

# 用转基因技术进行玉米抗螟育种的研究进展

李霞<sup>1,2</sup>, 何康来<sup>2</sup>, 王振营<sup>2\*</sup>

(1. 沈阳农业大学植物保护学院, 辽宁沈阳 110161; 2. 中国农业科学院植物保护研究所植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100094)

**摘要** 提高玉米自身的抗螟性以减轻虫害损失是一项经济、有效的方法。目前在基因水平上有两种方法可以达到快速提高玉米抗螟性的目的: 一种是将外源抗性基因通过各种物理手段转入玉米植株中, 形成外源转基因玉米, 如转 Bt 基因抗虫玉米, 这种方法已成功应用于现实生产中。另一种方法是利用分子标记技术定位玉米本身的抗性基因并借助与之紧密连锁的分子标记对目标性状的基因型进行选择, 即分子标记辅助选择技术, 这种技术已开始用于玉米抗虫育种中, 而在抗玉米螟育种中还处于抗性基因的初级定位阶段。就此两种方法开展的玉米抗玉米螟育种研究的现状及其存在问题进行综述。

**关键词** 玉米; 转基因技术; 玉米螟; 育种

中图分类号 Q343.1+5 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)15-3616-03

## Research Progress in Resistant Maize Breeding to Corn Borer with Transgenic Technology

LI Xia et al (College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161)

**Abstract** Improving maize resistance to corn borer is an economical and effective technique to reduce the yield loss caused by insect damage. There are two methods and one of them is to transfer a foreign resistant gene expressing Bt toxin into maize plant, which has been used in practice. Another is molecular marker assisted selection (MAS). The markers tightly linked with favorable genes were used to select target traits. MAS was adopted in maize breeding for resistance to insect pests, but it was still on exploration stage. Current advance and problem in the related field were reviewed in this paper.

**Key words** Maize; Transgenic technology; Corn borer; Breeding

玉米是重要的粮食作物之一, 亚洲玉米螟 (*O. furnacalis*)、欧洲玉米螟 (*Ostrinia nubilalis*) 等螟类害虫是影响玉米产量和品质的重要因素。采用转基因技术将 Bt 杀虫蛋白基因导入玉米基因组中, 是抗螟育种的一种方法, 它可以使玉米迅速而定向地获得抗虫性, 同时又能保留原有良好的农艺性状。但目前 Bt 玉米中杀虫蛋白对非靶标生物和生态环境的影响尚有争议, 且存在靶标害虫抗性风险和人们对转基因作物食用安全的忧虑等。因此, 转 Bt 基因玉米大面积推广种植还面临相当大的阻力。利用分子标记辅助选择是玉米抗虫育种中另一个很有前途的发展方向, 定位、分离和克隆玉米本身的抗虫基因, 在分子水平上对其进行操作并加以利用, 则可以大大加速育种的进程, 克服传统育种方法周期长、效率低、抗源缺乏和杂交不育等弊端, 同时抗性由多基因控制, 对多种螟虫均有一定的抗性, 使抗性稳定而又持久。目前分子标记辅助选择主要处于抗虫基因初级定位的阶段, 与之相关的分子标记技术和统计分析软件还需要进一步的发展和完善。笔者就用转基因方法进行玉米抗螟育种的研究进展及存在问题进行综述。

## 1 转外源抗虫基因玉米

**1.1 转外源抗螟基因玉米的研究进展** 目前在玉米抗螟育种中常用的外源基因是 Bt 杀虫蛋白基因。国内外已成功地运用 PEG 介导法、农杆菌法、基因枪轰击法、子房注射法等多种转化方法<sup>[1-3]</sup>, 将 Bt 杀虫蛋白基因导入玉米的基因组中, 成功获得了 Bt 玉米。目前普遍应用的 Bt 玉米杂交种的基因类型有 Gy1Ab (Bt11、MON810、176)、Gy9C (CBH51)、Gy1Ac (DBT418) 和 Gy1F 基因 (Tc 1507)。

