

转 *Cry1Ab-Ma* 基因玉米 CM8101 对 亚洲玉米螟抗性研究

张 爽^{1,2}, 鲁 鑫^{1,2}, 张嘉月¹, 杨小艳³, 谢树章³, 武凤慈⁴,
宋新元⁴, 王振华¹, 李新海^{1,2}, 翁建峰²

(1. 东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030; 2. 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081;

3. 重庆市农业科学院, 重庆 401329; 4. 吉林省农业科学院, 长春 130033)

摘 要: 利用 qRT-PCR 和 ELISA 等方法测定转 *Cry1Ab-Ma* 基因玉米 CM8101 不同世代、不同组织目标基因表达量, 开展玉米螟室内和田间生测鉴定, 评价转 *Cry1Ab-Ma* 基因玉米 CM8101 对亚洲玉米螟的抗性。结果表明, *Cry1Ab-Ma* 基因在 CM8101 各组织中均有表达, 不同世代间目的基因的表达量无显著性差异, 遗传稳定。室内生测结果表明, 转基因玉米 CM8101 各组织均对亚洲玉米螟具有显著的杀虫效果, 不同世代间玉米螟的存活率均无显著性差异。田间接虫鉴定结果表明, CM8101 在 T₃、T₄、T₅ 世代的抗性等级均为 1 级, 抗性水平为高抗。

关键词: 转基因玉米; 时空表达; 亚洲玉米螟; 抗性鉴定

中图分类号: S513.037

文献标识码: A

Efficacy Evaluation of Transgenic *Cry1Ab-Ma* Maize CM8101 for Resistance to the *Ostrinia furnacalis*

ZHANG Shuang^{1,2}, LU Xin^{1,2}, ZHANG Jia-yue¹, YANG Xiao-yan³, XIE Shu-zhang³, WU Feng-ci⁴,
SONG Xin-yuan⁴, WANG Zhen-hua¹, LI Xin-hai^{1,2}, WENG Jian-feng²

(1. Agricultural College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030;

2. Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081;

3. Chongqing Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 401329;

4. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract: qRT-PCR and ELISA methods were used to detect the *Cry1Ab-Ma* expression, and lab and field bioassay were applied to evaluate the insect resistance of transgenic *Cry1Ab-Ma* maize CM8101. The *Cry1Ab-Ma* genes could be detected to express in all tested tissues in CM8101, and there was no significant difference among different generations. Compared with non-transgenic maize Zheng 58, CM8101 showed significant insect resistance to *Ostrinia furnacalis* in different tissues both in laboratory and field conditions. And no significant differences in the survival rate of the *Ostrinia furnacalis* were observed in these tissues among different generations. The resistance rate of CM8101 was detected to be Class 1 at each generation, showing high resistance level to *Ostrinia furnacalis*.

Key words: Transgenic maize; Spatial-temporal expression; *Ostrinia furnacalis*; Insect resistance;

录用日期: 2019-03-19

基金项目: 转基因新品种培育科技重大专项(2018ZX0800201B)

作者简介: 张 爽(1994-), 黑龙江佳木斯人, 硕士, 研究方向为转基因玉米育种。E-mail: 931498043@qq.com

鲁 鑫为并列第一作者。E-mail: 564122850@qq.com

李新海和翁建峰为本文通讯作者。

E-mail: lixinhai@caas.cn E-mail: wengjianfeng@caas.cn

玉米在国家粮食安全和国民经济发展中占有重要地位。玉米螟是玉米田间生产的主要害虫, 大发生年减产可达 30% 以上, 培育抗虫玉米是解决该问题的重要手段^[1~4]。从 1990 年首次获得正常结实的转 *Bt* 基因玉米以来, 迄今已有 40 余种转 *Bt* 基因玉米事件被批准商业生产^[5~8]。ISAAA 组织统计, 2017 年全球转基因玉米种植面积达 5 970 万 hm²^[9]。目前, 国际上转 *Bt* 基因抗虫玉米的发展趋势在选择基

