

基于作物种质资源的优异等位 基因挖掘: 进展与展望

武 晶, 黎 裕

(中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘要: 作物种质资源中蕴含着大量优异等位基因, 如何鉴定并将这些变异应用于作物遗传改良是种质资源研究的中心任务之一。等位基因挖掘对种质资源遗传多样性分析、作物起源与演化研究、重要性状形成的分子基础阐释、种质创新与作物育种具有重要意义, 也是作物分子设计育种的基石。因此, 未来需要进一步研发更加高效的等位基因挖掘策略与技术方法, 加速优异等位基因的发现及其在作物遗传改良中的应用。本文重点评述了等位基因发掘的主要策略与技术途径, 提出了今后的重点任务与发展方向。

关键词: 种质资源; 等位基因挖掘; 遗传改良

Mining Superior Alleles in Crop Germplasm Resources: Advances and Perspectives

WU Jing, LI Yu

(Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: The superior and/or novel alleles (even rare alleles) for a particular trait are often detectable in crop germplasm resources. Exploration and application of allelic variations in crop genetic improvement is one of the tasks in the field of germplasm resources. Allele mining, which is an important tool in deciphering the genetic diversity, the origin and evolution, the molecular mechanism of important agriculture traits as well as germplasm innovation, etc., is the cornerstone of crop breeding by molecular design. There is a great demand on development of high-throughput, efficient allelic mining approaches, in order to accelerate the discovery of excellent alleles and their application in future crop improvement. For this purpose, here we review the major methods of the allelic discovery and propose the research priorities and focuses.

Key words: germplasm resources; mining allele; genetic improvement

等位基因 (allele) 是位于同源染色体的相同位置上具有不同 DNA 序列形式的基因, 不同的等位基因有各自特定的产物和表型。等位基因的产生是由于物种在进化或驯化过程中, 发生基因突变、重组以及转座子的影响等。等位基因挖掘工作包括基于基因或基因组序列, 利用分子生物学手段从种质资源中鉴定分离等位基因, 评估其育种利用价值, 明确

优异等位变异并提出利用方案。等位基因挖掘不仅仅限于挖掘基因编码区的序列变异, 还包括对基因的非编码区和调控区变异的挖掘^[1]。由于同一基因的不同等位基因功能往往存在差异^[2], 而这种功能差异恰恰为分子设计育种奠定了重要的实践基础。因此, 对种质资源等位基因的鉴定挖掘不仅为利用等位基因改良目标农艺性状提供新的基因资

收稿日期: 2019-05-27 修回日期: 2019-06-07 网络出版日期: 2019-06-17

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190527001>

第一作者研究方向为食用豆种质资源, E-mail: wujing@caas.cn

通信作者: 黎裕, 研究方向为作物种质资源, E-mail: liyu03@caas.cn

基金项目: 农作物种质资源保护与利用专项; 国家现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-08); 中国农业科学院科技创新工程

Foundation project: Protection and Utilization for Crop Germplasm Resources, the China Agriculture Research System (CARS-08), the Agricultural Science and Technology Innovation Program of the Chinese Academy of Agricultural Sciences

源,而且对种质资源分类保存亦具有重要作用^[3]。从宏观的角度看,等位基因挖掘是实现种质资源到基因资源转变的核心任务。

1 等位基因发掘方法

等位基因的鉴定方法主要包含有两类: EcoTILLING 技术和基于测序技术的等位基因鉴定。

1.1 EcoTILLING 技术鉴定等位基因

基于 TILLING 技术开发的用于探究种质资源多态性、鉴定挖掘等位基因的策略,称之为 EcoTILLING^[4]。EcoTILLING 技术的流程与 TILLING 技术基本相似:(1) 提取检测对象的单株 DNA,然后将单株 DNA 与标准样品 DNA 混合(1:1);(2) 将混合后的 DNA 放置于微量滴定板中,用荧光染料标记后的目的基因的特异引物进行扩增;(3) 用特异的切割错配碱基的内切酶切变性后的扩增产物;(4) 酶切产物经 LI-COR 测序仪,进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,检测不同错配位置切断的 DNA 片段;(5) 测序分析序列,验证错配碱基及其位置,证实等位基因的多态性。设计 EcoTILLING 引物依赖结构、调节或表现型表达候选基因等信息,甚至距离基因很远的调节区域信息,因此选择候选序列是进行 EcoTILLING 的关键步骤,TILLING 技术选择目标基因和设计引物的工具(CODDLe)同样也适用于 EcoTILLING 技术^[5]。当然,EcoTILLING 技术也有其不足之处,CEL I 酶切会造成多态性位点的检测在与引物互补区域会有 0~4% 的错误率^[4],此外,基因组 DNA 质量、引物设计和样品池也会影响准确性^[6]。同时,CEL I 酶昂贵的费用也限制了其使用,因此有研究者从甘蓝中提取内切酶代替 CEL I^[7]。此外,LI-COR 检测中必须用荧光染料标记引物也是一个限制因素,因此,研究人员开始尝试在引物两端加接头来改进方法,以降低费用^[8]。

EcoTILLING 技术不同于 TILLING 技术之处在于检测的是自然群体中的等位基因的多态性。通过 EcoTILLING 技术发现的多态性包括 SNP、小片段插入和缺失、SSR 的重复单元数等^[4]。EcoTILLING 技术不仅可以鉴定不同种质资源在同一位点上的等位基因,而且可发现 SNP 和单倍型,例如野生稻和栽培稻的 SNP 检测^[9],小麦 *Rht-1* 位点等位变异的鉴定^[10]。EcoTILLING 相比 TILLING 技术更加廉价高效,EcoTILLING 技术只需要对单个个体进行测序,无需将多个突变单株 DNA 混合进行筛选测序,因此更容易鉴定突变单株。此外,EcoTILLING 技

术鉴定成本较低,SNP 和单倍型测定需进行大规模测序。因此,EcoTILLING 技术目前已经成为筛选自然变异突变体中 SNP 变异的常用技术。目前,在多个物种中利用 EcoTILLING 技术对非生物胁迫、品质等农艺性状鉴定出大量等位基因并进行功能研究,如甜瓜病毒敏感性基因 *eIF4E* 新等位变异^[7],小麦中对 *Pina* 和 *Pinb* 基因在 1787 份种质资源中的等位变异进行了分析^[11],大麦 *MLO* 和 *MLA* 抗性基因的等位变异的检测和鉴定^[12],水稻耐盐基因等位变异的鉴定^[13]。此外,在水稻中利用 EcoTILLING 技术鉴定分离群体双亲的 SNP 定位到独脚金内酯相关基因^[14]。总之,利用 EcoTILLING 技术挖掘等位基因,加速了鉴定可用于培育改良品种的自然等位基因的进程。

1.2 基于测序技术的等位基因鉴定

1.2.1 靶向区段的等位基因挖掘 靶向区段等位基因挖掘主要有两种策略,第 1 种是基于 sanger 测序技术的 PCR 扩增目标基因,挖掘等位变异,第 2 种是基于最新测序技术的目标基因区段的重测序,对等位基因进行分析。

