

基因编辑大豆 AE15-18-1 种子真实性 快速识别方法的研发

李允静¹ 任雪贞² 肖芳¹ 王培² 高鸿飞¹ 晋芳²
翟杉杉¹ 景琦² 吴刚¹ 金石桥²

(¹中国农业科学院油料作物研究所 / 农业农村部油料作物生物学与遗传育种重点实验室 / 农业农村部植物生态环境安全检验检测中心(武汉) / 农业农村部农业转基因生物溯源重点实验室,湖北武汉 430062;²全国农业技术推广服务中心,北京 100125)

摘要:通过基因编辑快速培育品质改良大豆已成为大豆育种的目标之一,研究人员采用 CRISPR/Cas 系统定点编辑大豆 *GmFAD2-1A* 基因和 *GmFAD2-1B* 基因后,获得高油酸大豆材料 AE15-18-1。为准确筛选和确认高油酸大豆 AE15-18-1 的真实性,采用竞争性等位基因特异性 PCR 技术(KASP, Kompetitive Allele Specific PCR),分别针对 *GmFAD2-1A* 基因和 *GmFAD2-1B* 基因设计引物,开发了快速检测基因编辑大豆 AE15-18-1 种子的方法。该方法特异性强、检测样本量灵敏度达 0.25ng,能够准确快速识别 *GmFAD2-1A* 基因和 *GmFAD2-1B* 基因是否为编辑型,且能够准确区分编辑位点是纯合型还是杂合型,进而判断是否为基因编辑大豆 AE15-18-1 种子。该方法检测时间可缩短到 45min,检测成本低,检测效率高,适用于基因编辑大豆单粒种子真实性快速识别和纯度检测,在大豆育种和种子质量控制过程中具有良好的应用前景。

关键词:KASP 技术;基因编辑;大豆;真实性;纯度;快速识别

Development of Rapid Identification Method for Genuineness of Gene-edited Soybean AE15-18-1 Seeds

LI Yunjing¹, REN Xuezheng², XIAO Fang¹, WANG Pei², GAO Hongfei¹,
JIN Fang², ZHAI Shanshan¹, JING Qi², WU Gang¹, JIN Shiqiao²

(¹Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences/ Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Oil Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/ Inspection and Testing Center (Wuhan) for Plant Ecological Environment Safety, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/ Key Laboratory of Agricultural Genetically Modified Organisms Traceability, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wuhan 430062;²National Agro-Tech Extension and Service Center, Beijing 100125)

近年来,基因编辑技术作为革命性的育种工具,为作物遗传改良开辟了新途径^[1-4]。CRISPR-Cas 系统已经成功应用于创制多种重要农艺性状改良的新种质,如抗白粉病小麦^[5]、耐除草剂油菜^[6]、抗根腐病大豆^[7]、高油酸大豆^[8]、高蛋白大豆^[9]、超

甜糯玉米^[10]等,为保障全球粮食安全和农业可持续发展提供了新的解决方案。该技术主要是通过设计特定的 CRISPR-Cas 系统,构建包含目标序列的载体,经农杆菌介导的遗传转化导入目标作物,编辑工具在细胞内诱导 DNA 双链断裂,通过植物细胞自身的修复机制(如非同源末端连接或同源重组)产生目标序列突变^[11]。然而,该技术在使用过程中可能产生靶基因功能缺失和脱靶效应,从而对作物的基因组稳定性和功能产生潜在影响^[12]。因此,精准

基金项目:科技创新 2030——农业生物育种重大项目(2022ZD04019);
中国农业科学院科技创新工程(CAAS-ASYIP-2021-OCRI)

通信作者:吴刚,金石桥

高效的检测技术成为基因编辑作物安全评价与监管的关键环节。目前,基因编辑产品鉴定方法主要有全基因组测序法、PCR-测序法、PCR-电泳法^[13-14]、PCR-酶切-电泳法^[15]、可编程酶检测法(如 Cas9、Cas12)^[16-17]、Taqman 探针实时荧光 PCR 法^[18-19]、数字 PCR 法^[20]等。其中测序法依赖于第三方测序公司,耗时长;基于 PCR 方法的检测步骤繁琐且耗时;可编程酶检测法步骤繁琐且多处于研究阶段,稳定性较差;数字 PCR 法相对实时荧光 PCR 法检测成本较高;Taqman 探针实时荧光 PCR 法难以应对 1~2 个碱基变异的特异性检测需求。

竞争性等位基因特异性 PCR(KASP, Kompetitive Allele Specific PCR)是一种基于荧光检测的基因分型技术,其反应体系包含由两条带有不同荧光标签且靶向 SNP 位点的特异性正向引物和一条通用反向引物组成的 Primer mix,以及含有两种荧光信号的通用检测探针的 Master mix,经过 3 次 PCR 扩增对靶标位点进行检测。在 PCR 扩增过程中,荧光探针与淬灭探针退火,荧光探针作为通用引物嵌入到 PCR 产物中,发出荧光;通过荧光信号检测仪或荧光 PCR 仪读取 PCR 产物的荧光信号;如果检测样品个体的基因型是纯合的,将只产生单色荧光信号,如果样品个体的基因型是杂合的,则产生混合荧光信号^[21]。该技术可精准检测基因组 DNA 中的 SNP、InDel 突变以及长片段的插入/缺失等,具有高通量、低成本和操作友好的特点^[22]。近年来,KASP 技术逐渐应用于分子标记辅助育种、基因精细定位、种质资源鉴定^[23-25]、农作物种子品种纯度鉴定^[26],并在水稻(NY/T 2745—2021《水稻品种真实性鉴定 SNP 标记法》)、玉米(NY/T 4022—2021《玉米品种真实性鉴定 SNP 标记法》)、小麦(NY/T 4021—2021《小麦品种真实性鉴定 SNP 标记法》)品种真实性鉴定中建立了标准化检测体系,但在基因编辑作物检测中的应用案例较少。

