中国科学: 生命科学 2024 年 第 54 卷 第 5 期: 845 ~ 865
SCIENTIA SINICA Vitae lifecn.scichina.com
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS

评 述

合成生物学在作物遗传改良中的应用

王繁华[1,2], 乐亮[1], 普莉[1*]

1. 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081;
2. 内蒙古大学生命科学学院, 呼和浩特 010021
* 联系人, E-mail: puli@caas.cn

收稿日期: 2023-10-07; 接受日期: 2023-12-20; 网络版发表日期: 2024-04-17
国家自然科学基金(批准号: 32172091)、中国农业科学院基本科研业务费专项(批准号: Y2023PT20)和三亚中国农业科学院国家南繁研究院"南繁专项"(批准号: YBXM15)资助

摘要 作为一门新兴学科领域, 合成生物学将工程学和生物学相结合, 设计和生产新的生物元件和模块, 得到需要的人工生物系统. 近年来合成生物学发展迅速, 利用合成生物学技术可以对作物的产量、营养品质、抗逆等重要性状进行精准的改良和优化, 并在植物体内进行天然产物与蛋白的高效合成以满足人们更多的需求. 本文从功能元件的设计和改造、元件的合成与组装、挖掘调控回路和功能元件等方面介绍植物中广泛应用的合成生物学技术. 阐述合成生物学在提高作物产量、助力作物高效固氮、提升作物营养与品质、提高作物的环境适应性、合成表观遗传模块和构建植物细胞工厂等方面的最新研究进展. 在此基础上讨论目前合成生物学在作物遗传改良中所面临的问题以及今后的发展趋势.

关键词 合成生物学, 生物元件, 生物模块, 作物改良, 未来农业

我国人口众多, 耕地面积有限, 极端气候增多, 传统农业的发展已经不能满足日益增长的人口的粮食需求. 因此, 开发新型高效的生物系统, 提高农业生产力成为迫切的需要. 随着基因组学革命和系统生物学的兴起, 一门以工程原理为基础的学科应运而生, 由此产生的领域, 被称为合成生物学. 合成生物学目的在于设计和创造新的生物组件和体系, 从基本的生物组件构造复杂的人工生命体系, 对整个生命过程进行重新设计、改造和构建[1]. 20世纪60年代, Jacob和Monod[2]首次提出分子网络对细胞调控的概念. 进入21世纪, 合成生物学迅速发展, 2010年研究人员首次用合成基因组创造细菌细胞[3]. 2014年, 第一个酿酒酵母真核染色体被完整设计和合成, 为设计真核基因组生物学奠定基础[4]. 合成生物学最初应用于微生物, 但是随着技术的发展, 它也将扩展到更为复杂的植物生物系统[5]. 植物合成生物学是一个新兴的领域, 它将工程原理与植物生物学相结合来设计和生产新的装置. 这一新兴领域将在未来农业作物改良中发挥重要作用, 同时也将促进作物的生产. 本文针对合成生物学相关技术的进展以及合成生物学在作物中的应用进行综述, 为作物遗传设计与改良提供新思路.

引用格式: 王繁华, 乐亮, 普莉. 合成生物学在作物遗传改良中的应用. 中国科学: 生命科学, 2024, 54: 845–865
Wang F H, Le L, Pu L. Applications of synthetic biology in genetic improvement of crops (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2024, 54: 845–865, doi: 10.1360/SSV-2023-0230

© 2024 《中国科学》杂志社 www.scichina.com
https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSV-2023-0230

1 合成生物学相关技术进展

近年来随着合成生物学在植物中的应用越来越广泛, 与之相关的工具及技术的开发显得尤为重要. 从元件的功能设计和改造, 到元件的合成与组装, 再到挖掘调控回路和功能元件, 合成生物学相关技术的创新使得合成线路在作物中的构建成为可能.

1.1 设计和改造功能元件的技术

(1) 新型转基因与遗传转化技术. 作物的遗传转化是影响合成生物学在作物领域应用和发展的重要因素之一. 将目的基因转入不同的植株依赖于相应的递送系统, 常规递送系统包括农杆菌或病毒介导的递送和基因枪法. 近年来, 纳米材料作为一种新兴的生物分子传递材料被应用到作物农艺性状的改良[6,7](图1A). Thagun等人[8,9]设计一种基于肽纳米载体的叶面喷洒技术, 用于将生物分子输送到拟南芥、大豆和番茄中. 纳米粒子不仅被用作作物的营养物质改良[10,11], 而且还能加速植物对气候变化因素的适应, 如耐盐性[12]. 在植物组织培养中纳米粒子也显示其突出的作用, 如愈伤组织诱导、体细胞胚胎发生、器官发生和次生代谢产物的产生[13,14]. 由此可见, 利用纳米材料为载体进行无组织培养的转基因及植物基因编辑在某种程度上是可行的.

然而, 转基因植物的组织培养是一个耗时耗力的过程, 许多植物还没有建立有效的遗传转化方法, 如何将转基因或基因编辑稳定遗传到下一代仍然是需要解决的问题. 近期, Maher等人[15]开创避开基于组织培养的遗传转化方法, 通过瞬时表达将DNA载体导入到植物细胞中, 生长调节因子和基因组编辑的各种元件共表达将基因组编辑的体细胞重新转化为分生组织, 重新诱导经基因组编辑的分生组织形成可育植株, 并最终传递给下一代. 核基因转化已经得到广泛的应用, 但是质体转化技术由于其技术的限制, 在发展和应用层面均受到限制. 2019年, 德国马普植物分子生理学研究所的Schadach和Bock团队[16]发现一种新型的可以稳定遗传的质体转化技术, 使用根愈伤组织, 促进高效可育的转化植物的形成, 并且通过敲除植株对抗生素的抗性基因, 从而提高拟南芥细胞抗生素抗性的选择效率. 此外, Kumar团队[17]优化叶绿体转化载体, 在黄花蒿中有效地实现叶绿体基因组转化过程, 最大转化效率可达到16.6%. 这些方法提供一种新的策略, 用合成生物学的方法对作物进行精确的设计, 创制出全新的作物.

(2) 基因编辑技术. 传统的作物育种费时费力, 需要更有效且省时的育种方法来实现重要农作物精准基因组编辑, 这对加快农作物遗传改良进程具有重要意义. 基因编辑系统提供精确编辑基因的方法, 在过去的几年中, 因其简单、灵活、一致和高效, 已经彻底改变遗传研究和作物育种的方式(图1B). CRISPR/Cas9(clustered regularly interspaced shortpalindromic repeat/CRISPR-associated systems 9)基因编辑系统因其强大的编辑能力, 已用于包括植物在内的许多物种的靶向基因修饰[18,19], 其他的编辑系统如CRISPR-Cas12a, 也能够在植物中高效地进行多重基因组编辑[20~23]. 目前, 在众多的基因编辑方法中, 碱基编辑(base editing)是一种新型、高效的基因组编辑技术, 它能够在基因组上进行精确的碱基编辑而不会造成双链的断裂, 将基因组特定位点的某个目标碱基不可逆地替换为另一个碱基. 作物中许多重要农艺性状的品种差异是由一个或几个碱基变化决定的[24], 因此碱基编辑是精确分子育种的一种有效的工具. 目前虽然单碱基敲除已经广泛应用于许多植物物种, 但是碱基编辑器的应用效率仍然很低. 朱健康团队[25]基于原有的植物胞嘧啶碱基编辑器(cytidine base editors, CBE)体系引入优化的元件, 在水稻中测试发现碱基编辑效率大幅提高. 随后, 该研究组利用含有大肠杆菌7.10-NSPACS 9(D10A)融合体的简化碱基编辑器ABE-P1S (adenine base editor-plant version 1 simplified), 显著提高腺嘌呤碱基编辑器在水稻中的编辑效率[26].

Cas9蛋白可以通过sgRNA与PAM基序相邻的靶序列起作用[27,28]. 化脓性链球菌Cas9(*Streptococcus* pyogenes Cas9, SpCas9)是迄今为止最强大且使用最广泛的Cas9蛋白, 主要识别NGG PAM, 因此仅限于具有该基序的靶位点. 解决这些靶向范围限制的方案是设计具有改变的PAM特异性的Cas9变体. 最新研究使用稳定的转基因品系来评估xCas9和SpCas9-NG在水稻中进行基因编辑和碱基编辑的效率, 极大地扩展基因组编辑工具的靶向范围[29]. 有研究发现, Cas9-NG系统在所有NGG, NGA, NGT和NGC等位点上都具有编辑效率[30]. 这些基因编辑工具的开发极大地扩展基因组编辑工具在植物基因组中的靶向范围. 由于

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSV-2023-0230

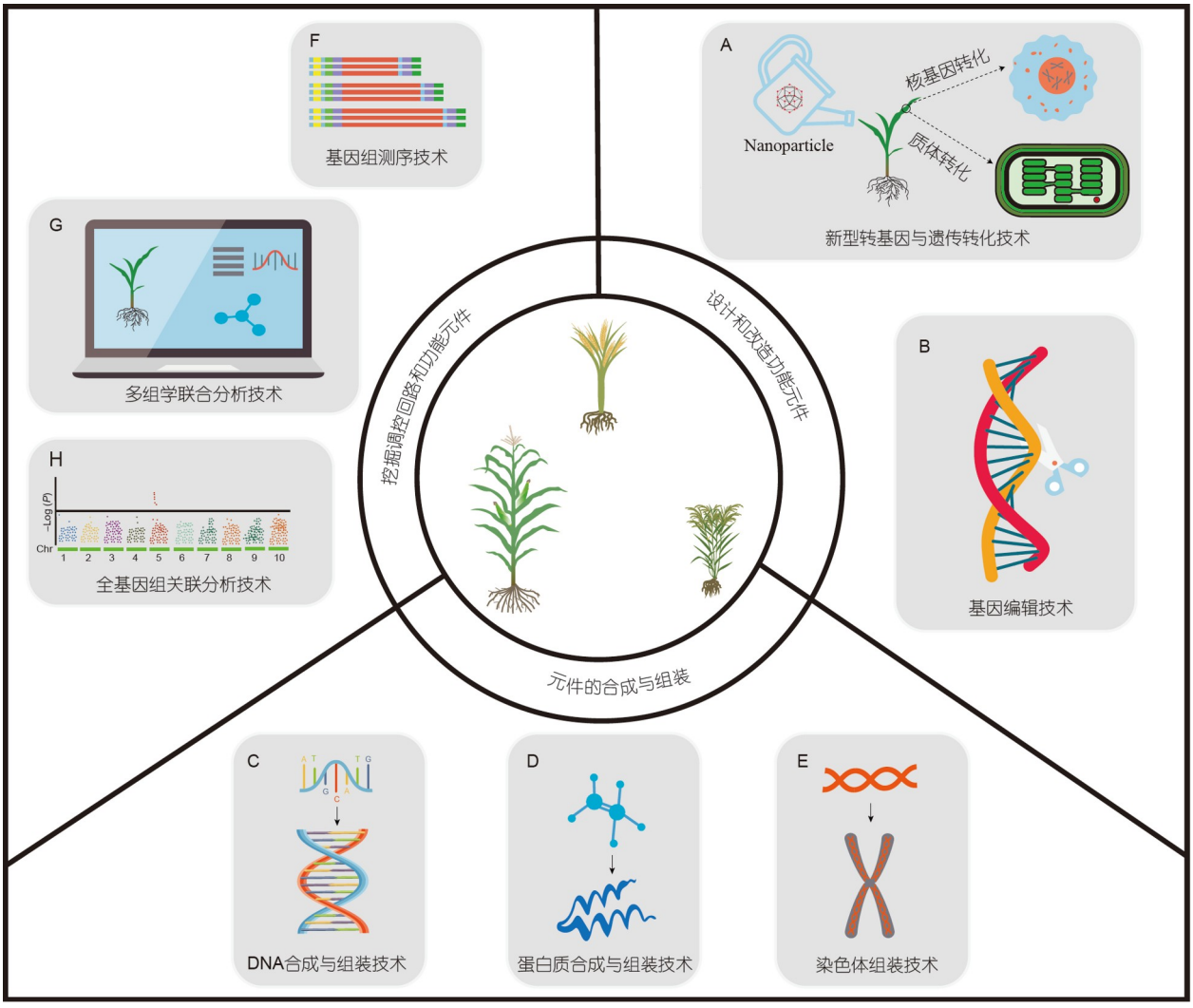


图 1　作物合成生物学相关技术. A: 新型转基因与遗传转化技术; B: 基因编辑技术; C: DNA合成与组装技术; D: 蛋白质合成与组装技术; E: 染色体组装技术; F: 基因组测序技术; G: 多组学联合分析技术; H: 全基因组关联分析技术

Figure 1　Techniques related to crop synthetic biology. A: New transgenic and genetic transformation technology; B: gene editing technology; C: DNA synthesis and assembly technology; D: protein synthesis and assembly technology; E: chromosome assembly technique; F: genome sequencing technology; G: multi-omics joint analysis technique; H: genome-wide association analysis technique

CRISPR/Cas9编辑技术涉及DNA链的断裂，导致遗传物质发生永久改变，因此不能广泛地应用于作物. 2021年, *Cell*杂志上发表的一篇论文中, 开发了一种新型表观遗传基因组编辑工具CRISPRoff[31]，该技术在不改变DNA序列的情况下特异性地控制基因表达. 这项技术的开发拓宽CRISPR/Cas9技术在作物中的应用.

