

CRISPR/Cas9 技术在小麦育种中的应用进展

曹巧¹, 史占良¹, 张国丛¹, 班进福¹, 郑树松², 傅晓艺¹, 张士昌¹, 何明琦¹, 韩然¹, 高振贤^{1*}

1.石家庄市农林科学研究院, 石家庄 050041;

2.中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101

摘要: 小麦(*Triticum aestivum* L.)是世界上主要的农作物之一,在粮食供应中发挥重要作用。在过去的几十年,由于小麦基因组复杂和遗传转化困难,导致小麦的基础和应用研究落后于其他谷类作物。2014年小麦基因组编辑取得了显著进展,进而促进了小麦生物技术的发展。综述了CRISPR/Cas9技术在小麦育种中的研究进展,简单介绍了CRISPR/Cas9基因编辑技术的发现、原理和优缺点,指出小麦基因编辑过程中农杆菌介导的遗传转化较粒子轰击法可降低转基因沉默频率,未来将成为基因编辑过程中主流的遗传转化方式;优化sgRNA的启动子、选择同源保守序列做为靶点可以提高基因编辑效率;新开发的碱基编辑器和prime editor需引入更多突变类型。展望了进一步提高小麦基因编辑效率和安全性的可行性,以期为未来小麦育种工作提供参考。

关键词: 小麦育种;基因编辑;CRISPR/Cas9

DOI:10.19586/j.2095-2341.2020.0104

中图分类号:S512

文献标识码:A

Progress of CRISPR/Cas9 Application in Wheat Breeding

CAO Qiao¹, SHI Zhanliang¹, ZHANG Guocong¹, BAN Jinfu¹, ZHENG Shusong², FU Xiaoyi¹, ZHANG Shichang¹, HE Mingqi¹, HAN Ran¹, GAO Zhenxian^{1*}

1.Shijiazhuang Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050041, China;

2.Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: *Triticum aestivum* L. is one of the main crops in the world and plays an important role in food security supply. In the past few decades, due to the complexity of wheat genome and the difficulty of genetic transformation, the basic and applied research of wheat has lagged behind other cereal crops. In 2014, remarkable progress was made in wheat genome editing, which promoted the development of wheat biotechnology. This paper summarized the research progress of CRISPR/Cas9 technology in wheat breeding, briefly introduced the discovery, principle, advantages and disadvantages of CRISPR/Cas9 gene editing technology, and pointed out that the *Agrobacterium* mediated genetic transformation in the process of wheat gene editing would reduce the gene silencing frequency compared with particle bombardment, and would become the mainstream genetic transformation in the process of gene editing in the future; optimizing the promoter of sgRNA and selecting the conserved sequence of homologous gene as the target can improve the efficiency of gene editing; the newly developed base editor and prime editor need to introduce more mutation types, and the feasibility of further improving the efficiency and safety of wheat gene editing was prospected to provide reference for future wheat breeding work.

Key words: wheat breeding; gene edit; CRISPR/Cas9

靶向突变或对基因组进行精确的改变是生物学研究的重点,过去10年,锌指核酸酶(zinc-finger

nucleases, ZFNs)^[1]、TAL效应子核酸酶(transcription activator like effector nucleases, TALENs)^[2]和成簇规

