



植物基因组编辑试剂材料的导入及转化系统的研究现状及前景

冉毅东^{1*}, 梁振^{2,3}, 张毅^{2,3,4}, 高彩霞^{2*}

1. 吉诺沃生物技术股份有限公司, 天津 301700;

2. 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 植物细胞与染色体工程国家重点实验室, 北京 100101;

3. 中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049;

4. 山东师范大学生命科学学院, 山东省逆境植物重点实验室, 济南 250014

* 联系人, E-mail: yidongran@genovo.org; cxgao@genetics.ac.cn

收稿日期: 2017-09-20; 接受日期: 2017-10-05; 网络版发表日期: 2017-11-16

摘要 目前科研人员已经研发了许多基因组编辑工具, 新的基因组编辑工具也在不断地探索中, 其中有一些编辑工具, 如CRISPR/Cas9系统已经被广泛地应用于植物遗传学、生物技术和育种等各方面. 基因组编辑技术可以对农艺性状相关基因的特异序列进行精准编辑, 从而开启了作物改良的新时代. 本文聚焦于植物基因组编辑试剂材料导入及转化的最新方法及进展, 比较了各种导入及转化系统的优缺点, 最后讨论了植物基因组编辑试剂材料导入及转化未来可能的发展方向.

关键词 基因组编辑, 脱氧核糖核酸(DNA), 核糖核酸(RNA), 核糖核蛋白(RNP), 病毒介导的转化, 农杆菌介导的转化, 基因枪法, 原生质体转染, 非转基因的编辑植物

传统的植物育种和遗传修饰技术极大地促进了作物产量的增加. 传统的植物育种技术包括远缘杂交、物理、化学诱变及其他的非特异性育种方法, 这些技术通常涉及基因组大片段的交换或者随机位点的诱变, 需要通过不断的回交从后代中分离出无用的变化, 因此整个过程耗时费力. 20世纪90年代以来, 转基因方法的出现丰富了植物育种技术^[1], 利用转基因方法获得了一批具有抗虫、抗病特性的新品种, 如抗虫棉(*Gossypium hirsutum*)、抗草甘膦玉米(*Zea mays*)等; 同时获得了富含大量营养元素的新品种(如富含花青素的紫色番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.), 富含 β -胡

萝卜素的黄金大米等). 转基因方法(也称作遗传修饰方法)为植物育种提供了重大的机遇, 但是由于其可能的负面影响(如基因流向其他植物、生态破坏、毒性和致敏性)引起了大众的担忧. 除此之外, 转基因方法缺乏准确性且耗时较长.

基因组编辑技术的出现为克服上述方法的缺点提供了机遇, 科学家可以利用基因组编辑技术突变特定的基因, 重组表观遗传标记, 修饰特异性的序列. 这种定向的基因工程利用设计的核酸酶使基因组产生位点特异性的双链断裂(double-stranded breaks DNA, DSBs), 然后通过非同源末端连接(non-homologous end

引用格式: 冉毅东, 梁振, 张毅, 等. 植物基因组编辑试剂材料的导入及转化系统的研究现状及前景. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 1159–1176, doi: 10.1360/N052017-00239
英文版见: Ran Y D, Liang Z, Gao C X. Current and future editing reagent delivery systems for plant genome editing. Sci China Life Sci, 2017, 60: 490–505, doi: 10.1007/s11427-017-9022-1

joining, NHEJ)或者同源重组(homologous recombination, HR)的修复方式在双链断裂处产生有效的基因修饰^[2,3]。锌指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFNs)、类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effect nucleases, TALENs)以及基于CRISPR/Cas系统的RNA引导的内切酶都能在特定的位点进行切割,产生特异性的基因组修饰,而且能够产生基因定点插入,用于优良性状的叠加^[4-6]。其中CRISPR/Cas系统由于其高效、易于设计和灵活性的特点,成为目前最受欢迎的植物基因组编辑工具^[7,8]。通过基因组编辑方法产生的突变体与通过传统育种或诱变产生的突变体没有明显的区别,因此,这些基因组编辑的植物可能被归为非转基因。一旦成行,将会避免转基因生物监管过程需要的高昂金钱和时间成本^[1]。

目前的植物基因组编辑方法依赖于植物的遗传转化^[9],因此只能作用于有限的物种中,植物基因组编辑的限制因素是如何将编辑的试剂材料“运送”到目的植物中,然后产生定点编辑的植物。此外,当基因组编辑产生的突变体用作商业产品时,要求突变体必须为非转基因植物,增加了基因组编辑的限制性条件,包括不含DNA的基因组编辑试剂材料的准备以及相应的转化方法。

植物基因组编辑的常规策略及步骤如图1所示,目前包括DNA、RNA或者蛋白质在内的基因组编辑试剂材料已经成功地用于植物基因组编辑。在此过程中,将基因编辑元件导入到植物细胞中并获得突变体是最关键的步骤,然而,目前尚未开发出特异针对植物基因组编辑的转化方法,大多数是基于已经建立的植物遗传转化系统。

利用基因组编辑技术创制新性状的主要障碍是将设计好的基因工程试剂材料转化到植物细胞中^[10]。转化方法主要分为两类:直接转化法和间接转化法。间接转化法是指通过细菌(如土壤农杆菌和发根农杆菌)或者病毒(烟草脆裂病毒和双生病毒)将质粒携带的基因载体引入到目标细胞中。直接转化法是指不需要其他的生物体做媒介,将编辑试剂材料直接转化到细胞中,最常见的直接转化法是原生质体转染和基因枪轰击法。农杆菌渗入和原生质体转染可以用作瞬时检测植物细胞中基因组编辑效率的方法,农杆菌介导的转化、基因枪转化、原生质体转染和病毒介导的转化通常用于稳定的基因编辑突变体的获得。此综述

总结了植物基因组编辑的转化方法,比较了当前的植物基因组编辑试剂材料、瞬时检测方法、获得稳定突变体的转化方法及应用,最后讨论了基于细胞的基因组编辑试剂材料转化技术的未来发展方向。

1 基因组编辑试剂材料的常见形式

最常见的基因组编辑试剂材料包括ZFNs, TALENs和CRISPR/Cas9系统的质粒DNA的形式,这些DNA材料除了参与植物基因组编辑以外,会随机地整合到植物的基因组上,因此获得的突变体被认为是转基因突变体,进而受到转基因的调控和监管。产生非转基因的植物突变体的一个有效方法是将DNA替换成RNA或者蛋白质,包括CRISPR/Cas9核糖核蛋白(ribonucleoproteins, RNPs)复合体。

1.1 DNA

DNA质粒是最常见的植物基因组编辑试剂材料,DNA转化可分为直接法和间接法两种,图2展示了用于农杆菌转化的典型的基因组编辑载体。

单链寡核苷酸(single-stranded oligodeoxynucleotides, ssODNs)。单链寡核苷酸可以用作基因组编辑的修复模板,Sauer等人^[11]利用CRISPR/Cas9以及ssODN模板对亚麻原生质体的5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合成酶基因(*EPSPS*)进行准确地编辑,由于编辑效率较高,在无筛选压力的条件下即可获得精准修复的突变体植株。这些突变体随后在温室中表示出对草甘膦喷雾的抗性,同时这种抗性可以有效地传递给后代。

嵌合的RNA/DNA寡核苷酸(COs)。嵌合的RNA/DNA寡核苷酸是指包含RNA和DNA残基,且能够自身互补配对的小的嵌合体。COs的两端会被序列加上帽子并形成发夹结构,从而使得COs不会被细胞内的解旋酶和核酸外切酶降解。此外, RNA残基的2'-O-甲基化使得寡核苷酸不会被哺乳动物细胞内的RNase H降解^[12,13]。与常规的质粒供体相比, COs的分子量很小(通常含有68个核苷酸),通过基因枪法可以将COs的多个拷贝导入到细胞中。利用COs已经在玉米(*Zea mays*)^[14,15]、烟草(*Nicotiana tabacum* L.)^[16]、水稻(*Oryza sativa*)^[17]和小麦(*Triticum aestivum* L.)^[18]中实现了定点突变。Wang等人^[19]将TALENs和*OsEPSPS*基

