

文章编号: 1005-0906(2012)06-0001-08

转基因玉米育种研究进展

刘小丹¹, 李淑华¹, 徐国良¹, XUE Yin-gen², 才卓¹, XU Wen-wei²

(1. 吉林省农业科学院, 长春 130033;

2. Agricultural Research and Extension Center, Texas A&M University System, 1102 East FM 1294, Lubbock, TX 79403, USA)

摘要: 转基因性状包括抗虫、耐除草剂、耐干旱、雄性不育、高赖氨酸含量和耐热淀粉酶等。介绍了转基因玉米的转化途径、转基因玉米的功能基因及性状、转基因玉米的基因聚合方法以及目前美国市场上的主要转基因玉米性状、转基因玉米及其产品检测技术和转 *Bt* 基因玉米害虫的抗性治理, 讨论转基因玉米基因专利失效以后的管理问题和转基因玉米基因发展趋势。

关键词: 玉米; 转基因; 育种; 遗传转化; 基因聚合

中图分类号: S513.035

文献标识码: A

Review of Genetically Modified Maize

LIU Xiao-dan¹, LI Shu-hua¹, XU Guo-liang¹, XUE Yin-gen², CAI Zhuo¹, XU Wen-wei²(1. *Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China;*2. *Agricultural Research and Extension Center, Texas A&M University System,*

1102 East FM 1294, Lubbock, TX 79403, USA)

Abstract: The transgenic traits have been engineered into maize include resistance to insect pests, tolerance to herbicides, tolerance to drought, male sterility, elevated levels of lysine and expressing a heat stable alpha-amylase enzyme. We reviewed the methods for transformation, the genes and traits introduced into maize, the approaches for stacking multiple-transgenes, the common traits of transgenic maize in the US market, the detection of genetically modified maize, and insect resistance management strategies of *Bt* maize. We discussed the issues in the management of expired genes after 2014, and the trends in genetically-modified maize development.

Key words: Maize; Transgenic; Breeding; Transformation; Gene stacking

转基因玉米是通过遗传工程技术在玉米的遗传物质中插入外源基因, 使其具备人类所希望的玉米品系。1983 年外源基因被成功转入烟草中, 标志着转基因植物研究进入了新时代。1986 年抗卡那霉素细菌基因转入到玉米细胞中^[1]。1988 年首次获得转基因玉米植株^[2]。1990 年成功培育出可育的转基因玉米植株^[3], 同年转基因玉米获得美国农业部环境释放许可^[4]。1995 年第一个含 *Bt cryIAb* 和耐除草剂

bar 基因的转基因玉米在美国获得商业化许可。2011 年美国玉米种植面积为 3 740 万 hm^2 , 其中转基因玉米占 88%^[5]。目前, 转基因玉米育种从基因转化、基因聚合、标记筛选、产品检测到害虫抗性管理等已经建立了一套比较完整的理论和技术体系。许多转化事件已获得环境释放许可。抗虫、耐除草剂、高赖氨酸和雄性不育等转基因性状已在生产中广泛应用。耐旱转基因玉米在 2011 年底也获得美国农业部商业化许可^[6]。

转基因玉米的推广和使用带来的不仅仅是杀虫和抗除草剂的直接效果, 更带来了生产效率和耕作方式的变革。免耕和条带耕作因除草剂的使用而大面积推广, 不再使用或很少使用杀虫剂以及延长机械化收获期限。转基因玉米不仅对种植业带来极大的影响, 而且对其他相关产业也会带来巨大的影响。

本文对转基因玉米的转化途径、转化事件及其

收稿日期: 2012-08-12

基金项目: 转基因生物新品种培育科技重大专项(2011ZX08003-001、2011ZX08003-003)

作者简介: 刘小丹, 硕士, 从事玉米遗传育种研究。

XU Wen-wei 为本文通讯作者。E-mail: wxu@ag.tamu.edu

致谢: 感谢转基因玉米育种专家崔运兴先生阅读全文。

本文应本刊主编才卓特约撰写。

性状特点、转基因玉米的基因聚合方法以及目前美国市场上的主要转基因玉米性状、转基因玉米及其产品检测技术和转基因玉米害虫的抗性治理进行综述,并对有关转基因玉米的发展趋势和相关问题进行探讨。

1 转基因玉米的转化途径

把外缘目的基因导入玉米受体的过程称为转化。转基因玉米的转化途径很多,在选择转化方法时不但要考虑转化效率和简便性,也要考虑植株再生能力和植株的可育性。目前转基因玉米常用的转化方法主要有基因枪法、农杆菌介导转化法、电击法等。

(1)基因枪法。基因枪法是用表面吸附有DNA的金属颗粒轰击受体细胞,将外源基因导入细胞。该方法的优点是无受体限制,Gordon-Kamm等用此方法成功培育出可育的转基因玉米。

