



CRISPR/Cas9 基因组编辑技术在番茄中的应用现状及展望

蒋 萌, 付尚谭, 王晓峰*

(西北农林科技大学 园艺学院/旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西杨陵 712100)

摘 要: CRISPR/Cas9 技术是一种能够快速对基因组靶位点进行特定 DNA 修饰的编辑工具。该文对近年来国内外有关 CRISPR/Cas9 技术在改善番茄农艺性状及提高生物、非生物胁迫抗性方面的研究进展进行综述, 并集中讨论了 CRISPR/Cas9 面临的一些问题, 为该基因编辑技术在番茄的种质创新及基因功能研究方面的应用提供参考。

关键词: 番茄; 基因编辑; CRISPR/Cas9

中图分类号: S641.2; Q785; Q786; Q789

文献标志码: A

Application Status and Prospect of CRISPR/Cas9 Genome Editing Technology in Tomato

JIANG Meng, FU Shangtan, WANG Xiaofeng*

(State Key Laboratory of Crop Stress Biology in Arid Areas, College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: CRISPR/Cas9 technology is an editing tool that can rapidly modify specific DNA of genomic targets. This paper reviews the research progress of CRISPR/Cas9 technology in improving tomato agronomic traits and improving biotic and abiotic stress resistance at home and abroad in recent years, and focuses on some problems faced by CRISPR/Cas9, so as to provide reference for the application of CRISPR/Cas9 gene editing technology in germplasm innovation and gene function research of tomato.

Key words: tomato; gene editing; CRISPR/Cas9

近年来随着分子生物学的不断发展, 基因编辑技术基于其高效、可控、定向编辑的特点在植物学和农学领域得到了广泛应用。该技术利用序列特异识别的核酸酶(sequence-specific nucleases, SSNs)使特定定位点的 DNA 双链发生断裂, 从而启动两种高度保守的自身修复机制, 即非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)和同源重组修复(homologous directed repair, HDR)。真核生物中

DNA 双链断裂(double strand break, DSBs)的修复多为 NHEJ 的方法, 即通过 DNA 连接酶直接连接 DSBs 末端, 但相比于需要同源序列模板的 HDR, 精确度更低^[1]。基因编辑技术主要有 3 种类型, 即锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)技术、类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)技术及规律成簇间隔短回文重复序列及其关联蛋白系统(clustered

收稿日期: 2021-10-14; 修改稿收到日期: 2021-12-13

基金项目: 国家自然科学基金(31972430); 杨陵示范区产学研用协同创新项目(2018Cxy-09)

作者简介: 蒋 萌(1998—), 女, 硕士研究生, 主要从事番茄育种研究。E-mail: jiangmeng412@163.com

* 通信作者: 王晓峰, 教授, 博士生导师, 主要从事油菜素内酯信号转导及在蔬菜作物上的研究应用。E-mail: wangxff99@nwsuaf.edu.cn

regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated proteins, CRISPR/Cas)。与 CRISPR/Cas 相比,ZFNs 和 TALENs 在编辑效率、稳定性、成本及复杂程度上都有其无法克服的缺点。

CRISPR/Cas 技术 2013 年开始应用于植物基因组编辑,加速了人们对植物基因组中特定 DNA 序列定向编辑的步伐,被 *Science* 杂志评为十大科学突破之一^[2]。其中应用最为广泛的是 CRISPR/Cas9 系统,目前已经在水稻、玉米、小麦等多种作物中得到应用^[3-6]。

番茄(*Solanum lycopersicum*)是中国及世界上最主要的蔬菜之一,其生命周期较短,遗传简单,具备成熟的遗传转化技术。自 2014 年 CRISPR/Cas9 首次应用于番茄基因编辑后,在基因功能研究和种质资源创新领域得到了大量的应用^[7],但编辑效率低等问题依然限制了其进一步发展。本综述将总结近几年 CRISPR/Cas9 技术在番茄中的应用现状,并讨论该技术在番茄中应用的前景及面临的问题。

1 CRISPR 技术简介

近年来,CRISPR/Cas9 基因组编辑技术被广泛地应用于多种生物体的基因编辑,以对基因功能进行基础研究和创建动植物育种的新材料。从 1987 年在碱性磷酸酶同工酶基因中发现 CRISPR 序列后^[8],经过不断地探索和改进,最终将 CRISPR/Cas 基因编辑技术应用于编辑目标基因。根据 Cas 基因的数量和功能之间的不同,CRISPR/Cas 系统被分为两类,第一类是需要多种蛋白的 I、Ⅲ和Ⅳ型系统,第二类是仅需单一蛋白即可编辑双链的Ⅱ、Ⅴ和Ⅵ型 CRISPR/Cas 系统^[9]。目前应用最为广泛的是来自Ⅱ型 CRISPR/Cas9 系统,该系统主要由 crRNA(CRISPR RNA)与 tracrRNA(trans-activating crRNA)结合后形成双链二级结构进行 Cas9 蛋白的招募,共同形成活性核糖核蛋白(ribonucleoproteins,RNPs)复合体并识别 PAM(protospacer adjacent motif)区,随后 Cas9 蛋白发挥其 DNA 核酸内切酶的活性,进行 DNA 双链的切割,由此产生 DSB 触发 DNA 修复机制。CRISPR/Cas9 基因组编辑技术应用的核心是构建 Cas9/sgrRNA 表达载体,将载体导入受体细胞并发挥编辑作用^[10],用于植物的 Cas9 核酸酶主要由 35S 启动子或组织特异性启动子等强启动子驱动,而 sgrRNA 一般由聚合酶Ⅲ转录的 U6 启动子驱动,多重靶点编辑一般通过串联 sgrRNA 连接至相应载体中表达^[11-12]。随后

通过农杆菌介导转化、农杆菌叶片注射法等方式导入受体细胞。

2013 年,*Science* 杂志报道了 CRISPR/Cas9 在小鼠等动物中的应用^[13],同年 *Nature Biotechnology* 杂志报道了在水稻、模式植物本氏烟草和拟南芥中的基因定点编辑^[14-15],并于 2014 年首次应用于番茄基因编辑^[7]。目前,CRISPR/Cas9 的应用主要集中在生物和非生物胁迫响应以及性状改良等方面,通过编辑编码序列位点产生无效等位基因突变体,最终应用于改良作物品种。

2 CRISPR/Cas9 系统在番茄中的应用现状

CRISPR/Cas9 技术近几年在番茄中的应用主要为农艺性状改良及抗逆、抗病基因功能研究,表 1 中列举了这三方面的应用。

2.1 CRISPR/Cas9 在番茄农艺性状改良中的应用现状

番茄传统育种需要花费大量的时间和精力将优良性状赋予目标品系,还会连锁引入一些不需要的不良性状,而 CRISPR/Cas9 技术能够快速精准地创制应用于各品系各位点的新种质资源^[16]。番茄基因组的测序使研究人员能够利用 CRISPR/Cas9 技术定点精确调控植株形态、生长发育、果实性状等农艺性状,从而得到优异的番茄种质资源。不仅如此,番茄作为一种研究浆果果实发育和果实成熟的模型,其性状改良对其他作物农艺性状改良也具有参考价值。

2.1.1 调控植株形态 叶型影响番茄的植株形态和光合效率,Brooks 等^[7]利用 CRISPR/Cas9 技术编辑番茄 *SLAGO7* 基因,导致叶型发生改变,并发现突变能够稳定遗传,首次证明了 CRISPR/Cas9 系统在番茄中的强大功能。株高是作物重要农艺性状,矮化番茄植株较小,适宜盆栽,观赏价值高,CRISPR/Cas9 编辑赤霉素信号转导的负调节因子 *PROCERA* 能够获得矮化突变体,自交获得 T₁ 代植株,杂合子在苗期表现出野生型和纯合子之间的中间表性,意味着突变为半显性,而发育后期纯合子杂合子矮化程度相同,随后通过自交获得了无 Cas9 构建的矮化番茄植株,为番茄优良矮化品种的培育提供了先例^[17]。

