

· 综 述 ·

# CRISPR/Cas9 基因编辑技术在食用菌中的应用现状

李荣平<sup>1</sup>, 李荣春<sup>1,2,3,4\*</sup>

- 1 云南菌视界生物科技有限公司 云南省级(珍稀食用菌)企业工程技术中心 昆明市级(食用菌)企业工程技术中心, 云南 昆明 650200
- 2 云南省张劲松专家工作站, 云南 昆明 650200
- 3 云南(昆明)张劲松药用真菌专家工作站, 云南 昆明 650200
- 4 云南农业大学食用菌研究所, 云南 昆明 650201

李荣平, 李荣春. CRISPR/Cas9 基因编辑技术在食用菌中的应用现状[J]. 生物工程学报, 2024, 40(4): 988-1001.

LI Rongping, LI Rongchun. Application of CRISPR/Cas9 gene editing technology in edible fungi: a review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(4): 988-1001.

**摘 要:** CRISPR/Cas9 基因编辑系统是一项通用的基因修饰技术, 是植物、动物、真菌以及微生物的功能基因和遗传育种研究的重要技术。本文介绍了该技术在食用真菌的基因研究和遗传育种中的应用现状, 包括 Cas9 和 sgRNA 的递送和表达策略、遗传转化方法、突变体筛选以及 DNA 双链断裂后的靶位点的修复策略。同时总结了该技术在食用菌中应用所面临的主要问题及其优化策略, 并结合个人研究背景展望了其未来在食用菌研究中的应用价值。

**关键词:** CRISPR/Cas9; 食用菌; 基因编辑; Cas9-RNP

## Application of CRISPR/Cas9 gene editing technology in edible fungi: a review

LI Rongping<sup>1</sup>, LI Rongchun<sup>1,2,3,4\*</sup>

- 1 Kunming (Edible Fungi) Enterprise Technology Center, Yunnan (Rare Edible Fungi) Enterprise Technology Center, Yunnan Junshijie Biotechnology Co., Ltd., Kunming 650200, Yunnan, China
- 2 Zhang Jinsong Expert Workstation of Yunnan Province, Kunming 650200, Yunnan, China
- 3 Zhang Jinsong Medicinal Fungi Expert Workstation of Yunnan (Kunming), Kunming 650200, Yunnan, China
- 4 Institute of Edible Fungi, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, Yunnan, China

**Abstract:** The CRISPR/Cas9 gene editing system is a versatile technology for modifying gene, playing

资助项目: 国家自然科学基金(U1802231); 云南省张劲松专家工作站(202305AF150084); 云南昆明张劲松药用真菌专家工作站(YSZJGZZ-2022043)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (U1802231), Zhang Jinsong Expert Workstation of Yunnan Province (202305AF150084), and Zhang Jinsong Medicinal Fungi Expert Workstation of Yunnan (Kunming) (YSZJGZZ-2022043).

\*Corresponding author. E-mail: rongchunli@126.com

Received: 2023-10-23; Accepted: 2023-12-19; Published online: 2023-12-25

a crucial role in the study of functional genes and genetic breeding of plants, animals, fungi, and microorganisms. This review provides a comprehensive analysis of the application of this technology in gene research and genetic breeding of edible fungi. The review covers various aspects, including the delivery and expression strategies of Cas9 and sgRNA, genetic transformation methods, mutant screening, and repair strategies for target sites following DNA double-strand breaks. Additionally, the review summarizes the main challenges and optimization strategies associated with the application of this technology in edible fungi. Lastly, the future application potential of this technology in edible fungi research is discussed, drawing from the authors' personal research background.

**Keywords:** CRISPR/Cas9; edible fungi; genome editing; Cas9-RNP

食用菌(edible fungi)是一类具有肥硕子实体的大型真菌的总称,可作食品、入药或是食药两用。食用菌营养价值极高,拥有独特的香气和鲜味,被认为是蛋白质等多种人体必需营养素的重要来源<sup>[1]</sup>。同时,食用菌次生代谢物还有抗氧化等多种药理活性<sup>[2]</sup>,是公认的食品和制药行业的重要原料。目前,许多国家已建立完整的食用菌相关产业链。随着食用菌市场的迅速壮大,对优质高产菌株的需求激增,同时也面临着菌株退化等各种挑战<sup>[3-4]</sup>。然而,食用菌本身复杂的遗传背景,加之传统的育种手段效率低、耗时费力且育种方向极不稳定,无法有效开展品种改良<sup>[5]</sup>。因此,开发出一种稳定、高效的分子育种技术是食用菌基础研究和产业发展的重要基础。

基因组编辑是一种在特定位置操控基因组 DNA 序列的新技术。现有的同源重组技术(homologous recombination, HR)、锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)技术和类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)技术都能实现对靶基因序列的定点修饰,但考虑到成本、效率以及食品安全等,仍无法满足于食用菌的分子育种需求<sup>[6-7]</sup>。相比之下,第三代基因编辑技术成簇的规则间隔短回文重复序列/CRISPR 相关蛋白 9(clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated protein 9, CRISPR/Cas9)系统,自开发以来凭借其简便、高效和精确的特性,已成功应用于多种模式生物的基因组编辑,

是目前最主流的基因打靶工具<sup>[8]</sup>。自 2016 年在食用菌中首次应用的报道以来,CRISPR/Cas9 系统不仅加快了食用菌领域的基础研发,也为产业突破“瓶颈”提供了新思路<sup>[9]</sup>。本文综述了 CRISPR/Cas9 系统在现有报道的食用真菌中的应用现状,针对应用中面临的主要问题提出了一系列的优化策略,并整理出 CRISPR/Cas9 在目标食用菌中应用时需要考虑的多种关键因素,为后续相关研发工作提供了理论基础。

## 1 食用菌 CRISPR/Cas9 基因编辑系统的现状

生命科学领域理论和技术的更新迭代,让 CRISPR/Cas9 系统成为食用菌相关基因定点修饰、品种定向改造以及创制新种质资源最有力的工具。目前,该技术在食用菌中的开发和应用主要包括担子菌门的大型真菌,如双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*)<sup>[9-10]</sup>、灰盖鬼伞(*Coprinopsis cinerea*)<sup>[11-12]</sup>、金针菇(*Flammulina filiformis*)<sup>[13-18]</sup>、灵芝(*Ganoderma lucidum*)<sup>[19-26]</sup>、平菇(*Pleurotus ostreatus*)<sup>[27-34]</sup>、裂褶菌(*Schizophyllum commune*)<sup>[35]</sup>、玉米黑粉菌(*Ustilago maydis*)<sup>[36-39]</sup>、杏鲍菇(*Pleurotus eryngii*)<sup>[40]</sup>、香菇(*Lentinula edodes*)<sup>[41-42]</sup>和真姬菇(*Hypsizygus marmoreus*)<sup>[43]</sup>,以及少数子囊菌如蛹虫草(*Cordyceps militaris*)<sup>[44-48]</sup>和竹黄菌(*Shiraia bambusicola*)<sup>[49-50]</sup>。CRISPR/Cas9 系统的应用概况如表 1 所示。

