

BÀI TỔNG QUAN

ỨNG DỤNG CÁC CÔNG CỤ CHỈNH SỬA HỆ GEN Ở THỰC VẬT

Nguyễn Đức Thành✉

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: nguyenducthanh_pcg@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 04.01.2020

Ngày nhận đăng: 10.3.2020

TÓM TẮT

Công nghệ chỉnh sửa hệ gen là các kỹ thuật sửa đổi gen như gây đột biến có mục tiêu hoặc chèn/xóa/thay thế tại các vị trí cụ thể trong hệ gen của các sinh vật sống. Chỉnh sửa hệ gen dựa vào việc tạo ra sự đứt sợi đôi DNA ở vị trí chuyên biệt và việc sửa chữa DNA thông qua kết nối đầu cuối không tương đồng hoặc sửa trực tiếp tương đồng. Sự phát triển các enzyme cắt trình tự chuyên biệt DNA (sequence-specific nuclease, SSN) đã cho phép chỉnh sửa chính xác gen mục tiêu. Những SSN này bao gồm: các siêu enzyme cắt DNA (meganuclease, MN), enzyme cắt DNA ngón tay kẽm (zinc finger nuclease, ZFN), các enzyme cắt DNA giống yếu tố hoạt hóa phiên mã (transcription activator-like effector nuclease, TALEN) và các enzyme cắt DNA gắn vào nhóm các trình tự lặp lại ngắn đọc xuôi ngược đều giống như nhau (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas, CRISPR/Cas) bao gồm CRISPR/Cas9 (từ vi khuẩn *Streptococcus pyogenes*) và CRISPR/Cpf1 (từ vi khuẩn *Prevotella* và *Francisella*). Đây là các công cụ chỉnh sửa gen được sử dụng để tạo sự đứt sợi đôi DNA tại vị trí cụ thể của hệ gen. Gần đây, hệ thống chỉnh sửa base (base editing, BE) và chỉnh sửa prime (prime editing, PE) cũng đã được thông báo. Bài tổng quan này trình bày những vấn đề cơ bản của các công cụ này và ứng dụng của chúng trong chỉnh sửa gen ở thực vật, đặc biệt là cung cấp các thông tin cập nhật nhất về ứng dụng trong cải tiến giống cây trồng.

Từ khóa: chỉnh sửa hệ gen, sự đứt sợi đôi DNA, enzyme cắt trình tự chuyên biệt DNA, gen mục tiêu, thực vật

MỞ ĐẦU

Thuật ngữ “chỉnh sửa hệ gen” đề cập đến các công nghệ sử dụng để sửa đổi gen, như gây đột biến có mục tiêu hoặc chèn/xóa/thay thế tại các vị trí cụ thể trong hệ gen của các sinh vật sống. Chỉnh sửa hệ gen dựa vào việc tạo ra sự đứt sợi đôi DNA (double sequence break, DSB) ở vị trí cụ thể và việc sửa chữa DNA thông qua kết nối đầu cuối không tương đồng (non-homologous end joining, NHEJ) hoặc sửa chữa trực tiếp tương đồng (homology directed repair, HDR). Ở thực vật, DSB chủ yếu được sửa chữa bởi NHEJ với sự tham gia của các enzyme để gắn trực tiếp các điểm đứt của DSB mà không

cần chuỗi DNA khuôn tương đồng đã được sửa chữa (Puchta, 2005). Do tính chất dễ bị lỗi, sửa chữa thông qua NHEJ thường dẫn đến việc bổ sung hoặc xóa các nucleotide và do đó, DNA thay đổi trình tự tại các vị trí đứt sợi đôi. Nhiều khi, NHEJ có thể dẫn đến mất hoàn toàn chức năng gen do sự chèn/mất đoạn (indels) trong exon dẫn đến đột biến sai lệch hoặc đột biến vô nghĩa. Cho đến nay, hầu hết các công bố về chỉnh sửa gen ở thực vật đã sử dụng con đường NHEJ để loại bỏ gen (knock-out gen). Đối với HDR, chuỗi DNA tương đồng được sử dụng như chuỗi khuôn để sửa chữa DSB vì thế cho phép sửa chữa một cách chính xác (Puchta, 2005). Vì thế, HDR được sử dụng để sửa đổi

trình tự nucleotide một cách chính xác hoặc thay thế/chèn gen tại vị trí đích với sự có mặt của chuỗi DNA khuôn đưa vào từ bên ngoài để sửa chữa. Không giống NHEJ, HDR xảy ra chủ yếu trong các giai đoạn S/G2 của chu trình tế bào và có hiệu quả thấp ở thực vật (Puchta, 2005). Lợi dụng hệ thống sửa chữa DNA bên trong tế bào, các công cụ tạo các DSB được sử dụng làm thay đổi hệ gen một cách chính xác. Gần đây các enzyme cắt chuyên biệt trình tự DNA (sequence-specific nuclease, SSN) được phát triển đã cho phép sửa đổi chính xác gen mục tiêu trong hệ gen. Những SSN này bao gồm: các siêu enzyme cắt DNA (meganuclease, MN) (Smith *et al.*, 2006), enzyme cắt DNA ngón tay kẽm (zinc finger nuclease, ZFN) (Kim *et al.*, 1996), các enzyme cắt DNA giống yếu tố hoạt hóa phiên mã (transcription activator-like effector nuclease, TALEN (Christian *et al.*, 2010; Morbitzer *et al.*, 2010; Bogdanove, Voytas, 2011) và các enzyme cắt DNA gắn vào nhóm các trình tự lặp lại ngắn đọc xuôi ngược đều giống như nhau (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas (CRISPR/Cas) bao gồm CRISPR/Cas9 từ vi khuẩn *Streptococcus pyogenes* (Jinek *et al.*, 2012) và CRISPR/Cpf1 từ vi khuẩn *Prevotella* và *Francisella* (Zetsche *et al.*, 2015). Đây là các công cụ chỉnh sửa gen được sử dụng để tạo DSB tại vị trí cụ thể của hệ gen. Tất cả các SSN đều có một miền có chức năng nhận diện và gắn với trình tự DNA chuyên biệt và một miền có hoạt tính cắt DNA để tạo DSB trên chuỗi DNA mục tiêu. Gần đây, hệ thống chỉnh sửa base (base editing, BE) (Komor *et al.*, 2016) và chỉnh sửa prime (prime editing, PE) đã được phát triển dùng cho mục đích chỉnh sửa hệ gen (Anzalone *et al.*, 2019). Hai hệ thống này cho phép chuyển đổi trực tiếp các nucleotide ở gen mục tiêu mà không cần cắt sợi đôi DNA. Bài tổng quan này sẽ trình bày những vấn đề cơ bản của các công cụ chỉnh sửa gen và ứng dụng của chúng trong chỉnh sửa gen ở thực vật, đặc biệt là cung cấp các thông tin cập nhật nhất về ứng dụng trong cải tiến giống cây trồng. Các độc giả muốn tìm hiểu nhiều hơn về những vấn đề cụ thể, đặc biệt là về mặt kỹ thuật có thể tham khảo thêm các tài liệu liên quan được trích dẫn trong bài.

CÁC CÔNG CỤ CHỈNH SỬA GEN

Các siêu enzyme cắt DNA (MN)

MN là các enzyme cắt DNA nội sinh với đặc trưng là có trình tự nhận biết lớn (từ 12 đến 40 bp) và miền liên kết không được ngăn cách miền xúc tác. MN được sử dụng để cắt sợi đôi DNA, tạo ra DSB trong một số hệ gen (Stoddard *et al.*, 2011). So với các SSN khác, các MN rất khó thiết kế lại cho các trình tự mục tiêu khác với trình tự nhận biết tự nhiên của chúng. Vì vậy, đối với thực vật, mới chỉ có các MN tự nhiên như I-SceI từ ty thể nấm men và I-CreI từ lục lạp của *Chlamydomonas reinhardtii* được sử dụng. MN đã được sử dụng trong công nghệ gen thực vật từ đầu những năm 2000. MN được sử dụng cho tạo DSB để gây đột biến mục tiêu ở locus *liguleless1* của ngô (Gao *et al.*, 2010) hay chèn gen mục tiêu *hppd* và *epsps* theo cơ chế sửa chữa tương đồng trong hệ gen cây bông (D'Hallium *et al.*, 2013) và tạo cây ngô bắt dục đực thông qua chỉnh sửa gen hữu dục *MS26* (Djukanovic *et al.*, 2013). Hạn chế của MN là rất khó thiết kế lại trình tự nhận biết tự nhiên để có thể nhận biết được các gen đích khác nhau.

Enzyme cắt DNA ngón tay kẽm (ZFN)

Các ZFN là thế hệ đầu tiên của công cụ chỉnh sửa gen được Lloyd và đồng tác giả (2005) lần đầu sử dụng để chỉnh sửa gen thực vật. Đây là các enzyme hạn chế nhân tạo được tạo ra bằng cách kết hợp miền liên kết DNA ngón tay kẽm với miền cắt sợi DNA. Miền ngón tay kẽm có thể được thiết kế để nhắm trình tự DNA mục tiêu cụ thể và cho phép các enzyme cắt DNA ngón tay kẽm nhắm trình tự mục tiêu duy nhất trong hệ gen. Bằng cách tận dụng bộ máy sửa chữa DNA nội sinh, những enzyme này có thể được sử dụng để chỉnh sửa chính xác hệ gen của các sinh vật bậc cao. Các miền liên kết DNA của các ZFN riêng lẻ thường chứa từ 3 đến 6 lần lặp lại ngón tay kẽm và mỗi lần có thể nhận biết từ 9 đến 18 cặp base (bp). Mỗi miền ngón tay kẽm trong vùng nhận biết DNA gắn với 3 nucleotide. Trung bình 3 hoặc 4 ngón tay kẽm kết hợp với nhau để nhận biết 9 đến 12 nucleotide. Để cắt sợi đôi DNA cần có hai ZFN. Miền cắt không đặc hiệu của enzyme *FokI* (enzyme cắt loại II) thường

được sử dụng làm miền cắt DNA trong ZFN. Miền cắt này phải nhị trùng hóa (dimerize) để cắt DNA do đó cần có một cặp ZFN để nhắm vị trí chuỗi DNA mục tiêu có trình tự đọc xuôi đọc ngược không giống nhau (non-palindromic). Các ZFN tiêu chuẩn thường hợp nhất miền cắt với đầu C của mỗi miền ngón tay kềm. Để cho hai miền cắt nhị trùng hóa và cắt DNA, hai ZFN riêng lẻ phải gắn các chuỗi DNA đối diện với đầu C cách nhau một khoảng nhất định. Trình tự gắn miền ngón tay kềm và miền cắt được sử dụng phổ biến nhất cần có đầu 5' của mỗi vị trí gắn cách nhau từ 5 đến 7 bp.

Hạn chế của ZFN là cần phải có 2 protein liên kết để gắn với sợi DNA mục tiêu, mỗi sợi có một đầu C gắn với enzyme *FokI*. Nếu muốn chỉnh sửa nhiều gen cần phải lắp ráp nhiều protein liên kết DNA cụ thể cho từng gen mục tiêu nên sẽ rất khó cho việc chỉnh sửa đồng thời nhiều gen.

Enzyme cắt DNA giống yếu tố hoạt hóa phiên mã (TALEN)

TALEN là công cụ chỉnh sửa gen thế hệ thứ hai và lần đầu tiên được sử dụng để chỉnh sửa gen thực vật vào năm 2011 (Cermak *et al.*, 2011; Mahfouz *et al.*, 2011). Li *et al.* (2012) đã cải tiến hệ thống cho hiệu quả hơn. TALEN bao gồm các yếu tố hoạt hóa phiên mã (TALE) kết hợp với vùng cắt của enzyme cắt DNA *FokI* để gắn với DNA đích và cắt sợi đôi DNA. Sự gắn TALE với DNA được thực hiện ở vùng giữa của protein này. Vùng giữa này có khoảng 30 lần lặp lại chuỗi 33 đến 35 amino acid. Số amino acid trong mỗi chuỗi lặp lại phần lớn không thay đổi trừ hai amino acid liền nhau, được gọi là chuỗi lặp lại chứa hai amino acid liền kề thay đổi (repeat variable di-residue, RVD). Các chuỗi RVD khác nhau nhận biết các cặp base DNA khác nhau với sự tương ứng một/một giữa các RVD trong miền lặp lại và các nucleotide trong DNA mục tiêu. Mã đặc hiệu liên kết được xác định như: HD liên kết với C, NI liên kết với A, NG liên kết với T và NN liên kết với A hoặc G (Boch *et al.*, 2009), NK liên kết với G (Morbiter *et al.*, 2010), ND liên kết với C, HN liên kết với A hoặc G, NH liên kết với G và NP liên kết với tất cả các nucleotide (de Lange *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013). Tính đặc hiệu

liên kết DNA có thể được tùy chỉnh bằng kỹ thuật TALE. Nhờ việc dự đoán các phương thức gắn đặc hiệu của TALE tự nhiên hoặc nhân tạo, có thể ứng dụng các protein này cho mục tiêu chỉnh sửa gen.

TALEN được sử dụng để tạo DSB trong tế bào thực vật (Shan *et al.*, 2013a; Zhang *et al.*, 2013). Khả năng nhắm mục tiêu cụ thể trong hệ gen cho phép thực hiện nhiều mục đích như đột biến mục tiêu, thêm, xóa hoặc chỉnh sửa gen một cách chính xác.

Giống như ZFN, hạn chế của TALEN là cần 2 protein liên kết để gắn với chuỗi DNA mục tiêu, mỗi chuỗi có một đầu C gắn với enzyme *FokI*. Ngoài ra, phải lắp ráp nhiều protein liên kết DNA cụ thể cho từng gen mục tiêu, nên khó cho việc chỉnh sửa đồng thời nhiều gen.

Hệ thống CRISPR/Cas

CRISPR lần đầu tiên được xác định trong hệ gen *Escherichia coli* vào năm 1987 (Ishino *et al.*, 1987). CRISPR/Cas được coi là công cụ chỉnh sửa hệ gen thế hệ thứ ba, lần đầu tiên được sử dụng để chỉnh sửa hệ gen thực vật vào năm 2013 và hiện là công cụ chỉnh sửa hệ gen phổ biến (Li *et al.*, 2013a; Nekrasov *et al.*, 2013; Shan *et al.*, 2013). Hệ thống CRISPR/Cas, bao gồm nhóm các đoạn lặp lại ngắn, cách nhau đều đặn có trình tự xuôi ngược giống nhau (CRISPR) và protein Cas, là một hệ thống miễn dịch thích nghi thông qua RNA ở vi khuẩn và vi khuẩn cổ giúp vi khuẩn bảo vệ và chống lại các phage và các yếu tố di truyền xâm lấn khác bằng cách phân cắt nucleic acid của hệ gen xâm lấn. Dựa trên cơ sở gen *Cas* và bản chất của phức hợp can thiệp, hệ thống CRISPR/Cas được chia thành hai lớp gồm sáu loại (Koonin *et al.*, 2017). Hệ thống CRISPR/Cas lớp 1 (gồm loại I, III và IV) sử dụng phức hợp nhiều protein Cas để hoạt động, trong khi hệ thống CRISPR/Cas lớp 2 (gồm loại II, V và VI) hoạt động chỉ với một protein phản ứng kết hợp với CRISPR RNA (crRNA).

