

· 特邀综述 ·

基因编辑技术在玉米中的研究进展

张强[†], 赵振宇[†], 李平华^{*}

山东农业大学, 泰安 271018

摘要 基因编辑技术已成为现代农业育种领域的重要工具。玉米(*Zea mays*)是全球最重要的粮食作物之一, 基因编辑技术在玉米中的应用显示出巨大的潜力。该文综述了基因编辑技术在玉米研究中的应用进展, 重点介绍了CRISPR/Cas等系统在玉米基因组编辑中的最新成果。首先, 介绍了基因编辑技术的基本原理和类型, 特别是CRISPR/Cas系统的工作机制及其在玉米中的应用优势。其次, 总结了基因编辑技术在玉米育种中的研究进展, 涵盖从基础的基因组编辑到复杂的多基因编辑, 旨在改良玉米的产量、品质和抗逆性等关键性状。最后, 文章列举了我国在玉米基因编辑方面的杰出工作, 并讨论了基因编辑技术应用于玉米育种中存在的问题, 同时展望了未来发展方向。

关键词 玉米, 基因组编辑, CRISPR/Cas系统, 遗传改良

张强, 赵振宇, 李平华 (2024). 基因编辑技术在玉米中的研究进展. 植物学报 59, 978–998.

基因编辑是依靠核酸酶对生物体内源基因进行定点敲入或敲除等修饰的新技术, 已广泛应用于基因功能研究和基因治疗等领域。根据编辑工具的不同, 已开发的基因编辑技术分为4类, 即锌指核酸酶(zinc-finger nuclease, ZFN)技术(Cathomen and Joung, 2008)、转录激活样效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)技术(Zhang et al., 2013)、成簇的规律间隔的短回文重复序列及相关蛋白(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated, CRISPR/Cas)技术(Mahmud et al., 2017)以及基于CRISPR/Cas的单碱基编辑(base editing, BE)技术(Mishra et al., 2020)。目前, TALEN、ZFN和CRISPR/Cas是基因编辑的3个重要工具。其中ZFN和TALEN技术存在编辑器结构复杂、可编辑位点少、载体构建困难、转染难及应用成本高等诸多问题, 导致难以推广应用。与其它2种基因编辑技术相比, CRISPR/Cas系统具有简单、灵活、高效和经济等优点, 已成为开展作物性状改良和品质优化最有力的遗传工具。

玉米(*Zea mays*)是我国重要的粮食作物之一, 重要性仅次于水稻(*Oryza sativa*), 其产量和品质直

接影响我国的粮食产量和食品安全。但玉米在生产过程中存在许多亟需解决的问题, 如病虫害严重、自交亲和、育种困难、生长周期长及茎秆易倒伏。传统育种方法需要通过多代自然选择和人工选择才能筛选出符合要求的玉米种质。而CRISPR/Cas系统能够精确识别和编辑特定的基因序列, 使育种人员能够针对所需的目标性状进行精准编辑, 故而极大地缩短了育种周期。目前, CRISPR/Cas系统已应用于玉米遗传育种和性状改良, 并表现出巨大的潜力, 如加速育种、优化品质以及提高抗逆性。本文将详细介绍CRISPR/Cas系统的类型、原理以及在玉米育种和品质改良中的应用, 并对未来玉米育种进行了展望。

1 CRISPR/Cas基因编辑技术

CRISPR/Cas基因编辑技术起源于细菌的免疫系统, 用于抵抗病毒入侵, 通过一系列重复的DNA序列(CRISPR)和相关蛋白质(Cas)进行DNA切割。自2012年在基因编辑中应用以来, 该技术迅速发展成为基因工程领域的核心工具。CRISPR技术有多种类型, 包括CRISPR/Cas9、CRISPR/Cas12a (Cpf1)、CRISPR/

收稿日期: 2024-05-27; 接受日期: 2024-08-20

基金项目: 山东省自然科学基金(No.ZR2023QC038)

[†] 共同第一作者

^{*} 通讯作者。E-mail: pinghuali@sdau.edu.cn

Cas13 (专注于RNA编辑)和CRISPR/Cas的衍生技术BE (base editor)和PE (prime editing)技术。CRISPR/Cas系统及其衍生技术各具特色与优势(表1), 能够精确且高效地满足多样化的基因编辑需求, 实现对基因组的精准调控与修饰, 并使其在基因治疗、农业改良和疾病模型构建等多个领域展现出巨大的应用潜力。

1.1 CRISPR/Cas9基因编辑系统

CRISPR/Cas9 基因编辑系统由向导 RNA (guide RNA, gRNA)和核酸内切酶Cas9复合体构成。Cas9 蛋白利用其独特的2种核酸结构域RuvC和HNH精确切割DNA双链。首先, RuvC结构域负责在PAM (protospacer adjacent motif)序列附近的特定单链DNA上执行切割。随后, HNH结构域则对与sgRNA (单链向导RNA)配对的DNA区域的另一条单链进行切割(Jinek et al., 2014)。Jinek等(2012)研究显示, 通过对sgRNA进行精确设计, Cas9能够识别5'-NGG-3'的PAM序列, 并与目标DNA进行互补配对, 引导Cas蛋

白对DNA链进行精确切割(图1A), 这为CRISPR/Cas9系统在植物科学领域的应用奠定了理论基础。2013年, CRISPR/Cas9系统应用于人类细胞编辑, 并成功实现基因编辑和基因突变(Mali et al., 2013; Cong et al., 2013)。此后, CRISPR/Cas系统迅速应用于植物, 并在水稻、小麦(*Triticum aestivum*)、玉米及拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)等多种植物中实现了特定基因位点的精确突变, 为农业生物技术领域带来了前所未有的突破(Shan et al., 2013; Li et al., 2013; Nekrasov et al., 2013)。

sgRNA是一种结构特定的单链RNA (Hille et al., 2018), 通过与目标基因配对引导Cas蛋白对靶基因进行切割。在CRISPR/Cas系统中, 成熟的crRNA (crispr-derived RNA)通过碱基互补配对与tracrRNA (transactivating RNA)结合。从而引导Cas蛋白在基因组DNA靶点处发生双链断裂(double strand break, DSB) (Butiuc-Keul et al., 2022)。为防止DSB破坏基因组, 细胞存在2种基因修复机制。其一为非同源末

表1 CRISPR/Cas及其衍生技术

Table 1 CRISPR/Cas and its derived technologies

基因编辑技术	编辑机制	功能作用	编辑效率	脱靶效应	设计复杂度	应用范围
CRISPR/Cas9	使用sgRNA导向DNA, 并引入双链断裂	所有类型的基因编辑, 主要是通过切割进而引入基因突变	编辑效率高, 但取决于目标位点的可访问性和sgRNA的设计	脱靶效应较高, 需要精确设计sgRNA以减少脱靶	中等, 需要设计精确的sgRNA	应用广泛, 包括基因敲除、插入和替换
CRISPR/Cas12	与Cas9类似, 但能够识别不同的PAM序列和单链切割	所有类型的基因编辑, 相较于Cas9提供更精细的编辑选择	编辑效率高, 受目标位点、PAM序列和sgRNA设计影响	脱靶效应低于Cas9, 提供更精确的编辑	中等, 需要考虑PAM兼容性和精确的sgRNA	应用广泛, 但尤其适用于需要更精确编辑的应用
CRISPR/Cas13	专门针对RNA编辑, 不涉及DNA, 使用特定的crRNA导向	主要用于RNA编辑, 不直接改变DNA	由于专门针对RNA, 编辑效率可能依赖于目标RNA的可访问性和crRNA设计	主要针对RNA, 几乎没有DNA脱靶风险	中等到高, 需要设计特定的crRNA	主要应用于RNA相关操作
胞嘧啶单碱基编辑(CBE)	脱氨基酶将C转化为U, 细胞修复为T	仅限C-G转换为T-A	编辑效率较高, 但同样受目标序列和细胞类型影响	脱靶效应低于CRISPR-Cas9, 但需要仔细设计sgRNA以降低脱靶效应	需要精确设计特定的sgRNA	主要用于精确的单碱基编辑
腺嘌呤单碱基编辑(ABE)	脱氨基酶将A转化为I, 细胞将其读作G	仅限A-T转换为G-C	编辑效率较高, 但受目标序列和细胞类型的影响	与CBE类似, 脱靶效应低, 但不能忽视	需要精确设计特定的sgRNA	主要用于精确的单碱基编辑
引导编辑(PE)	结合nCas9和逆转录酶, 使用由pegRNA提供的RNA模板直接编辑DNA	支持所有类型的小规模编辑, 包括替换、插入和删除	编辑效率从中等到高, 取决于目标序列、细胞类型和pegRNA设计	脱靶效应比CRISPR-Cas9和BE编辑器显著降低	较高, 需要设计包含特定目标识别序列和RNA模板的pegRNA	应用广泛, 能够实现复杂的基因编辑, 包括各种类型的遗传突变

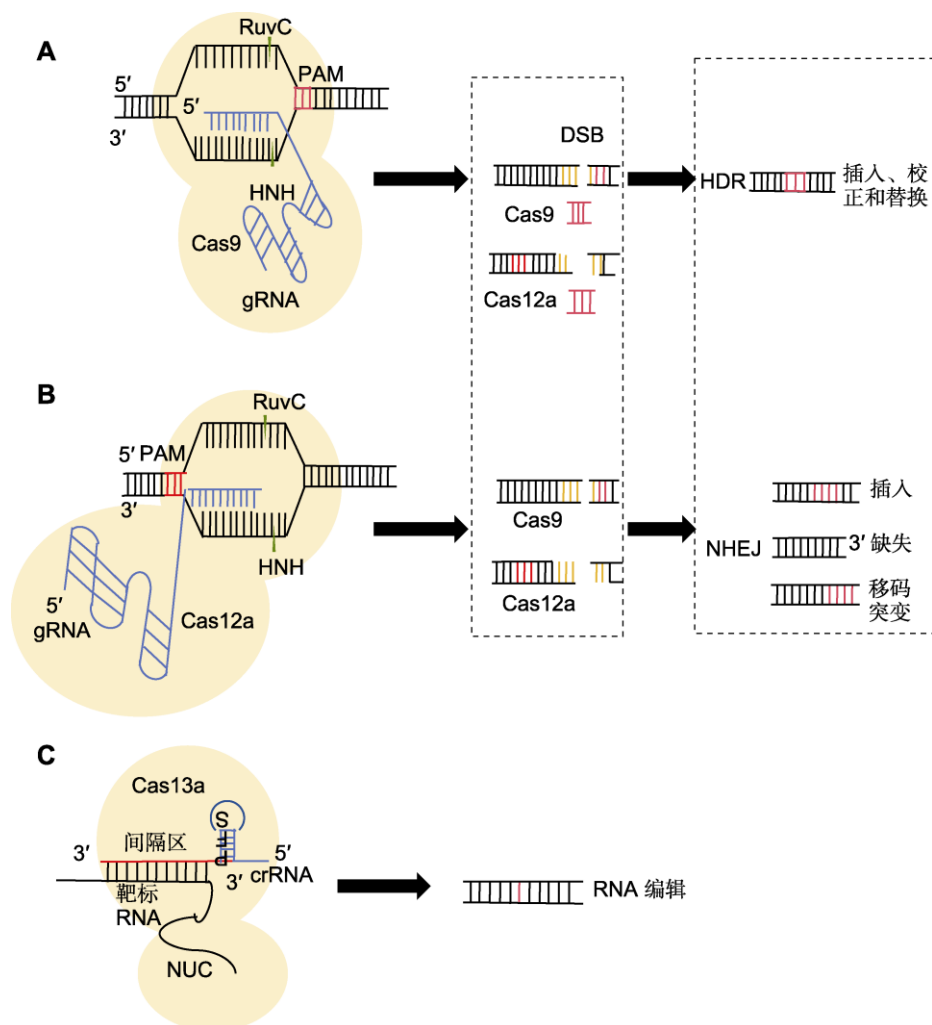


图1 CRISPR/Cas基因编辑系统工作原理

(A) Cas9蛋白利用结构域RuvC在原间隔区邻近基序(PAM)序列附近的特定单链DNA上切割,随后,HNH的结构域与sgRNA配对的DNA另一条单链进行切割形成双链断裂(DSB),最终进行同源定向修复(HDR)或非同源末端连接(NHEJ)修复成双链;(B) Cas12a通过crRNA介导识别5'-TTTN或5'-TTN的PAM序列;(C)当crRNA与靶标RNA通过碱基互补配对结合后,形成crRNA-Cas13复合物,导致Cas13蛋白构象发生变化,从而激活其RNA切割活性,使其能够特异性识别并结合靶标RNA进行切割

Figure 1 Principle of operation of CRISPR/Cas gene editing system

(A) The Cas9 protein utilizes its RuvC domain to cleave a specific single-stranded DNA near the protospacer adjacent motif (PAM) sequence, subsequently, the HNH domain cleaves the other single strand of DNA paired with the sgRNA, resulting in the formation of a double-strand break (DSB), which is ultimately repaired by homology-directed repair (HDR) or non-homologous end joining (NHEJ) to form double-stranded DNA; (B) Cas12a mediates the recognition of the PAM sequence 5'-TTTN or 5'-TTN by crRNA; (C) When the crRNA pairs with the target RNA through base complementarity, a crRNA-Cas13 complex is formed, causing a conformational change in the Cas13 protein, thereby activating its RNA cleavage activity, enabling the target RNA to be specifically recognized, bound, and cleaved.

