

基因组编辑技术在植物基因功能鉴定及作物育种中的应用

周想春¹, 邢永忠^{1,2}

1. 华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070;

2. 主要粮食作物产业化湖北省协同创新中心, 荆州 434025

摘要: 利用生物技术可以对植物基因组进行高效、精准、特异的修饰。锌指核酸酶(Zinc finger nucleases, ZFN)、转录激活样效应因子核酸酶(Transcription activator-like effector nucleases, TALEN)、成簇规律间隔短回文重复序列(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/Cas9 (CRISPR-associated 9)是目前基因组编辑技术应用中的关键工程核酸酶。通过产生 DNA 双链断裂(Double-strand breaks, DSBs)激活植物内源修复途径(包括非同源粘性末端连接和同源重组修复), 基因组编辑技术可以实现对靶位点的定点突变、缺失或者基因的插入与替换。基因组编辑已经被广泛地应用到各种植物的基因组修饰中, 如拟南芥、水稻、烟草等。本文主要概述了基因组编辑技术在植物基因功能鉴定及作物遗传育种中的应用, 并对其未来在作物精准改良中需要完善的相关问题进行了探讨。

关键词: 基因组编辑; ZFN; TALEN; CRISPR/Cas9; 基因功能鉴定; 作物育种

The application of genome editing in identification of plant gene function and crop breeding

Xiangchun Zhou¹, Yongzhong Xing^{1,2}

1. National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Hubei Collaborative Innovation Center for Grain Industry, Jingzhou 434025, China

Abstract: Plant genome can be modified *via* current biotechnology with high specificity and excellent efficiency. Zinc finger nucleases (ZFN), transcription activator-like effector nucleases (TALEN) and clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated 9 (Cas9) system are the key engineered nucleases used in the genome editing. Genome editing techniques enable gene targeted mutagenesis, gene knock-out, gene insertion or replacement at the target sites during the endogenous DNA repair process, including non-homologous end joining (NHEJ) and homologous recombination (HR), triggered by the induction of DNA double-strand break (DSB).

收稿日期: 2015-07-20; 修回日期: 2016-01-04

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(编号: 2012 AA10A303)和国家自然科学基金项目(编号: 91335201)资助[Supported by the High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2012 AA10A303) and the National Natural Science Foundation of China (No. 91335201)]

作者简介: 周想春, 博士研究生, 研究方向: 遗传学。E-mail: xiangchunzhou@sina.com

通讯作者: 邢永忠, 教授, 博士生导师, 研究方向: 生物化学与分子生物学。E-mail: yzxing@mail.hzau.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.15-327

网络出版时间: 2016-1-5 15:52:01

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20160105.1552.001.html>

Genome editing has been successfully applied in the genome modification of diverse plant species, such as *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, and *Nicotiana tabacum*. In this review, we summarize the application of genome editing in identification of plant gene function and crop breeding. Moreover, we also discuss the improving points of genome editing in crop precision genetic improvement for further study.

Keywords: genome editing; ZFN; TALEN; CRISPR/Cas9; identification; crop breeding

随着高通量测序技术的飞速发展,越来越多的植物物种完成了基因组测序,科学家们正面临着解读植物功能基因组的巨大挑战。利用自然变异构建作图群体,通过图位克隆技术分离基因是鉴定基因功能的有效方法(传统的正向遗传学),但是从构建群体直至揭示基因功能耗时较长^[1]。因此人工创建遗传突变成为植物学研究领域的重要部分。利用化学诱变(如 EMS(Ethyl methanesulfonate)和叠氮化钠)以及物理诱变(如 γ 射线)的方法可以在植物基因组中引入突变,但是因为突变产生的随机性,分离引起表型变异的基因比较难。于是科研人员借助转基因技术,利用反向遗传学的手段对功能注释基因进行 RNAi 下调表达^[2-4],或者对植物基因组进行 T-DNA 插入突变^[5-8]。但是 RNAi 调控只是一种不彻底的转录水平的调控,并且不能完全展现出基因对表型的影响;而 T-DNA 插入具有随机性,并且有多拷贝的现象,需要花费大量人力物力筛选突变体和鉴定功能基因。显然,对目标基因进行序列修饰产生定向突变将会更好地揭示基因功能,高效进行定向遗传育种。

基因组编辑(Genome editing)技术是一种利用工程核酸酶(Artificially engineered nucleases)在体内精确编辑基因组的技术。基因组的改造最早是利用同源重组(Homologous recombination, HR)来实现的。20 世纪 80 年代, Capecchi 实验室^[9-12]和 Smithies 实验室^[13,14]将应用基因同源重组改造基因组称为“基因打靶(Gene targeting)”,用于特异基因的失活或者修饰。植物中第 1 例报道的基因打靶是在烟草(*Nicotiana tabacum* L.)中进行的^[15]。之后的研究表明,这种典型的同源重组效率极低(10^{-6} ~ 10^{-4})^[16-21]。随后,利用工程核酸酶诱导产生 DNA 双链断裂(Double-strand break, DSB)引发同源重组的策略被应用到植物基因打靶中,大大提高了同源重组的效率^[22-27]。

本文主要介绍了 3 种工程核酸酶(ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas9)介导的基因组编辑技术及其在植物基因功能研究中以及作物育种中的应用,并探讨了基

因组编辑技术在未来作物精准改良中需要完善之处。

1 工程核酸酶介导的基因组编辑

基因组编辑技术是利用工程核酸酶诱导基因组产生 DNA 双链断裂,进而激活细胞内源修复机制,实现对基因组的精确的修饰(替换、插入或缺失)。双链断裂的修复途径有两种:同源重组和非同源末端连接(Non-homologous end joining, NHEJ)修复。同源重组是指利用同源序列作为模板进行缺失序列的修复,当提供外源的 DNA 修复模板,则在与内源序列相同或相近的位点发生重组,将外源 DNA 整合到特定位置。利用同源重组修复即可进行基因替换、插入或者定点突变等。非同源末端连接修复是指断裂的染色体在多种酶的作用下直接进行非精确的连接修复。这种修复方式往往是不准确的,会在特定位点引入插入/缺失。因此非同源末端连接修复往往会产生特定位点的遗传突变,实现对基因组的定点编辑。

基因组编辑技术最关键的步骤是利用工程核酸酶在靶位点产生双链断裂,通过同源重组或者非同源末端连接自我修复途径进行基因组修饰。目前应用最广的三类序列特异的工程核酸酶为锌指核酸酶(ZFN)、转录激活因子效应子核酸酶(TALEN)和规律成簇间隔短回文重复序列及其核酸酶(CRISPR/Cas9)(图 1)。这些工程核酸酶具有共同的特征,都包含 DNA 识别与结合结构域(位点特异性)以及核酸内切酶切割结构域(双链断裂的酶切活性),对特定靶位点进行特异性的结合并切割产生 DSB。

1.1 ZFNs 的结构原理及构建方法

ZFNs 是最早用来进行基因组定向修饰的位点特异性工程核酸酶^[28-32]。Zinc finger(ZF)是真核生物中一种最常见的 DNA 结合基序,结构保守,每个 ZF 基序可以特异识别碱基三联体(3 bp 碱基序列)^[33]。将 3~4 个 ZF 基序串联便构成了特异识别与结合 9~12 bp 特异 DNA 序列的 DNA 结合结构域(DNA

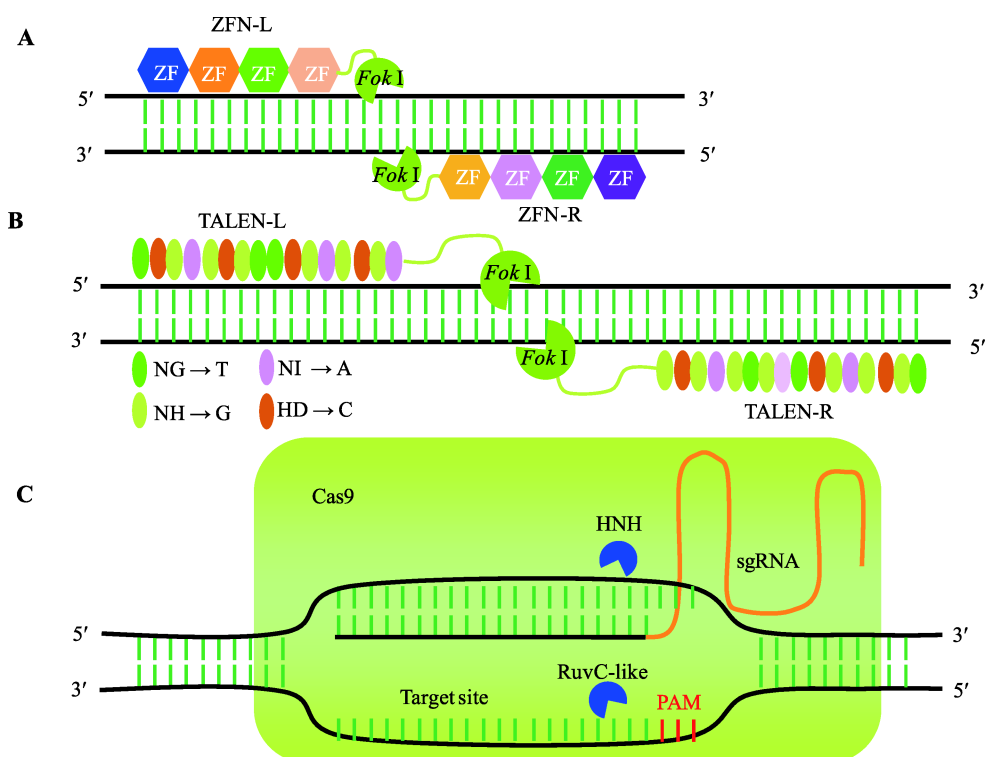


图1 三类工程核酸酶的作用原理

Fig. 1 Schematic principles of three types of engineered nucleases

A: ZFN 以二聚体的形式结合 DNA, 融合的 *FokI* 以二聚体形式发挥对靶区序列的切割作用; B: TALEN 以二聚体的形式结合 DNA, 融合的 *FokI* 以二聚体形式发挥对靶区序列的切割作用; C: CRISPR/Cas9 通过 sgRNA 介导识别 PAM 结构而结合 DNA, Cas9 切割结构域(HNH 和 RuvC-like)对靶序列进行特异性切割。

binding domain, DBD)。ZFNs 是一对人工合成的 DNA 结合结构域分别融合限制性内切酶 *FokI* 的非特异性 DNA 切割结构域(DNA cutting domain, DCD), 以二聚体形式发挥位点特异切割功能的工程核酸酶^[30]。ZFNs 靶向的两条识别序列一般间隔 5~7 bp (称间隔序列, spacer), 使 ZFNs 可以形成二聚体, 完成对间隔序列的特异性切割, 产生双链断裂^[30] (图 1A)。

