

林春姿, 黄其伟, 侯艳, 高上, 韩志开, 韦淡虹, 陈淳, 王加峰. 水稻多胺氧化酶基因 (*OsPAO4*) CRISPR/Cas9 编辑突变体的创制 [J]. 广东农业科学, 2023, 50 (3) : 1-10.

水稻多胺氧化酶基因 (*OsPAO4*) CRISPR/Cas9 编辑突变体的创制

林春姿, 黄其伟, 侯艳, 高上, 韩志开, 韦淡虹, 陈淳, 王加峰

(华南农业大学国家植物航天育种工程技术研究中心 /
广东省植物分子育种重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要: 【目的】稻瘟病是水稻生产上的重要限制因素, 挖掘与利用抗病基因是实现水稻高产稳产的重要保障。前期研究发现, 稻瘟病抗性相关 *osa-miR-21* 可能通过靶向调控多胺氧化酶基因 *OsPAO4* 调节水稻稻瘟病抗性, 但目前多胺氧化酶 (Polyamine oxidases, PAOs) 在水稻抗病中的功能研究尚未见报道。为进一步探究其在水稻抗病中的可能生物学功能, 本研究利用 CRISPR/Cas9 编辑技术对水稻 *OsPAO4* 基因进行定点编辑并对其后代突变体进行分析。【方法】在 *OsPAO4* 第 2 外显子处设计了 1 个 20 bp 的编辑靶点, 将靶点核苷酸片段克隆至 pRGEB32 载体, 获得 *OsPAO4* 编辑载体。随后, 利用农杆菌介导法转化水稻 *Pik-H4* NIL 愈伤组织中, 经过再生培养、潮霉素检测获得转基因阳性植株, 并对 T_0 代植株靶位点附近 DNA 序列进行 PCR 和测序分析。【结果】*OsPAO4* 基因被成功编辑, 最终获得 25 个转基因阳性植株, 并在 T_0 代产生多种突变类型: 3 株纯合突变、18 株杂合突变和 4 株未发生编辑的植株。此外, T_0 代杂合突变 *ospao4-8* 的颖壳颜色由紫色变为深灰色, 且 *ospao4* 突变体中过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 活性有所升高, 推测 *OsPAO4* 可能参与水稻的基础免疫过程。【结论】创制了多种类型 *ospao4* 突变体材料, 初步确定 *OsPAO4* 可能参与水稻免疫过程的调控, 为进一步深入揭示 *OsPAO4* 基因的具体生物学功能和分子调控机制奠定了重要基础。

关键词: 水稻; *OsPAO4*; CRISPR/Cas9; 基因编辑; 多胺氧化酶

中图分类号: S511.01

文献标志码: A

文章编号: 1004-874X (2023) 03-0001-10

Construction of Rice Mutants of the Polyamine Oxidase Gene *OsPAO4* Based on CRISPR/Cas9 Editing

LIN Chunzi, HUANG Qiwei, HOU Yan, GAO Shang, HAN Zhikai,
WEI Danhong, CHEN Chun, WANG Jiafeng

(National Engineering Research Center of Plant Space Breeding, South China Agricultural University /
Guangdong Province Key Laboratory of Plant Molecular Breeding, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】Rice blast is an important limiting factor in rice production. Exploring and utilizing resistant genes is an important guarantee for achieving high and stable yield of rice. Previous studies have shown that rice blast resistance-related microRNA *osa-miR-21* may regulate rice blast resistance by targeting the polyamine oxidase gene *OsPAO4*. However, the function of Polyamine Oxidases (PAOs) in rice disease resistance has not been reported. In order to further explore the possible biological function of *OsPAO4* gene in rice disease resistance, the CRISPR/Cas9 editing

收稿日期: 2022-12-11

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (2019A1515011825); 广东省水稻育种新技术重点实验室 2020 年开放课题

作者简介: 林春姿 (1996—), 女, 在读硕士生, 研究方向为水稻抗稻瘟病研究, E-mail: 1162825005@qq.com
通信作者: 王加峰 (1979—), 男, 博士, 副研究员, 研究方向为水稻抗病分子育种, E-mail: jfwang@scau.edu.cn

technology was used for site-specific editing of *ospao4* gene mutants and the edited offspring were also analyzed. 【 Method 】 A 20-bp editing target was designed in the second exon of *OsPAO4*, and the nucleotide fragments of the target was cloned into pRGEB32 vector to obtain *OsPAO4* editing vector. Then, the rice *Pik-H4* NIL callus was transformed by Agrobacterium-mediated method. Positive transgenic plants were obtained by regeneration culture and hygromycin detection, PCR and sequence analysis were performed on the DNA sequences near the target site in the T₀ generation plants. 【 Result 】 The results show that the *OsPAO4* gene was successfully edited and finally 25 transgenic-positive plants were obtained, and various mutation types were produced in the T₀ generation, including 3 homozygous mutants, 18 heterozygous mutants and 4 non-edited plants. In addition, the glume color of the heterozygous mutation *ospao4-8* of the T₀ generation changed from purple to dark gray, and the activity of catalase (CAT) in the mutants was increased. It was predicted that *OsPAO4* might participate in the basis immunization process. 【 Conclusion 】 A variety of *ospao4* mutants were created in this study, and it was preliminarily determined that *OsPAO4* might participate in the regulation of rice immune process, which laid an important foundation for further revealing the specific biological function and molecular regulation mechanism of *OsPAO4* gene.

Key words: rice; *OsPAO4*; CRISPR/Cas9; gene editing; polyamine oxidase

【研究意义】水稻 (*Oryza sativa* L.) 是世界上重要的粮食作物, 全球有近 50% 的人以水稻为主食^[1]。随着人口不断增加, 粮食需求也相应增加, 因此关注粮食生产安全显得尤为重要^[2]。目前, 传统的育种方法仍为提高水稻产量作出巨大贡献。但当前, 农业正面临人口快速增长、全球气候变化、病虫害和其他环境危害等多重挑战^[3], 因此, 迫切需要更先进、更完善的技术, 开发出产量潜力更高的水稻新品种, 增强生物胁迫抗性。多胺氧化酶 (Polyamine oxidases, PAOs) 是氧化分解多胺 (Polyamines, PAs) 的一种重要酶, 在维持植物体内多胺的动态平衡中起着重要作用^[4]。研究显示, PAs 主要作用于亚精胺 (Spermidine, Spd) 和精胺 (Spermine, Spm) 等高级多胺, 多胺氧化酶具有多个家族, 根据功能不同 PAOs 大致可以分为 3 类: 第一类可催化亚精胺与精胺, 生成 4-氨基正丁醛或 3-氨基基-4-氨基正丁醛, 同时生成 1,3-丙二胺与 H₂O₂, 这些 PAOs 仅存在于植物中^[5-7]; 第二类通过氧化动物体内 N-乙酰基衍生物二级氨基外侧面的碳以及植物体内非乙酰化的多胺, 使 PAs 反向转化^[8]; 第三类包含多胺氧化酶结构域, 但没有氧化分解多胺的作用^[9-13]。【前人研究进展】已有报道, 植物受到干旱、盐渍化、高温低温、病原物侵染等逆境胁迫时, 植物体内的多胺含量会发生显著变化, 说明多胺的合成与代谢参与了植物对逆境胁迫的响应^[5,14]。而 PAOs 作为一种氧化分解多胺的重要酶, 可能通过调节体内多胺水平来应对逆境胁迫。此外, PAOs 氧化 PAs 过程中会产生 H₂O₂, 而 H₂O₂ 是生物体细胞在代谢中产生

