

· 特邀综述 ·

# 基因编辑在饲草育种中的应用与展望

邓娴\*, 李彤, 曹晓凤\*

中国科学院遗传与发育生物学研究所, 植物基因组学国家重点实验室和国家植物基因研究中心, 北京 100101

**摘要** 基因编辑技术可对生物体的遗传物质进行精准修饰和定向改造, 是当前生命科学领域最受瞩目的颠覆性技术之一, 也是农牧业生物育种中的关键核心技术。近年来, 随着我国对高产优质饲草的需求量持续增加, 亟须培育具有自主知识产权的优质饲草品种。该文简要概述了基因编辑技术的发展及其在农业育种中的应用, 总结了禾本科和豆科饲草的基因组编辑研究进展, 展望了未来利用基因组编辑开展饲草分子设计育种的发展方向。

**关键词** 饲草, 基因编辑, 育种技术, 分子设计育种

邓娴, 李彤, 曹晓凤 (2023). 基因编辑在饲草育种中的应用与展望. 植物学报 58, 233–240.

随着我国居民生活水平的不断提高, 膳食结构中对肉、蛋和奶等蛋白类食品的消费持续增长, 对畜牧和养殖产品的需求量日益增加。然而, 相较于传统农业, 我国饲草育种起步较晚, 与国际先进水平尚存在一定差距, 导致我国饲草供给大量依赖进口, 严重影响了我国饲料粮安全, 亟须培育具有自主知识产权的高产、优质饲草品种。基因组编辑技术可在生物体内实现对基因组定点位置的精准修饰和定向改造, 其中第3代基因组编辑技术CRISPR系统目前被广泛使用。植物基因组编辑技术的开发与应用极大加快了植物功能基因组研究和农作物分子设计育种进程。基于此, 本文从基因组编辑技术的发展历程出发, 介绍了其在农业生物育种中的应用, 详述了禾本科和豆科饲草基因组编辑研究进展, 提出了利用基因组编辑技术开展饲草分子设计育种的发展方向。

## 1 基因编辑技术

### 1.1 基因编辑技术的发展

基因编辑技术是21世纪初期开始兴起的新一代生物技术, 能对基因组DNA进行特异性识别和定向改造, 已成为后基因组时代重要的研究手段, 在医疗、农业、能源、材料和环境等领域均展现出巨大的应用潜力,

是当前生命科学领域最受瞩目的颠覆性技术。与传统遗传操作技术相比, 基因编辑技术既具有可定点修饰的特点, 又摆脱了对物种的依赖性, 能够应用于更多的物种, 并具有高效、稳定和成本低等优势, 为科学研究和物种性状改良提供了有力的工具(Gaj et al., 2013)。

基因编辑技术是利用序列特异性人工核酸酶在基因组中的特定位点切割产生DNA双链断裂(double-strand breaks, DSBs), 随后激活生物体内非同源末端连接(nonhomologous end-joining, NHEJ)或同源重组修复(homology directed repair, HR)等自我修复系统, 从而实现靶位点上碱基的插入、缺失、替换和突变等一系列人工修饰(Symington and Gautier, 2011; Zhu et al., 2020)。随着序列特异性人工核酸酶的发展, 基因编辑技术的发展大致分为3个阶段, 分别以锌指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFNs) (Shukla et al., 2009)、类转录激活因子效应核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs) (Bedell et al., 2012)和成簇规律间隔短回文重复序列及其关联蛋白系统(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated system, CRISPR-Cas) (Cong et al., 2013; Mali et al., 2013)为代表。第1代ZFNs系统与第2代TALENs

收稿日期: 2022-12-16; 接受日期: 2023-04-18

基金项目: 国家重点研发计划(No.2022YFF1002802)

\* 通讯作者。E-mail: xfcao@genetics.ac.cn; xdeng@genetics.ac.cn

系统的原理较为相似,均为通过DNA结合蛋白识别靶标序列,再通过限制性核酸内切酶切割靶标DNA产生双链断裂。然而,由于ZFNs和TALENs系统均需构建与匹配靶向不同DNA基序的蛋白结构域,使其存在设计烦琐、结构复杂、操作困难和效率较低等问题,限制了其大规模应用(Gaj et al., 2013)。第3代基因编辑技术CRISPR系统的诞生,解决了ZFNs与TALENs系统的一系列问题,并具有操作简便、编辑效率高和可同时编辑多个目的基因等优点。近年来,在动物、植物和微生物中得到广泛应用和蓬勃发展,并开发出一系列衍生技术,运用于生物研究的各个领域(Gaj et al., 2013; Rani et al., 2016)。

