

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2016.01184

基于 CRISPR/Cas9 技术的水稻千粒重基因 *tgw6* 突变体的创建

王加峰 郑才敏 刘维 罗文龙 王慧 陈志强* 郭涛*

华南农业大学国家植物航天育种工程技术研究中心, 广东广州 510642

摘要: 利用 CRISPR/Cas9 技术对调控水稻产量千粒重基因 *TGW6* 定点编辑, 获得了一套有重要育种价值的 *tgw6* 突变体。设计了分别由 U3、U6a 和 U6b 启动子驱动、长 20 bp 的 guide RNA (gRNA) 靶点以靶向编辑 *TGW6* 基因的外显子, 首先将这 3 个靶点一起组装到 pYL-CRISPR/Cas9-MT(I) 载体上, 然后利用农杆菌介导侵染水稻材料 H447 (R819/玉珍香//R819 的 BC₃F₆)。提取 T₀ 代转基因植株的基因组 DNA 并对编辑位点附近的 DNA 片段进行 PCR 检测及测序分析。结果表明, T₀ 代材料中 *tgw6* 的突变频率高达 90%, 其中纯合缺失突变率约占 51%。对 T₁ 代纯合缺失突变体的千粒重性状的调查分析结果表明, 部分 *tgw6* 的缺失突变能显著提高千粒重(大于 5%)。不同类型 *tgw6* 突变体的成功创建不仅丰富了 *tgw6* 的变异类型, 为水稻的高产稳产奠定了重要的材料基础, 还证实了 CRISPR/Cas9 技术在水稻基因工程育种中高效、易操作的特点, 具有重要的理论与实践意义。

关键词: 水稻; 基因编辑; CRISPR/Cas9; *TGW6*; 千粒重

Construction of *tgw6* Mutants in Rice Based on CRISPR/Cas9 Technology

WANG Jia-Feng, ZHENG Cai-Min, LIU Wei, LUO Wen-Long, WANG Hui, CHEN Zhi-Qiang*, and GUO Tao*

National Engineering Research Center of Plant Space Breeding, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract: A set of *tgw6* (*Thousand grain weight 6*) mutants were constructed using CRISPR/Cas9 technology in this study. Three sites of 20 nt guide RNA (gRNA) targeted to the exon of *TGW6* were designed and transcribed from the U3, U6a and U6b promoters, respectively. The three target sites of gRNA were then ligated to the vector pYL-CRISPR/Cas9-MT(I) based on golden gate cloning strategy. The recombinant plasmid was transferred to a rice cultivar, H447 (R819/Yuzhenxiang//R819 BC₃F₆) by *Agrobacterium*-mediated transformation. Sequencing for the genomic DNA of *TGW6* locus in T₀ rice showed the mutagenesis frequency for *TGW6* was more than 90%, including 51% of the homozygous deletion mutations. Further analysis for the T₁ mutants showed almost all the homozygous deletion mutants improved the thousand grain weight significantly (more than 5%). The successful *tgw6* editing not only provided a series of *tgw6* mutants for high and stable yield of rice but also proved that CRISPR/Cas9 is a facile and powerful means of rice genetic engineering for scientific and agricultural applications, which has important theoretical and practical significance for rice breeding.

Keywords: Rice; Genome editing; CRISPR/Cas9; *TGW6*; Thousand grain weight

水稻(*Oryza sativa* L.)是世界上重要的粮食作物之一。由于人口的不断增长, 人们对粮食的需求也越来越大, 但水稻的单位面积产量一直没有太大提

升, 而且水稻的种植面积也在持续下降, 严重威胁着我国的粮食安全。要解决这一问题, 必须借助新技术和新的遗传改良策略。粒重是水稻产量构成的

本研究由广东省公益研究与能力建设转型项目(20150209), 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2011AA10A101)和国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-01-12)资助。

This study was supported by Public Welfare Research and Capacity Building Transformation Funds in Guangdong (20150209), the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (2011AA10A101) and Special Funds for the Construction of Modern Agricultural Industry Technology System (CARS-01-12).

* 通讯作者(corresponding authors): 郭涛, E-mail: guoquot@scau.edu.cn, Tel: 020-38604903; 陈志强, E-mail: chenlin@scau.edu.cn, Tel: 020-85283237

第一作者联系方式: E-mail: bcjfwang@gmail.com, Tel: 020-38604903

Received(收稿日期): 2015-12-17; Accepted(接受日期): 2016-05-09; Published online(网络出版日期): 2016-05-23.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20160523.0853.008.html>

三因子之一, 主要决定于籽粒胚乳中淀粉的合成与积累和籽粒的大小, 表现为典型的数量性状, 适当提高千粒重, 有利于产量的提高^[1]。截至目前, 已经克隆的千粒重相关的基因有: *qSW5/GW5*^[2-3]、*TGW6*^[4]、*GS3*^[5]、*GS5*^[6]、*GW2*^[7]、*GW8*^[8]、*qGL3/qGL3-1/GL3.1*^[9-11]等。其中, *TGW6* (*Thousand Grain Weight 6*)是调控水稻千粒重性状的最重要的基因之一。*TGW6*基因编码吲哚乙酸-葡糖糖水解酶, 其功能缺失突变(313 bp)会引起胚乳中吲哚乙酸含量下降, 进而细胞数量增加、粒长和粒重增加, 使水稻抽穗前籽粒的碳水化合物积累, 使日本晴产量增加15%且不影响稻米品质^[4]。

