

# 基于 CRISPR-Cas9 基因编辑技术在作物中的应用

殷文晶, 陈振概, 黄佳慧, 叶涵斐, 芦涛, 路梅, 饶玉春\*

浙江师范大学生命科学学院, 浙江 金华 321004

殷文晶, 陈振概, 黄佳慧, 叶涵斐, 芦涛, 路梅, 饶玉春. 基于 CRISPR-Cas9 基因编辑技术在作物中的应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(2): 399-424.

YIN Wenjing, CHEN Zhengai, HUANG Jiahui, YE Hanfei, LU Tao, LU Mei, RAO Yuchun. Application of CRISPR-Cas9 gene editing technology in crop breeding[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(2): 399-424.

**摘 要:** CRISPR-Cas9 系统是由成规律的间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR)及其相关蛋白构成, 广泛存在于细菌和古细菌中, 该系统作为一种特异性免疫保护, 可抵御病毒、噬菌体的二次侵染。CRISPR-Cas9 技术是继锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)和类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator like effector nucleases, TALENs)技术之后的第三代新型靶向基因组编辑技术。CRISPR-Cas9 技术具有灵活、高效、生产成本低且特异性高等优点, 极大地促进了基因功能方面的研究。CRISPR-Cas9 技术经过不断的完善和发展, 目前该技术已广泛应用在各个领域。本文介绍了 CRISPR-Cas9 技术的产生、工作机制及优势; 综述了 CRISPR-Cas9 技术在基因敲除、基因敲入、基因调控和基因组方面的应用以及在水稻、小麦、玉米、大豆和马铃薯等重要粮食作物以及对作物驯化的应用; 分析了 CRISPR-Cas9 技术目前面临的问题和挑战, 并展望了 CRISPR-Cas9 技术的发展及应用前景。

**关键词:** CRISPR-Cas9 技术; 基因编辑; 基因工程; 水稻; 作物

## Application of CRISPR-Cas9 gene editing technology in crop breeding

YIN Wenjing, CHEN Zhengai, HUANG Jiahui, YE Hanfei, LU Tao, LU Mei, RAO Yuchun\*

College of Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, Zhejiang, China

**Abstract:** The CRISPR-Cas9 system is composed of a clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) and its associated proteins, which are widely present in bacteria

资助项目: 浙江省自然科学基金重点项目(LZ23C130003); 广西水稻遗传育种重点实验室开放课题(2018-15-Z06-KF12)

This work was supported by the Key Projects Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LZ23C130003) and the Open Project of Guangxi Key Laboratory of Rice Genetics and Breeding (2018-15-Z06-KF12).

\*Corresponding author. E-mail: ryc@zjnu.cn

Received: 2022-08-20; Accepted: 2022-11-30; Published online: 2022-12-06

and archaea, serving as a specific immune protection against viral and phage secondary infections. CRISPR-Cas9 technology is the third generation of targeted genome editing technologies following zinc finger nucleases (ZFNs) and transcription activator like effector nucleases (TALENs). The CRISPR-Cas9 technology is now widely used in various fields. Firstly, this article introduces the generation, working mechanism and advantages of CRISPR-Cas9 technology; secondly, it reviews the applications of CRISPR-Cas9 technology in gene knockout, gene knock-in, gene regulation and genome in breeding and domestication of important food crops such as rice, wheat, maize, soybean and potato. Finally, the article summarizes the current problems and challenges encountered by CRISPR-Cas9 technology and prospects future development and application of CRISPR-Cas9 technology.

**Keywords:** CRISPR-Cas9 technology; gene editing; genetic engineering; rice; crop

近年来,随着科学技术的不断完善和发展,基因编辑技术的问世掀起了基因工程的新浪潮<sup>[1]</sup>。基因编辑是一种能精准地对生物体基因组特定目标基因进行定点编辑和修饰加工的基因工程技术。该研究手段的出现,突破了以往研究材料难获得的限制,因其在动植物体内可以准确高效地进行定点基因组编辑,在基因功能研究、基因治疗、遗传改良等方面广泛应用,推动着生物学领域的发展。

基因编辑技术主要包括最先被应用在基因组定点编辑的锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)<sup>[2]</sup>、类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator like effector nucleases, TALENs)<sup>[3]</sup>及具有简单高效易操作优点的成规律的间隔短回文重复序列及其相关蛋白(clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR-associated proteins, CRISPR-Cas)<sup>[4]</sup>技术。因前2项技术的DNA结合结构域组装复杂、改造成本高而未被广泛应用;而CRISPR-Cas具有设计简单、成本低、效率高等优点,在短短几年时间内,已被广泛应用在人类医学基因遗传疾病治疗、转基因技术研究和作物遗传育种改良等重要领域。

本文结合CRISPR-Cas9技术的部分研究成果,主要介绍CRISPR-Cas9技术的产生、发展、

机制和CRISPR-Cas各种改造版本的应用,以及CRISPR-Cas9技术在作物驯化和育种中的应用成果,为开展基因编辑技术这一领域相关工作提供参考依据。

## 1 CRISPR-Cas9 技术的简介

### 1.1 CRISPR-Cas9 技术的产生、发展及机制

1987年, Ishino等<sup>[5]</sup>首次在大肠杆菌基因组中发现一段特殊的重复序列:由相似大小间隔序列所隔开的序列。2002年, Jansen等<sup>[6]</sup>在原核生物(细菌和古细菌)中发现了新的重复DNA序列并将其命名为聚集规则间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR),同时他们在CRISPR序列附近发现4个与CRISPR功能相关的Cas基因。2007年, Barrangou等<sup>[7]</sup>在原核生物中发现了一种由CRISPR序列和相关Cas基因介导调控,提供对抗噬菌体等外源基因的抗性,抗性特异性由间隔-噬菌体序列的相似性主导。2012年, Jinek等<sup>[8]</sup>进一步阐明了CRISPR-Cas系统的作用机制。基于获得性免疫系统, Church实验室对其进行优化和改造,设计并构建II型CRISPR-Cas系统即CRISPR-Cas9系统(图1),即在动植物细胞中由RNA引导的编辑工具并证明该系统在哺乳动物

类方法, 定义出 2 种假定的新类型即隶属于“1”类和“2”类的 IV 和 V 型 CRISPR-Cas 系统, 已有的 CRISPR-Cas 系统分为 5 个类型、16 个亚型(表 1)<sup>[14]</sup>。目前, 广泛应用于功能基因研究、动物育种领域的是“2”类 CRISPR-Cas 系统, 即 CRISPR-SpCas9 基因编辑技术是基于化脓链球菌的获得性免疫系统, 其具有设计简单、成本低、效率高、适用性广等优点, 可实现基因敲除、敲入、定点编辑等<sup>[15]</sup>。

CRISPR-Cas9 系统中的 2 个主要元件分别为向导 RNA (small guide RNA, sgRNA)和 Cas9 蛋白。CRISPR-Cas9 系统作用的靶基因中通常含有一段短的原间隔相邻基元(protospacer adjacent motif, PAM), 该段序列通常在靶 DNA 的 3'末端作用。sgRNA 是根据靶基因设计的一段小型非编码 RNA, 具有指导 Cas9 蛋白对靶基因进行定点编辑的功能。Cas9 蛋白是一种核酸内切酶,

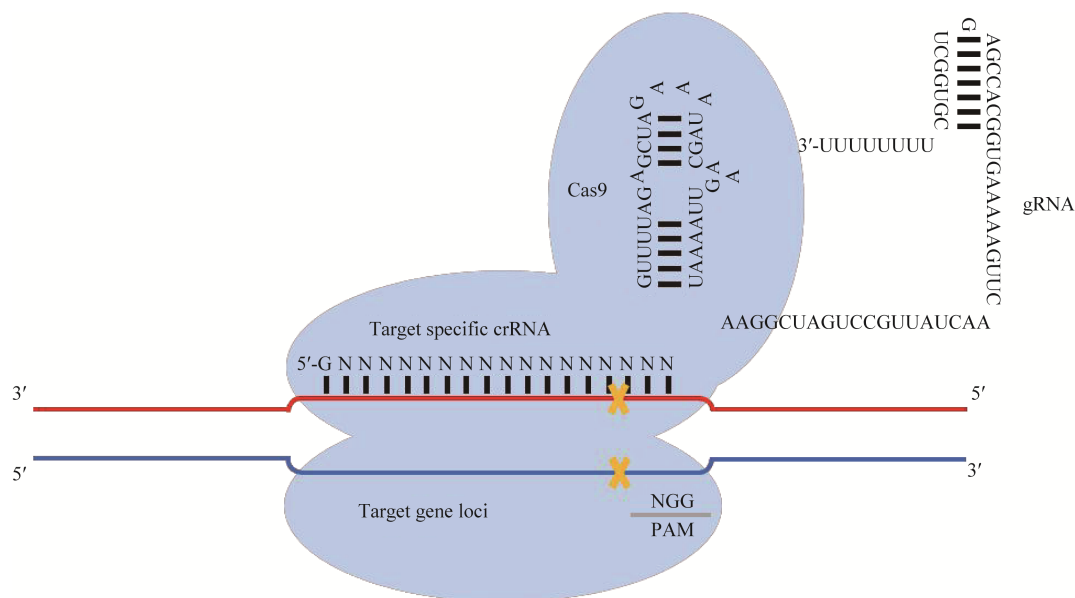


Figure 1 The mechanism of CRISPR-Cas9 system<sup>[9]</sup>. In human cells, RNA-guided gene targeting involves co-expression of Cas9 protein with C-terminal SV40 nuclear localization signal (NLS) with one or more gRNAs expressed by human U6 polymerase III promoter. The Cas9 protein unlocks the DNA double strand after gRNA recognizes the target sequence and splits the two strands, but only if the correct PAM is present at the 3' end. In principle, any genomic sequence in the GN<sub>20</sub>GG form can be targeted.

含有 REC、RuvC、HNH 和 PI 四个结构域, 其中 RuvC 和 HNH 结构域具有切割活性, 分别负责切割目的基因的靶标链和非靶标链, 其切割位点在 PAM 序列上游的 3–8 nt 处, PAM 的存在也是激活酶 Cas9 所必需的<sup>[16]</sup>。CRISPR-Cas9 系统的机制是由 sgRNA 指导 Cas9 蛋白将双链 DNA 断裂(double strand break, DSB)引入特定的靶基因中, 细胞中一旦发生这种断裂, 就会引发同源重组修复(homology directed repair, HDR)或非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)

2 种自动修复机制(图 2), 进而造成靶基因序列的插入、缺失和替换, 从而实现基因组的定向改造<sup>[17-18]</sup>。

## 1.2 CRISPR-Cas9 技术的优点

基因组编辑技术是新兴地、能精确地对生物体基因组目标靶基因进行特定修饰和定点改造及研究基因功能的一项技术。CRISPR-Cas9 技术是继 ZFNs 和 TALENs 技术之后的第三代新型靶向基因组编辑技术。CRISPR-Cas9 技术是 CRISPR-Cas 系统中应用最广泛的一种。

表 1 CRISPR-Cas9 系统的分类<sup>[14]</sup>

Table 1 Classification of CRISPR-Cas9 systems<sup>[14]</sup>

Categories	Type	Subtypes	Contains the Cas protein
The first major categories	I	I-A, I-B, I-C, I-D, I-E, I-F1, I-F2, I-F3	Cas1, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8
	III	III-A, III-B, III-C, III-D, III-E, III-F	Cas1, Cas2, Cas5, Cas6, Cas7, Cas10, Cas11
	IV	IV-A, IV-B, IV-C	Cas1, Cas2, Cas5, Cas6, Cas7
The second major categories	II	II-A, II-B, II-C1, II-C2	Cas1, Cas2, Cas4, Cas9
	V	V-A, V-B1, V-B2, V-C, V-D, V-E, V-F1, V-F1 (V-U3), V-F2, V-F3, V-G, V-U1, V-U2, V-U4, V-K (V-U5)	Cas1, Cas2, Cas4, Cas12
	VI	VI-A, VI-B, VI-B2, VI-C, VI-D	Cas1, Cas2, Cas13

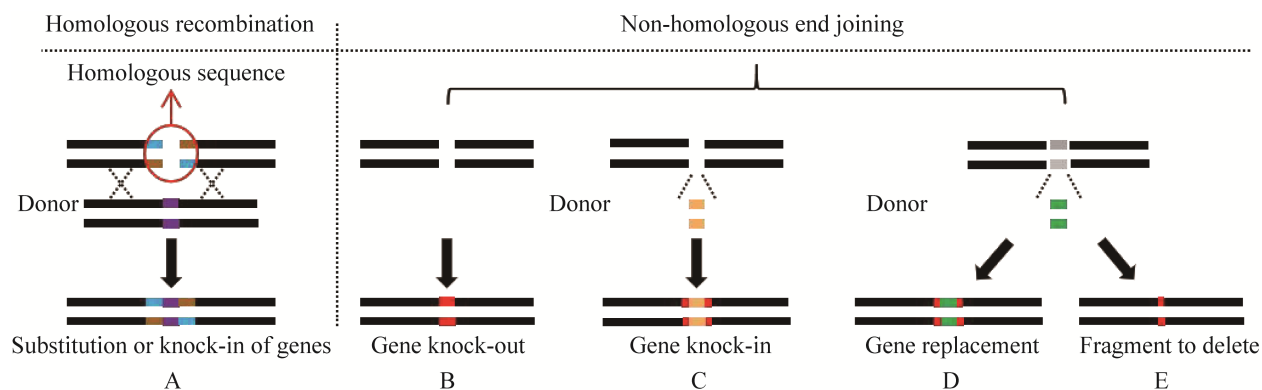


图 2 双链 DNA 断裂的两种修复方式<sup>[19]</sup>

Figure 2 Two methods for repairing double stranded DNA breaks<sup>[19]</sup>. DNA repair is mainly carried out by homology directed repair (HDR) and non-homologous end joining (NHEJ). HDR repair using homologous fragment as receptor template is more accurate, and gene replacement or insertion can be achieved by donor (A); however, NHEJ repair may lead to the insertion or deletion of the base at the DNA fracture site (red area), resulting in gene mutation (B). The donor of foreign DNA may be mistakenly connected to the gene, resulting in gene insertion (C). The rupture caused by two target sites may result in gene replacement (D) or deletion of large fragments (E).

