 DOI：10.13430/j.cnki.jpgr.20250902001

CRISPR/Cas9 基因编辑技术改良小麦重要性状的研究进展与应用

吕国国，刘 峥，梁仪红，刘 珂，马 悦，张 蒙，胡海燕

（河南科技学院农学院/小麦玉米两熟高效生产全国重点实验室/河南省作物基因组编辑工程技术研究中心，新乡 453000）

摘要：小麦（*Triticum aestivum* L.）是世界上最重要的粮食作物之一，在保障全球粮食安全和农业可持续发展中发挥着不可替代的作用。随着人口的持续增长和气候变化的加剧，小麦产量和品质提升的需求日益迫切。近年来，CRISPR/Cas9 基因编辑技术因其操作简便、靶向性强和编辑效率高，被广泛应用于水稻、玉米等主要作物的功能基因研究和性状改良并取得了显著进展。然而，小麦基因组为多倍体，结构复杂，且遗传转化效率相对较低，这些因素使得 CRISPR/Cas9 技术在小麦中的应用仍面临诸多挑战。针对这一现状，本文系统综述了 CRISPR/Cas9 的发现过程与作用原理，归纳了其能够引发的 4 种主要变异的类型，包括短序列插入、序列缺失、单碱基突变和大片段插入，并进一步重点综述了该技术在小麦抗病、抗逆以及增产等性状改良中的最新研究进展。同时，结合当前 CRISPR/Cas9 技术在小麦中应用所面临的挑战，如编辑效率偏低、脱靶效应以及转化体系不完善等问题，提出了潜在的优化方向与解决方案。本文旨在为后续小麦分子育种研究提供理论依据和技术参考，以推动基因编辑技术在小麦中的高效应用。

关键词：小麦；基因编辑；CRISPR/Cas9；抗病抗逆

Research Progress and Applications of CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing in Improving Important Traits in Wheat

LYU Guoguo，LIU Zheng，LIANG Yihong，LIU Ke，MA Yue，ZHANG Meng，HU Haiyan

（*School of Agriculture, Henan Institute of Science and Technology/State Key Laboratory of High-Efficiency Production of Wheat-Maize Double Cropping/Henan Engineering Research Center of Crop Genome Editing, Xinxiang 453000*）

Abstract: Wheat [*Triticum aestivum* L.] is one of the most important cereal crops worldwide, playing an indispensable role in ensuring global food security and sustainable agricultural development. With the continuous growth of the global population and the increasing impact of climate change, there is an urgent need to enhance wheat yield and quality. In recent years, CRISPR/Cas9 genome-editing technology has been widely applied to functional gene research and trait improvement in major crops such as rice and maize, achieving remarkable progress due to its simplicity, high targeting specificity, and editing efficiency. However, the polyploid nature and structural complexity of the wheat genome, coupled with its relatively low genetic transformation efficiency, making the application and advancement of CRISPR/Cas9 technology in wheat particularly challenging. In response to this situation, this review

收稿日期：2025-09-02 网络出版日期：
URL：https：//doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20250902001
第一作者研究方向为小麦茎基腐病抗性基因的挖掘和功能验证，E-mail：lvguoguo@hist.edu.cn；刘峥为共同第一作者
通信作者：胡海燕，研究方向小麦茎基腐病抗性基因挖掘及抗病种质创制，E-mail：haiyanhuhhy@126.com
基金项目：国家自然科学基金 (32171995，32501986)；中国博士后科学基金（2024M750748）；河南省科技攻关（252102111116）
Foundation projects: National Natural Science Foundation of China （32501986，32171995）； China Postdoctoral Science Foundation （2024M750748）；Henan Provincial Science and Technology Research Project（252102111116）

systematically summarizes the discovery and underlying mechanisms of CRISPR/Cas9 system, outlines the four main types of edits it can induce-inculding short fragment insertion, fragment deletions, base substitutions and large fragment insertions, and further highlights recent advances in applying this technology to improve disease resistance, stress tolerance, and yield related traits in wheat. Additionally, considering the current challenges in wheat CRISPR/Cas9 applications, such as limited editing efficiency, off-target effects, and imperfect transformation systems, potential optimization strategies and actionable solutions are proposed in this review. Overall, this review aims to provide a theoretical foundations and technical references for future molecular breeding research in wheat, thereby promoting the efficient application of genome-editing technologies in wheat.

Key words: wheat; genome editing; CRISPR/Cas9; disease resistance and stress tolerance

小麦（*Triticum aestivum* L.）是我国最为重要的粮食作物之一，在保障国家粮食安全中具有战略意义。然而，近年来， 小麦赤霉病、白粉病、条锈病、茎基腐病等重大病害频繁爆发[1] 以及干旱高温等非生物逆境的影响[2]导致小麦的产量与品质不断下降，利用生物育种手段进行多抗品种的选育是应对以上威胁最有效的途径之一。目前，基因编辑技术已成为作物性状改良的重要工具，然而小麦作为异源六倍体植物，其染色体结构复杂、基因组庞大、且遗传转化效率较低，导致该技术在小麦中的推广与应用仍相对滞后[3]。

成簇规律间隔短回文重复序列（CRISPR，clustered regularly interspaced short palindromic repeat）的出现为小麦遗传改良带来了新的突破。其由单向导 RNA（sgRNA，single guide RNA）和 Cas9 核酸酶组成，其中 sgRNA 的 5'端包含约 20 个核苷酸的靶序列，能够通过碱基互补识别并引导 Cas9 精确结合目标 DNA 序列，并在间隔序列邻近基序（PAM，protospacer adjacent motif ）附近引发双链断裂，实现基因的定点编辑。与传统蛋白质-DNA 识别机制相比，CRISPR/Cas9 依靠 RNA-DNA 碱基互补进行特异性识别，因而具备设计灵活、脱靶率低、编辑效率高等优点。此外，CRISPR/Cas9 结构简单，便于构建和操作，且可以同时编辑多个基因位点，极大提高了多性状聚合的可能性。基于这些优势，该技术已在小麦的抗病、抗逆、高产、高品质等多个方向得到广泛应用。

本文主要综述了 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的原理以及在小麦研究中的成功实践，对前人的工作进行总结归纳，以期为未来基因编辑技术在小麦研究中的应用提供参考，促进小麦品种高产高质、抗病抗逆研究的持续更新和产业的健康发展。

1 CRISPR/Cas9 的发现与原理

1987 年，CRISPR/Cas 由日本学者在大肠杆菌中发现[4]，2000 年 Mojica 等[5]提出将此类有规律重复序列命名为短规律间隔重复序列（SPSPs，short regularly spaced repeats），2005 年 Mojica 等[6]发现其可能参与原核生物的免疫反应。2002 年，这类高度保守的 DNA 重复序列被 Jansen 等[7]正式命名为成簇规律间隔短回文重复序列（CRISPR）。CRISPR 家族种类繁多，截至到 2011 年，研究者在细菌和古菌中已经鉴定

