

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2025-086

植物人工染色体的构建与应用

魏家秀¹, 嵇佩云¹, 节庆雨¹, 黄秋燕¹, 叶浩¹, 戴俊彪^{1,2}

(¹ 中国农业科学院农业基因组研究所, 农业农村部合成生物学重点实验室, 广东省岭南现代农业实验室, 广东 深圳 518120; ² 中国科学院深圳先进技术研究院合成生物学研究所, 广东省合成基因组学重点实验室, 深圳市合成基因组学重点实验室, 定量合成生物学重点实验室, 广东 深圳 518055)

摘要: 植物人工染色体 (PAC) 是一种人工构建、能在植物细胞中独立复制并稳定遗传的染色体载体, 具有高度工程化潜力。其核心优势在于能够承载超大容量基因模块并且独立于天然染色体系统, 被视为一种潜在的通用基因操作平台, 具有遗传稳定性与安全性。本文从合成生物学视角, 系统评述了PAC的构建策略、递送技术, 并讨论了其在植物核外基因组中的研究进展。当前, PAC构建主要采取自上而下与自下而上两种策略。然而, PAC的大容量也使其递送更为困难。PAC的构建不仅能在染色体尺度上改造现有植物, 更能通过构建全新的基因网络和代谢途径, 尝试设计和创造自然界尚未存在的、具有特殊功能或属性的新生命形式, 极大地拓展了合成生物学在植物领域的疆界。为充分释放这一潜力, 未来研究需攻克超大DNA片段合成与递送的技术瓶颈, 持续优化其遗传稳定性, 并深度融合人工智能与合成生物技术, 以实现PAC的精准设计与高效功能调控, 从而驱动其在农业、医药及环保等领域的突破性应用。

关键词: 人工染色体; 基因组工程; 植物人工染色体; 叶绿体人工染色体; 合成生物学

中图分类号: Q812 **文献标志码:** A

Construction and application of plant artificial chromosomes

WEI Jiaxiu¹, JI Peiyun¹, JIE Qingyu¹, HUANG Qiuyan¹, YE Hao¹, DAI Junbiao^{1,2}

(¹Shenzhen Branch, Guangdong Laboratory of Lingnan Modern Agriculture, Key Laboratory of Synthetic Biology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Agricultural Genomics Institute at Shenzhen, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shenzhen 518120, Guangdong, China; ²Guangdong Provincial Key Laboratory of Synthetic Genomics, Shenzhen Key Laboratory of Synthetic Genomics, Key Laboratory of Quantitative Synthetic Biology, Shenzhen Institute of Synthetic Biology, Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, Guangdong, China)

Abstract: Plant artificial chromosomes (PACs) are human-designed chromosomes that can independently replicate and are stably inherited in plant cells, offering significant potential for genetic engineering. A key advantage of PACs lies in their capacity to accommodate large genetic cassettes while functioning independently of the host genome, establishing PACs as a versatile platform for stable and biosafe genetic manipulation. This review systematically

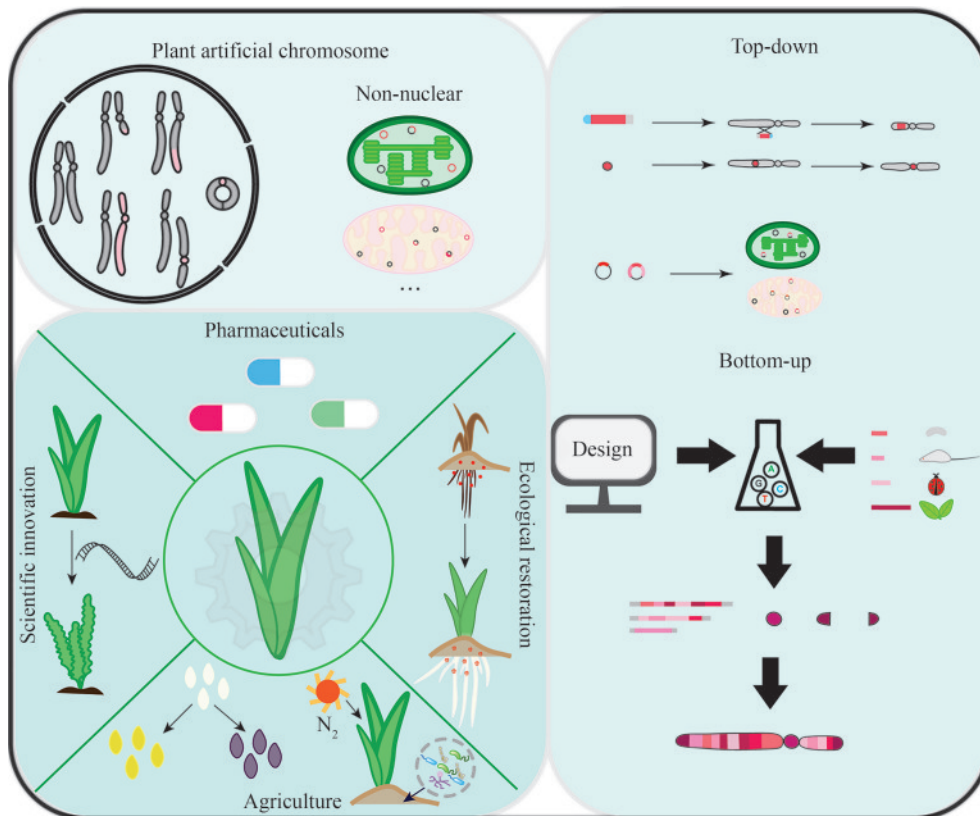
收稿日期: 2025-08-20 修回日期: 2025-09-27

基金项目: 国家重点研发计划 (2023YFA0913500); 国家自然科学基金 (32301232); 中国农业科学院科技创新工程专项 (2060299)

引用本文: 魏家秀, 嵇佩云, 节庆雨, 黄秋燕, 叶浩, 戴俊彪. 植物人工染色体的构建与应用[J]. 合成生物学, 2025, 6(5): 1093-1106

Citation: WEI Jiaxiu, JI Peiyun, JIE Qingyu, HUANG Qiuyan, YE Hao, DAI Junbiao. Construction and application of plant artificial chromosomes[J]. Synthetic Biology Journal, 2025, 6(5): 1093-1106

outlines current strategies for PAC construction, methodologies, and future application prospects from a synthetic biology perspective. Current strategies for PAC construction are broadly categorized into top-down and bottom-up approaches. The top-down strategy utilizes endogenous chromosomal elements through techniques such as telomere-mediated chromosomal truncation (TMCT) to generate minichromosomes. In contrast, the bottom-up strategy focuses on the *de novo* assembly of functional elements, such as centromeres, telomeres, and autonomous replication sequences to synthesize novel chromosomes. Significant progress has also been made in developing extra-nuclear PACs based on plastid or mitochondrial genomes, which benefits from prokaryotic-like transcription and translation systems and offer higher transgene containment. However, the efficient delivery of large PAC constructs into plant cells remains a major technical hurdle. This review evaluates various delivery methodologies to address this challenge. By enabling high-capacity, chromosome-scale engineering, PACs significantly expand the scope of synthetic biology, supporting not only large-scale genomic modifications in existing species but also the *de novo* design of synthetic gene networks and metabolic pathways. Delivering large PAC constructs into plant cells remains a major bottleneck, and the review evaluates various methods. By enabling chromosomal-level engineering, PACs expand the scope of synthetic biology. Beyond supporting large-scale modifications in existing plants, PACs also allow the *de novo* assembly of novel gene networks and metabolic pathways, paving the way for engineering plant systems with novel, non-native traits and functions. To fully unleash this potential, several technical challenges must be addressed, including efficient synthesis and delivery of large DNA fragments, enhancement of genetic stability, and the integration of artificial intelligence (AI) with synthetic biology for precise design and functional optimization of PACs. Through iterative design-build-test-learn (DBTL) cycles, PACs can be developed into predictable and stable biological systems. The convergence of these approaches is expected to drive transformative applications across agriculture, pharmaceuticals, and ecology.



