

唐 维, 后 猛, 宋炜涵, 等. 甘薯 U6 启动子克隆及其转录活性分析[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(6): 969-974.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.06.002

## 甘薯 U6 启动子克隆及其转录活性分析

唐 维, 后 猛, 宋炜涵, 闫 会, 王 欣, 李 臣, 高闰飞, 张允刚, 李 强  
(江苏徐淮地区徐州农业科学研究所/农业农村部甘薯生物学与遗传育种重点实验室, 江苏 徐州 221131)

**摘要:** 在 CRISPR/Cas9 基因编辑系统中, U6 启动子可以通过驱动 sgRNA 的表达来编辑目的基因, 因而其转录活性会影响基因编辑效率。尽管人们已经在拟南芥、玉米、大豆、棉花等植物中开展了 U6 启动子的克隆与应用研究, 然而目前在甘薯中 U6 启动子的相关研究还未见报道。本研究利用拟南芥的 AtU6 SnRNA 的保守序列在三裂野牵牛(*Ipomoea trifida*) 基因组数据库中搜索候选 U6 RNA, 然后在其上游搜索到 2 个不同的候选 U6 启动子, 长度分别为 526 bp (IbU6p-1) 和 532 bp (IbU6p-2); 序列比对分析结果显示, 甘薯的 U6 启动子具有上游序列元件 (USE) 以及 TATA-box, 其序列也与拟南芥高度相似。然后, 利用获得的 U6 启动子核酸序列构建了能够驱动萤火虫荧光素酶基因 (*LUC*) 表达的重载体 U6::LUC。最后, 将含有上述重组载体的根癌农杆菌瞬时转化到本氏烟草叶片和甘薯愈伤组织中, 并通过荧光成像技术分析荧光素酶活性。结果发现, 在烟草及甘薯愈伤组织中 2 个甘薯 U6 启动子均能驱动 *LUC* 基因表达, 具有转录活性。同时, IbU6p-2 的转录活性无论是在烟草叶片中还是在甘薯愈伤组织中都显著高于拟南芥 U6 启动子。本研究结果为进一步发展甘薯基因编辑技术提供了参考。

**关键词:** 甘薯; U6 启动子; 克隆; 基因编辑; 转录活性

**中图分类号:** S531 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)06-0969-06

## Cloning and transcriptional activity analysis of U6 promoter in sweetpotato

TANG Wei, KOU Meng, SONG Weihang, YAN Hui, WANG Xin, LI Chen, GAO Runfei,  
ZHANG Yungang, LI Qiang

(Xuzhou Institute of Agricultural Sciences in Jiangsu Xuhuai District/Key Laboratory of Sweet Potato Biology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Xuzhou 221131, China)

**Abstract:** In the CRISPR/Cas9 gene editing system, the U6 promoter can edit target genes by driving sgRNA expression, so its transcriptional activity can affect the efficiency of gene editing. Although studies on cloning and application of U6 promoter have been carried out in *Arabidopsis thaliana*, corn, soybean, cotton and other plants, there aren't any reports on relative research of U6 promoter in sweetpotato. In this study, we searched the *Ipomoea trifida* genome database for candidate U6 RNA, using the conservative sequence of AtU6 SnRNA in *A. thaliana*, and then found two different candidate U6 promoters with lengths of 526 bp (IbU6p-1) and 532 bp (IbU6p-2), respectively. Through sequence alignment analysis, we found that the U6 promoter of sweetpotato has upstream sequence element (USE) and TATA box, and its sequence was highly similar to that of *A. thaliana*. Then, a recombinant box U6::LUC was constructed using the obtained U6 promoter nucleic acid sequence to drive the expression of firefly luciferase gene. Finally, *Agrobacterium tumefaciens* containing the recombinant vector

was genetically transformed into *Nicotiana benthamiana* leaves and sweetpotato callus tissues by transient expression, and luciferase activity was analyzed using fluorescence imaging technology. The results showed that both sweetpotato U6 promoters could drive the expression of *LUC* gene and had transcriptional activity in tobacco and sweet-

收稿日期: 2023-07-29

基金项目: 徐州市现代农业重点专项 (KC21116); 国家甘薯产业技术体系项目 (CARS-10)

作者简介: 唐 维 (1982-), 男, 湖北武汉人, 博士, 副研究员, 主要从事甘薯分子遗传育种研究。 (E-mail) tangweilhr@163.com

通讯作者: 李 强, (E-mail) instrong@163.com

potato calli. At the same time, the transcriptional activities of IbU6p-2 in tobacco leaves and sweetpotato calli were significantly higher than that of *A. thaliana* U6 promoter. The results of this study lay a foundation for further development of sweetpotato gene editing technology.

