

# 基因编辑技术在作物育种中的应用与展望

李树磊 郑红艳 王磊

(中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

**摘要:** 基因编辑技术是指对目标基因进行“编辑”, 实现对特定基因片段的删除、插入和替换的一项技术。如今该技术已经被广泛应用于细菌、真菌、动物和植物等领域, 其中成簇的规律间隔的短回文重复序列及其相关系统 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated proteins, CRISPR/Cas system) 作为第三代编辑技术, 其效用远超前两代并因此在近年来迅猛发展。简要介绍了锌指核酸酶 (Zinc-finger nucleases, ZFNs)、转录激活子样效应因子核酸酶 (Transcription activator-like effectors nucleases, TALEN) 和 CRISPR/Cas 共 3 种基因组编辑技术的作用机理, 并总结 CRISPR/Cas 系统的功能、局限性以及其在作物育种上的应用, 最后对基因编辑作物的未来进行展望。

**关键词:** 基因编辑技术; CRISPR/Cas; 作物育种

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2020-0328

## Application and Prospect of Gene Editing Technology in Crop Breeding

LI Shu-lei ZHENG Hong-yan WANG Lei

(*Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081*)

**Abstract:** Genome editing is a group of technologies that allows the introduction of deletions, insertions or base substitutions by causing damage in targeted gene locus. This technology has now been utilized widely for editing the genome of various organisms, including bacteria, fungus, animals and plants. Compared to the Zinc-finger nucleases (ZFNs) and Transcription activator-like effectors nucleases (TALENs) editors, clustered regularly interspersed short palindromic repeats (CRISPR) / CRISPR-associated protein (Cas) (CRISPR/Cas) system has developed as an efficient and versatile method for genome engineering. In this review, we describe the basic mechanism of ZFNs, TALENs and CRISPR/Cas system, and summarize the functions, limitation and application of CRISPR/Cas system in crop breeding. Finally, we discuss the potential challenges and opportunities of genome-edited crops in the future.

**Key words:** gene editing technology; CRISPR/Cas; crop breeding

随着全球人口数量增加、气候变化、土壤流失和水资源缺失等问题日益突出, 到 2050 年, 全球对粮食的需求预计将比 2005 年增加 100%–110%<sup>[1]</sup>。为满足人们对农作物产品日益增长的需求, 作物育种技术创新显得尤为重要。杂交育种、突变育种和转基因育种是目前现代农业中作物改良的主要方法, 然而杂交育种需要年限较长<sup>[2]</sup>, 突变育种的随机性较大<sup>[3]</sup>, 转基因技术可通过引入外源基因从而获得优良性状, 但其商业化与监管过程比较繁琐<sup>[4]</sup>。基

因编辑技术近年来发展迅速, 通过不断地改进, 该技术现已成为一种操作简单、快速高效、成本低的靶向编辑基因工具, 运用基因编辑技术可以对作物自身基因进行精确删除或者插入以培育新品种, 具有巨大的发展潜力和应用前景。本文描述了 3 种基因编辑技术的原理, 并对 CRISPR/Cas 系统的功能、局限性以及其在作物育种上的应用做出详细总结, 最后对基因编辑作物的未来进行展望, 旨在为该技术在作物育种上的应用提供借鉴和新思路。

收稿日期: 2020-03-25

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项 (2018ZX08003-03B)

作者简介: 李树磊, 男, 硕士研究生, 研究方向: 植物分子生物学与基因工程; E-mail: lishulei1@163.com

通讯作者: 王磊, 男, 博士, 研究员, 研究方向: 作物功能基因组学; E-mail: wanglei01@caas.cn

## 1 基因编辑技术的发展

目前成熟应用的基因组编辑技术主要有3种,按时间顺序依次为:人工核酸酶介导的锌指核酸酶技术(Zinc finger nucleases, ZFNs)、类转录激活因子效应物核酸酶技术(Transcription activator-like effector nucleases, TALENs)和RNA介导的CRISPR/Cas技术(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/CRISPR-associated protein, CRISPR/Cas),以下主要对3种技术的组成和作用原理做简要介绍。

### 1.1 锌指核酸酶技术(ZFNs)

锌指核酸酶(ZFNs)具有单独的DNA结合域和DNA裂解域,即锌指蛋白(Zinc finger protein, ZFP)与天然IIS型限制酶*Fok I*,且已被广泛应用于靶向基因研究<sup>[5]</sup>。ZFNs诱导的双链断裂受到细胞DNA修复过程的影响,从而导致靶向突变和靶向基因置换的频率都非常高。

锌指蛋白是一类通过Cys2-His2锌指结构域去结合DNA的转录因子。其中该结构域每30个氨基酸结合一个锌原子,该转录因子是由一个 $\alpha$ 螺旋和两个反向的 $\beta$ 平行形成紧密的 $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$ 结构,能特异性识别3个连续的碱基对,ZFNs可以通过设计锌指结构域以及多个锌指蛋白来实现对特异的基因进行编辑<sup>[6-9]</sup>。天然IIS型限制酶*Fok I*具有物理上可分离的结合和裂解活性,其中裂解域没有明显的序列特异性,且*Fok I*核酸酶需要形成二聚体才可切割DNA产生双链断裂(double strand breaks, DSBs)<sup>[10-11]</sup>。

该技术靶向结合效率高,但由于蛋白设计复杂且筛选过程很漫长,且该技术无法实现对任意靶基因的结合与高通量编辑基因,所以该方法仍在不断完善中。

### 1.2 转录激活物效应核酸酶技术(TALENs)

转录激活子样效应核酸酶(TALENs)技术是继ZFNs之后的一种高效靶向基因编辑新技术,类似于ZFNs,TALENs包含一个识别特异DNA序列的TALEs(Transcription-activator-like effectors, TALEs)蛋白和非特异性的*Fok I*核酸酶,由两个TALEs蛋白识别和结合DNA靶位点,同时*Fok I*核酸酶对靶DNA进行切割,造成DNA双链断裂从而实现对基

因组靶位点的编辑<sup>[12]</sup>。

用于设计TALEs蛋白的基本结构域是一个高度保守的重复结构域,TALEs蛋白的DNA结合域由33-35个氨基酸的重复单元组成,其中位于12和13位的两个可变氨基酸残基称为重复可变的氨基酸残基(Repeat variable di-residue, RVD),通过这两个氨基酸残基识别并结合DNA序列<sup>[13]</sup>。

TALENs的裂解DNA的能力几乎与ZFNs的相同,且设计更为简单,特异性较强。但TALEs蛋白的同源重复序列较多,组装的工作量较大。且TALEs蛋白的体积几乎是ZFPs的3-4倍,对转化手段具有一定的限制,同样也限制该技术在高通量编辑上的应用<sup>[14]</sup>。

### 1.3 规律成簇的间隔短回文重复相关蛋白技术(CRISPR/Cas)

CRISPR/Cas系统是在细菌和古细菌中存在的一种适应性免疫反应,其主要作用为抵御噬菌体病毒和外源质粒DNA的入侵。

目前有3种CRISPR系统被验证,分别是Type I型基因(特征基因Cas3)、Type II型(特征基因Cas9)和Type III型(特征基因Cas10),每一种系统都使用一组独特的Cas蛋白和crRNA进行CRISPR干扰。其中I型和III型系统利用大型复合Cas蛋白质与复杂的crRNA结合去编辑目标序列<sup>[15]</sup>,而II型CRISPR系统只需依赖1个Cas9核酸酶及2个RNA,即crRNA(CRISPR-derived RNA, crRNA)和tracrRNA(trans-activating RNA, tracrRNA),就可以造成基因的双链断裂<sup>[16]</sup>。

基于以上CRISPR/Cas9系统的优良特性,该系统现已逐步改良为一个由RNA引导靶向编辑DNA的平台,广泛用于基因编辑、转录干扰和表观遗传调节等方面。在实际应用中,CRISPR/Cas9系统通常包含一个Cas9蛋白和一段根据靶位点设计的大约100 nt的sgRNA(simple guide RNA, sgRNA)序列,Cas9核酸酶在gRNA的引导下对DNA特定位点进行切割产生的DNA双链断裂。而DNA的双链断裂可以通过非同源末端连接(Non-homologous end joining, NHEJ)或同源重组(Homology recombination, HR)两种方式进行修复,从而实现目的性编辑。