因上由单基因向多基因发展,性状表现上由单一性状逐步向复合性状发展,不断扩大抗虫谱^[10,11]。孟山都公司和陶氏益农合作研发出含有8个基因(*Cry2Ab*、*Cry1A.105*、*Cry1F*、*Cry3Bv1*、*Cry34*、*Cry35Ab1*、*cp4*、*bar*)的转基因玉米 Smartstax™,表现出3种性状,其中,两种为抗虫性,一种为除草剂耐受性^[12]。沈志成等^[13]分别将 *Cry1Ab/Cry2A* 和 *Cry1Ab/vip3DA* 转入玉米自交系中,获得抗虫效果较好的转化体。浙江大学^[14]自主研发出含 *Cry1Ab*、*Cry2Aj* 基因玉米双抗 12-5,对黏虫、亚洲玉米螟具有较好抗性。

外源目的基因在受体自交系及杂交后代中能够稳定表达以及功能效率有效性是转基因作物作为育种材料进行利用的前提条件^[15]。Du 等^[16]通过田间生测等手段鉴定转基因自交后代,表明 *Cry1C* 基因具有遗传稳定性并一直保持较好的抗虫性。刘洋等^[17]通过对连续3代的转基因材料 HiII-NGc-1 进行 PCR、RT-PCR 和试纸条的检测,结合除草剂和玉米螟生测试验,获得了抗虫、抗除草剂双价转基因玉米自交系。岳卿等^[18]利用目的蛋白表达量分析并结合田间接虫鉴定方法,筛选出性状优良的转化体 B1-1 和 B1-7。孙红炜等^[19]通过 ELISA 方法测定转基因玉米双抗 505-12-5 中 *Cry1Ab* 蛋白的表达量,同时进行玉米螟室内及田间生测,证明其具有显著的抗虫效果。

中国农业科学院作物科学研究所采用将 *Cry1Ab* 密码子优化等方法合成具有自主知识产权的抗虫基因 *Cry1Ab-Ma*,采用农杆菌介导法转入易于转化的玉米杂交种 Hi II 中,通过回交转育获得了以郑58为遗传背景的转基因玉米 CM8101^[20]。本研究利用 qRT-PCR 和 ELISA 等方法测定目的基因在不同生育时期不同组织中的表达量,并对 CM8101 进行玉米螟室内和田间生测,研究 CM8101 对亚洲玉米螟的抗性,为抗虫转基因玉米新品种选育提供基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

转基因材料为转 *Cry1Ab-Ma* 基因的 T₃、T₄、T₅ 代转基因玉米 CM8101,其中,T₃、T₄、T₅ 代转基因玉米 CM8101 分别为转化事件 CM8101 与郑58回交3代、4代、5代并自交2代得到材料,对照材料为郑58,以上材料均由中国农业科学院作物科学研究所提供。转基因材料及对照种植于隔离条件严格的吉林省农业科学院转基因植物环境安全评价基地,试验地周围有高墙围绕,墙外有防护林带。所有材料均按常规栽培管理,全生育期不喷施杀虫剂。

1.2 实验方法

1.2.1 *Cry1Ab-Ma* 基因实时荧光定量 PCR 检测

参照 Xie 等^[21]的方法进行 RNA 的提取、纯化、cDNA 的合成和 qRT-PCR 的表达分析。检测的组织包括6个生育时期的9个组织样品:叶片、根、茎、雄穗、花粉、花丝、苞叶、雌穗尖和子粒,相应的受体对照同时进行取样和检测。*Cry1Ab-Ma* 基因上、下游引物分别为:5'-CGGAATCAAGCGATCAGC-3'和 5'-GTTTCGCCGCTGGACATA-3'。*GAPDH* 为内参,上、下游引物分别为:5'-TTGTCTCTGCGACTTCAACA-3'和 5'-TGGTACCAGGAAATGAGCTTGAC-3'。

1.2.2 *Cry1Ab-Ma* 蛋白含量检测

利用美国 Agdia 公司生产的 Bt *Cry1Ab/Ac* ELISA 检测试剂盒检测转基因玉米中 *Cry1Ab-Ma* 蛋白的含量。液氮研磨待测样品,称量 0.1 g 磨好的样品加入 1 mL 样品提取缓冲液。测量过程按说明书进行操作和绘制标准曲线,所有样品的吸光度值均由酶标仪(Biotek Synergy H1)读取。取样时期及检测部位同 1.2.1。

