



CRISPR/Cas基因编辑技术在水稻育种中的研究进展

李可, 吴传银, 隋毅*

中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081

* 联系人, E-mail: suiyi@caas.cn

2023-11-03 收稿, 2023-12-25 修回, 2023-12-26 接受, 2023-12-27 网络版发表

国家自然科学基金(32172093)和国家重点研发计划(2021YFF1000101-4)资助

摘要 中国是世界上最大的稻谷生产国和消费国, 水稻育种是满足我国可持续发展需求的重要环节之一. 近年来, 基于细菌获得性免疫系统改造而成的CRISPR/Cas作为一种热门的基因编辑技术, 在水稻育种领域发挥巨大的应用潜力. CRISPR/Cas基因编辑技术具有快速、精准等特点, 可以在短时间内生成新种质; 在为开发新型、可持续的农业系统提供机会的同时, 还促进了一系列新型育种技术的发展, 为农业创新的转变奠定基础. 本文首先综述了近年来CRISPR/Cas基因编辑技术在水稻产量、外观、品质、抗生物和非生物胁迫性能等方面的新种质开发研究进展, 其次重点介绍了它们在水稻上的应用和突破, 包括从头驯化、多性状协同提升、常规杂交育种、无融合生殖以及双单倍体育种技术, 最后简要阐明了CRISPR/Cas及其衍生工具的开发及其应用现状. 总之, 基因编辑技术的发现和发展将加快植物基因工程技术开发和生物育种进程, 在未来水稻育种中有广阔的应用前景, 为稳固我国粮食安全基础、解决全球粮食安全危机做出重要贡献.

关键词 水稻, 生物育种, 基因编辑, CRISPR/Cas

水稻作为中国的主要粮食作物之一, 其种植面积占全球种植面积的20%. 自2011年以来, 我国稻谷产量连续10年保持在2亿吨以上, 为粮食安全做出了重要贡献. 水稻的稳产增产离不开良种的支持. 我国的水稻育种经历了矮化育种、杂种优势利用和超级稻培育3次重大飞跃, 不仅实现了自给自足, 而且良种覆盖率超过了96%, 使我国水稻育种的科研水平处于国际领先地位.

随着我国农村社会结构的逐步转型和劳动力的大量转移, 农业机械化、数字化和智能化的迅速发展, 人口规模庞大和环境压力加剧给农业生产带来了巨大挑战, 尤其体现在作物育种方面. 众所周知, 作物产量是由多基因和环境因素共同控制的复杂数量性状, 作物在长期驯化过程中聚合了一些与产量相关的性状基因,

但也会逐渐丢失一些与抗逆或抗病相关的基因. 尽管传统杂交育种和突变育种等方法可以提升作物产量, 但也存在连锁累赘、培育周期长、耗时费力等缺陷^[1]. 转基因技术、基因编辑技术、双单倍体技术和无融合生殖技术等前沿生物技术的兴起则为作物育种提供了新的契机^[2].

近年来, 以成簇的规则间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/Cas蛋白(CRISPR-associated system)(CRISPR/Cas)为代表的基因编辑技术给植物生物学和作物育种带来了革命性变化. CRISPR/Cas系统最初发现于细菌和古菌, 基于细菌的获得性免疫系统改造而成, 其中CRISPR序列可以特异性识别外源核酸, Cas蛋白则凭借其特殊的非特异性核酸内切酶功能将外源核酸切断.

引用格式: 李可, 吴传银, 隋毅. CRISPR/Cas基因编辑技术在水稻育种中的研究进展. 科学通报, 2025, 70: 2483–2494

Li K, Wu C Y, Sui Y. Research progress of CRISPR/Cas gene editing technology in rice breeding (in Chinese). Chin Sci Bull, 2025, 70: 2483–2494, doi: [10.1360/TB-2023-1134](https://doi.org/10.1360/TB-2023-1134)

在水稻育种中, CRISPR/Cas技术的应用推动了新品种的研发, 加快了品种改良的进程, 为研究水稻的遗传作用机理提供了重要启示。

CRISPR/Cas技术的出现为位点特异性的基因组编辑提供了一个良好的平台, 并开启了一个新时代, 研究人员可通过操纵负责特定农艺性状的关键基因, 快速、精确地创制新的种质^[3]。基于最初设计的CRISPR/Cas9, 科学家们已经开发了众多CRISPR/Cas衍生工具, 以应对不同的应用场景。拓展后的CRISPR/Cas技术可以实现基因敲除、碱基编辑、基因定点插入或替换、靶向随机突变、表观遗传调控、转录调控和RNA编辑等。CRISPR/Cas系统的迭代升级为基因功能分析和在不同作物中创造理想的新种质提供了空前的机会, 引发第三次农业绿色革命^[4]。而CRISPR/Cas技术与传统育种技术、分子标记辅助选择、双单倍体技术、无性繁殖技术等相结合将大大促进水稻育种的发展。

本文主要总结近年水稻中CRISPR/Cas技术在基因功能分析与新种质的产生、作物从头驯化、多性状协同提升、常规杂交育种、无融合生殖、双单倍体育种中的应用, 并对CRISPR/Cas工具的开发现状进行简要概括。

1 水稻基因功能分析与种质资源创新

CRISPR/Cas技术可以通过多种手段操纵基因, 如基因敲除、敲入、替换等, 以快速鉴定基因功能, 进而生成有价值的作物新种质。

近年来, 人们利用CRISPR/Cas9基因编辑技术已开发出富含香气和低直链淀粉含量的水稻新品种。例如, Hui等人^[5]创造了甜菜碱醛脱氢酶2(*OsBADH2*)的新等位基因, 培育出谷粒香味增强的三系杂交水稻品种; Tian等人^[6]编辑了*OsWx*和*OsBADH2*基因, 培育出同源雄性不育突变株和不含Cas9蛋白的同源恢复原突变株。这些突变体的直链淀粉含量大大降低, 而香气(主要成分为2-乙酰基-1-吡咯啉)含量却显著提高, 进而培育出对农艺性状影响较小的芳香糯杂交水稻。

在改善水稻的食用与烹饪品质(eating and cooking quality, ECQ)方面, Zhu等人^[7]借助CRISPR/Cas技术开发了一种高效的多基因载体系统TGS II(TransGene Stacking II), 并将花青素合成相关的8个关键基因转入水稻, 实现了花青素在胚乳的特异合成, 创造出首例富含花青素的水稻新种质“紫晶米”。同样利用TGS II系统, Zhu等人^[8]对水稻胚乳中虾青素的生物合成途径进

行改造, 获得了富含虾青素的新型功能营养型水稻种质“赤晶米”(aSTARice)。Song等人^[9]通过CRISPR/Cas9技术, 在水稻品系SK118中引入*Floury Endosperm 2 (Flo2)*基因的功能缺失突变, 有效提高了大米的ECQ; Yang等人^[10]开发了由CRISPR/Cas9介导的谷蛋白基因(*OsGlu*)敲除技术, 降低了水稻籽粒蛋白质含量(Grain protein content, GPC), 为改良水稻ECQ提供了新策略; Huang等人^[11]编辑了水稻胚乳中淀粉合成的相关基因*SSII-2*和*SSII-3*, 发现*SSII-2*在调控水稻胚乳中直链淀粉的生物合成和含量方面起重要作用, 且仅当*SSII-3*活性较低或缺乏时, *SSII-2*才能发挥作用。