此外，基因编辑技术使精确操作作物物种中的单个基因或者大染色体片段成为可能，为育种计划提供许多优势. David Jackson团队[32]通过CRISPR/Cas9基因编辑手段微调*CLV-WUS*(*CLAVATA-WUSCHEL*)信号通路中的基因，使得玉米的产量增加. 研究人员运用CRISPR/Cas9技术在玉米自交系中使一个包含大量遗传变异的染色体区域发生臂间倒位, 使其易于重组, 为开发具有改良表型的玉米新品种提供可能[33]. 突变体是基因组研究的重要材料，利用CRISPR/Cas9技术创建水稻突变体库对于水稻功能基因组的研究以及遗传育种具有重要意义[34].

1.2　元件的合成与组装技术

(1) DNA合成与组装技术. DNA合成是近年来应

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSV-2023-0230

用广泛的从头合成核苷酸的技术，极大地推动合成生物学的发展. DNA合成主要包括DNA序列设计、寡核苷酸合成、DNA组装和功能测试及反馈四个步骤. 其中寡核苷酸合成和DNA组装是DNA合成的核心部分(图1C). 基于亚磷酰胺化学的固相寡核苷酸合成(solid-phase oligonucleotide synthesis, SPOS)是目前最广泛的DNA和RNA合成技术[35]. 利用此项技术寡核苷酸通常可以快速且自动合成多达200个核苷酸的序列, 也可以直接合成更长的核苷酸链(长至300~600 nt), 但是随着长度延长, 寡核苷酸合成产率会急剧降低并且试剂消耗高[36]. 为解决这一问题, 近年来人们发展核酸液相合成技术(liquid-phase oligonucleotide synthesis, LOPS), 在可溶性的聚合物载体上合成寡聚核酸, 由于反应使用均相反应混合物, 相比于固相合成, 每一步的偶联效率会有进一步提高, 并且需要更少的试剂量[37,38]. 此前研究中报道的LOPS中的每一步(偶联、加帽以及氧化)都需要对反应物进行分离, 这极大地限制合成效率. 在最新的研究中, 对这一过程进行进一步优化, 通过对过程的控制以一锅法实现碱基的增长, 并成功地合成基于DNA的水凝胶[39].

合成生物学的实现依赖于DNA组装技术，以确保组装获得的目的DNA片段进入合适的底盘细胞进而发挥功能. DNA组装一般是以预先合成的寡核苷酸(一般60~120 nt)为原料，经拼接组装得到长链DNA(图1C). 随着合成生物学的发展, DNA组装技术发展为酶依赖的组装技术，此外也发展一些非酶依赖的组装技术以及基于微生物体内重组的DNA组装技术. 基于DNA聚合酶的组装方法中，聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)是一种最常用的基于寡聚核苷酸的基因组装方案[40,41]. 通过一步PCR组装的方法, 可以将一组寡核苷酸混合物一步组装成为基因长度DNA，但这种方法得到的产物通常是一组长度不一的DNA. 另外一种基于PCR的两步法组装方法称为重叠延伸PCR[42]. Smith等人[43]利用连接酶与重叠延伸PCR相结合的方法合成噬菌体的基因组全长. 基于核酸内切酶的组装是以BioBrick技术和Golden Gate技术为主. 此外, 随着技术的进步, 基于核酸内切酶的组装又有新的发展，例如MASTER连接法[44]、USER克隆技术[45]、成对选择组装技术[46]. 基于核酸外切酶的组装以Gibson组装技术和SLIC组装技术为代表[47].

酶依赖的组装技术具有高效、操作简单的特点，但是因其通量不足且成本较高，因此具有一定的局限性. 而非酶依赖的组装技术成本低，且在高通量组装中具有优势. 非酶依赖的组装技术主要有EFC技术和TPA技术[48]. 尽管DNA组装已经能够拼接成几百kb的片段，但是对合成DNA来说这远远不够. 为满足高通量组装技术的需求，微生物体内的同源重组技术使得高效组装DNA大片段成为可能. 2008年, Venter团队[49]利用TAR(transformation-associated recombination)技术在酿酒酵母中完成生殖道支原体的组装; 覃重军团队[50]利用CasHRA(Cas9-facilitated homologous recombination assembly)技术构建1.03 Mb长的MGE-syn1.0 (minimal genome of *Escherichia coli*). Itaya等人[51]利用枯草芽孢杆菌中的同源重组系统合成134.5 kb的水稻叶绿体基因组. 此外，Cre/loxP(cyclization recombination enzyme, locus of X-overP)重组酶系统也被广泛应用于体内组装中[52].

相对高成本和低通量的寡核苷酸合成已限制DNA的大规模合成. 与传统的寡核苷酸相比，在微阵列上合成的寡核苷酸的价格可能要便宜得多，吞吐量也更高[53]. 因此，基于微阵列的DNA合成技术将成为未来发展趋势.

(2) 蛋白合成与组装技术. 随着对蛋白质合成机制理解的不断深入，合成生物学技术及定向进化技术的应用也越来越广泛(图1D). 近年来，无细胞蛋白合成(cell-free protein synthesis, CFPS)技术的突飞猛进，使其从一个分子生物学的小众工具转变为一个有望大规模制造蛋白质和加速生物设计的新技术平台. 然而，大多数蛋白质是通过在生物体内表达获得的，这在很大程度上决定它们是天然存在的氨基酸[54]. 相比之下，当需要掺入多种非天然氨基酸、翻译后修饰或人工骨架时, 化学合成的优势愈加凸显[54]. 固相肽合成(solid-phase peptide synthesis, SPPS)是化学肽和蛋白质生产的基础，但是经过反复优化仍然很难合成超过50个氨基酸的肽链，这在很大程度上是因为不断增长的链的删除、截断和聚合产生一系列的副产物[55]. 天然化学连接(native chemical ligation, NCL)的发展使得蛋白质链的化学合成成为可能[56]. 研究人员开发出一种新的技术, 可快速合成长达164个氨基酸的蛋白链[57]. 此外，有研究通过将登革热病毒结构蛋白和截短形式的非结构蛋白导入烟草[58], 实现病毒样颗粒在植物中的组装，并能成功地触发小鼠的免疫反应，这对于在植物系统

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSV-2023-0230

中生产疫苗具有重要的意义.

(3) 染色体组装技术. 高质量的基因组组装在作物遗传改良和遗传多样性研究中起着至关重要的作用. 尽管测序技术取得一系列进展, 但由于多倍体和高重复序列的存在, 植物复杂基因组的组装仍然难以实现[59]. 最新有研究报道, 研究人员报道一种PolyGembler(polyploidgenetic linkage assembler)方法用于复杂基因组的组装[60]. 为验证该方法的有效性, 研究人员利用PacBio Long Reads与限制性位点相关DNA测序相结合的方法, 构建异源四倍体草坪植物的假分子, 利用基因型数据和测序法构建二倍体甘薯(*Ipomoea trifida*)和同源四倍体马铃薯的假分子, 并纠正已发表的三叶草基因组组装的13个装配错误, 在已发表的马铃薯基因组中确定8个未确定的框架. 此外, Chen等人[61]结合二代和三代测序数据、BioNano以及高密度的遗传图谱等多种技术和手段, 成功组装出四倍体栽培种花生的20条染色体(10条A基因组和10条B基因组). 由此可见, 对作物基因组的解码和相关生物学问题的研究, 有望使作物从传统的遗传改良进入基因组辅助育种的新阶段(图1E).

1.3 挖掘调控回路和功能元件的技术

组学技术的出现快速提高人们对现代生物学的认知. 在合成生物学的发展过程中, 组学技术在挖掘调控回路和功能元件方面提供重要的工具和方法. 因此, 开发更加精准、高通量的定量手段, 利用多层次的组学技术, 为更好地了解生物体内的基因表达和调控机制提供更加可靠、全面的数据.

(1) 基因组测序技术. 丰富的遗传资源是应对作物品质改良和粮食安全挑战的重要保障, 如何有效地发掘和利用现有的遗传资源对于作物育种具有重要的意义. 近年来, 基因组测序作为一种高效的策略被逐渐运用于评估和利用潜在的、有价值但探索不足的种质资源, 以此充分发挥遗传资源的潜力(图1F). 目前, 多种作物的基因组已经成功测序和组装, 例如玉米[62], 小麦[63], 黑麦[64], 水稻[65], 大豆[66]棉花[67,68]等主要粮食和经济作物. 此外, 泛基因组和泛三维基因组极大地推动大豆的遗传改良[69~71]. 基因组测序技术提供大量的DNA序列信息, 研究人员可以基于这些基因组序列进行DNA片段的设计和合成, 用于构建新的遗传回路、合成新的代谢途径, 设计和构建新的功能模块和调控元件.

(2) 多组学联合分析技术. 多组学联合分析是指对来自不同组学(如基因组学、转录组学、表观组学、蛋白组学、代谢组学和表型组学等)的数据源进行归一化处理、比较分析应用到同一研究中(图1G). 作物株型、产量等复杂性状的研究离不开表型精准鉴定, 但传统的表型性状分析存在测量通量低、耗时费力、精度不高、破坏性等缺点, 难以做到全天候、全生育期的动态监测, 表型鉴定瓶颈严重阻碍作物基因资源的挖掘和重大品种的培育. 近期研究基于3D全自动高通量表型组鉴定平台, 首次对玉米自交系全生育期进行全自动高通量无损监测, 通过多光学图像批处理程序分析并提取图像性状(image-based traits, i-traits), 结合全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS)鉴定到与特定表型相关的核心单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)和候选基因, 构建基因-表型关联网络, 进一步通过机器学习构建株高的表型预测模型, 实现早期对株高的精准预测, 为玉米表型精准鉴定、重要基因克隆和株型改良提供有效策略和新的基因资源[72]. 光周期与生物钟相结合, 协调基因表达节奏, 从而确保植物适应环境. 研究表明, 转录组、表观基因组和3D基因组的全基因组昼夜节律分析, 确定几个对协调基因表达昼夜节律至关重要的因素, 包括光周期、组蛋白修饰、转录因子的染色质可及性、lncRNA的表达和3D染色质组织. 这些结果为理解光信号、染色质修饰和参与昼夜节律转录控制的空间组织提供一个框架[73]. 小麦每穗粒数是决定单产的重要性状, 有研究从转录组学、表观遗传学、基因组学等多组学手段, 深入解析小麦穗发育过程中转录因子的调控网络和层次关系[74]. 将多组学联合分析技术应用在合成生物学中, 可以帮助研究人员综合分析不同组学层面的数据, 揭示生物系统的整体性质和相互作用, 指导合成生物学的设计和优化.

(3) GWAS. 过去十年来, 已有多个重要的作物群体重测序工作完成. 这些作物群体涵盖来自全球多个国家和地区的传统品种和栽培种, 但它们对大量聚集优良等位基因的作物品系研究甚少. 随着组学关联技术的发展, GWAS通过结合SNP与表型性状信息, 能够快速找出决定某一性状的关键的SNP和基因(图1H).

大规模自然群体基因型和表型的测定为利用群体遗传学和GWAS的手段发现重要基因及育种改良提供

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSV-2023-0230

基础. Li等人[75]利用13份典型籼稻和818份典型粳稻, 研究群体结构与种质系谱的关系. Ren等人[76]利用全基因组关联分析解析现代育种对玉米根系结构的塑造, 对玉米根系结构相关基因的全基因组鉴定, 为培育适合密集型种植的玉米提供新的策略和遗传资源. 结合全基因组关联分析, 快速鉴定小麦抗条锈病的候选基因, 为通过全基因组水平进行抗锈病基因位点的发掘、鉴定奠定材料和数据基础[77]. Wu等人[78]对来自19个国家的683份普通菜豆资源的全基因组进行重测序, 明确普通菜豆种质资源的遗传多样性和群体结构特点. 全基因组关联分析技术在合成生物学中起到重要的作用, 可以帮助揭示基因与复杂性状之间的关联, 并为合成生物学的研究和应用提供指导和支持(表1).

