

番茄组蛋白变体 *H2A.Z* 基因双突变体的获得及其功能研究

杨学东*, 田守波*, 朱为民, 卢盼玲, 王虹, 王颖, 张辉**, 朱龙英**

(上海市农业科学院园艺研究所, 上海市设施园艺技术重点实验室, 上海 201403)

摘要: 以番茄自交系 1479 为材料, 利用基因编辑技术创制番茄组蛋白变体 *H2A.Z* 基因双突变体 *hta11hta9*。测序结果表明番茄 *H2A.Z* 基因被敲除。发芽试验结果表明组蛋白基因 *H2A.Z* 双突变体 *hta11hta9* 种子萌发受到严重影响。在相对低温 (17 °C) 下, *H2A.Z* 基因双突变体生长明显比野生型迟缓。

关键词: 番茄; 基因编辑; 组蛋白变体

中图分类号: S 641.2

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2018) 06-1081-08

Tomato Double Mutant of Histone Variant Gene was Obtained and its Function Research

YANG Xuedong*, TIAN Shoubo*, ZHU Weimin, LU Panling, WANG Hong, WANG Ying, ZHANG Hui**, and ZHU Longying**

(The Protected Horticulture Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai Key Laboratory of Protected Horticulture Technology, Shanghai 201403, China)

Abstract: Using tomato inbred line 1479 as the material, a double mutant of *H2A.Z* gene of histone variant *hta11hta9* was obtained by gene editing technique. Sequencing analysis showed that the tomato *H2A.Z* gene was knocked out. The results of germination experiment showed that *H2A.Z* double mutant *hta11hta9* had a serious effect on seed germination. The growth of *H2A.Z* double mutant *hta11hta9* was obviously slower than wild type under the relative low temperature of 17 °C.

Keywords: tomato; gene editing; histone variant

全基因组测序和基因组学的发展亟需有效的基因编辑工具来阐明基因的功能。锌指核酸酶 (zinc-finger nucleases, ZFNs) 是由锌指结构域与核酸内切酶 *Fok I* 的切割结构域融合而形成的具有识别特性的核酸内切酶。ZFNs 是最早开发的基因编辑工具, 但是由于其具有载体设计困难、脱靶率高以及有限的靶位点等缺点限制了广泛应用 (Qi et al., 2013)。类转录活化因子核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases, TALENs) 是由识别 DNA 碱基序列的 TALEs 蛋白和核酸内切酶 *Fok I* 的切割结构域融合形成 (Zhang et al., 2010)。作为基因编辑的工具 TALENs 比

收稿日期: 2018-03-05; **修回日期:** 2018-06-04

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2016YFD0101703, 2017YFD0101902); 上海市种业发展项目 [沪农科种字 (2016) 第 1-13 号, 沪农科种字 (2017) 第 3-1-2 号]; 上海市农业科学院“卓越”团队建设计划项目 [农科创 2017 (B-06)]

* 共同第一作者

** 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zhulongying@saas.sh.cn)

ZFNs 高效,同时构建载体简单,成本低廉,但是构建具有相似 TALE 模块序列的载体比较复杂。2013 年,有两个研究团队分别独立发现并证明了常间回文重复序列丛集/常间回文重复序列丛集关联蛋白 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins, CRISPR/Cas) 在人类和老鼠细胞中的靶向基因组切割功能 (Cong et al., 2013; Mali et al., 2013)。CRISPR/Cas 系统的识别位点末端有 PAM 序列 NGG, 只需要根据需求改变 gRNA 来特异靶向基因组 DNA, 而起切割作用的 Cas9 蛋白不需要改变, 因此比 ZFNs 和 TALENs 更加简洁。CRISPR/Cas 系统被开发以来,以其高效、简单、低成本等特点被广泛应用于各个领域 (Li et al., 2013)。目前,CRISPR/Cas 在许多物种中能够成功进行基因敲除、插入、激活和抑制 (Pennisi, 2013), 该系统已经被应用到拟南芥、短柄草 (Shan et al., 2013)、烟草 (Nekrasov et al., 2013)、水稻、小麦以及高粱 (Chen & Gao, 2014) 中。自 2014 年开始利用 CRISPR/Cas9 系统编辑番茄基因组 (Brooks et al., 2014), 改良番茄重要性状报道不断,例如利用 CRISPR/Cas9 系统敲除 *SI4A9* 创制单性结实番茄 (Ueta et al., 2017), 通过敲除 *SP5G* 促进番茄提早开花和果实成熟 (Soyk et al., 2017a), 通过基因编辑 *J2* 和 *EJ2* 创制多分枝高产量番茄材料 (Soyk et al., 2017b) 等。