在水稻籽粒形状、分蘖数和产量等方面, Lu等人^[12]敲除了梗稻中的*OsAAP3*基因, 发现分蘖数显著增加, 从而提高了谷粒产量; Fang等人^[13]利用基因编辑证明*OsAAP4*启动子序列在籼、梗稻中的差异, 发现其在籼稻中的表达量更高, 能产生更多的分蘖数和更高的谷粒产量; Tao等人^[14]敲除高产品种Suken118中的*OsSPMS1*基因, 获得了谷物产量增加的突变体, 证实*OsSPMS1*是水稻增产的一个重要靶标基因; Li等人^[15]敲除水稻中13个B型反应调节因子基因发现, *Osrr30*基因突变体在高温胁迫下表现出茎穗期延迟、产量增加和垩白度降低的性状, 表明*Osrr30*在水稻育种中具有重要的应用价值。

在抗虫抗病、冷热环境适应等方面, Li等人^[16]删除了对水稻生育力有负向调节作用的*Xa13*基因启动子的部分序列, 获得了具有抗病性和产量正常的水稻。Zhou等人^[17]在籼型温度敏感雄性不育(TGMS)品系Longke638S(LK638S)中植入了3个已知的广谱抗稻瘟病基因*Bsr-d1*、*Pi21*和*ERF922*, 获得了具有更强稻瘟病抗性的突变体, 同时发现*Pi21*或*ERF922*单突变体兼具稻瘟病抗性和细菌性白叶枯病抗性; Zhao等人^[18]敲除水稻的组蛋白去甲基化酶JM1710, 发现调控该酶合成的*JM1710*基因是干旱胁迫响应基因的负调控因子, 获得了耐旱性强的水稻突变体; Zhang等人^[19]通过敲除*OsWRKY63*基因, 培育出耐寒性增强的水稻; Zu等人^[20]在籼稻中分离了一种假尿苷合成酶基因*OsPUS1-1*的抑制子*sop10*, 并利用CRISPR/Cas9技术对其进行定点突变, 发现*sop10*功能缺失的突变体产生的活性氧(Reactive oxygen species, ROS)水平较低, 植株对低温胁迫的耐受力更强, 且产量不受影响, 为耐寒性水稻育种提供了新的基因资源。

此外, Guo等^[21]人对水稻*OsTIR1*和*OsAFB2-5*基因

进行定点突变,发现*OsTIR1/AFB*家族成员在水稻产量、分蘖、株高、根系和萌发等方面的功能部分冗余,而*OsAFB4*单突变体则对除草剂表现出强烈的抗性,这一发现为创制新的抗除草剂种质提供了机会; Nguyen等人^[22]利用改进后的CRISPR/Cas9技术在*αAmy3*(糖饥饿诱导基因)启动子的上游添加了3'剪接位点来实现内含子的靶向插入,其插入效率达12.5%,该方法被证实可应用于水稻悬浮细胞培养生产药用蛋白。

目前部分编辑的水稻基因如表1所示,可以看出其性状主要集中在籽粒产量及大小、分蘖数、株型、抗病抗逆等方面。未来利用CRISPR技术可以对水稻的种质资源进行规模化、精准鉴定,如基因的定点替换或表观水平上的微调等,进而改造水稻资源中蕴藏的重要农艺性状基因,从而加快育种利用和遗传改良的进程,培育出集多种优良性状于一身的水稻新种质。

2 水稻从头驯化

农作物驯化是人类农耕文明发展的历史必然,亦是大型复杂文明发展的基础。通过驯化农作物,人类可以获得与生产力、质量和农业栽培适应性相关的理想性状。然而,长期以来人们只关注与产量相关的性状,这在一定程度上导致了野生种中潜在的抗病性、抗非生物胁迫性和营养品质等性状的丧失。如果这些性状是单基因性状,并遵循孟德尔遗传规律,那么育种工作会相对简单;但在面对像抗非生物性胁迫这样呈现出分散性、多基因遗传特点的性状时,人们往往难以利用。因此,对于这些复杂性状的改良,育种工作面临着更大的挑战。而基因编辑技术的兴起及发展为改良这些复杂性状提供了潜在新的解决办法。

2017年, Zsögön等人^[35]提出了一种从头驯化野生物种的策略。他们利用基因编辑技术对携带多基因抗逆基因的番茄野生近缘种进行产量相关性状的基因编辑,从而实现了野生番茄的从头驯化。此外, 2021年, Yu等人^[36]报道了一种可以从头驯化异源四倍体水稻(*Oryza alta*)的途径。他们在筛选野生水稻材料时发现一个异源四倍体*Oryza alta*(CCDD)的野生稻材料具有高生物量生产率、强抗逆性和较易遗传转化的特性,命名为多倍体水稻1号(PPR1),并为其建立了高效的组织培养、转化和基因组编辑系统,同时完成了高质量的基因组组装;通过对重要农艺性状基因的分子设计、功能验证及多基因编辑与聚合来实现野生稻的从头驯化。因此, Yu等人^[36]的工作为重

新驯化野生物种开辟了一条有效途径;标志着利用精准基因组编辑技术快速驯化目标性状的作物新浪潮的到来。

综上, CRISPR/Cas技术为重新驯化野生物种和利用野生物种遗传多样性进行作物育种提供了新的机遇。

3 多性状协同提升

权衡效应是指作物不同性状之间存在的此消彼长的连锁效应,这一效应往往使一些优异性状不能兼得,具体表现为高产与抗病、高产与营养质量、产量与植株结构等^[37]。连锁累赘是指在育种过程中,目标良性基因的转移带入了不利性状的基因,它们与目标基因形成连锁,从而导致优劣性状存在于同一个体的现象。作物遗传改良需要打破由连锁累赘引起的复杂权衡。最近的研究发现,在水稻中, CRISPR/Cas技术介导的顺式调控区域编辑可以在不干扰靶基因功能的情况下微调靶基因的表达水平或表达谱,从而打破这权衡效应,在水稻中实现多种优良性状的协同提升。

Song等人^[37]通过删除水稻的一个典型多效基因*Ideal Plant Architecture 1(IPA1)*的顺式调控区,巧妙地解决了每圆锥花序粒数与分蘖数之间的权衡问题,从而显著提高了单株谷物产量。另外, *OsSWEET14*作为水稻中另一个多效性基因,在个体的抗病能力与株高、分蘖数和种子大小之间存在权衡作用,其功能缺失突变会使水稻的抗病能力增强,但也会导致种子变小,且生长延迟。Xu等人^[38]通过编辑*OsSWEET11*和*OsSWEET14*启动子中的转录激活效应子(transcription activator-like effectors, TALEs)结合元件,解决了分蘖数、种子大小与抗病性之间的权衡问题,并解释了通过丧失效应器触发的植物易感性来产生广谱抗性的原理。*SLG7*是调控籽粒纤细度和低垩白度的关键基因,并且对谷物产量相关性状的负面影响较小。Tan等人^[39]通过编辑其启动子中的AC II元件区域发现,编辑后的*SLG7*等位基因表达水平增加,而且可以在不影响产量和食用质量的情况下,表现出更好的外观品质。从细胞周期调控的角度切入, Wei等人^[40]研究了动植物中高度保守的减数分裂基因*HEI10*,发现敲除*HEI10*可显著减少减数分裂粗线期非姐妹染色单体交换现象(crossover, CO)的产生,重组型配子的数目减少,但并不会完全消除雌雄配子的生育能力,他们推测,可以通过编辑更多类似*HEI10*的减数分裂基因来堆叠重组,以产生不同类型的保留基因功能的突变体。这为开发优良品种

