

DOI: 10.13376/j.cblls/2016161

文章编号: 1004-0374(2016)10-1243-07



刘耀光, 华南农业大学教授。国家杰出青年基金获得者、教育部长江学者奖励计划特聘教授、亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室副主任。主要从事植物分子遗传与分子生物学研究。在杂交水稻的细胞质雄性不育与恢复性、水稻杂种不育与亲和性的分子遗传机制研究和植物生物技术(多基因转化和基因组编辑)领域取得突出成绩。在 *Nat Genet*、*Annu Rev*、*Plant Biol*、*PNAS*、*Plant Cell*、*Cell Res* 等刊物发表论文 100 多篇, 论文被引用 5 000 多次。获发明专利 7 项, 获广东省科学技术奖一等和大北农科技奖一等奖。

基因组编辑技术在水稻功能基因组和遗传改良中的应用

李希陶, 刘耀光*

(华南农业大学生命科学学院, 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广州 510642)

摘要: 基因组编辑技术对植物基因功能研究和作物遗传改良具有巨大的潜在价值。CRISPR/Cas9 系统是继锌指核酸酶 (ZFNs) 和类转录激活效应因子核酸酶 (TALENs) 系统之后的新一代基因组编辑技术系统, 具有操作简单和效率高等优点。概述了 CRISPR/Cas9 系统的技术特点及其在水稻基因功能研究及遗传改良中的应用, 并指出了该系统在植物基因精准编辑中需要突破的关键问题。

关键词: 基因组编辑; CRISPR/Cas9; 功能基因组学; 遗传改良; 水稻

中图分类号: Q943.2; S511

文献标志码: A

Genome editing technology for functional genomics and genetic improvement in rice

LI Xi-Tao, LIU Yao-Guang*

(State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources, College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The genome editing technologies have been playing increasingly important roles in functional genomics and genetic improvement in crops. The recently developed CRISPR/Cas9 system is a new generation of genome editing tool after the ZFNs and TALENs systems, and has the advantages of simplicity and high efficiency. Here we summarize the technical features of the CRISPR/Cas9 system and its applications in rice functional genomics studies and genetic improvement. We also indicate the existing problems to be resolved and perspectives of the CRISPR/Cas9 system for genome editing in plants.

Key words: genome editing; CRISPR/Cas9; functional genomics; genetic improvement; rice

收稿日期: 2016-07-11

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFD0100900); 转基因生物新品种培育科技重大专项(2014ZX08010-001, 2014ZX08009002)

*通信作者: E-mail: ygliu@scau.edu.cn

在生命科学研究领域，利用基因突变体分析基因的功能是一个不可缺少的步骤。传统的随机诱变方法（包括 T-DNA/转座子插入诱变）需要构建大群体的突变体库，并进行大规模筛选鉴定才能获得目的基因的突变体，是一个费时和高成本的工作。另一方面，培育优质高产、抗病虫害的作物品种是育种工作者努力奋斗的目标。常规的诱变和杂交育种周期长、效率低，已经难以实现日益提高的育种目标。

与随机诱变相比，直接在目的基因引入突变和修改序列的方法，即基因（组）定点编辑（gene editing, genome editing）技术对基因功能研究和遗传改良具有巨大优势。2013年发展起来的 CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9) 基因编辑系统^[1-2]是一种革命性的分子生物学和基因工程技术创新。仅仅几年时间的发展，该系统已被全球数以千计的实验室运用于广泛的领域，如动植物基因功能研究、作物特定性状改良等。更为重要的是，在有性繁殖的作物进行基因编辑后，可以通过遗传分离方法获得不含转基因元件 (transgene clean) 的遗传改良株系。

本文简述了植物 CRISPR/Cas9 系统在水稻功能基因组研究和遗传改良中的应用潜力和当前存在的技术瓶颈，并展望了植物 CRISPR/Cas9 系统进一步发展的前景。