端连接修复(non-homologous end joining, NHEJ),为主要修复路径。该路径通过在断裂末端随机插入或删除碱基进行直接修复,效率高,但无法保证编辑的精确性(Mladenov and Iliakis, 2011)。另一种是同源

重组修复(homology-directed repair, HDR),是精确的修复机制,即在切割位点处精确插入目标基因,实现精确编辑,但修复速度较慢且效率较低(Siebert and Puchta, 2002)。

1.2 CRISPR/Cas12a基因编辑系统

CRISPR/Cas9系统可供选择的靶基因编辑位点相对有限,同时存在较高的脱靶风险。相比之下,CRISPR/Cas12系统可提供更广泛的靶向范围,因此有望成为新一代基因编辑技术。杨帆和李寅(2017)报道的CRISPR DNA核酸内切酶Cpf1,也称为Cas12a,其分子较小,便于在细胞内传递。Cas12a的功能依赖于RuvC和NUC核酸结构域,并在crRNA的引导下通过识别5'-TTTN或5'-TTN的PAM序列,对目标DNA进行精确切割,从而产生DNA双链断裂(Shmakov et al., 2015)。CRISPR/Cas12系统在精确性和安全性方面较CRISPR/Cas9系统具有明显优势。例如,在CRISPR/Cas9系统中,Cas9蛋白通过识别PAM序列对靶基因进行切割,但当sgRNA解旋后,Cas蛋白可能错误识别并结合与PAM序列类似的非靶基因,从而导致脱靶,且这种错误结合不可逆。相比之下,Cas12蛋白结合在非靶基因时形成一个半封闭的R-环,只有在识别到真正的PAM序列时才会转变为一个封闭的R-环,这种可逆的结合方式显著降低了脱靶率。此外,Cas12a蛋白具有双重酶活性,能同时切割DNA和RNA,且使用的crRNA长度不到sgRNA的一半,这使Cas12a系统在细胞中的运送更高效。Cas12a与Cas9的切割机制有所不同。当DNA被切割后,Cas12a形成有5个核苷酸(nt)的黏性末端,这种特殊的末端结构更倾向于促进HDR过程,因此显著提高了基因编辑的精确性。Cas9则生成平直的末端,且其切割位点与PAM序列的距离较远,这可能导致在NHEJ过程中发生重复识别和切割,进而增加了基因编辑的不确定性(图1B) (Bandyopadhyay et al., 2020)。

1.3 CRISPR/Cas13基因编辑系统

CRISPR/Cas13系统是已鉴定并应用于植物的新型基因编辑技术。该系统由crRNA和核酸酶组成,并含有2个HEPN(高等真核生物和原核生物核苷酸结合内切酶)结构域,这使其能够在RNA水平上进行编辑。CRISPR/Cas13系统含有4种不同类型的Cas蛋白,即Cas13a、Cas13b、Cas13c和Cas13d(Cox et al., 2017)。在CRISPR/Cas13系统的多个亚型中,Cas13a表现出显著优势。其分子较小,易于构建表达载体和导入植物细胞。Cas13a由1个单独的crRNA分子进行

引导,该crRNA通过与靶RNA进行碱基互补配对实现相互作用,并且此过程诱导Cas13a发生构象变化。故而Cas13a能够结合crRNA,并特异性地顺向切割目标单链RNA。更为独特的是,在完成对目标RNA的顺向切割后,Cas13a还表现出反式切割活性,即能够不受限制地继续切割其它非靶标RNA分子(Freije et al., 2019)。不同于Cas9和Cas12蛋白,Cas13蛋白可在切割靶RNA后仍然保持活性,并继续切割其它非靶RNA序列,从而导致更多非靶序列被破坏(图1C)。CRISPR/Cas13系统已应用于敲除哺乳动物细胞和植物中基因表达和RNA检测。在Aman等(2018)的研究中,CRISPR/Cas13系统成功应用于萝卜(*Raphanus sativus*)花叶病毒(*Turnip Mosaic Virus*, TuMV)的干扰。Gootenberg等(2017)将Cas13蛋白改造为一种低成本、高效率及高灵敏度的诊断工具,即SHERLOCK(specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking),通过追踪控制靶向RNA的位置和Cas13蛋白的切割,使CRISPR系统的灵敏度大幅提高,几乎在所有环境下都可使用。

1.4 CRISPR/Cas衍生技术

1.4.1 CBE系统

2016年,David Liu团队在遗传编辑技术上取得了突破性进展,他们以CRISPR/Cas9系统为基础,开发出一种新的基因编辑技术——碱基编辑。该系统将胞嘧啶脱氨酶与nCas9或dCas9以及sgRNA结合。该复合体应用于特定的DNA位点,结合后胞嘧啶脱氨酶被激活,催化目标DNA链上的胞嘧啶(C)转变成尿嘧啶(U)。这一关键改变影响后续在DNA重复或修复阶段传递,最终在DNA序列中实现精确的C→T或G→A配对转化(图2A) (Komor et al., 2017)。第一代胞嘧啶碱基编辑系统(cytosine base editor 1, CBE1)由APOBEC1胞嘧啶脱氨酶和CRISPR-Cas9的核酸酶变体(nCas9或dCas9)组成,并通过一个16氨基酸的XTEN连接成肽,实现二者的融合。该系统通过避免依赖DSB的设计,显著降低了基因编辑过程中非目标效应和基因组不稳定性;并能够将C直接转变为U,进而在DNA重复或修复过程中被解读为胸腺嘧啶(T),从而实现C→T的精确点突变。但CBE1在体内的编辑效率较低,归因于尿嘧啶DNA糖苷酶(UDG)的作用,该酶通过碱基切除修复(BER)途径识别并移除

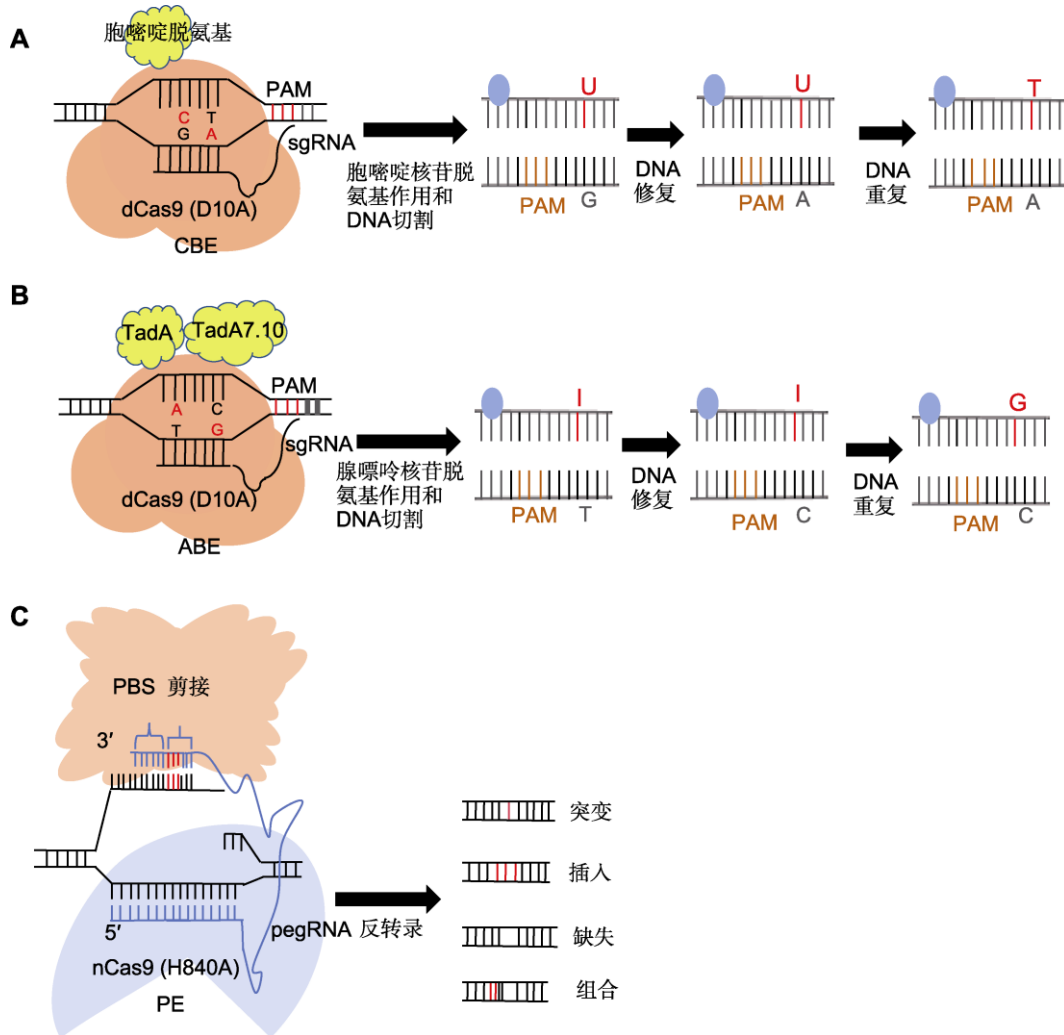


图2 碱基编辑器技术工作原理

(A) sgRNA识别并结合到目标DNA序列特定的原间隔区邻近基序(PAM)位点, dCas9蛋白则与sgRNA结合, 形成复合物并结合于目标DNA上, 但不切割DNA双链, 仅使其单链化; 随后胞嘧啶脱氨酶在sgRNA的引导下, 接触到暴露的单链DNA上的胞嘧啶, 并催化其脱氨反应, 将胞嘧啶转化为尿嘧啶; 最后在DNA重复或修复过程中, 尿嘧啶被视为胸腺嘧啶的类似物, 从而纳入到新合成的DNA链中, 实现C-G碱基对到T-A碱基对的直接替换; (B) 利用CRISPR-Cas9系统中的sgRNA识别并结合到目标DNA序列的PAM位点, Cas9蛋白与sgRNA结合形成复合物, 并定位于目标DNA上; ABE中的腺嘌呤脱氨酶在sgRNA的引导下, 接触到暴露的单链DNA上的腺嘌呤, 并催化其脱氨反应, 将腺嘌呤转化为次黄嘌呤或脱氧次黄嘌呤; 最后在DNA修复过程中, 识别到次黄嘌呤后, 启动修复过程, 中间产物通常被替换为鸟嘌呤, 从而实现A-T碱基对到G-C碱基对的直接替换; (C) 利用pegRNA作为引导分子结合sgRNA, 并在其3'末端增加引物结合位点(PBS)序列和逆转录模板(RTT); 在pegRNA的引导下, 部分失活的Cas9切口酶切断含PAM序列的DNA单链; 切割后的DNA单链与pegRNA的3'末端PBS序列互补并结合, 随后逆转录酶沿RTT模板序列开始逆转录反应, 将目标编辑序列直接引到DNA切口处; 随后细胞内DNA修复机制识别并处理切口处的DNA结构, 最终保留携带目标编辑的DNA链。CBE、ABE和PE同表1。

Figure 2 Principle of operation of base editor technology

(A) The sgRNA recognizes and binds to the specific protospacer adjacent motif (PAM) site on the target DNA sequence, and the dCas9 protein binds to the sgRNA, forming a complex that attaches to the target DNA and rendering it single-stranded; subsequently, the cytidine deaminase, guided by the sgRNA, contacts the exposed cytosine on the single-stranded DNA and catalyzes its deamination, converting cytosine to uracil; finally, during DNA replication or repair, uracil is recognized as an analog of thymine and thymine is incorporated into the newly synthesized DNA strand, thereby achieving a direct replacement of the C-G base pair with a T-A base pair; (B) The sgRNA in the CRISPR-Cas9 system recognizes and binds to the PAM site on

the target DNA sequence, and the Cas9 protein binds to the sgRNA to form a complex which is localized to the target DNA; under the direction of the sgRNA, adenine deaminase in the ABE system contacts the adenine on the single-stranded DNA, catalyzing its deamination reaction and converting adenine to hypoxanthine or deoxyhypoxanthine; during the DNA repair process, recognition of hypoxanthine triggers the initiation of the repair mechanism, typically resulting in the substitution of the intermediate product with guanine; this process facilitates the direct replacement of an A-T base pair with a G-C base pair; (C) Utilizing pegRNA as a guide molecule, it binds to the sgRNA and incorporates a primer binding site (PBS) sequence and reverse transcription template (RTT) at its 3' end; directed by the pegRNA, the partially deactivated Cas9 nickase cleaves the DNA single strand containing the PAM sequence; subsequently, the complementary PBS sequence at the 3' end of the pegRNA binds to the cleaved DNA strand; a reverse transcriptase then initiates a reverse transcription reaction along the RTT template sequence, directly incorporating the desired editing sequence into the DNA nick; finally, the intracellular DNA repair mechanisms are activated, ultimately retaining the DNA strand carrying the intended edit. CBE, ABE, and PE are the same as shown in Table 1.

