

网络出版日期:2018-05-09

网络出版地址:<http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1220.S.20180509.1603.004.html>

新型基因编辑技术发展及在植物育种中的应用

王艳芳, 苏婉玉, 曹绍玉, 张琳, 吕霞, 张应华, 许俊强

(云南农业大学 云南省滇台农业特色产业化工程研究中心, 昆明 650201)

摘要 近年来出现了几种新型基因编辑技术, 包括锌指核酸酶(ZFN)、转录激活子样效应因子核酸酶(TALEN)、规律性重复短回文序列簇与 Cas9(CRISPR/Cas9)系统。这些基因编辑技术是通过特异性结构识别靶位点, 核酸酶发挥切割作用, 对靶位点进行定点编辑, 由于此类基因编辑技术具有高效准确、制作简单的特点, 已被广泛应用到植物基因功能研究和定向改良植物性状方面。在此综述上述3种新型基因编辑技术的原理, 比较不同编辑技术的差异, 总结在拟南芥、烟草、水稻、玉米等作物育种中的应用, 指出基因编辑存在的问题, 对这些技术在基础研究及育种实践中的应用进行展望。

关键词 基因编辑; ZFN; TALENS; CRISPR/Cas

中图分类号 Q812

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2018)05-0617-09

目前, 以基因编辑(Gene editing)为基础的反向遗传学技术是基因改造与研究的手段之一^[1], 促进生物学研究的迅猛发展。近年来, 以序列特异核酸酶(Sequence-specific nucleases, SSNs)为工具的基因编辑技术已在全世界掀起研究热潮。2012年《Science》将其列为年度十大科学进展之一; 以TALEN为代表的SSNs被誉为“基因组巡航导弹”; 2013年基因编辑技术的新星CRISPR/Cas9又被《Science》列为年度十大科学进展之一; 2014年《Nature Methods》将基因编辑技术评为过去10 a对生物学研究最具影响力的研究方法之一^[2]。2016年NgAgo基因编辑技术被首次公布, 理论上更加先进、高效但技术尚未成熟且不能被多数试验证明^[3]。

基因组编辑通过特异性结构识别目标基因, 改造基因DNA来改变基因组中的特定基因, 从而定点修复致病基因^[4]或定点插入一个基因或DNA元件^[5-6]; 同时该技术也可对正常基因进行编辑, 实现基因的敲除、敲入、结构变异等修饰, 从而研究其在体内的功能。

1 人工核酸内切酶介导的新型基因编辑技术原理

人工核酸内切酶包含两个结构域:DNA结合

域和内切酶结构域。第1个结构域负责识别特定的DNA位点; 后者负责切割DNA。核酸内切酶在特定位点切割使DNA双链断裂(DSB), 诱发细胞产生非同源末端连接(NHEJ)和同源重组(HR)修复机制对受损DNA实现修复, 因而在特定位点插入、删除或缺失, 产生特定位点的基因突变, 从而实现对基因的定点修饰^[7-9]。

1.1 ZFN

ZFNS是最先用于基因编辑技术的特异性人工核酸酶。ZFN是人工设计且具有锌指结构的蛋白, 由锌指蛋白(Zinc finger protein, ZFP)构成的特异性DNA结合域和特异性核酸内切酶Fok I构成^[10-11]。ZFN的N末端为锌指蛋白DNA结合域, 可识别特定的DNA序列; 其C末端为Fok I切割结构域。Fok I与锌指结构域相连, 当Fok I形成二聚体时才具备酶切活性^[12], ZFP在Fok I的指导下识别靶基因位点将DNA双链切开(图1), 诱导细胞的修复机制对损伤DNA进行自主修复^[13]。

1.2 TALENS

TALEN是由转录激活因子样效应物(Transcription activator-like effector, TALE)替代ZF作为DNA结合域, 与Fok I切割域组成的基因

收稿日期:2017-05-25 修回日期:2017-10-13

基金项目:国家自然科学基金(31560560); 云南省应用基础研究计划(2015FD019)。

第一作者:王艳芳,女,硕士研究生,从事园艺蔬菜遗传与育种研究。E-mail:2801133046@qq.com

通信作者:许俊强,男,讲师,博士,从事蔬菜育种与分子生物学研究。E-mail:xujunqiang101@163.com

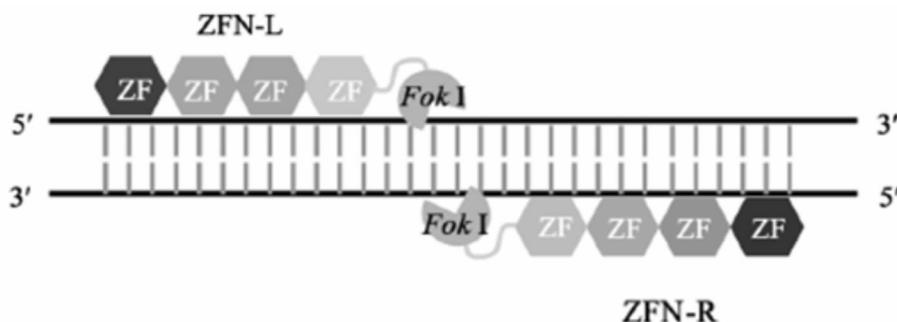
图 1 ZFN 类工程核酸酶的作用原理^[14]

