

DOI: 10.16861/j.cnki.zggc.2025.0751

CRISPR/Cas9 技术在茄科作物遗传改良中的应用研究进展

张铭洋¹, 王丹¹, 康国菊¹, 曾祥飞¹, 吕春悦¹, 胡新喜^{1,2}, 熊兴耀^{1,2,3}

(1. 湖南农业大学园艺学院·蔬菜生物学湖南省重点实验室·湖南省马铃薯工程技术研究中心 长沙 410128; 2. 岳麓山实验室蔬菜品种创制中心 长沙 410128; 3. 中国农业科学院深圳农业基因组研究所 广东深圳 440307)

摘要: 基因编辑技术为作物遗传改良提供了重要手段。CRISPR/Cas9 系统作为第三代基因编辑工具, 借助向导 RNA 特异性识别靶位点, 依靠 Cas9 核酸酶在目标基因位点实现基因敲除、替换或者插入等精确编辑。CRISPR/Cas9 基因编辑工具凭借设计简便、靶向性强、效率高等优势, 在植物功能基因解析及新品种创制方面发挥了重要作用。茄科作物如马铃薯、番茄、辣椒等是全球关键的经济作物, 在粮食安全以及农业发展中占据关键地位, 但其生产常受到病虫害、逆境胁迫以及品质缺陷等因素限制。笔者概述了 CRISPR/Cas9 技术的基本原理, 剖析 CRISPR/Cas9 技术在编辑效率、特异性等方面所面临的挑战, 综述其在茄科作物遗传改良中的应用成果, 以期为茄科作物精准育种研究与生产实践提供科学参考。

关键词: 茄科作物; CRISPR/Cas9; 基因编辑; 性状改良

中图分类号: S641+S532

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2026)04-001-12

Research progress on the application of CRISPR/Cas9 technology in genetic improvement of Solanaceae crops

ZHANG Mingyang¹, WANG Dan¹, KANG Guojun¹, ZENG Xiangfei¹, LÜ Chunyue¹, HU Xinxi^{1, 2}, XIONG Xingyao^{1, 2, 3}

(1. College of Horticulture, Hunan Agricultural University/Hunan Province Key Laboratory of Vegetable Biology/Hunan Provincial Potato Engineering Research Center, Changsha 410128, Hunan, China; 2. Vegetable Variety Creation Center of Yuelushan Laboratory, Changsha 410128, Hunan, China; 3. Shenzhen Institute of Agricultural Genomics, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shenzhen 440307, Guangdong, China)

Abstract: Gene editing technology provides a crucial tool for crop genetic improvement. As a third-generation gene editing tool, the CRISPR/Cas9 system utilizes guide RNA to specifically recognize target sites and relies on the Cas9 nuclease to achieve precise editing: Such as gene knockout, replacement, or insertion—at the target gene locus. With advantages including simple design, strong targeting specificity, and high efficiency, the CRISPR/Cas9 gene editing tool has played a vital role in plant functional gene analysis and new variety creation. Solanaceae crops, such as potato, tomato, and pepper, are globally vital economic crops occupying a pivotal position in food security and agricultural development. However, their production is often constrained by factors including pests and diseases, abiotic stress, and quality defects. This paper outlines the fundamental principles of CRISPR/Cas9 technology, analyzes the challenges in editing efficiency and specificity, and reviews its application achievements in the genetic improvement of Solanaceae crops, aiming to provide a scientific reference for precision breeding research and production practices in Solanaceae crops.

Key words: Solanaceae crops; CRISPR/Cas9; Gene editing; Trait improvement

茄科(Solanaceae)是重要的经济作物, 对保障粮食安全、提升人类营养健康水平以及推动农业经济发展有着重要意义。在实际生产过程中大多受

到病虫害、逆境以及品质问题的限制, 传统育种方式难以契合现代农业对于精准度和效率的要求。在 CRISPR/Cas9 技术成熟以前, 锌指核酸酶(zinc

收稿日期: 2025-11-04; 修回日期: 2025-12-15

基金项目: 国家重点研发计划(2023YFD1201505)

作者简介: 张铭洋, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为马铃薯基因编辑、抗病生理。E-mail: 448659169@qq.com

通信作者: 熊兴耀, 男, 教授, 主要从事马铃薯遗传育种与作物种质创新研究。E-mail: xiongxyao@126.com

finger nuclease, ZFN)和转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator like effector nucleases, TALENs)技术虽实现了靶向编辑,但是其设计较为复杂,效率也有限,应用受到了阻碍^[1-2]。CRISPR/Cas9 呈现出了更高的编辑效率以及更低的脱靶风险,已在水稻(*Oryza sativa*)、小麦(*Triticum aestivum*)、玉米(*Zea mays*)等重要作物中成功应用。茄科作物在基因编辑研究领域具有独特优势,番茄基因组较小且已完成高质量测序,为基因功能研究提供了理想平台。此外,番茄和马铃薯已建立了高效、稳定的遗传转化体系,能够实现外源基因的快速导入和再生植株的高效获得,为基因编辑技术的验证与应用提供了可靠平台。这些特性使茄科作物不仅成为植物基因功能研究的模式材料,也成为推动精准育种技术发展的前沿载体。笔者回顾了CRISPR/Cas9 技术的发展历程,探讨了CRISPR/Cas9 技术在编辑效率、特异性等方面所面临的挑战,重点分析了该技术在马铃薯、番茄等茄科作物中的应用策略与成效,期望可为推动CRISPR/Cas9 技术在茄科作物精准育种中的应用提供理论参考和技术支持。

1 CRISPR/Cas9技术的原理与发展

CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)技术为生物基因组的精确修饰与修复提供了革命性工具。CRISPR-Cas 系统的全称为规律成簇间隔短回文重复序列以及CRISPR 相关蛋白(CRISPR-associated protein, Cas),是一种存在于细菌和古细菌中的天然免疫机制,用于抵御噬菌体病毒和外源DNA 的入侵^[3]。CRISPR/Cas 系统根据效应蛋白组成可分为两大类:一类为I、III、IV型系统,包含多蛋白复合物;另一类为II、V、VI型,仅需单个Cas 蛋白即可完成对靶序列的识别与切割^[4]。目前,广泛应用于植物基因编辑的是来源于化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的II型Cas9 系统。

1.1 CRISPR/Cas9技术原理

CRISPR/Cas9 系统由CRISPR RNA(crRNA)、反式激活crRNA(tracrRNA)和Cas9 蛋白构成。系统通过识别外源DNA 的原间隔邻近基序(proto-spacer adjacent motif, PAM)启动免疫应答机制,常用的SpCas9 系统的PAM 序列为5'-NGG-3'。当相同的外源DNA 再次入侵时,前导区转录的前体RNA(pre-crRNA)与tracrRNA 形成复合体,经核糖核酸酶III(RNase III)加工生成的成熟crRNA 与

Cas9 蛋白识别外源DNA 并通过其核酸酶活性精准剪切靶标序列。CRISPR/Cas9 的HNH 结构域切割互补链,而RuvC 结构域切割非互补链,最终导致双链断裂以清除外源DNA^[5]。