CRISPR/Cas9系统是近几年发展的一种准确、便捷、高效率的生物基因组编辑方法。该系统仅需要短的gRNA和核酸酶(Cas9)就可以使特定的生物靶基因定点突变, 为生物定点编辑技术的发展注入了新的活力^[12-14]。目前, CRISPR/Cas9系统不但在酵母、果蝇、鼠、人等生物中, 而且已成功在拟南芥、烟草、甜橙、水稻、小麦、高粱、玉米以及苔藓植物地钱等植物中实现了定点基因组编辑^[15-19], 但对水稻育种中有重要价值的产量、品质、育性等关键基因的定向编辑研究鲜有报道, 更缺乏对相关突变体的育种价值评价。本研究利用CRISPR/Cas9

技术定点编辑了调控水稻千粒重的*TGW6*基因, 获得了一套具有重要应用价值的水稻*tgw6*突变体新种质, 为进一步提高水稻产量奠定了重要的材料基础。

1 材料与方法

1.1 水稻材料、CRISPR/Cas9 及 gRNA 载体

水稻材料H447为籼稻恢复系R819与优质米常规籼稻品种玉针香杂交后, 以R819为轮回亲本回交、自交得到的BC₃F₆代品系。该品系具有抗稻瘟病、株型紧凑、米质优等特点。Cas9载体pYLCRISPR/Cas9-MT(I)及gRNA载体(pYL-U3/U6a-b-gRNAs)(图1)由华南农业大学刘耀光教授馈赠。

1.2 gRNA 靶点选择及其寡核苷酸链引物的设计

根据调控水稻*TGW6*的外显子序列(GenBank登录号为AB513135.1), 设计*TGW6*的gRNA。按A/G(N)20NGG序列设计20 nt的寡核苷酸gRNA核心序列, 在水稻基因组数据库中比对设计好的gRNA序列以排除非特异性的靶切位点。寡核苷酸序列见表1。同时设计CRISPR鉴定引物Cas9-TGW6testF: 5'-CAACCAAACCAAAGCCTGC-3'和Cas9-TGW6testR: 5'-CCAATGCCTCATCAACTTAC-3'。所有寡核苷酸链引物均由Thermo Fisher Scientific公司合成。

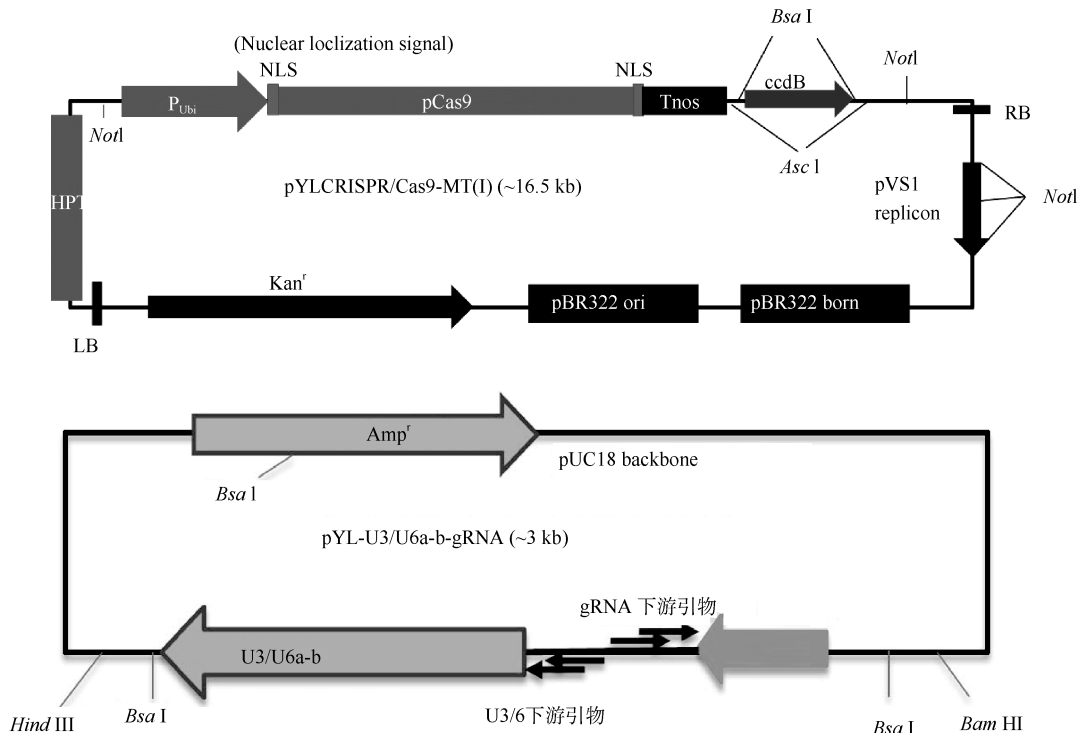


图 1 YLCRISPR/Cas9-MT(I)及 pYL-U3/U6a-b-gRNA 质粒图
Fig. 1 Maps of YLCRISPR/Cas9-MT(I) and pYL-U3/U6a-b-gRNA vectors