ZFNs 和 TALENs 都是由特异的 DNA 结合结构域和非特异的切割结构域(核酸内切酶 Fok I)构成。CRISPR-Cas9 同样也是由 2 部分构成,特异的 sgRNA 和非特异的核酸内切酶 Cas9。在特异性和脱靶效应方面,CRISPR-Cas9 强于 ZFNs,但是较 TALENs 稍差;在设计和构建系统方面,ZFNs 和 TALENs 都是通过特异的蛋白质序列对靶位点 DNA 进行识别,而 CRISPR-Cas9 则通过 sgRNA 识别特异序列,相对更好地设计及合成。因此,CRISPR-Cas9 相较于 ZFNs 和 TALENs 更为简单;CRISPR-Cas9 还具有制作成本低、不受甲基化限制、可同时对多个基因进行编辑等优势。除此之外,CRISPR-Cas9 对于相同的靶点有相当好的靶向效率<sup>[18,20]</sup>。

## 2 CRISPR-Cas9 技术的衍生技术

### 2.1 碱基编辑器

单碱基编辑器有 2 种,分别为 2016 年、2017 年发展起来的技术胞嘧啶碱基器(cytosine base editors, CBEs)和腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editors, ABEs)。CBEs 系统的组成包括:具有单链切割活性的切口 Cas9 (nicking Cas9, nCas9)蛋白、sgRNA、胞嘧啶脱氨酶(cytosine deaminase, CD)和尿嘧啶糖基化酶抑制剂(uracil glycosylase inhibitor, UGI);具体机制为:sgRNA 引导 nCas9 蛋白对非靶标链进行切割,导致在靶基因编辑窗口中的胞嘧啶(cytosine, C)在胞嘧啶脱氨酶的催化作用下脱去一个氨基后突变为尿嘧啶(uracil, U),UGI 则阻止碱基 U 被切除的发生;在 DNA 复制过程中尿嘧啶 U 被识别为胸腺嘧啶(thymine, T),随即与腺嘌呤(adenine, A)发生互补配对。在新一轮 DNA 复制时,腺嘌呤 A 与胸腺嘧啶 T 正常配对,进而实现 C-T 的转变。ABEs 系统由腺嘌呤脱氨酶与具有单链切割活性的

nCas9 蛋白融合而成。具体机制为:sgRNA 引导 nCas9 蛋白对非靶标链进行切割,导致在靶基因编辑窗口中的腺嘌呤 A 在腺嘌呤脱氨酶催化下脱去一个氨基变为次黄嘌呤(inosine, I),在 DNA 复制过程中腺嘌呤 A 被识别为鸟嘌呤(guanine, G),随即与胞嘧啶 C 发生互补配对,在新一轮 DNA 复制时,鸟嘌呤 G 与胞嘧啶 C 正常配对,最终实现 A-G 的转变<sup>[21-22]</sup>。

双碱基编辑器又称为饱和靶向内源基因突变编辑器(saturated targeted endogenous mutagenesis editor, STEME),这种双碱基编辑器在 sgRNA 的引导下,同一靶位点编辑胞嘧啶和腺嘌呤时,C-T 的突变效率高达 61.61%,同时诱导靶位点发生 C-T 和 A-G 的突变,其效率高达 15.1%,显著增加了靶基因碱基突变的效率饱和度及多样性<sup>[23]</sup>。

### 2.2 引导编辑器

2019 年,Anzalone 等<sup>[24]</sup>开发了一种编辑器-引导编辑器,该编辑器使用与逆转录酶融合后催化受损的 Cas9 蛋白直接将新的遗传信息转入到 DNA 靶位点,在人类细胞中应用次数超过 175 次,包括基因的靶向插入、缺失以及所有 12 种点突变的类型,引导编辑器无需双链的断裂和提供 DNA 供体模板。引导编辑器相较于碱基编辑器而言,具有互补的优势和劣势,该编辑器表现出比同源定向修复的效率相持平或更高且产生较少的副产物。其在已知 Cas9 脱靶位点上的脱靶效应比 Cas9 核酸内切酶低很多。这些优势的存在,大大扩展了基因组编辑的应用范围,理论上可纠正高达 89%与已知人类疾病相关的遗传变异。

国内外许多研究学者还将引导编辑技术应用于作物改良中。Lin 等<sup>[25]</sup>将引导编辑器应用在水稻和小麦中,成功进行了高达 21.8%频率的点突变、插入和缺失编辑。Tang 等<sup>[26]</sup>在水稻中针

对性地开发了3个版本的植物引导编辑器,展示了其可用于精准编辑水稻内源基因的用途,并获得了最高为1.55%的编辑效率器。Xu等<sup>[27]</sup>开发的植物主要编辑器2系统在水稻转基因T<sub>0</sub>代时产生的突变频率高达31.3%。Butt等<sup>[28]</sup>利用引导编辑器编辑水稻中*OsALS*、*OsIPA*、*OsTBI*三个基因,最高编辑效率达2%并获得了一些优良性状的转基因株系。除水稻和小麦外,Lu等<sup>[29]</sup>还将引导编辑器应用于番茄基因组的编辑,最高编辑效率达1.66%,证明引导编辑器可对番茄进行编辑。Wang等<sup>[30]</sup>开发了更易于进行引导编辑的载体,同时验证了其应用于双子叶植物烟草、拟南芥和单子叶植物水稻中的有效性。

### 2.3 CRISPR-dCas9 系统

Qi等<sup>[31]</sup>开发了一种基于Cas9控制基因表达的方法,当与sgRNA共表达时,Cas9会被催化而缺乏内切核酸酶活性,进而产生一种与DNA相关的识别复合物,该复合物特异性干扰转录、延伸、RNA聚合酶结合以及转录因子的结合,我们称之为CRISPR-dCas9系统。该系统在降低脱靶效应的同时可有效抑制大肠杆菌中靶基因的表达。这种由RNA引导的DNA识别,在全基因组范围内可选择性干扰基因的表达,可以同时抑制多个靶基因的表达,该作用是可逆的。在通用基因编辑方面具有很大的应用前景

CRISPR-dCas9系统通常在基因调控过程中发挥作用,即CRISPRi的转录抑制和转录激活作用。当dCas9(nuclease-dead Cas9)与靶基因的开放阅读框结合时,能够阻止RNA聚合酶的延伸;当dCas9与靶基因的启动子或转录起始位点结合时,就会阻止基因转录的起始。早在2013年,Bikard等<sup>[32]</sup>靶向绿色荧光蛋白报告质粒的开放阅读框和启动子,设计了不同的crRNAs,均可诱导dCas9对绿色荧光蛋白的表达,导致该质粒

在大肠杆菌中的表达强度降低,有效通过阻止RNA聚合酶的延伸发挥转录抑制作用。当dCas9与具有转录激活功能蛋白质的功能结构域结合时,可激活基因的转录。2013年,Maeder等<sup>[33]</sup>的研究发现,将dCas9蛋白与转录激活VP64融合后并在特异sgRNA的引导下,能显著激活人神经营养因子3基因和胚肾细胞HEK293血管内皮生长因子A基因的转录。

## 3 CRISPR-Cas9 技术的应用

CRISPR-Cas9技术近几年发展迅速,在科研研究中的应用呈现多种形式,主要包括:基因敲除(单基因单位点敲除、单基因多位点敲除、多基因敲除)、基因敲入、基因调控和基因组等方面。在基因敲除方面的应用最为广泛,可同时靶向多个基因<sup>[34]</sup>。

### 3.1 CRISPR-Cas9 技术在基因敲除中的应用

基因敲除在生命科学研究中是一项关键性技术,可以用来研究某个基因的功能并可以永久改变细胞表型,在医学临床遗传病的治疗方面具有良好的应用前景。CRISPR-Cas9技术的应用呈现多元化,传统的方法为构建敲除载体,主要通过农杆菌转化法将敲除载体转入植株中,经过1-2代培养后即可获得靶基因敲除的转基因株系<sup>[35]</sup>。基因敲除的靶基因可以是单个基因也可以是多个基因,对于靶基因而言,可以设计一个或多个sgRNA来定位不同的靶位点<sup>[36-37]</sup>。一般来说,研究者会针对同一个基因设计多个靶位点,以此来提高基因编辑的效率<sup>[38]</sup>。然而,获得多基因的共敲除突变体相对来说较为困难,但已有研究表明,多个sgRNA的串联对基因组编辑效率的影响并不大<sup>[39]</sup>。

#### 3.1.1 单基因单位点敲除

蔡曼君<sup>[40]</sup>利用CRISPR-Cas9技术,以玉米

籽粒发育基因 *Emp10* 为单靶基因构建单位点敲除载体, 突变体株系的胚和胚乳出现发育停滞现象, 籽粒成熟出现空瘪现象; 研究者针对 *Emp10* 基因的作用机理进行分析后发现, 当该基因缺失后, 会影响植物细胞内线粒体电子传递链复合体 I 的活性及组装, 氧化磷酸化途径受到阻碍, 最终影响受精后 ATP 的合成导致籽粒发育不良。横向器官边界域(*LBD*)基因是植物特异性基因, 在横向器官发育中发挥着重要作用。Liu 等<sup>[41]</sup>通过 CRISPR-Cas9 技术敲除番茄中 *LBD* 基因家族的亚家族基因 II 中 *SILBD40* 基因, 该基因参与茉莉酸信号转导, 敲除后的转基因株系增强了番茄的耐旱性。Feng 等<sup>[42]</sup>以玉米中 *Zmzb7* 作为标记基因, 利用 CRISPR-Cas9 技术构建体转化到玉米原生质体中进行突变, 成功获得产生白化病表型的转基因株系。基于 CRISPR-Cas9 技术, 将玉米的异染色质区域和常染色质区域的基因突变效率比较后发现, 突变效率均在 50% 左右, 这表明 CRISPR-Cas9 系统的基因靶向突变效率与染色质的存在状态并无关联。

### 3.1.2 单基因多位点敲除

刘玉琛等<sup>[43]</sup>针对番茄 *SIAP3* 的外显子上 2 个带有前间区序列附近的靶点 Targ1 和 Targ2 构建 CRISPR-Cas9 表达载体, 序列对比分析发现 *SIAP3* 基因在 PAM 上游 1–9 bp 的碱基处均发生了缺失突变, 导致 *SIAP3* 蛋白序列上的氨基酸缺失及翻译提前终止, 从而获得番茄雄蕊同源异型不育株系。Cai 等<sup>[44]</sup>利用 CRISPR-Cas9 特异性靶向诱导大豆光周期开花途径中的基因 *GmFT2a*, 针对该基因设计了 3 个靶向内源性位点, 结果均发生蛋白翻译提前终止的移码突变, 所有突变体株系开花周期均发生延长。大豆中存在拟南芥重要开花调控 *AtSPL3* 同源基因 *GmSPL3*, 吴艳等<sup>[45]</sup>构建了 CRISPR-Cas9 四突变位点的敲除载体, 成功获得 *spl3abcd* 突变体,

对比表型发现, 在短日照环境下, *spl3abcd* 突变体植株出现叶片变小、节数减少、节间距缩短、株高变矮等表型, 这表明 *GmSPL3* 基因在调控大豆植株形态方面发挥重要作用。

### 3.1.3 多基因敲除

研究发现, 通过利用 CRISPR-Cas9 多基因敲除系统, 同时将多个基因作为靶基因, 可获得多个优良性状共存的植株以及研究各个基因间相互作用的关系<sup>[46]</sup>。多个优良性状植株的出现作为作物育种方面提供新的材料。

沈兰等<sup>[39]</sup>利用 CRISPR-Cas9 技术成功构建水稻中 8 个与农艺性状相关基因的共敲除载体, 发现其中 5 个与产量(*EP3*、*GS3*、*GW2*、*DEP1*、*Gn1a*)相关的基因、2 个与香味(*BADH2*)和光周期(*Hd1*)相关的基因、1 个与株型(*LPA1*)相关的基因, 此外还获得了纯合六突变株、七突变株、八突变株, 为作物育种发展进程中快速引入遗传多样性提供策略。在油菜中, 株高和分枝数是油菜植物重要的结构组成部分, 直接影响油菜的产量。Zheng 等<sup>[47]</sup>在油菜中通过 CRISPR-Cas9 靶向诱变敲除与拟南芥中 *MAX1* (调节株高及腋芽的生长) 基因同源的 2 个 *BnaMAX1* 基因, 突变效率高达 56.30%–67.38%, 获得分枝增加、株高半矮化的突变体株系, 有助于增加每株的产量。有研究者利用 CRISPR-Cas9 技术对甘蓝型油菜中的 2 个分枝相关基因 *BnaBRC1* 和 *BnaBRC2* 进行定点突变, *brc1* 突变体功能的缺失出现多分枝表型, 由此进一步证明 *BnaBRC1* 基因参与了油菜的分枝调控<sup>[48]</sup>。*TaQ* 基因的存在影响着小麦穗特征的发育。Liu 等<sup>[49]</sup>采用 CRISPR-SpCas9 对小麦 *TaAQ*、*TaDq* 基因进行编辑, 在  $T_1$  代中得到了纯合植株, *TaDq* 的敲除植株与野生型植株仅在株高上有差异, 而 *TaAQ* 敲除植物或 *TaAQ* 和 *TaDq* 共敲除植物相比野生型和 *TaDq* 敲除植株更脆。



### 3.2 CRISPR-Cas9 技术在基因敲入中的应用

CRISPR-Cas9 技术在基因敲除方面的应用最为广泛,大部分用于实现对靶基因进行特异性敲除进而降低基因的表达量,但是许多优良性状的改良常常需要提高基因的表达量得以实现,因此,研究者借助基因定点敲高或敲入达到基因表达量提高的目的。

基因敲高是在目标靶基因的附近插入增强子或启动子等调控元件,进而提高基因的表达量。*PPO1* 和 *HPPD* 是水稻中 2 种除草剂抗性基因,通过基因敲高除草剂相关抗性基因的表达可显著提高水稻对除草剂的抗性。但传统的转基因技术将目标靶基因整合到基因组时存在随机性。Lu 等<sup>[50]</sup>则通过 CRISPR-Cas9 技术双靶位点进行编辑,靶位点分别是 *PPO1* 基因附近的 *CP12* 高表达基因及其启动子, *HPPD* 基因附近的 *Ubiquitin2* 高表达基因及其启动子; 2 个靶位点则分别通过片段倒位使 *CP12* 基因启动子驱动 *PPO1* 基因高表达及片段重复使 *Ubiquitin2* 基因启动子驱动 *HPPD* 基因高表达,进而提高水稻对除草剂的抗性。

基因敲入是在基因组合适的位点插入目标基因,传统的基因敲入存在一定的随机性并可能会降低作物产量。而利用 CRISPR-Cas9 技术可实现在基因组安全港(genome safe harbor, GSH)发生定点基因插入,有效避免了新基因的插入对作物产量的影响。基因组安全港是基因组区域可以安全地容纳新基因,且不会导致细胞基因组发生其他可能对宿主细胞造成不利影响。Dong 等<sup>[51]</sup>通过 CRISPR-Cas9 技术在水稻的 2 个基因组安全港靶向插入一个 5.2 kb 的类胡萝卜素生物合成盒,成功获得了种子中类胡萝卜素含量高且对形态或产量方面无检测损失的无标记水稻植株。

### 3.3 CRISPR-Cas9 技术在基因调控中的应用

基因调控是生物体内控制基因表达的机制。基因调控发生在 3 个水平上,主要在 DNA 遗传水平上的调控发挥作用。CRISPR-Cas9 成为基因组调控技术中灵活性较强的系统之一。

