

项目编号:

项目类别:

农业转基因生物安全评价 申 报 书

转 *cry3Bb1* 和 *cp4 epsps* 基因抗虫、抗草甘膦玉米
MON 88017 作为加工原料进口的安全证书

孟山都远东有限公司北京代表处

2007 年 9 月 25 日

中华人民共和国农业部制

农业转基因生物安全评价 申 报 书

项目名称：转 *cry3 Bb1* 和 *cp4 epsps* 基因抗虫、抗草甘膦玉米
MON 88017 作为加工原料进口的安全证书

申请单位：孟山都远东有限公司北京代表处

申 请 人：

地 址：北京市朝阳区工体北路甲 2 号盈科中心写字楼 IBM 大厦 916

邮政编码：100027

电 话：

传 真：

e - mail：

填报日期：2007 年 9 月 25 日

填 写 说 明

1. 在填写申报书之前，应认真阅读《农业转基因生物安全管理条例》、《农业转基因生物安全评价管理办法》、《农业转基因生物进口安全管理办法》等有关法规，了解相关的要求、标准和技术规范。
2. 此申报书同样适用于试验研究和中间试验的报告，但名称分别改为“农业转基因生物试验研究报告书”和“农业转基因生物中间试验报告书”，有些不使用的条款可以不用填写。例如：实验研究的报告书就不用填写试验方案。
3. 申报书内容应当包括以下部分：目录、申请表、项目内容摘要、工作目的和意义、国内外相关研究的背景资料、农业转基因生物安全评价、试验方案、相关附件资料、申报单位农业转基因生物安全小组审查意见、申报单位审查意见、所在省（市、自治区）的农业行政主管部门的审查意见。

填写申请表时，申请实验研究、中间试验、环境释放和生产性试验按表 2 填写；申请农业转基因生物安全证书按表 3 填写。

申报书中安全评价、试验方案和相关附件资料部分依照附件 I、II、III 要求逐条填写。

4. 申报书应当用中文填写，一式十份，一律使用 A4 纸，正文用小四宋体打印，标准字间距和单倍行距，并提供软盘或光盘。对于不符合要求的申报书，不予受理。
5. 申请者可以注明那些资料属于机密并说明理由。
6. 对于已批准果的环境释放或生产性试验，在试验结束后，若同一转基因生物在原批准地点以相同规模重复试验，在申报室“安全性评价”部分可以省略。
7. 受理时间：每年两次，截止日期分别为 3 月 31 日和 9 月 30 日。
8. 受理单位：农业部科技发展中心。

地址：北京朝阳区麦子店街 18 号楼。邮政编码：100026。收款单位：农业部科技发展中心；开户行：农行北京朝阳支行营业部；账号：010404010003699。



孟山都公司文件

© 2006 孟山都公司 版权所有 侵权必究

本申请书受著作权法保护。本申请书只限于由孟山都公司提交的农业转基因生物安全行政主管部门使用，并且只能用于本申请书的申请目的。没有孟山都公司的事先书面同意，任何出于其它目的使用本申请书将被严格禁止。孟山都公司提交本申请书给相关行政主管部门并不表示孟山都公司批准任何个人或实体获得任何权利对本申请书中涉及的知识产权进行授权许可或使用。

保密商业资料（CBI）声明

本申请书包含了许多属于孟山都公司开发并拥有的商业保密资料（CBI，Confidential Business Information）。这些商业保密资料（CBI）是由孟山都公司投入巨大的人力物力，经过长时间的研究获得，包括研究路线的制定、各种表达调控元件的DNA 序列、遗传操作策略和各种安全评价的数据等资料。孟山都公司目前只向世界各国农业转基因生物行政主管部门提交这些 CBI 资料用于安全评价和审批的目的，而从未公开发表或向公众提供。一旦孟山都公司的竞争对手获得这些资料，竞争对手将会以很少人力物力投入在很短的时间内开发出类似 MON 88017 的相应产品，这对孟山都公司来说是不公平的。孟山都公司在中国国内外面临着许多技术实力很强的竞争对手。因此，孟山都公司依据《农业转基因生物安全评价管理办法》第三章第二十七条的有关规定以及本申请书的填写说明，要求对本申请书的 CBI 资料进行保密。

•

目 录

内 容	页码
保密商业资料（CBI）声明	V
目录	VI
附件目录	VII
孟山都公司关于农业部批复信函的说明	II X
一、农业转基因生物安全证书申请表	1
二、项目内容摘要	3
三、工作目的和意义	5
四、国内外研究的相关背景资料	6
五、安全性评价	10
1 受体植物的安全性评价	10
2 基因操作的安全性评价	23
3 转基因植物的安全性评估	39
4 转基因植物产品的安全性评价	74
六、相关附件资料	876
1 目的基因的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列	87
2 目的基因与载体构建的图谱	89
3 目的基因与植物基因组整合及其表达的分子检测或鉴定结果	92
4 转基因性状及产物的检测和鉴定技术	109
5 各试验阶段审批书的复印件	110
6 各试验阶段的安全评价试验总结报告	111
7 转基因植物对生态环境安全性的综合评价报告	112
8 食用安全性的综合评价报告	118
9 该类转基因植物国内外生产应用概况	119
10 田间监控方案，包括监控技术、抗性治理措施、长期环境效应的研究方法等	120
11 审查所需的其它相关资料	121
12 转基因生物在输出国或地区已经允许作为相应用途并投放市场的证明文件	123
七、本单位农业转基因生物安全小组审查意见	139
八、本单位审查意见	140
九、所在省（市、自治区）的农业行政主管部门的审查意见（进口转基因生物直接 申请安全证书的，本项不填写）	141

附件目录 （所有附件均为保密商业资料（CBI））

技术报告编号及名称	页码
技术报告 1—14 装订于本申请书上册	
报告 1 保丰抗根虫、抗农达玉米 MON 88017 的分子生物学分析（孟山都公司报告：MSL-17609）	142
报告 2 在 2002 年美国进行的田间试验中采集的 MON 88017 组织中 Cry3Bb1 蛋白和 CP4 EPSPS 蛋白表达水平（孟山都公司报告：MSL-18823）	207
报告 3 用 Western-blotting 证明 MON 88017 多个世代间 Cry3Bb1 蛋白的表达（孟山都公司报告：MSL 18854）	232
报告 4 2001 年在美国进行的田间试验中 MON 88017 的表现型和生态学观察：实质等同和杂草化倾向的评估（孟山都公司报告：MSL 17652）	250
报告 5 2002 年在美国进行的田间试验中 MON 88017 的表现型和生态学观察：实质等同和杂草化倾向的评估（孟山都公司报告：MSL 18944）	286
报告 6 Cry3Bb1 蛋白对靶标生物和非靶标生物（NTO）的影响（孟山都公司研究报告）	327
a 对玉米根虫（WCRW）的影响（MSL 18799）	327
b 对瓢虫（ <i>Coleomegilla maculata</i> ）幼虫的影响（MSL 16907）	352
c 对瓢虫（ <i>Coleomegilla maculata</i> ）成虫的影响（MSL 16936）	379
d 对瓢虫（ <i>Hippodamia convergens</i> ）的影响（MSL 17171）	404
e 对蜜蜂（ <i>Apis mellifera</i> L.）幼虫的影响（MSL 17761）	422
f 对寄生蜂（ <i>Nasonia vitripennis</i> ）的影响（MSL 18136）	442
g 对花蝽象（ <i>Orius insidiosus</i> ）的影响（MSL 19697）	463
报告 7 CP4 EPSPS 蛋白与 AD4、TOXIN5 和 ALLPEPTIDES 数据库中已知蛋白的生物信息学分析（孟山都公司报告：MSL 18752）	506
报告 8 Cry3bb1 蛋白与 AD4、TOXIN5 和 ALLPEPTIDES 数据库中已知蛋白的生物信息学分析（孟山都公司报告：MSL 18709）	528
报告 9 利用 AD7 数据库更新 CP4 EPSPS 的生物信息学分析（孟山都公司报告：MSL 20627）	550
报告 10 利用 AD7 数据库更新 Cry3Bb1 的生物信息学分析（孟山都公司报告：MSL 20627）	583

MSL 20693)

报告 11 CP4 EPSPS 蛋白的小鼠急性经口毒理学研究 (孟山都公司报告: MSL 13077) 595

报告 12 MON 88107 和大肠杆菌生产的 CP4 EPSPS 蛋白理化性质和功能等同性评价 (孟山都公司报告: MSL 18815) 627

报告 13 大肠杆菌生产的 Cry3Bb1 蛋白的小鼠急性经口毒理学研究 (孟山都公司报告: MSL 18711) 666

报告 14 MON 88107 和大肠杆菌生产的 CP4 EPSPS 蛋白理化性质和功能等同性评价 (孟山都公司报告: MSL 18816) 699

技术报告 15—23 装订于本申请书下册

报告 15 MON 88017 籽粒的 90 天大鼠喂养试验 (孟山都公司报告: MSL19792) 742

报告 16 大肠杆菌生产的 CP4 EPSPS 蛋白在离体模拟胃液 (SGF) 条件下的消化试验 (孟山都公司报告: MSL 17566) 868

报告 17 大肠杆菌生产的 Cry3Bb1 蛋白在离体模拟胃液 (SGF) 和模拟肠液 (SIF) 条件下的消化试验 (孟山都公司报告: MSL 18662) 887

报告 18 在 2002 年美国进行的田间试验中采集的 MON 88017 不同组织的成分分析 (孟山都公司报告: MSL 18661) 912

报告 19 MON 88017 进口到中国的膳食风险评估 (孟山都公司报告: MSL 20911) 941

报告 20 MON 88017 籽粒经热处理后 CP4 EPSPS 蛋白的免疫学检测 (孟山都公司报告: MSL 19317) 1012

报告 21 MON 88017 籽粒经热处理后 Cry3Bb1 蛋白的免疫学检测 (孟山都公司报告: MSL 18980) 1029

报告 22 山东农科院植保所关于 MON 88017 在中国境内的环境安全检测报告 1059

报告 23 中国疾病预防控制中心营养与食品安全中心关于 MON 88017 的食用安全检测报告 1089

孟山都公司关于农业部批复信函的说明

问题（1）—关于输出国批准文件的要求

输出国批准文件请见本申请书附件资料 12 部分，其它技术资料请参见本申请书的相关技术报告。

问题（2）—关于在中国的检测报告的要求

农业部认定的技术检测机构出具的环境安全检测报告见技术报告 22，食用安全检测报告见技术报告 23。

问题（3）—关于 CP4 EPSPS 和 Cry3Bb1 蛋白联合急性经口毒性的试验资料要求

cp4 epsps 基因体外表达蛋白的急性经口毒性试验报告见技术报告 11, *cry3Bb1* 基因体外表达蛋白的急性经口毒性试验报告见技术报告 13。我们认为由于这两个蛋白对哺乳动物都没有毒性，因此没有必然的科学依据将这两种蛋白混合在一起进行急性经口毒性实验。在其它已经进行过的动物测试实验中，用高剂量蛋白处理小鼠时，CP4 EPSPS (Harrison et al, 1996) 和 Cry3Bb1 (Betz et al, 2000) 都没有出现使小鼠表现中毒的症状。而且，这两个蛋白的作用方式也已经很清楚了，两者迥然不同。分离自农杆菌 *Agrobacterium sp.* 菌株 CP4 的 CP4 EPSPS，与植物和微生物源食品和饲料中存在的各中 EPSPS 蛋白属于同一家族，两者在结构和功能上相似 (Levin and Sprinson, 1964; Harrison et al., 1996)。EPSPS 蛋白催化莽草酸途径的非限速步骤，其中莽草酸途径是芳香族氨基酸和芳香族分子生物合成的一个重要通道，广泛存在于植物和微生物中，但不存在于哺乳动物中 (Alibhai and Stallings, 2001)。自打人类开始以植物作为食物以来，就已经大量食用 EPSPS 酶了。CP4 EPSPS 酶被导入到抗除草剂草甘膦 (Roundup Ready) 玉米和大豆中，现已有一些国家将 Roundup Ready 玉米和大豆作为原料加工人类食品，至今未出现 CP4 EPSPS 蛋白对人类产生毒性的报道。

Cry3Bb1 蛋白与苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 中的许多 Cry 蛋白结构和功能相似。Bt 是一种常见的土壤微生物，于 1901 年在亚洲首次发现 (Ishiwata, 1901)。在过去的几十年间，Cry 蛋白作为 Bt 微生物杀虫剂的有效杀虫成分，已在世界各国（包括中国）长期安全使用。Cry 蛋白不具有酶的功能，而是与敏感昆虫胃肠细胞上的受体高度亲和结合，嵌入细胞膜内，形成小孔，使细胞裂解 (Betz et al, 2000; IPCS, 1999)。Cry 蛋白对非靶标生物包括哺乳动物都没有毒性，无论是仅用 Cry 蛋白进行测试，还是用 Cry 蛋白作为微生物制剂成分之一的混合物进行测试都是如此。非靶标生物（如哺乳动物）胃肠上没有之前提到的利于 Cry 蛋白结合的高亲和结合位点。因为 CP4 EPSPS 蛋白与 Cry3Bb1 蛋白的作用方式不同，而且都对哺乳动物无毒，因此从科学角度来看，没有充分理由说明有必要将两个蛋白混合来测试它们之间的相互作用。

已有的研究表明，在毒性测试中只要每种化学物成分都以低于观察不到明显效应的水平 (NOEL) 存在，那么混合的化学物也不可能会产生不良效应 (Seed et al., 1995; Groten et al., 1997)。这两种蛋白的水平对人类的暴露水平远低于高剂量小鼠急性口服毒性中测定的 NOELs，人类食用 MON 88017 粒而接触这两种蛋白（不管是只食用其中的一种，还是两种都被食用）而产生不利影响的可能性几乎可以忽略。高剂量急性口服毒性试验适于评价来源于生物技术的农作物中所引入蛋白的潜在毒性。根据现有的知识，大多数蛋白毒素都通过急性机制来发挥作用 (Betz et al., 2000; Sjoblad et. al., 1992)。CP4 EPSPS

蛋白与 Cry3Bb1 蛋白的作用方式不同，而且都对哺乳动物无毒，以此为依据可以看出，没有充分的科学理由表明将这两种蛋白混合来进行小鼠急性毒理学试验是必要的。

除此外，孟山都公司和中国疾病预防控制中心利用 MON 88017 分别进行了大白鼠 90 天喂养试验。试验结果均表明，大鼠在食用同时含有 Cry3b1 蛋白和 CP4 EPSPS 蛋白的 MON 88017 配制的饲料 90 天后，未见明显不良反应。详细资料见技术报告 15 和技术报告 23。

问题（4）—关于糠醛的资料要求

在孟山都公司进行的 MON 88017 成分分析中，的确分析了 2-糠醛（糠醛）的含量，不过由于 2-糠醛在 MON 88017 籽粒中的含量低于最低检测临界值（LOQ），无法得到具体检测含量，故在研究报告中未对 2-糠醛进行统计分析。详见本申请书技术报告 18。

问题（5）—关于大肠杆菌表达蛋白与植物表达蛋白实质等同的试验资料要求

大肠杆菌表达的蛋白与 MON 88017 表达蛋白的实质等同评价资料见本申请书的技术报告 12（CP4 EPSPS 蛋白）和技术报告 14（Cry3Bb1 蛋白）。

问题（6）—关于 Cry3Bb1 蛋白热稳定性的资料要求

Cry3Bb1 蛋白的热稳定性评价资料见本申请书的技术报告 21。

问题（7）—关于 MON 88017 膳食暴露水平的资料要求

MON 88017 的膳食暴露水平分析可参见本申请书安全评价部分的 3.3.6 部分和技术报告 19。

一、农业转基因生物安全证书申请表

项目名称		转 <i>cry3Bb1</i> 和 <i>cp4 epsps</i> 基因抗虫、抗草甘膦玉米 MON 88017 作为加工原料进口的安全证书						
项目来源		孟山都公司						
转 基 因 生 物 概 况	类别	动物 ☐ 植物 ☒ 微生物 ☐ (用√表示)						
	转基因生物名称		MON 88017					
	受体生物	中 文 名	玉米		学 名	<i>Zea mays</i> .L		
		分 类 地 位	禾本科、玉蜀黍属、玉米种		品种(系)名称	Hi-II	安全等级	I
	目 的 基 因 1	名 称	<i>cry3Bb1</i>		供体生物	<i>Bacillus thuringiensis</i> 和 <i>Agrobacterium</i> sp. CP4		
		生物学功能	<i>cry3Bb1</i> 基因编码的蛋白可使转基因植物抗鞘翅目昆虫；					
		启动子	P-e35S		终 止 子	Tahsp17.3'		
	目 的 基 因 2	名 称	<i>cp4 epsps</i>					
		生物学功能	<i>cp4 epsps</i> 基因表达蛋白使转基因植物具有对草甘膦类除草剂的抗性					
		启动子	P-ract1		终 止 子	NOS 3'		
		名 称						
		生物学功能						
		启动子			终 止 子			
	载 体 1	PV-ZMIR39 质粒			供体生物	<i>Escherichia coli</i>		
	载 体 2				供体生物			
.....				供体生物				
*标记基因 1	名 称	无		供体生物	无			
	启动子			终 止 子				
*标记基因 2	名 称			供体生物				
	启动子			终 止 子				
.....	名 称			供体生物				
	启动子			终 止 子				
*报告基因 1	名 称	无		供体生物	无			
	启动子			终 止 子				

转 基 因 生 物 概 况	*报告基因 2	名 称		供体生物	
		启动子		终 止 子	
		名 称		供体生物	
		启动子		终 止 子	
	调控序列 1	名 称	内含子 ract1	来 源	水稻
		功 能	内含子尚无明确功能，可能会参与 <i>cp4 epsps</i> 基因表达		
	调控序列 2	名 称	转移肽序列 CTP2	来 源	拟南芥
		功 能	协助 CP4 EPSPS 蛋白向叶绿体转移		
	调控序列 3	名 称	5'端前导链序列 wt CAB	来 源	小麦
		功 能	参与 <i>cry3Bb1</i> 基因表达		
	调控序列 4	名 称	内含子 ract1	来 源	水稻
功 能		内含子尚无明确功能，可能会参与 <i>cry3Bb1</i> 基因表达			
转 基 因 方 法		农杆菌介导转化		基因操作类型	1 2/ 3
转基因生物安全等级		I		转基因生物产品安全等级	I
试 验 概 况	中间试验 情 况	转基因生物名称及编号			
		试验的时间、地点与规模			
	环境释放 情 况	转基因生物名称及编号			
		批准文号			
		试验的时间、地点与规模			
	生产性试验 情 况	转基因生物名称及编号			
		批准文号			
		试验的时间、地点与规模			
	申 请 单 位 概 况	单 位 名 称		孟山都远东有限公司 北京代表处	地 址
邮 编		100027	电 话		
传 真			电子邮件		
申请人姓名			电 话		
传 真			电子邮件		
联系人姓名			电 话		
传 真			电子邮件		

* 若删除，应该在表中标注。

（注：进口转基因生物直接申请安全证书的，本表“试验概况”一栏不填写）

二、项目内容摘要

MON 88017 是通过 DNA 基因重组技术开发的具有抗玉米根虫和抗草甘膦类除草剂特性的转基因玉米。MON 88017 含有来源于大肠杆菌的 *cry3Bb1* 基因和来源于农杆菌 CP4 菌株 *cp4 epsps* 基因，前者编码 Cry3Bb1 蛋白，可以使转基因玉米 MON 88017 抗玉米根虫；后者可以在 MON 88017 中表达 CP4 EPSPS 蛋白（5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸合成酶），由于 CP4 EPSPS 对草甘膦不敏感，因此能够起到抗草甘膦类除草剂的功能。

通过农杆菌介导转化，将质粒载体 PV-ZMIR39 上构建的目的基因转到玉米 Hi-II 的细胞中，从而得到了 MON 88017。该质粒 T-DNA 边界序列内构建有 *cp4 epsps* 和 *cry3Bb1* 基因表达盒。MON 88017 的分子生物学分析证实，只有单一拷贝的 *cp4 epsps* 和 *cry3Bb1* 基因表达盒被整合到 MON 88017 的基因组中的单一位点上；同时，各种表达元素完好无损；但没有任何细菌质粒骨架序列插入到 MON 88017 基因组中。

通过对 MON 88017 连续 10 个世代的遗传稳定性分析，其结果证实 *cp4 epsps* 和 *cry3Bb1* 编码序列的在 MON 88017 中可以稳定遗传，并表现为孟德尔遗传方式。这一分析结果，也从另外一方面证实插入序列为单一拷贝。

MON 88017 表达的 CP4 EPSPS 蛋白，在结构上和其它粮食作物（如大豆和玉米）和微生物食品来源（如面包酵母）的内源 EPSPS 具有很高的同源性。同时，MON 88017 表达的 CP4 EPSPS 蛋白质的氨基酸序列与已经获得商业化批准（FDA 和 USDA）的抗农达®作物（如 40-3-2 大豆、NK 603 玉米、1544 棉花和 GT73 油菜等）中表达的 CP4 EPSPS 具有>99%的结构是相似的。另外，天然的 CP4 EPSPS 蛋白质广泛分布在环境中，已有的研究也表明抗农达作物（表达 CP4 EPSPS）不会对环境其它生物产生毒性，也不会对人体或动物的健康不会产生不良的影响。

苏云金杆菌（*B.t.*）的 Cry 蛋白同样也具有长期安全、广泛使用的历史。MON 88017 产生的 Cry3Bb1 蛋白是 Cry3Bb 蛋白质家族的一个成员，与已经商业化应用的微生物叶面喷施产品 Raven®生物杀虫剂内含有的野生型 Cry3Bb1 蛋白质相比，在氨基酸序列和性质上有>99%的相似性。MON 88017 表达的 Cry3Bb1 蛋白的氨基酸序列，与保丰（YieldGard®）抗根虫玉米（MON 863）的 Cry3Bb1 蛋白的氨基酸序列有>99.8%的相似性（仅有 1 个氨基酸不同），而后者已经获得 USDA 和 US-FDA 的商业化批准，以及中国、欧盟、日本等许多国家的进口批准。此外，以前还针对 MON 863 进行过的广泛的生物学危害评估，包括几个 Cry3Bb1 蛋白质的变种的试验、调查它们对鸟类、鱼类和陆地上非靶标昆虫等代表性物种的影响、估测其在土壤中分解代谢的时间以及评估其对濒危物种和土壤微生物的影响。MON 88017 产生的 Cry3Bb1 蛋白的对非靶标生物（NTO）的暴露临界值（MOE）的值域同 MON 863 观察发现的值域十分近似。因此，MON 88017 产生的 Cry3Bb1 蛋白质不会对非靶标生物和环境产生有害的影响。

试验证据表明，MON 88017 的营养成分实质上等同于具有相似遗传背景的常规玉米和其它常规玉米品种。2002 年在美国进行了田间试验，从试验材料中采集了秸秆和

® 抗农达是孟山都技术有限公司的注册商标。

® Raven 是 Ecogen 公司的注册商标。

® YieldGard 是孟山都技术公司的注册商标。

籽粒等组织分析相关营养成分。分析结果表明，在 MON 88017 和对照之间进行的 248 次比对中，有 232 次的比较结果不存在统计学显著差异，其它存在统计学显著性比对中的具体数值也都在常规品种都数值 99% 的允许区间内 ($p < 0.05$)；同时 MON 88017 的营养成分检测值均落在常规玉米的历史对照值域和文献发表数据的值域范围内。

本申请书旨在申请转 *cry3Bb1* 和 *cp4 epsps* 基因的抗虫抗除草剂玉米 MON 88017 作为加工原料进口中国的安全证书。在申请材料中，我们提交了有关 MON 88017 的安全性评价材料（包括受体植物的安全性评价材料、基因操作的安全性评价材料、转基因植物及其产品的安全性评价材料）、美国有关法规监管部门的批准文件以及农业部进一步要求的文件资料和相关检测报告，望予以审查批准。

三、工作目的和意义

MON 88017 的商业化种植给农民提供了虫害控制和杂草综合管理的新技术。于是，农民将得以给玉米越顶施用农达农用除草剂，进行广谱的杂草防治，同时使作物受害的风险减到最小，并可以有效防治玉米根虫幼虫—美国的重要玉米害虫。

采用携带有 *cry3Bb1* 和 *cp4 epsps* 基因的载体进行转化，提高了分别向玉米导入 2 个基因的工作效率，并且可以以 MON 88017 为亲本培育更多含有该二价基因的玉米品种，提供农业生产应用。MON 88017 在杂草防治方面的潜在效益，同抗农达玉米 NK 603 相同，并且也将会在玉米根虫的防治上近似于 MON 863。由于这种特性，可以使农民取得了相当多的效益。同时，还会减少了损害人体和环境的风险。

玉米是当今世界上最主要粮食作物，在 100 个国家里种植，每年种植面积 14 亿公顷。2004 年全世界玉米产量约 700 万吨，主要玉米生产国是美国、中国、巴西、墨西哥、法国和印度，这些国家玉米占全世界总产量的 75%（FAOSTAT, 2004）。

中国自二十世纪八十年代以来的市场经济改革和结构调整促进了畜牧业的发展，从而刺激了饲用玉米需要量的迅速增长。目前在中国，玉米正在越来越多地用于大型的养猪场和家禽场，而不仅仅是一种粮食作物了。近年来，在畜牧业发展特别是乙醇生产和其它工业加工的发展的拉动下，玉米消费增长很快，玉米供求关系发生重大变化，正在由供过于求向供求平衡转变。从发展趋势看，随着转化加工继续快速增长，中国的玉米供求可能出现偏紧格局。MON 88017 在美国、加拿大、阿根廷和智利等国家的商业化种植，可以促进国际玉米市场的供应，有助于缓解中国玉米的供求压力，促进全球粮食贸易发展。

四、国内外研究的相关背景资料

全球转基因作物应用情况

全球人口在迅速增长，据估计到 2025 年全球人口将由 2000 年的 65 亿增加到 85 亿，同时粮食需求也将在现在的基础上增加 50%。事实上，通过常规的品种改良和栽培技术改进，特别是杀虫剂的使用，粮食生产在过去几十年已经显著提高。上世纪 60 年代兴起的细胞遗传学和细胞生物学技术引发了“绿色革命”，使粮食作物的产量显著提高、抗病性和抗虫性明显增强。然而，这些技术的广泛采用也同时给环境和人类健康带来一些新的问题，如农药和化肥的使用导致土壤侵蚀加剧。同时，在这些技术使用 20 年后，对粮食增产的贡献也明显减少。为克服这些问题，来自于政府、大学、研究机构及公司的科学家们正在寻求新的技术和方法。随着重组 DNA 技术的发展，到上世纪 80 年代科学家们已经开发出一些新的现代育种技术和方法，其中利用农杆菌介导转化和基因枪转化的转基因技术是最为成功的一项。

2006 年，利用转基因技术开发的遗传改良（genetically modified, GM）作物在全球的种植面积超过 1 亿公顷，比 2005 年增长 13%，占全球可耕地面积的 4%，种植转基因作物的国家也从 2004 年的 17 个增加到 22 个。其中美国、阿根廷、巴西、加拿大、印度和中国是主要转基因作物种植国家。

1996 年世界第一个转基因作物的商业化被批准。从 1996 年至 2006 年，转基因作物的商业化发展速度平均每年递增 20%，特别是在一些工业化国家。就转基因性状而言，目前通过转基因技术导入并商业化开发的最重要性状当属抗除草剂，2006 年抗除草剂的转基因作物（主要包括大豆、玉米、棉花、油菜）种植面积为 6990 万公顷，占全球转基因作物种植面积的 68%；其次是抗虫性，抗虫转基因作物（主要是玉米、棉花和其它作物）面积为 1900 万公顷，占 19%。还有其它一些转基因性状也已被商业化利用，如抗病毒，只是种植面积相对较少。对于转基因作物，抗除草剂大豆，包括聚合基因，是最大的转基因作物，2006 年的种植面积达到 5860 万公顷，占全球转基因作物总面积的 57%；转基因玉米占第二位，达到 2520 万公顷，占 25%，转基因棉花 1340 万公顷，占 13%，转基因油菜为 480 万公顷，占 5%（James, 2006; Brookes and Barfoot, 2006）。

在美国和加拿大这样的工业化国家市场，由于新基因的开发和应用转基因作物还会继续下去，同时会有越来越多的发展中国家开始应用或扩大应用转基因作物。在未来 3-5 年内，导入减少投入的性状（input traits），如耐除草剂和抗虫性，依然是转基因作物发展的主要趋势。2-3 个转基因性状的聚合以及抗病毒性也会变得越来越重要。科学家们会特别关注不同来源的、调控农艺性状的基因，尤其是抗虫基因。然而，对于转基因作物中长期发展，增加产出的性状（主要是改变营养成分）必然要被关注。实际上已经有一些这样的转基因作物被开发出来了，如：维生素 A 水稻、高铁水稻、高蛋白转基因作物、去除致敏源和抗营养因子作物、改变淀粉和脂肪酸构成的作物、提高抗氧化物之含量的作物、耐环境胁迫的作物和雄性不育作物。

转基因作物的安全评价

遗传改良生物（GMO）安全评价的概念最早是由一些科学家于 1975 年在有关重组 DNA 研究的 Asilomar 会议上提出的。这些科学家担心重组 DNA 技术可能会导致重组病毒的产生，而这种重组病毒一旦从实验室泄漏会对公众健康产生不良影响。这些科学

家经过 14 个月的工作一致同意并起草了一份通过物理和生物方法防止危险试验结果和物品扩散的指南，该指南成为 1976 年由国家卫生研究所重组 DNA 咨询委员会起草的美国现代生物技术研究指南的基础。随后，其它一些国家也都采用了美国现代生物技术研究指南。

关于转基因植物环境安全性评价，Cordle 等（1991）描述了一种逐步进行安全评价的方法，具体如下：

A) 首先应该确定非改良生物的安全关注程度，包括：

- 1) 非改良生物的危害性和病原菌状态；
- 2) 在多变环境中适应的能力；
- 3) 在群落中的与其它生物的生态关系、功能和重要性；
- 4) 遗传信息转移的能力；
- 5) 监测和控制的可能性。

B) 其次应该考虑其遗传学操作对安全性的影响，包括：

- 1) 遗传改良的过程；
- 2) 基因的构建和表达；
- 3) 分子生物学知识和其它信息在什么程度上可以用来评估转基因生物的安全性。

C) 第三步要综合考虑上述步骤的评价。遗传改良生物的安全评价要在综合有关遗传改良生物和非遗传改良生物的所有已知信息后才可作出。

确定转基因植物的基因转移到周围环境中的可能性是非常重要的。转基因植物的基因有可能逃逸到下列生物体中：（1）改良基因转移到微生物或病原菌；（2）改良基因通过细菌感染为载体转移到其它植物物种中；（3）转基因植物扩散到自然生态环境中并繁殖；（4）改良基因水平转移到野生物种。但是，目前还没有证据表明转基因已经转移到微生物中或水平转移到其它植物中。

关于转基因植物的食品安全检测，国际食品规范委员会（Codex Alimentarius Commission）采用一些基本原则来评价来源于转基因植物和转基因微生物的遗传改良食品（GM food）。这些原则前提是依据预先评价、个案评价和评价转基因的直接效应（由插入基因引起）和间接效应（由插入一个新基因的互作结果引起）。Codex 的安全评价原则要求评价下述方面（Codex,2003; Codex, 2005）：

- A) 对健康的直接影响（毒性）；
- B) 引起过敏反应的倾向（过敏性）；
- C) 特定成分，不管是营养成分还是毒性成分；
- D) 插入基因的稳定性；
- E) 特定遗传改良的营养效应；
- F) 插入基因可能引起的不预测结果。

国际食品规范委员会制定的风险评估原则被普遍认为对于当前国际市场上的遗传

改良生物的安全评价是足够。目前，所有已经上市遗传改良生物产品都经过严格风险评估，与其相应的非改良生物产品比是同样安全的（WHO Report, June 23, 2005）。实际上，越来越多的新的转基因方法正在被采用，如无选择标记转化，这些方法可以显著减少由于目前采用的方法的转基因随机插入所引起潜在风险。同时，越来越多的更加安全的基因也正在被克隆出来。

转 *cry3Bb1* 和 *cp4 epsps* 基因作物研究

cry3Bb1 基因:

1991 年，Rupar 等报告发现了一个 *B.t* 新品系（EG4691），它产生一个对黄爪十一星叶甲（*Diabrotica undecimpunctatahowardi*）具有毒杀活性的晶体蛋白。Donovan 等（1992）分离和测序了编码这个蛋白质的基因，它被命名为 CryIIIB2（Gene Bank 连接号 M89794）。随后标准命名法定为 *B.t* 晶体蛋白，从 EG4691 分离的蛋白质称为 Cry3Bb1。

野生型 Cry3Bb1 存在于商业产品 *Raven Oil Flowable* 生物杀虫剂中，该生物杀虫剂自 1995 年起，即已在美国销售用于防治鞘翅目害虫。经鉴定，Cry3Bb1 与另一种 Cry3 蛋白质—Cry3Aa4（Gene Bank 连接号 M30503）大约有 67% 的氨基酸序列相同，后者在美国也已商业使用，防治马铃薯的主要害虫马铃薯甲虫（Perlak *et al*, 1993）。孟山都公司利用 *cry3Bb1* 基因开发的 MON 863 于 2003 年在美国进行了商业化种植，并在中国获得进口安全证书。

cp4 epsps 基因:

草甘膦通过抑制 5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸合成酶（EPSPS）合成，从而阻断植物体内所必需的芳香族氨基酸的生物合成，导致植物死亡。因此，以草甘膦作为有效成分的植物除草剂既可用于一年生或多年生的单子叶杂草，也可用于阔叶类杂草。然而草甘膦属于非选择性除草剂，在杀死杂草的同时还会杀死农作物。

毫无疑问，抗草甘膦作物的应用可以对农业生产活动带来重要影响。首先，抗草甘膦作物的应用可以为农民带来一种广谱杂草防除措施；第二，草甘膦是一种环境友好型的除草剂；第三，可以使草甘膦类除草剂在作物生长期应用；第四，抗除草剂作物+除草剂的杂草防除系统可以很好的适应少耕或免耕系统，从而保持土壤水分、减少土壤侵蚀和节省燃料；第五，提供低耗高效的杂草防除技术。

科学家长期以来一直致力培育抗除草剂的作物品种，但采用传统的育种技术（如传统的诱变和选择技术）都未取得成功。从上世纪 80 年代开始，人们开始借助于重组 DNA 技术来开发抗草甘膦的作物，并获得了成功。主要采用的原理或机制有 3 个方面：一是促使 5-烯醇丙酮酰-3-磷酸转移酶（EPSPS）超量表达；二是转入一个与草甘膦亲合性低的 EPSPS 基因；三是导入一个降解草甘膦的基因。

传统上，解决抗农达®（有效成分为草甘膦）问题的努力更多的是集中在导入一个编码对草甘膦抑制不太敏感的 EPSPS（耐草甘膦的 EPSPS）的基因。科学家们成功地在土壤农杆菌 CP4 小种中筛选到自然存在的 EPSPS 酶（CP4 EPSPS 酶），该酶对草甘膦的耐受表现出理想的动力学参数（kinetic parameters）（ $\text{appK}_1[\text{glyphosate}] = 2.7 \text{ mM}$ ）和紧密结合 PEP（ $\text{appK}_m\text{PEP} = 12 \text{ }\mu\text{M}$ ）。 $\text{appK}_1[\text{glyphosate}]$ 表示某种酶对草甘膦的耐受性， appK_1 值越高表明该酶对草甘膦的耐受性越强。而 $\text{appK}_m[\text{PEP}]$ 则表示某种酶与 PEP

® Registered trademark of Monsanto Technology LLC.