表1 gRNA靶点以及寡核苷酸序列
Table 1 Target sites of the gRNA and the oligonucleotide sequences

引导 RNA gRNA	寡核苷酸序列 Oligonucleotide sequence (5'-3')
TGW6U3-T1-F	ggcaGCCAGCATCTGGACCTCGG
TGW6U3-T1-R	aaacCCGAGGTCCAGATGCTGGC
TGW6U6a-T2-F	gccGGCTACAGCCATGAGAAGCA
TGW6U6a-T2-R	aaacTGCTTCTCATGGCTGTAGC
TGW6U6b-T3-F	gttgAGGCAAGCGGCGACCGCGG
TGW6U6b-T3-R	aaacCCGCGTGCCTGCTGCT

1.3 三靶点 pYLCRISPR/Cas9-tgw6-gRNA 载体的构建

参照Ma等^[18]的方法略作修改。(1)制备双链接头:分别取等量每个靶点的1对gRNA寡核苷酸链的上游引物与下游引物混合(终浓度 $1 \mu\text{mol L}^{-1}$), 95 °C处理30 s, 然后移至室温冷却完成退火;(2)酶切:取pYL-U3-gRNA、pYL-U6a-gRNA及pYL-U6b-gRNA质粒各1 μg , 制备20 μL 反应体系, 用5~10 U *Bsa* I (NEB)酶切20 min, 70 °C处理10 min使酶失活;(3)连接和PCR扩增:分别将酶切过的pYL-U3-gRNA、pYL-U6a-gRNA及pYL-U6b-gRNA质粒与各自所对应双接头连接, 然后分别利用引物B1'/B2 (B1': 5'-TTCAGAGGCTCTCTCTCGCACTGGAATCGGCAGCAAAGG-3'; B2: 5'-AGCGTGGGTCTCGTCAGGTCCATCCACTCCAAGCTC-3')、B2'/B3 (B2': 5'-TTCAGAGGCTCTCTGACACTGGAATCGGCAGCAAAGG-3'; B3: 5'-AGCGTG GTCTCGTCTTGGTCATCCACTCCAAGCTC-3')、B3'/BL (B3': 5'-TTCA GAGGTCTCTAAGACACTGGAA TCGGCAGCAAA GG-3'; BL: 5'-AGCGTGGGTCTCGACCGGTCCATCCACTCCAAGCTC-3')对gDNA (gRNA对应的DNA序列)进行扩增, 先95 °C 1 min, 然后按95 °C 15 s、60 °C 15 s和68 °C 30 s进行30个循环的反应;(4)产物纯化、酶切和连接:将所有靶点gDNA PCR产物回收混合后用20 U *Bsa* I在37 °C酶切30 min, 然后75 °C处理5 min;将酶切片纯化后与*Bsa* I酶切回收的pYLCRISPR/Cas9-MT(I)载体片段利用T4 DNA ligase (NEB) 20 °C连接2 h;(5)转化及质粒测序:连接产物转化DH5 α 感受态细胞后, 挑取单克隆接种培养, 抽提质粒后利用*Asc* I进行酶切鉴定, 并挑取酶切(*Asc* I)验证正确的克隆送Thermo Fisher Scientific公司测序。

1.4 农杆菌介导水稻愈伤遗传转化

参照Hiei等^[20]的方法, 将构建好的三靶点

pYLCRISPR/Cas9-tgw6-gRNA载体通过电击转化到农杆菌EHA105中, 将PCR检测呈阳性的克隆用于水稻愈伤组织转化。

1.5 水稻基因组 DNA 提取、突变体的 PCR 检测及测序

采用CTAB法提取转基因水稻基因组DNA^[21]。PCR扩增体系含2.5 μL 10 \times buffer for KOD-Plus、0.5 μL KOD plus聚合酶($5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$)、1 μL 25 mmol L^{-1} MgSO_4 、2.5 μL 2 mmol L^{-1} dNTPs、各0.5 μL 引物($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) (Cas9-TGW6testF与Cas9-TGW6testR)、0.5 μL 模板DNA, 以超纯水补至25 μL 。反应条件为94 °C 3 min; 32个循环的94 °C 30 s、55 °C 30 s和68 °C 60 s的反应, 最后68 °C延伸5 min。扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳(电泳缓冲液1 \times TAE), BIORAD凝胶成像系统观察、照相, 并送Thermo Fisher Scientific公司测序, 每个样品测序2次。

1.6 无 T-DNA 元件 *tgw6* 突变体的鉴定及其千粒重性状的调查分析

将PCR测序鉴定为突变的T₀代转基因单株自交结实后得到T₁代种子。T₁代种子播种成苗后提取叶片基因组DNA进行PCR检测, 对经鉴定*tgw6*发生了纯合突变的个体进一步利用引物hptF: 5'-AAGCTGCATCAT CGAAATTGC-3'与hptR: 5'-AAGAATCTC GTGCTTTCAGCTTCG-3'进行PCR检测以获得不含T-DNA成分的纯合*tgw6*突变株系。

