

赵霁泽, 万文涛, 赵仁慧, 等. 基于 CRISPR/Cas9 基因编辑技术改良扬麦 18 农艺与品质性状[J]. 江苏农业学报, 2025, 41(8):1466-1474.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2025.08.002

# 基于 CRISPR/Cas9 基因编辑技术改良扬麦 18 农艺与品质性状

赵霁泽<sup>1,2</sup>, 万文涛<sup>2</sup>, 赵仁慧<sup>2</sup>, 蒋正宁<sup>2</sup>, 吴荣林<sup>2</sup>, 别同德<sup>2</sup>, 陈升位<sup>1</sup>

(1. 云南农业大学农业与生物技术学院, 云南 昆明 650000; 2. 农业农村部长江中下游小麦生物学与遗传育种重点实验室/江苏里下河地区农业科学研究所, 江苏 扬州 225007)

**摘要:** 江苏省是中国重要的小麦主产省份, 地跨长江中下游和黄淮两大小麦主产区。长江中下游麦区种植的小麦以红皮春性小麦为主, 一般穗形大, 株型松散, 对赤霉病、白粉病和穗发芽等有较好抗性。黄淮麦区种植的小麦以白皮冬性小麦为主, 表现为株型紧凑、穗数多, 但大多数对赤霉病、白粉病和穗发芽敏感。为创制满足不同应用需求的小麦新种质, 以红皮春性软质品种扬麦 18 为材料, 利用 CRISPR/Cas9 技术对春化相关基因 *Vrn-D1*、籽粒硬度相关基因 *Pina* 和 *Pinb* 及种皮颜色相关基因 *Myb10* 进行编辑, 共获得 6 种 *Vrn-D1* 突变体、5 种 *Pin* 突变体及 7 种 *Myb10* 突变体。表型鉴定结果表明, 与野生型相比, *Vrn-D1* 突变体第 2、第 4 节间长度显著降低(除 *vrnM5* 编辑系), *Pin* 突变体籽粒硬度显著增加, 5 个 *Myb10* 突变体种皮的颜色变为白色。本研究结果为利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术改良小麦特定农艺性状和品质性状提供了参考。

**关键词:** 基因编辑; 春化基因; 籽粒硬度基因; 种皮颜色基因

中图分类号: S512.103 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2025)08-1466-09

## Improvement of agronomic and quality traits of Yangmai 18 using CRISPR/Cas9 gene editing technology

ZHAO Peize<sup>1,2</sup>, WAN Wentao<sup>2</sup>, ZHAO Renhui<sup>2</sup>, JIANG Zhengning<sup>2</sup>, WU Ronglin<sup>2</sup>, BIE Tongde<sup>2</sup>, CHEN Shengwei<sup>1</sup>

(1. College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650000, China; 2. Key Laboratory of Wheat Biology and Genetic Improvement for Lower & Middle Yangtze Valley, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Institute of Agricultural Sciences of the Lixiahe District in Jiangsu Province, Yangzhou 225007, China)

**Abstract:** Jiangsu province is an important wheat-producing province in China, spanning the middle and lower reaches of the Yangtze River (MLRYR) and the Huang-Huai region, two major wheat-growing areas. The wheat planted in the MLRYR is mainly red-skinned spring wheat, which usually has large panicles and a loose plant type, and is resistant to *Fusarium* head blight (FHB), powdery mildew (PM), and pre-harvest sprouting (PHS). In contrast, the wheat planted in the Huang-Huai region is mainly white-skinned winter wheat, which has a compact plant type and a higher number of panicles, but is generally susceptible to FHB, PM, and PHS. To develop new wheat germplasm that meet different application needs, the vernalization-related gene *Vrn-D1*, grain hardness-related genes *Pina* and *Pinb*, and the seed coat color-related gene *Myb10* were edited in the red-skinned spring soft wheat variety Yangmai 18 using CRISPR/Cas9 technology. A total of six *Vrn-D1* mutants, five *Pin* mutants, and seven *Myb10* mutants were obtained. Phenotypic identification results showed that compared with the wild type, the second and fourth internode lengths of the *Vrn-D1* mutants were significantly reduced (with the exception of the *vrnM5* line), the grain hardness of the *Pin* mutants was significantly increased, and the seed coat color of five *Myb10*

收稿日期: 2025-01-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(32472102); 江苏里下河地区农业科学研究所科研专项[SJ(22)114]

作者简介: 赵霁泽(2000-), 男, 江苏无锡人, 硕士研究生, 主要从事小麦遗传育种研究。(E-mail)m13771257610@163.com

通讯作者: 陈升位, (E-mail) ynkmcs@ynau.edu.cn

and seven *Myb10* mutants were obtained. Phenotypic identification results showed that compared with the wild type, the second and fourth internode lengths of the *Vrn-D1* mutants were significantly reduced (with the exception of the *vrnM5* line), the grain hardness of the *Pin* mutants was significantly increased, and the seed coat color of five *Myb10*

mutants changed from red to white. The results of this study provide a reference for using CRISPR/Cas9 gene editing technology to improve specific agronomic and quality traits of wheat.

**Key words:** gene editing; vernalization gene; grain hardness gene; seed coat color gene

普通小麦 (*Triticum aestivum* L.) 是中国三大粮食作物之一, 小麦安全生产对保障国家粮食安全和促进农民增收具有重要意义<sup>[1]</sup>。江苏省是中国重要的粮食生产基地, 地跨长江中下游、黄淮两大麦区, 江苏省内的研究者已经培育出具有不同生态适应性的小麦品种。长江中下游麦区小麦通常以红皮春性品种为主, 表现为大穗、株型松散, 且对小麦赤霉病、白粉病及穗发芽有较好的抗性, 但穗数、产量通常不及黄淮麦区品种。黄淮麦区的小麦以白皮硬质冬性小麦为主, 株型紧凑, 分蘖力强, 穗数多, 产量高, 但大多数对赤霉病、白粉病及穗发芽等的抗性不足<sup>[2]</sup>。已有研究证实, 少数持家基因决定了南北方小麦的形态、适应性的差异, 如北方冬性小麦品种春化基因 *VRN1* 均为隐性, 而南方小麦品种大多携带 1 个以上的显性位点, 表现为春性<sup>[3]</sup>; 北方小麦以硬质为主, 具有丰富的 *Pinb-D1* 变异类型, 而南方软质小麦籽粒硬度低, 基因型以野生型为主<sup>[4-5]</sup>。有研究发现, *Myb10* 基因 (即 *Tamyb10* 基因) 对小麦种皮颜色起到决定作用, 北方白皮小麦以隐性基因为主, 而南方红皮小麦存在 1 个或多个显性基因<sup>[6]</sup>。

