辑、CRISPR-Cas9 在热带作物改良中的应用进展以及所面临的挑战和问题, 同时对热带作物基因编辑育种方面提出建议, 以期后续研究提供思路, 并为进一步开发应用该技术以有效改良热带作物的植物性状提供参考。

关键词: 热带作物; 基因组编辑; CRISPR/Cas9

Application of CRISPR/Cas9 Technology in Tropical Crops Breeding

WANG Jingyi¹, GAN Shanshan^{1,2}, JIA Caihong¹, LIU Juhua¹

(¹Key Laboratory of Tropical Crops Biology and Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/ National Key Laboratory for Tropical Crop Breeding, Sanya Research Institute / Hainan Key Laboratory for Protection and Utilization of Tropical Bioresources, Hainan Institute for Tropical Agricultural Resources, Haikou 571101;
²College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430000)

Abstract: Tropical crops, including banana, papaya, sugarcane, cassava, rubber tree, oil palm, etc, are of importance in Chinese agriculture, which not only provide raw materials for our daily life and industrial and agricultural production, but also contribute to the main agricultural output and economic growth in tropical and subtropical zones of China. There are many barriers in tropical crops in use of modern molecular breeding techniques, such as polyploidy, heterozygous, vegetative propagation, long juvenile phase and large size of plants, etc. The genetic improvement of tropical crops through conventional breeding is troublesome, time-

收稿日期: 2023-10-10 修回日期: 2023-11-02 网络出版日期: 2023-11-23

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20231010001>

第一作者研究方向为香蕉遗传改良, E-mail: kiwi998@163.com

通信作者: 刘菊华, 研究方向为香蕉果实品质形成及遗传改良, E-mail: liujuhua@itbb.org.cn

基金项目: 海南省自然科学基金(321RC638); 中国热带农业科学院国家热带农业科学中心科技创新团队(CATASCXTD202310); 热带作物生物育种全国重点实验室科研项目(NKLTCB202301); 海南省院士创新平台科研专项(YSPTZX202101); 现代农业产业技术体系(CARS-31)

Foundation projects: Hainan Provincial Natural Science Foundation (321RC638); Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences for Science and Technology Innovation Team of National Tropical Agricultural Science Center (CATASCXTD202310); National Key Laboratory for Tropical Crop Breeding (NKLTCB202301); The Innovation Platform for Academicians of Hainan Province (YSPTZX202101); Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research System (CARS-31)

consuming, low efficiency and less progress. The development of genome editing technologies has brought a new way in tropical crops breeding. CRISPR-Cas9 mediated genome editing has been widely used in plants, profited from its higher targeting efficiency, versatility and ease of usage. This approach has been applied in banana, cassava, rubber tree, and sugarcane. Here, we focus on the recent advances based on CRISPR/Cas9 methodologies, and summarize their application in tropical crops breeding, as well as propose future perspectives and challenges in improving tropical plants.

Key words: tropical crops; genome editing; CRISPR/Cas9

CRISPR/Cas 系统(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein)已经成为基因组编辑的最流行和最先进的工具之一。1987年,研究人员在大肠杆菌(*Escherichia coli*)的碱性磷酸酶同工酶(IAP, alkaline phosphatase isozyme)基因中首次发现 CRISPR 序列,该序列是自然界中原核生物的一种防卫系统,通过激活适应性免疫应答来抵抗噬菌体等入侵^[1]。通过 CRISPR 序列包含的 Cas 蛋白和引导 RNA (sgRNA, single RNA)的双组分系统,CRISPR/Cas 可以在真核生物中进行基因的靶向插入、缺失和置换等遗传操作。将 CRISPR/Cas 系统开发应用为真核细胞的基因编辑工具已经彻底改变了基因组工程领域^[2]。

2013 年,CRISPR/Cas9 系统陆续应用于拟南芥^[3]、烟草^[4]、水稻和小麦^[5]中,显示了 CRISPR/Cas9 技术在植物中广泛应用的前景。此后,CRISPR/Cas9 系统的不断改进,使之成为低成本和高效率的精确遗传操作工具,也使得植物基因组编辑变得更容易,应用更广泛。越来越多的作物和其他植物物种已经通过基因组编辑进行基因功能验证和性状改良。因此,CRISPR/Cas9 技术有可能通过在更短的时间内更准确地引入目标性状来改变传统育种的前景。更重要的是,CRISPR/Cas9 与转基因育种技术相比,没有将外源基因转移到靶基因组中,从而为减少生物安全问题铺平了道路。

在热带地区种植的香蕉、木薯、甘蔗、橡胶、木瓜、油棕等热带作物,为我们的日常生活和工农业提供了重要的原材料。然而,这些作物的现代育种受到其生物学特性和遗传复杂性的严重阻碍^[6]。虽然 CRISPR/Cas9 技术已在部分热带作物上有研究报道,但相关研究尚处于起步阶段,与拟南芥、水稻、小麦等模式作物相比,其研究和应用水平仍相差甚远。本文介绍 CRISPR/Cas9 系统的研究动态,综述其在热带作物中的应用现状,以期对热带作物基因组编辑育种工作提供参考。

1 CRISPR/Cas9 系统的发展

CRISPR/Cas9 是生物基因组编辑中鉴定最明确、最受欢迎和应用最广泛的系统。该系统由两个元件组成:一个是称为 Cas9 的 RNA 引导的 DNA 内切酶,另一个是 sgRNA。Cas9 与 sgRNA 结合可以针对与 sgRNA 互补的基因组序列,并催化 DNA 骨架的双链断裂(DSB, double-stranded break)。然后,双链断裂主要通过容易出错的非同源末端连接(NHEJ, non-homologous end-joining)途径或无错误的同源重组(HDR, homology-directed repair)来修复。非同源末端连接容易导致单个碱基的插入、缺失或替换。在自然条件下,真核细胞中同源重组发生的概率很低,而非同源末端连接发生的几率更高。因此,可以通过双链断裂和随后的 DNA 修复来实现基因修饰和基因组编辑。在植物界中,CRISPR/Cas9 系统已被广泛用于作物的遗传改良或种质创制,如水稻^[7]、大豆^[8]、油菜^[9]、小麦^[10]等。

然而,基于 Cas9 的基因编辑的最大弱点是在基因组中形成非靶标的双链断裂,这可能会产生突变、大的染色体异常,如易位、倒位等。大多数致病突变和农学上重要的遗传变异都是 SNPs,需要更精确的基因组编辑工具来校正序列。因此,基于 Cas9 的碱基编辑器(BE, base editing)和引导编辑器(PE, prime editing)被开发出来^[11-12]。碱基编辑和引导编辑是两种可以在不需要双链断裂形成或供体 DNA 模板的情况下在靶位点进行编辑的精确基因组编辑工具。碱基编辑是催化失活的 Cas9 结构域和脱氨酶结构域的融合蛋白,在 sgRNA 引导下靶向目标碱基序列,从而完成改造目标基因的目的^[11]。科研人员相继研发的碱基编辑工具主要有:可实现 C:G 到 T:A 转换的 CBE (Cytosine base editor),A:T 到 G:C 转换的 ABE (Glycosylase base editor),C:G 到 G:C 转换的 CGBE (C to G base editor)和可同时生成 4 种类型的碱基转换(C 到 G, C 到 T, C 到 A 和 A 到 G)以及 InDels 的 CGBE 与 ABE 融合的双脱氧酶介导

