利用CRISPR/Cas9多基因编辑系统在水稻中快速引入遗传多样性

沈兰^{1,2†}, 华宇峰^{1†}, 付亚萍^{1†}, 李健^{3†}, 刘庆¹, 焦晓真¹, 辛高伟⁴, 王俊杰¹, 王兴春⁴, 严长杰^{2*}, 王克剑^{1*}

1. 中国水稻研究所, 中国农业科学院, 水稻生物学国家重点实验室, 杭州 310006;

2. 扬州大学农学院, 教育部植物功能基因组学重点实验室, 扬州 225009;

3. 连云港市农业科学院, 连云港 222006;

4. 山西农业大学生命科学学院, 太谷 030801

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: cjyan@yzu.edu.cn; wangkejian@caas.cn

收稿日期: 2017-08-10; 接受日期: 2017-09-20; 网络版发表日期: 2017-11-14

国家自然科学基金(批准号: 31271681, 3140101312)、中国农业科学院科技创新工程、江苏省重点研发计划(批准号: BE2017345)和江苏省农业科技自主创新资金(批准号: CX(13)5075)资助

摘要 成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)-核酸内切酶9(CRISPR/Cas9)系统已经成为许多物种特定基因组编辑的强大工具. 利用CRISPR/Cas9多基因编辑系统成功构建共敲除水稻(*Oryza sativa*)中8个农艺性状基因的载体. 通过遗传转化实验和DNA测序, 发现8个基因在T₀代有较高的突变效率, 并且T₀代突变株的突变类型包括杂合突变和纯合突变. 此外, 还在T₀代突变株中发现了纯合的六突突变株、七突突变株、八突突变株. 由于T₀代植物中获得丰富的突变体组合类型, 因而, 观测到靶基因多样的突变表型. 该研究表明, CRISPR/Cas9系统在作物育种过程中快速引入遗传多样性方面的潜力.

关键词 CRISPR/Cas9, 基因组编辑, 农艺性状基因, 水稻

突变体是研究基因功能和作物育种的重要材料. 传统的人工突变通常是由乙基甲磺酸酯诱变、辐照诱变和T-DNA插入而产生的. 但是, 这些方法在基因组中引起的突变是随机的, 因此需要耗时费力地对突变基因进行鉴定, 以便进一步研究.

过去的十年, 随着基因组编辑的出现^[1-3], 新的技术统称为“基因编辑”, 包括锌指核酶技术、转录活性物

质的效应核酸酶技术, 以及II型成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)-核酸内切酶9 (CRISPR/Cas9)系统. 其中, 由微生物适应性免疫系统发展而来的CRISPR/Cas9系统应用最广泛. 该系统由两个关键的部分组成: Cas9蛋白和一个由CRISPR RNA (crRNA)和反式激活crRNA组成的单链导向RNA (sgRNA), sgRNA识别DNA中的前间区序列邻近基序(protospacer adjacent

引用格式: 沈兰, 华宇峰, 付亚萍, 等. 利用CRISPR/Cas9多基因编辑系统在水稻中快速引入遗传多样性. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 1186–1195, doi: 10.1360/N052017-00166

英文版见: Shen L, Hua Y F, Fu Y P, et al. Rapid generation of genetic diversity by multiplex CRISPR/Cas9 genome editing in rice. Sci China Life Sci, 2017, 60: 506–515, doi: 10.1007/s11427-017-9008-8

motif, PAM)序列,进而引导Cas9核酸酶对靶序列进行切割. Cas9核酸酶引起的DNA双链断裂通过易出错的非同源末端连接的修复方式或同源重组的修复方式诱发多种突变类型. 例如, 碱基插入、碱基缺失、碱基替换和序列同源重组, 这些突变可能会导致可读框移码, 从而创造功能缺失突变体.

研究多个相关基因间的关系和基因家族的功能需要多基因突变体为研究材料^[4-7]. 迄今为止, 在许多生物中已经成功开发了CRISPR/Cas9多基因编辑系统^[8-14]. 这些系统用不同的策略将多个sgRNA和Cas9表达模块组装至一个双元表达载体中, 其中最广泛应用的组装策略为Golden Gate克隆方法和Gibson组装方法^[7,15-17]. 此前, 本实验室利用同尾酶技术开发了一种简单的CRISPR/Cas9多基因编辑系统^[18]. 该系统理论上可同时编辑无限个基因.

