



CRISPR/Cas基因组编辑在木本植物性状改良中的应用

袁雪宁[†], 姚凤鸽[†], 安轶, 江成, 陈宁宁, 黄李超, 卢孟柱, 张进^{*}

浙江农林大学林业与生物技术学院, 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室, 杭州 311300

[†] 同等贡献

^{*} 联系人, E-mail: zhangji@zafu.edu.cn

2023-11-01 收稿, 2023-12-13 修回, 2023-12-15 接受, 2023-12-18 网络版发表

浙江省“十四五”育种专项林木协作组(2021C02070-1)、国家重点研发计划(2021YFD2200205, 2021YFD2200700)、国家自然科学基金(32171814)和浙江省自然科学基金(LR22C160001)资助

摘要 CRISPR是成簇的、规律间隔的短回文序列, 存在于细菌、古细菌进化出的免疫防御系统中, 由于其能利用RNA靶向引导Cas核酸酶对基因组中的目标序列进行编辑, 成为基因组研究的重要工具。木本植物由于世代周期长, 育种周期通常长达数十年, 且存在近交衰退等问题, 采用分子育种手段十分必要。以基因组编辑主导的分子设计育种为木本植物的遗传改良提供了新的思路。本文对目前在木本植物中涉及的CRISPR/Cas系统Cas9、Cas12、Cas13、Cas14、单碱基编辑器、引导编辑器等几种编辑技术展开描述, 主要介绍了通过CRISPR/Cas9进行的单基因、多基因编辑在木本植物生长发育调控、胁迫抗性、品质调控等基因功能研究及性状改良中的应用进展, 及启动子编辑、单碱基编辑器和基于dCas9的基因激活技术在木本植物性状改良中的应用潜力。此外, 本文还探讨了木本植物基因组编辑技术在现阶段存在的问题及可能的解决方案。最后, 对新型基因组编辑器在木本植物性状改良中的应用潜力进行了展望, 旨在为木本植物分子设计育种提供参考。

关键词 木本植物, 性状改良, 基因组编辑, CRISPR/Cas系统, 碱基编辑器, 引导编辑器

基因组编辑是基于基因组学的一种在基因组中靶向和精确修饰的技术^[1]。随着基因工程的飞速发展, 基因编辑技术愈发成熟, 相继衍生出了三代基因组编辑技术, 包括锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)技术、转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)技术以及基于细菌成簇规律间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPRs)开发的CRISPR/Cas基因组编辑技术^[2]。第一代人工核酸内切酶ZFNs技术是将锌指蛋白(zinc-finger proteins, ZFP)与限制性内切酶Fok I的切割结构域融合后, 利用锌指结构识别特异DNA序列并将其切割的基因组编辑技术^[3]。该技术对特定序列的ZFP设计和筛选费时费力、成本

较高, 且有脱靶效应和Fok I自身二聚化造成非特异切割等原因, 导致其在基因组编辑中的应用受限^[4]。第二代人工核酸内切酶TALENs是将转录激活因子效应物(TALE)3'端的激活结构域序列换成编码Fok I的DNA序列后经转录翻译得到的融合人工核酸内切酶, 比锌指结合DNA序列更稳定, 特异性更高, 但目标序列的每个碱基都需要一个TALE识别元件, 载体构建工作量大。为了解决上述问题, 2012年Jinek等人^[5]开发出了CRISPR/Cas9系统, 该系统由Cas9蛋白和双RNA(crRNA和tracrRNA)两部分组成, Cas9蛋白是一种利用RNA作为向导识别靶标DNA的核酸内切酶, HNH和RuvC结构域是双链DNA的切割位点, 并人工合成了tracrRNA和crRNA连接在一起的sgRNA(single guide

引用格式: 袁雪宁, 姚凤鸽, 安轶, 等. CRISPR/Cas基因组编辑在木本植物性状改良中的应用. 科学通报, 2025, 70: 2509–2525

Yuan X N, Yao F G, An Y, et al. Application of CRISPR/Cas genome editing in woody plant trait improvement (in Chinese). Chin Sci Bull, 2025, 70: 2509–2525, doi: [10.1360/TB-2023-1125](https://doi.org/10.1360/TB-2023-1125)

RNA). 相较于第一、二代基因编辑技术, CRISPR/Cas系统有设计流程简单、操作方便、编辑效率高等优点^[6].

森林不仅在保持水土、涵养水源、防风固沙、调节气候、消除污染等方面发挥重要的生态功能^[7], 也为人类社会生产活动提供了大量原材料, 对促进农林经济可持续发展有重大意义. 但是木本植物世代周期长、遗传杂合度高、近交衰退等特点极大限制了木本植物遗传改良进程^[8]. CRISPR/Cas技术提供了将靶向突变引入植物基因组的有效机制, 系统一经开发就迅速在微生物、动物和植物中得以应用. 2013年CRISPR/Cas9系统首次在模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和烟草(*Nicotiana tabacum*)中实现了基因组编辑. 截至目前, CRISPR/Cas系统已在数十种植物中成功应用, 如杨柳科的杨属(*Populus* L.)、芸香科(Rutaceae)、蔷薇科(Rosaceae)、石榴科(Punicaceae)、大戟科(Euphorbiaceae)和禾本科(Poaceae)等. CRISPR编辑系统的日趋成熟为加速木本植物性状改良提供了可能^[9]. 本文介绍了CRISPR/Cas基因组编辑器及其在木本植物性状改良中的研究进展, 并对其发展前景进行了展望, 以期为木本植物分子设计育种提供参考.

1 基因组编辑器

CRISPR/Cas系统是从细菌和古细菌中发现的抵抗外源DNA或RNA的免疫防御系统, 经人为改造后, 现已成为生物体通用的基因组编辑工具^[10]. 其最初作用是细菌在遭受病毒入侵后将病毒基因的一小段序列添加到自身的DNA中, 当病毒再次遭受入侵后, 细菌可根据存储序列识别病毒并将其体内DNA切割使其失活^[11,12]. 根据CRISPR/Cas系统效应器模块的不同设计原则, 主要可将其分为两大类(1类和2类)的6种不同类型(I~VI型)^[13]. 第1类主要存在于古细菌中, 由多种Cas蛋白形成复合物, 结构复杂, 包括I、III和IV型, 较易对靶位点进行切割, 导致DNA双链断裂(double-strand break, DSB). 第2类结构简单, 由单一蛋白质组成, 包括II、V和VI型, 其中II型(以Cas9为代表)在现阶段应用最为广泛.

1.1 CRISPR/Cas9

Cas9是CRISPR/Cas系统第2类中II型的特征蛋白, 首次发现于酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)^[5].

CRISPR/Cas9是通过获取、表达和靶向干扰这3个过程来识别并切割靶基因的DNA序列^[4]. (1) 获取: 外源DNA序列识别后将其整合到受体基因组中CRISPR基因5'端的2个重复序列之间; (2) 表达: 在启动子的作用下将CRISPR基因转录成pre-crRNA(precursor crRNA), 同时与pre-crRNA重复区互补的tracrRNA也被转录, pre-crRNA在Cas蛋白、tracrRNA和核糖核酸酶Ⅲ的作用下加工成crRNA, tracrRNA又通过与crRNA的部分序列配对组成sgRNA用于识别和靶向DNA序列, sgRNA和Cas9蛋白结合形成复合体为剪切做准备; (3) 靶向干扰: crRNA识别原间隔相邻基序(protospacer adjacent motif, PAM)的“NGG”碱基序列, 并引导sgRNA/Cas9蛋白复合物通过两个切割结构域分别切割PAM区附近20 bp与sgRNA互补的靶DNA链和非靶DNA链, 造成DSB^[14]. DSB会诱导DNA通过自然条件下的非同源末端连接(nonhomologous end-joining, NHEJ)或同源重组(homology-directed repair, HDR)两种方式进行损伤修复. HDR可以将外源DNA供体片段重组整合到DNA双链断裂的位置, 但在自然条件下出现的概率较低; 若添加一个特定的外源DNA模板, 修复可通过HDR过程进行点突变的替换等定向进行. 细胞大多数DSB修复由NHEJ完成, 但该过程易错, 会引入插入或缺失突变, 造成靶标基因丧失功能^[15]. CRISPR/Cas9技术的优势在于操作简单、成本较低、可进行多重靶向修饰且应用广泛.

1.2 CRISPR/Cas12

Cas12a(也称为Cpf1)属于2类CRISPR系统的V型RNA引导的核酸内切酶, 是目前Cas12家族中研究最多的一类, 其作用机制与Cas9相似^[16]. 不同的是, Cas12a不需要tracrRNA的帮助, 靠自身存在的核糖核酸酶位点就可以将pre-crRNA自主加工为成熟的crRNA并融合在一起, 形成的蛋白复合物在crRNA引导下识别富含T的PAM区域(5'-TTTN-3'), 结合靶向DNA序列后进行切割产生交错黏性末端^[17]. 该系统中crRNA比sgRNA更短, 其蛋白也比Cas9蛋白更小, 有助于构建装载量小和多基因编辑的载体.

Cas12b(也称为C2c1)是V-B型Cas蛋白, 也需要tracrRNA和crRNA共同作用, 促使Cas12b蛋白切割双链DNA产生交错黏性末端^[18]. 它的蛋白比Cas9和Cas12a更小, 且缺乏HNH结构域, Cas12b对修饰的反应比Cas12a更灵敏、脱靶效率更低^[19].

1.3 CRISPR/Cas14

Cas14有a、b、c三个亚型, 其中Cas14a不需要PAM区就可以精确靶向ssDNA, 是一类高度紧凑的CRISPR核酸内切酶. 该蛋白含有的RuvC结构域是切割ssDNA的功能结构域, 并且该系统中sgRNA与靶向ssDNA完全互补才能进行切割, 这会导致sgRNA与靶向序列的任何不匹配都会严重降低Cas14a的切割活性. 所以Cas14a的独特之处在于单链DNA病毒基因组中的几乎任何序列都可作为靶标来靶向和切割病毒基因^[20].

1.4 CRISPR/Cas13

上述几种编辑器都是以DNA为研究对象, 而RNA在生物学中具有同等重要的作用, 因此对RNA的编辑也有重要的应用价值^[21]. 与前文中描述的几种Cas蛋白不同, VI型的Cas13蛋白特异性靶向RNA, 且Cas13a(也称为C2c2)是第一个应用的RNA核酸酶^[22], 其成功开发加速了科研人员对RNA功能的深入研究. Cas13a是由crRNA引导切割靶向ssRNA, 其切割活性受两个高等真核生物和原核生物核苷酸结合结构域(higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide-binding domain, HEPN)的影响. 只有crRNA的中心区域与靶RNA结合形成靶RNA双链后, 形成的双螺旋结构诱导Cas13a构象发生变化并以此激活HEPN催化位点, Cas13a蛋白才会发挥其切割作用^[23]. CRISPR/Cas13b作为CRISPR/Cas13系统中的另一种亚型, 与CRISPR/Cas13a的作用原理相似, 但也存在一些区别, Cas13b蛋白相对较小, 且不含Cas1和Cas2, 有2种不同基因型的附属蛋白——Csx27和Csx28, Csx27会抑制Cas13b蛋白酶的活性, Csx28与之相反, 会增强其活性^[24]. CRISPR/Cas13d和Cas13a都含有Cas1和Cas2, 其蛋白更小, Cas13d蛋白具有切割靶向ssRNA和加工pre-crRNA成为crRNA的双重活性, 该切割活性可以被WYL结构域正向诱导, 其相对于其他Cas13亚型蛋白有更高的编辑效率^[25]. 而CRISPR/Cas13系统中的其他3种亚型Cas13c、Cas13X和Cas13Y的作用原理与上述几种亚型类似, 其中Cas13X和Cas13Y相对于其他亚型更紧凑、氨基酸数量更少^[26].

