

玉米转基因技术研发与应用现状及展望

黎 裕, 王天宇

(中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘 要: 转基因技术的应用已成为国内外玉米育种的重要手段, 其产业化为全球玉米种业发展和玉米生产方式带来变革, 对粮食安全、生态安全和农民增收给予了重要保障。本文针对玉米遗传转化和新产品创制进展进行评述, 对今后我国玉米转基因技术研发及其应用进行展望。

关键词: 玉米; 遗传转化; 转基因育种

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Germplasm Enhancement in Maize: Advances and Prospects

LI Yu, WANG Tian-yu

(Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Transgenic technology (genetic engineering) has become an important approach in maize breeding, and its commercial use has resulted in the reform and even the revolution of global maize seed industry and maize production modes. The release of transgenic maize varieties have contributed greatly to food security, environmental security and farmers' income increase in the world. The advances in transformation techniques and transgenic breeding in maize were studied, and future prospects and main tasks in the field of transgenic research in maize were also proposed.

Key words: Maize; Genetic transformation; Transgenic breeding

自 1995 年抗虫抗除草剂玉米在美国获得商业化许可后, 转基因玉米的推广应用十分迅速。国际农业生物技术应用服务组织 (ISAAA) 统计数据表明, 从 1996 ~ 2016 年, 全球转基因玉米累计种植面积达 6 亿 hm^2 。在转基因玉米种植面积较大的国家中, 美国排名第一, 2016 年达到 3 500 万 hm^2 , 占玉米总面积的 92%; 巴西 1 570 万 hm^2 、阿根廷 470 万 hm^2 、加拿大 150 万 hm^2 。目前, 已登记的玉米转基因事件达 231 个, 其中还不包括我国国内的绝大多数转化事件。

近年来, 国内外在玉米转基因技术和产品研发领域取得了新的突破与进展。本文对玉米转基因技术研究现状、转基因育种进展进行评述, 就今后的发

展趋势和发展方向进行总结和展望。

1 玉米遗传转化技术研究

传统的遗传转化是指把外源目的基因导入玉米受体的过程。事实上, 目前称为颠覆性技术的基因编辑也需要把目标序列通过遗传转化的手段导入受体细胞, 但与需要把外源基因序列整合进玉米基因组不同。玉米遗传转化涉及到多个环节, 影响到最终转化效率的因素很多, 如组织培养基因型的依赖性、目标组织的大小和类型、载体与启动子类型、偏好密码子、选择标记类型、农杆菌株系、接种和共培养状态、植株再生过程等。玉米遗传转化技术的发展情况已有全面评述^[1]。

1.1 转化方法

在玉米上得到应用的遗传转化技术方法及其改进类型多种多样, 各自具有其优点和缺点 (表 1)。最早成功的转基因玉米报道始于 1988 年的原生质体转化^[2], 最早培育出可育转基因玉米的遗传转化方法是基因枪转化^[3]。通过条件优化, 并且多用幼胚和悬浮细胞作受体, 获得了如 MON810、GA21、

录用日期: 2018-03-10

基金项目: 转基因重大专项 (2016ZX08010-004)、中国农科院科技创新工程

作者简介: 黎 裕 (1966-), 男, 博士, 研究员, 主要从事玉米种质资源研究。Tel: 010-62131196 E-mail: liyu03@caas.cn

NK603等著名的转化事件。农杆菌可介导的玉米遗传转化技术报道相对较晚,直到日本烟草公司发表基于农杆菌介导的幼胚转化方法及其标准程序后^[4,5],在业界应用越来越广泛,该技术目前还在得到不断的优化与完善,使转化效率得到进一步提高。

1.2 受体系统

理想的受体系统(外植体组织)具有易于获得、全年都能获得、数量大、成本低廉、易于转化的特点。不同受体系统的转化效率有较大差异,其优缺点见表2。目前,大多数单位在农杆菌介导的转化过程中,用的受体系统是不成熟的合子胚或来自不成熟胚的胚性愈伤组织。针对成熟胚的愈伤组织诱导和转化有很多探索,但植株再生和转化效率低限制了其应用。其他外植体如萌动成熟胚、发芽种子、幼苗茎节、幼苗叶片、花药、茎尖分生组织、雄穗分生组织、雌穗分生组织等的转化效率均不太高,没有得到广泛应用。

点见表2。目前,大多数单位在农杆菌介导的转化过程中,用的受体系统是不成熟的合子胚或来自不成熟胚的胚性愈伤组织。针对成熟胚的愈伤组织诱导和转化有很多探索,但植株再生和转化效率低限制了其应用。其他外植体如萌动成熟胚、发芽种子、幼苗茎节、幼苗叶片、花药、茎尖分生组织、雄穗分生组织、雌穗分生组织等的转化效率均不太高,没有得到广泛应用。

表 1 不同玉米遗传转化技术方法的比较
Table 1 Comparison of different genetic transformation techniques in maize

转化方法 Transformation method	优 点 Advantage	缺 点 Disadvantage	代表性转化事件 Typical event
农杆菌介导转化	操作简单、转化效率高、再生植株可育性高、可转移大片段DNA、导入的外源基因拷贝数少、整合位点稳定、成本低	转化效率受载体类型、受体基因型、农杆菌以及转化各个环节条件影响,幼胚供应工作量大、成本高	5307、MIR162、MON89034、MON87427、98140、MON87419、MON87460等
基因枪转化	不受受体及受体基因型限制、操作简单	大多数转化事件仅能瞬时表达、导入的外源基因单拷贝少、转化效率低	MON863、GA21、NK603、MON832、BVL430101、MON810等
碳化硅纤维介导转化	操作简单,可用于悬浮细胞转化	转化效率低	DAS40278
电激转化	可用于原生质体、幼胚和愈伤组织的转化	转化效率低	MS3、MS6
PEG介导转化	可用于原生质体转化	转化效率低	T14、T25
花粉管通道法	不用建立原生质体和愈伤组织体系,无基因型限制	受DNA导入时间、浓度和除草剂筛选浓度等影响,转化效率低,PCR检测麻烦	无

表 2 主要玉米遗传转化受体系统的比较
Table 2 Comparison of different recipients in maize transformation

受 体 Recipient	优 点 Advantage	缺 点 Disadvantage
愈伤组织	来源广泛如幼胚、成熟胚、种子、叶片、幼穗等,能再生	只有第二种类型的愈伤组织有较好的再生能力
原生质体	可通过电激或PEG介导进行转化,再生能力弱	程序复杂,费工、费时,不易再生
悬浮细胞	可用于分离原生质体,或直接转化	再生较难
生殖细胞	可通过花粉管通道法或子房注射法转化	转化效率低
茎尖分生组织	可直接侵染、简单易操作	转化效率低,嵌合体多

1.3 受体基因型

理想的受体基因型是具有优良农艺性状的自交系。但由于受幼胚的农杆菌侵染能力、胚性愈伤组织形成能力和植株再生能力的影响,不同基因型的遗传转化存在很大的差异。大多数玉米自交系的幼

胚产生的是第一类愈伤组织(type I),难以转化,尽管通过培养基优化等措施,转化效率有所提高,但总体转化效率还是较低。目前,主要利用的是产生第二类愈伤组织(type II,来源于幼胚小盾片,具有脆、生长快、再生能力强的特点)的自交系,这类自交系具

有强烈的基因型依赖性,目前仅限于少数基因型,如杂交种 HiII(其亲本从 A188×B73 选出)、自交系 A188、A188/HiII 等,HiII 系统用得最多。

为了破解基因型依赖的问题,科学家从不同角度开展了大量理论研究和探索,一些优良自交系也逐渐用于遗传转化。杜邦先锋公司通过调整培养基配方(如葡萄糖、硫酸铜、细胞分裂素 6-苯甲酸嘌呤)来提高已商业化应用但为转化顽拗型的自交系的转化效率^[6]。吉林农业科学院把授粉后 24 h 的玉米胚珠用农杆菌直接侵染,2~3 周后分离出胚,再生出植株,通过这种方法可解决基因型依赖的问题,并且不用经历组织培养等过程^[7]。

Baby boom(BBM) 编码一个 AP2/ERF 转录因子,与根、种子、胚、茎尖分生组织发育有关,在分生组织干细胞以不分化状态进行维持的过程中有重要作用。*WUSCHEL(WUS)* 编码一个含同源域的转录因子,在植物的干细胞异化、早期胚胎发生、器官发生和开花过程中起重要作用。为了提高转化顽拗型自交系的转化效率,杜邦先锋公司通过玉米中的 *BBM* 和 *WUS2* 的同时过表达,发现可使转化顽拗型自交系如 PHH5G 得到转化^[8]。美国密苏里大学和罗德岛大学合作,使这两个基因同时过表达,并且加入一个脱水诱导的 *CRE/lox* 位点特异的重组系统,在农杆菌介导下,获得了正常的无标记转基因 B73 植株^[9]。

为了获得易转化的农艺性状优良的自交系,孟山都公司应用分子标记辅助选择方法,把 HiII 中的 5 个 QTL 转入迪卡公司的著名母本自交系 FBLL 中,创制出转化能力强的自交系^[10],但这些公司的用于转化的自交系往往拥有专利。通过广泛筛选,我国选出了一些相对易于转化的自交系如 18-599、丹 598、综 3、综 31 等用于实践。

1.4 选择标记

遗传转化过程中,需要在培养基中加入选择剂,选择剂可杀死非转化细胞,只留下转化细胞。最佳的选择剂对后续的再生、生根和植株生长没有负面影响。目前,抗生素(主要是潮霉素和卡那霉素)基因和除草剂(主要是草铵膦和草甘膦)基因是玉米遗传转化中最常用的负向选择标记基因。早期的转化过程中利用抗生素作选择剂较多,其中,利用 *nptII* 作选择标记基因用潮霉素作选择剂的共有 16 个转化事件商业化,但潮霉素现在已很少用于玉米遗传转化。除草剂选择标记系统有更多优越性,因为抗除草剂本身就是一种期望的农艺性状,*BAR* 和 *PAT* 是最常见的标记基因,*EPSPS* 和 *GAT* 也用得越来越多。近年来,利用甘露糖-6-磷酸异构酶(PMI)基因

manA 的甘露糖选择系统也有多个成功的例子。

在玉米中对无选择标记技术也有探索,其中,位点特异重组系统研究最多。孟山都公司应用 *Cre/lox* 系统去除选择标记基因^[11],应用双边界农杆菌转化载体,把选择标记基因放在骨架序列中,把目标基因放在 T-DNA 区域,可获得无标记的转基因植株^[12]。大连理工大学尝试把花柱去除后直接把外缘 DNA 滴在子房上,发现可获得无载体、无标记基因的转基因玉米植株^[13]。