随着水稻(*Oryza sativa*)基因组测序的完成, 越来越多的水稻农艺性状相关的基因被挖掘. 本研究利用CRISPR/Cas9多基因编辑技术对水稻中8个农艺性状基因进行编辑. 结果表明, 可通过一个水稻遗传转化实验实现对8个基因的共敲除. 此外, 本课题组获得了具有多基因突变组合的突变体. 群体多样性是推进作物育种进程的主要因素之一, 因此该结果为利用CRISPR/Cas9系统快速生成各种遗传材料提供了实验策略.

1 材料与方法

1.1 植物材料和生长条件

转基因受体材料为日本晴品种. 所有水稻植株均种植于浙江杭州中国水稻所实验基地, 正季常规水肥管理.

1.2 农艺性状测量

收获的水稻种子于42℃烘2天后室温保存. 随机选取20粒饱满的水稻种子, 在实验室测量粒长、粒宽和千粒重.

1.3 质粒构建

利用CRISPR/Cas9系统共敲除8个基因, 该系统通过同尾酶连接的方法将构建成功的表达载体导

入农杆菌. *DEP1*, *Gn1a*, *GW2*, *EP3*的sgRNA片段分别用*Kpn* I/*Xho* I, *Sal* I/*Xba* I, *Nhe* I/*Bam*H I和*Kpn* I/*Bgl* II酶切, 并组装为一个中间载体, 同样的将*BADH2*, *LPA1*, *GS3*和*Hd1*经过酶切, 并组装为一个中间载体. 接着将两个分别串联4个sgRNAs片段组装至一个包含8个sgRNAs的中间载体上, 最后将包含8个sgRNAs的中间载体用*Kpn* I/*Bgl* II酶切, 并连接至最终的表达载体pC1300-Cas9(*Kpn* I/*Bam*H I双酶切). 所有靶位点序列见网络版附表1.

1.4 农杆菌介导的水稻遗传转化

串联8个sgRNAs的双元表达载体pC1300-Cas9用于遗传转化实验. 根据前人的方法^[19], 通过农杆菌(菌株EHA105)介导的方法获得转基因水稻.

1.5 突变体检测

利用十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethyl ammonium bromide, CTAB)方法提取转基因水稻叶片的基因组DNA, 每个样品取约100 mg叶片组织. 利用KOD FX DNA聚合酶(Toyobo, 日本)分别扩增包含8个靶位点的序列. 用Sanger法对扩增的DNA片段进行测序, 并通过退化序列解码方法对测序结果进行分析^[20].

1.6 CRISPR/Cas9系统在水稻中的瞬时表达

利用酶水解的方法分离水稻原生质体^[21], 通过聚乙二醇-PEG-钙的方法转染水稻原生质体, 每个反应转化20 μg的质粒. 转染后的水稻原生质体于28℃黑暗孵育48 h.

1.7 PCR/RE实验

用CTAB法提取水稻原生质体基因组DNA, 包含靶序列的DNA片段通过KOD FX DNA聚合酶进行PCR扩增获得. 获得的DNA片段利用限制性内切酶分析该位点的突变效率.

1.8 香味检测

根据先前描述的方法^[22], 对水稻的香味进行测定. 取约0.5 g水稻分蘖期的绿色叶片切碎后放入2 mL的微量离心管, 每管加入1.7% KOH溶液室温孵育10 min, 至少请3个人通过闻气味评定香味.