的结合能力， $\text{appK}_m[\text{PEP}]$ 值越低，表明该酶与 PEP 结合能力越强，催化能力就越强。根据多力学参数，最终筛选出 CP4 EPSPS 蛋白，并从土壤农杆菌 CP4 小种中克隆了相应的基因（*cp4 epsps* 基因），该基因已被转化到一些作物中去。

cp4 epsps 基因成功被转化到作物中使转基因作物可以抵抗草甘膦类除草剂，并且转基因作物的产量、化学成分和营养成分与受体品种相比没有改变。

五、安全性评价

1 受体植物的安全性评价

1.1 受体植物的背景资料

1.1.1 学名、俗名和其它名称

受体植物为玉米，学名为 *Zea Mays* L.，俗名为玉米，也称作玉蜀黍、苞米、棒子等。

1.1.2 分类学地位

栽培玉米在分类上属于单子叶植物纲禾本科 (*Gramineae*)，玉蜀黍族 (*Maydeae*)，玉蜀黍属 (*Zea* L.)。在早期的分类系统中，玉蜀黍属仅有栽培玉米 (*Zea mays* L.) 一个种。Wilkes (1967) 将类蜀黍属 (大刍草 “Teosinte”) 归入玉蜀黍属，成为其中的一个亚属，包括两个种：一年生的墨西哥玉米 (*Zea mexicana*) 和多年生玉米 (*Zea perennis*)。根据新的研究结果，Doebley 领导的研究小组对玉蜀黍属内各分类单位的地位进行重新划分，制定了新的分类系统 (Doebley and Iltis, 1980)：

Graminea (禾本科)

Maydeae (玉蜀黍族)

 Genus *Zea* (玉蜀黍属)

Zea mays (玉米种)

ssp. mays (栽培玉米亚种)

玉米及其近缘物种和分类学分类，请详见表 1。

表 1 玉米分类学及其近缘物种

Family - Gramineae	
Subfamily - Panicoideae	
Tribe - Maydae	
Western Hemisphere:	
I. Genus - <i>Zea</i>	
A. Subgenus - <i>Luxuriantes</i>	
1. <i>Zea luxurians</i> (2n = 20)	
2. <i>Zea perennis</i> (2n = 40)	
3. <i>Zea diploperennis</i> (2n = 20)	
B. Subgenus - <i>Zea</i>	
1. <i>Zea mays</i> (2n = 20)	
Subspecies	
1. <i>Z. mays parviglumis</i> (2n = 20)	
2. <i>Z. mays huehuetenangensis</i> (2n = 20)	
3. <i>Z. mays mexicana</i> (Schrad.) (2n = 20)	
II. Genus – <i>Tripsacum</i>	
A. Section – <i>Tripsacum</i>	B. Section – <i>Fasciculata</i>
Species	Species
1. <i>T. andersonii</i> (2n = 64)	1. <i>T. jalapense</i> (2n = 72)
2. <i>T. australe</i> (2n = 36)	2. <i>T. lanceolatum</i> (2n = 72)
Varieties	3. <i>T. fasciculatum</i> (2n = 36)
a) <i>T. australe</i> var. <i>australe</i>	4. <i>T. maizar</i> (2n = 36, 72)
b) <i>T. australe</i> var. <i>hirstum</i>	5. <i>T. pilosum</i> (2n = 72)
3. <i>T. bravum</i> (2n = 36, 72)	Varieties
4. <i>T. cundinamarce</i> (2n = 36)	a). <i>T. pilosum</i> var. <i>guatemalense</i>
5. <i>T. dactyloides</i> (2n = 72)	b). <i>T. pilosum</i> var. <i>pilosum</i>
Varieties	
a) <i>T. dactyloides</i> var. <i>hispidum</i>	
b) <i>T. dactyloides</i> var. <i>dactyloides</i>	
c) <i>T. dactyloides</i> var. <i>meridionale</i>	
d) <i>T. dactyloides</i> var. <i>mexicanum</i>	
6. <i>T. floridanum</i> (2n = 36)	
7. <i>T. intermedium</i> (2n = 72)	
8. <i>T. manisurioides</i> (2n = 72)	
9. <i>T. latifolium</i> (2n = 36)	
10. <i>T. peruvianum</i> (2n = 72, 90, 108)	
11. <i>T. zopilotense</i> (2n = 36, 72)	
Asia:	
I. Genera—	
<i>Chionachne</i> (2n = 20)	<i>Schlerachne</i> (2n = 20)
<i>Coix</i> (2n = 10, 20)	<i>Trilobachne</i> (2n = 20)
<i>Polytoca</i> (2n = 20)	
Tribe—Andropogoneae	
I. Genus – <i>Manisuris</i>	

1.1.3 受体植物品种（或品系）名称

用作转化的最初玉米受体名为“Hi-II”，是用 A188 和 B73 自交系玉米改良得到的，这两个自交系分别由美国明尼苏达大学和依阿华州立大学培育的，市场上可以购得。

1.1.4 野生种或者栽培种

作为转基因受体的玉米（*Zea Mays* L.）是西半球起源的、为数不多的几种主要作物之一。Hi-II 为栽培玉米。

1.1.5 原产地及引进时间

针对玉米的起源和驯化已经进行了大量研究。有人认为玉米很可能于 7000 到 10000 年前在墨西哥南部开始驯化。玉米公认的起源目前还没有找到，但是墨西哥类蜀黍很可能在玉米的遗传背景里起了重要的作用。

哥伦布发现新大陆时，从智利到加拿大南部的当地文明社会正在种植玉米。哥伦布于 1492 年指出在古巴南部沿海地区有玉米种植，并在返回西班牙时把玉米引入了欧洲（Goodman, 1988）。玉米引入欧洲种植两代以后，玉米传遍了世界上可以种植玉米的那些地区。

针对玉米的来源已进行了广泛的研究，目前有四个主要的假说（OECD, 2003）。

1. 来自于墨西哥类蜀黍：利用墨西哥类蜀黍选育产生的玉米；
2. 三重假说：a) 玉米来自于果荚玉米；b) 利用玉米和三囊草杂交衍生的墨西哥类蜀黍，和c) 通过玉米同墨西哥类蜀黍或者三囊草种间杂交，或者同二者同时种间杂交，进化出来的现代玉米品种（Mangelsdorf, 1974）；
3. 普通起源假说：玉米、墨西哥类蜀黍和三囊草独立地来源于同一种常见但未知的祖先；
4. 灾难性有性突变假说：墨西哥类蜀黍由于后来遗传有性突变，导致雌穗的发育，从而产生了现代玉米。

其它的一些推断包括在 *Andropogoneae* 族里的 *Coix* 和 *Manisuris* 属的物种，它们对玉米的基因组的形成起了一定的作用。这些假说已经通过研究杂交种的基因组相似性、可育性、变异性和生态学特征的分离进行了验证，也通过考古学证据和分子遗传标记分析进行了验证。

尽管目前许多不同的证据报道以佐证不同的假说，但是更多的证据支持玉米起源于墨西哥类蜀黍（Galinat, 1988）的假说。墨西哥类蜀黍的基因组类似于玉米，易于同玉米杂交，还具有一些类似于玉米的植物生态学特性。这些证据证明玉米极有可能起源于墨西哥类蜀黍。

玉米何时被引入中国还无定论。公元 1511 年安徽省《颍州志》物产中所列珍珠秫被认为是我国玉米的最早记载（万国鼎 1962，中国作物遗传资源 1994）。山东农科院主编的《中国玉米栽培学》（1986 年）中认为《颍州志》中的珍珠秫应属高粱的一个品种。我国最早记载玉米的古籍有 1555 年河南《巩县志》、1551 年（明嘉靖 30 年）河南《襄城县志》、1555 年河南《巩县志》、1560 年甘肃《平凉府志》、1563 年《大理府志》和 1574 年的《云南通志》等。一般认为玉米是由阿拉伯人从西班牙带到麦加，由麦加经中亚西亚传入我国的西北部，再传到内陆各省；或从麦加传入印度和我国西南部，

尔后向其它地区传播。但是由于当时沿海地区商业发展迅速和航海事业十分发达，玉米经由海路传入东南沿海地区也是可能的。早期引进的玉米是硬粒型的，马齿型玉米是在 20 世纪 20 年代以后引入的。在 1760 年以前由云南广西一带的硬粒型地方品种经突变和选择形成了糯质玉米品种（详见《中国农业发展史》，1992，《中国农业科学技术史稿》，1989，《中国作物栽培史稿》，1980）。

1.1.6 用途

如今，玉米在 100 多个国家有商业种植。主要的玉米生产国是美国、中国、巴西、墨西哥、法国和印度，它们占了全世界总产量的 75%。种植玉米主要是为了获得玉米籽粒，其大多数用作动物饲料，但是也有相当大的部分制成产品用于食品、药物和工业产品等广大领域。从 2000 年开始，在河南省、西北地区和华北地区的 9 个省玉米被用来提炼燃料酒精。

(i) 食品

尽管玉米作为一种能源具有巨大的价值，但同以玉米为基础的食品加工相比，人类对整粒玉米的消费量非常少（Hodge, 1982; Watson, 1988）。用于食品和工业目的玉米籽粒大多数（77%）通过湿磨粉方式进行加工。在籽粒湿磨的过程中，经过胚芽胚乳分离，可以生产玉米油和淀粉。

胚芽部分同胚乳分离后，经压榨提取出玉米油，可用于制造人造黄油、烹调油和油炸油，供人类食用。玉米油尽管只占整个植物油市场很小的一部分，但其含有的大量的多不饱和脂肪酸却具有重要的营养和保健作用。玉米油被认为是一种高级植物油，因为它在冷藏温度下具有良好的香味、色泽、稳定性和澄清度。其在营养上的良好品质主要同其含有的亚麻脂肪酸和维生素 E 有关。这些良好的品质使之成为消费者直接食用和生产人造奶油用的高级油。这种精制油 50% 左右用于炸用油和色拉油，25% 用于生产人造奶油，25% 用于其它目的。经压榨的胚芽进行干燥后，可加进玉米渣饲料中。

胚乳部分可以用于磨粉，经离心处理可以分离出淀粉。约 40% 的淀粉作为食品直接消费，或者用于其它工业目的，而约 60% 转化为各种甜味剂（White and Pollack, 1995）。淀粉可以转化成多种甜味剂和发酵产品，包括高果糖玉米糖浆和乙醇。玉米淀粉也可以作为一种食品组成成分，如乳制品和冰激凌、面糊食品、烤制食品、汤料、酱油和浓汤、沙拉、肉、禽、鱼制品、糖果和饮料等等。

干磨粉是一个术语，通常指下列三种加工方法中的一种：

- 1) 石磨法（在非洲、拉丁美洲和亚洲广泛采用）；
- 2) 干磨乙醇法；
- 3) 调温去胚芽系统（TD）。

在食品加工业里，TD 系统法得到了最广泛的采用，常见的产品是粗磨谷粉、粗粉、面粉、油和饲料（OECD, 2002）。

(ii) 饲料产品

玉米籽粒里含有的代谢能是牲畜饲料里使用的各种谷物中最易于代谢的能量（Ensminger et al., 1990）。玉米籽粒里有大约 83% 的碳水化合物，它们以淀粉、戊聚糖、糊精、糖、纤维素和半纤维素的形式存在。淀粉是碳水化合物馏份里最大的组分，能提供大部分能量。纤维包括纤维素和半纤维素，它们一般来说对反刍动物有效，但对非反

当动物则很难利用。玉米籽粒里有大约 4%的油（White and Weber, 2003）玉米油含有大量的 18:2 亚麻酸，这是猪和家禽必需的多不饱和脂肪酸中的一种。虽然同其它谷物籽粒相比，玉米籽粒里的蛋白质含量较低（10% dw; ILSI-CCD, 2006），但由于它在动物日粮里所占比例较高，所以玉米蛋白是饲料中主要氨基酸的一个来源。如玉米籽粒是甲硫氨酸的良好来源，但不是赖氨酸和色氨酸的来源。甲硫氨酸和赖氨酸是家禽、猪和其它牲畜以玉米为主要成分的饲料中两个最重要的限制性氨基酸（NRC, 2001）。

作为湿法和干法磨粉的副产品，玉米面筋粉、淀粉渣和蒸馏干酒糟是牲畜饲料的重要成分。玉米淀粉渣和面筋粉是湿法磨粉的副产品，可掺入动物饲料中。面筋里蛋白质含量较高（60%），是类胡萝卜素的来源。它通常用于牛、鱼、家禽、宠物和其它动物饲料，主要用在家禽的日粮里。玉米淀粉渣（湿的或者干的）是极好的饲料，其淀粉和油含量低，可消化纤维含量高，是蛋白质（20%）的重要来源，主要用于奶牛和肉牛的日粮里。

除籽粒外，玉米还可用于青贮饲料，而青贮饲料作为重要的适口性能源，是饲养场和奶牛场的一种主要的饲草成分（Newcomb, 1995）。

1.1.7 在国内的应用情况

玉米早在 16 世纪就来到了中国，是早期的欧洲传教士带来的。最初在中国东部沿海地区—福建省的丘陵和山区种植，十七世纪传遍了中国各地。目前，玉米在中国的许多省份都有种植（Rozelle and Carter, 2001）。

玉米在中国的农业生产结构中起着重要的作用，是优良的饲料、重要的工业原料和优质的粮食作物。中国是世界上最重要的玉米生产国之一，2005 年播种面积约为 2636 万公顷，总产 1.4 亿吨（2005 年中国统计年鉴）。玉米的播种面积和总产量位于水稻和小麦之后，是第三大作物。玉米分布在北纬 50°—20° 间由东北至西南一个狭长的地带，包括 14 个省、自治区、直辖市。中国玉米带可分为 6 个产区：I. 北方春播玉米区；II. 黄淮海夏播玉米区；III. 西南山地玉米区；IV. 南方丘陵玉米区；V. 西北灌溉玉米区和 VI. 青藏高原玉米区（详见 1.3.1 部分和图 1）。其中，前 3 个产区占玉米播种总面积的 80%。

历史上，玉米单独或与其它谷类粮食一起制作各种中国人喜食的食品（如玉米饼、面包、蛋糕等）。鲜玉米（包括普通玉米和甜糯玉米）可直接食用。在过去的 20 年间，玉米成为最重要的饲料作物之一。玉米作为原材料可生产 300 多种工业产品，或作为制药的原料。玉米作物的终端用途在迅速地变化；玉米正在越来越多地用于大型养猪场和家禽场，而不再仅仅是一种粮食作物或者农家院养猪养鸡的饲料（Rozelle and Carter, 2001）。在中国，大约 75% 的玉米用于动物饲料，其余的用于人类消费和工业用途（USDA-ERS, 2000）。据统计（翟凤英和杨晓光, 2006），中国居民平均每标准人日玉米食物的摄入量为 9.9 克（表 2）。

地区	大城市	中小城市	一类农村	二类农村	三类农村	四类农村	平均
摄入量 (g/标准人日)	8.6	8.0	7.1	7.9	19.5	17.3	9.9

1.1.8 对人类健康和生态环境是否发生过不利影响

玉米原产于墨西哥，早在公元前 2700 年就作为粮食作物进行种植了（Salvador, 1997）。几百年来，一直是动物饲料和人类的主食。玉米籽粒及其加工品可以用在各种食品和动物饲料产品里。食用玉米时发生的过敏反应极为少见；研究最多的是同脂类传递蛋白质有关的课题（Pastorello et al., 2000）。此外，玉米里不含毒素（Watson, 1982; White and Pollak, 1995）。

玉米在全世界广泛地种植，人们认为它不是一种持久性杂草或者是一种难于防治的杂草。正如我们今天所知，玉米不能在野生环境里存活，因为其雌性花序（果穗）能限制种子的传播。

迄今为止，种植玉米、食用玉米（包括食用含有玉米成分的食品）、作为饲料或用于工业用途，都未见对人类或动物的健康及生态环境产生过不利影响的报道。

1.1.9 从历史上看，受体植物变成有害植物的可能性

玉米是起源于西半球为数不多的主要作物物种之一。虽然玉米已得到了广泛的研究，但是公认的玉米来源目前还没有找到。墨西哥类蜀黍极有可能在玉米的遗传背景里起了重要的作用。从一个野生杂草物种转化成一个依靠人类得以生存的栽培驯化物种，在西半球土著居民那里经历了很长的时间才得以完成。正如我们今天所知，与杂草不同，玉米不能在野生环境里存活，因为其雌性花序（果穗）能限制种子的传播，因此栽培玉米不具有成为杂草倾向。

1.1.10 是否有安全应用的记录

如前所述，玉米原产于墨西哥，早在公元前 2700 年就作为粮食作物进行种植了（Salvador, 1997）。长期以来，玉米一直是动物和人类的主食，因此证明了它用于食品具有长期的安全使用史。

1.2 受体植物的生物学特性

1.2.1 是一年生还是多年生

玉米是雌雄同株异花的一年生禾本科栽培植物。

1.2.2 对人类及其它生物是否有毒，如有毒，应说明毒性存在的部位及其毒性的性质

玉米不含有毒物质，对动物和人类健康是安全的。但根据 OECD（2002），玉米里有几个人们熟知的抗营养因子，包括植酸、2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one（DIMBOA）、棉子糖，以及胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的抑制因子。

植酸存在于玉米内，它能螯合矿物营养元素，包括钙、镁、钾、铁和锌，使单胃动物无法有效吸收这几种矿物质（Liener, 2000）。同时认为植酸对于动物，特别是非反刍动物，是一种重要的抗营养因子，因为它能降低磷的生物学有效性。饲料企业在生产加工时通常要向猪和家禽饲料中添加植酸酶，以提高饲料中磷的利用率。

DIMBOA 属于一组代谢物，即氧蒽酸和酚类化合物，通常可以在谷类植物中发现。DIMBOA 里的葡萄糖苷，即 DIMBOA-glc，是在玉米最初发育阶段存在于地上部绿色组织和根部组织里的这类化合物中最重要的一种（Cambier et al., 2000）。DIMBOA-glc 在受伤的植物组织里，利用酶去除葡萄糖苷，变成 DIMBOA，后者对昆虫有毒性（OECD, 2002）。

棉子糖是一种低分子量的碳水化合物，由于食用后它能产生气体造成肠胃气胀，人们认为它是一种抗营养因子（Maynard et al., 1979）。

玉米还含有少量的胰蛋白酶和胰凝蛋白酶的抑制因子，人们认为这二个因子都不具有营养重要性（White and Pollak, 1995）。

1.2.3 是否有致敏原，如有，应说明致敏原存在的部位及其毒性的性质

玉米不是常见的致敏食品。目前很少有关食用了玉米产品后发生过敏反应的报道（OECD, 2002）。过去的 7 年中，在美国只报道过二例（Pauls and Cross, 1988; Tanaka et al., 2001）。Jones 等（1995）研究表明，许多表现为对籽粒过敏的个人，实际上是对花粉过敏，这些人里有大约 80% 的人进行了食物攻击试验，并没有产生临床症状。此外，那些发生籽粒过敏反应的人，一般对小麦蛋白质发生过敏反应（~75%），对玉米的过敏反应极少（一百多位病人中不到六位向该小儿科过敏反应专科中心报告发生了过敏反应）。

来自于意大利的二份最新报告（Pasterello et al., 2000; Pasini et al., 2002）表明，有一些过敏病人出现的食品过敏反应，同食用包括玉米粥在内的玉米产品出现的过敏反应症状相一致，其中来自拿波里的 6 位病人轻度食品攻击结果呈阳性（Pasini et al., 2002）。但是，上述意大利研究中所报告的病人，通常对杂草、*prunidae* 类植物产生的花粉、籽粒及香料等，都会发生多重过敏反应。多重过敏反应使得临床上识别特定病例的致敏原时不太可靠；由于过敏反应之间或多或少潜在的交叉作用，使得皮试诊断和离体 IgE 结合试验更为复杂。目前，还没有足够的证据来了解在意大利或地中海地区玉米产品过敏反应流行的特点，也还没有来自于世界其它地区的、关于玉米食品过敏反应的报告实例。这表明，由于使用玉米及其衍生产品，对人类造成过敏反应的风险很可能是很低的。

1.2.4 受体植物的繁殖方式是有性繁殖还是无性繁殖，如有有性繁殖，是自花授粉还是异花授粉或常异花授粉；是虫媒传粉还是风媒传粉

玉米是有性繁殖作物，主要是风媒授粉，虫媒传粉较少。是自交、杂交均亲合的物种（Wilkes, 1972 and 1989）。自花授粉导致同一植株内遗传特征的纯和性，而异花授粉能结合许多植株的遗传特点，这一自交—杂交的概念和由此而来的产量反应构成了现代玉米种子业的基础。有生命力的花粉可以传播的距离取决于湿度、温度、风向、风力等因素。

1.2.5 在自然条件下与同种或近缘种的异交率

玉米是风媒授粉、自交亲合、互交可孕的物种（Wilkes, 1972 and 1989）。有生命力的花粉可以传播的距离取决于湿度、温度、风向、风力等因素。偶然，人们会发现，玉米花粉可以在良好的条件下风媒传播远达 3.2 公里。玉米可以交叉授粉，除了某些爆裂玉米品种和杂交种外，它们有一个配子体因子（在染色体 4 上的 Ga^s , Ga , 和 ga 等位基因系列）。

玉米和墨西哥类蜀黍具有杂交可亲和性。在墨西哥和危地马拉，它们在距离较近、其它条件良好时，可以自然杂交。墨西哥类蜀黍的自然分布局限于沿着墨西哥和危地马拉西部崖坡的季节性干燥的、夏季有雨的亚热带地区和墨西哥中部高原地区（Wilkes, 1972; Gonzalez and Corral, 1997）。

玉米和摩擦禾可杂交，但极为不易。并且杂交种具有高度的不育性，在遗传学上也不稳定（Mangelsdorf, 1974）。Galinat（1988）进一步说明，由于摩擦禾和玉米拥有不同数目的染色体，添加一个多余的摩擦禾染色体到玉米基因组里的几率是很低的，因此染色体的交换率被降低到了极低的水平。

1.2.6 育性（可育还是不育，育性高低，如果不育，应说明属于何种不育类型）

受体玉米是可育的。在自然条件下具有授粉、受精、结实能力。但有许多因素可以引起玉米的雄花不育，如高温、干旱、辐射、化学药物处理以及营养元素缺乏等。

1.2.7 全生育期

(i) 温度和生育期

玉米是一年生植物，其生育期的长短取决于品种特性及其生长的环境（Hanway and Ritchie, 1982）。在生长点露出地面（5 叶到 7 叶阶段）之后，在低于 0°C 的温度下，玉米的存活时间不超过 6 至 8 小时。冻害的程度取决于低于 0°C 的温度的时间长短、土壤条件、残茬、低温期的长短、风向、相对湿度和植物发育阶段。在温带地区晚春时的轻霜冻可以引起叶片损伤，也影响玉米灌浆。因此，玉米能否完成生命期取决于平均无霜期的长短。一般早熟品种到晚熟品种生育期约从 90 天—130 天不等。

无霜期的长短决定了生育期不同的玉米品种在不同纬度地区种植。相关的成熟期也取决于生育期间的气候条件、地形、大型水体和土壤类型（Troyer, 1994）。

同一品种的成熟期在同一年不同的种植地点有所不同，在同一地点不同年份也稍有不同，这取决于从种植到收获经历的环境条件。

(ii) 生长发育阶段

玉米自播种至成熟经历了营养生长（V）和生殖生长（R）阶段（Kumudini and Tollenaar, 1998）。这个过程可进一步分为许多阶段，以下作一个简要的介绍：

苗期（VE-V5）：由于中胚轴迅速生长使得玉米出土。随后，胚叶开始通过胚芽鞘尖长出来，50%以上玉米苗高 2-3cm 以上称为出苗。苗期是以生根、长叶、茎节分化为主要的营养生长阶段，一般历时 20-35 天不等

拔节期至抽雄期（V6-VT）：玉米生长点位于地面以上，茎迅速伸长为拔节。拔节是由玉米由营养生长转向营养生长与生殖生长并进的时期。至最后一叶长出，雄穗出现，玉米达到最大株高。一般历时 27-30 天。

吐丝期（R1）：当花丝在苞叶外面可见，抽丝即告开始。在这一阶段胚珠外观白色，内部清晰可见，含有很少的液体，胚不可见。在抽丝前后的二周是玉米植株的生命周期里对环境逆境最敏感的阶段。在这一阶段，在逆境条件下常见籽粒败育。败育造成的籽粒数目的减少会造成严重减产。

水泡期（R2）：吐丝后大约 10-14 天，水泡期即开始。其特点是籽粒的穗轴上有淡白色的水泡状籽粒，里面的胚乳含有透明的液体，而胚形状较小但可以分辨出来。花丝已经完成了授粉受精功能，开始干枯。

乳熟期（R3）：花丝形成后大约 18-22 天，籽粒外观为黄色，随着淀粉在胚乳里开始积累，其内为乳状白色液体。此时通过解剖，胚易于辨认。乳熟期穗粒数已经确定，籽粒中干物质的积累是影响产量的主要因素。

蜡熟期（R4）：花丝形成后大约 24-28 天，随着淀粉在胚乳内持续积累，使籽粒内部乳状液体变稠，形成“团样”液体，蜡熟阶段即告开始。

凹陷期（R5）：花丝形成后大约 35-42 天，全部或部分籽粒顶部开始凹陷，在籽粒的凹陷端附近，出现了一条明显的水平线，它是成熟籽粒液体（乳）区和固体（淀粉）区的分界线，成为“乳线”。随着籽粒的成熟，“乳线”将向着籽粒的基部（穗轴方向）

移动。当乳线在籽粒的顶部和基部之间达到 50%时，籽粒即为 40-45%含水量，并且已经达到了其最终干物质重的 95%。

完熟期（R6）：花丝形成后大约 55-65 天，籽粒的干物质达到最大值，籽粒即达到生理性成熟。在籽粒的乳线消失后不久，籽粒基部形成黑层，就达到了完熟期阶段。黑层首先在果穗顶部籽粒出现，随后基部籽粒逐步产生。黑层出现后籽粒的平均含水量为 30-35%，但可以随着环境条件的不同而有所变化。

1.2.8 在自然界中生存繁殖的能力，包括越冬性、越夏性及抗逆性等

玉米经过长期的驯化，使种子成为唯一繁殖器官，并需要人类的帮助使其继续世代繁衍或者空间传播（Gould, 1968; Troyer, 2001; OECD, 2002）。在自然生境里，玉米是非侵袭性的物种，并且已经丧失了其在野生条件下存活的能力（Gould, 1968）。同杂草植物相比，玉米有雌性花序（果穗），穗轴被苞叶包裹，一般不能发生单个籽粒的种子传播。

玉米没有无性生殖器官，其种子一般不具有休眠特性。玉米种子的存活取决于所处的温度、湿度、基因型、果皮保护和种子成熟度等。0°C 以下的温度会影响萌发，因此低温是种子生产期间的主要风险。高于 45°C 的温度也会对种子的生活力有负面影响（Shaw, 1988）。

虽然上个生长季洒落的玉米可以越冬并在次年萌发，但它不能像杂草一样长期存活。在许多农田系统里，常见玉米自生苗，但是很容易防治。因此没有人工栽培，玉米不能长期持续繁殖。

1.3 受体植物的生态环境

1.3.1 在国内的地理分布和自然生境

玉米在中国分布很广，南起海南岛，北到北纬 50° 的黑龙江，东起台湾及沿海各省，西到新疆、青藏高原，都有玉米栽培。东北及西南高寒山区为春播玉米，黄淮海流域为夏播玉米，在广西、海南等省可一年两季种植。根据各地气候条件、生产条件和种植制度，从东北到西南的狭长带状区域内，形成了中国玉米的主要种植区，即北方春播玉米区、黄淮海夏播玉米区、西南山地玉米区、南方丘陵玉米区、西北灌溉玉米区、青藏高原玉米区（图 1）（农业部种植业管理司, 2004; 佟屏亚）。



图 1 中国玉米主产区

1. **北方春播玉米区：**玉米主产区，占播种总面积的 39.2%，占总产的 43.8%。该区包括黑龙江、吉林、辽宁、宁夏，内蒙古、山西大部，河北、陕西和甘肃北部，生态条件和生产条件都适合玉米生长，地势平坦，土壤肥沃，光照充足，无霜期 130—170 天，年降雨量 400—800mm（60%降雨在 6—9 月间）。一年一熟。
2. **黄淮海夏播玉米区：**玉米主产区，占播种总面积的 32.7%，占总产的 35.5%。该区包括山东和河南、河北大部、山西中南部、陕西关中地区和江苏徐淮地区，是玉米的集中产区。水资源丰富，黄河、淮河和海河横穿该区，年降雨量为 170—220mm（70%降雨在夏季），水浇地面积达 50%。一年两熟。
3. **西南山地玉米区：**玉米主产区，占播种总面积的 18.4%，占总产的 13.4%。该区包括四川、云南和贵州省、陕西南部、广西西部高原地区、湖南、湖北和甘肃部分地区。山地占该区的 90%，地形复杂。无霜期为 240—330 天，降雨量为 800—1200mm。该区种植的玉米易受生物和非生物因素（如干旱和病虫害）的危害。一年一熟或一年多熟。
4. **南方丘陵玉米区：**该区面积广大，包括广东、海南、浙江、江苏和安徽南部、广西东部、湖南和湖北省。该区主要种植水稻，玉米面积较小，只占 3.2%，产量只占总产的 2.2%。该区位于热带和亚热带地区，无霜期 220—360 天，降雨量 1000—1800mm，适合玉米生长。一年三熟或一年四熟。
5. **西北灌溉玉米区：**该区为干旱地区，降雨量低于 200mm，包括新疆、河西甘肃走廊、宁夏河套地区。这一地区的作物主要靠灌溉。无霜期 130—180 天。玉米播种面积占 3%。一年一熟。
6. **青藏高原玉米区：**该区位于高纬度地区，包括青海省和西藏自治区、四川西部和云南北部地区。玉米栽培历史较短，播种面积很小。

1.3.2 生长发育所要求的生态环境条件,包括自然条件和栽培条件的改变对其地理分布区域和范围影响的可能性

正如在 1.2.7 节里讨论的那样,玉米生长发育理想的生态条件包括充足的土壤含水量、能促进种子萌发和出土的最佳土壤温度和充足的土壤养分。玉米生产的最佳时期是最热月份的等温线在 21 和 27°C 之间,无霜期在 120 至 180 天之间。150 毫米的夏季降雨量约为无灌溉条件下玉米生产的降雨下限,玉米生长期间的降雨量虽无上限,但过多的降雨会导致减产。光照、水分、温度及土壤条件对玉米生长发育均有影响。

1.3.3 是否为生态环境中的组成部分

玉米不是自然生态环境中的组成部分,但是已成为农业生态系统中一个重要组成部分。正如在 1.1.7 节里讨论的那样,玉米早在 16 世纪就被欧洲传教士引入中国。最初在中国东部沿海地区的福建省丘陵区 and 山区种植。之后,又在十七世纪传遍了中国各地 (Rozelle and Carter, 2001)。目前,玉米在中国的大多数省份都有种植 (1.3.1 节)。

1.3.4 与生态系统中其它植物的生态关系,包括生态环境的改变对这种(些)关系的影响以及是否会因此而产生或增加对人健康和生态环境的不利影响

玉米是异花授粉作物,在中国大部分省份都有种植。如前所述,某些墨西哥类蜀黍物种可以同玉米杂交产生可育后代,但是墨西哥类蜀黍只生长在墨西哥和危地马拉 (Sánchez-González and Ruiz-Corral, 1997)。摩擦禾可以同玉米杂交,但极为不易。并且杂交种具有高度的不育性,在遗传学上不具稳定性 (Mangelsdorf, 1974)。此外,玉米没有杂草特性,不能有效地侵袭现有的生态系统。因此,生态环境的改变将不可能对玉米产生任何生态效应,如演化为侵袭性杂草或因其稀有物种的灭绝等。人们预计,玉米和其它作物植物的生态学关系不会由于生态环境的变化而发生改变。

1.3.5 在生态系统里同其它生物(动物和微生物)的生态学关系,包括生态环境的变化对上述关系的影响以及后续的负面影响或者增加了对人体健康和环境的负面影响

在生态系统里,玉米同土壤内外的其它生物有一定的生态学关系。玉米根系由于其同诸多微生物群体,如细菌、真菌、放线菌 (Vega-Segovia and Ferrera-Cerrato, 1996)、原生动物和螨类等有一定的关系,所以还能起到土壤调节的作用。一些有益昆虫同玉米保持生态关系,玉米同时也有一些常见的病虫害。生态环境的变化不会改变玉米同生态环境中其它生物同的生态学关系,也不会对人体健康或环境产生任何的负面影响。

1.3.6 对生态环境的影响及其潜在危险程度

玉米是栽培作物,在中国有长期的栽培历史,没有证据表明会对生态环境造成风险。

1.3.7 涉及到国内非通常种植的植物物种时,应描述该植物的自然生境和有关其天然捕食者、寄生物、竞争物和共生物的资料

玉米是栽培作物,因此不涉及非通常种植植物问题。

1.4 受体植物的遗传变异

1.4.1 遗传稳定性

玉米是高等植物中应用较广的遗传学资料,含有较多的遗传位点,通过自交和回交可以稳定遗传。

玉米进化成为自由授粉作物物种后，直到二十世纪，玉米栽培品种才成为今天意义上的异化授粉作物。哥伦布发现新大陆之前，当地的土著人利用简单的群体选择来培育新品种。在今天看来，他们的选育方法极简单，但这些选择方法能十分有效地培育品种，以满足他们对食物、燃料、饲料和文化的需求。随着西半球文化的发展，发现了品种间杂交育种方法，由此人们可以遗传变异培育新品种。

十九世纪二十年代，奠定了杂交玉米育种基础理论。通过进行玉米品种遗传组成的基础研究，以确定某个特定玉米品种内的自花授粉效应（Shull, 1909）。玉米单株连续7至10代的自花授粉，培育出了纯系（即自交系），在这个纯系群体中每个植株都有相同的遗传特性。孟德尔遗传学理论对在近交过程中发生的遗传变化进行了正确解释：通过自交，使每个基因位点上杂合等位基因的逐步纯合，形成纯系。在纯系里等位基因的纯合，使活力和生产力普遍下降。

在二个纯系进行杂交时，人们发现后代生活力又得到恢复。如果在自交的过程中没有进行选择，则各种可能出现的杂交种的平均生产能力（如籽粒产量）和开始用来自交的品种的生产性能近似。但是，某些杂交种优于原始的自由授粉品种，并且可以通过杂交种的纯系亲本的杂交而进行繁殖。于是，确定了杂交玉米的理论：自交培育纯系、纯系杂交以产生杂交种，然后通过杂交种评价筛选，并利用纯系亲本生产优良杂交种，最后将这个杂交种提同农民使用（Shull, 1909）。

1.4.2 是否有发生遗传变异而对人类健康或生态环境产生不利影响的资料

在玉米育种过程中，育种家利用诱变、杂交等手段创造新的遗传变异，用来选育新品种。玉米在自然条件下也会产生一些遗传变异，育种家也经常有目的选择、利用这些自然变异进行品种改良。所有这些育种活动都是选择对人类和环境有益的遗传变异，淘汰不利变异。目前未见这些遗传变异对人类或环境产生不利影响的资料。

1.4.3 在自然条件下与其它植物种属进行遗传物质交换的可能性

基因飘移过程中，能够通过正常有性传播实现基因渐渗必须具备一定条件：1）二个亲本必须有性亲合；2）必须有重叠的物候学特性；和3）必须有适当的花粉载体，它能在二个亲本之间传递花粉。

玉米和一年生墨西哥类蜀黍具有遗传亲合性。在墨西哥和危地马拉，距离较近时，通过风媒传粉可以自由杂交。但在中国没有墨西哥类蜀黍分布在自然环境中。

玉米与近缘种大刍草具有进行遗传物质交换是有可能的，但是大量的研究表明大刍草和玉米间遗传物质交换受到严格的限制（Doebley and Iltis, 1980）。

在野生条件下，玉米同三囊草属杂交是极为困难的。另外，三囊草属对生境的要求类似于墨西哥类蜀黍，在中国没有三囊草属在自然环境中分布。

1.4.4 在自然条件下与其它生物（如微生物）交换遗传物质的可能性

目前从未发现任何关于遗传物质由玉米向其它生物传递遗传物质的报道。在自然条件下，从植物向动物或者微生物的基因水平转移在试验上目前还没有得到证实（Bertolla and Simonet, 1999; Nielson et al., 2000）。

1.5 受体植物的监测方法和监控的可能性

玉米植株的形态早已为人们所熟悉，因此很容易检测和控制。利用某些选择性除草剂和广谱除草剂，如草甘膦、阿特拉津、乙草胺等，可以有效控制玉米。此外，可以利用中耕防治玉米的自生苗。

1.6 受体植物的其它资料

有关玉米的其它资料可以从相关的教材、科技书籍、网站等信息渠道上获得。

1.7 根据上述评价，参照本办法第十一条有关标准划分受体植物的安全等级

综上所述，玉米对人体或者动物不具有毒性，对环境产生负面效应或者演变成为一种有害的生物的可能性极小。因此，根据《农业转基因生物安全评价管理办法》第二章第十一条的规定，本项目的受体植物的安全等级为I。

2 基因操作的安全性评价

2.1 转基因植物中引入或修饰性状和特性的叙述

MON 88017 是通过把 *cp4 epsps* 和 *cry3Bb1* 基因构建到同一转化载体的 T-DNA 区域内，然后通过质粒的转导，导入玉米受体细胞中。克隆自农杆菌 CP4 菌株的 *cp4 epsps* 基因能够编码产生 5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸合成酶（CP4 EPSPS），由于 CP4 EPSPS 对草甘膦不敏感，因此能够使转基因植物抵抗草甘膦类除草剂的伤害。而 MON 88017 中导入的另一个来自苏云金杆菌的 *cry3Bb1* 基因能够产生 Cry3Bb1 蛋白，从而使转基因植物抵抗玉米根虫的为害。

2.2 实际插入或删除序列的以下资料

2.2.1 插入序列的大小和结构，确定其特性的分析方法

插入序列包含有 *cp4 epsps* 和 *cry3Bb1* 两个基因表达盒，插入序列大小约为 7.1 kb（图 2、表 3、附件资料 3 和技术报告 1）。在 *cp4 epsps* 基因表达盒中包含有水稻肌动蛋白 1 基因（*actin1*）的启子（934 bp）、*actin1* 的内含子（461 bp）、拟南芥叶绿体转移肽（*CTP2*）序列（228 bp）、*cp4 epsps* 基因（1368 bp）和 NOS 终止子（256 bp）。而在 *cry3Bb1* 基因表达盒中则包含 35S 启动子（613 bp）、小麦叶绿素 A/B 结合蛋白的非翻译前导序列（251 bp）、*actin1* 的内含子（461 bp）、*cry3Bb1* 基因（1962 bp）、小麦 HSP17 蛋白的 3'端非翻译区编码序列（234 bp）。

通过限制性核酸内切酶的酶切和 Southern 印迹杂交可以确定上述表达调控元件的特性（图 2）。

2.2.2 删除区域的大小和功能

MON 88017 没有去除受体植物基因组的遗传物质（技术报告 1）。

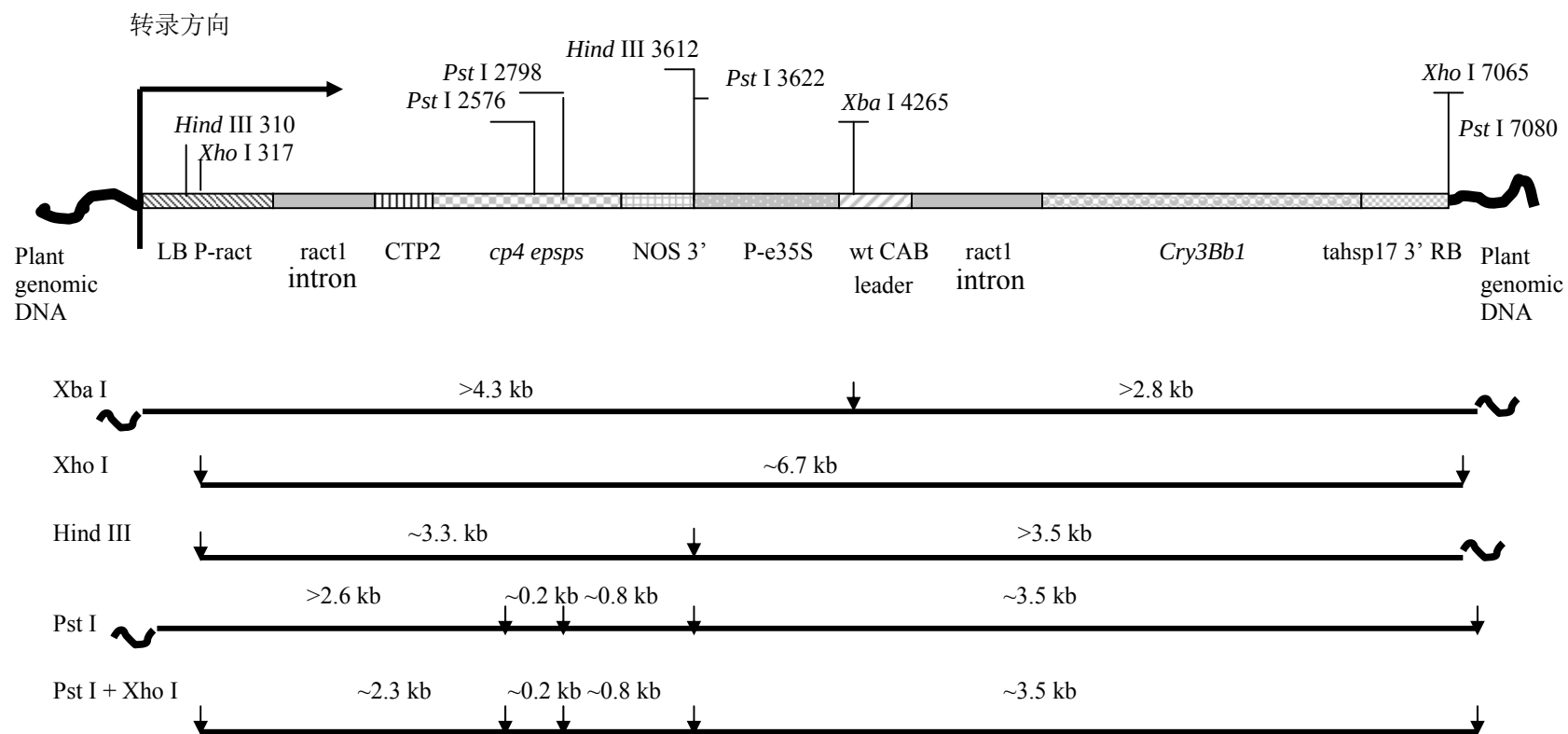


图2 MON 88017插入序列中表达调控元件的线性图谱

遗传表达调控元件和用于Southern杂交分析的限制性酶切位点标于图中。箭头所指位置为酶切位点。预期的限制性酶切片段大小也标在图中。MON 88017只含有单位点的单拷贝插入。

2.2.3 目的基因的核苷酸序列和推导的氨基酸序列

(i) 目的基因的 DNA 序列（CBI）

cp4 epsps 基因的 DNA 序列见图 3，*cry3Bb1* 基因的 DNA 序列见图 4。

涉及商业保密资料，故从该版本中删除

图 3 MON 88017 中 *cp4 epsps* 基因的核苷酸序列

涉及商业保密资料，故从该版本中删除

图 4 MON 88017 中 *cry3Bb1* 基因的核苷酸序列

(ii) 依据目的基因序列推导的氨基酸序列

依据目的基因 DNA 序列推导的 CP4 EPSPS 蛋白的氨基酸序列见图 5（附件资料 1 和技术报告 7），Cry3Bb1 蛋白的氨基酸推导序列见图 6（附件资料 1 和技术报告 8）。

```
1  MAQVSRICNG VQNPSLISNL SKSSQRKSPL SVSLKTQQHP RAYPISSSWG
51  LKKSGMTLIG SELRPLKVMS SVSTACMLHG ASSRPATARK SSGLSGTVRI
101 PGDKSISHRS FMFGGLASGE TRITGLLEGE DVINTGKAMQ AMGARIRKEG
151 DTWIIDGVGN GGLLAPEAPL DFGNAATGCR LTMGLVGVDYD FDSTFIGDAS
201 LTKRPMGRVL NPLREMGVQV KSEDGDRLPV TLRGPKTPTP ITYRVPMASA
251 QVKSAVLLAG LNTPGITTVI EPIMTRDHT E KMLQGFGANL TVETDADGVR
301 TIRLEGRGKL TGQVIDVPGD PSSTAFPLVA ALLVPGSDVT ILNVLMNPTR
351 TGLILTLQEM GADIEVINPR LAGGEDVADL RVRSSSTLKG V TVPEDRAPSM
401 IDEYPILAVA AAFAEGATVM NGLEELRVKE SDRLSAVANG LKLN GVDCDE
451 GETSLVVRGR PDGKGLGNAS GAAVATHLDH RIAMSFLVMG LVSENPVTVD
501 DATMIATSFP EFMDLMAGLG AKIELSDTKA A
```

