

范德佳, 陈士强, 王建华, 等. 利用 CRISPR/Cas 技术改良作物抗病性的研究进展[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(5): 1312-1321.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2020.05.031

利用 CRISPR/Cas 技术改良作物抗病性的研究进展

范德佳, 陈士强, 王建华, 张容, 刘建凤, 陈秀兰, 何震天
(江苏里下河地区农业科学研究所, 江苏 扬州 225007)

摘要: 病原体引起的作物病害日益增多, 严重威胁世界粮食安全。CRISPR/Cas 等基因组编辑技术能够实现基因组 DNA 片段插入或缺失、碱基编辑以及基因表达调控, 已成为作物抗病育种的重要方法。植物具有模式触发免疫反应 (PTI) 和效应子触发免疫反应 (ETI) 两层免疫机制, 相关基因可分为抗性基因 (*R*) 和感病基因 (*S*)。通过基因组编辑技术改造 *R* 基因或 *S* 基因, 能够改良作物对病原体的抗性, 以及定向降解病毒基因组可增强作物对病毒的抗性。水稻、小麦、番茄等作物已成功运用基因组编辑技术改良抗病性。基因组编辑技术发展迅速, 效率不断提高, 但仍应在相关法规的监管下依法进行研究。本文介绍了作物的抗病免疫机制和 CRISPR/Cas 技术在基因组编辑中的应用, 总结了改良作物抗病性的基因组编辑策略以及利用 CRISPR/Cas 技术提高作物抗病性的研究现状, 并展望了 CRISPR/Cas 技术在改良作物抗病性中的发展前景。

关键词: 基因组编辑技术; CRISPR/Cas; 作物抗病性

中图分类号: S336 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2020)05-1312-10

Advances in improvement of crop disease resistance using CRISPR/Cas technology

FAN De-jia, CHEN Shi-qiang, WANG Jian-hua, ZHANG Rong, LIU Jian-feng, CHEN Xiu-lan, HE Zhen-tian

(Institute of Agricultural Sciences of the Lixiahe District in Jiangsu Province, Yangzhou 225007, China)

Abstract: The increasing plant diseases caused by pathogens threaten the world food security seriously. CRISPR/Cas and other genome-editing technologies have been developed rapidly, including insertion or deletion of DNA segments, base editing and gene expression regulation. These technologies are becoming important methods for crop disease resistance breeding. Plant immune mechanism has two layers, PRR-triggered immunity (PTI) and effector-triggered immunity (ETI). The related genes include resistant gene (*R*) and susceptible gene (*S*). Through genome editing technology, the *R* gene or *S* gene can be modified to improve the resistance of crops towards fungal and bacterial diseases, and the viral disease resistance can be enhanced by the targeted degradation of viral genome. Genome editing technology has been used in rice,

wheat, tomato and other crops to improve disease resistance. In spite of the rapid development of genomic editing technology and continuous improvement of efficiency, we should carry out researches under the supervision of relevant laws and regulations. In this paper, the immune mechanism of plant and the application of CRISPR/Cas technology in genome-editing were introduced, and the genome-editing strategies for improving crop disease resistance and the research status of using CRISPR/Cas technology to enhance crop resistance were summarized. Final-

收稿日期: 2020-03-22

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项 (2016ZX08002-001); 省农业重大新品种创制项目 (PZCZ201707); 国家重点研发计划项目 (2016YFD0102101、2017YFD0100801); 江苏省自然科学基金项目 (BK20181213); 江苏里下河地区农业科学研究所项目 [SJ (17) 303]

作者简介: 范德佳 (1990-), 男, 江苏沭阳人, 博士, 助理研究员, 主要从事水稻分子育种工作。 (E-mail) fandejia2008@163.com

通讯作者: 何震天, (E-mail) yzhzt@126.com

ly, we prospected the future of CRISPR/Cas technology in crop resistance improvement.

Key words: genome editing technology; CRISPR/Cas; crop disease resistance

随着人口增加和耕地面积减少,世界粮食安全面临着巨大挑战^[1]。病毒、细菌、真菌等病原体不断侵害农作物,导致粮食产量严重降低。培育抗病品种是安全高效的病害防治策略。杂交、诱变和转基因等是目前作物抗病性改良的主要方法。

然而,生物技术日新月异,尤其是基因组编辑技术备受科学家们的关注。该技术是一种精确修饰基因组特定区域的方法,可以使基因组中靶位点的 DNA 片段发生缺失、插入以及碱基替换等变异^[2]。基因组的精确编辑和调控对于探索特定基因的功能至关重要,而且为改良作物抗病性和其他多种农艺性状提供了有力的工具。CRISPR/Cas9 技术(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9,规律成簇间隔短回文重复序列/CRISPR 相关蛋白 9)的发明更是开启了基因组编辑的新时代^[3]。利用 CRISPR/Cas9 培育作物新品种需要的年限比使用回交和标记辅助选择更少,而且在农艺性状上优于渐渗杂交品种^[4]。由此可见,基因组编辑技术在作物抗病性改良中的应用前景十分广阔。

1 植物抗病免疫机制

植物没有专门的免疫细胞或组织器官,依靠先天的免疫反应来抵御潜在的致病微生物或害虫。植物一般具有两层免疫系统,分别是模式触发免疫反应(PRR-triggered immunity,PTI)和效应子触发免疫反应(Effector-triggered immunity,ETI)^[5]。

PTI 依靠细胞膜定位的模式识别受体 PRR (Pattern-recognition receptor) 感知外源病原体相关分子模式 (Pathogen-associated molecular pattern, PAMP) 或微生物相关分子模式 (Microbe-associated molecular pattern, MAMP), 触发植物的免疫反应。例如,flg22 是广泛存在于革兰氏阴性细菌鞭毛蛋白 N 端的一段保守性极高的区域,大多数高等植物都可以通过 FLS2 识别该区域并激活防御性反应^[6]。

当病原体分泌的效应子克服 PTI 时,植物细胞内免疫受体会特异性识别效应子并引发 ETI。目前普遍认为植物 ETI 是比 PTI 更快、更强的免疫反应,甚至是可能导致局部坏死的过敏反应(HR)^[7],是

植物重要的专化性免疫机制。ETI 主要依赖 R 基因 (Resistance gene) 编码的 NLR (Nucleotide binding-leucine rich repeat) 家族蛋白质识别病原体效应子,并激活相关的防御进程^[8]。例如,在拟南芥中 RIN4 是 3 种不同的外源效应子 (AvrRpm1、AvrB 和 AvrRpt2) 结合靶点,而 NB-LRR 蛋白 (RPM1 和 RPS2) 识别这些效应子触发免疫反应^[9]。