组蛋白变体 H2A.Z 参与很多生物学过程,包括基因激活 (Xiao et al., 2013)、DNA 损伤修复 (Lee et al., 2010)、染色体分离 (Segarra et al., 2010) 和异染色质沉默等 (Yoo et al., 2011)。拟南芥中组蛋白变体 H2A.Z 调节开花时间,参与免疫反应和感知环境温度变化 (Nah & Jeffrey, 2010; Crevillen & Dean, 2011)。本研究中根据植物组蛋白同源性获得了番茄组蛋白变体 *H2A.Z* 基因,利用基因编辑技术获得了番茄组蛋白变体基因 *H2A.Z* 纯合单突变体,高通量测序表明番茄 *H2A.Z* 基因均被敲除;通过杂交进一步获得了番茄 *H2A.Z* 基因双突变体,发芽试验表明双突变体种子萌发受到严重抑制,低温试验表明双突变体生长明显迟缓于野生型。

1 材料与方法

1.1 试验材料

番茄 (*Solanum lycopersicum* L.) 自交系 ‘1479’ 和根癌农杆菌 GV3101 均由上海市农业科学院园艺研究所提供。试验于 2015 年 7 月到 2017 年 12 月在该所进行。

1.2 基因敲除载体构建

将番茄 *SIU6* 启动子和 sgRNA 通过融合 PCR 连接并克隆到 pGEM-T 载体上, *SIU6* 启动子和 sgRNA 含有 2 个 *Bsa* I 酶切位点,形成中间载体 pGEM-SIU6-sgRNA (图 1, A)。将 *Cas9* 序列通过酶切位点 *Bam*H I 和 *Sac* I 克隆到 pC131-N1-YFP 载体上,形成表达载体 pC131-35S-Cas9 (图 1, B)。

根据番茄目标基因设计靶向序列,根据靶向序列合成带有与 *Bsa* I 酶切粘性末端互补序

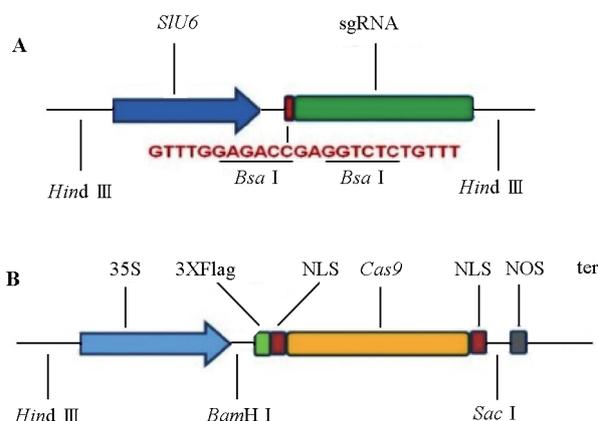


图 1 中间载体 pGEM-SIU6-sgRNA (A) 和表达载体 pC131-35S-Cas9 (B)

Fig. 1 Intermediate vector pGEM-SIU6-sgRNA (A) and expression vector pC131-35S-Cas9 (B)

列的引物。将合成的引物通过 *Bsa* I 酶切位点克隆到中间载体 pGEM-SIU6-sgRNA, 并通过 *Hind*III 酶切位点将带有靶向序列的 SIU6-sgRNA 克隆到表达载体 pC131-35S-Cas9, 获得 pC131-SIU6-sgRNA-35S-Cas9。

将 pC131-SIU6-sgRNA-35S-Cas9 转化农杆菌 GV3101, 并侵染番茄子叶。利用潮霉素对侵染后番茄子叶进行抗性筛选, 分离抗性芽后进行生根培养。提取抗性苗基因组 DNA, 并通过目标基因进行 Sanger 测序验证靶向位点突变情况。靶向位点设计位置位于番茄 *HTA11* 和 *HTA9* 基因的第 1 个外显子。Sanger 测序引物 (表 1) 设计在靶序列的上游和下游。分别构建 *HTA11* 和 *HTA9* 的基因敲除载体, 获得单基因纯合突变体之后, 通过杂交获得双突变体。