收稿日期:2020-08-28; 接受日期:2021-09-03

基金项目:河北省重点研发计划项目(20326311D);河北现代农业小麦产业技术体系项目;国家小麦产业技术体系项目(CARS-03-1-6)。

联系方式:曹巧 E-mail:qiaocao19@163.com; * 通信作者 高振贤 E-mail:zhenxiangao@163.com

律间隔短回文重复 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated nuclease 9, CRISPR/Cas9)^[3] 对应的 3 种基因组编辑技术得到迅速发展, 这些系统以类似方式在基因组中产生位点特异性双链断裂 (double strand breaks, DSBs), 诱导生物体通过非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 或同源重组 (homology-directed repair, HDR) 的方式修复 DSBs。在修复过程中 NHEJ 在酶切位点发生碱基插入或缺失 (insertions/deletions, Indels), 当人为提供同源供体 DNA 时, HDR 可实现对基因组 DNA 的定点替换^[4]。ZFNs 和 TALENs 具有识别 DNA 特异序列和切割 DNA 靶序列的限制性内切酶两种功能结构域, 已成功应用于多种植物^[1-2]。相比之下, CRISPR/Cas9 系统由一个短引导核糖核酸 (small guide RNA, sgRNA) 和条件性脱氧核糖核酸酶 Cas9 组成^[5], sgRNA 5' 端的 20 个核苷酸引导 Cas9/sgRNA 复合体沿着染色体脱氧核糖核酸寻找目标, 直至完全匹配。如果染色体上存在一个 NGG 三核苷酸-原间隔基序 (protospacer adjacent motif, PAM) 位于靶位点的下游, 则会引起 Cas9 构象变化, 激活 Cas9 两个独立的核酸酶结构域并导致靶位点的切割^[5], 目前 CRISPR/Cas9 系统已广泛运用于植物研究中。

小麦基因组编辑技术和遗传转化系统的发展使小麦进入了基因改造时代, 然而由于小麦基因组的复杂性和遗传转化效率低, 小麦基因组编辑的进展仍落后于其他农作物。目前, 小麦基因组编辑的研究主要集中于破坏基因, 关于基因打靶和碱基编辑的报道仍较少。TALENs 和 CRISPR/Cas9 技术已成功应用于小麦基因编辑中, 尤其是 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 因系统的简便、高效等特点应用最广泛, 占比高达 92.86%^[6]。本文主要综述了 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在近代小麦新品种培育中的成功实践, 对前人的育种工作进行归纳, 以期对未来育种工作提供参考, 促进优良小麦品种的持续更新和产业的健康发展。

1 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的发现

早在 1987 年就有研究者在细菌 DNA 中鉴定出 CRISPRs^[7], 但直至 2007 年 CRISPRs 才被证明

与 Cas 蛋白联合提供免疫力^[8]。2011—2012 年人类最初在细菌和古细菌中发现了 CRISPR/Cas9 系统通过 CRISPR-RNAs (crRNAs) 介导入侵核酸的沉默, 从而为细菌和古细菌提供了针对病毒和质粒的适应性免疫^[9-10]。之后, 5 个独立的研究小组将该基因编辑系统运用于动物中^[11-15]。2013 年有研究者首次利用 CRISPR/Cas9 系统在模式植物拟南芥、烟草和水稻开展基因编辑研究^[16-17]。截至目前共发现有 3 种类型 CRISPR/Cas 系统 (type I、type II 和 type III)^[18-19], 其中 I 型和 III 型 CRISPR/Cas 系统存在共同点: 特异的 Cas 核酸内切酶处理 pre-CRISPR-derived RNA (pre-crRNA) 一旦成熟, 每个 crRNA 组合成一个大型多 Cas 蛋白复合物, 该复合物识别并切割与 crRNA 互补的核酸序列; 相比之下, II 型 CRISPR/Cas 系统通过一种不同的机制处理 pre-crRNA, 利用 tracrRNA (a trans-activating crRNA) 与 pre-crRNAs 中的重复序列互补, 同时在 Cas9 存在时触发双链 RNA 特异核糖核酸酶 RNase III 活性^[20], Cas9 被认为是唯一负责 crRNA 引导的外源 DNA 沉默的蛋白质^[21]。目前经过改造的 II 型 CRISPR/Cas 系统已成为一个高效、简便的基因编辑工具, 并在微生物、植物和动物基因功能研究和遗传改良中得到广泛应用^[22]。

