

利用 CRISPR/Cas9 系统定向编辑水稻 *SD1* 基因

胡雪娇^{1,2} 杨佳^{1,3} 程灿¹ 周继华¹ 牛付安¹ 王新其¹ 张美良² 曹黎明^{1,*} 储黄伟^{1,*}

(¹上海市农业科学院 作物育种栽培研究所, 上海 201403; ²江西农业大学 农学院, 南昌 330045; ³上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; *通讯联系人, E-mail: chuhuangwei@saas.sh.cn; clm079@163.com)

Targeted Editing of Rice *SD1* Gene Using CRISPR/Cas9 System

HU Xuejiao^{1,2}, YANG Jia^{1,3}, CHENG Can¹, ZHOU Jihua¹, NIU Fuan¹, WANG Xinqi¹, ZHANG Meiliang², CAO Liming^{1,*}, CHU Huangwei^{1,*}

(¹Institute of Crop Breeding and Cultivation, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China; ²School of Agricultural Sciences, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; ³College of Food Sciences & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; *Corresponding author, E-mail: chuhuangwei@saas.sh.cn; clm079@163.com)

Abstract: 【Objective】In the last century, the usage of semi-dwarf rice varieties brought about significant improvements and great achievements in rice breeding. Most of the semi-dwarf rice varieties have loss-of-function mutations in the *Semi-Dwarf1* (*SD1*) gene. In order to obtain *sd1* mutant, targeted editing of *SD1* gene was performed. 【Method】*SD1* gene editing vector CRISPR-*SD1* was constructed by using CRISPR/Cas9 system, and transformed into two rice restore lines Shenfan 17 and Shenfan 24 by the *Agrobacterium*-mediated method. 【Result】Homozygous *sd1* mutants were obtained in T₀ generation in both varieties, and vector-free *sd1* mutant lines were segregated from the T₁ population. The plant heights of the two *sd1* mutants were decreased by 25% as compared with those of their wild types. 【Conclusion】CRISPR/Cas9 is a powerful tool for rice target gene editing, and has enormous potential in rice molecular breeding.

Key words: CRISPR/Cas9; gene editing; rice; *Semi-Dwarf1*

摘要: 【目的】半矮秆水稻品种的选育和应用是水稻育种的最重大成果之一。半矮秆品种大多是半矮秆基因 *SD1*(*semi-dwarf1*)功能缺失突变体, 为了获得 *sd1* 突变体, 本研究对 *SD1* 基因进行了定向编辑。【方法】利用 CRISPR/Cas9 系统, 以 *SD1* 基因为靶基因, 构建基因编辑载体 CRISPR-*SD1*, 用农杆菌介导的方法转化水稻恢复系申繁 17 和申繁 24。【结果】在 2 个转化受体的 T₀ 代均获得了纯合的 *sd1* 突变体, 并且在 T₁ 代株系中分离出了不含转基因序列的植株。2 个品种的 *sd1* 突变体与各自的野生型相比, 株高分别下降了 25% 左右。【结论】利用 CRISPR/Cas9 系统可以有效地对目的基因进行编辑, 在水稻分子育种领域具有巨大的应用价值。

关键词: CRISPR/Cas9; 基因编辑; 水稻; 半矮秆基因

中图分类号: Q755; S511.032

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2018)03-0219-07

农作物的驯化是一个野生植物品种不断变异加上人工选择的过程^[1]。到了近代, 人们利用物理、化学等手段诱导农作物的遗传物质发生变异, 再从诱变群体中选择符合人们某种要求的突变个体, 进而培育成新的品种。在过去几十年里, 用这种诱变育种方法获得了大量有价值的种质资源^[2]。然而, 诱变育种存在着变异的位点随机, 有益突变频率较低以及变异方向和性质难以控制等问题。随着功能

基因组学以及基因编辑技术的发展, 使得定向编辑特定靶基因, 从而快速获得具有预期性状的农作物新品种这一目标成为可能。CRISPR/Cas9 是 2013 年开始发展起来的一种基因编辑技术^[3-6], 与锌指核酸内切酶(zinc finger endonucleases, ZFNs)^[7]和转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)^[8]等基因编辑技术相比, CRISPR/Cas9 技术由于设计使用简单、灵活,

收稿日期: 2017-09-01; 修改稿收到日期: 2017-12-27。

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关计划资助项目(沪农科攻字 2014 第 7-1-2 号); 上海市浦江人才计划资助项目(16PJ1408900); 上海市种业发展计划资助项目(沪农科种字 2016 第 1-3 号)。

