

徐继法,徐 艳,赵吉强,等. CRISPR/Cas9 系统及其在单子叶植物中的应用[J]. 江苏农业科学,2017,45(18):21-24.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.18.005

# CRISPR/Cas9 系统及其在单子叶植物中的应用

徐继法,徐 艳,赵吉强,陈 磊,郭善利,宋建成  
(烟台大学生命科学学院,山东烟台 264005)

**摘要:**CRISPR/Cas9 系统作为第 3 代人工核酸内切酶,已经成为继锌指核酸内切酶(zinc finger endonuclease,简称 ZFNs)和类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease,简称 TALENs)之后的新型高效定点的基因组编辑新技术。作为新型的基因编辑技术,CRISPR/Cas9 系统拥有突变效率高、构建简单、花费成本低等特点,自其出现之后,受到广泛关注且得到迅速发展,给植物基因组研究和遗传育种带来革命性的变革。目前,该技术已经在多种单子叶植物中实现了基因组定点精确编辑,包括水稻(*Oryza sativa*)、小麦(*Triticum aestivum*)、玉米(*Zea mays*)等单子叶植物。

**关键词:**CRISPR/Cas9 系统;基因编辑技术;单子叶植物;植物基因组;遗传育种

**中图分类号:**Q789 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)18-0021-04

基因组编辑技术是指将目的基因整合到宿主基因的特定靶位点上,从而达到特异性的改造生物基因组 DNA,是基因功能研究的重要方法。基因组编辑技术通过构建人工核酸内切酶将基因组靶位点双链 DNA 片段特异性切割开断裂(double strand broken,简称 DSB),继而使细胞内非同源末端连接(non-homologous end joining,简称 NHEJ)和同源重组(homologous recombination,简称 HR)这 2 种修复机制激活,断

裂 DNA 片段得到修复,使该位点出现插入和缺失以及同源片段重组,此过程不仅可以使基因发生突变也可实现同源重组,可以说真正实现了对基因的编辑。目前,能对基因实现定点精确编辑的技术主要有锌指核酸酶(zinc-finger nucleases,简称 ZFNs)<sup>[1-2]</sup>、转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator like effector nucleases,简称 TALENs)<sup>[3-4]</sup>、成簇的规律的间隔的短的回文重复序列和相关蛋白(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein,简称 CRISPR/Cas9)<sup>[5-6]</sup>。

CRISPR/Cas9 系统与应用方面与 ZFNs、TALENs 相比具有巨大的优势,载体构建操作简单,对每 1 个基因靶位点修饰只需合成 1 个靶标 sgRNA,就能顺利实现对基因组精确定点编辑,而 ZFNs、TALENs 的编辑操作则相对繁琐复杂<sup>[7-8]</sup>;此外,CRISPR/Cas9 系统还拥有试验周期短、成本花费低、易于

收稿日期:2016-04-24

基金项目:国家自然科学基金(编号:3137616);山东省自然科学基金(编号:ZR2011CM044、ZR2011CM006)。

作者简介:徐继法(1987—),男,山东枣庄人,硕士,研究方向为植物分子发育生物学。E-mail:dongfengxjf@163.com。

通信作者:宋建成,博士,硕士生导师,研究方向为植物分子发育生物学。E-mail:jesong88@yahoo.com。

liming and nutrient source for acid Appalachian soil[J]. Journal of Environmental Quality,2012,41(4):1096-1106.

[36] Mukherjee A, Zimmerman A R, Harris W. Surface chemistry variations among a series of laboratory-produced biochars[J]. Geoderma,2011,163(3/4):247-255.

[37] Zhang A M, Chen Z H, Zhang G N, et al. Soil phosphorus composition determined by P-31 NMR spectroscopy and relative phosphatase activities influenced by land use[J]. European Journal of Soil Biology,2012,52:73-77.

[38] Zhang Y, Chen L, Zhang Y, et al. Examining the effects of biochar application on soil phosphorus levels and phosphatase activities with visible and fluorescence spectroscopy[J]. Spectrosc Spect Anal, 2016,36(7):2325-2329.

[39] Colvan S, Syers J, O'Donnell A. Effect of long-term fertiliser use on acid and alkaline phosphomonoesterase and phosphodiesterase activities in managed grassland[J]. Biology and Fertility of Soils, 2001,34(4):258-263.

[40] 赵 军,耿增超,张 雯,等. 生物炭及炭基硝酸铵肥料对土壤酶活性的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),

2015,43(9):123-130.