根据靶位点的 DNA 序列可以按顺序组装 ZF 基序, 构成特异识别靶位点的 ZFNs^[34,35]。构建 ZFNs 的方法一般包括 3 种: 模块直接组装法, 基于库的筛选法—OPEN(Oligomerized pool engineering)以及 CoDA (Context-dependent assembly)。模块直接组装法是最早被应用的, 也是操作最为简便的构建方法^[34,36~38]。该方法是基于 ZF 基序与碱基三联体之间的对应识别关系, 直接根据靶标序列按顺序组装 ZF 基序。模块直接组装法由于忽视了不同 ZFs 之间的相互作用, 会造成严重的脱靶效应, 降低了对靶位点的识别效

率^[39]。为了排除 ZFs 间相互作用的影响, 以筛选最优 ZF 模块组合为基础的 OPEN 方法得以应用。首先构建 3 个 ZFs 基序组合在一起的 ZFs 库, 然后筛选与靶标序列特异性及亲和力最强的组合^[40~42]。由于该方法需要构建 ZFs 库, 并且筛库耗时耗力, 因此限制了其广泛应用。于是新的简单易行的方法—CoDA 取代了 OPEN, 该方法吸取了模块直接组装的简易性, 并结合筛选的策略考虑了 ZFs 上下文依赖效应^[43]。利用 OPEN 的策略筛选功能较强的两个 ZF 基序组合, 使 ZFs 上下文依赖效应降到最小, 然后利用简单的克隆策略进行组装或者商业合成表达该 ZF 组合的 DNA 序列。因此, CoDA 大大缩短了组装的时间, 在植物中得到广泛应用^[43,44]。

1.2 TALEN 的结构原理及构建方法

随着 TALE 识别 DNA 密码的成功破译^[45,46], TALEN 成为一种目前应用十分广泛的序列特异性工程核酸内切酶^[47~49]。TALEN 的 DNA 结合结构域

来自人工设计与改造的个性化 TALE 蛋白。TALEs 最初来源于植物病原菌—假黄单胞菌分泌的效应因子,其通过识别特异的 DNA 序列,激活靶基因的转录而引起植物病害^[50-52]。TALE 蛋白具有特异的结构,包括带转运信号的 N 端、带核定位信号及转录激活结构域的 C 端以及具有 DNA 特异识别与结合能力的中部结构域^[52,53]。中部的 DNA 识别与结合结构域一般由不同数目的连续串联重复单体构成,每个重复单体含有 33~35 个氨基酸碱基,这些氨基酸残基十分保守,除了 12 位、13 位的残基有差异,其他残基都是保守的,这两个可变的氨基酸残基称为重复序列可变的双氨基酸残基(Repeat variable diresidues, RVD),决定了 TALE 对 DNA 识别的特异性^[46,54,55]。每个重复单体的 RVD 识别不同的碱基,构成了 TALE 识别 DNA 的密码^[46],例如 NI、HD、NG、NH、NN 分别识别 A、C、T、G、G/A,其中 NH 对 G 的识别特异性较 NN 强^[56,57]。基于 TALE 识别密码,可以根据靶序列,个性化地设计具有识别特异性的 TALE 蛋白,形成 TALEN 的 DNA 识别与结合结构域(DBD)。与 ZFN 一样,将 DBD 与 *Fok I* 非特异性的 DNA 切割结构域融合,便构成了序列特

异核酸内切酶 TALEN^[48,58-61](图 1B)。

通过对天然 TALE 蛋白的研究发现,TALE 识别的是以 T 开头的 DNA,于是研究者们提出了 TALEN 靶位点选择的原则^[58,60,62,63]。不同研究单位也建立并共享了 TALEN 靶点预测与设计的在线工具(表 1),其中以 Bogdanove 和 Voytas 实验室最早合作建立的 TALE-NT 网站(<https://tale-nt.cac.cornell.edu/>)应用较为广泛^[64]。用户可以选择不同的设计原则^[58,60,62,63]进行靶标基因组序列的 TALEN 靶点预测。预测结果中同时会显示间隔区(*Fok I* 二聚体切割位点区域)中所含的限制性酶切位点以便于突变鉴定。由于 *Fok I* 是以二聚体形式发挥剪切作用,因此与 ZFN 一样也是需要构建一对 TALENs 进行靶位点的切割。目前构建 TALEN 的主要方法有:基于 Golden gate 的组装方法^[61,62,65,66],基于连续克隆的组装方法^[67],以及基于固相合成的高通量方法^[68]。由于 Golden gate 操作简易、成本低,在植物领域中应用最为广泛。

1.3 CRISPR/Cas9 系统的结构原理及构建方法

正当 TALEN 技术迅速被广泛应用到植物研究领域时,一项新的基因组编辑技术 CRISPR/Cas9 被开

表 1 不同靶点设计工具对照表

Table 1 Comparison of variable tools for targets design

工具名称	网址	脱靶分析	可供靶点设计的植物	文献(工具介绍)
TALEN targeter	https://tale-nt.cac.cornell.edu	有	拟南芥、水稻、玉米、番茄、短柄草	[64]
E-TALEN	http://www.e-talen.org/E-TALEN/	有	拟南芥、水稻、短柄草	[69]
E-CRISP	http://www.e-crisp.org/E-CRISP/	有	拟南芥、水稻、玉米、短柄草	[70]
Cas9 design	http://cas9.cbi.pku.edu.cn/	有	拟南芥、番茄	[71]
CRISPR design	http://crispr.mit.edu/	有	拟南芥	[72]
CRISPR-P	http://cbi.hzau.edu.cn/crispr/	有	拟南芥、水稻、玉米、番茄、油菜等	[73]
SSFinder	https://code.google.com/p/ssfinder	无	拟南芥	[74]
CHOPCHOP	https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/index.php	有	拟南芥	[75]
CRISPRdirect	http://crispr.dbcls.jp/	有	拟南芥、水稻、高粱	[76]
CRISPR-PLANT	http://www.genome.arizona.edu/crispr/	有	拟南芥、水稻、玉米、大豆、高粱、番茄、短柄草等	[77]
Cas9 Online Designer	http://cas9.wicp.net/	有	拟南芥、水稻	无
CRISPR MultiTargeter	http://www.multicrispr.net/	无	拟南芥、水稻、玉米	[78]
CRISPRscan	http://www.crisprscan.org/	有	无	[79]
Cas-Designer	http://www.rgenome.net/cas-designer/	有	拟南芥、水稻、玉米、番茄、大豆、木薯等	[80]
sgRNA Designer	http://www.broadinstitute.org/rnai/public/analysis-tools/sgrna-design	无	无	[81]

发并迅速应用到各个科学研究领域。CRISPR/Cas9 技术编辑效率更高, 操作更为简便, 成本更低, 成为当前最为主流的基因组编辑技术^[82,83]。CRISPR/Cas9 是一种全新的序列特异核酸内切酶, 来源于细菌的免疫系统, 经人工修饰与改造, 用于基因组编辑。该系统通过人工设计特异的单个引导 RNA(Single guided RNA, sgRNA)介导 DNA 识别, 引导 Cas9 蛋白对靶序列的切割, 产生双链断裂(图 1C)。

CRISPR/Cas 是细菌用于保护自身免受外来质粒或者噬菌体 DNA 入侵的后天获得性免疫系统。根据其组分与序列的不同, 该系统分为三类(I 型、II 型和 III 型), 其中 I 型和 III 型较为复杂, 参与的 Cas 蛋白种类较多^[84]; 而对 II 型系统的研究发现, 该系统较为简便, 仅需成熟的 CRISPR RNAs(crRNA), 以及反式激活 crRNA(tracrRNA)便可以引导仅需的单个 Cas9 蛋白对特定外源 DNA 进行切割。在这个系统中, 当短的外来噬菌体或质粒 DNA 片段(Protospacer)被整合到细菌的 CRISPR 位点形成间隔区(Spacer), 间隔区会被转录并形成含有 protospacer 互补序列的成熟 crRNA, 接着退火与 tracrRNA 形成 crRNA-tracrRNA 的杂合 RNA(即 sgRNA), sgRNA 特异识别再次入侵的噬菌体或者质粒的 protospacer 区, 并引导 Cas9 对其进行双链的特异性切割—HNH 核酸酶结构域切割互补链而 RuvC-like 结构域切割非互补链(图 1C)。在外源 DNA 的 protospacer 的下游存在一个十分保守的-NGG 序列(称为 PAM 结构), PAM 序列与 sgRNA 共同决定了 CRISPR/Cas9 对靶序列结合的特异性, 并且 PAM 序列的识别会促使 Cas9 从结合构象向切割构象的转变。