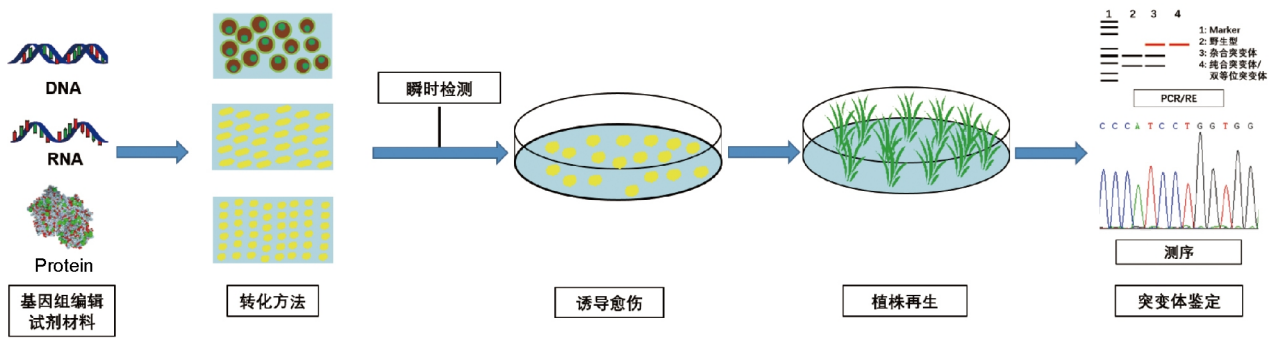


图1 植物基因组编辑的常规步骤

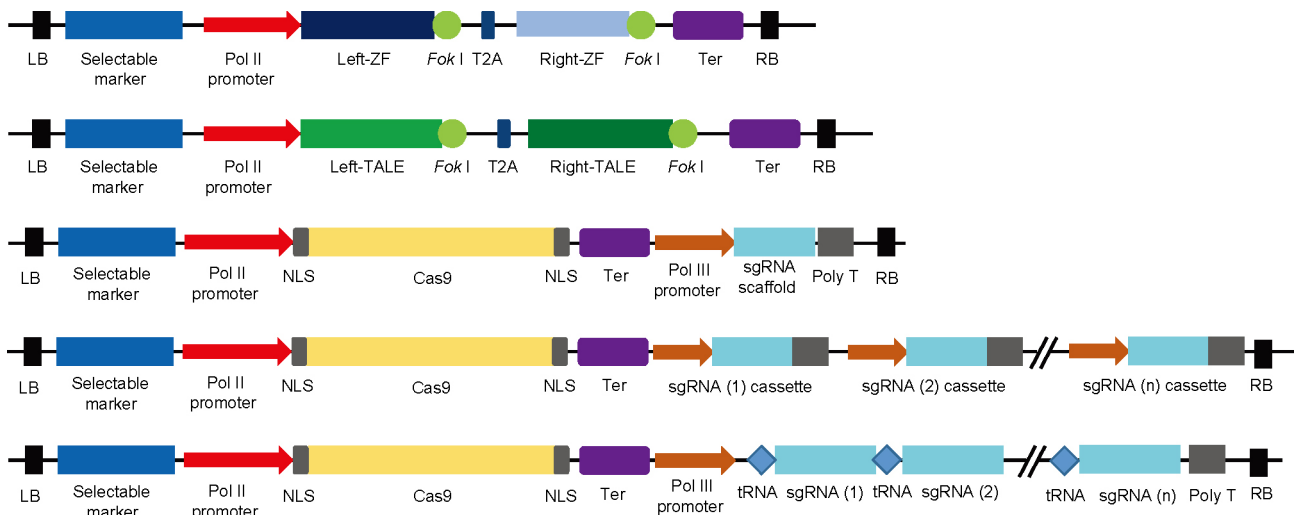


图2 农杆菌介导基因转化过程中ZFNs, TALENs和CRISPR/Cas9载体的构建

因的COs供体模板共转化到水稻中,在 T_0 代即得到了不含外源DNA的纯合突变体。

1.2 RNA

RNA作为植物病毒载体: Marton等人^[20]利用烟草脆裂病毒(TRV)表达系统将植物基因组编辑试剂材料转录为RNA,导入到植物细胞中,在烟草和矮牵牛(*Petunia hybrida* (J. D. Hooker) Vilmorin)中实现了ZFN介导的基因组编辑。此外,CRISPR/Cas9系统也可以通过烟草脆裂病毒表达系统实现对植物基因的编辑^[21]。

只含RNA。Cas9和含有目标序列的sgRNA载体可以在体外被转录成RNA,然后将RNAs进行纯化和转化。Zhang等人^[22]将CRISPR/Cas9的RNA在小麦未成熟胚中进行瞬时表达,可以在 T_0 代获得不含外源基因的

小麦纯合突变体。

1.3 蛋白质和核糖核蛋白复合体RNPs

以蛋白质和核糖核蛋白复合体作为基因组编辑的试剂材料可以有效地避免转基因整合事件的发生,目前已用于多个物种中。例如, Luo等人^[23]将本氏烟草乙酰乳酸合酶基因下游306 bp的TALEN蛋白, ALS2T1L和ALS2T1R转入烟草原生质体中,产生的突变效率约为1.4%。Woo等人^[24]将纯化的Cas9蛋白和向导RNA进行组装,并将组装好的RNPs复合体转入拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、烟草、生菜(var. *ramosa* Hort.)和水稻的原生质体中,可以获得突变的原生质体并再生出生菜的突变体植株。最近,CRISPR/Cas9的RNP复合体已经成功地用于小麦^[25]和玉米^[26]中,可以获得无外源DNA的小麦和玉米突变体。

2 验证基因组编辑的瞬时检测方法

此处的瞬时效应是指发生在未分化和再生的细胞和组织中的基因组编辑事件, 这种瞬时检测的方法常用于实验初期, 可以快速地检测基因组编辑试剂材料的效率, 还可以检测体内实验产生的修复机制是NHEJ还是HR途径。

2.1 原生质体转染

原生质体转染是检测基因组编辑效率和衡量基因组编辑事件最常见的方法。在很多案例中, 质粒DNA或者其他的生物材料通过电穿孔或者聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)介导的转化方法被导入到酶解消化后的叶肉细胞中, 多个DNA载体包括环状质粒、线性质粒, 或者DNA表达载体等可以共转化到同一个原生质体中。目前原生质体转化实验已经成功地应用于多种植物基因组编辑事件的检测: 如将ZFNs用于烟草中, 将TALENs用于拟南芥、烟草、二穗短柄草(*Brachypodium distachyum* (L.) Beauv.)、水稻、玉米和小麦中, 将CRISPR/Cas9用于拟南芥、烟草、水稻、玉米和小麦中。当基因组编辑工具用于植物基础研究和作物改良时, 瞬时实验也能发挥重要的作用: 通过原生质体瞬时实验, 可以快速地检测基因组编辑产生的不同结果, 包括插入或缺失突变、基因组大片段的缺失、同源重组等。Wright等人^[27]通过电穿孔的转化方式将ZFNs和一个DNA模板转入烟草原生质体中, 目的基因的同源重组效率可达到10%; Shan等人^[28]通过PEG介导的转化方法将靶定4个水稻基因和8个二穗短柄草基因的TALENs分别转化水稻和二穗短柄草的原生质体, 结果表明这些位点均发生了突变。Zhou等人^[29]利用不同的sgRNAs组合, 在水稻2号染色体上删除了10个烷型相关的双萜合成基因的基因簇(约245 kb), 在水稻中实现了大的DNA片段的删除。大多数通过基因组编辑方法产生的突变包括基因中断(删除或插入)、基因插入或基因替换等都可以通过原生质体的方法进行检测。

2.2 农杆菌渗入法

农杆菌是一种寄居在土壤里的植物病原菌, 可以感染植物的根部并形成根瘤, 农杆菌可以将特定的DNA片段(T-DNA)转入受感染植物细胞的细胞核中,

随后整合在宿主基因组中并被转录。当土壤农杆菌或者发根农杆菌与易感染的植物细胞相互作用后, 即会分别产生冠状瘤或者毛状根。这些菌株中包含一种大的质粒(大于200 kb), 这类质粒在冠状瘤诱导过程中起到重要作用, 因此被命名为Ti质粒或者Ri质粒。将这两种细菌中的Ti质粒卸甲修饰成双元载体, 可以用作转基因植物外源DNA的转运工具(具体的机制详见Gelvin^[30]撰写的综述)。

农杆菌渗入法是农杆菌介导的一种瞬时检测方法, 目前主要用于双子叶植物。该方法通过将液体培养的农杆菌渗入到植物叶片中, 从而使得转基因物质从细菌Ti质粒的T-DNA区域转运至植物细胞。在此方法中, 渗透区域的多数植物细胞均为转基因细胞。此外, 该方法可以用于较长的DNA片段的转化, 也可以将几个待转基因转入到同一个细胞中^[31]。农杆菌渗入法介导的基因共转化可以通过将待转基因整合入不同的农杆菌菌株中, 然后将不同的农杆菌培养基混合, 最后利用混合的农杆菌进行渗透实现; 也可以通过利用一个农杆菌菌株中包含多个双元载体实现; 或者通过一个农杆菌菌株中含有一个整合了多个基因的双元载体来实现。上述方法已经广泛地用于基因组编辑技术的瞬时体内活性检测^[32-37], 例如, Peer等人^[37]通过共转化35S::mGUS和35S::QQR-ZFN的方法在苹果(*Malus pumila* Mill.)和无花果(*Ficus carica* L.)叶片中重现了GUS的活性; Mahfouz等人^[38]利用农杆菌渗入法, 在烟草叶片中验证了Hax3 TALE介导的核酸酶可以在靶序列处产生双链断裂; Li等人^[34]在同一个双元载体中共转化了pcoCAS9及*AtPDS3*或者*NbPDS*基因的gRNA, 在拟南芥和烟草叶片的靶序列处均检测到预期的突变。

2.3 发根农杆菌法

发根农杆菌可以特异性地检测植物根毛的编辑效率, 目前为止, 这种方法只能用于大豆(*Glycine max* (Linn.) Merr.)基因组编辑的检测^[39-42]。例如, Curtin等人^[40]利用根毛转化的方法评估了ZFNs介导的9个大豆内源基因(*DCL1a/DCL1b*, *DCL4a/DCL4b*, *DCL2a*, *DCL2b*, *RDR6a*, *RDR6b*和*HEN*)的突变效率, 结果表明, 除了*DCL2a*和*2b*外, 其他7个位点均有突变。Du等人^[41]在大豆根毛中比较了TALEN和CRISPR/Cas这两种基

基因组编辑方法在两个基因位点*GmPDS11*和*GmPDS18*处的突变效率。

3 创制稳定的遗传突变体植株的转化方法

3.1 间接转化法

间接转化法是指通过农杆菌、植物病毒系统(包括烟草脆裂病毒和双生病毒等)将质粒携带的基因转入到目的细胞中的方法。

(1) 农杆菌介导的DNA转化法. 在已报道的基因组编辑研究中, 农杆菌介导的DNA转化方法占据了约80%的比例, 基本包括模式植物, 如拟南芥、本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)、烟草、矮牵牛; 主要的粮食作物, 如水稻、玉米、油菜(*Brassica napus* L.)、大麦和大豆; 蔬菜和水果作物包括番茄、苹果、无花果; 以及杨树(*Populus* L.)在内的林作物等. 发根农杆菌也可以用于植物基因组编辑的研究, 不过目前仅局限于大豆^[40-42]。

单个靶位点的转化方法. 当植物基因组编辑系统作用于一个基因位点(包括同一个基因家族的多个成员的保守序列)的编辑时, 基因组编辑系统的所有组分, 无论是ZFNs, TALENs还是CRISPR/Cas9, 与表达筛选标记的载体一起组装到一个双元载体中, 如图2所示, 此双元载体随后转入到农杆菌菌株中. 目前植物研究中多数的突变是单个基因的突变, 尤其是TALENs和ZFNs系统介导的突变。

多个靶位点的转化方法. 利用双元载体, 基因组编辑工具可以靶定单个基因, 也可以同时靶定多个基因, 如将多个双元载体分别转化到农杆菌中, 然后共转化植物细胞^[30]. 多个靶位点的转化可以将含有不同双元载体的农杆菌菌株混合到一起, 然后转染植物细胞, 也可以通过在一个双元载体中构建多个位点的基因组编辑工具实现. ZFNs和TALENs介导的多位点基因组编辑的主要限制因素是载体过大, 而对于CRISPR/Cas9系统来说, 多个靶位点可以共享Cas9蛋白, 针对每一个位点, 只需要设计一个特异的sgRNA即可. 多个sgRNAs的转录可以通过多个启动子分别转录实现, 也可以通过一个启动子的tRNA系统转录实现^[43]. Ma等人^[44]构建了2个载体, 分别含有8个和3个sgRNA的表达框, 这11个sgRNA分别靶定了FTL (FT-like)基因家族的11个