费用较低等优点,成为最受关注、使用最为广泛的基因编辑技术^[9]。利用 CRISPR/Cas9 技术已经在水稻^[10-12]、玉米^[13]、小麦^[11, 14]、高粱^[12]、大豆^[15-17]、番茄^[18]等作物中实现了基因定点编辑。最近的研究发现使用 CRISPR/Cas9 技术在转基因水稻的 T₀ 代植株中,就可以获得纯合的靶基因突变植株,并且编辑后的基因可以稳定遗传到下一代^[19]。

水稻 *SD1* 基因,被誉为“绿色革命基因”,编码赤霉素合成途径中一个关键的酶——赤霉素 20-氧化酶,功能缺失突变的等位基因 *sd1* 会使得水稻植株获得半矮秆的表型,并显著提高产量^[20-22]。我国水稻矮秆育种中普遍利用的籼稻矮源矮仔占、矮脚南特和低脚乌尖等品种,其矮生性均由 *sd1* 控制^[23]。例如,低脚乌尖的 *SD1* 基因发生了 382 bp 的缺失^[20]。20 世纪 50 年代至 60 年代初开始的矮秆育种主要是在籼稻品种中进行的,中国选育的代表性矮秆品种矮脚南特和矮仔占,以及随后菲律宾、韩国和美国等国相继育成的 IR8、统一和 Calrose 76 等矮秆高产品种都是籼稻品种^[23]。Asano 等^[24]通过比较半矮秆的粳稻日本晴和高秆的籼稻 Kasalath 发现,日本晴的 *SD1* 基因中存在两个 SNP 位点,导致 *SD1* 编码的赤霉素 20-氧化酶在第 100 和 340 位的两个氨基酸分别为谷氨酸和谷氨酰胺,而 Kasalath 的 *SD1* 蛋白在第 100 和 340 位氨基酸分别是甘氨酸和精氨酸,并且这两个功能性的 SNP 位点在所有粳稻品种中都存在,而几乎所有的籼稻地方品种和野生稻的 *SD1* 序列都与 Kasalath 的 *SD1* 一致。因此,人类在驯化粳稻品种的过程中,已经将突变的矮秆基因 *sd1* 筛选并固定下来。

上海市农业科学院在利用“籼粳架桥”技术^[25]创制恢复系的过程中,获得一些各方面性状优良,但株型偏高的恢复系。申繁 17 和申繁 24 从以粳稻恢复系 ZR213 为母本、CR-3 为父本的重组自交系后代中选育而来。ZR213、CR-3 以及申繁 17 和申繁 24 的株高都相对偏高。本研究以申繁 17 和申繁 24 为材料,经测序发现这两个品种的 *SD1* 基因序列和籼稻的 *SD1* 等位基因一致,用 CRISPR/Cas9 技术对这两个品种的 *SD1* 基因进行基因编辑,以期快速获得不含转基因序列的矮秆恢复系材料。

1 材料与方法

1.1 植物材料、载体和菌株

转基因受体材料为上海市农业科学院作物育种栽培研究所选育的粳稻恢复系申繁 17 和申繁 24。

本研究所用的 CRISPR/Cas9 中间载体 psgR-Cas9-Os 由中国科学院上海植物逆境生物研究中心朱健康教授提供^[10]。大肠杆菌 Top10、农杆菌 EHA105 和 pCambia1300 载体由本实验室保存。

1.2 主要试剂

限制性内切酶 *Bbs* I、T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司; *Taq* 酶、氨苄青霉素、卡那霉素、LB 培养基等其他试剂购自上海生工生物工程有限公司。

1.3 引物

本研究所用的引物序列见表 1。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.4 申繁 17 和申繁 24 的 *SD1* 基因型检测

以申繁 17 和申繁 24 的基因组 DNA 为模板,以引物 EXON1-F 和 EXON1-R 扩增 *SD1* 第 1 外显子,以引物 EXON3-F 和 EXON3-R 扩增 *SD1* 第 3 外显子,然后将 PCR 扩增产物测序,测序结果与日本晴和 Kasalath 的 *SD1* 序列进行比对。

1.5 CRISPR/Cas9 靶位点选择

使用 CRISPR Primer Designer 软件^[25]进行 CRISPR/Cas9 靶位点选择。然后通过水稻基因组 BLAST 分析,确保靶位点的特异性。

1.6 CRISPR/Cas9 表达载体的构建

根据靶位点的序列,合成两条引物 Oligo-F 和 Oligo-R,每条引物(10 μmol/L)各取 1 μL,加入 8 μL 退火缓冲液(TE+50 mmol/L NaCl),以 0.1℃/s 的速率从 95℃降到 16℃,获得靶位点接头。中间载体 psgR-Cas9-Os 用 *Bbs* I 酶切,回收载体片段,然后以 1:3 的摩尔数比与靶位点接头混合,用 T4 连接酶链接,转化大肠杆菌 Top10,用引物为 M13-F 和

表 1 本研究所用的引物

Table 1. Primers used in this research.