尽管运用 ZFNs 和 TALENs 技术已经在多种动物及植物中成功实现了基因的定点编辑,但这两种技术定向打靶依赖于特异性结合蛋白的合成,操作起来繁琐费时且打靶效率低,致使其应用进展缓慢,而 CRISPR/Cas 技术具备操作简单、周期短、效率高等优点,已经得到广泛应用和迅速发展,因此本文主要对 CRISPR/Cas 技术的作用方式及其在作物育种中的应用进行综述,为农作物品种改良提供有益的参考。

## 2 CRISPR/Cas 的应用

CRISPR/Cas 系统主要是通过 sgRNA 与 Cas 蛋白起作用,而通过修饰以上两部分,CRISPR/Cas 系统的应用将被不断拓宽。

### 2.1 靶向基因敲除 (Knock-out) 及敲入 (Knock-in)

Cas9 在 gRNA 的引导下,识别靶序列的 PAM (protospacer adjacent motif, PAM) 位点并切割靶位点, DNA 断裂引起的修复主要以 NHEJ 的方式修复。但 NHEJ 是一种易出错的修复方式,会在双链断裂的位置引入小的核酸插入或缺失 (Insertion and deletion, indel), 导致靶基因蛋白翻译产生移码突变,从而破坏基因功能。如果细胞中有与靶位点序列同源的 DNA 供体 (DNA donor) 片段时,位于供体 DNA 上的基因片段会通过同源重组方式整合到双链断裂的位置,从而实现目的片段敲入/替换<sup>[17]</sup>。

### 2.2 单碱基编辑

现在已经出现两类 DNA 碱基编辑器,胞嘧啶碱基编辑器 (Cytidine base editing, CBE) 将 C·G 碱基对转换为 T·A 碱基对,腺嘌呤碱基编辑器 (Adenine base editing, ABE) 将 A·T 碱基对转换为 G·C 碱基对。总的来说, CBE 和 ABE 可以实现所有 4 种可能的过渡突变 (C 到 T, G 到 A, A 到 G, T 到 C)<sup>[18]</sup>。

胞嘧啶碱基编辑 (CBE): 一种 APOBEC1 (Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 1) 胞苷脱氨酶可以通过脱氨基将胞嘧啶的外环胺生成尿嘧啶<sup>[19]</sup>, 将胞嘧啶 (C) 转化为尿嘧啶 (U), 进而通过 DNA 复制或者修复的方式转化为胸腺嘧啶 (T)。基于此原理,该系统不断优化。到目前为止, CBE3 系统通过 APOBEC1 胞苷脱氨酶、尿嘧啶糖基

化酶抑制剂 (Uracil glycosylase inhibitor, UGI) 及 nCas9-D10A (Cas9 nickase, nCas9) 突变体的融合表达,已成功在小麦、水稻、玉米等物种上实现安全高效的 C 到 T 的碱基替换编辑,且碱基替换与删除出现的概率很低<sup>[20]</sup>。

腺嘌呤碱基编辑 (ABE): ABE 由来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中的腺苷酸脱氨酶 (tRNA adenosine deaminase enzyme, TadA) 的突变体 TadA\* 和 nCas9-D10A 突变体组成, TadA\* 可将腺嘌呤 (A) 脱氨变为肌苷 (Inosine, I), 肌苷 (I) 在 DNA 复制时被识别为鸟嘌呤 (G), 最终实现 A 到 G 的变换。经过不断的进化改造, ABE7.10 系统是目前报道的效率最高且与应用最广的 ABE 系统<sup>[16, 21]</sup>。

### 2.3 DNA-free 编辑

不同于常规植物基因组编辑的转化手段, DNA-free 编辑是指通过粒子轰击或者 PEG 介导的方式将 CRISPR/Cas9 的体外转录物 (Delivering *in vitro* transcripts, IVTs) 或核糖核蛋白复合物 (Ribonucleoprotein complexes, RNPs) 直接转入植物细胞完成对靶基因的编辑。DNA-free 的编辑系统不仅消除 CRISPR/Cas9 随机整合到基因组 DNA 中的几率,而且改良了常规转化中存在的问题,如较高的潜在脱靶效应、易出现嵌合体、需通过后代分离方可获得无 CRISPR/Cas9 的植物突变体。

### 2.4 RNA 编辑

RNA 编辑的主要优点在于不改变编码基因本身,更加可控、不会遗传且效率较高 (同时靶向编辑多个基因的转录本)。2014 年, Jennifer Doudna 团队发现 Cas9 酶可与 PAM 序列共同作用,识别并结合到单链 RNA (Single-stranded RNA, ssRNA) 的特异位点上<sup>[22]</sup>。随后,张锋团队从多种细菌中找到一种能够切割大肠杆菌报告基因的 Cas13a 酶,开发出由单一 RNA 引导的 CRISPR/Cas13a 系统 (也称为 CRISPR/C2c2), 该系统可特异性的降低哺乳动物细胞中的内源 RNA 和报告 RNA 水平<sup>[23]</sup>。最近,美国芝加哥大学的 Dickinson 研究团队构建出一套以 CRISPR/Cas 为基础的 RNA 靶向系统 (CRISPR-Cas-inspired RNA targeting system, CIRTS), 可将一系列效应因子 (包括核酸酶、降解机制、翻译激活因子

和碱基编辑器)传递到目标转录本上<sup>[24]</sup>。

通过活性位点突变及与其他功能性蛋白进行融合,该技术已经能够成功对 RNA 进行单碱基编辑。在哺乳动物中使用的 RNA 单碱基编辑融合蛋白均来源于 ADAR 家族腺苷脱氨酶,该酶的脱氨基域(Deamination domain, DD),即 ADAR<sub>DD</sub>,能催化水解腺苷(A)脱氨,将腺苷(A)转化为肌苷(I)<sup>[25-26]</sup>。张锋团队设计了 REPAIR 系统(RNA Editing for Programmable A to I Replacement, REPAIR),该系统将以 RNA 为导向的 dCas13b,即 dPspCas13b,融合到 ADAR<sub>DD</sub>(E488Q)突变体,在哺乳动物细胞中实现了腺苷(A)替换至肌苷(I),而肌苷(I)在碱基互补配对时行使鸟苷(G)的作用,从而造成 A 到 I 到 G 的转变<sup>[27]</sup>。最近该团队在 REPAIR 的基础上,对 ADAR2 进行改进,构建出新的 RNA 编辑系统 RESCUE(RNA Editing for Specific C-to-U Exchange, RESCUE),使 ADAR2 腺苷脱氨酶具备将胞嘧啶(C)转化为尿嘧啶(U)的能力,实现了 C 到 U 的 RNA 编辑,且该系统仍保留将 A 转化为 I 的功能<sup>[28]</sup>。

### 2.5 其他应用

通过改良编辑系统的不同部分,还可以将 CRISPR 的应用继续扩展,比如通过 Cas9 或其变体与不同效应因子连接可以实现基因定位<sup>[29]</sup>、转录调节<sup>[30]</sup>、表观修饰<sup>[31]</sup>与活细胞成像<sup>[32]</sup>,还可以进行基因组以及药物筛选<sup>[33-34]</sup>。

## 3 CRISPR/Cas 在作物育种上的运用

现代农业育种的目标主要是培育高产优质、抗虫抗病的品种,传统育种周期漫长,而传统转基因技术的应用又受各种风险因素限制。近年来,我国已在作物分子育种方面积累了一定的成果,现已在不同作物当中鉴定并分离克隆大量产量、品质、抗除草剂、抗虫抗病、代谢调控和抗非生物逆境胁迫相关的基因,这些基因的有效利用将推动作物育种的快速发展,而 CRISPR/Cas 基因编辑技术具有高效的定点编辑能力,可实现更为可控且准确的基因组编辑,所以该技术在作物育种方面具有广阔应用前景。