(2)农杆菌介导转化法。农杆菌能感染大多数双子叶植物的受伤部位,根癌农杆菌在感染植物时,可将其中环状的Ti质粒上的一段DNA插入植物基因组中,引起植物遗传特性的变化。利用这种天然的载体系统,以实现外源基因对植物的遗传转化。Gould等应用农杆菌介导转化法成功地培育出转基因玉米^[7],开创了农杆菌介导法应用于玉米转基因育种的新纪元。农杆菌介导法与其他方法相比具有转化频率高、再生植株可育性高且可以转移大片段DNA的优点。

(3)电击法。电击法是利用高压电脉冲作用,在原生质膜上电击穿孔,形成可逆的瞬间通道,使外源DNA进入。Fromm等首次利用电击法将抗卡那霉素细菌基因转入了玉米原生质体中。Rhodes等用电击法转化玉米,并成功地获得了转基因玉米植株。

(4)其他转化方法。碳化硅纤维介导法,是把碳化硅纤维与受体细胞和外缘DNA混合、搅拌,表面吸附有DNA的纤维穿刺细胞壁,将外源DNA导入细胞。利用碳化硅纤维介导法已成功转化玉米细胞^[8],并成功获得可育玉米植株^[9]。聚乙二醇介导法(PEG),是借助化合物PEG、磷酸钙及高pH条件下诱导原生质体摄取外源DNA分子。花粉管通道法是在授粉后向子房注射目的基因的DNA溶液,利用植物在开花和受精过程中形成的花粉管通道,将外源DNA导入受精卵细胞,并进一步被整合到受体细胞的基因组中。

目前,仍不断有新的转化方法出现,但转化方法

已经不再是限制转基因玉米发展的主要因素。农杆菌介导法是目前玉米转化中比较常用的方法;碳化硅纤维介导法因其简单、容易操作,有可能成为转化玉米的主要方法之一。

2 转基因玉米的转化事件和性状

转化事件是指在把外缘DNA导入植物细胞的过程中,特定的外缘DNA与受体DNA在特定染色体、特定位点结合的事件。一个特定的转化事件起源于一个转化植株,导入的DNA片段不同或结合位点的不同均代表不同的转化事件。即使是相同的基因,由于结合的位点不同,导入到不同的染色体或同一染色体的不同位点,其结果也大不相同,能使基因高效表达的事件称为“精华事件”。由一个特定转化事件而培育出的稳定品系,必须经过大量的室内和田间试验,证明对人、动物和环境无害的情况下才可以解除管制,与非转基因玉米同等对待。同一个转化事件可以通过常规育种手段导入到不同的品种中去,因此,不同的转基因玉米品种用的可能是相同的转化事件。转化事件一般被认为是转基因育种的核心成果之一,转化事件的创建人一般会对转化事件申请专利保护。

截止到2012年2月,ISSAA(International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications)登记的转化事件共65项^[10]。转基因性状包括抗虫、耐除草剂、雄性不育、耐干旱、高赖氨酸含量和耐热淀粉酶等。尽管有登记的转化事件很多,但真正的功能基因并不多,针对鳞翅目害虫的只有7个基因,针对鞘翅目害虫的只有4个基因,而且这些基因全部来源于苏云金杆菌*Bacillus thuringiensis*,作用方式有很大的相似性;耐除草剂草甘膦基因有4个,耐草铵膦的基因有2个(表1)。

3 转基因玉米的基因聚合方法

通过基因聚合将多个目的基因导入同一个受体品系或杂交种,使玉米同时具有抗多种害虫和多种除草剂性状是生产实际的需要,也是目前转基因育种常用的手段。

3.1 转基因玉米亲本杂交聚合基因

转基因玉米亲本杂交聚合基因是指通过常规的杂交手段,把两个或多个转基因亲本的转基因性状聚合到一个自交系或杂交种中去。目前,生产上普遍应用的*Bt*杀虫基因和耐除草剂草甘膦的*Roundup Ready*(RR)、耐草铵膦的*Liberty Link*(LL)基因均表现

显性单基因遗传。只要亲本自交系具有特定基因,就可以通过杂交将不同的基因聚合到一个自交系或杂交种中。YieldGard Plus, 转化事件为 MON863 × MON810, 是用常规杂交把 MON863 的 *cry3Bb1* 基因

和 MON810 中的 *cry1Ab* 基因聚合。这种聚合的目的基因由于相互独立, 转基因之间没有连锁, 后代中会发生分离, 在后代的筛选过程中需要有较大的群体。