转 Bt 基因抗虫玉米对靶标害虫的防治效果非常显著, 在自然发生和人工接种条件下, Bt 玉米的产量不受玉米螟的影响, 比非 Bt 玉米增产 10% 以上<sup>[4]</sup>。表达 Gy1Ab 杀虫蛋

白基因的 Bt 玉米对食叶和蛀茎的一、二代欧洲玉米螟和亚洲玉米螟都有较高的抗性<sup>[5]</sup>。但是转 Bt 基因作物杀虫蛋白的表达存在着时空差异, 不同生命期, 不同部位, 杀虫效果不同, 对害虫的控制效果也有明显差异。Gy1Ab 杀虫蛋白在 Bt 玉米 Mon810 和 Bt11 中以营养生长阶段的心叶组织表达最高, 生殖生长阶段的花粉中含量最低<sup>[6,7]</sup>, 这种时空差异除了与启动子或 Bt 基因插入位点不同有关外<sup>[4]</sup>, 还与环境因素及播期有关<sup>[8]</sup>。

Bt 玉米是全球商品化程度最快的抗虫转基因作物之一。NatureCard 公司在 1996 年开始以 176 (Gy1Ab) 登记转基因玉米并以商品名生产。1997 年美国环保署 (EPA) 正式批准了 3 种转 Bt 蛋白基因的玉米杂交种上市销售, 包括“176”、“MON810”和“Bt11”。我国自 1993 年报道<sup>[3]</sup> 成功地获得 Bt 抗玉米螟转基因玉米以来, 已将 Bt 基因导入 E28、340、4112 等优良自交系并培养出抗玉米螟转基因玉米新品种。国产 Bt 玉米于 1997~2000 年, 先后在河北、山东和北京进行中间试验, 在河南、山东、黑龙江、吉林和辽宁等省进行环境释放试验。

## 1.2 转基因玉米面临的问题

**1.2.1 潜在风险。** 自从《Nature》杂志报道了 Bt 玉米花粉对大斑蝶 (*Danaus plexippus* L.) 幼虫有影响后, Bt 玉米对生态环境及其他方面产生的潜在影响越来越受到重视。国内外的学者围绕转 Bt 基因玉米花粉对非靶标生物的影响和 Bt 杀虫蛋白与土壤生态环境的相互作用等内容作了大量研究。研究表明, Bt 玉米对有益昆虫如瓢虫、草蛉和花蝽等没有不良影响<sup>[9,10]</sup>。Gawley<sup>[11]</sup> 对转基因的玉米在 12 个地点进行 10 年的观察, 并没有发现这些转基因作物具有较强的入侵性。虽然进入土壤中的杀虫蛋白在一定时期内仍有活性<sup>[12,13]</sup>, 但是它对秸秆的降解没有不良影响<sup>[14]</sup>, 对土壤微生物基本没有毒性<sup>[15,16]</sup>。另外, 针对《Nature》刊登的 1999 年由 Losey 等引发的大斑蝶事件和 2001 年由 Qvist 等引发的转基因渗入墨西哥当地玉米品种事件, 其他学者进行了更为细致、严密的研究, 结果发现, Losey 等试验设计没有合理

基金项目 国家“十五”攻关课题 (No. 2004BA520A15) 资助。

作者简介 李霞 (1978-), 女, 山东烟台人, 博士研究生, 研究方向: 玉米抗螟分子标记。\* 通讯作者, E-mail: wangzy61@yahoo.com.cn。

收稿日期 2006-04-29

的对照和具体的供试花粉剂量及毒素浓度,而 Quist 等则因为反向 PCR 引物设计的不当把从墨西哥当地玉米品种 K1、A3 中扩增出的产物误认为与转基因玉米品种中的 *adh1* 基因同源。可见两个事件在试验设计上均存在一定的缺陷<sup>[17]</sup>。目前还没有关于转 Bt 杀虫蛋白基因玉米对生态环境产生不利影响的报道,但是转 Bt 杀虫蛋白基因玉米的应用,对整个农田生态系统其他因子的直接和间接影响,应加以深入和长期的监测研究。