CRISPR loại II có ba thành phần chính gồm: protein CRISPR và hai crRNA không mã hóa là: crRNA chuyên hóa [trans-activating crRNA (tracrRNA)] và tiền crRNA [precursor crRNA (pre-

crRNA)] (Horvath, Barrangou, 2010; Bhaya *et al.*, 2011). Cas là một enzyme cắt DNA có chứa miền cắt DNA là HNH (His-Asn-His protein) và RuvC (enzyme resolvase từ chủng *E. coli* kháng UV), các miền này liên quan đến quá trình hoàn thiện của crRNA và cắt DNA mục tiêu nhờ sự dẫn của crRNA (Horvath, Barrangou, 2010; Bhaya *et al.*, 2011). CRISPR RNA chuyển hóa là chuỗi RNA mã hóa nhỏ chứa chuỗi bổ sung gần như hoàn toàn với các chuỗi lặp lại trong pre-crRNA để hình thành một cặp RNA cần thiết cho sự hoàn chỉnh của crRNA và cắt DNA mục tiêu dưới sự dẫn của crRNA. Các tiền crRNA được sao chép từ locus CRISPR và gồm một chuỗi đệm lặp lại tuần hoàn. Sự lặp lại (23 đến 47 bp) thường giống hệt nhau về chiều dài và trình tự trong một locus CRISPR, nhưng khác nhau nhiều ở các locus khác nhau. Hầu hết các trình tự lặp lại xuôi ngược đều giống nhau hoặc lặp lại đảo ngược ngấn có thể hình thành các cấu trúc bậc hai hình kẹp tóc (Horvath, Barrangou, 2010). Các chuỗi đệm (21 đến 72 bp) có nguồn gốc từ việc xâm lấn của DNA virus hoặc plasmid và có thể dẫn Cas để cắt protospacer xâm lấn (trình tự trong hệ gen ngoại lai mà từ đó các chuỗi đệm hình thành). Các trình tự chuỗi đệm thường là duy nhất trong locus CRISPR và có kích thước tương tự như chuỗi lặp lại và có cùng chiều như chuỗi lặp lại. Tiền crRNA bao gồm phần lớn vùng lặp lại CRISPR và phiên mã cùng với tra-crRNA. Sau đó, tra-crRNA lai với pre-crRNA để tạo thành RNA kép và liên kết với Cas. RNA kép sau đó được xúc tác bởi RNase III để tạo thành crRNA hoàn chỉnh với chuỗi ngắn cụt ở một đầu. CRISPR RNA kép hoàn chỉnh (crRNA:tra-crRNA) chủ yếu là 20 nucleotide tại đầu 5' của crRNA sẽ dẫn Cas đến DNA mục tiêu có trình tự protospacer liền kề (PAM) và trình tự bổ sung với protospacer. Cuối cùng, vùng HNH cắt chuỗi DNA bổ sung với RNA dẫn, trong khi vùng RuvC cắt chuỗi DNA không bổ sung với DNA mục tiêu tạo nên sự đứt sợi đôi ở vị trí 3 - 4 nucleotide trước chuỗi PAM trong chuỗi protospacer (Horvath, Barrangou, 2010; Bhaya *et al.*, 2011; Cong *et al.*, 2013).

Hệ thống CRISPR/Cas9 từ vi khuẩn *Streptococcus pyogenes* là hệ thống

CRISPR/Cas loại II được thiết kế để tạo ra các DSB phục vụ chỉnh sửa hệ gen (Jinek *et al.*, 2012; Cong *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013). Trong hệ thống này, crRNA và tra-crRNA được hợp nhất thành một RNA dẫn duy nhất (single guide RNA, sgRNA) cho đơn giản về mặt kỹ thuật. Theo đó, CRISPR/Cas9 chỉ có hai thành phần đó là: enzyme cắt DNA Cas9 để cắt DNA mục tiêu, sgRNA để dẫn Cas9 đến DNA mục tiêu (Cong *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013). Trong hệ thống này, Cas9 được lập trình để nhắm tới mục tiêu cụ thể chỉ bằng việc đưa vào trình tự sgRNA một chuỗi spacer 20 bp. Do đó, CRISPR/Cas9 đơn giản và dễ thao tác hơn nhiều so với hệ thống ZFN và TALEN. Nhiều sgRNA cho các chuỗi mục tiêu khác nhau có thể dễ dàng được thiết kế để chỉnh sửa đồng thời nhiều gen (Wang *et al.*, 2013).

Enzyme/protein Cas9 có nguồn gốc từ các vi khuẩn khác như *Staphylococcus aureus* (SaCas9), *Streptococcus thermophilus* (StCas9) và *Neisseria meningitidis* (NmCas9), cũng đã được phát triển làm công cụ chỉnh sửa hệ gen (Cebrian-Serrano, Davies, 2017). Để có thể cắt ở các vị trí mục tiêu khác nhau, Cas9 được thiết kế để nhận biết các PAM khác nhau, chẳng hạn như VQR-Cas9 (cho PAM có trình tự NGA), EQR-Cas9 (cho PAM có trình tự NGAG), VRERCas9 (cho PAM có trình tự NGCG), SaKKH-Cas9 (cho PAM có trình tự NNNRRT) (Kleinstiver *et al.*, 2015), xCas9 (cho PAM có trình tự NG, GAA) và SpCas9-NG (cho PAM có trình tự NG) (Nishimasu *et al.*, 2018).

Hệ thống CRISPR/Cas9 đã được sử dụng thành công để chỉnh sửa hệ gen trong cây trồng và cây mô hình do có khả năng thích ứng và độ chính xác cao. Tuy nhiên, đột biến ngoài ý muốn ở các khu vực ngoài mục tiêu và tính đặc hiệu của PAM là những vấn đề chính liên quan đến công nghệ này. Một số báo cáo đã chỉ ra sự gia tăng gần ngoài mục tiêu của enzyme này xảy ra ngay cả trong chuỗi DNA có tính bảo tồn cao (Fu *et al.*, 2013; Cong *et al.*, 2013; Tsai *et al.*, 2015). Chỉnh sửa hệ gen thông qua CRISPR/Cas9 theo hướng HDR được cho là cách tiếp cận khả thi để điều chỉnh các đột biến điểm trong gen mục tiêu và đẩy nhanh việc cải tiến cây trồng. Tuy nhiên, ở thực vật HDR

không thường xuyên xảy ra và cộng với hiệu quả thấp của việc đưa DNA khuôn vào tế bào luôn là thách thức cho sự thành công ở thực vật. Hơn nữa, hệ thống CRISPR/Cas9 phù hợp để loại bỏ gen hoặc loại trực tiếp bằng đưa DNA khuôn vào (knock-in), nhưng không thể chuyển đổi một nucleotide thành một nucleotide khác.

Hệ thống CRISPR/Cpf1

Hệ thống CRISPR/Cpf1 (hiện nay còn gọi là CRISPR/Cas12a) chính thức là công cụ chỉnh sửa hệ gen từ 2015 và được sử dụng cho chỉnh sửa ở thực vật vào năm 2016 (Zetsche *et al.*, 2015; Endo *et al.*, 2016a). CRISPR/Cpf1 chứa hai thành phần chính, enzyme Cpf1 và crRNA. CRISPR/Cpf1 là hệ thống CRISPR/Cas lớp 2, loại V. Cpf1 là phân tử protein lớn chứa 1300 amino acid (Makarova *et al.*, 2015). Các gen Cpf1 được liên kết với locus CRISPR mã hóa cho một endonuclease sử dụng gRNA để tìm và cắt DNA mục tiêu. Cpf1 là một endonuclease nhỏ hơn và đơn giản hơn Cas9, do đó một số hạn chế của hệ thống CRISPR/Cas9 được khắc phục. Mặc dù CRISPR/Cpf1 và hệ thống CRISPR/Cas9 tương tự nhau, nhưng cũng có một số khác biệt quan trọng. Thứ nhất là: hệ thống CRISPR/Cpf1 không cần tra-crRNA như ở hệ thống CRISPR/Cas9. Phức hợp Cpf1-crRNA có thể phân cắt DNA mục tiêu một cách hiệu quả. Thứ hai là: CRISPR/Cpf1 được thiết kế với độ dài 42 đến 44 nucleotide (nt), bao gồm 19 nt lặp lại và 23 đến 25 nt đệm (spacer), so với gần 100 nt sgRNA trong hệ thống CRISPR/Cas9 (Zetsche *et al.*, 2015). Thứ ba là: ngoài hoạt động như enzyme cắt DNA sợi kép, Cpf1 cũng hoạt động như một Rnase để chuyển pre-crRNA thành crRNA hoàn chỉnh (Zetsche *et al.*, 2015; Dong *et al.*, 2016; Fonfara *et al.*, 2016). Điều này làm cho hệ thống CRISPR/Cpf1 chỉ cần một chuỗi khởi động để điều khiển một số crRNA nhỏ, trong khi CRISPR/Cas9, phải cần các sgRNA riêng lẻ khác nhau để chỉnh sửa nhiều gen đích khác nhau, và như vậy phải sử dụng nhiều cấu trúc khác nhau. Thứ tư là: không giống như Cas9 chứa vùng RuvC và HNH để cắt cả hai chuỗi DNA ở cùng một vị trí (3-4 bp trước trình tự PAM) để tạo đầu bằng, Cpf1 chỉ chứa một vùng giống RuvC và một nuclease mới để cắt chuỗi mục tiêu và chuỗi

không phải mục tiêu ở các vị trí tương ứng 23 bp và 18 bp phía sau trình tự PAM, tạo ra đầu dính với phần nhô ra 5 bp (Zetsche *et al.*, 2015). Đặc điểm này làm cho các đột biến tạo ra bởi Cpf1 thường lớn hơn đột biến do Cas9 tạo ra. Đầu dính tạo ra, về lý thuyết, sẽ tăng hiệu quả chỉnh sửa gen theo cơ chế HDR khi sử dụng chuỗi DNA khuôn để chèn vào vị trí cắt của Cpf1. Thứ năm là: trong khi CRISPR/Cas9 cần chuỗi PAM giàu G (5'-NGG-3') ở đầu 3' của chuỗi mục tiêu, CRISPR/Cpf1 cần chuỗi PAM giàu T (5'-TTTN-3, hoặc 5'-TTN-3') ở đầu 5 của chuỗi mục tiêu (Zetsche *et al.*, 2015). Hiện nay có ba hệ thống CRISPR/Cpf1 được thiết kế, bao gồm FnCpf1 từ *Francisella novicida*, AsCpf1 từ *Acidaminococcus* sp. và LbCpf1 từ vi khuẩn *Lachnospiraceae*. Cả ba hệ thống Cpf1 đã được sử dụng để chỉnh sửa gen ở một số loài cây như: lúa, Arabidopsis, thuốc lá và đậu tương (Endo *et al.*, 2016a; Wang *et al.*, 2017a; Kim *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2017).

Hệ thống chỉnh sửa base (BE)

BE là hệ thống kết hợp vùng CRISPR/Cas9 bất hoạt (là các biên thể của Cas9 như dCas9 hoặc Cas9 nickase) và cytidine deaminase hoặc adenine deaminase lần đầu tiên được áp dụng thành công trong các tế bào động vật (Komor *et al.*, 2016; Gaudelli *et al.*, 2017). Komor và đồng tác giả (2016) đã thiết kế một cấu trúc kết hợp CRISPR/Cas9 và enzyme cytidine deaminase với khả năng duy trì sự dẫn của RNA nhưng không cắt sợi đôi DNA (hay còn gọi là Cas9 bất hoạt - dCas9 mang đột biến D10A và H840A) mà làm trung gian chuyển đổi trực tiếp cytidine thành uridine. Cytidine deaminase đầu tiên chuyển đổi cytosine trong DNA thành uracil và uracil sau đó được thay thế bằng thymine trong quá trình sao chép DNA, do đó có thể chuyển đổi C (cytosine) thành T (thymine) hoặc G (guanine) thành A (adenine). Kết quả là tạo ra hệ thống chỉnh sửa base, hệ thống này chuyển đổi cytidine trong không gian khoảng 5 nucleotide. Đây là hệ thống chỉnh sửa base cytidine (cytidine base editor, CBE). Hệ thống BE thế hệ đầu tiên (BE1) được thiết lập từ cytidine deaminase APOBEC1 từ chuột liên kết với dCas9 bằng một liên kết 16 amino acid (aa) XtEN (Komor *et al.*, 2016).

XtEN liên kết APOBEC1 với dCas9 và duy trì sự cân bằng giữa hai protein này. BE thế hệ thứ hai (BE2) đã được phát triển bằng cách thêm chất ức chế uracil glycosylase DNA (UGI) vào đầu C của cấu trúc nhắm DNA mục tiêu (APOBEC-XtEN-dcas9-UGI) (Komor *et al.*, 2016). BE thế hệ thứ ba (BE3) bao gồm rAPOBEC1 kết hợp với đầu N của enzyme cắt (nickase) Cas9-D10A bằng XtEN với 16 aa và nối UGI ở đầu C bằng một liên kết 4 aa (Komor *et al.*, 2016). Để tiếp tục mở rộng và tăng hiệu quả chỉnh sửa của BE, BE thế hệ thứ tư (BE4) sử dụng Cas9 từ *S. pyogenes* (SpBE4) và Cas9 từ *S. aureus* (SaBE4) được phát triển bằng cách liên kết rAPOBEC1 với Cas9-D10A thông qua 32 aa liên kết và hợp nhất hai phân tử UGI với cả hai đầu C và N của Cas9 nickase bởi một liên kết 9 aa (Komor *et al.*, 2017). Như vậy là hiện nay có 4 hệ thống BE chỉnh sửa C thành T.

Gaudelli và đồng tác giả (2017) đã thông báo về hệ thống chỉnh sửa base adenine (adenine base editor, ABE) cho phép chuyển đổi cặp A-T thành G-C. Các tác giả đã phát triển một adenosine tRNA deaminase hoạt động trên DNA khi kết hợp với CRISPR/Cas9 có khả năng xúc tác yếu và đã phát triển được hệ thống ABE7.10 có thể chuyển đổi A-T thành G-C. ABE tạo đột biến điểm hiệu quả và rõ ràng hơn so với phương pháp dựa vào Cas9 đồng thời tạo ít đột biến ngoài mục tiêu hơn Cas9.

Ở thực vật, Li và đồng tác giả (2017a), Lu và Zhu (2017), Zong và đồng tác giả (2017, 2018) đã báo cáo chuyển đổi thành công cặp C-G sang cặp A-T ở lúa bằng sử dụng hệ thống BE cytidine enzyme deaminase APOBEC1 (Cas9-D10A nickase, nCas9) hoặc Cas9 bất hoạt (dCas9) và chất ức chế glycosylase uracil (UGI). Sau đó, việc chuyển đổi các cặp A-T thành G-C cũng đã thành công ở lúa (Li *et al.*, 2018b; Hua *et al.*, 2018; Yan *et al.*, 2018).

Muốn BE thành công cần một trình tự PAM cụ thể (chẳng hạn NGG cho SpCas9) và base mục tiêu phải ở trong một chuỗi ngắn. Yêu cầu PAM cụ thể này là một hạn chế quan trọng làm giảm hiệu quả chỉnh sửa gen ở thực vật. BE cytosine deaminase có khả năng chỉnh sửa bất kỳ

C nào trong phạm vi 4 đến 5 nucleotide (hoặc đến 9 nucleotide). Đây là một hạn chế quan trọng của BE dẫn đến tính đặc hiệu thấp và hiệu quả chỉnh sửa thấp. Ngoài ra, chỉnh sửa ngoài mục tiêu vẫn là một hạn chế chính. Trong các hệ thống BE, chỉnh sửa ngoài mục tiêu xảy ra khi các cytosine bổ sung gần base mục tiêu. Jin và đồng tác giả (2019) quan sát thấy tuy BE3 có độ chính xác cao (HF1-BE3) nhưng đã gây ra bất ngờ vì mức tạo đột biến ngoài mục tiêu ở lúa rất cao. Điều này cho thấy cải tiến các hệ thống chỉnh sửa gen để có hiệu quả chỉnh sửa cao và chính xác luôn luôn là nhiệm vụ quan trọng trong việc chỉnh sửa gen.

Hệ thống chỉnh sửa prime (PE)

Gần đây, hệ thống chỉnh sửa tìm và thay thế hay còn được gọi là hệ thống chỉnh sửa prime (PE) (Anzalone *et al.*, 2019) đã được phát triển. PE có thể đưa một trình tự do người dùng xác định trước vào vị trí mục tiêu mà không cần cắt sợi đôi DNA hoặc khuôn DNA đã sửa chữa. Cấu trúc PE chứa enzyme phiên mã ngược của virus bạch cầu Moloney murine (M-MLV RT) gắn với đầu C của SpCas9 (H840A) (Anzalone *et al.*, 2019). Protein tổng hợp này được dẫn bởi một phân tử pegRNA (prime editing guide RNA) đến vị trí mục tiêu. Ngoài việc chỉ định vị trí mục tiêu, pegRNA chứa một vị trí gắn mồi (primer binding site, PBS) bổ sung với chuỗi chứa PAM và trình tự khuôn để phiên mã ngược (reverse transcriptase template sequence, RT template sequence). Thông tin di truyền đưa vào vị trí mục tiêu được mã hóa bởi trình tự chuỗi RT. Hệ thống PE có thể đưa tất cả 12 khả năng chuyển đổi base sang base (bao gồm chuyển đổi: C → T, G → A, A → G, T → C) và các đột biến chuyển vị: C → A, C → G, G → C, G → T, A → C, A → T, T → A và T → G), các indels nhỏ và các tổ hợp của chúng vào vị trí mục tiêu. Do có tính linh hoạt rộng, cho phép thực hiện các loại chỉnh sửa khác nhau trong hệ gen nên PE có tiềm năng lớn để phát triển các loại cây trồng ưu việt cho các mục đích khác nhau, như tăng năng suất, cung cấp khả năng chống lại các stress phi sinh học và sinh học khác nhau, và cải thiện chất lượng sản phẩm thực vật. PE đã được thực hiện ở lúa và lúa mì (Hua *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020a; Lin *et al.*, 2020; Tang *et al.*, 2020).