2 CRISPR/Cas 在基因组编辑中的应用

CRISPR/Cas 最初是在细菌体内发现的,是细菌用来识别和抵抗噬菌体等病原体入侵的防御系统^[10]。该系统被改造成人工核酸内切酶,广泛用于多个物种的基因组编辑^[11],编辑类型包括 InDel、染色体片段插入或移除、碱基编辑、基因表达调控等 (图 1)。

2.1 小片段插入/缺失 (InDel)

在基因组中引入 InDel 是最简单和使用最广泛的基因组编辑方式。此方式通过识别特异性的目标位点产生 DNA 双链断裂 (Double-stranded break, DSB), 然后经内源 DNA 修复机制来实现基因编辑。最常见的修复途径是非同源末端连接 (Non-homologous end joining, NHEJ), 其易出错的特性会导致目标区域内出现小的 InDel^[12]。

2.2 染色体片段移除和多位点编辑

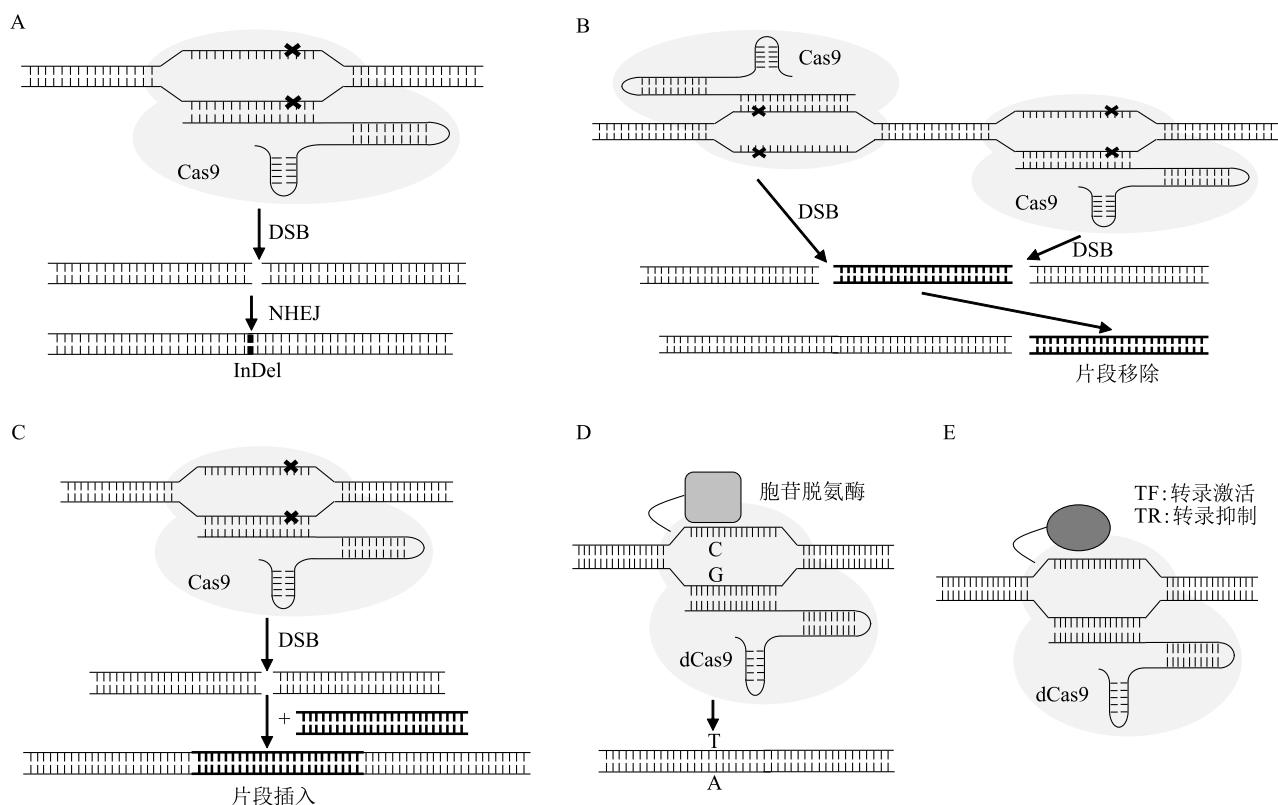
在同一染色体区域内诱导 2 个 DSB 可进行大片段 DNA 的切除,实现完全的基因缺失,甚至是包含基因簇的染色体片段缺失^[13]。在水稻中,CRISPR/Cas9 已实现 245 kb 染色体片段的移除^[14]。此外,通过表达与基因家族中保守区域相匹配的单个 gRNA 或针对不同位点的多个 gRNA, CRISPR/Cas9 可同时编辑多个基因^[15-17]。

2.3 基因插入和替换

基因组编辑技术可通过 NHEJ 或同源介导修复 (Homology-directed repair, HDR) 途径进行基因插入或替换^[13]。NHEJ 通常自发地在靶点进行 DSB 修复整合供体片段,而 HDR 需要 gRNA、Cas 和一个与靶点边界序列同源的供体修复模板的协同作用^[18]。通过 HDR 进行基因替换可以在特定的位点无缝地

整合新基因,而不会导致不想要的突变^[19]。然而,在植物中自然发生的 DNA 修复大多数是 NHEJ。研究发现将 NHEJ 与内含子靶向切割结合的基因组编

辑策略可以避免蛋白质编码序列中不需要的突变^[18]。



A: 小片段插入/缺失 (InDel); B: 染色体片段移除; C: 染色体片段插入; D: 碱基编辑 (胞嘧啶编辑器); E: 转录激活或抑制。DSB: DNA 双链断裂; NHEJ: 非同源末端连接。

图 1 CRISPR/Cas9 在基因组编辑中的应用

Fig.1 Application of CRISPR/Cas9 in genome editing

2.4 碱基编辑

胞嘧啶碱基编辑器 (Cytosine base editor, CBE) 和腺嘌呤碱基编辑器 (Adenine base editor, ABE) 的发明使得 CRISPR/Cas 基因组编辑工具的应用更加广泛^[20]。这种方法无需诱导 DSB 便可以实现基因组的碱基编辑,而且不依赖于 NHEJ/HDR。CBE 由胞苷脱氨酶与 nCas9 和尿嘧啶糖基化酶抑制剂融合而成^[21],基于人类 APOBEC3A 的编辑器已能够有效地将小麦、水稻和马铃薯中的 C 转换为 T^[20]。Gaudelli 等^[22]随后开发了 ABE,介导基因组 DNA 中 A 到 G 的转换。第七代 ABE (7.10) 在水稻和小麦中实现了高达 60% 的 A-G 转换效率^[23]。