**1.2.2 害虫的抗性及抗性治理。**1985 和 1990 年在美国的夏威夷和佛罗里达州分别发现小菜蛾(*Plutella xylostella* Linnaeus)田间种群对 Bt 杀虫剂产生了很高的抗性<sup>[18,19]</sup>。另外发现有 10 多种昆虫在实验室条件下对 Bt 蛋白产生了抗性<sup>[20]</sup>。因此,国内外对害虫的抗性治理问题开展了大量研究,并就此提出了两个基本策略:一是“庇护所”策略,即转基因玉米与非转基因玉米混合播种,使“庇护所”的敏感个体与来自邻近 Bt 玉米田的抗性个体交配产生杂合后代,以延缓抗性产生和发展。计算机模型模拟表明,保护敏感个体的存活和迁移或对害虫种群中释放敏感个体可以大大延缓抗性的产生<sup>[21]</sup>,Liu<sup>[22]</sup>为这一策略可以延缓害虫抗性的产生提供了试验依据。二是基因策略,即通过联合使用 Bt 蛋白基因和其他类型的抗虫基因,增加抗虫基因的多样性来延缓害虫抗性的产生和发展。

## 2 玉米自身的抗虫基因的分子标记辅助选择

分子标记技术的发展为抗虫育种提供了一种新的方法,通过它可以检测到控制复杂目标性状遗传变异的 QTL,并可能在育种的过程中对目标 QTL 进行选择。Thompson 提出当目标性状的遗传率很低,而 QTL 所揭示的遗传变异比例很高且需要选择的 QTL 在各种环境下的表达一致时, MAS 较传统表型选择有效,尤其是当 QTL 与环境互作效应很小时,用 MAS 选择更有效。常规的抗螟种质创新和育种过程中,人工接虫、剖秆调查工作相当麻烦,并且容易受到环境、人为因素的影响,传统选择率不高。Hint-Garcia<sup>[23]</sup>比较了传统轮回选择和 MAS 对欧洲玉米螟抗性的选择效率,发现 MAS 对玉米的二代欧洲玉米螟抗性和敏感性选择都是有效的。Wlax<sup>[24]</sup>利用 MAS 成功地对西南玉米螟抗性进行选择,共找到 3 个 QTL,分别位于第 7、9、10 号染色体上,可以解释 28% 的表型变异,通过对这 3 个 QTL 的分子标记辅助选择发现后代品系抗虫性明显提高。但是目前受各种因素影响还不能准确的定位出相关的 QTL,一些试验证明 MAS 的选择是无效的,如 Bohn<sup>[25]</sup>通过对西南玉米螟和甘蔗螟的 MAS 效果分析,认为如果不能找到有更大遗传效应的 QTL 或不能降低检测成本, MAS 价值不大。所以 MAS 用于玉米抗螟育种还需要更多的基础研究工作。

**2.1 玉米抗虫基因定位研究进展** 利用分子标记辅助选择,进行抗虫育种,目前还处于基因初级定位阶段。近年来,国外对欧洲玉米螟、西南玉米螟和甘蔗螟抗性 QTL 的遗传研究取得了重要进展,利用 SSR 等多种分子标记技术检测到 300 多个与抗螟性相关的 QTLs。国内对亚洲玉米螟的抗性 QTL 研究才刚刚开始。于永涛<sup>[26]</sup>2003 年以自交系 H21 × M617 和自 330 × K36 为材料,对控制玉米对亚洲玉米