**Key words:** sweetpotato; U6 promoter; cloning; gene editing; transcriptional activity

基因编辑是现代生物学发展史上的一项革命性的技术,它已经被广泛运用到与医学、动物、植物、昆虫、微生物等相关的多个研究领域<sup>[1-5]</sup>。该项技术从发明至今已从最初的锌指核酸酶系统发展到了簇状规则间隔短回文重复序列(CRISPR/Cas9)。现今,CRISPR/Cas9 凭借其具有高效、便捷、易操作等优点已经成为进行基因功能研究与种质遗传改良的主要工具,并被运用于作物的各个品质性状的改良,比如用于研制富含抗氧化成分的紫番茄<sup>[6]</sup>、高产水稻<sup>[7]</sup>、富含 omega-3 脂肪酸的亚麻荠<sup>[8]</sup>和高油酸大豆<sup>[9]</sup>等。

CRISPR/Cas9 通过 sgRNA 将 Cas9 蛋白带到靶点,对 DNA 进行切割,产生特异性双链断裂(DBS),随后利用非同源末端连接或同源重组机制来修复 DSB,从而产生碱基的突变、缺失,进而造成基因突变<sup>[10]</sup>。U6 RNA 是双子叶植物中的一类非编码小 RNA,它所对应的 U6 启动子是 CRISPR/Cas9 的主要组成部分之一,已广泛被人们用来驱动 sgRNA 的转录<sup>[11]</sup>。研究表明,U6 启动子通过影响 sgRNA 的表达丰度从而决定基因的编辑效率<sup>[12]</sup>。为了提高在不同物种中的基因编辑效率,人们对植物内源的 U6 启动子开展了相关研究。Gao 等<sup>[13]</sup>根据自身的内源启动子成功建立了适用于烟草的 CRISPR/Cas9 系统。在苹果愈伤组织中,卞书迅等<sup>[14]</sup>使用内源性 U6 启动子,大大增强了 sgRNA 的表达。唐志强等<sup>[15]</sup>在金银花中克隆了 3 个 U6 启动子,并筛选出一个具有高效转录活性的启动子。目前,研究者已在多个植物中开展了 U6 启动子相关研究,但是未见关于甘薯 U6 启动子的报道。为了更好地在甘薯中开展基因编辑工作,本研究拟将克隆到的 2 个甘薯 U6 启动子分别与常用的拟南芥 U6 启动子进行转录活性比较,为优化甘薯 CRISPR/Cas9 基因编辑系统提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

本试验所用的甘薯品种徐紫薯 8 号、本氏烟草和

植物表达载体 pGreenII-0800::LUC(LUC 表示荧光素酶基因)均保存于江苏徐淮地区徐州农业科学研究所甘薯遗传育种研究室。农杆菌感受态 EHA105 细胞由上海唯地生物技术有限公司提供;ECL 化学发光试剂盒由碧云天生物技术有限公司提供。引物合成及测序由上海擎科生物技术有限公司完成。

### 1.2 试验方法

1.2.1 甘薯 U6 启动子克隆与生物信息学分析 取徐紫薯 8 号的幼嫩叶片,并参考十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法抽提其基因组 DNA<sup>[16]</sup>。用拟南芥的 AtU6 SnRNA 保守序列在三裂野牵牛(*Ipomoea trifida*)基因组数据库(<http://sweetpotato-garden.kazusa.or.jp/>)中搜索候选 U6 RNA,然后在其上游找到对应启动子序列。根据同源序列法设计引物(表 1),用高保真酶(宝生物工程有限公司产品,大连)在甘薯中扩增 U6 启动子片段(IbU6p)。PCR 反应体系如下:98 ℃变性 2 min;98 ℃变性 10 s,55 ℃退火 10 s,72 ℃延伸 10 s,循环 35 次;72 ℃延伸 3 min。PCR 产物通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,回收单个片段并利用 pEASY-T1 Cloning Kit(北京全式金生物技术有限公司产品)进行 TA(Original TA Cloning Kit)克隆和测序分析。

