CRISPR/Cas介导的非转基因植物基因组编辑

高鸿烨, 冉取丙, 胡昕, 朱强*

福建农林大学林学院基础林学与蛋白质组学研究中心, 福州 350000

* 联系人, E-mail: zhuqiang@fafu.edu.cn

2020-09-03 收稿, 2020-10-20 修回, 2020-10-21 接受, 2020-10-22 网络版发表

国家自然科学基金(31870660)、国家重点研发计划(2018YFD0600102)、福建省教育厅科技创新团队项目(118/KLA18069A)和福建省科技厅林木种质资源创新项目(118/KLA18069A)资助

摘要 CRISPR/Cas介导的基因编辑系统已成为生命科学研究领域不可或缺的工具, 在植物基因组编辑方面也应用广泛. 传统的CRISPR/Cas编辑系统仍依赖于外源DNA整合于宿主植物的基因组, 属于传统转基因的范畴. 由于公众对转基因作物安全性的担心, 很多国家制定了针对转基因植物的严格监管政策, 使相关产品的应用受到了极大的限制. 如何在改造植物性状的同时, 消除外源基因插入的影响是科学家们要解决的重要问题. 近年来, 利用CRISPR系统创制DNA-free的植物基因编辑产品的技术应运而生, 得到了学术界的高度关注. 利用该系统在引发目的基因突变的同时, 没有外源DNA片段插入到植物基因组中, 因此可有效减低监管风险, 推动基因编辑作物的产业化应用推广. 本文对目前基于CRISPR/Cas系统进行DNA-free的植物基因编辑的研究进展进行了总结归纳, 包括DNA-free基因编辑技术的方法、在植物育种上的应用及前景展望等方面, 同时分析了目前该技术所存在的问题并提出改进建议. 本文将对这一领域的研究工作提供参考.

关键词 基因编辑, CRISPR, DNA-free, 植物, 遗传转化

转基因(genetically modified, GM)作为一项里程碑式的生物技术, 可以进行跨物种的基因挖掘和利用, 实现重要功能基因的定向转移, 赋予生物特定的性状, 满足人们的需要. 但是转基因技术所带来的问题也难以忽略, 比如: 植物基因组中外源DNA大片段的插入, 使植物特征的未知性大大增加; 转基因过程中外源DNA插入到植物基因组中的位点具有随机性, 无法精确控制而造成潜在风险; 外源插入片段很难彻底去除(如筛选标记基因等); 转基因技术无法对内源基因进行精准的操作等. 尽管学术界对转基因植物的安全性有一致的结论, 认为转基因食品并不会带来额外的健康风险, 也没有结论性证据表明转基因作物与环境变化之间存在因果关系^[1]. 但在中国的社会调查研究显示, 41.4%

和46.7%的普通公众对转基因植物的安全持中立和负面的看法^[2]. 世界上包括中国在内的多个国家制定了严格的监管政策, 致使转基因技术在植物育种应用中受到极大的限制. 因此, 开发新的基因操控技术, 在改良植物农艺性状的同时降低监管成本是科学家一直关注的研究热点. 近年来, 基因组编辑技术(genome editing)迅速发展, 为弥补转基因技术所存在的缺点提供了可能.

基因组编辑是一种高效且精准操纵靶基因的基因工程技术, 对于基因组复杂且难以通过常规育种方法改良的植物亦可适用^[3]. 基因编辑技术在近年日益成熟, 其中CRISPR/Cas介导的基因编辑系统被广泛应用, 通过将外源的DNA元件导入基因组并表达, 进行如敲

引用格式: 高鸿烨, 冉取丙, 胡昕, 等. CRISPR/Cas介导的非转基因植物基因组编辑. 科学通报, 2021, 66: 1408–1422

Gao H Y, Ran Q B, Hu X, et al. DNA-free genome editing (in Chinese). Chin Sci Bull, 2021, 66: 1408–1422, doi: [10.1360/TB-2020-0891](https://doi.org/10.1360/TB-2020-0891)

除特定基因、精准地插入或删除、基因激活或沉默等^[3,4]。传统的基因编辑技术仍需要外源DNA片段整合入基因组并发挥作用,无法规避转基因技术的缺憾。近年来,人们在此基础上研发了DNA-free的基因编辑技术,拓展了其应用范围。CRISPR/Cas介导的DNA-free的基因编辑技术无需转化的方法将CRISPR/Cas元件导入植物细胞,利用CRISPR/Cas系统对靶基因进行编辑,所获得的植物产品除了靶位点的修饰外,没有外源DNA片段被引入到植物基因组中;或者利用传统的CRISPR/Cas元件整合进植物基因组,进行植物基因编辑后,再通过自交或回交删除外源DNA片段。最终产品除了被编辑的靶位点外,没有额外的遗传修饰。这一技术被最早应用于拟南芥、烟草、水稻和莴苣4种植物的原生质体^[5],而后在玉米、小麦等物种中进一步地应用^[6,7]。该技术的出现将缓解公众对转基因或传统基因编辑技术的忧虑,有望加速其在经济林木遗传改良中的应用。本文将对基于CRISPR/Cas系统的DNA-free基因编辑技术相关的研究进行总结,并提出展望。

1 传统CRISPR/Cas植物基因组编辑简介及应用

CRISPR是原核生物基因组内的一段重复序列,参与细菌的免疫反应^[8]。CRISPR/Cas系统由两部分构成:规律成簇的短间隔重复(CRISPR)和CRISPR相关蛋白(Cas)。该系统发挥作用还需要gRNA(guide RNA)和基因序列上的PAM(proto-spacer adjacent motif)结构指引Cas蛋白发挥核酸内切酶作用。目前已知的Cas蛋白可分为两大类,第一大类包括I、III、IV型,第二大类包括II、V、VII型,均包含多种Cas蛋白^[9-11]。目前应用最广的Cas9属于II型系统。Cas9与单链引导RNA(single-guide RNA, sgRNA)发生结合后,其构象发生改变,在sgRNA的引导下,形成的复合体能够识别PAM(5'-NGG)位点并锚定到靶位点。在Cas蛋白核酸内切酶的作用下,在DNA靶位点产生精确的双链断裂(double-strand breaks, DSB),启动细胞的自我修复机制。在通过非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)或同源重组(homologous recombination, HR)途径进行修饰的过程中,对靶基因进行遗传修饰。

SpCas9是最常用的Cas9蛋白,其PAM识别序列是5'-NGG^[12,13],SaCas9则来自金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),其PAM识别序列是5'-NNGRRT或5'-NNGRR(N),相比于SpCas9,它的体积更小,但精确度

较差^[14]。FnCas9是Cas9家族中体积最大的成员之一, PAM识别序列为5'-YGG, FnCas9对NGG效率最高,对5'-NAG和5'-NGA同样也有一定活性^[15]。随着对Cas9结构功能的不断探究,研究者们陆续开发出Cas9变体:其中dCas9系统是将Cas9内切酶的RuvC1和HNH这两个核酸酶活性区域同时发生突变,导致无内切酶活性仅保留gRNA引导靶向基因组的能力^[16],被广泛应用于基因的激活、抑制、甲基化等调控^[17-19]。xCas9 3.7能识别更大范围的PAM序列,包括5'-NGG、5'-NG、5'-GAA和5'-GAT;且具有极其高的靶向特异性^[20]。Cas12a(Cpf1)为V-A型Cas蛋白,分子量相比于Cas9更小,因此更易进入细胞。Cas12a仅需CRISPR RNA(crRNA)便可进行工作,并且可切割DNA和RNA^[21,22]。Cas13a(C2c2)最主要的特点是Cas13a结合并切割RNA^[23,24]。2020年4月,被名为SpG和SpRY的两种新Cas9变体被发现,可识别更为广泛的PAM序列,允许以传统的CRISPR-Cas9酶无法达到的效率编辑DNA序列^[25]。2020年7月,科学家们又发现了一种“超小型”CRISPR酶——CasΦ^[26],其体积只有其他Cas蛋白的一半。CasΦ只有700~800个氨基酸,更有利于高效方便地导入到细胞中。这些Cas蛋白的发现,为将来创制DNA-free基因编辑材料提供了丰富的工具。