引物名称	引物序列(5' -3')
Primer name	Primer sequence (5' -3')
Oligo-F	TGGCGGAGGATGGAGCCCAAGATCC
Oligo-R	AAACGGATCTTGGGCTCCATCCTC
M13-F	TGTAACACGACGGCCAGT
SEQ1-F	GGGTCAATTGATTCGACCATC
SEQ1-R	GTGCTCGGACACCTGGAAGAAC
EXON1-F	GTCATTGATTCGACCATCATGTCTGTC
EXON1-R	GAATTACTTGTCTGTTGCTTCGAAGCA
EXON3-F	CTCTCCGTTGATGAATGATGATG
EXON3-R	CTTCTGTTTCGTTCCGTTTCGTTTC
HYG-F	CGTGCTTTCAGCTTCGATGTAGGA
HYG-R	GCATATGAAATCACGCCATGTAGTGT
CAS9-F	CTTCATCGAGCGGATGACCAACT
CAS9-R	AGATCGTGGTATGTGCCAGGGA

Oligo-R 进行菌落 PCR 鉴定, 并测序验证。获得的中间载体 psgR-Cas9-Os-SD1 用 *EcoR* I 和 *Hind*III 双酶切后, 回收大约 5.6 kb 长的片段, 并用 *EcoR* I 和 *Hind*III 双酶切载体 pCAMBIA1300, 回收载体片段, 将回收的片段与载体连接, 转化大肠杆菌 Top10, 同样用引物 M13-F 和 Oligo-R 进行菌落 PCR 鉴定, 并测序验证, 获得双元载体 CRISPR-SD1。

1.7 阳性转基因植株的获得及验证

获得的载体 CRISPR-SD1 用农杆菌 EHA105 介导的方法转化申繁 17 和申繁 24 的愈伤组织, 用潮霉素筛选获得 T₀ 代植株。取叶片提取基因组 DNA, 用 CRISPR-SD1 载体特异性引物 M13-F 和 Oligo-R 进行 PCR 扩增, 扩增产物的大小为 253 bp, 能扩增出目的片段的植株为转基因阳性植株。

1.8 靶位点序列的检测

取叶片提取基因组 DNA, 以引物 SEQ1-F 和 SEQ1-R 进行 PCR 扩增, 扩增产物连入 pMD18-T 载体, 转化大肠杆菌 Top10。随机挑取 10 个阳性克隆进行测序, 测序结果与野生型的 *SD1* 基因编码区序列比对, 如果 10 个克隆的序列全部是突变的, 则为纯合突变体, 如果 10 个克隆的序列既有突变的, 也有野生型的, 则为杂合子。

2 结果与分析

2.1 申繁 17 和申繁 24 的 *SD1* 基因序列的分析及靶位点设计

为了分析 ZR213、CR-3、申繁 17 和申繁 24 中 *SD1* 基因的基因型, 对其 *SD1* 基因的第 1 和第 3 外显子进行测序, 发现 ZR213、CR-3、申繁 17 和申繁 24 中 *SD1* 基因型与籼稻 Kasalath 的 *SD1* 等位基因型是一致的(图 1)。表明在“籼粳架桥”创制恢复系的过程中, 将籼稻的 *SD1* 等位基因导入到了申繁

	91	334
日本晴 Nipponbare	ATHGEFQYSE HGVDAALAR	PSAATPQHYPDFTWAD
Kasalath	ATHGEFQVSGHGVDAALAR	PSAATPRHYPDFTWAD
ZR213	ATHGEFQVSGHGVDAALAR	PSAATPRHYPDFTWAD
CR3	ATHGEFQVSGHGVDAALAR	PSAATPRHYPDFTWAD
申繁 17 Shenfan 17	ATHGEFQVSGHGVDAALAR	PSAATPRHYPDFTWAD
申繁 24 Shenfan 24	ATHGEFQVSGHGVDAALAR	PSAATPRHYPDFTWAD

图 1 水稻 *SD1* 氨基酸序列的比对

Fig. 1. Comparison of rice *SD1* amino acid sequence.

