

许磊, 何菡子, 范楚川. 基于CRISPR/Cas9的基因编辑及其在甘蓝型油菜中的应用[J]. 华中农业大学学报, 2024, 43(5): 51-64.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.05.006

基于CRISPR/Cas9的基因编辑及其 在甘蓝型油菜中的应用

许磊, 何菡子, 范楚川

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室/湖北洪山实验室, 武汉 430070

摘要 油菜是世界第二大油料作物, 同时也是我国最主要的食用植物油来源。长期以来, 油菜育种工作者尝试通过传统育种策略培育良种。然而, 甘蓝型油菜是种间杂交后双二倍进化而来的异源四倍体物种, 其基因组中存在较多基因冗余现象。因此, 通过人工杂交选择、随机诱变等传统遗传方法改良性状效率非常低。近年来, CRISPR/Cas9技术以其高效、简便的独特优势, 已广泛应用于多倍体油菜的基因功能研究和定向遗传改良。为了能够快速高效地对甘蓝型油菜进行种质资源创新和遗传改良, 将CRISPR/Cas9基因编辑技术应用于甘蓝型油菜恰逢其时。本文综述了目前CRISPR/Cas9系统应用于油菜基因功能研究和遗传改良的研究进展, 涉及油菜产量、含油量和脂肪酸组成、生物和非生物胁迫耐受性等重要农艺性状, 并探讨了油菜基因编辑存在的局限性以及未来发展的方向。

关键词 CRISPR/Cas9; 基因编辑; 甘蓝型油菜; 种质资源创新; 作物遗传改良

中图分类号 S336; S565 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2024)05-0051-14

油菜是世界上最重要的油料作物之一。甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L., AACC, $2n=38$) 是由二倍体亲本白菜 (*B. rapa*, AA, $2n=20$) 与甘蓝 (*B. oleracea*, CC, $2n=18$) 在距今 7 500 年前通过自然杂交产生的异源四倍体物种, 拥有复杂的基因组, 包含大量重复基因。甘蓝型油菜中多拷贝基因序列相似性高, 阻碍了油菜基因功能研究。对油菜来说, 敲除基因的所有同源拷贝是获得可靠表型的必要条件。近几十年来, X 射线辐射诱变等物理方法、甲基磺酸乙酯 (EMS) 诱变等化学方法以及 T-DNA 插入等生物方法已被广泛应用于功能基因组研究和作物育种。上述这些方法虽然能够产生可遗传的稳定突变, 但是它们诱发的突变都是随机的。后续需要经过耗时且费力的大规模筛选, 才能获得有效的目标突变体, 这对于异源四倍体的油菜来说尤为不便。因此, 需要寻找高效、省时、低成本、稳定遗传的新方法来促进作物遗传改良, 加快种质资源创新。

近几十年来, 基因编辑技术从无到有, 发展迅

速。这项技术是在 DNA 水平上对基因靶点进行一系列定点修饰或改造, 包括碱基的插入、缺失或替换。由于能实现对靶基因的精准调控, 自诞生以来基因编辑技术便被广泛地应用于不同物种的基因组 DNA 修饰。基因编辑技术主要分为 3 类: 锌指核酸酶系统 (zinc-fingers nucleases, ZFNs)、转录激活效应器样核酸酶系统 (transcription activator-like effector nucleases, TALENs) 以及 CRISPR/Cas 系统 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins, CRISPR/Cas)。ZFN 系统和 TALEN 系统由于结构复杂、成本高、效率低等问题迅速被简单快捷高效的 CRISPR/Cas 系统取代。CRISPR/Cas 系统可以缩短作物改良领域中基因功能鉴定和新品种选育的时间。截至目前, CRISPR/Cas 系统已成功应用于包括油菜在内的 50 多种植物上^[1]。本文简要介绍了基于 CRISPR/Cas9 系统开发的几种基因编辑工具, 总结了迄今为止 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在甘蓝型油菜基因功能探究和遗传改良方面的研究现状和未来发展方向,

收稿日期: 2023-08-15

基金项目: 湖北省重点研发计划项目 (2022BBA0039)

许磊, E-mail: 15202733352@163.com

通信作者: 范楚川, E-mail: fanchuchuan@mail.hzau.edu.cn

以期对相关研究者快速了解该领域发展现状提供参考。

1 基于 CRISPR/Cas9 系统的基因编辑技术

1.1 CRISPR/Cas9 编辑系统

经典的 CRISPR/Cas 系统根据效应模块的架构可分为 2 类: I 型和 II 型(图 1A)。通常 I 型 CRISPR/Cas 系统通过多个效应子的配合来发挥其 DNA 切割功能,基因编辑操作相对较为复杂。与之相反,II 型 CRISPR/Cas 系统仅使用 1 个大的效应蛋白来进行 DNA 切割,操作更简单。目前最常用的有 CRISPR/Cas9 和 CRISPR/Cpf1。

CRISPR/Cas9 属于 II 型 CRISPR 系统,由两部分组成: Cas9 蛋白和 sgRNA。其工作原理是,sgRNA 通过碱基互补配对引导 Cas9 蛋白靶向目标基因特定位置,该位点被称为 PAM 位点(protospacers adjacent motif, PAM),Cas9 蛋白随后在 PAM 位点附近切割双链 DNA,造成双链断裂(DSB, double-strand break)。DSB 引发细胞自损修复机制,即同源重组修复(homology directed repair, HDR)和非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ),在修复的过程中随机引入碱基的插入或缺失,从而在目标基因靶点处产生随机突变。得益于其巨大的优势,CRISPR/Cas9 已用于水稻、小麦、玉米、大豆和油菜等作物的遗传改良。

1.2 碱基编辑技术

基于 CRISPR/Cas9 介导的单碱基编辑能够以可设计的方式实现直接、不可逆的碱基转换,并且不需要创建 DSB。目前的碱基编辑器是由人工改造的 Cas9 核酸酶和单链 DNA 特异性脱氨酶组成的融合蛋白。在 sgRNA 的引导下,d/nCas9 将脱氨酶定位到靶点序列,形成 1 个 R-loop。R-loop 内的核苷酸充当脱氨酶的底物,这些核苷酸的位置定义了碱基编辑的“活动窗口”。目前广泛使用的单碱基编辑技术有 2 类:胞嘧啶碱基编辑器(cytosine base editor, CBE,图 1B)和腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editor, ABE,图 1C)。除此之外,还有在 CBE 基础上开发的糖基化酶碱基编辑器(glycosylase base editor, GBE,图 1D)以及将 2 种不同的单碱基编辑器融合形成的双碱基编辑器(dual base editor)。

1)胞嘧啶碱基编辑器。2016 年报道的胞嘧啶碱基编辑器(CBE)是第 1 个建立的基于 CRISPR 的单

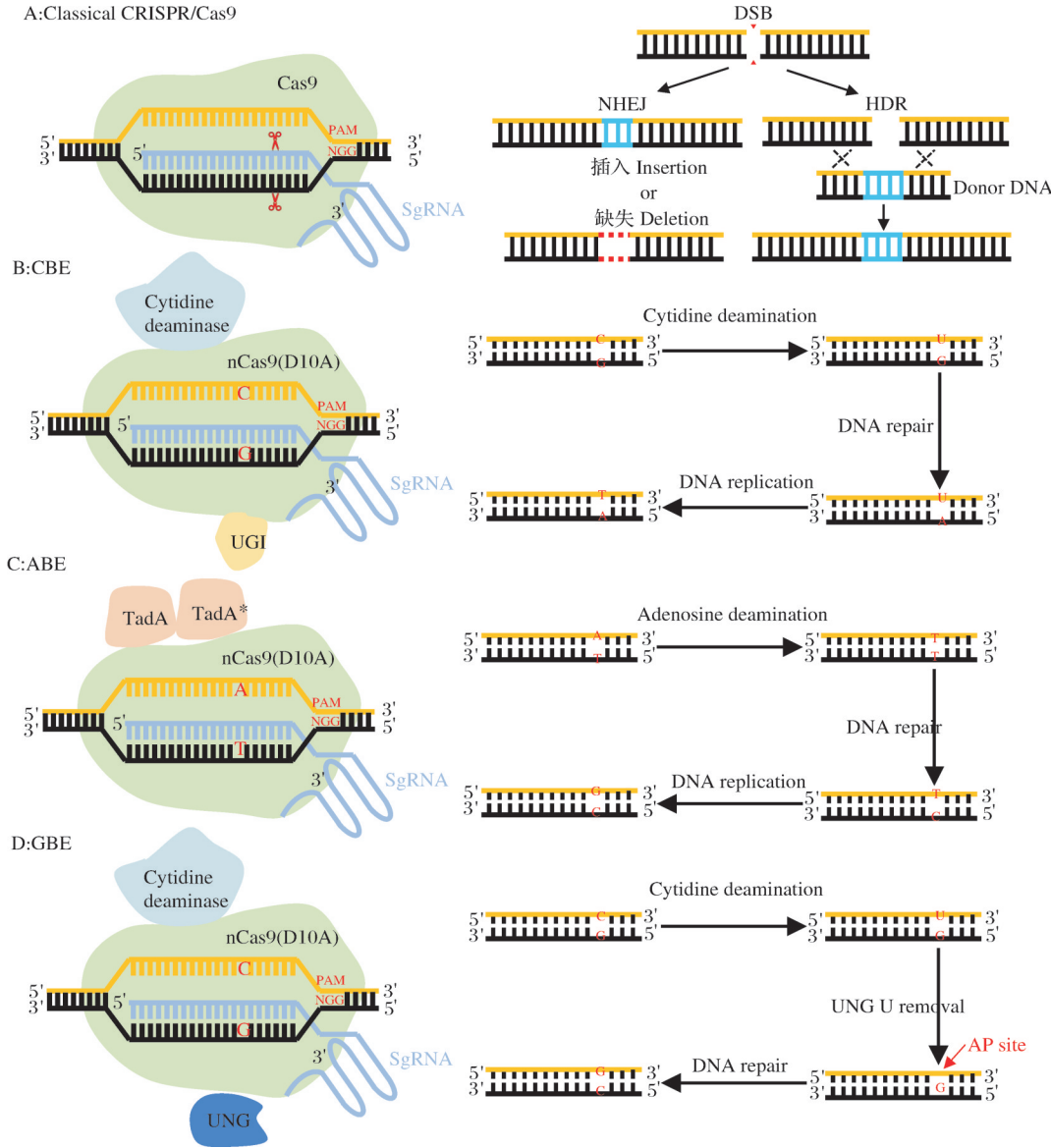
碱基编辑系统^[2]。在 CBE 中,nCas9(D10A)与胞苷脱氨酶和尿嘧啶 DNA 糖基化酶(uracil DNA glycosylase, UNG)抑制剂(uracil DNA glycosylase inhibitor, UGI)形成融合蛋白。在 sgRNA 的引导下,融合蛋白定位到靶点序列,在编辑窗口内直接诱导 C/G 变成 T/A。为了提高 CBEs 的编辑效率,CBEs 已经历了从 CBE1 到 CBE4 共 4 代的发展。最初 CBE1 是由大鼠胞苷脱氨酶(rAPOBEC1)和 dCas9 组成,体内编辑效率较低,仅有 7.7%;CBE2 的体内编辑效率高达 20%;CBE3 的编辑效率是 CBE2 的 2~6 倍;而优化后形成的 CBE4 的编辑效率又比 CBE3 提高了 1.5 倍,并且 C 到 G 或 A 和 indel 出现的频率大大降低^[2]。

