

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2024.11.018

利用 CRISPR/Cas9 技术靶向敲除番茄 *SlMYBL* 基因

李佳男, 徐娟, 宋茜茜, 汪宏涛, 唐晓凤

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘要: MYB 类蛋白家族是所有真核生物中存在的庞大且功能丰富的一类转录因子, MYB 蛋白主要参与形态建成、次生代谢等进而参与植物的非生物胁迫。文章通过比对美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库, 在番茄中发现了一个具有 EAR 转录抑制子的 R1-MYB 类转录因子, 即 *SlMYBL*, 通过同源克隆获得 *SlMYBL* 基因的全长 cDNA。*SlMYBL* 基因在番茄的所有组织中均有表达, 在果实中的表达量相对较高, 其次是根和叶片。有研究表明 R1-MYB 类转录因子可参与植株的逆境应答, 为了解 *SlMYBL* 是否响应逆境应答, 文章定量分析了番茄在不同胁迫处理下 *SlMYBL* 基因的转录水平, 发现其转录水平在盐胁迫下明显降低, 而对甘露醇胁迫并没有明显的差异, 表明 *SlMYBL* 基因可能参与了番茄植株响应盐胁迫的过程。为研究 *SlMYBL* 基因作用的分子机理, 进一步构建了该基因的 CRISPR 表达载体, 并获得 *SlMYBL* 基因的 CRISPR 敲除转基因番茄。该研究为发现 *SlMYBL* 基因在植物生长发育中的作用奠定了一定的理论基础。

关键词: 番茄; *SlMYBL* 基因; 逆境胁迫; CRISPR/Cas9 技术; 载体构建

中图分类号: Q785

文献标志码: A

文章编号: 1003-5060(2024)11-1553-06

Targeted knockout of tomato *SlMYBL* gene by CRISPR/Cas9 technology

LI Jianan, XU Juan, SONG Qianqian, WANG Hongtao, TANG Xiaofeng

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: The MYB family of proteins is a large and functionally abundant class of transcription factors present in all eukaryotes, and MYB proteins are mainly involved in morphogenesis, metabolism, and abiotic stress in plants. In this study, an R1-MYB transcription factor with EAR transcription inhibitor, *SlMYBL*, was found in tomato through National Center for Biotechnology Information (NCBI) database. The full-length cDNA of the *SlMYBL* gene was obtained by homologous cloning. *SlMYBL* gene is expressed in all tissues of tomato, and its expression in fruit is relatively high, followed by root and leaf. Studies have shown that R1-MYB transcription factors can participate in adversity response of plants. In order to understand whether *SlMYBL* responds to adversity response, the transcription level of *SlMYBL* gene in tomato materials under different stress treatment was quantitatively analyzed. It was found that the transcription level of *SlMYBL* gene decreased significantly under salt stress, but there was no significant difference in mannitol stress, suggesting that *SlMYBL* gene may be involved in the response of tomato plants to salt stress. In order to study the molecular mechanism of *SlMYBL* gene, the CRISPR expression vector of *SlMYBL* gene was constructed, and the CRISPR knockout transgenic tomato of *SlMYBL* gene was obtained. This study lays a theoretical foundation for discovering the role of *SlMYBL* gene in plant growth and development.

Key words: tomato (*Solanum lycopersicum*); *SlMYBL* gene; adversity stress; CRISPR/Cas9 technology; vec-

收稿日期: 2022-05-23; 修回日期: 2022-06-23

基金项目: 安徽省自然科学基金资助项目(2208085MC66)

作者简介: 李佳男(1997—), 女, 河南洛阳人, 合肥工业大学硕士生;

唐晓凤(1984—), 女, 四川广安人, 博士, 合肥工业大学副教授, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: tangxiaofeng1023@hfut.edu.cn.

tor construction

0 引言

番茄(*Solanum lycopersicum*)是重要的园艺作物,具有较高的营养价值,栽培广泛,且番茄基因组小,基因转化体系比较成熟。因此,番茄作为一种重要的模式作物,在科学研究中的作用日益突出^[1]。