1.5 玉米遗传转化相关性状的遗传与分子基础研究

玉米遗传转化的基因型依赖性是由遗传控制的。Krakowsky 等^[14]利用 H99×Mo17 的重组近交系(RIL)群体,对胚性愈伤组织形成能力进行了数量性状位点(QTL)定位,共检测到 8 个主效 QTL,并且存在上位性互作,认为该性状与激素有关。张红伟等^[15]利用 Mo17×黄早四的 RIL 群体,定位到控制出愈率、II 型愈伤组织诱导率、绿点和绿苗分化率的 8 个 QTL。潘光堂等^[16]利用 18-599×R15 的 F₂ 群体,检测到 5 个与胚性愈伤组织诱导率有关的 QTL。

玉米遗传转化过程中涉及到体细胞胚胎发生,这也牵涉到基因型依赖性问题。吉林大学对易再生自交系 H99 的胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织的差异基因表达进行分析,检测到 101 个与玉米胚性愈伤组织形成的候选基因^[17];对其蛋白组进行分析,检测到 15 个上调和 18 个下调表达的蛋白,认为生长素和胁迫信号可启动体细胞重编程和分裂,从而使与转录和代谢相关的蛋白出现差异表达^[18]。

四川农业大学分析了易转化自交系 18-599R 在幼胚愈伤组织诱导的 3 个阶段的转录组变化,共检测到 1 180 个转录因子在差异表达,特别是激素信号传导途径(包括细胞长大、分化、分裂、去分化等)中的转录因子(如 GA 信号传导相关的 ZmMYB138),其中 23 个转录因子受 miRNA 调控^[19];分析 18-599R 和不易转化自交系 B73 幼胚愈伤组织诱导的 3 个阶段的代谢组和蛋白组变化,发现其表达有很大差异,激素合成和转导能力的差异可能是基因型依赖的原因,在 18-599R 中组蛋白去乙酰化酶 2 和 ERF 转录因子表达降低,从而激活下游基因表达,促进了愈伤组织形成^[20]。墨西哥国立大学利用热带玉米 Tuxpeno 地方品种 VS-535,发现在其幼胚诱导的愈伤组织形成过程中,与胁迫响应和发育相关的 miRNA 表达水平上升,与激素响应相关的 miRNA 只是在诱导期间短暂增加^[21]。

体细胞胚胎发生受体激酶(SOMATIC EMBRYO-

GENESIS RECEPTOR KINASE, SERK)与体细胞胚胎发生有关。四川农业大学研究了玉米体细胞胚胎发生和 *ZmSERK* 在不同发育时期和激素处理下的基因表达之间的关系,发现 *ZmSERK1* 和 *ZmSERK2* 在维持胚胎发生过程中起重要作用, *ZmSERK3* 通过调节器表达水平在胚胎发生中有双重作用^[22]。中国农业科学院作科所针对玉米再生相关基因 *ZmLEC1*, 对 98 份玉米材料进行了序列分析,发现其中 4 个多态性位点与胚性愈伤组织形成能力存在显著关联^[23]。以上这些工作为解决基因型依赖性、愈伤组织形成和再生困难等问题提供了思路。

2 玉米转基因育种

玉米转基因育种涉及到抗虫、抗除草剂、优质、

抗逆、抗病、高产、生物反应器等多种性状,研发出的产品中以抗虫、抗除草剂最多,应用范围最广。

2.1 抗虫转基因玉米产品研发

玉米虫害十分严重,但由于玉米抗虫种质资源极度缺乏,利用转基因技术培育抗虫玉米新品种成为玉米育种中的主要途径。目前,抗虫基因主要来源于苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*),称为 *Bt* 基因。1993 年,Koziel 等应用基因枪转化方法,把 *Bt* 基因 *Cry1Ab* 转入一个优良自交系的幼胚中,获得一系列转化事件^[24],其中一个事件 Bt176 后来成为第一个转基因 *Bt* 玉米产品,由 Ciba-Geigy 公司在 1996 年释放。*Bt* 基因主要包括编码 Cry 类和 Cyt 类杀虫晶体蛋白基因以及编码 Vip 类营养期杀虫蛋白基因,但在商业化应用中 *cry* 类基因应用较多(表 3)。

表 3 已商业化应用的抗虫基因
Table 3 Major insect resistance genes used in commercial maize varieties

基 因 Gene	基因来源 Source	功能蛋白 Protein	功 能 Function
<i>cry1Ab</i>	苏云金杆菌 <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	Cry1Ab δ-内毒素蛋白	抗鳞翅目昆虫
<i>cry1Ac</i>	苏 云 金 杆 菌 <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> strain HD73	Cry1Ac δ-内毒素蛋白	抗鞘翅目昆虫特别是玉米根萤叶甲
<i>cry1F</i>	苏云金杆菌 <i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i>	Cry1F δ-内毒素蛋白	抗鳞翅目昆虫
<i>cry1Fa2</i>	来自苏云金杆菌 <i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> 的 <i>cry1F</i> 合成基因	修饰过的 Cry1F δ-内毒素蛋白	抗鳞翅目昆虫
<i>mcry1F</i>	来自苏云金杆菌 <i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> 的 <i>cry1F</i> 合成基因	修饰过的 Cry1F δ-内毒素蛋白	抗鳞翅目昆虫
<i>cry1A.105</i>	来自苏云金杆菌 <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>Kumamotoensis</i> 的 <i>cry1Ab</i> 、 <i>cry1F</i> 、 <i>cry1Ac</i> 合成基因	Cry1A.105 蛋白(包括 Cry1Ab、Cry1F、Cry1Ac 蛋白)	抗鳞翅目昆虫
<i>cry2Ab2</i>	苏云金杆菌 <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kumamotoensis</i>	Cry2Ab δ-内毒素蛋白	抗鳞翅目昆虫
<i>cry3Bb1</i>	苏云金杆菌 <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kumamotoensis</i>	Cry3Bb1 δ-内毒素蛋白	抗鞘翅目昆虫特别是玉米根萤叶甲
<i>ecry3.1Ab</i>	来自苏云金杆菌 <i>B. thuringiensis</i> 的 <i>Cry3A</i> 和 <i>Cry1Ab</i> 合成基因	Cry3A-Cry1Ab δ-内毒素蛋白	抗鳞翅目和鞘翅目昆虫
<i>mcry3A</i>	来自苏云金杆菌 <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>tenebrionis</i> 的 <i>cry3A</i> 合成基因	修饰过的 Cry3A δ-内毒素蛋白	抗鞘翅目昆虫特别是玉米根萤叶甲
<i>cry9C</i>	苏 云 金 杆 菌 <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>tolworthi</i> strain BTS02618A	Cry9C δ-内毒素蛋白	抗鞘翅目昆虫特别是玉米根萤叶甲
<i>cry34Ab1</i>	苏云金杆菌 <i>B. thuringiensis</i> strain PS149B1	Cry34Ab1 δ-内毒素蛋白	抗鞘翅目昆虫特别是玉米根萤叶甲
<i>vip3Aa20</i>	苏云金杆菌 <i>B. thuringiensis</i> strain AB88	营养体杀虫蛋白(<i>vip3Aa</i> 变异体)	抗鳞翅目昆虫
<i>pinII</i>	马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	蛋白酶抑制剂蛋白	通过降低可消化能力和叶片营养品质,提高抗虫性
<i>dvsnf7</i>	西方玉米根萤叶甲(<i>Diabrotica virgifera</i>)	在 双 链 RNA 转 录 本 上 携 带 有 <i>WCR Snf7</i> 基因一个 240 bp 的片段	RNAi 干扰导致目标基因 <i>Snf7</i> 的功能下调,使西方玉米根萤叶甲致死

抗虫转基因玉米育种出现以下发展趋势:

(1)靶标昆虫的范围不断拓展。早期的抗虫对象主要是鳞翅目昆虫玉米螟,选择的基因以 *cry1Ab* 和 *cry1F* 为主,后来通过对 *Bt* 基因的大范围挖掘,抗鞘翅目昆虫特别是玉米根萤叶甲的产品越来越多。如把大麦半胱氨酸蛋白酶抑制剂基因 *HvCPI-6* 导入玉米,发现转基因株系可通过改变半胱氨酸蛋白酶抗植食性红蜘蛛(*Tetranychus urticae*、*Brevipalpus chilensis*)^[25]。抗生物素蛋白是一种蛋清中糖蛋白,其基因导入玉米后,发现在玉米贮藏期间能抗甲壳虫和飞蛾等多种昆虫,但对老鼠没有毒性^[26]。

(2)基因挖掘和应用不断拓展。一是 *Bt* 基因种类增多,如 *cry3*、*cry9*、*cry34*、*cry35* 类基因均得到商业化应用。中国农业科学院植保所从苏云金杆菌 Btc007 菌株中鉴定出 *cry1Ie* 基因,获得的转化事件 IE09S034 可抗亚洲玉米螟、大豆食心虫和棉铃虫等^[27]。华中农业大学对苏云金杆菌中的 *cry1Ca5* 基因进行了优化,获得的转基因植株对鳞翅目昆虫有抗性^[28]。中国农业科学院生物技术所从苏云金杆菌 BT8 菌株中克隆出 *cry1Ah* 基因,通过玉米密码子

偏好性对其进行了优化,转基因玉米中目标蛋白表达更高,抗虫性更好^[29]。二是经密码子优化的人工合成基因增多,如 *cry1Fa2*、*mcry1F*、*mcry3A* 等,嵌合不同 *Bt* 基因的人工合成基因开始出现,如 *cry1A.105*、*ecry3.1Ab* 等。三是一些新的基因也在挖掘和利用中。来自马铃薯的蛋白酶抑制剂基因 *pinII* 得到商业化应用。中国科学院遗传发育所和四川农业大学也有在转基因抗虫玉米中利用豇豆胰蛋白酶抑制剂基因 *cpti* 的报道^[30]。来自绿针假单胞菌(*Pseudomonas chlororaphis*)的杀虫蛋白 IPD072Aa 可抗西方玉米根萤叶甲^[31]。来自蝎子(*Buthus martensii*)的神经毒素基因 *BmkIT*、来自烟草夜蛾(*Manduca sexta*)的几丁质酶基因 *chi* 也有抗虫效果^[32]。吉林省农业科学院将半夏(*Pinellia temata*)凝集素基因(*pta*)与 *cry1Aa* 构建双价表达载体,获得了转基因植株^[33]。

(3)与抗虫性状结合的复合性状新品种培育成为主要方向。迄今为止,获得商标的仅抗虫的转化事件仅6件(表4),目前在商业化推广应用中的绝大多数携带抗虫基因的转化事件是复合性状产品,其基础大多是这些事件。

表4 获得商标的抗虫转化事件
Table 4 Insect resistant events with commercial trademarks

转化事件 Event	基 因 Gene	获得方法 Transformation method	开发机构 Institution	商标名称 Trademark
5307	<i>ecry3.1Ab</i>	农杆菌转化	先正达	Agrisure® Duracade™
MIR162	<i>vip3Aa20</i>	农杆菌转化	先正达	Agrisure™ Viptera
MIR604	<i>mcry3A</i>	农杆菌转化	先正达	Agrisure™ RW
MON863	<i>cry3Bb1</i>	基因枪转化	孟山都	YieldGard™ Rootworm RW, MaxGard™
MON89034	<i>cry2Ab2</i> 、 <i>cry1A.105</i>	农杆菌转化	孟山都	YieldGard™ VT Pro™

