



CRISPR/Cas基因组编辑技术及其在农作物品种改良中的应用

赖郑诗雨¹, 黄赞唐¹, 孙洁婷¹, 敬雪皎¹, 向垒³, 赵海明³, 莫测辉^{3*}, 侯学文^{1,2*}

1. 华南农业大学生命科学学院光合作用与植物逆境生物学研究中心, 广州 510642;

2. 华南农业大学生命科学学院亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广州 510642;

3. 暨南大学生命科学技术学院广东省环境污染控制与修复材料工程中心, 广州 510632

* 联系人, E-mail: tchmo@jnu.edu.cn; hwx1969@scau.edu.cn

2022-02-17 收稿, 2022-03-20 修回, 2022-03-21 接受, 2022-03-22 网络版发表

国家自然科学基金(42077300, 42030713, 42177187)资助

摘要 CRISPR/Cas是存在于细菌及古细菌中成簇的、规律间隔的短回文重复序列及其核酸酶系统,是细菌和古细菌中破坏噬菌体与外源DNA的免疫防护机制。科学家将该免疫防护机制改造成了简便高效的基因组编辑工具,并在微生物、动物及植物的基因功能解析及改良方面取得了巨大的进展。本文先对基于CRISPR/Cas开发的植物基因组编辑工具,如CRISPR/Cas9、CRISPR/Cas介导的同源重组、胞嘧啶碱基编辑器、腺嘌呤碱基编辑器、双碱基编辑器和引导编辑器等介绍,接着详细阐述了在作物分子育种中越来越重要的DNA-free CRISPR/Cas植物基因组编辑技术,然后探讨了CRISPR/Cas基因组编辑技术在提高作物产量和品质、提高作物对生物及非生物逆境抗性、从头驯化及定向改良等方面的应用,分析了CRISPR/Cas植物基因组编辑技术的发展趋势、促进该技术应用的国家政策导向及社会环境,以便更好地促进CRISPR/Cas基因组编辑技术在农作物品种改良中的应用,助推我国种业振兴和藏粮于技战略的实现。

关键词 成簇的、规律间隔的短回文重复序列, 基因组编辑, 碱基编辑器, 引导编辑器, 作物改良, DNA-free

1987年, Ishino等人^[1]发现, 大肠杆菌*iap*基因的终止密码子后存在一段高度保守的29个核苷酸的重复序列(repeats)和高度变异的32个核苷酸的间隔子(spacer)相间排列的特殊序列, 但不知其功能。2005年, 3个研究团队分别报道了这些高度变异的间隔子序列与某些外源噬菌体和质粒序列非常相似, 与对噬菌体的敏感性有关^[2~4], 2011年, Makarova等人^[5]提出, 这些序列可能通过类似于RNA干涉的机制破坏外源噬菌体和质粒, 保护微生物免受伤害。随后证实, 这种被称为成簇的、规律间隔的短回文重复序列及其核酸酶系统(the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/

CRISPR associated nucleases, CRISPR/Cas)通过调控相关基因的表达影响噬菌体溶原性、生物膜形成和细菌的集群运动等方式, 使细菌免受外源噬菌体或质粒的破坏, 即在细菌中CRISPR/Cas起到对相应噬菌体或外源质粒的免疫保护作用^[6]。研究发现, 在细菌和古细菌中广泛存在CRISPR/Cas的获得性免疫机制, 它们被划分成两大类, 每一大类又可以继续划分为若干亚类。第一大类需要多个亚基才能构成效应复合体发挥作用, 而第二大类只需一个核酸酶蛋白即可发挥作用^[7]。从作为应用工具开发来说, 第二大类CRISPR/Cas备受青睐, 其中尤以CRISPR/Cas9基因组编辑工具率先取得突破。

引用格式: 赖郑诗雨, 黄赞唐, 孙洁婷, 等. CRISPR/Cas基因组编辑技术及其在农作物品种改良中的应用. 科学通报, 2022, 67: 1923–1937

Lai Z S Y, Huang Z T, Sun J T, et al. The recent progress of CRISPR/Cas genome editing technology and its application in crop improvement (in Chinese). Chin Sci Bull, 2022, 67: 1923–1937, doi: [10.1360/TB-2022-0197](https://doi.org/10.1360/TB-2022-0197)

科学家将CRISPR/Cas系统的Cas9蛋白质、crRNA (CRISPR-derived RNA)和tracrRNA(trans-activating crRNA)三部分进行整合改造,获得一款基因组编辑工具。如Jinek等人^[8]在体外通过4个碱基将crRNA与tracrRNA融合成一个sgRNA(single guide RNA)。实验表明,sgRNA可以介导Cas9蛋白打靶目的DNA。sgRNA与Cas9形成复合物,Cas9识别DNA链上前间区序列邻近基序(protospacer-adjacent motif, PAM) NGG,而sgRNA通过碱基互补原则搜索靶标DNA,二者一旦搜索到特异靶标DNA,Cas9核酸内切酶活性被激活,在PAM上游3和4位核苷酸之间切割产生DNA双链断裂(double strands breaking, DSB)^[9]。该系统的特异性取决于crRNA 20 bp的特异序列,以及Cas9蛋白对NGG序列的识别,因此只需对这一细菌免疫机制进行合适的改造,就可以获得一款CRISPR/Cas基因组编辑工具。至此,人们通过对细菌免疫机制的深入了解和改造,获得了一款设计简单、组装容易、高效和功能广泛的基因组编辑利器。在这款CRISPR/Cas9基因组编辑工具获得巨大成功的基础上,科学家继续通过gRNA设计改进、更多Cas效应蛋白的发掘利用以及Cas9与多种功能蛋白的融合等,使进行精准植物基因组编辑的工具更加丰富,并在植物基因功能解析及作物改良方面取得了一系列重要进展^[10-13]。本文着重介绍已开发成功的应用于植物的CRISPR基因组编辑工具,以及作物分子育

种中广泛应用的DNA-free CRISPR/Cas基因组编辑技术,论述其在农作物改良方面取得的重要进展,以便更好地为今后的工作提供借鉴。

1 基于CRISPR/Cas基因组编辑工具

经过近十年的发展,基于CRISPR/Cas的基因组编辑工具越来越多,赋予了科学家对植物基因组高效、强大及精准的编辑能力(表1)。

1.1 以破坏植物内源基因功能为目标的CRISPR/Cas基因组编辑工具

以CRISPR/Cas9构建的基因组编辑工具会在PAM上游的第3与第4核苷酸之间产生DSB。在生物体内,DSB将主要由非同源末端连接(nonhomologous end joining, NHEJ)机制修复,通常会导致DSB处小片段的插入、缺失或替换(图1(a))^[14]。如果这些突变发生在编码区域就会造成氨基酸的插入、缺失、替换或移码,在多数情况下会导致基因功能的破坏;但如果有时这些小的突变产生异常的遗传效应,则会对基因功能的解析带来困扰^[33]。对于基因组中的调控序列,如启动子、增强子、内含子、5'或3'端非编码区或者非编码RNA区,微小的插入缺失突变在多数情况下可能不会影响其功能,除非存在大片段的缺失。如果能将转基因植物中的标记基因、筛选基因等外源基因删除,将更

表1 CRISPR/Cas9基因组编辑器的主要类型及其特征

Table 1 The toolboxes of CRISPR/Cas9 genome editing technology and their characteristics

编辑器类型	sgRNA特征	Cas9特征	其他功能元件	主要用途	代表文献
CRISPR/Cas9	sgRNA	Cas9	核定位序列(nuclear location sequence, NLS)	导致靶位点小片段的插入、缺失及替换,通常导致基因功能丧失	[9,14,15]
MMEJ-CRISPR/Cas9	成对的sgRNA	Cas9	NLS	能删除微同源靶点序列间数百至数千碱基的DNA片段	[16-18]
AFIDs	sgRNA	Cas9	NLS、胞嘧啶脱氨酶、尿嘧啶DNA糖基化酶和无嘧啶裂解酶	精确删除靶点附近10个左右核苷酸	[19]
HDR-CRISPR/Cas9	sgRNA	Cas9	NLS、与靶位点同源的插入片段	在靶位点插入小片段的DNA	[20-22]
胞嘧啶碱基编辑器CBE	sgRNA	nCas9(D10A)	NLS、胞苷脱氨酶、尿嘧啶DNA糖基化酶抑制剂	将编辑窗口内的胞嘧啶转换为胸腺嘧啶	[23,24]
腺嘌呤碱基编辑器ABE	sgRNA	nCas9(D10A)及其变体Cas9n-NG, SpGn, SpRYn	NLS、大肠杆菌tRNA腺苷脱氨酶或其进化酶	将编辑窗口内的腺嘌呤转换为鸟嘌呤	[25-27]
双碱基编辑器STEME	sgRNA	nCas9(D10A)	NLS、胞苷脱氨酶、尿嘧啶DNA糖基化酶抑制剂、大肠杆菌tRNA腺苷脱氨酶或其进化酶	将编辑窗口内的胞嘧啶转换为胸腺嘧啶及腺嘌呤转换为鸟嘌呤	[28,29]
引导编辑器PPE	pegRNA	nCas9(H840A)	NLS、逆转录酶	12种类型的碱基替换、精确的片段插入及缺失	[30-32]