MYB 家族是植物体内数量最多、分布最广的转录因子,在植物抵御逆境和生长发育中起着重要的作用。MYB 家族因其结构域上有一段保守的 DNA 结合域,即 MYB 结构域而得名,该结构域上的 R 结构(R1、R2 和 R3)是不完全重复的,且由 1~3 个 R 结构串联组成。根据 MYB 蛋白上含有的 R 结构的位置和个数的不同,可分为 1R (R1/2、R3-MYB)、2R (R2R3-MYB)、3R-MYB (R1R2R3-MYB)、4R-MYB(含有 4 个 R1/R2 类重复)4 类,其中 R2R3-MYB 转录因子在植物中是最多的一类,主要参与植物形态建成、细胞发育,调节细胞代谢、苯丙烷代谢,响应生物及非生物胁迫、激素反应,分生组织的形成,细胞周期的调控,果实和种子的生长发育等作用^[2],如过表达 *MhMYB114-like* 明显增加了转基因苹果(*Malus domestica*)愈伤组织对缺铁胁迫耐受性^[3]。

目前,在番茄中 MYB 转录因子的功能研究主要集中在番茄果实成熟以及非生物胁迫方面。已有研究表明:高盐、低温、干旱和赤霉素等多种胁迫和激素可以诱导 *SlMYB113* 的表达,*SlMYB113* 的过表达能够增加花青素的积累,进而提高转基因番茄的低温耐受性^[4];在对番茄 R2R3-MYB 家族的 51 个基因做表达分析时,其中响应 NaCl 处理的基因有 10 个,响应 ABA 处理的基因有 11 个,响应低温胁迫的基因有 14 个,说明番茄 R2R3 类 MYB 转录因子积极参与植物的非生物胁迫响应^[5]。

基因编辑是品种改良的重要途径之一,能对基因组进行定向精确的修饰,目前已广泛应用于动植物基因功能研究和作物遗传改良当中。CRISPR/Cas9 技术是一种新兴的基因编辑手段,较传统基因编辑工具而言,该技术具有操作简便、突变率高、能稳定遗传等优点^[6],是提高作物产量、抗逆性、抗虫性、除草剂抗性和养分利用率的有效方法^[7-9]。CRISPR/Cas9 系统主要由

sgRNA 和 Cas9 蛋白组成,当前在拟南芥、高粱、烟草、水稻、小麦、番茄以及棉花等多种作物中均实现了利用 CRISPR/Cas 技术进行内源基因的定点敲除。文献^[10]利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建毛果杨 *bHLH106* 基因的突变体,初步证明了 *PtrbHLH106* 基因参与调控毛果杨次生木质部的发育;文献^[11]利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除 *O₅HXK1*,可以有效地促进水稻光合效率和高产品种的培育;CRISPR/Cas9 技术也被广泛应用于番茄作物中,主要研究方向集中在农艺性状改良及抗逆、抗病基因功能研究等方面^[12]。

本研究通过诸多分子生物学技术对番茄 *SlMYBL* 基因进行研究,并构建 *SlMYBL* 的 CRISPR/Cas9 载体,从而深度分析番茄的基本性质与发育过程。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 载体、菌株和植物材料

克隆载体 pTEX-Flag、大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH5 α 、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株 GV2260、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株 EHA105、CRISPR/Cas9 植物基因敲除载体 PUC5700 均由本实验室保存;野生型番茄(*Solanum lycopersicum*)由本实验室繁育保存。

1.1.2 试剂

RNA 提取试剂 Trizol;高保真 DNA 聚合酶 Pfu 酶;反转录试剂盒 cDNA Synthesis Super Mix(近岸蛋白质科技有限公司);琼脂糖胶回收试剂盒(生工生物工程(上海)股份有限公司);Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 连接酶、DL2000 DNA Marker (TaKaRa 公司);Primer Premier 5.0 软件设计的合成引物(生工生物工程(上海)股份有限公司);其余试剂为分析纯。

1.2 生物信息学分析

在美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库中搜索并命名番茄 *SlMYBL*,对该基因功能结构域及进化关系进行分析。搜索番茄 *SlMYBL* (*Solanum lycopersicum*, GenBank 登录号 XM_004236113.4)基因编码的蛋白质序列在其

