

杨海峰,甘晓雪,薄高峰,等. 利用 CRISPR/Cas9 系统编辑银腺杨 84K *LAZY* 基因[J]. 江苏农业科学,2022,50(18):258-262,273.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.18.039

利用 CRISPR/Cas9 系统编辑银腺杨 84K *LAZY* 基因

杨海峰,甘晓雪,薄高峰,王佳琪,郝 璞,张富满,王文功,韩傲霜

(内蒙古农业大学林学院,内蒙古呼和浩特 010018)

摘要:*LAZY1* 基因隶属于 *IGT* 基因家族,与植物分枝角度调控相关。为敲除 84K 杨中的 *LAZY1* 基因,获得转基因株系开展功能研究,以银腺杨 84K 为材料,克隆 84K 杨 *LAZY1* 基因的 3 个同源基因,设计基因编辑靶点,构建 CRISPR/Cas9 基因编辑载体,运用农杆菌介导法转化 84K 杨并成功获得 13 个基因编辑株系,经测序分析发现,有 3 个转基因株系的靶标位点发生碱基缺失或插入,表明这 3 个株系基因编辑成功,编辑效率为 23.07%。本研究结果丰富了 *IGT* 基因家族的功能研究,为 *IGT* 基因家族的分子育种应用和研究奠定了基础,为 CRISPR/Cas9 系统在银腺杨 84K 中的应用做出了初步探索。

关键词:*LAZY1* 基因;银腺杨 84K;CRISPR/Cas9 系统;载体构建;效率检测

中图分类号:S722.3⁺9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)18-0258-05

分枝角度是形成理想株型的重要组成部分,对植物的生物量、经济林木的产量、固碳量、景观效果均具有重要影响。分枝角度的大小受基因、内源激素以及外界环境等多种因素调控,其中,基因调控是重要的内部因素^[1]。研究发现,*IGT* 基因家族对分枝角度的调控尤为显著,隶属于 *IGT* 基因家族的 *LAZY1* 基因,最早由 Takahashi 等发现并确认其与分枝角度具有相关性^[2],经 Kishimoto 等研究确定水稻中的 *LAZY1* 基因位于 11 号染色体近着丝点位置^[3-4],在 *pd56* 和 *M265* 之间的 68 kb 区域中^[5]。随着对 *LAZY1* 基因的进一步深入研究,多位科学家先后从水稻 (*Oryza sativa*)、高粱 (*Sorghum bicolor*)、小麦 (*Triticum aestivum*)、玉米 (*Zea mays*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 等植物中发现了 *LAZY1* 基因的同源基因,从而证明了 *LAZY1* 基因并不是单子叶植物所特有的^[6-7]。2017 年,Xu 等以窄冠白杨为材料,分析了 *PzLAZY1* 基因在不同组织部位的表达情况,发现 *PzLAZY1* 基因在茎中最多,腋芽、叶中次之,根中表达量最少^[8],这与 Overbeek 对玉米 *LAZY1* 突变体的研究结果^[9] 相一致,由此证明

LAZY1 基因主要参与了植株地上部分的负向地性重力反应。

CRISPR/Cas9 技术通过小向导 RNA (sgRNA) 介导和 Cas9 蛋白切割实现对靶基因的编辑(碱基插入、删除、替换等),从而实现基因敲除^[10-11]。因其具有简便、高效、低价等优点,被广泛应用于水稻、小麦、拟南芥、烟草 (*Nicotiana tabacum*)、毛白杨 (*Populus tomentosa*)^[12] 等植物的研究中;其中,在水稻、小麦、拟南芥中都获得了稳定的基因编辑突变体^[13],为植物基因功能研究和遗传改良做出杰出贡献。但目前为止,大部分研究仅是对特定位置的突变,在目标基因上精准编辑的效率很低^[14]。近年来,有多位科学家在玉米、大豆 [*Glycine max* (Linn.) Merr.]、水稻、拟南芥中尝试了同源基因的精准编辑。例如,Svitashev 等成功通过基因枪转化法对米未成熟胚中的 *LIG1*、*MS26* 等基因进行精准编辑^[15]。Zhao 等利用双元 RNA 向导的 CRISPR/Cas9 系统对 *TFL1* 基因的一个特定区段进行了定点替换^[16]。因此,开发出高效、精准的 CRISPR/Cas9 基因编辑技术将是现代基因组学靶向修饰工作的巨大进步,且具有广阔的应用前景。