采用随机区组设计种植不含T-DNA成分的纯合*tgw6*突变株系及H447, 2个重复, 各小区中每个株系种植6行, 每行6株。株行距为20 cm \times 20 cm, 单本栽植。按大田常规栽培要求实施田间管理(水、肥、病虫害防治等)。收获成熟种子烘干后从中随机数取饱满、无病种子1000粒, 称重(g), 2个重复。保证重复间的差数与平均数之比<5%。采用SPSS13.0计算平均值和标准误, 采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)及Duncan法多重比较, 差异显著性水平为 $P = 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 gRNA靶点以及寡核苷酸序列设计

为利用CRISPR/Cas9技术获得*tgw6*的突变体, 根据CRISPR/Cas9技术的原理, 利用载体pYLCRISPR/Cas9-MT(I)及pYL-U3/U6a-b-gRNA构建基因编辑载体。设计了3个靶点以定点编辑千粒重基因*TGW6* (表1), 分别从起始密码子附近开始设计

这三个靶点(图2-A), 以保证可以彻底破坏 *TGW6* 的功能, 然后利用Golden gate的克隆方法^[18]将这3个

靶点gRNA组装到pYLCRISPR/Cas9-MT(I)载体上(图2-B)。

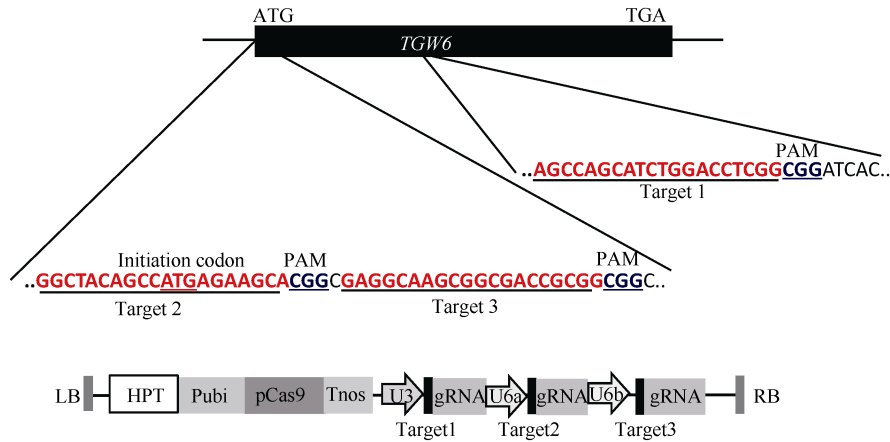


图 2 gRNA 靶位点及 CRISPR/Cas9-gRNA 的组装示意图

Fig. 2 Target sites of the gRNA and cloning of gRNA cassette into the CRISPR/Cas9 vector

A: 3 个靶点分别在 *TGW6* 基因内的位置; B: 3 个靶点组装到 pYLCRISPR/Cas9-MT(I)载体而成的 T-DNA 元件。

A: position of the three targets in the *TGW6* gene locus; B: T-DNA fragment assembled with the three targets and the pYLCRISPR/Cas9-MT(I) vector.

2.2 pYLCRISPR/Cas9-tgw6-gRNA 载体的鉴定

将构建的三靶点pYLCRISPR/Cas9-tgw6-gRNA载体利用 *Asc*I 酶切, 如图3所示, 3个靶点gDNA序列能被同时切出(1.8 kb左右), 表明三靶点gRNA元件顺利插入到pYLCRISPR/Cas9-MT(I)载体上。为进一步确定靶位点的准确性, 利用引物U3s (5'-GCATG GATCTTGGAGGAATCAGA-3')、U6as (5'-GGCTA TCGAGATG CCATACA-3')及U6bs (5'-AGAGAAGC CTAGTGTGCTCT-3')分别对各个靶点(Target 1~3)测序分析。结果表明(图4), 通过 *Bsa*I 位点组装的3个靶点序列都与所设计靶点序列(表1)一致, 因此所构建的pYLCRISPR/ Cas9-tgw6-gRNA载体适宜于下一步农杆菌介导的水稻遗传转化。

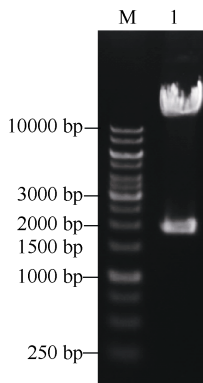


图 3 *Asc*I 酶切鉴定 pYLCRISPR/Cas9-tgw6-gRNA 载体

Fig. 3 Identification of the pYLCRISPR/Cas9-tgw6-gRNA plasmid digested with *Asc*I

M: 1 kb DNA ladder marker; 1: pYLCRISPR/Cas9-tgw6-gRNA.