表 1 突变体鉴定引物

Table 1 Primers for mutant identification	
引物名称 Primer name	引物序列 (5' - 3') Primer sequence
<i>HTA11</i> F	GGAGGGAAAGGGCTAGTAGCGG
<i>HTA11</i> Fm	GGAGGGAAAGGGCAGCGGGGAA
<i>HTA11</i> R	CTCTTTCTAATGGTAGAAAT
<i>HTA9</i> F	GGGAAAACAGCGGCTAATAAGG
<i>HTA9</i> Fm	GATTATGGGAAAACAGTAAGG
<i>HTA9</i> R	ATGCGCAAACCTTTTCAAATT
<i>HTA11</i> CeF	TTACAGATCTACGCACAAAT
<i>HTA11</i> CeR	CTCTTTCTAATGGTAGAAAT
<i>HTA9</i> CeF	CCTTCCAGCTCAGTCCAAT
<i>HTA9</i> CeR	ATGCGCAAACCTTTTCAAATT

1.3 番茄遗传转化和突变体检测

野生型番茄种子经 70%乙醇消毒 1 min, 无菌水冲洗 3 次, 10%次氯酸钠 (可加 0.1% Tween-20, 不加 SDS) 处理 10 min, 用无菌水冲洗 5 次。种子转移到 1/2MS 培养基上发芽 (26 °C, 16 h 光照)。将 7 d 的子叶切下并在低光照条件下 25 °C 预培养 24 h。将农杆菌菌液倒入装有子叶的培养皿中, 室温放置 30 min, 并不时晃动以帮助农杆菌与子叶的接触。将多余的菌液用移液器移去, 于 25 °C 黑暗条件下共培养 48 h。48 h 后将子叶转移到含 15 mg · L⁻¹ 潮霉素的筛选培养基上, 子叶的上表面朝上。每 2 周换新鲜筛选培养基, 1 个月后切取抗性芽转到生根培养基。生根的无菌苗经炼苗后移入营养土中, 检测基因转化和靶基因突变情况。基因转化检测引物用 *Cas9*F/*Cas9*R。鉴定 *hta11hta9* 双突变体的引物为 *HTA11*F/*HTA11*R、*HTA11*Fm/*HTA11*R、*HTA9*F/*HTA9*R、*HTA9*Fm/*HTA9*R (表 1)。

1.4 种子发芽率统计和低温处理试验

选取野生型和 *hta11hta9* 双突变体种子各 300 粒, 设置 3 次重复, 每次重复 100 粒。番茄种子置于垫有直径 9 cm 滤纸的培养皿中, 倒入 8 mL 蒸馏水, 加盖后放置在 26 °C 的恒温培养箱中进行发芽。种子以胚根明显露白认定为发芽。每隔 24 h 将发芽的种子取出计数, 直至 11 d 为止。

为了研究番茄组蛋白 *H2A.Z* 基因在番茄耐受低温中所起的作用, 分别将野生型和双突变体 *hta11hta9* 在 17 °C 和 22 °C 条件下培养 5 周, 光照 16 h, 黑暗 8 h。在 17 °C 和 22 °C 条件下培养 5 周, 测量野生型和双突变体的株高和单株鲜质量, 均为 12 次重复。在 22 °C 条件下培养 5 周, 通过对野生型和 *hta11hta9* 双突变体进行 RNA 测序获得 FPKM (fragments per kilobase million) 值, 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 番茄组蛋白变体 *H2A.Z* 基因突变体的获得

根据同源性比对, 从番茄基因组发现 3 个 *H2A.Z* 基因, 分别是 *HTA11* (Solyc06g084090)、*HTA9* (Solyc12g006830) 和 *HTA8* (Solyc09g065755)。根据番茄 *HTA11* 和 *HTA9* 设计靶向位点, 利用基

因编辑技术获得了杂合突变和纯合突变的后代（表 2）。

表 2 基因编辑结果统计
Table 2 Statistics of gene editing results

番茄目标基因 Tomato target gene	靶向位点 Target site	检测总数 Total	杂合突变体数量 Number of heterozygous mutation	纯合突变体数量 Number of homozygous mutation
<i>HTA11</i> (Solyc06g084090)	GGAGGGAAAGGGCTAGTAGC	33	20	4
<i>HTA9</i> (Solyc12g006830)	GGGGAAAACAGCGGCTAATA	27	17	1