本研究以银腺杨 84K 为研究材料,从中克隆获得 *PagLAZY1a*、*PagLAZY1b*、*PagLAZY1c* 基因的基因组部分序列,设计靶点,构建基因编辑载体,转化 84K 杨,获得转基因株系,以期为分析 *LAZY1* 基因功能提供研究材料,奠定研究基础,为深入研究 CRISPR/Cas9 系统在木本植物中的应用和技术改良

收稿日期:2021-11-23

基金项目:国家自然科学基金(编号:31660216);内蒙古自治区应用技术与开发资金项目(编号:2021GG0075、2019GG004);国家科技重大专项课题(编号:2018ZX08020002-005-005)。

作者简介:杨海峰(1975—),男,内蒙古兴安盟人,博士,副教授,主要从事林木基因组学及林木基因工程的科研与教学工作。E-mail:haifeng@imau.edu.cn。

提供线索,为杨树分子育种及品种改良奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

银腺杨 84K (*Populus alba* × *P. glandulosa* 84K) 无菌苗,由内蒙古农业大学林木遗传育种教研室保存;pEn - Chimera 入门载体和 pDE - CAS9 - NPT II 表达载体质粒由美国农业部林业局西南太平洋工作站林木遗传所赠送;大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞和农杆菌 GV3101 感受态细胞,由笔者所在实验室制备。

1.2 LAZYI 基因克隆及靶点设计

使用 BioEdit 软件,以银腺杨 84K 的全基因组 DNA 数据库创建本地数据库,以沙柳 *SpsLAZYIa*、*SpsLAZYIb*、*SpsLAZYIc* 基因的蛋白质编码区(CDS)序列^[17]分别作为查询序列,进行本地 BLAST 搜寻,获得 3 个同源基因序列,分别命名为 *PagLAZYIa*、*PagLAZYIb*、*PagLAZYIc*。根据这 3 个同源基因的序列设计上下游引物,预期产物长度分别为 1 836、2 074、1 374 bp。试验用到的引物序列详见表 1。

表 1 本研究所用引物

引物名称	引物序列(5'→3')	用途
<i>LAZYIa</i> - F	CATCATATATCCAGGTTGTATTGT	克隆基因
<i>LAZYIa</i> - R	CGGGTCTCTAATAAAGCAACA	克隆基因
<i>LAZYIb</i> - F	ATGAACAGTTCGACTTGTAATTATG	克隆基因
<i>LAZYIb</i> - R	CCATTGTGTGCTCTTCTTATT	克隆基因
<i>LAZYIc</i> - F	AAGAAAAGGATAAAAAACAGTGGTC	克隆基因
<i>LAZYIc</i> - R	TCAGTCTTTCCCTAATCATTTCTT	克隆基因
<i>LAZYIa</i> - FW	ATTGAAATGGCAGTGAAACACTGA	靶点
<i>LAZYIa</i> - REV	AAACTCAGTGTTTCACTGCCATT	靶点
<i>LAZYIb</i> - FW	ATTGAAATGGTAGTGAACCACTGA	靶点
<i>LAZYIb</i> - REV	AAACTCAGTGGTTCACCTACCATTT	靶点
<i>LAZYIc</i> - FW	ATTGAAAGGCTGGAGCCTCACTGC	靶点
<i>LAZYIc</i> - REV	AAACGCACTGAGGCTCCACCCTTT	靶点
SS61	GAGCTCCAGGCCTCCAGCTTTTCG	阳性植株鉴定

注:“—”为靶点序列。

采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取野生 84K 杨基因组 DNA 为模板,利用 *LAZYIa* - F 和 *LAZYIa* - R、*LAZYIb* - F 和 *LAZYIb* - R、*LAZYIc* - F 和 *LAZYIc* - R 分别为引物,进行 PCR 扩增,经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,切胶回收后与 pMD 19 - T 载体连接并测序获得 84K 杨中 *pagLAZYIa*、*PagLAZYIb*、*PagLAZYIc* 基因在 2 条同源染色体上的序列。

利用银腺杨 84K 基因组数据库及克隆获得的

完整序列信息,将 *PagLAZYIa*、*PagLAZYIb*、*PagLAZYIc* 基因的第 1 个外显子序列分别在基因编辑靶点在线设计网站(<https://zlab.bio/guide-design-resources>)上设计、筛选出得分最高的靶点序列,将靶点正向序列 5'端添加 ATTG 碱基,靶点的反向互补序列 5'端添加 AAAC 碱基,送至中美泰和生物技术(北京)有限公司合成引物。