17 和申繁 24 中, 导致这两个品种株高过高。

为了构建编辑 *SD1* 基因的 CRISPR/Cas9 表达载体, 将 *SD1* 基因 cDNA 序列输入 CRISPR Primer Designer 软件, 找到了 7 个 CRISPR/Cas9 靶位点(表 2), 用 BLAST 分析这些靶位点序列在水稻基因组中的特异性, 最后选用靶位点 1(Target 1)作为 *SD1* 基因编辑的靶位点。

2.2 CRISPR/Cas9 基因编辑载体构建

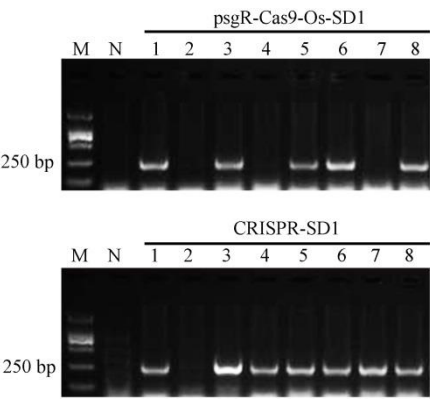
根据靶位点的序列, 合成两条引物 Oligo-F 和 Oligo-R(表 1)。将 Oligo-F 和 Oligo-R 混合复性后获得的靶位点片段与用 *Bbs* I 酶切后的 psgR-Cas9-Os 载体连接。连接产物转化大肠杆菌后进行菌落 PCR 鉴定, 鉴定所用引物为 M13-F 和 Oligo-R, 在阳性克隆中可以鉴定出 253 bp 的条带。共鉴定了 8 个克隆, 其中有 5 个克隆正确(图 2), 选取 1 号克隆进行测序验证, 并将最终获得的载体命名为 psgR-Cas9-Os-SD1。

将载体 psgR-Cas9-Os-SD1 用 *EcoR* I 和 *Hind*III 双酶切, 回收 5.6 kb 的片段, 然后与经 *EcoR* I 和 *Hind*III 双酶切回收的 pCAMBIA1300 载体连接, 转化大肠杆菌后, 再次用引物 M13-F 和 Oligo-R 进行菌落 PCR 鉴定, 共鉴定了 8 个克隆, 其中 7 个克隆为阳性克隆(图 2), 最后选取 1 号克隆进行测序验证正确, 将获得的 CRISPR/Cas9 基因编辑载体命名为 CRISPR-SD1。

表 2 水稻 *SD1* 基因中的 CRISPR/Cas9 靶位点

Table 2. Putative CRISPR/Cas9 target sites in rice *SD1* gene.

靶位点编号	靶位点序列	候选识别位点的毗邻基序	位置	DNA 链
Target number	Sequence of target site	Protospacer adjacent motif	Site / bp	DNA strand
1	GAGGATGGAGCCCAAGATCC	CGG	108	+
2	AGATCCCGGAGCCATTCGTG	TGG	122	+
3	GAGCCATTCGTGTGGCCGAA	CGG	130	+
4	GGATCTTGGGCTCCATCCTC	AGG	107	-
5	ACGAATGGCTCCGGGATCTT	GGG	120	-
6	CACGAATGGCTCCGGGATCT	TGG	121	-
7	TTCGGCCACACGAATGGCTC	CGG	129	-



M—D2000 标记; N—阴性对照; 1~8—克隆。
M, D2000 marker; N, Negative control; 1 to 8, Clones.
图 2 阳性克隆的菌落 PCR 筛选
Fig. 2. Screening positive clone by colony PCR.

2.3 农杆菌介导的遗传转化及转基因植株靶位点突变类型分析

CRISPR-SD1 载体用农杆菌介导的方法转化水稻恢复系申繁 17 和申繁 24 的愈伤组织, 用潮霉素筛选获得转基因苗。申繁 17 和申繁 24 分别获得了 10 株和 18 株 T₀ 代转基因苗。用载体特异的引物 M13-F 和 Oligo-R 进行 PCR 鉴定, 在 10 株申繁 17 的转基因苗中, 有 3 株阳性苗, 而在 18 株申繁 24 的转基因苗中, 有 5 株阳性苗。