春化作用是指在某些植物花芽分化和正常开花之前需要先经过一段时间低温处理的生理现象<sup>[7]</sup>。目前, 研究者已经从小麦中鉴定到 4 个春化基因, 并克隆了其中 3 个 (*VRN1*<sup>[8]</sup>、*VRN2*<sup>[9]</sup> 和 *VRN3*<sup>[10]</sup>), 其中 *VRN1* 的春化效应最强。*VRN1* 包含 3 个同源基因, 分别分布在 5A、5B、5D 染色体上, 其编码的转录因子是春化诱导途径的核心调控因子。通常情况下, 存在 1 个及以上 *VRN1* 位点时, 小麦表现为春性; 当 3 个 *VRN1* 位点都表现为隐性时, 小麦表现为冬性<sup>[11]</sup>。Chen 等<sup>[12]</sup> 研究发现, *VRN2* 与 *VRN1*、*VRN3* 共同参与了小麦的春化反应, *VRN2* 通过竞争性结合 *NF-Y* 转录因子抑制开花, 在春化条件下, *VRN1* 通过下调 *VRN2* 的相对表达量而促进开花, 证明 *VRN1* 对 *VRN2* 存在上位性效应。Shimada 等<sup>[13]</sup> 研究发现, *VRN1* 位于 *VRN3* 上游, 并通过调控 *VRN2* 形成 1 个正反馈循环。改变小麦的春化基因可以增强小麦的冬性及分蘖力, 对提升小麦产量有显著作用<sup>[14]</sup>。

小麦籽粒硬度是衡量小麦品质的重要指标, 主要

由硬度相关基因 *Pina*、*Pinb* 控制<sup>[15]</sup>。*Pina*、*Pinb* 均位于 5D 染色体短臂上的 *Ha* 位点, 编码 puroindoline 蛋白, 当 2 个基因均为野生型时, 籽粒表现为软质, 而当任一基因有功能缺陷时, 会导致小麦籽粒的硬度提升<sup>[16-18]</sup>。对 *Pina* 或 *Pinb* 不同基因型的靶向选择, 可有效拓宽小麦籽粒硬度的变异幅度, 以满足不同终端食品的需要。根据种皮颜色的不同, 可将小麦分为白皮小麦、红皮小麦, 种皮颜色由 3A、3B、3D 染色体长臂上的 *Myb10* 等位基因控制<sup>[19]</sup>。已有研究者发现, *Myb10* 对种皮颜色存在加性效应, 其中红色对白色表现为显性, 且随着基因对数的增加, 颜色加深<sup>[20]</sup>。*Myb10* 基因能够通过激活类黄酮与脱落酸 (ABA) 生物合成相关基因来调控种皮颜色、穗发芽抗性, 通过基因编辑手段可实现红皮与白皮间的转换<sup>[21]</sup>。

由于南北方小麦在生态适应性上的显著差异及对高产、优质及抗病等品种需求的多样性, 利用传统冬春杂交方法很难在短期内育成满足地方需求的理想品种。近年来, 随着基因工程技术的迭代更替, 生物育种技术也在不断创新和发展, 以 CRISPR/Cas9 系统及其衍生工具为主的基因编辑技术因其简单、高效和精准性, 极大满足了研究者对作物基因功能解析和靶向分子改良的需求<sup>[22]</sup>。Li 等<sup>[23]</sup> 利用 CRISPR/Cas9 技术同时编辑小麦 *MLO* 基因在 A、B、D 3 个亚基因组中的拷贝, 成功创制了广谱抗白粉病且高产的小麦新种质 Tamlo-R32。Tang 等<sup>[24]</sup> 利用 CRISPR 技术编辑小麦 *Ms2* 基因, 恢复了矮败小麦的育性, 为从优良矮败小麦群体、太谷核不育小麦群体中培育小麦新品种奠定了基础。Ni 等<sup>[25]</sup> 利用 CRISPR 技术成功实现了对 8 个小麦基因的同时精准编辑, 为作物优异性状的快速叠加提供了参考。

扬麦 18 是长江中下游麦区重要的多抗骨干亲本, 具有红皮软质、优质弱筋等特点, 对小麦赤霉病、白粉病、黄花叶病及穗发芽有较好的抗性<sup>[26-27]</sup>。笔者研究发现, 扬麦 18 在春化相关基因 *VRN1* 位点的基因型为 *vrn-A1/vrn-B1/Vrn-D1*, 在籽粒硬度相关基因 *Pin* 位点的基因型为 *Pina-D1a/Pinb-D1a*, 在种皮颜色相关基因 *Myb10* 位点的 *B*、*D* 基因组上为功能型。本研究拟在扬麦 18 材料中对 4 个持家基因

*Vrn-D1*、*Pina*、*Pinb* 和 *Myb10* 进行 CRISPR/Cas9 基因编辑,创制系列小麦特异种质,以期为江苏淮南、淮北 2 个生态区小麦的育种工作提供高产、抗病和优质的小麦遗传材料。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验材料

扬麦 18 为江苏里下河地区农业科学研究所选育的优质弱筋高产多抗小麦品种,用作基因编辑受体。科农 199 为白皮、冬性小麦,由中国科学院遗传与发育生物学研究所育成,在本研究中用作对照品种。基因编辑载体 *pLGYE-03* 由山东省农业科学院李根英团队提供。