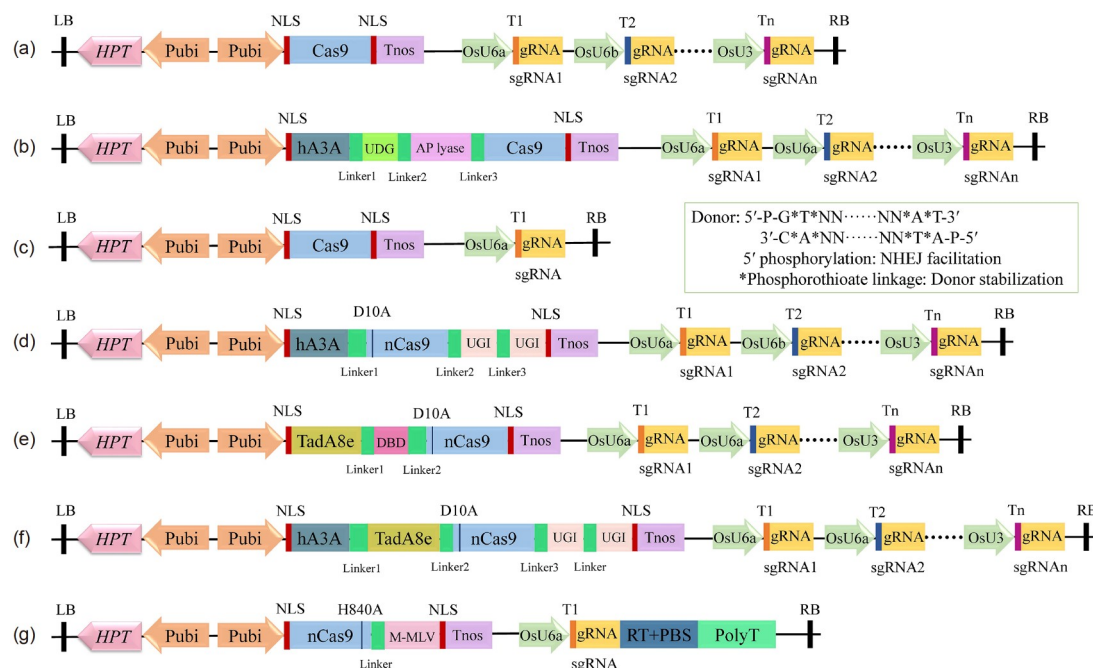


图 1 (网络版彩色)基于CRISPR/Cas9的几种植物基因组编辑工具的载体结构示意图。(a) 多靶点的CRISPR/Cas9载体; (b) APOBEC-Cas9融合诱导缺失系统; (c) 串联重复-HDR; (d) 多靶点的胞嘧啶碱基编辑器; (e) 多靶点的腺嘌呤碱基编辑器; (f) 饱和靶向内源诱变编辑器; (g) 植物引导编辑器。AP lyase, 无嘧啶裂解酶; Cas9, CRISPR相关核酸酶9; DBD, DNA结合结构域; hA3A, 一种来源于人的胞嘧啶脱氨酶; HPT, 潮霉素磷酸转移酶基因; gRNA, 引导RNA; LB, T-DNA左边界; Linker, 30个氨基酸左右的连接序列; M-MLV, 逆转录酶; nCas9, Cas9缺刻酶; NLS, 核定位序列; OsU6a、OsU6b和OsU3, 水稻小核RNA启动子; PBS, 逆转录引物的引物结合位点; Pubi, ubiquitin 启动子; RB, T-DNA右边界; RT, 逆转录模板; sgRNA, 单一引导RNA; T, 靶标序列; TadA8e, 大肠杆菌tRNA腺苷脱氨酶; Tnos, 胭脂碱合成酶基因终止子; UDG, 尿嘧啶DNA糖基化酶; UGI, 尿嘧啶DNA糖基化酶抑制剂

Figure 1 (Color online) Schematic diagram of the vector structures of main plant genome editing tools based on CRISPR/Cas9. (a) The multiplexed gene editing CRISPR/Cas9 vector; (b) APOBEC-Cas9 fusion-induced deletion system; (c) tandem repeat-HDR; (d) the multiplexed cytosine base editor; (e) the multiplexed adenine base editor; (f) saturated targeted endogenous mutagenesis editor; (g) plant prime editor. AP lyase, apyrimidinic lyase; Cas9, CRISPR associated nuclease 9; DBD, DNA binding domain; hA3A, apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide-like 3 A; HPT, *HYGROMYCIN PHOSPHOTRANSFERASE*; gRNA, guide RNA; LB, left border of T-DNA; Linker, linking sequence of about 30 amino acids; M-MLV, reverse transcriptase; nCas9, Cas9 nickase; NLS, nuclear location sequence; OsU6a, OsU6b, and OsU3, the promoters of rice small nuclear RNA; PBS, primer binding site of reverse transcription; Pubi, ubiquitin promoter; RB, right border of T-DNA; RT, reverse transcriptase template; sgRNA, single guide RNA; T, target sequence; TadA8e, *E. coli* tRNA adenosine deaminase; Tnos, nopaline synthase terminator; UDG, uracile DNA glycosylase; UGI, uracile DNA glycosylase inhibitor

容易使转基因植物满足监管要求和增加民众的接受程度。为了在特定的位点产生大片段DNA的缺失, 可通过在需要缺失的部位设计两个编辑位点, 由NHEJ介导的修复在两个靶位点之间可能造成大片段的缺失, 但效率较低。如果DSB旁侧存在微同源序列(microhomologous sequences, MHSs; 4~25 bp), 那么由微同源序列介导的末端修复(microhomology-mediated end joining, MMEJ)导致的大片段删除效率将大幅提高, 可以达到52.4%, 远高于NHEJ的介导(7.1%), 而且MMEJ介导的缺失片段的大小比NHEJ介导得更大^[16~18]。Xie等人^[34]开发了一个在线工具便于研究者高效地进行MMEJ靶位点的选择及引物设计。

Wang等人^[19]报道了一个胞嘧啶脱氨酶和Cas9等

功能元件介导的精确DNA片段删除系统APOBEC-Cas9融合诱导缺失系统(APOBEC-Cas9 fusion-induced deletion systems, AFIDs)。该系统由sgRNA、胞嘧啶脱氨酶、Cas9、尿嘧啶DNA糖基化酶(uracile DNA glycosylase, UDG)和无嘧啶裂解酶(AP lyase)等功能元件组成。其作用原理为: sgRNA将融合表达的胞嘧啶脱氨酶APOBEC-Cas9-UDG引导至靶位点, Cas9在PAM位点上游3和4核苷酸之间切割造成双链断裂, 胞嘧啶脱氨酶对窗口内胞嘧啶脱氨形成尿嘧啶, 在UDG的作用下导致尿嘧啶的去除而形成无嘧啶位点; DNA上的无嘧啶位点被体内的无嘧啶裂解酶切割造成DNA链断裂, 两个断裂位点之间的核苷酸被相应的核酸酶去除, 留下的平末端被体内的连接酶连接起来, 从而造成10

个左右的核苷酸精准缺失(图1(b)). Wang等人^[19]报道构建的AFID-3工具在水稻和小麦原生质体中检测到30.2%的核苷酸片段缺失, 34.8%转基因株系中核苷酸片段缺失; 采用改进型eAFID-3工具可以在TC区至Cas9产生的DSB之间形成更均一的核苷酸片段缺失. 该系统为研究基因调控区域及蛋白功能结构域的功能提供了有力的技术手段.

1.2 基于同源介导的双链DNA修复的精确基因组编辑工具

CRISPR/Cas形成的DSB还可以采用同源介导的机制(homology-directed repair, HDR)进行修复. HDR修复机制需要与断裂位点同源的模板. 该模板可以是姐妹染色体中的同源基因或者是外源提供的单链/双链DNA, 在此过程中可按设计引入或校正靶位点的突变, 甚至插入外源基因片段等(图1(c)). 因为植物细胞中HDR效率低及供体模板DNA投递困难等原因, 植物中HDR介导的精确基因组编辑不如其他生物中应用广泛. 近年来, 在植物中发展了阳性-阴性筛选^[35]、利用双生病毒提高供体模板DNA水平^[20]、将供体模板与sgRNA融合^[21]等策略, 在一定程度上提高了HDR介导的精确基因编辑效率, 但结果仍然不令人满意. 最近, Lu等人^[22]报道, 将DNA双链5'和3'端两个核苷酸用硫代磷酸酯修饰以提高供体DNA模板的稳定性, 利用CRISPR/Cas9系统可以将26~2049 bp的DNA片段定向插入水稻基因组中, 且能发挥其功能. 在此基础上, 进一步设计了串联重复-HDR(tandem repeat-HDR)策略来进行DNA片段的精确插入与替换, 在水稻基因组中实现了精确的碱基片段替换及长达130 bp的蛋白标签无缝插入内源基因, 平均效率达6.1%, 为植物基因的微改造及基因功能解析提供了有力的工具.

除了最常应用的Cas9外, 因Cas12a具有蛋白更小, 识别富含T的PAM序列TTTN, 特别是其切割位点离PAM序列较远且产生的是有4~5个核苷酸的交错末端等特点^[36], 其在CRISPR/Cas基因组编辑系统, 尤其在HDR中的应用也越来越受到重视, CRISPR/Cas12a介导的HDR在拟南芥^[37]、烟草^[38]和番茄^[39]等作物中均有成功报道.