2013年8月, *Nature Biotechnology*首次同时报道3个不同实验室利用CRISPR/Cas系统在水稻、小麦、拟南芥、烟草中实现基因编辑^[27-29]。此后CRISPR/Cas系统迅速在植物基因组编辑领域中崛起。CRISPR系统在植物基因组编辑中主要有以下几方面作用:功能基因的敲除^[30]、外源基因的精确插入或替换^[31,32]、单碱基的编辑^[33,34]、基因的表达调控^[35]。CRISPR系统已经广泛应用于各种植物物种中,其中Cas9基因组编辑技术已经应用于多种植物中,包括拟南芥^[36]、烟草^[36]、高粱^[36]、水稻^[36]、玉米^[37]、小麦^[38]、番茄^[39]、土豆^[40]、黄瓜^[41]、柚子^[42]、杨树^[43]、西瓜^[44]、草莓^[45]、葡萄^[46]、苹果^[47]等。同时Cas9的突变体也逐渐应用于植物基因编辑,dCas9主要涉及基因的表达调控,目前在拟南芥、水稻、烟草中已经有该系统的应用^[16]。最近几年,Cas12a(Cpf1)系统也在多种植物基因组编辑方面得到广泛应用,如拟南芥^[48]、水稻^[48]、玉米^[48]、烟草^[49]、棉花^[21]、柑橘^[50]等。但是这些研究大多均需要将外源的CRISPR/Cas元件导入植物基因组中,以转基因的手段进行基因编辑。DNA-free基因编辑技术的出现,将获得无外源DNA存在的编辑突变体,使

基因编辑的产品更好地被应用于产业化。

2 CRISPR介导无外源DNA整合的植物基因组编辑的方法

2.1 DNA-free植物基因编辑技术优势

CRISPR/Cas基因组编辑系统在农林作物的分子设计育种中发挥了重要的作用。传统的植物基因组编辑大多依赖于利用农杆菌、基因枪介导等方式将CRISPR/Cas元件和选择标记表达框导入受体植物细胞,在选择性培养基中再生获得稳定整合的转基因植株,并对靶基因位点发生了稳定遗传修饰的植株进行鉴定。而DNA-free基因编辑技术的最终产品保留了靶基因修饰的同时,其基因组中没有任何外源基因的插入。同传统的CRISPR/Cas基因编辑手段相比,DNA-free的基因编辑技术有以下特点。

2.1.1 无外源DNA的整合

在传统植物基因组编辑中,外源的CRISPR/Cas元件及筛选标记基因以转基因的方式被导入到植物细胞,并被整合在宿主的染色体中。这种方式带来一系列潜在的风险,比如外源DNA整合入宿主基因组是随机的,插入的位点不可预测^[51]。因此,CRISPR的表达元件有可能插入到转录沉默区域,从而导致表达元件沉默或表达不稳定;插入的位点可能是调控植物生长、发育或重要农艺性状的基因区域,从而破坏这些重要的功

能基因^[52];插入的CRISPR元件持续表达,大大增加脱靶几率和未知风险;外源的筛选标记基因无法剔除,有可能产生基因逃逸,造成环境污染;转化过程可造成植物基因组和表观组发生非预期的改变或损伤等。利用这种方式进行的基因编辑属于转基因的范畴,生产应用中会严格受到政策监管。DNA-free的基因编辑技术体系则部分或完全规避了转基因技术所带来的风险,在最后的植物产品中没有任何外源DNA的插入,本质上与传统的诱变育种一样,更容易为大众所接受。

2.1.2 低脱靶率

CRISPR/Cas系统的靶向基因编辑特异性一直是研究者们所关注的,而且早期的研究报道表明,CRISPR/Cas9系统在植物基因组编辑中,脱靶突变的发生率非常低^[53]。脱靶的原因之一可能是CRISPR/Cas9的元件插入到基因组中持续表达并发挥作用,从而加大了脱靶的几率。DNA-free的植物基因组编辑最主要的方法是通过在植物体中瞬时表达CRISPR系统相关元件,当在发挥作用之后,相关的元件将在细胞内被降解,而被修饰的靶位点则保留并遗传。由于缺乏外源DNA片段的整合,CRISPR的元件并不能一直稳定地进行基因编辑,所以脱靶率也随之降低(表1)。根据Woo等人^[5]的报道,将CRISPR/Cas核糖核蛋白(CRISPR/Cas ribonucleoprotein, CRISPR/Cas RNP)递送至拟南芥、小麦、烟草的原生体中,通过检测多个可能的脱靶位点,并未发现有脱靶情况出现。同样, Kim等人^[54]使用的Cpf1 RNP递

表 1 CRISPR系统在植物中不同递送方式的比较^{a)}

Table 1 Comparison of different delivery methods of CRISPR systems in plants

对比	CRISPR/Cas系统			
	GM T-DNA	DNA	DNA-free mRNA	RNP
编辑效率	++	++	+	+++
脱靶率	+++	++	+	-
流程时间	较长	较短	较短	较短
外源DNA整合	是	是/否	否	否
Cas蛋白	所有	Cas9/Cas12a		
组分稳定性	+++	+++	+	++
设计复杂性	+++	+++	++	+
功能	插入、缺失、替换、基因的表达调控、功能基因的敲除、单碱基编辑		插入、缺失、功能基因的突变	
法律监管	严格监管		相对宽松,部分国家不监管	

a) “-”表示“低”;“+”表示“高”;“+”越多表示程度越高

送至大豆和烟草原生质体中进行靶向编辑,脱靶实验分析其脱靶效率,在13个候选脱靶点(OT)位点上测量和验证INDEL频率,并通过在CpfI RNP递送大豆原生质体中进行靶向深度测序进行验证。研究结果表明,在13个候选位点中都没有检测到突变。同时,在普通小麦中通过RNP技术进行基因组编辑时,对其进行脱靶率的研究分析^[55],对获得的28株突变体进行脱靶位点的分析,也均未检测到非靶位点的突变。这些研究结果证明,DNA-free的植物基因组编辑技术体系有利于降低基因打靶的脱靶效率(表1)。

2.1.3 部分国家的法律监管相对宽松

目前,多数国家对转基因植物的政策监管具有明确、针对性强且严格的政策法规。由于基因编辑技术是近几年新兴起来,对于基因组编辑产品的安全性及其监管政策仍然处于形成的过程中,不同国家关于基因组编辑产品的政策存在很大差别。但在多个国家,如阿根廷、日本、美国等,基因编辑产品的监管政策相对于转基因产品较为宽松,一般如果最终植物不含有基因编辑技术引入的外源DNA,将不受监管(表1)。比如2016年,宾夕法尼亚大学的杨亦农课题组^[56]利用CRISPR/Cas9编辑技术获得了抗褐变的双孢菇。因为该产品没有任何额外的外源DNA片段插入,因而该产品不需要通过法规机构的监管程序,成为了第一例得到美国政府许可直接进行种植和销售CRISPR基因组编辑产品。最近,美国农业部又豁免了一系列基因编辑产品^[57]。在我国,2016年李家洋课题组^[58]提出了基因组编辑技术的管理框架,倾向满足最终产品不含有外源基因片段且无脱靶效应等条件时,基因组编辑产品可以按照常规育种品种对待,不需要进行监管。因而DNA-free的基因编辑技术产生的最终产品更容易为国家政策和普通大众所接受,有利于这些产品的产业化。

2.2 植物中DNA-free的基因组编辑方法

DNA-free的基因编辑技术发展仅仅几年,但已经应用于多种植物的分子育种,目前主要是通过递送瞬时的CRISPR/Cas元件,直接产生不含外源DNA片段的最终产品;或者在产品前期引入Cas核酸酶等外源DNA,但通过自交或者回交手段,从编辑后代植株染色体中分离去除,使最终产品不含有转基因的成分。

2.2.1 通过杂交方式去除外源DNA

传统的CRISPR基因编辑技术是通过转基因的方式将CRISPR载体递送至植物体内,整合到基因组,并

表达CRISPR相关元件以发挥靶向编辑的能力。研究者们为了将整合入植物基因组中的外源DNA剔除,提出将获得的突变植株通过多次自交或是杂交获得子代,直至获得无外源DNA的突变植株的方法^[59-62]。