### 3.1 提高产量

作物育种最主要的目的就是提高产量,产量指标的构成主要包括穗数、每穗实收粒数及粒重。水稻中的 *miR396e* 和 *mi396f* 是水稻株型和粒重的重要调控基因<sup>[35-37]</sup>,朱健康团队通过基因敲除获得 *miR396elf* 的双突变体,发现该突变体穗型增大,千粒重增加 40% 左右<sup>[38]</sup>。

*DEP1* (*Dense and erect panicle 1*) 是控制水稻穗粒数的显性基因,在我国北方主栽粳稻品种中,当 *DEP1* 基因在第 5 个外显子上存在 625 个碱基对的缺失,表现为茎顶端分生组织活性提高,株高变矮,枝梗数和穗粒数增加,产量提高<sup>[39]</sup>。Wang 等<sup>[40]</sup>通过设计 4 个 sgRNAs 在籼稻(自交系 IR58025B)中实现该基因的大片敲除,得到具有密集直立圆锥花序、株高降低且具有增产潜力的水稻材料。

*GW2* (*grain weight 2*, *GW2*) 基因编码 E3 泛素链接酶,在水稻、玉米、小麦籽粒发育过程中起负调控作用,Wang 等<sup>[41]</sup>利用 CRISPR/Cas9 对小麦籽粒重基因 *TaGW2* 进行敲除,突变体籽粒大小和千粒重明显增加;同年,高彩霞与王道文团队通过 CRISPR/Cas9 技术分别靶向 3 个同源基因 *TaGW2-A1*、*-B1* 和 *-D1* 的特异性区域,创制了 4 个 *TaGW2* 的突变体材料:*TaGW2-B1* 和 *TaGW2-D1* 的单突变体、*TaGW2-B1* 和 *-D1* 的双突变体以及 *TaGW2-A1*、*-B1*、*-D1* 的三突变体。比较发现 3 个基因均负调控小麦籽粒的宽度、长度、千粒重及平均单株产量,且 *TaGW2-B1* 的作用效果强于 *TaGW2-D1*<sup>[42]</sup>。

### 3.2 改善品质

随着人们生活水平的提高,要求培育的新品种作物不仅具有更高、更稳的产量,而且应该具有更好、更全面的产品品质。

花青素属于生物类黄酮物质,是在自然界广泛存在与植物中的天然水溶性色素,其最主要的生理性功能是自由基清除能力和抗氧化能力。富含原花青素和花青素的野生稻(*Oryza rufipogon* L.)籽粒显红色,该性状受到 *Rc* 和 *Rd* 两个互补基因的调节<sup>[43-44]</sup>,*Rc* 编码一个基本的螺旋-环-螺旋结构的转录因子,而 *Rd* 编码一个二氢黄酮醇 4 还原酶蛋白。野生稻的 *RcRd* 基因型能够产生红色籽粒的表型,

而大部分栽培水稻因 *Rc* 基因外显子碱基缺失造成移码突变，籽粒呈白色。福建农科院与厦门大学合作利用 CRISPR/Cas9 将原本移码突变转换为突变碱基为三的倍数的整码突变 (in-frame mutation)，致使该基因恢复功能，并得到了有较高的原花青素和花青素含量的红稻<sup>[45]</sup>。

亚油酸是一种对心脑血管健康有害的多不饱和脂肪酸，而 FAD2 蛋白的作用便是将籽粒中的油酸转化为亚油酸，通过突变该基因便可减少亚油酸的含量<sup>[46]</sup>。Okuzaki<sup>[47]</sup> 等通过 CRISPR/Cas9 以 FAD2 (*fatty acid desaturase 2*, FAD2) 位点 *BnaA.FAD2.a* 为靶点对多倍体油菜进行定点诱变，从回交子代中选择 FAD2 - aa 等位基因的突变植株，在自交子代中筛选到纯合植株。与野生型油菜相比，该纯合突变体材料籽粒当中油酸含量增加，亚油酸含量减少。

抗性淀粉 (Resistant Starch, RS) 是健康人体小肠内难以消化吸收的淀粉及淀粉降解物的总称，摄入高抗性淀粉食品可有效预防和控制糖尿病，并对肥胖症和肠道疾病起到积极预防作用<sup>[48]</sup>。淀粉分支酶 (Starch branching enzyme, SBE) 是水稻淀粉合成过程中的关键调控酶之一，夏兰琴团队运用 CRISPR/Cas9 技术对 *SBEII* 进行敲除后发现，直链淀粉和抗性淀粉含量分别提高到 25% 和 9.8%<sup>[49]</sup>。

### 3.3 除草剂的耐受性与抗性

通过外源基因导入是获得抗除草剂作物的传统方法，但因为是属于转基因作物，其在重要粮食作物中的推广应用受到限制，因此通过基因编辑提高重要农作物的除草剂抗性成为目前基因组编辑研究领域的热点之一。

草甘膦是目前世界上使用量最大的除草剂，目前生产上推广的抗草甘膦作物，几乎全部为通过导入农杆菌属的 CP4 菌株的 5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸合成酶基因，即 *EPSPS* (*5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase*, *EPSPS*) 基因获得的，商业化受到极大的阻碍。高彩霞和李家洋团队合作利用 CRISPR/Cas9 技术，通过非同源末端连接 (NHEJ) 修复方式在水稻中实现了 *EPSPS* 基因的定点替换，在 T0 代获得对草甘膦具有抗性的水稻材料<sup>[50]</sup>。

小麦遗传背景复杂，利用传统的育种方式培育

抗除草剂品种具有一定的难度。高彩霞、姜临建和李家洋团队合作利用单碱基编辑技术对小麦乙酰乳酸合成酶基因 (*Acetolactate synthase*, *ALS*) 和乙酰辅酶 A 羧基化酶基因 (*Acetyl CoA carboxylase*, *ACC*) 进行编辑，获得耐受磺酰脲类、咪唑啉酮类和芳氧基苯氧基丙酸酯类除草剂的小麦材料<sup>[51]</sup>。同样，扬州大学和上海师范大学团队合作利用 CRISPR/Cas9 介导的胞嘧啶碱基编辑技术，成功在油菜乙酰乳酸合成酶基因 *BnALS* 中引入 P197S 和 P197F 的突变，创制出苯磺隆除草剂抗性的油菜<sup>[52]</sup>。近日，高彩霞和李家洋团队再次合作设计了可以饱和突变并促进植物基因定向进化的基因编辑器 STEME (Saturated targeted endogenous mutagenesis editors, STEME)，并利用 20 个 sgRNA 在水稻原生质体中对乙酰辅酶 A 羧基化酶基因 *ACC* 的 CT 结构域的 168 个碱基序列产生了接近饱和的诱变，并筛选得到与除草剂分子结合能力减弱的氨基酸突变体材料，从而成功获得了水稻对除草剂的抗性<sup>[53]</sup>。

水稻 *OsSF3B1* (*Splicing factor 3b subunit 1*, *S3B-1*) 是一个真核细胞物种保守基因，植物中自然产生的剪接抑制剂在 RNA 剪接中起到非常重要的作用<sup>[54-55]</sup>。在农作物中，RNA 剪接抑制剂是一种有效的除草剂<sup>[56]</sup>。Butt 等<sup>[57]</sup> 运用 CRISPR 技术对水稻 *OsSF3B1* 基因的保守结构域 HR15-17 进行突变，经过除草剂的筛选，最终获得了 21 株抗除草剂的水稻植株。

### 3.4 抗虫性

植物当中 5-羟色胺和水杨酸的生物合成来自共同的源头物质<sup>[48]</sup>。浙江大学等单位以水稻为材料，发现两者的生物合成存在相互负调控现象，同时也发现通过调控植株体内 5-羟色胺生物合成，水稻会对害虫表现抗性。细胞色素 P450 基因 *CYP71A* (*cytochrome P-450LXXIA1*, *CYP71A*) 编码 5-羟色胺，该团队利用基因编辑技术 CRISPR/Cas9 技术突变 *CYP71A*，快速筛选培育出了抗褐飞虱、抗螟虫的非转基因水稻材料<sup>[58]</sup>。