山东舜丰生物科技有限公司通过 CRISPER-CAS12i 系统同时对 *GmFAD2-1A* 基因和 *GmFAD2-1B* 基因进行编辑,获得了品质改良高油酸大豆 AE15-18-1^[27],该大豆是 2023 年获得我国首个生产应用安全证书的基因编辑作物,具有良好的产业化前景。因此,针对该品种在种子质量检测和安全监

管中的实际需求,亟需开发一种高效、稳定且费用低廉的区分基因编辑大豆 AE15-18-1 纯合型和杂合型以及未编辑大豆种子的识别方法。本研究拟利用 KASP 技术设计特异性引物,实现对 *GmFAD2-1A* 和 *GmFAD2-1B* 基因编辑位点的高效识别,并能够区分纯合型和杂合型编辑事件,最终建立一种快速、准确识别基因编辑大豆 AE15-18-1 种子真实性和纯度的方法,推动基因编辑作物产业化应用进程。

1 材料与方 法

1.1 试验材料 基因编辑大豆 AE15-18-1 种子样品由全国农业技术推广服务中心提供,未编辑大豆(Williams 82、天隆 1 号、天隆 2 号、中豆 48、中豆 70、中豆 72、中豆 86)以及转基因大豆转化体含量为 1% 的混合样品(GTS40-3-2、MON89788、A5547-127、A2704-12、356043、305423、CV127、MON87701、MON87708、MON87769、MON87705、FG72、DAS81419-2)由中国农业科学院油料作物研究所搜集保存。本试验于 2024-2025 年度在中国农业科学院油料作物研究所和全国农业技术推广服务中心完成。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取及纯化 采用植物基因组 DNA 提取试剂盒(天根,DP305)进行种子粉末中 DNA 提取及纯化,详细操作步骤见说明书。采用紫外分光光度计 NanoDrop OneC(美国,Thermo Fisher)测定 DNA 浓度并评价其质量后,将 50ng/ μ L 的 DNA 模板储存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

1.2.2 KASP 检测体系 采用在线多重序列比对软件(<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>),将 *GmFAD2-1A* 和 *GmFAD2-1B* 基因编辑前和编辑后的序列进行比对,设计了基于 KASP 技术的用于检测编辑前和编辑后基因的引物组合信息(表 1)。两个基因编辑前和编辑后扩增序列大小均为 64bp,1A-FAM 和 1B-FAM 引物 5' 端连接核苷酸序列为“gaaggtgaccaagtcatgct”的 FAM 标签,1A-HEX 和 1B-HEX 引物 5' 端连接核苷酸序列为“gaaggtcgaggtcaacggatt”的 HEX 标签。引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,离心后用双蒸水稀释至 10 μ mol/L,-20 $^{\circ}$ C 避光保存备用。

KASP 反应体系:5 μ L 中包含 FLU-ARMS V5F 2 \times PCR MIX(固德,BGH1025RV5F.1) 2.5 μ L、

表1 KASP引物信息

基因	引物名称	引物序列(5'-3')	注释
<i>GmFAD2-1A</i>	1A-FAM	gaaggtgaccaagttcatgctTCCTCATTGCATGGCCAATCTA	编辑前
	1A-HEX	gaaggtcggagtcaacggattCCCTCATTGCATGGCCAATCTT	编辑后
	1A-COM	ATCACCCACACACCAGTGAGAAG	
<i>GmFAD2-1B</i>	1B-FAM	gaaggtgaccaagttcatgctTCCTCATTGCATGGCCAATCTA	编辑前
	1B-HEX	gaaggtcggagtcaacggattCCCCTTTTCCTCATTGCATGGCT	编辑后
	1B-COM	ATCACCCACACGCCAGTAAGAAT	

引物混合液 0.5 μ L、DNA 模板 2 μ L;其中特异引物混合液中 FAM 和 HEX 最终浓度均为 0.1 μ mol/L,下游通用引物 COM 最终浓度为 0.3 μ mol/L。KASP 反应程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 5min;95 $^{\circ}$ C 变性 5s,58 $^{\circ}$ C 退火延伸 20s,扩增 45 个循环;30 $^{\circ}$ C,30s 读取荧光信号。

1.2.3 KASP 特异性及灵敏度测试 选取基因编辑大豆 AE15-18-1、未编辑大豆(Williams 82、天隆 1 号、天隆 2 号、中豆 48、中豆 70、中豆 72、中豆 86)以及转基因大豆转化体含量为 1% 的混合样品(GTS40-3-2、MON89788、A5547-127、A2704-12、356043、305423、CV127、MON87701、MON87708、MON87769、MON87705、FG72、DAS81419-2),进行 KASP 方法的特异性测试,确认检测方法能否准确识别并区分纯合型基因编辑大豆、杂合型基因编辑大豆和未编辑大豆。

