

基因编辑技术在作物育种中研究及应用

韩平安^{1,2}, 孙瑞芬^{1,2}, 常悦^{1,2}, 唐宽刚^{1,2}, 王卓^{1,2}, 吴新荣^{1,2*}, 李晓东^{1,2*}

¹内蒙古自治区农牧业科学院, 内蒙古 呼和浩特

²内蒙古自治区甜菜品种遗传改良与种质创制重点实验室, 内蒙古 呼和浩特

Email: *wuxingrong@yahoo.com, *lixiaodong9@126.com

收稿日期: 2021年8月14日; 录用日期: 2021年9月17日; 发布日期: 2021年9月27日

摘要

介绍基因编辑技术种类、技术原理, CRISPR/Cas9技术是基因编辑最为主流的工具, 重点介绍CRISPR/Cas9技术原理, 总结前人利用CRISPR/Cas9技术在作物育种上的应用, 主要应用是提高作物产量, 改善作物品质, 提升作物抗逆性。本文还介绍了CRISPR/Cas9技术存在的问题及前景展望。本文为我国作物育种开展基因编辑研究提供理论参考。

关键词

基因编辑, CRISPR/Cas9, 作物育种

Research Progress and Application of Gene Editing Technology in Crop Breeding

Pingan Han^{1,2}, Ruifen Sun^{1,2}, Yue Chang^{1,2}, Kuangang Tang^{1,2}, Zhuo Wang^{1,2}, Xinrong Wu^{1,2*}, Xiaodong Li^{1,2*}

¹Inner Mongolia Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Hohhot Inner Mongolia

²Inner Mongolia Key Laboratory of Sugarbeet Genetics and Germplasm Enhancement, Hohhot Inner Mongolia

Email: *wuxingrong@yahoo.com, *lixiaodong9@126.com

Received: Aug. 14th, 2021; accepted: Sep. 17th, 2021; published: Sep. 27th, 2021

Abstract

The research introduces the types and principle of gene editing technology, CRISPR/Cas9 technology is the most mainstream tool for gene editing, this paper mainly introduces the principle of

*通讯作者。

文章引用: 韩平安, 孙瑞芬, 常悦, 唐宽刚, 王卓, 吴新荣, 李晓东. 基因编辑技术在作物育种中研究及应用[J]. 植物学研究, 2021, 10(5): 701-709. DOI: 10.12677/br.2021.105088

CRISPR/Cas9 technology and summarizes the application of CRISPR/Cas9 technology in crop breeding by predecessors, which is mainly used to increase crop yield, improve crop quality and enhance crop resistance. This paper also introduces the problems and prospects of CRISPR/Cas9 technology. This paper provides a theoretical reference for gene editing research in crop breeding of China.

Keywords

Gene Editing, CRISPR-Cas9, Crops Breeding

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

作物产量和品质的改良一直是农业科技人员研究的重点课题。传统育种可以通过栽培技术和高产途径提高农作物产量。近几年,在分子育种领域利用基因编辑技术可以有效针对某一基因对作物进行定向改良。

基因编辑技术是一种针对基因进行定向靶向修饰的技术[1],它不仅是解析阐明基因功能的重要工具,在作物上的应用也是划时代的重大突破。它包括人工核酸酶介导的锌指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFN)技术,类转录激活效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALEN)技术和 RNA 引导的 CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated nuclease, Cas)技术[1]。其中, ZFN 与 TALEN 核酸酶都已在植物基因工程中得到广泛、成功的应用,而基于 CRISPR/Cas 系统的基因组编辑技术则更具有高效方便等特点[2]。

2. 基因编辑技术分类

2.1. 锌指核酸酶技术(ZFN)

锌指蛋白是 1983 年在非洲爪蟾的 TFA 家族中发现的一类转录因子,该技术最初出现在 1996 年[3]。每个锌指蛋白可以特异性地识别 DNA 链上的 3 个连续碱基,把 3~6 个锌指蛋白串联成结构域,便可识别更多的碱基及序列[4] [5],且具有较高的特异性[5]。它是第一种真正靶向蛋白质的试剂,已普遍用于不同植物物种(如拟南芥(Arabidopsis),烟草和玉米)的靶向基因组修饰中[6] [7] [8]。但是,它的应用不仅需要适当的设计和组装新的 ZFN,还需要花费大量时间来验证其筛选过程[9]。

2.2. 类转录激活效应物核酸酶技术(TALEN)

TALEN 是一种基于 ZFNs 技术上,在植物病原菌中被定义的一种定点诱变[10]。它的靶位点是靶向 1 个核苷酸,而不是 3 个,这使得 TALENs 更加精确[11]。目前它已被成功运用于被子植物和苔藓植物的基因组编辑[12] [13]。与 ZFN 相比,TALEN 更容易设计[14]。