1.5 碱基编辑器(base editors, BE)

上述CRISPR/Cas系统的基因组编辑多数是通过NHEJ修复途径导致碱基增加或缺失引起的随机突变,

难以实现稳定的单碱基突变, 因此针对生物性状的定向改良, 开发一种精准且高效实现单碱基替换的技术尤为重要. 由CRISPR/Cas9发展而来的CRISPR/Cas单碱基编辑是一种新兴技术, 碱基编辑器是通过将工程碱基修饰酶融合到催化核酸内切酶失活的Cas9蛋白(nuclease-dead Cas9, dCas9)或具有单链切割活性的Cas9蛋白(nicking Cas9, nCas9)中创建的, 它不需要DNA双链的断裂就可以实现在靶位点改变核苷酸的类型^[27]. 当前应用较为广泛的BE主要有2种类型: 胞嘧啶碱基编辑器(cytosine base editor, CBE)和腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editor, ABE). CBE由活化诱导胞嘧啶脱氨酶(activation-induced cytidine deaminase, AID)、dCas9/nCas9和尿嘧啶糖基化酶抑制剂(uracil glycosylase inhibitor, UGI)3种元件构成, Cas9蛋白与AID组成融合蛋白, 融合蛋白会在sgRNA的引导下识别靶向DNA序列, 这时sgRNA与靶向DNA的一条链互补配对, 而AID则结合到另一条ssDNA链上并将该链上一定范围的胞嘧啶(C)脱氨变成尿嘧啶(U), 再通过DNA复制或修复将U转变成胸腺嘧啶(T), 最终实现从G/C碱基对变成T/A碱基对, 在整个过程中, UGI的作用是抑制尿嘧啶N-糖基化酶(uracil-N-glycosylase, UNG), 防止UNG切除脱氨生成的U碱基, 产生无嘌呤/无嘧啶(apurinic/apyrimidinic, AP)位点, 导致DNA发生NHEJ修复从而降低CBE的编辑效率. CBE的主要局限是只能诱导C的碱基替换, 其他形式的碱基则无法实现替换^[28]. 为了解决这一限制, Gaudelli等人^[29]发现了一种新的碱基编辑器——ABE, 其工作原理与CBE类似, 腺嘌呤脱氨酶可将A脱氨变为肌苷(I), 在DNA水平I会被当作G进行复制, 最终实现A/T碱基对到G/C碱基对的改变. 它们的不同之处在于, ABE不需要抑制烷基腺嘌呤DNA糖基化酶(alkyladenine DNA glycosylase, AAG)的活性. ABE和CBE两种碱基编辑类型只能催化嘌呤之间和嘧啶之间的转换, 而不能实现嘌呤与嘧啶之间的相互颠换, 而糖基化酶编辑器(glycosylase base editors, GBE)的出现为碱基之间的颠换提供了思路. GBE相当于CBE的副产物, 是以UNG产生的AP位点为突破口发现的编辑器, 由UNG-nCas9-AID三部分组成, 在UNG的作用下, 靶DNA序列上识别到的C会脱氨成U后被去除, 产生的AP位点在大肠杆菌和哺乳动物中通过DNA修复分别实现C到A和C到G的颠换^[30].

将ABE和CBE组合使用可以在不产生DSB或依赖供体DNA模板情况下实现4种碱基的替换, 而在微生物

中将ABE、CBE和GBE组合使用能够实现任意碱基的替换，这样有效提高了基因组编辑的效率^[31]，BE在植物中已经取代HDR引起的基因突变并成为更有效的基因组编辑工具^[1]。

1.6 引导编辑器(prime editor, PE)

PE是为了扩大精准编辑的范围和实现12种“碱基-碱基”替换或逆转而新开发的一种基因组编辑技术^[32]，可以进行多位点编辑、DNA短片段的插入和缺失，不需要DSB和修复模板就可以将目的DNA序列引入靶位点区实现基因编辑，减少了细胞自身修复过程对编辑结果的不可控影响^[33]。在PE中，pegRNA(prime editing guide RNA)是在sgRNA的基础上进行改造的，在sgRNA的3'端添加一段引物结合序列(primer binding site, PBS)和转录模板序列(RT template)，PE蛋白是由仅能切割单链的nCas9(H840A)蛋白与逆转录酶融合而成。PE蛋白在pegRNA的sgRNA序列引导下由nCas9蛋白切割靶DNA的一条链，PBS与断裂单链DNA上的碱基互补配对，之后逆转录酶发挥作用，以人工设计的序列为模板进行逆转录，再经DNA连接和修复后将新的DNA序列整合到目标DNA上实现精准的碱基替换、插入和缺失等变异^[34]。此外，2020年，Lin等人^[35]对引导编辑系统(prime editing system, PPE)的密码子、启动子和编辑条件进行了优化，调整了启动子编辑器在植物中的应用，编辑效率高达21.8%。PE将基因组编辑提升到了一个新的水平，在开展植物育种和功能基因组学

研究中具有巨大的潜力。

2 CRISPR/Cas基因组编辑在木本植物性状改良中的应用

在一代、二代基因组编辑技术的基础上，新形成的CRISPR/Cas技术发展迅速，目前在以杨属植物为首的多个物种中实现了单基因、多基因编辑，并在启动子编辑、BE以及基于dCas9的CRISPR激活技术的应用方面进行了一些探索(表1)。

2.1 单基因编辑在木本植物性状改良中的应用

为了验证CRISPR/Cas系统在植物中的可操作性，类胡萝卜素生物合成途径上的第一个合成酶——八氢番茄红素脱氢酶(phytoene desaturase, PDS)常被用作测试系统的内源靶基因。PDS具有保护叶绿素免受光漂白的作用，编辑该基因后植株表现出白化表型，可直接通过可视化筛选检验CRISPR/Cas系统在植物中的可行性。

在木本植物研究方面，Fan等人^[9]在毛白杨(*Populus tomentosa* Carr.)中使用4个gRNAs同时靶向PDS基因，根据白化表型所占的比例发现产生的突变率超过50%，测序分析结果显示有93.3%的突变体发生双等位基因突变和6.7%发生单等位基因突变，表明CRISPR/Cas9系统可以在杨树基因组中实现高效编辑。此外，An等人^[36]以银腺杨(*Populus alba* × *glandulosa* ‘84K’)为材料，使用高活性的MAS启动子驱动Cas9系统，使突变

表 1 CRISPR/Cas基因组编辑技术在木本植物性状改良中的应用简表(详见表S1)

Table 1 Summary of the application of CRISPR/Cas genome editing in woody plant traits improvement (see Table S1 for details)

研究目的	木本植物	包含编辑类型	涉及性状
CRISPR/Cas系统测试	毛白杨 ^[9] 、银腺杨 ^[6,36] 、杂交杨 ^[37] 、银灰杨 ^[38] 、甜橙 ^[39] 、金柑 ^[40] 、核桃 ^[41] 、欧洲板栗 ^[42] 、苹果 ^[43] 、毛竹 ^[44] 、麻竹 ^[45]	单基因编辑、单碱基编辑	白化
调控生长发育	南林895杨 ^[46,58] 、银灰杨 ^[7,47,51,53,55] 、欧洲山杨 ^[7] 、杂交杨 ^[48,54] 、毛白杨 ^[49] 、蒙达利松 ^[50] 、巴西橡胶树 ^[52,61] 、毛果杨 ^[56,57] 、苹果 ^[59] 、核桃 ^[60] 、麻竹 ^[45] 、美洲黑杨 ^[62] 、银灰杨 ^[62]	单基因编辑、多基因编辑、基因激活	高生长、径向生长、芽生长/再生/休眠、细胞壁合成、毛状体发育、不定根发生等
非生物胁迫抗性	毛果杨 ^[63] 、杂交杨 ^[64] 、银灰杨 ^[65] 、山新杨 ^[66] 、枳橙 ^[67] 、落叶松 ^[68] 、银腺杨 ^[69] 、新疆杨 ^[70]	单基因编辑、单碱基编辑	干旱胁迫、盐胁迫、除草剂抗性
生物胁迫抗性	葡萄柚 ^[67,71,72] 、甜橙 ^[39,67] 、美洲黑杨 ^[62] 、银灰杨 ^[62]	单基因编辑、单碱基编辑	柑橘溃疡病等
木质素合成	银灰杨 ^[73,75] 、毛白杨 ^[74,82] 、毛果杨 ^[76,77,80,84] 、银腺杨 ^[78,79,81,83] 、杂交白杨 ^[85] 、桉树 ^[86]	单基因编辑、多基因编辑、单碱基编辑	木质素、纤维素、木聚糖等生物合成
类黄酮合成	毛白杨 ^[87,89] 、银灰杨 ^[88] 、西洋梨 ^[90]	单基因编辑、基因激活	类黄酮、(原)花青素等
酚类代谢物合成	荔枝 ^[91] 、银灰杨 ^[92,93] 、石榴 ^[94] 、山金柑 ^[95]	单基因编辑、多基因编辑	水杨酸、茉莉酸、柠檬酸、安石榴苷及其相关代谢

率提高至75%。在金柑(*Fortunella hindsii*)中, Zhu等人^[40]利用2种sgRNA靶向*PDS*基因, 发现T₀代产生了3种不同程度白化表型的突变体, 其突变效率在45%~100%不等, 并预计在T₁代能将靶基因突变率提至100%。Walawage等人^[41]基于核桃(*Juglans regia* cv. Chandler)基因组开发了辅助gRNA设计的计算工具, 并通过CRISPR/Cas9系统精确敲除*PDS*基因, 为坚果类木本植物的基因功能解析和分子设计育种奠定了基础。另外, 通过测试*PDS*基因, 证实了CRISPR/Cas9系统也可在欧洲板栗(*Castanea sativa* Mill.)^[42]、苹果半矮化砧木品种(*Malus prunifolia* (Wild.) Borkh. ‘Seishi’×*M. pumila* Mill. var. *paradisiaca* Schneid. ‘M.9’)^[96]、毛竹(*Phyllostachys edulis*)^[44]、麻竹(*Dendrocalamus latiflorus* Munro)^[45]等木本植物中起作用, 为进一步利用CRISPR/Cas基因编辑系统对木本植物进行遗传改良提供了方法。