出 65 组直系同源的 Cas 蛋白质[8]。2017 年，Makarova 等[9]根据不同 CRISPR/Cas 参与 crRNA（CRISPR RNA）加工和干扰的效应模块将 CRISPR-Cas 划分为两类，一类 CRISPR/Cas 通常是由多个蛋白最终与 crRNA 组成复合物，另一类则是由单一蛋白质与 crRNA 组成复合物。其中 CRISPR/Cas9 相较于其他系统只存在一个效应蛋白且能同时编辑双链 DNA，其结构也相对简单，便于工程应用，因此成为了第一个也是最广泛应用的基因编辑系统。

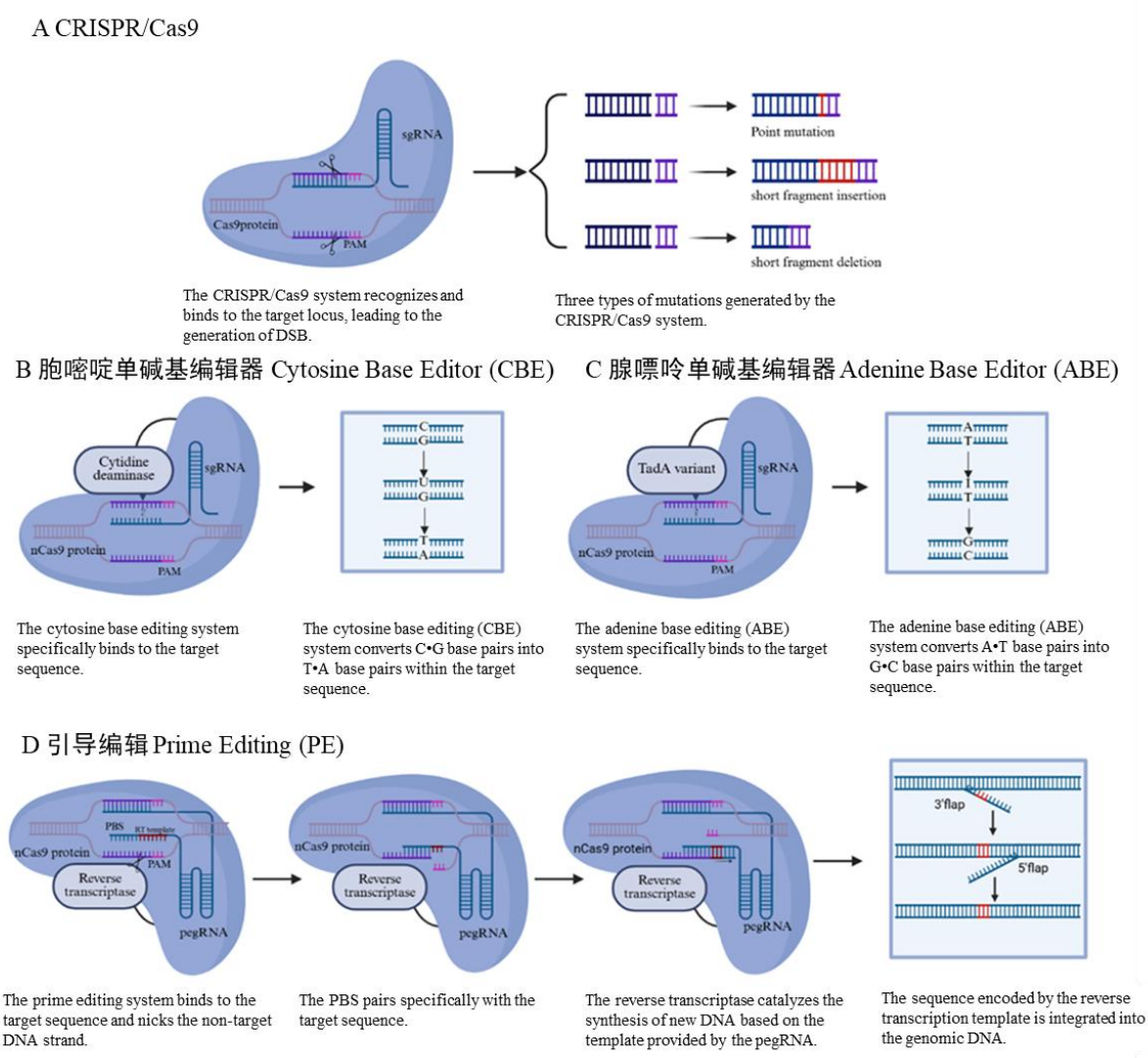
CRISPR/Cas9 主要由 CRISPR 基因座转录并剪切合成的向导 RNA（tracr-crRNA，trans-activating CRISPR-CRISPR RNA）和 Cas9 蛋白两个部分组成，其中 tracr-crRNA 负责引导 Cas9 产生双链 DNA 断裂（DSB，double-strand breakage），切割位点位于 PAM 位点的上游；Cas9 蛋白是一种 DNA 特异性的核酸内切酶，负责最终切割双链 DNA。当 CRISPR/Cas9 发生作用时，双链 DNA 在 tracr-crRNA 的引导下进入 Cas9 蛋白并被解开形成单链，随后结合在 Cas9 蛋白的两条沟壑中，在 Cas9 的两个核酸酶结构域的作用下分别被切割产生 DSB[8,10]。工程化应用的 CRISPR/Cas9 中，tracr-crRNA 被简化整合为 sgRNA（single guide RNA），通过搭配丰富的植物遗传转化体系可以相对便携地传递进植物体内编辑植物的基因组[11]。

2 CRISPR/Cas9 造成的变异

CRISPR/Cas9 可在目标基因处引发 4 种主要类型的变异，包括短序列插入、序列缺失、单碱基突变和大片段插入。为了实现对这 4 种变异类型的精确控制，研究者先后开发了单碱基编辑器（BEs，base editors ）、引导编辑（PE，prime editing）等主流基因编辑系统。在小麦功能基因的研究中，短序列插入和缺失是最常见的变异类型，被广泛应用于小麦产量与品质改良以及抗病抗逆性等方面。

2.1 短片段序列插入和缺失

短片段的插入与缺失是 CRISPR/Cas9 诱导 DSB 后经非同源末端连接（NHEJ，non-homologous end joining）过程产生的最常见的突变类型（图 1A），通常涉及一到几十个碱基的增减。由于非同源末端连接是一种非模板依赖的、低保真度的修复机制，常在切口处随机插入或删除碱基，从而引发编码序列的移码突变、导致翻译提前终止或破坏功能结构域，最终导致目标基因的敲除[12]。这类变异在小麦等植物的基因功能研究中具有广泛的应用前景，相较于传统的 RNAi 技术，CRISPR /Cas9 直接在基因组 DNA 层面引入突变，实现永久性的可遗传的基因敲除[13]。CRISPR/Cas9 不仅可以敲除功能基因，也可以敲除调控元件和 miRNA 等目标区域[14]，这使得 CRISPR/Cas9 对基因表达的调控拥有更高的自由度。