2.5 基因转录调节和表观基因组编辑

基因表达水平的调控除了通过 CRISPR/Cas 编辑转录调控元件 (包括启动子、转录因子、增强子

等),还可以在不改变基因组序列的条件下通过修饰转录组或表观基因组来实现^[24]。

基因表达干扰技术 CRISPRi,通过 CRISPR/dCas9 (丧失内切酶活性的 Cas9) 靶定启动子区域抑制转录因子的初始结合或在靶定的编码区阻断 RNA 聚合酶的延伸来抑制基因转录,达到基因敲除的目的^[25]。利用 CRISPR 招募 SRDX 等转录抑制因子,可以提高抑制效率^[26]。相反地,当激活因子通过 CRISPR 募集时,基因表达量增加^[24]。

CRISPR/Cas 技术利用甲基转移酶和乙酰化酶可以修饰表观基因组,从而调节基因转录^[24]。在植物中, DNA 甲基化和去甲基化已经成功地通过 SunTag 系统分别实现基因沉默和激活^[27-28]。此外,靶定 RNA 的 CRISPR/Cas 系统 (如 Cas13 和 RNA 靶向 Cas9) 可以靶向降解 RNA,甚至精确编辑 RNA 序列^[29]。

3 改良作物抗病性的策略

通过传统育种方法将自然变异的优良 *R* 基因导入新品种需要很长的育种年限。人为地引入随机突变也能够发掘新的优良等位基因,但这需要花费大量的时间来筛选突变体。转基因技术虽然高效,但受到政策的严格监管,应用受到限制。然而,基因组编辑技术的出现,克服了以往方法的局限性,尤其是 CRISPR/Cas 技术可以高效地实现特定定位点的突变^[30]。通过基因组编辑调节特定的植物防御机制,是目前提高植物抗病性最有效的措施之一。其应用策略(表 1)包括修饰 *R* 基因、改造 *S* 基因和直接靶向降解病毒基因组。

表 1 基因组编辑改良作物抗病性的策略

Table 1 Strategies for improving crop disease resistance by genome editing

策略	编辑方法
修饰 <i>R</i> 基因	(1) 编辑已知 <i>R</i> 基因的病原体识别位点, 提高识别活性; (2) 替换 <i>R</i> 基因的识别区域, 使其识别非特异性的病原体效应子; (3) 提高 <i>R</i> 基因表达水平。
改造 <i>S</i> 基因	(1) 突变 <i>S</i> 基因的效应子识别位点; (2) 移除或失活免疫负调节因子; (3) 抑制 <i>S</i> 基因表达。
靶向降解病毒基因组	将 CRISPR/Cas 系统转化到作物体内表达, 特异性切割病毒 DNA 或 RNA。

3.1 修饰 *R* 基因

R 基因已被广泛应用于作物抗病育种中。育种家可以通过基因重组, 将 *R* 基因导入或聚合到优良品种中, 也可以利用基因工程技术进行 *R* 基因转化, 增强作物抗病性^[31]。NLR 类蛋白质参与了对多种病原体的防御, 但单一类型的识别范围往往很窄。自然变异和自然选择会导致病原体效应子多样化, 使它们能够演变出克服 *R* 基因的变种或生理小种^[13]。因此, 人工设计识别范围更广的 NLR 变体是改良作物抗病性的一种有效方法。

研究结果表明, 变异的番茄 I2 免疫受体 (NLR) 具有新的识别活性, 其识别的效应子种类增加, 提高了番茄对致病疫霉 (*Phytophthora infestans*) 和尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) 等不同病原体的抗病性^[32]。除了突变效应子的直接受体, 利用效应子靶标改造非特异性的 NLR 可以增强免疫反应。例如, 拟南芥 PBS1 特异性地识别 AvrPphB 激活 ETI, 而 RIN4 是效应子 AvrRpt2 和 AvrRpm1 的

靶标, Kim 等^[33]将 PBS1 中效应子结合位点替换成 RIN4 的效应子结合位点 (RIN4 cleavage site 2, RCS2), 使 PBS1^{RCS2} 能够识别效应子 AvrRpt2, 从而引发植物的免疫反应。随着我们对植物 *R* 基因功能和分子机理认识的不断深入, 未来将可以通过人工设计免疫受体以提高作物抗病性。

3.2 改造 *S* 基因

S 基因 (Susceptible gene) 编码产物既可能是免疫的负调节因子, 也可能是与寄主植物发育有关的蛋白质。病原体可以操纵 *S* 基因来抑制植物免疫反应或促进病原体生长和扩散。*S* 基因的移除或失活会阻碍病原体在宿主中建立易感状态并导致致病力减弱, 增强植物的抗病性^[34], 这种策略减慢了病原体克服植物免疫的进程, 对病原体的选择压力较小, 其产生的抗病性比 *R* 基因的抗病性更持久。

水稻 *Pi2l* 是 *S* 基因的典型代表, *Pi2l* 蛋白包含一个重金属相关 (HMA) 结构域, 与稻瘟病效应子 AVR-Pik、AVR-Pia 和 AVR-Co39 靶向结合的结构域相似^[13]。Fukuoka 等^[35]发现 *Pi2l* 在编码富含脯氨酸的 C 端带有小片段缺失的自然等位基因产生了对稻瘟病的隐性抗性, 将其通过杂交手段导入水稻优良品种中, 与其紧密连锁的基因会引起稻米食用品质下降。而利用 CRISPR/Cas9 技术可以精准编辑 *Pi2l*, 定向改良水稻稻瘟病抗性却不影响稻米的食用品质^[16]。

3.3 直接靶向降解病毒基因组

植物大约一半的病害是由病毒引起, 造成了全球农业生产的巨大损失^[20]。CRISPR/Cas 系统本身就是一种防御机制, 负责切割外源质粒、DNA 或 RNA。将合理设计的 CRISPR/Cas 系统导入植物体内, 能够赋予植物对病毒的抗性。花椰菜花叶病毒 (*Caulimoviridae*) 具有双链 DNA (dsDNA), 可以直接被序列特异性核酸酶 (SSN) 识别并切割。双生病毒 (*Geminiviridae*) 和矮缩病毒 (*Nanoviridae*) 虽然是单链 DNA (ssDNA) 病毒, 但基因组在宿主细胞核内复制期间形成 dsDNA 中间体。转座病毒科 (Metaviridae) 和假病毒科 (Pseudoviridae) 病毒是逆转录 RNA 病毒, 尽管它们的基因组是单链 RNA, 但复制过程中也具有 dsDNA 形式^[36]。上述几类病毒都能够被 Cas 等核酸酶直接靶定降解。