### 3.5 非生物胁迫抗性

高温、寒冷、干旱和重金属毒害等非生物胁迫对作物的生长发育、产量和品质产生严重影响，是

导致农业减产的重要因素,应用基因工程方法提高作物对非生物胁迫的耐受能力,是作物分子育种面临的重要挑战之一。

镉 (Cadmium, Cd) 是对人体有害的一种重金属,会引发骨质疏松、肾功能衰竭、癌症及心血管疾病等<sup>[59]</sup>。镉超标的大米是膳食镉摄入的主要来源<sup>[60-61]</sup>。*OsNramp5* (*Natural resistance-associated macrophage protein, Nramp5*) 基因调控水稻体内金属离子的转运,该基因使植株具有吸附环境中 Cd 的能力并将其在籽粒中大量富集<sup>[62-63]</sup>。袁隆平团队通过利用基因编辑技术敲除该基因,发现突变体芽和根中的 Cd 浓度明显降低,且对植物产量影响不显著,最终在高镉土壤中筛选鉴定出耐 Cd 水稻基因编辑材料<sup>[64]</sup>。

玉米 *ARGOS8* (*Aluminum-induced Protein Superfamily Pseudogene, ARGOS8*) 基因是植物乙烯反应的负调控因子,过表达 *ARGOS8* 的转基因植物在干旱胁迫条件下对乙烯的敏感性减弱,产量提高<sup>[65]</sup>。Shi 等<sup>[66]</sup>通过 CRISPR 系统对玉米进行基因编辑,在该基因上游非编码区插入玉米 *GOS2* 启动子以代替 *ARGOS8* 的天然启动子,产生了乙烯反应负调节因子 *ARGOS8* 的新变种,与野生型玉米相比,该材料对干旱的抗性增强。

MicroRNA 是一类内源性的具有调控功能的非编码 RNA,大小约为 19-22 nt,其主要在发育过程中调节内源基因表达<sup>[67]</sup>。2018 年,朱健康团队利用其改良的基因编辑技术 (Short Tandem Target Mimic, STTM) 敲除水稻 *microRNA166*, 其中发现突变植株的叶片植株气孔疏导能力降低,蒸腾速率降低,抗旱性增加,从而获得 *miRNA166* 低表达抗旱水稻新品系<sup>[68]</sup>。

### 3.6 抗病性

病害是影响我国农业生产的重要因素,而现在主要的防治方法仅仅是提前消毒种子或在症状出现后喷施农药,但效果仍然不理想。但想要从根源上解决病害这一问题,抗病作物品种选育至关重要。

水稻白叶枯病是亚洲和非洲的一种重要病害,病原体为水稻黄单胞菌 (*Xanthomonas oryzae pv. oryzae, Xoo*), 该菌利用一组 III 型转录激活子

效应物 (TAles) 诱导宿主 *SWEET* (*Sugars Will Eventually be Exported Transporters, SWEET*) 基因表达,致使宿主易感该病<sup>[69-70]</sup>。Zhou 等<sup>[71]</sup>通过 CRISPR/Cas9 技术敲除 *OsSWEET13* 基因,提高水稻对该病的抗性,且证实了稻瘟病菌主要是通过提高宿主细胞对蔗糖的合成来感染宿主。最近,杨兵课题组通过 CRISPR 系统突变 *SWEET11*、*SWEET13* 和 *SWEET14* 三个基因的启动子,并在突变体中不断筛选鉴定得到对白叶枯病具有强大广谱抗性的水稻株系<sup>[72]</sup>。

稻瘟病是世界上危害水稻最严重的病害之一,稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 属于半知菌亚门真菌,可引起大幅度减产。植物乙烯应答因子 (Plant ethylene responsive factors, ERF) 是植物 APETELA2/ 乙烯应答因子 (AP2/ERF) 转录因子超家族的一个亚家族,它参与了多种胁迫耐受的调节,并参与了多种对非生物胁迫和生物胁迫的响应<sup>[73-75]</sup>。赵开军团队以稻瘟病感病品种空育 131 为材料,利用 CRISPR/Cas9 技术靶向敲除 *OsERF922* (*Ethylene-responsive transcription factor 2, ERF922*), 获得的 T2 纯合突变系在苗期和分蘖期对稻瘟病菌的抗性相比野生型都有显著提高<sup>[76]</sup>。

水稻矮化病 (Rice tungro disease, RTD) 是亚洲热带地区水稻生产的严重制约因素,RTD 是由水稻球形病毒 (Rice tungro spherical virus, RTSV) 与水稻杆状病毒相互作用引起的,具有 RTSV 抗性的植株大部分也表现出 RTD 抗性<sup>[77]</sup>。自然 RTSV 抗性是由翻译起始因子基因 (*The translation initiation factor 4 gamma, eIF4G*) 控制的隐性性状, *eIF4G* 蛋白中 Y<sup>1059</sup>V<sup>1060</sup>V<sup>1061</sup> 氨基酸残基发生单核苷酸多态性 (Single-nucleotide polymorphisms, SNPs) 或缺失而获得抗性<sup>[78]</sup>。利用该特性,Macovei 等<sup>[78]</sup>利用 CRISPR/Cas9 系统诱导 RTSV 敏感品种 IR64 中的 *eIF4G* 突变,该团队在温室条件下筛选并鉴定到不含 Cas9 序列且具有 RTSV 抗性的相对高产植株。

小麦白粉病是一种世界性病害,小麦白粉病菌 (*Blumeria graminis*) 属于囊菌亚门真菌。该病主要侵染作物的叶片与叶鞘,通过分生孢子或子囊孢子借气流传播到感病小麦叶片上。*MLO* (*Mildew-resistance locus, MLO*) 是大麦、小麦等作物中白粉

病菌成功侵染所必需的基因<sup>[79]</sup>。该基因突变后，大麦表现出对白粉病菌的持久、广谱抗性<sup>[80]</sup>。WANG等人通过TALEN与CRISPR/Cas9技术在六倍体小麦中编码抗霉位点的蛋白的3个等位基因*TaMLO-A1*、*TaMLO-B1*、*TaMLO-D1*中引入靶向突变，得到对白

粉病具有广谱抗性的小麦<sup>[81]</sup>。

总之，CRISPR/Cas系统是作物分子育种的最新且最有效的途径。表1总结了近年来CRISPR/Cas在作物育种上的应用，其包含了目标性状靶基因、编辑类型和作物种类。

表1 CRISPR/Cas系统在作物育种上的应用

目的性状	靶基因	编辑类型	作物	参考文献
穗型增大	<i>miR396</i>	NHEJ	水稻	[38]
穗重增加	<i>DEP1</i>	NHEJ	水稻	[39]
籽粒增大，粒数增多	<i>Gn1a</i> , <i>GS3</i> , <i>DEP1</i>	NHEJ	水稻	[82]
籽粒增大，粒重增加	<i>GW2</i>	NHEJ	小麦，水稻	[41-42]
减少不饱和脂肪酸	<i>FAD2</i>	NHEJ	油菜	[47]
高直链淀粉含量	<i>SBEIIb</i>	NHEJ	水稻	[49]
花青素增加	<i>Rc</i>	NHEJ	水稻	[45]
热敏感雄性不育	<i>TMS5</i>	NHEJ	玉米	[83]
抗除草剂	<i>DEP1</i> , <i>GW2</i>	ABE	小麦	[84]
抗除草剂	<i>ALS</i>	NHEJ	油菜	[52]
抗除草剂	<i>EPSPS</i>	NHEJ	水稻	[50]
抗除草剂	<i>ALS</i>	NHEJ	水稻	[85-86]
抗除草剂	<i>ALS</i>	NHEJ	小麦	[51]
抗除草剂	<i>ACC</i>	CBE, ABE	水稻	[53]
抗除草剂	<i>SF3B1</i>	NHEJ	水稻	[57]
抗除草剂	<i>ALS</i>	HR	大豆，玉米	[87-88]
抗虫	<i>CYP71A1</i>	NHEJ	水稻	[58]
干旱抗性	<i>miRNA166</i>	NHEJ	水稻	[68]
干旱抗性	<i>ARGOS8</i> promoter	HR	玉米	[66]
干旱抗性	<i>GhRDL1</i>	NHEJ	棉花	[89]
镉耐性	<i>Nramp5</i>	NHEJ	水稻	[64]
白叶枯病抗性	<i>SWEET11</i> , <i>SWEET13</i> , <i>SWEET14</i>	NHEJ	水稻	[72]
白粉病抗性	<i>TaMLO-A1</i> , <i>TaMLO-B1</i> , <i>TaMLO-D1</i>	NHEJ	小麦	[81]
白粉病抗性	<i>EDR1</i>	NHEJ	小麦	[90]
稻瘟病抗性	<i>ERF922</i>	NHEJ	水稻	[76]
水稻球形病毒抗性	<i>eIF4G</i>	NHEJ	水稻	[78]