CRISPR/Cas9 对 DNA 的靶向切割作用, 使其可以被用来进行基因组编辑。2012 年, Jinek 等^[85]在体外率先证实了 Cas9 可以在人工合成的 sgRNA 引导下对靶标 DNA 序列进行特异切割。2013 年, 科学家们又在体内实现了人工改造的 CRISPR/Cas9 系统对靶标 DNA 序列的特异性切割^[86,87]。由于该系统仅有 PAM 序列的唯一限制, 因此该技术被迅速应用到各个研究领域^[88-93]。

CRISPR/Cas9 系统设计相对简单, 对靶点的要求比较低, 目前也有各种各样共享的在线工具用来进行靶序列的预测(表 1)。有些预测工具同时对靶位点进行了脱靶分析, 如 E-CRISP^[70]、Cas9-design^[71]、

CRISPR design^[72]、CRISPR-P^[73]、CRISPR-PLANT^[77]等。由于 Cas9 无需形成二聚体来行使功能, 因此只需构建单个转化载体用于表达 Cas9 蛋白及 sgRNA 即可实现基因组编辑。并且, CRISPR/Cas9 系统可以实现同时对多个靶序列进行定点编辑。目前在植物研究领域已经报道了多种高效的 CRISPR/Cas9 载体系统(表 2), 包括来自 Kamoun 实验室^[91]、Sheen 实验室^[89,94]、朱健康实验室^[88,90,95-97]、高彩霞实验室^[93,98]、杨亦农实验室^[77,99,100]、瞿礼嘉实验室^[92]、Weeks 实验室^[101,102]、陈其军实验室^[103,104], 以及刘耀光实验室^[105]的 CRISPR 系统等。有些仅构建单个表达载体即可进行多靶标的同时定点编辑。Sheen 实验室载体系统在单个载体上串联表达两个独立的 sgRNAs, 可实现对两个靶点的同时切割^[89,94]。杨亦农实验室载体系统含有多个串联的 tRNA-gRNA 单元, 原始转录产物在内源 RNase P 和 RNase Z 的剪切下释放出成熟的 gRNAs 和 tRNA, 成熟的 gRNAs 引导 Cas9 实现对多靶点的同时切割^[100]。刘耀光课题组最近报道的 CRISPR/Cas9 系统利用 Golden gate 或者 Gibson 的方法组装可同时进行多个靶点编辑的表达载体, 平均编辑效率高达 85%^[105], 该系统对于双子叶及单子叶植物同样适用。

1.4 不同基因组编辑技术的比较

ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 介导的基因组编辑技术已经成为当前科学研究与生产应用领域的三大明星。这 3 种基因组编辑技术各有各的优缺点(表 3), 实际应用需结合各自优缺点进行合理使用。

ZFN 是最早被利用的工程核酸酶, 特异性较低, 效率不高, 脱靶率较大, 并且操作相对繁琐, 价格昂贵。TALEN 技术不但可以像 ZFN 一样对基因组进行编辑, 又相对简单、成本低, 被评为 2012 年十大科学进展之一^[106]。而最新的编辑技术 CRISPR/Cas9 相对 ZFN 及 TALEN 具有更有强大的优势, 主要表现在载体构建简单易行, 成本更低, 多靶点的同时定点修饰, 染色体大片段缺失, 靶向效率更高。刘耀光课题组的研究表明, 非正常靶位点序列(C 或者 T 开头)也可以拥有正常靶点序列(G 或者 A 开头)相似的编辑效率^[105], 使得靶位点的选择更加自由。更值得关注的是, 在动物及人类细胞中的最新研究表明, 通过对野生型 spCas9 蛋白进行改进, 可以识别

表 2 植物中应用较为广泛的 CRISPR/Cas9 载体系统

Table 2 Brief summary of CRISPR/Cas9 vectors used in plant

实验室	构建策略	简易性	靶点数目	成功应用的植物	参考文献
Kamoun	Golden gate	相对简单	单靶点	烟草	[91]
Sheen	简单连接	相对简单	多靶点	拟南芥、烟草	[89, 94]
朱健康	简单连接	相对简单	多靶点	拟南芥、水稻	[88, 90, 95~97]
高彩霞	简单连接	相对简单	单靶点	水稻、小麦	[93, 98]
杨亦农	Golden gate	相对复杂	多靶点	拟南芥、苜蓿、大豆、番茄、短柄草、水稻、高粱、玉米	[77, 99, 100]
瞿礼嘉	Gateway 以及 Golden gate	相对简单	多靶点	水稻	[92]
Weeks	简单连接	相对简单	单靶点	拟南芥、烟草、高粱、水稻	[101, 102]
陈其军	Golden gate	相对复杂	多靶点	拟南芥、玉米	[103, 104]
刘耀光	Golden gate 或者 Gibson	相对复杂	多靶点	拟南芥、水稻	[105]

表 3 三类工程核酸酶 ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 的比较

Table 3 Comparison of ZFN, TALEN and CRISPR/Cas9

类别	ZFN	TALEN	CRISPR/Cas9
识别方式	蛋白-DNA	蛋白-DNA	RNA-DNA
识别结构域	锌指蛋白	转录激活因子效应子	单个引导 RNA
切割结构域	<i>Fok I</i>	<i>Fok I</i>	Cas9
作用模式	成对	成对	单体
载体构建	较难	容易	十分简单
耗时	长	较短	短
成本	高	较低	低
靶向效率	低	高	极高
脱靶效应	高	低	较高*
靶位点长度	23~31 bp**	48~58 bp**	20 bp
制约因素	—	5'-T 开头	PAM 结构
多位点编辑	—	—	多 sgRNAs 介导多靶点编辑
编辑类型	定点基因突变、替换/插入	定点基因突变、替换/插入	定点基因突变、替换/插入、大片段缺失

注：*可通过提高 sgRNA 的特异性来降低 CRISPR/Cas9 脱靶率；** 靶位点识别序列包含间隔序列。

不同的 PAM 结构，使 CRISPR/Cas9 系统识别范围更为广泛的靶点^[107]。

2 基因组编辑技术在植物基因功能研究中的应用

植物体内利用 ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9 介导产生的双链断裂，在 HR 或者 NHEJ 的修复过程中^[108]，会发生基因定点修饰，包括基因的敲除，基因的插入与替换，甚至染色体大片段缺失(图 2)。对靶基因的定点编辑将更好地研究基因功能。目前，在植物中基因组编辑技术已经得到广泛的应用，如

模式植物拟南芥和水稻(表 4)。

2.1 基因敲除

最简单的基因修饰是基因的定点敲除。双链断裂在 NHEJ 的修复下产生小的插入或缺失突变，如果突变发生在基因编码区造成功能位点的缺陷或者移码，将会使靶基因功能丧失(图 2A)。

2005 年，在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中 ZFN 已经成功实现了对基因的定点突变^[109]，90%以上的突变为简单的插入(1~52 bp)或缺失(1~4 bp)，约 10%的突变既有插入又有缺失，其中 10%的突变体可以遗传给后代，表明，ZFNs 可以在植物中高效诱导定

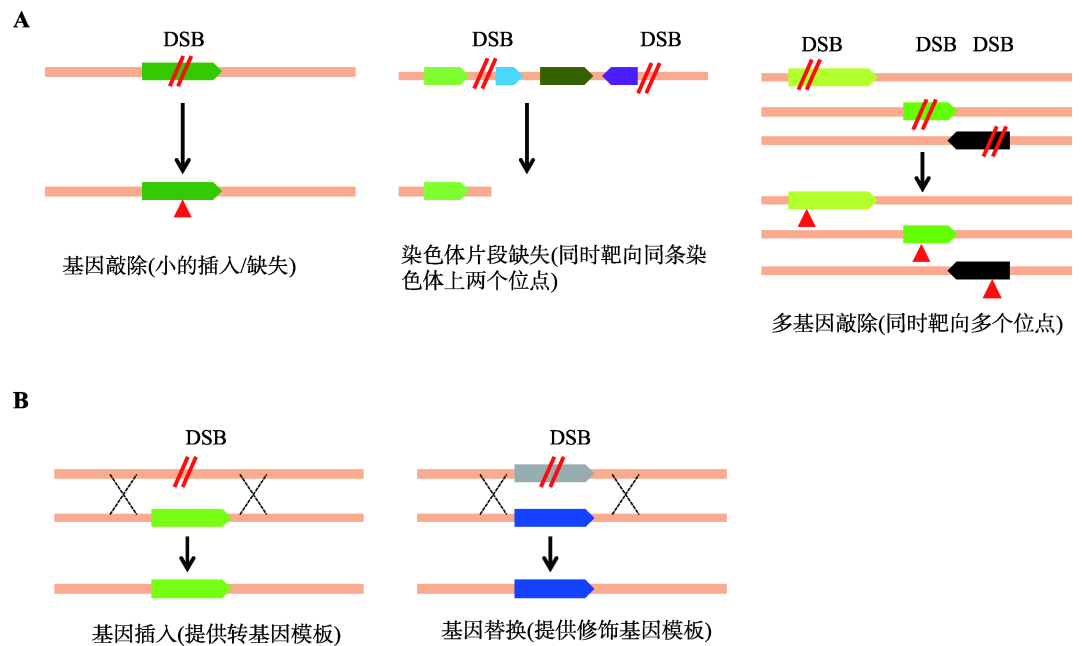


图 2 基因组编辑技术诱导产生的突变类型

Fig. 2 Overview of possible mutation types using genome editing

A: 工程核酸酶介导产生 DNA 双链断裂(DSB), 经过非同源末端连接(NHEJ)的方式修复; B: 产生的 DSB 经过同源重组(HR)的方式修复。箭头形状框指的是基因组上的阅读框; 红色填充的三角形表示基因突变(小的插入/缺失)