2 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的原理

成熟的 crRNA 与反式激活 crRNA (transactivated crRNA, tracrRNA) 碱基配对形成一个双 RNA 结构, 该结构引导 CRISPR 相关蛋白 Cas9 触发靶 DNA 双链断裂^[3]。Cas9 是一种 DNA 特异性的核酸内切酶, Cas9 蛋白在整个细菌界均较丰富, 但序列和大小差异较大, 所有已知的 Cas9 酶均含有一个 HNH 结构域, 该结构域切割与 sgRNA 序列互补的 DNA 链 (靶链), 以及一个 RuvC 核酸酶结构域, 该结构域切割非互补链 (非靶链), 产生双链 DNA 断裂 (double strand break, DSB)^[23]。Jinek 等^[5]研究了 2 种主要 Cas9 酶亚型 2.6 和 2.2 埃分辨率的晶体结构, 揭示了所有 Cas9 家族成员共有的核心结构, 结构中含一个结合核酸的裂缝, 单粒子电子显微镜重建显示, 形成裂缝的两瓣类似钳状, 当 sgRNA 与 Cas9 结合后诱导结构重塑, 形成一个中心通道, 与 DNA 底物结合。Cas9 广泛的结构重塑发生于与靶 DNA 双链结合之前, 暗示

sgRNA 的装载是 Cas9 激活的关键步骤。使用 CRISPR/Cas 进行基因组编辑时,含部分双链 tracrRNA:crRNAs 被设计成 sgRNAs,sgRNAs 保留了 2 个关键特征,5'端与靶 DNA 互补,3'端与 Cas9 蛋白结合^[24]。CRISPR/Cas 结合和切割 DNA 均需要识别一个短的三核苷酸原间隔基序(proto-spacer adjacent motif, PAM),DNA 异源双链形成始于 PAM,并向靶序列的远端方向进行,与 PAM 的相互作用触发 Cas9 的催化活性^[25],导致 DSBs,进而诱导生物体通过非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)或同源重组(homology-directed repair, HDR)修复 DSBs,完成基因编辑过程。

3 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的优缺点

使用传统育种方法在多倍体农作物,如甘蔗、棉花、小麦和马铃薯中引入理想性状是一项具有挑战性且耗时的工作,此外多倍体植物中用传统育种方法进行多性状的渗入和代谢改变也较困难。CRISPR/Cas 基因组编辑技术与传统的育种方法相比优势明显,可同时靶向多个基因或代谢途径,而不产生任何连锁冗余。如 CRISPR/Cas9 可有效用于编辑多个目的基因,已被开发用于在小麦中产生对白粉病的广谱抗性^[26];且还用于棉花^[27]、邓肯葡萄柚^[28]和马铃薯^[29]多倍体农作物中产生突变。

Cas9 蛋白的脱靶活性是 CRISPR/Cas 基因组编辑的主要问题,因 Cas 蛋白可以编辑任何与其 sgRNA 约 5 个错配的 DNA 序列^[30],但在大多数情况下,Cas9/sgRNA 不能识别与 sgRNA 错配大于 3 的 DNA 序列^[24]。尽管在植物中观察到的脱靶活性处于表面水平,但仍需要开发直接的方法以克服脱靶效应,确保 Cas9 编辑的特异性。CRISPR/Cas9 试剂的一些特性已被证实与 Cas9 的脱靶倾向有关。有报道表明 Cas9/sgRNA 不能识别和编辑 PAM 位点 10~12 bp 范围内不匹配的 DNA 位点,Cas9 蛋白质对 NGG-PAM 的亲和力高于 NAG-PAM^[31]。根据以上结果设计了几种策略以降低高离靶率:①选择 GC 含量较高(大于 70%)的目标位点^[32];②截短 sgRNAs,使目标互补区长度小于 20 个核苷酸,在不降低目标基因组编辑效率的情况下,降低偏离目标部位的意外突变($\geq 5\ 000$

倍)^[33];③Cas9 催化亚基的突变(RuvC 中的 D10A 和 HNH 中的 H840A)使 Cas9 转化为 DNA 切刻酶,2 个 Cas9 切刻酶与一对与靶基因座互补的 sgRNAs 可以介导 DSB,有效降低脱靶^[34]。随着测序发展和生物信息学软件工具的开发,以及对 Cas9 的不断改良,可以明显提高编辑效率,降低脱靶造成的不利影响^[24]。