2.1.2 改良果实性状 果实作为番茄的经济器官,其性状直接影响生产者的经济效益,其中果实保质期的延长,果实品质及果色的改良对经济效益影响较大。

表 1 CRISPR/Cas9 在番茄中的应用

Table 1 Application of CRISPR/Cas9 in tomato

研究方向 Research direction	靶基因 Target gene	应用 Application	参考文献 Reference
改良农业 性状 Improvement of agricultural traits	<i>SIAGO7</i>	改变叶型 Changes of leaf type	[7]
	<i>PROCERA</i>	矮化植株培育 Plant dwarfing	[17]
	<i>RIN</i>	延长保质期 Extending shelf life	[18-19]
	<i>RING2</i>	延长保质期 Extending shelf life	[20]
	<i>ALC</i>	延长保质期 Extending shelf life	[21]
	<i>SIORRM4</i>	延长保质期 Extending shelf life	[22]
	<i>SINAM1</i>	延长保质期 Extending shelf life	[23]
	<i>SIEZ2</i>	延长保质期 Extending shelf life	[24-25]
	<i>SIINVINH1</i> , <i>SiVPE5</i>	提高果实可溶性糖含量 Increasing soluble sugar content of fruit	[26]
	<i>SIRCM1</i>	提高果实品质 Increasing fruit traits	[27]
	<i>SGR1</i> , <i>LCY-E</i> , <i>BLC</i> , <i>LCY-B1</i> , <i>LCY-B2</i>	提高番茄红素含量 Increasing lycopene content	[28]
	<i>SIMYB12</i>	粉红果实 Pink fruit	[29-30]
	<i>PSY1</i>	黄色果实 Yellow fruit	[31]
	<i>CRTISO</i>	橙色果实 Orange fruit	[32]
	<i>SICLE3</i> , <i>SiCLV3</i>	增加花序、分支、子房数量 Inflorescences, branches, ovary increased	[33]
	<i>SIWOX8</i> , <i>SiWOX9</i>	新花序类型 Discovery of new inflorescence types	[34]
	<i>GABA-TP1</i> , <i>GABA-TP2</i> , <i>GABA-TP3</i> , <i>CAT9</i> , <i>SSADH</i>	调节花、叶、果实发育 Regulation of flower, leaf and fruit development	[11]
	<i>SIMPK20</i>	调节花粉发育 Pollen development	[35]
	<i>miR164a</i> , <i>miR164b</i> , <i>miR164d</i>	调节生长发育和果实性状 Regulation of growth and fruit traits	[36]
	<i>SiSTR1</i>	雄性不育系 Creation of male sterile line	[37]
	<i>SIMS10</i> ³⁵	雄性不育系 Creation of male sterile line	[38]
	<i>GGP</i>	调节花粉发育 Regulation of pollen development	[39]
	<i>SIAGL6</i>	单性结实 Creation of parthenocarpy	[40-41]
	<i>SIIAA9</i>	单性结实 Creation of parthenocarpy	[42]
	<i>SIER</i> , <i>SP5G</i> , <i>SP</i>	培育都市农业品种 Creation of urban agriculture varieties	[43]
	<i>SP</i> , <i>OVATE</i> , <i>FW2.2</i> , <i>CycB</i> , <i>MULTI-FLORA</i> , <i>FASCIATED</i>	改变株形果型, 提高果实数量和营养价值 Change plant shape and fruit type, increase fruit quantity and nutritional value	[44]
提高抗逆性 Improving stress resistance	<i>SIMAPK3</i>	提高抗旱性 Improving drought resistance	[46]
	<i>SINPR1</i>	提高抗旱性 Improving drought resistance	[47]
	<i>SIBZR1</i>	提高抗旱性 Improving drought resistance	[49]
	<i>SILBD40</i>	提高抗旱性 Improving drought resistance	[50]
	<i>GID1</i>	提高抗旱性 Improving drought resistance	[51]
	<i>SiCBF1</i>	提高抗寒性 Improving cold resistance	[52]
	<i>SISBPASE</i>	提高抗寒性 Improving cold resistance	[53]
	<i>SiHyPRP1</i>	提高抗盐性 Improving salt resistance	[54]
	<i>SiHAK20</i>	提高抗盐性 Improving salt resistance	[55]
	<i>SiMAX1</i>	提高抗除草剂能力 Improving herbicide resistance	[56]
	<i>SiGRXS14</i> , <i>SiGRXS15</i> , <i>SiGRXS16</i> , <i>SiGRXS17</i>	提高抗非生物胁迫能力 Enhancing capacity to resist abiotic stresses	[57]

续表 1Continued Table 1

研究方向 Research direction	靶基因 Target gene	应用 Application	参考文献 Reference
提高抗病性 Improving disease resistance	<i>SlMlo</i>	提高白粉病抗性 Improving powdery mildew resistance	[58-59]
	<i>SlPMR4</i>	抗白粉病 Improving powdery mildew resistance	[60]
	<i>miR482b, miR482c</i>	抗晚疫病 Improving <i>Phytophthora infestans</i> resistance	[61]
	<i>SlMYBS2</i>	抗晚疫病 Improving <i>Phytophthora infestans</i> resistance	[62-63]
	<i>Sloyc08g075770</i>	抗枯萎病 Improving Fusarium wilt resistance	[64]
	<i>SlMYC2</i>	抗灰霉病 Improving <i>Botrytis cinerea</i> resistance	[65]
	<i>PL</i>	抗灰霉病 Improving <i>Botrytis cinerea</i> resistance	[66]
	<i>TYLCV</i>	抗番茄黄化曲叶病 Improving TYLCV resistance	[67]
	<i>TYLCV Rep, CP</i>	抗番茄黄化曲叶病 Improving TYLCV resistance	[68]
	<i>TYLCV IR, CP</i>	抗番茄黄化曲叶病 Improving TYLCV resistance	[69]
	<i>SlPelo</i>	抗番茄黄化曲叶病 Improving TYLCV resistance	[59]
	<i>SlDCL2b</i>	抗番茄花叶病毒 Improving ToMV resistance	[71]
	<i>SlDCL2a, SlDCL2b</i>	抗马铃薯 X 病毒及烟草花叶病毒 Improving PVX and TMV resistance	[72]
	<i>SlJAZ2</i>	抗细菌性斑点病 Improving Bacterial speck resistant	[73]
	<i>SlPUB24</i>	抗细菌性疮痂病 Improving Bacterial spot resistance	[74]
	<i>Rx4</i>	抗细菌性疮痂病 Improving Bacterial spot resistance	[75-76]
	<i>SlDMR6-1</i>	提高多重抗病能力 Improving multiple disease resistance	[77-78]
	<i>ACER1a, ACET1b</i>	提高多重抗病能力 Improving multiple disease resistance	[79]

CRISPR/Cas9 基因组编辑技术被应用于研究果实成熟相关基因功能,如 *RIN* (ripening inhibitor)^[18-19]、*RING2*^[20]、*ALC* (alcobaca)^[21]、*ORRM4* (organelle RNA recognition motif-containing 4)^[22] 以及 *NAM1*^[23],敲除突变体果实延迟成熟,为培育货架期长的番茄耐贮藏品种提供材料。为了检测基因在果实发育中的特异功能,开发了果实特异性的 CRISPR/Cas9 系统,该系统以 *PPC2* 基因的启动子驱动 *Cas9* 基因表达,并结合 GFP 检测系统。使用该系统对植物发育产生多种影响的 *EZ2* (zeste) 基因进行编辑,对其在番茄果实中的功能进行探究,检测到果实成熟的延迟^[24-25],初步确认了果实特异性编辑的可行性,为番茄果实相关基因功能研究建立了新的研究方法。

可溶性糖是番茄果实品质中很重要的一个性状, *INVINH1* (inhibitor of the acid invertase gene) 基因特异性抑制细胞壁转化酶活性, *SlVPE5* (vacuolar processing enzyme) 负向调节糖的积累,均抑制果实可溶性糖积累。CRISPR/Cas9 编辑验证 *SlINVINH1* 和 *SlVPE5* 功能,结果表明,比起 *SlINVINH1* 和 *SlVPE5* 单突变体,双突变体能进一步提高番茄果实中可溶性糖积累,二者表现为协

同作用,为提高番茄果实品质提供实验依据^[26]。此外,叶绿素数量增加能够通过增强光合作用提高植物的营养品质和果实颜色。Liu 等^[27]得到了一个叶绿素减少的突变体,发现是 *SlRCM1* (reduced chlorophyll mutant 1) 基因所导致,该基因的敲除系果实在绿熟期表现出黄色,为改善果实品质提供了一个新思路。番茄红素是决定番茄果实品质的重要因素, *SGR1* (stay-green1)、*LCY-E* (lycopene E-cyclase)、*BLC* (beta-lycopene cyclase)、*LCY-B1* (lycopene B-cyclase1)、*LCY-B2* 是番茄红素代谢途径中的关键基因,设计 6 个 sgRNA 并利用 CRISPR/Cas9 系统进行敲除,其中 *sgr1* 单突变体的番茄红素含量增加约 5.1 倍,多重突变体也不同程度地增加了番茄红素和 β -胡萝卜素的含量,在提升果实营养品质方面有实际应用价值^[28]。