第 1 种策略对不同种质资源的目标基因进行扩增,然后进行片段测序,以识别等位基因中的核苷酸变异位点,分析不同材料间的变异多样性。主要包括以下几个步骤:(1) 种质资源群体的创建;(2) 单株 DNA 的提取准备;(3) 针对目标基因设计引物;(4) PCR 扩增并对产物进行测序;(5) 序列分析比对确定等位变异多样性。基于 PCR 技术的目标基因的等位基因挖掘不仅识别变异位点对基因结构的影响,通过对不同材料间序列的分析明确其 SNP、插入/缺失变异,并且分析目标基因的单倍型。在小麦、水稻、玉米、大豆、食用豆等作物中都得到了广泛的应用^[15-19]。例如,从 1320 份小麦种质中发现 7 个新的抗白粉病 *Pm3* 的等位基因^[20],利用 PCR 方法在 1520 份小麦种质资源中鉴定影响淀粉合成的蔗糖合成酶基因 *TaSu1* 和 *TaSu2* 的等位基因,发现大量的稀有等位变异存在于地方品种中^[21]。从 83 份水稻地方种中鉴定稻瘟病抗性基因 *Pi2* 及其新等位基因^[22]。从 329 份水稻种质资源中利用标记 'Pi54 MAS' 进行 PCR 扩增,鉴定分离 *Pi54* 的等位基因^[23]。玉米 *PSY1*、*LOX4* 和 *LOX5* 基因的种质资源的等位基因鉴定及功能、进化分析也是采用的 PCR 扩增方法^[24-25]。与 EcoTILLING 技术相比,基于测序的等位基因挖掘测序具有如下优点:(1) 所需设备相对简单;(2) 可检测的核苷酸变异类

型多;(3)操作步骤简单,所需时间较短;(4)费用相对较低,但也存在通量低等问题^[3]。无论如何,每一种鉴定技术都有其优缺点,应根据自己的实验目的来选用适宜的技术。

近年来,靶向区段测序(Targeted region sequencing)的兴起为大规模等位基因的挖掘提供了新的策略。靶向区段测序可以有针对性地对目标基因所在的特定基因组区段进行富集测序,有效降低了测序成本,提高了测序深度,更为经济有效地研究特定目标基因区的等位变异^[26]。目前,在人类疾病相关控制基因研究中应用较为广泛,相信由于低成本、高读取长度和高通量测序平台的实用性,未来基于靶向区段的测序技术将成为植物等位基因挖掘的主要手段之一。

1.2.2 全基因组水平鉴定等位基因 在过去的几年中,基于大规模平行算法的“下一代”测序平台的快速发展,极大程度地提高了测序的通量和序列的准确性,同时测序费用也大幅下降,因而对大量种质资源进行重测序也正在成为挖掘种质资源中蕴藏的新等位基因的一条高效途径。这一技术主要用于基因组的重测序,然后和参考基因组序列进行比对,大规模鉴定 SNP、InDel 等变异位点,分析成千上万个候选基因在大量作物种质资源中的等位基因,并确定其功能多样性。因此,这一技术很快成为一种低成本、高效率的等位基因挖掘方法,并在种质资源学研究领域中发挥着重要作用。基于第二代测序的全基因组水平鉴定技术主要包括全基因组重测序、简化基因组测序、RNA 测序等,全基因组重测序主要应用于水稻、棉花、谷子、木豆等基因组较小的作物^[27-31],而简化基因组测序则主要应用于小麦、大麦、玉米等基因组较大的作物^[32-34]。但要注意的是,重测序特别是简化基因组测序难以对整个目标基因的序列特别是基因调控区、内含子和前后两端非翻译区进行准确的变异评估。泛基因组(pangenome)构建策略一定程度上可解决这个问题,泛基因组测序是运用高通量测序及生物信息分析手段,针对不同种质资源进行高深度的测序及泛组装,构建泛基因组图谱,特定目标基因的序列可用于等位基因挖掘。目前在水稻、玉米、大豆、甘蓝、辣椒等^[35-39]作物上的泛基因组研究对下一步等位基因挖掘奠定了基础,但目前构建成本还相对较高,要针对海量种质资源开展相关研究还需假以时日。

1.3 等位基因效应评估

在获得目标基因的等位基因信息后,判断不同

等位基因间功能差异是进一步利用等位基因的基础。对等位基因在种质资源中的分布进行分析,可以明确等位基因是属于普遍等位基因还是稀有等位基因^[40-42]。不同等位基因的功能并不完全相同^[43-45],因此识别出最佳等位基因对于种质资源的利用具有重要意义。目前,等位基因的效应评估常用的方法是基于候选基因的关联分析。利用候选基因关联分析法可鉴定到位于该区段中影响表型的基因序列多态性,并可评估其效应。2001 年 Thornsberry 等^[46]首次利用候选基因关联分析发现 *dwarf 8* 基因是影响玉米株高的一个重要基因,同时,利用 92 个玉米自交系材料对 *dwarf 8* 基因的等位基因研究发现,其中几个等位基因与开花期显著关联。因此,应用候选基因关联分析可对特定基因的等位变异是否控制目标性状进行验证,进而挖掘出优异的等位基因^[47-48]。

2 等位基因挖掘的应用研究

通过从作物种质资源中挖掘感兴趣的基因,明确与性状变异关联的核苷酸序列变化,可以帮助我们深入了解性状变异的分子基础,鉴定并充分利用特异种质资源和优异等位基因。此外,等位基因分析在作物种质资源的遗传多样性和物种演化过程研究、基因的单倍型和进化分析、作物遗传改良等领域都具有重要的应用价值。

2.1 等位基因挖掘在遗传多样性评估中的应用

种质资源的有效利用取决于研究者对所拥有的种质资源的遗传多样性的了解程度,特别是感兴趣的候选基因的等位基因的多样性。同时,等位基因挖掘也是解析种质资源库中种质资源多样性的一种很有效的方法^[3,49]。由于等位基因鉴定在植物遗传资源保护利用中具有巨大的应用潜力,许多国际研究机构对保存种质资源的等位基因多样性进行研究^[50-51]。例如,水稻白叶枯病抗性基因 *Xa21*、*Xa26* 和 *Xa5* 的等位基因在野生稻和栽培稻资源中的 DNA 序列多态性和表达多样性,说明 *O.nivara* 在种间水平上表现出比 *O.sativa* 更强的多样性^[52]。108 份粗山羊草中鉴定出储藏蛋白 ALP 的 13 个等位基因(*TaALPb7D-A-M*),分析表明伊朗和土耳其的资源表现出最高的遗传多样性,它们分别携带着 7 个和 6 个基因,可以有目的地利用种质资源^[53]。国际挑战计划(GCP)发出对食用豆类、玉米、水稻、小麦、高粱、木薯等作物的种质资源进行多样性研究的倡议并设置相关计划,为聚合育种提供优异等位基

因/资源信息 (<http://www.generationcp.org/>)。

单倍型 (haplotype) 在遗传学上是指在同一染色体上多个基因座上等位变异的不同组合。等位基因的挖掘可有效鉴定与表型多样性相关联的候选基因/基因组区段的等位变异, 并且可评估新单倍型的发生频率、单倍型类型以及单倍型的进化过程等。目前, 在小麦、水稻、玉米等作物已经有大量的关于单倍型分析的报道^[15, 54-55], 并可用于遗传多样性研究。例如, 针对成熟期基因 *GmPhyA3*, 在 53 份大豆近等基因系和 396 份种质资源中鉴定出 6 种不同的单倍型, 发现加拿大东部大豆种质资源中功能等位基因 *E3Ha* 和功能缺失的等位基因 *e3-tr* 普遍存在^[33]。

