

转基因玉米培育及其检测技术应用研究

李 晶 尹祥佳 王雅琳
(兰州职业技术学院,甘肃兰州 730070)

摘要:玉米是全球和我国第一大粮食作物,对稳定我国粮食安全具有显著的贡献。随着农杆菌介导法等转基因技术在玉米转基因育种中的应用,能够有效培育抗虫转基因玉米、耐除草剂转基因玉米、耐干旱和品质改良转基因玉米。同时,通过将多基因聚合转化和常规玉米育种技术相结合,研究建立快速有效的玉米转基因检测技术,有助于不断培育优良性状的玉米新品种,促进我国玉米种业发展和乡村振兴。

关键词:转基因玉米;培育;检测技术

玉米是全球及我国第一大粮食作物,也是草食畜牧业和饲料行业的重要作物,其作为杂种优势研究和应用非常广泛,对稳定我国粮食生产安全,调整农业种植结构,增加农民收入等都具有重要的贡献。根据国家统计局数据显示,我国2020年玉米播种面积为4126.4万 hm^2 ,玉米产量约2.6亿t。预计到2030年,我国玉米生产的需求量将达到3.03亿 $\text{t}^{[1-2]}$ 。为保障玉米种植业的持续稳定发展,需要加大玉米新种质的选育,常规的玉米品种选育是通过选择育种、杂交育种、回交选育、诱变育种、群体改良等育种方法的集成育种,但选育周期较长,材料自主创新难度较大,再加上玉米种子品种的市场化程度较高,为了获取更多的效益,往往导致玉米种质遗传基础狭窄,市场上的品种同质化趋势加大,都会对玉米的生产带来一定的难度。随着基因工程技术和分子生物学技术的发展,以转基因技术为代表的生物技术在玉米品种选育过程中的应用作用日益凸显,尤其是通过育种设计,将生物技术育种与常规育种技术的结合,成为了重要的玉米新品种选育途径。

1 玉米转基因技术

转基因技术也称之为基因工程技术,在农业领域的应用非常广泛,包括玉米转基因研发在内的粮食作物品种的选育和改良成为了重要的农业科技攻关方向。1983年世界上首次报道了转基因烟草

的研发成功,带动了我国转基因作物育种。通过转基因技术的应用加速玉米种质资源的创新,在玉米种质改良过程中发挥着重要的作用^[3]。1986年我国启动了国家高技术研究发展规划,也就是“863”计划,将转基因植物在内的生物技术研发作为重点支持研究领域,随着研究的深入开展和积累,我国培育了自主知识产权的抗虫转基因棉花,并投入商业化生产。此外,国家重大基础研究计划(“973”计划)也将转基因育种列为重要的支持研究领域,特别是2008年我国开始实施的转基因生物新品种培育国家科技重大专项,有效实现了包括玉米在内的五大作物的转基因育种和常规育种的深度结合,研发出了一批重要的新品种和新材料。由中国农业科学院生物研究所和北京奥瑞金公司联合研发并于2009年获得了原农业部颁发的转植酸酶基因玉米自交系的安全证书,成为了我国转基因玉米研究的重要创始之作^[4],2015年转植酸酶基因玉米再次获得安全证书。2019年北京大北农生物技术有限公司的DBN9936和杭州瑞丰生物科技有限公司的双抗12-5获得安全证书。2020年北京大北农生物技术有限公司研发的耐除草剂转基因玉米获得农业农村部科技教育司颁发的农业转基因安全证书,有效期为5年。2021年中国农业大学国家玉米改良中心培育的抗虫玉米ND207获得生物安全证书,杭州瑞丰研发的浙大瑞丰8抗虫和耐除草剂转基因玉米、北京大北农生物技术有限公司研发的DBN3601T双价抗虫和耐除草剂转基因玉米获得转基因玉米安全证书。2022年杭州瑞丰耐除草剂玉

基金项目:2019年度兰州市科技发展指导性计划项目(2019-ZD-156);兰州职业技术学院2020-2021年度院级科研项目(2020XY-9)

