

• 综 述 •

CRISPR/Cas9 基因组编辑技术在药用植物中的研究进展

龙雨青¹, 曾娟¹, 王玲¹, 付学森¹, 刘紫璇¹, 童巧珍^{1,2,3}, 周日宝^{1,2,3*}, 刘湘丹^{1,2,3*}

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208

2. 湘产大宗道地药材种质资源及规范化种植重点实验室, 湖南 长沙 410208

3. 湖南省普通高等学校 中药现代化研究重点实验室, 湖南 长沙 410208

摘要: 成簇的规律间隔的短回文重复序列系统 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated system, CRISPR/Cas) 起源于细菌和古细菌的免疫反应。目前改造的 II 型 CRISPR/Cas9 系统是一项突破性的基因组编辑技术, 通过引导 RNA 识别靶基因序列位点实现基因组水平上的 DNA 序列精准修饰。该项技术已在主要农作物的抗病、抗逆和增产等方面广泛应用, 在药用植物有效成分的合成和提高、抗病抗逆等研究中具有广阔的应用潜力。通过对 CRISPR/Cas9 系统的发现完善、结构和原理及在药用植物中的应用情况等综述, 为该项技术在药用植物研究领域中的推广应用提供参考。

关键词: 成簇的规律间隔的短回文重复序列系统; 药用植物; 基因功能; 抗病抗逆; 分子育种

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)09-2940-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.09.027

Advances in CRISPR/Cas9 genome editing technique and its application in medicinal plants

LONG Yu-qing¹, ZENG Juan¹, WANG Ling¹, FU Xue-sen, LIU Zi-xuan¹, TONG Qiao-zhen^{1,2,3}, ZHOU Ri-bao^{1,2,3}, LIU Xiang-dan^{1,2,3}

1. College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. Key Laboratory of Germplasm Resources and Standardized Planting of Hunan Large-scale Genuine Medicinal Materials, Changsha 410208, China

3. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Modernization Research in General Colleges and Universities of Hunan Province, Changsha 410208, China

Abstract: The clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated system (CRISPR/Cas) is an adaptive immune defense system originated from bacteria and archaea. The modified CRISPR/Cas9 system of type II, a transformative genome editing technology, realizes precise modification of DNA sequence at genome level by guiding RNA to identify target gene sequence sites. This technology has been widely used in the disease resistance, stress resistance and yield increase of major crops, and has broad application potential in the synthesis and improvement of effective components of medicinal plants, disease resistance and stress resistance research. This review summarizes the discovery refinement, structure and principle of the CRISPR/Cas9 system, and its application in medicinal plants, in order to provide reference for the popularization and application of this technology.

收稿日期: 2022-12-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81673546); 湖南省研究生科研创新项目 (CX20220793); 国家现代农业产业技术体系资助 (CARS-21); 湖南省现代农业产业技术体系建设项目; 湖南省自然科学基金资助项目 (2021JJ30497); 湖南省自然科学基金资助项目 (2021JJ30515); 2020 年湖南省一流专业建设点: 中药资源与开发; 湖南中医药大学中药学一流学科项目 (校行科学【2018】3 号)

作者简介: 龙雨青 (1997—), 男, 博士研究生, 研究方向为中药资源。Tel: 15700710697 E-mail: 20183343@stu.hnucm.edu.cn

***通信作者:** 周日宝 (1962—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药资源与品质评价研究。Tel: (0731)88458233

E-mail: 1057323510@qq.com

刘湘丹 (1981—), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药资源与品质评价研究。Tel: (0731)88458233

E-mail: paeonia_dd@126.com

in the field of medicinal plants research.

Key words: clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated system; medicinal plants; gene function; disease resistance and stress resistance; molecular breeding

基因组编辑技术是在基因组水平上对 DNA 序列进行精确改造和修饰的遗传分子生物学技术, 该项技术利用核酸酶在基因组特定位点剪切产生双链断裂(double-strandbreak, DSB), 激活生物体自我修复系统从而实现靶基因定点突变、插入、缺失或替换。在现有的基因组编辑技术中, 成簇的规律间隔的短回文重复序列系统(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated system, CRISPR/Cas)^[1-2]与锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)^[3]和类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)^[4]相比, CRISPR/Cas 策略依赖于单链 RNA 进行序列识别, 它的识别位点由核酸组成, 改造后的 CRISPR/Cas9 系统相较于 ZFN 和 TALEN 这 2 类基因编辑工具只需要简单的克隆, 且靶序列设计简便、骨架载体构建过程简单、成本也相对低廉^[5]。依靠 CRISPR/Cas9 系统研究人员可以精准地改变动物、植物和微生物的 DNA, 其彻底改变了分子生命科学, 并以此获得 2020 年的诺贝尔化学奖。

鉴于 CRISPR/Cas9 系统强大的基因组分子改造能力和便捷的操作方式, 该项技术已迅速发展应用到大量植物的基因功能研究和分子育种中, 如采用 CRISPR/Cas9 系统同时编辑水稻的 3 个基因 *PIN5b* (穗长基因)、*GS3* (谷物大小基因) 和 *myeloblastosis 30 (MYB30)* (耐寒基因) 获得了高产和优良耐寒性的水稻新突变体^[6]。通过优化的 CRISPR/Cas9 系统在番茄体细胞引入控制单性结实的关键基因 *SIL1A49*, 可成功获得单性结实的番茄植株^[7]。CRISPR/Cas9 靶向修饰柑橘易感基因 *LOB1* 启动子可增强柑橘溃疡病抗性^[8]。CRISPR/Cas9 系统编辑矮牵牛的乙烯生物合成酶 1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶 1 基因, 可成功构建花期显著延长的 T0 代株系^[9]。近年来研究者对水果^[10]、粮食作物^[2,11]、油料作物^[12]、园艺作物^[13-14]等植物应用 CRISPR/Cas9 技术均进行了系统综述, 而在药用植物中自 2016 年黄璐琦院士团队进行了 CRISPR/Cas9 技术应用的展望以来, 少有全面系统的综述报道^[15]。

全球约有 80% 的人口主要依赖药用植物、植物

提取物及其衍生物进行初级保健和治疗疾病^[16], 青蒿、颠茄、罂粟、人参、丹参等多种植物因其具有较好生物活性的次生代谢物被广泛认知和使用, 相关有效成分可以通过化学合成获得, 但成本高昂。CRISPR/Cas9 技术结合合成生物学在药用植物有效成分生产中应用显示出巨大潜力。同时 CRISPR/Cas9 可以编辑多个位点, 为药用植物育种提供了一种全新的途径。CRISPR/Cas9 系统在生产药用成分、基因功能验证和定向修改药用植物性状实现精确分子育种等多个方面已经取得了一定的研究进展。本文重点对 CRISPR/Cas9 在药用植物中的应用进行梳理, 同时就其应用前景和发展方向进行展望, 为该技术在药用植物研究领域中的进一步应用提供参考。

1 CRISPR/Cas9 系统

1.1 基因编辑系统的发现及完善

Ishino 等^[17]首次在大肠杆菌 *Escherichia coli* 的 *IAP* 基因序列和功能研究中发现了规律成簇间隔的短回文重复序列。随后大量研究者对这一特殊序列进行了研究, 先后在其他细菌和古细菌中也发现了这一特殊的序列并命名为 CRISPR^[18-19]。Garneau 等^[20]、Barrangou 等^[21]和 Bolotin 等^[22]推测并证实嗜热链球菌以 CRISPR/Cas 系统快速抵抗噬菌体的入侵。Sapranas 等^[23]发现嗜热链球菌 CRISPR/Cas9 系统可以转移到大肠杆菌中, 并确定了 *Cas9* 是编码该项 CRISPR 干扰所必需的唯一 *Cas* 基因。Jinek 等^[24]发现 *Cas9* 是由 2 个 RNA 引导的 DNA 核酸内切酶, 并系统阐述了 CRISPR/Cas9 系统进行基因组编辑的原理和巨大潜力。在此基础上, 研究者通过设计 2 种不同的 II 型 CRISPR/Cas9 系统, 实现了人和小鼠细胞的内源基因组位点的精确编辑^[25-26], 并利用 CRISPR/Cas9 系统进行拟南芥和本氏烟草的原生质体转化^[27], 完成了水稻的基因组编辑和靶向基因突变^[28]。CRISPR/Cas9 技术逐步应用于动物、植物和微生物的基因组编辑。