的一种活性氧 (Reactive oxygen species, ROS), 适宜浓度的 ROS 具有免疫防御功能, 也能作为第二信使调节细胞信号通路^[15]。PAOs 在烟草中已被证明是氧爆发的关键因素, 其衍生产物 H₂O₂ 可直接导致细胞程序性死亡 (Programmed cell death, PCD)^[16]。灰霉病菌丝内 PAOs 活性的增加会生成大量 H₂O₂, 进而对菌丝体造成氧化损伤, 并阻碍其生长^[17]。*SIPAO4* 通过触发 H₂O₂ 介导的 Spd 增加番茄对盐碱胁迫的耐受性^[18]。PAs 代谢可以提高玉米黄曲霉病抗性^[19]。*OsPAO4* 可促进 γ-氨基丁酸 (GABA) 的生成, 而 γ-氨基丁酸转氨酶 (GABA-T) 催化 GABA 转化为琥珀酸半醛, 且 *OsGABA-T* 表达受稻瘟菌所诱导^[20]。此外, *OsPAO5* 被证实是水稻中胚轴伸长的负调控因子, 定点突变能促进直播水稻的胚轴伸长、提高出苗速率, 同时还可以提高粒重等产量性状, 敲除该基因后会导致其乙烯含量升高^[21]。RNAi 抑制草莓 *FaPAO5* 的表达, 可促进 Spd、Spm 和脱落酸 (Abscisic acid, ABA) 的积累, 同时抑制 H₂O₂ 的产生^[22]。水稻 *OsPAO4* 属于 PAOs 家族的一员, 可促进 GABA 的生成^[23], 但在水稻抗病免疫反应中的作用尚未见报道。【本研究切入点】基因组编辑技术的准确性和效率不断提高^[24]。现有的基因组编辑系统包括锌指核酸酶系统 (Zinc-finger nucleases, ZFNs)、转录激活子样效应核酸酶系统 (Transcription activator-like effector nucleases, TALENs) 和聚类规则间隔短回文重复相关蛋白系统 (CRISPR/Cas)。ZFNs 和 TALENs 由于系统组装技术困难、目标范围窄、效率低、成本高, 逐渐被 CRISPR/Cas 系统所取

代^[25]。CRISPR/Cas9 系统是目前应用最广泛的Ⅱ型基因组编辑技术^[26]。在过去几年里,应用 CRISPR/Cas9 编辑系统进行水稻遗传改良,显著提高了水稻的产量、品质及抗病能力^[27~29]。此外,CRISPR/Cas9 编辑系统显著推动水稻功能基因、转录调控及水稻分子育种研究^[30~33]。【拟解决的关键问题】本研究利用 CRISPR/Cas9 技术对 *OsPAO4* 基因实行定点编辑,构建水稻 *OsPAO4* 的突变体材料。研究结果可为后续开展 *OsPAO4* 基因功能及作物抗逆育种奠定重要基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试水稻材料为粳稻 *Pik-H4* NIL (本实验室利用诱变株系 H4 与丽江新团黑谷 LTH 构建的含有抗稻瘟病基因 *Pik-H4* 的近等基因系)。Cas9-gRNA 表达盒载体 pGTR 和 pRGEB32 购自中国北京 Addgene 公司。试验所需的编辑靶点引物、核酸测序服务分别由生工生物工程(上海)股份有限公司、北京擎科生物科技有限公司完成。*Bsa* I 内切酶、*Fok* I 内切酶、T4 DNA 连接酶购自 NEB (北京) 有限公司, Phanta Super-Fidelity DNA Polymerase 高保真酶购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。大肠杆菌 DH5α、根瘤农杆菌 EHA105 均购自中国北京擎科生物科技有限公司。

1.2 *OsPAO4* 蛋白功能预测分析

首先采用 NCBI-BLAST 分析 *OsPAO4* 蛋白的保守结构域,然后利用 ExPASy-Protparam 在线平台分析 *OsPAO4* 蛋白的理化性质,最后分别应用 SOMPA 和 SWISS-MODE 对 *OsPAO4* 蛋白的二级结构与三级结构进行预测分析。

1.3 *OsPAO4* 基因靶点选择及 gRNA 设计

利用 CRISPR-GE 网站 (<http://skl.scau.edu.cn/targetdesign/>) 对 *OsPAO4* 基因 gRNA 靶位点进行设计:首先按照 NGG 序列,与 *OsPAO4* 基因序列进行对比后筛选靶点,然后在 PLN02268 结构域(第 2 外显子)处设计 1 个靶点 (5'-ACCATTGAGAGGCAATGTGC-3')。通过 Cas-OFFinder (<http://www.rgenome.net/cas-offinder/>) 分析和水稻基因组对比分析验证确定 *OsPAO4* 的目的靶点,以检验其特异性。

1.4 CRISPR/Cas9 表达载体构建

CRISPR/Cas9 敲除载体构建参考 Xie 等^[34]

方法。根据靶点序列设计相应引物(表 1)。以 pGTR 载体为模板,分别用 L5AD5-F 引物和 *OsPAO4*-TARGET-R 引物、*OsPAO4*-TARGET-F 引物和 L3AD5-R 引物扩增相应片段。对扩增片段分别进行纯化后,用 *Bsa* I、T7 连接酶组装,然后再用引物(S5AD5-NEW-F 和 S3AD5-NEW-R)对组装产物进行 PCR 扩增。扩增产物纯化后用 *Fok* I 单酶切,最终得到 gRNA- 靶点 -tRNA 片段,进一步通过重组方法将该 gRNA 片段克隆至 Cas9 蛋白表达载体 pRGEB32,把重组载体转化大肠杆菌 DH5α 后,挑取几个单菌落摇菌,提取质粒,进行双酶切鉴定和菌落 PCR,挑取符合预期片段大小的 PCR 产物送至北京擎科生物有限公司测序,根据测序结果分析得到 *OsPAO4* 基因编辑载体。