分别将基因编辑大豆 AE15-18-1 的纯合型、杂合型以及未编辑大豆 DNA 模板稀释至 25ng/ μ L、10ng/ μ L、5ng/ μ L、2.5ng/ μ L、1.25ng/ μ L、0.625ng/ μ L、0.3125ng/ μ L、0.125ng/ μ L、0.0625ng/ μ L、0.025ng/ μ L、0.0125ng/ μ L。按照 1.2.2 方法配置 PCR 反应体系,进行 4 个平行 PCR 扩增,测试该方法的灵敏度,最终确定能够准确识别纯合型基因编辑大豆、杂合型基因编辑大豆和未编辑大豆的最低模板量。

1.2.4 KASP 方法检测 AE15-18-1 种子纯度 随机抽取 92 粒基因编辑大豆 AE15-18-1 种子,单粒研磨后制备 DNA 模板,按照 1.2.2 方法配置 KASP 反应体系后进行扩增,开展基因编辑大豆单粒种子纯度快速识别检测。试验进行 2 个平行 PCR 扩增,设置基因编辑大豆 AE15-18-1 纯合型、杂合型、未编辑大豆、对照样品和空白对照。

扩增结束后,检测到正常单色荧光或者混合荧光的种子,判定为有效检测单粒,否则判定为无效

检测单粒。*GmFAD2-1A* 基因和 *GmFAD2-1B* 基因检测结果均为纯合编辑型的,判定为基因编辑大豆 AE15-18-1;两个基因检测结果均为杂合编辑型或者一个为纯合编辑型一个为杂合编辑型的,也判定为基因编辑大豆 AE15-18-1;两个基因检测结果均为未编辑型的,判定为未编辑大豆。基因编辑大豆种子转化体纯度(%) = 基因编辑大豆 AE15-18-1 种子粒数 / 有效检测种子粒数 \times 100,采用 Excel 软件进行统计分析。

1.2.5 PCR-酶切-电泳法检测 AE15-18-1 种子纯度 利用 92 粒基因编辑大豆 AE15-18-1 单粒种子 DNA 模板进行 PCR-酶切-电泳法检测,PCR 引物信息见表 2。由于基因编辑的发生,*GmFAD2-1A* 基因和 *GmFAD2-1B* 基因的 BStXI 酶切位点发生改变,不会产生酶切,*GmFAD2-1A* 基因和 *GmFAD2-1B* 基因 PCR 扩增片段酶切前后片段大小不改变,分别为 454bp 和 783bp;未编辑的阴性大豆可被 BStXI 酶切开,*GmFAD2-1A* 基因 PCR 扩增片段酶切前为 453bp,酶切后为 304bp 和 149bp,*GmFAD2-1B* 基因 PCR 扩增片段酶切前为 790bp,酶切后为 659bp 和 131bp。

PCR 反应体系:20 μ L 体系包括 2 \times PCR MIX (VazymeP222) 10 μ L、上下游引物(10 μ mol/L)各 0.25 μ L、DNA 模板 2 μ L、ddH₂O 7.5 μ L。反应程序:95 $^{\circ}$ C、3min 预变性;95 $^{\circ}$ C、30s 变性,58 $^{\circ}$ C、30s 退火,72 $^{\circ}$ C、30s 延伸,35 个循环;72 $^{\circ}$ C、5min 延伸;4 $^{\circ}$ C 保存。

酶切反应:15 μ L 体系包括 BStXI (NEB R0113S) 0.5 μ L、PCR 产物原液 2 μ L、10 \times Buffer 1.5 μ L、ddH₂O 11 μ L。37 $^{\circ}$ C 酶切反应时间 3h。

2 结果与分析

2.1 序列比对与引物设计 经 NCBI 数据库

表2 PCR引物信息

检测基因	引物名称	引物序列(5'-3')	编辑前扩增片段(bp)	编辑后扩增片段(bp)
<i>GmFAD2-1A</i>	SP53-3	GCAATTCACCACACTGCTT	453	454
	SP54-2	CCACCCTATTGTGAGTGTGAC		
<i>GmFAD2-1B</i>	GmFAD2-1b-F	GCCTGCACCCCAGGATATTT	790	783
	GmFAD2-1b-R	GGACTAAAAGTGCTGAGTGAACGG		

BLAST 比对分析,结果发现大豆 *GmFAD2-1A* 和 *GmFAD2-1B* 基因的一致性达 94.92%, 同源性极高;此外,编辑后的 *GmFAD2-1A* 基因与未编辑的 *GmFAD2-1A* 基因相比插入了一个 T 碱基,编辑后的 *GmFAD2-1B* 基因与未编辑的 *GmFAD2-1B* 基因相比缺失了 7 个碱基“CAATCAT”(图 1)。

针对 *GmFAD2-1A* 基因 T 单碱基插入,在 3' 端 SNP 设计上游引物,未编辑型引物 3' 末端为碱基 A,编辑型 3' 末端为碱基 T,下游通用引物在 *GmFAD2-1A* 基因和 *GmFAD2-1B* 基因的 SNP 区域设计,且 3' 末端为 SNP 位点,从而能够保证特异性地扩增 *GmFAD2-1A* 基因。针对 *GmFAD2-1B* 基因缺失了 7 个碱基的情况,设计未编辑型引物 3' 末端上游引物包含缺失的 7 个碱基,编辑型 3' 末端不含有 7 个缺失碱基,下游通用引物同样设计在 *GmFAD2-1A* 基因和 *GmFAD2-1B* 基因的 SNP 区域,且 3' 末端为 SNP 位点,从而能够保证特异性地扩增 *GmFAD2-1B* 基因。编辑前和编辑后的引物