1.2.3 玉米螟室内及田间鉴定

试验所用亚洲玉米螟为吉林省农业科学院农业生物技术研究所以转基因植物环境安全研究课题组室内饲养种群,植物材料为转基因玉米 CM8101 T₃、T₄、T₅ 世代及对照郑58。室内生测分别采集心叶期内层未展开心叶、抽雄期未展开雄穗、吐丝期苞叶内部花丝、雌穗尖、灌浆末期子粒进行饲喂。从接虫后第1天开始,每2 d 调查1次幼虫存活状况,调查至第7天。田间抗性鉴定在心叶期和吐丝期分别接虫,每小区接虫45株,3次重复。心叶期接虫第14天后调查食叶级别,采用9级标准^[22],并根据食叶级别确定心叶期抗螟性。花丝期接虫后,待收获时调查并记录茎秆蛀孔数、孔道长度等。

1.3 数据处理

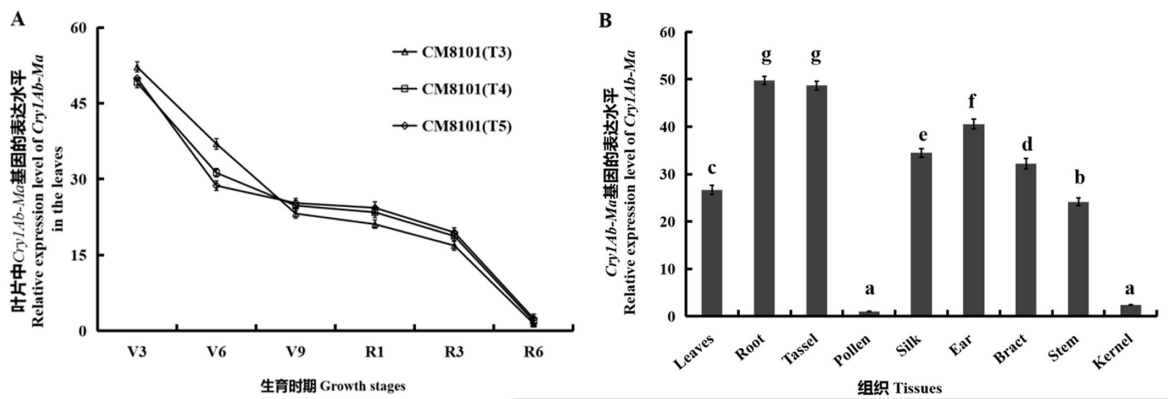
采用 Microsoft Excel 2007 对数据进行初步整理,采用 SPSS 23.0 对调查数据进行方差分析和差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 qRT-PCR 检测

图1分析结果显示,*Cry1Ab-Ma* 基因在各检测组织均有表达。在 CM8101 的 T₃ 代转基因植株中,叶片在6个取样时期中 *Cry1Ab-Ma* 基因的相对表达量平均值为 26.68,随着玉米的生长,相对表达量呈下降趋势。雌穗尖的相对表达量为 40.56,雄穗的相对表达量为 48.67,花丝的相对表达水平为 34.45,苞

叶的相对表达量为 32.22,乳熟期子粒的相对表达量为 2.40。*Cry1Ab-Ma* 基因在吐丝期花粉的相对表达水平最低,在根里的相对表达水平最高。郑 58 各时期样品组织中均未检测到目的基因表达。



注: A 图为不同时期叶片中 *Cry1Ab-Ma* 基因的表达水平; B 图为不同组织中 *Cry1Ab-Ma* 基因的表达水平。
Note: A, Expression level of *Cry1Ab-Ma* in leaves at different stages; B, Expression level of *Cry1Ab-Ma* in different tissues.