2)腺嘌呤碱基编辑器。腺嘌呤碱基编辑器(ABE)于 2017 年首次报道^[3]。理论上 ABE 可以通过用腺苷脱氨酶代替胞苷脱氨酶来产生。然而自然界中没有已知的酶可以使 DNA 中的腺苷脱氨基。因此,科学家将大肠杆菌 tRNA 腺苷脱氨酶(ecTadA)改造为脱氧腺苷脱氨酶(TadA*),可以使 ssDNA 上的腺苷脱氨基。接下来 nCas9(D10A)与腺苷脱氨酶 TadA*融合形成 ABE 系统。ABE 可以直接诱导 A:T 到 G:C 的转换。在这些 ABE 系统中,ABE7.10 被推荐用于 A/T 到 G/C 的转换,其效果已在多种细胞和生物中得到验证^[3]。

3)糖基化酶碱基编辑器。糖基化酶碱基编辑器(GBE)于 2020 年首次报道,是一种可以将 C 转换为 A 或者 G 的碱基编辑技术。GBE 由 nCas9、胞苷脱氨酶和尿嘧啶 DNA 糖基化酶(UNG)组成,该系统在 sgRNA 的引导下定位到靶点序列,UNG 将胞苷脱氨酶产生的 U 切除,形成一个诱导 DNA 修复机制的无嘌呤/无嘧啶(apurinic/apyrimidinic, AP)位点。该位点启动 DNA 损伤修复,从而诱导 C 转换为 A 或者 G^[4]。为了进一步提高 GBE 的性能,研究人员在 GBE 的基础上构建了 APOBEC (R33A)-nCas9-Rad51-Ung1 的融合蛋白,并命名为 GBE2.0。该编辑器能够实现更高的编辑效率(平均 30.88%),同时 C 到 G 的转换纯度更高。

4)双碱基编辑器。上述几种单碱基编辑技术只能实现单一的碱基转换,具有局限性。为了实现同时产生不同类型的碱基转换,研究者开发出了双碱基编辑技术(图 2A)。该编辑器可以同时诱导 C 到 T 和 A 到 G 的碱基转换。例如,Zhang 等^[5]成功开发了一种 nCas9(D10A)-NG 介导的高效胞嘧啶和腺嘌呤

双碱基编辑融合系统 STCBE-2, 并利用该系统对水稻 *OsEPSPS* 基因编码区和预测的草甘膦结合区域进行近饱和突变, 获得了高抗草甘膦的水稻新型基因资源。



A: 经典 CRISPR/Cas9 编辑系统。在 sgRNA 的引导下, Cas9 识别 PAM 并切割双链 DNA, 形成 DSB。DSB 通过 NHEJ 或 HDR 途径修复。在 NHEJ 途径中, 随机形成插入或缺失。在 HDR 途径中, 当附近存在供体 DNA 模板时, 形成精确的插入。B: CBE 单碱基编辑器。在 CBE 中, 胞苷脱氨酶直接将胞苷(C)脱氨基为尿苷(U), 从而导致 U—G 错配。在 DNA 修复和复制过程中, U 被识别为 T, 将 C—G 转换为 T—A 碱基对。C: ABE 单碱基编辑器。在 ABE 中, 进化的脱氧腺苷脱氨酶直接将腺嘌呤(A)脱氨为肌苷(I), 肌苷(I)与 C 配对, 产生 A—T 到 G—C 的替代。D: GBE 单碱基编辑器。在 GBE 中, 胞苷脱氨酶将 C 脱氨基为 U。接下来, 它被 UNG 去除, 创建 AP 位点。G 很可能会被引入该位点。这会在 DNA 修复和复制过程中将 C—G 转换为 G—C。A: Classic CRISPR/Cas9 editing system. Guided by the sgRNA, Cas9 recognizes PAM and cuts double-stranded DNA, forming a DSB. DSB are repaired by NHEJ or HDR. In the NHEJ pathway, random insertions or deletions are formed. In the HDR pathway, precise insertions are formed when a donor DNA template is present nearby. B: CBE single base editor. In CBE, cytidine deaminase deaminates cytidine (C) to uridine (U), resulting in U—G mismatch. During DNA repair and replication, U is recognized as T, converting C—G to T—A. C: ABE single base editor. In ABE, the evolved deoxyadenosine deaminase is used to deaminate adenine (A) to inosine (I), which pairs with C to produce an A—T to G—C substitution. D: GBE single base editor. In GBE, cytidine deaminase deaminates C to U. Next, it is removed by the UNG, creating the AP site. G is likely to be introduced to this site. This converts C—G to G—C during DNA repair and replication.

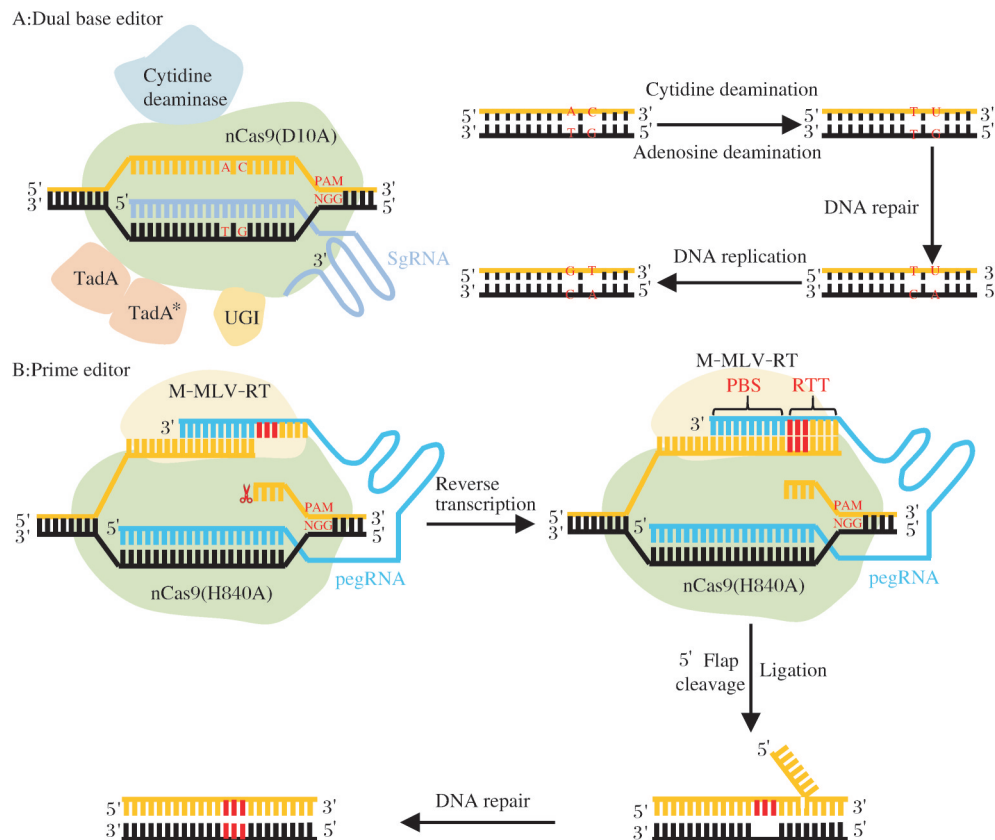
图 1 CRISPR/Cas9 编辑系统以及 3 种单碱基编辑器原理示意图

Fig. 1 Schematic diagram of CRISPR/Cas9 editing system and three single-base editors