目前, 利用CRISPR/Cas系统编辑单个基因的报道最多, 并在木本植物生长发育调控、提高抗逆性、改善木材及果实品质等方面(图1)取得一些进展。

2.1.1 调控生长发育

通过CRISPR/Cas9系统直接编辑参与植物生长发育及细胞活动的关键基因, 可显著调控木本植物的生长发育过程, 以期获得速生、优质、抗逆的木本植物新种质来满足现阶段不断增长的木材需求量。

油菜素内酯(brassinosteroid, BR)是植物特异性类

固醇激素, 可动态调节植物生长发育, DET2 (DEETIO-LATED2)是BR合成的限速酶。Fan等人^[49]敲除毛白杨(*Populus tomentosa* Carr.)中*PtoDET2*, 发现突变体中BR水平降低, 导致植株生长迟缓、生物量降低。Ye等人^[45]用CRISPR/Cas9技术对麻竹(*Dendrocalamus latiflorus* Munro)赤霉素(Gibberellin, GA)响应基因*GGR1*进行单基因编辑, 产生的纯合*grg1*突变体由于节间伸长导致株高增加。植物类成束阿拉伯半乳糖蛋白(fasciclin-like arabinogalactan protein, FLA)在植物生长发育的各阶段发挥作用, 对毛果杨(*Populus trichocarpa*)中*FLA40/45*双基因敲除导致突变体的茎长、直径增加, 木质部纤维和导管的细胞增大, 木质素含量增加^[57], 这为解析林木生长调控通路提供了有力手段。

杨树*ASX* (attenuation of secondary xylem)基因是木质部特异表达的受体样激酶(receptor-like kinases, RLKs)成员。Xie等人^[46]在南林895杨(*Populus deltoides* × *euramericana* ‘Nanlin895’)中利用CRISPR/Cas9编辑*ASX*, 发现突变体植株木质部分化及次生细胞壁(secondary cell wall, SCW)加厚受到抑制、植株生长减缓。*VCS* (*VASCULAR-CAMBIUM-SPECIFIC*)和*WOX* (*WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN*)是茎维管形成层特异表达基因, 在毛果杨中编辑*VCS2*及其同源基因*VCS2-h*, 导致双突变体*vcs2 vcs2-h*的维管形成层增殖区细胞层数和茎粗度均显著增加; 而同时敲除*WOX4a* *WOX4b*表现出形成层增殖区细胞层数减少, 为定向调



图1 (网络版彩色)不同类型CRISPR基因编辑器在木本植物性状改良中的应用

Figure 1 (Color online) Application of different types of CRISPR genome editors in woody plant traits improvement

控林木的径向生长提供了关键候选基因及途径^[56]。

Muhr等人^[47]在银灰杨(*P. tremula*×*alba* ‘INRA 717-1B4’)中对芽生长抑制因子(*BRANCHED*)*BRC1*和*BRC2*分别用2个sgRNA进行单基因编辑,获得了芽生长更健壮的*brc1-1*突变体和侧芽增多的*brc2-1*突变体,证实了*BRC1*在杨树中具有保守的功能而*BRC2*在侧芽生长调节中起更重要的作用。Maurya等人^[48]发现,杂交杨(*Populus tremula*×*tremuloides* ‘T89’)中敲除*BRC1*后导致短光周期下的生长停止表型延迟,该过程通过*APETALA1*和*FLOWERING LOCUS T2*基因介导,表明杨树的*BRC1*参与光周期调控。Chang等人^[60]在核桃(*Juglans regia* L. ‘Zhonglin 6’)中使用多个gRNA编辑控制细胞增殖和分化的关键转录因子*WOX11*,获得的*Jrwox11*突变体不定根数量减少,细胞数量增加但细胞体积变小,为调控木本植物根系结构和株型提供了思路。此外,有研究在苹果‘GL-3’中成功利用CRISPR/Cas9敲除苹果*MdSPL6* (*SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 6*)基因,获得了叶片再生能力和芽再生效率显著增强的苹果*Mdspl6*突变株^[59]。

与阔叶树相比,针叶树往往幼年期长、基因组巨大且复杂,通过传统育种对针叶树进行遗传改良非常耗时,目前关于针叶树种的基因编辑的报道较少。Poo-vaiah等人^[50]在蒙达利松(*Pinus radiata*)中分别使用单个gRNA、2个gRNA和RNP靶向细胞壁合成基因*GUX1*,通过体细胞胚胎发生途径产生蒙达利松突变体,其中使用单个、2个gRNA进行基因组编辑的胚胎/幼苗都是等位基因突变,编辑效率分别达到15%和12%,而用RNP与双gRNA共同递送时编辑效率可达33%,这为针叶树种的定向分子育种提供了更高效的策略。

2.1.2 提高胁迫抗性

目前已经鉴定到大量调控木本植物非生物胁迫响应及生物胁迫响应的关键基因,利用CRISPR/Cas9直接破坏植物相关敏感基因的表达,是提高木本植物胁迫能力的快捷有效方法之一。

在干旱条件下,AREB1-ADA2b-GCN5复合物会结合*PtrNAC*启动子区的ABRE基序进而驱动该基因表达,提高植物抗旱性。Li等人^[63]在毛果杨中利用CRISPR/Cas9技术成功靶向*ADA2*基因(*ALTERATION/DEFICIENCY INACTIVATION2*)中的一种可变剪切类型基因*ADA2b-3*,得到的*Ptrada2b-3*基因编辑植株因缺乏*ADA2b-3*蛋白,导致AREB1-ADA2b-GCN5复合物功能破坏,无法启动*PtrNAC*表达,从而引起杨树的抗旱能力

降低。*NF-YB21*是一类根特异性转录因子,杨树*nf-yb21*单基因突变体根中木质部导管直径变小,影响其吸水导致耐旱性降低^[64]。此外,Harding等人^[65]在银灰杨‘INRA 717-1B4’中利用CRISPR/Cas9编辑质体蔗糖外排转运蛋白*SUT4*基因,导致其移码突变,通过影响淀粉利用及叶片相对含水量的动态平衡,使得突变体在干旱条件下维持较高的相对含水量。Yang等人^[66]基于CRISPR/Cas9编辑系统,提出了一种通过热处理(37°C)以增加Cas9的切割活性来提高CRISPR/Cas介导基因编辑效率的方法,在山新杨(*Populus davidiana*×*bolleana*)中获得了敲除盐胁迫响应相关的基因*PdbKH*(K homology(KH)domain-containing protein)的突变体,发现该基因是盐胁迫响应的负调控因子。*HyPRP*是富含脯氨酸和羟脯氨酸的细胞壁结构蛋白。Zhang等人^[69]对我国北方地区栽植的树种‘84K’杨中的*PagHyPRP1*进行单基因敲除,证实其在盐和干旱胁迫中起负调控作用,发现突变体可通过提高POD和SOD过氧化物酶活性和脯氨酸含量来增强抗氧化和渗透调节能力,从而提高抗旱和耐盐性,为建立高基因组杂合度的木本植物基因编辑新策略提供了新思路。Bai等人^[70]对新疆杨(*Populus alba* var. *pyramidalis*)中C2H2-ZFP转录因子编码基因*OSIC1*(*OSMOTIC STRESS INDUCED C2H2 1*)进行编辑,发现*osic1*突变体对渗透胁迫更敏感,其主要通过含铜多胺氧化酶介导调节H₂O₂在保卫细胞中的含量调节气孔开闭,为进一步通过遗传改良提高木本植物抗性提供了参考。

柑橘溃疡病是对柑橘属植物造成严重危害的病害之一。*CsLOB1*(*LATERAL ORGAN BOUNDARIES*)及其同源基因*CsLOB9*是导致葡萄柚(*Citrus*×*paradisi*)感染溃疡病的关键基因。Jia等人^[71]利用CRISPR/Cas9对这2个基因编辑,发现柑橘溃疡病菌(*Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Xcc)接种后葡萄柚*Cslob1*及*Cslob9*突变体表现出来的溃疡症状大大减少^[72]。由于Cas12a可识别富含T的PAM序列——“TTTV”,可通过该技术进一步提高基因编辑效率,利用Cas12a/crRNA核糖核蛋白转化胚性原生质体成功提高了甜橙(*Citrus sinensis*)溃疡易感基因*CsLOB1*的编辑效率^[39],为林木及果树抗病分子育种提供了新思路。

2.1.3 改善品质性状

(1) 调控木质素合成。目前我国木材供需矛盾加剧,针对木材性状(如木质素含量、木材结构等)的改良对提升我国木材产量及品质有重要意义。木质素是位于

细胞壁的芳香族聚合物,为木质组织提供结构支撑,但其影响了木质纤维素的生物能源转化效率。咖啡酰莽草酸酯酶(caffeoyl shikimate esterase, CSE)参与合成木质素单体,对银灰杨中2个CSE基因CSE1和CSE2基因编辑,导致2个单突变体中咖啡酰莽草酸积累;cse1 cse2双突变体的木质素减少了35%,但纤维素到葡萄糖的转化率提高了4倍^[53]。Zhou等人^[73]在银灰杨(*P. tremula*×*alba*)中编辑了参与木质素合成的CoA连接酶基因4CL1和4CL2(4-COUMARATE:COA LIGASE),其突变体木质素含量降低,为在需要低木质素含量的纸浆生产等应用提供了理论基础。MYB156是调控次生细胞壁中木质素、纤维素及木聚糖等合成的关键调节因子。Yang等人^[74]在毛白杨中对MYB156进行基因编辑,导致次生细胞壁中的木质素、纤维素等发生异位沉积。对毛果杨中分别靶向2个关键转录因子进行单敲,突变体*hsfb3-1*和*myb092*通过在应力木形成过程中影响木质素和纤维素生物合成来调控木材形成转录调控网络,最终使木质素含量减少、纤维素增加^[76]。SAG基因在拟南芥中属于EDS1家族,是一类衰老相关基因,杨树中*PagSAG101a*基因受木质部分化关键转录因子*PagC3H17*的直接调控,敲除*PagSAG101a*后杨树茎形成层活性及木质部分化受到显著抑制^[79]。有研究发现,DJ-1超家族非典型成员*PtrDJIC*在杨树早期叶绿体发育和木质素沉积过程中发挥重要作用。Wang等人^[78]通过CRISPR/Cas9基因编辑系统成功敲除‘84K’杨的*PtrDJIC*基因,得到了一系列白化程度不同的突变体株系,且这些突变体生长较慢,而纯白表型的杨树因*DJIC*的完全缺失而致死,并且木质素大量沉积。CCR肉桂酰辅酶A还原酶是关键的木质素生物合成基因。在桉树(*Eucalyptus grandis*)中,Dai等人^[86]对*CCR1*和*IAA9A*(Aux/IAA家族的生长素依赖性转录因子)分别进行单基因编辑,发现*ccr1*编辑株系中木质化减少、导管塌陷;相较*ccr1*的等位基因编辑效率(32.0%),*iaa9a*可高达92.6%。Takata等人^[85]针对SCW合成关键转录因子VND家族成员,在杂交杨‘T89’中用CRISPR/Cas9构建*vns9/10/11/12*四敲突变体,发现其木纤维、韧皮部纤维和木质部射线实质细胞中的SCW均受到严重抑制,为定向调控木材发育提供了参考。BAHD家族酰基转移酶是一类可控制对羟基苯甲酸酯修饰木质素的酶,通过CRISPR/Cas9基因编辑毛果杨中该家族基因*PHBMT1*,几乎可消除茎木质素中的所有对羟基苯甲酸酯^[84]。此外,‘84K’杨中敲除乙烯响应转录因子*Pa-*