1.2 基本组成结构和作用机制

根据 *Cas* 编码基因序列差异, CRISPR/Cas 系统可分为 I、II 和 III 型。I 和 III 型 CRISPR/Cas 系统均需要 *Cas* 蛋白复合体才具有完整的剪切活性^[29-30],

II 型系统相对简单, 只需 1 个包含 RuvC 结构域和 HNH 核酸酶结构域的 Cas9 蛋白即可实现外源 DNA 切割^[31]。目前应用广泛的 CRISPR/Cas9 系统是在 II 型系统基础上发展改造而来的。经典的 CRISPR/Cas9 系统包括 Cas9 核酸内切酶、CRISPR RNA (crRNA) 和反式激活 crRNA (*trans*-activating crRNA, tracrRNA)。Jinek 等^[24]将 crRNA 和反式激活 crRNA 局部碱基配对组成单链向导 RNA (single-guide RNA, sgRNA)。Doudna 等^[32]进一步把 sgRNA 和 Cas9 构建到同 1 个表达载体上, 通过 sgRNA 指导 Cas9 实现 DNA 序列特异性的切割 (图 1)。该系统只需要设计 20 bp 的靶位点, 合成 gRNA 表达框, 构建过程简单迅速, 并且可以实现 1 个靶基因的多

个位点和多个靶基因同时编辑^[33]。其具体原理为靶基因中包含 1 个由几个碱基构成的原间隔序列邻近基序 (protospacer adjacent motif, PAM), 经典的 PAM 序列为 5'-NGG-3' (N 为任意碱基), CRISPR/Cas9 系统通过识别 PAM 在其上游进行剪切, 切割完成后产生 DSB, 从而激活细胞 DNA 修复机制。DSB 通常有 2 种修复机制: 同源重组修复 (homology-directed repair, HDR) 和非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ)。自然条件下细胞主要通过 NHEJ 修复 DSB, NHEJ 修复通过引入随机的插入、删除或替换实现基因功能的缺失; 若存在同源序列模板, 则会激活精确的 HDR 修复途径, 实现基因精确敲入、缺失、替换或突变^[34-35]。

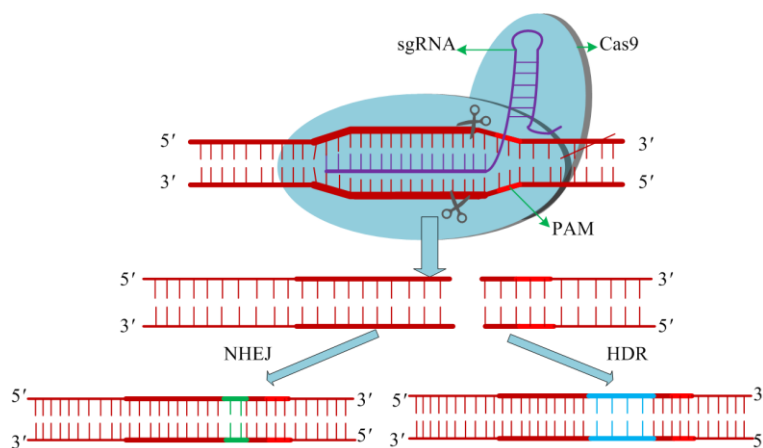


图 1 CRISPR/Cas9 系统编辑原理

Fig. 1 Mechanism of CRISPR/Cas9 system

1.3 在植物基因组编辑中的基本流程

首先获取靶基因序列, 已有全基因组数据的物种在数据库中检索基因全长和编码序列, 确定外显子区域序列。鉴于目前大多数的药用植物的缺乏全基因组数据, 可以利用 cDNA 末端快速克隆技术、染色体步移等方法逐步获得目标基因的基因组序列, 参考近源植物基因组确定外显子区域; 通过在线软件工具 CRISPR-P (<http://cbi.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR>)、CRISPR-P2.0 (<http://crispr.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR2/CRISPR>) 等^[36]设计靶基因的 sgRNA 位点并评价脱靶风险; 利用金门法等适宜的启动子下将合成的 sgRNA 表达框和 Cas9 克隆到植物表达载体中; 采用农杆菌遗传转化、基因枪等方法转化植物, 药用植物中常用农杆菌介导的遗传转化; 通过上述步骤获得突变体后提取基因组 DNA 进行阳性鉴定, 进一步通过 Sanger 测序或高通量测

序确定突变类型 (图 2)。

2 药用植物中 CRISPR/Cas9 系统的构建

CRISPR/Cas9 技术作为一项新兴的基因组编辑技术, 在大多数药用植物中尚未建立有效的载体构建和遗传转化体系, 故研究者通常利用报告基因或其他特殊目标基因来验证其有效性和可行性。

2.1 CRISPR/Cas9 编辑八氢番茄红素脱氢酶 (phytoene desaturase, PDS)

PDS 是植物类胡萝卜素合成途径中的关键酶, 位于类胡萝卜素合成途径的上游, 可催化无色的八氢番茄红素转变为有色的类胡萝卜素。类胡萝卜素是构成植物不同器官颜色的重要色素, 主要分布于植物器官的色素细胞中, 使花叶等植物器官呈现不同颜色。当 PDS 基因被沉默时, 植物类胡萝卜素合成途径受阻, 从而使叶绿素分解, 并导致植物发生白化和矮化^[37]。PDS 基因作为便捷的报告基因已在

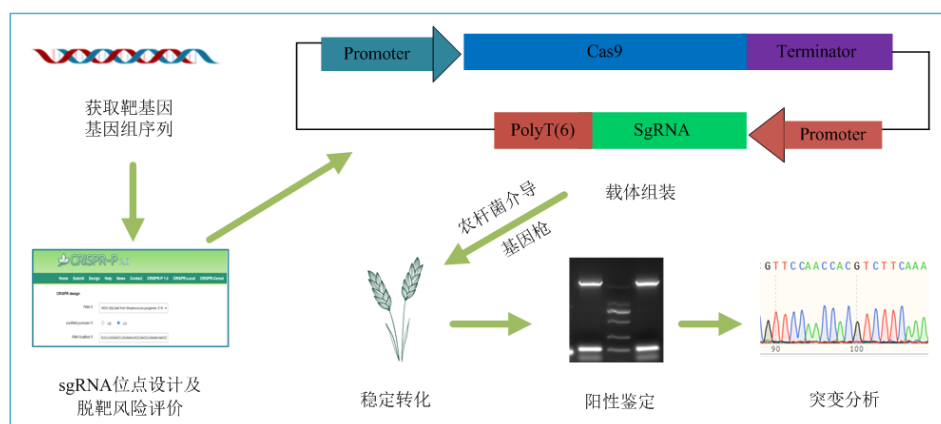


图2 CRISPR/Cas9 系统在植物基因组编辑中的基本流程

Fig. 2 Overview of basic flow of CRISPR/Cas9 system in plant genome editing

植物的基因编辑中被广泛应用，如构建基因沉默（virus-induced gene silencing, VIGS）的 *PDS* 载体转化侵染黄花菜幼苗^[38]和百合幼苗^[39]后，叶片发生白化现象，但这种白化突变往往不彻底。近年来研究者通过构建 *PDS* 基因的 CRISPR/Cas9 敲除载体并通过根癌农杆菌侵染法在多个药用植物中获得完全白化或嵌合白化植株，包括地黄^[40]、天目地黄^[41]、山药^[42]、萱草^[43]和大麻^[44]等。*PDS* 基因的 CRISPR/Cas9 遗传转化体系构建可为其他药用植物的基因编辑提供参考，也可为其他功能基因的验证与鉴定提供依据。