2.2 抗除草剂转基因玉米产品研发

目前,得到商业化应用的抗除草剂转化事件(表5),涉及到12个基因(表6)。除表5列出的抗除草剂产品外,推广应用的转基因产品中多为复合性状产品。其中,来自根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens* strain CP4)的 *cp4 epsps* 应用较为广泛,孟山都公司获得的转化事件 NK603 在后续的抗除草剂育种中使用较多^[34]。此外还有一些基因在挖掘和应用之中,中国农业科学院作物科学所对来自细菌的5-烯醇丙酮酰亚胺-3-磷酸合成酶(EPSPS)编码基因 *AM79 aroA* 进行密码子优化,把合成的基因 *mAM79* 转入玉米后表现出对草甘膦的4倍剂量抗性^[35];把谷子叶绿体乙酰基辅酶A羧化酶基因转入玉米,可

提高玉米抗除草剂稀禾定能力和油分含量^[36]。先锋公司应用嵌合RNA/DNA寡核苷酸技术,针对玉米中的乙酰羟酸合成酶基因(*AHAS*)进行单碱基突变,提高了玉米咪唑啉酮除草剂抗性^[37]。

2.3 抗逆转基因玉米产品研发

干旱、盐碱等非生物胁迫因子严重影响玉米生产,开展抗逆转基因玉米新品种培育是解决这个问题有效手段。但目前已商业化应用的转基因抗逆玉米仅有1例,即来自孟山都和巴斯夫公司的抗旱玉米 Genuity® DroughtGard™。该转化事件为 MON87460,目的基因 *cspB* 来自枯草杆菌(*Bacillus subtilis*),编码冷激蛋白B,该蛋白的功能是通过保持水分胁迫下RNA稳定性和翻译,维持正常细胞功

能^[38]。

鉴于抗逆性的重要性,我国近年来在抗逆转基因产品开发方面做了大量工作,取得了一些进展。在抗旱性方面,山东大学把大肠杆菌中的胆碱脱氢酶基因 *betA*^[39]、把盐土植物盐芥(*Thellungiella halophila*)中的液泡 H⁺-焦磷酸酶基因 *TsVP* 转入玉米^[40];山西省农业科学院把榆钱菠菜(*Atriplex hortensis*)的甜菜碱醛脱氢酶基因 *BADH* 转入玉米^[41];中国农业大学把拟南芥钼辅因子硫化酶基因 *LOS5* 转入玉米^[42]

获得了抗旱性表型良好的转基因玉米。在耐盐性方面,中国农业大学 1998 年把大肠杆菌糖醇代谢关键基因 6-磷酸山梨醇脱氢酶基因 *gutD* 转入玉米,检测到山梨醇的合成和积累,耐盐性明显好于对照^[43]。山东大学把来自大肠杆菌的胆碱脱氢酶基因 *betA* 转入玉米,发现自交系和杂交种的耐盐性均有明显提高^[44]。但目前我国转基因抗逆玉米进入生物安全评价环境释放阶段的转化事件很少。

表 5 重要的抗除草剂转化事件
Table 5 Important events with herbicide resistance in maize

转化事件 Event	基 因 Gene	获得方法 Transformation method	开发机构 Institution	商标名称 Trademark
DAS40278	<i>aad-1</i>	碳化硅纤维介导转化	陶氏	Enlist™ Maize
98140	<i>zm-hra ,gat4621</i>	农杆菌转化	杜邦先锋	Optimum™ GAT™
GA21	<i>mepsps</i>	基因枪转化	孟山都	Roundup Ready™ Maize, Agrisure™GT
MON87427	<i>cp4 epsps (aroA:CP4)</i>	农杆菌转化	孟山都	Roundup Ready™ Maize
NK603	<i>cp4 epsps (aroA:CP4)</i>	基因枪转化	孟山都	Roundup Ready™ 2 Maize
MON832	<i>goxv247 ,cp4 epsps (aroA:CP4)</i>	基因枪转化	孟山都	Roundup Ready™ Maize
NK603× T25	<i>pat (syn) ,cp4 epsps (aroA:CP4)</i>	杂交方法基因叠加	孟山都	Roundup Ready™ Liberty Link™ Maize
MON87419	<i>dmo ,pat</i>	农杆菌转化	孟山都	
DLL25 (B16)	<i>bar</i>	基因枪转化	孟山都	
T14,T25	<i>pat (syn)</i>	原生质体转化	拜耳	Liberty Link™ Maize
VCO-Ø1981-5	<i>epsps grg23ace5</i>	农杆菌转化	Genective S.A.	
HCEM485	<i>2mepsps</i>	气溶胶束注射	Stine Seed Farm	
MZHG0JG	<i>2mepsps ,pat</i>	农杆菌转化	先正达	

表 6 已商业化应用的抗除草剂基因
Table 6 Herbicide resistance genes in commercial maize varieties

基 因 Gene	基因来源 Source	功能蛋白 Protein	功 能 Function
<i>aad-1</i>	来自草卵圆线虫 <i>Sphingobium herbicidovorans</i> 的 <i>aad-1</i> 合成基因	aryloxyalkanoate 加双氧酶 1(AAD-1)	抗 2,4-D 除草剂
<i>pat</i>	产绿色链霉菌 <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	磷甲素 N-乙酰转移酶(PAT)	抗草铵磷
<i>pat (syn)</i>	来自产绿色链霉菌 <i>Streptomyces viridochromogenes</i> strain Tu 494 的合成基因	磷甲素 N-乙酰转移酶(PAT)	抗草铵磷
<i>bar</i>	吸水链霉菌 <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	磷甲素 N-乙酰转移酶(PAT)	抗草铵磷
<i>mepsps</i>	玉米 <i>Zea mays</i>	修饰过的 5-烯醇丙酮酰亚胺-3-磷酸合成酶(EPSPS)	抗草甘膦

续表6 Continued 6			
基 因 Gene	基因来源 Source	功能蛋白 Protein	功 能 Function
<i>2mepsps</i>	玉米 <i>Zea mays</i>	5-烯醇丙酮酰亚胺-3-磷酸合成酶 (EPSPS) (双突变版本)	抗草甘膦
<i>cp4 epsps (aroA:CP4)</i>	根癌农杆菌 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain CP4	抗除草剂类型的5-烯醇丙酮酰亚胺-3-磷酸合成酶(EPSPS)	抗草甘膦
<i>epsps grg23ace5</i>	来自土壤细菌球形节杆菌 <i>Arthrobacter globiformis</i> 的 <i>epsps grg23</i> 合成基因	修饰过的5-烯醇丙酮酰亚胺-3-磷酸合成酶 (EPSPS) 或 EPSPS ACE5 蛋白	抗草甘膦
<i>gat4621</i>	地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i>	草甘膦N-乙酰转移酶	抗草甘膦
<i>goxv247</i>	人苍白杆菌 <i>Ochrobactrum anthropi</i> strain LBAA	草甘膦氧化酶	抗草甘膦
<i>zm-hra</i>	玉米 <i>Zea mays</i>	抗除草剂类型的乙酰乙酸合成酶(als)	抑制乙酰乙酸合成酶类的除草剂,如磺脲类 sulfonylurea 、咪唑啉酮 imidazolinone
<i>dmo</i>	嗜麦芽寡养单胞菌 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain DI-6	麦草畏单氧化酶	抗麦草畏 dicamba 除草剂 (2-methoxy-3,6-dichlorobenzoic acid)

2.4 雄性不育转基因玉米产品研发

玉米制种问题一直困扰着种业发展,研发智能不育亲本具有很重要的意义。目前,已商业化应用的雄性不育基因仅4个(表7),而真正商业化推广的仅有1个转化事件32138,该转化事件由杜邦先锋公司利用农杆菌介导的转化方法获得,涉及 *ms45* 和

zm-aa1 两个来自玉米的基因,商标是32138 SPT maintainer。我国也很早就开始雄性不育玉米转基因研究,2000年中国农业大学用玉米花粉启动子 *Zm13*,采用基因枪转化方法把 *barnase* 基因导入玉米,获得的转基因植株中有5株的花粉部分不育^[45]。

表7 已商业化应用的授粉控制系统基因
Table 7 Major male sterility genes used in commercial maize varieties

基 因 Gene	基因来源 Source	功能蛋白 Protein	功 能 Function
<i>ms45</i>	玉米 <i>Zea mays</i>	ms45 蛋白	通过恢复小孢子细胞壁发育来恢复育性
<i>zm-aa1</i>	玉米 <i>Zea mays</i>	α淀粉酶	水解淀粉导致花粉不育
<i>dam</i>	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	DNA 腺嘌呤甲基酶	通过干预正常花药和花粉发育导致雄性不育
<i>barnase</i>	解淀粉芽孢杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	谷氨酰胺酶核糖核酸酶	通过干预花药毡层细胞的RNA产生导致雄性不育

2.5 抗病转基因玉米产品研发

目前尚没有抗病转基因玉米产品商业化,但其前景光明。在抗病毒方面,中国农业大学把来自大肠杆菌的双链RNA核糖核酸内切酶基因 *rnc70* 在玉米中表达,发现可以提高玉米抗双链RNA病毒侵染的能力,提高玉米粗缩病抗性^[46]。通过构建无标记基因的甘蔗花叶病毒(SCMV)反义外壳蛋白基因(*cp*)

表达载体,转入玉米自交系综3后,获得的转基因植株抗玉米矮花叶病^[47],将该病毒的复制酶基因的反向重复序列转入玉米,也获得相似效果^[48]。四川农业大学应用RNAi技术,针对玉米矮花叶病毒病的蛋白酶基因 *PI* 设计表达载体,转基因玉米表现出抗性^[49]。南非开普敦大学把玉米条纹病毒复制相关蛋白基因 *rep* 转入玉米,提高了玉米条纹病毒病抗

性^[50]。

玉米锈病是一种严重的真菌病害,美国 Donald Danforth 植物科学中心在玉米中过表达单组分双链 RNA 球状真菌病毒(Totivirus)抗真菌蛋白 KP4,发现对锈病抗性好,且不影响植株发育^[51]。*Lr34* 在小麦中可提供多种病害如锈病和白粉病的持久抗性,该基因编码一个 ATP 结合盒转运蛋白,转基因玉米表现出对普通锈病和大斑病的抗性,并且对植株生长没有影响^[52]。

由多个曲霉属真菌产生的黄曲霉毒素严重影响到玉米质量和人类及动物健康安全。美国亚利桑那大学应用 RNAi 技术,使编码黄曲霉毒素生物合成途径中的一个关键酶类基因 *aflC* 在子粒中特异性沉默,从而使转基因子粒中几乎检测不到黄曲霉毒素^[53]。