随着人们生活水平的提高,消费者对果色的要求也随之提高,粉果番茄更受中国消费者的欢迎。柚皮苷查尔酮 (naringenin chalcone, NarCh) 缺失造成番茄果实呈现粉色,对 NarCh 合成相关基因 *SlMYB12* (myeloblastosis 12) 进行编辑得到粉红果实突变体,且没有检测到突变体主要农艺性状及果实品质的变化,同时建立了基于 CRISPR/Cas9 系

统的粉果番茄快速育种系统,为日后通过基因编辑改良农艺性状提供了一个很好的实例^[29-30]。八氢番茄红素合酶(phytoene synthase, PSY)和类胡萝卜素异构酶(carotenoid isomerase, CRITISO)参与类胡萝卜素合成途径,利用 CRISPR/Cas9 分别敲除红果番茄的 *PSY1* 和 *CRTISO*,获得了黄色和橙色果实的突变体^[31-32]。

2.1.3 调节生长发育 番茄地上部分器官的分化和发育由茎端干细胞决定, *CLV/WUS* (*clavata/wuschel*)途径调控茎端分生组织的增值和分化。*CLV3* 通过抑制 *WUS* 的表达限制干细胞增殖, *Sl-CLE9* (*clavata 3/embryo*)通过缓冲 *SlCLV3* 对干细胞增值的限制来维持干细胞稳态,使用 CRISPR/Cas9 编辑 *SlCLE9* 和 *SlCLV3* 发现双突变体表现出茎粗增大、叶片及分枝增多,并发现 *SlCLE9* 和 *SlCLV3* 之间的主动补偿效应^[33]。Hendelman 等^[34]进一步研究 *WUS* 相关基因在发育中的调节功能,利用 CRISPR/Cas9 创造大量敲除 *SlWOX8* (*wuschel-related homeobox 8*)和 *SlWOX9* 启动子等位基因的突变体,揭示了该基因在生长发育方面的多效性,同时发现了新花序表型。 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)的含量与发育相关,选择 GABA 代谢途径中的 5 个基因进行敲除,得到的多个突变体组合均能够显著提高 GABA 含量,抑制花、叶、果实的生长发育,验证了 GABA 在发育中的功能,证明了多敲系统的高效性^[11]。此外,丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated proteins kinases, MAPKs)在调节植物生长发育、分裂等过程发挥着重要作用,但其在植物发育过程中的功能还不清楚。利用 CRISPR/Cas9 彻底敲除 *SlMPK20*,发现突变体花粉生存能力被抑制,探究了 *SlMPK20* 基因在花粉发育调控中的作用^[35]。*MIR* (MICRORNA)基因转录后加工产物微小核糖核酸(MicroRNAs, miRNAs),作用范围广泛,调控植物发育、生物非生物胁迫等生物过程。CRISPR/Cas9 分别编辑 *miR164a*、*miR164b* 和 *miR164d*,发现 *miR164a* 影响果实大小硬度等性状,而 *miR164b* 能够维持花芽正常发育,并在果实生长调控中和 *miR164a* 发生冗余,揭示了 *miR164* 在发育和果实性状中的作用^[36]。

2.1.4 雄性不育及单性结实品种培育 番茄杂种优势明显,但杂交制种需大量人力物力,雄性不育系的创制能够节省这部分成本,同时提高杂交种子纯度。Du 等^[37]鉴定并敲除雄蕊特异基因 *SlSTR1* 创

建了雄性不育系,并通过自交剔除了 T-DNA,同时创建通过幼苗颜色区分育性的保持系,建立了基于 CRISPR/Cas9 的番茄杂交制种系统。最近我们团队使用 CRISPR/Cas9 技术靶向育性基因 *MS10*³⁵ (*male sterile*)及其连锁的标记基因创建了具有绿色下胚轴标记或下胚轴多毛表型的雄性不育系。创制的不育系能够通过可视化标记在苗期区分出不育植株,且应用于杂交制种后能够获得高纯度杂交种,推动了 CRISPR/Cas9 在创制番茄雄性不育系及生产杂交种子中的应用^[38]。近期研究发现, GDP-I-半乳糖磷酸化酶(GDP-I-galactose phosphorylase, GGP)调控抗坏血酸含量, CRISPR/Cas9 诱导 *GGP* 突变导致植株花器官结构受损,进一步研究表明植株高抗坏血酸含量损害花粉活力,为雄性不育系的培育提供了新思路^[39]。

单性结实即无需授粉子房直接形成无子果实,能够避免花粉活力对坐果率的影响。*AGL6* (*agam-mous-like6*)基因被证明与番茄单性结实有关, CRISPR/Cas9 敲除 *AGL6* 产生了果实质量等性状未受影响的单性结实材料,验证了 *AGL6* 赋予番茄的单性结实能力^[40],并据此对 *SlAGL6* 介导的单性结实机制进行了深入研究^[41]。类似的, *Aux/IAA* (*auxin/indole-3-acetic acid*)转录因子 *SlIAA9* 的下调激活番茄单性结实, CRISPR/Cas9 敲除获得的单性结实突变体显示出果实无核的表型,研究发现该突变能够稳定遗传至下一代,并快速应用于番茄各品种^[42]。

2.1.5 多性状改良品种培育 CRISPR/Cas9 能够一次性编辑调控番茄生长发育、产量及营养方面的多个基因,同时优化番茄多个性状。Kwon 等^[43]利用 CRISPR/Cas9 同时编辑 *SlER* (*erecta*)、*SP* (*self-pruning*)和 *SP5G* (*self-pruning 5G*),获得株型紧凑,外观更像灌木, 40 d 内能够收获成熟果实且不影响产量的番茄植株,创建了一种适宜城市农业的番茄材料,能够满足现代化都市生存与发展需要。野生番茄具有很好的抗逆性,但品质方面还需改良, Zsögön 等^[44]选择野生番茄品种,靶向其形态方面的 6 个基因,得到了大量形态、果实数量、果实形状及营养物质发生改变但保留了野生品种抗逆性的突变体。其次,该团队还提出利用 CRISPR/Cas9 技术能够使番茄产生辣椒素,提高番茄营养价值和抗菌能力^[45]。这些结果表明了 CRISPR/Cas9 技术在番茄育种中具有很高的应用价值。

2.2 CRISPR/Cas9 在提高番茄抗逆性中的应用现状

番茄生长发育经常面临干旱、高温、低温等多种逆境条件,严重影响番茄的正常生长发育,因此提高番茄抗逆性一直是育种的主要目标。CRISPR/Cas9 技术推动植物抗逆相关基因功能及逆境胁迫机制等理论研究,并最终服务于番茄抗逆育种。

2.2.1 提高抗旱性 干旱是对番茄生长发育最具破坏性的非生物胁迫。MAPK 级联系统通过信号转导参与调节植物抗旱反应。CRISPR/Cas9 诱导的 *SlMAPK3* 突变体中,检测到了过氧化氢的含量减少及热胁迫耐受性降低^[46],此外,病原体防御反应调控因子 *SlNPR1* (nonexpressor of pathogenesis-related 1) 的 CRISPR/Cas9 敲除突变体,也得到了类似结果^[47]。证明 *SlMAPK3* 和 *SlNPR1* 响应干旱胁迫,赋予植株一定程度的抗旱能力,这些耐旱相关基因的编辑,凸显了基因组编辑技术在调节植株抗旱性中的可行性,但还未得到进一步应用。

植物激素对植物生长发育起着重要调节作用,其通过与外部环境之间相互作用提高植株对一定程度环境胁迫的适应能力^[48]。油菜素甾醇 (brassinosteroids, BRs) 信号通路的重要转录因子 *BZR1* (brassinazole resistant transcription factor 1) 参与抗旱调节,CRISPR/Cas9 诱变 *SlBZR1*, 突变体缺少热应激耐受性,且过氧化氢的含量减少、热胁迫耐受性降低^[49]。证明 *SlBZR1* 是抗旱性正调控因子。氮响应负调控因子 *LBD* (lateral organ boundaries domain) 参与茉莉酸 (jasmonate, JA) 信号传导,CRISPR/Cas9 介导的 *SlLBD40* 基因突变,提高了植株抗旱性,证明了 *SlLBD40* 是抗旱性的负调控因子^[50]。最近一项研究利用 CRISPR/Cas9 技术编辑赤霉素受体蛋白基因 *GID1* (gibberellin-insensitive dwarf1), 得到在缺水条件下保持较高水平叶片含水量的番茄植株,有效提高了番茄抗旱能力。在此基础上深入探究了赤霉素 (gibberellin, GA) 与番茄抗旱之间的关系,发现干旱胁迫下,植物体内 GA 水平降低,通过减少叶面积,促进气孔关闭,减少木质部增殖和扩张,以减少木质部水力传导等多种机制减少蒸腾作用,从而提高植株耐旱性^[51],但这些抗旱相关基因之间的关系还有待进一步研究。