Cas9 蛋白的剪切活性由 Ruv C 和 HNH 两个结构域决定,针对 2 个结构域的特征对 Cas9 蛋白进行基因突变修饰,促使 Cas9 蛋白核酸酶活性丧失但 DNA 序列识别功能保留,即 dCas9, dCas9 可与双链靶基因组结合, dCas9 特性类似于调控基因表达的转录因子,因此,研究人员将 dCas9 与转录激活/抑制蛋白相结合,进而达到激活或抑制基因转录的目的<sup>[52]</sup>。dCas9 单独存在时并不发挥作用<sup>[53]</sup>。虽然 dCas9 单独存在无法发挥作用,但它可以造成空间位阻现象,当 dCas9 结合在靶基因 DNA 序列的转录起始位点或启动子时,就可阻止转录起始的发生;当 dCas9 结合在靶基因的阅读框时,就可阻止 RNA 聚合酶的结合、转录因子结合及转录的延伸<sup>[54-55]</sup>。dCas9 与不同的转录激活因子结构域融合后会生成转录激活或转录抑制因子,其作用于内源基因组来激活或抑制基因组靶标的转录,进而控制基因的表达<sup>[56]</sup>。

sgRNA 引导 dCas9 的增加或减少来激活或抑制对基因组靶基因转录的调控,将 sgRNA 的靶点定位到启动子区域,可以更加高效地调控基因的表达<sup>[55]</sup>。转录激活结构域 VP64 与 dCas9 融合,与拟南芥启动子区 CpG 甲基化位点的 C 结合,促使 CpG 甲基化对 *AtFIS2* 基因转录的抑制作用得到解除<sup>[57-58]</sup>。Xing 等<sup>[59]</sup>利用 A3A-PBE 剪辑编辑器对草莓 *FvebZIPs1.1* 高度保守的上游的初级开放阅读框(open reading frame, ORF)进行编辑,产生了 7 个新等位基因,提高了草莓的甜度。Zeng 等<sup>[60]</sup>通过 CRISPR-dCas9 系统靶向控制淀粉合成基因 *Wx<sup>a</sup>* 的 5'UTR 内含子剪接位点



进行转录后调控,获得不同淀粉含量的突变体,为培育高品质水稻提供了新的方向。

除此之外,CRISPR-Cas9 也可在表观遗传水平上的染色质调控发挥作用,dCas9 与 DNA 甲基化酶、乙酰化酶融合后对基因进行修饰,或通过改变启动子与增强子之间的相互作用的强弱来改变染色质的结构进而调控基因的表达<sup>[55,61]</sup>。

### 3.4 CRISPR-Cas9 技术在基因组中的应用

CRISPR-Cas9 技术现已成为一种有效的基因编辑方法,利用该技术诱导有针对性地染色体重排(交叉、倒位和易位)在作物育种领域中具有较大的潜力。Filler 等<sup>[62]</sup>的研究证明 CRISPR-Cas 系统可通过诱导体细胞同源重组进行修复,进而实现靶向交叉。2019 年, Schmidt 等<sup>[63]</sup>在卵细胞特异性启动子的引导下,使用金黄色葡萄球菌的 Cas9 同源物在拟南芥中第一次成功诱导高达 18 kb 的可遗传倒位。在后续研究中,他们同样使用之前的研究工具成功逆转了在拟南芥中 1.17 Mb 的染色体倒位<sup>[64]</sup>。

在最近研究中, Beyer 等<sup>[65]</sup>首次利用 CRISPR-Cas 技术靶向对拟南芥 1 号染色体和 2 号染色体及 1 号染色体和 5 号染色体之间诱导发生相互易位。由 RNA 所引导的 Cas9 内切酶在特定靶基因序列处进行切割,会产生双链断裂的一种内在细胞的修复途径。而不精确地修复会导致染色体的插入、缺失或点突变。在果蝇中检测到 Cas9 介导的基因编辑通常会导致染色体臂的交换<sup>[66]</sup>。运用 CRISPR-Cas9 技术可实现染色体的大片段缺失,这为血液系统肿瘤发生、发展中的机制研究提供新的技术支持。程丽华等<sup>[67]</sup>利用 CRISPR-Cas9 技术成功构建了能使 Alox3-Alox12b-Alox8 基因簇发生缺失的慢病毒质粒载体,经 PCR 检测验证了该基因簇的片段缺失。工程化的 CRISPR-Cas9 是用于编辑真核生物基因组最有效且常用的工具,尤其在农作物中应用

广泛。Li 等<sup>[68]</sup>证明该系统应用在植物中会产生大片段染色体的缺失,可用于染色体片段的遗传分析、生物过程中基因功能的研究。

## 4 CRISPR-Cas9 技术在作物育种中的应用

CRISPR-Cas9 技术的应用具有高效、特异性和广谱性,所以备受研究者的关注和青睐,大量研究结果证实该技术适用于多种作物,如水稻、小麦、玉米、大豆、马铃薯等。其中,在水稻育种中的应用最为广泛(表 2)。通常通过提高作物产量、改良作物品质、获得生物和非生物抗性、获得优良性状材料及驯化等方面对作物进行针对性改良。

### 4.1 在水稻中的应用

我国是世界上最大的水稻(*Oryza sativa* L.)生产国和消费国之一,“绿色革命”将我国水稻育种研究推向了一个更高的水平。如何突破传统的遗传育种技术,实现更加高效精确的分子育种是我国粮食安全以及农业可持续性发展面临的主要问题<sup>[120]</sup>。CRISPR-Cas9 技术作为一种新型高效的基因组定点编辑技术,近年来在水稻作物育种改良方面备受研究者的青睐。

种子萌发率、分蘖数、每穗粒数及千粒重等都是决定水稻产量的关键指标,通过编辑相关基因达到提高水稻产量的目的。赤霉素(gibberellins, GA)是一种重要促生长植物激素,能解除种子休眠并刺激萌发,而 DELLA 蛋白在 GA 的信号通路中起抑制作用, *SLR1* 基因编码 DELLA 蛋白。耿敏等<sup>[35]</sup>利用 CRISPR-Cas9 技术构建水稻 *OsSLR1* 敲除突变株, *slr1* 相对于野生型日本晴在播种后提高了萌发率和生长速度。千粒重由籽粒中淀粉的合成和积累量及籽粒大小所决定,是典型的数量性状,水稻千粒重是预测产量的重要依据。*TGW6* 基因编码吡哆-3-乙酸-葡萄糖水解酶,其等位基

因功能的丧失通过对源器官多效性的影响导致水稻谷物重量的增加, 进而提高水稻的产量<sup>[69]</sup>。王加峰等<sup>[70]</sup>对水稻 *TGW6* 基因的外显子进行靶向编辑, 通过 CRISPR-Cas9 技术进行三位点突变,

突变后植株的千粒重增加 5%, 为培育高产型水稻奠定基础。*FWL2* 基因广泛存在于植物中且负调控细胞的分裂来控制器官和果实的大小<sup>[71]</sup>。王玲玲<sup>[72]</sup>采用 CRISPR-Cas9 技术针对水稻穗粒数

表 2 CRISPR-Cas9 技术在作物育种中的应用

Table 2 Application of CRISPR-Cas9 technology in crop breeding

Species	Target gene	Gene function	Mutation model	References
Rice	<i>OsSLR</i>	GRAS-domain protein	Gene knock-out	[35]
	<i>TGW6</i>	Thousand-grain weight 6	Gene insertion or deletion	[69-70]
	<i>OsFWL2</i>	Rice grain number regulation gene	Gene knock-out	[72]
	<i>OsBadh2</i>	Betaine aldehyde dehydrogenase	Gene insertion or deletion	[74-75]
	<i>Waxy/Wx</i>	Granule-bound starch synthase; waxy gene	Gene knock-out	[77]
	<i>OsAPP6, OsAPP10</i>	Amino acid transporter gene	Single base insertion or deletion, large fragment deletion	[79]
	<i>OsERF922</i>	ERF transcription factor	Gene insertion, deletion or replacement	[81]
	<i>HW3</i>	Bacterial blight susceptibility gene	Gene knock-out	[83]
	<i>Os-8N3/OsSWEET11</i>	Bacterial blight resistance 13	Gene knock-out	[85]
	<i>AFP1</i>	Enhancing abiotic stress resistance genes in rice	Small fragment deletion or replacement	[87]
	<i>OsALS</i>	Acetolactate synthase gene	Gene replacement	[89-90]
	<i>OsNramp5</i>	Cadmium, manganese transporter	Gene knock-out	[92]
	<i>TMS5</i>	Temperature sensitive male sterility gene	Gene insertion or deletion	[93]
	<i>PTGMS2-1</i>	Male fertility gene	Gene insertion or deletion	[94]
	<i>ZEPI</i>	The central element of the synaptonemal complex	Gene knock-out	[95]
Wheat	<i>MLO</i>	Powdery mildew resistance genes	Gene insertion	[96]
	<i>TaGASR7</i>	amylopectin synthesis gene	Gene insertion or deletion	[97]
	<i>TaSBEIIa</i>	Glucose-methanol-choline oxidoreductase	Single base C-T substitution	[100]
	<i>EDR1</i>	Negative regulation of powdery mildew resistance	Gene knock-out	[101]
	<i>TaNPI</i>	Glucose-methanol-choline oxidoreductase	Construct three-knock carrier	[102]
Maize	<i>ALS2</i>	Acetylactate synthase	Gene insertion or deletion	[105]
	<i>ARGOS8</i>	Ethylene reaction negative regulator	Gene insertion	[106]
	<i>ZmBADH2-1/ZmBADH2-2</i>	Betaine-aldehyde dehydrogenase	Double knock-out	[107]
	<i>MS26, 45</i>	Male sterility gene	Gene replacement	[108]
Soybean	<i>GmNARK</i>	Receptor kinase	Gene knock-out	[110]
	<i>GmFAD2-1A</i>	12 fatty acid desaturase 2	Gene deletion and replacement	[112]
	<i>GmFATB1</i>	Free fatty acids and acyl carrier proteins are released	Gene deletion	[113]
	<i>GmSnRK1.1/GmSnRK1.2</i>	Sucrose non-fermentation-related kinase	Double knock-out	[114]
Potato	<i>StSSR2</i>	Sterol side chain reductase 2 gene	Gene knock-out	[117]
	<i>VInv</i>	acid vacuolar invertase gene	Gene knock-out	[117]
	<i>GBSSI</i>	Granules bind starch synthase gene	Gene knock-out	[117]
	<i>GBSS</i>	Granules bind starch synthase gene	Gene knock-out	[118]
	<i>S-RNase</i>	S-locus RNase gene	Premature termination of translation	[119]

调控基因 *OsFWL2* 构建敲除载体, 在  $T_1$  代分离获得无 T-DNA 插入的纯合突变体, 培育出二次枝梗数、穗粒数和单株产量显著增加的株系, 为水稻产量的提高提供了新的种质。

通过编辑水稻稻米香味、控制直链淀粉和谷氨酸的相关合成基因的表达可以改善稻米的口感和品质。稻米中香味的主要成分是 2-乙酰基-1-吡咯啉(2-acetyl-1-pyrroline, 2AP), 其合成前体 4-氨基丁醛会被 *OsBADH2* 蛋白氧化后失去活性, 其香味主要受一个隐性基因 *Badh2* 控制<sup>[73]</sup>。邵高能等<sup>[74]</sup>和祁永斌等<sup>[75]</sup>利用 CRISPR-Cas9 技术分别对中花 11 和常规品种中的 *OsBadh2* 进行编辑, 均成功获得 2-AP 含量增加、香味性状明显改善的突变株系, 为香味型水稻的育种提供新的种质资源。直链淀粉的含量是影响水稻食用品质的关键组成成分, 水稻蜡质基因(*Waxy*, *Wx*)编码颗粒结合型淀粉合成酶(granule-bound starch synthase, GBSS)能直接控制稻米直链淀粉的合成<sup>[76]</sup>。冯璇等<sup>[77]</sup>利用 CRISPR-Cas9 技术对水稻优良保持系 209B 中的 *Wx* 位点进行定点编辑, 获得了直链淀粉含量仅为 1% 的糯稻纯合保持系 WX209B, 纯合突变率高达 26.9%, 进而转育成糯稻不育系 WX209A, 证明了多靶点基因编辑技术能够提高纯合突变率且纯合突变体可以稳定遗传。谷物蛋白质含量(grain protein content, GPC)是谷物质量的重要决定性因素。利用 CRISPR-Cas9 技术靶向编辑氨基酸转运体基因 *OsAAP6*、*OsAAP10*, 结果发现在 4 个遗传背景不同的品种中, 均可不同程度地导致谷氨酸蛋白含量的降低( $T_1$  代 GPC 下降 2.9%–19.1%,  $T_2$  代 GPC 下降 1.5%–10.4%), 进而提高水稻品质<sup>[78–79]</sup>。

稻瘟病和白叶枯病严重限制了水稻的生长, 也造成了水稻稻米产量的损失。CRISPR-Cas9 通过对易感基因进行基因编辑获得抗病性水稻。*OsERF922* 编码乙烯反应 AP2/ERF 转录因子,

受稻瘟病菌的强烈诱导, 对稻瘟病抗性起负调控作用<sup>[80]</sup>。Wang 等<sup>[81]</sup>通过 CRISPR-Cas9 靶向突变水稻 *OsERF922* 基因在不影响主要农艺性状的前提下增强了水稻稻瘟病抗性, 为水稻育种提供了新的种质资源。徐鹏等<sup>[82]</sup>利用 CRISPR-Cas9 技术, 以 *Pita*、*Pi21* 和 *ERF922* 为靶基因构建共编辑表达载体, 成功获得了对稻瘟病抗性增强且稳定遗传的三突变纯合株系, 在水稻育种方面具有较高的应用价值。水稻白叶枯病由黄单胞杆菌水稻致病变种(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Xoo)所引起, 是水稻生产中危害最严重的病害之一, 能导致水稻高达 50% 产量的减少, 增强水稻对 Xoo 的抗性和管理水稻白叶枯病的一种有效经济的方法。郝巍<sup>[83]</sup>利用 CRISPR-Cas9 技术对水稻白叶枯病感病相关基因 *HW3* 第一个外显子选定 2 个靶位点构建表达载体, 成功获得抗白叶枯病植株, 田间接种表型的调查结果显示, *HW3* 基因突变产生的抗病表型能稳定遗传。Xoo 的一个效应子通过转录激活水稻中 *Os-8N3* (*Xa13*)而引起白叶枯病。*Os-8N3* 是 TAL 效应体诱导的易感基因之一, *Os-8N3* 可以调节由 Xoo 引起在木质部导管中增殖和扩散的有毒铜重新分配, 并使 Xoo 的生长易于获得营养物质进而引起疾病<sup>[84]</sup>。Kim 等<sup>[85]</sup>利用 CRISPR-Cas9 技术靶向敲除水稻 *Os8N3* 基因, 在不影响基本农艺性状的基础上得到了水稻对单胞菌 pv 抗性增强且花粉育性也未受到影响的突变株, 这对水稻增强感病基因抗性具有现实意义。

