

文献综述

转基因玉米的研究与应用^{*}

程焉平

(吉林师范大学生物系, 吉林 四平 136000)

摘要: 转基因玉米是目前植物基因工程的研究热点之一, 已有转基因抗虫玉米、抗除草剂玉米进入商品化生产。本文就转基因玉米的受体系统、转化方法、实际应用及其安全性问题进行了综述。

关键词: 玉米; 转基因; 研究与应用

中图分类号: S 513.035.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2003)01-0028-03

The Research and Application Transgenic Maize

CHENG Yan-ping

(Department of Biology, Jilin Normal University, Siping, Jilin Province 136000, China)

Abstract: Recently, transgenic maize has become one of the debating hot spots in the field of plant genetic engineering. Transgenic maize with insect resistance and herbicide resistance have been put into commercial production. In this paper, we will discuss some problems which relate to transgenic maize receptor system, transforming method, practical application and biosafety.

Key words: maize; gene transformation; research and application

玉米(*Zea mays* L)是世界上重要的粮食和饲料作物, 种植面积仅次于小麦和水稻, 单位面积产量居全球之首。由于玉米在中国乃至世界粮食生产上的重要地位, 因而其转基因研究也成为全球的热点之一。目前, 转基因玉米在全世界的种植面积居第二位, 2000年及2001年均均在1 000万 hm^2 左右, 仅次于转基因大豆。其中, 抗虫(Bt)玉米的种植面积最大, 其次是抗除草剂转基因玉米^[1, 2]。近年来, 不论是玉米的遗传转化研究还是各种转基因玉米品种的选育及其商业化生产都已取得了可观的进展。

1 玉米转化的受体材料

目前, 要建立一个良好的遗传转化受体系统尚需要解决: 受体系统再生频率低、基因型依赖性强、再生细胞部位与感受态细胞不一致、对农杆菌侵染不敏感或发生过敏反应等一系列问题^[3]。所谓植物遗传转化系统是指用于转化的外植体通过组织培养途径或非组织培养途径, 可高效、稳定地再生无性系, 并能接受外源基因的整合以及对转化选择性抗

生素敏感的再生系统。玉米遗传转化受体系统应具备如下条件: ①高效稳定的再生能力。用于转化的受体系统一般应具有80%~90%以上的再生频率, 而且每块外植体上必须再生数量尽可能多的丛生苗^[4]; ②受体材料要有较高的遗传稳定性。建立系统时应避免体细胞发生突变; ③具有稳定的外植体供应来源。如幼胚等; ④对选择性抗生素敏感。即在一定抗生素浓度的选择性培养基中, 非转化细胞的生长、发育和分化受到抑制, 而转化的植物细胞可正常分裂和分化; ⑤对农杆菌的侵染有敏感性但无过敏反应。受体材料的类型包括: (a)原生质体。禾本科作物的早期转化工作主要是用原生质体进行的。转化方法主要包括: 电激法^[5]和PEG介导法^[6]。用原生质体作为受体系统可直接进行转化, 而且转化率较高, 但由于玉米的原生质体分离和再生完整植株很难, 所以, 目前已很少采用原生质体作受体系统; (b)胚性愈伤组织和胚性细胞悬浮系。胚性愈伤组织和胚性细胞悬浮系是目前最受欢迎的

* 收稿日期: 2002-04-05

作者简介: 程焉平(1954—), 男, 吉林省通化市人, 吉林师范大学生物系副教授, 从事遗传学及生物技术教学。

玉米转化受体系统。主要的转化方法有:电激法^[7]、基因枪法^[8]、PEG 介导法^[9]和碳化硅纤维法^[10]。该转化体系操作简单,可避免原生质体系统中原生质体分离再生上的困难。由胚性愈伤组织建立的胚性细胞悬浮系其转化率略高于直接采用胚性愈伤组织,但建立悬浮系需要一定的组织培养经验,且悬浮系产生再生植株比较难^[11]; (c) 外植体。为了避免繁锁的细胞和组织培养过程,缩短实验周期,减少变异和不孕、不育等现象对转化率的影响,许多研究者都采用子房、花粉等作为受体系统进行转化,并已获得成功^[12,13]。当然,此受体系统的转化后代群体较大,需简便可靠的筛选方法。

