

评述与展望

Review and Progress

## CRISPR/Cas9 基因编辑系统在水稻育种应用的研究进展

顾爽<sup>1</sup> 郑文静<sup>2</sup> 马殿荣<sup>1\*</sup>

1 沈阳农业大学水稻研究所, 农业部东北水稻生物学与遗传育种重点实验室, 教育部北方粳稻遗传育种重点实验室, 沈阳, 110161; 2 辽宁省水稻研究所, 沈阳, 110101

\* 通信作者, madianrong@syau.edu.cn

**摘要** 土壤退化、气候变化、生物和非生物胁迫的不利影响, 对保障我国粮食生产安全和稳定提出了新的挑战。为了更快地实现水稻育种目标, 在育种改良中整合分子育种新技术已经是当务之急。CRISPR/Cas9 基因编辑技术具有时间周期短、操作简便快捷、编辑效率高等优点, 已成为植物科学和水稻分子育种的重要工具, 在水稻种质资源创制和遗传改良中得到广泛应用。本研究在阐述 CRISPR/Cas9 系统工作原理的基础上, 综述了其在水稻株型改良、产量性状、品质改良、抗病性和抗逆性改良、水稻雄性不育系创制以及无性繁殖等方面的研究进展, 并对基因编辑技术在东北水稻育种中的应用前景进行了展望。

**关键词** 基因编辑, CRISPR/Cas9, 水稻, 分子育种

## Research Progress of CRISPR/Cas9 Gene-editing System In Rice Breeding

Gu Shuang<sup>1</sup> Zheng Wenjing<sup>2</sup> Ma Dianrong<sup>1\*</sup>

1 Rice Research Institute/Key Laboratory of Northeast Rice Biology and Breeding, Ministry of Agriculture/Key Laboratory of Northern Japonica Super Rice Breeding, Ministry of Education, Shenyang Agricultural University, Shenyang, 110161; 2 Liaoning Rice Research Institute, Shenyang, 110101

\* Corresponding author, madianrong@syau.edu.cn

DOI: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0010

**Abstract** The adverse effects of soil degradation, climate change, biotic stress and abiotic stress pose new challenges to the security and stability of food production in China. In order to realize the goal of rice breeding, it is urgent to integrate molecular breeding techniques in rice breeding. CRISPR/Cas9 gene-editing system has the advantages of short time cycle, simple and fast operation and high editing efficiency. It has become an important tool in plant science and rice molecular breeding, and has been widely used in the creation and genetic improvement of rice germplasm resources. Based on the work principle of CRISPR/Cas9 gene-editing system, this study summarized the research progress of CRISPR/Cas9 system in rice plant architecture improvement, production improvement, quality improvement, disease resistance and stress resistance improvement, rice male sterile line creation and asexual reproduction, and prospected the application prospect of gene editing system in rice breeding in Northeast China.

**Keywords** Gene-editing, CRISPR/Cas9, Rice (*Oryza sativa* L.), Molecular breeding

水稻(*Oryza sativa* L.)是人类重要的粮食作物, 对生物和非生物胁迫以及人口激增等因素的影响, 水稻生产安全面临巨大挑战。因此, 在育种改良中结合其他作物生长的地区生长。然而, 由于受到气候变化、分子技术手段, 加速培育高产作物新品种, 提高作物

本文首次发表在《分子与植物育种》上, 现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License, 协议对其进行授权, 再次发表与传播

收稿日期: 2020 年 5 月 31 日; 接受日期: 2020 年 6 月 4 日; 发表日期: 2020 年 6 月 11 日

引用格式: 顾爽, 郑文静, 马殿荣, 2020, CRISPR/Cas9 基因编辑系统在水稻育种应用的研究进展, 分子植物育种(网络版), 18(10): 1-8 (doi: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0010) (Gu S., Zheng W.J., and Ma D.R., 2020, Research progress of CRISPR/Cas9 gene-editing system in rice breeding, Fengzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding (online)), 18(10): 1-8 (doi: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0010))

对生物和非生物胁迫的耐受性(Delorge et al., 2014), 是保障现在和未来粮食生产稳定安全的有效途径。近年来, 以 CRISPR/Cas9 为代表的精准基因编辑技术得到快速发展, 在产量(Li et al., 2016b; Ma et al., 2019; Zhou et al., 2019), 品质(Sun et al., 2017; 邵高能等, 2017; 杨平等, 2020), 抗性(Lou et al., 2017; 徐鹏等, 2019; Kuang et al., 2020) 等方面取得了一系列的重要进展, 表明该技术在水稻育种改良有着巨大的应用价值, 可加速育种的定向变异和进化。本研究中, 笔者对前人的研究成果进行了系统汇总分析, 以期望在水稻分子育种中提供帮助。

