

水稻转基因材料培育的一般步骤

General Steps for the Cultivation of Transgenic Rice Materials

陈太钰, 吴昊, 林拥军, 陈浩*

作物遗传改良国家重点实验室, 华中农业大学, 武汉

*通讯作者邮箱: hchen@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 陈太钰, 吴昊, 林拥军, 陈浩. (2018). 水稻转基因材料培育的一般步骤. *Bio-101* e1010177. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010177.

How to cite: Chen, T. Y., Wu, H., Lin, Y. J. and Chen, H. (2018). General steps for the cultivation of transgenic rice materials. *Bio-101* e1010177. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010177. (in Chinese)

实验原理: 采用农杆菌介导的遗传转化获得转基因植株, 经分子鉴定, 表型检测, 田间农艺性状考查以及安全评价后培育转基因水稻。

实验目的: 以野生型水稻品种为受体培育具有商业化前景的转基因水稻新材料。

关键词: 转基因, 育种, 安全评价

实验步骤

1. 采用农杆菌介导遗传转化 (见农杆菌介导的籼稻遗传转化 [刘瑜等, 2018] 和农杆菌介导水稻快速转化 [崔莹等, 2018]) 产生转基因植株超过 1000 株, 经炼苗后移栽至温室 (此时转基因苗为 T₀ 代植株)。

注意: 对于任何世代的转基因植株, 只要涉及转基因植物的田间试验 (种植) 必须向农业农村部 (原农业部) 提交中间试验 (或以上阶段) 的申请, 经农业部备案或审批后方可进行田间试验, 否则只能在温室等封闭空间中完成相关试验。

2. 在 T₀ 代植株苗期采用小样法提取转基因植株的基因组 DNA (见水稻 DNA 小样抽提 [凌飞等, 2018]), 进行 PCR 阳性检测。受体为粳稻品种且筛选试剂为潮霉素 B 的转化植株阳性率一般可以达到 90% 以上, 受体为籼稻品种或采用其他筛选试剂如膦丝菌素 (Basta)、G418 等转化植株阳性率略低 (图 1)。

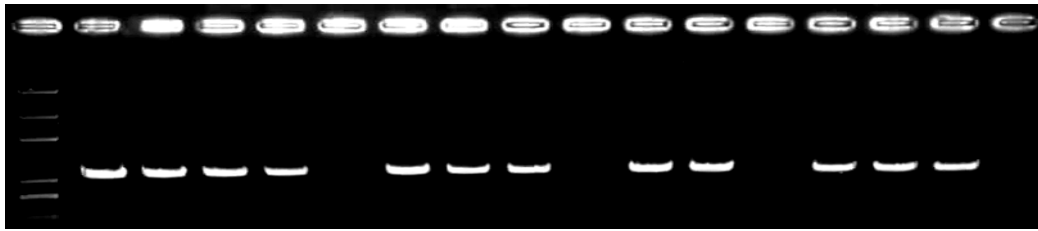


图 1. PCR 阳性检测图片

- 待 T₀ 转基因植株生长至分蘖盛期，采用大样法提取转基因植株基因组 DNA (见水稻叶片高质量 DNA 抽提 [吴昊等, 2018])，进行 Southern 印记杂交分析外源基因插入的拷贝数 (见 Southern Blot [吴昊等, 2018]) (图 2)，农杆菌介导法获得的转基因植株单拷贝率一般可达 20%-30% (单拷贝植株遗传稳定性相对较好，有利于后续的遗传和性状分析)。

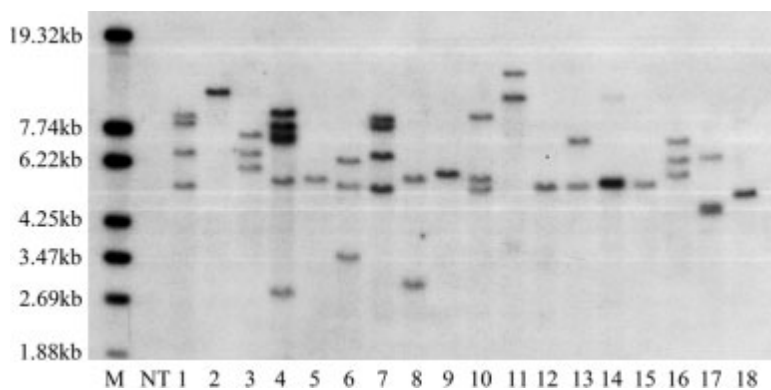


图 2. Southern 杂交拷贝数检测 (Ye *et al.*, 2009)