大多数植物病毒基因组是 RNA, RNA 病毒给农业生产造成的损失比 DNA 病毒更大^[37]。研究结果

表明,尽管大多数 SSN 只结合 DNA 分子,但当 PAM 呈寡核苷酸时, Cas9 蛋白能够结合和切割 ssRNA^[29]。Price 等^[38]开发了一种 CRISPR/Cas9 系统,利用来自弗朗西斯菌 (*Francisella novicida*) 的 Cas9 新变体 FnCas9 能够靶向降解 ssRNA 病毒基因组。另一项研究发现,沙氏纤毛菌 (*Leptotrichia shahii*) 具有一种新的 Cas 蛋白 C2c2 (Cas13a), 包含 2 个 RNase 结构域,对 RNA 噬菌体具有抗性^[39-40]。这些发现扩展了 CRISPR/Cas 的应用范围,使其成为提高植物对病毒抗性的强力工具。

4 CRISPR/Cas 技术提高作物抗病性的实践

4.1 对真菌病害的抗性

最早在大麦中发现的抗白粉病基因位点 (*MLO*) 是普遍存在于单子叶植物和双子叶植物中的典型的 *S* 基因,其突变体具有白粉病抗性^[41]。目前, *MLO* 基因突变产生的抗病性在小麦和番茄等作物中均得到验证。Wang 等^[17]发现小麦中有 3 个 *MLO* 同源等位基因,利用 CRISPR/Cas9 突变其中的 *TaMLO-A1*,增强了小麦对白粉病的抗性。番茄中存在 16 个 *SIMLO* 等位基因,其中 *SIMLO1* 是最重要的基因。Nekrasov 等^[42]通过 CRISPR/Cas9 靶向切割 *SIMLO1* 的两个相近位点,使突变体的 *SIMLO1* 基因缺失 48 bp 的 DNA 片段,经自交育成不含转基因成分的高抗白粉病番茄新品种 Tomelo,而且脱靶分析显示对 *SIMLO1* 基因座以外的基因组区域没有影响。蒲艳等^[43]选择 SIU6-2P4 为启动子驱动 sgRNA,构建番茄白粉病相关基因 *MLO1* 和 *EDR1* 为靶序列的 CRISPR/Cas9 基因组编辑载体,成功实现对番茄内源基因的编辑。

除 *MLO* 位点外,通过 CRISPR/Cas9 敲除水稻中的 *OsERF922* 和 *OsSEC3A* 基因,能够使突变体产生稻瘟病抗性^[44-45]。徐鹏等^[46]敲除长粒粳稻恢复系 L1014 中 *Pita*、*Pi21* 和 *ERF922*,稻瘟病抗性显著提高。王芳权等^[47]利用 CRISPR/Cas9 技术,敲除水稻品种南粳 9108 中的 *Pi21* 基因,突变频率大于 70%;杨海河等^[48]对水稻稻瘟病感病品种日本晴 *Pi21* 基因进行定点突变,获得了抗稻瘟病的隐性突变株系。Wang 等^[49]用 4 个 gRNA 靶向敲除 *VvWRKY52* 转录因子,提高了葡萄对灰霉菌的抗性,而且双等位基因突变植株和野生型在表型上没

有观察到明显差异。以上研究结果表明 CRISPR/Cas 系统可以作为改良作物对真菌病害抗性的强大工具。

4.2 对细菌病害的抗性

白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Xoo) 侵染水稻的过程依赖于蔗糖转运基因的诱导表达。水稻至少含有 20 个 *SWEET* 基因,迄今发现只有 3 种 *SWEET* 基因是能够被 Xoo 直接靶定,诱导水稻对白叶枯病的易感性,分别是 *OsSWEET11*、*OsSWEET13* 和 *OsSWEET14*^[50]。*OsSWEET11* 受 Xoo 分泌的类转录因子效应物 PthXo1 诱导表达^[51], *OsSWEET13* 受 PthXo2 诱导^[52], *OsSWEET14* 可以由 AvrXa7、PthXo3、TalC 和 TalF 中任意一个诱导^[53]。这 3 个基因启动子区域的突变均可导致相应的 Xoo 生理小种致病性减弱^[16,52,54]。Oliva 等^[55]还利用基于 CRISPR/Cas9 的多重基因组编辑技术,对这 3 个基因的启动子区域同时进行编辑,获得了对 Xoo 各个生理小种具有广谱抗性的水稻品系。

通过基因组编辑提高水稻对白叶枯病抗性的研究成果较多,如武广珩等^[56]利用 CRISPR/Cas9 技术创制了 *MAPKKK* 蛋白激酶基因单碱基插入的 *OsEDR1* 功能缺失突变体,增强了水稻对 Xoo 的抗性。郝巍等^[57]定点突变 IR24 的 *Pong2-1* 和 *Pong11-1* 位点,创制出 6 个抗白叶枯病水稻材料。郑凯丽等^[58]定点突变 IR24 中新发现的水稻白叶枯病感病基因 *Xig1*,突变株系对水稻白叶枯病的抗性得到明显提高,而农艺性状无显著差异。

CRISPR/Cas 技术在其他作物对细菌抗性改良方面也有广泛应用,例如 Jia 等^[59]通过编辑葡萄柚的 *CsLOB1* 基因启动子中的 PthA4 效应子结合元件,获得了对柑橘溃疡病菌 (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*, Xcc) 具有抗性的突变体。Peng 等^[60]等利用 CRISPR/Cas9 技术移除了 *CsLOB1* 的效应子结合区域,突变体对 Xcc 的抗性显著增强。De 等^[61]编辑了番茄 *SIDMR6-1* 的第 3 个外显子,产生了 7 bp 的缺失,结果显示突变体获得了对黄单胞菌 (*Xanthomonas gardneri* Xg153)、穿孔黄单胞菌 (*Xanthomonas perforans* Xp4b) 以及丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae* DC3000) 的抗性。Malnoy 等^[62]用 CRISPR/Cas9 RNP (Ribonucleoprotein, 核糖核蛋白) 方法编辑苹果原生质体中的 *DIPM-1*、*DIPM-2* 和 *DIPM-4* 基因,提高了对火疫病 (Fire blight) 的抗性。