表 1 所用引物序列

Table 1 Sequence of primers used in this study

引物名称	序列(5'→3')	扩增产物大小(bp)
IbU6p-1F	TTTATTTTATTTTTTCGGTITTTG	526
IbU6p-1R	ATTCTTGTTCCTCAATGGC	
IbU6p-2F	AGAATGCCTGGCCTTTAGTA	532
IbU6p-2R	CATGGAAGAACATGCT	
AtU6p-F	AGAAATCTCAAAATTC	303
AtU6p-R	CAATCACTACTTCGTCTC	

F:上游引物;R:下游引物。

使用 BioEdit 软件对甘薯 U6 启动子与拟南芥的 AtU6-1 启动子进行序列比对,分析甘薯 U6 启动子的序列特征。然后,利用植物启动子分析软件 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)分析甘薯 U6 启动子的顺

式作用元件。

**1.2.2 U6 启动子表达载体的构建** 首先,将植物表达载体 pGreenII-0800::LUC 用 *Hind* III 和 *Bam* H I 进行双酶切,获得线性化质粒。然后,根据同源重组的方法,以重组测序载体 pEASY-T1::IbU6p 为模板扩增 U6 启动子片段。利用胶回收试剂盒获得纯化的线性化质粒 pGreenII-0800::LUC 和插入片段 IbU6p。根据 pEASY®-Basic Seamless Cloning and Assembly Kit 试剂盒说明书(北京全式金生物技术有限公司产品),进行目的片段和载体的连接反应。然后,将连接产物转化大肠杆菌感受态 DH5 $\alpha$ 。挑取抗性平板上的单克隆进行菌落 PCR 检测并送公司测序,将测序结果正确的单克隆进行摇菌并获得重组表达载体 IbU6p::LUC。以同样的方法将拟南芥的 AtU6-1 启动子插入 pGreenII-0800::LUC 中,将该重组载体命名为 AtU6p::LUC。

**1.2.3 烟草和甘薯愈伤组织中的瞬时表达** 将构建成功的 IbU6p::LUC 和 AtU6p::LUC 重组表达载体以及阴性对照 pGreenII-0800::LUC 空载通过液氮法分别转化农杆菌感受态细胞 EHA105;然后,在抗性 LB 培养基[含有 50  $\mu$ g/ml 卡那霉素、50  $\mu$ g/ml 利福平和 100  $\mu$ mol/L 乙酰丁香酮(AS)]中振荡培养至菌液  $OD_{600}$  值为 0.8。离心后,用重悬液[10 mmol/L  $MgCl_2$ , 10 mmol/L 2-(*N*-吗啉)乙磺酸(MES, pH 5.6), 100  $\mu$ mol/L AS]重悬菌体至  $OD_{600}$  为 0.3~0.5。室温条件下放置 2~3 h 后注射到烟草叶片中,3 d 后进行荧光发光检测。

将上述含有 IbU6p::LUC 和 AtU6p::LUC 的农杆菌液同样在抗性 LB 培养基中振荡至菌液  $OD_{600}$  值为 0.8,然后用含有 100  $\mu$ mol/L AS 和 2 mg/L 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)的 MS 液体培养基重悬菌体至  $OD_{600}$  为 0.5。将准备好的甘薯愈伤组织放入其中,暗培养 30 min 后,超声波处理 30 s。然后将感染的愈伤组织在 MS+2,4-D+AS 的固体培养基中于 28  $^{\circ}C$  暗培养 72 h,再用无菌水重复清洗甘薯愈伤组织 4 次后放在 MS+2,4-D 培养基上。最后,利用萤火虫荧光素酶报告基因检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司产品)进行荧光发光检测。

**1.2.4 生物发光检测与分析** 将瞬时转化的烟草叶片和甘薯愈伤组织分别在 100 mmol/L 的荧光素钾盐溶液中反应 5 min。通过高分辨率制冷电荷耦合器件(CCD)荧光及化学发光成像系统(上海勤翔

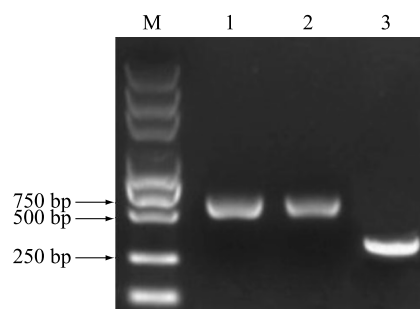
科学仪器有限公司产品)对烟草叶片发光图像进行采集,并运用成像软件对采集数据进行分析;另外,使用 Leica DM4000 B 型荧光显微镜(上海徕卡显微系统贸易有限公司产品)对甘薯愈伤组织进行拍照。试验数据利用 Excel 365 进行统计学分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 启动子克隆与序列分析