[41] 王 宁,焦晓燕,武爱莲,等. 生物炭对土壤磷、钾养分影响研究进展[J]. 山西农业科学,2016,44(9):1402-1405,1420.

[42] Quilliam R S, Glanville H C, Wade S C, et al. Life in the 'charosphere'-does biochar in agricultural soil provide a significant habitat for microorganisms? [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2013,65(6):287-293.

[43] Pietikäinen J, Kiikkilä O, Fritze H. Charcoal as a habitat for microbes and its effect on the microbial community of the underlying humus[J]. Oikos,2000,89(2):231-242.

[44] Farrell M, Kuhn T K, Macdonald L M, et al. Microbial utilisation of biochar-derived carbon[J]. The Science of the Total Environment, 2013,465(6):288-297.

[45] Muhammad N, Dai Z M, Xiao K C, et al. Changes in microbial community structure due to biochars generated from different feedstocks and their relationships with soil chemical properties[J]. Geoderma,2014,226-227(1):270-278.

[46] 郝 艳. 生物炭对农田土壤微生物生态的影响分析[J]. 南方农业,2016,10(17):91,94.

推广等特点。2013 年,CRISPR/Cas9 系统作为一种新的突破性基因编辑技术出现,就得到迅速推广与应用。目前该系统在水稻、小麦、玉米、高粱等单子叶植物基因组中成功实现了精确定点编辑。

## 1 CRISPR/Cas9 系统的基本结构

CRISPR/Cas9 系统是细菌和古生菌在长期自然进化过程中针对噬菌体、病毒和外源 DNA 入侵进化形成的一种适应性免疫防御系统,其结构也是长期自然选择的进化结果。约 40% 的细

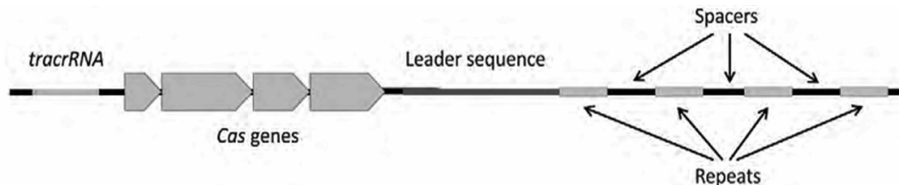


图1 CRISPR/Cas9 系统的基本结构

### 1.1 CRISPR/Cas9 系统的 3 个主要类型

CRISPR/Cas9 系统可分为 3 种不同的类型:Type I、Type II、Type III<sup>[14-15]</sup>。Type I 系统是最复杂以及含有 Cas 蛋白最多的系统,主要分布于细菌和古细菌中,包含 6 个蛋白,核心蛋白元件为 Cas3 蛋白,具有核酸酶和解旋酶的功能。在防御外源 DNA 入侵时,多个 Cas 蛋白与成熟的 crRNA 共同结合形成 CRISPR 相关病毒防御复合物 CASCAD (CRISPR associated complex for antiviral defense, 简称 CASCAD),在 crRNA 的介导下,CASCAD 与入侵的外源 DNA 结合,促使 CASCAD 内的 crRNA 与外源 DNA 的互补链配对形成 R 环结构,Cas3 的核酸酶识别 R 环结构后先将互补链切开,随后在 Cas3 的解旋酶和核酸酶作用下再将非互补链酶切,使其降解。

Type II 系统主要分布于细菌中,结构组分简单,核心蛋白元件为 Cas9 蛋白,Cas9 蛋白包含 2 个功能结构域,1 个在 N 端,有类似于 Ruc 核酸酶的活性;另 1 个在中部,有类似 HNH 核酸酶的活性<sup>[16]</sup>。II 型与其他 2 种类型有着截然不同的区别,成熟的 crRNA 是在 Cas9 蛋白独立参与下进行的,并与之结合形成复合物,即可对入侵的噬菌体 DNA 或是外源质粒进行酶切、降解。目前 II 型在 CRISPR/Cas9 系统研究中最深入,而且是被改造的最成功的人工核酸酶<sup>[17-19]</sup>。

Type III 系统主要分布于古细菌中,只有少数的细菌拥有该类型。该系统的核心蛋白元件为 Cas10,具有 RNA 酶活性和类似于 Type I 的 CASCAD 功能,主要参与 crRNA 的成熟以及外源核酸的降解。根据系统的靶标对象不同可将 III 分成 2 种亚型:Type III A、Type III B,前者的靶标对象为 mRNA,后者为 DNA,这也反映了自然界中的 CRISPR/Cas9 系统的多态性。