1.3 先导编辑技术

先导编辑器(prime editor, PE)首次报道于2019年,它可以实现所有12种碱基替换,特别是碱基颠换、精确插入和删除,而无需依赖DSB和供体DNA。PE由nCas9(H840A)和逆转录酶形成的融合蛋白以及pegRNA(prime editing guide RNA)组成(图2B)。pegRNA包含2个功能部分,sgRNA靶定位序列和逆转录模板(reverse transcription template, RTT)。RTT包括引物结合位点和编码突变信息的位点。当

PE系统融合蛋白锚定到靶位点时,nCas9切割非互补链,逆转录酶通过RTT逆转录出相应的含突变位点的ssDNA,然后通过DNA修复将突变整合到受体基因组中。为了提高其效率和准确性,研究者在PE的基础上开发了PE2、PE3、PE3b3、PE4、PE5和PEmax共6种编辑器^[6]。最近,Sun等^[7]建立了一种在染色体上精确插入大片段DNA的先导编辑技术PrimeRoot,能够将高达11.1 kb的大片段DNA精确插入植物基因组中,效率达到6.3%。



A: 双碱基编辑器,胞苷和腺苷脱氨酶同时将C脱氨为U,将A脱氨为I。在DNA修复和复制过程中,会产生C到T和A到G的替换。B: 先导编辑器(PE)。一旦先导编辑器复合物到达目标序列,nCas9(H840A)就会在DNA链上产生切口。然后,PBS与3'端结合,逆转录RT启动具有所需突变的RT模板的逆转录。经过切除和DNA修复后,编辑后的核苷酸序列被精确地整合到目标位点。A: A dual base editor. Cytidine and adenosine deaminase simultaneously deaminate C to U and A to I, respectively. During DNA repair and replication processes, substitutions from C to T and A to G occur. B: Prime editor (PE). Once the prime editor complex reaches the target sequence, nCas9 (H840A) creates a nick in the DNA strand. PBS then binds to the 3' end and reverse transcription (RT) is initiated with the RT template containing the desired mutation. After excision and DNA repair, the edited nucleotide sequence is precisely integrated into the target site.

图2 双碱基编辑器和先导编辑器原理示意图

Fig. 2 Schematic diagram of dual base editor and prime editor

2 基因编辑技术在甘蓝型油菜中的应用

2.1 CRISPR/Cas9在甘蓝型油菜中的应用

甘蓝型油菜是一种经济价值高、用途广泛的油料作物。CRISPR/Cas9基因编辑技术可在甘蓝型油

菜中实现1个或多个基因的有效突变,产生稳定遗传的突变体。后续通过杂交分离出无T-DNA的基因编辑植株。目前油菜中的基因编辑主要是利用CRISPR/Cas9进行基因功能的鉴定与优异种质资源创新^[8],包括油菜产量、含油量和脂肪酸组成、宜机收、粒色花色、开花时间和花发育、育性、营养成分、

生物和非生物胁迫耐受性等性状。

1)产量相关性状。产量相关性状一直是作物育种中重点关注的性状之一,种子大小、每角果粒数和单株角果数与油菜产量密切相关。Yang等^[9]敲除了CLV-WUS通路中的*BnCLV1*(*CLAVATA1*)、*BnCLV2*和*BnCLV3*,每个基因均获得了双拷贝纯合突变体。其中*BnCLV3*的双拷贝突变体每角果粒数和千粒重增加,可能有助于增加种子产量。Khan等^[10]敲除了*BnEOD3*(*ENHANCER3 OF DA1*)的4个同源拷贝,观察到突变体种子变小,每角果粒数增加,4拷贝突变体的单株产量平均提高了13.9%。Wang等^[11]敲除了2种调控花粉管引导性的天冬氨酸蛋白酶基因*BnAP36s*(*ASPARTATE PROTEASES 36*)和*BnAP39s*,突变体的结实率分别降低了50%和60%,由此导致产量的降低。

株型,包括株高、分枝数和叶形等性状,也是影响产量的相关性状。Zheng等^[12]敲除*BnMAX1*(*MORE AXILLARY GROWTH 1*)获得了分枝数增加的半矮化突变体。Stanic等^[13]敲除独脚金内酯受体基因*BnD14*获得了分枝数和花器官增加、植株矮化的突变体。Fan等^[14]敲除*BnBP*(*BREVIPEDICELLUS*)基因发现*BnBP.A03*和*BnBP.C03*突变后植株均变矮,株型变紧凑,它们的双拷贝突变体极度矮化并且不育。Song等^[15]敲除*BnBRI1*(*BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1*)产生了半矮株系,但对产量无影响。甘蓝型油菜存在广泛的叶形多样性,包括边缘完整的不裂叶、边缘锯齿状的浅裂叶以及裂叶。油菜的裂叶已被证实是高密度种植和杂交生产的理想性状。Hu等^[16-17]通过敲除裂叶亲本的*BnA10.LMI1*(*LATE MERISTEM IDENTITY 1*)和*BnA10.RCO*(*REDUCED COMPLEXITY*),产生了不裂叶和浅裂叶的突变体,验证了*BnA10.LMI1*和*BnA10.RCO*正向调控甘蓝型油菜叶形的发育。

2)含油量和脂肪酸组成。提高油菜种子含油量和改善脂肪酸组成一直是油菜育种的2个关键目标。敲除*BnSFAR4/5*(*SEED FATTY ACID REDUCER 4/5*)、*BnFAX1*(*FATTY ACID EXPORTER 1*)和*BnCIPK9*(*CALCINEURIN B-LIKE INTERACTING PROTEIN KINASE 9*)基因可以提高种子含油量^[18-20],而敲除*BnLPAT2/5*(*LYSOPHOSPHATIDIC ACID ACYLTRANSFERASE 2/5*)和*BnBASS2*(*BILE ACID SODIUM SYMPORTER FAMILY PROTEIN 2*)种子含油量会降低^[21-22]。脂

肪酸组成是决定菜籽油品质的关键因素,脂肪酸去饱和酶基因*BnFAD2*(*FATTY ACID DESATURASE 2*)是影响脂肪酸3种主要成分油酸、亚油酸和亚麻酸组成和比例的关键基因。敲除*BnFAD2*后种子中油酸的含量提高,亚油酸和亚麻酸的含量相应降低^[23]。Yan等^[24]敲除*BnLEC1*(*LEAFY COTYLEDON 1*)后,突变体种子含油量和油酸含量降低,亚油酸含量提高。磷酸烯醇丙酮酸/磷酸转运蛋白(phosphoenolpyruvate/phosphate translocator, PPT)将磷酸烯醇丙酮酸从细胞质转运到质体中,用于脂肪酸(FA)和其他代谢物的生物合成。敲除*BnPPT1*后,植株生长缓慢,叶片变黄,种子含油量也下降了2.2%~9.1%^[25]。

3)抗裂荚性状。油菜角果成熟易开裂的特性是造成田间产量损失的主要原因。Braatz等^[26]敲除*BnALC*(*ALCATRAZ*)基因发现突变体角果抗裂。Zaman等^[27]敲除*BnJAG*(*JAGGED*)的5个同源拷贝,发现其中*BnJAG.A08*拷贝突变后角果抗裂性能提高了2倍。Zhai等^[28]敲除*BnIND*(*INDEHISCENT*)的2个同源拷贝,发现*BnIND.A03*单拷贝突变体和*BnIND.A03/C03*双拷贝突变体的角果均显著抗裂。Zaman等^[29]敲除*BnSHP1/2*(*SHATTER-PROOF1/2*)的所有同源拷贝,其中*BnSHP1.A09*、*BnSHP1.A04*、*BnSHP1.C04-A*、*BnSHP2.C04-B*和*BnSHP2.A05*5个拷贝突变体表现出明显的角果抗裂性。

4)粒色、花色、叶色等色泽相关性状。油菜的黄籽性状是一种优良表型,与黑籽相比,具有种皮薄、原花青素含量低、油脂和蛋白质含量高的优点。目前已知通过敲除类黄酮途径的关键基因获得黄籽突变体的基因有*BnTT2*(*TRANSPARENT TESTA 2*)、*BnTT4*、*BnTT8*以及*BnPAP2*(*PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT 2*),上述突变体均可提高种子含油量并改善脂肪酸组成^[30-33]。

油菜花具有重要的观赏价值,花色是油菜遗传育种中备受关注的问题。与黄籽性状不同,甘蓝型油菜的花色是由类胡萝卜素含量决定的,敲除参与类胡萝卜素生物合成的玉米黄质环氧化酶基因*BnZEP*(*ZEAXANTHIN EPOXIDASE*),得到的*Bna09.zep/Bnc09.zep*双突变体呈现出橘色花瓣^[34]。而敲除类胡萝卜素异构酶基因*BnCRTISO*(*CAROTENOID ISOMERASE*),得到花瓣乳白色、叶片淡黄色的突变体^[35]。