2.3 *tgw6* 突变体的鉴定

采用CTAB法提取 T_0 代再生水稻植株的叶片, 对潮霉素基因检测为阳性的植株利用引物Cas9-TGW6testF及Cas9-TGW6testR对 *tgw6* 编辑位点上下游200 bp左右区域DNA片段进行PCR扩增。电泳结果(图5-A)表明, 扩增产物中多为 *tgw6* 片段缺失纯合体, 也有部分双等位杂合突变体存在。进一步对扩增产物的测序分析表明(图5-B), *tgw6* 突变频率高达90%, 其中51%为片段缺失纯合体(缺失片段长度均在100 bp以上), 39.5%是双等位杂合突变体。

2.4 无 T-DNA 元件 *tgw6* 突变体的鉴定及其千粒重性状分析

为进一步获得无 T-DNA 插入元件的 *tgw6* 突变体, 将 T_1 代 *tgw6* 缺失纯合突变的种子播种成苗, 苗期利用引物 hphF 与 hphR 对潮霉素基因进行PCR检测。结果表明, T_1 代转基因苗中潮霉素基因的分符合孟德尔定律(数据未列出), 图6中列出了对部分 *tgw6* 突变体潮霉素基因 PCR 检测的结果, 以进一步对这些材料进行千粒重性状的分析。对 T_2 代种子千粒重调查结果表明(表2), 所分析的5种类型的纯合缺失突变都显著提高了水稻的千粒重(大于5%)。

3 讨论

CRISPR/Cas9是一种新兴的基因定点编辑技术, 具有较高的特异性和编辑效率。相对于锌指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFNs)^[22-24]及 TALE 核酸酶

