



王巍, 张尧, 孙丽, 等. 小麦基因编辑的现状、机遇、挑战与发展方向[J]. 南京农业大学学报, 2026, 49(5): 1049–1063.

Wang W, Zhang Y, Sun L, et al. Current status, opportunities, challenges, and future directions of wheat gene editing[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2026, 49(5): 1049–1063.

特约综述

小麦基因编辑的现状、机遇、挑战与发展方向

王巍*, 张尧, 孙丽, 王秀娥*

(南京农业大学作物遗传与种质创新利用全国重点实验室/江苏省钟山生物育种实验室, 江苏 南京 211800)

摘要: 小麦高产稳产对于保障全球粮食安全至关重要, 培育和利用高产、抗病和耐逆的小麦品种是小麦高产稳产的基础。发掘、创制优异种质资源是小麦育种的根本。基因编辑技术的发展和利用, 推动了小麦种质资源创制技术变革, 并已创制了广谱抗条锈病和白粉病等优异小麦新种质。但基因编辑在小麦中的广泛应用面临两大难题: 第一, 传统基因编辑依赖遗传转化, 小麦遗传转化难度大、成本高, 可转化基因型受限; 第二, 小麦为异源六倍体, 基因组大、结构复杂, 致使小麦基因编辑效率偏低。近年来出现的病毒诱导的基因编辑技术(virus-induced gene editing, VIGE)使小麦基因编辑摆脱了遗传转化的限制, 降低了小麦基因编辑成本, 扩大了可编辑基因型范围, 提高了小麦基因编辑效率。本文在介绍不同基因编辑技术在小麦中应用现状的基础上, 比较小麦中现有基因编辑工具递送方法的优劣, 总结基因编辑技术在小麦基因挖掘和种质创制中发挥的作用, 最后讨论 VIGE 为小麦基因挖掘和种质创制带来的机遇以及小麦基因编辑依然面临的挑战和未来发展方向。

关键词: 小麦; 基因编辑; 种质创制; CRISPR-Cas; 病毒诱导的基因编辑技术(VIGE)

中图分类号: S512

文献标志码: A

文章编号: 1000-2030(2026)05-1049-15

Current status, opportunities, challenges, and future directions of wheat gene editing

WANG Wei*, ZHANG Yao, SUN Li, WANG Xiu'e*

(National Key Laboratory of Crop Genetics & Germplasm Enhancement and Utilization/Zhongshan Biological Breeding Laboratory of Jiangsu Province, Nanjing Agricultural University, Nanjing 211800, China)

Abstract: High and stable wheat yield is critical for ensuring global food security. The development of high yield, biotic and abiotic wheat varieties is fundamental for realizing this goal. The breakthrough of wheat breeding depends on the exploration and creation of elite genetic resources. Gene editing is a cutting-edge technology. Successful application of gene editing in wheat has driven innovation in wheat germplasm development. Elite germplasm with valuable traits, including broad-spectrum resistance to stripe rust and powdery mildew, has been created using gene editing. However, the widespread application of gene editing in wheat has been constrained by two major challenges. Firstly, conventional wheat gene editing relies on genetic transformation, which is difficult, costly and highly genotype-dependent; secondly, the huge and complicated hexaploid wheat genome results in relatively low gene-editing efficiency. The recently emerged virus-induced gene editing(VIGE) bypasses the need for genetic transformation, reduces the costs of wheat gene editing, expands the range of editable genotypes, and improves wheat gene editing efficiency. This review provides a brief overview of current gene editing technology applications in wheat, compares the advantages and limitations of existing gene editing tool delivery methods, summarizes the contributions of gene editing to gene discovery and germplasm innovation, and discusses the opportunities brought by VIGE as well as persistent challenges and future directions for wheat gene editing.

Keywords: wheat; gene editing; germplasm development; CRISPR-Cas; virus-induced gene editing(VIGE)

小麦在全球种植面积自 1961 年至今连续位居粮食作物首位(联合国粮食及农业组织, FAO)。中国是世界上小麦种植面积最大、总产量最高的国家, 小麦的高产稳产对保障全球和我国粮食安全均具有重要意义。全球变暖、耕作方式改变等因素导致病虫害流行、干旱和洪涝等逆境频发。以小麦病害为例, 秆锈菌致病小种 Ug99 克服了原有抗秆锈病基因, 导致非洲和西亚等地秆锈病大面积暴发^[1]; 新生病害麦瘟病在巴西和孟加拉国等国家发生^[2], 茎基腐病和纹枯病在我国流行^[3]。这些都给小麦安全生产带来了巨大挑

收稿日期: 2025-09-05

基金项目: 科技创新 2030-重大项目(2023ZD04025); 国家重点研发计划项目(2023YFF1000600)

作者简介: 王巍, 教授, 研究方向为小麦高通量基因编辑技术开发与分子育种, E-mail: wangw@njau.edu.cn; 王秀娥, 教授, 研究方向为小麦染色体工程与分子育种, E-mail: xiuew@njau.edu.cn。* 通信作者。

战。改良小麦抗病性和耐逆性,选育和利用抗病耐逆品种是保障小麦绿色、经济、安全生产的重要路径。

当前,以分子标记辅助选择技术为代表的育种 3.0 方兴未艾,以基因编辑、高通量测序、人工智能等新兴技术为代表的育种 4.0 又悄然兴起^[4]。但无论育种技术如何发展,种质资源的挖掘与创制始终都是小麦遗传育种的关键基础(图 1)。传统育种中,小麦种质主要来源于对小麦自然群体和远缘物种的挖掘,以及物理/化学诱变种质的筛选。但小麦为异源六倍体,基因组庞大(3 个亚基因组,基因组大小高达约 17 Gb,是水稻基因组的 40 倍)且结构复杂(重复序列多,占全基因组 85% 以上),3 个亚基因组(AABBDD)同源基因间的功能冗余等都加大了功能基因挖掘和种质创制的难度。以 CRISPR-Cas9 为代表的基因编辑技术在多基因编辑方面的优势,为小麦突变体,尤其是亚基因组同源基因多突变体的创制带来了便利,可有效解决同源基因功能冗余带来的难题,推动现有小麦种质创制方法变革,提高小麦种质创新和育种效率。

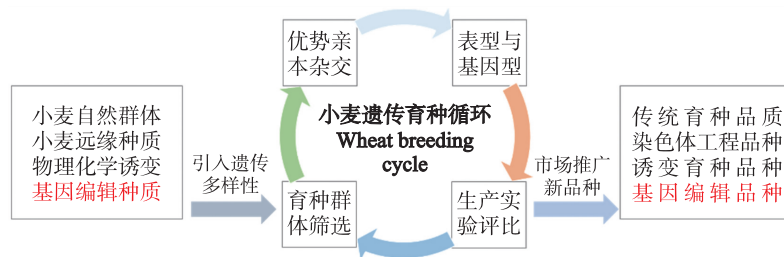


图 1 小麦育种循环图解

Fig. 1 The schematic illustration of wheat breeding cycle

基因编辑是可以定向突变基因组目标基因的技术^[5],其基本原理是在目标基因指定位点引入 DNA 双链断裂(DNA double-strand break, DSB),利用细胞自身在 DNA 双链断裂时启动的非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)或同源重组(homologous recombination, HR)修复机制,实现目标基因编码区或表达调控区域的缺失、插入和替换等^[6]。自 2012 年起,以 CRISPR-Cas9 为代表的基因编辑技术因其设计和应用的便利性,被迅速应用于医疗和农业等各个领域,为遗传疾病治疗和作物遗传育种带来了革命性的变化。CRISPR-Cas9 基因编辑技术的主要发明人 Emmanuelle Charpentier 和 Jennifer Doudna 也因此获得了 2020 年诺贝尔化学奖。

近年来,利用 CRISPR-Cas 基因编辑技术功能解析了数十个小麦基因^[7-9],并创制了在小麦育种中有重要利用价值的基因编辑新种质^[10-11]。虽然如此,小麦基因编辑依然面临因依赖遗传转化造成的通量低、成本高和基因型受限等诸多挑战。此外,小麦基因组的庞大和复杂也使小麦基因编辑效率相对低于二倍体作物。2021 年以来,在小麦中实现 VIGE 的研究被多次报道^[12-15],VIGE 打破了小麦基因编辑对遗传转化的依赖,降低了小麦基因编辑成本,提高了基因编辑效率,为小麦高通量基因编辑和分子设计育种带来了新机遇。此前,Li 等^[7]、Awan 等^[8]和 Zhou 等^[9]分别从不同角度对基因编辑技术在小麦中的应用进行了总结,并归纳了大量应用案例。本文将介绍各种基因编辑工具在小麦基因挖掘和种质创制中的应用现状,重点比较各种基因编辑工具递送方式在小麦基因编辑种质创制中的优劣,在此基础上,剖析 VIGE 为小麦功能基因挖掘和小麦基因编辑种质创制带来的机遇,讨论小麦基因编辑育种仍然面临的挑战和未来发展方向。

1 基因编辑工具及其在小麦中的应用情况

最早被应用于基因编辑的巨型核酸酶(meganuclease)能够识别并切割目标基因组中 12~40 bp 的特定位点,从而实现基因编辑^[16-17]。但因无法人为设计其基因编辑位点,未得到广泛应用。此后发现的锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)和转录激活因子样效应子核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALEN)得到了较为广泛的应用,但 2013 年以后迅速被 CRISPR-Cas 所取代。

