

# 2023年小麦新基因挖掘和遗传改良新技术研究回眸

叶兴国,林志珊,王轲,唐华丽,韩志阳

中国农业科学院作物科学研究所,北京 100081

**摘要** 2023年小麦生物育种相关研究取得了重要进展:挖掘了调控小麦高产、抗病、抗旱、耐低温等性状相关的新基因,创制了具有高产、抗病、优质等性状的新种质,构建了大批量EMS突变体库,完善了利用引导编辑系统编辑小麦内源基因和诱导系诱导小麦单倍体的技术体系,丰富了小麦基因组测序数据的覆盖度和多态性。今后需要注重这些新基因、新种质、新技术和新测序数据在小麦育种中的应用,充分发挥它们的作用。尤其是尽可能将多个优良基因或性状进行聚合,培育兼具高产、多抗、优质等多个优良性状的小麦品种。同时,加强小麦抗蚜虫、耐高温和高光效等性状的研究,努力解决小麦生产中的实际问题。

**关键词** 小麦;生物技术;基因挖掘;遗传改良;种质资源

小麦是全球最重要的粮食作物之一,其产量和品质关系到全球粮食安全和社会经济发展。尤其在中国,小麦种业发展备受各级政府的高度重视。近几年,受到经济效益的影响,玉米种植面积呈现稳步上升势头,小麦种植面积出现波动。在种植面积下降对小麦生产造成冲击的同时,小麦生长期间锈病、白粉病、赤霉病、黄花叶病毒病、黄矮病、蚜虫等生物胁迫,以及穗发芽、干旱、盐碱、高温、低温等非生物胁迫也依然不同程度影响着小麦的产量和品质,需要利用生物育种技术持续改良小麦对生物胁迫和非生物胁迫的抗性及其品质和生长发育特

性等。挖掘突破性的基因资源、开发新型生物育种技术是遗传改良小麦各种性状,提高产量的关键步骤。本文就2023年小麦遗传改良中新基因挖掘和新技术开发等研究进行简要回顾。

## 1 小麦新基因挖掘

### 1.1 抗病新基因

小麦锈病、白粉病和赤霉病等主要病害属于真菌性病害,黄花叶病毒病和黄矮病等病害由病毒引起,这些病害在中国乃至世界小麦主产区经常发

收稿日期:2023-12-18;修回日期:2023-12-28

基金项目:国家自然科学基金项目(32272180)

作者简介:叶兴国,研究员,研究方向为小麦生物技术育种,电子信箱:yexingguo@caas.cn

引用格式:叶兴国,林志珊,王轲,等. 2023年小麦新基因挖掘和遗传改良新技术研究回眸[J]. 科技导报, 2024, 42(1): 174-187; doi:10.3981/j.

issn.1000-7857.2024.01.011

生,危害植株叶片、叶鞘、茎秆和穗部等器官,影响光合作用、呼吸系统和新陈代谢,抑制小麦正常生长,导致绿色组织逐步枯萎、死亡,不仅降低小麦产量,还降低营养品质和加工品质。克隆和利用抗病基因,培育抗病小麦品种是防治小麦病害最经济、安全、有效的策略。

前期鉴定结果表明,来自小麦近缘物种拟斯卑尔脱山羊草的抗叶锈病基因 *Lr47* 对目前叶锈菌流行小种具有全生育期的广谱抗性。北京大学 Li 等<sup>[1]</sup>利用中国春 *ph1b* 突变体诱导拟斯卑尔脱山羊草 7S 与小麦 7A 部分同源染色体配对和重组,在对 *Lr47* 精细定位的基础上,结合改进的 MutRNASeq 方法,获得了 *Lr47* 的候选基因;进一步利用甲基磺酸乙酯(ethylmethylsulfone, EMS)突变体、大麦条纹花叶病毒-小向导 RNA(barley stripe mosaic virus-small guide RNA, BSMV-sgRNA)介导的基因编辑和转基因互补实验,鉴定了候选基因的功能;通过开发 *Lr47* 基因的选择性分子标记,发现 *Lr47* 只存在于极少数拟斯卑尔脱山羊草材料中。另外一个小麦叶锈病抗病位点 *Lr9* 位于小麦 6BL 末端,是 20 世纪 50 年代采用种间杂交结合 X 射线辐射小伞山羊草导入小麦的染色体易位片段。由于易位系中易位的非同源染色体不能发生交换和重组,无法通过传统的图位克隆策略克隆易位片段上的 *Lr9* 基因。为此,沙特阿卜杜拉国王科技大学 Wang 等<sup>[2]</sup>综合运用 EMS 诱变及突变体筛选、野生型材料 PacBio 三代全长转录组测序、突变体二代转录组测序及后续的数据分析,开发了一种基于 EMS 突变体转录组测序的基因克隆技术 MutIsoSeq,将目标基因的转录本与表型直接关联,实现了完全不依赖于重组和遗传定位的 *Lr9* 的克隆,发现 *Lr9* 编码的蛋白为 N 端含有 2 个串联重复的激酶、C 端含有 von Willebrand factor A (vWA) 和 Vwaint 结构域的新型抗病蛋白 WTK6-vWA。

*YrNAM* 基因在小麦近缘物种高大山羊草和沙融山羊草中存在同源基因,但并没有在小麦育种和生产中广泛应用。山东农业大学 Ni 等<sup>[3]</sup>在开发小麦性状关联突变体测序技术的基础上对野生型 P10-46 进行全长转录组测序和 7 个独立突变体进

行普通转录组测序,继而构建非冗余全长转录本并作为参考序列检测突变体的变异位点,以基因为单位统计独立突变出现的次数,克隆了小麦抗条锈病基因 *YrNAM*。序列分析发现, *YrNAM* 基因编码一个具有 NAM 结构域和 ZnF-BED 结构域的非典型抗病蛋白,不含有抗病基因典型的 NLR 结构域。转基因功能鉴定结果表明, *YrNAM* 对部分小麦条锈菌具有良好抗性。

目前在小麦中克隆的抗秆锈病基因还比较少。前人已经将十倍体长穗偃麦草中的抗秆锈病基因 *Sr43* 以染色体易位方式转入了小麦,对 Ug99 小种具有很强的抗性。美国明尼苏达大学 Yu 等<sup>[4]</sup>首先对携带 *Sr43* 的小麦-长穗偃麦草易位系进行 EMS 诱变,获得感病突变体;然后对易位系和感病突变体的易位染色体进行流式分选并测序,通过滑框分析和序列比对,发现其中一个 DNA 构架(scaffold)在突变体中具有变异位点,说明其存在 *Sr43* 的候选基因。进一步通过转录组测序及编码区(coding sequence, CDS)测序,发现 *Sr43* 具有 4 个可变剪切。转基因结果证明,该候选基因即为 *Sr43*,对秆锈病具有广谱抗性,且其抗性随温度升高而降低。澳大利亚联邦科工组织 Zhang 等<sup>[5]</sup>对携带 *Sr9* 不同等位基因的品种进行 EMS 诱变,对感病突变体进行 MutRenSeq,获得了一个共有的候选基因,分别在 *Sr9b*、*Sr9e*、*Sr9g* 和 *Sr9h* 遗传分离群体中进行验证,发现该基因与抗病性共分离。转基因结果显示,转基因植株表现为抗病,证明所克隆的基因就是 *Sr9*。

小麦抗白粉病基因虽然鉴定的比较多,但克隆的比较少。中国科学院 Han 等<sup>[6]</sup>通过小黑麦和小麦杂交、回交和田间抗性评价,创制了 2 个不同黑麦亲本来源的小麦-黑麦抗白粉病新种质 TR1 和 TR3,将其所携带的抗病新基因 *PmTR1* 和 *PmTR3* 均定位于黑麦 6RS 染色体上。其中, *PmTR1* 的抗性随生育进程而增强, *PmTR3* 表现为全生育期广谱抗性。利用 <sup>60</sup>Co- $\gamma$  射线辐照 TR1 和 TR3 开花期的穗部,创制大量小片段易位系/缺失系,物理定位锁定较小区间后,根据 *PmTR1* 的生育期抗性特点结合转录组分析获得 *PmTR1* 的 6 个候选基因,进一步利用大麦条纹花叶病毒介导基因沉默(barley stripe

mosaic virus induced gene silencing, BSMV-VIGS) 和 EMS 突变体分析锁定了唯一的候选基因。转化感病小麦品种的验证试验表明, 候选基因具有抗白粉病功能。由于 *PmTR3* 与 *PmTR1* 的物理定位区间存在一定重叠, 进一步根据 *PmTR1* 的序列信息克隆了其在 TR3 中的等位基因, 利用 BSMV-VIGS 和转基因试验证实了 *PmTR3* 基因的准确性。