基因, 最终获得了所有基因都突变的突变体植物, 该突变体的叶片表现出早衰的表型. 同时他们对水稻中合成直链淀粉的*OsWaxy*基因的3个位点进行编辑, 水稻突变体的直链淀粉含量降低了14%^[44]. Xie等人^[45]在水稻中开发了一种多顺反子的tRNA-gRNA (PTG)系统, 在此系统中, 每一个sgRNA的两侧都是tRNA, 因此单个sgRNAs可以准确地转录, 最终在T₀代实现多位点的基因组编辑或者基因组大片段的删除。

农杆菌介导的转化是最常见的植物转化方法, 其操作简便, 成本较低, 很容易在实验室中建立转化体系, 因此多数植物生物学实验室都可熟练运用该技术进行转化. 但是此方法具有以下4个缺点: (i) 在不同的双元载体中较难构建独立的基因组编辑试剂材料; (ii) 不能转化小的DNA片段、RNA或者蛋白质; (iii) 该方法依赖于特定的受体基因型, 尤其是对于单子叶植物而言; (iv) 很难避免Ti质粒的骨架整合到植物基因组上, 产生转基因植物。

(2) 病毒介导的基因组编辑试剂材料的转化. 最先利用病毒载体进行遗传转化的是动物细胞, 与动物细胞相比, 利用病毒载体对植物进行转化的研究并不常见. 在植物中, 最早被利用的病毒载体是烟草花叶病毒(TMV), 该病毒在烟草中实现了病毒介导的内源基因的沉默^[46], 从此以后, 多种植物病毒被用于病毒介导的基因沉默的研究. 由于大多数的植物病毒基因组是单链RNA (single-stranded RNA, ssRNA), 因此利用病毒介导基因沉默通常是通过接种体外转录的病毒载体来实现的. 对于DNA病毒, 如双生病毒等, 接种过程比较简单, 只需要病毒的DNA即可. 此外, 病毒基因组还可以以cDNA的形式插入到双元载体中, 然后通过农杆菌感染进入植物细胞, 完成转化过程. 目前烟草脆裂病毒已经可以将RNA高效地转化到植物细胞中并用于植物基因组编辑^[20,21]. 双生病毒也可以在修饰后将基因组编辑试剂材料运送到植物细胞中, 实现基因组编辑, 这种方法尤其适用于同源重组介导的基因打靶^[10,47,48]。

烟草脆裂病毒是一种高效诱导基因沉默的载体, 已经用于多种植物的功能基因组学研究. 烟草脆裂病毒是单链RNA病毒, 其基因组为二分基因组, 即包含2个正义的单链RNA分子, 分别命名为RNA1和RNA2. RNA2的基因组可以被修饰, 改造后具有转录后基因沉默的作用^[49]. 将待沉默基因的片段插入到RNA2中,

通过物理手段或者农杆菌渗透法进行接种, 接种过程需要RNA1和RNA2同时存在, 以农杆菌渗透法为例, 两种农杆菌菌株, 一种含有RNA1分子, 一种含有携带目的基因片段的RNA2分子, 两种菌株混合在一起后侵染植物叶片^[50], 即可实现目的基因的沉默。由于病毒RNA不能结合在植物基因组上, 因此受到编辑的突变体是非转基因植物。

烟草脆裂病毒还可以作为基因工程的载体。当RNA2分子被编码Zif268:FokI ZFN蛋白的RNA分子代替后, 在烟草和矮牵牛的体细胞中, 烟草脆裂病毒载体可以对预整合的报告基因进行修饰^[20]。烟草脆裂病毒也可以转化CRSIPR/Cas9系统, Ali等人^[21]在过表达Cas9的转基因烟草叶片上进行农杆菌转化, 所用的农杆菌为两种菌株的混合物, 一种含烟草脆裂病毒RNA1基因组, 一种含有烟草脆裂病毒RNA2分子, 而RNA2中包含烟草PDS基因的gRNA, 最终烟草的PDS基因被修饰。Ali等人的研究还表明, 通过混合序列特异性的RNA2分子, 在烟草中可以实现多个基因位点(PDS和PCNA)的同时编辑。

双生病毒是DNA病毒, 因此无需体外转录过程, 可直接通过物理接种的方式使质粒DNA感染宿主。双生病毒是一个大的植物病毒家族, 含有单链、成环的DNA分子, 基因组约为2.5~3.0 kb。当双生病毒的DNA分子进入宿主细胞的细胞核后, 单链DNA分子即会在宿主DNA聚合酶的帮助下形成双链DNA中间体, 这种双链DNA可以作为模板起始滚环复制和病毒基因的转录。对于双生病毒而言, 复制需要的唯一蛋白是复制起始蛋白(Rep), 复制起始蛋白通常结合在大基因间区(large intergenic region, LIR; 玉米线条病毒属(Mastreviruses))、基因间区(甜菜曲顶病毒属(Curtoviruses)和番茄伪曲顶病毒属(Curtoviruses))或者共同区域(双边基因组病毒属(Begomoviruses)), 在这些结合区域, 复制起始蛋白会识别发夹结构顶端的9个碱基序列(TAATATTAC)并进行切割, 产生单链切口。伴随着滚环复制, 单链基因组被转换成双链中间体, 或者被外壳蛋白包被形成新的病毒粒子, 这些病毒粒子可以通过植物内源的胞间连丝转运到相邻的细胞中。Baltes等人^[10]利用豆类黄矮病毒(BeYDV)瞬时表达序列特异的核酸酶(ZFNs, TALENs, CRSIPR/Cas9系统)以及DNA修复模板, 是首次利用双生病毒作为载体进行植物基因组编辑试剂材料转化的研究。在烟草中, 基于豆类

黄矮病毒的复制子对乙酰乳酸合成酶基因(ALS)的打靶效率比基于农杆菌T-DNA介导的基因打靶效率高1~2个数量级。除了核酸酶介导的靶向突变, 双生病毒载体还可以促进植物细胞中模板DNA的复制, 提高同源重组的基因打靶效率, 该方法进一步被用于修复无功能的*gus:nptII*基因。类似的基因组编辑工作还包括: Yin等人^[51]利用修饰后的甘蓝曲叶病毒(CaLCuV)作为载体对烟草*NbPDS3*和*NbIspsH*基因进行编辑, Čermák等人^[47]利用豆类黄矮病毒将组成型的35S启动子定点插入到番茄花青素突变体1基因(*ANT1*)启动子区, 编辑效率是传统DNA转化方法(如农杆菌)的10倍。最近Gil-Humanes等人^[48]将此方法运用到小麦中, 通过优化小麦矮化病毒, 提高了基因打靶的效率。

无论是自然条件还是实验条件下, 植物病毒可以系统地感染多种植物。病毒载体很容易通过农杆菌进入到植物的生长点, 利用病毒载体, 序列特异性核酸酶只能进行瞬时表达, 不会整合在基因组上。此外, 利用病毒复制系统, 基因组编辑的修复模板也可以进行复制, 因此这种转化方法可能是未来植物基因组编辑的理想方法。

3.2 直接转化法

直接转化法是指通过物理或化学的手段直接将基因组编辑成分或者试剂材料转化到植物细胞中, 最常见的直接转化法是基因枪法和原生质体转染法, 其他几种方法也可以产生转基因植物并且有基因组编辑的潜力, 如碳化硅纤维(whiskers)介导的转化、细胞和组织的电穿孔转化、胚胎电泳、显微注射、花粉管介导的转化以及脂质体介导的转化等^[52]。直接转化法可以将多个DNA载体(包括基因打靶材料和修复模板)同时进行转化, 也可以将不同形式的编辑试剂材料如DNA片段、RNA和蛋白质转化到植物细胞中。直接转化法不依赖植物基因型, 只需要完整的再生体系即可, 目前很多成功的植物基因组编辑系统都是利用原生质体转染或者基因枪法实现的。

(1) 原生质体转染。通过酶解植物细胞壁可以得到植物原生质体, 遗传材料包括DNA、蛋白质和其他的材料可以通过电穿孔或者PEG处理的方法转化到原生质体中。叶肉细胞来源的原生质体多用于双子叶植物的再生, 胚性愈伤来源的原生质体多用于单子叶植物的再生。由于原生质体转染法能够同时转化多个

组分,且包含大量的受体细胞,因此一直被认为是基因组编辑试剂材料理想的转化方法.此方法尤其适用于带有修复模板的基因修饰,这是因为此方法中受体细胞较多,大量的细胞可以被转化和再生,最终可以获得依赖于供体模板的基因组编辑事件,如同源重组等.原生质体转染最大的缺点是植物再生过程,尤其是单子叶植物的再生问题.

根据植物原生质体的再生能力,利用原生质体转染和培养的方法可以在细胞、组织和植株水平上获得基因组编辑事件.Wright等人^[27]利用含有缺陷*GUS:NPTII*报告基因的转基因烟草原生质体,通过电穿孔转化的方法将ZFN和修复模板DNA进行转化,经同源重组获得了报告基因正常表达的植物.利用原生质体转染和再生,TALENs介导的基因组编辑方法成功地用于马铃薯中^[53,54],随后CRISPR/Cas9核糖核蛋白复合物(ribo-nucleoproteins, RNP)s介导的基因组编辑也在马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)^[55]、拟南芥、烟草和生菜^[24]中进行了报道,同时获得了不含外源DNA的生菜突变体^[24].根据Clasen等人^[53]的研究,在马铃薯原生质体中转化液泡酸性转化酶基因(*VInv*)的TALENs载体,可以再生出在该基因发生突变的马铃薯突变体,突变体块茎中未检测到还原糖,利用突变体制作的马铃薯条中丙烯酰胺含量降低,马铃薯条变色情况减轻.但是利用已建立的原生质体再生体系获得再生植株,目前只能局限于某些特定的物种.

(2) 基因枪转化.生物弹道法,也被称为基因枪法,是一种通过轰击细胞将包裹在微粒表面的DNA运送到细胞中的方法,利用基因枪法运送的DNA受到足够的物理驱动力,使其能够穿透细胞壁,然后随机地整合到植物基因组上.基因枪法是转化植物DNA最常见的方法之一,该方法具有高效、可以同时转化几个DNA载体、不受植物物种的限制等优点;该方法最大的缺点是通常将多个拷贝的DNA同时转化到植物细胞中,因此可能产生不良效应,如在转基因植物中抑制基因的表达或者改变基因的表达模式等.

