

粳稻转基因技术体系的研究与应用进展

张喜娟, 来永才, 孟英, 唐傲, 董文军, 冷春旭, 刘猷红

(黑龙江省农业科学院 耕作栽培研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:水稻是我国 60% 以上人口的主食, 在保障国家口粮安全中起着举足轻重的作用。近年来, 随着人们生活水平的提高、城镇化进程的加快和消费习惯的改变, 我国粳稻消费需求快速增长。但是, 受耕地减少、生物与非生物因素胁迫日益严重的影响, 粳稻增产的难度越来越大。基因工程技术的发展和应用于打破这一僵局提供了可能。回顾了粳稻转基因技术的发展, 对粳稻转基因体系建立、体系优化、育种应用和安全转基因技术研发等方面进行了综述, 并对目前粳稻转基因技术存在的问题和未来的发展进行了分析和展望。

关键词: 粳稻; 转基因; 转化体系

中图分类号: S511 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2017)04-0136-04 **DOI:** 10.11942/j.issn1002-2767.2017.04.0136

我国作为世界第一人口大国, 保障粮食供给的任务始终十分艰巨。而且, 我国 60% 以上的人口以稻米为主食。因此, 水稻在保障口粮安全中起着举足轻重的作用^[1]。近年来, 随着人们生活水平提高, 我国优质粳米消费需求出现了快速增长的趋势^[2]。而且, 随着城镇化和消费习惯的改变, 今后我国对优质粳米的需求量将进一步增加。但是, 随着人口增加、耕地减少、生物与非生物因素胁迫日益严重, 再继续单纯靠扩大面积来实现粳稻增产的空间十分有限, 只能通过提高单产来持续增产, 粳稻生产必将面临巨大挑战^[1-3]。由于传统的粳稻品种间杂交育种方式对粳稻产量和品质的提升作用日趋有限, 而且有限的种质资源进一步限制了粳稻传统育种工作。然而基因工程技术的发展和打碎了物种间的界限, 增加了粳稻外源基因导入的途径和范围, 为打破这一僵局提供了可能^[4-5], 对粳稻育种有着深远且十分重要的意义。

1 粳稻转基因技术体系的研究

1.1 粳稻遗传转化技术体系的初步建立历程

1983 年, 多个科研团队几乎同时利用农杆菌成功获得转基因植物^[6-9]。1987 年, 世界首例转基因番茄在美国进行了田间实验。1994 年美国批准了转基因延熟番茄进入市场^[10]。此后, 转基

因技术迅速发展, 成为近代育种史上发展最快、效率最高的作物改良技术^[4-5, 10]。目前, 已报道的转基因方法主要有电击法、PEG 法、基因枪法、花粉管通道法以及农杆菌介导法^[4, 10]。世界首例水稻转基因报道来自于 3 个不同的研究小组, 1988 年, 他们以原生质体为受体, 利用电激等技术手段成功将外源基因导入水稻并获得转基因植株^[11-13]。1991 年, Christou 等成功利用基因枪转化的方法获得了转基因植株^[14]。1994 年, Hiei 等以粳稻成熟种子诱导的愈伤组织为受体, 采用“双超元”载体和向共培养基中添加乙酰丁香醇等手段, 建立了农杆菌介导的粳稻高效转基因技术体系^[15]。至此, 粳稻遗传转化技术体系初步建立完成。

1.2 我国粳稻转基因技术体系的建立与优化

中国是世界上最早开展水稻转基因技术研究的国家之一, 2009 年 11 月 13 日, 中国首次将转基因水稻生产应用安全证书批准给华中农业大学水稻团队研发的转 *cry1Ab/cry1Ac* 基因抗虫水稻华恢 1 号和 Bt 汕优 63^[16]。标志着我国已经初步建立了世界上为数不多的从基因克隆、功能鉴定、到遗传转化、品种选育、安全性评价的比较完整的水稻转基因研究和产业化体系。我国水稻转基因技术在经历了早期跟踪国际前沿和近期的自主创新两个阶段之后, 在水稻转基因基础研究和应用研究上已经形成了自己独特的优势和特色, 与国际先进水平差距较小, 在转基因抗虫水稻研究方面处于世界领先水平^[10, 17]。