螟抗性的 QTL 进行定位,分别检测到 9 和 8 个 QTL,其中位于 1.02/03 和 8.03/04 的 2 个 QTL 位点是两个群体所共有的。虽然各试验中检测到的 QTL 结果并不一致,但是还是发现有些 QTL 成簇存在并在多个作图群体中被检测到,其中位于染色体 1.07,1.11,3.04,5.06,7.04,9.05,10.04 上的几个基因簇在多个试验群体中被检测到对 4 种螟虫都具有抗性<sup>[27]</sup>,说明玉米对各种害虫的抗性机制在某种程度上是相同或相似的,通过对一种害虫的抗性筛选可能会对几种害虫同时产生抗性,这一发现对抗虫育种具有重要的意义。

**2.2 MAS 的进一步发展应用**直接决定于 QTL 定位的准确度 MAS 利用与 QTL 紧密连锁的分子标记间接的选择目标 QTL,从而达到选择目标性状的目的,其选择效果直接决定于 QTL 定位的准确度。作图群体的类型和大小、环境,育种水平、不同的 QTL 分析方法等因素都会影响到 QTL 定位结果。

**2.2.1 群体类型的影响。**Papst<sup>[28]</sup>在相同的环境下,采用复合区间作图法,在 D06 × D408 的 F<sub>2,3</sub> 家系中检测到 4 个与欧洲玉米螟茎秆为害抗性相关的 QTL;而在 F<sub>2,3</sub> 家系的 TC 后代中检测到 6 个与欧洲玉米螟茎秆级别抗性相关的 QTL,其中位于染色体 1.01,6.06,8.04 位置的 3 个 QTL 在 F<sub>2,3</sub> 家系中也被检测到。说明相同自交系组合的不同作图群体检测到的大部分 QTL 是一致的,但也有一部分是不同的。Groh<sup>[29]</sup>比较了 RIL 群体中检测到的 QTL 与 TC 群体检测到的 QTL 的一致性,在 TC 群体中检测到 4 个与 SWCB 叶片受害程度抗性相关的 QTL,与 RIL 群体中检测到的 9 个 QTL 比较分析发现有 2 个 QTL 是两个作图群体共有的。Groh 认为测交种的遮盖效应降低了 TC 后代的遗传率,从而使检测到的 QTL 数量减少,影响到 QTL 检测效果。

**2.2.2 环境因素的影响。**Janpatong<sup>[30]</sup>分别在 3 个不同的地点对 B73H × M647 的 244 个 F<sub>2,3</sub> 群体的一代欧洲玉米螟抗性 QTL 进行比较分析,结果发现,在 3 个不同的环境中分别检测到 7、3、3 个一代欧洲玉米螟抗性 QTL,其中只有位于染色体 1.05/06,6.02 位置的 2 个 QTL 在 3 个环境中被同时检测到。受环境因素的影响,那些仅在 1 个环境中检测到的 QTL 的位置和效应是随机的,不准确的。因此只有那些在不同环境中同时检测到的 QTL 才是可靠的,可以用于 MAS。

**2.2.3 样品量大小的影响。**作图群体的样本量大小能够影响到 QTL 的检测能力,Bohn<sup>[27]</sup>利用 CML131 × CML67 的 171 个 F<sub>3</sub> 群体,分别检测到 6 和 10 个与西南玉米螟和甘蔗螟叶片为害程度相关的 QTL,这些 QTL 分别能够解释 34.2%、60.2% 的表型变异。与上述结果相似,大部分试验中检测到的 QTL 只能解释约一半的遗传变异,说明受样本因素的影响还有些 QTL 没有被检测到,增加样本量能够提高 QTL 的检出率。但是高费用和高劳动量限制了样本容量的扩大,因此可以使用与抗性相关的其他性状(如叶片中的蛋白含量和丁布含量等遗传率高且可以准确测量的性状)进行连锁分析,以提高 QTL 的检测能力<sup>[23]</sup>。