1 基因组编辑技术

早年发展的基因组核酸操作技术，如反义 RNA 技术^[3]、T-DNA/转座子插入^[4]、RNAi 技术^[5]、超表达技术^[6]等，可以调控基因的表达或沉默，但这些技术都不能对目标基因进行精准的修饰，不能称之为基因编辑技术。

近来发展的序列特异性核酸酶 (sequence specific nuclease, SSN)，如锌指核酸酶^[7] (zinc finger nucleases, ZFNs)、类转录激活因子效应物核酸酶^[8] (transcription activator like effector nucleases, TALENs) 和 CRISPR/Cas9 等系统是通过在生物体基因组（基因）特定位置（靶点）引入染色体双链断裂 (double strand break, DSB)，进而引发非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 修复。易错的 NHEJ 修复往往导致修复位点产生碱基插入或者缺失，可造成目标基因的突变。如果同时导入与染色体靶点两侧同源的序列，DSB 还可以启动导入序列与染色体发生同源重组修复 (homology-directed repair, HDR)，达到精

细编辑目标基因的目的^[2]。

ZFNs 与 TALENs 是融合 DNA 识别结构域（锌指或 TAL 效应子）与核酸酶结构域而形成的嵌合蛋白，一般需要二聚化才能发挥作用。组装 ZFNs 与 TALENs 的 DNA 识别结构域的表达单元比较复杂，且切割靶点的效率较低。而 CRISPR/Cas9 系统由 Cas9 蛋白和单导向 RNA (sgRNA) 两个元件组成。sgRNA 的 5' 端 20 碱基的靶点互补序列与基因组靶点配对，引导 Cas9 蛋白切割靶序列^[2,9]。因此，构建 CRISPR/Cas9 表达单元非常简便，Cas9 蛋白切割靶点的效率很高。近年来应用 CRISPR/Cas9 对动植物进行基因组编辑的报道大大超过了 ZFNs 与 TALENs，CRISPR/Cas9 系统已成为基因组编辑技术的一个新突破^[10-11]。

2015 年，美国麻省理工学院张峰实验室又鉴定出 2 种与 Cas9 蛋白具有相似功能、同样来源于细菌 CRISPR 系统的 Cpf1 蛋白^[12]，形成了 CRISPR/Cpf1 系统。Cpf1 的 PAM 特异性以及切割方式都不同于 Cas9，是对基于 CRISPR 基因组编辑技术的重要补充。2016 年，河北科技大学韩春雨实验室鉴定了格氏嗜盐碱杆菌 (*Natronobacterium gregoryi*) 的 Argonaute 蛋白^[13] (简称 NgAgo) 可作为一种序列特异核酸内切酶，在人体细胞中进行基因组编辑。NgAgo 以小单链 DNA 介导，寻找靶序列进行切割，是基因组编辑技术的又一个重要发展。总之，基因组编辑技术将会不断发展完善。

CRISPR/Cas9 系统的基本工作原理已经有大量的介绍。在植物进行基因组编辑，一般采用双元转化载体，即在 T-DNA 区构建 Cas9 表达盒、sgRNA 表达盒和抗生素筛选标记基因，以此载体稳定转化受体植物并表达 Cas9 蛋白和 sgRNA。植物 CRISPR/Cas9 系统的一个特点是通过在一个双元载体的 T-DNA 中构建多个 sgRNA 表达盒，每种 sgDNA 携带不同的靶序列，或利用前体 tRNA 剪切产生多种 sgDNA，可以实现同时编辑多个基因位点^[14-15]。CRISPR/Cas9 系统是以 Cas9 蛋白在 PAM (protospacer adjacent motif) 上游第 3 个碱基处的切割位点为中心导致的突变^[9]。其中，约一半的突变事件为单碱基插入，且以 A 或 T 碱基插入为主^[14,16]。其余突变为单碱基到几十碱基的删除，但删除碱基的数目越多，其出现的频率越低^[14]。如果在一个染色体区域内设计 2 个或多个靶点，还可能产生靶点之间的片段缺失，因此，可以实现对整个基因或较大染色体区段的删除^[14,17]。以本课题组开发的 CRISPR/