表 1 CRISPR/Cas9 系统在食用菌中的应用概况

Table 1 Application of CRISPR/Cas9 system in edible fungi

Species	Promoter for sgRNA	Promoter for Cas9	Target gene	Selective marker	Materials	Methods	References
<i>Agaricus bisporus</i>	—	—	<i>ppo</i>	—	—	—	[9]
	<i>U6</i>	<i>gpd</i>	<i>ppo4</i>	<i>hyg<sup>r</sup></i>	Mycelia	ATMT	[10]
<i>Coprinopsis cinerea</i>	<i>U6</i>	<i>ded1/gpd</i>	<i>gfp</i>	<i>hyg<sup>r</sup></i>	Protoplast	PMT	[11]
	Synthesis <i>in vitro</i>	Synthesis <i>in vitro</i>	<i>cre1</i>	split-marker	Protoplast	PMT	[12]
<i>Flammulina filiformis</i>	<i>H1</i>	<i>gpd-fvs</i>	<i>mads-8</i>	<i>hyg<sup>r</sup></i>	Protoplast	PMT	[13]
	None	<i>gpd</i>	none	<i>hyg<sup>r</sup></i>	Mycelia	ATMT	[14]
	<i>H1</i>	<i>gpd</i>	<i>hk1/hk2</i>	<i>hyg<sup>r</sup></i>	Protoplast	PMT	[15]
	<i>gpd</i>	<i>gpd</i>	<i>fvgpcr1/fvgpcr2</i>	<i>hyg<sup>r</sup></i>	Mycelia	ATMT	[16]
	Synthesis <i>in vitro</i>	Synthesis <i>in vitro</i>	<i>pyrg</i>	5-FOA	Protoplast	PMT	[17]
	<i>U6</i>	<i>gpd</i>	<i>pyrg</i>	5-FOA	Protoplast	PMT	[18]
<i>Ganoderma lucidum</i>	<i>T7 in vitro</i> transcription	<i>gpd</i>	<i>ura3</i>	<i>cbx<sup>r</sup></i>	Protoplast	PMT	[19]
	<i>U6</i>	<i>gpd</i>	<i>glcrz1/glcrz2</i>	<i>cbx<sup>r</sup></i>	Protoplast	PMT	[20]
	<i>T7 in vitro</i> transcription	<i>gpd</i>	<i>ura3/gl17624</i>	<i>bar<sup>r</sup></i>	Protoplast	PMT	[21]
	<i>U6</i>	<i>gpd</i>	<i>ura3/cyp5150l8/cyp505d13</i>	<i>cbx<sup>r</sup></i>	Protoplast	PMT	[22]
	<i>T7 in vitro</i> transcription	<i>gpd</i>	<i>ura3/ku70</i>	<i>hyg<sup>r</sup></i>	Protoplast	PMT	[23]
	<i>U6</i>	<i>gpd</i>	<i>glcrz2/cyp5150l8</i>	<i>hyg<sup>r</sup></i>	Protoplast	PMT	[24]
	<i>T7 in vitro</i> transcription	Synthesis <i>in vitro</i>	<i>pyrg</i>	5-FOA	Protoplast	PMT	[25]
	<i>T7 in vitro</i> transcription	<i>gpd</i>	<i>ura3</i>	<i>cbx<sup>r</sup>/5-FOA</i>	Protoplast	PMT	[26]
<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>U6</i>	<i>ef3</i>	<i>pcc1/clp1</i>	<i>hyg<sup>r</sup></i>	Protoplast	PMT	[27]
	<i>U6</i>	<i>ef3</i>	<i>pyrg/fcy1</i>	<i>hyg<sup>r</sup></i>	Protoplast	PMT	[28]
	Synthesis <i>in vitro</i>	Synthesis <i>in vitro</i>	<i>pyrg</i>	<i>hyg<sup>r</sup></i>	Protoplast	PMT	[29]
	<i>U6</i>	<i>ef3</i>	<i>fcy1</i>	<i>hyg<sup>r</sup></i>	Protoplast	PMT	[30]
	<i>U6</i>	<i>ef3</i>	<i>fcy1/vp1/vp2/vp3/62347</i>	<i>hyg<sup>r</sup></i>	Protoplast	PMT	[31]
	<i>U6</i>	<i>ef3</i>	<i>mer3/msh4</i>	<i>hyg<sup>r</sup></i>	Protoplast	PMT	[32]
	Synthesis <i>in vitro</i>	Synthesis <i>in vitro</i>	<i>fcy1/pyrg</i>	5-FOA	Protoplast	PMT	[33]
	<i>U6</i>	<i>ef3</i>	<i>vp2/vp3/mnp2/mnp3/mnp6/lac2</i>	<i>hyg<sup>r</sup></i>	Protoplast	PMT	[34]
<i>Schizophyllum commune</i>	Synthesis <i>in vitro</i>	Heterologous expression	<i>hom2</i>	<i>nour<sup>r</sup></i>	Protoplast	PMT	[35]
<i>Ustilago maydis</i>	<i>U6</i>	<i>otef</i>	<i>be/bw</i>	<i>cbx<sup>r</sup></i>	Protoplast	PMT	[36]
	<i>U6/tRNA</i>	<i>hsp70</i>	<i>eff1-1,2,3,4,8</i>	<i>cbx<sup>r</sup></i>	Protoplast	PMT	[37]
	<i>U6</i>	<i>otef</i>	<i>um03848/um03849</i>	<i>hyg<sup>r</sup>/cbx<sup>r</sup></i>	Protoplast	PMT	[38]
	<i>U6</i>	<i>otef</i>	<i>don3/rua1/emt1/mat1/cdk5</i>	<i>cbx<sup>r</sup></i>	Protoplast	PMT	[39]

(待续)

(续表 1)

Species	Promoter for sgRNA	Promoter for Cas9	Target gene	Selective marker	Materials	Methods	References
<i>Pleurotus eryngii</i>	<i>U6</i>	<i>gpd</i>	<i>pyrg</i>	<i>cbx<sup>r</sup></i>	Protoplast	PMT	[40]
<i>Lentinula edodes</i>	<i>U6</i>	<i>gpd</i>	<i>hd1</i>	<i>hyg<sup>r</sup></i>	Protoplast	PMT	[41]
	—	—	<i>pyrg</i>	<i>cbx<sup>r</sup></i>	—	—	[42]
<i>Hypsizygus marmoreus</i>	<i>U6</i>	<i>CaMV35S/gpd</i>	<i>ura5</i>	<i>cbx<sup>r</sup></i>	Conidium	ATMT	[43]
<i>Cordyceps militaris</i>	<i>T7 in vitro</i> transcription	<i>gpd</i>	<i>ura3</i>	<i>bar<sup>r</sup>/5-FOA</i>	Conidium/ protoplast	ATMT/ PMT	[44]
	<i>tRNA/PtrpC</i>	<i>gpd</i>	<i>ura3</i>	5-FOA	Conidium/ protoplast	ATMT/ PMT	[45]
	<i>tRNA/AfU6-tRNA<sub>Gly</sub></i>	<i>gpd</i>	<i>cmwc-1/cmvd</i>	<i>hyg<sup>r</sup></i>	Protoplast	PMT	[46]
	<i>5S-1/5S-2/U6</i>	<i>gpd</i>	<i>ura5</i>	5-FOA	Protoplast	PMT	[47]
	Synthesis <i>in vitro</i>	Synthesis <i>in vitro</i>	<i>cmhk1</i>	<i>hyg<sup>r</sup></i>	Protoplast	PMT	[48]
<i>Shiraia bambusicola</i>	<i>U6</i>	<i>ef1a</i>	<i>sbapks</i>	<i>hyg<sup>r</sup></i>	Protoplast	PMT	[49]
	<i>U6/5SrRNA</i>	<i>gpd</i>	<i>pyrg/ku80</i>	5-FOA	Protoplast	PMT	[50]

PMT: PEG (polyethylene glycerol)-mediated transformation; ATMT: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation; — indicates that the data were not reported; *hyg<sup>r</sup>*: Hygromycin resistance; 5-FOA: 5-fluorooric acid; *cbx<sup>r</sup>*: Carboxin resistance; *bar<sup>r</sup>*: Phosphinothricin resistance; *nour<sup>r</sup>*: Nourseothricin resistance.