Fig. 1 Schematic principles of ZFN type of engineered nucleases

编辑技术。与 ZFN 相似,由 TALE 蛋白 DNA 结合域和 Fok I 两部分发挥作用,前者负责目标序列的特异性识别,后者进行靶位点的切割^[15]。

TALE 蛋白是植物病原体黄单胞菌分泌的一类效应蛋白因子,能够特异结合 DNA^[15-16]。TALE 蛋白由 3 部分组成^[17],第 1 部分来自于天然 TALE 蛋白,其 N 端含有Ⅲ型分泌系统所需的分泌和易位信号,即易位结构域;第 2 部分是 DNA 结合结构域,是一段重复氨基酸序列,由多个长度不同的 TALE 单元组成,且每 34 个氨基酸组成 1 个 TALE 单元,其中高度保守的氨基酸

有 32 个,只有第 12、13 位氨基酸是变化的,能够特异地结合 1 个碱基序列,因此这两个氨基酸又被称为重复变异双残基(Repeat variant diresidue, RVD)。不同的 RVD 能够特异性识别 1 种或多种碱基^[17];第 3 部分为天然 TALE 蛋白的 C 端,含有 1 个核定位信号和转录激活域,可帮助 TALE 蛋白定位于细胞核,同时发挥转录激活作用^[15,18-20]。Fok I 的切割活性依赖于其切割结构域的二聚化,两个 Fok I 发生二聚化后才会对 DNA 双链进行切割(图 2),从而诱发细胞 DNA 损伤后的两种修复过程^[21]。

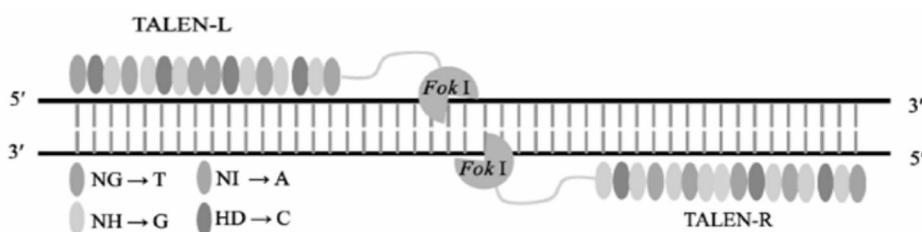
图 2 TALEN 类工程核酸酶的作用原理^[14]

Fig. 2 Schematic principles of TALEN type of engineered nucleases

1.3 CRISPR/Cas

CRISPR 系统发现于细菌自身免疫系统的过程中,主要存在细菌和古生菌中。CRISPR 系统由 3 部分构成:CRISPR 基因座(CRISPR locus)、前导序列(Leader sequence, LS)以及一类基因家族 Cas 基因(Cas genes)。CRISPR 基因座由一些正向重复序列(Direct repeat, DR)和非重复间隔序列Spacer)两部分间隔排列组成。Cas 基因是 CRISPR 位点附近的一类家族基因,主要承担核酸酶切割作用。1 个 Cas 基因簇往往包含 4~10 个保守基因^[22],它表达出的 Cas 蛋白在免疫系统过程中发挥重要作用。前导序列由 300~500 bp 碱基组成,位于 CRISPR 的 5' 端,与第 1 个重复序

列直接相连,是相对保守的 AT 富集区^[23]。

CRISPR/Cas 系统工作的核心在于人工设计的 sgRNA (Single-guide RNA), sgRNA 是由 crRNA(CRISPR RNA)与反式激活 crRNA 即 tracrRNA(Trans-activating CRISPR RNA)两种非编码 RNA 通过碱基配对结合而成^[24]。其作用原理:核酸内切酶 Cas 在 sgRNA 的引导下,在目标基因的特定区域对特定 DNA 进行定点切割,造成双 DNA 链断裂,细胞实行自主修复机制,从而实现特定位点的定向编辑^[25]。由于 Cas 基因的不同,CRISPR/Cas 系统可分为 3 种类型:I 型、II 型和 III 型。其中 I 型和 III 型因使用较复杂,应用较少,而 II 型最为简单,研究的也较多,也是

目前最常用的人工核酸酶。CRISPR/Cas9 就是最常用的一种, Cas9 酶在 sgRNA 的引导下定向切割目标位点, 产生 DSB, 从而实现基因的定向编辑(图 3)。