1.1 ZFN 与 TALEN 在小麦基因编辑中的应用

ZFN 是最早可人为设计靶位点的基因编辑工具,由 3~6 个能够识别 3 个特定核苷酸的锌指 DNA 结合单元和 C 端的 Fok I 核酸酶结构域组成(图 2-a)^[18-19]。由于 Fok I 形成同源二聚体时才能发挥 DNA 切割活性,而每个 ZFN 只携带 1 个 Fok I,因此要 2 个 ZFN 同时靶向 1 个位点才能切割 DNA,实现基因编

辑^[20]。2018和2020年,ZFN在小麦中的应用被2次报道,分别应用于基于同源重组(homologous recombination,HR)的精准编辑和不携带转基因成分的基因编辑突变体创制^[21-22]。

TALEN由类转录激活因子效应物(transcription activator-like effector,TALE)的16个DNA结合结构域及其辅助元件和1个C端的Fok I核酸酶结构域组成(图2-b)。TALE的每个DNA识别结构域包含33~35个氨基酸残基,这些识别结构域之间仅有2个氨基酸不同,用于决定其核苷酸识别的特异性^[23]。由于其识别结构域相对ZFN更加特异、设计更加简单,自2010年开始被迅速应用于酵母^[24]、人类^[25-26]、水稻^[27]、拟南芥^[28]等物种。2014年,Wang等^[29]首次在小麦中应用TALEN,创制了小麦白粉病感病基因*TaMLO*的功能缺失突变体,以及对应的具有白粉病广谱抗性且不影响产量的*Tamlo-R32*株系^[10];2017年,Luo等^[30]采用TALEN在小麦品种‘Fielder’中编辑*Lr21ψ*,使‘Fielder’获得对条锈病的抗性。

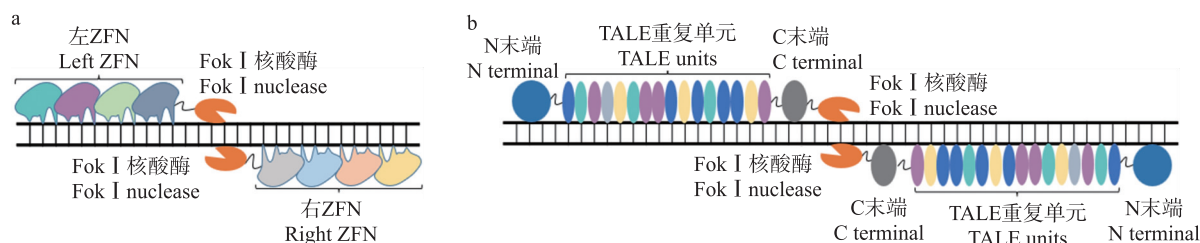


图2 基因编辑工具 ZFN(a)和 TALEN(b)图解

Fig. 2 The schematic illustration of gene editing tools ZFN(a) and TALEN(b)

图片修改自参考文献[31]。The images are modified from reference[31].

1.2 CRISPR-Cas 基因编辑工具在小麦中的应用

CRISPR是规律间隔成簇短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)的简称,于1987年在大肠杆菌中被首次发现^[32]。2007年,Barrangou等^[33]发现病毒攻击嗜热链球菌后,病毒的基因组序列会被整合进嗜热链球菌的CRISPR序列,从而使嗜热链球菌获得对该病毒的免疫能力,证实CRISPR是细菌免疫系统的一部分。2012年,Jinek等^[34]使用CRISPR-Cas9在体外成功切割双链DNA。2013年,Cong等^[35]和Mali等^[36]分别报道了CRISPR-Cas9在真核细胞基因组编辑中的应用。CRISPR-Cas9系统只需设计含有20个核苷酸的靶标(protospacer),且保证其3'端有相邻的PAM(protospacer adjacent motif)序列NGG,将靶标序列作为spacer构建至sgRNA即可应用于基因编辑(图3)。因其设计的便利性,CRISPR-Cas9被快速应用于植物基因编辑,在拟南芥、水稻、小麦和烟草等植物细胞中的首次应用于2013年被同时报道^[37-39]。由于商业化使用CRISPR-Cas9需要支付高昂的专利费,因此多家科研单位独立开发了新型CRISPR-Cas,如Cas12i3^[40-41]等。至今为止,CRISPR-Cas9依然是效率最高、应用最为广泛的基因编辑工具。

为了摆脱CRISPR-Cas9因PAM序列NGG造成的应用范围限制,科学家开发了识别不同PAM的CRISPR-Cas12a^[42]以及大量CRISPR-Cas9、CRISPR-Cas12a变种。同时,为了打破Cas9(约4.2 kb)过大造成的递送限制,还开发了Cas12f^[43]、TnpB^[44]、IscB^[44]和TIGR-Tas^[45]等迷你型(约1 kb)基因编辑工具。根据PubMed检索结果,截至2025年9月,在小麦中利用CRISPR-Cas9实现基因编辑的研究论文有240余篇,而利用CRISPR-Cas12a和Cas12i3的均不足20篇,远低于水稻等其他物种。

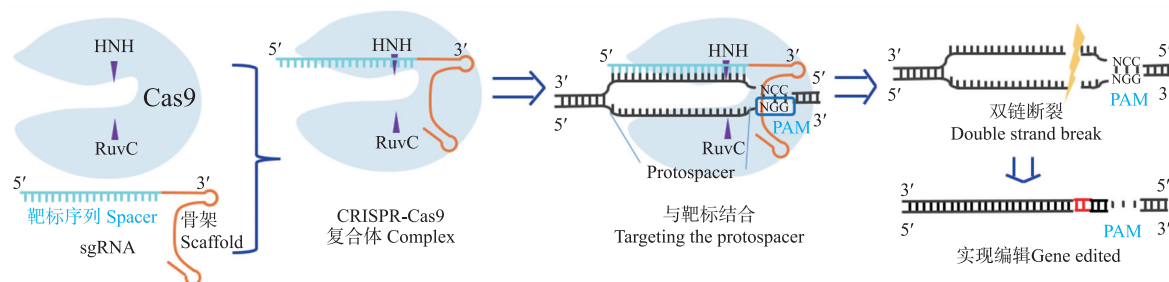


图3 CRISPR-Cas9实现基因编辑的过程图解

Fig. 3 The schematic illustration of the gene editing process induced by CRISPR-Cas9

图片修改自参考文献[31]。The images are modified from reference[31].

1.3 精准编辑工具在小麦中的应用

CRISPR-Cas 的 DNA 编辑方式主要以 NHEJ 造成的基因功能缺失为主,无法满足科学研究和实际应用对靶位点进行高效精准编辑的需求。针对这一问题,研究人员以 CRISPR-Cas9 为基础,发展了以胞嘧啶碱基编辑器 CBE(cytosine base editor, C·G→T·A)^[46]、腺嘌呤碱基编辑器 ABE(adenine base editor, A·T→G·C)^[47] 和先导编辑器 PE(prime editor)^[48] 等一系列精准编辑工具(图4),并对常用的 CRISPR-Cas 基因编辑工具及其衍生精准编辑器的原理和优缺点进行了详细综述^[49],本文将不再对此赘述。精准基因编辑工具改良或应用的工作在哺乳动物细胞中已经大量报道,但在植物,尤其是小麦中,由于编辑效率低,应用难度大,目前已经报道的碱基编辑^[50-52] 和先导编辑^[53-56] 应用主要由少数实验室完成。Zhang 等^[52] 利用碱基编辑工具创制了小麦抗除草剂种质, Ni 等^[55] 和 Zhao 等^[56] 在小麦中优化了先导编辑工具,并实现了多基因编辑和基因调控元件的编辑。

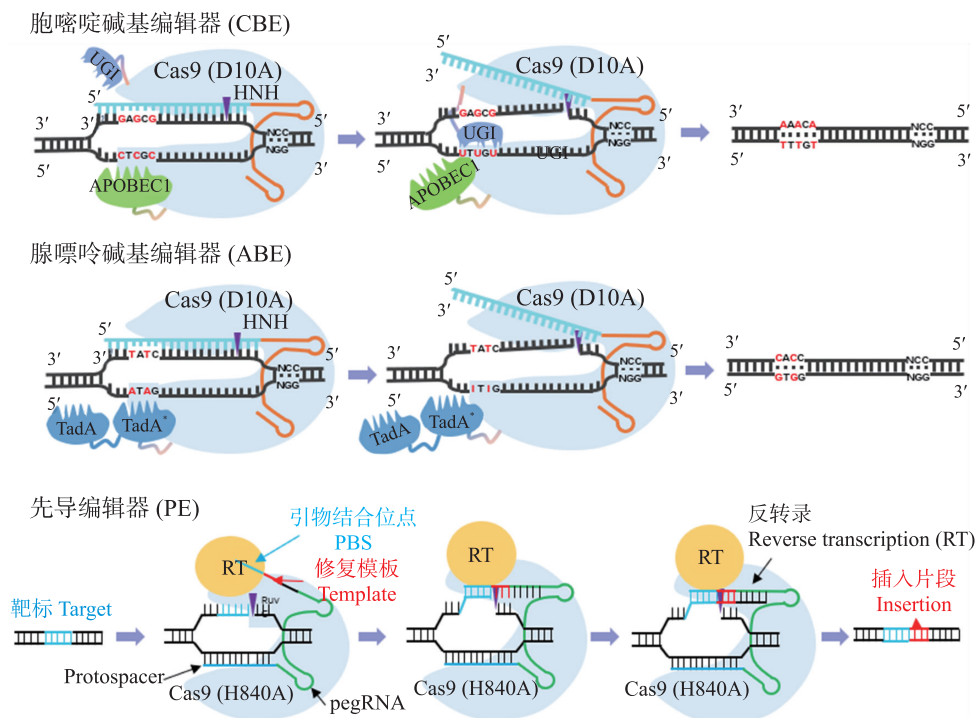


图4 胞嘧啶碱基编辑器、腺嘌呤碱基编辑器和先导编辑器实现精准编辑过程示意图

Fig. 4 The schematic illustration of the gene editing process induced by the cytosine base editor (CBE), adenine base editor (ABE) and prime editor (PE)

图片修改自参考文献[31]。The images are modified from reference[31].