这些研究结果表明,通过 CRISPR/Cas9 技术编辑相关抗病基因,能够提高作物对细菌病原体的抗性,在作物新品种培育中具有巨大的应用潜力。

4.3 对病毒病的抗性

病毒基因组分为双链 DNA(dsDNA)、单链 DNA(ssDNA)、双链 RNA(dsRNA)、单链 RNA(ssRNA)等类型^[41]。CRISPR/Cas 以 DNA 或 RNA 为底物,可直接降解病毒基因组。基于 Cas9 或 Cas13a 的 CRISPR/Cas 平台已被成功用于增强植物对 DNA 或 RNA 病毒的抗性^[31]。

4.3.1 直接靶向降解病毒基因组 针对双生病毒(基因组为 ssDNA)的基因组编辑研究开展的较早。Ji 等^[63]在甜菜严重曲顶病毒(Beet severe curly top virus, BSCTV)基因组的编码和非编码区域筛选了 43 个候选 sgRNA/Cas9 靶位点,在烟草叶片瞬时表达靶定这些位点的 sgRNA/Cas9 复合体,均能不同程度地降低接种叶片中的病毒积累,整株转化的烟草和拟南芥中 Cas9 和 sgRNA 的表达水平较高,对病毒感染的抵抗力强。Baltes 等^[64]设计并转化了 11 种针对大豆黄矮病毒(BeYDV)的 Rep(复制起始蛋白)基序、Rep 结合位点、发夹结构和非核苷酸序列的 sgRNA,使烟草中病毒含量降低了 87%。Ali 等^[65]开发了针对番茄黄叶卷曲病毒(TYLCV)编码和非编码序列具有特异性的 sgRNA,发现靶定保守的茎环序列能显著降低病毒的复制和积累。

Cas9 新变体 FnCas9 和 Cas13a 能够直接靶定 RNA。Zhang 等^[37]在烟草和拟南芥中表达了针对黄瓜花叶病毒(CMV)和烟草花叶病毒(TMV)的 Fn-Cas9 和靶定 RNA 的 sgRNA,转基因植物中 CMV 和 TMV 积累比对照减少了 40%~80%,而且通过表达 sgRNA-FnCas9 系统获得的抗性能够稳定遗传。Aman 等^[66]通过转化 Cas13a,靶定芜菁花叶病毒(TuMV)RNA 基因组的绿色荧光蛋白基因(*GFP*)和辅助成分蛋白酶沉默抑制剂基因(*HC-Pro*),使烟草获得了有效的对病毒的抗性。

4.3.2 修饰作物抗病毒相关基因 编辑病毒基因组的抗病毒策略需要在农作物的基因组中持续表达外源 Cas 和 sgRNA,会受到转基因安全政策的严格监管。而通过编辑作物抗病毒相关基因,可以获得不含转基因元件的抗病毒品种。RNA 病毒通常需要利用宿主植物因子来完成其生命周期,如真核翻译起始因子 eIF4E、eIF(iso)4E 和 eIF4G^[41]。Chan-

drasekaran 等^[67]利用 CRISPR/Cas9 分别突变黄瓜易感基因 *eIF4E* 的 2 个不同位点,而且通过回交分离去除了基因组中的 CRISPR/Cas9 工具,获得了对马铃薯 Y 病毒属(*Potyviridae*)病毒具有抗性的突变体(eIF4E)。该突变体对黄瓜脉黄化病毒(CVYV)、西葫芦黄花叶病毒(ZYMV)和木瓜圆点花叶病毒-W(PRSV-W)均具有抗性。付紫梅等^[68]和杨晶等^[69]分别构建了靶定番茄 *eIF4E1* 基因和甜瓜 *eIF4E* 基因的 CRISPR/Cas9 载体,可用于创制抗病毒作物新材料。潘洪杏等^[70]定向敲除烟草 *eIF4E-6* 基因,改良了优质烤烟品种 K326 对马铃薯 Y 病毒的抗性。Pyott 等^[71]对拟南芥 *eIF(iso)4E* 基因引入位点特异性突变,该位点 1 bp 插入或缺失都赋予了植株对单链 RNA 病毒 TuMV 的完全抗性,并且 T₃ 代纯合突变体与野生型植物相比在生长和发育上没有显著差异。Macovei 等^[72]通过 CRISPR/Cas9 诱变水稻中的等位基因 *eIF4G*,创制了新的抗水稻东格鲁球状病毒(RTSV)材料。

5 面临的挑战和发展前景

5.1 深入研究植物抗病机制

为精确编辑作物基因组和改良作物抗病性,我们必须更加全面地了解病原菌感染过程中的基因调控动态,发掘植物的 *R* 基因和 *S* 基因,并阐明其作用机制^[73]。目前,DNA 测序技术发展迅速,产生了大量的基因组数据,包括许多物种的全基因组序列。这对理解控制农艺性状及其与环境因素相互作用的复杂遗传网络具有很大的帮助。未来研究人员还可以借助于群体水平的基因组方法,结合不同的“组学”数据库和基因编辑工具深入了解农艺性状的调控机制。

5.2 提高遗传转化效率

目前的 CRISPR/Cas 转化体系大多限于特定的物种、基因型或特定组织,几乎所有的方法都需要组织培养和遗传转化,费时费力^[74]。编辑植物生殖细胞或分生组织细胞可以实现不依赖基因型和组织培养过程的遗传转化^[75]。Maher 等^[76]开发了 Fast-TrACC 方法,通过共表达生长调节因子和基因组编辑的各种组件将基因组编辑的体细胞重新转化为分生组织,诱导其成为可育植株,从而简化或完全避免了组织培养。为了进一步扩大转化体系的应用范围,研究者还可以修饰农杆菌或植物相关基因来提

高农杆菌介导的转化效率和成功率。例如,过表达胚状体发育相关基因 *Baby boom* 和 *Wuschel2* 能够显著提高玉米等单子叶作物的转化效率,增加了可转化的优良基因型种类^[77]。另外,基于纳米技术和病毒颗粒结构的新型转化体系系统也有望用于作物改良,它们对细胞损伤小、毒性低,转化效率可能更高^[78]。