序列分别添加 FAM 标签和 HEX 标签,经 KASP 检测,未编辑大豆样品检测到 FAM 荧光信号,纯合型基因编辑大豆 AE15-18-1 样品检测到 HEX 荧光信号,杂合型基因编辑大豆 AE15-18-1 样品检测到混合荧光信号。

针对基因编辑大豆 AE15-18-1 的纯合型和杂合型以及未编辑大豆进行 KASP 扩增,对引物组进行初步测试,发现 3 种类型大豆检测结果与预期一致(图 2),表明两种基因的 KASP 引物能够准确进行不同基因型的识别和区分,具有有效性。

2.2 特异性及灵敏度测试 经特异性测试,发现 1A-FAM/1A-HEX/1A-COM 引物组合能够准确识别基因编辑大豆 AE15-18-1 中 *GmFAD2-1A* 基因编辑纯合型、杂合型以及多个未编辑大豆样品和转基因大豆转化体混合样品,检测结果与预期一致,表明该引物组合的特异性良好;1B-FAM/1B-HEX/1B-COM 引物组合能够准确识别基因编辑大豆 AE15-18-1 中 *GmFAD2-1B* 基因编辑纯合型、杂

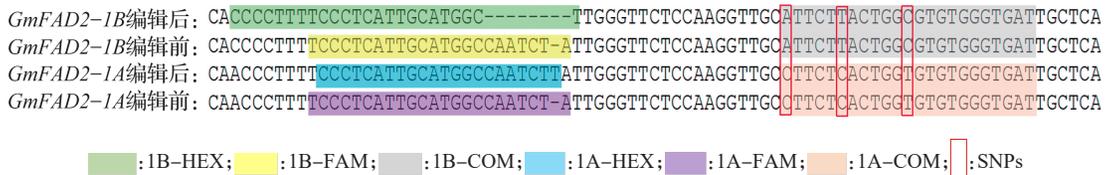
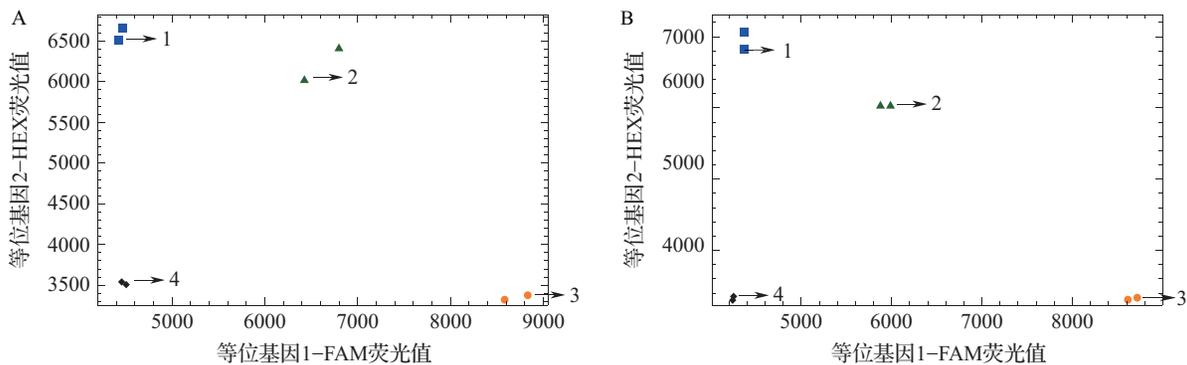


图1 序列比对结果



A: *GmFAD2-1A* 基因特异性检测结果; B: *GmFAD2-1B* 基因特异性检测结果; 1: 纯合型基因编辑大豆 AE15-18-1; 2: 杂合型基因编辑大豆 AE15-18-1; 3: 未编辑大豆 Williams 82; 4: 空白对照 ddH₂O

图2 AE15-18-1 大豆不同基因型检测

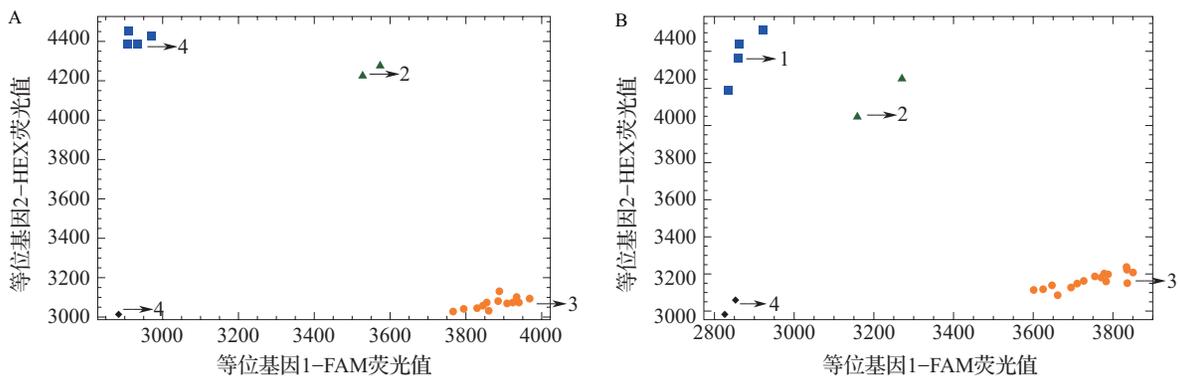
合型以及多个未编辑大豆样品和转基因大豆转化体混合样品,检测结果与预期一致,表明该引物组合的特异性良好(图3)。