为了提高该方法的筛选效率,研究者通过在CRISPR载体中插入筛选标记来缩短筛选时间和节省人力财力。Gao等人^[60]将*mCherry*表达盒插入CRISPR/Cas9载体中,通过可视化的荧光筛选无外源DNA的突变植株。当载体整合入植物基因组时,强启动子At2S3控制之下的*mCherry*表达盒也会被整合入基因组中,获得的T0突变植株通过自交获得T1植株的种子根据荧光显微镜可以筛选出一组没有荧光的种子,即为无外源DNA的子代。这种荧光标记筛选方法促进了DNA-free植物的鉴定。分离DNA-free编辑植物的另一种策略是将CRISPR构建体与靶向抗除草剂P450酶的RNA干扰元件偶联。这种策略可以实现除草剂依赖性的无转基因植物的分离^[63]。以上两种筛选方法虽然促进了DNA-free编辑植株的鉴定,但在T2代中并未富集或增加无转基因植物的比例。He等人^[64]报道了一种新的筛选方法,该方法可以主动或自动消除含有CRISPR/Cas9构建体的植物,并且保留足够的时间为植物体中CRISPR/Cas9构建体进行靶向基因修饰。利用一对自杀基因,*BARNASE*和*CMS2*,可以有效杀死所有T0植物产生的含有CRISPR/Cas9的花粉和胚胎。该策略有效地消除所有T1植物中的CRISPR/Cas9转基因,大大减少了鉴定包含CRISPR/Cas9产生的目标突变的无转基因植物所需的人工和时间。尽管利用自交或回交的方式可将外源插入片段从编辑后代植株染色体中分离去除,但该过程仍然费时费力。在某些倍性复杂、育种周期长或无性繁殖的植物上,该方法的应用范围也被大大限制。

2.2.2 在植物中瞬时表达CRISPR相关元件

针对通过杂交手段去除外源基因编辑元件的缺点,研究者们提出通过在植物细胞通过无须转化的方式瞬时表达CRISPR相关元件,如表达纯化的Cas蛋白及sgRNA或转入对应的瞬时表达载体等方法,在T0代植株中即可通过筛选获得DNA-free的编辑植株。主要的策略有以下几种。

(i) PEG介导CRISPR/Cas元件在植物原生质体中瞬时表达。植物细胞不同于动物细胞,植物细胞最大不同在于存在一道天然的物理屏障——细胞壁,因此也决定了将生物大分子导入植物细胞必须采用与导入动

物细胞截然不同的策略^[6,65]。目前已报道的DNA-free植物基因组编辑的研究中,使用最多的递送策略是聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)介导的植物基因组编辑。先通过酶解消化细胞壁得到原生质体,然后通过PEG介导的原生质体转化将CRISPR瞬时表达元件导入植物原生质体中,并在原生质体中发挥CRISPR系统的靶向编辑能力。2015年, Woo研究团队^[5]首次通过PEG介导的方法将CRISPR/Cas9 RNP复合体导入拟南芥、烟草、生菜、水稻等原生质体中,酶解消化细胞壁获得各种植物的原生质体,在体外形成Cas9 RNP复合体,通过PEG介导的原生质体转化将其递送至原生质体中,同时靶向编辑植物基因组。该实验不仅靶向编辑了生菜*BIN2*基因(*BIN2*基因编码BR信号通路中的负调节因子),而且获得了再生植株以及子代植株。2017年, Kim等人^[54]则首次成功利用PEG介导的原生质体转化将CRISPR/Cpf1 RNP复合体导入大豆和烟草原生质体中,靶向突变了大豆的两个同源基因*FAD2-1A*和*FAD2-1B*,增加豆油中的油酸水平。该策略已在多种植物细胞中成功实现了CRISPR/Cas RNP介导的植物基因组编辑。但由于原生质体再生技术的限制,目前仅有生菜^[5]、马铃薯^[66]、苹果和葡萄^[67]等少数植物种类的原生质体可以再生获得完整的基因编辑植株,大多数植物仍处于原生质体的靶向编辑,还无法由原生质体再生成为完整植株。因此,也就很难通过原生质体得到DNA-free的基因组编辑的完整植物株系。最近的一项研究则将体外分离的水稻精细胞和卵细胞电击融合产生无细胞壁的合子,再以PEG介导将CRISPR/Cas RNP导入合子进行基因组编辑,被编辑的合子可继续发育成可稳定遗传的完整植株^[68],为利用DNA-free的基因编辑手段改良植物性状提供了一种新策略。

(ii) 脂质体转染介导CRISPR/Cas元件瞬时表达。脂质体转染介导的原生质体转化与PEG介导的原生质体转化相似。与PEG介导的方法不同的是,脂质体转染利用植物细胞膜自身特性以相对温和的方式进行外源物质的递送。相比PEG,其更加高效且对细胞的损害较小。脂质体以静电结合的方式包裹Cas RNP,通过细胞的胞吞作用递送至细胞内,更加契合细胞膜的特性,当递送至细胞体内脂质体自动解离,同时发挥RNP的作用,而包裹或吸附的脂质体则被细胞分解排出体外。Liu等人^[69]利用脂质体转染介导的原生质体转化将Cas9 RNP核糖蛋白复合体递送至烟草原生质中,并成功发挥CRISPR系统的功能进行靶向编辑。研究者利用

了Lipofectamine 3000和RNAiMAX等脂质体进行递送,并通过脂质体转染分析其转染效率。实验结果表明,其递送效率分别为66%和48%,研究者又通过靶向表达荧光蛋白的转基因烟草的原生质体,发现其靶向诱变效率为6%^[69]。

PEG介导和脂质体转染介导的原生质体转化的植物基因组编辑,已应用于多种植物物种的靶向基因编辑,都是以原生质体为转化宿主。但目前能够进行原生质体再生的物种较少,这两种方法在实际生产方面的应用受到了很大限制。

(iii) 基因枪介导CRISPR/Cas元件瞬时表达。基因枪主要是将生物大分子如DNA、蛋白质等,通过特定的方法包裹在微米甚至纳米级的金粉或钨粉微粒上,通过高压气体加速将其直接送入完整的植物愈伤组织或者细胞中的一种技术。也是目前将CRISPR/Cas瞬时表达元件导入植物细胞的常用方法之一。目前已有报道通过基因枪将CRISPR/Cas瞬时表达元件轰击到玉米^[6]、小麦^[55]、水稻^[70]等作物的幼胚或愈伤组织中,并且能够在6~9周内获得由CRISPR/Cas瞬时表达元件进行基因编辑的再生DNA-free完整植株^[6,55]。能够递送的CRISPR/Cas瞬时表达元件包括CRISPR/Cas RNP复合体; CRISPR/Cas瞬时表达载体和瞬时表达Cas9编码序列和指导RNA的体外转录本(*in vitro* transcripts, IVTs)这3种形式。

基因枪介导的RNP复合体递送至植物细胞方法主要是通过体外组装获得Cas RNP复合体,再通过金粉包裹形成复合物,作为基因枪递送的弹药,最后通过基因枪高压气体加速将弹药轰击到植物细胞中。目前已通过基因枪将RNP复合体轰击到小麦的幼胚或诱导的愈伤组织中。Liang等人^[55]设计sgRNA分别靶向小麦的*TaGW2*和*TaGASR7*基因,这一对基因分别与籽粒的粒重和粒长相关。研究者利用基因枪将靶向这一对基因的RNP复合体分别轰击小麦幼胚,并获得*TaGW2*和*TaGASR7*基因突变的DNA-free的编辑植株。Svitashev等人^[6]则是利用基因枪将RNP复合体轰击至玉米幼胚中,靶向玉米乙酰乳酸合酶基因(*ALS2*)和雄性育性基因(*MS26*、*MS45*),并分别获得了抗除草剂和雄性不育特性的DNA-free的基因编辑植株。该策略还通过基因枪将CRISPR/Cas瞬时表达载体轰击至小麦愈伤组织中,靶向突变小麦*TaGASR7*和*TaDEP1*基因,并通过诱导分化再生获得矮化表型的基因编辑植株,并且也能够将瞬时表达Cas9编码序列和指导RNA的体外转录本