### 1.2 基因编辑载体的构建

从扬麦 18 中克隆 *Vrn-D1*、*Pina*、*Pinb* 和 *Myb10* 基因后,将序列在线提交至 CRISPR-Direct 网站(<https://crispr.dbcls.jp>),寻找具有“NGG”基序的 PAM 位点,分别设计单链向导 RNA (sgRNA)。其中,针对 *Vrn-D1* 基因设计 2 个靶标位点,二者相距 4 592 bp;针对 *Myb10* 基因设计 2 个靶标位点,二者相距 154 bp;在 *Pina*、*Pinb* 2 个基因上各设计 1 个靶标位点(表 1)。在设计的靶点 sgRNA 两端添加载体序列作为引物,在 *pMETaU6* 载体中扩增、回收“sgRNA1-U6 启动子-sgRNA2”片段,用同源重组方法分别将 *Vrn-D1*、*Pina*/*Pinb*、*Myb10* 的 sgRNA 构建成编辑载体 *pLGYE-03-Vrn*、*pLGYE-03-Pin*、*pLGYE-03-Myb10*,分别进行独立的基因编辑和遗传转化。

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this research

引物名称	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')	用途
VRN-T1	CCTGAATTCAGATTCACCT	AATATCTAGTCATTGGAAGT	<i>Vrn-D1</i> 靶点 1 变异检测
VRN-T2	GATCTCGTGCGCCTTCTTG	CCTACCCTCCAACACCGG	<i>Vrn-D1</i> 靶点 2 变异检测
PINB	CAACCTTCGCGCAATACTCA	TCATAGATCATCACTCAGCACTC	<i>Pinb</i> 靶点变异检测
PINA	AGGACTGCTTCTCTGCTAG	ACAGGCCATTGTTGAGCAC	<i>Pina</i> 靶点变异检测
MYB10	TGGGCTTCATGATGAGCCCG	TATCGGACTGCTGCTCTGTC	<i>Myb10</i> 靶点变异检测
bar	TCTGCACCATCGTCAACCA	CAGAAACCCACGTCATGCC	基因盒检测

### 1.4 不同类型基因编辑系的表型鉴定

在小麦返青期调查 *Vrn-D1* 各独立编辑系的苗期形态,分别以野生型扬麦 18、冬性小麦品种科农 199 作为春性、冬性小麦对照。成熟后,调查各编辑

表 1 基因编辑的靶点序列

Table 1 Target sequences of edited genes

靶基因	编辑靶点	靶点序列(5'→3')
<i>Vrn-D1</i>	sgRNA1	TCGAGCGGAGATGGGGCGCGGG
	sgRNA2	GCGCTACTCTTATGCAGAAAAGG
<i>Pina</i>	sgRNA1	GTTGGCAGTTACGATGTTGCTGGCGG
<i>Pinb</i>	sgRNA1	GCCGACTGCAAGTTCCTACTGTTG
<i>Myb10</i>	sgRNA1	GCACGAGCAGCAGCCCGATAACGG
	sgRNA2	TGGGCTTCCTGATGAGCCCGTGG

靶点序列中加粗部分表示 PAM 位点。

### 1.3 基因编辑事件的检测

利用 *bar* 基因检测引物(表 2)检测 T<sub>0</sub> 代植株的编辑盒,引物序列由山东省农业科学院李根英团队提供。扩增程序为:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 1 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测目标条带。

用高通量突变跟踪平台(Hi-TOM)的高通量测序技术对 *Vrn-D1*、*Pina*、*Pinb* 和 *Myb10* 基因编辑靶点进行检测,根据基因编辑靶点的侧翼序列设计特异性引物(表 2)。对基因编辑植株进行第 1 轮 PCR 扩增,扩增程序:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 1 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。在特异性引物上添加高通量测序接头(在左侧引物的左侧添加“5'-GGAGTGAGTACGGT-GTGC-3'”,在右侧引物的右侧添加“5'-GAGTTG-GATGCTGGATGG-3'”)。以第 1 轮 PCR 产物为模板,进行第 2 轮 PCR 扩增,PCR 扩增程序同第 1 轮,扩增产物直接用于高通量测序。

系的株高、节间长度。

采用瑞典 Perten 公司的 Perten 4100 型单粒谷物测试仪(Single kernel characterization system, SKCS)测定不同 *Pin* 基因编辑后代的硬度,每个编

辑系随机选取 100 粒进行测定。根据测定结果,确定其硬度级别,硬度指数<40.00 的为软质麦,硬度指数>60.00 的为硬质麦,硬度指数为 40.00~60.00 的为混合麦。

得到 *Myb10* 各编辑事件后代后,直接观察籽粒颜色,分别以扬麦 18、科农 199 作为红皮小麦、白皮小麦的对照。

1.5 数据处理

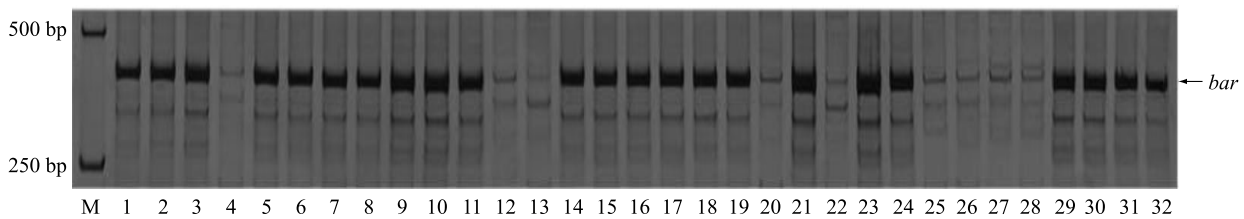
用 Excel 2021 进行数据整理,用 IBM SPSS Statistics 26 进行均值计算、方差分析和显著性检验,用最小显著差异法(Least significant difference, LSD)进

行多重比较。

2 结果与分析

2.1 T<sub>0</sub>代基因编辑植株编辑盒的鉴定

利用 *bar* 基因检测标记对 T<sub>0</sub>代植株进行编辑盒的鉴定。结果显示,在 55 个 *Vrn-D1* 基因编辑植株中共检出 47 个单株携带编辑盒,在 30 个 *Pin* 基因编辑植株中共检出 24 个单株携带编辑盒,在 29 个 *Myb10* 基因编辑植株中共检出 22 个单株携带编辑盒。收获上述编辑盒阳性单株种子用于后续分析,部分 T<sub>0</sub>代植株编辑盒鉴定结果见图 1。



