

# 转基因技术与基因编辑技术在 抗除草剂农作物上的应用

崔永祯<sup>1</sup> 杨晓云<sup>2</sup> 李绍祥<sup>1</sup> 浦秋红<sup>1</sup> 杨忠慧<sup>1</sup> 李宏生<sup>1</sup> 丁明亮<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup> 云南省农业科学院粮食作物研究所, 昆明 650205; <sup>2</sup> 云南省丽江市种子管理站, 丽江 674199; <sup>3</sup> 中国农业大学植物保护学院植物病理学系 / 农业农村部作物有害生物监测与绿色防控重点开放实验室, 北京 100193)

**摘要:** 田间杂草不仅干扰农作物的生长, 还可造成农作物产量损失, 因此控制田间杂草对农作物具有重要意义。然而我国对于田间杂草的控制仍然是使用除草剂等化学防治手段为主, 但是一些灭生性除草剂不能直接用于农作物伴生杂草的控制, 而通过转基因和基因编辑等生物技术培育抗除草剂农作物可很好地克服这一难题。目前, 转基因技术和基因编辑技术在全世界已广泛应用于抗除草剂农作物的培育, 主要综述了这两种生物技术的研究现状及其在抗除草剂农作物上的应用情况。

**关键词:** 转基因; 基因编辑; 抗除草剂; 作物改良

自人类对农作物驯化以来, 遍布田间的杂草不但与农作物在阳光、水分、养分及生长空间等各种资源上存在一定的竞争, 而且还是多种病原菌及害虫的中间寄主生物, 杂草的存在显著影响农作物的产量及农产品的品质<sup>[1]</sup>。因此, 对各种农作物田间的杂草进行有效地控制可促进农作物的增产增收, 是农田管理的重要措施之一。目前, 对田间杂草的控制主要有人工拔除、物理除草、化学除草、生物防

治除草和微生物除草等, 虽然化学除草存在农药残留威胁农业生态环境与食品安全, 增加农业生产成本及不规范操作带来的农作物毒害作用等负面效应, 但是化学除草仍然是使用最多且效果较好的方式<sup>[1-2]</sup>。目前, 化学除草剂特别是草甘膦和草丁膦等灭生性除草剂由于其高效、低毒、易降解、无残留等优势使用广泛, 但这些灭生性除草剂没有选择性, 不能直接用于各种农作物田间的杂草控制, 而通过转基因技术和基因编辑技术培育抗草甘膦和草丁膦的农作物可以很好地克服这一难题。因此, 利用转基因技术与基因编辑技术培育抗除草剂农作物具有非常广阔的应用前景, 为现代农业的可持续发展提供

**基金项目:** 云南省种子种业联合实验室建设项目; 云南省财政部门预算项目重大专项(530000210000000013809)

杨晓云为并列第一作者

通信作者: 丁明亮

目投入到玉米种业优势产区, 统筹制种大县奖励、现代种业提升工程等项目, 切实加大各级财政资金支持基地建设的力度, 形成基地建设的强大合力。

**4.2.8 强化科技创新与服务** 充分发挥农业科研院所、龙头企业和产业体系的技术优势和人才优势, 针对基地建设中的连作障碍、水肥一体化、病虫害绿色防控、去雄收获适用机械研发、生产信息化等关键环节, 建立政产学研推协同创新机制, 研究解决制约玉米制种基地发展关键技术“瓶颈”问题, 加强技术培训、指导和示范服务, 全面提高基地农户、制种专业合作社、种子企业和管理人员的素质, 提升种子生产

和服务水平。加大《种子法》等法律法规规章宣传培训, 营造良好发展环境。

## 参考文献

- [1] 李友强. 推进甘肃现代种业发展的思路与措施. 中国种业, 2021 (1): 1-4
- [2] 刘培玉. 南安农业机械化发展的制约因素及对策. 福建农机, 2016 (3): 2-5, 8
- [3] 甘肃省人民政府办公厅. 关于印发《甘肃省深化种业体制改革提高创新能力实施方案》的通知. (2014-06-09) [2022-01-17]. <http://www.gsei.com.cn/html/1275/2014-06-09/content-57618.html>

(收稿日期: 2022-01-18)