抗白粉病基因 *Pm69* 来源于野生二粒小麦材料 G305-3M, 位于小麦 6BL 染色体末端, 是一个完全显性的广谱抗病基因。以色列海法大学 Li 等<sup>[7]</sup> 利用长读长测序技术对 G305-3M 进行测序, 获取了 *Pm69* 定位区段内的 DNA 重叠群(contig)序列, 结合 EMS 突变体的转录组测序快速锁定 *NLR-6* 为 *Pm69* 的候选基因。利用 VIGS 技术进行的功能验证结果表明, *NLR-6* 为 *Pm69* 基因。*Pm69* 是快速进化的 R 基因簇中的一个非常稀有的 NLR 类基因, 对 55 个来自不同国家的白粉菌生理小种均表现为免疫或高抗, 具有较好的育种应用价值。

小麦中的 NLR 免疫受体蛋白 Pm2a 可感知白粉菌效应蛋白 AvrPm2。瑞士苏黎世大学 Manser 等<sup>[8]</sup> 利用酵母双杂交筛选, 证实小麦锌指蛋白 TaZF 与 AvrPm2 互作, 沉默小麦中的 TaZF 降低了 Pm2a 介导的白粉病抗性。进一步研究发现, TaZF 蛋白中一段含有 DNA 结合基序的 66 个氨基酸短序列(约占 TaZF 长度的 30%) 足以与 AvrPm2 相互作用。发现小麦转录因子 TaZF 与 AvrPm2 和 Pm2a 互作, 并将 Pm2a 和 AvrPm2 从细胞质募集到细胞核中, 证明 TaZF 在 Pm2a 识别 AvrPm2 的抗病过程中充当促进剂的作用。

小麦黄花叶病毒病由土壤中的真菌携带和传播, 在小麦中缺乏抗源。日本国立农业和食品研究组织 Mishina 等<sup>[9]</sup> 用图位克隆方法克隆了位于小麦 3BS 染色体上抗黄花叶病主效基因 *Ym2*, 通过转基因互补实验、细菌人工染色体文库构建及测序、RNA 原位杂交、酶联免疫吸附剂测定等方法对 *Ym2* 进行了功能验证。进化分析证实该基因来源于小麦近缘植物沙融山羊草, 抗病鉴定发现 *Ym2* 在小麦根系中发挥作用, 在病毒侵染的源头上发挥抗病作用, 具有重要的应用价值。

宁波大学 Liu 等<sup>[10]</sup> 利用基因芯片对 2 个小麦群体中的黄花叶病抗性位点进行全基因组关联分析, 在 2D 染色体上筛选到 1 个关键的抗病位点。进一步通过重组自交系群体和双单倍体群体构建及标记开发、基因分型等研究, 对抗病位点进行数量性状位点(quantitative trait locus, QTL) 定位, 鉴定到候选基因 *TraesCS2D02G513600*, 隶属小麦木瓜类半胱氨酸蛋白酶家族成员 TaRD21A; 分别在抗/感小麦品种中克隆到 TaRD21A<sup>R</sup> 和 TaRD21A<sup>S</sup> 基因, 发现二者仅第 96 位氨基酸存在差异(TaRD21A<sup>S</sup> 为丙氨酸, TaRD21A<sup>R</sup> 为苏氨酸), 过表达 TaRD21A<sup>R</sup> 显著抑制黄花叶病毒的侵染。

小麦黄矮病由携带病毒的蚜虫传播, 在小麦及其近缘植物中鉴定的抗性基因非常稀少。河南农业大学 Wang 等<sup>[11]</sup> 对过表达来自黄矮病毒的 17K 蛋白编码基因的转基因小麦株系进行免疫沉淀和质谱分析, 发现核定位信号序列(NLS) 介导 17K 蛋白与核转运受体蛋白 Importin- $\alpha$  互作, 使 17K 蛋白借助小麦的核蛋白转运系统进入细胞核。利用病毒介导的基因沉默技术, 在大麦中证明 Importin- $\alpha$  是 17K 蛋白高效进入细胞核所必需的因子。进一步利用成簇规律性间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeat sequences, CRISPR/Cas9) 技术编辑小麦中的 6 个 *Importin- $\alpha$*  基因, 创制了不同等位基因发生敲除的突变体组合, 其中, 突变体  $\alpha 1aaBBDD/\alpha 2AAbbdd$  和  $\alpha 1aabbbdd/\alpha 2AAbbDD$  对黄矮病的抗性显著增强。另外发现, 过多的 *Importin- $\alpha$*  基因缺失显著抑制植株生长, 但较少的 *Importin- $\alpha$*  基因缺失抗病能力提高不明显。因此, 恰当降低 *Importin- $\alpha$*  基因表达对于提高小麦黄矮病的抗性至关重要。

## 1.2 产量相关性状新基因

小麦籽粒产量主要取决于单位面积穗数、穗粒数和千粒重, 是小麦产量构成的三要素, 也受株高、株型和叶片持绿期等性状的影响。需要挖掘影响小麦株高、籽粒大小、粒重、分蘖数和穗粒数等性状的关键基因, 不断提高小麦产量。众所周知, 20 世纪中叶培育的小麦品种中普遍携带 *Rht-B1b* 或 *Rht-D1b* 等矮秆基因, 显著降低了株高, 提高了收

获指数,解决了倒伏问题,实现了单产的大幅度提升,开启了小麦的“绿色革命”。但是,*Rht-B1b*或*Rht-D1b*等位变异同时存在粒重和氮素利用效率显著降低等不良效应。因此,利用新的矮秆基因资源,培育不依赖于*Rht1-B1b*或*Rht1-D1b*的半矮秆小麦品种,一直是小麦遗传育种领域关注的热点问题之一。

针对上述问题,中国农业大学开展了卓有成效的研究工作。Song等<sup>[12]</sup>基于正向遗传学策略,在小麦4BS染色体上鉴定到一个协同提升产量和氮素利用效率的半矮秆位点,发现该位点为一段500 kb左右、包括3个紧密连锁基因(*Rht-B1*、*EamA-B*和*ZnF-B*)的大片段缺失(命名为*r-e-z*单倍型)。与绿色革命基因型*Rht-B1b*相比,*r-e-z*单倍型保持了半矮秆株型,且茎秆强度、耐密性、收获指数、千粒重和产量等显著提升。在群体水平下,缺失单倍型增产10%以上。进一步利用基因编辑技术创制了*Rht-B1*、*EamA-B*和*ZnF-B*基因不同类型突变体,发现*Rht-B1*功能丧失导致株高、穗长和粒重显著增加,*ZnF-B*功能缺失表现为株高和千粒重降低但穗长没有显著变化,*EamA-B*功能丧失不影响小麦表型<sup>[12]</sup>。

随后,Zhang等<sup>[13]</sup>在小麦中鉴定到直接调控细胞分裂素氧化酶/脱氢酶*TaCKX*基因表达的转录因子*TaMADS-GS*,其在籽粒发育早期高表达。利用CRISPR/Cas9技术获得了*Tamads-gs-ad*敲除系和*Tamads-gs-d*敲除系,发现突变体中胚乳细胞数目减少、胚乳细胞化进程延迟,粒长、粒宽、千粒重显著降低,而株高、穗长、小穗数、穗粒数、淀粉含量和蛋白含量没有显著差异。对233份小麦种质资源中*TaMADS-GS*等位变异进行分析的结果表明,*TaMADS-GS-A*存在4种等位变异类型,其中,*Hap1*对*TaCKX*具有更强的抑制作用,且携带*Hap1*材料的籽粒较大、千粒重较高。统计分析发现,*Hap1*在育成品种和地方品种中的占比分别为68%和15%;认为*Hap1*是调控粒重的优异等位变异,是小麦高产育种中新的基因资源。在另一项研究中,Li等<sup>[14]</sup>以小麦品种长6878为材料,利用EMS诱变获得了矮秆、圆粒突变体*mu-597*。通过构建分离群体和图位

克隆,发现*mu-597*中肌动蛋白编码基因*TaACT7-D*发生了1个碱基突变,导致其编码的*TaACT7*蛋白第65位氨基酸变化;突变类型的*TaACT7-D*<sup>G65S</sup>虽然能与野生型的*TaACT7*互作,但其形成多聚体的能力显著降低。因此,认为突变类型*TaACT7-D*<sup>G65S</sup>的积累干扰了小麦细胞中单体肌动蛋白向聚集态丝状肌动蛋白的动态转变,导致细胞骨架重塑发生异常,表现出植株矮化和籽粒变圆的表型,是小麦株型与粒型协同改良的基因资源。