2 合成生物学在作物遗传改良中的应用

随着人们将微生物合成生物学中发展起来的设计原则和理念应用于作物, 作物合成生物学领域正在走向成熟并逐渐应用于实践. 例如, 合成生物学在提高作物产量、助力作物高效固氮、提升作物营养与品质、提高作物的环境适应性等方面发挥越来越重要的作用, 同时, 对表观合成生物学的研究有利于作物的遗传改良, 将工程设计理念应用于作物使得植物作为细胞工厂源源不断地为人们提供所需的产品(图2).

2.1 合成生物学在提高作物产量中的应用

为提高农业的产量, 提高作物的光合效率是一项重要的举措. 近年来, 随着合成生物学的发展, 研究人员利用合成生物学技术改造植物光合系统, 能有效提高植物将光能转化为生物量的效率[79]. 对作物生产力和资源利用有相当大影响的酶是光合作用中的CO_2固定酶——核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, Rubisco)[80]. Rubisco是一种低效的羧化酶, 为提高植物对CO_2的固定效率, 改善植物光合作用的一个重要方式就是提高Rubisco的羧化效率[81]. 有研究通过烟草叶绿体转化技术改造Rubisco大、小亚基, 以提高植物的光合作用效率[82]. 由于RuBisCO在光合作用和全球碳循环中的重要性, 以及其在提高作物光合作用效率和产量方面的潜力, 对RuBisCO的遗传改造有助于在作物中构建高效的RuBisCO, 提高作物光合效率, 从而提高粮食产量[83]. 其次, 在光反应过程中, 植物通过光合电子传递和光合磷酸化将光能转化为ATP和NADPH(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate). 研究人员将藻类

表 1 近年作物合成生物学相关技术的进展

Table 1 Recent advances in crop synthetic biology related technologies

技术	简述	应用	文献
	设计和改造功能元件的技术		
转基因与遗传转化技术	利用基因重组和转化等技术将特定的外源目的基因转移到受体生物中, 以实现预期的、有针对性的遗传改变.	大豆、番茄、小麦、黄花蒿	[8,9,12,17]
基因编辑技术	基因组编辑系统被广泛应用于多种物种, 包括植物, 在其中实现靶向基因修饰.	小麦、水稻、玉米	[18,20,25,26,32~34]
	元件的合成与组装技术		
DNA合成与组装技术	DNA组装一般使用预先合成的寡核苷酸片段(通常为60~120 nt)作为原料, 通过拼接组装形成长链DNA.	水稻	[51]
蛋白质合成与组装技术	将多种天然氨基酸或者非天然氨基酸进行翻译后修饰, 合成具有功能的蛋白质.	烟草	[58]
染色体组装技术	将基因组组装成近染色质水平.	番薯、马铃薯和花生	[60,61]
	挖掘调控回路和功能元件的技术		
基因组测序技术	基因组测序是一种高效的策略, 被逐渐应用于评估和利用潜在的、有价值但探索不足的种质资源, 旨在充分发挥遗传资源的潜力.	小麦、黑麦、水稻、大豆、棉花、玉米	[62~71]
多组学联合分析技术	联合多种组学进行的数据分析是组学发展的新趋势. 这种方法能够产生更为可靠且数据更为丰富的结果.	玉米、水稻和小麦	[72~74]
全基因组关联分析技术	GWAS通过结合SNP和表型性状信息, 能够快速找出决定某一性状的关键SNP和基因.	水稻、玉米、小麦和菜豆	[75~78]

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSV-2023-0230

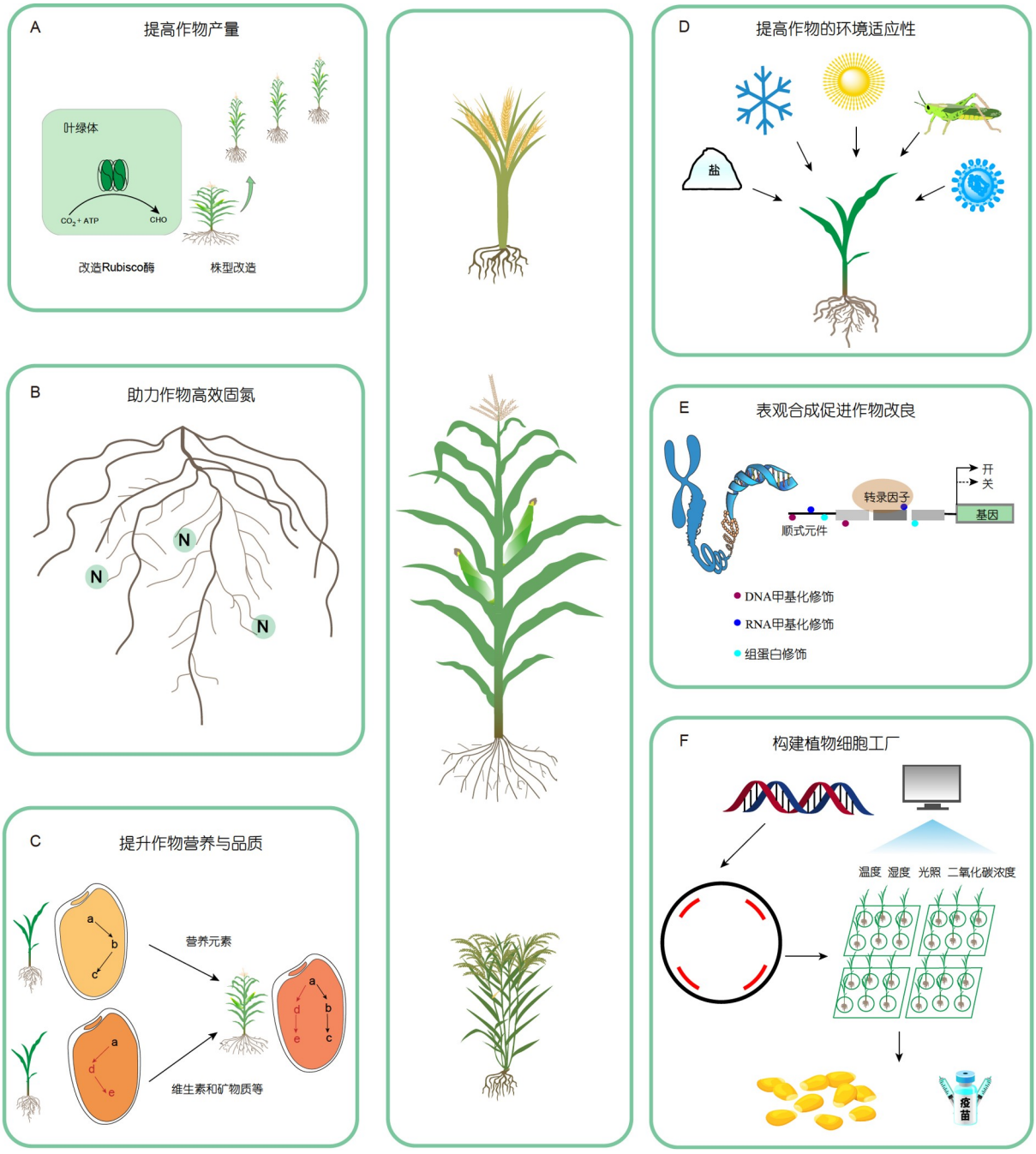


图 2　合成生物学在作物遗传改良中的应用. A: 合成生物学在提高作物产量中的应用; B: 合成生物学在助力作物高效固氮中的应用; C: 合成生物学在提升作物营养与品质中的应用; D: 合成生物学在提高作物环境适应性中的应用; E: 表观合成促进作物改良; F: 利用合成生物学构建植物细胞工厂

Figure 2　Applications of synthetic biology in crop improvement. A: Applications of synthetic biology in improving crop yield; B: nitrogen fixation; C: nutrition and quality; D: crop environmental adaptability; E: synthetic epigenetics for crop improvement; F: construction of plant cell factories using synthetic biology

细胞色素基因引入拟南芥来增强光合电子转移和光合磷酸化, 从而促进植物的光合作用及其生长[84]. 此外, 可以通过改变光保护机制提高光合效率和作物生产力. 研究发现, 在波动光下加速烟草的光保护机制, 能

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSV-2023-0230

使叶片加速对二氧化碳的吸收并且使植物的干重增加约15%[85].

通过增加气孔动力学有助于提高水利用率以及促进碳的同化进而提高作物产量. 在拟南芥气孔保卫细胞中表达人工合成的光门控K^+通道BLINK1, 加速光照下的气孔开度和照射后的闭合, 使植物生物量增加2.2倍[86]. 向光素(phototropin, phot)是一类重要的UV-A/蓝光受体. phot1和phot2是拟南芥中向光素家族中的两个成员, 它们除在向光性反应中具有重要作用, 还通过调控气孔开闭、控制叶片定位、改变叶绿体位置等影响光合效率. 研究表明, 通过定向进化方法获得的对光敏感性降低的突变体phot1和phot2, 不仅能够增强叶绿体的定位效果, 而且在低光照条件下生物量明显增加[87]. 在多项研究中发现, 通过改造单个基因也有助于提高玉米产量和改善农艺性状[88,89]. Simmons等人[90]发现玉米*ZM-BG1H1*的过表达可提高玉米产量, 编码丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的基因*KNR6*通过影响雌穗小花数目、穗长和行粒数进而控制玉米产量[91].

提高作物光合作用羧化效率是提高作物产量的重要举措. 与C3植物相比, C4光合植物将CO_2固定在Rubisco酶的周围, 能够极大地减少光呼吸. 为提高光合作用的合成速率、生物量和产量, 将C4光合作用机制引入C3作物中是一种有效的方式. 在一项研究中, 研究人员将玉米C4途径的关键酶ZmPEPC, ZmPPDK, ZmNADP-MDH和ZmNADP-ME的原始基因组序列(包括启动子, UTR, 外显子和内含子)分别转入水稻中, 并将叶肉细胞光呼吸关键酶OsGDCH进行突变, 最终获得表达单个玉米C4光合途径酶的转基因水稻[92]. 虽然该研究首次实现C4循环的羧化反应, 但是该转基因水稻不能构建完整的C4循环. 最新的研究表明, 将玉米的五种酶引入水稻叶片的特定细胞和隔室中时, 可以建立部分C4通路[93].

控制作物光呼吸作用是增加作物产量的方式之一. 叶绿体是光合作用的主要场所, 光反应和暗反应两个阶段都在叶绿体进行, 能够实现光吸收、电子传递、光合磷酸化、碳同化等关键生化步骤. 人造光合作用可以模仿植物光合作用实现对太阳能的转化、存储和利用. Miller等人[94]从菠菜中分离得到类囊体膜, 利用微流体技术将其与16种酶一起包裹在油包水液滴中, 形成半天然, 半合成的人造“叶绿体”, 并利用光和该系统实现CO_2的固定. 利用合成生物学, 重新设计光呼吸过程, 实现转基因烟草的生物量比野生型烟草植物提高40%[95]. 此外, 几种光呼吸旁路也已被引入植物, 主要通过增加叶绿体二氧化碳浓度或优化能量平衡来改善光合作用. 最近报道一个工程化的GCGT旁路可以提高水稻的光合作用和生产力[96]. 利用多基因组装和转化系统能够在水稻叶绿体中建立新的光呼吸旁路[97]. 经改造的水稻在光合作用效率, 生物量产量和氮含量等方面均显著增加, 为水稻增产提供新的方式. 通过合成生物学方法, 科学家将乙醇酸作为光呼吸旁路的起始代谢物质, 在植物中构建光呼吸旁路, 通过蓝细菌“甘油酸途径”或者叶绿体中的乙醇酸氧化, 绕过乙醇酸再循环为3-磷酸甘油酸的过程并促进植物生长[95]. 然而, 构建的新路径会释放二氧化碳从而限制其固碳效率. 有意思的是, 海洋蛋白细菌中存在另一种乙醇酸同化途径: β-羟基天冬氨酸循环(β-hydroxyaspartate cycle, BHAC), 该途径首先将乙醇酸氧化为乙醛酸酯, 然后经过四个酶促反应转化为C4化合物草酰乙酸(oxaloacetic acid, OAA), 值得一提的是, 该过程不会损失碳氮, 因此比自然光呼吸和之前报道的其他旁路途径更为有效[98], 研究报道, 将BHAC途径引入到拟南芥过氧化酶体中改变碳氮代谢, 为农业生产力的提高提供新的研究思路[99].