2.2 等位基因挖掘在作物起源与演化研究中的应用

利用从等位基因挖掘研究中获得的序列信息, 可以进一步对物种的起源与演化进行分析, 也可澄清基因的来源、演化及传播途径^[51-53]。例如, 利用水稻粒长基因 *GS3* 等位基因的序列对水稻的驯化过程、水稻亚群的起源和栽培品种与野生种之间的基因流向等进行分析^[56]。水稻 *GLA* 基因是 *GAD1/RAE2* 的一个新的等位基因, 对 *GLA* 等位基因的分析说明, 籼稻芒少受到选择, 而粳稻中短籽粒、芒少与高品质一起受到选择, 进一步加深了人类对水稻驯化的理解^[48]。在小麦中通过对不同基因的等位基因序列分析帮助我们更好地理解关键基因的进化过程, 包括 *PPD* 基因、*BTI* 基因、*NAM-B1* 基因、*Rht-D1* 基因、*CKX* 基因等^[15, 57-60]。澳大利亚 Murdoch 大学的马武军团队研究了 21 个来自以色列的野生二粒小麦自然群体类燕麦蛋白基因 (*ALP*) 的等位基因变异, 并研究自然选择对等位基因的影响, 明确 *ALP* 在小麦驯化过程中的进化历程^[61]。*HaFT1*, *HaGa2ox* 和 *c4973* 等 3 个基因在不同地域分布的种质资源中的等位基因的序列分析证实北美东部是栽培向日葵的单一驯化事件^[62]。

单倍型鉴定与比较分析也可用于作物起源与演化研究。例如, 小麦 *CKX6-D1* 基因鉴定出 5 种单倍型, 现代育成种中仍然保留两种类型单倍型 a、b, 而单倍型 c、d 和 e 3 种类型在驯化过程中已经丧失^[58]。玉米 *CCT* 基因在自交系中至少鉴定出 15 种单倍型类型, 而在商品化玉米杂交种中仅发现 3 种类型单倍型, 其中 9 种单倍型类型显著提高了玉米茎腐病的抗性, 特别是单倍型 5 (H5) 在花期和抗茎腐性都表现优良, 在今后的玉米育种中具有潜在的应用价

值^[54]。对水稻 *OsLG3b* 基因单倍型和起源演化分析表明, *OsLG3b* 的长粒等位变异可能发生在粳稻驯化之后, 是在驯化和改良过程中的一种适应热带地区的驯化基因, 并已经被育种家利用, 通过连续的自然杂交和人工选择育种杂交传播渗入到少数籼稻和温带粳稻中^[55]。中国科学院田志喜团队对 *J* 基因在种质资源中的等位变异分析表明, 在适应低纬度的大豆品种中至少存在 8 种功能缺失型的单倍型, 在大豆生态适应性的形成中起到至关重要的作用, 并发现等位变异已经在低纬度地区 (中国南方) 被广泛应用于提高大豆产量的育种中, 对大豆生产起着极其重要的作用^[63]。

2.3 等位基因挖掘在重要性状形成的遗传和分子机理阐释中的应用

不同等位基因的功能有时并不完全相同, 有些变异的发生会直接影响基因的功能, 如编码区的变异常导致功能的丧失, 而启动子区域的变异可能会导致基因的表达模式发生变化, 因此, 等位基因挖掘有助于阐明重要性状形成的分子机理。较为突出的是在水稻中已经鉴定了一系列的水稻抗稻瘟病优异等位基因, *Pi-ta*、*Pina*、*Pinb*、*Pikh*、*Pi54* 和 *Pi-2*^[64-68]。特别是 2017 年四川农业大学陈学伟团队分离到新型广谱抗稻瘟病基因 *bsr-d1*, 在感病水稻材料中, 等位基因 *Bsr-d1* 受稻瘟病菌侵染诱导表达, 进而诱导过氧化物酶基因表达, 导致活性氧水平下降, 表现为易感。而来源于具有广谱抗稻瘟病的水稻地方品种地谷中的 *bsr-d1* 的启动子区域的 1 个变异位点, 导致其与转录因子 *MYBS1* 结合能力增强, 抑制 *bsr-d1* 的转录, 增加活性氧的积累, 产生广谱抗病性。通过对分布于不同国家的 3000 份水稻材料基因序列的分析, 证实 313 份材料中携带有 *bsr-d1* 优异等位基因^[69]。

近年来, 随着大量作物参考基因组的发布和测序技术水平的提升, 基于全基因组关联分析则是从全基因组的水平对单倍型进行评估。水稻、玉米、谷子、棉花、油菜、木豆等作物都已经完成了单倍型图谱的构建, 在全基因组水平明确了作物驯化与品种改良的关键基因 (位点) 的单倍型及遗传结构, 为解析重要性状形成的分子机理提供了证据^[30-31, 70-72]。例如, 浙江大学作物科学研究所蒋立希教授团队通过对 991 份油菜种质资源的基因组重测序, 结合表型开展全基因组关联分析, 发现 *FLOWERING LOCUS T* 与 *FLOWERING LOCUS C* 等 2 个基因启动子区域的 SNP 单倍型差异, 以及乙烯合成与信号传导

途径基因的遗传多态性,是导致 3 种生态分型的关键分子基础^[73]。棉花 *AIL6* 候选基因存在 2 个主要单倍型,一个和高皮棉产量性状显著关联,而另外一个与低皮棉产量显著关联,双尾检测也显示出单倍型和皮棉产量之间的显著相关性^[74]。水稻 *qSE3* 基因在盐胁迫下促进水稻种子萌发和育苗,在水稻种质资源中鉴定出 5 种单倍型类型,其中单倍型 3 (HAP3) 在盐分胁迫下与种子发芽率正相关^[75]。

2.4 等位基因挖掘在作物育种中的应用

近年来,在水稻、小麦、玉米等作物中已经分离鉴定到一系列与产量、抗病性等重要农艺性状相关的优异等位基因,并已证实已经在育种生产中被广泛应用^[22,76]。例如,小麦绿色革命的等位基因 *Rht-B1b* 在全国主要麦区的品系的平均分布频率为 24.5%, *Rht-D1b* 基因的平均分布频率为 45.5%^[77]; 小麦部分同源基因 *TaSPL20* 和 *TaSPL21* 在长期的驯化和遗传改良过程中产生基因沉默或功能变异^[78],这些重要性状控制基因的优异等位基因已在我国小麦育种进程中受到了定向选择并被广泛应用。此外,我国东北和长江中下游地区大面积种植的直立和半直立穗型的高产粳稻品种都含有突变的 *depl* 基因,表明 *depl* 基因已在我国水稻增产中发挥了关键作用^[79]。玉米 *BR2* 基因的等位基因 *qph1* 在降低株高和增加产量上有显著作用,通过对玉米种质资源中 *qph1* 基因的等位变异分析发现,玉米超亲突变最有可能发生在温带玉米育种计划中,而 SNP5259 (T) 突变是最近才发生的,在育种中尚未得到广泛的应用,在今后的育种中将有较好的应用前景^[80]。

优异等位变异的鉴定为特异分子标记的开发提供了信息,促使新的或优异等位基因精准渗入适宜的遗传背景,培育含有变异的新资源。近年来,研究表明控制重要农艺性状的关键基因的优异等位变异,通过开发等位基因特异性分子标记,可被分子标记辅助选择育种有效利用^[16,20,64]。小麦绿色革命基因 *RhtB1* 位点在不同的种质资源中鉴定出多个等位基因,并且株高的降低程度也表现出明显差异,相比野生型 *Rht-B1a*, *Rht-B1b* 等位基因在 64 bp 位置处由 T 变为 C, *Rht-B1c* 等位基因在 147 bp 处存在一个 2026 bp 的 TRIM 转座子的插入, *Rht-B1e* 等位基因在 181 bp 位置处由 T 变为 A, *Rht-B1p* 等位基因在 178 bp 位置处由 C 变为 T,并且依据这些变异位点开发了特异鉴定等位基因的标记并应用于小