So sánh các hệ thống chỉnh sửa hệ gen

Các công cụ chỉnh sửa hệ gen ZFN, TALEN, CRISPR/Cas và CRISPR/Cpf1 có thể tạo ra DSB tại các vị trí cụ thể trong hệ gen và có thể được sửa chữa bởi NHEJ hoặc HDR dẫn đến sự đột biến ở gen tại vị trí mục tiêu. So với ZFN và TALEN, CRISPR/Cas có một số lợi thế. Lợi thế thứ nhất là dựa trên việc lai RNA/DNA đơn giản, tạo ra tính đặc hiệu của chuỗi, các nhà nghiên cứu có thể dễ dàng nhắm mục tiêu một gen khác bằng cách thay thế trình tự 20 nucleotide bổ sung; ngược lại, ZFN và TALEN dựa trên cơ chế nhận biết bằng protein dẫn, trong đó để nhắm mục tiêu của một chuỗi DNA cụ thể yêu cầu lắp ráp mô-đun các cặp đơn vị protein nhận dạng và để cấu trúc một hệ thống vector cần tốn thời gian và đắt hơn so với hệ thống CRISPR/Cas; bởi vậy, ZFN và TALEN không được áp dụng rộng rãi cho chỉnh sửa hệ gen ở thực vật. Thứ hai, CRISPR/Cas có thể đồng thời chỉnh sửa nhiều gen do đó cho phép chỉnh sửa nhiều gen trong cây mà chỉ cần một lần chuyển hệ thống chỉnh sửa vào cây, không cần quá trình sàng lọc và lai sau chuyển gen. Tóm lại, phương pháp CRISPR/Cas được coi là hiệu quả, ít tốn kém và thân thiện với người dùng hơn so với ZFN và TALEN.

Hệ thống BE và hệ thống PE không cần cắt sợi đôi DNA và có thể chỉnh sửa các đột biến điểm. Tuy nhiên, hệ thống BE chỉ chuyển đổi C thành T hoặc G thành A (hệ thống CBE) hay cặp A-T thành cặp G-C (hệ thống ABE) và sự chuyển đổi xảy ra trong một chuỗi ngắn (khoảng 5 nucleotide) nên khả năng chỉnh sửa ngoài mục tiêu là khá cao. Hệ thống PE có thể đưa tất cả 12 khả năng chuyển đổi base này sang base khác vào vị trí mục tiêu và cho phép cắt, bổ sung và thay thế một cách chính xác. Tuy nhiên, giống như BE, vùng chỉnh sửa của PE ngắn (4-16 nucleotide) và hiệu suất chỉnh sửa thấp. Ngoài ra, việc kiểm tra trên thực vật đến nay vẫn còn hạn chế.

NGUYÊN LÝ VÀ CÁC BƯỚC CHỈNH SỬA HỆ GEN

Nguyên lý chung của các kỹ thuật chỉnh sửa hệ gen thông qua ZFN, TALEN và CRISPR/Cas9 là phải cắt sợi đôi DNA ở vị trí cụ thể. Sau đó nhờ cơ chế sửa chữa, DNA có thể sửa

chữa theo hai cách: cách thứ nhất là nối đầu cuối không tương đồng trong trường hợp không có chuỗi DNA khuôn kèm theo kết quả là dẫn đến việc tạo ra đột biến có mục tiêu và cách thứ hai là sửa chữa trực tiếp tương đồng trong trường hợp có chuỗi DNA khuôn đã chỉnh sửa kèm theo để có thể chỉnh sửa gen hoặc tích hợp gen ở vị trí cụ thể. Đối với hệ thống BE thì không cần cắt sợi đôi DNA mà sử dụng các cấu trúc chỉnh sửa gồm enzyme chuyển đổi cytidine deaminase và adenosine deaminase kết hợp với CRISPR/Cas9 bất hoạt. Trong hệ thống PE, Cas9-H840A nickase được hợp nhất với chuỗi phiên mã ngược. Protein tổng hợp chọn sợi DNA chỉnh sửa để bắt đầu sao chép ngược bằng cách mồi vào sợi DNA được chọn và sao chép thông tin di truyền được mã hóa bởi pegRNA có mang khuôn phiên mã ngược và vị trí gắn mồi.

Để chỉnh sửa hệ gen, trước tiên là chọn công cụ chỉnh sửa phù hợp (ZFN, TALEN, CRISPR/Cas...) và thiết kế cấu trúc chỉnh sửa gen ở vị trí cụ thể, sau đó chuyển cấu trúc này vào tế bào. Tiếp theo là tiến hành phát hiện các kiểu gen chỉnh sửa. Ở đây, hai bước quan trọng đối với thực vật là chuyển cấu trúc chỉnh sửa vào tế bào và phát hiện các kiểu gen chỉnh sửa sẽ được trình bày.

Chuyển cấu trúc chỉnh sửa vào tế bào

Trong các nghiên cứu về chỉnh sửa hệ gen ở thực vật, các cấu trúc chỉnh sửa được chuyển đến vị trí mục tiêu chủ yếu bằng *Agrobacterium tumefaciens* (Cai *et al.*, 2009; de Pater *et al.*, 2009, 2013; Ali *et al.*, 2015, Lee *et al.*, 2019, Char *et al.*, 2017, 2020). Phương pháp này cho phép tích hợp T-DNA vào hệ gen và biểu hiện ổn định hoặc tạm thời (trong trường hợp thâm truyền agro-infiltration) các thành phần chỉnh sửa gen. Với phương pháp này thì thực vật chỉnh sửa gen sẽ chứa trình tự DNA ngoại lai, bao gồm cả cấu trúc mã hóa cho các thành phần chỉnh sửa trong hệ gen cây chủ. Do đó, để loại bỏ các chuỗi DNA có nguồn gốc *A. tumefaciens* này bằng cách nhân giống là không khả thi đối với các loài sinh sản vô tính như nho, khoai tây và chuối.

Một số nghiên cứu (Curtin *et al.*, 2011; Iaffalando *et al.*, 2016, Kirchner *et al.*, 2017;

Zhou *et al.*, 2018) đã sử dụng *A. rhizogenes* như một công cụ vận chuyển các thành phần chỉnh sửa gen. Vi khuẩn này gây ra sự hình thành rễ tơ nên có thể gián tiếp chứng minh việc chỉnh sửa gen thành công và hỗ trợ việc chọn lọc các thể biến đổi gen.

Một phương pháp khác đã được sử dụng là dùng virus thực vật (plant geminivirus) làm phương tiện để sản xuất nhiều RNA dẫn giúp cải thiện hiệu quả chỉnh sửa gen (Baltes *et al.*, 2014, Yin *et al.*, 2015, Butler *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017b).

Các cấu trúc chỉnh sửa cũng đã được đưa vào tế bào bằng phương pháp bắn gen (Ainley *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2016, Svitashv *et al.*, 2016). Phương pháp này có thể sử dụng để đưa các plasmid mang các cấu trúc chỉnh sửa gen (Sun *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016a; Zhang *et al.*, 2017) hoặc để đưa phức hợp ribonucleoprotein (RNP) bao gồm Cas nuclease và gRNA tương ứng (Svitashv *et al.*, 2015; Liang *et al.*, 2017, 2018b) vào tế bào thực vật. Việc sử dụng RNP cho bắn gen sẽ cải thiện đáng kể hiệu quả chỉnh sửa.

Phương pháp chuyển nạp thông qua protoplast bằng xử lý polyethyl glycol đã được thông báo sử dụng để chuyển trực tiếp các plasmid mã hóa các thành phần chỉnh sửa gen (Wright *et al.*, 2005; Townsend *et al.*, 2009; Malnoy *et al.*, 2016, Subburaj *et al.*, 2016; Andersson *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2017) và RNP (Woo *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2017; Andersson *et al.*, 2018; Tuncel *et al.*, 2019) vào protoplast. Chuyển các RNP vào tế bào thực vật thông qua protoplast có thể loại bỏ khả năng chèn DNA tái tổ hợp vào hệ gen cây chủ. Hơn nữa, các RNP phân hủy ngay sau khi chuyển vào bởi enzyme phân hủy protein nội sinh trong các tế bào nên có thể làm giảm tần số khảm và hiệu ứng ngoài mục tiêu trong toàn bộ cây tái sinh. Bởi vì không cần phải tối ưu hóa sử dụng codon hoặc tìm promoter phù hợp để biểu hiện Cas9 và gRNA, việc sử dụng các RNP có thể mở rộng khả năng ứng dụng để chỉnh sửa gen cho tất cả các loài thực vật. Ngoài ra, sử dụng RNP cho phép sàng lọc trong ống nghiệm để lựa chọn gRNA hoạt động mạnh và đánh giá kiểu gen của các

dòng đột biến thông qua phân tích đa hình chiều dài các đoạn cắt giới hạn. Ưu điểm chính của phương pháp này là khả năng thu được các cây chỉnh sửa gen không có DNA ngoại lai, vì cây được tái sinh từ một protoplast biến đổi gen. Nhược điểm quan trọng của phương pháp này là vấn đề tái sinh cây hoàn chỉnh từ protoplast vẫn chưa được giải quyết cho nhiều loài cây.

Phát hiện các kiểu gen chỉnh sửa

Để phát hiện các đột biến gây ra bởi công cụ chỉnh sửa gen, hiện nay có thể sử dụng các phương pháp PCR/RE (Shan *et al.*, 2014), phương pháp cắt không phù hợp (enzyme mismatch cleavage) sử dụng enzyme T7 Endonuclease I hoặc Surveyor (Vouillot *et al.*, 2015), phân tích RFLP với enzyme cắt có nguồn gốc từ gRNA CRISPR/Cas9 (RGEN) (RGEN-mediated RFLP analysis - Kim *et al.*, 2014), giải trình tự Sanger (Brinkman *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015), giải trình tự thế hệ mới (Guell *et al.*, 2014), giải trình tự sâu và phân tích trình tự toàn bộ hệ gen (Li *et al.*, 2019b; Qin *et al.*, 2020), phân tích độ tan chảy với độ phân giải cao (Dahlem *et al.*, 2012) và PCR kết hợp điện di mao quản huỳnh quang (Ramlee *et al.*, 2015, 2017). Ngoài ra, có thể sử dụng PCR sau đó dùng phức hợp RNP tinh chế của Cas9 hoặc Cpf1 (hay gọi là Phương pháp PCR/RNP) để phát hiện các đột biến chỉnh sửa gen (Liang *et al.*, 2018). Phương pháp này nhạy hơn phương pháp giải trình tự Sanger và có thể áp dụng nhiều hơn phương pháp PCR/RE vì không yêu cầu vị trí nhận biết như enzyme cắt hạn chế.

ỨNG DỤNG CÁC CÔNG CỤ CHỈNH SỬA HỆ GEN Ở THỰC VẬT

Ứng dụng ZFN

ZFN được phát hiện vào năm 1996 (Kim *et al.*, 1996). Năm 2003, lần đầu tiên các nhà khoa học có thể làm bất hoạt gen bằng cách sử dụng ZFN (Bibikova *et al.*, 2003). Năm 2005, lần đầu tiên ZFN đã được thực hiện thành công ở thực vật (Lloyd *et al.*, 2005). Tiếp đến là sự thành công trong việc sử dụng ZFN để biến đổi di truyền ở các loài cây khác nhau như ngô, thuốc lá, Arabidopsis, đậu tương, lúa... (Shukla *et al.*,

2009; Townsend *et al.*, 2009; de Pater *et al.*, 2009, 2013; Zhang *et al.*, 2010; Sander *et al.*, 2011; Curtin *et al.*, 2011; Cantos *et al.*, 2014). ZFN đã sử dụng để vô hiệu hóa gen ở *Arabidopsis* (Osakabe *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010), biến đổi gen ở thuốc lá (Townsen *et al.*, 2009), bổ sung chính xác gen mục tiêu kháng chất diệt cỏ hoặc làm gián đoạn locus đích trong ngô (Shukla *et al.*, 2009) hay quy tụ gen ở ngô (Petolino *et al.*, 2010; Ainley *et al.*, 2013). Gần đây, Bonawitz và đồng tác giả (2019) đã sử dụng ZFN để tạo cây đậu trong chuyển gen thông qua cơ chế NHEJ chèn đa gen chỉnh sửa vào locus *FAD2-1a* liên quan đến thành phần tinh dầu ở hạt. Hiện nay, ZFN không được sử dụng nhiều do tính hướng mục tiêu thấp, số lượng mục tiêu giới hạn và số lượng chỉnh sửa sai mục tiêu lớn.

Ứng dụng TALEN

TALEN đã được sử dụng thành công ở một số loài thực vật bao gồm *Arabidopsis* (Christian *et al.*, 2013; Former *et al.*, 2015), thuốc lá (Zhang *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016), lúa (Li *et al.*, 2012a, 2016; Ma *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016a; Nishizawa-Yokoi *et al.*, 2016), lúa mì (Wang *et al.*, 2014), lúa mạch (Wendt *et al.*, 2013; Gurushidze *et al.*, 2014; Budhagatapalli *et al.*, 2015), ngô (Liang *et al.*, 2014; Char *et al.*, 2015), đậu tương (Haun *et al.*, 2014, Du *et al.*, 2016), khoai tây (Sawai *et al.*, 2014; Nicolai *et al.*, 2015; Clasen *et al.*, 2016), cà chua (Lor *et al.*, 2014; Xiong *et al.*, 2015; Cermak *et al.*, 2015), *Brassica oleracea* (Sun *et al.*, 2013), mía (Jung, Altpeter, 2016; Kannan *et al.*, 2018).

Một số đặc điểm nông học, như khả năng kháng bệnh ở lúa (Li *et al.*, 2012a; Blanvillain - Baufume *et al.*, 2017), kháng chất diệt cỏ ở lúa mì (Wang *et al.*, 2014) và lúa (Li *et al.*, 2016c), hoạt động phytase trong lúa mạch (Wendt *et al.*, 2013), chất lượng dầu trong đậu tương (Haun *et al.*, 2014; Demorest *et al.*, 2016), hương thơm trong gạo (Shan *et al.*, 2015), khả năng bảo quản lạnh và các đặc điểm chế biến trong khoai tây (Clasen *et al.*, 2016), sinh tổng hợp lignin, caffeic acid O-methyltransferase (COMT) để giảm hàm lượng lignin trong mía (Jung, Altpeter, 2016) hay cải tiến hiệu quả quá trình saccharin hóa mà

không làm giảm năng suất sinh khối ở mía (Kannan *et al.*, 2018) đã được cải tiến thông qua công cụ TALEN.

Ứng dụng CRISPR/Cas

Kể từ báo cáo đầu tiên về chỉnh sửa gen ở thực vật vào năm 2013, CRISPR/Cas9 đã được sử dụng để chỉnh sửa gen ở một số loài thực vật, bao gồm thuốc lá (Li *et al.*, 2013a; Nekrasov *et al.*, 2013), *Arabidopsis* (Li *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2013; Mao *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2013, 2014), lúa (Shan *et al.*, 2013, 2013a; Miao *et al.*, 2013; Xie, Wang, 2013; Woo *et al.*, 2015; Endo *et al.*, 2016, 2016a; Li *et al.*, 2016a, Sun *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2019; Hoang *et al.*, 2020), lúa mì (Shan *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2017), lúa mạch (Che *et al.*, 2018; Char *et al.*, 2020), cà chua (Brooks *et al.*, 2014; Ueta *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018d), ngô (Svitashev *et al.*, 2015; Char *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2019), khoai tây (Wang *et al.*, 2015a), cây dương (Fan *et al.*, 2015), đậu tương (Michino *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015), rêu (Lopez-Obando *et al.*, 2016;), cải dầu (Braatz *et al.*, 2017), *Brassica oleracea* (Lawrenson *et al.*, 2015;), cam ngọt (Jia, Wang, 2014; Jia *et al.*, 2016, 2019), táo (Nishitani *et al.*, 2016), liverwort (Sugano *et al.*, 2014), nho (Ren *et al.*, 2016), rau diếp (Woo *et al.*, 2015; Bertier *et al.*, 2018), dưa chuột (Chandrasekaran *et al.*, 2016), cao su (Iaffaldano *et al.*, 2016), bông (Chen *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2019b; Qin *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2021), *Lotus japonicus* (Wang *et al.*, 2016a), lanh (Sauer *et al.*, 2016), cây dã yên (Zhang *et al.*, 2016), cam quýt (Jia, Wang, 2014; Jia *et al.*, 2016), dưa hấu (Tian *et al.*, 2017) và sắn (Odipio *et al.*, 2017; Hummel *et al.*, 2018).