2 小麦基因编辑工具递送方法

将基因编辑工具递送至小麦细胞,是实现小麦基因编辑、创制小麦基因编辑突变体的前提。目前,在小麦中创制可遗传突变的基因编辑工具递送方法主要包括遗传转化和单倍体诱导等,这些方法高度依赖遗传转化,提高了小麦突变体创制成本,限制了可编辑小麦的基因型。为突破这一瓶颈,研究者不断探索新型递送方式,如利用病毒递送基因编辑元件 RNA^[15] 等。以下梳理并比较了基因编辑工具主要递送方法及其在小麦中的应用现状(图5)。

2.1 农杆菌转染

农杆菌转染重复性好、成本较低,是最受欢迎的农作物遗传转化方法。然而,受制于转化效率(通常<5%)和再生效率偏低等因素,基因枪介导的遗传转化是早期小麦遗传转化的主要方法。2015年,日本烟草公司通过培养基组分优化和幼胚的物理处理,开发出小麦农杆菌转化系统(Agrobacterium-mediated transformation system),可以对‘Fieldier’等再生能力强的小麦品种(基因型)实现高达40%~70%的稳定转化率,极大地推动了基因编辑技术在小麦中的应用^[57-58]。后续研究通过引入关键再生调控基因,进一步拓宽可被遗传转化的小麦基因型,推动农杆菌介导的遗传转化成为小麦基因编辑突变体创制的主要方

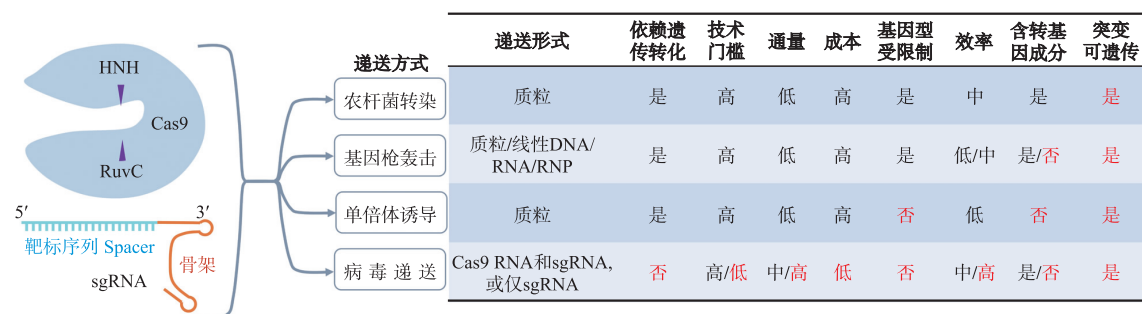


图5 小麦基因编辑突变体创制方法及其主要优缺点比较

Fig. 5 Methods for creating gene-edited wheat mutants and comparison of their main advantages and disadvantages

式^[59-60]。但该技术借助 T-DNA 序列将外源 DNA 插入小麦基因组,导致利用基因编辑创制的小麦突变体在育种应用时需接受严格的转基因安全监管。

2.2 基因枪轰击

基因枪介导的遗传转化在小麦早期基因编辑应用中起到了重要作用^[29,61],但由于其效率相对于新型农杆菌转化技术较低,且基因枪轰击可能引起基因组结构变异等问题,逐渐被农杆菌介导的小麦遗传转化取代。但基因枪介导的遗传转化具有其独特的优势。例如,基因枪轰击可以递送基因编辑元件的 RNA 转录本^[62],或者基因编辑器蛋白(Cas9 或碱基编辑器)和 sgRNA 复合物(RNP)^[63],在无抗生素筛选的情况下实现植株再生,创制完全不含转基因成分的基因编辑突变体。但在去除抗生素筛选流程时,有大量未被转化的细胞被再生成植株,通常占再生植株总数的 90% 以上^[64],加之 RNA 和 RNP 的遗传转化过程中,RNA 和蛋白的不稳定造成基因编辑效率降低。因此,需创制数百至数千株再生植株,才有可能获得目标基因编辑突变体,这极大地提高了小麦基因编辑突变体创制成本。

2.3 单倍体诱导

单倍体诱导编辑技术(haploid induction editing technology, HI-Edit)通过将表达基因编辑元件的单倍体诱导系与目标基因型杂交,使二者配子融合,编辑目标基因型配子基因组,此后基因编辑元件表达框与单倍体诱导系基因组一起消失,而被编辑的目标基因型配子发育成基因编辑单倍体,再通过诱导形成携带纯合编辑位点的双单倍体^[65]。该技术在小麦基因编辑中的主要优势:1)摆脱了基因型的限制,可以编辑任意基因型;2)产生的基因编辑双单倍体完整保留目标基因型遗传背景,且不含任何转基因成分。但对于小麦而言,该技术也存在明显的不足之处:1)对每个基因进行编辑时,都需要对小麦单倍体诱导系进行遗传转化,而目前最常用的小麦单倍体诱导系是玉米白甜糯品系,其遗传转化非常困难;2)基因编辑效率偏低,需要大量创制双单倍体,并从中筛选基因编辑突变体。目前,利用基因编辑技术突变 *PLA/MTL* 和 *CENH3* 等基因创制的小麦单倍体诱导系,有望改变单倍体诱导系难以遗传转化的现状,加速该技术在小麦中的应用。

2.4 病毒递送

利用前面所述的递送方法,每编辑一个基因都需要进行一次遗传转化。虽然当前小麦遗传转化效率已有极大改善,但依然面临周期长、可转化基因型受限、商业化服务价格昂贵等问题,限制了基因编辑的广泛应用。探索利用新型递送工具,摆脱小麦基因编辑对遗传转化的依赖,是变革小麦基因编辑突变体创制方式的关键。

RNA 病毒很早便被研究人员应用于实现不依赖遗传转化的基因编辑,但无法获得可遗传的编辑事件^[66]。直至 2020 年,Ellison 等^[67]首次报道了利用烟草脆裂病毒(tobacco rattle virus, TRV)递送与 RNA 转移元件(如 mobile transfer RNA^{Met}-like structure)融合的 sgRNA 至 Cas9 转基因烟草,实现了可遗传的基因编辑。从 2021 年起,有 3 篇文章分别独立报道了应用大麦条纹花叶病毒(barley stripe mosaic virus, BSMV)递送 sgRNA 至 Cas9 转基因小麦获得稳定遗传基因编辑事件^[12-14]。BSMV 是正义链 RNA 病毒,包含 α 、 β 和 γ 3 条链,其 γ 链可以递送小片段(小于 700 nt)RNA 至小麦等麦类作物中,早期主要被用于病毒诱导的瞬时基因沉默^[68]。由于 BSMV 可以侵染小麦顶端分生组织和生殖细胞,利用 BSMV 递送 sgRNA (96 nt)至 Cas9(约 4.2 kb)转基因小麦,收获种子后对后代进行筛选,即可获得基因编辑突变体(图 6-a)。

虽然该方法在一次遗传转化后即可使后续基因编辑突变体创制摆脱其限制,但依然依赖 Cas9 转基因株系。2025 年,Qiao 等^[15]报道了利用大麦黄条点花叶病毒(barley yellow striate mosaic virus,BYSMV)同时递送 Cas9 RNA 和 sgRNA 至多种小麦基因型,获得稳定遗传的基因编辑突变体,实现了不依赖 Cas9 转基因株系的 VIGE(图 6-b)。BYSMV 是负链 RNA 病毒,只有 1 条单链,可以系统性侵染小麦,但不能侵染顶端或侧枝分生组织,因此该方法需将 Cas9 RNA 和 sgRNA 均与 RNA 转移元件融合,促进 Cas9 RNA 和 sgRNA 向分生组织转移。虽然该方法接种的小麦主茎无法将基因编辑事件遗传至后代,但大约 10%的接种单株有部分侧枝可以将基因编辑事件遗传至后代。

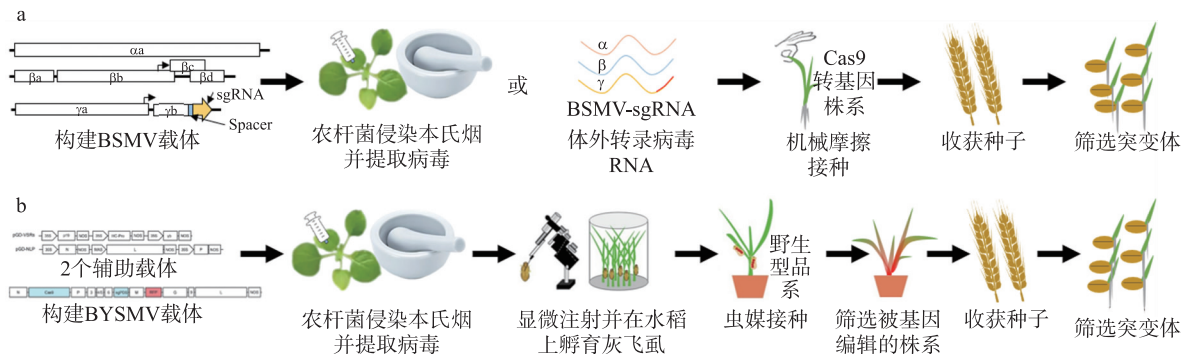


图 6 利用正义链 RNA 病毒 BSMV(a)和反义链 RNA 病毒 BYSMV(b)实现 VIGE 的流程

Fig. 6 The pipelines to achieve VIGE via positive strand RNA virus BSMV(a) and negative strand RNA virus BYSMV(b)