经灵敏度测试,发现1A-FAM/1A-HEX/1A-COM引物组合能够准确稳定检测0.25~50ng模板量的基因编辑大豆AE15-18-1纯合型、杂合型以及未编辑大豆中的*GmFAD2-1A*基因,0.125ng及以下DNA模板量不能稳定识别3种类型大豆。1B-FAM/1B-HEX/1B-COM引物组合能够准确检测0.125~50ng模板量的基因编辑大豆AE15-18-1纯合型、杂合型以及未编辑大豆中的*GmFAD2-1B*基因,0.05ng及以下DNA模板量不能稳定识别3种类型大豆。以上结果表明,两种KASP引物组合检测方法的灵敏度最低可达到0.25ng的模板量。

2.3 KASP技术对基因编辑大豆AE15-18-1种子纯度的检测 针对随机选取的92粒AE15-18-1大

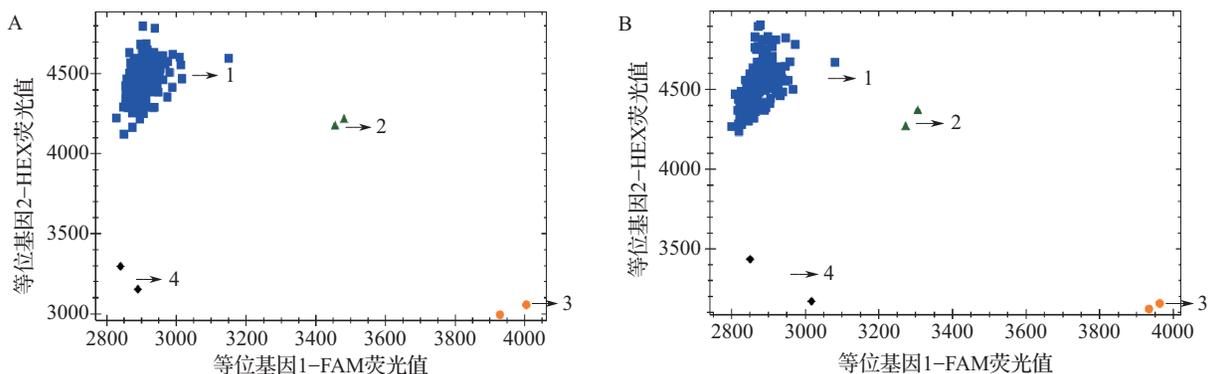
豆种子,采用建立的KASP方法,对单粒种子进行真实性检测,发现1A-FAM/1A-HEX/1A-COM引物组合检测*GmFAD2-1A*基因在92粒种子中均为基因编辑纯合型,92粒种子中*GmFAD2-1A*基因编辑后的纯度为100%;1B-FAM/1B-HEX/1B-COM引物组合检测*GmFAD2-1B*基因在92粒种子中均为基因编辑纯合型,92粒种子中*GmFAD2-1B*基因编辑后的纯度为100%(图4)。结果表明,本研究建立的基于KASP技术快速识别基因编辑大豆AE15-18-1单粒种子真实性的方法,能够应用于基因编辑大豆AE15-18-1种子纯度快速鉴定。

2.4 PCR-酶切-电泳法对基因编辑大豆AE15-18-1种子纯度的检测 为了进一步验证研发的KASP技术检测基因编辑大豆AE15-18-1纯度的准确性,采用PCR-酶切-电泳法对92粒种子纯度结果进行检测。结果发现,基因编辑大豆AE15-18-1中*GmFAD2-1A*基因扩增后,PCR产物在



A: *GmFAD2-1A* 基因特异性检测结果; B: *GmFAD2-1B* 基因特异性检测结果; 1: 纯合型基因编辑大豆 AE15-18-1 及阳性对照; 2: 杂合型基因编辑大豆 AE15-18-1; 3: 未编辑大豆 (Williams 82、天隆 1 号、天隆 2 号、中豆 48、中豆 70、中豆 72、中豆 86、转基因大豆 1% 转化体混合样品); 4: 空白对照 ddH₂O