通过基因枪介导的转化可以对植物基因组进行编辑,Shan等人^[28,56]利用TALEN或CRISPR/Cas9系统对二穗短柄草、水稻和小麦内源基因进行了定点敲除;Ainley等人^[57]将除草剂抗性基因(*aad1*)插入到了ZFN的靶位点处;Li等人^[58]利用CRISPR/Cas9系统对*HPT*基因进行了序列替换,同时通过同源重组对大豆内源基

因*ALSI*进行了准确的编辑.Svitashev等人^[59]利用基因枪法将所有的基因组编辑试剂材料和修复模板转化玉米,通过同源重组的方法对玉米*ALS*基因进行定点替换,此外,利用基因枪介导的转化,他们还获得了基因定点插入突变体,但是利用农杆菌介导的转化,未能获得定点插入突变体.

最近研究表明,通过基因枪法转化不含DNA的基因组编辑试剂材料,可以获得无外源DNA的突变体,可能绕过转基因的调控监管.体外转录的CRISPR/Cas9 IVTs或者RNPs已经成功地用于六倍体小麦基因的编辑^[22,25],Svitashev等人^[26]在玉米中利用CRISPR/Cas9 RNPs获得了不含外源基因的突变体.

(3) Whisker介导的转化.Shukla等人^[60]在玉米Hi-II的胚性细胞中利用这种方法转化*IPK1*基因的ZFNs,最终实现了基因定点突变和插入.

(4) 其他转化方法.细胞穿膜肽(cell permeable peptides, CPPs)是一种非病毒载体系统,能够将核酸和纳米材料转化到细胞中,细胞穿膜肽可以用于DNA、RNA、蛋白质、纳米材料和药物的传送,因此受到广泛的关注.细胞穿膜肽有以下几个典型的特点:(i)少于30个氨基酸;(ii)富含精氨酸和赖氨酸;(iii)带有正电荷或者两性分子;(iv)容易制备;(v)无毒性^[61].目前利用细胞穿膜肽可以将DNA和蛋白质转化到植物细胞,包括配子细胞中^[62].带有穿膜序列(MTS,包含12个氨基酸)的细胞穿膜肽可以实现Cre重组酶的细胞内转运:在含有His6-NLS-Cre-MTS蛋白的培养基中培养水稻愈伤组织,Cre重组酶可以转运到水稻愈伤中,随后在水稻中产生位点特异性的DNA切割^[63],类似的实验也在柑橘(*Citrus reticulata* Blanco.)中进行了报道^[64].

纳米生物技术为基因组编辑试剂材料的转化提供了有效的手段,纳米材料能够将特定的生物分子准确地转运到细胞、组织和有机体中^[65].介孔氧化硅纳米粒子(mesoporous silica nanoparticles, MSNs)就是这样的一种纳米材料,这种多孔的纳米颗粒由有序的孔结构形成,因此对蛋白质等分子具有大的运载能力^[66].Wang研究组^[67]首次利用介孔氧化硅纳米粒子将生物材料运送到植物细胞,通过基因枪法,介孔氧化硅纳米粒子能够共转化DNA和化学物质^[68],也能转运DNA和蛋白质^[67]到植物细胞中.Martin-Ortigosa等人^[69]利用介孔氧化硅纳米粒子将Cre重组酶转运到玉米细胞中,Cre重组酶存储在金粉包被的介孔氧化硅纳米粒子

的小孔中,通过基因枪轰击的方法进入植物细胞.该细胞基因组中两个loxP位点中间包含有1个编码草甘膦乙酰转移酶的筛选基因(*gat*)和1个*Anemonia majano*蓝色荧光蛋白报告基因(*AmCyan1*).Cre重组酶在细胞内被释放,然后在loxP位点处进行重组,DsRed2进行表达,两个基因被删除.目前,直接和间接的基因组编辑试剂材料的转化方法均已经被广泛地应用.

直接法包括原生质体转染和基因枪法,该方法可以将多个不同形式的基因组编辑试剂材料进行转化,且具有较高的效率,因此可能是未来发展的趋势.利用这种方法产生的多拷贝DNA片段的随机整合可以通过转化不含DNA的基因组编辑试剂材料来避免,转化不含DNA的基因组编辑试剂材料还可以产生非转基因突变体,用于经济作物的生产.间接法如病毒感染法也可以转运不同形式的基因组编辑试剂材料,易于操作且成本较低.正如Altpeter等人^[9]指出的那样,在很多作物中,大多数基因组编辑试剂材料的转化和基因组编辑系统还不能满足应用的需求,主要局限于:通过组织培养再生出基因组编辑植物的周期较长,植物稳定转化的效率较低;农杆菌介导的基因转化运送的DNA量较少,很难实现同源重组;基因枪介导的转化方法准确度较低.因此,所有的技术都需要进一步优化和提高.表1列举了目前大部分发表的有关ZFN、TALAN和CRISPR、Cas介导的基因组编辑试剂材料在植物中的导入方法和编辑结果.

4 展望

基因剪刀,包括人工设计的归巢内切酶(meganucleases, MENs)、ZFNs、TALENs、尤其是CRISPR/Cas系统等,已经广泛地用于不同的作物品种并产生定点突变、删除、同源重组等,基因剪刀还可用于转基因的叠加及内源基因的转录重编程(表1).在不久的将来,通过这些技术将会获得抗病、优质、高产等品质改良的新的农作物品种,尽管这些发生了准确突变的作物是否被归为转基因监管目前还没有定论^[1,3],在加拿大,基因组编辑产生的经济作物已经获得了批准^[133],最近美国农业部也表明,CRISPR编辑的蘑菇(*Agaricus campestris*)和玉米中均不含有外源DNA,可以不需要监管直接进入市场.

植物基因组编辑技术面临的最突出的问题是缺乏

理想的转化方法和细胞再生体系,基因组编辑的机制也需要进一步发掘.目前可用的遗传转化方法不能用于所有的植物品种,而只能局限于特定的基因型、组织和培养类型.根据文献报道,大多数的基因组编辑仍旧聚焦于创制DNA断裂进而破坏基因功能,只有少数的报道是通过同源重组的方式对内源基因进行准确地序列纠正、替换和叠加,这主要是由于缺乏对基因组编辑的分子机制研究,同时缺少转化多种基因组编辑试剂材料的有效手段造成的.理想的植物基因组编辑方法应该包含以下几点:(i)所用的转化方法能够高效地将基因组编辑试剂材料转化到作物品种的特定基因型中,外植体应包含能够再生的所有物种的分生组织,不受基因型的限制.近期Lowe等人^[134]研究表明,当玉米中含有*Bbm* (Baby boom)及*Wus2* (Wuschel2)转基因时,植物再生能够突破组织和基因型的限制.利用病毒载体进行转化,可以使得载体快速地传递并编辑植物的生殖细胞系.(ii)通过植物生殖细胞系进行转化,如花粉管通道和人工杂交的转化方法可以有效地避免物种、基因型和再生体系的限制.(iii)必须建立高效的植物再生体系才能获得足够的突变体植物,即大量的细胞能够被转化和再生.以原生质体再生体系为例,在原生质体转化过程中,有上百万的细胞被转化但最终只能再生出上千数目的植物.如果建立了高效的植物再生体系,将再生出大量的植物,最终获得同源重组和基因叠加的突变体(尽管成功率很低).原生质体转化方法目前面临的最大的挑战是为所有的植物建立原生质体再生体系.(iv)基因编辑的核酸酶,包括ZFNs、TALENs和CRISPR/Cas9,能够以蛋白质或者RNA的形式进行瞬时表达,这种不含DNA的形态能够消除启动子带来的可变性(由于启动子不能在每个细胞或细胞类型中均工作,因此基于CRISPR/Cas9系统的载体选择性表达会带来变化),此方法还会产生非转基因的植物,增加了基因编辑植物的可接受性.(v)高效的转化方法仍旧受到期待.新技术介导的转化方法已经用于医学研究领域,在哺乳动物细胞中表现出很高的效率.除了病毒载体,非病毒载体包括脂质纳米粒子(lipid nanoparticles, LNPs)、脂质体(如二油酰磷脂酰胆碱, DOTAP, 胆固醇)、聚合物(聚乙烯亚胺-PEI, 聚L-赖氨酸-PLL)、CPPs、偶联物以及一些新的分子,如细胞衍生膜小泡(CMV s)已经用于运载上述可设计的核酸酶或核酸蛋白酶的质粒或者mRNA.非