表 1 利用CRISPR/Cas技术编辑的部分水稻基因

Table 1 Several rice genes edited using CRISPR/Cas technology

基因	性状	编辑系统	编辑方式	参考文献
<i>OsAAP3</i>	分蘖数、籽粒产量	Cas9	敲除	[12]
<i>OsSPMS1</i>	籽粒产量	Cas9	敲除	[14]
<i>OsNRT</i>	氮转运	Cas9	靶向替换	[23]
<i>OsEPFL</i>	雄穗分支数	Cas12b	转录调控	[24]
<i>SSII-2</i> 、 <i>SSII-3</i>	直链淀粉合成	Cas9	敲除	[11]
<i>OsAAP4</i>	分蘖数、籽粒产量	Cas9	插入	[13]
<i>OsTIR1</i> 、 <i>OsAFB2</i>	株高、分蘖数、根形态	Cas9	定点突变	[21]
<i>OsAFB3</i> 、 <i>OsAFB5</i>	株高、籽粒产量、根形态	Cas9	定点突变	[21]
<i>OsAFB4</i>	除草剂抗性	Cas9	定点突变	[21]
<i>OsACC1</i>	除草剂抗性	Cas9	引导编辑	[25]
<i>OsMPK6</i> 等	除草剂抗性	Cas9	碱基编辑	[26]
<i>OsHPPD</i>	除草剂抗性	Cas9	靶向倒位	[27]
<i>OsGS</i>	籽粒大小	Cas12a	敲除	[28]
<i>OsGW</i>	籽粒大小	Cas12a	敲除	[28]
<i>OsBADH2</i>	谷粒香气	Cas9	插入、删除	[5]
<i>OsSD8</i>	株型	Cas9	靶向删除	[29]
<i>OsGlu</i>	谷粒蛋白含量	Cas9	敲除	[10]
<i>Bsr-d1</i>	抗稻瘟病	Cas9	插入	[17]
<i>Pi21</i>	抗稻瘟病、抗白叶枯病	Cas9	插入	[17]
<i>ERF922</i>	抗稻瘟病、抗白叶枯病	Cas9	插入	[17]
<i>OsXa13</i>	抗白叶枯病	Cas9	删除	[16]
<i>JMJ710</i>	耐旱性	Cas9	敲除	[18]
<i>Osrr30</i>	抽穗期、籽粒产量、垩白度	Cas9	敲除	[15]
<i>OsWRKY63</i>	耐寒性	Cas9	敲除	[19]
<i>sop10</i>	耐寒性	Cas9	定点突变	[20]
<i>OsRBL1</i>	真菌抗性	Cas9	靶向删除	[30]
<i>PigmR</i>	抗稻瘟病	Cas9	敲入	[31]
<i>uORF OsDLT</i>	株高、分蘖数	Cas9	引导编辑	[32]
<i>OsS5H</i>	抗病性	Cas9	多位点敲除	[33]
<i>OsWx</i> 、 <i>OsBADH2</i>	直链淀粉含量	Cas9	定点突变	[6]
<i>Flo2</i>	食用与蒸煮品质	Cas9	敲除	[9]
<i>OsEPSPS</i>	除草剂抗性	nCas9	单碱基编辑	[34]

提供了新的途径.

此外, Zhou等人^[41]基于CRISPR/Cas技术, 在水稻中将*OsGBSSI*和*OsGS3*基因作为靶标, 对*OsD18*(赤霉素生物合成途径中的*GA3ox*编码基因)的启动子进行编辑, 发现编辑后的品系表现出连续半矮化现象, 但对谷物产量影响不大. 田间试验表明, 编辑了*OsD18*启动子

的株系与不同遗传背景下的绿色革命基因*OsSD1*突变体具有相似的产量和抗倒伏表型. 因此, 通过编辑*OsD18*启动子, 研究人员成功地创造了具有定量绿色革命性状的高产水稻, 其抗倒伏能力比*OsSD1*突变体更好. 这些研究实例为创造农艺性状的数量变异提供了替代策略.

4 加快水稻杂交种子的常规生产

杂种优势利用是作物育种中的一项重大突破,极大地提高了作物产量。然而,由于性状的遗传分离,后代无法保持杂种优势,因此每年都需要耗费大量时间、精力和资金来生产杂交种子。近年来,广泛应用雄性不育系在杂交种子的产量和作物育种质量方面取得了巨大的进展,尤其是CRISPR/Cas技术在揭示水稻雄性不育的机制和开发雄性不育品系方面显示出独特的优势,许多与雄性不育相关的基因已经被成功鉴定,并提高了对控制作物雄性不育分子机制的认识。

MYB(v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog)作为植物中最大的转录因子家族,参与细胞分化、细胞周期调节等生理发育过程,并对植物的次生代谢和器官形态建成具有重要的影响^[42]。近年来,利用CRISPR/Cas工具在水稻中研究MYB基因家族的研究日益增多。Han等人^[43]通过CRISPR/Cas技术敲除MYB转录因子*OsMS188*,发现多个敲除品系表现出雄性不育的表型,其绒细胞发育和退化异常,性腺层缺失,花药角质层缺陷,证实*OsMS188*基因在绒束发育和花粉壁形成中的关键调控作用;Xiang等人^[44]分离并鉴定了编码MYB蛋白的*Baymax1(BM1)*基因的雄性不育突变体,通过图位克隆、互补和使用CRISPR/Cas9技术的定向诱变,发现*Bm1*突变体表现出减数分裂轻微滞后、锥体向分泌型过渡中止、锥体过早退化和花粉外植体形成异常的现象,最终导致成熟的白色花药中缺乏可见花粉,证明*Bm1*对水稻雄性生殖力具有关键调控作用,具有潜在的应用价值。

温度敏感基因雄性不育系(thermo-sensitive genic male sterility, TGMS)是两系杂交水稻育种的重要组成部分,已被广泛应用。Barman等人^[45]利用CRISPR/Cas9对控制二倍体水稻生育能力的温敏雄性不育基因*TMS5*(thermo-sensitive genic male sterility gene 5)进行编辑,成功获得突变体YK17S,并证实了这是一个具有优异产量潜力的新TGMS品系,可广泛应用于籼稻两系杂交育种;Fang等人^[46]利用一个超级谷粒品系GXU47,也在*TMS5*上设计了特异性突变,培育出一个新的TGMS品系GXU47-5,再次证实利用CRISPR/Cas9技术生成优良突变株是可行且高效的;Chen等人^[47]的研究同样聚焦于*TMS5*,通过基因编辑获得两个突变品系H2s和H3s,在将这些突变株系与四倍体水稻杂交后,所产生的F₁代杂交种的有效圆锥花序数、总粒数和结