1.2 CRISPR/Cas9技术的发展

CRISPR 序列最早发现于大肠杆菌基因组中,Jansen 等^[6]通过比较微生物基因组结构,将其正式命名为CRISPR,同时提出了CRISPR 相关蛋白(Cas)的I-III型分类体系。Jinek 等^[7]将crRNA 与tracrRNA 融合为单链向导RNA (sgRNA),开发出可编程的CRISPR/Cas9 基因编辑系统。随后,此系统成功应用于哺乳动物细胞及多种植物的基因组定向修饰,开创了植物基因工程新时代^[8-9]。2015—2018 年间,多种新型Cas 蛋白(如Cas12a、Cas13a 等)的发现进一步丰富了CRISPR 工具库^[10-11]。单碱基编辑技术的出现实现了无需DNA 双链断裂的精准碱基替换。引导编辑系统能够实现单碱基的自由转换,以及小片段的精准插入与删除。它突破了传统CRISPR/Cas9 对PAM 序列的依赖和碱基编辑对转换类型的限制,可以编辑得更多更精准,也开始运用在茄科作物基因编辑中^[12]。在编辑工具不断向更精准、更灵活的方向演进的同时,基因组操纵的尺度与范围也取得了重大突破。Sun 等^[13]发明的新型可编程的染色体水平大片段DNA 精准操纵技术PCE(programmable chromosome engineering),在动植物中实现千碱基至兆碱基级别DNA 的精准、无痕操纵,提升了在真核基因组中进行大范围、可编程重排的能力。基因组编辑工具已初步形成了从点突变到染色体结构变异的多尺度、精准化操作体系,为基因组功能研究与作物遗传改良提供了更为全面的技术支撑。

2 CRISPR/Cas9技术在茄科作物中的应用

在茄科作物研究中,以马铃薯和番茄为基础的CRISPR/Cas9 技术体系已日趋完善。科研团队借助靶向编辑关键功能基因,在抗病、抗逆、品质和农艺性状改良等方面取得了一定进展。

2.1 抗病性改良

茄科植物的抗病性研究主要聚焦于对感病基因(S 基因)的编辑,敲除植物体内的这类基因可以使其获得广谱且持久的抗性。在马铃薯晚疫病抗性改良中,Nam 等^[14]从植物免疫信号通路中筛选出调控细胞程序性死亡的*StDND1*、参与叶绿素合成

的 *StCHL1* 等基因,对不同的 sgRNA 系统进行评分,选择最适的 sgRNA 对上述基因进行敲除,4 个等位基因全敲除的 *StDND1*、*StCHL1* 突变体晚疫病抗性明显增强。*StCHL1* 突变体表型和野生型一致, *StDND1* 突变体呈现生长缓慢、叶片皱缩的表型。通过精准设计靶向不同免疫通路感病基因的 sgRNA,可有效打破植物的感病性,获得的抗病性状在 T1 代中能够稳定遗传; Moon 等^[15]设计 3 种 gRNA 借助 RNP 递送编辑 *StSR4* 基因,编辑效率最高达 34%。突变体中水杨酸大量积累,下游抗病基因 *StPRI* 激活,从而显著增强了马铃薯对致病疫霉菌的抗性,但抗性性状与生长抑制的矮化表型紧密连锁,尤其在水杨酸积累极高的突变株系中更为显著;研究人员对马铃薯 *StERF3*、*StNRL1* 和 *StPM1* 等易感基因进行编辑,也成功培育出表型正常对晚疫病敏感度下降的遗传材料,且其他表型无明显变化^[16-18]。

在白粉病抗性研究中, *Mlo* (mildew resistance locus o) 基因家族的 *Mlo1* 是典型的感病基因,研究人员利用 CRISPR/Cas9 敲除 *SIMlo1* 基因,成功培育出非转基因且抗白粉病的番茄种质^[19];在此基础上 Pramanik 等^[20]引入双靶点 CRISPR/Cas9 系统靶向 *SIMlo1*, 获得基因序列大片段缺失的抗病植株; Santillan 等^[21]设计 4 对 sgRNA 对白粉病易感 *PMR4* 基因定向编辑,突变体中出现了多种 4-900 bp 的缺失、1 bp 的插入和 892 bp 的倒位情况,突变植株对白粉病的抗性显著提高,病理表明明显缓解。在辣椒中, Kim 等^[22]采用 CRISPR/Cas9-RNP 技术,将 CRISPR/Cas9 复合物转染到辣椒 CM334 和甜椒 Dempsey 的纯分离原生质体中。测序分析结果表明, *CaMlo2* 基因在 2 个品种中进行了差异编辑,2 个品种的抗病性均有所提升。

Saikia 等^[23]对番茄中编码脯氨酸富含蛋白(Hy-PRP1)的 *SIHyPRP1* 与 *SIDEA1* 基因进行双基因编辑,显著增强了番茄对枯萎病的耐受性。Sanchez-Leon 等^[24]针对易感炭疽病辣椒品种中的 *CaERF28* 基因设计了由 Pol II 启动子驱动 Cas9 的高效编辑系统。在 T0 代植株中实现了 72.5% 的突变效率,而采用多靶点策略后效率进一步提升至 85.7%。通过对 T1 和 T2 代的分离,成功筛选出了不含 T-DNA 及选择标记的抗病纯合突变系。*DMR6* (down mildew resistance 6) 基因作为水杨酸信号通路的关键负调控因子,在茄科作物抗病育种中展现出高度保守的功能特性。Nam 等^[14]利用

Cas9 技术获得的 *StDMR6-2* 突变体矮化且晚疫病抗性没有明显提高,完全敲除 4 个等位基因 *StDMR6-1* 的突变体对晚疫病的抗性显著增强且生长正常; Thomazella 等^[25]利用 CRISPR/Cas9 技术,针对番茄 *SIDMR6-1* 的第 2 和第 3 外显子设计了 2 个 sgRNA 进行编辑,成功获得了 T0 代纯合的稳定突变体株系。突变体表现出广谱且持久的抗病性,能有效抵御丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)、辣椒疫霉(*Phytophthora capsica*)等多种病原菌的侵染,该抗病性状在后代中稳定遗传,其性状与体内水杨酸水平升高及免疫响应基因的增强相关;在茄子抗病育种领域,经 *SmDMR6-1* 基因编辑的 T1、T2 代植株对致病疫霉和辣椒疫霉的抗性均有提升,病斑面积明显缩减^[26]。

在病毒病害防控方面,研究者建立了多维度干预策略。翻译起始因子 eIF4E 是许多植物对多病毒隐性抗性的主要来源, Luciola 等^[27]通过特异性敲除 *eIF4E1* 基因,使 PVYNTN 症状明显减轻且没有改变马铃薯 eIF4E 基因家族其他成员的 mRNA 稳态水平,为实现更广泛的抗性提供精细的编辑策略基础。Wang 等^[28]则采用 SIDCL 亚家族基因协同编辑策略建立番茄多重抗病毒防线,此外特异性靶向病毒衣壳蛋白编码区,可有效抑制番茄黄化曲叶病毒(TYLCV)的基因组复制^[29]。CRISPR 系统还被开发为高效病原检测工具, Besati 等^[30]将 CRISPR-Cas12a/Cas9 与重组酶聚合酶扩增技术结合,实现了对番茄棕色皱纹果病毒(ToBRFV)的快速检测,为病害早期预警与防控提供了新手段。