1.3 胞嘧啶碱基编辑器

胞嘧啶碱基编辑器(cytosine base editor, CBE)是指能将编辑窗口内的胞嘧啶转换为胸腺嘧啶(即将C-G碱

基对转换为T-A碱基对)的CRISPR基因组编辑工具. 其作用原理是: 利用定点突变产生的只能切割DNA双链中一条链的缺刻酶nCas9(D10A), 与胞苷脱氨酶、尿嘧啶DNA糖基化酶抑制剂(uracil DNA glycosylase inhibitor, UGI)融合表达(图1(d)), 当sgRNA将nCas9引导至靶位点时, 脱氨酶将非靶标链的胞苷脱氨形成尿苷, C-G配对被转变为不匹配的U-G; UGI抑制UDG防止产生无嘧啶碱基位点. nCas9(D10A)在靶标链PAM上游3与4核苷酸之间形成缺口, 细胞内自身的错配修复机制将错配的U-G修复为U-A, 在随后的DNA复制中U被T取代, 形成正确的T-A配对, 如此就实现了编辑窗口内C-G至T-A的转换. 自2016年CBE首次在哺乳动物细胞中应用以来, 现已在植物细胞编辑中广泛应用, 主要从选择不同的脱氨酶、使用串联UGI等进一步提高CBE的编辑专一性和效率、降低副反应等方面改进. Ren等人^[23]测试了7种不同胞苷脱氨酶及其工程改造酶, 发现载脂蛋白B信使RNA编辑催化样蛋白3成员A(apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide-like 3A, APOBEC3A, A3A, 该酶具有将单链DNA/RNA中的C脱氨转变为U的功能)的一个工程改造酶A3A/Y130F在水稻及拟南芥中有较宽的编辑窗口(PAM前4~15个核苷酸)和最高的编辑效率(平均37.9%), 且对甲基化C也具有有良好的编辑效率. 将2个MS2 RNA融合到gRNA结构中, 同时将MS2衣壳蛋白(MS2 coat protein, MCP)与UGI融合表达, 通过MS2-MCP间的特异识别可将4个UGI招募到nCas9-脱氨酶附近, 有效地降低了DNA链断裂导致的插入缺失突变等副反应, 同时C-G转换为T-A的编辑效率进一步提高. Zeng等人^[24]采用水稻偏好密码子优化evorAPOBEC1、evoFERNY、evoCDA1和hA3A等胞嘧啶脱氨酶, 通过一定长度的连接序列分别与nCas9或其变体融合表达, 并在融合蛋白的N和C端分别添加核定位序列(nuclear localization sequence, NLS), 成功构建了高效的植物胞嘧啶碱基编辑器PhieCBEs. 这套系统具有编辑效率高(比对照BE4编辑器提高3~8倍), 以及更宽的编辑窗口($C_2 \sim C_{10}$, 甚至 $C_{-1} \sim C_{13}$), 且编辑窗口内胞嘧啶被编辑的概率相近, 产生非C-T编辑的副产物的水平低以及较低的T-DNA自靶向突变等优点. Choi等人^[40]报道用核糖体蛋白亚基5a(ribosomal protein subunit 5a, RPS5a)启动子来驱动nCas9(D10A)等功能元件的CBE, 在拟南芥中的测试表明, 其编辑效率比传统的35S启动子提高了32%.

1.4 腺嘌呤碱基编辑器

腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editor, ABE)是指能将编辑窗口内的腺嘌呤转换为鸟嘌呤(即将A-T碱基对转换为G-C碱基对)的CRISPR基因组编辑工具。其作用原理是:将蛋白质工程进化的大肠杆菌tRNA腺苷脱氨酶(tRNA adenosine deaminase, TadA)与nCas9(D10A)融合表达(图1(e)),当sgRNA将nCas9(D10A)-TadA引导至靶位点时,TadA将非靶标链编辑窗口的腺苷脱氨变为肌苷I,同时nCas9(D10A)将靶标链PAM前的3和4位核苷酸之间形成缺口;细胞内自身的错配修复机制发挥作用,肌苷被DNA聚合酶识别为鸟苷,这样靶标链上原来的A被修复为C,在随后的DNA复制中I被G取代,形成正确的G-C配对,至此ABE实现了将编辑窗口内A-T转换为G-C。Li等人^[25]报道,将TadA与NLS通过不同方式融合表达,构建了7个适用于植物的腺嘌呤碱基编辑器PABE1-7,其中PABE7将A-T转换为G-C的效率最高,在水稻和小麦的原生质体中为7.5%,在再生的水稻和小麦株系中达到59.1%。Yan等人^[26]筛选到新的腺苷脱氨酶变体TadA8e和TadA9,在水稻中具有更高的编辑效率和更宽的编辑窗口。Tan等人^[27]采用水稻偏好性密码子对来自RADIATION SENSITIVE 51的单链DNA结合结构域(DNA-binding domain, DBD)和TadA8e进行优化,采用30多个氨基酸的连接序列将其与对PAM序列要求较低或无要求的Cas9变体(Cas9n-NG, SpGn, SpRYn)融合表达,并且在该融合蛋白的N和C端各加一个NLS,成功构建了3个植物中应用的高效腺嘌呤碱基编辑器PhieABE。该系统具有高效、几乎无PAM限制的靶位点识别能力、编辑窗口广、无靶序列偏好性以及低自靶向和脱靶效率等优点。Wang等人^[41]将工程改造的TadA分别与nCas9或dCas9融合构建了异源四倍体陆地棉中应用的ABE,发现GhABE7.10n编辑效率最高,主要编辑位点是A5,在DNA水平上未检测到脱靶,在RNA水平上检测到轻微脱靶。

1.5 双碱基编辑器

双碱基编辑器是将上述胞嘧啶碱基编辑器和腺嘌呤碱基编辑器的功能元件有机地组合(图1(f)),同时实现编辑窗口内胞嘧啶转换为胸腺嘧啶和腺嘌呤转换为鸟嘌呤(即将C-G碱基对转换为T-A碱基对和将A-T碱基对转换为G-C碱基对),因此也称为饱和靶向内源诱变编辑器(saturated targeted endogenous mutagenesis editor, STEME)^[28,29]。Li等人^[28]报道,在水稻原生质体中

STEME-1编辑器以15.1%效率同时进行C到T和A到G的突变;STEME-NG在水稻原生质体中针对乙酰辅酶A羧化酶的56个氨基酸区域产生了高达73.21%接近饱和的突变,利用该技术高效地获得了抗除草剂的水稻突变株系。Xu等人^[42]报道了一款双碱基编辑器pDuBE1,用它构建打靶水稻乙酰乳酸合酶(ACETOLACTATE SYNTHASE, ALS)等4个基因的双碱基编辑器,在转基因水稻中双碱基的同时编辑效率可达49.7%。可见,双碱基编辑器是植物基因功能定向进化的高效工具,在作物农艺性状、产量及品质改良等方面将发挥重要作用。

1.6 引导编辑器

虽然上述编辑工具让人们拥有较为强大的基因编辑能力,但均不能同时进行12种类型的碱基替换、精确的片段插入和缺失,以及这些编辑的组合,而这些精准的编辑可在引导编辑器中实现^[43]。Lin等人^[30]通过密码子、启动子及编辑条件的优化,成功地开发了在植物中应用的引导编辑器(plant prime editor, PPE)。PPE主要包括融合表达的nCas9(H840A)-逆转录酶,以及引导编辑的向导RNA(prime editing guide RNA, pegRNA,由sgRNA、编辑位点附近互补作为逆转录引物的引物;结合位点和期望编辑的模板序列3部分构成)(图1(g))。sgRNA将nCas9(H840A)引导至靶位点,nCas9(H840A)对非靶标链切割形成缺口导致DNA解链,引物结合区(primer-binding site, PBS)找到与其匹配的区域并作为逆转录的引物,逆转录酶以引入的期望编辑的序列为模板进行逆转录延伸,通过细胞内源的修复机制将引入的突变固定下来。这样通过模板序列的设计就可在特定的位点引入期望的各种突变,完成引导编辑。Lin等人^[30]开发的PPE在转基因水稻株系中检测到引导编辑的频率可达21.8%。Xu等人^[31,32]成功开发了类似的PPE系统,但这一系统只能对几十个核苷酸进行编辑。Anzalone等人^[44]报道了双引导编辑器(twinPE),该系统利用一个引导编辑蛋白和两个pegRNA,能够在人类基因组中插入、替换或删除800个碱基对左右的片段;如果再与位点特异的丝氨酸重组酶一起应用,twinPE能够在人类细胞中靶向整合5000 bp以上的片段和将40 kb靶向序列倒置。目前,还未有类似植物编辑器的报道,相信适用于植物中的twinPE也将很快被开发出来。

上述基于CRISPR/Cas的基因组编辑工具虽然在编辑效率、专一性等方面还有提升的空间,但已经赋予

了人们对植物基因组多样化且强大的编辑修饰能力;而且随着研究的深入,更多更好的基于CRISPR/Cas的编辑工具将被开发出来.虽然CRISPR/Cas基因组编辑技术在植物中的应用不足10年,但该技术已在植物基因功能解析、作物品质改良、作物育种技术创新等方面产生了丰硕成果.

2 CRISPR/Cas非转基因的植物基因组编辑技术

传统的CRISPR/Cas基因组编辑技术依赖于将含相应功能元件的T-DNA(图1)插入植物基因组中,并在植物细胞中稳定表达发挥其基因组编辑功能.虽然编辑植物中的T-DNA能够通过自交或回交的方式被分离,但这一策略不仅费时费力,而且对无性繁殖的作物(如马铃薯、香蕉、木薯和葡萄等)及营养生长期较长的木本植物并不适用;并且不少国家仍将传统的CRISPR/Cas基因组编辑植物与传统的转基因植物一样严格监管,这必将影响培育的植物新品种推向市场的进程.近年来,为了解决这个应用的核心问题,一种称为非转基因(DNA-free)的CRISPR/Cas基因组编辑技术应运而生^[45,46],对该技术体系的主要特点介绍如下.