2.2.2 提高抗寒性 寒冷也是影响植物生长发育和产量的重要环境因素之一。CBFs (CRT binding factors) 是一种存在于各物种中的冷响应因子,利用 CRISPR/Cas9 技术编辑 *SlCBF1* 基因得到的突变

体对低温胁迫的耐受性和敏感度下降^[52],突变体脯氨酸含量、过氧化氢含量和抗氧化酶活性等生理指标测定也验证了这一结果,同时检测到 JA、ABA 等激素含量的提高。这些结果有助于更好地探究 *SlCBF1* 在抗冷机制中的作用方式。过表达光合碳同化关键酶 *SBPase* 能够提高植株耐寒性,而利用 CRISPR/Cas9 创建的突变体 *slsbpase* 则对冷害更加敏感,突变导致植株体内抗坏血酸和谷胱甘肽含量、谷胱甘肽合成酶活性及其编码基因转录丰度的降低,并抑制 AsA-GSH 再循环,这些结果支持 *SlSBPase* 中的突变通过抑制 GSH 生物合成和 AsA-GSH 再循环来加剧低温诱导的氧化应激,并表明 *SBPase* 是番茄植株对低温胁迫的最佳响应所必需的^[53]。

2.2.3 提高抗盐性 盐碱胁迫会对农作物整个生长周期造成不同程度的抑制,限制农作物产量和质量。*HyPRPs* (hybrid proline-rich proteins) 是盐胁迫反应的负调控因子,CRISPR/Cas9 精确调控 *Sl-HyPRP1* 使番茄在萌发和营养阶段表现出高盐度耐受性^[54]。*SlHAK20* (high-affinity K^+ 20) 位于 4 号染色体前端,具有钠钾离子转运体功能,能够维持植物组织中的 K^+ 和 Na^+ 稳态,利用 CRISPR/Cas9 进行敲除,发现该基因与番茄耐盐性相关,为解释耐盐分子机制以及耐盐品种的选育提供了重要依据^[55]。

2.2.4 提高抗除草剂能力 根寄生杂草对农作物产量和质量影响很大, *MAX1* (more axillary growth 1) 基因是独脚金内酯 (strigolactone, SL) 合成基因,而 SL 是根寄生杂草萌发所必需的诱导剂。设计靶向 *SlMAX1* 基因第 3 个外显子的 sgRNA, 得到 *SlMAX1* 敲除突变体,发现该突变体 SL 水平降低,并获得对根寄生杂草分枝列当 (*Phelipanche aegyptiaca*) 的抗性,为有效控制根寄生杂草提供了新方法^[56]。

2.2.5 提高多种非生物胁迫抗性 植物通过活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 清除机制减轻非生物胁迫带来的损害,其稳态调节因子 CGFS 型谷氧还蛋白 (CGFS-type glutaredoxin, GRX), CRISPR/Cas9 靶向诱变分析番茄 4 种 GRX 基因 (*SlGRXS14*、*SlGRXS15*、*SlGRXS16* 和 *SlGRXS17*), 其中 *SlGRXS14* 和 *SlGRXS17* 突变体对热、寒冷、干旱、重金属毒性、营养缺失和短光周期等非生物胁迫都更敏感,而 *SlGRXS16* 突变体主要对寒冷更加敏感,为通过基因工程方法提高番茄对多种非生物胁迫的耐受性提供了新思路^[57]。

2.3 CRISPR/Cas9 在提高番茄抗病性中的应用现状

近年来,番茄病害发生逐年增多,根据病原体可分为真菌病、病毒病和细菌病等,这些病害严重影响了番茄产量,CRISPR/Cas9 系统的应用有效提高番茄对不同类型病原体的抵抗力。

2.3.1 提高真菌病抗性 番茄白粉病主要危害叶片,该病害通过在叶片上形成霉斑来影响光合作用,直接影响植株生长发育。研究表明番茄 *Mlo*(mildew resistance locus o)基因家族 *SlMlo1* 是白粉病易感基因,利用 CRISPR/Cas9 技术敲除 *SlMlo1*,10 个月内即可得到白粉病抗性很强的非转基因番茄^[58]。在此基础上,研究人员引入多敲系统创制抗病突变体,构建双靶点 CRISPR/Cas9 系统靶向 *SlMlo1*,成功获得 *SlMlo1* 大片段缺失且完全抗白粉病的突变体^[59]。此外,白粉病易感基因 *PMR4* (powdery mildew resistance 4)的缺失导致抗病性增强^[60],多靶点 CRISPR/Cas9 系统编辑 *SlPMR4* 的敲除突变体显著地提高了白粉病抗性。证明了 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术能够快速且有效地提高植株对真菌病抗性。

致病疫霉 (*Phytophthora infestans*)所引起的番茄晚疫病是一种严重的番茄真菌病害,主要影响设施番茄产量。miRNAs 能够通过抑制其靶基因提高植物抗性,利用多重编辑系统同时敲除 *miR482b* 和 *miR482c*,发现双突变体比单突变体抗性更高,揭示了 miRNAs 调控抗性新机制^[61]。此外,CRISPR/Cas9 验证了 *SlMYBS2* 对致病疫霉的正向调控作用,并推测 *SlMYBS2* 通过 SA 和 JA 信号通路抵抗致病疫霉^[62-63]。CRISPR/Cas9 技术还可用于更多番茄致病疫霉相关基因功能的进一步验证中。

基因组编辑技术还被应用于提高尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)所导致枯萎病^[64]以及灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*)所导致的灰霉病抗性^[65]。CRISPR/Cas9 编辑产生的 *Sloyc08g075770* 突变体对枯萎病敏感性更高^[64]。此外,茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MeJA) 在植物抗逆中起信号传递作用,研究人员推测 MeJA 相关转录因子 MYC2 (myelocytomatosis protein 2) 参与调控植株抗逆,CRISPR/Cas9 技术介导的 *SlMYC2* 突变,降低了突变体果实抗灰霉病能力和抗氧化酶活性,证明该基因在 MeJA 诱导的番茄果实抗灰霉病过程中起正调控作用^[65]。此外,最近研究发现果胶裂解酶基因

PL (pectate lyase) 的 CRISPR/Cas9 敲除将植株对灰霉病的易感性降低了 50% 以上^[66]。

2.3.2 提高病毒病抗性 番茄黄化曲叶病毒 (tomato yellow leaf curl virus, TYLCV) 是番茄生产中的一种毁灭性病害。CRISPR/Cas9 能够靶向 TYLCV 基因组从而提高植物抗病性^[67],此外通过靶向番茄 TYLCV 基因组的复制酶 *Rep* (replicase) 及外壳蛋白 CP (coat protein),赋予突变体 TYLCV 抗性,其中 CP 位点的突变效率更高^[68]。在此基础上利用诱导型启动子构建 CRISPR/Cas9 表达载体,靶向 TYLCV 的基因间区域 IR (intergenic region) 和 CP 序列,检测到病毒的积累减少或发生延迟^[69]。除此之外,研究人员通过 QTL 定位 (quantitative trait locus) 鉴定了抗性连锁的一系列位点,使用 CRISPR/Cas9 敲除 *Ty-5* 位点编码的 *SlPelo* (pelota) 基因,其缺失也能有效抑制 TYLCV 病毒增殖^[59]。

除直接干扰病毒基因组外,小型 RNA 在病毒防御中的作用也值得探讨。DCL (dicer-like) 作为加工酶参与 RNA 沉默,其中拟南芥 DCL2 能够将内源性和病毒性 dsRNA (double-stranded RNA) 加工成 22-nt 的 sRNA (small RNA),从而造成病毒 RNA 沉默^[70]。为了研究番茄 DCL2 在抗病中的功能,使用 CRISPR/Cas9 编辑番茄 *DCL2* 四个亚家族 (*SlDCL2a-SlDCL2d*) 中表达量最高的 *SlDCL2b*,显著增强了番茄对番茄花叶病毒 (tomato masaic virus, ToMV) 的抗性^[71],同时编辑 *SlDCL2a* 和 *SlDCL2b* 则显著提高番茄对马铃薯 X 病毒 (potato virus X, PVX) 和烟草花叶病毒 (tobacco mosaic virus, TMV) 的抗性^[72]。研究认为 *SlDCL2* 是番茄抗病毒病途径中的关键组成部分,证明 CRISPR/Cas9 在创建番茄多重抗病品种方面有着很大的潜力。