## 1 CRISPR/Cas9 系统简介

### 1.1 CRISPR/Cas9 系统工作原理

CRISPR/Cas9 是细菌和古细菌在长期演化过程中形成的一种适应性免疫防御机制(Jinek et al., 2012)。当细菌受到噬菌体等外源 DNA 侵染时, 细菌的前导区率先反应并发生应答, 同时诱导和调控 CRISPR 转录为长链 RNA 前体(Pre CRISPR RNA, pre-crRNA), 长链 pre-crRNA 被截断成为短的成熟 crRNA (CRISPR-derived RNA), 接下来 crRNA 与 tracrRNA (trans-activating RNA) 精确结合并融合为 tracrRNA/crRNA 复合物(Bhaya et al., 2011)。复合物调控引导核酸酶 Cas9 蛋白, 最终精准剪切 DNA 双链(Brendel et al., 2014)。通过人工设计这两种 RNA, 可以改造形成与 tracrRNA/crRNA 复合物同样具有引导作用的 sgRNA (short guide RNA), 其可以引导 Cas9 蛋白对 DNA 的目标位点精确切割 (Jinek et al., 2012), DNA 双链发生断裂(double strand breaks, DSBs)。DSBs 以非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ) 或同源重组(homology directed repair, HDR) 进行修复。NHEJ 的修复方式容易发生错误, 断裂位置会产生小片段的缺失或插入, 从而产生基因突变; 在供体 DNA 存在的情况下, 断裂位置会通过 HDR 方式进行修复, 引入精准的碱基插入或替换。

### 1.2 CRISPR/Cas9 系统的技术优势

CRISPR/Cas9 技术作为新兴的基因组编辑方法, 在作物遗传育种方面有着无可取代的地位。CRISPR/Cas9 技术只通过编辑内源基因完成遗传基因改良, 全过程中只有 RNA 和蛋白质作为效应分子, 后代中很容易筛选出没有外源基因整合的编辑材料, 避免了传统转基因方法导致的公众和舆论关切的安全问题, 使作物改良过程更为迅速并容

易被接受。CRISPR/Cas9 技术可以实现基因组的定点编辑, 而不影响基因组中的其他位点, 并有望在 DNA 修复系统的作用下实现特定位点的精确突变, 而且效率更高。

但是, CRISPR/Cas9 技术在应用过程中仍然存在很多问题。比如, 脱靶会引起基因组非靶向位点的突变, 从而引起研究结果的不确定性。再者, 如何通过 HDR 修复途径提高基因编辑效率和实现大片段插入和碱基替换也是面临的一个挑战。

## 2 CRISPR/Cas9 技术在水稻育种中的应用

2013 年多篇 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在植物育种上成功应用文章的发表(Jiang et al., 2013; Nekrasov et al., 2013; Shan et al., 2013), 预示着 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在植物中正式得以应用。近年来, CRISPR/Cas9 基因编辑技术得到快速发展, 已广泛用于作物的种质资源创制(Li et al., 2016c; Zhou et al., 2016; Kuang et al., 2020)、遗传改良(王加峰等, 2016; Farhat et al., 2019; Zhou et al., 2019)。基因编辑技术在水稻中的应用, 已经成为解析水稻基因功能和分子机理的重要工具。

### 2.1 CRISPR/Cas9 在水稻株型改良方面的应用

水稻株型的好坏与产量高低和品质优劣有着重要的关系。水稻株型的构成因子主要有株高、叶型、分蘖数、分蘖角度和穗型。胡雪娇等(2018)利用 CRISPR/Cas9 系统靶向编辑半矮秆基因 *SD1, sd1* 突变体株高大约下降了 25%。Li 等(2016)利用 CRISPR/Cas9 技术以中花 11 为材料靶向编辑直立穗型基因 *DEP1* 和理想株型基因 *IPA1, dep1* 突变体植株性状表现为穗型直立紧凑; *ipal* 突变体则表现为分蘖数或减少或增加, 呈现两种极端表现(图 1)。

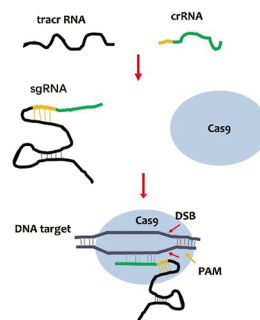


图 1 CRISPR/Cas9 基因编辑系统的工作机制

Figure 1 Molecular mechanism underlying CRISPR/Cas9 gene editing system

## 2.2 CRISPR/Cas9 在水稻产量提高方面的应用

粒重是水稻产量构成的重要性状,与有效穗数和每穗粒数共同构成水稻产量三要素,是多基因控制的数量性状位点。Zhou 等(2019)敲除 3 个水稻品种中粒长基因 *GS3*、*GS2* 和每穗粒数基因 *Gn1a*,发现三基因突变有叠加增产效应。Xu 等(2016)敲除水稻千粒重基因粒重基因 *GW2*、*GW5* 和千粒重多基因 *TGW6* 后,得到 *gw2gw5tgw6* 和 *gw2gw5* 纯合突变体,发现突变体粒长、粒宽和粒重都显著增加。*OsSNB* 参与植物发育调控,尤其是花器官的发育(Lee et al., 2007)。Ma 等(2019)通过 CRISPR/Cas9 技术敲除 *OsSNB* 基因,突变体的粒长、粒宽和千粒重都增加,说明 *OsSNB* 不仅可以调控花器官发育,在控制水稻粒型方面也有重要作用。

抽穗期是影响水稻产量的重要因素,水稻抽穗是指从营养生长转化到生殖生长的关键阶段。Li 等(2017)对黑龙江不同品种的 *Hd2*、*Hd4*、*Hd5* 同时进行突变,有效缩短突变体抽穗期。