对 T0 代进行 Sanger 测序，发现了 *HTA11* 基因缺失 4 个碱基和 *HTA9* 基因缺失 7 个碱基的纯合突变单株（图 2）。

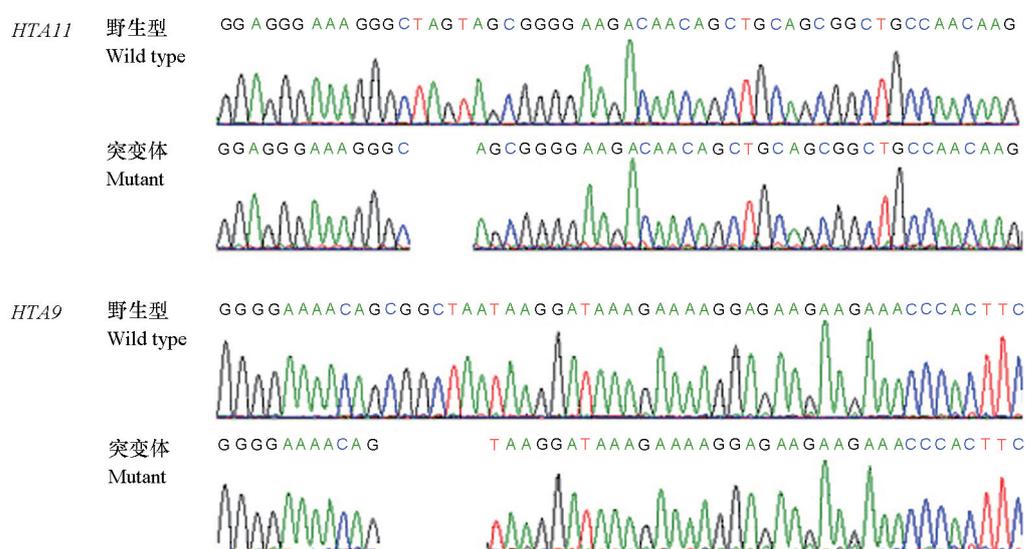


图 2 番茄 *HTA11* 和 *HTA9* 基因 Sanger 测序结果
Fig. 2 The Sanger sequencing results of tomato *HTA11* and *HTA9*

根据靶位点基因序列缺失差异设计能够检测突变体和野生型的引物，用来检测 *HTA11* 和 *HTA9* 基因的杂合和纯合状态。引物 *HTA11F/HTA11R* 和 *HTA9F/HTA9R* 根据野生型的 *HTA11* 和 *HTA9* 基因设计，如果 PCR 有条带，基因没有突变。引物 *HTA11Fm/HTA11R* 和 *HTA9Fm/HTA9R* 根据两个基因发生突变的序列设计，如果 PCR 有条带说明基因发生突变。

将两个基因的单突变体 *hta11* 和 *hta9* 杂交获得 F₁，经过突变体引物验证发现 F₁ 的 *HTA11* 和 *HTA9* 基因均为杂合状态（图 3）。F₁ 自交获得 F₂ 并经过突变体引物鉴定获得了 *hta11hta9* 纯合双突变体（图 3）。对于经过 PCR 鉴定的双突变体经过进一步 Sanger 测序，证实 *HTA11* 和 *HTA9* 基因均为纯合突变，即获得番茄的 *HTA11* 和 *HTA9* 基因的纯合双突变体 *hta11hta9*。

2.2 双突变体基因敲除效果检测

取双突变体 *hta11hta9* 和野生型叶片，经过表达谱测序验证，发现番茄 *HTA11* 和 *HTA9* 基因表达在双突变体中表达极低（图 4）。检测番茄 *H2A.Z* 基因 *HTA8* (Solyc09g065755) 表达情况发现，*HTA8* 基因表达在对照和 *hta11hta9* 之间没有差别（图 5）。以上结果表明通过基因编辑技术，*HTA11* 和 *HTA9* 基因均被定点敲除，获得了番茄 *HTA11* 和 *HTA9* 双突变体 *hta11hta9*。