M: DL2000; 1~32: 部分 T<sub>0</sub>代 Cas9 编辑植株。

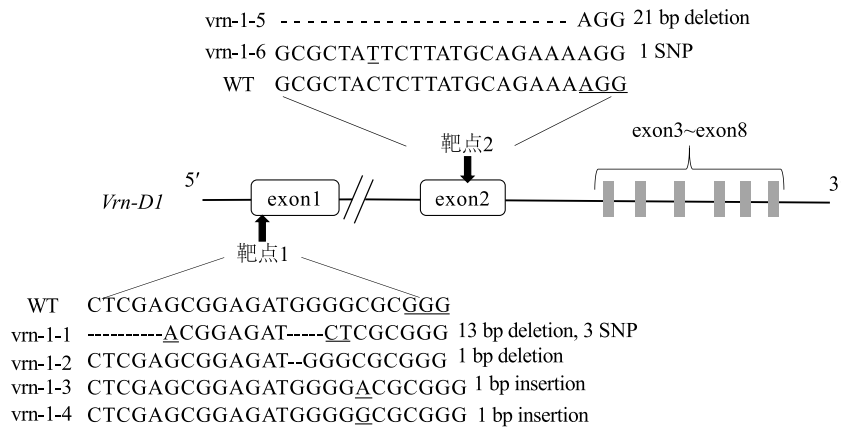
图 1 部分 T<sub>0</sub>代植株编辑盒鉴定结果

Fig.1 Identification of partial T<sub>0</sub> generation Cas9-edited plants

2.2 编辑事件的检测分析

2.2.1 *Vrn-D1* 编辑事件的检测 用 Hi-TOM 高通量测序技术对 *Vrn-D1* 编辑的 T<sub>2</sub>代植株的 2 个靶点进行测序分析。在靶点 1 处共检测到 4 个编辑事件,分别为 *vrn-1-1*、*vrn-1-2*、*vrn-1-3*、*vrn-1-4*。其中,*vrn-1-1* 在起始密码子 ATG 附近发生 13 bp 的碱基缺失和 3 个点突变[即 3 个单核苷酸多态性(SNP)]; *vrn-1-2* 在 ATG 处发生 1 bp 的碱基缺失;*vrn-1-3*、

*vrn-1-4* 在靶点处均存在 1 bp 的不同碱基插入。以上 4 种突变均导致编码蛋白质发生移码突变。在靶点 2 处检测到 2 个编辑事件,分别为 *vrn-1-5*、*vrn-1-6*。其中,*vrn-1-5* 在靶点位置发生 21 bp 的片段缺失,但未产生移码突变;*vrn-1-6* 在靶点位置存在 1 个 SNP,为同义突变(图 2)。综合 2 个靶点的测序结果,共得到 6 种突变类型,将其命名为 *vrnM1*~*vrnM6*(表 3)。



*vrn-1-5*、*vrn-1-6*、*vrn-1-1*、*vrn-1-2*、*vrn-1-3*、*vrn-1-4* 表示编辑类型;WT 表示扬麦 18;SNP 表示单核苷酸多态性;insertion 表示插入;deletion 表示删除;exon 表示外显子;-表示因编辑产生的序列缺失;\_表示因编辑产生的序列突变。

图 2 *Vrn-D1* 基因靶点的变异序列

Fig.2 Variation detection of target sequences in *Vrn-D1* gene

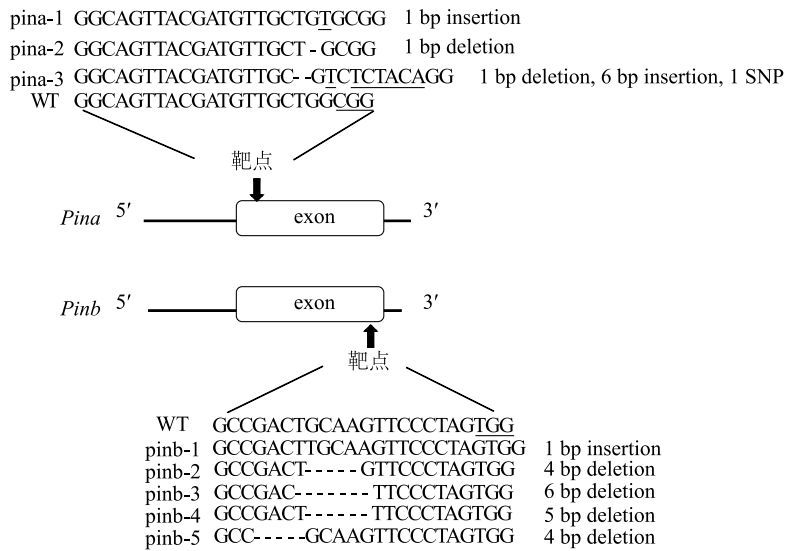
表 3 *Vrn-D1* 突变体类型

Table 3 Types of *Vrn-D1* mutants

突变体类型	编辑事件	蛋白质突变类型
vrnM1	vrn-1-5/vrn-1-2	移码突变
vrnM2	vrn-1-5/vrn-1-1	移码突变
vrnM3	vrn-1-6/vrn-1-2	移码突变
vrnM4	vrn-1-2	移码突变
vrnM5	vrn-1-3	移码突变
vrnM6	vrn-1-4	移码突变

2.2.2 *Pina*、*Pinb* 双编辑事件的检测 利用高通量测序技术对 *Pina*、*Pinb* 双编辑材料进行编辑事件的检测。在 *Pina* 靶点处发现 3 个编辑事件,分别为 *pina*-