### 1.1 sgRNA 的表达策略

作为 CRISPR/Cas9 系统的重要元件之一, sgRNA 能否高效地表达直接影响基因编辑的成败, 而 sgRNA 的转录水平取决于启动子活性的强弱, 因此启动子的选择很关键。

sgRNA 在细胞内的表达一般由 RNA 聚合酶 III (RNA polymerase III, Pol III)型启动子驱动。在真核生物中, *U6 sn-RNA* 作为一种参与剪接反应的小分子 RNA, 始终保持高水平表达, 因此组成型 *U6* 启动子常被作为驱动 sgRNA 的关键元件。已报道的食用菌基因编辑中几乎所有表达载体的构建都尝试并成功以 Pol III型 *U6* 启动子驱动 sgRNA 的转录。其中, 食用菌内源的 *U6* 启动子往往是驱动 sgRNA 的最佳选择。在蛹虫草<sup>[45-46]</sup>、平菇<sup>[31]</sup>和玉米黑粉菌<sup>[37]</sup>中, *tRNA* 和 *U6* 启动子的元件组合被成功用于 sgRNA 的高效表达。Meng 等<sup>[46]</sup>发现蛹虫草中异源嵌合体 *AfU6-tRNA<sub>Gly</sub>* 驱动 sgRNA 时靶向编辑效率可高达 80%。Deng 等<sup>[50]</sup>发现竹黄菌内源的 *5S rRNA*

启动子可以驱动 sgRNA 的表达, 其活性甚至高于内源 *U6* 启动子。此外, 人源的 Pol III型启动子 *H1* 也被尝试用于驱动金针菇基因编辑中 sgRNA 表达, 但并未能获得突变体<sup>[13,15]</sup>。

*U6* 启动子驱动 sgRNA 的表达策略有一定的局限性, 如不具备组织表达特异性且难以实现条件诱导。因此, 也有研究报道尝试使用 RNA 聚合酶 II (RNA polymerase II, Pol II)型启动子。林金德等<sup>[16]</sup>成功将金针菇内源 *gpd* 启动子用于驱动 sgRNA 转录。Chen 等<sup>[45]</sup>优化蛹虫草基因编辑体系时发现, 相对于直接使用 *tRNA* 启动子, 与中等强度的 Pol II型启动子 *PtrpC* 共同驱动 sgRNA 的表达, 其编辑效率有明显的改善。

基于两种 RNA 聚合酶启动子驱动 sgRNA 的策略虽然已经实现多种食用菌的靶基因修饰, 但仍有部分物种中难以鉴定出该类型的启动子, 只能采用以 *T7* 转录试剂盒体外表达 sgRNA 的方案。该方法可以有效避免外源基因插入的风险, sgRNA 的稳定性较高, 不易引起免疫反应。此

外, Chen 等<sup>[44]</sup>研究中也尝试过以新发现的蛹虫草启动子 *Pcmlsm3* 和终止子 *Tcmura3* 构建载体并转化受体材料, 但并未获得对应的突变株。

## 1.2 Cas9 蛋白的表达策略

Cas9 蛋白的高效和稳定表达在食用菌基因编辑中面临诸多挑战。首先是物种本身的密码子偏好性差异决定不同食用菌表达 Cas9 蛋白时需要进行密码子序列的优化。同时核定位信号(nuclear localization signal, NLS)是帮助 Cas9 蛋白在细胞核内特异表达的关键, 使用天然分离的 Cas9 构建载体时需要在两端添加如 SV40 NLS 等作用元件<sup>[51]</sup>。

Cas9 蛋白的表达同样与启动子类型相关。Pol II 组成型启动子 *gpd* 作为糖酵解途径的管家基因, 是食用菌基因编辑中内源表达 Cas9 的首选。此外, 其他类型的启动子也有使用报道。如平菇中以组成型启动子 *ef3* 驱动 Cas9 表达; Schuster 等分别以组成型启动子 *otef*<sup>[36]</sup>和诱导型启动子 *hsp70*<sup>[37]</sup>实现了玉米黑粉菌中 Cas9 的高效表达; Deng 等<sup>[49]</sup>在竹黄菌中以组成型启动子 *ef1 $\alpha$*  激活了 Cas9 的表达; 梁艳<sup>[43]</sup>发现 Pol III 型启动子 *CaMV35S* 也能成功驱动 Cas9 的转录。此外, Sugano 等<sup>[11]</sup>筛选出灰盖鬼伞的新型强启动子 *ded1*, 实现了 Cas9 的高效表达。Wang 等<sup>[40]</sup>在杏鲍菇基因编辑的探索时证明 *tw1* 启动子能高效表达 Cas9, 为后续研究奠定了基础。

当然, 利用体外表达并纯化好的 Cas9 蛋白与 sgRNA 共同孵育组装成核糖核蛋白(ribonucleoprotein, RNP)复合物的方式也是目前食用菌基因编辑中比较常见的 Cas9 表达策略。该方法不仅可以体外快速验证复合物对靶基因的切割活性, 同时外源导入的 Cas9-RNP 复合物切割靶位点后会随细胞修复机制自然降解, 从而实现无外源基因插入的靶位点修饰。这是一种食用菌分子育种中极具潜力的 Cas9 表达策略。

## 1.3 Cas9 和 sgRNA 的递送策略

CRISPR/Cas9 系统的 Cas9 蛋白和 sgRNA 能否成功转入受体细胞是遗传转化体系建立的重要前提。食用菌中报道应用的 Cas9 和 sgRNA 递送策略主要有 3 种。

一是将 Cas9 和 sgRNA 构建到同一载体上共表达。该方法几乎应用于所有食用菌基因编辑体系的构建。其特点是可实现对单个或多个靶基因的定向修饰<sup>[52]</sup>, 可快速筛选阳性突变株的同时成本较低<sup>[53]</sup>。但该方法存在载体构建困难且其大小受限<sup>[54]</sup>, 宿主易发生免疫效应<sup>[55]</sup>, 以及外源基因的不可控插入<sup>[56]</sup>等不利因素。

二是将体外转录的 sgRNA 导入 Cas9 蛋白稳定表达的背景菌株。该方法在灵芝<sup>[19,21,26]</sup>和蛹虫草<sup>[44]</sup>的基因组编辑中已有报道。其特点是可灵活调整 sgRNA 序列和浓度, 构建简便且以 Cas9 稳定表达菌株为背景能有效提高转化效率。但该方法由于宿主菌株内特异的修饰酶作用, 以及不成熟的制备方法会导致 sgRNA 的稳定性和活性变化<sup>[57]</sup>, 同时抗性标记的缺乏也会增加突变株的筛选难度。

三是基于体外组装的 Cas9-RNP 系统将 Cas9 和 sgRNA 导入受体菌株。这是一种新型的 Cas9 和 sgRNA 递送策略, 在灵芝<sup>[25]</sup>、金针菇<sup>[17]</sup>、平菇<sup>[29,33]</sup>、蛹虫草<sup>[48,58]</sup>和灰盖鬼伞<sup>[12]</sup>中均有应用报道。其特点是组装相对简单, 可根据需要快速制备; Cas9 和 sgRNA 复合物能稳定靶向目的序列实现高效的基因组编辑<sup>[59]</sup>; 直接使用复合物可以避免 Cas9 蛋白长期表达对细胞造成毒性, 也不用考虑启动子选择和密码子优化<sup>[60]</sup>。此外, 该方法获得的突变株无外源基因插入, 非常满足食用菌分子育种的要求<sup>[55]</sup>。当然, 该递送策略同样缺乏可用筛选标记, 在基因编辑效率较低时难以有效筛选突变株, 且经济成本略高于前两者。

#### 1.4 主要遗传转化方法和筛选策略

遗传转化包括 2 个步骤,一是通过转化方法将作用元件导入受体材料,使其整合到宿主体内或基因组上;二是利用筛选标记分离转化子,获得可遗传性状定向改变的突变株。食用菌多样化的种类分布及其复杂的细胞壁组成结构,增加了其遗传转化体系的构建难度。因此,转化方法和受体材料的选择是转化体系建立的重要前提条件。

食用菌基因编辑中使用最多的转化方法是聚乙二醇 PEG 介导法[(polyethylene glycol)-mediated transformation, PMT];只有少数报道农杆菌转化法(*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT)<sup>[10,14,16,43,46-47]</sup>。PMT 法依赖于 PEG 改变细胞膜通透性,而 ATMT 法的优势在于农杆菌的作用机制可以将质粒转入受体材料中。两种转化方法虽各有优劣,但部分研究中发现 PMT 法在食用菌中的转化效率明显优于 ATMT 法<sup>[46]</sup>。此外,非离子型表面活性剂 Triton X-100 (终质量浓度 0.005%–0.01%)的添加,能够有效优化 PMT 法介导的原生质体转化,显著提升靶基因的修饰水平,编辑效率甚至可达到 100%<sup>[17,26,40,58]</sup>。遗传转化体系中受体材料的选择也是制约转化效率的另一重要因素,由于大型真菌特殊的遗传背景,绝大多数食用菌基因编辑中遗传转化的受体材料都是以原生质体为主,极少尝试使用菌丝体和孢子等。