中国农业科学院围绕产量性状相关基因挖掘同样做了很多工作。Dong等<sup>[15]</sup>在小麦品种偃展4110的EMS突变体库中筛选到一个分蘖显著减少的突变体*tn1*,形态学和组织学观察发现*tn1*茎基部能够形成分蘖芽,但不能正常伸长。遗传分析表明,*tn1*的寡分蘖性状由1对隐性等位基因控制。通过图位克隆将候选基因定位在染色体6BS末端约352 kb区段内,包含12个候选基因。通过测序分析,发现只有*TraesCS6B02G013100*基因的第二个外显子上存在2个碱基的突变(SNP<sup>G373A</sup>和SNP<sup>G392A</sup>),分别造成了2个氨基酸的变化,视为*TN1*的候选基因。遗传互补试验结果表明,*TraesCS6B02G013100*能够使突变体少分蘖的表型恢复正常,证明*TraesCS6B02G013100*就是*TN1*基因。在另一项研究中,Kong等<sup>[16]</sup>利用基因编辑敲除小麦*TaARF12*基因,发现转基因植株比含有绿色革命基因的野生型植株进一步变矮,同时,茎秆变粗,穗增大。突变体由于株型改善,穗粒数增加14.7%,千粒重增加3.9%,产量增加11.1%以上,显示出明显的增产效应,意味着能通过*TaARF12*基因创制矮秆大穗小麦,在“绿色革命”品种基础上进一步提高小麦产量。

另外,Xie等<sup>[17]</sup>从小麦品种偃展1号突变体库中鉴定到一个显性矮秆圆粒突变体*drg1-D*,突变体株高矮于野生型,籽粒变短呈近圆形。对*drg1-D*进行的组织学观察发现,其农艺性状的变化是由于其细胞形状改变和无规则排列所致。利用图位克隆、遗传互补和基因编辑等方法克隆到调控株高与粒形的新基因*DRG1*,其编码一个参与微丝形成的肌动蛋白。进一步研究发现,*DRG1*突变影响了微

丝延伸的方向和微丝聚合的稳定性,导致突变体植株矮化、籽粒缩短。最近,Liu等<sup>[18]</sup>在对中国262个微核心种质的全基因组关联分析中,发现小麦7AS染色体上存在一个与千粒重显著关联的QTL位点。结合对千粒重差异显著的F<sub>2</sub>分离群体进行的BSR-seq分析、育种和驯化选择谷分析,以及LD区段内的差异基因表达分析,确定候选基因为海藻糖-6-磷酸-磷酸酶编码基因*TaTPP-7A*,在发育籽粒的糊粉层中高水平表达。过表达*TaTPP-7A*转基因小麦植株的千粒重、单株产量和粒长显著增加,成熟期提前;基因编辑敲除突变体则表现出相反的趋势,证实*TaTPP-7A*是调控千粒重和产量的正向功能基因。

山东农业大学Yan等<sup>[19]</sup>在克隆调控小麦株高和单株穗数基因*TaCRTISO-1B*(编码类胡萝卜素异构酶)的基础上,利用CRISPR/Cas9技术敲除*TaCRTISO*基因,突变体株高降低,但在低光强下单株穗数增多;在高光强下2个等位基因敲除和3个等位基因敲除突变体单株穗数减少,变异程度与敲除位点数目有关,存在剂量效应。深入分析发现,*TaCRTISO*可能通过影响光合作用、活性氧含量和独脚金内酯信号途径的基因表达水平调控小麦植株的生长发育。根据该基因在大量小麦种质资源中的变异类型和表型鉴定,发现2种*TaCRTISO-1B*优异单倍型具有降低株高和增加单株穗数的作用。

### 1.3 生长发育相关性状新基因

2023年,中国河南等省小麦主产区“烂场雨”现象造成严重的穗发芽灾害,小麦抗穗发芽再度引起广泛关注。西北农林科技大学Tai等<sup>[20]</sup>以680份小麦自然群体为材料,通过表型测定获得了25组与穗发芽相关的表型数据。利用混合模型建立了这些表型数据与wheat SNP660K芯片数据的关联,在小麦基因组上定位到102个与穗发芽性状显著的QTL位点。通过与拟南芥、水稻、玉米和大麦中控制种子休眠、萌发与穗发芽基因的同源序列比对,得到了330条小麦同源基因序列信息;将候选QTL与小麦已知基因和同源基因比对,发现53个小麦穗发芽相关新QTL位点;随后利用小麦基因表达数据库信息,结合对QTL区域内SNPs位点重

要性的分析,发现*TaPI4K-2A*作为其中一个新位点的因果基因,是小麦穗发芽的关键调控因子。重测序和单基因关联结果发现,*TaPI4K-2A*的启动子区和编码区分别存在与穗发芽显著相关的SNPs,据此将*TaPI4K-2A*分为2个主要的单倍型,含有*TaPI4K-2A<sup>Hap1</sup>*的品种穗发芽抗性较强,含有*TaPI4K-2A<sup>Hap2</sup>*的品种穗发芽抗性较弱。*TaPI4K-2A*基因及其自然变异位点的挖掘,为利用分子育种手段培育穗发芽抗性品种提供了新的靶标基因。

虽然过表达*GRF4-GIF1*嵌合基因和*TaWOX5*基因能够显著提高小麦再生效率和遗传转化效率,但可以利用的再生相关基因非常有限。中国科学院Liu等<sup>[21]</sup>利用RNA-seq、ATAC-seq、CUT&Tag等技术绘制了小麦再生过程的转录和染色质动态图谱,搭建了一个顺序的转录调控网络,从中鉴定到446个核心转录因子,推测它们可能参与介导小麦品种遗传转化效率的差异。通过与拟南芥再生过程涉及的调控因子进行比较分析,鉴定到2个与小麦幼胚再生关系密切的新基因*TaDOF3.4*和*TaDOF5.6*,其过表达能显著提高多个小麦品种的遗传转化效率。山东农业大学Yu等<sup>[22]</sup>研究发现,过表达*TaLAX1*基因能够显著提高小麦芽再生能力,从而提升了遗传转化和基因编辑效率。进一步研究表明,*TaLAX1*通过激活*TaGRF4*、*TaGIF1*、细胞分裂素合成及生长素转运相关基因的表达,发挥了促进小麦再生植株的作用,丰富了提高植物遗传转化效率可以利用的基因资源。

近几年,尽管杂交小麦研究取得了一定进展,但缺乏优良稳定不育系的问题依然存在,对光温敏不育系的研究还不够深入。山东省农业科学院Zhang等<sup>[23]</sup>通过对小麦小分子RNA测序数据进行分析,在雌雄蕊分化期和四分体期的小麦幼穗中鉴定到大量21-nt和24-nt phasiRNA,暗示phasiRNA可能在小麦的生殖发育过程中发挥重要作用。随后选取phasiRNA合成路径中与雄蕊发育相关的3个关键基因*TaDCL4*、*TaDCL5*和*TaRDR6*,利用CRISPR/Cas9技术进行编辑,获得了雄性不育突变体。通过对这些突变体的小分子RNA测序,发现这3个基因参与了phasiRNA的产生过程,阐明了

其造成花粉败育的原因,为小麦雄性不育系创制提供了基因资源。北京大学 Xu 等<sup>[24]</sup>通过比较转录组分析鉴定到的种子植物中保守的、小孢子特异表达的多铜氧化酶 SCULP,选取小麦中的 *TaSCULP1* 基因进行表达模式分析,发现其在单核期和二核期小孢子外壁特异表达(这是已知孢粉素前体聚合阶段),纯化的 *TaSCULP1* 能够结合孢粉素酚类单元对香豆酸。证实 SCULP1 在小麦温敏雄性不育系 BS366 中的积累受到了损害,在不育条件下其表达部分恢复了外壁完整性和育性;认为 SCULP1 是调控小麦温敏不育的关键小孢子蛋白,维持花粉外壁完整性,参与小麦温敏不育信号途径,揭示了小麦温敏不育形成的分子新机制。