麦株高育种^[10,43,45,81-82]。水稻香味基因 (*badh2*) 是比较典型的等位基因鉴定并开发特异标记的实例,2005 年被克隆以来,鉴定了至少 7 个等位基因:第 8 外显子 7 bp 的插入、第 2 外显子 7 bp 的缺失、启动子区域的 MITE 转座子的缺失、在第 8 内含子的中间部分 2 个 SNP 位点、第 2 内含子 TT 的缺失、第 4 内含子 AT 重复单元的插入和编码区的单碱基变化。在这些变异位点中,部分等位变异在功能差异分析的基础上,已成功开发可应用于分子育种的功能标记^[83]。对水稻 18 种不同的亚基淀粉合酶基因核苷酸序列的比较显示,存在 5 种等位变异,都与观察到的表型明显相关,根据 30 个水稻品种的多个等位基因变异,开发出可以应用于辅助育种方案中的改善稻米品质的等位基因特异性标记^[84]。水稻 *SNB* 突变型等位基因 (*ssh1*) 可影响多个产量相关性状,具有增加粒长和粒重的遗传效应。将 *SNB* 突变型等位基因导入优良籼稻品种 93-11 中,可进一步增加粒长和粒重,表明 *SNB* 突变型等位基因的应用具有提高水稻产量的潜力^[85]。根据 32 份超甜玉米自交系中超甜玉米基因 (*bt2*) 启动子区域的 3 个 SNP 位点中的 -103 (A/G) 位点开发等位基因特异 PCR 标记,并建立了通过等位基因特异标记辅助筛选 *bt2* 基因的分子育种平台^[86]。除水稻、小麦、玉米外越来越多的作物也成功鉴定到等位基因并通过特异标记的开发利用优异等位基因。马铃薯块茎品质基因 *AGPaseS-a* 位点的多态性和 *Pain-1* 基因启动子区域的多态性,开发了相应的等位基因的特异标记^[87]。油菜脂肪酸去饱和酶基因 *FAD 2* 在野生资源中有 4 bp 的插入,而 *FAD 3* 基因的 3 个外显子上都存在单碱基的变化,针对这些差异位点开发了可应用于油菜育种的 SCAR 标记^[88]。在对欧洲大麦种质资源中春化基因 (*VRN-H1/H4*) 的大规模等位基因多样性分析的基础上,开发了等位基因特异性分子标记^[89]。等位基因挖掘更重要的应用领域是全基因组选择,因为对种质资源转化不同等位基因的效应得到明确后可进一步提高全基因组选择效率和精度^[90]。

近年来,基因编辑技术的快速发展,CRISPR/Cas 介导的农作物基因定点编辑敲除、单碱基替换和等位基因替换系统,可以有目标地精准创制包含特定优异等位基因的新种质,如水稻高产基因 *Gn1a* 和 *DEP1* 的等位基因新种质,番茄矮秆 *DELLA* 等位基因新种质^[91-92]。定向突变小麦品种科农 199 的 *TaALS* 或 *TaACCase* 基因,新的等位基因对磺酰脲

类、咪唑啉酮类或芳氧苯氧丙酸类除草剂具有抗性, 为麦田杂草防控提供了育种新材料, 创制的新种质具有重要应用价值^[93]。通过基因编辑技术对控制关键驯化基因的等位基因进行聚合, 可实现野生植物的从头驯化, 为创制新的栽培物种提供了新的策略^[94]。

3 展望

目前, 世界各种质库都保存有大量的种质资源, 且呈持续增加趋势。种质资源中蕴藏有大量关键基因的变异/新基因, 而这些变异对于作物改良具有重要的作用。因此, 鉴定并探索重要农艺性状的控制基因的等位基因多样性及其育种利用价值, 是种质资源研究中必不可少的一个环节。同时, 优异等位基因在作物遗传改良过程中已经显示出巨大的应用前景, 因此从种质资源中进行等位基因鉴定, 特别是优异等位基因的发掘和应用, 是未来种质资源研究的主要方向和重点任务之一, 也是使种质资源加速转变为基因资源的关键所在。今后将重点从以下几方面展开工作。

3.1 作物种质资源的表型精准鉴定

表型是分析等位基因功能最重要的基础数据, 表型鉴定精准度的提高将给优异等位基因挖掘和利用提供更多的机会。因此, 需借助高通量、高分辨率的表型分析技术和平台(包括表型组学平台)对种质资源开展育种急需性状的精准鉴定。

3.2 开发更加高效的等位基因挖掘策略和技术方法

近年来随着作物基因库中序列数据的快速大量的增加, 为了更有效地筛选遗传变异和高效利用基因组资源, 应开发新的高效等位基因鉴定策略, 如规模化的全基因组水平或靶向区域测序技术方法、生物信息学分析方法、等位基因育种价值评估技术等。

3.3 加强野生近缘种和地方品种种质资源的等位基因的鉴定和利用

野生种质资源和地方品种携带有现代品种所欠缺的优异等位基因, 是作物育种的基因资源宝库, 但是对作物野生资源和地方品种的深度鉴定和利用还很薄弱。因此, 需利用基因组学、变异组学、表型组学等手段鉴定野生种质资源和地方品种中的优异等位基因, 使库存种质资源能够在现代育种中发挥作用。

3.4 强化优异等位基因在种质创新和作物育种中的应用

在充分发掘高产、优质、抗病、抗逆等优异等位

基因的基础上, 应大量开发实用分子标记, 应用分子标记辅助选择、全基因组选择等分子设计技术方法, 聚合优异等位基因, 实现种质创新和作物育种效率的大幅度提升; 应用转基因技术, 跨物种转移有利等位基因, 实现“老物种”产生“新性状”, 从根本上解决现存种质资源中没有其基因的问题; 应用基因组编辑技术, 从头驯化形成新型栽培作物, 或通过调控其基因表达产生人们期望性状, 使种质创新和作物育种实现革命性的飞跃; 甚至应用合成生物技术, 把优异等位基因进行设计、组装并实现从头合成。

参考文献

- [1] Latha R, Rubia L, Bennett J, Swaminathan M S. Allele mining for stress tolerance genes in *Oryza* species and related germplasm. *Molecular Biotechnology*, 2004, 27(2): 101-108
- [2] Li S, Tian Y, Wu K, Ye Y, Yu J, Zhang J, Liu Q, Hu M, Li H, Tong Y, Harberd N P, Fu X. Modulating plant growth-metabolism coordination for sustainable agriculture. *Nature*, 2018, 560(7720): 595-600
- [3] Kumar G R, Shakhthivel K, Sundaram R M, Neerja C N, Rani N S, Viraktamath B C, Madhav M S. Allele mining in crops: prospects and potentials. *Biotechnology Advance*, 2010, 28(4): 451-461
- [4] Comai L, Young K, Till B J, Reynolds S H, Greene E A, Codomo C A, Enns L C, Johnson J E, Burtner C, Odden A R. Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by Ecotilling. *The Plant Journal*, 2004, 37(5): 778-786
- [5] McCallum C M, Comai L, Greene E A, Henikoff S. Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiology*, 2000, 123(2): 439-442
- [6] Cooper J L, Till B J, Laport R G, Darlow M C, Kleffner J M, Jamai A, El-Mellouki T, Liu S, Ritchie R, Nielsen N, Bilyeu K D, Meksem K, Comai L, Henikoff S. TILLING to detect induced mutations in soybean. *BMC Plant Biology*, 2008, 8: 9
- [7] Nieto C, Piron F, Dalmais M, Marco C F, Moriones E, Gómez-Guillamón M L, Truniger V, Gómez P, García-Mas J, Aranda M A, Bendahmane A. EcoTILLING for the identification of allelic variants of melon *eIF4E*, a factor that controls virus susceptibility. *BMC Plant Biology*, 2007, 7: 34
- [8] Rungis D, Hamberger B, Yanik B, Wilkin J, Bohlmann J, Ritland K. Efficient genetic mapping of single nucleotide polymorphisms based upon DNA mismatch digestion. *Molecular Breeding*, 2005, 16(3): 261-270
- [9] Rakshit S A, Matsumura H, Takahashi Y, Hasegawa Y, Ito A, Ishii T, Miyashita N T, Terauchi R. Large-scale DNA polymorphism study of *Oryza sativa* and *O. rufipogon* reveals the origin and divergence of Asian rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, 114: 731-743
- [10] Li A, Yang W, Lou X, Liu D, Sun J, Guo X, Wang J, Li Y, Zhan K, Ling H, Zhang A. Novel natural allelic variations at the *Rht-1* loci in wheat. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2013, 55(11): 1026-1037
- [11] Ma X, Sajjad M, Wang J, Yang W, Sun J, Li X, Zhang A,