表 1 *OsPAO4* 基因编辑株系构建所用引物序列
Table 1 Primer sequences for *OsPAO4* gene editing plant

引物 Primer	碱基序列 (5'-3') Base sequence (5'-3')
<i>OsPAO4</i> -TARGET-F	taACCATTGAGAGGCAATGTGCgttttagagctagaa
<i>OsPAO4</i> -TARGET-R	cgGCACATTGCGCTCTCAATGGTtgccaccggccggaa
L5AD5-F	cgGGTCTCAGGCAGGATGGGCAGTCTGGC AACAAAGCACCAGTGG
L3AD5-R	taGGTCTCAAACGGATGAGCCACAGCAA CAAAAAAAAAGCACCGACTCG
S5AD5-NEW-F	CGGGTCTCAGGCAGGATGGGCAGTCTG
S3AD5-NEW-R	TAGGTCTCCAACGGATGAGCGACAGC
pRGEB32-CX-F	TTACGCAATTGGACGACAAC
pRGEB32-CX-R	CTTCTGGCTGGTTGTGTTG GAGCATATA CGCCGGAGTC
HPT-F	CAAGACCTGCCCTGAAACCGA
HPT-R	CGCTGCTACGCCGCCAGCCGCC GAGCCATGAGGCTCCCATATCAAT
<i>OsPAO4</i> -T1-F	
<i>OsPAO4</i> -T1-R	

1.5 表达载体遗传转化及阳性植株鉴定

选用饱满一致的 *Pik-H4* NIL 种子诱导出愈伤组织,采用农杆菌介导的方法侵染水稻愈伤组织,经潮霉素筛选、分化获得转基因抗性植株。利用 CTAB 法提取 T₀ 代植株 DNA,以特异性潮霉素引物(HPT-F/HPT-R)进行 PCR 扩增(表 1),可扩增出 501 bp 条带的植株,此为转基因阳性株系。

1.6 突变位点 PCR 扩增检测及突变类型分析

为检测 *OsPAO4* 编辑靶点的突变情况,分别在靶点的上下游设计测序引物 *OsPAO4*-T1-F、*OsPAO4*-T1-R(表 1),对提取的水稻基因组 DNA(见 1.5 中所述)进行 PCR 扩增(目的片段

长度为 483 bp)，扩增片段送至北京擎科生物有限公司进行测序分析，将测序结果与 *OsPAO4* 基因组序列进行比对，分析鉴定转基因植株的基因突变类型。

1.7 过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 活性测定

利用 CAT 测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 中国) 测定样品中 CAT 活力。具体操作步骤依据说明书进行：准确称取水稻叶片，用剪刀剪碎后置于研钵中，按照质量体积比 1 : 9 加入 9 倍体积的生理盐水，然后在冰浴条件下将叶片研磨至匀浆。将匀浆液用离心管收集后，用冷冻离心机在 4℃、10 000 r/min 下离心 10 min，取 10% 上清匀浆进行测定，然后按照说明书分别制作对照管、测定管，3 次重复，计算公式如下：

$$\text{CAT 活力 (u/mgprot)} = \frac{(A_{\text{对照管}} - A_{\text{测试管}})}{60 \times \text{取样量} \times \text{样品蛋白浓度}} \times 271$$

2 结果与分析

2.1 OsPAO4 蛋白分析

OsPAO4 蛋白的理化性质分析结果表明，该

蛋白包含 487 个氨基酸，分子量为 52.91 kD，理论等电点 (pI) 和总平均亲水性分别为 5.29 和 -0.041，不稳定系数为 32.73，表明 *OsPAO4* 蛋白偏酸性且亲水、稳定。*OsPAO4* 蛋白中丰度最高的氨基酸为亮氨酸 (Leu)，含有 49 个且占比达 10.1%，

其次是丙氨酸 (Ala) 和缬氨酸 (Val)，分别含有 47 和 42 个，各占氨基酸总数的 9.7% 和 8.6%。*OsPAO4* 蛋白保守结构域分析结果 (图 1) 显示其在第 24 位到第 458 位氨基酸之间具有一个典型的 PLN02268 保守结构域，表明该基因属于 PAOs 家族。进一步预测其蛋白二级结构与三级结构，发现 *OsPAO4* 蛋白中包含 42.30% 的 α -螺旋、5.75% 的 β -转角、18.07% 延伸链以及 33.88% 无规则卷曲 (图 2)。

2.2 gRNA 靶点选择和序列设计

OsPAO4 位于水稻第 4 号染色体上，基因组序列全长为 3 392 bp，CDS 为 1 464 bp，含有 9 个外显子和 8 个内含子，其中 2 号外显子最长、



图 1 *OsPAO4* 蛋白保守结构域预测

Fig. 1 Conserved domains prediction of *OsPAO4* protein

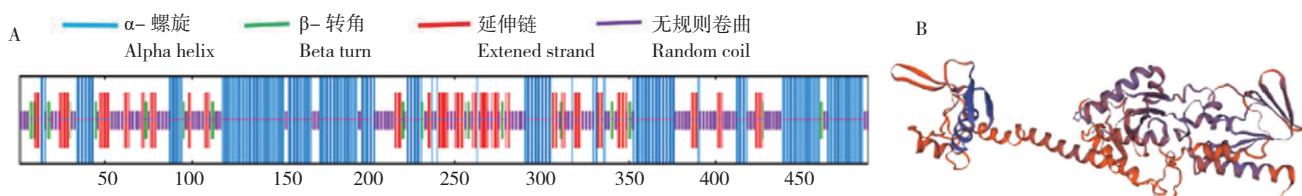


图 2 *OsPAO4* 蛋白二级结构 (A) 与三级结构 (B) 预测

Fig. 2 Prediction of the secondary (A) and tertiary (B) structures of *OsPAO4* protein

为 430 bp，1 号外显子最短、仅 28 bp。为破坏 *OsPAO4* 蛋白 PLN02268 保守结构域的功能，利用 CRISPR-GE 网站 (<http://skl.scau.edu.cn/targetdesign/>) 在 *OsPAO4* 第 2 个外显子区域设计一个靶点 (5'-AC CATTGAGAGGCAATGTGC CGG-3') 进行定点编辑 (图 3)。

2.3 CRISPR/Cas9 表达载体构建

将组装好的 gRNA 表达盒替换 Cas9 载体骨架中的 gRNA scaffold 片段，得到 pRGEB32-*OsPAO4*-gRNA 表达载体 (图 4A)。挑取几个单菌落，摇菌，提取质粒进行双酶切鉴定及菌落