2.6 优质转基因玉米产品研发

迄今为止,已商业化的优质转基因玉米产品仅有 1 个,即 Renessen LLC 公司通过基因枪转化法,把谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)中的二氢甲基吡啶酸合成酶基因 *cordapA* 转入玉米,获得可提高赖氨酸含量的转化事件 LY038,其商标名为 *Mavera™ Maize*。中国农业大学把马铃薯微管相关蛋白 SBgLR 转入玉米,通过在种子中特异表达,发现子粒中醇溶蛋白和非醇溶蛋白以及赖氨酸含量均有显著提高^[54]。美国衣阿华州立大学在玉米胚乳中表达猪奶 α -乳白蛋白,赖氨酸含量比对照提高了 29%~47%^[55]。使棉花中的赖氨酸富集蛋白基因 *GhLRP* 在玉米种子中特异表达,也可提高赖氨酸含量^[56]。为了提高玉米子粒营养品质特别是必需氨基酸含量,孟山都公司通过应用嵌合双链 RNA 技术使 19 和 22kD α -玉米醇溶蛋白含量降低,从而提高赖氨酸和色氨酸含量^[57]。美国罗格斯大学将大肠杆菌的 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸盐还原酶基因(*EcPARR*)在玉米叶中特异表达,使玉米种子中富含甲硫氨酸的 10-kDa δ -醇溶蛋白含量得到提高,并且其他醇溶蛋白含量没有降低;转基因株系的甲硫氨酸含量比高甲硫氨酸自交系 B101 提高 57.6%,用作鸡饲料后显著提高了其日增重量^[58]。把子粒苋 11S 球蛋白基因导入玉米,转基因株系的总蛋白含量提高 32%,一些必需氨基酸含量提高 8%~44%^[59]。

为了提高油分含量,孟山都公司把来自真菌 *Umbelopsis ramanniana* 和粗糙链孢霉(*Neurospora crassa*)中的二酰甘油 O-酰基转移酶基因 *DGAT2* 转入玉米,发现来自后者基因的转基因株系油分含量可提高 26%^[60]。杜邦先锋公司把玉米 *LEAFY COTY-*

LEDON1(ZmLEC1) 基因过表达,发现油分含量可提高高达 40%,但种子发芽和叶片生长变差;*LEC1* 基因下游有个转录因子 *WRINKLED1(ZmWRI1)*,其过表达则使油分含量提高的同时没有负面影响^[61]。美国蒙大拿州立大学把控制小麦子粒硬度的 Puroindoline 蛋白 a 和 b 的基因 *Pina* 和 *Pinb* 转入玉米,发现种子油分含量可提高 25.23%^[62],可提高淀粉含量 4.86%、降低子粒硬度^[63]。

在维生素含量提升方面,西班牙莱里达大学应用组合核转化技术,把 5 个由不同胚乳特异启动子驱动的一类胡萝卜素生物合成基因转入到缺乏胚乳类胡萝卜素合成的白玉米品种中,发现胡萝卜素和其他类胡萝卜素含量大幅度提高,其中过表达玉米 *psy1* 基因和来自菠萝泛菌(*Pantoea ananatis*)的 *crtI* 基因的转化事件形成了没有大面积推广的产品(商标为 Carolight[®])^[64]。针对维生素 A 缺乏的问题,美国衣阿华州立大学把草生欧文菌(*Erwinia herbicola*)的 *crtB* 和 *crtI* 基因在胚乳中特异表达,转基因株系的一类胡萝卜素含量提高了 34 倍^[65]。德国歌德大学进一步通过过表达八氢番茄红素合成酶基因,并敲除番茄红素 ϵ -环化酶基因,从而提高了转基因株系的虾青素含量^[66]。该大学科技人员还应用基因枪转化方法,利用来自玉米的 *psy1*、菠萝泛菌的 *crtI*、水稻的 *dhar*、大肠杆菌的 *folE* 等基因,通过同时改造 3 个不同的代谢途径,使转基因玉米中 3 种维生素含量得到显著提高, β -胡萝卜素含量提高了 168 倍、抗坏血酸含量提高了 5 倍、叶酸含量提高了 1 倍^[67]。中国农业科学院生物技术所把大豆生育酚甲基转移酶基因 *GmTMT2a* 转入玉米,发现 α -生育酚含量可提高 3~4.5 倍^[68]。

直链淀粉是重要的工业原料,但普通玉米中直链淀粉含量一般很低。吉林农业大学通过应用反义 RNA 技术抑制玉米淀粉分枝酶 *sbe2a* 的表达,直链淀粉含量最高提高了 84.3%,但总淀粉含量差异不大^[69]。山东大学应用 RNAi 技术,通过抑制淀粉分枝酶基因 *ZmSBEIIa* 和 *ZmSBEIIb* 的表达,转基因株系子粒的直链淀粉含量最高可达 55.89%,并且淀粉含量和子粒产量没有降低^[70]。东北师范大学在抑制这两个基因的同时,过表达玉米中的 *Bt2*、*Sh2*、*Sh1* 和 *GbssIIa* 基因以提高蔗糖合成酶、AGP 酶和淀粉合成酶活性,转基因株系的胚乳淀粉含量增加 2.8%~7.7%,直链淀粉含量增加 37.8%~43.7%^[71]。

美国佛罗里达大学应用反义策略,在玉米中表达反义高粱 O-甲基转移酶基因 *omt*,使玉米中的 O-甲基转移酶表达水平降低,从而降低木质素含

量,提高玉米饲用品质^[72]。此外,中国农业科学院生物技术所与奥瑞金公司合作,利用基因枪转化法把黑曲霉(*Aspergillus niger*)中的肌醇六磷酸酶基因 *phyA2* 转入玉米,可使种子中植酸磷降解为动物可吸收的无机磷^[73],转化事件 BVLA430101 获得农业部生产应用证书,但未实际推广应用。中国农业科学院饲料所将来自 *Gibberella* sp. Strain F75 的抗蛋白酶的 α -牛乳糖基因 *aga-F75* 转入玉米,使其在胚中表达,每 kg 玉米种子中的 Aga-F75M 表达水平达到 1 万个单位^[74]。为了去除动物饲料中的抗营养因子甘露聚糖,中国农业科学院饲料所把来自 *Bispora* sp. MEY-1 的 β -甘露聚糖酶基因 *man5As* 转入玉米,使其在胚中特异表达,在种子中的表达水平达到 26 860 U/kg^[75]。为了去除抗营养因子葡聚糖,在动物饲料中往往加入外来葡聚糖酶,中国农业科学院生物技术所与饲料所合作,把修饰过的来自 *Bispora* sp. MEY-1 的酸性 endo- β -1,3-1,4-葡聚糖酶基因 *Bgl7A* 转入玉米,子粒中的表达水平达 779 800 U/kg,是对照的 236 倍^[76]。以上这些工作,均可为降低饲料成本发挥重要作用。

2.7 高产转基因玉米产品研发

提高玉米产量是玉米育种的永恒主题,这里的产量传统上是指食用或饲用的子粒产量,现在也指加工后的生物乙醇产量。提高子粒产量的转基因途径探索不多,其中有意义的例子包括杜邦先锋公司把玉米本身的 *ARGOS1(ZAI)* 基因进行过表达,发现可提高玉米生长量、子粒产量和抗旱性,当把该基因的两个优良等位基因进行基因叠加后,产量和适应性会更好^[77]。中科院上海生命科学院在玉米中过表达来自拟南芥、水稻和玉米本身的细胞壁转化酶基因,发现转基因株系的产量得到显著提高,子粒大小、子粒数和淀粉含量均有提高^[78]。Wang 等^[79]把大肠杆菌的葡萄糖焦磷酸化酶基因 *glgC16* 导入玉米,发现可以提高种子重量。

先正达公司利用农杆菌转化方法,把来自 *Thermococcales* spp. 的 *amy797E* 基因(其目标蛋白是热稳定的 α 淀粉酶)进行修饰再人工合成后转入玉米,获得转化事件 3272,发现可以提高乙醇产量,该产品商标名为 Enogen[™]。比利时根特大学把来自拟南芥的赤霉酸生物合成途径中的关键酶 *GA20-OXI-DASE1(GA20-OXI)* 基因转入玉米,发现温室条件下营养体生物量显著高于对照,但大田试验结果不一致^[80]。Fornale 等^[81]应用 RNAi 技术,抑制玉米中肉桂醇脱氢酶(CAD)的表达,发现不同组织中细胞壁组分发生变化,大田条件下生物量增加,乙醇产量提

高。在生物乙醇生产过程中,需要加入 α -淀粉酶和淀粉葡糖苷酶来降低子粒淀粉,成本高昂,针对这个问题,衣阿华州立大学把来自热厌氧菌(*Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus*) 编码 amylopullulanase(APU)的基因转入玉米,淀粉酶和支链淀粉酶在种子中均得到高表达,乙醇转化效率达到 90.5%^[82]。

2.8 养分高效利用转基因玉米产品研发

养分高效利用的玉米转基因产品尚未商业化应用,但研究上取得了一定进展。英国草地和环境研究所把根癌农杆菌中的异戊烯转移酶基因 *IPT* 用衰老相关启动子 P_{SEE1} 驱动后转入玉米,发现在低氮条件下能推迟衰老^[83]。总体来说,提高氮磷钾利用效率的研究成果公开发表的还不多。

2.9 生物反应器转基因玉米产品研发

玉米是用于生物反应器很好的作物之一,每 hm^2 玉米可产重组蛋白 74 ~ 740 $\text{g}^{[84]}$,利用玉米进行生物反应器产品开发取得了突破性进展。ProdiGene 公司在 1997 年利用玉米生产抗生物素蛋白 avidin,每 hm^2 产值可达 500 万美元^[85];先锋公司在 1999 年利用玉米生产抑酶肽^[86]。目前,针对产生肠毒素的大肠杆菌(导致腹泻)的疫苗原型已进入临床 I 期评估中,转基因玉米表达的目标蛋白是大肠杆菌热不稳定肠毒素的 B 亚基(LTB)^[87]。另有一些针对细菌和病毒的转基因玉米疫苗产品处于临床前期的评估阶段,其中包括表达来自胸膜肺炎放线杆菌(导致肺炎)的 ApxIIA 抗原、来自猪繁殖呼吸综合征病毒 PRRSV 的 M 蛋白、来自流感病毒 A 的 H3N2 株系的核蛋白、来自绵羊狂犬病毒的 G 蛋白、来自肝炎 B 病毒的肝炎 B 表面抗原(HBsAg)^[88]、来自口蹄疫病毒的 VP1 蛋白^[89]、来自新堡病毒的 F 蛋白^[90]、来自猪肠胃炎病毒的 S 蛋白等。流感病毒核蛋白(NP)是一种 RNA 结合蛋白,在不同病毒株系中高度保守,可作为一种普适疫苗靶标,美国衣阿华州立大学使 H3N2 猪源流感病毒的 NP 基因在玉米胚乳中表达, T3 代种子中的表达水平达到 70 $\mu\text{g/g}^{[91]}$ 。溶酶体贮积症是一种遗传病,最好的方法是酶替代治疗,为了在植物中生产用于治疗的酶,加拿大 Simon Fraser 大学用玉米种子胚乳来表达 α -L-艾杜糖苷酸酶,经济效益显著^[92]。西班牙莱里达大学还用玉米来生产可中和人类艾滋病毒(HIV)的单克隆抗体 2F5^[93]。