A：CRISPR/Cas9，CRISPR/Cas9 通过识别 PAM 位点与目标片段结合并切割双链，切口在 DNA 修复后会产生切割位点处的碱基产生突变，切割位置处发生短的片段插入和切割位置处出现片段缺失 3 种变异；B~C：在单碱基编辑中，Cas9 蛋白的核酸酶活性失活，使得整个系统在与目标蛋白结合后不会切割目标位点，而是在碱基脱氨酶的作用下改变目标位点的碱基；胞嘧啶单碱基编辑器中，胞嘧啶在脱氨酶的作用下变成尿嘧啶，在复制过程中被当做胸腺嘧啶；腺嘌呤单碱基编辑器中腺嘌呤被脱氨变成次黄嘌呤，并在复制过程中被认为是鸟嘌呤；D：引导编辑中的 Cas9 蛋白的核酸酶活性部分失活，只会切割非靶向链，在切割后 PegRNA 的 PBS 区会结合在切口处，并在逆转录酶的帮助下使 DNA 单链沿着逆转录模板延伸，从而将外源片段引入进基因组中

A: The CRISPR/Cas9 system recognizes the PAM site and binds to the target sequence, where it cleaves the DNA double strand. After DNA repair, three types of variations may occur: (1) base substitutions at the cleavage site; (2) short fragment insertions at the cleavage site; (3) fragment deletions at the cleavage site; B-C: In base editing, the nuclease activity of Cas9 is inactivated, so the system does not cut the target site after binding to the target sequence. Instead, bases at the target site are modified through the action of a base deaminase; In the cytosine base editor, cytosine is deaminated to uracil, which is recognized as thymine during replication; In the adenine base editor, adenine is deaminated to inosine, which is interpreted as guanine during replication; D: In the prime editing, the nuclease activity of Cas9 is partially inactivated, allowing cleavage of only the non-target strand. After cleavage, the PBS region of the pegRNA anneals to the cut site, and with the help of reverse transcriptase, the DNA single strand is extended along the reverse transcription template, thereby integrating the exogenous fragment into the genome

图 1 CRISPR/Cas9 及其变体的原理

Fig. 1 Principles of the CRISPR/Cas9 system and its variants

2.2 单碱基突变

单碱基突变是在目标基因特定位点，仅发生 1 个碱基对的改变，而不引入任何插入或缺失（图 1B、C）。此类变异能够产生精确的单碱基改变，从而对特定氨基酸或顺式调控位点进行微调，相较于其他类型的变异，单碱基突变对基因组整体结构的扰动更小，更接近自然突变发生的方式，从而在不扰乱整体基因组结构的前提下，实现对表型性状的定向调控[15]。为实现对碱基突变的高效诱导，有研究者开发了碱基编辑器，其核心结构通常由催化失活的 Cas9（dCas9，dead Cas9）或切割缺陷型 Cas9（nCas9，nickase Cas9）与碱基脱氨酶融合构成。该系统可在无需诱导 DSB 产生的前提下，通过定向脱氨反应实现 C/G 到 T/A 或 A/T 到 G/C 的碱基转换[16]。

单碱基编辑器已在植物中成功应用。2018 年，Li 等[17]利用腺苷酸脱氨酶与 Cas9 蛋白融合构建了腺苷酸单碱基编辑器（ABE，adenine base editor ），在植物细胞中能实现由 A 到 G 的转换，应用于水稻后实现了乙酰辅酶 A 羧化酶基因目标区域的单碱基突变，使水稻具备了抗除草剂的特性。同样，Shimatani 等[18]利用诱导性胞苷脱氨酶对乙酰乳酸合成酶基因 *OsALS* 进行多位点的单碱基编辑，也成功地使水稻获得了抗除草剂的突变。然而，由于小麦自身基因组特性，单碱基编辑器在小麦中的应用仍相对有限。Zong 等[19]利用人源胞苷脱氨酶 APOBEC3A 与 nCas9 蛋白融合表达形成的胞嘧啶单碱基编辑器 A3A-CBE（APOBEC3A-Cytosine base editor）对小麦乙酰乳酸合成酶基因 *TaALS* 进行了编辑，成功将基因的保守位点 Pro197 的脯氨酸替换苯丙氨酸。Zhang 等[20]则通过胞嘧啶单碱基编辑器对小麦的 *TaALS* 基因进行单碱基编辑，将基因的保守位点 Pro174 进行了由脯氨酸到丝氨酸或苯丙氨酸的转换，使突变体产生抗除草剂的能力。

2.3 引导编辑

引导编辑是目前新兴的 CRISPR/Cas9 变体，由一类融合了逆转录酶的 Cas9 和引导编辑向导 RNA（pegRNA，prime editing guide RNA）构成（图 1D）。pegRNA 的 5′端有一段与目标基因互补的碱基序列即引物结合位点（PBS，primer-binding site），而 3′端携带有逆转录模板区域。Cas9 蛋白结合到目标基因并切割 DNA 后，断开的单链与 pegRNA 互补配对，并沿逆转录模板序列延伸，从而将逆转录模板上的变异引入到目标区域[21]。整个引导编辑的过程无需诱导双链断裂，也不依赖细胞的同源重组途径，因而能减少非预期变异并显著提高插入效率，且由于变异来自于逆转录模板，引导编辑的编辑效果相较于单碱基编辑器更加稳定精确，引导编辑能造成短片段插入和缺失以及单碱基突变 3 种变异类型。Lin 等[22]通过引导编辑在水稻细胞中诱导细胞周期蛋白基因 *OSCDC48-T1* 产生了 6 bp 的插入和缺失，突变效率分别为 1.2% 和 19.2%。尽管引导编辑能够精确诱导 DNA 产生 3 种类型的突变，但是突变效率却并不如 CRISPR/Cas9 和单碱基编辑器，加上小麦自身的基因组特性，引导编辑没有被广泛应用于小麦基因的研究中。

2.4 大片段插入

通过 CRISPR/Cas9 可以在基因组特定位点引入长度为数百至数千碱基的 DNA 序列，包括功能基因、调控元件、标签序列或调控模块等。此类插入可用于功能基因插入、启动子替换、顺式调控元件重构等复杂基因操作，扩展了植物基因组的工程化潜力。传统的大片段插入主要依赖 CRISPR/Cas 诱导目标基因产生 DSB，并借助同源重组（HDR，homology directed repair）机制插入携带有目标区域同源臂的供体 DNA。然而，该过程常受到非同源末端连接竞争性修复的干扰，且植物中 HDR 效率普遍较低，严重限制了大片段插入的稳定性与效率[23]。

为克服这类问题，引导编辑的变体模板跳跃型引导编辑（TJ-PE，template-jumping prime editing）被提出，相较于引导编辑，TJ-PE 可以切割两个位点，同时 TJ-PE 含有两个引物结合位点，在切割 DNA 后两个引物结合位点之间的模板序列可以通过逆转录过程引入到目标区域中[24]，由于不再受到 pegRNA 长度的限制，TJ-PE 可以插入超过 100 bp 的序列，例如 Li 等[25]在水稻中使用 TJ-PE 已经成功在花青素合成相关基因 *OsC1* 序列上实现了最高 710 bp 的插入。