2 结果与分析

2.1 利用CRISPR/Cas9多基因编辑系统编辑水稻中8个基因

先前利用CRISPR/Cas9系统进行水稻中QTL的编辑, 并发现编辑相同的QTLs, 在不同的水稻品种中产量的变化是不同的, 甚至变化趋势相反^[4]. 因此, 随机选取8个农艺性状相关基因在同一个水稻背景中进行研究, 分别是*BADH2* (betaine aldehyde dehydrogenase 2), *DEP1* (dense and erect panicle 1), *Gn1a* (grain number), *GS3* (major quantitative trait loci (QTL) for grain length and weight), *GW2* (major QTL associated with rice grain width and weight), *Hd1* (heading date 1), *EP3* (ERECT PANICLE)和*LPA1* (loose plant architecture 1). 其中5个基因(*DEP1*, *EP3*, *Gn1a*, *GS3*和*GW2*)与产量相关, 一个基因(*LPA1*)与株型相关, *BADH2*和*Hd1*分别与水稻香味和光周期相关. 为了改善植株的穗部性状, 选择了3个穗部性状相关基因*DEP1*, *EP3*和*Gn1a*进行基因编辑. 前人研究表明, *DEP1*和*EP3*突变可以改善穗形^[23-26], *Gn1a*基因突变导致增加的每穗粒数^[27]. 利用CRISPR/Cas9系统分别靶向*DEP1* (cDNA第一外显子15~36 bp), *EP3* (cDNA第一外显子261~282 bp)和*Gn1a* (cDNA第一外显子322~343 bp)基因(图1A~C). 除了穗

部性状, 谷粒大小也是影响产量的重要因素. 本实验选择了两个广泛应用的QTLs, *GS3*和*GW2*. *GS3*突变株的籽粒变长^[28,29], 而*GW2*突变导致籽粒变宽和千粒重增加^[30]. 因此, 选择*GS3*和*GW2*共突变是为了增加粒长、粒宽. 选择基因组DNA中距离启动子97~118 bp的目标序列编辑*GS3* (图1D), 选择cDNA第一个外显子600~621 bp的序列编辑*GW2* (图1E). 株型是形成高产水稻品种的重要参数, 选择株型相关基因进行编辑, 该基因功能缺失突变体表现出松散的株型^[31]. 选择cDNA第二个外显子319~340 bp的序列进行编辑*LPA1* (图1F). 为了获得有芳香且生长期发生变化的突变体, 选择另外两个基因*BADH2*和*Hd1*^[32,33]进行实验, *BADH2*的靶序列包含基因组DNA中*BADH2*的启动子区(图1G), *Hd1*的靶位点位于cDNA第一个外显子251~272 bp (图1H).

利用传统的同尾酶技术, 构建同时靶向8个基因的CRISPR/Cas9表达载体(图2). 首先将8个靶序列分别组装至中间载体SK-gRNA, 接着将SK-gRNA-*BADH2*, SK-gRNA-*LPA1*, SK-gRNA-*GS3*和SK-gRNA-*Hd1*组装成一个中间载体SK-gRNA-*BADH2-LPA1-GS3-Hd1*; 将SK-gRNA-*DEP1*, SK-gRNA-*Gn1a*, SK-gRNA-*GW2*和SK-gRNA-*EP3*组装成一个中间载体SK-gRNA-*DEP1-Gn1a-GW2-EP3*. 随后将串联4个sgRNAs的中间

图1 水稻中8个敲除基因的示意图

靶序列用黑色大写字母表示; 起始密码子用双下画线表示; PAM区用下画线表示; 箭头表示的区域包含基因编辑位点

图2 CRISPR/Cas9介导的水稻8基因敲除系统的流程图

克隆用的酶切位点图中标注, 3对同尾酶BamH I /Bgl II, Nhe I /Xba I 和Sal I /Xho I 分别用蓝色、绿色和黄色标注

载体组装成一个中间载体, 该载体串联8个sgRNAs. 最后将串联8个sgRNAs的模块通过酶切-连接的方法组装至表达载体pC1300-Cas9.

2.2 水稻原生质体中单个基因的编辑效率

为了确定该多基因系统是否发挥功能, 利用水稻原生质体瞬时表达系统共转sgRNAs和Cas9蛋白至水稻原生质体, 通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)/限制性内切核酸酶(restriction endonuclease, RE)酶切实验发现8个基因在水稻原生质体中都发生了基因编辑(图3). 通过比较BADH2基因在3个独立的载体(SK-gRNA-BADH2, SK-gRNA-BADH2-LPA1-GS3-Hd1和SK-gRNA-DEP1-Gn1a-GW2-EP3-BADH2-LPA1-GS3-Hd1)中的突变效率, 发现BADH2基因的突变效率在单基因和多基因敲除的瞬时表达系统中几乎一样, 并且其他的7个基因的比较结果与之类似(图3), 表明sgRNAs的串联数目可能不会影响CRISPR/Cas9的突变效率.