叶色主要与叶绿体的发育相关,Liu等^[36]敲除参与叶绿体发育的基因 *BnYCO* (*YELLOW COTYLEDON*)后,其突变体子叶黄化、真叶失绿。Xu等^[37]敲除与光合系统PSⅡ周期修复循环有关的基因 *BnFtsH1*,突变体子叶黄化、生物量积累降低。

5)开花时间和花发育。油菜开花时间不仅影响油菜产量,还会影响下茬作物的播期,因此适宜的花期也是油菜育种的重要目标。TERMINAL FLOWER 1(TFL1)是磷脂酰乙醇胺结合蛋白(phosphatidylethanolamine-binding protein, PEBP)家族成员,在高等植物的花分生组织决定和开花时间调控中起重要作用。Sriboon等^[38]敲除 *BnTFL1*的5个拷贝,发现只有 *BnC03.TFL1*的突变体具有早花表型。Jiang等^[39]敲除组蛋白赖氨酸甲基转移酶基因 *BnSDG8* (*SET DOMAIN GROUP 8*),发现 *BnSDG8.A/C*功能缺失突变体植株开花时间提前。Ahmar等^[40]敲除 *BnSVP* (*SHORT VEGETATIVE PHASE*)的所有拷贝得到不同拷贝组合的突变体,开花时间平均缩短了40.6%~50.7%。*COL9* (*CONSTANS-like 9*)作为锌指转录因子家族的一员,控制着许多不同植物的生长发育。Guo等^[41]敲除油菜 *BnCOL9*的4个拷贝,得到的突变体具有早花表型。Li等^[42]敲除 *BnSPL3* (*SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 3*)后,突变体发育迟缓,开花延迟。

许多芸薹属作物的产量经常受到花器官发育异常的阻碍。然而,这些异常花器官的分子机制尚不清楚。*APETALA2* (*AP2*)作为植物ABCE模型中的A类基因,调控着花器官的发育。Zhang等^[43]敲除 *BnAP2*,发现4拷贝突变体出现萼片-心皮修饰表型。

6)育性。自交不亲和(self incompatibility, SI)是雌雄同体被子植物通过排斥自交花粉来阻止近亲交配的遗传机制,自交不亲和株系有利于杂种优势的利用。通过敲除 *BnMLPK* (*M-LOCUS PROTEIN KINASE*)和 *BnARC1* (*ARM-REPEAT-CONTAINING PROTEIN 1*),油菜自交不亲和性被完全抑制,自花授粉后种子比野生型显著增加^[44]。与此相反的是,敲除 *BnA5.ZML1*和 *BnS6-SMI2* (*SCR-methylation-inducing region 2*),油菜自交不亲和性增强^[45-46]。

雄性不育是提高作物产量最有效的杂种优势技术之一。Xin等^[47]敲除 *BnMS5a* (*MALE STERILITY 5*)或 *BnMS5c*,均会导致雄性不育,证明恢复等位

基因 *MS5a*和维持等位基因 *MS5c*都是甘蓝型油菜雄性育性所必需的。Farooq等^[48]敲除 *BnRFL11* (*RESTORATION OF FERTILITY-LIKE 11*), *bn-rfl11*表现出营养缺陷,包括分枝减少和叶片变小,同时也表现出雄性不育。细胞色素P450 (CYP450)单加氧酶超家族在植物生长发育中起着重要作用。Wang等^[49]敲除 *BnCYP704B1*,编辑后的单株在成熟花药中表现出无花粉、不育的表型。

7)营养成分。硫代葡萄糖苷(glucosinolates, GSLs)是一种抗营养因子,消除或降低油菜籽中硫苷的含量是提高饲料和食品价值的必要条件。敲除硫代葡萄糖苷转运蛋白基因 *BnGTR2* (*GLUCOSINOLATE TRANSPORTER 2*),种子硫苷含量显著降低^[50-51]。植酸(phytic acid, PA),同样是一种抗营养因子。Sashidhar等^[52]通过敲除PA生物合成的关键基因 *BnITPK* (*INOSITOL TETRAKISPHOSPHATE KINASE*)的3个拷贝,得到低植酸的突变体。生育酚,即维生素E,是人体健康必不可少的营养素。Zhang等^[53]通过敲除 *BnVTE4* (*VITAMIN E DEFICIENT 4*),突变体的 α -生育酚含量降低。

油菜在生长过程中会从土壤中吸收多种营养元素,营养元素在植物的生命代谢中各自有不同的生理功能,相互间是不可代替的。硼(B)在细胞壁形成、花粉管生长、膜完整性、固氮、糖转运和植物代谢中起着关键作用。Feng等^[54]敲除 *BnA09.WRKY47*,突变体对低硼胁迫更敏感,而 *BnA09.WRKY47*的过表达系对低磷胁迫耐受。甘蓝型油菜是一种镉(Cd)超富集植物,对食品和饲料安全构成严重威胁。Yao等^[55]敲除 *BnCUP1* (*Cd UPTAKE-RELATED 1*),突变体降低了油菜植株体内镉的积累。磷(P)缺乏是影响油菜根系生长发育的主要环境因素。Xu等^[56]敲除 *BnGPR1* (*GLYCINE-RICH PROTEIN 1*),突变体植株对低磷胁迫更敏感,但是过表达系表现出对低磷胁迫的耐受性。

8)生物和非生物胁迫耐受性。油菜在生长发育过程中会受到生物和非生物胁迫的考验。油菜菌核病是油菜的一种重要病害,通常会导致5%~100%的田间产量损失。Sun等^[57]发现敲除 *BnWRKY70*的3个同源拷贝,突变体对菌核病的抗性增强。Cao等^[58]敲除 *BnF5H* (*FERULATE-5-HYDROXYLASE*)后,突变体的茎秆强度增加,茎叶对菌核病的抗性增强。Zhang等^[59]编辑 *BnQCR8*的1个或多个拷贝,获得的突变体均对菌核病和灰霉病具有较强的抗性,并且主要的农艺性状与野生型没有显著差

异。Geng 等^[60]敲除 *BnIDA* (*INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION*), 突变体表现出角果抗裂、花器官不脱落、抗菌核病等优良特性。Zhang 等^[61]敲除 *BnMPK3* (*MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 3*) 后, 突变体菌核病抗性降低, 但其过表达系对菌核病的抗性增强。Probsting 等^[62]敲除 *BnCRTL1a* (*CALRETICULIN1a*) 后突变体降低了对黄萎病的敏感性。

油菜生长过程中大部分时期对缺水十分敏感, 因此, 培育抗旱油菜品种至关重要。Wu 等^[63]敲除 *BnRGA* (*REGULATORS OF GA*) 的 4 个拷贝, 发现 *BnA06.RGA* 的突变体 *BnA6.rga-D* 抗旱性增强。Linghu 等^[64]敲除 U-box E3 泛素连接酶基因 *BnPUB18/19* (*Plant U-box 18/19*), 突变体耐旱性显著提高。而 Liu 等^[65]敲除 *BnSGI* (*STRESS AND GROWTH INTERCONNECTOR*) 后, 突变体对于干旱胁迫变得更敏感。Song 等^[66]敲除 *BnHOS1* (*HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES 1*) 增强了油菜耐寒性。

9) 其他。拟南芥同源域转录因子 *STM* (*SHOOT MERISTEMLESS*) 对于茎尖分生组织功能至关重要, 它与 *CLV3* (*CLAVATA3*)/*WUS* (*WUSCHEL*) 反馈调节通路配合维持茎尖分生组织中干细胞的稳态。Yu 等^[67]敲除 *BnSTM*, 突变体出现茎顶端发育异常、子叶柄融合的表型。通过敲除质体核苷酸转运蛋白基因 *BnNTT1* (*NUCLEOTIDE TRIPHOSPHATE TRANSPORTER 1*) 和 *BnNTT2*, 突变体均生长迟缓、类囊体发育异常以及光合效率低下^[68-69]。Wang 等^[70]敲除淀粉分支酶基因 *BnSBE* (*STARCH BRANCHING ENZYMES*) 6 拷贝突变体中淀粉结构改变。

2.2 CRISPR/Cas9 介导的其他编辑技术在甘蓝型油菜中的应用

传统的 CRISPR/Cas9 已成熟地用于甘蓝型油菜基因功能研究和种质资源创新, 同时碱基编辑技术 (CBE、ABE) 以及病毒介导的定点插入等基于 CRISPR/Cas9 的基因编辑技术也在甘蓝型油菜中有成功应用。

Cheng 等^[71]在甘蓝型油菜中建立并开发了由人 A3A 胞苷脱氨酶与 Cas9 切口酶和尿嘧啶糖基化酶抑制剂融合组成的 A3A-PBE 系统。设计了 3 种 sgRNA 分别靶向 *ALS* (*ACETOLACTATE SYNTHASE*)、*RGA* 和 *IAA7* (*INDOLE-3-ACETIC AC-*

