

CRISPR/Cas9 基因编辑系统及其在水稻育种中的应用综述

尹祥佳, 李艳玫, 郝楠

(兰州职业技术学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 综述了 CRISPR/Cas9 基因编辑系统及其在水稻育种中的应用。在水稻基因组水平上进行基因定向编辑改造对水稻育种具有重要意义。CRISPR/Cas9 基因编辑系统是近几年来研究发现的一种定点基因组编辑新工具, 仅需要短 RNA 和核酸酶就可以对特定的靶标基因进行突变, 因其简便高效而被广泛应用于包括水稻在内的多种生物的基因组编辑中。

关键词: CRISPR/Cas9; 基因编辑; 水稻育种

中图分类号: S511

文献标志码: A

文章编号: 1001-1463(2017)10-0080-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2017.10.024

The Crispr/Cas9 Gene Editing System and Its Review of Application in Rice Breeding

YIN Xiangjia LI Yanmei HAO Nan

(Lanzhou Vocational and Technical College, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: It is great significance in rice breeding of gene directed to edit on the rice genome level. CRISPR/Cas9 gene editing system is in recent years, the study found that a new fixed-point genome editing tools, need only a short RNA and DNA enzyme can in a specific target gene mutations, because of simple and highly effective and widely used in including rice, a variety of biological genome in the editor. Through the review CRISPR/Cas9 gene editing system and its application in rice breeding, in order to provide some references for the research in this field.

Key words: CRISPR/Cas9; Gene editing; Rice breeding

水稻是我国乃至全球最为重要的粮食作物之一, 全世界 50% 以上的人口以水稻为主食。我国是世界上最大的水稻生产国和消费国, 水稻对我国粮食生产和安全起着重要的作用。近年来, 随着人口数量、耕地面积以及生物逆境胁迫等因素的影响, 我国水稻生产面临越来越严峻的挑战^[1-2]。依靠水稻科技育种, 不断加大科研投入, 加强水稻产量、抗性、品质的育种研究已经成为提高水稻生产水平的有效途径^[3]。

随着基因组测序技术的迅速发展, 作物基因组测序取得了突破性进展, 目前全球已基本完成大约 64 种作物的基因组测序, 其中有 25 种是由我国科学家独立完成或参与完成^[4]。水稻是第一个完成基因组测序的粮食作物, 目前已经处于以功能基因组学研究为标志的后基因组时代^[5]。中国农业科学院联合国际水稻研究所、华大基因研

究院完成了全球 3 000 份水稻核心种质的重测序工作, 为研究水稻基因功能、指导水稻全基因组选择育种提供了重要平台^[6-7], 也为深入开展水稻功能基因组研究和利用转基因技术改良水稻品种提供了可靠的保障^[8]。

任何新的育种技术的研发与应用要具有创新性, 基因编辑技术作为合成生物学的核心技术为典型的代表^[9]。基因编辑技术是近几年发展起来的对基因组进行定向精确修饰的技术, 可以对基因组中的靶位点进行敲除、插入、碱基替换、点突变等定点人工修饰^[10]。主要包括锌指核酸酶(ZFNs)技术、转录激活子样效应物核酸酶(TALENs)技术和 CRISPR/Cas 核酸酶(CRISPR/Cas RGNs)技术^[11]。TALENs 和 CRISPR/Cas 分别在 2012 年和 2013 年被 Science 评为世界十大科学研究突破课题之一。

收稿日期: 2017-05-16

基金项目: 兰州职业技术学院 2016 年院内科研项目(项目编号: 2016B-2)。

作者简介: 尹祥佳(1984—), 男, 甘肃兰州人, 农艺师, 硕士, 主要从事作物遗传育种研究。E-mail: yinxiangjia@lvu.edu.cn。