(IVTs)通过基因枪的方法轰击至植物愈伤组织或细胞中,并发挥靶向编辑的能力^[7]。

(iv) 植物病毒介导的DNA-free植物基因编辑。植物病毒载体是一类新型的外源基因表达载体,具有表达水平高、繁殖速度快、易于纯化和保存等特点。目前,已有利用植物病毒介导基因编辑以创制DNA-free植物产品的相关报道。2015年,Voytas实验室^[71,72]利用TRV(tobacco rattle virus)病毒设计gRNA递送系统,设计PDS基因的靶向gRNA,通过TRV病毒递送系统将gRNA传递至过表达Cas9蛋白的烟草中,并且获得突变植株。也有研究发现,在烟草以及拟南芥中,通过豌豆早枯病毒(pea early-browning virus, PEBV)要比TRV病毒介导的CRISPR基因编辑效率要高^[73]。大麦条纹花叶病毒(barley stripe mosaic virus, BSMV)的gRNA传递系统也成功应用在小麦和玉米植物基因组编辑当中^[74]。也有研究利用表达sgRNA的RNA病毒感染Cas9转基因植物^[75]。通过设计sgRNA序列将其整合入RNA病毒中,使病毒侵染表达Cas9蛋白的转基因植物体,在植物体中形成完整的CRISPR体系,并发挥靶向编辑的功能。Cody等人^[76]利用烟草花叶病毒设计了一种同时表达多重sgRNA和过表达荧光蛋白的TRBO病毒载体,用于递送sgRNA至植物体中,获得过表达荧光蛋白的突变植株。2020年6月29日,李正和团队^[77]成功实现了将Cas9蛋白及sgRNA的RNA序列同时整合入RNA病毒中递送至植物细胞中。该研究利用一种负链RNA病毒(negative-strand RNA viruses, NSVs)载体系统向植物体内递送CRISPR/Cas9基因编辑器,并高效产生可稳定遗传的靶向基因编辑。将Cas9和gRNA序列插入到弹状病毒(Rhabdoviruses)SYNV基因的N基因和P基因之间,并且设计的gRNA靶向烟草的PDS基因,利用弹状病毒成功递送CRISPR系统至烟草体内,并且靶向编辑PDS基因,最后获得了白化表型的DNA-free再生植株。

植物病毒介导的基因编辑体系也在被不断地优化拓展。Flowering Locus T(FT)是调控植物开花最重要的基因,可以作为长距离信号从叶子移动到顶端分生组织^[78]。在表达sgRNA与FT复合体的TRV病毒介导下,FT携带sgRNA从叶片进入顶端分生组织,赋予了sgRNA递送至植物体特定的区域进行靶向编辑的能力^[75]。研究者们还设计了具有串联排列的tRNA-gRNA结构的合成基因,可在体内高效、精确地加工成具有引导能力的gRNA,从而指导Cas9靶向编辑多个基因位点^[79,80]。

2.2.3 基于位点特异性重组删除CRISPR元件,创制DNA-free基因编辑产品

传统的CRISPR/Cas基因编辑需要将相关元件整合进植物基因组中,利用标记基因删除技术,可以将编辑靶基因后的CRISPR/Cas元件删除,从而获取DNA-free的基因编辑产品。目前已经发展了多种标记基因删除的技术,如位点特异性重组、表达盒转化法、转座子法等^[81],其中Flippase/Flp recognition target(FLP/FRT)位点特异性重组系统被成功用于删除植物基因组中的CRISPR/Cas元件^[82]。FLP是一种重组酶,能够特异性的识别一段全长为48 bp的序列FRT,对靶位点进行删除、插入、倒位和易位等重组反应。当两个FRT位点位于同一条DNA链且同向排列时,在FLP重组酶的作用下,会导致两位点之间的DNA片段被切除^[83]。利用这一特殊的删除能力,将CRISPR元件与FLP/FRT系统相结合,在CRISPR表达元件的两端连接同向的FRT位点,并加入了热诱导型启动子用于控制FLP重组酶的表达。通过农杆菌介导的方法将该系统递送至植物细胞中,到CRISPR系统靶向基因编辑后,可通过热诱导的FLP/FRT系统将外源DNA删除,以此达到DNA-free的效果。Pompili等人^[82]通过构建CRISPR表达载体,并在CRISPR表达盒两侧设计了同向FRT位点,并加入热诱导型的FLP表达盒。该CRISPR系统靶向编辑苹果火疫病相关基因DIPM-4,获得含有CRISPR表达盒的突变体后,通过热击启动FLP/FRT系统删除CRISPR表达盒,最后获得无CRISPR表达盒的抗火疫病的苹果编辑植株。

2.3 DNA-free的基因组编辑技术在植物中的应用

在植物中进行DNA-free的基因组编辑相关技术的发展时间不足10年,但涉及的植物物种已有十几种,为将来更好地利用该技术进行植物分子育种及产业化奠定了理论与实践基础。我们总结了目前利用该技术在植物研究中的应用进展(表2)。

2.4 DNA-free植物基因编辑技术存在的问题

DNA-free植物基因编辑技术有突出的优势,但其中存在的一些问题也让研究者们十分关注,比如通过无须转化途径进行DNA-free基因编辑效率偏低、编辑类型单一、鉴定筛选困难等。

2.4.1 靶向编辑效率较低

与通过农杆菌介导的传统基因编辑技术不同,DNA-

表 2 NDA-free 的基因组编辑技术在植物研究中的应用^{a)}
Table 2 Application of DNA-free genome editing technology in plants

物种	细胞状态	元件	转化方法	编辑器	靶基因	编辑效率	是否获得再生植株	文献
烟草(<i>Nicotianatabacum</i> L.)	原生质体	蛋白	PEG	I-SceI	含有单个基因组I-SceI识别位点的突变体	7.70%	否	[84]
	原生质体	蛋白	PEG	TALENs	乙酰乳酸合酶基因(<i>NbALS2</i>)	1.40%	否	
生菜(<i>L. sativa</i>)	原生质体	RNP	PEG	Cas9	油菜素内酯信号途径负调控因子基因(brassinosteroid insensitive 2, <i>BIN2</i>)的同源基因	46%	是	
烟草(<i>Nicotiana tabacum</i> L.)	原生质体	RNP	PEG	Cas9	茉莉酸合成途径丙二烯氧化物环化酶基因(<i>allene oxide cyclase, AOC</i>)	44%	否	[5]
拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i> L. Heynh.)	原生质体	RNP	PEG	Cas9	光敏色素B基因(<i>phytochrome B, PHYB</i>)、油菜素内酯信号途径负调控因子基因(<i>brassinosteroid insensitive 1, BRI1</i>)	<i>PHYB</i> : 16%	否	
水稻(<i>O. sativa</i> cv. Dongjin)	原生质体	RNP	PEG	Cas9	细胞色素基因 <i>P450</i> 、DDB1结合WD40蛋白编码基因 <i>DWD1</i>	<i>P450</i> : 19%; <i>DWD1</i> : 8.4%	否	
苹果(<i>Malus domestica</i> Borkh. cv. Golden delicious)	原生质体	RNP	PEG	Cas9	苹果火疫病易感基因 <i>DIPM1</i> -1,2,4	<i>DIPM1</i> : 6.7%; <i>DIPM2</i> : 0.5%~3.3%; <i>DIPM4</i> : 2.5%~6.9%	否	[85]
葡萄(<i>V. vinifera</i> cv. Chardonnay)	原生质体	RNP	PEG	Cas9	葡萄白粉病易感基因(<i>mildew resistance locus O-7, MLO-7</i>)	0.10%	否	
矮牵牛(<i>Petunia</i> × <i>hybrida</i> hort. ex E. Vilm.)	原生质体	RNP	PEG	Cas9	硝酸还原酶基因(<i>nitrate reductase, NR</i>)	5.3%~17.8%	否	[86]
玉米(<i>Z. mays</i> L.)	幼胚	RNP	基因枪	Cas9	叶舌发育相关基因(<i>liguleless1, LIG1</i>)、乙酰乳酸合酶(<i>ALS2</i>)、雄性育性基因(<i>MS26, MS45</i>)	<i>LIG1</i> : 9.7%; <i>MS45</i> : 4.0%; <i>MS26</i> : 2.4%	是	[6]
小麦(<i>T. aestivum</i>)	幼胚	DNA	基因枪	Cas9	<i>TaGASR7</i> 、 <i>TaGW2</i> 、 <i>TaDEP1</i> 、 <i>TaNAC2</i> 、 <i>TaPIN1</i> 、 <i>TaLOX2</i>	<i>TaGASR7</i> : 1.4%~5.0%; <i>TaGW2</i> : 2.6%~3.3%; <i>TaDEP1</i> : 2.0%; <i>TaNAC2</i> : 16%; <i>TaPIN1</i> : 8%; <i>TaLOX2</i> : 9.5%	是	[7]
	幼胚	mRNA	基因枪	Cas9	籽粒粒重相关基因(<i>grain width 2, TaGW2</i>)	1.10%		
大豆(<i>Glycine max</i> L. Merr.)	原生质体	RNP	PEG	Cas12a	脂肪酸去饱和酶基因(<i>fatty acid desaturase, FAD</i>)	<i>FAD2-1A</i> : 0.0%~11.7%; <i>FAD2-1B</i> : 0.0%~9.1%	否	[54]
野生烟草(<i>Nicotiana attenuata</i> Torr. ex S. Watson)	原生质体	RNP	PEG	Cas12a	丙二烯氧化物环化酶基因 <i>AOC</i>	0.08%~0.8%		
小麦(<i>T. aestivum</i> cv. Kenong 199和cv. YZ814)	幼胚	RNP	基因枪	Cas9	籽粒粒重相关基因(<i>grain width 2, TaGW2</i>)、籽粒粒长相关基因 <i>TaGASR7</i>	cv. Kenong199: 4%~5%; cv. YZ814: 1%~2%	是	[55]
马铃薯(<i>S. tuberosum</i> cv. Kuras)	原生质体	RNP	PEG	Cas9	结合态淀粉合成酶基因(<i>granule-bound starch synthase, GBSS</i>)	化学合成sgRNA: 1%~9%; 体外转录sgRNA: 22%~25%	是	[66]
小麦(<i>T. aestivum</i>)	幼胚	RNP	基因枪	Cas9	籽粒粒重相关基因(<i>grain width 2, TaGW2</i>)	4.40%	是	[87]
	幼胚	mRNA	基因枪	Cas9		~1.1%	是	