的碱基编辑器(AGBE, a dual deaminase-mediated base editor by fusing CGBE with ABE)等^[13-14]。与碱基编辑相比,引导编辑则可以在靶位点进行所有可能的碱基转换、小的 InDels 及其组合^[12]。目前,基于植物的碱基编辑和引导编辑系统已在水稻、小麦、玉米、番茄等几种植物中进行了测试,并取得了良好的效果^[15-16]。

2 CRISPR/Cas9技术在主要热带作物中的应用

CRISPR/Cas9 系统在理论上适用于所有物种,在模式植物中已有成熟的应用体系,在香蕉、番木瓜、甘蔗、木薯、天然橡胶、油棕等主要热带作物中已有初步应用,应用进展阐述如下。

2.1 香蕉

香蕉(*Musa spp.*)是世界重要的果粮兼备的经济作物,也是全球鲜果消费量和贸易额最大的水果,在推动我国热带与亚热带地区农民脱贫致富和乡村振兴中起着重要作用。然而,香蕉生产受到枯萎病、干旱、冷害等生物和非生物胁迫的严重威胁。全球最重要的香蕉栽培品种是三倍体,高度不育,遗传基础狭窄,这些特性严重阻碍应用传统杂交育种培育香蕉优良新品种。而诱变育种与突变体选育新品种具有周期长、盲目性大等问题。因此,香蕉生物育种被认为是培育抗逆、抗病优质新品种的理想途径。

来自国内外的相关学者已相继在香蕉中建立了 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术体系。胡春华等^[17]利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在巴西蕉(AAA)中编辑八氢番茄红素脱氢酶基因(*MaPDS*, *phytoene desaturase gene*),获得完全白化和花白叶杂合的香蕉突变株系,编辑效率为 55%。Kaur 等^[18]设计针对 Rasthali (AAB) 中 2 个 *PDS*(*RAS-PDS1* 和 *RAS-PDS2*) 基因的 sgRNA 引导 Cas9 剪切靶基因,突变效率达到 59%。Naim 等^[19]在 Williams (AAA) 中设计针对 *PDS* 基因的第 1 个外显子的 2 个 sgRNA 引导 Cas9 剪切靶基因,编辑效率达到 100%。Ntui 等^[20]比较了来自 *Musa accuminata* (AA) 和 *Musa balbisiana* (BB) 参考基因组的 *PDS* 基因,在最保守区域设计了 2 个针对 *PDS* 基因的 sgRNA 构建 CRISPR/Cas9 载体,并转化到香蕉 Sukali Ndiizi (AAB) 和大蕉 Gonja Manjaya (AAB) 的胚性悬浮细胞中,对 18 个编辑株系进行靶位点的测序,两个品种中均观察到 100% 的高效突变和 723 bp 的大片段

缺失。在香蕉基因编辑体系的优化和改进上,2020 年, Wu 等^[21]在香蕉原生质体中比较了 CRISPR/Cas9、CRISPR/Cas12a 和 RNP-CRISPR-Cas9 对 *PDS* 基因的编辑效率,发现 CRISPR/Cas9 介导的诱变效率高于其他两种体系。2022 年, Zhang 等^[22]通过对 Cas9 进行密码子优化和使用香蕉内源 U6 启动子优化 Cas9 基因组编辑骨架载体,使编辑效率提高了 4 倍。2023 年, Hu 等^[23]利用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术,将基因组编辑元件和基因清除元件整合在同一载体上,实现了在靶位点发生基因组编辑后对引入的功能基因成分进行删除,从而在香蕉中建立了高效的无转基因残留的基因组编辑技术体系,为香蕉基因组编辑技术的产业应用奠定了基础。

随着 CRISPR/Cas9 编辑技术体系在香蕉中的成功建立, CRISPR/Cas9 介导的基因组编辑技术在香蕉中已被应用于增强抗病性、提高果实品质、延长货架期和改善株型结构等方面。香蕉条纹病毒(BSV, banana streak virus)是一种整合在香蕉 B 基因组中的双链杆状 DNA 病毒,称为内源性 BSV (eBSV, endogenous BSV)。它严重影响了非洲大蕉(AAB)的生产,也限制了携带 B 基因组的二倍体祖先种 *Musa balbisiana* 或其衍生物作为亲本的使用。2019 年, Tripathi 等^[24]利用 CRISPR/Cas9 技术编辑香蕉内源条纹病毒,致其失活不能产生感染性病毒颗粒,为香蕉生产、杂交育种及 B 基因组在香大蕉遗传改良中的应用铺平道路,同时也为灭活其他内源病毒提供有效策略。2021 年, Tripathi 等^[25]利用 CRISPR/Cas9 对 *MusaDMR6* 基因进行编辑,获得了抗黄单胞菌枯萎病香蕉。研究人员也尝试通过 CRISPR 技术培育抗香蕉枯萎病 4 号生理小种的新品种^[26]。大多数 Cavendish 类香蕉品种的果肉中 β -胡萝卜素含量较低, Kaur 等^[27]使用 CRISPR/Cas9 技术编辑香蕉 *LCYE* 基因的第 5 个外显子来创制富含 β -胡萝卜素的香蕉品种,获得了果实中 β -胡萝卜素含量提高了 6 倍的编辑株系。研究发现 Rasthali (AAB) 中 *CCD4* (*RAS-CCD4*) 的较高表达与果肉中 β -胡萝卜素的积累呈负相关。Awasthi 等^[28]利用 CRISPR/Cas9 技术对 Rasthali 中的 *RAS-CCD4* 基因进行编辑,发现突变株系中根部的 β -胡萝卜素积累量比叶子中的增加更多。在香蕉中分别编辑 *MaGA20ox2*、*Achn379131* 和 *MaACO1* 基因也得到了半矮化和香蕉果实货架期延长的突变株系^[29-31]。

2.2 番木瓜

番木瓜(*Carica papaya* L.)是木瓜科番木瓜属

的多年生草本果树,在热带和亚热带国家广泛种植,以其丰富的营养和药用价值而受欢迎。然而,番木瓜产业的发展受到番木瓜环斑花叶病毒病(PRSV, papaya ringspot virus)的严重限制,抗病品种的培育成为产业发展的关键。由于我国可食用番木瓜抗病资源匮乏,栽培种遗传基础狭窄,通过传统的杂交育种难以培育出抗病品种,而分子育种技术则可有效地改良品种的抗病性^[32]。抗番木瓜环斑病毒的转基因番木瓜是第一个转基因水果作物,最终于1998年在夏威夷商业化生产^[33];2008年,番木瓜基因组序列测序完成^[34];番木瓜是果树中相对容易建立再生体系的物种^[32, 35-36];这些将为利用CRISPR-Cas9系统进行番木瓜精准分子设计育种提供有力的技术支撑。