本试验基于 U6 启动子基因序列的保守性,在现有的甘薯近缘野生种 *Ipomoea trifida* 的基因组数据中搜索到 2 个不同的候选 U6 启动子。然后,根据同源序列法设计引物,以甘薯品种徐紫薯 8 号的基因组 DNA 为模板扩增了 2 个甘薯 U6 启动子片段,分别命名为 IbU6p-1 和 IbU6p-2,片段长度分别为 526 bp 和 532 bp(图 1)。同时,从已报道的基因编辑载体 pHSE401<sup>[15]</sup>中分离到了拟南芥 U6 启动子片段 AtU6p。

将克隆到的 2 个甘薯 U6 启动子和拟南芥 U6 启动子进行序列比对,着重分析影响 U6 启动子转录活性的顺式作用元件 USE 和 TATA-box 以及两者之间的距离。结果表明,IbU6p-1 和 IbU6p-2 具有与 AtU6p 一样保守的 USE 元件以及 TATA-box,而且 2 个元件之间的间隔也相对一致(图 2),暗示所克隆的 IbU6 启动子很可能具有与 AtU6p 一样的转录活性。



M: marker; 1: IbU6p-1; 2: IbU6p-2; 3: AtU6p。

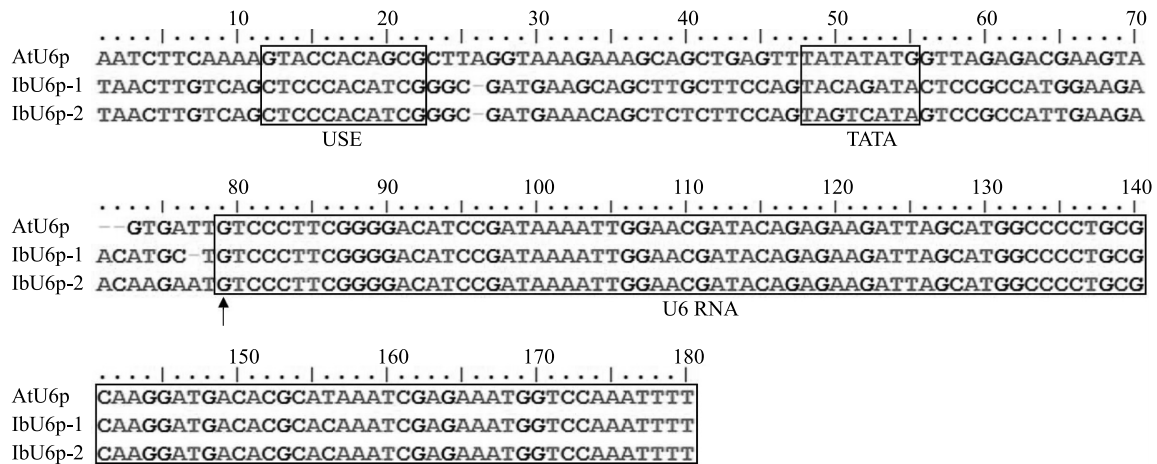
图 1 U6 启动子片段克隆与电泳分析

Fig. 1 Cloning and electrophoretic analysis of U6 promoter fragment

### 2.2 U6 启动子表达载体构建

使用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Bam* H I 对植物瞬时表达载体 pGreenII-0800::LUC 进行双酶切后,分别将 IbU6p-1、IbU6p-2 和 AtU6p 核酸片段插入该载体中。然后,经过转化大肠杆菌感受态细胞获得单克隆。挑选阳性菌落经液体 LB 培养基培养后提