图 3 AE15-18-1 大豆基因特异性测试

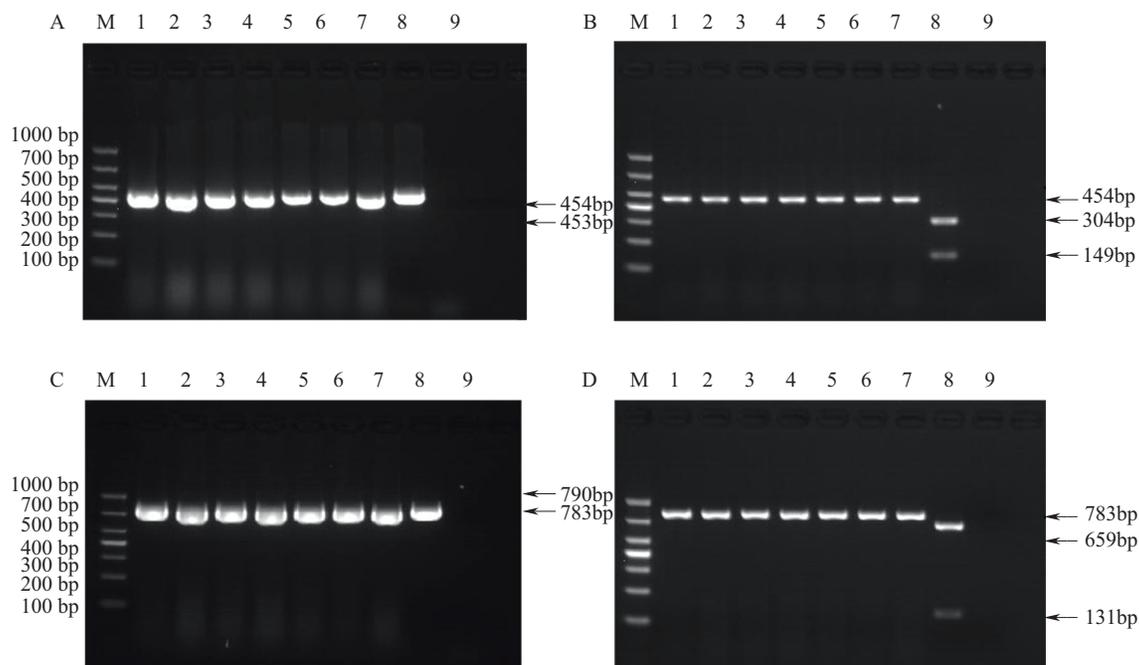


A: *GmFAD2-1A* 基因纯度检测结果; B: *GmFAD2-1B* 基因纯度检测结果; 1: 92 粒大豆样品及纯合型基因编辑大豆 AE15-18-1; 2: 杂合型基因编辑大豆 AE15-18-1; 3: 未编辑大豆 Williams 82; 4: 空白对照 ddH₂O

图 4 AE15-18-1 大豆 KASP 技术种子纯度检测结果

BStXI 酶切前和酶切后片段大小均为 454bp, 未发生酶切, 未编辑大豆样品 453bp 的 PCR 产物经酶切后获得 304bp 和 149bp 大小的片段(图 5A、B)。基因编辑大豆 AE15-18-1 中 *GmFAD2-1B* 基因扩增后, PCR 产物在 BStXI 酶切前和酶切后片段大小均为 783bp, 未发生酶切, 试验仅展示了 7 粒基因编辑

大豆 AE15-18-1 种子检测的结果, 未编辑大豆样品 790bp 的 PCR 产物经酶切后获得 659bp 和 131bp 大小的片段(图 5C、D)。以上结果表明, 92 粒种子均为纯合型基因编辑大豆 AE15-18-1, 且种子纯度达 100%, 与 KASP 方法检测结果完全一致, 验证了本研究开发的 KASP 检测方法具有准确性和可靠性。



A、B: *GmFAD2-1A* 基因检测结果; C、D: *GmFAD2-1B* 基因检测结果; M: Takara DL1000;
1~7: AE15-18-1 大豆; 8: 未编辑大豆 Williams 82; 9: 空白对照 ddH₂O

图 5 AE15-18-1 大豆 PCR-酶切-电泳法种子纯度验证部分结果

3 讨论

截止到 2024 年底, 我国已经有 5 个基因编辑大豆品种相继获得了农业用基因编辑生物安全证书, 包括 AE15-18-1、25T93-1、P16、QH64112、E001SYFT。目前报道的 KASP 技术在基因编辑作物检测上的应用仍较少, 与 TaqMan 探针法相比, KASP 不需要针对特定位点设计特异性探针, 而是采用与基因特异引物配合使用的通用探针, 大幅降低了试剂成本。然而, KASP 技术也存在一定的局限性, 在设计引物时要求上游引物的 3' 末端含变异碱基, 下游为通用引物, 限定了引物的位点, 若变异位点附近的碱基序列不适合设计引物, 则难以建立符合要求的 KASP 检测方法。

本研究对大豆 *GmFAD2-1A* 和 *GmFAD2-1B* 基因编辑前后序列比对, 发现同源性极高, 一致性达到了 94.92%。根据 KASP 技术原理, 针对 *GmFAD2-1A* 基因产生的 SNP 和 *GmFAD2-1B* 基因产生的

InDel 突变序列, 分别设计了特异性 KASP 引物。测试后发现, 本研究建立的快速识别基因编辑大豆 AE15-18-1 的检测方法能够特异地识别编辑前和编辑后的 *GmFAD2-1A* 和 *GmFAD2-1B* 基因特异性位点, 且能准确区分种子单粒(单株)样品的基因型, 进一步确认种子真实性, 判定是否为标称基因编辑大豆事件。本方法的灵敏度达到了 0.25ng 的模板量, 对比李峰等^[28]发明专利中的灵敏度检测效果, 本研究采用的样品实施方案和灵敏度检测效果显著提高。本研究在 KASP 技术快速检测中采用了一款兼容性高、超快速检测 SNP 的试剂(FLU-ARMS V5F 2 × PCR MIX), PCR 扩增程序由梯度扩增简化至两步扩增, 检测时间由 90min 缩短到了 45min 左右, 极大地提高了检测效率, 建议可作为国外 Laboratory of the Government Chemist (LGC) 公司售卖的 KASP 检测试剂的替代品, 节约试验成本。与 PCR-酶切-电泳法(时长 6.5h)相比, KASP 技

术检测时间缩短了6倍,成本缩减了近5倍,在保证检测效果的基础上显著提高了检测效率。另外,与水稻、玉米、小麦等常规农作物品种真实性鉴定相比,本研究建立的基因编辑大豆AE15-18-1真实性识别方法不需要采用一套多态性位点引物组检测,只需要针对两个特异性编辑位点进行测试,工作程序更简便快捷。