中国热带农业科学院热带生物技术研究所在转基因生物安全研究团队的科研人员利用Golden Gate法构建了番木瓜曲叶病毒的CRISPR/Cas9的串联多切点表达载体^[37];随后又基于不同的番木瓜环斑花叶病毒保守序列,采用CRISPR/FnCas9技术和Golden Gate载体构建系统,将5个sgRNA串联到同一载体上,并通过瞬时表达番木瓜叶片实现了对番木瓜环斑花叶病毒的抑制作用^[38]。最近,Brewer等^[39]通过农杆菌介导转化,设计了3种针对番木瓜PDS基因的sgRNA,建立了一种有效的基于CRISPR/Cas9的木瓜基因编辑系统。经过编辑的转基因植株表现出完全的白化表型,在3个gRNA靶位点检测到包括插入、倒置和删除在内的多种基因编辑,InDel突变的效率为81%。此外,Hoang等^[40]开发了一种通过根瘤菌来评估木瓜基因组编辑效率的体内毛状根系。这些研究为利用CRISPR/Cas9系统进行番木瓜基因功能分析、性状改良和育种开辟了新的途径。

2.3 甘蔗

甘蔗(*Saccharum* spp.)是世界上80%的糖和26%的生物乙醇的工业原料作物。甘蔗的基因组是所有驯化农业物种中最复杂的($2n = 100 \sim 130$),其复杂的、高度多倍体的基因组阻碍了传统杂交育种技术在甘蔗品种改良上的应用进程^[41]。基因组编辑将开启甘蔗精确育种的新时代。

Zhao等^[42]通过沉默恢复GUS活性的方法来检测Cre/lox和CRISPR/Cas9系统转化效果,同时比较其特异性重组效率,结果表明,优化Cre/lox系统> Cre/lox系统> CRISPR/Cas9系统。经验证CRISPR/Cas9系统的突变效应与同源重组完全一致,可以实

现定向精准突变,为甘蔗目标基因编辑的实验设计提供可靠依据。镁螯合酶(MgCh, magnesium chelatase)是叶绿素生物合成途径中的关键酶。与PDS敲除基因的矮化和白化表型不同,MgCh突变体表现出浅绿色到黄色的叶片表型,与野生型的生长速度相似。Eid等^[43]设计针对MgCh基因的2个sgRNA,以CaMV35S启动子驱动密码子优化后的Cas9构建载体,利用基因枪法在甘蔗品种CP88-1762愈伤组织中进行转化,并比较了转化4 d后的愈伤组织保持在28℃培养或37℃热处理培养48 h后再转到28℃培养对突变频率的影响,发现热处理将编辑效率提高了2倍,并极大地促进了多个等位基因的共突变。共突变的后代表型最为明显,出现严重的叶绿体耗竭现象。同时Oz等^[44]利用CRISPR/Cas9技术编辑甘蔗乙酰乳酸合酶(ALS, acetolactate synthase)中与除草剂抗性相关的两个密码子(W574L和S653I)。对来自5个独立实验的146个独立转化植株的评价表明,除25个或18个品系的W574L或S653I外,11个品系的乙酰乳酸合酶(ALS)中同时出现了靶向W574L和S653I的氨基酸替换。这项工作可通过靶向核苷酸替换将劣势等位基因转化为优势等位基因。

2.4 木薯

木薯(*Manihot esculenta* Crantz)是世界热带与亚热带地区广泛栽植的重要主粮作物,也是主要的工业原料。在这种重要的主食作物中进行有效的基因编辑将为解决木薯生产中生物和非生物胁迫的限制以及采后利用提供新机遇。木薯遗传转化体系的建立和基因组测序的完成使得基于CRISPR的基因组编辑技术在木薯基础和应用研究中的潜力得以实现,从而改善木薯重要的经济性状。2017年,Odipto等^[45]首次在两个木薯品种(TMS60444和TME204)中报道了CRISPR/Cas9介导的靶向MePDS基因编辑的研究。在两个木薯品种中分别获得58和25个独立转基因株系,其中木薯品种TME204的再生植株中90%以上有白化表型。这为CRISPR/Cas9技术在木薯中的应用揭开序幕。

研究人员陆续将CRISPR/Cas9技术用于木薯抗病性的增强、淀粉品质的改善以及无氰木薯品种的开发等研究。木薯褐条病(CBSD, cassava brown streak disease)和木薯花叶病(CMD, cassava mosaic disease)是木薯上的两种主要毁灭性病毒病。Gomez等^[46]在木薯品种TMS60444中对真核翻译起始因子4E(eIF4E, eukaryotic translation initiation factor

4E)蛋白亚型即新型帽结合蛋白-1(nCBP-1, novel cap-binding protein-1)和nCBP-2进行靶向诱变,降低了木薯褐条病相关疾病症状的水平和木薯褐条病毒在贮藏根中的积累,虽然增强了对木薯褐条病的抗性,但并未获得完全抗性。Mehta等^[47]利用CRISPR/Cas9技术开发非洲木薯花叶病毒的抗性,但编辑株系对非洲木薯花叶病毒没有表现出明显的抗性。这可能与研究者仅使用靶向一个病毒区域(AC2)的单个sgRNA有关。叶昕彤^[48]则利用CRISPR/Cas9技术靶向编辑斯里兰卡木薯花叶病毒基因组DNA,筛选抗病效果优良的sgRNA靶点并转化我国木薯主栽品种华南8号。而Veley等^[49]则基于CRISPR介导的基因编辑技术,以内源性位点3'末端的GFP标记糖外排转运蛋白基因(SWEET, sugars will eventually be exported transporters) *MeSWEET10a*,开发了一种可视化工具来监测木薯细菌性枯萎病(CBB, cassava bacterial blight)在体内的感染进程,这是CRISPR介导的同源重组和基因标记在木薯体内的首次演示。Wang等^[50]通过CRISPR/Cas9技术编辑木薯*MeSWEET10a*基因的启动子增强了突变株系对木薯细菌性枯萎病的抵抗力,且并未影响突变植株的正常生长和产量。在改善淀粉性状方面,Bull等^[51]报道了CRISPR/Cas9在操纵淀粉生物合成和提高淀粉贮藏品质方面的应用。Luo等^[52]利用双sgRNA CRISPR/Cas9系统实现了木薯中淀粉分支酶(SBE, starch branching enzyme) *SBE2*的基因编辑,获得了直链淀粉和抗性淀粉显著增加的突变株系。研究人员利用CRISPR/Cas9技术对开发无氰木薯品种也进行了尝试。Juma等^[53]利用CRISPR/Cas9对CYP79家族的P450单加氧酶基因(CYP, cytochrome P450 enzyme) *MeCYP79D1*的第3外显子进行了靶向诱变。*mecyp79d1*编辑株系叶片中亚麻苦苷和嬗变氰化物的含量降低了7倍。Gomez等^[54]进一步利用CRISPR/Cas9技术编辑产氰葡萄糖苷生物合成第1步中的两个关键酶基因 *CYP79D1* 和 *CYP79D2*,发现双重敲除消除了3种木薯(TMS60444, TME419和TMS91/02324)的产氰能力,单基因敲除则显示两个 *CYP79D* 基因对木薯产氰的贡献存在差异。

目前木薯遗传转化的模式品种为来源于非洲的TMS60444品种,该品种产量和淀粉含量低、分枝多、抗病性差,不是理想的生物育种受体材料。因此,研发我国优良木薯品种的高效遗传转化技术具有重要意义。中国热科院生物所植物抗逆基因功