### 1.2 CRISPR/Cas9 系统的作用原理

CRISPR/Cas9 系统通过使用 CRISPR RNA (crRNA) 来指导入侵核酸的沉默,为细菌和古细菌提供针对病毒和外源质粒的适应性免疫。该适应性免疫系统依赖于由 crRNA 所引导的特异性序列和 Cas9 蛋白的内切核酸酶活性来清除入侵的病毒和质粒 DNA,其主要作用过程可通过以下 3 步进行<sup>[20]</sup>:(1)间隔序列的获得。当外来的病毒或外源质粒入侵细菌时,CRISPR/Cas9 系统能鉴别入侵核酸中的几个保守的紧邻靶区域下游的原始相邻碱基序列 (protospacer adjacent

菌和 90% 的古细菌都含有 CRISPR/Cas9 系统<sup>[9-10]</sup>。CRISPR/Cas9 系统由 CRISPR 序列元件及其位点附近的一系列保守的相关 Cas 蛋白基因 (CRISPR - associated genes, 简称 Cas genes) 组成。CRISPR/Cas9 的基因座结构相对简单 (图 1),主要由 5' 端的 tracrRNA、Cas 蛋白编码基因、CRISPR 位点组成。不同物种间 CRISPR 位点数目与重复序列的数目也有所不同<sup>[11-13]</sup>,但均包括 3 种序列 (重复 - 间隔序列、Cas 蛋白序列、前导序列)。重复 - 间隔序列由多个相同的重复序列及穿插其间的间隔序列组成,间隔序列可以特异性地识别外源 DNA。

motif, 简称 PAM),然后将临近 PAM 的间隔序列 (PAM, 序列: NRG, 其中 R = G/A) 修饰加工并整合到自身 CRISPR 基因座中。(2) CRISPR 基因座的表达。CRISPR 基因座先被转录成 pre - crRNA, 然后与 tracrRNA 形成一个双链复合物,Cas9 帮助 RNase III 将复合物切割成小片段,即生成成熟的 crRNA。(3) CRISPR 系统特异性降解入侵的外源核酸。成熟的 crRNA 与 tracrRNA 结合形成发夹 RNA,发夹 RNA 再与 Cas9 结合形成功能性复合物 (Cas9/crRNA/tracrRNA),然后在成熟的 crRNA 中的靶向核苷酸序列引导下将 Cas9 核酸内切酶结合至入侵的 DNA 的 PAM 处互补靶位点上,Cas9 切割入侵的外源 DNA 靶序列,入侵的外源核酸被降解。

2012 年,Jinek 等针对双链 tracrRNA 与 crRNA 基因的功能,设计出能模拟二者结合后形成发夹结构的单链引导 RNA (single guide RNA, 简称 sgRNA),sgRNA 具备了 crRNA - tracrRNA 复合物的功能,在 sgRNA - Cas9 系统中 sgRNA 部分能与 Cas9 核酸内切酶结合并将后者引导至基因组上的靶位点处进行结合与切割<sup>[21]</sup>。与目前广泛使用的基于 ZFNs 以及 TALENs 的基因定点修饰技术相比,CRISPR/Cas9 系统的识别机制赋予了该打靶系统在合成组装上无可比拟的优越性,因其可以通过简单的替换一段短的 RNA 分子来改变其序列识别的特异性,故而更为简便、经济。

## 2 CRISPR/Cas9 系统的构建及在单子叶植物中的研究进展

### 2.1 植物 Cas9 蛋白的优化选择

由于 CRISPR/Cas9 系统是细菌细胞所特有的,因此运用这一系统实现对动植物细胞的编辑,必须借助细菌的 CRISPR/Cas9 系统,CRISPR/Cas9 系统类型 II 结构简单、便于操作,对靶序列的切割只需 tracrRNA、Pre - crRNA、Cas9、RNase III 等 4 种成分。Cas9 基因来源于化脓性链球菌 II 型 CRISPR 获得性免疫系统,编码区全长为 4 107 bp<sup>[21]</sup>。Cas9 基因应用于真核生物基因组编辑还需要添加核定位信号,以保证 Cas9 蛋白能定位到细胞核<sup>[17]</sup>。Cas9 基因在植物基因组定点编辑时,目前主要采取植物密码子优化<sup>[17,22]</sup>,部分直接使用动物密码子优化<sup>[23-24]</sup>。Feng 等研究对水稻 SPP、YSA、ROC5 基因进行了准确地定点编辑,通过对 Cas9 的密码子进