5.3 提高 CRISPR/Cas 的特异性和编辑效率

CRISPR/Cas9 技术是目前最流行的基因组编辑方法^[79-80],限制其效率和特异性的因素有 PAM 特异性、sgRNA 的设计合理性和脱靶效应^[13]。Cas9 与 PAM 序列(NGG)的严格匹配在一定程度上限制了目标序列的选择范围。在野生型 SpCas9 的 PAM 识别结构域引入突变能够克服 NGG-PAM 的靶区限制^[81]。由于脱靶效应受 Cas9 对 gRNA 错配的耐受性以及错配序列数量、位置和分布影响^[13],Slaymaker 等^[82]基于蛋白质结构,改变 Cas9 中 3 个氨基酸,显著减少了脱靶编辑。Woo 等^[83]研究发现应用核糖核蛋白复合物(RNP)进行基因组编辑时脱靶频率比植株直接表达 Cas 要显著降低。Lin 等^[84]建立并优化了适用于植物的引导编辑系统(Plant prime editing, PPE),在水稻和小麦基因组中实现了更加精确和高效的碱基替换、插入或删除。此外,开发新型的 Cas(如 Cas12b)也能够提高编辑效率^[85]。

5.4 完善监管政策

世界各国对基因编辑作物仍然缺乏明确和一致的监管政策^[73]。2016 年美国农业部裁定,不含外源 DNA 的基因编辑蘑菇和玉米不需要受传统转基因政策的监管,但是欧盟法院却将基因编辑作物归类等同于转基因作物。

中国于 2001 年颁布《农业转基因生物安全管理条例》,2017 年发布修订版^[86]。条例第三条规定“本条例所称农业转基因生物,是指利用基因工程技术改变基因组构成,用于农业生产或者农产品加工的动植物、微生物及其产品”。基因编辑技术是新一代的基因工程技术,基因编辑作物属于上述管理范畴,应按现有法规加以管理。农业农村部发布的《2020 年农业转基因生物监管工作方案》首次明确表示基因编辑等新育种技术研究要依法开展^[87]。因此,目前中国的基因编辑作物仍然按照农业转基因生物进行监管。

目前中国学者对不含外源 DNA 的基因编辑作

物的监管有争议,有学者认为基因编辑作物和传统育种技术点突变产生的结果是一致的,按传统的转基因生物进行安全评价和管理会阻碍该技术的发展^[88-91]。因此,完善基因编辑作物的相关政策是利用基因组编辑技术进行作物育种、推广基因编辑作物的关键。

6 总 结

基因组编辑技术引发了植物生物学的一场重大革命,对作物育种也产生了巨大的影响。与传统育种相比,利用基因组编辑技术既可以快速获得目标性状,又可以极大地缩短育种年限。本研究团队主要进行稻麦诱变育种研究,通过辐射诱变技术育成了扬辐麦系列小麦品种、扬辐粳系列水稻品种 20 余个。但是,传统诱变育种技术存在变异不确定、选择效率不高等缺点。通过基因组编辑技术进行定向诱变将极大地提高育种效率,有助于快速育成优质抗病稻麦新品种。

CRISPR/Cas9 技术以其简单、高效和通用性等特点成为当前基因组编辑的标准方法,是进行植物基因敲除、插入、替换、点突变、转录调控和表观修饰的有力工具。该技术已被广泛应用于修饰 S 基因或改造 R 基因,以提高作物对各种病原菌的抗性。随着政策的完善以及分子生物学技术的进一步发展,CRISPR/Cas 等基因组编辑技术必将在作物抗病性改良中发挥巨大作用。

参考文献:

- [1] FAO. The future of food and agriculture-Alternative pathways to 2050. Summary version[M]. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2018.
- [2] GAJ T, GERSBACH C A, BARBAS C F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering[J]. Trends in Biotechnology, 2013, 31(7): 397-405.
- [3] GAO C. The future of CRISPR technologies in agriculture[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2018, 19(5): 275-276.
- [4] GAO H, GADLAGE M J, LAFFITTE H R, et al. Superior field performance of waxy corn engineered using CRISPR-Cas9[J]. Nature Biotechnology, 2020, 38(5): 579-581.
- [5] 张 杰,董莎萌,王 伟,等. 植物免疫研究与抗病虫绿色防控:进展、机遇与挑战[J]. 中国科学:生命科学, 2019, 49(11): 1479-1507.
- [6] ROBATZEK S, BITTEL P, CHINCHILLA D, et al. Molecular identification and characterization of the tomato flagellin receptor