表 1 利用 ZFNs, TALENs 和 CRISPR/Cas9 技术进行植物基因组编辑的概况^{a)}

物种/基因组编辑工具/目的基因	编辑结果	瞬时检测或稳定的编辑细胞的转化方法	稳定的编辑植物的转化方法	参考文献
<i>At/C/PDS3, FLS2, RACK1b, 1c</i>	删除、替换和插入(多位点编辑)	原生质体转染, 农杆菌渗入法		Li 等人 ^[34]
<i>At/C/-GFP</i>	删除和插入	农杆菌渗入法		Jiang 等人 ^[70]
<i>At/C/-GFP</i>	删除和插入		花序转染法	Jiang 等人 ^[71]
<i>At/C/-BRI1, JAZ1, GAI, YFP</i>	删除和插入	原生质体转染	土壤农杆菌介导的转化	Feng 等人 ^[72]
<i>At/C/-BRI1, JAZ1, GAI, CHL1, API, TT4, GUUS</i>	删除和插入		土壤农杆菌介导的转化	Feng 等人 ^[73]
<i>At/C/-CHL1, CHL2, TT4i</i>	删除、替换(HDR, NHEJ)和插入(多位点编辑)	原生质体转染	土壤农杆菌介导的转化	Mao 等人 ^[74]
<i>At/C/-ADH1</i>	替换(HDR)		花序转染法	Schimpl 等人 ^[75]
<i>At/C/-TRY, CPC, ETC2</i>	删除和插入		花序转染法	Xing 等人 ^[76]
<i>At/C/-5g55580 (3个位点)</i>	删除和插入		花序转染法	Ma 等人 ^[44]
<i>At/C/-ADH1, TT4, RTE1, Guus</i>	删除和插入(HR介导 GUS 基因)		花序转染法	Fausser 等人 ^[77]
<i>At/C/-ETC2, TRY, CPC</i>	删除和插入(多位点编辑)		花序转染法	Wang 等人 ^[78]
<i>At/C/-BRI1</i>	删除和插入		花序转染法	Yan 等人 ^[79]
<i>Nb/C/-PDS3</i>	删除、替换(HDR, NHEJ)和插入	原生质体转染, 农杆菌渗入法		Li 等人 ^[34]
<i>Nb/C/-PDS</i>	删除	农杆菌渗入法		Belhaj 等人 ^[32]
<i>Nb/C/-PDS</i>	删除	农杆菌渗入法	土壤农杆菌介导的转化	Nekrasov 等人 ^[35]
<i>Nb/C/-PDS</i>	删除	农杆菌渗入法		Upadhyay 等人 ^[80]
<i>Nb/C/-Transcriptional activation-EDLL domain, dHax3 TAD of phytopathogenic Xanthomonas spp. Repression-SRDX repression domain</i>	调控	农杆菌渗入法		Piatek 等人 ^[36]
<i>Nb/C/-PCNA, PDS</i>	删除和插入		烟草脆裂病毒介导的转化	Ali 等人 ^[21]
<i>GFP</i>	删除和插入(NHEJ)	农杆菌渗入法		Jiang 等人 ^[70]
<i>Nb/C/-PDS, IspH, fsGUS</i>	删除和插入		农杆菌介导的双生病毒转化	Yin 等人 ^[51]
<i>Nt/C/-PDS, PDR6</i>	删除和插入	原生质体转染		Gao 等人 ^[81]
<i>Nt/C/-SurA, SurB</i>	删除和插入	农杆菌介导的双生病毒转化		Baltes 等人 ^[10]
<i>Os/C/-ROC5, SPP, YSA</i>	删除和插入		土壤农杆菌介导的转化	Feng 等人 ^[72]
<i>Os/C/-SWEET11, SWEET14, dsRED</i>	删除和插入(NHEJ)	原生质体转染		Jiang 等人 ^[70]
<i>Os/C/-NbPDS</i>	删除和插入	农杆菌渗入法		Belhaj 等人 ^[32]

续表1

物种/基因组编辑工具/目的基因	编辑结果	瞬时检测或稳定的编辑细胞的转化方法	稳定的编辑植物的转化方法	参考文献
<i>Os/C/-PDS-SP1, BADH2, 02g23823, MPK2</i>	删除、替换(HDR, NHEJ)和插入	原生质体转染	基因枪介导的转化	Shan等人 ^[56]
<i>Os/C/-MYB1</i>	删除和插入	原生质体转染	土壤农杆菌介导的转化	Mao等人 ^[74]
<i>Os/C/-MPK5</i>	删除和插入	原生质体转染		Xie和Yang等人 ^[82]
<i>Os/C/-CAO, LAZY1</i>	删除		土壤农杆菌介导的转化	Miao等人 ^[83]
<i>Os/C/-PTG1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9</i>	删除和插入(单位点和多位点编辑)		土壤农杆菌介导的转化	Xie等人 ^[45]
<i>Os/C/-BEL</i>	替换		土壤农杆菌介导的转化	Xu等人 ^[84]
<i>Os/C/-11 FTL基因, GSTU, MRP15, AnP Waxy</i>	删除、替换(HDR, NHEJ)和插入		土壤农杆菌介导的转化	Ma等人 ^[44]
<i>Os/C/-SWEET1a, 1b, 11和 13; P450; 10个双萜类基因</i>	删除和插入-大的DNA片段删除(245 kb)	原生质体转染	土壤农杆菌介导的转化	Zhou等人 ^[29]
<i>Os/C/-PDS, PMS3, EPSPS, DERF1, MSH1, MYB5, MYB1, ROC5, SPP, YSA</i>	删除、替换(HDR, NHEJ)和插入		土壤农杆菌介导的转化	Zhang等人 ^[85]
预整合的 <i>DsRED</i>	删除和插入		土壤农杆菌介导的转化	Mikami等人 ^[86]
<i>Os/C/-DMC1A</i>	删除和插入			Mikami等人 ^[87]
<i>Ta/C/-MLO</i>	删除和插入(NHEJ)	原生质体转染		Shan等人 ^[56] 、Wang等人 ^[88]
<i>Ta/C/-GW2(RNP)</i>	删除和插入	原生质体转染	基因枪介导的转化	Liang等人 ^[25]
<i>Ta/C/-Inox, PDS</i>	删除	农杆菌渗入法		Upadhyay等人 ^[80]
<i>Hv/C/-PM19</i>	删除和替换		土壤农杆菌介导的转化	Lawrenson等人 ^[89]
<i>Ds/C/-RED2</i>	删除和插入	土壤农杆菌介导的转化		Jiang等人 ^[70]
<i>Mp/C/-ARF1</i>	删除		土壤农杆菌介导的转化	Sugano等人 ^[90]
<i>Zm/C/-IPK</i>	删除和插入	原生质体转染		Liang等人 ^[91]
<i>Zm/C/-HKT1</i>	删除和插入(多位点编辑)	原生质体转染	土壤农杆菌介导的转化	Xing等人 ^[76]
<i>Zm/C/-LIG1, MS26, MS45, ALS1, ALS2</i>	删除、替换和基因插入		基因枪介导的转化	Svitashev等人 ^[59]
<i>Zm/C/-LIG, MS26, MS45, ALS2</i>	删除和插入		基因枪介导的转化	Svitashev等人 ^[26]
<i>Zm/C/-ARGOS8</i>	删除、插入和交换		基因枪介导的转化	Shi等人 ^[92]
<i>Gm/C/-</i> 预整合的 <i>gfp5a', gfp3a' 07g14530, 01gDDM1, 11gDDM1, 01g+11gDDM1-Chr-1, 01g+11gDDM1-Chr11, Met1-04g, Met1-06g, miR1514, miR1509</i>	删除、插入和替换		根毛农杆菌介导的转化	Jacobs等人 ^[42]
<i>Gm/C/-DD20, DD43, ALS1</i>	删除、插入、替换(HDR)和编辑		基因枪介导的转化	Li等人 ^[58]

续表 1

物种/基因组编辑工具/目的基因	编辑结果	瞬时检测或稳定的编辑细胞的转化方法	稳定的编辑植物的转化方法	参考文献
<i>Gm/C/-06g14180, 08g02290, Glyma12g37050</i>	删除和插入		根毛农杆菌介导的转化	Sun 等人 ^[93]
<i>Gm/C/-转基因BAR, FEI, FEI2, SHR</i>	删除和插入		根毛农杆菌介导的转化	Cai 等人 ^[39]
<i>Gm/C/-PDS11, GlymaPDS18</i>	删除和插入	根毛农杆菌介导的转化	土壤农杆菌介导的转化	Du 等人 ^[41]
<i>Cs/C/PDS</i>	删除和替换	农杆菌渗入法		Jia 和 Wang ^[33]
<i>Cp/C/CsPDS</i>	删除和替换	农杆菌渗入法	土壤农杆菌介导的转化	Jia 和 Wang ^[94]
<i>Cp/C/CsLOB1</i> 启动子	调控			Jia 等人 ^[95]
<i>Sl/C/-AGO7</i>	删除和替换		土壤农杆菌介导的转化	Brooks 等人 ^[96]
<i>Sl/C/-Ant1</i>	插入		农杆菌介导的双生病毒转化	Čermák 等人 ^[47]
<i>Sl/C/-RIN</i>	删除和插入		土壤农杆菌介导的转化	Ito 等人 ^[97]
<i>St/C/-IAA2</i>	删除和替换		土壤农杆菌介导的转化	Wang 等人 ^[98]
<i>St/C/-ALS1</i>	删除和插入		土壤农杆菌介导的转化	Butler 等人 ^[99]
<i>St/C/-GBSS</i>	删除和插入		原生质体转染	Andersson 等人 ^[55]
<i>Pt/C/-PDS</i>	删除和替换		土壤农杆菌介导的转化	Fan 等人 ^[100]
<i>Bo/C/-C.GA4.a</i>	删除和替换		土壤农杆菌介导的转化	Lawrenson 等人 ^[89]
<i>Ps/C/-4'OMT2</i>	删除	农杆菌渗入法, 烟草脆裂病毒介导的转化		Alagoz 等人 ^[101]
<i>Cs/C/-eIF4E</i>	删除和插入		土壤农杆菌介导的转化	Chandrasekaran 等人 ^[102]
<i>Vv/C/-IdnDH</i>	删除和插入		土壤农杆菌介导的转化	Ren 等人 ^[103]
<i>Vv/C/-MLO-7</i>	删除和插入	原生质体转染		Malnoy 等人 ^[104]
<i>Md/C/-DIPM-1, DIPM-2, DIPM-4</i>	删除和插入	原生质体转染		Malnoy 等人 ^[104]
<i>At/Z/-预整合的QQR</i>	删除和插入		花序转染法	Llody 等人 ^[105]
<i>At/Z/-不完整的GUS基因</i>	删除和插入		土壤农杆菌介导的转化	Tovkach 等人 ^[106]
<i>At/C/-ADH1, TT4</i>	删除和插入	原生质体转染	花序转染法	Zhang 等人 ^[107]
<i>At/Z/-ABI4</i>	删除和替换		花序转染法	Osakabe 等人 ^[108]
<i>At/Z/-预整合的目的序列</i>	删除和插入		花序转染法	de Pater 等人 ^[109]
<i>At/Z/-PPO</i>	替换(HDR)		花序转染法	de Pater 等人 ^[110]
<i>At/Z/-预整合的GUS基因</i>	删除和替换	病毒载体		Vainstein 等人 ^[111]
<i>At/Z/-预整合的GFP基因</i>	替换 (HDR)		土壤农杆菌介导的转化	Weinthal 等人 ^[112]
<i>At/Z/-ADH1</i>	替换(HDR)(缺少DNA修复蛋白KU70和LIG4)		花序转染法	Qi 等人 ^[113]
<i>At/Z/-3 RLK 基因簇, 1 个大的R基因簇</i>	删除、倒置和复制		花序转染法	Qi 等人 ^[114]
<i>At/Z/-ADH1</i>	替换		基因枪介导的双生病毒转化	Baltes 等人 ^[10]