(续表2)

物种	细胞状态	元件	转化方法	编辑器	靶基因	编辑效率	是否获得再生植株	文献
卷心菜(<i>Brassica oleracea</i>)	原生质体	RNP	PEG	Cas9	类胡萝卜素合成途径八氢番茄红素脱氢酶基因 (phytoenenedesaturase, <i>PDS</i>)、春化作用调控基因 (<i>frigida</i> , <i>FRF</i>)	<i>FRF</i> : 0.09%~2.25%; <i>PDS</i> : 0.14%~1.33%	否	
大白菜(<i>B. rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i>)	原生质体	RNP	PEG	Cas9		<i>FRF</i> : 1.15%~24.51%; <i>PDS</i> : 3.78%~24.51%	否	[88]
油菜(<i>B. napus</i> L. cv. Topaz)	原生质体	RNP	PEG	Cas9		0%	否	
苹果(<i>Malus domestica</i>)	原生质体	RNP	PEG	Cas9	乙酰乳酸合酶(<i>ALS1</i>)	-	是	[67]
葡萄(<i>V. vinifera</i> L.)	原生质体	RNP	PEG	Cas9	乙酰乳酸合酶(<i>ALS1</i>)	-	是	
水稻(<i>O. sativa</i> cv. Nipponbare)	幼胚	RNP	基因枪	Cas9	八氢番茄红素脱氢酶基因 <i>OsPDS</i>	33.80%	是	[89]
马铃薯(<i>S. tuberosum</i> cv. Desiree)	原生质体	RNP	PEG	Cas9	与块茎褐化相关基因(polyphenol oxidase, <i>SIPPO2</i>)	25%PEG: 27%; 40%PEG: 68%	是	[90]
小麦(<i>T. aestivum</i>)	幼胚	RNP	基因枪	Cas9	-	-	是	[91]
生菜(<i>L. sativa</i> var. Chungchima)	原生质体	RNP	PEG	Cas9	-	-	是	[92]
	原生质体	RNP	PEG	Cas12a	-	-	是	
水稻(<i>O. sativa</i> cv. Nipponbare)	合子	RNP	PEG	Cas9	红色荧光蛋白报告基因 <i>DsRed2</i> 、中脉形成和心皮发育调控基因(<i>drooping leaf</i> , <i>DL</i>)、籽粒粒形相关基因(<i>grain width 7</i> , <i>GW7</i>)、精卵融合调控基因(<i>generative cell-specific-1</i> , <i>GCS1</i>)	<i>DsRed2</i> : 25%; <i>DL</i> : 13.6%~14.3%; <i>GW7</i> : 21.4%; <i>GCS1</i> : 64%	是	[68]
水稻(<i>O. sativa</i> cv. Nipponbare)	幼胚	RNP	基因枪	Cas9	八氢番茄红素脱氢酶基因 <i>OsPDS</i>	野生型Cas9: 3.6%; HiFiCas9: 8.8%	是	[70]
	幼胚	RNP	基因枪	Cas12a		AsCas12a: 0.0%; LbCas12a: 23.8%	是	
橡胶树(<i>hevea brasiliensis</i>)	原生质体	RNP	PEG	Cas9	植物开花控制基因(<i>flowering locus T</i> , <i>FT</i>)、花序分生组织属性基因(<i>terminal flower1</i> , <i>TFL1</i>)	3.74%~20.11%	否	[93]
烟草(<i>N. tabacum</i> cv. Bright Yellow-2)	原生质体	RNP	基因枪	Cas9		3%	否	
	原生质体	RNP	脂质体转染	Cas9	橙色荧光蛋白报告基因pporRFP	6%	否	[69]
苹果(<i>Malus domestica</i> Borkh. cv. Golden delicious和Gala)	外植体	DNA	农杆菌侵染	Cas9	苹果火疫病易感基因 <i>DIPM-4</i>	Gala: 1.55%; Golden delicious: 2.55%	是	[82]

a) “-”表示文献未提及

free基因编辑技术的靶向编辑效率较低且不稳定。其主要原因在于DNA-free的植物基因编辑,受转化方法、CRISPR相关元件的使用比例等因素限制,并且在不同植物物种和不同状态的植物细胞中,其靶向编辑效率差距较大。在植物中其靶向编辑效率低至0.1%^[85],高至33.8%~46%^[5,89]。如何提高靶位点的编辑效率与稳定性是将来研究的一个重点。

2.4.2 基因编辑技术的编辑类型有限

目前传统的基因编辑方法可以造成植物基因的缺失、外源片段插入、碱基替换、大片段删除等。但目前利用DNA-free的基因编辑技术在植物中仅能对植物内源基因进行突变,形成小的缺失及插入^[5],技术功能单一。如何进行DNA-free基因编辑功能的拓展也是将来需要关注的研究方向之一。

2.4.3 DNA-free基因编辑植物鉴定筛选困难

在植物中进行DNA-free的基因编辑最大挑战之一就是基因编辑植株的鉴定筛选。相比于传统的质粒转染,DNA-free技术大多数不能携带筛选标记,因此这给筛选编辑植株带来极大的难度。目前基因编辑植株的鉴定手段少,耗时耗力,且成本较高。研发经济、高效、便捷的鉴定手段对后期该技术的推广应用至关重要。

3 DNA-free的植物基因组编辑的未来展望

DNA-free的植物基因编辑技术凭借其独特的优势在植物分子育种领域正被广泛地应用。我们对DNA-free的植物基因编辑进行了以下几点展望。

3.1 优化植物细胞转化的方法

如今,已成熟应用的DNA-free植物基因组编辑技术策略仅限于杂交方式去除外源DNA、基因枪介导、病毒介导、PEG介导的原生质体转化、脂质体转染介导的原生质体等方法(图1)。而近年来,已有多种植物细胞转化的新方法出现,在应用于植物基因组编辑方面有很大的发展潜力。比如随着纳米材料的不断改良,已经有多种纳米材料可以高效地递送蛋白质或遗传物质。纳米材料介导的CRISPR/Cas基因编辑系统已经成功地在动物细胞中得到应用。Lee等人^[94]将纳米金颗粒包裹的RNP递送至细胞内,并有效地将表达红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)细胞转变为表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)细胞。Li等人^[95]开发了一种仿生矿化的纳米材料介导的递送机制,他们发现,Cas9 RNP复合物具有快速形成仿生矿化RNP纳米