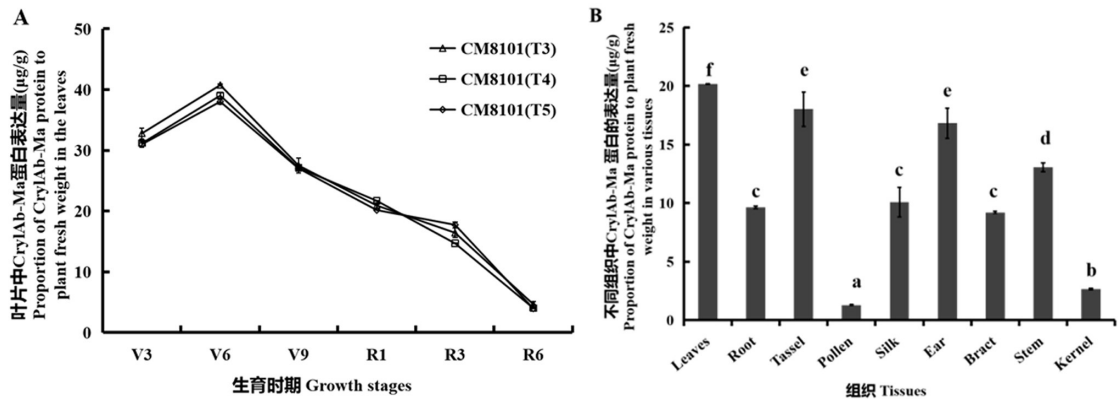
图1 转基因玉米 CM8101 不同时期、不同组织 *Cry1Ab-Ma* 基因转录表达水平

Fig.1 Relative expression levels of *Cry1Ab-Ma* gene in nine tissues of CM8101 at different growth stages

2.2 ELISA 检测

采用 ELISA 方法进行检测(图 2)。测定结果表明, CM8101 转基玉米所测组织中均能检测到 *Cry1Ab-Ma* 蛋白, 叶片中含量最高, 花粉中含量最低。在 T_5 代, 在叶片中的含量随着植株生长发育呈下降趋势, 苗期时表达量最高。吐丝期时, 在雌穗尖中的表达量为 $16.81\text{ }\mu\text{g/g}$, 在雄穗中的表达量为

$18.01\text{ }\mu\text{g/g}$, 在花丝中表达量为 $10.08\text{ }\mu\text{g/g}$, 苞叶中的表达量为 $9.19\text{ }\mu\text{g/g}$, 乳熟期子粒表达量为 $2.64\text{ }\mu\text{g/g}$ 。 T_3 、 T_4 、 T_5 这 3 个回交后代苗期(V3)时期的叶片组织, *Cry1Ab-Ma* 蛋白含量分别为 32.80 、 31.18 、 $31.00\text{ }\mu\text{g/g}$ 。3 个世代的相对表达量经单因素方差分析无显著性差异($P>0.05$)。



注: A 图为不同时期叶片中 *Cry1Ab-Ma* 蛋白含量; B 图为不同组织中 *Cry1Ab-Ma* 蛋白含量。
Note: A, *Cry1Ab-Ma* protein expression in leaves at different stages; B, *Cry1Ab-Ma* protein expression in different tissues.

图2 转基因玉米 CM8101 不同时期不同组织 *Cry1Ab-Ma* 蛋白的表达水平

Fig.2 Expression levels of *Cry1Ab-Ma* proteins in different tissues of transgenic maize CM8101 at different stages

2.3 室内玉米螟抗性鉴定

调查饲喂转基因玉米 CM8101 的心叶、雄穗、花丝、雌穗穗尖、子粒部位在第 1、3、5、7 天后亚洲玉米螟的存活率。调查结果表明, 饲喂第 3 天时, 亚洲玉米螟的存活率显著降低, 均达到 30% 左右; 饲喂第 7 天后亚洲玉米螟的存活率为 0(表 1)。在 5% 显著水

平范围内, 取食转基因玉米 CM8101 的心叶、雄穗、花丝、雌穗穗尖、子粒的亚洲玉米螟初孵幼虫第 7 天时的存活率均低于取食非转基因对照郑 58 对应部位的亚洲玉米螟幼虫的存活率, 且存在显著性差异。 T_3 、 T_4 、 T_5 代转基因玉米 CM8101 的心叶、雄穗、花丝、雌穗穗尖、子粒部位均对亚洲玉米螟具有较强

杀虫效果,且抗虫效率稳定。

2.4 田间玉米螟抗性鉴定

2.4.1 心叶期抗虫性鉴定

人工接虫 14 d 后逐株调查食叶级,叶级别划分依据 NY/T1248.5-2006 的 9 级分级标准。叶片危害级别调查结果显示,T₃、T₄、T₅这 3 个世代转基因玉米 CM8101 对靶标害虫玉米螟有很好的控制作用,食叶级别均为 1 级,抗性水平为高抗。非转基因对照郑 58 的食叶级别为 8 级,抗性水平为感。在 5% 显著水平范围内,CM8101 叶片危害级别显著低于非转