3 CRISPR/Cas9 在小麦中的应用

在小麦中，产量、品质、抗病、抗逆性的提升是育种的核心目标。目前，小麦中大多数都是通过 CRISPR/Cas9 使目标基因发生短片断缺失插入从而敲除目标基因，使相关的表型发生改变（表 1）进而达到基因功能研究的目的。

表 1 CRISPR/Cas9 在小麦中的应用

Table 1 Applications of CRISPR/Cas9 in wheat

基因名称 Gene name	基因敲除后植株表型 The plant phenotype of gene knockout	转化方法 Transformation method	参考文献 References
TaARF12	小麦穗状花序增大，产量提高	农杆菌转化	[26]
TaD27	小麦的分蘖数和籽粒数提高	农杆菌转化	[27]
TaWUS	小麦的千粒重和产量提高	农杆菌转化	[28]
TaZnF-B	小麦矮化且产量提高	农杆菌转化	[29]
TaPGS1	平均千粒重、粒宽和粒长降低	农杆菌转化	[30]
TaSPL13	粒径和数量提高	农杆菌转化	[31]
TaFT-D1	淀粉晶粒尺寸和重量降低	—	[32]
TaABI3	成熟籽粒淀粉含量提高	—	[33]
Ta33-mer	小麦的致敏性降低	基因枪法	[34]
TaASN2	游离天冬酰胺含量降低	基因枪转化	[35]
TaIPK1	籽粒中铁和锌积累提高	农杆菌转化	[36]
TaPPO	面团褐变降低	农杆菌转化	[37]
TaMLO	小麦对白粉病的抗性提高	—	[38]
TaPsIPK1	小麦对黄锈病的抗性提高	—	[39]
TaCIPK14	小麦对条锈病的抗性提高	农杆菌转化	[40]
TaeIF4E	小麦黄花叶病毒的抗性提高	—	[41]
TaPDIL5-1	小麦对黄花叶病毒抗性提高	农杆菌转化	[42]
TaEDR1	小麦对白粉病的抗性提高	—	[43]

TaHAG1	小麦对白粉病的抗性降低	农杆菌转化	[44]
TaPAD4	小麦对白粉病的抗性降低	农杆菌转化	[44]
TaNLR	小麦对茎锈病的抗性降低	农杆菌转化	[45]
TabHLH27	小麦的耐旱性和水利用率降低	—	[46]
TaSal1	小麦的耐旱性提高	基因枪转化	[47]
TaGW2	抗旱性和产量提高	农杆菌转化	[48]
TaAT1	小麦幼苗成活率和株高提高	—	[49]

— 表示为文章中未注明转化方法

— indicates that the gene transformation method was not mentioned in the original article

3.1 CRISPR/Cas9 在提高小麦产量与品质方面的研究

小麦产量是影响粮食安全的最重要的性状，其稳定对于我国粮食安全具有重要意义。研究表明，敲除生长素响应因子基因 *TaARF12* 可以使突变体的穗状花序增大，产量提高[26]，敲除调节分蘖的负调控因子 *TaD27* 可以使小麦的分蘖数增加，从而使小麦的分蘖数和籽粒数提高[27]，敲除蔗糖代谢相关基因 *TaWUS*[28]、油菜素内酯信号相关基因 *TaZnF-B*[29]、调节植物发育的转录因子基因 *TaPGS1*[30]、SPL 转录因子基因 *TaSPL13*[31]、淀粉合成相关基因 *TaFT-D1*[32]*和 TaABI3*[33]等与小麦籽粒的大小相关的基因都可以显著提高籽粒大小，从而实现增产。

除产量外，小麦的加工品质与营养品质同样至关重要。例如，麸质蛋白中的 33-mer 肽段是诱发乳糜泻的关键抗原表位，Sánchez-León 等[34]通过设计特异性 sgRNA 对目标保守区域进行敲除，显著降低了α-麦胶蛋白总量及其免疫反应性，从而降低小麦的致敏性。敲除天冬酰胺合成酶基因 *TaASN2* 可降低籽粒游离天冬酰胺水平，从而大幅减少小麦制品在高温加工（如烘焙、煎炸）过程中产生的致癌物丙烯酰胺的含量，降低致癌风险[35]。敲除肌醇五磷酸 2-激酶基因 *TaIPK1*，能增强籽粒对铁和锌的生物富集能力，提高微量营养元素水平，改善小麦的营养价值[36]。此外，敲除多酚氧化酶基因 *TaPPO* 可改善面粉的加工与贮藏特性，有效抑制生面团的酶促褐变，延长其色泽与风味的稳定时间，提升最终产品的感官品质[37]。

3.2 CRISPR/Cas9 在提高小麦抗病性方面的研究

小麦常遭受条锈病、白粉病等严重病害侵袭，传统农药防治效果有限且易产生抗药性问题。CRISPR/Cas9 技术通过靶向编辑抗病性相关基因，特别是易感（S，susceptibility）基因和抗性（R，resistance）基因，可显著增强小麦抗病能力，有效减少病害造成的产量损失与品质降低。通过将 S 基因敲除能直接地显著提升小麦的抗病能力，例如 Li 等[38]通过 CRISPR/Cas9 定向改变了小麦感病基因位点 MLO，使其大片段缺失，进而获得了对白粉病具有广谱持久抗性的小麦品种；针对由真菌引起的小麦条锈病，Wang 等[39]鉴定出一种小麦蛋白激酶基因 *TaPsIPK1*，其在敲除后提高了植株对小麦条锈病的抗性；He 等[40]通过 CRISPR/Cas9 将钙调磷酸酶蛋白相互作用蛋白激酶 *TaCIPK14* 敲除，突变株系中小麦病程相关基因的表达增强，使得小麦对条锈病产生广谱耐受性；Kan 等[41][42]以及 Zhang[43]等过敲除易感基因 *TaelF4E* 的保

守区域、*TaPDIL5-1* 的直系同源基因以及 *TaEDR1* 的直系同源基因获得了对黄花叶病以及白粉病具有防御能力的新品系。与之类似，R 基因也可以通过敲除增强小麦的感病性来验证功能，例如 Song 等[44]对小麦组蛋白乙酰转移酶基因 *TaHAG1* 及其互作基因 *TaPAD4* 进行敲除后，发现小麦对白粉病的抗性降低，证实了 *TaHAG1* 和 *TaPAD4* 的作用；Wang 等[45]通过敲除小麦中的 NLR 抗病蛋白，降低了小麦对条锈病的抗性。