## 1.2 CRISPR-Cas9技术

CRISPR系统最早在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中发现(Ishino et al., 1987),是细菌和古细菌对抗病毒的自身防御系统,主要通过成簇且具有规律间隔的短回文重复序列(即CRISPR序列)及CRISPR相关系统(即Cas)识别入侵病毒的基因组信息,并靶向切割清除病毒基因。2012年,CRISPR-Cas9系统被证明能作为新一代基因组编辑工具,并且是目前最常用的基因编辑工具(Jinek et al., 2012)。CRISPR-Cas9系统主要包含1个可切割双链DNA的Cas9蛋白和1个向导RNA (small guide RNA, sgRNA), Cas9在sgRNA的引导下切割基因组中的目标位点,导致双链DNA断裂,触发体内的非同源末端连接或同源重组等DNA修复过程,从而实现目标位点上碱基的插入、缺失或替换等突变。与ZFNs和TALENs技术相比,CRISPR技术具有靶位点识别能力强、编辑效率高、应用范围广、设计和操作简便及成本低等优势,这使其在很短时间内便发展成为主流基因编辑工具,且广泛应用于动物疾病模型构建、动植物功能基因研究和育种应用领域(Gaj et al., 2013; Rani et al., 2016)。

自2012年CRISPR-Cas9系统被用于基因编辑工具以来,其不断被优化和拓展,从而衍生出一系列可在不同层面和维度对生命体进行遗传调控和设计改造的新工具和新方法。碱基编辑系统(base editor)利用nCas9 (nickase Cas9, 仅切割DNA的1条链)可在不产生DNA双链断裂的情况下,实现基因组特定位点单个碱基替换的精准编辑,从而有效避免编辑过程中的基因组损伤,主要包括催化C>T碱基替换的胞嘧

啶碱基编辑器(cytidine base editor, CBE) (Komor et al., 2016)和催化A>G碱基替换的腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editor, ABE) (Gaudelli et al., 2017); 引导编辑系统(prime editor)通过与逆转录酶结合,在基因组中高效、精准地实现DNA小片段插入/删除和任意碱基的替换与突变(Anzalone et al., 2019); 多基因敲除系统利用同时表达或加工成熟多个sgRNA实现多靶点的敲除(Xing et al., 2014; Xie et al., 2015); 通过dCas9 (dead Cas9, 催化失活的Cas9)与转录激活因子或转录抑制因子结合,CRISPRa (activation)和CRISPRi (interference)可分别用于对基因表达进行位点特异性的激活和抑制(Qi et al., 2013); 通过dCas9与表观修饰因子结合,表观遗传编辑系统可改变特定基因位点的DNA甲基化或组蛋白修饰(Nakamura et al., 2021)。这些技术的研发与应用使CRISPR-Cas9系统成为当之无愧的“万能基因编辑器”。

## 1.3 CRISPR-Cas9技术在农业育种中的应用

优异农作物种质资源是保障国家粮食安全、促进农业现代化和农业可持续发展的重要前提,而种质的不断优化和改良对现代农业生产具有重要作用。农作物的栽培与驯化是农业文明的重要组成部分。然而,传统的育种方式通常改良周期长且效率低,导致遗传多样性大量减少和环境适应力逐渐下降。随着基因组编辑技术的兴起,科学家能够实现精准可控的育种,快速获得高产、优质且抗逆的理想种质。目前,基因组编辑技术已在水稻(*Oryza sativa*)、小麦(*Triticum aestivum*)和玉米(*Zea mays*)等粮食作物以及大豆(*Glycine max*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)、马铃薯(*S. tuberosum*)、紫花苜蓿(*Medicago sativa*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)、陆地棉(*Gossypium hirsutum*)、生菜(*Lactuca sativa*)和西瓜(*Citrullus lanatus*)等经饲作物中广泛应用(Chen et al., 2019; Gao, 2021)。