基因玉米郑 58(表 2),且达显著差异水平。

2.4.2 吐丝期抗虫性鉴定

在收获前逐株剖秆调查蛀茎情况,记录活虫数、隧道长度和驻孔数。依据农业部 953 号公告-10.1-2007 的玉米穗期玉米螟为害程度分级标准和穗期对玉米螟抗性的评价标准,对照郑 58 的危害级别为 7 级,抗性级别为感。分析结果显示,T₃、T₄、T₅这 3 个世代 CM8101 转基因品系为害级别均为 1 级,抗性级别为高抗(表 3)。转基因玉米调查的活虫数、隧道长度和驻孔数均极显著低于非转基因对照。

表 1 不同组织对亚洲玉米螟幼虫的杀虫效果

Table 1 Efficacy of different tissues against the *Ostrinia furnacalis* neonates

玉米组织 Maize tissues	取食时间(d) Feeding time	幼虫存活率(%) Survival rate of neonate larvae			
		郑 58(CK)	CM8101(T ₃)	CM8101(T ₄)	CM8101(T ₅)
心 叶	1	100.00±0.00 a	88.00±5.83 bc	70.00±7.07 b	80.00±3.16 bc
	3	98.00±4.47 a	10.00±7.07 b	14.00±5.48 b	12.00±3.74 b
	5	98.00±4.47 a	2.00±2.20 b	0.00±0.00 b	10.00±3.16 b
	7	98.00±4.47 a	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b
雄 穗	1	100.00±0.00 a	68.00±8.94 b	54.00±13.00 b	68.00±2.00 b
	3	98.00±4.47 a	30.00±12.00 b	12.00±8.00 b	12.00±5.48 b
	5	98.00±4.47 a	4.00±4.47 b	2.00±1.25 b	4.00±2.45 b
	7	98.00±4.47 a	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b
花 丝	1	100.00±0.00 a	84.00±2.00 b	78.00±4.47 b	46.00±2.45 c
	3	98.00±4.47 a	30.00±13.00 c	58.00±8.37 b	22.00±2.00 c
	5	98.00±4.47 a	12.00±7.00 b	8.00±8.37 b	6.00±2.45 b
	7	98.00±4.47 a	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b
穗 尖	1	100.00±0.00 a	60.00±13.00 bc	66.00±8.94 b	48.00±2.00 c
	3	98.00±4.47 a	34.00±12.00 bc	30.00±10.00 b	14.00±2.45 b
	5	98.00±4.47 a	18.00±8.00 c	2.00±4.47 b	4.00±2.45 b
	7	98.00±4.47 a	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b
子 粒	1	100.00±0.00 a	62.00±2.45 b	60.00±2.45 b	64.00±4.47 b
	3	98.00±4.47 a	25.00±4.47 b	32.00±5.83 b	24.00±2.45 b
	5	98.00±4.47 a	2.00±2.00 b	2.00±2.00 b	4.00±2.45 b
	7	98.00±4.47 a	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b

注:表中数据为平均值±标准误,同行中字母不同表示差异显著(P<0.05)。下表同。

Note: The data indicated by Mean ± SE, different letters within a line were significantly different(P<0.05). The same below.

表 2 心叶期转基因玉米 CM8101 与非转基因玉米郑 58 被害级别及抗性水平

Table 2 Disease ratings and resistant levels of CM8101 and non-transgenic controls against *Ostrinia furnacalis* in the field at whorl stage

材 料 Material	食叶级别 Leaf feeding rating	虫害级别 Disease rating	抗性水平 Resistant level
CM8101(T ₃)	1.0 a	1 a	高抗
CM8101(T ₄)	1.0 a	1 a	高抗
CM8101(T ₅)	1.0 a	1 a	高抗
郑 58	8.0 a	7 b	感

表3 吐丝期转基因玉米 CM8101 与非转基因玉米被害级别及抗性水平
Table 3 Disease ratings and resistant levels of CM8101 and non-transgenic controls against *Ostrinia furnacalis* at silking stage