2.1 利用瞬时表达载体实现DNA-free的CRISPR/Cas基因组编辑

传统的CRISPR/Cas基因组编辑是将其功能组件放入双元载体的T-DNA中,通过插入植物基因组并表达出sgRNA及Cas蛋白而发挥作用,而采用瞬时表达技术,这些功能元件就无需插入植物基因组,在植物细胞中表达并完成其功能后即被降解.Zhang等人^[47]开发了瞬时表达CRISPR/Cas9 DNA的基因组编辑系统(transiently expressed CRISPR/Cas 9 DNA, TECCDNA)来达到DNA-free.他们用基因枪将表达sgRNA及Cas9的瞬时表达载体轰击小麦未成熟胚,在无筛选压力的培养基上再生植株.在六倍体面包小麦和四倍体硬粒小麦中编辑6个基因的综合分析表明,编辑效率可高达9.5%,并且几乎所有T0代株系为DNA-free.Chen等人^[48]将农杆菌(含有打靶八氢番茄红素去饱和酶基因(*PHYTOENE DESATURASE*, *PDS*))的sgRNA和Cas9的载体与烟草叶盘进行3 d共培养,在不添加选择压力的培养基中再生,利用这些功能元件的瞬时表达获得再生株系,结合高通量测序及高分辨率溶解曲线分析发现,2.57%的再生株系为编辑株系,且17.2%的编辑株系为

DNA-free. Meyer等人^[49]采用聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)介导的原生质体转化法,将打靶着丝粒特异组蛋白H3基因(*CENTROMERE SPECIFIC HISTONE H3*, *CENH3*)的CBE载体转化胡萝卜原生质体.在再生胡萝卜株系中,该基因两个表达的编辑效率分别为11.9%和14.7%,并且其中纯合及双等位突变达到86%,经检测这些株系均是DNA-free.

2.2 利用体外RNA转录本或RNA病毒载体实现DNA-free的CRISPR/Cas基因组编辑

上述DNA载体的瞬时表达虽然能够获得DNA-free的编辑株系,但也存在DNA片段插入植物基因组的可能性,使用CRISPR/Cas功能元件的体外RNA转录本或RNA病毒载体系统就可进一步降低这种可能性.Zhang等人^[47]报道了sgRNA和Cas9体外转录本的瞬时表达技术(TECCRNA).他们采用基因枪将打靶小麦*GW2*基因的sgRNA和Cas9的RNA转录本导入小麦Kelong 199的未成熟胚,在T0代株系中的编辑效率为1.1%,其中35.3%的株系是6个*GW2*等位基因被编辑的纯合株系.将CRISPR/Cas功能元件克隆到RNA病毒载体并利用其获得DNA-free的编辑植物也是一个重要策略.Ariga等人^[50]将打靶*PDS*基因的sgRNA和Cas9克隆到马铃薯病毒X(potato virus X, PVX)载体,通过农杆菌浸润或机械接种的方式侵染烟草叶盘,在不含筛选抗生素培养基上,60%以上的再生植株均发生了编辑,并在其下一代植株中均未检测到PVX.Ma等人^[51]将植物RNA负链病毒苦苣菜黄网弹状病毒(sonchus yellow net rhabdovirus, SYNIV)改造成为RNA病毒载体,将打靶*PDS*基因的CRISPR/Cas功能组件克隆到其中,在不含筛选抗生素培养基中,90%以上的再生烟草植株均发生了编辑,其中57%的株系是4个*PDS*等位基因均发生可稳定遗传的突变,RNA病毒载体可以通过植株再生或有性繁殖而被完全除去.

2.3 利用CRISPR/Cas核糖核蛋白实现DNA-free的CRISPR/Cas基因组编辑

如果能够将体外转录的sgRNA和Cas蛋白组成的核糖核蛋白(ribonucleoproteins, RNP)复合物投递到植物细胞中,在其发挥作用后随即被降解,对获得DNA-free的CRISPR/Cas基因组编辑植物更为有利.Woo等人^[52]采用PEG介导的方法分别将打靶不同基因的RNP导入拟南芥、烟草、生菜和水稻原生质体,高达46%的再生

株系均发生了相应的编辑。最近,采用该方法成功获得了番茄^[53]、胡萝卜^[54]和油菜^[55]等的DNA-free再生编辑株系。此外,Liu等人^[56]将打靶*GFP*基因的RNP用脂质体导入烟草原生质体中,发现其编辑效率可达6%。但目前能从原生质体成功再生植株的作物品种有限,因此陆续开发了其他非原生质体的RNP递送方式。如Dong等人^[57]用基因枪法将RNP导入玉米未成熟胚,在不含选择压力的培养基中7%的再生株系被编辑。Salekdeh等人^[58]报道了一种有效投递RNP的有机纳米材料。将来,相信更多有效的RNP递送方式会被开发出来。

综上所述,DNA-free CRISPR/Cas9植物基因组编辑技术中其功能组件在植物细胞中不是稳定存在,因此其编辑效率比传统的CRISPR/Cas9植物基因组编辑技术相对较低,但其脱靶率也更低;而且再生株系在不含选择压力的培养基上获得,编辑株系的占比也明显降低,但随着基于二代测序技术的高通量、低成本筛选技术Hi-TOM等的应用^[59],筛选到编辑株系也变得快速简单。更重要的是,该技术没有外源DNA插入植物基因组,所形成的编辑类似于常规诱变育种技术。随着对这一类编辑技术培育植物品种监管的放松,预计DNA-free CRISPR/Cas9植物基因组编辑技术将成为越来越重要的作物育种工具。

3 CRISPR/Cas基因组编辑技术在作物品种改良中的应用

3.1 提高作物产量

利用农业生物技术提高农作物产量是解决人口增长、耕地减少的重要手段。农作物产量是许多相关基因相互作用和调控的结果,采用CRISPR/Cas基因组编辑技术有针对性地调控产量相关基因的表达水平就可达到提高产量的目的。水稻中3个QTL基因*GS3*、*GW2*、*GN1a*分别负调控水稻籽粒大小、籽粒宽和重量以及籽粒产量等3个与水稻产量密切相关的性状。Zhou等人^[60]采用多重编辑CRISPR/Cas9技术在3个优良水稻品种中同时编辑这3个基因,发现这3个基因对产量的贡献具有加和性,比传统的育种技术更加高效。Wang等人^[15]采用CRISPR/Cas9技术对水稻细胞分裂素激活酶OsLOGL5的C-端保守的25个氨基酸序列进行编辑,获得的编辑株系在多个地理环境的种植条件下均显著增加了谷物产量。大豆*JAGGED1*是负调控大豆果荚种子数和叶片性状的主要基因。Cai等人^[61]设计了针

对*JAGGED1*两个位点的CRISPR/Cas9载体转化低纬度大豆品种“华春6号”,从T1代中分离获得了同时敲除*JAGGED1*和2的纯合株系,春夏两季的大田种植表明,产量分别增加了8.81%和8.67%。

3.2 提高作物品质

作物品质,包括营养品质、食用品质、卫生品质、加工品质及商品品质等,都是由相关基因控制的。采用CRISPR/Cas基因组编辑技术调控这些基因的表达就可获得具有期望品质的农作物品种。稻米的直链淀粉含量决定米饭的食味品质,直链淀粉含量主要取决于颗粒结合型淀粉合成酶I (granule-bound starch synthase I, GBSSI)的活性。上游开放阅读框(upstream open reading frame, uORF)存在于多数真核生物mRNA的5'端非翻译区,具有调低下游主开放阅读框(primary open reading frame, pORF)翻译及促进mRNA降解的作用。消除这些潜在的uORF,会提高pORF的表达。Zhang等人^[62]采用CRISPR/Cas9技术去除拟南芥芸苔素内酯受体基因*BRI1*的uORF,虽然其mRNA水平没有差异,但其蛋白表达量比野生型明显增加,并表现出对芸苔素内酯合成抑制剂芸苔素唑抑制下胚轴伸长的抗性;编辑去除生菜中抗坏血酸合成关键酶基因*GPP2*的uORF,使生菜叶片抗坏血酸含量比野生型增加了150%,抗氧化逆境的能力也明显提高。Xing等人^[63]采用CBE编辑器改造草莓转录因子基因*bZIPs1.1*的uORF,获得了一系列含糖量不同的草莓突变体,且其他农艺性状没有改变,通过无性繁殖可快速形成新品种。Xu等人^[64]采用CBE编辑器针对*GBSSI*的3个酶活性相关的重要靶位点进行编辑,获得了一系列*GBSSI*蛋白含量与酶活性不同程度降低的株系,直链淀粉含量在1.4%~11.9%之间,满足不同的加工需求。对控制重要农艺性状的基因进行编辑,可以获得目标物质含量不同的一系列新株系,丰富作物品种,满足不同人群的需求。

不少作物中含低分子量的蛋白质过敏原,敏感人群食用就会产生荨麻疹、腹痛腹泻甚至休克等过敏症状。小麦面粉中的 α -醇溶蛋白家族是造成易感人群乳糖糜泻(一种自身免疫性疾病)的主要原因。在面包小麦中 α -醇溶蛋白家族大约由100个基因编码,采用传统的育种技术很难获得低 α -醇溶蛋白家族的小麦品种。Sánchez-León等人^[65]在 α -醇溶蛋白家族基因的保守位点设计了2个靶位点,对获得的转基因小麦株系分析表明,许多醇溶蛋白基因被破坏,醇溶蛋白降幅达32%~82%,