由于承载量、接种方式和递送范围的不同,BSMV 和 BYSMV 在实现 VIGE 过程中各有优势(表 1)。在承载量方面,BSMV 承载量小,只能递送 sgRNA,实现 VIGE 仍然需要以表达 Cas9 的小麦株系为基础,在编辑无法遗传转化的基因型时,需要首先通过杂交将 Cas9 转移至目标基因型;BYSMV 承载量大,可以同时递送 Cas9 RNA 和 sgRNA,使小麦 VIGE 完全摆脱对遗传转化的依赖,从而可以直接编辑任意小麦基因型,进一步降低不同小麦基因型、小麦二级和三级基因库种质资源中关键功能基因的挖掘难度,并产生不含任何转基因成分的基因编辑突变体,使其在育种应用中更容易被公众接受。在接种方式方面,BYSMV 需使用灰飞虱(*Laodelphax striatellus*)作为接种媒介,不仅其操作过程中的生物安全要求高,其复杂的操作过程也增加了以其为基础的 VIGE 推广应用难度;BSMV 通过简单机械摩擦即可实现接种,其推广应用十分便利。在基因编辑工具递送范围方面,只有大约 10%的 BYSMV 接种单株有部分侧枝携带基因编辑事件,增加了筛选工作量;BSMV 接种成功的单株则全部能够产生可遗传的基因编辑事件,突变体筛选相对简单。在实际的研究工作和育种实践中,可依据需求和成本选择不同的 VIGE 实现方式。在生物安全性方面,虽然 BSMV 通过简单的机械摩擦即可传播,但 BSMV 毒力相对较低,染毒后代大多数不携带病毒,只能递送 sgRNA,实现基因编辑仍然依赖 Cas9 转基因株系,无法编辑天然物种,生物安全性相对较高。BYSMV 可以同时递送 Cas9 和 sgRNA,且其接种依赖灰飞虱,外溢风险较高,需要进行更加严格的操作过程管控。

表 1 基于 BSMV 和 BYSMV 的 VIGE 优缺点比较

Table 1 The comparison between BSMV- and BYSMV-based VIGE

病毒 Virus	递送形式 Delivering manner	接种方式 Inoculation method	递送范围 Delivery range
BSMV	sgRNA	机械摩擦	全部接种植株的全部分蘖
BYSMV	Cas9 RNA 和 sgRNA	显微注射灰飞虱,与水稻共培养后接种小麦	部分接种植株的部分分蘖

注:加粗字体为对应递送工具所具有的比较优势。
Note: The words in bold indicate the advantages of the relative delivering cargo.

虽然实现方法不同,但 2 种 VIGE 技术均使小麦基因编辑种质创制摆脱了对遗传转化的依赖,为基因编辑种质创制带来了变革性的推动。其主要原因:1) BSMV 和 BYSMV 几乎可以侵染所有小麦基因型,使小麦基因编辑摆脱了对基因型的依赖;2) 降低了小麦基因编辑成本,可以低至每个基因约 2 000 元,低至目前商业化转基因实现基因编辑的 1/10;3) 由于病毒复制能力强,提高了基因编辑元件的表达量,部分靶点的基因编辑效率可以提高至 100%;4) 省去了遗传转化的繁琐步骤,每人每年可编辑的基因数量极大提高,可以高达数百个基因。

小麦 VIGE 在如下诸多方面还有待进一步改善:1) 由于操作繁琐、技术难点多等原因,仍然只有少数实验室完全掌握;2) 单次接种最多只能编辑 2 个靶标,更高水平的多基因编辑还有待进一步发展;3) 只有基因或功能元件敲除的相关研究被报道,亟需碱基替换、片段插入等精准编辑的实现方法,用于指导种质创制中广泛需求的精准编辑;4) 如何实现递送能力、接种方式和递送范围的完美整合,进一步降低成本、提高效率,是 VIGE 技术发展的下一个目标。

3 基因编辑技术加速小麦功能基因挖掘

未来分子设计育种,尤其是通过基因编辑技术实现精准快速育种,高度依赖于对关键功能基因的挖掘与深度解析。创制候选基因突变体是功能基因挖掘和机制解析的关键。长期以来,因为缺乏参考基因组和突变体库等原因,小麦的功能基因挖掘严重滞后于模式植物拟南芥和水稻。小麦关键春化基因 *VRN1* 的克隆是在图位克隆的基础上,通过与拟南芥、水稻和大麦等的共线性分析^[69]以及表达相关性分析^[70]等预测候选基因。通过化学诱变和物理诱变等创制小麦突变体存在以下主要问题:1) 在全基因组创制大量随机突变,造成复杂的遗传背景,不利于将表型与目标基因关联;2) 需要筛选庞大的突变群体才能获得目标基因突变体;3) 为克服同源基因功能冗余,获得 3 个亚基因组同源基因多突变体,需要进行多代杂交。基因编辑技术可以克服上述难题,快速创制遗传背景清晰的亚基因组同源基因多突变体,加速小麦功能基因的挖掘,赋能小麦分子设计育种。

3.1 助力图位克隆,加速功能基因验证

近年来,小麦功能基因,尤其是小麦抗病基因的克隆和功能解析取得了重大进展,很大程度上得益于过去 10 年间小麦遗传转化技术的一系列突破,推动了基因编辑技术在小麦中的应用,为小麦功能基因挖掘提供了便利的技术条件。利用 CRISPR-Cas9 技术创制的小麦突变体推动了赤霉病抗性位点 *Fhb1* 关键功能基因 *TaHRC* 的克隆^[71-72],以及 *TaHRC* 赤霉病抗性机制的解析^[73]。CRISPR-Cas 具有实现多基因编辑、创制不同基因多突变体的优势,在解析调控复杂数量性状的信号通路时,较传统诱变技术表现更加明显。已有研究利用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术创制单突变和双突变体,验证小麦高产半矮秆关键位点 *r-e-z* 的 2 个关键功能基因 *Rht-B1* 和 *ZnF-B* 的互作关系,深入解析了小麦高产的分子机制^[74]。

3.2 结合比较基因组学,解析直系同源基因功能

直系同源基因存在于不同物种,但来源于同一祖先基因,通常具有相同或类似的生物学功能,也有可能出现功能分化。小麦参考基因组的释放和基因编辑技术的发展,为通过比较基因组学加速小麦功能基因挖掘提供了条件。利用基因编辑技术创制 *MLO* (*Mildew resistance locus O*) 基因的小麦直系同源基因突变体,获得了小麦广谱抗白粉病种质^[29]。利用类似方法,相继验证了粒型和千粒重调控基因 *TaGW2*^[75-76]、*TaGW7*^[77]、*TaGASR7*^[62],株型调控基因 *TaSPL14*^[78]、*TaDEP1*^[62],养分利用效率调控基因 *TaPHO2*^[79]、*TaARE1*^[80]等的功能。利用该方法创制的小麦亚基因组同源基因多突变体,为小麦基因功能的深度解析提供了契机。例如,*TaGW2* 纯合三突变体的创制,助力验证了该基因在小麦与水稻中负向调控千粒重的保守功能,更推动研究者发现了 *TaGW2* 在小麦蛋白质含量^[75]、抗旱^[81]、分蘖调控^[82]、抗叶锈病^[83]和抗条锈病^[84]等方面的功能和调控机制。

3.3 结合多组学数据分析和分子生化筛选,挖掘功能基因

通过基因组学和分子生化技术进行大规模筛选,结合遗传学方法验证也是挖掘功能基因、解析信号通路的重要途径。基因编辑技术在创制小麦亚基因组同源基因多突变体方面的优势,为加速大规模筛选所得小麦关键候选功能基因的验证提供了便利。Wang 等^[11]通过转录组学数据筛选出多个受条锈病诱导的蛋白激酶,利用 CRISPR-Cas9 创制 A、B、D 亚基因组纯合三突变,验证了 *TaPsIPK1* 是条锈病感病因子,创制了广谱抗条锈病的小麦新种质;Gao 等^[85]利用酵母单杂交筛库挖掘到直接调控小麦谷蛋白基因 *Glu1* 的关键转录因子 *TaNAC19*,利用 CRISPR-Cas9 创制 *TaNAC19* 突变体,深入解析了其生物学功能和分子生化机制,为小麦品质与产量协同提升提供了理论支撑。随着小麦中基因编辑突变体创制通量提升和成本下降,基于基因编辑开展功能基因挖掘与信号通路解析的研究必将得到新的发展,赋能小麦基因挖掘与种质创制。