4 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在小麦中的应用

CRISPR/Cas9 是目前小麦中应用最广泛的基因编辑技术,其较 ZFNs 和 TALENs 具备以下 5 个明显优点:①CRISPR/Cas9 系统只有 Cas9 蛋白和 sgRNA 两个简单组分,而 ZFNs 和 TALENs 均为嵌合核酸酶,含有 FokI 切割和 DNA 结合两个结构域,且以二聚体的形式发挥作用;②CRISPR/Cas9 系统通过 sgRNA 借助碱基配对将 Cas9 招募到靶向 DNA 序列,而 ZFNs 和 TALENs 需要借助蛋白和 DNA 的相互作用;③Cas9 的目标大小仅为 20 bp,而 ZFNs 和 TALEN 为 40 bp;④同时对多个基因进行基因编辑时 CRISPR/Cas9 系统较 ZFNs 或 TALENs 更高效、省时^[14];⑤用于 CRISPR/Cas9 系统的质粒较 ZFNs 和 TALENs 系统易于组装。鉴于以上原因使 CRISPR/Cas9 成为全世界最流行的基因组编辑技术。

4.1 农杆菌介导的 CRISPR/Cas9 系统

目前农杆菌介导的遗传转化是将 CRISPR/Cas9 DNA 组分输送到植物中最重要和最常见的方法^[35]。2018 年前小麦获得基因编辑后代植株的基因组编辑系统多是通过粒子轰击法实现遗传转化的^[36-37],但其在将载体骨架上的大片段 DNA 共转移时易导致高频的转基因沉默事件发生^[38]。相比之下,农杆菌介导的遗传转化因待转移的 DNA 片段被限定在双元载体中的左右边界,通常在转移 DNA (transfer DNA, T-DNA) 时只产生简单的插入,降低了转基因沉默频率^[39]。随着小麦中农杆菌介导转化效率的提高^[40]和可用于转化的受体小麦基因型范围扩大^[41],使其在小麦基因组编辑中成为一种更有前景的转运遗传物质的手段。Zhang 等^[42]成功地构建了农杆菌介导的 CRISPR/Cas9 系统,在 4 个籽粒调控相关基因中分别产生

靶向突变,转基因保持活性并持续诱导 T_1 代和 T_2 代的位点特异性突变。

4.2 影响CRISPR/Cas9基因编辑的因素

CRISPR/Cas9系统无论采用粒子轰击法还是农杆菌介导的遗传转化进行基因编辑时,均需要先将构建好的载体进行原生质体转化,并对其转化效率进行评价,进而选出构建的最佳载体进行后续愈伤组织的转化试验。Zhang等^[42]通过将构建的pOsUbi-GFP、pUC-35S:GFP+1载体转染小麦原生质体后进行荧光比较,发现绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)中1 bp的插入导致GFP无法表达,当pTaU6.1-gGFP、pTaU6.2-gGFP、pTaU6.3-gGFP、pTaU6.5-gGFP分别与ZmUbi-Cas9-GFP共同转化小麦原生质体时会对GFP进行基因编辑,导致荧光发生变化,荧光经过标准化校正后发现U6启动子引导的sgRNA编辑效率为47.4%~68.5%。表明构建含有不同启动子的sgRNA载体转化小麦原生质体时,对基因的编辑效率存在明显差异,因此小麦中构建农杆菌介导的CRISPR/Cas9系统进行遗传转化时,选用sgRNA的高效率启动子有利于提高基因编辑效率。Wang等^[43]在*TaGW7*基因的前3个外显子内共选择了8个靶位点,利用CRISPR/Cas9编辑系统对其进行基因编辑,3个同源基因(*TaGW7-A1*、*TaGW7-B1*和*TaGW7-D1*)中有7个目标位点是保守的,GW7T4靶基因仅在*TaGW7-B1*和*TaGW7-D1*之间是保守的,通过构建载体转化原生质体和下一代测序对每个gRNA靶点的效率进行评估,结果发现基因编辑效率为0.10%~10.94%,其中GW7T6效率最高,而GW7T4效率最低。表明靶点位置的选择显著影响CRISPR/Cas9系统在小麦中的基因编辑效率,在六倍体小麦中同时实现对3个等位基因的编辑时应优先选取保守序列作为靶位点。