- Liu D. Diversity, distribution of puroindoline genes and their effect on kernel hardness in a diverse panel of Chinese wheat germplasm. *BMC Plant Biology*, 2017, 17(1): 158
- [12] Mejlhede N, Kyjovska Z, Backes G, Burhenne K, Rasmussen S K, Jahoor A. EcoTILLING for the identification of allelic variation in the powdery mildew resistance genes *mlo* and *Mla* of barley. *Plant Breeding*, 2006, 125(5): 461-467
- [13] Negrao S, Almadani C, Pires I, McNally K L, Oliveira M M. Use of EcoTILLING to identify natural allelic variants of rice candidate genes involved in salinity tolerance. *Plant Genetic Resources*, 2011, 9(2): 300-304
- [14] Tamiru M, Abe A, Utsushi H, Yoshida K, Takagi H, Fujisaki K, Undan J R, Rakshit S, Takaichi S, Jikumar Y, Yokota T, Terry M J, Terauchi R. The tillering phenotype of the rice plastid terminal oxidase (PTOX) loss-of-function mutant is associated with strigolactone deficiency. *New Phytologist*, 2014, 202(1): 116-131
- [15] Guo Z, Song Y, Zhou R, Ren Z, Jia J. Discovery, evaluation and distribution of haplotypes of the wheat *Ppd-D1* gene. *New Phytologist*, 2010, 185(3): 841-851
- [16] Biselli C, Urso S, Tacconi G, Steuernagel B, Schulte D, Gianinetti A, Bagnaresi P, Stein N, Cattivelli L, Valè G. Haplotype variability and identification of new functional alleles at the *Rdg2a* leaf stripe resistance gene locus. *Theoretical and Applied Genetics*, 2013, 126(6): 1575-1586
- [17] Strable J, Wallace J G, Unger-Wallace E, Briggs S, Bradbury P J, Buckler E S, Vollbrecht E. Maize *YABBY* genes drooping leaf1 and drooping leaf2 regulate plant architecture. *The Plant Cell*, 2017, 29(7): 1622-1641
- [18] Sayama T, Ono E, Takagi K, Takada Y, Horikawa M, Nakamoto Y, Hirose A, Sasama H, Ohashi M, Hasegawa H, Terakawa T, Kikuchi A, Kato S, Tatsuzaki N, Tsukamoto C, Ishimoto M. The *Sg-1* glycosyltransferase locus regulates structural diversity of triterpenoid saponins of soybean. *The Plant Cell*, 2012, 24(5): 2123-2138
- [19] Basu U, Upadhyaya H D, Srivastava R, Daware A, Malik N, Sharma A, Bajaj D, Narnoliya L, Thakro V, Kujur A, Tripathi S, Bharadwaj C, Hegde V S, Pandey A K, Singh A K, Tyagi A K, Parida S K. ABC transporter-mediated transport of glutathione conjugates enhances seed yield and quality in chickpea. *Plant Physiology*, 2019, 180(1): 253-275
- [20] Bhullar N K, Zhang Z, Wicker T, Keller B. Wheat gene bank accessions as a source of new alleles of the powdery mildew resistance gene *Pm3*: a large scale allele mining project. *BMC Plant Biology*, 2010, 10(1): 88
- [21] Hou J, Jiang Q, Hao C, Wang Y, Zhang H, Zhang X. Global selection on sucrose synthase haplotypes during a century of wheat breeding. *Plant Physiology*, 2014, 164(4): 1918-1929
- [22] Ingole Kishor D, Prashanthi S K, Krishnaraj P U. Mining of blast resistance gene, *Pi2* and its novel allelic variant from landraces of rice from Karnataka. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 2017, 87(4): 1429-1441
- [23] Vasudevan K, Gruissem W, Bhullar N K. Identification of novel alleles of the rice blast resistance gene *Pi54*. *Scientific Reports*, 2015, 5: 15678
- [24] Fu Z, Chai Y, Zhou Y, Yang X, Warburton M L, Xu S, Cai Y, Zhang D, Li J, Yan J. Natural variation in the sequence of *PSY1* and frequency of favorable polymorphisms among tropical and temperate maize germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 2013, 126(4): 923-935
- [25] De La Fuente G N, Murray S C, Isakeit T, Park Y S, Yan Y, Warburton M L, Kolomiets M V. Characterization of genetic diversity and linkage disequilibrium of *ZmLOX4* and *ZmLOX5* loci in maize. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53973
- [26] Witek K, Jupe F, Witek A I, Baker D, Clark M D, Jones J D. Accelerated cloning of a potato late blight-resistance gene using RenSeq and SMRT sequencing. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(6): 656-660
- [27] Jia G, Huang X, Zhi H, Zhao Y, Zhao Q, Li W, Chai Y, Yang L, Liu K, Lu H, Zhu C, Lu Y, Zhou C, Fan D, Weng Q, Guo Y, Huang T, Zhang L, Lu T, Feng Q, Hao H, Liu H, Lu P, Zhang N, Li Y, Guo E, Wang S, Wang S, Liu J, Zhang W, Chen G, Zhang B, Li W, Wang Y, Li H, Zhao B, Li J, Diao X, Han B. A haplotype map of genomic variations and genome-wide association studies of agronomic traits in foxtail millet (*Setaria italica*). *Nature Genetics*, 2013, 45(8): 957-961
- [28] Qi J, Liu X, Shen D, Miao H, Xie B, Li X, Zeng P, Wang S, Shang Y, Gu X, Du Y, Li Y, Lin T, Yuan J, Yang X, Chen J, Chen H, Xiong X, Huang K, Fei Z, Mao L, Tian L, Städler T, Renner S S, Kamoun S, Lucas W J, Zhang Z, Huang S. A genomic variation map provides insights into the genetic basis of cucumber domestication and diversity. *Nature Genetics*, 2013, 45(12): 1510-1518
- [29] Du X, Huang G, He S, Yang Z, Sun G, Ma X, Li N, Zhang X, Sun J, Liu M, Jia Y, Pan Z, Gong W, Liu Z, Zhu H, Ma L, Liu F, Yang D, Wang F, Fan W, Gong Q, Peng Z, Wang L, Wang X, Xu S, Shang H, Lu C, Zheng H, Huang S, Lin T, Zhu Y, Li F. Resequencing of 243 diploid cotton accessions based on an updated A genome identifies the genetic basis of key agronomic traits. *Nature Genetics*, 2018, 50(6): 796-802
- [30] Varshney R K, Saxena R K, Upadhyaya H D, Khan A W, Yu Y, Kim C, Rathore A, Kim D, Kim J, An S, Kumar V, Anuradha G, Yamini K N, Zhang W, Muniswamy S, Kim J S, Penmetsa R V, von Wettberg E, Datta S K. Whole-genome resequencing of 292 pigeonpea accessions identifies genomic regions associated with domestication and agronomic traits. *Nature Genetics*, 2017, 49(7): 1082-1088
- [31] Varshney R K, Thudi M, Roorkiwal M, He W, Upadhyaya H D, Yang W, Bajaj P, Cubry P, Rathore A, Jian J, Doddamani D, Khan A W, Garg V, Chitkineni A, Xu D, Gaur P M, Singh N P, Chaturvedi S K, Nadigatla G V P R, Krishnamurthy L, Dixit G P, Fikre A, Kimurto P K, Sreeman S M, Bharadwaj C, Tripathi S, Wang J, Lee S H, Edwards D, Polavarapu K K B, Penmetsa R V, Crossa J, Nguyen H T, Siddique K H M, Colmer T D, Sutton T, von Wettberg E, Vigouroux Y, Xu X, Liu X. Resequencing of 429 chickpea accessions from 45 countries provides insights into genome diversity, domestication and agronomic traits. *Nature Genetics*, 2019, 51(5): 857-864
- [32] Romay M C, Millard M J, Glaubitz J C, Jason A, Peiffer J A, Swarts K L, Casstevens T M, Elshire R J, Acharya C B, Mitchell S E, Flint-Garcia S A, McMullen M D, Holland J B, Edwards S, Buckler E S, Gardner C A. Comprehensive genotyping of the USA national maize inbred seed bank.