续表1

物种/基因组编辑工具/目的基因	编辑结果	瞬时检测或稳定的编辑细胞的转化方法	稳定的编辑植物的转化方法	参考文献
<i>Petunia</i> /Z/-预整合的 <i>GUS</i> 基因目的序列	删除和插入		土壤农杆菌介导的转化	Marton等人 ^[20]
<i>Gm</i> /Z/- <i>DCL1</i> (<i>DCL1a</i> / <i>DCL1b</i>), <i>DCL4</i> (<i>DCL4a</i> / <i>DCL4b</i>), <i>DCL2a</i> , <i>DCL2b</i> , <i>RDR6a</i> , <i>RDR6b</i> , <i>HEN1a</i>	删除和插入	根毛农杆菌介导的转化	根毛农杆菌介导的转化	Curtin等人 ^[40]
<i>Nt</i> /Z/- <i>gus:nptII</i>	替换(HDR)	农杆菌介导的双生病毒转化		Baltes等人 ^[10]
<i>Nb</i> /Z/- <i>NtSuR</i> , <i>NtSuRB</i>	删除、替换(HDR, NHEJ)和插入	原生质体电穿孔法		Townsend等人 ^[115]
<i>Nb</i> /Z/-预整合的 <i>GUS:NPTII</i>	替换(HDR)	原生质体电穿孔法		Wright等人 ^[27]
<i>Nb</i> /Z/-预整合的 <i>GFP</i> 基因目的序列	替换(HDR)		土壤农杆菌介导的转化	Cai等人 ^[116]
<i>Nt</i> /Z/- <i>CHN50</i>	插入 <i>PAT</i> 基因		土壤农杆菌介导的转化	Cai等人 ^[116]
<i>Nb</i> /Z/- <i>GFP</i> 和 <i>GUS</i>	删除和替换	农杆菌介导的双生病毒转化	农杆菌介导的双生病毒转化	Baltes等人 ^[10]
<i>Nb</i> /Z/-预整合的 <i>GFP</i> 基因目的序列	hph替换(HDR)		土壤农杆菌介导的转化	Weinthal等人 ^[112]
<i>Nb</i> /Z/-预整合的 <i>GUS</i> 基因目的序列	删除和插入		土壤农杆菌介导的转化	Marton等人 ^[20]
<i>Nb</i> /Z/-不完整的 <i>GUS</i> 基因	删除和插入		土壤农杆菌介导的转化	Tovkach等人 ^[106]
<i>Zm</i> /Z/- <i>IPK</i>	替换和插入(HDR)		WHISKERS TM	Shukla等人 ^[60]
<i>Zm</i> /Z/-预整合的 <i>PAT</i> 基因目的序列	<i>AAD1</i> 基因插入		基因枪介导的转化	Ainly等人 ^[57]
<i>Bn</i> /Z/-表达 <i>KASII</i> 的ZFP-TF	基因调控		土壤农杆菌介导的转化	Gupta等人 ^[117]
<i>Md</i> /Z/-预整合的 <i>QQR</i> 目的序列- <i>ZFN</i>	删除和插入	农杆菌渗入法	土壤农杆菌介导的转化	Peer等人 ^[37]
<i>Fc</i> /Z/-预整合的 <i>QQR</i> 目的序列- <i>ZFN</i>	删除和插入	农杆菌渗入法	土壤农杆菌介导的转化	Peer等人 ^[37]
<i>At</i> /T/- <i>CLV3</i>	删除和插入		花序转染法	Forner等人 ^[118]
<i>Nt</i> /T/- <i>ALS</i> (<i>SurA</i> 和 <i>SurB</i>)	删除、插入和替换(HDR)	原生质体转染		Zhang等人 ^[119]
<i>Nt</i> /T/- <i>SurA</i> 和 <i>SurB</i>	删除和插入	农杆菌介导的双生病毒转化		Baltes等人 ^[10]
<i>Nb</i> /T/-EBE	删除和插入	农杆菌介导的转化		Mahfouz等人 ^[38]
<i>Nb</i> /T/- <i>ALS</i>	删除	农杆菌介导的双生病毒转化		Baltes等人 ^[10]
<i>Nb</i> /T/- <i>ALS2</i>	删除	原生质体转染-mRNA		Stoddard等人 ^[120]

续表 1

物种/基因组编辑工具/目的基因	编辑结果	瞬时检测或稳定的编辑细胞的转化方法	稳定的编辑植物的转化方法	参考文献
<i>Nb</i> /T/- <i>FucT</i> 和 <i>XylT</i>	多基因删除		原生质体转染	Li 等人 ^[121]
<i>Os</i> /T/- <i>EPSPS</i>	删除和替换		基因枪介导的转化	Wang 等人 ^[78]
<i>Os</i> /T/- <i>IIN3</i> (也称作 <i>SWEET14</i>)	删除和插入		土壤农杆菌介导的转化	Li 等人 ^[122]
<i>Os</i> /T/- <i>DEP1</i> , <i>BADH2</i> , <i>CKX2</i> , <i>SD1</i>	删除、替换和插入	原生质体转染	基因枪介导的转化	Shan 等人 ^[28]
<i>Os</i> /T/- <i>BADH2</i> , <i>CKX2</i> , <i>DEP1</i>	删除和插入		土壤农杆菌介导的转化	Shan 等人 ^[123]
<i>Os</i> /T/- <i>ALS</i>	同源重组		基因枪介导的转化	Li 等人 ^[124]
<i>Os</i> /T/- <i>CSA</i> , <i>PMS3</i> , <i>DERF1</i> , <i>GN1a</i> , <i>TAD1</i> , <i>MST7</i> , <i>MST8</i>	删除、替换和插入		土壤农杆菌介导的转化	Zhang 等人 ^[125]
<i>Bd</i> /T/- <i>ABA1</i> , <i>CKX2</i> , <i>SMC6</i> , <i>SPL</i> , <i>SBP</i> , <i>COI</i> , <i>RHT</i> , <i>HTA1</i>	删除、替换和插入	原生质体转染	基因枪介导的转化	Shan 等人 ^[28]
<i>Hv</i> /T/- <i>HvPAPhy_a</i> 的启动子	删除		土壤农杆菌介导的转化	Wendt 等人 ^[126]
<i>Hv</i> /T/-预整合的 <i>GFP</i> 基因目的序列	删除和插入		土壤农杆菌介导的转化(花粉)	Gurushidze 等人 ^[127]
<i>Ta</i> /T/- <i>MLO</i>	删除和插入	原生质体转染	基因枪介导的转化	Wang 等人 ^[88]
<i>Zm</i> /T/- <i>PDS</i> , <i>IPK1A</i> , <i>IPK</i> , <i>MRP4</i>	删除	原生质体转染	土壤农杆菌介导的转化	Liang 等人 ^[91]
<i>Zm</i> /T/- <i>glossy2</i>	删除	基因枪介导的转化	土壤农杆菌介导的转化	Char 等人 ^[128]
<i>Gm</i> /T/- <i>FAD2-1A</i> , <i>FAD2-1B</i>	删除和插入	根毛农杆菌介导的转化	根毛农杆菌介导的转化	Haun 等人 ^[129]
<i>Gm</i> /T/- <i>PDSII</i> , <i>PDSI8</i>	删除和插入	根毛农杆菌介导的转化	土壤农杆菌介导的转化	Du 等人 ^[41]
<i>Sl</i> /T/- <i>PRO</i>	删除和插入		土壤农杆菌介导的转化	Lor 等人 ^[130]
<i>Sl</i> /T/- <i>Ant1</i>	插入		农杆菌介导的双生病毒转化	Čermák 等人 ^[47]
<i>St</i> /T/- <i>VInv</i>	删除和插入	原生质体转染	原生质体转染	Clasen 等人 ^[53]
<i>St</i> /T/- <i>ALS</i>	删除和插入	原生质体转染	原生质体转染	Nicolia 等人 ^[54]
<i>St</i> /T/- <i>Ubi7</i>	插入除草剂抗性基因 <i>ASL</i>	农杆菌渗入法	土壤农杆菌介导的转化	Forsyth 等人 ^[131]
<i>Ss</i> /T/- <i>COMT</i>	删除和插入		土壤农杆菌介导的转化	Jung 和 Altpeter ^[132]

a) At: *A. thaliana*, 拟南芥; Nt: *N. benthamiana*, 本氏烟; Nc: *N. tabaccum*, 烟草; Os: *O. sativa*, 水稻; Hv: *H. vulgare*, 大麦; Sb: *S. bicolor*, 高粱; Mp: *M. polymorphal*, 地钱; Zm: *Z. mays*, 玉米; Gm: *G. max*, 大豆; Cs: *C. sinensis*, 甜橙; Cp: *C. paradise*, 葡萄柚; Sl: *S. lycopersicum*, 番茄; St: *S. tuberosum*, 马铃薯; Pt: *P. tomentose*, 毛白杨; Bo: *B. oleracea*, 油菜; Ps: *P. somniferum*, 罂粟; Ca: *C. sativus*, 黄瓜; Vv: *V. Vinifera*, 葡萄; Md: *M. domestica*, 苹果; Bn: *B. napus*, 油菜籽; Fc: *F. carica*, 无花果; Bd: *Brachypodium distachyon*, 二穗短柄草; Ss: *Saccharum* spp. Hybrids, 甘蔗; C: CRISPR/Cas9; Z: Zinc-finger nucleases, 锌指核酸酶; T: Talen, TALE核酸酶

的分子, 如细胞衍生膜小泡(CMVVs)已经用于运载上述可设计的核酸酶或核酸蛋白酶的质粒或者mRNA. 非病毒载体在将质粒或mRNA运至到组织或细胞的过程

中, 可以保证质粒或mRNA不会被降解^[135,136]. 因此这些方法可以用于植物的基因转化, 至少可以用于原生质体的转染.