Keywords: artificial chromosome; genome engineering; plant artificial chromosome; plastid artificial chromosome; synthetic biology

人工染色体 (artificial chromosome) 是一种能在细胞中自主复制, 并在分裂过程中稳定遗传的人工构建的染色体载体系统, 具有高度可定制和工程化的特性。依据宿主的差异, 现阶段人工染色体主要包括细菌人工染色体 (bacterial artificial chromosome, BAC)、酵母人工染色体 (yeast artificial chromosome, YAC)、人类细胞人工染色体 (human artificial chromosome, HAC) 和植物人工染色体 (plant artificial chromosome, PAC)。

人工染色体的发展最早可追溯到1973年, Cohen团队^[1]开发出首个质粒载体pSC101, 实现了外源基因在细菌中的克隆。尽管这并非完整染色体, 但为后续人工染色体设计提供了“可自主复制载体”这一核心思路。1983年, Murray等^[2]构建了世界上第一条人工染色体, 其设计整合了复制起点、着丝粒和端粒等酿酒酵母染色体关键元件, 具备酵母天然染色体的许多特性。该研究证明染色体稳定存在需要包含的基本元件有着丝粒、端粒和复制起点, 且元件的功能可重构。Burke等^[3]在此基础上构建出可承载大片段DNA的YAC载体。90年代末, 通过将合成的 α 卫星DNA与端粒DNA、基因组DNA结合, 在人类HT1080细胞中形成HAC^[4], 进一步探索了构建人工染色体所需的基本元件。这些成功经验为PAC的发展提供了构建思路和技术借鉴。2007年, Carlson等^[5]在玉米中构建了一个环形小染色体, 可承载多个基因; Birchler团队^[6]使用端粒介导的染色体截断技术 (telomere-mediated chromosomal truncation, TMCT) 亦成功在玉米中构建了人工染色体。与传统转基因相比, PAC可承载更多外源基因, 实现多基因协同调控, 对复杂数量性状进行综合改良; 且不整合至宿主基因组, 避免随机整合产生的位置效应。PAC能独立稳定遗传, 使其对生物体的改造更加安全可控。因此, PAC的研究对生命科学和生物产业发展有重要意义。

本综述系统性地梳理了目前PAC构建的相关研究进展, 剖析现有合成策略的技术原理及其发展态势, 深入探讨PAC研究进程中的瓶颈问题, 期望通过整合最新研究成果, 从合成生物学视角为未来PAC的设计与构建提供理论支撑, 推动其在作物改良与育种、生态修复以及生物制药等领域的广泛应用。

1 植物人工染色体的构建策略

PAC是一种独立于植物基因组的多基因表达系统, 具有自主复制活性, 且可稳定遗传。与YAC和HAC一样, PAC包含染色体的最基本功能元件: 着丝粒、端粒和自主复制序列 (autonomously replicating sequence, ARS)。然而, 在着丝粒的构建组装中, YAC依赖酵母着丝粒保守序列, 组装简单; 人类着丝粒依赖大段 α 卫星DNA重复, 设计复杂; 相比之下, 植物着丝粒组成具有物种特异性, 且着丝粒功能依赖表观遗传标记, 设计难度增加^[7]。目前尚无法通过直接组装着丝粒、自主复制序列、端粒以及选择标记便获得具备完整功能的PAC^[8]。

近年来, 随着对线粒体和叶绿体基因组、基因功能以及基因表达的深入研究, 高等植物的质体可以作为许多生物技术应用的重要平台。PAC的范围也逐渐从对核内染色体的人工构建, 拓宽至对核外基因组的人工构建^[9-10]。植物中遗传操作较为成熟的核外遗传物质主要包括线粒体DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 和质体DNA (plastid DNA, ptDNA), 如叶绿体DNA (chloroplast DNA, cpDNA)。核外遗传物质中的叶绿体环状基因组, 结构高度保守, 作为表达外源基因的载体系统具有诸多优势。质体中的转录翻译机制多呈现原核特性, 可采用多顺反子调控的表达策略, 便于复杂代谢途径的工程化改造^[11]。此外, 叶绿体作为原核生物系统, 因缺乏表观遗传机制或转录后基因沉默机制, 故而可用于特定产物 (如蛋白质) 的高水平稳定表达^[12-14]。在多数植物里, 叶绿体主要遵循母系遗传模式。该机制有效阻断叶绿体基因及外源基因通过花粉的传播途径, 降低基因外溢的概率, 从而提升转基因植物的生物安全性^[11, 15]。

植物人工染色体的构建主要采取自上而下 (top-down) 与自下而上 (bottom-up) 两种策略^[16]。自上而下策略主要基于现有染色体进行改造, 直接利用植物内源染色体上天然的功能元件, 确保新形成的染色体在细胞中发挥功能且稳定遗传^[17]; 自下而上策略则致力于从头构建染色体, 通过获得功能元件, 如着丝粒、端粒、自主复制

序列和筛选标记等,在体外进行组装,并最终获得全新的染色体^[18]。该构建策略具备较高的设计与工程化自由度,具有更为广泛的应用场景。

1.1 自上而下策略构建植物人工染色体

自上而下的构建策略是目前植物中主要的人工染色体构建方式。该策略的核心优势在于可直接利用植物内源染色体上的天然功能元件(尤其是着丝粒结构),进而保障了染色体在细胞分裂进程中的稳定传递^[17]。已有研究显示,功能着丝粒的形成以高度重复的卫星DNA序列为结构基础,通过招募着丝粒特异性组蛋白及其他着丝粒蛋白,塑造独特的表观遗传环境,最终实现其正常的生物学功能^[19-20]。

与着丝粒的复杂性不同,植物端粒的功能主要取决于其特定的核苷酸重复序列,绝大多数植物端粒含有保守的TTTAGGG重复单元,可通过遗传转化的方式将端粒重复单元导入植物细胞,并整合到内源染色体上^[21-22]。整合位点下游的端粒序列可诱导染色体于特定位置出现断裂与封端现象,此特性使TMCT技术成为实施自上而下策略的一项可靠且关键的技术方法^[23-25]。这种方法构建的人工染色体因携带了功能性着丝粒和端粒,能够独立复制和稳定遗传。

2006年,Birchler团队^[6]首次报道TMCT技术在植物中的应用实例,他们将一段源自拟南芥,长度为2.6 kb的端粒重复序列转入玉米基因组,成功诱导形成人工染色体。此后,该团队利用TMCT成功生成A染色体衍生微型人工染色体(IGT-1),并利用Cre-lox系统在体内实现对人工染色体的改造^[26]。该研究为未来可编辑式PAC平台的开发提供了核心知识,证实融合多种位点特异性重组酶与核酸酶系统的人工染色体平台能够契合定制化目标功能的要求,这对于植物生物技术的发展具有重要意义。

目前,TMCT技术已在玉米、拟南芥、大麦、水稻、油菜和小麦等多种重要作物中得到应用^[6, 27-33],是构建PAC的有效手段之一^[34-35]。值得注意的是,在小麦、油菜等作物中存在高频的染色体截断现象,且截断后的染色体可稳定遗传给

后代^[25, 27]。据此,TMCT技术在多倍体植物中或许更具应用优势。

此外,部分植物基因组中存在非必需的B染色体,其不会与常规A染色体组发生重组,遵循独立的进化轨迹,且通常对植物生长发育的影响很小^[36]。因此,基于B染色体构建的载体对宿主基因组的有害影响较小,且易于选择和恢复^[37]。研究者利用TMCT技术对B染色体进行截断,获得了可通过减数分裂进行稳定传递的微型B染色体^[18]。尽管植物B染色体为构建PAC提供了重要平台,但受限于大多数植物不含B染色体(如水稻、拟南芥等),因此该技术存在一定局限性。

1.2 自下而上策略构建植物人工染色体

功能性着丝粒的形成是自下而上构建人工染色体的关键步骤。着丝粒作为染色体上高度特化的功能区域,在细胞分裂进程中主导染色体与纺锤体微管的连接,以保障染色体精准分离至子细胞。植物着丝粒包含大量高度重复的卫星DNA与着丝粒逆转录转座子,两者组成了着丝粒DNA序列,在着丝粒的形成和功能发挥中起着至关重要的作用^[38]。着丝粒特异性组蛋白H3变体CENH3在着丝粒DNA上的沉积是形成功能性着丝粒的关键,其作为表观遗传标记维持着丝粒的功能^[39-40]。