4.3 CRISPR/Cas9基因编辑效果

CRISPR/Cas9基因编辑系统通过产生DSBs,进而诱导生物体修复DSBs,此时导致的突变多为缺失和插入突变。如部分遗传易感个体在摄入小麦醇溶蛋白时引发乳糜泻,其是一种自身免疫性疾病,Sánchez-León等^[36]利用CRISPR/Cas9技术获得 α -醇溶蛋白突变体,这些突变体中碱基变化范围在-126~+158 bp,在一个已经鉴定出45个不同野生型 α -醇溶蛋白基因的小麦品系中,使多达

35个基因发生了突变,从而使该突变体小麦的免疫反应性降低了85%。*GW2*基因是谷类作物粒重的一个关键遗传决定因素,在六倍体普通小麦中有3个同源基因(*TaGW2-A1*、*TaGW2-B1*和*TaGW2-D1*),Zhang等^[44]利用CRISPR/Cas9技术获得缺失1个(B1或D1)、2个(B1和D1)或3个(A1、B1和D1)*TaGW2*同源基因的基因编辑突变体,结果发现来自不同基因组的*TaGW2*的单拷贝突变的小麦植株,其粒径和千粒重(thousand-grain weight, TGW)均呈上升趋势;双同源突变体表现出比单基因组突变体更高的表型变异;在三重突变体中粒径和TGW的增加幅度最大。Singh等^[45]利用CRISPR-Cas9技术在*Ta-Ms45*基因的A、B和D同源序列中产生突变,最终导致花粉发育中止,实现雄性不育。Abe等^[46]利用农杆菌介导的CRISPR/Cas9技术研究了小麦中控制种子休眠的*Qsd1*同源等位基因,获得了多重突变,延长了种子的休眠期,并降低了小麦穗发芽率。以上均是CRISPR/Cas9基因编辑系统在小麦中进行实践的成功案例,随着该技术的不断成熟,未来会有越来越多的对人类有益的小麦基因编辑突变体产生,也更有利于对小麦基因功能进行解析。

4.4 CRISPR/Cas9基因编辑的发展

新开发的高效胞嘧啶脱氨酶介导了胞嘧啶转化为胸腺嘧啶,在疾病治疗和农艺性状改良方面具有巨大应用潜力^[47],扩大编辑更多的DNA核苷酸需额外的碱基编辑工具,如嘌呤碱基的替换或嘌呤和嘧啶之间的颠换。Zong等^[48]将改良的tRNA腺苷脱氨酶与核酸酶灭活的CRISPR/Cas9融合,首次在小麦中实现将靶点目标腺嘌呤转化成鸟嘌呤。高效的碱基编辑效率,低插入缺失突变和高纯度产品使该植物的腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editor, ABE)表现优于CRISPR/Cas9系统中HDR介导的基因组编辑。Zong等^[48]通过优化tRNA腺苷脱氨酶相对于nCas9的位置、核定位信号(nuclear localization signal, NLS)的数量和位置以及不同形式的sgRNA,发现腺苷脱氨酶ecTadA-ecTadA*置于nCas9氨基末端,3个NLSs置于nCas9碳端,并搭配esgRNA使得ABE在小麦中的编辑效率最高。该ABE系统仍有进一步优化和扩展的可能,如可以使用生物技术改造Cas9识别不同的PAM,扩展目标的位点数量^[49]。