- Genome Biology, 2013, 14 (6): R55
- [33] Tardivel A, Sonah H, Belzile F, O'Donoghue L S. Rapid identification of alleles at the soybean maturity gene *E3* using genotyping by sequencing and a haplotype-based approach. *Plant Genome*, 2014, 7 (2): 1-9
- [34] Milner S G, Jost M, Taketa S, Mazón E R, Himmelbach A, Oppermann M, Weise S, Knüpffer H, Basterrechea M, König P, Schüler D, Sharma R, Pasam R K, Rutten T, Guo G, Xu D, Zhang J, Herren G, Müller T, Krattinger S G, Keller B, Jiang Y, González M Y, Zhao Y, Habekuß A, Färber S, Ordon F, Lange M, Börner A, Graner A, Reif J C, Scholz U, Mascher M, Stein N. Genebank genomics highlights the diversity of a global barley collection. *Nature Genetics*, 2019, 51 (2): 319-326
- [35] Zhao Q, Feng Q, Lu H, Li Y, Wang A, Tian Q, Zhan Q, Lu Y, Zhang L, Huang T, Wang Y, Fan D, Zhao Y, Wang Z, Zhou C, Chen J, Zhu C, Li W, Weng Q, Xu Q, Wang Z X, Wei X, Han B, Huang X. Pan-genome analysis highlights the extent of genomic variation in cultivated and wild rice. *Nature Genetics*, 2018, 50 (2): 278-284
- [36] Lu F, Romay M C, Glaubitz J C, Bradbury P J, Elshire R J, Wang T, Li Y, Li Y, Semagn K, Zhang X, Hernandez A G, Mikel M A, Soifer I, Barad O, Buckler E S. High-resolution genetic mapping of maize pan-genome sequence anchors. *Nature Communications*, 2015, 6: 6914
- [37] Li Y H, Zhou G, Ma J, Jiang W, Jin L G, Zhang Z, Guo Y, Zhang J, Sui Y, Zheng L, Zhang S S, Zuo Q, Shi X H, Li Y F, Zhang W K, Hu Y, Kong G, Hong H L, Tan B, Song J, Liu Z X, Wang Y, Ruan H, Yeung C K, Liu J, Wang H, Zhang L J, Guan R X, Wang K J, Li W B, Chen S Y, Chang R Z, Jiang Z, Jackson S A, Li R, Qiu L J. De novo assembly of soybean wild relatives for pan-genome analysis of diversity and agronomic traits. *Nature Biotechnology*, 2014, 32 (10): 1045-1052
- [38] Golicz A A, Bayer P E, Barker G C, Edger P P, Kim H, Martinez P A, Chan C K, Severn-Ellis A, McCombie W R, Parkin I A, Paterson A H, Pires J C, Sharpe A G, Tang H, Teakle G R, Town C D, Batley J, Edwards D. The pangenome of an agronomically important crop plant *Brassica oleracea*. *Nature Communications*, 2016, 7: 13390
- [39] Ou L, Li D, Lv J, Chen W, Zhang Z, Li X, Yang B, Zhou S, Yang S, Li W, Gao H, Zeng Q, Yu H, Ouyang B, Li F, Liu F, Zheng J, Liu Y, Wang J, Wang B, Dai X, Ma Y, Zou X. Pan-genome of cultivated pepper (*Capsicum*) and its use in gene presence-absence variation. *New Phytologist*, 2018, 220 (2): 360-363
- [40] Shomura A, Izawa T, Ebana K, Ebitani T, Kanegae H, Konishi S, Yano M. Deletion in a gene associated with grain size increased yields during rice domestication. *Nature Genetics*, 2008, 40 (8): 1023-1028
- [41] Li Y, Fan C, Xing Y, Jiang Y, Luo L, Sun L, Shao D, Xu C, Li X, Xiao J, He Y, Zhang Q. Natural variation in *GS5* plays an important role in regulating grain size and yield in rice. *Nature Genetics*, 2011, 43 (12): 1266-1269
- [42] Wang S, Wu K, Yuan Q, Liu X, Liu Z, Lin X, Zeng R, Zhu H, Dong G, Qian Q, Zhang G, Fu X. Control of grain size, shape and quality by *OsSPL16* in rice. *Nature Genetics*, 2012, 44 (8): 950-954
- [43] Peng J R, Richards D E, Hartley N M, Murphy G P, Devos K M, Flintham J E, Beales J, Fish L J, Worland A J, Pelica F, Sudhakar D, Christou P, Snape J W, Gale M D, Harberd N P. 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature*, 1999, 400 (6741): 256-261
- [44] Wu J, Kong X, Wan J, Liu X, Zhang X, Guo X, Zhou R, Zhao G, Jing R, Fu X, Jia J. Dominant and pleiotropic effects of a *GAI* gene in wheat results from a lack of interaction between *DELLA* and *GID1*. *Plant Physiology*, 2011, 157 (4): 2120-2130
- [45] Li A, Yang W, Guo X, Liu D, Sun J, Zhang A. Isolation of a gibberellin-insensitive dwarfing gene, *Rht-B1e*, and development of an allele-specific PCR marker. *Molecular Breeding*, 2012, 30 (3): 1443-1451
- [46] Thornsberry J M, Goodman M M, Doewbley J, Kresovich S, Nielsen D, Buckler E S. *Dwarf8* polymorphisms associate with variation in flowering time. *Nature Genetics*, 2001, 28 (3): 286-289
- [47] Chan A N, Xu S, Shi Y, Li Y, Guo D, Xue J. Identification of favorable alleles in the non-yellow coloring 1 gene by association mapping in maize. *Euphytica*, 2017, 213 (1): 12
- [48] Zhang Y, Zhang Z, Sun X, Zhu X, Li B, Li J, Guo H, Chen C, Pan Y, Liang Y, Xu Z, Zhang H, Li Z. Natural alleles of *GLA* for grain length and awn development were differently domesticated in rice subspecies *japonica* and *indica*. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17: 1547-1559
- [49] Kaur N, Street K, Mackay M, Yahiaoui N, Keller B. Allele mining and sequence diversity at the wheat powdery mildew resistance locus *Pm3*. *Proceedings of the 11th International Wheat Genetics Symposium*. Sydney: Sydney University Press, 2008: 1-3
- [50] Dwivedi S L, Scheben A, Edwards D, Spillane C, Ortiz R. Assessing and exploiting functional diversity in germplasm pools to enhance abiotic stress adaptation and yield in cereals and food legumes. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1461
- [51] Mayer M, Unterseer S, Bauer E, de Leon N, Ordas B, Schön C C. Is there an optimum level of diversity in utilization of genetic resources? *Theoretical and Applied Genetics*, 2017, 130 (11): 2283-2295
- [52] Bimolata W, Kumar A, M S K, Sundaram R M, Laha G S, Qureshi I A, Ghazi I A. Nucleotide diversity analysis of three major bacterial blight resistance genes in rice. *PLoS One*, 2015, 10 (3): e0120186
- [53] Cao D, Wang H, Zhang B, Liu B, Liu D, Chen W, Zhang H. Genetic diversity of avenin-like b genes in *Aegilops tauschii* Coss. *Genetica*, 2018, 146 (1): 45-51
- [54] Li Y, Tong L, Deng L, Liu Q, Xing Y, Wang C, Liu B, Yang X, Xu M. Evaluation of *ZmCCT* haplotypes for genetic improvement of maize hybrids. *Theoretical and Applied Genetics*, 2017, 130 (12): 2587-2600
- [55] Yu J, Miao J, Zhang Z, Xiong H, Zhu X, Sun X, Pan Y, Liang Y, Zhang Q, Abdul Rehman R M, Li J, Zhang H, Li Z. Alternative splicing of *OsLG3b* controls grain length and yield in japonica rice. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16 (9): 1667-1678
- [56] Takanokai N, Jiang H, Kubo T, Sweeney M, Matsumoto T, Kanamori H, Padhukasahasram B, Bustamante C, Yoshimura A, Doi K, McCouch S. Evolutionary history of *GS3*, a gene conferring grain length in rice. *Genetics*, 2009, 182 (4): 1323-1334