表 1 转基因玉米功能基因和性状

Table 1 Transgenes and traits used in commercial maize production

功能基因 Gene	性状 Trait	功能基因 Gene	性状 Trait
<i>cry1Ab</i>	对鳞翅目害虫有效(抗 ECB、抑制 CEW、FAW)	CP4 <i>epsps</i>	耐除草剂草甘膦
<i>cry1Ac</i>	对鳞翅目害虫有效(抗 ECB)	<i>epsps</i>	耐除草剂草甘膦
<i>cry9c</i>	对鳞翅目害虫有效(抗 ECB、SWCB;抑制 BCW、CSB)	<i>goxv247</i>	耐除草剂草甘膦
<i>cry1F</i>	对鳞翅目害虫有效(抗 BCW、ECB、FAW、WBC;抑制 CEW)	<i>gat4621</i>	耐除草剂草甘膦
<i>cry1A.105</i>	对鳞翅目害虫有效(抗 CEW、ECB、FAW)	<i>als</i>	耐咪唑啉酮类除草剂
<i>cry2Ab2</i>	对鳞翅目害虫有效(抗 CEW、ECB、FAW)	<i>ACCase</i>	耐环己二酮类除草剂
<i>vip3A</i>	对鳞翅目害虫有效(抗 BCW、CEW、ECB、FAW、WBC、CSB)	<i>zm-hra</i>	耐乙酰乳酸合成酶抑制剂类除草剂
<i>cry34Ab1</i>	抗鞘翅目玉米根萤叶甲	<i>barnase</i>	雄性不育
<i>cry35Ab1</i>	抗鞘翅目玉米根萤叶甲	<i>dam</i>	雄性不育
<i>mcry3A</i>	抗鞘翅目玉米根萤叶甲	<i>zm-aal,DsRed2</i>	雄性不育, 种子着色
<i>cry3Bb1</i>	抗鞘翅目玉米根萤叶甲	<i>cordapA</i>	高赖氨酸含量
<i>bar</i>	耐除草剂草铵膦	<i>amy797E</i>	耐热淀粉酶
<i>pat</i>	耐除草剂草铵膦	<i>CspB</i>	耐干旱

注:BCW 为地老虎;CEW 为玉米穗夜蛾;CRW 为玉米根萤叶甲;CBS 为粉茎螟;ECB 为欧洲玉米螟;FAW 为秋粘虫;SWCB 为西南玉米螟;WBC 为西部豆夜蛾。下表同。

Note: BCW, Black cut worm; CEW, Corn ear worm; CRW, Corn root worm; CBS, Corn stalk borer; ECB, European corn borer; FAW, Fall army worm; SWCB, Southwestern corn borer; WBC, Western bean cut worm. The same below.

3.2 多基因单载体共转化聚合法

即把两个或多个基因用同一个载体一次性转化到一个受体品系中, 把两个或多个独立表达框串联在一个表达载体中, 各个目的基因的两端均具有各自的启动子、增强子、终止子等转录和翻译调控因子。YieldGard VT RW/RR2, 转化事件为 MON88017, 使用 PV-ZMIR39 单个载体, 载体同时含有 *cry3Bb1* 和 CP4 *epsps* 基因, 但两个基因各自有自己的启动子、增强子、终止子等转录和翻译调控元件。在这种情况下, 不同的目的基因导入到玉米的特定染色体位点后, 目的基因之间一般完全连锁, 筛选简单, 比较容易获得稳定的后代, 而且通过使用不同的启动子和调控元件, 可以灵活调控各基因的表达, 但随着基因数目的增加, 载体的容量会成为限制因素。

3.3 多基因多载体共转化聚合法

多基因多载体共转化, 是先将目的基因连接到不同的载体上, 然后将位于不同载体上的多个基因一次性同时转化到同一个受体中。MON809 的转化使用了 PV-ZMBK07 和 PV-ZMGT10 两个载体, PV-ZMBK07 含有 *cr1Ab* 基因, PV-AMGT10 含有

CP4 *epsps* 基因和 *goxv247* 基因。多基因多载体共转化方法由于简单易行, 是玉米多基因聚合转化的常用方法之一。由于基因位于不同载体上, 构建表达框比较容易, 但是不同基因的转化率一般各不相同。

除以上聚合方法外, 多次转化法、叶绿体基因技术、内部核糖体进入位点序列(IRES)和多蛋白技术也可以用于基因的聚合。在实际应用中, 常常多种聚合方法结合使用, 把多个目的基因聚合到一个品系中。MON89034、TC1507、MON88017 和 DAS-59112-7 都是由多基因单载体共转化聚合而来, 而目前市场上正在推广的具有 8 个基因的 Genuity SmartStax 则是由这 4 个转基因亲本通过常规杂交育种而来。

4 转基因性状向优异种质的导入

受转化效率如愈伤组织、转化和再生植株的限制, 最初的转基因玉米基因型农艺性状一般较差, 需要通过回交转化成带转基因的等基因型系。目前, 许多新的育种材料在引入转基因性状的优点后能保持亲本和其杂交种原有的优势。在选用转基因性状的供体时, 不仅农艺性状要好, 而且供体和受体自交系

最好是同一优势类群。在导入后的筛选过程中,可以利用特定的性状如使用除草剂选择特定的耐除草剂基因等进行生物选择,同时,分子标记也是必不可少的重要手段。

5 目前美国市场上主要的转基因玉米性状

目前美国转基因玉米几乎被少数几家大的公司所垄断。尽管不同的公司使用了不同的转化事件、名称和商标,但功能基因非常有限。目前美国市场上主

要的转基因玉米性状见表 2。

6 转基因玉米及其产品检测技术

转基因玉米及其产品检测技术不仅是育种效率和产品质量的保证,而且也是转基因作物风险评估与监测、转基因产品的监管的重要手段。目前,转基因玉米及其产品的检测方法主要有生物测定、DNA 检测、蛋白质检测、生物芯片检测技术和近红外光谱检测等。