2.3. CRISPR/Cas9 技术

与 ZFN 和 TALEN 不同,CRISPR 系统是 RNA 定向的 DNA 核酸内切酶,可适用细菌免疫系统[3]。CRISPR 技术已被广泛用来编辑(超过 20 种作物)植物的基因组,以修饰多种性状,例如产量、品质和对

非生物/生物胁迫的抗性等[15] [16]。当前,新的基因组编辑技术,例如成簇规则间隔的短回文重复序列 CRISPR-Cas9、CRISPR-Cpf1 和 CRISPR-Cas13 的基因修饰已开发。同时与 ZFN 和 TALEN 相比,它具有设计简单、高效和成本低的优势[17] [18] [19]。

CRISPR/Cas9 是一种 RNA 引导的核酸内切酶,可通过核苷酸碱基配对特异性靶向 DNA 序列[20]。接下来本文将着重分析 CRISPR/Cas9 技术在作物中的应用以及存在的问题及发展。

3. CRISPR/Cas9 技术

CRISPR/Cas 系统是原核生物 RNA 介导的序列特异性适应性免疫系统,根据其组分与序列的不同,该系统可分为三大类型(I 型、II 型和 III 型),其中 I 型和 III 型相对复杂,并且参与的 Cas 蛋白相对较多;而 II 型系统较为简便,仅需单个 Cas9 蛋白作为核酸酶就可进行 DNA 切割功能,因此 II 型系统,被人为个性化设计,赋予其新的功能,即我们熟知的 CRISPR/Cas9 系统,用于基因编辑[21]。

该系统有两个分支:CRISPR 阵列和 Cas9 核酸酶。CRISPR 阵列由一系列高度保守的短 DNA 重复序列组成,通常为 21~48 bp 的回文序列或短的反向重复序列,这些序列由相似长度的独特间隔子隔开。另一方面,Cas9 是一种与 CRISPR 相关的核酸酶蛋白,可协助外源 DNA 降解。Cas9 由 CRISPR 阵列旁的 Cas 基因编码[22] [23],CRISPR/Cas9 系统在基因组中产生双链断裂(DSB)的能力,使其成为用做基因组剪刀的绝佳编辑工具[24]。

在 II 型 CRISPR/Cas 系统中,编码 Cas9 蛋白和两个 RNA 的单个基因,从间隔子转录的成熟 CRISPR RNA (crRNA)和反式作用 RNA(tracrRNA)足以进行 RNA 引导的裂解外来 DNA。要使 crRNA 成熟,必须使用 RNase III 和 tracrRNA [25]。然而,可以通过工程化的小向导 RNA (sgRNA)来简化此过程,该小向导 RNA 包含一个发夹,该发夹模仿 tracrRNA-crRNA 复合体和具有与原间隔子相邻的基序的短导序列 (NGG) [24]。因此,Cas9 核酸内切酶可以产生靶 DNA 的序列特异性 DSB 与 sgRNA 结合。Cas9 核酸内切酶产生的 DSB 被 NHEJ 或 HDR 修复[26] [27] [28] [29]。NHEJ 介导的修复导致在目标位点产生小缺失,从而导致基因功能通过移码突变而破坏。在具有与 DSB 侧翼序列同源的单链或双链 DNA 模板的情况下,HDR 可以产生具有精确点突变或 DNA 插入片段的突变等位基因。

4. CRISPR/Cas9 在作物上的应用

到目前为止,CRISPR/Cas9 已被运用于操控几乎所有生命系统的基因组,它被用于提高作物产量、改善品质、提升抗性、生物(真菌、细菌、病毒等)/非生物(热、干旱、霜冻、盐度等)胁迫以及雄性不育等方向,具有更广阔的应用前景。