ID 7) 基因。所有 3 个目标基因的碱基编辑效率均超过 20%。Hu 等^[72]对 4 个 CBE 系统进行了改造, 实现油菜中 5 个靶基因的胞苷碱基编辑。结果表明, 3 个 CBE 系统都能实现基因组编辑, 其中 *BnA3A1-PBE* 与之前报道的油菜 CBE 系统相比, 具有最高的碱基编辑效率 (最高达 50.5%)。 *BnA06.RGA* 和 *BnALS* 靶位点发生的胞苷取代可稳定遗传, 分别为矮化表型和用于杂草控制的除草剂抗性。Wu 等^[73]利用 CBE 编辑 *BnALS1* 和 *BnALS3*, 但在 T1 代仅得到 *BnALS1* 的编辑单株, 赋予了油菜苯磺隆抗性。

最近开发的腺嘌呤碱基编辑器 (ABE) 能够在高等植物真核细胞中实现高效、精确的 A 到 G 的碱基转换。Kang 等^[74]证明 ABE 系统可以通过瞬时转染成功应用于拟南芥和甘蓝型油菜的原生质体, 并通过农杆菌介导的转化成功应用于植物。在 *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) 蛋白中进行 A 到 G 替换, 产生单个氨基酸变化或 *PHYTOENE DESATURASE 3* (*PDS3*) 的 RNA 转录本的错误剪接, 从而获得分别具有晚花和白化表型的转基因植物。Hu 等^[75]改造了 4 个 ABE 骨架, 分别针对 *BnPDS*、*BnALS* 等 9 个基因设计了 18 个 sgRNA 进行不同 ABE 系统的效率测试, 在甘蓝型油菜中创建了有效的 ABE 单碱基编辑系统。

油菜在种植过程中经常受到杂草的影响, 培育抗除草剂品种是应对杂草威胁的有效途径。草甘膦对大面积的杂草防治非常有效, 对环境的危害很小。但由于其对油菜的毒性, 很少直接用于油菜田。研究表明, 在不同植物中, 烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸合成酶 (*enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase*, *EPSPS*) 的草甘膦结合位点突变赋予了对草甘膦的抗性。Wang 等^[76]为了在甘蓝型油菜中实现有效的基因替换, 采用了表达由来自铜绿假单胞菌的 CRISPR 相关 RNA 内切核糖核酸酶 *Csy4* 切割的单链引导 RNA (sgRNA) 的 CRISPR/Cas9 系统, 在内源性甘蓝型油菜 *EPSPS* 基因 *BnC04.EPSPS* 中实现了精确的基因替换, 氨基酸替换频率高达 20%。含有这些基因替换的油菜苗具有较强的草甘膦耐受性。

综上所述, 目前已有大量研究利用 CRISPR/Cas9 技术及其介导的 ABE 和 CBE 技术进行油菜基因功能鉴定与优异种质资源创新, 从多个方面改良了油菜种质资源, 我们从产量等 9 个方面进行分类和汇总 (表 1)。

表 1 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在甘蓝型油菜中的应用

Table 1 Application of CRISPR/Cas9 gene editing technologies in *Brassica napus*

性状 Traits	基因编辑技术 Gene editing technology	靶基因 Target gene	突变体表型 Mutant phenotype	参考文献 Reference
产量	CRISPR/Cas9	<i>BnCLV1/2/3</i>	多室角果	[9]
	CRISPR/Cas9	<i>BnEOD3</i>	种子变小,每角果粒数增加	[10]
	CRISPR/Cas9	<i>BnAP36s/39s</i>	结实率降低	[11]
	CRISPR/Cas9	<i>BnMAX1</i>	植株半矮化,分枝数增加	[12]
	CRISPR/Cas9	<i>BnD14</i>	矮化、多分枝、花器官增多	[13]
	CRISPR/Cas9	<i>BnA03.BP</i>	植株半矮化,株型紧凑	[14]
	CRISPR/Cas9	<i>BnBRI1</i>	植株矮化	[15]
	CRISPR/Cas9	<i>BnA10.LMI1</i>	叶片不裂	[16]
	CRISPR/Cas9	<i>BnA10.RCO</i>	叶片不裂	[17]
	CBE	<i>BnA06.RGA</i>	植株矮化	[72]
	CBE	<i>BnRGA、BnIAA7</i>	植株矮化	[71]
	CRISPR/Cas9	<i>BnLPAT2/5</i>	种子油体增大,含油量降低	[21]
	CRISPR/Cas9	<i>BnSFAR4/5</i>	种子含油量提高	[18]
	CRISPR/Cas9	<i>BnFAX1</i>	种子含油量提高	[19]
含油量和脂肪酸组成	CRISPR/Cas9	<i>BnBASS2</i>	种子含油量降低	[22]
	CRISPR/Cas9	<i>BnCIPK9</i>	种子含油量提高,ABA 含量提高	[20]
	CRISPR/Cas9	<i>BnFAD2</i>	种子油酸含量提高	[23]
	CRISPR/Cas9	<i>BnLEC1</i>	种子含油量和油酸含量降低,亚油酸含量提高	[24]
	CRISPR/Cas9	<i>BnPPT1</i>	植株发育迟缓,种子含油量降低	[25]
	CRISPR/Cas9	<i>BnALC</i>	抗裂角	[26]
抗裂角	CRISPR/Cas9	<i>BnJAG</i>	抗裂角	[27]
	CRISPR/Cas9	<i>BnIND</i>	抗裂角	[28]
	CRISPR/Cas9	<i>BnSHP1/2</i>	抗裂角	[29]
	CRISPR/Cas9	<i>BnTT2</i>	黄籽,种子含油量提高,脂肪酸组成改善	[30]
	CRISPR/Cas9	<i>BnTT8</i>	黄籽,种子含油量提高,脂肪酸组成改善	[32]
粒色花色等色泽相关性状	CRISPR/Cas9	<i>BnTT4</i>	黄籽,种子含油量提高,脂肪酸组成改善	[31]
	CRISPR/Cas9	<i>BnPAP2</i>	黄籽	[33]
	CRISPR/Cas9	<i>BnA09.ZEP/BnC09.ZEP</i>	橙色花瓣	[34]
	CRISPR/Cas9	<i>BnCRTISO</i>	乳白色花瓣,淡黄色叶片	[35]
	CRISPR/Cas9	<i>BnYCO</i>	子叶黄化,真叶失绿	[36]
	CRISPR/Cas9	<i>BnFtsH1</i>	子叶黄化	[37]
	CRISPR/Cas9	<i>BnSDG8</i>	早花	[39]
	CRISPR/Cas9	<i>BnTFL1</i>	早花,株型改变	[38]
开花时间和花发育	CRISPR/Cas9	<i>BnSVP</i>	早花	[40]
	CRISPR/Cas9	<i>BnCOL9</i>	早花	[41]
	CRISPR/Cas9	<i>BnSPL3</i>	植株发育迟缓,晚花	[42]
	CRISPR/Cas9	<i>BnAP2</i>	萼片一心皮修饰	[43]
	ABE	<i>BnFT、BnPDS3</i>	晚花、白化	[74]
	CRISPR/Cas9	<i>BnA5.ZML1</i>	自交亲和性降低	[45]
	CRISPR/Cas9	<i>BnS6-SMI2</i>	自交不亲和增强	[46]
	CRISPR/Cas9	<i>BnARC1</i>	自交不亲和性被完全抑制	[44]
育性	CRISPR/Cas9	<i>BnMS5a/BnMS5c</i>	雄性不育	[47]
	CRISPR/Cas9	<i>BnRFL11</i>	雄性不育	[48]
	CRISPR/Cas9	<i>BnCYP704B1</i>	雄性不育	[49]

续表 1 Continued Table 1

性状 Traits	基因编辑技术 Gene editing technology	靶基因 Target gene	突变体表型 Mutant phenotype	参考文献 Reference
营养成分	CRISPR/Cas9	<i>BnITPK</i>	种子植酸含量降低	[52]
	CRISPR/Cas9	<i>BnGTR2</i>	种子硫苷含量降低	[50-51]
	CRISPR/Cas9	<i>BnVTE4</i>	α -生育酚含量降低	[53]
	CRISPR/Cas9	<i>BnA09.WRKY47</i>	对低硼胁迫更敏感	[54]
	CRISPR/Cas9	<i>BnCUP1</i>	降低植株镉积累	[55]
	CRISPR/Cas9	<i>BnGPR1</i>	对低磷胁迫更敏感	[56]
	CRISPR/Cas9	<i>BnWRKY70</i>	抗菌核病	[57]
	CRISPR/Cas9	<i>BnQCR8</i>	抗菌核病和灰霉病	[59]
	CRISPR/Cas9	<i>BnF5H</i>	茎强度增加,抗菌核病	[58]
	CRISPR/Cas9	<i>BnMPK3</i>	菌核病抗性降低	[61]
生物和非生物胁迫耐受性	CRISPR/Cas9	<i>BnIDA</i>	角果抗裂、花器官抗脱落、抗菌核病	[60]
	CRISPR/Cas9	<i>BnCRT1a</i>	抗黄萎病	[62]
	CRISPR/Cas9	<i>BnEPSPS</i>	草甘膦抗性	[76]
	CRISPR/Cas9	<i>BnA06.RGA</i>	耐旱	[63]
	CRISPR/Cas9	<i>BnHOS1</i>	耐寒性增强	[66]
	CRISPR/Cas9	<i>BnSGI</i>	对干旱胁迫更敏感	[65]
	CRISPR/Cas9	<i>BnPUB18/19</i>	耐旱	[64]
	CBE	<i>BnALS</i>	抗除草剂	[71-73]
	CRISPR/Cas9	<i>BnSTM</i>	茎顶端发育异常,子叶柄融合	[67]
	CRISPR/Cas9	<i>BnNTT1</i>	类囊体发育异常,植株生长迟缓	[68]
其他	CRISPR/Cas9	<i>BnNTT2</i>	类囊体发育异常,植株生长迟缓	[69]
	CRISPR/Cas9	<i>BnSBE</i>	淀粉结构改变	[70]
	ABE	9个基因	无表型观察	[75]