2.3 T₀代水稻植株基因的编辑特征

串联8个sgRNAs的双元表达载体进行遗传转化

实验, T₀代获得36株转基因阳性株. 为了分析靶位点的突变效率, 测序分析了阳性株的8个基因靶位点区域. 结果表明, 8个基因EP3, GS3, GW2, BADH2, DEP1, Gn1a, LPA1, Hd1的突变效率分别为50%, 100%, 67%, 81%, 83%, 97%, 67%, 78% (图4). 此外, 分析了每个目标位点的基因型, 发现除了GS3, 其余7个基因有3种基因型, 即纯合突变(包括双等位基因突变)、杂合突变和野生型(WT) (图4B). 本研究还发现, 4种基因(BADH2, Gn1a, GS3和GW2)的纯合突变效率>55%. 并且8个基因的杂合突变效率<35% (图4B). 综上所述, 8个目标位点不同的变异频率和突变类型将导致转基因植物中基因型的多样性.

多数情况下, 基因研究或作物育种中也需要含有不同基因组合的突变体. 为了分析T₀代植物中基因型组合的多样性, 统计分析了8种突变基因的组合模式. 在36株转基因植物中, 共发现了25种不同的基因型, 包括双突变、五突变、六突变、七突变和八突变(表1). 这些突变体中包含4株纯合突变体(1株纯合六突变体, 1株纯合七突变体, 以及2株纯合八突变体), 并且所有靶基因的突变类型都包含纯合突变(图4C). 所以利用一个遗传转化实验在T₀代获得许

图3 水稻原生质体中8个基因突变位点的PCR/RE实验

BADH2, *DEPI*, *Gn1a*, *GW2*, *Hd1*, *EP3*, *LPA1*和*GS3*基因的PCR产物分别用*Msc* I, *Nar* I, *Msc* I, *T7E1*, *T7E1*, *Hinf* I, *T7E1*和*T7E1*进行酶切。泳道M表示DNA marker; 泳道1表示单个sgRNA (SK-4G-*BADH2*, SK-4G-*DEPI*, SK-4G-*Gn1a*, SK-4G-*GW2*, SK-4G-*Hd1*, SK-4G-*EP3*, SK-4G-*LPA1*和SK-4G-*GS3*)和Cas9蛋白共转水稻原声质体的PCR/RE结果; 泳道2表示并联的4个sgRNAs (SK-4G-*DEPI*-*Gn1a*-*GW2*-*EP3*和SK-4G-*BADH2*-*LPA1*-*GS3*-*Hd1*)和Cas9蛋白共转水稻原声质体的PCR/RE结果; 泳道3表示并联的8个sgRNAs (SK-4G-*DEPI*-*Gn1a*-*GW2*-*EP3*-*BADH2*-*LPA1*-*GS3*-*Hd1*)和Cas9蛋白共转水稻原声质体的PCR/RE结果; 泳道4表示对照sgRNA (SK-4G)和Cas9蛋白共转水稻原声质体的PCR/RE结果

多突变基因的组合。

2.4 较低的脱靶率

先前研究表明, CRISPR/Cas9介导的许多物种的基因组编辑存在脱靶^[11,34,35], 因此, 利用美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)局部序列排比检索基本工具(BLAST)分析8个基因的靶位点序列, 发现3个基因(*BADH2*, *DEPI*, *EP3*)有潜在的脱靶位点。并且研究发现3个基因(*BADH2*, *DEPI*, *EP3*)脱靶位点的突变率分别为0%, 11.1%, 5.6%, 远低于8个靶位点的突变效率(图4D和网络版附表2)。