4.1. 提高产量

育种最重要的目的就是提升产量,产量的形成与株型发育(分蘖、株高、茎叶夹角、穗型等)和籽粒形成(花穗建成、籽粒发育等)相关。分蘖是重要的农艺性状,Xiaoxia Wen 等人发现了一种半矮化和低分蘖突变体 *Osdlt10* 基因突变水稻,并且证明了该基因在调节水稻腋芽发育、分蘖的形成过程中起重要作用[30]。已经对水稻品种中华 11 的 *Gn1a* (Os01g0197700)、*DEP1* (Os09g0441900)、*GS3* (Os03g0407400)和 *IPA1* (Os08g0509600)基因进行了突变,这些基因起着谷粒数量调节剂的作用并且控制穗构型、粒大小和植物构型[30]。这项研究表明,可以利用 CRISPR/Cas9 系统轻松操纵与产量相关的基因,从而改善栽培农作物品种的重要农艺性状。雄性不育是杂交种子生产的前提,Bin Wang 等人揭示了 *SAW1-GA20ox3-GAMYB* 途径控制水稻花药发育的机制,并为通过杂交育种的基因编辑提供了雄性不育系的新的靶基因[31]。Sergei Svitashv 等人在玉米中针对雄性育性基因(*MS26* 和 *MS45*)进行了基因突变,在此过程中回收了含有双等位基因多重突变的植物,引导 RNA 将其直接递送到含有预先整合的 Cas9 未成熟胚胎细胞中,也导致了靶向

突变, 后代显示出预期的孟德尔突变[32]。蒋佳芮等人通过花粉离体培育获得单倍体, 利用 CRISPR/Cas9 系统编辑番茄红素脱氢酶基因位点, 产生白化单倍体植株建立了烟草单倍体基因编辑系统[33]。

4.2. 改善品质

“高产不优质, 优质不高产”是作物育种界普遍存在的一个瓶颈问题。植物的休眠对农业生产有至关重要的影响, 如有些种子的休眠期如果较短, 在收获前的母株上萌发, 影响种子的产量和品质; 还有些作物到了播种季节, 但种子未经适当处理就进行播种, 田间容易发生出苗参差不齐, 出苗率低的现象。Lawrenson 等人在 2015 年针对大麦的多拷贝基因进行了研究, 编码了 ABA 诱导质膜蛋白的 HvPM19 基因被用来研究休眠特性, 并且筛选出与靶基因敲除相关的预期矮表型的 T0 植物[34]。

植酸(PA)是玉米种子中的天然产物, 它是一种抗营养化合物, 在人体内会引起消化不良, 并且会造成环境污染。Liang 等人讨论了 PA 与肌醇 1, 2, 3, 4, 5, 6 六基磷酸的存在, 并设计两个靶向 ZmIPK (肌醇磷酸激酶)基因的 gRNA (可催化 PA 生物合成降解中的关键步骤)来降低玉米种子中 PA 的含量[35]。

4.3. 提升抗逆性

多年来, 生物因素和理化因素已经对植物的生产造成了不利影响, 目前植物生物学的研究之一集中在产生可以耐受恶劣农业气候条件的农作物, 以满足不断增长的人类的需求。

4.3.1. 生物胁迫

CRISPR/Cas 系统也被用于生产对 DNA 病毒感染具有抗性的植物。Tong Zhang 等人利用 CRISPR/Cas 技术对拟南芥和本氏烟草植物进行了 RNA 病毒分子免疫。其中表达了黄瓜花叶病毒(CMV)和烟草花叶病毒(TMV), 植物表现出显著减弱的病毒感染症状, 此外, 在靶向转基因病毒的植物中, 这种抗性是可遗传的, 后代显示出了明显较少的病毒积累。这种技术可以在农业领域中用于病毒控制的用途[36]。稻瘟病是由稻瘟病原菌引起的水稻的一种病害, 降低产量。它在水稻的整个生育期中都可能发生, 分为苗瘟、叶瘟、穗瘟和节瘟。Wang 等人在 2016 年通过靶向水稻中的 OsERF922 基因, 使水稻产生了抗稻瘟病的能力[37]。2014 年, Wang 等采用 CRISPR/Cas9 技术, 对小麦白粉病抗性相关基因 Ta MLO 进行特异性敲除, 获得了抗小麦白粉病的遗传材料[38]。2017 年 Yongwei Sun 等首次利用 CRISPR/Cas9 技术介导的 SBEIIb 编辑, 改变了淀粉的精细结构和营养特性, 证明生产高直链淀粉水稻的可行性[39]。Jun Li 等在水稻内源性基因 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS)中实现基因置换 2.0%, 同时还使用靶向一个内含子的 sgRNA 和包括相同 sgRNA 位点供体 DNA 模板, 以 2.2% 的频率获得靶向基因插入。带有 OsEPSPS 基因并具有预期替代作用的水稻植株具有抗草甘膦的能力, 此外, 位点特异性基因的替换和插入还被遗传给下一代[40]。