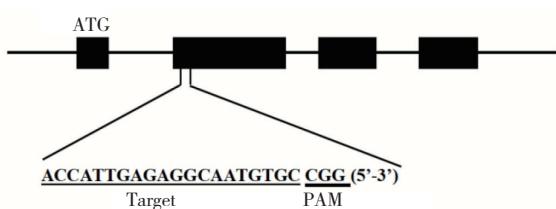


图 3 *OsPAO4* 基因结构和靶位点位置

Fig. 3 Gene structure of *OsPAO4* and the target site location

PCR 鉴定，符合要求的单菌落进行测序鉴定。利用引物 pRGEB32-CX-F 对载体上的靶点 gRNA 表达盒进行测序，结果显示，靶点 gRNA 表达盒序列正确克隆至 pRGEB32 上，可用于下一步农杆菌转化。

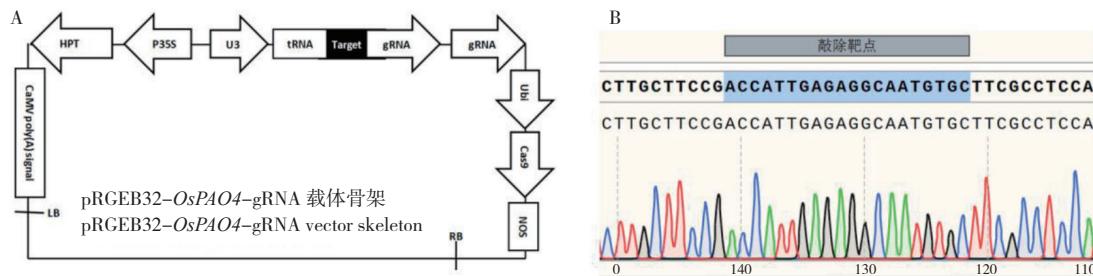


图 4 pRGE32–OsPAO4–gRNA 表达载体组装 (A) 及靶点测序鉴定 (B)

Fig. 4 Assembly diagram (A) and target identification sequences (B) inserted in pRGE32–OsPAO4–gRNA recombinant vector

菌介导的水稻遗传转化 (图 4B)。

2.4 转基因阳性植株鉴定

利用农杆菌介导法将 pRGE32–OsPAO4–gRNA 重组表达载体转化到 *Pik-H4* NIL 的愈伤组织, 经再分化、抗性筛选得到 29 个转化株系, 提取每个株系的基因组 DNA, 利用 PCR 扩增检测

潮霉素 (Hygromycin, HPT II) 抗性基因。结果 (图 5) 显示, 共有 25 株转基因植株可以检测到潮霉素抗性基因, 表明成功将外源质粒 pRGE32–OsPAO4–gRNA 转化到水稻中, 转化率约 86.2%。

2.5 突变类型分析

为明确 *OsPAO4* 的编辑类型, 对获得的 25



“M”代表 marker, “-”代表以野生型 DNA 为模板的阴性对照, 洋道 1~29 代表 *OsPAO4* 对应的第 1~29 株转基因株系
"M" represents marker. "—" represents the negative control using wild-type DNA as template.

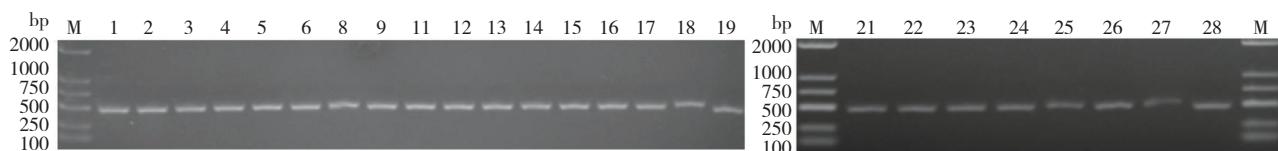
Lane "1~29" represent the 1~29 transgenic plants corresponding to *OsPAO4*

图 5 *OsPAO4* 转基因株系潮霉素抗性基因 (HPT II) PCR 鉴定

Fig. 5 HPT II identification of the positive transgenic *OsPAO4* plants by PCR amplification

株 T_0 代转基因阳性植株的目标基因靶点区域序列设计特异性引物 (*OsPAO4*-T1-F 与 *OsPAO4*-T1-R), 并进行 PCR 扩增和测序分析(图 6~图 7)。对比野生型 *Pik-H4* NIL 中该基因序列, 参考 *OsPAO4* 转基因株系中靶点附近序列的测序峰图, 并利用解码网站 (<http://skl.scau.edu.cn/dsdecode/>) 对全部转基因植株测序结果进行解码分析。结果 (表 2) 表明, 25 株中有 3 株为纯合突变, 18 株为双峰, 4 株检测结果与野生型一致、即靶点处

未发生基因编辑。在纯合突变体 *ospao4-3* 中该基因存在 2 个碱基缺失, 导致氨基酸移码突变, 并未引起提前终止, 但是后面氨基酸排列发生较大改变; *ospao4-17* 中发生单碱基的缺失同时导致移码突变, 使突变位点后 16 位氨基酸处发生终止, 变成仅有 27 个氨基酸的小肽; *ospao4-24* 中靶标处发生单碱基的插入突变, 导致翻译提前终止、蛋白变短, 仅包含 17 个氨基酸。综上所述, 纯合突变株系在 T_0 代时目的基因功能可能完全丧失,



“M”代表 marker; 洋道上的数字代表 *OsPAO4* 对应的转基因株系
"M" represents marker. The numbers in the lane represent the transgenic plants corresponding to *OsPAO4*

图 6 *OsPAO4* 突变位点 PCR 扩增检测

Fig. 6 PCR amplification detection of *OsPAO4* mutation site

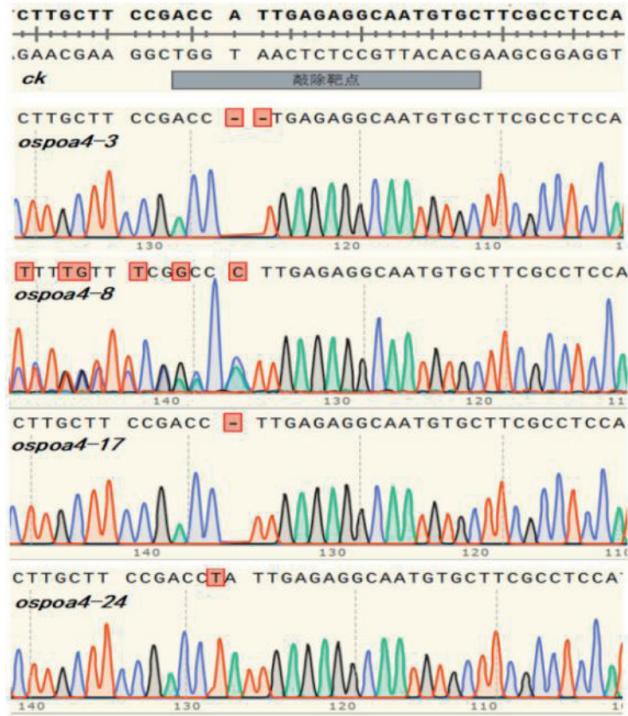


图 7 部分转基因株系 *OsPAO4* 靶点区域序列的测序比对分析
Fig. 7 Sequencing comparison analysis chart of the *OsPAO4* target region sequences of some transgenic plants