3 展 望

CRISPR/Cas9 基因编辑技术显示出强大的、特异的、多重基因组编辑的能力,已广泛用于油菜重要性状的基础研究和遗传改良。但 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的潜力远远不止这些,未来该技术在油菜中应该会有更广阔的应用前景。

3.1 采用更加精确且多功能的基因编辑工具

CRISPR/Cas9 基因编辑技术虽然在油菜中已经建立了成熟的体系,但是大部分在油菜中的应用都是产生功能缺失突变体。然而许多有价值的性状是由单核苷酸多态性或者是精确设计的 indel 赋予的。因此,利用遗传多样性和精确修改基因组对于作物育种非常重要。到目前为止,除了 CBE 和 ABE 在油菜上有初步应用外,其他精确的基因编辑例如 GBE、双碱基编辑以及先导编辑 PE 均未在油菜中成功实现。如果能将这些精确且多功能的技术应用于油菜中,将会极大地提高基因编辑对油菜遗传改良的有

效性。

3.2 突破油菜遗传转化受体限制

目前为止,CRISPR/Cas9 在油菜中的应用主要依靠农杆菌介导的稳定转化来传递 CRISPR 载体。然而,一些优良的甘蓝型油菜品种往往由于缺乏适合再生的性状而不易转化。目前报道的农杆菌介导遗传转化的油菜品种有春性品种和半冬性品种,其中春性品种有 Westar、862、Haydn 等,半冬性品种有 J9707、J9712、ZS6 等。除此之外,对于那些难以转化的商品油菜品种,可以通过利用形态发生基因打破遗传转化的受体限制,玉米中已经成功利用形态发生基因 *WUS2* 和 *BBM* 实现了稳定的遗传转化。在过去的 30 a 里,基础研究为我们提供了关于控制形态发生基因的详细资料。这些见解将继续为测试形态发生基因提供灵感,并与控制表达的新方法一起,将导致不断改进,扩大适合转化的不同油菜品种的范围。此外,组织培养过程通常在技术上要求很高,耗时且费力。因此,开发无需组织培养的递送方法,

如纳米颗粒或病毒递送,将有助于进一步扩大CRISPR/Cas9在油菜中的应用。

3.3 利用CRISPR/Cas9在油菜中构建全基因组突变体文库

CRISPR/Cas9技术的高效率非常适合在各种生物体和细胞类型中进行高通量基因编辑。由于CRISPR/Cas9的靶向特异性是由1个20 bp的sgRNA赋予的,因此可以很容易地大规模地基于阵列合成寡核苷酸文库。这种强大的基因组级CRISPR/Cas9诱变系统已经成功地用于水稻和玉米的研究。例如,Lu等^[77]利用CRISPR/Cas9系统在水稻中进行基因组规模的诱变,并生成了靶向功能缺失突变体文库,为水稻研究和育种提供了有用的资源。Liu等^[78]将基于CRISPR/Cas9的多重高通量靶向诱变与遗传定位和基因组学方法相结合,成功靶向了743个与农艺和营养性状相关的候选基因。最近,He等^[79]使用CRISPR混合文库在甘蓝型油菜异源四倍体作物中实现基因组规模的靶向编辑,总共设计了18 414个sgRNA来靶向10 480个感兴趣的基因,随后获得了1 104株含有1 088个sgRNA的再生转基因植物,编辑结果显示,178个基因中有93个被鉴定为突变,编辑效率为52.2%。由此可见,利用CRISPR/Cas9实现高通量的靶向基因编辑,筛选大规模突变文库,将是发现改善油菜品种目标性状新基因的良好途径。

3.4 基因编辑技术应用的前提条件和限制因子

虽然CRISPR/Cas9基因编辑技术以其简单、高效的独特优势被广泛应用于油菜的基因功能研究和遗传改良,但是关于基因编辑技术的使用并非毫无限制。其使用的前提条件,一是需要对目标基因组有深入的了解,包括基因的功能和调控机制;二是需要严格的实验条件和操作规范,以确保基因编辑的准确性和安全性。

基因编辑技术并不是万能的,它同样具备一些限制因子:(1)细胞类型和组织的可编辑性。不同类型的细胞和组织基因编辑的可行性不同,有些细胞和组织基因编辑的效率较低;(2)基因编辑的准确性和安全性。基因编辑可能面临脱靶风险或其他不良影响,需要确保编辑的准确性和安全性;(3)道德和伦理问题。基因编辑涉及到生命和遗传信息的改变,需要考虑道德和伦理问题,以及相关的法律法规。

参考文献 References

- [1] 蒋金金,苏汉东,洪登峰,等.植物生物技术研究进展[J].植物生理学报,2023,59(8):1436-1462.JIANG J J, SU H D, HONG D F, et al. Advances and perspectives in plant biotechnology[J]. Plant physiology journal, 2023, 59(8): 1436-1462 (in Chinese with English abstract).
- [2] KOMOR A C, KIM Y B, PACKER M S, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage[J]. Nature, 2016, 533(7603): 420-424.
- [3] GAUDELLI N M, KOMOR A C, REES H A, et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage[J]. Nature, 2017, 551(7681): 464-471.
- [4] ZHAO D D, LI J, LI S W, et al. Glycosylase base editors enable C-to-A and C-to-G base changes[J]. Nature biotechnology, 2021, 39(1): 35-40.
- [5] ZHANG C, ZHONG X, LI S Y, et al. Artificial evolution of OsEPSPS through an improved dual cytosine and adenine base editor generated a novel allele conferring rice glyphosate tolerance[J]. Journal of integrative plant biology, 2023, 65(9): 2194-2203.
- [6] ANZALONE A V, RANDOLPH P B, DAVIS J R, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA[J]. Nature, 2019, 576(7785): 149-157.
- [7] SUN C, LEI Y, LI B S, et al. Precise integration of large DNA sequences in plant genomes using PrimeRoot editors[J]. Nature biotechnology, 2024, 42(2): 316-327.
- [8] 杨文文, 聂甲玥, 樊红霞, 等. 基因编辑技术在油菜中的应用[J]. 分子植物育种, 2023, 21(7): 2253-2261. YANG W W, NIE J Y, FAN H X, et al. Applications of gene editing in *Brassica napus* [J]. Molecular plant breeding, 2023, 21(7): 2253-2261 (in Chinese with English abstract).
- [9] YANG Y, ZHU K Y, LI H L, et al. Precise editing of CLAVATA genes in *Brassica napus* L. regulates multilocular silique development [J]. Plant biotechnology journal, 2018, 16(7): 1322-1335.
- [10] KHAN M H U, HU L M, ZHU M S, et al. Targeted mutagenesis of EOD3 gene in *Brassica napus* L. regulates seed production [J]. Journal of cellular physiology, 2021, 236(3): 1996-2007.
- [11] WANG L L, LIANG X M, DOU S W, et al. Two aspartic proteases, BnaAP36s and BnaAP39s, regulate pollen tube guidance in *Brassica napus* [J/OL]. Molecular breeding, 2023, 43(4): 27 [2023-08-15]. <https://doi.org/10.1007/s11032-023-01377-1>.
- [12] ZHENG M, ZHANG L, TANG M, et al. Knockout of two BnaMAX1 homologs by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis improves plant architecture and increases yield in rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. Plant biotechnology journal, 2020, 18(3): 644-654.