图 5 MON 88017 表达的 CP4 EPSPS 蛋白推导氨基酸序列

该推导序列中包含 CTP2 转移肽（用下划线标出的氨基酸 1-76）

```

1  MANPNNRSEH DTIKVTPNSE LQTNHNQYPL ADNPNSTLEE LNYKEFLRMT
51  EDSSTEVLND STVKDAVGTG ISVVGQILGV VGVPFAGALT SFYQSFLNTI
101 WPSDADPWKA FMAQVEVLID KKIEEYAKSK ALAELQGLQN NFEDYVNALN
151 SWKKTPLSLR SKRSQDRIRE LFSQAESHFR NSMPSFAVSK FEVLFLPTYA
201 QAANTHLLLL KDAQVFGEW GYSSSEDVAEF YRRQLKLTQQ YTDHCVNWYN
251 VGLNGLRGST YDAWVKFNRF RREMTLTVLD LIVLFPFYDI RLYSKGVKTE
301 LTRDIFTDPI FLTLTLQKYG PTFLSIENSI RKPHLFDYLQ GIEFHTRLRP
351 GYFGKDSFNY WSGNYVETRP SIGSSKTITS PFYGDKSTEP VQKLSFDGQK
401 VYRTIANTDV AAWPNGKVYL GVTKVDFSQY DDQKNETSTQ TYDSKRNNGH
451 VSAQDSIDQL PPETTDEPLE KAYSHQLNYA ECFLMQDRRG TIPFFTWTNR
501 SVDFFNNTIDA EKITQLPVVK AYALSSGASI IEGPGFTGGN LLFLKESSNS
551 IAKFKVTLNS AALLQRYRVR IRYASTTNLR LFVQNSNNDL LVIYINKTMN
601 KDDDLTYQTF DLATTNSNMG FSGDKNELII GAESFVSNEK IYIDKIEFIP
651 VQL

```

图 6 MON 88017 表达的 Cry3Bb1 蛋白推导氨基酸序列

其中有6个氨基酸与野生型Cry3Bb1蛋白的氨基酸不同（用加粗及下划线标出），具体为：2A（插入）、H232R、S312L、N314T、E318K和Q349R。

2.2.4 插入序列在植物细胞中的定位（是否整合到染色体、叶绿体、线粒体，或以非整合形式存在）及其确定方法

MON 88017 是用含有 *cp4 epsps* 和 *cry3Bb1* 基因表达盒的质粒 PV-ZMIR39 经过农杆菌介导转化，再经连续选育而得到的。外源插入序列整合到 MON 88017 细胞核基因组中，这一点可以从 Southern 杂交结果得到证实（附件资料 1 和技术报告 1）。在 MON 88017 玉米基因组中没有发现 PV-ZMIR39 的 T-DNA 区域外任何表达调控元件和骨架序列。经 PCR 对植物基因组和插入基因相连的 3'和 5'进行检测，验证了 MON 88017 玉米只有一个位点的单拷贝插入。

2.2.5 插入序列的拷贝数

探针 1、2、3 和 4 可以覆盖整个 T-DNA 区域（图 8），因此被用来进行 Southern 分析，以确定插入序列的位点数和插入拷贝数。插入序列拷贝数的检测分析结果见图 7，附件资料 3 和技术报告 1。质粒 PV-ZMIR39 经 *EcoR I* 限制性内切酶消化后和阴性对照 DNA 经 *Sca I* 消化后混合，经与探针 1、2、3 和 4 杂交，可以产生 PV-ZMIR39 质粒相应的大小条带（6.3 kb、3.5 kb 和 2.6 kb，第 4 和 5 泳道）。MON 88017 转基因玉米基因组经 *Sca I* 消化后，产生了一条约 13 kb 的条带（第 2 和 6 泳道）。这些结果表明 MON 88017 含有一个拷贝，位于 13 kb 大小对的 DNA 片断上。MON 88017 经 *Xba I* 消化后产生两条，大小分别为 7.4 kb 和 5.5 kb（第 3 泳道），表明插入序列两边的片断大小。连同插入拷贝数的分析，MON 88017 是在单一位点上插入了单个拷贝的外源 DNA。

2.3 目的基因与载体构建的图谱，载体的名称、来源、结构、特性和安全性，包括载体是否有致病性以及是否可能演变为有致病性

DNA 克隆和质粒 PV-ZMIR39 载体构建的寄主是大肠杆菌（载体构建图谱见图 8、附件资料 2 和技术报告 1）。大肠杆菌普遍存在于环境中，也存在于脊椎动物包括人体的消化系统里（Jefferson et al., 1986）。大肠杆菌的这些特点证明没有必要对其进行更多的毒理学分析试验。

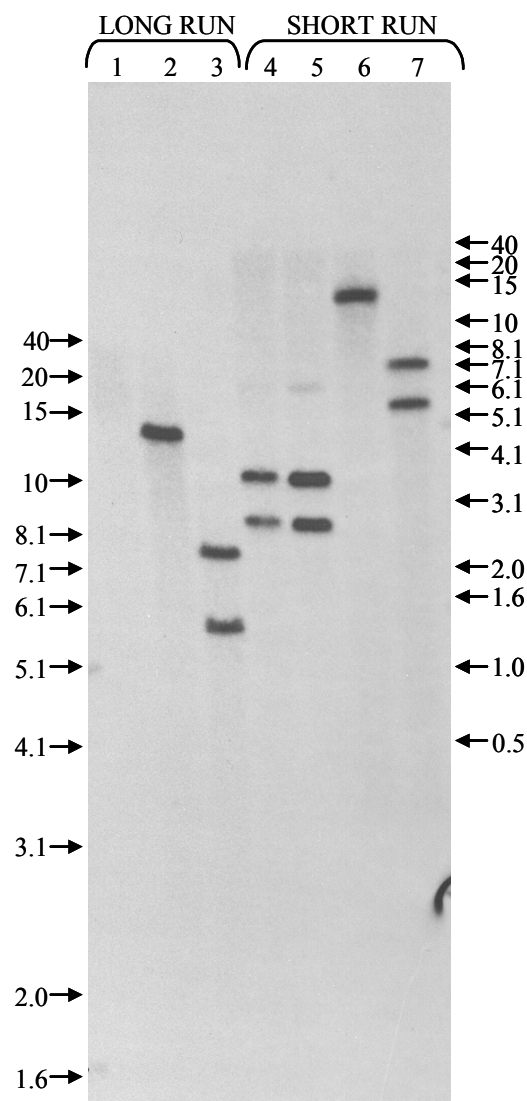


图7 MON 88017的Southern杂交分析: 插入拷贝数

杂交探针 (探针1、2、3和4, 图8) 用³²P标记, 每泳道加样量为~10 μg经酶切的籽粒DNA, 各泳道加样如下:

- 泳道 1: 对照 (*Sca* I)
 2: MON 88017 (*Sca* I)
 3: MON 88017 (*Xba* I)
 4: 对照 (*Sca* I) 混入 PV-ZMIR39 (*Eco*R I) [0.5 copy]
 5: 对照 (*Sca* I) 混入 PV-ZMIR39 (*Eco*R I) [1.0 copy]
 6: MON 88017 (*Sca* I)
 7: MON 88017 (*Xba* I)
 → 表明分子量大小

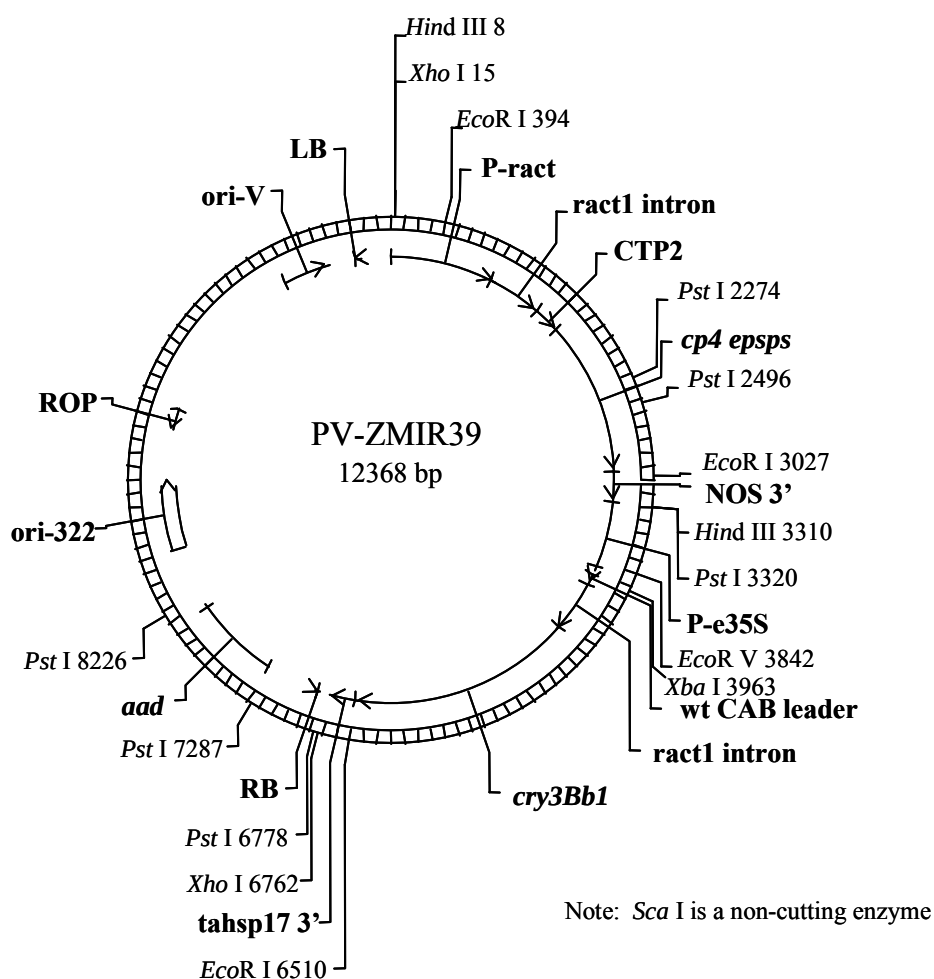


图8 PV-ZMIR39质粒图谱

探针	覆盖的遗传元件	起始位置	结束位置	总长度(bp)
1	部分 LB + P-ract1 + 部分 CTP2	12080	1482	1771
2	CTP2 + <i>cp4 epsps</i>	1423	3019	1597
3	部分 <i>cp4 epsps</i> + NOS'3 + P-e35s + wt CAB leader + ract1 intron	2991	4533	1543
4	<i>cry3Bb1</i> + tahsp17 3' + RB	4534	6865	2332
5	部分骨架序列	6866	9492	2627
6	部分骨架序列	9465	12066	2602
7	P-act1 + ract1 intron	13	1407	1395
8	NOS '3	3032	3287	256
9	P-e35s	3321	3933	613
10	Wt CAB leader + ract1 intron	3958	4533	576
11	<i>cry3Bb1</i>	4534	6510	1977
12	tahasp17 3'	6511	6744	234

用于农杆菌介导转化获得 MON 88017 的 PV-ZMIR39 质粒环形图谱。遗传元件用粗体标出，限制性内切酶的酶切位点也在图中标出。上表列出了用于 Southern 分析所使用的探针。

2.4 载体中插入区域各片段的资料

2.4.1 启动子和终止子的大小、功能及其供体生物的名称

在 *cp4 epsps* 基因表达盒中,目的基因由水稻肌动蛋白 1 基因(*actin1*)的启子 P-ract1 驱动,其分子量大小为 934 bp;而终止子为来源于根癌农杆菌的胭脂碱合成酶基因(NOS)的终止子,分子量大小为 256 bp。其详细信息见表 3。

而在 *cry3Bb1* 基因表达盒, *cry3Bb1* 基因则由人工修饰的花椰菜花叶病毒 35S 亚基编码基因的启动子 P-e35S 驱动,该启动子分子量大小为 613 bp;翻译转录的终止序列为来源于小麦热激蛋白 17 (HSP17) 编码基因的终止子,分子量大小为 234 bp。其详细信息见表 3 (附件资料 2)。

表3 构建在PV-ZMIR39质粒中的遗传表达调控元件

遗传元件	质粒序列(bp)	功能(参考文献)
LB	12067-12090	源自农杆菌,用于 T-DNA 的转化的左边界序列(Barker <i>et al.</i> , 1983)
间插序列	12091-12364	来自于农杆菌的 DNA 序列 (Barker <i>et al.</i> , 1983)
间插序列	12365-12	人工合成序列,多聚核苷酸接头
P-ract1	13-946	源自于水稻肌动蛋白编码序列的启动子 (McElroy <i>et al.</i> , 1990)
ract1 intron	947-1407	源自于水稻肌动蛋白编码序列的内含子 (McElroy <i>et al.</i> , 1991)
间插序列	1408-1423	人工合成序列,多聚核苷酸接头
CTP2	1424-1651	源自拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>) 叶绿体转移肽的编码序列 (Klee <i>et al.</i> , 1987)
cp4 epsps	1652-3019	来源于农杆菌 CP4 菌株,编码 CP4EPSPS 蛋白 (Padgett <i>et al.</i> , 1996)
间插序列	3020-3031	人工合成序列,多聚核苷酸接头
NOS 3'	3032-3287	来自土壤农杆菌的胭脂碱合成酶基因的 3'非翻译区 (Bevan <i>et al.</i> , 1983)
间插序列	3288-3320	人工合成序列,多聚核苷酸接头
P-e35S	3321-3393	花椰菜花叶病毒 (CaMV) 启动子 (Odell <i>et al.</i> 1985), 带有重复增强区 (Kay <i>et al.</i> , 1987)
间插序列	3394-3957	人工合成序列,多聚核苷酸接头
wt CAB leader	3958-4028	小麦叶绿体 IIa/b 结合蛋白的 5'非翻译前导序列 (Lamppa <i>et al.</i> , 1985)
间插序列	4029-4056	人工合成序列,多聚核苷酸接头
ract1 intron	4057-4517	来自于水稻编码肌动蛋白基因的内含子 (McElroy <i>et al.</i> , 1991)
遗传元件	质粒序列(bp)	功能(参考文献)
间插序列	4518-4533	人工合成序列,多聚核苷酸接头

cry3Bb1.pvampir39	4534-6495	源自苏云金芽孢杆菌亚种 <i>kumamotoensis</i> 的编码合成 Cry3Bb1 蛋白的序列 (English <i>et al.</i> , 2000)
间插序列	6496-6510	人工合成序列, 多聚核苷酸接头
tahsp17 3'	6511-6744	小麦 17.3kDa 的热激蛋白的 3' 非翻译区 (McElwain & Spiker, 1989)
间插序列	6745-6840	源自大肠杆菌, 人工合成的多聚核苷酸接头序列 (Depicker <i>et al.</i> , 1982)
RB	6841-6865	来自于农杆菌, 用于 T-DNA 的转化的右边界序列 (Depicker <i>et al.</i> , 1982)
间插序列	6866-7350	源自大肠杆菌, 人工合成的多聚核苷酸接头序列 (Depicker <i>et al.</i> , 1982; Sutcliffe, 1978; Fling <i>et al.</i> , 1985)
aad	7351-8139	Tn7 转座子中的氨基糖苷类修饰酶 3'(9)-O-核苷酸转移酶的细菌启动子和编码序列 (Fling <i>et al.</i> , 1985) (GenBank accession X03043)
间隔序列	8140-8681	源自大肠杆菌的多聚核苷酸接头序列 (Fling <i>et al.</i> , 1985; Sutcliffe, 1978)
ori-322	8682-9310	pBR322 的复制原点 (Sutcliffe, 1978)
间隔序列	9311-9727	pBR322 质粒的一部分 (Sutcliffe, 1978)
ROP	9728-9919	引物蛋白抑制子的编码序列, 用以保证在大肠杆菌中的质粒拷贝数 (Giza & Huang, 1989)
间隔序列	9920-11182	pBR322 质粒的一部分 (Sutcliffe, 1978)
间隔序列	11183-11430	来自大肠杆菌的合成序 (Stalker <i>et al.</i> , 1981)
ori-V	11431-11824	来自于广谱寄主质粒 RK2 的农杆菌复制起点 (Stalker <i>et al.</i> , 1981)
间隔序列	11852-11910	来自于大肠杆菌的合成序列 (Stalker <i>et al.</i> , 1981)
间隔序列	11911-12066	来自于农杆菌的 DNA 序列 (Barker <i>et al.</i> , 1983)

2.4.2 标记基因和报告基因的大小、功能及其供体生物的名称

插入序列中不包含标记基因和报告基因 (表3和技术报告1)。

2.4.3 其它表达调控序列的名称及其来源 (如人工合成或供体生物名称)

插入序列中包含的其它遗传表达调控序列还有 (详见表3)：

拟南芥叶绿体转移肽编码序列 (CTP2)：在 *cp4 epsps* 基因表达盒中, *cp4 epsps* 编码基因和来源拟南芥叶绿体转移肽编码序列 (CTP2) 连在一起, CTP2 的分子量大小为 461 bp, 编码叶绿体转移肽, 引导 CP4 EPSPS 向叶绿体转移 (Klee *et al.*, 1987)。叶绿体是芳香类氨基酸生物合成的场所 (Kishore and Shah, 1988)。转移肽完成使命后通常会从成熟的蛋白质上脱离并分解 (Della-Cioppa *et al.*, 1986)。

水稻肌动蛋白1基因的内含子 (ract1-intron)：在 *cp4 epsps* 基因表达盒和 *cry3Bb1* 基因表达盒中分别包括1个来源于水稻肌动蛋白1基因 (*actin1*) 的内含子, 分子量大小为 228 bp。

小麦叶绿素A/B结合蛋白的前导链 (wt CAB leader)：在cry3Bb1基因表达盒中构建有来源于小麦的叶绿素A/B结合蛋白的5' 非翻译前导链，用于调控翻译和转录。

T-DNA边界序列：质粒载体PV-ZMIR39含有一段转移DNA序列 (T-DNA)，可以把构建在T-DNA区域中基因转化至植物细胞中。T-DNA两个边界被命名为左边界序列和右边界序列，它们一定程度上决定了插入基因是否能被转化到植物基因组中。左边界序列的34个碱基对中的25个碱基对来源于农杆菌根癌菌的(*A. tumefaciens*)的质粒pTi5955 (Barker *et al.*, 1983)。右边界序列的24对碱基对来源于农杆菌根癌菌 (*A. tumefaciens*) 质粒pTiT37 (Depicker *et al.*, 1982)。

T-DNA边界外的遗传元件：T-DNA区域外还构建有一些用于质粒繁殖和筛选所需要的遗传表达调控元件 (见表3)。但是这些遗传表达调控元件以及质粒的骨架序列在转化过程中没有插入到植物基因组中去。

2.5 转基因方法

MON 88017 是通过农杆菌介导转化得到的，玉米受体自交系为 Hi-II，转化用的质粒为 PV-ZMIR39 (图 8)，根癌农杆菌小种为 ABI。

通过农杆菌感染新分离的玉米幼胚，并使用乙酰丁香酮促进感染受体，将功能基因 DNA 导入玉米细胞。Ishida 等人 (1996) 和 Rout 和 Armstrong (1997) 已经描述了利用农杆菌进行胚分离和接种的方法。利用农杆菌接种后，将幼胚与农杆菌共培养 1—3 天，然后将玉米幼胚转移到含有羧苄青霉素和草甘膦的选择培养基上进行筛选，前者能抑制农杆菌，后者用于筛选转化细胞。然后，按照 Armstrong 和 Phillips (1988) 描述的方法，在选择培养基上对转化细胞进行继代，最终得到转基因再生植株。

在实验室、温室和田间对得到的转化体进行抗虫性、草甘膦耐性和农艺性状的筛选。在许多转化体中，MON 88017 被选作最好的转化体。此后对 MON 88017 进行了法规要求的安全评价研究，以便确认其与普通常规玉米实质等同，并确定导入的 CP4 EPSPS 和 Cry3Bb1 蛋白质对人体健康和环境都是安全的。

图9描述了涉及MON 88017研发的一些主要步骤和过程。

2.6 插入序列表达的资料

2.6.1 插入序列表达的器官和组织，如根、茎、叶、花、果、种子等

采用酶联免疫吸附分析法 (ELISA)，分析了MON 88017的各种组织里CP4 EPSPS 和Cry3Bb1蛋白质的含量 (附件资料3和技术报告2)。ELISA分析采用的试验材料和方法、以及关于组织类型的描述在技术报告2里作了详细介绍。试验材料是从于2002年在美国三个田间试验点的MON 88017试验中采集的，这些试验点位于美国主要玉米种植区内。各个试验点全都采用了3次重复的完全随机区组设计。采集的植株组织或部位包括花粉、花丝、秸秆、根系、籽粒等，表4汇总了这些材料中CP4 EPSPS和Cry3Bb1蛋白的含量。在整个的生长季里，从V2至R1营养生长阶段，收集了下列的组织：跨阶段生长叶片 (OSL1-4)、跨阶段生长植株 (OSWP 1-4) 和跨阶段生长根系 (OSR 1-4)。表5和表6分别汇总了跨阶段生长的不同组织中CP4 EPSPS和Cry3Bb1蛋白的含量。表7列出了相应的检测和定量的阈值。

全部试验点各种组织里CP4 EPSPS蛋白质的平均含量，幼叶为220 µg/g dwt、花粉为390µg/g dwt、秸秆为57µg/g dwt、根系为70µg/g dwt、籽粒为5.8 µg/g dwt。干秸秆和花丝的CP4 EPSPS蛋白质含量未作评估。在跨生长阶段取样的组织中，全部的试验点的

CP4 EPSPS蛋白质的平均含量叶片为220-150 $\mu\text{g/g dwt}$ ，而根系为150-70 $\mu\text{g/g dwt}$ 。总而言之，CP4 EPSPS蛋白质的含量在生长季里呈下降趋势。

全部试验点各种组织里Cry3Bb1蛋白质的平均含量，幼叶为570 $\mu\text{g/g dwt}$ 、花粉为25 $\mu\text{g/g dwt}$ 、花丝为380 $\mu\text{g/g dwt}$ 、秸秆为95 $\mu\text{g/g dwt}$ 、根系为130 $\mu\text{g/g dwt}$ 、籽粒为15 $\mu\text{g/g dwt}$ 、干秸秆为88 $\mu\text{g/g dwt}$ 。在跨生长阶段取样的组织中，全部的试验点的Cry3Bb1蛋白质的平均含量叶片为570-260 $\mu\text{g/g dwt}$ 、整株为500-220 $\mu\text{g/g dwt}$ 、根系为370-100 $\mu\text{g/g dwt}$ 。总而言之，Cry3Bb1蛋白质的含量在生长季里也同样呈下降趋势。

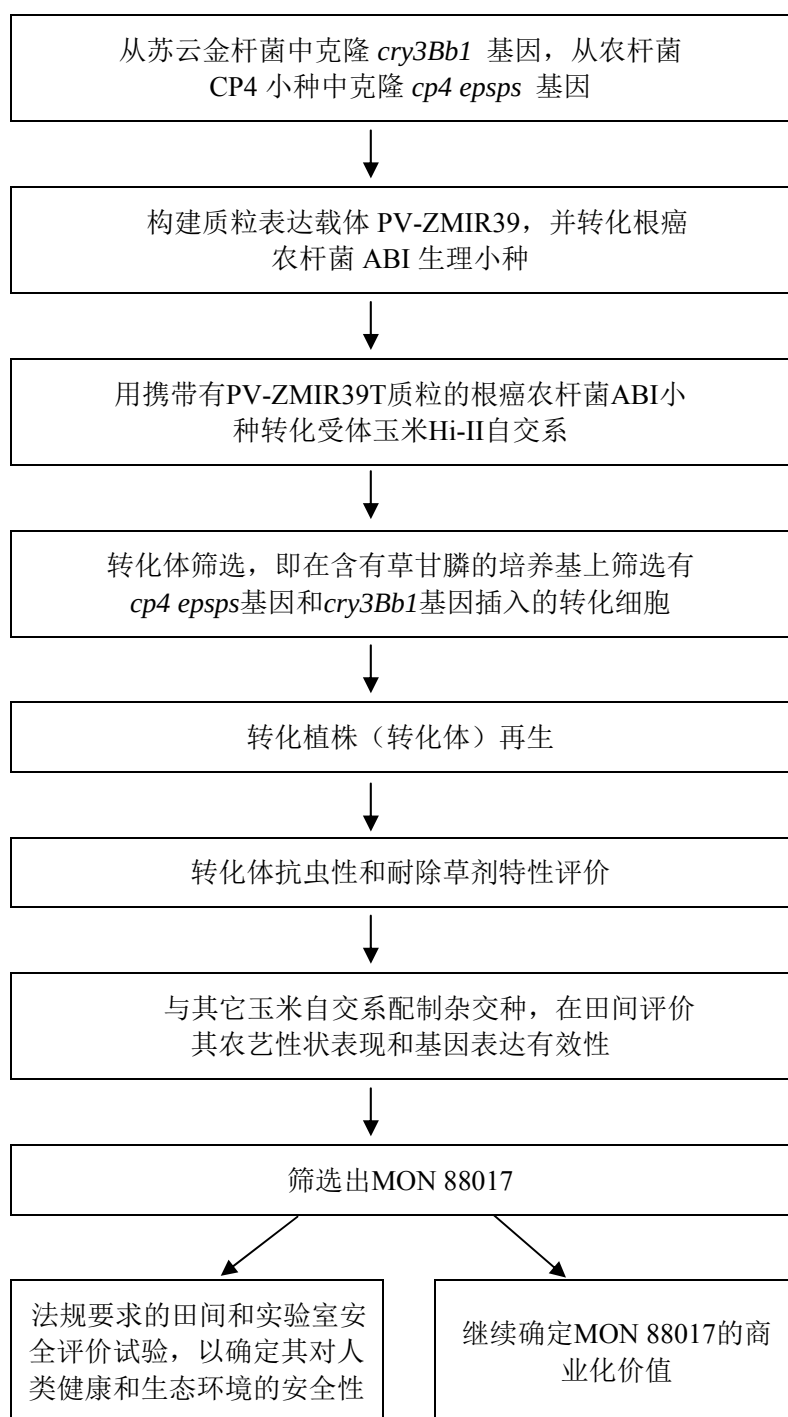


图9 MON 88017开发步骤示意图

表4 MON 88017组织里CP4 EPSPS和Cry3Bb1蛋白含量

组织类型 ¹	生长阶段	Cry3Bb1 平均值 (SD) ² [值域] ³		CP4 EPSPS 平均值 (SD) ² [值域] ³	
		(µg/g dwt)	(µg/g fwt)	(µg/g dwt)	(µg/g fwt)
幼叶	V2-V3 (14-22 DAP)	570 (170) [230-820]	76 (23) [28-110]	220 (30) [160-260]	30 (5.3) [19-36]
花粉	R1 (62-69 DAP)	25 (4.2) [17-32]	14 (2.5) [11-20]	390 (85) [210-470]	220 (43) [130-280]
花丝	R1 (62-69 DAP)	380 (65) [300-500]	37 (5.6) [30-45]	NM	NM
秸秆	R4-R6 (97-124 DAP)	95 (19) [75-130]	27 (5.5) [22-39]	57 (7.6) [42-69]	16 (2.1) [12-19]
根系	R4-R6 (97-124 DAP)	130 (29) [98-170]	21 (3.1) [17-27]	70 (20) [47-110]	11 (2.8) [6.6-15]
籽粒	R6 (133-146 DAP)	15 (3.6) [10-22]	13(3.1) [8.7-19]	5.8 (0.97) [4.1-7.1]	5.1 (0.89) [3.7-6.3]
干秸秆	R6 (采收后) (133-147 DAP)	88 (13) [71-110]	30 (4.4) [25-39]	NM	NM

¹ 技术报告 2 介绍了组织的类型。检测和定量的阈值列于表 7。

² 全部的试验点和重复都计算了平均值和标准差 (n=9)。

³ 全部的试验点测定了各个组织类型的最小值和最大值。

DAP = 种植后日数。

n = 样本数目。

SD = 标准差。全部的试验点计算了平均误差和标准误差 (n=9)。

NM = 未测量。

表 5 MON 88017 跨生长阶段生长的组织中 CP4 EPSPS 蛋白水平^{1,2}

组织 (n=9)		V2-V3 (14-22 DAP)	V5 (26-34 DAP)	V8 (40-45 DAP)	V11-V17 (55-62 DAP)	R4-R6 (97-124 DAP)
µg/g 干重						
叶片	Mean (SD)	220 (30)	190 (26)	170 (37)	150 (19)	NA
	Range	160-260	130-250	140-240	120-170	
根系	Mean (SD)	150 (34)	110 (29)	100 (30)	97 (18)	70 (20)
	Range	110-220	74-160	62-160	72-130	47-110
µg/g 鲜重						
叶片	Mean (SD)	30 (5.3)	36 (5.5)	38 (8.6)	35 (4.7)	NA
	Range	19-36	29-46	28-54	30-42	
根系	Mean (SD)	16 (3.3)	15 (3.3)	13 (3.0)	14 (2.3)	11 (2.8)
	Range	10-21	12-20	8.9-18	11-18	6.6-15

¹ DAP = 播种后天数；dwt = 组织干重；fwt = 组织鲜重； n = 样本数；NA = 不适用；SD = 标准差

² 附件 2 描述了各组织类型。检测和定量的阈值列于表 7。

表6 MON 88017跨生长阶段生长的组织中Cry3Bb1蛋白水平^{1,2}

组织 (n=9)		V2-V3 (14-22 DAP)	V5 (26-34 DAP)	V8 (40-45 DAP)	V11-V17 (55-62 DAP)	R4-R6 (97-124 DAP)	R6 (133-147 DAP)
µg/g 干重							
叶子	Mean (SD)	570 (170)	430 (58)	310 (45)	260 (44)	NA	NA
	Range	230-820	310-510	240-380	190-340		
整株	Mean (SD)	500 (64)	380 (170)	310 (48)	220 (23)	NA	NA
	Range	410-590	150-600	230-380	190-250		
根系	Mean (SD)	370 (80)	250 (71)	210 (78)	180 (37)	130 (29)	100 (19)
	Range	240-510	190-420	150-410	110-230	98-170	77-140
µg/g 鲜重							
叶子	Mean (SD)	76 (23)	75 (10)	69 (12)	62 (9.2)	NA	NA
	Range	28 - 110	58 - 92	55 - 90	49 - 77		
整株	Mean (SD)	50 (6.4)	37 (8.0)	34 (5.2)	32 (4.4)	NA	NA
	Range	41 - 59	26 - 48	25 - 42	26 - 38		
根系	Mean (SD)	39 (8.1)	34 (8.4)	29 (8.2)	26 (5.4)	21 (3.1)	18 (2.6)
	Range	24 - 51	25 - 55	21 - 50	16 - 34	17 - 27	14 - 22

¹ DAP = 播种后天数; dwt = 组织干重; fwt = 组织鲜重; n = 样本数; NA = 不适用; SD = 标准差

² 技术报告 2 描述了各组织类型。检测和定量的阈值列于表 7。

表7 CP4 EPSPS 和 Cry3Bb1 蛋白质酶联免疫的检测阈值

组织 ¹	Cry3Bb1		CP4 EPSPS	
	LOD (µg/g fwt)	LOQ (µg/g fwt)	LOD (µg/g fwt)	LOQ (µg/g fwt)
叶片	0.0073	0.044	0.090	0.17
根系	0.032	0.040	0.050	0.10
花粉	0.020	0.039	0.12	0.18
花丝	0.012	0.041	NM	NM
秸秆	0.010	0.047	0.11	0.21
籽粒	0.0097	0.051	0.18	0.28

¹ 附件2描述了各组织类型。

LOD = 检测阈值

LOQ = 定量阈值

NM = 未检测

2.6.2 插入序列的表达量及其分析方法

插入序列在各组织器官中的表达量结果在见以上 2.6.1 部分。

CP4 EPSPS 蛋白的 ELISA 检测方法（技术报告 2）

利用自动工作站进行了 CP4 EPSPS 蛋白质的 ELISA 分析。在含有 0.15M NaCl 的涂层缓冲液里，把小白鼠抗 CP4 EPSPS 抗体稀释至 1.0 g/ml 的最终浓度，并固定的 96 孔培养板中，然后在 4°C 冰箱里培养≥8 小时。培养板用 1x PBS 里清洗，然后加入 CP4 EPSPS 蛋白质标准或样本提取物（100µl/孔），随后在 37°C 下进行培养。利用含有 0.1% (w/v) BSA 的 1x PBST 溶液稀释秸秆样本提取物，利用含有 0.1M tris、0.1M

Na₂B₄O₇·10H₂O、0.01 M MgCl₂、0.05% (v/v) Tween-20 和 0.2% (w/v) L-ascorbic acid (TBA) 的溶液 (pH7.8) 稀释籽粒样本。培养板像前面一样进行清洗, 然后按 100μl/孔加入抗 CP4 EPSPS 过氧化酶, 并在 37°C 下进行培养。按 100μl/孔加入 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine 培育培养基 (TMB, Kirkegaard & Perry, Gaithersburg, MD)。按 100μl/孔加入 6M H₃PO₄, 终止酶反应。利用浓度值域在 0.456-14.6 ng/ml 之间的一个 CP4 EPSPS 蛋白质标准曲线进行内推, 完成 CP4 EPSPS 蛋白质的定量。

利用质量控制样本, 确认分析结果。利用含有 CP4 EPSPS 蛋白质的组织, 制备正质量控制 (QC) 样本。利用不含有 *cp4 epsps* 编码序列、于是不能生产 CP4 EPSPS 蛋白质的常规组织, 制备负质量控制样本。在每个培养皿的培养孔上, 按三次重复, 分析正、负 QC 样本的提取液。正 QC 样本全都在方法证实期内确定的值域内, 全部的负 QC 样本, 不出所料, 全都小于分析的 LOQ 值。

Cry3Bb1 蛋白的 ELISA 检测方法 (技术报告 2)

利用自动工作站进行 Cry3Bb1 蛋白质的 ELISA 分析。将山羊的抗 Cry3Bb1 抗体在涂层缓冲液 (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.6) 里稀释, 并在 5.0g/ml 的浓度下固定在 96 孔培养板上, 然后在 4°C 的冰箱里培养 ≥12 小时。用含有 0.05% (v/v) Tween-20 (1x PBST) 的 1x PBS 液清洗培养板, 然后按 150μl/孔加入含有 0.25% (w/v) 酪蛋白缓冲液进行封阻, 再在 37°C 下进行培养。培养板像前面介绍的一样进行清洗, 然后按 100μl/孔把 Cry3Bb1 标准或样本蛋白质加入 1x PBST/0.1% BSA 里, 并在 37°C 下进行培养。在按 100μl/孔加入生物素化的山羊抗 Cry3Bb1 抗体和 NeutrAvidin-HRP, 分别进行培养之后, 即完成了这一过程。按 100μl/孔加入 HRP 培养基 TMB, 培育平皿培养物。按 100μl/孔加入 6M H₃PO₄, 终止酶反应。利用浓度值域在 0.35-11.2 ng/ml 之间的 Cry3Bb1 蛋白质标准曲线, 进行内推, 完成 Cry3Bb1 蛋白质水平的定量。

利用质量控制样本证实分析的结果。利用含有 Cry3Bb1 蛋白质的组织, 制备正质量控制 (QC) 样本。利用不含有 *cry3Bb1* 编码序列、于是不能生产 *cry3Bb1* 蛋白质的常规组织, 制备负质量控制样本。在每个培养皿的培养槽上, 按三次重复, 分析正、负 QC 样本的提取液。正 QC 样本全都在方法证实期内确定的值域内, 全部的负 QC 样本, 不出所料, 全都小于分析的 LOQ 值。

2.6.3 插入序列表达的稳定性

为了确定 MON 88017 中插入序列的遗传稳定性, 利用 MON 88017 多个育种世代的试验材料进行 Southern 杂交分析 (技术报告 1) 和 Western 杂交分析 (技术报告 3), 以确定插入序列在不同世代的拷贝数和 Cry3Bb1 蛋白在不同世代间的表达。图 10 显示了 MON 88017 的育种图谱以及用于分析的世代, 分析的特定世代在图中用黑体标出。

Southern 杂交分析结果示于图 11 (技术报告 1)。F₂ 代 (H198BC0F₁ x LH159) 在此分析中被用作对照世代。MON 88017 及其非转基因对照的基因组 DNA 采用 Xba I 酶切。质粒 PV-ZMIR39 用 EcoR I 进行酶切, 并于非转基因对照的酶切 DNA 混合, 电泳结果表现出预期大小为 6.3 kb、3.5 kb 和 2.6 kb 的三条带 (泳道 3 和 4)。与 3.5 kb 和 2.6 kb 片段相比, 6.3 kb 的带的信号较弱, 主要是因为靶标插入序列在该片段中的比例较少。以前用来进行拷贝数分析的 MON 88017 酶切 DNA (图 7 的泳道 3) 这次被设置在第 5 泳道, 同样表现出分别为 7.4 kb 和 5.5 kb 两条带, 与预期结果一致。此外, MON 88017 的 6 个世代分析被安排在泳道 6—11, 同样产生 7.4 kb 和 5.5 kb 两条带。这一分析结果表明 MON 88017 的插入序列在不同世代间可以稳定遗传。

Western杂交分析结果（图12和技术报告3）表明，在MON 88017的不同育种世代材料中均可以检测到Cry3Bb1蛋白，其Cry3Bb1蛋白的分子量大小与大肠杆菌表达的Cry3Bb1蛋白的分子量是对应的。因此可以证明MON 88017中插入cry3Bb1基因在不同的遗传世代间可以稳定遗传和表达。

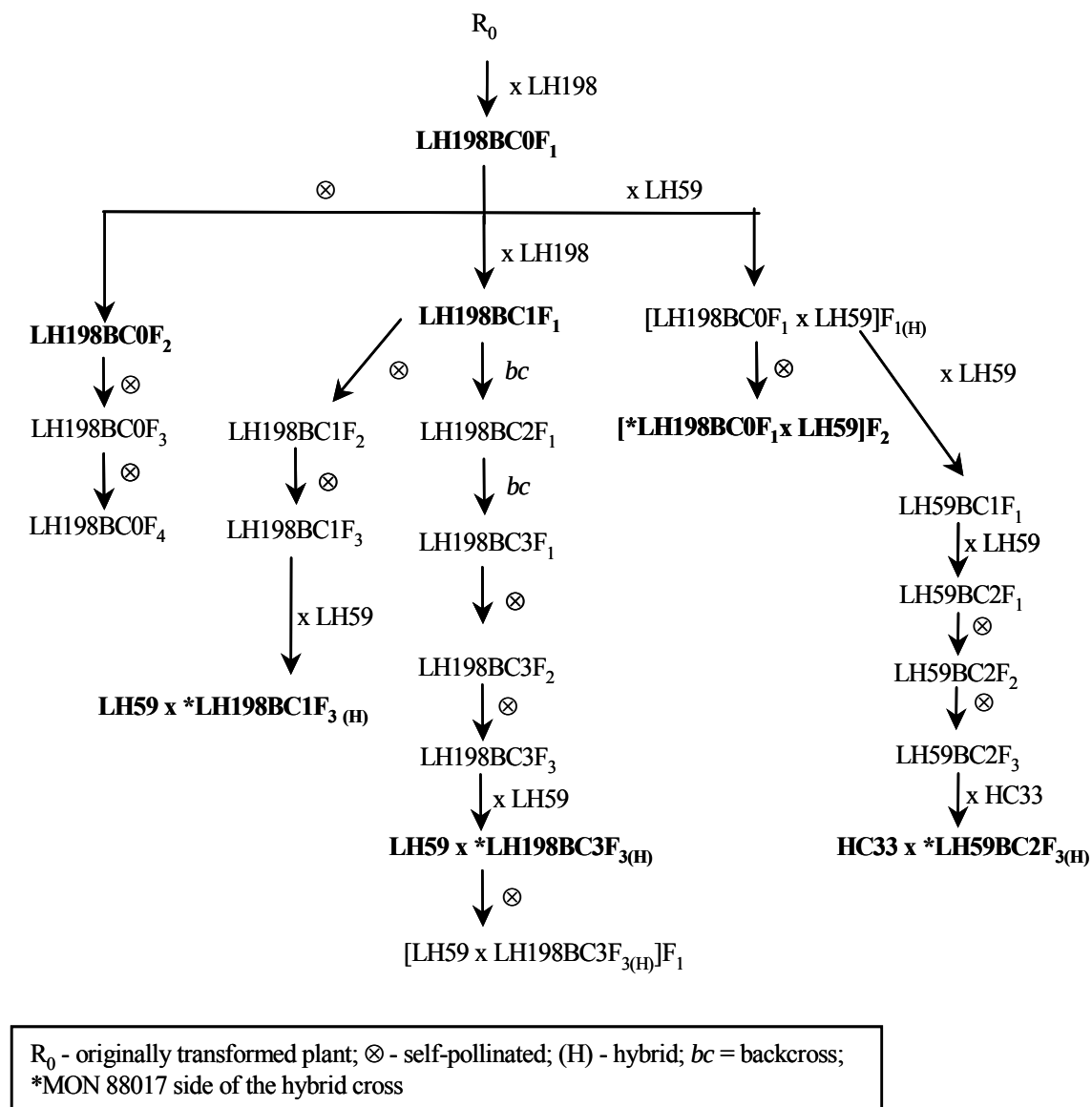


图10 MON 88017的育种图谱

分析目的

分子生物学分析:

插入稳定性 (Southern blot):

表现型试验 (2001):

2002 T/C/R 试验:

表达/营养成分:

表现型试验 (2002):

休眠/萌发:

MON 88017 的世代

[LH198BC0F₁ x LH59]F₂

用黑体标出的世代

LH59 x LH198BC1F₃ (H)