还需结合后续试验进行验证，而杂合突变则需要等 T_1 、 T_2 代分离后继续测序分析。

2.6 穗粒颖壳颜色表型分析

对 T_0 代植株的生长表型及籽粒颖壳颜色调查结果发现，杂合类型植株 (*ospao4-8*) 的籽粒结实率未发生变化，但植株分蘖明显增多，且颖壳颜色由紫色变为深灰色，而其他突变类型的杂合株系表型均没有明显改变（图 8），可能杂合突变影响了花青素的积累，具体发生机制需要结合 T_1 、 T_2 代表型进行分析。



图 8 野生型 *Pik-H4* NIL (A) 和杂合株系 *ospao4-8/OsPAO4* (B) 的籽粒颜色

Fig. 8 Glume color of the wild-type *Pik-H4* NIL (A) and a *ospao4-8/OsPAO4* mutant (B)

表 2 部分转基因株系中 *OsPAO4* 基因靶位点编辑情况
Table 2 Editing of *OsPAO4* gene targets in some transgenic plants

株系 Strain	编辑情况 Editing	株系 Strain	编辑情况 Editing
<i>ospao4-1</i>	2 个碱基缺失/未编辑	<i>ospao4-16</i>	1 个碱基缺失/未编辑
<i>ospao4-2</i>	2 个碱基缺失/6 个碱基缺失	<i>ospao4-17</i>	1 个碱基缺失
<i>ospao4-3</i>	2 个碱基缺失	<i>ospao4-18</i>	1 个碱基缺失/2 个碱基缺失
<i>ospao4-4</i>	2 个碱基缺失/T 碱基插入	<i>ospao4-19</i>	4 个碱基缺失/1 个碱基缺失
<i>ospao4-5</i>	未编辑	<i>ospao4-21</i>	未编辑
<i>ospao4-6</i>	21 个碱基缺失/未编辑	<i>ospao4-22</i>	1 个碱基缺失/2 个碱基缺失
<i>ospao4-8</i>	2 个碱基缺失/未编辑	<i>ospao4-23</i>	2 个碱基缺失/6 个碱基缺失
<i>ospao4-9</i>	6 个碱基缺失/未编辑	<i>ospao4-24</i>	T 碱基插入
<i>ospao4-11</i>	未编辑	<i>ospao4-25</i>	T 碱基插入/未编辑
<i>ospao4-12</i>	2 个碱基缺失/6 个碱基缺失	<i>ospao4-26</i>	1 个碱基缺失/未编辑
<i>ospao4-13</i>	2 个碱基缺失/未编辑	<i>ospao4-27</i>	2 个碱基缺失/1 个碱基缺失
<i>ospao4-14</i>	未编辑	<i>ospao4-28</i>	4 个碱基缺失/未编辑
<i>ospao4-15</i>	A 碱基插入/未编辑		

2.7 CAT 活性分析

PAOs 氧化 PAs 过程中会产生 H_2O_2 ，而 H_2O_2 是生物体细胞在代谢中产生的一种活性氧 (ROS)，适宜浓度的 ROS 能作为第二信使调节细胞信号通路，激活植物防御功能^[14]。而 CAT 可分解 H_2O_2 ，检测转基因株系 *ospao4-3*、*ospao4-17* 和野生型植株 *Pik-H4* NIL 中 CAT 活性有助于了解植株体内 H_2O_2 水平。已知 CAT 可以将 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2 ，使细胞免遭 H_2O_2 毒害。本研究结果 (图 9) 发现，*ospao4* 突变会导致 CAT 活性升高，因此推测 *ospao4* 突变会促进 H_2O_2 分解，降低 ROS

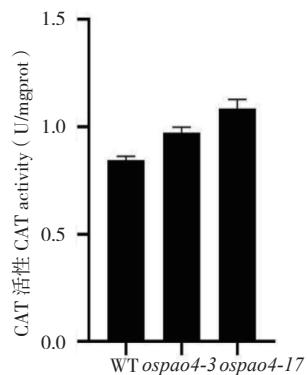


图 9 野生型和 *ospao4* 突变体中 CAT 活性

Fig. 9 CAT activity in wild type and *ospao4* mutants

水平，进而增强水稻敏感性。

3 讨论

生物和非生物胁迫可造成粮食作物产量大幅降低，提高植物的抗逆性是当前育种的主要目标。其中 CRISPR/Cas9 系统因其简单、对靶标切割的高特异性、不涉及复杂的蛋白质化学和普遍适用性而被育种研究人员广泛接受^[35]，已在水稻、玉米、小麦等作物重要性状的改良中得到应用^[36]。

PAs 是一种重要的植物生长调节物质。在植物受到病原入侵时，体内迅速积累大量 PAs 并相互转化，一部分 PAs 由二胺氧化酶 (Diamine oxidase, DAO) 氧化，DAOs 主要催化氧化腐胺 (Putrescine, Put) 和尸胺 (Cadaverine, Cad) 产生 4-氨基丁醛、氨气 (Ammonia, NH₃) 和 H₂O₂^[37-38]；另一部分被 PAOs 氧化分解，引起下游相关抗病基因和细胞死亡相关基因的表达等来响应这些生物胁迫^[39]，如下游物质 γ -氨基丁酸 (GABA) 在环境胁迫下迅速积累。内源 GABA 可影响植物生长；外源 GABA 可参与植物信号转导、转录调控、激素生物合成，刺激 ROS 产生 (适宜浓度)，进而增强植物抗病性^[40]。PAs 在 PAOs 催化下的最终产物为 H₂O₂，但在 PAs 代谢过程中，参与调控植物免疫途径的基因仍未可知。目前已在水稻中发现 7 种 PAOs 基因^[8]，但关于 *OsPAO4* 功能的报道较少，因此研究 *OsPAO4* 的功能也有利于进一步解析 PAs 在抗逆方面的作用。此外，前人研究表明 ROS 是防御稻瘟病菌侵染的关键因素^[8]。PAOs 活性会影响细胞内 PAs 水平，导致 H₂O₂ 水平的改变，进而影响 ROS 爆发^[4]，所以 PAOs 可能与水稻抗病性相关。