另外,玉米也用于其他蛋白或代谢产物的生产。美国 ProdiGene 公司用转基因玉米生产天然甜味蛋白 brazzein(来自一种非洲植物五倍子 *Pentadiplandra brazzeana*),其表达水平可达到玉米种子中可溶蛋白总量的 4%,纯化产品的甜度可达到蔗糖的

1 200 倍^[94]。锰过氧化物酶(MnP)可用于降解木质素,在工业上有重要用途,该公司把来自黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)的 *MnP1* 基因转入玉米种子中特异表达,取得良好效果^[95]。杜邦先锋公司把来自突变链球菌(*Streptococcus mutans*)的 *gtfD* 基因在玉米子粒中表达,α-葡聚糖含量在成熟种子中为干重的 0.8% ~ 14%^[96]。Cel6A 是红褐肉座菌(*Hypocrea jecorina*)产生的纤维二糖水解酶(用于生物转化过程的一种昂贵酶)的一种,美国阿肯色州立大学将其在玉米胚乳中表达^[97],把来自 *Acidothermus cellulolyticus* 的 E1 纤维素酶基因、来自 *Trichoderma reesei* 编码纤维二糖水解酶 I 的基因转入玉米,效益显著^[98]。美国 Agrivida 公司也尝试利用玉米来生产糖苷水解酶家族 10 种木聚糖酶^[99]。

2.10 复合性状转基因玉米产品研发

近年来聚合多个基因的基因叠加(gene stacking)技术得到飞速发展,其中包括仅涉及一个性状的基因叠加和涉及多种性状的基因叠加。在遗传转化环节通过多基因单载体转化、多基因多载体共转化等实现基因叠加是重要途径,获得了一批有重要价值的复合性状转化事件(表 8)。多基因单载体转化方

法的困难在于 T-DNA 过大会大大降低转化效率,但成功的报道不少。利用连接子多肽 LP4/2A 把抗虫基因 *cryIAh* 和抗除草剂基因 *2mG2-epsps* 连在一起构建协同表达载体 p2EPUHLGN,转基因玉米株系目的性状表达正常^[100]。多基因多载体共转化方法简单有效,但由于插入位点是随机的,需要更多的转化事件来进行后续筛选。

在目前商业化应用的复合性状转化事件中,大多数是通过不同转化事件之间的杂交后代筛选获得的(表 9)。其中主要是抗虫抗除草剂两个性状复合的事件,但也有抗虫优质、抗虫高产(乙醇产量高)、抗除草剂高产、抗除草剂抗旱的转化事件。在抗虫抗除草剂产品中,孟山都开发的聚合 8 个基因的 Genuity® SmartStax™最为著名,事实上目前该公司还开发了聚合 10 个基因的转基因产品(转化事件为 MON87427 × MON89034 × TC1507 × MON87411 × 59122×DAS40278),2017 年已开始批准进入市场。此外,还有在抗虫可除草剂的基础上,把抗旱或高产基因加入其中获得的转化事件,也很快会实现产业化。

表 8 直接转化获得的重要复合性状转化事件
Table 8 Important events with gene stacking through direct transformation

转化事件 Event	性 状 Trait	基 因 Gene	获得方法 Transformation method	开发机构 Institution	商标名称 Trademark
676、678、680	抗除草剂、雄性不育	<i>pat ,dam</i>	基因枪转化	杜邦先锋	
MS3、MS6	抗除草剂、雄性不育	<i>bar ,barnase</i>	电击法转化	拜耳	InVigor™ Maize
CBH-351	抗虫、抗除草剂	<i>bar ,cry9C</i>	基因枪转化	拜耳	Starlink™ Maize
Bt10	抗虫、抗除草剂	<i>cryIAb ,pat</i>	农杆菌转化	先正达	Bt10
Bt11	抗虫、抗除草剂	<i>cryIAb ,pat</i>	基因枪转化	先正达	Agrisure™ CB/LL
Bt176	抗虫、抗除草剂	<i>cryIAb ,bar</i>	基因枪转化	先正达	NaturGard KnockOut™, Maximizer™
MZIR098	抗虫、抗除草剂	<i>ecry3.1Ab ,mcry3A ,pat</i>	农杆菌转化	先正达	
DBT418	抗虫、抗除草剂	<i>cryIAc ,bar ,pinII</i>	基因枪转化	孟山都	Bt Xtra™ Maize
MON810	抗虫、抗除草剂	<i>cryIAb ,goxv247 ,cp4 epsps</i>	基因枪转化	孟山都	YieldGard™, MaizeGard™
MON88017	抗虫、抗除草剂	<i>cp4 epsps ,cry3Bb1</i>	农杆菌转化	孟山都	YieldGard™ VT™ Rootworm™ RR2
MON87411	抗虫、抗除草剂	<i>cry3Bb1 ,cp4 epsps ,dvsnf7</i>	农杆菌转化	孟山都	
MON809、MON802、 MON801	抗虫、抗除草剂	<i>cryIAb ,cp4 epsps , goxv247</i>	基因枪转化	孟山都	
59122	抗虫、抗除草剂	<i>pat ,cry34Ab1 ,cry35Ab1</i>	农杆菌转化	陶氏和杜邦先锋	Herculex™ RW
TC1507	抗虫、抗除草剂	<i>cryIFa2 ,pat</i>	基因枪转化	陶氏杜邦先锋	Herculex™ I, Herculex™ CB
TC6275	抗虫、抗除草剂	<i>bar ,mocryIF</i>	农杆菌转化	陶氏	
4114	抗虫、抗除草剂	<i>cryIF ,cry34Ab1 , cry35Ab1 ,pat</i>	农杆菌转化	杜邦先锋	

表9 通过杂交等手段获得的重要复合性状转化事件

Table 9 Important events with gene stacking through hybridization of different transformed events in commercial maize varieties

转化事件 Event	性 状 Trait	基 因 Gene	开发机构 Institution	商标名称 Trademark
LY038×MON810	抗虫、高赖氨酸	<i>cordapA</i> 、 <i>cry1Ab</i>	Renessen LLC	Mavera™ YieldGard™ Maize
5307×MIR604×Bt11× TC1507×GA21	抗虫、抗除草剂	<i>ecry3.1Ab</i> 、 <i>mcry3A</i> 、 <i>cry1Ab</i> 、 <i>pat</i> 、 <i>cry1Fa2</i> 、 <i>mepsps</i>	先正达	Agrisure® Duracade™ 5122
5307×MIR604× Bt11× TC1507×GA21×MIR162	抗虫、抗除草剂	<i>ecry3.1Ab</i> 、 <i>mcry3A</i> 、 <i>cry1Ab</i> 、 <i>pat</i> 、 <i>cry1Fa2</i> 、 <i>mepsps</i> 、 <i>vip3Aa20</i>	先正达	Agrisure® Duracade™ 5222
BT11×59122×MIR604× TC1507×GA21	抗虫、抗除草剂	<i>cry1Ab</i> 、 <i>cry1Fa2</i> 、 <i>pat</i> 、 <i>mepsps</i> 、 <i>mcry3A</i> 、 <i>cry34Ab1</i> 、 <i>cry35Ab1</i>	先正达	Agrisure® 3122
Bt11×GA21	抗虫、抗除草剂	<i>cry1Ab</i> 、 <i>pat</i> 、 <i>mepsps</i>	先正达	Agrisure™ GT/CB/LL
Bt11×MIR162	抗虫、抗除草剂	<i>pat</i> 、修饰过的 <i>cry1Ab</i> 、 <i>vip3Aa20</i>	先正达	Agrisure® Viptera™ 2100
Bt11×MIR162×GA21	抗虫、抗除草剂	<i>cry1Ab</i> 、 <i>vip3Aa20</i> 、 <i>pat</i> 、 <i>mepsps</i>	先正达	Agrisure® Viptera™ 3110
BT11×MIR162×MIR604	抗虫、抗除草剂	<i>cry1Ab</i> 、 <i>pat</i> 、 <i>mcry3A</i> 、 <i>vip3Aa20</i>	先正达	Agrisure® Viptera™ 3100
Bt11×MIR162×MIR604× GA21	抗虫、抗除草剂	<i>cry1Ab</i> 、 <i>pat</i> 、 <i>mcry3A</i> 、 <i>vip3Aa20</i> 、 <i>mepsps</i>	先正达	Agrisure® Viptera™ 3111, Agrisure® Viptera™ 4
Bt11×MIR162×TC1507× GA21	抗虫、抗除草剂	<i>cry1Ab</i> 、 <i>vip3Aa20</i> 、 <i>cry1Fa2</i> 、 <i>pat</i> 、 <i>mepsps</i>	先正达	Agrisure™ Viptera 3220
Bt11×MIR604	抗虫、抗除草剂	<i>cry1Ab</i> 、 <i>pat</i> 、 <i>mcry3A</i>	先正达	Agrisure™ CB/LL/RW
BT11×MIR604×GA21	抗虫、抗除草剂	<i>cry1Ab</i> 、 <i>pat</i> 、 <i>mcry3A</i> 、 <i>mepsps</i>	先正达	Agrisure™ 3000GT
MIR604×GA21	抗虫、抗除草剂	<i>mcry3A</i> 、 <i>mepsps</i>	先正达	Agrisure™ GT/RW
GA21×MON810	抗虫、抗除草剂	<i>mepsps</i> 、 <i>cry1Ab</i>	孟山都	Roundup Ready™ YieldGard™ maize
MON863×MON810	抗虫、抗除草剂	<i>cry3Bb1</i> 、 <i>cry1Ab</i> 、 <i>cp 4 mepsps</i>	孟山都	YieldGard™ Plus
MON810×MON88017	抗虫、抗除草剂	<i>cp4 epsps</i> 、 <i>cry1Ab</i> 、 <i>cry3Bb1</i>	孟山都	YieldGard™ VT Triple
MON863×MON810×NK603	抗虫、抗除草剂	<i>cry1Ab</i> 、 <i>cry3Bb1</i> 、 <i>cp4 epsps</i>	孟山都	YieldGard™ Plus with RR
MON863 ×NK603	抗虫、抗除草剂	<i>cp4 epsps</i> 、 <i>cry3Bb1</i>	孟山都	YieldGard™ RW + RR
MON89034×MON88017	抗虫、抗除草剂	<i>cp4 epsps</i> 、 <i>cry1A.105</i> 、 <i>cry2Ab2</i> 、 <i>cry3Bb1</i>	孟山都	Genuity® VT Triple Pro™
MON89034× NK603	抗虫、抗除草剂	<i>cp4 epsps</i> 、 <i>cry1A.105</i> 、 <i>cry2Ab2</i>	孟山都	Genuity® VT Double Pro™
MON89034×TC1507× MON88017×59122	抗虫、抗除草剂	<i>cp4 epsps</i> 、 <i>cry1Fa2</i> 、 <i>cry2Ab2</i> 、 <i>cry35Ab1</i> 、 <i>cry34Ab1</i> 、 <i>cry3Bb1</i> 、 <i>cry1A.105</i> 、 <i>pat</i>	孟山都	Genuity® SmartStax™
MON89034×TC1507× NK603	抗虫、抗除草剂	<i>cry1Fa2</i> 、 <i>cp4 epsps</i> 、 <i>pat</i> 、 <i>cry2Ab2</i> 、 <i>cry1A.105</i>	孟山都	Power Core™
NK603×MON810	抗虫、抗除草剂	<i>cp4 epsps</i> 、 <i>cry1Ab</i>	孟山都	YieldGard™ CB + RR
T25×MON810	抗虫、抗除草剂	<i>pat</i> (syn)、 <i>cry1Ab</i>	孟山都	Liberty Link™ Yieldgard™ Maize
MON87427×MON89034× TC1507×MON87411× 59122×DAS40278	抗虫、抗除草剂	<i>cp4 epsps</i> 、 <i>cry2Ab2</i> 、 <i>cry1A.105</i> 、 <i>cry1F</i> 、 <i>pat</i> 、 <i>cry34Ab1</i> 、 <i>cry35Ab1</i> 、 <i>cry3Bb1</i> 、 <i>dsnf7</i> 、 <i>aad-1</i>	孟山都	
59122×NK603	抗虫、抗除草剂	<i>cp4 epsps</i> 、 <i>cry34Ab1</i> 、 <i>cry35Ab1</i> 、 <i>pat</i>	杜邦先锋	Herculex™ RW Roundup Ready™ 2