2.5 多基因突变植株的表型鉴定和分析

利用CRISPR/Cas9系统, 获得丰富的基因敲除组

合的突变体。为了研究多基因共敲除突变体是否具有预期的表型, 分析了 T_0 代基因纯合突变组合的遗传表型。

有研究表明, *DEPI*基因的第5个外显子的自然突变导致该基因提前终止, 植株表现为穗长变短、直立穗和增加的每穗粒数^[24,26]。 *EP3*基因的功能缺失突变株表现出增加的花序分枝数量和增加的每穗粒数^[23,25]。 *Gn1a*基因突变导致增加的每穗粒数进而引起产量的增加^[27]。通过测序分析36个阳性株的突变区域, 对多种突变类型进行鉴定分析, 结果表明, 靶基因的突变类型包括碱基插入、碱基缺失和碱基替换(网络版附1)。进一步观察移码突变植株的花序发现, *DEPI*和*Gn1a*共敲除突变体(突变体1)表现出直立穗表型和稍微降低的穗粒数, 而*Gn1a*突变体(突变体2)表现出增加的穗粒数(图5)。这些结果表明, *Gn1a*和*DEPI*的突变株与

图 4 T₀代水稻植株基因靶位点突变分析

A: T₀代植株8个基因的突变频率; B: 每个基因野生型、纯合突变和杂合突变的频率; C: 不同基因突变组合的株数; D: T₀代植株脱靶基因的突变频率

表 1 水稻中8个农艺性状基因的组合模式^{a)}

突变类型	基因型	植株编号	总数
双突变	AABBccDdEEFFGGHH	3	3
五突变	AabbccddEEffGGHH	2	8
	aaBbCcddEEffGGHH	1	
	aaBBccddEEFFGgHh	2	
	AABbccddEEffGgHH	1	
	AABbccddEEffGGHh	1	
	AABBCcDdeeffGGHh	1	
六突变	aabbCcdddeeffGGHH	1	6
	aaBbCcdddeeffGGHH	2	
	aabbccddeeffGGHH	1	
	aabbccddeeffGGHH	1	
	AaBbCCddEeFfGgHH	1	
七突变	aabbccddEEffGgHh	1	10
	aaBbccddEEffGgHh	1	
	aabbccddeeffGgHh	2	
	aaBbccddEeFFGgHh	1	
	aabbccddeeffFGgh	1	
	aabbccddeeffGGhh	1	
	aaBbccddeeffFGgh	2	
	aabbccddeeffGGHh	1	
八突变	AaBbccddEeFfGgHh	1	9
	aabbccddeeffGghh	4	
	aaBbccddEeFfGgHh	1	
	aabbccddeeffgghh	2	
	AabbccddeeffGgHh	1	

a) 字母a~h分别表示BADH2, DEP1, Gn1a, GS3, GW2, Hd1, EP3, LPA1. 小写字母表示修饰过的基因, 而大写字母表示野生型基因

图5 日本晴、突变体1和突变体2的穗形分析

A: 日本晴、突变体1和突变体2的穗型图, 标尺为1 cm; B: 日本晴、突变体1和突变体2穗长分析; C: 日本晴、突变体1和突变体2每穗粒数的分析; B和C的误差线用SD计算, $n=5$; 突变体1和突变体2的基因型分别为aabbccddeeffgghh和AABBccDdEEFFGGHH. A~h分别表示如下基因: *BADH2*, *DEP1*, *Gn1a*, *GS3*, *GW2*, *Hd1*, *EP3*和*LPA1*

各自的自然突变株有类似的表型, 但是两个基因共突变会出现非预期的表型。

本研究中粒形基因*GS3*, 调控粒长和粒重的主效QTL. 前人研究表明, 编辑该基因器官大小调节的功能结构域使得植株粒形变长^[28,29]. 与WT相比, *GS3*突变体的粒长度显著增加(>8 mm)并且千粒重增加(图6A,

C和E). 谷粒大小也受另一个主效QTL (*GW2*)的影响, 它通过负调控细胞分裂来控制植株的粒宽和粒重. 有研究表明, 该基因功能缺失导致植株粒宽增加和产量增加^[30]. 本研究中另一个控制水稻粒形基因, *GW2*突变, 植株表现为粒宽增加、千粒重增加(图6B, D和E), 与该基因的自然突变株表型类似。

