

生物技术在小麦抗锈育种中的应用研究进展

李玲¹, 虎梦霞², 张文涛², 王万军³, 曹世勤^{4,5,6}, 黄瑾^{4,5,6},
张勃^{4,5,6}, 孙振宇^{4,5,6}, 贾秋珍^{4,5,6}

- (1. 兰州市农业科技研究推广中心, 甘肃 兰州 730030; 2. 甘肃省农业科学院小麦研究所, 甘肃 兰州 730070; 3. 天水市农业科学研究所甘谷绿色农业研究中心, 甘肃 甘谷 741200; 4. 甘肃省农业科学院植物保护研究所, 甘肃 兰州 730070; 5. 农业农村部天水作物有害生物野外科学观测实验站, 甘肃 甘谷 741200; 6. 农业农村部国家植物保护甘谷观测实验站, 甘肃 甘谷 741200)

摘要: 条锈病是小麦生产上最主要的病害之一, 培育抗锈新品种是提高产量和保障粮食安全的关键, 生物技术的快速发展有效促进了小麦重要性状相关基因的挖掘与利用。通过阐述了细胞工程、染色体工程、分子标记、基因编辑、全基因组关联分析等技术在小麦抗锈相关性状改良和应用中的研究现状, 分析了小麦抗锈育种中尚需解决的问题, 旨在为生物技术在甘肃小麦抗锈育种中的应用及其发展提供支持。

关键词: 生物技术; 小麦; 抗锈育种; 基因编辑

中图分类号: TS255.9; S633.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 2097-2172(2024)06-0510-05

doi: 10.3969/j.issn.2097-2172.2024.06.004

Research Progress on the Application of Biotechnology in Wheat Breeding against Stripe Rust

LI Ling¹, HU Mengxia², ZHANG Wentao², WANG Wanjun³, CAO Shiqin^{4,5,6}, HUANG Jin^{4,5,6},
ZHANG Bo^{4,5,6}, SUN Zhenyu^{4,5,6}, JIA Qiuzhen^{4,5,6}

- (1. Lanzhou Agricultural Research & Technology Promotion Centre, Lanzhou Gansu 730030, China; 2. Wheat Research Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China; 3. Green Agronomic Centre, Tianshui Academy of Agricultural Sciences, Gangu Gansu 741200, China; 4. Institute of Plant Protection, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China; 5. Scientific Observing and Experimental Station of Crop Pests in Tianshui, the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P. R. China, Gangu Gansu 741200, China; 6. National Agricultural Experimental Station for Plant Protection at Gangu, the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P. R. China, Gangu Gansu 741200, China)

Abstract: Stripe rust is the most important diseases in wheat production, breeding the new wheat varieties which have resistant characteristics to stripe rust is an essential method to improve yield and safeguard food security. The rapid development of biotechnology has effectively promoted the mining and utilization of genes related to important wheat traits. In this paper, the current situation and application of cell engineering, chromosome engineering, molecular markers, gene editing, genome-wide association analysis and other technologies to improve wheat rust resistance related traits were described, and the issues to be solved in wheat stripe rust resistance breeding were analyzed, in order to provide support for the application and development of biotechnology in wheat rust resistance breeding in Gansu Province.

Key words: Biotechnology; Wheat; Breeding for rust resistance; Gene editing

小麦作为中国北方居民的基本口粮, 其产量的变化在保障国家粮食安全中起着举足轻重的作用。育种技术的进步促进了小麦产量、品质及抗

逆性的不断提升^[1]。条锈病是发生于甘肃省及中国小麦生产上最主要的病害, 条锈菌生理小种的不断变异造成抗病品种的持续丧失, 引致条锈病

收稿日期: 2024-05-10

基金项目: 甘肃省农业科学院育种专项(2022GAAS06); 金城科普专家项目。

作者简介: 李玲(1970—), 女, 甘肃临洮人, 高级农艺师, 主要从事农作物新品种研究与应用工作。Email: 563957893@qq.com。

通信作者: 曹世勤(1971—), 男, 甘肃临洮人, 研究员, 主要从事小麦有害生物综合防控技术研究工作。Email: caoshiqin6702@163.com。