#### 1.4 抗逆相关性状新基因

进入 21 世纪以来,全球极端天气频繁出现,致使小麦生产受到严重影响,干旱、低温、盐碱、倒伏等越来越成为小麦减产的主要因素。2022 年底至 2023 年初,中国多地出现低温冻害,部分麦区出现了倒春寒,造成小麦植株大面积死亡、不育或结实率降低,降低了小麦产量。另外,小麦主要种植在干旱半干旱地区,每年 40% 的麦田受到不同程度的干旱胁迫。因此,探究并利用耐冷、抗旱基因对提高小麦适应性具有重要意义。目前,在小麦中已鉴定出一些耐冷、抗旱基因和相关通路,然而由于抗逆性是一个复杂的多途径调控系统,仍有许多未知调控途径需要探究。

河南农业大学 Zhang 等<sup>[25]</sup>通过整合全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS)和 BSR-Seq 数据,克隆了 2 个耐低温的关键基因 *TaSnRK1α* 和 *TaPAP6L*。利用 VIGS 技术对候选基因进行功能验证,发现 *TaSnRK1α* 是一个低温响应正调控基因;通过 EMS 突变体、过表达和基因编辑,证实 *TaSnRK1α* 正向调控小麦低温抗性;提出 *TaSnRK1α*-*TaPAP6L* 模块通过调控茉莉酸含量增强小麦低温抗性的新机制,为中国小麦耐冷育种提供了重要基因资源,并为小麦低温响应的遗传基础和调控机理解析奠定了一定的理论基础。

山东大学 Tian 等<sup>[26]</sup>通过 GWAS 分析,在小麦 4B 染色体上鉴定到一个经典且物种保守的耐旱主效

QTL 位点 *qDT4B*,曾在多个小麦耐旱遗传分析中定位到,在水稻等作物中也存在共线性区域,但该位点的关键基因一直未知。研究发现, *qDT4B* 中 WD40 蛋白编码基因 *TaWD40-4B.1* 的第 1274 位碱基发生了无义突变,导致 *TaWD40-4B.1* 提前终止;小麦自然群体中存在全长单倍型 *TaWD40-4B.1C* 和截短单倍型 *TaWD40-4B.1T*,携带 *TaWD40-4B.1C* 的小麦材料抗旱性明显高于携带 *TaWD40-4B.1T* 的小麦材料。对 *TaWD40-4B.1C* 和 *TaWD40-4B.1T* 过表达系和 RNAi 株系的表型鉴定证明, *TaWD40-4B.1C* 有助于提高小麦的抗旱能力和节水产量,而 *TaWD40-4B.1T* 无明显作用;过表达 *TaWD40-4B.1C* 能显著提高小麦的耐盐、耐碱和耐热能力,显示了 *TaWD40-4B.1C* 对非生物胁迫的广谱抗性和在小麦分子育种中的应用潜力。

中国农业科学院 Wang 等<sup>[27]</sup>在小麦抗旱基因挖掘方面开展了较多研究。通过筛选小麦品种矮抗 58 突变体库,克隆到控制干旱条件下苗期叶片萎蔫的功能获得型基因 *DIW1/TaPP2C158*,其属于蛋白磷酸酶 PP2C clade I 家族。对该基因过表达和 CRISPR 敲除株系进行的表型鉴定结果表明, *TaPP2C158* 负调控小麦抗旱性。通过关联分析找到了 *TaPP2C158* 提高保水力/抗旱性的优异单倍型,发现 *TaPP2C158* 的 C 端变异导致其蛋白磷酸酶活性不同,进而表现为不同单倍型小麦材料抗旱性指标的差异。真核生物中的雷帕霉素靶点(target of rapamycin, TOR)信号通路在进化上高度保守且在胁迫应答中发挥重要作用, Ma 等<sup>[28]</sup>发现 TOR 信号通路中的 *TaTIP41* 是一个受渗透胁迫及脱落酸(abscisic acid, ABA)诱导的基因,过表达 *TaTIP41* 提高了小麦耐旱性,而 RNAi 降低小麦耐旱性。进一步研究发现,该基因通过促进 ABA 介导的气孔关闭正向调控小麦耐旱性,且 *TaTIP41* 与 *TaTAP46* 互作。对 *TaTAP46* 过表达和 RNAi 株系进行的功能鉴定表明, *TaTAP46* 与 *TaTIP41* 的功能基本相同,发挥耐旱作用的机制类似。另外, *TaTIP41* 和 *TaTAP46* 均可与多个 *TaPP2A* 互作,利用 VIGS 在小麦中瞬时沉默 *TaPP2A* 的表达,显著提高了小麦的耐旱性。

西北农林科技大学 Wang 等<sup>[29]</sup>在小麦中发现,核定位的组蛋白甲基转移酶 TaATX4 在小麦干旱胁迫应答中作为 ABA 信号的负调节因子发挥作用,ABA 和水分亏缺均可诱导 TaATX4 基因表达。在拟南芥 *atx4* 和 *atx5* 突变体中异源表达 TaATX4,部分互补了 *atx4* 突变体表型。进一步利用 CRISPR/Cas9 对小麦 TaATX4 基因进行编辑,获得了对 ABA 敏感且抗旱性显著提升的突变体株系;通过对 TaATX4 编辑株系进行转录组测序分析,发现 TaATX4 可调控 ABA 和干旱胁迫应答基因表达,进而调控小麦抗旱性。Li 等<sup>[30]</sup>最新的研究发现, TaGW2 基因过表达增强了小麦抗旱性,但导致灌溉条件下产量下降;相反,敲低或敲除 TaGW2 减弱了抗旱性,但显著增加了籽粒大小和重量; TaGW2 与 TaARR12 互作并促进其降解, TaARR12 抑制小麦的干旱反应,但不影响产量;敲除 TaARR12 突变体表现抗旱和增产;表明 TaGW2-TaARR12 调控模块对小麦干旱反应至关重要,为改良小麦抗旱性提供了可用的基因资源。

## 2 重要小麦新种质创制

### 2.1 抗病新种质

小麦赤霉病是中国小麦生产中最重要病害,每年发病面积约 2000 万  $\text{hm}^2$ ,严重时减产 30% 以上,含有 DON 毒素的籽粒不但不能食用,也不能饲用。近年来,赤霉病出现北移的现象,从小麦主产区黄淮南部地区向山东、河北等地甚至北方春麦区扩展。长期以来,小麦抗赤霉病育种缺乏理想抗源,育种进程缓慢。虽然在小麦资源内鉴定到苏麦 3 号等极少数抗病品种,但抗性水平非常有限。中国科学院 Guo 等<sup>[31]</sup>历经 20 多年的研究,发现小麦近缘植物-长穗偃麦草中含有高抗赤霉病的基因。利用远缘杂交、染色体工程、辐射诱变等技术将长穗偃麦草中的抗病基因引渗到了小麦基因组中,培育了高抗赤霉病的小麦-长穗偃麦草小片段易位系,进一步培育了中科 166 等国审小麦新品种,抗性水平显著高于之前国内培育和鉴定的抗病小麦品种,显示出良好的应用前景,可望在中国主要麦

区商业化种植。

之前的研究发现,携带抗叶锈病基因 *Lr47* 的小麦-拟斯卑尔脱山羊草易位系存在连锁累赘,导致小麦减产约 3.8%,并降低出粉率,增加面粉灰分含量等,限制了携带该基因易位系的育种应用。北京大学 Li 等<sup>[2]</sup>通过 *pb1b* 突变体诱导的部分染色体配对获得了大小为~36 Mb 和~13 Mb 的小麦-拟斯卑尔脱山羊草新型小片段易位系,并通过回交转育到中国主栽小麦品种扬麦 21 中。初步结果表明,获得的新易位系基本不存在不利连锁性状,促进了抗性基因 *Lr47* 的育种利用,为小麦抗叶锈病育种提供了新材料。

1966 年,转入小麦中的长穗偃麦草抗叶锈病基因 *Lr19* 一直保持着优良的广谱抗性,由于长穗偃麦草染色体与小麦染色体不发生交换,该基因一直没有精细定位和克隆。*Lr19* 与叶黄素相关基因紧密连锁,使其面粉呈黄色,导致其育种应用受限。山东农业大学 Xu 等<sup>[32]</sup>利用含有 *Lr19* 的代换系 7E1 (7D) 与不含该基因的代换系 7E2 (7D) 构建遗传群体,经对  $F_1$ 、 $F_2$  和  $F_{2,3}$  代进行抗病性鉴定,将 *Lr19* 显性抗病基因定位于 7E1 染色体上。通过分子标记确认该基因位于 SSR 标记 *XBg262436* 和 *XBarc76* 之间,遗传距离分别为 2.4 cM 和 1.7 cM。利用中国春和二倍体长穗偃麦草参考基因组和代换系重测序数据,以及 STS 标记,进一步将该基因精细定位于 *XsdauK3734* 和 *XsdauK2839* 之间,遗传距离分别为 0.2 cM 和 0.1 cM。利用中国春 *ph1b* 突变体与易位系 K11695 杂交,创制 2 个携带 *Lr19* 基因的小片段易位系。其中,易位系 1—40 面粉呈白色,不含有类胡萝卜素合成基因 *PSY-E1*。