此外, 增加作物的光能利用效率也能提高作物产量. 育种家通过选择育种使得作物的种植密度增加, 并且选择后的作物具有更直立的叶片, 叶片夹角随之减小, 减少相互遮光, 并能捕获光能维持光合作用, 改善籽粒灌浆的叶片氮积累并增加籽粒产量[100]. Tian等人[101]从玉米野生祖先种大刍草中克隆控制玉米紧凑株型、密植增产的关键基因*UPA1*(*Upright Plant Architecture1*)和*UPA2*(*Upright Plant Architecture 2*), 这两个数量性状基因座使得玉米具有直立的结构. 此外, 有研究鉴定新的MYB样转录因子OsMPH1, 其参与水稻株高的调节[102]. 相关研究也表明, miRNAs在调控株高中具有重要作用[103], 通过对水稻品种Shiokari及其矮秆近等基因系Shiokarid6进行分析, 发现在水稻中过量表达miR319的转基因水稻具有稳定的矮化表型. 这一发现揭示miR319在未来分子育种中的潜在应用. 因此, 合成生物学对于提高作物产量, 提升农业生产力, 实现农业可持续发展具有重要意义.

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSV-2023-0230

2.2　合成生物学在助力作物高效固氮中的应用

工业氮肥的施用满足农作物的高产需求，同时也带来土壤板结、水体富营养化等环境问题，严重阻碍农业的可持续发展. 然而，生物固氮是自然界中的部分原核微生物利用体内复杂的固氮酶系统，在常温常压下将大气中的氮气转换为生物体可利用的氨的过程. 利用生物工程技术改造固氮系统, 并将固氮系统导入作物的线绿体、叶绿体等细胞器，使作物实现自主固氮, 是实现现代农业所面临的一个重要问题.

共生固氮是植物与微生物相互作用的结果，改善氮素营养的一种方法是鉴定与植物相互作用的固氮微生物. 来源于香蒲中的内生酵母Rhodotorula mucilaginosa JGTA-S1具有固氮功能，将JGTA-S1酵母定殖在水稻中，能显著提高水稻的生长[104]. 玉米在木质部汁液中专门招募一个核心微生物群，这一核心微生物群通过生物固氮促进植物氮素营养，促进根系发育[105]. 固氮酶系统核心酶组分在真核细胞器中的稳定性是限制固氮酶系统向真核系统转移的重要因素[106,107]. 为解决这一问题, 研究人员在固氮酶MoFe蛋白的NifD亚基上确定其在线粒体中涉及其稳定性的NifD-R氨基酸残基[108].

豆科植物与根瘤菌之间的自然信号转换对于根瘤菌在植物根器官中形成根瘤至关重要. 最新的研究发现，豆科植物的皮层细胞获得的SHR-SCR(SHORT-ROOT-SCARECROW)干细胞分子模块是豆科植物共生结瘤固氮的前提事件，该干细胞分子模块能够被根瘤菌的信号激活，诱导豆科植物苜蓿的皮层分裂，形成根瘤[109]. Geddes等人[110]利用合成生物学技术, 设计出植物与其根际细菌之间的分子信号通路. 此外, Bozsoki等人[111]通过合成生物学改造植物编码赖氨酸基序(lysin motif, LysM)的受体, 以识别微生物激发子进而驱动细胞内信号传导调控微生物的定殖，从而使非豆科植物能够进行固氮. 由此可见，合成生物学的发展为生物固氮提供更多的可能性.

2.3　合成生物学在提升作物营养与品质中的应用

尽管作物育种大大提高农产品的产量，但作物的营养品质却不能得到改善. 因此，通过合成生物学技术对主食作物进行改造是改善高危人群食品中必需微量营养素缺乏的策略之一.

花青素是一种在自然界广泛分布、抗氧化能力很强的天然植物色素，研究表明日摄入足量的花青素能够有效降低人体患多种慢性疾病的风险. 研究发现, *SlAN2like*的功能缺失在驯化番茄无法积累花青素而呈现红色[112]. 超量表达番茄内源单个SlMYB75转录因子能够大量积累花青素并获得显著紫色的番茄果实[113]. 利用果实特异启动子过表达*SlAN2-like*, 可以获得果皮和果肉中均有丰富花青素积累的紫色番茄[114]. 多数谷物中的膳食类胡萝卜素含量较少，在以稻米为单一主食的国家经常出现维生素A缺乏症. 研究表明, 利用代谢工程将G*tHMG1*, *GZmPsy1*和*GPaCrt1*共表达能够增强水稻胚乳中类胡萝卜素的生物合成[115]. 此外，有研究利用一个类胡萝卜素合成缺陷的蒺藜苜蓿突变体, 成功克隆控制蒺藜苜蓿类胡萝卜素合成关键调控基因*WP1*(*WHITE PETAL1*)[116]. 虾青素(astaxanthin)是一类橙红色的植物营养素(phytonutrient)，是类胡萝卜素的最高级形式，在生物体具有超强的抗氧化性，对人体健康具有重要的保健作用. 自然界中，虾青素主要是由一些藻类、细菌、浮游植物，利用β-类胡萝卜素作为前体，在β-胡萝卜素羟化酶(β-carotene hydroxylase, BHY)和β-类胡萝卜素酮化酶(β-carotene ketolase, BKT)作用下合成的. 高等植物虽然具有丰富的β-类胡萝卜素前体, 但由于缺乏关键的BKT, 并不能合成虾青素. 目前，Zhu等人[117]利用高效的多基因载体系统TGSII(transgene stacking II)，实现在水稻胚乳中从头合成虾青素的营养强化(biofortification)目标，培育出世界首例胚乳富含虾青素的新型功能营养型水稻种质“虾青素米”，也称“赤晶米”. Liu等人[118]在玉米籽粒中能够重构虾青素代谢途径，将高含量虾青素的玉米饲喂蛋鸡后，鸡蛋中虾青素含量显著增多. 甜菜素是一类仅存在于石竹目植物中的水溶性天然色素，具抗菌、抗癌、消炎、降血脂和保护神经等诸多保健功能, 但甜菜素有限的天然来源限制其开发与应用. 研究报道，通过合成生物学技术能够在胡萝卜中重构甜菜素生物合成途径，合成并积累甜菜苷，这为培育高甜菜苷含量的胡萝卜新种质、拓展甜菜素的生物来源提供理论与技术支持[119].

虽然许多主食作物(如水稻、小麦和玉米)为人们提供足够的热量，但不能满足微量营养素(如维生素B1, 维生素B6, 维生素B9, 维生素C)的需求, 因此会导致所谓的“隐性饥饿”[120]. 合成生物学为微量元素的大

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSV-2023-0230

量合成提供可能性.

维生素B1(硫胺素)是所有生物体中间代谢的重要辅助因子. 在人类中, 心血管疾病和神经紊乱通常与缺乏维生素B1有关. 抛光大米是导致维生素B1含量低的主要原因, 因此对大米中产生维生素B1的组分进行生物功能的改造使其产生更高含量的维生素B1, 对改善人类健康和营养具有重要意义. 目前, 在拟南芥中已经发现许多参与维生素B1生物合成的基因, 但是水稻中发现的很少. 最新的研究表明, 使用CRISPR/Cas9基因编辑来创建水稻*OsPALE1*敲除突变体, 发现水稻*OsPALE1*(*Os08g0566000*)参与维生素B1的生物合成[121]. 维生素B6对关键的代谢反应至关重要, 它在植物中具有抗氧化特性. 在水稻中两个维生素B6从头合成途径的拟南芥基因*AtPDX1.1*和*AtPDX2*的组成型表达, 能导致叶片(高达28.3倍)和根(高达12倍)中的维生素B6显著增加[122]. 此外, Nan等人[123]发现水稻基因*OsMDH1*的异位表达改变编码维生素B6生物合成途径关键酶的基因的表达水平, 因此*OsMDH1*可能影响水稻组织中维生素B6的含量. 叶酸(folates)属于水溶性B族维生素(B9), 在生物体中作为一碳(C1)供体和受体发挥重要作用. 人类自身不能合成叶酸, 主要依赖于从食物中摄取. 目前已培育出多种富含叶酸的作物新品种, 例如高叶酸玉米[124]、水稻[125]和番茄[126]. 通过过表达叶酸合成通路的两个基因氨基脱氧分支酸合酶基因(*aminodeoxychorismate synthase*, *ADCS*)和GTP环水解酶基因(GTP cyclohydrolase, GTPCHI)番茄果实[127]和水稻种子[125]中的叶酸浓度都有所增加. 将叶酸与叶酸结合蛋白相结合, 使叶酸含量提高150倍, 并且提高叶酸的稳定性, 从而能够长期储存高叶酸的大米[128]. 以前的研究表明, 通过引入*GTPCHI*和*ADCS*基因能够增强水稻和番茄中叶酸的生物合成. 然而, 该策略在马铃薯块茎中并未显著增加叶酸的含量. 随后, 研究人员在转化*GTPCHI*和*ADCS*基因的基础上, 又引入线粒体叶酸合成途径中的下游基因*HPPK*/*DHPS*(*hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase/dihydropteroate synthase*)和/或*FPGS*(*folylpolyglutamate synthetase*)[129], 该策略能够使叶酸含量增加12倍, 而且在块茎的储藏期内, 叶酸含量能够保持相对稳定. 此外, 研究人员通过基因组和转录组关联分析, 选择两个成熟种子中叶酸总量存在显著差异的玉米自交系来研究叶酸相关基因的表达和籽粒形成过程中叶酸衍生物的分布[130]. 通过QTL定位获得两个控制玉米籽粒中与叶酸含量有关的变异的QTL[131], 这些都为提高玉米叶酸含量的标记辅助育种提供依据.

维生素C(抗坏血酸)是一类重要的抗氧化物质, 也是植物生长调控因子. 人类由于缺乏抗坏血酸合成代谢的能力, 必须从新鲜的水果蔬菜中摄取. 番茄是我国种植面积最大的蔬菜作物, 果实中富含大量的维生素C. 先前的研究表明, 绿色植物中维生素C的合成途径有甘露糖/半乳糖途径、古洛糖途径、半乳糖醛酸途径和肌醇途径[132]. 而番茄中主要以甘露糖/半乳糖途径和半乳糖醛酸途径为主. 在番茄中超量表达肌醇氧酶基因*MIOX4*(*Myo-inositol oxygenase 4*)能够提高番茄叶片和果实中维生素C含量[133]. 此外, Ye等人[134]通过全基因组关联分析研究番茄的代谢性状, 发现SlbHLH59是D-甘露糖/L-半乳糖途径中一种新的维生素C合成转录因子, 它通过直接调控番茄果实中维生素C生物合成相关结构基因的表达来决定果实中维生素C的含量. 被誉为“热带苹果”的番石榴也是重要的天然维生素C来源, 通过对番石榴的全基因组进行组装测序, 研究人员初步解析番石榴维生素C合成和果实软化分子机制[135]. 生物强化是一种提高农产品中微量营养素含量的方法, 包括围绕矿物营养素的目标和运动途径(根吸收、运输、再动员、储存和增强的生物利用度)的调节的策略, 从土壤中提取营养素, 并以其生物可利用的形式“推动”到植物的经济部分[136]. 研究表明, 采用生物强化策略能够增加田间种植的木薯块根中铁和锌的含量[137]. 由此可见, 通过合成生物学对作物营养与品质等性状进行精准地改良和优化, 对于提高作物的营养价值具有重要意义.

2.4 合成生物学在提高作物环境适应性中的应用

植物在生长和发育的过程中需要应对不同的胁迫环境. 这些对植物产生胁迫的环境因素通常包括非生物胁迫(盐胁迫、高温、干旱以及冷害等)和生物胁迫(病原体感染和食草动物的啃食等)[138]. 对胁迫过程中信号传递和应答过程的深入了解将有助于人们利用合成生物学提高作物的环境适应性, 实现农业的可持续发展.

蛋白激酶在植物非生物胁迫反应中发挥重要的作用[139]. 来自不同家族的许多激酶已被证明参与盐胁迫反应, 如钙依赖性蛋白激酶(calcium-dependent protein

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSV-2023-0230

kinases, CDPKs)[140], 丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)[141], 以及受体激酶(receptor-like protein kinases, RLKs)[142]. Sun等人[143]研究发现野生大豆BET1s-SNARE通过介导胞质类受体激酶CRCK1s蛋白定位, 调控盐胁迫应答. 盐胁迫导致细胞质内Ca^{2+}浓度迅速上升, 从而激活SOS(salt overly sensitive)途径协助植物应对盐胁迫逆境[139,144]. Jing等人[145]发现一种在水稻中含有一个钙结合EF-hand基序的小caleosin家族蛋白——OsClo5. 该蛋白是一种在水稻萌发期间和幼苗期间调节其耐盐性的负调控因子, 对钙蛋白酶影响盐胁迫反应的分子机制的理解有助于改善水稻抗盐胁迫的潜力.