在甘肃省及中国的发生与流行, 造成严重的产量和经济损失^[2-3]。持续不断进行抗锈新种质的创制与应用是防治小麦条锈病的关键措施。以常规杂交、回交等技术手段为主的育种方法(2.0 时代)为小麦种质资源创新、新品种选育及产量的大幅度提升做出了重要贡献, 但育种效率偏低、选择精度不够等问题仍制约着小麦抗条锈育种的发展^[4-5]。

生物技术的快速发展和应用, 不仅助推了全球小麦育种技术的革命性进步, 也为甘肃省小麦抗锈育种带来了新曙光。本文通过总结细胞工程、染色体工程、分子标记、基因编辑及全基因组关联分析等方面的研究进展, 分析存在的问题, 旨在为甘肃省小麦抗条锈育种工作更好地开展提供理论支持。

1 研究进展

1.1 细胞工程与染色体工程

近年来, 基于双单倍体(DH)群体构建, 建立了花粉小孢子培养技术体系, 使得优异种质的纯合时间大大缩短, 育种效率得到显著提升^[6-7]。通过体细胞不对称融合技术, 将长穗偃麦草(*Thinopyrum ponticum*)的染色体片段导入受体小麦品种, 创制出了一批具有优异特质的目标新种质^[8]; 将小麦与长穗冰草体细胞杂交, 创制出高分子量麦谷蛋白亚基新种质^[9]; 利用小麦与玉米杂交产生单倍体, 克服了花药培养时受基因型控制和白化苗制约等限制因素^[10]。胡道芬等^[11]通过花培育种技术培育出加倍单倍体小麦新品种京花 1 号; 杨随庄等^[12]利用杂交诱导单性生殖技术培育出优异种质 WS4-8 等小麦新品种(系); 基于远缘杂交和染色体工程相结合的方法, 已经创制出长穗偃麦草及华山新麦草和滨麦、粗山羊草与普通小麦、小麦与黑麦、小麦与冰草属杂交的抗病优异新资源, 如小偃系列品种、中科 166、西农 511、南农 92R 等^[13-17]; 甘肃省农业科学院也已经利用花粉管通道法育成抗锈冬小麦品种陇鉴 9821 等^[18]。以上育种工作的开展, 不仅使得目标优异种质的纯合时间显著缩短, 而且育种精准性和效率也得到较好的提升。

1.2 分子标记技术

DNA 分子标记技术是提高育种效率、实现生物育种的主要技术措施, 更是小麦抗条锈病育种

的关键技术^[7]。近年来, 国内外在小麦优异种质资源苗期和成株期表型鉴定、抗条锈基因挖掘与标记以及重要基因克隆等方面均取得了诸多成果, 定位了一批抗条锈病基因/QTL, 克隆了 *Yr5*、*Yr7*、*Yr10*、*Yr15*、*Yr36*、*YrAS2388R* 和 *YrU1* 等抗条锈病基因, 建立了相应的分子标记育种体系, 并在抗锈育种中得到广泛应用^[16-17]。甘肃省农业科学院小麦研究所利用携带抗叶锈病基因 *Yr30*、*Yr18*、*Yr29* 的载体品种, 以及来自河南周口农业科学院的优异种质资源周 8425B, 基于分子标记辅助育种技术(MAS)进行抗条锈病基因聚合育种, 先后培育出聚合了 3~4 个抗条锈病基因的兰天 132 (*Yr9+Yr17+Yr30+YrZH84*)、兰天 196 (*Yr9+Yr17+Yr30*)等抗性优异新品系, 为甘肃陇南抗条锈基因分子育种打下了良好基础^[19-20]。

1.3 基因编辑

基因编辑技术可对植物基因组进行精准修饰, 从而达到定向改变育种目标性状的目的。目前常用的基因编辑系统有锌指核酸酶(ZFNs)、类转录激活因子效应物核酸酶(TALENs)和 CRISPR/Cas 系统等^[21], 其中 CRISPR/Cas 系统具有简单、高效、低成本等优势, 可实现基因的精准敲除、编辑、定点替换、插入和引导等, 是作物性状改良的重要工具, 将成为小麦抗锈育种的重要技术手段^[22]。