2.2 CRISPR/Cas9 编辑其他植物基因

在没有报告基因的条件下，研究者通常采用聚合酶链式反应、Southern 杂交分析和深度测序分析等方法来证实 CRISPR/Cas9 系统是否可成功在植物体内建立并完成基因组编辑。Chib 等^[45]利用农杆菌介导法成功地将 CRISPR 二元载体整合到番红花愈伤组织中，该系统可用于遗传转化和改良相对困难的番红花的基因敲除或编辑。Liu 等^[46]通过双 sgRNA 的 CRISPR/Cas9 系统构建载体，peg 介导转化灵芝原生质体，实现灵芝基因组中 *ura3* 和 *GL17624* 基因的片段缺失。Wang 等^[47]通过设计黑果枸杞的果实质量数量性状基因 *fw2.2* 的单一 sgRNA (sgRNA₁ 和 sgRNA₂) 和双 sgRNA，利用农杆菌介导的转化黑枸杞叶片获得植株，双 sgRNA 的 CRISPR/Cas9 系统在纯合子/双等位基因突变中的编辑效率是单 sgRNA 的 CRISPR/Cas9 系统的 2 倍多，得到高效的黑枸杞再生和遗传转化体系。Kui 等^[48]对铁皮石斛的木质纤维素合成途径的

5 个基因进行编辑，该系统编辑效率为 10%~100%，可以用于铁皮石斛的基因组编辑。向舒月^[49]在丹参中设计了单一转录单元骨架 CRISPR/Cas9 系统（single transcript unit CRISPR-Cas9, STU-Cas9）和双转录单元骨架的系统，基于丹参毛状根瞬时转化体系，发现双单元系统的编辑效率明显优于单单元系统，其中以 *AtUbi10* 启动子驱动 Cas9 表达、*AtU6* 启动子驱动 sgRNA 表达的双单元骨架载体，编辑效率最优，实现丹参基因组多位点共编辑的稳定转化。柴胡是传统常用的中药材，刘璇^[50]构建了 *GFP* 基因的 CRISPR/Cas9 载体，通过发根农杆菌介导转化柴胡无菌苗，初步建立了柴胡的遗传转化体系；冯亮^[51]进一步对柴胡侧根发育相关基因 *BcLAA13* 构建 CRISPR/Cas9 敲除载体，实现了原生质体和愈伤组织的转化，进而优化了柴胡的基因编辑遗传转化体系。此外，研究者在罗勒^[52]、大叶石斛^[53]及蛹虫草^[54]等基因组中实现了基因位点特异性缺失和插入，为其他基因的编辑奠定了基础。药用植物中 CRISPR/Cas9 系统的构建归纳见表 1。

3 CRISPR/Cas9 在药用植物研究中的应用

3.1 基因功能研究

药用植物基因功能的研究利用克隆或多组学筛选获取相关基因编码片段或基因全长，进而在大肠杆菌进行原核表达及酵母真核表达完成验证。深入的功能研究则通过植物体内的 RNA 干扰（RNA interference, RNAi）、病毒诱导 VIGS 等实现，这些方法在药用植物的基因功能研究已有相对深入的发展，如 RNAi 干扰雷公藤 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶（3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme

表 1 药用植物中 CRISPR/Cas9 系统的建立

Table 1 Establishment of CRISPR/Cas9 system in medicinal plants

药用植物	材料	Cas9 启动子	SgRNA 启动子	靶基因	成株表型	编辑效率/%	文献
地黄	叶片	35S	AtU6	<i>PDS</i>	白化	29.72	40
天目地黄	嫩叶	35S	AtU6	<i>PDS</i>	白化	35.09	41
山药	原生质体/叶片	Zm Ubi	双 SgRNA, 内源 U6	<i>PDS</i>	白化	83.30	42
萱草	愈伤组织	35S	TaU6	<i>PDS</i>	白化后恢复	—	43
大麻	原生质体/下胚轴	—	AtU6	<i>PDS</i>	白化	2.48	44
番红花	愈伤组织	35S	—	Cas9	—	4.00	45
灵芝	原生质体	—	双 SgRNA, —	<i>GL17624</i> 、 <i>ura3</i>	—	36.70	46
黑果枸杞	叶片	—	单 SgRNA, AtU6	<i>fw2.2</i>	—	43.75~87.50	47
			双 SgRNA, AtU6			93.75	
罗勒	叶片	35S	U6	<i>ObDMR1</i>	矮化	92.60	52
大叶石斛	原球茎	OsUBI	OsU3	<i>VAR2</i>	—	0.66	53
蛹虫草	蛹虫草细胞	—	—	<i>ura3</i>	—	—	54
铁皮石斛	原球茎	35S	OsU3	<i>C3H</i> 、 <i>C4H</i> 、 <i>4CL</i> 、 <i>CCR</i> 和 <i>IRX</i>	—	10.00~100.00	48
丹参	叶片、毛状根	AtUbi10	AtU6	<i>PDS</i>	—	77.50	49
柴胡	毛状根	35S	AtU6	<i>GFP</i>	—	10.00	50
柴胡	原生质体/下胚轴	—	U6	<i>BclAA13</i>		19.40	51

A reductase, *HMGR*) 基因并通过农杆菌介导毛状根发现 *HMGR* 的沉默显著降低雷公藤甲素和雷公藤碱的生物合成量^[55]。Zhou 等^[56]在水仙中建立了 VIGS 系统并发现 *MYB3* 基因可抑制黄酮类化合物的生物合成。然而相较于 RNAi 和 VIGS, CRISPR/Cas9 可以在基因组上实现基因的完全敲除, 即基因完全不表达, 因此使用 CRISPR/Cas9 敲除基因来验证基因功能更为可靠。目前已有不少药用植物功能基因通过 CRISPR/Cas9 系统完成验证或鉴定了新功能。

3.1.1 丹参 丹参是常用的大宗中药材丹参的原植物, 也是药用植物基因工程研究的模式植物, 因此丹参功能基因的研究相对深入。丹参主要活性成分为以丹参酮为代表的二萜类和以丹酚酸 B 为代表的酚酸类化合物^[57], 目前主要的基因功能研究集中在 2 类活性成分的合成途径关键基因。丹参酮的研究主要是下游合成途径中的细胞色素 P450 (cytochrome P450 enzyme system, CYP450) 氧化酶家族的功能鉴定。于浩滢^[58]通过多组学鉴定了可能参与丹参酮生物合成途径的 *CYP71AU66* 和 *CYP76AK5* 基因, 并通过 CRISPR/Cas9 获得了 *CYP76AK5* 基因敲除的毛状根, 丹参酮含量变化有待进一步测定。Li 等^[59]使用 CRISPR/Cas9 精确敲除

丹参中丹参酮生物合成的关键酶基因柯巴基焦磷酸合酶 1, 农杆菌介导毛状根转化获得了 3 个纯合突变体和 8 个嵌合突变体, 纯合突变体中丹参酮完全缺失, 其他酚酸代谢物则没有显著影响, 嵌合突变体丹参酮含量也明显下降。李江^[60]通过农杆菌介导丹参叶片获得 CRISPR/Cas9 编辑的 DNA 甲基转移酶基因 *C5-Mtase* 突变幼苗, 明确了 DNA 甲基化参与丹参酮的生物合成。