## 2.3 CRISPR/Cas9 在水稻品质改良方面的应用

直链淀粉(amylose, AM)和支链淀粉(amylopectin, AP)是稻米淀粉的两种类型,二者的组成比例决定了稻米的食用品质和加工品质。MA 等(2015)通过敲除水稻蜡质基因 *Wx*,成功将突变体 AM 含量由 14.6% 降至 2.6%,获得糯性稻米。淀粉分支酶(starch branching enzyme, SBE) 基因控制支链淀粉的合成。在 *SBE* 突变的作物中,直链淀粉(AM)和抗性淀粉(resistant starch, RS)含量升高(朱霁晖等, 2015)。白建江等(2018)对淀粉分支酶 *SBE3* 基因进行编辑,突变体中抗性淀粉含量由 0.48% 增至 10% 以上,从而获得高抗性淀粉水稻新品系。Sun 等(2017)利用 CRISPR/Cas9 技术敲除淀粉分支酶基因 *SBE II b*, *SBE II b*, 突变体的 RS 含量由低于 1% 提升至 9.8%。

水稻香味是水稻最重要的食味品质之一,一直受到育种家的重视。2-乙酰-1-吡咯啉(2-AP)是水稻中主要的挥发性物质之一,*Badh2* 基因在编码区和调控区域发生突变时,会引起 2-AP 前体物质增加,进而积累 2-AP,水稻从而产生香味(彭波等, 2017)。杨平等(2020)利用 CRISPR/Cas9 技术构建双靶点编辑 *Badh2* 基因,突变体中香味物质 2-AP 含量显著增加,香味浓淡有 2-AP 含量正相关。

## 2.4 CRISPR/Cas9 在水稻抗性提升方面的应用

水稻病害严重影响水稻的优质高产,培育优质

抗病水稻品种是育种家研究和选育的重点之一。赵开军等靶向敲除空育 131 中抗稻瘟病基因 *Os-ERF922*,在苗期和分蘖期,突变体的稻瘟病抗性都增强。周焕斌团队(任斌等, 2017)利用单碱基编辑技术靶向编辑抗稻瘟病基因 *pi-ta*,突变效率为 18%。徐鹏等(2019)利用 CRISPR/Cas9 技术实现 *Pi21*、*OsERF922*、*Pita* 三基因突变,突变体对部分稻瘟病生理小种抗性显著增强。

CRISPR/Cas9 基因编辑系统在提升水稻对非生物胁迫耐力的方面得到广泛应用。在水稻耐旱方面,Lou 等(2017)靶向编辑 *OsSAPK2* 基因,纯合 T1 代 *OsSAPK2* 突变体对 ABA 不敏感,对干旱胁迫更敏感,证实 *OsSAPK2* 具有提高水稻耐旱性的功能。在水稻耐冷方面,Shen 等(2017)利用 CRISPR/Cas9 技术靶向编辑 *OsAnn3* 基因,相比野生型,获得的 6 株突变体株系对低温都更加敏感。

CRISPR/Cas9 基因编辑技术在改良水稻对除草剂的抗性方面也得到广泛应用。Li 等(2016)以日本晴为材料敲除 *EPSPS* 基因,成功获得具有除草剂草甘膦抗性植株。ALS 是一种乙酰乳酸合成酶,参与合成植物支链氨基酸。周焕斌团队(Kuang et al., 2020)利用单碱基编辑技术,实现了 *OsALS1* 和 *OsACC* 基因的饱和突变,成功创制具有除草剂抗性的水稻品种南粳 46。

## 2.5 CRISPR/Cas9 在水稻育性改良方面的应用

水稻两系不育系分为光敏核不育系(PGMS)和温敏核不育系(TGMS)(吴明基等, 2018)。张大兵等利用 CRISPR/Cas9 技术靶向敲除空育 131 花粉碳饥饿基因 *CSA*, *csa* 突变体在短日照下呈现完全雄性不育,长日照条件下表现出雄性可育,从而创制出光敏核雄性不育突变体。黄忠明等(2018)靶向敲除水稻温敏不育基因 *TMS5*, *tms5* 突变体在高温条件下完全雄性不育,低温条件下雄性可育,且证实 *tms5* 突变体花粉育性的转换温度为 28℃,但突变体的结实率和单株重都有所下降。

CRISPR/Cas9 技术在实现水稻无性繁殖,固定杂种优势方面发挥出巨大优势作用(表 1)。Sundaresan 团队(Khanday et al., 2019)靶向敲除 *BBM1*、*BBM2*、*BBM3* 基因,同时在卵细胞中异位表达 *BBM1* 基因,诱导水稻产生孤雌生殖,利用有丝分裂替代减数分裂,从而实现水稻种子的无性繁殖。王克剑团队研究证实,多重编辑减数分裂基因 *REC8*、*PAIR1* 和 *OSD1*,可以产生二倍体配子和四倍体种子,编辑参与