1.4 新型基因编辑技术的比较

从 ZFN 到 CRISPR/CAS 技术来看, 在基因编辑的过程中每种技术都具有自己的特点(表 1)。

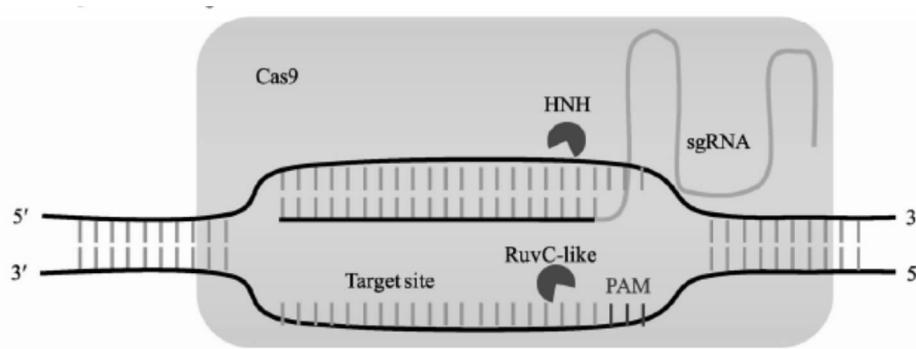


图 3 CRISPR/Cas9 类工程核酸酶的作用原理^[14]

Fig. 3 Schematic principles of CRISPR/Cas9 type of engineered nucleases

表 1 新型基因编辑技术的差异比较

Table 1 Differences in new gene editing techniques

项目 Item	ZFN	TALEN	CRISPR/CAS
来源 Source	动植物、微生物 Plants, animals and microorganism	病原体黄单胞菌 <i>Pathogen Xanthomonas</i>	细菌、古生菌 Bacteria and archaea adaptive
构成 Structure	ZFP+Fok I	TALE+Fok I	Cas9+sgRNA
技术难度 Technical difficulty	困难 Difficult	较容易 Easier	较容易 Easier
识别模式 Recognition mode	蛋白质-DNA Protein-DNA recognition	蛋白质-DNA Protein-DNA recognition	RNA-DNA RNA-DNA recognition
编辑特点 Editing features	单位点编辑 Single point editor	单位点编辑 Single point editor	多位点编辑 Multi point editing
识别特性 Recognition characteristics	较弱 Weaker	较强 Stronger	强 Strong
编辑范围 Edit range	小 Narrow	较小 Narrower	较广 Wider
精确度 Accuracy	无法预测 Unpredictable	较低 Lower	较高 Higher
脱靶效应 Off-target effects	较低 Lower	较低 Lower	较高 Higher
毒性 Toxicity	较弱 Weaker	较弱 Weaker	较强 Stronger
性价比 Cost performance	低 Low	低 Lower	较高 Higher
局限 Limit	上下文依赖效应 Context dependent effect	重复构建载体 Duplicate construction vector	脱靶严重 Off-target seriously

2 新型基因编辑技术在植物中应用

备受欢迎的新型基因编辑技术已成功在多种植物中得到普遍运用, 不仅在模式植物中成熟应用, 且随着不断发展、完善, 该技术逐步走向成熟。近年来也在非模式植物如小麦、大豆、番茄等中得到广泛应用。

2.1 模式植物

2.1.1 拟南芥 2005 年, ZFN 初次诱导其染色

体基因发生突变, 提高后代突变率, 且有一半以上突变体可以稳定遗传至下一代^[26]。利用雌激素诱导系统对基因进行高效突变, 获得丙烯醇抗性突变体 *adh1* (*alcohol dehydrogenase 1*) 和种皮不含花青素突变体 *tt4* (*transparent testa*), 其中有 69% 的 *adh1* 突变及 33% 的 *tt4* 突变可稳定遗传给后代^[27]。Osakabe 等^[28] 对拟南芥的 *ABSCISIC ACID INSENSITIVE 4* 基因进行突变, 获得预期表型, 如对脱落酸及葡萄糖的不敏感

性的 abi4(ABSCISIC ACID INSENSITIVE 4)突变体。种种例子可证明,ZFN 可提高植物基因打靶效率,在今后研究中有望克服植物基因组靶向修饰的难题^[29]。TALEN 在拟南芥的原生质体中,首次实现对内源靶基因的敲除^[30]。Cermak 等^[31]利用一套基于 Golden gate 方法组装 TALEN,对拟南芥原生质体中 *ADH1* (*alcohol dehydrogenase 1*) 基因进行高效定点突变,得到 6 个独立的突变体。针对 *TT4* (*transparent testa 4*) 基因设计间隔 230 bp 的两个 sg RNAs,实现大片段缺失^[32]。Feng 等^[33]对拟南芥耐油菜素类固醇基因 *BRIL* (*BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1*) 和赤霉素基因 *GAI* (*GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE*) 进行编辑,获得 50 株 *T₁* 代转基因植株,大部分转基因植株在早期生长阶段表现出多种生长表型,其中 *BRIL* 转基因植株有一半表现出生长阻滞、叶片卷曲, *GAI* 转基因植株中有 1/4 的植株外形矮小。