表 2 美国目前市场上主要的转基因玉米性状
Table 2 The common traits of transgenic maize in the US market

商 标 Trademark	转化事件 Event	功能基因 Gene	抗地上害虫 Target pest above ground	抗地下害虫 Target pest below ground	耐除草剂 Tolerant to herbicide	庇护区要求 Refuge requirement
Agrisure GT	GA21	<i>epsps</i>			GT	
Agrisure CB/LL	BT11	<i>cry1Ab</i> 、 <i>pat</i>			LL	
Agrisure GT/CB/LL	BT11 × GA21	<i>cry1Ab</i> 、 <i>epsps</i> 、 <i>pat</i>	抗 ECB;抑制 CEW、 FAW、CSB		GT、LL	20%
Agrisure RW	MIR604	<i>mcry3A</i>		CRW		20%
Agrisure GT/RW	MIR604 × GA21	<i>mcry3A</i> 、 <i>epsps</i>		CRW	GT	20%
Agrisure CB/LL/RW	BT11 × MIR604	<i>cry1Ab</i> 、 <i>mcry3A</i> 、 <i>pat</i>	抗 ECB;抑制 CEW、 FAW、CSB	CRW	LL	20%
Agrisure 3100	BT11 × MIR162 × MIR604					
Agrisure 3000GT	BT11 × MIR604 × GA21	<i>cry1Ab</i> 、 <i>mcry3A</i> 、 <i>epsps</i> 、 <i>pat</i>	抗 ECB;抑制 CEW、 FAW、CSB	CRW	GT、LL	20%
Agrisure Viptera 3110 (含耐热 α-淀粉酶)	Event 3272 × BT11 × MIR 604 × GA21	<i>amy797E</i> 、 <i>cry1Ab</i> 、 <i>Vip3A</i> 、 <i>epsps</i> 、 <i>pat</i>	抗 BCW、CEW、ECB、 FAW、WBC、CSB		GT、LL	20%
Agrisure Viptera 3111	BT11 × MIR 162 × GA21	<i>cry1Ab</i> 、 <i>mcry3A</i> 、 <i>vip3A</i> 、 <i>epsps</i> 、 <i>pat</i>	抗 BCW、CEW、ECB、 FAW、WBC、CSB	CRW	GT、LL	20%
Agrisure 3122	BT11 × MIR 162 × MIR 604 × TC1507 × GA21	<i>cry1Ab</i> 、 <i>cry1F</i> 、 <i>mcry3A</i> 、 <i>cry34Ab1</i> 、 <i>cry35Ab1</i> 、 <i>epsps</i> 、 <i>pat</i>	抗 BCW、ECB、FAW、 WBC;抑制 CEW、 CSB	CRW	GT、LL	5%
Herculex I	TC1507	<i>cry1F</i> 、 <i>pat</i>	抗 BCW、ECB、FAW、 WBC;抑制 CEW		LL	20%
Herculex I/RR2	TC1507 × NK603	<i>cry1F</i> 、 <i>pat</i> 、 <i>Cp4 epsps</i>	抗 BCW、ECB、FAW、 WBC;抑制 CEW		LL、RR2	20%
Herculex RW	DAS-59122-7	<i>cry34Ab1</i> 、 <i>cry35Ab1</i> 、 <i>pat</i>		CRW	LL	20%
Herculex RW/RR2	DAS-59122-7 × NK603	<i>cry34Ab1</i> 、 <i>cry35Ab1</i> 、 <i>pat</i> 、 <i>Cp4 epsps</i>		CRW	LL、RR2	20%
Herculex XTRA	TC1507 × DAS-59122-7	<i>cry1F</i> 、 <i>cry34Ab1</i> 、 <i>cry35Ab1</i> 、 <i>pat</i>	抗 BCW、ECB、FAW、 WBC;抑制 CEW	CRW	LL	20%
Herculex XTRA/RR2	DAS-59122-7 × TC1507 × NK603	<i>cry1F</i> 、 <i>cry34Ab1</i> 、 <i>cry35Ab1</i> 、 <i>pat</i> 、 <i>Cp4 epsps</i>	抗 BCW、ECB、FAW、 WBC;抑制 CEW	CRW	LL、RR2	20%
Optimum Intrasect	TC1507 × MON 810 × NK603	<i>cry1F</i> 、 <i>cry1Ab</i> 、 <i>pat</i> 、 <i>Cp4 epsps</i>	抗 BCW、ECB、FAW、 WBC;抑制 CEW、CSB		LL、RR2	5% ~ 20%
Optimum AcreMax	同上	同上	同上	同上	同上	5%混装
Optimum AcreMax RW	同 Herculex RW/RR2	<i>cry34Ab1</i> 、 <i>cry35Ab1</i> 、 <i>pat</i>		CRW	LL、RR2	10%混装