- 对单拷贝 T₀ 代植株进行不定期观察，剔除农艺性状明显变异 (矮化、黄化、白化、不育等) 的植株。
- 对株型正常的单拷贝 T₀ 代植株进行 mRNA 水平上的外源基因表达量的检测，方法可用半定量 RT-PCR，Northern 杂交或定量 real-time PCR。取样部位和发育时期依目标性状而定，比如抗虫性状一般取拔节后的茎秆或叶片，抗除草剂性状取苗期或成株期的叶片、营养品质性状取未成熟的种子等。以育种为目标的转基因试验，一般尽可能的挑选单拷贝插入、外源基因表达量高且农艺性状与受体品种无明显差异的转化植株。
- 参考 mRNA 水平上的外源基因表达量的检测，对目标基因进行蛋白水平表达量检

测，方法可以针对目标蛋白的性质采用 Western 杂交或者 ELISA 检测试剂盒。

7. 一般在成株期对选取的转基因植株进行目标表型如抗虫或抗除草剂效应的初步鉴定。

8. 在成熟期分单株对 T_0 代植株收种；

注意：1 至 8 步实验尽量在 T_0 代完成，因为在 T_1 代中外源基因插入拷贝数、外源基因表达水平、目标性状等会发生分离，且种植的植株数量会远多于 T_0 代。选取单拷贝插入、目标性状明显，外源基因表达高且农艺性状无明显变异的株系（因为这些株系具有更好的商业化潜力）进行后续实验。

9. 种植 T_1 代植株，每个家系种植 30 株，条件允许可以进行适量的表型鉴定和 PCR 阳性检测并考察家系内的表型分离情况，比如外源基因分离是否符孟德尔遗传规律，成熟后单株收种。

10. 如果 T_2 代植株具有标记基因（即抗生素或除草剂抗性基因）可通过 T_2 代种子在含有筛选试剂培养基上的发芽试验来筛选转基因纯合阳性植株（图 3）。否则，需要通过对 T_2 代进行 PCR 检测，根据不同家系的外源基因分离情况筛选纯合阳性。



图 3. 发芽实验筛选纯合植株，左起，纯合阴性，杂合和纯合阳性

11. 纯合植株 T_2 代种植。每家系种植至少 30 株（同时种植原品种）。种植 T_2 的主要目的是确定转基因纯合阳性家系，并完成农艺性状考察。同时也可以适当进行基因表达量和表型的检测，成熟后单株收种（图 4）。

12. 考种。选取农艺性状与原品种无显著差异的转基因纯合阳性家系进行后续实验（图 5）。根据考种结果，如果农艺性状变异较大可以增加加 2 次回交实验和 2 次自交实

验，尽可能剔除因转基因过程中导致的体细胞变异。



图 4. 田间表型(抗虫)鉴定 (Ye et al., 2009)

Table 2. Agronomic traits of the six homozygous transgenic lines and wild-type Zhonghua 11 under field conditions (Wuhan, China, 2007)^{ab}

	Plant height (cm)	Panicles per plant	Grains per panicle	Seed-set rate (%)	1000-grain weight (g)	Yield per plant (g)	Panicle length (cm)
RJ1 (CK)	96.67 (±2.66)	13.48 (±0.31)	108.39 (±4.80)	79.81 (±3.74)	23.88 (±0.35)	34.51 (±2.45)	20.98 (±0.24)
RJ2	88.75 (±2.66)**	13.55 (±0.89)	89.30 (±1.31)**	73.84 (±1.68)**	23.50 (±0.18)	28.30 (±2.06)*	20.04 (±0.23)
RJ3	90.47 (±3.00)*	13.80 (±0.98)	87.46 (±5.49)**	76.63 (±2.06)	23.11 (±0.19)**	27.66 (±3.11)**	20.14 (±0.86)
RJ4	89.22 (±3.16)**	14.58 (±1.51)	94.35 (±1.89)**	82.18 (±1.13)	24.90 (±0.22)**	34.01 (±3.10)	20.99 (±1.40)
RJ5	92.28 (±2.48)	14.75 (±1.98)	101.94 (±5.79)	81.00 (±0.48)	24.39 (±0.41)	36.16 (±4.10)	21.10 (±0.26)
RJ6	89.83 (±1.32)**	15.27 (±2.27)	104.90 (±7.03)	82.15 (±2.53)	23.73 (±0.06)	37.56 (±3.08)	21.09 (±0.30)
RJ7	92.02 (±1.47)*	16.88 (±2.56)*	72.75 (±4.19)**	70.77 (±2.55)**	24.73 (±0.29)**	30.10 (±3.78)	20.96 (±0.38)
LSD _{0.05}	4.56	2.67	9.09	4.22	0.51	4.61	1.17
LSD _{0.01}	6.40	3.73	12.75	5.91	0.72	6.47	1.65