非生物胁迫是水稻生长发育的主要因素之一, 温度、干旱、杂草以及重金属等非生物胁迫都可能导致水稻大面积减产。CRISPR-Cas9 技术是提高水稻的非生物胁迫抗性的有效方法之一。由于全球气候变暖, 导致耕地干旱频率的发生不断增加, 干旱已然成为影响水稻产量的重要非生物胁迫之一<sup>[86]</sup>。周天顺等<sup>[87]</sup>利用 CRISPR-Cas9

技术对 *AFPI* 进行敲除,结果突变体株系对 ABA 的敏感性和叶片水分散失率降低,而耐旱性、耐热性以及渗透胁迫能力增强。*OsALS* 基因编码乙酰乳酸合酶,已有研究表明 *OsALS* 中特定氨基酸突变后可提高对乙酰乳酸合酶类咪唑啉酮除草剂(imidazolinone, IMI)的耐受性<sup>[88]</sup>。*ALS* 基因的功能缺失性突变会致死,所以获得 *ALS* 突变的非功能缺失基因至关重要,Wang 等<sup>[89]</sup>对 CBE 系统进行优化后大大提高了碱基编辑效率并扩大在水稻中的编辑范围,成功在 *ALS* 基因的第 1 882 位的核苷酸实现了 C-T 的碱基替换,突变后的突变株表现出对 IMI 除草剂强的耐受性。Wang 等<sup>[90]</sup>同样通过 CRISPR-Cas9 技术对 *OsALS* 进行突变,在第 1 882 位的核苷酸发生 C-T 替换的同时形成一种新的水稻抗除草剂等位基因 *G628W*,该基因的表达增加了水稻对除草剂的耐受能力。经后代鉴定和对表型调查显示,等位基因 *G628W* 的无转基因后代除株高降低外,其余性状与野生型植株并无差异。水稻是一种极易富镉的作物,过量镉的摄入会严重危害人类健康,*OsNramp5* 基因编码一种镉和锰的转运蛋白,影响根中镉的吸收及分布,其功能的缺失极大地降低了根对镉的吸收和积累<sup>[91]</sup>。龙起樟等<sup>[92]</sup>构建 *OsNramp5* 基因 CRISPR-Cas9 敲除载体转基因株系,显著降低了镉的积累,在非镉污染环境下种植的 4 个品种 *OsNramp5* 基因敲除株系籽粒中镉含量均低于 0.02 mg/kg,较野生型平均降低 85.5%;而在镉污染土壤中种植时,不同品种 *OsNramp5* 敲除株系籽粒中镉含量均低于 0.1 mg/kg,比野生型平均降低 94.8%。

雄性不育系是传统杂交稻育种的核心,传统杂交育种具有周期长、劳动强度大等缺点,而利用 CRISPR-Cas9 技术敲除水稻生育相关基因,经过 1-2 代选育就可快速获得非转基因雄性不育系,加速水稻的育种<sup>[93]</sup>。Shen 等<sup>[94]</sup>通过

CRISPR-Cas9 技术以两个籼稻品种 9311 和华占的雄性生育基因 *PTGMS2-1* 构建表达载体,成功获得光周期/热敏感基因雄性不育系水稻,温度是该突变体花粉生育力恢复的主要因素。Liu 等<sup>[95]</sup>使用 CRISPR-Cas9 技术,在水稻中构建 *ZEP1* 基因敲除载体,产生了 *ZEP1* 的无效突变体,无效突变体表现出绝对的雄性不育但雌性育性正常,经遗传分析,发现在没有 *ZEP1* 的情况下,基因重组效率大大提高,遗传所产生的干扰完全消除,同时该突变体的产生为增加作物育种的遗传多样性提供了新方法。

## 4.2 在小麦中的应用

小麦属于异源六倍体,是世界上第二大粮食作物,为人类提供约 20%的能量,由于其基因组较为庞大,育种也受到一定程度的影响。CRISPR-Cas9 技术的高效性和特异性很好地解决了这一难题。研究人员对小麦通过 CRISPR-Cas9 技术定点突变,获得稳定遗传的优良性状突变体,这为 CRISPR-Cas9 技术在小麦育种方面的研究奠定基础<sup>[96]</sup>。与谷类粮食作物水稻类似,千粒重相关基因同样也影响小麦的产量,调控千粒重相关基因的表达对小麦的产量起着关键作用。Zhang 等<sup>[97]</sup>通过与 *TaGASR7* 基因的 3 个同源物,基于 CRISPR-Cas9 技术对 DNA 或 RNA 介导的瞬时表达通过粒子轰击引入六倍体面包小麦和四倍体硬粒小麦的愈伤组织,在  $T_0$  代获得千粒重显著增加的突变体。

过多谷蛋白的摄入会引起小肠损伤和炎症,易感人群还会出现营养不良、贫血、骨质疏松等并发症疾病,因此,在不影响产量的前提下有效降低小麦中谷蛋白的含量显得尤为重要。Sánchez-León 等<sup>[98]</sup>利用 CRISPR-Cas9 技术通过以小麦谷蛋白免疫显性表位编码序列附近相邻的保守区域作为靶位点,精确有效地减少了小麦中谷蛋白的含量,获得了低谷蛋白、非转基因小

麦。抗性淀粉是在健康人群小肠中一种不被吸收的淀粉,但抗性淀粉具有控制血糖、预防肠道疾病以及促进维生素和矿物质吸收等功能<sup>[99]</sup>。抗性淀粉的合成途径与直链淀粉的合成途径类似且存在显著的正相关关联,*SBE* 是直链淀粉合成途径中的关键调控基因,通过抑制 *SBE* 基因的表达会使小麦中抗性淀粉的含量增加,通过介导 CRISPR-Cas9 技术构建水稻基因 C-T 单碱基基因编辑载体,对 *TaSBEIIa* 淀粉分支酶基因进行基因敲除,获得了高抗性淀粉含量的冬春小麦新种质资源<sup>[100]</sup>。

小麦白粉病是一种由真菌引起的病害,天气干燥时极易发生,严重时还会导致小麦产量大幅度减产。*MLO* (mildew resistance locus O)是植物特异性家族基因,*mlo* 突变体对白粉病真菌具有有效且持久的广谱抗性。王延鹏等<sup>[96]</sup>利用 CRISPR-Cas9 技术对小麦白粉病易感基因 *MLO* 进行定向突变,成功创制出对白粉病具有广谱抗性的小麦品种,为小麦白粉病的抗病育种研究提供重要的初始材料。除此之外,*EDR1* 基因已被证实对小麦白粉病具有调控作用,Zhang 等<sup>[101]</sup>利用 CRISPR-Cas9 技术,同时修饰小麦 *EDR1* (enhanced disease resistance 1)基因的 3 个同源物获得了 *Taedr1* 小麦植株,通过对其进行病毒诱导或 RNA 干扰增强了小麦对白粉病的抗性,同时在 *Taedr1* 小麦植株中没有发现由于霉菌诱导而出现的细胞死亡,因此 CRISPR-Cas9 技术应用在抗逆性的研究育种中具有潜在的应用价值。

在杂交育种中,小麦的雄性不育基因及其突变体为杂交种子的生产提供宝贵的资源,雄性不育系可作为母本以此来提高后代种子的纯度,进而克服人工授粉的困难。小麦是异源六倍体,利用传统杂交方法获得核隐性雄性不育突变体相对困难,而 CRISPR-Cas9 技术可实现对多个同源等位基因同时突变,进而获得雄性不育突变体

植株<sup>[102-103]</sup>。*TaNP1* 基因在水稻和玉米中的同源基因分别为 *OsNP1* 基因和 *ZmIPE1* 基因,编码葡萄糖-甲醇-胆碱氧化还原酶,可调节绒毡层的退化和花粉外壁的形成。*osnp1* 和 *zmipe1* 突变体均表现为完全雄性不育,Li 等<sup>[102]</sup>利用 CRISPR-Cas9 技术,对 *TaNP1* 同源等位基因进行编辑修饰,获得 *TaNP1* 三重纯合突变导致完全雄性不育的突变小麦。

### 4.3 在玉米中的应用

玉米是禾本科植物,是仅次于水稻和小麦的第三大谷类作物,其种植面积广泛,相较于传统育种 CRISPR-Cas9 技术具有特异性强、育种周期短等优势,该技术的应用极大地推动了优良性状玉米品种的开发<sup>[104]</sup>。

CRISPR-Cas9 技术主要用来提高玉米非生物胁迫抗性来提高玉米的品质。Svitashev 等<sup>[105]</sup>针对玉米中一个编码乙酰乳酸合酶的基因 *ALS2*,运用 CRISPR-Cas9 技术构建单链寡核苷酸或双链 DNA 载体作为修复模板成功获得耐氯磺隆的株系。耐旱性是衡量玉米产量的一个重要指标,Shi 等<sup>[106]</sup>以玉米乙烯反应的负调节剂天然基因 *ARGOS8* 的启动子区域为靶点,通过 CRISPR-Cas9 技术将 *GOS2* 启动子替换 *ARGOS8* 的启动子或插入到 *ARGOS8* 基因的 5'-非翻译区,获得了耐旱且产量提高的玉米品种。

随着生活水平的提升,人类对玉米的食用口感和品质的需求也不断提高,香味是作物的食味品质之一,基于 CRISPR-Cas9 技术对玉米香味负调控基因进行敲除可获得香味型玉米。*BADH2* 基因编码甜菜碱醛脱氢酶,*BADH2* 的突变会抑制香味物质 2-AP 的合成。张翔等<sup>[107]</sup>通过构建 *ZmBADH2-1* 和 *ZmBADH2-2* 香味基因的 CRISPR-Cas9 共敲除载体,成功创制出在玉米籽粒中就具有香米味道的玉米新品种。

雄性不育株系作为育种的重要材料,

CRISPR-Cas9 技术在培育雄性不育株系方面存在巨大的潜能。Svitashev 等<sup>[108]</sup>基于 CRISPR-Cas9 技术在相同的 4 个基因组区域, 针对玉米中 *liguleless-1* (*LIG*)、乙酰乳酸合酶(*ALS2*)以及 2 个雄性生育(*MS26* 和 *MS45*)基因, 体外预组装纯化 Cas9 蛋白靶向转录 gRNA, 使用氢基因枪对玉米未成熟的胚胎细胞进行粒子轰击。通过与总基因组 DNA 传递实验比较后发现, 轰击前后二者的突变频率、突变类型基本一致, 而 RNP 传递的脱靶率以及纯合突变率显著降低。

#### 4.4 在大豆中的应用

豆科植物种类繁多, 大豆作为主要的豆科植物之一, 是我国重要的粮食和油料作物, 其营养价值丰富、生理活性强, 也是人类植物蛋白质的主要来源, 具有较高的营养和经济价值, 用途极其广泛。同时, 随着人类生活水平质量的不断提高, 利用 CRISPR-Cas9 技术快速培育高产、优质的大豆品种具有现实意义。

氮元素是植物生长发育的基本元素之一, 保证植物正常摄入和利用氮元素, 对农业的发展至关重要。根瘤作为根瘤菌与豆科植物的共生体, 二者形成互利共生关系, 其固氮量占豆科植物固氮量的 77%, 它可以转化大气中的氮气, 进而为植物生长发育提供氮营养。因此, 大豆的生物固氮作用也为农业生产的可持续发展提供重要保证。根瘤的存在为豆科植物的生长提供了丰富的氮元素营养, 但由于生物固氮作用是非常耗能的过程, 所以过多根瘤的存在会成为大豆生长的负担, 因此控制根瘤的数目就显得尤为重要<sup>[109]</sup>。在豆科植物中提出一种负反馈调节机制-结瘤自主调控机制(*autoregulation of nodulation, AON*), 主要通过根-茎-根之间的长距离信号传导来实现对根瘤数量的控制。根据目的基因 *GmNARK* 设计 3 条 sgRNA, 构建 CRISPR-Cas9 敲除载体, 获得具有超结瘤、叶片深绿、植株矮小表型的

突变体, 为研究大豆中结瘤固氮机制提供重要的遗传材料, 同时提供新型大豆分子育种种质资源<sup>[110]</sup>。

通过 CRISPR-Cas9 技术构建大豆油酸、饱和脂肪酸、蛋白质等相关合成基因敲除载体, 是获得优质大豆油的关键所在<sup>[111]</sup>。油酸是一种单不饱和  $\omega$ -9 脂肪酸, 大量存在于动植物体内, 具有降低有害胆固醇、缓解心血管疾病、防止脂肪硬化的作用。所以, 培育高含量油酸的大豆对人体健康具有重要意义。12-脂肪酸去饱和酶 2 (*fatty acid desaturase 2, FAD2*)是催化油酸形成亚油酸的关键酶, *FAD2* 酶的存在会大大降低油酸的含量, 因此, 通过降低或抑制 *FAD2-1A* 基因的表达, 可提高大豆种子中油酸/亚油酸的比例。针对大豆油酸基因 *GmFAD2-1A*, 构建 3 个长 20 bp 的 gRNA 靶点的 CRISPR-Cas9 编辑载体并通过农杆菌介导的方法转入华夏 3 号大豆材料中, 其突变体株系对种子中总蛋白和总脂肪的含量没有影响, 但其种子中的油酸含量高达 23%<sup>[112]</sup>。人类如果摄入过量的饱和脂肪酸, 就会引起胆固醇的升高, 增加脂肪硬化的风险。*FATB* 蛋白是一种硫酯酶, 具有释放酰基载体蛋白和游离脂肪酸的作用, 其释放后的游离脂肪酸会参与脂肪酸链的合成与延长, Ma 等<sup>[113]</sup>鉴定了一对大豆 *FATB* 编码基因 *GmFATB1a* 和 *GmFATB1b* 并通过 CRISPR-Cas9 技术对其进行敲除, 敲除株系种子中棕榈酸和硬脂酸的含量显著降低, 同时有益脂肪酸亚油酸的相对含量增加了 1.3%–3.6%, 为大豆在育种中提供优良的遗传材料。

大豆产量还受到非生物胁迫的影响, 利用 CRISPR-Cas9 技术敲除大豆非生物胁迫相关敏感基因对大豆的生长和产量具有现实意义。蔗糖非发酵相关激酶(*sucrose non-fermenting related protein kinases, SnRKs*)是广泛存在于植物中的

一类丝/苏氨酸蛋白激酶,在植物的生长、发育、代谢和抗逆等方面发挥着不可替代的作用。*GmSnRK1.1* 和 *GmSnRK1.2* 是 *SnRK1* 的 2 个主要表达同源基因,参与大豆多种抗逆途径的调控。利用 CRISPR-Cas9 技术构建 *GmSnRK1.1* 和 *GmSnRK1.2* 双基因敲除突变体,结果显示突变体植株降低了对 ABA 的敏感性及对碱胁迫的耐性<sup>[114]</sup>。