行偏好性优化,在 *Cas9* 碳端添加核定位信号,并用 35S 启动子驱动 *Cas9* 表达,最后成功对基因进行了定点编辑<sup>[25]</sup>。因此对植物基因组的编辑过程中都采用了该类型。

## 2.2 植物的 CRISPR/Cas9 编辑载体系统的构建

目前大部分植物 CRISPR/Cas9 载体系统采用常规的酶切连接克隆方法构建 *Cas9*/sgRNA 表达载体,只适合同时打靶单个或少数几个靶点。Ma 等构建了一套适用于单子叶植物、双子叶植物并可进行多靶点修饰的 pYLCRISPR/Cas9 载体系统<sup>[26]</sup>。该载体系统利用 PCR 扩增获得多个含不同靶序列的 sgRNA 表达盒,并通过基于 II<sub>s</sub> 型限制性内切酶(如 *Bsa*I)的 Golden Gate ligation<sup>[27]</sup>或者基于复合酶的 Gibson Assembly<sup>[28]</sup>克隆技术,一次性整合到 CRISPR/Cas9 二元载体上。此外,Orel 等也设计了 Gateway 二元 T-DNA 载体来共表达 *Cas9* 和 sgRNA,并利用报告基因 *DGU. US* 来研究 CRISPR/Cas9 系统能否使双链 DNA 发生断裂<sup>[29]</sup>。研究结果表明,当二者被共转化到水稻的愈伤组织时,只有含有报告基因的 CRISPR/Cas9 系统所转入的愈伤组织上含有 GUS 着色点,对照只有报告基因无 GUS 着色点,说明 CRISPR/Cas9 系统在转入植物细胞中依然有活性进行表达。其他的 CRISPR/Cas9 载体系统使用传统的 II 型限制性内切酶克隆方法,需要多轮克隆将少数几个 sgRNA 表达盒组装到 CRISPR/Cas9 二元载体。

由于 CRISPR/Cas9 系统能使植物细胞中产生双链 DNA 断裂,并且其基因编码区产生的大部分突变会产生移码或片段缺失,可导致靶基因的功能缺失,使植物遗传性状发生变异。由此可见,CRISPR/Cas9 系统的构建能迅速提高其应用与推广。

## 2.3 CRISPR/Cas9 系统在单子叶植物中性状改良与基因功能的研究

目前由 CRISPR/Cas9 系统所介导的植物基因组定点编辑技术的应用主要有植物功能基因组学研究、农作物品种的优良选育、有针对性地利用 CRISPR/Cas9 系统来改造农作物品种,提高植物的抗病性、提高产量等<sup>[30]</sup>。目前该 CRISPR/Cas9 技术已经被迅速推广及利用,并已经有多位研究者对该系统在水稻、小麦、玉米和高粱等多种植物中的应用情况进行了综述,阐述该技术在这些植物的基因组编辑中的应用以及可行性。

Jiang 等利用 CRISPR/Cas9 系统设计靶向水稻细菌性疫病的易感基因的 *O<sub>s</sub>SWEET14* 和 *O<sub>s</sub>SWEET11* 的启动子区域,并在水稻原生质体中实施转化,测序结果显示靶标位点发生了定点突变<sup>[31]</sup>。Xie 等同样利用该技术也构建水稻 3 个不同位点的 sgRNAs,检测的突变效率为 3%~8%;此外,研究者还发现构建 CRISPR/Cas9 系统在不完全匹配的基因组位点存在脱靶效应,进一步分析表明 sgRNA 与靶标 DNA 的错配位置是决定 *Cas9*/gRNA 打靶特异性的关键因素<sup>[23]</sup>。为了最大限度地降低可能存在的脱靶效应的影响,应该谨慎选择 spacer 序列,尽可能选择序列特异性较高的位置。此外,结合植物研究的特点,针对同一个目标基因,分别使用不同的 spacer 构建独立的基因敲除个体,进而综合分析试验结果是排除偶然因素干扰试验结果的行之有效的办法。

Wang 等利用 CRISPR/Cas9 系统实现了对小麦 *MLO* 基因的定向突变,即针对 *MLO* 基因的单个拷贝设计 CRISPR/Cas9 靶位点,在原生质体和转基因植物中的结果表明,突变只发生