能研究团队在木薯生物育种技术研究方面取得新进展,建立了我国木薯主栽品种华南8号的高效遗传转化及基因编辑体系,该团队以分生组织高表达的YAO启动子驱动Cas9蛋白表达,编辑*MePDS*基因,编辑效率达到93%,单等位纯合突变率达到45%,为迄今木薯基因编辑领域的最高纯合突变率^[55]。该研究团队还利用CRISPR/Cas9技术成功编辑了木薯可溶性淀粉合成酶III(SS, soluble starch synthase)即*MeSSIII-1*和*MeSSIII-2*、己糖转运蛋白基因(STP, sugar transport proteins) *MeSTP7*和*MeSTP15*、液泡转化酶(VINV, vacuolar invertase) *MeVINV1*以及WRKY转录因子家族基因*MeWRKY12*等靶标位点,这为获得相关突变体,进一步解析木薯块根发育、木薯淀粉合成与积累机制奠定基础。

2.5 橡胶树

巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)是当前天然橡胶的主要来源。作为一种具有长童期(6~7年)的异花授粉树种,通过常规育种方法对橡胶树进行遗传改良的效率非常低,难以满足经济需求。因此,迫切需要更有效的分子方法来加速橡胶树的性状改良。橡胶树全基因组序列的测序完成及橡胶树原生质体再生植株方法的成功建立为利用CRISPR/Cas9技术在橡胶树中进行基因编辑奠定了坚实的基础^[56-57]。刘承圆^[58]以拟南芥感橡胶树白粉菌突变体*pad4*为靶标,通过CRISPR/Cas9系统得到突变体植株,为进一步培养橡胶树抗白粉病品系奠定了基础。中国热带农业科学院华玉伟团队首先尝试在橡胶树原生质体中使用CRISPR/Cas9核糖核蛋白开发无DNA基因组编辑系统,该团队分别针对可以加快和延迟橡胶树花期的基因(*FT*和*TFL1*)设计sgRNA,利用PEG介导法将Cas9-sgRNA组装成的核糖核蛋白(RNP, ribonucleoprotein)导入叶肉细胞制备的原生质体,在国际上率先建立了橡胶树CRISPR/Cas9系统,为培育无外源DNA污染的基因编辑橡胶品系提供了参考^[59]。2021年,该团队进一步利用5个橡胶树内源U6启动子驱动sgRNA的转录,在巴西橡胶树原生质体中进行瞬时编辑发现HbU6-2和pHbU6-4驱动的编辑效率最高,并选择最短启动子HbU6-2作为后续实验的启动子。随后,Dai等^[60]利用10个靶向5个开花时间相关基因(*FT*和*TFL1*)的sgRNA对巴西橡胶树原生质体进行基因组编辑分析,发现3种突变模式,即缺失、插入和碱基替换,其中短缺失最为突出并构建了针对*HbPDS*基因的的稳定转化编辑载体,将其转化进橡胶

树愈伤组织中,获得了 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑诱导的具有预期白化表型的纯合突变愈伤组织。

2.6 油棕

具有“世界油王”美誉的油棕(*Elaeis guineensis* Jacq.)是一种重要的热带木本油料作物,是棕榈(仁)油的主要原料作物。全球对棕榈油的需求逐年增加,到 2050 年,棕榈油的需求将增至 2.5 亿吨,超过世界油类和脂肪的总产量^[61]。培育性状改良的高产油棕是满足日益增长的棕榈油消费需求的先决条件。油棕属棕榈科单子叶异花授粉植物,后代性状变异大,常规杂交育种难以满足商业化需求。生物育种成为油棕育种技术的理想选择。科研人员对油棕转基因技术进行了优化,获得了转基因苗或者转基因愈伤组织^[62]。为了在油棕中建立高效的 CRISPR/Cas9 系统,研究人员以 *EgPDS* 为靶点设计了 5 个 gRNAs,使用快速电穿孔介导的原生质体瞬时表达系统,检测了密码子优化的 SpCas9 的功能和 5 个 gRNA 的有效性,以识别高效的 gRNA^[63]。结果发现,油棕叶肉原生质体电转染效率为 17%~26%,在 Cas9/gPDS4 和 Cas9/gPDS5 转化的原生质体中检测到剪切频率分别为 6.49% 和 25.49%。Yeap 等^[63]进一步利用生物离子轰击法转化油棕未成熟合子胚对 *EgPDS* 和 BR 受体蛋白基因(*EgBR11*, *brassinosteroid-insensitive 1*)的靶位点进行编辑,获得了较高的编辑效率(42.86%~100%);在经 *EgPDS* 编辑的棕榈小苗中观察到嵌合白化表型,而在 *EgBR11* 编辑的棕榈小苗中则表现出生长发育不良和叶尖坏死表型。该结果通过优化高效 gRNA 的选择和 DNA 传递方法在油棕中实现有效的基因编辑,为油棕遗传改良提供了新的途径。

2.7 咖啡和可可

作为饮料类热带经济作物,咖啡(*Coffea canephora* L.)和可可(*Theobroma cacao* L.)是全球消耗最多的植物源饮品。2018 年,法国和美国的科学家分别建立了咖啡和可可以的 CRISPR/Cas9 基因编辑系统^[64-65]。科研人员针对咖啡 *CcPDS* 基因进行基因编辑时,得到了 T₀代纯合突变体,但该突变体并没有表现出完全的白化,只有黄化和弱小矮化等表型^[64]。可可黑果病是影响可可作物产量的重要病害。研究发现抑制可可免疫系统调节基因 *TcNPR3* 的表达可增强植株对疫霉菌的抗性。Fister 等^[65]认为,通过 CRISPR/Cas9 技术敲除可可的病程相关非表达子基因(*TcNPR3*, *Non-Expressor of Pathogenesis-Related3*),可以显著增强其对疫霉菌的抗性。Fister

等^[65]首次使用农杆菌注射方法,将含有该基因编辑载体的农杆菌注入离体叶片 48 小时后,再将疫霉菌接种到叶片上,发现与对照组相比,病斑面积明显减小,测序发现基因突变率为 27%,但转化可体细胞胚后仅获得了嵌合突变体胚。Scharf 等^[66]则报道了一种基于 CRISPR/Cas9 的快速检测方法,用于定量测定优质风味可可 Arriba 中的 bulk coco (CCN-51)。利用该技术可以在 Arriba 中检测到至少 10% 的 CCN-51 混合物。