U-G错配, 修复CBE1进行的C→U编辑。为克服这一限制, 引入了第二代碱基编辑器CBE2 (RAPOBEC1-XTEN-dCas9-UGI), 其中包括一个来自噬菌体PBS的尿嘧啶DNA糖苷酶抑制剂(UGI)。UGI的加入可抑制UDG的活性, 从而提高体内基因编辑效率。与BE1相比, BE2的体内编辑活力明显提高。在CBE1和CBE2的基础上, 第三代碱基编辑器CBE3 (RAPOBEC1-XTEN-nCas9-UGI)采用更精细的策略, 包括一个能进行单链刻痕的活性nCas9 (D10A)变体。这种战略性修改促进了DNA链断裂, 显著增强C→T转换效率, 同时观察到插入或缺失(indels)率约为1.1% (Komor et al., 2016)。相较于CBE3, CBE4有2个关键的改进: 双份UGI的引入和连接APOBEC1与nCas9的扩展连接肽。这些优化措施显著提高了系统编辑效率, 同时最大限度地减少indels和靶外效应(Lee et al., 2020)。

1.4.2 ABE系统

2016年, 引入了一种具有革命性的遗传编辑工具腺嘌呤碱基编辑(adenine base editor, ABE) (Nishida et al., 2016)。该系统与CBE有所不同, 它能够直接将A-T碱基对直接转化为G-C。ABE系统由携带D10A突变的nCas9和腺苷脱氨酶组成, 在gRNA的精确引导下, ABE能够准确地识别靶向目标DNA序列, 将腺嘌呤(A)转化为腺苷(I)。随后, 在DNA重复过程中, I被解读为鸟嘌呤(G), 从而显著提高基因编辑的精确性(图2B) (Kim et al., 2017)。为促进DNA中腺嘌呤直接脱氨, 研究人员重新定位大肠杆菌tRNA腺苷脱氨酶(ec-TadA), 并通过筛选与定向进化, 成功开发出一种ecTadA突变体, 用于在DNA中靶向和修改腺嘌呤。然后将ecTadA突变体与nCas9 (D10A)融合, 由此标志着第一代腺嘌呤碱基编辑器的诞生, 但最初编辑效率

仅为3.2% (Nishida et al., 2016)。为提高腺嘌呤碱基编辑系统的编辑效率, 研究人员构建了一个全面的TadA序列突变文库, 然后将其与dCas9蛋白融合。该方法能够利用抗生素进行抗性筛选, 故而提高了效率。此外, 通过定向进化方法, 包括易错PCR和DNA重组, 进行了7轮迭代进化, 成功开发出ABE7.10。此版本显著提高了基因编辑的效率和精度。值得注意的是, ABE7.10在靶向基因组的特定区域, 特别是在sgRNA的第4-7位置表现出明显的高效性(Yan et al., 2018; Koblan et al., 2018)。随后, 在ABE7.10的基础上, 研究人员转向进一步优化腺嘌呤脱氨酶, 旨在提高碱基编辑效率。通过对TadA7.10的定向优化, 成功研发出TadA8e (Gaudelli et al., 2020; Richter et al., 2020)。从ABE8e到ABE9的进化是通过对TadA8e进行增强实现的。科研人员将2个突变L145T和N108Q精准地引入到TadA-8e中, 并依托冷冻电子显微镜(cryo-EM)进行深入分析, 显著提升了ABE9在编辑窗口的活性, 特别是在sgRNA的5-6位置处, 从而大幅提高了基因编辑精度(Chen et al., 2023)。此外, ABE9还能消除对胞嘧啶的非目标编辑, 降低非靶基因编辑的发生概率。

1.4.3 PE系统

CBE和ABE碱基编辑系统能够执行4种类型的碱基转换, 即C-T、G-A、A-G和T-C。然而, 对于其它8种可能的碱基转换(C-A、C-G、G-C、G-T、A-C、A-T、T-A和T-G)以及碱基插入和删除能力不足, 这通常对于纠正更广泛的遗传异常至关重要。为解决此限制, David Liu团队将Cas酶、M-MLV-RT逆转录酶以及特别设计的引导RNA (pegRNA)进行整合, 即引导编辑(PE)。此创新方法可实现对基因组的精准编辑, 包括精确的插入、删除以及全面的碱基转换, 覆盖所有12

种类型的碱基转换,且无需依赖DSB或额外的DNA模板,极大地提升了基因编辑的效率和准确性(图2C)(Doman et al., 2020)。该系统巧妙地利用sgRNA精准地引导逆转录酶到达特定的DNA位点,之后逆转录酶直接启动并驱动pegRNA中嵌入的模板进行逆转录,将其精准地转录到DNA链上,从而实现高度目标导向且精确的遗传修饰(Doman et al., 2020)。Nelson等(2022)在pegRNA的3'端加入结构RNA基序,生成epegRNA,可防止3'延伸的降解,从而提高了PE系统的编辑效率。同时,开发出pegLIT工具识别并计算pegRNA与3'基序之间的非干扰核苷酸,可优化3'结构基序的选择。第一代PE系统将M-MLV-RT与一个切割型Cas9(nCas9 H840A)融合,建立了Prime Editing的初始平台。在此基础上,PE2通过进化M-MLV逆转录酶扩大PE的潜力,显著提高了系统生成靶向突变和插入缺失的效率。Bai等(2024a)受DNA靶序列染色质开放性显著影响基因编辑效率的启发,在基因编辑载体中共表达促进染色质开放的人源RNA m6A去甲基化酶hFTO,显著提高了编辑效率。随后的PE3又有所创新,即使用额外的sgRNA设计用于切割非互补DNA链,在某些特定细胞环境下(如293T细胞)其编辑效率高达78%(Haapaniemi et al., 2018; Grünwald et al., 2019; Jin et al., 2019; Zhou et al., 2019; Zuo et al., 2019; Kurt et al., 2021)。Chen等(2021)对影响引导编辑效果的内源性因子进行了系统筛选,发现DNA错配修复通路(MMR)起关键作用;此外,MMR通路的关键因子MLH1的显性负性突变体(MLH1 dn)能增强PE的编辑效率。优化的PE系统融合蛋白结构同样提升了编辑效率,最终开发出更强大的PE升级版PE4/PE4max和PE5/PE5max。Qiao等(2023)发现编辑效率低是玉米中应用基因编辑技术的主要障碍。通过设计pegRNA和优化PE蛋白,显著提高了编辑效率。优化的ePE5max系统具有足够的效率,能在玉米靶基因中产生可遗传突变,消除了使用PEs的主要障碍。Liu等(2024)通过暂时抑制MMR系统来优化基因编辑效率,既提高了编辑效率,又规避了长期抑制可能引发的基因组不稳定风险。采用优化的PE系统ePE5c,结合RNA干扰技术可提升编辑效率。Doman等(2023)通过噬菌体辅助进化和蛋白质工程技术,成功开发出体积更小、效率更高的主要编辑器PE6a和PE6b。在无DNA双链断裂以及额外DNA

模板的情况下,实现靶位点的精准编辑。Yan等(2024)利用全基因组CRISPRi筛选技术,发现了一个关键的细胞决定因子,即小RNA结合外切核酸酶保护因子La,其对于引导编辑至关重要。通过将La与引导编辑蛋白融合,构建了引导编辑器PE7,显著提升了编辑效率。

2 基因编辑技术在玉米中的应用

基因编辑技术的发展为玉米育种带来了划时代的变革。通过精准地编辑玉米基因组,能够培育出产量更高、抗逆性更强且营养更丰富的玉米新品种(何晓玲等, 2022)。基因编辑技术不仅极大地缩短了玉米的育种周期,降低了研发成本,而且能够在维持玉米遗传优势的基础上,精确地改良其特定性状。基因编辑技术的应用为玉米产业的可持续发展注入了新活力,为全球粮食安全提供了有力保障。下文将系统总结CRISPR/Cas9技术在玉米多个关键领域的应用,包括增加产量、优化品质、增强生物与非生物胁迫抗性以及在不育系创制和单倍体诱导等方面的应用进展(表2)。

2.1 利用基因编辑技术加速玉米育种进程

2.1.1 促进单倍体诱导

在自然条件下,大多数植物(如玉米)表现为二倍体,即每个细胞含有2套染色体。为培育出遗传上纯合的系谱,研究人员通过多代连续自交以确保后代基因的纯合性。而单倍体诱导技术提供了一种更为高效的方法。该技术通过特定的双单倍体(DH)途径,诱导植物产生仅含1套染色体的细胞,进而发育成单倍体植株。随后,利用染色体加倍技术,将单倍体植株转化为遗传稳定的二倍体植株,极大地缩短了培育纯合谱系的时间(Ren et al., 2017)。基于CRISPR/Cas9技术对玉米中的花粉特异性磷脂酶基因ZmPLA1进行精确编辑,Dong等(2018)成功开发出高效的孤雌生殖单倍体诱导体系;他们还融入一个组织特异性表达的双荧光蛋白标记系统,显著优化了单倍体的鉴别和筛选流程,极大地提高了筛选效率,并为作物改良中双单倍体育种技术的应用确立了新标准。Stock6(可诱导产生单倍体的玉米突变体)作为玉米单倍体诱导育种的关键工具,可通过杂交诱发孤雌生殖,即使花粉

表2 基因编辑技术在玉米改良中的应用

Table 2 Applications of gene editing technology in maize improvement

应用	靶标基因	基因功能	性状改良	参考文献
单倍体诱导	<i>ZmPLA1</i>	编码特异性磷脂酶	单倍体诱导	Dong et al., 2018
	<i>ZmDMP</i>	单倍体诱导	单倍体诱导	Liu et al., 2017
	<i>CENH3</i>	单倍体诱导	单倍体诱导	Wang et al., 2021a
雄性不育	<i>MS45</i>	编码异胡豆苷合成酶类似蛋白	花粉发育异常, 雄性不育	Svitashev et al., 2015
	<i>MS8</i>	编码 β -1,3-半乳糖基转移酶	花粉发育异常, 雄性不育	Chen et al., 2018
	<i>ZmABCG2</i> 和 <i>ZmFAR1</i>	角质层减少和蜡质含量增加	花粉发育异常, 雄性不育	Jiang et al., 2021
	<i>ZmTMS5</i>	编码RNase Z蛋白	温敏雄性不育植株	Li et al., 2017b
	<i>Dcl5</i>	产生多样化的24 nt phasiRNAs	温敏雄性不育植株	Teng et al., 2020
	<i>CLE7</i> 和 <i>FCP1</i>	控制分生组织大小	果穗行数 and 籽粒产量增加, 果穗变大, 叶夹角减小	Liu et al., 2021
株型	<i>ZmLg1</i>	编码调控SBP结构域蛋白	叶夹角减小, 种植密度增大	Li et al., 2017a
	<i>SAMBA</i>	影响有丝分裂期推进复合体	节间缩短, 上部叶片缩小、直立, 叶片整体缩小	Gong et al., 2022
	<i>ZmRAVL1</i>	影响油菜素内酯信号通路	叶夹角变小	刘杰和严建兵, 2019
	<i>GA20ox3</i>	赤霉素合成	半矮生	Zhang et al., 2020a
	<i>ZmACO2</i>	乙烯合成	促进花序和花发育, 增加穗重	Ning et al., 2021
激素	<i>ZmCEP1</i>	肽激素合成	降低植株和穗高度、穗长、籽粒大小和百粒重	Xu et al., 2021
	<i>CKX</i>	细胞分裂素氧化酶合成	细胞分裂和植物器官的形成	刘超等, 2020
	<i>Zm079</i> 、 <i>Zm080</i> 和 <i>Zm081</i>	调控百粒重	增加穗重、穗长和穗粗	穆路遥, 2022
	<i>Zmst1</i>	影响气孔开放和光合作用	叶片提前衰老	Wang et al., 2019a
光合作用	<i>qkw9</i>	光合作用减弱	为籽粒充实提供的母体光合产物减少	Huang et al., 2020
	<i>ZmSWEET13</i>	光合作用受损	叶片中可溶性糖和淀粉含量增加	Bezruczyk et al., 2018
	<i>ANT1</i>	光合作用受损	相互遮荫	Liu et al., 2020
	<i>Zmpif3</i> 、 <i>Zmpif4</i> 和 <i>Zmpif5</i>	调控光信号和光形态发生	减弱植株对遮荫环境的响应	Wu et al., 2019
香味	<i>ZmBADH2a</i> 和 <i>mBADH2b</i>	控制2-乙酰基-1-吡咯烷酮合成	挥发物含量增加, 香气增加	Wang et al., 2021b; 张翔等, 2021; 王彦晓, 2021
	<i>Zmsh2</i>	编码AGPase酶	甜玉米	Dong et al., 2019; 祁昱涛, 2019
糯性	<i>SH2</i> 和 <i>WX</i>	编码AGPase酶和GBSS酶	甜玉米和糯玉米	Gao et al., 2020; Qi et al., 2020
抗倒伏	<i>ZmWx1</i>	编码GBSS酶	纤维素和木质素含量增加	Li et al., 2020
	<i>stiff1</i>	控制纤维素和木质素含量	秸秆强度增加	Zhang et al., 2020b
	<i>qpa1</i>	半矮化	株高和穗位降低, 茎粗增加, 叶片更直立	Wei et al., 2018
干旱	<i>ZmPHYCs</i>	减弱避荫综合症	降低植株高度和穗位高度	Li et al., 2020
	<i>ARGOS8</i>	乙烯响应负调控因子	提高耐旱能力	Shi et al., 2017
	<i>ZmHDT103</i>	编码乙酰化酶	提高耐旱能力	Wang et al., 2024
	<i>ZmSRL5</i>	编码CALSP蛋白	提高耐旱能力	Pan et al., 2020
抗除草剂	<i>ZmEPSPS</i>	抑制叶绿体中5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶的作用	抗除草剂	Kaul et al., 2024
	<i>ALS2</i>	编码乙酰乳酸合成酶	抗除草剂	Svitashev et al., 2015, 2016; Li et al., 2020; Jiang et al., 2020
病原侵染	<i>ZmLox3</i>	编码脂肪氧化酶	抗黑粉菌	Pathi et al., 2020
	<i>ZmGDla</i>	编码RabGDP解离抑制因子	抗粗缩病	Liu et al., 2022
	<i>ZmCOI1a</i> 和 <i>ZmJAZ15</i>	茉莉酸合成	抗茎腐病	Ma et al., 2021
	<i>ZmFBL41</i>	E3泛素连接酶复合体的成员之一	抗纹枯病	李伟滔等, 2019