2 玉米的转化方法

2.1 基因枪法

基因枪法 (particle bombardment, particle gun, gene gun, microprojectile, biological ballistics, biolistics) 是借助高速运动的金属微粒将附着在其表面上的核酸分子导入受体细胞的遗传转化技术,在已获得的转基因玉米中,有一半以上是由基因枪法进行转化的。1989 年, Klein 等人用基因枪法将 GUS 和 pat 基因导入玉米悬浮细胞系中,首次获得转基因玉米^[14]。此后,基因枪技术便成为转基因玉米研究的主要技术手段。Vain 等人 (1993) 采用在打枪前后在含有 0.2 mol/L 山梨醇和 0.2 mol/L 甘露醇的培养基上对玉米胚性细胞进行高渗处理,使玉米瞬间表达的转化率和稳定表达的转化率分别提高了 2.7 倍和 6.8 倍^[15]。基因枪法的主要优点是可将外源基因直接转入可再生的细胞团中。另外,此方法没有明显的宿主限制,可转化多种组织和器官。转化受体可以是胚性悬浮细胞,愈伤组织、未成熟胚分生组织,也可以是花粉、茎尖等。但以悬浮细胞为更理想的转化受体^[16]。基因枪法的缺点是转化率较低,导入的外源基因的拷贝数较多。

2.2 PEG 介导法

借助聚乙二醇 (PEG) 可诱导质粒 DNA 转化植物细胞,加入适量的钙离子可提高转化率。PEG 可促使细胞与 DNA 间接触与粘连,并通过引起膜表面电荷的紊乱及干扰细胞间的识别来促进外源 DNA 进入原生质体。PEG 法是目前应用最多的直接转移基因的方法之一。它可以打破农杆菌宿主范围的限制,便于禾谷类作物的遗传转化。此方法的实验成本低,结果稳定,重复性好,尤其是不需要特殊仪器设备,易于推广。PEG 方法的不足之处是:以原生质体为基因受体,需要建立可靠高效的原生

质体再生系统^[17]。

2.3 电激法

电激法是利用高速电脉冲在植物细胞壁上打开一个微孔,并将目的 DNA 与细胞在溶液中混合, DNA 分子则可以通过微孔进入细胞,从而组入受体细胞的基因组中。Hallui 等 (1992) 用电激法轰击 I 型胚性愈伤组织获得转基因植株^[18]。Chowrira G M 等 (1995) 用此方法在玉米中进行了抗除草剂转基因研究并获得成功^[19]。电激法弥补了基因枪法转化要求用 II 型胚性愈伤组织的不足,对基因型的依赖程度大大降低。

2.4 子房注射法

子房注射法是用微玻针将外源 DNA 注入子房中,使其在合子胚旺盛分裂中进入细胞并整合到受体基因组中。丁群星等 (1993) 用子房注射法将 Bt 基因导入玉米子粒中并获得了转基因玉米 (T0)^[20]。子房注射法可免去组织培养过程,并由此避免了由组培产生的各种弊端。

2.5 农杆菌介导法

虽然作为单子叶植物的玉米对农杆菌介导感染缺乏创伤效应,但近几年通过研究者的努力,已成功地用农杆菌介导法将外源基因导入玉米等禾本科作物中。Ishida Y 等 (1996) 用带有 GUS 和 Bar 基因的农杆菌感染玉米自交系 A188 幼胚获得成功^[21]。与其它方法相比,农杆菌介导法通过一次转化更容易使单拷贝基因插入基因组中,利于外源基因的表达。

除上述方法外,碳化硅纤维介导法和阳离子转化法在玉米转化研究中也起到良好的作用^[4]。

3 转基因玉米的应用

3.1 抗除草剂转基因玉米

选育抗除草剂转基因作物品种是一种高效、低成本的控制杂草的手段。近年来,随着基因转化技术的不断完善,科学工作者培育出了一大批抗除草剂转基因玉米品种。如抗咪唑啉酮玉米、抗稀禾定玉米、抗 Liberty 玉米、抗农达玉米、抗 Poast 玉米、抗草甘膦玉米、抗草铵膦玉米、抗草丁膦玉米等^[19]。

3.2 抗虫转基因玉米

玉米在抗虫转基因研究中占有十分重要地位。2001 年,其种植面积达到 590 万 hm^2 , 占全球抗虫转基因作物种植面积的一半以上^[22]。目前,向玉米中转入的抗虫基因主要是 Bt 毒蛋白基因,并已进入商品化生产。玉米生产的主要害虫是玉米螟,故转基因抗虫玉米的主要研究集中在抗玉米螟品种的选

育上。1993 年, Koziel 等将 CryIA(b) 基因的一部分转入玉米自交系幼胚盾片中, 获得了高水平表达 CryIA(b) 的植株, 并表现出很强的抗玉米螟的能力^[22]。

3.3 抗病转基因玉米

抗病转基因玉米的主要目标是抗病毒和抗真菌病害。研究发现玉米矮花叶病毒(MDMV)B 株外壳蛋白在转基因植株中表现出对 MDMV 的抗性^[23]。另外, 转几丁质酶基因玉米被认为具有抗真菌病害的效果^[24]。