LH59 x LH198BC3F₃ (H) seed; [LH59 x LH198BC3F₃ (H)]F₁ grain

LH59 x LH198BC3F₃ (H) seed; [LH59 x LH198BC3F₃ (H)]F₁ grain

LH59 x LH198BC3F₃ (H)

LH59 x LH198BC3F₃ (H)

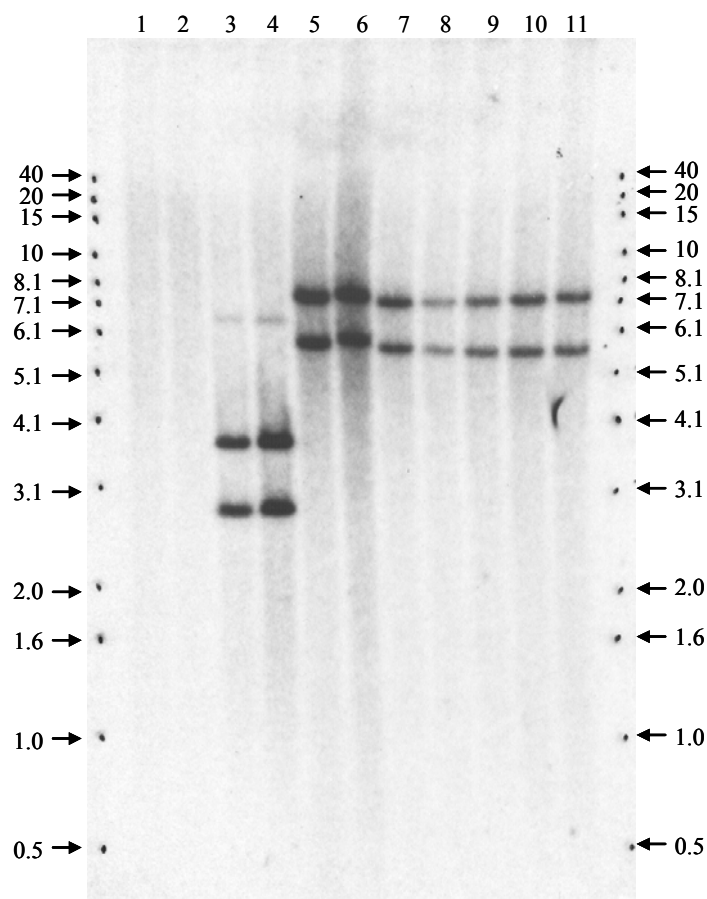


图11 MON 88017插入DNA的稳定性分析

用于杂交的探针为探针1、2、3和4（图8），用³²P标记，每泳道加样量为~10 μg经酶切的籽粒DNA，各泳道加样如下：

- 泳道
- 1: 对照LH198 (*Xba* I)
 - 2: 对照LH59 x LH198 (*Xba* I)
 - 3: 对照LH59 x LH198 (*Xba* I) 混入PV-ZMIR39 (*EcoR* I) [0.5 copy]
 - 4: 对照LH59 x LH198 (*Xba* I) 混入PV-ZMIR39 (*EcoR* I) [1.0 copy]
 - 5: MON 88017 [LH198BC0F₁ x LH59]F₂ (*Xba* I)
 - 6: MON 88017 LH198BC0F₁ (*Xba* I)
 - 7: MON 88017 LH198BC0F₂ (*Xba* I)
 - 8: MON 88017 LH198BC1F₁ (*Xba* I)
 - 9: MON 88017 LH198BC1F₃ x LH59_(H) (*Xba* I)
 - 10: MON 88017 LH59 x LH198BC3F_{3(H)} (*Xba* I)
 - 11: MON 88017 HC33 x LH59BC2F_{3(H)} (*Xba* I)

→ 表明分子量大小

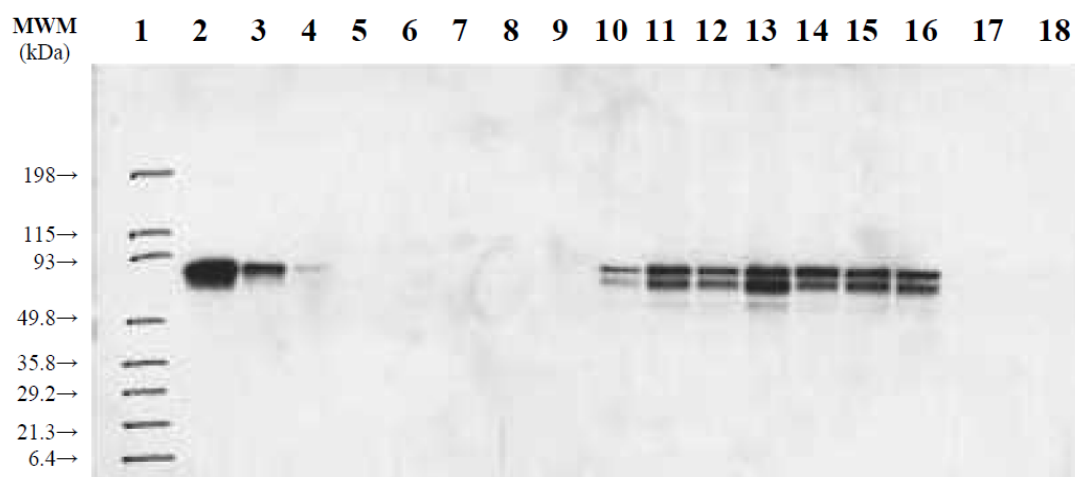


图 12. MON 87017 中 Cry3Bb1 蛋白表达的多世代稳定性

泳道	样品描述	上样量
1	分子量标准	8 μ l
2	Cry3Bb1 蛋白参照标准	4 ng
3	Cry3Bb1 蛋白参照标准	2 ng
4	Cry3Bb1 蛋白参照标准	1 ng
5	空白泳道	-
6	LH59×LH198（对照物）	30 μ l
7	LH198（对照物）	30 μ l
8	空白泳道	-
9	空白泳道	-
10	MON 88017 / LH198BC0F ₁	30 μ l
11	MON 88017 / LH198BC0F ₂	30 μ l
12	MON 88017 / LH198BC1F ₁	30 μ l
13	MON 88017 / (LH198BC0F ₁ ×LH59) F ₂	30 μ l
14	MON 88017 / LH198BC1F ₃ ×LH59	30 μ l
15	MON 88017 / LH59×LH198BC3F ₃	30 μ l
16	MON 88017 / HC33×LH59BC2F ₃	30 μ l
17	空白泳道	-
18	空白泳道	-

2.7 根据上述评价，参照本办法第十二条有关标准划分基因操作的安全类型

综上所述，培育MON 88017所采用的基因操作没有改变受体生物的安全性。根据《农业转基因生物安全评价管理办法》第二章第十二条的相关标准，用于MON 88017转化的基因操作方法属于类型2。

3 转基因植物的安全性评估

3.1 转基因植物的遗传稳定性

在前文的 2.6.3 部分，已经对插入序列的遗传稳定性进行了 Southern 杂交分析，结果表明插入的外源基因为单个位点的单一拷贝插入，经过多个连续世代依然可以表现稳定（技术报告 1）。针对插入的外源基因，我们还对 10 个世代（7 个回交世代和 3 个自交世代，表 8 和图 10）的基因分离数据进行了卡方（Chi square）测验，以确定 MON 88017 的抗根虫和抗除草剂特性是否符合孟德尔遗传学的分离比例，最终评价 MON 88017 中 *cry3Bb1* 和 *cp4 epsps* 基因的遗传稳定性。抗根虫特性是以 Cry3Bb1 蛋白的 ELISA 分析来确定的。分析结果列于表 8。

表8 MON 88017植株后代分离比例的预期值和观测值

世代	观察值（植株数）		预期值（植株数）		χ^2
	阳性	阴性	阳性	阴性	
LH198BC ₀ F ₁	21	14	17.5	17.5	1.03 [†]
LH198BC ₀ F ₂	53	12	48.75	16.25	1.15 [†]
LH198BC ₁ F ₁	21	9	15	15	4.03 [#]
LH198BC ₂ F ₁	10	15	12.5	12.5	0.64 [†]
LH198BC ₃ F ₁	8	5	6.5	6.5	0.31 [†]
LH198BC ₃ F ₂	21	3	18	6	1.39 [†]
LH198BC ₀ F ₁ ×LH59	29	0	14.5	14.5	27.03 [*]
LH59 BC ₁ F ₁	7	5	6	6	0.08 [†]
LH59 BC ₂ F ₁	8	5	6.5	6.5	0.31 [†]
LH59 BC ₂ F ₂	35	13	36	12	0.03 [†]

[†] 在 $p \leq 0.05$ 时不显著 (Chi square = 3.84, 1 df)

[#] 在 $p \leq 0.05$ 时，显著 (Chi square = 3.84, 1 df)；但在 $p \leq 0.01$ 时不显著 (Chi square = 6.63)

^{*} 在 $p \leq 0.05$ 时，显著 (Chi square = 3.84, 1 df)；在 $p \leq 0.01$ 时也显著 (Chi square = 6.63)

χ^2 检验公式为：

$$\chi^2 = \sum [(|o-e|-0.5)^2 / e]$$

式中 o = 观察到的基因型频率， e = 预计的基因型频率，0.5
是单自由度分析的 Yates 校正因子 (Little and Hills, 1978)。

根据孟德尔遗传学分析结果（表8），除了 LH198BC₁F₁ 和 LH198BC₀F₁×LH59 两个世代外，所有其它世代的卡方值均小于 3.84，表明实际观察的分离比例与理论预期的分离比例是一致的。LH198BC₁F₁ 世代的结果在 $P \leq 0.05$ 水平下观察值与预期值间差异显著，但在 $P \leq 0.01$ 水平下差异不显著。而 LH198BC₀F₁×LH59 世代的观察值与预期值的显著差异主要是由于上一世代（LH198BC₀F₁）应用农达除草剂进行了配子选择所引起的，从而导致收获种子没有表型不分离。

这一基于孟德尔遗传学的分析结果与*cry3Bb1*和*cp4 epsps*基因的单个位点的单一拷贝Southern杂交分析结果是一致的。这些结果都可以证明MON 88017的插入序列的稳定性。

此外, 2.6.3部分关于多个遗传世代材料中Cry3Bb1蛋白的Western印记分析也表明其遗传稳定性(图12)。

3.2 转基因植物与受体或亲本植物在环境安全性方面的差异

3.2.1 生殖方式和生殖率

2001—2002年在美国连续二年进行了18点次的田间试验, 评估了MON 88017下列14个农艺性状的表现: 幼苗活力、早期直立株数、50%植株散粉天数、50%植株抽丝天数、穗位高、株高、保绿性、最终直立株数、果穗下垂、茎秆倒伏、根倒伏、籽粒容重、籽粒含水量和产量(结果见表9、技术报告4和技术报告5)。

表9 2001—2002年MON 88017在美国18点次田间试验的表现性调查结果

调查性状 ¹	2001 年		2002 年	
	MON 88017	对照	MON 88017	对照
幼苗活力(1-9级)	3.7*	4.1	7.6*†	6.5
早期直立株数	69.1	66.8	64.1	61.9
50%植株散粉天数	66.8	66.6	58.8*†	59.2
50%植株抽丝天数	66.9	66.9	59.5	59.8
穗位高(英寸)	45.5	45.3	3.8	3.9
株高(英寸)	88.8	87.9	40.5	41.4
保绿性	5.5	5.7	82.2	82.8
最终直立株数	61.6	63.3	0.5	0.4
果穗下垂(株/小区)	0.5	0.7	2.5	3.4
茎秆倒伏(株/小区)	5.4	4.1	3.9	4.1
根倒伏(株/小区)	0.7	0.6	53.8	53.0
籽粒容重(磅/蒲尔式)	54.5	54	19.0	19.4
籽粒含水量(%)	22.1	22	54.9	54.6
产量(蒲尔式/英亩)	153.3	148	150.2	143.4

¹ 不是在所有试验点调查了所有数据。

* 在 $p \leq 0.05$ 水平下 MON 88017 与对照有显著性差异

† 在 $p \leq 0.05$ 水平下 MON 88017 与对照有显著性互作

在14个调查性状中, 有许多性状与生殖方式和生殖率有关, 如散粉期、抽丝期、穗位高、株高、果穗下垂、籽粒容重、籽粒含水量和产量等。在这些与生殖方式和生殖率相关的性状中, 只有50%植株散粉天数在2002年的试验中MON 88017和对照有统计学上差异, 但这并不能说明二者之间有明显差异。首先, 这种统计学上的差异并不是在二年的试验中都可以观察到; 其次, 即使是2002年的试验中, MON 88017和对照间的平均值差异很小(58.8天对59.2天), 不具有生物学意义; 第三, 对2002年各点试验数据分别统计则没有观察到MON 88017和对照间达到统计学上的显著差异。至于幼苗活力在二年试验中都观察到统计学上的显著差异, 并不能说明MON 88017和对照的生殖方式和生殖率有变化。一来, MON 88017与对照的调查数值相差很小并且还包含有人为划级上的差异; 二来, 这种幼苗活力的观察差异并没有带来MON 88017和对照间散粉期、抽丝期、

直立株数和产量等与生殖方式和生殖率密切相关的性状上的差异。这些结果和分析表明，MON 88017在生殖方式和生殖率方面与非转基因对照没有差异。

3.2.2 传播方式和传播能力

玉米所携带基因的传播方式和传播能力与宿主花粉的形态特征和生活力有着密切的关系。为此，孟山都针对MON 88017的花粉特性进行了研究，以确定 $cp4\ epsps$ 和 $cry3Bb1$ 的存在、基因表达产物（CP4 EPSPS和Cry3Bb1蛋白质）的存在、以及经遗传改良过程后MON 88017花粉特性是否会发生改变。试验材料为MON 88017以及相应遗传背景的非转基因对照植株上收集的玉米花粉。同时试验中还采集了其它商用常规玉米杂交种植株上的花粉作为参照对比。试验的花粉样本是从2003年在美国伊利诺州的Jersey县进行的田间试验里植株上收集的（USDA批准文件03-112-14n）。

结果表明，MON 88017 和非转基因对照在花粉的平均直径上不存在统计学显著性差异（表 10、图 13 和图 14）。MON 88017 与非转基因对照相比，虽然其花粉生活力间的差异达到在统计学上显著水平（99.4%对 98.0%），但二者的差异较小并且二者的花粉生活力具体数值仍然在普通常规玉米花粉生活力调查数值的范围内（86-100%）（表 10）。玉米能产生大量的花粉，花粉的活力范围可从雄性不育玉米的 0%到普通玉米的 100%（正如本研究中观察到的那样），所以我们认为这一差异（1.4%）较小，不可能具有生物学意义。这些结果证明，同对照相比，导入的 $cp4\ epsps$ 和 $cry3Bb1$ 基因、表达的产物（CP4 EPSPS 和 Cry3Bb1 蛋白）、以及转基因遗传操作过程都没有改变 MON 88017 花粉的特性。

表10 MON 88017和非转基因对照花粉特性的比较

材料	花粉平均直径 (μm) ¹	有活力的花粉(%) ²
MON 88017	78.8	99.4*
非转基因对照	77.0	98.0
常规玉米杂交种 ³	60-95	86-100

*表明在 $p \leq 0.05$ 时 MON 88017 与对照具有统计学的显著差异

¹ 样本数目= 3

² 样本数目= 15

³ 在四个参照花粉样本里观察到的值域。

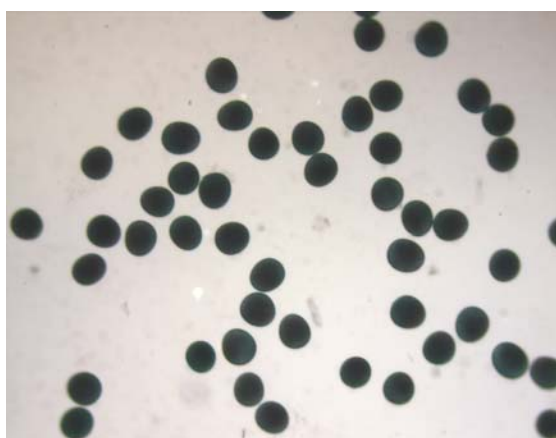


图 13 MON 88017 玉米花粉粒形态（100X）

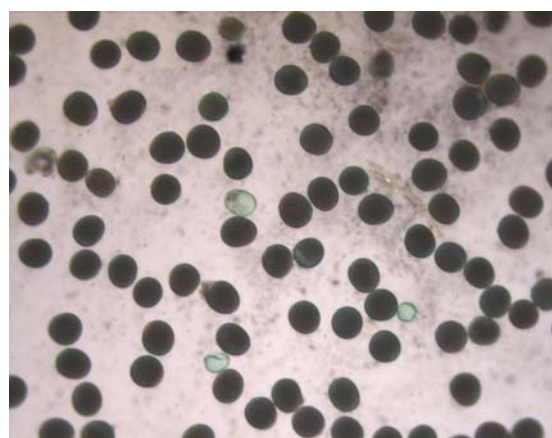


图 14 非转基因对照玉米花粉粒形态（100X）

除玉米花粉外，种子的传播和运输也是玉米扩散的主要方式之一。MON 88017 中导入的性状不直接影响繁殖的形态学，因此对其本身种子传播方式和能力也不会造成改变。就玉米与其近缘种属植物的关系而言，玉米可以通过远缘杂交将其所携带的基因，包括转基因，传播到其近缘种属植物。

与野生玉蜀黍物种的杂交：

通过有性杂交而产生基因漂移流，必须具备一定的条件，即：（1）两个亲本必须进行有性杂交；（2）两性配子可以结合；（3）必须存在合适的花粉携带者和在两个亲本之间有能力转移花粉；（4）产生的后代必须有生育力和生态上适合它们所处的环境。

玉米和墨西哥玉蜀黍（玉米的墨西哥亚种 *Zea mays ssp. mexicana* Schrad）是遗传亲合的、风传授粉，在墨西哥和危地马拉地区，当它们彼此接近时，可以自由杂交。玉米极易和墨西哥玉蜀黍杂交。但是除偶然在植物园有墨西哥玉蜀黍标本外，在美国和中国没有墨西哥玉蜀黍的自然分布。仅在几周的时间里接受人工的昼夜长短调节，这些标本可以与玉米同时开花（由于光周期的作用）（Wilkes, 1967）。

另一个近亲属磨擦禾属的习性相似于墨西哥玉蜀黍，16 种墨西哥玉蜀黍的 12 种，天然生长在墨西哥和危地马拉。佛罗里达鸭茅状磨擦禾（*Tripsacum floridanum*）天然生长在佛罗里达南头。尚不知在野外是否会出现玉米与磨擦禾属的杂交，但就目前所知玉米与磨擦禾属的杂交极其困难，而且其杂交后代表现各种水平的不育性（Galinat, 1988; Manglesdorf, 1974; Russell 和 Hallauer, 1980）。

栽培玉米的种间杂交

在栽培的玉米种内，不同亚种间和品种间可以发生自然杂交而进行基因交换。风传花粉可以在相同地块内的植株间和邻近地块的植株间流动。基因的自由流动相似于栽培玉米中出现的流动。

3.2.3 休眠期

种子的休眠（如硬粒种子）是植物的一种存活机制，这是一种重要的特性，而这一特性又经常同植物杂草化有关（Anderson, 1996）。休眠机制，包括硬粒种子的休眠机制，随着物种的不同而不同，可能涉及各种较为复杂的过程。

孟山都公司针对 MON 88017（LH59 x MON 88017[+]/LH198BC3F₃）和非转基因对照（LH59 x MON 88017[-]/LH198BC3F₃）的种子休眠和萌发特性进行了研究。此外，研究还包括了 3 个常规的商业化玉米杂交种作为参照物。试验种子于 2002 年在波多黎各（Puerto Rico）和夏威夷（Hawaii）的试验地收集的。萌发试验在控温生长箱内进行，4 次重复。萌发的温度处理如下：

- 大约 5、10、20 或 30°C 恒定温度处理
- 大约 5/20、10/20 或 20/30°C 变温处理

官方种子分析家协会（Association of Official Seed Analysts, AOSA）推荐的最适合玉米种子萌发的温度范围为 20-30°C。由于大多数品种的种子可以在适宜温度下萌发，因此试验采用了 <20°C 的温度处理来评价种子休眠特性。试验评价了下述 5 个萌发性状：正常萌发种子百分数、有活力硬实种子百分数、非正常萌发种子百分数、有活力的吸涨种子百分数和死亡种子百分数。试验数据统计采用 SAS 软件，差异显著水平设为 $p \leq 0.05$ 。

在 MON 88017 和对照间种子萌发特性的 70 个数据对比中，有 61 个数据对比在 $p \leq 0.05$ 下没有显著差异。试验中没有观察到硬实种子；MON 88017 与对照在有活力硬实种子百分数方面也没有显著性差异。具有显著性差异的数据对比为：1 个正常种子萌发率对比、1 个死亡种子率对比、2 个非正常种子萌发率对比和 5 个有活力吸涨种子率对比。这 9 个存在显著差异的数据对比全部出现在 $\leq 10^{\circ}\text{C}$ 的处理中，这些温度处理均低于理想的玉米种子萌发温度。通常在非正常温度下表现出的结果不能被认为是遗传差异带来的结果。因此，这些不连贯、不连续出现的显著性差异很可能是由于随机误差引起的，尽管这种差异达到统计学上的显著差异。这些结果有助于奠定风险评估的基础（包括实质等同原则和熟悉原则）。同时，这些结果，特别是没有观察到 MON 88017 有硬实种子，表明转基因的遗传操作过程、转基因编码序列本身或者是转基因表达的蛋白没有改变种子休眠特性。

3.2.4 适应性

MON 88017 和对照在植物生长、产量和发育上差异可参见 3.2.7 部分。从表现型和农艺性状的评估结果看，MON 88017 与其相应的非转基因对照和常规玉米杂交种相比不具有增加或减少适应性的优势或趋势。当然，在农业生产田及生产过程中 MON 88017 因为具有 cp4 epsps 基因可以耐受草甘膦类除草剂的喷施。

3.2.5 生存竞争能力

如前所述，普通商用玉米品种一般不认为是杂草，所以不能侵袭现有的自然生态系统。玉米不具有种子在土壤里的长期持久性、扩散、侵袭和在新的或多样性的环境下成为优势物种的能力，或者同本地植被竞争的能力等任何优势特性。

玉米植株只借助种子繁殖，玉米种子没有典型杂草的内在休眠特性，因此极冷时不能存活，很难越冬。现代玉米不被作为一种杂草存活，因为在玉米属于农作物，对其进行选择和驯化过程与杂草植物的进化过程相反，演变为玉米果穗被苞叶所包裹。由于玉米穗的结构之故，单个种子的扩散不会自然地出现。然而，即使单个玉米粒在田间和从田间到仓库的路上撒落，也不能在栏杆、水沟和路边找到玉米自生苗。玉米没有人类的帮助不能跨世代存活，也没有作为杂草存活的能力（Galinat, 1988）。而且，即使玉米可以越冬进入大豆的作物轮作，但机械和化学的措施可以防治这些自生苗。

根据田间试验的结果，玉米 MON 88017 在影响存活（对病、虫的敏感性、萌芽和定居）、增殖（产生的种子）和扩散（通过种子和花粉）等的生物学特性方面与非转基因对照没有差别（见本章 3.2 相关部分）。

3.2.6 转基因植物的遗传物质向其它植物、动物和微生物发生转移的可能性

一旦整合进植物基因组，T-DNA 边界序列就会丢失。由于缺少边界序列的帮助，整合的 DNA 转移到其它植物里的可能性几乎没有，除非通过有性杂交（Huttner *et al.*, 1992; Bakkeren *et al.*, 1989）。因此，MON 88017 中目的基因通过有性杂交转移的范围只限于有性亲和种属（见 1.4.3 部分）。如同在 1.4.4 部分描述的那样，目前世界上还没有直接证据表明已经发生过遗传基因在生物间的水平转移（horizontal transfer）。

3.2.7 转变成杂草的可能性

在美国的主要杂草参考资料里，玉米并不作为杂草列出（Crockett, 1977; Holm *et al.*, 1979; Muenscher, 1980），也不列在联邦政府出版的有害杂草物种名单里（7 CFR Part 360）。此外，玉米一直在全世界种植，并没有任何玉米是有害杂草的报道。因为玉米在进化过程中曾经过选育，所以，玉米不能作为一种杂草存活，因为在玉米属于农作物，

对其进行选择和驯化过程与杂草植物的进化过程相反，演变为玉米果穗被苞叶所包裹。由于玉米穗的结构之故，单个种子的扩散不会自然地出现。然而，即使单个玉米粒在田间和从田间到仓库的路上撒落，也不能在栏杆、水沟和路边找到玉米自生苗。

在MON 88017和对照的对比研究里，针对种子休眠和萌发特性（见3.2.3部分）、表现型（见3.2.1部分）和花粉形态学特点（见3.2.2部分）进行了评估，评估它们的变化能否影响植物病虫害潜势，特别是植物杂草潜势。在这些特点的评估中，没有发现MON 88017、对照、商业化种植的常规玉米间任何具有生物学意义的差异，鉴于其具有亲缘关系并且不能提高杂草潜势，评估的结果支持认为它们实质上没有区别的结论。此外，根据USDA-APHIS通知的规定，对种植MON 88017的田间试验小区，采收后进行了全面的监测，结果并未显示其在存活率或持久性上同其它玉米有任何的差异。这些数据表明，MON 88017与非转基因对照和其它常规玉米杂交种一样，都不具有杂草化的倾向。

MON 88017 含有抗农达玉米NK603 同样含有的 CP4 EPSPS 蛋白质，后者已于 2000 年在美国实现了商业化。在商业推广后的三年里，没有报道表明具有这一特性的玉米已产生了杂草化问题。MON 88017 里还有 Cry3Bb1 蛋白质，这种蛋白质和已经商业化批准并应用多年的 YieldGard 抗根虫玉米（MON 863）里的 Cry3Bb1 蛋白质在氨基酸序列上有 99.8%的相似性。在 YieldGard 抗根虫玉米，在决定解除对 MON 863 监管的批准文件（批准文件 01-137-01p）的环境安全评估中，USDA-APHIS 认为：“这个导入的特性，即，对鳞翅目昆虫的抗性，预计不会使 MON 863 变成一种杂草。”

3.2.8 抗虫转基因植物对靶标生物和非靶标生物的影响，包括对环境有益和有害生物的影响

MON 88017对靶标生物玉米根虫的影响

MON 863和MON 88017均可以表达Cry3Bb1蛋白，但二者又不完全相同。孟山都公司采用这两种Cry3Bb1蛋白针对靶标害虫—马铃薯甲虫（Colorado potato beetle, CPB）和玉米根虫（Western corn root worm, WCRW）一幼虫半致死剂量（LC₅₀）进行了研究（技术报告6a）。结果表明，MON 88017表达的Cry3Bb1针对CPB幼虫和WCRW幼虫的平均LC₅₀分别为0.84 µg/ml和139 µg/ml；而MON 863表达的Cry3Bb1.11098的LC₅₀则为0.95 µg/ml和100 µg/ml。这两种蛋白对CPB和WCRW体重的影响也没有显著差异（p=0.1262和p=0.2443），表明二者在生物学功能和活性方面是等同的。MON 863已经在中国获得批准。

孟山都公司还于2002年和2003年进行MON 863和MON 88017对WCRW幼虫抗性的田间试验。2002年的田间试验包括在依阿华、依利诺斯、内布拉斯加和南达科他州的7个试验点；2003年的试验包括在依阿华和依利诺斯州的5个试验点。试验材料为MON 88017、MON 863和非转基因对照，采用随机区组设计，4次重复，单行区，行长17.5-20英尺，每行30株；在玉米生长的V2期人工接种WCRW虫卵，接种密度为每英尺1400-1600块，于玉米生长的VT时期（抽穗期）调查虫害，每行调查10个根。结果表明，非转基因对照玉米的根系伤害率（RDR）平均为1.47（范围0.81-2.38），不同年份和试验地点间的差异达到显著水平（P>F<0.0001）。而MON 88017和MON 863的抗虫表现一致（没有达到显著差异），在所有试验点的抗虫性均明显好于非转基因对照，平均RDR为0.12。由此可以得出结论，MON 88017表达的Cry3Bb1蛋白可以有效抵抗玉米根虫，并且该蛋白与MON 863表达的Cry3Bb1蛋白功能是等同的。

对非靶标生物的影响

a. CP4 EPSPS 蛋白质

MON 88017和其它抗农达作物产生的CP4 EPSPS蛋白质，类似于环境中植物和微生物组织里广泛存在的天然CP4 EPSPS蛋白质。因此，根据这一事实可以推论转基因产生的CP4 EPSPS蛋白质不会具有针对非害虫生物的生物活性。尽管如此，一些研究人员还是针对接触抗农达作物的各种节肢动物，进行了试验室调查(Goldstein, 2003; Boongird *et al.*, 2003; Jamornman *et al.*, 2003; Harvey *et al.*, 2003)。使有代表性的传粉昆虫、土壤生物、有益节肢动物和害虫物种接触抗农达作物的组织（花粉、种子和叶片）。这些研究尽管设计各有不同，但结论却是一致的，即在接触了能产生CP4 EPSPS蛋白质的抗农达作物的各个物种里，都观察到CP4 EPSPS蛋白缺乏毒性(Nahas *et al.*, 2001; Dunfield and Germida 2003, Siciliano and Germida, 1999)。

针对能产生 CP4 EPSPS 蛋白质的转基因大豆进行的田间试验，进一步证实了毒性的缺乏。至于 Collembola 的多样性和丰富性，抗农达大豆和在同样的管理系统下生长的常规大豆，并没有任何不同(Bitzer *et al.*, 2000)。针对在各种杂草管理系统下生长的抗农达大豆进行的其它研究断定，这个抗农达特性对节肢动物没有明显的直接影响，尽管同植物品种有关的杂草管理和表现型的差异（株高或成熟度）能影响节肢动物的群体(Jasinski *et al.*, 2003; McPherson *et al.*, 2003; Buckelew *et al.*, 2000)。预计 MON 88017 同样不能对节肢动物产生任何影响。

b. Cry3Bb1 蛋白质

USDA 和 EPA 先前已对 YieldGard 根虫玉米 (MON 863) 产生的 Cry3Bb1 蛋白质进行了环境评估。在 MON 863 的环境安全评估里(申请书 01-137-01p)，USDA-APHIS 考虑了 Cry3Bb1 蛋白质对非靶标生物 (NTO)，包括对有益生物和受到威胁的或濒临灭绝的物种的潜在影响。USDA 认为该产品[MON 863]同其它栽培玉米相比，对于农业有益生物，不可能具有更大的、不良、有害或有毒的效应。除了我们发现不存在植物病虫害风险之外，MON863 及其后代非管制地位的确定，不会对受到威胁的或濒临灭绝的物种产生任何影响。

根据对几个 Cry3Bb1 蛋白质变种进行的研究，EPA 针对鸟类、鱼类和陆生非靶标昆虫等有代表性的物种，对产生 Cry3Bb1 的玉米进行了广泛的环境灾害评估，以支持 MON 863 的注册(EPA, 2003a)。EPA 还考虑到了对濒临灭绝的物种可能产生的影响和在环境里的 Cry3Bb1 蛋白质的演变。FIFRA 科学顾问委员会 (SAP) 会议(EPA, 2002b)、对科技专家的咨询和 EPA 收到的公众意见，也都进行了考虑。EPA 断定，“本署有足够的信息使本署相信，建议使用的 Cry3Bb1 玉米不会对非靶标野生、水生和土壤生物产生任何风险。然而，在 2002 年 8 月咨询了 FIFRA SAP 之后，并根据一些公众的意见，本署将要求提交更多的数据。补充研究将对本署做出的结论产生进一步的影响。”孟山都将在适当的时机提交 EPA 要求的补充信息资料。

因为 MON 88017 含有 Cry3Bb1 蛋白质，这个蛋白质在理化特性上和和功能上等同于 MON 863 产生的 Cry3Bb1 蛋白质。所以，对环境无风险的结论应该同样适用于这一蛋白质。EPA 作为 MON 863 注册条件要求提供的补充数据，也将支持 MON 88017 对环境无风险的结论。

针对有代表性的鸟类（北美鹌和鹌鹑）、水生物种（鲇和水蚤）、陆生有益脊椎动物（Collembola、瓢虫、蜜蜂成虫和幼虫、草蛉、寄生蜂和蚯蚓），先前已进行了一系

列的研究，评估了对接触了 Cry3Bb1 蛋白质变种的非靶标生物（NTO）可能产生的不良影响。这些非靶标生物接触了大量的、含有植物 Cry3Bb1 变种的玉米叶片、籽粒或花粉组织，或者摄食了含有苏云金杆菌（*B.t*）或大肠杆菌产生的 Cry3Bb1 变种的人工日粮。在每个实例里，都证实了 Cry3Bb1 蛋白质变种的无观察到的效应浓度（NOEC）。根据 NOEC 对预期最大环境浓度（MEEC）的比率，计算了曝露最小值（MOE）。结果表明，MOE 的值域居于 3 倍到 141 倍之间（EPA, 2003a）。此外，按日粮的 10 和 35wt%，分别饲给北美鹌、鹌鹑和斑点叉尾鲷以含有 Cry3Bb1 蛋白质变种的玉米籽粒，结果发现对它们的生长或存活没有任何不良影响。

孟山都公司进行的针对已非靶标生物影响的结果表明，Cry3Bb1 蛋白质不会对非靶标生物造成任何显著的风险（技术报告 6b、c、d、e、f 和 g）。

3.2.9 对生态环境的其它有益或有害作用

如前所述，在 MON 88017 和常规玉米杂交种之间的生物学相关表现型差异，就是 MON 88017 能产生 CP4 EPSPS 蛋白和 Cry3Bb1 蛋白，因而可以使 MON 88017 耐受草甘膦类除草剂和抵抗玉米根虫的危害。到目前为止，我们还未发现 MON 88017 对生态环境造成不良影响。

3.3 转基因植物与受体或亲本植物在人体健康影响方面的差异

3.3.1 毒性

玉米是食物和饲料的主要来源，具有很长的安全应用历史，一般认为对人类健康是有益的，其中并不含有有毒成分（White 和 Pollack, 1995; Watson, 1987）。

CP4 EPSPS 蛋白毒性安全性评价

a. CP4 EPSPS 蛋白与已知蛋白或毒素相似性分析

利用 FASTA 序列分析软件为工具，分析对比了 CP4 EPSPS 蛋白和 ALLPEPTIDES 数据库里各种蛋白结构的相似性（技术报告 7）。按照 ALLPEPTIDES 数据库里蛋白序列与 CP4 EPSPS 的相似程度进行定级。与 CP4 EPSPS 蛋白最相似的蛋白是转基因抗农达大豆（*Glycine max*）中的蛋白（登记号 AY125353），二者有 455 个氨基酸重叠，重叠率达 100%（*E*-值为 1.4×10^{-165} ）。这一结果表明 MON 88017 中表达的 CP4 EPSPS 蛋白与已经获得商业化批准的抗农达（Roundup Ready）大豆中的 CP4 EPSPS 蛋白是一样的。其它具有相似性（*E*-值 $< 1 \times 10^{-5}$ ）的蛋白也都属于 EPSPS 蛋白。

同样是利用 FASTA 序列分析软件还分析了 CP4 EPSPS 蛋白与毒素数据库（TOXIN5）里的各种蛋白的结构相似性，并根据相似性程度对这些蛋白进行了排序。其中最具相似性的蛋白是蜡状芽孢杆菌（*Bacillus cereus*）神经磷脂酶 C 的先导蛋白（登记号码 P11889），二者有 131 个氨基酸重叠，重叠率只有 28.2%（*E*-值为 0.26）。该结果表明 CP4 EPSPS 蛋白与任何已知毒素蛋白不可能具有相似性。

FASTA 序列分析结果表明 CP4 EPSPS 蛋白与已知的对人类和动物健康有影响的毒素蛋白或者其它有生物活性的蛋白没有相似性。

b. CP4 EPSPS 蛋白急性口服毒理学研究

Harrison 等（1996）利用大肠杆菌生产的 CP4 EPSPS 进行小鼠急性经口毒理学研究（技术报告 11）。大肠杆菌生产的 CP4 EPSPS 蛋白已经被证实与 MON 88017 中表达的 CP4 EPSPS 蛋白是等同的（技术报告 12）。CP4 EPSPS 蛋白的饲用采用单一剂量且剂量

高达572 mg/kg，实验组包括10只雄性和10只雌性CD-1小鼠组成。实验用的CP4 EPSPS蛋白是经大肠杆菌繁殖提取的。实验中没有发现CP4 EPSPS蛋白处理对于小鼠的存活率、临床表现、增重、饲料消耗或总的病理学观察有什么不利影响。因此，可以认为对于CP4 EPSPS来说“无可观察到的效应水平”（NOEL）应该等于甚至大于572 mg/kg。

c. CP4 EPSPS蛋白供体生物Agrobacterium sp. strain CP4的安全性

农杆菌CP4小种（*Agrobacterium sp. strain CP4*）选作供体生物是因为其能产生天然的抗草甘膦EPSPS蛋白而使其表现为对草甘膦的抗性（Padgett *et al.*, 1996）。该细菌的分离物，即CP4小种，已经过美国微生物培养库（American Type Culture Collection）进行的分离鉴定，最终确定为属于农杆菌的生理小种。目前还没有报道表明农杆菌中的任何种对人体或者动物具有致病能力，而且农杆菌一般不是致敏源（FAO/WHO, 1991）。此外，根据FAO/WHO（2001）报告，目前还不知道有任何的人群对细菌性蛋白敏感。

供体生物的安全性在孟山都公司以前提交的许多产品申请时已经经过了严格的审查，并被认为是安全的并且这些产品都获得了批准，包括抗农达大豆40-3-2（1994）、抗农达油菜（1995）、抗农达棉花1445（1995）、抗农达玉米NK 603（2000）和抗农达甜菜（1998）。

d. CP4 EPSPS蛋白动物喂养试验

用MON 88017（表达CP4 EPSPS蛋白）进行大鼠90天喂养试验的结果详见以下关于Cry3Bb1蛋白毒性安全评价部分的动物喂养试验结果。

e. CP4 EPSPS与来源于食品的、具有长期安全消费史的各种EPSPS的相似性

在MON 88017里表达的CP4 EPSPS蛋白类似于已经广泛存在于各种食品和饲料的各种EPSPS蛋白。如表11所示，CP4 EPSPS蛋白和天然存在于植物里的各种EPSPS具有同源性，包括粮食作物（如大豆和玉米）、真菌和微生物来源的食品（如酵母菌（*Saccharomyces cerevisiae*）食品），而这些作物和食品都具有人类长期安全消费的历史（Padgett *et al.*, 1996; Harrison *et al.*, 1996）。鉴于CP4 EPSPS蛋白与在各种食品中的EPSPS的相似性，使人们有理由放心地消费CP4 EPSPS蛋白，而不必担心它会对人类和动物健康产生不良影响。此外，同源EPSPS酶在粮食作物和普通微生物里是无所不在的，这证明CP4 EPSPS蛋白以及它们的酶活性不会对人体和动物的消费造成危险。

表11. 天然CP4 EPSPS推导氨基酸序列同其它EPSPS进行比较

CP4 EPSPS	大豆	玉米	矮牵牛	大肠杆菌	B. subtilis	S. cerevisiae
%相同序列	26	24	23	26	41	30
%序列相似性	51	49	50	52	59	54

f. CP4 EPSPS蛋白在商用粮食和饲料作物里的存在

自从1996年投放市场以来，含有CP4 EPSPS的作物已经广泛种植并作为食品和饲料消费。孟山都开发的第一代抗农达转基因大豆40-3-2就是其中很重要的一个含有CP4 EPSPS蛋白的作物。到2005年，它在美国大豆产区已占全部大豆面积的89%。从全球来看，抗农达大豆（40-3-2）种植面积达到约1.34亿英亩，占全球大豆种植面积的57%（James, 2006）。根据推算，全球消费的大豆和大豆产品中有60%可能含有CP4 EPSPS蛋白。

除了大豆，其它许多主要用作粮食和饲料的抗农达作物也都表达CP4 EPSPS蛋白，包括抗农达的玉米、油菜、糖用甜菜、苜蓿和少量的抗农达棉花。在2005年，这些抗农达转基因作物，包括单一性状和复合性状（stack），在全球的种植面积已经超过了6990万公顷（James, 2006）。总之，全球有1 / 4的食品和饲料中可能含有CP4 EPSPS。如上所述，人们从1996年起即开始消费含有CP4 EPSPS的食品和饲料产品了。目前还没有任何证据表明含有CP4 EPSPS的食品或饲料对人或动物有任何不良影响。所以，有理由认为MON 88017以及含有CP4 EPSPS蛋白的食品和饲料是安全的。