2.2 抗逆性改良

随着全球气候变化加剧,抗逆育种的重要性日益凸显。在马铃薯中,帽结合蛋白 CBP80 参与脱落酸(ABA)信号通路,通过靶向马铃薯 *StCBP80* 基因可以增强植株的耐旱能力,编辑后的品系在干旱胁迫下,表现出较低的产量损失^[31]。在番茄中, MAPK 级联系统通过信号转导参与调节植物抗旱反应,以番茄中的丝裂原激活蛋白激酶 SIMAPK3 为目标,构建 Cas9 编辑系统,与 WT 植物相比, *sl-mapk3* 突变体在干旱胁迫下表现出更严重的萎蔫症状、过氧化氢含量提高、抗氧化酶活性降低和产生膜损伤,验证了 *SIMAPK3* 通过保护细胞膜免受氧化损伤和调节胁迫相关基因的转录来参与番茄植株的干旱反应^[32]。 *CPK28*^[33]、*ATG10*^[34]、*SILBD40*^[35]、*CBF1*^[36] 基因功能的逐渐阐明揭示了植株应对高温、干旱、低温等胁迫的分子机制。在耐

热性研究领域,已从单一基因功能验证发展到对复杂调控网络的解析与操纵。Liang 等^[37]发现 *SIJA2L* 能够整合高温胁迫与果实成熟信号,通过直接激活 *SIHsfA3* 和 *SICAT3* 增强耐热性,并通过调控 *SLA-COI* 影响乙烯合成,从而同时协调耐热性与果实成熟进程。CGFS 型谷氧还蛋白(CGFS-type glutaredoxin, GRX)是植物的稳态调节因子,靶向编辑多个 GRXS 家族基因均显示番茄植株对热、冷、干旱、重金属等多种非生物胁迫的耐受性增强^[38]。

Veillet 等^[39]通过 CBE 靶向编辑番茄和马铃薯中的乙酰乳酸合酶基因(*ALS*),成功创制了除草剂抗性株系,该系统在番茄中的编辑效率高达 71%。对根寄生杂草相关基因 *SIMAX1* 的精准修饰为创制除草剂抗性种质提供了新路径^[40]。为了研究茄科作物对恶劣环境胁迫的响应机制,Zhou 等^[41]利用 CRISPR/Cas9 靶向编辑 *StPHO1*,突变体显示出茎鲜质量降低和根鲜质量增加的典型缺磷表型,突变体也积累了更多的花青素,根中的可溶性磷含量更高,茎中的含量更低,证实了 *StPHO1;1* 在马铃薯磷运输中起着重要作用。

2.3 品质改良

随着社会经济的发展,消费者对农产品的感官品质、食用特性、营养成分及健康效益提出了更高要求。马铃薯淀粉组分中直链与支链结构的比例会对品质造成影响,编辑颗粒结合淀粉合成酶基因(*granule-bound starch synthase, GBSS*)降低马铃薯中直链淀粉含量,一定程度上提升了加工性能。设计 3 个不同的 sgRNA 靶向 *GBSS* 基因不同部位,有 2%~12%的再生芽发生至少有 1 个等位基因发生突变,在 10%的分析品系中也发现了 34~236 bp 的载体 DNA 插入片段^[42]。为提升编辑效率,将 CRISPR/Cas9 系统中拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)启动子 AtU6 替换为马铃薯自身启动子 StU6,得到 4 个 *GBSS* 等位基因同时编辑的效率为 35%的编辑体系^[43]。为了解决基因编辑过程中外源 DNA 插入的问题,将 CRISPR/Cas9-RNP 导入原生质体中,9%的突变株不含有外源 DNA 片段^[44]。淀粉支酶(*starch-branching enzymes, SBE*)是支链淀粉形成过程中的关键酶。Tuncel 等^[45]将靶向 *SBE1* 和 *SBE2* 基因的 Cas9-sgRNA 构建体转染到马铃薯原生质体中,创制了长链支链淀粉含量增加的优质马铃薯品系。

低温糖化导致马铃薯加工时美拉德反应加剧,生成类黑色素和潜在致癌物丙烯酰胺,严重影响薯

片、薯条等产品的色泽与食用安全。Shumbe 等^[46]敲除 *VINV* 基因, Vojta 等^[47]利用 CRISPR-dCas9-DRM2 技术对 *VINV* 启动子进行甲基化修饰抑制基因表达,均获得低还原糖含量的马铃薯品系,缓解低温糖化现象。高量的糖苷生物碱(steroidal alkaloids and their glycosylated forms, SGAs)会导致马铃薯产生苦味,影响食用品质和安全。Nakayasu 等^[48]针对编码类固醇 16 α -羟化酶(steroid 16 α -hydroxylase)的 *St16DOX* 基因引入 pMgP237 载体,使用马铃薯毛状根培养系统快速筛选可有效突变 *St16DOX* 基因的 9 个候选 gRNA,创制了马铃薯根毛中没有龙葵素积累的材料,有助于在短期内评估候选 gRNA 靶序列的功效。Zheng 等^[49]在马铃薯品种大西洋中编辑 *StSSR2* 基因,获得 64 个突变系,其中 6.25%发生插入突变,与野生型植株相比,编辑后植株的叶片、薯皮、薯肉中的龙葵素含量显著降低。多酚氧化酶(polyphenol oxidases, PPOs)可催化酚类物质的氧化反应,导致块茎在采收及加工过程中发生酶促褐变,损害其商品外观与营养品质。Gonzalez 等^[50]用 CRISPR/Cas9 编辑 Desiree 品种的 *StPPO2* 基因,通过 RNP 转染得到 24%的四等位基因突变体,突变体的块茎 PPO 活性降低 69%,酶促褐变减少 73%,货架期也随之延长。Sashidhar 等^[51]借助 CRISPR/Cas9 编辑 *SmelPPO4*、*SmelPPO5* 和 *SmelPPO6* 基因的保守区域,培育出酶促褐变程度显著降低的茄子。通过 CRISPR/Cas9 技术诱变茄子 *SmelPPO2* 酪氨酸酶 CuA 结合域,所得突变体种子早萌率提高,成苗植株呈现矮化分枝特征,果实成熟时间缩短,褐变发生延迟^[52]。这一结果揭示了 PPO 基因的潜在多效性调控网络,凸显了 CRISPR/Cas9 技术在茄科植株功能基因研究与定向育种中的巨大潜力。

果实质地是农作物商品化生产中的关键品质指标,通过遗传改良延长采后贮藏期始终是育种研究的核心目标之一。果胶裂解酶(pectate lyase, PL)在果实软化过程中可以分解细胞壁,基于 CRISPR/cas9 技术敲除 *SIPL* 基因,突变体表现出更坚固的果实表型和更长的货架期,而不降低感官和营养品质^[53],为番茄果实相关基因功能研究建立了新的研究方法。*CNR* (colorless non-ripening) 和 *NOR* (non-ripening) 是调节番茄果实成熟的主要基因,*CNR* 突变体株系表现为果实延迟成熟,*NOR* 突变体株系则表现为果实部分不成熟^[54]。在作物育种工作中,果实的发育以及产量的提升占据着极