在 A 基因组上<sup>[32]</sup>。结果表明,在多倍体的小麦中,利用基因组编辑技术既可以同时突变多个拷贝,也可以特异地突变单个基因拷贝。此外,该研究还利用基因组编辑系统引发的 DNA 自身修复途径非同源末端连接(non-homologous end joining,简称 NHEJ)在小麦 *MLO* 位点实现了基因的定点插入,插入的片段可以稳定遗传。Sharma 等利用面包小麦(*Triticum aestivum*)EST 数据库中的 120 万条序列,采用严谨型参数装配出 27 268 条 contigs。在 2 832 条 contigs 中鉴定出 3 327 条 EST-SSR 和每个 contig 中可能的 CRISPR 结合位点,并指出利用 CRISPR 系统可能减少小麦植酸含量的重要靶标基因<sup>[33]</sup>。

Liang 等利用 TALENs、CRISPR/Cas9 等 2 种技术对玉米相关基因中分别进行了定点编辑,二者都在玉米原生质体获得了很高的突变效率。此外还发现,这 2 种系统诱导玉米原生质体靶基因突变的效率基本相似<sup>[34]</sup>。Xing 等同样也利用 CRISPR/Cas9 系统实现了在原生质体中对玉米的高亲和性钾转运蛋白基因(*ZmHKT1*)的定点编辑,同时也使 CRISPR/Cas9 系统在转基因玉米植株中进行了稳定遗传<sup>[35]</sup>。

试验结果表明,CRISPR/Cas9 系统可以对单子叶植物的单一外源基因、内源基因或是单子叶植物的多个基因进行定向的基因编辑。然而,在应用过程中 *Cas9* 蛋白的修饰、启动子的选择等要素对单子叶植物基因组编辑的效率影响完全不同,这在设计 CRISPR/Cas9 系统的实际操作过程中须要注意。以 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术正广泛应用于植物新基因的功能研究,比反义基因和 RNA 干扰(RNAi)技术的效果更好。因此,CRISPR/Cas9 基因组编辑技术将更广泛应用于植物基础生物学研究和作物遗传改良中。

## 3 展望

CRISPR/Cas9 技术自 2013 年初开始被成功应用以来,已被迅速应用于多种生物的研究,其在基因编辑中的优越性是显而易见的,相较于传统的转基因技术而言是高效的、精准的,相对于 TALENs 和 ZFNs 技术而言,其操作更加简便、敲除效率更高、基因编辑更加精准,大大降低了脱靶机率。最近美国麻省理工学院和哈佛学院的张峰博士实验室又鉴定出 2 种与 *Cas9* 蛋白具有相似功能,同样来源于 CRISPR 系统的 Cpf1 蛋白,形成了 CRISPR/Cpf1 系统<sup>[36]</sup>。Cpf1 的 PAM 特异性以及切割方式都不同于 *Cas9*,这一发现无疑是对基于 CRISPR 的基因组编辑技术的重要补充。

CRISPR/Cas9 及其相关技术系统的发展随着植物功能基因组研究的开展,以及对 CRISPR/Cas9 系统的深入研究,将全面推动基因组编辑技术的发展,其应用领域必然会越来越广。毫无疑问,CRISPR/Cas9 系统将是一种强大而高效的辅助工具,它的出现为植物基因工程的研究提供了一个新的想法和思路,必将给植物基因组定点编辑和植物遗传育种带来革命性的变革。

## 参考文献:

- [1] Morton J, Davis M W, Jorgensen E M, et al. Induction and repair of zinc-nuclease-targeted double-strand breaks in somatic cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006, 103(44):