本研究通过对 OsPAO4 蛋白进行保守结构域预测，发现 OsPAO4 蛋白拥有 PAOs 家族高度保守的 PLN02268 结构域。为探究 OsPAO4 基因的生物学功能，利用 CRISPR/Cas9 技术在 PLN02268 结构域设计单编辑靶点（第 2 外显子），对抗稻瘟病近等基因系 *Pik-H4 NIL* 中的 *OsPAO4* 基因进行定点编辑，成功获得 25 株阳性转基因 T₀ 代植株。通过对靶点区域序列测序，发现 T₀ 代存在多种突变类型，如纯合突变、杂合突变、双等位突变等，单靶点编辑对 *OsPAO4* 基因也具有较高的编辑效率。进一步分析发现，这些突变体中大部分因缺失或插入的碱基数不是 3 的倍数，从而

产生移码突变或导致蛋白翻译提前终止。同时，本研究获得一种杂合突变类型 *ospao4-8*，其颖壳呈深灰色（原始材料 *Pik-H4 NIL* 颖壳为紫色），推测 *ospao4* 基因杂合突变影响了颖壳中花青素的积累。植物中花青素的产生受到光、温度、碳水化合物、植物激素和胁迫等多种因素的影响^[41]，PAs 与乙烯合成前体均为 S- 腺苷甲硫氨酸 (S-Adenosylmethionine, SAM)^[42]，*ospao4* 的杂合突变可能部分降低了 PAs 的水平、促进了乙烯的产生，进而促进水稻的成熟及花青素的积累。此外，有研究指出，氮含量会影响花青素的合成，而 PAs 可以替代无机氮促进其生长^[43]，因此，*ospao4* 杂合突变的颖壳颜色变化可能是由于 PAs 水平的改变间接影响了花青素的积累，进而改变颖壳颜色。

已有研究表明，PAs 氧化产生的 H₂O₂ 参与了超敏反应 (Hypersensitive response, HR) 途径，从而使得细菌对病原体具有耐受性^[44]。外源施加 Spm 可增强拟南芥对黄瓜花叶病毒的抗性，而利用 PAOs 抑制剂可抑制防御基因的激活，以上实验均证实 PAO 参与抗性反应^[45]。由于 PAOs 活性的改变会影响细胞内 PAs 水平，进而导致 H₂O₂ 水平发生改变^[4]。而 CAT 可促使 H₂O₂ 降解，因此测定 CAT 活性有助于间接了解突变体植物体内 H₂O₂ 的水平。本研究 CAT 活性测定结果显示，突变体中 CAT 活性相较于野生型有所升高，可能是由于 *ospao4* 突变后会促使植物体内 H₂O₂ 被降解和清除，降低 ROS 水平，进而增强了水稻对病原菌的敏感性，初步证实 *OsPAO4* 可能通过影响 PAs 水平调控 H₂O₂ 的积累，进而参与水稻抗病反应。

综上所述，利用 CRISPR/Cas9 技术获得了类型较为丰富的 *ospao4* 突变体，为研究水稻 *OsPAO4* 基因介导的抗病分子机制提供了丰富的突变材料。CRISPR/Cas9 技术可以定点编辑植物的内源基因，产生多样的突变体，获得丰富的水稻育种材料，将突变体经过不断回交等一系列手段消除转基因的痕迹，结合传统的作物育种，将极大加快育种进程。值得关注的是，发展非组织培养依赖的基因编辑技术，并降低编辑系统的脱靶效应仍是该技术推广应用的关键，需大力投入和积极开展相关研究。

4 结论

本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术，设计靶向 *OsPAO4* 基因 PLN02268 结构域（第 2 外显子）处的单靶点，对 *OsPAO4* 基因进行定点编辑，并获得 *ospao4* 纯合突变体材料。*ospao4* 杂合突变体 *ospao4-8* 在幼苗时期的长势与野生型 *Pik-H4* NIL 大致相同，但植株分蘖明显增多，且籽粒颜色由紫色变为深灰色，但其他突变类型的杂合株系表型未发生明显改变。同时，与野生型 *Pik-H4* NIL 相比，*ospao4* 突变体中 CAT 活性有所升高，H₂O₂ 被分解和清除，推测 *OsPAO4* 可能参与水稻基础免疫过程的调控，为进一步深入揭示 *OsPAO4* 基因的功能和分子调控机制奠定了重要基础。

参考文献 (References) :