2.1.2 烟草 利用 ZFN 对烟草细胞的单个基因序列进行突变,使其耐除草剂^[34]。Wright 等^[35]将部分序列缺失的 *Gus;Npt II* 报告基因(β-葡萄糖酸糖苷酶:新霉素磷酸转移酶)随机整合到烟草基因组的不同位点,并修复该基因使其能够正常表达,不仅获得转基因植物,也证明 ZFNs 对基因有修复功能。对烟草原生质体乙酰乳酸合成酶基因 *SuRA* (*tobacco acetohydroxyacid synthase*) 和 *SuRB* 编辑后,内源基因替换效率可达 40%,且对咪唑啉酮和磺酰脲类除草剂具备抗性^[36]。利用 TALEN 技术定向敲除体内 *eIF4E-6* (*eu-karyotic translation initiation factors 4E*) 基因,提高其对马铃薯 Y 病毒 (PVY) 的抗性^[37]。利用 CRISPR/Cas9 技术编辑转基因本氏烟草 16C (16C transgenic *Nicotiana benthamiana*, 16C-NB) 的 *GFP* (*green fluorescent protein*) 基因,用 PCR-RE (polymerase chain reaction-restriction enzyme) 的方法检测其突变体,成功建立本氏烟草 CRISPR/Cas9 基因敲除瞬时表达系统^[38]。针对其 *NbPDS* (*Nicotiana benthamiana phytoene desaturase*) 基因设计间隔 50 bp 的两个 sg RNAs,实现基因大片段的缺失、突变^[39]。利用 CRISPR/Cas9 技术成功的在烟草中敲除 *eIF4E-6* 基因,从而提高对 PVY 病毒的抗性^[40]。

2.1.3 水稻 Shan 等^[41]将两对 TALENs 转入

水稻原生质体及愈伤组织中,实现 *Os BADH2a*、*b* (*Oryza sativa betaine aldehyde dehydrogenase 2a, b*) 两个基因的同时突变。随后又对水稻不同性状的基因进行突变,包括香味、大穗、半矮化等基因,直接用于水稻育种。利用 TALENs 使水稻感病基因 *Os SWEET14* 的启动子发生突变,在不影响其生长发育的条件下提高水稻对白叶枯病的抗性^[42]。利用 CRISPR/Cas 系统定点敲除其 *PDS* (*phytoene desaturase*) 基因,基因突变的效率高于转基因水稻的^[43]。定点突变水稻基因组中已知的苯达松(Bentazon)抗性基因 *CYP81A6* (*cytochrome P450 monooxygenase*),突变效率约为 2.73%,可为以后苯达松敏感突变体育种提供材料^[44]。在水稻品种改良中,利用 CRISPR 技术分别对水稻 *Os BADH2* (*Oryza sativa betaine aldehyde dehydrogenase 2*) 和 *LOC_Os10g05490* 编码区进行编辑,获得水稻香米株系和耐冷性株系^[45-46]。

2.1.4 玉米 玉米内源基因 *IPK1* 编码其体内植酸生物合成的关键酶,Shukla 等^[47]利用 ZFN 实现对该基因的插入失活,使植酸合成途径受阻,从而降低植酸含量。之后又将除草剂抗性基因 *PAT* 插入玉米内源基因 *IPK*,获得抗除草剂植株^[47]。将天然存在的优良糯玉米性状通过 CRISPR 技术直接敲入高产杂交品种中,获得优良品种的同时也解决糯玉米产量低的问题^[48]。

2.2 在其他植物中应用

利用 ZFN 成功地对大豆基因组中高度重复序列进行定点敲除^[49]。在衣藻中实现用 ZFN 敲除内源基因^[50]。基于 Golden Gate 方法构建的 TALEN 技术成功且高效地敲除短柄草中的一系列基因^[41]。通过 TALEN 技术成功敲除大麦中的 *grf* (*growth hormone releasing factor*) 基因,不仅效率高且可稳定地遗传给后代^[51]。利用 TALEN 敲除两个脂肪酸去饱和酶基因 *FAD2-1a* (*The Fatty Acid Desaturase 2-1a*) 和 *FAD2-1b* (*The Fatty Acid Desaturase 2-1b*),使大豆单饱和脂肪酸含量大大提高,延长保质期^[52]。通过 TALEN 技术定向突变土豆 *Vinv* (*Vacuolar Invertase*) 基因,改进土豆的冷藏性及加工品质^[53]。在小麦中利用 TALEN 获得抗白粉病的小麦株系^[54]。利用 TALEN 技术编辑 1 个马铃薯品系基因,降低天门冬酰胺和单糖的含量的同时也提高其耐储藏性^[55]。