Hệ thống CRISPR/Cas9 được ứng dụng nhiều cho nghiên cứu chức năng gen của thực vật, đặc biệt là các gen đóng vai trò quan trọng trong việc cải tiến di truyền của nhiều đặc điểm nông học quan trọng như: làm mất chức năng một số gen, chỉnh sửa hay thay thế để tạo ra cây trồng với các đặc điểm vượt trội bao gồm khả năng kháng bệnh, thích nghi với các điều kiện bất lợi phi sinh học khác nhau, cải thiện chất lượng dinh dưỡng và năng suất.

Tạo cây trồng kháng bệnh

CRISPR/Cas9 được sử dụng trực tiếp để làm mất chức năng các gen gây bệnh hay còn gọi S-gen để phát triển các cây trồng kháng bệnh. Chẳng hạn như việc làm bất hoạt gen *OsERF922* dẫn đến tăng tính kháng bệnh đạo ôn do *Magnaporthe oryzae* gây ra ở lúa (Wang *et al.*, 2016). Tương tự, gây đột biến bất hoạt gen *SWEET13* làm tăng khả năng kháng bệnh bạc lá lúa (Zhou *et al.*, 2015). Zhang và đồng tác giả (2017), Nekrasov và đồng tác giả (2017) đã tạo đột biến ở gen *TaEDR1* và gen *MLO* để nhận các cây lúa mì và cà chua kháng bệnh mốc sương. Các gen liên quan đến tính kháng bệnh do virus gây ra cũng là các gen mục tiêu được tạo đột biến bằng công cụ CRISPR/Cas9 để tạo giống cây trồng kháng virus (Zaidi *et al.*, 2016).

Ortigosa và đồng tác giả (2019) đã báo cáo việc tạo ra giống cà chua kháng bệnh do vi khuẩn *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Pto) DC3000 gây ra thông qua chỉnh sửa gen *SIJAZ2* bằng CRISPR/Cas9. Khả năng kháng bệnh sọc nâu ở sắn (Cassava brown streak disease - CBSD) đã nhận được khi chỉnh sửa đồng thời các gen *eIF4E* là *nCBP-1* và *nCBP-2* bằng công cụ chỉnh sửa CRISPR/Cas9 (Gomez *et al.*, 2019). Li và đồng tác giả (2020) sử dụng CRISPR/Cas9 chỉnh sửa promoter của gen *Xa13* để tạo dòng lúa kháng bệnh bạc lá. Trong khi chỉnh sửa promoter của gen *OsSWEET14* ở siêu lúa Basmati bằng CRISPR/Cas9, Zafar và đồng tác giả (2020) đã tạo được 4 dòng lúa kháng bệnh bạc lá. Zhang và đồng tác giả (2020) sử dụng hệ thống CRISPR/Cas9 chỉnh sửa nhiều gen để tạo đột biến ba gen *GmF3H1*, *GmF3H2* và *GmFNSII-1* ở rễ tơ và cây đậu tương. Kết quả đã tạo được các cây đậu tương đột biến có hàm lượng isoflavone ở lá cao gần gấp đôi so với đối chứng và có khả năng kháng virus khảm đậu tương (SMV).

Tạo cây trồng chống chịu yếu tố bất lợi phi sinh học

CRISPR/Cas9 đã được áp dụng rộng rãi trong các cây trồng chính như lúa mì, lúa, ngô, bông, đậu tương, cà chua và khoai tây để tạo giống chống chịu các yếu tố bất lợi phi sinh học. Các gen *TaDREB3* và *TaDREB2* ở lúa mì (Kim *et al.*, 2017), protein kinase hoạt hóa bằng

mitogen (*OsMPK2*), phytoene desaturase (*OsPDS*) và betaine aldehyd dehydrogenase (*OsBADH2*) ở lúa (Shan *et al.*, 2013), *AGROS* ở ngô (Shi *et al.*, 2017), *Drb2a* và *Drb2b* ở đậu tương (Curtin *et al.*, 2018), *MAPKs* và *SIMAPK3* ở cà chua (Wang *et al.*, 2017) đã được chỉnh sửa bằng CRISPR/Cas9 để tạo cây trồng có tính chịu hạn hoặc mặn. Gần đây, Zhang và đồng tác giả (2019) đã báo cáo cải thiện khả năng chịu mặn của lúa bằng sử dụng vector biểu hiện Cas9-OsRR22-gRNA để chỉnh sửa gen *OsRR22*.

Cải thiện năng suất cây trồng

Làm mất chức năng các gen ảnh hưởng tiêu cực đến các yếu tố cấu thành năng suất như số nhánh (*OsAAP3*), kích thước bông (*OsDEP1*, *TaDEP1*), khối lượng hạt (*TaGW2*, *TaGASR7*), kích thước hạt (*OsGS3*, *OsGRF4*) và số hạt (*OsGn1a*) bằng hệ thống CRISPR/Cas9 đã được nhiều tác giả công bố. Kết quả đã chứng minh rằng CRISPR/Cas9 là một công cụ hiệu quả để cải thiện năng suất cây trồng (Li *et al.*, 2016b; Lu *et al.*, 2018). Gây đột biến đồng thời các gen *GS3*, *GW2*, *GW5* và *TGW6*, Xu và đồng tác giả (2016) đã quy tụ được sự gia tăng kích thước hạt và khối lượng hạt. Trong một nghiên cứu khác, 30 giống lúa đã được đọc trình tự toàn bộ hệ gen và 57 gen kiểm soát các đặc điểm liên quan đến năng suất đã được sàng lọc. Những đột biến của 57 gen này đã được tạo ra bằng công cụ CRISPR/Cas9. Kết quả đánh giá kiểu hình đã chỉ ra một số gen rất quan trọng cho việc điều chỉnh các tính trạng liên quan đến năng suất lúa (Huang *et al.*, 2018). Ở lúa mì, làm mất chức năng gen *GASR7* thông qua CRISPR/Cas9 đã làm gia tăng khối lượng hạt (Zhang *et al.*, 2016b). Chỉnh sửa gen *TaGW2* có vai trò quan trọng đối với tính trạng khối lượng hạt, Zhang và đồng tác giả (2018a) đã khẳng định vai trò của gen này, ngoài ra, kết quả của tác giả cũng cho thấy ngoài sự gia tăng khối lượng hạt, ở một số dòng lúa mì đột biến còn có sự gia tăng protein hạt, đặc biệt là hai chỉ tiêu liên quan đến chất lượng sử dụng là protein bột và độ bền của gluten cũng tăng (Zhang *et al.*, 2018a).

Cải thiện chất lượng cây trồng

Công cụ CRISPR/Cas9 được ứng dụng nhiều

để cải thiện chất lượng cây trồng bao gồm: chất lượng lưu trữ, giá trị dinh dưỡng, hương thơm và hàm lượng tinh bột. Chất lượng nấu của gạo đã được cải thiện khi làm biến đổi gen *Waxy* bằng CRISPR/Cas9 (Zhang *et al.*, 2018). Giá trị dinh dưỡng của gạo cũng đã được cải thiện bằng cách làm bất hoạt gen *SBEIIb* dẫn đến kết quả tổng hợp nhiều hơn amylose (Sun *et al.*, 2017). Gen *GBSS* liên quan đến tổng hợp tinh bột ở khoai tây đã được gây đột biến thông qua CRISPR/Cas9, các dòng đột biến có hàm lượng amylose giảm nhưng tỷ lệ amylose/amylopectin lại tăng (Andersson *et al.*, 2017). Qi và đồng tác giả (2016) đã báo cáo giảm được 12,5% protein zein (một loại protein nghèo dinh dưỡng, khó hấp thụ) trong hạt ngô bằng tạo đột biến gen *PPR* và *RPL* bằng CRISPR/Cas9, ở các cây đột biến có sự gia tăng năng suất, hàm lượng tryptophan và lysine. DuPont Pioneer đã sản xuất một dòng ngô năng suất cao cho mục đích thương mại bằng việc làm bất hoạt gen *Waxy* thông qua CRISPR/Cas9 (Waltz, 2016). CRISPR/Cas9 cũng được sử dụng để sản xuất gạo có hàm lượng amylose cao và tinh bột bền bằng cách gây đột biến gen mã hóa enzyme phân nhánh tinh bột *SBEIIb* (Sun *et al.*, 2017). Tuncel và đồng tác giả (2019) đã chứng minh rằng đột biến các gen *SBE* thông qua CRISPR/Cas9 có khả năng tạo ra các đặc tính tinh bột mới, có giá trị mà không cần tích hợp DNA ngoại lai vào hệ gen. Hoang và đồng tác giả (2020) tạo ra sáu allele *Wx* mới bằng cách chỉnh sửa khu vực gần hộp TATA của đoạn khởi động gen *Wxb* làm giảm biểu hiện gen *Wx* và điều chỉnh hàm lượng amylose (AC). Trong đó allele *Wxb-d8* cho thấy tiềm năng trong chọn giống, vì hoạt động của nó làm giảm vừa phải và ổn định AC dưới các điều kiện sinh trưởng khác nhau và có các đặc điểm tương tự như dòng mang allele *Wxmp* và có AC rất thấp.

Với công cụ CRISPR/Cas9, Zeng và đồng tác giả (2020) đã tạo đột biến trong chuỗi 2 kb bao gồm 0,9 kb làm nhiệm vụ điều hòa promoter của gen *Wxa* và 1,1 kb vùng không mã (intron) gồm vùng 5' không dịch mã (UTR) của giống lúa *indica* TianFengB (TFB) có năng suất cao, nhưng chất lượng hạt kém do hàm lượng amylose (AC) cao (khoảng 25%) và độ bền gen (GC) thấp

(56 mm). Kết quả là các tác giả đã nhận được những dòng lúa chỉnh sửa gen có hàm lượng amylose giảm từ 19,6 đến 9,8% và độ bền gen tăng đến 62-83 mm (so với 56 mm ở đối chứng). Với mục đích cải tạo năng suất và chất lượng tinh bột, Chao và đồng tác giả (2019) đã tạo đột biến ở gen *isoamylase 1 (ISA1)* và đã nhận được cây lúa chỉnh sửa gen với hàm lượng đường và độ bền gen cao. Liu và đồng tác giả (2020) đã nghiên cứu dùng CRISPR/Cas9 để chỉnh sửa nhiều gen và tạo đột biến mục tiêu dựa trên phương pháp lập bản đồ di truyền và hệ gen, đã thành công trong tạo đột biến 743 gen ứng cử viên đích tương ứng với các đặc điểm liên quan đến nông học và dinh dưỡng.

Một số nghiên cứu khác nhằm cải thiện chất lượng cây trồng đã được thực hiện thông qua CRISPR/Cas9, ví dụ, tạo cây *Camelina sativa* và *Brassica napus* chỉnh sửa gen có nồng độ oleic acid cao (Jiang *et al.*, 2017; Okuzaki *et al.*, 2018), cà chua có thời hạn sử dụng dài (Li *et al.*, 2018c) và hàm lượng lycopene (Li *et al.*, 2018e) hoặc amin γ -aminobutyric acid tăng (Li *et al.*, 2018a).

Các tính trạng khác ở cây trồng

Ngoài các tính trạng chống chịu, năng suất chất lượng, một số tính trạng khác cũng đã được nghiên cứu cải thiện thông qua CRISPR/Cas9. Sanchez-Leon và đồng tác giả (2018) đã tạo dòng lúa mì có hàm lượng gluten (protein liên quan đến bệnh không dung nạp gluten) thấp bằng công cụ CRISPR/Cas9. Sử dụng CRISPR/Cas9, Shao và đồng tác giả (2020) đã chỉnh sửa gen *MaGA20ox2* trong cây chuối và thu được đột biến nửa lùn.

Thực vật có thể sử dụng để sản xuất các protein dược phẩm, nhưng sự khác biệt giữa glycan liên kết N của thực vật và động vật có vú, bao gồm sự hiện diện của dư lượng β -1,2-xylose và lõi α -1,3-fucose trong thực vật, có thể ảnh hưởng đến hoạt động, hiệu lực và khả năng sinh miễn dịch của protein có nguồn gốc thực vật. Do đó, việc sửa đổi N-glycosyl nội sinh để tổng hợp N-glycans không có β -1,2-xylose và α -1,3-fucose là rất cần thiết. Jansing và đồng tác giả

(2019) đã sử dụng CRISPR/Cas9 để tạo cây thuốc lá *N. benthamiana* sản xuất protein tái tổ hợp thiếu α -1,3-fucose và β -1,2-xylose nhờ đột biến của sáu gen khác nhau.

Ứng dụng hệ thống CRISPR/Cpf1

Hệ thống CRISPR/Cpf1 đã được áp dụng thành công ở các loài thực vật như lúa (Tang *et al.*, 2017, 2018, 2019; Wang *et al.*, 2017a, Li *et al.*, 2020b), đậu tương (Kim *et al.*, 2017) thuốc lá, cà chua, *Arabidopsis* (Bernabe-Orts *et al.*, 2019) và ngô (Lee *et al.*, 2019). Đáng chú ý, không có đột biến ngoài mục tiêu được phát hiện ở vị trí ngoài mục tiêu trong cây lúa được chỉnh sửa bằng LbCpf1, cho thấy rằng LbCpf1 là một công cụ chỉnh sửa gen hiệu quả và chính xác (Tang *et al.*, 2018). Ở cây bông, Li và đồng tác giả (2019) đã thành công trong chỉnh sửa gen với hiệu suất chỉnh sửa 87% và không có hiện tượng sai mục tiêu.

Jia và đồng tác giả (2019) đã sử dụng LbCas12a để chỉnh sửa gen *CsPDS* ở bưởi Duncan. Các kết quả cho thấy LbCas12a có thể được sử dụng để chỉnh sửa gen cây có múi. Đáng chú ý là một dòng bưởi Duncan chỉnh sửa gen có giảm bớt các triệu chứng bệnh thối cây do chủng *Xanthomonas citri* XccDpthA4: dCsLOB1.4 gây ra. Để cải thiện thành phần dầu của đậu tương, hệ thống CRISPR/Cpf1 đã được sử dụng để tạo đột biến hai gen *FAD2-1B* và *FAD2-1A*. Kết quả đã tạo được cây đậu tương cho năng suất cao với nồng độ axit oleic được cải thiện (Kim *et al.*, 2017).

Ứng dụng hệ thống chỉnh sửa base

Hệ thống chỉnh sửa base cytosine và adenine đã được sử dụng thành công trong các loại cây trồng chính và cây mô hình để chỉnh sửa các gen liên quan đến đa hình nucleotide đơn ở lúa (Li *et al.*, 2017a; Shimatani *et al.*, 2017; Tian *et al.*, 2018; Ren *et al.*, 2018), lúa mì (Zong *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018b), ngô (Zong *et al.*, 2017), khoai tây (Zong *et al.*, 2018; Veilet *et al.*, 2019), cà chua (Shimatani *et al.*, 2017; Veilet *et al.*, 2019), dưa hấu (Tian *et al.*, 2018), đậu tương (Cai *et al.*, 2020) và cải dầu (Cheng *et al.*, 2021). Ở lúa các tính trạng như kháng đạo ôn (Ren *et*

al., 2018), kháng chất diệt cỏ (Li *et al.*, 2018b; Veilet *et al.*, 2019), hay các tính trạng về năng suất (Hua *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019a), chất lượng (Li *et al.*, 2019a) đã được cải tạo thông qua BE. Khả năng kháng chất diệt cỏ ở khoai tây, cà chua, dưa hấu (Veilet *et al.*, 2019; Tian *et al.*, 2018) hay năng suất ở lúa mì (Li *et al.*, 2018b) và sự phân ly chromosome ở ngô (Zong *et al.*, 2017) cũng đã được cải tạo nhờ sử dụng hệ thống BE.