Cry3Bb1蛋白毒性安全性评价

a. Cry3Bb1蛋白与已知蛋白或毒素相似性分析

利用 FASTA 序列分析软件为工具，分析对比了 Cry3Bb1 蛋白和 ALLPEPTIDES 数据库里各种蛋白结构的相似性（技术报告 8）。按照 ALLPEPTIDES 数据库里蛋白序列与 Cry3Bb1 的相似程度进行定级。正如预期的那样，与 Cry3Bb1 蛋白最相似的蛋白是 *Bacillus thuringiensis* 中的杀虫晶体蛋白 Cry3Bb 蛋白（登记号 Q06117），二者有 651 个氨基酸重叠，重叠率达到 99.2%（E-值为 0）。其它具有相似性的蛋白也都是 Cry 蛋白。MON 88017 中表达的 Cry3Bb1 蛋白是 Cry3Bb 蛋白家族的一员，该蛋白的氨基酸序列与生物杀虫剂（Raven Oil Flowable）含有的野生型的 Cry3Bb1 蛋白的相似性>99%。

FASTA序列分析结果表明Cry3Bb1蛋白与已知的对人类和动物健康有影响的毒素蛋白或其它有生物活性的蛋白没有相似性。

b. Cry3Bb1蛋白急性口服毒理学研究

孟山都公司针对Cry3Bb1的食用安全性进行了小鼠急性经口毒理学实验，以评估由Cry3Bb1蛋白质是否会引起小白鼠可能发生的不良临床症状或有害效应（技术报告13）。

实验所采用的Cry3Bb1蛋白是通过大肠杆菌发酵生产的，并且已证明大肠杆菌产生的Cry3Bb1蛋白质等同于MON 88017里表达的植物产生的Cry3Bb1蛋白质（技术报告14）。二组雌、雄CD1小鼠，每组10只，采用高剂量Cry3Bb1蛋白质急性灌胃饲喂。根据定量液最大可得Cry3Bb1浓度（估计为37 mg/mL）和按66.6 mL/kg 体重计算的总剂量水平，确定了靶标剂量为2442 mg/kg。由于Cry3Bb1蛋白质溶解度有限，所以不能一次施给。于是，按33.3 mL/kg体重分为二个剂量（总量为66.6 mL/kg），以达到靶标剂量2442 mg/kg。在定量日（日0），按33.3 mg/mL 体重的剂量，施给二次，中间相隔约四小时。一个有10只雄鼠和10只雌鼠的对照组，按1900 mg/kg，饲给牛血清白蛋白（BSA）。对定量液的分析表明，Cry3Bb1蛋白质的浓度为靶标的79%，因此，达到的剂量为1930 mg/kg。

在研究期间，在食物消耗上，没有观察到任何显著的差异。在解剖检验时，没有观察到任何同Cry3Bb1蛋白质消耗有关的肉眼病理学症状。在这一实验条件下，任何实验组里都没有观察到毒性的存在（技术报告13）。因此，大肠杆菌产生的Cry3Bb1蛋白质的小鼠体内的急性口服LD₅₀剂量，应大于1930 mg/kg体重。这一剂量被确定为NOEL。

这一研究的结果同YieldGard抗根虫玉米MON 863的安全评价研究结果是一致的，二者同样是表达Cry3Bb1蛋白，而MON 863已经获得美国EPA、FDA和USDA的批准，并在全球许多国家商业化应用。中国也已于2004年批准了MON 863进口用作加工原料的安全证书。

为了便于对比，还利用其它的Cry3Bb1蛋白质进行了啮齿动物急性口服毒理学实验。在每次的急性口服实验中，取得的最高剂量水平未能产生与处理相关的不良效应的证据。因此，被认为是无可观察到的效应水平（NOEL）。这些结果列于表12。

表 12. 各种 *B.t.* 发酵生产的和植物产生的 Cry3 蛋白的急性口服 NOEL 值

Cry3 蛋白	NOEL (mg/kg) ^a
Cry3Bb1 – MON 88017	≥ 1930
Cry3Bb1 – YieldGard 抗根虫玉米 (MON 863)	≥ 3200
Cry3Bb1 – Raven Oil Flowable 生物杀虫剂的野生型 ^b	≥ 30
Cry3Aa4 - NewLeaf [®] 土豆	≥ 5000

a - 试验的最高处理剂量为 NOEL。

b – Raven是Cry3Bb1、Cry3Aa4和CryIAc蛋白的混合。试验中Cry3蛋白占40% (w/w)，而Cry3Bb1蛋白占全部Cry3蛋白的66-75%。试验中最高处理剂量为10⁸ CFU/个体，相当于100 mg/kg体重。

c. Cry3Bb1 蛋白供体生物 *Bacillus thuringiensis* 的安全性

关于苏云金杆菌（*B.t.*）作为Bt基因供体的安全性，已经进行过大量的分析。苏云金杆菌的*kumamotoensis*亚种是自然存在于土壤中的一种孢子型革兰氏阳性芽孢杆菌。自1958年起，美国就开始利用苏云金杆菌的各种生理小种来商业化生产具有杀虫活性的微生物发酵产品（EPA, 1988），其中许多生理小种可以用于生产针对特定害虫具有毒杀作用的晶体蛋白。根据可识别的氨基酸，可以将这些杀虫蛋白分成不同的类型。每种蛋白具有其特定的名称，其名称依次用阿拉伯数字、大写字母、小写字母和阿拉伯数字构成（如：Cry3Bb1）。这些蛋白根据以下特征进行分类：

- 初级分类的氨基酸相似性小于45%（如：Cry2和Cry3等）；
- 次级分类的氨基酸相似性大于45%但小于78%（如：Cry3A, Cry3B）；
- 第三级分类的氨基酸相似性大于78%但小于95%（如：Cry3Ba, Cry3Bb）；
- 第四级分类的氨基酸相似性大于95%（如：Cry3Bb1, Cry3Bb2），这一级别的差异被认为是等位基因的差异。

总的来看，初级分类就已经奠定了Bt蛋白的特定杀虫活性，比如Cry1、Cry2、Cry3和Cry4蛋白分别对鳞翅目（Lepidopteran）、鳞翅目和双翅目（Lepidopteran/Dipteran）鞘翅目（Coleopteran）以及双翅目昆虫有毒杀作用（Bravo, 1997; Höfte and Whitely, 1989）。

在进行了一系列毒理学研究和传染性安全评价后，美国食品药品监督管理局（FDA）于1960年批准了第一个微生物Bt产品。这些研究和评价包括急性口服、亚慢性和慢性毒理学实验，而这些实验与用于传统的化学杀虫剂安全评价试验是一样的。同年稍晚些时候，美国农业部（USDA）也批准了该产品。1971年，美国环境保护署（EPA）被授权管理涉及杀虫剂抗性的产品。从那以后，大量的自然的和经遗传改良的微生物Bt产品获得批准上市。EPA已经批准的产品包括了在转基因作物中表达的各种修饰的Cry蛋白（如：Cry1Ab、Cry1Ac、Cry2Ab2和Cry3Aa）。大量毒理学实验结果表明，食品和饲料中存在

[®] NewLeaf is a registered trademark of Monsanto Technology LLC.

的各种Cry蛋白和Bt产品对哺乳动物没有不良影响，据此可以断定苏云金杆菌（Bt）是安全的。超过40年的苏云金杆菌安全应用历史也证明了这一点（McClintock et al., 1995）。在苏云金杆菌长期应用中也没有报道表明对人类健康有不良影响（EPA, 1998）。

d. Cry3Bb1蛋白的动物喂养试验

孟山都公司针对MON 88017对人类和动物健康的影响进行了大鼠90天喂养实验（技术报告15）。实验设计采用3组Sprague-Dawley Crl:CD (CD)[®] IGS BR大鼠，每组雌雄性大鼠各20只。第1组大鼠用含有11%（w/w）MON88017玉米粉和22%（w/w）对非转基因照玉米粉的饲料饲喂；第2组大鼠用含有33%（w/w）MON 88017玉米粉的饲料饲喂；第3组大鼠用含有33%（w/w）非转基因对照玉米粉饲喂。实验过程中，每日进行临床观察、每周测体重和食物消耗量、进行终端临床病理学试验（血液学、血液化学、尿分析）、测定器官重量、对宏观和微观病理学评估。实验结果表明，所有大鼠在各种处理下均正常生长直至进行解剖。临床观察结果表明没有大鼠出现异常，体重、取食以及临床病理学参数均未受到各处理饲料配方的影响。因此可以得出结论，饲料中含有高达33%的MON 88017玉米粉不会对Sprague Dawley大鼠造成不良影响。

根据中国农业部的要求，中国疾病控制与预防中心进行了MON 88017的大鼠90天喂养的验证性实验（技术报告23）。实验选用140只断乳Wistar大鼠，按体重随机分成7组，每组20只（雌雄各半）。7个试验组分别饲喂常规饲料、含有3个剂量非转基因对照玉米粉的饲料（12.5%、25%和50%）和含有3个剂量转基因MON 88017玉米粉的饲料（12.5%、25%和50%）。结果表明，转基因玉米MON 88017掺入饲料饲喂大鼠90天，动物活动、生长未见异常，被毛浓密有光泽。转基因玉米MON 88017雌性50%剂量组大鼠的碱性磷酸酶检测值升高，与常规组和非转基因对照50%剂量组相比达到显著性差异（ $P < 0.05$ ）。未发现转基因玉米MON 88017对大鼠体重、食物利用率、血液学指标、脏器重量、脏器比以及组织病理学观察有生物学意义的改变。

3.3.2 过敏性

分析蛋白的致敏性通常要将其与已知的致敏蛋白的生物化学特性进行比较。如果某种蛋白具有下列特点，那么它就不可能是致敏蛋白：

1. 该蛋白来源于非致敏源；
2. 该蛋白在植株总蛋白中所占比例不大；
3. 在氨基酸序列方面，该蛋白同已知的致敏源没有结构的相似性；
4. 该蛋白在模拟胃液的消化系统中表现不稳定。

以下将逐一讨论MON 88017中产生的CP4 EPSPS蛋白和Cry3Bb1蛋白的特点，并且证明这两种转基因表达蛋白不可能是致敏源。

CP4 EPSPS蛋白致敏性安全性评价

a. CP4 EPSPS蛋白的来源

如前所述，*cp4 epsps*编码序列来自于一个天然存在的土壤细菌，利用美国微生物培养库（American Type Culture Collection）进行的分离鉴定，已经证实该土壤细菌为根癌农杆菌的CP4小种。由于目前没有研究报告表明根癌农杆菌属于致敏源，因此，可以确定CP4 EPSPS蛋白不是来源于一个已知的致敏源。此外，根据FAO/WHO（2001），目前还不知道有任何的人群对细菌蛋白过敏。

b. CP4 EPSPS蛋白在全部蛋白中所占比例

在生长季内的大多数时间段上，都可以在植株体内检测到含量相对较低的CP4 EPSPS蛋白。在所有植物组织里，玉米籽粒是最有可能的致敏组织，因此常用玉米籽粒来评价致敏性。在本申请书第2.6.1部分描述了MON 88017外源蛋白表达的情况，这些数据表明CP4 EPSPS蛋白质在MON 88017里的总体平均值为5.8 g/g (dwt)（表4）。蛋白质总量占MON 88017籽粒的干重平均百分数为12.51%（附件资料3和技术报告2）。在每克MON 88017籽粒中，CP4 EPSPS蛋白质所占百分数可按下列公式计算：

$$5.8\text{g/g} \div 125,100\text{g} \times 100\% = 0.0046362\%$$

因此，CP4 EPSPS蛋白质只在MON 88017籽粒总蛋白占很小的比例。

c. CP4 EPSPS蛋白同已知致敏源序列同源性的生物信息学分析

在2003年，国际食品法典委员会公布了新蛋白潜在致敏性的评价原则（Codex Alimentarius, 2003）。此原则的依据是导入蛋白和已知致敏源之间在氨基酸序列上的对比结果，如果发现导入的蛋白在至少有80个氨基酸的片段长度上与致敏源具有至少35%的氨基酸是相同的，则该导入蛋白有可能是潜在的致敏原。该原则还建议，利用已经证实大小的多肽进行位移搜索可以从免疫学角度来识别一些不相关蛋白质中的相关多肽。

利用致敏源数据库7（Allergen Database, version 7.0, AD7）评价了CP4 EPSPS蛋白与各种致敏蛋白之间的序列同源性（技术报告9）。AD7包含了FARRP最新发表的致敏源（见www.allergenonline.com）。利用FASTA序列分析软件确定各种致敏蛋白和CP4 EPSPS的相似程度，并依据相似性进行了排序。AD7数据库中的这些致敏蛋白，没有任何1个蛋白在任何1个连续的80个氨基酸的长度上与CP4 EPSPS蛋白的氨基酸达到或者超过35%相似的阈值。只有尘螨（dust mite）致敏蛋白Der F II（GI号546852）与CP4 EPSPS之间有很低的相似性，其中在1个82个氨基酸长度的片段上有5个缺口，如果补上这5个缺口其同源性才能达到30.5%。如果在CP4 EPSPS全长序列（455个氨基酸）上进行比较，重叠的序列很少（18%），其E-值为0.51。较高的E-值表示被测序列和来自于数据库的序列之间相似性程度较低。一般来说，二个序列之间的比较的E-值小于或等于 1×10^{-5} 的时才能认为二者之间具有显著的同源性。比较研究中得到0.51的E-值不能确定CP4 EPSPS蛋白与Der F II具有同源性，因为即使在一些非同源序列的比较中可能会随机出现~1的E-值（Pearson, 2000）。因此，象这样低程度的相似性是不能作为确定CP4 EPSPS与该致敏蛋白具有同源性的依据的。其余的比较分析结果表明，CP4 EPSPS蛋白和其它致敏源之间没有显著的同源性。

d. CP4 EPSPS蛋白在模拟消化液中的稳定性分析

Harrison等人（1996）证明了CP4 EPSPS蛋白能在模拟胃液里迅速降解。根据蛋白质印迹杂交分析，CP4 EPSPS在胃消化系统的半衰期不到15秒钟，在肠消化系统里不到10分钟。因此，即使任何的CP4 EPSPS蛋白可以坚持进入胃消化系统的话，也势必会迅速降解掉。

随后进行的CP4 EPSPS蛋白离体模拟胃液（SGF）消化试验也证实了上述观点（技术报告16）该实验采用国际生命科学研究（ILSI）公布的标准方法（Thomas *et al.*, 2004）。同Harrison等人（1996）以前的试验一样，本项研究也采用了大肠杆菌生产的CP4 EPSPS蛋白，消化率采用SDS-PAGE凝胶染色（colloidal blue staining）、蛋白质印迹（Western blot）和CP4 EPSPS酶活性鉴定进行评估。

实验结果证实了大肠杆菌产生的 CP4 EPSPS 蛋白 SGF 里迅速被消化。SDS-PAGE 凝胶染色结果表明, 98%以上的 CP4 EPSPS 蛋白在 15 秒钟内被消化(图 15)。Western 印迹分析结果表明, CP4 EPSPS 蛋白有 95%在 15 秒钟内被消化(图 16)。同样, CP4 EPSPS 蛋白在 SGF 里培养不到 15 秒钟, 其活性降低到了小于 10%(表 13)。总之, 可以断定大肠杆菌产生的 CP4 EPSPS 蛋白能在模拟胃液里迅速降解, 所以不可能对人体健康产生危险。

表13. 在模拟胃液消化后大肠杆菌生产的CP4 EPSPS蛋白的比活性

样本	比活性 (单位/mg 蛋白)
无胃蛋白酶的试验对照培养 0 秒钟	4.92
无胃蛋白酶的试验对照培养 60 分钟	2.10
大肠杆菌产生的 CP4 EPSPS 蛋白在 SGF 里培养 0 秒钟	5.63
E.大肠杆菌产生的 CP4 EPSPS 蛋白在 SGF 里培养 15 秒钟	0.27
E.大肠杆菌产生的 CP4 EPSPS 蛋白在 SGF 里培养 30 秒钟	0.15
E.大肠杆菌产生的有 CP4 EPSPS 蛋白在 SGF 里培养 60 秒钟	0.15
无 CP4 EPSPS 的试验对照培养 0 秒钟	0.02
无 CP4 EPSPS 的试验对照培养 60 分钟	0.05
缓冲液空白	0.01

Cry3Bb1蛋白致敏性安全性评价

a. Cry3Bb1蛋白的来源

如前所述, Cry3Bb1蛋白质是从苏云金杆菌*kumamotoensis*亚种EG4691中分离出的野生型Cry3Bb1蛋白质的一个变种(Donovan et al, 1992)。苏云金杆菌亚种*kumamotoensis*是一个孢子型的革兰氏阳性土传细菌。自1958年以来, 苏云金杆菌一直在商业化生产具有杀虫活性的微生物衍生产品(EPA, 1988)。目前尚无报道表明人类对苏云金杆菌及其产品发生过敏的事件。也没有报道表明Cry3Bb1蛋白属于致敏源。

b. Cry3Bb1蛋白在全部蛋白中所占的比例

Cry3Bb1蛋白质在MON 88017玉米籽粒中的平均含量为15 g/g (dwt) (表4)。MON 88017籽粒中总蛋白占干物重百分数为12.51%(附件资料3和技术报告2)。在每克MON 88017籽粒中, Cry3Bb1蛋白质所占比例计算如下:

$$15 \text{ g/g} \div 125,100 \text{g} \times 100\% = 0.01199 \%$$

因此, Cry3Bb1蛋白质, 在MON 88017的总蛋白中只占很小的比例。

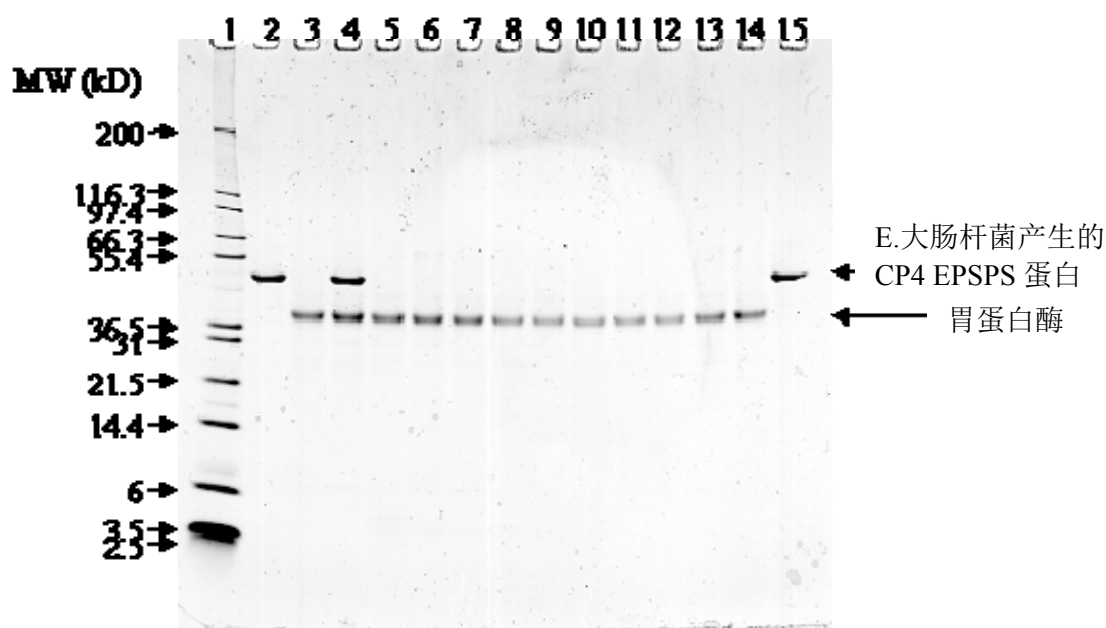


图15. SDS-PAGE凝胶染色结果，显示纯化的大肠杆菌产生的CP4 EPSPS蛋白在模拟胃液里的消化情况

采用10→20%聚丙烯酰胺梯度凝胶（SDS-PAGE）分离蛋白，缓冲液为tricine缓冲液，亮蓝G染色。大肠杆菌产生的CP4 EPSPS蛋白，根据消化前的浓度，按每泳道500ng加样。

泳道	描述	培养时间
1	分子量标记	
2	无胃蛋白酶的试验对照(P0)	0 秒
3	无 CP4 EPSPS 的试验对照 (N0)	0 秒
4	在 SGF 里的 CP4 EPSPS 蛋白, T = 0	0 秒
5	在 SGF 里的 CP4 EPSPS 蛋白, T = 1	15 秒
6	在 SGF 里的 CP4 EPSPS 蛋白, T = 2	30 秒
7	在 SGF 里的 CP4 EPSPS 蛋白, T = 3	1 分
8	在 SGF 里的 CP4 EPSPS 蛋白, T = 4	2 分
9	在 SGF 里的 CP4 EPSPS 蛋白, T = 5	4 分
10	在 SGF 里的 CP4 EPSPS 蛋白, T = 6	8 分
11	在 SGF 里的 CP4 EPSPS 蛋白, T = 7	15 分
12	在 SGF 里的 CP4 EPSPS 蛋白, T = 8	30 分
13	在 SGF 里的 CP4 EPSPS 蛋白, T = 9	60 分
14	无 CP4 EPSPS 的试验对照(N9)	60 分
15	无胃蛋白酶的试验对照(P9)	60 分

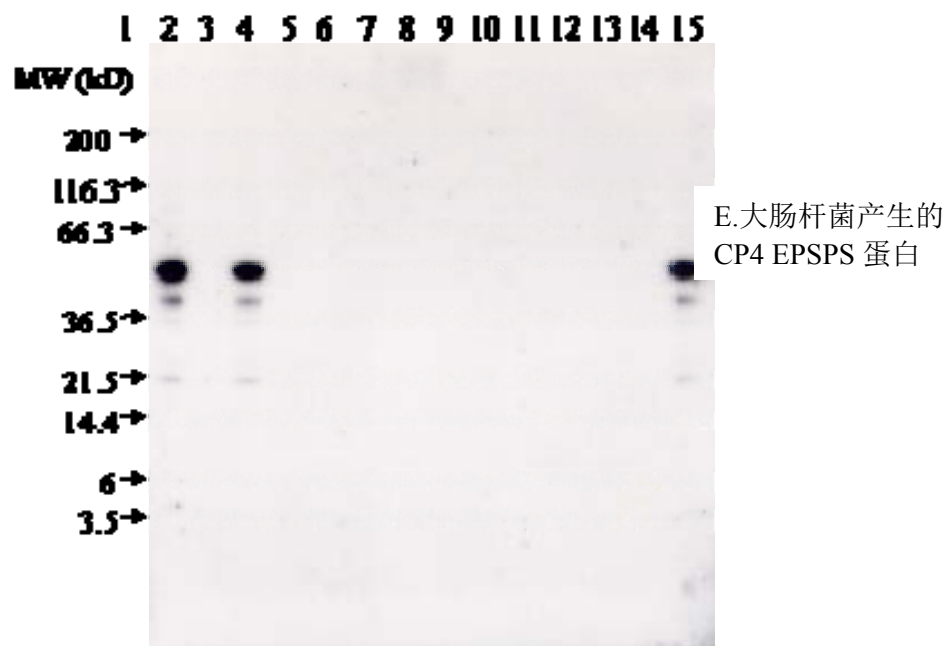


图16. 蛋白质印迹杂交分析结果，显示纯化的大肠杆菌产生的CP4 EPSPS蛋白在模拟胃液里的消化

采用10→20%聚丙烯酰胺梯度凝胶（SDS-PAGE）分离蛋白。大肠杆菌产生的CP4 EPSPS蛋白，按90%的纯度并根据消化前的浓度，按每泳道1ng加样。

泳道	描述	培养时间
1	分子量标记	
2	无胃蛋白酶的试验对照 (P0)	0 s
3	无 CP4 EPSPS 的试验对照 (N0)	0 s
4	在 SGF 里的 CP4 EPSPS 蛋白, T = 0	0 s
5	在 SGF 里的 CP4 EPSPS 蛋白, T = 1	15 s
6	在 SGF 里的 CP4 EPSPS 蛋白, T = 2	30 s
7	在 SGF 里的 CP4 EPSPS 蛋白, T = 3	1 min
8	在 SGF 里的 CP4 EPSPS 蛋白, T = 4	2 min
9	在 SGF 里的 CP4 EPSPS 蛋白, T = 5	4 min
10	在 SGF 里的 CP4 EPSPS 蛋白, T = 6	8 min
11	在 SGF 里的 CP4 EPSPS 蛋白, T = 7	15 min
12	在 SGF 里的 CP4 EPSPS 蛋白, T = 8	30 min
13	在 SGF 里的 CP4 EPSPS 蛋白, T = 9	60 min
14	无 CP4 EPSPS 的试验对照(N9)	60 min
15	无胃蛋白酶的试验对照(P9)	60 min

c. Cry3Bb1蛋白同已知致敏源序列同源性的生物信息学分析

利用致敏源数据库7（Allergen Database, version 7.0, AD7）评价了Cry3Bb1蛋白与各种致敏蛋白之间的序列同源性（技术报告10）。AD7包含了FARRP最新发表的致敏源（见www.allergenonline.com）。利用FASTA序列分析软件确定各种致敏蛋白和Cry3Bb1的相似程度，并依据相似性进行了排序。与Cry3Bb1蛋白最具相似性的蛋白是原肌球蛋白（tropomyosin）（DI编号83715928），该蛋白为一个动物源（*Sepia esculenta*）的致敏源。在175个氨基酸序列上二者的相似性只有22.9%，其E-值4.8。而在Cry3Bb1蛋白全长序列上（653个氨基酸）重叠率只有27%。某种蛋白被认为与已知致敏源相似并能引起过敏反应的最小相似性要在全长氨基酸序列内达到 $\geq 50\%$ （Aalberse, 2000），因此Cry3Bb1蛋白和原肌球蛋白（tropomyosin）不具有同源性和相似性。其余的比较分析结果表明，Cry3Bb1蛋白和其它致敏源之间没有显著的同源性。

d. Cry3Bb1蛋白在模拟消化液中的稳定性分析

同样是利用ILSI胃蛋白酶消化法，孟山都公司进行了Cry3Bb1蛋白质在模拟胃液（SGF）和模拟肠液（SIF）里的离体消化率试验（技术报告17）。SGF里有蛋白质水解酶。采用胶体亮兰G染色SDS，评估了SGF里的消化率。SIF里有一种称为胰酶的蛋白质水解酶（包括胰蛋白酶）的混合物。采用蛋白印迹法评估了在SIF里的消化率。

Cry3Bb1蛋白质当在SGF里培养时，能被迅速地消化。采用胶体亮兰G染色SDS聚丙烯酰胺凝胶进行分析时，全长Cry3Bb1蛋白质至少有98%（约75KD）可在15秒钟内在SGF里被消化（图17）。在几个初始时间点上，观察到了一个蛋白质水解片断（在亮兰G染色线前边），在培养了四分钟后，又不见了。在采用蛋白质印迹法（Western blotting）分析时，全长Cry3Bb1蛋白质至少有99.8%可在15秒钟内在SGF里被消化，在评估的样本上没有观察到任何蛋白质水解片断（图18）。

全长Cry3Bb1蛋白质在SIF里培养时，也迅速被消化。当采用蛋白印迹法进行评估时，全长Cry3Bb1蛋白质至少有99.5%可在1分钟内在SIF里被消化（图19）。不出所料，在24小时的全部过程中，观察到了抗蛋白酶片断。针对Cry1、Cry2和Cry3家族蛋白的全体成员，有人已经描述了全长原毒素经蛋白质水解（胰蛋白酶）转变为活性毒素的过程（EPA, 2001b, 2002, 2003a）。这些结果表明，Cry3Bb1蛋白质在哺乳动物的消化道里是极易消化的。

3.3.3 抗营养因子

根据OECD的资料，“在考虑玉米中的抗营养因子和天然毒素时，只有植酸对动物饲料是重要的”（OECD, 2002）。测定了MON 88017籽粒里抗营养因子（植酸和棉子糖）和二次代谢物（阿魏酸和p-香豆酸）的含量，并与常规玉米进行了对比（表14和技术报告18）。没有观察到统计学显著差异。因此，可以断定MON 88017里抗营养因子和次生代谢产物的含量同非转基因玉米对照实质是等同的。

3.3.4 营养成分

在2002年生长季里，在美国主要玉米种植区的三个田间试验点（Iowa, Illinois and Nebraska）进行了MON 88017的田间试验。供试材料包括MON 88017和非转基因常规对照玉米。在各田间试验点上还种植了4个已经商业化种植的常规玉米杂交种，以提供12个不同的参照值区间。在每个田间试验点上，MON 88017、对照和其它商业化玉米种子按完全随机区组设计、每区组3次重复。根据标签的说明，各试验小区施用了农达UltraMAX除草剂。在腊熟晚期/马牙早期采收秸秆样本，在籽粒成熟时采收籽粒样本，

并分析秸秆样本和籽粒样本的营养成分，以比较MON 88017和非转基因对照在营养成分构成上是否存在差异（技术报告18）。

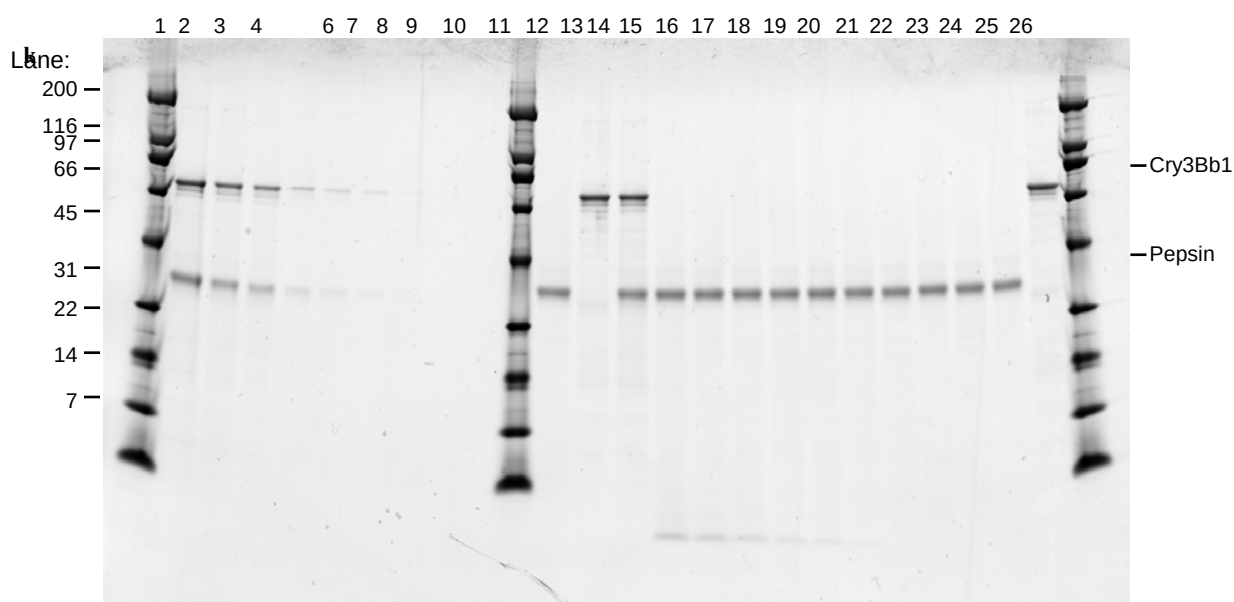


图17. SDS-PAGE分析大肠杆菌产生的Cry3Bb1蛋白在模拟胃液里的消化情况

SDS-PAGE采用10-20%梯度凝胶和Colloidal亮兰G染色，加样量为每泳道500 ng Cry3Bb1蛋白。

泳道	描述	消化时间	泳道	描述	消化时间
1	MWM*	---	14	SGF-2 T0	0 sec
2	500 ng SGF-2 T0	---	15	SGF-2 T1	15 sec
3	200 ng SGF-2 T0	---	16	SGF-2 T2	30 sec
4	100 ng SGF-2 T0	---	17	SGF-2 T3	1 min
5	50 ng SGF-2 T0	---	18	SGF-2 T4	2 min
6	25 ng SGF-2 T0	---	19	SGF-2 T5	4 min
7	10 ng SGF-2 T0	---	20	SGF-2 T6	8 min
8	5 ng SGF-2 T0	---	21	SGF-2 T7	15 min
9	2.5 ng SGF-2 T0	---	22	SGF-2 T8	30 min
10	1 ng SGF-2 T0	---	23	SGF-2 T9	60 min
11	MWM*	---	24	SGF-2 N60	60 min
12	SGF-2 N0	0 sec	25	SGF-2 P60	60 min
13	SGF-2 P0	0 sec	26	MWM*	---

*MWM (分子量标记) = Bio-Rad SDS-PAGE Standards, Broad Range

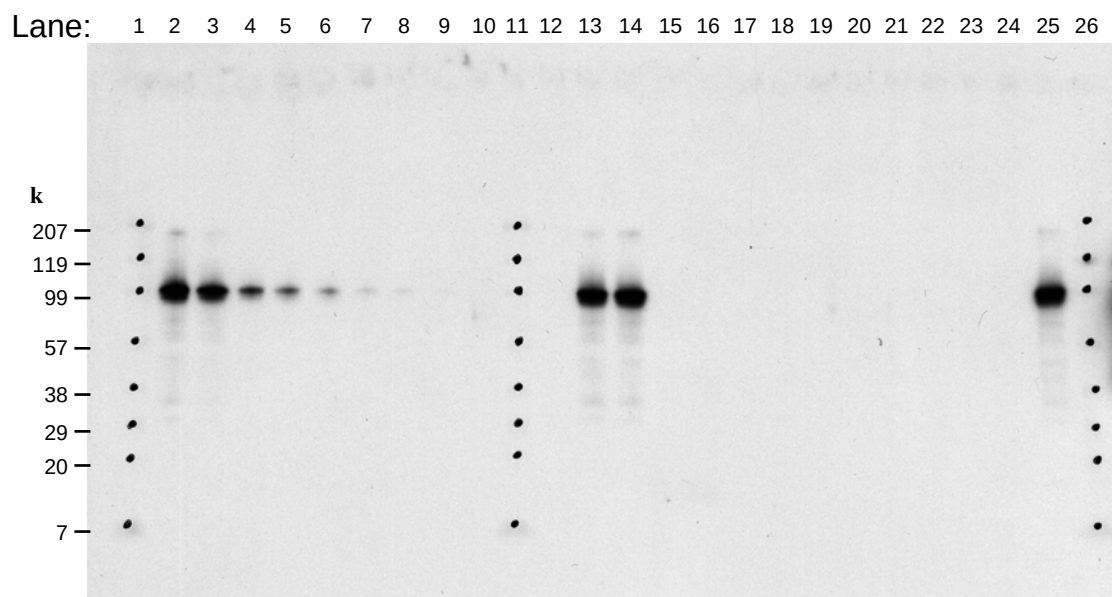


图18 蛋白质印迹分析大肠杆菌产生的Cry3Bb1蛋白在模拟胃液里的消化情况

SDS-PAGE采用10-20%梯度凝胶。蛋白经分离后转移至PVDF进行蛋白印迹分析，免疫反应结果用ECL检测，上图曝光时间为5秒钟。

泳道	描述	消化时间	泳道	描述	消化时间
1	MWM*	---	14	SGF-2 T0	0 sec
2	10 ng SGF-2 T0	---	15	SGF-2 T1	15 sec
3	5 ng SGF-2 T0	---	16	SGF-2 T2	30 sec
4	1 ng SGF-2 T0	---	17	SGF-2 T3	1 min
5	0.5 ng SGF-2 T0	---	18	SGF-2 T4	2 min
6	0.2 ng SGF-2 T0	---	19	SGF-2 T5	4 min
7	0.1 ng SGF-2 T0	---	20	SGF-2 T6	8 min
8	0.05 ng SGF-2 T0	---	21	SGF-2 T7	15 min
9	0.02 ng SGF-2 T0	---	22	SGF-2 T8	30 min
10	0.01 ng SGF-2 T0	---	23	SGF-2 T9	60 min
11	MWM*	---	24	SGF-2 N60	60 min
12	SGF-2 N0	0 sec	25	SGF-2 P60	60 min
13	SGF-2 P0	0 sec	26	MWM*	---

*MWM (分子量标记) = Bio-Rad Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range

Lane: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26

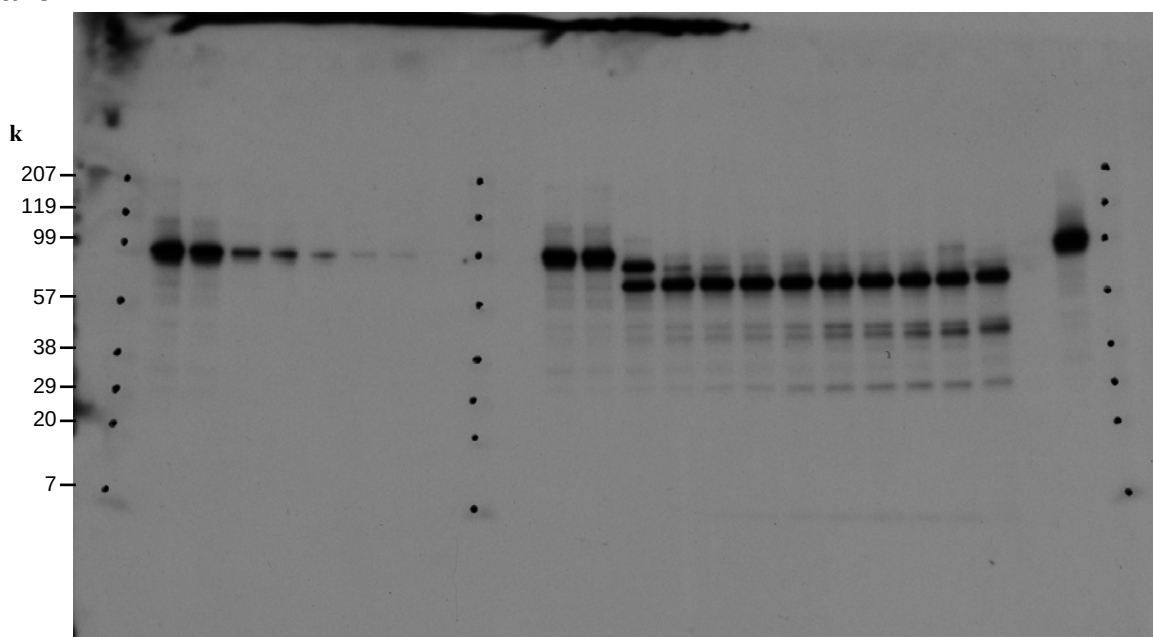


图19 蛋白质印迹分析大肠杆菌产生的Cry3Bb1蛋白在模拟肠液里的消化情况

SDS-PAGE采用10-20%梯度凝胶。蛋白经分离后转移至PVDF进行蛋白印迹分析，免疫反应结果用ECL检测，上图曝光时间为5秒钟。图中圆点（泳道1、10和26）代表印迹膜上分子量标记的位置。

泳道	描述	消化时间	泳道	描述	消化时间
1	MWM*	---	14	SIF T1	1 min
2	10 ng SIF T0	---	15	SIF T2	5 min
3	5 ng SIF T0	---	16	SIF T3	15 min
4	1 ng SIF T0	---	17	SIF T4	30 min
5	0.5 ng SIF T0	---	18	SIF T5	1 hr
6	0.2 ng SIF T0	---	19	SIF T6	2 hr
7	0.1 ng SIF T0	---	20	SIF T7	4 hr
8	0.05 ng SIF T0	---	21	SIF T8	6 hr
9	0.01 ng SIF T0	---	22	SIF T9	12 hr
10	MWM*	---	23	SIF T10	24 hr
11	SIF N0	0 min	24	SIF N24	24 hr
12	SIF P02	0 min	25	SIF P24	24 hr
13	SIF T0	0 min	26	MWM*	---

*MWM (分子量标记) = Bio-Rad Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range

秸秆样本的成分分析包括蛋白质、脂肪、灰分、含水量、酸性洗涤纤维（ADF）、中性洗涤纤维（NDF）、矿物质（钙、磷）和碳水化合物。籽粒样本的成分分析包括蛋白质、脂肪、灰分、含水量、ADF、NDF、日粮纤维总量（TDF）、氨基酸、脂肪酸（C8-C22）、矿物质（钙、铜、铁、镁、锰、磷、钾、钠和锌）、维生素（B1、B2、B6、E、烟酸和叶酸）、抗营养因子（植酸和棉子糖）、二次代谢物（糖醛、阿魏酸和香豆酸）和碳水化合物。总共分析了77种不同的分析成分（秸秆有9种，籽粒有68种）。下列15种成分分析中有超过50%数值低于最低定量标准（LOQ）而无法准确定量分析，它们是：钠、2-糠醛、8:0辛酸、10:0癸酸、12:0月桂酸、14:0肉豆蔻酸、14:1肉豆蔻脑酸、15:0十五烷酸、15:1十五烯酸、17:0十七烷酸、17:1十七碳烯酸、18:3咖马亚麻酸、20:2二十碳二烯酸、20:3二十碳三烯酸和20:4二十碳四烯酸。因此，没有将这些成分纳入统计分析。对其它62个成分进行了统计学分析（秸秆9个成分，籽粒53个成分）。