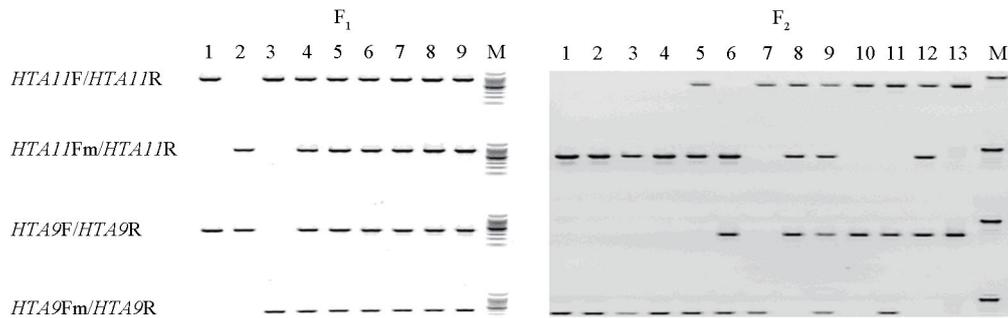


图3 突变体 *hta11* 和 *HTA9* 杂交 F_1 和 F_2 代的 PCR 检测结果

F_1 : 1: 野生型; 2: *hta11* 突变体; 3: *hta9* 突变体; 4~9: *HTA11* 基因和 *HTA9* 基因均为杂合突变。 F_2 : 1~4: *HTA11* 基因纯合突变体和 *HTA9* 纯合突变体; 5: *HTA11* 基因杂合突变, *HTA9* 基因纯合突变; 6: *HTA11* 基因纯合突变, *HTA9* 基因杂合突变; 7: *HTA9* 基因纯合突变; 8: *HTA11* 基因杂合突变; 9: *HTA11* 基因杂合突变, *HTA9* 基因杂合突变; 10: *HTA11* 和 *HTA9* 基因均未突变; 11: *HTA9* 基因杂合突变; 12: *HTA11* 基因杂合突变; 13: 野生型。M: DNA 标记。

Fig. 3 Identification of tomato *H2A.Z* double mutant

F_1 : 1: WT; 2: *hta11* mutant; 3: *hta9* mutant; 4 - 9: Heterozygous mutation at *HTA11* and *HTA9* genes. F_2 : 1 - 4: Homozygous mutation at *HTA11* and *HTA9* genes; 5: Heterozygous mutation at *HTA11* gene, homozygous mutation at *HTA9* gene; 6: Homozygous mutation at *HTA11* gene, heterozygous mutation at *HTA9* gene; 7: Homozygous mutation at *HTA9* gene; 8: Heterozygous mutation at *HTA11* gene; 9: Heterozygous mutation at *HTA9* gene; 10: No mutation at *HTA11* and *HTA9* genes; 11: Heterozygous mutation at *HTA9* gene; 12: Heterozygous mutation at *HTA11* gene; 13: Wild type. M: DNA marker.

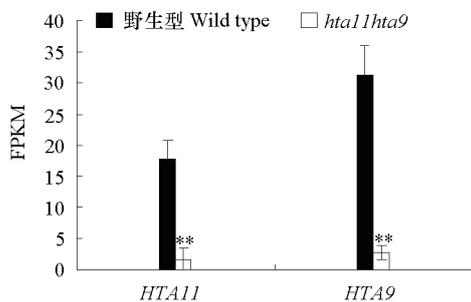


图4 *HTA11* 和 *HTA9* 基因在番茄野生型和双突变体 *hta11hta9* 中的表达

Fig. 4 Expression of *HTA11* and *HTA9* genes in wild type and double mutant *hta11hta9*

** $P < 0.01$.

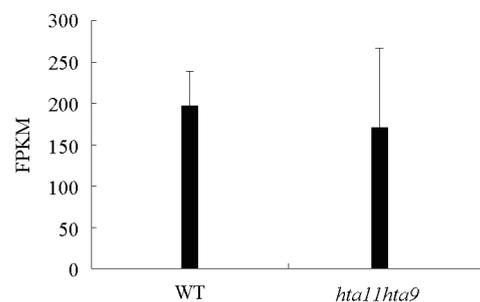


图5 组蛋白变体 *H2A.Z* 基因 *HTA8* (Solyc09g065755) 在番茄野生型 (WT) 和双突变体 *hta11hta9* 中的表达

Fig. 5 Expression of *HTA8* gene in wild type (WT) and double mutant *hta11hta9*

2.3 番茄组蛋白变体 *H2A.Z* 基因双突变体发芽率检测

种子萌发试验表明 *hta11hta9* 双突变体发芽能力显著低于野生型 (图6), 发芽 11 d 时 *hta11hta9* 发芽率为 53%, 而野生型为 90%。这表明番茄 *H2A.Z* 基因参与了种子萌发过程, 对于种子正常萌发具有重要作用。

2.4 番茄组蛋白变体 *H2A.Z* 基因对于番茄苗期低温耐性的影响

将番茄野生型和双突变体 *hta11hta9* 在 17 °C 和 22 °C 条件下培养 5 周, 结果发现在 22 °C 条件下野生型和双突变体 *hta11hta9* 株高无显著差异, 但是在 17 °C 条件下 *hta11hta9* 双突变体株高要明显小于野生型 (图7)。