他物种中的同源序列,主要包括黑果枸杞 *LrMYB1R1* (*Lycium ruthenicum*, GenBank 登录号 KY568981.1)、马铃薯 *SpMYB1R1-like* (*Solanum pennellii*, GenBank 登录号 XM_015214509.2)、辣椒 *CaMYB1R1* (*Capsicum annuum*, GenBank 登录号 NM_001324835.1)、甘薯 *InMYB1R1-like* (*Ipomoea nil*, GenBank 登录号 XM_019298905.1)、烟草 *NtMYB1R1-like* (*Nicotiana tabacum*, GenBank 登录号 XM_016586289.1)、山核桃 *CiMYB1R1-like* (*Carya illinoensis*, GenBank 登录号 XR_006236300.1)、石榴 *PgMYB1R1-like* (*Punica granatum*, GenBank 登录号 XM_031551726.1)、樱桃 *PaMYB1R1-like* (*Prunus avium*, GenBank 登录号 XM_021952700.1) 以及芝麻 *SiMYB1R1-like* (*Sesamum indicum*, GenBank 登录号 XM_011088882.2)。经 ClusterX 多重序列比对后使用 MEGA7.0 软件,利用邻接(neighbor-joining, NJ)法来绘制系统进化树。

1.3 *SlMYBL* 基因编码区的扩增

通过 Trizol 法提取番茄总 RNA,检查番茄 RNA 的浓度和完整性,参考试剂盒说明合成第 1 链 cDNA,并在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存备用。通过番茄 *SlMYBL* 基因的编码序列(coding sequence, CDS)(GenBank 登录号 XM_004236113.4)设计 *SlMYBL* 编码区扩增引物。

聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)条件为: $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min; $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min(30 个循环); $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 7 min 扩增基因序列。通过凝胶回收 PCR 产物并与克隆载体 pTEX::Flag 连接以转化 DH5 α 感受态细胞,鉴定阳性克隆(命名为 pTEX::*SlMYBL*-Flag)并进一步测序。通过测序结果对比分析确定是否成功扩增出 *SlMYBL* 基因片段。

1.4 *SlMYBL* 基因的表达谱分析

利用 TomExpress 分别收集番茄植株不同组织(种子、根、分生组织、叶、花朵)和不同时期的果实(不成熟绿果、成熟绿果、破色期、破色期 10 d)数据,以研究番茄 *SlMYBL* 基因的组织表达模式。

1.5 *SlMYBL* 基因 CRISPR 表达载体的构建

利用 CRISPR-P 2.0 软件设计 sgRNA,选中目标片段后利用 Primer 5.0 软件对已知的靶序列进行引物设计,将 F&R 引物($10\text{ }\mu\text{mol/L}$)用 ddH $_2$ O 稀释并混合至终浓度为 $1\text{ }\mu\text{mol/L}$,并于

$28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育 30 min 后备用。

加入 $10\times$ T4 DNA ligase buffer $1\text{ }\mu\text{L}$ 、T4 ligase $0.1\text{ }\mu\text{L}$ 、ccdB-pDGB3- Ω 2-ONPH 10 ng 、BsmBI 内切酶 $0.1\text{ }\mu\text{L}$ 、Primer mixture $1\text{ }\mu\text{L}$,并用 ddH $_2$ O 定容至 $10\text{ }\mu\text{L}$,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min、 $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min 下重复 6 个循环后转化大肠杆菌 DH5 α 过夜培养,挑取单菌落进行 PCR 鉴定,对阳性单菌落进行扩大培养并取样送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.6 番茄植株的遗传转化

野生型番茄种子经表面消毒后置于 1/2MS 培养基,经过 3 d 暗培养和 4 d 光照培养后,萌发生长无菌幼苗。剪下幼苗子叶和茎段,在预培养基中光照培养 3 d。利用农杆菌介导法,用吸光度 A_{600} 为 0.5~0.6 的带有 *SlMYBL* 基因的 CRISPR 载体的农杆菌侵染预培养的番茄子叶和茎段 15 min,然后将叶片和茎段晾干移至共培养基。经过 2 d 共培养后,将转化番茄叶片和茎段愈伤组织依次转移至含 60、65、70 mg/mL 的卡那霉素(Kana)的筛选培养基中培养 60 d 左右。待其长出分化小苗后转移至生根培养基,经生根培养基中 IAA 等激素诱导约 15 d 后分化形成根系,栽入土培育苗盆中,在培养室中生长。