虽然, 已成熟胚作为受体的粳稻转基因技术体系已经初步建立, 但转化效率仍需进一步提高。

收稿日期: 2017-02-05

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项资助项目 (2016ZX08001-001)

第一作者简介: 张喜娟 (1981-), 女, 黑龙江省哈尔滨市人, 博士, 副研究员, 从事水稻栽培与生理基础研究。E-mail: xijuanzhang@163.com。

为此,我国科研人员重点围绕基因型选择、受体类型、愈伤诱导、共培养方式、再生体系、筛选标记等方面开展体系优化研究^[18]。建立了多个优化后的粳稻转基因体系,其中,陈惠等使水稻愈伤组织转化率和植株转化率提高到 70% 以上^[19]。苏益等建立了在 40 d 内获得了水稻转基因植株的技术体系,该体系的转化效率和再生效率分别达到了 71.3% 和 57%^[20]。此外,中国农科院作物所与未名凯拓公司合作建立了基于成熟胚为受体的规模化粳稻转基因技术体系,开体系已经应用于生产上大面积种植的 35 个粳稻品种,平均分化出苗率达到 40%~60%。转化周期从传统的 150~180 d 缩短到 75~90 d。如果以模式品种 Kitake 为标准计算,每人每年可获得独立转化体 4 000~6 000 株,基本实现了粳稻遗传转化的规模化和工厂化^[18]。

1.3 粳稻安全转基因相关技术的研究

随着转基因技术的发展和普及以及部分转基因作物的商业化,转基因作物或转基因食品的安全问题越来越受到关注。为了提高转基因技术体系的安全性,针对筛选标记的安全问题,我国科学家开展了多项研究工作,提出了两种解决筛选标记安全性的策略。一是建立无选择标记的高效粳稻转基因体系,该体系主要是通多采用农杆菌介导双菌双载体和双 T-DNA 单载体共转化来实现的,目前已取得了较好的转化效果^[18,21-23]。二是建立安全标记基因转化体系,该体系主要是采用甘露糖代替传统的抗生素和除草剂等选择标记,目前已经基本建立了高效、快速、简便的粳稻甘露糖筛选转化体系,转化率可到达 50% 左右^[24]。

2 粳稻重要农艺性状的转基因改良应用

目前,全球转基因水稻研究非常迅速,已有数百例转基因水稻获准田间试验,涉及抗虫、抗病、品质改良等众多农艺性状。我国的转基因水稻研发与世界同步,抗虫转基因水稻处于世界领先^[25]。

2.1 粳稻的抗虫转基因改良应用

虫害是水稻减产的主要因素之一,生产上的主要防治手段是使用化学杀虫剂,但其不仅增加生产成本,还会造成环境污染。培育抗虫品种是一种经济环保的策略。但水稻中严重缺乏有效的抗性种质资源。目前,最有希望和前途的方法就是利用转基因技术把外源抗虫基因引入水稻中创

造抗虫品种。目前粳稻中主要是转入 *Bt* 基因,使用较多的包括 *cry1A* 基因,如 *cry1Ab*^[26], *cry1Ac*^[27] 以及 *cry1Ab/Ac* 融合基因^[28]。这些转 *Bt* 基因水稻大多都表现对二化螟、三化螟和稻纵卷叶螟高度的杀虫活性。中国科学院遗传与发育生物学研究所和福建省农业科学院联合研制了无选择标记高抗鳞翅目害虫转基因水稻品系,并通过回交转育方式培育了众多品系,这些品系表现出明显的增产效果^[17]。