4 小麦种质创制的基因编辑策略及其应用现状

挖掘与创制优异种质是小麦育种取得突破的基础。自 20 世纪 40 年代,在绿色革命基因、人工诱变种

质和远缘种质等的推动下,我国小麦育种在高产、抗病和耐逆等方面不断取得突破。近年来,小麦优异基因的挖掘和功能解析,为加速分子育种奠定了基础。基因编辑技术在小麦种质精准创制,尤其是小麦广谱抗病种质创制等方面的突出表现,为创造在小麦育种中有重大利用价值的突破性核心种质带来新的机遇。

4.1 小麦基因编辑种质创制策略及其应用现状

利用基因编辑创制小麦新种质目前常用的策略包括基因功能敲除、基因表达调控元件的编辑和基因编码区的精准编辑。根据实际育种需求和目标基因的不同特点,采用不同策略创制基因编辑种质(图7)。针对负向调控农艺性状的基因,可采用简单易行的基因功能敲除策略;针对正向调控农艺性状的基因,可以破坏基因表达/翻译负向调控元件,如启动子区转录抑制因子结合位点、miRNA结合位点、5'非翻译区uORF,从而提高基因或蛋白表达量;针对部分一因多效基因,在需要改变单个下游信号通路时,可以针对性地破坏调控组织表达特异性的启动子区调控元件,或通过精准编辑实现关键氨基酸位点的替换、删除和插入。上述策略中,在小麦中应用最多的是基因功能敲除,例如创制的广谱抗条锈病种质 *tapsipk1* 突变体^[11] 和小麦单倍体诱导系 *tapla* 突变体^[86] 等。广谱抗白粉病种质 mlo-R32 株系的创制联合运用了基因功能敲除和表达调控元件破坏^[10];小麦抗除草剂种质 *taacc* 突变体的创制则运用碱基编辑实现了精准点突变^[52]。

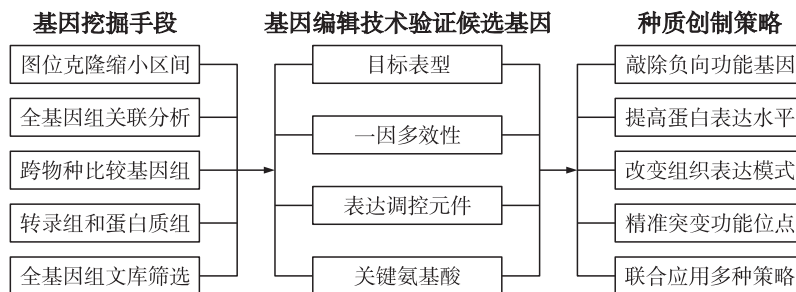


图7 基因编辑技术加速小麦基因挖掘和种质创新的策略

Fig. 7 The strategy by applying gene editing technology to accelerate wheat gene mining and germplasm creation

4.2 通过多基因编辑技术实现小麦多性状协同改良

不同于基因挖掘与功能解析对单个基因或信号通路的关注,小麦种质创制需系统评估遗传变异对其全部农艺性状(如生长发育动态、水肥利用效率、抗病耐逆性及加工品质等)的影响。传统种质创制依赖表型鉴定实现多性状协同改良,效率低、周期长。分子标记辅助育种可提升特定性状,如抗病性和加工品质的定向改良效率。然而受制于传统杂交-回交方法,多性状协同改良进程仍显迟滞。基因编辑技术可摆脱杂交的限制,在1~2个世代内实现多基因精准编辑,革新了优异性状高效聚合的方式。当前小麦多基因编辑系统最高可在单一世代编辑5个基因、15个位点^[87],为小麦多性状高效协同改良提供了技术基础。

5 VIGE 助力小麦基因挖掘和种质创新

CRISPR-Cas 基因编辑技术为小麦基因挖掘和种质创新带来了革命性变化,但其对遗传转化的依赖限制了该技术的广泛应用。VIGE 技术通过创新递送方法,打破了基因编辑依赖遗传转化的瓶颈,使小麦基因编辑通量更高、成本更低、效率提升、可编辑基因型更广泛,开启了基因编辑在小麦中应用的全新局面。因此,本文进一步讨论 VIGE 为小麦基因挖掘和种质创制带来的潜在变革(图8)。

5.1 加速农艺性状调控位点的基因挖掘

随着小麦参考基因组和泛基因组的释放,小麦遗传学研究已经进入功能基因组时代,其标志之一是大量关键性状调控基因图位克隆和功能解析的研究发展迅速。基因编辑技术在多个关键性状调控位点候选基因的验证中起到至关重要的作用^[71,74,88],但其对遗传转化的依赖阻碍了无法遗传转化的小麦基因型中关键位点基因的挖掘。VIGE 技术打破了这一障碍,使在无法遗传转化的小麦基因型中验证功能基因成为可能。Li 等^[89]将表达 Cas9 的转基因株系与含有抗叶锈病基因 *Lr47* 的小麦基因型杂交,基于 BSMV 的 VIGE,创制了 *Lr47* 候选基因突变体,解决了携带 *Lr47* 的小麦基因型无法被遗传转化造成的候选基因验证

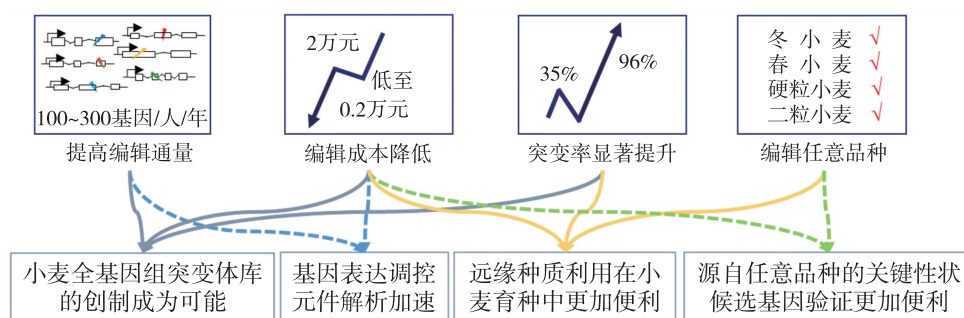


图8 VIGE 为小麦基因编辑育种带来的新机遇

Fig. 8 The new opportunities for gene editing-based wheat breeding brought by VIGE

难题。在克隆数量性状关键调控基因时,精细定位所需群体大,锁定基因相对困难。针对这一现象,利用VIGE的高通量基因编辑能力,可通过敲除图位克隆区间内几个至数十个候选基因,结合表型鉴定,加速候选基因的验证。类似地,VIGE也适用于加速验证通过全基因组关联分析预测的数量性状位点候选基因以及通过转录组、蛋白质组和代谢组等多组学数据预测的大量候选基因。

5.2 创制小麦全基因组饱和突变体库

为了满足小麦功能基因挖掘需要,国内外多个团队独立构建了基于化学和/或物理诱变的小麦突变体库^[90-92]。但人工诱变突变体存在遗传背景复杂、同源基因多突变创制难度大等诸多问题。基因编辑突变体遗传背景清晰,多突变体创制相对容易,在遗传学研究中优势明显。目前,已创制水稻全基因组基因编辑突变体库^[93-94],为小麦提供了借鉴。由于依赖遗传转化的小麦基因编辑成本(每个基因1~2万元)高达水稻的10倍以上,再加上小麦基因数量多(约为水稻的3倍),阻碍了小麦基因编辑突变体库的创制。VIGE使小麦基因编辑成本低至与水稻相当,为创制小麦全基因组基因编辑突变体库提供了可能。

5.3 加速远缘种质在小麦育种中的利用

通过远缘杂交和染色体工程导入小麦野生近缘物种染色体片段,改良小麦抗逆性和农艺性状,是近现代小麦育种的重要手段之一。传统染色体工程利用辐射处理和 $ph1b$ 突变体等方法将外源染色体片段导入小麦基因组,其过程复杂、耗时长、目标性差。基因编辑可变革染色体工程技术,加速并有目标地创制远缘新种质。研究表明,利用CRISPR-Cas9同时打断拟南芥2条目标染色体,从其后代可以获得0.01%~3.75%的染色体易位系^[95],未来可以在小麦中发展该技术并用于外源染色体易位系的创制。目前,利用基因编辑创制染色体易位效率相对偏低,需要创制并筛选大量基因编辑株系,如果利用遗传转化实现基因编辑又存在小麦基因型依赖,利用VIGE技术创制目标染色体易位系将是实现该目标的最佳选择。在小麦远缘种质利用过程中,针对外源染色体易位系存在连锁累赘的问题,可以利用VIGE技术实现大片段删除^[14],精确编辑连锁累赘位点。未来,VIGE结合染色体工程,有望创制突破性小麦远缘种质,在小麦育种中发挥更大的作用。

5.4 功能解析关键转录调控元件,创制多性状协同提升的小麦种质

随着小麦基因功能解析的不断深入,大量基因被证明存在一因多效性,在关键性状调控中存在补偿性平衡。如何发挥基因编辑技术优势,实现多性状协同改良,是未来小麦基因编辑育种面临的重要课题。近年来,通过精准编辑基因表达调控元件实现产量要素^[96]和抗病高产^[10]协同提升的研究不断被报道,凸显了深入挖掘基因表达调控元件功能的重要性。 $TaMLO$ 负调控小麦白粉病抗性,正调控小麦的生长发育。通过长片段敲除存在于液泡膜单糖转运蛋白基因 $TaTMT3B$ 和 $TaMLO$ 之间的远程调控元件,提高 $TaTMT3B$ 表达量,可以恢复因敲除 $TaMLO$ 造成的生长缺陷,实现小麦白粉病抗性和产量的协同提升^[10]。随着多组学技术的发展,小麦转录因子全基因组结合基序和远程基因表达调控元件被大量预测^[97],VIGE技术在小麦高通量和多基因编辑方面的潜力,将为小麦基因表达调控元件突变体的大量创制及其功能解析提供技术基础,进一步推动多性状协同改良的小麦种质创制。