中国科学院 Han 等<sup>[6]</sup>通过开发和利用 *PmTR1* 及 *PmTR3* 基因特异的分子标记,创制了大量小片段易位系,可有效服务于 *PmTR1* 和 *PmTR3* 的染色体工程育种。河南农业大学的 Wang 等<sup>[11]</sup>针对小麦中的 6 个 *Importin- $\alpha$*  基因,利用基因组编辑技术获得了 9 种 *Importin- $\alpha$*  不同等位基因敲除的突变体,发现突变体  $\alpha 1\text{aaBBDD}/\alpha 2\text{AAAbdd}$  和  $\alpha 1\text{aabbdd}/\alpha 2\text{AAAbDD}$  对黄矮病毒的抗性显著增强,且不影响生长发育,证明了小麦 *Importin- $\alpha$*  基因在黄矮病毒

致病过程中的重要作用,创制了2种黄矮病抗性显著增强、具有潜在育种应用价值的新种质。

## 2.2 高产和优质潜力新种质

中国农业大学 Song 等<sup>[12]</sup>对 *r-e-z* 单倍型的分析结果发现,增产的缺失单倍型为稀有的变异类型,仅在中国的12份种质资源中存在。通过标记辅助选择策略,结合常规育种,初步选育出4个整合 *r-e-z* 单倍型的高产、半矮秆小麦苗头品系,在群体条件下产量比高产主栽品种良星99提高6.5%~15.2%。利用 *r-e-z* 单倍型介导的油菜素内酯 (Brassinolide, BR) 和赤霉素 (Gibberellic acid, GA) 激素再平衡,可望培育出矮秆抗倒、高产和氮素高效利用的小麦品种,克服长期以来生产上推广种植的“绿色革命”小麦品种在进一步提高产量方面的局限。

前期的相关研究表明,小麦近缘种属高大山羊草 1S 染色体上携带优质高分子量麦谷蛋白亚基和低分子量麦谷蛋白亚基编码基因,对小麦加工品质改良具有积极作用。笔者实验室利用体细胞无性系变异手段,借助分子标记筛选和原位杂交鉴定,将高大山羊草 1SL 和 1S'S 染色体臂以易位方式与小麦 1B 染色体重组,培育了 1S'L·1BS 和 1BL·1S'S 易位系。进一步通过回交转育,结合分子标记辅助选择,将易位染色体 1S'L·1BS 和 1BL·1S'S 分别转育到农艺性状优良的宁春4号、宁春50号等小麦品种中,获得每个遗传背景改良的新易位系。40K 液相芯片结果显示,易位系与回交亲本相似度 91.18%~96.37%。1BL·1S'S 易位系中谷蛋白含量显著增加,1S'L·1BS 易位系中谷蛋白大聚体含量显著减少,2类易位系面包品质均明显提高<sup>[33]</sup>。

## 3 基因编辑技术和诱导系诱导单倍体技术完善

### 3.1 基因编辑技术

基因组编辑可以对生物的遗传信息进行精准、高效的修饰,已经成为改良小麦等植物的重要技术,胞嘧啶碱基编辑系统和腺嘌呤碱基编辑系统将 CRISPR 为代表的基因组编辑技术引入了精准

编辑新时代。但目前利用的碱基编辑系统的核心元件-脱氨酶都来自于人、哺乳动物或鱼类等真核生物,家族单一,在基因编辑过程中存在效率不够高、序列有偏好性以及潜在的脱靶风险等问题。

中国科学院 Huang 等<sup>[34]</sup>通过人工智能软件 AlphaFold2 对多个代表性的具有脱氨潜力的蛋白质序列进行了结构预测,结合蛋白质结构的多重比对和代表性成员的活性检测,发现了新的来自于细菌的脱氨酶家族,包括单链胞嘧啶脱氨酶 (Sdd) 和双链胞嘧啶脱氨酶 (Ddd)。基于这些脱氨酶开发了一系列新型碱基编辑系统,涉及 Ddd1 和 Ddd9 脱氨酶的双链碱基编辑系统,克服了常规编辑器对 GC 序列编辑效率明显降低的缺陷;涉及 Sdd7 和 Sdd3 的单链碱基编辑系统,展现出了非常高的编辑活性,在 GC 序列同样具有可观的碱基编辑能力;涉及 Sdd6 的单链碱基编辑系统具有极高的特异性,几乎检测不到脱靶事件。利用开发的 Sdd7-CBE 系统,在大豆中获得了稳定编辑植株,显著提高了碱基编辑效率,而利用常规基因组编辑技术没有获得编辑植株。在此基础上, Hu 等<sup>[35]</sup>开发了一种突破 CRISPR 限制的模块化结构的碱基编辑系统 CyDENT,在细胞核、线粒体和叶绿体中均实现了有效的胞嘧啶碱基编辑,不但具有广泛基因组靶向能力和编辑特异性,而且能够实现具有单链偏好性的碱基编辑。在水稻原生质体细胞核和叶绿体等器官中均实现了高效的胞嘧啶碱基编辑,显著提高了编辑的精准度,降低了脱靶风险。

中山大学 Xiong 等<sup>[36]</sup>从插入 nCas9 内部的脱氨酶结构域入手,将碱基编辑器拆分为 N 端和 C 端两部分,使脱氨酶和 nCas9 同时失活,以防止脱氨酶的组成型活性造成 gRNA 非依赖性脱靶。在靶位点处,利用 gRNA 作为分子胶将拆分的两部分稳定重构为具备完全活性的碱基编辑器,从而实现中靶编辑。建立了简单普适的 CBE/ABE 脱靶消除策略——分裂脱氨酶安全编辑 (split deaminase for safe editing, SAFE),在水稻、拟南芥等生物中实现了高效、低脱靶的碱基编辑。

虽然 SpCas9 是目前应用最为广泛的 CRISPR 系统,但 SpCas9 主要识别 5'-NGG-3' PAM,特别是

A/T 富集区域的编辑。目前开发的可识别不同 PAM 的新 Cas 系统中, PAM 较长, 可编辑位点较 Sp-Cas9 更为稀少; 可识别宽广 PAM 的 SpCas9 变体在植物中的编辑效率有限, 且存在一定程度的自编辑效应。因此, 亟待开发具有高编辑性能的植物新型 CRISPR-Cas9 系统。电子科技大学 Zhong 等<sup>[37]</sup>针对植物基因组编辑工具开发瓶颈问题, 综合运用生物信息学方法, 在细菌基因组中挖掘到了一个来源于益生菌鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) 的新型 CRISPR-Cas9 系统 LrCas9, 构建了具有高编辑活性、高特异性且识别 A/T 富集 PAM 的基因组编辑新工具, 可特异识别 5'-NGAAA-3' PAM 位点, 在水稻和小麦等植物中均可实现有效的基因组编辑。此外, 还发现 LrCas9 在相同的位点较 LbCas12a 和 SpCas9 变体具有更高的编辑活性。进一步, 利用 LrCas9 系统在水稻中对 *O<sub>s</sub>Wx* 基因的启动子进行编辑, 获得了直链淀粉含量变化的新种质。

引导编辑系统作为一种新型基因组编辑工具, 可以实现植物基因组任意碱基的替换, 以及小片段的插入和删除, 并在与位点特异性重组酶耦合时展现出高效、精准、大片段定点插入的潜力。与水稻等二倍体物种不同, 小麦等多倍体植物中的引导编辑效率依然很低, 难以有效利用, 开发高效、稳定, 尤其适用于多倍体植物的引导编辑系统仍是研究的难点和热点。中国农业大学 Ni 等<sup>[38]</sup>通过在 *pegRNA* 3' 端添加不同的 RNA 基序、SpCas9 中引入氨基酸突变和改变核定位信号优化 nCas9-RT 融合蛋白结构、利用新的逆转录酶氨基酸突变位点 V223A 等策略, 对引导编辑系统进行改造, 开发了高效的再升级版植物引导编辑器, 在小麦中实现了对抗病、抗除草剂、品质性状等 2~8 个基因的同时编辑, 总编辑效率达 74.5%, 建立了高效、精准、稳定的多基因引导编辑系统, 拓宽了引导编辑系统在植物基因组编辑中的广适性。