#### 4.5 在马铃薯中的应用

马铃薯是我国乃至世界的重要粮食作物,具有较高的营养价值,因其淀粉含量极高,马铃薯是淀粉生产的重要原材料。马铃薯属于多倍体作物,现种植的多以四倍体为主,由于其遗传背景复杂、同源四倍体和高度杂合影响了种子的发育和育种。传统的育种方法周期长、可预见性低,无法满足现代需求。而利用现代育种手段 CRISPR-Cas9 技术可以有效地改善这一现状,加速马铃薯的育种进程<sup>[115]</sup>。

马铃薯中淀粉的含量及性质随直链淀粉与支链淀粉比例的变化而变化,因此,通过改变马铃薯中直链淀粉与支链淀粉的比例或使其仅含有一种淀粉将促进马铃薯的育种优势<sup>[116]</sup>。赵国超<sup>[117]</sup>在马铃薯中利用 CRISPR-Cas9 技术同时敲除马铃薯龙葵素合成关键基因甾醇侧链还原酶 2 基因(*St SSR2*)、在低温糖化中起关键作用的酸性液泡转化酶基因(*VInv*)以及直链淀粉合成相关的颗粒结合型淀粉合成酶基因(*GBSS I*),获得了低龙葵素、抗低温糖化或支链淀粉含量高的马铃薯新品系。基因敲除马铃薯株系在表型、生理指标和块茎产量未产生明显的影响,适合农耕田间种植。Andersson 等<sup>[118]</sup>将马铃薯颗粒结合淀粉合成酶基因 *GBSS* 作为靶标基因,利用 CRISPR-Cas9 技术构建靶向敲除载体,结果发现,GBSS 酶活性的降低导致直链淀粉合成改变的淀粉和直链淀粉与支链淀粉的比例伴随增加。

马铃薯属于四倍体植物,四倍体的特性严重阻碍了马铃薯的育种进程。因此,研究人员尝试将自交亲和性引入二倍体种质,促使马铃薯的育种可以转变为二倍体自交或  $F_1$  杂交品种育种的近交系。Enciso-Rodriguez 等<sup>[119]</sup>利用 CRISPR-Cas9 技术靶向 *S-RNase* 基因的保守外显子区域,成功获得了稳定的自交性亲和的马铃薯二倍体株系,加快了马铃薯的育种进程。

#### 4.6 在作物驯化中的应用

目前,在农业生产进程中,人们对粮食作物的培育主要集中在高产、稳产、营养、易栽培和抗逆等方面,这就使得主要栽培作物品种的资源 and 遗传多样性显得尤为匮乏,而部分野生作物天然具有良好的抗逆性和蕴含较高的营养价值便成为新作物选育的目标。但是,通过传统的育种方法来驯化野生作物需要耗费大量的时间和精力,无法适应当下快速发展的农业需求。利用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术,对野生作物中多个有益基因进行同时编辑,大大加速了对野生作物的驯化进程。

Li 等<sup>[121]</sup>使用 CRISPR-Cas9 技术对野生番茄从头驯化,获得了具有驯化表型但无 Cas9 后代株系且保留了野生番茄的抗病性和耐盐性。Zsögön 等<sup>[122]</sup>基于 CRISPR-Cas9 技术设计了一种基因组工程策略,将理想性状与野生品种中天然的有用性状相结合,对 6 个位点进行编辑,使野生番茄从头驯化,最终得到果实大小增加 3 倍、果实数量增加 10 倍的优良株系。Zhu 等<sup>[123]</sup>利用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术对多倍体高秆野生稻的多种优良性状进行定向编辑改造,该技术在保留野生作物优良性状的同时大大加快了从头驯化的进程,同时也避免了传统驯化方法所需的长时间杂交和基因自然突变的选择。Yu 等<sup>[124]</sup>通过利用 CRISPR-Cas9 技术对水稻“绿色革命”基因 *sd1* 编辑获得 6 个独立的突变体,其中粒长



显著增加,另一方面也证明了该技术可直接促进野生异源四倍体水稻的改良。该项技术的开发加速了对野生作物的驯化。

## 5 CRISPR-Cas9 技术目前面临的问题

### 5.1 技术问题

#### 5.1.1 产生脱靶效应

CRISPR-Cas9 技术依靠 sgRNA 的识别序列与靶向序列特异性结合发挥作用。其脱靶效应主要是由于基因组较复杂,sgRNA 也会与基因组中非靶位点相似序列识别后匹配,导致脱靶效应的产生,这是主要原因之一。产生脱靶效应的另一原因是 Cas9 蛋白可能会识别非标准 PAM。CRISPR-Cas9 基因编辑系统理论上依靠 Cas9 对 PAM 位点上游 3 个碱基处进行切割。但在实际情况中,Cas9 蛋白既能识别靶标位点附近的标准 PAM (序列为 NGG),也能识别非标准 PAM (序列为 NAG),研究者在设计靶向序列时常会忽略非标准 PAM 的存在,这也会在一定程度上引起该技术的脱靶<sup>[125]</sup>。

#### 5.1.2 外源基因干扰

CRISPR-Cas9 技术通常通过由农杆菌所介导的转化方式侵染植物以得到突变株系,当携带 sgRNA 和 Cas9 的编辑载体时,一些载体片段存在随机整合到植物基因组 DNA,从而导致外源基因的引入。外源基因成分的存在会造成一系列无法预料和难以解决的生物安全问题<sup>[126]</sup>。像一些通过有性世代遗传分离的作物如水稻,研究者可在子代中筛选鉴定无外源基因成分的植株,但像马铃薯等一些不经有性世代遗传分离的作物,就无法避免外源基因成分残留的现象<sup>[127]</sup>。因此,通过将编辑载体的元件以核糖核蛋白的形式作为元件进行装载并应用到不经有性世代遗传分离的作物中去,从源头上切断外源基因的

引入<sup>[109,128]</sup>。但此方法的操作难度较大,需要不断寻找合适的方法对其进行优化,以此提高效率适应更多作物的应用。

Liu 等<sup>[129]</sup>开发了一种 web 应用工具:外源成分检测器(foreign element detector, FED),基于全基因组测序数据来表明外源载体成分信息。它包括一个由 26 921 个向量序列组成的向量序列库,可一次性完成对 46 695 种不同外源元素序列的检测。由于其具有较高的灵敏度和准确性,FED 可精确地检测出外源成分片段长度及所在基因组的位置,大大提高了对基因组编辑产品的检测效率。

### 5.2 监管问题

目前,由 CRISPR-Cas9 技术所引发的作物监管问题主要是 CRISPR-Cas9 技术在应用于作物时会引入外源基因成分,进而导致生物安全问题。CRISPR-Cas9 技术是通过细胞自身的修复实现突变,与作物的自然突变、化学物理诱变非常相似,但实质尚未明确<sup>[130]</sup>。世界各国对 CRISPR-Cas9 基因编辑技术仍缺乏一致和明确的监管政策。2016 年,美国农业部决定,不含外源 DNA 基因编辑的蘑菇和玉米不受传统转基因政策的监管,而欧盟将基因编辑作物归为转基因作物。我国于 2001 年颁布、2017 年修订的《农业转基因生物安全管理条例》中第三条规定:“本条例所称的农业转基因生物是指利用基因工程技术改变基因组构成,用于农业生产或农产品加工的动植物、微生物及其产品”。基因编辑技术是基因工程技术之一,所以按上述条例规定,基因编辑作物应当按转基因生物进行监督管理。但目前对于基因编辑作物的监管具体措施还未颁布。除此之外,一些中国学者对不含外源 DNA 的 CRISPR-Cas9 基因编辑作物的监管有争议,按传统的转基因生物进行监管会阻碍该技术的发展,因此,完善基因编辑作物相关监管政策有

利于基因组编辑技术在作物育种中的应用<sup>[131]</sup>。

### 5.3 递送问题

CRISPR-Cas9 基因编辑技术需借助递送系统进入到生物体内才能发挥编辑作用,如何将编辑元件高效地递送到生物体内将会直接影响编辑效率。目前最常用的传统递送系统主要有:生物学介导的递送(农杆菌、病毒作为介导)、非生物介质的递送、粒子轰击(基因枪)递送等方式,以及近年发展起来的新型纳米技术递送系统<sup>[132]</sup>。

在植物遗传转化研究中最常用的递送工具是由生物学所介导,但由于其宿主范围受到限制,仅适用部分植物物种且还面临着如何高效地将外源基因整合到宿主基因组中的困难。粒子轰击常通过基因枪或借助外力递送到植物物种或细胞中,但该种方式的递送存在一定的局限性,经常由于不当的外力操作而导致植物物种组织受到损伤<sup>[133]</sup>。由于传统的递送系统具有宿主范围限制、外力不可控、效率低等缺点,因此,近年在研究领域中,纳米材料作为递送系统载体备受研究学者的青睐和关注。

目前,纳米材料作为遗传疾病、癌症治疗及靶向给药递送载体在医学领域广泛应用。基于不同的材料研究者们开发出了不同的纳米递送载体,主要包括二氧化硅纳米颗粒(mesoporous silica nanoparticle, MSN)<sup>[134]</sup>、壳聚糖络合物单壁碳纳米管(carbon nanotube, CNT)<sup>[135]</sup>、分层双氢氧化物黏土纳米片(layered double hydroxide, LDH)<sup>[136]</sup>以及磁性纳米颗粒(magnetite nanoparticle, MN)<sup>[137]</sup>等。MSN 作为递送载体将蛋白质通过生物学方法递送至植物细胞的选择基因或报告基因处,其可避免产生精准修饰的“非转基因植物”<sup>[134]</sup>。CNT 在不借助生物学或化学的帮助下,有选择性地将质粒 DNA 递送到不同植物物种中的叶绿体中发挥边际作用<sup>[135]</sup>。无毒、可降解的 LDH 纳米片可促进 dsRNA 在烟草

细胞中的递送<sup>[136]</sup>。载有磁性的纳米颗粒可将外源 DNA 在磁场的存在下递送至花粉中,通过磁化方式对花粉授粉,转基因作物也由此而来<sup>[137]</sup>。对于一些难以通过传统的生物学方法进行遗传转化的植物物种,纳米颗粒递送技术是一种有效的办法,解决了 CRISPR-Cas9 基因编辑技术的递送问题。

相较于传统的转基因递送方法,纳米颗粒技术的开发为基因编辑技术在各种作物中的递送提供了有利的基础条件。首先,纳米颗粒技术不再受到宿主的限制,根据材料的特性有选择性地高效地在植物物种细胞中进行递送,在实现高效递送的同时还能将生物分子有目标地递送到目标处发挥其编辑作用。

## 6 CRISPR-Cas9 技术展望

自 1987 年以来研究者在大肠杆菌基因组中发现一段规律间隔特殊的重复序列,到 2012 年 CRISPR-Cas9 技术作用机制被详细阐明,CRISPR-Cas9 技术的应用逐渐深入生物学领域。其作为一种带有特异性重复序列的核酸内切酶,经过研究者的不断开发和完善,在应用方面的高效性及广谱性已基本超越 ZFNs 和 TALENs 两种特异性核酸酶。

CRISPR-Cas9 技术的主要优势在于成本低、设计简单、特异性强、效率高,而且可对单个基因多位点或多个基因同时进行编辑。因此,CRISPR-Cas9 技术一经问世就得到生物界研究人员的广泛关注和青睐。除了传统基于 DNA 双链断裂的 CRISPR-Cas9 技术外,还存在基于单链断裂的碱基和引导编辑器,还有不会引起 DNA 断裂的 CRISPR-dCas9 技术。仅从 2012 到 2022 年这 10 年内,CRISPR-Cas9 技术经过不断地完善得到了飞速地发展。

目前,CRISPR-Cas9 技术成功运用于多种

作物改良,尤其是在水稻、小麦、玉米、大豆、马铃薯等重要农作物中,该技术在提高作物产量、改良作物品质、获得生物和非生物抗性等方面都有广泛应用。传统依赖 DNA 双链断裂的 CRISPR-Cas9 技术对大部分性状改良明显。我们一方面应加强利用这些已创造出的优良品种在作物育种中的应用,推广农业种植,切实减轻农民负担;另一方面将 CRISPR-Cas9 技术巨大的应用潜能运用到更多的作物中,例如蓝莓、佛手、荔枝、金线莲、无花果等小的经济果树作物。不仅可以提高果树的产量、满足更大的经济市场需求,而且可以从外观、口感、营养价值等方面进行改良以满足人类对品质生活的要求。最重要的是提高作物的生物或非生物抗性,通过 CRISPR-Cas9 技术培育同一作物的不同品种,以适应不同生长环境,减少运输成本,降低因地适宜的作物价格。

CRISPR-dCas9 技术作为精准度较高的基因编辑和调控工作,具有较大的发展潜能。虽然该技术在水稻、拟南芥、烟草中已经得到应用,但存在效率低等问题,需要研究人员进一步完善和优化。

大量研究证明,基因编辑技术是快速准确地改善不同作物物种性状的可靠工具。2019 年, Fernie 等<sup>[138]</sup>在文章中讨论了就 CRISPR-Cas9 基因编辑技术在作物驯化应用方面对“再驯化”(re-domestication)和“重新驯化”(de novo domestication)的概念进行了重申,他们认为 CRISPR-Cas9 基因编辑技术加快了对作物的驯化,甚至实现了对作物进行从头驯化的可能。如今快速发展的现代生物技术和基因组学功能研究推动着基因编辑在作物中的应用,将基因编辑与作物育种相结合,有望掀起“第三次绿色革命”的浪潮。因此,我们应该从调查和收集更多野生优良种质资源,进一步加强作物代谢组学、

基因组学、合成生物学等多重研究,挖掘并鉴定更多驯化基因,为作物的驯化提供更多的材料基础。进一步提高基因编辑技术的靶向效率、高效递送以及快速驯化,优化合成生物学并加强 CRISPR-Cas9 技术在作物中的应用,为作物的快速驯化提供一定的技术支持。

虽然 CRISPR-Cas9 技术面临脱靶效应、外源基因引入、生物安全问题等挑战,但我们相信,经过研究人员的不断完善和改进,这些挑战也终将会克服。针对 CRISPR-Cas9 技术所造成的脱靶效应,可以通过优化 sgRNA 和改造 Cas 蛋白来降低脱靶效应。针对 CRISPR-Cas9 技术引入外源基因这一问题,有研究发现可以通过其后代分离的方法去除外源基因的干扰;或通过将 sgRNA 和 Cas9 蛋白组装成核糖核蛋白复合体,从源头上避免外源基因。经过研究者的不断努力,我们相信会有更多更高效的基因编辑技术优化措施运用于作物改良。

## REFERENCES

- [1] DAS A, GHANA P, RUDRAPPA B, GANDHI R, TAVVA VS, MOHANTY A. Genome editing of rice by CRISPR-cas: end-to-end pipeline for crop improvement[A]//Methods in Molecular Biology[M]. New York, NY: Springer US, 2021, 2238: 115-134.
- [2] BIBIKOVA M, BEUMER K, TRAUTMAN JK, CARROLL D. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases[J]. Science, 2003, 300(5620): 764.
- [3] HOCKEMEYER D, WANG HY, KIANI S, LAI CS, GAO Q, CASSADY JP, COST GJ, ZHANG L, SANTIAGO Y, MILLER JC, ZEITLER B, CHERONE JM, MENG XD, HINKLEY SJ, REBAR EJ, GREGORY PD, URNOV FD, JAENISCH R. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases[J]. Nature Biotechnology, 2011, 29(8): 731-734.
- [4] LIU GW, LIN QP, JIN S, GAO CX. The CRISPR-Cas toolbox and gene editing technologies[J]. Molecular Cell, 2022, 82(2): 333-347.