表 4 基因组编辑技术在模式植物基因功能研究中的应用实例

Table 4 Application examples of genome editing in identification of model plant gene function

物种	基因	突变体表型	核酸酶	修复	文献
拟南芥	<i>ADH1</i>	丙烯醇抗性	ZFN、TALEN、CRISPR	NHEJ、HR	[42, 62, 112, 120]
	<i>TT4</i>	种皮不含花青素	ZFN、TALEN	NHEJ	[42, 90, 112]
	<i>ABI4</i>	对脱落酸及葡萄糖不敏感	ZFN	NHEJ	[110]
	<i>BR11</i>	生长迟缓、卷叶	CRISPR	NHEJ	[88]
	<i>GAI</i>	矮化	CRISPR	NHEJ	[88]
	<i>CHL1</i>	<i>CHL1</i> , 2 单突叶片浅绿, 双突白化	CRISPR	NHEJ	[90, 103]
	<i>TRY</i> 、 <i>CPC</i> 、 <i>ETC2</i>	<i>try cpc</i> 双突植株变小, 叶片表皮毛簇生; 三突植株更小, 并且叶片向上卷曲	CRISPR	NHEJ	[103]
水稻	<i>OsSWEET14</i>	抗白叶枯病	TALEN、CRISPR	NHEJ	[113, 101]
	<i>YSA</i>	苗期白化	CRISPR	NHEJ	[88]
	<i>CAO1</i>	夜色浅绿	CRISPR	NHEJ	[92]
	<i>LZAY1</i>	分蘖角增大	CRISPR	NHEJ	[92]
	<i>OsPDS</i>	白化、矮化	CRISPR	NHEJ	[93, 95, 100]
	<i>FTLs</i>	叶片早衰	CRISPR	NHEJ	[105]
	<i>OsGSTU</i> 、 <i>OsMRP15</i> 、 <i>OsAnP</i>	紫叶稻中三突叶片变绿	CRISPR	NHEJ	[105]
	<i>OsWaxy</i>	直链淀粉含量显著降低	CRISPR	NHEJ	[105]

注: 以双子叶模式植物拟南芥以及单子叶模式植物水稻为例。

点突变并稳定遗传。随后,张锋等^[42]利用雌激素诱导系统实现了对拟南芥基因的高效突变,获得丙烯醇抗性突变体 *adh1* 以及种皮不含花青素突变体 *tt4*, 突变类型多为插入或缺失(1~142 bp), 并且接近 20% 的突变体为纯合突变, 说明两个等位基因型都被破坏了; 另外 69% 的 *adh1* 突变以及 33% 的 *tt4* 突变可以遗传给后代。同年, Osakabe 等^[110]对拟南芥的 *ABSCISIC ACID INSENSITIVE 4* 基因进行了突变, 获得了预期表型的 *abi4* 突变体, 如对脱落酸及葡萄糖的不敏感性。其他植物如烟草^[41]、玉米 (*Zea mays*)^[111]、大豆 (*Glycine max*)^[44] 也利用 ZFN 成功获得相应基因的突变体。以上说明, ZFNs 可以在植物中诱导定点突变产生突变体, 用于精准的反向遗传学。

继 ZFN 技术之后, TALEN 技术在短短几年的时间里迅速发展成为植物领域十分有用的基因编辑技术。2011 年, Cermak 等^[62]开发了一套基于 Golden gate 组装 TALEN 的方法, 模块组装及载体的构建仅需 5 d 时间, 利用该方法在拟南芥原生质体中对 *ADH1* 基因进行了高效的定点突变, 得到了 6 个独立的突变体, 均以间隔序列为中心缺失 4~15 bp。2013 年, Dan 实验室在拟南芥中通过稳定的遗传转化方法, 进行 TALEN 定点突变^[112]。作者针对拟南芥 7 个基因设计了 7 对 TALENs, 观察到了 2%~15% 的细胞突变, 可以遗传的概率为 1.5%~12%, 其研究表明 TALENs 可以作为模式植物定点诱变的工具。在作物中如水稻^[113,114]、玉米^[115]、小麦 (*Triticum aestivum* L.)^[116]、大麦 (*Hordeum vulgare* L.)^[117,118], TALEN 技术也迅速得到应用。值得一提的是, 单奇伟等^[114]在水稻原生质体及愈伤组织中共转两对 TALENs, 实现了 *OsBADH2a,b* 两个基因的同时突变, 并且得到了同一染色体上两位点间大片的缺失突变体。基因组大片的缺失可以更好的应用于植物功能基因组的研究 (图 2A), 例如对整个基因的缺失可以实现对长链非编码 RNA 的敲除, 这是简单的移码突变或者小片段的插入或缺失所不能实现的; 再者, 对整个基因簇的缺失可以更好认识基因簇的生物学功能与意义。

随着 CRISPR/Cas9 技术的首次报道, 该技术被广泛应用到各种植物中, 包括模式植物如拟南芥^[88~90], 作物如水稻^[88,92,93,101]、玉米^[115]、高粱 (*sorghum*)^[101]、烟草^[89,91,101]、小麦^[121]等, 并且定向突变的频率较

ZFNs 和 TALENs 有大的提高。CRISPR/Cas9 系统可以更好地进行多靶点的同时突变, 只需同时设计多个 sgRNAs (图 2A); 并且, 对同一个基因设计两个 sgRNAs, 可以实现基因的大片段缺失甚至整个基因的敲除。例如, 在拟南芥中, Mao 等^[90]针对 *TT4* 基因设计间隔 230 bp 的两个 sgRNAs, 实现了大片段的缺失, 缺失频率高达 26%。在本生烟草中, Bhlhaj 等^[122]采用同样的策略, 对 *NbPDS* 基因设计间隔 50 bp 的两个 sgRNAs, 实现了对该基因大片的缺失突变。2015 年, 刘耀光实验室开发的多靶点 CRISPR/Cas9 系统, 更加有效地实现了多基因定点突变及大片段缺失。作者在拟南芥及水稻中同时靶向基因家族的多成员 (多至 8 个位点)、生物合成途径上的多基因或者一个基因的多位点, 获得了多基因功能丧失的突变体以及单基因大片段缺失的突变体^[105]。

2.2 基因替换或插入

基因编辑工具为基因打靶提供了新的策略。利用 ZFN、TALEN、CRISPR/Cas9 产生靶位点的双链断裂, 在提供外源 DNA 修复模板的情况下, 经过同源重组修复可以实现基因的定点替换或者基因插入 (图 2B)。

ZFN 介导的基因打靶在玉米中实现了基因的定点插入, 使内源基因 *IPK1* 插入失活, 基因替换效率高达 20%, 并且可以稳定遗传^[111]。同年, Cai 等^[123]将靶向烟草几丁质基因的 ZFNs 转化烟草悬浮细胞和叶盘原生质体, 并共转两端含有与靶点几丁质基因同源的除草剂抗性标记, 成功获得了约 10% 正确定点插入抗性标记的转化细胞。另外, Townsend 等^[41]利用 ZFN 介导的同源重组编辑烟草原生质体乙酰乳酸合成酶基因 *SuRA* 和 *SuRB*, 基因替换效率可达 4%。在拟南芥中, 利用同样的方法, Pater 等^[119]也实现了对原卟啉原氧化酶基因 *PPOX* 的基因打靶, 重组频率为 3.1×10^{-3} , PCR 及 DNA 杂交分析表明, 基因打靶是通过 ZFNs 诱导产生 DSB, 继而在基因 5' 端及 3' 端发生同源重组修复来实现的。

2013 年, 张勇等^[124]利用 TALEN 在烟草中进行基因打靶, 将 TALEN 质粒和供体 DNA 共转入烟草原生质体, 诱导产生愈伤, 经检测, *ALS* 基因打靶效率为 4%。同样, CRISPR/Cas9 系统也成功用于烟草^[89]和水稻^[93]的基因打靶。2014 年 Dan 实验室利

用基于双生病毒的复制子, 构建了可以同时装载位点特异核酸酶(ZFNs、TALENs 和 CRISPR/Cas9)及 DNA 修复模板的载体系统, 提高了烟草中基因打靶的效率, 成功修复了缺陷的 *gus::npt II* 基因, 并且得到了功能修复的 *GUS::NPT II* 基因再生植株^[27]。

3 基因组编辑技术在作物育种中的应用

长期以来, 作物育种是育种家永恒的课题。鉴于耕地面积的缩减和自然资源的日益紧缺, 培育优质高产、抗病抗虫的作物品种是当前育种家奋斗的目标^[125,126]。常规杂交育种利用各个作物种内优良的基因, 实现了作物的增产与高抗, 但因选育周期漫长, 已经逐渐难以实现日益提高的育种目标。目前, 科学界的明星基因编辑技术对作物内源基因的定向改造为作物的遗传改良提供了新的途径(表 5)。更为重要的是, 由于包含表达位点特异核酸酶的 T-DNA 插入位点与靶位点的独立性, 精准改良的转基因植株可以通过自交或者回交的手段, 分离出只含有靶位点编辑而不含转基因片段的精准遗传改良株系(图 3)。另外, 利用基因编辑技术对染色体大片段的缺失^[127], 可以快速敲除控制不良性状的基因簇, 实现作物的快速遗传改良。