采用混合模式方差分析进行了营养成分数据的统计学分析。每个试验点的数据作为一个分析组，同时三个点全部数据平均值也作为一组进行分析，一共进行了四组分析来评估MON 88017和非转基因对照的秸秆和籽粒数据对比。差异显著性分析按照5%的水平（ $p < 0.05$ ）。MON 88017与非转基因对照间共有248次数据对比（4组分析×62种成分）。对于4个商业化玉米杂交种的12个参照也进行了营养成分分析，计算了95%的置信度下的99%的容许区间值。在MON 88017同非转基因对照间差异达到显著水平的数据对比中，将比较MON 88017的数据是否在99%容许区间内，以确定该数据的数值是否介于其它商业化玉米杂交种数据的容许区间里，以进一步确定该数据与常规玉米杂交种是否存在差异。

秸秆和籽粒样本的分析结果表明，在所作的248个MON 88017和非转基因对照间数据对比中有232个对比没有达到统计学的显著差异（表14—表21，技术报告18）。在秸秆的所有数据对比中没有任何对比达到显著差异（表15）。在籽粒的成分分析方面，有16个数据对比的差异达到显著水平，包括：16:0棕榈酸、18:1油酸、18:3亚麻酸、20:0二十烷酸、铜、蛋氨酸、含水量、烟酸和丝氨酸（上述每个成分有1组对比）、18:2亚油酸（有3组对比）和维生素B1（有4组对比）（表21）。在完全随机的条件下，应该大约有12（ 0.05×248 ，即5%）次对比预期具有统计学显著性。除了维生素B1之外，没有其它成分在全部4组对比分析（3个单个试验点分别对比以及和全部试验点汇总对比）中达到统计学显著差异。MON 88017的维生素B1分析数据在4组对比中显著低于非转基因对照。但是，MON 88017籽粒中维生素B1数据依然还是介于有关玉米文献发表的维生素B1数值范围内和历史上有记载的玉米维生素B1数值范围内（表22）。在MON 88017和非转基因对照之间16次达到显著差异的数据对比中，MON 88017的分析值全部落在以4商用玉米杂交种分析值为基础得出的99%容许区间内。因此，这些差异不被认为具有生物学意义。表14至表21列出了秸秆和籽粒相关分析结果的汇总。表22列出了文献发表和历史记载的玉米秸秆和籽粒成分分析值。

根据这些数据和分析，可以认为MON 88017秸秆和籽粒在成分上与非转基因对照和已经商业化应用的其它玉米杂交种没有区别。

表 14. MON 88017 和常规玉米在各试验点的次生代谢产物和抗营养因子含量分析

成分(单位) ^a	MON 88017 平均 ± S.E. (范围)	非转基因对照 平均 ± S.E. (范围)	差异(MON 88017—对照)			商业化玉米(范围) [99% T.I.] ^b
			平均 ± S.E. (范围)	95% CI (下限, 上限)	p-值	
阿魏酸 (μg/g dwt)	2175.34 ± 46.31 (1986.75 - 2275.48)	2121.05 ± 46.31 (1927.55 - 2339.71)	54.29 ± 49.66 (-200.92 - 347.92)	-47.14,155.7 2	0.283	(1717.17 - 2687.57) [1415.19,3173.90]
p-香豆酸 (μg/g dwt)	169.26 ± 7.26 (148.45 - 215.25)	154.83 ± 7.26 (141.41 - 173.24)	14.43 ± 9.88 (-14.72 - 72.55)	-9.75,38.61	0.194	(152.30 - 319.15) [43.13,384.34]
植酸 (% dwt)	0.95 ± 0.043 (0.83 - 1.05)	0.89 ± 0.043 (0.72 - 1.03)	0.058 ± 0.056 (-0.15 - 0.24)	-0.058,0.17	0.309	(0.45 - 1.00) [0.28,1.12]
棉籽糖 (% dwt)	0.17 ± 0.013 (0.14 - 0.20)	0.17 ± 0.013 (0.14 - 0.23)	0.00080 ± 0.0081 (-0.035 - 0.036)	-0.019,0.021	0.924	(0.073 - 0.22) [0,0.32]

^a dwt=干重；S.E.= 标准差；C.I.= 置信区间；T.I.= 容许区间；

^b 95%置信区间内包括 99%商业化玉米的值。负数被置于 0。

表 15. MON 88017 和非转基因对照玉米秸秆成分分析比较（全部试验点汇总）

组成 (单位) ^a	MON 88017 平均值 ± S.E. (范围)	对照 平均值 ± S.E. (范围)	差值 (MON 88017—对照)			商业化玉米(范围) [99% T.I.] ^b
			平均值 ± S.E. (范围)	95% C.I. (下限, 上限)	p-值 e	
灰份(% dwt)	3.99 ± 0.24 (3.30 - 5.53)	4.04 ± 0.24 (3.59 - 4.67)	-0.051 ± 0.28 (-1.37 - 1.55)	-0.74,0.64	0.861	(2.62 - 6.78) [0.72,7.42]
碳水化合物 (% dwt)	86.19 ± 0.62 (83.54 - 87.88)	86.48 ± 0.62 (84.43 - 87.71)	-0.29 ± 0.40 (-2.58 - 1.73)	-1.11,0.54	0.478	(81.86 - 89.90) [78.70,93.43]
总脂肪 (% dwt)	1.61 ± 0.29 (0.80 - 3.13)	1.65 ± 0.29 (0.83 - 2.97)	-0.039 ± 0.25 (-1.47 - 1.99)	-0.56,0.48	0.878	(0.69 - 2.92) [0.80,2.95]
水份 (% fw)	70.86 ± 0.66 (68.50 - 72.70)	70.66 ± 0.66 (69.10 - 72.70)	0.20 ± 0.39 (-1.40 - 1.90)	-0.61,1.01	0.615	(65.20 - 78.60) [59.37,80.83]
蛋白质 (% dwt)	8.20 ± 0.31 (7.44 - 8.97)	7.82 ± 0.31 (6.79 - 8.54)	0.38 ± 0.25 (-0.99 - 1.65)	-0.13,0.88	0.137	(6.31 - 9.96) [4.17,11.81]
ADF (% dwt)	26.54 ± 1.25 (24.29 - 29.97)	25.45 ± 1.25 (23.34 - 28.13)	1.10 ± 1.76 (-2.58 - 4.08)	-2.97,5.16	0.549	(19.16 - 35.55) [13.95,38.96]
NDF (% dwt)	37.34 ± 1.22 (33.44 - 45.05)	38.33 ± 1.22 (35.86 - 41.18)	-0.99 ± 1.42 (-4.63 - 6.97)	-3.90,1.91	0.490	(30.27 - 57.93) [23.80,54.73]
钾 (% dwt)	0.22 ± 0.014 (0.19 - 0.26)	0.23 ± 0.014 (0.18 - 0.31)	-0.0092 ± 0.014 (-0.054 - 0.024)	-0.044,0.026	0.542	(0.13 - 0.32) [0.11,0.32]
磷 (% dwt)	0.25 ± 0.011 (0.21 - 0.30)	0.25 ± 0.011 (0.20 - 0.30)	0.0017 ± 0.013 (-0.060 - 0.079)	-0.029,0.032	0.899	(0.16 - 0.31) [0.095,0.38]

^a dwt=干重；S.E.= 平均数标准差；C.I.= 置信区间；T.I.= 容许区间；

^b 95%置信区间内包括 99%商业化玉米的值。负数被置于 0。

表 16. MON 88017 和非转基因对照玉米籽粒氨基酸分析比较（全部试验点汇总）

成分 (单位) ^a	MON 88017 平均值 ± S.E. (范围)	非转基因对照 平均值 ± S.E. (范围)	差异 (MON 88017—对照)			商业化玉米 (范围) [99% T.I.] ^b
			平均值 ± S.E. (范围)	95% C.I. (下限, 上限)	p-值	
丙氨酸 (% total AA)	7.55 ± 0.084 (7.29 - 7.70)	7.55 ± 0.084 (7.34 - 7.79)	-0.0026 ± 0.039 (-0.19 - 0.18)	-0.097,0.092	0.949	(7.24 - 8.16) [6.66,8.49]
精氨酸 (% total AA)	4.42 ± 0.11 (4.10 - 4.74)	4.29 ± 0.11 (4.01 - 4.63)	0.13 ± 0.060 (-0.12 - 0.36)	-0.013,0.28	0.066	(3.72 - 5.08) [3.34,5.67]
天冬氨酸 (% total AA)	6.22 ± 0.050 (6.09 - 6.34)	6.25 ± 0.050 (6.04 - 6.45)	-0.032 ± 0.067 (-0.34 - 0.18)	-0.20,0.13	0.648	(6.18 - 6.81) [5.77,7.16]
胱氨酸 (% total AA)	2.14 ± 0.054 (1.93 - 2.26)	2.15 ± 0.054 (1.93 - 2.30)	-0.013 ± 0.042 (-0.20 - 0.17)	-0.098,0.073	0.766	(1.82 - 2.58) [1.46,2.89]
谷氨酸 (% total AA)	20.40 ± 0.18 (19.80 - 20.87)	20.44 ± 0.18 (19.91 - 20.84)	-0.036 ± 0.086 (-0.52 - 0.48)	-0.25,0.17	0.686	(19.46 - 21.57) [18.01,22.15]
甘氨酸 (% total AA)	3.45 ± 0.063 (3.32 - 3.62)	3.45 ± 0.063 (3.18 - 3.61)	0.0061 ± 0.031 (-0.081 - 0.19)	-0.058,0.070	0.844	(3.29 - 4.03) [2.81,4.54]
组氨酸 (% total AA)	2.99 ± 0.049 (2.90 - 3.10)	2.95 ± 0.049 (2.83 - 3.14)	0.032 ± 0.022 (-0.056 - 0.10)	-0.023,0.087	0.200	(2.50 - 3.12) [2.16,3.60]
异亮氨酸 (% total AA)	3.59 ± 0.037 (3.43 - 3.71)	3.57 ± 0.037 (3.45 - 3.76)	0.025 ± 0.044 (-0.15 - 0.25)	-0.065,0.11	0.577	(3.39 - 3.79) [3.30,3.84]
亮氨酸 (% total AA)	13.28 ± 0.20 (12.69 - 13.62)	13.31 ± 0.20 (12.76 - 14.11)	-0.037 ± 0.098 (-0.69 - 0.56)	-0.28,0.20	0.717	(12.11 - 14.35) [10.72,15.18]

^a AA=氨基酸; S.E.= 平均数的标准差; C.I.= 置信区间; T.I.= 容许区间;

^b 95%置信区间内包括 99%商业化玉米的值。负数被置于 0。

表 16（续）。 MON 88017 和非转基因对照玉米籽粒氨基酸分析比较（全部试验点汇总）

成分 (单位) ^a	MON 88017 平均值 ± S.E. (范围)	非转基因对照 平均值 ± S.E. (范围)	差异 (MON 88017—对照)			商业化玉米 (范围) [99% T.I.]
			平均值 ± S.E. (范围)	95% C.I. (下限, 上限)	p-值	
赖氨酸 Lysine (% total AA)	2.69 ± 0.058 (2.42 - 2.87)	2.66 ± 0.058 (2.49 - 2.82)	0.024 ± 0.047 (-0.072 - 0.11)	-0.074,0.12	0.614	(2.44 - 3.27) [2.06,3.73]
蛋氨酸 (% total AA)	1.98 ± 0.059 (1.85 - 2.05)	2.01 ± 0.059 (1.83 - 2.20)	-0.030 ± 0.043 (-0.15 - 0.12)	-0.14,0.076	0.515	(1.70 - 2.47) [1.37,2.60]
苯丙氨酸 (% total AA)	5.18 ± 0.059 (4.97 - 5.31)	5.14 ± 0.059 (5.01 - 5.32)	0.035 ± 0.055 (-0.13 - 0.25)	-0.10,0.17	0.545	(4.82 - 5.39) [4.57,5.71]
脯氨酸 (% total AA)	9.39 ± 0.094 (9.02 - 9.69)	9.34 ± 0.094 (8.85 - 9.80)	0.046 ± 0.11 (-0.61 - 0.71)	-0.18,0.27	0.676	(8.35 - 9.72) [7.60,10.37]
丝氨酸 Serine (% total AA)	4.83 ± 0.049 (4.65 - 5.04)	4.91 ± 0.049 (4.63 - 5.13)	-0.081 ± 0.068 (-0.47 - 0.42)	-0.22,0.059	0.244	(4.81 - 5.23) [4.60,5.43]
苏氨酸 (% total AA)	3.22 ± 0.040 (3.10 - 3.38)	3.25 ± 0.040 (3.06 - 3.37)	-0.026 ± 0.045 (-0.25 - 0.24)	-0.12,0.067	0.572	(2.96 - 3.55) [2.89,3.84]
色氨酸 (% total AA)	0.54 ± 0.027 (0.48 - 0.60)	0.55 ± 0.027 (0.41 - 0.68)	-0.0090 ± 0.018 (-0.17 - 0.096)	-0.046,0.028	0.627	(0.44 - 0.83) [0.36,0.77]
酪氨酸 (% total AA)	3.35 ± 0.16 (2.35 - 3.66)	3.43 ± 0.16 (2.58 - 3.66)	-0.079 ± 0.23 (-1.18 - 0.98)	-0.61,0.46	0.743	(2.26 - 3.80) [2.62,4.26]
缬氨酸 Valine (% total AA)	4.79 ± 0.039 (4.60 - 4.92)	4.74 ± 0.039 (4.60 - 4.94)	0.043 ± 0.052 (-0.25 - 0.26)	-0.064,0.15	0.414	(4.44 - 5.04) [4.22,5.27]

^a AA=氨基酸；S.E.= 平均数的标准差；C.I.= 置信区间；T.I.= 容许区间；

^b 95%置信区间内包括 99%商业化玉米的值。负数被置于 0。

表 17. MON 88017 和非转基因对照玉米籽粒脂肪酸分析比较（全部试验点汇总）

成分 (单位) ^a	MON 88017 平均值 ± S.E. (范围)	非转基因对照 平均值 ± S.E. (范围)	差异 (MON 88017—对照)			商业化玉米 (范围) [99% T.I.]
			平均值 ± S.E. (范围)	95% C.I. (下限, 上限)	p-值	
16:0 棕榈酸 (% total FA)	10.24 ± 0.43 (10.07 - 10.52)	11.27 ± 0.43 (10.14 - 14.57)	-1.03 ± 0.60 (-4.35 - 0.36)	-2.42,0.37	0.128	(9.29 - 17.81) [6.51,16.50]
16:1 棕榈油酸c (% total FA)	0.18 ± 0.010 (0.16 - 0.21)	0.18 ± 0.010 (0.16 - 0.22)	-0.0030 ± 0.0064 (-0.029 - 0.025)	-0.019,0.013	0.655	(0.054 - 0.21) [0.0017,0.28]
18:0 硬脂酸 (% total FA)	2.01 ± 0.073 (1.80 - 2.19)	2.07 ± 0.073 (1.76 - 2.23)	-0.052 ± 0.046 (-0.28 - 0.25)	-0.15,0.042	0.266	(1.68 - 2.30) [1.41,2.53]
18:1 油酸 (% total FA)	22.74 ± 0.23 (22.20 - 23.53)	22.87 ± 0.23 (21.43 - 23.51)	-0.13 ± 0.24 (-0.94 - 1.13)	-0.71,0.46	0.613	(19.79 - 34.46) [9.25,44.14]
18:2 亚油酸 (% total FA)	62.85 ± 0.39 (61.86 - 63.72)	61.52 ± 0.39 (59.10 - 63.18)	1.34 ± 0.53 (-0.64 - 4.19)	0.093,2.58	0.038	(51.64 - 64.12) [41.22,74.09]
18:3 亚油酸 (% total FA)	1.21 ± 0.062 (1.15 - 1.26)	1.32 ± 0.062 (1.19 - 1.77)	-0.11 ± 0.077 (-0.53 - 0.043)	-0.30,0.079	0.205	(0.84 - 1.91) [0.42,1.95]
20:0 花生酸 (% total FA)	0.37 ± 0.010 (0.35 - 0.39)	0.38 ± 0.010 (0.35 - 0.41)	-0.0085 ± 0.0032 (-0.028 - 0.0088)	-0.015,-0.0019	0.012	(0.36 - 0.45) [0.31,0.49]
20:1 二十碳烯酸(% total FA)	0.24 ± 0.0056 (0.23 - 0.26)	0.25 ± 0.0056 (0.24 - 0.26)	-0.0034 ± 0.0034 (-0.019 - 0.019)	-0.010,0.0036	0.323	(0.24 - 0.36) [0.18,0.40]
22:0 山油酸 (% total FA)	0.15 ± 0.0027 (0.14 - 0.16)	0.15 ± 0.0027 (0.14 - 0.17)	-0.0062 ± 0.0038 (-0.018 - 0.014)	-0.014,0.0016	0.116	(0.074 - 0.24) [0.071,0.25]

^a FA= 脂肪酸; S.E.= 平均数的标准差; C.I.= 置信区间; T.I.= 容许区间;

^b 95%置信区间内包括 99%商业化玉米的值。负数被置于 0。

表 18. MON 88017 和非转基因对照玉米籽粒矿物质分析比较（全部试验点汇总）

成分 (单位) ^a	MON 88017 平均值 ± S.E. (范围)	非转基因对照 平均值 ± S.E. (范围)	差异 (MON 88017—对照)			商业化玉米 (范围) [99% T.I.]
			平均值 ± S.E. (范围)	95% C.I. (下限, 上限)	p-值	
钙 Calcium (% dwt)	0.0054 ± 0.00035 (0.0047 - 0.0060)	0.0058 ± 0.00035 (0.0049 - 0.0069)	-0.00040 ± 0.00025 (-0.0013 - -0.00006)	-0.0010,0.00021	0.159	(0.0032 - 0.0060) [0.0017,0.0062]
铜 Copper (mg/kg dwt)	1.73 ± 0.086 (1.48 - 2.05)	1.99 ± 0.086 (1.64 - 2.63)	-0.26 ± 0.12 (-0.95 - 0.41)	-0.54,0.016	0.061	(1.01 - 2.34) [0.17,3.00]
铁 Iron (mg/kg dwt)	21.51 ± 0.59 (20.07 - 22.92)	21.84 ± 0.59 (20.31 - 23.93)	-0.33 ± 0.62 (-2.16 - 2.12)	-1.60,0.93	0.595	(16.42 - 26.03) [12.60,31.26]
镁Magnesium (% dwt)	0.14 ± 0.0034 (0.13 - 0.15)	0.14 ± 0.0034 (0.13 - 0.16)	-0.0022 ± 0.0044 (-0.024 - 0.018)	-0.011,0.0069	0.618	(0.10 - 0.14) [0.088,0.16]
锰 Manganese (mg/kg dwt)	9.72 ± 0.38 (9.01 - 10.76)	9.37 ± 0.38 (7.55 - 10.44)	0.35 ± 0.38 (-0.39 - 1.56)	-0.57,1.27	0.384	(4.96 - 9.81) [2.45,10.60]
磷 Phosphorus (% dwt)	0.39 ± 0.010 (0.37 - 0.41)	0.39 ± 0.010 (0.36 - 0.43)	-0.0042 ± 0.013 (-0.052 - 0.042)	-0.032,0.023	0.754	(0.28 - 0.41) [0.24,0.44]
钾 Potassium (% dwt)	0.41 ± 0.012 (0.39 - 0.44)	0.42 ± 0.012 (0.38 - 0.47)	-0.0063 ± 0.012 (-0.052 - 0.037)	-0.030,0.018	0.592	(0.29 - 0.43) [0.27,0.48]
锌 Zinc (mg/kg dwt)	24.53 ± 0.98 (22.31 - 27.27)	24.92 ± 0.98 (22.02 - 27.18)	-0.39 ± 0.62 (-3.87 - 1.90)	-1.67,0.89	0.534	(17.15 - 26.18) [13.42,31.37]

^a dwt=干重；S.E.= 平均数标准差；C.I.= 置信区间；T.I.= 容许区间；

^b 95%置信区间内包括 99%商业化玉米的值。负数被置于 0。

表 19. MON 88017 和非转基因对照玉米籽粒营养成分和纤维分析比较（全部试验点汇总）

成分 (单位) ^a	MON 88017 平均值 ± S.E. (范围)	非转基因对照 平均值 ± S.E. (范围)	差异 (MON 88017—对照)			商业化玉米 (范围) [99% T.I.]
			平均值 ± S.E. (范围)	95% C.I. (下限, 上限)	p-值	
灰份 Ash (% dwt)	1.54 ± 0.077 (1.31 - 1.68)	1.59 ± 0.077 (1.23 - 1.97)	-0.049 ± 0.087 (-0.45 - 0.43)	-0.23,0.13	0.573	(1.04 - 1.86) [0.94,1.73]
碳水化合物 (% dwt)	82.32 ± 0.40 (81.61 - 83.39)	82.33 ± 0.40 (80.67 - 83.62)	-0.019 ± 0.25 (-1.39 - 0.94)	-0.62,0.58	0.940	(81.46 - 86.68) [79.39,89.67]
总脂肪 (% dwt)	3.64 ± 0.13 (3.44 - 3.96)	3.79 ± 0.13 (3.53 - 4.36)	-0.16 ± 0.080 (-0.63 - 0.15)	-0.35,0.041	0.100	(2.38 - 4.43) [0.74,6.01]
水份 (% fw)	11.10 ± 0.99 (9.03 - 13.20)	11.60 ± 0.99 (9.73 - 14.20)	-0.49 ± 0.35 (-1.10 - -0.10)	-1.36,0.37	0.212	(9.15 - 14.90) [4.67,17.56]
蛋白质 Protein (% dwt)	12.51 ± 0.35 (11.63 - 13.00)	12.28 ± 0.35 (11.22 - 13.82)	0.23 ± 0.24 (-0.82 - 1.37)	-0.36,0.82	0.379	(9.26 - 13.37) [6.20,15.35]
ADF (% dwt)	3.77 ± 0.16 (3.31 - 4.40)	3.54 ± 0.16 (2.97 - 4.69)	0.23 ± 0.18 (-0.62 - 1.16)	-0.13,0.59	0.203	(2.39 - 4.89) [1.89,5.23]
NDF (% dwt)	12.44 ± 0.62 (10.99 - 13.58)	11.87 ± 0.62 (10.38 - 14.29)	0.57 ± 0.50 (-1.21 - 2.64)	-0.66,1.79	0.299	(8.41 - 16.54) [3.51,21.65]
TDF (% dwt)	16.24 ± 0.71 (13.57 - 18.64)	15.40 ± 0.71 (13.18 - 17.84)	0.84 ± 0.96 (-2.39 - 4.19)	-1.51,3.20	0.414	(11.80 - 23.04) [5.72,27.10]

^a ADF = 酸性洗涤纤维；NDF = 中性洗涤纤维；TDF = 总可食性纤维；S.E.= 平均数标准差；C.I.= 置信区间；T.I.= 容许区间；

^b 95%置信区间内包括 99%商业化玉米的值。负数被置于 0。

表 20. MON 88017 和非转基因对照玉米籽粒维生素分析比较（全部试验点汇总）

成分 (单位) ^a	MON 88017 平均值 ± S.E. (范围)	非转基因对照 平均值 ± S.E. (范围)	差异 (MON 88017—对照)			商业化玉米 (范围) [99% T.I.]
			平均值 ± S.E. (范围)	95% C.I. (下限, 上限)	p-值	
叶酸 (mg/kg dwt)	0.48 ± 0.021 (0.38 - 0.60)	0.48 ± 0.021 (0.42 - 0.59)	0.0012 ± 0.030 (-0.074 - 0.11)	-0.072,0.075	0.969	(0.28 - 0.61) [0.12,0.77]
烟酸 (mg/kg dwt)	20.94 ± 1.20 (17.04 - 24.14)	21.75 ± 1.20 (19.08 - 23.92)	-0.81 ± 0.42 (-2.04 - 0.23)	-1.67,0.050	0.063	(14.11 - 27.77) [3.19,34.49]
维生素 B ₁ (mg/kg dwt)	2.47 ± 0.14 (2.30 - 2.69)	3.24 ± 0.14 (2.99 - 3.60)	-0.77 ± 0.12 (-1.02 - -0.35)	-1.06,-0.48	<0.001	(2.69 - 3.73) [1.96,4.38]
维生素 B ₂ (mg/kg dwt)	1.10 ± 0.041 (0.98 - 1.22)	1.13 ± 0.041 (0.99 - 1.33)	-0.025 ± 0.037 (-0.17 - 0.14)	-0.12,0.066	0.524	(0.88 - 1.32) [0.67,1.51]
维生素 B ₆ (mg/kg dwt)	7.16 ± 0.22 (6.57 - 8.06)	7.10 ± 0.22 (5.65 - 8.54)	0.063 ± 0.28 (-1.27 - 2.40)	-0.59,0.72	0.828	(4.93 - 7.24) [4.29,7.84]
维生素 E (mg/kg dwt)	14.15 ± 1.70 (6.08 - 16.93)	14.07 ± 1.70 (1.74 - 17.77)	0.070 ± 1.46 (-11.15 - 14.39)	-2.93,3.07	0.962	(8.09 - 21.97) [0,29.69]

^a dwt=干重；S.E.= 平均数标准差； C.I.= 置信区间； T.I.= 容许区间；

^b 95%置信区间内包括 99%商业化玉米的值。负数被置于 0。

表 21. MON 88017 和非转基因对照玉米具有统计学显著差异的成分汇总

组织/地点/检测的成份 (单位) ^a	MON 88017 平均值	对照 平均值	均差(对照值的%)	显著性 (p-值)	MON 88017 (范围)	99% 容许区间 ^b
籽粒						
依阿华州 (IA)						
16:0 棕榈酸 (% total FA)	10.16	12.94	-21.50	0.029	(10.11-10.23)	[6.51, 16.50]
18:2 亚油酸 (% total FA)	63.25	60.41	4.70	0.017	(62.73-63.72)	[41.22, 74.09]
18:3 亚油酸 (% total FA)	1.25	1.57	-20.26	0.036	(1.24-1.26)	[0.42, 1.95]
蛋氨酸 (% total AA)	2.02	2.16	-6.39	<0.001	(1.96-2.05)	[1.37, 2.60]
水份 (% fw)	9.38	9.93	-5.54	0.034	(9.03-9.70)	[4.67, 17.56]
维生素 B ₁ (mg/kg dwt)	2.54	3.07	-17.37	<0.001	(2.42-2.65)	[1.96, 4.38]
依利诺斯州 (IL)						
18:1 油酸 (% total FA)	22.53	23.29	-3.26	<0.001	(22.50-22.56)	[9.25, 44.14]
18:2 亚油酸 (% total FA)	63.11	62.15	1.55	0.003	(62.84-63.29)	[41.22, 74.09]
烟酸 (mg/kg dwt)	21.10	22.52	-6.30	0.014	(20.39-21.52)	[3.19, 34.49]
维生素 B ₁ (mg/kg dwt)	2.30	3.10	-25.63	<0.001	(2.30-2.30)	[1.96, 4.38]
内布拉斯加州 (NE)						
铜 Copper (mg/kg dwt)	1.57	2.21	-28.80	0.023	(1.48-1.68)	[0.17, 3.00]
丝氨酸 (% total AA)	4.80	4.97	-3.37	0.042	(4.80-4.81)	[4.60, 5.43]
维生素 B ₁ (mg/kg dwt)	2.58	3.56	-27.53	<0.001	(2.47-2.69)	[1.96, 4.38]
所有试验地点综合						
18:2 亚油酸 (% total FA)	62.85	61.52	2.17	0.038	(61.86-63.72)	[41.22, 74.09]
20:0 花生酸 (% total FA)	0.37	0.38	-2.24	0.012	(0.35-0.39)	[0.31, 0.49]
维生素 B ₁ (mg/kg dwt)	2.47	3.24	-23.72	<0.001	(2.30-2.69)	[1.96, 4.38]

^a dwt = 干重; fw = 鲜重; AA = 氨基酸; FA = 脂肪酸;

^b 95%置信区间内包括 99%商业化玉米的值。负数被置于 0。

表 22. 玉米植株和籽粒中各种成分的文献发表的数值范围和历史记载的数值范围

组织/成分 ¹	文献数据 ²	历史数据 ³
叶片		
营养成分 (% dwt)		
灰份	2.43-9.64 ^a ; 2-6.6 ^b	2.03-8.23
碳水化合物	83.2-91.6 ^b ; 76.5-87.3 ^a	80.6-90.8
总脂肪FI	0.35-3.62 ^b ; 1.42-4.57 ^a	0.61-4.02
水份 (% fw)	56.5-80.4 ^a ; 55.3-75.3 ^b	42-78.8
蛋白质	4.98-11.56 ^a	3.86-11.0
纤维 (% dwt)		
酸性洗涤纤维 (ADF)	18.3-41.0b; 17.5-38.3a	17.6-36.7
中性洗涤纤维 (NDF)	26.4-54.5b; 27.9-54.8a	29.6-55.2
矿物质 (% dwt)		
钙	0.0969-0.3184b	0.0866-0.2754
磷	0.1367-0.2914b	0.1602-0.2914
籽粒		
营养成分 (% dwt)		
灰份	1.1-3.9d; 0.89-6.28b	0.81-3.09
碳水化合物	77.4-87.2b; 82.2-88.1a	79.8-89.6
总脂肪	3.1-5.7d; 2.48-4.81b	1.74-4.83
水份 (% fw)	7-23d; 8.18-26.2b	6.07-24.7
蛋白质	6-12d; 9.7-16.1c	6.15-14.8
纤维 (% dwt)		
酸性洗涤纤维 (ADF)	3.3-4.3d; 2.46-11.34a,b	2.3-9.33
中性洗涤纤维 (NDF)	8.3-11.9d; 7.58-15.91b	6.88-18.1
总食用纤维 (TDF)	10.99-11.41h	-

¹ fw=鲜重; dw=干重;

² 文献值范围参考: ^aRidley et al., 2002. ^bSidhu et al., 2000. ^cJugenheimer, 1976. ^dWatson, 1987. ^eWatson, 1982. ^fClassen et al., 1990. ^gDowd and Vega, 1996. ^hChoi et al., 1999.

³ 历史记载范围来源于孟山都公司以前进行的所有分析结果

换算: % dw x 10⁴ = µg/g dw; mg/g dw x 10³ = mg/kg dw; mg/100g dw x 10 = mg/kg dw

表 22（续）。玉米植株和籽粒中各种成分的文献发表的数值范围和历史记载的数值范围

组织/检测成份 ¹	文献数据 ²	历史数据 ³
籽粒		
矿物质		
钙 (% dwt)	0.01-0.1d	0.0024-0.0089
铜 (mg/kg dwt)	0.9-10d	0.98-3.43
铁 (mg/kg dwt)	1-100d	10.4-30.7
镁 (% dwt)	0.09-1d	0.082-0.16
锰 (mg/kg dwt)	0.7-54d	3.2-9.89
磷 (% dwt)	0.26-0.75d	0.24-0.46
钾 (% dwt)	0.32-0.72d	0.29-0.53
锌 (mg/kg dwt)	12-30d	14.1-37.2
氨基酸	(% total protein)	(% total amino acid)
丙氨酸Alanine	6.4-9.9e	7.06-8.19
精氨酸Arginine	2.9-5.9e	3.49-5.48
天冬氨酸Aspartic acid	5.8-7.2e	5.97-7.36
胱氨酸Cystine	1.2-1.6e	1.61-2.94
谷氨酸Glutamic acid	12.4-19.6e	17.3-20.4
甘氨酸Glycine	2.6-4.7e	3.22-4.91
组氨酸Histidine	2.0-2.8e	2.46-3.35
异亮氨酸Isoleucine	2.6-4.0e	2.95-4.08
亮氨酸Leucine	7.8-15.2e	11.2-14.6
赖氨酸Lysine	2.0-3.8e	2.35-4.18
蛋氨酸Methionine	1.0-2.1e	1.61-2.89
苯丙氨酸Phenylalanine	2.9-5.7e	4.6-5.76
脯氨酸Proline	6.6-10.3e	8.03-9.9
丝氨酸Serine	4.2-5.5e	3.45-5.63
苏氨酸Threonine	2.9-3.9e	2.87-4.01
色氨酸Tryptophan	0.5-1.2e	0.39-1.04
酪氨酸Tyrosine	2.9-4.7e	1.93-4.32
缬氨酸Valine	2.1-5.2e	3.94-5.46

¹ fw=鲜重；dw=干重；

² 文献值范围参考：^aRidley et al., 2002. ^bSidhu et al., 2000. ^cJugenheimer, 1976. ^dWatson, 1987. ^eWatson, 1982. ^fClassen et al., 1990. ^gDowd and Vega, 1996. ^hChoi et al., 1999.

³ 历史记载范围来源于孟山都公司以前进行的所有分析结果

换算： $\% dw \times 10^4 = \mu g/g dw$; $mg/g dw \times 10^3 = mg/kg dw$; $mg/100g dw \times 10 = mg/kg dw$

表 22（续）。玉米植株和籽粒中各种成分的文献发表的数值范围和历史记载的数值范围

组织/检测成份 1	文献数据 2	历史数据 3
籽粒		
脂肪酸 Fatty Acids	(% total fat)	(% total fatty acid)
16:0 棕榈酸Palmitic	7-19e	8.41-12.5
16:1 棕榈油酸Palmitoleic	1e	0.05-0.18
18:0 硬脂酸Stearic	1-3e	1.33-2.61
18:1 油酸Oleic	20-46e	20.1-37.7
18:2 亚油酸Linoleic	35-70e	48.0-66.1
18:3 亚油酸Linolenic	0.8-2e	0.74-1.45
20:0 花生酸Arachidic	0.1-2e	0.31-0.56
20:1二十碳烯酸Eicosenoic	-	0.15-0.44
22:0 山榆酸Behenic	-	0.075-0.3
维生素 Vitamins	(mg/kg dwt)	
叶酸Folic acid	0.3d	0.33-0.75 µg/g dwt
烟酸Niacin	9.3-70d	-
维生素 B1	3-8.6e	0.2-0.33 mg/100g dwt
维生素 B2	0.25-5.6e	0.83-1.74 µg/g dwt
维生素 B6	5.3d; 9.6e	-
维生素 E	3-12.1e; 17-47d	0.005-0.037 mg/g dwt

¹ fw=鲜重；dw=干重；

² 文献值范围参考：^aRidley et al., 2002. ^bSidhu et al., 2000. ^cJugenheimer, 1976. ^dWatson, 1987. ^eWatson, 1982. ^fClassen et al., 1990. ^gDowd and Vega, 1996. ^hChoi et al., 1999.