作物在生长的过程中需要充足的水分供应和适宜的温度环境以确保正常的受精和结实. 高温下玉米花粉败育, 会严重影响产量[146]. 热胁迫通过影响籽粒灌浆过程中籽粒数量和种子存储物质的积累, 降低玉米的产量. 研究发现, 碳代谢中叶绿体定位的6-磷酸葡糖酸脱氢酶PGD3对高温敏感, 而细胞质定位的同工酶PGD1和PGD2具有热稳定活性. 进一步通过工程化*PGD1*和*PGD2*基因, 让其定位到叶绿体, 可以增加植物的热稳定性, 并通过增加籽粒数量来缓解夜间高温条件下的玉米产量损失[147]. 最新研究鉴定一个可以介导干旱和高温胁迫的NAC转录因子NUT1[148], 该转录因子通过调控原生木质部的发育调控水分运输, 从而影响玉米的干旱和高温表型, NUT1表达的时空特异性有利于农作物应对田间水分的不断变化, *NUT1*基因及其相关遗传途径可能是未来提高农作物抗干旱和高温胁迫的重要靶标.

源自热带和亚热带地区的主要作物品种(如水稻、玉米、番茄、大豆和棉花)缺乏适应低温的能力, 只能在热带或亚热带地区生长[149]. 因此, 低温胁迫(包括低温和冰冻)限制植物的生长、发育和地理分布, 并降低世界范围内的作物产量[150]. 植物为能够抵御冷胁迫, 产生各种生理、分子和代谢反应. 采用反向遗传学方法, 已鉴定出调控玉米耐寒性的几个基因, 包括A型应答调节因子1(*Zea mays response gegulator 1*, *ZmRR1*)、纤维素合酶(*Cellulose synthase A*, *CesA*)、丝裂原活化蛋白激酶8(*Mitogen-activated Protein Kinases 8*, MPK8)、脱水-反应元件结合蛋白1(*Dehydration-Responsive Element Binding protein*, *DREB1s*)和碱性亮氨酸拉链(*basic Leucine Zipper*, *bZIP*)转录因子bZIP68. 其中, *ZmRR1*可通过上调*DREB1*和*CesA*基因的表达来增强耐寒性, DREB1和C*esA*是玉米耐寒性的两种调节因子. *ZmRR1*的自然变异导致玉米的不同耐寒性[151]. *bZIP68*最近被发现可通过抑制*DREB1*基因的表达来降低耐寒性, *bZIP68*是玉米早期驯化过程中的目标. 此外, 研究显示*MPK8*会使*ZmRR1*不稳定, 但会使*bZIP68*稳定, 从而对玉米的耐寒性产生负面影响[152]. 研究还发现, *ZmICE1*(*inducer of CBF expression 1*)自然多态性通过氨基酸代谢作用于玉米低温耐受性[153]. 由此可见, 通过遗传、分子和生化分析方法, 进一步阐明植物抵抗非生物胁迫的分子机制, 是利用合成生物学提高作物抗逆性的关键.

除非生物胁迫, 病原菌也会影响植物的生长发育进而降低作物的产量[154]. 真菌性病害是影响植物健康和粮食安全的主要因素之一[155,156]. 素有“水稻癌症”之称的稻瘟病作为水稻的主要病害, 严重危害水稻的产量和品质. 因此, 为防治水稻稻瘟病以及培育抗性水稻品种, 解析其致病机理显得尤为重要. He等人[157]利用遗传、生化、细胞生物和病理学等技术手段, 发现稻瘟病菌超长链脂肪酸通过影响Septin环的组装以调控侵染钉的形成, 从而对水稻形成致病性. 病原菌与寄主互作的过程相当复杂, 因此, 如何使植物对病原体进行精确的防御显得尤为重要. 大豆疫霉是大豆根腐病和茎腐病的病原, 造成世界范围内大豆产量的巨大损失. Xia等人[158]最近报道发现, 在大豆疫霉根腐病发病过程中, 大豆疫霉菌通过N-糖基化修饰来保护核心毒性因子免受寄主大豆胞外蛋白酶的攻击, 并提出植物在胞外对病原菌的“多层免疫模式”, 这为改良作物的抗性提供基础和理论依据.

目前, 植物病毒病害已经成为农业生产中的第二大病害, 植物一旦染上病毒将带来毁灭性的后果. 在组织培养和再生技术中, 通常以茎尖脱毒技术制备无毒的外植体[159], 但其深层机理并未得到解析. 最新的研究发现, 在植物分生组织的干细胞内存在一种WUSCHEL(WUS)蛋白[160], 该蛋白受病毒感染诱导, 并且通过直接抑制一类甲基转移酶基因, 影响核糖体的组装, 从而降低蛋白质合成速率, 抑制病毒的传播. WUS作为一个保守的干细胞调节蛋白, 其同源蛋白存在于多种植物中, 其介导的广谱抗病毒机制对作物抗病毒防治具有重要意义. 玉米粗缩病是一种世界性的病毒病, 由斐济病毒属(*Fijivirus*)病毒通过灰飞虱介导

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSV-2023-0230

传播. 研究人员通过图位克隆、转录组和代谢组等生物学手段, 揭示ZmDBF2-ZmGLK36-ZmJMT/ZmLOX8分子模块调控玉米抗粗缩病的遗传基础, 为作物抗病改良提供基因资源[161].

植物不断受到不同种类的生物胁迫, 尤其是草食昆虫, 由于它们攻击植物的方式多种多样, 对作物构成严重的威胁[162]. 因此, 研究有效的害虫防控策略迫在眉睫. 研究报道, 多顺反子tRNA-amiR(PTA)系统与HIGS技术相结合能有效防治鳞翅目昆虫对玉米的侵食[163]. 植物挥发性有机化合物(biogenic volatile organic compounds, BVOCs)是个体间信息传递的主要载体, 植物可以释放BVOC以吸引食草动物的天敌或者传播到同一植物到远端以应对食草动物进一步的伤害. 同时, 相邻的植物也可能识别这些BVOC信号, 通过启动自己防御反应来减少可预测的损害[164,165]. 最新的一项研究表明, 红薯在各种食草动物咀嚼后诱导释放挥发性化合物DMNT, 该化合物会介导邻近的甘薯植物的全株系统性防御反应[162]. 此外, 转基因抗虫玉米、抗虫水稻以及抗虫棉花的研究也为抗虫作物的发展提供借鉴[166]. 在非洲, 玉米是主要主食作物, 其产量和数百万人的生计受到寄生独脚金的威胁. 玉米根部分泌到根际的独脚金内酯能够诱导独脚金的萌发. 研究发现, 通过改变独脚金内酯的生物合成, 能够提升玉米对杂草的抗性, 这为玉米的抗独脚金育种提供新的视野[167]. 利用合成生物学的原理和技术, 重构和优化植物的信号转导途径, 对植物进行基因改造, 使其产生特定的抗性相关蛋白或信号分子, 从而增强植物对生物胁迫的抵抗能力.

2.5 表观合成(Episynthesis)促进作物改良

遗传学上完全相同的细胞可以产生不同的基因表达情况, 并且该表型在细胞分裂后仍能维持. 这种能力对环境的适应, 细胞分化和多细胞的发育至关重要. 此类遗传状态, 不涉及DNA序列的改变, 通常与表观遗传相关[168]. 通常许多复杂性状的产生伴随着表观调控的发生, 因此, 随着天然调控网络的解析, 利用合成生物学的方法, 从头建立和驱动的表观遗传学系统, 并将其应用于作物改良, 是目前作物合成生物学发展的重要方向之一.

表观合成通过改变植物细胞中的表观修饰特征, 可以实现对基因组的重编程, 从而调节和控制特定基因的表达. DNA甲基化(5mC)和RNA甲基化(m^6A)是两种重要的核酸修饰, 在基因表达调控中发挥重要作用并参与诸多生物学过程. 研究发现, DNA甲基化可通过调节m^6A去甲基化酶基因表达的方式影响番茄果实m^6A修饰, 而m^6A去甲基化酶反馈调节DNA甲基化, 从而共同调控果实成熟[169]. FTO为动物中的RNA去甲基酶, 是动物中著名的肥胖基因, 在植物中没有同源蛋白. 研究发现, 在水稻和马铃薯中引入FTO, 可实现针对RNA修饰m^6A去甲基化, 并大幅提高作物产量和生物量[170]. 小RNA、长链非编码RNA及其RNA修饰在调控作物产量与品质、抗病与抗逆等方面具有重要作用[171]. 通过引入合成的RNA分子或调节非编码RNA的表达水平, 可以实现对特定基因的靶向抑制或激活, 这可以用于改善作物的抗性、品质和生长发育等性状. 植物中, 由小RNA介导的DNA甲基化(RNA-directed DNA methylation, RdDM)在转座子沉默和基因表达调控中起重要作用. RdDM介导的MITEs甲基化通过抑制*OsMIR156d/j*和促进*D14*基因的表达, 调控水稻分蘖[172].

逆境胁迫对作物的生长和产量产生负面影响. 通过利用合成生物学和表观遗传学的方法, 可以优化植物的逆境响应. 研究人员将人工合成的锌指DNA结合结构域融合RNA介导的DNA甲基化途径的元件上, 从而直接甲基化*MeSWEET10a*启动子区域的TAL20效应子结合元件. 这种甲基化可以阻止TAL20的结合, 抑制木薯*MeSWEET10a*的转录激活, 提高抗病性, 同时使植物保持正常生长和发育的状态[173]. 有研究发现, 水稻在响应稻瘟病菌侵染过程中, DNA甲基化水平会提高, 并伴随相关甲基化酶和重要稻瘟病菌应答基因的转录变化[174]. RNA m^5C在调控环境适应性方面展示重要功能. 研究报道, *OsNUSN2*介导mRNA的m^5C修饰, 调控mRNA的转录、维持叶绿体功能, 从而增强对高温胁迫的适应性[175]. 染色质状态的重塑在植物胁迫反应中具有关键作用. 研究发现水稻中一个RPD3/HDA1家族的组蛋白去乙酰化酶OsHDA706能够特异去除组蛋白H4乙酰基, 并通过调控H4K5ac和H4K8ac修饰降低2C类蛋白磷酸酶基因*OsPP2C49*的表达, 从而提高水稻的耐盐性[176]. 高温胁迫导致作物雄性不育, 从而降低产量. 有研究通过RNA-seq和ChIP-seq等实验揭示高温影响H3K27me3水平, 从而抑制茉莉酸(jasmonic acid, JA)生物合成基因表达, 进而影响JA稳

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSV-2023-0230

态, 导致棉花雄性不育[177]. 这为高温下组蛋白修饰对雄性育性调控提供新的见解, 并提出提高棉花耐高温性的潜在策略.

表观遗传学核心调节模块由编写器(writer)和阅读器(reader)组成. 在合成生物学的早期研究中, 人们在细菌中合成最小的遗传电路[178~180], 这些发现对探索基因调控具有重要意义. 随着对真核生物, 特别是哺乳动物的研究不断增加, 研究人员陆续开发操纵哺乳动物基因的表达网络. 研究表明, 利用合成生物学的方法, 可以从头建立和驱动表观遗传学系统[180]. 因此, 通过表观合成生物学构建表观遗传学新系统能够为作物遗传改良提供新思路.

2.6　利用合成生物学构建植物细胞工厂

智能化植物工厂为现代农业和生物制药的生产提供新的发展模式, 将促进人工智能与农业科学等多学科的交叉与融合. 采用合成生物学的“源-库-流”策略, 研究人员设计虾青素代谢途径, 通过种子特异性双向启动子驱动多物种来源的虾青素合成相关的酮化酶和羟化酶基因, 成功地在玉米籽粒中重构虾青素代谢途径[118]. 利用合成生物学手段, 研究人员利用微拟球藻工厂生产出自然界不存在或稀有的、具有特殊燃料特性或营养功效的“特种甘油三酯(TAG)”[181]. 利用现有的微生物和动物细胞培养技术生产的药物已经远远不能满足人们的需求, 且利用微生物和动物系统生产的药物成本高昂, 因此亟需一种成本低廉且绿色的生产药物的方法. 植物是食品和药品的天然制造工厂, 利用植物系统制药可能是未来人类治疗疾病的有效方法. 例如, 最新研究表明, 利用红豆杉细胞系可以高效生产明星抗癌药物紫杉醇[182]. 研究人员通过设计两种针对乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)的人工miRNA(amiR471和amiR519), 使其在转基因生菜品种中稳定表达[183]. 喂养小鼠后发现其能够有效降低HBsAg的表达, 抑制HBsAg表达引起的肝损伤, 治疗HBV感染. 植物合成生物学也为利用植物系统生产用于治疗艾滋病和肺结核疾病的药物和疫苗提供广阔的前景[184]. 严重急性呼吸系统综合症冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)在全球范围内持续存在. 植物细胞作为一种多功能的重组蛋白生产系统, 在制定应对当前新冠肺炎疫情的对策方面做出重大贡献. 研究报道, 植物细胞能成功表达SARS-CoV-2奥密克戎变体的单克隆抗体, 可有效中和变异毒株[185,186]. 稳定转化的水稻植株中高效表达SARS-CoV-2受体结合域蛋白, 这为长期大规模生产抗病毒抗体和凝集素提供稳定的资源[187]. 因此, 利用合成生物学构建植物细胞工厂有助于推动生物技术的发展, 为人类的健康、环境保护和可持续发展做出贡献.