1 CRISPR/Cas9 基因编辑系统

1.1 CRISPR/Cas9 的发现及研究历程

1987 年, Ishino 等^[12]首次在大肠杆菌 K12 的碱性磷酸酶基因附近区域发现了成簇规律间隔的短回文重复核酸序列。此后, 人们陆续在细菌和古细菌基因中也发现, 大量类似回文结构的正向重复核酸序列。2005 年, Bolotin 等^[13]研究发现, CRISPR 间隔序列与噬菌体、质粒等外源 DNA 序列具有高度的同源性。2006 年, Makarova 等^[14]研究认为, CRISPR 系统可能通过一种类似于真核生物 RNAi 的方式实现自身的免疫功能。2007 年, Barrangou 等^[15]首次实验证明了嗜热链球菌的 CRISPR 系统可以直接参与细菌对噬菌体的适应性免疫表达调控反应, 证实 CRISPR/Cas 系统使细菌产生获取噬菌体 DNA 片段而形成特殊的“记忆模式”, 从而使细菌获得对同一噬菌体入侵时的免疫功能。2012 年 Jinek 等^[16]发现, Type II CRISPR 系统中的 Cas9 是一种核酸酶。2013 年, Cong 等^[17]发表了基于 CRISPR/Cas9 系统在人类与小鼠细胞系中进行基因敲除的新方法。2014 年, Hu 等^[18]首次成功的把艾滋病病毒从培养的人类细胞系中消除, 这在艾滋病治愈研究方面迈出了重要一步。至此, CRISPR/Cas9 这个新型基因组编辑系统被广大研究者所熟知, 也成为近年分子生物学界的热点研究领域。CRISPR/Cas9 系统除了可以在人类与动物细胞系中实现定点修饰, 还可以在地钱、拟南芥、烟草、水稻、小麦、高粱、玉米等模式植物和粮食作物中实现定点基因组编辑, 但目前只在拟南芥和水稻中可以获得稳定的突变体植株^[19]。因此, CRISPR/Cas9 系统要在更多的模式植物研究中获得突变体还得做大量的工作。

1.2 CRISPR/Cas 类型

到目前为止, 研究发现了 3 种不同类型的 10 个亚型的 CRISPR/Cas 系统, 分别存在于 40% 和 90% 已测序的细菌和古细菌中^[20-21]。Type I 型 CRISPR/Cas 系统广泛存在于大肠杆菌等细菌、铜绿假单胞菌等古生菌中, 包含 6 个亚型(Cas1、Cas2、Cas3、Cas5、Cas6、Cas7), 靶标类型为 DNA。Type II 型 CRISPR/Cas 系统只存在于嗜热链球菌等细菌基因组中, 包含 4 亚型(Cas1、Cas2、Cas4、Cas9), 靶标类型为 DNA。Type III 型 CRISPR/Cas 系统来源于激烈火球菌等古生菌, 包含 4 个亚型(Cas1、Cas2、Cas6、Cas10), 靶标类型为 DNA 或 RNA^[22-23]。目前, CRISPR/Cas 系统组成成分较为简单且最常用的方式, 是在细胞或

生物体内引入 Cas9 酶和设计不同的导向 RNA (sgRNA), 来指导 Cas9 完成对 DNA 的定点切割修饰。

1.3 CRISPR/Cas 基本结构和作用原理

CRISPR/Cas 主要由 CRISPR 序列元件与 Cas 基因家族蛋白组成。CRISPR 序列元件是一类特殊的 DNA 重复序列, 由一些高度保守的重复序列 (Repeat) 和间隔序列 (Spacer) 相间排列构成, 还有位于重复上游的引导序列 (Leader) (图 1)。同一位点内的重复序列高度保守, 而不同位点间的重复序列却存在较高的多样性。此外, 在 CRISPR 位点附近还存在 4-10 个与 CRISPR 相关的 Cas 基因家族蛋白酶, 具有核酸酶和内切酶活性, 能对 DNA 序列进行特异剪切和修复。其中, CRISPR/Cas9 系统作用原理为转录加工成的 CRISPR RNA (crRNA) 与反式激活 crRNA (tracrRNA) 形成二元复合体结构, 被称为单一引导 RNA (sgRNA)。此复合体引导 Cas9 蛋白酶的 HNH 能够特异性识别与 crRNA 碱基互补配对的模板链, 实现切割; RuvC 参与另一条链特定位点的切割, 切割位点都位于 PAM 上游处 (图 2), 随后通过体内的 NHEJ (non-homologous end joining) 修复机制引入基因突变。因此可以设计不同的 sgRNA 使得 CRISPR/Cas9 能够剪切不同的 DNA 碱基序列而获得突变体。