取获得的转基因番茄植株和野生型植株幼嫩叶片,用 SDS-PAGE 法提取番茄总 DNA,以野生型为阴性对照进行 DNA 水平 PCR 鉴定,PCR 反应程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $54\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s(30 个循环); $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 7 min。对 DNA 阳性菌株进行靶位点序列验证,以阳性菌株 DNA 为模板,PCR 反应程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $54\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s(30 个循环); $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 7 min。其 PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

2 结果与分析

2.1 *SlMYBL* 基因的生物信息学结果分析

本文利用对已公布的番茄 *SlMYBL* 序列进行结构域分析。*SlMYBL* 存在与马铃薯 *SpMYB1R1-like*、枸杞 *LrMYB1*、辣椒 *CaMYB1R1* 等参与逆境应答的负调控转录因子相似的 EAR 转录抑制子,如图 1a 所示,初步推测 *SlMYBL* 基因通过参与植物的逆境应答。

结合 GenBank 数据库中公布的 *LrMYB1R1*、*SpMYB1R1-like*、*CaMYB1R1*、*InMYB1R1-like*、*AtMYB4*、*PgMYB1R1-like*、*PaM-*

YB1R1-like、*CiMYB1R1-like*、*SiMYB1R1-like* 以及 *NtMYB1R1-like* 等氨基酸序列,使用 MEGA7.0 软件构建进化树,分析结果如图 1b 所示。由图 1b 可知,与番茄 *SiMYBL* 基因亲缘关系最近的是马铃薯,而与拟南芥最远。

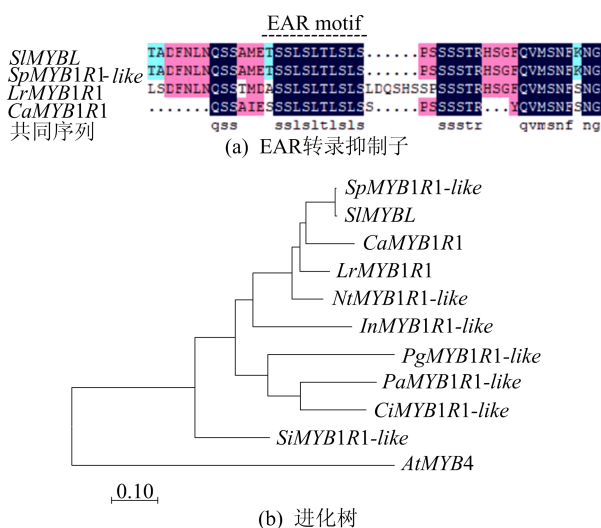


图 1 番茄 *SiMYBL* 基因的生物信息学分析

2.2 *SiMYBL* cDNA 全长序列的克隆

使用野生型番茄 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增,将扩增片段与 pTEX-Flag 载体连接后,转化至大肠杆菌,并通过琼脂糖凝胶电泳进行检测,结果如图 2 所示。图 2 中:M 代表 DL5000 DNA Marker;1 代表阳性大肠杆菌。由图 2 可知,扩增出的基因片段与预期的 *SiMYBL* 基因大小一致,因此将阳性单菌落进行测序鉴定,对测序结果进行对比分析后,确定成功克隆出番茄 *SiMYBL* 基因片段。

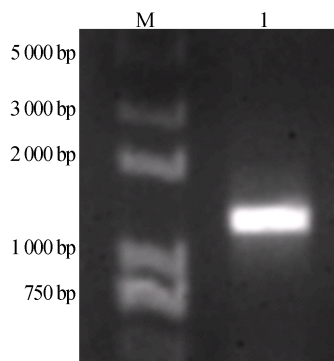


图 2 番茄 *SiMYBL* 基因 PCR 产物

2.3 *SiMYBL* 基因表达模式分析

利用 TomExpress 网站可获取番茄 *SiMYBL* 基因在各个组织和阶段的转录水平,如图 3 所示。

图 3 中:S 表示种子,R 表示根,M 表示分生组织,L 表示叶,F 表示花;IG 表示不成熟绿果(immature green),MG 表示成熟绿果(mature green),B 表示破色期(breaker),B-10 表示破色期 10 d (Breaker-10 d)。