为关键的地位。AP2/ERF (ethylene-responsive factor, APETALA2) 转录因子 *SIENO* 对花分生组织活性起到调控作用,对 *SIENO* 基因进行编辑后,结果表明 *ENO* 直接调节 *SIWUS* 表达域以维持花干细胞稳态,*ENO* 基因突变导致植物产生更大的多室果实^[55],番茄转化酶基因 *LIN*^[56]和编码 GA2 氧化酶 *FISI* 基因^[57]的验证则为改良果实硬度和适应长日环境提供了新靶点。

在番茄品质分析中可溶性糖含量也是重要指标,*INVINHI* (inhibitor of the acid invertase gene) 基因抑制细胞壁转化酶活性,*SIVPE5* 编码液泡糖转运蛋白,二者共同调控蔗糖向果实的运输与卸载代谢途径。*SIINVINHI* 的单基因敲除^[58]及其与 *SIVPE5* 的双基因共编辑^[59]在有效编辑位点产生了移码突变,破坏了基因功能。与野生型相比,编辑突变体的果实可溶性固形物含量显著提升,并且单果质量和植株生长未受影响。通过对糖分代谢通路中多个关键节点基因进行协同编辑,可以规避单一基因编辑可能带来的补偿效应,实现品质性状的突破性改良。该优良性状在 T1 代群体中稳定遗传,证明了该策略在培育高糖度番茄品种中的巨大潜力。*SGRI* (stay-green1) 是番茄红素代谢途径中的关键基因,利用 CRISPR/Cas9 系统进行敲除,*sgr1* 突变体的番茄红素含量提高 5.1 倍,成功提高了番茄红素和 β -胡萝卜素等抗氧化物质含量^[60]。组成型光形态建成的 *CSN5B* 基因是植物合成维生素 C 的抑制因子,安焯森等^[61]编辑 *SICSN5B* 基因提高番茄果实中维生素 C 含量,为后续培育优质番茄新品种提供了材料。

CRISPR/Cas9 基因编辑技术还应用于改变果实颜色。八氢番茄红素合成酶 (phytonene synthase, PSY) 编码植物八氢番茄红素合成酶,调控类胡萝卜素合成的早期步骤。靶向敲除 *PSY1* 降低了番茄红素总含量,导致番茄果实呈黄色。在杂交 F₁ 代中,通过 CRISPR/Cas9 在双亲等位基因的突变位点之间诱导 DSB,成功观察到了由 HR 修复产生的红色果肉^[62],证明体细胞同源重组可以作为一种有效的育种策略,为实现模块化、智能化的下一代精准育种提供了关键的理论依据和技术支撑。*MYB12* 作为类黄酮生物合成途径转录因子,可影响类黄酮的积累,利用 CRISPR/Cas9 技术敲除 *SIMYB12* 基因可以高效地获得粉红色果实^[63]。类胡萝卜素异构酶 (carotenoid isomerase, CRITISO) 参与类胡萝卜素合成途径,敲除红果番茄的 *CRTISO* 获得了橙色果

实的突变体^[64]。Vu 等^[65]以 *ANTI* 为靶基因培育出花青素含量较高的紫色番茄。基因编辑技术除了能改良马铃薯内在品质,还能提升外观品质和挖掘产量潜力。Wulff 等^[66]通过编辑 *F3H* 基因改变了马铃薯表皮色泽,让 Deserichan 和 Nansen 两个马铃薯品种的红色表皮变成了黄色。

2.4 其他农艺性状改良

四倍体马铃薯基因组高度杂合导致纯合周期长,利用二倍体野生近缘种来生产自交系需要打破自交不亲和的限制。为克服四倍体遗传复杂性,研究人员转向依靠基因编辑技术推进二倍体育种。通过 CRISPR/Cas9 靶向编辑 *S-RNase* 等位基因,成功获得了 *S-RNase* 双等位基因突变的自交亲和性马铃薯材料^[67-68],加速了优良种质资源的创制进程,同时敲除在花粉中特异表达的 *Sli* 基因,为利用野生资源开展杂交育种提供了新方式^[69]。马铃薯单倍体育种技术也取得突破,*DMP* (domain of unknown function679 membrane protein) 基因的功能缺失可在多种植物中诱导单倍体的形成,Zhang 等^[70]利用 CRISPR/Cas9 系统敲除 *StDMP* 基因,结合荧光筛选标记,建立了高效的双单倍体育种技术体系,将传统育种周期显著缩短。这一突破为快速获得纯合二倍体自交系、解决马铃薯基因组杂合性导致的育种难题提供了工具,极大地推动了二倍体马铃薯杂交育种的发展进程。

除抗病、抗逆及果实品质等主要性状外,CRISPR/Cas9 技术还在茄科其他关键农艺性状的精准改良中展现出巨大潜力,在促进杂交制种、适应智慧农业模式等前沿领域还取得了一系列突破。番茄中,*AGL6* (aga-mous-like6),*IAA9* (auxin/indole-3-acetic acid9) 等基因被证明与植株单性结实有关,通过编辑 *SIAGL6*^[71]、*SIAA9*^[72]和 *SIARF7*^[73]调控番茄单性结实基因,成功创制了在热激条件下仍能维持正常单果质量的番茄单性结实材料,有效保障了逆境中的稳定结实;*SISTR1* 基因编码的 STR 蛋白(异胡豆苷合成酶)参与萜类吲哚生物碱合成途径,对雄蕊发育和花粉活力具有调控作用。Du 等^[74]靶向敲除雄蕊特异性基因 *SISTR1*,成功构建出花粉活力完全丧失的雄性不育系。同时还研发了配套保持系,能在幼苗期通过胚轴颜色筛选植株,建立起无转基因成分的杂交制种体系。Choi 等^[75]设计多种 sgRNA 靶向编辑辣椒单性结实相关基因 *PADI*,实现辣椒单性结实性状的有效改良,为培育新型无籽辣椒品种提供了新方向。

传统育种方法在驯化野生植物时常伴随遗传多样性丧失和抗逆性下降等问题。野生番茄虽然拥有极强的抗病性与耐盐性,但其果实通常较小,植株结构松散且开花周期较长,这些特性均使其难以满足商业化种植需求。Li 等^[76]利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术对野生番茄进行驯化研究,该团队不仅编辑控制开花时间的 *SP5G*、*SP* 基因的编码序列,还创新性地对 *SICLV3* 启动子、*SIWUS* 下游的 *CArG* 抑制元件以及 *SIGGPI* 上游开放阅读框进行了精准编辑,成功将紧凑株型、早花性状以及果实增大等关键驯化性状精准导入野生番茄,这些性状在后代中能够稳定保持,编辑后的植株保留了野生亲本对细菌性斑点病和盐胁迫的强大抗性。编辑 *SP*^[77]和 *SP5G*^[78] 基因可培育出株型紧凑、具有有限生长习性的番茄新种质,这类株型既便于机械化采收也适配机器人授粉作业,为番茄工厂化生产提供了可行方案。这些突破性进展充分证实了 CRISPR/Cas9 技术在番茄遗传改良与育种领域具备广阔的应用前景。