3.3 CRISPR/Cas9 在提高小麦抗逆性方面的研究

利用 CRISPR/Cas9 靶向敲除与非生物胁迫响应相关的关键基因，可有效创制具有增强耐受性的小麦新种质。Wang 等[46]通过敲除非典型碱性螺旋-环-螺旋转录因子基因 *TabHLH27*，成功获得水利用效率更高、耐旱性显著增强的小麦突变体。Abdallah 等[47]敲除核酸酶/焦磷酸酶基因 *TaSal1* 后，突变体展现出气孔形态优化（气孔开度减小、宽度增加、泡状细胞膨大）以及加速气孔关闭的特性，使其在干旱胁迫下的萌发与幼苗生长表现显著优于野生型，证明了其抗旱能力的提升。Li 等[48]通过 CRISPR/Cas9 对 RING-E3 连接酶基因 *TaGW2* 进行敲除后，植株的耐旱性降低。CRISPR/Cas9 在耐碱方面也有所应用，例如 Sun 等[49]将小麦保守的耐碱基因 *TaAT1* 敲除后，突变体在碱胁迫条件下的幼苗存活率和株高均显著优于野生型，确证了 *TaAT1* 在小麦中作为碱胁迫敏感因子的作用。

4 CRISPR/Cas9 在小麦中的技术挑战

CRISPR/Cas9 作为植物遗传改良的革命性工具，其高效率、低成本与精准靶向的优势为作物性状带来了突破。然而，受限于小麦自身基因组的复杂性以及再生效率导致的编辑效率不高，CRISPR/Cas9 在小麦中的应用主要局限于诱导目标基因产生短片段的插入、缺失，利用单碱基突变、引导编辑等对小麦基因组进行更复杂操作的研究较少。针对这一问题，优化递送方法、多位点编辑和拓展 Cas 蛋白多样性有望成为解决的手段。

（1）优化递送方式。近年来，已有研究者通过改造植物 RNA 病毒作为递送载体，将 CRISPR 系统组分导入小麦，实现了可遗传基因编辑[50-51]。病毒载体可将 sgRNA 表达盒递送至已稳定表达 Cas9 蛋白的植株中，实现瞬时编辑。相较于传统的遗传转化方法，使用病毒载体传递可以免去组织再生的步骤，既不会出现基因枪法的随机插入现象，也不会像农杆菌转化法一样传递效率低依赖特定的基因型。Li 等[52]利用改造的大麦条纹花叶病毒（BSMV，barley stripe mosaic virus）构建的 BSMV-sgRNA 载体成功实现了对 *TaPDS*、*TaGW2* 和 *TaGASR7* 基因的敲除，并在突变体的下一代中同样观察到遗传变异，验证了该变异具有可遗传性。

（2）多位点编辑。通过设置多个不同靶向位点的特异性 sgRNA 以诱导小麦基因组目标区域产生大片段缺失或编辑目标区域在 A、B、D 染色体组上的同源片段，是提高编辑效率的一种简便而有效的方法。

多位点编辑可通过两种途径实现。传统方法将多个 sgRNA 表达盒串联，每个表达盒配备独立的启动子和终止子[53]，而目前应用最广泛的方法是通过 Golden Gate 或 Gateway 等组装方法将多个 sgRNA 串联在同一表达盒中，并利用核酶、前体 tRNA 或可剪切的内含子等序列进行分隔，使转录后的 RNA 在加工系统作用下可以被切割成多个 sgRNA[54]。为便于将多个 sgRNA 串联在同一表达盒中，已有研究通过人工诱导 sgRNA 产生突变，开发出大量 sgRNA 变体[55]，这些 sgRNA 变体仍然具有原始 sgRNA 的功能但同源性降低，显著地提高了多靶向位点编辑的效率。二是通过模块化载体设计流程并结合软件辅助设计特异性 sgRNA，多靶向位点编辑的效率可以被进一步提高，例如 Wu 等[56]开发出一套新型的 CRISPR/Cas9 植物超多重基因组编辑系统，这套系统最高可以承载 49 个 sgRNA 靶向 49 个细胞分裂素代谢相关基因的靶序列，编辑后有 33 个靶序列存在短片段的缺失、插入，总体编辑效率为 67.3%。

（3）扩展 Cas 蛋白的多样性。通过对 Cas9 蛋白进行定向改造或者应用其他的 Cas 家族成员也能从根本上解决编辑效率的问题，例如针对 PAM 位点判定严格导致 CRISPR/Cas9 无法应用于不同序列的问题，可以改造 Cas9 蛋白使其拥有更宽泛的结合基序，进而使实验设计提高效率[57-59]，也可以通过生物信息学挖掘，从其他微生物中寻找出特异的 CRISPR/Cas 作为主流 CRISPR/Cas9 的补充，例如 Zhong 等[60]在鼠李糖乳杆菌中分离出的 CRISPR/LrCas9 拥有偏向 AT 含量多的 PAM 位点，在水稻中被成功应用于进行多位点编辑，也被开发出了对应的单碱基编辑器。此外，Thomas 等[61]在斑马鱼中的实验证明了核酸外切酶与 CRISPR/Cas9 共表达可以增强其编辑效率；Wang 等[62] 使用 Cas12 与外切酶结构域的融合蛋白编辑小麦的 DNA，提高了其编辑效率，证实了该方法在小麦中的可用性。有研究证明染色质结构的开放可以提高 CRISPR/Cas9 的效率并抑制脱靶[63-64]，因此使用拥有转录激活结构域的蛋白促进染色质的开放可以增强 CRISPR/Cas9 的可及性和编辑效率，例如 Liu 等[65]将 Cas9 蛋白与转录激活结构域融合形成 Cas9-TV（Cas9- Transcription activation domain）融合蛋白结构，在水稻中产生的插入、缺失效率分别是普通 Cas9 蛋白的 1.87 倍和 1.44 倍，同一研究中还发现，若在 sgRNA 的靶向区域附近引入失活的 sgRNA（Dead sgRNAs），可以进一步增强 CRISPR/Cas9 系统的编辑效率。

5 展望

与传统育种方法相比，CRISPR/Cas9 在实现目标作物改良方面具有更高的效率和精度。近年来，随着多种 CRISPR/Cas9 扩展工具不断涌现，科研人员能够对小麦关键基因实施更加精准的调控，从而系统性地提升其产量及品质、抗病性、非生物胁迫耐受性。然而，由于小麦庞大且高度重复的基因组以及更多的同源基因使得靶位点设计、脱靶控制和突变类型验证等工作仍面临挑战，限制了 CRISPR/Cas9 在小麦生物学研究中的广泛应用。随着基因编辑研究的深入，生物信息学和人工智能在分子生物学中的重要性日益凸显。两者与 CRISPR/Cas9 技术的结合，正逐渐成为推动小麦基因编辑研究的关键方向。具体而言，生物信息学

在小麦基因组序列解析、高效的 CRISPR 靶点筛选及脱靶效应预测等方面发挥重要作用，而人工智能的引入，不仅提升了信息处理与整合效率，更为人工设计新功能蛋白质提供了可能[66]。在未来，小麦的基因编辑研究应当顺应这种趋势，不断地发掘和改造能提高基因编辑效率的因子，使其更适配于小麦基因组。通过不断地创新与突破，CRISPR/Cas9 的应用将会为小麦精准育种奠定坚实基础，推动具有优良农艺性状的小麦种质的开发，为全球粮食安全做出贡献。