1.3 LAZY 基因敲除载体构建

对 pEn - Chimera 入门载体质粒进行酶切,回收酶切产物,获得线性化 pEn - Chimera 入门载体。采用重组 PCR 的方法将添加接头的 2 条靶点序列进行双链互补,并与线性化 pEn - Chimera 载体连接,转化 DH5 α 大肠杆菌,测序鉴定。将构建成功的入门载体 pEn - Chimera 和表达载体 pDE - CAS9 - NPT II 进行同源置换,转化 DH5 α 大肠杆菌,对菌落进行 PCR 鉴定,并测序检测。将成功构建的表达载体转化农杆菌 GV3101 菌株。

1.4 银腺杨 84K 叶盘法转化及转基因植株的检测

活化携带有表达载体的农杆菌菌株,振荡培养至吸光度 $D_{600\text{ nm}}$ 为 0.6 ~ 0.8 时,重悬菌液,用于侵染。取培养 3 ~ 4 周无菌苗中上部叶片,垂直叶脉划伤,置于重悬液中,50 r/min 振荡侵染 15 min。将叶片置于共培养基上,暗培养 3 d。转移至分化培养基上光照培养,2 ~ 3 周继代 1 次。待叶片长出愈伤组织并分化出芽,芽高 2 ~ 3 cm 时,切下置于生根培养基中培养 2 ~ 3 周即可生根,同时利用生根培养基进行单株增殖扩繁。对获得的抗性株系分别提取 DNA,以 SS61 引物和靶点反向序列为引物进行 PCR 扩增,用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,筛选阳性植株。

1.5 基因编辑效率的检测

以转基因株系 DNA 为模板,加入引物 *LAZYIa* - F 和 *LAZYIa* - R 进行 PCR 序列扩增,获得目标产物经切胶回收后与 pMD 19 - T 载体连接,转化 DH5 α 大肠杆菌,对菌落进行 PCR 鉴定,并测序检测。利用 DNAMAN (Version 7.0) 对测序结果与靶点序列进行比对,分析编辑效率。

2 结果与分析

2.1 LAZY - I 基因组序列的克隆与靶点设计

利用银腺杨 84K 的基因组数据库结合沙柳 *SpsLAZYIa*、*SpsLAZYIb*、*SpsLAZYIc* 基因的 CDS 序列,经比对获得 3 个 *LAZYI* 基因的同源序列,分别命名为 *PagLAZYIa*、*PagLAZYIb*、*PagLAZYIc*。以野

生型 84K 杨的 DNA 为模板, *LAZY1a* - F 和 *LAZY1a* - R、*LAZY1b* - F 和 *LAZY1b* - R、*LAZY1c* - F 和 *LAZY1c* - R 分别为上下游引物, 克隆获得 *PagLAZY1a*、*PagLAZY1b*、*PagLAZY1c* 基因组部分同源序列, 该序列为包含上述基因前 2 个外显子完整序列的基因组序列。

将上述 3 个基因的第 1 个外显子序列分别在基因编辑靶点在线设计网站 (<https://zlab.bio/guide-design-resources>) 上提交设计; 获得 3 个高分靶点序列 (图 1)。该靶点序列在目标基因上无单核苷酸多态性 (SNP) 位点, GC 含量为 40%, 前间隔序列邻近基序 (PAM) 标识位点为 NGG (N 可以是 A、T、G、C 中的任意碱基), 与杨树中同源关系较近的 *LAZY1* 基因同源序列比对结果显示, 错配碱基数为 3~4 个, 说明该靶位点特异性较高, 符合敲除靶点的设计要求。

>PagLAZY1a

ATGAAGGTAAGCCTACTGTACACGTGAAAAAGAGAAAAGTATTGATCTTTCTCAATGCTTCTTGAGCTAATTT
ATGAATCCCACTTTATTGCAGTTACTAGGTTGGATGCACCGTAAGCTTCGGCAAATGGCAGTGAAACACTG
AAGGATTTTGCTATTGGTAGGTATCTTCAACTTTATATTCTGCTAAACACTTCCTATTCAAATATAGGCAT