续表9 Continued 9

转化事件 Event	性 状 Trait	基 因 Gene	开发机构 Institution	商标名称 Trademark
TC1507×59122×MON810× MIR604×NK603	抗虫、抗除草剂	<i>cry1Fa2</i> 、 <i>cp4 epsps</i> 、 <i>pat</i> 、 <i>cry34Ab1</i> 、 <i>cry35Ab1</i> 、 <i>cry1Ab</i> 、 <i>mcry3A</i>	杜邦先锋	Optimum™ Intrasect Xtreme
TC1507×59122×MON810× NK603	抗虫、抗除草剂	<i>cry1Fa2</i> 、 <i>cp4 epsps</i> 、 <i>pat</i> 、 <i>cry34Ab1</i> 、 <i>cry35Ab1</i> 、 <i>cry1Ab</i>	杜邦先锋	Optimum™ Intrasect XTRA
TC1507×MIR604×NK603	抗虫、抗除草剂	<i>cry1Fa2</i> 、 <i>cp4 epsps</i> 、 <i>pat</i> 、 <i>mcry3A</i>	杜邦先锋	Optimum™ TRIsect
TC1507×MON810×NK603	抗虫、抗除草剂	<i>cry1Fa2</i> 、 <i>cp4 epsps</i> 、 <i>pat</i> 、 <i>cry1Ab</i>	杜邦先锋	Optimum™ Intrasect
TC1507×59122	抗虫、抗除草剂	<i>cry1F</i> 、 <i>pat</i> 、 <i>cry34Ab1</i> 、 <i>cry35Ab1</i>	陶氏杜邦先锋	Herculex XTRA™
TC1507×59122×NK603	抗虫、抗除草剂	<i>cry1Fa2</i> 、 <i>cp4 epsps</i> 、 <i>pat</i> 、 <i>cry34Ab1</i> 、 <i>cry35Ab1</i>	陶氏杜邦先锋	Herculex XTRA™ RR
TC1507×NK603	抗虫、抗除草剂	<i>cry1Fa2</i> 、 <i>cp4 epsps</i> 、 <i>pat</i>	陶氏杜邦先锋	Herculex™ I RR
3272×Bt11×MIR604× TC1507×5307×GA21	抗虫、抗除草剂、高产	<i>amy797E</i> 、 <i>ecry3.1Ab</i> 、 <i>mcry3A</i> 、 <i>cry1Fa2</i> 、 <i>cry1Ab</i> 、 <i>pat</i> 、 <i>mepsps</i>	先正达	
MON87460× MON89034 × MON88017	抗虫、抗除草剂、抗旱	<i>cpB</i> 、 <i>cry1A.105</i> 、 <i>cry2Ab2</i> 、 <i>cry3Bb1</i> 、 <i>cp4 epsps</i>	孟山都	

3 展 望

目前,基于农杆菌介导转化和基因枪转化的玉米遗传转化技术尽管已得到广泛使用,但在基因编辑时代来临的今天还存在诸多挑战。为了解决这些问题,各国建立了多个规模化转基因技术平台,美国衣阿华州立大学和密苏里大学、中国农业大学和中国农业科学院以及一些国内公司的玉米转基因技术平台农杆菌转化效率均已稳定在5%以上。还需要继续深化遗传转化技术研究以提高转化效率、再生效率和获得高质量转化事件,并探索简单易行的转化方法,找到类似拟南芥蘸花法的无需组培的技术或大幅度简化组培程序的技术。此外,基因型依赖性仍然是目前玉米遗传转化中的突出问题,特别是现在已成为基因编辑的瓶颈因素,通过多种途径来克服基因型依赖性将是今后重要的努力方向之一。

抗虫、抗除草剂的转基因玉米产品在国外已经非常成熟,并且结合抗旱、优质、高产等的复合性状产品不断增加,在生物反应器产品开发方面也取得了突破性进展,转基因玉米种业国外跨国公司已远远走在各国前列,也给我国玉米种业发展带来了巨大压力。一种策略是加强基因编辑技术研发及其应用,但其基础在于对玉米基因组中的基因及其功能有较为深入的了解,目前我国在玉米功能基因研究领域基本达到了国际同等水平,如果国家对基因编

辑作物的监管政策较为灵活,则有可能在应用方面大放异彩;另一种策略是强化动植物微生物的基因克隆和功能验证,挖掘出有自主知识产权的优异抗虫、抗除草剂等新基因,需要国家和企业有较大的投资。就性状角度来看,抗旱、抗病、养分高效利用等转基因玉米产品国际上尚不多见,我国可以此为重点,突出新品种培育。生物反应器有良好应用前景,我国可采取科企合作的方式进行研发,以实现巨大的社会效益。此外,加强基因叠加技术和产品研发将是未来转基因育种的主要方向。

参考文献:

[1] Que Q, Elumalai S, Li X, et al. Maize transformation technology development for commercial event generation[J]. Frontier in Plant Science, 2014, 5: 379.

[2] Rhodes C A, Pierce D A, Mettler L 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] Ishida Y, Saito H, Ohta S et al. High efficiency transformation of maize(*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Nature Biotechnology, 1996, 14: 745–750.

[5] Ishida Y, Hiei Y, Komari T. *Agrobacterium*–mediated transformation of maize[J]. Nature Protocol, 2007, 2: 1614–1621.

[6] Cho M–J, Banh J, Yu M, et al. Improvement of *Agrobacterium*–mediated transformation frequency in multiple modern elite commercial maize(*Zea mays* L.) inbreds by media modifications[J]. Plant Cell,

- Tissue and Organ Culture, 2015, 121: 519–529.
- [7] Chen L, Cong Y, He H, et al. Maize(*Zea mays* L.) transformation by *Agrobacterium tumefaciens* infection of pollinated ovules[J]. Journal of Biotechnology, 2014, 171: 8–16.
 - [8] Lowe K, Wu E, Wang N, et al. Morphogenic regulators *Baby boom* and *Wuschel* improve monocot transformation[J]. The Plant Cell, 2016, 28: 1998–2015.
 - [9] Mookkan M, Nelson–Vasilchik K, Hague J, et al. Selectable marker independent transformation of recalcitrant maize inbred B73 and sorghum P898012 mediated by morphogenic regulators *BABY BOOM* and *WUSCHEL2*[J]. Plant Cell Reporter, 2017, 36: 1477–1491.
 - [10] Lowe B A, Way M M, Kumpf J M, et al. Marker assisted breeding for transformability in maize[J]. Molecular Breeding, 2006, 18: 229–239.
 - [11] Zhang W, Subbarao S, Addae P, et al. *Crellox*–mediated marker gene excision in transgenic maize(*Zea mays* L.) plants[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 107: 1157–1168.
 - [12] Huang S, Gilbertson L A, Adams T H, et al. Generation of marker–free transgenic maize by regular two–border *Agrobacterium* transformation vectors[J]. Transgenic Research, 2004, 13: 451–461.
 - [13] Yang A, Su Q, An L. Ovary–drip transformation: a simple method for directly generating vector– and marker–free transgenic maize (*Zea mays* L.) with a linear *GFP* cassette transformation[J]. Planta, 2009, 229: 793–801.
 - [14] Krakowsky M D, Lee M, Garay L, et al. Quantitative trait loci for callus initiation and totipotency in maize(*Zea mays* L.)[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2006, 113: 821–830.
 - [15] 张红伟,刘亚娟,郭晓琳,等. 玉米幼胚愈伤组织的诱导和诱导再生的QTL分析[J]. 作物学报, 2006, 32: 385–389.
Zhang H W, Liu Y J, Guo X L, et al. QTL mapping for callus induction and plant regeneration in maize immature embryos[J]. Acta Agronomica Sinica, 2006, 32: 385–389. (in Chinese)
 - [16] 潘光堂,张志明,魏 昕,等. 玉米幼胚培养能力性状QTL分析[J]. 作物学报, 2006, 32: 7–13.
Pan G T, Zhang Z M, Wei X, et al. QTL analysis of maize(*Zea mays* L.) embryo culturing capacity[J]. Acta Agronomica Sinica, 2006, 32: 7–13. (in Chinese)
 - [17] Sun L, Wu Y, Su S, et al. Differential gene expression during somatic embryogenesis in the maize(*Zea mays* L.) inbred line H99[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2012, 109: 271–286.
 - [18] Sun L, Wu Y, Zou H, et al. Comparative proteomic analysis of the H99 inbred maize(*Zea mays* L.) line in embryogenic and non–embryogenic callus during somatic embryogenesis[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2013, 113: 103–119.
 - [19] Ge F, Luo X, Huang X, et al. Genome–wide analysis of transcript factors involved in maize embryonic callus formation[J]. Physiologia Plantarum, 2016, 158: 452–462.
 - [20] Ge F, Hu H, Huang X, et al. Metabolomic and proteomic analysis of maize embryonic callus induced from immature embryo[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 1004.
 - [21] Alejandri–Ramirez N D, Chavez–Hernandez E C, Contreras–Guerro J L, et al. Small RNA differential expression and regulation in Tuxpeno maize embryogenic callus induction and establishment[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2018, 122: 78–89.
 - [22] Zhang S, Liu X, Lin Y, et al. Characterization of a *ZmSERK* gene and its relationship to somatic embryogenesis in a maize culture[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2011, 105: 29–37.
 - [23] 李 钊,张登峰,孙永华,等. 玉米再生相关基因 *ZmLECI* 的序列变异及其与胚性愈伤组织形成能力的关联分析[J]. 作物学报, 2013, 39: 1727–1738.
Li Z, Zhang D F, Sun Y H, et al. Sequence diversity of *ZmLECI* and association analysis fo embryogenic calli formation ability in maize[J]. Acta Agronomica Sinica, 2013, 39: 1727–1738. (in Chinese)
 - [24] Koziel M G, Beland G L, Bowman C, et al. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*[J]. Biotechnology, 1993, 11: 194–200.
 - [25] Carrillo L, Martinez M, Ramessar K, et al. Expression of a barley cystatin gene in maize enhances resistance against phytophagous mites by altering their cysteine–proteases[J]. Plant Cell Reporter, 2011, 30: 101–112.
 - [26] Kramer K J, Morgan T D, Throne J E, et al. Transgenic avidin maize is resistant to storage insect pests[J]. Nature Biotechnology, 2000, 18: 670–674.
 - [27] Song F P, Zhang J, Gu A, et al. Identification of *cryII*–Type Genes from *Bacillus thuringiensis* Strains and Characterization of a Novel *cryII*–Type Gene[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69: 5207–5211.
 - [28] Du D, Geng C, Zhang X, et al. Transgenic maize lines expressing a *cryIC** gene are resistant to insect pests[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2014, 32: 549–557.
 - [29] 李圣彦,郎志宏,朱 莉,等. 利用密码子优化提高Bt *cryIAh* 基因在转基因玉米(*Zea mays* L.)中的表达[J]. 中国农业科技导报, 2011, 13(6): 20–26.
Li S, Lang Z, Zhu L, et al. Improvement of Bt *cryIAh* gene expression in transgenic maize(*Zea mays* L.) through codon optimization [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2011, 13(6): 20–26. (in Chinese)
 - [30] 伍晓丽,朱 赓,李晚忱,等. 农杆菌介导豇豆胰蛋白酶抑制剂基因(*cpti*)在玉米中的遗传转化[J]. 作物学报, 2004, 30: 297–298.
Wu X L, Zhu Z, Li W C, et al. *Agrobacterium*–mediated delivery of cowpea trypsin inhibitor gene into maize plant[J]. Acta Agronomica Sinica, 2004, 30: 297–298. (in Chinese)
 - [31] Schellenberger U, Oral J, Rosen B A, et al. A selective insecticidal protein from *Pseudomonas* for controlling corn rootworms[J]. Science, 2016, 354: 634–637.
 - [32] Liu M, Hao Y, Sun Y, et al. Developing insect resistance with fusion gene transformation of chitinase and scorpion toxin gene in maize(*Zea mays* L.)[J]. Maydica, 2016, 61.
 - [33] 袁 英,李启云,孔祥梅,等. 转双价抗虫基因 *Bt-pta* 玉米植株的获得[J]. 中国农学通报, 2006, 22(10): 131–134.
Yuan Y, Li Q Y, Kong X M, et al. Synchronous expression of *pta* and *cryIA(a)* gene in maize[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2006, 22(10): 131–134. (in Chinese)