作为基因组编辑技术的新方向,CRISPR已被广泛运用。运用CRISPR/Cas9系统可对多倍体小麦基因进行多位点同时突变或单位点定向突变^[54]。在甜橙中通过农杆菌介导法转入Cas9以及合成的sgRNA,编辑靶向CsPDS(*Citrus sinensis phytoene desaturase*)基因,成功使该基因发生突变^[55]。成功地在香蕉体内定点敲除内源基因MaPDS(*Musa phytoene dehydrogenase*),获得突变体株系,为以后进一步研究奠定基础^[57]。对杨树(*Populus tomentosa*)的PDS基因进行多靶点修饰,在T₀代转化体获得白化突变体^[58-59]。Fan等^[58]设计4个不同的gRNA分别编辑毛白杨不同基因组位点的八氢番茄红素脱氢酶基因8PtoPDS(*poplar phytoene desaturase gene*)以及相邻的基因,农杆菌介导转化后,转基因杨树表现出明显的白化表型。利用CRISPR技术删除双孢菇(*Agaricus bisporus*)中编码导致褐变的多酚氧化酶(*polyphenol oxidase, PPO*)基因家族,PPO酶的活性降低30%,使双孢菇延缓褐变或抗褐变^[60]。CRISPR/Cas9系统成功地应用于编辑大豆的乙酰乳酸合成基因1ALS1(*Acetylated lactic acid synthesis*)并获得氯磺隆抗性基因^[61]。通过CRISPR系统,对调控番茄果实成熟基因RIN(*Ripening inhibitor*)进行编辑,延长保质期^[62];2017年,对番茄体内SIACS2(*Solanum Lycopersicum 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase*)进行修饰,SIACS2是番茄系统Ⅱ乙烯合成的限速酶,从而调控系统Ⅱ乙烯的过量表达,可避免番茄过熟^[63]。利用CRISPR/Cas9技术对控制番茄叶片形态的SAGO7基因进行敲除,将突变植株的叶片与野生型番茄叶片相比,其有些窄小甚至呈针状,由此可证明番茄SAGO7基因的功能^[64]。此外,CRISPR/Cas9系统也被广泛应用于如高粱^[65]、马铃薯^[66-70]、西瓜^[71]、黄瓜^[72]等植物中。

3 展望

近年来,在基因编辑技术不断发展的过程中,尽管每种技术不可避免存在一些有待解决和发展的问题,如ZFN—如何增强锌指蛋白的特异性以及如何精确调控ZFN的表达;TALEN—如何避免重复构建载体和缩短其重复序列避免序列太长而限制应用等;CRISPR/Cas—怎样降低严重的脱靶效应和解决PAM(*protospacer adjacent motif*)限制打靶位点的问题;但这些人工核酸酶所介导的新型基因编辑技术凭借其自身独特的优势仍取得突飞猛进的发展,且极大地推进科学的研究的进展。

新型基因编辑技术存在一系列问题,尤其是各基因编辑技术的脱靶效应,当然人们也在不断寻求解决的方法。例如,可针对不同目标基因设计不同的ZFP蛋白组合、TALE蛋白组合以及sgRNA,增强其识别特异性的同时也可降低脱靶效应;各基因编辑技术在设计编辑靶位点时选择特异性较高的位点,最大程度上降低脱靶效应;在ZFN和TALEN应用中务必保证核酸内切酶Fok I为二聚体,这样不仅具有切割作用还可降低脱靶效应;而在CRISPR/Cas应用时,利用Cas9单切口酶和成对的sgRNA以及对sgRNA的正确选择在基因组编辑中可能对脱靶效应有所帮助;另外,针对那些已出现脱靶的位点进行研究,找出其原因和解决措施;当然也可针对切割的目标片段选择合适的修复途径或者根据自身所能切割的片段大小来降低脱靶效应等。更值得一提的是最近《Plant Cell》报道一篇有关解决植物基因组编辑的整体方案。其核心是存在于植物体内的一种多功能基因编辑“工具箱”,该“工具箱”以TALEN和CRISPR/Cas两个系统为依据,不仅可实现同时编辑多个基因和删除大片断基因,还可定点修饰和编辑单子叶和多子叶植物的基因等,且目前这种方案已成功在西红柿、烟草、小麦、大麦以及苜蓿中得到应用^[73]。由此可见,通过新型基因编辑技术对植物体内重要的基因进行定点修饰及编辑,如基因敲除、敲入或替换等,可以实现对植物品种和性状的精准改良,培育出适合各种不良环境条件和人们所需求的植物新品种,促进农业生产快速发展。

总而言之,新型基因编辑技术在未来科学发展的道路上会扮演越来越重要的角色,也会成为许多领域研究与应用的重要工具。

参考文献 Reference:

- [1] VOYTAS D F. Plant genome engineering with sequence-specific nucleases[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2013, 64(1):327-350.
- [2] 单齐伟,高彩霞.植物基因组编辑及衍生技术最新研究进展[J].遗传,2015,37(10):953-973.
- SHAN Q W, GAO C X. Research progress of genome editing and derivative technologies in plants[J]. *Hereditas*,