1、*pina*-2、*pina*-3;在 *Pinb* 靶点处发现 5 个编辑事件,分别为 *pinb*-1、*pinb*-2、*pinb*-3、*pinb*-4、*pinb*-5(图 3)。其中,*pina*-1 在靶点处存在 1 bp 的碱基插入;*pina*-2 在靶点处存在 1 bp 的碱基缺失;*pina*-3 在靶点处存在 1 个 SNP、1 bp 碱基缺失和 6 bp 碱基插入。以上 3 种突变均导致编码蛋白质发生移码突变。在 *Pinb* 编辑位点,*pinb*-1 存在 1 bp 的碱基插入,*pinb*-2 存在 4 bp 的碱基缺失,*pinb*-4 存在 5 bp 的碱基缺失,*pinb*-5 存在 4 bp 的碱基缺失。以上 4 种突变均导致编码蛋白质发生移码突变。*pinb*-3 在靶点处存在 6 bp 的碱基缺失,未导致编码蛋白质发生移码突变。综合 2 个靶点的测序结果,筛选到 5 种纯合的 *Pina*、*Pinb* 双编辑系,命名为 *pinM1*~*pinM5*(表 4)。



*pina*-1、*pina*-2、*pina*-3、*pinb*-1、*pinb*-2、*pinb*-3、*pinb*-4、*pinb*-5 表示编辑类型;WT 表示扬麦 18;SNP 表示单核苷酸多态性;insertion 表示插入;deletion 表示删除;exon 表示外显子;-表示因编辑产生的序列缺失;\_表示因编辑产生的序列突变。

图 3 *Pina*、*Pinb* 基因靶点变异序列

Fig.3 Variation detection of target sequences in *Pina* and *Pinb*

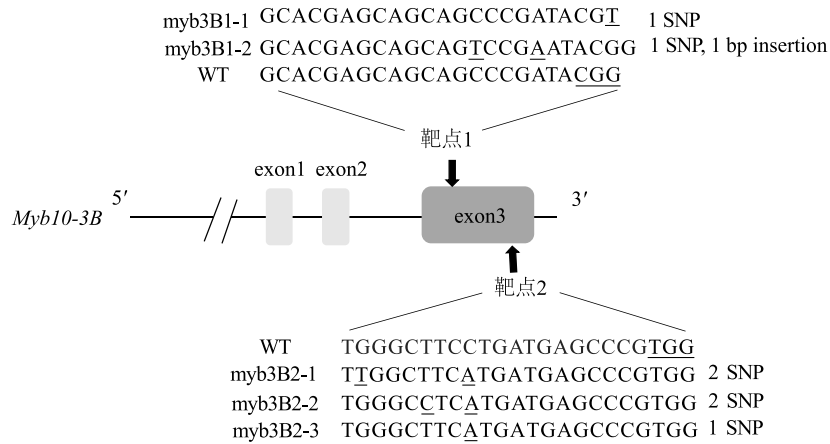
表 4 *Pin* 突变体类型

Table 4 Types of *Pin* mutants

突变体类型	编辑事件	蛋白质突变类型
pinM1	<i>pina</i> -2/ <i>pinb</i> -1	移码突变
pinM2	<i>pina</i> -2/ <i>pinb</i> -2	移码突变
pinM3	<i>pina</i> -1/ <i>pinb</i> -1	移码突变
pinM4	<i>pina</i> -3/ <i>pinb</i> -3	移码突变
pinM5	<i>pina</i> -1/ <i>pinb</i> -4	移码突变

2.2.3 *Myb10* 编辑事件的检测 用高通量测序技术

对 *Myb10* 编辑材料进行编辑事件的检测,结果表明,在 *Myb10-3B* 上,靶点 1 存在 2 个编辑事件,靶点 2 存在 3 个编辑事件(图 4)。综合 2 个靶点的测序结果,共得到 4 种突变类型,分别为 *Myb3BT1*、*Myb3BT2*、*Myb3BT3* 和 *Myb3BT4*, *Myb3BT1*、*Myb3BT2* 产生了非同义突变,*Myb3BT3* 产生了移码突变(表 5)。在 *Myb10-3D* 上,靶点 1 未检测到突变,靶点 2 检测到 3 个编辑事件(图 5)。*Myb3DT1*、*Myb3DT2* 产生了非同义突变,*Myb3DT3* 产生了同义突变(表 5)。



myb3B1-1、myb3B1-2、myb3B2-1、myb3B2-2、myb3B2-3 表示编辑类型;WT 表示扬麦 18;SNP 表示单核苷酸多态性;insertion 表示插入;exon 表示外显子;\_表示因编辑产生的序列突变。

图 4 *Myb10-3B* 基因靶点变异序列

Fig.4 Variation detection of target sequences in *Myb10-3B* gene

表 5 *Myb10* 突变体类型

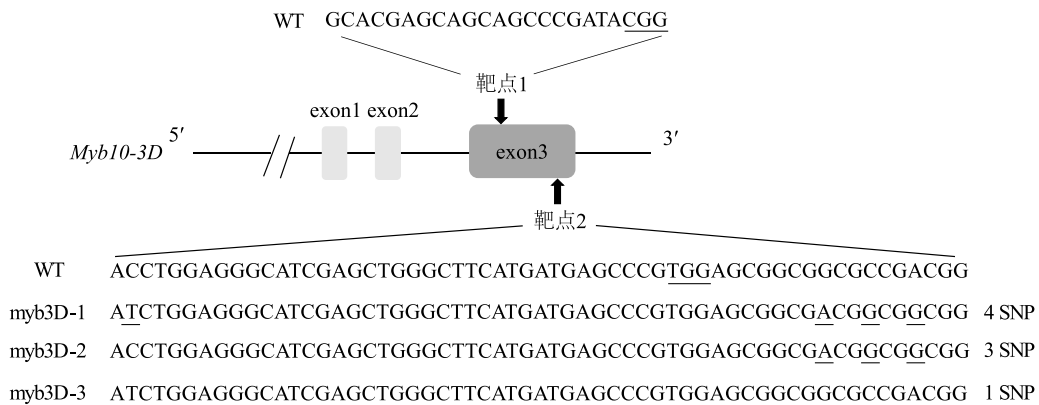
Table 5 Types of *Myb10* mutants

突变体类型	编辑事件	蛋白质突变类型
Myb3BT1	myb3B2-1	非同义突变
Myb3BT2	myb3B1-1/myb3B2-3	非同义突变
Myb3BT3	myb3B1-2/myb3B2-2	移码突变
Myb3BT4	myb3B2-3	同义突变
Myb3DT1	myb3D-1	非同义突变
Myb3DT2	myb3D-2	非同义突变
Myb3DT3	myb3D-3	同义突变