参考文献

- 1 Hartung F, Schiemann J. Precise plant breeding using new genome editing techniques: opportunities, safety and regulation in the EU. *Plant J*, 2014, 78: 742–752
- 2 Bortesi L, Fischer R. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotech Adv*, 2015, 33: 41–52
- 3 Voytas D F, Gao C. Precision genome engineering and agriculture: opportunities and regulatory challenges. *PLoS Biol*, 2014, 12: e1001877
- 4 Petolino J F. Genome editing in plants via designed zinc finger nucleases. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 2015, 51: 1–8
- 5 Rinaldo A R, Ayliffe M. Gene targeting and editing in crop plants: a new era of precision opportunities. *Mol Breeding*, 2015, 35: 40
- 6 Weeks D P, Spalding M H, Yang B. Use of designer nucleases for targeted gene and genome editing in plants. *Plant Biotechnol J*, 2015, 14: 483–495
- 7 Paul J W, Qi Y. CRISPR/Cas9 for plant genome editing: accomplishments, problems and prospects. *Plant Cell Rep*, 2016, 35: 1417–1427
- 8 Schaeffer S M, Nakata P A. CRISPR/Cas9-mediated genome editing and gene replacement in plants: transitioning from lab to field. *Plant Sci*, 2015, 240: 130–142
- 9 Altpeter F, Springer N, Bartley L, et al. Advancing crop transformation in the era of genome editing. *Plant Cell*, 2016, 28: 1510–1520
- 10 Baltes N J, Gil-Humanes J, Cermak T, et al. DNA replicons for plant genome engineering. *Plant Cell*, 2014, 26: 151–163
- 11 Sauer N J, Narváez-Vásquez J, Mozoruk J, et al. Oligonucleotide-mediated genome editing provides precision and function to engineered nucleases and antibiotics in plants. *Plant Physiol*, 2016, 170: 1917–1928
- 12 Cole-Strauss A, Yoon K, Xiang Y, et al. Correction of the mutation responsible for sickle cell anemia by an RNA-DNA oligonucleotide. *Science*, 1996, 273: 1386–1389
- 13 Yoon K, Cole-Strauss A, Kmiec E B. Targeted gene correction of episomal DNA in mammalian cells mediated by a chimeric RNA-DNA oligonucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 2071–2076
- 14 Zhu T, Peterson D J, Tagliani L, et al. Targeted manipulation of maize genes in vivo using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 8768–8773
- 15 Baszczynski C L, Zhu T, Mettenburg K, et al. Engineering herbicide-resistant maize using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nat Biotechnol*, 2000, 18: 555–558
- 16 Beetham P R, Kipp P B, Sawycky X L, et al. A tool for functional plant genomics: chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause *in vivo* gene-specific mutations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 8774–8778
- 17 Okuzaki A, Toriyama K. Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-directed gene targeting in rice. *Plant Cell Rep*, 2004, 22: 509–512
- 18 Dong C, Beetham P, Vincent K, et al. Oligonucleotide-directed gene repair in wheat using a transient plasmid gene repair assay system. *Plant Cell Rep*, 2006, 25: 457–465
- 19 Wang M, Liu Y, Zhang C, et al. Gene editing by co-transformation of TALEN and chimeric RNA/DNA oligonucleotides on the rice *OsEPSPS* gene and the inheritance of mutations. *PLoS ONE*, 2015, 10: e0122755
- 20 Marton I, Zuker A, Shklarman E, et al. Nontransgenic genome modification in plant cells. *Plant Physiol*, 2010, 154: 1079–1087
- 21 Ali Z, Abul-faraj A, Li L, et al. Efficient virus-mediated genome editing in plants using the CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant*, 2015, 8: 1288–1291
- 22 Zhang Y, Liang Z, Zong Y, et al. Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. *Nat Commun*, 2016, 7: 12617
- 23 Luo S, Li J, Stoddard T J, et al. Non-transgenic plant genome editing using purified sequence-specific nucleases. *Mol Plant*, 2015, 8: 1425–1427
- 24 Woo J W, Kim J, Kwon S I, et al. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 1162–1164
- 25 Liang Z, Chen K, Li T, et al. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun*, 2017, 8: 14261
- 26 Svitashv S, Schwartz C, Lenderts B, et al. Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun*, 2016, 7: 13274
- 27 Wright D A, Townsend J A, Winfrey Jr R J, et al. High-frequency homologous recombination in plants mediated by zinc-finger nucleases. *Plant J*, 2005, 44: 693–705
- 28 Shan Q, Wang Y, Chen K, et al. Rapid and efficient gene modification in rice and brachypodium using TALENs. *Mol Plant*, 2013a, 6: 1365–1368
- 29 Zhou H, Liu B, Weeks D P, et al. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: 10903–10914
- 30 Gelvin S B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “Gene-Jockeying” tool. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003, 67: 16–37

- 31 Kapila J, De Rycke R, Van Montagu M, et al. An Agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci*, 1997, 122: 101–108
- 32 Belhaj K, Chaparro-Garcia A, Kamoun S, et al. Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods*, 2013, 9: 39
- 33 Jia H, Wang N. Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA. *PLoS One*, 2014, 9: e0093806
- 34 Li J F, Norville J E, Aach J, et al. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 688–691
- 35 Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, et al. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 691–693
- 36 Piatek A, Ali Z, Baazim H, et al. RNA-guided transcriptional regulation *in planta* via synthetic dCas9-based transcription factors. *Plant Biotechnol J*, 2015, 13: 578–589
- 37 Peer R, Rivlin G, Golobovitch S, et al. Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in perennial fruit trees. *Planta*, 2015, 241: 941–951
- 38 Mahfouz M M, Li L, Shamimuzzaman M, et al. *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: 2623–2628
- 39 Cai Y, Chen L, Liu X, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing in soybean hairy roots. *PLoS ONE*, 2015, 10: e0136064
- 40 Curtin S J, Zhang F, Sander J D, et al. Targeted mutagenesis of duplicated genes in soybean with zinc-finger nucleases. *Plant Physiol*, 2011, 156: 466–473
- 41 Du H, Zeng X, Zhao M, et al. Efficient targeted mutagenesis in soybean by TALENs and CRISPR/Cas9. *J Biotech*, 2016, 217: 90–97
- 42 Jacobs T B, LaFayette P R, Schmitz R J, et al. Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. *BMC Biotechnol*, 2015, 15: 16
- 43 Raitskin O, Patron N J. Multi-gene engineering in plants with RNA-guided Cas9 nuclease. *Curr Opin Biotech*, 2016, 37: 69–75
- 44 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: 1274–1284
- 45 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: 3570–3575
- 46 Kumagai M H, Donson J, della-Cioppa G, et al. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 1679–1683
- 47 Čermák T, Baltes N, Čegan R, et al. High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biol*, 2015, 16: 232
- 48 Gil-Humanes J, Wang Y, Liang Z, et al. High-efficiency gene targeting in hexaploid wheat using DNA replicons and CRISPR/Cas9. *Plant J*, 2017, 89: 1251–1262
- 49 Dinesh-Kumar S P, Anandalakshmi R, Marathe R, et al. Virus-induced gene silencing. *Methods Mol Biol*, 2003, 236: 287–294
- 50 English J, Davenport G, Elmayan T, et al. Requirement of sense transcription for homology-dependent virus resistance and trans-inactivation. *Plant J*, 1997, 12: 597–603
- 51 Yin K, Han T, Liu G, et al. A geminivirus-based guide RNA delivery system for CRISPR/Cas9 mediated plant genome editing. *Sci Rep*, 2015, 5: 14926
- 52 Rakoczy-Trojanowska M. Alternative methods of plant transformation—a short review. *Cell Mol Biol Lett*, 2002, 7: 849–858
- 53 Clasen B M, Stoddard T J, Luo S, et al. Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. *Plant Biotechnol J*, 2015, 14: 1–8
- 54 Nicolia A, Proux-Wéra E, Åhman I, et al. Targeted gene mutation in tetraploid potato through transient TALEN expression in protoplasts. *J Biotech*, 2015, 204: 17–24
- 55 Andersson M, Turesson H, Nicolia A, et al. Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Rep*, 2017, 36: 117–128
- 56 Shan Q, Wang Y, Li J, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013b, 31: 686–688
- 57 Ainley W M, Sastry-Dent L, Welter M E, et al. Trait stacking via targeted genome editing. *Plant Biotechnol J*, 2013, 11: 1126–1134
- 58 Li Z, Liu Z B, Xing A, et al. Cas9-guide RNA directed genome editing in soybean. *Plant Physiol*, 2015, 169: 960–970
- 59 Svitashv S, Young J K, 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: 931–945
- 60 Shukla V K, Doyon Y, Miller J C, et al. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature*, 2009, 459: 437–441
- 61 Huang Y, Lee H, Tolliver L M, et al. Delivery of nucleic acids and nanomaterials by cell-penetrating peptides: opportunities and challenges.

- Biomed Res Int 2015, in press, doi: 10.1155/2015/834079
- 62 Chugh A, Eudes F, Shim Y S. Cell-penetrating peptides: nanocarrier for macromolecule delivery in living cells. *IUBMB Life*, 2013, 62: 183–193
- 63 Cao M X, Huang J Q, Yao Q H, et al. Site-specific DNA excision in transgenic rice with a cell-permeable cre recombinase. *Mol Biotechnol*, 2006, 32: 055–064
- 64 Jensen S P, Febres V J, Moore G A. Cell penetrating peptides as an alternative transformation method in citrus. *J Citrus Pathol*, 2014, 1: 10.15
- 65 Du J, Jin J, Yan M, et al. Synthetic nanocarriers for intracellular protein delivery. *Curr Drug Metab*, 2012, 13: 82–92
- 66 Popat A, Hartono S B, Stahr F, et al. Mesoporous silica nanoparticles for bioadsorption, enzyme immobilisation, and delivery carriers. *Nanoscale*, 2011, 3: 2801–2818
- 67 Martin-Ortigosa S, Valenstein J S, Lin V S Y, et al. Gold functionalized mesoporous silica nanoparticle mediated protein and dna codelivery to plant cells via the biolistic method. *Adv Funct Mater*, 2012, 22: 3576–3582
- 68 Torney F, Trewyn B G, Lin V S Y, et al. Mesoporous silica nanoparticles deliver DNA and chemicals into plants. *Nat Nanotech*, 2007, 2: 295–300
- 69 Martin-Ortigosa S, Peterson D J, Valenstein J S, et al. Mesoporous silica nanoparticle-mediated intracellular cre protein delivery for maize genome editing via loxP site excision. *Plant Physiol*, 2014, 164: 537–547
- 70 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–e188
- 71 Jiang W, Yang B, Weeks D P. Efficient CRISPR/Cas9-mediated gene editing in *Arabidopsis thaliana* and inheritance of modified genes in the T₂ and T₃ generations. *PLoS One*, 2014, 9: e0099225
- 72 Feng Z, Zhang B, Ding W, et al. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2013, 23: 1229–1232
- 73 Feng Z, Mao Y, Xu N, et al. Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 4632–4637
- 74 Mao Y, Zhang H, Xu N, et al. Application of the CRISPR-Cas system for efficient genome engineering in plants. *Mol Plant*, 2013, 6: 2008–2011
- 75 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: 1139–1150
- 76 Xing H L, Dong L, Wang Z P, et al. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biol*, 2014, 14: 327
- 77 Fauser F, Schiml S, Puchta H. Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2014, 79: 348–359
- 78 Wang Z P, Xing H L, Dong L, et al. 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
- 79 Yan L, Wei S, Wu Y, et al. High-efficiency genome editing in *Arabidopsis* using YAO promoter-driven CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant*, 2015, 8: 1820–1823
- 80 Upadhyay S K, Kumar J, Alok A, et al. RNA-guided genome editing for target gene mutations in wheat. *G3*, 2013, 3: 2233–2238
- 81 Gao J, Wang G, Ma S, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol Biol*, 2014, 10: 1007
- 82 Xie K, Yang Y. RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Mol Plant*, 2013, 6: 1975–1983
- 83 Miao J, Guo D, Zhang J, et al. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell Res*, 2013, 23: 1233–1236
- 84 Xu R, Li H, Qin R, et al. Gene targeting using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR-Cas system in rice. *Rice*, 2014, 7: 5
- 85 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
- 86 Mikami M, Toki S, Endo M. Comparison of CRISPR/Cas9 expression constructs for efficient targeted mutagenesis in rice. *Plant Mol Biol*, 2015, 88: 561–572
- 87 Mikami M, Toki S, Endo M. Precision targeted mutagenesis via Cas9 paired nickases in rice. *Plant Cell Physiol*, 2016, 57: 1058–1068
- 88 Wang Y, Cheng X, Shan Q, et al. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 947–951
- 89 Lawrenson T, Shorinola O, Stacey N, et al. Induction of targeted, heritable mutations in barley and Brassica oleracea using RNA-guided Cas9 nuclease. *Genome Biol*, 2015, 16: 258
- 90 Sugano S S, Shirakawa M, Takagi J, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in the liverwort *Marchantia polymorpha* L.. *Plant Cell Physiol*, 2014, 55: 475–481
- 91 Liang Z, Zhang K, Chen K, et al. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *J Genet Genomics*, 2014, 41: 63–68
- 92 Shi J, Gao H, Wang H, et al. ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions.