3　总结与展望

随着人们将合成生物学中发展起来的设计原则和理念, 以及部分微生物元件应用于作物育种, 利用合成生物学对作物进行的遗传改良正在走向成熟. 然而, 由于单个的农艺性状受多个基因的控制, 且以模块化的方式被调控, 因此合成线路在作物中的构建仍然困难重重. 为解决这一难题, 利用前沿多学科交叉技术对复杂性状形成的调控网络进行全面的解析显得尤为重要.

人工智能借助机器学习模型, 使得作物育种由传统的杂交育种发展为现在的精准定向育种. 基因组技术、大数据技术和人工智能技术的快速发展使育种技术进入育种4.0时代. 智能育种4.0通过在全基因组层面上建立机器学习预测模型, 建立智能组合优良等位基因的自然变异、人工变异、数量性状位点的育种设计方案, 实现智能、高效、定向培育新品种. 对于育种4.0时代, 如何对定制的未来作物进行快速设计是未来农业发展的新方向. 而随着OpenAI公司开发的生成式预训练变换器(generative pre-trained transformer, GPT)大模型的成熟, 育种4.0获得更重要的工具. GPT可以从全球文献中提取文本, 使育种学家能够获得大量的生物学和育种数据或知识, 从而生成一个全面的生物知识图谱. 全球研究和生物知识图谱可以增强作物育种, 进而可以积累更多数据或知识, 以丰富全球研究和生物知识图谱. 这也为作物优异性状的定向合成提供大量的知识和数据. 未来几十年, 生物技术与人工智能技术的协同发展将会为各类经济作物的育种带来新的机遇和挑战, 使作物育种实现智能的革命性转变.

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSV-2023-0230

参考文献

1 Schwille P. Bottom-up synthetic biology: engineering in a tinkerer's world. Science, 2011, 333: 1252–1254
2 Monod J, Jacob F. General conclusions: teleonomic mechanisms in cellular metabolism, growth, and differentiation. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1961, 26: 389–401
3 Gibson D G, Glass J I, Lartigue C, et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. Science, 2010, 329: 52–56
4 Annaluru N, Muller H, Mitchell L A, et al. Total synthesis of a functional designer eukaryotic chromosome. Science, 2014, 344: 55–58
5 Liu W, Stewart Jr. C N. Plant synthetic biology. Trends Plant Sci, 2015, 20: 309–317
6 Chaudhry N, Dwivedi S, Chaudhry V, et al. Bio-inspired nanomaterials in agriculture and food: current status, foreseen applications and challenges. Microb Pathog, 2018, 123: 196–200
7 Duhan J S, Kumar R, Kumar N, et al. Nanotechnology: the new perspective in precision agriculture. Biotechnol Rep, 2017, 15: 11–23
8 Thagun C, Horii Y, Mori M, et al. Non-transgenic gene modulation *via* spray delivery of nucleic acid/peptide complexes into plant nuclei and chloroplasts. ACS Nano, 2022, 16: 3506–3521
9 Thagun C, Chuah J A, Numata K. Targeted gene delivery into various plastids mediated by clustered cell-penetrating and chloroplast-targeting peptides. Adv Sci, 2019, 6: 1902064
10 Wang P, Lombi E, Zhao F J, et al. Nanotechnology: a new opportunity in plant sciences. Trends Plant Sci, 2016, 21: 699–712
11 Medina-Pérez G, Fernández-Luqueño F, Campos-Montiel R G, et al. Nanotechnology in crop protection: status and future trends. In: Opender Koul, ed. Nano-Biopesticides Today and Future Perspectives. New York: Academic Press, 2019. 17–45
12 Fathi A, Zahedi M, Torabian S, et al. Response of wheat genotypes to foliar spray of ZnO and Fe_2O_3 nanoparticles under salt stress. J Plant Nutr, 2017, 40: 1376–1385
13 Verma M L, Kumar P, Sharma D, et al. Advances in nanobiotechnology with special reference to plant systems. In: R. Prasad ed, Plant Nanobionics, Nanotechnology in the Life Sciences. Cham: Springer International Publishing, 2019. 1–17
14 Kim D H, Gopal J, Sivanesan I. Nanomaterials in plant tissue culture: the disclosed and undisclosed. RSC Adv, 2017, 7: 36492–36505
15 Maher M F, Nasti R A, Vollbrecht M, et al. Plant gene editing through de novo induction of meristems. Nat Biotechnol, 2020, 38: 84–89
16 Ruf S, Forner J, Hasse C, et al. High-efficiency generation of fertile transplastomic *Arabidopsis* plants. Nat Plants, 2019, 5: 282–289
17 Kaushal C, Abdin M Z, Kumar S. Chloroplast genome transformation of medicinal plant *Artemisia annua*. Plant Biotechnol J, 2020, 18: 2155–2157
18 Chen K, Wang Y, Zhang R, et al. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. Annu Rev Plant Biol, 2019, 70: 667–697
19 Mao Y, Botella J R, Zhu J K. Heritability of targeted gene modifications induced by plant-optimized CRISPR systems. Cell Mol Life Sci, 2017, 74: 1075–1093
20 Cheng Y, Zhang Y, Li G, et al. CRISPR-Cas12a base editors confer efficient multiplexed genome editing in rice. Plant Commun, 2023, 4: 100601
21 Zhou J, Liu G, Zhao Y, et al. An efficient CRISPR-Cas12a promoter editing system for crop improvement. Nat Plants, 2023, 9: 588–604
22 Su H, Wang Y, Xu J, et al. Generation of the transgene-free canker-resistant Citrus sinensis using Cas12a/crRNA ribonucleoprotein in the T0 generation. Nat Commun, 2023, 14: 3957
23 Duan Z, Yang X, Ji X, et al. Cas12a-based on-site, rapid detection of genetically modified crops. J Integr Plant Biol, 2022, 64: 1856–1859
24 Zhang Y, Massel K, Godwin I D, et al. Applications and potential of genome editing in crop improvement. Genome Biol, 2018, 19: 210
25 Wang M, Wang Z, Mao Y, et al. Optimizing base editors for improved efficiency and expanded editing scope in rice. Plant Biotechnol J, 2019, 17: 1697–1699
26 Hua K, Tao X, Liang W, et al. Simplified adenine base editors improve adenine base editing efficiency in rice. Plant Biotechnol J, 2020, 18: 770–778
27 Deveau H , Barrangou R, Garneau J E, et al. Phage response to CRISPR-Encoded Resistance in *Streptococcus thermophilus*. J Bacteriol, 2008, 190: 1390–1400
28 Mojica F J M, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, et al. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. Microbiol, 2009, 155: 733–740

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSV-2023-0230

29 Hua K, Tao X, Han P, et al. Genome engineering in rice using Cas9 variants that recognize NG PAM sequences. Mol Plant, 2019, 12: 1003–1014

30 Zhong Z, Sretenovic S, Ren Q, et al. Improving plant genome editing with high-fidelity xCas9 and non-canonical PAM-Targeting Cas9-NG. Mol Plant, 2019, 12: 1027–1036

31 Nuñez J K, Chen J, Pommier G C, et al. Genome-wide programmable transcriptional memory by CRISPR-based epigenome editing. Cell, 2021, 184: 2503–2519.e17

32 Liu L, Gallagher J, Arevalo E D, et al. Enhancing grain-yield-related traits by CRISPR-Cas9 promoter editing of maize CLE genes. Nat Plants, 2021, 7: 287–294

33 Schwartz C, Lenderts B, Feigenbutz L, et al. CRISPR-Cas9-mediated 75.5-Mb inversion in maize. Nat Plants, 2020, 6: 1427–1431

34 Meng X, Yu H, Zhang Y, et al. Construction of a genome-wide mutant library in rice using CRISPR/Cas9. Mol Plant, 2017, 10: 1238–1241

35 Caruthers M H. A brief review of DNA and RNA chemical synthesis. Biochem Soc Trans, 2011, 39: 575–580

36 Hughes R A, Ellington A D. Synthetic DNA synthesis and assembly: putting the synthetic in synthetic biology. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2017, 9: a023812

37 Lonnberg H. Synthesis of oligonucleotides on a soluble support. Beilstein J Org Chem, 2017, 13: 1368–1387

38 Molina A G, Sanghvi Y S. Liquid-phase oligonucleotide synthesis: past, present, and future predictions. CP Nucleic Acid Chem, 2019, 77: e82

39 Creusen G, Akintayo C O, Schumann K, et al. Scalable one-pot-liquid-phase oligonucleotide synthesis for model network hydrogels. J Am Chem Soc, 2020, 142: 16610–16621

40 Saiki R K, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, 1986, 230: 1350–1354

41 Saiki R K, Gelfand D H, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 1988, 239: 487–491

42 Horton R M, Hunt H D, Ho S N, et al. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. Gene, 1989, 77: 61–68

43 Smith H O, Hutchison Clyde A. I, Pfannkoch C, et al. Generating a synthetic genome by whole genome assembly: φX174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100: 15440–15445

44 Chen W H, Qin Z J, Wang J, et al. The MASTER (methylation-assisted tailorable ends rational) ligation method for seamless DNA assembly. Nucleic Acids Res, 2013, 41: e93

45 Nour-Eldin H H, Geu-Flores F and Halkier B A. USER cloning and USER fusion: the ideal cloning techniques for small and big laboratories. Methods Mol Biol, 2010, 643: 185–200

46 Blake W J, Chapman B A, Zindal A, et al. Pairwise selection assembly for sequence-independent construction of long-length DNA. Nucleic Acids Res, 2010, 38: 2594–2602

47 Gibson D G, Young L, Chuang R Y, et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. Nat Methods, 2009, 6: 343–345

48 Liang J, Liu Z, Low X Z, et al. Twin-primer non-enzymatic DNA assembly: an efficient and accurate multi-part DNA assembly method. Nucleic Acids Res, 2017, 45: e94

49 Gibson D G, Benders G A, Andrews-Pfannkoch C, et al. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. Science, 2008, 319: 1215–1220

50 Zhou J, Wu R, Xue X, et al. CasHRA (Cas9-facilitated homologous recombination assembly) method of constructing megabase-sized DNA. Nucleic Acids Res, 2016, 44: e124

51 Itaya M, Fujita K, Kuroki A, et al. Bottom-up genome assembly using the Bacillus subtilis genome vector. Nat Methods, 2008, 5: 41–43

52 Kasai Y, Harayama S. Construction of marker-free transgenic strains of *Chlamydomonas reinhardtii* using a Cre/*loxP*-mediated recombinase system. PLoS ONE, 2016, 11: e0161733

53 Kosuri S, Eroshenko N, LeProust E M, et al. Scalable gene synthesis by selective amplification of DNA pools from high-fidelity microchips. Nat Biotechnol, 2010, 28: 1295–1299

54 Bondalapati S, Jbara M, Brik A. Expanding the chemical toolbox for the synthesis of large and uniquely modified proteins. Nat Chem, 2016, 8: 407–418

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSV-2023-0230

55 Kent S B. Total chemical synthesis of proteins. Chem Soc Rev, 2009, 38: 338–351

56 Dawson P E, Muir T W, Clark-Lewis I, et al. Synthesis of proteins by native chemical ligation. Science, 1994, 266: 776–779

57 Hartrampf N, Saebi A, Poskus M, et al. Synthesis of proteins by automated flow chemistry. Science, 2020, 368: 980–987

58 Ponndorf D, Meshcheriakova Y, Thuenemann E C, et al. Plant-made dengue virus-like particles produced by co-expression of structural and non-structural proteins induce a humoral immune response in mice. Plant Biotechnol J, 2021, 19: 745–756

59 Kyriakidou M, Tai H H, Anglin N L, et al. Current strategies of polyploid plant genome sequence assembly. Front Plant Sci, 2018, 9: 1660