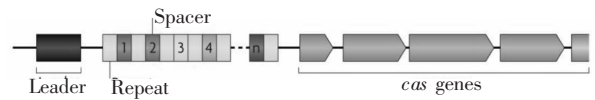


图 1 CRISPR/Cas 基本结构^[24]

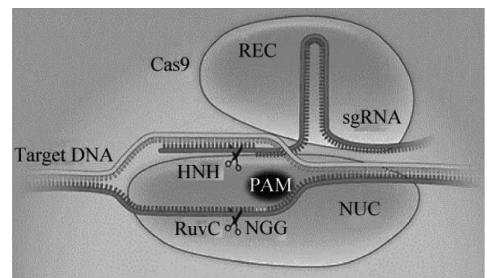


图 2 CRISPR/Cas9 作用原理^[25]

2 CRISPR/Cas9 在水稻育种中的应用

培育高产、抗病、抗旱、高品质的水稻品种一直是育种家追求的育种目标, 也是提升水稻种业科技水平和确保我国粮食安全的根本途径。以水稻杂交育种为代表的常规育种具有周期长、选育针对性较差等不足, 已经逐渐难以快速实现育种目标。多年来, 我国的水稻分子育种研究水平取得了广泛的研究成果, 分离克隆了大量的控制

表 1 水稻基因组 CRISPR/Cas9gRNA 序列的设计网站

设计网址名称	网址	脱靶分析
E-CRISPR Design	http://e-crisp-test.dkfz.de/E-CRISP/designcrispr.html	有
CRISPR-P	http://cbi.hzau.edu.cn/crispr/	有
CRISPRdirect	http://crispr.dbcls.jp/	有
CRISPR-PLANT	http://www.genome.arizona.edu/crispr/CRISPRsearch.html	有
Cas9 Online Designer	http://cas9.wicp.net/	有
CRISPR MultiTargeter	http://www.multicrispr.net/	无
Cas-Designer	http://www.rgenome.net/cas-designer/	有

产量基因、品质基因、抗病基因、抗虫基因、抗非生物逆境功能基因、代谢调控基因^[26]。重点开展了以水稻功能基因组学研究为基础的全基因组分子标记技术主导下的水稻分子设计育种研究。利用 CRISPR/Cas9 系统对水稻进行基因定点突变, 可实现更为可控的水稻基因组修饰, 有针对性的进行水稻优良基因的定点整合和多个优良性状基因的聚合, 将成为提高水稻产量、抗性和品质的一个重要手段。

应用 CRISPR/Cas9 系统定向编辑水稻基因一般有以下 7 个步骤: gRNA 靶点设计及寡核苷酸链合成; 构建 CRISPR/Cas9 sgRNA 表达载体; 遗传转化水稻愈伤组织、筛选抗性愈伤; 提取愈伤组织基因组 DNA 后 PCR 扩增靶位点; 酶切或测序鉴定突变类型; 再生植株鉴定; T2 代种子中获得突变体新种质。适用于水稻基因组 CRISPR/Cas9 gRNA 序列的设计需要借助专门的数据库完成(表1)。Xu 等^[27]针对水稻除草剂抗性基因 BEL 设计了 3 个不同 gRNAs, 研究发现 CRISPR/Cas9 系统突变效率在 2%~16%, 表型分析显示转基因植株对除草剂苯达松敏感。杜彦修等^[28]以水稻 OsbHLH116 基因为编辑对象, 设计并合成了长度为 19bp 的 sgRNA 寡核苷酸序列, 经转化、筛选、分析后得到了 6 个突变单株。王加峰等^[29]利用 CRISPR/Cas9 对调控水稻产量千粒重基因 TGW6 定点编辑, 结果表明, T0 代材料中 *tgw6* 的突变频率高达 90%, 其中纯合缺失突变率约占 51%。王芳权等^[30]利用 CRISPR/Cas9 针对抗稻瘟病 Pi21 基因的两个靶位点, 靶位 1 突变效率为 78.57%, 靶位 2 突变效率为 92.86%, 突变效率较高。总之, CRISPR/Cas9 是当前研究水稻育种的最新途径, 可以有效提高水稻的产量、抗性和品质(表2)。