>PagLAZY1b

ATGAAGGTAAATTCTACTATACTCGTGAAATTGAAAATATTAATCTTTCTCAATGCTTCTTGATCTAATTGCTGA
ATCCCACTTTATTGCAGTTACTCGGTTGGATGCACCGTAAGCTCCGGCAAATGGTAGTGAACCACTGAAGG
ATTTTGCTATTGGTGAGTATCTTCGATCCTTTTAGTTTTCCTGCCAAACATTTCTATTTCCAATAGGCTTGAA

>PagLAZY1c

ATGGATGAGACCACCAATATTCTTAGGTCTCAGGAACGGCTGATCCCTGTCTACAATAAAGCTAGACACAACC
GTCAATCATCTAGGGTGTTTCATGAAAAAGAAAAGGGTGGAGCCTCAGTGCAGGTATTTTAGGACATCCCA
CCTCTTAGATTTTCCCACTGGCTAAGGCCTTTATGGCCACTCCGCAAATGGATCCTCTCTCCCAAGGGAT
AAGGTTCAAAGTGGGCATATTGGCATAAATATAGCAGCCACTTCATGATACAAATAACTAGTATTTGCTAGGTT

灰色阴影表示 *PagLAZY* 基因外显子; __表示 sgRNA 靶位点; _表示 PAM 区

图1 3 个靶位点在 *PagLAZY1a*、*PagLAZY1b*、*PagLAZY1c* 基因第 1 个外显子上的位置

2.2 *LAZY1* 基因编辑载体构建

将互补双链的靶点序列连接线性化的 pEn - Chimera 入门载体, 经 PCR 鉴定, 目标条带与预计的 369 bp 目标片段长度一致 (图 2 - a)。测序结果表明, *LAZY1a*、*LAZY1b*、*LAZY1c* 靶点序列成功进入 pEn - Chimera 入门载体, 可进行下一步表达载体构建。

将携带有 *LAZY* 基因靶点序列的 pEn - Chimera 入门载体与 pDE - CAS9 - NPT II 表达载体进行同源置换, PCR 鉴定结果表明, 目标条带与预计的 933 bp 目标片段长度一致 (图 2 - b)。测序分析结果表明, 靶点序列及其驱动元件已成功置换进 pDE - CAS9 - NPT II 表达载体中, 可用于银腺杨 84K 的基因转化。

2.3 转基因株系获得及 PCR 鉴定

将构建的 3 个基因编辑表达载体 (*pDE - CAS9 - NPT II* :: *LAZY1a*、*pDE - CAS9 - NPT II* :: *LAZY1b*、*pDE - CAS9 - NPT II* :: *LAZY1c*) 通过农杆菌介导法转化 84K 杨, 分别获得 21、17、12 株抗性株系 (图 3)。为检测单基因编辑的转化效率, 本研究对转化 *pDE - CAS9 - NPT II* :: *LAZY1a* 载体的 21 株抗性植

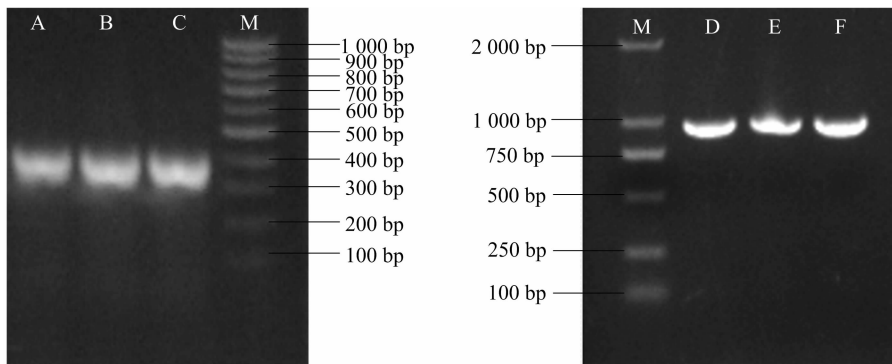
株进行 PCR 鉴定, 检测结果表明, 共 13 个株系为阳性植株, PCR 阳性鉴定阳性率为 61.9% (图 4)。

2.4 转基因植株靶点序列编辑效率分析

对 *LAZY1a* 的 13 个转基因株系进行靶点序列测序分析, 结果表明, 在 1 号、5 号、9 号株系中均发生不同程度的碱基缺失, 其中 1 号株系靶点的第 16、17 个碱基发生缺失, 5 号株系靶点的第 15 个碱基发生缺失, 9 号株系靶点的第 18 个碱基发生插入, 靶点编辑效率为 23.07%, 均为杂合突变体 (表 2)。