3 问题与展望

相较于模式植物和主粮作物而言,CRISPR/Cas9 系统在热带作物基因功能研究和品种改良方面的应用比较滞后,多数尚处于基因编辑体系建立的初步阶段。高效的遗传转化再生体系是进行转基因和基因编辑的前提。目前虽已在上述热带作物中建立了有效的再生和遗传转化体系,但仍然存在较大问题。如在香蕉中,已报道的转化受体有香蕉胚性细胞悬浮系(ECS, embryogenic cell suspensions)、原生质体、茎尖或多芽体薄切片等,但每种受体却都有明显的缺陷,如 ECS 法虽可得到单细胞起源的转基因株系,但建立和维持 ECS 需要耗费大量时间、精力,再生周期长(15~18 个月),而且 ECS 诱导技术仍仅限于有限的几个实验室和几个基因型品种,技术重现性差;茎尖或多芽体薄切片虽简单快速,但成功率极低,极易产生嵌合体而导致后期筛选过程中目标性状的丢失;原生质体虽转化方便,但再生非常困难。因此,迫切需要一种广适、高效、稳定的香蕉遗传转化再生方案。作为单子叶多年生的木本油料作物,目前油棕遗传转化的受体主要是胚性愈伤组织^[62]。未成熟花序是诱导油棕体细胞胚再生较为理想的外植体材料,但油棕愈伤组织体细胞胚发生频率较低,芽再生困难。由胚性愈伤经体细胞胚发生过程到获得再生株系通常需要 2 年以上时间,其中体细胞胚发生过程最为困难,一般需 6~8 个月时间。目前国内相关研究团队正在积极开展油棕遗传转化及基因编辑工作。咖啡和可可遗传转化体系涉及因素较多,研究者们采用的遗传转化方法也存在着较大差异,存在可重复性差、转化效率低等问题。因此,构建适合我国咖啡和可可主栽品种的高效稳定的遗传转化体系仍需进一步探究。相较而言,国内相关研究团队已在热带果树番木瓜和热带经济作物甘蔗、木薯和橡胶上建立了较为成熟的以胚性愈伤组织为受体的

遗传转化再生技术,但其杂合性和多倍体在内的基因组复杂性导致了将基因组编辑应用于这些物种的困难,编辑效率有待提高。

总体而言,上述这些热带作物的全基因组测序工作虽已相继完成并公布,但对重要农艺性状相关的基因通路和基因功能的解析仍需进一步加强;多数热带作物尚不具备稳定的遗传转化体系或转化效率偏低,使得基因组编辑实验和优化变得困难,想要得到稳定可遗传的基因编辑材料,工作量大,耗时长;热带作物的多倍体特性和基因组杂合性增加了在遗传转化 T_0 代就能获得目标基因的突变表型的难度;现有的植物sgRNA在线设计软件数据库中仅包含少数热带作物基因组信息,收集更多热带作物品种的基因组数据将有助于CRISPR/Cas9的应用。

使用瞬时原生质体系统进行PEG介导的CRISPR元件递送对于gRNA验证非常有用,但只有极少数植物物种可以从原生质体再生。微粒轰击(基因枪)和农杆菌介导的递送,高度依赖植物种类、基因型和组织类型特异性^[67]。为克服基因型依赖性,利用特定的形态发生因子对体细胞进行重组,使其开始胚胎发生,是植物转化领域的一项重大突破,对单子叶植物和难以转化的植物尤其如此。如玉米胚自主发生基因(*BBM*, *baby boom*)和WOX转录因子(*WUS2*, *Wuschel2*)基因的异位表达提高了几种作物的转化效率,包括玉米、高粱、籼稻、甘蔗等^[68]。WOX转录因子(*WOX5*, *WUSCHEL-like HOMEBOX5*)或GRF4-GIF1嵌合蛋白的组成型表达提高了小麦、其他单子叶和双子叶植物的转化效率^[69-70]。因此有必要设计和克隆包含GRF4-GIF1等形态发生因子的嵌合复合物的CRISPR/Cas9载体,并应用于热带作物中以产生具有更高再生效率的稳定转化体。

南方科技大学朱健康团队开发了一种递送系统(CDB, cut-dip-budding),利用根茎再生的优势,利用发根农杆菌对甘薯进行转化和编辑,直接产生毛状根^[71]。该技术在组织培养过程中难以从外植体重新再生的植物物种中显示出巨大的潜力。为解决热带作物基因组编辑的限制,集中精力开发基于非组织培养的转化系统也是一个重要的研究领域。例如纳米颗粒辅助的直接转基因传递或转基因的病毒介导的转基因沉默(VIGS, virus induced gene silencing),然后从受感染的组织中再生植株。

Wolabu 等^[72]在苜蓿上利用多重gRNA-

CRISPR/Cas9载体将*MsSGR*基因的诱变效率提高了23%~49%,并在 T_0 代中产生了完全敲除4个等位基因拷贝的纯合突变体。这种多重gRNA-CRISPR/Cas9基因组编辑系统提供了一种可靠有效的基因功能鉴定方法。多重gRNA-CRISPR/Cas9基因组编辑系统的另一个策略是BREEDIT(多重基因编辑工具),已在玉米中报道以改良其数量性状^[73]。利用该策略编辑与植物生长相关的多个基因,获得了超过1000个经基因改造的玉米突变体库^[73]。最近,Gupta等^[74]开发了一种模块化的多重基因PE编辑系统,最高可以同时水稻中的4个基因位点进行编辑。Gupta等^[74]主要是利用Golden Gate克隆和Gateway重组技术,使多个pegRNA-ngRNA模块的装配变得简单。利用该系统,Gupta等^[74]进行了两基因(双重),三基因(三重)和四基因(四重)的同时编辑实验,并产生了较高的编辑效率,简化了构建多基因编辑PE载体的过程,使更多实验室可以利用PE进行多基因编辑实验。以上研究对于具有复杂基因组和多倍化的热带作物具有很好的借鉴作用。

基因组编辑分子生物学研究的进展导致设计出具有广泛应用的各种基因组编辑工具。因此,选择编辑给定物种的最佳系统和编辑的目的变得至关重要。最近新兴的碱基编辑和引导编辑技术具有扩大基因组编辑范围和效率的潜力,其在热带作物中的应用可以在精确和加速遗传改良中发挥至重要的作用。

参考文献

- [1] 郭晓强. CRISPR-Cas9技术发展史:25年的科学历程. 自然杂志, 2016, 38 (4): 278-286
Guo X Q. The invention of CRISPR-Cas9 technology: 25-years scientific journey. Chinese Journal of Nature, 2016, 38 (4): 278-286
- [2] Cong L, Ran F A, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib B, Hsu P D, Wu X, Jiang W, Marraffini L A, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science, 2013, 339 (6121): 819-823
- [3] Li J F, Norville J E, Aach J, McCormack M, Zhang D, Bush J, Church G M, Sheen J. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. Nature Biotechnology, 2013, 31: 688-691
- [4] Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, Jones JDG, Kamoun S. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. Nature Biotechnology, 2013, 31: 691-693