Lin等^[50]基于CRISPR/Cas9系统开发的Prime

editor 在小麦中实现点突变、插入和缺失,较碱基编辑系统可以创制更多的突变类型。Prime editors 是 CRISPR-Cas9 切口酶和逆转录酶相融合,经过改造的向导 RNA (prime editing guide RNAs, pegRNA) 与 Prime editors 蛋白结合,基因编辑过程中不涉及供体 DNA 或双链断裂。Lin 等^[50]通过对密码子、启动子和编辑条件的优化,开发了用于小麦的 Prime editor,小麦原生质体基因编辑的效率约为 1.4%。目前该方法在小麦中转化效率较低,仅限于原生质体的瞬时表达研究,尚未获得基因编辑的小麦植株。

5 展望

虽然基因编辑技术在小麦上已经有了发展路线,但仍有许多方面需要改进以提高小麦的生产力。①基因编辑过程中涉及的农杆菌介导遗传转化对小麦基因型具有依赖性。虽然已有 15 个中国商品小麦品种被农杆菌成功转化,但大多数基因型的转化效率较低,如济麦 22、矮抗 58、轮选 987 和京 411^[51],因此,在小麦遗传转化中,需克服基因型依赖性;②虽然 CRISPR/Cas9 相关技术因其高效、特异、简单和多功能而被广泛用于小麦基因组编辑,但通常 Cas9 识别的 PAM 为 NGG,限制了其目标范围,尤其对于碱基编辑器,单个碱基的变化有时不能使氨基酸改变。水稻中已经开发出 SpCas-NG,可以识别的 PAM 为 NG、NTG、NTT 和 NCG,可明显提高基因编辑效率。但小麦中尚未见相关报道,因此,扩大 PAM 兼容性对小麦基因组编辑具有重要意义;③获得无转基因的基因编辑小麦植株。无转基因的基因编辑小麦植株与传统射线诱变获得的突变体相似,无任何载体序列,但目前小麦中多借助载体进行遗传转化,需要在后代中对是否含有载体片段进行检测。有研究者将预组装的 TALENs 蛋白、CRISPR/Cas9 核糖核蛋白或其 mRNA 递送到植物细胞中,获得了不含转基因的基因编辑植物^[52-53],但由于组织培养过程中不存在选择压力,直接将 TALENs 或 Cas9 蛋白输送至小麦细胞中低效且费力。采用 RNA 病毒做为载体完成 DNA 转运可以获得无转基因的基因编辑小麦,Choi 等^[54]已成功利用被修饰的小麦条纹花叶病毒携带异源编码序列,实现蛋白质在小麦中的表达。将来需要科研工作者研发出将

CRISPR/Cas9 转至到小麦中的高效病毒载体,获得无转基因的基因编辑小麦植株,以广泛应用于商业化生产。

参 考 文 献

- [1] CARROLL D. Genome engineering with zinc-finger nucleases [J]. *Genetics*, 2011, 188(4): 773-782.
- [2] CERMAK T, DOYLE E L, CHRISTIAN M, *et al.* Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting[J/OL]. *Nucl. Acids Res.*, 2011, 39(12): e82[2021-10-20]. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr218>.
- [3] 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.
- [4] SYMINGTON L S, GAUTIER J. Double-strand break end resection and repair pathway choice[J]. *Annu. Rev. Genet.*, 2011, 45(1): 247-271.
- [5] JINEK M, JIANG F, TAYLOR D, *et al.* Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation [J]. *Science*, 2014, 343(6176): 1247997-1247997.
- [6] WANG K, GONG Q, YE X. Recent developments and applications of genetic transformation and genome editing technologies in wheat[J]. *Theor. Appl. Genet.*, 2020, 133(5): 1603-1622.
- [7] ISHINO Y, SHINAGAWA H, MAKINO K, *et al.* Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product[J]. *J. Bacteriol.*, 1987, 169(12): 5429-5433.
- [8] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, *et al.* CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-1712.
- [9] WIEDENHEFT B, STERNBERG S H, DOUDNA J A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea[J]. *Nature*, 2012, 482(7385): 331-338.
- [10] TERNS M P, TERNS R M. CRISPR-based adaptive immune systems[J]. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2011, 14(3): 321-327.
- [11] CHO S W, KIM S, KIM J M, *et al.* Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease [J]. *Nat. Biotechnol.*, 2013, 31(3): 230-232.
- [12] HWANG W Y, YANFANG F, DEEPAK R, *et al.* Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system[J]. *Nat. Biotechnol.*, 2013, 31(3): 227-229.
- [13] JINEK M, EAST A, CHENG A, *et al.* RNA-programmed genome editing in human cells[J/OL]. *Elife*, 2013, 2: e00471 [2021-10-20]. <https://doi.org/10.7554/eLife.00471>.
- [14] MALI P, YANG L, ESVELT K M, *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 823-826.
- [15] LE C, RAN F A, COX D, *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [16] LI J F, NORVILLE J E, AACH J, *et al.* Multiplex and homolo-

