

文章编号 :1003-8701(2003)04-0023-06

抗除草剂转基因作物的研究及其安全性

程焉平

(吉林省吉林师范大学生命科学学院,吉林 四平 136000)

摘要:目前,抗除草剂转基因作物在转基因作物的研究和利用中占据主导地位,为了使其健康、有序的持续发展,对其进行深入细致的探讨是十分必要的。在综述了抗除草剂基因的转化方法及其抗性机理的同时,还讨论了其安全性问题,并对今后抗除草剂转基因作物的研究与应用进行了展望。

关键词:转基因作物;抗除草剂;遗传转化;生物安全

中图分类号:Q78

文献标识码:A

随着分子生物学理论和基因转化、组织培养等技术的不断发展,近10年来,科学家们已选育出许多抗除草剂转基因作物品种。目前,抗除草剂转基因作物的种植面积已达4 480万 hm^2 ,居全球转基因作物种植面积之首。到2001年底,抗除草剂转基因作物的面积为全世界转基因作物种植面积总数(5 260万 hm^2)的85%^[1]。自1986年世界上第一次进行抗除草剂转基因烟草的田间试验以来,抗除草剂转基因作物始终在转基因作物的研究与应用中占据主导地位。抗除草剂转基因作物的大面积推广,在提高粮食产量、简化农业生产环节、节约能源和水源、降低除草剂的研制与开发成本等诸多方面产生了巨大的经济效益。当然,在转基因技术的研究和利用中,抗除草剂作物所引发的社会争议也最为激烈。人们担心抗除草剂转基因作物会给生态环境、人类健康等带来无法预料的负面效应。为此,在利用抗除草剂转基因作物提高产量的同时,也需要对其安全性问题进行深入细致的探讨。

1 抗除草剂基因的主要转入方法

1.1 农杆菌介导法

自1974年发现根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)Ti质粒上的T-DNA(transfer-DNA)可转移并整合进植物基因组中,导致冠瘿瘤(Grow gall tumor)的形成^[2]。将抗除草剂基因插入T-DNA区,用Ti质粒作为基因转移的载体,将目的基因插入受体植物细胞内,可使其产生对除草剂的抗性^[3]。目前,用此方法对各种作物进行除草剂抗性基因转化的报道有很多。Raineri D M等(1990)^[4]、Chan M T等(1993)^[5]、Aldemita R R等(1996)^[6]和Cheng X等(1998)^[7],相继报道了用农杆菌介导法进行抗除草剂转基因水稻的研究。1996年,Ishela Y等用带有GUS和Bar基因的农杆菌感染玉米自交系A188幼胚获得成功^[8]。此外,有关番茄、矮牵牛、烟草、小麦、甘蓝、油菜、石刁柏和杨树等的抗除草剂转基因

收稿日期:2002-12-12

作者简介:程焉平(1954-),男,吉林师范大学生命科学学院副教授,从事遗传学教学。

因研究也有报道。

农杆菌介导是目前植物基因转化的最主要方法之一。在已有的转基因植物中,约80%是由此法获得的^[7]。农杆菌介导法的优点是:不需要分离原生质体,用整块的植物组织即可,操作方便。同时,此方法插入的基因数目少而且稳定,便于基因调控的研究。缺点有:大批转化许多单子叶植物,尤其是转化一些经济价值较高的禾本科植物以及百合、郁金香等重要花卉品种时难度很大。

1.2 基因枪转化法

基因枪法(Particle gun)是1987年由Sanford等首先发现。它是借助高速运动的(300~600 m/s)金属微粒(金粉或钨粉颗粒)将附着其表面的DNA分子引入到受体细胞中的一种遗传物质转化技术。通过基因枪技术的运用,许多对除草剂具有抗性的转基因作物相继推出。Vasil等(1992)将Gust和Bar基因导入小麦愈伤组织中,获得了世界上首例具有除草剂抗性的转基因小麦^[9]。Cao J等(1992)^[10]、朱冰等(1996)^[11]先后获得了抗除草剂转基因水稻。Wan Y等(1994)^[12]成功地将Bar基因转入大麦细胞中。Wan Y(1995)^[13]将GUS和Bar基因成功地导入玉米的I型愈伤组织中。另外,在烟草、油菜、大豆中也均有相关报道。