通信作者:尹祥佳

米和中国种子集团有限公司的3个转基因玉米获得转基因安全证书。转基因玉米研发的常用转基因技术有农杆菌介导法、基因枪法和花粉管通道法。

1.1 农杆菌介导法 农杆菌是自然界存在的,农杆菌介导的玉米遗传转化方法是最常用,也是最有效的玉米转化方法。在试验操作层面是将待转化的外源目的基因整合到经过改造的遗传转化的T-DNA区,借助农杆菌侵染植物的细胞,实现外源基因与植物基因组的转移与融合^[5],再利用植物组织培养再生体系,培育出转化再生的植物植株,再进一步进行转基因的检测确定以及后代转化的稳定性分子和植物生理学鉴定,得到稳定表达的转基因植株。谢超等^[6]采用农杆菌转化方法将提高玉米籽粒类胡萝卜素基因 *chyb* 基因和耐草甘膦 *bar* 基因转入玉米品种 7922 中,获得品质改良和抗除草剂的玉米育种材料。王阳等^[7]对抗虫基因 *cry1Ab* 进行改造后获得新的基因 *cryFL1a*,用农杆菌转化 HiII 玉米幼胚,通过转基因检测抗性和转化后代的抗病鉴定试验得到了抗亚洲玉米螟的玉米材料。农杆菌介导玉米转化方法主要的转化受体为玉米幼胚诱导的愈伤组织、玉米幼胚、玉米黄化苗的茎尖,农杆菌的菌株主要有 EHA105、C58 和 LBA4404。

1.2 基因枪法 基因枪法是一种物理的转化方法,又称为粒子枪法,是采用高速的金属微粒表面的外源 DNA 分子随机整合到植物受体细胞中^[8]。李志亮等^[9]选用玉米自交系京 501 诱导的愈伤组织,采用基因枪法转化 *P5C5* 基因获得转基因材料,并进行了抗旱性鉴定,结果显示 *P5C5* 基因能够在干旱胁迫下通过基因的表达提高脯氨酸含量、降低丙二醛含量来提高转基因玉米的抗旱性。韩平安等^[10]用基因枪对玉米自交系 A188 诱导的幼胚愈伤组织进行转化 *cp4EPSPS* 基因,获得抗草甘膦转基因玉米材料。基因枪法转化玉米的主要受体材料有幼胚、愈伤组织和茎端分生组织^[11]。

1.3 花粉管通道法 花粉管通道法最早应用在烟草的转化当中,我国学者周光宇于 20 世纪 80 年代创立了花粉管通道转化技术,主要是采集植物花粉进行处理,然后利用天然花粉管通道将外源 DNA 目的基因携带进入胚囊实现外源基因的遗传转化^[12]。韩猛等^[13]选用玉米自交系京 24,将 *BADH* 基因通

过花粉管通道法进行转化,并对 T₂ 转基因植株进行了耐盐性生理指标的鉴定,得到了耐盐性自交系材料。陈丽娟等^[14]选用玉米自交系京 517、京 501 和吉 444,构建了 *bar* 基因为筛选标记基因和 *CspB* 为目的基因的双价植物表达载体,通过花粉管通道法实现了转化受体材料的耐旱性和耐除草剂等性状改良。花粉管通道法因受到外界环境的影响较大,所以最好选择晴天进行试验,这样可以减少花粉质量对转化效率的负面影响。除此之外,外源 DNA 片段的大小、浓度、纯度,田间导入量和导入时间也是影响转化效率的因素。近些年,采用超声波辅助花粉介导的方法能够有效提高转化效率,不受实验室植物组织培养的限制。