颗粒(Bm-RNP)的能力。仿生矿化作用可以维持Cas9蛋白的天然功能并保护sgRNA活性,并且与单独的RNP相比,可实现20%的基因组编辑。但是在植物中没有纳米材料介导的基因编辑系统相关的报道。加大对该系统在植物基因编辑方面的研究,开发可以高效携带瞬时表达载体,CRISPR体外转录本(IVTs),或Cas RNP复合体结合形成的纳米复合体递送至植物细胞中的体系,将更为高效、方便地创制DNA-free的基因编辑产品。

病毒载体系统是外源基因体内递送和瞬时表达的理想工具,将是未来创制DNA-free的基因编辑系统的重要手段之一。在植物中,尽管多种DNA病毒(如bean yellow dwarf virus、wheat dwarf virus、cabbage leaf curl virus)和RNA病毒(如tobacco rattle virus)被有效地用于烟草、马铃薯、番茄、水稻、小麦等的基因编辑,但也存在多种问题需要解决。比如,双生病毒感染植物后很难获得再生植株;在瞬时表达体系中,双生病毒的应用仅限于植物叶片组织;单一病毒的侵染能力仅限于单个或有限的几个特定物种;病毒载体携带外源DNA的能力有待提高;病毒侵染植物的效率较低等问题。要解决这些问题,应加强植物病毒感染植物细胞的机理研究,开发诱导型的病毒表达载体以降低病毒对植物细胞的负面影响;筛选更多广谱的病毒载体加以改造,以负载更多的外源DNA及更高的侵染效率等。

3.2 对CRISPR/Cas系统元件的优化与拓展

无论是基因枪、病毒介导、PEG还是脂质转染等技术,递送的遗传物质大小受到严格的限制,是影响转染效率的一个重要因素。更小型的Cas蛋白可能会更有效地被递送到细胞中。Cas14蛋白仅有普通Cas蛋白一半的大小,这极大地减轻了递送物质尺寸大小的限制^[96]。CasΦ蛋白则是最近被发现的新型Cas蛋白^[26],它来源于巨大噬菌体,大小仅为Cas9的一半,但又不同于Cas14蛋白。这些新的小型Cas蛋白是否可以提高DNA-free的基因编辑的效率值得深入研究。

目前无需转化途径进行DNA-free基因编辑的系统多采用SpCas9蛋白,仅有一例为cpfl^[54,70]。SpCas9蛋白与Cpf1所能识别的PAM序列固定且有限,大大限制了编辑靶位点的选择。目前所发现的一些Cas9变体,如Cas13a、xCas9 3.7、SpG和SpRY等^[20,23],识别的PAM位点更为丰富。创制基于这些Cas9变体的DNA-free体系,将为人们提供更合适的靶位点选择。

DNA-free基因编辑在植物中的应用功能较为单一,

图 1 (网络版彩色)CRISPR/Cas系统介导DNA-free植物的基因组编辑流程

Figure 1 (Color online) CRISPR/Cas system mediates DNA-free plants genome editing processes

目前仅能实现靶基因的定点敲除突变。传统的CRISPR系统能够做到功能基因的敲除^[30]、外源基因的精确插入或替换^[32]、单碱基的编辑^[34,97]，以及基因的表达调控^[35]，但这些功能在DNA-free的基因编辑领域中尚未

有相关的报道，潜力巨大。

3.3 提高DNA-free基因编辑植物的鉴定筛选效率

传统的CRISPR/Cas系统通常是通过在载体中插入

抗性筛选标记, 以此达到初筛编辑植物体的目的. 相比于传统的CRISPR/Cas系统, CRISPR/Cas介导的非转基因编辑系统, 不存在外源DNA的整合, 难以进行抗性筛选. 因此, 后期的最终植物产品的筛选及鉴定工作相对困难且工作量大. 如何高效、方便、经济地筛选出DNA-free的基因编辑植物是将来需要重点关注的一个问题.

随着对CRISPR系统各组分结构的不断剖析, 在动物细胞中应用的一些鉴定技术手段被陆续开发. 比如, Qiao等人^[98]巧妙地将RFP封装在壳聚糖中形成一个包含荧光的运载工具. 该运载工具可以将具有聚谷氨酸肽标签(E-tag)的工程Cas9 RNP和DNA供体同时输送到一系列细胞类型中, 可通过荧光标签初步筛选出标记细胞, 大大提高了筛选效率. Li等人^[99]设计并合成了一种荧光表面活性剂(fluorescent endosomal disruptive surfactant, FEDS)不仅可以增强RNP的递送效率, 并且

可以识别被编辑的细胞, 其基因编辑效率提高了300%. 而Nasri等人^[100]则直接荧光标记sgRNA达到识别的效果, 并进行基因编辑细胞的富集处理. 这些鉴定筛选方法都给DNA-free基因编辑的植物带来启发, 有利于后期开发适用于植物的高效筛选方法.

随着测序技术的进步, 基于高通量测序手段的鉴定方法也越来越流行. 比如, 中国农业科学院中国水稻研究所王克剑团队^[101]研发了一种基于二代测序技术的高效、低成本的鉴定CRISPR/Cas基因编辑突变体的工具, 大大方便了基因编辑产品的鉴定工作. 在此基础上, 有望进一步优化体系, 在降低检测成本, 建立智能化分析流水线、提高检测灵敏度等方面得到进一步的提高.

综上, DNA-free的基因编辑技术的开发和应用, 可减少公众对转基因作物可能带来的潜在风险的担忧, 更好地服务于农林作物育种的产业化进程, 更好地服务于人类社会的发展.

参考文献

- 1 Stewart Jr C N, Richards Iv H A, Halfhill M D. Transgenic plants and biosafety: Science, misconceptions and public perceptions. *Biotechniques*, 2000, 29: 832–843
- 2 Cui K, Shoemaker S P. Public perception of genetically-modified (GM) food: A nationwide Chinese consumer study. *npj Sci Food*, 2018, 2: 10
- 3 Feng Z, Zhang B, Ding W, et al. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2013, 23: 1229–1232
- 4 Abdelrahman M, Jogaiah S, Burritt D J, et al. Legume genetic resources and transcriptome dynamics under abiotic stress conditions. *Plant Cell Environ*, 2018, 41: 1972–1983
- 5 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
- 6 Svitashv S, Schwartz C, Lenderts B, et al. Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun*, 2016, 7: 13274
- 7 Zhang Y, Liang Z, Zong Y, et al. Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. *Nat Commun*, 2016, 7: 12617
- 8 Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 2010, 327: 167–170
- 9 Wright A V, Nuñez J K, Doudna J A. Biology and applications of CRISPR systems: Harnessing nature's toolbox for genome engineering. *Cell*, 2016, 164: 29–44
- 10 Makarova K S, Wolf Y I, Alkhnbashi O S, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13: 722–736
- 11 Shmakov S, Abudayyeh O O, Makarova K S, et al. Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems. *Mol Cell*, 2015, 60: 385–397
- 12 Hart T, Tong A H Y, Chan K, et al. Evaluation and design of genome-wide CRISPR/SpCas9 knockout screens. *G3*, 2017, 7: 2719–2727
- 13 Mougiakos I, Bosma E F, Weenink K, et al. Efficient genome editing of a facultative thermophile using mesophilic spCas9. *ACS Synth Biol*, 2017, 6: 849–861
- 14 Qin R, Li J, Li H, et al. Developing a highly efficient and widely adaptive CRISPR-Sa Cas9 toolset for plant genome editing. *Plant Biotechnol J*, 2019, 17: 706–708
- 15 Chen F, Ding X, Feng Y, et al. Targeted activation of diverse CRISPR-Cas systems for mammalian genome editing via proximal CRISPR targeting. *Nat Commun*, 2017, 8: 14958
- 16 Moradpour M, Abdulah S N A. CRISPR/dCas9 platforms in plants: Strategies and applications beyond genome editing. *Plant Biotechnol J*, 2020, 18: 32–44
- 17 Zhao Y, Li L, Zheng G, et al. CRISPR/dCas9-mediated multiplex gene repression in *Streptomyces*. *Biotechnol J*, 2018, 13: e1800121