## 4 CRISPR/Cas 局限性

如今CRISPR/Cas系统已经在真核生物当中得到广泛运用，尤其是动物当中，其研究进展十分迅速。植物基因编辑进展相对落后的原因，除了动植物本身之间的差异以外，CRISPR/Cas系统自身的缺陷也对编辑效率产生影响。

### 4.1 PAM序列的限制

目前被广泛研究并应用于植物编辑当中的CRISPR核酸酶包括来自化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的SpCas9和来自毛螺科菌(*Lachnospiraceae*

*bacterium*)的LbCpf1, SpCas9需要识别编辑靶位点的“NGG”PAM序列行使功能, LbCpf1则需要严格识别“TTTV”PAM位点发挥作用, 在实际应用时, 这对于特定靶位点的选择存在一定限制。因此, 如何有效拓展CRISPR核酸酶PAM位点范围, 成为CRISPR系统在植物基因组编辑中广泛应用的关键。

日本横滨市立大学Seiichi Toki团队通过定点突变发现, SpCas9的突变体SpCas9-NGv1(R1335A/L1111R/D1135V/G1218R/E1219F/A1322R/T1337R)可以在水稻和拟南芥基因组中以NG为

PAM 进行有效突变<sup>[91]</sup>。

xCas9 是最近发现的一种识别哺乳动物细胞中大多数 PAM 类型的 Cas9 变体, 包括 NG、GAA 和 GAT, xCas9 已被证实可在水稻中进行基因敲除以及碱基替换<sup>[56]</sup>。中国电子科技大学张勇团队和美国马里兰大学威益平团队通过构建来自弗朗西斯菌属 (*Francisella novicida*) 的 FnCpf1、LbCpf1 核酸酶的 RR 及 RVR 突变体表达系统, 成功实现了以“CCCC”、“TYCV”、“TATG”为 PAM 位点的水稻基因组编辑, 扩大了 Cpf1 核酸酶在植物基因组编辑中的应用范围<sup>[92]</sup>。以上研究不仅有效地拓展了 CRISPR 的应用, 而且显著提高了植物基因组的编辑范围, 但仍需进一步对其进行优化, 在扩大编辑范围的同时提高编辑效率。

#### 4.2 转化系统的限制

植物基因编辑效率的提高在一定程度上依赖于高效的转化系统, 目前常用的转化系统包括农杆菌介导法、基因枪轰击法及 PEG 转化法 (Polyethylene glycol, PEG), 其中农杆菌介导法是最成熟的转化途径, 但由于宿主范围的限制, 只适用于部分植物物种和组织; 基因枪轰击法和 PEG 转化法靶向受体材料类型广泛, 无宿主的限制, 但基因枪轰击法由于基因枪轰击的随机性, 外源基因进入宿主基因组的整合位点相对不固定, 拷贝数往往较多, 不利于外源基因在宿主植物的稳定表达; PEG 转化涉及到植株再生问题, 目前仅有烟草等少数物种可以实现<sup>[93]</sup>。纳米材料目前已经广泛用于医学领域中, 在哺乳动物细胞中, 有研究表明纳米颗粒可以运送 Cas9 蛋白与 sgRNA 进入细胞, 并在 30% 的细胞中对目的基因进行编辑<sup>[94]</sup>。CRISPR 编辑技术结合纳米颗粒在植物上的应用将克服宿主范围的限制, 且适用于广泛的植物物种和不同的组织。该技术的成功应用将快速推进作物的遗传改良进展。

#### 4.3 DNA 特异性识别的限制 (脱靶)

除了扩大基因组的编辑范围, DNA 的特异性识别也是需要攻破的又一难关。研究人员利用多种方法揭示了基于 CRISPR 的基因组编辑的 DNA 靶向特性, 但却没有一种方法和算法能证明野生型 Cas9 蛋白与其同源的 sgRNA 存在靶外反应。但仍存在很多

案例, 非靶位点的基因修改接近甚至超越靶位点修改的频率<sup>[95]</sup>。

通过不断地摸索, 研究人员开发出以下几种策略降低脱靶效率: 其一为通过简单地截短 sgRNA, 使其与目标 DNA 的互补性少于 20 个核苷酸, 结果是 SpCas9 的非目标修饰可以减少几个数量级<sup>[96-97]</sup>; 其二是在有足够的机会改变靶位点后降低其在细胞中的活性或寿命。例如, 直接向细胞传递 Cas9 与 sgRNA 核糖核酸蛋白复合物 (RNPs), 该方法可保证 Cas9 蛋白的瞬时活性, 且在一段时间后该蛋白会在细胞中降解<sup>[98]</sup>。此外, 将 Cas9 核酸酶的两个残基的其中一个失活, 改造其为 nCas9, 并分别设计两个 sgRNA, 当两个 nCas9 同时与 DNA 链上的靶位点结合时, DNA 发生双链断裂, 在一定程度上大大减少脱靶几率<sup>[99]</sup>。

### 5 基因编辑作物的展望

传统育种中利用的遗传变异主要来自于自然过程、物理或化学的诱变, 而这些变异概率低且突变位点不可预测, 基因编辑技术与转基因技术均能克服以上缺点, 这对作物基因功能研究与遗传育种具有重要的意义, 但这两种技术之间也有巨大的差异。转基因技术一直在许多国家被称为基因改造技术 (Genetic modification), 是将外源基因导入特定作物基因组当中并使其表达相应的产物的新型育种技术, 这些基因可以来自同一物种内部, 也可以跨越物种边界来生产新的作物。其核心在于具有表达优良性状能力的外源基因的导入, 通过后代筛选保留该优良性状。与转基因作物育种不同的是, 基因编辑作物育种仅用于编辑作物内源基因, 且可以通过后代的杂交分离将导入的外源基因剥离, 所以经过基因编辑育种获得的品种完全不含外源基因。

未来基因编辑育种技术在作物改良育种方面的发展大概有以下几种思路: 第一, 许多作物的全基因组测序已经完成, 而大多数已测序的基因功能仍未知。通过基因敲除创建全基因组水平的大规模突变体文库是该工具未来应用的必然趋势, 此举对于功能基因组研究与作物改良具有重要意义; 第二, 作物的优良性状往往依赖复杂的代谢网络进行调控, 而除了敲除外该工具还可以通过调控基因的上下游

序列或转录因子致使某些基因表达或被抑制。甚至该工具可直接调控 RNA，在不影响遗传的情况下直接在转录水平进行调控，这可以直接用来评估调控区域与表型的关系进而促进作物育种；第三点是优秀的品系往往需要集各种优良性状于一身，这需要多个控制优良性状的基因组同时表达，因此能够同时操控并调控多个基因的基因编辑技术具有重要的应用价值<sup>[100]</sup>。