我国科学家在利用基因组编辑技术进行农业育种方面做出了一系列开创性的工作。例如,利用CRISPR-Cas9系统创制了具有白粉病广谱抗性且高产的小麦新种质(Wang et al., 2014; Li et al., 2022),打破性状连锁创制了高产水稻(Song et al., 2022),及创制了产生不同直链淀粉含量的水稻新种质(Zeng et al., 2020)。此外,我国科学家还突破传统育种限制,利用CRISPR-Cas9系统在主粮作物水稻和经济作物

番茄的野生资源快速驯化方面做出了突出贡献(Li et al., 2018; Yu et al., 2021)。目前, 利用CRISPR-Cas9系统, 我国已创制出多种基因编辑作物品系, 如抗除草剂的水稻、香味糯玉米、高油酸大豆、高番茄红素番茄、高维生素C生菜和抗褐化马铃薯。然而, 由于饲草具有物种多样、高度杂合、基因组结构复杂和自交不亲和等生物学特征, 导致其基因组信息不完整, 功能基因组研究薄弱, 难以建立稳定高效的遗传转化和基因组编辑体系, 因此与传统农作物相比仅有少数饲草建立了基因组编辑体系(表1)。饲草的功能基因挖掘和育种技术发展相对滞后, 限制了我国饲草分子设计育种的进程。

## 2 基因编辑技术在饲草育种中的应用

### 2.1 燕麦

燕麦(*Avena sativa*)隶属禾本科燕麦属, 为一年生草本植物。作为重要的饲料作物, 其茎秆与叶片的蛋白质、脂肪和可消化纤维含量较高, 且粗纤维含量低、柔软多汁, 适口性好, 具有较高的营养价值。燕麦对生长土地要求不高, 具有较强的耐逆性。因此, 燕麦不仅是牲畜理想的饲草, 而且在保护草地资源和促进草地畜牧业可持续发展方面发挥重要作用。然而, 燕麦田间的禾本科杂草危害非常严重, 阻碍了燕麦的生产。使用除草剂是最经济且有效的农田防除杂草技术, 通过提高燕麦的抗除草剂能力, 可以在去除杂草的同时保证燕麦的田间产量以及品质。采用基因编辑技术敲除抗除草剂关键酶, 是提升燕麦防除能力的有效途径。乙酰辅酶A羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACCase)是禾本科植物多种除草剂的作用靶标。于东洋等(2019)通过CRISPR-Cas9系统编辑了燕麦的ACCase基因, 将关键位点由异亮氨酸突变为亮氨酸, 使燕麦对环己烯酮类除草剂(如拿捕净)产生抗性, 该成果为燕麦分子育种研究及提升其它禾本科饲草防除能力提供了新思路。

### 2.2 黑麦草

多年生黑麦草(*Lolium perenne*)具有分蘖多、耐牧性强、生长和建植速度快等优点, 是世界范围内广为种植的重要禾本科饲草和草坪草(麻冬梅等, 2014)。黑麦草作为禾本科小麦族的成员, 具有小麦族物种典型

的杂合度高和基因组复杂等特性, 因此其功能基因组研究相对滞后, 定向改良较为困难。姜倩倩等(2021)通过建立快速且高效的瞬时基因表达体系靶向改良多年生黑麦草, 并用构建的靶向黑麦草*LpCKX1*基因的CRISPR-Cas9基因编辑载体验证了瞬时表达体系。Zhang等(2020)利用CRISPR-Cas9系统在黑麦草体内引入基因*LpDMC1* (*DISRUPTED MEIOTIC c-DNA1*)以及着丝粒特异的组蛋白H3变体*LpCENH3*, 并在多年生黑麦草中获得8个*LpDMC1*的T<sub>0</sub>敲除突变体。*DMC1*是一种高度保守的蛋白质, 在许多物种的减数分裂中起关键作用。Zhang等(2020)研究发现, 黑麦草的*Lpdmc1*缺失突变体也表现为完全雄性不育, 说明*DMC1*在黑麦草中也具有保守性。这些研究结果为多年生黑麦草基因编辑载体的快速鉴定及功能基因组研究提供了有效工具, 为深入开展多年生黑麦草的功能基因组学研究奠定了基础, 也为其在种质创新领域和分子育种方面的研究提供了借鉴。