- [5] Shan Q, Wang Y, Li J, Zhang Y, Chen K, Liang Z, Liu J, Xi J J, Qiu J, Gao C. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 2013, 31: 686–688
- [6] Zhang P. Tropical crops enter the era of genome editing. *Tropical Plants*, 2022, 1:10
- [7] 毛兴学, 郑晓钰, 孙炳蕊, 李晨, 陈文丰, 潘大建, 柳武革, 范芝兰, 王丰. 应用 CRISPR/Cas9 技术创制低直链淀粉含量水稻种质. *植物遗传资源学报*, 2022, 23 (2): 583–591
Mao X X, Zheng X Y, Sun B R, Li C, Chen W F, Pan D J, Liu W G, Fan Z L, Wang F. Creating novel rice germplasms with low amylose content by editing upstream sequence of *Wx* gene coding region via CRISPR/Cas9 technology. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022, 23 (2): 583–591
- [8] 王超凡, 张大健. 基因编辑技术在大豆种质资源研究中的利用. *植物遗传资源学报*, 2020, 21 (1): 26–32
Wang C F, Zhang D J. Application of gene editing in studies of soybean germplasm resource. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2020, 21 (1): 26–32
- [9] 高谢旺, 谭安琪, 胡信畅, 祝孟洋, 阮颖, 刘春林. 利用 CRISPR/Cas9 技术创制高油酸甘蓝型油菜新种质. *植物遗传资源学报*, 2020, 21 (4): 1002–1008
Gao X W, Tan A Q, Hu X C, Zhu M Y, Ruan Y, Liu C L. Creation of new germplasm of high-oleic rapeseed using CRISPR/Cas9. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2020, 21 (4): 1002–1008
- [10] 于美, 唐华丽, 叶兴国. 利用转基因技术和基因编辑技术改良小麦进展. *植物遗传资源学报*, 2023, 24 (1): 102–116
Yu M, Tang H L, Ye X G. Progresses on wheat improvement by using transgenic and genome editing technologies. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2023, 24 (1): 102–116
- [11] Rees H A, Liu D R. Base editing: Precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. *Nature Reviews Genetics*, 2018, 19: 770–788
- [12] Anzalone A V, Randolph P B, Davis J R, Sousa A A, Koblan L W, Levy J M, Chen P J, Wilson C, Newby G A, Raguram A, Liu D R. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 2019, 576: 149–157
- [13] 赵无迪, 黄国斌, 朱向星, 毕延震, 唐冬生. 碱基编辑技术在猪遗传改良上的应用研究进展. *生物工程学报*, 2023, 39 (10): 3936–3947
Zhao W D, Huang G B, Zhu X X, Bi Y Z, Tang D S. Application of single base editing technique in pig genetic improvement: A review. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39 (10): 3936–3947
- [14] Liang Y, Xie J, Zhang Q, Wang X, Gou S, Lin L, Chen T, Ge W, Zhuang Z, Lian M, Chen F, Li N, Ouyang Z, Lai C, Liu X, Li L, Ye Y, Wu H, Wang K, Lai L. AGBE: A dual deaminase-mediated base editor by fusing CGBE with ABE for creating a saturated mutant population with multiple editing patterns. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50: 5384–5399
- [15] Zong Y, Wang Y, Li C, Zhang R, Chen K, Ran Y, Qiu J, Wang D, Gao C. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. *Nature Biotechnology*, 2017, 35: 438–440
- [16] Xu W, Zhang C, Yang Y, Zhao S, Kang G, He X, Song J, Yang J. Versatile nucleotides substitution in plant using an improved system, prime editing. *Molecular Plant*, 2020, 13: 675–678
- [17] 胡春华, 邓贵明, 孙晓玄, 左存武, 李春雨, 邱瑞彬, 杨乔松, 易干军. 香蕉 CRISPR/Cas9 基因编辑技术体系的建立. *中国农业科学*, 2017, 50 (7): 1294–1301
Hu C H, Deng G M, Sun X X, Zuo C W, Li C Y, Kuang R B, Yang Q S, Yi G J. Establishment of an efficient CRISPR/Cas9-mediated gene editing system in banana. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50 (7): 1294–1301
- [18] Kaur N, Alok A, Shivani, Kaur N, Tiwari S. CRISPR/Cas9-mediated efficient editing in *phytoene desaturase* (*PDS*) demonstrates precise manipulation in banana cv. Rasthali genome. *Functional Integrative Genomics*, 2018, 18 (1): 89–99
- [19] Naim F, Dugdale B, Kleidon J, Brinin A, Shand K, Waterhouse P, Dale J. Gene editing the phytoene desaturase alleles of Cavendish banana using CRISPR/Cas9. *Transgenic Research*, 2018, 27 (5): 451–460
- [20] Ntui V O, Tripathi J N, Tripathi L. Robust CRISPR/Cas9 mediated genome editing tool for banana and plantain (*Musa* spp.). *Current Plant Biology*, 2020, 21: 100128
- [21] Wu S, Zhu H, Liu J, Yang Q, Shao X, Bi F, Hu C, Hou H, Chen K, Yi G. Establishment of a PEG-mediated protoplast transformation system based on DNA and CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes for banana. *BMC Plant Biology*, 2020, 20 (1): 425
- [22] Zhang S, Wu S, Hu C, Yang Q, Dong T, Sheng Ou, Deng G, He W, Dou T, Li C, Sun C, Yi G, Bi F. Increased mutation efficiency of CRISPR/Cas9 genome editing in banana by optimized construct. *PeerJ*, 2022, 10: e12664
- [23] Hu C, Liu F, Sheng O, Yang Q, Dou T, Dong T, Li C, Gao H, He W, Liu S, Deng G, Yi G, Bi F. Efficient and transgene-free genome editing in banana using a *REG-2* promoter-driven gene-deletion system. *Molecular Horticulture*, 2023, 3: 16
- [24] Tripathi J N, Ntui V O, Ron M, Muiruri S K, Britt A, Tripathi L. CRISPR/Cas9 editing of endogenous *banana streak virus* in the B genome of *Musa* spp. overcomes a major challenge in banana breeding. *Communication Biology*, 2019, 2: 46
- [25] Tripathi J N, Ntui V O, Shah T, Tripathi L. CRISPR/Cas9 mediated editing of *DMR6* Orthologue in banana (*Musa* spp.) confers enhanced resistance to bacterial disease. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19 (7): 1291–1293
- [26] Maxmen A. CRISPR could save bananas from fungus. *Nature*, 2019, 574: 15
- [27] Kaur N, Alok A, Shivani, Kumar P, Kuar N, Awasthi P,