目前直接从植物基因组中获得大型串联DNA重复序列仍具有挑战性。在HAC的构建过程中曾面临相似的挑战,研究者采用了定向克隆策略,利用单拷贝质粒逐步构建出结构稳定的大规模 α 卫星DNA序列,与端粒DNA及基因组DNA结合后形成了HAC,该HAC能招募特定的活性着丝粒蛋白,在无选择压力的环境下稳定遗传6个月^[4]。借鉴HAC的成功经验,Carlson等^[5]率先构建了一个携带玉米着丝粒重复序列CentC的环形质粒,并将其递送至玉米胚性组织细胞,进而产生了一个可稳定遗传至少四代且独立于内源染色体的自主型玉米微型染色体。随后,Ananiev等^[41]构建了由天然着丝粒片段、复制起始点以及端粒重复序列组成的线性穿梭载体,将其导入玉米细胞后形成微型染色体。该微型染色体能在有丝分裂以及器官形成过程中进行复制和传递。尽管后续分析对

其真正的从头组装性质提出了质疑，这些研究仍为染色体的从头组装奠定了基础。

Logsdon 等^[42]的研究证实，除借助 α 卫星 DNA 构建 HAC 外，利用非着丝粒 DNA 序列亦可形成稳定遗传的功能性 HAC，这为 PAC 的构建提供了重要参考。利用乳糖操作子/抑制剂 (LacO/LacI) 标记系统，将果蝇 CENP-A homologue (CID, for centromere identifier) 构建为 CID-GFP-LacI 融合蛋白进行靶向处理，使其与外源性 LacO 序列结合，招募着丝粒蛋白，然后与微管结合形成一个功能性着丝粒，其能在几个细胞代次中稳定传递^[43]。因此，通过设计着丝粒蛋白靶向非着丝粒 DNA 序列来诱导新着丝粒的产生具备一定可行性。在玉米中，通过表达 LexA-CENH3 融合蛋白，使其靶向结合染色体上人工设计的 LexO 重复序列，进而招募天然 CENH3 蛋白以形成功能性着丝粒^[44-45]。新着丝粒能有效组织微管，使染色体分离，产生携带人工着丝粒的微型染色体，并实现减数分裂传递。然而，其在减数分裂过程中的稳定性仍显著低于天然染色体，且在后续世代中出现新染色体丢失的现象。因此，此技术有待进一步优化。

端粒作为染色体末端保守的保护性帽结构，其核心序列在不同种类生物中已相对明确。绝大多数植物端粒由高度保守的重复单元组成，可在合成片段末端引入“端粒种子”序列，经内源端粒酶催化延伸而形成完整的端粒结构，进而有效阻止染色体末端的融合或降解^[6, 46]。此外，自主复制序列的选取直接影响人工染色体的复制时序与保真性^[47]。鉴于不同植物中具有自主复制能力的 DNA 片段在酵母中亦能呈现较强的活性^[48-49]，故而在调试过程中，可选用具有自主复制能力的同源或异源 DNA 片段，以优化染色体复制效率。

核外人工染色体的构建则可以参考 YAC 的构建思路，通过组装着丝粒、自主复制序列、端粒以及选择标记成为一个新的染色体。例如，利用甜菜曲顶卷叶病毒 (BCTV) 复制起始蛋白 (Rep) 和病毒复制起点 (VOR) 序列构建叶绿体“迷你染色体”^[9]。“迷你染色体”在叶绿体中高效扩增，能够充当植物中的蛋白表达载体，不仅可以缩短筛选流程，而且由其驱动的转基因表达水平显著

高于传统转基因手段。

Occhialini 等学者^[50]依托小型合成基因组，开发出一种名为“mini-synplastome” (Gen2) 的新型平台，此平台包含烟草质体基因组外元件 (NICE1 序列以及 ori A2、A1)、长同源臂和一个双筛系统。基于该平台，非整合型的外源 DNA 在无选择压力时可实现稳定的多代遗传，规避了传统同源重组方法可能引发的基因污染问题，并且不会对天然质体基因组产生干扰，在生物医药、酶类生产以及作物改良等领域展现出广泛的应用潜能。然而，此技术仍存在一定局限性，如不同物种中的适用性、质粒拷贝数以及目标基因的表达水平等。鉴于此，该研究团队对 mini-synplastome 展开了优化升级工作，在确保其具备游离复制能力的前提下，对复制区域同源序列进行了精简处理，最终获得了 Gen3 mini-synplastome^[51]。该设计通过消除非必要的质体序列对复制起点进行优化，同时降低内部同源性以增强载体稳定性。该新型迷你合成质粒在植物整个发育阶段均能维持高拷贝数，且可表达类胡萝卜素合成通路，故而可用于表达复杂的多基因途径。这不仅在代谢工程领域展现出广泛的应用前景，也为农作物的遗传改良提供了新的技术手段。

1.3 植物人工染色体的递送与整合

超大 DNA 片段向植物细胞的高效递送是整个 PAC 构建过程中的核心瓶颈。DNA 片段向植物细胞的递送主要面临以下几方面的困难：① DNA 大片段的克隆与扩增受 DNA 载体系统的承载能力和遗传稳定性限制；② 植物细胞壁形成的刚性屏障显著制约外源 DNA 内化效率^[52]；③ 外源基因的整合与表达可能引起植物的转录后基因沉默；④ 复杂繁复的筛选与鉴定工作。因此，递送过程中应综合考量宿主、成本、效率、安全性、操作可行性等多重因素^[53]。

目前，主要有 3 类递送策略：生物载体介导、物理/化学穿透及纳米材料运载^[54]。其中，根癌农杆菌介导的遗传转化凭借其天然 DNA 转移机制占据主导地位。农杆菌通过 VirD2/VirE2 蛋白复合体将 T-DNA 递送入植物细胞核并整合至基因组。尽

管该方法操作便捷,但其整合位点具有随机性,且插入DNA片段的长度有限制(150 kb以内),寄主植物范围也有一定局限性,因而远不能满足PAC构建需求^[55]。一种策略是优化DNA载体系统。细菌人工染色体(BAC)因其能承载DNA大片段(50~350 kb)以及具有遗传稳定性,因此在植物基因组文库构建中有所应用^[56-57]。于是研究者基于BAC,通过添加大肠杆菌F因子和农杆菌Ri质粒的复制子,构建了二元BAC(Binary BAC, BiBAC)载体。该载体在大肠杆菌和农杆菌中为单拷贝,可将至少150 kb的外源DNA导入烟草基因组^[58-60]。此外,优化工程型农杆菌也可提升农杆菌转化的效率^[61]。

聚乙二醇(PEG)介导的原生质体转化通过改变细胞膜通透性引入外源DNA,广泛应用于植物原生质体的遗传转化^[62]。该方法操作简便,但在很大程度上受制于原生质体的质量以及原生质体恢复为完整植株的效率^[53]。电击转化则依赖高压电脉冲瞬时击穿原生质体脂质双分子层,形成纳米级亲水通道促进外源DNA的摄入^[63]。尽管其转化效率更高,但高频电刺激会破坏细胞膜、细胞骨架以及核膜的完整性,诱发染色体碎片化、非整倍体的产生等遗传异常,导致原生质体死亡以及再生植株出现有丝分裂紊乱与减数分裂不育^[64]。基因枪轰击以高压氦气驱动金属微粒(金/钨)携带DNA穿透细胞壁,该方法不依赖于生物载体,适用于多种植物物种,尤其是农杆菌不敏感的作物,可以转化细胞器或非分裂细胞,突破了传统方法的限制。但该方法在传递效率和一致性方面都有待改进^[65]。Ismagul等^[66]将PEG法与金属微粒相结合,利用PEG和镁离子溶液包裹微载体可以显著提高小麦的转化效率。

功能化纳米材料,如纤维素靶向修饰的碳纳米管、层状双氢氧化物等,通过表面工程模拟病原体侵染机制,载体表面配体特异性识别细胞壁孔隙,触发内吞作用将DNA包被体通过喷施、注射或共培养的方式递入胞内^[67-68]。虽然该技术在植物人工染色体递送中仍处于概念验证阶段,但其独特的生物相容性设计与多场景适配能力,为未来实现超大大人工染色体递送提供了颇具前景的技术路径。磁转染技术利用外部磁场引导与外源载体结合的磁性纳米颗粒(MNP)向靶细胞移动,