2.2 粳稻的抗病转基因改良应用

在抗病转基因方面,主要是采取转抗性基因、防卫基因以及利用反义 RNA 和 RNAi 进行抗病品种的研制^[29-30]。稻瘟病、白叶枯病和纹枯病是粳稻生产中的主要病害,其中稻瘟病是影响北方粳稻生产的最重要病害。目前除了直接利用已经鉴定的主效抗病基因以外,通过转基因过表达病程相关蛋白(如几丁质酶、 β -1,3-葡聚糖酶等)也可以提高粳稻的稻瘟病抗性。Nishizawa 等通过在粳稻中组成型表达几丁质酶成功提高了粳稻的抗稻瘟病能力^[31]。Nishizawa 等还利用过量表达 β -1,3-葡聚糖酶增强了转基因水稻对稻瘟病的抗性^[32]。除了单独使用一个病程相关蛋白基因外,联合使用多个病程相关蛋白基因的策略也有报道,例如联合使用几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶可以显著提高转基因水稻对稻瘟病的抗性^[33-34]。

2.3 粳稻的转基因营养改良应用

近年来,随着生活水平的提高,人们对稻米品质,尤其是营养品质的要求也越来越高。多数报道是围绕改善稻米蛋白质,特别是人体必需氨基酸如赖氨酸的含量,进而增加其营养价值展开的。通过转其它植物的高赖氨酸蛋白到粳稻中,可以显著提高粳稻的赖氨酸含量。Gao 等通过基因枪法将四棱豆来源的高赖氨酸蛋白基因导入水稻,转基因水稻种子的赖氨酸含量提高了 16.04%^[35]。李科等人^[36]将高赖氨酸蛋白基因 *sb401* 导入粳稻品种,转基因水稻种子中蛋白质、赖氨酸和其它人体必需氨基酸的含量都有所提高。

此外,还有一些研究通过转基因方法提高水稻 β -胡萝卜素和铁、锌等微量元素含量。比较著名的例子是黄金稻米,通过转八氢番茄红素合成酶和八氢番茄红素去饱和酶,在水稻胚乳中建立原本没有的 β -胡萝卜素的合成途径,进而增加水

稻胚乳中的维生素 A 含量^[37]。多个研究团队还尝试转铁、锌贮藏蛋白到粳稻中,都成功提高了水稻胚乳中的铁、锌等微量元素含量^[38-40]。

3 粳稻转基因技术目前存在的问题及展望

在国家“863”计划、“国家转基因植物专项”和“转基因动植物新品种培育”国家重大专项的支持下,经过近 20 年的努力,我国转基因粳稻的研究取得了重大进展。实现了粳稻遗传转化的规模化和工厂化,构建了高效的遗传转化体系。但是,我国目前拥有自主知识产权的基因相对较少,缺乏有重要应用价值的关键,产业化后容易受制于人。因此,要加强我国在农业基础研究方面的投入,重点解决关键基因的挖掘和关键专利技术研发问题。

此外,我国的粳稻转基因体系仍主要出于试验性阶段,多数从事转基因研究的团队集中在科研院所和高校,转基因规模小而分散,与孟山都等大型跨国公司相比,仍存在较大差距。而且现有的转基因技术体系仍需进一步优化完善,克服目前存在的转化周期长、基因型限制明显、操作繁琐、关键转化技术研发力度不够等一系列问题。今后一个阶段,仍然需要加强上述方面的研究力度。

未来一个阶段,要加强转基因核心技术的研发力度,重点开展转基因新技术、新方法的研究。同时,加强安全标记的筛选与技术优化、无选择标记和外源基因删除等安全转基因技术的研发。此外,还应加强转基因的科普宣传,提高人们对转基因技术的科学认识,消除公众的误解、偏见和疑虑。

参考文献:

- [1] 陈温福,徐正进.水稻超高产育种理论与方法[M]. 科学出版社,北京,2007: 3-4.
- [2] 徐正进,陈温福,马殿荣,等. 辽宁水稻食味值及其与品质性状的关系[J]. 作物学报,2005(8): 1092-1094.
- [3] 陈温福,潘文博,徐正进. 我国粳稻生产现状及发展趋势[J]. 沈阳农业大学学报,2006(6): 801-805.
- [4] 陈浩,林拥军,张启发. 转基因水稻研究的回顾与展望[J]. 科学通报,2009,54(18): 2699-2717.
- [5] 朱祯. 转基因水稻研发进展[J]. 中国农业科技导报,2010,12(2): 9-16.
- [6] Bevan M W, Flavell R B, Chilton M D. A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation[J]. Nature, 1983, 304: 184-187.
- [7] Fraley R T, Rogers S G, Horsch R B, et al. Expression of bacterial genes in plant cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1983, 80: 4803-4807.
- [8] Herrera-Estrella L, Depicker A, van Montagu M, et al. Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector [J]. Nature, 1983, 303: 209-213.
- [9] Murai N, Kemp J D, Sutton D W, et al. Phaseolin gene from bean is expressed after transfer to sunflower via tumor-inducing plasmid vectors[J]. Science, 1983, 222: 476-482.
- [10] 储成才. 转基因生物技术育种: 机遇还是挑战[J]. 植物学报, 2013, 48(1): 10-22.
- [11] Toriyama K, Arimoto Y, Uchimiya H, et al. Transgenic rice plants after direct gene transfer into protoplast[J]. Nature Biotechnology, 1988, 6: 1072-1074.
- [12] Zhang H M, Yang H, Rech E L. Transgenic rice plants produced by electroporation-mediated plasmid uptake into protoplasts[J]. Plant Cell Report, 1988, 7: 379-384.
- [13] Zhang W, Wu R. Efficient regeneration of transgenic plants from rice protoplasts and correctly regulated expression of the foreign gene in the plants[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1988, 76: 835-840.
- [14] Christou P, Ford T L, Kofron M. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos[J]. Biotechnology, 1991, 9: 957-962.
- [15] Hiei Y, Ohta S, Komari T, et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA[J]. The Plant Journal, 1994, 6: 271-282.
- [16] 李黎红, 叶卫军, 郭龙彪. 我国转基因水稻研究进展和商业化前景分析[J]. 中国稻米, 2012, 18(6): 1-4.
- [17] 朱祯, 曲庆乐, 张磊. 水稻转基因研究及新品种选育[J]. 生物产业技术, 2010(5): 28-34.
- [18] 张欣, 付亚萍, 周君莉, 等. 水稻规模化转基因技术体系构建与应用[J]. 中国农业科学, 2014(21): 4141-4154.
- [19] 陈惠, 赵原, 种康. 一种改进的水稻成熟胚愈伤组织高效基因转化系统[J]. 植物学通报, 2008(3): 322-331.
- [20] 苏益, 黄善金, 蔺万煌, 等. 根癌农杆菌介导的水稻快速转化方法研究[J]. 中国农学通报, 2008(5): 83-86.
- [21] 于恒秀, 陆美芳, 陈秀花, 等. 不同转化方法培育无抗性选择标记转基因水稻效率的比较[J]. 中国水稻科学, 2009, 23(2): 120-126.
- [22] 陆美芳, 刘巧泉, 于恒秀, 等. 农杆菌介导的水稻双载体共转化法中部分影响因素的研究[J]. 生物技术通报, 2005(5): 55-62.
- [23] 陈扬勋, 张治国, 路铁刚. 无筛选标记转基因作物的研究进展[J]. 生物技术通报, 2012(12): 1-7.
- [24] Duan Y, Zhai C, Li H, et al. An efficient and high-throughput protocol for *Agrobacterium* mediated transformation based on phosphomannose isomerase positive selection in