实率都有明显优势。由于杂交种的高杂合度可维持数代,这将节省种子成本,因此利用基因编辑技术开发四倍体水稻的TGMS是一条有效途径,可加速多倍体异交的利用。

湿度敏感雄性不育系(humidity-sensitive genic male sterility, HGMS)对环境干湿程度十分敏感,表现为在低湿度时雄性不育,而在高湿度时雄性可育。基于*OsCER1*基因具有参与水稻中超长链烷烃(very-long-chain, VLC)的生物合成的功能, Ni等人^[48]敲除*OsCER1*基因,获得表现出HGMS特性的新品系(*OsCER1*Cas),证实*OsCER1*的敲除会影响VLC烷烃的代谢,使突变体的花粉在低湿度环境下对柱头的黏附性降低,难以萌发,而高湿度环境则提高了花粉的萌发率。这种新型HGMS分子机制,将在两系杂交稻育种中具有潜在的应用价值。Pak等人^[49]通过沉默与拟南芥*AtOPR3*的水稻同源基因*OsOPR7*,培育出一类雄性不育系,为在杂交水稻中建立不育系-恢复系的双系统提供了新的思路;Song等人^[50]利用CRISPR/Cas9技术,在籼稻9311的遗传背景下获得不含转基因成分的*CYP703A3*缺陷雄性不育突变体,并成功获得具有稳定遗传性的保持系9311-3B,实现细胞质雄性不育系(GMS)材料的批量育种,获得了一批杂交水稻优良组合。

杂交水稻种子的生产过程中,必须在收获种子前移除恢复品系,以避免不希望的自交的种子的污染,这一过程耗费大量人、物和财力。因此,人们也考虑使用雌性不育系作为花粉供体,并要求这种不育系对环境敏感,以保持恢复系的条件^[51]。与雄性不育不同,热敏雌性不育系的相关报道较少,但它对通过全机械化生产作物杂交种子却是非常重要的。Li等人^[52]首次在水稻中鉴定了一种自发的温度敏感雌性不育基因*tfs1*(thermo-sensitive female sterility 1)突变体,其在高温下完全不育,在低温下部分可育。他们发现,将*tfs1*的等位基因导入不同的优异水稻品种中,均可获得温敏型雌性不育个体,因此可利用这一特性构建一种不引起营养或雌性生殖发育缺陷的雌性不育系。此外,在田间试验中,*tfs1*突变体作为恢复系的杂交穗的结实率更高,这一发现为水稻全机械化杂交种子生产铺平了新的道路。上述研究表明,CRISPR/Cas技术为水稻常规杂交种子的生产提供了强有力的工具,这些成果可向不同作物中加以延伸,将极大地促进不同作物的商业杂交种子的生产。

5 杂交水稻的无融合生殖

杂种优势通常是指 F_1 杂种在某种性状上的表现优于两个亲本的现象,然而由于后代中遗传信息的随机分离,这种优势很容易丧失,无融合生殖(apomixis)则为这一问题提供了良好的解决方案.无融合生殖是指不经过雌、雄性细胞融合,直接由营养体细胞或未进行减数分裂的大孢子母细胞发育成无性胚或无性种子的生殖,这种无性胚或无性种子保持了 F_1 植株的杂合性,因而能够固定杂种优势.无融合生殖技术的发展将对农业和粮食生产产生革命性的影响,因为它可以降低成本,缩短育种时间,并且避免许多与有性生殖(如不相容障碍)和无性繁殖(如病毒转移)相关的并发症,因此无融合生殖技术的应用有可能彻底改变未来作物育种的方向^[53].近年来,如何在作物中实现无融合生殖已成为植物学领域的前沿研究热点,基因编辑工具介导的无融合生殖技术也已在部分作物中实现了杂交后代的杂种优势固定.

在水稻中, Khanday等人^[54]于2019年通过CRISPR技术编辑*BABY BOOM1*(*BBM1*)、*BBM2*和*BBM3*,获得了保留亲本杂合性的无性系后代,证实其无性繁殖性状可在多代无性系中稳定遗传.同年, Wang等人^[55]利用*MATL/ZmPLA1/NLD*基因(最初在玉米中发现,可诱导母本单倍体的产生),以此诱导MiMe突变体(mitosis instead of meiosis),同时突变3个控制减数分裂的基因*PAIR1*、*REC8*和*OSD1*,从而导致减数分裂转化为有丝分裂进行单性生殖,通过CRISPR技术在杂交稻中实现4个基因同时敲除的策略,最终获得无融合生殖的克隆种子. Vernet等人^[56]通过基因编辑技术在卵细胞中表达*BBM1*基因来诱导MiMe突变体,得到了未减数分裂的雌配子,证明了人工合成无融合生殖在水稻 F_1 杂种中的可行性.为了进一步探究合成无性繁殖性状和优良异交表型的跨代遗传机理, Liu等人^[57]将克隆植株繁殖到 T_4 代,通过分析农艺性状,以及基因组、转录组、甲基化组和等位基因特异性转录组,观察到合成的无性繁殖性状可通过多代稳定传递,同时也鉴定到少数非整倍体的存在.该实验有助于证实未来使用无融合生殖进行水稻育种的可行性.以上研究中的共同问题是无性系后代的结实率均较野生型显著降低,为了解决这个问题,近期Wei等人^[58]开发了一种与正常杂交稻几乎相当的高育性人工合成无融合生殖技术.他们发现,*BBM4*基因在卵细胞中的表达可以触发杂交稻的孤雌

生殖和单倍体后代的产生,且无融合生殖植株的育性没有受到明显的影响,其结实率几乎与正常杂交的结实率相当,高繁殖力也可以稳定遗传给下一代.目前,*BBM4*依赖的无融合生殖机理仍未完全解析,未来在解决无融合生殖的育性方面,或许可以选择更多的卵细胞特异性启动子,尤其是水稻天然启动子来驱动*BBM4*的表达,检测其诱导孤雌生殖和合成无融合生殖的能力.此外,*BBM1*和*BBM4*在卵细胞中的共同表达也可考虑用于提高克隆种子的频率,以促进人工合成无融合生殖在农业上的应用.

6 水稻双单倍体育种技术

双单倍体育种技术,因其可以快速产生纯合子植物,极大地加快育种过程,目前已成功地应用于玉米等作物的育种^[59].近年来,利用CRISPR/Cas基因组编辑技术在不同作物中进行单倍体诱导的机制和应用方面取得了许多进展.

随着控制玉米单倍体诱导的主效基因*MATL*的克隆,先正达公司率先利用基因编辑技术获得了水稻*OsMATL*同源基因的突变体,并成功地诱导出水稻的单倍体,其诱导率为2%~6%^[60]. Liu等人^[61]通过CRISPR/Cas9技术在水稻中创制了一系列*OsMATL*基因的移码突变体,实验表明这种突变体在自交群体中有6%的单倍体诱导率,证实了*MATL*的功能保守性,并创建了水稻单倍体诱导系,这是水稻育种的重大突破.近期, Liu等人^[62]在水稻中鉴定了玉米*ZmPLA1*和*ZmDMP*的同源基因*OsPLA1*(*OsMATL*)和*OsDMP3/6*,发现*OsPLA1*的敲除会导致结实率降低并引起单倍体的诱发,而*osdmp3*、*osdmp6*和双突变体则均不能单独触发单倍体的产生,与*ospla1*结合时也不能提高单倍体诱导率.这些结果表明,不同作物间单倍体诱导存在不同的作用机理,如何提高水稻单倍体的频率则是未来研究的重点.