免疫活性最高降幅达85%。Bra j I 是存在于芥菜(为异源四倍体作物)种子中分子量为22 kD的过敏原。Assou等人^[66]设计打靶Bra j I 基因的多个sgRNA,以芥菜品种Terratop和CR2664为受体材料,获得了将4个Bra j I 等位基因敲除的株系。这些突变大多数能稳定遗传给下一代,编辑株系中的Bra j I 蛋白大幅降低甚至完全缺失。全氟辛酸(perfluoro octanoic acid, PFOA)是新兴的持久性有机污染物,通过一些通道蛋白转运积累至地上部^[67]。我们正在采用CRISPR/Cas9基因组编辑技术敲除生菜中候选的通道蛋白基因,以期减少生菜叶中PFOA积累,从而提高生菜的卫生安全品质。可见,采用CRISPR/Cas基因组编辑技术敲除蛋白过敏原,或通过对通道蛋白基因编辑降低有机污染物在食用部分的积累等方式提高食物的卫生品质,将是该技术的重要应用方向之一。

CRISPR/Cas基因组编辑技术可以通过调控相关基因的表达提高作物中的有益成分,从而提高其商品价值。大豆油中脂肪酸成分和含量对其营养价值与使用性能有重要影响,正常大豆油中含25%油酸(18:1)、52%亚油酸(18:2)、18%亚麻酸(18:3),较高的亚油酸和亚麻酸使得大豆油与大豆油处理食品具有氧化不稳定性,低油酸大豆油在市场上的竞争力弱于低芥酸菜籽油和橄榄油。大豆中 δ -12脂肪酸脱饱和酶2(fatty acid desaturase 2, FAD2)催化油酸为亚油酸,亚油酸再进一步由 δ -9脂肪酸脱饱和酶3(FAD3)催化为亚麻酸。大豆FAD2包含多个基因,其中FAD2-1A和FAD2-1B在大豆种子中高表达,决定大豆油酸的含量,且这两个基因编码区同源率高达99%。Do等人^[68]针对FAD2-1A和FAD2-1B的保守区域设计了2个靶位点, T0代阳性株系产生多种类型的FAD2功能缺失突变株,且这些突变能遗传给下一代。对FAD2-1A和FAD2-1B纯合突变体的分析表明,油酸含量增加到80%以上,亚油酸含量降至1.3%~1.7%,显著提高了大豆油的品质。稻米等的香味赋予其较高的商品价值,已知2-乙酰-1-吡咯啉是主要的香味来源,甜菜碱醛脱氢酶2(betaine aldehyde dehydrogenase 2, BADH2)功能弱化或缺失可以显著提高其含量,从而增加香味,科学家采用CRISPR/Cas9技术破坏BADH2的功能,分别创制出具有香味的水稻、玉米和高粱新种质^[69~71]。

3.3 提高抵抗生物逆境及非生物逆境能力

作物在生长发育过程中难免会遇到生物或非生物

逆境,如果能提高作物抵抗生物、非生物逆境的能力,就能保持作物的稳产、高产。Ji等人^[72]构建了两个甜菜严重曲顶病毒BSCTV(beet severe curly top virus)诱导的CRISPR/Cas9载体,发现它们在烟草及拟南芥中均能有效抑制BSCTV病毒的产生,且基本消除了组成型载体带来的严重脱靶效应,为防治植物病毒病提供了一条新思路,提高了甜菜的产量和品质。稻瘟病菌和黄单胞菌Xoo分别是导致稻瘟病与白叶枯病这两种水稻毁灭性病害的病原菌。Xoo分泌一种或数种转录激活样效应因子,分别结合于水稻蔗糖转运蛋白基因SWEET11/SWEET13/SWEET14启动子的特定区域EBEs(effector binding elements)来激活这些基因的表达,从而使水稻易感Xoo。Oliva等人^[73]采用CRISPR/Cas9基因组编辑技术对这3个基因的EBEs进行编辑,有多达5个位点的突变被引入到水稻Kitaake品种以及两个大规模栽培的优良品种IR64和Ciherang-Sub1,在其他农艺性状没有受到不利影响的前提下,这些被编辑的水稻株系获得了对许多Xoo生理小种的广谱抗性。Bsr-d1、Pi21和ERF922是3个广谱的抗稻瘟病基因负调控基因。Zhou等人^[74]以热敏雄性不育株系LK638S为材料,采用CRISPR/Cas9基因组编辑技术获得了这3个基因单突和三突的株系,均表现出对稻瘟病菌和黄单胞菌抗性明显提高,单突株系的优良农艺性状并未降低。小麦白粉病抗性位点O(MILDEW RESISTENCE LOCUS O, MLO)是小麦对白粉病的主要感病基因,它的突变可以赋予小麦对白粉病菌广谱且持久的抗性^[75]。Wang等人^[76]采用基因组编辑技术将六倍体小麦中的3个MLO同源等位基因同时进行编辑,获得的编辑株系均表现出对白粉病菌抗性。但由于MLO基因功能的多效性,这些编辑株系同时表现出早衰、矮化及产量降低等不利表型,使单纯敲除MLO基因在生产中的应用受到限制。幸运的是, Li等人^[77]在编辑株系中发现了既具白粉病菌抗性又没有不利生产性状的株系Tamlo-R32。分析表明,该株系3个MLO同源等位基因均被编辑,同时MLO-B1前304 kb大片段缺失导致染色体结构发生变化,使临近的液泡单糖转运蛋白3(tonoplast monosaccharide transporter 3, TMT3B)异位活化表达,正是这一原因使MLO基因被破坏后产生的不利表型被回复。随后,他们采用CRISPR/Cas9基因组编辑技术将这一遗传机制引入4个优良小麦品种中,成功获得了兼具抗白粉病菌且产量不降低的小麦新株系。这一研究工作为今后创制抗病且高产的作物新品种提供了范例。

作物在生长发育过程中也可能受到干旱、高温、低温、盐害及重金属等非生物逆境的影响, CRISPR/Cas9基因组编辑技术可以通过编辑相关敏感基因和调控基因两个方面来提高作物抵抗非生物逆境的能力。Kumar等人^[78]利用CRISPR/Cas9技术获得了籼稻优良品种MTU1010 *DST(drought and salt tolerance)* 366 bp 缺失突变体 $dst^{A184-305}$ 。该突变体叶片变宽、气孔密度变小, 在苗期表现出对干旱中度抗性和对盐害的高度抗性, 有利于在这些逆境条件下保持其产量。生长素是通过调控生长素响应因子(*auxin responsive factors*, *ARF*)等相关下游基因的表达而实现其生理功能。Bouzroud等人^[79]采用CRISPR/Cas9技术敲除了番茄的*ARF4*基因, 该番茄突变体表现出对干旱和盐害的抗性。水稻*PQT3*基因编码一个E3泛素连接酶, 是逆境下活性氧ROS水平的负调控因子。Alfatih等人^[80]采用CRISPR/Cas9技术获得了3个独立的*PQT3*功能缺失突变体, 在氧化胁迫和盐胁迫下突变体的萌发率和生长状态均显著优于野生型, 在田间和温室栽培条件下显示出显著的增产特性。

3.4 赋予作物抗除草剂能力

化学除草有助于农业的规模化, 因此培育抗化学除草剂的作物品种在现代农业生产中具有优势。CRISPR/Cas9技术可以在不引入外源基因的情况下, 通过改变作物内源基因的氨基酸而赋予作物抗除草剂的能力。乙酰乳酸合酶ALS是植物合成支链氨基酸的关键酶, 是50余种除草剂的作用靶标。Kuang等人^[81]采用双碱基编辑器, 在水稻*ALS1*编码框中设计63个sgRNA进行饱和编辑, 成功筛选到一系列对双草醚有抗性的突变株系, 其中P171F的抗性最强, 且这一突变对水稻的生长没有任何不良影响。他们还利用CBE编辑器将优良栽培品种南粳46的ALS进行了P171F编辑, 获得了不含转基因且农艺性状没有改变的抗双草醚的新株系。Liang等人^[82]用CBE获得了谷子ALS P170A的DNA-free编辑株系, 其T1代纯合株系对除草剂烟嘧磺隆表现出抗性。5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶(5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, EPSPS)是芳香族氨基酸合成的关键酶, 是广谱高效农药草甘膦的作用靶标。前期工作已经证明, 该酶的2个氨基酸突变体(T102I和P106S, EPSPSmTIPS)和5个氨基酸突变体(L169F、G173A、A175G、M176C、R177L, EPSPSmLFGAAGMCRL)在不影响其酶活性的前提下

具有草甘膦抗性。Wang等人^[83]采用一种CRISPR/Cas9介导的HDR策略, 成功地将油菜内源EPSPS替换成EPSPSmTIPS和EPSPSmLFGAAGMCRL, 获得了能稳定遗传且具有草甘膦抗性的油菜新株系。除了这2个基因外, 目前已报道采用CRISPR/Cas9技术编辑作物的内源基因赋予作物除草剂抗性的基因还包括*SF3B1*^[84]、乙酰辅酶A合成酶基因^[85]和*OsTubA2*^[86]等。