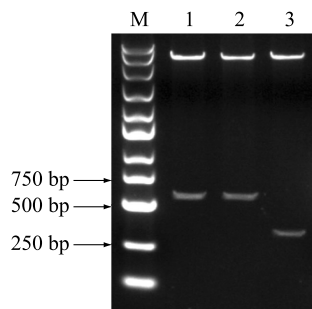


箭头所指为 U6 RNA 的转录起始位点。方框内为 U6 RNA 的特征序列。

图 2 甘薯 U6 启动子序列比对分析

Fig.2 Sequence alignment analysis of U6 promoter in sweetpotato

取质粒,并进行酶切验证和测序分析。结果(图 3)表明,重组载体 IbU6p-1::LUC、IbU6p-2::LUC 和 AtU6p::LUC 酶切后出现 2 个条带,大小与预期结果一致;同时测序结果也与各个 U6 启动子序列完全一致,说明 U6 启动子表达载体构建成功。



M: marker; 1: IbU6p-1::LUC; 2: IbU6p-2::LUC; 3: AtU6p::LUC.

图 3 U6p::LUC 重组载体双酶切电泳分析

Fig.3 Electrophoresis analysis of recombinant vector U6p::LUC by double enzyme digestion

### 2.3 IbU6 启动子转录活性分析

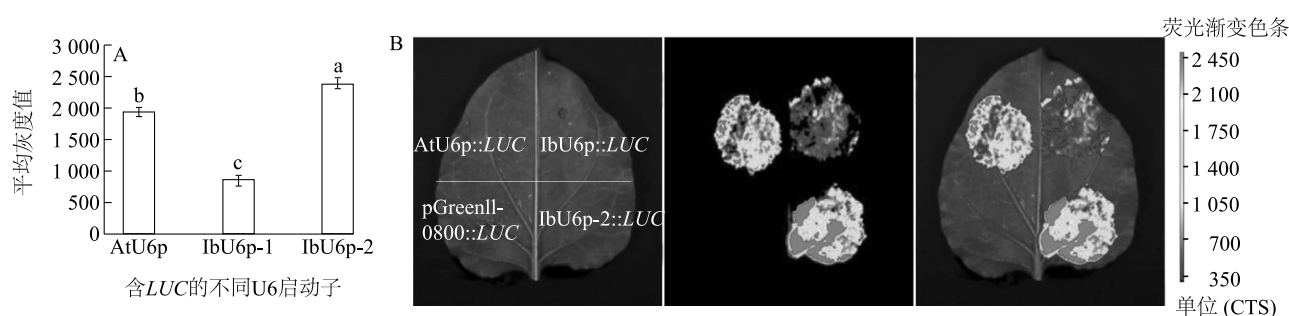
分别将含有 IbU6p-1::LUC、IbU6p-2::LUC 和 AtU6p::LUC 载体的农杆菌瞬时转化到烟草,并以 pGreenII-0800::LUC 空载为阴性对照。待 72 h 后对注射的烟草叶片部分开展荧光素酶活性检测,同时对荧光信号强弱进行方差分析,发现 IbU6p-2 的荧光信号最强,其次为 AtU6p,而 IbU6p-1 的荧光信号最弱(图 4)。

为了进一步比较分析 IbU6p-1、IbU6p-2 和 AtU6p

在甘薯中的转录活性,通过农杆菌遗传转化的方法分别用 IbU6p-1::LUC、IbU6p-2::LUC 和 AtU6p::LUC 转化甘薯愈伤组织,并在荧光显微镜下进行观察。结果(图 5)表明,尽管所有的 U6 启动子都可以在甘薯愈伤组织中驱动 LUC 基因表达,但其效率存在明显的差异。与 AtU6p::LUC 相比, IbU6p-1::LUC 和 IbU6p-2::LUC 转染的甘薯愈伤组织荧光信号明显增加。同时,在 IbU6p-1::LUC 转染的甘薯愈伤组织中,能明显观察到的荧光信号发光点相对较少,而在 IbU6p-2::LUC 转染的甘薯愈伤组织中,其荧光信号发光点的数量和发光强度要明显高于 IbU6p-1::LUC。上述结果说明,在甘薯愈伤组织中,甘薯内源 U6 启动子驱动基因表达的能力要高于外源的拟南芥 U6 启动子,特别是 IbU6p-2 启动子能够大幅提高 sgRNA 的转录效率。