^a Values are given as means (± standard deviation).
^b * Means significantly different from the control ($P < 0.05$).
 ** Means significantly different from the control ($P < 0.01$).

图 5. 田间农艺性状考察 (Ye et al., 2009)

注：以下实验为商业化前生物安全评价阶段，必须按要求提供各项材料向转基因主管部门申请并获得许可后实施。

13. 中间实验

以育种 (商业化) 为目的转基因试验应尽早申报中间试验。通常在转基因植物的 T₁ 或 T₂ 代即可进行中间试验。每个中间试验可申报 1-20 个转化体。中间试验主要包括分子特征检测、目标性状检测、基因表达水平的检测、农艺性状的初步考察等。中间试验的过程通常是筛选具有产业化前景的转化体的过程。

试验地点和规模：不超过 2 个省（市、区），每省不超过 3 个点。种植规模不超过 4 亩。试验地点应当明确试验所在的省（市、自治区）、县（市）、乡、村。

试验年限：一般为一至二年。

14. 环境释放实验

试验地点和规模：不超过 2 个省（市、自治区），每省不超过 5 个点。种植规模不超过 4~30 亩。试验地点应当明确试验所在的省（市、自治区）、县（市）、乡、村。

试验年限：一次申请环境释放的期限一般为一至二年。

15. 生产性试验

试验地点和规模：应在批准进行过环境释放的省（市、自治区）进行，不超过 2 个省（市、自治区），每个省不超过 3 个点。种植面积大于 30 亩。试验地点应当明确试验所在的省（市、自治区）、县（市）、乡、村。试验年限：一次申请生产性试验的期限一般为一至两年。

注意：13-15 步期间应该按要求，由主管部门委托机构进行安全评价，包括食用安全评价（营养学评价、毒性学评价、致敏性评价、标记基因安全性评价、重金属与农药残留以及对人类的长期非预期效应等）和环境安全评价（生存竞争力、基因漂移、对靶标生物及非靶标生物的影响、对生态环境的非预期后果等）。

16. 安全证书的申报。

17. 申报品种审定。

18. 申报生产许可。

19. 商业化生产制种。

参考文献

1. 《农业转基因生物安全管理条例》
2. 崔莹，蔡朝霞，林拥军，陈浩. (2018). [农杆菌介导水稻快速转化](#). *Bio-101* e1010176. DOI: 10.21769/BioProtoc.1010176.
3. 凌飞，吴昊，林拥军，陈浩. (2018). [水稻 DNA 小样抽提](#). *Bio-101* e1010101. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010101.
4. 刘瑜，凌飞，林拥军，陈浩. (2018). [农杆菌介导的籼稻遗传转化](#). *Bio-101* e1010175. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010175.

5. 吴昊, 陈太钰, 林拥军, 陈浩. (2018). [水稻叶片高质量 DNA 抽提](#). *Bio-101* e1010102. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010102.
6. 吴昊, 陈太钰, 林拥军, 陈浩. (2018). [Southern Blot](#). *Bio-101* e1010104. Doi 10.21769/BioProtoc.1010104.
7. Ye, R., Huang, H., Yang, Z., Chen, T., Liu, L., Li, X., Chen, H. and Lin, Y. (2009). [Development of insect-resistant transgenic rice with Cry1C*-free endosperm](#). *Pest Manag Sci* 65(9): 1015-1020.