筛选标记是快速、高效获得突变子的关键。食用菌基因编辑中常用的筛选标记包括抗药性标记和营养缺陷型标记。几乎所有食用菌中都利用抗药性标记辅助筛选突变株,其中以潮霉素和萎锈灵抗性最为常见。但抗药性标记在部分食用菌中存在无法稳定遗传给后代的问题<sup>[40]</sup>。营养缺陷型标记是利用代谢基因与相应的营养缺陷型受体遗传互补实现筛选。最常见的营养缺陷型标记是利用尿嘧啶合成途径的关键酶基因如 *ura3*、

*pyrg* 等。该类型基因编码乳清酸核苷-5'-磷酸脱羧酶,参与催化尿嘧啶合成的关键反应,当靶基因被破坏后菌株表现出尿嘧啶营养缺陷,可在含尿苷和 5-氟乳清酸(5-fluorouric acid, 5-FOA)的培养基中正常生长;靶基因被回补后菌株可合成尿嘧啶,在不含尿嘧啶的培养基上正常生长。利用这种双向选择作用可实现后续靶基因突变菌株的筛选。

#### 1.5 靶点的修复策略

CRISPR/Cas9 系统作用时, Cas9 蛋白能够识别并靶向修饰基因造成其双链断裂,触发细胞内源的非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)和同源重组(homology directed repair, HDR)修复机制,从而保证 DNA 双链的完整性。NHEJ 机制存在于所有细胞周期,但其保真性较差,所获得的突变类型不可控;而 HDR 则具有高保真特性,修复过程有同源供体模板即可实现基因的定向编辑,如定向敲除基因、敲入外源基因等。基于此虽可能实现靶向基因的插入和替换,但实际应用中绝大多数生物更倾向于通过 NHEJ 途径修复断裂后的双链,而 HDR 的效率则较低<sup>[61]</sup>。因此,很多丝状真菌中的相关研究都尝试并成功通过抑制或失活 NHEJ 修复通路的方式来提高 HDR 的效率<sup>[62]</sup>。

作为细胞内最常见的修复机制, Tu 等<sup>[23]</sup>发现灵芝中以 NHEJ 方式修复 CRISPR/Cas9 系统引发的双链断裂的频率达到 96.7%;而在包括裂褶菌<sup>[62]</sup>、灰盖鬼伞<sup>[63]</sup>和平菇<sup>[64-65]</sup>等多种食用菌中, HDR 发生的概率不到 3%。这些因素虽然限制着基因工程技术的开展,但灰盖鬼伞<sup>[63]</sup>和平菇<sup>[64]</sup>中的研究证实,通过沉默 NHEJ 修复途径关键酶基因的方式同样也能有效提高 HDR 的效率。Weterings 等<sup>[66]</sup>总结出 Ku70 和 Ku80 是 NHEJ 修复通路中的关键作用蛋白。de Jong 等<sup>[62]</sup>通过同源重组技术敲除裂褶菌 *ku80* 后发现突变体中

HDR 介导的修复类型明显增多。此外, Tu 等<sup>[23]</sup>基于 CRISPR/Cas9 系统敲除灵芝 *ku70* 基因后获得 NHEJ 修复活性显著降低的突变体, 其 HDR 介导的靶基因插入和替换频率达到 96.3% 和 93.1%, 而对照株仅有 3.3% 和 0%; Deng 等<sup>[50]</sup>以竹黄菌 *ku80* 为靶基因, 获得靶位置插入 *pyrg* 基因的效率达到 100% 的突变株; Jan vonk 等<sup>[35]</sup>以敲除了 *ku80* 的裂褶菌突变体为背景菌株进行基因编辑, 结果表明靶位点的同源重组率明显增加。

除了直接将 NHEJ 修复通路抑制或失活, 研究发现以含有靶基因同源臂的供体 DNA 为模板可以有效提高 HDR 频率。Meng 等<sup>[46]</sup>在蛹虫草中基于自主复制的 AMA1 质粒建立了高效 CRISPR/Cas9 基因编辑系统, 在引入同源修复模板后, 对光受体基因 *cmwc-1* 和 *cmvvd* 的编辑效率提高到 73.9%。Tu 等<sup>[23]</sup>在灵芝 *ku70* 基因突变后以含有 1.5 kb 同源侧翼序列的供体 DNA 为模板, 实现了高效的靶基因插入和替换。此外, Zou 等<sup>[58]</sup>发现基于优化后的 Cas9-RNP 系统, 供体模板只需要 20 bp 左右的同源臂即可实现 56.52% 的同源重组整合率。Jan vonk 等<sup>[35]</sup>也在裂褶菌中验证出含有 100 bp 的同源臂就能实现同源重组, 而 250 bp 的同源臂则有效提高重组效率。Wege 等<sup>[39]</sup>在玉米黑粉菌中以短双链寡核苷酸为同源重组模板实现靶基因的敲除, 成功创制出几种不同类型的突变体。

## 2 面临的主要问题与优化策略

CRISPR/Cas9 基因编辑技术在拥有广阔应用前景的同时, 仍有诸多待解决的问题。与动、植物和其他微生物相比, 食用菌 CRISPR 系统存在基因编辑效率不稳定、容易产生脱靶效应等共性问题。同时作为大型真菌的食用菌, 其特殊性是物种多样性所带来的种属遗传差异以及多细

胞形态、细胞分化和厚几丁质细胞壁等导致 CRISPR 系统开发时难以有效筛选突变体, 并且部分抗性筛选标记在食用菌中无法稳定遗传。此外, 食用菌作为一种重要的新型农产品, 所开发的分子育种工具不仅要能满足高效快捷的基础研究需求, 同时能否保障转基因生物的安全问题是将改良后的栽培品种或新创制的种质资源与商业化的食用菌产业联系起来的关键和难点。

### 2.1 编辑效率低

编辑效率是指获得的阳性转化子中靶基因被成功编辑的菌株所占的比例。编辑效率低是 CRISPR/Cas9 系统自开发应用于基因工程以来一直存在的普遍问题, 在食用菌中同样如此。造成这一现象的 3 个主要原因及其优化策略如下。

一是遗传转化体系的效率低。刘建雨等<sup>[14]</sup>使用 ATMT 法将 Cas9 表达载体转入金针菇菌丝时的转化率为 6.84%, 而欧阳萍兰等<sup>[15]</sup>通过 PMT 法将靶向冷诱导基因 *hk1* 和 *hk2* 的编辑载体转化原生质体的效率分别为 24.1% 和 12.5%。表明同一物种使用不同的转化方法和不同的受体材料时的转化效率存在差异。因此, 针对不同食用菌的基因编辑时, 首先要考虑能否建立一套高效、稳定的遗传转化体系, 同时结合其他研究进展对其进行优化和改进, 如添加适量的化学试剂、改进原生质体的制备和再生条件以及选择合适的受体材料等。

二是 Cas9 和 sgRNA 的表达水平低。Chen 等<sup>[44]</sup>发现 sgRNA 的低水平转录会影响载体靶向 *ura3* 基因的效率。密码子的稀有性和核定位信号决定着 Cas9 蛋白的表达水平。因此, 构建 Cas9 和 sgRNA 高表达的食用菌基因编辑体系时, 首先是选择合适的启动子, 如内源的 Pol III 组成型 *U6* 启动子驱动 sgRNA 转录, 内源的 Pol II 组成型启动子 *gpd* 驱动 Cas9 表达。其次, 针对不同食用菌进行 Cas9 密码子优化, 并添加核定位信

号辅助 Cas9 蛋白入核。保证 Cas9 和 sgRNA 顺利表达后进一步尝试引入一些作用元件如 AMA1 片段等优化系统的工作效率<sup>[46]</sup>。