- LeFLS2, an orthologue of *Arabidopsis* FLS2 exhibiting characteristically different perception specificities[J]. *Plant Molecular Biology*, 2007, 64(5): 539-547.
- [7] GREENBERG J T, YAO N. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions[J]. *Cellular Microbiology*, 2004, 6(3): 201-211.
- [8] CHISHOLM S T, COAKER G, DAY B, et al. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response[J]. *Cell*, 2006, 124(4): 803-814.
- [9] JONES J D G, DANGL J L. The plant immune system[J]. *Nature*, 2006, 444(7117): 323-329.
- [10] 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.
- [11] 舒心媛, 严旭, 蒲烨弘, 等. CRISPR/Cas 系统的作用原理及其在作物遗传改良中的应用[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2018, 44(3): 259-268, 381.
- [12] SYMINGTON L S, GAUTIER J. Double-strand break end resection and repair pathway choice[J]. *Annual Review of Genetics*, 2011, 45(1): 247-271.
- [13] LANGNER T, KAMOUN S, BELHAJ K. CRISPR crops: Plant genome editing toward disease resistance[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2018, 56(1): 479-512.
- [14] ZHOU H, LIU B, WEEKS D P, et al. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(17): 10903-10914.
- [15] 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-associated9 system[J]. *Plant Physiology*, 2014, 166(3): 1292-1297.
- [16] LI S, SHEN L, HU P, et al. Developing disease-resistant thermosensitive male sterile rice by multiplex gene editing[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2019, 61(12): 1201-1205.
- [17] WANG Y, CHENG X, SHAN Q, 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.
- [18] LI J, MENG X, ZONG Y, et al. Gene replacements and insertions in rice by intron targeting using CRISPR-Cas9[J]. *Nature Plants*, 2016, 2(10): 16139.
- [19] WANG M, LU Y, BOTELLA J R, et al. Gene targeting by homology-directed repair in rice using a geminivirus-based CRISPR/Cas9 system[J]. *Molecular Plant*, 2017, 10(7): 1007-1010.
- [20] CHEN K, WANG Y, ZHANG R, et al. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2019, 70(1): 667-697.
- [21] KOMOR A, KIM Y, PACKER M, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage[J]. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-424.
- [22] GAUDELLI N, KOMOR A, REES H, et al. Programmable base editing of A · T to G · C in genomic DNA without DNA cleavage[J]. *Nature*, 2017, 551(7681): 464-471.
- [23] LI C, ZONG Y, WANG Y, et al. Expanded base editing in rice and wheat using a Cas9-adenosine deaminase fusion[J]. *Genome Biology*, 2018, 19(1): 59.
- [24] ZHANG Y, MALZAHN A A, SRETENOVIC S, et al. The emerging and uncultivated potential of CRISPR technology in plant science[J]. *Nature Plants*, 2019, 5(8): 778-794.
- [25] 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.
- [26] PIATEK A, ALI Z, BAAZIM H, et al. RNA-guided transcriptional regulation in planta via synthetic dCas9-based transcription factors[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2015, 13(4): 578-589.
- [27] GALLEGO-BARTOLOMÉ J, GARDINER J, LIU W, et al. Targeted DNA demethylation of the *Arabidopsis* genome using the human TET1 catalytic domain[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018, 115(9): 2125-2134.
- [28] PAPIKIAN A, LIU W, GALLEGO-BARTOLOMÉ J, et al. Site-specific manipulation of *Arabidopsis* loci using CRISPR-Cas9 Sun-Tag systems[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 729.
- [29] O'CONNELL M, OAKES B, STERNBERG S, et al. Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9[J]. *Nature*, 2014, 516(7530): 263-266.
- [30] ANDOLFO G, IOVIENO P, FRUSCIANTE L, et al. Genome-editing technologies for enhancing plant disease resistance[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1813.
- [31] DONG O X, RONALD P C. Genetic engineering for disease resistance in plants: Recent progress and future perspectives[J]. *Plant Physiology*, 2019, 180(1): 26-38.
- [32] GIANNAKOPOULOU A, STEELE J F, SEGRETIN M E, et al. Tomato I2 immune receptor can be engineered to confer partial resistance to the oomycete *Phytophthora infestans* in addition to the fungus *Fusarium oxysporum*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2015, 28(12): 1316-1329.
- [33] KIM S H, QI D, ASHFIELD T, et al. Using decoys to expand the recognition specificity of a plant disease resistance protein[J]. *Science*, 2016, 351(6274): 684-687.
- [34] LAPIN D, VAN DEN ACKERVEKEN G. Susceptibility to plant disease: more than a failure of host immunity[J]. *Trends in Plant Science*, 2013, 18(10): 546-554.
- [35] FUKUOKA S, SAKA N, KOGA H, et al. Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in rice[J]. *Science*, 2009, 325(5943): 998-1001.
- [36] ROMAY G, BRAGARD C. Antiviral defenses in plants through genome editing[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017(8): 47.
- [37] ZHANG T, ZHENG Q, YI X, et al. Establishing RNA virus resistance in plants by harnessing CRISPR immune system[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(8): 1415-1423.

- [38] PRICE A A, SAMPSON T R, RATNER H K, et al. Cas9-mediated targeting of viral RNA in eukaryotic cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015, 112(19): 6164-6169.
- [39] ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S, KONERMANN S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector[J]. Science, 2016, 353(6299): 5573.
- [40] SHMAKOV S, ABUDAYYEH O O, MAKAROVA K S, et al. Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems[J]. Molecular Cell, 2015, 60(3): 385-397.
- [41] BORRELLI V M G, BRAMBILLA V, ROGOWSKY P, et al. The enhancement of plant disease resistance using CRISPR/Cas9 technology[J]. Frontiers in Plant Science, 2018(9): 1245.
- [42] NEKRASOV V, WANG C, WIN J, et al. Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 482.
- [43] 蒲 艳, 刘 超, 李继洋, 等. 番茄 U6 启动子的克隆及 CRISPR/Cas9 基因编辑体系的建立[J]. 中国农业科学, 2018, 51(2): 315-326.
- [44] MA J, CHEN J, WANG M, et al. Disruption of *OsSEC3A* increases the content of salicylic acid and induces plant defense responses in rice[J]. Journal of Experimental Botany, 2017, 69(5): 1051-1064.
- [45] 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.
- [46] 徐 鹏, 王 宏, 涂燃冉, 等. 利用 CRISPR/Cas9 系统定向改良水稻稻瘟病抗性[J]. 中国水稻科学, 2019, 33(4): 313-322.
- [47] 王芳权, 范方军, 李文奇, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术敲除水稻 *Pi21* 基因的效率分析[J]. 中国水稻科学, 2016, 30(5): 469-478.
- [48] 杨海河, 毕冬玲, 张 玉, 等. 基于 CRISPR/Cas9 技术的水稻 *Pi21* 基因编辑材料的创制及稻瘟病抗性鉴定[J]. 分子植物育种, 2017, 15(11): 4451-4465.
- [49] WANG X, TU M, WANG D, et al. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in grape in the first generation[J]. Plant Biotechnology Journal, 2018, 16(4): 844-855.
- [50] STREUBEL J, PESCE C, HUTIN M, et al. Five phylogenetically close rice *SWEET* genes confer TAL effector-mediated susceptibility to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*[J]. New Phytologist, 2013, 200(3): 808-819.
- [51] ANTONY G, ZHOU J, HUANG S, et al. Rice *xa13* recessive resistance to bacterial blight is defeated by induction of the disease susceptibility gene *Os-11N3*[J]. The Plant Cell, 2010, 22(11): 3864-3876.
- [52] 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]. The Plant Journal, 2015, 82(4): 632-643.
- [53] DOUCOURÉ H, PÉREZ-QUINTERO A L, RESHETNYAK G, et al. Functional and genome sequence-driven characterization of TAL effector gene repertoires reveals novel variants with altered specificities in closely related Malian *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strains[J]. Frontiers in Microbiology, 2018(9): 1657.
- [54] JIANG W, ZHOU H, BI 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.
- [55] OLIVA R, JI C, ATIENZA-GRANDE G, et al. Broad-spectrum resistance to bacterial blight in rice using genome editing[J]. Nature Biotechnology, 2019, 37(11): 1344-1350.
- [56] 武广珩, 傅仙玉. 利用 CRISPR/Cas9 技术编辑水稻负调控抗病基因 *OsEDR1* 及功能分析[J]. 应用与环境生物学报, 2020, 26(3): 1-10.
- [57] 郝 巍, 纪志远, 郑凯丽, 等. 利用基因组编辑技术创制水稻白叶枯病抗性材料[J]. 植物遗传资源学报, 2018, 19(3): 151-158.
- [58] 郑凯丽, 纪志远, 郝 巍, 等. 水稻白叶枯病感病相关基因 *Xig1* 的分子鉴定及抗病资源创制[J]. 作物学报, 2020. Doi: 10.3724/SP.J.1006.2020.
- [59] JIA H, ORBOVIC V, JONES J B, et al. Modification of the PthA4 effector binding elements in Type I *CsLOB1* promoter using Cas9/sg RNA to produce transgenic Duncan grapefruit alleviating XccΔpthA4: dCs LOB 1.3 infection[J]. Plant Biotechnology Journal, 2016, 14(5): 1291-1301.
- [60] PENG A, CHEN S, LEI T, et al. Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene *CsLOB1* promoter in citrus[J]. Plant Biotechnology Journal, 2017, 15(12): 1509-1519.
- [61] DE TOLEDO THOMAZELLA D P, BRAIL Q, DAHLBECK D, et al. CRISPR-Cas9 mediated mutagenesis of a *DMR6* ortholog in tomato confers broad-spectrum disease resistance [J]. BioRxiv, 2016. Doi: 10.1101/064824.
- [62] MALNOY M, VIOLA R, JUNG M-H, et al. DNA-free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins[J]. Frontiers in Plant Science, 2016 (7): 1904.
- [63] JI X, ZHANG H, ZHANG Y, et al. Establishing a CRISPR-Cas-like immune system conferring DNA virus resistance in plants[J]. Nature Plants, 2015, 1(10): 15144.
- [64] BALTES N J, HUMMEL A W, KONECNA E, et al. Conferring resistance to geminiviruses with the CRISPR-Cas prokaryotic immune system[J]. Nature Plants, 2015, 1(10): 15145.
- [65] ALI Z, ABULFARAJ A, IDRIS A, et al. CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants[J]. Genome Biology, 2015, 16(1): 238.
- [66] AMAN R, ALI Z, BUTT H, et al. RNA virus interference via CRISPR/Cas13a system in plants[J]. Genome Biology, 2018, 19(1): 1.
- [67] 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.