- [5] ISHINO Y, SHINAGAWA H, MAKINO K, AMEMURA M, NAKATA A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product[J]. Journal of Bacteriology, 1987, 169(12): 5429-5433.
- [6] JANSEN R, van EMBDEN JDA, GAASTRA W, SCHOOLS LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes[J]. Molecular Microbiology, 2002, 43(6): 1565-1575.
- [7] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, RICHARDS M, BOYAVAL P, MOINEAU S, ROMERO DA, HORVATH P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. Science, 2007, 315(5819): 1709-1712.
- [8] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, HAUER M, DOUDNA JA, CHARPENTIER E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. Science, 2012, 337(6096): 816-821.
- [9] MALI P, YANG LH, ESVELT KM, AACH J, GUELL M, DICARLO JE, NORVILLE JE, CHURCH GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. Science, 2013, 339(6121): 823-826.
- [10] CONG L, RAN FA, 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[J]. Science, 2013, 339(6121): 819-823.
- [11] HAFT DH, SELENGUT J, MONGODIN EF, NELSON KE. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes[J]. PLoS Computational Biology, 2005, 1(6): e60.
- [12] MAKAROVA KS, HAFT DH, BARRANGOU R, BROUNS SJJ, CHARPENTIER E, HORVATH P, MOINEAU S, MOJICA FJM, WOLF YI, YAKUNIN AF, van der OOST J, KOONIN EV. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems[J]. Nature Reviews Microbiology, 2011, 9(6): 467-477.
- [13] MAKAROVA KS, WOLF YI, ALKHNABASHI OS, COSTA F, SHAH SA, SAUNDERS SJ, BARRANGOU R, BROUNS SJJ, CHARPENTIER E, HAFT DH, HORVATH P, MOINEAU S, MOJICA FJM, TERNS RM, TERNS MP, WHITE MF, YAKUNIN AF, GARRETT RA, van der OOST J, BACKOFEN R, KOONIN EV. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems[J]. Nature Reviews Microbiology, 2015, 13(11): 722-736.
- [14] 冯万有, 蒙丽娜, 陈春, 何立珍, 覃广胜, 石德顺. CRISPR/Cas 系统分类和病原体检测的研究进展[J]. 生物技术, 2022, 32(2): 258-267, 251.
- [15] 马锦荣. 新型 CRISPR/SpCas9-hRed $\beta$  基因编辑系统的构建及验证[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2021.
- MA JR. Construction and verification of a novel CRISPR/SpCas9-hRed $\beta$  gene editing system[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2021 (in Chinese).
- [16] FRIEDLAND AE, TZUR YB, ESVELT KM, COLAIACOVO MP, CHURCH GM, CALARCO JA. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system[J]. Nature Methods, 2013, 10(8): 741-743.
- [17] 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[J]. 遗传, 2013, 35(11): 1265-1273.
- LI J, ZHANG Y, CHEN KL, SHAN QW, WANG YP, LIANG Z, GAO CX. CRISPR/Cas: a novel way of RNA-guided genome editing[J]. Hereditas, 2013, 35(11): 1265-1273 (in Chinese).
- [18] SAMANTA MK, DEY A, GAYEN S. CRISPR/Cas9: an advanced tool for editing plant genomes[J]. Transgenic Research, 2016, 25(5): 561-573.
- [19] 林萌萌, 李春娟, 闫彩霞, 孙全喜, 赵小波, 王娟, 苑翠玲, 单世华. CRISPR/Cas9 基因编辑技术在作物中的应用[J]. 核农学报, 2021, 35(6): 1329-1339.
- LIN MM, LI CJ, YAN CX, SUN QX, ZHAO XB, WANG J, YUAN CL, SHAN SH. Application of CRISPR/Cas9 gene editing technology in crops[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2021, 35(6): 1329-1339 (in Chinese).
- [20] 刘早利, 陈亚红, 王春台, 刘新琼. 稻瘟病新抗性基因 *Pi39* 候选基因 CRISPR/Cas9 敲除载体的构建[J]. 中国农学通报, 2016, 32(6): 91-95.
- LIU ZL, CHEN YH, WANG CT, LIU XQ. Knock-out vector construction of novel blast resistance gene *Pi39* candidate gene by CRISPR/Cas9 system[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2016, 32(6): 91-95 (in Chinese).
- [21] KOMOR AC, KIM YB, PACKER MS, ZURIS JA, LIU DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage[J]. Nature, 2016, 533(7603): 420-424.
- [22] GAUDELLI NM, KOMOR AC, REES HA, PACKER MS, BADRAN AH, BRYSON DI, LIU DR. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage[J]. Nature, 2017,

- 551(7681): 464-471.
- [23] LI C, ZHANG R, MENG XB, CHEN S, ZONG Y, LU CJ, QIU JL, CHEN YH, LI JY, GAO CX. Targeted, random mutagenesis of plant genes with dual cytosine and adenine base editors[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(7): 875-882.
- [24] ANZALONE AV, RANDOLPH PB, DAVIS JR, SOUSA AA, KOBLAN LW, LEVY JM, CHEN PJ, WILSON C, NEWBY GA, RAGURAM A, LIU DR. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA[J]. *Nature*, 2019, 576(7785): 149-157.
- [25] LIN QP, ZONG Y, XUE CX, WANG SX, JIN S, ZHU ZX, WANG YP, ANZALONE AV, RAGURAM A, DOMAN JL, LIU DR, GAO CX. Prime genome editing in rice and wheat[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(5): 582-585.
- [26] TANG X, SRETENOVIC S, REN QR, JIA XY, LI MK, FAN TT, YIN D, XIANG SY, GUO YC, LIU L, ZHENG XL, QI YP, ZHANG Y. Plant prime editors enable precise gene editing in rice cells[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(5): 667-670.
- [27] XU RF, LI J, LIU XS, SHAN TF, QIN RY, WEI PC. Development of plant prime-editing systems for precise genome editing[J]. *Plant Communications*, 2020, 1(3): 100043.
- [28] BUTT H, RAO GS, SEDEEK K, AMAN R, KAMEL R, MAHFOUZ M. Engineering herbicide resistance via prime editing in rice[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(12): 2370-2372.
- [29] LU YM, TIAN YF, SHEN RD, YAO Q, ZHONG DT, ZHANG XN, ZHU JK. Precise genome modification in tomato using an improved prime editing system[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(3): 415-417.
- [30] WANG L, KAYA HB, ZHANG N, RAI R, WILLMANN MR, CARPENTER SCD, READ AC, MARTIN F, FEI ZJ, LEACH JE, MARTIN GB, BOGDANOVA AJ. Spelling changes and fluorescent tagging with prime editing vectors for plants[J]. *Frontiers in Genome Editing*, 2021, 3: 617553.
- [31] QI LS, LARSON MH, GILBERT LA, DOUDNA JA, WEISSMAN JS, ARKIN AP, LIM WA. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression[J]. *Cell*, 2013, 152(5): 1173-1183.
- [32] BIKARD D, JIANG WY, SAMAI P, HOCHSCHILD A, ZHANG F, MARRAFFINI LA. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(15): 7429-7437.
- [33] MAEDER ML, LINDER SJ, CASCIO VM, FU YF, HO QH, JOUNG JK. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 977-979.
- [34] 赵山山, 邸一桓, 郝光飞. CRISPR-Cas9 基因编辑技术在基因功能和作物育种中的研究进展[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(21): 7087-7093.
- ZHAO SS, DI YH, HAO GF. Research progress of CRISPR-Cas9 gene editing technology in gene function and crop breeding[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17(21): 7087-7093 (in Chinese).
- [35] 耿敏, 王婷婷, 陶英瑜, 于丽静, 吴铭, 张春玉. 利用 CRISPR 基因编辑技术构建水稻 *O<sub>s</sub>SLR1* 敲除突变体[J]. *分子植物育种*, 2021: 1-10.
- GENG M, WANG TT, TAO YY, YU LJ, WU M, ZHANG CY. Rice *O<sub>s</sub>SLR1* mutant created through CRISPR/Cas9 technology[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021: 1-10 (in Chinese).
- [36] 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[J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(8): 1274-1284.
- [37] CASINI A, STORCH M, BALDWIN GS, ELLIS T. Bricks and blueprints: methods and standards for DNA assembly[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2015, 16(9): 568-576.
- [38] 时欢, 林玉玲, 赖钟雄, 杜宜殷, 黄鹏林. CRISPR/Cas9 介导的植物基因编辑技术研究进展[J]. *应用与环境生物学报*, 2018, 24(3): 640-650.
- SHI H, LIN YL, LAI ZX, DU YY, HUANG PL. Research progress on CRISPR/Cas9-mediated genome editing technique in plants[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2018, 24(3): 640-650 (in Chinese).
- [39] 沈兰, 华宇峰, 付亚萍, 李健, 刘庆, 焦晓真, 辛高伟, 王俊杰, 王兴春, 严长杰, 王克剑. 利用 CRISPR/Cas9 多基因编辑系统在水稻中快速引入遗传多样性[J]. *中国科学: 生命科学*, 2017, 47(11): 1186-1195.
- SHEN L, HUA YF, FU YP, LI J, LIU Q, JIAO XZ, XIN GW, WANG JJ, WANG XC, WANG KJ. Rapid introduction of genetic diversity in rice using CRISPR/Cas9 multi-gene editing system[J]. *Scientia Sinica: Vitae*, 2017, 47(11): 1186-1195 (in Chinese).
- [40] 蔡曼君. 玉米产量性状相关基因 *Emp10* 及 *Ter1* 的定位与克隆[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2019.
- CAI MJ. Fine mapping and cloning of the yield trait related genes *Emp10* and *Ter1* in maize[D]. Wuhan:

- Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [41] LIU L, ZHANG JL, XU JY, LI YF, GUO LQ, WANG ZR, ZHANG XC, ZHAO B, GUO YD, ZHANG N. CRISPR/Cas9 targeted mutagenesis of *SILBD40*, a lateral organ boundaries domain transcription factor, enhances drought tolerance in tomato[J]. *Plant Science*, 2020, 301: 110683.
- [42] FENG C, YUAN J, WANG R, LIU Y, BIRCHLER JA, HAN FP. Efficient targeted genome modification in maize using CRISPR/Cas9 system[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2016, 43(1): 37-43.
- [43] 刘玉琛, 丘式浚, 金曼, 邓汉超, 尹梅, 陈竹锋, 周向阳, 唐晓艳. CRISPR/Cas9 技术在创制番茄雄性不育株系中的应用研究[J]. *农业生物技术学报*, 2019, 27(6): 951-960.
- LIU YC, QIU SJ, JIN M, DENG HC, YIN M, CHEN ZF, ZHOU XY, TANG XY. Study on the application of CRISPR/Cas9 technology in development of tomato (*Solanum lycopersicum*) male sterile line[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2019, 27(6): 951-960 (in Chinese).
- [44] CAI YP, CHEN L, LIU XJ, GUO C, SUN S, WU CX, JIANG BJ, HAN TF, HOU WS. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of *GmFT2a* delays flowering time in soya bean[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(1): 176-185.
- [45] 吴艳, 侯智红, 程群, 董利东, 芦思佳, 南海洋, 甘卓然, 林永波. 大豆 *GmSPL3* 基因家族功能初探[J]. *大豆科学*, 2019, 38(5): 694-703.
- WU Y, HOU ZH, CHENG Q, DONG LD, LU SJ, NAN HY, GAN ZR, LIN YB. Preliminary study on the function of *GmSPL3* gene family in soybean[J]. *Soybean Science*, 2019, 38(5): 694-703 (in Chinese).
- [46] 梁敏敏, 张华丽, 陈俊宇, 戴冬青, 杜成兴, 王惠梅, 马良勇. 利用 CRISPR/Cas9 技术创制抗稻瘟病香型早籼温敏核不育系[J]. *中国水稻科学*, 2022, 36(3): 248-258.
- LIANG MM, ZHANG HL, CHEN JY, DAI DQ, DU CX, WANG HM, MA LY. Developing fragrant early indica TGMS line with blast resistance by using CRISPR/Cas9 technology[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2022, 36(3): 248-258 (in Chinese).
- [47] ZHENG M, ZHANG L, TANG M, LIU JL, LIU HF, YANG HL, FAN SH, TERZAGHI W, WANG HZ, HUA W. Knockout of two *Bna MAX 1* homologs by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis improves plant architecture and increases yield in rapeseed (*Brassica napus* L.)[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(3): 644-654.
- [48] OLALEKAN MUSA AMOO. 利用 CRISPR/CAS9 技术鉴定 *BRANCHED1* 和 *BRANCHED2* 基因参与调控油菜分枝的功能[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2020.
- OLALEKAN MA. CRISPR/CAS9 technique was used to identify the functions of *BRANCHED1* and *BRANCHED2* genes involved in regulating the branches of rapeseed[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [49] LIU HY, WANG K, TANG HL, GONG Q, DU LP, PEI XW, YE XG. CRISPR/Cas9 editing of wheat *TaQ* genes alters spike morphogenesis and grain threshability[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2020, 47(9): 563-575.
- [50] LU Y, WANG JY, CHEN B, MO SD, LIAN L, LUO YM, DING DH, DING YH, CAO Q, LI YC, LI Y, LIU GZ, HOU QQ, CHENG TT, WEI JT, ZHANG YR, CHEN GW, SONG C, HU Q, SUN S, FAN GY, WANG YT, LIU ZT, SONG BA, ZHU JK, LI HR, JIANG LJ. A donor-DNA-free CRISPR/Cas-based approach to gene knock-up in rice[J]. *Nature Plants*, 2021, 7(11): 1445-1452.
- [51] DONG OX, YU S, JAIN R, ZHANG N, DUONG PQ, BUTLER C, LI Y, LIPZEN A, MARTIN JA, BARRY KW, SCHMUTZ J, TIAN L, RONALD PC. Marker-free carotenoid-enriched rice generated through targeted gene insertion using CRISPR-Cas9[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 1178.
- [52] 罗旻, 顾华. CRISPR-dCas9 系统在基因表达调控中的最新研究进展[J]. *实验室研究与探索*, 2016, 35(3): 20-23.
- LUO M, GU H. The state of the art of CRISPR-dCas9 system on regulating level of gene expression[J]. *Research and Exploration in Laboratory*, 2016, 35(3): 20-23 (in Chinese).
- [53] 刘思远, 易国强, 唐中林, 陈斌. 基于 CRISPR/Cas9 系统在全基因组范围内筛选功能基因及调控元件研究进展[J]. *遗传*, 2020, 42(5): 435-443.
- LIU SY, YI GQ, TANG ZL, CHEN B. Progress on genome-wide CRISPR/Cas9 screening for functional genes and regulatory elements[J]. *Hereditas*, 2020, 42(5): 435-443 (in Chinese).
- [54] 管丽红, 贾紫森, 林俊堂. 规律成簇间隔短回文重复-相关核酸内切酶 9 技术在基因组编辑和基因转录调控中的应用[J]. *新乡医学院学报*, 2021, 38(1): 1-5.
- GUAN LH, JIA ZS, LIN JT. Application of regular clustering interval short palindrome repetition-related endonuclease 9 technology in genome editing and gene transcription regulation[J]. *Journal of Xinxiang Medical University*, 2021, 38(1): 1-5 (in Chinese).
- [55] MORADPOUR M, ABDULAH SNA. CRISPR/dCas9 platforms in plants: strategies and applications beyond