- gous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9[J]. Nat. Biotechnol., 2013, 31(8): 688–691.
- [17] NEKRASOV V, STASKAWICZ B, WEIGEL D, *et al.*. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease[J]. Nat. Biotechnol., 2013, 31(8): 691–693.
 - [18] MAKAROVA K S, HAFT D H, BARRANGOU R, *et al.*. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems[J]. Nat. Rev. Microbiol., 2011, 9(6): 467–477.
 - [19] MAKAROVA K S, ARAVIND L, WOLF Y I, *et al.*. Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems[J]. Biol. Direct., 2011, 6(38): 1–27.
 - [20] DELTCHEVA E, CHYLINSKI K, SHARMA C M, *et al.*. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III[J]. Nature, 2011, 471(7340): 602–607.
 - [21] SAPRANAUSKAS R, GASIUNAS G, FREMAUX C, *et al.*. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*[J]. Nucl. Acids Res., 2011, 39(21): 9275–9282.
 - [22] 殷朝敏, 范秀芝, 史德芳, 等. CRISPR/Cas 基因编辑技术及其在真菌中的应用[J]. 生物技术通报, 2017, 33(3): 58–65.
 - [23] GASIUNAS G, BARRANGOU R, HORVATH P, *et al.*. Cas9 – crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2012, 109(39): 15539–15540.
 - [24] VATS S, KUMAWAT S, KUMAR V, *et al.*. Genome editing in plants: exploration of technological advancements and challenges[J]. Cells, 2019, 8(11): 1386–1424.
 - [25] STERNBERG S H, REDDING S, JINEK M, *et al.*. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9[J]. Nature, 2014, 507(7490): 62–67.
 - [26] 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.
 - [27] WANG P, JUN Z, SUN L, *et al.*. High efficient multi-sites genome editing in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*) using CRISPR/Cas9 system[J]. Plant Biotechnol. J., 2017, 16(1): 137–150.
 - [28] JIA H, ZHANG Y, ORBOVIĆ V, *et al.*. Genome editing of the disease susceptibility gene CsLOB1 in citrus confers resistance to citrus canker [J]. Plant Biotechnol. J., 2017, 15(7): 817–823.
 - [29] ANDERSSON M, TURESSON H, NICOLIA A, *et al.*. Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts[J]. Plant Cell Rep., 2017, 36(1): 117–128.
 - [30] FU Y, FODEN J A, KHAYTER C, *et al.*. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells[J]. Nat. Biotechnol., 2013, 31(9): 822–826.
 - [31] HSU P D, SCOTT D A, WEINSTEIN J A, *et al.*. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases[J]. Nat. Biotechnol., 2013, 31(9): 827–832.
 - [32] LIN Y, CRADICK T J, BROWN M T, *et al.*. CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences[J]. Nucl. Acids Res., 2014, 42(11): 7473–7485.
 - [33] FU Y, SANDER J D, REYON D, *et al.*. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs[J]. Nat. Biotechnol., 2014, 32(3): 279–284.
 - [34] RAN F, HSU P, LIN C Y, *et al.*. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity[J]. Cell, 2013, 154(6): 1380–1389.
 - [35] SOYARS C L, PETERSON B A, BURR C A, *et al.*. Cutting edge genetics: CRISPR/Cas9 editing of plant genomes[J]. Plant Cell Physiol., 2018, 59(8): 1608–1620.
 - [36] SÁNCHEZ-LEÓN S, GIL-HUMANES J, OZUNA SERAFINI C, *et al.*. Low-gluten, non-transgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9[J]. Plant Biotechnol. J., 2017, 16(4): 902–910.
 - [37] 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.
 - [38] CAROLINE T, ANNE P, MICHEL B, *et al.*. Biolistic transformation of wheat: increased production of plants with simple insertions and heritable transgene expression[J]. Plant Cell Tiss. Org., 2014, 119(1): 171–181.
 - [39] DAI S, PING Z, MARMEY P, *et al.*. Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment[J]. Mol. Breed., 2001, 7(1): 25–33.
 - [40] ISHIDA Y, TSUNASHIMA M, HIEI Y, *et al.*. Wheat (*Triticum aestivum* L.) transformation using immature embryos[J]. Methods Mol. Biol., 2015, 1223: 189–198.
 - [41] WANG K, LIU H, DU L, *et al.*. Generation of marker-free transgenic hexaploid wheat via an *Agrobacterium*-mediated co-transformation strategy in commercial Chinese wheat varieties [J]. Plant Biotechnol. J., 2016, 15(5): 12–20.
 - [42] ZHANG Z, HUA L, GUPTA A, *et al.*. Development of an *Agrobacterium*-delivered CRISPR/Cas9 system for wheat genome editing[J]. Plant Biotechnol. J., 2019, 17(8): 1623–1635.
 - [43] WANG W, PAN Q, TIAN B, *et al.*. Gene editing of the wheat homologs of TONNEAU1-recruiting motif encoding gene affects grain shape and weight in wheat[J]. Plant J., 2019, 100(2): 251–264.
 - [44] 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.
 - [45] SINGH M, KUMAR M, ALBERTSEN M C, *et al.*. Concurrent modifications in the three homeologs of Ms45 gene with CRISPR-Cas9 lead to rapid generation of male sterile bread wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Plant Mol. Biol., 2018, 97(4): 371–383.
 - [46] ABE F, HAQUE E, HISANO H, *et al.*. Genome-edited triple-recessive mutation alters seed dormancy in wheat[J]. Cell Rep.,