3 展望

CRISPR/Cas9 的研究时间比较短, 但自从细菌和古细菌的天然免疫系统改造为定向基因编辑技术后, 迅速成为分子生物学的研究热点工具, 目前 CRISPR/Cas 技术的发展集中在 II 型 CRISPR 中的 Cas9 核酸酶, 还有其他类型的 CRISPR 系统有

表 2 CRISPR/Cas9 在水稻育种中的应用

基因	育种目标	文献
BEL	抗除草剂	[27]
OsbHLH116	品质改良	[28]
TGW6	粒重产量	[29]
Pi21、Pi39	抗稻瘟病	[30-31]
ROC5	卷叶育种	[32]
OsWaxy	糯性育种	[32]
OsBADH2	香米株系育种	[33-34]
OsPDS	耐冷性株系	[33]
OsGA20ox2	降低株高	[35]
HW3	抗白叶枯病	[36]
Hdl	水稻抽穗期	[37]
Gn1a、DEP1、GS3、IPA1	产量育种	[38]
OsERF922	抗稻瘟病	[39]

很大的研究空间。CRISPR-Cas9 系统将给基因组定向修饰的研究和应用领域带来突破性的技术革命, 特别是在基因功能验证、疾病靶向治疗、生物新能源及生物制药等应用中具有广阔的前景。但是还存在靶向效率低和脱靶效应的问题, 需要继续开展深入研究。

CRISPR/Cas9 在水稻性状改良与分子设计育种方面不断发挥着重要的作用。我国科学家已经提出了水稻“2020 研究计划”和水稻 4D 基因组学研究计划, 在此基础上开展 CRISPR/Cas9 基因编辑育种研究, 必将变革水稻育种的模式, 增强水稻分子设计育种能力, 实现目标性状的精确改良, 巩固和发展我国的水稻分子育种水平。

我国已将水稻育种的主体转向种业公司, 但种业公司在育种研发过程中离不开科研院所的大力协作。通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术对我国主推水稻品种进行遗传改良, 将会成为开展合作的重要目标。只有将水稻 CRISPR/Cas9 基因编辑技术与常规育种相结合, 科研院所与企业相结合, 共同提升我国水稻育种能力和种业科技水平, 才能不断增强我国水稻育种的国际竞争力和服务力。但现在面临的最大问题是该技术获得的水稻育种新材料是否受国家农业部相关转基因法律的约束, 以及是否受相关知识产权法律的保护。

参考文献:

- [1] 陈浩, 林拥军, 张启发. 转基因水稻研究的回顾与展望[J]. 科学通报, 2009, 54(18): 2699-2717.