- [34] Heck G R, Armstrong C L, Astwood J D, et al. Development and characterization of a CP4 EPSPS-based glyphosate-tolerant corn event[J]. *Crop Science*, 2005, 44: 329-339.
- [35] Ren Z, Cao G, Zhang Y, et al. Overexpression of a modified *AM79 aroA* gene in transgenic maize confers high tolerance to glyphosate[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2015, 14: 414-422.
- [36] Dong Z, Zhao H, He J, et al. Overexpression of a foxtail millet Acetyl-CoA carboxylase gene in maize increases sethoxydim resistance and oil content[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10: 3986-3995.
- [37] Zhu T, Mettenburg K, Peterson D J, et al. Engineering herbicide-resistant maize using chimeric RNA/DNA oligonucleotides[J]. *Nature Biotechnology*, 2000, 18: 555-557.
- [38] Castiglioni P, Warner D, Bensen R J, et al. Bacterial RNA chaperones confer abiotic stress tolerance in plants and improved grain yield in maize under water-limited conditions[J]. *Plant Physiology*, 2008, 147: 446-455.
- [39] Quan R, Shang M, Zhang H, et al. Engineering of enhanced glycine betaine synthesis improves drought tolerance in maize[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2004, 2: 477-486.
- [40] Li B, Wei A, Song C, et al. Heterologous expression of the *TsVP* gene improves the drought resistance of maize[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2008, 6: 146-159.
- [41] Yang L, Liu X, Guo X, et al. Comparison between transgenic maize with exotic betaine aldehyde dehydrogenase(*BADH*) gene and its untransformed counterpart[J]. *Maydica*, 2016, 61: 1-5.
- [42] 刘成, 杨炳鹏, 孙宝成, 等. 转 *LOS5* 玉米的大田抗旱性鉴定[J]. *中国农业科学*, 2016, 49: 4469-4479.
- Liu C, Yang B B, Sun B C, et al. Field identification of drought tolerance of *LOS5* transgenic maize[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49: 4469-4479. (in Chinese)
- [43] 刘岩, 王国英, 刘俊君, 等. 大肠杆菌 *gutD* 基因转入玉米及耐盐转基因植株的获得[J]. *中国科学(C辑)*, 1998, 28: 542-547.
- Liu Y, Wang G Y, Liu J J, et al. Expression of *gutD* from *Escherichia coli* in maize and improved salt tolerance of transgenic plants[J]. *Science in China(Series C)*, 1998, 28: 542-547. (in Chinese)
- [44] 杨爱芳, 张可炜, 尹小燕, 等. 转基因耐盐玉米自交系的农艺性状及杂种优势表现的分析[J]. *中国农业科学*, 2007, 40: 2895-2902.
- Yang A F, Zhang K W, Yin X Y, et al. Agronomic traits and combining ability analysis of salt enduring transgenic maize[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2007, 40: 2895-2902. (in Chinese)
- [45] 刘大文, 王守才, 谢友菊, 等. 转 *Zm13-Barnase* 基因玉米的获得及其花粉育性研究[J]. *植物学报*, 2000, 42: 611-615.
- Liu D W, Wang S C, Xie Y J, et al. Study on pollen fertility in transgenic maize with transgen of *Zm13-Barnase*[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2000, 42: 611-615. (in Chinese)
- [46] Cao X, Lu Y, Di D, et al. Enhanced virus resistance in transgenic maize expressing a dsRNA-specific endoribonuclease gene from *E. Coli*[J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(4): 60829.
- [47] 白云凤, 赵晋锋, 郑军, 等. 反义外壳蛋白基因介导的抗 *SCMV* 转基因玉米研究[J]. *作物学报*, 2006, 32: 661-665.
- Bai Y F, Zhao J F, Zheng J, et al. *SCMV*-resistant transgenic maize mediated by antisense *cp* gene[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2006, 32: 661-665. (in Chinese)
- [48] 白云凤, 杨红春, 曲琳, 等. 抗甘蔗花叶病毒的无标记反向重复转基因玉米[J]. *作物学报*, 2007, 33: 973-978.
- Bai Y F, Yang H C, Qu L, et al. Inverted-repeat transgenic maize plants resistant to sugarcane mosaic virus[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2007, 33: 973-978. (in Chinese)
- [49] Zhang Z Y, Wang Y G, Shen X J, et al. RNA interference-mediated resistance to maize dwarf mosaic virus[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2013, 113: 571-578.
- [50] Shepherd D N, Mangwende T, Martin D P, et al. Maize streak virus-resistant transgenic maize: a first for Africa[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2007, 5: 759-767.
- [51] Allen A, Islamovic E, Kaur J, et al. Transgenic maize plants expressing the Totivirus antifungal protein, KP4, are highly resistant to corn smut[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2011, 9: 857-864.
- [52] Sucher J, Boni R, Yang P, et al. The durable wheat disease resistance gene *Lr34* confers common rust and northern corn leaf blight resistance in maize[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, 15: 489-496.
- [53] Thakare D, Zhang J, Wing R A, et al. Aflatoxin-free transgenic maize using host-induced gene silencing[J]. *Science Advances*, 2017, 3: 1602382.
- [54] Liu C, Li S, Yue J, et al. Microtubule-associated protein SBGLR facilitates storage protein deposition and its expression leads to lysine content increase in transgenic maize endosperm[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16: 29772-29786.
- [55] Bicar E H, Woodman-Clíkeman W, Sangtong V, et al. Transgenic maize endosperm containing a milk protein has improved amino acid balance[J]. *Transgenic Research*, 2008, 17: 59-71.
- [56] Yue J, Li C, Zhao Q, et al. Seed-specific expression of a lysine-rich protein gene, *GhLRP*, from cotton significantly increases the lysine content in maize seeds[J]. *International Journal of molecular Sciences*, 2014, 15: 5350-5365.
- [57] Huang S, Frizzi A, Florida C A, et al. High lysine and high tryptophan transgenic maize resulting from the reduction of both 19- and 22-kD α -zeins[J]. *Plant Molecular Biology*, 2006, 61: 525-535.
- [58] Planta J, Xiang X, Leustek T, et al. Engineering sulfur storage in maize seed proteins without apparent yield loss[J]. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 2017, 114: 11386-11391.
- [59] Rascon-Cruz Q, Sinagawa-Garcia S, Osuna-Castro J A, et al. Accumulation, assembly, and digestibility of amarantin expressed in transgenic tropical maize[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108: 335-342.
- [60] Oakes J, Brackenridge D, Colletti R, et al. Expression of fungal *diacylglycerol acyltransferase2* genes to increase kernel oil in maize[J]. *Plant Physiology*, 2011, 155: 1146-1157.
- [61] Shen B, Allen W B, Zheng P, et al. Expression of *ZmLEC1* and *ZmWRI1* increases seed oil production in maize[J]. *Plant Physiology*, 2010, 153: 980-987.
- [62] Zhang J, Martin J M, Beecher B, et al. The ectopic expression of the wheat Puroindoline genes increase germ size and seed oil content in transgenic corn[J]. *Plant Molecular Biology*, 2010, 74: 353-365.