实现高效转染,但此方法大多应用在动物细胞中,在植物中成功案例较少^[69]。超声波处理技术是利用超声波产生的空化作用和细胞膜破损效应等非热生物效应增加细胞膜的通透性,从而促进核酸分子等外源大分子进入靶细胞,如植物原生质体、悬浮细胞、花粉等^[70-72]。此外还有碳化硅晶须(SiC)、氧化铝晶须(ABW)介导的转化已在水稻、黄瓜等植物中成功应用并获得转基因植株^[73-74]。尽管目前已经建立多种递送策略,却均有一定局限性。因此,优化这些策略的效率并开发新技术,已成为当下亟待解决的重要课题。

PAC作为外源基因堆叠和整合操作平台,当外源DNA成功转入植物细胞后,需要精准整合至PAC靶位点^[27]。一种策略是对载体系统进行优化升级,例如,刘耀光团队^[75-76]结合BiBAC的特点构建了植物可转化人工染色体(transformation-competent artificial chromosome, TAC),该载体携带的P1裂解复制子可被IPTG诱导产生多拷贝,可用于整合多个基因转化植物。该团队^[77]基于TAC研发出高效的Cre-loxP介导的多基因载体系统TGS II(TransGene Stacking II),可实现多基因的高效快速组装,将10个基因同时转化植物^[78],首次培育出“紫晶米”。将TGS II系统与独特的核苷酸序列引导的切口核酸内切酶(UNiE)介导的DNA组装(UNiEDA)相结合,成功开发出TGS II-UNiE系统,可用于长DNA片段的高效克隆和多基因堆叠,利用该方法在烟草和水稻中成功实现甜菜红素的生物合成^[79-82]。高彩霞团队^[83]创制新型Lox变体和工程化Cre蛋白变体,基于更高效的Cre-lox系统开发新型染色体级编辑平台:PCE/RePCE系统(programmable chromosome engineering)系统,可以实现从千碱基到兆碱基级的多种类型无痕DNA精准编辑。在玉米和小麦等作物中应用该系统,能一次性把18.8 kb的DNA片段无缝整合于多个目标位点。该系统为植物外源DNA大片段的整合提供了有力的技术支持。

另一种策略则主要依赖于同源重组机制,模式植物小立碗藓凭借天然的高同源重组效率成为相关研究的理想系统,然而绝大多数高等植物的自发同源重组率不足1%,严重制约了高等植物人工染色体技术的应用效率^[84-85]。为突破这一限制,研究者发现通过诱导位点特异性双链断裂可以显

著提升重组效率，CRISPR-Cas9系统作为核心工具^[86]，可以实现对功能元件的精确编辑和整合^[87]。然而，尽管Cas9可在DNA上造成双链断裂（double-strand break, DSB），植物细胞中，不同修复机制对DSB的竞争机制仍使得外源DNA的重组效率较低^[88]。植物中的同源重组修复机制利用同源模板实现精准修复是合成DNA整合在基因组上的理想路径^[76]。基于CRISPR-Cas9系统，研究人员开发出一种不依赖于植物细胞遗传转化体系，将CRISPR-Cas9蛋白和gRNA在体外组装成核糖核蛋白复合物（RNP），然后将该复合物转化到拟南芥、烟草、生菜和水稻等植物原生质体中，获得不含转基因片段的突变植株^[89-90]。

尽管目前PAC中外源大片段DNA的高效与精准整合仍面临挑战，但基于Cre重组酶和CRISPR-Cas等系统已展现出巨大潜力。未来随着基因编辑工具、DNA修复机制研究及递送技术的进一步融

合与优化，有望实现更高效、可控的染色体工程操作，充分释放PAC在作物育种和合成生物学中的应用价值。

2 合成生物学时代的植物人工染色体技术

2.1 植物人工染色体工程化设计

合成生物学通过工程化原理设计、构建和优化生物元件、基因线路及系统设计，为PAC的开发提供了强大工具。基于合成生物学的模块化策略，结合设计-构建-测试-学习（DBTL）迭代循环，不断优化PAC的设计，提高遗传稳定性和表达效率，使PAC成为具备特定功能的稳定生物系统（图1）。

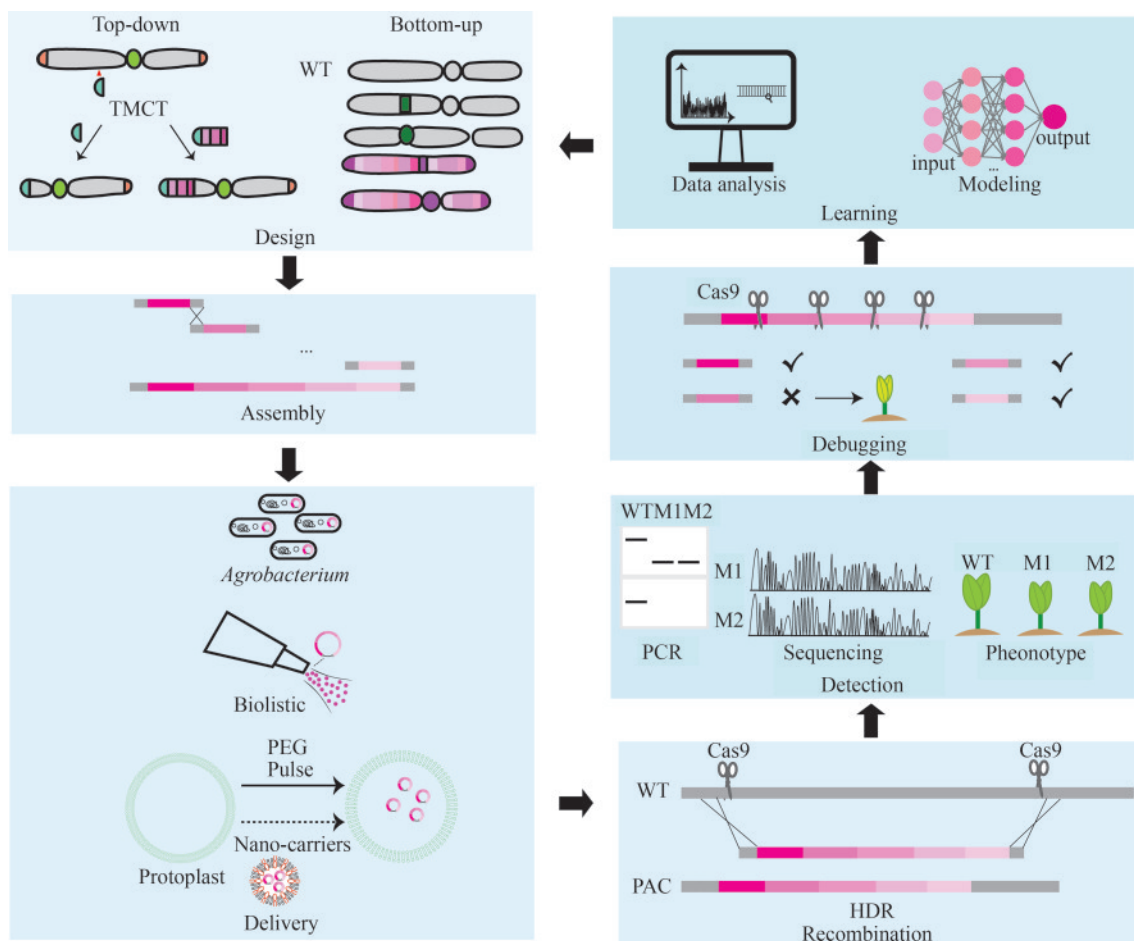


图1 植物人工染色体构建流程

Fig. 1 The construction process of plant artificial chromosomes

与微生物相比,植物的培育周期相对较长,DNA长片段在植物中的传递效率有限制,并且存在复杂的表观遗传调控。因此在设计PAC时,需要考虑质粒的承载力、DNA长片段的模块化组装方式、基因沉默机制、染色体间相互作用以及基因组三维结构等多个因素^[91]。生物系统能够被拆解为转录调控元件、启动子、转录起始位点、外显子以及终止子等元件。植物中缺乏特征清晰明确的遗传元件^[92],故而需要针对这些元件展开分析与评估,以便构建标准化元件库^[93-95]。植物PAC的设计需要使用经过全面鉴定的生物元件,这些元件应独立、可靠、互不干扰、可组合以及可扩展。王勇研究团队^[96]搭建的综合性植物合成生物学元件库PSBD(<https://www.bic.ac.cn/PSBD/front/#/>)可满足此类需求。此元件库收录并整合了1677个催化元件、384个调控元件、309个物种信息以及850个化学分子信息。该平台提供的元件资源可支持PAC中基因线路与代谢途径的设计。