了可靠保障。

## 1 转基因技术研究现状及其在抗除草剂作物上的应用

**1.1 转基因技术研究现状** 转基因技术(Transgenic technology)是指将一种生物体(供体)的基因与载体在体外进行拼接重组,然后转入另一生物体(受体)内,使之按照人们的意愿稳定遗传并表达出新产物,使其在性状、功能、表型、营养和消费品质等方面满足人类需要的技术<sup>[3]</sup>。转基因技术与常规杂交育种的差别主要表现在两个方面:由于不同物种间存在生殖隔离,传统技术往往仅在物种内的个体上实现基因转移,而转基因技术却不受物种间亲缘关系的限制,可打破不同物种间生殖隔离,扩大基因可利用的范围;由于涉及物种个体间整个基因组的交流,致使传统的育种技术仅在物种的性状水平上进行选择时不可能准确地对某个基因控制的性状进行选择,即对后代表现的预见性较差,而转基因技术中遗传转化的基因往往是经过明确定义且功能清晰的基因,即对后代表现的预见性较好。因此,将二者紧密结合,能快速培育多抗、优质、高产、高效新品种,大大提高品种改良效率,并可降低农药、肥料投入,在缓解资源约束、保障食品安全、保护生态环境、拓展农业功能等方面潜力巨大<sup>[4]</sup>。

转基因技术一直是当今生物技术研究热点,因此已报道的转基因技术种类较多,主要分为以下两类:一类是通过脂质体法、农杆菌或病毒介导的利用表达载体系统转化的方法;另一类是通过基因枪法、花粉管通道法、Floral dip法及纳米载体包埋法等物理或化学手段直接进行遗传转化的方法<sup>[3]</sup>。在这两大类遗传转化方法中,农杆菌介导的转基因技术应用最为广泛,其基本原理是:构建到T-DNA上的目标基因可随T-DNA导入植物,进而整合到受体植物的染色体上<sup>[5]</sup>。该方法具有材料范围广、转化率高、单拷贝比例高、转化子稳定等特点,欧婷等<sup>[6]</sup>通过该方法将抗草甘膦基因(*EPSPS-G6*)导入3个受体材料,获得了60株抗草甘膦转基因棉花植株,转化成功率6.4%。

**1.2 转基因技术在抗除草剂农作物上的应用** 转基因技术是人类历史上应用最为迅速的重大技术之一,自20世纪末转基因农作物实现商业化种植以来,全世界转基因农作物的种植面积和销售效益都

得到了飞速发展。国际农业生物技术应用服务组织(ISAAA)发布的《2019年全球生物技术/转基因农作物商业化发展态势》报告显示:2019年作为转基因农作物商业化的第24年,转基因农作物在全世界共种植了1.904亿hm<sup>2</sup>,相比转基因开始商业化种植起始之年1996年增加了约112倍,累计种植面积达27亿hm<sup>2</sup>;2019年抗除草剂农作物种植面积为8150万hm<sup>2</sup>(43%),其中抗虫/抗除草剂(IR/HT)复合性状农作物面积增长6%,覆盖了全世界45%的转基因作物的种植面积,主要涉及大豆(*Glycine max*(Linn.)Merr.)、油菜(*Brassica campestris*L.)、玉米(*Zea mays*L.)、苜蓿(*Medicago sativa*Linn.)和棉花(*Gossypium spp.*)等农作物<sup>[7]</sup>。抗除草剂的功能基因主要为PAT(*bar*)和EPSPS,此外还包括编码腈水解酶(Nitrilase)的BXN和编码麦草畏-氧-脱甲基酶(Dicamba O-demethylase)的DDM等<sup>[8]</sup>。最早实现抗除草剂转基因农作物商业化种植的国家是美国,目前转基因农作物的研发机构主要是孟山都、拜耳等种业巨头<sup>[7]</sup>。释放的品种多为单一类型的除草剂抗性转基因农作物,现在已出现了部分抗虫/抗除草剂(IR/HT)复合性状的转基因农作物<sup>[7-8]</sup>。