³ 历史记载范围来源于孟山都公司以前进行的所有分析结果

换算： % dw x 10⁴ = µg/g dw; mg/g dw x 10³ = mg/kg dw; mg/100g dw x 10 = mg/kg dw

3.3.5 抗生素抗性

转化所用的表达载体质粒PV-ZMIR39不含任何抗生素抗性基因，因此MON 88017也不可能含有抗生素抗性基因。质粒PV-ZMIR39的T-DNA区域外构建有*aad*选择基因（见本申请书安全评价部分的2.4章节和图8），用于细菌和质粒的筛选。但该选择基因并未整合到MON 88017基因组中（见本申请书安全评价部分的2.2.4章节和附件1）。

3.3.6 对人体和食品安全性的其它影响

玉米作为人类食物和动物饲料的用途已经在申请书安全评价部分的第1章讨论过。CP4 EPSPS蛋白和Cry3Bb1蛋白通过食用以MON 88017为原料的食品和饲料暴露给人类和动物。通过人类和动物每日取食玉米的数量以及CP4 EPSPS蛋白和Cry3Bb1蛋白在玉米中的表达水平来计算每日膳食暴露量（daily dietary exposure, DDE）。人类只食用玉米籽粒和玉米籽粒的加工品，而动物则食用籽粒和秸秆饲料。

在美国，成年人平均每天食用0.27克/公斤体重的玉米（包括胚乳的加工品）。该数据是根据CSFII1994—1998美国成年人食物消费调查得出的（Exponent公司—DEEM USTM数据库（7.77版本）。而畜牧业的玉米消费量要高很多。幼猪每日平均食用玉米量为37克/公斤体重（假定饲料中含有60%玉米），成年猪则为23克/公斤体重（假定饲料中含有75%玉米）；4周左右的鸡每日取食平均为57克/公斤体重（假定饲料中含有60%玉米）；产乳期的奶牛（体重约570公斤，每日产奶37公斤）每日平均消费4.4公斤玉米籽粒和10.4公斤的青贮饲料，分别相当于食用7.7克/公斤体重的籽粒和18.2克/公斤体重的青贮饲料（Ouellet et al., 2003）。每日膳食暴露量可以按下述公式计算：

$$DDE = \text{玉米消费量 (g/kg)} \times \text{Cry3Bb1或CP4 EPSPS蛋白含量 (}\mu\text{g/g)}。$$

利用人类和动物消费玉米的上限估计值，可以推算出这两个蛋白的暴露临界值（MOE）。MOE可以定义为由毒理学试验得出的非观察效应水平（NOEL）占DDE的比例，即：

$$MOE = NOEL (\mu\text{g/kg}) \div DDE (\mu\text{g/kg})。$$

暴露量的计算是假定在用玉米加工人类食品的过程中这两种蛋白没有损失，同时还假定用于加工食品的玉米100%为MON 88017（实际上MON 88017极不可能在市场上占到100%）。

CP4 EPSPS蛋白膳食暴露量的估计

MON 88017籽粒中的CP4 EPSPS蛋白的平均水平为5.8 $\mu\text{g/g}$ （干重）（范围为4.1–7.1），而秸秆中的平均水平为57 $\mu\text{g/g}$ （干重）（范围为42–69）（见本申请书安全评价部分第2.6.1章节的表4）。而饲喂大鼠在CP4 EPSPS蛋白的最高剂量达到572 mg/kg（572,000 $\mu\text{g/kg}$ ）时仍未出现不良反应，也就是说CP4 EPSPS蛋白的NOEL为572,000 $\mu\text{g/kg}$ （见前3.3.1部分）。

奶牛的饲料既包括玉米籽粒也包括青贮饲料，因此计算CP4 EPSPS蛋白的暴露量应该将两部分来源都考虑进去。青贮饲料（40%籽粒和60%秸秆）中CP4 EPSPS蛋白平均含量应为36.5 $\mu\text{g/g}$ （5.8 $\mu\text{g/g} \times 40\% + 57 \mu\text{g/g} \times 60\%$ ），而最高含量为44.2 $\mu\text{g/g}$ （7.1 $\mu\text{g/g} \times 40\% + 69 \mu\text{g/g} \times 60\%$ ）。因此，MON 88017产生的CP4 EPSPS蛋白对人类和动物的MOE列于表23。

表 23. MON 88017 作为食品和饲料时 CP4 EPSPS 蛋白和 Cry3Bb1 蛋白的膳食消费暴露临界值

参数	成年人	雏鸡	幼猪	成年猪	奶牛
每日籽粒消费量 (g/kg body wt)	0.27	57	37	23	7.7
每日秸秆消费量 (g/kg body wt)	NA	NA	NA	NA	18.2
CP4 EPSPS					
DDE (mg/ kg body wt/day)	0.0016 (0.0019)*	0.331 (0.405)	0.215 (0.263)	0.133 (0.163)	0.709 (0.859)
MOE	364,331 (301,053)	1,730 (1,413)	2,665 (2,177)	4,287 (3,503)	806.8 (666)
Cry3Bb1					
DDE (mg/ kg body wt/day)	0.0041 (0.0059)	0.855 (1.254)	0.555 (0.814)	0.345 (0.506)	1.262 (1.749)
MOE	470,731 (327,119)	2,257 (1,539)	3,477 (2,371)	5,594 (3,814)	1,529 (1,103)

* 括号内数字表示用蛋白表达范围上限的数值计算的

Cry3Bb1蛋白膳食暴露量的估计

MON 88017籽粒中的Cry3Bb1蛋白的平均水平为15 µg/g（干重）（范围为10–22），而秸秆中的平均水平为95 µg/g（干重）（范围为75–130）（见本申请书安全评价部分第2.6.1章节的表4）。而饲喂大鼠在Cry3Bb1蛋白的最高剂量达到1930 mg/kg(572,000 µg/kg)时仍未出现不良反应，也就是说Cry3Bb1蛋白的NOEL为1,930,000 µg/kg（见前3.3.1部分）。

奶牛的饲料既包括玉米籽粒也包括青贮饲料，因此计算Cry3Bb1蛋白的暴露量应该将两部分来源都考虑进去。青贮饲料（40%籽粒和60%秸秆）中Cry3Bb1蛋白平均含量应为63 µg/g（15 µg/g x 40% + 95 µg/g x 60%），而最高含量为86.8 µg/g（22 µg/g x 40% + 130 µg/g x 60%）。MON 88017产生的Cry3Bb1蛋白对人类和动物的MOE同样列于表23。

中国居民每日膳食玉米暴露水平

翟凤英和杨晓光（2006）调查了中国居民平均玉米膳食消费水平，每标准人日玉米食物的摄入量为9.9克（见本申请书安全评价部分第1.1.7章节的表2）。即使是在玉米消费最高的三类农村每标准人日玉米食物的摄入量为仅19.5克。由此可以看出，中国人的玉米消费水平远低于美国。因此，MOE也会明显低于美国。有关MON 88017如果进口到中国的膳食暴露分析详见技术报告19。

3.4 根据上述评价，参照本办法第十三条有关标准划分转基因植物的安全等级。

MON 88017系采用安全等级为I的常规玉米自交系Hi-II为受体，并经类型2的转化方法转化后获得的。大量的研究表明MON 88017转化事件对人类和动物健康以及对生态环境的安全性的影响与常规玉米品种是一致的。根据《农业转基因生物安全评价管理办法》第二章第十三条的规定，MON 88017转基因植物应该属于安全等级I级。

4 转基因植物产品的安全性评价

4.1 生产、加工活动对转基因植物安全性的影响

玉米的磨粉加工过程可分为湿磨和干磨加工（图 20）。首先将玉米籽粒清洗和浸泡（软化）在水基溶液里，以释放出淀粉。抽走浸渍液，玉米进行磨粉，使胚芽分离开来。然后，浸渍液可用在动物饲料里，也可用于其它产品的发酵。

在胚芽分离的过程中，采用机械和溶剂加工法提取胚芽里的油。玉米离开在水悬液里的胚芽分离器后，进一步研磨，以便从籽粒纤维里释放淀粉和面筋。淀粉和面筋浆液通过管道输入淀粉分离机。纤维和胚芽残渣（废粉片）卖作动物饲料。

密度低于淀粉的面筋（玉米蛋白质）在离心机里同淀粉分开。提取的面筋粉用作家禽饲料和用在宠物食品里。淀粉收集起来，经过冲洗，生产高级淀粉。淀粉或者是经干燥后以专用淀粉上市销售，或者转变成玉米糖浆和其它甜味剂。

不论是湿磨还是干磨，在玉米磨粉过程以及以后的食品加工过程，往往会使玉米籽粒或者面粉经受一定的高温处理或经酸碱溶液处理。经过这样的过程，转基因所带来的新的蛋白含量或者和籽粒中的蛋白含量维持相近，或者会有所降低。因此，对转基因植物的加工过程不会使 MON 88017 及其产品的安全性发生改变，或者使其相对更安全。

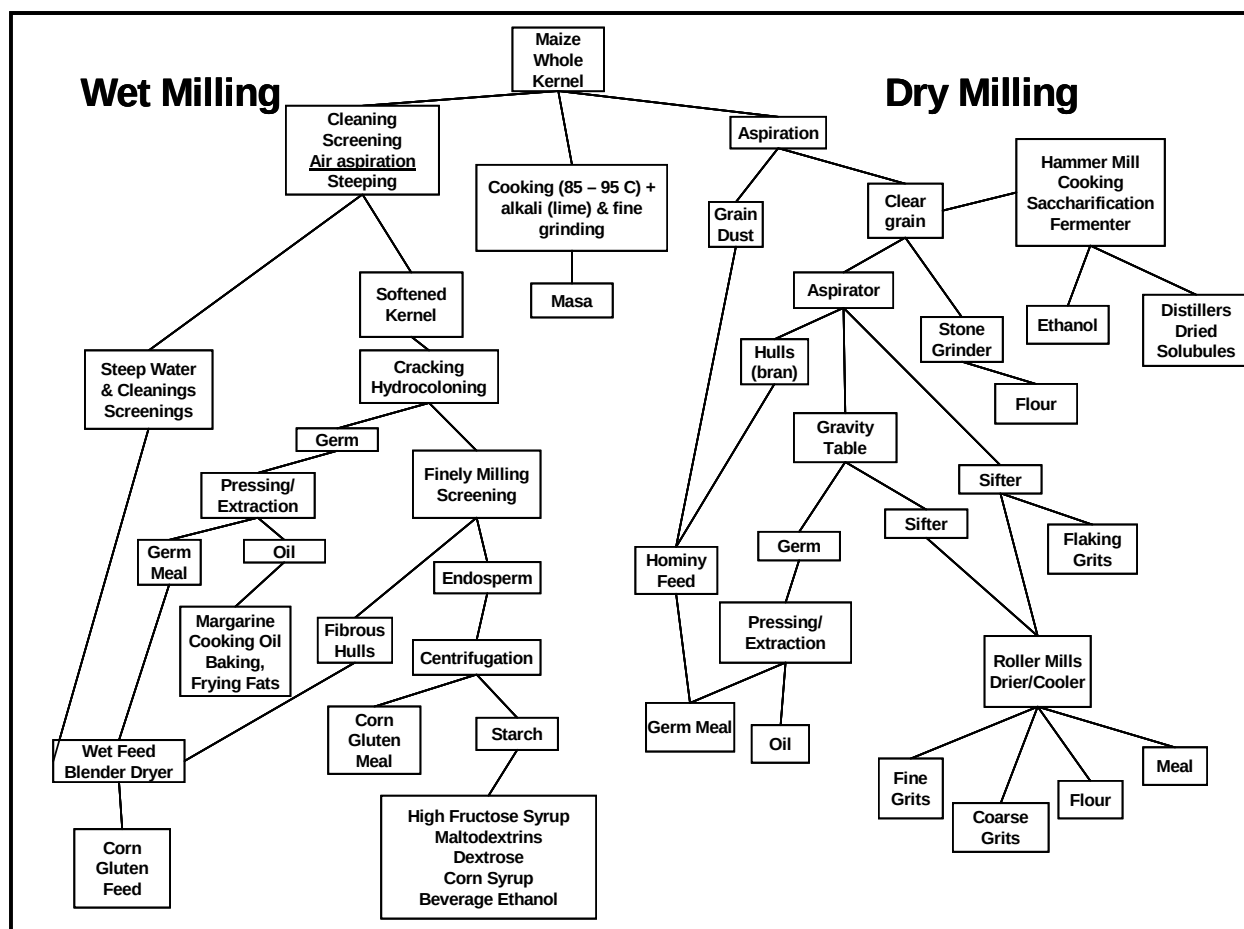


图 20 玉米加工过程

4.2 转基因植物产品的稳定性

MON 88017 玉米与非转基因对照的区别是能产生 CP4 EPSPS 蛋白和 Cry3Bb1 蛋白。而这两种蛋白与转基因植物及产品的稳定性关系不大，因此可以预期 MON 88017 和其加工产品在稳定性方面没有差异。

对 MON 88017 加工产品的稳定性评估可包括加工过程的稳定性和在适当的、代表性胃肠道模拟系统中降解的稳定性。

MON 88017 加工产品在加工过程中稳定性最主要是体现在对加热处理的稳定性。模拟玉米籽粒加工过程中采用的热加工步骤，对 MON 88017 玉米籽粒进行了热处理，热处理采用 206℃ 下 20 分钟（技术报告 20 和技术报告 21）。加热处理后，检测脱脂的 MON 88017 籽粒中 CP4 EPSPS 和 Cry3Bb1 蛋白。结果表明，CP4 EPSPS 蛋白和 Cry3Bb1 蛋白免疫检测水平低于 LOD 下限，说明两种蛋白的经加热后比原来的含量下降 98% 以上。

利用 SDS-PAGE 和 Western Blot 印迹分析法评估 CP4 EPSPS 蛋白在模拟胃液 (SGF) 和 Cry3Bb1 蛋白在 SGF 和模拟肠液 (SIF) 的消化能力的结果表明：在 SGF 里培养 15 秒钟，至少有 95% 的 CP4 EPSPS 蛋白和 98% 的 Cry3Bb1 蛋白被消化；在 SIF 里培养 15 秒钟，至少有 99.5% 的 Cry3Bb1 蛋白被消化掉（详见本申请书安全评价部分第 3.3.2 章节和技术报告 16、17、20 和 21）。

4.3 转基因植物产品与转基因植物在环境安全性方面的差异

表现型和农艺评估的结果表明，MON 88017 同常规玉米相比不具有能导致植物病虫害风险或提高生态学风险的特征。生态学相互作用有关数据表明，MON 88017 不能提高对特定病害、昆虫（除了靶标昆虫）或非生物胁迫的易感性或者抗性。总而言之，这些数据支持下列结论，即 MON 88017 看来不可能提高植物病虫害风险，也不会最终有意义地改变其生态学影响。此外，在各种 MON 88017 的加工产品里不可能存在任何有活力的种子或花粉等，因此进一步降低了转基因植物产品的环境安全性关注的必要性。

如前 4.1 和 4.2 部分所述，通过磨粉、产品加工以及人类和动物肠胃道消化，MON 88017 产品中 CP4 EPSPS 蛋白和 Cry3Bb1 蛋白几乎就没有了。另外转基因植物的加工产品不含任何获得组织和器官，因此就产品比转基因植物本身对环境安全方面的影响更小。

4.4 转基因植物产品与转基因植物在对人体健康的影响方面的差异

如前所述（见本申请书安全评价 3.3 部分），在进行严格的毒理学、免疫学、成分分析和膳食暴露水平的评价和分析基础上，可以得出结论认为 MON 88017 对人类健康和动物安全方面不会造成不良影响。而 MON 88017 的加工产品在加工中采用的加热处理还可以大大降低 CP4 EPSPS 蛋白和 Cry3Bb1 蛋白的含量。因此，加工产品比 MON 88017 对人类健康来说更安全。

4.5 参照本办法第十四条有关标准划分转基因植物产品的安全等级

综上所述，目前玉米所采用的生产加工方法不会影响玉米产品的安全性，因此，根据《农业转基因生物安全评价管理办法》第二章第十四条的规定，本项目转基因植物的产品的安全等级为 I。

参考文献

1. 农业部种植业管理司组编 2004. 中国玉米品质区划及产业布局 pp80-91. 中国农业出版社.
2. 佟屏亚 <http://219.239.34.169/was40/detail?record=27&channelid=21610>.
3. 翟凤英, 杨晓光. 2006. 中国居民营养与健康状况条查报告之二 (2002) —膳食与营养素摄入状况, 人民卫生出版社
4. AACC. 1998. *In Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists*, 9th Edition.
5. Aalberse, R.C. 2000. Structural biology of allergens. *J. Allergy Clin Immunol.* 106:228-38.
6. Aalberse, R.C, J. Akkerdaas, and R. Van Ree. 2001. Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens. *Allergy* 56:478-90.
7. Aebersold, R. 1993. Mass spectrometry of proteins and peptides in biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology.* 4:412-419.
8. Ahrens, W.H. ed. 1994. *Herbicide handbook*, 7th ed. Weed Sci. Soc. Am. Lawrence, KS. 352pp.
9. Anderson, R. A. and S. A. Watson. 1982. The corn milling industry. Pp 31-78. *In CRC Handbook of Processing and Utilization in Agriculture*, Vol. II. Wolff, I. A. (ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida.
10. AOAC International. 2000. *In Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17th Edition. Association of Official Analytical Chemists International, Gaithersburg, Maryland.
11. AOCS. 1997. *In Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society*, 5th Edition. American Oil Chemists Society, Champaign, Illinois.
12. Arfin, S.M. and R.A. Bradshaw. 1988. Cotranslational processing and protein turnover in eucariotic cells. *Biochem.* 27:7984-7990.
13. Armstrong, C.L. and R.L. Phillips. 1988. Genetic and cytogenetic variation in plants regenerated from organogenic and friable, embryogenic tissue cultures of maize. *Crop Sci.* 28:363-369.
14. Astwood, J.D., J.N. Leach, and R.L. Fuchs. 1996. Stability of food allergens to digestions *in vitro*. *Nature Biotechnol.* 14:1269-1273.
15. Bagshaw, R. D., J. W. Callahan, and D. J. Mahuran. 2000. Desalting of in-gel-digested protein sample with mini-C18 columns for matrix-assisted laser desorption ionization time of flight peptide mass fingerprinting. *Anal Biochem* 284:432-435.
16. Bakkeren, G., Z. Koukollkova-Nicola, N. Grimsley and B. Hohn. 1989. Recovery of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA Molecules from Whole Plants Early After Transfer. *Cell* 57: 847-857.
17. Barker, R.F., K.B. Idler, D.V. Thompson, and J.D. Kemp 1983. Nucleotide Sequence of the T-DNA Region from the *Agrobacterium tumefaciens* Octopine Ti Plasmid pTi15955. *Plant Mol. Biol.* 2: 335-350.
18. Baum, J.A., M. Kakefuda, and C. Gawron-Burke. 1996. Engineering *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides with an indigenous site-specific recombination system. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(No.12):4367-4373.
19. Bertolla, F. and P. Simonet. 1999. Horizontal gene transfer in the environment: natural transformation as a putative process for gene transfers between transgenic plants and microorganisms. *Mini Review Res. Microbiol.* 150: 375-384.
20. Betz, F.S., B.G. Hammond, and R.L. Fuchs. 2000. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regulatory Tox. Pharm.* 32:156-173
21. Bevan, M., W M. Barnes and M.D. Chilton. 1983. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucleic Acids Res.* 11(No.2):369-385.

22. Bitzer, R.J., L.D. Buckelew, and L.P. Pedigo. 2000. Effects of transgenic herbicide-resistant soybean varieties and systems on surface-active springtails (*Entognatha: collembola*). *Environ. Entomol.* 31:449-461.
23. Boongird, S., T. Seawannasri, T. Ananachaiyong, and S. Rattithumkul. 2003. Effect of Roundup Ready corn NK603 on foraging behavior and colony development of *Apis mellifera* L. under greenhouse conditions. Pp. 26-27. *In* Proceedings of the Sixth National Plant Protection Conference, November 24-27, 2003.
24. Bravo, A. 1997. Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin family proteins and their functional domains. *J Bacteriol.* 179(No.9):2793-2801.
25. Bradstreet, R.B. 1965. The Kjeldahl Method for Organic Nitrogen, Academic Press, New York, New York.
26. Brobst, K. M. 1972. Gas-liquid Chromatography for Trimethylsilyl Derivatives. *In* Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol. 6. Academic Press: New York, New York.
27. Brookes, Graham and Barfoot, Peter 2006. GM Crops: The First Ten Years-Global Socio-Economic and Environmental Impact. ISAAA Briefs No 36. PG Economics Ltd., UK.
28. Buckelew, L.D., L.P. Pedigo, H. M. Mero, M.D.K. Owen and G.L. Tylka. 2000. Effects of weed management systems on canopy insects in herbicide-resistant soybeans. *J. Econ. Entomol.* 93:1437-1443.
29. Cambier, V., T. Hance, E. De Hoffmann. Variation of DIMBOA and related compounds content in relation to the age and plant organ in maize. *Phytochemistry* 2000; 53: 223-229.
30. Choi-Rhee, E. and J. E. Cronan. 2003. The Biotin Carboxylase-Biotin Carboxyl Carrier Protein Complex of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem* 278(No.33):30806-30812.
31. Choi, I.H., J.H. Son, and K.H. Nahm, 1999. Dietary fiber fraction for grains containing high levels of water-soluble non-starch polysaccharides. *Jpn Poult Sci* 36(4): 269-274.
32. Classen, D., Arnason, J.T., Serratos, J.A., Lambert, J.D.H., Nozzolillo, C., and B.J.R. Philogene. 1990. Correlation of phenolic acid content of maize to resistance to *Sitophilus zeamais*, the maize weevil, in CIMMYT's collections. *J Chem Eco* 16(1 2): 301-315.
33. Codex Alimentarius. 2003. Guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant-DNA plants. CAC/GL 45-2003.
34. Codex Standard. 2005. Codex standard for named vegetable oils. Codex-Stan 210. http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.do?lang=en. [Accessed May 23, 2006].
35. Cort, W.M., T.S. Vincente, E.H. Waysek, and B.D. Williams. 1983. Vitamin E Content of Feedstuffs Determined by High-Performance Liquid Chromatographic Fluorescence. *J Agric Food Chem* 31: 1330-1333.
36. Crickmore, N., D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, and D.H. Dean. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(No.3):807-813.
37. Crockett, L. 1977. Wildly Successful Plants: North American Weeds. University of Hawaii Press, Honolulu, Hawaii.
38. Dahlquist, R.L. and J.W. Knoll. 1978. Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry: Analysis of Biological Materials and Soils for Major, Trace, and Ultra Trace Elements. *Appl Spectroscopy* 32: 1-29.
39. Della-Cioppa, G., S.C. Bauer, B.K. Klein, D.M. Shah, R.T. Fraley, and G.M. Kishore. 1986. Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:6873-6877.
40. Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski, and H.M. Goodman. 1982. Nopaline Synthase: Transcript Mapping and DNA Sequence. *J. Molec. Appl. Genet.* 1(No.6):561-573

41. Doane. 2001. The 2000 AgroTrak study. A syndicated study conducted by Doan Marketing Research, Inc.
42. Doebley J.F. and H.H. Iltis. 1980. Taxonomy of *Zea* (Gramineae). II. A subgeneric classification with key to taxa. *Amer. J. Botany* 67:982-993
43. Donovan, W.P., M.J. Rupa, A.C. Slaney, T. Malvar, M.C. Gawron-Burke, and T.B. Johnson. 1992. Characterization of two genes encoding *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins toxic to *Coleoptera* species. *Appl. Env. Micro.* 58(No.12):3921-3927.
44. Dowd, P.F. and F.E. Vega. 1996. Enzymatic oxidation products of allelochemicals as a basis for resistance against insects: Effects on the corn leafhopper *Dalbulus maidis*. *Natural Toxins* 4: 85-91.
45. Dunfield, K.E. and J.J. Germida. 2003. Seasonal changes in the rhizosphere microbial communities associated with field-grown genetically modified canola (*Brassica napus*). *Appl. Environ. Microbiol.* 69:7310-7318.
46. Ensminger, M.E., J.E. Oldfield and W. W. Heinemann. 1990. Feeds and Nutrition (Second Edition). The Ensminger Publishing Co., Clovis, CA, USA.
47. EPA. 1988. Guidance for the Reregistration of Pesticide Products Containing *Bacillus thuringiensis* as the Active Ingredient. U.S. Environmental Protection Agency. NTIS PB 89-164198.
48. EPA. 1993. Re-registration Eligibility Decision (R.E.D. Facts): Glyphosate. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Washington, D.C.
49. EPA. 1995a. Plant pesticide *Bacillus thuringiensis* CryIIIa delta-endotoxin and the genetic material necessary for its production; Tolerance exemption; Final rule. U. S. Environmental Protection Agency. Fed. Reg. 60:21725.
50. EPA. 1995b. Plant pesticide *Bacillus thuringiensis* CryIA(b) delta-endotoxin and the genetic material necessary for its production (plasmid vector pCIB4431) in corn; Final rule. U.S. Environmental Protection Agency. Fed. Reg. 60:42443.
51. EPA. 1995c. Plant pesticide *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin and the genetic material necessary for its production in cotton; Tolerance exemption; Final rule. U.S. Environmental Protection Agency. Fed. Reg. 60:47871.
52. EPA. 1996. *Bacillus thuringiensis* CryIA(b) delta-endotoxin and the genetic material necessary for its production in all plants; Exemption from requirement of a tolerance; Final rule. U.S. Environmental Protection Agency. Fed. Reg. 61:40340.
53. EPA. 1997. *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* CryIA(c) and the genetic material necessary for its production in all plants; Exemption from the requirement of a tolerance on all raw agricultural commodities; Final rule. U.S. Environmental Protection Agency. Fed. Reg. 62:17720.
54. EPA. 1998. Reregistration Eligibility Decision (R.E.D.) *Bacillus thuringiensis*. U.S. Environmental Protection Agency. EPA738-R-98-004.
55. EPA. 2001a. *Bacillus thuringiensis* Cry3Bb1 and Cry2Ab2 Protein and the Genetic Material Necessary for its Production in Corn and Cotton; Exemption from the Requirement of a Tolerance; Final rule. U.S. Environmental Protection Agency. Fed. Reg. 66(92): 24061-24066.
56. EPA. 2001b. Biopesticide registration action document: *Bacillus thuringiensis* plant-incorporated protectants. U.S. Environmental Protection Agency.
http://www.epa.gov/opbtpd1/biopesticides/pips/bt_brad.htm
57. EPA. 2002a. Biopesticide registration action document: *Bacillus thuringiensis* Cry2Ab protein and its genetic material necessary for its production in cotton.
Amended. http://www.epa.gov/opbtpd1/biopesticides/ingredients/tech_docs/brad_006487.pdf
58. EPA. 2002b. SAP Meeting Minutes No. 2002-05: August 27-29, 2002 FIFRA Scientific Advisory Panel Meeting, Held at the Sheraton Crystal City Hotel, Arlington, Virginia.

59. EPA. 2003a. Biopesticide registration action document: Event MON 863 *Bacillus thuringiensis* Cry3Bb1 corn. Benefits assessment.
http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_006484.htm
60. EPA. 2003b. Notice of filing a pesticide petition to amend 40CFR part 180 by removing the time limitation for the exemption from the requirement of a tolerance for the plant-produced *Bacillus thuringiensis* Cry3Bb1 protein and the genetic material necessary for its production in or on field corn, sweet corn, and popcorn. Fed. Reg. 68(204): 60371-60375.
61. FAO/WHO. 1991. Strategies for assessing the safety of foods produced by biotechnology. Report of joint FAO/WHO consultation. Geneva, 1991.
62. FAO/WHO. 2001. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology. 22-25 January 2001. Rome, Italy.
63. FDA. 1992. Statement of Policy: Foods Derived from New Plant Varieties. U.S. Food and Drug Administration. Fed. Reg. 57:22984-23005.
64. Fling, M., J. Kopf, and C. Richards. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3'(9)-O-nucleotidyltransferase. Nucleic Acids Res. 13(No.19): 7095-7106
65. Fraley, R.T., S.G. Rogers, R.B. Horsch, P.R. Sanders, J.S. Flick, S.P. Adams, M.L. Bittner, L.A. Brand, C.L. Fink, J.S. Fry, G.R. Galluppi, S.B. Goldberg, N.L. Hoffmann, and S.C. Woo. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 80:4803-4807.
66. Franz, J.E., M.K. Mao, and J.A. Sikorski. 1997. Glyphosate: a unique global herbicide. ACS Monograph 189, American Chemical Society, Washington, DC
67. Galinat, W.C. 1988. The origin of corn. Pp 1-31. In Corn and Corn Improvement. Sprague, G.F. and J.W. Dudley (eds.). American Society of Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin.
68. Giesy, J.P., S. Dobson, and K.R. Solomon. 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 167:35-120.
69. Gianessi, L.P. and J.E. Carpenter. 2000. Agricultural Biotechnology: Benefits of transgenic soybeans. National Center for Food and Agricultural Policy.
70. Gianessi, L.P., C. S. Silvers, S. Sankula, and J. E. Carpenter. 2002. Plant Biotechnology: Current and Potential Impact For Improving Pest Management in U.S. Agriculture. An analysis of 40 case studies. National Center for Food & Agricultural Policy, Washington, D.C.
71. Giza, P.E. and R.C. Huang. 1989. A self-inducing runaway-replication plasmid expression system utilizing the Rop protein. Gene 78: 73-84.
72. Goldstein, S.M. 2003. Life History Observations of Three Generations of *Folsomia candida* (Willem) (*Colembola: Isotomidae*) Fed Yeast and Roundup Ready Soybeans and Corn. P. 83. Masters Thesis. Michigan State University.
73. Gonzalez, J. and J. Corral. 1997. Pp 18-39. Teosinte distribution in Mexico. In Proceedings of a Forum: Gene Flow Among Maize Landraces, Improved Maize Varieties, and Teosinte: Implications for Transgenic Maize. Serratos, J.A., M.C. Willcox, and F. Castillo (eds.). INIFAP, CIMMYT and CNBA, Mexico.
74. Goodman, M.M. 1988. The history and evolution of maize. CRC Critical Rev. Plant Sciences 7:197-220
75. Goodman, M.M. and W.L. Brown. 1988. Races of corn. Pp 33-79. In Corn and corn improvement. Sprague, G.F. and J.W. Dudley (eds.). American Society of Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Society of America. Madison, Wisconsin.
76. Görisch, H. 1988. Drop dialysis: time course of salt and protein exchange. Anal Biochem 173:393-398.

77. Gould, F.W. 1968. Grass systematics. McGraw Hill, New York.
78. Hagermann, A.E. and R. L. Nicholson. 1982. High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Hydroxycinnamic Acids in Maize Mesocotyl. J. Agric. Food Chem. 30: 1098-1102.
79. Hanway, J.J. and S.W. Ritchie. 1982. How a Corn Plant Develops. Spec. Rep. No. 48. Iowa State Univ. Coop. Extension Service, Ames, Iowa.
80. Harrison, L.A., M.R. Bailey, M.W., Naylor, J.E., Ream, B.G. Hammond, D.L. Nida, B.L. Burnette, T.E. Nickson, T.A. Mitsky, M.L. Taylor, R.L. Fuchs, and S.R. Padgett. 1996. The expressed protein in glyphosate-tolerant soybean, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp. strain CP4, is rapidly digested *in vitro* and is not toxic to acutely gavaged mice. J. Nutr. 126:728-740.
81. Harvey, L.H., T.J. Martin, and D. Seifers. 2003. Effect of Roundup Ready wheat on greenbug, Russian wheat aphid, and wheat curl mite. J. Agri. and Urb. Entomol. (In Press).
82. Haslam, E. 1993. Pp 3-50. Shikimic Acid: Metabolism and Metabolites. John Wiley and Sons: Chichester, England.
83. Hebblethwaite, J.F. 1995. The contribution of no-till to sustainable and environmentally beneficial crop production: a global perspective. Conservation Technology Information Center, West Lafayette, Indiana.
84. Hodge, J. E. 1982. Food and Feed Uses of Corn. Pp 79-87. In CRC Handbook of Processing and Utilization in Agriculture, Vol. II. Part 1. I.A. Wolff (ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida.
85. Hofmann, C., P. Lüthy, R. Hutter, and V. Pliska. 1988a. Binding of the delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). Eur. J. Biochem. 173:85-91.
86. Hofmann, C., H. Y. Vanderbruggen, H. Hofte, J. Van Rie, S. Jansens, and H. Van Mellaert. 1988b. Specificity of *B. thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of high affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 7844-7848.
87. Höfte, H. and H.R. Whitely. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53:242-255.
88. Holm, L., J.V. Pancho, J.P. Herberger, and D.L. Plucknett. 1979. Introduction. Pp. i-vii. A Geographical Atlas of World Weeds. John Wiley and Sons, New York.
89. Hunkapillar, M. W., R. M. Hewick, W. J. Dreyer, and L. E. Hood. 1983. High-sensitivity sequencing with gas-phase sequenator. Methods Enzymol 91:399-413.
90. Huttner, S.L., C. Arntzen, R. Beachy, G. Breuning, E. Nester, C. Qualset, and A. Vidaver. 1992. Revising Oversight of Genetically Modified Plants. *Bio/Technology* 10: 967-971.
91. ILSL-CCD, 2006. International Life Science Institute Crop Composition Database. Version 3.0. Available at: <http://www.cropcomposition.org>.
92. Ishida, Y., H. Saito, S. Ohta, Y. Hiei, T. Komari, and T. Kumashiro. 1996. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Nature Biotechnology 14:745-750.
93. James, C. 2003a. Global review of commercialized transgenic crops: 2002. ISAAA Briefs No. 29. Feature: Bt maize. Ithaca, New York.
94. James, C. 2003b. Preview: Global status of commercialized transgenic crops: 2003. ISAAA Briefs No.30. Ithaca, New York.
95. James, C. 2006. Global Status of Commercialized Biotech/GM crops: 2006. ISAAA Brief No. 35. ISAAA, Ithaca, New York.
96. Jamornman, S., S. Sopa, S. Kumsri, T. Anantachaiyong, and S. Rattithumkul. 2003. Roundup Ready corn NK603 effect on Thai greenlacewing, *Mallada basalis* (Walker) under laboratory

- conditions. Pp. 29-30. In Proceedings of Sixth National. Plant Protection Conference, November 24-27, 2003.
97. Jasinski, J.R., J.B. Easley, C.E. Young, J. Kovach, and H. Willson. 2003. Select nontarget arthropod abundance in transgenic and nontransgenic field crops in Ohio. *Environ. Entomol.* 32:407-4013.
 98. Jefferson, R.A., T.A. Kavanagh and M.W. Bevan. 1986. β -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8447-8451.
 99. Jiménez, C.R., L. Huang, Y. Qui, and A.L. Burlingame. 1998. Pp 16.4.1-5. In-gel digestion of proteins for MALDI-MS fingerprint mapping. *Current Protocols in Protein Science*, Supplement 14.
 100. Jones, S.M., C.F. Magnolfi, S.K. Cooke and H.A. Sampson. 1995. Immunologic cross-reactivity among cereal grains and grasses in children with food hypersensitivity. *J. Allergy and Clinical Immunol.* 96(3): 341-351.
 101. Kay, R., A. Chan, M. Daly, and J. McPherson. 1987. Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236: 1299-1302.
 102. Kalthoff, I.M. and E.B. Sandell. 1948. *Quantitative Inorganic Analysis*, MacMillan, New York, New York.
 103. Kishore, G. and D. Shah. 1988. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Ann. Rev. Biochem.* 57:627-663.
 104. Klee, H.J., Y.M. Muskopf, and C.S. Gasser. 1987. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Mol. Gen. Genet.* 210: 437-442.
 105. Kumudini, S. and T. Tollenaar. 1998. Corn Phenology. Guelph University. <http://www.plant.uoguelph.ca/research/homepages/ttollena/corn.htm> [Accessed August 15, 2006]
 106. Lamppa G., G. Morelli, and N. Chua. 1985. Structure and developmental regulation of a wheat gene encoding the major chlorophyll a/b-binding polypeptide. *Mol. Cell. Biol.* 5 (No.6):1370-1378.
 107. Lavrik, P.B., D.E. Bartnicki, J. Feldman, B.G. Hammond, P.J. Keck, S.L. Love, M.W. Naylor, G.J. Rogan, S.R. Sims, and R.L. Fuchs. 1995. Pp 148-158. Safety assessment of potatoes resistant to Colorado potato beetle. In ACS Symposium Series 605. Genetically Modified Foods. Safety Issues. Engel, K-H, G.R. Takeoka, and Teraniashi (eds.). American Chemical Society, Washington, DC.
 108. Lehrfeld, J. 1989. High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Phytic Acid on a pH-Stable, Macroporous Polymer Column. *Cereal Chem* 66(No.6): 510-515.
 109. Lehrfeld, J. 1994. HPLC Separation and Quantitation of Phytic Acid and Some Inositol Phosphates in Foods: Problem and Solutions. *J Agric Food Chem* 42: 2726-2731.
 110. Liener, I.E. 1983. Naturally Occurring Toxicants in Foods and their Significance in the Human Diet. *Arch. Toxicol.*, Suppl. 6, 153-166.
 111. Little T.M., and F.J. Hills. 1978. Pp 267-282. Analysis of Counts. In *Agricultural Experimentation*. John Wiley & Sons, New York.
 112. Mangelsdorf, P.C. 1974. *Corn--Its Origin, Evolution, and Improvement*. Harvard Univ. Press. Cambridge, Massachusetts.
 113. Mason, B. S. and H. T. Slover. 1971. A Gas Chromatographic Method for the Determination of Sugars in Foods. *J Agric Food Chem* 19:551-554.
 114. Maynard, L.A., J.K. Loosli, H.F. Hintz and R.G. Warner. 1979. *Animal Nutrition* (Seventh Edition). McGraw Hill Book Co. New York, NY., USA.
 115. McClintock, J.T., C.R. Schaffer, and R.D. Sjoblad. 1995. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pest. Sci.* 45:95-105.

116. McElroy, D., W. Zhang, J. Cao, and R. Wu. 1990. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *Plant Cell*. 2:163-171.
117. McElroy, D., A.D. Blowers, B. Jenes, and R. Wu. 1991. Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (*Act1*) 5' region for use in monocot transformation. *Mol. Gen. Genet.* 231:150-160.
118. McElwain, E., and S. Spiker. 1989. A wheat cDNA clone, which is homologous to the 17 kd heat-shock protein gene family of soybean. *Nucl. Acids Res.* 17:1764.
119. McMurray, C.H., W.J. Blanchflower, and D.A. Rice. 1980. Influence of extraction techniques on determination of α -tocopherol in animal feedstuffs. *JAOAC* 63(6): 1258-1261.
120. McPherson, R.M., W.C. Johnson, B.G. Millinix, W.A. Mills and F.S. Peeples. 2003. Influence of herbicide-tolerant soybean production systems on insect pest populations and pest-induced crop damage. *J. Econ. Entomol.* 96:690-698.
121. Metcalfe, D.D., J.D. Astwood, R. Townsend, H.A. Sampson, S.L. Taylor, and R.L. Fuchs. 1996. Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Critical Rev. Food Sci. Nutr.* 36:S165-S186.
122. Metcalf, R.L. 1986. Foreword. Pp vii-xv. *In Methods for the Study of Pest Diabrotica*. Krysan, J.L. and T.A. Miller (eds.). Springer-Verlag, New York.
123. Methods of Analysis for Infant Formulas (1973). Infant Formula Council, Atlanta, Georgia.
124. Muenscher, W.C. 1980. Weeds. 2nd ed. Cornell University Press, New York.
125. Nahas, E. 2001. Pp 1-29. Environmental Monitoring of the Post-Commercialization of the Roundup Ready Soybean in Brazil, Report 2. Microbiological Parameters.
126. NCGA. 2003. The World of Corn. National Corn Growers Association.
<http://www.ncga.com/03world/main/index.html>.
127. Newcomb, M.D. 1995. Corn and animal nutrition in the United States. BNF, U.S. FDA.
128. Nielson, K.M., J.D. van Elsas, and K. Smalla. 2000. Safety issues in antibiotic resistance marker genes in transgenic crops. *Proceedings of the 6th International Feed Production Conference*, Piacenza, 27-28 November 2000, pp. 146-162.
129. Noteborn, H. 1994. Safety assessment strategies for genetically modified plant products. Case study: *Bacillus thuringiensis*-toxin tomato. *In Biosafety of Foods Derived by Modern Biotechnology*. Rack, N. (ed.). BATS, Agency for Biosafety Research and Assessment of Technology Impacts, Basel, Switzerland.
130. NRC (National Research Council). 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle (7th revised Ed.). National Academy Press, Washington D.C., USA..
131. OECD. 1999. Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to glyphosate herbicide. OECD Environmental Health and Safety Publications. Paris ENV/JM/MONO(99)9.
132. OECD. 2002. Consensus document on compositional considerations for new varieties of maize (Zea Mays): key food and feed nutrients, anti-nutrients and secondary plant metabolites. Paris ENV/JM/MONO (2002)25.
133. OECD. 2003. Consensus document on the biology of Zea Mays subsp. Mays (maize). Paris ENV/JM/MONO (2003)11.
134. Odell, J.T., F. Mag, and N-H. Chua. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313:810-812.
135. Okunuki, H., R. Teshima, T. Shigeta, J. Sakushima, H. Akiyama, Y. Goda, M. Toyoda, and J. Sawada. 2002. Increased Digestability of Two Products in Genetically Modified Food (CP4-EPSPS and Cry1Ab) after Preheating. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 43(No.2): 68 – 73.

136. Orthoefer, F.T. and R.D. Sinram. 1987. Corn oil: Composition, processing, and utilization. Pp 535-551. *In* Corn Chemistry and Technology. Watson, S.A. and R.E. Ramstad (eds.). American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota.
137. Ouellet D.R., H. Lapierre, and J. Chiquette. 2003. Effects of corn silage processing and amino acid supplementation on the performance of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:3675-3684
138. Padgett, S.R., D.B. Re, G.F. Barry, D.E. Eichholtz, X. Delannay, R.L. Fuchs, G.M. Kishore, and R.T. Fraley. 1996. New weed control opportunities: Development of soybeans with a Roundup Ready gene. *In* Herbicide-Resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory, and Technical Aspects. Duke, S.O. (ed.). CRC Press, New York
139. Pariza, M.W. and E.M. Foster. 1983. Determining the safety of enzymes used in food processing. *J. Food Protection* 46(No.5):453-468.
140. Pasini, G., b. Simonato, A. Curioni, S. Vincenzi, A. Cristando, B. Santucci, A.D. Perufto, M. Giannattasio. 2002. IgE-mediated allergy to corn: a 50 kDa protein, belonging to the Reduced Soluble Proteins, is a major allergen. *Allergy* 57(2): 98-106.
141. Pastorello, E.A., L. Farioli, V. Pravettoni, M. Ispano, E. Scibola, C. Trambaioli, M.G. Giuffrida, R. Ansaloni, J. Godovac-Zimmerman, A. Conti, D. Fortunato, C. Ortolani. 2000. The maize major allergen, which is responsible for food-induced allergic reactions, is a lipid transfer protein. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106: 744-751.
142. Pauls, J.D. and D. Cross. 1988. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis to corn. *J. Allergy Clin. Immunol.* 101: 853-854.
143. Pearson, W. R. 2000. Flexible sequence similarity searching with the FASTA3 program package. *Methods Mol Biol* 132:185-219.
144. Perlak, F.J., T.B. Stone, Y.M. Muskopf, L.J. Petersen, G.B. Parker, S.A. McPherson, J. Wyman, S. Love, G. Reed, D. Biever, and D.A. Fischhoff. 1993. Genetically improved potatoes: protection from damage by colorado potato beetles. *Plant Mol. Biol.* 22:313-321.
145. Perry, T.W. 1988. Corn as a livestock feed. Pp 941-963. *In* Corn and Corn Improvement. Sprague, G.F., and J.W. Dudley (eds.). American Society of Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin.
146. Rademacher, T.W., R.B. Parekh, and R.A. Dwek. 1988. Glycobiology. *Annu Rev Biochem* 57:785-838.
147. Reicosky, D.C., W.D. Kemper, G.W. Langdale, C.L. Douglas, Jr., and P.E. Rassmussen. 1995. Soil organic matter changes resulting from tillage and biomass production. *J. Soil and Water Cons.* 50:253-261.
148. Reidell, W.E. 1990. Rootworm and mechanical damage effects on root morphology and water relations in maize. *Crop Sci.* 30:628-631.
149. Ridley, W.P., R.S. Sidhu, P.D. Pyla, M.A. Nemeth, M.L. Breeze, and J.D. Astwood. 2002. Comparison of the nutritional profile of glyphosate-tolerant corn event NK603 with that of conventional corn (*Zea mays* L.). *J. Agric. Food Chem.* 50(25): 7235-7243.
150. Romano, C.P. 2002. Expression of Cry3B insecticidal proteins in plants. U.S. Patent 6,501,009.
151. Rout, J.R. and C.L. Armstrong. 1997. Factors affecting transfer and integration of T-DNA into corn (*Zea mays* L.) cells. Program Issue of Congress on *In Vitro* Biology, June 14-18, 1997. *Jour. Soc. In Vitro. Biol.* 33(3):14A.
152. Rozelle, S. and C. Carter. 2001. China's Corn Economy: A Report to the National Research Initiative Committee. University of California, Davis.
<http://www.agecon.ucdavis.edu/aredepart/facultydocs/Rozelle/ChinaCorn/chinaproject.php> [Accessed August 15, 2006].