- [13] STANIC M, HICKERSON N M N, ARUNRAJ R, et al. Gene-editing of the strigolactone receptor *BnD14* confers promising shoot architectural changes in *Brassica napus* (Canola)[J]. Plant biotechnology journal, 2021, 19(4): 639-641.
- [14] FAN S H, ZHANG L, TANG M, et al. CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the *BnaA03.BP* gene confers semi-dwarf and compact architecture to rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. Plant biotechnology journal, 2021, 19(12): 2383-2385.
- [15] SONG M, BIN L H, HUANG S H, et al. Genome-wide survey of leucine-rich repeat receptor-like protein kinase genes and CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis *BnBRI1* in *Brassica napus* [J/OL]. Frontiers in plant science, 2022, 13: 865132 [2023-08-15]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.865132>.
- [16] HU L M, ZHANG H, YANG Q Y, et al. Promoter variations in a homeobox gene, *BnA10.LMI1*, determine lobed leaves in rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. Theoretical and applied genetics, 2018, 131(12): 2699-2708.
- [17] HU L M, ZHANG H, SUN Y X, et al. BnA10.RCO, a homeobox gene, positively regulates leaf lobe formation in *Brassica napus* L. [J]. Theoretical and applied genetics, 2020, 133(12): 3333-3343.
- [18] KARUNARATHNA N L, WANG H Y, HARLOFF H J, et al. Elevating seed oil content in a polyploid crop by induced mutations in seed fatty acid reducer genes [J]. Plant biotechnology journal, 2020, 18(11): 2251-2266.
- [19] LI Y Q, ALI U, CAO Z X, et al. Fatty acid exporter 1 enhances seed oil content in *Brassica napus* [J/OL]. Molecular breeding, 2022, 42 (12) : 75 [2023-08-15]. <https://doi.org/10.1007/s11032-022-01346-0>.
- [20] WANG N, TAO B L, MAI J M, et al. Kinase CIPK9 integrates glucose and abscisic acid signaling to regulate seed oil metabolism in rapeseed [J]. Plant physiology, 2023, 191 (3) : 1836-1856.
- [21] ZHANG K, NIE L L, CHENG Q Q, et al. Effective editing for lysophosphatidic acid acyltransferase 2/5 in allotetraploid rapeseed (*Brassica napus* L.) using CRISPR-Cas9 system [J/OL]. Biotechnology for biofuels, 2019, 12: 225 [2023-08-15]. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1567-8>.
- [22] TANG S, GUO N, TANG Q Q, et al. Pyruvate transporter BnaBASS2 impacts seed oil accumulation in *Brassica napus* [J]. Plant biotechnology journal, 2022, 20(12): 2406-2417.
- [23] HUANG H B, CUI T T, ZHANG L L, et al. Modifications of fatty acid profile through targeted mutation at *BnaFAD2* gene with CRISPR/Cas9-mediated gene editing in *Brassica napus* [J]. Theoretical and applied genetics, 2020, 133 (8) : 2401-2411.
- [24] YAN G B, YU P G, TIAN X, et al. DELLA proteins BnaA6.RGA and BnaC7.RGA negatively regulate fatty acid biosynthesis by interacting with BnaLEC1s in *Brassica napus* [J]. Plant biotechnology journal, 2021, 19(10): 2011-2026.
- [25] TANG S, PENG F, TANG Q Q, et al. BnaPPT1 is essential for chloroplast development and seed oil accumulation in *Brassica napus* [J]. Journal of advanced research, 2022, 42: 29-40.
- [26] BRAATZ J, HARLOFF H J, MASCHER M, et al. CRISPR-Cas9 targeted mutagenesis leads to simultaneous modification of different homoeologous gene copies in polyploid oilseed rape (*Brassica napus*) [J]. Plant physiology, 2017, 174 (2) : 935-942.
- [27] ZAMAN Q U, CHU W, HAO M Y, et al. CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing of *JAGGED* gene in *Brassica napus* L. [J/OL]. Biomolecules, 2019, 9 (11) : 725 [2023-08-15]. <https://doi.org/10.3390/biom9110725>.
- [28] ZHAI Y G, CAI S L, HU L M, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing reveals differences in the contribution of INDEHISCENT homologues to pod shatter resistance in *Brassica napus* L. [J]. Theoretical and applied genetics, 2019, 132 (7) : 2111-2123.
- [29] ZAMAN Q U, CHU W, SHI Y Q, et al. Characterization of *SHATTERPROOF* homoeologs and CRISPR-Cas9-mediated genome editing enhances pod-shattering resistance in *Brassica napus* L. [J]. The CRISPR journal, 2021, 4(3): 360-370.
- [30] XIE T, CHEN X, GUO T L, et al. Targeted knockout of *BnTT2* homologues for yellow-seeded *Brassica napus* with reduced flavonoids and improved fatty acid composition [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2020, 68 (20) : 5676-5690.
- [31] LI L, TIAN Z T, CHEN J, et al. Characterization of novel loci controlling seed oil content in *Brassica napus* by marker metabolite-based multi-omics analysis [J]. Genome biology, 2023, 24 (1) : 141 [2023-08-15]. <https://doi.org/10.1186/s13059-023-02984-z>.
- [32] ZHAI Y G, YU K D, CAI S L, et al. Targeted mutagenesis of *BnTT8* homologs controls yellow seed coat development for effective oil production in *Brassica napus* L. [J]. Plant biotechnology journal, 2020, 18(5): 1153-1168.
- [33] WEI H, JIAO R Y, CHENG H T, et al. Targeted mutations of the *BnPAP2* leads to yellow seed coat in *Brassica napus* L. [J]. J Integr Agr, 2024, 23(2): 724-730.
- [34] LIU Y J, YE S H, YUAN G G, et al. Gene silencing of *BnaA09.ZEP* and *BnaC09.ZEP* confers orange color in *Brassica napus* flowers [J]. The plant journal: for cell and molecular biology, 2020, 104(4): 932-949.
- [35] LI H L, YU K D, AMOO O, et al. Site-directed mutagenesis of the carotenoid isomerase gene *BnaCRTISO* alters the color of petals and leaves in *Brassica napus* L. [J/OL]. Frontiers in plant science, 2022, 13: 801456 [2023-08-15]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.801456>.
- [36] LIU T T, TAO B L, WU H F, et al. Bn.YCO affects chloro-

- plast development in *Brassica napus* L. [J]. The crop journal, 2021, 9(5): 992-1002.
- [37] XU K, SONG J R, WU Y J, et al. *Brassica* evolution of essential *BnaFtsH1* genes involved in the PSII repair cycle and loss of *FtsH5* [J/OL]. Plant science, 2022, 315: 111128 [2023-08-15]. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.111128>.
- [38] SRIBOON S, LI H T, GUO C C, et al. Knock-out of TERMINAL FLOWER 1 genes altered flowering time and plant architecture in *Brassica napus* [J/OL]. BMC genetics, 2020, 21(1): 52 [2023-08-15]. <https://doi.org/10.1186/s12863-020-00857-z>.
- [39] JIANG L, LI D H, JIN L, et al. Histone lysine methyltransferases BnaSDG8.A and BnaSDG8.C are involved in the floral transition in *Brassica napus* [J]. Plant J, 2018, 95: 672-685.
- [40] AHMAR S, ZHAI Y G, HUANG H B, et al. Development of mutants with varying flowering times by targeted editing of multiple *SVP* gene copies in *Brassica napus* L. [J]. The crop journal, 2022, 10(1): 67-74.
- [41] GUO J, ZENG L, CHEN H, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of *BnaCOL9* advances the flowering time of *Brassica napus* L. [J/OL]. International journal of molecular sciences, 2022, 23(23): 14944 [2023-08-15]. <https://doi.org/10.3390/ijms232314944>.
- [42] LI C, HAO M Y, WANG W X, et al. An efficient CRISPR/Cas9 platform for rapidly generating simultaneous mutagenesis of multiple gene homoeologs in allotetraploid oilseed rape [J/OL]. Frontiers in plant science, 2018, 9: 442 [2023-08-15]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00442>.
- [43] ZHANG Y F, HUANG S H, WANG X F, et al. Defective *APETALA2* genes lead to sepal modification in *Brassica* crops [J/OL]. Frontiers in plant science, 2018, 9: 367 [2023-08-15]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00367>.
- [44] CHEN F, YANG Y, LI B, et al. Functional analysis of M-locus protein kinase revealed a novel regulatory mechanism of self-incompatibility in *Brassica napus* L. [J/OL]. International journal of molecular sciences, 2019, 20(13): 3303 [2023-08-15]. <https://doi.org/10.3390/ijms20133303>.
- [45] DUAN Z Q, ZHANG Y T, TU J X, et al. The *Brassica napus* GATA transcription factor BnaA5.ZML1 is a stigma compatibility factor [J]. Journal of integrative plant biology, 2020, 62(8): 1112-1131.
- [46] DOU S W, ZHANG T, TU J X, et al. Generation of novel self-incompatible *Brassica napus* by CRISPR/Cas9 [J]. Plant biotechnology journal, 2021, 19(5): 875-877.
- [47] XIN Q, WANG X, GAO Y P, et al. Molecular mechanisms underpinning the multiallelic inheritance of MS5 in *Brassica napus* [J]. The plant journal, 2020, 103(5): 1723-1734.
- [48] FAROOQ Z, NOUMAN RIAZ M, FAROOQ M S, et al. Induction of male sterility by targeted mutation of a restorer-of-fertility gene with CRISPR/Cas9-mediated genome editing in *Brassica napus* L. [J/OL]. Plants, 2022, 11(24): 3501 [2023-08-15]. <https://doi.org/10.3390/plants11243501>.
- [49] WANG Z L, ZHANG Y F, SONG M, et al. Genome-wide identification of the cytochrome P450 superfamily genes and targeted editing of *BnCYP704B1* confers male sterility in rapeseed [J/OL]. Plants, 2023, 12(2): 365 [2023-08-15]. <https://doi.org/10.3390/plants12020365>.
- [50] HE Y Z, YANG Z Q, TANG M Q, et al. Enhancing canola breeding by editing a glucosinolate transporter gene lacking natural variation [J]. Plant physiology, 2022, 188(4): 1848-1851.
- [51] TAN Z D, XIE Z Q, DAI L H, et al. Genome- and transcriptome-wide association studies reveal the genetic basis and the breeding history of seed glucosinolate content in *Brassica napus* [J]. Plant biotechnology journal, 2022, 20(1): 211-225.
- [52] SASHIDHAR N, HARLOFF H J, POTGIETER L, et al. Gene editing of three *BnITPK* genes in tetraploid oilseed rape leads to significant reduction of phytic acid in seeds [J]. Plant biotechnology journal, 2020, 18(11): 2241-2250.
- [53] ZHANG H Y, SHI Y Q, SUN M D, et al. Functional differentiation of *BnVTE4* gene homologous copies in α -tocopherol biosynthesis revealed by CRISPR/Cas9 editing [J/OL]. Frontiers in plant science, 2022, 13: 850924 [2023-08-15]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.850924>.
- [54] FENG Y N, CUI R, WANG S L, et al. Transcription factor BnaA9.WRKY47 contributes to the adaptation of *Brassica napus* to low boron stress by up-regulating the boric acid channel gene *BnaA3.NIP5; I* [J]. Plant biotechnology journal, 2020, 18(5): 1241-1254.
- [55] YAO J Y, BAI J Y, LIU S, et al. Editing of a novel Cd uptake-related gene *CUP1* contributes to reducing cd accumulations in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* [J/OL]. Cells, 2022, 11(23): 3888 [2023-08-15]. <https://doi.org/10.3390/cells11233888>.
- [56] XU P, LI H Y, XU K, et al. Genetic variation in the glycine-rich protein gene BnGRP1 contributes to low phosphorus tolerance in *Brassica napus* [J]. Journal of experimental botany, 2023, 74(12): 3531-3543.
- [57] SUN Q F, LIN L, LIU D X, et al. CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing of the *BnWRKY11* and *BnWRKY70* genes in *Brassica napus* L. [J/OL]. International journal of molecular sciences, 2018, 19(9): 2716 [2023-08-15]. <https://doi.org/10.3390/ijms19092716>.
- [58] CAO Y R, YAN X Y, RAN S Y, et al. Knockout of the lignin pathway gene BnF5H decreases the S/G lignin compositional ratio and improves *Sclerotinia sclerotiorum* resistance in *Brassica napus* [J]. Plant, cell & environment, 2022, 45(1): 248-261.