Wu và đồng tác giả (2020) sửa dụng CBE chỉnh sửa gen *BnALS1* ở vị trí P197 tạo được cây cải dầu kháng chất diệt cỏ. Qin và đồng tác giả (2020) đã phát triển một hệ thống GhBE3 bao gồm miền cytidine deaminase kết hợp với nCas9 và UGI, để chỉnh sửa gen *GhCLA* (liên quan đến phát triển của lục lạp) và *GhPEBP* (liên quan đến phát triển cành) ở cây bông đã nhận được hiệu quả chỉnh sửa cao (lên tới 57,78%) và không có chỉnh sửa ngoài mục tiêu.

Xu và đồng tác giả (2021) đã sử dụng hệ thống CBE với việc thiết kế 3 sgRNA nhằm ba exon TS1, TS2 và TS3 của gen *Wxb* để tạo hàng loạt đột biến có hàm lượng amylose từ 1,4% – 11,9% và đã điều chỉnh chỉnh được hàm lượng amylose ở lúa từ 0% – 12%. Kết quả này làm phong phú thêm nguồn vật liệu cho các nhà chọn giống.

Ứng dụng hệ thống chỉnh sửa prime

Khả năng đặc biệt của PE là sửa đổi trình tự mục tiêu trong hệ gen cho những ứng dụng khác nhau trong sinh học thực vật, bao gồm nghiên cứu cơ bản như phân tích thông lượng cao về chức năng gen để cải thiện việc chú giải và tạo ra sự đa dạng di truyền nhân tạo theo hướng tiến hóa, cũng như ứng dụng thực tiễn phát triển các cây trồng được cải thiện năng suất, kháng bệnh, chống chịu các stress phi sinh học, và gia tăng số lượng cũng như chất lượng các chất hữu ích trong thực vật.

Hệ thống PE đã thành công trên cây lúa (Li *et al.*, 2020a; Lin *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2020) và lúa mì (Lin *et al.*, 2020) trong việc tạo ra các cây chỉnh sửa gen chịu chất diệt cỏ. Theo đó, sự thay thế nucleotide của gen acetolactate synthase

(ALS) nội sinh và ngoại sinh ở lúa đã thành công với tần số 0,26 đến 2% (Butt *et al.*, 2020), 14,3% (Lin *et al.*, 2020) và cao nhất là 26% (Xu *et al.*, 2020) còn của gen 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) là 2,22% (Li *et al.*, 2020a). Ở khoai tây tứ bội, với hệ thống chỉnh sửa PE2, Veillet và đồng tác giả (2020) đã nhận được 3 sự kiện thay thế ở locus mục tiêu ở gen *StALS1* và có tới 92% cây chuyển gen mang đột biến. PE là hệ thống chỉnh sửa mới và còn ít được nghiên cứu nhưng có nhiều hứa hẹn trong chỉnh sửa gen thực vật, tuy nhiên, nó cần được tối ưu hóa hơn nữa các thành phần và điều kiện.

THÁCH THỨC ĐỐI VỚI CHỈNH SỬA HỆ GEN Ở THỰC VẬT

Mặc dù chỉnh sửa hệ gen thông qua các công cụ chỉnh sửa, đặc biệt là CRISPR/Cas đã đạt được những thành tựu đáng kể trong cải tiến cây trồng, chỉnh sửa hệ gen còn có những thách thức nhất định cần được khắc phục để phát triển hệ thống chỉnh sửa hiệu quả hơn. Một thách thức quan trọng là phương pháp chuyển cấu trúc chỉnh sửa vào cây. Hiện nay, các phương pháp chuyển cấu trúc chỉnh sửa vẫn dựa trên các phương pháp chuyển gen truyền thống. Các phương pháp này đều mang tính đặc thù cho các mô và kiểu gen khác nhau và vẫn còn nhiều hạn chế. Việc biến nạp cấu trúc chỉnh sửa mới hạn chế ở một số mô, một số kiểu gen và một số loài cây. Phát triển hệ thống biến nạp rất quan trọng cho hiệu quả chỉnh sửa hệ gen. Tiếp theo là thách thức về vấn đề chỉnh sửa ngoài mục tiêu và nguyên nhân của vấn đề này, vì có nhiều vấn đề an toàn liên quan với các sản phẩm sinh học từ chỉnh sửa hệ gen. Tuy nhiên, đột biến ngoài mục tiêu có thể được phát hiện và loại bỏ thông qua sự phân ly. Phát triển các hệ thống CRISPR yêu cầu PAM dài và thiết kế sgRNA gần hơn với trình tự mục tiêu, hay phạm vi chuyển đổi nucleotide rộng hơn (đối với các hệ thống BE và PE) có thể giúp giảm thiểu các chỉnh sửa ngoài mục tiêu trong tương lai. Chính vì vậy, việc tối ưu hóa các hệ thống chỉnh sửa và phát triển các hệ thống chỉnh sửa chính xác và hiệu quả hơn luôn là nhiệm vụ quan trọng của chỉnh sửa hệ gen nói chung và chỉnh sửa hệ gen ở thực vật nói riêng. Loại bỏ T-DNA và cấu

trúc chỉnh sửa để nhận cây chỉnh sửa gen không mang gen chuyển ngoại lai cũng là một thách thức đối với chỉnh sửa gen, đặc biệt là đối với các loài cây sinh sản vô tính. Đối với các cây sinh sản hữu tính, việc loại bỏ gen chuyển ngoại lai có thể thực hiện thông qua phân ly di truyền, tuy nhiên tỷ lệ cây không mang gen chuyển khá thấp và phải tốn thời gian. Chuyển các bản sao *in vitro* của Cas9 và sgRNA hay các ribonucleoprotein là các giải pháp cho vấn đề này.

Với việc khai thác các ý tưởng sáng tạo của sinh học hệ thống, sinh học tổng hợp, giải trình tự thế mới và những phát triển mới nhất về các phương pháp tiếp cận hệ gen chức năng, kết hợp với các công cụ chỉnh sửa hệ gen chính xác và hiệu quả sẽ cho phép phát triển cây trồng thông minh với năng suất cao hơn và chất lượng tốt hơn. Trong tương lai gần, công nghệ CRISPR/Cas, BE và PE có thể được kết hợp và thúc đẩy các chương trình tạo giống để cách mạng hóa nền nông nghiệp toàn cầu và tạo ra các sản phẩm cây trồng an toàn.

KẾT LUẬN

Các công nghệ chỉnh sửa hệ gen thông qua các công cụ chỉnh sửa khác nhau hứa hẹn cho chỉnh sửa gen hiệu quả và chính xác khi trình tự các gen mục tiêu được xác định. Những công cụ này, đặc biệt là sự đơn giản, linh hoạt và hiệu quả của hệ thống CRISPR/Cas giúp chỉnh sửa gen chính xác để cải tiến cây trồng thông qua gây đột biến có mục tiêu hoặc chèn/xóa/thay thế tại bất kỳ vị trí gen nào trong cây trồng. Những công cụ này có thể tạo ra các giống mới thông qua chỉnh sửa hệ gen một cách trực tiếp và trong nhiều trường hợp, đạt hiệu quả tương đương phương pháp chuyển gen nhưng có thể tạo ra các giống mới mà không cần đưa gen lạ vào hệ gen thực vật. Do đó, các giống cây trồng mới được tạo ra bằng các công cụ chỉnh sửa hệ gen phù hợp có thể được coi là cây trồng không chuyển gen, và vì thế có thể được chấp nhận hơn ở các quốc gia nơi mà cây trồng biến đổi gen bị công chúng từ chối. Nhiều tính trạng nông sinh học quan trọng như tính kháng bệnh, khả năng chống chịu các yếu tố bất lợi của môi trường, năng suất, chất lượng v.v đã được cải thiện thông qua chỉnh sửa

hệ gen. Tuy nhiên, vẫn còn nhiều thách thức về độ chính xác và hiệu quả như phương pháp chuyển nạp cấu trúc chỉnh sửa, sự chỉnh sửa ngoài mục tiêu và hiệu suất chỉnh sửa thấp cần phải giải quyết. Xong, chúng ta tin rằng những rào cản này sẽ được tháo gỡ và các công cụ chỉnh sửa hệ gen ở thực vật sẽ tiết kiệm thời gian và cho hiệu quả cao, đặc biệt là hệ thống CRISPR/Cas, hệ thống chỉnh sửa base và hệ thống chỉnh sửa prime chắc chắn sẽ trở thành các công cụ tạo giống cây trồng phổ biến trong tương lai. Ngoài ra, sự kết hợp các công cụ chỉnh sửa hệ gen với những công nghệ tạo giống khác sẽ tạo ra các cây trồng có khả năng chống chịu điều kiện ngoại cảnh bất lợi, chịu bệnh, có chất lượng dinh dưỡng, hình thái phù hợp và năng suất cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ainley WM, Sastry-Dent L, Welter ME, Murray MG, Zeitler B, Amora R, Corbin DR, Miles RR, Arnold NL, Strange TL, Simpson MA, Cao Z, Carroll C, Pawelczak KS, Blue R, West K, Rowland LM, Perkins D, Samuel P, Dewes CM, Shen L, Sriram S, Evans SL, Rebar EJ, Zhang L, Gregory PD, Urnov FD, Webb SR, Petolino JF (2013) Trait stacking via targeted genome editing. *Plant Biotechnol J* 11(9): 1126-1134.
- Ali Z, Abul-faraj A, Li L, Ghosh N, Piatek M, Mahjoub A, Aouida M, Piatek A, Baltés NJ, Voytas DF, Dinesh-Kumar S, Mahfouz MM (2015) Efficient virus-mediated genome editing in plants using the CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant* 8: 1288-1291
- Andersson M, Turesson H, Nicolia A, Fält AS, Samuelsson M, Hofvander P (2017) Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Rep* 36: 117-128.
- Andersson M, Turesson H, Olsson N, Fält AS, Ohlsson P, Gonzalez MN, Samuelsson M, Hofvander P (2018) Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery. *Physiol Plant* 164: 378-384.
- Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, Sousa AA, Koblan LW, Levy JM, Chen PJ, Wilson C, Newby GA, Raguram A, Liu DR (2019) Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* 576: 149-157.
- Baltés NJ, Gil-Humanes J, Cermak T, Atkins PA, Voytas DF (2014) DNA replicons for plant genome engineering. *Plant Cell* 26: 151-163.
- Bernabe-Orts JM, Casas-Rodrigo I, Minguet EG, Landolfi V, Garcia-Carpintero V, Gianoglio S, Vazquez-Vilar M, Granell A, Orzaez D (2019) Assessment of Cas12a-mediated gene editing efficiency in plants. *Plant Biotech J* 17: 1971-1984.
- Bertier LD, Ron M, Huo H, Bradford K J, Britt A B, Michelmore RW (2018) High-resolution analysis of the efficiency, heritability, and editing outcomes of CRISPR-Cas9 -induced modifications of NCED4 in lettuce (*Lactuca sativa*). *G3* 8: 1513-1521.
- Bhaya D, Davison M, and Barrangou R (2011) CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: Versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet* 45: 273-279.
- Bibikova M, Beumer K, Trautman JK, Carroll D (2003) Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science* 300: 764, doi: 10.1126/science.1079512.
- Blanvillain-Baufume S, Reschke M, Sole M, Auguy F, Doucoure H, Szurek B, Meynard D, Portefaix M, Cunnac S, Guiderdoni E, Boch J, Koebnik R (2017) Targeted promoter editing for rice resistance to *Xanthomonas oryzae* pv *Oryzae* reveals differential activities for SWEET14-inducing TAL effectors. *Plant Biotechnol J* 15(3): 306-317.
- Bogdanove AJ, Voytas DF (2011) TAL effectors: Customizable proteins for DNA targeting. *Science* 333: 1843-1846.
- Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U (2009) Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326: 1509-1512
- Bonawitz ND, Ainley WM, Itaya A, Chennareddy SR, Cacak T, Effinger K, Jiang K, Mall TK, Marri PR, Samuel JP, Sardesai N, Simpson M, Folkerts O, Sarria R, Webb SR, Delkin, Gonzalez DO, Simmonds DH, Dayakar R, Paredy DR (2019) Zinc finger nuclease-mediated targeting of multiple transgenes to an endogenous soybean genomic locus via non-homologous end joining. *Plant Biotech J* 17: 750-761.
- Braatz, J, Harloff HJ, Mascher M, Stein N, Himmelbach A, Junget C (2017) CRISPR-Cas9 targeted mutagenesis leads to simultaneous modification of different homoeologous gene copies

- in polyploidy oilseed rape (*Brassica napus*). *Plant Physiol* 174: 935-942.
- Brinkman EK, Chen T, Amendola M, van Steensel B (2014) Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Res* 42 (22): e168.
- Brooks C, Nekrasov V, Lippman Z B, and Van Eck J (2014) Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. *Plant Physiol* 166: 1292-1297.
- Budhagatapalli N, Rutten T, Gurushidze M, Kumlehn J, Hensel G (2015) Targeted modification of gene function exploiting homologydirected repair of TALEN-mediated double-strand breaks in barley. *G3 (Bethesda)* 5(9): 1857-63.
- Butler NM, Baltes NJ, Voytas DF, Douches DS (2016) Geminivirus-mediated genome editing in potato (*Solanum tuberosum* L.) using sequence specific nucleases. *Front Plant Sci* 7: 1045.
- Butt H, Eid A, Ali Z, Atia MAM, Mokhtar MM, Hassan N, Lee CM, Bao G, Mahfouz MM (2017) Efficient CRISPR/Cas9-mediated genome editing using a chimeric single-guide RNA molecule. *Front Plant Sci* 8: 1441.
- Butt H, Rao GS, Sedeek K, Aman R, Kamel R, Mahfouz M (2020) Engineering herbicide resistance via prime editing in rice. *Plant Biotech J*: 1-3, doi: 10.1111/pbi.13399.
- Cai CQ, Doyon Y, Ainley WM, Miller JC, Dekelver RC, Moehle EA, Rock JM, Lee YL, Garrison R, Schulenberg L, Blue R, Worden A, Baker L, Faraji F, Zhang L, Holmes MC, Rebar EJ, Collingwood TN, Rubin-Wilson B, Gregory PD, Urnov FD, Petolino JF (2009) Targeted transgene integration in plant cells using designed zinc finger nucleases. *Plant Mol Biol* 69: 699-709.
- Cai Y, Chen L, Zhang Y, Yuan S, Su Q, Sun S, Wu C, Yao W, Han T, Hou W (2020) Target base editing in soybean using a modified CRISPR/Cas9 system. *Plant Biotech J* 1-3, doi: 10.1111/pbi.13386.
- Cantos C, Francisco P, Trijatmiko KR, Slamet-Loedin I, Chadha-Mohanty PK (2014) Identification of “safe harbor” loci in indica rice genome by harnessing the property of zinc-finger nucleases to induce DNA damage and repair. *Front Plant Sci* 5: 302.
- Cebrian-Serrano A, Davies B (2017) CRISPR-Cas orthologues and variants: optimizing the repertoire, specificity and delivery of genome engineering tools. *Mamm Genome* 28: 247-261.
- Cermak T, Doyle E L, Christian M, Wang L, Zhang Y, Schmidt C, Baller J A, Somia N V, Bogdanove A J, Voytas D F (2011) Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res* 39(12): e82.
- Cermak T, Baltes NJ, Cegan R, Zhang Y, Voytas DF (2015) High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biol* 16(1): 232.
- Chandrasekaran J, Brumin M, Wolf D, Leibman D, Klap C, Pearlsman M, Sherman A, Arazi T, Gal-On A (2016) Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Mol Plant Pathol* 17: 1140-1153.
- Chao S, Cai, Feng B, Jiao G, Sheng Z, Luo J, Tang S, Wang J, Hu P, Wei X (2019) Editing of rice isoamylase gene *ISA1* provides insights into its function in starch formation. *ScienceDirect, Rice Sci* 26(2): 77-87.
- Char SN, Unger-Wallace E, Frame B, Briggs SA, Main M, Spalding MH, Vollbrecht E, Wang K, Yang B (2015) Heritable site-specific mutagenesis using TALENs in maize. *Plant Biotechnol J* 13(7): 1002-1010.
- Char SN, Neelakandan AK, Nahampun H, Frame B, Main M, Spalding MH, Becraft PW, Meyers BC, Walbot V, Wang K, Yang B (2017) An *Agrobacterium*-delivered CRISPR/Cas9 system for high-frequency targeted mutagenesis in maize. *Plant Biotechnol J* 15: 257-268.
- Char SN, Wei J, Mu Q, Li X, Zhang ZJ, Yu J, Yan B (2020) An *Agrobacterium*-delivered CRISPR/Cas9 system for targeted mutagenesis in sorghum. *Plant Biotech J* 18: 319-321.
- Che P, Anand A, Wu E, Sander JD, Simon MK, Zhu W, Sigmund AL, Zastrow-Hayes G, Miller M, Liu D, Shai Lawit SJ, Zhao ZY, Albertsen MC, Joneset TJ (2018) Developing a flexible, high efficiency *Agrobacterium*-mediated sorghum transformation system with broad application. *Plant Biotechnol J* 16: 1388-1395.
- Chen X, Lu X, Shu N, Wang S, Wang J, Wang D, Guo L, Ye W (2017) Targeted mutagenesis in cotton