2 转基因玉米培育

目前,转基因玉米培育的目标性状主要是在抗虫转基因玉米、耐除草剂转基因玉米、耐干旱和品质改良转基因玉米等方面^[15]。

2.1 抗虫转基因玉米 在玉米种植过程中,虫害导致的玉米减产较为普遍,主要为棉铃虫、亚洲玉米螟和黏虫的危害。为了减少化学防治带来的环境问题,通过转基因技术培育抗虫转基因玉米品种,保障玉米生产安全是一项重要的路径^[16]。陈沼汀等^[17]选用玉米自交系 H99 幼胚为转化试验材料,用农杆菌介导转化法将抗虫基因 *cry1Ab13* 导入到玉米基因组中,通过分子检测和田间抗虫鉴定,对玉米螟的抗性显著提高。王建军等^[18]以郑 58 和昌 7-2 玉米自交系为试验材料,用花粉介导法将 *cry1Ac* 基因导入玉米基因组中,然后进行多代 PCR 检测和 Southern 杂交分析,获得纯合的转基因株系。在抗虫转基因玉米培育过程中,抗虫的评价试验是非常重要的环节,尤其是转 *Bt* 玉米对于玉米螟、黏虫、棉铃虫有一定的抗性,能够抑制黏虫生长发育^[19]。同时还要根据不同玉米种植区害虫发生情况实行分区域布局,研究进行管控的转基因抗虫玉米种植应对策略^[20]。

2.2 耐除草剂转基因玉米 玉米在种植生产过程中与各种田间杂草争夺水分和营养物质,导致其生长过程中的营养成分积累和产量受到抑制,因此,作为一种广谱内吸传导性除草剂,草甘膦是目前使用量最大的除草剂品种之一,而耐除草剂草甘膦转基因玉米研究和应用是重要的转基因玉米材料培育的方向^[21]。耐草甘膦基因通常作为表达载体构

建中的筛选标记基因,与其他目的基因同时实现遗传转化,能够获得复合性状的转基因玉米材料。余桂容等^[22]以玉米自交系 18599 和综 31 幼胚为转化受体,通过筛选、检测,获得了耐除草剂和抗虫的双抗玉米亲本育种材料。刘苗苗等^[23]选用玉米 Hi-II 为转化受体材料,用农杆菌介导法将耐草甘膦基因 *G10ev* 导入受体材料基因组中并进行了抗性鉴定,培育出了具有自主知识产权的耐草甘膦玉米转化系 AG16。

2.3 耐旱转基因玉米 由于水资源的短缺,加之农业灌溉用水条件的不同,旱作农业的发展急需耐旱转基因玉米品种的培育。相关研究表明,干旱每年导致作物减产达 50% 以上,随着我国耐旱转基因玉米的研究发展,耐旱基因主要分为转录因子、酶类和其他抗旱相关蛋白基因^[24]。郑成忠等^[25]以 T_4 转 *BADH* 基因玉米自交系丹 988 为材料,经过加代对 T_5 和 T_6 转基因植株进行基因表达稳定性、生理生化指标测定、田间耐旱性分析,培育了耐旱玉米新种质资源。冷益丰等^[26]研究了转入抗旱基因 *TsDREB2A*、*CBF4* 和 *PIS* 的 13 份玉米自交系种子材料的萌发期抗旱性。因此,耐旱基因的挖掘以及转化玉米材料评价是培育耐旱玉米品种的有效途径。

除此之外,品质改良转基因玉米品种主要与抗虫、耐除草剂的多基因聚合转化,获取复合性状的转基因玉米新材料。邹俊杰等^[27]研究了含有 *Cry3Bb*、*Cry1Ab*、*cp4epsps*、*ZmTMT* 和 *ZmHPT 5* 个基因聚合的转基因材料,具有抗虫、耐除草剂和提高维生素 E 含量等性状的遗传稳定性表达。将多基因聚合转化和常规育种技术相结合,培育多种符合性状的转基因玉米材料具有重要的研究价值和广泛的应用前景。

3 转基因玉米检测技术

转基因玉米检测技术主要有两类,一是以核酸为检测对象的 PCR 法,包含普通 PCR 检测、多重 PCR 检测和实时荧光定量 PCR 检测;二是以蛋白质为检测对象的检测法,常用的有试纸条转基因检测。核酸检测方法是应用 PCR 技术开展转基因玉米成分的检测方法。阳丽等^[28]根据常见的玉米内源基因 *CaMV35S* 启动子和 *NOS* 终止子,转化的外源目的基因设计检测引物,通过优化检测体系,建