三是 sgRNA 的靶向效率低。CRISPR/Cas9 系统在胞内面临着各种复杂的生理生化环境,如不同 sgRNA 的二级结构、与靶位点的底物亲和力以及半衰期和稳定性等都会影响其靶向效率。不同食用菌或同一物种的不同靶基因修饰中,CRISPR/Cas9 系统也表现出编辑效率的差异<sup>[20]</sup>。因此,应用 CRISPR/Cas9 系统时要保证其 sgRNA 的靶向效率,可以借助在线软件(如 CRISPOR 等)进行 sgRNA 的设计和评估;采用如金针菇<sup>[18]</sup>、灵芝<sup>[21,23]</sup>、平菇<sup>[33]</sup>中已经实现的双重 sgRNA 介导的靶基因编辑策略;也可以通过设计多个 sgRNA 并添加内源性 tRNA 结构元件实现多基因的高效编辑<sup>[31,37,45-46]</sup>。此外,采用体外表达 sgRNA 的方法进行靶向效率的快速验证,可有效避免使用低效率的 sgRNA。

## 2.2 存在脱靶效应

CRISPR/Cas9 系统应用的另一个问题是存在脱靶效应。虽然 Cas9 的切割特异性受 sgRNA 序列和原间隔序列相邻基序(protospacer adjacent motif, PAM)元件的控制,但潜在的脱靶效应会发生在与靶序列同源性较高的基因组任意位置,非特异性切割会引起一系列未知的连锁反应<sup>[67]</sup>。内源 Cas9 的表达多以组成型的强启动子驱动,虽然其高水平的表达有利于保证编辑效率,但 *cas9* 基因在宿主体内的持续性高表达会导致宿主积累的 Cas9 蛋白冗余,从而增加脱靶的风险。

因此在食用菌中应用 CRISPR/Cas9 系统时,可以借助 sgRNA 设计软件选择出特异性较高的 sgRNA 序列降低脱靶率;通过一些新技术手段如染色体重排检测技术(primer extension-mediated sequencing, PEM-seq)等量化 sgRNA 对靶位点的

切割效率<sup>[68]</sup>;同时,适当截短 sgRNA 序列的长度<sup>[69]</sup>或在 5'端添加两个鸟嘌呤核苷酸能增加其特异性<sup>[70]</sup>;控制 sgRNA 的浓度以及瞬时表达作用元件的方式也能有效避免脱靶效应<sup>[30]</sup>。此外,可以考虑使用体外组装 Cas9-RNP 复合物的表达策略来有效抑制 Cas9 的持续表达;修饰后的 Cas9 对靶 DNA 和 PAM 序列的特异识别能力增强,降低了非特异识别概率<sup>[71]</sup>;也可以尝试使用诱导型启动子驱动 Cas9 在特定条件下完成表达。

## 2.3 突变体筛选困难

食用菌基因编辑突变体筛选困难的主要原因之一是存在非纯合编辑。食用菌的异核性决定其在转化过程中会有很多未被编辑的核,极大地增加了筛选难度。因此,多数食用菌研究都以该物种自身的单核体为背景材料,Zou 等<sup>[58]</sup>发现添加化学试剂肌醇和苯菌灵等可以有效提高单核原生质体的制备率。最近,Yamasaki 等<sup>[32]</sup>基于质粒介导的 CRISPR/Cas9 技术成功在平菇双核菌株 PC9×#64 中实现了靶基因的修饰,并证明该质粒可以应用于其他不同类型的食用菌双核菌株的靶基因修饰,为其他食用菌中以双核菌株为背景材料开展工作提供了技术和理论基础。

突变体筛选困难的另一限制因素是可用筛选标记不足。食用菌中最常见的筛选标记为抗药性标记和营养缺陷型标记。然而,这些标记都存在局限性和潜在问题。虽然抗药性标记可以满足高效、快捷地筛选出基因编辑突变体,但部分抗药性标记稳定性不够,经过几次传代后存在抗性丢失的风险<sup>[40]</sup>。营养缺陷型标记则只有当对应的营养缺陷基因被成功回补时,突变体才能在缺素培养基上正常生长,且该方法应用的前提是需要获得相应的缺陷突变体,在实际应用中也不能保证回补的表型与野生型是否一致。因此,除了基于现有的筛选标记进行食用菌突变株筛选,也



要考虑发掘、建立更多稳定而便捷的筛选办法,如通过靶向基因置换的方式快速筛选突变体,以及尝试将其他物种中的标记开发应用于目标食用菌等。

## 2.4 生物安全问题

生物安全问题是转基因产品迈向商业化首要面临的挑战之一。基因编辑技术对促进农业生产和改善农产品性状等各方面的作用毋庸置疑。目前已有少数基因编辑作物如 SU 油菜 TM<sup>[72]</sup>和抗褐变双孢蘑菇等种植售卖的报道,我国也在今年通过了首个关于大豆的基因编辑安全证书<sup>[73]</sup>。可以预见的是,基因编辑技术在未来必将逐步融入各个领域的发展。然而,基因编辑作用所产生的物种遗传变异以及残留的 CRISPR 基因编辑结构是否会引发一些不良影响还需进一步探讨。不同国家/地区对此态度也不尽一致,而少量碱基突变以及无外源基因插入的基因编辑产物显然更容易被公众接受,也更容易通过法律监管<sup>[74]</sup>。因此,在农业生产中使用 CRISPR 系统的一个主要挑战是获得无转基因且具有稳定可遗传性状的基因编辑产物。

如何获得无转基因材料是将 CRISPR/Cas9 系统用于食用菌育种时必须攻克的问题。基于质粒载体的稳定转化中外源 DNA 主要整合到宿主染色体上,利用传统的遗传分离方法虽然有几率获得无转基因的突变体,但耗时耗力,且食用菌本身复杂的遗传背景加大了操作的难度。针对这种外源序列的残留问题,可以参考通过引入带有 AMA1 自主复制序列的质粒有效避免其整合到宿主染色体上,并在非选择性培养条件下将其分离<sup>[46]</sup>。通过瞬时表达转化引入的环状质粒或 RNA 在完成切割后会被细胞内源的核酸酶分解,可以实现全程 DNA-free 的基因组编辑,在很多模式生物包括食用菌平菇等的基因编辑体系开发中均有应用报道,可以作为参考策略<sup>[30]</sup>。

基于体外组装 Cas9-RNP 复合物的转化不需要优化 CRISPR/Cas 表达盒,减少了评估启动子转录效率等复杂的构建步骤,且复合物只会在受体细胞内短暂存留,有效降低了脱靶的风险,是目前报道的食用菌编辑中尝试修饰缺陷型基因的首选策略。同样,还可以参考开发和利用更为成熟的植物基因编辑体系来克服外源序列残留的问题,包括药物诱导、荧光标记辅助、纳米生物技术以及转基因自我消除技术(transgene killer CRISPR, TKC)等<sup>[75]</sup>。当然,结合新开发的胞嘧啶碱基编辑器(cytosine base editor, CBE)和腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editor, ABE)等对现有的食用菌基因编辑体系进行优化或开发新的工具也是未来行业发展的前沿方向。

## 3 结论与展望

CRISPR/Cas9 基因编辑技术是生命科学领域近年来最伟大的发明之一。尽管相对于其他模式真菌,该技术在大型真菌中的开发和应用仍处于起步阶段,还有很多亟待解决的问题,但自 2016 年首次应用以来,CRISPR/Cas9 系统为更多食用菌物种精准、稳定的基因组编辑奠定了基础。结合现有食用菌中相关报道,将 CRISPR/Cas9 应用于目标食用菌时可以参考以下策略:(1) 基于 PMT 法介导的原生质体转化,并添加适量的化学试剂 Triton X-100 进行优化,可以构建出高效、稳定的遗传转化体系;(2) 首选营养缺陷型基因为靶标,并使用在线软件辅助分析、设计出特异的 sgRNA 序列;(3) 优先选用内源 U6 启动子驱动 sgRNA,内源 *gpd* 启动子驱动 *Cas9* 表达;(4) 根据目标物种对 *Cas9* 进行密码子优化并添加核定位信号;(5) 采用体外组装 sgRNA 和 *Cas9* 复合体的策略可快速获得突变体;(6) 敲除 NHEJ 修复机制的关键酶基因 *ku70* 和 *ku80* 可以有效提高同源重组修复的概率。