本研究检测了控制水稻株形基因*LPA1*, 该基因通过调控分蘖角和叶夹角决定株型^[31]. 研究发现, *lpa1*表现出增加的分蘖角和叶夹角(图7), 该结果与前人结果一致。

除了产量相关基因, 本研究中还编辑了两个基因, *BADH2*和*Hd1*. *BADH2*基因突变导致该植株的籽粒具有独特的香味^[32]. 有研究表明, 修饰过的*Hd1*基因(光周期响应)在短日照条件下表现出推迟的抽穗期^[33]. 利用一种简单的方法^[22]检测*badh2*突变株, 即通过嗅叶片的香味. 检测到有香味的植株为*BADH2*基因功能缺失突变株, 这与预期结果一致. 由于*hd1*突变株未采用不同的光周期处理, 突变体的抽穗期与WT相比没有差异。

3 讨论

CRISPR/Cas9系统由于其简单和高效, 在许多物种的基因组编辑中得到了广泛的应用^[7,8,11~13]. 本研究利用CRISPR/Cas9系统通过一个遗传转化实验成功地

图6 日本晴、突变体3和突变体4的粒形分析

A和B: 日本晴、突变体3和突变体4的粒型图, 标尺为1 cm; C: 日本晴、突变体3和突变体4粒长分析; D: 日本晴、突变体3和突变体4粒宽分析; E: 日本晴、突变体3和突变体4千粒重分析; C, D和E误差线用SD计算, $n=20$, 3次重复; 突变体3和突变体4的基因型分别为aabbccddeeffgghh和aaBBccddEEFFGgHh; a~h分别表示如下基因: *BADH2*, *DEP1*, *Gn1a*, *GS3*, *GW2*, *Hd1*, *EP3*和*LPA1*

同时编辑水稻中8个农艺性状相关基因. 有研究报导重复序列会引起基因重组, 进而导致基因沉默^[36,37]. 虽然研究中8个SK-gRNAs具有相同的启动子序列和结构序列, 但是检测发现T₀代转基因植株中8个基因的突变效率都很高. 此外, 在水稻瞬时表达系统中也检测到8个基因的突变. 这些结果表明, 无论sgRNAs之间是否存在重组, 均不足以影响CRISPR/Cas9系统的敲除效率.

突变体对作物育种以及基因的研究都是至关重要的. 目前在许多水稻品种中报道了农艺性状相关基因, 其中一些已广泛应用于水稻育种^[27,29,30,38-44]. 但是将来自不同水稻品种中的优良基因整合到一个育成品种中面临着挑战. 本研究利用CRISPR/Cas9系统, 对水稻日本晴的3个穗形基因(*DEP1*, *EP3*和*Gn1a*)、两个粒形基因(*GS3*和*GW2*)、株型基因(*LPA1*)、香味基因(*BADH2*)和光周期基因(*Hd1*)进行共编辑实验. 与前人研究结果一致, 3个穗形相关基因都能增加水稻每穗粒数, 而*dep1*和*ep3*双突变体分别表现出直立穗和大穗表型. 本研究还检测到*gn1a*突变体表现出预期的穗粒数增加的表型; 日本晴遗传背景*dep1*突变体表现出直立穗表型, 但是穗粒数和结实率均表现为下降趋势, 该结果可能由本实验中*DEP1*基因严重的突变导致. 调控粒长基因(*GS3*和*GW2*)突变后植株粒长变长、粒宽增加, 与这两个基因的自然突变体表型一致. 此外, 发现与*gs3 gw2*双突变体相比, *gs3*突变体具有更长的粒长和较短的粒宽(图7). 这些结果表明, *GW2*基因可能负调控*GS3*基因的功能. 本实验中*LPA1*基因突变后植

图7 不同基因组合的植株表型图

A~F: 植株背景为日本晴; 字母a~h分别表示*BADH2*, *DEP1*, *Gn1a*, *GS3*, *GW2*, *Hd1*, *EP3*, *LPA1*. 小写字母表示修饰过的基因, 大写字母表示正常基因. 标尺为10 cm

株表现为松散型株型, 与前人结果一致^[31].