Cas9 载体系统对水稻基因组进行编辑为例, 可获得平均突变效率为 85.4%, 大部分为均一的双等位突变 (54.9%) 和纯合突变 (24.7%), 并可遗传到后代^[14]。应用这一系统, 对水稻成功突变了基因家族的多个基因 (可达 8 个基因)、生物合成途径中的相关基因和单个基因的多个靶点, 并且在转化的 T₀ 代就获得有表型的突变体^[14,18-19]。

基因组编辑产生的双等位突变和杂合突变序列的 PCR 扩增产物的直接测序会产生复杂的重叠峰, 而克隆后测序又费时和费用高。为解决这个问题, 本课题组开发了一种简便的“简并序列解码法 (degenerate sequence decoding, DSD)”^[20] 及其在线软件工具 DSDdecode (<http://dsdecode.scgene.com/>)^[21], 从而实现了对各种类型突变的测序文件解码自动化。综上所述, CRISPR/Cas9 系统的发展对植物和作物的基础研究和性状遗传改良提供了强大的技术手段。

2 基因组编辑技术在水稻基因功能研究及遗传改良中的应用

2.1 水稻基因功能研究

水稻是重要的粮食作物, 也是单子叶模式植物, 对其进行分子生物学研究具有重要的意义。对目标基因的定点编辑能更好地研究新基因的功能。由于开发利用植物 CRISPR/Cas9 基因编辑技术才只有 2~3 年的时间, 目前报道的水稻基因编辑大部分是对已知功能基因的效果验证, 对未知新基因的功能研究的例子还比较少 (表 1)。预计在未来短期内将有大量的利用 CRISPR/Cas9 编辑技术揭示水稻新基因功能的报道。

中国科学院上海植物逆境生物学研究中心朱健康实验室对水稻 3 个容易观察表型的基因 (*ROC5*、*SPP* 和 *YSA*) 进行了编辑, 在 T₁ 代转基因株系中, *SPP* 突变效率为 5%, *ROC5* 和 *YSA* 突变效率高达

表1 基因组编辑技术在水稻基因功能研究及遗传改良中的应用

功能基因	突变体表型	文献
<i>OsYSA</i>	苗期白化	[16, 22]
<i>CAO1</i>	夜色浅绿	[23]
<i>LZAY1</i>	分蘖角增大	[23]
<i>OsPDS</i>	白化	[16, 24]
<i>FTLs*</i>	叶片早衰	[14]
<i>OsGSTU*</i> 、 <i>OsMRP15*</i> 、 <i>OsAnP*</i>	紫叶稻叶片变绿	[14]
<i>OsMPKs</i>	细胞增殖等	[15, 24-25]
<i>OsPMS3</i>	光温敏雄性不育	[16]
<i>OsEPSPS</i>	抗草甘膦	[16]
<i>OsDERF1</i>	干旱应答	[16]
<i>OsMSH1</i>	雄性不育	[16]
<i>OsMYBs</i>	转录调控	[16]
<i>OsSPP</i>	叶色白化	[16, 22]
<i>OsSWEETs</i>	抗白叶枯病	[17, 26-27]
<i>OsDEP1</i>	直立密穗	[28-29]
<i>OsCKX2</i>	增加穗粒数	[28-29]
<i>OsSD1</i>	半矮化	[28]
<i>OsWaxy</i>	降低直链淀粉含量	[14, 22]
<i>OsBADH2</i>	香米	[24, 28]
<i>OsROC5</i>	卷叶	[16, 22]
<i>OsERF922</i>	抗稻瘟病	[30]
<i>OsGS3</i>	提高粒重	[29]
<i>OsIPA1</i>	增加分蘖数	[29]
<i>OsBEL</i>	除草剂敏感	[31]
<i>OsALS</i>	抗除草剂	[32-33]
<i>TMS5</i>	温敏不育	[34]