- Gossypium hirsutum* L using the CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep* 7: 44304.
- Cheng H, Hao M, Ding B, Mei D, Wang W, Wang H, Zhou R, Liu J, Li C, Hu Q (2021) Base editing with high efficiency in allotetraploid oilseed rape by A3A-PBE system. *Plant Biotech J* 19: 87-97.
- Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, Bogdanove AJ, Voytas DF (2010) Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* 186: 757-761.
- Christian M, Y Qi, Y Zhang, and D F Voytas, 2013. Targeted mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* using engineered TAL effector nucleases. *G3: Genes Genomes Genet* 3(9): 1697-1705.
- Clasen BM, Stoddard TJ, Luo S, Demorest ZL, Li J, Cedrone F, Tibebu R, Davison S, Ray EE, Daulhac A, Coffman A, Yabandith A, Retterath A, Haun W, Nicholas J, Baltes DS, Mathis L, Voytas DF, Zhang F (2016) Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. *Plant Biotechnol J* 14(1):169-176.
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini L A, Zhang F (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339: 819-823.
- Curtin SJ, Zhang F, Sander JD, Haun WJ, Starker C, Baltes NJ, Reyon D, Dahlborg EJ, Goodwin MJ, Coffman AP, Dobbs D, Joung JK, Voytas DF, Stupar RM (2011) Targeted mutagenesis of duplicated genes in soybean with zinc finger nucleases. *Plant Physiol* 156: 466-473.
- Curtin SJ, Xiong Y, Michno JM, Campbell BW, Stec AO, Cermak T, Starker C, Voytas DF, Eamens AL, Stupar RM (2018) CRISPR/Cas9 and TALENs generate heritable mutations for genes involved in small RNA processing of *Glycine max* and *Medicago truncatula*. *Plant Biotechnol J* 16: 1125-1137.
- Dahlem TJ, Hoshijima K, Juryneć MJ, Gunther D, Starker CG, Locke AS, Weis AM, Voytas DF, Grunwald DJ (2012) Simple methods for generating and detecting locus-specific mutations induced with TALENs in the zebrafish genome. *PLoS Genet* 8(8): e1002861.
- de Lange O, Schreiber T, Schandry N, Radeck J, Braun KH, Koszinowski J, Heuer H, Strauß A, Lahaye T (2013) Breaking the DNA-binding code of *Ralstonia solanacearum* TAL effectors provides new possibilities to generate plant resistance genes against bacterial wilt disease. *New Phytol* 199: 773-786.
- de Pater S, Neuteboom LW, Pinas JE, Hooykaas PJ, van der Zaal BJ (2009) ZFN-induced mutagenesis and gene-targeting in *Arabidopsis* through *Agrobacterium*-mediated floral dip transformation. *Plant Biotechnol J* 7: 821-835.
- de Pater S, Pinas JE, Hooykaas PJJ, van der Zaal BJ (2013) ZFN-mediated gene targeting of the *Arabidopsis* protoporphyrinogen oxidase gene through *Agrobacterium*-mediated floral dip transformation. *Plant Biotechnology J* 11: 510-515.
- Demorest ZL, Cofman A, Baltes NJ, Stoddard TJ, Clasen BM, Luo S, Retterath A, Yabandith A, Gamo ME, Bissen J, Mathis L, Voytas DF, Zhang F (2016) Direct stacking of sequence-specific nuclease-induced mutations to produce high oleic and low linolenic soybean oil. *BMC Plant Biol* 16(1): 225, doi: 10.1186/s12870-016-0906-1.
- D'Halluin K, Vanderstraeten C, Van Hulle J, Rosolowska J, Van Den Brande I, Pennewaert A, D'Hont K, Bossut M, Jantz D, Ruiter R, Broadhvest J (2013) Targeted molecular trait stacking in cotton through targeted double-strand break induction. *Plant Biotechnol J* 11: 933-941.
- Djukanovic V, Smith J, Lowe K, Yang M, Gao H, Jones S, Nicholson MG, West A, Lape J, Bidney D, Falco SC, Jantz D, Lyznik LA (2013) Male-sterile maize plants produced by targeted mutagenesis of the cytochrome P450-like gene (MS26) using a re-designed I-CreI homing endonuclease. *The Plant J* 76: 888-899.
- Dong D, Ren K, Qiu X, Zheng J, Guo M, Guan X, Liu H, Li N, Zhang B, Yang D, Ma C, Wang S, Wu D, Ma Y, Fan S, Wang J, Gao N, Huang Z (2016) The crystal structure of Cpf1 in complex with CRISPR RNA. *Nature* 532: 522-526.
- Du H, Zeng X, Zhao M, Cui X, Wang Q, Yang H, Cheng H, Yu D (2016) Efficient targeted mutagenesis in soybean by TALENs and CRISPR/Cas9. *J Biotechnol* 217: 90-97.
- Endo M, Mikami M, Toki S (2016) Biallelic gene targeting in rice. *Plant Physiol* 170: 667-677.
- Endo A, Masafumi M, Kaya H, Toki S (2016a) Efficient targeted mutagenesis of rice and tobacco genomes using Cpf1 from *Francisella novicida*. *Sci Rep* 6: 38169.

- Fan D, Liu T, Li C, Jiao B, Li S, Hou Y, Luo K (2015) Efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Populus* in the first generation. *Sci Rep* 5: 12217, doi: 10.1038/srep12217.
- Feng Z, Zhang B, Ding W, Liu X, Yang DL, Wei P, Cao F, Zhu S, Zhang F, Mao Y, Zhu JK (2013) Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res* 23: 1229-1232.
- Feng Z, Mao Y, Xu N, Zhang B, Wei P, Yang DL, Wang Z, Zhang Z, Zheng R, Yang L, Zeng L, Liu X, Zhu JK (2014) Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(12): 4632-4637.
- Fonfara I, Richter H, Bratovic M, Rhun A L, Charpentier E (2016) The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA. *Nature* 532: 517-521.
- Forner J, Pfeifer A, Langenecker T, Manavella PA, Lohmann JU (2015) Germline-transmitted genome editing in *Arabidopsis thaliana* using TAL-effector-nucleases. *PLoS One* 10(3): e0121056.
- Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD (2013) High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature Biotech* 31: 822-826.
- Gao H, Smith J, Yang M, Jones S, Djukanovic V, Nicholson MG, West A, Bidney D, Falco SC, Jantz D, Lyznik A (2010) Heritable targeted mutagenesis in maize using a designed endonuclease. *The Plant J* 61: 176-187.
- Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, Liu DR (2017) Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* 551(7681): 464-471.
- Gomez MA, Z Lin D, Mol T, Chauhan RD, Hayden L, Renninger K, Beyene G, Taylor NJ, Carrington JC, Staskawicz BJ, Bart RS (2019) Simultaneous CRISPR/Cas9-mediated editing of cassava *eIF4E* isoforms *nCBP-1* and *nCBP-2* reduces cassava brown streak disease symptom severity and incidence. *Plant Biotech J* 17: 421-434.
- Güell M, Yang L, Church GM (2014) Genome editing assessment using CRISPR Genome Analyzer (CRISPR-GA). *Bioinformatics* 30 (20): 2968-2970.
- Gurushidze M, Hensel G, Hiekel S, Schedel S, Valkov V, Kumlehn J (2014) True-breeding targeted gene knock-out in barley using designer TALE nuclease in haploid cells. *PLoS One* 9(3): e92046.
- Haun W, Cofman A, Clasen BM, Demorest ZL, Lowy A, Ray E, Retterath A, Stoddard T, Juillerat A, Cedrone F, Mathis L, Voytas DF, Zhang F (2014) Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. *Plant Biotechnol J* 12(7): 934-940.
- Horvath P, Barrangou R (2010) CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* 327: 167-170.
- Hua K, Tao X, Yuan F, Wang D, Zhu J (2018) Precise A-T to G-C base editing in the rice genome. *Mol Plant* 11: 627-630.
- Hua K, Jiang Y, Tao X, Zhu JK (2020) Precision genome engineering in rice using prime editing system. *Plant Biotech J* 1-3, doi: 10.1111/pbi13395.
- Huang J, Li J, Zhou J, Wang L, Yang S, Hurst LD, Li WH, Tian D (2018) Identifying a large number of high-yield genes in rice by pedigree analysis, whole-genome sequencing, and CRISPR-Cas9 gene knockout. *Proc Natl Acad Sci USA* 115: E7559-E7567.
- Huang L, Li Q, Zhang C, Chu R, Gu Z, Tan H, Zhao D, Fan X, Liu Q (2020) Creating novel *Wx* alleles with fine-tuned amylose levels and improved grain quality in rice by promoter editing using CRISPR/Cas9 system. *Plant Biotech J* 1-3, doi: 10.1111/pbi13391.
- Hummel AW, Chauhan RD, Cermak T, Mutka AM, Vijayaraghavan A, Boyher A, Starker CG, Bart R, Voytas DF, Taylor NJ (2018) Allele exchange at the *EPSPS* locus confers glyphosate tolerance in cassava. *Plant Biotechnol J* 16(7): 1275-1282.
- Iaffaldano B, Zhang Y, Cornish K (2016) CRISPR/Cas9 genome editing of rubber producing dandelion *Taraxacum kok-saghyz* using *Agrobacterium rhizogenes* without selection. *Ind Crops Products* 89: 356-362.
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A (1987) Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol* 169: 5429-5433.
- Jansing J, Sack M, Augustine SM, Fischer R, Bortesi L (2019) CRISPR/Cas9-mediated knockout of six

- glycosyltransferase genes in *Nicotiana benthamiana* for the production of recombinant proteins lacking β -1,2-xylose and core α -1,3-fucose. *Plant Biotech J* 17: 350-361.
- Jia HG, Wang N (2014) Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA. *PLoS One* 9: e93806.
- Jia H, Zhang Y, Orbovic V, Xu J, White F, Jones J, Wang N (2016) Genome editing of the disease susceptibility gene *CsLOB1* in citrus confers resistance to citrus canker. *Plant Biotechnol J* 15: 817-823.
- Jia H, Orbovic V, Wang N (2019) CRISPR-LbCas12a-mediated modification of citrus. *Plant Biotech J* 17: 1928-1937.
- Jiang W, Zhou H, Bi H, Fromm M, Yang B, Weeks DP (2013) Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res*, doi:10.1093/nar/gkt780.
- Jiang WZ, Henry IM, Lynagh PG, Comai L, Cahoon EB, Weeks DP (2017) Significant enhancement of fatty acid composition in seeds of the allohexaploid, *Camelina sativa*, using CRISPR/Cas9 gene editing. *Plant Biotechnol J* 15:648-57.
- Jin S, Zong Y, Gao Q, Zhu Z, Wang Y, Qin P, Liang C, Wang D, Qiu JL, Zhang F, Gao C (2019) Cytosine, but not adenine, base editors induce genome-wide off-target mutations in rice. *Science* 364: 292-295.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337: 816-821.
- Jung JH, Altpeter F (2016) TALEN mediated targeted mutagenesis of the caffeic acid O-methyltransferase in highly polyploid sugarcane improves cell wall composition for production of bioethanol. *Plant Mol Biol* 92: 131-142.
- Kannan B, Jung JH, Moxley GW, Lee SM, Altpeter F (2018) TALEN-mediated targeted mutagenesis of more than 100 COMT copies/alleles in highly polyploid sugarcane improves saccharification efficiency without compromising biomass yield. *Plant Biotechnol J* 16: 856-866.
- Kim JM, Kim D, Kim S, Kim JS (2014) Genotyping with CRISPR-Cas derived RNA-guided endonucleases. *Nat Commun* DOI: 10.1038/ncomms4157.
- Kim H, Kim S T, Ryu J, Kang B C, Kim J S, Kim SG (2017) CRISPR/Cpf1-mediated DNA-free plant genome editing. *Nat Commun* 8: 14406.
- Kim D, Kim D, Alptekin B, Budak H (2017) CRISPR/Cas9 genome editing in wheat *Funct Integr Genomics* 18: 31-41.
- Kim YA, Moon H, Park CI (2019) CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of *Os8N3* in rice to confer resistance to *Xanthomonas oryzae* pv *Oryzae*. *Rice* 12: 67.
- Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S (1996) Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 1156-1160.
- Kirchner TW, Niehaus M, Debener T, Schenk MK, Herde M (2017) Efficient generation of mutations mediated by CRISPR/Cas9 in the hairy root transformation system of *Brassica carinata*. *PLoS One* 12(9): e0185429.
- Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, Topkar V, Nguyen NT, Zheng Z, Gonzales APW, Li Z, Peterson RT, Yeh J-RJ, Martin J, Arye MJ, Joung JK (2015) Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature* 23: 523(7561): 481-485.
- Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR (2016) Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 533(7603): 420-424
- Komor AC, Badran AH, Liu, DR (2017) CRISPR-Based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes. *Cell* 168(1-2): 20-36.
- Koonin EV, Makarova KS, Zhang F (2017) Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol* 37: 67-78.
- Lawrenson T, Shorinola O, Stacey N, Li C, Ostergaard L, Patron N, Uauy C, Harwood W (2015) Induction of targeted, heritable mutations in barley and *Brassica oleracea* using RNA-guided Cas9 nuclease. *Genome Biol* 16: 258.
- Lee K, Zhang Y, Kleinstiver BP, Guo JA, Arye MJ, Miller J, Malzahn A, Zarecor S, Lawrence-Dill CJ, Joung JK, Qi Y, Wang K (2019) Activities and specificities of CRISPR/Cas9 and Cas12a nucleases for targeted mutagenesis in maize. *Plant Biotech J* 17: 362-372.