## 3 讨论

在植物基因编辑系统中,U6 启动子通常被用来驱动 sgRNAs 的高效表达。它一般以高度保守的鸟嘌呤核苷酸为转录起始点,有助于改善转录的 sgRNA 的同质性,并减少脱靶效应<sup>[17-18]</sup>。因此,在许多植物物种中拟南芥 U6 (AtU6) 启动子和水稻 U6 (OsU6) 启动子被广泛用于异源表达 sgRNAs<sup>[19-22]</sup>。一般而言,在 CRISPR/CAS9 系统中,AtU6 启动子用于双子叶植物,OsU6 启动子用于单子叶植物<sup>[23-25]</sup>。然而,U6 启动子的异源应用大多在亲缘关系较近的植物物种中<sup>[26]</sup>。最近,在棉花、大豆、菊苣、小麦等



A: IbU6p-1::LUC, IbU6p-2::LUC 和 AtU6p::LUC 的荧光亮度数值比较; B: IbU6p-1::LUC, IbU6p-2::LUC 和 AtU6p::LUC 在烟草叶片中的荧光成像检测。不同的小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。LUC: 荧光虫荧光素酶基因。

图4 IbU6 启动子转录活性比较

Fig.4 Comparison of transcriptional activity of IbU6 promoter



白色箭头为荧光信号发光点。

图5 在甘薯愈伤组织中荧光检测 AtU6p (A)、IbU6p-1 (B) 和 IbU6p-2 (C) 驱动 LUC 的表达

Fig.5 Fluorescence detection of LUC expression driven by AtU6p (A), IbU6p-1 (B) and IbU6p-2 (C) in sweetpotato callus tissue

作物的研究中,已发现内源 U6 启动子能更好地驱动 sgRNA 的高表达,从而提高自身的基因编辑效率<sup>[27-30]</sup>。所以,内源性 U6 启动子的克隆与研究,对优化 CRISPR/Cas9 介导的作物基因组编辑系统有着重要的意义。

最近,人们在甘薯中已经实现了基于 CRISPR/Cas9 的基因编辑研究<sup>[31-32]</sup>,然而该研究是通过 AtU6 启动子异源驱动 sgRNAs 表达。本研究首先克隆了甘薯 U6 启动子,然后将 U6 启动子片段插入到 LUC 报告基因的上游,获得重组表达载体 IbU6p-1::LUC 和 IbU6p-2::LUC,最后通过瞬时表达 LUC 基因和化学发光来分析甘薯 U6 启动子的转录活性。结果发现,甘薯 IbU6p-1 和 IbU6p-2 都含有 RNA 聚合酶 III 识别的 USE 和 TATA-box 顺式元件,并具有转录活性,并且 IbU6p-2 的转录活性无论是在烟草叶片还是在甘薯愈伤组织中都显著高于 AtU6p。上述结果表明 IbU6p-2 可以作为优异的内源 U6 启动子用于甘薯基因编辑系统的构建。

## 4 结论

从甘薯品种徐紫薯 8 号中克隆到 2 条长度分别为 526 bp 和 532 bp 的 U6 启动子(分别命名为 IbU6p-1、IbU6p-2),均具有转录活性,其中 IbU6p-2 的转录活性显著高于 IbU6p-1。此外,甘薯 U6 启动子在其愈伤组织中的转录活性高于拟南芥的 U6 启动子,特别是 IbU6p-2 的转录活性明显高于 AtU6p。

## 参考文献:

- [1] MILLS E M, BARLOW V L, LUK L Y P, et al. Applying switchable Cas9 variants to *in vivo* gene editing for therapeutic applications[J]. Cell Biology and Toxicology, 2020, 36(1): 17-29.
- [2] TANIHARA F, HIRATA M, OTOI T. Current status of the application of gene editing in pigs[J]. Journal of Reproduction and Development, 2021, 67(3): 177-187.
- [3] YIN K Q, GAO C X, QIU J L. Progress and prospects in plant genome editing[J]. Nature Plants, 2017, 3: 17107.
- [4] GANTZ V M, AKBARI O S. Gene editing technologies and applications for insects[J]. Current Opinion in Insect Science, 2018,