4.3.2. 非生物胁迫

玉米 ARGOS8 是乙烯反应负调节剂。先前研究表明, 组成型过表达 ARGOS8 的转基因植物在干旱胁迫条件下降低了乙烯敏感性, 并提高了谷物产量。为了探索抗旱育种中 ARGOS8 天然表达变异的目标用途, 检查了 400 多个玉米自交系的多样化集合中的 ARGOS8 mRNA 表达, 但所有品系中的表达水平均低于原始 ARGOS8 转基因事件中的表达水平。然后, 采用了具有 CRISPR-Cas 技术来设计 ARGOS8 的新型变体。赋予中等水平的组成型表达的天然玉米 GOS2 启动子被插入天然 ARGOS8 基因的 5'端非翻译区, 或用于替代 ARGOS8 的天然启动子。通过 CR 和测序验证了其 DNA 修饰的精确度。最后由田间研究表明, 与 WT 相比, 该变种在开花干旱胁迫条件下, 每公顷增加了 313.9 kg 的谷物产量, 而灌溉条件良好的条件下则没有产量损失[41]。

所有 OsLOGL5 编辑的植物在干旱条件下均显著提高了结实率, 总粒数, 每穗满粒数和千粒重, 这

表明 OsLOGL5 可能参与了种子发育和籽粒充实过程的调节。在不同的非生物胁迫条件下, OsLOGL5 蛋白的 C 末端在调节水稻产量中起着重要作用, 而 OsLOGL5 对于提高水稻的产量和稳定性很重要[42]。

5. 问题及展望

通常, CRISPR/Cas9 构建体通过农杆菌介导[43]、基因枪[44]和原生质体转染的方式进入植物细胞[45]。其中, 由于农杆菌介导偏向于插入单个或低拷贝数基因的特性, 并且相较于基因枪更加廉价, 使得农杆菌介导更受人欢迎[46]。但这项技术难免在构建以及运用过程中会有些问题。

5.1. 技术方面的问题

5.1.1. 脱靶问题

CRISPR/Cas 核酸酶并非 100%准确, 并且其可以与实际靶标具有相似性的靶位点进行切割[47]。在小麦等多倍体物种中, 以相同的 sgRNA 靶向全部三个同系同源物, 则 CRISPR/Cas 脱靶可用于一种优势, 而其中一个与另一个则具有核酸多态性[48]。有大量证据表明, CRISPR/Cas 在植物中使用是一种非常精确的基因组编辑工具。在大多数情况下, 可以通过设计具有最少预期脱靶数的特异性 sgRNA 来避免脱靶。尽管需要更多的研究来确定 CRISPR/Cas 引起的意料之外的靶位点改变(例如大的染色体插入、缺失或倒位), 若做好避免, CRISPR/Cas 或成为作物改良和育种的首选技术。尽管如此, 在逆向遗传研究中仍然有很多问题, 让植物科学家关注[49]。

5.1.2. 外源基因问题

在使用质粒做载体时, 降解以后的小片段 DNA 会残留, 形成外源基因。这种小片段外源基因是无法检测出来的。基于 CRISPR/Cas9 的植物基因组单碱基编辑系统和植物基因组定点插入和替换系统, 以及全程无外源 DNA 的 DNA-free 植物基因组编辑系统[50]等不断出现和改进。

5.1.3. 转化系统限制

植物基因编辑效率的提高在一定程度上依赖于高效的转化系统, 目前常用的转化系统包括农杆菌介导法、基因枪轰击法和 PEG 转化法[51]。其中, 最成熟的就是农杆菌介导法, 但由于宿主范围的限制, 只能适用于部分植物; 基因枪轰击法和 PEG 转化法虽然无宿主限制, 但基因枪轰击法具有随机性, 外源基因进入宿主基因组的整合位点相对不固定, 不利于外源基因的稳定表达; 而 PEG 转化涉及到植株再生问题, 目前仅有烟草等少数物种可以实现[52]。

5.1.4. PAM 序列问题

尽管 CRISPR/Cas 系统在基因工程方面显示出巨大的希望和灵活性, 但 PAM 序列中的序列要求可能会限制某些应用。Cas9 蛋白的定向进化应提供一种走向 PAM 独立的途径, 也可以提供一种产生更有效的 Cas9 核酸内切酶的手段。还需要进行其他研究, 以评估 RNA 引导的 DNA 核酸内切酶在体外和体内的特异性和毒性[53]。最后, 依靠可定制的重组酶[54]和转录因子[55]影响基因组结构和功能的条件方法的不断发展将补充现有和未来的核酸酶技术。这些技术在一起有望增强我们探索和改变任何基因组的能力, 并构成理解和治疗新的疾病。

5.2. 法律监管方面的问题

基因编辑技术的出现为植物育种提供了极好的机遇, 但我国对于基因编辑作物并无明显的法律界定[56]。在欧盟, 只要具有外源 DNA 导入, 不论植物是否含有该基因, 都会被定义为转基因生物。在美国农业监管部门认定 5 种基因编辑作物(ZFNS 技术创制的低植酸玉米、TALEN 技术创制的耐冷藏马铃薯品