主要茄科作物的基因编辑研究进展详见表 1。

3 CRISPR/Cas9 技术应用面临的挑战与优化策略

3.1 编辑特异性的提升与效率的优化

要实现 CRISPR/Cas9 系统在茄科作物中的高效精准编辑,需要从系统设计以及外部条件等多个维度协同优化。*sgRNA* 是决定 Cas9 靶向精度的关键因素,设计时要避开 poly-T 以及 GNGG 等容易脱靶的序列,选择富含 G 且缺乏 A 的 *sgRNA*,还可采用截短型 *sgRNA* 或者双 *sgRNA* 提高结合特异性来降低脱靶风险^[79-80]。挖掘可识别更为宽松 PAM 的 Cas 同源蛋白以及可以识别 NGN 和 NRN 类型 PAM 的 SpG 与 SpRY 突变体^[81],使得可编辑基因组位点的数量增加,扩大了 CRISPR/Cas9 在不同物种中的应用范围。CRISPR/Cas9 编辑效率受 Cas9 蛋白表达水平、温度以及物种特异性等多种因素影响。采用物种优化的启动子及密码子优化的 Cas9 序列可保证体系高效表达^[82]。短暂的热激处理被证实可以提高 Cas9 蛋白的酶活性,进而提高 Cas9 在拟南芥、马铃薯等植物中的编辑效率^[83-84]。

3.2 多元递送系统的开发与应用

多数茄科作物特别是辣椒和马铃薯,遗传转化效率通常不高,还存在基因型依赖的情况。这使得设计出精准的 *sgRNA* 或者选用高效的 Cas 突变体也很难实现稳定表达和有效递送,阻碍了基因编辑

工具在茄科作物中的开发与应用。解决了“怎样编辑”的技术问题后,“怎样高效递送”就成了限制茄科作物基因编辑技术发展的关键。Yuan 等^[85]建立了双启动子高效瞬时表达系统,借助农杆菌侵染提高了编辑效率,且有效降低了植株中 Cas9 的残留。对于像马铃薯这类高度杂合的四倍体作物,没有外源 DNA 整合的 CRISPR/Cas9 RNP (CRISPR/Cas9 Ribonucleoprotein) 编辑方法呈现出独特优势,还能有效避免近交抑制的风险^[85]。利用改造后的病毒载体进行系统性递送,不用经过复杂的组织培养就能实现高效的体细胞编辑,并已在番茄、辣椒中得到了无病毒与转基因残留的再生植株^[86-87]。最近有研究发现,植物胚胎发生相关肽的表达能促进植物的体细胞胚胎发生和芽再生。把这类再生因子与高效的视觉报告系统 RUBY 结合,构建“双轨”递送系统^[88],有可能打破基因型依赖,给辣椒、马铃薯等作物的高效转化带来希望。这些多样化的递送体系为不同作物及不同研究目标提供了灵活高效的技术选择。

4 展望

随着 CRISPR/Cas9 技术在茄科作物育种中的深入应用,其研究重心正从技术验证转向解决实际育种难题。未来该领域的发展将聚焦于突破以下几个核心瓶颈:

一是编辑工具在复杂基因组作物中的应用仍存在效率与特异性瓶颈。马铃薯育种面临的首要问题在于其同源四倍体基因组的复杂性,多等位基因的存在使得完全敲除目标基因变得困难,而脱靶风险则可能引发非预期突变。针对这一问题,通过开发多重 *sgRNA* 编辑系统,设计特异性靶向不同等位基因的多个 *sgRNA*,并借助新型 Cas 变体或利用稀有 PAM 识别序列,有望显著降低脱靶风险,提升编辑操作的可靠性与稳定性。同时,优化外植体的状态以及热处理的时间和温度等培养条件,并将其与其他优化策略协同使用,对提高编辑效率至关重要。此外,也可以结合人工智能辅助的 *sgRNA* 设计平台,系统性地提升编辑精准度。

二是遗传转化与递送效率是限制其在优良品种中应用的关键障碍。高效的遗传转化体系仍局限于少数模式品种,大多数优良栽培种难以转化。辣椒等物种外植体褐化严重,无法产生可再生的阳性细胞系,而且畸形苗出现的比例很高,严重制约了基因编辑技术的应用。未来应重点开发不依赖

表1 主要茄科作物的基因编辑研究

Table 1 Gene editing research on major Solanaceae crops

研究方向 Research direction	植物 Plant	目标基因 Target gene	目标性状 Target trait	参考文献 Reference
抗病性改良 Improvement of disease resistance	马铃薯 Potato	<i>StDND1</i>	提高晚疫病抗性	[14]
		<i>StCHL1</i>	提高晚疫病抗性	[14]
		<i>StDMR6-1</i>	提高晚疫病抗性	[15]
		<i>StDMR6-2</i>	提高晚疫病抗性	[15]
		<i>StSR4</i>	提高晚疫病抗性	[15]
			提高晚疫病抗性	[15]
		<i>StERF3</i>	提高晚疫病抗性	[16]
			提高晚疫病抗性	[16]
		<i>StNRL1</i>	提高晚疫病抗性	[17]
			提高晚疫病抗性	[17]
	番茄 Tomato	<i>StPM1</i>	提高晚疫病抗性	[18]
			提高晚疫病抗性	[18]
		<i>elF4E1</i>	提高马铃薯 Y 病毒抗性	[27]
			提高马铃薯 Y 病毒抗性	[27]
		<i>StMlo1</i>	提高白粉病抗性	[19-20]
			提高白粉病抗性	[19-20]
		<i>PMR4</i>	提高白粉病和晚疫病抗性	[21]
			提高白粉病和晚疫病抗性	[21]
		<i>SlHyPRP1</i>	提高枯萎病抗性	[23]
		<i>SIDEA1</i>	提高枯萎病抗性	[23]
茄子 Eggplant 辣椒 Pepper	<i>SIDMR6</i>	提高多重抗病能力	[25]	
		提高多重抗病能力	[25]	
	<i>SIDCL2a</i>	提高马铃薯 X 病毒和烟草花叶病毒抗性	[28]	
	<i>SIDCL2b</i>	提高马铃薯 X 病毒和烟草花叶病毒抗性	[28]	
	<i>SIDCL2d</i>	提高马铃薯 X 病毒和烟草花叶病毒抗性	[28]	
	<i>TYLCV Rep, Cp</i>	提高番茄黄化曲叶病抗性	[29]	
		提高番茄黄化曲叶病抗性	[29]	
	<i>ToBRFV</i>	检测番茄棕色皱纹果病毒	[30]	
		检测番茄棕色皱纹果病毒	[30]	
	<i>SmDMR6</i>	提高致病疫霉和辣椒疫霉抗性	[26]	
辣椒 Pepper	<i>CaMLO2</i>	提高白粉病抗性	[22]	
		提高白粉病抗性	[22]	
	<i>CaERF28</i>	提高抗炭疽病抗性	[24]	
抗逆性改良 Improvement of stress resistance	马铃薯 Potato	<i>StCBP80</i>	提高抗旱性	[31]
			提高抗旱性	[31]
		<i>StALS</i>	提高抗除草剂能力	[39]
			提高抗除草剂能力	[39]
		<i>StMYB44</i>	证实 <i>StMYB44</i> 参与调控 <i>StPHO1</i> 表达	[41]
	番茄 Tomato	<i>SIMAPK3</i>	揭示耐热调节机制	[32]
			揭示耐热调节机制	[32]
		<i>CPK28</i>	提高耐热性	[33]
			提高耐热性	[33]
		<i>ATG10</i>	提高抗旱性	[34]
			提高抗旱性	[34]
		<i>SILBD40</i>	提高抗旱性	[35]
			提高抗旱性	[35]
		<i>CBF1</i>	提高抗寒性	[36]
			提高抗寒性	[36]
品质改良 Improvement of quality	马铃薯 Potato	<i>SlJA2L</i>	揭示耐热及果实成熟调节机制	[37]
			揭示耐热及果实成熟调节机制	[37]
		<i>SIGRXS14</i>	提高抗非生物胁迫能力	[38]
		<i>SIGRXS15</i>	提高抗非生物胁迫能力	[38]
	马铃薯 Potato	<i>SIGRXS16</i>	提高抗非生物胁迫能力	[38]
		<i>SIGRXS17</i>	提高抗非生物胁迫能力	[38]
		<i>ALS</i>	提高抗除草剂能力	[39]
		<i>SIMAX1</i>	提高抗除草剂能力	[40]
马铃薯 Potato	<i>StGBSS</i>	降低块茎中直链淀粉比例	[42-44]	
	<i>SBE1</i>	降低块茎中直链淀粉比例	[45]	
	<i>SBE2</i>	降低块茎中直链淀粉比例	[45]	