*Vrn-D1* 基因编辑系的苗期形态发现,各编辑系在苗期均呈明显的匍匐特征,与冬性小麦品种科农 199 类似,而野生型扬麦 18 在苗期呈直立状(图 6)。在成熟期考察各编辑系与扬麦 18 的株高、各节间长度。结果(表 6)显示,仅 *vrnM6* 编辑系的株高与扬麦 18 相比差异显著;所有编辑系的第 2 节间长度均显著低于扬麦 18;除 *vrnM5* 以外的其余 5 种编辑系的第 4 节间长度也均显著低于扬麦 18;各编辑系的第 1、第 3、第 5 节间长度与野生型相比均无显著差异。上述结果表明,春化基因 *Vrn-D1* 的不同突变会造成株高降低程度的差异,且这种差异主要来自于对第 2、第 4 节间长度的影响。

### 2.3 基因编辑系的表型鉴定

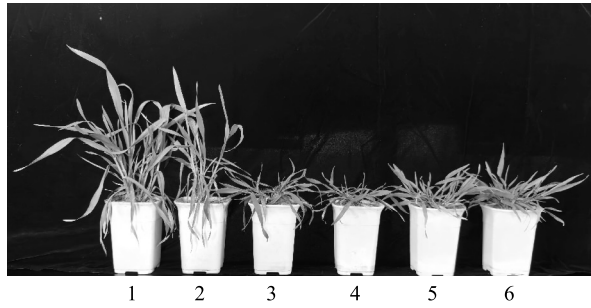
#### 2.3.1 *Vrn-D1* 编辑系的农艺性状分析 考察各



myb3D-1、myb3D-2、myb3D-3 表示编辑类型;WT 表示扬麦 18;SNP 表示单核苷酸多态性;exon 表示外显子;\_表示因编辑产生的序列突变。

图 5 *Myb10-3D* 基因靶点变异序列

Fig.5 Variation detection of target sequences in *Myb10-3D* gene



1,2:扬麦 18;3:vrnM1;4:vrnM2;5,6:科农 199。

图 6 *Vrn-D1* 基因编辑系的苗期形态

Fig.6 Seedling phenotypes of *Vrn-D1* editing lines

2.3.2 硬度相关基因编辑对籽粒硬度和质地的影响 对 5 种 *Pina*、*Pinb* 双编辑系进行硬度的测定，

表 6 野生型和突变型农艺性状

Table 6 Agronomic traits of wild-type and mutants

类型	株高 (cm)	第 1 节间长度 (cm)	第 2 节间长度 (cm)	第 3 节间长度 (cm)	第 4 节间长度 (cm)	第 5 节间长度 (cm)
WT	90.31±0.94a	5.11±0.32a	9.17±0.16a	11.94±0.27a	19.56±0.31a	29.63±0.44a
vrnM1	87.83±1.01a	4.73±0.31a	7.65±0.13b	12.59±0.26a	18.22±0.20b	29.70±0.34a
vrnM2	88.29±3.13a	5.09±0.54a	7.70±0.37b	11.79±0.75a	17.95±0.73b	29.37±1.25a
vrnM3	88.00±1.04a	3.72±0.37a	7.95±0.29b	12.28±0.25a	17.62±0.54b	28.60±0.49a
vrnM4	89.00±2.08a	5.55±0.83a	8.08±0.32b	12.63±0.89a	18.28±0.78b	29.87±0.37a
vrnM5	85.33±0.67a	5.07±0.52a	7.96±0.11b	10.73±0.17a	18.95±0.68a	28.57±0.73a
vrnM6	81.00±3.14b	4.48±0.57a	7.24±0.44b	11.65±0.26a	17.50±0.99b	27.65±1.05a

WT:扬麦 18;vrnM1~vrnM6 见表 3。同列数据后标有不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。

表 7 突变型与野生型籽粒硬度分析

Table 7 Analysis of grain hardness index in mutant and wild-type seeds

突变体类型	硬度指数	硬度类型
WT	14.12a	软质
pinM1	62.55c	硬质
pinM2	57.90c	混合
pinM3	70.43d	硬质
pinM4	51.69b	混合
pinM5	58.48c	混合

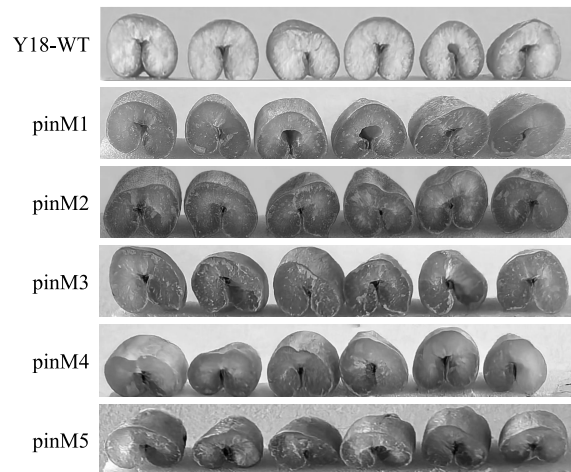
WT:扬麦 18。同列数据后标有不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。

### 3 讨论

与长江中下游麦区红皮春性小麦相比,北方黄淮麦区冬性小麦主要表现为白皮、硬质、多穗、高产,但在穗发芽、抗赤霉病和白粉病等方面,南方小麦具有显著优势<sup>[28-30]</sup>。红皮春性软质小麦品种扬麦 18

由表 7 可以看出,与野生型 (WT) 相比, *pinM1*~*pinM5* 的籽粒硬度均显著增强 ( $P<0.05$ ), 硬度指数均超过 50.00, 表现为硬质麦或混合麦特征, 其中 *pinM3* 突变体表现为超高硬度。对籽粒进行横切观察发现, 野生型扬麦 18 具有明显的粉质特征, 而所有编辑系的籽粒均呈现角质或半角质特征 (图 7)。