**2.2.4 QTL 分析方法的影响。**Bohn<sup>[27]</sup>利用复合区间作图法(CM)检测到位于染色体 2 上的 1 个 QTL 对甘蔗螟取食叶片有抗性作用,它与另 1 个 QTL 连锁并且作用相反;在用

区间作图法分析时却没有发现这 2 个 QTL, 其原因在于 CIM 在回归模型中使用选定的标记作为协因子, 增加了 QTL 的检测能力, 并可以检测到那些处于排斥状态的连锁 QTL, 克服了区间作图法的缺陷。

### 3 展望

21 世纪, 随着信息技术和生物技术的迅猛发展, 以及人类对环境保护的要求越来越高, 利用转基因技术进行玉米抗螟育种已取得一定进展。转 Bt 基因抗虫玉米已用于农业生产中, 并带来可观的经济效益, 但是外源转基因玉米对整个农田生态系统及其他因子的直接和间接影响还不够明确, 并存在害虫对其产生抗性的潜在风险, 因此转 Bt 基因抗虫玉米对生态环境的潜在影响和害虫抗性治理问题成为目前国内外研究的热点问题。而利用玉米天然抗性基因提高玉米抗螟性还处在初级阶段, 随着分子标记技术的发展、越来越饱和的遗传图谱的构建以及更完善的试验方案和更为有效的统计分析方法的提出, 分子标记辅助选择以及 QTL 克隆分离等方面将会得到全面地发展。另外通过对单个转入基因和抗性 QTL 同时进行 MAS 可以结合两种方法的优势, 培育出高效、持久的抗性玉米品系。