表1 (续)
Table 1 (Continued)

研究方向 Resarch direction	植物 Plant	目标基因 Target gene	目标性状 Target trait	参考文献 Reference
		<i>VINV</i>	降低低温糖化程度 Reduce the degree of low temperature saccharification	[46-47]
		<i>St16DOX</i>	降低龙葵素含量 Reduce the content of solanine	[48]
		<i>StSSR2</i>	降低龙葵素含量 Reduce the content of solanine	[49]
		<i>StPPO2</i>	降低酶褐变程度 Reduce the degree of enzymatic browning	[50]
		<i>F3H</i>	改变薯皮颜色 Change the color of potato peel	[66]
	番茄 Tomato	<i>SIPL</i>	延长果实保质期 Extend the shelf life of fruit	[53]
		<i>CNR</i> <i>NOR</i>	延长果实保质期 Extend the shelf life of fruit	[54]
		<i>SIENO</i>	改善果实大小 Improve fruit size	[55]
		<i>LIN</i>	改善果实硬度 Improve fruit hardness	[56]
		<i>FIS1</i>	改善果实硬度 Improve fruit hardness	[57]
		<i>SIINVINH1</i>	提高果实可溶性糖含量 Increase the soluble sugar content of fruit	[58]
		<i>SIVPE5</i>	提高果实可溶性糖含量 Increase the soluble sugar content of fruit	[59]
		<i>SGR1</i>	提高番茄红素含量 Increase the content of lycopene	[60]
		<i>SICSN5B</i>	提高果实维生素C含量 Increase the content of vitamin C in fruit	[61]
		<i>PSY1</i>	黄色果实 Yellow fruit	[62]
		<i>SIMYB12</i>	粉红色果实 Pink fruit	[63]
		<i>CRTISO</i>	橙黄色果实 Orange fruit	[64]
		<i>ANT1</i>	紫色果实 Purple fruit	[65]
	茄子 Eggplant	<i>SmelPPO4</i> <i>SmelPPO5</i> <i>SmelPPO6</i>	降低酶褐变程度 Reduce the degree of enzymatic browning	[51]
		<i>SmelPPO2</i>	改善株型、降低酶促褐变程度 Improve plant type, reduce the degree of enzymatic browning	[52]
其他农艺 性状改良 Improvement of other agronomic traits	马铃薯 Potato	<i>S-RNase</i>	自交亲和 Make self-affinity	[67-68]
		<i>Sli</i>	自交亲和 Make self-affinity	[69]
		<i>StDMP</i>	自交亲和 Make self-affinity	[70]
	番茄 Tomato	<i>SIAGL6</i>	单性结实 Make unisexual solid	[71]
		<i>SI1AA9</i>	单性结实 Make unisexual solid	[72]
		<i>SIARF7</i>	单性结实 Make unisexual solid	[73]
		<i>SISTR1</i>	单性结实 Make unisexual solid	[74]
		<i>SP5G</i> <i>SP</i>	野生番茄驯化 Make wild tomatoes domesticated	[76]
		<i>SICLV3</i> <i>SIWUS</i> <i>SIGGP1</i>		
		<i>SP</i>	改善株型 Improve plant type	[77]
		<i>SP5G</i>	改善株型 Improve plant type	[78]
	辣椒 Pepper	<i>PADI</i>	单性结实 Make unisexual solid	[75]

基因型的通用递送平台,可以通过建立“RUBY+再生小肽”双轨系统,结合病毒介导的瞬时转化技术,优化基因型筛选报告基因、改进转化流程,完善RNP转化技术等多种方法突破基因型依赖的限制。同时要优化外植体的选择,改良培养基的配方,精确控制培养条件,系统解决遗传转化效率低下的问题。

三是重要农艺性状多受多基因网络控制,单一基因编辑难以实现突破性改良。同时,单碱基编辑器、双碱基编辑器及引导编辑器等新型编辑工具各具特点,但在不同园艺作物中的适用性及编辑效果存在显著差异。未来可以建立基于多组学数据的编辑效果预测模型,为不同育种目标(如精准点突变、小片段插入删除等)提供编辑工具选择依据,开发适用于不同园艺作物的特异性编辑器及其组合使用方案,整合多重编辑技术以实现代谢通路中多个关键节点的协同改造与精细调控。将基因编辑技术与智慧农业的需求进行深度融合,以此培育出契合现代农业发展需求的新一代优良品种。