除了*MATL*以外, Kalinowska等人^[63]在2019年通过在*CENH3*蛋白的N末端区域替换单个氨基酸,开发了3种单倍体诱导系,产生了1%的单倍体后代. Kaur等人^[64]最近在水稻中鉴定并分析*OsCENH3*基因的几个突变体,发现在基因库中存在的大多数*OsCENH3*等位基因都具有同义替换,并且有少数非同义替换现象发生在N末端结构域,尽管这在一定程度上影响蛋白质的构象,但由于组蛋白折叠结构域未发现任何功能性SNP位点,因此这些变异可能对单倍体诱导并不起作用.未

来针对于*OsCENH3*突变体的研究还有待进一步深入。此外, Zhang等人^[65]发现, 通过敲除编码卵细胞的特异性天冬氨酸内肽酶(ECSs)的*ecs1*、*ecs2*基因可以诱导单倍体, 并证实水稻中精子与卵细胞成功融合后, ECSs在确保受精后雌雄细胞核融合方面发挥了关键作用。这些研究结果为水稻单倍体育种提供了新的方法和见解。

7 CRISPR/Cas工具在植物基因组编辑中的应用现状

利用CRISPR/Cas9技术对功能基因进行敲除(knockout)是目前在植物中应用最广泛的研究方向。其原理是, 细胞通过非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)修复途径实现对2个等位基因的同时编辑, 进而产生等位突变, 实现基因敲除。对于二倍体植物, 如水稻, 研究发现, 由CRISPR/Cas9产生突变的效率能达到80%以上^[66]。

为进一步提升编辑方式的精准度、灵活性, 人们逐渐聚焦于通过同源重组(homologous recombination, HR)修复途径来实现供体片段的精准插入或替换。传统的递送CRISPR/Cas编辑元件的方法多数依赖于农杆菌转化法, 而农杆菌仅提供有限的DNA拷贝数, 供体DNA的有效递送是制约基因插入/替换效率的关键因素之一, 除了基因枪转化外, 病毒递送是提供高拷贝DNA供体的有效策略之一。为此, Wang等人^[67]首先利用CRISPR/Cas9产生的双链断裂(double-strand breaks, DSBs), 结合一种双生病毒载体, 将丰富的供体DNA导入水稻细胞, 通过复制出大量供体片段拷贝, 在转基因水稻植株中实现高达19.4%的靶向频率。此后, Ellison等人^[68]在烟草中发现了一种RNA病毒, 经改造后可被用于递送CRISPR-Cas复合体, 导致多个基因同时发生可遗传的突变, 在感染的体细胞组织中编辑效率达到90%~100%, 有效减少对植物组织培养的需求。近年来, 一种基于纳米颗粒的CRISPR基因组工程递送系统被提出^[69], 其具有低毒性、可选择递送所有生物分子、不依赖植物物种等优势, 为一些对农杆菌有抗性或对组织培养有抗药性的植物提供了新的选择。

随着CRISPR/Cas系统的衍生工具, 如CRISPR/Cas12a(Cpf1)、单碱基编辑(base editing, BE)和引导编辑(prime editing, PE)等技术的开发和利用, CRISPR系统的单基因及多基因编辑能力得到进一步提升。相对于CRISPR/Cas9而言, 我国自主研发的新型CRISPR/

Cas12i与CRISPR/Cas12j系统对顺式调控元件的识别和切割效率更高, 也能更好地发挥启动子编辑效应。它的出现打破了国外对CRISPR/Cas系列工具技术的垄断, 一些现代基因工程的“卡脖子”问题得以缓解。近年来, 以CRISPR/Cas12a为基础的一系列基因编辑工具逐渐得到开发。Zhou等人^[41]基于CRISPR/Cas技术, 开发了一种新型CRISPR/Cas12a启动子编辑系统(CAPE), 用于通过编辑特定的基因启动子来改善水稻的农艺性状。Zhang等人^[70]证实, CRISPR/Cas12a可以在植物中实现高效的多位点基因组编辑, 因为其富含T的PAM偏好性补充SpCas9在基因组靶向时富含G的PAM需求。Cheng等人^[71]在水稻中开发了高效的Cas12a胞嘧啶碱基编辑器(cytosine base editors, CBEs)和腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editor, ABEs)系统, 通过实验证实, 该类碱基编辑器与基于Cas9切口酶的碱基编辑器相比, 产生DNA断裂的可能性较小, 非常适合用于多重启动子编辑, 可以在不产生插入或缺失突变的情况下对基因表达进行微调。近期, Tong等人^[72]开发出一种新型的腺嘌呤碱基颠换编辑器(AYBE, Y=C或T)及其变体, 并被证实可用于哺乳动物细胞的靶向编辑, 但其在植物基因组编辑中的应用尚未可知。Gupta等人^[73]利用一种高度特异性的高效引导编辑系统, 首次将水稻*OsSWEET14*基因中的TAL效应结合元件敲入功能失调的*Xa23*启动子中, 从而实现可诱导的TALE依赖性细菌性枯萎病抗性, 并创造了具有广谱抗性的抗性等位基因。PE系统被证实可以有效地插入短片段(~44 bp), 但在大片的插入方面效率却不高, 为此, Wang等人^[74]开发了GRAND编辑, 可以在没有DNA供体的情况下精确地插入大的DNA片段, 且允许插入的最高片段大小达1 kb。Li等人^[75]利用水稻优化的ePE2系统, 将3个广泛使用的表位标签精确插入到目标基因的3'末端, 证实通过GRAND编辑可以有效地插入更长的序列, 为植物研究提供了一种简单、易用、高效的蛋白质标签策略, 有助于实现顺式元件、增强子和其他工程元件的精确插入, 用于作物育种。

在利用CRISPR/Cas9调控植物基因表达方面, 研究发现可以将人工突变后失去核酸酶活性却仍保留DNA结合能力的dCas9蛋白与特定的转录调控结构域融合, 通过sgRNA将融合蛋白带到目标基因的启动子区, 从而同时靶向多个不同的基因组位点, 以此调控基因表达。通过将不同类型的组蛋白修饰酶或DNA去甲基化酶与dCas9蛋白进行融合, 植物的表观基因组便

有可能实现重新编辑^[76]。基于此, Li等人^[77]开发了一种高效的dCas9的转录激活平台, 其能同时适用于植物与哺乳动物细胞, 具有更强的单个或多个靶基因的转录激活作用, 并在水稻中得到了成功应用。Ming等人^[24]在水稻原生质体中共筛选到12种转录激活构型, 并揭示了一个强大的基于dAaCas12b的转录激活系统, 在植物中实现了5~8倍的转录激活。CRISPR/dCas系统的开发为操纵多个基因的同时表达提供了一种特别的思路, 对植物中作物的生产应用具有重要的价值。目前该项技术在哺乳动物细胞中已被证实可用于实现全基因组范围的筛选^[78], 这为将来实现控制植物发育和环境胁迫反应的关键基因的高通量筛选提供了必要的保障。

8 展望

CRISPR/Cas基因编辑技术的出现使基因工程领域发生了革命性的变化, 其为基因功能分析和作物育种提供了新的契机, 快速推动了水稻驯化、创建雄性和雌性不育系、双单倍体技术, 以及无融合生殖技术的发展, 并预示着作物新育种时代的到来。一些国家如美国、日本、澳大利亚等对基因编辑作物采取了相对开放的监管政策, 并允许它们进行田间试验, 然后投放商业种植^[79]。近年来我国对基因编辑作物的品种开发也出台了一系列政策。2022年1月, 农业农村部制定公布了《农业用基因编辑植物安全评价指南(试行)》, 首次为农业用基因编辑技术颁布相关政策与管理措施, 主要针对没有引入外源基因的基因编辑植物, 依据可能产生的风险申请安全评价, 明确基因编辑产品区别于转基因作物管理。2023年5月, 农业农村部下发了全国首个植物基因编辑安全证书, 标志着我国基因编辑正式驶入产业化快车道, 这对我国生物育种技术研发与产业推动具有里程碑意义。