- Li L, Piatek MJ, Atef A, Piatek A, Wibowo A, Fang X, Sabir JSM, Zhu JK, Mahfouz MM (2012) Rapid and highly efficient construction of TALE-based transcriptional regulators and nucleases for genome modification. *Plant Mol Biol* 78(4-5): 407-416.
- Li T, Liu B, Spalding MH, Weeks DP, Yang B (2012a) High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nat Biotech* 30: 390-392.
- Li L, Atef A, Piatek A, Ali Z, Piatek M, Aouida M, Sharakou A, Mahjoub A, Wang G, Khan S, Fedoroff NV, Zhu JK, Mahfouz, M (2013) Characterization and DNA-binding specificities of Ralstonia TAL-like effectors. *Mol Plant* 6: 1318-1330.
- Li JF, Norville JE, Aach J, McCormack M, Zhang D, Bush J, Church GM, Sheen J (2013a) Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in Arabidopsis and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol* 31: 688-691.
- Li Z, Liu Z B, Xing A, Moon BP, Koellhoffer J P, Huang L, Ward R T, Clifton E, Falco SC, Cigan AM (2015) Cas9-guide RNA directed genome editing in soybean. *Plant Physiol* 169: 960-970.
- Li J, Stoddard TJ, Demorest ZL, Lavoie PO, Luo S, Clasen BM, Cedrone F, Ray EE, Cofman AP, Daulhac A, Yabandith A, Retterath AJ, Mathis L, Voytas DF, D'Aoust MA, Zhang F (2016) Multiplexed, targeted gene editing in *Nicotiana benthamiana* for glyco-engineering and monoclonal antibody production. *Plant Biotechnol J* 14(2): 533-542.
- Li J, Meng X, Zong Y, Chen K, Zhang H, Liu J, Li J, Gao C (2016a) Gene replacements and insertions in rice by intron targeting using CRISPR-Cas9. *Nat Plants* 2: 16139.
- Li M, Li X, Zhou Z, Wu P, Fang M, Pan X, Lin Q, Luo W, Wu G, Li H (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- doi: 10.3389/fpls.2016.00377.
- Li T, Liu B, Chen CY, Yang B (2016c) TALEN-mediated homologous recombination produces site-directed DNA base change and herbicide-resistant rice. *J Genet Genom* 43(5): 297-305.
- Li J, Zhang H, Si X, Tian Y, Chen K, Liu J, Chen H, Gao C (2017) Generation of thermosensitive male-sterile maize by targeted knockout of the *ZmTMS5* gene. *J Genet Genomics* 44(9): 465-468.
- Li J, Sun Y, Du J, Zhao Y, Xia L (2017a) Generation of targeted point mutations in rice by a modified CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant* 10: 526-529.
- Li R, Li R, Li X, Fu D, Zhu B, Tian H, Luo Y, Zhu H (2018a) Multiplexed CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering of γ -aminobutyric acid levels in *Solanum lycopersicum*. *Plant Biotechnol J* 16(2): 415-427.
- Li C, Zong Y, Wang Y, Jin S, Zhang D, Song Q, Zhang R, Gao C (2018b) Expanded base editing in rice and wheat using a Cas9-adenosine deaminase fusion. *Genome Biol* 19(1): 59.
- Li R, Fu D, Zhu B, Luo Y, Zhu H (2018c) CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of *IncRNA1459* alters tomato fruit ripening. *Plant J* 94: 513-524.
- Li T, Yang X, Yu Y, Si X, Zhai X, Zhang H, Dong W, Gao C, Xu C (2018d) Domestication of wild tomato is accelerated by genome editing. *Nat Biotechnol* doi:10.1038/nbt4273.
- Li X, Wang Y, Chen S, Tian H, Fu D, Zhu B, Luo Y, Zhu H (2018e) Lycopene is enriched in tomato fruit by CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing. *Front Plant Sci* 9: 559, doi: 10.3389/fpls.2018.00559.
- Li B, Rui H, Li Y, Wang Q, Alariqi M, Qin L, Sun L, Ding X, Wang F, Zou J, Wang Y, Yuan D, Zhang X, Jin S (2019) Robust CRISPR/Cpf1 (Cas12a)-mediated genome editing in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*). *Plant Biotech J* 17: 1862-1864.
- Li H, Qin R, Liu X, Liao S, Xu R, Yang J, Wei P (2019a) CRISPR/Cas9-mediated adenine base editing in rice genome. *ScienceDirect, Rice Sci* 26(2): 125-128.
- Li J, Manghwar H, Sun L, Wang P, Wang G, Sheng H, Zhang J, Liu H, Qin L, Rui H, Li B, Lindsey K, Daniell H, Jin S, Zhang X (2019b) Whole genome sequencing reveals rare off-target mutations and considerable inherent genetic or/and somaclonal variations in CRISPR/Cas9-edited cotton plants. *Plant Biotechnol J* 17: 858-868.
- Li C, Li W, Zhou Z, Chen H, Xie C, Lin Y (2020) A new rice breeding method: CRISPR/Cas9 system editing of the Xa13 promoter to cultivate transgene-free bacterial blight-resistant rice. *Plant Biotech J* 18: 313-315.

- Li H, Li J, Chen J, Yan L, Xia L (2020a) Precise modifications of both exogenous and endogenous genes in rice by prime editing. *Mol Plant* 13: 671–674.
- Li S, Zhang Y, Xia L, Yiping Qi Y (2020b) CRISPR-Cas12a enables efficient biallelic gene targeting in rice. *Plant Biotech J* 18: 1351-1353.
- Li B, Liang S, Alariqi M, Wang F, Wang G, Wang Q, Xu Z, Lu Yu1, Zafar MN, Sun L, Si H, Yuan D, Guo W, Wang Y, Lindsey K, Zhang X, Jin S (2021) The application of temperature sensitivity CRISPR/LbCpf1 (LbCas12a) mediated genome editing in allotetraploid cotton (*G. hirsutum*) and creation of nontransgenic, gossypol-free cotton. *Plant Biotech J* 19: 221-223.
- Liang Z, Zhang K, Chen K, Gao C (2014) Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *J Genet Genom* 41(2): 63-68.
- Liang Z, Chen K, Li T, Zhang Y, Wang Y, Zhao Q, Liu J, Zhang H, Liu C, Ran Y, Gao C (2017) Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun* 8: e14261.
- Liang Z, Chen K, Yan Y, Zhang Y, Gao C (2018) Genotyping genome-edited mutations in plants using CRISPR ribonucleoprotein complexes. *Plant Biotech J* 16: 2053-2062.
- Liang Z, Chen K, Zhang Y, Liu J, Yin K, Qiu JL, Gao C (2018b) Genome editing of bread wheat using biolistic delivery of CRISPR/Cas9 in vitro transcripts or ribonucleoproteins. *Nat Protoc* 13: 413-430.
- Lin Q, Zong Y, Xue C, Wang S, Jin S, Zhu Z, Wang Y, Anzalone AV, Raguram A, Doman JL, Liu DR, Caixia Gao C (2020) Prime genome editing in rice and wheat. *Nat Biotechnol* 38(5): 582-585.
- Liu W, Xie X, Ma X, Li J, Chen J, Liu YG (2015) DSDecode: a web-based tool for decoding of sequencing chromatograms for genotyping of targeted mutations. *Mol Plant* 8 (9): 1431-1433.
- Liu HJ, Jian L, Xu J, Zhang Q, Zhang M, Jin M, Peng Y, Yan J, Han B, Liu J, Gao F, Liu X, Huang L, Wei W, Ding Y, Yang X, Li Z, Zhang M, Sun J, Bai M, Song W, Chen H, Sun X, Li W, Lu Y, Liu Y, Zhao J, Qian Y, Jackson D, Fernie AR, Yan J (2020) High-throughput CRISPR/Cas9 mutagenesis streamlines trait gene identification in maize. *The Plant Cell* 32: 1397-1413.
- Lloyd A, Plaisier CL, Carroll D, Drews GN (2005) Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 2232-2237.
- Lor VS, Starker CG, Voytas DF, Weiss D, Olszewski NE (2014) Targeted mutagenesis of the tomato *PROCERA* gene using transcription activator-like effector nucleases. *Plant Physiol* 166: 1288-1291.
- Lopez-Obando M, Hoffmann B, Gery C, Guyon-Debast A, Teoule E, Rameau C, Bonhomme S, Nogue F (2016) Simple and efficient targeting of multiple genes through CRISPR-Cas9 in *Physcomitrella patens*. *G3* 6: 3647-3653.
- Lu Y, Zhu J K (2017) Precise editing of a target base in the rice genome using a modified CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant* 10: 523-525.
- Lu K, Wu B, Wang J, Zhu W, Nie H, Qian J, Huang W, Fang Z (2018) Blocking amino acid transporter OsAAP3 improves grain yield by promoting outgrowth buds and increasing tiller number in rice. *Plant Biotechnol J* 16: 1710-1722.
- Ma L, Zhu F, Li Z, Zhang J, Li X, Dong J, Wang T (2015) TALEN-based mutagenesis of lipoxygenase LOX3 enhances the storage tolerance of rice (*Oryza sativa*) seeds. *PLoS One* 10(12): e0143877.
- Mahfouz M M, Li L, Shamimuzzaman M, Wibowo A, Fang X, Zhu J K (2011) De novo-engineered transcription activator-like effector TALE hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 2623-2628.
- Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Haft DH, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Tern RM, Terns MP, White MF, Yakunin AF, Garrett RA, van der Oost J, Backofen R, Koonin EV (2015) An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 13(11): 722-736.
- Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, Dicarlo JE, Norville J E, Church GM (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339: 823.
- Malnoy M, Viola R, Jung MH, Koo OJ, Kim S, Kim JS, Velasco R, Nagamangala Kanchiswamy C (2016) DNA-free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. *Front Plant Sci* 7: e01904.

- Mao Y, Zhang H, Xu N, Zhang B, Gao F, Zhu JK (2013) Application of the CRISPR/Cas system for efficient genome engineering in plants. *Mol Plant* doi:10.1093/mp/sst121.
- Miao J, Guo D, Zhang J, Huang Q, Qin G, Zhang X, Wan J, Gu H, Qu LJ (2013) Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell Res* 23:1233-1236.
- Michno JM, Wang X, Liu J, Curtin SJ, Kono TJY, Stupar RM (2015) CRISPR/Cas mutagenesis of soybean and *Medicago truncatula* using a new web-tool and a modified Cas9 enzyme. *GM Crops Food* 6: 243-252.
- Morbiter R, Römer P, Boch J, Lahaye T (2010) Regulation of selected genome loci using de novo-engineered transcription activatorlike effector (TALE)-type transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 21617-21622.
- Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, Jones JD, Kamoun S (2013) Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol* 31: 691-693.
- Nekrasov V, Wang C, Win J, Lanz C, Weigel D, Kamoun S (2017) Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. *Sci Rep* 7: 482.
- Nicolia A, Proux-Wera E, Ahman I, Onkokesung N, Andersson M, Andreasson E, Zhu LH (2015) Targeted gene mutation in tetraploid potato through transient TALEN expression in protoplasts. *J Biotechnol* 204:17-24.
- Nishimasu H, Shi X, Ishiguro S, Gao L, Hirano S, Okazaki S, Noda T, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Mori H, Oura S, Holmes B, Tanaka M, Seki M, Hirano H, Aburatani H, Ishitani R, Ikawa M, Yachie N, Zhang F, Nureki O (2018) Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. *Science* 361: 1259-1262.
- Nishitani C, Hirai N, Komori S, Wada M, Okada K, Osakabe K, Yamamoto T, Osakabe Y (2016) Efficient genome editing in apple using a CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep* 6: 31481.
- Nishizawa-Yokoi A, Cermak T, Hoshino T, Sugimoto K, Saika H, Mori A, Osakabe K, Hamada M, Katayose Y, Starker C, Voytas DF, Toki S (2016) A defect in DNA Ligase4 enhances the frequency of TALEN-mediated targeted mutagenesis in rice. *Plant Physiol* 170(2): 653-666.
- Odipto J, Alicai T, Ingelbrecht I, Nusinow DA, Bart R, Taylor NJ (2017) Efficient CRISPR/Cas9 genome editing of phytoene desaturase in cassava. *Front Plant Sci* 8: 1780, doi: 10.3389/fpls.2017.01780.
- Okuzaki A, Ogawa T, Koizuka C, Kaneko K, Inaba M, Imamura J, Koizuka N (2018) CRISPR/Cas9-mediated genome editing of the fatty acid desaturase 2 gene in *Brassica napus*. *Plant Physiol Biochem* 131: 63-69.
- Ortigosa A, Gimenez-Ibanez S, Leonhardt N, Solano R (2019) Design of a bacterial speck resistant tomato by CRISPR/Cas9-mediated editing of SIJAZ2. *Plant Biotechnol J* 17: 665-673.
- Osakabe K, Osakabe Y, Toki S (2010) Site-directed mutagenesis in Arabidopsis using custom-designed zinc finger nucleases. *Proc Nat Acad Sci USA* 107(26): 12034-12039.
- Petolino JF, Worden A, Curlee K, Connell J, Tonya L, Moynahan S, Larsen C, Russell S (2010) Zinc finger nucleasemediated transgene deletion. *Plant Mol Biol* 73(6): 617-628.
- Puchta H (2005) The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. *J Exp Bot* 56(409): 1-14.
- Qi W, Zhu T, Tian Z, Li C, Zhang W, Song R (2016) High-efficiency CRISPR/Cas9 multiplex gene editing using the glycine tRNA-processing system-based strategy in maize. *BMC Biotechnol* 16: 58.
- Qin L, Li J, Wang Q, Xu Z, Sun L, Alariqi M, Manghwar H, Wang G, Li B, Ding X, Rui H, Huang H, Lu T, Lindsey K, Daniell H, Zhang X, Jin S (2020). High-efficient and precise base editing of C•G to T•A in the allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*) genome using a modified CRISPR/Cas9 system. *Plant Biotech J* 18: 45-56.
- Ramlee MK, Yan T, Cheung AM, Chuah CT, Li S (2015) High throughput genotyping of CRISPR/Cas9-mediated mutants using fluorescent PCR-capillary gel electrophoresis. *Sci Rep* 5: 15587.
- Ramlee MK, Wang J, Cheung AM, Li S (2017) Using a fluorescent PCR-capillary gel electrophoresis technique to genotype CRISPR/ Cas9-mediated knockout mutants in a high-throughput format. *J Vis Exp* 122: e55586, doi:10.3791/55586.
- Ren C, Liu X, Zhang Z, Wang Y, Duan W, Li S, Liang Z (2016) CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted

- mutagenesis in Chardonnay *Vitis vinifera* L. *Sci Rep* 6: 32289.
- Ren B, Yan F, Kuang Y, Li N, Zhang D, Zhou X, Lin H, Zhou H (2018) Improved base editor for efficiently inducing genetic variations in rice with CRISPR/Cas9-guided hyperactive hAID mutant. *Mol Plant* 11(4): 623-626.
- Sanchez-Leon S, Gil-Humanes J, Ozuna CV, Gimenez MJ, Sousa C, Voytas DF, Barro F (2018) Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol J* 16(4): 902-910.
- Sander JD, Dahlborg EJ, Goodwin MJ, Cade L, Zhang F, Cifuentes D, Curtin SJ, Blackburn JS, Thibodeau-Beganny S, Qi Y, Pierick CJ, Hoffman E, Maeder ML, Khayter C, Reyon D, Dobbs D, Langenau M, Stupar RM, Giraldez AJ, Voytas DF, Peterson RT, Yeh JR, Joung JK (2011) Selection-free zinc-fingernuclease engineering by context-dependent assembly CoDAa. *Nat Methods* 8: 67-69.
- Sauer NJ, Narvaez-Vasquez J, Mozuruk J, Miller RB, Warburg ZJ, Woodward MJ, Mihiret YA, Lincoln TA, Segami RE, Sanders SL (2016) Oligonucleotide mediated genome editing provides precision and function to engineered nucleases and antibiotics in plants. *Plant Physiol* 170: 1917-1928.
- Sawai S, Ohyama K, Yasumoto S, Seki H, Sakuma T, Yamamoto T, Takebayashi Y, Kojima M, Sakakibara H, Aoki T, Muranaka T, Saito K, Umemoto N (2014) Sterol side chain reductase 2 is a key enzyme in the biosynthesis of cholesterol, the common precursor of toxic steroidal glycoalkaloids in potato. *Plant cell* 26(9): 3763-3774.
- Shan Q, Wang Y, Li J, Zhang Y, Chen K, Liang Z, Zhang K, Liu J, Xi JJ, Qiu JL, Gao C (2013) Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* 31: 686-688.
- Shan Q, Wang Y, Chen K, Liang Z, Li J, Zhang Y, Zhang K, Liu J, Voytas DF, Zheng X, Zhang Y, Gao C (2013a) Rapid and efficient gene modification in rice and *Brachypodium* using TALENs. *Mol Plant* 6(4):1365-1368.
- Shan Q, Wang Y, Li J, Gao C (2014) Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nat Protoc* 9: 2395-2410.
- Shan Q, Zhang Y, Chen K, Zhang K, Gao C (2015) Creation of fragrant rice by targeted knockout of the *OsBADH2* gene using TALEN technology. *Plant Biotechnol J* 13:791-800.
- Shao X, Wu S, Dou T, Zhu H, Hu C, Huo H, He W, Deng G, Sheng O, Bi F, Gao H, Dong T, Li C, Yang Q, Yi G (2020) Using CRISPR/Cas9 genome editing system to create *MaGA20ox2* gene-modified semi-dwarf banana. *Plant Biotech J* 18: 17-19.
- Shi J, Gao H, Wang H, Lafitte HR, Archibald RL, Yang M, Hakimi SM, Mo H, Habben JE (2017) ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnol J* 15(2): 207-216.
- Shimatani Z, Kashojiya S, Takayama M, Terada R, Arazoe T, Ishii H, Teramura H, Yamamoto T, Komatsu H, Miura K, Ezura H, Nishida K, Ariizumi T, Kondo A (2017) Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol* 35(5): 441-443.
- Smith J, Grizot S, Arnould S, Duclert A, Epinat JC, Chames P, Prieto J, Redondo P, Blanco F, Bravo J, Montoya G, Paques F, Duchateau P (2006) A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic Acids Res* 34: e149. doi:10.1093/nar/gkl720.
- Subburaj, S, Chung, SJ, Lee, C, Ryu, SM, Kim, DH, Kim, JS, Bae, S, and Lee, GJ (2016) Site-directed mutagenesis in *Petunia × hybrida* protoplast system using direct delivery of purified recombinant Cas9 ribonucleoproteins, *Plant Cell Rep* 35: 1535-1544.
- Sugano SS, Shirakawa M, Takagi J, Matsuda Y, Shimada T, Hara-Nishimura I, Kohchi T (2014) CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant Cell Physiol* 55: 475-481.
- Shukla VK, Doyon Y, Miller JC, DeKelver RC, Moehle EA, Worden SE, Mitchell JC, Arnold NL, Gopalan S, Meng X, Choi VM, Rock JM, Wu YY, Katiba, GE, Zhifang G, McCaskill D, Simpson MA, Blakeslee B, Greenwalt SA, Butler HJ, Hinkley SJ, Zhang L, Rebar EJ, Gregor PD, Urnov FD (2009) Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature* 459: 4370-441.
- Stoddard BL (2011) Homing endonucleases: From microbial genetic invaders to reagents for targeted DNA modification. *Structure* 19: 7-15.
- Sun Z, Li N, Huang G, Xu J, Pan Y, Wang Z, Tang Q, Song M, Wang X (2013) Site-specific gene targeting using transcription activator-like effector (TALE)-based nuclease in *Brassica oleracea*. *J Integr Plant*

Biol 55:1092-1103.