由于基因枪技术可绕过原生质体阶段,故其在禾本科作物的转化上具有极大的应用潜力。此外,基因枪技术还可以用于将基因转入叶绿体和线粒体,从而使转化细胞器成为可能。但基因枪法的转化效率低,而造价又高。此外,用基因枪技术将DNA直接导入受体植物细胞中的方法,使DNA的有序性和计量性都较差。而且,整合入植物细胞基因组中的外源基因通常是多拷贝的,这有可能导致植物的某些非正常基因表达,故此方法的稳定性与农杆菌介导法相比差些,并有可能发生共抑制现象。

1.3 PEG 诱导的遗传转化(PEG 法)

借助聚乙二醇(PEG)、多聚-L-鸟氨酸(pLO)、多聚赖氨酸、磷酸钙及高pH值条件下诱导原生质体摄取外源DNA分子,可促使细胞膜与DNA间接触与粘连,并通过膜表面电荷的紊乱及干扰细胞之间的识别,从而利于细胞间的融合及外源DNA进入原生质体。Fèher A等(1991)^[14]、Datta S K等(1992)^[15]、O'Naill C M等(1993)^[16]以及Kramer C等(1993)^[17]先后报道了用PEG法对高粱、水稻、玉米、小麦、大麦、甘蓝和白菜等多种作物进行的抗除草剂转基因作物的研究工作。

PEG法是目前应用最多的直接转移基因的方法,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,这对于大多数作物而言尚存在许多困难。

1.4 电击穿孔转化法

电击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,从而进入受体细胞的基因组中。Christou P等(1991)^[18]、Chowrira G M等(1995)^[19]、Halluin(1992)^[20]、Sabri(1996)^[21]、Chowrira G M等(1996)^[22]和Lurquin P F(1997)^[23]在水稻、玉米、小麦、大麦和大豆等多种作物中进行了抗除草剂转基因作物的研究。

此外,还有激光微束转化法、显微注射转化法、超生波转化法、花粉管介导法、萌动种子剥胚浸泡法、碳化硅纤维介导法和阳离子转化法等。这些方法的适用范围仍有待于今后研究确定。

2 抗除草剂转基因作物的抗性机理

根据作用机理的不同 ,可将除草剂抗性基因的作用方式分为三类 :

2.1 提高靶酶或靶蛋白基因的表达量

当施用草甘膦类除草剂时 ,植物体内会积累大量的莽草酸 ,最终可导致细胞死亡。莽草酸是磷酸烯醇式丙酮酸莽草酸合成酶 (5-enolpyruxyl shikimate-3-phosphate synthase, EPSPS)催化过程中的重要中间产物。研究表明 ,*Klebsiella pneumoniae* 的 EPSPS 对草甘膦十分敏感 ,因此 ,证明 EPSPS 是草甘膦的作用靶标。植物细胞或通过 EPSPS 的过量表达对一定量的草甘膦产生抗性 ,或是通过 EPSPS 的作用活性位点变化对草甘膦产生抗性。如携带 EPSPS 基因多拷贝质粒的 *E.coli* 细胞过量生成 (5 ~ 17 倍)的 EPSPS ,对草甘膦的抗性至少增加 8 倍。

2.2 产生对除草剂不敏感的原靶标异构酶或异构物

磺酰脲类除草剂和咪唑啉酮类除草剂均为植物体内支链氨基酸生物合成的抑制剂 ,其作用靶标是乙酰乳酸合成酶 (acetolactate-synthase, ALS)。据交感抗性类型的研究发现 ,不同位置的点突变与特定的交感抗性类型有关。点突变使 ALS 酶蛋白的氨基酸发生置换 ,从而降低了 ALS 对除草剂的敏感程度 ,增加了作物对除草剂的抗性。从烟草和拟南芥分离出的 ALS 基因的单突变基因 ,基因表达产生了异构的 ALS 活性而不再受磺酰脲类除草剂的影响。再有 ,肺炎克氏杆菌 *aroA* 基因的突变使 EPSPS 第 96 位的甘氨酸被丙氨酸置换 ,从而使其与草甘膦的结合不敏感。

2.3 产生可使除草剂发生降解的酶或酶系统

GOX 基因是编码草甘膦氧化还原酶的基因 ,该基因的产物可使草甘膦降解为无毒成分。从作物的生长发育考虑 ,通过产生外源酶而使除草剂失活的基因比前面两种抗性机制中提到的基因更具优越性。因靶标酶或靶标蛋白的过量表达会造成作物的代谢负担 ,对其生长发育和提高产量都不利。而且 ,靶标酶的改变 ,其异构酶活性一般会降低 ,反而对作物生长有害。此外 ,抗溴苯腈的 *BXn* 基因和解毒 2,4-D 的 *tfdA* 基因也在作物中获得成功表达。