*gERF81*基因引起导管细胞密度增加、导管细胞面积减小,且次生壁木质素含量显著上升^[81]。漆酶(laccase)在木质素单体聚合过程中发挥作用,对毛白杨中*LAC14*单敲后,S/G比值增加、木质化程度降低,导致生物质酶促糖化效率提高^[82]。Guo等人^[83]通过对‘84K’杨中*LAC19*、*LAC25*、*LAC32*进行单基因、双基因和三基因的编辑,其突变体的株高和直径增加、木质素含量均有不同程度的降低,且木质素聚合程度显著下降。纤维素也是参与木本植物次生细胞壁的主要组成成分,对毛果杨中纤维素合成酶*Ces*基因进行基因编辑,*PtrcesA4*、*7a/b*和*8a/b*突变体都具有匍匐生长、丧失顶端优势、矮小成垂枝的盆景树特征,遗传证据表明*PtrCesA7a*和*7b*、*PtrCesA8a*和*8b*存在功能冗余^[80]。另有研究利用CRISPR/Cas9技术对*PalCesA4*亚基保守区(P-CR)中的4个残基Pro₄₃₅、Trp₄₃₆、Pro₄₃₇和Gly₄₃₈的高效结合位点进行敲除,导致突变体生长速度、根系发育受到抑制,为利用CRISPR/Cas9技术介导的木本植物基因工程改良提供了一种策略^[77]。

(2) 调控类黄酮合成。类黄酮类化合物包括黄酮、黄酮醇、花青素和原花青素(PA, 又称缩合单宁),其中PA在植物响应生物及非生物胁迫中发挥重要作用。Wang等人^[87]发现,毛白杨*MYB115*转录因子可直接结合并激活PA合成结构基因来参与PA生物合成,利用CRISPR/Cas9得到的*myb115*突变体中PA含量降低,且对真菌*Dothiorella gregaria*更为敏感。随后,Liu等人^[88]对*MYB115*和*MYB134*在PA合成途径中的功能进行深度分析,利用2种杂交杨(*P. tremula*×*tremuloides* ‘INRA 353-38’和*P. tremula*×*alba* ‘INRA 717-1B4’)构建了*myb115*和*myb134*的单基因及双基因敲除突变体,发现PA生物合成途径在杨树叶片和根系中存在差异,且*MYB115*和*MYB134*正向调控杨树PA合成分支路径。在花青素合成调控方面,在毛白杨中敲除组蛋白H3K9去甲基化酶基因*JMJ25*导致花青素显著积累,其主要是通过*JMJ25*直接结合*MYB182*基因座并使其染色质去甲基化来调控花青素生物合成^[89]。

(3) 调控酚类等代谢物合成。植物酚类次生代谢物有广泛的生理及药理活性,是果树类林木的果实风味及营养价值等品质的决定因素。多酚氧化酶基因(*polyphenol oxidase*, PPO)是果皮褐变关键基因。Wang等人^[91]成功利用CRISPR/Cas9系统编辑了‘妃子笑’荔枝(*Litchi chinensis* Sonn.)中的PPO基因。发现*Lcppo*突变体中出现碱基插入、缺失和替换等多种碱基编辑类型,

为果树果实品质改良奠定了基础。水杨苷类(salicynoids)化合物是一类酚基糖苷类化合物,在杨柳科植物中大量积累, Fellenberg等人^[92]对银灰杨中水杨酸(SA)生物合成UDP-葡萄糖糖基转移酶基因(*UGT71L1*和*UGT78M1*)敲除,发现*ugt71L1*突变体毛状根中水杨素含量降低,且敲除*UGT71L1*导致杨树节间变短、叶片变小,水杨酸和茉莉酸(JA)合成受到影响^[93]。Chang等人^[94]对石榴毛状根中2个UDP-糖基转移酶基因(*PgUGT84A23*、*PgUGT84A24*)分别进行单敲及双敲,双敲材料中安石榴苷(punicalagin)的含量降低了40%,这为改善果实品质提供了新思路。柑橘亚科基因组广泛,PH是柠檬酸合成中的MYB类转录因子, Huang等人^[95]对早花柑橘山金柑中*CitPH4*进行敲除,发现其通过介导PH4调控柑橘液泡酸化使柠檬酸含量显著降低,表明*CitPH4*可以作为柑橘果实风味改良的关键基因。

2.2 多基因编辑在木本植物性状改良中的应用

木本植物的关键性状通常受多基因控制,为了改良复杂性状,可通过基因编辑手段对多个基因进行编辑。近期, *Science*报道了林木多基因编辑方面的一项重要突破^[97]。该研究利用机器学习模型预测并筛选出毛果杨全基因组的近7万种基因编辑策略,在针对木质素生物合成途径里21个关键结构基因对应的347种策略中,超过99%的策略可编辑至少3个基因。选取了7种最佳策略并构建了174个编辑株系,发现单基因编辑无法大幅降低木质素含量,而多基因编辑植株木质素含量降低了50%以上;此外,该研究还包含复杂的纸浆生产厂模型,评估了CRISPR编辑木材对纸浆生产效率及温室气体排放的影响。该研究建立的这种结合遗传学、计算生物学、CRISPR工具和生物经济学的跨学科策略,为未来的林木分子设计育种提出了更高维度的解决方案及更广泛的应用。

在多基因编辑过程中,由于gRNA及启动子效率等因素,多个gRNA效率常受到影响。Brueggemann等人^[7]获得了多个gRNA结构之间关系的证据,对2种杨树中的开花时间基因*SOCI*(*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1*)和*FUL*(*FRUITFULL*)、性别决定相关基因*NFP*(*NFP-like*)和*TOZ19*(*TORMOZEMBRYO DEFECTIVE 19*)进行单基因、多基因编辑,发现gRNA上的GC含量在40%~60%之间、gRNA 3'末端的嘌呤碱基量(4个左右)和不形成二级结构配对的种子序列区域(seed region, 18~20 nt)都会提高gRNA的编辑效率。

此外, Bewg等人^[51]在银灰杨‘INRA 717-1B4’中利用sgRNA靶向MYB家族的3个毛状体调节因子(*MYB186*、*MYB138*和*MYB38*)的保守序列,发现针对保守位点的单个sgRNA对于杨树的多重编辑也很有效。Triozi等人^[55]利用Golden Gate MoClo的工具包在银灰杨中用根尖干细胞分裂转录因子*SHR*(*SHORT ROOT*)基因测试基因编辑的效率,得到缺乏明确的内皮细胞层的*SHR*双等位基因突变体,并测试了在同一载体中连入2个sgRNA分别靶向*YUC4*(*YUCCA 4*)和*PLT1*(*PLETHORA 1*)或分别靶向*LBD12*(*LATERAL ORGAN BOUNDARIES-DOMAIN*)和*LBD4*的双基因编辑效率,发现在每个载体对应的4个编辑植株中,有3个(*yuc4/plt1*)和2个(*lbd12/lbd4*)突变体检测到了3个基因的双拷贝突变,表明基于Golden Gate MoClo双基因编辑的效率高。油菜素内酯信号在植物生长发育中起关键作用,在杨树中敲除4个BR受体基因(*PdBR11-2/3*和*PdBR11-1/6*),发现4突变体植株茎形成层分布不连续、木质部分化和生长受到显著抑制^[58]。开花时间相关基因*FT*在杨树一年生长周期中具有重要作用, André等^[54]研究发现*ft1*突变体仅在冷处理中芽萌发受抑制,*ft2a*单敲无明显表型变化、*ft2b*芽在长日照条件下提早开花、*ft2*双敲严重矮化,在长日照下花芽分化更加明显,表明在春季和夏季,*FT2*对杨树营养生长是必需的,调节杨树进入休眠状态;而*FT1*与解除冬季休眠有关,并在春季萌芽调控中起着重要的作用,揭示了FT在杨树生长周期中调节两个完全不同的主要发育控制点。

传统基因编辑大多依赖于农杆菌介导的稳定转化获得编辑植株,该过程周期较长,为了测试不同基因编辑器的编辑效率,在木本植物中利用瞬时转化的方法可以有效加快测试过程。Yuan等人^[37]通过应用eYGF-Puv紫外可见报告基因,开发了一种在转化初期能很容易筛选阳性突变体的方法,并检验了基于多重CRISPR的基因组编辑在杂交杨(*P. trichocarpa*×*deltoides* ‘52-225’)原生质体中的效率。结果表明,两种表达Trex2-Cas9系统的构建体在杂交杨中的编辑效率为31%~57%,且能产生2个靶位点之间的大片段缺失,表明BeYDV衍生的复制子提高了多基因编辑效率,为木本植物多基因编辑提供了一种新策略。Dai等人^[52]在橡胶树(*Hevea brasiliensis*)中编辑5个开花时间相关基因(*HbFT1*、*HbFT2*、*HbTFL1-1*、*HbTFL1-2*、*HbTFL1-3*),编辑效率可达到8.47%~24.92%。Fan等人^[61]开发了一个使用核糖核蛋白的橡胶树基因组编辑系统,在橡

胶树原生质体中靶向开花相关基因*FT*、*TFL1*的5个靶位点上得到了3.74%~20.11%的突变率。但通过瞬时表达得到的突变体不能稳定遗传,所以可先使用瞬时表达系统明确合适的编辑器及编辑效率高的gRNA等,再进行稳定转化,为缩短林木育种周期和进行遗传改良提供思路。

2.3 启动子编辑介导的性状改良

启动子编辑通过调控结合元件的策略能够在木本植物中影响基因的表达水平,将有助于基因功能解释,并为木本植物分子育种提供更多的可能性。这种编辑策略能够通过编辑靶基因启动子区域顺式作用元件来影响上游转录因子对其启动子区域的结合,从而实现靶基因表达的微调,但该策略受限于功能性顺式作用元件的挖掘。目前启动子编辑的报道较少,且效率偏低,迫切需提高启动子编辑效率来提高基因组编辑的多样性^[98]。Huang等人^[67]用ABE碱基编辑器将葡萄柚和甜橙溃疡易感性基因*LOB1*启动子区域中的TATA盒编辑为CACA,通过瞬时表达生成无转基因的突变体,编辑后的*LOB1*启动子区增强了2种柑橘属果树的溃疡病抗性,为木本植物性状的微调提供了新思路。

2.4 单碱基编辑在木本植物性状改良中的应用

上述几种编辑器下产生的突变体都是随机突变产生的,但是当某种操控木本植物性状的基因功能活性位点和调控分子机制已经明确的情况下,可以针对该功能性位点进行定向编辑,以期获得精准控制的性状改良。近年来,CBE和ABE的开发在许多植物中得到应用,并产生了相对较高的编辑效率,极大促进了农林业定向精准分子育种的研究进程。