- 16370 – 16375.
- [2] Durai S, Mani M, Kandavelou K, et al. Zinc finger; nucleases custom – designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells [J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33 (18): 5978 – 5990.
- [3] Miller J C, Tan S Y, Qiao G J, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing [J]. *Nature Biotechnology*, 2011, 29 (2): 143 – 148.
- [4] Lillestol R, Redder P, Garrett R A, et al. A putative viral defence mechanism in archaeal cells [J]. *Archaea*, 2006, 2(1): 59 – 72.
- [5] Brouns S J J, Jore M M, Lundgren M, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes [J]. *Science*, 2008, 321 (5891): 960 – 964.
- [6] 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]. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169(12): 5429 – 5433.
- [7] Chrisyian M, Cermak T, Doyle E L, et al. Targeting DNA double – strand breaks with TAL effector nucleases [J]. *Genetics*, 2010, 186 (2): 757 – 761.
- [8] Carroll D, Morton J J, Beumer K J, et al. Design, construction and *in vitro* testing of zinc finger nuclease [J]. *Nature Protocols*, 2006, 1 (3): 1329 – 1341.
- [9] Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats [J]. *BMC Bioinformatics*, 2007, 8(1): 172.
- [10] Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. CRISPR finder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats [J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35: 52 – 57.
- [11] Jansen R, van Embden J D A, Gaastra W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes [J]. *Molecular microbiology*, 2002, 43(6): 1565 – 1575.
- [12] Wei C X, Liu J Y, Yu Z S, et al. TALEN or Cas9 – rapid, efficient and specific choices for genome modifications [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2013, 40(6): 281 – 289.
- [13] Godde J S, Bickerton A. The repetitive DNA elements called CRISPRs and their associated genes: evidence of horizontal transfer among prokaryotes [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2006, 62 (6): 718 – 729.
- [14] Haft D H, Selengut J, Mongodin E F, et al. A guild of 45 CRISPR – associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas9 subtypes exist in prokaryotic genomes [J]. *PLoS Computational Biology*, 2005, 1(6): e60.
- [15] Makarova KS, Aravind L, Wolf Y I, et al. Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR/Cas9 systems [J]. *Biology Direct*, 2011, 6(1): 38.
- [16] Garneau J E, Dupuis M È, Villion M, et al. The CRISPR/Cas9 bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA [J]. *Nature*, 2010, 468(7320): 67 – 71.
- [17] Cong L, Ran F A, Cox D, et al. Multiple genome engineering using CRISPR/Cas9 systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819 – 923.
- [18] Qi L S, Larson M H, Gilbert L A, et al. Repurposing CRISPR as an RNA – guided platform for sequence – specific control of gene expression [J]. *Cell*, 2013, 152(5): 1173 – 1183.
- [19] Wang H Y, Yang H, Shivalila C S, et al. One – step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas9 mediated genome engineering [J]. *Cell*, 2013, 153(4): 910 – 918.
- [20] Terns M P, Terns R M. CRISPR – based adaptive immune systems [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2011, 14(3): 321 – 327.
- [21] 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.
- [22] Shan Q W, Gao C X. Research progress of genome editing and derivative technologies in plants [J]. *Hereditas*, 2015, 37 (10): 953 – 973.
- [23] Xie K B, Yang Y N. RNA – guided genome editing in plants using a CRISPR – Cas system [J]. *Molecular Plant*, 2013, 6(6): 1975 – 1983.
- [24] 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.
- [25] Feng Z Y, Zhang B T, Ding W N, et al. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas9 system [J]. *Cell Research*, 2013, 23 (10): 1229 – 1232.
- [26] Ma X L, Zhang Q Y, Zhu Q L, et al. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high – efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants [J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(8): 1274 – 1284.
- [27] Engler C, Kandzia R, Marillonnet S. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability [J]. *PLoS One*, 2008, 3(11): e3647.
- [28] Gibson D G, Young L, Chuang R Y, et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases [J]. *Nature Methods*, 2009, 6(5): 343 – 345.
- [29] Orel N, Kyryk A, Puchta H. Different pathways of homologous recombination are used for the repair of double – strand breaks within tandemly arranged sequences in the plant genome [J]. *The Plant Journal*, 2003, 35(5): 604 – 612.
- [30] Frampton R A, Pitman A R, Fineran P C. Advances in bacteriophage – mediated control of plant pathogens [J]. *International Journal of Microbiology*, 2012(6079): 1 – 11.
- [31] 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.
- [32] Wang Y P, Cheng X, Shan Q W, et al. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew [J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(9): 947 – 951.
- [33] Sharma S, Upadhyay S K. Functional characterization of expressed sequence tags of bread wheat (*Triticum aestivum*) and analysis of crisper binding sites for targeted genome editing [J]. *American Journal of Bioinformatics Research*, 2014, 4(1): 11 – 22.
- [34] Liang Z, Zhang K, Chen K L, et al. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas9 system [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2014, 41(2): 63 – 68.
- [35] Xing H L, Dong L, Wang Z P, et al. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants [J]. *BMC Plant Biology*, 2014, 14(1): 327.
- [36] Zetsche B, Gootenberg J S, Abudayyeh O O, et al. Cpf1 is a single RNA – guided endonuclease of a class 2 CRISPR – Cas system [J]. *Cell*, 2015, 163(3): 759 – 771.