- 28;66-72.
- [5] ADIEGO-PÉREZ B, RANDAZZO P, DARAN J M, et al. Multiplex genome editing of microorganisms using CRISPR-Cas [J]. FEMS Microbiology Letters, 2019, 366(8): 86.
- [6] ČERMÁK T, BALTES N J, ČEGAN R, et al. High-frequency, precise modification of the tomato genome [J]. Genome Biology, 2015, 16: 232.
- [7] BANDYOPADHYAY A, YIN X, BISWAL A, et al. CRISPR-Cas9-mediated genome editing of rice towards better grain quality [J]. Methods in Molecular Biology, 2019, 1892: 311-336.
- [8] JIANG W Z, HENRY I M, LYNAGH P G, et al. Significant enhancement of fatty acid composition in seeds of the allohexaploid, *Camelina sativa*, using CRISPR/Cas9 gene editing [J]. Plant Biotechnology Journal, 2017, 15(5): 648-657.
- [9] 张威, 许文静, 许亚男, 等. 基于 *CRISPR/Cas9* 基因编辑的高油酸大豆品系创制 [J]. 江苏农业学报, 2023, 39(2): 321-327.
- [10] PICKAR-OLIVER A, GERSBACH C A. The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications [J]. Nature Review Molecular Cell Biology, 2019, 20(8): 490-507.
- [11] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. Science, 2013, 339(6121): 819-823.
- [12] WEI Y D, QIU Y, CHEN Y H, et al. CRISPR/Cas9 with single guide RNA expression driven by small tRNA promoters showed reduced editing efficiency compared to a U6 promoter [J]. RNA, 2017, 23(1): 1-5.
- [13] GAO J P, WANG G H, MA S Y, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum* [J]. Plant Molecular Biology, 2015, 87(1/2): 99-110.
- [14] 卞书迅, 韩晓蕾, 袁高鹏, 等. 苹果 U6 启动子的克隆及功能分析 [J]. 中国农业科学, 2019, 52(23): 4364-4373.
- [15] 唐志强, 李小丽, 许小涵, 等. 金银花 U6 启动子的克隆及转录活性分析 [J]. 山东科学, 2022, 35(2): 11-17.
- [16] 李强, 揭琴, 刘庆昌, 等. 甘薯基因组 DNA 高效快速提取方法 [J]. 分子植物育种, 2007, 5(5): 743-746.
- [17] SHAN Q W, WANG Y P, LI J, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system [J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(8): 686-688.
- [18] SATHEESH V, ZHANG H, WANG X T, et al. Precise editing of plant genomes-prospects and challenges [J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2019, 96: 115-123.
- [19] 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.
- [20] FAUSER F, SCHIML S, PUCHTA H. Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana* [J]. The Plant Journal, 2014, 79(2): 348-359.
- [21] LI J F, NORVILLE J E, AACH J, et al. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9 [J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(8): 688-691.
- [22] ZHOU H B, 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.
- [23] BORTESI L, FISCHER R. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond [J]. Biotechnology Advances, 2015, 33(1): 41-52.
- [24] 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.
- [25] BELHAJ K, CHAPARRO-GARCIA 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.
- [26] WANG M B, HELLIWELL C A, WU L M, et al. Hairpin RNAs derived from RNA polymerase II and polymerase III promoter-directed transgenes are processed differently in plants [J]. RNA, 2008, 14(5): 903-913.
- [27] LONG L, GUO D D, GAO W, et al. Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing in cotton by improved sgRNA expression [J]. Plant Methods, 2018, 14: 85.
- [28] DI Y H, SUN X J, HU Z, et al. Enhancing the CRISPR/Cas9 system based on multiple GmU6 promoters in soybean [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2019, 519(4): 819-823.
- [29] BERNARD G, GAGNEUL D, ALVES DOS SANTOS H, et al. Efficient genome editing using CRISPR/Cas9 technology in chicory [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(5): 1155.
- [30] LIU H Y, WANG K, JIA Z M, et al. Efficient induction of haploid plants in wheat by editing of TaMTL using an optimized *Agrobacterium*-mediated CRISPR system [J]. Journal of Experimental Botany, 2020, 71(4): 1337-1349.
- [31] WANG H X, WU Y L, ZHANG Y D, et al. CRISPR/Cas9-Based mutagenesis of starch biosynthetic genes in sweetpotato (*Ipomoea Batatas*) for the improvement of starch quality [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(19): 4702.
- [32] 刘霞宇. 甘薯 *CRISPR/Cas9* 基因编辑系统的建立及 miR2111 调控甘薯块根中花青素积累的功能研究 [D]. 太原: 山西农业大学, 2020.

(责任编辑: 陈海霞)