### 参考文献

- [1] RHODES C A, HERCE D A, METTLER J, et al. Genetically transformed maize plants from protoplasts[J]. *Science*, 1988(240): 204 - 207.
- [2] 姚丹, 王丕武, 刘占柱, 等. 农杆菌介导法将 Bt 杀虫蛋白基因导入玉米自交系的研究[J]. *吉林农业大学学报*, 2004, 26(1): 27 - 31.
- [3] 丁群星, 谢友菊, 戴景瑞, 等. 用子房注射法将 Bt 毒蛋白基因导入玉米的研究[J]. *中国科学 B 辑*, 1993, 23(7): 707 - 713.
- [4] ARCHER T L, CARL PATRICK, GRETA SCHLISIER, et al. Ear and shank damage by corn borers and corn earworms to four events of *Bacillus thuringiensis* transgenic maize[J]. *Gop Protection*, 2001(20): 139 - 144.
- [5] HE K L, WANG Z Y, ZHOU D R, et al. Evaluation of transgenic Bt corn for resistance to the Asian corn borer (Lepidoptera: Pyralidae)[J]. *J Econ Entomology*, 2003, 96(3): 935 - 940.
- [6] 王冬妍, 王振营, 何康来, 等. Bt 玉米杀虫蛋白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.
- [7] TRACRE S B, CARLSON R E, HICHER C D, et al. Bt and non Bt maize growth and development as affect by temperature and drought stress[J]. *Agronomy Journal*, 2000, 92(5): 1027 - 1035.
- [8] HICHER C D, RICE M E. Effect of planting dates and *Bacillus thuringiensis* corn on the population dynamics of European corn borer (Lepidoptera: Grammididae)[J]. *J Econ Entomology*, 2001, 94(3): 730 - 742.
- [9] WOLD S J, BURKNESS E C, HUTCHSON W D, et al. Infield monitoring of beneficial insect populations in transgenic corn expressing a *Bacillus thuringiensis* toxin[J]. *J Ecto Science*, 2001, 36(2): 177 - 187.
- [10] 刘慧. 转 Bt 基因玉米对节肢动物群落多样性的影响[D]. 北京: 中国农业科学院研究生院, 2005.
- [11] CRAWLEY M J, BROWNS L, HAILS R S, et al. Bt technology: transgenic crops in natural habits[J]. *Nature*, 2001(409): 682 - 683.
- [12] ZWAHLEN C, HLBECK A, GUGERLI. Degradation of the GylAb protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* corn tissue in the field[J]. *Molecular Ecology*, 2003(12): 765 - 775.
- [13] 白耀宇, 蒋明星, 程家安, 等. 转 Bt 基因水稻 GylAb 杀虫蛋白在水稻土中的降解[J]. *中国水稻科学*, 2004, 18(3): 255 - 261.
- [14] CORIET J, ANDERSEN M N, CAULS, et al. Decomposition processes under Bt (*Bacillus thuringiensis*) maize: results of a multi-site experiment[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005(37): 1 - 5.
- [15] WU W X, YE Q F, MIN H, et al. Bt-transgenic rice straw affects the culturable microbiota and dehydrogenase and phosphatase activities in a flooded paddy soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004(36): 289 - 295.
- [16] 王洪兴, 陈欣, 唐建军, 等. 转 Bt 基因水稻秸秆降解对土壤微生物可培养类群的影响[J]. *生态学报*, 2004, 24(1): 89 - 94.
- [17] 陈茂, 叶恭银, 胡萃. 《Nature》有关转基因玉米生态安全争论性报道的回顾[J]. *生态学杂志*, 2004, 23(2): 80 - 85.
- [18] TABASHNIK B E, CUSHING N L, HINSON N, et al. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Hutteridae)[J]. *J Econ Entomology*, 1990(83): 1671 - 1676.
- [19] MC CAUGHY W H. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*[J]. *Science*, 1985(229): 193 - 195.
- [20] TABASHNIK B E, ROUSH R T, EARLE E D, et al. Resistance to Bt Toxins[J]. *Science*, 2000(287): 42.
- [21] BOURQUET D, GENISSEL A, RAYMOND M. Insecticide resistance and dominance levels[J]. *J Econ Entomology*, 2000, 93(6): 1588 - 1595.
- [22] HU Y B, TABASHNIK B K. Experimental evidence that refuges delay insect adaptation to *Bacillus thuringiensis*[J]. *PRSL (Series B): Biological Sciences*, 1997(264): 605.
- [23] FIUNT GARCIA S A, DARRAH L L, MC MULLEN M D. Phenotypic versus marker-assisted selection for stalk strength and second-generation European corn borer resistance in maize[J]. *Theor Appl Genet*, 2003(107): 1331 - 1336.
- [24] WILCOX M C, KHARALLAH M M, BERGMANSON D, et al. Selection for resistance to Southwestern corn borer using marker-assisted selection and conventional backcross[J]. *Gop Sci*, 2002(42): 1516 - 1528.
- [25] BOHN M, SCHLIZ B, KREPS R, et al. QTL mapping for resistance against the European corn borer (*Ostrinia nubilalis* Hbn.) in early maturing European dent germplasm[J]. *Theor Appl Genet*, 2000(101): 907 - 917.
- [26] 于永涛. 玉米对亚洲玉米螟抗性的 QTL 分析[D]. 保定: 河北农业大学, 2003.
- [27] BOHN M, KHARALLAH M M, JIANG C, et al. QTL mapping in tropical maize: II. Comparison of genomic regions for resistance to *Diatraea* spp[J]. *Gop Sci*, 1997(37): 1892 - 1902.
- [28] PAPPST C, BOHN M, UIZ H F, et al. QTL mapping for European corn borer resistance (*Ostrinia nubilalis* Hbn.), agronomic and forage quality traits of testcross progenies in early-maturing European maize (*Zea mays* L.) germplasm[J]. *Theor Appl Genet*, 2004(108): 1545 - 1554.
- [29] GROHS, KHARALLAH M M, GONZALEZ DE LEON D, et al. Comparison of QTLs mapped in RILs and their test-cross progenies of tropical maize for insect resistance and agronomic traits[J]. *Hort Breed*, 1998(117): 193 - 202.
- [30] JAMPATONG C, MC MULLEN M D, BARREY B D, et al. Quantitative trait loci for first and second-generation European corn borer resistance derived from the maize inbred M47[J]. *Gop Sci*, 2002(42): 584 - 593.