Sun Y, Zhang X, Wu C, He Y, Ma Y, Hou H, Guo X, Du W, Zhao Y, Xia L (2016) Engineering herbicide resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase. *Mol Plant* 9: 628-631.

Sun Y, Jiao G, Liu Z, Zhang X, Li J, Guo X, Du W, Du, J, Francis F, Zhao Y, Xia L (2017) Generation of high-amylose rice through CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of starch branching enzymes. *Front Plant Sci* 8: 1298.

Svitashev S, Young J K, Schwartz C, Gao H, Falco S C, Cigan AM (2015) Targeted mutagenesis, precise gene editing and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. *Plant Physiol* 169: 931-945.

Svitashev S, Schwartz C, Lenderts B, Young JK, Mark Cigan A (2016) Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complex. *Nat Commun* 7: e13274. <https://doi.org/10.1038/ncomms13274>.

Tang X, Lowder LG, Zhang T, Malzahn AA, Zheng X, Voytas DF, Zhong Z, Chen Y, Ren Q, Li Q (2017) A CRISPR-Cpf1 system for efficient genome editing and transcriptional repression in plants. *Nat Plants* 3: 17018.

Tang X, Liu G, Zhou J, Ren Q, You Q, Tian L, Xin X, Zhong Z, Liu B, Zheng X, Zhang D, Malzahn A, Gong Z, Qi Y, Zhang T, Zhang Y (2018) A large-scale whole-genome sequencing analysis reveals highly specific genome editing by both Cas9 and Cpf1 (Cas12a) nucleases in rice. *Genome Biol* 19: 84.

Tang X, Ren Q, Yang L, Bao Y, Zhong Z, He Y, Liu S, Qi C, Liu B, Wang Y, Sretenovic S, Zhang Y, Zheng X, Zhang T, Qi Y, Zhang Y (2019) Single transcript unit CRISPR 2.0 systems for robust Cas9 and Cas12a mediated plant genome editing. *Plant Biotechnol J* 17(7): 1431-1445.

Tang X, Sretenovic S, Ren Q, Jia X, Li M, Fan T, Yin D, Xiang S, Guo Y, Liu L, Zheng X, Qi Y, Zhang Y (2020) Plant prime editors enable precise gene editing in rice cells. *Mol Plant* 13(5): 667-670.

Tian S, Jiang L, Gao Q, Zhang J, Zong M, Zhang H, Ren Y, Guo S, Gong G, Liu F (2017) Efficient CRISPR/Cas9-based gene knockout in watermelon. *Plant Cell Rep* 36: 399-406.

Tian S, Jiang L, Cui X, Zhang J, Guo S, Li M, Zhang

H, Ren Y, Gong G, Zong M, Liu F, Chen Q, Xu Y (2018) Engineering herbicide-resistant watermelon variety through CRISPR/Cas9-mediated base editing. *Plant Cell Rep* 37: 1353-1356.

Townsend JA, Wright DA, Winfrey RJ, Fu F, Maeder ML, Joung JK, Voytas DF (2009) High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. *Nature* 459: 442-445.

Tsai S Q, Zheng Z L, Nguyen N T, Liebers M, Topkar V V, Thapar V, Wyvekens N, Khayter C, Iafate A J, Le L P, Aryee M J, Joung J K. 2015. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat Biotechnol* 33(2): 187-197.

Tuncel A, Corbin KR, Ahn-Jarvis J, Harris S, Hawkins E, Smedley MA, Harwood W, Warren FJ, Patron NJ, Smith AM (2019) Cas9-mediated mutagenesis of potato starch-branching enzymes generates a range of tuber starch phenotypes. *Plant Biotech J* 1-13, doi: 10.1111/pbi13137.

Ueta R, Abe C, Watanabe T, Sugano SS, Ishihara R, Ezura H, Osakabe Y, Osakabe K (2017) Rapid breeding of parthenocarpic tomato plants using CRISPR/Cas9. *Sci Rep* 7: 507, doi:10.1038/s41598-017-00501-4.

Veillet F, Perrot L, Chauvin L, Kermarrec MP, Guyon-Debast A, Chauvin JE, Nogué F, Mazier M (2019) Transgene-free genome editing in tomato and potato plants using Agrobacterium-mediated delivery of a CRISPR/Cas9 cytidine base editor. *Int J Mol Sci* 20(2), pii-E402. <https://doi.org/10.2290/ijms20020402>.

Veillet F, Kermarrec MP, Chauvin L, Guyon-Debast A, Chauvin J, Gallois JL, Nogué F (2020) Prime editing is achievable in the tetraploid potato, but needs improvement. *bioRxiv* preprint doi: 10.1101/2020.06.18.159111.

Vouillot L, Thelie A, Pollet N (2015) Comparison of T7E1 and surveyor mismatch cleavage assays to detect mutations triggered by engineered nucleases. *G3: (Bethesda)* 5: 407-415.

Waltz E (2016) CRISPR-edited crops free to enter market, skip regulation. *Nat Biotechnol* 34: 582.

Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R (2013) Onestep generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 153: 910-918.

- Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, Qiu JL (2014) Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotech* 32: 947-951.
- Wang M, Liu Y, Zhang C, Liu J, Liu X, Wang L, Wang W, Chen H, Wei C, Ye X, Li X, Tu J (2015) Gene editing by co-transformation of TALEN and chimeric RNA/DNA oligonucleotides on the rice *OsEPSPS* gene and the inheritance of mutations. *PLoS One* 10(4): e0122755.
- Wang S, Zhang S, Wang W, Xiong X, Meng F, Cui X (2015a) Efficient targeted mutagenesis in potato by the CRISPR/Cas9 system. *Plant Cell Rep* 34: 1473-1476.
- Wang F, Wang C, Liu P, Lei C, Hao W, Gao Y, Liu YG, Zhao K (2016) Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene *OsERF922*. *PLoS One* 11: e0154027.
- Wang L, Wang L, Tan Q, Fan Q, Zhu H, Hong Z, Zhang Z, Duanmu, D (2016a) Efficient inactivation of symbiotic nitrogen fixation related genes in *Lotus japonicas* using CRISPR-Cas9. *Front Plant Sci* 7: 1333.
- Wang L, Chen L, Li R, Zhao R, Yang M, Sheng J, Shen L (2017) Reduced drought tolerance by CRISPR/Cas9-mediated SIMAPK3 mutagenesis in tomato plants. *J Agric Food Chem* 65: 8674-8682.
- Wang M, Mao Y, Lu Y, Tao X, Zhu, JK (2017a) Multiplex gene editing in rice using the CRISPR-Cpf1 system. *Mol Plant* 10: 1011-1013.
- Wang M, Lu Y, Botella JR, Mao Y, Hua K, Zhu JK (2017b) Gene targeting by homology-directed repair in rice using a geminivirus-based CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant* 10: 1007-1010.
- Wendt T, Holm P, Starker C, Christian M, Voytas D, Brinch-Pedersen H, Holme I (2013) TAL effector nucleases induce mutations at a pre-selected location in the genome of primary barley transformants. *Plant Mol Biol* 83: 279-285.
- Woo JW, Kim J, Kwon SI, Corvalán C, Cho SW, Kim H, Kim SG, Kim ST, Choe S, Kim JS (2015) DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat Biotechnol* 33: 1162-1164, doi: 10.1038/nbt3389.
- Wright DA, Townsend JA, Winfrey RJ Jr, Irwin PA, Rajagopal J, Lonosky PM, Hall BD, Jondle MD, Voytas DF (2005) High frequency homologous recombination in plants mediated by zinc finger nucleases. *Plant J* 44: 693-705.
- Wu J, Chen C, Xian G, Liu D, Lin L, Yin S, Sun Q, Fang Y, Zhang H, Wang Y (2020) Engineering herbicide-resistant oilseed rape by CRISPR/Cas9-mediated cytosine base-editing. *Plant Biotech J*: 1-3.
- Xie K, Yang Y (2013) RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Mol Plant* 6: 1975-1983.
- Xiong J, Ding J, Li Y (2015) Genome-editing technologies and their potential application in horticultural crop breeding. *Horticult Res* 2: 15019, doi:10.1038/hortres.2015.19.
- Xu R, Yang Y, Qin R, Li H, Qiu C, Li L, Wei P, Yang J (2016) Rapid improvement of grain weight via highly efficient CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing in rice. *J Genet Genomics* 43: 529-532.
- Xu R, Qin R, Li H, Li D, Li L, Wei P, Yang J (2017) Generation of targeted mutant rice using a CRISPR-Cpf1 system. *Plant Biotechnol J* 15: 713-717.
- Xu R, Li J, Liu X, Shan T, Qin R, Wei P (2020). Development of Plant Prime-Editing Systems for Precise Genome Editing. *Plant Comm* 1: 100043.
- Xu Y, Lin Q, Li X, Wang F, Chen Z, Wang J, Li W, Fan F, Tao Y, Jiang Y, Wei X, Zhang R, Zhu QH, Bu Q, Yang J, Gao C (2021) Fine-tuning the amylose content of rice by precise base editing of the *Wx* gene. *Plant Biotech J* 19: 11-13.
- Yan F, Kuang Y, Ren B, Wang J, Zhang D, Lin H, Yang B, Zhou X, Zhou H (2018) Highly efficient AT to GC base editing by Cas9n-guided tRNA adenosine deaminase in rice. *Mol Plant* 11: 631-634.
- Yin K, Han T, Liu G, Chen T, Wang Y, Yu AYL, Liu Y (2015) A geminivirus-based guide RNA delivery system for CRISPR/Cas9 mediated plant genome editing. *Sci Rep* 5:14926, doi: 10.1038/srep14926.
- Yu QH, Wang B, Li N, Tang Y, Yang S, Yang T, Xu J, Guo C, Yan P, Wang Q, Asmutola P (2017) CRISPR/Cas9-induced targeted mutagenesis and gene replacement to generate longshelf life tomato lines. *Sci Rep* 7: 11874, doi:10.1038/s41598-017-12262-1.

- Zafar K, Khan MZ, Amin I, Mukhtar Z, Yasmin S, Arif M, Ejaz K, Mansoor S (2020) Precise CRISPR-Cas9 mediated genome editing in super Basmati rice for resistance against bacterial blight by targeting the major susceptibility gene. *Front Plant Sci*, doi: 10.3389/fpls.2020.00575.
- Zaidi SSA, Tashkandi M, Mansoor S, Mahfouz MM (2016) Engineering plant immunity: Using crispr/cas9 to generate virus resistance. *Front Plant Sci* 7: 1673.
- Zeng D, Liu T, Ma X, Wang B, Zheng Z, Zhang Y, Xie X, Yang B, Zhao Z, Qinlong Zhu Q, Liu YG (2020) Quantitative regulation of Waxy expression by CRISPR/Cas9-based promoter and 5'UTR-intron editing improves grain quality in rice. *Plant Biotech J* 1-3, doi: 10.1111/pbi.13427.
- Zetsche B, Gootenberg J S, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, Volz SE, Joung J, Oost J, Regev A, Koonin EV, Zhang F (2015) Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a Class 2 CRISPR/Cas system. *Cell* 163: 759-771.
- Zhang F, Maeder ML, Unger-Wallace E, Hoshaw JP, Reyon D, Christian M, Li X, Pierick CJ, Dobbs D, Peterson T, Joung JK, Voytas DF (2010) High frequency targeted mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 12028-12033.
- Zhang Y, Zhang F, Li X, Baller JA, Qi Y, Starker CG, Bogdanove AJ, Voytas DF (2013) Transcription activator-like effector nucleases enable efficient plant genome engineering. *Plant Physiol* 161(1): 20-27.
- Zhang B, Yang X, Yang C, Li M, Guo Y (2016) Exploiting the CRISPR/Cas9 system for targeted genome mutagenesis in Petunia. *Sci Rep* 6: 20315.
- Zhang H, Gou F, Zhang J, Liu W, Li Q, Mao Y, Botella JR, Zhu JK (2016a) TALEN-mediated targeted mutagenesis produces a large variety of heritable mutateons in rice. *Plant Biotech J* 14(1): 186-194.
- Zhang Y, Liang Z, Zong Y, Wang Y, Liu J, Chen K, Qiu JL, Gao C (2016b) Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. *Nat Commun* 7: 12617.
- Zhang Y, Bai Y, Wu G, Zou S, Chen Y, Gao C, Tang D (2017) Simultaneous modification of three homoeologs of *TaEDR1* by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat. *Plant J* 91: 714-724.
- Zhang J, Zhang H, Botella JR, Zhu J (2018) Generation of new glutinous rice by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the Waxy gene in elite rice varieties. *J Integr Plant Biol* 60: 369-375.
- Zhang Y, Li D, Zhang D, Zhao X, Cao X, Dong L, Liu J, Chen K, Zhang H, Gao C, Wang D (2018a) Analysis of the functions of TaGW2 homoeologs in wheat grain weight and protein content traits. *Plant J* 94: 857-866.
- Zhang A, Liu Y, Wang F, Li T, Chen Z, Kong D, Bi J, Zhang F, Luo X, Wang J, Tang J, Yu X, Liu G, Luo L (2019) Enhanced rice salinity tolerance via CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the *OsRR22* gene. *Mol Breed* 39: 47, doi:10.1007/s11032-019-0954-y.
- Zhang P, Du H, Wang J, Pu Y, Yang C, Yan R, Yang H, Cheng H, Yu D (2020) Multiplex CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering increases soya bean isoflavone content and resistance to soya bean mosaic virus. *Plant Biotech* 18: 1384-1395.
- Zhou J, Peng Z, Long J, Sosso D, Liu B, Eom JS, Hoang S, Liu S, Vera Cruz C, Frommer WB, White FF, Yang B (2015) Gene targeting by the TAL effector PthXo2 reveals cryptic resistance gene for bacterial blight of rice. *Plant J* 82: 632-643.
- Zhou Z, Tan H, Li Q, Chen J, Gao S, Wang Y, Chen W, Zhang L (2018) CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis of RAS in *Salvia miltiorrhiza*. *Phytochemistry* 148: 63-70.
- Zong Y, Wang Y, Li C, Zhang R, Chen K, Ran Y, Qiu JL, Wang D, Gao C (2017) Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. *Nat Biotechnol* 35:438-440.
- Zong Y, Song Q, Li C, Jin S, Zhang D, Wang Y, Qiu JL, Gao C (2018) Efficient C to T base editing in plants using a fusion of nCas9 and human APOBEC3A. *Nat Biotechnol* 36: 950-953.

APPLICATION OF GENOME EDITING TOOLS IN PLANTS

Nguyen Duc Thanh

Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Genome editing technology is the genome modification techniques, such as targeted mutagenesis or insert/delete/replacement at specific locations in the genome of living organisms. Genome editing is based on the creation of double sequence break (DSB) in a specific location and DNA repair via nonhomologous end joining (NHEJ) or homology direct repair (HDR). The development of sequence-specific nuclease (SSN) allows precise editing of the target gene. These SSNs include: meganuclease (MN), zinc finger nuclease (ZFN), transcription activator-like effector nuclease (TALEN) and CRISPR-associated nuclease (Cas) including CRISPR/Cas9 (from *Streptococcus pyogenes*) and CRISPR/Cpf1 (from *Prevotella* and *Francisella*1). These are the genome editing tools used to create DSBs at specific locations of the genome. Recently, the base editing (BE) and prime editing (PE) tools have been reported. This review will cover the basics of these tools and their application in genome editing in plants, especially providing the most up-to-date information on their application in crop improvement.

Keywords: genome editing, DNA double strand breaks, sequence-specific nuclease, targeted gene, plants