1.3.1 基因敲除 CRISPR/Cas 系统主要引起基因组 DNA 双链断裂, 随后通过非同源末端修复(NHEJ)或同源重组修复(HDR)措施对基因组进行修复, 进而达到预期目的^[23]。基因敲除可对控制植物重要性状的负向调控基因进行定点敲除, 使目标基因产生随机插入、缺失或碱基替换, 进而创制出目标性状改良的突变体, 该技术已成为目前植物遗传改良的重要措施^[24]。研究发现, *TaWRKY19*、*TaCIPK14*、*TaPsIPK1* 等基因的敲除可以提高小麦对条锈病的抗性^[25-27]。

1.3.2 单碱基编辑 单核苷酸多态性(SNP)是最常见的遗传变异来源。碱基编辑技术可以在精确的基因组位置上产生单碱基突变, 而不会产生 DNA 双链断裂, 从而实现重要目标基因定向进化^[28]。近年来广泛应用的单碱基编辑系统主要有 3 种, 为 A:T 到 G:C 转换的腺嘌呤碱基编辑器(ABE)、

C : G 到 T : A 转换的碱基编辑器(CBE)和 C : G 到 G : C 转换的碱基编辑器(CGBE)^[29]。碱基编辑器已应用于多种植物的改良中,如利用 CBE 碱基编辑器,已将除草剂抗性突变成功引入到拟南芥、西瓜、小麦、马铃薯和番茄等物种^[30-33]。Zhang 等^[34]利用 CBE 系统,成功编辑了小麦抗除草剂基因 *TaALS* 和 *TaACC*,并产生了对多种除草剂具有耐受性的突变,为麦田杂草防治提供了新材料。由于多倍体物种基因组结构复杂,需要同时对所有等位基因进行编辑才能获得所需的表型性状,因此碱基编辑系统在六倍体小麦育种中的应用仍然非常有限^[35]。

1.3.3 精准编辑 精准编辑是由同源定向修复(Homology directed repair, HDR)介导的基因插入或替换,该技术可用于等位基因替换、基因整合或外源目标基因座的标记等^[22]。利用 RNA 转录本为修复模板,可实现 HDR 介导的 *OsALS* 等位基因替换^[36-37]。Luo 等^[38]报道了一种通过将 Cas9 RNP 和 dsDNA 供体递送到小麦茎端分生组织中来实现基于 HDR 的基因组编辑的新方法,在快速改善经济作物重要农艺性状中具有巨大潜力。

1.3.4 引导编辑 引导编辑是对任意数个到几十个核苷酸进行突变、插入或替换,并且不需要产生双链断裂和引入外源供体 DNA 的编辑技术^[39]。该系统由 nSpCas9(H840A)蛋白经过工程化改造的 M-MLV RT 逆转录酶及先导编辑引导 RNA(peRNA)组成^[40]。其中先导编辑引导 RNA(pegRNA)中的向导 RNA(guide RNA)在基因组靶点位置附近形成编辑链上的单链切口,进而通过 pegRNA 中的 PBS (Primer binding site)序列引导含有目标编辑序列的逆转录模板(RTtemplate),将突变精确导入基因组中^[41]。Lin 等^[42]建立的 PPE 系统在水稻和小麦原生质体中实现了多个内源基因的精准编辑,产生了单碱基置换、多碱基置换、插入及缺失等,并以 21.8% 的编辑频率获得再生的引导编辑水稻植株。植物引导编辑的多功能性具有推动植物育种的潜力。

1.4 全基因组关联分析

全基因组关联分析 (Genome-wide association study, GWAS)是基于连锁不平衡(Linkage disequilibrium, LD),通过群体分析,在全基因组水平上检