种和高油酸、低亚油酸大豆、以及通过 CRISPR/Cas9 技术创制的抗褐化双孢菇和抗除草剂玉米)新品种为非转基因作物。所以,合理合法的使用这种高效的基因编辑技术至关重要,同时也是对广大群众食品安全的保障。

5.3. 展望

CRISPR/Cas9 技术作为针对简单或复杂生物体中特定基因组序列的选择方法,为多倍体作物基因编辑提供了技术手段,不同于转基因作物育种,基因编辑作物育种仅编辑作物内源基因,且可以通过后代的杂交分离将导入的外源基因剥离,所以获得的品种完全不含外源基因。在不改变作物原本的优良性状的前提下使新选育出的品种产能提高、相关经济产量增加等,综合以上几种优势,CRISPR/Cas9 技术未来将广泛应用于作物育种中。虽然目前的 CRISPR/Cas9 技术仍然存在挑战。现有报道的作物修饰是 CRISPR 介导基因敲除,敲除事件少,效率低,但是敲除对于作物育种非常有用,因为通过编辑可以赋予作物中不存在的一些新性状。相信不久的将来通过开发不同的策略来完善这项具有前景的育种新技术。

基金项目

内蒙古自治区农牧业创新基金项目(2018CXJJN07); 内蒙古自治区科技重大专项项目(ZDZX2018015); 国家自然科学基金项目(31860407); 国家糖料产业技术体系项目(CARS-170104); 内蒙古自治区“草原英才”创新人才团队项目(甜菜生物技术产业创新团队); 2018 年度自治区本级引进第五类人才科研支持和岗位激励; 内蒙古自治区科技计划项目(2021GG0026); 内蒙古自治区自然科学基金项目(2021LHBS03006)。

参考文献

- [1] 周冠彤, 雷建峰, 代培红, 刘超, 李月, 刘晓东. 棉花 CRISPR/Cas9 基因编辑有效 sgRNA 高效筛选体系的研究[J]. 作物学报, 47(3): 427-437.
- [2] 谢科, 饶力群, 李红伟, 安学丽, 方才臣, 万向元. 基因组编辑技术在植物中的研究进展与应用前景[J]. 中国生物工程杂志, 2013, 33(6): 99-104.
- [3] Chang, H.A., Ramya, M., An, H.R., Park, P.M. and Jang, S. (2020) Progress and Challenges in the Improvement of Ornamental Plants by Genome Editing. *Plants*, **9**, Article No. 687. <https://doi.org/10.3390/plants9060687>
- [4] 张庆晓, 曹少先, 苏磊, 王慧利, 孟春花, 王锋. 锌指核酸酶技术在基因组定点修饰中的应用[J]. 畜牧与兽医, 2013, 45(1): 96-100.
- [5] 王琪, 张浩, 王博文, 雷秀娟, 王英平. 基因编辑技术在人参中的应用展望[J]. 特产研究, 2020, 42(3): 72-76 +85.
- [6] Osakabe, K., Osakabe, Y. and Toki, S. (2010) Site-Directed Mutagenesis in Arabidopsis Using Custom-Designed Zinc Finger Nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 12034-12039. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000234107>
- [7] Petolino, J.F., Worden, A., Curlee, K., Connell, J., Strange Moynahan, T.L., Larsen, C., et al. (2010) Zinc Finger Nuclease-Mediated Transgene Deletion. *Plant Molecular Biology*, **73**, 617-628. <https://doi.org/10.1007/s11103-010-9641-4>
- [8] Shukla, V.K., Doyon, Y., Miller, J.C., Dekelver, R.C., Moehle, E.A., Worden, S.E., et al. (2009) Precise Genome Modification in the Crop Species Zea Mays Using Zinc-Finger Nucleases. *Nature*, **459**, 437-441. <https://doi.org/10.1038/nature07992>
- [9] Hsu, P. and Feng, Z. (2012) Dissecting Neural Function Using Targeted Genome Engineering Technologies. *ACS Chemical Neuroscience*, **3**, 603-610. <https://doi.org/10.1021/cn300089k>
- [10] Ahmar, S., Saeed, S., Khan, M.H.U., Ullah Khan, S., Mora-Poblete, F., Kamran, M., et al. (2020) A Revolution toward Gene-Editing Technology and Its Application to Crop Improvement. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, Article No. 5665. <https://doi.org/10.3390/ijms21165665>
- [11] Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., et al. (2009) Breaking the Code of DNA Binding Specificity of Tal-Type III Effectors. *Science*, **326**, 1509-1512. <https://doi.org/10.1126/science.1178811>
- [12] Li, T., Liu, B., Spalding, M.H., Weeks, D.P. and Yang, B. (2012) High-Efficiency Talen-Based Gene Editing Produces Disease-Resistant Rice. *Nature Biotechnology*, **30**, 390-392. <https://doi.org/10.1038/nbt.2199>