## 2 基因编辑技术研究现状及其在抗除草剂作物上的应用

**2.1 基因编辑技术研究现状** 基因编辑技术是通过对生物体细胞基因组中目的基因的一段核苷酸序列甚至是单个核苷酸进行替换、删除、增加或者是插入外源的DNA序列,使之产生可遗传的、突变的一种生物技术<sup>[9-11]</sup>。该技术与高能射线或化学诱变剂导致的DNA随机突变不同,基因编辑技术可定向改变基因的组成和结构。当然在自然界生物体对于这种DNA的变异会自发修复,主要为非同源末端连接(NHEJ)和同源重组(HR)两种方式对生物体DNA损伤进行修复,这也是基因编辑技术的底层逻辑<sup>[12]</sup>。目前,主流基因编辑技术主要有锌指核酸酶(ZFNs)、TAL效应子核酸酶(TALENs)和成簇的规律间隔的短回文重复(CRISPR/Cas9),特别是CRISPR/Cas9基因编辑技术因其表现出载体构建简便且不受基因组甲基化影响,能靶向几乎任意细胞任意序列且可同时靶向多个靶点,切割效率高且精准等突出优势,发展迅速并获得了2020

年的诺贝尔化学奖<sup>[13-14]</sup>。CRISPR/Cas9 基因编辑系统的发现始于 1987 年,在大肠杆菌的基因组中首次发现了特殊的重复间隔序列,随后在其他细菌和古细菌中也发现了这一特殊序列,随后的研究证明 CRISPR 系统是古细菌和细菌的一种不断进化适应的免疫防御机制,直到 2012 年 CRISPR /Cas9 的详细作用机制被发现,并预测可作为基因编辑技术<sup>[15-17]</sup>。CRISPR/Cas9 基因编辑技术的原理为:通过人工设计的 gRNA (guide RNA) 来识别目的基因组序列,并引导 Cas9 蛋白进行有效切割 DNA 双链,形成双链断裂,损伤后修复会造成碱基敲除或插入等<sup>[18]</sup>。在 CRISPR/Cas 系统中,依据 Cas 蛋白的种类及其组合的不同可分为 Type I、Type II 和 Type III 3 种主要类型,其中 Type I 类型含有 Cas1、Cas2 和 Cas3, Type II 类型含有 Cas1、Cas2 和 Cas9, Type III 类型含有 Cas1、Cas2 和 Cas10,由于 Type II 免疫系统需要的 Cas 蛋白相对简单,因此经过人为改造的 Type II 类型的 CRISPR/Cas9 系统已成为一个高效、简便的基因编辑工具<sup>[19]</sup>。随着技术的进步,CRISPR/Cas9 基因编辑技术得到了一定的发展。David Liu 团队改造了 CRISPR/Cas9 基因编辑系统,研发出首个可编辑 DNA 单个碱基的基因编辑技术 CBE (Cytosine base editor),可以将 C-G 碱基对转变成 T-A 碱基对<sup>[20]</sup>;之后该团队又获得可将 A-T 碱基对转变成 G-C 碱基对的碱基编辑器 ABE (Adenine base editor),同时具有较低的编辑错误发生率<sup>[21]</sup>。在 2019 年该团队实现了基因编辑领域的里程碑式突破,开发出一种超精确的新型基因编辑工具 PE (Prime editors),无需 DNA 双链断裂,无需额外的 DNA 模板,便可实现 ATCG 4 种碱基间所有 12 种单碱基的自由“改变”,并且能有效实现多碱基的精准增删<sup>[22]</sup>。在国内,研究者开发了“循环打靶”碱基编辑策略,通过双靶点的“循环打靶”设计将 CRISPR/Cas9 变成了全功能的碱基编辑器,随后又设计了能够上调基因表达的倒位、重复等基因组结构变异,成功实现了对目标基因的敲高<sup>[23-24]</sup>。CRISPR/Cas9 基因编辑技术的出现与发展很大程度上促进了整个生命科学的发展,不仅用于药物开发、疾病治疗、基因调控等领域的研究,而且在农作物的遗传改良如抗除草剂作物的培育等领域也起到重要作用<sup>[9]</sup>。