6 小麦基因编辑面临的挑战

随着基因编辑技术的迭代升级,尤其是VIGE技术的发明,基因编辑在小麦功能基因挖掘、基因功能解析和种质创制中的变革性作用不断凸显。但小麦基因编辑在精准编辑、多基因编辑、大片段操作、递送

方法和底盘工具开发等方面依然面临诸多挑战。

6.1 提高精准编辑工具在小麦中的效率

精准编辑工具不仅可以通过精确改变功能基因关键氨基酸位点、miRNA 结合位点等,实现功能基因的定向改造,还可以针对功能基因进行随机饱和突变,从而获得自然界不存在等优势等位变异。但碱基编辑和先导编辑等精准编辑工具在小麦中一直存在效率偏低的问题。Ni 等^[55]通过优化 pegRNA (prime editing guide RNA) 表达调控元件,与 Cas9 和逆转录酶融合蛋白进行点突变等方法相结合,使先导编辑工具在小麦中的编辑效率提高至 74.5%,为先导编辑技术在小麦中的广泛应用提供了基础。以此类推,碱基编辑器在小麦中的编辑效率亦可通过点突变、表达调控元件优化等方法进行提升。此外,VIGE 技术不但使小麦基因编辑摆脱了对遗传转化的依赖,也大幅提高了 CRISPR-Cas9 的基因编辑效率。未来采用 RNA 病毒或其他载体递送碱基编辑和先导编辑器元件,也将是提高小麦精准编辑效率的潜在方法之一。

6.2 加速研发多基因编辑技术

育种 4.0 实现的关键之一是大规模基因组编辑,即在每个世代编辑数十到数百个位点,这将是实现优势等位基因组合的最高效方法^[4]。虽然具有良好的应用前景,多基因编辑在小麦中的报道却屈指可数^[13-14,61,87,98]。小麦多基因编辑面临的挑战:1) 多基因编辑会降低单个靶位点的效率,使在一个世代内编辑全部靶位点的概率偏低。与通过遗传转化实现基因编辑相比,VIGE 可以提高多基因编辑效率,但由于 BSMV 承载量低和存在超侵染排除等原因,目前只能实现 2 个靶点的同时编辑^[13-14]。未来可通过开发或改造类似 BYSMV 的高承载量递送载体,实现高效多位点编辑。2) 在实际育种中,需要针对不同基因的功能特点,采用不同编辑器创制其优势等位,但目前的多基因编辑体系以单一类型基因编辑工具为主。最近报道的多重正交碱基编辑技术,通过在 sgRNA 中添加结构序列,利用 RNA-蛋白互作机制招募不同碱基编辑器,在单一世代实现了多个位点的不同类型碱基编辑^[99],为利用不同类型工具实现多基因编辑指明了方向。

6.3 推动大片段操作技术在小麦中的应用

小麦异源多倍体的特性和庞大的基因组提高了其对内源结构变异和外源大片段渗入的容忍度,内源染色体结构变异和外源染色体片段渗入在小麦种质改良中起到了举足轻重的作用。然而,通过筛选自然变异和人工诱变种质,或通过染色体工程获得性状改良的染色体结构变异种质,是一项耗时耗力的工作。基因编辑技术为小麦染色体结构变异的快速定向创制提供了可能性。目前,依赖于 DSB 和 NHEJ 的基因编辑技术是创制染色体结构变异体的主要方法,但会引入不必要的插入或缺失。最近,出现了使用成对的 pegRNA 进行先导编辑,或将位点特异性重组酶与 CRISPR 系统相结合,如 PASSIGE、PASTE、PrimeRoot 和 PCE 等,在哺乳动物细胞和植物基因组中进行 kb 至 Mb 级别片段操作的技术。然而,这些技术仍然面临效率低下、难以在小麦中实现的问题。目前只有 Zhao 等^[56]基于 Prime Editing 技术实现了小麦染色体的大片段精准删除、替换和插入。如何在小麦中探索实现此类大片段操作技术,满足在小麦基因组中实现多基因堆叠、遗传连锁重组、消除连锁累赘,以促进优异远缘种质等位基因的利用,是小麦基因编辑在未来的重要研究方向之一。

6.4 进一步优化小麦基因编辑递送技术

虽然 VIGE 技术使小麦基因编辑突破了对遗传转化的依赖,推动了基因编辑在小麦中的应用,但现有 VIGE 实现方式要么因 BYSMV 接种过程繁琐,造成推广应用困难,要么因 BSMV 承载量太低,存在对 Cas9 转基因株系的依赖。因此,需要开发接种方法简单、承载量大且在小麦生殖细胞或其前体细胞中递送能力强的基因编辑元件递送工具。除病毒载体外,开发和利用纳米材料也有望进一步改良小麦基因编辑工具递送方法。有报道采用碳纳米颗粒递送基因编辑元件表达载体至小麦叶片^[100]或小麦种子^[101]实现小麦体细胞编辑。未来若成功实现纳米材料递送基因编辑工具表达载体至小麦顶端分生组织或生殖细胞,将有望实现完全不依赖转基因的小麦基因编辑技术。此外,开发尺寸较小的基因编辑工具,降低递送工具的承载量需求,是改良基因编辑种质创制方法的另一个研究方向。目前已报道的迷你型基因编辑工具包括 Cas12f1^[43]、TnpB^[44]、IscB^[44]和 TIGR-Tas^[45]等,其中 Cas12f1 已在水稻中成功应用^[102]。未来优化 Cas12f1 等迷你型基因编辑器在小麦中实现基因编辑,并改造 BSMV,使其能够递送完整基因编辑工具,有望实现完全摆脱遗传转化且操作方便的 VIGE。

6.5 挖掘适应小麦生长温度的基因编辑工具

包括 CRISPR-Cas9 在内的基因编辑工具在小麦中效率偏低的原因,除了小麦基因组大、结构复杂,还有小麦的最适生长温度偏低(15~25℃)。多数 CRISPR-Cas 来源于最适生存温度(37℃以上)较高的细菌或古细菌,在低温条件下无法高效发挥其活性。因此,从低温环境下的微生物宏基因组中挖掘新的 CRISPR-Cas 或其他特异适用于小麦的新型基因编辑工具,将是未来小麦基因编辑实现效率突破的根本出路。

7 小麦基因编辑的未来发展方向

未来,研究人员除了需要针对小麦基因编辑面临的挑战,在技术层面上实现方法改良和技术创新,还需要探索如何将基因编辑与人工智能(AI)等其他新兴技术相结合,发展新型小麦种质创制和品种培育技术。小麦基因编辑的未来发展方向,主要有以下几点:

1) 结合植物快速育种技术,实现小麦基因编辑规模化、集约化。虽然现有 VIGE 技术极大地降低了小麦基因编辑成本,但依然无法满足小麦功能基因挖掘和基因功能解析对突变体的大量需求。将植物快速育种技术(如 Speed Breeding)与 VIGE 等新型小麦基因编辑技术相结合,将极大地缩短小麦世代周期,为基因编辑后代的筛选争取宝贵时间,推动实现小麦基因编辑突变体创制的规模化与集约化。该策略具有高度的可行性,呼吁非营利机构联合推动该策略的实施,加速小麦基因编辑突变体库的建立和开放共享。

2) 结合 AI 育种等前沿技术,实现小麦品种精准定制。在基因组、转录组和表型组等大数据的推动下,人工智能有望推动小麦育种从传统的经验筛选迈向智能化的精准设计。将基因编辑技术与 AI 深度融合,利用 AI 强大的计算与学习能力,深度挖掘多源大数据,精准预测控制优异性状的关键靶点,并设计高效编辑策略,利用多基因编辑技术精确执行 AI 设计蓝图,定向创制目标基因型,可以极大地提高育种的可预测性和效率,最终实现对高产、抗逆、优质等复杂性状的智能化、定制化改良,彻底变革小麦育种研发体系。

3) 针对小麦基因组特点,发展基因组表观修饰编辑技术。六倍体小麦具有庞大而复杂的基因组,通过丰富的表观修饰调控基因表达^[97]。开发针对表观修饰(如 DNA 甲基化、组蛋白修饰)的编辑技术,可通过精准调控关键基因表达,创制优异小麦种质。已有研究将表观调控元件与 CRISPR 系统融合,在拟南芥等模式植物中实现了可遗传的性状调控。将此类技术引入小麦,有望实现基因时空表达的精细化调控,为实现多性状协同改良、创制突破性小麦种质提供技术基础。

4) 发展细胞器基因编辑技术,实现核质协同调控。光合作用和能量代谢在作物生长发育、抗病和耐逆等过程中起着重要作用。拥有独立基因组的叶绿体和线粒体是光合作用与能量代谢调控的核心枢纽。通过编辑叶绿体基因可优化光合作用效率,直接提升产量潜力;操控线粒体基因则能提高细胞能量利用效率。将细胞器编辑与核基因组编辑技术耦合,系统优化核质互作网络,有望驱动小麦育种技术迈向新阶段。

参考文献 References:

- [1] Singh R P, Hodson D P, Jin Y, et al. Emergence and spread of new races of wheat stem rust fungus: continued threat to food security and prospects of genetic control[J]. *Phytopathology*, 2015, 105(7): 872-884.
- [2] Ceresini P C, Castroagudín V L, Rodrigues F Á, et al. Wheat blast: past, present, and future[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2018, 56: 427-456.
- [3] Su J, Zhao J J, Zhao S Q, et al. Genetics of resistance to common root rot (spot blotch), *Fusarium* crown rot, and sharp eyespot in wheat[J]. *Frontiers in Genetics*, 2021, 12: 699342.
- [4] Wallace J G, Rodgers-Melnick E, Buckler E S. On the road to breeding 4.0: unraveling the good, the bad, and the boring of crop quantitative genomics[J]. *Annual Review of Genetics*, 2018, 52: 421-444.
- [5] Chen K L, Wang Y P, Zhang R, et al. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2019, 70: 667-697.
- [6] 单奇伟, 高彩霞. 植物基因组编辑及衍生技术最新研究进展[J]. *遗传*, 2015, 37(10): 953-973.
Shan Q W, Gao C X. Research progress of genome editing and derivative technologies in plants[J]. *Hereditas*, 2015, 37(10): 953-973 (in Chinese with English abstract).
- [7] Li S Y, Zhang C, Li J Y, et al. Present and future prospects for wheat improvement through genome editing and advanced technologies[J]. *Plant Communications*, 2021, 2(4): 100211.