与传统的 ZFNs 和 TALENs 技术相比, CRISPR/Cas9 系统优势明显。作为一种理想的食用菌基因组修饰工具,将其应用于目标食用菌的研究和开发是非常必要的。与 CRISPR/Cas9 系统在其他食用菌中的应用报道一致的是,前期展开的探索实验结果表明所选择的目标食用菌菌株显示出对潮霉素和萎锈灵的敏感性,可作为基因编辑突变体的筛选标记。同时参考该技术在其他食用菌中所取得的应用进展有望在目标食用菌中实现相关技术体系的建立。此外,随着科技的不断进步,CRISPR/Cas9 系统也将在诸如人工改造 Cas9 蛋白以及开发出更多 Cas 同源蛋白等多方面获得进一步改造和优化,从而实现控制脱靶效应、减弱甚至是消除 PAM 基序对 Cas 蛋白的限制作用以及提高精确打靶效率等。这种优势也将使得该技术在食用菌菌种改良、分子育种和代谢产物调控等多领域内占据不可替代的地位。同时,该技术在动、植物以及丝状真菌等的基因功能研究和作物遗传改良中所展现出来的跨物种间巨大的应用潜力,包括单碱基编辑、双碱基编辑以及糖基化酶碱基编辑技术等最新技术的应用报道,也预示着其未来在食用菌相关领域包括功能基因挖掘、定向菌种改良以及创制新种质资源等不可估量的应用价值。当然,不可忽视的是目前 CRISPR/Cas9 技术在食用菌中的应用还存在诸如脱靶效应、编辑效率低、突变筛选困难等不足,需要更多根本性的突破和解决方案以推进现代化食用菌产业发展。值得注意的是,食用菌具有极高的营养、药用和研究价值,并且食用菌产业作为我国继粮、油、蔬、果后新兴的第 5 大农业种植业,食品安全问题不容小觑。因此,相关机构必须致力于建立一套科学严谨的监管体系来有效引导和管理市场,兼顾人类健康和环境安全的同时稳步推动食用菌基因编辑产品的产业化,并完成生产方式和技术的转型。

## REFERENCES

- [1] RATHORE H, PRASAD S, SHARMA S. Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: a review[J]. *PharmaNutrition*, 2017, 5(2): 35-46.
- [2] ABDELSHAFY AM, BELWAL T, LIANG Z, WANG L, LI D, LUO ZS, LI L. A comprehensive review on phenolic compounds from edible mushrooms: occurrence, biological activity, application and future prospective[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022, 62(22): 6204-6224.
- [3] YAN ZY, ZHAO MR, WU XL, ZHANG JX. Metabolic response of *Pleurotus ostreatus* to continuous heat stress[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 10: 3148.
- [4] PÉREZ G, LOPEZ-MOYA F, CHUINA E, IBAÑEZ-VEA M, GARDE E, LÓPEZ-LLORCA LV, PISABARRO AG, RAMÍREZ L. Strain degeneration in *Pleurotus ostreatus*: a genotype dependent oxidative stress process which triggers oxidative stress, cellular detoxifying and cell wall reshaping genes[J]. *Journal of Fungi*, 2021, 7(10): 862.
- [5] ZHANG YR, WANG DW, CHEN YT, LIU TT, ZHANG SS, FAN HX, LIU HC, LI Y. Healthy function and high valued utilization of edible fungi[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2021, 10(4): 408-420.
- [6] CHRISTIAN M, CERMAK T, DOYLE EL, SCHMIDT C, ZHANG F, HUMMEL A, BOGDANOVA AJ, VOYTAS DF. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases[J]. *Genetics*, 2010, 186(2): 757-761.
- [7] ZHANG F, MAEDER ML, UNGER-WALLACE E, HOSHAW JP, REYON D, CHRISTIAN M, LI XH, PIERICK CJ, DOBBS D, PETERSON T, VOYTAS DF. High frequency targeted mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(26): 12028-12033.
- [8] SHALEM O, SANJANA NE, ZHANG F. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2015, 16(5): 299-311.
- [9] WALTZ E. Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation[J]. *Nature*, 2016, 532(7599): 293.
- [10] 吕阳, 贺晓飞, 王佩, 刘世玲, 韩少鹏, 曾弓剑, 周雁, 沈祥陵. 基于 CRISPR 系统的双孢蘑菇基因编辑体系建立及应用[J]. *食用菌学报*, 2020, 27(3): 16-22. LV Y, HE XF, WANG P, LIU SL, HAN SP, ZENG GJ, ZHOU Y, SHEN XL. Establishment of a CRISPR/Cas9

- system in *Agaricus bisporus*[J]. *Acta Edulis Fungi*, 2020, 27(3): 16-22 (in Chinese).
- [11] SUGANO SS, SUZUKI H, SHIMOKITA E, CHIBA H, NOJI S, OSAKABE Y, OSAKABE K. Genome editing in the mushroom-forming basidiomycete *Coprinopsis cinerea*, optimized by a high-throughput transformation system[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 1260.
- [12] PAREEK M, HEGEDÜS B, HOU ZH, CSERNETICS Á, WU HL, VIRÁGH M, SAHU N, LIU XB, NAGY L. Preassembled Cas9 ribonucleoprotein-mediated gene deletion identifies the carbon catabolite repressor and its target genes in *Coprinopsis cinerea*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2022, 88(23): e0094022.
- [13] 罗润, 林俊芳, 郭丽琼, 叶志伟, 郭天芬, 云帆. 基于 CRISPR/Cas9 系统的金针菇基因组编辑载体构建[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(20): 230-234.  
LUO R, LIN JF, GUO LQ, YE ZW, GUO TF, YUN F. Construction of *Flammulina velutipes* genome editing vector by using CRISPR/Cas9 system[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(20): 230-234 (in Chinese).
- [14] 刘建雨, 刘建辉, 张丹, 徐珍, 王瑞娟, 杨慧, 于海龙, 尚晓冬. 农杆菌介导的 Cas9 基因转化金针菇的研究[J]. *食用菌学报*, 2017, 24(3): 25-29.  
LIU JY, LIU JH, ZHANG D, XU Z, WANG RJ, YANG H, YU HL, SHANG XD. *Agrobacterium*-mediated gene transformation of Cas9 into *Flammulina velutipes*[J]. *Acta Edulis Fungi*, 2017, 24(3): 25-29 (in Chinese).
- [15] 欧阳萍兰, 李琼洁, 郭丽琼, 林俊芳, 叶志伟, 魏韬, 郑倩望, 伍土恒, 罗润. 基于 CRISPR/Cas9 技术研究金针菇冷诱导结实基因 HK1 和 HK2 的编辑转化系统[J]. *食用菌学报*, 2018, 25(3): 1-7, 107.  
OUYANG PL, LI QJ, GUO LQ, LIN JF, YE ZW, WEI T, ZHENG QW, WU TH, LUO R. Establishment of a CRISPR/Cas9 system for editing cold-induced gene *HK1/HK2* in *Flammulina velutipes*[J]. *Acta Edulis Fungi*, 2018, 25(3): 1-7, 107 (in Chinese).
- [16] 林金德, 杨雪琴, 魏韬, 郭丽琼, 林俊芳, 陈韵声, 黄诗诗. 金针菇 G 蛋白偶联受体基因的 CRISPR/Cas9 基因组编辑载体构建及转化研究[J]. *菌物学报*, 2019, 38(3): 349-361.  
LIN JD, YANG XQ, WEI T, GUO LQ, LIN JF, CHEN YS, HUANG SS. Construction and transformation of CRISPR/Cas9 genome editing vector of *Flammulina filiformis* G protein-coupled receptor gene[J]. *Mycosystema*, 2019, 38(3): 349-361 (in Chinese).
- [17] LIU JY, CUI HY, WANG RJ, XU Z, YU HL, SONG CY, LU H, LI QZ, XING DR, TAN Q, SUN WM, ZOU G, SHANG XD. A simple and efficient CRISPR/Cas9 system using a ribonucleoprotein method for *Flammulina filiformis*[J]. *Journal of Fungi*, 2022, 8(10): 1000.
- [18] LIUXT, DONG JH, LIAO J, TIAN L, QIU H, WU T, GE F, ZHU J, SHI L, JIANG AL, YU HS, ZHAO MW, REN A. Establishment of CRISPR/Cas9 genome-editing system based on dual sgRNAs in *Flammulina filiformis*[J]. *Journal of Fungi*, 2022, 8(7): 693.
- [19] QIN H, XIAO H, ZOU G, ZHOU Z, ZHONG JJ. CRISPR-Cas9 assisted gene disruption in the higher fungus *Ganoderma* species[J]. *Process Biochemistry*, 2017, 56: 57-61.
- [20] LI H, ZHONG JJ. Role of calcineurin-responsive transcription factor CRZ1 in ganoderic acid biosynthesis by *Ganoderma lucidum*[J]. *Process Biochemistry*, 2020, 95: 166-173.
- [21] LIU K, SUN B, YOU H, TU JL, YU XY, ZHAO P, XU JW. Dual sgRNA-directed gene deletion in basidiomycete *Ganoderma lucidum* using the CRISPR/Cas9 system[J]. *Microbial Biotechnology*, 2020, 13(2): 386-396.
- [22] WANG PG, XIAO H, ZHONG JJ. CRISPR-Cas9 assisted functional gene editing in the mushroom *Ganoderma lucidum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(4): 1661-1671.
- [23] TU JL, BAI XY, XU YL, LI N, XU JW. Targeted gene insertion and replacement in the basidiomycete *Ganoderma lucidum* by inactivation of nonhomologous end joining using CRISPR/Cas9[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(23): e0151021.
- [24] WANG PA, ZHANG JM, ZHONG JJ. CRISPR-Cas9 assisted *in situ* complementation of functional genes in the basidiomycete *Ganoderma lucidum*[J]. *Process Biochemistry*, 2022, 121: 689-697.
- [25] EOM H, CHOI YJ, NANDRE R, HAN HG, KIM S, KIM M, OH YL, NAKAZAWA T, HONDA Y, RO HS. The Cas9-gRNA ribonucleoprotein complex-mediated editing of *pyrG* in *Ganoderma lucidum* and unexpected insertion of contaminated DNA fragments[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13: 11133.
- [26] 张志刚, 张劲松, 邹根, 唐传红, 冯杰, 鲍大鹏, 陈建波, 谭贻. 基于 CRISPR/Cas9 方法构建‘沪农灵芝 1 号’基因编辑系统[J]. *食用菌学报*, 2023, 30(2): 9-18.