## 2.2 基因编辑技术在抗除草剂农作物上的应用

基因编辑技术相比传统育种技术能快速定向改良农作物的目标性状,并且可大大缩短育种周期,当前利用主流的 CRISPR/Cas9 基因编辑技术对农作物的产量、品质、抗逆性、抗虫及抗除草剂等方面进行改良获得了较好的效果<sup>[10-11]</sup>。迄今为止,通过基因组编辑技术已经开发了多个抗除草剂作物,可以很好地解决杂草问题和提高作物生产力,以满足世界各地日益增长的粮食需求并发挥重要作用<sup>[11]</sup>。Svitashev 等<sup>[25]</sup>采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术编辑玉米 *ALS2* 基因获得了抗除草剂氯磺隆的玉米突变种质。Chen 等<sup>[26]</sup>利用基于 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的“循环打靶”碱基编辑策略将 Cas9 变成了全功能的碱基编辑器,在被成功编辑的水稻植株中,利用高表达基因 *CP12* 基因的启动子驱动 *PPO1* 基因的表达和高表达基因 *Ubiquitin2* 基因的启动子驱动 *HPPD* 基因的表达,从而大幅“敲高”了水稻内源 *PPO1* 和 *HPPD* 基因,使水稻植株表现出预期的抗除草剂性状。Zhang 等<sup>[27]</sup>利用基于 CRISPR/Cas9 系统的单碱基编辑技术,对高产小麦品种科农 199 乙酰乳酸合成酶(*ALS*)基因进行编辑,获得了抗除草剂烟嘧磺隆(*Nicosulfuron*)的小麦基因编辑种质。除以上农作物以外,通过基因编辑技术也获得了土豆(*Solanum tuberosum* L.)、大豆(*Glycine max* (Linn.) Merr.)、油菜(*Brassica campestris* L.)、西瓜(*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum.et Nakai)、番茄(*Lycopersicon esculentum* Miller)、亚麻(*Linum usitatissimum* L.)、辣椒(*Capsicum annuum* L.)和木薯(*Manihot esculenta* Crantz)等农作物的抗除草剂新种质<sup>[11]</sup>。

## 3 展望

转基因技术和基因编辑技术已广泛应用于抗除草剂农作物的改良,也取得了较好的效果。由于公众普遍认为转基因作物可能存在一定的环境和公共卫生风险,因此转基因农作物特别是粮食作物的种植在一些国家仍然受到限制。然而,基因编辑技术被普遍认为属于非转基因范畴,可切实打消公众对于转基因农作物的顾虑<sup>[11]</sup>。2015 年第 1 个基因编辑抗除草剂农作物油菜作为非转基因农作物被批准在美国种植,标志着基于基因编辑的抗除草剂农作物在农业生产上实现了商业化应用<sup>[26]</sup>。当前,我

国转基因技术与基因编辑技术等先进农业生物技术的某些领域已处于国际领先水平,但整体实力与国际先进水平还有一定的距离,应继续寻求技术创新,切实推动包括抗除草剂农作物品种改良在内相关农业生物技术的发展,以促进我国现代化农业的可持续发展。因此,利用转基因技术与基因编辑技术培育的抗除草剂农作物特别是粮食作物具有非常广阔的应用前景。