利用 ZFN 进行遗传改良最早是在烟草中进行的。

2009 年, Townsend 等^[41]利用 ZFN 介导同源重组编辑烟草原生质体乙酰乳酸合酶基因 *SuRA* 和 *SuRB*, 产生了对除草剂的抗性。*SuR* 位点的特定突变形式会产生对咪唑啉酮和磺酰脲类除草剂的抗性, 利用同源重组替换内源 *SuR* 即可实现对除草剂的抗性。玉米植酸中的磷含量占种子总磷量的 75%, 被认为是一种负营养, 因此, 降低玉米种子的植酸含量是育种家长久以来的愿望。2009 年, Shukla 等^[111]利用 ZFN 介导的基因打靶造成玉米内源基因 *IPK1* 的插入失活。该基因编码肌醇-1,3,4,5,6-戊基磷酸酶, 是植酸生物合成的关键酶。插入失活使植酸合成途径受阻, 从而降低了玉米籽粒中的植酸含量。

TALEN 技术介导的基因定点突变被证实可以用来创建白叶枯抗性水稻。Li 等^[113]利用 TALEN 技术对水稻蔗糖转运蛋白基因 *OsSWEET14* 的启动子区与白叶枯病原菌效应蛋白结合的顺式元件进行定点突变, 降低了水稻白叶枯病原菌分泌的效应蛋白与 *OsSWEET14* 的启动子的结合能力, 从而产生对白叶枯病原菌的抗性, 并且该顺式元件不影响 *OsSWEET14* 蛋白的表达及活性, 因此不影响 *OsSWEET14* 对水稻生长发育的作用。2013 年, 单奇伟等^[114]对控制水稻不同性状基因进行突变, 包括香味基因 *OsBADH2*、直立密穗基因 *OsDEP1*、大穗基因 *OsCKX2*、半矮化

表 5 基因组编辑技术在作物育种中的应用实例

Table 5 Application examples of genome editing in crop breeding

修饰	物种	基因	育种目的	核酸酶	修复	文献
定点突变	水稻	<i>OsSWEET14</i>	白叶枯病原菌的抗性株系	TALEN	NHEJ	[113]
		<i>OsBADH2</i>	创建香米株系	TALEN、 CRISPR	NHEJ	[93,114,128]
		<i>OsPDS</i>	创建白化失绿水稻株系	CRISPR	NHEJ	[93,100]
		<i>OsWaxy</i>	降低直链淀粉含量	CRISPR	NHEJ	[105]
		<i>ROC5</i>	卷叶育种	CRISPR	NHEJ	[88]
		<i>OsDEP1</i>	直立、密穗育种	TALEN	NHEJ	[114]
		<i>OsCKX2</i>	增加穗粒数, 提高产量	TALEN	NHEJ	[114]
		<i>OsSD1</i>	半矮化育种	TALEN	NHEJ	[114]
	大豆	<i>FAD2-1a,1b</i>	提高大豆单饱和油含量, 延长保质期	TALEN	NHEJ	[129]
	小麦	<i>TaMLO</i>	对白粉病具广谱抗性株系	TALEN	NHEJ	[116]
替换/插入	土豆	<i>VInv</i>	改良土豆的冷藏性及加工性状	TALEN	NHEJ	[130]
	番茄	<i>RIN</i>	保质期延长的番茄品系	CRISPR	NHEJ	[131]
	烟草	<i>SuRA</i> 、 <i>SuRB</i>	抗除草剂	ZFN	HR	[41]
	玉米	<i>IPK1</i>	降低玉米籽粒中植酸含量	ZFN	HR	[111]

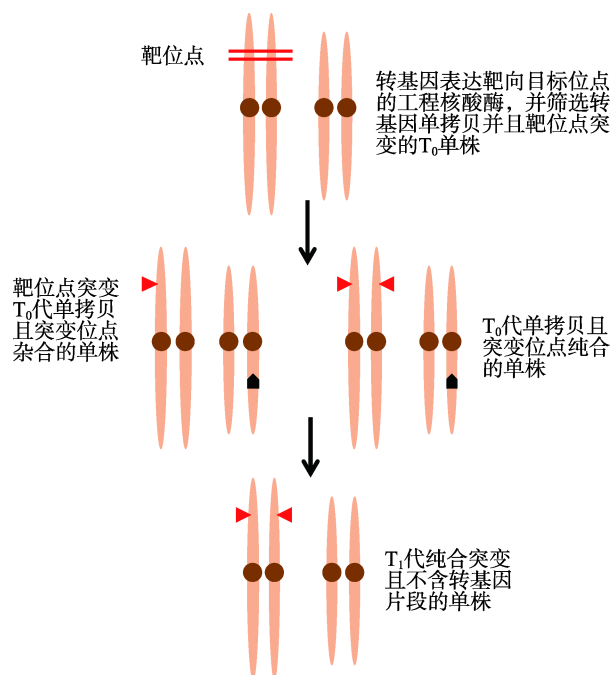


图 3 基因组编辑技术在作物育种中的应用策略

Fig. 3 Strategy for the application of genome editing in crop breeding

利用基因组编辑技术可以获得非转基因的突变体。 T_0 代获得的单拷贝含靶位点突变的单株, 后代经过自交(或者回交)的方式, 可以筛选获得靶位点纯合突变且不含转基因片段的单株。黑色的箭头形框表示的是可表达工程核酸酶的转基因片段。

基因 *OsSD1*, 可以用于水稻育种。在大豆中, Haun 等^[129]利用 TALEN 敲除了两个脂肪酸去饱和酶基因 (*FAD2-1a* 和 *FAD2-1b*), 使大豆单饱和油含量大大提高, 延长保质期。在土豆中, Clasen 等^[130]利用 TALEN 技术对土豆 *Vinv* 基因进行突变, 可以改良土豆的冷藏性及加工品质。2014 年, 王延鹏等^[116]利用 TALEN 技术首次在六倍体小麦 ($2n=42$, AABBDD) 中对 *TaMLO* 基因的 3 个拷贝保守区域同时进行了定点突变, 获得了对白粉病具有广谱抗性的小麦株系。

王延鹏等^[116]运用 CRISPR/Cas9 系统, 针对小麦 A 基因组 *TaMLO* 基因特异的位点设计 sgRNA, 实现了 A 基因组 *TaMLO* 基因的定向突变, 而对 B 和 D 基因组 *TaMLO* 基因没有破坏作用, 表明在多倍体的小麦中, 利用基因编辑技术既可同时突变多个拷贝, 也可以定向的突变单拷贝。2013 年, 单奇伟等^[93]利用 CRISPR 技术对水稻 *OsBADH2*、*OsPDS* 基因进行编辑, 获得 *osbadh2* 及 *ospds* 突变体, 可以用于香米株系和耐冷性株系的创建。同年, 冯争艳等^[88]对

水稻 *ROC5*、*OsWaxy* 基因进行突变, 可以用于水稻卷叶育种及糯性育种。在番茄中, Ito 等^[131]借助 CRISPR 的方法对控制番茄果实成熟基因 *RIN* 进行了突变, 可以用于开发保质期延长的番茄品系。

4 基因组工程在未来作物育种中的展望

利用基因组编辑技术定点敲除不利基因, 从而实现目标性状的精准改良, 无疑会大大提高作物定向遗传改良效率。由于 CRISPR/Cas9 系统具有其优越性(简单易行、突变效率高、成本低、多靶点同时突变等), 将会被广泛地应用于作物的精准遗传改良。例如, 对水稻生物逆境抗性的隐性 *R* 基因 *xa5*^[132]、*xa13*^[133] 的利用, 人们可以借助靶向的基因组编辑技术对显性基因 *Xa5*、*Xa13* 进行定点敲除, 使隐性基因 *xa5*、*xa13* 能够发挥其抗性。当然, 更为广泛的运用基因组工程技术需要进一步完善, 比如提高载体系统构建的简易性, 提高特异性, 降低脱靶率^[134]等; 另外, 通过修饰植物密码优化的 Cas9 蛋白, 筛选可以识别不同 PAM 结构的 Cas9 变体蛋白, 将会增加 CRISPR/Cas9 对靶点的识别范围。再者, 目前植物中还不能充分利用这 3 种工程核酸酶介导的同源重组, 进行基因的替换或者定点插入, 并稳定遗传。因此, 基因精准定点编辑(即通过 HR 途径实现基因定点修复或者插入)是未来作物分子育种领域亟待解决的难题^[135]。一旦实现了利用 HR 途径完成基因打靶, 并得到稳定遗传的改良株系, 将会对作物育种领域做出巨大的贡献。例如, 利用基因打靶进行劣势基因的替换、优良基因的导入, 可以使优良基因快速用于作物育种。

参考文献(References):

- [1] Mauricio R. Mapping quantitative trait loci in plants: Uses and caveats for evolutionary biology. *Nat Rev Genet*, 2001, 2(5): 370–381. [DOI]
- [2] Jorgensen R, Matzke M, Matzke AJM. Plants, RNAi, and the nobel prize. *Science*, 2006, 314(5803): 1242–1243. [DOI]
- [3] Eamens A, Wang MB, Smith NA, Waterhouse PM. RNA silencing in plants: Yesterday, today, and tomorrow. *Plant Physiol*, 2008, 147(2): 456–468. [DOI]
- [4] McGinnis KM. RNAi for functional genomics in plants. *Brief Funct Genomics*, 2010, 9(2): 111–117. [DOI]