综上所述, 通过一个遗传转化实验, 不仅获得了8个农艺性状共突变的植株, 而且在T₀代创造出丰富的突变基因组合的突变体. 获得的8个基因共突变的突变体中包括纯合基因型和杂合基因型. 因此, 转基因下一代将获得具有丰富表型的群体. 群体多样性是育种工作的主要推动力, 本研究为作物育种进程中快速引入遗传多样性提供策略.

参考文献

- Shan Q, Wang Y, Li J, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 686–688
- Li T, Huang S, Zhao X, et al. Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: 6315–6325
- Wood A J, Lo T W, Zeitler B, et al. Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. *Science*, 2011, 333: 307–307
- Shen L, Wang C, Fu Y, et al. Opposing effects of QTLs on grain yield in different rice varieties. *J Integr Plant Biol*, 2016, in press, doi: 10.1111/jipb.12501
- Li M, Li X, Zhou Z, et al. Reassessment of the four yield-related genes *GN1A*, *DEP1*, *GS3*, and *IPA1* in rice using a CRISPR/Cas9 system. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 377
- Zhang Z, Mao Y, Ha S, et al. A multiplex CRISPR/Cas9 platform for fast and efficient editing of multiple genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep*, 2016, 35: 1519–1533
- 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

- 8 Generoso W C, Gottardi M, Oreb M, et al. Simplified CRISPR-Cas genome editing for *Saccharomyces cerevisiae*. *J Microbiol Methods*, 2016, 127: 203–205
- 9 Liu X, Zhang Y, Cheng C, et al. CRISPR-Cas9-mediated multiplex gene editing in CAR-T cells. *Cell Res*, 2017, 27: 154–157
- 10 Ma X, Liu Y G. CRISPR/Cas9-based multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Curr Protoc Mol Biol*, 2016, 115: 31.6.1–31.6.21
- 11 Ma X, Zhu Q, Chen Y, et al. CRISPR/Cas9 platforms for genome editing in plants: developments and applications. *Mol Plant*, 2016, 9: 961–974
- 12 Qi W, Zhu T, Tian Z, et al. High-efficiency CRISPR/Cas9 multiplex gene editing using the glycine tRNA-processing system-based strategy in maize. *BMC Biotechnol*, 2016, 16: 58
- 13 Sakuma T, Masaki K, Abe-Chayama H, et al. Highly multiplexed CRISPR-Cas9-nuclease and Cas9-nickase vectors for inactivation of hepatitis B virus. *Genes Cells*, 2016, 21: 1253–1262
- 14 Wang X, Niu Y, Zhou J, et al. Multiplex gene editing via CRISPR/Cas9 exhibits desirable muscle hypertrophy without detectable off-target effects in sheep. *Sci Rep*, 2016, 6: 32271
- 15 Patron N J. DNA assembly for plant biology: techniques and tools. *Curr Opin Plant Biol*, 2014, 19: 14–19
- 16 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
- 17 Casini A, Storch M, Baldwin G S, et al. Bricks and blueprints: methods and standards for DNA assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, 16: 568–576
- 18 Wang C, Shen L, Fu Y, et al. A simple CRISPR/Cas9 system for multiplex genome editing in rice. *J Genet Genomics*, 2015, 42: 703–706
- 19 Hiei Y, Ohta S, Komari T, et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J*, 1994, 6: 271–282
- 20 Ma X, Chen L, Zhu Q, et al. Rapid decoding of sequence-specific nuclease-induced heterozygous and biallelic mutations by direct sequencing of PCR products. *Mol Plant*, 2015, 8: 1285–1287
- 21 Shan Q, Wang Y, Li J, et al. Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nat Protoc*, 2014, 9: 2395–2410
- 22 Sood B C, Sidiq E A. A rapid technique for scent determination in rice. *Indian J Genet Plant Breed*, 1978, 38: 368–275
- 23 Yu H, Murchie E H, González-Carranza Z H, et al. Decreased photosynthesis in the erect panicle 3 (*EP3*) mutant of rice is associated with reduced stomatal conductance and attenuated guard cell development. *J Exp Bot*, 2015, 66: 1543–1552