测与目标性状相关联的标记或基因的研究方法^[43],作为数量性状基因座(Quantitative trait locus, QTL)挖掘的有力工具,GWAS 已被广泛用于小麦多种性状的基因发掘。Jia 等^[44]为揭示中国小麦抗条锈性的遗传结构,利用 90 K SNP 基因芯片对 240 份中国小麦品种(系)进行了全基因组关联分析,首次筛选出 *QYr.hbaas-1BS*、*QYr.hbaas-2BL*、*QYr.hbaas-3AL*、*QYr.hbaas-4BL.3*、*QYr.hbaas-4DL*、*QYr.hbaas-6DS* 等 6 个抗条锈病 QTL; Cheng 等^[45]对 120 份来自贵州、四川等地的冬小麦材料进行了全基因组关联分析,在田间和温室试验中共发现 16 个与小麦条锈病显著相关的 SNP 位点,其中 3 个 SNP 与抗条锈菌 V26 小种的 QTL 连锁。

2 存在的问题

尽管生物育种技术取得了突飞猛进的发展,但在小麦生物育种中尚有诸多亟待解决的问题。一是克隆的小麦抗条锈病基因数量仍相对偏少,目前仅有 *Yr5*、*Yr7*、*Yr10*、*Yr15*、*Yr36*、*YrAS2388R*、*YrU1* 等极少数,绝大多数基因尚未得到克隆;二是生物育种成本相对偏高,目前单基因育种的成本仍相对较高,而无法大规模应用于实践;三是转录组、代谢组、环境组等多维数据尚未应用于基因组选择育种^[7];四是抗锈数据资料尚不能完全共享,使得各团队得到的相关数据和结果难以相互利用。

3 展望

传统小麦育种通过自然变异、人工杂交等方法系统选育抗锈良种。生物育种主要以转基因、基因编辑等技术,高效创制目标变异群体。下一步育种的方式向多学科合作、大规模基因型选择的方向发展^[16,22]。针对甘肃省小麦抗锈生物育种,尚需做好以下几个方面的工作。一是加快功能基因克隆的数量,挖掘针对条锈菌主要流行小种的主要功能基因。加快克隆优异抗锈功能基因的数量和质量,针对当前主要流行小种 *CYR34*、*CYR32* 及新菌系 *ZS* 进行选择,才能使抗锈育种成效更有针对性和实效性;二是大幅度降低生物育种成本,有针对性地开展育种芯片开发,降低单个基因分型成本,尽快实现大规模生物育种;三是加强高效表型精准鉴定技术研究与应用,进一步强化多学科的交叉应用,创新发展适用于高效精准鉴定

的技术模型^[10,21]; 四是强化基因组选择育种平台建设, 建立通用的抗锈育种大数据平台, 在数据采集、分析、存储与管理方面实现标准化、规范化, 数据融合共通, 助力实现大数据育种。

虽然传统育种方法具有费时、费力且目标性不高的缺点, 但在小麦新品种培育过程中具有不可替代的作用。甘肃省未来小麦抗锈育种, 唯有将生物育种技术、高通量自动化表型评价技术等与传统育种技术有机结合, 充分发挥各种育种技术的优势, 结合自身实际扬长避短, 才能更好地实现甘肃小麦抗锈育种的精准化、高效化和规模化, 助推甘肃小麦抗锈育种技术尽快从当前的 2.0 水平上升到 3.0、4.0 水平。

参考文献:

- [1] 李振岐, 曾士迈. 中国小麦锈病[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [2] 韩德俊, 康振生. 中国小麦品种抗条锈病现状及存在问题与对策[J]. 植物保护, 2018, 44(5): 1-12.
- [3] 曹世勤, 贾秋珍, 宋建荣, 等. 甘肃省冬小麦抗条锈菌 CYR34 育种策略[J]. 植物遗传资源学报, 2019, 20(5): 1129-1133.
- [4] 曹世勤, 王万军, 贾秋珍, 等. 甘肃省冬小麦抗条锈病育种现状及对策[J]. 中国农业科技导报, 2022, 24(10): 109-124.
- [5] 曹世勤, 贾秋珍, 鲁清林, 等. 甘肃陇南越夏区小麦抗条锈病育种研究进展[J]. 寒旱农业科学, 2022, 1(2): 104-110.
- [6] BHOWMIK P, ELLISON E, POLLEY B, et al. Targeted mutagenesis in wheat microspores using CRISPR/Cas9 [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 6502-6511.
- [7] 蒋金金, 苏汉东, 洪登峰, 等. 植物生物技术研究进展[J]. 植物生理学报, 2023, 59(8): 1436-1462.
- [8] WANG M, WANG M, ZHAO M, et al. TaSR01 plays a dual role in suppressing TaSIP1 to fine tune mitochondrial retrograde signalling and enhance salinity stress tolerance[J]. New Phytologist, 2022, 236(2): 495-511.
- [9] JAUHAR P P, XU S S, BAENZIGER P S. Haploidy in cultivated wheats: induction and utility in basic and applied research[J]. Crop Science, 2009, 49(3): 737-755.
- [10] 李洪杰, 陈明, 李少雅, 等. 小麦生物育种: 进展机遇和挑战[J]. 中国基础科学, 2022, 24(4): 1-8; 28.
- [11] 胡道芬, 袁振东, 汤云莲, 等. 植物细胞工程——冬小麦花培新品种京花 1 号的育成[J]. 中国科学(B 辑 化学 生物学 农学 医学 地学), 1986, 3: 283-292.
- [12] 杨随庄, 王炜, 曹世勤, 等. 抗条锈病小麦种质 WS4-8 的抗性鉴定及遗传[J]. 植物保护学报, 2015, 42(5): 770-776.
- [13] 贾子苗, 邱玉亮, 林志珊, 等. 利用近缘种属优良基因改良小麦研究进展[J]. 作物杂志, 2021, 37(2): 1-14.
- [14] 李宏伟, 郑琪, 李滨, 等. 长穗偃麦草分子育种基础研究进展[J]. 植物学报, 2022, 57(6): 792-801.
- [15] 郝明, 张连全, 黄林, 等. 合成六倍体小麦的遗传育种[J]. 植物遗传资源学报, 2022, 23(1): 40-48.
- [16] LIU C, WANG J, FU S, et al. Establishment of a set of wheat-rye addition lines with resistance to stem rust [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2022, 135(7): 2469-2480.
- [17] LI Q, LU Y, PAN C, et al. Chromosomal localization of genes conferring desirable agronomic traits from wheat-*Agropyron cristatum* disomic addition line 5113[J]. PLoS One, 2016, 11(11): e0165957.
- [18] 曹世勤, 骆惠生, 黄瑾, 等. 冬小麦品种陇鉴 9821 抗条锈遗传分析[J]. 植物病理学报, 2012, 42(3): 274-280.
- [19] 杨芳萍, 曹世勤, 郭莹, 等. 小麦条锈病抗性基因定位及分子标记技术研究进展[J]. 寒旱农业科学, 2024, 3(1): 1-10.
- [20] 白斌, 杜久元, 何瑞, 等. 成株抗性与全生育期抗性基因聚合培育抗条锈性小麦新品种[J]. 植物保护, 2023, 49(6): 47-54.
- [21] RONSPIES M, DORN A, SCHINDELE P, et al. CRISPR-Cas-mediated chromosome engineering for crop improvement and synthetic biology[J]. Nature Plants, 2021, 7(5): 566-573.
- [22] 闫磊, 张金山, 朱健康, 等. 基因编辑技术及其在农作物中的应用进展[J]. 中国农业科技导报, 2022, 24(12): 78-89.
- [23] HABER Z, SHARMA D, SELVARAJ KSV, et al. Is CRISPR/Cas9-based multi-trait enhancement of wheat forthcoming?[J]. Plant Science. 2024, 341: 112021.
- [24] SHAN Q, BALTES N J, ATKINS P, et al. ZFN, TALEN and CRISPR-Cas9 mediated homology directed gene insertion in *Arabidopsis*: a disconnect between somatic and germinal cells[J]. Journal of Genetics Genomics,