- [5] Koncz C, Németh K, Rédei GP, Schell J. T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 1992, 20(5): 963–976. [DOI]
- [6] Krysan PJ, Young JC, Sussman MR. T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1999, 11(12): 2283–2290. [DOI]
- [7] Jeon JS, Lee S, Jung KH, Jun SH, Jeong DH, Lee J, Kim C, Jang S, Lee S, Yang K, Nam J, An K, Han MJ, Sung RJ, Choi HS, Yu JH, Choi JH, Cho SY, Cha SS, Kim SI, An G. T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *Plant J*, 2000, 22(6): 561–570. [DOI]
- [8] Jung KH, An G. Functional characterization of rice genes using a gene-indexed T-DNA insertional mutant population. In: Yang YN, ed. *Rice Protoc*. Humana Press, 2013, 956: 57–67. [DOI]
- [9] Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, 1987, 51(3): 503–512. [DOI]
- [10] Capecchi MR. The new mouse genetics: Altering the genome by gene targeting. *Trends Genet*, 1989, 5(3): 70–76. [DOI]
- [11] Thomas KR, Capecchi MR. Introduction of homologous DNA sequences into mammalian cells induces mutations in the cognate gene. *Nature*, 1986, 324(6092): 34–38. [DOI]
- [12] Thomas KR, Folger KR, Capecchi MR. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell*, 1986, 44(3): 419–428. [DOI]
- [13] Doetschman T, Maeda N, Smithies O. Targeted mutation of the *Hprt* gene in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(22): 8583–8587. [DOI]
- [14] Koller BH, Smithies O. Inactivating the β_2 -microglobulin locus in mouse embryonic stem cells by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(22): 8932–8935. [DOI]
- [15] Paszkowski J, Baur M, Bogucki A, Potrykus I. Gene targeting in plants. *EMBO J*, 1988, 7(13): 4021–4026. [DOI]
- [16] Baur M, Potrykus I, Paszkowski J. Intermolecular homologous recombination in plants. *Mol Cell Biol*, 1990, 10(2): 492–500. [DOI]
- [17] Lee KY, Lund P, Lowe K, Dunsmuir P. Homologous recombination in plant cells after *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell*, 1990, 2(5): 415–425. [DOI]
- [18] Offringa R, de Groot MJA, Haagsman HJ, Does MP, van den Elzen PJM, Hooykaas PJJ. Extrachromosomal homologous recombination and gene targeting in plant cells after *Agrobacterium* mediated transformation. *EMBO J*, 1990, 9(10): 3077–3084. [DOI]
- [19] Halfter U, Morris PC, Willmitzer L. Gene targeting in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet*, 1992, 231(2): 186–193. [DOI]
- [20] Swoboda P, Gal S, Hohn B, Puchta H. Intrachromosomal homologous recombination in whole plants. *EMBO J*, 1994, 13(2): 484–489. [DOI]
- [21] Miao ZH, Lam E. Targeted disruption of the *TGA3* locus in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 1995, 7(2): 359–365. [DOI]
- [22] Puchta H, Dujon B, Hohn B. Homologous recombination in plant cells is enhanced by *in vivo* induction of double strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21(22): 5034–5040. [DOI]
- [23] Puchta H, Dujon B, Hohn B. Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(10): 5055–5060. [DOI]
- [24] Fauser F, Roth N, Pacher M, Ilg G, Sánchez-Fernández R, Biesgen C, Puchta H. *In planta* gene targeting. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(19): 7535–7540. [DOI]
- [25] Wright DA, Townsend JA, Winfrey RJ, Jr., Irwin PA, Rajagopal J, Lonosky PM, Hall BD, Jondle MD, Voytas DF. High-frequency homologous recombination in plants mediated by zinc-finger nucleases. *Plant J*, 2005, 44(4): 693–705. [DOI]
- [26] Marton I, Zuker A, Shklarman E, Zeevi V, Tovkach A, Roffe S, Ovadis M, Tzfira T, Vainstein A. Nontransgenic genome modification in plant cells. *Plant Physiol*, 2010, 154(3): 1079–1087. [DOI]
- [27] Baltes NJ, Gil-Humanes J, Cermak T, Atkins PA, Voytas DF. DNA replicons for plant genome engineering. *Plant Cell*, 2014, 26(1): 151–163. [DOI]
- [28] Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to *Fok I* cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(3): 1156–1160. [DOI]
- [29] Bibikova M, Beumer K, Trautman JK, Carroll D. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science*, 2003, 300(5620): 764. [DOI]
- [30] Durai S, Mani M, Kandavelou K, Wu J, Porteus MH, Chandrasegaran S. Zinc finger nucleases: Custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(18): 5978–5990. [DOI]

- [31] Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*, 2011, 188(4): 773–782. [DOI]
- [32] Kim S, Kim JS. Targeted genome engineering via zinc finger nucleases. *Plant Biotechnol Rep*, 2011, 5(1): 9–17. [DOI]
- [33] Pabo CO, Peisach E, Grant RA. Design and selection of novel Cys₂His₂ zinc finger proteins. *Annu Rev Biochem*, 2001, 70: 313–340. [DOI]
- [34] Bae KH, Do Kwon Y, Shin HC, Hwang MS, Ryu EH, Park KS, Yang HY, Lee DK, Lee Y, Park J, Kwon HS, Kim HW, Yeh BI, Lee HW, Sohn SH, Yoon J, Seol W, Kim JS. Human zinc fingers as building blocks in the construction of artificial transcription factors. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(3): 275–280. [DOI]
- [35] Segal DJ, Beerli RR, Blancafort P, Dreier B, Effertz K, Huber A, Koksche B, Lund CV, Magnenat L, Valente D, Barbas III CF. Evaluation of a modular strategy for the construction of novel polydactyl zinc finger DNA-binding proteins. *Biochemistry*, 2003, 42(7): 2137–2148. [DOI]
- [36] Segal DJ, Dreier B, Beerli RR, Barbas III CF. Toward controlling gene expression at will: Selection and design of zinc finger domains recognizing each of the 5'-GNN-3' DNA target sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(6): 2758–2763. [DOI]
- [37] Beerli RR, Barbas III CF. Engineering polydactyl zinc-finger transcription factors. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(2): 135–141. [DOI]
- [38] Wright DA, Thibodeau-Beganny S, Sander JD, Winfrey RJ, Hirsh AS, Eichinger M, Fu FL, Porteus MH, Dobbs D, Voytas DF, Joung JK. Standardized reagents and protocols for engineering zinc finger nucleases by modular assembly. *Nat Protoc*, 2006, 1(3): 1637–1652. [DOI]
- [39] Ramirez CL, Foley JE, Wright DA, Müller-Lerch F, Rahman SH, Cornu TI, Winfrey RJ, Sander JD, Fu FL, Townsend JA, Cathomen T, Voytas DF, Joung JK. Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. *Nat Methods*, 2008, 5(5): 374–375. [DOI]
- [40] Maeder ML, Thibodeau-Beganny S, Osiak A, Wright DA, Anthony RM, Eichinger M, Jiang T, Foley JE, Winfrey RJ, Townsend JA, Unger-Wallace E, Sander JD, Müller-Lerch F, Fu FL, Pearlberg J, Göbel C, Dassié JP, Pruett-Miller SM, Porteus MH, Sgroi DC, John Iafrate A, Dobbs D, McCray PB, Jr., Cathomen T, Voytas DF, Joung JK. Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Mol Cell*, 2008, 31(2): 294–301. [DOI]
- [41] Townsend JA, Wright DA, Winfrey RJ, Fu FL, Maeder ML, Joung JK, Voytas DF. High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. *Nature*, 2009, 459(7245): 442–445. [DOI]
- [42] Zhang F, Maeder ML, Unger-Wallace E, Hoshaw JP, Reyon D, Christian M, Li XH, Pierick CJ, Dobbs D, Peterson T, Joung JK, Voytas DF. High frequency targeted mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(26): 12028–12033. [DOI]
- [43] Sander JD, Dahlborg EJ, Goodwin MJ, Cade L, Zhang F, Cifuentes D, Curtin SJ, Blackburn JS, Thibodeau-Beganny S, Qi YP, Pierick CJ, Hoffman E, Maeder ML, Khayter C, Reyon D, Dobbs D, Langenau DM, Stupar RM, Giraldez AJ, Voytas DF, Peterson RT, Yeh JRJ, Joung JK. Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA). *Nat Methods*, 2011, 8(1): 67–69. [DOI]
- [44] Curtin SJ, Zhang F, Sander JD, Haun WJ, Starker C, Baltes NJ, Reyon D, Dahlborg EJ, Goodwin MJ, Coffman AP, Dobbs D, Keith Joung J, Voytas DF, Stupar RM. Targeted mutagenesis of duplicated genes in soybean with zinc-finger nucleases. *Plant Physiol*, 2011, 156(2): 466–473. [DOI]
- [45] Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 2009, 326(5959): 1509–1512. [DOI]
- [46] Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 2009, 326(5959): 1501. [DOI]
- [47] Bogdanove AJ, Voytas DF. TAL effectors: Customizable proteins for DNA targeting. *Science*, 2011, 333(6051): 1843–1846. [DOI]
- [48] Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, Bogdanove AJ, Voytas DF. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 2010, 186(2): 757–761. [DOI]
- [49] Baker M. Gene-editing nucleases. *Nat Methods*, 2012, 9(1): 23–26. [DOI]
- [50] Kay S, Hahn S, Marois E, Hause G, Bonas U. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science*, 2007, 318(5850): 648–651. [DOI]
- [51] Römer P, Hahn S, Jordan T, Strauß T, Bonas U, Lahaye T. Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper *Bs3* resistance gene. *Science*,