利用基因编辑技术进行作物改良育种的优势已经显而易见，但在能否市场化的问题上还存在较大争议。到目前为止，欧盟已经批准了大约 118 种转基因生物，但大多数转基因生物是用来喂养动物的，只有极少数是供人类直接食用，欧洲几乎没有转基因食品的市场，基因编辑作物被一并认为是转基因技术产物并按照该技术对其进行监管<sup>[101]</sup>。与欧盟的态度不同，2016 年宾夕法尼亚大学利用基因编辑培育的抗褐变蘑菇，在美国并未受到监管<sup>[102]</sup>。此举标志着美政府对该技术的缓和态度，而在 2018 年，美国农业部正式发布声明，表示不会对一些新育种技术的作物进行监管，而其中就包括基因编辑技术。

由于各国对于基因编辑及其产物定义并不统一，因此各国的管理方法与管理现状也不尽相同。而对于全世界来说，这种新颖的生物技术所带来的意义十分深远，其不光在农业与医学方面带来全新的局面，还会对社会的经济贸易方面造成影响。只是现在这种不稳定的局面还无法让其飞速拓展开来，但随着基础研究的加深与其他学科的发展，该技术定将获得大众接受并广泛应用。中国作为农业大国，其粮食作物产量近年来屡创新高，但这些产量的背后是除草剂与化肥的不合理使用造成的环境破坏问题与无法应对日渐恶劣的环境而逐渐枯竭的优良品种。基因编辑技术对于中国农业的发展以及提高产业创新能力具有重大意义。相信在不久的将来，我国将具备该技术的成熟体系，并将其产业化以服务农业，在新的农业革命当中领先于世界。

#### 参考文献

- [ 1 ] Tilman D, Balzer C, Hill J, et al. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture [ J ] . Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108 ( 50 ) : 20260-20264.
- [ 2 ] Scheben A, Wolter F, Batley J, et al. Towards CRISPR/Cas crops - bringing together genomics and genome editing [ J ] . New Phytol, 2017, 216 ( 3 ) : 682-698.
- [ 3 ] Pacher M, Puchta H. From classical mutagenesis to nuclease-based breeding - directing natural DNA repair for a natural end-product [ J ] . Plant J, 2017, 90 ( 4 ) : 819-833.
- [ 4 ] Prado JR, Segers G, Voelker T, et al. Genetically engineered crops : from idea to product [ J ] . Annu Rev Plant Biol, 2014, 65 : 769-790.
- [ 5 ] Lin L, Wu LP, Chandrasegaran S. Functional domains in Fok I restriction endonuclease [ J ] . Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 89 ( 10 ) : 4275-4279.
- [ 6 ] Kim YG, Chandrasegaran S. Chimeric restriction endonuclease [ J ] . Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91 ( 3 ) : 883-887.
- [ 7 ] Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes : zinc finger fusions to Fok I cleavage domain [ J ] . Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93 ( 3 ) : 1156-1160.
- [ 8 ] Kim YG, Smith J, Durgesha M, et al. Chimeric restriction enzyme : Gal4 fusion to fokI cleavage domain [ J ] . Biological Chemistry, 2009, 379 ( 4-5 ) : 489-496.
- [ 9 ] Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases [ J ] . Genetics, 2011, 188 ( 4 ) : 773-782.
- [ 10 ] Bitinaite J, Wah DA, Aggarwal AK, et al. FokI dimerization is required for DNA cleavage [ J ] . Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95 ( 18 ) : 10570-10575.
- [ 11 ] Jeff S, Marina B, Whitby FG, et al. Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains [ J ] . Nucleic Acids Research, 2000 ( 17 ) : 17.
- [ 12 ] Joung JK, Sander JD. TALENs : a widely applicable technology for targeted genome editing [ J ] . Nat Rev Mol Cell Biol, 2013, 14 ( 1 ) : 49-55.
- [ 13 ] Miller JC, Holmes MC, Wang J, et al. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing [ J ] . Nat Biotechnol, 2007, 25 ( 7 ) : 778-785.
- [ 14 ] Miller JC, Tan S, Qiao G, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing [ J ] . Nat Biotechnol, 2011, 29 ( 2 ) :

- 143-148.
- [ 15 ] Liang L, Fan XD. CRISPR-Cas system : a powerful tool for genome engineering [ J ] . *Plant Molecular Biology*, 2014, 85 ( 3 ) : 209-218.
- [ 16 ] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [ J ] . *Science*, 2012, 337 ( 6096 ) : 816-821.
- [ 17 ] Zhang JP, Li XL, Li GH, et al. Efficient precise knockin with a double cut HDR donor after CRISPR/Cas9-mediated double-stranded DNA cleavage [ J ] . *Genome Biol*, 2017, 18 ( 1 ) : 35.
- [ 18 ] Rees HA, Liu DR. Base editing : precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells [ J ] . *Nat Rev Genet*, 2018, 19 ( 12 ) : 770-788.
- [ 19 ] Harris RS, Petersen-Mahrt SK, Neuberger MS. RNA editing enzyme APOBEC1 and some of its homologs can act as DNA mutators [ J ] . *Molecular Cell*, 2002, 10 ( 5 ) : 1247-1253.
- [ 20 ] Zong Y, Wang Y, Li C, et al. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion [ J ] . *Nat Biotechnol*, 2017, 35 ( 5 ) : 438-440.
- [ 21 ] Matsoukas IG. Commentary : Programmable base editing of A center dot T to G center dot C in genomic DNA without DNA cleavage [ J ] . *Frontiers in Genetics*, 2018, 9 : 21.
- [ 22 ] O'Connell MR, Oakes BL, Sternberg SH, et al. Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9 [ J ] . *Nature*, 2014, 516 ( 7530 ) : 263-266.
- [ 23 ] Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector [ J ] . *Science*, 2016, 353 ( 6299 ) : aaf5573.
- [ 24 ] Rauch S, He E, Srienic M, et al. Programmable RNA-Guided RNA effector proteins built from human parts [ J ] . *Cell*, 2019, 178 ( 1 ) : 122-134.
- [ 25 ] Bass BL, Weintraub H. An unwinding activity that covalently modifies its double-stranded RNA substrate [ J ] . *Cell*, 55 ( 6 ) : 1089-1098.
- [ 26 ] Matthews MM, Thomas JM, Zheng Y, et al. Structures of human ADAR2 bound to dsRNA reveal base-flipping mechanism and basis for site selectivity [ J ] . *Nature Structural & Molecular Biology*, 2016, 23 ( 5 ) : 426-433.
- [ 27 ] Cox DBT, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al. RNA editing with CRISPR-Cas13 [ J ] . *Science*, 2017, 358 ( 6366 ) : 1019-1027.
- [ 28 ] Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Franklin B, et al. A cytosine deaminase for programmable single-base RNA editing [ J ] . *Science*, 2019, 365 ( 6451 ) : 382-386.
- [ 29 ] Cheng AW, Jillette N, Lee P, et al. Casilio : a versatile CRISPR-Cas9-Pumilio hybrid for gene regulation and genomic labeling [ J ] . *Cell Res*, 2016, 26 ( 2 ) : 254-257.
- [ 30 ] Long L, Guo H, Yao D, et al. Regulation of transcriptionally active genes via the catalytically inactive Cas9 in *C. elegans* and *D. rerio* [ J ] . *Cell Res*, 2015, 25 ( 5 ) : 638-641.
- [ 31 ] Kearns NA, Pham H, Tabak B, et al. Functional annotation of native enhancers with a Cas9-histone demethylase fusion [ J ] . *Nat Methods*, 2015, 12 ( 5 ) : 401-403.
- [ 32 ] Wang H, Nakamura M, Abbott TR, et al. CRISPR-mediated live imaging of genome editing and transcription [ J ] . *Science*, 2019, 365 ( 6459 ) : 1301-1305.
- [ 33 ] Chen YC, Farzadfard F, Gharaei N, et al. Randomized CRISPR-Cas transcriptional perturbation screening reveals protective genes against alpha-synuclein toxicity [ J ] . *Mol Cell*, 2017, 68 ( 1 ) : 247-257 e245.
- [ 34 ] Han K, Jeng EE, Hess GT, et al. Synergistic drug combinations for cancer identified in a CRISPR screen for pairwise genetic interactions [ J ] . *Nat Biotechnol*, 2017, 35 ( 5 ) : 463-474.
- [ 35 ] Che R, Tong H, Shi B, et al. Control of grain size and rice yield by GL2-mediated brassinosteroid responses [ J ] . *Nat Plants*, 2015, 2 : 15195.
- [ 36 ] Gao F, Wang K, Liu Y, et al. Blocking miR396 increases rice yield by shaping inflorescence architecture [ J ] . *Nat Plants*, 2015, 2 ( 1 ) : 15196.
- [ 37 ] Duan P, Ni S, Wang J, et al. Regulation of OsGRF4 by OsmiR396 controls grain size and yield in rice [ J ] . *Nat Plants*, 2015, 2 ( 1 ) : 15203.
- [ 38 ] Miao C, Wang D, He R, et al. Mutations in MIR396e and MIR396f increase grain size and modulate shoot architecture in rice [ J ] . *Plant Biotechnol J*, 2020, 18 ( 2 ) : 491-501.
- [ 39 ] Huang XZ, Qian Q, Liu ZB, et al. Natural variation at the DEPI locus enhances grain yield in rice [ J ] . *Nature Genet*, 2009, 41 ( 4 ) : 494-497.
- [ 40 ] Wang Y, Geng LZ, Yuan ML, et al. Deletion of a target gene in Indica rice via CRISPR/Cas9 [ J ] . *Plant Cell Reports*, 2017, 36 ( 8 ) : 1333-1343.