在 17 °C 条件下 *hta1hta9* 双突变体的单株质量极显著低于野生型，而在 22 °C 条件下，两者没有显著差异（图 8）。

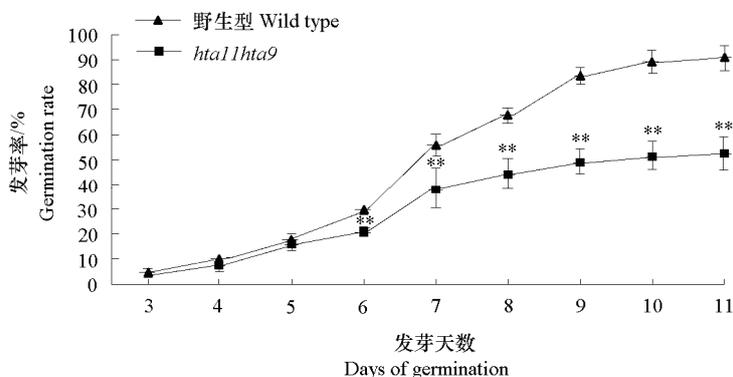


图 6 番茄野生型和双突变体 *hta1hta9* 种子发芽率

Fig. 6 Seed germination rate of wild type and double mutant *hta1hta9*

** $P < 0.01$.

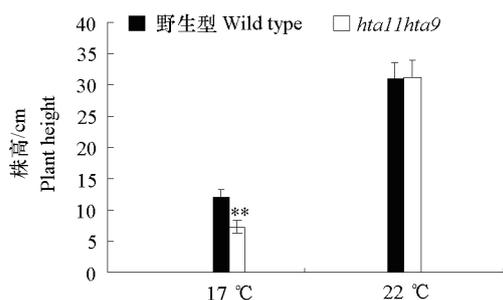


图 7 不同温度下番茄野生型和双突变体 *hta1hta9* 株高

Fig. 7 Plant height of wild type and double mutant *hta1hta9* under different temperatures

** $P < 0.01$.

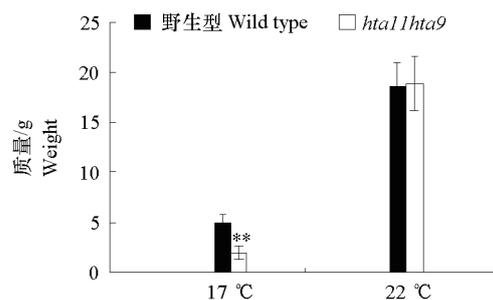


图 8 不同温度下番茄野生型和双突变体 *hta1hta9* 质量

Fig. 8 Weight of wild type and double mutant *hta1hta9* under different temperatures

** $P < 0.01$.

3 讨论

基因编辑系统 CRISPR/Cas9 自 2013 年报道以来，以其高效、操作简单、特异性好等优点迅速被应用于医疗、基因功能研究、农作遗传改良等领域（崔霞和张率斌，2017）。本研究中利用番茄 *U6-26* 基因启动子启动 guide RNA，利用 35S 启动子启动 *Cas9* 基因表达，建立基于 CRISPR/Cas9 载体系统获得番茄基因组定点敲除突变体的方法，并且获得了较好的基因敲除结果。目前，随着研究的深入，对于基因编辑精度要求越来越高，因此利用 CRISPR 系统进行碱基替换受到人们的重视，包括 C: G 编辑为 T: A 以及 T: A 编辑为 C: G（Gaudelli et al., 2017; Komor et al., 2017）。高彩霞研究组构建了高效的植物单碱基编辑系统 nCas9-PBE，成功地在小麦、水稻和玉米三大重要农作物的基因组中实现高效、精确的单碱基定点突变（Zong et al., 2017），朱健康研究组利用 APOBEC1-XTEN-Cas9(D10A)融合序列在水稻中对 *NRT1.1B* 和 *SLR1* 进行了碱基替换（Lu & Zhu,

2017)。因此, 开发适合番茄碱基替换载体系统将是研究番茄基因组编辑技术应用的一个重要方向。

H2A.Z 是组蛋白 *H2A* 的变体之一, 在不同物种之间有着高度的序列保守性, 在调控植物开花、生长发育、免疫应答、有丝分裂、DNA 修复以及温度感应等方面均发挥了重要作用。本研究中通过基因编辑获得了番茄的 *H2A.Z* 基因的双突变体 *hta1hta9*, 并发现双突变体 *hta1hta9* 种子萌发受到严重影响, 发芽率明显低于野生型, 这表明组蛋白 *H2A.Z* 基因对于种子正常萌发发挥了重要作用。通过对拟南芥的 *ARP6* 基因缺失突变体 *suf3* 表型研究发现 *suf3* 在胚胎发育和种子萌发方面都存在明显缺陷, 而 *ARP* 通过染色质重塑复合物 *SWR1* 将 *H2A.Z* 组装到核小体中 (Crevillen & Dean, 2011; Berriri et al., 2016)。