相较于直接敲除植物的内源性基因,单碱基编辑通过介导显隐性抗病基因之间的转化在增强植物的抗病性的同时能更大限度地减少对植物正常生长的影响。例如,Huang等人^[67]用CBE单碱基编辑器编辑枳橙(*Carrizo citrange*)中的抗除草剂乙酰乳酸合酶基因(*acetolactate synthase*, *ALS*),在编辑*ALS*基因的植物中仅观察到C到T的替换,且检测不到外源T-DNA的插入,表明*Csals*突变体不属于传统意义上的转基因植株。此外,Yao等人^[62]利用pHEE901(BE3)和A3A/Y130F-BE3两种CBE编辑器通过C-T转换,使银灰杨中参与植物真细菌病原响应的转录因子*PLATZ*提前终止,发现这两种

编辑器的编辑效率均可达到13%~14%。Li等人^[75]同样在‘717杨’中测试了2种CBE(PmCDA1-BE3和A3A/Y130F-BE3)和2种ABE(ABEmax_V1 and ABEmax_V2)的效率,发现在2种CBE中A3A/Y130F-BE3通过AtU3启动子产生编辑效率(50%~95.5%)比PmCDA1-BE3AtU6(26.3%~78.9%)的高,而ABE中ABEmax_V2通过AtU3启动子产生编辑效率(95.5%)高于ABEmax_V1(84.2%)。对AtU6启动子,A3A/Y130F-BE3(19.0%)的编辑效率高于PmCDA1-BE3AtU6(0%)。因此,利用AtU3启动子表达sgRNA能在测试的CBEs和ABEs中产生较高效率的碱基编辑。另外,Sretenovic等人^[38]评估了6种用于编辑植物中NGG的PAM位点以及无PAM目标位点的CBE,尽管效率较低,但在杨树和水稻的稳定转化品系中实现了C到G的编辑。

此外,在ABE和CBE基础上,衍生出了双碱基编辑器(dual-base editors):双碱基编辑器将胞嘧啶脱氨酶和腺嘌呤脱氨酶同时与单个Cas蛋白融合,可同时将C-T和A-G替换引入同一基因组区域。例如,Xu等人^[99]用编辑效率高达87.6%的新型植物双碱基编辑器pDuBE1,诱导水稻除草剂抗性相关基因*OsALS*的2个点突变,A-G和C-T的同时转换效率高达49.7%。此外,近期报道的SAFE(split deaminase for safe editing)系统,适用于含有不同胞苷或腺苷脱氨酶的BE,在拟南芥和水稻中表现出高效的靶向编辑^[100]。然而,目前关于双碱基编辑器或者SAFE系统在林木中的研究尚未见报道。综合上述优点,单碱基编辑器在未来木本植物的性状精准调控领域将会有更广阔的应用。

2.5 基于dCas9的CRISPR激活技术

CRISPR/Cas编辑技术除了可以进行基因组编辑,还可以利用dCas9对基因进行表达水平的激活。Yao等人^[62]采用基于dCas9的CRISPR激活技术微调2个分别参与光合作用和微管动力学以及植物免疫的靶基因*TPX2*(*Targeting Protein for Xklp2*)和*LecRLK-G*(*G-type lectin receptor-like protein kinase*)的表达,并在美洲黑杨(*Populus deltoides* ‘WV94’)中通过原生质体瞬时表达,将这两个基因激活,使表达量升至1.2~4.7倍。随后分别在银灰杨‘717-1B4’和美洲黑杨‘WV94’中通过农杆菌介导稳定转化这两种基因,CRISPR导致靶基因表达激活至1.5~7.0倍,证明了基于dCas9的CRISPRa系统在杨树中的有效性。Ming等人^[90]以CRISPR-Act3.0为基本骨架,在西洋梨(*Pyrus communis*)中构建了基于

CRISPR/dCas9的基因转录激活系统(CRISPRa), 对梨愈伤组织中的花青苷生物合成基因进行单基因及多基因激活, 包括单基因激活*PybZIPa*、双基因激活*Py-MYB114/PybHLH3*及三基因激活*PyDFR/PyANS/PyUFGT*, 并获得花青苷积累增加表型, 表明利用基因组编辑系统进行的转录激活可以对多个目的基因表达水平的发挥调控作用. 该系统的开发进一步拓宽了CRISPR/Cas基因组编辑系统在木本植物性状改良中的应用.

3 总结与展望

传统木本植物遗传育种由于周期长、效率低等问题, 难以应对未来林业面临的需求及挑战. 相较于草本植物, CRISPR/Cas系统在木本植物基因功能研究和改良方面的应用相对滞后, 多数林木及果树品种尚处于基因编辑体系建立的初步阶段. 而CRISPR/Cas技术在木本植物基因功能研究及分子模块设计育种方面有巨大优势, 可极大缩短育种周期, 在木本植物遗传改良方面具有广阔的发展和应用前景. 目前, 在木本植物中应用CRISPR/Cas9系统所面临的主要问题及发展趋势体现在以下几个方面.

3.1 组培及遗传转化体系不健全

传统的方法如利用农杆菌或基因枪将目的基因或遗传修饰工具递送进入植物细胞后, 需要经过复杂的组织培养过程产生遗传改良植株, 这个过程周期长、操作繁琐, 且大多数植物难以通过这一方法实现遗传转化. 近几年, 虽然通过利用*BBM*和*WUS*^[101]、*WOX5*^[102]或*GIF-GRF*^[103]等与植物再生有关的基因在一定程度上能够辅助遗传修饰工具的递送, 但这些方法目前仅实现在一些单子叶植物和少数双子叶植物的研究中^[104].

为克服传统技术植物组织培养过程带来的困难, 研究人员开发了一种植物遗传修饰方法: Cut-dip-budding(CDB)递送系统, 即不需要组织培养过程, 而是利用遗传修饰根长出芽的过程将发根农杆菌侵染切断的植物幼苗而获得稳定的遗传修饰植株. 在木本植物(椿树、榉木、臭茉莉)中实现了基因编辑工具的递送, 展示了在多种易根植物中的应用潜力. 未来, 随着对植物根蘖机制的研究深入, CDB递送系统有望实现对更多植物物种的简便遗传转化操作, 进一步促进遗传改良^[105].

3.2 易产生嵌合体

在木本植物中应用CRISPR/Cas9的另一个缺点是可能会产生嵌合体. 这可能是由于Cas9和sgRNA的组成型表达, 导致不同发育时期的诱变. 要避免CRISPR/Cas9在植物中产生嵌合体, 可采取以下几种方法.

(1) 优化gRNA设计. 选择高特异性和高效率的gRNA, 合理选择引导RNA序列长度、配对强度和结构以及特定的靶向位点.

(2) 精确的Cas9表达调控. 调控Cas9蛋白的表达水平和时机可以减少嵌合体的形成. 通过使用特定的启动子和组织特异性表达的载体, 可以确保Cas9蛋白只在目标组织和特定发育阶段表达.

(3) 引入预组装的Cas9蛋白. 可以使用Cas9蛋白和gRNA先进行重组再转移到植物细胞中的策略, 这在其他物种如拟南芥和烟草这类草本模式植物中已经有所应用, 如Woo等人^[106]使用预组装的CRISPR-Cas9核糖核蛋白对植物进行无DNA插入的基因组编辑.

(4) 新型载体和纳米粒子的使用. 针对植物基因编辑, 研究人员正在开发新型的载体和纳米粒子, 用于有效地传递Cas9蛋白和gRNA到植物细胞中. 这些载体和纳米粒子可以通过包装和修饰的方式, 增强Cas9蛋白和gRNA的稳定性和特异性.

总之, 综合运用上述的几种策略可提高确保木本植物基因组编辑的准确性和安全性. 此外, 对编辑后植物进行全面的分子和生化分析, 以及长期的观察和验证, 也是避免嵌合体形成的重要措施.

3.3 脱靶效应

虽然CRISPR/Cas9基因编辑效率高, 但是gRNA在与基因组的互补配对时可允许1~5 nt的错配, 因此在对靶点进行编辑时有可能对基因组上的其他相似序列位置产生编辑, 而使基因编辑在精准度降低的同时带来风险^[107]. 针对这个问题, 研究人员也开发了各种基于CRISPR/Cas9开发的衍生软件或者工具包等来解决这个问题. 例如, Xue等人^[108]开发了一种基于网络的工具, 通过提高银灰杨基因组的高度相似序列之间的区分性, 同时减少错误比对, 有助于提高二代测序数据分析基因组编辑的精准性. Ren等人^[68]开发CRISPR-SpRY工具, 通过以无PAM的方式实现DNA编辑, SpRY可以通过NHEJ在Dahurian落叶松原生质体和水稻转基因系中的松弛PAM位点实现高效的靶向诱变, 打破了

植物基因组工程中的PAM限制性屏障, 实现高效的靶向诱变。此外, Pan等人^[109]开发了一种基于单个Cas9蛋白的多功能CRISPR-Combo平台, 该系统依靠单个Cas9蛋白和工程化的gRNA来招募转录调节因子, 用于同时进行基因组编辑(靶向诱变或碱基编辑)和植物中的基因激活, 证明了通过激活杨树中的形态发生基因来加速基因组编辑植物的再生和繁殖。目前高通量测序技术已被广泛应用到各种检测分析中, 但是复杂的测序文库构建方法以及专业的生物信息学分析, 限制了二代测序技术在基因编辑检测领域的应用。Liu等人^[110]面向普通生物学实验室开发的Hi-TOM突变鉴定方法只需两步简单的PCR, 即可完成多样本混合测序文库的构建, 且在得到测序数据后, 只需要将数据上传至在线分析网站就可获得每个样品及每个靶位点的详细突变序列信息及其对应的基因型信息, 为基因组编辑突变鉴定提供了一种简单经济高效的策略。

3.4 无外源DNA污染的基因编辑

迄今为止, 几乎所有关于木本植物和克隆作物中进行的基因编辑都在内源基因组中存在外源DNA的插入的现象, CRISPR系统的表达盒渗入野生近缘种可能被视为潜在的风险, 在有性繁殖的植物中, T-DNA可以通过孟德尔分离消除, 但在童期较长的木本植物中难以在短期内通过分离后代获得无DNA插入的基因编辑植株。而目前市场对在生物中引入外源DNA的管控制度可能会极大限制转基因植物的商业应用, 因此获得DNA-free编辑的植株有望避免或减轻许多国家的监管负担, 并可能提高市场接受度^[111]。