考虑到PAC在测试阶段和最终生物系统中的行为可能不同,因此可选择一些合成生物学工具和数据库平台用于遗传元件的选择和组装辅助,使PAC以可预测的方式发挥作用并融入生物系统中,同时不会遭受不必要的内源性干扰。标准化元件可通过多种DNA组装策略在PAC上组装基因线路、基因簇或代谢通路,例如BioBrick组装法、Golden Gate克隆和Gibson模块化组装^[97]。逻辑门和开关(如正交传感器)可以实现对构建体中的基因表达进行转录调控和精确控制^[98-99],从而赋予植物特定环境适应性^[100]。张数一团队^[101]开发了一种新型植物基因线路设计框架,基于数学模型预测,依据建立的标准化元件单位以及正交传感器和逻辑门元件库,可以设计在植物中动态调控表型的基因线路,这为在PAC上设计组装可预测的基因线路提供了新方法。GoldenBraid3.0(GB3.0)平台可通过整合实验数据,预测元件组合效果,优化复杂遗传装置构建^[102]。借助该平台,研究者能够设计正交转录调控工具箱和基因线路,精确控制植物的生化和生理状态。

快速检测基因线路是优化PAC性能的关键。原生质体因转化效率高和组织限制少,是高通量筛选的理想平台^[103-104]。Dlugosz等^[105]开发了一种

可在4小时内完成从BY-2烟草悬浮培养物中自动化分离并转化原生质体的自动化方法。理论上,该研究开发的方法应适用于任何植物悬浮培养/原生质体系统,大大提升了植物原生质体转化流程的效率。PAC的快速迭代优化可以参考酵母的SCRaMbLE系统,该系统通过Cre-lox重组实现基因组动态重排,生成多样化表型^[106]。PAC可借鉴此思路,引入迭代进化重排系统(如loxPsym位点和Cre酶),诱导基因重排,根据需要筛选优化的基因组合。此外,利用正交报告系统ReSCuES精确筛选重排细胞,结合Dre-rox系统实现多层次重组控制^[107]。

人工智能(artificial intelligence, AI)与合成生物学相结合,通过计算工具和机器学习方法优化PAC设计。最近,多团队合作基于AI研发出了Evo模型,可实现单核苷酸分辨率下的长序列DNA建模,具备从分子到基因组尺度的序列设计能力,甚至生成新型CRISPR系统,这些突破为生物工程、基因组设计以及人工染色体的设计与合成开辟了新的可能性^[108]。谷歌DeepMind推出了AlphaGenome模型,此模型能够基于兆级碱基输入,预测单碱基突变对调控基因的多种生物进程所产生的影响,同时还可对基因突变带来的影响开展量化评估^[109]。利用该模型在基因组层面评估PAC在宿主细胞中对各项生物进程的影响,有助于达成PAC基因模块设计与构建的快速迭代优化,且可应用于植物基因组进化过程的研究。

2.2 合成生物学驱动植物人工染色体创新应用

利用合成生物学提供的创新工具和策略,PAC可承载多基因簇、代谢及发育途径等多基因功能模块,并通过DBTL循环优化,实现“定制作物”的快速培育,在农业、生物制药及生态修复等领域展现巨大潜力。

在农业领域,PAC可以在提高作物产量、改良品质及培育新品种等方面发挥作用。其典型应用包括:将C₄光合途径基因簇至PAC,使C₃作物(如水稻)转化为C₄型以提高光合作用效率^[110-111];通过PAC组装固氮酶基因簇及其调控元件,赋予非豆科植物自主固氮能力^[112-113];利用PAC整合抗

菌肽编码基因或病原体拮抗性次级代谢产物基因簇（如樱草素合成通路），提高作物抗病性^[114-115]。植物底盘在膜蛋白表达、前体供应、产物耐受、分区化合成等方面具有明显的优势，可以被开发用作制药工业的“绿色细胞工厂”。基于PAC可开发高效植物底盘系统：生产疫苗、抗体等高价值蛋白^[116]；重构代谢通路以合成高价值药物分子（如紫杉醇、青蒿素等）^[117-118]。PAC在生态环境监测与修复领域同样具有应用潜力。基于微生物环境修复的成功案例（如需钠弧菌整合5个降解基因簇，构建出高盐环境高效降解复合有机污染物的工程菌株^[119]），可将同类降解基因簇移植至植物系统。通过在PAC上同步设计环境响应型生物传感器与污染物降解模块，可赋予植物原位环境污染物检测与降解能力。

上述应用均可依托PAC作为标准化合成生物学平台，基于标准化元件与组装原则，AI辅助设计基因线路（如逻辑门、反馈回路）和动态调控系统（如光敏感开关，温度敏感开关）^[99]；对目标基因簇或代谢通路进行重构，比如关键酶性能优化、抑制因子删除等；利用诱导型启动子、核糖核酸开关或核糖体开关^[97]，精准控制基因簇或代谢通路表达强度，同步协调细胞内前体供应（如乙酰-CoA、NADPH）与能量代谢（ATP/ADP比率）^[120]。在悬浮细胞系统中进行瞬时表达-表型关联分析，结合多组学与报告基因检测通路运行情况，并进行高通量筛选。利用AI整合筛选数据训练预测模型，优化PAC设计，直至达到预期目标。值得注意的是，PAC的引入或许意味着新物种的诞生。为维护生态安全，可在PAC中引入非传统碱基序列、氨基酸从而有效防止逃逸、遗传漂变。

3 结论与展望

PAC为染色体工程开辟了新的途径，为理解细胞命运、染色体行为、基因表达调控以及其他生命过程提供了新的工具，同时为操纵多基因提供更大的平台，在提高粮食产量、改善营养品质、生物制药、促进环境修复等领域具有广阔应用前景。合成生物学与PAC相结合，将工程原理应用于植物系统，为PAC的构建提供新的思路和技术，

进而发挥PAC的最大潜力。

未来针对PAC的研究工作可集中在以下几个方面：建立人工染色体设计原则与元件库；突破超大片段DNA合成与人工染色体体内外构建瓶颈；发展人工染色体向植物细胞的精准递送与高效移植技术；探究人工染色体在植物中的功能激活与稳定遗传机制；实现人工染色体基因表达的精准时空调控与表观遗传重编程；开发用于人工染色体的复杂农艺性状协同调控与功能分析的AI工具。随着DNA合成成本下降和递送技术突破，其应用将从模式植物扩展至主粮作物，最终进入“设计-构建-测试-学习”闭环的植物合成生物学新时代。

PAC为染色体尺度研究提供可编程的合成生物学底盘，有助于研究者去探究多细胞基因组的未知特性，理解染色体行为与物种性状及进化之间的联系。例如，PAC可以作为合成着丝粒验证平台，结合AI与合成生物学工具，从头设计含高频卫星重复序列的人工着丝粒，实现染色体精确分离与有丝分裂稳定性，探究着丝粒的功能与遗传连锁；亦可在PAC上整合组蛋白修饰酶与DNA修饰酶，构建可遗传的表观遗传开关^[121]，帮助深入理解PAC的表观遗传景观重建过程。此外，通过Hi-C技术（高通量染色体构象捕获技术）解析PAC与宿主染色体的空间互作网络，揭示外源染色体对三维基因组结构的影响，以及宿主染色体三维结构重构与表观修饰对基因表达和表型调控^[106]。作物育种者不仅可将PAC应用于无性繁殖作物（马铃薯、木薯等）的育种，还可将PAC引入到单倍体诱导系中，通过单倍体培育和加倍的过程将PAC转移到新的品系或新的基因型中，加速作物新品种的选育^[37]。将来，可利用PAC重构植物染色体关键进化事件，在实验室条件下探索染色体行为与物种进化之间的关系。PAC技术将重塑人类改造生命的能力边界。