材 料 Material	活虫数 Living larva	单株隧道长度(cm) Mean tunnel length /plant	单株驻孔数(个/株) Number of tunnels /plant	危害级别 Disease level	抗性级别 Resistant level
CM8101(T ₃)	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	1	高抗
CM8101(T ₄)	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	1	高抗
CM8101(T ₅)	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	1	高抗
郑58	0.17±0.09 a	4.53±0.59 b	2.44±0.33 b	7	感

3 结论与讨论

抗虫转基因玉米的 Bt 蛋白表达水平与其抗性直接相关。龙丽坤等^[23]采用 ELSIA 方法,测定了 Mon89034 的杂交后代 Cry1A.105 蛋白在苗期和心叶期叶片、花丝、花粉、雌穗尖、茎髓以及乳熟期子粒中的表达含量,结果表明,叶片中蛋白表达含量最高,在 16.20~30.82 μg/g。Nguyen 等^[24]测定了转基因玉米 Mon810 生长发育的 4 个时期 5 个部位的 Cry1Ab 蛋白表达量,表明 Cry1Ab 蛋白在玉米乳熟末期的叶片中表达量最高,在花粉中表达量最低。姜志磊等^[25]对 2 个转 *Bt* 基因玉米株系进行了 Bt 蛋白含量的测定,表明 Bt 蛋白在玉米各个部位以及各个发育时期均表达,随着植株生长,Bt 蛋白表达量逐渐减少。在不同组织中 Bt 蛋白的表达量有显著性差异,叶片中表达量最高,根、种子和花丝中较少。但也有一些研究表明,Bt 蛋白的表达量在吐丝期达到峰值,之后呈下降趋势。含量随生育期的推移呈明显先上升后下降趋势,而在茎秆、花粉和子粒中保持比较稳定的水平,这可能与转基因材料种植季有关。Gutha 等^[27]在印度多个试验地种植一系列杂交玉米材料,并连续两年通过 ELISA 实验测定了 3 个发育时期的叶片中 Actin、EF1- α 和 GAPD 3 个内源蛋白的含量,结果表明,玉米内源蛋白的表达受到生长环境的影响较大。因此,评价转基因作物外源蛋白表达的稳定性的同时考虑遗传背景、发育时期、不同组织以及不同生长环境等因素。

转基因植株是否具有优良的目标性状,是评价其育种利用价值的关键。美国孟山都公司研发的第 1 代转 *Bt* 基因玉米 Mon810 对亚洲玉米螟和欧洲玉米螟具有较高的田间抗虫性^[28]。孙红炜等分别在玉米 6~8 叶期、花丝期、子粒期采集幼嫩部位饲喂玉米螟,24 h 后幼虫死亡率分别为 87%、100% 和 100%;田间鉴定在心叶期和吐丝期接虫,调查结果均为高抗。孙越等^[29]采用在培养室中接虫方法,鉴

定玉米螟心叶期的抗性;同时用灌浆期的子粒和苞叶对玉米螟进行饲喂,2 周后调查玉米螟的死亡率。结果表明,在饲喂 12 d 后,玉米螟的死亡率高达 80% 以上。本研究对转基因玉米 CM8101 心叶、雌穗尖、雄穗、花丝及子粒的玉米螟室内生测表明,CM8101 对亚洲玉米螟有较高的抗性,各组织饲喂 3 d 后,玉米螟死亡率均达 75% 以上;7 d 后死亡率达 100%。对 CM8101 在心叶期和吐丝期进行田间接虫鉴定。结果表明,对亚洲玉米螟的抗性水平为高抗。转基因玉米 CM8101 的 *Cry1Ab-Ma* 目的基因在转录和翻译水平稳定表达,不同世代各组织均对亚洲玉米螟有较强的杀虫效果,田间抗虫性等级为 1 级,抗性水平为高抗,抗虫效率在各世代间表现稳定。

参考文献:

[1] 陈立玲,张庆贺,薛 争,等. 吉林省玉米螟生物防治现状与展望[J]. 中国生物防治学报,2015,31(4):561-567.
Chen L L, Zhang Q H, Xue Z, et al. Current situation and prospect of biological control of corn borer in Jilin province[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2015, 31(4): 561-567. (in Chinese)

[2] 刘 臣,陈 琳,王冰洁,等. 四种 Bt 蛋白对六种重要鳞翅目害虫的杀虫活性评价[J]. 中国生物防治学报,2017(6):774-779.
Liu C, Chen L, Wang B J, et al. Insecticidal activity of four different Bt toxins against six important lepidopteran pests[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2017(6): 774-779. (in Chinese)