表 1 CRISPR/Cas9 技术在水稻育种中应用

Table 1 Applications of CRISPR/Cas9 in rice breeding

基因	编辑方式	突变体表型	编辑效率(%)	参考文献
Target gene	Editing mode	Mutant phenotype	Editing efficiency (%)	Reference
<i>SD1</i>	敲除	株高降低	27.8~30	(胡雪娇等, 2018)
	Knockout	Shorter plant height		
<i>SD1</i>	敲除	株高降低	85.7	(王新等, 2019)
	Knockout	Shorter plant height		
<i>DEP1</i>	敲除	穗型直立紧凑	67.5	(Li et al., 2016b)
	Knockout	Dense erect panicles increase		
<i>IPA1</i>	敲除	分蘖数, 穗粒数增加/减少	27.5	(Li et al., 2016b)
	Knockout	Tillers and grain number per panicle change		
<i>GS3</i>	敲除	粒长增加	57.5	(Li et al., 2016b)
	Knockout	Long grain		
<i>GS3</i>	敲除	粒长增加, 花时提前	-	(孟帅等, 2018)
	Knockout	Long grain, Early heading date		
<i>Gn1a</i>	敲除	主穗粒数增加	42.5	(Li et al., 2016b)
	Knockout	Grain number of main panicle increase		
<i>GW2, GS3, Gn1a</i>	敲除	株高降低, 穗长增加	33.3~80	(Zhou et al., 2019)
	Knockout	Shorter plant height, Long panicle		
<i>TGW6</i>	敲除	千粒重增加	90	(王加峰等, 2016)
	Knockout	Thousand grain weight enhancement		
<i>GW2, GW5, TGW6</i>	敲除	粒重增加	-	(Xu et al., 2016)
	Knockout	Grain weight enhancement		
<i>OsSNB</i>	敲除	粒长, 粒重增加	-	(Ma et al., 2019)
	Knockout	Grain Length, Grain weight enhancement		
<i>Hd1</i>	敲除	抽穗期延迟	12.5	(王兰, 2015)
	Knockout	Heading time delay		
<i>Hd2</i>	敲除	抽穗期提前	-	(周文甲等, 2017)
	Knockout	Heading time in advance		
<i>Hd2/Hd4/Hd5</i>	敲除	抽穗期提前	77.8	(Li et al., 2017)
	Knockout	Heading time in advance		
<i>Ef7</i>	敲除	抽穗期延迟	-	(Cui et al., 2019)
	Knockout	Heading time delay		
<i>qSH1</i>	敲除	落粒性降低	54.55~63.64	(盛夏冰等, 2018)
	Knockout	Reducing the seed shattering		
<i>Wx</i>	敲除	直链淀粉含量降低	87.5~100	(汪秉琨等, 2018)
	Knockout	Low amylose		
<i>Wx</i>	敲除	直链淀粉含量降低	0~30.77	(周鑫等, 2018)
	Knockout	Low amylose		
<i>Wx</i>	敲除	直链淀粉含量降低	57.1	(杨平等, 2020)
	Knockout	Low amylose		
<i>SBE3</i>	敲除	抗性淀粉含量增加	40	(白建江 et al., 2018)
	Knockout	High resistant starch		
<i>SBE I, SBE II b</i>	敲除	直链淀粉含量增加	26.7~40	(Sun et al., 2017)
	Knockout	High amylose		
<i>Badh2</i>	敲除	香味物质 2-AP 含量增加	-	(邵高能等, 2017;
	Knockout	2-AP increase		周文甲等, 2017)

续表 1

Continuing table 1

基因	编辑方式	突变体表型	编辑效率(%)	参考文献
Target gene	Editing mode	Mutant phenotype	Editing efficiency (%)	Reference
<i>Badh2</i>	敲除	香味物质 2-AP 含量增加	46.2	(杨平等, 2020)
	Knockout	2-AP increase		
<i>Pi21</i>	敲除	Pi21 蛋白移码突变或提前终止	66.7	(王芳权等, 2016)
	Knockout	Pi21 protein frameshift or terminate early		
<i>Pi21</i>	敲除	稻瘟病抗性增强	86.7	(杨海河等, 2017)
	Knockout	Rice blast resistance improvement		
<i>OsERF922</i>	敲除	抗稻瘟病能力增强	42	(Wang et al., 2016)
	Knockout	Rice blast resistance improvement		
<i>pi-ta</i>	单碱基编辑	抗稻瘟病能力增强	18.2	(任斌等, 2017)
	Base Editing	Rice blast resistance improvement		
<i>Pita, Pi21, ERF922</i>	敲除	抗稻瘟病能力增强	65~85	(徐鹏等, 2019)
	Knockout	Rice blast resistance improvement		
<i>Pong2-1/Pong11-1</i>	敲除	白叶枯病抗性增强	-	(郝巍等, 2018)
	Knockout	Bacterial blight resistant		
<i>OsRAV2</i>	敲除	对盐胁迫更敏感	-	(Duan et al., 2016)
	Knockout	Salt susceptible		
<i>OsSAPK2</i>	敲除	对干旱胁迫更敏感	-	(Lou et al., 2017)
	Knockout	Drought susceptible		
<i>NRL2</i>	敲除	对干旱胁迫更敏感	82.4	(陈炜等, 2018)
	Knockout	Drought susceptible		
<i>OsAnn3</i>	敲除	对低温胁迫抗性增加	31.6	(Shen et al., 2017)
	Knockout	Low temperature resistant		
<i>EPSPS</i>	定点替换	抗除草剂	2	(Li et al., 2016a)
	Replacement	Herbicide resistant		
<i>ALS1</i>	单碱基编辑	抗除草剂	1.94~3.41	(Shimatani et al., 2017)
	Base Editing	Herbicide resistant		
<i>ALS1, OsACC</i>	单碱基编辑	抗除草剂	24~28	(Kuang et al., 2020)
	Base Editing	Herbicide resistant		
<i>OsNramp5</i>	敲除	籽粒镉含量降低	39~90	(龙起樟等, 2019)
	Knockout	Low Cd		
<i>csa</i>	敲除	光敏核雄性不育	16.7~50	(Li et al., 2016c)
	Knockout	Photo-sensitive genic male sterile		
<i>TMS5</i>	敲除	温敏核雄性不育	46.2~88.2	(Zhou et al., 2016)
	Knockout	Thermo-sensitive genic male sterile		
<i>TMS5</i>	敲除	温敏核雄性不育	63.89	(黄忠明等, 2018)
	Knockout	Thermo-sensitive genic male sterile		
<i>TMS5</i>	敲除	温敏核雄性不育	81.8	(杜茜等, 2019)
	Knockout	Thermo-sensitive genic male sterile		
<i>BBM1, BBM2, BBM3</i>	敲除	无性繁殖	-	(Khanday et al., 2019)
	Knockout	Asexual propagation		
<i>REC8, PAIR1, OSD1, MTL</i>	敲除	无性繁殖	-	(Wang et al., 2019)
	Knockout	Asexual propagation		