- 2015,37(10):953-973.
- [3] GAO F, SHEN X Z, JIANG F, et al. DNA-guided genome editing using the *Natronobacterium gregoryi* Argonaute [J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(7): 768-773.
- [4] CHAMBERLAIN J K, Schwarze U, Ussell K D, et al. Genetargeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta[J]. *Science*, 2004, 303(5661): 1198-1201.
- [5] JOHNSON L, MERCER K, JACKS T, et al. Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice[J]. *Nature*, 2001, 410(6832): 1111-1116.
- [6] BEARD C, HOCHEDLINGER K, JAENISCH R, et al. Efficient method to generate single-copy transgenic mice by site-specific integration in embryonic stem cells[J]. *Genesis*, 2006, 44(1): 23-28.
- [7] SYMINGTON L S, GAUTIER J. Double-strand break end resection and repair pathway choice[J]. *Annual Review of Genetics*, 2011, 45(1): 247-271.
- [8] WOOD A J, LO T W, ZEITLER B, et al. Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs[J]. *Science*, 2011, 333(6040): 307.
- [9] LO T W, PICKLE C S, LIN S, et al. Precise and heritable genome editing in evolutionarily diverse nematodes using TALENs and CRISPR/Cas9 to engineer insertions and deletions[J]. *Genetics*, 2013, 195(2): 331-348.
- [10] KPM Y G, CHA J, CHANDRASEGARAN S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to *Fok I* cleavage domain[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93(3): 1156-1160.
- [11] 王令, 张存芳, 张智英. 锌指核酸酶在基因组靶向修饰中的应用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2009, 25(7): 585-589.
- WANG L, ZHANG C F, ZHANG ZH Y. Application of zinc finger nucleases in genome targeting modification[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 25(7): 585-589.
- [12] BITINAITE J, WAH D A, AGGARWAL A K, et al. *Fok I* dimerization is required for DNA cleavage[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95(18): 10570-10575.
- [13] KIM S, LEE M J, KIM H, et al. Preassembled zinc-finger arrays for rapid construction of ZFN[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(1): 7.
- [14] 周想春, 邢永忠. 基因组编辑技术在植物基因功能鉴定及作物育种中的应用[J]. 遗传, 2016, 38(3): 227-242.
- ZHOU X CH, XING Y ZH. The application of genome editing in identification of plant gene function and crop breeding[J]. *Hereditas*, 2016, 38(3): 227-242.
- [15] MOSCOU M J, BOGDANOVA A J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors [J]. *Science*, 2009, 326(5959): 1501.
- [16] BOCH J, SCHOLZE H, SCHOMACK S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors[J]. *Science*, 2009, 326(5959): 1509-1512.
- [17] 杨发誉, 葛香连, 谷峰. 新型靶向基因组编辑技术研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2014, 34(2): 98-103.
- YANG F Y, GE X L, GU F. Reserach progress of new targeted gene editing technique[J]. *China Biotechnology*, 2014, 34(2): 98-103.
- [18] MUSSOLINO C, CATHOMEN T. TALE nucleases: tailored genome engineering made easy[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2012, 23(5): 644-650.
- [19] BONAS U, STALL R E, STASKAWICZ B, et al. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* [J]. *Molecular & General Genetics*, 1989, 218(1): 127-136.
- [20] KAY S, HAHN S, MAROIS E, et al. Abacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator[J]. *Science*, 2007, 318(5850): 648-651.
- [21] URNOV F D, REBAR E J, HOLMES M C, et al. Genome editing with engineered zinc finger nucleases[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11(19): 636-646.
- [22] GRISSA I, VERGNAUD G, POURCEL C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats[J]. *Bioinformatics*, 2007, 8(1): 172.
- [23] JANSEN R, VANEMBDEN J D, GAASTRA W, et al. Identificationof a novel family of sequence repeats among prokaryotes[J]. *Oomics-a Journal of Integrative Biology*, 2002, 6(1): 23-33.
- [24] 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.
- [25] SAPRANAUSKAS R, GASIUNAS G, FREMAUX C, et al. The *Streptococcus thermophiles* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli* [J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(21): 9275-9282.
- [26] LLOYD A, PLAISIER C L, CARROLL D, et al. Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in *Arabidopsis* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102(6): 2232-2237.
- [27] ZHANG F, MAEDER M L, UNGERWALLAC E, et al. High frequency targeted mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using zinc-finger nucleases [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(26): 12028-12033.
- [28] OSAKABE K, OSAKABE Y, TOKI S. Site-directed mutagenesis in *Arabidopsis* using custom-designed zinc finger nucleases[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(26): 12034-12039.
- [29] 李乐, 朱晔荣, 王勇. 植物基因打靶研究进展[J]. 生物学通报, 2007, 42(12): 8-10.
- LI L, ZHU Y R, WANG Y. Advances in gene targeting of plants[J]. *Bulletin of Biology*, 2007, 42(12): 8-10.