近期一些CRISPR/Cas9的拓展应用打开了新局面。例如, 近期报道的利用微粒递送CRISPR系统为林木基因编辑提供了新的策略, 利用机械力将涂有基因编辑试剂的微粒输送到植物的体细胞胚胎中, 成功获得了DNA-Free基因编辑的银灰杨^[112]。其中3.0%基因编辑株系瞬时表达了CRISPR质粒, 但没有整合到植物基因组中, 效率比之前报道的苹果树中的瞬时转化策略高出10倍^[113]。但这种方法也可能会导致染色体重排, 这一点可能需要通过全基因组测序来排除。另外, 还有应用于BEs的SAFE系统。该系统不仅消除了与gRNA非依赖性的脱靶DNA/RNA编辑, 还减少了gRNA依赖性的脱靶编辑, 同时提高靶向编辑产物的纯度^[100]。

原生质体介导的瞬时转化在前文中提到其对于确定靶位点的效率有一定帮助。此外, 通过将RNP复合物

递送至原生质体中并诱变靶基因, 可在不引入外源DNA的情况下获得突变体, 目前率先在拟南芥、莴苣、水稻^[106]、烟草^[114]、马铃薯^[115]、野甘蓝和芸薹^[116]等多种作物中得到应用。近期, 在一些木本植物, 如葡萄树^[117]、橡胶树^[61]、苹果^[118]、板栗^[119]和松树^[50]中也通过使用RNP实现无外源DNA插入的基因组编辑。

病毒介导的递送可将目标基因传递给植物宿主并进行表达, 目前已在稳定表达植物蛋白方面有了一些应用^[120]。在双子叶植物中, 已有烟草环斑病毒(TRSV)、豆荚斑驳病毒(BPMV)、大豆花叶病毒(SMV)和黄瓜花叶病毒(CMV)被成功改造, 以便产生重组蛋白质^[121~124]。新型的递送载体, 如病毒样颗粒(VLP), 具有包膜和衣壳, 但不具有病毒基因组, 也被开发用于DNA递送^[125]。基于上述原理, 开发病毒介导的基因编辑系统也将成为一种趋势。此外, 纳米载体, 包括无机材料、脂质、聚合物或碳基纳米载体, 以及基于DNA的纳米结构, 已用于将CRISPR/Cas复合物递送到细胞中^[22]。与传统方法相比, 这些系统具有改善生物相容性、降低毒性、增强稳定性细胞和组织特异性递送, 以及刺激响应激活CRISPR/Cas核酸酶潜力等方面的优势。最近, 通过纳米载体携带DNA, 已在烟草、棉花细胞中初步实现无需转基因整合的基因组编辑, 但在木本植物中的应用仍待探索。

另外, 还可通过嫁接的方式绕过传统遗传转化方式获得转基因系。TLS(tRNA-like structure)作为一个信号, 可以实现从根到地上部的长距离移动。利用这一特点, Zaman等人^[126]用CRISPR-RNA即CRISPR/Cas9基因技术以RNA的形式, 从转基因砧木运输到未修饰的接穗的远端部分, 使靶基因在接穗处实现可遗传编辑, 绕过了组织培养转化的限制, 在扩大基因编辑应用领域有重大意义。

3.5 其他基因组编辑技术的应用潜力

现阶段基于CRISPR/Cas系统衍生的CRISPR/Cas13系统、CRISPR/Cas14系统、引导编辑器等技术在木本植物中应用报道较少, 拓宽这些新技术在木本植物上的应用, 将为木本植物遗传改良提供更多可能性。

与传统的RNAi技术相比, Cas13脱靶率较低, 但是CRISPR/Cas13对基因组不进行编辑, 因此可绕过DNA双链互补带来的修复机制, 调节RNA以改变靶基因的

表达或对RNA的化学修饰,如N⁶-甲基腺嘌呤(m⁶A)、N¹-甲基腺嘌呤(m¹A)、5-甲基胞嘧啶(m⁵C)、5-羟甲基胞嘧啶(hm⁵C)等修饰,这些修饰可以通过影响RNA的稳定性、翻译效率、可识别性等,进而影响基因的转录表达,调控植株的生长过程,并导致植株产生可遗传的表型变化。

CRISPR/Cas14a的主要优点是不需要任何限制性序列来靶向和切割单链DNA, ssDNA病毒基因组中的几乎任何序列都可以被精准地靶向,因此是引导切割ssDNA病毒的理想工具。CRISPR/Cas14a可能通过大量地切割ssDNA病毒控制流行病、保护植物免受病毒的侵害。

PE系统在水稻等农作物育种中目前已取得了一些研究进展,尤其是抗除草剂种质的创造^[127],但是该编辑系统的编辑效率较低且不稳定。Anzalone等人^[34]最近在哺乳动物细胞中开发的twin-PE系统解决了编辑效

率低的问题,但是植物中该技术的编辑效率低于哺乳动物细胞,由于植物和动物细胞通过DNA修复的方式存在差异,因此一些动物中的研究在植物中不适用,这对该系统在植物中发展应用具有局限性,尤其在木本植物中关于该系统的研究更少,因此在未来研究人员通过对PE系统的不断优化可能会成为在已知位点进行定点突变和在未知位点产生新突变的首选工具^[128]。

综上所述,基因编辑器为木本植物性状改良提供了新的可能性。通过这一技术,可大幅改变木本植物生长、抗性、品质等相关性状。然而在应用基因编辑技术时,需要谨慎考虑相关法律法规的约束,重视其可能带来的长期影响和潜在风险,以确保可持续发展及应用。此外,本文探讨的在木本植物中提高编辑效率和安全性的递送方法,亟待科研人员进一步开发及完善,并拓展其应用潜力,期望以此手段为加速木本植物性状改良提供参考价值。

参考文献

- 1 Savadi S, Mangalassery S, Sandesh M S. Advances in genomics and genome editing for breeding next generation of fruit and nut crops. *Genomics*, 2021, 113: 3718–3734
- 2 Yin K, Gao C, Qiu J L. Progress and prospects in plant genome editing. *Nat Plants*, 2017, 3: 17107
- 3 Ma X, Zhang Q, Zhu Q, et al. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Mol Plant*, 2015, 8: 1274–1284
- 4 Sharma S, Kaur R, Singh A. Recent advances in CRISPR/Cas mediated genome editing for crop improvement. *Plant Biotechnol Rep*, 2017, 11: 193–207
- 5 Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337: 816–821
- 6 An Y, Geng Y, Yao J, et al. Efficient genome editing in *Populus* using CRISPR/Cas12a. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 593938
- 7 Bruegmann T, Deecke K, Fladung M. Evaluating the efficiency of gRNAs in CRISPR/Cas9 mediated genome editing in poplars. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 3623
- 8 Grattapaglia D, Silva-Junior O B, Resende R T, et al. Quantitative genetics and genomics converge to accelerate forest tree breeding. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 1693
- 9 Fan D, Liu T, Li C, et al. Efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Populus* in the first generation. *Sci Rep*, 2015, 5: 12217
- 10 Cong L, Ran F A, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339: 819–823
- 11 Richter H, Randau L, Plagens A. Exploiting CRISPR/Cas: Interference mechanisms and applications. *Int J Mol Sci*, 2013, 14: 14518–14531
- 12 Koonin E V, Makarova K S. CRISPR-Cas. *RNA Biol*, 2013, 10: 679–686
- 13 Koonin E V, Makarova K S, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol*, 2017, 37: 67–78
- 14 Mackon E, Jeazet Dongho Epse Mackon G C, Guo Y, et al. Development and application of CRISPR/Cas9 to improve anthocyanin pigmentation in plants: Opportunities and perspectives. *Plant Sci*, 2023, 333: 111746
- 15 Walsh R M, Hochedlinger K. A variant CRISPR-Cas9 system adds versatility to genome engineering. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 15514–15515
- 16 Manghwar H, Lindsey K, Zhang X, et al. CRISPR/Cas system: Recent advances and future prospects for genome editing. *Trends Plant Sci*, 2019, 24: 1102–1125
- 17 Yamano T, Nishimasu H, Zetsche B, et al. Crystal structure of Cpf1 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 2016, 165: 949–962
- 18 Wu F, Qiao X, Zhao Y, et al. Targeted mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using CRISPR-Cas12b/C2c1. *J Integr Plant Biol*, 2020, 62: 1653–1658