- japonica rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant Cell Reports, 2012, 31: 1611-1624.
- [25] 朱祯. 高效抗虫转基因水稻的研究与开发[J]. 中国科学院院刊, 2001(16): 353-357.
- [26] 吴家道, 杨剑波, 许传万, 等. 水稻抗白叶枯病基因 *Xa21* 转基因水稻及其杂交稻研究[J]. 作物学报, 2001, 27: 29-34.
- [27] 曾千春, 吴茜, 周开达, 等. 修饰的 *cry1Ac* 基因导入籼稻明恢 81 获得抗虫纯合系[J]. 遗传学报, 2002, 29: 519-524.
- [28] Ramesh S, Nagadhara D, Pasalu I C, et al. Development of stem borer resistant transgenic parental lines involved in the production of hybrid rice[J]. J Biotechnol, 2004, 111: 131-141.
- [29] Kanneganti V, Gupta A K. Overexpression of *OsiSAP8*, a member of stress associated protein (SAP) gene family of rice confers tolerance to salt, drought and cold stress in transgenic tobacco and rice[J]. Plant Mol Biol, 2008, 66: 445-462.
- [30] Xiao B, Chen X, Xiang C, et al. Evaluation of seven function-known candidate genes for their effects on improving drought resistance of transgenic rice under the field conditions[J]. Mol Plant, 2009, 2: 73-83.
- [31] Nishizawa Y, Nishio Z, Nakazono K, et al. Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic japonica rice by constitutive expression of rice chitinase[J]. Theor Appl Genet, 1999, 99: 383-390.
- [32] Nishizawa Y, Saruta M, Nakazono K, et al. Characteriza-
- tion of transgenic rice plants over-expressing the stress-inducible beta-glucanase gene *Gns1* [J]. Plant Mol Biol, 2003, 51: 143-152.
- [33] 冯道荣, 许新萍, 卫剑文, 等. 使用双抗真菌蛋白基因提高水稻抗病性的研究[J]. 植物学报, 1999(41): 1187-1191.
- [34] 许明辉, 唐祥舜, 谭亚玲, 等. 几丁质酶 E 葡聚糖酶双价基因导入模型杂交稻恢复系提高稻瘟病抗性的研究[J]. 遗传学报, 2003(30): 330-334.
- [35] Gao Y F, Jing Y X, Shen S H, et al. Transfer of lysine-rich protein gene into rice and production of fertile transgenic plants[J]. Acta Bot Sin, 2001, 43: 506-511.
- [36] 李科, 王世全, 吴发强, 等. 农杆菌介导的转高赖氨酸蛋白基因 (sb401) 水稻 T_4 代分析 [J]. 中国水稻科学, 2008(22): 131-136.
- [37] Paine J A, Shipton C A, Chaggar S, et al. A new version of Golden Rice with increased pro-Vitamin A content[J]. Nat Biotechnol, 2005, 23: 482-487.
- [38] Goto F, Yoshihara T, Shigemoto N, et al. Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene[J]. Nat Biotechnol, 1999, 17: 282-286.
- [39] Lucca P, Hurrell R, Potrykus I. Genetic engineering approaches to improve the bioavailability and the level of iron in rice grains[J]. Theor Appl Genet, 2001, 102: 392-397.
- [40] Vasconcelos M, Datta K, Oliva N, et al. Enhanced iron and zinc accumulation in transgenic rice with the ferritin gene[J]. Plant Sci, 2003, 164: 371-378.

Research and Application Progress of Transgenic Technology System of *japonica* Rice

ZHANG Xi-juan, LAI Yong-cai, MENG Ying, TANG Ao, DONG Wen-jun, LENG Chun-xun, LIU You-hong

(Cultivation and Farming Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: Rice is the staple food providing calories for more than 60% people in China, which plays an important role in ensuring food security of our country. In recent years, the demand of *japonica* rice developed rapidly because of the influence of people's living standard, urbanization and consumption habits. But, it was difficult to increase *japonica* rice yield because of limited cultivated land and more biotic and abiotic stress. The genetic engineering technology provided the possibility to break the deadlock. The history of *japonica* rice transgenic technology was reviewed. Then, the establishment and optimization of *japonica* rice transgenic system, transgenic breeding and safe transgenic technology were described. Finally, the existing problems and development in future of *japonica* rice transgenic technology were analyzed and prospected.

Keywords: *japonica* rice; transgene; transformation system

(该文作者还有王立志、姜树坤、孙兵, 单位同第一作者)