参考文献

[1]李跃, 刘万才, 赵中华. 2022 年全国小麦病虫害发生防治概况及对策思考. 中国植保导刊, 2023, 43(1): 52-54, 92

Li Y, Liu W C, Zhao Z H. Overview of the occurrence and control of wheat diseases and pests in China in 2022 and reflections on counter measures. China Plant Protection, 2023, 43(1): 52-54, 92

[2]李乔, 叶杨春, 常旭虹, 王德梅, 王艳杰, 杨玉双, 马瑞琦, 赵广才, 蔡瑞国, 张敏, 刘希伟. 花后高温干旱逆境对冬小麦光合特性和产量的影响. 作物学报, 2025, 51(4): 1077-1090

Li Q, Ye Y C, Chang X H, Wang D M, Wang Y J, Yang Y S, Ma R Q, Zhao G C, Cai R G, Zhang M, Liu X W. Effects of high temperature and drought stresses on photosynthetic characteristics and yield of winter wheat after anthesis. Acta Agronomica Sinica, 2025,51(4): 1077-1090

[3]王巍, 张尧, 孙丽, 王秀娥. 小麦基因编辑的现状、机遇、挑战与发展方向. 南京农业大学学报, 2025, https://link.cnki.net/urlid/32.1148.S.20251203.1429.002.

Wang W, Zhang Y, Sun L, Wang X E. Current status, opportunities, challenges, and future directions of wheat gene editing. Journal of Nanjing Agricultural University, 2025, https://link.cnki.net/urlid/32.1148.S.20251203.1429.002.

[4]Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. Journal of Bacteriology, 1987, 169(12): 5429-5433

[5]Mojica F J, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of archaea, bacteria and mitochondria. Molecular Microbiology, 2000, 36(1): 244-246

[6]Mojica F J, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. Journal of Molecular Evolution,2005, 60(2): 174-182

[7]Jansen R, Embden J D, Gaastra W, Schouls L M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes.Molecular Microbiology, 2002, 43(6): 1565-1575

[8]Makarova K S, Haft D H, Barrangou R, Brouns S J, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica F J, Wolf Y I, Yakunin A F, van der Oost J, Koonin E V. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. Nature Reviews Microbiology, 2011, 9(6): 467-477

[9]Makarova K S, Wolf Y I, Alkhnbashi O S, Costa F, Shah S A, Saunders S J, Barrangou R, Brouns S J, Charpentier E, Haft D H, Horvath P, Moineau S, Mojica F J, Terns R M, Terns M P, White M F, Yakunin A F, Garrett R A, van der Oost J, Backofen R, Koonin E V. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. Nature Reviews Microbiology, 2015, 13(11): 722-736

[10]Jinek M, Jiang F G, Taylor D W, Sternberg S H, Kaya E, Ma E, Anders C, Hauer M, Zhou K H, Lin S, Kaplan M, Iavarone A T, Charpentier E, Nogales E, Doudna J A. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. Science, 2014, 343(6176): 1247997

[11]Shan Q W, Wang Y P, Li J, Zhang Y, Chen K L, Liang Z, Zhang K, Liu J X, Xi J Z J, Qiu J L, Gao C X. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. Nature Biotechnology, 2013, 31(8): 686-688

[12]Zhang Z Z, Hua L, Gupta A, Tricoli D, Edwards K J, Yang B, Li W L. Development of an Agrobacterium-delivered CRISPR/Cas9 system for wheat genome editing. Plant Biotechnology Journal, 2019, 17(8): 1623-1635

[13]范姗姗, 杜金强, 张新宁, 吴玉杰, 孟凡荣, 李永春. 小麦 *TaMBD9* 基因敲除及其对叶夹角的影响. 河南农业大学学报, 2025,59(1): 29-37

Fan S S, Du J Q, Zhang X N, Wu Y J, Meng F R, Li Y C. Gene knockout of *TaMBD9* and its effects on leaf angle in wheat. Journal of Henan Agricultural University, 2025, 59(1): 29-37

[14]张茂林, 王娟, 严佳丽, 何春梅, 徐倩, 刘铁山, 董瑞, 刘春晓, 关海英, 刘强, 汪黎明, 曾廷儒. 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑片段敲除技术创制玉米多样化等位变异. 山东农业科学, 2024,56(9):1-5

Zhang M L, Wang J, Yan J L, He C M, Xu Q, Liu T S, Dong R, Liu C X, Guan H Y, Liu Q, Wang L M, Zeng T R. Engineering diversified allelic variation in maize by fragment knockout using CRISPR/Cas9 genome editing. Shandong Agricultural Sciences,2024, 56(9): 1-5

[15]Yu Q H, Wang B K, Li N, Tang Y P, Yang S B, Yang T, Xu J, Guo C M, Yan P, Wang Q, Asmutola P. CRISPR/Cas9-induced targeted mutagenesis and gene replacement to generate long-shelf life tomato lines. Scientific Reports. 2017, 7(1):11874

[16]Komor A C, Kim Y B, Packer M S, Zuris J A, Liu D R. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. Nature, 2016,19: 420-424

[17]Li C, Zong Y, Wang Y P, Jin S, Zhang D B, Song Q N, Zhang R, Gao C X. Expanded base editing in rice and wheat using a Cas9-adenosine deaminase fusion. Genome Biology, 2018, 19(1): 29-59

[18]Shimatani Z, Kashojiya S, Takayama M, Terada R, Arazoe T, Ishii H, Teramura H, Yamamoto T, Komatsu H, Miura K, Ezura H, Nishida K, Ariizumi T, Kondo A. Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. Nature Biotechnology, 2017, 35(5): 441-443

[19]Zong Y, Song Q N, Li C, Jin S, Zhang D B, Wang Y P, Qiu J L, Gao C X. Efficient C-to-T base editing in plants using a fusion of nCas9 and human APOBEC3A. Nature Biotechnology, 2018, 36(1): 950–953

[20]Zhang R, Liu J X, Chai Z Z, Chen S, Bai Y, Zong Y, Chen K L, Li J Y, Jiang L J, Gao C X. Generation of herbicide tolerance traits and a new selectable marker in wheat using base editing. Nature Plants, 2019, 5(5): 480-485

[21]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(7785): 149-157

[22]Lin Q P, Zong Y, Xue C X, Wang S X, Jin S, Zhu Z X, Wang Y P, Anzalone A V, Raguram A, Doman J L, Liu D R, Gao C X. Prime genome editing in rice and wheat. Nature Biotechnology, 2020, 38(5): 582-585

[23]Chen J L, Li S Y, He Y B, Li J Y, Xia L Q. An update on precision genome editing by homology-directed repair in plants. Plant Physiology, 2022, 188(4): 1780-1794