- [2] 赵凌, 赵春芳, 周丽慧. 我国水稻生产概况分析[J]. 农业科学与技术, 2016, 17(1): 78-80.
- [3] 李韬, 李长成, 孙发宇, 等. 2016年作物科学热点回眸[J]. 科技导报, 2017, 35(1): 78-85.
- [4] 贾继增, 高丽锋, 赵光耀, 等. 作物基因组学与作物科学革命[J]. 中国农业科学, 2015, 48(17): 3316-3332.
- [5] 王凤梅. 水稻功能基因组学研究[J]. 生物技术通报, 2007(1): 10-13.
- [6] 3000 rice genomes project. The 3000 rice genomes project[J]. Giga Science, 2014, 3: 7.
- [7] 郑天清, 余泓, 张洪亮, 等. 水稻功能基因组育种数据库(RFGB): 3K水稻SNP与InDel子数据库[J]. 科学通报, 2015, 60(4): 367-371.
- [8] 张欣, 付亚萍, 周君莉. 水稻规模化转基因技术体系构建与应用[J]. 中国农业科学, 2014, 47(21): 4141-4154.
- [9] 张先恩. 2017合成生物学专刊序言[J]. 生物工程学报, 2017, 33(3): 311-314.
- [10] 张白雪, 孙其信, 李海峰. 基因修饰技术研究进展[J]. 生物工程学报, 2015, 31(8): 1162-1174.
- [11] 陈勇龙, 黄华荣, 唐平平, 等. 基因组编辑技术—CRISPR/Cas系统[J]. 杭州师范大学学报: 自然科学版, 2015, 14(1): 60-65.
- [12] ISHINO Y, SHINAGAWA H, MAKINO K, *et al.* Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli* and identification of the gene product [J]. J. Bacteriol, 1987, 169(12): 5429-5433.
- [13] BOLOTIN A, QUINQUIS B, SOROKIN A, *et al.* Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin[J]. Microbiology, 2005, 151(8): 2551-2561.
- [14] MAKAROVA KS, GRISHIN N V, SHABALINA S A, *et al.* A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action[J]. Biology Direct, 2006, 1: 7.
- [15] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, *et al.* CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. Science, 2007, 315(5819): 1709-1712.
- [16] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. Science, 2012, 337(6096): 816-821.
- [17] CONG L, RAN F A, COX D, *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339(6121): 819-823.
- [18] HU W, KAMINSKI R, YANG F, *et al.* RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevent new HIV-1 infection [J]. Proceedings of the National Academy of Science of the USA, 2014, 111(31): 11461-11466.
- [19] 瞿礼嘉, 郭冬姝, 张金喆, 等. CRISPR/Cas系统在植物基因组编辑中的应用[J]. 生命科学, 2015, 27(1): 64-70.
- [20] RICHTER H, RANDAU L, PLAGENS A. Exploiting CRISPR/Cas: Interference mechanisms and applications [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14(7): 14518-14531.
- [21] HORVATH P, BARRANGOU R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea[J]. Science, 2010, 327(5962): 167-170.
- [22] 景润春, 卢洪. CRISPR/Cas9基因组定向编辑技术的发展与在作物遗传育种中的应用[J]. 中国农业科学, 2016, 49(7): 1219-1229.
- [23] 赵欣, 胡军. CRISPR/Cas基因编辑系统及其在植物中的研究进展[J]. 中国农学通报, 2015, 31(12): 187-192.
- [24] MARRAFFINI L A, SONTHEIMERE J. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea[J]. Genetics, 2010, 11(3): 181-190.
- [25] BARRANGOU R. RNA EVENTS. Cas9 targeting and the CRISPR revolution[J]. Science, 2014, 344(6185): 707-708.
- [26] 肖景华, 吴昌银, 袁猛, 等. 中国水稻功能基因组研究进展与展望[J]. 科学通报, 2015, 60(18): 1711-1722.
- [27] XU R, LI H, QIN R, *et al.* Gene targeting using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR-Cas system in rice [J]. Rice, 2014, 7(1): 5.
- [28] 杜彦修, 季新, 陈会杰, 等. 基于CRISPR/Cas9系统的OsbHLH116基因编辑及其脱靶效应分析[J]. 中国水稻科学, 2016, 30(6): 577-586.
- [29] 王加峰, 郑才敏, 刘维, 等. 基于CRISPR/Cas9技术的水稻千粒重基因*tgw6*突变体的创建[J]. 作物学报, 2016, 42(8): 1160-1167.
- [30] 王芳权, 范方军, 李文奇, 等. 利用CRISPR/Cas9技术敲除水稻Pi21基因的效率分析[J]. 中国水稻科学, 2016, 30(5): 469-478.
- [31] 刘早利, 陈亚红, 王春台, 等. 稻瘟病新抗性基因Pi39候选基因CRISPR/Cas9敲除载体的构建[J]. 中国农学通报, 2016, 32(6): 91-95.
- [32] FENG Z Y, ZHANG B T, DING W N, *et al.* Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system [J]. Cell Res, 2013, 23(10): 1229-1232.
- [33] SHAN Q W, WANG Y P, LI J, *et al.* Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR/Cas system[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(8): 686-688.
- [34] 邵高能, 谢黎虹, 焦桂爱, 等. 利用CRISPR/CAS9技术编辑水稻香味基因*Badh2*[J]. 中国水稻科学, 2017, 31(2): 216-222.