参考文献

- [1] MUSSOLINO C, ALZUBI J, FINE E J, et al. TALENs facilitate targeted genome editing in human cells with high specificity and low cytotoxicity[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(10): 6762-6773.
- [2] ZHANG X M, JIN X, SUN R, et al. Gene knockout in cellular immunotherapy: Application and limitations [J]. *Cancer Letters*, 2022, 540: 215736.
- [3] ADLI M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 1911.
- [4] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-1712.
- [5] ZHU M, XU R D, YUAN J S, et al. Tracking-seq reveals the heterogeneity of off-target effects in CRISPR-Cas9-mediated genome editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2025, 43(5): 799-810.
- [6] JANSEN R, VAN EMBDEN J D A, GAASTRA W, et al. Identification of a novel family of sequence repeats among prokaryotes[J]. *Omics: A Journal of Integrative Biology*, 2002, 6(1): 23-33.
- [7] 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.
- [8] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas Systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [9] CAI Y, CHEN L, SUN S, et al. CRISPR/Cas9-mediated deletion of large genomic fragments in soybean[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(12): 3835.
- [10] COX D B T, GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, et al. RNA editing with CRISPR-Cas13[J]. *Science*, 2017, 358(6366): 1019-1027.
- [11] HARRINGTON L B, BURSTEIN D, CHEN J S, et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes[J]. *Science*, 2018, 362(6416): 839-842.
- [12] VU T V, NGUYEN N T, KIM J, et al. The obstacles and potential solution clues of prime editing applications in tomato[J]. *Biodesign Research*, 2022: 0001.
- [13] SUN C, LI H C, LIU Y J, et al. Iterative recombinase technologies for efficient and precise genome engineering across kilobase to megabase scales[J]. *Cell*, 2025, 188(17): 4693-4710.
- [14] NAM P K, LENMAN M, WANG E S, et al. Mutations introduced in susceptibility genes through CRISPR/Cas9 genome editing confer increased late blight resistance in potatoes[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 4487.
- [15] MOON K B, PARK S J, PARK J S, et al. Editing of *StSR4* by Cas9-RNPs confers resistance to *Phytophthora infestans* in potato[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 997888.
- [16] RAZZAQ H A, IJAZ S, HAQ U I, et al. Functional inhibition of the *StERF3* gene by dual targeting through CRISPR/Cas9 enhances resistance to the late blight disease in *Solanum tuberosum* L.[J]. *Molecular Biology Reports*, 2022, 49(12): 11675-11684.
- [17] BI W, LIU J, LI Y, et al. CRISPR/Cas9-guided editing of a novel susceptibility gene in potato improves *Phytophthora* resistance without growth penalty[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2024, 22(1): 4-6.
- [18] NOROUZI M, NAZARAIN-FIROUZABADI F, ISMAILI A, et al. CRISPR/Cas StNRL1 gene knockout increases resistance to late blight and susceptibility to early blight in potato[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2024, 14: 1278127.
- [19] NEKRASOV V, WANG C, WIN J, et al. Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 482.
- [20] PRAMANIK D, SHELAKE 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): 1878.
- [21] SANTILLAN M 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.
- [22] KIM H, CHOI J, WON K H. A stable DNA-free screening system for CRISPR/RNPs-mediated gene editing in hot and sweet cultivars of *Capsicum annum*[J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1): 449.
- [23] SAIKIA B, REMYA S, DEBBARMA J, et al. CRISPR/Cas9-based genome editing and functional analysis of SIHy-PRP1 and SIDEA1 genes of *Solanum lycopersicum* L. in imparting genetic tolerance to multiple stress factors[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2024, 15: 1304381.