- [57] Zhang C, Gao L, Sun J, Jia J, Ren Z. Haplotype variation of green revolution gene *Rht-D1* during wheat domestication and improvement. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2014, 56 (8): 774-780
- [58] Zhang L, Zhao Y L, Gao L F, Zhao G Y, Zhou R H, Zhang B S, Jia J Z. *TaCKX6-D1*, the ortholog of rice *OsCKX2*, is associated with grain weight in hexaploid wheat. *New Phytologist*, 2012, 195 (3): 574-584
- [59] Lundström M, Leino M W, Hagenblad J. Evolutionary history of the *NAM-B1* gene in wild and domesticated tetraploid wheat. *BMC Genetics*, 2017, 18 (1): 118
- [60] Wang Y, Hou J, Liu H, Li T, Wang K, Hao C, Liu H, Zhang X. *TaBT1*, affecting starch synthesis and thousand kernel weight, underwent strong selection during wheat improvement. *Journal of Experimental Botany*, 2019, 70 (5): 1497-1511
- [61] Zhang Y, Hu X, Islam S, She M, Peng Y, Yu Z, Wylie S, Juhasz A, Dowla M, Yang R, Zhang J, Wang X, Dell B, Chen X, Nevo E, Sun D, Ma W. New insights into the evolution of wheat a venin-like proteins in wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115 (52): 13312-13317
- [62] Blackman B K, Scascitelli M, Kane N C, Luton H H, Rasmussen D A, Bye R A, Lentz D L, Rieseberg L H. Sunflower domestication alleles support single domestication center in eastern North America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108 (34): 14360-14365
- [63] Lu S, Zhao X, Hu Y, Liu S, Nan H, Li X, Fang C, Cao D, Shi X, Kong L, Su T, Zhang F, Li S, Wang Z, Yuan X, Cober E R, Weller J L, Liu B, Hou X, Tian Z, Kong F. Natural variation at the soybean *J* locus improves adaptation to the tropics and enhances yield. *Nature Genetics*, 2017, 49 (5): 773-779
- [64] Huang C L, Hwang S Y, Chiang Y C, Lin T P. Molecular evolution of the *Pi-ta* gene resistant to rice blast in wild rice (*Oryza rufipogon*). *Genetics*, 2018, 179 (3): 1527-1538
- [65] Wang J, Sun J, Liu D, Yang W, Wang D, Tong Y, Zhang A. Analysis of *Pina* and *Pinb* alleles in the micro-core collections of Chinese wheat germplasm by Ecotilling and identification of a novel *Pinb* allele. *Journal of Cereal Science*, 2008, 48 (3): 836-842
- [66] Ramkumar G, Biswal A, Mohan K, Sakthivel K, Sivaranjani A, Neeraja C. Identifying novel alleles of rice blast resistance genes *Pik^h* and *Pita* through allele mining. *International Rice Research Notes*, 2010, 1-6
- [67] Kumari A, Das A, Devanna B, Thakur S, Singh P, Singh N, Sharma T. Mining of rice blast resistance gene *Pi54* shows effect of single nucleotide polymorphisms on phenotypic expression of the alleles. *European Journal of Plant Pathology*, 2013, 137 (1): 55-65
- [68] Hittalmani S, Kahani F, Dhanagond S M, Rao A M. DNA marker characterization for allele mining of blast and bacterial leaf blight resistant genes and evaluation for grain yield. *African Journal of Biotechnology*, 2013, 12 (18): 2331-2340
- [69] Li W, Zhu Z, Chern M, Yin J, Yang C, Ran L, Cheng M, He M, Wang K, Wang J, Zhou X, Zhu X, Chen Z, Wang J, Zhao W, Ma B, Qin P, Chen W, Wang Y, Liu J, Wang W, Wu X, Li P, Wang J, Zhu L, Li S, Chen X. A natural allele of a transcription factor in rice confers broad-spectrum blast resistance. *Cell*, 2017, 170 (1): 114-126
- [70] Chia J, Song C, Bradbury P, Costich D, de Leon N, Doebley J, Elshire R, Gaut B, Geller L, Glaubitz J, Gore M, Guill K, Holland J, Hufford M, Lai J, Li M, Liu X, Lu Y, McCombie R, Nelson R, Poland J, Prasanna B, Pyhajarvi T, Rong T, Sekhon R, Sun Q, Tenaillon M, Tian F, Wang J, Xu X, Zhang Z, Kaeppler S, Ross-Ibarra J, McMullen M, Buckler E, Zhang G, Xu Y, Ware D. Maize HapMap2 identifies extant variation from a genome in flux. *Nature Genetics*, 2012, 44 (7): 803-807
- [71] Ma Z, He S, Wang X, Sun J, Zhang Y, Zhang G, Wu L, Li Z, Liu Z, Sun G, Yan Y, Jia Y, Yang J, Pan Z, Gu Q, Li X, Sun Z, Dai P, Liu Z, Gong W, Wu J, Wang M, Liu H, Feng K, Ke H, Wang J, Lan H, Wang G, Peng J, Wang N, Wang L, Pang B, Peng Z, Li R, Tian S, Du X. Resequencing a core collection of upland cotton identifies genomic variation and loci influencing fiber quality and yield. *Nature Genetics*, 2018, 50 (6): 803-813
- [72] Huang X, Kurata N, Wei X, Wang Z, Wang A, Zhao Q, Zhao Y, Liu K, Lu H, Li W, Guo Y, Lu Y, Zhou C, Fan D, Weng Q, Zhu C, Huang T, Zhang L, Wang Y, Feng L, Furuumi H, Kubo T, Miyabayashi T, Yuan X, Xu Q, Dong G, Zhan Q, Li C, Fujiyama A, Toyoda A, Lu T, Feng Q, Qian Q, Li J, Han B. A map of rice genome variation reveals the origin of cultivated rice. *Nature*, 2012, 490 (7421): 497-501
- [73] Wu D, Liang Z, Yan T, Xu Y, Xuan L, Tang J, Zhou G, Lohwasser U, Hua S, Wang H, Chen X, Wang Q, Zhu L, Maodzeka A, Hussain N, Li Z, Li X, Shamsi I H, Jilani G, Wu L, Zheng H, Zhang G, Chalhoub B, Shen L, Yu H, Jiang L. Whole-genome resequencing of a worldwide collection of rapeseed accessions reveals the genetic basis of ecotype divergence. *Molecular Plant*, 2019, 12 (1): 30-43
- [74] Fang L, Wang Q, Hu Y, Jia Y, Chen J, Liu B, Zhang Z, Guan X, Chen S, Zhou B, Mei G, Sun J, Pan Z, He S, Xiao S, Shi W, Gong W, Liu J, Ma J, Cai C, Zhu X, Guo W, Du X, Zhang T. Genomic analyses in cotton identify signatures of selection and loci associated with fiber quality and yield traits. *Nature Genetics*, 2017, 49 (7): 1089-1098
- [75] He Y, Yang B, He Y, Zhan C, Cheng Y, Zhang J, Zhang H, Cheng J, Wang Z. A quantitative trait locus, *qSE3*, promotes seed germination and seedling establishment under salinity stress in rice. *The Plant Journal*, 2018, 97 (6): 1089-1104
- [76] Ma Y, Dai X, Xu Y, Luo W, Zheng X, Zeng D, Pan Y, Lin X, Liu H, Zhang D, Xiao J, Guo X, Xu S, Niu Y, Jin J, Zhang H, Xu X, Li L, Wang W, Qian Q, Ge S, Chong K. *COLD1* confers chilling tolerance in rice. *Cell*, 2015, 160 (6): 1209-1221
- [77] Zhang X, Yang S, Zhou Y, He Z, Xia X. Distribution of the *rht-b1b*, *rht-d1b* and *rht8* reduced height genes in autumn-sown Chinese wheats detected by molecular markers. *Euphytica*, 2006, 152 (1): 109-116
- [78] Zhang B, Xu W, Liu X, Mao X, Li A, Wang J, Chang X, Zhang X, Jing R. Functional conservation and divergence among homoeologs of *TaSPL20* and *TaSPL21*, two SBP-Box genes governing yield-related traits in hexaploid wheat. *Plant Physiology*, 2017, 174 (2): 1177-1191
- [79] Huang X, Qian Q, Liu Z, Sun H, He S, Luo D, Xia G, Chu C, Li J, Fu X. Natural variation at the *DEP1* locus enhances grain yield in rice. *Nature Genetics*, 2009, 41 (4): 494-497