3.5 从头驯化

目前在生产上广泛栽培的作物品种一般都是人类经过长期的生产实践以产量导向选育而来, 遗传基础一般较为狭窄, 可能丢失了大量抗生物和非生物逆境的抗逆基因。在对基因功能充分了解的基础上, 人们发现, 只需对栽培品种的野生型祖先中少数基因进行编辑, 就可将无生产栽培价值的野生型祖先快速驯化为产量高、品质优、具广谱抗性的优良品种。醋栗番茄(*Solanum pimpinellifolium*)是栽培番茄的野生近缘种。Zsögön等人^[87]构建了同时编辑*SELF-PRUNING*(与番茄分枝类型有关)、*OVATE*(与果实形状相关)、*FASCIATED*和*FRUIT WEIGHT 2.2*(与果实大小相关)、*MULTIFLORA*(与果实数目相关)和*LYCOPENE β CYCLASE*(与番茄红素合成相关)6个基因的CRISPR/Cas9载体, 对醋栗番茄进行遗传转化, 经过筛选获得了株型改变、果实增大3倍、果实数量增加10倍且番茄红素增加500%的系列优良株系, 且不含外源基因并保持了其亲本的优良抗逆特性。Li等人^[88]的类似工作也表明, 这一从头驯化策略是可行的。

多倍体植物较二倍体植物在生长、产量及环境适应方面具有优势。目前栽培水稻品种均为2倍体, 但自然界中存在异源四倍体野生稻, 它们具有天然的杂种优势、生物量大和环境适应能力强等优点, 但它们同时具有稀穗、粒小、落粒和芒长等非驯化特征, 无法作为生产栽培品种直接加以利用。李家洋团队^[89]开展了野生四倍体水稻的从头驯化工作, 从野生四倍体水稻中筛选到具有生长优势、易于遗传转化的异源四倍体水稻PPR1为底盘品种。经过全基因组测序并组装, 结果发现, 113个重要农艺性状控制基因与二倍体栽培水稻的相关基因同源, 针对水稻落粒性、芒长、株高、籽粒大小、茎壁厚度及开花日期等重要农艺性状基因开展基于CRISPR/Cas9多基因编辑, 获得了相关农艺性状显著改善的系列株系, 为将野生植物快速驯化为栽培品种打开了大门。他们的这一驯化策略同样适用于

其他植物, 可以将驯化过程由以前的数千年缩短至几年至十多年的时间, 将为扩大人类的食物种类、保障粮食安全发挥巨大的作用。

3.6 CRISPR/Cas技术介导的作物定向改良

基因的定向进化是建立在基因饱和突变基础上, 在特定条件下连续筛选获得功能弱化、增强或产生新功能的突变体, 即迫使生物按人们的设计方向进化。微生物中的基因定向进化与改造已为人们所熟知, 在植物中CRISPR/Cas介导的对特定基因进行饱和编辑也能在作物定向改良中发挥重要作用。OsSF3B1是水稻剪辑复合体的主要亚基之一, 是剪辑抑制剂普拉二烯内酯B(pladienolide B, PB)和聚酮类化合物GEX1A的作用靶点, 会导致广泛的剪辑受阻, 影响植物的正常生长。为了产生尽可能多的OsSF3B1变体, Butt等人^[84]针对该基因编码区所有PAM位点设计了119个sgRNA文库并构建了CRISPR/Cas9载体, 通过农杆菌介导法进行侵染, 在添加0.4及0.6 $\mu\text{mol/L}$ GEX1A的筛选培养基中, 从15000个转化愈伤中获得了21株再生水稻株系。测序分析表明, 这些编辑位点小的突变只是影响了OsSF3B1与GEX1A的结合, 但未影响其正常的剪辑功能。乙酰乳酸合酶ALS某些位点的突变可以在不影响其功能的同时产生对磺酰脲类和嘧啶羧酸类除草剂的抗性。Kuang等人^[81]采用双碱基编辑器介导的进化策略和sgRNA文库对OsALS编码区进行饱和突变, 分别用农杆菌介导法和基因枪法进行水稻愈伤转化, 以除草剂双草醚为筛选压力, 找到了从未报道过的两个位点4种类型的突变, 可以赋予水稻对双草醚的抗性。Xu等人^[42]采用双碱基编辑器获得了OsALS P171F/OsACC1 I1781V的双突变水稻株系, 赋予了对双嘧啶乙酸和氟草胺两种除草剂的抗性。从这些例子可以发现, 对相关功能基因采用CRISPR/Cas9基因组编辑技术进行饱和和突变, 再辅以恰当的筛选压力, 可以快速地使植物朝研究者设计的方向进化。

4 展望

CRISPR/Cas技术的出现及其系列应用工具的开发应用是生命科学研究领域具有划时代意义的重大事件。为了充分发挥CRISPR/Cas基因组编辑技术在作物育种方面的潜力, 需要在如下三方面开展工作。

一是CRISPR/Cas技术的持续改进及加强相关基础理论研究。虽然目前已有许多CRISPR/Cas编辑工具可

供使用(表1), 但这些工具在提高编辑效率和降低脱靶率方面仍有进一步提高的空间, 尤其需在提高HDR介导的编辑效率、成功开发在植物中应用的twinPE等方面继续努力。如Tsuchida等人^[90]报道了一个分子量更小、靶点编辑效率更高以及脱靶率更低的CasX; Bravo等人^[91]在解析Cas9脱靶结构机制的基础上, 设计获得了SuperFi-Cas9, 其编辑效率与原始Cas9相当, 但其脱靶效率下降了4000倍。如果这些新开发的Cas蛋白应用在CRISPR/Cas编辑工具中, 则必将进一步提高植物分子育种的效率。同理, 如果采用定向进化方式继续对碱基编辑器中的APOBEC3A和TadA等进行改造, 也将进一步提高碱基编辑器的效率。DNA-free的CRISPR/Cas基因组编辑技术在作物分子育种中具有天然的优势, 进一步在功能元件投递技术、外植体选择及提高筛选效率等方面持续改进。另一方面, 充分了解基因的功能和调控关系是进行分子设计育种的前提, 因此进一步加强基础理论研究, 阐明更多基因的功能及其调控关系, 只有这样才能利用基因组编辑工具对相关基因按设计进行改造, 实现更高水平的分子设计育种。

二是监管政策的适时调整以促进CRISPR/Cas基因组编辑技术在作物品种改良中的应用。从CRISPR/Cas等基因组编辑技术的作用原理来看, 稳定表达的CRISPR/Cas基因组编辑技术插入基因组的编辑元件与其编辑靶位点处于不同的染色体位点。靶位点编辑完成后插入的编辑元件可以通过下一代的分离重组而消除, 而DNA-free的CRISPR/Cas基因组编辑技术则完全没有外源DNA插入植物基因组的问题, 最终获得的编辑株系不含任何外源基因, 只是对靶位点进行有限的修饰和改造。因此, CRISPR/Cas基因组编辑技术改造的作物类似于传统上认为是安全的自然突变、物理和化学诱变育种、太空诱变育种等方式获得的育种材料, 在本质上不同于超表达、干涉、反义RNA及T-DNA插入等被严格监管的早期转基因技术获得的育种材料。故对CRISPR/Cas基因组编辑作物就不宜沿用严格的转基因作物的管理措施。若对CRISPR/Cas基因组编辑技术获得的作物品种进行严格监管, 会不必要地耗费研究机构、种业公司的时间、经费及精力, 延缓基因编辑品种的应用, 继而阻碍这一领域的快速发展。基于这些原因, 世界上越来越多的国家(包括美国、英国和日本等)已不再将CRISPR/Cas9基因组编辑技术获得的作物品种作为转基因作物监管, 这将极大地促进CRISPR/

Cas9基因组编辑技术在作物品种创制中的应用。如最近在日本采用CRISPR基因编辑的西西里红高GABA(γ -氨基丁酸,改善机体睡眠质量、降血压等生理功效)番茄已经上市,这是世界上第一款上市销售的CRISPR/Cas9基因组编辑作物^[92]。因此,呼吁我国有关监管部门从CRISPR/Cas9基因组编辑技术的安全性出发,参考国际发达国家管理措施,尽快出台适用于CRISPR/Cas9基因组编辑作物的管理政策,释放CRISPR/Cas9基因组编辑技术在农作物品种改良与创制中的巨大潜能。2022年1月24日,中华人民共和国农业农村部颁发了《农业用基因编辑植物安全评价指南(试行)》(http://www.moa.gov.cn/ztl/zjyqwgz/sbzn/202201/t20220124_6387561.htm),该指南主要针对没有引入外源基因的基因编辑植物,依据风险等级的不同申报安全评价以申

请生产应用安全证书。该指南的发布为我国基因编辑植物规范化发展提供了依据,并为今后进一步放开基因编辑植物的监管提供借鉴。

三是加强科普宣传,提高公众对CRISPR/Cas基因组编辑作物的接受程度。公众是CRISPR/Cas基因组编辑作物的最终消费者,只有大家充分认同基因组编辑作物与常规育种技术获得的作物同样安全,打通消费渠道,这样才能促进CRISPR/Cas基因组编辑技术及其在作物改良中的广泛应用。因此,建议研究人员积极向公众科普CRISPR/Cas基因组编辑作物的安全性及其技术优势,为科技的发展营造良好的社会环境。