### 2.3 蒙古冰草

蒙古冰草(*Agropyron mongolicum*)隶属禾本科小麦族冰草属, 为多年生草本植物, 生态幅度广, 主要分布于温带和寒温带草原, 为寒旱生植物。蒙古冰草根系发达、返青早、分蘖能力强、茎叶柔软且抗逆性强, 耐旱特性尤为突出, 是干旱草原和荒漠草原上的重要牧草, 具有极高的生态和育种价值。蒙古冰草蕴含大量与耐逆性和高品质相关的基因, 利用基因编辑技术快速挖掘并验证相关基因具有重要意义。落粒性是禾本科植物在进化过程中为抵御恶劣环境及繁衍后代, 通过长期的生存竞争逐渐形成的一种适应机制(Hirosue et al., 2000)。2019年, 专家利用CRISPR-Cas9系统对蒙古冰草的原生质体进行基因编辑, 建立了高效的蒙古冰草CRISPR-Cas9靶位点筛选系统, 并最终在原生质体基础上建立了高效的瞬时转化体系, 成功对蒙古冰草落粒相关基因*Sh1*进行了编辑, 该研究为后续蒙古冰草稳定转化植株的基因编辑和功能研究提供了技术支撑(张文静等, 2019)。

### 2.4 海大麦

海大麦(*Hordeum marinum*)是小麦族中的草类物种, 属盐生植物, 具有耐盐和耐渍等优异特性。基因编辑手段不仅可辅助挖掘其耐逆相关基因从而为农牧作

物的抗逆性遗传改良提供优异基因资源,而且可通过提高海大麦本身的品质拓展禾本科饲草资源库。目前,已建立了海大麦基因组信息以及有效的遗传转化体系。为研究海大麦的耐盐性状, Kuang等(2022)基于基因组信息,利用CRISPR-Cas9系统对海大麦中的质膜Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交换蛋白SOS1 (Salt Overly-Sensitive 1)进行了基因编辑,获得的sos1突变体表现为盐敏感性状,其根部对Na<sup>+</sup>的吸收量显著高于野生型,揭示了SOS1调控海大麦耐盐性的重要作用,该研究为其它饲草抗逆机制的解析与育种改良提供了重要参考。

2.5 紫花苜蓿

苜蓿是豆科苜蓿属模式植物,其中紫花苜蓿(*M. sativa*)是世界上最重要的多年生豆科牧草,其蛋白质含量丰富、具有优质纤维素并能够结瘤固氮,可改良土壤,被誉为“牧草之王”,为奶牛等草食动物提供了重要优质饲草。尽管紫花苜蓿是我国种植面积最大的豆科饲草作物,但我国苜蓿干草自给率仅为64%,苜蓿种子80%长期依赖进口,对外依存度很高,是我国农业领域关键的“卡脖子”问题。

紫花苜蓿基因组信息和重要性状遗传信息是其遗传育种工作的基石。Shen等(2020)破译了我国重要紫花苜蓿栽培种中苜1号的基因组,并对世界核心种质进行重测序,获得了许多重要农艺性状关联的候选区域。Chen等(2020)破译了我国地方特有品种新疆大叶紫花苜蓿的基因组,为后续利用CRISPR-Cas9系统进行紫花苜蓿基因编辑和分子育种奠定了坚实的基础。Gao等(2018)建立了四倍体苜蓿的CRISPR-