立 PCR 初步的筛选检测方法。尹全等^[29]研究了转基因玉米筛查的多重 PCR 检测方法,构建了进口转基因玉米基因元件 *P-CaMV35S*、*P-ract1*、*T-NOS*、*pat*、*bar* 和 *PMI* 等元件的组合筛选检测体系,对我国进口的转基因玉米进行快速和有效的检测。袁磊等^[30]设计特异性引物和 Taqman 探针,通过实时荧光 PCR 技术建立玉米 MON88017 特异性检测方法,检测结果的灵敏度和准确性都比较高,可以满足国际上关于转基因的 1% 检测底限要求。作为蛋白质检测方法的试纸条分为样品垫、衬板、吸收垫、结合垫、NC 膜、检测带和控制带,已经成为了商品化的试纸。检测时将样品研磨,溶解后获取蛋白质溶液,再用试纸检测读取结果,转基因检测试纸在玉米转基因检测中应用非常方便,能够显著提高检测效率。

参考文献

- [1] 何伟,祝蕾,刘欣泽,安学丽,万向元. 玉米遗传转化与商业化转基因玉米开发. 中国生物工程杂志, 2021, 41 (12): 13-23
- [2] 朱永升,杨麟,何远远,何文铸. 3 份氮高效利用基因转基因杂交玉米产量评价. 四川农业科技, 2020 (12): 20-22
- [3] 宋伟彬,赵海铭,赖锦盛. 2019 年中国玉米生物学研究进展. 玉米科学, 2020, 28 (3): 15-30
- [4] 黄大昉. 我国转基因作物育种发展回顾与思考. 生物工程学报, 2015, 31 (6): 892-900
- [5] 杨琳. T-DNA 在农杆菌介导转基因玉米中的整合模式. 成都: 四川农业大学, 2012
- [6] 谢超,季静,王罡,史利平,张烈,尹日晖,关春峰,金超,陈玉春. *chyb* 基因的玉米遗传转化及后代性状分析. 分子植物育种, 2016, 14 (7): 1718-1723
- [7] 王阳,杨朔,尹悦佳,刘洋,李楠,柳青,于志晶,刘相国,冯树丹,郝东云. 分子改造 *Cry* 蛋白基因的转基因玉米创制及其抗虫功能评价. 玉米科学, 2015, 23 (6): 27-34
- [8] 关淑艳,董昭旭,李晖,孙国旭,马义勇. 生物技术在玉米育种中的应用. 吉林农业大学学报, 2016, 38 (2): 127-137
- [9] 李志亮,吴忠义,杨清,张希太,叶嘉,邢浩春,陈建中,黄从林. 生物技术在玉米育种中的应用. 吉林农业大学学报, 2016, 38 (2): 127-137
- [10] 韩平安,吴新荣,孙瑞芬,常悦,石海波,唐宽刚,梁亚晖,李晓东. 基因枪介导抗草甘膦基因对玉米自交系 A188 的遗传转化. 北方农业学报, 2020, 48 (6): 1-5
- [11] 王景超. 玉米转基因方法研究进展. 现代农业科技, 2016 (6): 34-35
- [12] 洪德峰,张学舜,刘俊恒,马毅,魏峰. 花粉管通道法在玉米转基因中的应用. 中国种业, 2009 (4): 12-13
- [13] 韩猛,王霄汉,张中保,邹华文,吴忠义. *BADH* 基因转入玉米自交系的研究. 作物杂志, 2015 (2): 64-69

中国种子协会种子企业调研报告

王磊 张璐 孙立华 赵帅 韩奎 张文艳

(中国种子协会,北京 100125)

摘要:通过实地调研,了解种业振兴中各地管理机构、科研单位、种业企业为企业发展所做出的努力,剖析企业在政策、资源、科研、市场环境方面所面临的困境,提出种业企业做优做强的建议。

关键词:企业主体;企业困境;企业担当

为了解种业企业发展情况,发挥种业企业在种业振兴中的主力军作用,中国种子协会组织开展了2021年种子企业情况调研活动,通过发放调研问卷、召开座谈会、实地考察等方式,调研了60余家企业、7家省级行业协会、6家省级种子管理部门,并专项调研了16家种业企业科企合作和兼并重组情况。