当前PAC技术仍面临诸多挑战，如递送效率低、染色体激活失败、遗传不稳定等。合成生物学通过提供标准化生物元件、模块化设计策略、高效组装与测试体系，正在持续助力PAC技术突破瓶颈。其工程化理念和自动化平台显著加强了人工染色体“设计-构建”环节的可靠性与效率，

并为功能调试与表观调控提供了创新工具。随着合成生物学与多组学、机器学习等学科的进一步融合，PAC技术将在农业、医药、环保等多个领域引发变革性发展。

参 考 文 献

- [1] COHEN S N, CHANG A C Y, BOYER H W, et al. Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1973, 70(11): 3240-3244.
- [2] MURRAY A W, SZOSTAK J W. Construction of artificial chromosomes in yeast[J]. Nature, 1983, 305(5931): 189-193.
- [3] BURKE D T, CARLE G F, OLSON M V. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors[J]. Science, 1987, 236(4803): 806-812.
- [4] HARRINGTON J J, BOKKELEN G V, MAYS R W, et al. Formation of *de novo* centromeres and construction of first-generation human artificial microchromosomes[J]. Nature Genetics, 1997, 15(4): 345-355.
- [5] CARLSON S R, RUDGERS G W, ZIELER H, et al. Meiotic transmission of an *in vitro*-assembled autonomous maize minichromosome[J]. PLoS Genetics, 2007, 3(10): e179.
- [6] YU W C, LAMB J C, HAN F P, et al. Telomere-mediated chromosomal truncation in maize[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(46): 17331-17336.
- [7] BIRCHLER J A, HAN F P. Maize centromeres: structure, function, epigenetics[J]. Annual Review of Genetics, 2009, 43: 287-303.
- [8] JIANG S Y, LUO Z Q, WU J, et al. Building a eukaryotic chromosome arm by *de novo* design and synthesis[J]. Nature Communications, 2023, 14: 7886.
- [9] JAKUBIEC A, SAROKINA A, CHOINARD S, et al. Replicating minichromosomes as a new tool for plastid genome engineering[J]. Nature Plants, 2021, 7(7): 932-941.
- [10] SHAO R F, BARKER S C. Chimeric mitochondrial minichromosomes of the human body louse, *Pediculus humanus*: evidence for homologous and non-homologous recombination[J]. Gene, 2011, 473(1): 36-43.
- [11] RUF S, KARCHER D, BOCK R. Determining the transgene containment level provided by chloroplast transformation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(17): 6998-7002.
- [12] MALIGA P. Plastid transformation in higher plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2004, 55: 289-313.
- [13] BOCK R. Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology[J]. Journal of Molecular Biology, 2001, 312(3): 425-438.
- [14] TAUNT H N, STOFFELS L, PURTON S. Green biologics: the algal chloroplast as a platform for making biopharmaceuticals[J]. Bioengineered, 2018, 9(1): 48-54.
- [15] WANI S H, HAIDER N, KUMAR H, et al. Plant plastid engineering[J]. Current Genomics, 2010, 11(7): 500-512.
- [16] JAMES J S, DAI J B, CHEW W L, et al. The design and engineering of synthetic genomes[J]. Nature Reviews Genetics, 2025, 26(5): 298-319.
- [17] PUCHTA H, HOUBEN A. Plant chromosome engineering—past, present and future[J]. New Phytologist, 2024, 241(2): 541-552.
- [18] YU W C, HAN F P, GAO Z, et al. Construction and behavior of engineered minichromosomes in maize[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(21): 8924-8929.
- [19] ZHONG C X, MARSHALL J B, TOPP C, et al. Centromeric retroelements and satellites interact with maize kinetochore protein CENH3[J]. The Plant Cell, 2002, 14(11): 2825-2836.
- [20] GENT J I, WANG N, DAWE R K. Stable centromere positioning in diverse sequence contexts of complex and satellite centromeres of maize and wild relatives[J]. Genome Biology, 2017, 18(1): 121.
- [21] ZÁVODNÍK M, FAJKUS P, FRANEK M, et al. Telomerase RNA gene paralogs in plants - the usual pathway to unusual telomeres[J]. New Phytologist, 2023, 239(6): 2353-2366.
- [22] KUMAWAT S, CHOI J Y. No end in sight: mysteries of the telomeric variation in plants[J]. American Journal of Botany, 2023, 110(11): e16244.
- [23] GRAHAM N D, CODY J P, SWYERS N C, et al. Chapter Three - Engineered minichromosomes in plants: structure, function, and applications[M/OL]//JEON K W. International review of cell and molecular biology. Netherlands, Amsterdam: Academic Press, 2015: 63-119. (2015-06-17) [2025-09-01]. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.05.002>.
- [24] BIRCHLER J A, GRAHAM N D, SWYERS N C, et al. Plant minichromosomes[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2016, 37: 135-142.
- [25] YIN X Z, ZHANG Y X, CHEN Y H, et al. Precise characterization and tracking of stably inherited artificial minichromosomes made by telomere-mediated chromosome truncation in *Brassica napus*[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 743792.
- [26] GAETA R T, MASONBRINK R E, ZHAO C Z, et al. *In vivo* modification of a maize engineered minichromosome[J]. Chromosoma, 2013, 122(3): 221-232.
- [27] YAN X H, LI C, YANG J, et al. Induction of telomere-mediated chromosomal truncation and behavior of truncated chromosomes in *Brassica napus*[J]. The Plant Journal, 2017, 91