- 18 Lowder L G, Paul J W, Qi Y. Multiplexed transcriptional activation or repression in plants using CRISPR-dCas9-based systems. *Method Mol Biol*, 2017, 1629: 167–184
- 19 Lowder L G, Malzahn A, Qi Y. Plant gene regulation using multiplex CRISPR-dCas9 artificial transcription factors. *Method Mol Biol*, 2018, 1676: 197–214
- 20 Hu J H, Miller S M, Geurts M H, et al. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature*, 2018, 556: 57–63
- 21 Li B, Rui H, Li Y, et al. Robust CRISPR/Cpf1 (Cas12a)-mediated genome editing in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*). *Plant Biotechnol J*, 2019, 17: 1862–1864
- 22 Vu T V, Sivankalyani V, Kim E J, et al. Highly efficient homology-directed repair using CRISPR/Cpf1-geminiviral replicon in tomato. *Plant Biotechnol J*, 2020, 18: 2133–2143
- 23 Abudayyeh O O, Gootenberg J S, Essletzbichler P, et al. RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature*, 2017, 550: 280–284
- 24 Ackerman C M, Myhrvold C, Thakku S G, et al. Massively multiplexed nucleic acid detection using Cas13. *Nature*, 2020, 582: 277–282
- 25 Walton R T, Christie K A, Whittaker M N, et al. Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants. *Science*, 2020, 368: 290–296
- 26 Pausch P, Al-Shayeb B, Bisom-Rapp E, et al. CRISPR-CasΦ from huge phages is a hypercompact genome editor. *Science*, 2020, 369: 333–337
- 27 Shan Q, Wang Y, Li J, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 686–688
- 28 Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, et al. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 691–693
- 29 Li J F, Norville J E, Aach J, et al. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 688–691
- 30 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
- 31 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
- 32 Li J, Meng X, Zong Y, et al. Gene replacements and insertions in rice by intron targeting using CRISPR-Cas9. *Nat Plants*, 2016, 2: 16139
- 33 Wang J, Meng X, Hu X, et al. xCas9 expands the scope of genome editing with reduced efficiency in rice. *Plant Biotechnol J*, 2019, 17: 709–711
- 34 Zong Y, Wang Y, Li C, et al. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol*, 2017, 35: 438–440
- 35 Lowder L G, Zhang D, Baltes N J, et al. A CRISPR/Cas9 toolbox for multiplexed plant genome editing and transcriptional regulation. *Plant Physiol*, 2015, 169: 971–985
- 36 Jiang W, Zhou H, Bi H, et al. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: e188
- 37 Feng C, Yuan J, Wang R, et al. Efficient targeted genome modification in maize using CRISPR/Cas9 system. *J Genets Genomics*, 2016, 43: 37–43
- 38 Zhang S, Zhang R, Gao J, et al. Highly efficient and heritable targeted mutagenesis in wheat via the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR/Cas9 system. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 4257
- 39 Pan C, Ye L, Qin L, et al. CRISPR/Cas9-mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in tomato plants in the first and later generations. *Sci Rep*, 2016, 6: 24765
- 40 Johansen I E, Liu Y, Jørgensen B, et al. High efficacy full allelic CRISPR/Cas9 gene editing in tetraploid potato. *Sci Rep*, 2019, 9: 17715
- 41 Hu B, Li D, Liu X, et al. Engineering non-transgenic gynoecious cucumber using an improved transformation protocol and optimized CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant*, 2017, 10: 1575–1578
- 42 El-Mounadi K, Morales-Floriano M L, Garcia-Ruiz H. Principles, applications, and biosafety of plant genome editing using CRISPR-Cas9. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 56
- 43 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
- 44 Zhang M, Liu Q, Yang X, et al. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of Clpsk1 in watermelon to confer resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Plant Cell Rep*, 2020, 39: 589–595
- 45 Wilson F M, Harrison K, Armitage A D, et al. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of phytoene desaturase in diploid and octoploid strawberry. *Plant Methods*, 2019, 15: 45
- 46 Ren F, Ren C, Zhang Z, et al. Efficiency optimization of CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in grape. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 612
- 47 Nishitani C, Hirai N, Komori S, et al. Efficient genome editing in apple using a CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*, 2016, 6: 31481
- 48 Malzahn A A, Tang X, Lee K, et al. Application of CRISPR-Cas12a temperature sensitivity for improved genome editing in rice, maize, and *Arabidopsis*. *BMC Biol*, 2019, 17: 9

- 49 Endo A, Masafumi M, Kaya H, et al. Efficient targeted mutagenesis of rice and tobacco genomes using Cpf1 from *Francisella novicida*. *Sci Rep*, 2016, 6: 38169
- 50 Jia H, Orbović V, Wang N. CRISPR-LbCas12a-mediated modification of citrus. *Plant Biotechnol J*, 2019, 17: 1928–1937
- 51 Gelvin S B. Integration of *Agrobacterium* T-DNA into the plant genome. *Annu Rev Genet*, 2017, 51: 195–217
- 52 Jupe F, Rivkin A C, Michael T P, et al. The complex architecture and epigenomic impact of plant T-DNA insertions. *PLoS Genet*, 2019, 15: e1007819
- 53 Wolt J D, Wang K, Sashital D, et al. Achieving plant CRISPR targeting that limits off-target effects. *Plant Genome*, 2016, 9: 1–3
- 54 Kim H, Kim S T, Ryu J, et al. CRISPR/Cpf1-mediated DNA-free plant genome editing. *Nat Commun*, 2017, 8: 14406
- 55 Liang Z, Chen K, Li T, et al. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun*, 2017, 8: 14261
- 56 Waltz E. Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. *Nature*, 2016, 532: 293
- 57 Waltz E. With a free pass, CRISPR-edited plants reach market in record time. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 6–7
- 58 Huang S, Weigel D, Beachy R N, et al. A proposed regulatory framework for genome-edited crops. *Nat Genet*, 2016, 48: 109–111
- 59 Chen R, Xu Q, Liu Y, et al. Generation of transgene-free maize male sterile lines using the CRISPR/Cas9 system. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 1180
- 60 Gao X, Chen J, Dai X, et al. An effective strategy for reliably isolating heritable and Cas9-free arabidopsis mutants generated by CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Plant Physiol*, 2016, 171: 1794–1800
- 61 Nekrasov V, Wang C, Win J, et al. Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. *Sci Rep*, 2017, 7: 482
- 62 Pyott D E, Sheehan E, Molnar A. Engineering of CRISPR/Cas9-mediated potyvirus resistance in transgene-free *Arabidopsis* plants. *Mol Plant Pathol*, 2016, 17: 1276–1288
- 63 Lu H P, Liu S M, Xu S L, et al. CRISPR-S: An active interference element for a rapid and inexpensive selection of genome-edited, transgene-free rice plants. *Plant Biotechnol J*, 2017, 15: 1371–1373
- 64 He Y, Zhu M, Wang L, et al. Programmed self-elimination of the CRISPR/Cas9 construct greatly accelerates the isolation of edited and transgene-free rice plants. *Mol Plant*, 2018, 11: 1210–1213
- 65 Li X, Wan S, Geng L Z, et al. Genome editing in plants directed by CRISPR/Cas ribonucleoprotein complexes (in Chinese). *Hereditas*, 2020, 42: 556–564 [李霞, 施皖, 耿立召, 等. CRISPR/Cas核糖核蛋白介导的植物基因组编辑. *遗传*, 2020, 42: 556–564]
- 66 Andersson M, Turesson H, Olsson N, et al. Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery. *Physiol Plant*, 2018, 164: 378–384
- 67 Osakabe Y, Liang Z, Ren C, et al. CRISPR-Cas9-mediated genome editing in apple and grapevine. *Nat Protoc*, 2018, 13: 2844–2863
- 68 Toda E, Koiso N, Takebayashi A, et al. An efficient DNA- and selectable-marker-free genome-editing system using zygotes in rice. *Nat Plants*, 2019, 5: 363–368
- 69 Liu W, Rudis M R, Cheplick M H, et al. Lipofection-mediated genome editing using DNA-free delivery of the Cas9/gRNA ribonucleoprotein into plant cells. *Plant Cell Rep*, 2020, 39: 245–257
- 70 Banakar R, Schubert M, Collingwood M, et al. Comparison of CRISPR-Cas9/Cas12a ribonucleoprotein complexes for genome editing efficiency in the rice phytoene desaturase (OsPDS) gene. *Rice*, 2020, 13: 4
- 71 Ali Z, Abul-faraj A, Li L, et al. Efficient virus-mediated genome editing in plants using the CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant*, 2015, 8: 1288–1291
- 72 Ali Z, Abul-Faraj A, Piatek M, et al. Activity and specificity of TRV-mediated gene editing in plants. *Plant Signal Behav*, 2015, 10: e1044191
- 73 Ali Z, Eid A, Ali S, et al. Pea early-browning virus-mediated genome editing via the CRISPR/Cas9 system in *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis*. *Virus Res*, 2018, 244: 333–337
- 74 Hu J, Li S, Li Z, et al. A barley stripe mosaic virus-based guide RNA delivery system for targeted mutagenesis in wheat and maize. *Mol Plant Pathol*, 2019, 20: 1463–1474
- 75 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
- 76 Cody W B, Scholthof H B, Mirkov T E. Multiplexed gene editing and protein overexpression using a *Tobacco mosaic virus* viral vector. *Plant Physiol*, 2017, 175: 23–35
- 77 Ma X, Zhang X, Liu H, et al. Highly efficient DNA-free plant genome editing using virally delivered CRISPR-Cas9. *Nat Plants*, 2020, 6: 773–779
- 78 Jackson S D, Hong Y. Systemic movement of FT mRNA and a possible role in floral induction. *Front Plant Sci*, 2012, 3: 127
- 79 Xie K, Minkenberg B, Yang Y. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 3570–3575
- 80 Qi W, Zhu T, Tian Z, et al. High-efficiency CRISPR/Cas9 multiplex gene editing using the glycine tRNA-processing system-based strategy in maize. *BMC Biotechnol*, 2016, 16: 58