2.3.3 提高细菌病抗性 丁香假单胞菌 (*pseudomonas syringae*) 是细菌性叶斑病的致病菌,它通过释放冠毒素 COR (coronatine) 引起植株气孔的张开,从而利于细菌的侵染。JAZ (jasmonate-ZIM) 结构域蛋白是 COR 共受体,运用 CRISPR/Cas9 编辑 *SlJAZ2*,使其缺少 JAZ 结构域,突变体对细菌性叶斑病产生抵抗力^[73]。

黄单胞菌 (*Xanthomonas euvesicatoria* pv) 引起番茄疮痂病,PUB (plant U-box) 在多种作物中正向调控植株抗病性,CRISPR/Cas9 敲除 *SlPUB24*,突变体显示出黄单胞菌属 T3 族易感性,因此认为

SlPUB24 是一种黄单胞菌属 T3 族抗性基因,为疮痂病抗病机制研究提供基础^[74]。此外,CRISPR/Cas9 编辑抗性(resistance, R)基因 *Rx4*,发现 *Rx4* 蛋白识别黄单胞菌属 T3 族病原体后,激活防御机制超敏反应(hypersensitive response, HR),从而提高疮痂病抗性,亦为疮痂病抗病机制研究提供参考^[75-76]。

2.3.4 提高植株多重抗病能力 传统育种依赖于单一 R 基因,而易感基因 *S* (Susceptibility gene)更具持久和广谱抗病性。CRISPR/Cas9 技术提供了一种多重抗病材料的创建策略,其诱导的番茄 *S* 基因 *SlDMR6-1* 突变,赋予番茄更强的细菌、卵菌和真菌等不同类型的病原体抗性^[77-78]。此外,CRISPR/Cas9 诱导的乙炔酶编码基因 *ACER1a* 和 *ACET1b* 突变显示出对真菌和细菌病原体的抗性的增加^[79]。

总而言之,这些研究结果体现了 CRISPR/Cas9 在抗病性方面的强大功能,该技术能够帮助科研人员探索病原体发病机制和植物体抗病机制,对农业可持续发展起到了很大的推动作用^[80]。

3 CRISPR/Cas9 系统存在的问题及改进方法

随着 CRISPR/Cas9 技术的不断发展,其应用范围的扩大也成了一个问题,CRISPR/Cas9 系统编辑特异性的提高、转化系统的优化以及新型基因编辑系统的开发等方法能够降低 CRISPR/Cas9 技术应用的局限性。

3.1 编辑效率的提高

尽管 CRISPR/Cas9 具有精确高效的特点,但由于 Cas9 核酸酶在一定程度上可以容忍 sgRNA 与靶序列之间的错配,直接导致编辑精确性下降。虽然在植物中比较少见^[81],但研究人员还是开发了各种方法以降低脱靶效应。

稳定的 sgRNA 能够更准确地引导 RNPs, Moreno-Mateos 等^[82] 分析发现富含 G 而缺乏 A 的 sgRNA 更加稳定,设计 sgRNA 时应避开 poly-T 序列、限制 GNGG 序列,此外截短 sgRNA 也能降低脱靶效应^[83]。此外,使用两种不同的 Cas9 酶进行编辑也能够极大地减少脱靶效应^[84]。脱靶效应也与靶点序列设计相关,各种软件网站被开发以进行更具有特异性的靶点设计^[82]。研究人员还开发出多靶点系统,通过串联 sgRNA,靶向单个基因不同靶点,更彻底地进行基因编辑。此外,优化 Cas9 表

达启动子^[85],诱导剂诱导 HDR 修复途径^[86],预测网站的应用^[10]等也能提高基因编辑精确性。

3.2 转化系统的优化

目前,导入 CRISPR 系统比较成熟的方法是通过农杆菌介导的转化,该方法虽然能够使 Cas9 和 sgRNA 在植物体内稳定表达,但转化效率较低。Yu 等^[21] 提出病毒介导的基因组编辑系统能够简化繁琐的转化过程, Ma 等^[87] 将 SpCas9 和 gRNA 插入到 SYN1 病毒基因组中,成功应用于烟草,编辑效率能够达到 40%~91%。CRISPR/Cas9 的瞬时转化能够实现无转基因编辑, Yuan 等^[88] 建立双生病毒复制子和双终止子的高水平瞬时转化系统,通过农杆菌侵染在番茄中瞬时表达,进行目标基因的编辑,该系统提高了编辑效率以及后代无 Cas9 植株的比例。此外,遗传转化过程中的生长条件改变也促进了突变的增加^[3]。

3.3 新型基因编辑技术的发展

为了解决 CRISPR/Cas9 的限制性问题,新的基因编辑技术也在不断地被发现,如几乎没有脱靶效应的 CRISPR/Cpf1^[89] 以及能够精准编辑的碱基编辑技术(base editing, BE)^[90]等。

Zetsche 等^[91] 发现 Cpf1 系统,将其归为 CRISPR 的第 2 类 V 型,又被称为 CRISPR/Cas12a。该系统使用单一 RNA 引导核酸内切酶,产生具有 5'突出的粘性末端,促进 NHEJ 机制精确地编辑基因。此外该核酸酶本身是 RNase 能够切割 RNA,且分子量小能够方便地进入细胞,扩大了 CRISPR 的应用范围^[92]。此后还开发出了多种高效 Cas12a^[93],以提高编辑效率,扩大 PAM 区域识别范围。CRISPR/LbCpf1 的双生病毒多重复子系统的使用成功编辑番茄耐盐相关的 *SlHKT1;2* 等位基因,且有效提高了 HDR 的基因组编辑效率,为无转基因编辑铺平道路^[94]。Bernabé-Orts^[95] 证明了 CRISPR/Cas12a 能够在番茄中进行基因编辑,并且没有检测到脱靶效应,能够作为 CRISPR/Cas9 的替代工具,该系统还被应用于 *ToMV* 和番茄棕褐色果实病毒(tomato brown rugose fruit virus, ToBRFV)的特异性检测^[96]。

BE 也在多种作物中得到了应用^[97-98],该技术基于 CRISPR/Cas9 系统,能够实现单个碱基替换。与 CRISPR 相比, BE 不依赖于 DSBs 的产生,无需供体 DNA 参与并更具高效性和广泛适用性^[90]。Shimatani 等^[99] 将 CRISPR/Cas9 和活化诱导的胞苷脱氨酶 AID(activation-induced cytidine deami-

nase)融合,将该系统命名为 Target-AID,利用该系统进行编辑,得到的突变体在靶位点发生点突变,证明了 BE 在作物改良方面的可行性。乙酰乳酸合酶 ALS(acetolactate synthase)赋予番茄对磺酰脲类除草剂氯磺隆抗性,且精确碱基编辑效率高达 71%,其中 12.9%的番茄植株无 T-DNA 插入^[98]。在番茄中靶向类胡萝卜素代谢途径中的 3 个基因(*SlDDB1*、*SlDET1* 和 *SlCYC-B*)同时导入碱基置换突变,增加了番茄果实中类胡萝卜素含量,证明了 Target-AID 碱基编辑技术能够高效编辑多个基因^[100]。Lu 等^[101]在番茄中利用 Prime Editing 技术实现了精准的碱基替换或删除,该团队引入荧光报告基因通过基因枪法进行转换,优化了植物密码子和启动子,从而大大提高编辑效率。

此外,更加高效的 CRISPR/Cas12f1^[102] 以及 TnpB^[103]等系统也被开发。这些新型系统能够识别更多的 PAM 序列,结构更加简化,扩大了基因编辑的应用范围。通过基因编辑系统不断地更新,在番茄上使 CRISPR 系统成为一个常规化的技术将是一项长期持续的工作。

4 展 望

对植物活体基因组的定向编辑是长期以来农学

上实现基因优化的重大难题,CRISPR/Cas9 基因组编辑技术能够高效而简单地解决这一问题,使我们对基因功能的研究和农艺性状的优化有了一个不可替代的有力工具。一直以来转基因技术的应用都存在着很大的争议,但 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术不引入外源基因,能够产生无 T-DNA 插入的编辑后代,这为使用生物技术手段创建优异的非转基因材料提供了崭新的途径。因此 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术将在番茄等重要作物上获得广泛的应用。2016 年 4 月,CRISPR/Cas9 创建的蘑菇通过了美国农业部的认证,也让基因编辑在育种方面的应用受到了很大的鼓舞^[104],使得 CRISPR/Cas9 的道德讨论及法律制约也在不断完善。

目前基因编辑技术已经在抗病、抗逆方面以及改良农艺性状方面取得了很大的成就,加速了农作物的驯化,提高了番茄商业价值。与传统的基因沉默技术如 RNAi 及 VIGS 技术相比,CIRSPR/Cas9 技术能够更加精确地对目标基因进行编辑,多敲系统的引入则能够更加彻底地对目标基因进行敲除。此外,CRISPR/Cas9 技术创建的突变体能够稳定遗传,从而更准确地研究目标基因的功能,保证了科研的严谨性。尽管机遇与挑战并存,但 CRISPR/Cas9 的时代已经到来。

参考文献:

[1] SHAN Q W, WANG Y P, LI J, *et al.* Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, **31**(8): 686-688.