2.3.3 *Myb10* 基因编辑对种皮颜色的影响 对 *Myb10* 基因各编辑系的种皮颜色进行观察发现, 除 *Myb3BT4*、*Myb3DT3* 这 2 个同义突变类型保持了扬麦 18 的红色种皮外, 其他编辑系小麦的种皮颜色均变为白色。*Myb10* 编辑系种子外观的比较结果见图 8。

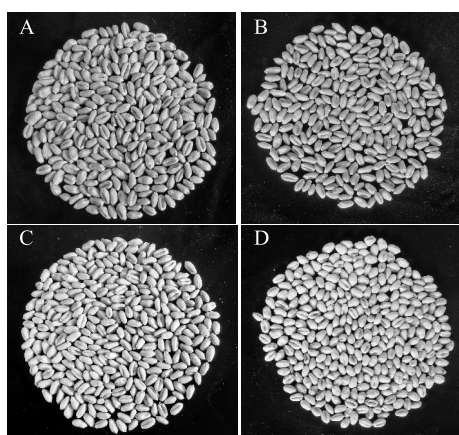


Y18-WT:野生型扬麦 18;pinM1~pinM5 见表 7。

图 7 *Pin* 基因编辑系籽粒剖面

Fig.7 Seed cross sections of *Pin* editing lines

是长江中下游麦区重要的抗病亲本, 兼抗赤霉病、白粉病、黄花叶病和穗发芽。利用 CRISPR/Cas9 技术



A: 扬麦 18; B: Myb3BT4 编辑系; C: Myb3BT1 编辑系; D: 科农 199。

图 8 *Myb10* 编辑系种子外观的比较

Fig.8 Comparison of seed appearance in *Myb10* editing lines

对春化基因等持家基因进行靶向编辑,将北方小麦的株型优势引入南方小麦中,并保持南方小麦的抗性优势,对于创制满足不同农艺、品质需求的小麦新种质及其在分子育种中的应用具有重要价值。

本研究通过 CRISPR/Cas9 技术成功创制了 *Vrn-D1*、*Pina*、*Pinb* 和 *Myb10* 等 4 个持家基因的系列编辑系。创制的 *vrnM1* ~ *vrnM6* 等 *Vrn-D1* 编辑系表现出不同的株高、节间长度,为筛选具有适宜株高的小麦育种新材料提供了重要种质。上述编辑系在苗期均表现出匍匐特征,与冬性小麦相似,延长了春化进程,推迟了拔节时间,而成熟期与扬麦 18 相近,对于避开倒春寒、提高抗倒性有重要价值。

*Pina*、*Pinb* 基因编码的膜结合蛋白 puroindoline 是 friabilin 蛋白复合体的核心组分,是调节小麦籽粒硬度的关键蛋白<sup>[31]</sup>,其不同变异类型可导致小麦籽粒硬度产生差异。迄今,小麦中已报道的 *Pinb-D1* 等位变异已达到 27 种<sup>[32]</sup>,但得到育种利用的仍是 *Pinb-D1b* 等极个别类型,*Pinb-D1b* 突变类型在优质小麦品种中的分布频率很高。本研究创制的 5 个 *Pin* 基因编辑系具有各不相同的硬度表现,拓宽了硬度变异范围,可以满足面包、馒头、饼干等不同终端食品对小麦品质的需求,未来可在品质分子育种中发挥重要作用。

*Myb10* 编辑结果证实,该基因是决定种皮颜色的关键基因。已有研究发现,种皮颜色与种子休眠期存在密切联系,白皮小麦的休眠期一般短于红皮

小麦<sup>[33]</sup>,在成熟后期持续阴雨条件下容易发生穗发芽危害,导致大面积减产、品质下降<sup>[34]</sup>。因此,本研究获得的白皮小麦编辑系更适用于北方小麦品种的改良。

CRISPR/Cas9 技术与传统诱变和转基因方法相比,具有操作简便、靶向变异效率高、对基因组损伤小等优点,对于提高作物遗传多样性、育种实用性具有重要利用价值<sup>[35]</sup>。利用该技术,本研究高效创制了白皮、冬性和高硬度等基因编辑系。由于遗传背景均为扬麦 18,可以通过不同编辑系之间的杂交,快速创制满足不同生态型和品质需求的新品系。如通过三者杂交创制白皮硬质冬性小麦新品系,可直接在冬季温度更低、生育后期降水较少的黄淮麦区种植。由于小麦新品系保持了扬麦 18 对赤霉病、白粉病和黄花叶病的综合抗性,与北方当前主推品种相比具有突出的抗性优势。

## 4 结论

本研究利用 CRISPR/Cas9 技术在扬麦 18 遗传背景下对 4 个持家基因 (*Vrn-D1*、*Pina*、*Pinb* 和 *Myb10*) 进行基因编辑,创制了冬性、籽粒硬质、白皮等系列小麦新种质,研究结果可为南北方小麦跨生态区分子育种提供理论支撑。

## 参考文献:

- [1] 王一杰,辛岭,胡志全,等. 我国小麦生产、消费和贸易的现状分析[J]. 中国农业资源与区划,2018,39(5):36-45.
- [2] 姚金保,张鹏,余桂红,等. 江苏省小麦品种(系)籽粒产量基因型与环境互作分析[J]. 麦类作物学报,2021,41(2):191-202.
- [3] WANG L, NIU J S, LI Q Y, et al. Allelic variance at the vernalization gene locus *Vrn-D1* in a group of sister wheat (*Triticum aestivum*) lines and its effects on development[J]. The Journal of Agricultural Science,2015,153(4):588-601.
- [4] 王化敦,高春蕾,张鹏,等. 长江中下游麦区小麦品种籽粒硬度及 puroindoline 基因等位变异的分子检测[J]. 麦类作物学报,2017,37(4):438-444.
- [5] 胡文静,吴宏亚,董亚超,等. 江苏省小麦品种(系)硬度基因分布特点解析[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版),2020,41(6):28-33.
- [6] 陈杰,陈锋,詹克慧,等. 普通小麦籽粒 *Tamyb10* 基因等位变异的分子检测[J]. 麦类作物学报,2013,33(2):224-229.
- [7] 胡巍,侯喜林,史公军. 植物春化特性及春化作用机理[J]. 植物学通报,2004,39(1):26-36.