### 3.2 快速直观鉴定单倍体籽粒技术

在前几年的研究中, 通过编辑小麦 *TaPLD/MTL* 基因创制了小麦单倍体诱导系, 以诱导系作为父本能够诱导母本产生 6%~20% 的单倍体籽粒, 显著提高了获得小麦单倍体植株的效率。然而, 利用

诱导系作为父本的杂交当代中的单倍体籽粒和二倍体籽粒在形态上难以区分, 需要进行繁琐的细胞学和 DNA 鉴定, 延后了单倍体的加倍时间, 降低了加倍效果和工作效率。中国农业科学院 Tang 等<sup>[39]</sup>和中国农业大学 Qi 等<sup>[40]</sup>分别利用小麦 *TaMTL/PLD* 单倍体诱导系与表达花青素基因 *ZmC1* (胚芽鞘呈现紫色) 的转基因小麦杂交, 获得了携带 *ZmC1* 基因的小麦 *TaMTL* 单倍体诱导系 HIPC 或 PCI。以 HIPC 或 PCI 作为父本与其他小麦材料杂交, 籽粒萌发后胚芽鞘呈现白色的为单倍体, 胚芽鞘呈现紫色的为二倍体<sup>[39-40]</sup>。通过比较多个谷类作物种子特异启动子调控花青素基因 *ZmC1* 和 *ZmR* 在小麦胚中的表型, 发现 pBD68 双向启动子调控 2 个花青素基因的转基因植株 (TRC) 的幼胚和成熟胚完全紫色。进一步将 TRC 纯合株系与 *TaMTL* 单倍体诱导系杂交或利用 *TaPLD* 单倍体诱导系转化由胚特异启动子调控 2 个花青素基因的载体, 创制了携带花青素基因 *ZmC1* 和 *ZmR* 的小麦 *TaMTL/PLD* 单倍体诱导系 HIPE 或 PEI。以 HIPE 或 PEI 作为父本与其他小麦材料杂交, 杂交籽粒中表现紫色胚的为二倍体, 表现白色胚的为单倍体。细胞学鉴定和 DNA 含量测定等验证结果表明, 根据胚色直观鉴定小麦杂交后代中单倍体籽粒的准确率为 100%<sup>[39-40]</sup>, 这大大减轻了鉴定单倍体的工作量, 提高了鉴定的准确性, 将显著促进小麦单倍体育种工作高效开展。

## 4 基因组测序和突变体库建立

### 4.1 基因组测序

从复杂的小麦基因组中克隆基因仍然具有挑战性, 基因组测序数据可以为从小麦中克隆新基因提供极大便利。目前, 虽然报道了几个版本的小麦基因组测序数据, 但测序数据的覆盖度和多态性还不够, 需要不断丰富小麦基因组测序数据。河南农业大学 Jia 等<sup>[41]</sup>完成了中国小麦优异骨干品种矮抗 58 基因组测序和高质量组装, 建立了多组学数据库。通过比较矮抗 58 与中国春的基因组, 认为近百年来小麦育种改良引起的基因组变异和亚基因

组间同源基因的优化重组是遗传改良的基因组基础。开发了基于多倍体位点单倍型差异的全基因组关联分析方法 HGWAS, 比基于单个同源基因的 GWAS 能更有效地解析重要农艺性状相关位点, 为小麦及其他相关研究提供了丰富的多组学信息。崖州湾国家实验室 Niu 等<sup>[42]</sup>通过对 355 份中国和美国育成的小麦品种以及地方品种进行表型评价和重测序分析, 发现育成品种表型和遗传多样性与地方品种相比均发生了很大改变。现代育成品种比地方品种产量高、株高降低、开花期缩短。中国育成品种主要通过增加籽粒大小、穗粒数和千粒重提高产量, 而美国主要依靠增加分蘖数提高产量; 表明中美两国对小麦表型的重塑方面存在差异。进一步对多个农艺性状进行了 GWAS 分析, 鉴定到一批控制重要农艺性状的位点, 绘制了这些位点的基因型指纹图谱, 其中, 大部分位点的优异等位变异频率在中美品种中均明显增加, 但中国品种和美国品种增加幅度有所差异, 说明中美在育种过程中对这些位点进行了不同程度的趋同选择。

沙特阿卜杜拉国王科技大学 Ahmed 等<sup>[43]</sup>利用长读长测序分别完成了野生和驯化一粒小麦高质量染色体水平参考基因组, 发现 2 个一粒小麦基因组间具有很强的共线性, 同时与小麦 A 亚基因组之间也存在高度共线性; 然后组装出一粒小麦完整的着丝粒区域, 结合 ChIP-seq (CENH3+H3K4me3) 和转录组数据分析, 发现一粒小麦着丝粒具有高度动态性, 揭示了驯化一粒小麦从新月沃地扩散出去后复杂的杂交和基因渗入模式。北京大学 Wang 等<sup>[44]</sup>对栽培一粒小麦材料 PI 306540 进行测序, 得到了接近完整的基因组, 是迄今为止报道的小麦 A 基因组中最高质量的基因组组装。基于生信预测和转录组数据, 共注释到 37310 个高置信基因和 15858 个低置信基因。基于高置信度基因的共线性分析, 证实一粒小麦与乌拉尔图小麦以及四倍体和六倍体小麦中 A 亚基因组之间相似度很高。利用获得的基因组序列, 证实 PI 306540 中存在已克隆的抗秆锈病基因 *Sr21*、*Sr22b* 和 *Sr60*。利用一粒小麦基因组, 结合乌拉尔图以及已发表的小麦基因组, 对 5AL 染色体末端~9.5 Mb 片段进行了平均核苷酸一

致性分析, 确认了抗条锈病基因 *Yr34* 的来源。此外, 利用获得的一粒小麦参考基因组, 结合 BSR-seq、标记开发和群体连锁遗传分析, 在 PI 119435 中快速定位了一个新的抗叶锈病基因 *LrPI119435*, 发现其对中国叶锈菌小种 PHQS 具有很好的抗性。

河南大学 Li 等<sup>[45]</sup>整合了远缘杂交、快速渐渗、快速加代、非变性荧光原位杂交、高通量表型组和全外显子测序等技术, 创建了一个系统、标准化的将节节麦中的优良基因资源高通量快速渐渗到小麦中的技术体系 (A-Wi) 和平台。整个方案包括人工八倍体小麦的快速合成、节节麦基因组的快速渐渗和渐渗系渐渗基因的快速纯合, 利用该方案可以在 2 年内创制稳定的节节麦/小麦的高代纯合渐渗系, 将优异性状从节节麦渗入到现代小麦品种中。

#### 4.2 突变体库建立

全基因组或全外显子测序突变体库创建可为作物功能基因研究提供重要材料基础。尽管小麦外显子测序突变体库已有报道, 构建高容量、涵盖更多基因变异的突变体库对于小麦功能基因组研究非常必要。中国农业科学院 Xiong 等<sup>[46]</sup>利用 EMS、高能碳离子和  $\gamma$  射线等不同诱变方式处理小麦品种京 411, 创制了 2162 份小麦突变体。通过外显子捕获测序  $M_2$  或高代稳定突变体单株, 利用三代测序技术组装野生型京 411 基因组并结合重测序数据, 对突变位点进行校正, 共鉴定到 18025209 个突变位点, 有效突变覆盖 96.7% 的高置信度基因和 70.5% 低置信度基因, 每 kb 的 CDS 区平均检测到 47.1 个突变。PCR 测序结果表明, EMS 类型 SNP 突变位点阳性率为 94.5%, 非 EMS 类型 SNP 突变位点阳性率为 87.9%, InDel 阳性率为 81.4%; 缺失位点扩增验证表明, 79.1% 的大片段缺失为阳性。

中国科学院 Wang 等<sup>[47]</sup>利用 EMS 处理小麦品种科农 9204, 构建了包含 2090 个株系的突变体库, 在生育期、株型、穗型、叶型和籽粒性状可观察到高频率和广泛的表型变异。通过靶向科农 9204 基因组的全外显子组探针, 对突变体库和野生型科农 9204 进行捕获测序, 后经严格过滤共保留了 297 万个 SNP, 其中 97.26% 的 SNP 是 EMS 类突变, 随机验证表明, 超过 95% 的 SNP 是真实可靠的突变并能