- [13] Kopschke, S., Schüßler, E., Althoff, F. and Zachgo, S. (2017) Talen-Mediated Genome-Editing Approaches in the Liverwort *Marchantia Polymorpha* Yield High Efficiencies for Targeted Mutagenesis. *Plant Methods*, **13**, Article No. 20. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0167-5>
- [14] Gupta, R.M. and Musunuru, K. (2014) Expanding the Genetic Editing Tool Kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. *The Journal of Clinical Investigation*, **124**, 4154-4161. <https://doi.org/10.1172/JCI72992>
- [15] Ahmad, S., Wei, X., Sheng, Z., Hu, P. and Tang, S. (2020) CRISPR/Cas9 for Development of Disease Resistance in Plants: Recent Progress, Limitations and Future Prospects. *Briefings in Functional Genomics*, **19**, 26-39. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elz041>
- [16] Zafar, S.A., Zaidi, S.S., Gaba, Y., Singla-Pareek, S.L., Dhankher, O.P., Li, X., Mansoor, S. and Pareek, A. (2020) Engineering Abiotic Stress Tolerance via CRISPR/ Cas-Mediated Genome Editing. *Journal of Experimental Botany*, **71**, 470-479. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz476>
- [17] Kim, H. and Kim, J.S. (2014) A Guide to Genome Engineering with Programmable Nucleases. *Nature Reviews Genetics*, **15**, 321-334. <https://doi.org/10.1038/nrg3686>
- [18] Vats, S., Kumawat, S., Kumar, V., Patil, G.B., Joshi, T., Sonah, H., Sharma, T.R. and Deshmukh, R. (2019) Genome Editing in Plants: Exploration of Technological Advancements and Challenges. *Cells*, **8**, Article No. 1386. <https://doi.org/10.3390/cells8111386>
- [19] Woo, J.W., Kim, J., Kwon, S.I., Corvalán, C., Cho, S.W., Kim, H., Kim, S.G., Kim, S.T., Choe, S. and Kim, J.S. (2015) DNA-Free Genome Editing in Plants with Preassembled CRISPR-Cas9 Ribonucleoproteins. *Nature biotechnology*, **33**, 1162-1164. <https://doi.org/10.1038/nbt.3389>
- [20] Manghwar, H., Lindsey, K., Zhang, X. and Jin, S. (2019) CRISPR/Cas System: Recent Advances and Future Prospects for Genome Editing. *Trends in Plant Science*, **24**, 1102-1125. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.09.006>
- [21] 周想春. 基于基因编辑的水稻抽穗期定向改良及广亲和材料创建[D]: [博士学位论文]. 武汉: 华中农业大学, 2017.
- [22] Bhaya, D., Davison, M. and Barrangou, R. (2011) CRISPR-Cas Systems in Bacteria and Archaea: Versatile Small RNAs for Adaptive Defense and Regulation. *Annual Review of Genetics*, **45**, 273-297. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132430>
- [23] Liu, D., Hu, R., Palla, K.J., Tuskan, G.A. and Yang, X. (2016) Advances and Perspectives on the Use of CRISPR/Cas9 Systems in Plant Genomics Research. *Current Opinion in Plant Biology*, **30**, 70-77. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.01.007>
- [24] Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A. and Charpentier, E. (2012) A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, **337**, 816-821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- [25] Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C.M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z.A., Eckert, M.R., Vogel, J. and Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA Maturation by *Trans*-Encoded Small RNA and Host Factor RNase III. *Nature*, **471**, 602-607. <https://doi.org/10.1038/nature09886>
- [26] Barnes, D.E. (2001) Non-Homologous End Joining as a Mechanism of DNA Repair. *Current Biology*, **11**, R455-R457. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00279-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00279-2)
- [27] Lieber M.R. (2010) The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. *Annual Review of Biochemistry*, **79**, 181-211. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.093131>
- [28] van den Bosch, M., Lohman, P.H. and Pastink, A. (2002) DNA Double-Strand Break Repair by Homologous Recombination. *Biological Chemistry*, **383**, 873-892. <https://doi.org/10.1515/BC.2002.095>
- [29] Wyman, C. and Kanaar, R. (2006) DNA Double-Strand Break Repair: All's Well That Ends Well. *Annual Review of Genetics*, **40**, 363-383. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090451>
- [30] Wen, X., Sun, L., Chen, Y., Xue, P., Yang, Q., Wang, B., Yu, N., Cao, Y., Zhang, Y., Gong, K., Wu, W., Chen, D., Cao, L., Cheng, S., Zhang, Y. and Zhan, X. (2020) Rice Dwarf and Low Tillering 10 (*OsDLT10*) Regulates Tiller Number by Monitoring Auxin Homeostasis. *Plant Science*, **297**, Article ID: 110502. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110502>
- [31] Wang, B., Fang, R., Chen, F., Han, J., Liu, Y.-G., Chen, L. and Zhu, Q. (2020) A Novel Ccch-Type Zinc Finger Protein Saw1 Activates *OsGA20ox3* to Regulate Gibberellin Homeostasis and Anther Development in Rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, **62**, 1594-1606. <https://doi.org/10.1111/jipb.12924>
- [32] Svitashv, S., Schwartz, C., Lenderts, B., Young, J.K. and Mark Cigan, A. (2016) Genome Editing in Maize Directed by CRISPR-Cas9 Ribonucleoprotein Complexes. *Nature Communications*, **7**, Article No. 13274. <https://doi.org/10.1038/ncomms13274>
- [33] 蒋佳芮, 许力, 李锐, 张建铎, 向海英, 高茜, 宋春满, 邓乐乐, 杨文武, 杨光宇, 张承明, 李雪梅, 曾婉俐. 烟草