- [68] 付紫梅, 向本春, 袁 伦, 等. 靶向加工番茄 *eIF4E1* 的 CRISPR/Cas9 载体有效性验证[J]. 新疆农业科学, 2018, 55(2): 230-237.
- [69] 杨 晶, 李 冠, 王旭辉, 等. CRISPR-Cas9 技术敲除甜瓜 *eIF4E* 基因表达载体的构建[J]. 新疆农业科学, 2018, 55(5): 821-828.
- [70] 潘洪杏, 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.
- [71] PYOTT D E, SHEEHAN E, MOLNAR A. Engineering of CRISPR/Cas9-mediated potyvirus resistance in transgene-free *Arabidopsis* plants[J]. Molecular Plant Pathology, 2016, 17(8): 1276-1288.
- [72] MACOVEI A, SEVILLA N R, CANTOS C, et al. Novel alleles of rice *eIF4G* generated by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis confer resistance to rice tungro spherical virus[J]. Plant Biotechnology Journal, 2018, 16(11): 1918-1927.
- [73] HUA K, ZHANG J, BOTELLA J R, et al. Perspectives on the application of genome-editing technologies in crop breeding[J]. Molecular Plant, 2019, 12(8): 1047-1059.
- [74] JI X, YANG B, WANG D. Achieving plant genome editing while bypassing tissue culture[J]. Trends in Plant Science, 2020, 25(5): 427-429.
- [75] HAMADA H, LINGHU Q, NAGIRA Y, et al. An in planta biolistic method for stable wheat transformation[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 11443.
- [76] MAHER M F, NASTI R A, VOLLBRECHT M, et al. Plant gene editing through *de novo* induction of meristems[J]. Nature Biotechnology, 2020, 38(1): 84-89.
- [77] LOWE K, WU E, WANG N, et al. Morphogenic regulators *Baby boom* and *Wuschel* improve monocot transformation[J]. The Plant Cell, 2016, 28(9): 1998-2015.
- [78] DEMIRER G, ZHANG H, MATOS J, et al. High aspect ratio nanomaterials enable delivery of functional genetic material without DNA integration in mature plants[J]. Nature Nanotechnology, 2019, 14(5): 456-464.
- [79] 黄 娟, 邓国富, 高利军, 等. CRISPR/Cas9 系统及其在作物育种中的应用[J]. 南方农业学报, 2018, 49(1): 14-21.
- [80] 李 莉, 任红艳, 毕延震, 等. 基因编辑技术的新进展及展望[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(23): 5-10.
- [81] KLEINSTIVER B P, PREW M S, TSAI S Q, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities[J]. Nature, 2015, 523(7561): 481-498.
- [82] SLAYMAKER I M, GAO L, ZETSCHE B, et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity[J]. Science, 2016, 351(6268): 84-88.
- [83] WOO J W, KIM J, KWON S I, et al. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins[J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(11): 1162-1164.
- [84] LIN Q, ZONG Y, XUE C, et al. Prime genome editing in rice and wheat[J]. Nature Biotechnology, 2020, 38(5): 582-585.
- [85] MING M, REN Q, PAN C, et al. CRISPR-Cas12b enables efficient plant genome engineering[J]. Nature Plants, 2020, 6(3): 202-208.
- [86] 农业部农业转基因生物安全管理办公室. 农业转基因生物安全管理条例(2017年10月7日修订版)[EB/OL]. (2017-12-22)[2020-03-21]. http://www.moa.gov.cn/ztl/zjyqwgz/xggzjg/201007/t20100717_1601306.htm.
- [87] 农业农村部. 农业农村部办公厅关于印发 2020 年农业转基因生物监管工作方案的通知[EB/OL]. (2020-1-10)[2020-03-21]. http://www.moa.gov.cn/nybgh/2020/202002/202004/t20200414_6341549.htm.
- [88] 沈 平, 章秋艳, 杨立桃, 等. 基因组编辑技术及其安全管理[J]. 中国农业科学, 2017, 50(8): 1361-1369.
- [89] 焦 悦, 吴 刚, 黄耀辉, 等. 基因组编辑技术及其安全管理[J]. 中国农业科技导报, 2018, 20(4): 12-19.
- [90] 薛满德, 龙 艳, 裴新梧. 基因编辑技术及其在作物育种中的应用与安全管理[J]. 中国农业科技导报, 2018, 20(9): 12-22.
- [91] HUANG S, WEIGEL D, BEACHY R N, et al. A proposed regulatory framework for genome-edited crops[J]. Nature Genetics, 2016, 48(2): 109-111.

(责任编辑:陈海霞)