与雌蕊接触,也不形成正常的双倍体合子,而是直接形成单倍体种子,随后通过化学处理或温度震荡等手段进行染色体加倍,进而形成遗传上纯合的双单倍体植株。Liu等(2017)利用CRISPR/Cas9技术对玉米*ZmPLA1*基因第1外显子进行精确编辑,导致特定的缺失突变。编辑后的突变体平均单倍体诱导率约为2%,与Stock6的诱导效率相似。该研究团队进一步采用CRISPR/Cas9技术敲除*ZmDMP*基因后,观察到该基因缺失单倍体诱导率提高5–6倍。这是首次在非Stock6背景下观察到的独立单倍体诱导现象,展现出基因编辑技术在提高单倍体诱导率方面的巨大应用潜力。通过将CRISPR/Cas9基因编辑技术与传统单倍体诱导策略相结合,创制了单倍体诱导编辑(haploid-induction editing, HI-Edit)策略(Kelliher et al., 2019)和单倍体诱导介导的基因组编辑(haploid inducer-mediated genome editing, IMGE)策略(Wang et al., 2019a)。利用单倍体诱导技术可以高效生成单倍体植株,随后通过CRISPR/Cas9或其它基因编辑技术进行目标基因的精确修改。HI-Edit策略的独特之处在于,允许在不引入外源DNA的条件下对基因进行精准改良,因此显著降低了对转基因技术的依赖。通过这种策略,可在2个世代内成功培育出特定性状的纯合株系。此外,该策略有效克服了玉米遗传转化过程中的基因型限制,为玉米育种提供了更广泛的适用范围。在真核生物中,着丝粒是染色体准确分离与遗传信息传递不可或缺的区域,而特异的着丝粒组蛋白CH3 (CENH3)在识别和维持着丝粒染色质结构方面扮演着关键角色。Wang等(2021a)通过CRISPR/Cas9技术对玉米*CENH3*基因进行编辑,成功创制了一个由单碱基缺失引起编辑提前终止的突变体。该突变体与野生型进行杂交后,自交时纯合的突变体具有高度致死性,无法通过配子传递,而杂合子与野生型进行正反交配,后代为单倍体或非整倍体。这表明*CENH3*突变可通过一次杂交转移到其它品系中,为构建高效且简化的玉米单倍体诱导系统提供了可能。

2.1.2 加速雄性不育系创制

目前,通过基因编辑技术已成功创制了多种玉米核雄性不育和温敏雄性不育突变体。特别是*MS45*基因,作为控制花粉发育的关键基因,其突变导致不育性状

能稳定遗传。Svitashev等(2015)通过CRISPR/Cas9对*MS45*基因进行定点编辑,获得双等位基因的雄性不育突变体。此外,通过对*MS8*基因进行编辑产生雄性不育突变体,并且这些突变体遵循孟德尔遗传规律(Chen et al., 2018)。研究表明,*ZmFAR1*和*ZmABC-G26*作为受microRNA调控的脂质代谢关键基因,在玉米花药发育和脂质代谢中发挥重要作用。通过对*ZmABCG26*以及脂质代谢相关基因*ZmFAR1*进行CRISPR/Cas9定点编辑,在突变体花药中观察到角质层减少而蜡质含量增加的变化,这有助于创造新的雄性不育系(Jiang et al., 2021)。此外,通过靶向敲除*ZmTMS5*基因获得热敏雄性不育玉米品种,其可在特定的温度下表现出不育性状(Li et al., 2017b)。在植物发育的关键阶段,小RNA (sRNA)在调控靶向mRNA的转录水平、保持基因组的完整性以及增强DNA甲基化方面发挥重要作用。特别是在许多单子叶植物中,*Dcl5* (Dicer-like 5)酶经精确切割mRNA生成24 nt的分阶段次级小干扰RNA (phasiRNAs)。在开花植物的减数分裂过程中,phasiRNAs对花药的正常功能具有关键作用。Teng等(2020)通过CRISPR-Cas9系统生成包括等位基因以及一个转座子中断的等位基因在内的几个*dcl5*突变体,并发现*dcl5*突变体几乎或根本没有24 nt phasiRNAs,其花药短小且绒毡层细胞有缺陷,并表现出温敏雄性不育性状。

2.2 基于基因编辑技术的玉米产量育种

2.2.1 改良株型

玉米植株的形态特征如密植耐受性、茎秆强度、植株高度、叶片夹角和穗位高度,对于玉米光合效率和空间资源利用具有决定性作用,并直接影响产量。因此,在玉米育种和农业生产实践中,株型优化是提高产量和作物适应性的关键因素。在玉米发育初期,特别是在9至10叶期,位于叶腋的分生组织(AM)转变为花序分生组织(IM),继而在IM上发育出多行小穗分生组织(SPM)。而分生组织的生长和发育主要受CLAVATA-WUSCHEL信号途径中CLE肽信号调控,此途径是果穗行数及粒重增加的关键(Schoof et al., 2000)。Liu等(2021)利用CRISPR/Cas9基因编辑技术,对玉米中*CLV3*的同源基因*CLE7*和*FCP1*的启动子区进行特定的缺失编辑,发现突变体中分生组织显著增大,从而间接提高玉米产量相关性状,如穗大小、粒数及百

粒重。叶夹角是影响玉米密植的关键因子, 优化叶夹角不仅能提高光利用效率, 还可改善作物群体的空气流通, 最终提高群体光合效率。Li等(2017a)利用CRISPR/Cas9对玉米*ZmLg1*基因进行编辑, 该基因编码一种含SBP (squamosa promoter-binding protein)结构域的蛋白, 负责调控叶夹角。通过对*ZmLg1*基因第1外显子进行编辑, T_0 代植株展现出高达51.5%–91.2%的基因编辑效率, 并使叶夹角明显变小至对照组的50%, 且突变特征稳定遗传。田间试验表明, 这些突变体通过增加种植密度展现出增产潜力。SAMBA作为植物特异性调节因子, 是影响拟南芥有丝分裂期推进复合体(APC/C)的关键因子, 负责控制细胞周期的顺利进行。研究发现, SAMBA与APC/C在玉米中同样存在相互作用, 通过对玉米中2个SAMBA基因敲除突变体的观察, 发现一系列生长缺陷, 包括节间缩短、上部叶片缩小和直立以及叶片整体缩小(Gong et al., 2022)。玉米中功能基因*brd1*和*ZmRAVL1*通过油菜素内酯信号通路调控叶夹角。UPA2定位于*ZmRAVL1*上游, 具有与DRL1蛋白结合的能力。LG1蛋白参与调控玉米叶夹角, 能激活*ZmRAVL1*的表达。DRL1与LG1直接相互作用, 抑制LG1对*ZmRAVL1*的激活。相较于玉米, 其祖先种大刍草(*Zea mays* subsp. *parviglumis*)的UPA2位点与DRL1蛋白结合能力更强, 导致*ZmRAVL1*表达显著受抑制, 进而下调其下游基因*brd1*的表达, 降低叶环区内源BR水平, 使叶夹角变小。将大刍草UPA2等位基因导入玉米或对玉米中的*ZmRAVL1*进行编辑, 在密植条件下均可显著提高玉米的产量(刘杰和严建兵, 2019)。

2.2.2 改变激素含量

植物激素在玉米整个生命周期中扮演重要角色。赤霉素、生长素、细胞分裂素、乙烯、脱落酸、茉莉酸和水杨酸等植物激素通过复杂的相互作用和信号转导网络, 构成一个高度精密的调控系统。“绿色革命”基因赤霉素氧化酶基因*GA20ox*对于促进半矮表型的形成起重要作用, 不仅提高作物产量, 同时增强了植株的抗倒伏能力。Zhang等(2020a)利用CRISPR/Cas9技术编辑玉米*GA20ox3*基因后, 突变体中GA₁₂和GA₅₃的含量升高, 而其它GA前体的含量显著降低, 成功培育出半矮型玉米, 并在 T_2 代植株中筛选出无转基因矮秆玉米。在玉米生长发育中, 细胞分裂素氧化

酶(cytokinin oxidase, CKX)起关键作用, 其通过降解细胞分裂素调节植物激素水平。刘超等(2020)从玉米B73的基因组数据中成功鉴定出3个穗发育关键基因。使用e-crisp设计特异性sgRNA后, 采用密码子优化的CRISPR/Cas9系统, 成功构建了CKX基因的植物表达载体*p3301-U6P-sgRNA-Ubi-Cas9*, 为创制基因敲除玉米突变体奠定了基础。Ning等(2021)对数量性状基因座*qEL7*进行鉴定, 发现该基因座控制玉米的果穗长、花朵数和生育力等。*qEL7*编码的1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶2 (ACO2)是乙烯生物合成过程中的关键酶, 在发育中的花序特定区域呈现特异性表达。通过编辑*ZmACO2*基因验证了*qEL7*的功能, 发现该编辑减少了发育中果穗的乙烯产生, 促进花序和花的发育, 从而提高产量。C末端编码肽(CEPs)是一类重要的肽激素, 其在拟南芥和水稻中通过细胞间通信调节植物生长和非生物胁迫响应, 而其在玉米中的作用仍知之甚少。Xu等(2021)探讨了玉米*ZmCEP1*的时空表达模式, 发现其可能调节生长素(auxin)等植物激素的运输和分布, 进而影响籽粒细胞的分裂和扩张, 为玉米籽粒改良提供了新的靶点和思路。

2.2.3 改变果穗大小

果穗作为玉米产量形成的关键组分, 其形态特征如穗长、行数及籽粒数直接影响种子的生产潜力。数量性状基因座(quantitative trait locus, QTLs)对穗长起核心控制作用。但目前定位到与穗长相关的QTLs非常少, 且其分子机制大多未知。通过全基因组关联分析, Luo等(2022)鉴定出*YIGE1*, 其编码一个未知蛋白, 通过影响雌花小花数量调节穗长, 且过表达*YIGE1*能显著增加雌性花序分生组织的大小, 从而增加穗长和粒数, 提高总体产量。而使用CRISPR/Cas9技术敲除*YIGE1*或通过高度活跃的DNA转座子(mutator, Mu)插入产生的突变体与之表现相反。穆路遥(2022)基于3个百粒重关键基因*Zm079*、*Zm080*和*Zm081*, 通过CRISPR/Cas9技术成功创制了多份基因编辑材料。*Zm080*基因敲除导致部分植株百粒重明显降低, 而其它植株的穗重、穗长和穗粗显著增加。对*Zm081*基因的编辑影响植株的株高、穗位高和雄穗分枝数等。

2.2.4 改变玉米光合效率

气孔运动通过调节CO₂的可用性影响植物的光合速

率,这一过程受到光合产物的反馈调节。然而,在单子叶作物中,该调节回路的遗传组分和机制尚待进一步阐明。Wang等(2019b)基于图位克隆*CST1*并通过CRISPR/Cas9系统,发现导致*CST1*蛋白E81K突变的是一种属于Clade I SWEET (Sugars Will Eventually be Exported Transporters)家族的基因突变。*CST1*编码一个在附属细胞中表达的功能性葡萄糖转运蛋白。E81K突变破坏了*CST1*蛋白的寡聚化能力及其葡萄糖转运活性,导致气孔开度减小、碳饥饿以及叶片提前衰老。此外,一个含有DYW基序的五肽重复蛋白(pentatricopeptide repeat protein, PPR)参与叶绿体NADH脱氢酶复合体*ndhB*亚基C到U的编辑。Huang等(2020)利用CRISPR/Cas9技术对*qkw9*基因进行敲除,在*qkw9*的空白背景下,*ndhB*的C到U编辑被抑制,光合作用减弱。作物产量的形成依赖于从叶片到种子的蔗糖高效分配。*ZmSWEET13*旁系同源体(*Zmsweet13a*、*Zmsweet13b*和*Zmsweet13c*)是叶片中表达量最高的基因之一。Bezruczyk等(2018)通过基因编辑进行三重敲除,突变体表现严重的生长受阻,光合机构受损,叶片积累大量可溶性糖和淀粉,且RNA-seq数据揭示突变体中与光合作用和碳水化合物代谢相关的基因发生转录失调。*ANT* (*AINTEGUMENTA*)是一种AP2转录因子,在植物生长和花器官形成中起重要作用。Liu等(2020)利用CRISPR/Cas9技术生成1个单密码子缺失突变体和2个*ANT1*同源基因移码突变体。这2个移码突变体与野生型(WT)相比,表现出植物光合效率和生长速率降低及叶面积变小。在高密度种植条件下,玉米植株之间相互遮挡,导致底部叶片光照强度降低,进而影响红光与远红光的比例,最终降低产量。为解释该现象的分子机制,Wu等(2019)利用CRISPR/Cas9技术对玉米中参与光信号传递和光依赖形态建成的PIF基因家族成员*Zmpif3*、*Zmpif4*和*Zmpif5*进行敲除,发现在黑暗条件下生长的突变体幼苗的中胚轴伸长被严重抑制,且对模拟遮荫处理的响应减弱。