3 已获抗除草剂抗性基因的作物及抗性基因的应用

3.1 已获抗除草剂抗性基因的作物种类

近十几年来 ,抗除草剂转基因作物的选育工作取得了重大进展 ,出现了一大批抗除草剂转基因作物品种。①抗磺酰脲(sulfonylurea)类 :油菜、水稻、大豆、亚麻、棉花、番茄、甘蔗、莴苣、甜瓜和杨树等 ;②抗咪唑啉酮(imidazolinone) :烟草、玉米、油菜、甜菜和小麦等 ;③抗草甘膦(glyphosate) :番茄、玉米、水稻、小麦、糜子蔗、棉花、向阳葵和甜菜等 ;④抗磺草灵(asulam) :番茄 ;⑤抗莠去津(alrazine) :大豆 ;⑥抗草铵膦(glufosinate) :玉米、小麦、水稻、大豆、油菜、马铃薯、番茄、甜菜和苜蓿等 ;⑦抗溴苯腈(bromoxynil) :油菜、棉花、马铃薯、烟草和番茄等 ;⑧抗 2,4-D :棉花和玉米等 ;⑨抗稀禾定 (poast) :玉米等。

3.2 抗除草剂基因的应用^[24]

①通过向作物转入除草剂抗性基因 ,使其获得或增强对除草剂的抗性 ,从而解决除草剂在使用过程中出现的选择性问题。抗除草剂转基因作物的大面积种植 ,将使许多灭生性除草剂得以广泛使用 ,同时 ,也会促进新型除草剂的研制与开发。

②通过转基因技术使作物获得或改善 “他感效应 ”或 “异株克生 ”能力 ,从而使其能

抑制杂草。所谓“他感效应”或“异株克生”现象是指植物体固有的一种影响其它生物生长发育的能力。利用转基因技术可使作物获得或增强这种性状,从而对杂草有所抑制。美国 ARCO 植物研究所长期从事这方面的研究工作,并取得了一定的进展。

③将外源核显性抗除草剂基因转移到用做恢复系的品种和常规品种中,可选育成携带纯合的核显性抗除草剂基因的新型恢复系。用这样的恢复系配制杂种,施用一次除草剂就可以除去假杂种,从而提高杂交种的产量和质量。

④将新种质的核隐性抗除草剂基因转移到不育系中,在繁育种子时,施用除草剂可同时去杂,这不仅确保了不育系的纯度,还简化了不育系的繁育程序。

⑤利用转基因技术育成携带叶绿体抗阿特拉津基因的不育系。在配制杂交种时,一次施用除草剂,可同时除去种子中混杂的恢复系、杂株和杂草,获得整齐一致的杂种群。这有利于提高制种的产量和质量,从而提高杂种的制种水平。

4 抗除草剂转基因作物的安全性问题^[25 26]

从转基因研究所面对的激烈争论看,转基因产品安全性问题已成为其能否健康并持续发展的关键^[27]。与抗除草剂转基因作物有关的安全性问题有以下 6 个方面^[28]:

①抗除草剂转基因作物可以与其它作物或其野生近缘植物通过杂交发生抗性基因“漂移”,产生新的抗性杂草类型,这将引起抗性基因大范围扩散,从而增加杂草化的风险。因此,对“漂移”现象应该加强研究和监测。

②抗除草剂转基因作物自身可发生逃逸,生成杂草和自生苗从而发生杂草化,并造成对农业生产的危害。目前,自身杂草化所涉及的作物有近 20 个科,50 个类型。所以,应进一步研究可能发生自身杂草化的作物类型及其发生杂草化的规律。

③由于某种转基因作物对某种除草剂具有抗性而使生产者大量反复使用该种除草剂,这将导致杂草抗性的增强。目前,全世界已有 170 多种杂草对多种除草剂产生了不同程度的抗性。

④对野生植物群落的潜在影响,包括替代当地某些植物或改变当地植物群落结构,抗性基因“漂移”到其它野生植物上,改变后者的适应性,导致植物群落结构的改变;对非目标生物(如昆虫、鸟类和微生物等)产生的不利影响;过量使用除草剂而加重对环境的污染,并进一步对人畜造成伤害。必须清醒地认识到,抗除草剂转基因作物的研究和利用绝不能以破坏环境为代价。