- 2018, 45(12): 681–684.
- [25] WANG N, FAN X, He M, et al. Transcriptional repression of TaNOX10 by TaWRKY19 compromises ROS generation and enhances wheat susceptibility to stripe rust[J]. *Plant Cell*, 2022, 34: 1784e1803.
- [26] HE F, WANG C, SUN H, et al. Simultaneous editing of three homoeologues of TaCIPK14 confers broad-spectrum resistance to stripe rust in wheat[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2023, 21(2): 354–368.
- [27] WANG N, TANG C, FAN X, et al. Inactivation of a wheat protein kinase gene confers broad-spectrum resistance to rust fungi[J]. *Cell*, 2022, 185(16): 2961–2974.
- [28] WANG G, XU Z, WANG F, et al. Development of an efficient and precise adenine base editor(ABE) with expanded target range in allotetraploid cotton(*Gossypium hirsutum*)[J]. *BMC Biology*, 2022, 20(1): 45.
- [29] WU J, CHEN C, XIAN G, et al. Engineering herbicide-resistant oilseed rape by CRISPR/Cas9-mediated cytosine base-editing[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(9): 1857–1859.
- [30] ZONG Y, WANG Y, CHAO L, et al. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion[J]. *Nature Biotechnology*. 2017, 35(5): 438–440.
- [31] WU J, CHEN C, XIAN G, et al. Engineering herbicide-resistant oilseed rape by CRISPR/Cas9-mediated cytosine base-editing[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(9): 1857–1859.
- [32] QIN L, LI J, WANG Q, et al. High-efficient and precise base editing of C·G to T·A in the allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*) genome using a modified CRISPR/Cas9 system[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(1): 45–56.
- [33] CAI Y, CHEN L, ZHANG Y, et al. Target base editing in soybean using a modified CRISPR/Cas9 system[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(10): 1996–1998.
- [34] ZHANG R, LIU J, CHAI Z, et al. Generation of herbicide tolerance traits and a new selectable marker in wheat using base editing[J]. *Nature Plants*. 2019, 5(5): 480–485.
- [35] WANG P, ZHANG J, SUN L, et al. High efficient multisites genome editing in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*) using CRISPR/Cas9 system[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(1): 137–150.
- [36] LI S, LI J, HE Y, et al. Precise gene replacement in rice by RNA transcript-templated homologous recombination [J]. *Nature Biotechnology*. 2019, 37(4): 445–450.
- [37] 闫磊, 李晶莹, 李慧园, 等. 农作物基因编辑科技研发及应用[J]. *中国基础科学*, 2022, 24(6): 9–18; 27.
- [38] LUO W, SUZUKI R, IMAI R. Precise in planta genome editing via homology-directed repair in wheat[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2023, 21(4): 668–670.
- [39] 邱梅玉, 张雪梅, 张宁, 等. 引导编辑技术的研究进展及应用[J]. *畜牧兽医学报*, 2024, 55(4): 1345–1355.
- [40] 彭春燕, 柏梦焱, 关跃峰. 植物引导编辑技术的研究进展[JOL]. *科学通报*, 1–15. (2024-03-02) [2024-05-29]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1784.N.20240228.2247.004.html>.
- [41] ANZALONE A V, RANDOLPH P B, DAVIS J R, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA[J]. *Nature*, 2019, 576(7785): 149–157.
- [42] LIN Q, ZONG Y, XUE C, et al. Prime genome editing in rice and wheat[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(5): 582–585.
- [43] 张颖, 石婷瑞, 曹瑞, 等. ICARDA 引进-小麦苗期抗旱性的全基因组关联分析[J]. *中国农业科学*, 2024, 57(9): 1658–1681.
- [44] JIA M, YANG L, ZHANG W, et al. Genome-wide association analysis of stripe rust resistance in modern Chinese wheat[J]. *BMC Plant Biology*. 2020, 20(1): 491.
- [45] CHENG B, GAO X, CAO N, et al. Genome-wide association analysis of stripe rust resistance loci in wheat accessions from southwestern China[J]. *Journal of Applied Genetics*, 2020, 61(1): 37–50.