人们利用CRISPR/Cas系统, 已经编辑了水稻中控制不同性状的重要基因, 由此创制了一批优良的新种质。为进一步了解基因家族不同成员间功能冗余性, 分析遗传途径中的上位性关系, Xiong等人^[80]在水稻中建立了一个基于同尾酶技术的多重基因编辑系统, 该系统被证实具有方便、稳定、高效等特点, 理论上可以同时编辑无限数量的基因。除了靶向方法外, CRISPR技术也被用于高通量筛选突变体, 早在2017年, Lu等人^[81]就在水稻中创建了覆盖全基因组的突变群体, 以在不同的条件下筛选不同的性状。预计在不久的将来, 在其他作物中也将获得由CRISPR介导的全基因组敲除群体。

尽管CRISPR/Cas技术目前依旧存在如插入效率偏低、脱靶效应明显、通用载体构建困难等问题, 但毋庸置疑的是, 基因编辑技术的发现和发展已经对植物基因工程和作物育种产生了巨大影响。当前, CRISPR/Cas系统的迭代升级为基因功能分析和在水稻中创造理想的种质资源提供了前所未有的机会, 其与传统育种方法、分子标记辅助选择、双单倍体技术、无性繁殖技术等相结合将大大促进水稻育种的发展。在可预见的未来, 基于CRISPR/Cas技术开发出的基因编辑及其衍生工具将更具有普适性、简捷性, 以从全基因组范围对基因型和表型进行鉴定和筛选, 推进水稻乃至禾本科植物的高效育种。

未来, 鉴定、发掘与创制一批具有重要育种价值的新种质仍是水稻育种的重要方向, 人们可以结合基因组学、信息学等现代科学技术, 加速水稻育种的精准化、数据化、智能化, 实现有利基因的聚合, 从而建立定向改良目标性状的方法。无融合生殖系统产生杂交种的克隆种子, 有望改变未来育种模式。随着CRISPR-Cas技术的不断革新, 其将成为水稻精确育种的主要策略, 并将彻底改变未来农业生产。

参考文献

- 1 Razzaq A, Wani S H, Saleem F, et al. Rewilding crops for climate resilience: Economic analysis and *de novo* domestication strategies. *J Exp Bot*, 2021, 72: 6123–6139
- 2 Awan M J A, Pervaiz K, Rasheed A, et al. Genome edited wheat- current advances for the second green revolution. *Biotechnol Adv*, 2022, 60: 108006
- 3 Wang J Y, Doudna J A. CRISPR technology: A decade of genome editing is only the beginning. *Science*, 2023, 379: eadd8643
- 4 Adeyinka O S, Tabassum B, Koloko B L, et al. Enhancing the quality of staple food crops through CRISPR/Cas-mediated site-directed mutagenesis. *Planta*, 2023, 257: 78
- 5 Hui S, Li H, Mawia A M, et al. Production of aromatic three-line hybrid rice using novel alleles of *BADH2*. *Plant Biotechnol J*, 2022, 20: 59–74

- 6 Tian Y, Zhou Y, Gao G, et al. Creation of two-line fragrant glutinous hybrid rice by editing the *Wx* and *OsBADH2* genes via the CRISPR/Cas9 system. *Int J Mol Sci*, 2023, 24: 849
- 7 Zhu Q, Yu S, Zeng D, et al. Development of “purple endosperm rice” by engineering anthocyanin biosynthesis in the endosperm with a high-efficiency transgene stacking system. *Mol Plant*, 2017, 10: 918–929
- 8 Zhu Q, Zeng D, Yu S, et al. From golden rice to aSTARice: Bioengineering astaxanthin biosynthesis in rice endosperm. *Mol Plant*, 2018, 11: 1440–1448
- 9 Song X, Chen Z, Du X, et al. Generation of new rice germplasms with low amylose content by CRISPR/CAS9-targeted mutagenesis of the *FLOURY ENDOSPERM 2* gene. *Front Plant Sci*, 2023, 14: 1138523
- 10 Yang Y, Shen Z, Li Y, et al. Rapid improvement of rice eating and cooking quality through gene editing toward glutelin as target. *J Integr Plant Biol*, 2022, 64: 1860–1865
- 11 Huang L, Gu Z, Chen Z, et al. Improving rice eating and cooking quality by coordinated expression of the major starch synthesis-related genes, *SSII* and *Wx*, in endosperm. *Plant Mol Biol*, 2021, 106: 419–432
- 12 Lu K, Wu B, Wang J, et al. Blocking amino acid transporter *OsAAP3* improves grain yield by promoting outgrowth buds and increasing tiller number in rice. *Plant Biotechnol J*, 2018, 16: 1710–1722
- 13 Fang Z, Wu B, Ji Y. The amino acid transporter *OsAAP4* contributes to rice tillering and grain yield by regulating neutral amino acid allocation through two splicing variants. *Rice*, 2021, 14: 2
- 14 Tao Y, Wang J, Miao J, et al. The spermine synthase *OsSPMS1* regulates seed germination, grain size, and yield. *Plant Physiol*, 2018, 178: 1522–1536
- 15 Li C, Gong C, Wu J, et al. Improvement of rice agronomic traits by editing Type-B response regulators. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 14165
- 16 Li C, Zhou L, Wu B, et al. Improvement of bacterial blight resistance in two conventionally cultivated rice varieties by editing the noncoding region. *Cells*, 2022, 11: 2535
- 17 Zhou Y, Xu S, Jiang N, et al. Engineering of rice varieties with enhanced resistances to both blast and bacterial blight diseases via CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol J*, 2022, 20: 876–885
- 18 Zhao W, Wang X, Zhang Q, et al. H3K36 demethylase *JMJ710* negatively regulates drought tolerance by suppressing *MYB48-1* expression in rice. *Plant Physiol*, 2022, 189: 1050–1064
- 19 Zhang M, Zhao R, Huang K, et al. The *OsWRKY63–OsWRKY76–OsDREB1B* module regulates chilling tolerance in rice. *Plant J*, 2022, 112: 383–398
- 20 Zu X, Luo L, Wang Z, et al. A mitochondrial pentatricopeptide repeat protein enhances cold tolerance by modulating mitochondrial superoxide in rice. *Nat Commun*, 2023, 14: 6789
- 21 Guo F, Huang Y, Qi P, et al. Functional analysis of auxin receptor *OsTIR1/OsAFB* family members in rice grain yield, tillering, plant height, root system, germination, and auxinic herbicide resistance. *New Phytol*, 2021, 229: 2676–2692
- 22 Nguyen T M, Lu C A, Huang L F. Applications of CRISPR/Cas9 in a rice protein expression system via an intron-targeted insertion approach. *Plant Sci*, 2022, 315: 111132
- 23 Zhang J, Liu Y X, Zhang N, et al. *NRT1.1B* is associated with root microbiota composition and nitrogen use in field-grown rice. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 676–684
- 24 Ming M, Ren Q, Pan C, et al. CRISPR–Cas12b enables efficient plant genome engineering. *Nat Plants*, 2020, 6: 202–208
- 25 Xu R, Liu X, Li J, et al. Identification of herbicide resistance *OsACC1* mutations via in planta prime-editing-library screening in rice. *Nat Plants*, 2021, 7: 888–892
- 26 Yan D, Ren B, Liu L, et al. High-efficiency and multiplex adenine base editing in plants using new TadA variants. *Mol Plant*, 2021, 14: 722–731
- 27 Lu Y, Wang J, Chen B, et al. A donor-DNA-free CRISPR/Cas-based approach to gene knock-up in rice. *Nat Plants*, 2021, 7: 1445–1452
- 28 Zhang L, Zuris J A, Viswanathan R, et al. AsCas12a ultra nuclease facilitates the rapid generation of therapeutic cell medicines. *Nat Commun*, 2021, 12: 3908
- 29 Qu R, Zhang P, Liu Q, et al. Genome-edited ATP BINDING CASSETTE B1 transporter *SD8* knockouts show optimized rice architecture without yield penalty. *Plant Commun*, 2022, 3: 100347
- 30 Sha G, Sun P, Kong X, et al. Genome editing of a rice CDP-DAG synthase confers multipathogen resistance. *Nature*, 2023, 618: 1017–1023
- 31 Sun X, Xiang Y, Dou N, et al. The role of transposon inverted repeats in balancing drought tolerance and yield-related traits in maize. *Nat Biotechnol*, 2023, 41: 120–127
- 32 Xue C, Qiu F, Wang Y, et al. Tuning plant phenotypes by precise, graded downregulation of gene expression. *Nat Biotechnol*, 2023, 41: 1758–1764
- 33 Liu X, Yu Y, Yao W, et al. CRISPR/Cas9-mediated simultaneous mutation of three salicylic acid 5-hydroxylase (*OsS5H*) genes confers broad-spectrum disease resistance in rice. *Plant Biotechnol J*, 2023, 21: 1873–1886
- 34 Zhang C, Zhong X, Li S, et al. Artificial evolution of *OsEPSPS* through an improved dual cytosine and adenine base editor generated a novel allele