- [1] BIRLA D S, MALIK K, SAINGER M, CHAUDHARY D, JAIWAL R, JAIWAL P K. Progress and challenges in improving the nutritional quality of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017, 57(11): 2455–2481. DOI:10.1080/10408398.2015.1084992.
- [2] MILOVANOVIC V, SMUTKA L. Asian countries in the global rice market [J]. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 2017, 65: 679–688. DOI:10.11118/actaun201765020679.
- [3] MISHRA R, JOSHI R K, ZHAO K. Genome editing in rice: Recent advances, challenges, and future implications [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 1361. DOI:10.3389/fpls.2018.01361.
- [4] YU Z, JIA D, LIU T. Polyamine oxidases play various roles in plant development and abiotic stress tolerance [J]. *Plants*, 2019, 8(6): 184. DOI:10.3390/plants8060184.
- [5] 朱雪峰. 棉花 *GhPAO3* 基因抗旱功能初步分析 [D]. 石河子: 石河子大学, 2019.
- ZHU X F. Preliminary analysis of drought resistance function of cotton *GhPAO3* gene [D]. Shihezi: Shihezi University, 2019.
- [6] CERVELLI M, BIANCHI M, CONA A, CROSATTI C, STANCA M, ANGELINI R, FEDERICO R, MARIOTTINI P. Barley polyamine oxidase isoforms 1 and 2, a peculiar case of gene duplication: Barley polyamine oxidase isoform 1 gene expression [J]. *FEBS Journal*, 2006, 273(17): 3990–4002. DOI:10.1111/j.1742-4658.2006.05402.x.
- [7] MOSCHOU P N, PASHALIDIS K A, ROUBELAKIS-ANGELAKIS K A. Plant polyamine catabolism: The state of the art [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2008, 3(12): 1061–1066. DOI:10.4161/psb.3.12.7172.
- [8] ONO Y, KIM D W, WATANABE K, SASAKI A, NIITSU M, BERBERICH T, KUSANO T, TAKAHASHI Y. Constitutively and highly expressed *Oryza sativa* polyamine oxidases localize in peroxisomes and catalyze polyamine back conversion [J]. *Amino Acids*, 2012, 42(2–3): 867–876. DOI:10.1007/s00726-011-1002-3.
- [9] SHI Y, LAN F, MATSON C, MULLIGAN P, WHETSTINE J R, COLE P A, CASERO R A, SHI Y. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog lsd1 [J]. *Cell*, 2004, 119(7): 941–953. DOI:10.1016/j.cell.2004.12.012.
- [10] SPEDALETTI V, POLTICELLI F, CAPODAGLIO V, SCHININA M E, STANO P, FEDERICO R, TAVLADORAKI P. Characterization of a lysine-specific histone demethylase from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Biochemistry*, 2008, 47(17): 4936–4947. DOI:10.1021/bi701969k.
- [11] LUO M, HUNG F Y, YANG S G, LIU X C, WU K Q. Histone lysine demethylases and their functions in plants [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2014, 32(2): 558–565. DOI:10.1007/s11105-013-0673-1.
- [12] MOSAMMAPARAST N, SHI Y. Reversal of histone methylation: Biochemical and molecular mechanisms of histone demethylases [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2010, 79(1): 155–179. DOI:10.1146/annurev.biochem.78.070907.103946.
- [13] FORTES A M, AGUDELO-ROMERO P, PIMENTEL D, ALKAN N. Transcriptional modulation of polyamine metabolism in fruit species under abiotic and biotic stress [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 816. DOI:10.3389/fpls.2019.00816.
- [14] KEREN I, LAPIDOT M, CITOVSKY V. Coordinate activation of a target gene by *KDM1C* histone demethylase and *OTLD1* histone deubiquitinase in *Arabidopsis* [J]. *Epigenetics*, 2019, 14(6): 602–610. DOI:10.1080/15592294.2019.1603982.
- [15] HUANG H, ULLAH F, ZHOU D X, YI M, ZHAO Y. Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 800. DOI:10.3389/fpls.2019.00800.
- [16] YODA H, YAMAGUCHI Y, SANO H. Induction of hypersensitive cell death by hydrogen peroxide produced through polyamine degradation in tobacco plants [J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(4): 1973–1981. DOI:10.1104/pp.103.024737.
- [17] 杨康, 陈健, 辛爱景, 蔡金霞, 石志琦, 杨立飞. 麝香草酚抑制灰霉菌的作用机理: PAO-H₂O₂ 系统 [J]. 应用生态学报, 2020, 31(7): 2441–2448. DOI:10.13287/j.1001-9332.202007.031.
- YANG K, CHEN J, XIN A J, CAI J X, SHI Z Q, YANG L F. Mechanism of thymol inhibiting *Botrytis cinerea*: PAO-H₂O₂ system [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2020, 31(7): 2441–2448. DOI:10.13287/j.1001-9332.202007.031.
- [18] YANG J Y, WANG P J, LI S Z, LIU T, HU X H. Polyamine oxidase triggers H₂O₂-mediated spermidine improved oxidative stress tolerance of tomato seedlings subjected to saline-alkaline stress [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(3): 1625. DOI:10.3390/ijms23031625.
- [19] MAJUMDAR R, MINOCHA R, LEBAR M D, RAJASEKARAN K, LONG S, CARTER-WIENTJES C, MINOCHA S, CARY J W. Contribution of maize polyamine and amino acid metabolism toward resistance against *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin production [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 692. DOI:10.3389/fpls.2019.00692.
- [20] WU C X, ZHOU S Y, ZHANG Q, ZHAO W S, PENG Y L. Molecular cloning and differential expression of an γ -aminobutyrate transaminase gene, *OsGABA-T*, in rice (*Oryza sativa*) leaves infected with blast