- 81 Wang G P, Du W M, Xia L Q. Current status of transgenic technologies for safety consideration in plants and future perspectives. *Sci Agric Sin*, 2014, 47: 823–843
- 82 Pompili V, Dalla Costa L, Piazza S, et al. Reduced fire blight susceptibility in apple cultivars using a high-efficiency CRISPR/Cas9-FLP/FRT-based gene editing system. *Plant Biotechnol J*, 2020, 18: 845–858
- 83 Amin A, Roca H, Luetke K, et al. Synapsis, strand scission, and strand exchange induced by the FLP recombinase: Analysis with half-FRT sites. *Mol Cell Biol*, 1991, 11: 4497–4508
- 84 Luo S, Li J, Stoddard T J, et al. Non-transgenic plant genome editing using purified sequence-specific nucleases. *Mol Plant*, 2015, 8: 1425–1427
- 85 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
- 86 Subburaj S, Chung S J, Lee C, et al. Site-directed mutagenesis in *Petunia*×*hybrida* protoplast system using direct delivery of purified recombinant Cas9 ribonucleoproteins. *Plant Cell Rep*, 2016, 35: 1535–1544
- 87 Liang Z, Chen K, Zhang Y, et al. Genome editing of bread wheat using biolistic delivery of CRISPR/Cas9 *in vitro* transcripts or ribonucleoproteins. *Nat Protoc*, 2018, 13: 413–430
- 88 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
- 89 Banakar R, Eggenberger A L, Lee K, et al. High-frequency random DNA insertions upon co-delivery of CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein and selectable marker plasmid in rice. *Sci Rep*, 2019, 9: 19902
- 90 González M N, Massa G A, Andersson M, et al. Reduced enzymatic browning in potato tubers by specific editing of a polyphenol oxidase gene via ribonucleoprotein complexes delivery of the CRISPR/Cas9 system. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 1649
- 91 Liang Z, Chen K, Gao C. Biolistic delivery of CRISPR/Cas9 with ribonucleoprotein complex in wheat. *Methods Mol Biol*, 2019, 1917: 327–335
- 92 Park J, Choi S, Park S, et al. DNA-free genome editing via ribonucleoprotein (RNP) delivery of CRISPR/Cas in lettuce. *Methods Mol Biol*, 2019, 1917: 337–354
- 93 Fan Y, Xin S, Dai X, et al. Efficient genome editing of rubber tree (*Hevea Brasiliensis*) protoplasts using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. *Ind Crop Prod*, 2020, 146: 112146
- 94 Lee K, Conboy M, Park H M, et al. Nanoparticle delivery of Cas9 ribonucleoprotein and donor DNA *in vivo* induces homology-directed DNA repair. *Nat Biomed Eng*, 2017, 1: 889–901
- 95 Li S, Song Z, Liu C, et al. Biomimetic mineralization-based CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein nanoparticles for gene editing. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11: 47762–47770
- 96 Harrington L B, Burstein D, Chen J S, et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes. *Science*, 2018, 362: 839–842
- 97 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
- 98 Qiao J, Sun W, Lin S, et al. Cytosolic delivery of CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins for genome editing using chitosan-coated red fluorescent protein. *Chem Commun*, 2019, 55: 4707–4710
- 99 Li J, Røise J J, Zhang J, et al. A novel fluorescent surfactant enhances the delivery of the Cas9 ribonucleoprotein and enables the identification of edited cells. *Chem Commun*, 2019, 55: 4562–4565
- 100 Nasri M, Mir P, Dannenmann B, et al. Fluorescent labeling of CRISPR/Cas9 RNP for gene knockout in HSPCs and iPSCs reveals an essential role for GADD45b in stress response. *Blood Adv*, 2019, 3: 63–71
- 101 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

Summary for “CRISPR/Cas介导的非转基因植物基因组编辑”

DNA-free genome editing

Hongye Gao, Qubing Ran, Xin Hu & Qiang Zhu^{*}

Basic Forestry and Proteomics Research Center, College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350000, China

^{*} Corresponding author, E-mail: zhuqiang@fafu.edu.cn

CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)-Cas systems have been extensively used for gene editing of many plant species, including model plants such as *Arabidopsis* and rice, and major crops such as maize and wheat, as well as woody plants like poplar, bamboo, apple and citrus, etc. This technique has not only significantly promoted basic research, but has also facilitated the agronomic traits improvement of economically important crops or trees. Typically, the CRISPR/Cas system required its integration and expression of exogenous DNA in the genome of host plants, which lead to the cleavage of site-specific DNA double-strand breaks, and introduced the genome modifications during the DNA repair process. However, the integration of CRISPR/Cas elements brings several concerns for commercialization and basic research. First, the inserted CRISPR/Cas cassette is constitutively expressed in plant cells, and may increase the chance of off-target changes, as well as make it difficult to evaluate the stability and penetrance of the initially observed phenotypes. Second, plants with a foreign gene integrated into its genome were regarded as classic genetically modified organisms, which may potentially lead to the escape of the gene into the environment, leading to legislation concerns and strict government policy regulation about such organisms. Therefore, one of the main challenges in using the CRISPR/Cas system in commercial agriculture is to improve the plant's agronomic traits by genome editing, meanwhile obtaining transgene-free mutant plants with stable transmissible properties.

DNA-free genome editing technology in plants is new and began in 2015, and since then great advances have been made on producing transgenic-free genome-edited plants. The exogenous CRISPR/Cas cassette and other transgenes could be eliminated by multiple approaches after the target gene has been edited. For example, the CRISPR/Cas expression cassette can be removed through genetic segregation for plants that are reproduced sexually, and the end products are CRISPR-edited but transgene-free. Transgene-free gene-edited plants may also be generated by non-transgenic approaches, such as transient expression of mRNA encoding Cas nuclease and guide RNA without DNA integration, preassembled ribonucleoprotein and sgRNA complex transfection, fluorescence marker-assisted transgene cassette selection and elimination, virus-mediated and nano-material mediated genome editing technologies. By using these methods, people can obtain the genome-edited end plant product with increased agronomic traits, while no additional foreign DNA fragments have been introduced into the plant genome. Until now, at least 14 transgene-free and genome-edited plant species have been generated using this technology. In this review, we have highlighted these achievements, including methods, applications and the possibilities of their commercialization in plant breeding. We also discuss the current problems in using this technology, such as very low efficiency, limited gene modification types and labor-consuming aspects. With the development of new plant cell transformation methods and the applications of new typical CRISPR/Cas systems, the potential strategies for improving this revolutionary technology in the future are also discussed.

gene editing, CRISPR, DNA-free, plant, genetic transformationdoi: [10.1360/TB-2020-0891](https://doi.org/10.1360/TB-2020-0891)