- 单倍体基因编辑系统的建立[J]. 中国烟草学报, 2020, 26(5): 66-71.
- [34] Lawrenson, T., Shorinola, O., Stacey, N., Li, C., Østergaard, L., Patron, N., Uauy, C. and Harwood, W. (2015) Induction of Targeted, Heritable Mutations in Barley and *Brassica oleracea* Using RNA-Guided Cas9 Nuclease. *Genome Biology*, **16**, Article No. 258. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0826-7>
- [35] Liang, Z., Zhang, K., Chen, K. and Gao, C. (2014) Targeted Mutagenesis in *Zea mays* Using TALENs and the CRISPR/Cas System. *Journal of Genetics and Genomics*, **41**, 63-68. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2013.12.001>
- [36] Zhang, T., Zheng, Q., Yi, X., An, H., Zhao, Y., Ma, S. and Zhou, G. (2018). Establishing RNA Virus Resistance in Plants by Harnessing CRISPR Immune System. *Plant Biotechnology Journal*, **16**, 1415-1423. <https://doi.org/10.1111/pbi.12881>
- [37] Wang, F., Wang, C., Liu, P., Lei, C., Hao, W., Gao, Y., Liu, Y.G. and Zhao, K. (2016) Enhanced Rice Blast Resistance by CRISPR/Cas9-Targeted Mutagenesis of the ERF Transcription Factor Gene *OsERF922*. *PLoS ONE*, **11**, e0154027. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154027>
- [38] Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J., Gao, C. and Qiu, J.L. (2014) Simultaneous Editing of Three Homoeoalleles in Hexaploid Bread Wheat Confers Heritable Resistance to Powdery Mildew. *Nature Biotechnology*, **32**, 947-951. <https://doi.org/10.1038/nbt.2969>
- [39] Sun, Y., Jiao, G., Liu, Z., Zhang, X., Li, J., Guo, X., Du, W., Du, J., Francis, F., Zhao, Y. and Xia, L. (2017) Generation of High-Amylose Rice through CRISPR/Cas9-Mediated Targeted Mutagenesis of Starch Branching Enzymes. *Frontiers in Plant Science*, **8**, Article No. 298. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00298>
- [40] Li, J., Meng, X., Zong, Y., Chen, K., Zhang, H., Liu, J., Li, J. and Gao, C. (2016) Gene Replacements and Insertions in Rice by Intron Targeting Using CRISPR-Cas9. *Nature Plants*, **2**, Article No. 16139. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.139>
- [41] Shi, J., Gao, H., Wang, H., Lafitte, H.R., Archibald, R.L., Yang, M., Hakimi, S.M., Mo, H. and Habben, J.E. (2017) ARGOS8 Variants Generated by CRISPR-Cas9 Improve Maize Grain Yield under Field Drought Stress Conditions. *Plant Biotechnology Journal*, **15**, 207-216. <https://doi.org/10.1111/pbi.12603>
- [42] Wang, C., Wang, G., Gao, Y., Lu, G., Habben, J.E., Mao, G., Chen, G., Wang, J., Yang, F., Zhao, X., Zhang, J., Mo, H., Qu, P., Liu, J. and Greene, T.W. (2020) A Cytokinin-Activation Enzyme-Like Gene Improves Grain Yield under Various Field Conditions in Rice. *Plant Molecular Biology*, **102**, 373-388. <https://doi.org/10.1007/s11103-019-00952-5>
- [43] Li, J.F., Norville, J.E., Aach, J., McCormack, M., Zhang, D., Bush, J., Church, G.M. and Sheen, J. (2013) Multiplex and Homologous Recombination-Mediated Genome Editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* Using Guide RNA and Cas9. *Nature Biotechnology*, **31**, 688-691. <https://doi.org/10.1038/nbt.2654>