[2] 常振仪,严 维,刘东风,等. CRISPR/Cas 技术研究进展[J]. *农业生物技术学报*, 2015, **23**(9): 1 196-1 206.

CHANG Z Y, YAN W, LIU D F, *et al.* Research progress on CRISPR/Cas[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2015, **23**(9): 1 196-1 206.

[3] XU Y, WANG F Q, CHEN Z H, *et al.* Intron-targeted gene insertion in rice using CRISPR/Cas9: A case study of the Pi-ta gene[J]. *The Crop Journal*, 2020, **8**(3): 424-431.

[4] WANG X L, XU Y J, HUANG J L, *et al.* CRISPR-Mediated knockout of the ABCC2 gene in *Ostrinia furnacalis* confers high-level resistance to the *Bacillus thuringiensis* Cry1Fa toxin[J]. *Toxins*, 2020, **12**(4): 246.

[5] MILNER M J, CRAZE M, HOPE M S, *et al.* Turning up the temperature on CRISPR: Increased temperature can improve the editing efficiency of wheat using CRISPR/Cas9[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, **11**: 583 374.

[6] ZHANG M, WEI H L, LIU J, *et al.* Non-functional GoF-

LA19s are responsible for the male sterility caused by hybrid breakdown in cotton (*Gossypium* spp.)[J]. *The Plant Journal*, 2021, **107**(4): 1 198-1 212.

[7] BROOKS C, NEKRASOV V, LIPPMAN Z B, *et al.* Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-Associated 9 system[J]. *Plant Physiology*, 2014, **166**(3): 1 292-1 297.

[8] 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]. *Journal of Bacteriology*, 1987, **169**(12): 5 429-5 433.

[9] PINILLA-REDONDO R, MAYO-MUÑOZ D, RUSSEL J, *et al.* Type IV CRISPR-Cas systems are highly diverse and involved in competition between plasmids[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, **48**(4): 20 002 012.

[10] 刘耀光,李构思,张雅玲,等. CRISPR/Cas 植物基因组编辑技术研究进展[J]. *华南农业大学学报*, 2019, **40**(5): 38-49.

LIU Y G, LI G S, ZHANG Y L, *et al.* Current advances on CRISPR/Cas genome editing technologies in plants[J]. *Journal*

- of South China Agricultural University, 2019, **40**(5): 38-49.
- [11] LI R, LI R, LI X D, *et al.* Multiplexed CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering of γ -aminobutyric acid levels in *Solanum lycopersicum* [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, **16**(2): 415-427.
- [12] SANTILLÁN MARTÍNEZ M I, BRACUTO V, KOSEOGLOU E, *et al.* CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the tomato susceptibility gene PMR4 for resistance against powdery mildew[J]. *BMC Plant Biology*, 2020, **20**(1): 284.
- [13] CONG L, RAN F A, COX D, *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, **339**(6 121): 819-823.
- [14] NEKRASOV V, STASKAWICZ B, WEIGEL D, *et al.* Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, **31**(8): 691-693.
- [15] LI J F, NORVILLE J E, AACH J, *et al.* Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, **31**(8): 688-691.
- [16] XIA X H, CHENG X H, LI R, *et al.* Advances in application of genome editing in tomato and recent development of genome editing technology[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2021, **134**(9): 2 727-2 747.
- [17] TOMLINSON L, YANG Y, EMENECKER R, *et al.* Using CRISPR/Cas9 genome editing in tomato to create a gibberellin-responsive dominant dwarf DELLA allele[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, **17**(1): 132-140.
- [18] ITO Y, NISHIZAWA -YOKOI A, ENDO M, *et al.* Re-evaluation of the rin mutation and the role of RIN in the induction of tomato ripening[J]. *Nature Plants*, 2017, **3**(11): 866-874.
- [19] ITO Y, SEKIYAMA Y, NAKAYAMA H, *et al.* Allelic mutations in the ripening -inhibitor locus generate extensive variation in tomato ripening[J]. *Plant Physiology*, 2020, **183**(1): 80-95.
- [20] ITO Y, NAKAMURA N, KOTAKE-NARA E. Semi-dominant effects of a novel ripening inhibitor (rin) locus allele on tomato fruit ripening [J]. *PLoS One*, 2021, **16** (4): e0249575-e0249575.
- [21] YU Q H, WANG B K, LI N, *et al.* CRISPR/Cas9-induced targeted mutagenesis and gene replacement to generate long-shelf life tomato lines[J]. *Scientific Reports*, 2017, **7**: 11 874.
- [22] YANG Y F, ZHU G N, LI R, *et al.* The RNA editing factor SIORRM4 is required for normal fruit ripening in tomato[J]. *Plant Physiology*, 2017, **175**(4): 1 690-1 702.
- [23] GAO Y, FAN Z Q, ZHANG Q, *et al.* A tomato NAC transcription factor, SINAM1, positively regulates ethylene biosynthesis and the onset of tomato fruit ripening[J]. *The Plant Journal; for Cell and Molecular Biology*, 2021, **108**(5): 1 317-1 331.
- [24] FEDER A, JENSEN S, WANG A, *et al.* Tomato fruit as a model for tissue-specific gene silencing in crop plants[J]. *Horticulture Research*, 2020, **7**(1): 142.
- [25] BOUREAU L, HOW-KIT A, TEYSSIER E, *et al.* A CURLY LEAF homologue controls both vegetative and reproductive development of tomato plants[J]. *Plant Molecular Biology*, 2016, **90**(4-5): 485-501.
- [26] WANG B, LI N, HUANG S, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated *SlINVINH1* and *SlVPE5* gene editing[J]. *PeerJ*. 2021, **9**: e12478.
- [27] LIU G Z, YU H Y, YUAN L, *et al.* SIRCM1, which encodes tomato Lutescent1, is required for chlorophyll synthesis and chloroplast development in fruits[J]. *Horticulture Research*, 2021, **8**(1): 128.
- [28] LI X D, WANG Y N, CHEN S, *et al.* Lycopene is enriched in tomato fruit by CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, **9**: 559.
- [29] YANG T X, DENG L, ZHAO W, *et al.* Rapid breeding of pink-fruited tomato hybrids using the CRISPR/Cas9 system[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2019, **46**(10): 505-508.
- [30] DENG L, WANG H, SUN C L, *et al.* Efficient generation of pink-fruited tomatoes using CRISPR/Cas9 system [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2018, **45**(1): 51-54.
- [31] FILLER HAYUT S, MELAMED BESSUDO C, LEVY A A. Targeted recombination between homologous chromosomes for precise breeding in tomato[J]. *Nature Communications*, 2017, **8**: 15 605.
- [32] ISAACSON T, RONEN G, ZAMIR D, *et al.* Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of β -carotene and xanthophylls in plants[J]. *The Plant Cell*, 2002, **14**(2): 333-342.
- [33] RODRIGUEZ-LEAL D, XU C, KWON C T, *et al.* Evolution of buffering in a genetic circuit controlling plant stem cell proliferation[J]. *Nature Genetics*, 2019, **51**(5): 786-792.
- [34] HENDELMAN A, ZEBELL S, RODRIGUEZ-LEAL D, *et al.* Conserved pleiotropy of an ancient plant homeobox gene uncovered by cis-regulatory dissection[J]. *Cell*, 2021, **184**(7): 1 724-1 739. e16.
- [35] CHEN L F, YANG D, ZHANG Y W, *et al.* Evidence for a specific and critical role of mitogen-activated protein kinase 20 in uni-to-binucleate transition of microgametogenesis in tomato[J]. *The New Phytologist*, 2018, **219**(1): 176-194.
- [36] GUPTA S K, VISHWAKARMA A, KENEA H D, *et al.* CRISPR/Cas9 mutants of tomato MICRORNA164 genes uncover their functional specialization in development[J]. *Plant Physiology*, 2021, **187**(3): 1 636-1 652.
- [37] DU M M, ZHOU K, LIU Y Y, *et al.* A biotechnology-based male-sterility system for hybrid seed production in tomato[J]. *The Plant Journal*, 2020, **102**(5): 1 090-1 100.
- [38] LIU J W, WANG S F, WANG H, *et al.* Rapid generation of tomato male-sterile lines with a marker use for hybrid seed production by CRISPR/Cas9 system[J]. *Molecular Breeding*, 2021, **41**(3): 1-12.
- [39] DESLOUS P, BOURNONVILLE C, DECROS G, *et al.*