[3] 王旭静,张 欣,刘培磊,等. 复合性状转基因植物的应用现状与安全评价[J]. 中国生物工程杂志,2016,36(4):18-23.
Wang X J, Zhang X, Liu P L, et al. The application and safety assessment of stacked transgenic plant[J]. China Biotechnology, 2016, 36(4): 18-23. (in Chinese)

[4] 刘旭霞,张 楠. 中美转基因作物种植管理制度比较[J]. 中国生物工程杂志,2017,37(8):119-127.
Liu X X, Zhang N. Comparison of regulation on GM crops cultivation management in USA and China[J]. China Biotechnology, 2017, 37(8): 119-127. (in Chinese)

[5] Fromm M. Inheritance and expression of chimeric genes in progeny of the transgenic Plants[J]. Bio Teehnology, 1990, 8: 833-844.

[6] Nguyen H T, Jehle J A. Quantitative analysis of the seasonal and tis-

- sue-specific expression of Cry1Ab in transgenic maize Mon810[J]. Journal of Plant Diseases & Protection, 2007, 114(2): 82–87.
- [7] Kim J H, Kim H Y. Event-specific detection methods for genetically modified maize MIR604 using Real-time PCR[J]. Food Science & Biotechnology, 2009, 18(5): 1118–1123.
- [8] Zhang Y W, Liu Y J, Ren Y, et al. Overexpression of a novel Cry1Ie, gene confers resistance to Cry1Ac-resistant cotton bollworm in transgenic lines of maize[J]. Plant Cell Tissue & Organ Culture, 2013, 15 (2): 151–158.
- [9] James C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2017, ISAAA Briefs No.43, ISAAA: Ithaca, NY.
- [10] Bravo A, Gill S S, Mario Soberón. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control[J]. Toxicon, 2007, 49(4): 432–435.
- [11] Christou P, Capell T, Kohli A, et al. Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops[J]. Trends in Plant Science, 2006, 11(6): 302–308.
- [12] Marra M C, Piggott N E, Goodwin B K. The anticipated value of SmartStax™ for US corn growers[J]. Agbioforum, 2006, 13(1): 1–12.
- [13] 常雪, 王伟, 沈志成, 等. 转 *cry1Ab/cry2Aj*、*cry1Ab/vip3DA* 玉米对棉铃虫、甜菜夜蛾和斜纹夜蛾的抗性评价[J]. 植物保护学报, 2016, 43(6): 951–957.
- Chang X, Wang W, Shen Z C, et al. Evaluation of transgenic *cry1Ab/cry2Aj* and *cry1Ab/vip3DA* maize events for their resistance to *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera exigua* and *Prodenia litura*[J]. Journal of Plant Protection, 2016, 43(6): 951–957. (in Chinese)
- [14] Wang X J, Xin Z, Yang J T, et al. Effect on transcriptome and metabolome of stacked transgenic maize containing insecticidal cry and glyphosate tolerance epsps genes[J]. Plant J, 2018, 93(6): 951–957.
- [15] Dietzpfelstetter A. Stability of transgene expression as a challenge for genetic engineering[J]. Plant Science, 2010, 179(3): 164–167.
- [16] Du D X, Geng C J, Zhang X B, et al. Transgenic maize lines expressing a *cry1C**, gene are resistant to insect pests[J]. Plant Mol Biol Report, 2014, 32(2): 549–557.
- [17] 刘洋, 刘相国, 汪洋洲, 等. 抗虫抗除草剂转基因玉米 HiII-NGc-1 的遗传稳定性分析[J]. 生物技术进展, 2016, 6(6): 428–434.
- Liu Y, Liu X G, Wang Y Z, et al. Genetic stability analysis of insect-resistant and herbicide-tolerance transgenic maize HiII-NGc-1[J]. Current Biotechnol 2016, 6(6): 428–434. (in Chinese).
- [18] 岳同卿, 郎志宏, 王延锋, 等. 转 *Bt cry1Ah* 基因抗虫玉米的获得及其遗传稳定性分析[J]. 农业生物技术学报, 2010, 18(4): 638–644.