受精的 *MTL* 基因可以诱导产生杂交水稻中的单倍体种子。利用此方法将种子克隆繁殖从而固定 F1 代

杂交水稻的杂种优势有望实现, 对农业生产具有革命性意义。

### 3 CRISPR/Cas9 在水稻育种中的应用前景

CRISPR/Cas9 系统作为新兴的基因组编辑技术,在作物遗传育种和性状改良方面有着无可取代的地位。在产量和品质改良方面,培育既能保障水稻产量,又能满足消费者需求的水稻品种,兼具高产量和适口性的特点,依赖于自然突变和随机突变的常规育种技术很难实现。随着基因组、转录组学等一系列分子生物技术的应用与发展,调控水稻产量、品质的分子机制研究的不断深入,越来越多的与产量、品质相关的基因被定位和克隆,CRISPR/Cas9 技术为实现多个优良基因聚合的育种目标提供了可能性。东北大米米质好、食味品质优良,在市场上广受好评。但是由于受到气候、生物胁迫等因素影响,东北大米的产量受到严重威胁。如何发挥 CRISPR/Cas9 聚合多个高产水稻基因的技术优势,在提高东北水稻产量的前提下,同时保障其本身的食味品质不受影响,是目前研究者们需要关注的重点。同时,通过 CRISPR/Cas9 系统改良北方水稻株型,获得光合利用率高的理想株型,是挖掘北方水稻产量潜力的有效途径之一。CRISPR/Cas9 技术是克服高产、优质水稻育种障碍的有效途径。

应对水稻生物胁迫和非生物胁迫不利影响时,提高水稻对不利环境的耐受力是行之有效的办法。采用常规育种手段获得有利基因的过程往往耗时长,劳动强度大。通过 CRISPR/Cas9 系统培育抗性水稻品种,应对不利环境是一种高效、简单的方式。盐碱胁迫和冷害胁迫是东北稻区普遍的非生物胁迫,对水稻的整个生长周期都会产生影响,严重制约东北水稻的产量和品质。利用 CRISPR/Cas9 技术将耐盐碱、耐冷害的优良抗性基因引入东北水稻,获得抗性优良、高产、优质的水稻新种质,为解决东北局部地区因高盐高碱和低温冷害,导致种植面积缩小,水稻产量低下,品质差的问题提供了新的思路。在解决生物胁迫方面,稻瘟病是影响东北稻区的主要病害,然而稻瘟病的致病机理复杂,病菌生理小种的变异多样,所以选育抗病周期长,抗性稳定的品种十分重要。利用 CRISPR/Cas9 技术获得抗稻瘟病水稻新品种对于解决这个问题有重要意义。CRISPR/Cas9 系统是培育优良抗性水稻品种的有利手段。

但是,如何确定更多优异靶标基因及组合应用,如何提高 Cas9 编辑效率及精确碱基变异和片段置换,并在更广泛的植物材料中实现快速编辑仍是亟待解决的问题。但是,相信在不久的将来,随着

CRISPR/Cas9 系统的进一步优化和改良,在作物改良与培育新品种方面会发挥其无可取代的作用。

#### 作者贡献

顾爽负责本综述初稿的相关文献资料查阅、整理和撰写;郑文静参与讨论和论文的修改;马殿荣是综述的通讯作者和负责人,指导论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

#### 致谢

本研究由辽宁省“兴辽英才计划”项目(XLYC-1808003)资助。

#### 参考文献

- Bhaya D., Davison M., and Barrangou R., 2011, CRISPR-Cas Systems in Bacteria and Archaea: Versatile Small RNAs for Adaptive Defense and Regulation, *Ann. Rev. Genet.*, 45: 273-297
- Brendel J., Stoll B., Lange S.J., Sharma K., Lenz C., Stachler A. E., Maier L.K., Richter H., Nickel L., Schmitz R.A., Randau L., Allers T., Urlaub H., Backofen R., and Marchfelder A., 2014, A Complex of Cas Proteins 5, 6, and 7 is required for the biogenesis and stability of clustered regularly interspaced short Palindromic Repeats (CRISPR)-derived RNAs (crRNAs) in *Haloferax volcanii*, *J. Biol. Chem.*, 289 (10): 7164-7177
- Cui Y., Zhu M.M., Xu Z.J., and Xu Q., 2019, Assessment of the effect of ten heading time genes on reproductive transition and yield components in rice using a CRISPR/Cas9 system, *Theor. Appl. Genet.*, 132(6): 1887-1896
- Delorge I., Janiak M., Carpentier S., and Van Dijck P., 2014, Fine tuning of trehalose biosynthesis and hydrolysis as novel tools for the generation of abiotic stress tolerant plants, *Frontiers Plant Sci.*, 5: 147
- Duan Y.B., Li J., Qin R.Y., Xu R.F., Li H., Yang Y.C., Ma H., Li L., Wei P.C., and Yang J.B., 2016, Identification of a regulatory element responsible for salt induction of rice Os-RAV2 through ex situ and in situ promoter analysis. *Plant Mol. Biol.*, 90(1-2): 49-62
- Farhat S., Jain N., and Singh N., 2019, CRISPR-Cas9 directed genome engineering for enhancing salt stress tolerance in rice, *Seminars In Cell Dev. Biol.*, 96: 91-99
- Jiang W.Z., Zhou H.B., Bi H.H., Fromm M., and Yang B., 2013, Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice, *Nucleic Acids Res.*, 41(20): e188
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna A., and