- genome editing[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(1): 32-44.
- [56] PIATEK A, ALI Z, BAAZIM H, LI LX, ABULFARAJ A, AL-SHAREEF S, AOUIDA M, MAHFOUZ MM. RNA-guided transcriptional regulation in planta via synthetic dCas9-based transcription factors[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2015, 13(4): 578-589.
- [57] LOWDER LG, ZHANG DW, BALTES NJ, PAUL JW III, TANG X, ZHENG XL, VOYTAS DF, HSIEH TF, ZHANG Y, QI YP. A CRISPR/Cas9 toolbox for multiplexed plant genome editing and transcriptional regulation[J]. *Plant Physiology*, 2015, 169(2): 971-985.
- [58] RODRÍGUEZ-LEAL D, LEMMON ZH, MAN J, BARTLETT ME, LIPPMAN ZB. Engineering quantitative trait variation for crop improvement by genome editing[J]. *Cell*, 2017, 171(2): 470-480.e8.
- [59] XING SN, CHEN KL, ZHU HC, ZHANG R, ZHANG HW, LI BB, GAO CX. Fine-tuning sugar content in strawberry[J]. *Genome Biology*, 2020, 21(1): 230.
- [60] ZENG DC, LIU TL, MA XL, WANG B, ZHENG ZY, ZHANG YL, XIE XR, YANG BW, ZHAO Z, ZHU QL, LIU YG. Quantitative regulation of Waxy expression by CRISPR/Cas9-based promoter and 5'UTR-intron editing improves grain quality in rice[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(12): 2385-2387.
- [61] ZHU HC, LI C, GAO CX. Publisher correction: applications of CRISPR-Cas in agriculture and plant biotechnology[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2020, 21(11): 712.
- [62] HAYUT SF, BESSUDO CM, LEVY AA. Targeted recombination between homologous chromosomes for precise breeding in tomato[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 15605.
- [63] SCHMIDT C, PACHER M, PUCHTA H. Efficient induction of heritable inversions in plant genomes using the CRISPR/Cas system[J]. *The Plant Journal*, 2019, 98(4): 577-589.
- [64] SCHMIDT C, FRANZ P, RÖNSPIES M, DREISSIG S, FUCHS J, HECKMANN S, HOUBEN A, PUCHTA H. Changing local recombination patterns in *Arabidopsis* by CRISPR/Cas mediated chromosome engineering[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 4418.
- [65] BEYING N, SCHMIDT C, PACHER M, HOUBEN A, PUCHTA H. CRISPR-Cas9-mediated induction of heritable chromosomal translocations in *Arabidopsis*[J]. *Nature Plants*, 2020, 6(6): 638-645.
- [66] BRUNNER E, YAGI R, DEBRUNNER M, BECK-SCHNEIDER D, BURGER A, ESCHER E, MOSIMANN C, HAUSMANN G, BASLER K. CRISPR-induced double-strand breaks trigger recombination between homologous chromosome arms[J]. *Life Science Alliance*, 2019, 2(3): e201800267.
- [67] 程丽华, 刘玉, 牛挺. 应用CRISPR-Cas9基因编辑技术实现染色体大片段缺失[J]. *中华血液学杂志*, 2017, 38(5): 427-431.
- CHENG LH, LIU Y, NIU T. Chromosomal large fragment deletion induced by CRISPR/Cas9 gene editing system[J]. *Chinese Journal of Hematology*, 2017, 38(5): 427-431 (in Chinese).
- [68] LI RQ, CHAR SN, YANG B. Creating large chromosomal deletions in rice using CRISPR/Cas9[A]//*Methods in Molecular Biology*[M]. New York, NY: Springer New York, 2019: 47-61.
- [69] ISHIMARU K, HIROTSU N, MADOKA Y, MURAKAMI N, HARA N, ONODERA H, KASHIWAGI T, UJIE K, SHIMIZU BI, ONISHI A, MIYAGAWA H, KATO E. Loss of function of the IAA-glucose hydrolase gene *TGW6* enhances rice grain weight and increases yield[J]. *Nature Genetics*, 2013, 45(6): 707-711.
- [70] 王加峰, 郑才敏, 刘维, 罗文龙, 王慧, 陈志强, 郭涛. 基于CRISPR/Cas9技术的水稻千粒重基因 *tgw6* 突变体的创建[J]. *作物学报*, 2016, 42(8): 1160-1167.
- WANG JF, ZHENG CM, LIU W, LUO WL, WANG H, CHEN ZQ, GUO T. Construction of *tgw6* mutants in rice based on CRISPR/Cas9 technology[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2016, 42(8): 1160-1167 (in Chinese).
- [71] LIBAULT M, ZHANG XC, GOVINDARAJULU M, QIU J, ONG YT, BRECHENMACHER L, BERG RH, HURLEY-SOMMER A, TAYLOR CG, STACEY G. A member of the highly conserved *FWL* (tomato *FW2.2*-like) gene family is essential for soybean nodule organogenesis[J]. *The Plant Journal*, 2010, 62(5): 852-864.
- [72] 王玲玲. 水稻穗粒数调控基因 *OsFWL2* 的功能研究[D]. 扬州: 扬州大学硕士学位论文, 2018.
- WANG LL. Functional analysis of *OsFWL2* gene involved in grain number regulation in rice[D]. Yangzhou: Master's Thesis of Yangzhou University, 2018 (in Chinese).
- [73] 任俊, 曹跃炫, 黄勇, 董慧荣, 刘庆, 王克剑. 基因编辑技术及其水稻中的发展和应用[J]. *中国稻米*, 2021, 27(4): 92-100.
- REN J, CAO YX, HUANG Y, DONG HR, LIU Q, WANG KJ. Development and application of genome editing technology in rice[J]. *China Rice*, 2021, 27(4): 92-100 (in Chinese).
- [74] 邵高能, 谢黎虹, 焦桂爱, 魏祥进, 圣忠华, 唐绍清,



- 胡培松. 利用 CRISPR/CAS9 技术编辑水稻香味基因 *Badh2*[J]. 中国水稻科学, 2017, 31(2): 216-222.
- SHAO GN, XIE LH, JIAO GA, WEI XJ, SHENG ZH, TANG SQ, HU PS. CRISPR/CAS9-mediated editing of the fragrant gene *Badh2* in rice[J]. Chinese Journal of Rice Science, 2017, 31(2): 216-222 (in Chinese).
- [75] 祁永斌, 张礼霞, 王林友, 宋建, 王建军. 利用 CRISPR/Cas9 技术编辑水稻香味基因 *Badh2*[J]. 中国农业科学, 2020, 53(8): 1501-1509.
- QI YB, ZHANG LX, WANG LY, SONG J, WANG JJ. CRISPR/Cas9 targeted editing for the fragrant gene *Badh2* in rice[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2020, 53(8): 1501-1509 (in Chinese).
- [76] ZHOU H, XIA D, ZHAO D, LI YH, LI PB, WU B, GAO GJ, ZHANG QL, WANG GW, XIAO JH, LI XH, YU SB, LIAN XM, HE YQ. The origin of *Wx<sup>la</sup>* provides new insights into the improvement of grain quality in rice[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2021, 63(5): 878-888.
- [77] 冯璇, 王新, 韩悦, 白德朗, 许可, 刘芳, 覃宝祥, 罗继景, 韦政, 邱永福, 李容柏. CRISPR/Cas9 介导基因组编辑培育糯稻不育系 WX209A[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(4): 1589-1596.
- FENG X, WANG X, HAN Y, BAI DL, XU K, LIU F, QIN BX, LUO JJ, WEI Z, QIU YF, LI RB. CRISPR/Cas9 mediated genomic editing breeding for glutinous CMS line WX209A in rice[J]. Genomics and Applied Biology, 2018, 37(4): 1589-1596 (in Chinese).
- [78] PENG B, KONG HL, LI YB, WANG LQ, ZHONG M, SUN L, GAO GJ, ZHANG QL, LUO LJ, WANG GW, XIE WB, CHEN JX, YAO W, PENG Y, LEI L, LIAN XM, XIAO JH, XU CG, LI XH, HE YQ. *OsAAP6* functions as an important regulator of grain protein content and nutritional quality in rice[J]. Nature Communications, 2014, 5: 4847.
- [79] WANG SY, YANG YH, GUO M, ZHONG CY, YAN CJ, SUN SY. Targeted mutagenesis of amino acid transporter genes for rice quality improvement using the CRISPR/Cas9 system[J]. The Crop Journal, 2020, 8(3): 457-464.
- [80] LIU DF, CHEN XJ, LIU JQ, YE JC, GUO ZJ. The rice ERF transcription factor OsERF922 negatively regulates resistance to *Magnaporthe oryzae* and salt tolerance[J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(10): 3899-3911.
- [81] WANG FJ, WANG CL, LIU PQ, LEI CL, HAO W, GAO Y, LIU YG, ZHAO KJ. Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene *OsERF922*[J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0154027.
- [82] 徐鹏, 王宏, 涂燃冉, 刘群恩, 吴玮勋, 傅秀民, 曹立勇, 沈希宏. 利用 CRISPR/Cas9 系统定向改良水稻稻瘟病抗性[J]. 中国水稻科学, 2019, 33(4): 313-322.
- XU P, WANG H, TU RR, LIU QE, WU WX, FU XM, CAO LY, SHEN XH. Orientation improvement of blast resistance in rice via CRISPR/Cas9 system[J]. Chinese Journal of Rice Science, 2019, 33(4): 313-322 (in Chinese).
- [83] 郝巍. 利用 CRISPR/Cas9 技术对水稻白叶枯病感病相关基因 *HW3* 进行定点修饰及功能分析[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2016.
- HAO W. Identification of a susceptibility-related gene *HW3* for bacterial blight of rice by using CRISPR/Cas9 system[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016 (in Chinese).
- [84] YUAN M, CHU ZH, LI XH, XU CG, WANG SP. The bacterial pathogen *Xanthomonas oryzae* overcomes rice defenses by regulating host copper redistribution[J]. The Plant Cell, 2010, 22(9): 3164-3176.
- [85] KIM YA, MOON H, PARK CJ. CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of *Os8N3* in rice to confer resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*[J]. Rice (N Y), 2019, 12(1): 67.
- [86] 饶玉春, 戴志俊, 朱怡彤, 姜嘉骥, 马若盈, 王予焯, 王跃星. 水稻抗干旱胁迫的研究进展[J]. 浙江师范大学学报(自然科学版), 2020, 43(4): 417-429.
- RAO YC, DAI ZJ, ZHU YT, JIANG JJ, MA RY, WANG YY, WANG YX. Advances in research of drought resistance in rice[J]. Journal of Zhejiang Normal University (Natural Sciences), 2020, 43(4): 417-429 (in Chinese).
- [87] 周天顺, 余东, 刘玲, 欧阳宁, 袁贵龙, 段美娟, 袁定阳. 利用 CRISPR/Cas9 技术编辑 *AFP1* 基因提高水稻耐逆性[J]. 中国水稻科学, 2021, 35(1): 11-18.
- ZHOU TS, YU D, LIU L, OUYANG N, YUAN GL, DUAN MJ, YUAN DY. CRISPR/Cas9-mediated editing of *AFPI* improves rice stress tolerance[J]. Chinese Journal of Rice Science, 2021, 35(1): 11-18 (in Chinese).
- [88] OKUZAKI A, SHIMIZU T, KAKU K, KAWAI K, TORIYAMA K. A novel mutated acetolactate synthase gene conferring specific resistance to pyrimidinyl carboxy herbicides in rice[J]. Plant Molecular Biology, 2007, 64(1/2): 219-224.
- [89] WANG MG, WANG ZD, MAO YF, LU YM, YANG RF, TAO XP, ZHU JK. Optimizing base editors for improved efficiency and expanded editing scope in rice[J]. Plant Biotechnology Journal, 2019, 17(9): 1697-1699.