3 讨论

植物分枝角度和分枝方向在植物形态建成过程中具有重要作用, 与植物生物量和作物产量密切相关。其中, 有关分枝角度调控的分子层面研究目前仍以高粱、水稻、小麦等草本模式植物为主^[18], 在木本植物中的研究相对较少, 尚缺乏系统性研究。本研究利用 CRISPR/Cas9 系统对银腺杨 84K 分枝角度相关基因 *LAZY1* 基因进行敲除, 获得抗性植株, 检测靶标位点, 分析编辑效率, 旨在为后续 *IGT* 基因家族在杨树中的基因功能研究提供基础参考数据。



a. 入门载体的 PCR 鉴定结果

b. 表达载体的 PCR 鉴定结果

M—DL2000 DNA Marker; A—*pEn-Chimera::LAZY1a* 入门载体; B—*pEn-Chimera::LAZY1b* 入门载体;
C—*pEn-Chimera::LAZY1c* 入门载体; D—*pDE-CAS9-NPT II::LAZY1a* 表达载体;
E—*pDE-CAS9-NPT II::LAZY1b* 表达载体; F—*pDE-CAS9-NPT II::LAZY1c* 表达载体

图2 入门载体、表达载体的 PCR 鉴定结果

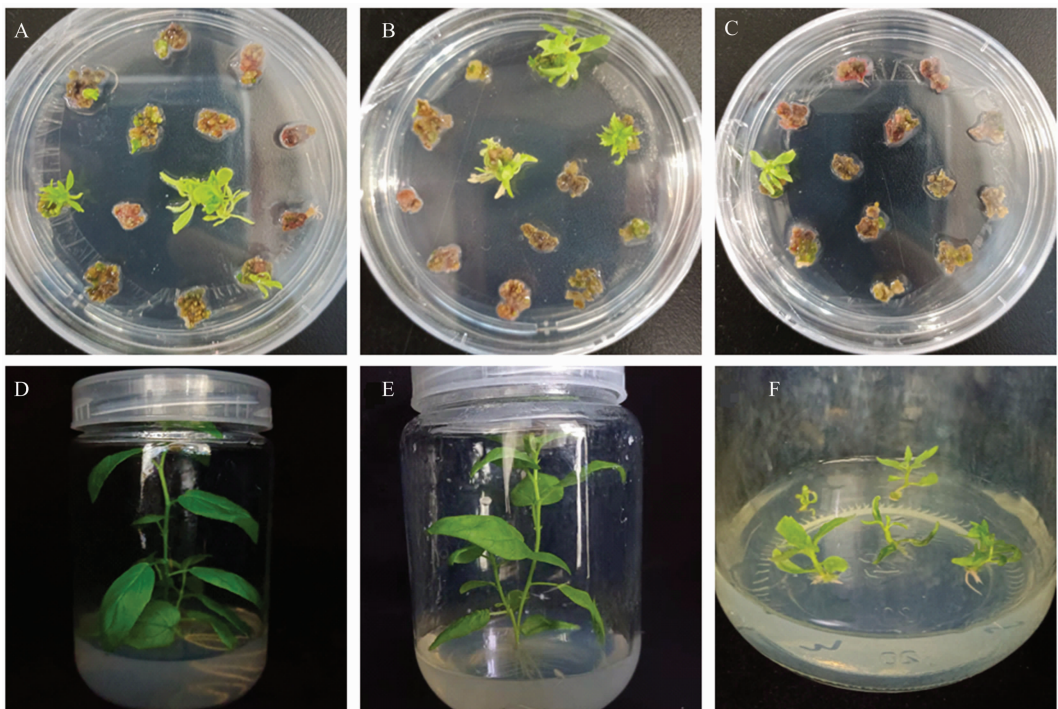
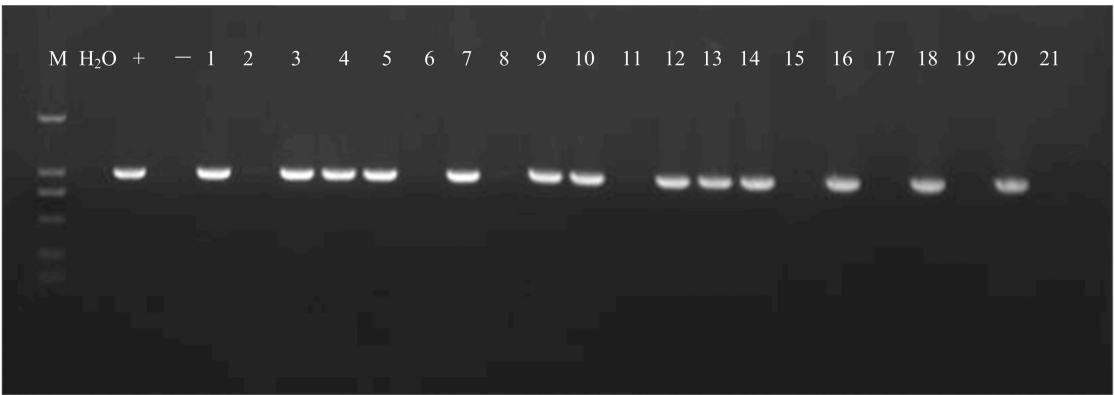
A—*LAZY1a* 抗性芽; B—*LAZY1b* 抗性芽; C—*LAZY1c* 抗性芽; D—*LAZY1a* 转基因植株;E—*LAZY1b* 转基因植株; F—*LAZY1c* 转基因植株