Cas9基因编辑系统。Chen等(2020)利用CRISPR-Cas9系统在紫花苜蓿中成功获得4套MsPDS基因全部被编辑的突变体,转化植株也表现出明显的矮小和白化表型,同时对复叶形态建成相关基因MsPALM1进行编辑,获得了能够稳定遗传的多叶型紫花苜蓿材料。Wolabu等(2020)建立并优化了紫花苜蓿CRISPR-Cas9多基因编辑工具,极大地提高了多倍体中多个同源基因的敲除效率。Ye等(2022)通过编辑紫花苜蓿中的葡萄糖-甲醇-胆碱氧化还原酶超家族基因MsNP1 (*No Pollen 1*)创制了可用于苜蓿杂交育种制种的隐性核不育系及其保持系材料。此外, Zheng等(2022)通过编辑MsGA3ox1 (*GA 3-oxidase1*)获得矮化、匍匐、高叶茎比以及高蛋白含量的紫花苜蓿新种质。Singer等(2021)利用CRISPR-Cas9对紫花苜蓿MsSPL8 (*SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE 8*)的同源基因进行编辑,获得了具有梯度敲除表型的突变体植株。这些工作为紫花苜蓿功能基因组研究以及高效育种体系的建立提供了理论基础和技术支持。

2.6 百脉根

百脉根(*Lotus corniculatus*)为豆科百脉根属多年生草本植物,具有耐寒、耐旱、耐涝和抗虫等特性,且营养丰富、适口性好、采食率高,是极具潜力的优良牧草之一。百脉根的细胞再生能力强,遗传转化效率高,且自交结实,易于获得稳定的遗传后代,是研究牧草品质改良的豆科模式植物(程星等, 2009)。Wang等(2016)在豆科模式植物一年生日本百脉根(*L. japo-*

表1 CRISPR-Cas9技术在饲草中的应用

Table 1 Application of CRISPR/Cas9 technology in forage crops

| 物种   | 靶基因               | 针对性状/表型          | 参考文献                |
|------|-------------------|------------------|---------------------|
| 燕麦   | ACCase            | 抗除草剂             | 于东洋等, 2019          |
| 黑麦草  | DMC1              | 雄性不育             | Zhang et al., 2020  |
| 蒙古冰草 | Sh1               | 落粒性状             | 张文静等, 2019          |
| 海大麦  | SOS1              | 耐盐性状             | Kuang et al., 2022  |
| 紫花苜蓿 | SPL8              | 多分枝、再生强、生物量大、抗旱  | Singer et al., 2021 |
|      | PALM1             | 多叶型              | Chen et al., 2020   |
|      | NP1               | 隐性核不育            | Ye et al., 2022     |
|      | GA3ox1            | 矮化、匍匐、高叶茎比、高蛋白含量 | Zheng et al., 2022  |
|      | SGR               | 叶片衰老             | Wolabu et al., 2020 |
| 百脉根  | SYMRK/Lb1/Lb2/Lb3 | 共生固氮相关           | Wang et al., 2016   |

nicus)中建立了基因组编辑的CRISPR-Cas9系统:在根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导的稳定转化体系中,通过*LjU6-1*基因启动子驱动靶向共生固氮基因*SYMRK* (*Symbiosis receptor-like kinase*)位点的sgRNA,在T<sub>0</sub>代转基因株系中实现了约35%的突变效率;利用2个sgRNA同时编辑3个同源的豆血红蛋白基因*LjLb1*、*LjLb2*和*LjLb3*,获得稳定遗传的三突变体,根瘤呈现白色。这些技术的建立为进一步研究百脉根的功能基因组及牧草性状改良奠定了基础(Wang et al., 2016)。

### 3 展望

随着我国人民生活水平的提高,膳食结构逐渐从以粮食作物为主的“吃的饱”向以肉、蛋和奶倾斜的“吃的好”转变,致使对畜牧和养殖产品的需求量日益增加。但我国草原逐年退化,可提供的喂饲产品有限,导致目前我国饲草大量依赖进口,干草进口总量从2012年的 $4.6 \times 10^5$  t剧增至2021年的 $1.99 \times 10^6$  t,成为我国优质饲草供给乃至粮食安全的重大隐患,粮食安全实际已部分演变为饲料粮安全。相较于传统农业的发展,我国牧草育种起步较晚。在种质资源方面,我国缺乏表现优异且拥有自主知识产权的饲草品种,而引进的饲草品种又难以适应我国的气候和土壤环境,导致我国虽大量进口牧草种子但仍无法满足国内饲草供给需求;在产量方面,我国优质饲草的生产供给能力较低,导致我国肉和奶业的发展高度依赖从欧美国家进口商品草;在质量方面,我国自产的牧草品种差异较大,加之机械收贮装备落后等原因,导致部分牧草的品质不稳定,草畜转化率较低,严重影响了我国的饲料粮安全。