番茄在 17 °C 条件下处理 5 周, 发现 *hta1hta9* 生长明显迟缓于野生型, 植株质量和株高均显著小于野生型, 但是在 22 °C 培养条件下 *hta1hta9* 和野生型没有明显差别。这些结果表明 *H2A.Z* 基因在相对低温情况下番茄生长发育具有重要作用。在拟南芥上的研究表明, 组蛋白变体 *H2A.Z* 及其参与的核小体组装在植物感知温度变化的过程中扮演了重要角色, *H2A.Z* 赋予核小体更高的稳定性, 含有 *H2A.Z* 的核小体在相对高的温度下可以保持稳定 (Kumar & Wigge, 2010)。在染色质重塑复合物 *Swr1* 成员 *ARP6* (Actin related protein 6) 缺失的突变体中, *H2A.Z* 不能够正常加载到温度应答基因 *Hsp70* 上, 并且 *arp6* 突变体植株热相关基因转录水平也与野生型在高温处理下一致 (Kumar & Wigge, 2010)。在二穗短柄草中, 受 *ARP6* 调节参与染色质重塑的 *H2A.Z* 在热胁迫应答和谷粒发育过程中扮演了重要角色 (Boden et al., 2013)。染色质重塑以及核小体组装过程在植物应答外界环境温度过程中起了重要作用。低温处理拟南芥时, *COR15A* 和 *ATGOLS3* 通过启动子区域染色质的去组装来激活表达; 而当恢复正常温度条件时, 组蛋白和核小体的动态变化得到逆转 (Kwon et al., 2009)。核小体的组装和去组装机制可能是一种植物通过快速调节染色质结构来适应环境温度变化的机制 (Zhu et al., 2013)。在高等植物中, 从染色质层面上认识 *H2A.Z* 调控基因表达的分子机理是新的研究热点。关于温度调控植物生长发育, *H2A.Z* 感知温度及参与调控免疫 (Cheng et al., 2013) 的研究主要在模式作物拟南芥上取得一些进展, 而在重要农作物如番茄上的研究很少。

References

- Berriri S, Gangappa S N, Kumar S V. 2016. *SWR1* chromatin-remodeling complex subunits and *H2A.Z* have non-overlapping functions in immunity and gene regulation in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 9 (7): 1051 - 1065.
- Boden S A, Kavanova M, Finnegan E J, Wigge P A. 2013. Thermal stress effects on grain yield in *Brachypodium distachyon* occur via *H2A.Z*-nucleosomes. *Genome Biology*, 14 (6): R65.
- Brooks C, Nekrasov V, Lippman Z B, 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 Physiology*, 166 (3): 1292 - 1297.
- Chen K, Gao C. 2014. Targeted genome modification technologies and their applications in crop improvements. *Plant Cell Reports*, 33 (4): 575 - 583.
- Cheng C, Gao X, Feng B, Sheen J, Shan L, He P. 2013. Plant immune response to pathogens differs with changing temperatures. *Nature Communications*, 4: 2530.
- Cong L, Ran F A, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu P D, Wu X, Jiang W, Marraffini L A, Zhang F. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339 (6121): 819 - 823.
- Crevillen P, Dean C. 2011. Regulation of the floral repressor gene *FLC*: the complexity of transcription in a chromatin context. *Current Opinion in Plant Biology*, 14 (1): 38 - 44.
- Cui Xia, Zhang Shuaibin. 2017. The utilization and prospect of genome editing in horticultural crops. *Acta Horticulturae Sinica*, 44 (9): 1787 - 1795. (in Chinese)
- 崔霞, 张率斌. 2017. 基因编辑技术及其在园艺作物中的应用和展望. *园艺学报*, 44 (9): 1787 - 1795.