60 Zhou C, Olukolu B, Gemenet D C, et al. Assembly of whole-chromosome pseudomolecules for polyploid plant genomes using outbred mapping populations. Nat Genet, 2020, 52: 1256–1264

61 Chen X, Lu Q, Liu H, et al. Sequencing of cultivated peanut, *Arachis hypogaea*, yields insights into genome evolution and oil improvement. Mol Plant, 2019, 12: 920–934

62 Schnable P S, Ware D, Fulton R S, et al. The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. Science, 2009, 326: 1112–1115

63 Appels R, Eversole K, Stein N, et al. Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. Science, 2018, 361: eaar7191

64 Li G, Wang L, Yang J, et al. A high-quality genome assembly highlights rye genomic characteristics and agronomically important genes. Nat Genet, 2021, 53: 574–584

65 Goff S A, Ricke D, Lan T H, et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). Science, 2002, 296: 92–100

66 Schmutz J, Cannon S B, Schlueter J, et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. Nature, 2010, 463: 178–183

67 Li F, Fan G, Lu C, et al. Genome sequence of cultivated upland cotton (*Gossypium hirsutum* TM-1) provides insights into genome evolution. Nat Biotechnol, 2015, 33: 524–530

68 Hu Y, Chen J, Fang L, et al. Gossypium barbadense and *Gossypium hirsutum* genomes provide insights into the origin and evolution of allotetraploid cotton. Nat Genet, 2019, 51: 739–748

69 Liu Y, Du H, Li P, et al. Pan-genome of wild and cultivated soybeans. Cell, 2020, 182: 162–176.e13

70 Ni L, Liu Y, Ma X, et al. Pan-3D genome analysis reveals structural and functional differentiation of soybean genomes. Genome Biol, 2023, 24: 12

71 Huang X H, Long Y X, Wang M J. Pan-3D genome research promotes soybean genetic improvement (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2023, 53: 551–552 [黄鲜晖, 龙跃轩, 王茂军. 泛三维基因组研究推动大豆遗传改良. 中国科学: 生命科学, 2023, 53: 551–552]

72 Wang W, Guo W, Le L, et al. Integration of high-throughput phenotyping, GWAS, and predictive models reveals the genetic architecture of plant height in maize. Mol Plant, 2023, 16: 354–373

73 Zhang Y, Chen G, Deng L, et al. Integrated 3D genome, epigenome and transcriptome analyses reveal transcriptional coordination of circadian rhythm in rice. Nucleic Acids Res, 2023, 51: 9001–9018

74 Xuelei L, Yongxin X, Dongzhi W, et al. Systematic mining and genetic characterization of regulatory factors for wheat spike development. bioRxiv, 2022, 2022: 516122

75 Li X, Chen Z, Zhang G, et al. Analysis of genetic architecture and favorable allele usage of agronomic traits in a large collection of Chinese rice accessions. Sci China Life Sci, 2020, 63: 1688–1702

76 Ren W, Zhao L, Liang J, et al. Genome-wide dissection of changes in maize root system architecture during modern breeding. Nat Plants, 2022, 8: 1408–1422

77 Wu J, Yu R, Wang H, et al. A large-scale genomic association analysis identifies the candidate causal genes conferring stripe rust resistance under multiple field environments. Plant Biotechnol J, 2021, 19: 177–191

78 Wu J, Wang L, Fu J, et al. Resequencing of 683 common bean genotypes identifies yield component trait associations across a north-south cline. Nat Genet, 2020, 52: 118–125

79 Kubis A, Bar-Even A. Synthetic biology approaches for improving photosynthesis. J Exp Bot, 2019, 70: 1425–1433

80 Parry M A J, Andralojc P J, Scales J C, et al. Rubisco activity and regulation as targets for crop improvement. J Exp Bot, 2013, 64: 717–730

81 Sharwood R E. Engineering chloroplasts to improve Rubisco catalysis: prospects for translating improvements into food and fiber crops. New Phytol, 2017, 213: 494–510

82 Martin-Avila E, Lim Y L, Birch R, et al. Modifying plant photosynthesis and growth via simultaneous chloroplast transformation of Rubisco large and small subunits. Plant Cell, 2020, 32: 2898–2916

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSV-2023-0230

83 Zhou Y J, Li X, Chen G Y. Res rearch progress in plant RuBisCO (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2023, 53: 1213–1229 [周昱婕, 李霞, 陈根云, et al. 植物RuBisCO研究进展. 中国科学: 生命科学, 2023, 53: 1213–1229]

84 Chida H, Nakazawa A, Akazaki H, et al. Expression of the algal cytochrome c_6 gene in *Arabidopsis* enhances photosynthesis and growth. Plant Cell Physiol, 2007, 48: 948–957

85 Kromdijk J, Głowacka K, Leonelli L, et al. Improving photosynthesis and crop productivity by accelerating recovery from photoprotection. Science, 2016, 354: 857–861

86 Papanatsiou M, Petersen J, Henderson L, et al. Optogenetic manipulation of stomatal kinetics improves carbon assimilation, water use, and growth. Science, 2019, 363: 1456–1459

87 Hart J E, Sullivan S, Hermanowicz P, et al. Engineering the phototropin photocycle improves photoreceptor performance and plant biomass production. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116: 12550–12557

88 Fox T, DeBruin J, Haug Collet K, et al. A single point mutation in *Ms44* results in dominant male sterility and improves nitrogen use efficiency in maize. Plant Biotechnol J, 2017, 15: 942–952

89 Wu J, Lawit S J, Weers B, et al. Overexpression of *zmm28* increases maize grain yield in the field. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116: 23850–23858

90 Simmons C R, Weers B P, Reimann K S, et al. Maize BIG GRAIN1 homolog overexpression increases maize grain yield. Plant Biotechnol J, 2020, 18: 2304–2315

91 Jia H, Li M, Li W, et al. A serine/threonine protein kinase encoding gene KERNEL NUMBER PER ROW6 regulates maize grain yield. Nat Commun, 2020, 11: 988

92 Lin H C, Arrivault S, Coe R A, et al. A partial C_4 photosynthetic biochemical pathway in rice. Front Plant Sci, 2020, 11: 564463

93 Ermakova M, Arrivault S, Giuliani R, et al. Installation of C_4 photosynthetic pathway enzymes in rice using a single construct. Plant Biotechnol J, 2021, 19: 575–588

94 Miller T E, Beneyton T, Schwander T, et al. Light-powered CO_2 fixation in a chloroplast mimic with natural and synthetic parts. Science, 2020, 368: 649–654

95 South P F, Cavanagh A P, Liu H W, et al. Synthetic glycolate metabolism pathways stimulate crop growth and productivity in the field. Science, 2019, 363: 45

96 Wang L M, Shen B R, Li B D, et al. A synthetic photorespiratory shortcut enhances photosynthesis to boost biomass and grain yield in rice. Mol Plant, 2020, 13: 1802–1815

97 Shen B R, Wang L M, Lin X L, et al. Engineering a new chloroplastic photorespiratory bypass to increase photosynthetic efficiency and productivity in rice. Mol Plant, 2019, 12: 199–214

98 Schada von Borzyskowski L, Severi F, Krüger K, et al. Marine Proteobacteria metabolize glycolate via the β-hydroxyaspartate cycle. Nature, 2019, 575: 500–504

99 Roell M S, Schada von Borzyskowski L, Westhoff P, et al. A synthetic C_4 shuttle via the β-hydroxyaspartate cycle in C_3 plants. Proc Natl Acad Sci USA, 2021, 118: e2022307118

100 Stewart D W, Costa C, Dwyer L M, et al. Canopy structure, light interception, and photosynthesis in maize. Agron J, 2003, 95: 1465–1474

101 Tian J, Wang C, Xia J, et al. Teosinte ligule allele narrows plant architecture and enhances high-density maize yields. Science, 2019, 365: 658–664

102 Zhang Y, Yu C, Lin J, et al. OsMPH1 regulates plant height and improves grain yield in rice. PLoS ONE, 2017, 12: e0180825

103 Liu W T, Chen P W, Chen L C, et al. Suppressive effect of microRNA319 expression on rice plant height. Theor Appl Genet, 2017, 130: 1507–1518

104 Paul K, Saha C, Nag M, et al. A tripartite interaction among the basidiomycete *Rhodotorula mucilaginosa*, N_2-fixing endobacteria, and rice improves plant nitrogen nutrition. Plant Cell, 2020, 32: 486–507

105 Zhang L, Zhang M, Huang S, et al. A highly conserved core bacterial microbiota with nitrogen-fixation capacity inhabits the xylem sap in maize plants. Nat Commun, 2022, 13: 3361

106 Allen R S, Tilbrook K, Warden A C, et al. Expression of 16 nitrogenase proteins within the plant mitochondrial matrix. Front Plant Sci, 2017, 8: 287

107 Burén S, Young E M, Sweeny E A, et al. Formation of nitrogenase NifDK tetramers in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. ACS

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSV-2023-0230

Synth Biol, 2017, 6: 1043–1055
108 Xiang N, Guo C, Liu J, et al. Using synthetic biology to overcome barriers to stable expression of nitrogenase in eukaryotic organelles. Proc Natl Acad Sci USA, 2020, 117: 16537–16545
109 Dong W, Zhu Y, Chang H, et al. An SHR-SCR module specifies legume cortical cell fate to enable nodulation. Nature, 2021, 589: 586–590
110 Geddes B A, Paramasivan P, Joffrin A, et al. Engineering transkingdom signalling in plants to control gene expression in rhizosphere bacteria. Nat Commun, 2019, 10: 3430
111 Bozsoki Z, Gysel K, Hansen S B, et al. Ligand-recognizing motifs in plant LysM receptors are major determinants of specificity. Science, 2020, 369: 663–670
112 Colanero S, Tagliani A, Perata P, et al. Alternative splicing in the anthocyanin fruit gene encoding an R2R3 MYB transcription factor affects anthocyanin biosynthesis in tomato fruits. Plant Commun, 2020, 1: 100006
113 Jian W, Cao H, Yuan S, et al. SlMYB75, an MYB-type transcription factor, promotes anthocyanin accumulation and enhances volatile aroma production in tomato fruits. Hortic Res, 2019, 6: 22
114 Sun C, Deng L, Du M, et al. A transcriptional network promotes anthocyanin biosynthesis in tomato flesh. Mol Plant, 2020, 13: 42–58
115 Tian Y S, Wang B, Peng R H, et al. Enhancing carotenoid biosynthesis in rice endosperm by metabolic engineering. Plant Biotechnol J, 2019, 17: 849–851
116 Meng Y, Wang Z, Wang Y, et al. The MYB activator WHITE PETAL1 associates with MtTT8 and MtWD40-1 to regulate carotenoid-derived flower pigmentation in *Medicago truncatula*. Plant Cell, 2019, 31: 2751–2767
117 Zhu Q, Zeng D, Yu S, et al. From golden rice to aSTARice: bioengineering astaxanthin biosynthesis in rice endosperm. Mol Plant, 2018, 11: 1440–1448
118 Liu X, Ma X, Wang H, et al. Metabolic engineering of astaxanthin-rich maize and its use in the production of biofortified eggs. Plant Biotechnol J, 2021, 19: 1812–1823
119 Wang B, Wang Y, Deng Y, et al. Synthesis of betanin by expression of the core betalain biosynthetic pathway in carrot (*Daucus carota* L.). Horticultural Plant J, 2023, doi: 10.1016/j.hpj.2023.05.012
120 Strobbe S, De Lepeleire J, Van Der Straeten D. From in planta function to vitamin-rich food crops: the ACE of biofortification. Front Plant Sci, 2018, 9: 1862
121 Hsieh P H, Chung Y H, Lee K T, et al. The rice PALE1 homolog is involved in the biosynthesis of vitamin B1. Plant Biotechnol J, 2021, 19: 218–220
122 Mangel N, Fudge J B, Li K T, et al. Enhancement of vitamin B_6 levels in rice expressing Arabidopsis vitamin B_6 biosynthesis *de novo* genes. Plant J, 2019, 99: 1047–1065
123 Nan N, Wang J, Shi Y, et al. Rice plastidial NAD-dependent malate dehydrogenase 1 negatively regulates salt stress response by reducing the vitamin B_6 content. Plant Biotechnol J, 2020, 18: 172–184
124 Naqvi S, Zhu C, Farre G, et al. Transgenic multivitamin corn through biofortification of endosperm with three vitamins representing three distinct metabolic pathways. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106: 7762–7767
125 Storozhenko S, De Brouwer V, Volckaert M, et al. Folate fortification of rice by metabolic engineering. Nat Biotechnol, 2007, 25: 1277–1279
126 de la Garza R D, Quinlivan E P, Klaus S M J, et al. Folate biofortification in tomatoes by engineering the pteridine branch of folate synthesis. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 13720–13725
127 Díaz de la Garza R I, Gregory Iii J F, Hanson A D. Folate biofortification of tomato fruit. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104: 4218–4222
128 Blancquaert D, Van Daele J, Strobbe S, et al. Improving folate (vitamin B_9) stability in biofortified rice through metabolic engineering. Nat Biotechnol, 2015, 33: 1076–1078
129 De Lepeleire J, Strobbe S, Verstraete J, et al. Folate biofortification of potato by tuber-specific expression of four folate biosynthesis genes. Mol Plant, 2018, 11: 175–188
130 Lian T, Guo W, Chen M, et al. Genome-wide identification and transcriptional analysis of folate metabolism-related genes in maize kernels. BMC Plant Biol, 2015, 15: 204
131 Guo W, Lian T, Wang B, et al. Genetic mapping of folate QTLs using a segregated population in maize. JIPB, 2019, 61: 675–690
132 Smirnoff N. and Vitamin C: the metabolism and functions of ascorbic acid in plants, In: Rébeillé F, Douce R, eds, Advances in Botanical Research. New York: Academic Press, 2011. 107–177