丹酚酸 B 的部分合成途径如图 3。周正等^[61-63]基于基因组、转录组和代谢组数据对丹酚酸生物合成途径关键催化酶进行系统研究, 采用 CRISPR/Cas9 系统对迷迭香酸合成酶 (rosmarinic acid synthase, RAS)、CYP98A 家族氧化酶及丹参漆酶进行功能研究。在迷迭香酸合酶基因 *RAS* 编辑中, 分别设计了拟南芥 U6 启动子和水稻 U3 启动子驱动 sgRNA。U6 启动子的 sgRNA 转化获得了 8 个突变体的毛状根系, U3 启动子驱动 sgRNA 则没有获得突变体毛状根。在成功编辑的毛根中, 尤其是纯合突变体中, 迷迭香酸和丹酚酸 B 等的酚酸含量显著降低, 迷迭香酸前体物质含量显著增加。在丹参漆酶编辑中通过靶向保守结构域敲除丹参漆酶家族的多个基因, 获得了 45 个基因编辑的毛状根, 根中迷迭香酸和丹酚酸 B 的积累减少。此外, 基因编辑

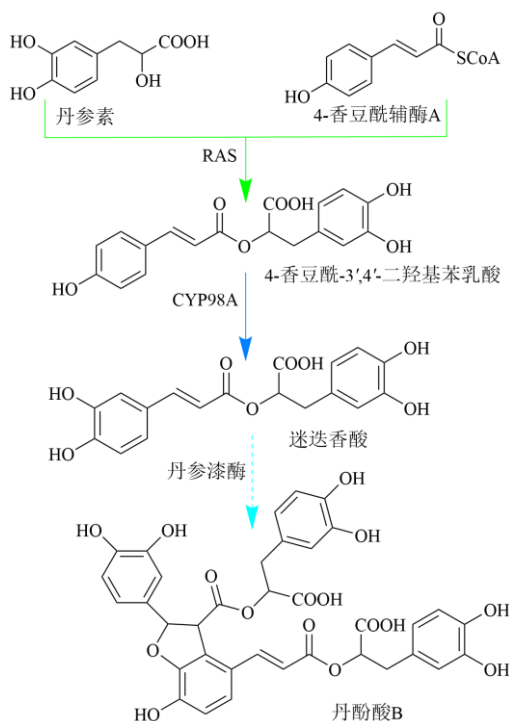


图 3 丹酚酸 B 的部分合成途径

Fig. 3 Partial biosynthetic pathways of salvianolic acid B

品系中毛状根的生长发育明显迟缓，且几乎不含木脂素。在 CYP98A 家族氧化酶编辑中，分别构建了 CYP98A14 和 CYP98A75 的单基因和双基因敲除载体，获得 12 株成功编辑的毛状根，敲除株系中迷迭香酸和丹酚酸 B 含量均明显降低。研究证实 RAS10、CYP98A75 和 CYP98A14 在丹酚酸的生物合成中发挥重要作用，丹参漆酶是丹参酚酸成分合成、累积的关键酶，并在丹参根的发育和木脂素形成中起关键作用，为丹参中丹酚酸生物合成途径的解析提供了丰富的理论基础。

此外，Deng 等^[64]通过 CRISPR/Cas9 介导的根癌农杆菌侵染丹参无菌外植体获得毛状根，敲除丹参的碱性亮氨酸拉链转录因子 1 (basic leucine zipper 1, bZIP1)。敲除株系毛状根较野生型颜色加深，酚酸含量减少，丹参酮增加，证实脱落酸响应转录因子 bZIP1 参与丹参酚酸和丹参酮的生物合成。胡贝^[65]敲除了丹酚酸合成的旁路基因 4-羟苯基丙酮酸双加氧酶 (4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, HPPD)，通过发根农杆菌介导转化叶片获得 17 株 HPPD 基因缺失的毛状根，编辑株系中迷迭香酸和丹酚酸 B 化合物含量均显著高于对照株系，丹参酮类物质则没有显著差异，结果表明敲除 HPPD 基因可有效增加酚酸类代谢物含量。

3.1.2 甘草 甘草是我国常用的大宗药材之一，药用历史悠久，具有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳等功效，其主要活性成分甘草酸是甘草质量的指标性成分之一^[66]。1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合酶 (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, DXS) 和阿魏酸 5-羟化酶 (ferulate 5-hydroxylase, F5H) 基因是影响甘草酸生物合成的重要功能基因，田少凯^[67]基于 CRISPR/Cas9 系统使用发根农杆菌侵染甘草无菌苗分别获得 DXS 和 F5H 敲除的甘草毛状根体系，敲除根系中甘草酸含量显著高于野生型和阴性对照组甘草毛状根，证实 DXS 和 F5H 基因负调控甘草酸的生物合成。

3.1.3 人参 人参的根和根茎是临床常用的补虚药之一，具有大补元气、补脾益肺、安神益智和生津养血等功效，人参皂苷类有效成分在医疗、保健、食品和化妆品等领域都有广泛应用^[68]。人参中原人参二醇 6-羟化酶催化原人参二醇产生原人参三醇，Choi 等^[69]使用 2 个 sgRNA (sgRNA1 和 sgRNA4) 分别构建 2 个 CRISPR/Cas9 系统敲除载体，利用农杆菌介导人参根原人参二醇 6-羟化酶基因靶突变，获得的纯合突变根系仅产生原人参二醇型人参皂苷，且 CRISPR/Cas9 系统诱导的靶突变对人参 sgRNA 靶点具有高度的特异性，该研究首次在人参属中使用 CRISPR/Cas9 系统靶向诱导突变皂苷生物合成的关键基因。

3.1.4 黄花蒿 黄花蒿在我国入药历史悠久，古籍记载可治疟疾，屠呦呦研究团队证实了黄花蒿中的提取物青蒿素具有高效的抗疟特性^[70]。Koerniati 等^[71]利用 CRISPR/Cas9 破坏蒿属植物甾醇合成的生物途径来提高青蒿素含量，在黄花蒿中靶向突变青蒿素生物合成的竞争基因——角鲨烯合酶，并获得了 52 株突变体植株，青蒿素的含量尚未测定。朱智慧^[72]构建多靶点的 CRISPR/Cas9 载体定向突变青蒿素合成途径中的竞争性萜类合成酶，拟通过阻断合成其他萜类化合物的分支实现青蒿素产量的提高，获得黄花蒿基因编辑阳性再生植株 33 株，青蒿素含量变化尚不清楚。

3.1.5 聚合草 聚合草是一种具有抗炎、镇痛等作用的药用植物，其毒性成分吡咯里西啶生物碱 (pyrrolizidine alkaloids, PAs) 限制了其应用。Zakaria 等^[73]敲除了 PAs 生物合成途径的 2 个 hss 等位基因并介导转化获得毛状根，2 个 hss 基因中只敲除 1 个时 PAs 水平显著降低；2 个 hss 基因同时敲除时则

没有检测到 PAs, 表明 CRISPR/Cas9 在非模式植物 PAs 的生物合成改造中潜力巨大。

3.1.6 烟草 烟草是研究功能基因的模式植物。Mercx 等^[74]通过 CRISPR/Cas9 在普通烟草 BY-2 悬浮细胞中敲除 2 个 $\beta(1,2)$ -木糖基转移酶 *XylT* 基因和 4 个 $\alpha(1,3)$ 岩藻糖基转移酶 *FucT* 基因 (共 12 个等位基因), 转基因的 3 个品系显示出 $\beta(1,2)$ -木糖

和 $\alpha(1,3)$ -岩藻糖的含量显著降低, 为人工改造植物的药理糖蛋白奠定基础。蒋悦^[75]通过构建低温胁迫转录因子 MYB4a 的 CRISPR/Cas9 敲除载体, 发现 MYB4a 参与烟草花青素的合成和烟株的生长发育。

3.1.7 其他 CRISPR/Cas9 系统在苦荞麦、龙葵、颠茄、喜树等多种药用植物的基因功能研究也有应用, 并进行归纳总结, 见表 2。

表 2 多种药用植物基因功能研究的 CRISPR/Cas9 系统应用

Table 2 Application of CRISPR/Cas9 system in gene function studies of various medicinal plants