⑤用导入外源基因的转基因作物生产的食品,其质量是否会下降,外源基因表达的蛋白质是否会产生过敏反应甚至有毒,更重要的是,转基因食品的安全性具有“非预期性”(unintended),这是目前公众最关心的。为此,必须对转基因作物食品进行长期的监控^[29]。

⑥导入作物中的抗除草剂基因是否具有稳定的表达量,如果抗性基因的表达量不够甚至因故失去表达作用,在施用除草剂时,将会使作物发生药害甚至导致作物全部被杀死。所以,必须定期对抗除草剂转基因作物抗性的稳定性进行检测。

以上各项抗除草剂转基因作物的安全性问题并非孤立存在,而是相互作用的。这种互作的结果将会比单个因素更具影响力。总之,在抗除草剂转基因作物品种释放及市场化之前,必须制定详细的、具有针对性的安全性规划。

5 展 望

不论就抗除草剂转基因作物的研究趋势还是就目前全球抗除草剂转基因作物的推广面积而言,此项研究与开发在相当长的时期内仍将在转基因作物研究和利用领域中占主流地位。纵观其研究和应用现状,展望如下^[27]:

①抗除草剂转基因作物的研究总体上要符合生物技术的可持续发展策略。

②生物安全性研究将决定抗除草剂转基因作物市场化前景。

③建立客观、严格的安全评价体系将是抗除草剂转基因作物研究及利用能否健康、可持续发展的必备条件。

④能否分离出更好的抗除草剂基因并搞清其遗传变异及表达规律将是制约抗除草剂转基因作物发展的关键技术。

⑤转基因作物所抗的除草剂应首选那些残留期短、残留量少、对环境“温和”、不易在土壤中淋溶、挥发性小和杀草谱广,尤其是对人畜毒性低的类型。

⑥选育降解酶类抗除草剂转基因作物是未来的发展方向。

⑦选育同时抗除草剂、抗虫、抗病和抗旱等并且优质高产的综合优良品种是更高的发展目标。

⑧应选用抗性广泛、表达稳定的抗除草剂基因,避免盲目发展。

⑨为了使抗除草剂转基因作物更好、更快地适应传统的农业生产方式,必须将转基因技术的研究和应用与传统的、常规的遗传育种、作物栽培和植物保护等技术有机结合起来,这对于研究外源基因在受体植物中的表达和调控规律等,以及获得性状优良而且稳定的转基因作物品种是至关重要的。

⑩在选育抗除草剂转基因作物时,应加强创新方面的研究,而不应仅仅是模仿他人的研究成果。

目前,抗除草剂转基因作物在选育技术上已日渐成熟,但其在市场化过程中能否健康、稳定发展并获得与之相适应的市场规模,将主要取决于其安全性问题的妥善解决。总之,生物技术的研究与开发必须从社会长远利益的角度出发,力求可持续发展,切不可只顾短期利益,更不能只顾经济效应而抛弃生态效应。

参考文献:

- [1] James C. Global Status of Commercialized Transgenic Crops: 2001[J]. ISAAA Briefs No. 24. ISAAA: Ithaca, N. Y., 2001.
- [2] Ishicla 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.
- [3] Zhu T, Mettenburg K, Peterson D J. Engineering herbicide-resistant maize using chimeric RNA/DNA oligonucleotides[J]. Nature Biotechnology, 2000, 18 :555-558.
- [4] Raineri D M, Bottino P, Gordon M P, et al. Agrobacterium-mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Bio/technology, 1990, 8(1): 33-38.
- [5] Chan M T. Agrobacterium-mediated production of transgenic rice plant expressing a chimeric alpha-amylase promoter/beta-glucuronidase gene[J]. Plant Molecular Biology, 1993, 22(3): 491-504.
- [6] Aldemita R R, Hodges T K. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of japonica and indica rice varieties[J]. Planta, 1996, 199(4): 612-615.
- [7] Cheng X, Sardana R, Kaplan H, et al. Agrobacterium-transform of rice plant expressing synthetic *cryIA* (b) and *cryIA* (c) genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer[J]. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(6): 2767-2770.
- [8] Ishicla Y, Saito H, Ohta S, et al. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by agrobacterium tumefaciens[J]. Nature Biotech, 1996, 14: 745-750.