* 为新基因。

26%~84%，*YSA* 的 T_1 代大约 10% 是纯合突变株系^[22]。该实验室还对 *OsPDS*、*PMS3*、*OsEPSPS*、*OsDERF1*、*OsMSH1*、*OsMYB1* 和 *MYB5* 基因进行编辑，获得的 T_0 代转基因株系中平均 44.4% 产生了突变，其中 7.7% 的突变株系是纯合突变^[16]，这些突变体表现出预期的表型。 T_0 代是纯合的突变株系，能够稳定地遗传给 T_1 代； T_0 代是 2 个等位基因发生不同突变的株系，在 T_1 代中突变等位基因的分符合孟德尔遗传规律。

北京大学瞿礼嘉实验室对水稻 *CAOI* 基因进行打靶编辑，获得 30 株突变株系，其中 25 株 (83.3%) 在 PAM 上游有碱基的插入或者缺失，有 4 个株系 (13.3%) 为纯合突变；对水稻 *LAZY1* 基因进行打靶编辑，获得 12 株突变株系，其中有 11 株 (91.6%) 在 PAM 上游存在碱基的插入或者缺失，有 6 个株系 (50%) 为纯合突变^[23]。

本课题组构建了高效的植物 CRISPR/Cas9 多靶点编辑系统，对数十个水稻基因 (包括功能未知的新基因) 进行了编辑，普遍获得了 60%~100% 的突变率 (平均突变率达 86%)^[14,19]。以此系统对紫叶稻的 3 个新基因 *OsGSTU*、*OsMRP15*、*OsAnP* 进行敲除，产生了绿叶突变体，表明这些基因参与花青素合成途径^[14]。该系统可以同时基因组中多个不同的基因位点进行编辑，从而可以修饰同一基因家族中的不同成员或同一代谢途径中的不同调控基因^[19]。

由于 CRISPR/Cas9 系统的载体构建简便性和定点突变效率高的特性，目前许多实验室已经使用该系统替代以往使用的 RNA 干扰和反义 RNA 技术进行新基因的功能分析。另外，还可以利用 CRISPR/Cas9 系统开展对大量的未知功能新基因的规模化突变工作，建立规模化的新基因突变体库，促进功能基因组学研究。

2.2 水稻性状遗传改良

水稻诱变育种是遗传改良的重要方式之一，它是利用各种化学诱变剂和物理因素诱导遗传变异，获得有应用价值的突变体，育成新的优良品种或创造新的种质资源。我国水稻诱变育种始于 20 世纪 50 年代，相继育成了许多优良的品种，并创造了大量新的种质资源。然而，诱变育种存在着突变频率低，突变的性状随机，难以同时获得多个理想性状。基因组编辑技术除了应用于水稻功能基因组研究，还可以应用于水稻品种改良，帮助水稻育种工作者更加快速、定向地改良品种。另外，基因编辑技术只是对内源基因进行定点编辑，获得的目标基因修

饰植株可以通过遗传分离排除外源转基因元件，避免了传统转基因作物需要的生物安全评价问题^[35]。

作物的农艺性状由许多基因控制，这些基因可以分为正调控基因和负调控基因。正调控基因的正常功能或其增强表达可以表现出优良性状。负调控基因的功能是抑制优良性状的表现，下调其表达或敲除其功能可以解除其抑制作用，获得优良的目标性状。由于目前的植物基因组编辑技术主要是对目标基因产生功能丧失突变，而替换和定点插入目的片段的效率还很低，目前报道的 TALENs 和 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在水稻遗传改良的应用中，主要是针对负调控基因的编辑 (表 1)。