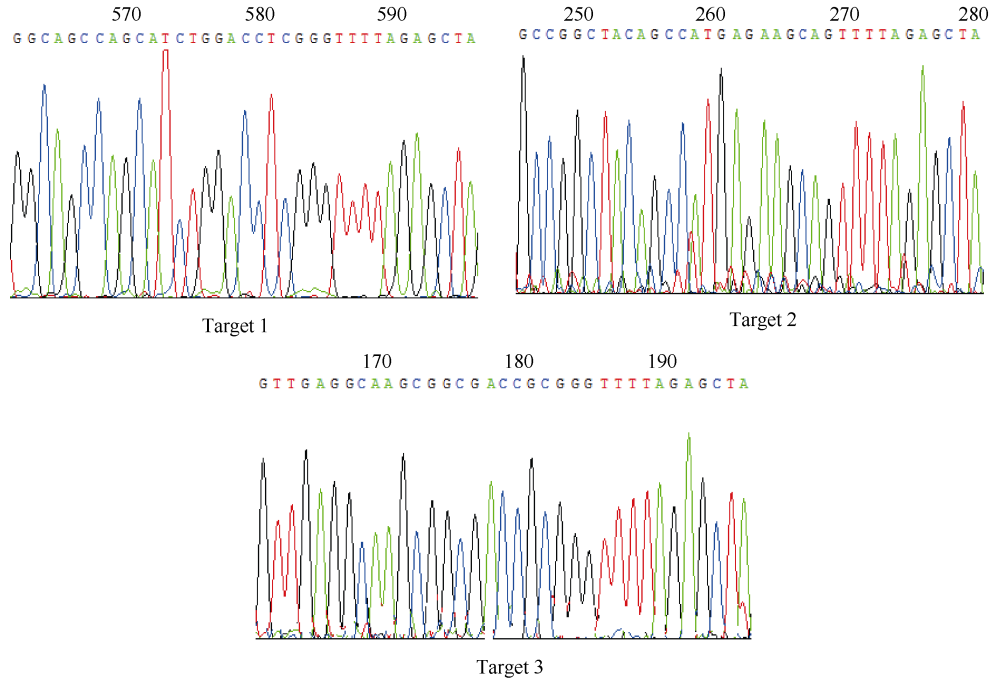


图 4 3 个靶点序列的测序结果
Fig. 4 Sequencing results for the three target sequences

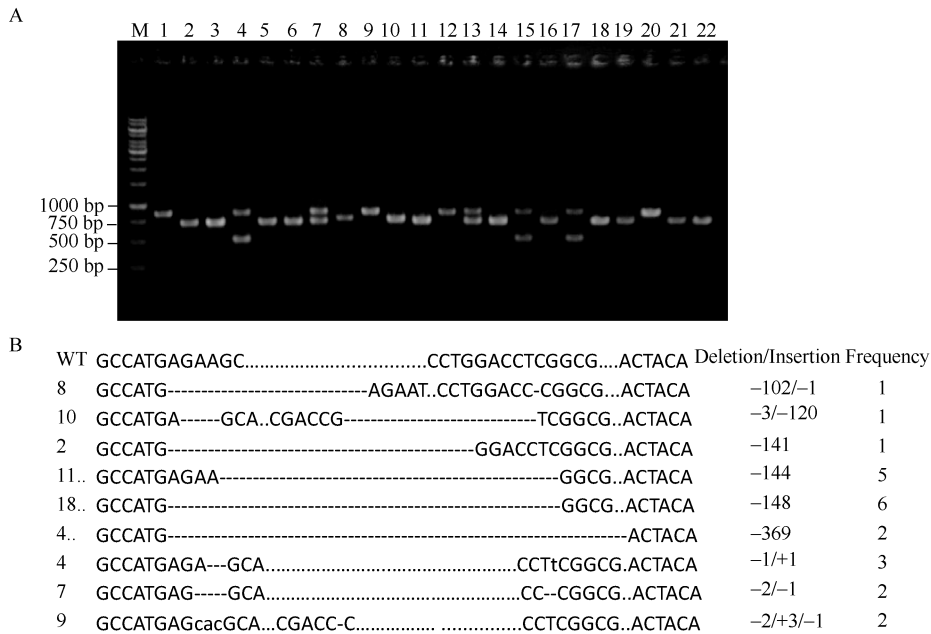


图 5 *tgw6* 突变体的 PCR 检测及其与野生型序列比对分析

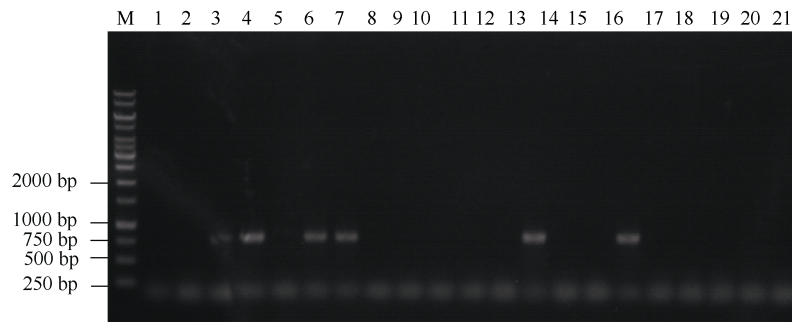
Fig. 5 PCR identification and sequence alignment of *tgw6* mutants compared to the WT line

A: T_0 代(1~22)水稻 *tgw6* 编辑位点附近 DNA 片段的 PCR 检测结果, 野生型(WT)为 H447, 水稻扩增长度为 953 bp; B: 对应于 A 的 PCR 产物的测得序列与野生型(WT)的序列比对结果。“次数”指 A 电泳图对应的突变体中同一类型编辑位点突变个体出现的频率。

A: PCR identification results for the DNA fragments near the edited locus of the *tgw6* T_0 mutants (1–22) and WT line (H447); B: sequence alignment of *tgw6* mutants compared to the WT line. “Frequency” refers to the frequency of the same edited mutation among the corresponding mutants in the electrophoresis map of A.

(transcription activator like effector nucleases, TALENs)^[25-27] 2种基因编辑技术, CRISPR/Cas9技术构建简便灵活, 仅需要一个gRNA及一个核酸酶

(Cas9)即可实现对靶基因DNA序列的剪切。目前的研究主要集中于CRISPR/Cas9技术的开发及特定基因敲除。

图 6 部分 *tgw6* 突变体潮霉素基因的 PCR 检测Fig. 6 PCR identification for *hph* gene of parts of *tgw6* mutants

1: WT; 2~5: 缺失 103 bp 的突变体; 6~9: 缺失 123 bp 的突变体; 10~13: 缺失 141 bp 的突变体; 14~17: 缺失 144 bp 的突变体; 18~21: 缺失 148 bp 的突变体。

1: WT; 2~5: the 103-bp deletion-mutants; 6~9: the 123-bp deletion-mutants; 10~13: the 141-bp deletion-mutants; 14~17: the 144-bp deletion-mutants; 18~21: the 148-bp deletion-mutants.

表 2 不同类型 *tgw6* 缺失突变体的千粒重测定结果Table 2 Thousand grain weight of different types of homozygous deletion mutants of *tgw6*

突变类型 Mutant type	缺失碱基数 Base deletion (bp)	千粒重 Thousand-grain weight (g)	增加比例 Percentage increased (%)
野生型 Wide type	0	22.0±0.50 a	0
1	103	23.1±0.57 b	5.0
2	123	23.4±0.50 b	6.3
3	141	23.1±0.47 b	5.0
4	144	23.7±0.38 b	7.7
5	148	24.0±0.35 b	8.2

表中所列数据为平均值±标准误; 表中同列数据后字母相同者表示在 0.05 水平上差异不显著(Duncan's 法)

Data listed in the table are mean±standard error; values followed by the same letter within the same column are not significantly different at the 0.05 probability level (Duncan's method).

本研究中利用多靶点 gRNAs 对水稻的 *TGW6* 基因进行一次性定点编辑, 获得了一系列不同类型的 *tgw6* 突变体, T_0 代 *tgw6* 的突变频率高达 90%, 其中, *tgw6* 纯合缺失突变比例约占 51%, 表明多靶点的定点编辑利于在 T_0 代获得纯合缺失突变的类型。对 T_1 代的幼苗所含潮霉素基因的 PCR 检测结果与大多农杆菌介导的水稻遗传转化一致, 潮霉素基因的分离也符合孟德尔定律, 因此通过转基因 T_0 代植株自交便可以在 T_1 代分离出无转基因成分的 *tgw6* 纯合缺失突变株系。虽然 Xu 等^[19]指出, T_1 代转基因植株的突变将具有不确定性, 到 T_2 代以后该突变才能稳定遗传, 这主要是由基因编辑时选用的靶点过少(通常为 1 个)造成的, 单靶点很难造成大片段的缺失, 多是碱基的替换或者插入等突变, 使得 T_1 代转基因植株靶基因的编辑位点还可能存在 gRNA 靶点识别的序列, 导致发生再次编辑, 从而使得突变具有不确定性; 相反, 利用 2 个以上靶点进行的基因定点编辑可以提高纯合缺失突变的频率, 在 T_0 代就可能获得可以稳定遗传给 T_1 代的突变。虽然单靶点的基因编辑