稳定遗传。基因组中共有 98.79% 的编码基因发生了突变,在 99.41% 的位点中存在 3 个同源基因的全部突变,73.09% 的位点至少发生一个同源基因的突变。平均每个株系有 1383 个 EMS 类突变,整个诱变群体中每 kb 有 19.94 个突变。在突变体库中发现了很多与产量和农艺性状相关的关键基因的新等位变异,在黑麦来源的 1RS 区段也产生了大量突变,这些关键基因/区段的变异对于小麦改良具有重要应用潜力。

泉脉农业科技有限公司 Wang 等<sup>[48]</sup>以小麦新品种鲁研 128、济麦 38、济麦 44 和山农 30 为材料,利用 EMS 进行大批量处理,创制了百万级的小麦突变群体库。M<sub>1</sub> 代突变群体代中的表型变异非常丰富,鉴定到超过 3000 个叶绿素缺失突变体、2519 个密穗突变体和 1692 个雄性不育突变体植株。此外,还鉴定到一些罕见突变,如表皮蜡质减少的突变体和双穗突变体。创制的百万级小麦 EMS 突变群体是小麦基础研究和应用研究的宝贵资源,为小麦遗传学研究和小麦生物育种提供了一个极具价值的种质资源库,为定向培育优良小麦品种奠定了宝贵的种源基础。

## 5 展望

2023 年国内外围绕小麦多种性状的遗传改良,挖掘了与小麦高产、抗病、抗旱、耐低温等性状相关的新基因,创制了高产、抗病、优质等新种质和大批量 EMS 突变体,完善了利用引导基因编辑系统编辑小麦内源基因和诱导系诱导小麦单倍体的技术体系,丰富了小麦基因组测序的样本品种并提高了测序数据的覆盖度和多态性,取得了较大进展。然而,目前生产中防治小麦各种病害还主要依靠农药。下一步需要注重这些新基因、新种质、新技术和新测序数据在小麦育种中的应用,充分发挥它们的作用。尤其,尽可能将多个优良基因或性状进行聚合,培育兼具高产、多抗、优质等多个优良性状的小麦品种。

众所周知,蚜虫是危害小麦的主要害虫,灌浆期高温胁迫对小麦产量的影响越来越大,但围绕小

麦抗蚜、耐高温等性状开展的基因资源挖掘和材料创制的研究明显偏少。在过去的一年,中国农业大学 Wen 等<sup>[49]</sup>和 Wang 等<sup>[50]</sup>在小麦耐高温响应的分子机制方面进行了有价值的探讨,发现 TaHsfA1 蛋白的 SUMO 化修饰和 HSFA6e-HSP70 通路通过调控 mRNA 翻译调控小麦对高温的防御反应;另外, Niu 等<sup>[51]</sup>发现抑制小麦中天冬氨酸蛋白酶编码基因 APP1 的表达,能够阻止叶片在高温下的衰老,延长有效光合时间,显著提高了光合效率和粒重。最近,中国科学院 Dong 等<sup>[52]</sup>通过在 C<sub>3</sub> 作物水稻中表达 C<sub>4</sub> 蒺藜苜蓿来源的 SHR 基因,在水稻中建立了 C<sub>4</sub> 结构的维管束模型,为 C<sub>3</sub> 作物移植 C<sub>4</sub> 植物的光合作用工程奠定了基础。上述研究也为将水稻和 C<sub>4</sub> 植物中的耐热基因、高光效基因转入小麦,提高小麦光合效率和耐热性提供了借鉴。

CRISPR-Cas 系统从细菌/古菌的转座子进化而来,自然界很可能从这些强大的转座子基因中还创造了其他系统。美国哥伦比亚大学 Meers 等<sup>[53]</sup>通过回看 CRISPR-Cas9 的前身-跳跃基因(转座子),揭示了 CRISPR 系统中作为 DNA 剪刀的 Cas 蛋白进化的全过程,证实 RNA 引导的 DNA 核酸酶 TnpB 和 IscB 能够防止转座酶 TnpA 在转座过程中的永久性丢失,这有助于人类发现新的基因编辑工具,对于小麦等作物精准分子育种具有重要潜在应用价值。

## 参考文献 (References)

- [1] Li H, Hua L, Zhao S, et al. Cloning of the broad-spectrum wheat leaf rust resistance gene *Lr47* introgressed from *Aegilops speltoides*[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 6072.
- [2] Wang Y, Abrouk M, Gourdupis S, et al. An unusual tandem kinase fusion protein confers leaf rust resistance in wheat[J]. *Nature Genetics*, 2023, 55(6): 914-920.
- [3] Ni F, Zheng Y, Liu X, et al. Sequencing trait-associated mutations to clone wheat rust-resistance gene *YrNAM*[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 4353.
- [4] Yu G, Matny O, Gourdupis S, et al. The wheat stem rust resistance gene *Sr43* encodes an unusual protein kinase [J]. *Nature Genetics*, 2023, 55(6): 921-926.
- [5] Zhang J, Nirmala J, Chen S, et al. Single amino acid

- change alters specificity of the multi-allelic wheat stem rust resistance locus *Sr9*[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 7354.
- [6] Han G, Liu H, Zhu S, et al. Two functional CC-NBS-LRR proteins from rye chromosome 6RS confer differential age-related powdery mildew resistance to wheat[J/OL]. *Plant Biotechnology Journal*, 2023. [2023-12-18]. <https://doi.org/10.1111/pbi.14165>.
- [7] Li Y, Wei Z Z, Sela H, et al. Dissection of a rapidly evolving wheat resistance gene cluster by long-read genome sequencing accelerated the cloning of *Pm69*[J/OL]. *Plant Communications*, 2023. [2023-12-18]. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2023.100646>.
- [8] Manser B, Zbinden H, Herren G, et al. Wheat zinc finger protein TaZF interacts with both the powdery mildew AvrPm2 protein and the corresponding wheat Pm2a immune receptor[J/OL]. *Plant Communications*, 2023. [2023-12-18]. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2023.100769>.
- [9] Mishina K, Suzuki T, Oono Y, et al. Wheat *Ym2* originated from *Aegilops sharonensis* and confers resistance to soil-borne Wheat yellow mosaic virus infection to the roots[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2023, 120(11): e2214968120.
- [10] Liu P, Shi C, Liu S, et al. A papain-like cysteine protease-released small signal peptide confers wheat resistance to wheat yellow mosaic virus[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 7773.
- [11] Wang L, Zhang K, Wang Z, et al. Appropriate reduction of *importin- $\alpha$*  gene expression enhances yellow dwarf disease resistance in common wheat[J/OL]. *Plant Biotechnology Journal*, 2023. [2023-12-18]. <https://doi.org/10.1111/pbi.14204>.
- [12] Song L, Liu J, Cao B, et al. Reducing brassinosteroid signalling enhances grain yield in semi-dwarf wheat[J]. *Nature*, 2023, 617(7959): 118-124.
- [13] Zhang J, Zhang Z, Zhang R, et al. Type I MADS-box transcription factor *TaMADS-GS* regulates grain size by stabilizing cytokinin signalling during endosperm cellularization in wheat[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2023, 13(10): 1076.
- [14] Li X, Cao B, Du D, et al. *TaACTIN7-D* regulates plant height and grain shape in bread wheat[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2023, 50(11): 895-908.
- [15] Dong C, Zhang L, Zhang Q, et al. *Tiller number1* encodes an ankyrin repeat protein that controls tillering in bread wheat[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 836.
- [16] Kong X, Wang F, Wang Z, et al. Grain yield improvement by genome editing of *TaARF12* that decoupled peduncle and rachis development trajectories via differential regulation of gibberellin signalling in wheat[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2023, 21(10): 1990-2001.
- [17] Xie Z, Zhang L, Zhang Q, et al. A Glu209Lys substitution in *DRG1/TaACT7*, which disturbs F-actin organization, reduces plant height and grain length in bread wheat[J]. *New Phytologist*, 2023, 240(5): 1913-1929.
- [18] Liu H, Si X, Wang Z, et al. *TaTPP-7A* positively feedback regulates grain filling and wheat grain yield through T6P-SnRK1 signalling pathway and sugar-ABA interaction[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2023, 21(6): 1159-1175.
- [19] Yan Q, Lu Y, Pang Y, et al. *TaCRTISO* dosage modulates plant height and spike number per plant in wheat[J/OL]. *Plant Physiology*, 2023. [2023-12-18]. <https://doi.org/10.1073/pnas.2214968120>.
- [20] Tai L, Wu J, Jing Y, et al. A genome-wide association study uncovers that *TaPI4K-2A* regulates pre-harvest sprouting in wheat[J/OL]. *Plant Communications*, 2023. [2023-12-18]. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2023.100739>.
- [21] Liu X, Bie X M, Lin X, et al. Uncovering the transcriptional regulatory network involved in boosting wheat regeneration and transformation[J]. *Nature Plants*, 2023, 9(6): 908-925.
- [22] Yu Y, Yu H, Peng J, et al. Enhancing wheat regeneration and genetic transformation through overexpression of *TaLAX1*[J/OL]. *Plant Communications*, 2023. [2023-12-18]. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2023.100738>.
- [23] Zhang R, Zhang S, Li J, et al. CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of *TaDCLA*, *TaDCL5* and *TaRDR6* induces male sterility in common wheat[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2023, 21(4): 839-853.
- [24] Xu L, Tang Y, Yang Y, et al. Microspore expressed SCULP1 is required for *p*-coumaroylation of sporopollenin, exine integrity, and pollen development in wheat[J]. *New Phytologist*, 2023, 239(1): 102-115.
- [25] Zhang L, Zhang N, Wang S, et al. A *TaSnRK1 $\alpha$*  Modulates *TaPAP6L*-Mediated wheat cold tolerance through regulating endogenous jasmonic acid[J]. *Advanced Science*, 2023, 10(31): 2303478.
- [26] Tian G, Wang S, Wu J, et al. Allelic variation of *TaWD40-4B.1* contributes to drought tolerance by modulating