- [63] Zhang J, Martin J M, Beecher B, et al. Seed-specific expression of the wheat Puroindoline genes improves maize wet milling yields[J]. Plant Biotechnology Journal, 2009, 7: 733-743.
- [64] Zhu C, Naqvi S, Breitenbach J, et al. Combinatorial genetic transformation generates a library of metabolic phenotypes for the carotenoid pathway in maize[J]. Proceedings of National Academy of Sciences USA, 2008, 105: 18232-18237.
- [65] Aluru M, Xu Y, Guo R, et al. Generation of transgenic maize with enhanced provitamin A content[J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59: 3551-3562.
- [66] Farre G, Perez-Fons L, Decourcelle M, et al. Metabolic engineering of astaxanthin biosynthesis in maize endosperm and characterization of a prototype high oil hybrid[J]. Transgenic Research, 2016, 25: 477-489.
- [67] Naqvi S, Zhu C, Farre, et al. Transgenic multivitamin corn through biofortification of endosperm with three vitamins representing three distinct metabolic pathways[J]. Proceedings of National Academy of Sciences USA, 2009, 19: 7762-7767.
- [68] Zhang L, Luo Y, Zhu Y, et al. *GmTMT2a* from soybean elevates the α -tocopherol content in corn and *Arabidopsis*[J]. Transgenic Research, 2013, 22: 1021-1028.
- [69] 关淑艳, 王丕武, 刘广娜, 等. 用反义 RNA 技术创造高直链淀粉玉米材料[J]. 中国农业科学, 2009, 42: 3028-3035.
- Guan S Y, Wang P W, Liu G N, et al. Reducing the maize amylopectin content through anti-sense manipulation[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2009, 42: 3028-3035. (in Chinese)
- [70] Zhao Y, Li N, Li B, et al. Reduced expression of starch branching enzyme IIa and IIb in maize endosperm by RNAi constructs greatly increases the amylase content in kernel with nearly normal morphology[J]. Planta, 2015, 241: 449-461.
- [71] Jiang L, Yu X, Qi X, et al. Multigene engineering of starch biosynthesis in maize endosperm increases the total starch content and the proportion of amylase[J]. Transgenic Research, 2013, 22: 1133-1142.
- [72] He X, Hall M B, Gallo-Meagher M, et al. Improvement of forage quality by downregulation of maize *O*-methyltransferase[J]. Crop Science, 2003, 43: 2240-2251.
- [73] Chen R, Xue G, Chen P, et al. Transgenic maize plants expressing a fungal phytase gene[J]. Transgenic Research, 2008, 17: 633-643.
- [74] Yang W, Zhang Y, Zhou X, et al. Production of a highly protease-resistant fungal-galactosidase in transgenic maize seeds for simplified feed processing[J]. PLoS ONE, 2015, 10(6): 0129294.
- [75] Xu X, Zhang Y, Meng Q, et al. Overexpression of a fungal β -mannanase from *Bispora* sp. MEY-1 in maize seeds and enzyme characterization[J]. PLoS ONE, 2013, 8(2): 56146.
- [76] Zhang Y, Xu X, Zhou X, et al. Overexpression of an acidic endo- β -1,3-1,4-glucanase in transgenic maize seed for direct utilization in animal feed[J]. PLoS ONE, 2013, 8(12): 81993.
- [77] Guo M, Rupe M A, Wei J, et al. Maize *AGROSI(ZARI)* transgenic alleles increase hybrid maize yield[J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65: 249-260.
- [78] Li B, Liu H, Zhang Y, et al. Constitutive expression of cell wall invertase genes increases grain yield and starch content in maize[J]. Plant Biotechnology Journal, 2013, 11: 1080-1091.
- [79] Wang Z, Chen X, Wang J, et al. Increasing maize seed weight by enhancing the cytoplasmic ADP-glucose pyrophosphorylase activity in transgenic maize plants[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2007, 88: 83-92.
- [80] Voorend W, Nelissen H, Vanholme R, et al. Overexpression of *GA20-OXIDASE1* impacts plant height, biomass allocation and saccharification efficiency in maize[J]. Plant Biotechnology Journal, 2016, 14: 997-1007.
- [81] Fornale S, Capellades M, Encina A, et al. Altered lignin biosynthesis improves cellulosic bioethanol production in transgenic maize plants down-regulated for cinnamyl alcohol dehydrogenase[J]. Molecular Plant, 2012, 5: 817-830.
- [82] Nahampun H N, Lee C J, Jane J L, et al. Ectopic expression of bacterial amylopullulanase enhances bioethanol production from maize grain[J]. Plant Cell Reporter, 2013, 32: 1393-1405.
- [83] Robson P R H, Donnison I S, Wang K, et al. Leaf senescence is delayed in maize expressing the *Agrobacterium IPT* gene under the control of a novel maize senescence-enhanced promoter[J]. Plant Biotechnology Journal, 2004, 2: 101-112.
- [84] Rosales-Mendoza S, Sanchez-Robledo C S, Banuelos-Hernandez B, et al. Corn-based vaccines: current status and prospects[J]. Planta, 2017, 245: 875-888.
- [85] Hood E E, Witcher D R, Maddock S, et al. Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification[J]. Molecular Breeding, 1997, 3: 291-306.
- [86] Zhong G Y, Peterson D, Delaney D E, et al. Commercial production of aprotinin in transgenic maize seeds[J]. Molecular Breeding, 1999, 5: 345-356.
- [87] Chikwamba R, McMurray J, Shou H, et al. Expression of a synthetic *E. coli* heat-labile enterotoxin B sub-unit(LT-B) in maize[J]. Molecular Breeding, 2002, 10: 253-265.
- [88] Hayden C A, Egelkroun E M, Moscoso A M, et al. Production of highly concentrated, heat-stable hepatitis B surface antigen in maize[J]. Plant Biotechnology Journal, 2012, 10: 979-984.
- [89] Zhang S, Zhang G, Rong T, et al. Transformation of two *VPI* genes of *O*- and *Asia 1*-type foot-and mouth disease virus into maize[J]. Agricultural Sciences in China, 2011, 10: 661-667.
- [90] Guerrero-Andrade O, Loza-Rubio E, Olivera-Flores T, et al. Expression of the Newcastle disease virus fusion protein in transgenic maize and immunological studies[J]. Transgenic Research, 2006, 15: 455-463.
- [91] Nahampun H N, Bosworth B, Cunnick J, et al. Expression of H3N2 nucleoprotein in maize seeds and immunogenicity in mice[J]. Plant Cell Reporter, 2015, 34: 969-980.
- [92] He X, Haselhorst T, von Itzstein M, et al. Production of α -L-iduronidase in maize for the potential treatment of a human lysosomal storage disease[J]. Nature Communications, 2012, 3: 1062.
- [93] Sabalza M, Madeira L, van Dolleweerd C, et al. Functional characterization of the recombinant HIV-neutralizing monoclonal antibody 2F5 produced in maize seeds[J]. Plant Molecular Biology, 2012, 80: 477-488.

(下转第22页)

- [15] 刑吉敏,蔡春泉,王维真,等. 国外种质×国内种质玉米单交种产量构成性状的遗传分析[J]. 玉米科学, 2005, 13(1): 55-59.
Xing J M, Cai C Q, Wang W Z, et al. Genetic analysis on yield traits on yield traits in the hybrids of foreign germplasms domestic germplasm in maize[J]. Journal of Maize Sciences, 2005, 13(1): 55-59. (in Chinese)
- [16] 李明爽,傅洪拓,龚永生,等. 杂种优势预测研究进展[J]. 中国农学报, 2008, 24(1): 117-122.
Li M S, Fu H T, Gong Y S, et al. Progresses in the study on the heterosis prediction[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2008, 24(1): 117-122. (in Chinese)
- [17] 王永飞,王 鸣,王得元,等. 杂种优势早期预测研究现状[J]. 中国农学报, 1997, 13(5): 45-46.
Wang Y F, Wang M, Wang D Y, et al. Current status of early prediction of heterosis[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 1997, 13(5): 45-46. (in Chinese)
- [18] 黄清阳,高之仁,荣廷昭. 玉米自交系间遗传距离与产量杂种优势、杂种产量的关系[J]. 遗传学报, 1991, 18(3): 271-276.
Huang Q Y, Gao Z R, Rong T Z, et al. The relationship between genetic distance and yield heterosis/hybrid yield in maize[J]. Acta Genetica Sinica, 1991, 18(3): 271-276. (in Chinese)
- [19] 钱洪惠. 玉米正反交杂种主要性状相关分析[J]. 内蒙古农业科技, 1996(6): 5-6.
Qian H H. Correlation analysis on main characters of maize crosses [J]. Inner Mongolia Agricultural Science and Technology, 1996(6): 5-6. (in Chinese)
- [20] 石清琢. 玉米单交种正反交F₁代产量及主要农艺性状差异初探[J]. 杂粮作物, 1999(6): 37-38.
Shi Q Z. A preliminary study on the differences of F₁ yield and main agronomic traits of maize hybrids[J]. Crops, 1999(6): 37-38. (in Chinese)
- [21] Coe E H. The properties, origin and mechanism of conversion type inheritance at the B locus in maize[J]. Genetics, 1966, 53: 1035-1063.
- [22] Roberto Pilu, Andrea Bucci, Laura Casella, et al. A quantitative trait locus involved in maize yield is tightly associated to the r1 gene on the long arm of chromosome 10[J]. Mol Breeding, 2012, 30: 799-807.
- [23] 薛 静,杨凤萍,陈绪清,等. 利用可视化标记建立 Cre-loxP 介导的抗生素删除载体系统并应用于玉米转基因研究[J]. 分子植物育种, 2012, 10(4): 404-410.
Xue J, Yang F P, Cheng X Q, et al. Using anthocyanins as a visible reporter to establish a cre-loxP mediated antibiotics deletion system and apply to transgenic maize[J]. Molecular Plant Breeding, 2012, 10(4): 404-410. (in Chinese)
- [24] Goff S A, Cone K C, Chandler V L. Functional analysis of the transcriptional activator encoded by the maize B gene: evidence for a direct functional interaction between two classes of regulatory proteins[J]. Genes Dev., 1992, 6(5): 864-875.
- [25] 单立波,李义文,赵铁汉,等. 利用花色素苷调节基因作为基因枪转化效果指示的研究[J]. 遗传学报, 2009, 27(1): 65-69.
Shan L B, Li Y W, Zhao T H, et al. Estimation of biofistic transformation effect by transient expression of cl-r regulatory genes of anthocyanin biosynthesis[J]. Acta Genetica Sinica, 2009, 27(1): 65-69. (in Chinese)

(责任编辑:朴红梅)

(上接第15页)

- [94] Lamphear B J, Barker D K, Brooks C A, et al. Expression of the sweet protein brazzein in maize for production of a new commercial sweetener[J]. Plant Biotechnology Journal, 2005, 3: 103-114.
- [95] Clough R C, Pappu K, Thompson K, et al. Manganese peroxidase from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* is enzymatically active and accumulates to high levels in transgenic maize seed[J]. Plant Biotechnology Journal, 2006, 4: 53-62.
- [96] Zhang S, Dong J G, Wang T, et al. High level accumulation of α -glucan in maize kernels by expressing the *gtfD* gene from *Streptococcus mutans*[J]. Transgenic Research, 2007, 16: 467-478.
- [97] Devaiah S P, Requesens D V, Chang Y K, et al. Heterologous expression of cellobiohydrolase II(Cel6A) in maize endosperm[J]. Transgenic Research, 2013, 22: 477-488.
- [98] Hood E E, Love R, Lane J, et al. Subcellular targeting is a key condition for high-level accumulation of cellulose protein in transgenic maize seed[J]. Plant Biotechnology Journal, 2007, 5: 709-719.
- [99] Gary B N, Carlson A R, Meissner J, et al. Global and grain-specific accumulation of glycoside hydrolase family 10 xylanases in transgenic maize(*Zea mays*) [J]. Plant Biotechnology Journal, 2011, 9: 1100-1108.
- [100] Sun H, Lang Z, Lu W, et al. Developing transgenic maize(*Zea mays* L.) with insect resistance and glyphosate tolerance by fusion gene transformation[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2015, 14: 305-313.

(责任编辑:李万良)