续表 2 Continued 2

商 标 Trademark	转化事件 Event	功能基因 Gene	抗地上害虫 Target pest above ground	抗地下害虫 Target pest below ground	耐除草剂 Tolerant to herbicide	庇护区要求 Refuge requirement
Optimum AcreMax 1 (90%HX/RR2 XTRA+ 10% HX1/RR2)	同 HX/RR2 XTRA 和 HX1/RR2	<i>cry1F</i> 、 <i>cry34Ab1</i> 、 <i>cry35Ab1</i> 、 <i>pat</i> 、 <i>Cp4 epsps</i>	抗 BCW、ECB、FAW、 WBC;抑制 CEW	CRW	LL、RR2	10%混装
Optimum Intrasect Xtra	TC1507 × DAS-59122-7 × MON 810 × NK603	<i>cry1F</i> 、 <i>cry34Ab1</i> 、 <i>cry1F</i> 、 <i>cry1Ab</i> 、 <i>pat</i> 、 <i>Cp4 epsps</i>	抗 BCW、ECB、FAW、 WBC;抑制 CEW、CSW	CRW	LL、RR2	20%
Optimum AcreMax Xtra	同上	同上	同上	同上	同上	10%混装
Roundup Ready Maize 2	NK603	<i>CP4 epsps</i>			RR2	
YieldGard Maize Borer	MON810	<i>cry1Ab</i>	抗 ECB;抑制 CEW、 FAW、CSB			20%
YieldGard Maize Borer/RR2	NK603 × MON810	<i>cry1Ab</i> 、 <i>CP4 epsps</i>	抗 ECB;抑制 CEW、 FAW、CSB		RR2	20%
YieldGard Root Worm	MON863	<i>cry3Bb1</i>		CRW		20%
YieldGard Root Worm/RR2	MON863 × NK603	<i>cry3Bb1</i> 、 <i>CP4 epsps</i>		CRW	RR2	20%
YieldGard Plus	MON863 × MON810	<i>cry1Ab</i> 、 <i>cry3Bb1</i>	抗 ECB;抑制 CEW、 FAW	CRW		20%
YieldGard Plus/RR2	MON863 × MON810 × NK603	<i>cry1Ab</i> 、 <i>cry3Bb1</i> 、 <i>CP4 epsps</i>	抗 ECB;抑制 CEW、 FAW	CRW	RR2	20%
YieldGard VT Root Worm/RR2	MON88017	<i>cry1Ab</i> 、 <i>Cry3Bb1</i>		CRW	RR2	20%
YieldGard VT Triple	MON810 × MON88017	<i>cry1Ab</i> 、 <i>cry3Bb1</i>	抗 ECB;抑制 CEW、 FAW	CRW	RR2	20%
Genuity VT Double PRO	Mon89034 × NK603	<i>cry1A.105</i> 、 <i>cry2Ab2</i> 、 <i>Cp4 epsps</i>	抗 CEW、ECB、FAW		RR2	5%
Genuity VT Double PRO RIB Complete	同上	同上	同上	同上	同上	5%混装
Genuity VT Triple PRO	MON89034 × MON88017	<i>cry1A.105</i> 、 <i>cry2Ab2</i> 、 <i>cry3Bb1</i> 、 <i>Cp4 epsps</i>	抗 CEW、ECB、FAW		RR2	20%
Genuity SmartStax	MON89034 × TC1507 × MON88017 × DAS-59112-7	<i>cry1A.105</i> 、 <i>cry2Ab2</i> 、 <i>cry1F</i> 、 <i>cry3Bb1</i> 、 <i>cry34Ab1</i> 、 <i>cry35Ab1</i> 、 <i>pat</i> 、 <i>Cp4 epsps</i>	抗 BCW、CEW、ECB、 FAW、WBC	CRW	LL、RR	5%
Genuity SmartStax RIB Complete	同上	同上	同上	同上	同上	5%混装
Pioneer 种子生产技术 (雄性不育和种子着色)	DP-32138-1/2	<i>zm-aal</i> 、 <i>DsRed2</i>				

注:GT为耐除草剂草甘膦;LL为耐除草剂草铵膦;RR2为耐除草剂草甘膦。

Note: GT, Glyphosate tolerant; LL, Liberty link (glufosinate tolerant); RR2, Roundup ready (glyphosate tolerant).