种子是农业的“芯片”,育种一般包括自然选育、杂交选育、分子育种和设计育种等阶段。许多饲草具有多样的品种、多年生的特性、高度杂合、复杂的基因组结构及自交不亲和等生物学特征,导致目前主要饲草难以获得完整的基因组信息和物种特异的基因元件信息。此外,由于饲草品种繁多、基因型复杂,导致难以建立稳定、高效且广泛适用的遗传转化和基因组编辑系统。因此,与传统农作物相比,饲草的功能基因挖掘和育种技术发展相对滞后,仍处于自然选育和杂交育种阶段,无法满足我国对高质量饲草

的需求。

功能基因组研究、基因组编辑技术和高效递送再生技术能够快速定向聚合农作物高产、优质和抗逆等优异性状,是实现分子设计育种的基础(Gao, 2021)。我国在农作物基因编辑技术应用领域处于国际领先地位,为精准设计和创制新型农作物提供了范例,也为饲草基因组编辑体系的发展提供了经验和模式。为快速实现饲草分子设计育种,我国亟须加强饲草基础生物学研究,如高产、优质和抗逆等优异性状及自交不亲和等特异生物学性状的形成机制研究;同时需建立分子设计育种研究平台,如多倍化高杂合度基因组解析、多组学数据整合与数据库建设、全基因组关联分析技术体系、高通量表型组鉴定、高效遗传转化体系和基因组编辑平台。饲草基础生物学研究与分子设计育种平台的建立,将为我国饲草育种进入“快车道”奠定坚实的基础,对打破我国草产品的进口依赖及打好草种业翻身仗具有重要意义。

### 参考文献

- 程星, 包爱科, 冯波, 王锁民 (2009). 百脉根基因工程研究进展. 生物技术通报 (4), 1–6, 28.
- 姜倩倩, 陈磊, 李正男, 尹启琳, 张立培, 赵吉强, 宋建成 (2021). 多年生黑麦草原生质体制备及瞬时表达体系的建立. 分子植物育种 19, 2941–2948.
- 麻冬梅, 郭林娜, 金凤霞, 李会文, 许兴 (2014). 多年生黑麦草多基因遗传转化体系的建立与优化. 中国草地学报 36, 13–17.
- 于东洋, 王凤梧, 融晓萍, 武志娟, 王鑫, 杨燕, 韩冰, 田青松 (2019). 利用CRISPR/Cas9技术对燕麦乙酰辅酶A羧化酶(ACCCase)基因的编辑. 分子植物育种 17, 6356–6362.
- 张文静, 融晓萍, 田青松, 李婷婷, 武志娟, 刘慧艳, 韩冰 (2019). 利用CRISPR/Cas9技术对蒙古冰草落粒相关基因*Sh1*的编辑. 分子植物育种 17, 5021–5025.
- Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, Sousa AA, Koblan LW, Levy JM, Chen PJ, Wilson C, Newby GA, Ragu-ram A, Liu DR (2019). Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* 576, 149–157.
- Bedell VM, Wang Y, Campbell JM, Poshusta TL, Starker CG, Krug II RG, Tan WF, Penheiter SG, Ma AC, Leung AYH, Fahrenkrug SC, Carlson DF, Voytas DF, Clark KJ, Essner JJ, Ekker SC (2012). *In vivo* genome editing