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSV-2023-0230

133 Munir S, Mumtaz M A, Ahiakpa J K, et al. Genome-wide analysis of Myo-inositol oxygenase gene family in tomato reveals their involvement in ascorbic acid accumulation. BMC Genom, 2020, 21: 284

134 Ye J, Li W, Ai G, et al. Genome-wide association analysis identifies a natural variation in basic helix-loop-helix transcription factor regulating ascorbate biosynthesis via D-mannose/L-galactose pathway in tomato. PLoS Genet, 2019, 15: e1008149

135 Feng C, Feng C, Lin X, et al. A chromosome-level genome assembly provides insights into ascorbic acid accumulation and fruit softening in guava (*Psidium guajava*). Plant Biotechnol J, 2021, 19: 717–730

136 Hefferon K. Nutritionally enhanced food crops; progress and perspectives. Int J Mol Sci, 2015, 16: 3895–3914

137 Narayanan N, Beyene G, Chauhan R D, et al. Biofortification of field-grown cassava by engineering expression of an iron transporter and ferritin. Nat Biotechnol, 2019, 37: 144–151

138 Zhu J K. Abiotic stress signaling and responses in plants. Cell, 2016, 167: 313–324

139 Gong Z, Xiong L, Shi H, et al. Plant abiotic stress response and nutrient use efficiency. Sci China Life Sci, 2020, 63: 635–674

140 Atif , Shahid , Waqas , et al. Insights on calcium-dependent protein kinases (cpks) signaling for abiotic stress tolerance in plants. Int J Mol Sci, 2019, 20: 5298

141 de Zelicourt A, Colcombet J, Hirt H. The role of MAPK Modules and ABA during abiotic stress signaling. Trends Plant Sci, 2016, 21: 677–685

142 Ye Y, Ding Y, Jiang Q, et al. The role of receptor-like protein kinases (RLKs) in abiotic stress response in plants. Plant Cell Rep, 2017, 36: 235–242

143 Sun X, Cai X, Yin K, et al. Wild soybean SNARE proteins BET1s mediate the subcellular localization of the cytoplasmic receptor-like kinases CRCK1s to modulate salt stress responses. Plant J, 2021, 105: 771–785

144 Yang Y, Guo Y. Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt-stress responses. New Phytol, 2018, 217: 523–539

145 Jing P, Kong D, Ji L, et al. OsClo5 functions as a transcriptional co-repressor by interacting with OsDi19-5 to negatively affect salt stress tolerance in rice seedlings. Plant J, 2021, 105: 800–815

146 Begcy K, Nosenko T, Zhou L Z, et al. Male sterility in maize after transient heat stress during the tetrad stage of pollen development. Plant Physiol, 2019, 181: 683–700

147 Ribeiro C, Hennen-Bierwagen T A, Myers A M, et al. Engineering 6-phosphogluconate dehydrogenase improves grain yield in heat-stressed maize. Proc Natl Acad Sci USA, 2020, 117: 33177–33185

148 Dong Z, Xu Z, Xu L, et al. *Necrotic upper tips1* mimics heat and drought stress and encodes a protoxylem-specific transcription factor in maize. Proc Natl Acad Sci USA, 2020, 117: 20908–20919

149 Chinnusamy V, Zhu J, Zhu J K. Cold stress regulation of gene expression in plants. Trends Plant Sci, 2007, 12: 444–451

150 Pearce R. Plant freezing and damage. Ann Bot, 2001, 87: 417–424

151 Zeng R, Li Z, Shi Y, et al. Natural variation in a type-A response regulator confers maize chilling tolerance. Nat Commun, 2021, 12: 4713

152 Li Z, Fu D, Wang X, et al. The transcription factor *bZIP68* negatively regulates cold tolerance in maize. Plant Cell, 2022, 34: 2833–2851

153 Jiang H, Shi Y, Liu J, et al. Natural polymorphism of ZmICE1 contributes to amino acid metabolism that impacts cold tolerance in maize. Nat Plants, 2022, 8: 1176–1190

154 Boller T, He S Y. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. Science, 2009, 324: 742–744

155 Fisher M C, Henk D A, Briggs C J, et al. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. Nature, 2012, 484: 186–194

156 Hawkins N J, Fraaije B A. Fitness penalties in the evolution of fungicide resistance. Annu Rev Phytopathol, 2018, 56: 339–360

157 He M, Su J, Xu Y, et al. Discovery of broad-spectrum fungicides that block septin-dependent infection processes of pathogenic fungi. Nat Microbiol, 2020, 5: 1565–1575

158 Xia Y, Ma Z, Qiu M, et al. N-glycosylation shields *Phytophthora sojae* apoplastic effector PsXEG1 from a specific host aspartic protease. Proc Natl Acad Sci USA, 2020, 117: 27685–27693

159 Wang Q, Cuellar W J, Rajamäki M, et al. Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. Mol Plant Pathol, 2008, 9: 237–250

160 Wu H, Qu X, Dong Z, et al. WUSCHEL triggers innate antiviral immunity in plant stem cells. Science, 2020, 370: 227–231

161 Xu Z, Zhou Z, Cheng Z, et al. A transcription factor ZmGLK36 confers broad resistance to maize rough dwarf disease in cereal crops. Nat Plants, 2023, 9: 1720–1733

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSV-2023-0230

162 Meents A K, Chen S P, Reichelt M, et al. Volatile DMNT systemically induces jasmonate-independent direct anti-herbivore defense in leaves of sweet potato (*Ipomoea batatas*) plants. Sci Rep, 2019, 9: 17431

163 Bao W, Li A, Zhang Y, et al. Improvement of host-induced gene silencing efficiency via polycistronic-tRNA-amiR expression for multiple target genes and characterization of RNAi mechanism in *Mythimna separata*. Plant Biotechnol J, 2021, 19: 1370–1385

164 Kessler A, Baldwin I T. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. Annu Rev Plant Biol, 2002, 53: 299–328

165 Takabayashi J, Dicke M. Plant—carnivore mutualism through herbivore-induced carnivore attractants. Trends Plant Sci, 1996, 1: 109–113

166 Li Y, Hallerman E M, Wu K, et al. Insect-resistant genetically engineered crops in China: development, application, and prospects for use. Annu Rev Entomol, 2020, 65: 273–292

167 Li C, Dong L, Durairaj J, et al. Maize resistance to witchweed through changes in strigolactone biosynthesis. Science, 2023, 379: 94–99

168 Bonasio R, Tu S, Reinberg D. Molecular signals of epigenetic states. Science, 2010, 330: 612–616

169 Zhou L, Tian S, Qin G. RNA methylomes reveal the m^6A-mediated regulation of DNA demethylase gene SlDML2 in tomato fruit ripening. Genome Biol, 2019, 20: 156

170 Yu Q, Liu S, Yu L, et al. RNA demethylation increases the yield and biomass of rice and potato plants in field trials. Nat Biotechnol, 2021, 39: 1581–1588

171 He K, Zhou X L, Wang Y Q, et al. RNA regulation and improvement of crop agronomic traits (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2024, 54 [何凯, 周晓利, 王玉秋, 等. RNA调控与作物农艺性状改良. 中国科学: 生命科学, 2024, 54]

172 Xu L, Yuan K, Yuan M, et al. Regulation of rice tillering by RNA-directed DNA methylation at miniature inverted-repeat transposable elements. Mol Plant, 2020, 13: 851–863

173 Veley K M, Elliott K, Jensen G, et al. Improving cassava bacterial blight resistance by editing the epigenome. Nat Commun, 2023, 14: 85

174 Cui N, Chen X, Shi Y, et al. Changes in the epigenome and transcriptome of rice in response to *Magnaporthe oryzae* infection. Crop J, 2021, 9: 843–853

175 Tang Y, Gao C C, Gao Y, et al. OsNSUN2-Mediated 5-methylcytosine mRNA modification enhances rice adaptation to high temperature. Dev Cell, 2020, 53: 272–286.e7

176 Liu K, Chen J, Sun S, et al. Histone deacetylase OsHDA706 increases salt tolerance via H4K5/K8 deacetylation of *OsPP2C49* in rice. JIPB, 2023, 65: 1394–1407

177 Li Y, Chen M, Khan A H, et al. Histone H3 lysine 27 trimethylation suppresses jasmonate biosynthesis and signaling to affect male fertility under high temperature in cotton. Plant Commun, 2023, 4: 100660

178 Elowitz M B, Leibler S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. Nature, 2000, 403: 335–338

179 Gardner T S, Cantor C R, Collins J J. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. Nature, 2000, 403: 339–342

180 Park M, Patel N, Keung A J, et al. Engineering epigenetic regulation using synthetic read-write modules. Cell, 2019, 176: 227–238.e20

181 Xin Y, Shen C, She Y, et al. Biosynthesis of triacylglycerol molecules with a tailored PUFA profile in industrial microalgae. Mol Plant, 2019, 12: 474–488

182 Perez-Matas E, Hidalgo-Martinez D, Moyano E, et al. Overexpression of ^{BAPT} and ^{DBTNBT} genes in *Taxus baccatain vitro* cultures to enhance the biotechnological production of paclitaxel. Plant Biotechnol J, 2024, 22: 233–247

183 Zhang S, Sang X, Hou D, et al. Plant-derived RNAi therapeutics: a strategic inhibitor of HBsAg. Biomater, 2019, 210: 83–93

184 Habibi P, Daniell H, Soccol C R, et al. The potential of plant systems to break the HIV-TB link. Plant Biotechnol J, 2019, 17: 1868–1891

185 Jugler C, Sun H, Nguyen K, et al. A novel plant-made monoclonal antibody enhances the synergetic potency of an antibody cocktail against the SARS-CoV-2 Omicron variant. Plant Biotechnol J, 2023, 21: 549–559

186 Sun H, Jugler C, Nguyen K, et al. The potency and synergy of plant-made monoclonal antibodies against the BA.5 variant of SARS-CoV-2. Plant Biotechnol J, 2023, 21: 463–465

187 Saba-Mayoral A, Rosa C, Sobrino-Mengual G, et al. Production of the SARS-CoV-2 receptor-binding domain in stably transformed rice plants for developing country applications. Plant Biotechnol J, 2023, 21: 1094–1096

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSV-2023-0230

Applications of synthetic biology in genetic improvement of crops

WANG FanHua[1,2], LE Liang[1] & PU Li[1]

1 Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;
2 School of Life Science, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China

As a newly emerged field of study, synthetic biology combines engineering principles with biology to design and produce new biological components and modules in order to obtain desired artificial biological systems. In recent years, synthetic biology has developed rapidly. Advances in synthetic biological techniques allow for precise improvement of genetic traits in crop plants, such as increasing yield, improving product quality, and enhancing resistance against biotic and abiotic stresses. In addition, the engineered biosynthesis of many natural products has been achieved through the construction of microbial or plant cell factories to meet a wider range of human needs. In this review, we introduce recent advances in synthetic biology techniques widely applied in plants, including the design and modification of functional components, synthesis and assembly of components, and exploration of regulatory circuits and functional modules. We also summarize the latest progress in enhancing crop yield, facilitating efficient nitrogen fixation, improving crop nutrition and quality, enhancing crop adaptability to the environment, synthesizing epigenetic modules, and constructing plant cell factories using synthetic biology. Furthermore, the current challenges and future development of synthetic biology in crop genetic improvement are discussed.

synthetic biology, biological components, biological modules, crop improvement, future agriculture

doi: 10.1360/SSV-2023-0230

https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSV-2023-0230