图3 抗性芽的生成及转基因植株的获得

CRISPR/Cas 系统是近年来发展起来的能够实现对基因组精准定点编辑的技术,相对于其他基因编辑技术效率更显著,操作更便捷,但在某些植物中编辑效率较低。本研究按照 sgRNA 的设计原则,设计 *LAZY1* 基因靶标序列,长度均为 20 nt,转化银腺杨 84K 后对 *LAZY1a* 阳性植株进行靶标序列检测,发现靶点编辑效率仅为 23.07%,效率较低,可能存在 2 个方面的原因。首先,靶标序列的长度对编辑效率有影响。据 Fu 等的研究显示,采用小于 20 nt 的短 sgRNA 进行基因打靶试验,可以有效降

低脱靶风险,提高编辑效率^[19]。Chen 等比较不同长度(18、19、20 个碱基) sgRNA 的切割效率,发现长度为 19 个碱基的 sgRNA 具有最高的切割效率^[20]。其次,选用合适的启动子能够有效提升 CRISPR/Cas9 系统的基因编辑效率^[21]。本研究利用来自拟南芥的 AtU6-26 启动子构建表达载体,虽然成功获得基因编辑成功株系,表明该启动子可应用于银腺杨 84K 的 CRISPR/Cas9 系统研究,但编辑效率较低,可能有启动子的影响。因此,在后续基因编辑工作中,将采用 19 nt 靶点序列,同时采用来自 84K 杨的



M—DL2000 DNA Marker; H₂O 为空白对照; + 为阳性对照; - 为阴性对照; 1~21 为对应的 21 株转化植株

图4 *LAZY1a* 转基因阳性苗鉴定结果

表 2 *PagLAZY1a* 基因编辑株系的靶标位点序列分析

株系	等位基因	靶点序列(5'→3')	突变类型
WT	allele1	TCGGCA <u>AAATG</u> GCTAGTGAACACTGAA <u>GGATT</u> TTG	WT
	allele2	TCGGCA AAATG <u>G</u> TAGTGAACACTGAA <u>GGATT</u> TTG	WT
0-1	allele1	TCGGCA <u>AAATG</u> GCTAGTGAAC—TGAA <u>GGATT</u> TTG	-2
	allele2	TCGGCA AAATG <u>G</u> TAGTGAACACTGAA <u>GGATT</u> TTG	WT
0-5	allele1	TCGGCA <u>AAATG</u> GCTAGTGA—ACTGAA <u>GGATT</u> TTG	-1
	allele2	TCGGCA <u>AAATG</u> GCTAGTGAACACTGAA <u>GGATT</u> TTG	WT
0-9	allele1	TCGGCA AAATGCTAGTGAACAC [T] TGAA <u>GGATT</u> TTG	+1
	allele2	TCGGCA <u>AAATG</u> GCTAGTGAACACTGAA <u>GGATT</u> TTG	WT