纯度是种子质量的重要指标之一^[29],依照GB 4404.2—2010《粮食作物种子 第2部分:豆类》,大豆大田用种纯度需不低于98.0%。随着生物育种产业化不断推进,对转基因和基因编辑农作物种子纯度质量检测提出了新要求,如精准快速、高通量、低成本等。农作物品种纯度鉴定是随机抽取一定数量种子进行单粒或单株检测,根据检测结果计算纯度。KASP检测技术适用于高通量单粒/单株检测,本研究建立的基于KASP技术快速检测方法与PCR-酶切-电泳法的检测结果完全一致,能够应用于种子纯度精准快速鉴定,可为基因编辑大豆AE15-18-1种子质量安全检测和监管提供技术参考。

本方法的成功建立及应用对后续一系列基因编辑大豆真实性检测和纯度鉴定研究具有借鉴意义,后续将探索快速提取同KASP技术相结合的基因编辑大豆检测方法,进一步提高检测效率;同时将收集25T93-1、P16、QH64112、E001SYFT等基因编辑大豆分子特征信息,开发统一的特异性位点检测方法,形成一套基因编辑大豆信息库,为基因编辑大豆品种快速筛查与身份确认提供技术支撑。

参考文献

- [1] Gao C X. Genome engineering for crop improvement and future agriculture. *Cell*, 2021, 184 (18): 1621-1633
- [2] Monfort M, Buitink J, Roeber F, Nogué F. Genome editing, an opportunity to revive soybean cultivation in Europe. *The Plant Journal*, 2025, 121: e17266
- [3] Hui F J, Tang X, Li B, Alariqi M, Xu Z P, Meng Q Y, Hu Y X, Wang G Y, Zhang Y, Zhang X L, Jin S X. Robust CRISPR/Mb2Cas12a genome editing tools in cotton plants. *iMeta*, 2024, 3: e209
- [4] Lv P, Su F, Chen F Y, Yan C X, Xia D D, Sun H, Li S S, Duan Z Q, MA C L, Zhang H, Wang M G, Niu X M, Zhu J K, Zhang J S. Genome editing in rice using CRISPR/Cas12i3. *Plant Biotechnology Journal*, 2024, 22: 379-385
- [5] Wang Y P, Cheng X, Shan Q W, Zhang Y, Liu J X, Gao C X, Qiu J L. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature Biotechnology*, 2014, 32 (9): 947-951
- [6] Cheng H T, Hao M Y, Ding B L, Mei D S, Wang W X, Wang H, Zhou R J, Liu J, Li C, Hu Q. Base editing with high efficiency in allotetraploid oilseed rape by A3A-PBE system. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19: 87-97
- [7] Liu T F, Ji J, Cheng Y Y, Zhang S C, Wang Z R, Duan K X, Wang Y C. CRISPR/Cas9-mediated editing of *GmTAP1* confers enhanced resistance to *Phytophthora sojae* in soybean. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2023, 65 (7): 1609-1612
- [8] Do P T, Nguyen C X, Bui H T, Tran L T N, Stacey G, Gillman J D, Zhang Z J, Stacey M G. Demonstration of highly efficient dual gRNA CRISPR/Cas9 editing of the homeologous *GmFAD2-1A* and *GmFAD2-1B* genes to yield a high oleic, low linoleic and α -linolenic acid phenotype in soybean. *BMC Plant Biology*, 2019, 19: 311
- [9] Wang L, O'Conner S, Tanvir R, Zheng W G, Cothron S, Towery K, Bi H H, Ellison E E, Yang B, Voytas D F, Li L. CRISPR/Cas9-based editing of *NF-YC4* promoters yields high-protein rice and soybean. *New Phytologist*, 2025, 245: 2103-2116
- [10] Dong L, Qi X T, Zhu J J, Liu C L, Zhang X, Cheng B, Mao L, Xie C X. Supersweet and waxy: meeting the diverse demands for specialty maize by genome editing. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17 (10): 1853-1855
- [11] 偶春, 张敏, 丁霖, 姚侠妹, 王泽璐, 彭城, 徐俊锋. CRISPR/Cas9 基因编辑技术在植物中的应用与政策监管. *浙江农业学报*, 2022, 34 (8): 1806-1814
- [12] 王慧媛, 刘晓, 薛淮, 赵剑峰, 熊燕. 完善安全管理, 促进基因编辑作物的科技与产业发展. *植物生理学报*, 2020, 56 (11): 2317-2328
- [13] Hayashi K, Hashimoto N, Daigen M, Ashikawa I. Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the *Piz* locus. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108 (7): 1212-1220
- [14] Broccanello C, Chiodi C, Funk A, McGrath J M, Panella L, Stevanato P. Comparison of three PCR-based assays for SNP genotyping in plants. *Plant Methods*, 2018, 14: 28
- [15] Konieczny A, Ausubel F M. A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *The Plant Journal*, 1993, 4 (2): 403-410
- [16] Zhou W H, Hu L, Ying L M, Zhao Z, Chu P K, Yu X F. A CRISPR-Cas9-triggered strand displacement amplification method for ultrasensitive DNA detection. *Nature Communications*, 2018, 9: 5012
- [17] Wang M Y, Liu X J, Yang J T, Wang Z X, Wang H Q, Wang X J. CRISPR/Cas12a-based biosensing platform for the on-site detection of single-base mutants in gene-edited rice. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 944295
- [18] Zhang H W, Li J, Zhao S B, Yan X H, Si N W, Gao H F, Li Y J, Zhai