- 19 Teng F, Cui T, Feng G, et al. Repurposing CRISPR-Cas12b for mammalian genome engineering. *Cell Discov*, 2018, 4: 63
- 20 Khan M Z, Haider S, Mansoor S, et al. Targeting plant ssDNA viruses with engineered miniature CRISPR-Cas14a. *Trends Biotechnol*, 2019, 37: 800–804
- 21 Abudayyeh O O, Gootenberg J S, Essletzbichler P, et al. RNA targeting with CRISPR–Cas13. *Nature*, 2017, 550: 280–284
- 22 Chowdhry R, Lu S Z, Lee S, et al. Enhancing CRISPR/Cas systems with nanotechnology. *Trends Biotechnol*, 2023, 41: 1549–1564
- 23 Aman R, Ali Z, Butt H, et al. RNA virus interference via CRISPR/Cas13a system in plants. *Genome Biol*, 2018, 19: 1
- 24 Barrangou R, Gersbach C A. Expanding the CRISPR toolbox: Targeting RNA with Cas13b. *Mol Cell*, 2017, 65: 582–584
- 25 Gupta R, Ghosh A, Chakravarti R, et al. Cas13d: A new molecular scissor for transcriptome engineering. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 866800
- 26 Xu C, Zhou Y, Xiao Q, et al. Programmable RNA editing with compact CRISPR–Cas13 systems from uncultivated microbes. *Nat Methods*, 2021, 18: 499–506
- 27 Cheng H, Hao M, Ding B, et al. Base editing with high efficiency in allotetraploid oilseed rape by A3A-PBE system. *Plant Biotechnol J*, 2020, 19: 87–97
- 28 Hua K, Tao X, Zhu J K. Expanding the base editing scope in rice by using Cas9 variants. *Plant Biotechnol J*, 2018, 17: 499–504
- 29 Gaudelli N M, Komor A C, Rees H A, et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 2017, 551: 464–471
- 30 Zhao D, Li J, Li S, et al. Glycosylase base editors enable C-to-A and C-to-G base changes. *Nat Biotechnol*, 2020, 39: 35–40
- 31 Liu Z, Chen M, Chen S, et al. Highly efficient RNA-guided base editing in rabbit. *Nat Commun*, 2018, 9: 2717
- 32 Tingting L, Jinpeng Z, Xi Y, et al. Development and application of prime editing in plants. *Rice Sci*, 2023, 30: 509–522
- 33 Hua K, Jiang Y, Tao X, et al. Precision genome engineering in rice using prime editing system. *Plant Biotechnol J*, 2020, 18: 2167–2169
- 34 Anzalone A V, Randolph P B, Davis J R, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 2019, 576: 149–157
- 35 Lin Q, Zong Y, Xue C, et al. Prime genome editing in rice and wheat. *Nat Biotechnol*, 2020, 38: 582–585
- 36 An Y, Geng Y, Yao J, et al. An improved CRISPR/Cas9 system for genome editing in *Populus* by using mannopine synthase (MAS) promoter. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 703546
- 37 Yuan G, Liu Y, Yao T, et al. eYGFPuv-assisted transgenic selection in *Populus deltoides* WV94 and multiplex genome editing in protoplasts of *P. trichocarpa* × *P. deltoides* Clone ‘52-225’. *Plants*, 2023, 12: 1657
- 38 Sretenovic S, Liu S, Li G, et al. Exploring C-To-G base editing in rice, tomato, and poplar. *Front Genome Ed*, 2021, 3: 756766
- 39 Su H, Wang Y, Xu J, et al. Generation of the transgene-free canker-resistant *Citrus sinensis* using Cas12a/crRNA ribonucleoprotein in the T0 generation. *Nat Commun*, 2023, 14: 3957
- 40 Zhu C, Zheng X, Huang Y, et al. Genome sequencing and CRISPR/Cas9 gene editing of an early flowering mini-Citrus (*Fortunella hindsii*). *Plant Biotechnol J*, 2019, 17: 2199–2210
- 41 Walawage S L, Zaini P A, Mubarik M S, et al. Deploying genome editing tools for dissecting the biology of nut trees. *Front Sustain Food Syst*, 2019, 3: 100
- 42 Pavese V, Moglia A, Corredora E, et al. First report of CRISPR/Cas9 gene editing in *Castanea sativa* Mill. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 728516
- 43 Zhang Y, Zhou P, Bozorov T A, et al. Application of CRISPR/Cas9 technology in wild apple (*Malus sieversii*) for paired sites gene editing. *Plant Methods*, 2021, 17: 79
- 44 Huang B, Zhuo R, Fan H, et al. An efficient genetic transformation and CRISPR/Cas9-based genome editing system for moso bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Front Plant Sci*, 2022, 13: 822022
- 45 Ye S, Chen G, Kohnen M V, et al. Robust CRISPR/Cas9 mediated genome editing and its application in manipulating plant height in the first generation of hexaploid Ma bamboo (*Dendrocalamus latiflorus* Munro). *Plant Biotechnol J*, 2020, 18: 1501–1503
- 46 Xie Z, Gui J, Zhong Y, et al. Screening genome-editing knockouts reveals the receptor-like kinase *ASX* role in regulations of secondary xylem development in *Populus*. *New Phytol*, 2023, 238: 1972–1985
- 47 Muhr M, Paulat M, Awwanah M, et al. CRISPR/Cas9-mediated knockout of *Populus BRANCHED1* and *BRANCHED2* orthologs reveals a major function in bud outgrowth control. *Tree Physiol*, 2018, 38: 1588–1597
- 48 Maurya J P, Singh R K, Miskolczi P C, et al. Branching regulator *BRC1* mediates photoperiodic control of seasonal growth in hybrid aspen. *Curr Biol*, 2020, 30: 122–126.e2
- 49 Fan C, Yu H, Qin S, et al. Brassinosteroid overproduction improves lignocellulose quantity and quality to maximize bioethanol yield under green-like biomass process in transgenic poplar. *Biotechnol Biofuels*, 2020, 13: 9
- 50 Poovaiah C, Phillips L, Geddes B, et al. Genome editing with CRISPR/Cas9 in *Pinus radiata* (D. Don). *BMC Plant Biol*, 2021, 21: 363
- 51 Bewg W P, Harding S A, Engle N L, et al. Multiplex knockout of trichome-regulating MYB duplicates in hybrid poplar using a single gRNA. *Plant Physiol*, 2022, 189: 516–526

- 52 Dai X, Yang X, Wang C, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing in *Hevea brasiliensis*. *Industr Crops Products*, 2021, 164: 113418
- 53 de Vries L, Brouckaert M, Chanoca A, et al. CRISPR-Cas9 editing of CAFFEYOYL SHIKIMATE ESTERASE 1 and 2 shows their importance and partial redundancy in lignification in *Populus tremula* × *P. alba*. *Plant Biotechnol J*, 2021, 19: 2221–2234
- 54 André D, Marcon A, Lee K C, et al. *FLOWERING LOCUS T* paralogs control the annual growth cycle in *Populus* trees. *Curr Biol*, 2022, 32: 2988–2996.e4
- 55 Triozzi P M, Schmidt H W, Dervinis C, et al. Simple, efficient and open-source CRISPR/Cas9 strategy for multi-site genome editing in *Populus tremula* × *alba*. *Tree Physiol*, 2021, 41: 2216–2227
- 56 Dai X, Zhai R, Lin J, et al. Cell-type-specific *PtrWOX4a* and *PtrVCS2* form a regulatory nexus with a histone modification system for stem cambium development in *Populus trichocarpa*. *Nat Plants*, 2023, 9: 96–111
- 57 Zhen C, Hua X, Jiang X, et al. Cas9/gRNA-mediated mutations in *PtrFLA40* and *PtrFLA45* reveal redundant roles in modulating wood cell size and SCW synthesis in poplar. *Int J Mol Sci*, 2022, 24: 427
- 58 Wang C, Liu N, Geng Z, et al. Integrated transcriptome and proteome analysis reveals brassinosteroid-mediated regulation of cambium initiation and patterning in woody stem. *Hortic Res*, 2022, 9: uhab048
- 59 Li H, Sun H, Dong H, et al. Genome editing of apple *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 6* enhances adventitious shoot regeneration. *Plant Physiol*, 2023, 191: 840–843
- 60 Chang Y, Song X, Zhang Q, et al. Robust CRISPR/Cas9 mediated gene editing of *JrWOX11* manipulated adventitious rooting and vegetative growth in a nut tree species of walnut. *Sci Hortic*, 2022, 303: 111199
- 61 Fan Y, Xin S, Dai X, et al. Efficient genome editing of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) protoplasts using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. *Industr Crops Products*, 2020, 146: 112146
- 62 Yao T, Yuan G, Lu H, et al. CRISPR/Cas9-based gene activation and base editing in *Populus*. *Hortic Res*, 2023, 10: uhad085
- 63 Li S, Lin Y C J, Wang P, et al. The AREB1 transcription factor influences histone acetylation to regulate drought responses and tolerance in *Populus trichocarpa*. *Plant Cell*, 2019, 31: 663–686
- 64 Zhou Y, Zhang Y, Wang X, et al. Root-specific NF-Y family transcription factor, *PdNF-YB21*, positively regulates root growth and drought resistance by abscisic acid-mediated indoleacetic acid transport in *Populus*. *New Phytol*, 2020, 227: 407–426
- 65 Harding S A, Tuma T T, Aulakh K, et al. Tonoplast sucrose trafficking modulates starch utilization and water deficit behavior in poplar leaves. *Plant Cell Physiol*, 2022, 63: 1117–1129
- 66 Yang X, Wang J, Sun X, et al. A method for generating genome edited plant lines from CRISPR-transformed Shanxin poplar plants. *Plant Sci*, 2023, 333: 111732
- 67 Huang X, Wang Y, Wang N. Base editors for citrus gene editing. *Front Genome Ed*, 2022, 4: 852867
- 68 Ren Q, Sretenovic S, Liu S, et al. PAM-less plant genome editing using a CRISPR–SpRY toolbox. *Nat Plants*, 2021, 7: 25–33
- 69 Zhang T, Zhang W, Ding C, et al. A breeding strategy for improving drought and salt tolerance of poplar based on CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol J*, 2023, 21: 2160–2162
- 70 Bai Q, Niu Z, Chen Q, et al. The C₂ H₂-type zinc finger transcription factor OSIC1 positively regulates stomatal closure under osmotic stress in poplar. *Plant Biotechnol J*, 2023, 21: 943–960
- 71 Jia H, Zhang Y, Orbović V, et al. Genome editing of the disease susceptibility gene *CsLOB1* in citrus confers resistance to citrus canker. *Plant Biotechnol J*, 2017, 15: 817–823
- 72 Jia H, Zou X, Orbovic V, et al. Genome editing in citrus tree with CRISPR/Cas9. *Methods Mol Biol*, 2019, 1917: 235–241
- 73 Zhou X, Jacobs T B, Xue L J, et al. Exploiting SNPs for biallelic CRISPR mutations in the outcrossing woody perennial *Populus* reveals 4-coumarate:CoA ligase specificity and redundancy. *New Phytol*, 2015, 208: 298–301
- 74 Yang L, Zhao X, Ran L, et al. *PtoMYB156* is involved in negative regulation of phenylpropanoid metabolism and secondary cell wall biosynthesis during wood formation in poplar. *Sci Rep*, 2017, 7: 41209
- 75 Li G, Sretenovic S, Eisenstein E, et al. Highly efficient C-to-T and A-to-G base editing in a *Populus* hybrid. *Plant Biotechnol J*, 2021, 19: 1086–1088
- 76 Liu B, Liu J, Yu J, et al. Transcriptional reprogramming of xylem cell wall biosynthesis in tension wood. *Plant Physiol*, 2021, 186: 250–269
- 77 Nayeri S, Baghban Kohnehrouz B, AhmadiKhah A, et al. CRISPR/Cas9-mediated P-CR domain-specific engineering of CESA4 heterodimerization capacity alters cell wall architecture and improves saccharification efficiency in poplar. *Plant Biotechnol J*, 2022, 20: 1197–1212
- 78 Wang X, Shao C, Liu L, et al. *PtrDJIC*, an atypical member of the DJ-1 superfamily, is essential for early chloroplast development and lignin deposition in poplar. *Hortic Plant J*, 2023, 9: 1039–1054
- 79 He H, Song X Q, Jiang C, et al. The role of senescence-associated gene101 (*PagSAG101a*) in the regulation of secondary xylem formation in poplar. *J Integr Plant Biol*, 2022, 64: 73–86