药用植物	Cas9 启动子	SgRNA 启动子	靶基因	是否得到成株	结果	文献
苦荞麦	35S	双 SgRNA AtU6	<i>FlMYB45</i>	否/毛状根	突变体中芦丁、儿茶素和其他类黄酮的含量增加, CRISPR/Cas9 介导的 <i>FlMYB45</i> 靶向突变可以提高荞麦类黄酮含量	76
龙葵	35S	AtU6	<i>SnAN2</i>	是	突变体植株的成熟果实呈黄绿色, 表明 <i>SnAN2</i> 在龙葵花青素 77-78 的合成中起重要作用	80
蒺藜苜蓿	—	双 SgRNA —	<i>CYP93E2</i>	是	突变体在叶、茎和根中均不产生大豆甾醇, 植株形态特征无显著变化	81
颠茄	—	—	<i>PYKS</i>	否/毛状根	获得几乎不含托烷类生物碱的颠茄毛状根	82
喜树	—	AtU6	<i>OpG10H</i> 、 <i>OpSLS</i>	否/毛状根	<i>OpG10H</i> 或 <i>OpSLS</i> 敲除株系中喜树碱含量明显降低, 表明这 2 个基因在喜树碱生物合成中发挥重要作用	83
灵芝	GPD	内源 U6	<i>CYP5150I8</i>	否/菌丝体	研究构建了内源 U6 启动子的 CRISPR/Cas9 系统, 突变体灵芝酸的含量显著降低	84
罂粟	35S	AtU6	<i>4'OMT2</i>	是	基因敲除植株中的苜基异喹啉生物碱 BIA (如吗啡、蒂巴因) 的生物合成显著降低, 为药用植物中 BIA 代谢和生物合成研究提供研究基础	85
雷公藤	—	—	<i>TwSE</i>	否/酿酒酵母	鉴定了 5 个 <i>TwSE</i> 基因, <i>TwSEs</i> 1~4 均与雷公藤特殊代谢物有关, <i>TwSE1</i> 可能是雷公藤红素的生物合成的关键基因, <i>TwSE5</i> 可能具有新功能	86

3.2 药用植物活性成分的酵母生产

近年来合成生物学的迅速发展实现了许多药用植物活性成分的酵母工程化生产^[85], CRISPR/Cas9 技术则加速了酵母菌株的改造和活性成分的生产。酿酒酵母是植物天然产物微生物细胞工厂构建的理想宿主, 在酵母中实现有效成分的生物合成并提高生产效率是研究者的主要目标。

在酵母中实现有效成分的生物合成方面, Utomo 等^[86]利用 CRISPR/Cas9 开发了增强显著抗癌活性化合物紫杉醇的前体紫杉二烯生物合成的酵母菌株。单葡萄糖醛基甘草次酸 (glycyrrhetic acid 3-O- β -D-glucuronide, GAMG) 是甘草酸的衍生物之一, 也是一种高甜度天然功能性甜味剂, 具有优良的抗炎症、抗过敏等作用, 其在甘草中含量较低且难以获得, Huang 等^[87]基于 CRISPR/Cas9 基因组编

辑技术在工程化的酿酒酵母菌株中实现了 GAMG 的生物合成。

在酵母的有效成分生产效率方面, 汤皓等^[88]优化了酿酒酵母内的 CRISPR/Cas9 基因编辑系统。雷公藤中的雷公藤红素的具有显著的抗癌和抗肥胖活性, 其骨架来源于木栓酮, Zhou 等^[89]在 CRISPR/Cas9 系统构建的工程酵母中重建了木栓酮的生物合成途径, Gao 等^[90]进一步构建了高产的木栓酮工程菌株, 最终获得的四重突变体菌株中木栓酮的产量为比原始菌株高约 65 倍, 为以木栓酮为骨架的三萜类化合物的高效生产提供了依据。柳杉二醇是在日本柳杉中发现的具有抗炎、抗氧化和抗菌活性的倍半萜, Tong 等^[91]克隆鉴定了一种合成柳杉二醇的新型倍半萜环化酶, 并利用 CRISPR/Cas9 在酿酒酵母中重建了柳杉二醇的生物合成, 改造的菌株比

原始菌株产量高出 38 倍以上。Liu 等^[92]基于多重基因组编辑技术增加藏红花酸合成途径关键酶基因 *CCD2* 和 *ALDH* 的拷贝数,建立了温度响应性的生产藏红花酸的酿酒酵母菌株,进一步提高了藏红花酸的产量。

综上,CRISPR/Cas9 系统的开发与发展为微生物合成生物学的研究提供了高效便捷的基因编辑技术^[93],2 种新兴学科和技术的结合在药用植物活性成分的生产中潜力巨大。

3.3 药用植物的改良和育种

传统的杂交育种利用各个物种优良的基因融合实现植物的增产与高抗,但存在育种时间长、过程繁琐、结果不确定等问题。外源转基因育种也是研究较为广泛的育种方式,然而严格的法律限制及未知的安全性受到公众质疑。CRISPR/Cas9 基因编辑可以准确在基因组水平对目标基因进行多靶点定向突变或敲除,能在较短育种周期内获得目标性状植株,而且该技术对基因的编辑效果类似于自然变异,公众的接受度更高。

药用植物中目前主要应用于增加有效成分含量、改善代谢物、增强植物抗逆性等方面。胡淞等^[94]敲除了铁皮石斛茎中表达量较高的类纤维素合成酶 *DeCsl4* 基因,发现突变的 *DeCsl4* 导致铁皮石斛茎干中纤维素的合成降低,该研究为培育纤维素含量较低的铁皮石斛和其他药用植物提供了依据。颠茄中含有的莨菪碱在临床上广泛应用,用于治疗心律失常和有机磷中毒等。然而,植物中的莨菪碱含量极低,且莨菪碱与颠茄中的其他托烷类生物碱如山莨菪碱和东莨菪碱分离困难、成本昂贵。Zeng 等^[95]基于 CRISPR/Cas9 敲除莨菪碱转化为山莨菪碱途径中的关键酶基因莨菪碱 6 β -羟化酶(hyoscyamine 6 β -hydroxylase, *H6H*),获得 *H6H* 纯合突变的颠茄植株中,其莨菪碱产量显著升高,而未检测到山莨菪碱和东莨菪碱,在培育高莨菪碱且不含山莨菪碱和东莨菪碱的颠茄新品种中应用前景广阔。半夏是常用的药用植物之一,其块茎医药用途广泛。半夏高温抗性较差,通常夏季地上部分就全部枯萎,块茎停止生长,Zhang 等^[96]鉴定了半夏中参与热应激反应的硬脂酸去饱和酶基因硬脂酸-ACP 去饱和酶基因(stearoyl-ACP desaturase, *SAD*),通过 CRISPR/Cas9 系统敲除 *SAD* 后子代植株的抗热胁迫能力增强,为半夏耐高温的新种质培育提供了基础。Hasley 等^[97]通过编辑罗勒霜霉病易感基因霜霉

病抗性 6(downy mildew resistant 6, *DMR6*)并转化获得了 56 个 T0 代植株,鉴定了 3 个 *DMR6* 完全敲除的无转基因系。无转基因系的 T2 代幼苗与野生型植物相比,病原体生物量减少了 69%~93%,霜霉病抗性显著增强,该研究获得了霜霉病抗性高的无转基因罗勒品种。此外,华霜^[98]利用 CRISPR/Cas9 编辑了人参抗疫病基因 *RPS2*,通过农杆菌介导人参愈伤和叶片转化,获得 4 个突变株系,抗疫病的有效性则有待进一步研究。

4 结语与展望

随着基因编辑技术的迅速发展,CRISPR/Cas9 在药用植物的遗传系统构建、基因功能验证、有效成分生产和分子育种等方面均有长足的发展,同时也存在一些问题需要优化和解决。