3.4 玉米雄性不育

采用基因工程技术使母本不育, 但经过处理其育性又能恢复, 此项技术可大大降低杂交制种的成本。研究发现, 细胞毒素(cytotoxin)在花粉中表达即可抑制花粉发育, 而第二个基因的产物又可恢复其花粉的育性^[25]。Leemans 等(1992)报道, 编码核糖核酸酶(barnase)的基因可导致玉米雄性不育^[25]。此外, 分子生物学研究发现细胞质雄性不育(cytoplasmic male sterility; CMS)与线粒体有关, 已在玉米的线粒体 DNA 上找到与 CMS 有关的基因^[26]。

3.5 利用转基因玉米生产工业蛋白

Hood 等(1997)报道通过转基因玉米生产鸡蛋抗毒素白蛋白, 目前已经进行商业化生产。美国的 ProdiGene 公司用转基因玉米生产 β -葡萄糖苷酸酶(GUS)也已经进入商业化生产^[16]。

4 转基因玉米的安全性问题

为了使转基因研究健康、有序及其产业化的可持续发展, 必须要加强其安全性方面的研究。转基因玉米的安全性问题大多与其它作物类似, 但也具有自身的特点。

4.1 转基因玉米发生杂草化的机率虽然不大, 但也存在“基因逃逸”的问题。例如, 玉米野生近缘种为玉米草。而除了 *Z. perennis* 外, 所有的玉米草都可与栽培玉米形成杂交种, 从而使转入的外源基因(特别是抗性基因)逃逸到玉米草中, 形成杂草化问题^[27]。

4.2 抗虫转基因玉米的释放可能引起害虫产生抗性, 从而使抗虫效果降低。此外, 抗虫转基因玉米的使用还可能引发害虫寄主的转移, 使原来的次要害虫上升为主要害虫^[28]。

4.3 转基因玉米的释放可能对野生植物群落产生不良影响。如抗性基因的“漂移”可能改变野生植物的适应性, 并还有可能对“非目标生物”产生危害。

另外, 过多地使用除草剂还会造成环境的污染。

4.4 标记基因(尤其是用抗生素基因作标记)可能会发生基因的“水平转移”, 从而对人体产生负面影响, 如抗生素抗性基因与人体内病原物发生“异源重组”, 则会降低抗生素在临床医疗过程中的有效程度。

4.5 食品安全问题是目前转基因产品能否顺利进入市场的关键所在。而人们最担心的也正是这一问题。例如, 导入生物体的“外源基因”是否使该物种的原有基因发生对食用者有害的基因突变, 或产生有害的基因产物。还有, 导入转基因食品的“外源基因”及其蛋白质产物是否会产生危害消费者健康的有毒性或过敏性物质。

4.6 外源基因表达的稳定性是非常重要的。如抗虫和抗除草剂基因, 一旦表达量达不到预期的标准, 则会给农业生产造成不可弥补的损失。

虽然转基因玉米的研究及其产业化生产中存在安全性问题, 而且人们暂时还难以预料其究竟会对人类产生多大的负面效应。但同时, 人类又急需这项技术来解决全球性食物短缺问题。摆在我们面前的只有一条路: 在继续研究和利用转基因玉米的同时, 高度重视其安全性评价与管理, 从而求得其健康、安全、持续的发展。

参考文献:

- [1] James C. Global status of commercialized transgenic crops: 2000 [M]. ISAAA: Ithaca, N. Y., 2000.
- [2] James C. Global status of commercialized transgenic crops: 2001 [M]. ISAAA: Ithaca, N. Y., 2001.
- [3] Christow P. Strategies for variety-independent genetic transformation of important cereals [J]. Euphytica, 1995, 85: 13-27.
- [4] 杜鹃, 王昱, 王萍, 等. 玉米遗传转化系统的研究进展 [J]. 遗传, 2001, 23(1): 69-72.
- [5] Laursen C M. Production of fertile transgenic maize by electroporation of suspension culture cells [J]. Plant Mol Biol, 1994, 24: 51-61.
- [6] Lusardi M C. An approach towards genetically engineered cell fate mapping in maize using the Lc gene as a visible marker [J]. Plant, 1994, 5: 471-582.
- [7] Wan Y. Tape I calls as a bombardment target for generating fertile transgenic maize (*Zea mays* L.) [J]. Plants, 1995, 196: 7-14.
- [8] Demehey B K. Comparison of selective agents for use with the selectable marker gene bar in maize transformation [J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 1994, 36: 1-7.
- [9] Kramer C. Selection of transformed protoplasts derived *Zea mays* colonies with phosphinothricin and a novel assay using the pH indicator chlorophenol red [J]. Planta, 1993, 190: 454-458.
- [10] Kaeppler H F. Silicon carbide fiber-mediated stable transformation of plant cells [J]. Theor Appl genet, 1992, 84: 560-566.