- using a high-efficiency TALEN system. *Nature* **491**, 114–118.
- Chen HT, Zeng Y, Yang YZ, Huang LL, Tang BL, Zhang H, Hao F, Liu W, Li YH, Liu YB, Zhang XS, Zhang R, Zhang YS, Li YX, Wang K, He H, Wang ZK, Fan GY, Yang H, Bao AK, Shang ZH, Chen JH, Wang W, Qiu Q** (2020). Allele-aware chromosome-level genome assembly and efficient transgene-free genome editing for the autotetraploid cultivated alfalfa. *Nat Commun* **11**, 2494.
- Chen KL, Wang YP, Zhang R, Zhang HW, Gao CX** (2019). CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. *Annu Rev Plant Biol* **70**, 667–697.
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F** (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**, 819–823.
- Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF** (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* **31**, 397–405.
- Gao CX** (2021). Genome engineering for crop improvement and future agriculture. *Cell* **184**, 1621–1635.
- Gao RM, Feyissa BA, Croft M, Hannoufa A** (2018). Gene editing by CRISPR/Cas9 in the obligatory outcrossing *Medicago sativa*. *Planta* **247**, 1043–1050.
- Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, Liu DR** (2017). Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* **551**, 464–471.
- Hirosue T, Yamasue Y, Yabuno T** (2000). Shattering habit and dormancy of spikelets in a cultivated form of *Echinochloa oryzicola* recently found in China. *Weed Res* **40**, 449–456.
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A** (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol* **169**, 5429–5433.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E** (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816–821.
- Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR** (2016). Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* **533**, 420–424.
- Kuang LH, Shen QF, Chen LY, Ye LZ, Yan T, Chen ZH, Waugh R, Li Q, Huang L, Cai SG, Fu LB, Xing PW, Wang K, Shao JR, Wu FB, Jiang LX, Wu DZ, Zhang GP** (2022). The genome and gene editing system of sea barleygrass provide a novel platform for cereal domestication and stress tolerance studies. *Plant Commun* **3**, 100333.
- Li SN, Lin DX, Zhang YW, Deng M, Chen YX, Lv B, Li BS, Lei Y, Wang YP, Zhao L, Liang YT, Liu JX, Chen KL, Liu ZY, Xiao J, Qiu JL, Gao CX** (2022). Genome-edited powdery mildew resistance in wheat without growth penalties. *Nature* **602**, 455–460.
- Li TD, Yang XP, Yu Y, Si XM, Zhai XW, Zhang HW, Dong WX, Gao CX, Xu C** (2018). Domestication of wild tomato is accelerated by genome editing. *Nat Biotechnol* **36**, 1160–1163.
- Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM** (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* **339**, 823–826.
- Nakamura M, Gao YC, Dominguez AA, Qi LS** (2021). CRISPR technologies for precise epigenome editing. *Nat Cell Biol* **23**, 11–22.
- Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, Lim WA** (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* **152**, 1173–1183.
- Rani R, Yadav P, Barbadikar KM, Baliyan N, Malhotra EV, Singh BK, Kumar A, Singh D** (2016). CRISPR/Cas9: a promising way to exploit genetic variation in plants. *Bio-technol Lett* **38**, 1991–2006.
- Shen C, Du HL, Chen Z, Lu HW, Zhu FG, Chen H, Meng XZ, Liu QW, Liu P, Zheng LH, Li XX, Dong JL, Liang CZ, Wang T** (2020). The chromosome-level genome sequence of the autotetraploid alfalfa and resequencing of core germplasms provide genomic resources for alfalfa research. *Mol Plant* **13**, 1250–1261.
- Shukla VK, Doyon Y, Miller JC, DeKolver RC, Moehle EA, Worden SE, Mitchell JC, Arnold NL, Gopalan S, Meng XD, Choi VM, Rock JM, Wu YY, Katibah GE, Gao ZF, McCaskill D, Simpson MA, Blakeslee B, Greenwalt SA, Butler HJ, Hinkley SJ, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD** (2009). Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature* **459**, 437–441.
- Singer SD, Burton Hughes K, Subedi U, Dhariwal GK, Kader K, Acharya S, Chen GQ, Hannoufa A** (2021). The CRISPR/Cas9-mediated modulation of *SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE 8* in alfalfa leads to distinct phenotypic outcomes. *Front Plant Sci* **12**, 774146.