- [30] 张金脉,任兆瑞. TALENs:一种新的基因定点修饰技术[J]. 生命科学,2013,25(1):126-132.
- ZHANG J M, REN ZH R. TALENs: a new genome site-specific modification technology [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2013, 25(1): 126-132.
- [31] 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]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(17): 7879.
- [32] MAO Y F, ZHANG H, XU N F, et al. Application of the CRISPR-Cas system for efficient genome engineering in plants [J]. *Molecular Plant*, 2013, 6(6): 2008-2011.
- [33] FENG Z Y, ZHANG B T, DING W N, et al. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system [J]. *Cell Research*, 2013, 23(10): 1229-1232.
- [34] CAI C Q, DOYON Y, AINLEY W M, et al. Targeted transgene integration in plant cells using designed zinc finger nucleases [J]. *Plant Molecular Biology*, 2009, 69(6): 699-709.
- [35] WRIGHT D A, THIBODEAU-BEGANNYH S, SANDER J D, et al. Standardized reagents and protocols for engineering zinc finger nucleases by modular assembly [J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(3): 1637-1652.
- [36] TOWNSEND J A, WRIGHT D A, WINFREY R J, et al. High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases [J]. *Nature*, 2009, 459(7245): 442-445.
- [37] 宋琳娜,杨鹏九,万秀清,等. 应用 TALENs 技术定向敲除烟草 *eIF4E-6* 基因 [J]. 安徽农业科学, 2017, 45(4): 142-146.
- SONG L N, YANG P J, WAN X Q, et al. The directional knockout of *eIF4E-6* gene using TALENs technique [J]. *Journal of Anhui Agriculture Sciences*, 2017, 45(4): 142-146.
- [38] 杨学飞,刘亚娟,高原,等. CRISPR/Cas9 系统在本氏烟草基因敲除中的应用 [J]. 分子植物育种, 2017, 15(1): 30-38.
- YANG X F, LIU Y J, GAO Y, et al. The application of CRISPR/Cas9 system in gene knock-out of *Nicotiana benthamiana* [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2017, 15(1): 30-38.
- [39] BELHAJ K, CHAPARRO-GARCIAH A, KAMOUN S, et al. Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system [J]. *Plant Methods*, 2013, 9(1): 39.
- [40] 潘红杏,刘侠,万秀清,等. 利用 CRISPR-Cas9 基因组编辑技术定向敲除烟草 *eIF4E-6* 基因 [J]. 分子植物育种, 2017, 15(2): 538-544.
- PAN H X, LIU X, WAN X Q, et al. Directional knockout of *eIF4E-6* gene using CRISPR-Cas9 genome editing technique [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2017, 15(2): 538-544.
- [41] SHAN Q W, WANG Y P, CHEN K L, et al. Rapid and efficient gene modification in rice and *Brachypodium* using TALENs [J]. *Molecular Plant*, 2013, 6(4): 1365-1368.
- [42] LI T, LIU B, SPALDING M H, et al. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice [J]. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(5): 390-392.
- [43] SHAN Q, WANG Y, LI J, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system [J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(8): 686-688.
- [44] 姜明君,常振仪,卢嘉威,等. 应用 TALEN 技术定点突变水稻苯达松抗性基因 *CYP81A6* [J]. 农业生物技术学报, 2016, 24(8): 1225-1232.
- JIANG M J, CHANG ZH Y, LU J W. TALEN-mediated mutagenesis of bentazon resistance gene *CYP81A6* in rice [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2016, 24(8): 1225-1232.
- [45] 邵高能,谢黎虹,焦桂爱,等. 利用 CRISPR/CAS9 技术编辑水稻香味基因 *Badh2* [J]. 中国水稻科学, 2017, 31(2): 216-222.
- SHAO G N, XIE L H, JIAO G A, et al. CRISPR/CAS9-mediated editing of the fragrant gene *Badh2* in rice [J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2017, 31(2): 216-222.
- [46] 沈春修. 水稻 LOC_Os10g05490 位点冷胁迫条件下表达分析 CRISPR/CAS 定向编辑 [J]. 浙江农业学报, 2017, 29(2): 177-185.
- SHEN CH X. CRISPR/Cas9 editing and expression analysis of LOC_Os10g05490 in rice under cold stress [J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2017, 29(2): 177-185.
- [47] SHUKLA V K, DOYON Y, MILLER J C, et al. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases [J]. *Nature*, 2009, 459 (7245): 437-441.
- [48] LEDFORD H. Gene-editing surges as us rethinks regulation [J]. *Nature*, 2016, 532(7598): 158-159.
- [49] CURTIN S J, ZHANG F, SANDER J D, et al. Targeted mutagenesis of duplicated genes in soybean with zinc-finger nucleases [J]. *Plant Physiology*, 2011, 156 (2): 466-473.
- [50] SIZOVA I, GREINER A, AWASTHI M, et al. Nuclear gene targeting in *Chlamydomonas* using engineered zinc-finger nucleases [J]. *Plant Journal*, 2013, 73(5): 873-882.
- [51] CHEN K, SHAN Q, GAO C. An efficient TALEN mutagenesis system in rice [J]. *Methods*, 2014, 69(1): 2-8.
- [52] HAUN W, COFFMAN A, CLASEN B M, et al. Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family [J]. *Plant Biotechnol Journal*, 2014, 12(7): 934-940.
- [53] CLASEN B M, STODDARD T J, LUO S, et al. Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, 14(1): 169-176.
- [54] WANG Y P, CHENG X, SHAN Q W, et al. Simultaneous