- ZHANG ZG, ZHANG JS, ZOU G, TANG CH, FENG J, BAO DP, CHEN JB, TAN Y. Construction of a CRISPR/Cas9-based genome editing system in *Ganoderma lucidum* 'hunong No. 1' cultivar[J]. *Acta Edulis Fungi*, 2023, 30(2): 9-18 (in Chinese).
- [27] BOONTAWON T, NAKAZAWA T, HORII M, TSUZUKI M, KAWAUCHI M, SAKAMOTO M, HONDA Y. Functional analyses of *Pleurotus ostreatus* *pcc1* and *clp1* using CRISPR/Cas9[J]. *Fungal Genetics and Biology*: FG & B, 2021, 154: 103599.
- [28] BOONTAWON T, NAKAZAWA T, INOUE C, OSAKABE K, KAWAUCHI M, SAKAMOTO M, HONDA Y. Efficient genome editing with CRISPR/Cas9 in *Pleurotus ostreatus*[J]. *AMB Express*, 2021, 11(1): 30.
- [29] BOONTAWON T, NAKAZAWA T, XUHB, KAWAUCHI M, SAKAMOTO M, HONDA Y. Gene targeting using pre-assembled Cas9 ribonucleoprotein and split-marker recombination in *Pleurotus ostreatus*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2021, 368(13): fnab080.
- [30] KOSHI D, UESHIMA H, KAWAUCHI M, NAKAZAWA T, SAKAMOTO M, HIRATA M, IZUMITSU K, SUMITA T, IRIE T, HONDA Y. Marker-free genome editing in the edible mushroom, *Pleurotus ostreatus*, using transient expression of genes required for CRISPR/Cas9 and for selection[J]. *Journal of Wood Science*, 2022, 68(1): 1-8.
- [31] XU HB, NAKAZAWA T, ZHANG YF, OH M, BAO DP, KAWAUCHI M, SAKAMOTO M, HONDA Y. Introducing multiple-gene mutations in *Pleurotus ostreatus* using a polycistronic tRNA and CRISPR guide RNA strategy[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2022, 369(1): fnac102.
- [32] YAMASAKI F, NAKAZAWA T, OH M, BAO DP, KAWAUCHI M, SAKAMOTO M, HONDA Y. Gene targeting of dikaryotic *Pleurotus ostreatus* nuclei using the CRISPR/Cas9 system[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2022, 369(1): fnac083.
- [33] BOONTAWON T, NAKAZAWA T, CHOI YJ, RO HS, OH M, KAWAUCHI M, SAKAMOTO M, HONDA Y. Double-gene targeting with preassembled Cas9 ribonucleoprotein for safe genome editing in the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2023, 370: fnad015.
- [34] NAKAZAWA T, YAMAGUCHI I, ZHANG YF, SAKA C, WU HL, KAYAMA K, KAWAUCHI M, SAKAMOTO M, HONDA Y. Experimental evidence that lignin-modifying enzymes are essential for degrading plant cell wall lignin by *Pleurotus ostreatus* using CRISPR/Cas9[J]. *Environmental Microbiology*, 2023, 25(10): 1909-1924.
- [35] JAN VONK P, ESCOBAR N, WÖSTEN HAB, LUGONES LG, OHM RA. High-throughput targeted gene deletion in the model mushroom *Schizophyllum commune* using pre-assembled Cas9 ribonucleoproteins[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 7632.
- [36] SCHUSTER M, SCHWEIZER G, REISSMANN S, KAHMANN R. Genome editing in *Ustilago maydis* using the CRISPR-Cas system[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2016, 89: 3-9.
- [37] SCHUSTER M, SCHWEIZER G, KAHMANN R. Comparative analyses of secreted proteins in plant pathogenic smut fungi and related basidiomycetes[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2018, 112: 21-30.
- [38] KHANAL S, SCHROEDER L, ALEJANDRO NAVA-MERCADO O, MENDOZA H, PERLIN MH. Role for nitrate assimilatory genes in virulence of *Ustilago maydis*[J]. *Fungal Biology*, 2021, 125(10): 764-775.
- [39] WEGE SM, GEJER K, BECKER F, BÖLKER M, FREITAG J, SANDROCK B. Versatile CRISPR/Cas9 systems for genome editing in *Ustilago maydis*[J]. *Journal of Fungi*, 2021, 7(2): 149.
- [40] WANG T, YUE S, JIN Y, WEI H, LU L. Advances allowing feasible *pyrG* gene editing by a CRISPR-Cas9 system for the edible mushroom *Pleurotus eryngii*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2021, 147: 103509.
- [41] MOON S, AN JY, CHOI YJ, OH YL, RO HS, RYU H. Construction of a CRISPR/Cas9-mediated genome editing system in *Lentinula edodes*[J]. *Mycobiology*, 2021, 49(6): 599-603.
- [42] KAMIYA A, UESHIMA H, NISHIDA S, HONDA Y, KAMITSUJI H, SATO T, MIYAMOTO H, SUMITA T, IZUMITSU K, IRIE T. Development of a gene-targeting system using CRISPR/Cas9 and utilization of *pyrG* as a novel selectable marker in *Lentinula edodes*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2023, 370: fnad042.
- [43] 梁艳. 真姬菇 CRISPR/Cas9 基因编辑技术中转化质粒构建和启动子效率的研究[D]. 长春: 吉林农业大学硕士学位论文, 2022.
- LIANG Y. Research on construction of transformation plasmid and promoter efficiency in CRISPR/Cas9 gene editing technology in *Hypsizygus marmoreus*[D].