- Chaturvedi S, Pandey P, Pandey A, Pandey A K, Tiwari S. CRISPR/Cas9 directed editing of *lycopene epsilon-cyclase* modulates metabolic flux for β -carotene biosynthesis in banana fruit. *Metabolic Engineering*, 2020, 59: 76–86
- [28] Awasthi P, Khan S, Lakhani H, Chaturvedi S, Shivani, Kaur N, Singh J, Kesarwani A K, Tiwari S. Transgene-free genome editing supports the role of carotenoid cleavage dioxygenase 4 as a negative regulator of β -carotene in banana. *Journal of Experimental Botany*, 2022, 73 (11): 3401–3416
- [29] 孙晓玄. 香蕉 CRISPR/Cas9 基因编辑技术体系的建立. 广州: 华南农业大学, 2017
- Sun X Y. Establishment of an efficient CRISPR/Cas9-mediated gene editing system in banana. Guangzhou: South China Agricultural University, 2017
- [30] Shao X, Wu S, Dou T, Zhu H, Yi G. Using CRISPR/Cas9 genome editing system to create *MaGA20ox2* gene-modified semi-dwarf banana. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18: 17–19
- [31] Hu C, Sheng O, Deng G, He W, Bi F. CRISPR/Cas9-mediated genome editing of *MaACO1* (aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase1) promotes the shelf life of banana fruit. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19: 654–56
- [32] 魏岳荣, 周陈平, 邝瑞彬, 杨护, 黄炳雄, 杨敏. 番木瓜均质胚性细胞悬浮系的建立和高效植株再生. *果树学报*, 2023, 40 (2): 376–385
- Wei Y R, Zhou C P, Kuang R B, Yang H, Huang B X, Yang M. Development of embryogenic cell suspension cultures and efficient plant regeneration of *Carica papaya* L. *Journal of Fruit Science*, 2023, 40 (2): 376–385
- [33] Gonsalves D. Control of Papaya ringspot virus in papaya: A case study. *Annual Review of Phytopathology*, 1998, 36: 415–437
- [34] Ming R, Hou S, Feng Y, Yu Q, Dionne-Laporte A, Saw J H, Senin P, Wang W, Ly B V, Lewis K L T, Salzberg S L, Feng L, Jones M R, Skelton R, Murray J E, Chen C, Qian W, Shen J, Du P, Eustice M, Tong E, Tang H, Lyons E, Paul R E, Michael T P, Wall K, Rice D W, Albert H, Wang M L, Zhu Y J, Schatz M, Nagarajan N, Acob R A, Guan P, Blas A, Wai C M, Ackerman C M, Ren Y, Liu C, Wang J N, Wang J P, Na J, Shakirov E V, Haas B, Thimmapuram J, Nelson D, Wang X, Bowers J E, Gschwend A R, Delcher A L, Singh R, Suzuki J, Tripathi S, Neupane K, Wei H, Irikura B, Paidi M, Jing N, Zhang W, Presting G, Wondor A, Navajas-Pérez R, Torres M J, Feltus F A, Porter B, Li Y, Burroughs A M, Luo M, Christopher D A, Mount S M, Moore P H, Sugimura T, JIANG J, Schuler M A, Friedman V, Mitchell-Olds T, Shippen D S, de Pamphilis C W, Palmer J D, Freeling M, Paterson A H, Gonsalves D, Wang L, Alam M. The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature*, 2008, 452: 991–996
- [35] Al-Shara B, Taha R M, Mohamad J, Elias H, Khan A. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in the *Carica papaya* L. cv. Eksotika. *Plants*, 2020, 9 (3): 360
- [36] 赵晓兵, 曾秋霞, 杨丽媛, 方寒梅, 左丽萍, 吴永旺, 岳晶晶. 番木瓜胚性愈伤组织高效诱导与植株再生. *分子植物育种*, 2022, 20 (8): 2713–2724
- Zhao X B, Zeng Q X, Yang L Y, Fang H M, Zuo L P, Wu Y W, Yue J J. Efficient induction of papaya embryogenic callus and plant regeneration. *Molecular Plant Breeding*, 2022, 20 (8): 2713–2724
- [37] 王绪朋, 赵辉, 贾瑞宗, 孔华, 郭运玲, 郭安平. 用 Golden Gate 法构建广谱抗番木瓜环斑病毒海南株系的 CRISPR/FnCas9 植物表达载体. *热带作物学报*, 2018, 39 (5): 955–962
- Wang X P, Zhao H, Jia R Z, Kong H, Guo Y L, Guo A P. Construction of CRISPR/FnCas9 plant expression vectors with broad spectrum resistance to Hainan Papaya ringspot virus by Golden gate. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2018, 39 (5): 955–962
- [38] 龙欢, 赵辉, 王绪朋, 贾瑞宗, 贺萍萍, 孔华, 郭运玲, 郭安平. 基于 CRISPR 基因编辑系统抗番木瓜曲叶病毒的植物转化载体的构建. *热带作物学报*, 2019, 40 (10): 2022–2028
- Long H, Zhao H, Wang X P, Jia R Z, He P P, Kong H, Guo Y L, Guo A P. Construction of CRISPR plant expression vectors resistance to papaya leaf curl virus. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2019, 40 (10): 2022–2028
- [39] Brewer S E, Chambers A H. CRISPR/Cas9-mediated genome editing of *phytoene desaturase* in *Carica papaya* L. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2022, 97: 580–592
- [40] Hoang T H T, Nguyen N H, Nguyen L T, Bui T P, Le N T, Dao N T, Monteiro M, Pham N B, Molnar A, Chu H H, Do P T. Developing a robust *in vivo* hairy root system for assessing transgene expression and genome editing efficiency in papaya. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2023, 152: 661–667
- [41] 许孚, 汪洲涛, 路贵龙, 阙友雄. 甘蔗遗传改良中的基因工程: 适用、成就、局限和展望. *农业生物技术学报*, 2022, 30 (3): 580–593
- Xu F, Wang Z T, Lu G L, Que Y X. Genetic engineering in sugarcane improvement: Adaptability, achievements, limitations and prospects. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2022, 30 (3): 580–593
- [42] Zhao Y, Karan R, Altpeter F. Error-free recombination in sugarcane mediated by only 30 nucleotides of homology and CRISPR/Cas9 induced DNA breaks or Cre-recombinase. *Biotechnology Journal*, 2021, 16 (6): e2000650
- [43] Eid A, Mohan C, Sanchez S, Wang D D, Altpeter F. Multiallelic, targeted mutagenesis of magnesium chelatase with CRISPR/Cas9 provides a rapidly scorable phenotype in highly polyploid sugarcane. *Frontiers in Genome Editing*, 2021, 3: 654996
- [44] Oz M T, Altpeter A, Karan R, Merotto A, Altpeter F. CRISPR/Cas9-mediated multi-allelic gene targeting in sugarcane confers herbicide tolerance. *Frontiers in Genome*