从图 3 可以看出,*SiMYBL* 基因在番茄各组织中均有表达,其中在成熟绿果中表达量最高,其次在根和叶片中也有不同程度的表达,表明 *SiMYBL* 基因可能参与调控植株的生长发育和果实成熟。

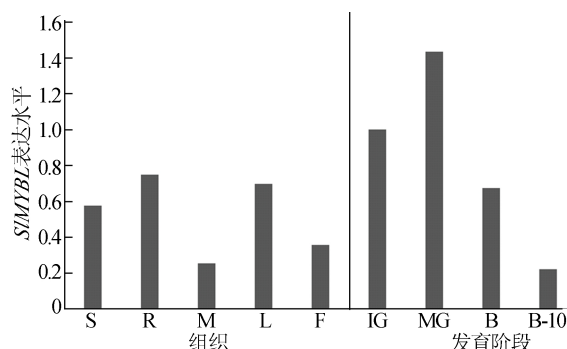


图 3 *SiMYBL* 基因的表达模式分析

2.4 *SiMYBL* 受胁迫诱导情况分析

前期研究表明 *SiMYBL* 基因中含有 EAR 转录抑制区域,因此测试 *SiMYBL* 基因在盐胁迫下的表达水平是否受到影响。在该实验中,将野生型番茄幼苗在 200 mmol/L NaCl 和 300 mmol/L 甘露醇处理 7 d 后提取 RNA 反转录用于定量分析。

与对照组(CK)相比,NaCl 处理后番茄 *SiMYBL* 基因的表达水平明显减少,如图 4 所示。图 4 中,*表示 $P < 0.05$ 具有显著差异。图 4 表明番茄 *SiMYBL* 基因可以响应盐胁迫,可能参与调控植物响应高盐胁迫的逆境应答。

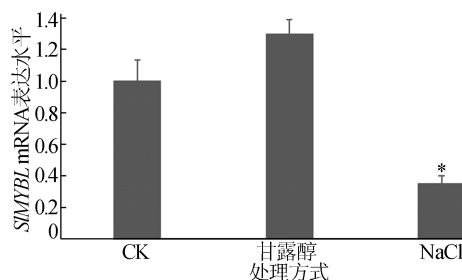


图 4 胁迫处理后番茄叶片中 *SiMYBL* 基因的表达情况

2.5 *SiMYBL* 基因表达载体的构建

运用 CRISPR 在线设计工具(sgRNA 在线设

计软件 CRISPR-P 2.0),对 *SlMYBL* 基因组进行中靶率分析和特异性分析,综合中靶率和片段特异性,选取了 G、C 数量适中、基因特异性较强的关键片段 Target (5'-TGTTACAGTCGGCAAACGA-

3')作为靶序列,用于 gRNA 载体构建。

利用 Primer 5.0 软件对已知的靶序列进行引物设计,引物序列见表 1 所列。按上述方法构建 CRISPR 载体。

表 1 用于扩增特异性序列 sgRNA 的引物

引物名称	引物序列(5'—3')	用途
<i>SlMYBL</i> -S1-F	ATTGGGTTACAGTCGGCAAACGA	靶点敲除载体构建
<i>SlMYBL</i> -S1-R	AAACTCGTTTGCCGACTGTGAACC	靶点敲除载体的构建
U6-F	CCTGGGAATCTGAAAGAAGAGAA	阳性菌落的鉴定
<i>SlMYBL</i> -S2-R	CGTTTGCCGACTGTGAACC	阳性菌落的鉴定

2.6 *SlMYBL* 基因表达载体的鉴定

将表达载体转化至大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 中,挑单菌落进行 PCR 检测,引物序列见表 1 所列,凝胶电泳图如图 5 所示。