Li 等^[26] 运用 TALENs 定向破坏了水稻蔗糖转运蛋白基因 *OsSWEET14* (水稻感病基因) 启动子中的效应蛋白结合元件 (effector-binding element, EBE)，有效降低了水稻白叶枯病原菌 (*Xanthomonas oryzae*) 分泌的效应蛋白与 *OsSWEET14* 的启动子的结合能力，使 *OsSWEET14* 的表达不受白叶枯菌调控，从而提高了水稻对白叶枯病的抗性，而不影响水稻生长发育功能。Shan 等^[28] 也构建了一系列 TALENs，对控制水稻不同性状的基因进行突变，包括香味基因 *OsBADH2*、直立密穗基因 *OsDEP1*、大穗基因 *OsCKX2*、半矮化基因 *OsSD1*，创建了优良的水稻育种材料。

Shan 等^[24] 利用 CRISPR/Cas9 技术对水稻的香气基因 *OsBADH2* 进行编辑，获得了香米突变体。Feng 等^[22] 对水稻 *ROC5* 和 *OsWaxy* 基因进行编辑，产生了卷叶及糯性突变。本课题组对粳稻和籼稻的 *OsWaxy* 的编辑也获得了糯性品系^[14]。*OsERF922* 编码一个 AP2/ERF 类转录因子，负调控水稻对稻瘟病菌的抗性以及对盐的耐受性^[36]。Wang 等^[30] 利用 CRISPR/Cas9 系统在水稻品种空育 131 中对该基因进行敲除，获得抗稻瘟病株系。Li 等^[29] 利用 CRISPR/Cas9 系统重新评估水稻 4 个产量相关的负调控基因，即穗粒数基因 *Gn1a* (*OsCKX2*)、直立密穗基因 *DEP1*、粒重基因 *GS3* 和分蘖数相关基因 *IP1*。获得的水稻品种中花 11 突变体的表型与以前报道的表型相似，对提高单株产量有作用。

水稻的除草剂 (苯达松) 抗性基因 *BEL* 的功能缺失使水稻失去对苯达松和磺酰脲类除草剂的抗性^[37]。Xu 等^[31] 利用 CRISPR/Cas9 系统突变了 *BEL*，获得苯达松敏感的株系。Sun 等^[32] 通过 CRISPR/Cas9 系统介导的同源重组，对水稻 *ALS* 基因的两个氨基酸位点的密码子进行定点替换，通过

后代分离, 获得不含有转基因元件的抗除草剂水稻。

华南农业大学庄楚雄实验室利用 CRISPR/Cas9 系统对多个籼稻和粳稻品种的温敏不育基因 *tms5* 的野生型基因 *TMS5*^[34] 进行突变, 快速培育出温敏不育系, 可用于两系杂交稻育种^[38]。

这些例子说明 CRISPR/Cas9 系统具有其简单易行、突变效率高、成本低、多靶点同时突变等优势, 初步证实能有效地应用于水稻的遗传改良。

随着对水稻农艺性状相关基因的分子生物学研究的深入, 越来越多的重要基因被克隆和阐明功能, 为利用基因编辑技术定向改良, 提升水稻品种的商业价值提供了遗传基础。因此, 可以从提高产量、改良品质、增强抗性、节水省肥增效等方面开展水稻品种改良。

产量性状包括直接的产量构成 3 因素 (单位面积有效穗数、每穗实粒数和千粒重) 和诸多的间接性状 (如株型穗型、生育期、育性、光合效能、营养利用率等)。目前已克隆的水稻产量性状基因, 包括控制分蘖的基因 *MOC1*、*OsTBI*、*IPA1* 等; 控制穗粒数的基因 *Gn1a*、*DST*、*Ghd7* 等; 控制粒型的基因 *GS3*、*GW2*、*GW5*、*OsSPL16*、*OsPPKL1*、*OsglHAT1*、*GW7*、*GW8* 等; 控制穗型的基因 *DEP1*。其中有些是负调控基因, 修饰这些基因并进行适当组合, 有望获得理想的高产水稻新品种。