也会出现纯合突变的变异类型, 但是突变率大多在 20% 以下^[19], 而且难以利用 PCR 鉴定出来, 一般需要借助对变异位点附近的 DNA 片段测序才能鉴定出来。另一方面, 由于 gRNA 识别序列较短(20 bp 左右), 靶点多造成脱靶的可能性越大^[28], 水稻等植物可以通过回交等手段来降低脱靶的影响。在利用 CRISPR/Cas9 技术进行水稻等植物相关性状突变体的创建过程中, 需要综合考虑合理选择转化受体及靶点位置和数量, 如本研究中对突变体千粒重性状分析发现, 突变体的千粒重都比对照提高了 5% 以上, 但与已知的 *tgw6* 突变体(313 bp 缺失)会使日本晴产量增加 15%^[9]的结果不太一致, 推测可能是材料背景差异或者突变位点的差异引起的。

随着人类对粮食的高产、高品质需求的不断提高, 仅对基因进行定向改良是远远不够的, 如何对特定育种材料进行多基因的一次性导入成为亟待解决的问题。随着研究的不断深入, 人们已经发现利用 CRISPR/Cas9 剪切形成的缺口可促进外源基因片段高效重组到基因组中, 这一发现已先后在细菌、

酵母、老鼠、果蝇、斑马鱼、线虫上取得了成功^[29-35]。由于植物的特殊性,使得依赖于CRISPR/Cas9的基因导入技术发展相对较慢,即使如此,有研究小组已经利用双生病毒载体系统在烟草、西红柿中取得了成功^[36-37]。相信在1~2年内该技术也会在水稻中被成功应用,这一技术的发展将会对水稻品种抗性、品质等改良起到重大推动作用,具有广阔的应用前景。

4 结论

获得了类型较为丰富(多碱基缺失、插入等)的*tgw6*突变体,为进一步应用于水稻的高产、稳产育种奠定了重要材料基础。为快速创建稻米品质(*fgr*、*Chalk*)、雄性不育(*tms5*)等生产上有重要应用价值的水稻优异新种质提供了重要参考,并有望为水稻种质资源创新提供安全、高效的新途径,具有重要的理论和实践意义。

致谢:感谢华南农业大学刘耀光研究员提供的pYLCRISPR/Cas9-MT(I)及gRNA载体(pYL-U3/U6a-b-gRNAs)。

References

- [1] You A Q, Lu X G, Jin H J, Ren X, Liu K, Yang G C, Yang H Y, Zhu L L, He G C. Identification of quantitative trait loci across recombinant inbred lines and testcross populations for traits of agronomic importance in rice. *Genetics*, 2006, 172: 1287–1300
- [2] Shomura A, Izawa T, Ebana K, Ebitani T, Kanegae H, Konishi S, Yano M. Deletion in a gene associated with grain size increased yields during rice domestication. *Nat Genet*, 2008, 40: 1023–1028
- [3] Weng J F, Gu S H, Wan X Y, Gao H, Guo T, Su N, Lei C, Zhang X, Cheng Z J, Guo X P, Wang J L, Jiang L, Zhai H Q, Wan J M. Isolation and initial characterization of *GW5*, a major QTL associated with rice grain width and weight. *Cell Res*, 2008, 18: 1199–1209
- [4] Ishimaru K, Hirotsu N, Madoka Y, Murakami N, Hara N, Onodera H, Kashiwagi T, Ujiie K, Shimizu B, Onishi A, Miyagawa H, Katoh E. Loss of function of the IAA-glucose hydrolase gene *TGW6* enhances rice grain weight and increases yield. *Nat Genet*, 2013, 45: 707–711
- [5] Fan C C, Xing Y Z, Mao H L, Lu T T, Han B, Xu C G, Li X H, Zhang Q F. *GS3*, a major QTL for grain length and weight and minor QTL for grain width and thickness in rice, encodes a putative transmembrane protein. *Theor Appl Genet*, 2006, 112: 1164–1171
- [6] Li Y B, Fan C C, Xing Y Z, Jiang Y H, Luo L J, Sun L, Shao D, Xu C J, Li X, Xiao J H, He Y Q, Zhang Q F. Natural variation in *GS5* plays an important role in regulating grain size and yield in rice. *Nat Genet*, 2011, 43: 1266–1269
- [7] Song X J, Huang W, Shi M, Zhu M Z, Lin H X. A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase. *Nat Genet*, 2007, 39: 623–630
- [8] Wang S K, Wu K, Yuan Q, Liu X, Liu Z, Lin X, Zeng R, Zhu H, Dong G, Qian Q, Zhang G Q, Fu X D. Control of grain size, shape and quality by *OsSPL16* in rice. *Nat Genet*, 2012, 44: 950–954
- [9] Hu Z J, He H H, Zhang S Y, Sun F, Xin X, Wang W, Qian X, Yang J S, Luo X J. A Kelch motif-containing serine/threonine protein phosphatase determines the large grain QTL trait in rice. *J Integr Plant Biol*, 2012, 54: 979–990
- [10] Qi P, Lin Y S, Song X J, Shen J B, Huang W, Shan J X, Zhu M Z, Jiang L, Gao J P, Lin H X. The novel quantitative trait locus *GL3.1* controls rice grain size and yield by regulating *Cyclin-T1*; 3. *Cell Res*, 2012, 22: 1666–1680
- [11] Zhang X, Wang J, Huang J, Lan H, Wang C, Yin C, Wu Y, Tang H, Qian Q, Li J, Zhang H. Rare allele of *OsPPKL1* associated with grain length causes extra-large grain and a significant yield increase in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 21534–21539
- [12] Rath D, Amlinger L, Rath A, Lundgren M. The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, 2015, 117: 119–128
- [13] Belhaj K, Chaparro-Garcia A, Kamoun S, Patron N J, Nekrasov V. Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Curr Opin Biotechnol*, 2015, 32: 76–84
- [14] Osakabe Y, Osakabe K. Genome editing with engineered nucleases in plants. *Plant Cell Physiol*, 2015, 56: 389–400
- [15] Jiang W, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffini L A. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 233–239
- [16] Feng Z, Zhang B, Ding W, Liu X, Yang D L, Wei P, Cao F, Zhu S, Zhang F, Mao Y, Zhu J K. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2013, 23: 1229–1232
- [17] Bortesi L, Fischer R. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnol Adv*, 2015, 33: 41–52
- [18] Ma X L, Zhang Q, Zhu Q, Liu W, Chen Y, Qiu R, Wang B, Yang Z, Li H, Lin Y, Xie Y, Shen R, Chen S, Wang Z, Chen Y, Guo J, Chen L, Zhao X, Dong Z, Liu Y G. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Mol Plant*, 2015, 8: 1274–1284
- [19] Xu, R F, Li H, Qin R Y, Li J, Qiu C H, Yang Y C, Ma H, Li L, Wei P C, Yang J B. Generation of inheritable and “transgene clean” targeted genome-modified rice in later generations using the CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*, 2015, 11491. doi: 10.1038/srep11491
- [20] Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J*, 1994, 6: 271–282
- [21] Wang H, Chu Z, Ma X, Li R, Liu Y. A high through-put protocol of plant genomic DNA preparation for PCR. *Acta Agron Sin*, 2013, 39: 1200–1205
- [22] Bibikova M, Golic M, Golic K G, Carroll D. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics*, 2002, 161: 1169–1175
- [23] Bibikova M, Beumer K, Trautman J K, Carroll D. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science*, 2003,