- Charpentier E., 2012, A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity, *Science*, 337(6096): 816-821
- Khanday I., Skinner D., Yang B., Mercier R., and Sundaresan V., 2019, A male-expressed rice embryogenic trigger redirected for asexual propagation through seeds, *Nature*, 565(7737): 91
- Kuang Y.J., Li S.F., Ren B., Yan F., Spetz C., Li X.J., Zhou X.P., and Zhou H.B., 2020, Base-Editing-Mediated Artificial Evolution of OsALS1 In Planta to Develop Novel Herbicide-Tolerant Rice Germplasms, *Mol. Plant*, 13(4)
- Lee D.Y., Lee J., Moon, S., Park S.Y., and An G., 2007, The rice heterochronic gene SUPERNUMERARY BRACT regulates the transition from spikelet meristem to floral meristem, *Plant J.*, 49(1): 64-78
- Li J., Meng X.B., Zong Y., Chen K.L., Zhang H.W., Liu J.X., Li J.Y., and Gao C.X., 2016a, Gene replacements and insertions in rice by intron targeting using CRISPR-Cas9, *Nature Plants*, 2(10): 16139
- Li M.R., Li X.X., Zhou Z.J., Wu P.Z., Fang M.C., Pan X.P., Lin Q.P., Luo W.B., Wu G.J., and Li H.Q., 2016b, Reassessment of the Four Yield-related Genes Gn1a, DEP1, GS3, and IPA1 in Rice Using a CRISPR/Cas9 System. *Front. Plant Sci.*, 7: 377
- Li Q.L., Zhang D.B., Chen M.J., Liang W.Q., Wei J.J., Qi Y.P., and Yuan Z., 2016c, Development of japonica Photo-Sensitive Genic Male Sterile Rice Lines by Editing Carbon Starved Anther Using CRISPR/Cas9, *J. Genet. Genomics*, 43(6): 415-419
- Li X.F., Zhou W.J., Ren Y.K., Tian X.J., Lv T.X., Wang Z.Y., Fang J., Chu C.C., Yang J., and Bu Q.Y., 2017, High-efficiency breeding of early-maturing rice cultivars via CRISPR/Cas9-mediated genome editing, *J. Genet. Genomics*, 44(3): 175-178
- Ma X., Feng F., Zhang Y., Eid I., Xu K., Li T.F., Mei H.W., Liu H.Y., Gao N.N., Chen C.L., and Luo L.J., 2019, A novel rice grain size gene OsSNB was identified by genome-wide association study in natural population, *PLoS Genet.*, 15(5): e1008191
- Nekrasov V., Staskawicz B., and Weigel D., 2013, Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease, *Nat. Biotechnol.*, 31(8): 691-693
- Shan Q.W., Wang Y.P., and Li J., 2013, Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system, *Nat. Biotechnol.*, 31(8): 686-688
- Shen C., Que Z., and Xia Y., 2017, Knock out of the annexin gene OsAnn3 via CRISPR/Cas9-mediated genome editing decreased cold tolerance in rice, *J. Plant Biol.*, 60(6): 539-547
- Shimatani Z., Kashojiya S., and Takayama M., 2017, Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion, *Nat. Biotechnol.*, 35(5): 441-443
- Sun Y., Jiao G., Liu Z., Zhang X., Li J.Y., Guo X.P., Du W.M., Du J.L., Francis F., Zhao Y.D., and Xia L.Q., 2017, Generation of High-Amylose Rice through CRISPR/Cas9-Mediated Targeted Mutagenesis of Starch Branching Enzymes, *Front. Plant Sci.*, 8: 298
- Wang F.J., Wang C.L., Liu, P.Q., Lei C.L., Hao W., Gao Y., Liu Y.G., and Zhao K.J., 2016, Enhanced Rice Blast Resistance by CRISPR/Cas9-Targeted Mutagenesis of the ERF Transcription Factor Gene OsERF922, *PLoS One*, 11(4): e0154027
- Xu R., Yang Y., Qin R., Li H., Qiu C.H., Li L., Wei P.C., and Yang J.B., 2016, Rapid improvement of grain weight via highly efficient CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing in rice. *J. Genet. Genomics*, 43(8): 529-532
- Zhou H., He, M., Li J., Chen L., Huang Z.F., Zheng S.Y., Zhu L.Y., Ni E.D., Jiang D.G., Zhao B.R., and Zhuang C.X., 2016, Development of commercial thermo-sensitive genic male sterile rice accelerates hybrid rice breeding using the CRISPR/Cas9-mediated TMS5 editing system, *Sci. Rep.*, 6: 12
- Zhou J.P., Xin X.H., He Y., Chen H.Q., Li Q., Tang X., Zhong Z.H., Deng K.J., Zheng X.L., Akher S.A., Cai G.Z., Qi Y.P., and Zhang Y., 2019, Multiplex QTL editing of grain-related genes improves yield in elite rice varieties. *Plant Cell Rep.*, 38(4): 475-485
- Du X., Fei Y.Y., Wang F.Q., Xu Y., Wang J., Li W.Q., Zhao L., Chen Z.H., Liang G.H., Zhou Y., and Yang J., 2019, Thermo-sensitive Male Sterile Line Created by Editing TMS5 Gene in japonica Rice, *Zhongguo Shuidao Kexue (Chin. J. Rice Sci.)*, 33(5): 429-435 (杜茜, 费云燕, 王芳艳, 许扬, 王军, 李文奇, 赵凌, 陈智慧, 梁国华, 周勇, 杨杰, 2019, 敲除 TMS5 基因获得温敏不育粳稻新材料, *中国水稻科学*, 33(5): 429-435)
- Hao W., Ji Z.Y., Zheng K.L., Sun H.D., Wang F.J., Tang Y.C., Zhang M.W., and Zhao K.C., 2018, Enhancing rice resistance to Bacterial Blight by genome editing, *Zhiwu Yichuan Xuebao (Journal of Plant Genetic Resources)*, 19(3): 523-530 (郝巍, 纪志远, 郑凯丽, 孙宏达, 王福军, 唐永超, 张明伟, 赵开军, 王春连, 2018, 利用基因组编辑技术创制水稻白叶枯病抗性材料, *植物遗传资源学报*, 19(3): 523-530)
- Hu X.J., Yang J., Cheng C., Zhou J.H., Niu F.A., Wang X.Q., Zhang M.L., Cao L.M., and Chu H.W., 2018, Targeted editing of Rice SD1 Gene using CRISPR/Cas9 System, *Zhongguo Shuidao Kexue (Chin. J. Rice Sci.)*, 32(3): 219-225 (胡雪娇, 杨佳, 程灿, 周继华, 牛付安, 王新其, 张美良, 曹黎明, 储黄伟, 2018, 利用 CRISPR/Cas9 系统定向编辑水稻 SD1 基因, *中国水稻科学*, 32(3): 219-225)
- Huang Z.M., Zhou Y.B., Tang X.D., Zhao X.H., Zhou Z.W., Fu X.X., Wang K., Shi J.W., Li Y.F., Fu C.J., and Yang Y.Z.,