- [24] SANCHEZ-LEON S, GIL-HUMANES J, OZUNA C V, et al. Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(4):902-910.
- [25] 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):1-11.
- [26] FERRERO M, VALENTINO D, MILANI A M, et al. Enhancing tolerance to *Phytophthora* spp. in eggplant through DMR6-1 CRISPR/Cas9 knockout[J]. *Plant Stress*, 2024, 14:100691.
- [27] LUCIOLI A, TAVAZZA R, BAIMA S, et al. CRISPR-Cas9 targeting of the *eIF4E1* gene extends the potato virus Y resistance spectrum of the *Solanum tuberosum* L. cv. Désirée[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13:873930.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] BESATI M, SAFARNEJAD M R, ALIAHMADI A, et al. Detection of tomato brown rugose fruit virus through CRISPR-Cas12a and CRISPR-Cas9 systems[J]. *Scientific Reports*, 2025, 15(1):25638.
- [31] SALARIA N, SIDDAPPA S, THAKUR K, et al. *Solanum tuberosum* (CYCLING DOF FACTOR) CDF1.2 allele: A candidate gene for developing earliness in potato[J]. *South African Journal of Botany*, 2020, 132:242-248.
- [32] 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):8674-8682.
- [33] HU Z J, LI J X, DING S T, et al. The protein kinase CPK28 phosphorylates ascorbate peroxidase and enhances thermotolerance in tomato[J]. *Plant Physiology*, 2021, 186(2):1302-1317.
- [34] MINGMING H, WU J T, YANG Y, et al. The HsfA1a-BAG5b module mediates thermotolerance through activating autophagy in tomato[J]. *Plant Physiology*, 2025, 199(3):526.
- [35] 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, 301:110683.
- [36] 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):9042-9051.
- [37] LIANG Y F, FANG M, HUANG S, et al. Multifunctional NAC transcription factor SIJA2L integrates the ethylene pathway to orchestrate thermotolerance and fruit ripening in tomato[J]. *The New Phytologist*, 2025, 248(5):2409-2427.
- [38] 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):1263-1279.
- [39] 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.
- [40] 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(1):3905.
- [41] ZHOU X, ZHA M, HUANG J, et al. StMYB44 negatively regulates phosphate transport by suppressing expression of PHOSPHATE1 in potato[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68(5):1265-1281.
- [42] ANDERSSON M, TURESSON H, NICOLIA A, et al. Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts[J]. *Plant Cell Reports*, 2017, 36(1):117-128.
- [43] JOHANSEN I E, LIU Y, JORGENSEN B, et al. High efficacy full allelic CRISPR/Cas9 gene editing in tetraploid potato[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1):17715.
- [44] ANDERSSON M, TURESSON H, OLSSON N, et al. Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery[J]. *Physiol Plant*, 2018, 164(4):378-384.
- [45] TUNCEL A, CORBIN K R, AHN-JARVIS J, et al. Cas9-mediated mutagenesis of potato starch-branching enzymes generates a range of tuber starch phenotypes[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(12):2259-2271.
- [46] SHUMBE L, VISSÉ M, SOARES E, et al. Differential DNA methylation in the *Vinv* promoter region controls cold induced sweetening in potato[J]. *Biorxiv*, 2020, 4:062562.
- [47] VOJTA A, DOBRINIC P, TADIC V, et al. Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(12):5615-5628.
- [48] NAKAYASU M, AKIYAMA R, LEE H J, et al. Generation of α -solanine-free hairy roots of potato by CRISPR/Cas9 mediated genome editing of the *St16DOX* gene[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, 131:70-77.
- [49] ZHENG Z, YE G, ZHOU Y, et al. Editing sterol side chain reductase 2 gene (*StSSR2*) via CRISPR/Cas9 reduces the total steroidal glycoalkaloids in potato[J]. *All Life*, 2021, 14(1):401-413.
- [50] GONZALEZ M N, MASSA G A, ANDERSSON M, et al. Reduced enzymatic browning in potato tubers by specific editing of a polyphenol oxidase gene via ribonucleoprotein complexes delivery of the CRISPR/Cas9 system[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10:1649.
- [51] 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.
- [52] KODACKATTUMANNIL P, LEKSHMI G, KOTTACKAL M, et al. Hidden pleiotropy of agronomic traits uncovered by CRISPR-Cas9 mutagenesis of the tyrosinase CuA-binding domain of the polyphenol oxidase 2 of eggplant[J]. *Plant Cell Reports*, 2023, 42(4):825-828.
- [53] WANG D D, SAMSULRIZAL N H, YANG C, et al. Characterization of CRISPR mutants targeting genes modulating pectin degradation in ripening tomato[J]. *Plant Physiology*, 2019, 179(2):544-557.
- [54] GAO Y, ZHU N, ZHU X, et al. Diversity and redundancy of the ripening regulatory networks revealed by the fruit ENCODE and the new CRISPR/Cas9 CNR and NOR mutants[J]. *Horticulture Research*, 2019, 6:39.
- [55] YUSTE-LISBONA F J, FERNANDEZ-LOZANO A, PINEDA B, et al. ENO regulates tomato fruit size through the floral meristem development network[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(14):8187-8195.
- [56] SOYK S, LEMMON Z H, OVED M, et al. Bypassing negative epistasis on yield in tomato imposed by a domestication gene[J]. *Cell*, 2017, 169(6):1142-1155.
- [57] LI R, SUN S, WANG H J, et al. *FISI* encodes a GA2-oxidase that regulates fruit firmness in tomato[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1):5844.
- [58] KAWAGUCHI K, TAKEI-HOSHI R, YOSHIKAWA I, et al. Functional disruption of cell wall invertase inhibitor by genome editing increases sugar content of tomato fruit without decrease fruit weight[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1):21534.
- [59] WANG B K, LI N, HUANG S Y, et al. Enhanced soluble sugar content in tomato fruit using CRISPR/Cas9-mediated *SIINVINH1* and *SIVPE5* gene editing[J]. *PeerJ*, 2021, 9:e12478.
- [60] 杨亮,刘欢,马燕勤,等.利用 CRISPR/Cas9 技术创制高番茄红素番茄新材料[J]. *园艺学报*, 2024, 51(2):253-265.
- [61] 安焯森,王雁伟,田文超,等.基于 CRISPR/Cas9 技术创制高维生素 C 番茄材料[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2025, 41(3):460-469.
- [62] HAYUT S F, MELAMED BESSUDO C, LEVY A A. Targeted recombination between homologous chromosomes for precise breeding in tomato[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1):15605.
- [63] 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.
- [64] BEN SHLUSH I, SAMACH A, MELAMED-BESSUDO C, et al. CRISPR/Cas9 induced somatic recombination at the *CRTISO* locus in tomato[J]. *Genes*, 2021, 12(1):59.
- [65] VU T V, SIVANKALYANI V, KIM E J, et al. Highly efficient homology-directed repair using CRISPR/Cpf1-geminiviral replicon in tomato[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(10):2133-2143.
- [66] WULFF V A, ANDERSSON M, BRURBERG M B, et al. Colour change in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers by disruption of the anthocyanin pathway via ribonucleoprotein complex delivery of the CRISPR/Cas9 system [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2024, 157(2):25.
- [67] YE M W, PENG Z, TANG D, et al. Generation of self-compatible diploid potato by knockout of *S-RNase*[J]. *Nature Plants*, 2018, 4(9):651-654.
- [68] ENCISO R F, MANRIQUE-CARPINTERO N C, NADAKUDUTI S S, et al. Overcoming self-incompatibility in diploid potato using CRISPR-Cas9[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10:376.
- [69] EGGERS E J, VAN DER B A, VAN H S A W, et al. Neofunctionalisation of the *Sli* gene leads to self-compatibility and facilitates precision breeding in potato[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1):4141.
- [70] ZHANG J Z, YIN J, LUO J Y, et al. Construction of homozygous diploid potato through maternal haploid induction[J]. *aBIOTECH*, 2022, 3(3):163-168.
- [71] 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.
- [72] UETA R, ABE C, WATANABE T, et al. Rapid breeding of parthenocarpic tomato plants using CRISPR/Cas9 [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1/4):507.
- [73] HU J H, ISRAELI A, ORI N M, et al. The interaction between DELLA and ARF/IAA mediates crosstalk between gibberellin and auxin signaling to control fruit initiation in tomato[J]. *Plant Cell*, 2018, 30(8):1710-1728.
- [74] DU M M, ZHOU K, LIU Y Y, et al. A biotechnology-based male-sterility system for hybrid seed production in tomato[J]. *Plant Journal*, 2020, 102(5):1090-1100.
- [75] CHOI H Y, SHIN H, KIM C Y, et al. Highly efficient CRISPR/Cas9-RNP mediated *CaPAD1* editing in protoplasts of three pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2024, 19(1):2383822.
- [76] LI T D, YANG X P, YU Y, et al. Domestication of wild tomato is accelerated by genome editing[J]. *Nature biotechnology*, 2018, 36(12):1160-1163.
- [77] NAGAMINE A, EZURA H. Genome editing of DWARF and SELF-PRUNING rapidly confers traits suitable for plant factories while retaining useful traits in tomato[J]. *Breeding Science*, 2024, 74(1):59-72.
- [78] YU X C, LI Z Y, YANG Y F, et al. Harnessing green revolution genes to optimize tomato production efficiency for vertical farming[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2025, 67(9):2446-2460.
- [79] CHEN X Y, XU F, ZHU C M, et al. Dual sgRNA-directed gene knockout using CRISPR/Cas9 technology in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4(1):7581.
- [80] KIM D, BAE S, PARK J, et al. Digenome-seq: Genome-wide

- profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(3):237-243.
- [81] VICENCIO J, SÁNCHEZ-BOLAÑOS C, MORENO-SÁNCHEZ I, et al. Genome editing in animals with minimal PAM CRISPR-Cas9 enzymes[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1):2601.
- [82] LIU Y, ZHANG C L, WANG X F, et al. CRISPR/Cas9 technology and its application in horticultural crops[J]. *Horticultural Plant Journal*, 2022, 8(4):395-407.
- [83] TANG X M, CHEN S L, YU H W, et al. Development of a gRNA-tRNA array of CRISPR/Cas9 in combination with grafting technique to improve gene-editing efficiency of sweet orange[J]. *Plant Cell Reports*, 2021, 40(12):2453-2456.
- [84] 熊文汶, 刘慧敏, 陈凯园, 等. 基于热处理 CRISPR/Cas9 马铃薯植株的基因编辑体系优化[J]. *园艺学报*, 2023, 50(12):2591-2600.
- [85] 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.
- [86] LEE S Y, KANG B, VENKATESH J, et al. Development of virus-induced genome editing methods in *Solanaceous* crops[J]. *Horticulture Research*, 2024, 11(1):uhad233.
- [87] ZHAO C, LOU H H, LIU Q, et al. Efficient and transformation-free genome editing in pepper enabled by RNA virus-mediated delivery of CRISPR/Cas9[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2024, 66(10):2079-2082.
- [88] 王中一, 刘熠, 胡博文, 等. 基于 RUBY 及 CaREF1 的辣椒高效遗传转化体系构建[J]. *园艺学报*, 2025, 52(4):1093-1104.