综上所述,只有从上述三方面协调推进,才能尽早使我国迈入智能设计育种“4.0时代”,促进种业振兴,提高作物的产量和品质,实现藏粮于技战略。

参考文献

- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, et al. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*, 1987, 169: 5429–5433
- Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, et al. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 2005, 151: 2551–2561
- Mojica F J M, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, et al. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*, 2005, 60: 174–182
- Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*, 2005, 151: 653–663
- Makarova K S, Haft D H, Barrangou R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9: 467–477
- Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 2010, 327: 167–170
- Koonin E V, Makarova K S, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol*, 2017, 37: 67–78
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337: 816–821
- Fichtner F, Urrea Castellanos R, Ülker B. Precision genetic modifications: A new era in molecular biology and crop improvement. *Planta*, 2014, 239: 921–939
- Zeng X Y, Hou X W. Application of CRISPR/Cas9 genome editing technology in functional genomics and improvement of plants (in Chinese). *Plant Physiol J*, 2015, 51: 1351–1358 [曾秀英, 侯学文. CRISPR/Cas9基因组编辑技术在植物基因功能研究及植物改良中的应用. *植物生理学报*, 2015, 51: 1351–1358]
- Zhu H, Li C, Gao C. Applications of CRISPR-Cas in agriculture and plant biotechnology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21: 661–677
- Gao C. Genome engineering for crop improvement and future agriculture. *Cell*, 2021, 184: 1621–1635
- Liu G, Lin Q, Jin S, et al. The CRISPR-Cas toolbox and gene editing technologies. *Mol Cell*, 2022, 82: 333–347
- 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
- Wang C, Wang G, Gao Y, et al. A cytokinin-activation enzyme-like gene improves grain yield under various field conditions in rice. *Plant Mol Biol*, 2020, 102: 373–388
- Owens D D G, Caulder A, Frontera V, et al. Microhomologies are prevalent at Cas9-induced larger deletions. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47: 7402–7417
- Tan J, Zhao Y, Wang B, et al. Efficient CRISPR/Cas9-based plant genomic fragment deletions by microhomology-mediated end joining. *Plant Biotechnol J*, 2020, 18: 2161–2163
- Xie X R, Zeng D C, Tan J T, et al. CRISPR-based DNA fragment deletion in plants (in Chinese). *Chin Bull Bot*, 2021, 56: 44–49 [谢先荣, 曾栋昌,

- 谭健韬, 等. 基于CRISPR编辑系统的DNA片段删除技术. 植物学报, 2021, 56: 44–49]
- 19 Wang S, Zong Y, Lin Q, et al. Precise, predictable multi-nucleotide deletions in rice and wheat using APOBEC-Cas9. *Nat Biotechnol*, 2020, 38: 1460–1465
- 20 Gil-Humanes J, Wang Y, Liang Z, et al. High-efficiency gene targeting in hexaploid wheat using DNA replicons and CRISPR/Cas9. *Plant J*, 2017, 89: 1251–1262
- 21 Butt H, Eid A, Ali Z, et al. Efficient CRISPR/Cas9-mediated genome editing using a chimeric single-guide RNA molecule. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1441
- 22 Lu Y, Tian Y, Shen R, et al. Targeted, efficient sequence insertion and replacement in rice. *Nat Biotechnol*, 2020, 38: 1402–1407
- 23 Ren Q, Sretenovic S, Liu G, et al. Improved plant cytosine base editors with high editing activity, purity, and specificity. *Plant Biotechnol J*, 2021, 19: 2052–2068
- 24 Zeng D, Liu T, Tan J, et al. PhieCBEs: Plant high-efficiency cytidine base editors with expanded target range. *Mol Plant*, 2020, 13: 1666–1669
- 25 Li C, Zong Y, Wang Y, et al. Expanded base editing in rice and wheat using a Cas9-adenosine deaminase fusion. *Genome Biol*, 2018, 19: 59
- 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 Tan J, Zeng D, Zhao Y, et al. PhieABEs: A PAM-less/free high-efficiency adenine base editor toolbox with wide target scope in plants. *Plant Biotechnol J*, 2022, doi: 10.1111/pbi.13774
- 28 Li C, Zhang R, Meng X, et al. Targeted, random mutagenesis of plant genes with dual cytosine and adenine base editors. *Nat Biotechnol*, 2020, 38: 875–882
- 29 Hu F Y, Wang K J. The STEME system: A novel tool for directed evolution *in vivo* (in Chinese). *Hereditas*, 2020, 42: 231–235 [胡风越, 王克剑. STEME系统: 一种助力体内定向进化的新工具. 遗传, 2020, 42: 231–235]
- 30 Lin Q, Zong Y, Xue C, et al. Prime genome editing in rice and wheat. *Nat Biotechnol*, 2020, 38: 582–585
- 31 Xu R, Li J, Liu X, et al. Development of plant prime-editing systems for precise genome editing. *Plant Commun*, 2020, 1: 100043
- 32 Xu W, Zhang C, Yang Y, et al. Versatile nucleotides substitution in plant using an improved prime editing system. *Mol Plant*, 2020, 13: 675–678
- 33 Tuladhar R, Yeu Y, Tyler Piazza J, et al. CRISPR-Cas9-based mutagenesis frequently provokes on-target mRNA misregulation. *Nat Commun*, 2019, 10: 4056
- 34 Xie X, Liu W, Dong G, et al. MMEJ-KO: A web tool for designing paired CRISPR guide RNAs for microhomology-mediated end joining fragment deletion. *Sci China Life Sci*, 2020, 64: 1021–1024
- 35 Nishizawa-Yokoi A, Endo M, Ohtsuki N, et al. Precision genome editing in plants via gene targeting and *piggyBac*-mediated marker excision. *Plant J*, 2014, 81: 160–168
- 36 Zetsche B, Gootenberg J S, Abudayyeh O O, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 2015, 163: 759–771
- 37 Merker L, Schindele P, Huang T K, et al. Enhancing *in planta* gene targeting efficiencies in *Arabidopsis* using temperature-tolerant CRISPR/Lb Cas12a. *Plant Biotechnol J*, 2020, 18: 2382–2384
- 38 Huang T K, Armstrong B, Schindele P, et al. Efficient gene targeting in *Nicotiana tabacum* using CRISPR/SaCas9 and temperature tolerant LbCas12a. *Plant Biotechnol J*, 2021, 19: 1314–1324
- 39 Vu T V, Doan D T H, Tran M T, et al. Improvement of the LbCas12a-crRNA system for efficient gene targeting in tomato. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 722552
- 40 Choi M, Yun J Y, Kim J H, et al. The efficacy of CRISPR-mediated cytosine base editing with the RPS5a promoter in *Arabidopsis thaliana*. *Sci Rep*, 2021, 11: 8087
- 41 Wang G, Xu Z, Wang F, et al. Development of an efficient and precise adenine base editor (ABE) with expanded target range in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*). *BMC Biol*, 2022, 20: 45
- 42 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
- 43 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
- 44 Anzalone A V, Gao X D, Podracky C J, et al. Programmable deletion, replacement, integration and inversion of large DNA sequences with twin prime editing. *Nat Biotechnol*, 2021, doi: 10.1038/s41587-021-01133-w
- 45 Gao H Y, Ran Q B, Hu X, et al. DNA-free genome editing (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2021, 66: 1408–1422 [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]
- 46 Gu X, Liu L, Zhang H. Transgene-free genome editing in plants. *Front Genome Ed*, 2021, 3: 805317
- 47 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
- 48 Chen L, Li W, Katin-Grazzini L, et al. A method for the production and expedient screening of CRISPR/Cas9-mediated non-transgenic mutant