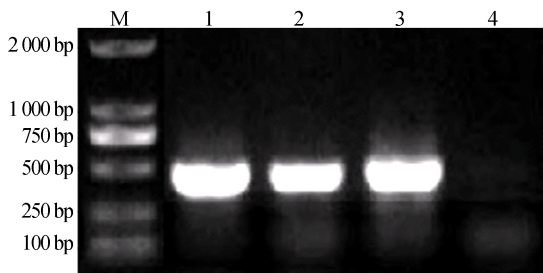


图 5 表达载体的菌落 PCR 鉴定结果

图 5 中:M 代表 DL2000 DNA Marker;1、2

代表阳性大肠杆菌;3 代表阳性对照;4 代表阴性对照。

从图 5 可以看出,脉道 1、2 均扩增出长度约 500 bp,条带明亮、大小符合预期的片段,表明表达载体成功转化至大肠杆菌。为进一步确定载体是否构建成功,扩大培养阳性克隆并提取质粒送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序鉴定。

2.7 番茄植株的遗传转化与鉴定

通过上述农杆菌介导法将 *SlMYBL* 基因进行遗传转化,获得转基因番茄植株。提取转基因植株、野生型基因组 DNA,用 PUC5700 表达载体所携带筛选标记 *Cas9*-F/R 引物,见表 2 所列,利用引物对基因组 DNA 进行 PCR 鉴定。

表 2 用于鉴定转基因番茄株系的引物

引物名称	引物序列(5'—3')	用途
<i>Cas9</i> -F	GAGCAGGAAAATAGGCAAGG	转基因株系 DNA 的鉴定
<i>Cas9</i> -R	CACTGTAAGCTGTAGGAG	转基因株系 DNA 的鉴定
<i>SlMYBL</i> -S3-F	TCTTATCTCCATTCAACACG	转基因株系测序的鉴定
<i>SlMYBL</i> -S3-R	TCTAACCTCGCTTACGCTCA	转基因株系测序的鉴定

对 DNA 阳性菌株进行进一步的靶位点序列验证,测序结果如图 6 所示。

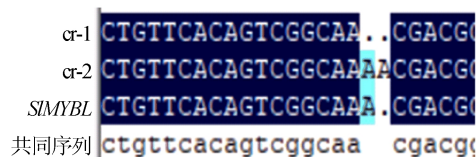


图 6 转基因株系的测序鉴定

由图 6 可知,DNA 阳性菌株有 2 个不同的靶位点编辑株系,分别命名为 *SlMYBL*-cr-1 和 *SlMYBL*-cr-2。*SlMYBL*-cr-1 株系有 1 个位点的碱基缺失;*SlMYBL*-cr-2 株系有 1 个位点的碱基

插入,两者均产生移码突变,从而使多肽链的氨基酸种类和序列发生改变,结果表明已成功获得 *SlMYBL* 基因的 CRISPR/Cas9 敲除植株。

3 讨 论

在自然界中,植物面临着各种复杂的生物和非生物胁迫的环境条件,包括干旱、高盐、极温以及病原菌侵染等,这些胁迫都会严重影响植物生长发育和作物产量。为了应对这些环境条件,植物自身发展进化出一个复杂的网络来感应这些信号,从而调控一些特异的抗性基因表达^[13]。

MYB 类转录因子在番茄中的功能研究也逐渐成熟,番茄 *LeAN2* 基因编码一个花青素相关

的 R2R3-MYB 转录因子,能被低温和氧化胁迫诱导表达。将 *LeAN2* 在烟草中过量表达后能增加花青素的积累和增强其对冷害和氧化胁迫的抵抗能力^[13]。本研究对多种植物 MYB 同源序列进行生物信息学分析,并通过 MEGA7.0 软件邻接法绘制系统发育树分析发现,番茄 *SlMYBL* 与马铃薯的关系最为密切。

已有研究表明番茄 MYB 类基因在所有组织中均表达,本研究分析发现 *SlMYBL* 基因在番茄各个组织及不同时期果实中均有表达,其中在果实、根和叶片中均有稳定的表达,这表明 *SlMYBL* 基因在番茄的器官和果实发育过程中都起着重要作用。对 *SlMYBL* 基因序列分析发现其含有 EAR 基序,近年来的研究表明,EAR 转录抑制子在调节植物防御和逆境胁迫反应的过程中发挥着重要作用^[14]。这套机制也可以抑制一些激活子相关蛋白在防御和逆境胁迫下的活性,以防止由于应答反应过于剧烈而对自身细胞产生伤害^[15],由此推测 *SlMYBL* 也可能参与番茄植株的逆境应答,其中高盐和高渗透压是植物生长过程中普遍遇到逆境胁迫因子。通过本文研究发现,NaCl 处理会抑制番茄 *SlMYBL* 基因的转录水平,进一步验证了 *SlMYBL* 基因可参与胁迫环境下植物的生长和发育。