(1)生物测定技术。生物测定是利用玉米对特定环境因子的反应来检查该玉米是否含有转基因。如喷洒草甘膦可以检测玉米是否带有耐草甘膦基因;用玉米根系饲喂玉米根萤叶甲幼虫可以粗略判断该玉米是否带有抗玉米根萤叶甲的基因。生物测定一般不需要复杂昂贵的设备,但只能用于粗略判断。

(2)DNA检测技术。基于PCR技术的DNA检测是进行转基因性状检测中应用最广的检测方法,包括通用原件检测、基因特异性检测和转化事件特异性的定性检测以及对样品中起始核酸拷贝数的定量检测等。

通用原件检测主要是以转基因玉米的通用元件

如启动子、终止子和标记基因为特异性扩增片段,定性检测是否为转基因玉米。但该方法不能确定目的基因的种类和性质,而且由于通用元件在自然界中也普遍存在,所以很容易出现假阳性。

基因特异性检测是对目的基因进行检测。一般是通过在目的基因的基因盒上设计引物,对目的基因进行扩增,但该方法不能区别相同基因的不同转化事件。

转化事件特异性检测是通过扩增插入位点侧翼的受体 DNA 序列,鉴定含有相同外源基因的不同转化事件。扩增侧翼序列的方法有反向 PCR、热不对称交错 PCR 和连接介导 PCR 等。目前有关玉米转化事件特异性检测已有不少报道,如 Bt11、MON810、MIR604^[11-13]。转化事件特异性检测是目前转基因玉米检测中常用的方法。

实时荧光定量 PCR 技术的出现,使定量检测转基因样品的核酸拷贝数成为可能。实时荧光定量 PCR 技术是在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,然后用外标的标准曲线对未知模板进行定量分析^[14]。

(3)蛋白质检测技术。每个转基因表达产生特定的蛋白质。酶联免疫吸附法(ELISA)是通过抗原和抗体发生特异性结合检测基因表达的蛋白质产物。该方法具有特异性强、灵敏度高、可以定性和定量等优点。目前,这种方法已经广泛用于分析测定转基因作物中外源基因的存在和其表达的靶蛋白质水平,如转基因玉米的 Bt 杀虫蛋白^[15]。

目前,市场上的转基因快速测试条如 Agdia、QuickStix 是以 ELISA 原理为基础,将特异性蛋白抗体涂抹硝化纤维等支撑物上制成试剂条,当试剂条与样品中的蛋白质抗原接触时,即可发生颜色反应。该方法操作简单,不受场地和实验设备限制,适合田间快速检测,并且可以对转基因产品实行半定量分析,但此法不能确定基因型是纯合还是杂合。如果目标基因是在特定的组织中表达则必须从该组织中取样。

(4)生物芯片技术。生物芯片技术是利用分子间特异性的相互作用原理,通过缩微技术将许多不同的蛋白质、基因等组分分别点滴到同一个很小的硅片、尼龙膜或玻璃片表面的微点阵分析系统。生物芯片可以对转基因植物目标蛋白质或基因等组分进行高通量、快速、准确的检测。其基本原理是微点阵上的分子与待测分子(如基因或蛋白)的特异性结合,发生显色反应或仪器可以检测到的特异性反应。由

于微点阵上分布有数百(甚至上千)个不同的组分,所以该方法可以同时数百甚至上千个目标基因或蛋白进行检测,大大提高了检测效率^[16]。

7 害虫对转基因玉米的抗性及其治理

大量研究表明,害虫能够对转基因抗虫玉米产生抗性。田间和室内研究表明,玉米根萤叶甲已经对表达 Cry3Bb1 杀虫蛋白的玉米产生抗性^[17]。通过多年的抗性治理研究和实践,普遍认为预防性的高剂量/庇护区互补策略是 Bt 玉米害虫抗性治理的最优策略。庇护区是指在转基因玉米田种植一定面积的非转基因玉米,作为害虫生存繁殖的场所。庇护区的玉米通常是用不带转基因杀虫性状的同一品种的玉米或开花生育期相近、农艺性状相似的杂交种。在这种系统中,转基因玉米表达高水平的 Bt 杀虫蛋白的目的是杀死所有没有抗性基因和抗性基因杂合子个体的大部分敏感害虫,同时敏感害虫又可以在非转基因玉米庇护区内繁殖,通过敏感害虫和抗性害虫的交配而稀释害虫种群的抗性基因,延缓害虫种群抗性的发展,延长转 Bt 基因玉米的使用寿命。

7.1 高剂量/庇护区互补策略的前提

高剂量/庇护区互补策略认为,害虫对 Bt 杀虫蛋白的抗性是由单个隐性基因控制,基因型有抗性纯合子、敏感型纯合子和抗性杂合子 3 种。昆虫种群中原有的抗性基因频率很低,而且抗性个体和敏感个体可以随机交配。在田间条件下,只有抗性纯合子的个体才能抵抗高剂量的毒素。抗性纯合子个体和非转基因玉米庇护区的敏感个体交配产生敏感的杂合子个体,从而使抗性得以稀释。

7.2 高剂量原则

1998 年美国环境保护署给高剂量的定义是能够杀死害虫敏感品系的 99%(即 LD₉₉)的 25 倍剂量^[18]。这是从害虫抗性治理的角度对转基因玉米品种提出的质量要求,其目的是杀死转基因玉米田的几乎所有敏感个体和杂合子个体,延缓抗性的发展。由于转基因技术的进步,目前使转基因玉米产生 25 倍于 LD₉₉ 的剂量已经没有障碍。