在改良稻米品质方面, 可以对 *GW7*、*GW8*、*Chalk5*、*ALK*、*Waxy*、*BADH2* 等基因进行修饰和组合, 获得粒长、长宽比、直链淀粉含量、香味等性状的改良品种。

在增强抗性方面, 可以对水稻稻瘟病和白叶枯病抗性负调控基因, 如 *Pi21*、*Xa5*、*Xa13*、*OsERF922* 等进行修饰, 产生隐性等位基因能够提高品种的抗病性。

在降低重金属吸收运转方面, 可以对 *OsLCT1*、*OsNramp5*、*OsNramp1*、*OsLCD*、*OsHMA2* 等基因进行编辑, 创制抗重金属污染的水稻新种和亲本材料。

3 当前植物基因编辑技术的瓶颈

目前基于 CRISPR/Cas9 系统的植物基因组修饰主要是对特定位点的突变, 在基因编码区可产生移码或碱基缺失, 或产生在 2 个靶点之间的片段缺失, 导致靶标基因的功能丧失, 产生性状变异。对负调控目标基因进行这种破坏性的基因编辑可以产生改良的农艺性状; 但是, 与动物细胞相比, 由于

向植物细胞导入同源重组供体片段和 DNA 同源重组的效率较低, 目前的植物基因组编辑技术对目标基因进行精准碱基替换、片段替换和定点插入等精准编辑的效率很低, 因此, 对大部分控制重要农艺性状的正调控基因的精准编辑还难以展开。

有若干报道在玉米、大豆、水稻、拟南芥中尝试了基于同源重组的精准编辑。Svitashev 等^[39] 通过基因枪转化方法将体外转录的 sgRNA 和同源重组供体片段导入已转化整合 *Cas9* 表达盒的玉米未成熟胚, 成功地对无叶舌基因 *LIG1*、雄性不育基因 *MS26* 和 *MS45*、抗除草剂基因 *ALS1* 和 *ALS2* 进行编辑。Li 等^[40] 也通过基因枪转化方法编辑大豆 *DD20* 和 *DD43* 基因。Zhao 等^[41] 利用双元 RNA 向导的 CRISPR/Cas9 系统和采用一个含有 *eGFP* 的供体片段对 *TFL1* 基因的一个特定区段进行了定点替换。Sun 等^[32] 和 Endo 等^[35] 通过基因枪转化和农杆菌转化精准编辑, 获得水稻抗除草剂变异基因 *ALS*。这些研究在供体片段中加上报告基因或者抗性筛选基因, 或编辑目标基因本身是抗除草剂基因 (*ALS*) 等, 以利筛选成功的编辑事件。但是这种编辑技术会留下外源标记基因, 不能对任意基因进行无缝精准的编辑。

因此, 解决如何提高供体片段供给效率和同源重组率的问题, 开发出高效的编辑任意植物基因的精准编辑技术, 将大大促进植物功能基因组的研究和作物品种的改良。

4 结语与展望

任何新技术的出现都是机遇与挑战并存, 基因组编辑技术的应用同样也面临着技术优化和政策法规两个层面的挑战。该技术产生的作物新品种在监管标准上存在争议: 美国农业监管部门认为由植物细胞自我修复机制产生的突变体不属于转基因^[42], 因此, 基因组编辑植物不被定义为转基因生物 (genetically modified organism, GMO)。应该在“转基因生物 (GMO)”和“基因组编辑作物 (genome-edited crop, GEC)”之间划出明确的界线, 向公众说明它们之间的差别: GMO 是通过转基因技术引入外源 DNA 序列的产品, 而 GEC 则是通过对生物体自身持有的基因进行编辑修饰的产品。

目前, 至少 2 种基因组编辑的植物品种获得了美国农业监管部门的批准, 它们分别是植酸含量较低的玉米品种和抗除草剂的油菜品种。基因组编辑的抗除草剂油菜也得到了加拿大农业部门的批