- Changchun: Master's Thesis of Jilin Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [44] CHEN BX, WEI T, YE ZW, YUN F, KANG LZ, TANG HB, GUO LQ, LIN JF. Efficient CRISPR-Cas9 gene disruption system in edible-medicinal mushroom *Cordyceps militaris*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1157.
- [45] CHEN BX, XUE LN, WEI T, WANG N, ZHONG JR, YE ZW, GUO LQ, LIN JF. Multiplex gene precise editing and large DNA fragment deletion by the CRISPR-Cas9-TRAMA system in edible mushroom *Cordyceps militaris*[J]. *Microbial Biotechnology*, 2022, 15(12): 2982-2991.
- [46] MENG GL, WANG XP, LIU MQ, WANG F, LIU QZ, DONG CH. Efficient CRISPR/Cas9 system based on autonomously replicating plasmid with an *AMA1* sequence and precisely targeted gene deletion in the edible fungus, *Cordyceps militaris*[J]. *Microbial Biotechnology*, 2022, 15(10): 2594-2606.
- [47] 李波, 邹根, 周思池, 尹昕, 杨占山, 鲍大鹏, 李晓玲, 汪滢. 基于 CRISPR/Cas9 的蛹虫草无抗性标记转化技术的构建[J]. *菌物学报*, 2022, 41(7): 1044-1054.
- LI B, ZOU G, ZHOU SC, YIN X, YANG ZS, BAO DP, LI XL, WANG Y. Construction of the CRISPR/Cas9-based marker-free transformation of *Cordyceps militaris*[J]. *Mycosystema*, 2022, 41(7): 1044-1054 (in Chinese).
- [48] CHOI H, PARK SW, OH J, KIM CS, SUNG GH, SANG H. Efficient disruption of *CmHkl* using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein delivery in *Cordyceps militaris*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2023, 370: fnad072.
- [49] DENG H, GAO R, LIAO X, CAI Y. Genome editing in *Shiraia bambusicola* using CRISPR-Cas9 system[J]. *Journal of Biotechnology*, 2017, 259: 228-234.
- [50] DENG H, LIANG W, FAN TP, ZHENG X, CAI Y. Modular engineering of *Shiraia bambusicola* for hypocrellin production through an efficient CRISPR system[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 165: 796-803.
- [51] NØDVIG CS, NIELSEN JB, KOGLE ME, MORTENSEN UH. A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0133085.
- [52] MALI P, YANG LH, ESVELT KM, AACH J, GUELL M, DiCARLO JE, NORVILLE JE, CHURCH GM. RNA-guided human genome engineering *via* Cas9[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 823-826.
- [53] SHALEM O, SANJANA NE, HARTENIAN E, SHI X, SCOTT DA, MIKKELSON T, HECKL D, EBERT BL, ROOT DE, DOENCH JG, ZHANG F. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells[J]. *Science*, 2014, 343(6166): 84-87.
- [54] HRYHOROWICZ M, LIPÍŃSKI D, ZEYLAND J, SŁOMSKI R. CRISPR/Cas9 immune system as a tool for genome engineering[J]. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 2017, 65(3): 233-240.
- [55] CHEN XY, GONÇALVES MAFV. Engineered viruses as genome editing devices[J]. *Molecular Therapy*, 2016, 24(3): 447-457.
- [56] WOO JW, KIM J, KWON SI, CORVALÁN C, CHO SW, KIM H, KIM SG, KIM ST, CHOE S, KIM JS. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins[J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(11): 1162-1164.
- [57] KIM S, KIM D, CHO SW, KIM J, KIM JS. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells *via* delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins[J]. *Genome Research*, 2014, 24(6): 1012-1019.
- [58] ZOU G, XIAO ML, CHAI SX, ZHU ZH, WANG Y, ZHOU ZH. Efficient genome editing in filamentous fungi *via* an improved CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein method facilitated by chemical reagents[J]. *Microbial Biotechnology*, 2021, 14(6): 2343-2355.
- [59] JINEK M, JIANG FG, TAYLOR DW, STERNBERG SH, KAYA E, MA EB, ANDERS C, HAUER M, ZHOU KH, LIN S, KAPLAN M, IAVARONE AT, CHARPENTIER E, NOGALES E, DOUDNA JA. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation[J]. *Science*, 2014, 343(6176): 1247997.
- [60] BURGER A, LINDSAY H, FELKER A, HESS C, ANDERS C, CHIAVACCI E, ZAUGG J, WEBER LM, CATENA R, JINEK M, ROBINSON MD, MOSIMANN C. Maximizing mutagenesis with solubilized CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes[J]. *Development*, 2016, 143(11): 2025-2037.
- [61] DING Y, WANG KF, WANG WJ, MA YR, SHI TQ, HUANG H, JI XJ. Increasing the homologous recombination efficiency of eukaryotic microorganisms for enhanced genome engineering[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(11): 4313-4324.
- [62] de JONG JF, OHM RA, de BEKKER C, WÖSTEN

- HAB, LUGONES LG. Inactivation of Ku80 in the mushroom-forming fungus *Schizophyllum commune* increases the relative incidence of homologous recombination[J]. FEMS Microbiology Letters, 2010, 310(1): 91-95.
- [63] NAKAZAWA T, ANDO Y, KITAAKI K, NAKAHORI K, KAMADA T. Efficient gene targeting in  $\Delta$ Cc.ku70 or  $\Delta$ Cc.lig4 mutants of the agaricomycete *Coprinopsis cinerea*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2011, 48(10): 939-946.
- [64] SALAME TM, KNOP D, TAL D, LEVINSON D, YARDEN O, HADAR Y. Predominance of a versatile-peroxidase-encoding gene, *mnp4*, as demonstrated by gene replacement *via* a gene targeting system for *Pleurotus ostreatus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(15): 5341-5352.
- [65] OKUDA Y, MURAKAMI S, HONDA Y, MATSUMOTO T. An MSH4 homolog, *stp1*, from *Pleurotus pulmonarius* is a silver bullet for resolving problems caused by spores in cultivated mushrooms[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(15): 4520-4527.
- [66] WETERINGS E, CHEN DJ. The endless tale of non-homologous end-joining[J]. Cell Research, 2008, 18(1): 114-124.
- [67] LIN YN, CRADICK TJ, BROWN MT, DESHMUKH H, RANJAN P, SARODE N, WILE BM, VERTINO PM, STEWART FJ, BAO G. CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(11): 7473-7485.
- [68] YIN JH, LIU MZ, LIU Y, WU JC, GAN TT, ZHANG WW, LI YH, ZHOU YX, HU JZ. Optimizing genome editing strategy by primer-extension-mediated sequencing[J]. Cell Discovery, 2019, 5: 18.
- [69] FU YF, SANDER JD, REYON D, CASCIO VM, JOUNG JK. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs[J]. Nature Biotechnology, 2014, 32(3): 279-284.
- [70] CHO SW, KIM S, KIM Y, KWEON J, KIM HS, BAE SS, KIM JS. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases[J]. Genome Research, 2014, 24(1): 132-141.
- [71] KLEINSTIVER BP, PREW MS, TSAI SQ, TOPKAR VV, NGUYEN NT, ZHENG ZL, GONZALES APW, LI ZY, PETERSON RT, YEHR JR J, ARYEE MJ, JOUNG JK. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities[J]. Nature, 2015, 523(7561): 481-485.
- [72] 郑怀国, 赵静娟, 秦晓婧, 贾倩, 齐世杰. 全球作物种业发展概况及对我国种业发展的战略思考[J]. 中国工程科学, 2021, 23(4): 45-55.
- [73] ZHENG HG, ZHAO JJ, QIN XJ, JIA Q, QI SJ. Overview of the global crop seed industry and strategic thinking on its development in China[J]. Strategic Study of CAE, 2021, 23(4): 45-55 (in Chinese).
- [74] 陈宏宇, 郝丽芳. 基因编辑领域专家访谈: 谷峰教授——记首个基因编辑安全证书获批[J]. 生物工程学报, 2023, 39(7): 3055-3056.
- [75] 偶春, 张敏, 丁霖, 姚侠妹, 王泽璐, 彭城, 徐俊锋. CRISPR/Cas9 基因编辑技术在植物中的应用与政策监管[J]. 浙江农业学报, 2022, 34(8): 1806-1814.
- OU C, ZHANG M, DING L, YAO XM, WANG ZL, PENG C, XU JF. Application and policy regulation of CRISPR/Cas9 gene editing technology in plants[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2022, 34(8): 1806-1814 (in Chinese).
- [75] HE YB, ZHAO YD. Technological breakthroughs in generating transgene-free and genetically stable CRISPR-edited plants[J]. aBIOTECH, 2020, 1(1): 88-96.

(本文责编 陈宏宇)