为了分析这 8 株阳性转基因苗中的 SDI 靶位点序列是否已经被编辑, 用引物 SEQ1-F 和 SEQ1-R 在转基因苗中扩增包含 SDI 基因靶位点的 DNA 片段, 进行测序。结果发现在这 8 株转基因苗中, 靶位点序列都发生了不同类型的突变。其中有 4 个株系插入 1 个碱基, 还有另外 4 个株系发生了不同数

目碱基的缺失突变(图 3)。
在 8 个突变株系中除了繁 17-1 和繁 24-8 两个株系的突变分别导致缺失 5 和 23 个氨基酸外, 其他的突变株系的突变都导致了移码突变使得翻译提前终止。在 T₁ 突变体中发现繁 17-1 和繁 24-8 的株高与其野生型相比没有显著的变化。而其他突变株系的株高与野生型相比显著降低, 且同一个品种不同突变株系之间株高的差异不显著。

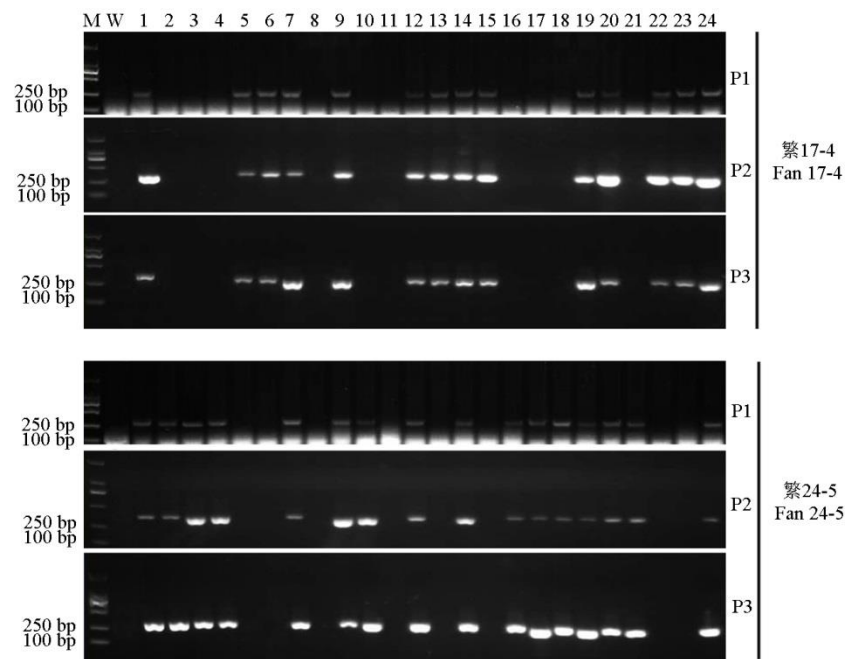
2.4 不含转基因的矮秆突变体的获得

为了获得不含转基因(T-DNA)序列的矮秆申繁 17 和申繁 14 株系, 选取 2 个纯合的转基因株系繁 17-4 和繁 24-5 开展进一步研究。这 2 个转基因株系分别种植 24 株 T₁ 代植株, 在苗期分别取单株叶片, 提取 DNA, 用转基因载体的特异性引物 M13-F 和 Oligo-R, 以及潮霉素和 Cas9 基因特异的引物进行 PCR 鉴定, 在繁 17-4 和繁 24-5 的 T₁ 代群体中, 分别鉴定出了 10 株和 8 株不含转基因载体序列的单株(图 4)。同时, 对不含转基因载体序列单株的靶基因位点进行测序, 结果显示 T₁ 代中的靶位点突变和上一代是一致的, 说明用 CRISPR/Cas9 基因编辑获得的突变是可以稳定遗传的。在此, 分别将获得的不含转基因载体片段的繁 17-4 和繁 24-5 株系命名为矮繁 17 和矮繁 24。在 T₂ 代, 测量了矮繁 17 和矮繁 24 株高、有效穗数、穗长、千粒重、每穗粒数和结实率等农艺性状, 发现与它们各自的野生型申繁 17 和申繁 24 相比, 除了株高出现显著下降外(下降约 25%), 而其他农艺性状均没有出现显著的改变(图 5)。