- 24 Zhou Y, Zhu J, Li Z, et al. Deletion in a quantitative trait gene *qPE9-1* associated with panicle erectness improves plant architecture during rice domestication. *Genetics*, 2009, 183: 315–324
- 25 Piao R, Jiang W, Ham T H, et al. Map-based cloning of the *ERECT PANICLE 3* gene in rice. *Theor Appl Genet*, 2009, 119: 1497–1506
- 26 Huang X, Qian Q, Liu Z, et al. Natural variation at the *DEP1* locus enhances grain yield in rice. *Nat Genet*, 2009, 41: 494–497
- 27 Ashikari M, Sakakibara H, Lin S, et al. Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science*, 2005, 309: 741–745
- 28 Mao H, Sun S, Yao J, et al. Linking differential domain functions of the GS3 protein to natural variation of grain size in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 19579–19584
- 29 Fan C, Xing Y, Mao H, et al. *GS3*, a major QTL for grain length and weight and minor QTL for grain width and thickness in rice, encodes a putative transmembrane protein. *Theor Appl Genet*, 2006, 112: 1164–1171
- 30 Song X J, Huang W, Shi M, et al. A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase. *Nat Genet*, 2007, 39: 623–630
- 31 Wu X, Tang D, Li M, et al. Loose plant architecture1, an INDETERMINATE DOMAIN protein involved in shoot gravitropism, regulates plant architecture in rice. *Plant Physiol*, 2013, 161: 317–329
- 32 Chen S, Yang Y, Shi W, et al. *Badh2*, encoding betaine aldehyde dehydrogenase, inhibits the biosynthesis of 2-acetyl-1-pyrroline, a major component in rice fragrance. *Plant Cell*, 2008, 20: 1850–1861
- 33 Yano M, Katayose Y, Ashikari M, et al. *Hd1*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANS*. *Plant Cell*, 2000, 12: 2473–2484
- 34 Hu X, Wang C, Fu Y, et al. Expanding the range of CRISPR/Cas9 genome editing in rice. *Mol Plant*, 2016, 9: 943–945
- 35 Doench J G, Fusi N, Sullender M, et al. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 184–191
- 36 Fukuma M, Ganmyo Y, Miura O, et al. Cloning and characterization of a human genomic sequence that alleviates repeat-induced gene silencing. *PLoS ONE*, 2016, 11: e0153338
- 37 Mitsuda S H, Shimizu N. Epigenetic repeat-induced gene silencing in the chromosomal and extrachromosomal contexts in human cells. *PLoS ONE*, 2016, 11: e0161288
- 38 Jiang L, Liu X, Xiong G, et al. DWARF 53 acts as a repressor of strigolactone signalling in rice. *Nature*, 2013, 504: 401–405

- 39 Si L, Chen J, Huang X, et al. *OsSPL13* controls grain size in cultivated rice. [Nat Genet](#), 2016, 48: 447–456
- 40 Miura K, Ikeda M, Matsubara A, et al. *OsSPL14* promotes panicle branching and higher grain productivity in rice. [Nat Genet](#), 2010, 42: 545–549
- 41 Wang S, Li S, Liu Q, et al. The *OsSPL16-GW7* regulatory module determines grain shape and simultaneously improves rice yield and grain quality. [Nat Genet](#), 2015, 47: 949–954
- 42 Monna L, Kitazawa N, Yoshino R, et al. Positional cloning of rice semidwarfing gene, *sd-1*: rice “green revolution gene” encodes a mutant enzyme involved in gibberellin synthesis. [DNA Res](#), 2002, 9: 11–17
- 43 Spielmeier W, Ellis M H, Chandler P M. Semidwarf (*sd-1*), “green revolution” rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2002, 99: 9043–9048
- 44 Cho Y G, Eun M Y, McCouch S R, et al. The semidwarf gene, *sd-1*, of rice (*Oryza sativa* L.). II. Molecular mapping and marker-assisted selection. [Theor Appl Genet](#), 1994, 89: 54–59