- [59] ZHANG X K, CHENG J S, LIN Y, et al. Editing homologous copies of an essential gene affords crop resistance against two cosmopolitan necrotrophic pathogens [J]. *Plant biotechnology journal*, 2021, 19(11): 2349-2361.
- [60] GENG R, SHAN Y, LI L, et al. CRISPR-mediated BnaIDA editing prevents silique shattering, floral organ abscission, and spreading of *Sclerotinia sclerotiorum* in *Brassica napus* [J/OL]. *Plant communications*, 2022, 3(6): 100452 [2023-08-15]. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2022.100452>.
- [61] ZHANG K, ZHUO C J, WANG Z X, et al. BnaA03.MKK5-BnaA06.MPK3/BnaC03.MPK3 module positively contributes to *Sclerotinia sclerotiorum* resistance in *Brassica napus* [J/OL]. *Plants*, 2022, 11(5): 609 [2023-08-15]. <https://doi.org/10.3390/plants11050609>.
- [62] PRÖBSTING M, SCHENKE D, HOSSAIN R, et al. Loss of function of CRT1a (calreticulin) reduces plant susceptibility to *Verticillium longisporum* in both *Arabidopsis thaliana* and oilseed rape (*Brassica napus*) [J]. *Plant biotechnology journal*, 2020, 18(11): 2328-2344.
- [63] WU J J, YAN G B, DUAN Z Q, et al. Roles of the *Brassica napus* DELLA protein BnaA6. RGA, in modulating drought tolerance by interacting with the ABA signaling component BnaA10. ABF2 [J/OL]. *Frontiers in plant science*, 2020, 11: 577 [2023-08-15]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00577>.
- [64] BIN L H, SONG M, MU J X, et al. Comprehensive analysis of U-box E3 ubiquitin ligases gene family revealed BnPUB18 and BnPUB19 negatively regulated drought tolerance in *Brassica napus* [J/OL]. *Industrial crops and products*, 2023, 200: 116875 [2023-08-15]. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116875>.
- [65] LIU J, LIU J, DENG L B, et al. An intrinsically disordered region-containing protein mitigates the drought-growth trade-off to boost yields [J]. *Plant physiology*, 2023, 192(1): 274-292.
- [66] SONG M, BIN L H, HUANG S H, et al. Identification of nuclear pore complexes (NPCs) and revealed outer-ring component BnHOS1 related to cold tolerance in *B. napus* [J]. *International journal of biological macromolecules*, 2022, 223(Pt A): 1450-1461.
- [67] YU K D, LI H L, WU X L, et al. Targeted mutagenesis of *BnaSTM* leads to abnormal shoot apex development and cotyledon petiole fusion at the seedling stage in *Brassica napus* L. [J/OL]. *Frontiers in plant science*, 2023, 14: 1042430 [2023-08-15]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1042430>.
- [68] HONG Y, XIA H, LI X, et al. *Brassica napus* BnaNTT1 modulates ATP homeostasis in plastids to sustain metabolism and growth [J/OL]. *Cell reports*, 2022, 40(2): 111060 [2023-08-15]. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111060>.
- [69] XIA H, HONG Y, LI X, et al. *BnaNTT2* regulates ATP homeostasis in plastid to sustain lipid metabolism and plant growth in *Brassica napus* [J/OL]. *Molecular breeding: new strategies in plant improvement*, 2022, 42(9): 54 [2023-08-15]. <https://doi.org/10.1007/s11032-022-01322-8>.
- [70] WANG L P, WANG Y, MAKHMOUDOVA A, et al. CRISPR-Cas9-mediated editing of starch branching enzymes results in altered starch structure in *Brassica napus* [J]. *Plant physiology*, 2022, 188(4): 1866-1886.
- [71] CHENG H T, HAO M Y, DING B L, et al. Base editing with high efficiency in allotetraploid oilseed rape by A3A-PBE system [J]. *Plant biotechnology journal*, 2021, 19(1): 87-97.
- [72] HU L M, AMOO O, LIU Q Q, et al. Precision genome engineering through cytidine base editing in rapeseed (*Brassica napus* L.) [J/OL]. *Frontiers in genome editing*, 2020, 2: 605768 [2023-08-15]. <https://doi.org/10.3389/fgeed.2020.605768>.
- [73] WU J, CHEN C, XIAN G Y, et al. Engineering herbicide-resistant oilseed rape by CRISPR/Cas9-mediated cytosine base editing [J]. *Plant biotechnology journal*, 2020, 18(9): 1857-1859.
- [74] KANG B C, YUN J Y, KIM S T, et al. Precision genome engineering through adenine base editing in plants [J]. *Nature plants*, 2018, 4(7): 427-431.
- [75] HU L M, ZHAI Y G, XU L, et al. Precise A·T to G·C base editing in the allotetraploid rapeseed (*Brassica napus* L.) genome [J]. *Journal of cellular physiology*, 2022, 237(12): 4544-4550.
- [76] WANG Z R, WAN L L, XIN Q, et al. Optimizing glyphosate tolerance in rapeseed by CRISPR/Cas9-based geminiviral donor DNA replicon system with Csy4-based single-guide RNA processing [J]. *Journal of experimental botany*, 2021, 72(13): 4796-4808.
- [77] LU Y M, YE X, GUO R M, et al. Genome-wide targeted mutagenesis in rice using the CRISPR/Cas9 system [J]. *Molecular plant*, 2017, 10(9): 1242-1245.
- [78] LIU H J, JIAN L M, XU J T, et al. High-throughput CRISPR/Cas9 mutagenesis streamlines trait gene identification in maize [J]. *The plant cell*, 2020, 32(5): 1397-1413.
- [79] HE J J, ZHANG K, YAN S X, et al. Genome-scale targeted mutagenesis in *Brassica napus* using a pooled CRISPR library [J]. *Genome research*, 2023, 33(5): 798-809.

CRISPR/Cas9 based gene editing and its application in *Brassica napus* L.

XU Lei, HE Hanzi, FAN Chuchuan

National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement/Hubei Hongshan Laboratory,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Rapeseed is the second largest oil crop in the world and the most important source of edible vegetable oil in China. Rapeseed breeders have attempted to breed elite varieties through traditional breeding schemes for a long time. However, *Brassica napus* L. is an allotetraploid species that evolved from double diploidization after interspecific hybridization, and there is a significant amount of gene redundancy in its genome. Therefore, the efficiency of improving traits through traditional genetic methods including artificial hybridization selection and random mutagenesis is very low. In recent years, CRISPR/Cas9 technology has been widely used in studying gene function and targeted genetic improvement of polyploid rapeseed due to its unique advantages of high efficiency and simplicity. It is timely to apply CRISPR/Cas9 gene editing technology to *Brassica napus* L. for the rapid and efficient innovation of germplasm resource and genetic improvement. This article reviewed the progress towards the application of CRISPR/Cas9 system in studying gene function and genetic improvement of rapeseed, involving important agronomic traits such as yield, the content of oil, the composition of fatty acid, the tolerance of biological and abiotic stress. The limitations of gene editing in rapeseed and the directions for future development were discussed as well.

Keywords CRISPR/Cas9; gene editing; *Brassica napus* L.; innovation of germplasms; crop genetic improvement

(责任编辑:张志钰)