- Gaudelli N M, Komor A C, Rees H A, Packer M S, Badran A H, Bryson D I, Liu D R. 2017. Programmable base editing of A*T to G*C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 551 (7681): 464 - 471.
- Komor A C, Zhao K T, Packer M S, Gaudelli N M, Waterbury A L, Koblan L W, Kim Y B, Badran A H, Liu D R. 2017. Improved base excision repair inhibition and bacteriophage Mu Gam protein yields C:G-to-T:A base editors with higher efficiency and product purity. *Science Advances*, 3 (8): eaao4774.
- Kumar S V, Wigge P A. 2010. H2A.Z-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in *Arabidopsis*. *Cell*, 140 (1): 136 - 147.
- Kwon C S, Lee D, Choi G, Chung W I. 2009. Histone occupancy-dependent and -independent removal of H3K27 trimethylation at cold-responsive genes in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 60 (1): 112 - 121.
- Lee H, Yoo S J, Lee J H, Kim W, Yoo S K, Fitzgerald H, Carrington J C, Ahn J H. 2010. Genetic framework for flowering-time regulation by ambient temperature-responsive miRNAs in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research*, 38 (9): 3081 - 3093.
- Li J F, Norville J E, Aach J, McCormack M, Zhang D, Bush J, Church G M, Sheen J. 2013. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature Biotechnology*, 31 (8): 688 - 691.
- Lu Y, Zhu J. 2017. Precise editing of a target base in the rice genome using a modified CRISPR/Cas9 system. *Molecular Plant*, 10 (3): 523 - 525.
- Mali P, Yang L, Esvelt K M, Aach J, Guell M, DiCarlo J E, Norville J E, Church G M. 2013. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339 (6121): 823 - 826.
- Nah G, Jeffrey Chen Z. 2010. Tandem duplication of the FLC locus and the origin of a new gene in *Arabidopsis* related species and their functional implications in allopolyploids. *The New Phytologist*, 186 (1): 228 - 238.
- Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, Jones J D, Kamoun S. 2013. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnology*, 31 (8): 691 - 693.
- Pennisi E. 2013. The CRISPR craze. *Science*, 341 (6148): 833 - 836.
- Qi Y, Li X, Zhang Y, Starker C G, Baltes N J, Zhang F, Sander J D, Reyon D, Joung J K, Voytas D F. 2013. Targeted deletion and inversion of tandemly arrayed genes in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 3 (10): 1707 - 1715.
- Segarra S, Mir R, Martinez C, Leon J. 2010. Genome-wide analyses of the transcriptomes of salicylic acid-deficient versus wild-type plants uncover Pathogen and Circadian Controlled 1 (PCC1) as a regulator of flowering time in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment*, 33 (1): 11 - 22.
- Shan Q, Wang Y, Li J, Zhang Y, Chen K, Liang Z, Zhang K, Liu J, Xi J J, Qiu J L, Gao C. 2013. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 31 (8): 686 - 688.
- Soyk S, Muller N A, Park S J, Schmalenbach I, Jiang K, Hayama R, Zhang L, Van Eck J, Jimenez-Gomez J M, Lippman Z B. 2017a. Variation in the flowering gene SELF PRUNING 5G promotes day-neutrality and early yield in tomato. *Nature Genetics*, 49 (1): 162 - 168.
- Soyk S, Lemmon Z H, Oved M, Fisher J, Liberatore K L, Park S J, Goren A, Jiang K, Ramos A, van der Knaap E, Zamir D, Eshed Y, Lippman Z B. 2017b. Bypassing negative epistasis on yield in tomato imposed by a domestication gene. *Cell*, 169 (6): 1142 - 1155.
- Ueta R, Abe C, Watanabe T, Sugano S S, Ishihara R, Ezura H, Osakabe Y, Osakabe K. 2017. Rapid breeding of parthenocarpic tomato plants using CRISPR/Cas9. *Scientific Reports*, 7 (1): 507.
- Xiao D, Zhao J J, Hou X L, Basnet R K, Carpio D P, Zhang N W, Bucher J, Lin K, Cheng F, Wang X W, Bonnema G. 2013. The *Brassica rapa* FLC homologue FLC2 is a key regulator of flowering time, identified through transcriptional co-expression networks. *Journal of Experimental Botany*, 64 (14): 4503 - 4516.
- Yoo S K, Wu X, Lee J S, Ahn J H. 2011. AGAMOUS-LIKE 6 is a floral promoter that negatively regulates the FLC/MAF clade genes and positively regulates FT in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 65 (1): 62 - 76.
- Zhang F, Maeder M L, Unger-Wallace E, Hoshaw J P, Reyon D, Christian M, Li X, Pierick C J, Dobbs D, Peterson T, Joung J K, Voytas D F. 2010. High frequency targeted mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (26): 12028 - 12033.
- Zhu Y, Dong A, Shen W H. 2013. Histone variants and chromatin assembly in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1819 (34): 343 - 348.
- Zong Y, Wang Y, Li C, Zhang R, Chen K, Ran Y, Qiu J L, Wang D, Gao C X. 2017. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. *Nature Biotechnology*, 35 (5): 438 - 440.