在药用植物基因编辑系统的构建中,许多常用药用植物如人参、丹参、地黄等已建立了完整高效的 CRISPR/Cas9 基因编辑遗传转化体系。研究者在此类药用植物的后续研究中可参考已建立的系统和方法。然而诸多药用植物如柴胡、大麻、番红花的 CRISPR/Cas9 系统编辑效率仍需提高,金银花、三七、黄芪等常用药用植物的 CRISPR/Cas9 系统亟待建立。以表 1 为参考,药用植物中单 SgRNA 编辑的编辑效率较低,而采用双 SgRNA 和植物内源启动子的编辑系统的编辑效率相对较高。CRISPR/Cas9 系统的核心表达元件:启动子、Cas9 核酸酶、sgRNA 都可以设计改造,如 Cas9 的启动子可以使用 CaMV35S、ubi 等 polII 型启动子,也可以使用植物内源启动子(表 1 和 2),Cas9 蛋白可以选择不同的突变体,如 SpCas9^[99-100]等,亦可通过密码子优化来提高编辑效率^[101],gRAN 表达框通常使用 CaMV 35S、植物内源 U6 或 U3 等 polIII 启动子并可以 2 个或多个 gRAN 串联实现多位点共编辑^[47],Cas9 和 gRAN 亦可共用 1 个 STU-Cas9^[49],CRISPR/Cas9 系统包含的全部元件几乎都可以选择性更改。因此在未建立 CRISPR/Cas9 系统或编辑效率较低的药用植物中,可以通过优化各项元件或采用不同编辑策略来建立适应性的高效低脱靶系统。

在药用植物的基因功能研究中,受限于大多数药用植物基因组尚未公布和解析,因此研究深度相对滞后。以数据较为完整的丹参为例,研究者基于转录组、代谢组和基因组的多组学联合分析鉴定了大量的功能基因和代谢途径,采用 CRISPR/Cas9 系统逐步阐明其有效成分丹参酮和丹酚酸的合成代谢

途径, 为其他药用植物如人参的人参皂苷、黄花蒿的青蒿素、红景天的红景天苷等合成代谢途径研究提供参考和思路。而在木本植物如灰毡毛忍冬、马兜铃等中, 由于生长年限较长等原因验证功能基因的纯合筛选往往是在模式植物、愈伤组织或原核细胞中完成的, 缺乏成株表型, 通过 CRISPR/Cas9 在 T0 代获得纯合突变体简化了这一过程。随着将来更多药用植物基因组的解析, CRISPR/Cas9 将会被应用于大量功能基因和代谢途径的研究中。此外, CRISPR/Cas9 技术既可通过基因的外显子设计 gRAN 精确编辑基因组 DNA, 也可实现编码 RNA 和非编码 RNA 转录水平的调控^[102], 在基因功能和转录调控的研究中均表现出强大的编辑能力, 故在研究药用植物的转录调控方面也具有广阔的发展潜力。

在药用植物的有效成分生产中, 甘草次酸、柳杉二醇和藏红花酸等成分已经利用 CRISPR/Cas9 技术在酵母中实现了从头合成并提高生产效率。目前尚有大量药用有效成分如石斛碱、紫草素等获得成本高昂、提取分离困难, 微生物合成生物学为药用植物有效成分生产提供了载体和方法^[93]。通过以微生物为载体, 使用高效精准的基因编辑技术改造已有微生物细胞或设计创建新的微生物元件, 在微生物体内完成相关有效成分的从头合成, 进而创建高效的微生物细胞工厂, 对于便捷低成本地获取药用植物有效成分具有重要意义。

在药用植物的分子育种中, CRISPR/Cas9 的应用还处于初步阶段。首先, 应用的药用植物的种类较少, 仅限于人参、颠茄及罗勒等少数物种, 而且许多未获得预期目标性状。其次, 应用的方法较为单一, 通常采用单位点突变或单基因敲除来培育新种质, 很少靶向编辑多个 DNA 位点。CRISPR/Cas9 多重基因编辑可同时对基因组中多个靶位点进行编辑, 极大地缩短了研究中高阶突变体获取的周期和难度^[103-104]。在水稻中, 研究者利用 CRISPR/Cas9 多重基因技术构建了 8 个农艺性状相关基因的共敲除载体^[105], 迅速高效地获得了突变材料, 该项研究为药用植物育种中快速引入遗传多样性和多样化种质创新提供了策略。

综上所述, CRISPR/Cas9 技术在药用植物的应用中仍存在诸多不足, 发展空间和发展前景广阔。以研究相对较为深入和系统的丹参为参考, 随着 CRISPR/Cas9 技术的完善和深入发展, 以及未来结

合碱基编辑器和引导编辑的应用, 可以预见大量的药用植物遗传转化体系逐步建立, 许多有效成分的生物合成关键基因及代谢途径将会被解析, 进一步使得有效成分的生产效率提高、获取来源丰富、生产成本降低。同时药用植物的品种改良和种质创新更为便捷, 育种周期大幅缩短, 最终实现药用植物资源的可持续利用, 为人类的医疗和保健提供丰富的物质基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Liu G W, Lin Q P, Jin S, *et al.* The CRISPR-Cas toolbox and gene editing technologies [J]. *Mol Cell*, 2022, 82(2): 333-347.
- [2] Zhang D Q, Zhang Z Y, Unver T, *et al.* CRISPR/Cas: A powerful tool for gene function study and crop improvement [J]. *J Adv Res*, 2021, 29: 207-221.
- [3] Shukla V K, Doyon Y, Miller J C, *et al.* Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases [J]. *Nature*, 2009, 459(7245): 437-441.
- [4] Bedell V M, Wang Y, Campbell J M, *et al.* In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system [J]. *Nature*, 2012, 491(7422): 114-118.
- [5] Das D, Singha D L, Paswan R R, *et al.* Recent advancements in CRISPR/Cas technology for accelerated crop improvement [J]. *Planta*, 2022, 255(5): 109.
- [6] Zeng Y F, Wen J Y, Zhao W B, *et al.* Rational improvement of rice yield and cold tolerance by editing the three genes *OsPIN5b*, *GS3*, and *OsMYB30* with the CRISPR-Cas9 system [J]. *Front Plant Sci*, 2020, 10: 1663.
- [7] Ueta R, Abe C, Watanabe T, *et al.* Rapid breeding of parthenocarpic tomato plants using CRISPR/Cas9 [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 507.
- [8] Peng A H, Chen S C, Lei T G, *et al.* Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene *CsLOB1* promoter in citrus [J]. *Plant Biotechnol J*, 2017, 15(12): 1509-1519.
- [9] Xu J P, Kang B C, Naing A H, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated editing of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase1 enhances *Petunia* flower longevity [J]. *Plant Biotechnol J*, 2020, 18(1): 287-297.
- [10] Zhou J H, Li D D, Wang G M, *et al.* Application and future perspective of CRISPR/Cas9 genome editing in fruit crops [J]. *J Integr Plant Biol*, 2020, 62(3): 269-286.
- [11] Jaganathan D, Ramasamy K, Sellamuthu G, *et al.* CRISPR for crop improvement: An update review [J]. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 985.
- [12] 李麟芳, 肖麓. CRISPR/Cas9 技术在主要油料作物中的