- S S, Xiao F, Wu G, Wu Y H. An editing-site-specific PCR method for detection and quantification of CAO1-edited rice. *Foods*, 2021, 10 (6): 1209-1213
- [19] Peng C, Wang H, Xu X L, Wang X F, Chen X Y, Wei W, Lai Y M, Liu G Q, Godwin L D, Li J Q, Zhang L, Xu J F. High-throughput detection and screening of plants modified by gene editing using quantitative real-time polymerase chain reaction. *The Plant Journal*, 2018, 95 (3): 557-567
- [20] Peng C, Zheng M, Ding L, Chen X Y, Wang X F, Feng X P, Wang J M, Xu J F. Accurate detection and evaluation of the gene-editing frequency in plants using droplet digital PCR. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11 : 610790
- [21] 赵越, 孙宇峰, 徐磊, 王盼, 边境, 王晓楠. KASP 标记技术在作物基因定位中的应用进展. *北方园艺*, 2023 (19): 122-127
- [22] Semagn K, Babu R, Hearne S, Olsen M. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): Overview of the technology and its application in crop improvement. *Molecular Breeding*, 2014, 33 : 1-14
- [23] Sathishkumar R, Mohanrao M D, Geethanjali S, Prasad M S L, Senthilvel S. A simple and cost-effective SNP genotyping assay for marker-assisted selection of wilt resistance in castor breeding. *Industrial Crops and Products*, 2025, 226 : 120693
- [24] 杨青青, 唐家琪, 张昌泉, 高继平, 刘巧泉. KASP 标记技术在主要农作物中的应用及展望. *生物技术通报*, 2022, 38 (4): 58-71
- [25] 武玉花, 翟杉杉, 普豪祯, 高鸿飞, 张华, 李俊, 李允静, 肖芳, 吴刚, 徐利群. 农业用植物基因编辑产品检测方法研究进展. *中国农业科学*, 2024, 57 (17): 3318-3334
- [26] 汪文祥, 刘佳, 王会, 邵海波, 龚建明, 陆进科, 梅德圣. 基于 KASP 标记快速鉴定油菜杂交种纯度的方法. *分子植物育种*. <https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20241205.1039.012>
- [27] 谢洪涛, 段志强. 利用 Cas12i 在大豆中进行基因编辑的方法: 中国, 202210787127. 7. 2023-06-06
- [28] 李峰, 高晓凯, 刘帅, 苗伟, 谢秀菊. 基于 KASP 技术检测基因编辑大豆的引物和方法: 中国, 202410816417. 9. 2024-09-27
- [29] 王春平, 张万松, 陈翠云, 张新友, 赵虹, 郭天财, 霍晓妮, 汤其林, 尹海庆. 中国种子生产程序的革新及种子质量标准新体系的构建. *中国农业科学*, 2005, 38 (1): 163-170

(收稿日期: 2025-09-18)

(上接第 109 页)

希森 6 号最低, 毕薯 8 号最高; 平均商品化率在 48.61%~91.82% 之间, 米拉(CK)最低, 沃土 5 号最高。

3 讨论

毕节市由于其特定的自然资源优势, 马铃薯种植面积逐年扩大, 但由于受到单位面积上群体和肥料施用不合理等诸多因素影响, 导致单产不高^[3]。马铃薯是一种高产作物, 磷、钾肥料是生长过程中不可缺少的元素, 使用不当会造成作物后期营养失衡, 水分、气温和土壤类型等因素也会对肥效产生影响, 使用低氮、高钾、高磷硫酸钾型复合肥和腐熟的圈肥作为底肥配合施用, 可确保马铃薯健康生长, 进而提高经济效益。

随着海拔高度升高, 气温逐渐下降, 降水概率增加但蒸发量降低, 土壤形成特殊的水分平衡, 低温环境导致生育期延长, 但病虫害的发生概率也相对较低, 且昼夜温差大有利于马铃薯块茎的养分积累, 从而提高产量。马铃薯种植时要根据不同区域的气候和土壤条件, 合理进行种植区划和品种布局。不同品种的要求略有不同, 需要结合当地气候、土壤、

水资源等条件进行选择, 不同品种在不同海拔高度播种期相同时, 品种间的出苗期、现蕾期、开花期、成熟期均有所差别, 同一品种在不同海拔高度种植, 其生育期有随海拔高度上升呈逐渐延长的趋势。因此, 在赫章县高海拔区域应选用生育期较长、耐寒性强的中晚熟品种, 如毕薯 8 号、青薯 9 号、陇薯 7 号、沃土 5 号等品种(系), 生育期适中, 抗病性强、经济效益好, 可在赫章县域内进一步示范推广; 中低海拔应选用生育期短的中早熟品种, 如米拉(CK)、威芋 5 号、希森 6 号等, 产量不高, 抗病性中等, 但市场商品性好, 可在赫章县中低海拔区域适当推广种植。

参考文献

- [1] 彭慧, 熊梅, 冯明义, 聂敏, 赵立屿, 王友琼. 7 个马铃薯品种在赫章县的产量表现及对晚疫病的抗性. *农技服务*, 2021 (1): 72-73, 76
- [2] 王珍珍, 崔长磊, 孙莎莎, 孔海明, 李学洋, 胡柏耿. 马铃薯希森 6 号产量与栽培密度、肥料施用量的关系研究. *中国种业*, 2025 (1): 94-102, 110
- [3] 龙卫金, 聂绍科, 龙国, 张绍荣. 马铃薯新品种毕薯 4 号高产栽培技术研究. *现代农业科技*, 2017 (13): 71-72, 75

(收稿日期: 2025-09-18)