7.3 庇护区的面积比例和种植格局的确定

根据美国环境保护署对转基因抗虫植物注册登记的要求,申请登记的公司要提交有关害虫抗性治理方案的相关资料,其中重要的一项即为设立庇护区的面积比例、方法和科学依据^[18]。

庇护区面积比例的确定,不但要考虑杀虫基因的数目和杀虫毒素的作用方式,也要考虑目标害虫

的生物学、生态学、遗传学、行为、扩散、种群的初始抗性基因频率、种植地区的环境、寄主分布和种植者按要求种植庇护区的比率等因素,最后使用适当的数学模型对抗性的发展趋势进行评估,得出庇护区的比例。

目前,市场上的单价抗虫转基因玉米防治鳞翅目害虫时,庇护区的面积一般不少于 20%。如果位于棉花种植区时,因为棉花害虫能同时取食棉花和玉米更容易产生抗性,庇护区的面积要提高到 50%^[18],庇护区距离转基因玉米要在 800 m 以内。联合使用两种或两种以上不同杀虫机制的杀虫基因时,由于作用位点的增多,害虫同时对几种杀虫基因产生抗性的几率比单个基因低,因此,可以延缓抗性的发展,需要的庇护区的面积可能会相应减少。聚合了 8 个基因(6 个杀虫基因和两个抗除草剂基因)的 SmartStax,其需要的庇护区比例已经降到 5%^[19]。另外,当一个转基因玉米可以同时防治两种或多种害虫时,庇护区的面积要以要求严格的害虫为准。由于玉米根萤叶甲的扩散性能等种群特点比玉米螟更容易产生抗性,当转基因玉米同时具有抗玉米根萤叶甲和抗玉米螟性状时,庇护区的面积要按玉米根萤叶甲要求来设定。

过去非转基因的庇护区常常以条块的形式种植在转基因玉米田的中间或周围。目前,为了方便使用,不同的公司纷纷推出了预先按比例混合好的“一袋装”。即同一品种的不带转基因杀虫性状的玉米和带有转基因杀虫性状的玉米种子混合后装在一个袋子里,种植者直接播种即可,两种玉米在田间混合种植。

8 展 望

随着分子生物学和遗传工程技术的飞速发展,转基因玉米的研究和应用已进入了崭新的纪元。过去几年,转基因玉米的研究主要集中在抗虫和抗除草剂上,聚合了 8 个基因的 SmartStax 在生产上的应用把抗虫和抗除草剂转基因玉米推上了高峰。但从目前的情况看,由于基因的互作和植物在基因表达上的权衡折衷现象,并不一定是基因愈多愈好。目前,转基因玉米的研究重点已经转向了抗旱、高效利用氮素、高产和高品质等性状上并取得了阶段性成果。未来几年,全新性状的转基因玉米将会进入商业化阶段。

转基因玉米是高科技成果的携带者,转基因抗虫、抗除草剂玉米之所以如此成功,除了其直接的杀

虫和抗除草剂效果之外,在很大程度上也是顺应了简化农事操作、减少劳动力投入的需求。*Bt* 玉米可以显著减轻茎倒、根倒和掉穗,延长机械化收获期限,使得玉米子粒有充分的时间在田间干燥,减少收获后干燥费用。*Bt* 玉米因为减轻了害虫对根和茎的危害,间接提高了玉米的抗旱性,提高水分和营养的利用效率。转基因玉米不仅对种植业带来极大的影响,而且对其他相关产业也会带来预想不到的影响。作为草甘膦老牌生产商的孟山都公司推出 Roundup Ready 抗除草剂作物,大大提高了市场对草甘膦的需求,并对其他除草剂品种和生产商产生了严重冲击。所以在转基因玉米研究中,不能仅仅注重直接的转基因性状表现,还要考虑其他方面因素的影响等。

转基因玉米在生产上的大量推广应用,使得非转基因常规玉米越来越少,许多优秀的非转基因玉米和农家品种面临消失的局面。欧盟一些国家或地区对转基因玉米仍然有很多限制,市场对非转基因玉米仍有相当的需求。有机农产品必须使用非转基因的种子,有机畜产品必须使用非转基因饲料,所以对非转基因玉米种质的保护和研究就显得格外重要,常规育种也必不可少。

第一个转基因性状专利——耐除草剂 Roundup Ready 性状基因专利保护期限即将在 2014 年终结,此后将陆续会有大量的基因专利失效。虽然使用者不用再付专利使用费,育种工作者也可以自由地利用专利失效的性状基因,转基因种子等产品价格会明显下降,种植者也可以自己留种用于再种植。但由于专利原有者不再负责原基因看护,许多问题也随之而来。许多国家对转基因产品的注册管理是定期评估和更新,此后的事务该由谁负责,这涉及到转基因产品的进出口和市场,对种植尤其重要,这是目前美国转基因领域最有争议的焦点之一。因此,成立失效基因专利基金组织,负责基因专利失效以后的统一管理和协调有可能会成为应对措施之一。

参考文献:

- [1] Fromm M E, Taylor L P, Walbot V. Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation[J]. *Nature*, 1986, 319: 791-793.
- [2] Rhodes C A, Pierce D A, Mettler I J, et al. Genetically transformed maize plants from protoplasts[J]. *Science*, 1988, 240: 204-207.
- [3] Gordon-Kamm W J, Spencer T M, Mangano M L, et al. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants [J]. *Plant Cell*, 1990, 2: 603-618.
- [4] ISB(Information Systems for Biotechnology). Information Systems for Biotechnology[EB/OL]. <http://www.isb.vt.edu/data.aspx>. 2012.
- [5] USDA. National Agricultural Statistics Service(NASS)[M]. Acreage. 2011.