- 应用进展 [J]. 植物生理学报, 2020, 56(3): 373-381.
- [13] 阙婷婷, 汪冲, 郑志仁, 等. 基因编辑技术在花卉育种中应用的研究进展 [J]. 上海师范大学学报: 自然科学版, 2021, 50(1): 50-56.
- [14] 黄少勇, 王娟, 王柏柯, 等. CRISPR/Cas9 技术在园艺作物中的研究进展 [J]. 新疆农业科学, 2020, 57(7): 1223-1232.
- [15] 胡添源, 高伟, 黄璐琦. 展望 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在药用植物研究中的应用 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(16): 2953-2957.
- [16] Ekor M. The growing use of herbal medicines: Issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety [J]. *Front Pharmacol*, 2014, 4: 177.
- [17] 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]. *J Bacteriol*, 1987, 169(12): 5429-5433.
- [18] Mojica F J M, Ferrer C, Juez G, et al. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning [J]. *Mol Microbiol*, 1995, 17(1): 85-93.
- [19] Jansen R, van Embden J D A, Gaastra W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes [J]. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6): 1565-1575.
- [20] Garneau J E, Dupuis M È, Villion M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA [J]. *Nature*, 2010, 468(7320): 67-71.
- [21] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes [J]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-1712.
- [22] Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, et al. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin [J]. *Microbiology*, 2005, 151(Pt 8): 2551-2561.
- [23] Sapranas R, Gasiunas G, Fremaux C, et al. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli* [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(21): 9275-9282.
- [24] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [25] Cong L, Ran F A, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [26] Mali P, Yang L H, Esvelt K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 823-826.
- [27] 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]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 688-691.
- [28] Xie K B, Yang Y N. RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system [J]. *Mol Plant*, 2013, 6(6): 1975-1983.
- [29] 姚祝平, 程远, 万红建, 等. CRISPR/Cas9 基因编辑技术在植物基因工程育种中的应用 [J]. 分子植物育种, 2017, 15(7): 2647-2655.
- [30] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma C M, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III [J]. *Nature*, 2011, 471(7340): 602-607.
- [31] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(39): E2579-E2586.
- [32] Doudna J A, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 [J]. *Science*, 2014, 346(6213): 1258096.
- [33] Xie K B, Minkenberg B, Yang Y N. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(11): 3570-3575.
- [34] Liu D G, Hu R B, Palla K J, et al. Advances and perspectives on the use of CRISPR/Cas9 systems in plant genomics research [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2016, 30: 70-77.
- [35] Yin K Q, Gao C X, Qiu J L. Progress and prospects in plant genome editing [J]. *Nat Plants*, 2017, 3: 17107.
- [36] 丁莉萍, 张杰伟, 马艳, 等. CRISPR/Cas 基因组编辑技术研究进展及其在植物中的应用 [J]. 植物生理学报, 2019, 55(4): 411-424.
- [37] Qin G J, Gu H Y, Ma L G, et al. Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis [J]. *Cell Res*, 2007, 17(5): 471-482.
- [38] 李森, 程宵婧, 侯非凡, 等. 黄花菜八氢番茄红素脱氢酶基因 *HcPDS* 的克隆及 VIGS 转化表达验证 [J]. 河北农业大学学报, 2021, 44(1): 25-32.
- [39] 徐华. 百合 VIGS 体系的建立及 *LhDTX35* 基因的克隆和功能研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2018.
- [40] Li X R, Zuo X, Li M M, et al. Efficient CRISPR/Cas9-mediated genome editing in *Rehmannia glutinosa* [J]. *Plant Cell Rep*, 2021, 40(9): 1695-1707.
- [41] 左鑫, 李铭铭, 李欣容, 等. CRISPR/Cas9 技术在天目

- 地黄 RcPDS1 基因编辑中的应用 [J]. 园艺学报, 2022, 49(7): 1532-1544.
- [42] Syombua E D, Zhang Z Z, Tripathi J N, *et al.* A CRISPR/Cas9-based genome-editing system for yam (*Dioscorea* spp.) [J]. *Plant Biotechnol J*, 2021, 19(4): 645-647.
- [43] 刘颖竹. 萱草成花相关基因功能分析及 CRISPR/Cas9 系统介导成花基因功能敲除研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2020.
- [44] Zhang X Y, Xu G C, Cheng C H, *et al.* Establishment of an *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in Hemp (*Cannabis Sativa* L.) [J]. *Plant Biotechnol J*, 2021, 19(10): 1979-1987.
- [45] Chib S, Thangaraj A, Kaul S, *et al.* Development of a system for efficient callus production, somatic embryogenesis and gene editing using CRISPR/Cas9 in Saffron (*Crocus sativus* L.) [J]. *Plant Methods*, 2020, 16: 47.
- [46] Liu K, Sun B, You H, *et al.* Dual sgRNA-directed gene deletion in basidiomycete *Ganoderma lucidum* using the CRISPR/Cas9 system [J]. *Microb Biotechnol*, 2020, 13(2): 386-396.
- [47] Wang W, Liu J M, Wang H, *et al.* A highly efficient regeneration, genetic transformation system and induction of targeted mutations using CRISPR/Cas9 in *Lycium ruthenicum* [J]. *Plant Methods*, 2021, 17(1): 71.
- [48] Kui L, Chen H T, Zhang W X, *et al.* Building a genetic manipulation tool box for orchid biology: Identification of constitutive promoters and application of CRISPR/Cas9 in the orchid, *Dendrobium officinale* [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 7: 2036.
- [49] 向舒月. 基于 CRISPR-Cas9 的丹参、黄瓜基因组编辑系统构建及评价 [D]. 成都: 电子科技大学, 2022.
- [50] 刘璇. 柴胡 *BcUGT3* 基因的遗传转化及 CRISPR/Cas9 技术在柴胡中的应用初探 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2018.
- [51] 冯亮. 柴胡 *BcIAA13* 基因 CRISPR/Cas9 编辑体系及遗传转化体系的构建与优化 [D]. 绵阳: 西南科技大学, 2022.
- [52] Navet N, Tian M Y. Efficient targeted mutagenesis in allotetraploid sweet basil by CRISPR/Cas9 [J]. *Plant Direct*, 2020, 4(6): e00233.
- [53] Setiawati Y, Nopitasari S, Lawrie M D, *et al.* *Agrobacterium*-mediated transformation facilitates the CRISPR/Cas9 genome editing system in *Dendrobium macrophyllum* A. Rich orchid [J]. *AIP Conf Proc*, 2020, 2260(1): 060016.
- [54] Chen B X, Wei T, Ye Z W, *et al.* Efficient CRISPR-Cas9 gene disruption system in edible-medicinal mushroom *Cordyceps militaris* [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1157.
- [55] Zhang B, Huo Y B, Zhang J, *et al.* *Agrobacterium rhizogenes*-mediated RNAi of *Tripterygium wilfordii* and application for functional study of terpenoid biosynthesis pathway genes [J]. *Ind Crops Prod*, 2019, 139: 111509.
- [56] Zhou P, Peng J Y, Zeng M G, *et al.* Virus-induced gene silencing (VIGS) in Chinese narcissus and its use in functional analysis of *NtMYB3* [J]. *Hortic Plant J*, 2021, 7(6): 565-572.
- [57] Dey A. CRISPR/Cas genome editing to optimize pharmacologically active plant natural products [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 164: 105359.
- [58] 于浩滢. 丹参酮生物合成途径相关 *CYP450* 基因的筛选及功能研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2019.
- [59] Li B, Cui G H, Shen G A, *et al.* Targeted mutagenesis in the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 43320.
- [60] 李江. 丹参全基因组 DNA 甲基化谱及 DNA 甲基转移酶与去甲基化酶基因的系统分析 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2018.
- [61] 周正. 丹酚酸生物合成途径关键催化酶的解析及功能研究 [D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2021.
- [62] Zhou Z, Tan H X, Li Q, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis of *RAS* in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Phytochemistry*, 2018, 148: 63-70.
- [63] Zhou Z, Li Q, Xiao L, *et al.* Multiplexed CRISPR/Cas9-mediated knockout of laccase genes in *Salvia miltiorrhiza* revealed their roles in growth, development, and metabolism [J]. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 647768.
- [64] Deng C P, Shi M, Fu R, *et al.* ABA-responsive transcription factor bZIP1 is involved in modulating biosynthesis of phenolic acids and tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *J Exp Bot*, 2020, 71(19): 5948-5962.
- [65] 胡贝. CRISPR/Cas9 技术在生产高丹酚酸丹参毛状根的应用 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2022.
- [66] 李葆林, 麻景梅, 田宇柔, 等. 甘草中新发现化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(8): 2438-2448.
- [67] 田少凯. 甘草 DXS 和 F5H 基因对甘草酸生物合成的调控研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.
- [68] 张浩然, 叶安琪, 张跃伟, 等. 人参皂苷衍生化及生物活性研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(14): 4554-4567.
- [69] Choi H S, Koo H B, Jeon S W, *et al.* Modification of ginsenoside saponin composition via the CRISPR/Cas9-mediated knockout of protopanaxadiol 6-hydroxylase gene in *Panax ginseng* [J]. *J Ginseng Res*, 2022, 46(4): 505-514.
- [70] 詹忠根. 转录因子调控青蒿素生物合成的作用机制研