2.3 基于基因编辑技术的玉米品质育种

2.3.1 增加香味

2-乙酰基-1-吡咯烷酮(2AP)是从芳香型水稻中鉴定出的200多种挥发性物质中的关键风味化合物。除水稻外,多种植物中都存在天然的芳香物质,通常表现出

较低的甜菜碱醛脱氢酶2 (BADH2)活性。Wang等(2021b)对玉米*BADH2*同源基因*ZmBADH2a*和*ZmBADH2b*进行CRISPR/Cas敲除,生成*ZmBADH2a*和*ZmBADH2b*双基因突变体。在双突变体中,无论是新鲜籽粒还是干燥成熟种子,其2AP含量均升高。此外,张翔等(2021)利用CRISPR/Cas9技术在玉米4号染色体*ZmBADH2-1*和1号染色体*ZmBADH2-2*进行精确敲除,双基因突变体籽粒中的2AP含量与芳香型水稻相似,由此创制出具有类似香米香气的新型玉米种质。王彦晓(2021)选取包括郑58、糯型玉米N355、XCW175及LN005M等在内的多种普通及特殊玉米品种进行研究,利用构建的3种CRISPR/Cas系统载体对*BADH2*基因进行编辑,并通过农杆菌介导法将这些载体导入玉米幼胚中,培育出多个带有香气的玉米自交系新品种。

2.3.2 改变甜味

玉米通过光合作用将太阳能转换为化学能(包括ATP和NADPH),并利用这些能量将大气中的CO₂固定成单糖。随后经过一系列生化反应转化为ADP-葡萄糖,最终在淀粉合成酶的作用下聚合成淀粉。甜玉米的潜在机制之一是玉米*SH2* (*SHRUNKEN2*)基因(影响淀粉合成酶活性的关键基因)的突变,该基因编码胚乳ADP-葡萄糖焦磷酸化酶(ADP-glucose pyrophosphorylase, AGPase)的大亚基。*SH2*基因突变或下调导致淀粉合成酶活性降低,从而增加游离糖的含量。Dong等(2019)利用CRISPR/Cas9技术靶向编辑*SH2*以及另一个影响淀粉生物合成的关键基因*WX* (*WAXY*) (编码淀粉合成酶),创制出具有*sh2sh2wxwx*基因型的wx品系,其含糖量显著提高。祁显涛(2019)利用CRISPR/Cas9技术精确修饰甜糯复合型等基因以改变其农艺性状,提高玉米支链淀粉含量,从而赋予玉米糯性。此外,基因编辑还可创制富含可溶性糖的高甜度玉米,并开发出具有独特香气的玉米新种质。通过CRISPR/Cas9技术定点敲除*Zmwx1*和*Zmsh2*基因,并筛选出具有显著糯性和甜味特征的玉米植株,再通过杂交获得兼具甜糯特性的玉米新品种。

2.3.3 改良糯性性状

糯玉米的糯性是通过*WX*基因的突变实现。该基因编码的直链糖合成酶I (granule-bound starch synthase

1, GBSS I)为直链淀粉合成所必需。研究表明, *WX*基因突变导致淀粉几乎全为直链型。由于缺少支链淀粉, 糯玉米的籽粒在烹饪后表现出较高的透明度和黏性。利用CRISPR/Cas9基因编辑技术, Gao等(2020)对*Zmwaxy*基因进行编辑, 引入4 kb和6 kb大片段缺失, 有效创制出具有较高产量的糯玉米杂交品种。Qi等(2020)采用CRISPR/Cas9方法对*Zmwx1*基因进行靶向编辑, 将ZC01玉米品种转变为糯玉米。这些研究显示了CRISPR/Cas技术在精确改良玉米遗传特性和提升农业价值方面的巨大潜力和广阔前景。

2.4 基于基因编辑技术的玉米抗逆育种

2.4.1 提高抗倒伏性

茎秆倒伏性由茎秆强度决定, 且是限制高密度种植条件下玉米产量的关键因素。然而, 玉米茎秆强度的分子遗传基础复杂, 导致改良方法效率低。在玉米茎秆发育中, *STIFF1*基因扮演关键角色。Zhang等(2020b)采用CRISPR/Cas9技术编辑*STIFF1*基因的特定等位基因, 进一步提高了玉米茎秆的纤维素和木质素含量。*sd1*和*Rht1*等半矮化基因在水稻和小麦中的应用促发第一次“绿色革命”。在玉米中, 尚未发现能有效降低株高但不降低产量性状的半矮化基因。利用CRISPR/Cas技术, Wei等(2018)精确鉴定到编码P-糖蛋白的*Brachytic2*基因(*qpa1*)的新等位基因。并在*qpa1*基因的最后一个外显子中引入241 bp缺失, 突变体表现为不降低产量但显著降低株高和穗位以及增加茎粗。在光照条件下, 玉米PHYC2蛋白定位于细胞核和细胞质, 且能够与自身或PHYBs相互作用。异源表达*ZmPHYCs*能够补偿拟南芥*phyC-2*突变体在持续红光条件下的表型。Li等(2020)利用CRISPR/Cas9技术创建了*ZmPHYC1*和*ZmPHYC2*双基因敲除突变体, 在长日照条件下该突变体表现出中等程度的早花表型, 而过表达*ZmPHYC2*植株表现出株高和穗位中度降低。

2.4.2 提高抗旱性

近百年来, 玉米产量大幅提升, 然而其抗旱性却显著下降, 这表明产量性状与抗逆性之间存在拮抗关系, 且二者在基因组上的遗传位点紧密连锁。要实现产量与抗性的最佳平衡, 关键在于找到并揭示控制产量性状的干旱胁迫应答负调控位点的遗传作用机制(陈凡

等, 2024)。在玉米育种中, *ARGOS8*基因作为乙烯响应的负调控因子, 对提高抗旱性意义重大。构建过表达*ARGOS8*的突变体可降低植株对乙烯的敏感性, 并在干旱条件下提高作物产量。Shi等(2017)利用CRISPR-Cas9技术, 以本地玉米*GOS2*启动子替换*ARGOS8*的启动子, 实现*ARGOS8*位点的精确基因组DNA修改, 生成新突变体。与野生型相比, 突变体在开花期干旱应激条件下的产量明显提高。Wang等(2024)通过序列比对, 鉴定出编码组蛋白去乙酰化酶基因*ZmHDT103*, 发现该基因在玉米幼苗中对聚乙二醇处理有反应, 进而利用CRISPR/Cas9技术创制了3个敲除系, 并获得*ZmHDT103*的*ChinaMU*突变体。在干旱条件下, *ZmHDT103*突变体幼苗的抗旱能力显著高于野生型。Pan等(2020)发现玉米*ZmSRL5*基因突变体表现出蜡晶形态和分布异常、成熟叶片半卷曲且对干旱的敏感性增强。此外, 通过CRISPR/Cas9技术生成的2个等位基因突变体同样对干旱敏感, 进一步证实了*srl5*的表型。

2.4.3 创制抗除草剂新材料

在全球范围内, 杂草侵扰是导致作物减产的重大问题之一。广谱高效的草甘膦(glyphosate)是一种应用广泛的除草剂, 其作用机制是通过抑制植物叶绿体中的5-烯醇丙酮酸-3-磷酸酰基梳香酸合成酶(EPSPS)干扰梳香酸途径。Kaul等(2024)利用CRISPR/Cas9介导的位点特异性编辑开发高效的抗除草剂玉米品系, 通过敲除*ZmEPSPS*基因的保守区域, 并敲入HDR-GATIPS-m*ZmEPSPS*实现*ZmEPSPS*基因片段替换。通过编辑玉米植株并采用新的三重替代策略, 赋予玉米高度抗除草剂特性, 同时其农艺性状与野生型相似。Svitashev等(2015, 2016)通过CRISPR/Cas9技术对玉米中乙酰乳酸合成酶2 (ALS2)基因进行了精确编辑。利用一段127 bp的DNA作为修复模板, 实现蛋白质中第165位脯氨酸向丝氨酸替换。突变体玉米植株在施用含氯磺隆(chlorsulfuron)除草剂环境下能够正常生长。Li等(2020)利用CBE系统, 对玉米*ZmALS1*和*ZmALS2*进行编辑。编辑后的玉米品系在原生质体和恢复植株中呈现CBE的有效活性, 且包含*ZmALS1*纯合突变或*ZmALS1*和*ZmALS2*双重突变, 在高达使用剂量15倍的氯磺隆条件下仍具显著抗性。此外, Jiang等(2020)基于PE对玉米*ZmALS1*和

*ZmALS2*基因进行编辑,结果分别有53.2%和6.5%的转基因株系成功引入S621I和W542L突变;4.8%的株系在这2个ALS基因中均呈现纯合的S621I突变,另有4.8%的株系同时含有S621I和W542L双重突变,赋予玉米对多种作用于ALS抑制剂的抗除草剂能力。

2.4.4 创制抗病新材料

近年来,利用基因编辑技术,特别是CRISPR/Cas9技术提高玉米抗病性已成为研究热点。通过CRISPR/Cas9技术精确修改与病原体互作的基因,能够显著提高玉米对特定真菌或病毒的抵抗力。例如,玉米黑粉菌(*Ustilago maydis*)是当前最严重的玉米病害之一。Pathi等(2020)发现在黑粉菌侵染后玉米中脂肪氧化酶(lipoxygenase, Lox)基因*ZmLox3*的表达量显著升高,表明其编码产物在黑粉菌侵染过程中发挥作用。利用CRISPR/Cas9技术对*ZmLox3*基因第1外显子进行定点编辑,得到的突变体植株表现出对黑粉菌的抵抗力增强,体内黑粉菌生物量显著减少。此外,玉米粗缩病是由水稻黑条矮缩病毒(rice black-streaked dwarf virus, RBSDV)引起的病害。研究表明,玉米中*ZmGDIa*基因编码的RabGDP解离抑制因子在囊泡形成和运输中发挥重要作用,并被确定为玉米粗缩病的易感因子。Liu等(2022)采用CRISPR/Cas9技术将编辑位点设定在*ZmGDIa*基因第1外显子和翻译起始密码子下游30 bp处,产生1 bp的插入和32 bp的缺失突变体。通过对比接种病毒后的植株表型,发现野生型植株表现出矮化表型,叶片背面出现蜡状突起,且不能正常结实。相反,基因编辑后的突变体具有良好的生长发育能力和显著抵抗RBSDV的能力。禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum*)是玉米茎腐病的主要致病菌之一。在植物中,茉莉酸(jasmonic acid, JA)作为关键的内源激素参与对病害的防御反应。在茉莉酸信号途径中,COI (coronatine-insensitive)蛋白是关键受体, JAZ (jasmonate zim-domain)蛋白则发挥负调控作用。Ma等(2021)利用CRISPR/Cas9技术编辑玉米*ZmCOI1a*和*ZmJAZ15*基因,发现*ZmCOI1a-ZmJAZ15*作用模块在调控玉米对赤霉穗腐病抗性中起关键作用。在无JAs信号时,*ZmJAZ15*与转录因子结合,抑制防御相关基因的表达;当存在JAs信号时,*ZmCOI1a*与*ZmJAZ15*相互作用,导致

*ZmJAZ15*被泛素化降解,从而解除对防御相关基因的抑制。由立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)引起的纹枯病严重危害玉米生长,研究人员利用全基因组关联分析(genome wide association study, GWAS)推测*ZmFBL41*是关键基因。而转座子插入突变体*zmfb141* (*mu1059763*)较对照表现出更强的抗性,*ZmFBL41*蛋白是E3泛素连接酶复合体成员,能介导复合体对肉桂醇脱氢酶的降解,从而降低木质素的积累,使玉米易感纹枯病(李伟滔等, 2019)。上述研究成果在抗病育种、病害防控、基础研究和农业可持续发展方面具有重要的应用价值。

3 展望

3.1 我国基因编辑技术的发展现状

基因编辑技术作为一项前沿生物技术,对国家安全具有重要影响。然而,当前众多专利和关键技术掌握在国外大公司手中,导致我国在相关领域受外部制约,发展严重受阻。因此,我国亟需自主研发基因编辑技术,打破外部技术限制,降低对外部技术的依赖,保障国家粮食安全,推动生物技术的发展。

我国科学家紧跟国际科技前沿,并在基因编辑领域作出了卓越贡献。赖锦盛团队在基因编辑底盘技术的研发上取得了重大突破,他们成功研发了具有自主知识产权的新型底盘核酸酶Cas12i和Cas12j (Bai et al., 2024b)。与已有底盘酶相比,在蛋白同源性、核酸酶分类等方面均存在明显差异。该成果不仅填补了我国在基因编辑底盘工具方面的技术空白,还打破了国外技术垄断,为我国基因编辑技术的自主创新和产业化发展提供了重要支撑。他们还将自主研发的基因编辑工具应用于农业领域,利用Cas12i和Cas12j基因编辑核酸酶对水稻和玉米等主要农作物进行基因改良,培育出具有优良性状的新品种。朱健康团队与赖锦盛团队合作,共同开发了新型基因编辑工具CRISPR/Cas12i和CRISPR/Cas12j。朱健康团队还进一步探索了CRISPR/Cas12i家族的新成员Cas12i3在植物基因编辑中的应用(Lv et al., 2024)。他们分析了CRISPR/Cas12i3在水稻中的编辑效率,并构建了多靶点编辑体系和碱基编辑工具,为丰富植物基因编辑工具库作出重要贡献。他们还开发出一种极其简单的植物转基因及基因组编辑方法——“极度简化的切割-