双子叶作物特别是番茄,仍然是 CRISPR/Cas9 基因调控的理想候选作物,从而提高番茄生产力和产量,稳定获得番茄优良突变体植株^[16]。为进一步研究 *SlMYBL* 基因参与胁迫环境下植物的生长和发育的作用机制,本研究设计并构建了适用于番茄 *SlMYBL* 基因的 CRISPR/Cas9 敲除载体,通过测序分析,已对目的基因进行了定点编辑,获得 *SlMYBL* 的 CRISPR 转基因番茄幼苗,为后续研究该基因在番茄生长发育中所起的作用提供了思路,为以 *SlMYBL* 为节点的分子调控机制研究提供了新的基础。

[参 考 文 献]

[1] 程珂燕. 番茄转录因子 CRISPR/Cas9 突变体库构建及 *nfy-gamma like* 突变体分析[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2020.
[2] 蒋悦,罗倩,杨琴,李红强,等. 烟草 *NtMYB4a* 基因 CRISPR/Cas9 敲除载体构建与遗传转化[J]. 农业生物技术学报,

2021,29(9):1698-1709.
[3] 程丽. 苹果属垂丝海棠转录因子 *MhERF017* 和 *Mh-MYB114-like* 的克隆及响应缺铁的功能研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2020.
[4] 刘壮斌. 低温胁迫下番茄 *MYB113* 基因的功能分析[D]. 泰安:山东农业大学,2019.
[5] 赵盼盼. 番茄 R2R3MYB 转录因子家族鉴定及 *SlMYB41* 和 *SlMYB64* 基因功能研究[D]. 泰安:山东农业大学,2017.
[6] FIAZ S, AHMAR S, SAEED S, et al. Evolution and application of genome editing techniques for achieving food and nutritional security[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(11): 55-85.
[7] BAI S W, YU H, WANG B, et al. Retrospective and perspective of rice breeding in China[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2018, 45(11): 603-612.
[8] RAO Y C, LI Y Y, QIAN Q. Recent progress on molecular breeding of rice in China[J]. Plant Cell Reports, 2014, 33(4): 551-564.
[9] MAX L, ZHANG Q Y, ZHU Q L, et al. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants[J]. Molecular Plant, 2015, 8(8): 1274-1284.
[10] 孙佳彤, 国艳娇, 李爽, 等. 基于 CRISPR/Cas9 的毛果杨 *bHLH106* 转录因子的功能研究[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2021, 45(6): 15-23.
[11] ZHENG S Y, YE C J, LU J Q, et al. Improving the rice photosynthetic efficiency and yield by editing *OsHXK1* via CRISPR/Cas9 system[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(17): 9554.
[12] 蒋萌, 付尚谭, 王晓峰. CRISPR/Cas9 基因组编辑技术在番茄中的应用现状及展望[J]. 西北植物学报, 2022, 42(2): 348-360.
[13] KERWIN R, FEUSIER J, CORWIN J, et al. Natural genetic variation in *Arabidopsis thaliana* defense metabolism genes modulates field fitness[J]. eLife, 2015, 4(4): 1-3.
[14] MENG X, YIN B, FENG L H, et al. Overexpression of R2R3-MYB gene leads to accumulation of anthocyanin and enhanced resistance to chilling and oxidative stress[J]. Biologia Plantarum, 2014, 58(1): 121-130.
[15] 张健飞, 权瑞党, 黄荣峰. EAR 转录抑制子结构及功能的研究[J]. 中国农业科技导报, 2011, 13(4): 53-57.
[16] CHANDRASEKARAN M, BOOPATHI T, PARAMASIVAN M. A status-quo review on CRISPR-Cas9 gene editing applications in tomato[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 190: 120-129.

(责任编辑 闫杏丽)