- 300: 764
- [24] Dreier B, Fuller R P, Segal D J, Lund C V, Blancafort P, Huber A, Koksich B, Barbas C F. Development of zinc finger domains for recognition of the 5'-CNN-3' family DNA sequences and their use in the construction of artificial transcription factors. *J Biol Chem*, 2005, 280: 35588–35597
- [25] Hockemeyer D, Wang H, Kiani S, Lai C S, Gao Q, Cassady J P, Cost G J, Zhang L, Santiago Y, Miller J C, Zeitler B, Cherone J M, Meng X, Hinkley S J, Rebar E J, Gregory P D, Urnov F D, Jaenisch R. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 731–734
- [26] Tesson L, Usal C, Ménoret S, Leung E, Niles B J, Remy S, Santiago Y, Vincent A I, Meng X, Zhang L, Gregory P D, Anegón I, Cost G J. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 695–696
- [27] Huang P, Xiao A, Zhou M G, Zhu Z Y, Lin S, Zhang B. Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 699–700
- [28] Endo M, Mikami M, Toki S. Multigene knockout utilizing off-target mutations of the CRISPR/Cas9 system in rice. *Plant Cell Physiol*, 2015, 56: 41–47
- [29] Jiang W, Zhou H, Bi 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:e188. doi: 10.1093/nar/gkt780
- [30] DiCarlo J E, Norville J E, Mali P, Rios X, Aach J, Church G M. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: 4336–4343
- [31] Shen B, Zhang J, Wu H Y, Wang J, Ma K, Li Z, Zhang X G, Zhang P, Huang X. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Res*, 2013, 23: 720–723
- [32] Gratz S J, Cummings A M, Nguyen J N, Hamm D C, Donohue L K, Harrison M M, Wildonger J, O'Connor-Giles K M. Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA guided Cas9 nuclease. *Genetics*, 2013, 194: 1029–1035
- [33] 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: 819–823
- [34] Chang N, Sun C, Gao L, Zhu D, Xu X, Zhu X, Xiong J W, Xi J J. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos. *Cell Res*, 2013, 23: 465–472
- [35] Dickinson D J, Ward J D, Reiner D J, Goldstein B. Engineering the *Caenorhabditis elegans* genome using Cas9-triggered homologous recombination. *Nat Methods*, 2013, 10: 1028–1034
- [36] Čermák T, Baltes N J, Čegan R, Zhang Y, Voytas D F. High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biol*, 2015, 16(1): 232. doi: 10.1186/s13059-015-0796-9
- [37] Yin K, Han T, Liu G, Chen T, Wang Y, Yu A Y, Liu Y. A geminivirus-based guide RNA delivery system for CRISPR/Cas9 mediated plant genome editing. *Sci Rep*, 2015, 14926. doi: 10.1038/srep14926