- 2007, 318(5850): 645–648. [DOI]
- [52] Boch J, Bonas U. *Xanthomonas* AvrBs3 Family-Type III effectors: Discovery and function. *Annu Rev Phytopathol*, 2010, 48: 419–436. [DOI]
- [53] Bogdanove AJ, Schornack S, Lahaye T. TAL effectors: Finding plant genes for disease and defense. *Curr Opin Plant Biol*, 2010, 13(4): 394–401. [DOI]
- [54] Deng D, Yan CY, Pan XJ, Mahfouz M, Wang JW, Zhu JK, Shi YG, Yan NE. Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science*, 2012, 335(6069): 720–723. [DOI]
- [55] Mak ANS, Bradley P, Cernadas RA, Bogdanove AJ, Stoddard BL. The crystal structure of TAL effector Pth-Xo1 bound to its DNA target. *Science*, 2012, 335(6069): 716–719. [DOI]
- [56] Cong L, Zhou RH, Kuo YC, Cunniff M, Zhang F. Comprehensive interrogation of natural TALE DNA-binding modules and transcriptional repressor domains. *Nat Commun*, 2012, 3(7): 968. [DOI]
- [57] Streubel J, Blücher C, Landgraf A, Boch J. TAL effector RVD specificities and efficiencies. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(7): 593–595. [DOI]
- [58] Li T, Huang S, Jiang WZ, Wright D, Spalding MH, Weeks DP, Yang B. TAL nucleases (TALNs): Hybrid proteins composed of TAL effectors and *Fok I* DNA-cleavage domain. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(1): 359–372. [DOI]
- [59] Mahfouz MM, Li LX, Shamimuzzaman M, Wibowo A, Fang XY, Zhu JK. De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(6): 2623–2628. [DOI]
- [60] Miller JC, Tan SY, Qiao GJ, Barlow KA, Wang JB, Xia DF, Meng XD, Paschon DE, Leung E, Hinkley SJ, Dulay GP, Hua KL, Ankoudinova I, Cost GJ, Urnov FD, Zhang HS, Holmes MC, Zhang L, Gregory PD, Rebar EJ. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(2): 143–148. [DOI]
- [61] Zhang F, Cong L, Lodato S, Kosuri S, Church GM, Arlotta P. Efficient construction of sequence-specific tal effectors for modulating mammalian transcription. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(2): 149–153. [DOI]
- [62] Cermak T, Doyle EL, Christian M, Wang L, Zhang Y, Schmidt C, Baller JA, Somia NV, Bogdanove AJ, Voytas DF. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(17): 7879. [DOI]
- [63] Mussolino C, Morbitzer R, Lütge F, Dannemann N, Lahaye T, Cathomen T. A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(21): 9283–9293. [DOI]
- [64] Doyle EL, Booher NJ, Standage DS, Voytas DF, Brendel VP, VanDyk JK, Bogdanove AJ. TAL effector-nucleotide targeter (TALE-NT) 2.0: Tools for TAL effector design and target prediction. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(W1): W117–W122. [DOI]
- [65] Engler C, Gruetzner R, Kandzia R, Marillonnet S. Golden gate shuffling: A one-pot DNA shuffling method based on type II restriction enzymes. *PLoS One*, 2009, 4(5): e5553. [DOI]
- [66] Sanjana NE, Cong L, Zhou Y, Cunniff MM, Feng GP, Zhang F. A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. *Nature Protoc*, 2012, 7(1): 171–192. [DOI]
- [67] Sander JD, Cade L, Khayter C, Reyon D, Peterson RT, Joung JK, Yeh RJ. Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 697–698. [DOI]
- [68] Reyon D, Tsai SQ, Khayter C, Foden JA, Sander JD, Joung JK. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(5): 460–465. [DOI]
- [69] Heigwer F, Kerr G, Walther N, Glaeser K, Pelz O, Breinig M, Boutros M. E-TALEN: A web tool to design TALENs for genome engineering. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(20): e190. [DOI]
- [70] Heigwer F, Kerr G, Boutros M. E-CRISP: Fast CRISPR target site identification. *Nat Methods*, 2014, 11(2): 122–123. [DOI]
- [71] Ma M, Ye AY, Zheng W, Kong L. A guide RNA sequence design platform for the CRISPR/Cas9 system for model organism genomes. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 270805. [DOI]
- [72] Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Li YQ, Fine EJ, Wu XB, Shalem O, Cradick TJ, Marraffini LA, Bao G, Zhang F. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 827–832. [DOI]
- [73] Lei Y, Lu L, Liu HY, Li S, Xing F, Chen LL. CRISPR-P: A web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants. *Mol Plant*, 2014, 7(9): 1494–1496. [DOI]
- [74] Upadhyay SK, Sharma S. SSFinder: High throughput CRISPR-Cas target sites prediction tool. *Biomed Res Int*,

- 2014, 2014: 742482. [DOI]
- [75] Montague TG, Cruz JM, Gagnon JA, Church GM, Valen E. CHOPCHOP: A CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(W1): W401–W407. [DOI]
- [76] Naito Y, Hino K, Bono H, Ui-Tei K. CRISPRdirect: Software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics*, 2015, 31(7): 1120–1123. [DOI]
- [77] Xie KB, Zhang JW, Yang YN. Genome-wide prediction of highly specific guide RNA spacers for CRISPR–Cas9-mediated genome editing in model plants and major crops. *Mol Plant*, 2014, 7(5): 923–926. [DOI]
- [78] Prykhodzhiy SV, Rajan V, Gaston D, Berman JN. CRISPR MultiTargeter: a web tool to find common and unique CRISPR single guide RNA targets in a set of similar sequences. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0119372 [DOI]
- [79] Moreno-Mateos MA, Vejnar CE, Beaudoin JD, Fernandez JP, Mis EK, Khokha MK, Giraldez AJ. CRISPR-scan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR–Cas9 targeting *in vivo*. *Nat Methods*, 2015, 12(10): 982–988. [DOI]
- [80] Park J, Bae S, Kim JS. Cas-Designer: a web-based tool for choice of CRISPR–Cas9 target sites. *Bioinformatics*, 2015, 31(24): 4014–4016. [DOI]
- [81] Doench JG, Hartenian E, Graham DB, Tothova Z, Hegde M, Smith I, Sullender M, Ebert BL, Xavier RJ, Root DE. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR–Cas9-mediated gene inactivation. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(12): 1262–1267. [DOI]
- [82] Barrangou R. RNA-mediated programmable DNA cleavage. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(9): 836–838. [DOI]
- [83] Pennisi E. The CRISPR craze. *Science*, 2013, 341(6148): 833–836. [DOI]
- [84] Li J, Zhang Y, Chen KL, Shan QW, Wang YP, Liang Z, Gao CX. CRISPR/Cas: a novel way of RNA-guided genome editing. *Hereditas (Beijing)*, 2013, 35(11): 1265–1273. 李君, 张毅, 陈坤玲, 单奇伟, 王延鹏, 梁振, 高彩霞. CRISPR/Cas 系统: RNA 靶向的基因组定向编辑新技术. *遗传*, 2013, 35(11): 1265–1273. [DOI]
- [85] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable Dual-RNA-Guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816–821. [DOI]
- [86] Cong L, Ann Ran F, Cox D, Lin SL, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu XB, Jiang WY, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823. [DOI]
- [87] Mali P, Yang LH, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823–826. [DOI]
- [88] Feng ZY, Zhang BT, Ding WN, Liu XD, Yang DL, Wei PL, Cao FQ, Zhu SH, Zhang F, Mao YF, Zhu JK. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2013, 23(10): 1229–1232. [DOI]
- [89] Li JF, Norville JE, Aach J, McCormack M, Zhang DD, Bush J, Church GM, Sheen J. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 688–691. [DOI]
- [90] Mao YF, Zhang H, Xu NF, Zhang BT, Gou F, Zhu JK. Application of the CRISPR–Cas system for efficient genome engineering in plants. *Mol Plant*, 2013, 6(6): 2008–2011. [DOI]
- [91] Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, Jones JDG, Kamoun S. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 691–693. [DOI]
- [92] Miao J, Guo DS, Zhang JZ, Huang QP, Qin GJ, Zhang X, Wan JM, Gu HY, Qu LJ. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR–Cas system. *Cell Res*, 2013, 23(10): 1233–1236. [DOI]
- [93] Shan QW, Wang YP, Li J, Zhang Y, Chen KL, Liang Z, Zhang K, Liu JX, Xi JJ, Qiu JL, Gao C. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR–Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 686–688. [DOI]
- [94] Li JF, Zhang D, Sheen J. Targeted plant genome editing via the CRISPR/Cas9 technology. *Methods Mol Biol*, 2015, 1284: 239–255. [DOI]
- [95] Zhang H, Zhang JS, Wei PL, Zhang BT, Gou F, Feng ZY, Mao YF, Yang L, Zhang H, Xu NF, Zhu JK. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnol J*, 2014, 12(6): 797–807. [DOI]
- [96] Mao YF, Zhang ZJ, Feng ZY, Wei PL, Zhang H, Botella JR, Zhu JK. Development of germ-line-specific CRISPR–Cas9 systems to improve the production of heritable gene modifications in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol J*, 2015, doi: 10.1111/pbi.12468. [DOI]
- [97] Feng ZY, Mao YF, Xu NF, Zhang BT, Wei PL, Yang DL, Wang Z, Zhang ZJ, Zheng R, Yang L, Zeng L, Liu XD, Zhu JK. Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*,