- 2018, Construction of tms5 Mutants in rice based on CRISPR/Cas9 technology, *Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica)*, 44(06): 844-851 (黄忠明, 周延彪, 唐晓丹, 赵新辉, 周在为, 符星学, 王凯, 史江伟, 李艳锋, 符辰建, 杨远柱, 2018, 基于 CRISPR/Cas9 技术的水稻温敏不育基因 tms5 突变体的构建, *作物学报*, 44(6): 844-851)
- Long Q.Z., Huang Y.L., Tang X.Y., Wang H.M., Lu M., Yuan L.F., and Wang J.L., 2019, Creation of Low-Cd-accumulating indica rice by Disruption of OsNramp5 Gene via CRISPR/Cas9, *Zhongguo Shuidao Kexue (Chin. J. Rice Sci.)*, 33(5): 407-420 (龙起樟, 黄永兰, 唐秀英, 王会民, 芦明, 袁林峰, 万建林, 2019, 利用 CRISPR/Cas9 敲除 OsNramp5 基因创制低镉籼稻, *中国水稻科学*, 33(5): 407-420)
- Meng S., Xu P., Zhang Y.X., Wang H., Cao L.Y., Cheng S.H., and Shen X.H., 2018, Creation of Low-Cd-accumulating indica Rice by Disruption of OsNramp5 Gene via CRISPR/Cas9, *Zhongguo Shuidao Kexue (Chin. J. Rice Sci.)*, 32(2): 119-127 (孟帅, 徐鹏, 张迎信, 王宏, 曹立勇, 程式华, 沈希宏, 2018, 利用 CRISPR/Cas9 技术编辑粒长基因 GS3 改善粳稻花时, *中国水稻科学*, 32(2): 119-127)
- Peng B., Sun Y.F., Chen B.Y., Sun R.M., Kong D.Y., Pang R.H., Li X.H., Song X.H., Li H.L., Li J.T., Zhou Q.Y., Liu L., Duan B., and Song S.Z., 2017, Research progress of Fragrance Gene and its application in rice breeding, *Zhiwu Xuebao (Chinese Bulletin of Botany)*, 52(6): 797-807 (彭波, 孙艳芳, 陈报阳, 孙瑞萌, 孔冬艳, 庞瑞华, 李先文, 宋晓华, 李慧龙, 李金涛, 周棋赢, 柳琳, 段斌, 宋世枝, 2017, 水稻香味基因及其在育种中的应用研究进展, *植物学报*, 52(6): 797-807)
- Ren B., Yan F., Kuang Y.J., Li N., Zhang D.W., Lin H.H., and Zhou H.B., 2017, A CRISPR/Cas9 toolkit for efficient targeted base editing to induce genetic variations in rice, *Zhongguo Shengming (Sci. China Life Sci.)*, 47(11): 1177-1185 (任斌, 严芳, 旷永洁, 李娜, 张大伟, 林宏辉, 周焕斌, 2017, 水稻靶标基因单碱基定向替换技术的建立, *中国科学(生命科学)*, 47(11): 1177-1185)
- Shao G.N., Xie L.H., Jiao G.A., Wei X.J., Sheng Z.H., Tang S.Q., and Hu P.S., 2017, CRISPR/CAS9-mediated Editing of the Fragrant Gene Badh2 in Rice, *Zhongguo Shuidao (Chin. J. Rice Sci.)*, 31(2): 216-222 (邵高能, 谢黎虹, 焦桂爱, 魏祥进, 圣忠华, 唐绍清, 胡培松, 2017, 利用 CRISPR/CAS9 技术编辑水稻香味基因 Badh2, *中国水稻科学*, 31(2): 216-222)
- Sheng X.B., Tan Y.N., Sun Z.Z., Yu D., Wang X.F., Yuan G.L., Yuan D.Y., and Duan M.J., 2018, Using CRISPR/Cas9-Mediated Targeted Mutagenesis of qSH1 Reduces the Seed Shattering in Rice, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 51(14): 2631-2641 (盛夏冰, 谭炎宁, 孙志忠, 余东, 汪雪峰, 袁贵龙, 袁定阳, 段美娟, 2018, 利用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术定向降低水稻落粒性, *中国农业科学*, 51(14): 2631-2641)