- [80] Xing A, Gao Y, Ye L, Zhang W, Cai L, Ching A, Llaca V, Johnson B, Liu L, Yang X, Kang D, Yan J, Li J. A rare SNP mutation in *Brachytic2* moderately reduces plant height and increases yield potential in maize. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66 (13): 3791-3802
- [81] Ellis M, Spielmeier W, Gale R, Rebetzke J, Richards A. "Perfect" markers for the *Rht-B1b* and *Rht-D1b* dwarfing genes in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 105 (6-7): 1038-1042
- [82] Bazhenov M S, Divashuk M G, Amagai Y, Watanabe N, Karlov G I. Isolation of the dwarfing *Rht-B1p* (*Rht17*) gene from wheat and the development of an allele-specific PCR marker. *Molecular Breeding*, 2015, 35 (11): 1-8
- [83] Kovach M J, Calingacion M N, Fitzgerald M A, McCouch S R. The origin and evolution of fragrance in rice (*Oryza sativa* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106 (34): 14444-14449
- [84] Mikami I, Uwatoko N, Ikeda Y, Yamaguchi J, Hirano H Y, Suzuki Y, Sano Y. Allelic diversification at the *wx* locus in landraces of Asian rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 2008, 116 (7): 979-989
- [85] Jiang L, Ma X, Zhao S, Tang Y, Liu F, Gu P, Fu Y, Zhu Z, Cai H, Sun C, Tan L. The *APETALA2*-like transcription factor SUPERNUMERARY BRACT controls rice seed shattering and seed size. *The Plant Cell*, 2019, 31 (1): 17-36
- [86] 乐素菊, 刘鹏飞, 曾慕衡, 王伟权, 王小明. 超甜玉米 *bt2* 基因 SNP 位点的分析及分子标记辅助筛选. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2012, 40 (11): 73-78
Le S J, Liu P H, Zeng M H, Wang W Q, Wang X M. Promoter region of super sweet corn *bt2* gene and development of molecular marker-assisted selection. *Journal of Northwest A&F University: Nat.Sci.Ed.*, 2012, 40 (11): 73-78
- [87] Li L, Tacke E, Hofferbert H R, Lübeck J, Strahwald J, Draffehn A M, Walkemeier B, Gebhardt C. Validation of candidate gene markers for marker-assisted selection of potato cultivars with improved tuber quality. *Theoretical and Applied Genetics*, 2013, 126 (4): 1039-1052
- [88] Yang Q, Fan C, Guo Z, Qin J, Wu J, Li Q, Fu T, Zhou Y. Identification of *FAD2* and *FAD3* genes in *Brassica napus* genome and development of allele-specific markers for high oleic and low linolenic acid contents. *Theoretical and Applied Genetics*, 2012, 125 (4): 715-729
- [89] Cockram J, Chiapparino E, Taylor S A, Stamati K, Donini P, Laurie D A, O'sullivan D M. Haplotype analysis of vernalization loci in European barley germplasm reveals novel *VRN-H1* alleles and a predominant winter *VRN-H1/VRN-H2* multi-locus haplotypes. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, 115 (7): 993-1001
- [90] Biselli C, Cavalluzzo D, Perrini R, Gianinetti A, Bagnaresi P, Urso S, Orasen G, Desiderio F, Lupotto E, Cattivelli L, Valè G. Improvement of marker-based predictability of Apparent Amylose Content in japonica rice through GBSSI allele mining. *Rice*, 2014, 7 (1): 1
- [91] Tomlinson L, Yang Y, Emenecker R, Smoker M, Taylor J, Perkins S, Smith J, MacLean D, Olszewski N E, Jones J D G. Using CRISPR/Cas9 genome editing in tomato to create a gibberellin-responsive dominant dwarf DELLA allele. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17 (1): 132-140
- [92] Huang L, Zhang R, Huang G, Li Y, Melakua G, Zhang S, Chen H, Zhao Y, Zhang J, Zhang Y, Hu F. Developing superior alleles of yield genes in rice by artificial mutagenesis using the CRISPR/Cas9 system. *The Crop Journal*, 2018, 6 (5): 475-481
- [93] Zhang R, Liu J, Chai Z, Chen S, Bai Y, Zong Y, Chen K, Li J, Jiang L, Gao C. Generation of herbicide tolerance traits and a new selectable marker in wheat using base editing. *Nature Plants*, 2019, 5: 480-485
- [94] Li T, Yang X, Yu Y, Si X, Zhai X, Zhang H, Dong W, Gao C, Xu C. Domestication of wild tomato is accelerated by genome editing. *Nature Biotechnology*, 2018, 36 (12): 1160-1163