- 2014, 111(12): 4632–4637. [DOI]
- [98] Shan QW, Wang YP, Li J, Gao CX. Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nat Protoc*, 2014, 9(10): 2395–2410. [DOI]
- [99] Xie KB, Yang YN. RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Mol Plant*, 2013, 6(6): 1975–1983. [DOI]
- [100] Xie KB, Minkenberg B, Yang YN. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(11): 3570–3575. [DOI]
- [101] Jiang WZ, Zhou HB, Bi HH, Fromm M, Yang B, Weeks DP. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, *Sorghum* and rice. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(20): e188. [DOI]
- [102] Jiang WZ, Yang B, Weeks DP. Efficient CRISPR/Cas9-mediated gene editing in *Arabidopsis thaliana* and inheritance of modified genes in the T2 and T3 generations. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99225. [DOI]
- [103] Xing HL, Dong L, Wang ZP, Zhang HY, Han CY, Liu B, Wang XC, Chen QJ. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biol*, 2014, 14: 327. [DOI]
- [104] Wang ZP, Xing HL, Dong L, Zhang HY, Han CY, Wang XC, Chen QJ. Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in *Arabidopsis* in a single generation. *Genome Biol*, 2015, 16: 144. [DOI]
- [105] Ma XL, Zhang QY, Zhu QL, Liu W, Chen Y, Qiu R, Wang B, Yang ZF, Li HY, Lin YR, Xie YY, Shen RX, Chen SF, Wang Z, Chen YL, Guo JX, Chen LT, Zhao XC, Dong ZC, Liu YG. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Mol Plant*, 2015, 8(8): 1274–1284. [DOI]
- [106] Alberts B. The breakthroughs of 2012. *Science*, 2012, 338(6114): 1511. [DOI]
- [107] Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, Topkar VV, Nguyen NT, Zheng ZL, Gonzales APW, Li ZY, Peterson RT, Yeh JRJ, Aryee MJ, Joung JK. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature*, 2015, 523(7561): 481–485. [DOI]
- [108] Wyman C, Kanaar R. DNA double-strand break repair: All's well that ends well. *Annu Rev Genet*, 2006, 40: 363–383. [DOI]
- [109] Lloyd A, Plaisier CL, Carroll D, Drews GN. Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(6): 2232–2237. [DOI]
- [110] Osakabe K, Osakabe Y, Toki S. Site-directed mutagenesis in *Arabidopsis* using custom-designed zinc finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(26): 12034–12039. [DOI]
- [111] Shukla VK, Doyon Y, Miller JC, DeKolver RC, Moehle EA, Worden SE, Mitchell JC, Arnold NL, Gopalan S, Meng XD, Choi VM, Rock JM, Wu YY, Katibah GE, Gao ZF, McCaskill D, Simpson MA, Blakeslee B, Greenwalt SA, Butler HJ, Hinkley SJ, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature*, 2009, 459(7245): 437–441. [DOI]
- [112] Christian M, Qi YP, Zhang Y, Voytas DF. Targeted mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* using engineered TAL effector nucleases. *G3-Genes Genom Genet*, 2013, 3(10): 1697–1705. [DOI]
- [113] Li T, Liu B, Spalding MH, Weeks DP, Yang B. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(5): 390–392. [DOI]
- [114] Shan QW, Wang YP, Chen KL, Liang Z, Li J, Zhang Y, Zhang K, Liu JX, Voytas DF, Zheng XL, Zhang Y, Gao CX. Rapid and efficient gene modification in rice and *Brachypodium* using TALENs. *Mol Plant*, 2013, 6(4): 1365–1368. [DOI]
- [115] Liang Z, Zhang K, Chen KL, Gao CX. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *J Genet Genomics*, 2014, 41(2): 63–68. [DOI]
- [116] Wang YP, Cheng X, Shan QW, Zhang Y, Liu JX, Gao CX, Qiu JL. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(9): 947–951. [DOI]
- [117] Wendt T, Holm PB, Starker CG, Christian M, Voytas DF, Brinch-Pedersen H, Holme IB. TAL effector nucleases induce mutations at a pre-selected location in the genome of primary barley transformants. *Plant Mol Biol*, 2013, 83(3): 279–285. [DOI]
- [118] Gurushidze M, Hensel G, Hiekel S, Schedel S, Valkov V, Kumlehn J. True-breeding targeted gene knock-out in barley using designer TALE-nuclease in haploid cells. *Plos One*, 2014, 9(3): e92046. [DOI]
- [119] de Pater S, Pinas JE, Hooykaas PJ, van der Zaal BJ. ZFN-mediated gene targeting of the *Arabidopsis protoporphyrinogen oxidase* gene through *Agrobacterium*

- mediated floral dip transformation. *Plant Biotechnol J*, 2013, 11(4): 510–515. [DOI]
- [120] Schiml S, Fauser F, Puchta H. The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for in planta gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in *Arabidopsis* resulting in heritable progeny. *Plant J*, 2014, 80(6): 1139–1150. [DOI]
- [121] Upadhyay SK, Kumar J, Alok A, Tuli R. RNA-guided genome editing for target gene mutations in wheat. *G3 (Bethesda)*, 2013, 3(12): 2233–2238. [DOI]
- [122] Belhaj K, Chaparro-Garcia A, Kamoun S, Nekrasov V. Plant genome editing made easy: Targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods*, 2013, 9(1): 39. [DOI]
- [123] Cai CQ, Doyon Y, Ainley WM, Miller JC, DeKolver RC, Moehle EA, Rock JM, Lee YL, Garrison R, Schulenberg L, Blue R, Worden A, Baker L, Faraji F, Zhang L, Holmes MC, Rebar EJ, Collingwood TN, Rubin-Wilson B, Gregory PD, Urnov FD, Petolino JF. Targeted transgene integration in plant cells using designed zinc finger nucleases. *Plant Mol Biol*, 2009, 69(6): 699–709. [DOI]
- [124] Zhang Y, Zhang F, Li X, Baller JA, Qi Y, Starker CG, Bogdanove AJ, Voytas DF. Transcription activator-like effector nucleases enable efficient plant genome engineering. *Plant Physiol*, 2013, 161(1): 20–27. [DOI]
- [125] Collins NC, Tardieu F, Tuberosa R. Quantitative trait loci and crop performance under abiotic stress: Where do we stand? *Plant Physiol*, 2008, 147(2): 469–486. [DOI]
- [126] Wollenweber B, Porter JR, Lubberstedt T. Need for multidisciplinary research towards a second green revolution - commentary. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8(3): 337–341. [DOI]
- [127] Zhou H, Liu B, Weeks DP, Spalding MH, Yang B. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(17): 10903–10914. [DOI]
- [128] Shan Q, Zhang Y, Chen K, Zhang K, Gao C. Creation of fragrant rice by targeted knockout of the *OsBADH2* gene using TALEN technology. *Plant Biotechnol J*, 2015, 13(6): 791–800. [DOI]
- [129] Haun W, Coffman A, Clasen BM, Demorest ZL, Lowy A, Ray E, Retterath A, Stoddard T, Juillerat A, Cedrone F, Mathis L, Voytas DF, Zhang F. Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the *fatty acid desaturase 2* gene family. *Plant Biotechnol J*, 2014, 12(7): 934–940. [DOI]
- [130] Clasen BM, Stoddard TJ, Luo S, Demorest ZL, Li J, Cedrone F, Tibebu R, Davison S, Ray EE, Daulhac A, Coffman A, Yabandith A, Retterath A, Haun W, Baltes NJ, Mathis L, Voytas DF, Zhang F. Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. *Plant Biotechnol J*, 2016, 14(1): 169–176. [DOI]
- [131] Ito Y, Nishizawa-Yokoi A, Endo M, Mikami M, Toki S. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the *RIN* locus that regulates tomato fruit ripening. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 467(1): 76–82. [DOI]
- [132] Lyer-Pascuzzi AS, Jiang H, Huang L, McCouch SR. Genetic and functional characterization of the rice *Bacterial Blight* disease resistance gene *xa5*. *Phytopathology*, 2008, 98(3): 289–295. [DOI]
- [133] Antony G, Zhou JH, Huang S, Li T, Liu B, White F, Yang B. Rice *xa13* recessive resistance to *Bacterial Blight* is defeated by induction of the disease susceptibility gene *Os-11N3*. *Plant Cell*, 2010, 22(11): 3864–3876. [DOI]
- [134] Zheng W, Gu F. Progress of application and off-target effects of CRISPR/Cas9. *Hereditas (Beijing)*, 2015, 37(10): 1003–1010.
郑武, 谷峰. CRISPR/Cas9 的应用及脱靶效应研究进展. 遗传, 2015, 37(10): 1003–1010. [DOI]
- [135] Shan QW, Gao CX. Research progress of genome editing and derivative technologies in plants. *Hereditas (Beijing)*, 2015, 37(10): 953–973.
单奇伟, 高彩霞. 植物基因组编辑及衍生技术最新研究进展. 遗传, 2015, 37(10): 953–973. [DOI]

(责任编辑: 高彩霞)