- [9] Vasil V. Herbicide resistance fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus[J]. *Bio/Technology*, 1992, 10: 667–674.
- [10] Cao J. Regeneration of herbicide resistance rice plants following microprojectile-mediated transformation of suspension culture cells[J]. *Plants Cell Report*, 1992, 11(11): 586–591.
- [11] 朱 冰. 利用基因枪法获得可遗传的抗除草剂转基因水稻植株[J]. *中国农业科学*, 1996, 29(6): 15–20.
- [12] Wan Y, Lemaux P G. Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants[J]. *Plant Physiol*, 1994, 104: 37–48.
- [13] Wan Y. Tape I calls as a bombardment target for generating fertile transgenic maize (*Zea mays* L.)[J]. *Plants*, 1995, 196: 7–14.
- [14] Fehér A, Felföldi K, Preiszner J. PEG-mediated transformation of leaf protoplasts of *Solanum tuberosum*[J]. *Plant Cell*, 1991, 27: 105–114.
- [15] Datta S K, Datta K, Soltanifar N. Herbicide resistant Indica rice plants from Indica breeding line IR72 after PEG-mediated transformation of protoplasts[J]. *Plant Mol. Biol.*, 1992, 20: 619–629.
- [16] Neill O, Horváth C M, Horváth G V. Chloroplast transformation in plants: polyethylene glycol (PEG) treatment of protoplasts is an alternative to biolistic delivery systems[J]. *The Plant Journal*, 1993, 3: 729–738.
- [17] Kramer C. Selection of transformed protoplast-derived *Zea mays* colonies with phosphinothricin and a novel assay using the pH indicator chlorophenol red[J]. *Planta*, 1993, 190: 454–458.
- [18] Christou P, Ford T, Kofron M. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos[J]. *Bio/Technology*, 1991, 9: 957–962.
- [19] Chowrira G M, Akella V, Lurquin P F. Electroporation-mediated gene transfer into intact nodal meristems *in planta*[J]. *Molec. Biotech*, 1995, 3: 17–23.
- [20] Halluin K. Transgenic maize plants by tissue electroporation[J]. *Plant Cell*, 1992, 4: 1495–1505.
- [21] Sabi N. Transient and stable electrotransformations of intact black Mexican sweet maize cells are obtained after preplasmolysis[J]. *Plant Cell Rep*, 1996, 15: 924–928.
- [22] Chowrira G M, Akella V, Fuerst P E. Transgenic grain legumes obtained by *in planta* electroporation-mediated gene transfer[J]. *Molec. Biotech*, 1996, 5: 85–96.
- [23] Lurquin P F. Gene transfer by electroporation[J]. *Molec. Biotech*, 1997, 7: 5–35.
- [24] 张荣全. 转基因除草剂的研究进展[J]. *世界农业*, 2001, 2: 38–39.
- [25] Atkinson H J, Green J, Cowgill S, et al. The case for genetically with a poverty focus[J]. *Trends in Biotechnology*, 2001, 3: 91–96.
- [26] Borch K, Rasmussen B. Analytical approach to the implementation of genetically modified crops[J]. *Trends in Biotechnology*, 2001, 12: 484–486.
- [27] 程焉平, 庄炳昌. 转基因产品的安全性及其对应策略[J]. *遗传*, 2001, 6: 577–579.
- [28] 刘 谦, 朱 鑫. 生物安全[M]. 北京: 科学出版社, 2001, 79–93.
- [29] 沈孝宙. 遗传工程食物的健康安全性问题——介绍 2000/2001 年 FAO/WHO 联合专家顾问委员会的结论意见与建议[J]. *生物工程进展*, 2001, 21(5): 9–16.

The Study and Biosafety of Herbicide Resistant Transgenic Crops

CHENG Yan-ping

(College of Life Science, Jilin Normal University, Siping, 136000, China)

Abstract: At present, herbicide resistant transgenic crops play a dominant role in the research and utilization of transgenic crops. In order to develop them healthily and properly, it is essential to discuss them particularly and deeply. In the paper we reviewed the method of genetic transformation and the mechanism of herbicide resistant genes. We also discussed the biosafety and prospected the study and application of herbicide resistant transgenic crops.

Key words: Transgenic crops; Herbicide resistance; Genetic transformation; Biosafety