- Editing, 2021, 3: 673566
- [45] Odipio J, Alicai T, Ingelbrecht I, Nusinow D A, Bart R, Taylor N J. Efficient CRISPR/Cas9 genome editing of *phytoene desaturase* in cassava. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1780
- [46] Gomez M A, Lin Z D, Moll T, Chauhan R D, Hayden L, Renninger K, Beyene G, Taylor N J, Carrington, J C, Staskawicz B J. Simultaneous CRISPR/Cas9-mediated editing of cassava *elF4E* isoforms *nCBP-1* and *nCBP-2* reduces cassava brown streak disease symptom severity and incidence. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17: 421–434
- [47] Mehta D, Stürchler A, Anjanappa R B, Zaidi S S, Hirsch-Hoffmann M, Gruissem W, Vanderschuren H. Linking CRISPR-Cas9 interference in cassava to the evolution of editing-resistant geminiviruses. *Genome Biology*, 2019, 20 (1): 80
- [48] 叶昕彤. 利用CRISPR/Cas9 靶向斯里兰卡木薯花叶病毒创制抗病木薯材料. 杭州: 浙江大学, 2021
Ye X T. Generation of Sri Lankan cassava mosaic virus resistant cassava plants by CRISPR/Cas9-mediated genome targeting. Hangzhou: Zhejiang University, 2021
- [49] Veley K M, Okwuonu I, Jensen G, Yoder M, Taylor N J, Meyers B C, Bart R S. Gene tagging via CRISPR-mediated homology-directed repair in cassava. *Genes, Genomes, Genetics*, 2021, 11 (4): jkab028
- [50] Wang Y, Geng M, Pan R, Zhang T, Zhen X, Che Y, Li R, Liu J, Chen Y, Guo J. Engineering bacterial blight-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the *MeSWEET10a* promoter in cassava. *bioRxiv*. (2022-03-02) [2023-10-10]. <https://doi.org/10.1101/2022.3.2.482644>
- [51] Bull S E, Seung D, Chanez C, Mehta D, Kuon J E, Truernit E, Hochmuth A, Zurkirchen I, Zeeman S C, Gruissem W, Vanderschuren H. Accelerated ex situ breeding of *GBSS*- and *PTST1*-edited cassava for modified starch. *Science Advances*, 2018, 4: eaat6086
- [52] Luo S, Ma Q, Zhong Y, Jing J, Wei Z, Zhou W, Lu X, Tian Y, Zhang P. Editing of the starch branching enzyme gene *SBE2* generates high-amylose storage roots in cassava. *Plant Molecular Biology*, 2022, 108, 429–442
- [53] Juma B S, Mukami A, Mweu C, Ngugi M P, Mbinda W. Targeted mutagenesis of the *CYP79D1* gene via CRISPR/Cas9-mediated genome editing results in lower levels of cyanide in cassava. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 1009860
- [54] Gomez M A, Berkoff K C, Gill B K, Iavarone A T, Lieberman S E, Ma J M, Schultink A, Karavolias N G, Wyman S K, Chauhan R D, Taylor N J, Staskawicz B J, Cho M J, Rokhsar D S, Lyons J B. CRISPR-Cas9-mediated knockout of *CYP79D1* and *CYP79D2* in cassava attenuates toxic cyanogen production. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 13: 1079254
- [55] Wang Y J, Lu X H, Zhen X H, Yang H, Che Y N, Hou J Y, Geng M T, Liu J, Hu X W, Li R M, Guo J C, Yao Y A. transformation and genome editing system for cassava cultivar SC8. *Genes*, 2022, 13: 1650
- [56] Tang C, Yang M, Fang Y, Luo Y, Gao S, Xiao X, An Z, Zhou B, Zhang B, Tan X, Yeang H Y, Qin Y, Yang J, Lin Q, Mei H, Montoro P, Long X, Qi J, Hua Y, He Z, Sun M, Li W, Zeng X, Cheng H, Liu Y, Yang J, Tian W, Zhuang N, Zeng R, Li D, He P, Li Z, Zou Z, Li S, Li C, Wang J, Wei D, Lai C Q, Luo W, Yu J, Hu S, Huang H. The rubber tree genome reveals new insights into rubber production and species adaptation. *Nature Plants*, 2016, 2 (6): 16073
- [57] 戴雪梅, 黄天带, 李季, 杨先锋, 黄华孙. 不同外植体对橡胶树原生质体分离和再生的影响. *分子植物育种*, 2014, 12 (6): 1259–1264
Dai X M, Huang T D, Li J, Yang X F, Huang H S. Effects of different explants on isolation and regeneration of protoplast in rubber tree. *Molecular Plant Breeding*, 2014, 12 (6): 1259–1264
- [58] 刘承圆. 橡胶树 *Mlo* 基因的克隆和基因修饰载体的构建. 海口: 海南大学, 2018
Liu C Y. Cloning of *MLO* gene in *Hevea brasiliensis* and construction of gene modified vectors. Haikou: Hainan University, 2018
- [59] Fan Y T, Xin S C, Dai X M, Yang X F, Huang H S, Hua Y W. Efficient genome editing of rubber tree (*hevea brasiliensis*) protoplasts using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. *Industrial Crops & Products*, 2020, 146: 112146
- [60] Dai X M, Yang X F, Wang C, Fan Y T, Xin S C, Hua Y W, Wang K J, Huang H S. CRISPR/Cas9-mediated genome editing in *Hevea brasiliensis*. *Industrial Crops & Products*, 2021, 164: 113418
- [61] Masani M Y A, Izawati A M D, Rasid O A, Parveez G K A. Biotechnology of oil palm: Current status of oil palm genetic transformation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2018, 15: 335–347
- [62] Yarra R, Jin L, Zhao Z, Cao H. Progress in tissue culture and genetic transformation of oil palm: An overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20 (21): 5353
- [63] Yeap W C, Norkhairunnisa C M K, Norfadzilah J, Muhammad Rashdan M, Appleton D R, Harikrishna K. An efficient clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 mutagenesis system for Oil Palm (*Elaeis guineensis*). *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 773656
- [64] Breitler J C, Dechamp E, Campa C, Rodrigues L A Z, Guyot R, Marraccini P, Etienne H. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis has the potential to accelerate the domestication of *Coffea canephora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2018, 134 (3): 383–394
- [65] Fister A S, Landherr L, Maximova S N, Guiltinan M J. Transient expression of CRISPR/Cas9 machinery targeting TcNPR3 enhances defense response in *Theobroma cacao*. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 268

- [66] Scharf A, Lang C, Fischer M. Genetic authentication: Differentiation of fine and bulk cocoa (*Theobroma cacao* L.) by a new CRISPR/Cas9-based in vitro method. *Food Control*, 2020, 114: 107219
- [67] Chen K, Wang Y, Zhang R, Zhang H, Gao C. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. *Annual Review of Plant Biology*, 2019, 70: 667-697
- [68] Lowe K, Wu E, Wang N, Hoerster G, Hastings C, Cho MJ, Scelongo C, Lenderts B, Chamberlin M, Cushatt J, Wang L, Ryan L, Khan T, Chow-Yiu J, Hua W, Yu M, Banh J, Bao Z, Brink K, Igo E, Rudrappa B, Shamseer P M, Bruce W, Newman L, Shen B, Zheng P, Bideny D, Falco C, Register J, Zhao Z Y, Xu D, Jones T, Gordon-Kamm W. Morphogenic regulators BABY BOOM and WUSCHEL improve monocot transformation. *Plant Cell*, 2016, 28: 1998-2015
- [69] Debernardi J M, Tricoli D M, Ercoli M F, Hayta S, Ronald P, Palatnik J F, Dubcovsky J. A GRF-GIF chimeric protein improves the regeneration efficiency of transgenic plants. *Nature Biotechnology*, 2020, 38: 1274-1279
- [70] Wang K, Shi L, Liang X, Zhao P, Wang W, Liu J, Chang Y, Hiei Y, Yanagihara C, Du L, Ishida Y, Ye X G. The gene *TaWOX5* overcomes genotype dependency in wheat genetic transformation. *Nature Plants*, 2022, 8: 110-117
- [71] Cao X, Xie H, Song M, Lu J, Ma P, Huang B, Wang M, Tian Y, Chen J, Lang Z, Li G, Zhu J K. Cut-dip-budding delivery system enables genetic modifications in plants without tissue culture. *Innovation*, 2022, 4 (1): 100345
- [72] Wolabu T W, Cong L, Park J J, Bao Q, Chen M, Sun J, Xu B, Ge Y, Chai M, Liu Z. Development of a highly efficient multiplex genome editing system in outcrossing tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*). *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 1063
- [73] Lorenzo C D, Debray K, Herwegh D, Develtere W, Impens L, Schaumont D, Vandeputte W, Aesaert S, Coussens G, De Boe Y. BREEDIT: A multiplex genome editing strategy to improve complex quantitative traits in maize. *Plant Cell*, 2022, 35 (1): 218-238
- [74] Gupta A, Liu B, Raza S, Chen Q J, Yang B. Modularly assembled multiplex prime editors for simultaneous editing of agronomically important genes in rice. *Plant Communications*, 2023, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2023.100741>