- editing of three homoeo-alleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(9): 947-951.
- [55] JONES H D. Regulatory uncertainty over genome editing [J]. *Nature Plants*, 2015, 1(1): 14011.
- [56] JIA H, WANG N. Targeted genome editing of sweet orange using Cas/sgRNA[J]. *PLoS one*, 2014, 9(4): e93806.
- [57] 胡春华, 邓贵明, 孙晓玄, 等. 香蕉 CRISPR/Cas9 基因编辑技术体系的建立[J]. 中国农业科学, 2017, 50(7): 1294-1301.
- HU CH H, DENG G M, SUN X X, et al. Establishment of an efficient CRISPR/Cas9-mediated gene editing system in banana[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50 (7): 1294-1301.
- [58] FAN D, LIU T T, LI C F, et al. Efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in populus in the first generation[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(12217): 12217.
- [59] 刘婷婷, 范迪, 冉玲玉, 等. 应用CRISPR/Cas9技术在杨树中高效敲除多个靶基因[J]. 遗传, 2015, 37(10): 1044-1052.
- LIU T T, FAN D, RAN L Y, et al. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of multiple genes in *Populus*[J]. *Hereditas*, 2015, 37(10): 1044-1052.
- [60] WALTZ E. Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation[J]. *Nature*, 2016, 532(7599): 293.
- [61] LI Z S, LIU Z B, XING A Q, et al. Cas9-Guide RNA directed genome editing in soybean[J]. *Plant Physiology*, 2015, 169(2): 960-970.
- [62] ITO Y, NISHIZAWA-YOKOI A, ENDO M, et al. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the RIN locus that regulates tomato fruit ripening[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 467(1): 76-82.
- [63] 白云凤, 张爱萍, 吴建俊, 等. 靶向番茄 SLACS2 基因 CRISPR/CAS sgRNA 的设计和分析[J]. 生物信息学, 2017, 15(1): 7-15.
- BAI Y F, ZHANG A P, YAN J J, et al. Design and evaluation for sgRNAs target editing SLACS2 gene in CRISPR/Cas system[J]. *Chinese Journal of Bioinformatics*, 2017, 15(1): 7-15.
- [64] 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[J]. *Plant Physiology*, 2014, 166(3): 1292-1297.
- [65] JIANG W Z, ZHOU H B, BI H H, et al. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, *Sorghum* and rice[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(20): e188.
- [66] MUTHONI J. Tetrasomic inheritance in cultivated potato and implications in conventional breeding [J]. *Australian Journal of Crop Science*, 2015, 54(3): 185-190.
- [67] WANG S, ZHANG S, WANG W, et al. Efficient targeted mutagenesis in potato by the CRISPR/Cas9 system [J]. *Plant Cell Reports*, 2015, 34(9): 1473-1476.
- [68] 李祥栋, 石明, 魏心元. 禾谷类作物胚乳淀粉合成及Waxy基因研究进展[J]. 中国农学通报, 2015, 31(12): 181-186.
- LI X D, SHI M, WEI X Y. Advances for starch biosynthesis and Waxy gene in cereal crop[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2015, 31(12): 181-186.
- [69] 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 Reports*, 2017, 36(1): 117-128.
- [70] BUTLER N M, BALTES N J, VOYTAS D F, et al. Geminivirus-mediated genome editing in potato(*Solanum tuberosum* L.) using sequence-specific nucleases[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7(1045): 1-13.
- [71] TIAN S, JIANG L, GAO Q, et al. Efficient CRISPR/Cas9-based gene knockout in watermelon[J]. *Plant Cell Report*, 2016, 36(3): 399-406.
- [72] CHANDRASEKARAN J, BRUMIN M, WOLF D, et al. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2016, 17(7): 1140-1153.
- [73] CERMAK T, CURTIN S J, GIL-HUMANES J, et al. A multi-purpose toolkit to enable advanced genome engineering in plants[J]. *Plant Cell*, 29(6): 1196-1217.

Development of Novel Gene Editing Technologies and Its Applications in Plant Breeding

WANG Yanfang, SU Wanyu, CAO Shaoyu, ZHANG Lin,
LÜ Xia, ZHANG Yinghua and XU Junqiang

(Yunnan Agricultural University, Dianbai Engineering Research Center for Characteristic
Agriculture Industrialization of Yunnan Province, Kunming 650201, China)

Abstract Several novel gene editing techniques have been developed in recent years, it involves in zinc finger nucleases (ZFNs), transcription activator-like effector-based nucleases (TALEN), the clustered regularly interspaced short palindromic repeats-Cas9 system (CRISPR/Cas9). These techniques can site-directly edit genomes by recognizing the target sites according to the specific structure followed by endonuclease dissection. Novel genome editing techniques have been applied widely in studies on the gene functions of plants and improved the agronomic traits directionally in plants breeding because of its advantages of higher efficiency and easy-making. In this article, the characteristics, principles of three novel gene editing technologies and its applications in breeding of arabidopsis, tobacco, rice and maize were reviewed, and its differences were compared. The problems of gene editing are pointed out and the application of these techniques in basic research and breeding practice is prospected.

Key words Gene editing; ZFN; TALENS; CRISPR/CAS

Received 2017-05-25 **Returned** 2017-10-13

Foundation item The National Natural Science Foundation of China (No. 31560560); the Project of Applied & Basic Research of Yunnan (No. 2015FD019).

First author WANG Yanfang, female, master student. Research area: garden vegetables genetics and breeding. E-mail: 2801133046@qq.com

Corresponding author XU Junqiang, male, lecturer, Ph. D. Research area: vegetable breeding and molecular biology. E-mail: xujunqiang101@163.com

(责任编辑:郭柏寿 Responsible editor: GUO Baishou)