[11] 王景雪, 孙毅, 杜建中. 玉米转基因研究进展[J] . 生物技术通报, 2001, (2): 13-16.

[12] Koziel M G. Field performance sof elite transgenic maize plant expressing an insecticidal protein derived from Bacillus thuringien-sis[J] . Bio/ Technology, 1993, 11: 194.

[13] Low K. Germline transformation of maize fowing maipulation of chimeric shoot meristems[J] . Bio/ Technology, 1995, 13: 677-682.

[14] Klein T M .Genetic trains fom ationo fmaizecell spart i clebomber dment[J] . Plant Physiol, 1989, 91: 440-444.

[15] Vain P.Osmotie teatment enhances particle bombardment— me-diated transient and stable transformation of maize[J] . Plant Cell Rep 1993, 12: 84-88.

[16] 赵久然, 郭景伦, 腾海涛, 等. 玉米转基因研究进展[J] . 玉米科学, 2000, 8(3): 14-17.

[17] Neill O, Horváth C M, Horváth G V. Chlomplast transforma-tion in plants: polyethylene glycol (PEG) treatment of protoplas-ts is an alternative to biolistic delivery systems[J] . The Plant Joumal 1993, 3: 729-738.

[18] Hallui K, Bonne E, Bossut M, et al. Transgenic maize plants by tissue electroporation[J] . The plant cell. 1992, 4: 1495-1505.

[19] Chow nia G M., Akella V, Lurquin P F. Electroporation— medi-ated gene transfer into intact nodal meristems in planta[J] . Molec. Biotech, 1995, (3): 17-23.

[20] 丁群星. 用子房注射法将 毒蛋白基因导入玉米的研究[J] . 中 国科学(B 辑). 1993, (23): 707.

[21] Ishida Y, et al. High efficiency transformation of maize (Zea mays L.) mediate by Agrobacterium tumefaciens[J] . Nature Biotechnology, 1996, (14): 741-750.

[22] Koziel M G. Field performance of elite transgenic maize plant ex-pressing an insecticidal protein derived from Bacillus thuringiensis [J] . Bio/ Technology, 1993, (11): 194-200.

[23] 黎裕, 王天宇. 转基因玉米的研究现状与未来[J] . 玉米科学, 2000, 8 (4): 20-22.

[24] 郝转芳, 毛雪, 李润植. 转基因改良植物抗真菌病害的策略及 其进展[J] . 生物技术通报, 2001, (6): 9-11.

[25] leemans J. Genetic engineering for fertility control[J] . Cell Biochem, 1992, 16: 203.

[26] 王永飞, 马三梅, 韩毅科, 等. 利用基因工程创造植物雄性不育 的策略[J] . 遗传, 2001, 23(3): 276-280.

[27] Doebley J. Molecular evidence for gene flow among Zea species [J] . Bioscience, 1990, 40: 443-448.

[28] 刘谦, 朱鑫泉 . 生物安全[M] . 北京: 科学出版社, 2001. 58-72.

欢迎订阅《黑龙江农业科学》

《黑龙江农业科学》是黑龙江省农业科学院主办的综合性学术期刊, 是全国优秀期刊、黑龙江省优秀期刊、“中国期刊方阵”期刊。

《黑龙江农业科学》是一份全面反映黑龙江省农业特色、内容丰富、信息量大、资料性强、国内外公开发行的综合性期刊。本刊以高新实效为原则, 以服务科研、服务生产为宗旨, 把以黑龙江省为主, 其它省区为辅的农业科研成果、科学技术、发展趋势以及新产品、新品种等及时地报道出去。让大家及时、准确地获得所需的科技信息。

本刊发行面广, 读者群大: 农业科研工作者、农业院校师生、国营农场及各农业技术推广部门的科技人员、管理干部和广大农民群众等。

本刊为国际大十六开本, 四封彩色, 52 页, 双月刊, 刊号: ISSN1002—2767, CN23—1204/S, 邮发代号 14—61, 单月 10 日出版, 每期定价 5.00 元, 全年 30.00 元(含邮费)。全国发行, 全国各地邮局(所)均可办理订阅手续。

欢迎业内人士投稿、刊登广告。

地址: 哈尔滨市南岗区学府路 368 号

《黑龙江农业科学》编辑部

电话: 0451—6668373

邮政编码: 150086

E—mail: nykx13579@sina.com