株系 Line		突变类型 Mutant type	是否纯合 Homozygous or not
WT	CGGTGTGCGACCTGAGGATGGAGCCCAAGA TCCCGGAGCCATTCGTGTGGCCGAACGGC		
繁17-1	CGGTGTGCGACCTGAG-----CCC GGAGCCATTCGTGTGGCCGAACGGC	d15	是 Yes
繁17-2	CGGTGTGCGACCTGAGGATGGAGCCCAAGAA TCCCGGAGCCATTCGTGTGGCCGAACGGC	i1	否 No
繁17-4	CGGTGTGCGACCTGAGGATGGA-----TGGCCGAACGGC	d25	是 Yes
繁24-2	CGGTGTGCGACCTGAGGATGGAGCCCAAGAG TCCCGGAGCCATTCGTGTGGCCGAACGGC	i1	否 No
繁24-5	CGGTGTGCGACCTGAGGATGGAGCCCAAGAA TCCCGGAGCCATTCGTGTGGCCGAACGGC	i1	是 Yes
繁24-8	CGGTGTGCGACCTGAGGATGGA-----d69	d69	是 Yes
繁24-11	CGGTGTGCGACCTGAGGATGGAGCCC---GA TCCCGGAGCCATTCGTGTGGCCGAACGGC	d2	否 No
繁24-16	CGGTGTGCGACCTGAGGATGGAGCCCAAGATT TCCCGGAGCCATTCGTGTGGCCGAACGGC	i1	是 Yes

灰色字体表示靶序列, 下划线表示候选识别位点的毗邻基序(PAM)序列, 方框表示插入碱基, 横线表示缺失碱基, 箭头表示 Cas9 剪切位点。
The grey letters indicated the target sequence. The underline indicated protospacer adjacent motif(PAM) sequence. The box represented the insert base. The transverse line indicated deletion sequence. Arrow indicated the Cas9 cleavage site.

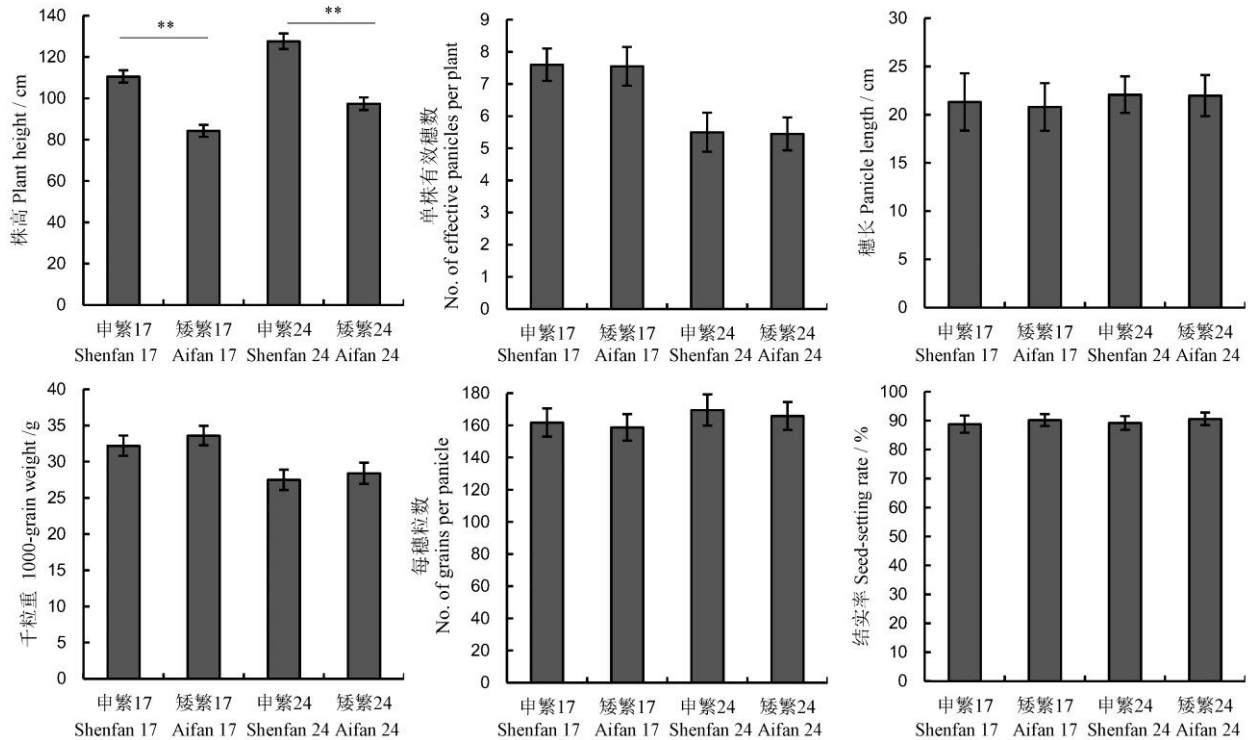
图 3 T₀ 代转基因株系中 SDI 基因突变类型的分析
Fig. 3. Mutation type in SDI gene of T₀ transgenic lines.