1 种业企业发展情况

1.1 管理机构积极引领 各地政府根据党中央、国

务院部署,落实农业农村部对种业振兴工作的安排,从当地实际情况出发,出台种业政策,推进种业企业发展。提高种企地位 如江苏省泰州市在2021年一号文件中,明确提出要支持当地种业企业——江苏红旗种业股份有限公司。加强资金扶持 如江西省2021年3月成立了江西省兴赣种业发展基金,存续期10年,首期规模达3.01亿元,主要针对成长型企业进行投资。推动科企合作 如上海市出台政策鼓励支持科研院所、高等院校科研人才通过兼职、选

- [14] 陈丽娟,黄从林,张秀海,吴忠义,杨德光. *CspB* 基因植物表达载体的构建及转化玉米自交系的研究. 作物杂志,2011(3): 70-74
- [15] 焦悦,韩宇,杨桥,黄耀辉,安吉翠,杨亚洲,叶纪明. 全球转基因玉米商业化发展态势概述及启示. 生物技术通报,2021,37(4): 164-176
- [16] 杨小艳,王云鹤,翁建峰,吴红,韩焱,雷开荣,谢树章. 转 *cryIA*. *301* 基因玉米对主要鳞翅目害虫的抗性研究. 农业生物技术学报. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3342.S.20220518.1332.012.html>
- [17] 陈沼汀,董昭旭,刘双,孙国旭,李晖,魏晓禹,孙苏,关淑艳. 转 *cryIAb13* 基因玉米新种质的创制. 华南农业大学学报,2016,37(5): 31-37
- [18] 王建军,杨慧珍,刘佼. *cryIAc* 基因在转基因玉米中的遗传规律及对抗虫性影响. 生物技术通报,2015,31(1): 122-130
- [19] 宋苗,汪海,张杰,何康来,梁革梅,朱莉,黄大昉,郎志宏. 转 *Bt cryIAh* 基因抗虫玉米对亚洲玉米螟、棉铃虫和黏虫的抗性评价. 生物技术通报,2016,32(6): 1-6
- [20] 李国平,吴孔明. 中国转基因抗虫玉米的商业化策略. 植物保护学报,2022,49(1): 17-32
- [21] 谢树章,杨小艳,林清,翁建峰,蒋晓英,李新海,雷开荣. 抗草甘膦转基因玉米研究进展. 中国农业科技导报,2013,15(3): 36-41
- [22] 余桂容,曹颖,杜文平,宋军,陈谦,徐利远. 抗虫耐草甘膦双价基因表达载体的构建及玉米转化. 西南农业学报,2015,28(2):

475-479

- [23] 刘苗苗,程家慧,林海燕,沈志成,王志勇,林朝阳. 抗草甘膦转基因玉米 AG16 分子特征和抗性鉴定. 草业科学,2017,34(9): 1830-1837
- [24] 韦正乙,张玉英,王云鹏,邢少辰. 基因工程在玉米抗旱育种中的应用. 玉米科学,2014,22(4): 1-7
- [25] 郑成忠,王丕武,吴楠,张卓,赵翠兰. 转 *BADH* 基因玉米自交系的抗旱耐盐性分析. 吉林农业大学学报,2016,38(3): 266-273
- [26] 冷益丰,张彪,赵久然,杨俊品,刘亚,康继伟,陈洁,唐海涛,谭君,何文铸. 转基因玉米种子萌发期抗旱性鉴定. 干旱地区农业研究,2013,31(1): 177-182
- [27] 邹俊杰,徐妙云,张兰,罗彦忠,刘源,郑红艳,王磊. 转基因抗虫、耐除草剂及品质改良复合性状玉米 *BBHTL8-1* 的分子特征及功能评价. 中国农业科技导报,2022,24(2): 77-85
- [28] 阳丽,操志林. 转基因玉米种子的 PCR 检测. 江西农业学报,2014,26(4): 98-99
- [29] 尹全,李忆,宋君,侯雪,王东,张富丽,刘文娟,常丽娟,雷绍荣,刘勇. 多重 PCR 筛查检测进口转基因玉米. 核农学报,2016,30(6): 1045-1053
- [30] 袁磊,孙红伟,李凡,李宁,赵蕾,路兴波. 以实时荧光定量 PCR 技术检测转基因玉米 MON88017. 作物学报,2011,37(1): 2117-2121

(收稿日期: 2022-05-27)