- [8] Awan M J A, Pervaiz K, Rasheed A, et al. Genome edited wheat-current advances for the second green revolution[J]. *Biotechnology Advances*, 2022, 60: 108006.
- [9] Zhou X M, Zhao Y D, Ni P, et al. CRISPR-mediated acceleration of wheat improvement: advances and perspectives[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2023, 50(11): 815–834.
- [10] 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.
- [11] Wang N, Tang C L, 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.e19.
- [12] Chen H, Su Z Q, Tian B, et al. Development and optimization of a *Barley stripe mosaic virus*-mediated gene editing system to improve *Fusarium* head blight resistance in wheat[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2022, 20(6): 1018–1020.
- [13] Li T D, Hu J C, Sun Y, et al. Highly efficient heritable genome editing in wheat using an RNA virus and bypassing tissue culture[J]. *Molecular Plant*, 2021, 14(11): 1787–1798.
- [14] Wang W, Yu Z T, He F, et al. Multiplexed promoter and gene editing in wheat using a virus-based guide RNA delivery system[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2022, 20(12): 2332–2341.
- [15] Qiao J H, Zang Y, Gao Q, et al. Transgene- and tissue culture-free heritable genome editing using RNA virus-based delivery in wheat[J]. *Nature Plants*, 2025, 11(7): 1252–1259.
- [16] Belfort M, Roberts R J. Homing endonucleases: keeping the house in order[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(17): 3379–3388.
- [17] Jasin M. Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases[J]. *Trends in Genetics*, 1996, 12(6): 224–228.
- [18] Kim Y G, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(3): 1156–1160.
- [19] Miller J C, Holmes M C, Wang J B, et al. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(7): 778–785.
- [20] Hockemeyer D, Soldner F, Beard C, et al. Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases[J]. *Nature Biotechnology*, 2009, 27(9): 851–857.
- [21] Ran Y D, Patron N, Kay P, et al. Zinc finger nuclease-mediated precision genome editing of an endogenous gene in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) using a DNA repair template[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(12): 2088–2101.
- [22] Bilichak A, Sastry-Dent L, Sriram S, et al. Genome editing in wheat microspores and haploid embryos mediated by delivery of ZFN proteins and cell-penetrating peptide complexes[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(5): 1307–1316.
- [23] Cermak T, Doyle E L, Christian M, et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(12): e82.
- [24] Li T, Huang S, Zhao X F, et al. Modularly assembled designer TALE effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(14): 6315–6325.
- [25] Hockemeyer D, Wang H Y, Kiani S, et al. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases[J]. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(8): 731–734.
- [26] Miller J C, Tan S Y, Qiao G J, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing[J]. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(2): 143–148.
- [27] Li T, Liu B, Spalding M H, et al. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice[J]. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(5): 390–392.
- [28] Mahfouz M M, Li L X, Piatek M, et al. Targeted transcriptional repression using a chimeric TALE-SRDX repressor protein[J]. *Plant Molecular Biology*, 2012, 78(3): 311–321.
- [29] Wang Y P, Cheng X, Shan Q W, et al. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(9): 947–951.
- [30] Luo M, Li H Y, Chakraborty S, et al. Efficient TALEN-mediated gene editing in wheat[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(11): 2026–2028.
- [31] Wang W, Akhunov E. Application of CRISPR-cas-based genome editing for precision breeding in wheat[M]//Wheat improvement. Cham: Springer International Publishing, 2022: 539–556.
- [32] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, et al. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product[J]. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169(12): 5429–5433.
- [33] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709–1712.
- [34] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816–821.
- [35] Cong L, Ran F A, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823.
- [36] Mali P, Yang L H, Esvelt K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 823–826.
- [37] Li J F, Norville J E, Aach J, et al. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(8): 688–691.
- [38] Nekrasov V, Staskawicz B, Weigel D, et al. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided

- endonuclease[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(8): 691–693.
- [39] Shan Q W, Wang Y P, Li J, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(8): 686–688.
- [40] Lv P, Su F, Chen F Y, et al. Genome editing in rice using CRISPR/Cas12i3[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2024, 22(2): 379–385.
- [41] Wang W X, Yan L, Li J Y, et al. Engineering a robust Cas12i3 variant-mediated wheat genome editing system[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2025, 23(3): 860–873.
- [42] Zetsche B, Gootenberg J S, Abudayyeh O O, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system[J]. *Cell*, 2015, 163(3): 759–771.
- [43] Bigelyte G, Young J K, Karvelis T, et al. Miniature type V-F CRISPR-Cas nucleases enable targeted DNA modification in cells[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 6191.
- [44] Altae-Tran H, Kannan S, Demircioglu F E, et al. The widespread IS200/IS605 transposon family encodes diverse programmable RNA-guided endonucleases[J]. *Science*, 2021, 374(6563): 57–65.
- [45] Faure G, Saito M, Wilkinson M E, et al. TIGR-Tas: a family of modular RNA-guided DNA-targeting systems in prokaryotes and their viruses[J]. *Science*, 2025, 388(6746): eadv9789.
- [46] Komor A C, Kim Y B, Packer M S, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage[J]. *Nature*, 2016, 533(7603): 420–424.
- [47] Gaudelli N M, Komor A C, Rees H A, et al. Programmable base editing of A·T to G·C in genomic DNA without DNA cleavage[J]. *Nature*, 2017, 551(7681): 464–471.
- [48] 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.
- [49] Anzalone A V, Koblan L W, Liu D R. Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(7): 824–844.
- [50] Li C, Zong Y, Wang Y P, et al. Expanded base editing in rice and wheat using a Cas9-adenosine deaminase fusion[J]. *Genome Biology*, 2018, 19(1): 59.
- [51] Zong Y, Song Q N, Li C, et al. Efficient C-to-T base editing in plants using a fusion of nCas9 and human APOBEC3A[J]. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(10): 950–953.
- [52] Zhang R, Liu J X, Chai Z 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.
- [53] Lin Q P, Zong Y, Xue C X, et al. Prime genome editing in rice and wheat[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(5): 582–585.
- [54] Jin S, Lin Q P, Gao Q, et al. Optimized prime editing in monocot plants using PlantPegDesigner and engineered plant prime editors (ePPEs)[J]. *Nature Protocols*, 2023, 18(3): 831–853.
- [55] 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.
- [56] Zhao Y D, Huang Z W, Zhou X M, et al. Precise deletion, replacement and inversion of large DNA fragments in plants using dual prime editing[J]. *Nature Plants*, 2025, 11(2): 191–205.
- [57] Zhang Z Z, Hua L, Gupta A, et al. Development of an *Agrobacterium*-delivered CRISPR/Cas9 system for wheat genome editing[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(8): 1623–1635.
- [58] Zhang S J, Zhang R Z, Gao J, et al. Highly efficient and heritable targeted mutagenesis in wheat via the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR/Cas9 system[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(17): 4257.
- [59] Debernardi J M, Tricoli D M, Ercoli M F, et al. A GRF-GIF chimeric protein improves the regeneration efficiency of transgenic plants[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(11): 1274–1279.
- [60] Wang K, Shi L, Liang X N, et al. The gene TaWOX5 overcomes genotype dependency in wheat genetic transformation[J]. *Nature Plants*, 2022, 8(2): 110–117.
- [61] Wang W, Pan Q L, He F, et al. Transgenerational CRISPR-Cas9 activity facilitates multiplex gene editing in allopolyploid wheat[J]. *The CRISPR Journal*, 2018, 1(1): 65–74.
- [62] Zhang Y, Liang Z, Zong Y, et al. Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 12617.
- [63] Liang Z, Chen K L, Li T D, et al. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14261.
- [64] Zhang K, Liu J X, Zhang Y, et al. Biolistic genetic transformation of a wide range of Chinese elite wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2015, 42(1): 39–42.
- [65] Kelliher T, Starr D, Su X J, et al. One-step genome editing of elite crop germplasm during haploid induction[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(3): 287–292.
- [66] Ali Z, Abul-faraj A, Li L X, et al. Efficient virus-mediated genome editing in plants using the CRISPR/Cas9 system[J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(8): 1288–1291.
- [67] Ellison E E, Nagalakshmi U, Gamou M E, et al. Multiplexed heritable gene editing using RNA viruses and mobile single guide RNAs[J]. *Nature*