准^[43]。与此相反，欧盟规定非自然方式产生的基因修饰就是GMO，他们又同时认为化学和物理诱变获得作物突变体不是GMO。然而，基因组编辑的突变与化学和物理诱变以及自然突变只是达成的手段(技术)不同，变异的实质等同，是没有本质区别的，欧盟的这种判断并非依据科学原理而是基于政治考虑。因此，欧盟面临两难的情况，对基因组编辑作物的监管标准存在着不确定性^[44]。但最近，欧盟也倾向于基因组编辑作物不被定义为GMO。

为了推动和规范基因组编辑技术在作物育种中的应用，Huang等^[45]在*Nature Genetics*撰写文章，对基因组编辑作物管理提出几点建议：一是在研究环节尽可能降低基因组编辑作物的传播风险；二是确保基因组编辑作物中的外源DNA被完全去除；三是如果基因组编辑作物中的目标基因参照了其他植物物种的同源基因进行编辑，必须注明两个物种的亲缘关系和基因同源性关系；四是通过全基因组测序技术检测并记录编辑作物的基因组变异情况；五是应将上述4点的信息在新品种审定资料中备案，基因组编辑作物只需接受常规育种作物同等的管理。*Nature Genetics*编辑部同期发表了评论支持该管理框架的建议，赞同应该基于产品(品种)特性而非基于利用的技术的管理理念，指出：“基于基因组学的农业技术革命如果得到负责任的推广，将会满足甚至超越科学界和社会的需求。作者们提出的基因组编辑作物管理框架，将为基于生命科学的可持续农业赢得公众支持^[46]。”

放眼未来，基因组编辑技术能使人们对植物基因组特定基因(位点)进行精准、高效的改造，将在植物功能基因组研究和作物遗传改良中发挥巨大的作用。

[参 考 文 献]

- [1] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339: 823-6
- [2] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339: 819-23
- [3] Bourque JE. Antisense strategies for genetic manipulations in plants. *Plant Sci*, 1995, 2: 125-49
- [4] Krysan PJ, Young JC, Sussman MR. T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1999, 11: 2283-90
- [5] Kusaba M. RNA interference in crop plants. *Curr Opin Biotechnol*, 2004, 15: 139-43
- [6] Prelich G. Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. *Genetics*, 2012, 190: 841-54
- [7] Bibikova M, Beumer K, Trautman JK, et al. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science*, 2003, 300: 764
- [8] Bedell VM, Wang Y, Campbell JM, et al. *In vivo* genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature*, 2012, 491: 114-8
- [9] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337: 816-21
- [10] Ledford H. CRISPR, the disruptor. *Nature*, 2015, 522: 20-4
- [11] Ledford H. CRISPR: gene editing is just the beginning. *Nature*, 2016, 531: 156-9
- [12] Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 2015, 163: 759-71
- [13] Gao F, Shen XZ, Jiang F, et al. DNA-guided genome editing using the *Natronobacterium gregoryi* Argonaute. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 768-73
- [14] Ma X, Zhang Q, Zhu Q, et al. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Mol Plant*, 2015, 8: 1274-84
- [15] Xie K, Minkenberg B, Yang Y. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 3570-5
- [16] Zhang H, Zhang J, Wei P, et al. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnol J*, 2014, 12: 797-807
- [17] Zhou H, Liu B, Weeks DP, et al. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: 10903-14
- [18] 马兴亮, 刘耀光. 植物CRISPR/Cas9基因组编辑系统与突变分析. *遗传*, 2016, 38: 118-25
- [19] Ma X, Zhu Q, Chen Y, et al. CRISPR/Cas9 platforms for genome editing in plants: developments and applications. *Mol Plant*, 2016, 9: 961-74
- [20] Ma X, Chen L, Zhu Q, et al. Rapid decoding of sequence-specific nuclease-induced heterozygous and biallelic mutations by direct sequencing of PCR products. *Mol Plant*, 2015, 8: 1285-7
- [21] Liu W, Xie X, Ma X, et al. DSDecode: a web-based tool for decoding of sequencing chromatograms for genotyping of targeted mutations. *Mol Plant*, 2015, 8: 1431-3
- [22] Feng Z, Zhang B, Ding W, et al. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2013, 23: 1229-32
- [23] Miao J, Guo D, Zhang J, et al. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell Res*, 2013, 23: 1233-6
- [24] Shan Q, Wang Y, Li J, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 686-8
- [25] Xie K, Yang Y. RNA-guided genome editing in plants