- 2019, 28(5): 1362–1369.
- [47] HESS G T, TYCKO J, YAO D, *et al.*. Methods and applications of CRISPR-mediated base editing in eukaryotic genomes [J]. *Mol. Cell*, 2017, 68(1): 26–43.
 - [48] ZONG Y, SONG Q, CHAO L, *et al.*. Efficient C-to-T base editing in plants using a fusion of nCas9 and human APOBEC3A [J]. *Nat. Biotechnol.*, 2018, 36(10): 950–953.
 - [49] HU J H, MILLER S M, GEURTS M H, *et al.*. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity[J]. *Nature*, 2018, 556(7699): 57–63.
 - [50] LIN Q, ZONG Y, XUE C, *et al.*. Prime genome editing in rice and wheat[J]. *Nat. Biotechnol.*, 2020, 38(5): 582–585.
 - [51] WANG K, LIU H, DU L, *et al.*. Generation of marker-free transgenic hexaploid wheat via an *Agrobacterium*-mediated co-transformation strategy in commercial Chinese wheat varieties [J]. *Plant Biotechnol. J.*, 2016, 15(5): 12–20.
 - [52] WOO J W, KIM J, KWON S I, *et al.*. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins [J]. *Nat. Biotechnol.*, 2015, 33(11): 1162–1164.
 - [53] STODDARD T J, CLASEN B M, BALTES N J, *et al.*. Targeted mutagenesis in plant cells through transformation of sequence-specific nuclease mRNA[J/OL]. *PLoS ONE*, 2016, 11(5): e0154634 [2021–10–21]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154634>.
 - [54] CHOI I R, STENGER D C, MORRIS T J, *et al.*. A plant virus vector for systemic expression of foreign genes in cereals[J]. *Plant J.*, 2000, 23(4): 547–555.