[24]Zheng C W, Liu B, Dong X L, Gaston N, Sontheimer E J, Xue W. Template-jumping prime editing enables large insertion and exon rewriting in vivo. Nature Communications, 2023, 14(1): 3369

[25]Li F, Hou H N, Song M L, Chen Z, Peng T, Du Y X, Zhao Y F, Li J Z, Miao C B. Targeted insertion of large DNA fragments through template-jumping prime editing in rice. Plant Biotechnology Journal, 2025, 23(7): 2645-2647

[26]Kong X C, Wang F, Wang Z Z, Gao X H, Geng S F, Deng Z Y, Zhang S, Fu M X, Cui D D, Liu S S, Che Y Q, Liao R Y, Yin L J, Zhou P, Wang K, Ye X G, Liu D C, Fu X F, Mao L, Li A L. Grain yield improvement by genome editing of *TaARF12* that decoupled peduncle and rachis development trajectories via differential regulation of gibberellin signalling in wheat. Plant Biotechnology Journal, 2023, 21(10): 1990-2001

[27]Awan M J A, Amin I, Rasheed A, Saeed N A, Mansoor S. Knockout mutation in *TaD27* enhances number of productive tillers in hexaploid wheat. Frontiers in Genome Editing, 2024, 6: 1455761

[28]Liu H X, Li T, Hou J, Yin X T, Wang Y Q, Si X M, Rehman S U, Zhuang L, Guo W L, Hao C Y, Zhang X Y. *TaWUS-like-5D* affects grain weight and filling by inhibiting the expression of sucrose and trehalose metabolism-related genes in wheat grain endosperm. Plant Biotechnology Journal, 2025, 23(6): 2018-2033

[29]Song L, Liu J, Cao B L, Liu B, Zhang X P, Chen Z Y, Dong C Q, Liu X Q, Zhang Z H, Wang W X, Chai L L, Liu J, Zhu J, Cui S B, He F, Peng H R, Hu Z R, Su Z P, Guo W L, Xin M M, Yao Y Y, Yan Y, Song Y M, Bai G, Sun Q X, Ni Z F. Reducing brassinosteroid signalling enhances grain yield in semi-dwarf wheat. Nature, 2023, 617(7959): 118-124

[30]Guo X J, Fu Y X, Lee Y J, Chern M S, Li M L, Cheng M P, Dong H X, Yuan Z W, Gui L X, Yin J J, Qing H, Zhang C B, Pu Z E, Liu Y J, Li W T, Li W, Qi P F, Chen G Y, Jiang Q T, Ma J, Chen X W, Wei Y M, Zheng Y L, Wu Y R, Liu B, Wang J R. The *PGS1* basic helix-loop-helix protein regulates *Fl3* to impact seed growth and grain yield in cereals. Plant Biotechnology Journal, 2022, 20(7): 1311-1326

[31]Gupta A, Hua L, Zhang Z Z, Yang B, Li W L. CRISPR-induced miRNA156-recognition element mutations in *TaSPL13* improve multiple agronomic traits in wheat. Plant Biotechnology Journal, 2023, 21(3):536-548

[32]Zhang Y H, Liu H X, Wang Y J, Si X M, Pan Y X, Guo M J, Wu M J, Li Y H, Liu H X, Zhang X Y, Hou J, Li T, Hao C Y. *TaFT-D1* positively regulates grain weight by acting as a coactivator of *TaFDL2* in wheat. Plant Biotechnology Journal,2025, 23(6): 2207-2223

[33]Zhao L, Chen J C, Zhang Z H, Wu W Y, Lin X L, Gao M X, Yang Y M, Zhao P, Xu S B, Yang C F, Yao Y Y, Zhang A M, Liu D C, Wang D Z, Xiao J. Deciphering the transcriptional regulatory network governing starch and storage protein biosynthesis in wheat for breeding improvement. Advanced Science,

2024, 11(33): e2401383

[34]Sánchez-León S, Gil-Humanes J, Ozuna C V, Giménez M J, Sousa C, Voytas D F, Barro F. Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. Plant Biotechnology Journal, 2018, 16(4): 902-910

[35]Raffan S, Sparks C, Huttly A, Hyde L, Martignago D, Mead A, Hanley S J, Wilkinson P A, Barker G, Edwards K J, Curtis T Y, Usher S, Kosik O, Halford N G. Wheat with greatly reduced accumulation of free asparagine in the grain, produced by CRISPR/Cas9 editing of asparagine synthetase gene *TaASN2*. Plant Biotechnology Journal, 2021, 19(8): 1602-1613

[36]Ibrahim S, Saleem B, Rehman N, Zafar S A, Naeem M K, Khan M R. CRISPR/Cas9 mediated disruption of Inositol Pentakisphosphate 2-Kinase 1 (*TaIPK1*) reduces phytic acid and improves iron and zinc accumulation in wheat grains. Journal of Advanced Research, 2021, 37: 33-41

[37]Wold-McGimsey F, Krosch C, Alarcón-Reverte R, Ravet K, Katz A, Stromberger J, Mason R E, Pearce S. Multi-target genome editing reduces polyphenol oxidase activity in wheat (*Triticum aestivum* L.) grains. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1247680

[38]Li S N, Lin D X, Zhang Y W, Deng M, Chen Y X, Lv B, Li B S, Lei Y, Wang Y P, Zhao L, Liang Y T, Liu J X, Chen K L, Liu Z Y, Xiao J, Qiu J L, Gao C X. Genome-edited powdery mildew resistance in wheat without growth penalties. Nature, 2022, 602(7897): 455-460

[39]Wang N, Tang C L, Fan X, He M Y, Gan P F, Zhang S, Hu Z Y, Wang X D, Yan T, Shu W X, Yu L G, Zhao J R, He J N, Li L L, Wang J F, Huang X L, Huang L L, Zhou J M, Kang Z S, Wang X J. Inactivation of a wheat protein kinase gene confers broad-spectrum resistance to rust fungi. Cell, 2022, 185(16): 2961-2974.e19

[40]He F X, Wang C, Sun H L, Tian S X, Zhao G S, Liu C, Wan C P, Guo J, Huang X L, Zhan G M, Yu X M, Kang Z S, Guo J. Simultaneous editing of three homoeologues of *TaCIPK14* confers broad-spectrum resistance to stripe rust in wheat. Plant Biotechnology Journal, 2023, 21(2): 354-368

[41]Kan J H, Cai Y, Cheng C Y, Chen S Q, Jiang C C, He Z T, Yang P. CRISPR/Cas9-guided knockout of *eIF4E* improves Wheat yellow mosaic virus resistance without yield penalty. Plant Biotechnology Journal, 2023, 21(5): 893-895

[42]Kan J H, Cai Y, Cheng C Y, Jiang C C, Jin Y L, Yang P. Simultaneous editing of host factor gene *TaPDIL5-1* homoeoalleles confers wheat yellow mosaic virus resistance in hexaploid wheat. The New Phytologist, 2022, 234(2): 340-344