- p>conferring rice glyphosate tolerance.
- J Integr Plant Biol*
- , 2023, 65: 2194–2203
- 35 Zsögön A, Cermak T, Voytas D, et al. Genome editing as a tool to achieve the crop ideotype and *de novo* domestication of wild relatives: Case study in tomato. *Plant Sci*, 2017, 256: 120–130
- 36 Yu H, Lin T, Meng X, et al. A route to *de novo* domestication of wild allotetraploid rice. *Cell*, 2021, 184: 1156–1170
- 37 Song X, Meng X, Guo H, et al. Targeting a gene regulatory element enhances rice grain yield by decoupling panicle number and size. *Nat Biotechnol*, 2022, 40: 1403–1411
- 38 Xu Z, Xu X, Gong Q, et al. Engineering broad-spectrum bacterial blight resistance by simultaneously disrupting variable TALE-binding elements of multiple susceptibility genes in rice. *Mol Plant*, 2019, 12: 1434–1446
- 39 Tan W, Miao J, Xu B, et al. Rapid production of novel beneficial alleles for improving rice appearance quality by targeting a regulatory element of *SLG7*. *Plant Biotechnol J*, 2023, 21: 1305–1307
- 40 Wei X, Liu Q, Sun T, et al. Manipulation of genetic recombination by editing the transcriptional regulatory regions of a meiotic gene in hybrid rice. *Plant Commun*, 2023, 4: 100474
- 41 Zhou J, Liu G, Zhao Y, et al. An efficient CRISPR–Cas12a promoter editing system for crop improvement. *Nat Plants*, 2023, 9: 588–604
- 42 Guo K, Hou L D, Zhang Y Y, et al. Advances in plant MYB gene family research (in Chinese). *J Yangtze Univ (Nat Sci Ed)*, 2020, 17: 93–98 [郭凯, 侯留迪, 张莹莹, 等. 植物MYB基因家族研究进展. 长江大学学报(自然科学版), 2020, 17: 93–98]
- 43 Han Y, Zhou S D, Fan J J, et al. OsMS188 is a key regulator of tapetum development and sporopollenin synthesis in rice. *Rice*, 2021, 14: 4
- 44 Xiang X J, Sun L P, Yu P, et al. The MYB transcription factor Baymax1 plays a critical role in rice male fertility. *Theor Appl Genet*, 2021, 134: 453–471
- 45 Barman H N, Sheng Z, Fiaz S, et al. Generation of a new thermo-sensitive genic male sterile rice line by targeted mutagenesis of TMS5 gene through CRISPR/Cas9 system. *BMC Plant Biol*, 2019, 19: 109
- 46 Fang Y, Yang J, Guo X, et al. CRISPR/Cas9-induced mutagenesis of TMS5 confers thermosensitive genic male sterility by influencing protein expression in rice (*Oryza sativa* L.). *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 8354
- 47 Chen Y, Shahid M Q, Wu J, et al. Thermo-sensitive genic male sterile lines of neo-tetraploid rice developed through gene editing technology revealed high levels of hybrid vigor. *Plants*, 2022, 11: 1390
- 48 Ni E, Deng L, Chen H, et al. *OsCER1* regulates humidity-sensitive genic male sterility through very-long-chain (VLC) alkane metabolism of tryptophan in rice. *Funct Plant Biol*, 2021, 48: 461
- 49 Pak H, Wang H, Kim Y, et al. Creation of male-sterile lines that can be restored to fertility by exogenous methyl jasmonate for the establishment of a two-line system for the hybrid production of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Biotechnol J*, 2021, 19: 365–374
- 50 Song S, Wang T, Li Y, et al. A novel strategy for creating a new system of third-generation hybrid rice technology using a cytoplasmic sterility gene and a genic male-sterile gene. *Plant Biotechnol J*, 2021, 19: 251–260
- 51 Yu H, Li J. Producing hybrid seeds like conventional rice. *Cell Res*, 2022, 32: 959–960
- 52 Li C, Xu Y, Liu H, et al. Molecular recognition of itch-associated neuropeptides by bombesin receptors. *Cell Res*, 2022, 33: 184–187
- 53 Fei X, Shi J, Liu Y, et al. The steps from sexual reproduction to apomixis. *Planta*, 2019, 249: 1715–1730
- 54 Khanday I, Skinner D, Yang B, et al. A male-expressed rice embryogenic trigger redirected for asexual propagation through seeds. *Nature*, 2019, 565: 91–95
- 55 Wang C, Liu Q, Shen Y, et al. Clonal seeds from hybrid rice by simultaneous genome engineering of meiosis and fertilization genes. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 283–286
- 56 Vernet A, Meynard D, Lian Q, et al. High-frequency synthetic apomixis in hybrid rice. *Nat Commun*, 2022, 13: 7963
- 57 Liu C, He Z, Zhang Y, et al. Synthetic apomixis enables stable transgenerational transmission of heterotic phenotypes in hybrid rice. *Plant Commun*, 2023, 4: 100470
- 58 Wei X, Liu C, Chen X, et al. Synthetic apomixis with normal hybrid rice seed production. *Mol Plant*, 2023, 16: 489–492
- 59 Kelliher T, Starr D, Richbourg L, et al. MATRILINEAL, a sperm-specific phospholipase, triggers maize haploid induction. *Nature*, 2017, 542: 105–109
- 60 Yao L, Zhang Y, Liu C, et al. *OsMATL* mutation induces haploid seed formation in indica rice. *Nat Plants*, 2018, 4: 530–533
- 61 Liu J, Liang D, Yao L, et al. Rice haploid inducer development by genome editing. *Methods Mol Biol*, 2021, 2238: 221–230
- 62 Liu Z, Zhong Y, Qi X, et al. Haploids can be induced in knockout mutants of *OsPLA1*, but not *OsDMP3* or *OsDMP6*, in rice. *Crop J*, 2023, 12: 213–221
- 63 Kalinowska K, Chamas S, Unkel K, et al. State-of-the-art and novel developments of *in vivo* haploid technologies. *Theor Appl Genet*, 2019, 132: 593–605
- 64 Kaur K, Neelam K, Singh J, et al. Uncovering natural allelic and structural variants of *OsCENH3* gene by targeted resequencing and *in silico* mining in genus *Oryza*. *Sci Rep*, 2023, 13: 830