## 参考文献

- [1] 邱龙,马崇烈,刘博林,章旺根.耐除草剂转基因作物研究现状及发展前景.中国农业科学,2012,45(12):2357-2363
- [2] 朱笑坤,鲁东飞,柳明,段又生,刘尚钟.杂草控制技术的发展及新型的转基因除草技术//江树人.农药与环境安全国际会议论文集.北京:中国农业大学出版社,2005
- [3] 骆翔,刘志颐,章树民,申硕,王德福,王劲松.植物转基因技术研究进展.中国农学通报,2014,30(15):234-240
- [4] 农业部农业转基因生物安全办公室.转基因技术与传统的杂交育种技术有何异同、优势是什么?.(2010-07-17)[2022-01-19].[http://www.moa.gov.cn/ztl/zjyqwgz/kpxc/201007/t20100717\\_1601245.htm](http://www.moa.gov.cn/ztl/zjyqwgz/kpxc/201007/t20100717_1601245.htm)
- [5] 张佳星,何聪芬,叶兴国,董银卯.农杆菌介导的单子叶植物转基因研究进展.生物技术通报,2007(2):23-26
- [6] 欧婷,何秋伶,陈进红,祝水金.基于抗草甘膦基因的棉花茎尖农杆菌介导转化方法的研究.棉花学报,2013,25(5):410-416
- [7] 国际农业生物技术应用服务组织.2019年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势.中国生物工程杂志,2021,41(1):114-119
- [8] Que Q, Chilton M M, de Fontes C M, He C, Nuccio M, Zhu T, Wu Y, Chen J S, Shi L. Trait stacking in transgenic crops: challenges and opportunities. GM Crops, 2010, 1(4): 220-229
- [9] 廖嘉明,李春梅,张石虎,李布野,欧阳昆唏,陈晓阳. CRISPR/Cas9 基因编辑技术的发展及其在植物中的应用.中国农业科技导报,2021,23(12):20-28
- [10] 焦耀磊,王春生,曲硕,孙珊珊,朱婷婷,赵贺,王丕武. CRISPR/Cas9 技术在作物遗传育种中的应用进展.河南农业科学,2021,50(7):1-7
- [11] Hussain A, Ding X, Alariqi M, Manghwar H, Hui F J, Li Y P, Cheng J Q, Wu C L, Cao J L, Jin S X. Herbicide resistance: another hot agronomic trait for plant genome editing. Plants, 2021, 10, 621
- [12] Featherstone C, Jackson S P. DNA double-strand break repair. Current Biology, 1999, 9(20): 759-761
- [13] Carroll D. Genome engineering with Zinc-Finger Nucleases. Genetics, 2011, 188(4): 773-782
- [14] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna J A, Charpentier E. A programmable Dual-RNA-Guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science, 2012, 337(6096): 816-821
- [15] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. Journal of Bacteriology, 1987, 169(12): 5429-5433
- [16] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero D A, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science, 2007, 315(5819): 1709-1712
- [17] Wiedenheft B, Sternberg S H, Doudna J A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. Nature, 2012, 482(7385): 331-338
- [18] Mali P, Yang L, Esvelt K M, Aach J, Guell M, Dicarlo J E, Norville J E, Church G M. RNA-Guided human genome engineering via Cas9. Science, 2013, 339(6121): 823-826
- [19] Makarova K S, Haft D H, Barrangou R, Brouns S, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica F, Wolf Y I, Yakunin A F, van der Oost J, Koonin E V. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. Nature Reviews Microbiology, 2011, 9(6): 467-477
- [20] Komor A C, Kim Y B, Packer M S, Zuris J A, Liu D R. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. Nature, 2016, 533(7603): 420
- [21] Gaudelli N M, Komor A C, Rees H A, Packer M S, Badran A H, Bryson D I, Liu D R. Programmable base editing of A. T to G. C in genomic DNA without DNA cleavage. Nature, 2017, 551(7681): 464
- [22] Anzalone A V, Randolph P B, Davis J R, Sousa A A, Koblan L W, Levy J M, Chen P J, Wilson C, Newby G A, Raguram A, Liu D R. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. Nature, 2019, 576(7785): 149
- [23] Yang W, Qi W, Li Y C, Wang J Y, Luo Y M, Ding D H, Mo S D, Chen B, Lu Y, Li H R, Jiang L J. Programmed sequential cutting endows Cas9 versatile base substitution capability in plants. Science China Life Sciences, 2021, 64(6): 1025-1028
- [24] Lu Y, Wang J Y, Chen B, Mo S D, Lian L, Luo Y M, Ding D H, Ding Y H, Cao Q, Li Y C, Li Y, Liu G Z, Hou Q Q, Cheng T T, Wei J T, Zhang Y R, Chen G W, Song C, Hu Q, Sun S, Fan G Y, Wang Y T, Liu Z T, Song B A, Zhu J K, Li H R, Jiang L J. A donor-DNA-free CRISPR/Cas-based approach to gene knock-up in rice. Nature Plants, 2021, 7(11): 1445-1452
- [25] Svitashv S, Young J K, Schwartz C, Gao H R, Falco S C, Cigan A M. Targeted mutagenesis, precise gene editing, and Site-Specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. Plant Physiology, 2015, 169(2): 931-945
- [26] Chen Y Y, Wang Z P, Ni H W, Xu Y, Chen Q J, Jiang L J. CRISPR/Cas9-mediated base-editing system efficiently generates gain-of-function mutations in *Arabidopsis*. Science China Life Sciences, 2017, 60(5): 520-523
- [27] Zhang R, Liu J X, Chai Z Z, Chen S, Bai Y, Zong Y, Chen K L, Li J X, Jiang L J, Gao C X. Generation of herbicide tolerance traits and a new selectable marker in wheat using base editing. Nature Plants, 2019, 5(5): 480-485

(收稿日期: 2022-01-19)