- using a CRISPR-Cas system. *Mol Plant*, 2013, 6: 1975-83
- [26] Li T, Liu B, Spalding MH, et al. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nat Biotechnol*, 2012, 30: 390-2
- [27] Jiang W, Zhou H, Bi H, et al. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: e188
- [28] Shan Q, Wang Y, Chen K, et al. Rapid and efficient gene modification in rice and *Brachypodium* using TALENs. *Mol Plant*, 2013, 6: 1365-8
- [29] Li M, Li X, Zhou Z, et al. Reassessment of the four yield-related genes *Gn1a*, *DEP1*, *GS3*, and *IPA1* in rice using a CRISPR/Cas9 system. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 377
- [30] Wang F, Wang C, Liu P, et al. Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene *OsERF922*. *PLoS One*, 2016, 11: e154027
- [31] Xu R, Li H, Qin R, et al. Gene targeting using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR-Cas system in rice. *Rice*, 2014, 7: 5
- [32] Sun Y, Zhang X, Wu C, et al. Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase. *Mol Plant*, 2016, 9: 628-31
- [33] Song G, Jia M, Chen K, et al. CRISPR/Cas9: A powerful tool for crop genome editing. *Crop J*, 2016, 4: 75-82
- [34] Zhou H, Zhou M, Yang Y, et al. RNase Z^{SI} processes *Ubl40* mRNAs and controls thermosensitive genic male sterility in rice. *Nat Commun*, 2014, 5: 4884
- [35] Endo M, Mikami M, Toki S. Biallelic gene targeting in rice. *Plant Physiol*, 2016, 170: 667-77
- [36] Liu D, Chen X, Liu J, et al. The rice ERF transcription factor *OsERF922* negatively regulates resistance to *Magnaporthe oryzae* and salt tolerance. *J Exp Bot*, 2012, 63: 3899-911
- [37] Pan G, Zhang X, Liu K, et al. Map-based cloning of a novel rice cytochrome P450 gene *CYP81A6* that confers resistance to two different classes of herbicides. *Plant Mol Biol*, 2006, 61: 933-43
- [38] Zhou H, He M, Li J, et al. Development of commercial thermo-sensitive genic male sterile rice accelerates hybrid rice breeding using CRISPR/Cas9 mediated *TMS5* editing system. *Sci Rep*, 2016 [Epub ahead of print]
- [39] Svitashv S, Young JK, Schwartz C, et al. Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. *Plant Physiol*, 2015, 169: 931-45
- [40] Li Z, Liu ZB, Xing A, et al. Cas9-guide RNA directed genome editing in soybean. *Plant Physiol*, 2015, 169: 960-70
- [41] Zhao Y, Zhang C, Liu W, et al. An alternative strategy for targeted gene replacement in plants using a dual-sgRNA/Cas9 design. *Sci Rep*, 2016, 6: 23890
- [42] Ledford H. US regulation misses some GM crops. *Nature*, 2013, 500: 389-90
- [43] Waltz E. Tiptoeing around transgenics. *Nat Biotechnol*, 2012, 30: 215-7
- [44] Jones HD. Regulatory uncertainty over genome editing. *Nat Plants*, 2015, 1: 14011
- [45] Huang S, Weigel D, Beachy RN, et al. A proposed regulatory framework for genome-edited crops. *Nat Genet*, 2016, 48: 109-11
- [46] Where genome editing is needed. *Nat Genet*, 2016, 48: 103