- 80 Xu W, Cheng H, Zhu S, et al. Functional understanding of secondary cell wall cellulose synthases in *Populus trichocarpa* via the Cas9/gRNA-induced gene knockouts. *New Phytol*, 2021, 231: 1478–1495
- 81 Zhao X W, Wang Q, Wang D, et al. *PagERF81* regulates lignin biosynthesis and xylem cell differentiation in poplar. *J Integr Plant Biol*, 2023, 65: 1134–1146
- 82 Qin S, Fan C, Li X, et al. LACCASE14 is required for the deposition of guaiacyl lignin and affects cell wall digestibility in poplar. *Biotechnol Biofuels*, 2020, 13: 197
- 83 Guo Y, Wang S, Yu K, et al. Manipulating microRNA *miR408* enhances both biomass yield and saccharification efficiency in poplar. *Nat Commun*, 2023, 14: 4285
- 84 Zhao Y, Yu X, Lam P Y, et al. Monolignol acyltransferase for lignin p-hydroxybenzoylation in *Populus*. *Nat Plants*, 2021, 7: 1288–1300
- 85 Takata N, Awano T, Nakata M T, et al. *Populus NST/SND* orthologs are key regulators of secondary cell wall formation in wood fibers, phloem fibers and xylem ray parenchyma cells. *Tree Physiol*, 2019, 39: 514–525
- 86 Dai Y, Hu G, Dupas A, et al. Implementing the CRISPR/Cas9 technology in eucalyptus hairy roots using wood-related genes. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 3408
- 87 Wang L, Ran L, Hou Y, et al. The transcription factor MYB115 contributes to the regulation of proanthocyanidin biosynthesis and enhances fungal resistance in poplar. *New Phytol*, 2017, 215: 351–367
- 88 Liu Y, Ma D, Constabel C P. CRISPR/Cas9 disruption of *MYB134* and *MYB115* in transgenic poplar leads to differential reduction of proanthocyanidin synthesis in roots and leaves. *Plant Cell Physiol*, 2023, 64: 1189–1203
- 89 Fan D, Wang X, Tang X, et al. Histone H3K9 demethylase JM125 epigenetically modulates anthocyanin biosynthesis in poplar. *Plant J*, 2018, 96: 1121–1136
- 90 Ming M, Long H, Ye Z, et al. Highly efficient CRISPR systems for loss-of-function and gain-of-function research in pear calli. *Hortic Res*, 2022, 9: uhac148
- 91 Wang S, Wang G, Li H, et al. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of embryogenic callus and CRISPR/Cas9-mediated genome editing in ‘Feizixiao’ litchi. *Hortic Plant J*, 2023, 9: 947–957
- 92 Fellenberg C, Corea O, Yan L H, et al. Discovery of salicyl benzoate UDP-glycosyltransferase, a central enzyme in poplar salicinoid phenolic glycoside biosynthesis. *Plant J*, 2020, 102: 99–115
- 93 Gordon H, Fellenberg C, Lackus N D, et al. CRISPR/Cas9 disruption of *UGT71L1* in poplar connects salicinoid and salicylic acid metabolism and alters growth and morphology. *Plant Cell*, 2022, 34: 2925–2947
- 94 Chang L, Wu S, Tian L. Effective genome editing and identification of a regiospecific gallic acid 4-O-glycosyltransferase in pomegranate (*Punica granatum* L.). *Hortic Res*, 2019, 6: 123
- 95 Huang Y, He J, Xu Y, et al. Pangenome analysis provides insight into the evolution of the orange subfamily and a key gene for citric acid accumulation in citrus fruits. *Nat Genet*, 2023, 55: 1964–1975
- 96 Nishitani C, Hirai N, Komori S, et al. Efficient genome editing in apple using a CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*, 2016, 6: 31481
- 97 Sulis D B, Jiang X, Yang C, et al. Multiplex CRISPR editing of wood for sustainable fiber production. *Science*, 2023, 381: 216–221
- 98 Tang X, Zhang Y. Beyond knockouts: Fine-tuning regulation of gene expression in plants with CRISPR-Cas-based promoter editing. *New Phytol*, 2023, 239: 868–874
- 99 Xu R, Kong F, Qin R, et al. Development of an efficient plant dual cytosine and adenine editor. *J Integr Plant Biol*, 2021, 63: 1600–1605
- 100 Xiong X, Liu K, Li Z, et al. Split complementation of base editors to minimize off-target edits. *Nat Plants*, 2023, 9: 1832–1847
- 101 Mookkan M, Nelson-Vasilchik K, Hague J, et al. Selectable marker independent transformation of recalcitrant maize inbred B73 and sorghum P898012 mediated by morphogenic regulators *BABY BOOM* and *WUSCHEL2*. *Plant Cell Rep*, 2017, 36: 1477–1491
- 102 Wang K, Shi L, Liang X, et al. The gene *TaWOX5* overcomes genotype dependency in wheat genetic transformation. *Nat Plants*, 2022, 8: 110–117
- 103 Debernardi J M, Tricoli D M, Ercoli M F, et al. A GRF–GIF chimeric protein improves the regeneration efficiency of transgenic plants. *Nat Biotechnol*, 2020, 38: 1274–1279
- 104 Kong J, Martin-Ortigosa S, Finer J, et al. Overexpression of the transcription factor *GROWTH-REGULATING FACTOR5* improves transformation of dicot and monocot species. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 572319
- 105 Cao X, Xie H, Song M, et al. Cut–dip–budding delivery system enables genetic modifications in plants without tissue culture. *Innovation*, 2023, 4: 100345
- 106 Woo J W, Kim J, Kwon S I, et al. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 1162–1164
- 107 Doench J G, Fusi N, Sullender M, et al. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 184–191
- 108 Xue L J, Alabady M S, Mohebbi M, et al. Exploiting genome variation to improve next-generation sequencing data analysis and genome editing

- efficiency in *Populus tremula* × *alba* 717-1B4. *Tree Genet Genomes*, 2015, 11: 82
- 109 Pan C, Li G, Malzahn A A, et al. Boosting plant genome editing with a versatile CRISPR-Combo system. *Nat Plants*, 2022, 8: 513–525
- 110 Liu Q, Wang C, Jiao X, et al. Hi-TOM: A platform for high-throughput tracking of mutations induced by CRISPR/Cas systems. *Sci China Life Sci*, 2019, 62: 1–7
- 111 Goraloglia G S, Redick T P, Strauss S H. Gene editing in tree and clonal crops: Progress and challenges. *In Vitro CellDevBiol-Plant*, 2021, 57: 683–699
- 112 Hoengenaert L, Van Doorselaere J, Vanholme R, et al. Microparticle-mediated CRISPR DNA delivery for genome editing in poplar. *Front Plant Sci*, 2023, 14: 1286663
- 113 Charrier A, Vergne E, Dousset N, et al. Efficient targeted mutagenesis in apple and first time edition of pear using the CRISPR-Cas9 system. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 40
- 114 Lin C S, Hsu C T, Yang L H, et al. Application of protoplast technology to CRISPR/Cas9 mutagenesis: From single-cell mutation detection to mutant plant regeneration. *Plant Biotechnol J*, 2018, 16: 1295–1310
- 115 Andersson M, Turesson H, Nicolia A, et al. Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Rep*, 2017, 36: 117–128
- 116 Murovec J, Guček K, Bohanec B, et al. DNA-Free genome editing of *Brassica oleracea* and *B. rapa* protoplasts using CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein Complexes. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 1594
- 117 Malnoy M, Viola R, Jung M H, et al. DNA-free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1904
- 118 Osakabe Y, Liang Z, Ren C, et al. CRISPR–Cas9-mediated genome editing in apple and grapevine. *Nat Protoc*, 2018, 13: 2844–2863
- 119 Pavese V, Moglia A, Abbà S, et al. First report on genome editing via ribonucleoprotein (RNP) in *Castanea sativa* Mill.. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 5762
- 120 Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S. Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Curr Opin Biotechnol*, 2007, 18: 134–141
- 121 Zhang C, Ghabrial S A. Development of Bean pod mottle virus-based vectors for stable protein expression and sequence-specific virus-induced gene silencing in soybean. *Virology*, 2006, 344: 401–411
- 122 Seo J K, Lee H G, Kim K H. Systemic gene delivery into soybean by simple rub-inoculation with plasmid DNA of a soybean mosaic virus-based vector. *Arch Virol*, 2009, 154: 87–99
- 123 Fang L, Wei X Y, Liu L Z, et al. A tobacco ringspot virus-based vector system for gene and microRNA function studies in cucurbits. *Plant Physiol*, 2021, 186: 853–864
- 124 Matsuo K, Hong J S, Tabayashi N, et al. Development of *Cucumber mosaic virus* as a vector modifiable for different host species to produce therapeutic proteins. *Planta*, 2007, 225: 277–286
- 125 Roos W H, Ivanovska I L, Evilevitch A, et al. Viral capsids: Mechanical characteristics, genome packaging and delivery mechanisms. *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64: 1484
- 126 Zaman Q U, Raza A, Gill R A, et al. New possibilities for trait improvement via mobile CRISPR-RNA. *Trends Biotechnol*, 2023, 41: 1335–1338
- 127 Jiang Y, Chai Y, Qiao D, et al. Optimized prime editing efficiently generates glyphosate-resistant rice plants carrying homozygous TAP-IVS mutation in EPSPS. *Mol Plant*, 2022, 15: 1646–1649
- 128 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

补充材料

表S1 CRISPR/Cas基因组编辑技术在木本植物性状改良中的应用

本文以上补充材料见网络版csb.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

Summary for “CRISPR/Cas基因组编辑在木本植物性状改良中的应用”

Application of CRISPR/Cas genome editing in woody plant trait improvement

Xuening Yuan[†], Fengge Yao[†], Yi An, Cheng Jiang, Ningning Chen, Lichao Huang, Mengzhu Lu & Jin Zhang^{*}

State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, College of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, China

[†] Equally contributed to this work

^{*} Corresponding author, E-mail: zhangj@zafu.edu.cn

CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) is a system found in bacteria and archaea that functions as an immune defense mechanism against foreign DNA or RNA. Due to its ability to edit specific target genes within the genome using RNA-guided Cas nucleases, CRISPR has become a valuable tool in genome research and genome modification. Forests play a crucial role in various ecological functions, including soil and water conservation, regulation of climate, prevention of wind and sand erosion, and pollution removal. Additionally, they provide abundant raw materials for human production activities, making them vital for promoting sustainable development in agriculture and forestry economies. However, woody plants face challenges such as inbreeding depression due to their long reproductive periods and generation cycles spanning several decades. With the rapid development of molecular breeding technology, the application of genome editing-driven molecular design breeding offers a promising approach to improve the genetics of woody plants. The CRISPR genome editing system provides opportunities to expedite the improvement of woody plant traits. By manipulating the genes related to growth and disease resistance, it is possible to cultivate woody plant varieties that can better adapt to diverse environmental conditions. This, in turn, enhances growth rates, stress resistance, and quality characteristics of woody plants. This review introduces several CRISPR/Cas system genome editing technologies applicable to woody plants, including Cas9, Cas12a, Cas13, Cas14a, base editors, and prime editors. Furthermore, this review summarizes the latest advancements in applying CRISPR/Cas genome editing systems for single gene editing in woody plants, focusing on their impact on growth, development, stress resistance, and wood or fruit quality. The potential applications of other emerging technologies, such as multi-gene editing, promoter editing, base editing, and dCas9-based activation, in improving woody plant traits are also discussed. Additionally, challenges associated with woody plant genome editing technology, such as incomplete genetic transformation systems, chimeras, off-target effects, and the risk of foreign DNA contamination in transgenic lines, are addressed along with potential solutions. While gene technology holds immense potential for enhancing woody plant genetics, it also raises concerns regarding human health and biodiversity. Therefore, comprehensive research and evaluation are necessary to ensure the safety and sustainability of gene technology in the genetic improvement of woody plants. Finally, this review presents an outlook on the potential applications of new genome editors like CRISPR/Cas13, and CRISPR/Cas14a and PE in the genetic enhancement of woody plants, aiming to provide insights for molecular design breeding efforts. In conclusion, the utilization of genome editing technology for improving woody plant genetics is a captivating field. With further advancements in science and technology, we anticipate the development of more innovative gene editors or improved delivery systems to enhance the performance of woody plants. This, in turn, will have a significant impact on enhancing key plant traits and laying the foundation for the sustainable development of forestry and horticulture.

woody species, trait improvement, genome editing, CRISPR/Cas system, base editors, prime editors

doi: [10.1360/TB-2023-1125](https://doi.org/10.1360/TB-2023-1125)