注:WT 为野生型植株;0-1、0-5、0-9 为转基因型植株;—为靶点序列; 为 PAM 序列;—为碱基缺失; [T] 为碱基插入; allele1、allele2 分别指 *PagLAZY1a* 基因的 2 个等位基因;-2、-1、+1 分别表示减少了 2 个碱基、减少了 1 个碱基、增加了 1 个碱基。

启动子来构建基因编辑载体,预计能够有效提高基因编辑效率。

4 结论

本研究利用银腺杨 84K 为材料,成功构建了 3 个 *LAZY* 同源基因的基因编辑表达载体,获得 13 株转化 *pDE-CAS9-NPT II::LAZY-1a* 载体的阳性株系,其中 3 个株系基因编辑成功,编辑效率为 23.07%。该研究结果可以为 *LAZY* 基因功能的研究和杨树分子育种提供理论依据,为 CRISPR/Cas9 系统在银腺杨 84K 中的应用做了初步探索,同时,为改良 CRISPR/Cas9 系统提供了参考。

参考文献:

[1]刘蒙蒙,谭 彬,郑先波,等. 几个影响植物分枝角度的关键基因及其调控机制[J]. 分子植物育种,2017,15(7):2815-2822.
[2]Takahashi M, Kinoshita T, Takeda K. Character expressions and causal genes of some mutants in rice plant [J]. Plant Breeding Institute, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan,1968,55(4):496-512.

[3]Kishimoto N, Foolad M R, Shimosaka E, et al. Alignment of molecular and classical linkage maps of rice, *Oryza sativa* [J]. Plant Cell Reports,1993,12(7/8):457-461.
[4]Abenes M L P, Tabien R E, McCouch S R, et al. Orientation and integration of the classical and molecular genetic maps of chromosome 11 in rice[J]. Euphytica,1994,76(1/2):81-87.
[5]Li P J, Wang Y H, Qian Q, et al. *LAZYI* controls rice shoot gravitropism through regulating polar auxin transport [J]. Cell Research,2007,17(5):402-410.
[6]李学勇,钱 前,李家洋. 水稻分蘖的分子机理研究[J]. 中国科学院院刊,2003,18(4):274-276.
[7]Yoshihara T, Spalding E P, Iino M. *AtLAZYI* is a signaling component required for gravitropism of the *Arabidopsis thaliana* inflorescence [J]. The Plant Journal,2013,74(2):267-279.
[8]Xu D, Qi X, Li J H, et al. *PzTAC* and *PzLAZY* from a narrow-crown poplar contribute to regulation of branch angles[J]. Plant Physiology and Biochemistry,2017,118:571-578.
[9]Overbeek J V. “*LAZY*,” an a-geotropic form of maize. “Gravitational indifference” rather than structural weakness accounts for prostrate growth-habit of this form[J]. Journal of Heredity, 1936,27(3):93-96.
[10]Wang P C, Zhang J, Sun L, et al. High efficient multisites genome