- fungus [J]. *Journal of Plant Research*, 2006, 119(6): 663–669. DOI:10.1007/s10265-006-0018-3.
- [21] LYU Y S, SHAO G N, JIAO G A, SHENG Z H, XIE L H, HU S K, TANG S Q, WEI X J, HU P S. Targeted mutagenesis of POLYAMINE OXIDASE 5 that negatively regulates mesocotyl elongation enables the generation of direct-seeding rice with improved grain yield [J]. *Molecular Plant*, 2021, 14(2): 344–351. DOI:10.1016/j.molp.2020.11.007.
- [22] MO A, XU T, BAI Q, SHEN Y Y, GAO F, GUO J X. FaPA05 regulates Spm/Spd levels as a signaling during strawberry fruit ripening [J]. *Plant Direct*, 2020, 4(5) [2023–02–03]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pld3.217>. DOI:10.1002/pld3.217.
- [23] BRIKIS C J, ZAREI A, CHIU G Z, DEYMAN K L, LIU J Y, TROBACHER C P, HOOVER G J, SUBEDI S, DEEII J R, BOZZO G G, SHELP B J. Targeted quantitative profiling of metabolites and gene transcripts associated with 4-aminobutyrate (GABA) in apple fruit stored under multiple abiotic stresses [J]. *Horticulture Research*, 2018, 5(1): 61. DOI:10.1038/s41438-018-0069-3.
- [24] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, HAUER M, DOUDNA J A, CHARPENTIER E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816–821. DOI:10.1126/science.1225829.
- [25] 李文龙, 栾鑫, 张强, 余宁, 冯晓敏, 刘志霞. 基于CRISPR/Cas9基因编辑技术的水稻定向改良研究进展 [J]. 广东农业科学, 2022, 49(9): 114–124. DOI:10.16768/j.issn.1004-874X.2022.09.012.
- LI W L, LUAN X, ZHANG Q, YU N, FENG X M, LIU Z X. Target improvement of rice based on CRISPR/Cas9 gene editing technology [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2022, 49(9): 114–124. DOI:10.16768/j.issn.1004-874X.2022.09.012.
- [26] CONG L, RAN F A, COX D, LIN S, BARRETTTO R, HABIB N, HSU P D, WU X, JIANG W, MARRAFFINI L A, ZHANG F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823. DOI:10.1126/science.1231143.
- [27] ZHOU J P, XIN X H, HE Y, CHEN H Q, LI Q, TANG X, ZHONG Z H, DENG K J, ZHENG X L, AKHER S A, CAI G Z, QI Y P, ZHANG Y. Multiplex QTL editing of grain-related genes improves yield in elite rice varieties [J]. *Plant Cell Reports*, 2019, 38(4): 475–485. DOI:10.1007/s00299-018-2340-3.
- [28] WANG F J, WANG C L, LIU P Q, LEI C L, HAO W, GAO Y, LIU Y G, ZHAO K J. Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene *OsERF922* [J]. *PloS one*, 2016, 11(4): e0154027. DOI:10.1371/journal.pone.0154027.
- [29] SHEN L, HUA Y F, FU Y P, LI J, LIU Q, JIAO X Z, XIN G W, WANG J J, WANG X C, YAN C J, WANG K J. Rapid generation of genetic diversity by multiplex CRISPR/Cas9 genome editing in rice [J]. *Science China Life Sciences*, 2017, 60(5): 506–515. DOI:10.1007/s11427-017-9008-8.
- [30] 林春姿, 谢华斌, 黄其伟, 高上, 王加峰. 利用CRISPR/Cas9技术定向编辑水稻 *OsIQDI* 基因 [J]. 广东农业科学, 2022, 49(8): 1–10. DOI:10.16768/j.issn.1004-874X.2022.08.001.
- LIN C Z, XIE H B, HUANG Q W, GAO S, WANG J F. Targeted editing of *OsIDQ1* gene in rice based on CRISPR/Cas9 technology [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2022, 49(8): 1–10. DOI:10.16768/j.issn.1004-874X.2022.08.001.
- j.issn.1004-874X.2022.08.001.
- [31] 段敏, 谢留杰, 高秀莹, 唐海娟, 黄善军, 潘晓飚. 利用CRISPR/Cas9技术创制广亲和水稻温敏雄性不育系TB52S [J/OL]. 中国水稻科学, 2023<https://kns.cnki.net/kcms/detail//33.1146.S.20230106.1517.011.html> [2013–01–09].
- DUAN M, XIE L J, GAO X Y, TANG H J, HUANG S J, PAN X B. Construction of wide compatibility thermo-sensitive genic male sterility TB52S in rice based on CRISPR/Cas9 technology [J/OL]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2023<https://kns.cnki.net/kcms/detail//33.1146.S.20230106.1517.011.html> [2013–01–09].
- [32] 牛淑琳, 鞠培娜, 周冠华, 戴南平, 周晋军, 谢先芝, 郑崇珂. 利用CRISPR/Cas9技术编辑 *OsRR22* 基因创制耐盐水稻种质资源 [J]. 山东农业科学, 2023, 55(2):30–35. DOI:10.14083/j.issn.1001-4942.2023.02.004.
- NIU S L, JU P N, ZHOU G H, DAI N P, ZHOU J J, XIE X Z, ZHENG C K. Creation of salt-tolerant rice germplasm by editing *OsRR22* gene via CRISPR/Cas9 [J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2023, 55(2):30–35. DOI:10.14083/j.issn.1001-4942.2023.02.004.
- [33] 李景芳, 温舒越, 赵利君, 陈庭木, 周振玲. 基于CRISPR/Cas9技术创制耐盐香味水稻 [J/OL]. 中国水稻科学, 2023<https://kns.cnki.net/kcms/detail//33.1146.S.20230106.1454.010.html> [2023–01–09].
- LI J F, WEN S Y, ZHAO L J, CHEN T M, ZHOU Z L. Production of salt-tolerant and fragrant rice based on CRISPR/Cas9 technology [J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2023<https://kns.cnki.net/kcms/detail//33.1146.S.20230106.1454.010.html> [2023–01–09].
- [34] XIE K, MINKENBERG B, YANG Y. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 112(11): 3570–3575. DOI:10.1073/pnas.1420294112.
- [35] ZAIDI S S E A, MUKHTAR M S, MANSOOR S. Genome editing: Targeting susceptibility genes for plant disease resistance [J]. *Trends in Biotechnology*, 2018, 36(9): 898–906. DOI:10.1016/j.tibtech.2018.04.005.
- [36] 王福军, 赵开军. 基因组编辑技术应用于作物遗传改良的进展与挑战 [J]. 中国农业科学, 2018, 51(1): 1–16. DOI:10.3864/j.issn.0578-1752.2018.01.001.
- WANG F J, ZHAO K J. Progress and challenge of crop genetic improvement via genome editing [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51(1): 1–16. DOI:10.3864/j.issn.0578-1752.2018.01.001.
- [37] ALCÁZAR R, ALTABELLA T, MARCO F, BORTOLOTTI C, REYMOND M, KONCZ C, CARRASCO P, TIBURCIO A F. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance [J]. *Planta*, 2010, 231(6):1237–1249. DOI:10.1007/s00425-010-1130-0.
- [38] MOSCHOU P N, WU J, CONA A, TAVLADORAKI P, ANGELINI R, ROUBELAKIS-ANGELAKIS K A. The polyamines and their catabolic products are significant players in the turnover of nitrogenous molecules in plants [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(14): 5003–5015. DOI:10.1093/jxb/ers202.
- [39] GHOLIZADEH F, MIRZAGHADERI G. Genome-wide analysis of the polyamine oxidase gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.) reveals involvement in temperature stress response [J]. *PloS One*, 2020, 15(8): e0236226. DOI:10.1371/journal.pone.0236226.

- [40] PODLEŠÁKOVÁ K, UGENA L, SPÍCHAL L, DOLEZAL K, DE DIEGO N. Phytohormones and polyamines regulate plant stress responses by altering GABA pathway [J]. *New Biotechnology*, 2019, 48: 53–65. DOI:10.1016/j.nbt.2018.07.003.
- [41] KIM J S, LEE B H, KIM S H, OK K H, CHO K Y. Response to environmental and chemical signals for anthocyanin biosynthesis in nonchlorophyllous corn (*Zea mays* L.) leaf [J]. *Journal of Plant Biology*, 2006, 49(1): 16–25. DOI:10.1007/BF03030784.
- [42] MARTIN-TANGUY J. Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches) [J]. *Plant Growth Regulation*, 2001, 34: 135–148. DOI:10.1023/A:1013343106574.
- [43] TAKAHASHI T. Plant polyamines [J]. *Plants (Basel)*, 2020, 9(4): 511. DOI:10.3390/plants9040511.
- [44] FU X Z, CHEN C W, WANG Y, LIU J H, MORIGUCHI T. Ectopic expression of *MdSPDS1* in sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) reduces canker susceptibility: involvement of H₂O₂ production and transcriptional alteration [J]. *BMC Plant Biology*, 2011, 11: 55. DOI:10.1186/1471-2229-11-55.
- [45] MITSUYA Y, TAKAHASHI Y, BERBERICH T, MIYAZAKI A, MATSUMURA H, TAKAHASHI H, TERAUCHI R, KUSAANO T. Spermine signaling plays a significant role in the defense response of *Arabidopsis thaliana* to cucumber mosaic virus [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2009, 166(6): 626–643. DOI:10.1016/j.jplph.2008.08.006.

(责任编辑 张辉玲)