- 65 Zhang X, Shi C, Li S, et al. A female *in vivo* haploid-induction system via mutagenesis of egg cell-specific peptidases. *Mol Plant*, 2023, 16: 471–480
- 66 Liu Y G, Li G S, Zhang Y L, et al. Current advances on CRISPR/Cas genome editing technologies in plants (in Chinese). *J South China Agric Univ*, 2019, 40: 38–49 [刘耀光, 李构思, 张雅玲, 等. CRISPR/Cas植物基因组编辑技术研究进展. 华南农业大学学报, 2019, 40: 38–49]
- 67 Wang M, Lu Y, Botella J R, et al. Gene targeting by homology-directed repair in rice using a geminivirus-based CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant*, 2017, 10: 1007–1010
- 68 Ellison E E, Nagalakshmi U, Gamo M E, et al. Multiplexed heritable gene editing using RNA viruses and mobile single guide RNAs. *Nat Plants*, 2020, 6: 620–624
- 69 Demirer G S, Silva T N, Jackson C T, et al. Nanotechnology to advance CRISPR–Cas genetic engineering of plants. *Nat Nanotechnol*, 2021, 16: 243–250
- 70 Zhang Y, Ren Q, Tang X, et al. Expanding the scope of plant genome engineering with Cas12a orthologs and highly multiplexable editing systems. *Nat Commun*, 2021, 12: 1944
- 71 Cheng Y, Zhang Y, Li G, et al. CRISPR–Cas12a base editors confer efficient multiplexed genome editing in rice. *Plant Commun*, 2023, 4: 100601
- 72 Tong H, Wang X, Liu Y, et al. Programmable A-to-Y base editing by fusing an adenine base editor with an N-methylpurine DNA glycosylase. *Nat Biotechnol*, 2023, 41: 1080–1084
- 73 Gupta A, Liu B, Chen Q J, et al. High-efficiency prime editing enables new strategies for broad-spectrum resistance to bacterial blight of rice. *Plant Biotechnol J*, 2023, 21: 1454–1464
- 74 Wang J, He Z, Wang G, et al. Efficient targeted insertion of large DNA fragments without DNA donors. *Nat Methods*, 2022, 19: 331–340
- 75 Li J, Ding J, Zhu J, et al. Prime editing-mediated precise knockin of protein tag sequences in the rice genome. *Plant Commun*, 2023, 4: 100572
- 76 Puchta H. Using CRISPR/Cas in three dimensions: Towards synthetic plant genomes, transcriptomes and epigenomes. *Plant J*, 2016, 87: 5–15
- 77 Li Z, Zhang D, Xiong X, et al. A potent Cas9-derived gene activator for plant and mammalian cells. *Nat Plants*, 2017, 3: 930–936
- 78 Pan C, Sretenovic S, Qi Y. CRISPR/dCas-mediated transcriptional and epigenetic regulation in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2021, 60: 101980
- 79 Tang Q, Wang X, Jin X, et al. CRISPR/Cas technology revolutionizes crop breeding. *Plants*, 2023, 12: 3119
- 80 Xiong J, Wang C, Wang K. Construction of CRISPR/Cas9 multiplex genome editing system in rice. *Methods Mol Biol*, 2023, 2653: 107–114
- 81 Lu Y, Ye X, Guo R, et al. Genome-wide targeted mutagenesis in rice using the CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant*, 2017, 10: 1242–1245

Summary for “CRISPR/Cas基因编辑技术在水稻育种中的研究进展”

Research progress of CRISPR/Cas gene editing technology in rice breeding

Ke Li, Chuanyin Wu & Yi Sui*

Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

* Corresponding author, E-mail: suiyi@caas.cn

China is the world's largest producer and consumer of rice, and expanding grain output through rice breeding is one of China's primary measures for meeting sustainable food demands. The country's sustainable development strategy heavily relies on advancements in rice breeding, which is a critical factor in meeting the growing food demand and addressing environmental challenges. Currently, domestic food security is threatened by global climate change, population expansion, environmental pollution, and a lack of resources. Simultaneously, the promotion of global sustainable development poses new challenges to China's modern agriculture. There is a pressing need to solve the food crisis, break through the monopoly of seed sources, and achieve the “two-carbon” (carbon peaking and carbon neutrality) goal. This requires mastering core bio-breeding technologies to promote the development of green and low-carbon modern agriculture. For example, breeding high-yield, pest-resistant, and drought-resistant crops can reduce the use of pesticides and carbon emissions. Breeding food-saving, high-yield, and disease-resistant farm animals can efficiently use grass fodder and reduce drug and carbon emissions. Some innovative solutions such as CRISPR/Cas gene editing have emerged as vital to revolutionizing rice breeding programs in recent years. CRISPR/Cas, a widely adopted gene-editing technology based on the modified acquired immune system of bacteria, has great potential for applications in rice breeding. It enables the rapid and precise generation of new germplasm, providing an opportunity for the development of new and sustainable agricultural systems, while facilitating a series of novel breeding technologies and laying the foundation for agricultural innovation. Using CRISPR/Cas technology, researchers can edit genes related to rice yield, appearance, quality, and resistance to biotic and abiotic stresses, thereby enhancing the agricultural value of rice and making it more marketable. By editing relevant genes, researchers can increase rice resistance to pests and diseases, as well as tolerance to drought, salinity, and other abiotic stresses. In addition to its application in germplasm development, the CRISPR/Cas technology has facilitated the development of novel breeding techniques. For example, de novo domestication is enabled by transforming wild rice into cultivated rice by editing specific genes. Moreover, CRISPR/Cas technology can break the linkage drag, allowing the simultaneous expression of multiple beneficial genes by editing genes that affect genetic linkage. It can also be used for hybrid seed production, apomixis, and doubled haploid technology. Finally, we discuss the development of CRISPR/Cas tools, their derivatives, and their applications are briefly elucidated. The discovery and advancement of gene-editing technologies will undoubtedly have a significant impact on plant genetic engineering and breeding, offering broader prospects for future rice breeding. In conclusion, progress in research on CRISPR/Cas gene-editing technology in rice breeding provides new opportunities and challenges. Through the application of this technology, we can improve the traits of rice more precisely, increasing its yield, quality, and resistance, which will provide important support for the sustainable development of China's rice industry and contribute to solving the problem of global food security. The discovery and development of gene editing technology will accelerate the development of plant genetic engineering technology and the process of bio-breeding and has broad application prospects in future rice breeding, which will make an important contribution to solidifying the foundation of China's food security and solving the global food security crisis.

rice, biological breeding, gene editing, CRISPR/Cas

doi: [10.1360/TB-2023-1134](https://doi.org/10.1360/TB-2023-1134)