- Song XG, Meng XB, Guo HY, Cheng Q, Jing YH, Chen MJ, Liu GF, Wang B, Wang YH, Li JY, Yu H (2022). Targeting a gene regulatory element enhances rice grain yield by decoupling panicle number and size. *Nat Biotechnol* **40**, 1403–1411.
- Symington LS, Gautier J (2011). Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu Rev Genet* **45**, 247–271.
- Wang LX, Wang LL, Tan Q, Fan QL, Zhu H, Hong ZL, Zhang ZM, Duanmu D (2016). Efficient inactivation of symbiotic nitrogen fixation related genes in *Lotus japonicus* using CRISPR-Cas9. *Front Plant Sci* **7**, 1333.
- Wang YP, Cheng X, Shan QW, Zhang Y, Liu JX, Gao CX, Qiu JL (2014). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol* **32**, 947–951.
- Wolabu TW, Cong LL, Park JJ, Bao QY, Chen M, Sun J, Xu B, Ge YX, Chai MF, Liu ZP, Wang ZY (2020). Development of a highly efficient multiplex genome editing system in outcrossing tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*). *Front Plant Sci* **11**, 1063.
- Xie KB, Minkenberg B, Yang YN (2015). Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**, 3570–3575.
- Xing HL, Dong L, Wang ZP, Zhang HY, Han CY, Liu B, Wang XC, Chen QJ (2014). A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biol* **14**, 327.
- Ye QY, Meng XZ, Chen H, Wu JL, Zheng LH, Shen C, Guo D, Zhao YF, Liu JL, Xue Q, Dong JL, Wang T (2022). Construction of genic male sterility system by CRISPR/Cas9 editing from model legume to alfalfa. *Plant Biotechnol J* **20**, 613–615.
- Yu H, Lin T, Meng XB, Du HL, Zhang JK, Liu GF, Chen MJ, Jing YH, Kou LQ, Li XX, Gao Q, Liang Y, Liu XD, Fan ZL, Liang YT, Cheng ZK, Chen MS, Tian ZX, Wang YH, Chu CC, Zuo JR, Wan JM, Qian Q, Han B, Zuccolo A, Wing RA, Cao CX, Liang CZ, Li JY (2021). A route to *de novo* domestication of wild allotetraploid rice. *Cell* **184**, 1156–1170.
- Zeng DC, Liu TL, Ma XL, Wang B, Zheng ZY, Zhang YL, Xie XR, Yang BW, Zhao Z, Zhu QL, Liu YG (2020). Quantitative regulation of Waxy expression by CRISPR/Cas9-based promoter and 5'UTR-intron editing improves grain quality in rice. *Plant Biotechnol J* **18**, 2385–2387.
- Zhang YW, Ran YD, Nagy I, Lenk I, Qiu JL, Asp T, Jensen CS, Gao CX (2020). Targeted mutagenesis in ryegrass (*Lolium* spp.) using the CRISPR/Cas9 system. *Plant Biotechnol J* **18**, 1854–1856.
- Zheng LH, Wen JQ, Liu JL, Meng XZ, Liu P, Cao N, Dong JL, Wang T (2022). From model to alfalfa: gene editing to obtain semidwarf and prostrate growth habits. *Crop J* **10**, 932–941.
- Zhu HC, Li C, Gao CX (2020). Applications of CRISPR-Cas in agriculture and plant biotechnology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 661–677.

## Application and Prospect of Gene Editing in Forage Grass Breeding

Xian Deng<sup>\*</sup>, Tong Li, Xiaofeng Cao<sup>\*</sup>

*State Key Laboratory of Plant Genomics and National Center for Plant Gene Research, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*

**Abstract** Gene editing technology can manipulate the genome of organisms precisely and directionally. It is one of the most eye-catching subversive technologies in the field of life sciences, and has become the key technology in breeding of agriculture and animal husbandry. Recently, the demand for high-yield and high-quality forage grass are increasing in China, therefore, it is urgent to cultivate high-quality forage grass varieties with independent intellectual property rights. Here, we briefly reviewed the development of gene editing technology and its application in agricultural breeding, summarized the research progress in genome editing of gramineous and leguminous forage, and prospected the future direction of molecular module-based technology in forage grass breeding using genome editing.

**Key words** forage grass, gene editing, breeding technology, molecular module-based design breeding

**Deng X, Li T, Cao XF** (2023). Application and prospect of gene editing in forage grass breeding. *Chin Bull Bot* **58**, 233–240.

---

<sup>\*</sup> Authors for correspondence. E-mail: xfcao@genetics.ac.cn; xdeng@genetics.ac.cn

(责任编辑: 孙冬花)