M—D2000 标记; W—野生型; 1~24— T_1 转基因植株; P1—引物 M13F 和 Oligo-R; P2—引物 HYG-F 和 HYG-R; P3—引物 CAS9-F 和 CAS9-R。M, D2000 marker, W, Wild type; Lanes 1-24, T_1 transgenic plants; P1, Primer M13F and Oligo-R; P2, Primer HYG-F and HYG-R; P3, Primer Cas9-F and Cas9-R.

图 4. T_1 代中不含转基因载体序列植株的 PCR 筛选

Fig. 4. PCR screening of transgenic-free plants in T_1 generation.



**表示差异极显著($P < 0.01$)。

**Significant at 0.01 level.

图 5 野生型与 T_2 代 *sd1* 突变体的农艺性状($n=20$)

Fig. 5. Agronomic traits of wild type and T_2 -generation *sd1* mutants ($n=20$).

3 讨论

水稻矮秆品种的选育和应用是水稻育种领域的一个重大的突破^[23],过去一般利用与矮源品种进行杂交,并结合表型或分子标记辅助选择的方法进行矮秆品种选育,费时费力。现代分子生物技术育种的兴起为矮秆育种提供了一些比较快捷高效的手段,可以直接抑制或者敲除矮秆基因,而不改变基因组中其他基因的序列和表达水平,从而可以获得预期的株高表型,而对其他的性状不会有影响。Qiao等^[26]利用RNAi技术抑制半矮秆基因*SD1*的表达,获得了半矮秆的水稻品种。然而RNAi技术本身存在一些缺点,限制了RNAi技术在作物分子育种领域的应用。比如RNAi技术常常存在脱靶的问题,一些和靶基因序列相近的基因表达也会受到抑制;RNAi技术通过降解靶基因的mRNA进行基因干涉,降低其表达水平,而非完全敲除靶基因的功能^[27]。基因编辑技术,特别是CRISPR/Cas9技术的发展,使得RNAi技术在功能基因组学和作物分子育种领域的应用正迅速地取代。

Zhang等^[19]发现利用CRISPR/Cas9技术对水稻进行基因编辑,在T₀代转基因植株中即可获得纯合的基因突变植株,并且这些突变可以稳定遗传给下一代。由于转基因过程中,如果转基因是单拷贝插入的情况下,根据孟德尔遗传定律,在T₁转基因的群体中,就会出现1/4的植株不含转基因序列。因此,从理论上讲用CRISPR/Cas9技术,在第2代就可以获得不含转基因的突变体。

本研究利用CRISPR/Cas9技术对粳稻恢复系申繁17和申繁24进行*SD1*基因编辑,发现在获得的8个转基因株系中,有5个株系在T₀代就获得了纯合的*sd1*突变。选取其中2个纯合的转基因株系繁17-4和繁24-5分别种植成T₁群体,筛选出了不含转基因序列的个体,并且这些个体中*SD1*的突变方式与T₀一致,说明CRISPR/Cas9技术编辑后的突变位点可以稳定地遗传给下一代。株高测定结果表明,CRISPR/Cas9技术编辑后获得的半矮秆品种的株高与其野生型相比大约降低25%。本研究结果表明CRISPR/Cas9技术是一种非常有效的水稻矮秆育种工具。

参考文献:

[1] Doebley J F, Gaut B S, Smith B D. The molecular genetics of crop domestication. *Cell*, 2006, 127(7): 1309-1321.