- Overproduction of ascorbic acid impairs pollen fertility in tomato[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2021, **72**(8): 3 091-3 107.
- [40] KLAP C, YESHAYAHOU E, BOLGER A M, *et al.* Tomato facultative parthenocarpy results from SIAGAMOUS-LIKE 6 loss of function[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, **15**(5): 634-647.
- [41] GUPTA S K, BARG R, ARAZI T. Tomato agamous-like6 parthenocarpy is facilitated by ovule integument reprogramming involving the growth regulator KLUH[J]. *Plant Physiology*, 2021, **185**(3): 969-984.
- [42] UETA R, ABE C, WATANABE T, *et al.* Author correction: Rapid breeding of parthenocarpic tomato plants using CRISPR/Cas9[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 16 776.
- [43] KWON C T, HEO J, LEMMON Z H, *et al.* Rapid customization of Solanaceae fruit crops for urban agriculture[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, **38**(2): 182-188.
- [44] ZSÖGÖN A, ČERMÁK T, NAVES E R, *et al.* De novo domestication of wild tomato using genome editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, **36**(12): 1 211-1 216.
- [45] NAVES E R, DE ÁVILA SILVA L, SULPICE R, *et al.* Capsaicinoids: pungency beyond *Capsicum* [J]. *Trends in Plant Science*, 2019, **24**(2): 109-120.
- [46] WANG L, CHEN L, LI R, *et al.* Reduced drought tolerance by CRISPR/Cas9-mediated SIMAPK3 mutagenesis in tomato plants[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, **65**(39): 8 674-8 682.
- [47] LI R, LIU C X, ZHAO R R, *et al.* CRISPR/Cas9-Mediated SINPR1 mutagenesis reduces tomato plant drought tolerance [J]. *BMC Plant Biology*, 2019, **19**(1): 38.
- [48] 尚庆茂, 李晓芬, 张志刚. 植物对逆境交叉适应的分子机制 [J]. 西北植物学报, 2007, **27**(9): 1 921-1 928.
- SHANG Q M, LI X F, ZHANG Z G. Molecular mechanism of plant cross-adaptation to stress[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2007, **27**(9): 1 921-1 928.
- [49] YIN Y L, QIN K Z, SONG X W, *et al.* BZR1 transcription factor regulates heat stress tolerance through FERONIA receptor-like kinase-mediated reactive oxygen species signaling in tomato[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2018, **59**(11): 2 239-2 254.
- [50] LIU L, ZHANG J L, XU J Y, *et al.* CRISPR/Cas9 targeted mutagenesis of SILBD40, a lateral organ boundaries domain transcription factor, enhances drought tolerance in tomato [J]. *Plant Science*, 2020, **301**(prepublish): 110 683.
- [51] ILLOUZ-ELIAZ N, NISSAN I, NIR I, *et al.* Mutations in the tomato gibberellin receptors suppresses xylem proliferation and reduces water loss under water-deficit conditions[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2020, **71**(12): 3 603-3 612.
- [52] LI R, ZHANG L X, WANG L, *et al.* Reduction of tomato-plant chilling tolerance by CRISPR-Cas9-Mediated SICBF1 mutagenesis[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, **66**(34): 9 042-9 051.
- [53] WANG M L, DING F, ZHANG S X. Mutation of *SISB-PASE* aggravates chilling-induced oxidative stress by impairing glutathione biosynthesis and suppressing ascorbate-glutathione recycling in tomato plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 565 701.
- [54] TRAN M T, DOAN D T H, KIM J, *et al.* CRISPR/Cas9-based precise excision of SIHyPRP1 domain(s) to obtain salt stress-tolerant tomato[J]. *Plant Cell Reports*, 2021, **40**(6): 999-1 011.
- [55] WANG Z, HONG Y C, ZHU G T, *et al.* Loss of salt tolerance during tomato domestication conferred by variation in a Na⁺/K⁺ transporter[J]. *The EMBO Journal*, 2020, **39**(10): e103256.
- [56] BARI V K, NASSAR J A, ALY R. CRISPR/Cas9 mediated mutagenesis of MORE AXILLARY GROWTH 1 in tomato confers resistance to root parasitic weed *Phelipanche aegyptiaca* [J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 3 905.
- [57] KAKESHPOUR T, TAMANG T M, MOTOLAI G, *et al.* CGFS-type glutaredoxin mutations reduce tolerance to multiple abiotic stresses in tomato[J]. *Physiologia Plantarum*, 2021, **173**(3): 1 263-1 279.
- [58] NEKRASOV V, WANG C M, WIN J, *et al.* Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 482.
- [59] PRAMANIK D, SHELAK R M, PARK J, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated generation of pathogen-resistant tomato against tomato yellow leaf curl virus and powdery mildew[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, **22**(4): 1 878-1 878.
- [60] HUIBERS R P, LOONEN A E, GAO D, *et al.* Powdery mildew resistance in tomato by impairment of SIPMR4 and SIDMR1[J]. *PLoS One*, 2017, **8**(6): e67467.
- [61] HONG Y H, MENG J, HE X L, *et al.* Editing miR482b and miR482c simultaneously by CRISPR/Cas9 enhanced tomato resistance to *Phytophthora infestans* [J]. *Phytopathology*, 2021, **111**(6): 1 008-1 016.
- [62] LIU C X, ZHAO Y Y, TAN X Y, *et al.* CRISPR/Cas9-Mediated SIMYBS2 mutagenesis reduces tomato resistance to *Phytophthora infestans* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, **22**(21): 11 423.
- [63] CUI J, JIANG N, MENG J, *et al.* LncRNA33732-respiratory burst oxidase module associated with WRKY1 in tomato-*Phytophthora infestans* interactions[J]. *The Plant Journal*, 2019, **97**(5): 933-946.
- [64] PRIHATNA C, BARBETTI M J, BARKER S J. A novel tomato *Fusarium wilt* tolerance gene[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1 226.
- [65] SHU P, LI Z Y, MIN D D, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated SIMYC2 mutagenesis adverse to tomato plant growth and MeJA-induced fruit resistance to *Botrytis cinerea* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, **68**(20): 5 529-5 538.
- [66] SILVA C J, VAN DEN ABEELE C, ORTEGA-SALAZAR