- [ 8 ] YAN L, LOUKOIANOV A, TRANQUILLI G, et al. Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(10):6263-6268.
- [ 9 ] YAN L L, LOUKOIANOV A, BLECHL A, et al. The wheat *VRN2* gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization[J]. Science, 2004, 303(5664):1640-1644.
- [ 10 ] YAN L, FU D, LI C, et al. The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of *FT*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(51):19581-19586.
- [ 11 ] FU D L, SZUCS P, YAN L L, et al. Large deletions within the first intron in *VRN-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2005, 273(1):54-65.
- [ 12 ] CHEN A, DUBCOVSKY J. Wheat TILLING mutants show that the vernalization gene *VRN1* down-regulates the flowering repressor *VRN2* in leaves but is not essential for flowering[J]. PLoS Genetics, 2012, 8(12):e1003134.
- [ 13 ] SHIMADA S, OGAWA T, KITAGAWA S, et al. A genetic network of flowering-time genes in wheat leaves, in which an *APETA-LAI/FRUITFULL*-like gene, *VRN1* is upstream of FLOWERING LOCUS T[J]. The Plant Journal; for Cell and Molecular Biology, 2009, 58(4):668-681.
- [ 14 ] 封超年, 朱新开, 王龙俊, 等. 小麦茎蘖成穗率与产量关系及其调控[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 1999, 20(3):1-7.
- [ 15 ] 吴宏亚, 蒋正宁, 王玲, 等. 小麦籽粒硬度及其对面粉加工品质影响的研究进展[J]. 江苏农业学报, 2014, 30(2):437-441.
- [ 16 ] DOULIEZ J P, MICHON T, ELMORJANI K, et al. Mini review: structure, biological and technological functions of lipid transfer proteins and indolines, the major lipid binding proteins from cereal kernels[J]. Journal of Cereal Science, 2000, 32(1):1-20.
- [ 17 ] GAUTIER M F, ALEMAN M E, GUIRAO A, et al. *Triticum aestivum* puroindolines, two basic cystine-rich seed proteins; cDNA sequence analysis and developmental gene expression[J]. Plant Molecular Biology, 1994, 25(1):43-57.
- [ 18 ] NIRMAL R C, FURTADO A, WRIGLEY C, et al. Influence of gene expression on hardness in wheat[J]. PLoS One, 2016, 11(10):e0164746.
- [ 19 ] 王根平, 毕惠惠, 孙永伟, 等. 红粒小麦 *Tamyb10* 单倍型检测及其与穗发芽抗性的关系[J]. 作物学报, 2014, 40(6):984-993.
- [ 20 ] LANG J, JIANG H Y, CHENG M P, et al. Variation of *TaMyb10* and their function on grain color and pre-harvest sprouting resistance of wheat[J]. The Plant Journal; for Cell and Molecular Biology, 2024, 118(5):1388-1399.
- [ 21 ] ZHU Y W, LIN Y R, FAN Y J, et al. CRISPR/Cas9-mediated restoration of *Tamyb10* to create pre-harvest sprouting-resistant red wheat[J]. Plant Biotechnology Journal, 2023, 21(4):665-667.
- [ 22 ] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. Science, 2007, 315(5819):1709-1712.
- [ 23 ] LI S N, LIN D X, ZHANG Y W, et al. Genome-edited powdery mildew resistance in wheat without growth penalties[J]. Nature, 2022, 602(7897):455-460.
- [ 24 ] TANG H L, LIU H Y, ZHOU Y, et al. Fertility recovery of wheat male sterility controlled by *Ms2* using CRISPR/Cas9[J]. Plant Biotechnology Journal, 2021, 19(2):224-226.
- [ 25 ] NI P, ZHAO Y D, ZHOU X M, et al. Efficient and versatile multiplex prime editing in hexaploid wheat[J]. Genome Biology, 2023, 24(1):156.
- [ 26 ] 陆成彬, 张伯桥, 高德荣, 等. 抗赤霉病小麦新品种扬麦 18 的选育研究[J]. 中国农学通报, 2010, 26(10):146-148.
- [ 27 ] 胡正, 陶斯娜, 王贝贝, 等. 江淮地区主推弱筋小麦产量、品质及部分农艺性状分析[J]. 安徽农业大学学报, 2023, 50(1):1-7.
- [ 28 ] 胡秀娟. 我国主要小麦品种品质现状与北方冬麦区品种演变研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2006.
- [ 29 ] 王震, 李金秀, 张彬, 等. 不同生态区小麦品种的穗发芽抗性评价[J]. 应用生态学报, 2020, 31(12):4161-4170.
- [ 30 ] 张勇, 胡文静, 张春梅, 等. 我国“十三五”育成小麦新品种(系)抗赤霉病进展分析与展望[J]. 生物技术进展, 2021, 11(5):590-598.
- [ 31 ] GIROUX M J, MORRIS C F. Wheat grain hardness results from highly conserved mutations in the friabilin components puroindoline a and b[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(11):6262-6266.
- [ 32 ] IFTIKHAR A, ALI I. Kernel softness in wheat is determined by starch granule bound puroindoline proteins[J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2017, 26(3):247-262.
- [ 33 ] 朱冬梅, 张晓祥, 王玲, 等. 长江中下游麦区主要小麦品种穗发芽抗性及其鉴定方法比较[J]. 麦类作物学报, 2014, 34(7):944-949.
- [ 34 ] 李志坤, 时萍, 姜文武, 等. 长江中下游安徽地区部分小麦品种(品系)穗发芽抗性分析[J]. 农业科技通讯, 2021(1):56-61.
- [ 35 ] 景润春, 卢洪. CRISPR/Cas9 基因组定向编辑技术的发展与在作物遗传育种中的应用[J]. 中国农业科学, 2016, 49(7):1219-1229.

(责任编辑:徐艳)