- [ 41 ] Wang W, Pan Q, He F, et al. Transgenerational CRISPR-Cas9 activity facilitates multiplex gene editing in allopolyploid wheat [ J ] . CRISPR J, 2018, 1 ( 1 ) : 65-74.
- [ 42 ] Zhang Y, Li D, Zhang D, et al. Analysis of the functions of TaGW2 homoeologs in wheat grain weight and protein content traits [ J ] . Plant J, 2018, 94 ( 5 ) : 857-866.
- [ 43 ] Furukawa T, Maekawa M, Oki T, et al. The Rc and Rd genes are involved in proanthocyanidin synthesis in rice pericarp [ J ] . Plant J, 2007, 49 ( 1 ) : 91-102.
- [ 44 ] Sweeney MT, Thomson MJ, Pfeil BE, et al. Caught red-handed : Rc encodes a basic helix-loop-helix protein conditioning red pericarp in rice [ J ] . Plant Cell, 2006, 18 ( 2 ) : 283-294.
- [ 45 ] Zhu Y, Lin Y, Chen S, et al. CRISPR/Cas9-mediated functional recovery of the recessive rc allele to develop red rice [ J ] . Plant Biotechnol J, 2019, 17 ( 11 ) : 2096-2105.
- [ 46 ] Wells R, Trick M, Soumpourou E, et al. The control of seed oil polyunsaturate content in the polyploid crop species *Brassica napus* [ J ] . Mol Breed, 2014, 33 ( 2 ) : 349-362.
- [ 47 ] Okuzaki A, Ogawa T, Koizuka C, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing of the fatty acid desaturase 2 gene in *Brassica napus* [ J ] . Plant Physiol Biochem, 2018, 131 : 63-69.
- [ 48 ] Resistant Starch. Proceedings for the 2nd plenary meeting of EURESTA : European FLAIR Concerted Action No. 11 on physiological implications of the consumption of resistant starch in man. Crete, 29 May-2 June 1991 [ J ] . Eur J Clin Nutr, 1992, 46 ( Suppl 2 ) : S1-148.
- [ 49 ] Sun YW, Jiao GA, Liu ZP, et al. Generation of high-amylose rice through CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of starch branching enzymes [ J ] . Frontiers in Plant Science, 2017, 8 : 298.
- [ 50 ] Li J, Meng XB, Zong Y, et al. Gene replacements and insertions in rice by intron targeting using CRISPR-Cas9 [ J ] . Nature Plants, 2016, 2 ( 10 ) : 16139.
- [ 51 ] Zhang R, Liu JX, Chai ZZ, et al. Generation of herbicide tolerance traits and a new selectable marker in wheat using base editing [ J ] . Nature Plants, 2019, 5 ( 5 ) : 480-485.
- [ 52 ] Wu J, Chen C, Xian G, et al. Engineering herbicide-resistant oilseed rape by CRISPR/Cas9-mediated cytosine base-editing [ J ] . Plant Biotechnol J, 2020, 18 ( 9 ) : 1857-1859.
- [ 53 ] Li C, Zhang R, Meng X, et al. Targeted, random mutagenesis of plant genes with dual cytosine and adenine base editors [ J ] . Nat Biotechnol, 2020, 38 ( 7 ) : 875-882.
- [ 54 ] Ling Y, Alshareef S, Butt H, et al. Pre-mRNA splicing repression triggers abiotic stress signaling in plants [ J ] . Plant J, 2017, 89 ( 2 ) : 291-309.
- [ 55 ] AlShareef S, Ling Y, Butt H, et al. Herboxidiene triggers splicing repression and abiotic stress responses in plants [ J ] . BMC Genomics, 2017, 18 ( 1 ) : 260.
- [ 56 ] Miller-Wideman M, Makkar N, Tran M, et al. Herboxidiene, a new herbicidal substance from *Streptomyces chromofuscus* A7847. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical and biological properties [ J ] . J Antibiot ( Tokyo ), 1992, 45 ( 6 ) : 914-921.
- [ 57 ] Butt H, Eid A, Monuin AA, et al. CRISPR directed evolution of the spliceosome for resistance to splicing inhibitors [ J ] . Genome Biol, 2019, 20 ( 1 ) : 73.
- [ 58 ] Lu HP, Luo T, Fu HW, et al. Resistance of rice to insect pests mediated by suppression of serotonin biosynthesis [ J ] . Nat Plants, 2018, 4 ( 6 ) : 338-344.
- [ 59 ] 崔玉静, 黄益宗, 朱永官. 镉对人类健康的危害及其影响因子的研究进展 [ J ] . 卫生研究, 2006 ( 5 ) : 656-659.
- Cui YJ, Huang YZ, Zhu YG. Adverse health effects of cadmium and related factors [ J ] . Journal of Hygiene Research, 2006 ( 5 ) : 656-659.
- [ 60 ] Yuan LP. Development of hybrid rice to ensure food security [ J ] . Rice Science, 2014, 21 ( 1 ) : 1-2.
- [ 61 ] Jallad KN. Heavy metal exposure from ingesting rice and its related potential hazardous health risks to humans [ J ] . Environ Sci Pollut Res Int, 2015, 22 ( 20 ) : 15449-15458.
- [ 62 ] Ishikawa S, Ishimaru Y, Igura M, et al. Ion-beam irradiation, gene identification, and marker-assisted breeding in the development of low-cadmium rice [ J ] . Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109 ( 47 ) : 19166-19171.
- [ 63 ] Clemens S, Aarts MG, Thomine S, et al. Plant science : the key to preventing slow cadmium poisoning [ J ] . Trends Plant Sci, 2013, 18 ( 2 ) : 92-99.
- [ 64 ] Tang L, Mao B, Li Y, et al. Knockout of OsNramp5 using the CRISPR/Cas9 system produces low Cd-accumulating indica rice without compromising yield [ J ] . Sci Rep, 2017, 7 ( 1 ) : 14438.
- [ 65 ] Shi J, Habben JE, Archibald RL, et al. Overexpression of ARGOS genes modifies plant sensitivity to ethylene, leading to improved