- I, *et al.* Host susceptibility factors render ripe tomato fruit vulnerable to fungal disease despite active immune responses [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2021, **72**(7): 2 696-2 709.
- [67] ALI Z, ABULFARAJ A, IDRIS A, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants[J]. *Genome Biology*, 2015, **16**(11): 238.
- [68] TASHKANDI M, ALI Z, ALJEDAANI F, *et al.* Engineering resistance against tomato yellow leaf curl virus via the CRISPR/Cas9 system in tomato[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2018, **13**(10): e1525996.
- [69] GHORBANI FAAL P, FARSI M, SEIFI A, *et al.* Virus-induced CRISPR Cas9 system improved resistance against tomato yellow leaf curl virus[J]. *Molecular Biology Reports*, 2020, **47**(5): 3 369-3 376.
- [70] BOUCHÉ N, LAURESSERGUES D, GASCIOLLI V, *et al.* An antagonistic function for *Arabidopsis* DCL2 in development and a new function for DCL4 in generating viral siRNAs[J]. *The EMBO Journal*, 2006, **25**(14): 3 347-3 356.
- [71] WANG T, DENG Z Q, ZHANG X, *et al.* Tomato DCL2b is required for the biosynthesis of 22-nt small RNAs, the resulting secondary siRNAs, and the host defense against ToMV [J]. *Horticulture Research*, 2018, **5**: 62.
- [72] WANG Z, HARDCASTLE T J, CANTO PASTOR A, *et al.* A novel DCL2-dependent miRNA pathway in tomato affects susceptibility to RNA viruses[J]. *Genes & Development*, 2018, **32**(17-18): 1 155-1 160.
- [73] ORTIGOSA A, GIMENEZ-IBANEZ S, LEONHARDT N, *et al.* Design of a bacterial speck resistant tomato by CRISPR/Cas9-mediated editing of SJJAZ2 [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, **17**(3): 665-673.
- [74] LIU X, MENG G, WANG M R, *et al.* Tomato SIPUB24 enhances resistance to *Xanthomonas euvesicatoria* pv. perforans race T3[J]. *Horticulture Research*, 2021, **8**: 30.
- [75] ZHANG X, LI N, LIU X, *et al.* Tomato protein Rx4 mediates the hypersensitive response to *Xanthomonas euvesicatoria* pv. perforans race T3[J]. *The Plant Journal*, 2020, **105**(6): 1 630-1 644.
- [76] BOTÈR M, AMIGUES B, PEART J, *et al.* Structural and functional analysis of SGT1 reveals that its interaction with HSP90 is required for the accumulation of Rx, an R protein involved in plant immunity[J]. *The Plant Cell*, 2007, **19**(11): 3 791-3 804.
- [77] THOMAZELLA D P D T, SEONG K, MACKELPRANG R, *et al.* Loss of function of a DMR6 ortholog in tomato confers broad-spectrum disease resistance[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, **118**(27): e2026152118.
- [78] DE TOLEDO THOMAZELLA D P, BRAIL Q, DAHLBECK D, *et al.* CRISPR-Cas9 mediated mutagenesis of a DMR6 ortholog in tomato confers broad-spectrum disease resistance[J]. *bioRxiv*, 2016, doi:10.1101/1064824.
- [79] JEON J E, KIM J G, FISCHER C R, *et al.* A pathogen-responsive gene cluster for highly modified fatty acids in tomato [J]. *Cell*, 2020, **180**(1): 176-187.
- [80] TYAGI S, KUMAR R, KUMAR V, *et al.* Engineering disease resistant plants through CRISPR Cas9 technology[J]. *GM Crops & Food*, 2021, **12**(1): 125-144.
- [81] PETERSON B A, HAAK D C, NISHIMURA M T, *et al.* Genome-wide assessment of efficiency and specificity in CRISPR/Cas9 mediated multiple site targeting in *Arabidopsis* [J]. *PLoS One*, 2016, **11**(9): e0162169.
- [82] MORENO-MATEOS M A, VEJNAR C E, BEAUDOIN J D, *et al.* CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR- Cas9 targeting *in vivo* [J]. *Nature Methods*, 2015, **12**(10): 982-988.
- [83] WILSON L O W, O'BRIEN A R, BAUER D C. The current state and future of CRISPR Cas9 gRNA design tools [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2018, **9**: 749.
- [84] CHO S W, KIM S, KIM Y, *et al.* Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases[J]. *Genome Research*, 2014, **24**(1): 132-141.
- [85] HASHIMOTO R, UETA R, ABE C, *et al.* Efficient multiplex genome editing induces precise, and self-ligated type mutations in tomato plants [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, **9**: 916.
- [86] AIRD E J, LOVENDAHL K N, ST MARTIN A, *et al.* Increasing Cas9-mediated homology-directed repair efficiency through covalent tethering of DNA repair template[J]. *Communications Biology*, 2018, **1**: 54.
- [87] MA X N, ZHANG X Y, LIU H M, *et al.* Highly efficient DNA-free plant genome editing using virally delivered CRISPR-Cas9[J]. *Nature Plants*, 2020, **6**(7): 773-779.
- [88] YUAN S Z, KAWASAKI S, ABDELLATIF I M Y, *et al.* Efficient base editing in tomato using a highly expressed transient system[J]. *Plant Cell Reports*, 2021, **40**(4): 667-676.
- [89] KIM D, KIM J, HUR J K, *et al.* Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2016, **34**(8): 863-868.
- [90] ZENG D C, LIU T L, TAN J T, *et al.* PhieCBEs: plant high-efficiency cytidine base editors with expanded target range[J]. *Molecular Plant*, 2020, **13**(12): 1 666-1 669.
- [91] ZETSCHE B, GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, *et al.* Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-cas system[J]. *Cell*, 2015, **163**(3): 759-771.
- [92] FONFARA I, RICHTER H, BRATOVIČ M, *et al.* The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA [J]. *Nature*, 2016, **532**(7 600): 517-521.
- [93] TENG F, LI J, CUI T T, *et al.* Enhanced mammalian genome editing by new Cas12a orthologs with optimized crRNA scaffolds[J]. *Genome Biology*, 2019, **20**(1): 1-6.
- [94] VU T V, SIVANKALYANI V, KIM E J, *et al.* Highly efficient homology-directed repair using CRISPR/Cpf1-gemini-

viral replicon in tomato[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, **18**(10): 2 133-2 143.

[95] BERNABÉ-ORTS J M, CASAS-RODRIGO I, MINGUET E G, *et al.* Assessment of Cas12a-mediated gene editing efficiency in plants[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, **17**(10): 1 971-1 984.

[96] ALON D M, HAK H, BORNSTEIN M, *et al.* Differential detection of the tobamoviruses tomato mosaic virus (ToMV) and tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) using CRISPR-Cas12a[J]. *Plants*, 2021, **10**(6): 1 256.

[97] ZHANG R, LIU J X, CHAI Z Z, *et al.* Generation of herbicide tolerance traits and a new selectable marker in wheat using base editing[J]. *Nature Plants*, 2019, **5**(5): 480-485.

[98] VEILLET F, PERROT L, CHAUVIN L, *et al.* Transgene-free genome editing in tomato and potato plants using *Agrobacterium*-mediated delivery of a CRISPR/Cas9 cytidine base editor[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, **20**(2): 402.

[99] SHIMATANI Z, KASHOJIYA S, TAKAYAMA M, *et al.* Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion[J]. *Nature Biotechnology*, 2017, **35**(5): 441-443.

[100] HUNZIKER J, NISHIDA K, KONDO A, *et al.* Multiple gene substitution by Target-AID base-editing technology in tomato[J]. *Scientific Reports*, 2020, **10**: 20 471.

[101] LU Y M, TIAN Y F, SHEN R D, *et al.* Precise genome modification in tomato using an improved prime editing system[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, **19**(3): 415-417.

[102] OKANO K, SATO Y, HIZUME T, *et al.* Genome editing by miniature CRISPR/Cas12f1 enzyme in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2021, **132**(2): 120-124.

[103] ALTAE-TRAN H, KANNAN S, DEMIRCIOGLU F E, *et al.* The widespread IS200/IS605 transposon family encodes diverse programmable RNA-guided endonucleases[J]. *Science*, 2021, **374**(6 563): 57-65.

[104] WALTZ E. Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation[J]. *Nature*, 2016, **532**(7 599): 293.

(编辑:宋亚珍)

《西北植物学报》2021 年审稿专家名单
(以姓氏笔画为序)

于澄宇	马雄风	马锋旺	王卫卫	王西平	王军卫	王军辉	王青锋	王晓峰	王崇英	王得祥
王慷林	王曙光	韦毅刚	尤庆敏	甘立军	叶绍明	田惠桥	巩振辉	朱仁斌	朱志红	朱相云
乔玉山	庄 静	刘 冰	刘文哲	刘占林	刘西平	刘全儒	刘志鹏	刘培亮	孙广玉	苏 旭
杜 峰	李 英	李 攀	李玉红	李忠虎	李周岐	李秧秧	李宽意	李得孝	李登科	杨 清
杨洪强	吴 卫	吴振海	邱全胜	张 岗	张飞雄	张文辉	张延龙	张宏利	张建强	张硕新
张鲁刚	张福生	陈 鹏	陈兴福	陈进明	陈坤明	陈贵林	陈素梅	林金水	林雁冰	罗 建
岳 明	金效华	周明芹	於丙军	单卫星	赵继新	胡永红	饶广远	洪棋斌	祝钦泷	袁 杰
钱 前	徐 炎	高 翔	高志奎	高锦明	郭世荣	郭其强	郭晓思	唐 明	唐 岱	黄 方
黄 康	曹建国	常朝阳	麻鹏达	康永祥	阎 侃	梁文裕	梁国华	董娟娥	韩文炎	程金凤
谢树莲	赖钟雄	蔡 霞	熊友才	黎 斌	黎星辉	薛吉全	魏安智	魏鑫丽	上官周平	

以上为《西北植物学报》2021 年的审稿专家,感谢一年来在百忙之中为本刊把好学术质量关,在此特向专家们致以最诚挚的谢意,还望在今后的岁月中继续支持学报的工作。