- [Plant Biotechnol J](#), 2016, 15: 207–216
- 93 Sun X, Hu Z, Chen R, et al. Targeted mutagenesis in soybean using the CRISPR-Cas9 system. [Sci Rep](#), 2015, 5: 10342
 - 94 Jia H, Wang N. Xcc-facilitated agroinfiltration of citrus leaves: a tool for rapid functional analysis of transgenes in citrus leaves. [Plant Cell Rep](#), 2014b, 33: 1993–2001
 - 95 Jia H, Orbovic V, Jones J B, et al. Modification of the PthA4 effector binding elements in Type I CsLOB1 promoter using Cas9/sgRNA to produce transgenic Duncan grapefruit alleviating XccΔpthA4:dCsLOB1.3 infection. [Plant Biotechnol J](#), 2016, 14: 1291–1301
 - 96 Brooks C, Nekrasov V, Lippman Z B, et al. Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated 9 system. [Plant Physiol](#), 2014, 166: 1292–1297
 - 97 Ito Y, Nishizawa-Yokoi A, Endo M, et al. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the RIN locus that regulates tomato fruit ripening. [Biochem Biophys Res Commun](#), 2015, 467: 76–82
 - 98 Wang S, Zhang S, Wang W, et al. Efficient targeted mutagenesis in potato by the CRISPR/Cas9 system. [Plant Cell Rep](#), 2015, 34: 1473–1476
 - 99 Butler N M, Atkins P A, Voytas D F, et al. Generation and inheritance of targeted mutations in potato (*Solanum tuberosum* L.) using the CRISPR/Cas system. [PLoS ONE](#), 2016, 10: e0144591
 - 100 Fan D, Liu T, Li C, et al. Efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in populus in the first generation. [Sci Rep](#), 2015, 5: 12217
 - 101 Alagoz Y, Gurkok T, Zhang B, et al. Manipulating the biosynthesis of bioactive compound alkaloids for next-generation metabolic engineering in opium poppy using CRISPR-Cas 9 genome editing technology. [Sci Rep](#), 2016, 6: 30910
 - 102 Chandrasekaran J, Brumin M, Wolf D, et al. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. [Mol Plant Pathol](#), 2016, 17: 1140–1153
 - 103 Ren C, Liu X, Zhang Z, et al. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). [Sci Rep](#), 2016, 6: 32289
 - 104 Malnoy M, Viola R, Jung M H, et al. DNA-free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. [Front Plant Sci](#), 2016, 7: 1904
 - 105 Lloyd A, Plaisier C L, Carroll D, et al. Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in *Arabidopsis*. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2005, 102: 2232–2237
 - 106 Tovkach A, Zeevi V, Tzfira T. A toolbox and procedural notes for characterizing novel zinc finger nucleases for genome editing in plant cells. [Plant J](#), 2009, 57: 747–757
 - 107 Zhang F L, Unger-Wallace E, Hoshaw J P, et al. High frequency targeted mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2010, 107: 12028–12033
 - 108 Osakabe K, Osakabe Y, Toki S. Site-directed mutagenesis in *Arabidopsis* using custom-designed zinc finger nucleases. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2010, 107: 12034–12039
 - 109 de Pater S, Neuteboom L W, Pinas J E, et al. ZFN-induced mutagenesis and gene-targeting in *Arabidopsis* through *Agrobacterium*-mediated floral dip transformation. [Plant Biotech J](#), 2009, 7: 821–835
 - 110 de Pater S, Pinas J E, Hooykaas P J J, et al. ZFN-mediated gene targeting of the *Arabidopsis* protoporphyrinogen oxidase gene through *Agrobacterium*-mediated floral dip transformation. [Plant Biotechnol J](#), 2013, 11: 510–515
 - 111 Vainstein A, Marton I, Zuker A, et al. Permanent genome modifications in plant cells by transient viral vectors. [Trends Biotech](#), 2011, 29: 363–369
 - 112 Weinthal D, Tovkach A, Zeevi V, et al. Genome editing in plant cells by zinc finger nucleases. [Trends Plant Sci](#), 2010, 15: 308–321
 - 113 Qi Y, Zhang Y, Zhang F, et al. Increasing frequencies of site-specific mutagenesis and gene targeting in *Arabidopsis* by manipulating DNA repair pathways. [Genome Res](#), 2015, 23: 547–554
 - 114 Qi Y, Li X, Zhang Y, et al. Targeted deletion and inversion of tandemly arrayed genes in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases. [G3](#), 2013, 3: 1707–1715
 - 115 Townsend J A, Wright D A, Winfrey R J, et al. High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. [Nature](#), 2009, 459: 442–445
 - 116 Cai C Q, Doyon Y, Ainley W M, et al. Targeted transgene integration in plant cells using designed zinc finger nucleases. [Plant Mol Biol](#), 2009, 69: 699–709
 - 117 Gupta M, DeKolver R C, Palta A, et al. Transcriptional activation of *Brassica napus* β -ketoacyl-ACP synthase II with an engineered zinc finger protein transcription factor. [Plant Biotech J](#), 2012, 10: 783–791
 - 118 Forner J, Pfeiffer A, Langenecker T, et al. Germline-transmitted genome editing in *Arabidopsis thaliana* using TAL-effector-nucleases. [PLoS ONE](#), 2015, 10: e0121056
 - 119 Zhang Y, Zhang F, Li X, et al. Transcription activator-like effector nucleases enable efficient plant genome engineering. [Plant Physiol](#), 2013, 161: 20–27

- 120 Stoddard T J, Clasen B M, Baltes N J, et al. Targeted mutagenesis in plant cells through transformation of sequence-specific nuclease mRNA. *PLoS ONE*, 2016, 11: e0154634
- 121 Li J, Stoddard T J, Demorest Z L, et al. Multiplexed, targeted gene editing in *Nicotiana benthamiana* for glyco-engineering and monoclonal antibody production. *Plant Biotechnol J*, 2016, 14: 533–542
- 122 Li T, Liu B, Spalding M H, et al. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nat Biotechnol*, 2012, 30: 390–392
- 123 Shan Q, Zhang Y, Chen K, et al. Creation of fragrant rice by targeted knockout of the *OsBADH2* gene using TALEN technology. *Plant Biotechnol J*, 2015, 13: 791–800
- 124 Li T, Liu B, Chen C Y, et al. TALEN-mediated homologous recombination produces site-directed DNA base change and herbicide-resistant rice. *J Genet Genomics*, 2016, 43: 297–305
- 125 Zhang H, Gou F, Zhang J, et al. TALEN-mediated targeted mutagenesis produces a large variety of heritable mutations in rice. *Plant Biotechnol J*, 2016, 14: 186–194
- 126 Wendt T, Holm P B, Starker C G, et al. TAL effector nucleases induce mutations at a pre-selected location in the genome of primary barley transformants. *Plant Mol Biol*, 2013, 83: 279–285
- 127 Gurushidze M, Hensel G, Hiekel S, et al. True-breeding targeted gene knock-out in barley using designer TALE-nuclease in haploid cells. *PLoS ONE*, 2014, 9: e92046
- 128 Char S N, Unger-Wallace E, Frame B, et al. Heritable site-specific mutagenesis using TALENs in maize. *Plant Biotechnol J*, 2015, 13: 1002–1010
- 129 Haun W, Coffman A, Clasen B M, et al. Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. *Plant Biotechnol J*, 2014, 12: 934–940
- 130 Lor V S, Starker C G, Voytas D F, et al. Targeted mutagenesis of the tomato *PROCERA* gene using transcription activator-like effector nucleases. *Plant Physiol*, 2014, 166: 1288–1291
- 131 Forsyth A, Weeks T, Richael C, et al. Transcription activator-like effector nucleases (TALEN)-mediated targeted DNA insertion in potato plants. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1572
- 132 Jung J H, Altpeter F. TALEN mediated targeted mutagenesis of the caffeic acid *O*-methyltransferase in highly polyploid sugarcane improves cell wall composition for production of bioethanol. *Plant Mol Biol*, 2016, 92: 131–142
- 133 Pratt S. Growers to see new HT canola in 2016. The Western Producer, 28 March 2012 <http://www.producer.com/2014/03/growers-to-see-new-ht-canola-in-2016/>
- 134 Lowe K, Wu E, Wang N, et al. Morphogenic regulators *Baby boom* and *Wuschel* improve monocot transformation. *Plant Cell*, 2016, 28: 1998–2015
- 135 Kelley M L, Strezoska Ž, He K, et al. Versatility of chemically synthesized guide RNAs for CRISPR-Cas9 genome editing. *J Biotech*, 2016, 233: 74–83
- 136 Wang L, Li F, Dang L, et al. *In vivo* delivery systems for therapeutic genome editing. *Int J Mol Sci*, 2016, 17: 626