- [90] WANG FQ, XU Y, LI WQ, CHEN ZH, WANG J, FAN FJ, TAO YJ, JIANG YJ, ZHU QH, YANG J. Creating a novel herbicide-tolerance *OsALS* allele using CRISPR/Cas9-mediated gene editing[J]. The Crop Journal, 2021, 9(2): 305-312.
- [91] ISHIMARU Y, BASHIR K, NAKANISHI H, NISHIZAWA NK. OsNRAMP5, a major player for constitutive iron and manganese uptake in rice[J]. Plant Signaling & Behavior, 2012, 7(7): 763-766.
- [92] 龙起樟, 黄永兰, 唐秀英, 王会民, 芦明, 袁林峰, 万建林. 利用 CRISPR/Cas9 敲除 *OsNramp5* 基因创制低镉籼稻[J]. 中国水稻科学, 2019, 33(5): 407-420.
- LONG QZ, HUANG YL, TANG XY, WANG HM, LU M, YUAN LF, WAN JL. Creation of low-Cd-accumulating indica rice by disruption of *OsNramp5* gene via CRISPR/Cas9[J]. Chinese Journal of Rice Science, 2019, 33(5): 407-420 (in Chinese).
- [93] 吴明基, 林艳, 刘华清, 陈建民, 付艳萍, 杨绍华, 王锋. 利用 CRISPR/Cas-9 技术创制水稻温敏核不育系[J]. 福建农业学报, 2018, 33(10): 1011-1015.
- WU MJ, LIN Y, LIU HQ, CHEN JM, FU YP, YANG SH, WANG F. Development of thermo-sensitive male sterile rice with CRISPR/Cas9 technology[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2018, 33(10): 1011-1015 (in Chinese).
- [94] SHEN L, DONG GJ, ZHANG Y, HU GC, ZHANG Q, HU GL, XU B, REN DY, HU J, ZHU L, GAO ZY, ZHANG GH, GUO LB, ZENG DL, QIAN Q. Rapid creation of new photoperiod-/thermo-sensitive genic male-sterile rice materials by CRISPR/Cas9 system[J]. Rice Science, 2019, 26(2): 129-132.
- [95] LIU CL, CAO YW, HUA YF, DU GJ, LIU Q, WEI X, SUN TT, LIN JR, WU MG, CHENG ZK, WANG KJ. Concurrent disruption of genetic interference and increase of genetic recombination frequency in hybrid rice using CRISPR/Cas9[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 757152.
- [96] 王延鹏, 程曦, 高彩霞, 邱金龙. 利用基因组编辑技术创制抗白粉病小麦[J]. 遗传, 2014, 36(8): 848.
- WANG YP, CHENG X, GAO CX, QIU JL. Creating powdery mildew resistant wheat by genome editing technology[J]. Hereditas, 2014, 36(8): 848 (in Chinese).
- [97] ZHANG Y, LIANG Z, ZONG Y, WANG YP, LIU JX, CHEN KL, QIU JL, GAO CX. Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA[J]. Nature Communications, 2016, 7: 12617.
- [98] SÁNCHEZ-LEÓN S, GIL-HUMANES J, OZUNA CV, GIMÉNEZ MJ, SOUSA C, VOYTAS DF, BARRO F. Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9[J]. Plant Biotechnology Journal, 2018, 16(4): 902-910.
- [99] 杨瑞芳, 朴钟泽, 万常照, 李钢燮, 龚长春, 白建江. 高抗性淀粉水稻新品种优糖稻 2 号的选育及其特征特性[J]. 中国稻米, 2020, 26(1): 94-95, 99.
- YANG RF, PIAO ZZ, WAN CZ, LI GX, GONG CC, BAI JJ. Breeding and characteristics of new rice variety youtangdao 2 with high resistant starch[J]. China Rice, 2020, 26(1): 94-95, 99 (in Chinese).
- [100] 李晶莹. CRISPR/Cas9 介导的水稻基因编辑技术体系构建与高抗性淀粉小麦新种质创制[D]. 北京: 中国农业科学院博士学位论文, 2021.
- LI JY. Development of different toolkits for CRISPR/Cas9-mediated rice genome editing and creation of novel wheat germplasm high in resistant starch[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021 (in Chinese).
- [101] ZHANG YW, BAI Y, WU GH, ZOU SH, CHEN YF, GAO CX, TANG DZ. Simultaneous modification of three homoeologs of *TaEDR1* by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat[J]. The Plant Journal, 2017, 91(4): 714-724.
- [102] LI J, WANG Z, HE GM, MA LG, DENG XW. CRISPR/Cas9-mediated disruption of *TaNPI* genes results in complete male sterility in bread wheat[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2020, 47(5): 263-272.
- [103] 孙清桐. 小麦雄性不育突变体 HTS-1 中 *TaEPFL1* 基因的克隆、定位及表达分析[D]. 南充: 西华师范大学硕士学位论文, 2019.
- SUN QX. Cloning, localization and expression analysis of *TaEPFL1* gene in the pistillody line of common wheat HTS-1[D]. Nanchong: Master's Thesis of China West Normal University, 2019 (in Chinese).
- [104] 朱金洁. CRISPR-Cas9 介导的玉米基因组定点编辑研究[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2015.
- ZHU JJ. Targeted genome editing in maize using CRISPR-Cas9[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [105] SVITASHEV S, YOUNG JK, SCHWARTZ C, GAO HR, FALCO SC, CIGAN AM. Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA[J]. Plant Physiology, 2015, 169(2): 931-945.
- [106] SHI JR, GAO HR, WANG HY, LAFITTE HR, ARCHIBALD RL, YANG MZ, HAKIMI SM, MO H, HABBEN JE. ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions[J]. Plant Biotechnology

- Journal, 2017, 15(2): 207-216.
- [107] 张翔, 史亚兴, 卢柏山, 武莹, 刘亚, 王元东, 杨进孝, 赵久然. 利用 CRISPR/Cas9 技术编辑 *BADH2-1/BADH2-2* 创制香味玉米新种质[J]. 中国农业科学, 2021, 54(10): 2064-2075.
- ZHANG X, SHI YX, LU BS, WU Y, LIU Y, WANG YD, YANG JX, ZHAO JR. Creation of new maize variety with fragrant rice like flavor by editing *BADH2-1* and *BADH2-2* using CRISPR/Cas9[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2021, 54(10): 2064-2075 (in Chinese).
- [108] SVITASHEV S, SCHWARTZ C, LENDERTS B, YOUNG JK, MARK CIGAN A. Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes[J]. Nature Communications, 2016, 7: 13274.
- [109] 何雪蓓. 大豆慢生型根瘤菌 TetR-like 蛋白 Blr7023 调控大豆异黄酮外排机制研究[D]. 兰州: 兰州大学硕士学位论文, 2021.
- HE XQ. Regulatory mechanism of a TetR-like Blr7023 protein of *Bradyrhizobium diazoefficiens* in the efflux of soybean isoflavonoids[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Lanzhou University, 2021 (in Chinese).
- [110] 柏梦焱, 袁珏慧, 孙嘉丰, 厉苏宁, 关跃峰. 基于 CRISPR-Cas9 基因编辑技术创制大豆 gmnark 超结瘤突变体[J]. 大豆科学, 2019, 38(4): 525-532.
- BAI MY, YUAN JH, SUN JF, LI SN, GUAN YF. Generation of gmnark mutant with supernodulation via CRISPR-Cas9 in soybean[J]. Soybean Science, 2019, 38(4): 525-532 (in Chinese).
- [111] 蔡宇鹏. CRISPR/Cas9 介导的大豆基因组定点编辑研究[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2016.
- CAI YP. CRISPR/Cas9-mediated genome editing in soybean[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016 (in Chinese).
- [112] 侯智红, 吴艳, 程群, 董利东, 芦思佳, 南海洋, 甘卓然, 刘宝辉. 利用 CRISPR/Cas9 技术创制大豆高油酸突变系[J]. 作物学报, 2019, 45(6): 839-847.
- HOU ZH, WU Y, CHENG Q, DONG LD, LU SJ, NAN HY, GAN ZR, LIU BH. Creation of high oleic acid soybean mutation plants by CRISPR/Cas9[J]. Acta Agronomica Sinica, 2019, 45(6): 839-847 (in Chinese).
- [113] MA J, SUN S, WHELAN J, SHOU HX. CRISPR/Cas9-mediated knockout of *GmFATB1* significantly reduced the amount of saturated fatty acids in soybean seeds[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(8): 3877.
- [114] 李慧卿, 陈超, 陈冉冉, 宋雪薇, 李倩娜, 朱延明, 丁晓东. 利用 CRISPR/Cas9 双基因敲除系统初步解析大豆 *GmSnRK<sub>1.1</sub>* 和 *GmSnRK<sub>1.2</sub>* 对 ABA 及碱胁迫的响应[J]. 遗传, 2018, 40(6): 496-507.
- LI HQ, CHEN C, CHEN RR, SONG XW, LI JN, ZHU YM, DING XD. Preliminary analysis of the role of *GmSnRK<sub>1.1</sub>* and *GmSnRK<sub>1.2</sub>* in the ABA and alkaline stress response of the soybean using the CRISPR/Cas9-based gene double-knockout system[J]. Hereditas, 2018, 40(6): 496-507 (in Chinese).
- [115] 李晓. 马铃薯原生质体培养再生及利用 CRISPR/Cas9 瞬时转化的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学硕士学位论文, 2019.
- LI X. Regeneration of potato protoplasts and transient transformation using CRISPR/Cas9[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia University, 2019 (in Chinese).
- [116] ZEEMAN SC, KOSSMANN J, SMITH AM. Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2010, 61: 209-234.
- [117] 赵国超. 利用 CRISPR/Cas9 技术选育马铃薯低龙葵素、抗低温糖化和支链淀粉高的新品系[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学硕士学位论文, 2019.
- ZHAO GC. A new potato strain with low solanine, low temperature saccharification resistance and high amylopectin content was selected by CRISPR/Cas9 technology[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia University, 2019 (in Chinese).
- [118] ANDERSSON M, TURESSON H, NICOLIA A, FÄLT AS, SAMUELSSON M, HOFVANDER P. Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts[J]. Plant Cell Reports, 2017, 36(1): 117-128.
- [119] ENCISO-RODRIGUEZ F, MANRIQUE-CARPINTERO NC, NADAKUDUTI SS, BUELL CR, ZARKA D, DOUCHES D. Overcoming self-incompatibility in diploid potato using CRISPR-Cas9[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 376.
- [120] 郭韬, 余泓, 邱杰, 李家洋, 韩斌, 林鸿宣. 中国水稻遗传学研究进展与分子设计育种[J]. 中国科学: 生命科学, 2019, 49(10): 1185-1212.
- GUO T, YU H, QIU J, LI JY, HAN B, LIN HX. Advances in rice genetics and breeding by molecular design in China[J]. Scientia Sinica: Vitae, 2019, 49(10): 1185-1212 (in Chinese).
- [121] LI TD, YANG XP, YU Y, SI XM, ZHAI XW, ZHANG HW, DONG WX, GAO CX, XU C. Domestication of wild tomato is accelerated by genome editing[J]. Nature Biotechnology, 2018, 36(12): 1160-1163.
- [122] ZSÖGÖN A, ČERMÁK T, NAVES ER, NOTINI MM, EDEL KH, WEINL S, FRESCHI L, VOYTAS DF, KUDLA J, PERES LEP. *De novo* domestication of wild

- tomato using genome editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(12): 1211-1216.
- [123] ZHU XG, ZHU JK. Precision genome editing heralds rapid *de novo* domestication for new crops[J]. *Cell*, 2021, 184(5): 1133-1134.
- [124] YU H, LIN T, MENG XB, DU HL, ZHANG JK, LIU GF, CHEN MJ, JING YH, KOU LQ, LI XX, GAO Q, LIANG Y, LIU XD, FAN ZL, LIANG YT, CHENG ZK, CHEN MS, TIAN ZX, WANG YH, CHU CC, et al. A route to *de novo* domestication of wild allotetraploid rice[J]. *Cell*, 2021, 184(5): 1156-1170.e14.
- [125] 袁伟曦, 喻云梅, 胡春财, 赵祖国. CRISPR/Cas9 技术存在的问题及其改进措施的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2017, 33(4): 70-77.  
YUAN WX, YU YM, HU CC, ZHAO ZG. Current issues and progress in the application of CRISPR/Cas9 technique[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33(4): 70-77 (in Chinese).
- [126] BAO AL, BURRITT DJ, CHEN HF, ZHOU XN, CAO D, TRAN LS P. The CRISPR/Cas9 system and its applications in crop genome editing[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2019, 39(3): 321-336.
- [127] 姚祝平, 程远, 万红建, 李志邈, 叶青静, 阮美颖, 王荣青, 周国治, 杨悦俭. CRISPR/Cas9 基因编辑技术在植物基因工程育种中的应用[J]. *分子植物育种*, 2017, 15(7): 2647-2655.  
YAO ZP, CHENG Y, WAN HJ, LI ZM, YE QJ, RUAN MY, WANG RQ, ZHOU GZ, YANG YJ. Application of CRISPR/Cas9 genome editing technology in plant genetic engineering breeding[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2017, 15(7): 2647-2655 (in Chinese).
- [128] LIANG Z, CHEN KL, LI TD, ZHANG Y, WANG YP, ZHAO Q, LIU JX, ZHANG HW, LIU CM, RAN YD, GAO CX. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14261.
- [129] LIU Q, JIAO XZ, MENG XB, WANG C, XU C, TIAN ZX, XIE CX, LI GY, LI JY, YU H, WANG KJ. FED: a web tool for foreign element detection of genome-edited organism[J]. *Science China Life Sciences*, 2021, 64(1): 167-170.
- [130] 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.  
WANG FJ, ZHAO KJ. Progress and challenge of crop genetic improvement via genome editing[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51(1): 1-16 (in Chinese).
- [131] 范德佳, 陈士强, 王建华, 张容, 刘建凤, 陈秀兰, 何震天. 利用 CRISPR/Cas 技术改良作物抗病性的研究进展[J]. *江苏农业学报*, 2020, 36(5): 1312-1321.  
FAN DJ, CHEN SQ, WANG JH, ZHANG R, LIU JF, CHEN XL, HE ZT. Advances in improvement of crop disease resistance using CRISPR/Cas technology[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2020, 36(5): 1312-1321 (in Chinese).
- [132] WANG P, ZHAO FJ, KOPITTE PM. Engineering crops without genome integration using nanotechnology[J]. *Trends in Plant Science*, 2019, 24(7): 574-577.
- [133] 张玉苗, 李蓉, 鲁瑶, 林玉玲, 赖钟雄, 徐涵. 基于提高 CRISPR/Cas 基因编辑效率的研究进展[J]. *热带作物学报*, 2019, 40(10): 2006-2015.  
ZHANG YM, LI R, LU Y, LIN YL, LAI ZX, XU H. Research progress on improving CRISPR/Cas genome editing efficiency[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2019, 40(10): 2006-2015 (in Chinese).
- [134] MARTIN-ORTIGOSA S, PETERSON DJ, VALENSTEIN JS, LIN VSY, TREWYN BG, LYZNIK LA, WANG K. Mesoporous silica nanoparticle-mediated intracellular cre protein delivery for maize genome editing via *loxP* site excision[J]. *Plant Physiology*, 2014, 164(2): 537-547.
- [135] KWAK SY, LEW TTS, SWEENEY CJ, KOMAN VB, WONG MH, BOHMERT-TATAREV K, SNELL KD, SEO JS, CHUA NH, STRANO MS. Chloroplast-selective gene delivery and expression in planta using chitosan-complexed single-walled carbon nanotube carriers[J]. *Nature Nanotechnology*, 2019, 14(5): 447-455.
- [136] MITTER N, WORRALL EA, ROBINSON KE, LI P, JAIN RG, TAOCHY C, FLETCHER SJ, CARROLL BJ, LU GQM, XU ZP. Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses[J]. *Nature Plants*, 2017, 3: 16207.
- [137] ZHAO X, MENG ZG, WANG Y, CHEN WJ, SUN CJ, CUI B, CUI JH, YU ML, ZENG ZH, GUO SD, LUO D, CHENG JQ, ZHANG R, CUI HX. Pollen magnetofection for genetic modification with magnetic nanoparticles as gene carriers[J]. *Nature Plants*, 2017, 3(12): 956-964.
- [138] FERNIE AR, YAN JB. *De novo* domestication: an alternative route toward new crops for the future[J]. *Molecular Plant*, 2019, 12(5): 615-631.

(本文责编 郝丽芳)