- [6] USDA/APHIS. Determination of Nonregulated Status for MON 87460 Maize (*Zea mays* L.)[M]. 2011.
- [7] Gould J, Devey M, Hasegawa O, et al. Transformation of *Zea mays* L. using *agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex[J]. Plant Physiol, 1991, 95: 426-434.
- [8] Kaeppler H, Somers D A, Rines H W, et al. Silicon carbide fiber-mediated stable transformation of plant cells[J]. Theor. Appl. Genet, 1992, 84: 560-566.
- [9] Frame B R, Drayton P R, Bagnall S V. Production of fertile transgenic maize plants by silicon carbide whisker-mediated transformation[J]. Plant J., 1994, 6: 941-948.
- [10] ISSAA(International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications)[EB/OL]. GM Approval Database, <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase>. 2012.
- [11] Zimmermann A. Event specific transgene detection in Bt11 maize by quantitative PCR at the integration site[J]. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, 2000. 33: 3, 210-216.
- [12] Hernandez M, Pla M, Esteve T, et al. Specific real-time quantitative PCR detection system for event MON810 in maize YieldGard based on the 3'-transgene integration sequence[J]. Transgen Res., 2003, 12: 179-189.
- [13] Lee S H, Yi B Y, Kima S J. Event-specific analytical methods for biotech maize MIR 604 and DAS-59122-7[J]. J. Sci. Food and Agri., 2009, 89: 15, 2616-2624.
- [14] Xu W, Liang Z, Rong Y, et al. Characterization and event-specific quantitative detection of DAS-59122-7 maize insert with the application of plasmidic reference material[J]. J. Sci. Food. Agric., 2009, 89: 494-503.
- [15] Székács A, Lauber E, Takács E, et al. Detection of Cry1Ab toxin in the leaves of MON 810 transgenic maize[J]. Anal. Bioanal Chem., 2010, 396: 2203-2211.
- [16] Bai S, Zhang J, Li S, et al. Detection of six genetically modified maize lines using optical thin-film biosensor chips[J]. J. Agric. Food Chem., 2010, 58, 8490-8494.
- [17] Gassmann A J, Petzold-Maxwell J L, Keweshan R S, et al. Field-Evolved Resistance to Bt Maize by Western Maize Rootworm[J]. PLoS ONE 6(7): e22629. doi:10.1371/journal.pone.0022629, 2011.
- [18] USEPA(US Environmental Protection Agency). Final report of the FIFRA scientific advisory panel subpanel on *Bacillus thuringiensis* (Bt) plant-pesticides and resistance management [EB/OL]. Washington: US Environmental Protection Agency. <http://www.epa.gov/biopes-ticides>, 1998.
- [19] Monsanto. Genuity® SmartStax® Maize [EB/OL]. <http://www.genuity.com/Maize/Genuity-SmartStax.aspx>. 2011.

(责任编辑: 朴红梅)

欢迎订阅 欢迎投稿 欢迎刊登广告

——《作物杂志》

《作物杂志》是中国作物学会和中国农业科学院作物科学研究所主办的农作物实用性技术类期刊, 1985年创刊。刊登具有创新性、实用性强的有关农作物的文章; 快速报导农业新技术、新成果。

本刊信息量大、时效性强; 影响面广。曾荣获第三届 / 第四届 / 第五届全国优秀农业科技期刊奖、中国科协优秀科技期刊奖。连续入选全国中文核心期刊、中国科技核心期刊和中国农业核心期刊, 2005年进入国家精品期刊库。

读者对象为农业科研人员、农业院校师生、农业技术推广工作者, 种植业专业户、农业经营人员, 农业示范园区、农场等有关人员。

栏目设置有专家论坛、专题综述、研究报告、种子科技与管理、栽培技术、植物保护等。

本刊为双月刊, 大16开本, 152页。定价15元, 全年90元, 全国各地邮局均可订阅。漏订者请寄款至编辑部, 地址: 北京中关村南大街12号中国农科院作物所内, 收款人: 作物杂志编辑部, 邮编: 100081

本刊已正式开通网上在线投稿系统, 欢迎大家使用网上注册投稿, 网址: <http://zwzz.cbpt.cnki.net/>

电子信箱: zwzz304@mail.caas.net.cn

电 话: (010)82108790