- (4): 700-713.
- [28] KAPUSI E, MA L, TEO C H, et al. Telomere-mediated truncation of barley chromosomes[J]. *Chromosoma*, 2012, 121(2): 181-190.
- [29] TEO C H, MA L, KAPUSI E, et al. Induction of telomere-mediated chromosomal truncation and stability of truncated chromosomes in *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Plant Journal*, 2011, 68(1): 28-39.
- [30] NELSON A D, LAMB J C, KOBROSSLY P S, et al. Parameters affecting telomere-mediated chromosomal truncation in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2011, 23(6): 2263-2272.
- [31] XU C H, CHENG Z K, YU W C. Construction of rice minichromosomes by telomere-mediated chromosomal truncation [J]. *The Plant Journal*, 2012, 70(6): 1070-1079.
- [32] YAN D, MA Y H, WANG H, et al. High ionic conductivity conjugated artificial solid electrolyte interphase enabling stable lithium metal batteries[J]. *Green Chemistry*, 2025, 27(25): 7564-7574.
- [33] LIU J L, ZHANG R X, CHAI N, et al. Programmable genome engineering and gene modifications for plant biodesign[J]. *Plant Communications*, 2025, 6(8): 101427.
- [34] YANG X Y, LI J H, CHEN L, et al. Stable mitotic inheritance of rice minichromosomes in cell suspension cultures[J]. *Plant Cell Reports*, 2015, 34(6): 929-941.
- [35] SATTAR M N, AL HASHEDI S A, MUNIR M, et al. Practical applications of minichromosomes in modern agriculture for better crops[M]//AL-KHAYRI J M, YATOO A M, JAIN S M, et al. Handbook of agricultural technologies. Singapore: Springer Nature Singapore, 2025: 1-22. (2025-02-28)[2025-09-01]. https://doi.org/10.1007/978-981-99-0862-2_25-1.
- [36] JONES N, HOUBEN A. B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome [J]. *Trends in Plant Science*, 2003, 8(9): 417-423.
- [37] BIRCHLER J A, SWYERS N C. Engineered minichromosomes in plants[J]. *Experimental Cell Research*, 2020, 388(2): 111852.
- [38] NAISH M. Bridging the gap: unravelling plant centromeres in the telomere-to-telomere era[J]. *New Phytologist*, 2024, 244(6): 2143-2149.
- [39] COMAI L, MAHESHWARI S, MARIMUTHU M P A. Plant centromeres[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2017, 36: 158-167.
- [40] YU W C, YAU Y Y, BIRCHLER J A. Plant artificial chromosome technology and its potential application in genetic engineering[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, 14(5): 1175-1182.
- [41] ANANIEV E V, WU C C, CHAMBERLIN M A, et al. Artificial chromosome formation in maize (*Zea mays* L.) [J]. *Chromosoma*, 2009, 118(2): 157-177.
- [42] LOGSDON G A, GAMBOGI C W, LISKOVYKH M A, et al. Human artificial chromosomes that bypass centromeric DNA [J]. *Cell*, 2019, 178(3): 624-639.e19.
- [43] MENDIBURO M J, PADEKEN J, FÜLÖP S, et al. *Drosophila* CENH3 is sufficient for centromere formation[J]. *Science*, 2011, 334(6056): 686-690.
- [44] ZENG Y B, WANG M Y, GENT J I, et al. Increased maize chromosome number by engineered chromosome fission[J]. *Science Advances*, 2025, 11(21): eadw3433.
- [45] DAWE R K, GENT J I, ZENG Y B, et al. Synthetic maize centromeres transmit chromosomes across generations[J]. *Nature Plants*, 2023, 9(3): 433-441.
- [46] PESKA V, GARCIA S. Origin, diversity, and evolution of telomere sequences in plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 117.
- [47] TAN X Y, WU X L, HAN M Z, et al. Yeast autonomously replicating sequence (ARS): identification, function, and modification[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2021, 21(7): 464-474.
- [48] ECKDAHL T T, BENNETZEN J L, ANDERSON J N. DNA structures associated with autonomously replicating sequences from plants[J]. *Plant Molecular Biology*, 1989, 12(5): 507-516.
- [49] MOLIN W T, YAGUCHI A, BLENNER M, et al. Autonomous replication sequences from the *Amaranthus palmeri* eccDNA replicon enable replication in yeast[J]. *BMC Research Notes*, 2020, 13(1): 330.
- [50] OCCHIALINI A, PFOTENHAUER A C, LI L, et al. Mini-synplastomes for plastid genetic engineering[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2022, 20(2): 360-373.
- [51] OCCHIALINI A, KING G, MAJDI M, et al. An optimized version of the small synthetic genome (mini-synplastome) for plastid metabolic engineering in *Solanum tuberosum* (potato) [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2024, 13(12): 4245-4257.
- [52] YONG J X, WU M M, CARROLL B J, et al. Enhancing plant biotechnology by nanoparticle delivery of nucleic acids[J]. *Trends in Genetics*, 2024, 40(4): 352-363.
- [53] RUSTGI S, NAVEED S, WINDHAM J, et al. Plant biomacromolecule delivery methods in the 21st century[J]. *Frontiers in Genome Editing*, 2022, 4: 1011934.
- [54] MIYAMOTO T, NUMATA K. Advancing biomolecule delivery in plants: harnessing synthetic nanocarriers to overcome multiscale barriers for cutting-edge plant bioengineering[J]. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 2023, 96(9): 1026-1044.
- [55] CHO H J, MOY Y, RUDNICK N A, et al. Development of an efficient marker-free soybean transformation method using the novel bacterium *Ochrobactrum haywardense* H1[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2022, 20(5): 977-990.
- [56] WOO S S, JIANG J, GILL B S, et al. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of

- Sorghum bicolor*[J]. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22(23): 4922-4931.
- [57] WANG G L, HOLSTEN T E, SONG W Y, et al. Construction of a rice bacterial artificial chromosome library and identification of clones linked to the Xa-21 disease resistance locus[J]. *The Plant Journal*, 1995, 7(3): 525-533.
- [58] HAMILTON C M, FRARY A, LEWIS C, et al. Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(18): 9975-9979.
- [59] ZIEMIENOWICZ A. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: factors, applications and recent advances[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2014, 3(4): 95-102.
- [60] LI X Y, YANG Q H, PENG L, et al. *Agrobacterium*-delivered VirE2 interacts with host nucleoporin CG1 to facilitate the nuclear import of VirE2-coated T complex[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(42): 26389-26397.
- [61] GORALOGIA G S, WILLIG C, STRAUSS S H. Engineering *Agrobacterium* for improved plant transformation[J]. *The Plant Journal*, 2025, 121(5): e70015.
- [62] LIU Y C, VIDALI L. Efficient polyethylene glycol (PEG) mediated transformation of the moss *Physcomitrella patens*[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2011(50): e2560.
- [63] BATES G W. Plant transformation via protoplast electroporation[M/OL]//HALL R D. *Methods in molecular biology: plant cell culture protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, 1999: 359-366[2025-09-01]. <https://doi.org/10.1385/1-59259-583-9:359>.
- [64] MORI K, TANASE K, SASAKI K. Novel electroporation-based genome editing of carnation plant tissues using RNPs targeting the anthocyanidin synthase gene[J]. *Planta*, 2024, 259(4): 84.
- [65] LEE K, WANG K. Strategies for genotype-flexible plant transformation[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2023, 79: 102848.
- [66] ISMAGUL A, YANG N N, MALTSEVA E, et al. A biolistic method for high-throughput production of transgenic wheat plants with single gene insertions[J]. *BMC Plant Biology*, 2018, 18(1): 135.
- [67] KANDHOL N, DASH P K, SINGH V P, et al. Nanomaterial-based gene delivery in plants: an upcoming genetic revolution [J/OL]. *Trends in Plant Science*, 2025. (2025-06-28)[2025-09-01]. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2025.04.012>.
- [68] YAN Y, ZHU X J, YU Y, et al. Nanotechnology strategies for plant genetic engineering[J]. *Advanced Materials*, 2022, 34(7): 2106945.
- [69] ZUVIN M, KURUOGLU E, KAYA V O, et al. Magnetofection of green fluorescent protein encoding DNA-bearing polyethyleneimine-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles to human breast cancer cells[J]. *ACS Omega*, 2019, 4(7): 12366-12374.
- [70] LIU Y, YANG H, SAKANISHI A. Ultrasound: mechanical gene transfer into plant cells by sonoporation[J]. *Biotechnology Advances*, 2006, 24(1): 1-16.
- [71] YANG L Y, CUI G M, WANG Y X, et al. Expression of foreign genes demonstrates the effectiveness of pollen-mediated transformation in *Zea mays*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 383.
- [72] JOERSBO M, BRUNSTEDT J. Sonication: a new method for gene transfer to plants[J]. *Physiologia Plantarum*, 1992, 85(2): 230-234.
- [73] NANASATO Y, KONAGAYA K I, OKUZAKI A, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of kabocha squash (*Cucurbita moschata* Duch) induced by wounding with aluminum borate whiskers[J]. *Plant Cell Reports*, 2011, 30(8): 1455-1464.
- [74] MATSUSHITA J, OTANI M, WAKITA Y, et al. Transgenic plant regeneration through silicon carbide whisker-mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Breeding Science*, 1999, 49(1): 21-26.
- [75] LIU Y G, SHIRANO Y, FUKAKI H, et al. Complementation of plant mutants with large genomic DNA fragments by a transformation-competent artificial chromosome vector accelerates positional cloning[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(11): 6535-6540.
- [76] LIN L, LIU Y G, XU X P, et al. Efficient linking and transfer of multiple genes by a multigene assembly and transformation vector system[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(10): 5962-5967.
- [77] ZHU Q L, LIU Y G. TransGene stacking II vector system for plant metabolic engineering and synthetic biology[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2021, 2238: 19-35.
- [78] SRIVASTAVA V, THOMSON J. Gene stacking by recombinases[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, 14(2): 471-482.
- [79] ZHAO Y C, HAN J L, TAN J T, et al. Efficient assembly of long DNA fragments and multiple genes with improved nickase-based cloning and Cre/loxP recombination[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2022, 20(10): 1983-1995.
- [80] ZHU Q L, ZENG D C, YU S Z, et al. From Golden Rice to aSTARice: bioengineering astaxanthin biosynthesis in rice endosperm[J]. *Molecular Plant*, 2018, 11(12): 1440-1448.
- [81] ZHU Q L, YU S Z, ZENG D C, et al. Development of "Purple Endosperm Rice" by engineering anthocyanin biosynthesis in