现代乡村园林景观设计中存在的问题及发展趋势

高晓妍¹, 唐红²

(1. 甘肃农业大学林学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃林业职业技术学院, 甘肃 天水 741020)

摘要: 简述了现代农村园林景观设计的必要性。在分析现代农村园林景观建设存在问题的基础上, 提出了景观建设在保留原有特性上进行创新; 适当的增加绿化面积; 以简洁舒适为原则的景观建设; 结合农村农作物进行景观植物搭配等现代农村园林景观建设的发展趋势。

关键词: 乡村; 景观设计; 植物配置

中图分类号: S731 **文献标志码:** A

文章编号: 1001-1463(2017)10-0084-03

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2017.10.025

随着我国农村文化、美化、净化建设工程的稳步推进, 乡村环境建设有了改头换面的巨大改变, 正以前所未有的速度快步前行^[1-2]。新农村建设的整体规划如火如荼进行, 乡村环境整治作为新农村建设的重要内容, 乡村园林景观设计也被列入新农村建设总体工作中。但人们对于园林景观的认识仅局限于城市, 而村镇园林景观设计没有相应的规范和技术指导。村镇绿化大多数局限于道路绿化和住宅庭院绿化, 绿化层次单调, 绿地率低, 缺乏总体规划, 也不能起到很好的生态防护作用。因此如何继承和发扬传统的乡土文化, 创造出具有乡村特色而非城市发展模式的现代乡村景观园林, 是园林工作者应该思考的问题^[3-4]。近年来, 国家也逐步将乡村景观和乡村园林规划加入到了新农村建设总体规划中来, 保留传统、进行创新农村文化建设, 创造具有乡村特色的园林景观, 是我国乡村园林景观规划面临的新挑战。由于生活环境的不断改善, 人们对环境的需求越来越高, 经济条件决定了生活水平, 大部分经济条件较好的农民选择陆续走出农村, 在城区环境好的地段选择购置房屋, 造成农村劳

动力的逐年流失, 部分农村已变成了无人区, 土地也闲置荒废。所以, 改变原有的农村生活条件, 提高农民居住区的生活环境, 是现代农村管理者必须具备的意识, 也是农村园林景观发展的趋势。

1 现代农村园林景观设计的必要性

目前, 农村掀起了一股建设的热潮, 改变了长久以来传统的农民生活方式和环境, 另一层面也提高了农民生活水平, 促进了经济增长。现代农村建设的内容不仅仅是给农民修建新住宅、整修公路, 随着农民生活水平的逐年提高, 园林景观不再是城市的专属, 也逐渐变成农村的名片, 成为农村建设的重要内容。新农村园林景观设计能协调农村经济与环境发展的需要, 在提高农民生活质量的基础上, 进一步达到整洁优美的农业生产环境, 同时提高农业生产效率。农村园林景观还能起到缩小城乡差别的作用, 使现代农村同时兼具生态、社会、经济三大效益, 是园林化、景观化的具体表现过程^[5-7]。

2 现代农村园林景观设计在建设存在的问题

2.1 园林绿化景观与总体规划脱节

在我国大部分农村地区, 政府虽然编制了总

收稿日期: 2017-03-10

作者简介: 高晓妍(1987—), 女, 甘肃天水人, 助教, 在职硕士研究生, 研究方向为园林景观。联系电话: (0)15193857520。

通信作者: 唐红(1969—), 女, 甘肃兰州人, 副教授, 硕士生导师, 主要从事园林专业教学工作及园林规划设计工程、园林观赏植物遗传育种工作。E-mail: 416286561@qq.com。

- [35] 张笑寒. CRISPR/Cas9 定点编辑 OsGA20ox2 基因降低水稻株高研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2016.
- [36] 郝巍. 利用 CRISPR/Cas9 技术对水稻白叶枯病感病相关基因 HW3 进行定点修饰及功能分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.
- [37] 王兰. 水稻抽穗基因 Hdl 的 CRISPR/Cas9 载体构建及结果分析[D]. 雅安: 四川农业大学, 2015.
- [38] MEIRU LI, XIAOXIA LI, ZEJIAO ZHOU, *et al.* Re-

assessment of the four yield-related genes gn1a, DEP1, GS3, and IPA1 in rice using a CRISPR/Cas9 system[J]. *Front. Plant Sci.*, 2016, 7(377): 1-13.

- [39] FUJUN WANG, CHUNLIAN WANG, PIQING LIU, *et al.* Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor Gene OsERF922[J]. *PLOS ONE*, 2016, 11(4): 1-18.

(本文责编: 陈珩)