- drought tolerance in both arabidopsis and maize [ J ] . *Plant Physiol*, 2015, 169 ( 1 ) : 266-282.
- [ 66 ] Shi J, Gao H, Wang H, et al. ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions [ J ] . *Plant Biotechnol J*, 2017, 15 ( 2 ) : 207-216.
- [ 67 ] Singh A, Gautam V, Singh S, et al. Plant small RNAs : advancement in the understanding of biogenesis and role in plant development [ J ] . *Planta*, 2018, 248 ( 3 ) : 545-558.
- [ 68 ] Zhang J, Zhang H, Srivastava AK, et al. Knock-down of rice microRNA166 confers drought resistance by causing leaf rolling and altering stem xylem development [ J ] . *Plant Physiology*, 2018, 176 ( 3 ) : 2082-2094.
- [ 69 ] White FF, Potnis N, Jones JB, et al. The type III effectors of *Xanthomonas* [ J ] . *Mol Plant Pathol*, 2009, 10 ( 6 ) : 749-766.
- [ 70 ] Bezrutezyk M, Yang J, Eom JS, et al. Sugar flux and signaling in plant-microbe interactions [ J ] . *Plant J*, 2018, 93 ( 4 ) : 675-685.
- [ 71 ] Zhou J, Peng Z, Long J, et al. Gene targeting by the TAL effector PthXo2 reveals cryptic resistance gene for bacterial blight of rice [ J ] . *Plant J*, 2015, 82 ( 4 ) : 632-643.
- [ 72 ] Oliva R, Ji C, Atienza-Grande G, et al. Broad-spectrum resistance to bacterial blight in rice using genome editing [ J ] . *Nat Biotechnol*, 2019, 37 ( 11 ) : 1344-1350.
- [ 73 ] Jung J, Won SY, Suh SC, et al. The barley ERF-type transcription factor HvRAF confers enhanced pathogen resistance and salt tolerance in *Arabidopsis* [ J ] . *Planta*, 2007, 225 ( 3 ) : 575-588.
- [ 74 ] Vogel MO, Moore M, Konig K, et al. Fast retrograde signaling in response to high light involves metabolite export, MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE6, and AP2/ERF transcription factors in *Arabidopsis* [ J ] . *Plant Cell*, 2014, 26 ( 3 ) : 1151-1165.
- [ 75 ] Muller M, Munne-Bosch S. Ethylene response factors : A key regulatory hub in hormone and stress signaling [ J ] . *Plant Physiol*, 2015, 169 ( 1 ) : 32-41.
- [ 76 ] Wang F, Wang C, Liu P, et al. Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene OsERF922 [ J ] . *PLoS One*, 2016, 11 ( 4 ) : e0154027.
- [ 77 ] Anjaneyulu A, Satapathy MK, Shukla VD. Rice tungro [ M ] . Lebanon : Science Publishers, Inc. , 1995.
- [ 78 ] Macovei A, Sevilla NR, Cantos C, et al. Novel alleles of rice eIF4G generated by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis confer resistance to Rice tungro spherical virus [ J ] . *Plant Biotechnol J*, 2018, 16 ( 11 ) : 1918-1927.
- [ 79 ] Panstruga R. Serpentine plant MLO proteins as entry portals for powdery mildew fungi [ J ] . *Biochemical Society Transactions*, 2005, 33 ( 2 ) : 389-392.
- [ 80 ] Piffanelli P, Ramsay L, Waugh R, et al. A barley cultivation-associated polymorphism conveys resistance to powdery mildew [ J ] . *Nature*, 2004, 430 ( 7002 ) : 887-891.
- [ 81 ] Wang Y, Cheng X, Shan Q, et al. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew [ J ] . *Nat Biotechnol*, 2014, 32 ( 9 ) : 947-951.
- [ 82 ] Li M, Li X, Zhou Z, et al. Reassessment of the four yield-related genes Gn1a, DEPI, GS3, and IPA1 in rice using a CRISPR/Cas9 system [ J ] . *Front Plant Sci*, 2016, 7 : 377.
- [ 83 ] Li J, Zhang H, Si X, et al. Generation of thermosensitive male-sterile maize by targeted knockout of the *ZmTMS5* gene [ J ] . *J Genet Genomics*, 2017, 44 ( 9 ) : 465-468.
- [ 84 ] Li C, Zong Y, Wang Y, et al. Expanded base editing in rice and wheat using a Cas9-adenosine deaminase fusion [ J ] . *Genome Biol*, 2018, 19 ( 1 ) : 59.
- [ 85 ] Endo M, Mikami M, Toki S. Biallelic gene targeting in rice [ J ] . *Plant Physiol*, 2016, 170 ( 2 ) : 667-677.
- [ 86 ] Haroon B, Ayman E, Zahir A, et al. Efficient CRISPR/Cas9-mediated genome editing using a chimeric single-guide RNA molecule [ J ] . *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8 : 1441.
- [ 87 ] Svitashv S, Young JK, Schwartz C, et al. Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA [ J ] . *Plant Physiology*, 2015, 169 ( 2 ) : 931-945.
- [ 88 ] Li Z, Liu ZB, Xing A, et al. Cas9-Guide RNA directed genome editing in soybean [ J ] . *Plant Physiol*, 2015, 169 ( 2 ) : 960-970.
- [ 89 ] Dass A, Abidin MZ, Reddy VS, et al. Isolation and characterization of the dehydration stress-inducible GhRDL1 promoter from the cultivated upland cotton ( *Gossypium hirsutum* ) [ J ] . *Journal of Plant Biochemistry & Biotechnology*, 2016, 26 ( 1 ) : 1-7.
- [ 90 ] Zhang Y, Bai Y, Wu G, et al. Simultaneous modification of three homoeologs of TaEDR1 by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat [ J ] . *Plant J*, 2017, 91 ( 4 ) : 714-724.

- [ 91 ] Endo M, Mikami M, Endo A, et al. Genome editing in plants by engineered CRISPR-Cas9 recognizing NG PAM [ J ] . Nat Plant, 2019, 5 ( 1 ) : 14-17.
- [ 92 ] Zhong ZH, Zhang YX, You Q, et al. Plant genome editing using FnCpf1 and LbCpf1 nucleases at redefined and altered PAM sites [ J ] . Molecular Plant, 2018, 11 ( 7 ) : 999-1002.
- [ 93 ] Lin CS, Hsu CT, Yang LH, et al. Application of protoplast technology to CRISPR/Cas9 mutagenesis : From single cell mutation detection to mutant plant regeneration [ J ] . Plant Biotechnology Journal, 2018, 16 ( 7 ) : 1295-1310.
- [ 94 ] Mout R, Ray M, Yesilbag Tonga G, et al. Direct cytosolic delivery of CRISPR/Cas9-Ribonucleoprotein for efficient gene editing [ J ] . ACS Nano, 2017, 11 ( 3 ) : 2452-2458.
- [ 95 ] Kuscu C, Arslan S, Singh R, et al. Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease [ J ] . Nat Biotechnol, 2014, 32 ( 7 ) : 677-683.
- [ 96 ] Tsai SQ, Zheng Z, Nguyen NT, et al. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases [ J ] . Nat Biotechnol, 2015, 33 ( 2 ) : 187-197.
- [ 97 ] Fu Y, Sander JD, Reyon D, et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs [ J ] . Nat Biotechnol, 2014, 32 ( 3 ) : 279-284.
- [ 98 ] Liang Z, Chen K, Zhang Y, et al. Genome editing of bread wheat using biolistic delivery of CRISPR/Cas9 *in vitro* transcripts or ribonucleoproteins [ J ] . Nat Protoc, 2018, 13 ( 3 ) : 413-430.
- [ 99 ] Komor AC, Badran AH, Liu DR. CRISPR-Based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes [ J ] . Cell, 2017, 168( 1-2 ) : 20-36.
- [ 100 ] Zhang Y, Massel K, Godwin ID, et al. Applications and potential of genome editing in crop improvement [ J ] . Genome Biol, 2018, 19 ( 1 ) : 210.
- [ 101 ] Bruetschy C. The EU regulatory framework on genetically modified organisms ( GMOs ) [ J ] . Transgenic Res, 2019, 28 ( S2 ) : 169-174.
- [ 102 ] Waltz E. Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation [ J ] . Nature, 2016, 532 ( 7599 ) : 293-293.

( 责任编辑 朱琳峰 )