- [44] Miao, J., Guo, D., Zhang, J., Huang, Q., Qin, G., Zhang, X., Wan, J., Gu, H. and Qu, L.J. (2013) Targeted Mutagenesis in Rice Using CRISPR-Cas System. *Cell Research*, **23**, 1233-1236. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.123>
- [45] Shan, Q., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Chen, K., Liang, Z., Zhang, K., Liu, J., Xi, J.J., Qiu, J.L. and Gao, C. (2013) Targeted Genome Modification of Crop Plants Using a CRISPR-Cas System. *Nature Biotechnology*, **31**, 686-688. <https://doi.org/10.1038/nbt.2650>
- [46] Char, S.N., Neelakandan, A.K., Nahampun, H., Frame, B., Main, M., Spalding, M.H., Becraft, P.W., Meyers, B.C., Walbot, V., Wang, K. and Yang, B. (2017) An *Agrobacterium*-Delivered CRISPR/Cas9 System for High-Frequency Targeted Mutagenesis in Maize. *Plant Biotechnology Journal*, **15**, 257-268. <https://doi.org/10.1111/pbi.12611>
- [47] Tycko, J., Myer, V.E. and Hsu, P.D. (2016) Methods for Optimizing CRISPR-Cas9 Genome Editing Specificity. *Molecular Cell*, **63**, 355-370. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.07.004>
- [48] Liang, Z., Chen, K., Li, T., Zhang, Y., Wang, Y., Zhao, Q., Liu, J., Zhang, H., Liu, C., Ran, Y. and Gao, C. (2017) Efficient DNA-Free Genome Editing of Bread Wheat Using CRISPR/Cas9 Ribonucleoprotein Complexes. *Nature Communications*, **8**, Article No. 14261. <https://doi.org/10.1038/ncomms14261>
- [49] Hahn, F., and Nekrasov, V. (2019) CRISPR/Cas Precision: Do We Need to Worry about Off-Targeting in Plants? *Plant Cell Reports*, **38**, 437-441. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2355-9>
- [50] 王福军, 赵开军. 基因组编辑技术应用于作物遗传改良的进展与挑战[J]. 中国农业科学, 2018, 51(1): 1-16
- [51] 李树磊, 郑红艳, 王磊. 基因编辑技术在作物育种中的应用与展望[J]. 生物技术通报, 2020, 36(11): 209-221.
- [52] Lin, C.S., Hsu, C.T., Yang, L.H., Lee, L.Y., Fu, J.Y., Cheng, Q.W., Wu, F.H., Hsiao, H.C., Zhang, Y., Zhang, R., Chang, W.J., Yu, C.T., Wang, W., Liao, L.J., Gelvin, S.B. and Shih, M.C. (2018) Application of Protoplast Technology to CRISPR/Cas9 Mutagenesis: From Single-Cell Mutation Detection to Mutant Plant Regeneration. *Plant Biotechnology Journal*, **16**, 1295-1310. <https://doi.org/10.1111/pbi.12870>
- [53] Gaj, T., Gersbach, C.A. and Barbas III, C.F. (2013) ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-Based Methods for Genome Engineering. *Trends in Biotechnology*, **31**, 397-405. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.04.004>
- [54] Gaj, T., Mercer, A.C., Sirk, S.J., Smith, H.L. and Barbas III, C.F. (2013) A Comprehensive Approach to Zinc-Finger

Recombinase Customization Enables Genomic Targeting in Human Cells. *Nucleic Acids Research*, **41**, 3937-3946.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt071>

- [55] Beerli, R.R. and Barbas III, C.F. (2002) Engineering Polydactyl Zinc-Finger Transcription Factors. *Nature Biotechnology*, **20**, 135-141. <https://doi.org/10.1038/nbt0202-135>
- [56] 肖义军, 黄艳萍. 基因编辑技术在作物育种上的应用研究进展[J]. 生物学教学, 2019, 44(11): 2-4.