- Plants, 2020, 6(6): 620–624.
- [68] Holzberg S, Brosio P, Gross C, et al. *Barley stripe mosaic virus*-induced gene silencing in a monocot plant[J]. The Plant Journal, 2002, 30(3): 315–327.
- [69] Yan L, Loukoianov A, Tranquilli G, et al. Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(10): 6263–6268.
- [70] Trevaskis B, Bagnall D J, Ellis M H, et al. MADS box genes control vernalization-induced flowering in cereals[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(22): 13099–13104.
- [71] Su Z Q, Bernardo A, Tian B, et al. A deletion mutation in *TaHRC* confers *Fhb1* resistance to *Fusarium* head blight in wheat[J]. Nature Genetics, 2019, 51(7): 1099–1105.
- [72] Li G Q, Zhou J Y, Jia H Y, et al. Mutation of a histidine-rich calcium-binding-protein gene in wheat confers resistance to *Fusarium* head blight [J]. Nature Genetics, 2019, 51(7): 1106–1112.
- [73] He Y, Yang X J, Xia X B, et al. A phase-separated protein hub modulates resistance to *Fusarium* head blight in wheat[J]. Cell Host & Microbe, 2024, 32(5): 710–726.e10.
- [74] Song L, Liu J, Cao B L, et al. Reducing brassinosteroid signalling enhances grain yield in semi-dwarf wheat[J]. Nature, 2023, 617(7959): 118–124.
- [75] Zhang Y, Li D, Zhang D B, et al. Analysis of the functions of *TaGW2* homoeologs in wheat grain weight and protein content traits[J]. The Plant Journal, 2018, 94(5): 857–866.
- [76] Wang W, Simmonds J, Pan Q L, et al. Gene editing and mutagenesis reveal inter-cultivar differences and additivity in the contribution of *TaGW2* homoeologues to grain size and weight in wheat[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2018, 131(11): 2463–2475.
- [77] Wang W, Pan Q L, Tian B, et al. Gene editing of the wheat homologs of *TONNEAU1*-recruiting motif encoding gene affects grain shape and weight in wheat[J]. The Plant Journal, 2019, 100(2): 251–264.
- [78] Cao J, Liu K Y, Song W J, et al. Pleiotropic function of the *Squamosa promoter*-binding protein-like gene *TaSPL14* in wheat plant architecture [J]. Planta, 2021, 253(2): 44.
- [79] Ouyang X, Hong X, Zhao X Q, et al. Knock out of the *PHOSPHATE 2* gene *TaPHO2-A1* improves phosphorus uptake and grain yield under low phosphorus conditions in common wheat[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 29850.
- [80] Zhang J H, Zhang H T, Li S Y, et al. Increasing yield potential through manipulating of an *ARE1* ortholog related to nitrogen use efficiency in wheat by CRISPR/Cas9[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2021, 63(9): 1649–1663.
- [81] 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]. The Plant Cell, 2024, 36(3): 605–625.
- [82] Jian C, Pan Y X, Liu S J, et al. The *TaGW2-TaSPL14* module regulates the trade-off between tiller number and grain weight in wheat[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2024, 66(9): 1953–1965.
- [83] Liu S J, Liu H, Guo M J, et al. Knockout of *GRAIN WIDTH2* has a dual effect on enhancing leaf rust resistance and increasing grain weight in wheat[J]. Plant Biotechnology Journal, 2024, 22(7): 2007–2009.
- [84] Li S M, Li T, Zhang P Y, et al. The E3 ubiquitin ligase *TaGW2* facilitates *TaSnRK1γ* and *TaVPS24* degradation to enhance stripe rust susceptibility in wheat[J]. Plant Biotechnology Journal, 2025, 23(3): 750–765.
- [85] Gao Y J, An K X, Guo W W, et al. The endosperm-specific transcription factor *TaNAC019* regulates glutenin and starch accumulation and its elite allele improves wheat grain quality[J]. The Plant Cell, 2021, 33(3): 603–622.
- [86] Liu C X, Zhong Y, Qi X L, et al. Extension of the *in vivo* haploid induction system from diploid maize to hexaploid wheat [J]. Plant Biotechnology Journal, 2020, 18(2): 316–318.
- [87] Luo J M, Li S Y, Xu J J, et al. Pyramiding favorable alleles in an elite wheat variety in one generation by CRISPR-Cas9-mediated multiplex gene editing[J]. Molecular Plant, 2021, 14(6): 847–850.
- [88] Zhang X Y, Jia H Y, Li T, et al. *TaCol-B5* modifies spike architecture and enhances grain yield in wheat[J]. Science, 2022, 376(6589): 180–183.
- [89] Li H N, Hua L, Zhao S Q, et al. Cloning of the wheat leaf rust resistance gene *Lr47* introgressed from *Aegilops speltoides* [J]. Nature Communications, 2023, 14: 6072.
- [90] Krasileva K V, Vasquez-Gross H A, Howell T, et al. Uncovering hidden variation in polyploid wheat[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, 114(6): E913–E921.
- [91] Xiong H C, Guo H J, Fu M Y, et al. A large-scale whole-exome sequencing mutant resource for functional genomics in wheat [J]. Plant Biotechnology Journal, 2023, 21(10): 2047–2056.
- [92] Wang D Z, Li Y P, Wang H J, et al. Boosting wheat functional genomics via an indexed EMS mutant library of KN9204 [J]. Plant Communications, 2023, 4(4): 100593.
- [93] Meng X B, Yu H, Zhang Y, et al. Construction of a genome-wide mutant library in rice using CRISPR/Cas9[J]. Molecular Plant, 2017, 10(9): 1238–1241.
- [94] Lu Y M, Ye X, Guo R M, et al. Genome-wide targeted mutagenesis in rice using the CRISPR/Cas9 system[J]. Molecular Plant, 2017, 10(9): 1242–1245.
- [95] Beying N, Schmidt C, Pacher M, et al. CRISPR-Cas9-mediated induction of heritable chromosomal translocations in *Arabidopsis* [J]. Nature

- Plants, 2020, 6(6): 638–645.
- [96] Song X G, Meng X B, Guo H Y, et al. Targeting a gene regulatory element enhances rice grain yield by decoupling panicle number and size[J]. Nature Biotechnology, 2022, 40(9): 1403–1411.
- [97] Zhang Y Y, Li Z J, Liu J Y, et al. Transposable elements orchestrate subgenome-convergent and -divergent transcription in common wheat[J]. Nature Communications, 2022, 13: 6940.
- [98] Li J H, Zhang S J, Zhang R Z, et al. Efficient multiplex genome editing by CRISPR/Cas9 in common wheat[J]. Plant Biotechnology Journal, 2021, 19(3): 427–429.
- [99] Zhang A, Shan T F, Sun Y, et al. Directed evolution rice genes with randomly multiplexed sgRNAs assembly of base editors[J]. Plant Biotechnology Journal, 2023, 21(12): 2597–2610.
- [100] Doyle C, Higginbottom K, Swift T A, et al. A simple method for spray-on gene editing *in planta*[J]. bioRxiv, 2019. DOI: 10.1101/805036.
- [101] She L W, Cheng X J, Jiang P, et al. Modified carbon dot-mediated transient transformation for genomic and epigenomic studies in wheat[J]. Plant Biotechnology Journal, 2025, 23(4): 1139–1152.
- [102] Ye Z Y, Zhang Y Y, He S Q, et al. Efficient genome editing in rice with miniature Cas12f variants[J]. aBIOTECH, 2024, 5(2): 184–188.

责任编辑: 范雪梅



王巍,南京农业大学农学院教授、博导。曾在美国堪萨斯州立大学担任助理教授(研究系列),于2023年入选江苏省特聘教授,并通过高层次人才引进加入南京农业大学农学院。以(共同)第一作者在*Nature Communications*、*Plant Biotechnology Journal*和*Plant Journal*等杂志发表论文,受邀参编英文专著一部,在国际学术会议作报告2次。主要从事小麦高通量基因编辑工具的开发和应用,打破了小麦基因编辑技术对转基因的依赖,开发了RNA病毒介导的小麦基因编辑技术,实现了低成本、高通量的小麦基因编辑。将小麦基因编辑技术与基因组学技术相结合,加速小麦产量和抗病性状关键调控基因挖掘,并应用于小麦育种。



王秀娥,南京农业大学二级教授,钟山学者首席教授。任作物遗传与种质创新利用全国重点实验室副主任、农业农村部华东作物基因资源与种质创制重点实验室主任、中国-肯尼亚作物分子生物学“一带一路”联合实验室主任、江苏省遗传学会理事长、《作物学报》等期刊编委。入选农业农村部科研杰出人才与创新团队、农业农村部神农英才计划领军英才、江苏省现代农业产业技术创新团队首席专家、江苏省现代农业产业体系岗位科学家、江苏省“333”工程第二层次培养对象。从事小麦遗传育种研究30余年,主要开展麦类作物新基因的发掘和育种利用以及种质创新理论和技术研究。先后主持国家自然科学基金重点项目、国家重点研发计划项目等30余项;获国家科技进步奖二等奖和国家技术发明奖二等奖各1项,教育部高校科学研究优秀成果奖(技术发明奖和科技进步奖)一等奖各1项;发表论文160余篇,其中SCI论文60余篇。参编教材和专著4部。获批发明专利20余件、植物新品种保护权3项。