[43]Zhang Y W, Bai Y, Wu G H, Zou S H, Chen Y F, Gao C X, Tang D Z. Simultaneous modification of three homoeologs of *TaEDR1* by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat. The Plant Journal, 2017, 91(4): 714-724

[44]Song N, Lin J C, Liu X B, Liu Z H, Liu D B, Chu W, Li J P, Chen Y M, Chang S M, Yang Q, Liu X Y, Guo W L, Xin M M, Yao Y Y, Peng H R, Ni Z F, Xie C J, Sun Q X, Hu Z R. Histone acetyltransferase *TaHAG1* interacts with *TaPLATZ5* to activate *TaPAD4* expression and positively contributes to powdery mildew resistance in wheat. New Phytologist, 2022, 236(2): 590-607

[45]Wang Y J, Wang X D, Zhang L, Zhakupova K, Ayala F, Ouyang Y, Lu J, Athiyannan N, Wulff B B H, Krattinger S G. An optimized disease resistance gene cloning workflow for wheat. Nature Communications, 2025, 16(1): 4904

[46]Wang D Z, Zhang X X, Cao Y, Batool A, Xu Y X, Qiao Y Z, Li Y P, Wang H, Lin X L, Bie X M, Zhang X S, Jing R L, Dong B D, Tong Y P, Teng W, Liu X G, Xiao J. *TabHLH27* orchestrates root growth and drought tolerance to enhance water use efficiency in wheat. Journal of Integrative Plant Biology, 2024, 66(7): 1295-1312

[47]Abdallah N A, Elsharawy H, Abulela H A, Thilmony R, Abdelhadi A A, Elarabi N I. Multiplex CRISPR/Cas9-mediated genome editing to address drought tolerance in wheat. GM Crops & Food-Biotechnology in Agriculture and the Food Chain, 2022, 6: 1-17

[48]Li S M, Zhang Y F, Liu Y L, Zhang P Y, Wang X M, Chen B, Ding L, Nie Y X, Li F F, Ma Z B, Kang Z S, Mao H D. The E3 ligase *TaGW2* mediates transcription factor *TaARR12* degradation to promote drought resistance in wheat. Plant Cell, 2024, 36(3): 605-625

[49]Sun W J, Zhang H L, Yang S, Liu L J, Xie P, Li J, Zhu Y Y, Ouyang Y D, Xie Q, Zhang H W, Yu F F. Genetic modification of Gγ subunit *AT1* enhances salt-alkali tolerance in main graminaceous crops. National science review, 2023, 10(6): nwad075

[50]Wang W, Yu Z T, He F, Bai G H, Trick H N, Akhunova A, Akhunov E. Multiplexed promoter and gene editing in wheat using a virus-based guide RNA delivery system. Plant Biotechnology Journal, 2022, 20(12): 2332-2341

[51]Qiao J H, Zang Y, Gao Q, Liu S N, Zhang X W, Hu W Y, Wang Y, Han C G, Li D W, Wang X B. Transgene- and tissue culture-free heritable genome editing using RNA virus-based delivery in wheat. Nature Plants, 2025, 11(7): 1252-1259

[52]Li T D, Hu J C, Sun Y, Li B S, Zhang D L, Li W L, Liu J X, Li D W, Gao C X, Zhang Y L, Wang Y P. Highly efficient heritable genome editing in wheat using an RNA virus and bypassing tissue culture. Molecular Plant, 2021, 14(11): 1787-1798

[53]Ma X L, Zhang Q Y, Zhu Q L, Liu W, Chen Y, Qiu R, Wang B, Yang Z F, Li H Y, Lin Y R, Xie Y Y, Shen R X, Chen S F, Wang Z, Chen Y L, Guo J X, Chen

L T, Zhao X C, Dong Z C, Liu Y G. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. Molecular Plant, 2015, 8(8): 1274-1284

[54]Xie K B, Minkenberg B, Yang Y N. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(11): 3570-3575

[55]Wang Y Q, Li X F, Liu M L, Zhou Y J, Li F. Guide RNA scaffold variants enabled easy cloning of large gRNA cluster for multiplexed gene editing. Plant Biotechnology Journal, 2024, 22(2): 460-471

[56]Wu S T, Kyaw H, Tong Z J, Yang Y R, Wang Z W, Zhang L Y, Deng L H, Zhang Z G, Xiao B G, Quick W P, Lu T G, Xiao G Y, Qin G N, Cui X. A simple and efficient CRISPR/Cas9 system permits ultra-multiplex genome editing in plants. The Crop Journal, 2024, 12(2): 569-582

[57]Hu J H, Miller S M, Geurts M H, Tang W, Chen L, Sun N, Zeina C M, Gao X, Rees H A, Lin Z, Liu D R. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. Nature, 2018, 556(7699): 57-63

[58]Wang J J, Meng X B, Hu X X, Sun T T, Li J Y, Wang K J, Yu H. xCas9 expands the scope of genome editing with reduced efficiency in rice. Plant Biotechnology Journal, 2019, 17(4): 709-711

[59]Li J Y, Luo J M, Xu M L, Li S Y, Zhang J H, Li H Y, Yan L, Zhao Y D, Xia L Q. Plant genome editing using xCas9 with expanded PAM compatibility. Journal of Genetics and Genomics, 2019, 46(5): 277-280

[60]Zhong Z H, Liu G Q, Tang Z J, Xiang S Y, Yang L, Huang L, He Y, Fan T T, Liu S S, Zheng X L, Zhang T, Qi Y P, Huang J, Zhang Y. Efficient plant genome engineering using a probiotic sourced CRISPR-Cas9 system. Nature Communications, 2023, 14(1): 6102

[61]Clements T P, Tandon B, Lintel H A, McCarty J H, Wagner D S. RICE CRISPR: Rapidly increased cut ends by an exonuclease Cas9 fusion in zebrafish. Genesis, 2017, 55(8): 10.1002

[62]Wang W X, Yan L, Li J Y, Zhang C, He Y B, Li S Y, Xia L Q. Engineering a robust Cas12i3 variant-mediated wheat genome editing system. Plant Biotechnology Journal, 2025, 23(3): 860-873

[63]Jensen K T, Fløe L, Petersen T S, Huang J R, Xu F P, Bolund L, Luo Y L, Lin L. Chromatin accessibility and guide sequence secondary structure affect CRISPR-Cas9 gene editing efficiency. FEBS Letters, 2017, 591: 1892-1901

[64]Kim D, Kim J S. DIG-seq: A genome-wide CRISPR off-target profiling method using chromatin DNA. Genome research, 2018, 28(12): 1894-1900

[65]Liu G W, Yin K Q, Zhang Q W, Gao C X, Qiu J L. Modulating chromatin accessibility by transactivation and targeting proximal dsgRNAs enhances Cas9 editing efficiency in vivo. Genome Biology, 2019, 26; 20(1): 145

[66]Fei H Y , Li Y J, Liu Y J, Wei J J, Chen A J, Gao C X. Advancing protein evolution with inverse folding models integrating structural and evolutionary constraints. Cell, 2025, 188(17): 4674-4692