- plants. *Hortic Res*, 2018, 5: 13
- 49 Meyer C M, Goldman I L, Grzebelus E, et al. Efficient production of transgene-free, gene-edited carrot plants via protoplast transformation. *Plant Cell Rep*, 2022, 41: 947–960
 - 50 Ariga H, Toki S, Ishibashi K. Potato virus X vector-mediated DNA-free genome editing in plants. *Plant Cell Physiol*, 2020, 61: 1946–1953
 - 51 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
 - 52 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
 - 53 Nicolai A, Andersson M, Hofvander P, et al. Tomato protoplasts as cell target for ribonucleoprotein (RNP)-mediated multiplexed genome editing. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2021, 144: 463–467
 - 54 Klimek-Chodacka M, Gieniec M, Baranski R. Multiplex site-directed gene editing using polyethylene glycol-mediated delivery of CRISPR gRNA: Cas9 ribonucleoprotein (RNP) complexes to carrot protoplasts. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 10740
 - 55 Sidorov V, Wang D, Nagy E D, et al. Heritable DNA-free genome editing of canola (*Brassica napus* L.) using PEG-mediated transfection of isolated protoplasts. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 2021, doi: 10.1007/s11627-021-10236-7
 - 56 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
 - 57 Dong S, Qin Y L, Vakulskas C A, et al. Efficient targeted mutagenesis mediated by CRISPR-Cas12a ribonucleoprotein complexes in maize. *Front Genome Ed*, 2021, 3: 670529
 - 58 Salekdeh P R, Ma'mani L, Tavakkoly-Bazzaz J, et al. Bi-functionalized aminoguanidine-PEGylated periodic mesoporous organosilica nanoparticles: A promising nanocarrier for delivery of Cas9-sgRNA ribonucleoproteins. *J Nanobiotechnol*, 2021, 19: 95
 - 59 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
 - 60 Zhou J, Xin X, He Y, et al. Multiplex QTL editing of grain-related genes improves yield in elite rice varieties. *Plant Cell Rep*, 2019, 38: 475–485
 - 61 Cai Z, Xian P, Cheng Y, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing of *GmJAGGED1* increased yield in the low-latitude soybean variety Huachun 6. *Plant Biotechnol J*, 2021, 19: 1898–1900
 - 62 Zhang H, Si X, Ji X, et al. Genome editing of upstream open reading frames enables translational control in plants. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 894–898
 - 63 Xing S, Chen K, Zhu H, et al. Fine-tuning sugar content in strawberry. *Genome Biol*, 2020, 21: 230
 - 64 Xu Y, Lin Q, Li X, et al. Fine-tuning the amylose content of rice by precise base editing of the *Wx* gene. *Plant Biotechnol J*, 2021, 19: 11–13
 - 65 Sánchez-León S, Gil-Humanes J, Ozuna C V, et al. Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol J*, 2018, 16: 902–910
 - 66 Assou J, Zhang D, Roth K D R, et al. Removing the major allergen Bra j 1 from brown mustard (*Brassica juncea*) by CRISPR/Cas9. *Plant J*, 2022, 109: 649–663
 - 67 Yu P F, Li Y W, Zou L J, et al. Variety-selective rhizospheric activation, uptake, and subcellular distribution of perfluorooctanesulfonate (PFOS) in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Environ Sci Technol*, 2021, 55: 8730–8741
 - 68 Do P T, Nguyen C X, Bui H T, et al. Demonstration of highly efficient dual gRNA CRISPR/Cas9 editing of the homeologous *GmFAD2-1A* and *GmFAD2-1B* genes to yield a high oleic, low linoleic and α -linolenic acid phenotype in soybean. *BMC Plant Biol*, 2019, 19: 311
 - 69 Tang Y, Abdelrahman M, Li J, et al. CRISPR/Cas9 induces exon skipping that facilitates development of fragrant rice. *Plant Biotechnol J*, 2021, 19: 642–644
 - 70 Wang Y, Liu X, Zheng X, et al. Creation of aromatic maize by CRISPR/Cas. *J Integr Plant Biol*, 2021, 63: 1664–1670
 - 71 Zhang D, Tang S, Xie P, et al. Creation of fragrant sorghum by CRISPR/Cas9. *J Integr Plant Biol*, 2022, doi: 10.1111/jipb.13232
 - 72 Ji X, Si X, Zhang Y, et al. Conferring DNA virus resistance with high specificity in plants using virus-inducible genome-editing system. *Genome Biol*, 2018, 19: 197
 - 73 Oliva R, Ji C, Atienza-Grande G, et al. Broad-spectrum resistance to bacterial blight in rice using genome editing. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 1344–1350
 - 74 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, doi: 10.1111/PBI.13766
 - 75 Schulze-Lefert P, Vogel J. Closing the ranks to attack by powdery mildew. *Trends Plant Sci*, 2000, 5: 343–348
 - 76 Wang Y, Cheng X, Shan Q, et al. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 947–951
 - 77 Li S, Lin D, Zhang Y, et al. Genome-edited powdery mildew resistance in wheat without growth penalties. *Nature*, 2022, 602: 455–460
 - 78 Kumar V V S, Verma R K, Yadav S K, et al. CRISPR-Cas9 mediated genome editing of drought and salt tolerance (*OsDST*) gene in indica mega

- rice cultivar MTU1010. *Physiol Mol Biol Plants*, 2020, 26: 1099–1110
- 79 Bouzroud S, Gasparini K, Hu G, et al. Down regulation and loss of auxin response factor 4 function using CRISPR/Cas9 alters plant growth, stomatal function and improves tomato tolerance to salinity and osmotic stress. *Genes*, 2020, 11: 272
- 80 Alfatih A, Wu J, Jan S U, et al. Loss of rice *PARQUAT TOLERANCE 3* confers enhanced resistance to abiotic stresses and increases grain yield in field. *Plant Cell Environ*, 2020, 43: 2743–2754
- 81 Kuang Y, Li S, Ren B, et al. Base-editing-mediated artificial evolution of OsALS1 in planta to develop novel herbicide-tolerant rice germplasms. *Mol Plant*, 2020, 13: 565–572
- 82 Liang Z, Wu Y, Ma L, et al. Efficient genome editing in *Setaria italica* using CRISPR/Cas9 and base editors. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 815946
- 83 Wang Z, Wan L, Xin Q, et al. Optimizing glyphosate tolerance in rapeseed by CRISPR/Cas9-based geminiviral donor DNA replicon system with Csy4-based single-guide RNA processing. *J Exp Bot*, 2021, 72: 4796–4808
- 84 Butt H, Eid A, Momin A A, et al. CRISPR directed evolution of the spliceosome for resistance to splicing inhibitors. *Genome Biol*, 2019, 20: 73
- 85 Zhang R, Liu J, Chai Z, et al. Generation of herbicide tolerance traits and a new selectable marker in wheat using base editing. *Nat Plants*, 2019, 5: 480–485
- 86 Liu L, Kuang Y, Yan F, et al. Developing a novel artificial rice germplasm for dinitroaniline herbicide resistance by base editing of *OsTubA2*. *Plant Biotechnol J*, 2020, 19: 5–7
- 87 Zsögön A, Čermák T, Naves E R, et al. *De novo* domestication of wild tomato using genome editing. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 1211–1216
- 88 Li T, Yang X, Yu Y, et al. Domestication of wild tomato is accelerated by genome editing. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 1160–1163
- 89 Yu H, Lin T, Meng X, et al. A route to *de novo* domestication of wild allotetraploid rice. *Cell*, 2021, 184: 1156–1170.e14
- 90 Tsuchida C A, Zhang S, Doost M S, et al. Chimeric CRISPR-CasX enzymes and guide RNAs for improved genome editing activity. *Mol Cell*, 2022, 82: 1199–1209.e6
- 91 Bravo J P K, Liu M S, Hibshman G N, et al. Structural basis for mismatch surveillance by CRISPR-Cas9. *Nature*, 2022, 603: 343–347
- 92 Waltz E. GABA-enriched tomato is first CRISPR-edited food to enter market. *Nat Biotechnol*, 2022, 40: 9–11

Summary for “CRISPR/Cas基因组编辑技术及其在农作物品种改良中的应用”

The recent progress of CRISPR/Cas genome editing technology and its application in crop improvement

Zhengshiyu Lai¹, Zantang Huang¹, Jieting Sun¹, Xuejiao Jing¹, Lei Xiang³, Haiming Zhao³, Cehui Mo^{3*} & Xuewen Hou^{1,2*}

¹ Center for Photosynthesis and Plant Stress Biology, College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

² State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources, College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

³ Guangdong Provincial Research Center for Environment Pollution Control and Remediation Materials, College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China

* Corresponding authors, E-mail: tchmo@jnu.edu.cn; hwx1969@scau.edu.cn

CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) and CRISPR-associated (Cas) nucleases were originally identified in bacteria and archaea as their immune protection system to destroy phage and exogenous DNA. Relatively simple and powerful genome editing technologies have been developed based on the CRISPR/Cas system. In the last decade, CRISPR/Cas has been utilized as an effective genome editing tool in microorganisms, animals and plants. In this review, we will first discuss how the CRISPR/Cas system (e.g., CRISPR/Cas9) is used to edit plant genomes through various developed tools including small and large size DNA fragment deletions, homology-directed recombination, cytosine base editor, adenine base editor, dual base editor and prime editor. Details about these CRISPR/Cas plant genome editing tools including their working mechanisms, the construction of these tools using various functional elements, and several examples of applications will be provided. Indeed, the successful development of these tools allows researchers to modify plant genomes, functionally dissect plant genes, conduct molecular-design based breeding. Although the CRISPR/Cas T-DNA can be screened out either through back-crossing to wild type or self-crossing, the DNA-free CRISPR/Cas plant genome editing technologies bring obvious advantages in crop molecular breeding, especially for vegetative breeding crops or long juvenile stage plants. Therefore, secondly, we will describe how DNA-free CRISPR/Cas plant genome editing technology works. DNA-free CRISPR/Cas plant genome editing technology, which is especially useful in crop molecular breeding, can be achieved through the following approaches: Transiently expressed CRISPR/Cas DNA can be delivered into immature embryos using particle bombardment, or into explants using *Agrobacterium tumefaciens* mediated method, or into protoplasts through polyethylene glycol mediation; *in vitro* transcripts of sgRNA and Cas nuclease can be imported into immature embryos using particle bombardment. Both sgRNA and Cas nuclease can be cloned into RNA virus vector before they are used to transform explants. Ribonucleoprotein complexes formed by *in vitro* transcribed sgRNA and Cas nuclease can be delivered into protoplasts, immature embryos through polyethylene glycol, lipofection or nanoparticle mediated methods, respectively. DNA-free edited plants can be identified from plants regenerated on medium without selective reagent. Thirdly, we will cover the recent successful applications of CRISPR/Cas as a plant genome-editing tool in crop improvements including crop yield and quality improvement, biotic and abiotic stresses resistance, de novo domestication, and crop directed improvement. These examples demonstrate that CRISPR/Cas plant genome editing technology is effective and valuable to crop molecular breeding. Lastly, we will discuss the future development of CRISPR/Cas technology in plant genome editing, the role of appropriate national management policies and favorable social environment in promoting this field. The editing efficiency of these tools can be further improved and the off-target rate reduced. Further enhancement of the CRISPR/Cas technology will depend on improved functional elements (e.g., CasX, SuperFi-Cas9, engineered APOBEC3A and TdA, etc.) and good vector design. Successful applications of CRISPR/Cas plant genome editing technologies in crop improvement will depend on appropriate regulatory policies and public acceptance of genome-edited crops. This paper aims to provide important insights into how CRISPR/Cas as a powerful plant genome-editing technology can be used in improving crop varieties, accelerating seed industry development, and fulfilling our national strategy of food storage in technology.

CRISPR, genome editing, base editor, prime editor, crop improvement, DNA-free

doi: [10.1360/TB-2022-0197](https://doi.org/10.1360/TB-2022-0197)