- Wang B.K., Zhang H., Hong R.K., Zhang J.W., Yang R., Luo Q., and Zeng Q.C., 2018, Wx Gene Editing via CRISPR/Cas9 System in Rice, *Zhongguo Shuidao Kexue (Chin. J. Rice Sci.)*, 32(1): 35-42 (汪秉琨, 张慧, 洪汝科, 张锦文, 杨睿, 罗琼, 曾千春, 2018, CRISPR/Cas9 系统编辑水稻 Wx 基因, *中国水稻科学*, 32(1): 35-42)
- Wang F.Q., Fan F.J., Li W.Q., Zhu J.Y., Wang J., Zhong W.G., and Yang J., 2016, Knock-out Efficiency Analysis of Pi21 Gene Using CRISPR/Cas9 in Rice, *Zhongguo Shuidao Kexue (Chin. J. Rice Sci.)*, 30(5): 469-478 (王芳权, 范方军, 李文奇, 朱金燕, 王军, 仲维功, 杨杰, 2016, 利用 CRISPR/Cas9 技术敲除水稻 Pi21 基因的效率分析, *中国水稻科学*, 30(5): 469-478)
- Wang J.F., Zheng C.M., and Liu W., 2016, Construction of tgw6 Mutants in Rice Based on CRISPR/Cas9 Technology, *Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica)*, 42 (8): 1160-1167 (王加峰, 郑才敏, 刘维, 2016, 基于 CRISPR/Cas9 技术的水稻千粒重基因 tgw6 突变体的创建, *作物学报*, 42(8): 1160-1167)
- Wu M.J., Lin Y., Liu H.Q., Chen J.M., Fu Y.P., Yang S.H., and Wang F., 2018, Development of Thermo-Sensitive Male Sterile Rice with CRISPR/Cas9 Technology, *Fujian Nongye Xuebao (Fujian Journal of Agricultural Sciences)*, 33(10): 1011-1015 (吴明基, 林艳, 刘华清, 陈建民, 付艳萍, 杨绍华, 王锋, 2018, 利用 CRISPR/Cas-9 技术创制水稻温敏核不育系, *福建农业学报*, 33(10): 1011-1015)
- Xu P., Wang H., Tu R.R., Liu Q.E., Wu W.Q., Fu X.M., Cao L.Y., and Shen X.H., 2019, Orientation Improvement of Blast Resistance in Rice via CRISPR/Cas9 System, *Zhongguo Shuidao Kexue (Chin. J. Rice Sci.)*, 33(4): 313-322 (徐鹏, 王宏, 涂燃冉, 刘群恩, 吴玮勋, 傅秀民, 曹立勇, 沈希宏, 2019, 利用 CRISPR/Cas9 系统定向改良水稻稻瘟病抗性, *中国水稻科学*, 33(4): 313-322)
- Zhou W.J., Tian X.J., Ren Y.K., Wei X.J., Gao Y., Xie L.H., Liu Z.H., Pu Q.Y., and Li X.F., 2017, Breeding of Early-maturity and Fragrant Rice via CRISPR/Cas9 Mediated Genome Editing, *Turang Yu Zuowu (Soils and Crops)*, 6(2): 146-152 (周文甲, 田晓杰, 任月坤, 魏祥进, 高扬, 谢黎虹, 刘华招, 卜庆云, 李秀峰, 2017, 利用 CRISPR/Cas9 创造早熟香味水稻, *土壤与作物*, 6(2): 146-152)
- Zhu J.H., Zhang C.Q., Gu M.H., and Liu Q.Q., 2015, Progress in the Allelic Variation of Wx Gene and Its Application in Rice Breeding, *Zhongguo Shuidao Kexue (Chin. J. Rice Sci.)*, 29(4): 431-438 (朱霁晖, 张昌泉, 顾铭洪, 刘巧泉, 2015, 水稻 Wx 基因的等位变异及育种利用研究进展, *中国水稻科学*, 29(4): 431-438)