- [2] 张雪峰. 中国谷子产业发展问题研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2013.
- [3] 刁现民. 禾谷类杂粮作物耐逆和栽培技术研究新进展[J]. 中国农业科学,2019,52(22):3943–3949.
- [4] Li P H, Brutnell T P. *Setaria viridis* and *Setaria italica*, model genetic systems for the panicoid grasses[J]. Journal of Experimental Botany, 2011,62(9):3031–3037.
- [5] Diao X M, Schnable J, Bennetzen J L, et al. Initiation of *Setaria* as a model plant[J]. Frontiers of Agricultural Science and Engineering, 2014,1(1):16–20.
- [6] 贾冠清, 刁现民. 中国谷子种业创新现状与未来展望[J]. 中国农业科学,2022,55(4):653–665.
- [7] Bennetzen J L, Schmutz J, Wang H, et al. Reference genome sequence of the model plant *Setaria* [J]. Nature Biotechnology, 2012,30(6):555–561.
- [8] Zhang G Y, Liu X, Quan Z W, et al. Genome sequence of foxtail millet (*Setaria italica*) provides insights into grass evolution and biofuel potential [J]. Nature Biotechnology, 2012,30(6):549–554.
- [9] Jia G Q, Huang X H, Zhi H, et al. A haplotype map of genomic variations and genome-wide association studies of agronomic traits in foxtail millet (*Setaria italica*) [J]. Nature Genetics, 2013,45(8):957–961.
- [10] Yang Z R, Zhang H S, Li X K, et al. A mini foxtail millet with an *Arabidopsis*-like life cycle as a C_4 model system [J]. Nature Plants, 2020,6(9):1167–1178.
- [11] 高俊华, 王润奇, 毛丽萍, 等. 安矮 3 号谷子矮秆基因的染色体定位[J]. 作物学报,2003,29(1):152–154.
- [12] 钱继岳. 谷子矮秆基因的等位性和 GA_3 敏感性测定[D]. 石家庄:河北师范大学,2009.
- [13] 赵美丞. 谷子半显性矮秆基因 *SiDw1* 的图位克隆及形成机制分析[D]. 北京:中国农业科学院,2013.
- [14] Xue C X, Zhi H, Fang X J, et al. Characterization and fine mapping of *SiDWARF2* (*D2*) in foxtail millet [J]. Crop Science, 2016,56(1):95–103.
- [15] Fan X K, Tang S, Zhi H, et al. Identification and fine mapping of *SiDWARF3* (*D3*), a pleiotropic locus controlling environment-independent dwarfism in foxtail millet [J]. Crop Science, 2017,57(5):2431–2442.
- [16] Takagi H, Abe A, Yoshida K, et al. QTL-seq: rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations [J]. The Plant Journal, 2013,74(1):174–183.
- [17] Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991,88(21):9828–9832.
- [18] Takeda K. Internode elongation and dwarfism in some gramineous plants [J]. Gamma Field Symposium, 1977,16:1–18.
- [19] 刘浩, 王加峰, 孙大元, 等. 水稻矮秆基因研究进展[J]. 广东农业科学,2013,40(22):139–144.
- [20] 杨秀. 玉米矮生突变体 *das* 的鉴定和基因定位[D]. 北京:中国农业科学院,2019.
- [21] 宋秋平, 俞佳虹, 刘佳, 等. 植物矮化基因相关研究进展[J]. 广东农业科学,2021,48(8):19–28.
- [22] 姚丹. 遗传作图群体中 SNP 识别软件开发及杨树高密度遗传图谱构建[D]. 南京:南京林业大学,2019.
- [23] Neff M M, Turk E, Kalishman M. Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis [J]. Trends in Genetics, 2002,18(12):613–615.
- (上接第 262 页)
- editing in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*) using CRISPR/Cas9 system [J]. Plant Biotechnology Journal, 2018,16(1):137–150.
- [11] Shen L, Hua Y F, Fu Y P, et al. Erratum to: rapid generation of genetic diversity by multiplex CRISPR/Cas9 genome editing in rice [J]. Science China Life Sciences, 2019,62(9):1270.
- [12] 曾秀英, 侯学文. CRISPR/Cas9 基因组编辑技术在植物基因功能研究及植物改良中的应用[J]. 植物生理学报,2015,51(9):1351–1358.
- [13] 胡春华, 邓贵明, 孙晓玄, 等. 香蕉 CRISPR/Cas9 基因编辑技术体系的建立[J]. 中国农业科学,2017,50(7):1294–1301.
- [14] 李希陶, 刘耀光. 基因组编辑技术在水稻功能基因组和遗传改良中的应用[J]. 生命科学,2016,28(10):1243–1249.
- [15] Svitashv S, Young J K, Schwartz C, et al. Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA [J]. Plant Physiology, 2015,169(2):931–945.
- [16] Zhao Y P, Zhang C S, Liu W W, et al. An alternative strategy for targeted gene replacement in plants using a dual-sgRNA/Cas9 design [J]. Scientific Reports, 2016,6:23890.
- [17] 张磊. 沙柳 *SpsLAZY1a, b* 基因克隆及功能初步分析[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2018.
- [18] 时欢, 林玉玲, 赖钟雄, 等. CRISPR/Cas9 介导的植物基因编辑技术研究进展[J]. 应用与环境生物学报,2018,24(3):640–650.
- [19] Fu Y F, Sander J D, Reyon D, et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs [J]. Nature Biotechnology, 2014,32(3):279–284.
- [20] Chen C H, Xiao T, Xu H, et al. Improved design and analysis of CRISPR Knockout Screens [J]. Bioinformatics, 2018,34(23):63–73.
- [21] 张成, 何明亮, 汪威, 等. 一种 CRISPR-Cas9 介导的拟南芥高效基因编辑系统的构建与应用[J]. 中国农业科学,2020,53(12):2340–2348.