- [2] Liu Q, Xu X, Ren X, Fu H, Wu D, Shu Q. Generation and characterization of low phytic acid germplasm in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 2007, 114(5): 803-814.
- [3] Cho S W, Kim S, Kim J M, Kim J S. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 230-232.
- [4] Cong L, Ran F A, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu P D, Wu X, Jiang W, Marraffini L A, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [5] Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife*, 2013, 2: e00471.
- [6] Mali P, Aach J, Stranges P B, Esvelt K M, Moosburner M, Kosuri S, Yang L, Church G M. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 833-838.
- [7] Mani M, Kandavelou K, Dy F J, Durai S, Chandrasegaran S. Design, engineering, and characterization of zinc finger nucleases. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 335(2): 447-457.
- [8] Bogdanove A J, Voytas D F. TAL effectors: Customizable proteins for DNA targeting. *Science*, 2011, 333(6051): 1843-1846.
- [9] Samanta M K, Dey A, Gayen S. CRISPR/Cas9: An advanced tool for editing plant genomes. *Transgenic Res*, 2016, 25(5): 561-573.
- [10] Mao Y, Zhang H, Xu N, Zhang B, Gou F, Zhu J K. Application of the CRISPR-Cas system for efficient genome engineering in plants. *Mol Plant*, 2013, 6(6): 2008-2011.
- [11] Shan Q, Wang Y, Li J, Zhang Y, Chen K, Liang Z, Zhang K, Liu J, Xi J J, Qiu J L, Gao C. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 686-688.
- [12] Jiang W Z, Zhou H B, Bi H H, Fromm M, Yang B, Weeks D P. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(20): e188.
- [13] Liang Z, Zhang K, Chen K, Gao C. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *J Genet Genom*, 2014, 41(2): 63-68.
- [14] Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, Qiu J L. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(9): 947-951.

- [15] Jacobs T B, LaFayette P R, Schmitz R J, Parrott W A. Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. *BMC Biotechnol*, 2015, 15: 16.
- [16] Li Z, Liu Z B, Xing A, Moon B P, Koellhoffer J P, Huang L, Ward R T, Clifton E, Falco S C, Cigan A M. Cas9-Guide RNA directed genome editing in soybean. *Plant Physiol*, 2015, 169(2): 960-970.
- [17] Sun X, Hu Z, Chen R, Jiang Q, Song G, Zhang H, Xi Y. Targeted mutagenesis in soybean using the CRISPR-Cas9 system. *Sci Rep*, 2015, 5: 10342.
- [18] Brooks C, Nekrasov V, Lippman Z B, Van Eck J. Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. *Plant Physiol*, 2014, 166(3): 1292-1297.
- [19] Zhang H, Zhang J, Wei P, Zhang B, Gou F, Feng Z, Mao Y, Yang L, Zhang H, Xu N, Zhu J K. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnol J*, 2014, 12(6): 797-807.
- [20] Monna L, Kitazawa N, Yoshino R, Suzuki J, Masuda H, Maehara Y, Tanji M, Sato M, Nasu S, Minobe Y. Positional cloning of rice semidwarfing gene, *sd-1*: Rice "Green Revolution Gene" encodes a mutant enzyme involved in gibberellin synthesis. *DNA Res*, 2002, 9(1): 11-17.
- [21] Spielmeier W, Ellis M H, Chandler P M. Semidwarf (*sd-1*), "green revolution" rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(13): 9043-9048.
- [22] Sasaki A, Ashikari M, Ueguchi-Tanaka M, Itoh H, Nishimura A, Swapan D, Ishiyama K, Saito T, Kobayashi M, Khush G S, Kitano H, Matsuoka M. Green revolution: A mutant gibberellin-synthesis gene in rice. *Nature*, 2002, 416(6882): 701-702.
- [23] 谷福林, 翟虎渠, 万建民, 张红生. 水稻矮秆性状研究及矮源育种利用. *江苏农业学报*, 2003, 19(1): 48-54.
- Gu F L, Zhai H Q, Wan L M, Zhang H S. Study on Inheritance of dwarf character and its utilization in rice (*Oryza sativa* L.) breeding. *Jiangsu J Agric Sci*, 2003, 19(1): 48-54. (in Chinese with English abstract)
- [24] Asano K, Yamasaki M, Takuno S, Miura K, Katagiri S, Ito T, Doi K, Wu J, Ebana K, Matsumoto T, Innan H, Kitano H, Ashikari M, Matsuoka M. Artificial selection for a green revolution gene during japonica rice domestication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(27): 11034-11039.
- [25] Yan M, Zhou S R, Xue H W. CRISPR Primer Designer: Design primers for knockout and chromosome imaging CRISPR-Cas system. *J Integr Plant Biol*, 2015, 57(7): 613-617.
- [26] Qiao F, Zhao K J. The Influence of RNAi targeting of *OsGA20ox2* gene on plant height in rice. *Plant Mol Biol Rep*, 2011, 29(4): 952.
- [27] Harrison M M, Jenkins B V, O'Connor-Giles K M, Wildonger J. A CRISPR view of development. *Genes Dev*, 2014, 28(17): 1859-1872.