浸泡-嫁接(ES-CDB)”法(Cao et al., 2023)。这种方法省略了传统基因编辑流程中的复杂步骤,使得基因编辑操作更加简便易行。此方法有望降低基因编辑技术的门槛,推动其在更广泛领域应用。高彩霞团队通过去除引导编辑器中核糖核酸酶H结构域,并融合具有核酸伴侣活性的病毒核衣壳蛋白,设计出优化的引导编辑器(ePPE),大幅提高了编辑效率(Zong et al., 2022)。他们利用AI辅助的大规模蛋白结构预测,挖掘到全新的脱氨酶底盘元件,并成功开发出一系列具有自主知识产权的Sdd7-CBE系统新型碱基编辑工具(Huang et al., 2023);同时开发出不依赖CRISPR的全新碱基编辑工具CyDENT(Hu et al., 2024),可在细胞核、线粒体和叶绿体基因组中高效地进行胞嘧啶碱基编辑。高彩霞团队还通过优化基因编辑工具的设计和筛选条件,显著提升了基因编辑的精准度和效率。例如,基于Cas12a和环状RNA的引导编辑器(CPE)(Liang et al., 2024)可同时编辑多达4个基因。为整合优化的引导编辑工具和位点特异性重组酶,又开发了PrimeRoot系统(Sun et al., 2024),可实现植物细胞中长达11.1 kb大片段DNA的精准定点插入,该成果展现了大片段DNA精准插入技术在未来生物育种中应用的巨大潜力。

3.2 高效的递送技术为高通量玉米基因编辑提供支撑

基因编辑技术已成为现代生物技术和育种中不可或缺的工具,尤其在提高作物产量和抗病性以及增强环境适应性方面展现出巨大潜力,其在玉米上的应用取得较大进展。由于植物细胞具有坚固的细胞壁,使得常规的遗传物质递送方法(如转染)难以直接应用于玉米细胞。此外,尽管原生质体可作为遗传物质的接收体,但实现从原生质体到完整玉米植株的再生却极为困难,严重限制了基因编辑技术的有效性和应用范围。目前使用农杆菌介导和粒子轰击等DNA递送方法在玉米中面临转化效率低的问题。重要的是,玉米受基因型影响非常严重,难以实现所有玉米品种的基因编辑。故此提出一系列解决方案。(1) 跨代基因编辑。在处理难以通过传统遗传转化方法改良的玉米品种时,可选择与携带基因编辑组件的转基因编辑株系杂交。在不进行组织培养的前提下,直接在目标品种中定点产生新的等位基因,有效克服了遗传转化和植物

再生的技术瓶颈(Wang et al., 2018)。此外,利用回交保持新品种的优良特性,同时通过精确的基因编辑可避免常规杂交育种中的连锁阻力问题(Wang et al., 2019b)。(2) 纳米技术递送系统。此前研究人员使用将含有绿色荧光蛋白(GFP)基因的质粒与花粉共处理后人工授粉进行转基因(李娜等, 2013),现在可利用磁性纳米颗粒作为载体,将外源基因直接输送到花粉中(李想, 2018),通过自然的生殖过程实现基因的转入和表达,可为基因编辑技术在玉米中的应用提供支撑。(3) 基于生长调节基因的增强转化系统。利用Baby boom和Wuschel2(植物干细胞发育中的关键调控因子)提高玉米的遗传转化效率(Lowe et al., 2016),形态发生基因*Bbm*和*Wus2*的使用显著提高玉米的转化率并降低了基因型依赖(Lowe et al., 2018; Wang et al., 2020; 许洁婷等, 2022)。(4) 农杆菌辅助质粒系统。在植物遗传转化领域,特别是在面对顽拗型植物(如玉米)时,传统双元载体系统和超双元载体系统面临转化效率不高的问题。为提高遗传转化效率,科研人员探索并引入额外的辅助质粒,从而构建出三元载体系统(Anand et al., 2018)。这不仅简化了操作流程,还有效提升了遗传转化的成功率。

3.3 基因编辑监管政策为玉米基因编辑高速发展提供动力

近年来,基因编辑技术取得了快速发展,尤其是CRISPR/Cas系统的发展,为精确修改生物基因组提供了强大的工具。该技术不仅加速了基础生物学研究,也极大推动了农业、医疗和生物工程等领域的发展。然而,这项技术的应用同时引发了全球范围内关于其安全性和监管政策的广泛讨论。在美国,基因编辑作物的监管相对宽松。美国农业部(USDA)明确表示,若基因编辑作物未引入外源DNA,且其修改类型可通过传统育种实现,则不会被视作转基因作物,因此不受严格的GMO法规限制。这一政策鼓励了科技创新,使得基因编辑作物能更快地推向市场。欧盟的监管框架则更严格。欧盟法院2018年的裁决认定,使用CRISPR等新型基因编辑技术产生的作物应受到与转基因作物相同的法规约束。这意味着所有通过这些新技术改良的作物都需经过严格的安全评估和审批流程才能获准种植或销售。

我国对基因编辑技术的监管相对审慎。虽然我国

在基因编辑研究方面处于国际前列,但在商业化应用和监管政策制定方面较为谨慎。我国的基因编辑作物监管政策强调科学性、预防性和透明性。政府鼓励基于科学方法评估基因编辑技术的风险与效益,并要求所有基因编辑作物在商业化之前必须经过严格的生物安全评审。评审不仅涉及作物本身的安全性,还包括其对环境可能产生的长远影响。此外,我国对基因编辑作物的研发与应用采取预防性原则,即在完全明确技术后果前,采取保守的管理措施。这包括在研发早期阶段进行严格的监控和必要的安全测试,以及在技术推广应用中实施动态监管,确保及时应对可能出现的新问题和挑战。2022年1月,农业农村部更新了《农业转基因生物安全评价管理办法》并发布了《农业用基因编辑植物安全评价指南(试行)》,这主要适用于未引入外源基因的基因编辑植物,并依据潜在风险进行安全评估。2023年4月,农业农村部推出《农业用基因编辑植物评审细则(试行)》,从分子特性、环境安全、食用安全和评审程序4个方面对基因编辑植物的安全评估进行了详细规定,以增强《农业用基因编辑植物安全评价指南(试行)》的实操性。2023年4月28日,农业农村部发布了《2023年农业基因编辑生物安全证书批准清单》,这标志着中国在规范农业基因编辑的安全评价管理方面取得了里程碑式的进展。

基因编辑技术(如CRISPR/Cas系统)的快速发展表明,这种高效、低成本的育种工具正推动全球农业逐步向广泛采用基因编辑作物方向转变。这一趋势不仅由技术成熟和效率提升驱动,还受到全球人口增长和气候变化带来的环境压力的影响,农作物生产需要更加高效和可持续发展。同时,随着法规的推出、国际合作的增强以及公众接受度的提高,全球正逐渐接受基因编辑作物作为保障食品安全和生态平衡的重要解决方案。基因编辑作物凭借其精准高效的特性具有巨大的发展潜力,有望引领全球农业进入一个新的发展时代。

作者贡献声明

张强: 查阅文献,构思并撰写论文;赵振宇: 查阅文献与修改润色论文;李平华: 确定文章主题,审阅修改文章,提供资金支持。

参考文献

- Aman R, Ali Z, Butt H, Mahas A, Aljedaani F, Khan MZ, Ding SW, Mahfouz M (2018). RNA virus interference via CRISPR/Cas13a system in plants. *Genome Biol* **19**, 1.
- Anand A, Bass SH, Wu E, Wang N, McBride KE, Annaluru N, Miller M, Hua M, Jones TJ (2018). An improved ternary vector system for *Agrobacterium*-mediated rapid maize transformation. *Plant Mol Biol* **97**, 187–200.
- Bai MY, Lin WX, Peng CY, Song PZ, Kuang HQ, Lin JN, Zhang JP, Wang JY, Chen B, Li HR, Kong FJ, Jia GF, Guan YF (2024a). Expressing a human RNA demethylase as an assister improves gene-editing efficiency in plants. *Mol Plant* **17**, 363–366.
- Bai YH, Liu SN, Bai Y, Xu ZS, Zhao HN, Zhao HM, Lai JS, Liu Y, Song WB (2024b). Application of CRISPR/Cas12i.3 for targeted mutagenesis in broomcorn millet (*Panicum miliaceum* L.). *J Integr Plant Biol* **66**, 1544–1547.
- Bandyopadhyay A, Kancharla N, Javalkote VS, Dasgupta S, Brutnell TP (2020). CRISPR-Cas12a (Cpf1): a versatile tool in the plant genome editing tool box for agricultural advancement. *Front Plant Sci* **11**, 584151.
- Bezruczyk M, Hartwig T, Horschman M, Char SN, Yang JL, Yang B, Frommer WB, Sosso D (2018). Impaired phloem loading in *zmsweet13a, b, c* sucrose transporter triple knock-out mutants in *Zea mays*. *New Phytol* **218**, 594–603.
- Butiuc-Keul A, Farkas A, Carpa R, Iordache D (2022). CRISPR-Cas system: the powerful modulator of accessory genomes in prokaryotes. *Microb Physiol* **32**, 2–17.
- Cao XS, Xie HT, Song ML, Zhao LH, Deng S, Tian YF, Li GF, Lang ZB, Zhu JK (2023). Extremely simplified cut-dip-budding method for genetic transformation and gene editing in *Taraxacum kok-saghyz*. *Innovation Life* **1**, 100040.
- Cathomen T, Joung JK (2008). Zinc-finger nucleases: the next generation emerges. *Mol Ther* **16**, 1200–1207.
- Chen F, Gu HY, Qi XQ, Lin RC, Qian Q, Xiao LT, Yang SH, Zuo JR, Bai YF, Chen ZD, Ding ZJ, Wang XJ, Jiang LW, Chong K, Wang L (2024). Achievements and advances of plant sciences research in China in 2023. *Chin Bull Bot* **59**, 171–187. (in Chinese)
- 陈凡, 顾红雅, 漆小泉, 林荣呈, 钱前, 萧浪涛, 杨淑华, 左建儒, 白永飞, 陈之端, 丁兆军, 王小菁, 姜里文, 种康, 王雷 (2024). 2023年中国植物科学重要研究进展. 植物学报 **59**, 171–187.
- Chen L, Zhang S, Xue NN, Hong MJ, Zhang XH, Zhang D, Yang J, Bai SJ, Huang YF, Meng HW, Wu H, Luan CM,

- Zhu BY, Ru GM, Gao HY, Zhong LP, Liu MZ, Liu MY, Cheng YY, Yi CQ, Wang LR, Zhao YX, Song GJ, Li DL (2023). Engineering a precise adenine base editor with minimal bystander editing. *Nat Chem Biol* **19**, 101–110.
- Chen PJ, Hussmann JA, Yan J, Knipping F, Ravisankar P, Chen PF, Chen CD, Nelson JW, Newby GA, Sahin M, Osborn MJ, Weissman JS, Adamson B, Liu DR (2021). Enhanced prime editing systems by manipulating cellular determinants of editing outcomes. *Cell* **184**, 5635–5652.
- Chen RR, Xu QL, Liu Y, Zhang JJ, Ren DT, Wang GY, Liu YJ (2018). Generation of transgene-free maize male sterile lines using the CRISPR/Cas9 system. *Front Plant Sci* **9**, 1180.
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin SL, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu XB, Jiang WY, Marraffini LA, Zhang F (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**, 819–823.
- Cox DBT, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Franklin B, Kellner MJ, Joung J, Zhang F (2017). RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science* **358**, 1019–1027.
- Doman JL, Pandey S, Neugebauer ME, An MR, Davis JR, Randolph PB, Mcelroy A, Gao XD, Raguram A, Richter MF, Everette KA, Banskota S, Tian K, Tao YA, Tolar J, Osborn MJ, Liu DR (2023). Phage-assisted evolution and protein engineering yield compact, efficient prime editors. *Cell* **186**, 3983–4002.
- Doman JL, Raguram A, Newby GA, Liu DR (2020). Evaluation and minimization of Cas9-independent off-target DNA editing by cytosine base editors. *Nat Biotechnol* **38**, 620–628.
- Dong L, Li LN, Liu CL, Liu CX, Geng SF, Li XH, Huang CL, Mao L, Chen SJ, Xie CX (2018). Genome editing and double-fluorescence proteins enable robust maternal haploid induction and identification in maize. *Mol Plant* **11**, 1214–1217.
- Dong L, Qi XT, Zhu JJ, Liu CL, Zhang X, Cheng BJ, Mao L, Xie CX (2019). Supersweet and waxy: meeting the diverse demands for specialty maize by genome editing. *Plant Biotechnol J* **17**, 1853–1855.
- Freije CA, Myhrvold C, Boehm CK, Lin AE, Welch NL, Carter A, Metsky HC, Luo CY, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Yozwiak NL, Zhang F, Sabeti PC (2019). Programmable inhibition and detection of RNA viruses using Cas13. *Mol Cell* **76**, 826–837.
- Gao HR, Gadlage MJ, Lafitte HR, Lenderts B, Yang MZ, Schroder M, Farrell J, Snopek K, Peterson D, Feigenbutz L, Jones S, St Clair G, Rahe M, Sanyour-Doyel N, Peng CN, Wang LJ, Young JK, Beatty M, Dahlke B, Hazebroek J, Greene TW, Cigan AM, Chilcoat ND, Meeley RB (2020). Superior field performance of waxy corn engineered using CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol* **38**, 579–581.
- Gaudelli NM, Lam DK, Rees HA, Solá-Esteves NM, Barrera LA, Born DA, Edwards A, Gehrke JM, Lee SJ, Liquori AJ, Murray R, Packer MS, Rinaldi C, Slaymaker IM, Yen J, Young LE, Ciaramella G (2020). Directed evolution of adenine base editors with increased activity and therapeutic application. *Nat Biotechnol* **38**, 892–900.
- Gong P, Bontinck M, Demuyneck K, De Block J, Gevaert K, Eeckhout D, Persiau G, Aesaert S, Coussens G, Van Lijsebettens M, Pauwels L, De Jaeger G, Inzé D, Nelissen H (2022). SAMBA controls cell division rate during maize development. *Plant Physiol* **188**, 411–424.
- Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, Verdine V, Donghia N, Daringer NM, Freije CA, Myhrvold C, Bhattacharyya RP, Livny J, Regev A, Koonin EV, Hung DT, Sabeti PC, Collins JJ, Zhang F (2017). Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science* **356**, 438–442.
- Grünewald J, Zhou RH, Iyer S, Lareau CA, Garcia SP, Aryee MJ, Joung JK (2019). CRISPR DNA base editors with reduced RNA off-target and self-editing activities. *Nat Biotechnol* **37**, 1041–1048.
- Haapaniemi E, Botla S, Persson J, Schmierer B, Taipale J (2018). CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nat Med* **24**, 927–930.
- He XL, Liu PC, Ma BJ, Chen XF (2022). Advance in genome editing technology based on CRISPR/Cas9 and its application in plants. *Chin Bull Bot* **57**, 508–531. (in Chinese)
- 何晓玲, 刘鹏程, 马伯军, 陈析丰 (2022). 基于CRISPR/Cas9的基因编辑技术研究进展及其在植物中的应用. *植物学报* **57**, 508–531.
- Hille F, Richter H, Wong SP, Bratovič M, Ressel S, Charpentier E (2018). The biology of CRISPR-Cas: backward and forward. *Cell* **172**, 1239–1259.
- Hu JC, Sun Y, Li BS, Liu Z, Wang ZW, Gao Q, Guo MY, Liu GW, Zhao KT, Gao CX (2024). Strand-preferred base editing of organellar and nuclear genomes using CyDENT. *Nat Biotechnol* **42**, 936–945.
- Huang J, Lu G, Liu L, Raihan MS, Xu JT, Jian LM, Zhao LX, Tran TM, Zhang QH, Liu J, Li WQ, Wei CX, Braun DM, Li Q, Fernie AR, Jackson D, Yan JB (2020). The