- 究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(19): 6258-6272.
- [71] Koerniati S, Simanjuntak G. CRISPR/Cas9 system for disruption of biochemical pathway for sterol synthesis in *Artemisia annua* L [J]. *IOP Conf Ser: Earth Environ Sci*, 2020, 482(1): 012028.
- [72] 朱智慧. 不同产地黄花蒿转录组分析及 CRISPR/Cas9 在黄花蒿中的应用 [D]. 淮北: 淮北师范大学, 2020.
- [73] Zakaria M M, Schemmerling B, Ober D. CRISPR/Cas9-mediated genome editing in comfrey (*Symphytum officinale*) hairy roots results in the complete eradication of pyrrolizidine alkaloids [J]. *Molecules*, 2021, 26(6): 1498.
- [74] Mercx S, Smargiasso N, Chaumont F, et al. Inactivation of the $\beta(1,2)$ -xylosyltransferase and the $\alpha(1,3)$ -fucosyltransferase genes in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells by a multiplex CRISPR/Cas9 strategy results in glycoproteins without plant-specific glycans [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 403.
- [75] 蒋悦. 利用 CRISPR/Cas9 技术定点编辑 *NtMYB4a* 基因及其响应低温胁迫的分子机制 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2021.
- [76] Wen D, Wu L, Wang M Y, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of *FtMYB45* promotes flavonoid biosynthesis in Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 879390.
- [77] Heo J, Bang W Y, Jeong J C, et al. The comparisons of expression pattern reveal molecular regulation of fruit metabolites in *S. nigrum* and *S. lycopersicum* [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 5001.
- [78] Park S, Lee E, Heo J, et al. Rapid generation of transgenic and gene-edited *Solanum nigrum* plants using *Agrobacterium*-mediated transformation [J]. *Plant Biotechnol Rep*, 2020, 14(4): 497-504.
- [79] Confalonieri M, Carelli M, Gianoglio S, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of *CYP93E2* modulates the triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula* [J]. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 690231.
- [80] Hasebe F, Yuba H, Hashimoto T, et al. CRISPR/Cas9-mediated disruption of the pyrrolidine ketide synthase gene reduces the accumulation of tropane alkaloids in *Atropa belladonna* hairy roots [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2021, 85(12): 2404-2409.
- [81] Shi M, Gong H, Cui L J, et al. Targeted metabolic engineering of committed steps improves anti-cancer drug camptothecin production in *Ophiorrhiza pumila* hairy roots [J]. *Ind Crops Prod*, 2020, 148: 112277.
- [82] Wang P A, Xiao H, Zhong J J. CRISPR-Cas9 assisted functional gene editing in the mushroom *Ganoderma lucidum* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(4): 1661-1671.
- [83] Alagoz Y, Gurkok T, Zhang B H, et al. Manipulating the biosynthesis of bioactive compound alkaloids for next-generation metabolic engineering in opium poppy using CRISPR-Cas9 genome editing technology [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 30910.
- [84] Zhou J W, Zhang Y, Hu T Y, et al. Functional characterization of squalene epoxidase genes in the medicinal plant *Tripterygium wilfordii* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 120: 203-212.
- [85] Gupta D, Sharma G, Saraswat P, et al. Synthetic biology in plants, a boon for coming decades [J]. *Mol Biotechnol*, 2021, 63(12): 1138-1154.
- [86] Utomo J C, Chaves F C, Bauchart P, et al. Developing a yeast platform strain for an enhanced taxadiene biosynthesis by CRISPR/Cas9 [J]. *Metabolites*, 2021, 11(3): 147.
- [87] Huang Y, Jiang D, Ren G X, et al. De novo production of glycyrrhetic acid 3-O-mono- β -D-glucuronide in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 709120.
- [88] 汤皓, 程亚田, 郭娟, 等. Cas9 表达对酿酒酵母细胞生长和生产天然产物的影响及 CRISPR-Cas9 编辑系统的优化 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(15): 4066-4073.
- [89] Zhou J W, Hu T Y, Gao L H, et al. Friedelane-type triterpene cyclase in celastrol biosynthesis from *Tripterygium wilfordii* and its application for triterpenes biosynthesis in yeast [J]. *New Phytol*. 2019, 223(2): 722-735.
- [90] Gao H Y, Zhao H, Hu T Y, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for high-level friedelin via genetic manipulation [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10: 805429.
- [91] Tong Y R, Su P, Guan H Y, et al. Eudesmane-type sesquiterpene diols directly synthesized by a sesquiterpene cyclase in *Tripterygium wilfordii* [J]. *Biochem J*, 2018, 475(17): 2713-2725.
- [92] Liu T F, Dong C, Qi M M, et al. Construction of a stable and temperature-responsive yeast cell factory for crocetin biosynthesis using CRISPR-Cas9 [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 653.
- [93] 李洋, 申晓林, 孙新晓, 等. CRISPR 基因编辑技术在微生物合成生物学领域的研究进展 [J]. 合成生物学, 2021, 2(1): 106-120.
- [94] 胡淞, 田英男, 冯垒, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术研究铁皮石斛 *Csl4* 基因的功能 [J]. 分子植物育种, 2021, 19(8): 2596-2602.

- [95] Zeng L J, Zhang Q Z, Jiang C X, *et al.* Development of *Atropa belladonna* L. plants with high-yield hyoscyamine and without its derivatives using the CRISPR/Cas9 system [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(4): 1731.
- [96] Zhang H, Zhang Z Y, Xiong Y J, *et al.* Stearic acid desaturase gene negatively regulates the thermotolerance of *Pinellia ternata* by modifying the saturated levels of fatty acids [J]. *Ind Crops Prod*, 2021, 166: 113490.
- [97] Hasley J A R, Navet N, Tian M. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of sweet basil candidate susceptibility gene *ObDMR6* enhances downy mildew resistance [J]. *PLoS One*, 2021, 16(6): e0253245.
- [98] 华霜. 基于 CRISPR/Cas9 系统对人参抗病基因的编辑 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.
- [99] Miller S M, Wang T N, Randolph P B, *et al.* Continuous evolution of SpCas9 variants compatible with non-G PAMs [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(4): 471-481.
- [100] 柳柯, 林桂虹, 刘坤, 等. CRISPR/Cas 系统的挖掘、改造与功能拓展 [J]. 合成生物学, 2023, 4(1): 47-66.
- [101] Zhang S, Wu S P, Hu C H, *et al.* Increased mutation efficiency of CRISPR/Cas9 genome editing in banana by optimized construct [J]. *Peer J*, 2022, 10: e12664.
- [102] 张慧博, 孙超. CRISPR/Cas9 技术在药用植物功能基因组研究中的应用和展望 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2022, 24(2): 638-648.
- [103] Rao Y C, Yang X, Pan C Y, *et al.* Advance of clustered regularly interspaced short palindromic repeats-Cas9 system and its application in crop improvement [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 839001.
- [104] 郎楠, 梁洛瑜, 汪军丽, 等. CRISPR-Cas9 多基因编辑技术在植物研究中的应用 [J/OL]. 分子植物育种, [2021-07-23]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210722.1032.002.html>.
- [105] Shen L, Hua Y F, Fu Y P, *et al.* Rapid generation of genetic diversity by multiplex CRISPR/Cas9 genome editing in rice [J]. *Sci China Life Sci*, 2017, 60(5): 506-515.

[责任编辑 赵慧亮]