- lating catalase activity in wheat[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 1200.
- [27] Wang J, Li C, Li L, et al. *DIW1* encoding a clade I PP2C phosphatase negatively regulates drought tolerance by dephosphorylating TaSnRK1.1 in wheat[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2023, 65(8): 1918–1936.
- [28] Ma J, Geng Y, Liu H, et al. *TaTIP41* and *TaTAP46* positively regulate drought tolerance in wheat by inhibiting PP2A activity[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2023, 65(9): 2056–2070.
- [29] Wang Z, Zhang Y, Kang Z, et al. Improvement of wheat drought tolerance through editing of *TaATX4* by CRISPR/Cas9[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2023, 50(11): 913–916.
- [30] Li S M, Zhang Y F, Liu Y L, et al. The E3 ligase TaGW2 mediates transcription factor TaARR12 degradation to promote drought resistance in wheat[J/OL]. *Plant Cell*, 2023. [2023–12–18]. <https://doi.org/10.1093/plcell/koad307>.
- [31] Guo X, Shi Q, Wang M, et al. Functional analysis of the glutathione S-transferases from *Thinopyrum* and its derivatives on wheat Fusarium head blight resistance[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2023, 21(6): 1091–1093.
- [32] Xu S S, Lyu Z F, Zhang N, et al. Genetic mapping of the wheat leaf rust resistance gene *Lr19* and development of translocation lines to break its linkage with yellow pigment[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2023, 136(9): 200.
- [33] Qiu Y L, Han Z Y, Liu N T, et al. Effects of *Aegilops longissima* chromosome 1S<sup>1</sup> on wheat bread-making quality in two types of translocation lines[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2023, 137(1): 2.
- [34] Huang J, Lin Q, Fei H, et al. Discovery of deaminase functions by structure-based protein clustering[J]. *Cell*, 2023, 186(15): 3182–3195.
- [35] Hu J, Sun Y, Li B, et al. Strand-preferred base editing of organellar and nuclear genomes using CyDENT[J/OL]. *Nature Biotechnology*, 2023. [2023–12–18]. <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01910-9>.
- [36] Xiong X, Liu K, Li Z, et al. Split complementation of base editors to minimize off-target edits[J]. *Nature Plants*, 2023, 9(11): 1832–1847.
- [37] Zhong Z, Liu G, Tang Z, et al. Efficient plant genome engineering using a probiotic sourced CRISPR–Cas9 system[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 6102.
- [38] Ni P, Zhao Y, Zhou X, et al. Efficient and versatile multiplex prime editing in hexaploid wheat[J]. *Genome Biology*, 2023, 24(1): 156.
- [39] Tang H, Wang K, Zhang S, et al. A fast technique for visual screening of wheat haploids generated from *TaMTL*-edited mutants carrying anthocyanin markers[J]. *Plant Communications*, 2023, 4(3): 100569.
- [40] Qi X, Guo S, Zhong Y, et al. Establishment of an efficient haploid identification system by engineering anthocyanin accumulation in the wheat embryo[J]. *Plant Communications*, 2023, 4(3): 100568.
- [41] Jia J, Zhao G, Li D, et al. Genome resources for the elite bread wheat cultivar Aikang 58 and mining of elite homeologous haplotypes for accelerating wheat improvement[J]. *Molecular Plant*, 2023, 16(12): 1893–1910.
- [42] Niu J, Ma S, Zheng S, et al. Whole-genome sequencing of diverse wheat accessions uncovers genetic changes during modern breeding in China and the United States [J]. *The Plant Cell*, 2023, 35(12): 4199–4216.
- [43] Ahmed H I, Heuberger M, Schoen A, et al. Einkorn genomics sheds light on history of the oldest domesticated wheat[J]. *Nature*, 2023, 620(7975): 830–838.
- [44] Wang X F, Li H, Shen T, et al. A near-complete genome sequence of einkorn wheat provides insight into the evolution of wheat a subgenomes[J]. *Plant Communications*, 2023, 16: 100768.
- [45] Li H, Zhu L, Fan R, et al. A platform for whole-genome speed introgression from *Aegilops tauschii* to wheat for breeding future crops[J/OL]. *Nature Protocols*, 2023. [2023–12–18]. <https://doi.org/10.1038/s41596-023-009-22-8>.
- [46] Xiong H, Guo H, Fu M, et al. A large-scale whole-exome sequencing mutant resource for functional genomics in wheat[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2023, 21(10): 2047–2056.
- [47] Wang D, Li Y, Wang H, et al. Boosting wheat functional genomics via an indexed EMS mutant library of KN9204 [J]. *Plant Communications*, 2023, 4(4): 100593.
- [48] Wang W Q, Guan X Z, Gan Y, et al. Creating large EMS populations for functional genomics and breeding in wheat[J/OL]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2023. [2023–12–18]. <https://doi.org/10.1016/j.jia.2023.05.039>.
- [49] Wen J, Qin Z, Sun L, et al. Alternative splicing of *TaHS-FA6e* modulates heat shock protein-mediated translational regulation in response to heat stress in wheat[J]. *New Phytologist*, 2023, 239(6): 2235–2247.
- [50] Wang H, Feng M, Jiang Y, et al. Thermosensitive SU-

- MOylation of *TaHsfA1* defines a dynamic ON/OFF molecular switch for the heat stress response in wheat[J]. *The Plant Cell*, 2023, 35(10): 3889–3910.
- [51] Niu K X, Chang C Y, Zhang M Q, et al. Suppressing *ASPARTIC PROTEASE1* prolongs photosynthesis and increases wheat grain weight[J]. *Nature Plants*, 2023, 9(6): 965–977.
- [52] Dong W, Chang T, Dai H, et al. Creating a C4-like vein pattern in rice by manipulating short root and auxin levels[J/OL]. *Science Bulletin*, 2023. [2023–12–18]. <https://doi.org/10.1016/j.scib.2023.10.005>.
- [53] Meers C, Le H C, Pesari S R, et al. Transposon-encoded nucleases use guide RNAs to promote their selfish spread[J]. *Nature*, 2023, 622(7984): 863–871.

## Annual progress on new gene characterization and novel technology development for wheat genetic improvement in 2023

YE Xingguo, LIN Zhishan, WANG Ke, TANG Huali, HAN Zhiyang

Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

**Abstract** In the past year, dramatic progress on wheat genetic improvement was achieved, including the exploring of new genes related to high yield, disease resistance, and drought and low temperature tolerance, the development of new germplasm with ideal disease resistance and promising yield and good quality potential, the creating of EMS-induced mutants in a large scale, the improvement of prime editing technology used in wheat and haploid induction system by wheat edited mutant, and the enrichment of wheat genome sequencing data on coverage and polymorphism. In future studies, these genes, materials, technologies, and genome sequencing information should be better used in wheat breeding for fully playing their roles. Particularly, multiple available genes or traits can be pyramided by crossing or advanced techniques to develop ideal wheat varieties which have high yield, multiple resistances, and satisfying quality. Additionally, more researches on aphid resistance, high temperature tolerance, and high photosynthetic efficiency are necessary in this crop for reducing yield loss in wheat production.

**Keywords** wheat; biotechnology; gene exploring; genetic improvement; germplasm ●



(责任编辑 王丽娜)