- Kernel size-related quantitative trait locus *qKW9* encodes a pentatricopeptide repeat protein that affects photosynthesis and grain filling. *Plant Physiol* **183**, 1696–1709.
- Huang JY, Lin QP, Fei HY, He ZX, Xu H, Li YJ, Qu KL, Han P, Gao Q, Li BS, Liu GW, Zhang LX, Hu JC, Zhang R, Zuo EW, Luo YL, Ran YD, Qiu JL, Zhao KT, Gao CX (2023). Discovery of deaminase functions by structure-based protein clustering. *Cell* **186**, 3182–3195.
- Jiang YL, Li ZW, Liu XZ, Zhu TT, Xie K, Hou QC, Yan TW, Niu CF, Zhang SW, Yang MB, Xie RR, Wang J, Li JP, An XL, Wan XY (2021). *ZmFAR1* and *ZmABCG26* regulated by microRNA are essential for lipid metabolism in maize anther. *Int J Mol Sci* **22**, 7916.
- Jiang YY, Chai YP, Lu MH, Han XL, Lin QP, Zhang Y, Zhang Q, Zhou Y, Wang XC, Gao CX, Chen QJ (2020). Prime editing efficiently generates W542L and S621I double mutations in two ALS genes in maize. *Genome Biol* **21**, 257.
- Jin S, Zong Y, Gao Q, Zhu ZX, Wang YP, Qin P, Liang CZ, Wang DW, Qiu JL, Zhang F, Gao CX (2019). Cytosine, but not adenine, base editors induce genome-wide off-target mutations in rice. *Science* **364**, 292–295.
- 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.
- Jinek M, Jiang FG, Taylor DW, Sternberg SH, Kaya E, Ma EB, Anders C, Hauer M, Zhou KH, Lin S, Kaplan M, Iavarone AT, Charpentier E, Nogales E, Doudna JA (2014). Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science* **343**, e1247997.
- Kaul T, Thangaraj A, Jain R, Bharti J, Kaul R, Verma R, Sony SK, Abdel Motelb KF, Yadav P, Agrawal PK (2024). CRISPR/Cas9-mediated homology donor repair base editing system to confer herbicide resistance in maize (*Zea mays* L.). *Plant Physiol Biochem* **207**, 108374.
- Kelliher T, Starr D, Su XJ, Tang GZ, Chen ZY, Carter J, Wittich PE, Dong SJ, Green J, Burch E, Mccuiston J, Gu WN, Sun YJ, Strebe T, Roberts J, Bate NJ, Que QD (2019). One-step genome editing of elite crop germplasm during haploid induction. *Nat Biotechnol* **37**, 287–292.
- Kim YB, Komor AC, Levy JM, Packer MS, Zhao KT, Liu DR (2017). Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. *Nat Biotechnol* **35**, 371–376.
- Koblan LW, Doman JL, Wilson C, Levy JM, Tay T, Newby GA, Maianti JP, Raguram A, Liu DR (2018). Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction. *Nat Biotechnol* **36**, 843–846.
- 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.
- Komor AC, Zhao KT, Packer MS, Gaudelli NM, Waterbury AL, Koblan LW, Kim YB, Badran AH, Liu DR (2017). Improved base excision repair inhibition and bacteriophage Mu Gam protein yields C:G-to-T:A base editors with higher efficiency and product purity. *Sci Adv* **3**, eaao4774.
- Kurt IC, Zhou RH, Iyer S, Garcia SP, Miller BR, Langner LM, Grünwald J, Joung JK (2021). CRISPR C-to-G base editors for inducing targeted DNA transversions in human cells. *Nat Biotechnol* **39**, 41–46.
- Lee HK, Smith HE, Liu CY, Willi M, Hennighausen L (2020). Cytosine base editor 4 but not adenine base editor generates off-target mutations in mouse embryos. *Commun Biol* **3**, 19.
- Li CX, Liu CL, Qi XT, Wu YC, Fei XH, Mao L, Cheng BJ, Li XH, Xie CX (2017a). RNA-guided Cas9 as an *in vivo* desired-target mutator in maize. *Plant Biotechnol J* **15**, 1566–1576.
- Li J, Zhang HW, Si XM, Tian YH, Chen KL, Liu JX, Chen HB, Gao CX (2017b). Generation of thermosensitive male-sterile maize by targeted knockout of the *ZmTMS5* gene. *J Genet Genomics* **44**, 465–468.
- Li JF, Norville JE, Aach J, McCormack M, Zhang DD, Bush J, Church GM, Sheen J (2013). Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol* **31**, 688–691.
- Li N, Sun Y, Yang LY (2013). Cytological study of pollen-mediated plant transformation method based on GFP observation. *Chin Bull Bot* **48**, 616–622. (in Chinese)
- 李娜, 孙毅, 杨利艳 (2013). 基于GFP观察的花粉介导植物转基因方法的细胞学研究. *植物学报* **48**, 616–622.
- Li QQ, Wu GX, Zhao YP, Wang BB, Zhao BB, Kong DX, Wei HB, Chen CX, Wang HY (2020). CRISPR/Cas9-mediated knockout and overexpression studies reveal a role of maize phytochrome C in regulating flowering time and plant height. *Plant Biotechnol J* **18**, 2520–2532.
- Li WT, He M, Chen XW (2019). Discovery of *ZmFBL41^{Chang7-2}* as a key weapon against banded leaf and sheath blight resistance in maize. *Chin Bull Bot* **54**, 547–549. (in Chinese)

- 李伟滔, 贺闯, 陈学伟 (2019). ZmFBL41^{Chang7-2}: 玉米抗纹枯病的关键利器. *植物学报* **54**, 547–549.
- Li X (2018). Optimization of the Genetic Transformation System of *Caladium bicolor* ‘Hongtao K’ and the Introduction of *AtPAP1* Gene and Maize *Lc* Gene. Master’s thesis. Chongqing: Southwest University. (in Chinese)
- 李想 (2018). 彩叶芋‘红桃K’遗传转化体系的优化及*AtPAP1*基因与玉米*Lc*基因的导入. 硕士论文. 重庆: 西南大学.
- Liang RH, He ZX, Zhao KT, Zhu HC, Hu JC, Liu GW, Gao Q, Liu MY, Zhang R, Qiu JL, Gao CX (2024). Prime editing using CRISPR-Cas12a and circular RNAs in human cells. *Nat Biotechnol* doi: 10.1038/s41587-023-02095-x.
- Liu C, Li Y, Dai PH, Yao ZP, Liu XD (2020). Construction of genome editing vectors targeting CKXs in maize. *Mol Plant Breed* **18**, 7051–7055. (in Chinese)
- 刘超, 李月, 代培红, 姚正培, 刘晓东 (2020). 玉米CKXs基因组编辑载体的构建. *分子植物育种* **18**, 7051–7055.
- Liu CL, Kong M, Yang F, Zhu JJ, Qi XT, Weng JF, Di DP, Xie CX (2022). Targeted generation of null mutants in *ZmGDIα* confers resistance against maize rough dwarf disease without agronomic penalty. *Plant Biotechnol J* **20**, 803–805.
- Liu CX, Li X, Meng DX, Zhong Y, Chen C, Dong X, Xu XW, Chen BJ, Li W, Li L, Tian XL, Zhao HM, Song WB, Luo HS, Zhang QH, Lai JS, Jin WW, Yan JB, Chen SJ (2017). A 4bp insertion at *ZmPLA1* encoding a putative phospholipase A generates haploid induction in maize. *Mol Plant* **10**, 520–522.
- Liu J, Yan JB (2019). A teosinte rare allele increases maize plant density and yield. *Chin Bull Bot* **54**, 554–557. (in Chinese)
- 刘杰, 严建兵 (2019). 大刍草稀有等位基因促进玉米密植高产. *植物学报* **54**, 554–557.
- Liu L, Gallagher J, Arevalo ED, Chen R, Skopelitis T, Wu QY, Bartlett M, Jackson D (2021). Enhancing grain-yield-related traits by CRISPR-Cas9 promoter editing of maize *CLE* genes. *Nat Plants* **7**, 287–294.
- Liu WY, Lin HH, Yu CP, Chang CK, Chen HJ, Lin JJ, Lu MYJ, Tu SL, Shiu SH, Wu SH, Ku MSB, Li WH (2020). Maize ANT1 modulates vascular development, chloroplast development, photosynthesis, and plant growth. *Proc Natl Acad Sci USA* **117**, 21747–21756.
- Liu XS, Gu DF, Zhang YR, Jiang YL, Xiao Z, Xu RF, Qin RY, Li J, Wei PC (2024). Conditional knockdown of *Os-MLH1* to improve plant prime editing systems without disturbing fertility in rice. *Genome Biol* **25**, 131.
- Lowe K, La Rota M, Hoerster G, Hastings C, Wang N, Chamberlin M, Wu E, Jones T, Gordon-Kamm W (2018). Rapid genotype “independent” *Zea mays* L. (maize) transformation via direct somatic embryogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* **54**, 240–252.
- Lowe K, Wu E, Wang N, Hoerster G, Hastings C, Cho MJ, Scelonge C, Lenderts B, Chamberlin M, Cushatt J, Wang LJ, Ryan L, Khan T, Chow-Yiu J, Hua W, Yu M, Banh J, Bao ZM, Brink K, Igo E, Rudrappa B, Shamsseer PM, Bruce W, Newman L, Shen B, Zheng PZ, Bidney D, Falco C, Register J, Zhao ZY, Xu DP, Jones T, Gordon-Kamm W (2016). Morphogenic regulators *Baby boom* and *Wuschel* improve monocot transformation. *Plant Cell* **28**, 1998–2015.
- Luo Y, Zhang ML, Liu Y, Liu J, Li WQ, Chen GS, Peng Y, Jin M, Wei WJ, Jian LM, Yan J, Fernie AR, Yan JB (2022). Genetic variation in *YIGE1* contributes to ear length and grain yield in maize. *New Phytol* **234**, 513–526.
- Lv P, Su F, Chen FY, Yan CX, Xia DD, Sun H, Li SS, Duan ZQ, Ma CL, Zhang H, Wang MG, Niu XM, Zhu JK, Zhang JS (2024). Genome editing in rice using CRISPR/Cas12i3. *Plant Biotechnol J* **22**, 379–385.
- Ma L, Sun YL, Ruan XS, Huang PC, Wang S, Li SF, Zhou Y, Wang F, Cao Y, Wang Q, Wang ZH, Kolomiets MV, Gao XQ (2021). Genome-wide characterization of jasmonates signaling components reveals the essential role of *ZmCOI1a-ZmJAZ15* action module in regulating maize immunity to gibberella stalk rot. *Int J Mol Sci* **22**, 870.
- Mahmud S, Ahmed J, Aziz MA, Hasan MR, Shaon SM, Bhuiyan MNAH, Rahman MF, Rakib HH, Islam MS (2017). Clustered regularly interspaced short palindromic repeats Cas systems: a comprehensive review. *Int J Basic Clin Pharmacol* **4**, 613–622.
- Mali P, Yang LH, Esvelt KM, Aach J, Guell M, Dicarlo JE, Norville JE, Church GM (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* **339**, 823–826.
- Mishra R, Joshi RK, Zhao KJ (2020). Base editing in crops: current advances, limitations and future implications. *Plant Biotechnol J* **18**, 20–31.
- Mladenov E, Iliakis G (2011). Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutat Res* **711**, 61–72.
- Mu LY (2022). Creation of Gene Editing Materials for Three Maize 100-Kernel Weight Candidate Genes. Master’s thesis. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 穆路遥 (2022). 三个玉米百粒重候选基因基因编辑材料的创制. 硕士论文. 武汉: 华中农业大学.

- Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, Jones JDG, Kamoun S** (2013). Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol* **31**, 691–693.
- Nelson JW, Randolph PB, Shen SP, Everette KA, Chen PJ, Anzalone AV, An MR, Newby GA, Chen JC, Hsu A, Liu DR** (2022). Engineered pegRNAs improve prime editing efficiency. *Nat Biotechnol* **40**, 402–410.
- Ning Q, Jian YN, Du YF, Li YF, Shen XM, Jia HT, Zhao R, Zhan JM, Yang F, Jackson D, Liu L, Zhang ZX** (2021). An ethylene biosynthesis enzyme controls quantitative variation in maize ear length and kernel yield. *Nat Commun* **12**, 5832.
- Nishida K, Arazoe T, Yachie N, Banno S, Kakimoto M, Tabata M, Mochizuki M, Miyabe A, Araki M, Hara KY, Shimatani Z, Kondo A** (2016). Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science* **353**, 1248.
- Pan ZY, Liu M, Zhao HL, Tan ZD, Liang K, Sun Q, Gong DM, He HJ, Zhou WQ, Qiu FZ** (2020). *ZmSRL5* is involved in drought tolerance by maintaining cuticular wax structure in maize. *J Integr Plant Biol* **62**, 1895–1909.
- Pathi KM, Rink P, Budhagatapalli N, Betz R, Saado I, Hiekel S, Becker M, Djamei A, Kumlehn J** (2020). Engineering smut resistance in maize by site-directed mutagenesis of *LIPOXYGENASE 3*. *Front Plant Sci* **11**, 543–895.
- Qi XT** (2019). Engineering Liguleless, Super-Sweet and Waxy Compound Mazie Varieties via CRISPR-Cas9. PhD dissertation. Hefei: Anhui Agricultural University. (in Chinese)
- 祁显涛** (2019). 基于CRISPR-Cas9的玉米紧凑株型与甜糯复合型性状定向遗传改良. 博士论文. 合肥: 安徽农业大学.
- Qi XT, Wu H, Jiang HY, Zhu JJ, Huang CL, Zhang X, Liu CL, Cheng BJ** (2020). Conversion of a normal maize hybrid into a waxy version using *in vivo* CRISPR/Cas9 targeted mutation activity. *Crop J* **8**, 440–448.
- Qiao DX, Wang JY, Lu MH, Xin CP, Chai YP, Jiang YY, Sun W, Cao ZH, Guo SY, Wang XC, Chen QJ** (2023). Optimized prime editing efficiently generates heritable mutations in maize. *J Integr Plant Biol* **65**, 900–906.
- Ren JJ, Wu PH, Trampe B, Tian XL, Lübberstedt T, Chen SJ** (2017). Novel technologies in doubled haploid line development. *Plant Biotechnol J* **15**, 1361–1370.
- Richter MF, Zhao KT, Eton E, Lapinaite A, Newby GA, Thuronyi BW, Wilson C, Koblan LW, Zeng J, Bauer DE, Doudna JA, Liu DR** (2020). Phage-assisted evolution of an adenine base editor with improved Cas domain compatibility and activity. *Nat Biotechnol* **38**, 883–891.
- Schoof H, Lenhard M, Haecker A, Mayer KFX, Jürgens G, Laux T** (2000). The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell* **100**, 635–644.
- Shan QW, Wang YP, Li J, Zhang Y, Chen KL, Liang Z, Zhang K, Liu JX, Xi JJ, Qiu JL, Gao CX** (2013). Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* **31**, 686–688.
- Shi JR, Gao HR, Wang HY, Lafitte HR, Archibald RL, Yang MZ, Hakimi SM, Mo H, Habben JE** (2017). AR-GOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnol J* **15**, 207–216.
- Shmakov S, Abudayyeh OO, Makarova KS, Wolf YI, Gootenberg JS, Semenova E, Minakhin L, Joung J, Konermann S, Severinov K, Zhang F, Koonin EV** (2015). Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems. *Mol Cell* **60**, 385–397.
- Siebert R, Puchta H** (2002). Efficient repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination between directly repeated sequences in the plant genome. *Plant Cell* **14**, 1121–1131.
- Sun C, Lei Y, Li BS, Gao Q, Li YJ, Cao W, Yang C, Li HC, Wang ZW, Li Y, Wang YP, Liu J, Zhao KT, Gao CX** (2024). Precise integration of large DNA sequences in plant genomes using prime root editors. *Nat Biotechnol* **42**, 316–327.
- Svitashev S, Schwartz C, Lenderts B, Young JK, Mark Cigan A** (2016). Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun* **7**, 13274.
- Svitashev S, Young JK, Schwartz C, Gao HR, Falco SC, Cigan AM** (2015). Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. *Plant Physiol* **169**, 931–945.
- Teng C, Zhang H, Hammond R, Huang K, Meyers BC, Walbot V** (2020). *Dicer-like 5* deficiency confers temperature-sensitive male sterility in maize. *Nat Commun* **11**, 2912.
- Wang BB, Zhu L, Zhao BB, Zhao YP, Xie YR, Zheng ZG, Li YY, Sun J, Wang HY** (2019a). Development of a haploid-inducer mediated genome editing system for accelerating maize breeding. *Mol Plant* **12**, 597–602.
- Wang H, Yan SJ, Xin HJ, Huang WJ, Zhang H, Teng SZ, Yu YC, Fernie AR, Lu XD, Li PC, Li SY, Zhang CY,**

- Ruan YL, Chen LQ, Lang ZH (2019b). A subsidiary cell-localized glucose transporter promotes stomatal conductance and photosynthesis. *Plant Cell* **31**, 1328–1343.
- Wang N, Arling M, Hoerster G, Ryan L, Wu E, Lowe K, Gordon-Kamm W, Jones TJ, Chilcoat ND, Anand A (2020). An efficient gene excision system in maize. *Front Plant Sci* **11**, 1298.
- Wang N, Gent JI, Dawe RK (2021a). Haploid induction by a maize *cenH3* null mutant. *Sci Adv* **7**, eabe2299.
- Wang W, Pan QL, He F, Akhunova A, Chao S, Trick H, Akhunov E (2018). Transgenerational CRISPR-Cas9 activity facilitates multiplex gene editing in allopolyploid wheat. *Crispr J* **1**, 65–74.
- Wang XD, Guo YH, Wang YR, Peng YL, Zhang HW, Zheng J (2024). *ZmHDT103* negatively regulates drought stress tolerance in maize seedlings. *Agronomy* **14**, 134.
- Wang YX (2021). Using CRISPR/Cas Gene Editing Technology to Create Scented Corn. Master's thesis. Jinan: Shandong Normal University. (in Chinese)
王彦晓 (2021). 利用CRISPR/Cas基因编辑技术创建香味玉米. 硕士学位论文. 济南: 山东师范大学.
- Wang YX, Liu XQ, Zheng XX, Wang WX, Yin XQ, Liu HF, Ma CL, Niu XM, Zhu JK, Wang F (2021b). Creation of aromatic maize by CRISPR/Cas. *J Integr Plant Biol* **63**, 1664–1670.
- Wei L, Zhang X, Zhang ZH, Liu HH, Lin ZW (2018). A new allele of the *Brachytic2* gene in maize can efficiently modify plant architecture. *Heredity* **121**, 75–86.
- Wu GX, Zhao YP, Shen RX, Wang BB, Xie YR, Ma XJ, Zheng ZG, Wang HY (2019). Characterization of maize phytochrome-interacting factors in light signaling and photomorphogenesis. *Plant Physiol* **181**, 789–803.
- Xu JT, Liu XG, Jin ML, Pan H, Han BZ, Li MJ, Yan S, Hu GQ, Yan JB (2022). Establishment of genotype-independent high-efficiency transformation system in maize. *Acta Agron Sin* **48**, 2987–2993. (in Chinese)
许洁婷, 刘相国, 金敏亮, 潘弘, 韩宝柱, 李梦娇, 岩说, 胡国庆, 严建兵 (2022). 不依赖基因型的高效玉米遗传转化体系的建立. *作物学报* **48**, 2987–2993.
- Xu RB, Li YF, Sui Z, Lan TY, Song WJ, Zhang M, Zhang YR, Xing JW (2021). A C-terminal encoded peptide, *ZmCEP1*, is essential for kernel development in maize. *J Exp Bot* **72**, 5390–5406.
- Yan F, Kuang YJ, Ren B, Wang JW, Zhang DW, Lin HH, Yang B, Zhou XP, Zhou HB (2018). Highly efficient A-T to G-C base editing by Cas9n-guided tRNA adenosine deaminase in rice. *Mol Plant* **11**, 631–634.
- Yan J, Oyler-Castrillo P, Ravisankar P, Ward CC, Levesque S, Jing Y, Simpson D, Zhao AQ, Li H, Yan WH, Goudy L, Schmidt R, Solley SC, Gilbert LA, Chan MM, Bauer DE, Marson A, Parsons LR, Adamson B (2024). Improving prime editing with an endogenous small RNA-binding protein. *Nature* **628**, 639–647.
- Yang F, Li Y (2017). The new generation tool for CRISPR genome editing: CRISPR/Cpf1. *Chin J Biotechnol* **33**, 361–371. (in Chinese)
杨帆, 李寅 (2017). 新一代基因组编辑系统CRISPR/Cpf1. *生物工程学报* **33**, 361–371.
- Zhang JJ, Zhang XF, Chen RR, Yang L, Fan KJ, Liu Y, Wang GY, Ren ZJ, Liu YJ (2020a). Generation of transgene-free semidwarf maize plants by gene editing of *Gibberellin-Oxidase20-3* using CRISPR/Cas9. *Front Plant Sci* **11**, 1048.
- Zhang X, Shi YX, Lu BS, Wu Y, Liu Y, Wang YD, Yang JX, Zhao JR (2021). Creation of new maize variety with fragrant rice like flavor by editing *BADH2-1* and *BADH2-2* using CRISPR/Cas9. *Sci Agric Sin* **54**, 2064–2072. (in Chinese)
张翔, 史亚兴, 卢柏山, 武莹, 刘亚, 王元东, 杨进孝, 赵久然 (2021). 利用CRISPR/Cas9技术编辑*BADH2-1/BADH2-2*创制香味味道玉米新种质. *中国农业科学* **54**, 2064–2072.
- Zhang Y, Zhang F, Li XH, Baller JA, Qi YP, Starker CG, Bogdanove AJ, Voytas DF (2013). Transcription activator-like effector nucleases enable efficient plant genome engineering. *Plant Physiol* **161**, 20–27.
- Zhang ZH, Zhang X, Lin ZL, Wang J, Liu HQ, Zhou LN, Zhong SY, Li Y, Zhu C, Lai JS, Li XR, Yu JM, Lin ZW (2020b). A large transposon insertion in the *stiff1* promoter increases stalk strength in maize. *Plant Cell* **32**, 152–165.
- Zhou CY, Sun YD, Yan R, Liu YJ, Zuo EW, Gu C, Han LX, Wei Y, Hu XD, Zeng R, Li YX, Zhou HB, Guo F, Yang H (2019). Off-target RNA mutation induced by DNA base editing and its elimination by mutagenesis. *Nature* **571**, 275–278.
- Zong Y, Liu YJ, Xue CX, Li BS, Li XY, Wang YP, Li J, Liu GW, Huang XX, Cao XF, Gao CX (2022). An engineered prime editor with enhanced editing efficiency in plants. *Nat Biotechnol* **40**, 1394–1402.
- Zuo EW, Sun YD, Wei W, Yuan TL, Ying WQ, Sun H, Yuan LY, Steinmetz LM, Li YX, Yang H (2019). Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos. *Science* **364**, 289–292.

Research Progress of Gene Editing Technology in Maize

Qiang Zhang[†], Zhenyu Zhao[†], Pinghua Li^{*}

Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China

Abstract Gene editing technology has become an important tool in crop breeding. Maize, one of the globally most important food crops, has been shown with great potential in the use of gene editing technology in genome research and breeding. In this paper, we reviewed the recent progress and applications of gene editing technology in maize research, with a focus on the latest achievements in maize genome editing by CRISPR/Cas. Firstly, we introduced the basic principles and types of gene editing technology, particularly the working mechanism of the CRISPR/Cas systems, and its application advantages in maize. Secondly, we summarized the research progress of gene editing technology in maize breeding, from basic genome editing to the editing of complex multi-gene regulation, aiming at the improvement of key traits such as yield, grain quality, and stress resistance. Finally, the outstanding research work in maize gene editing in China is presented and the existing issues of gene editing technology in maize breeding are discussed, along with an outlook on future development trends.

Key words maize, genome editing, CRISPR/Cas system, genetic improvement

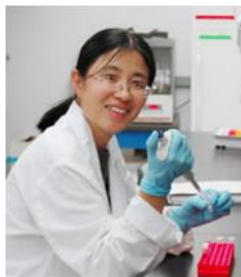
Zhang Q, Zhao ZY, Li PH (2024). Research progress of gene editing technology in maize. *Chin Bull Bot* **59**, 978–998.

[†] These authors contributed equally to this paper

^{*} Author for correspondence. E-mail: pinghuali@sdau.edu.cn

(责任编辑: 白羽红)

通讯作者/团队简介



李平华, 博士, 教授, 博士生导师。2011年获BTI研究所Lawrence Bogorad分子生物学奖; 2013年入选国家海外重点人才工程青年项目; 2015年入选山东省“泰山学者攀登计划”。研究团队主要以C₄作物玉米为材料, 利用正反向遗传学、分子生物学、细胞生物学以及生物信息学等方法, 系统研究密植条件下玉米的株型建成, C₄光合启动过程中基因表达的调控机制, 为全面理解并利用C₄光合特性进行玉米耐密高光效育种提供理论依据。