- Yue T Q, Lang Z H, Wang Y F, et al. Acquisition of the transgenic maize harboring *Bt cry1Ah* gene and analysis of its inheritable stability[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2010, 18(4): 638–644. (in Chinese)
- [19] 孙红伟, 李凡, 高瑞, 等. 转 *Gry1Ab/cry2Aj* 和 *G10evo-epsps* 基因玉米中 Bt 蛋白的时空表达及抗性评价[J]. 生物安全学报, 2018, 27(1): 63–68.
- Sun H W, Li F, Gao R, et al. Bt protein spatial-temporal expression and evaluation for resistance of transgenic *cry1Ab / cry2Aj* and *G10evo-epsps* maize[J]. Journal of Biosafety, 2018, 27(1): 63–68. (in Chinese)
- [20] 杨小艳, 翁建峰, 谢树章, 等. 转 *Cry1Ab-Ma* 基因抗虫玉米植株的获得及其后代分析[J]. 分子植物育种, 2015, 13(9): 1943–1948.
- Yang X Y, Weng J F, Xie S Z, et al. Construction and genetic transformation of plant expression vector harboring insect resistant gene *Cry1Ab-Ma* in maize[J]. Molecular Plant Breeding, 2015, 13(9): 1943–1948. (in Chinese)
- [21] Xie G N, Li Z X, Ran Q J, et al. Over-expression of mutated *Zm-DAl* or *ZmDAR1* gene improves maize kernel yield by enhancing starch synthesis[J]. Plant Biotechnology Journal, 2017, 16(1): 234–244.
- [22] 李桂玲, 李欢庆. 玉米抗螟性鉴定评价标准的研究[J]. 玉米科学, 2007, 15(5): 142–143.
- Li G L, Li H Q. Research on the criteria of evaluating standard for maize resistance to asian maize borer[J]. Journal of Maize Sciences, 2007, 15(5): 142–143. (in Chinese)
- [23] 龙丽坤, 李飞武, 李葱葱. 复合性状转基因玉米外源蛋白的时空表达规律[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(12): 29–33.
- Long L K, Li F W, Li C C. Spatiotemporal expression pattern of exogenous proteins of genetically modified corn with complex traits [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2014, 42(12): 29–33. (in Chinese)
- [24] Nguyen H T, Jehle J A. Quantitative analysis of the seasonal and tissue-specific expression of *Cry1Ab* in transgenic maize Mon810 [J]. Journal of Plant Diseases & Protection, 2007, 114(2): 82–87.
- [25] 姜志磊, 刘德璞, 李晓辉. 转基因抗虫玉米 Bt 毒蛋白的时空表达分析[J]. 吉林农业科学, 2008, 33(6): 35–37.
- Jiang Z L, Liu D P, Li X H. Studies on the temporal and spatial expressions of Bt toxin protein of Bt transgenic maize[J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 2008, 33(6): 35–37. (in Chinese)
- [26] Székács A, Lauber É, Juracek J. Cry1Ab toxin production of Mon810 transgenic maize[J]. Environmental Toxicology & Chemistry, 2010, 29(1): 182–190.
- [27] Gutha L R, Purushottam D, Veeramachaneni A, et al. Expression of endogenous proteins in maize hybrids in a multi-location field trial in India[J]. Transgenic Research, 2018, 27(4): 1–12.
- [28] 王冬妍, 王振营, 何康来, 等. Bt 玉米杀虫蛋白含量的时空表达及对亚洲玉米螟的杀虫效果[J]. 中国农业科学, 2004, 37(8): 1155–1159.
- Wang D Y, Wang Z Y, He K L, et al. Temporal and spatial expression of Cry1Ab Toxin in transgenic Bt corn and its effects on asian corn borer, *ostrinia furnacalis*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2004, 37(8): 1155–1159. (in Chinese)
- [29] 孙越, 刘秀霞, 李丽莉, 等. 兼抗虫、除草剂、干旱转基因玉米的获得和鉴定[J]. 中国农业科学, 2015, 48(2): 215–228.
- Sun Y, Liu X X, Li L L, et al. Production of transgenic maize germplasm with multi-traits of insect-resistance, glyphosate-resistance and drought-tolerance[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2015, 48(2): 215–228. (in Chinese)

(责任编辑: 朴红梅)