- the endosperm with a high-efficiency transgene stacking system [J]. *Molecular Plant*, 2017, 10(7): 918-929.
- [82] 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[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(12): 1802-1815.
- [83] SUN C, LI H C, LIU Y J, et al. Iterative recombinase technologies for efficient and precise genome engineering across kilobase to megabase scales[J]. *Cell*, 2025, 188(17): 4693-4710.e15.
- [84] RENSING S A, GOFFINET B, MEYBERG R, et al. The moss *Physcomitrium (Physcomitrella) patens*: a model organism for non-seed plants[J]. *The Plant Cell*, 2020, 32(5): 1361-1376.
- [85] KAMISUGI Y, CUMING A C, COVE D J. Parameters determining the efficiency of gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(19): e173.
- [86] BEN-TOV D, MAFESSONI F, CUCUY A, et al. Uncovering the dynamics of precise repair at CRISPR/Cas9-induced double-strand breaks[J]. *Nature Communications*, 2024, 15: 5096.
- [87] JEONG S H, LEE H J, LEE S J. Recent advances in CRISPR-Cas technologies for synthetic biology[J]. *Journal of Microbiology*, 2023, 61(1): 13-36.
- [88] ROZOV S M, PERMYAKOVA N V, DEINEKO E V. The problem of the low rates of CRISPR/Cas9-mediated knock-ins in plants: approaches and solutions[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(13): 3371.
- [89] LIANG Z, CHEN K L, LI T D, et al. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14261.
- [90] WOO J W, KIM J, KWON S I, et al. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins [J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(11): 1162-1164.
- [91] OSTROV N, BEAL J, ELLIS T, et al. Technological challenges and milestones for writing genomes[J]. *Science*, 2019, 366(6463): 310-312.
- [92] LIU W S, STEWART C N JR. Plant synthetic biology[J]. *Trends in Plant Science*, 2015, 20(5): 309-317.
- [93] VOLLEN K, ZHAO C S, ALONSO J M, et al. Sourcing DNA parts for synthetic biology applications in plants[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2024, 87: 103140.
- [94] PFOTENHAUER A C, OCCHIALINI A, NGUYEN M A, et al. Building the plant SynBio toolbox through combinatorial analysis of DNA regulatory elements[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2022, 11(8): 2741-2755.
- [95] NAYAK N, MEHROTRA S, KARAMCHANDANI A N, et al. Recent advances in designing synthetic plant regulatory modules[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2025, 16: 1567659.
- [96] TIAN C F, LI J H, WU Y H, et al. An integrative database and its application for plant synthetic biology research[J]. *Plant Communications*, 2024, 5(5): 100827.
- [97] DA SILVEIRA GOMIDE M, DE CASTRO LEITÃO M, COELHO C M. Biocircuits in plants and eukaryotic algae[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 982959.
- [98] BASSO M F, ARRAES F B M, GROSSI-DE-SA M, et al. Insights into genetic and molecular elements for transgenic crop development[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 509.
- [99] ANDRES J, BLOMEIER T, ZURBRIGGEN M D. Synthetic switches and regulatory circuits in plants[J]. *Plant Physiology*, 2019, 179(3): 862-884.
- [100] EMILIANI V, ENTCHEVA E, HEDRICH R, et al. Optogenetics for light control of biological systems[J]. *Nature Reviews Methods Primers*, 2022, 2: 55.
- [101] KONG C, YANG Y, QI T C, et al. Predictive genetic circuit design for phenotype reprogramming in plants[J]. *Nature Communications*, 2025, 16: 715.
- [102] VAZQUEZ-VILAR M, QUIJANO-RUBIO A, FERNANDEZ-DEL-CARMEN A, et al. GB3.0: a platform for plant bio-design that connects functional DNA elements with associated biological data[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(4): 2196-2209.
- [103] YOO S D, CHO Y H, SHEEN J. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis[J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(7): 1565-1572.
- [104] JIANG F W, ZHU J, LIU H L. Protoplasts: a useful research system for plant cell biology, especially dedifferentiation[J]. *Protoplasma*, 2013, 250(6): 1231-1238.
- [105] DLUGOSZ E M, LENAGHAN S C, STEWART C N. A robotic platform for high-throughput protoplast isolation and transformation[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2016(115): e54300.
- [106] ONG J Y, SWIDAH R, MONTI M, et al. SCRaMbLE: a study of its robustness and challenges through enhancement of hygromycin B resistance in a semi-synthetic yeast[J]. *Bioengineering*, 2021, 8(3): 42.
- [107] SCHINDLER D, WALKER R S K, JIANG S Y, et al. Design, construction, and functional characterization of a tRNA neochromosome in yeast[J]. *Cell*, 2023, 186(24): 5237-5253.e22.
- [108] NGUYEN E, POLI M, DURRANT M G, et al. Sequence modeling and design from molecular to genome scale with Evo [J]. *Science*, 2024, 386(6723): eado9336.
- [109] AVSEC Ž, LATYSHEVA N, CHENG J, et al. AlphaGenome: advancing regulatory variant effect prediction with a unified DNA sequence model[EB/OL]. bioRxiv. 2025. (2025-07-11)

- [2025-09-01]. <https://doi.org/10.1101/2025.06.25.661532>.
- [110] PRADHAN B, PANDA D, BISHI S K, et al. Progress and prospects of C₄ trait engineering in plants[J]. *Plant Biology*, 2022, 24(6): 920-931.
- [111] PRYWES N, PHILLIPS N R, TUCK O T, et al. Rubisco function, evolution, and engineering[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2023, 92: 385-410.
- [112] BAHUGUNA V, BHATT G, MAIKHURI R, et al. Nitrogen fixation through genetic engineering: a future systemic approach of nitrogen fixation[M/OL]//NATH M, BHATT D, BHARGAVA P, et al. *Microbial metatranscriptomics belowground*. Singapore: Springer Singapore, 2021: 109-122. (2021-06-03) [2025-09-01]. https://doi.org/10.1007/978-981-15-9758-9_5.
- [113] BENNETT E M, MURRAY J W, ISALAN M. Engineering nitrogenases for synthetic nitrogen fixation: from pathway engineering to directed evolution[J]. *BioDesign Research*, 2023, 5: 5.
- [114] MONTESINOS E. Functional peptides for plant disease control [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2023, 61: 301-324.
- [115] AHUJA I, KISSEN R, BONES A M. Phytoalexins in defense against pathogens[J]. *Trends in Plant Science*, 2012, 17(2): 73-90.
- [116] HUANG W K, ZHANG Y M, XIAO N, et al. Trans-complementation of the viral movement protein mediates efficient expression of large target genes *via* a tobacco mosaic virus vector[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2024, 22(11): 2957-2970.
- [117] HU Y J, GU C C, WANG X F, et al. Asymmetric total synthesis of taxol[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2021, 143(42): 17862-17870.
- [118] LI J H, MUTANDA I, WANG K B, et al. Chloroplastic metabolic engineering coupled with isoprenoid pool enhancement for committed taxanes biosynthesis in *Nicotiana benthamiana*[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 4850.
- [119] SU C, CUI H T, WANG W W, et al. Bioremediation of complex organic pollutants by engineered *Vibrio natriegens*[J]. *Nature*, 2025, 642(8069): 1024-1033.
- [120] BOEHM C R, BOCK R. Recent advances and current challenges in synthetic biology of the plastid genetic system and metabolism[J]. *Plant Physiology*, 2019, 179(3): 794-802.
- [121] ZHANG Y Z, YUAN J L, ZHANG L R, et al. Coupling of H3K27me3 recognition with transcriptional repression through the BAH-PHD-CPL2 complex in *Arabidopsis*[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 6212.



通讯作者: 戴俊彪(1974—),男,研究员,博士生导师,广东省合成基因组学重点实验室主任,深圳合成基因组学重点实验室主任,欧洲科学院院士。研究方向为开发基因和基因组的合成、组装及转移技术,通过基因组的设计构建解析基因组功能,并进行合成生物的改造和优化等方面的研究工作。

E-mail: daijunbiao@caas.cn



第一作者: 魏家秀(1992—),女,博士。研究方向为叶绿体基因组的核迁移。

E-mail: weijiaxiu@caas.cn



共同第一作者: 嵇佩云(1996—),女,博士。研究方向为植物高效同源重组元件的挖掘与应用。

E-mail: jipeiyun@caas.cn