153. Russell, W.A. and A.R. Hallauer. 1980. Corn. Pp. 299-312. *In* Hybridization of Crop Plants. Fehr, W.R. and H.H. Hadley (eds.). American Society of Agronomy and Crop Science Society of America, Publishers, Madison, Wisconsin.
154. Sacchi, V.F., P. Parenti, G.M. Hanozet, B. Giordana, P. Luthy and M.G. Wolfersberger. 1986. *Bacillus thuringiensis* toxin inhibits K⁺ gradient-dependent amino acid transport across the brush border membrane of *Pieris brassicae* midgut cells. Fed. European Biol. Soc. Lett. 204:213-218.
155. Salvador, R.J. 1997. Maize. *In* The Encyclopedia of Mexico: History, Society, and Culture. Fitzroy Dearborn Publishers, Chicago, Illinois.
156. Sambrook, J., and D. Russell (eds.). 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
157. Sánchez-Gazález, J.J. and J.A. Ruiz-Corral. 1997. Distribución del teocintle en México. *In*: J.A. Serratos, M.C. Wilcox and F. Castillo (eds.). Flujo genético entre maíz criollo, maíz mejorado y teocintle: implicaciones para el maíz transgénico. CIMMYT, México, D.F.
158. SAS Software Release 8.1 (TS1M0). 1999-2000. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina.
159. Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler, and D. H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. Molec. Biol. Rev. 62:775-806.
160. Shaw, R.H. 1988. Climate requirement. Corn and Corn Improvement, 609-630.
161. Shull, G.H. 1909. A pure line method of corn breeding. Am. Breeders Assoc. Rep. 5:51-59
162. Siciliano, S.D. and J.J. Germida. 1999. Taxonomic diversity of bacteria Associated with the roots of field-grown transgenic *Brassica napus* cv. Quest, compared to the nontransgenic *B. Napus* cv. Exel and *B. Rapa* cv. Parkland. FEMS Microbiol. Ecol. 29:263-272.
163. Sidhu, R.S., B.G. Hammond, R.L. Fuchs, J.-N. Mutz, L.R. Holden, B. George, and T. Olson. 2002. Glyphosate-tolerant corn: the composition and feeding value of grain from glyphosate-tolerant corn to that of conventional corn (*Zea mays* L.). J. Agric Food Chem. 48(6): 2305-2312.
164. Sjoblad, R.D., J.T. McClintock and R. Engler. 1992. Toxicological considerations for protein components of biological pesticide products. Regulatory Toxicol. Pharmacol. 15:3-9.
165. Sleisenger, M.H. and J.S. Fordran. 1989. Pp 685-689. *In* Gastrointestinal disease. Pathophysiology Diagnosis Management. Fourth Ed. Vol 1. Sleisenger, M.H. and J.S. Fordran (Eds). W.B. Saunders Company.
166. Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J.Mol. Biol. 98:503-517.
167. Speek, A.J., J. Schijver, and W.H.P. Schreurs. 1985. Vitamin E composition of some seed oils as determined by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. J Food Sci 50(1): 121-124.
168. Spike, B.P. and J.J. Tollefson. 1991. Yield response of corn subjected to western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) infestation and lodging. J. Econ. Entomol. 84:1585-1590.
169. Stalker, D.M., C.M. Thomas, and D.R. Helinski. 1981. Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. Mol. Gen. Genetics. 181: 8-12.
170. Steinrucken, H. and N. Amrhein. 1980. The Herbicide Glyphosate is a Potent Inhibitor of 5-Enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate Synthase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 94(No.4):1207-1212
171. Sutcliffe, J.G. 1978. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. Symposia on Quantitative Biology. 43: 77-90.
172. Tanaka, L.G., El-Dahr, J.M. and Lehrer, S.B. 2001. Double-blind, placebo-controlled corn challenge resulting in anaphylaxis. J. Allergy and Clinical Immunol. 107(4): 744.

173. Thomas, K., M. Aalbers, G.A. Bannon, M. Bartels, R.J. Dearman, D.J. Esdaile, T.J. Fu, C.M. Glatt, N. Hadfield, C. Hatzos, S.L. Hefle, J.R. Heylins, R.E. Goodman, B. Henry, C. Herouet, M. Holsapple, G.S. Ladics, T.D. Landry, S.C. MacIntosh, E.A. Rice, L.S. Privalle, H.Y. Steiner, R. Teshima, R. van Ree, M. Woolhiser, J. Zawodny. 2004. A multi-laboratory evaluation of a common *in vitro* pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 39: (in press)
174. Tilch, C. and P.S. Elias. 1984. Investigation of the mutagenicity of ethylphenyl-glycidate. *Mutation Research* 138:1-8.
175. Troyer, F. 1994. Breeding early corn. Pp 341-396. *In* Specialty Corns. Arnel R. Hallauer (ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
176. Troyer, F. 2001. Pp 341-396. Temperate corn: background, behavior and breeding. A.R. Hallauer Specialty Corns. CRC Press, Boca Raton, Florida.
177. USDA Agriculture Handbook No. 379 1970. Forage Fiber Analysis. *In* Agricultural Handbook No. 379. United States Department of Agriculture: Washington, D.C.
178. USDA Agriculture Handbook No. 74 1973. Energy Value of Foods. *In* Agricultural Handbook No. 74. United States Department of Agriculture: Washington, D.C.; pp. 2-11.
179. USDA-Economic Research Service (ERS). 2000. Biotechnology: Implications for U.S. Corn and Soybeans Trade, *Agricultural Outlook*, April 2000. Washington d.C.: USDA-ERS.
180. USDA-NASS, 2004. <http://www.usda.gov/nass/pubs/pubs.htm>
181. U.S. Pharmacopeia. 1995. Volume XXII (Rockville, MD: United States Pharmacopeia Convention, Inc.
182. Van Mellaert, H., J. Van Rie, C. Hofmann, and A. Reynaerts. 1988. Conference On Biotechnology, Biological Pesticides and Novel Plant-Pest Resistance for Insect Pest Management, Boyce Thompson Institute, Cornell University, New York.
183. Vega-Segovia, M.L. and R. Ferrera-Cerrato. 1996. Microorganisms del rizoplano del maíz y frijol inoculados con mutantes de Rhizobium y Azospirillum. *In*: J. Pérez-Moreno and R. Ferrera-Cerrato. (eds.) Avances de Investigación, Área de Microbiología de Suelos. PROEDAF-IRENAT, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México, pp. 9-17.
184. Watson, S.A. 1982. Corn: Amazing Maize. General Properties. Pp 3-29. *In* CRC Handbook of Processing and Utilization in Agriculture, Vol. II: Part 1 Plant Products. Wolff, I.A. (ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida.
185. Watson, S.A. 1987. Structure and composition. *In* Corn: Chemistry and Technology. Watson, S.A., and Ramstad, P.E., Eds.; American Association of Cereal Chemists: St. Paul, MN; pp. 53-82.
186. Watson, S.A. 1988. Corn marketing, processing, and utilization. Pp 881-940. *In* Corn and Corn Improvement. Sprague, G.F., and J.W. Dudley (eds.). American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin.
187. Wauchope, R.D., T.L. Estes, R. Allen, J.L. Baker, A.G. Hornsby, R.L. Jones, R.P. Richards, and D.I. Gustafson. 2001. Predicted impact of transgenic herbicide-tolerant corn on drinking water quality in vulnerable watersheds of mid-western USA. *Pest Management Sci.* 58:146-160.
188. White, P.J. and L.M. Pollack. 1995. Corn as a food source in the United States: Part II. Processes, Products, Composition, and Nutritive Values. *Cereal Foods World* 40:756-762.
189. White, P.J and Weber, E.J. 2003. Lipids of the kernel. Pp. 355-405. *In* Corn Chemistry and Technology, 2nd Ed. White, P.J. and L. A. Johnson (eds.). American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, Minnesota.
190. WHO. 1994. Glyphosate. World Health Organization (WHO), International Programme of Chemical Safety (IPCS), Geneva. Environmental Health Criteria No. 159.

191. Wilkes, H.G. 1967. Introduction. Pp. 1-2. Discussion and Summary. Pp. 121-127. *In Teosinte: The Closest Relative of Maize.* Bussey Institution, Harvard University, Cambridge, Massachusetts.
192. Wilkes, H.G. 1972. Maize and its wild relatives. *Science* 177: 1071-1077.
193. Wilkes, H.G. 1989. Maize: domestication, racial evolution, and spread. Pp 440-455. *In Foraging and Farming: The Evolution of Plant Exploration.* D.R. Harris and G.C. Hillman (eds.). Unwin Hyman, London, England.
194. Williams, K., M. LoPresti, and K. Stone. 1997. Internal protein sequencing of SDS-PAGE-separated proteins: Optimization of an in-gel digest protocol. *Tech in Protein Chem* 8:79-98.
195. Yagami, T., Y. Haishima, A. Nakamura, H. Osuna, and Z. Ikezawa. 2000. Digestibility of allergens extracted from natural rubber latex and vegetable foods. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106:752-762.

六、相关附件资料

1. 目的基因的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列（CBI）

抗虫抗草甘膦玉米转化事件 MON 88017 中目的基因的核苷酸序列

cp4 epsps 基因的核苷酸序列

涉及商业保密资料，故从该版本中删除

cry3Bb1 基因的核苷酸序列

涉及商业保密资料，故从该版本中删除

由目的基因核苷酸序列推导的氨基酸序列

由 *cp4 epsps* 基因编码序列推导的 CP4 EPSPS 蛋白的氨基酸序列:

```
1  MAQVSRICNG VQNPSLISNL SKSSQRKSPL SVSLKTQQHP RAYPISSSWG LKKSGMTLIG
61 SELRPLKVMS SVSTACMLHG ASSRPATARK SSGLSGTVRI PGDKSISHRS FMFGGLASGE
121 TRITGLLEGE DVINTGKAMQ AMGARIRKEG DTWIIDGVGN GLLAPEAPL DFGNAATGCR
181 LTMGLVGVDYD PDSTFIGDAS LTKRPMGRVL NPLREMGVQV KSEDGDRLPV TLRGPKTPTP
241 ITYRVPMASA QVKSALLLAG LNTPGITTVI EPIMTRDHT E KMLQGFGANL TVETDADGVR
301 TIRLEGRGKL TGQVIDVPGD PSSTAFPLVA ALLVPGSDVT LLNVLMNPTR TGLILTLQEM
361 GADIEVINPR LAGGEDVADL RVRSTLKG V TVPEDRAPSM IDEYPILAVA AAFAEGATVM
421 NGLEELRVKE SDRLSAVANG LKLNQVDCDE GETSLVVRGR PDGKGLGNAS GAAVATHLDH
481 RIAMSFLVMG LVSENPVTVD DATMIATSFP EFMDLMAGLG AKIELSDTKA A
```

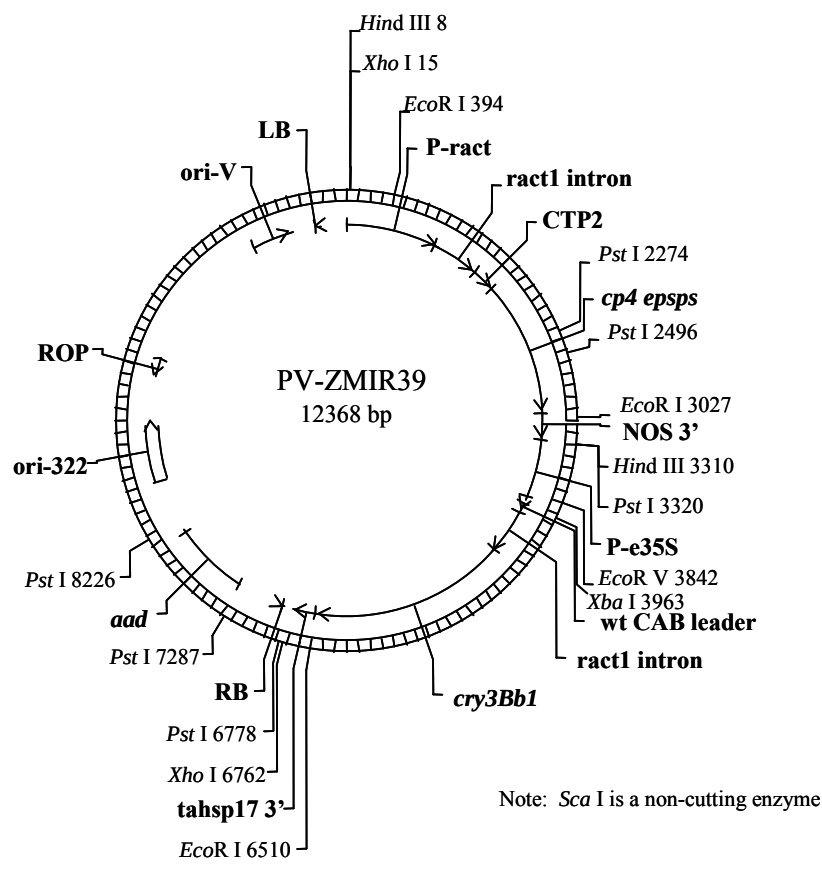
注：下划线部分为 CTP2 转运肽序列（氨基酸 1~76），在引导前体蛋白进入叶绿体后，这段序列被切除，释放出成熟的 CP4 EPSPS 蛋白。

由 *cry3Bb1* 基因编码序列推导的 Cry3Bb1 蛋白的氨基酸序列:

```
1  MANPNNRSEH DTIKVTPNSE LQTNHNQYPL ADNPNSTLEE LNYKEFLRMT EDSSTEVLND
61  STVKDAVGTG ISVVGQILGV VGVFPAGALT SFYQSFLNTI WPSDADPWKA FMAQVEVLID
121 KKIEEYAKSK ALAELQGLQN NFEDYVNALN SWKKTPLSLR SKRSQDRIRE LFSQAESHFR
181 NSMPSTFAVSK FEVLFLPTYA QAANTHLLLL KDAQVFGEW GYSSDVAEF YRRQLKLTQQ
241 YTDHCVNWN VGLNGLRGST YDAWVKFNRF RREMTLTVLD LIVLFPFYDI RLYSGVKTE
301 LTRDIFTDPI FLLTTLQKYG PTFLSIENSI RKPHLFDYLQ GIEFHTRLRP GYFGKDSFNY
361 WSGNYVETRP SIGSSKTITS PFYGDKSTEP VQKLSFDGQK VYRTIANTDV AAWPNGKVYL
421 GVTKVDFSQY DDQKNETSTQ TYDSKRNGH VSAQDSIDQL PPETTDEPLE KAYSHQLNYA
481 ECFLMQDRRG TIPFFTWTNR SVDFNTIDA EKITQLPVV AYALSSGASI IEGPGFTGGN
541 LLFLKESSNS IAKFKVTLNS AALLQRYRVR IRYASTTNLR LFVQNSNND LVIYINKTMN
601 KDDDLTYQTF DLATTNSNMG FSGDKNELII GAESFVSNEK IYIDKIEFIP VQL
```

注：下划线标注的 6 个氨基酸是与野生型 Cry3Bb1 不同的序列，这 6 个氨基酸的替换分别为：2A（插入）、H232R、S312L、N314T、E318K 和 Q349R。

2. 目的基因与载体构建的图谱



PV-ZMIR39质粒图谱

探针	覆盖的遗传元件	起始位置	结束位置	总长度(bp)
1	部分 LB + P-ract1 + 部分 CTP2	12080	1482	1771
2	CTP2 + cp4 epsps	1423	3019	1597
3	部分 cp4 epsps + NOS'3 + P-e35s + wt CAB leader + ract1 intron	2991	4533	1543
4	cry3Bb1 + tahsp17 3' + RB	4534	6865	2332
5	部分骨架序列	6866	9492	2627
6	部分骨架序列	9465	12066	2602
7	P-act1 + ract1 intron	13	1407	1395
8	NOS '3	3032	3287	256
9	P-e35s	3321	3933	613
10	Wt CAB leader + ract1 intron	3958	4533	576
11	cry3Bb1	4534	6510	1977
12	tahasp17 3'	6511	6744	234

用于农杆菌介导转化获得 MON 88017 的 PV-ZMIR39 质粒环形图谱。遗传元件用粗体标出，限制性内切酶的酶切位点也在图中标出。上表列出了用于 Southern 分析所使用的探针。

抗根虫抗草甘膦双重性状玉米 MON 88017 是将 *cp4 epsps* 和 *cry3Bb1* 基因构建到同一转化载体 PV-ZMIR39 的 T-DNA 区域内，然后借助于农杆菌介导的转化方法将质粒 PV-ZMIR39 转入常规玉米细胞中，再通过常规选育过程得到的。质粒 PV-ZMIR39 上的 T-DNA 区域含有两个完整的表达盒，在转化过程中被整合到玉米基因组上，包括：*cp4 epsps* 表达盒，受来源于水稻肌动蛋白基因 (*actin1*) 启动子 P-ract1 和来源于根癌农杆菌的胭脂碱合酶基因 (*nos*) 终止子调控；以及 *cry3Bb1* 基因表达盒，受增强的花椰菜花叶病毒 35S 亚基编码基因的启动子 P-e35S 和来源于小麦热激蛋白 HSP17 编码基因的终止子调控。转化质粒上各遗传元件如上图所示，其功能描述见下表。

PV-ZMIR39 质粒主链的组成及功能

遗传元件	质粒序列 (bp)	功能 (参考文献)
LB	12067-12090	源自农杆菌，用于 T-DNA 的转化的左边界序列 (Barker <i>et al.</i> , 1983)
间插序列	12091-12364	来自于农杆菌的 DNA 序列 (Barker <i>et al.</i> , 1983)
间插序列	12365-12	人工合成序列，多聚核苷酸接头
P-ract1	13-946	源自于水稻肌动蛋白编码序列的启动子 (McElroy <i>et al.</i> , 1990)
ract1 intron	947-1407	源自于水稻肌动蛋白编码序列的内含子 (McElroy <i>et al.</i> , 1991)
间插序列	1408-1423	人工合成序列，多聚核苷酸接头
CTP2	1424-1651	源自拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>) 叶绿体转移肽的编码序列 (Klee <i>et al.</i> , 1987)
cp4 epsps	1652-3019	来源于农杆菌 CP4 菌株，编码 CP4EPSPS 蛋白 (Padgett <i>et al.</i> , 1996)
间插序列	3020-3031	人工合成序列，多聚核苷酸接头
NOS 3'	3032-3287	来自土壤农杆菌的胭脂碱合成酶基因的 3'非翻译区 (Bevan <i>et al.</i> , 1983)
间插序列	3288-3320	人工合成序列，多聚核苷酸接头
P-e35S	3321-3393	花椰菜花叶病毒 (CaMV) 启动子 (Odell <i>et al.</i> 1985)，带有重复增强区 (Kay <i>et al.</i> , 1987)
间插序列	3394-3957	人工合成序列，多聚核苷酸接头
wt CAB leader	3958-4028	小麦叶绿体 IIa/b 结合蛋白的 5'非翻译前导序列 (Lamppa <i>et al.</i> , 1985)
间插序列	4029-4056	人工合成序列，多聚核苷酸接头
ract1 intron	4057-4517	来自于水稻编码肌动蛋白基因的内含子 (McElroy <i>et al.</i> , 1991)
遗传元件	质粒序列 (bp)	功能 (参考文献)
间插序列	4518-4533	人工合成序列，多聚核苷酸接头

cry3Bb1.pvampir39	4534-6495	源自苏云金芽孢杆菌亚种 <i>kumamotoensis</i> 的编码合成 Cry3Bb1 蛋白的序列 (English <i>et al.</i> , 2000)
间插序列	6496-6510	人工合成序列, 多聚核苷酸接头
tahsp17 3'	6511-6744	小麦 17.3kDa 的热激蛋白的 3' 非翻译区 (McElwain & Spiker, 1989)
间插序列	6745-6840	源自大肠杆菌, 人工合成的多聚核苷酸接头序列 (Depicker <i>et al.</i> , 1982)
RB	6841-6865	来自于农杆菌, 用于 T-DNA 的转化的右边界序列 (Depicker <i>et al.</i> , 1982)
间插序列	6866-7350	源自大肠杆菌, 人工合成的多聚核苷酸接头序列 (Depicker <i>et al.</i> , 1982; Sutcliffe, 1978; Fling <i>et al.</i> , 1985)
aad	7351-8139	Tn7 转座子中的氨基糖苷类修饰酶 3'(9)-O-核苷酸转移酶的细菌启动子和编码序列 (Fling <i>et al.</i> , 1985) (GenBank accession X03043)
间隔序列	8140-8681	源自大肠杆菌的多聚核苷酸接头序列 (Fling <i>et al.</i> , 1985; Sutcliffe, 1978)
ori-322	8682-9310	pBR322 的复制原点 (Sutcliffe, 1978)
间隔序列	9311-9727	pBR322 质粒的一部分 (Sutcliffe, 1978)
ROP	9728-9919	引物蛋白抑制子的编码序列, 用以保证在大肠杆菌中的质粒拷贝数 (Giza & Huang, 1989)
间隔序列	9920-11182	pBR322 质粒的一部分 (Sutcliffe, 1978)
间隔序列	11183-11430	来自大肠杆菌的合成序 (Stalker <i>et al.</i> , 1981)
ori-V	11431-11824	来自于广谱寄主质粒 RK2 的农杆菌复制起点 (Stalker <i>et al.</i> , 1981)
间隔序列	11852-11910	来自于大肠杆菌的合成序列 (Stalker <i>et al.</i> , 1981)
间隔序列	11911-12066	来自于农杆菌的 DNA 序列 (Barker <i>et al.</i> , 1983)

3. 目的基因与植物基因组整合及其表达的分子检测或鉴定结果（PCR 检测、Southern 杂交分析、Northern 或 Western 分析结果、目的基因产物表达结果）

本附件资料项下包括以下内容：

- 3-1 MON 88017 插入及侧翼序列的 PCR 和 DNA 序列分析；
- 3-2 MON 88017 目的基因在植物基因组中的插入数和拷贝数的 Southern 分析；
- 3-3 MON 88017 质粒骨架序列的 Southern 分析；
- 3-4 MON 88017 插入稳定性分析；
- 3-5 MON 88017 目的基因的表达分析；
- 3-6 MON 88017 插入序列的表达稳定性分析。

3-1. MON 88017 插入及侧翼序列的 PCR 和 DNA 序列分析 (CBI)

利用PCR方法扩增可覆盖插入全长的7段相互重叠的DNA区域并进行序列分析，从而证实玉米转化事件MON 88017中插入各遗传元件的排列方式。

无模板DNA的对照反应（下图：第4、7、10、14泳道）如预期所料，用任何引物组合均无PCR产物产生。非转基因的阴性对照反应（下图：第3、6、9、13泳道）用七对引物中的四对组合时没有PCR产物产生。

涉及商业保密资料，故从该版本中删除

利用重叠 PCR 方法扩增覆盖插入全长的序列——产物 A~D (CBI)

泳道 1: 500 bp DNA ladder (Life Technologies)
泳道 2: MON 88017 基因组 DNA
泳道 3: 亲本对照 LH59×LH198 DNA
泳道 4: 无 DNA 模板对照
泳道 5: MON 88017 基因组 DNA
泳道 6: 亲本对照 LH59×LH198 DNA
泳道 7: 无 DNA 模板对照
泳道 8: MON 88017 基因组 DNA
泳道 9: 亲本对照 LH59×LH198 DNA
泳道 10: 无 DNA 模板对照
泳道 11: 质粒 PV-ZMIR39 DNA
泳道 12: MON 88017 基因组 DNA
泳道 13: 亲本对照 LH59×LH198 DNA
泳道 14: 无 DNA 模板对照
泳道 15: 质粒 PV-ZMIR39 DNA
泳道 16: 500 bp DNA ladder (Life Technologies)

用于产生产物E、F、G的引物组合在非转基因DNA模板中有PCR扩增产物（下图：第3、7、10泳道），但这些产物都不是引物组合应该产生的预期大小片段。同样的PCR

产物在用玉米转化事件MON 88017的DNA为模板时也有产生（下图：第2、6、9泳道）。这些PCR产物的出现很有可能是由于PCR引物组合中单向或双向引物对玉米基因组序列产生了非特异性扩增。

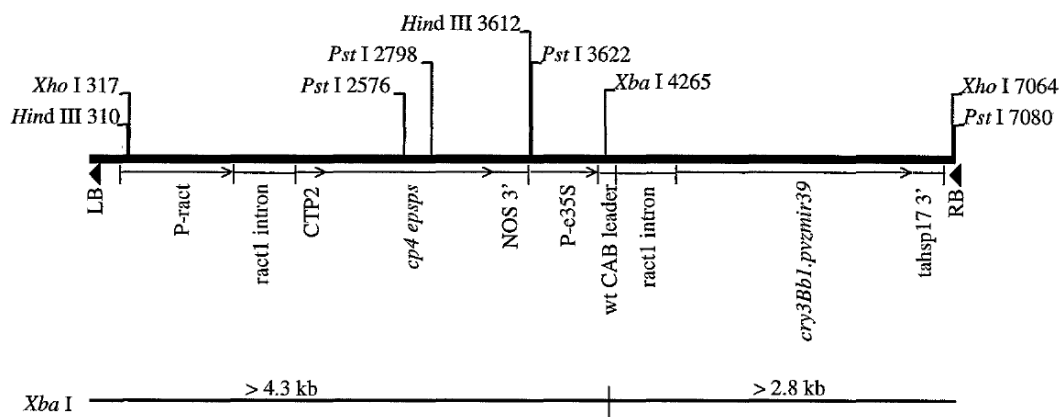
涉及商业保密资料，故从该版本中删除

利用重叠 PCR 方法扩增覆盖插入全长的序列——产物 E~G（CBI）

- 泳道 1: 500 bp DNA ladder (Life Technologies)
- 泳道 2: MON 88017 基因组 DNA
- 泳道 3: 亲本对照 LH59×LH198 DNA
- 泳道 4: 无 DNA 模板对照
- 泳道 5: 质粒 PV-ZMIR39 DNA
- 泳道 6: MON 88017 基因组 DNA
- 泳道 7: 亲本对照 LH59×LH198 DNA
- 泳道 8: 无 DNA 模板对照
- 泳道 9: MON 88017 基因组 DNA
- 泳道 10: 亲本对照 LH59×LH198 DNA
- 泳道 11: 无 DNA 模板对照
- 泳道 12: 500 bp DNA ladder (Life Technologies)

质粒PV-ZMIR39在三组PCR分析（产物C-E，见上两图）中用于阳性对照，这些PCR扩增的产物只包括插入的DNA而没有插入侧翼的基因组DNA。在这三组分析中，玉米

转化事件MON 88017和质粒PV-ZMIR39均产生了预期大小的PCR产物：1.0 kb的产物C、2.0 kb的产物D以及2.3 kb的产物E。在以质粒PV-ZMIR39为模板DNA进行产物E的扩增时，可见模糊的低分子量产物，这可能是由于非特异性扩增引起的。玉米转化事件MON 88017还产生了以下预期大小的条带：1.0 kb的产物A、0.9 kb的产物B、2.3 kb的产物F以及2.2 kb的产物G。玉米转化事件MON 88017中这些预期大小PCR产物的产生证实插入中元件之间的排列或连接方式与它们在质粒PV-ZMIR39上的相对位置一致。下面示意图描述了单个基因表达盒中各元件的排列情况。



MON 88017 中来源于 PV-ZMIR39 质粒的 T-DNA 插入片段线性示意图

将由玉米转化事件MON 88017产生的所有7个PCR产物进行DNA测序，以进一步证实插入中各遗传元件的排列方式。下图给出了玉米转化事件MON 88017中插入序列以及插入两端的侧翼基因组DNA序列

涉及商业保密资料，故从该版本中删除

MON 88017 中的插入及侧翼基因组序列（CBI）

注：碱基 1-102(单下划线部分)为插入序列的 5'端侧翼玉米基因组 DNA 序列，碱基 7230-7450 (加双下划线部分)为插入序列的 3' 端侧翼玉米基因组 DNA 序列。碱基 103-7229 为 MON 88017 的插入序列；其中 2052-3419 为 *cp4 epsps* 基因编码区，4934-6895 为 *cry3Bb1* 基因编码区。

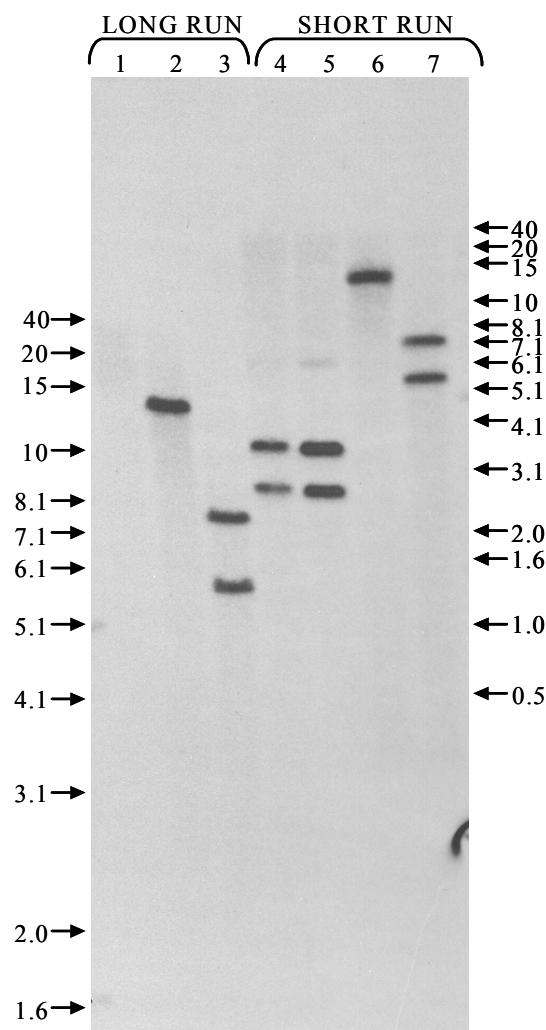
3-2. MON 88017 目的基因在植物基因组中的插入数和拷贝数的 Southern 分析

为了检测MON 88017玉米转化事件中外源基因的插入数，利用限制性内切酶*Sca* I消化测试组和对照组DNA，同时以4个放射性标记的覆盖T-DNA全长的探针（探针1、2、3、4，质粒图）进行印迹分析。由于*Sca* I在PV-ZMIR39中没有酶切位点，它会产生包含整个插入DNA及其相邻植物基因组DNA在内的限制性片段。检测到的限制性片段个数能够反映实际存在的插入数目。

通过用限制性内切酶*Xba* I消化MON 88017和对照DNA可以确定同一个基因座内部整合的T-DNA的拷贝数。*Xba* I在T-DNA中只有一个酶切位点。如果转化事件只含有一个T-DNA拷贝，应该产生两条带，分别代表两侧边界片段，每个边界片段都带有部分的T-DNA及其侧翼玉米基因组DNA。因此，由该分析结果可判断转化事件中是否含有多个拷贝的T-DNA。详见上述附件资料3-1部分的插入片段线性示意图。

*Eco*R I在质粒PV-ZMIR39上共有3处酶切位点，且均在T-DNA内部，分别为394、3027和6510处。质粒PV-ZMIR39的DNA预先用*Eco*R I消化，可释放出~2.6 kb、~3.5 kb和~6.3 kb的3个片段，凝胶电泳时与经*Sca* I消化的对照DNA混合上样，作为阳性杂交对照，与覆盖T-DNA全长的探针杂交时预期检测到代表部分T-DNA的~2.6 kb和~3.5 kb的信号。此外，~6.3 kb的片段有一小部分位于T-DNA内，与探针4有部分重叠，预期在Southern杂交膜上也能检测到该片段的杂交信号。

插入数与拷贝数的分析结果见下图。预先用*Eco*R I消化的质粒PV-ZMIR39 DNA与经*Sca* I消化的对照DNA混合上样，产生预期大小的约6.3 kb、3.5 kb和2.6 kb的条带（第4、5泳道），分别对应于PV-ZMIR39的*Eco*R I限制性片段，其中~6.3 kb条带的信号较弱，是由于相对于~3.5 kb和~2.6 kb的片段，只有小部分靶标T-DNA序列存在于该~6.3 kb的*Eco*R I限制性片段内。用*Sca* I消化的玉米转化事件MON 88017的DNA（第2、6泳道）产生一条~13 kb的条带，符合预期；这一结果证实玉米转化事件MON 88017中仅含有一个T-DNA插入。用*Xba* I消化的玉米转化事件MON 88017的DNA（第3、7泳道）产生2条特异的条带，分别位于~7.4 kb和~5.5 kb处，符合>4.3 kb和>2.8 kb的预期，分别代表两侧边界片段。综合插入数的分析，结果表明玉米转化事件MON 88017在单个基因座位点中含有单个拷贝的插入。



MON 88017 的 Southern 杂交分析：插入数和拷贝数

印迹用 4 个用 ^{32}P 标记的相互重叠探针（探针 1、2、3、4，质粒图）同时进行杂交，各泳道含约 10 ng 酶切消化的基因组 DNA。泳道描述如下：

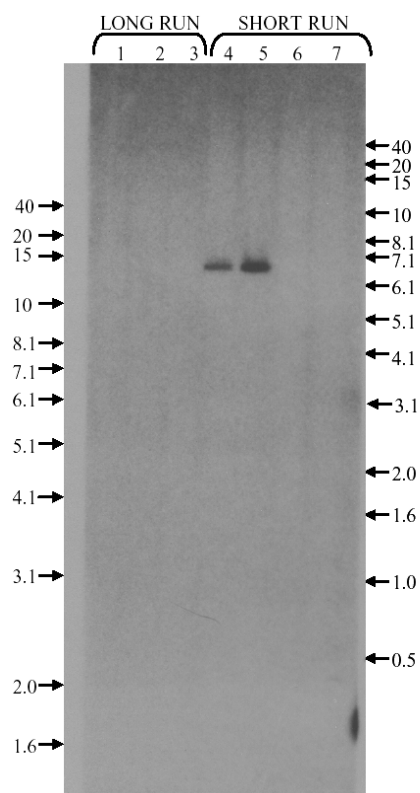
- 泳道 1：常规对照玉米基因组（*Sca* I），与 T-DNA 探针没有产生杂交信号。
- 泳道 2：MON 88017（*Sca* I），检测到包括整个 T-DNA 插入及其两侧玉米基因组序列在内的 ~13 kb 边界片段，证实插入数为 1。
- 泳道 3：MON 88017（*Xba* I），检测到 ~7.4 kb 和 ~5.5 kb 信号，符合 >4.3 kb 和 >2.8 kb 的预期，分别包括部分 T-DNA 及侧翼玉米基因组序列，证实拷贝数为 1。
- 泳道 4：对照（*Sca* I）与 PV-ZMIR39（*Eco*R I, 0.5 拷贝当量）混合，检测预期代表部分 T-DNA 的 ~2.6 kb 和 ~3.5 kb 信号，以及较弱的 ~6.3 kb 信号。
- 泳道 5：对照（*Sca* I）与 PV-ZMIR39（*Eco*R I, 1 个拷贝当量）混合，检测预期代表部分 T-DNA 的 ~2.6 kb 和 ~3.5 kb 信号，以及较弱的 ~6.3 kb 信号；信号强度随着质粒酶切片段掺入量的增加而增强。
- 泳道 6：MON 88017（*Sca* I），同泳道 2，短时程电泳。
- 泳道 7：MON 88017（*Xba* I），同泳道 3，短时程电泳。

箭头表明 DNA 分子大小（kb），由溴化乙锭染色凝胶上的分子量标记指示。

3-3. MON 88017 质粒骨架序列的 Southern 分析

为了检测MON 88017玉米转化事件中是否存在质粒PV-ZMIR39的骨架序列,用*Sca* I 分别消化MON 88017的DNA与对照DNA。同时以2个覆盖PV-ZMIR39骨架的重叠探针 (探针5和6, 质粒图) 进行Southern杂交检测。预先用*Eco*R I消化的质粒PV-ZMIR39的DNA与经*Sca* I消化的对照DNA混合上样, 作为阳性杂交对照。此外, MON 88017的DNA 还用*Xba* I消化处理。由于探针与分子量标准条带之间可能存在预期的交叉杂交, 在杂交开始前将分子量标准所在泳道从杂交膜上切除。被切下的印迹条在杂交完成后再与杂交膜重新拼接, 以便估算Southern杂交条带的分子量大小。

质粒骨架序列检测的Southern分析结果如下图所示。对照DNA (第1泳道) 为阴性对照, 没有产生可检测的杂交条带, 与预期结果一致。预先用*Eco*R I消化的质粒PV-ZMIR39的DNA与经*Sca* I消化的对照组DNA混合上样 (第4、5泳道), 产生了~6.3 kb的预期大小条带。玉米转化事件MON 88017的DNA (第2、3、6、7泳道) 没有杂交条带被检出。这一结果证实玉米转化事件MON 88017不含有任何可检测的源于转化载体PV-ZMIR39的骨架序列。

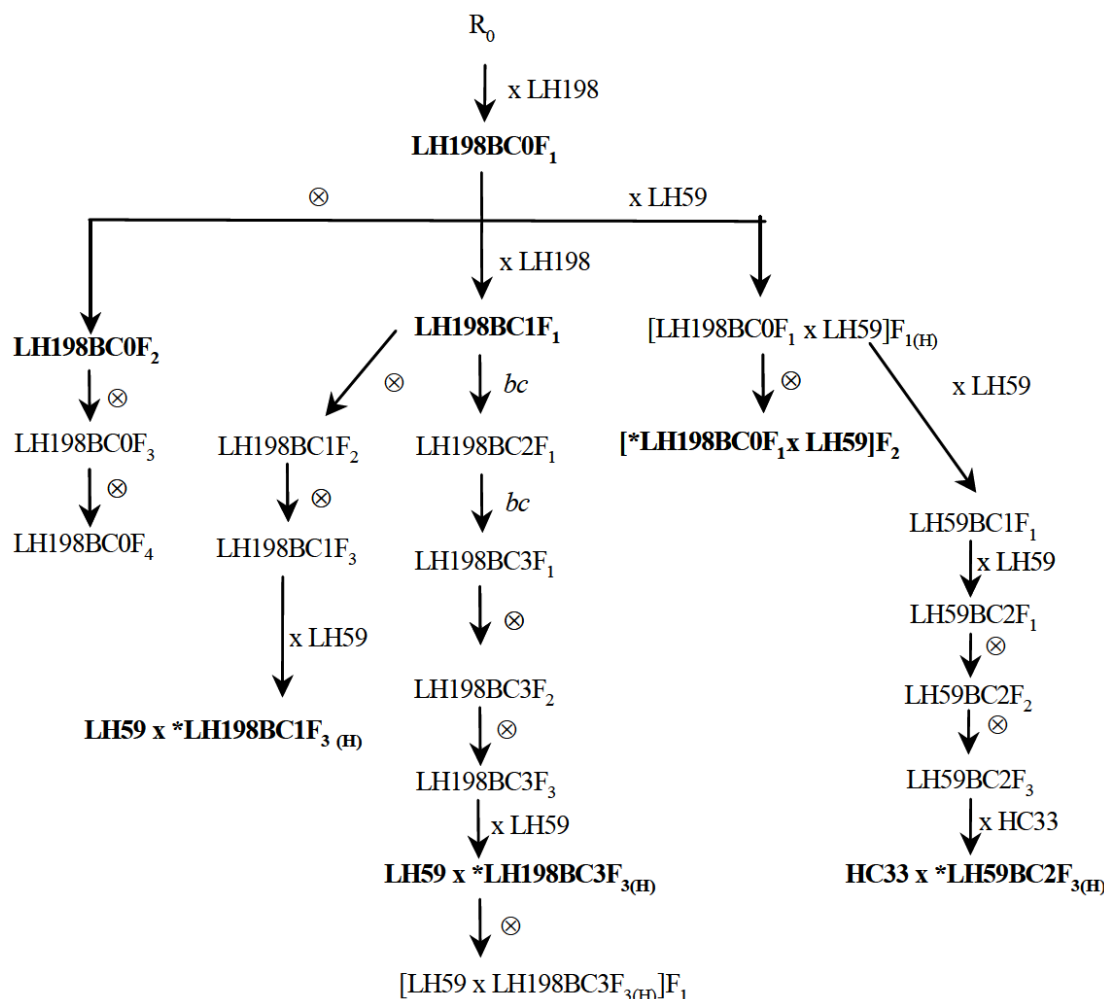


MON 88017 的 Southern 杂交分析: 质粒骨架序列分析

- 泳道 1: 常规对照玉米基因组 (*Sca* I)
- 泳道 2: MON 88017 (*Sca* I)
- 泳道 3: MON 88017 (*Xba* I)
- 泳道 4: 对照 (*Sca* I) 与 PV-ZMIR39 (*Eco*R I, 0.5 拷贝当量) 混合
- 泳道 5: 对照 (*Sca* I) 与 PV-ZMIR39 (*Eco*R I, 1 个拷贝当量) 混合
- 泳道 6: MON 88017 (*Sca* I)
- 泳道 7: MON 88017 (*Xba* I)

→ 箭头表明 DNA 分子大小 (kb), 由溴化乙锭染色凝胶上的分子量标记指示

3-4. MON 88017 插入稳定性分析



注：MON 88017 各世代选育图谱，其中加粗字体标明了多世代插入稳定性分析所用的 Southern 杂交材料。

插入片段在后代中的分离比例

利用 Chi 平方检验，对 MON 88017 的 10 个世代进行了分离方式（阳性/阴性）的显著性检验，以确定 MON 88017 后代中 *cry3Bb1* 和 *cp4 epsps* 基因的可遗传性和稳定性。以抗玉米根虫（CRW）活性和草甘膦耐受性的表型为 MON 88017 后代性状阳性，其分离频率的预期值和观测值如下表如示。被鉴定为抗根虫阳性的植株基于 Cry3Bb1 蛋白的 ELISA 检测结果。如前所述，由于 *cry3Bb1* 和 *cp4 epsps* 基因在转化载体上是相连的，位于同一 T-DNA 中，并且仅以单拷贝形式插入在 MON 88017 中单个位点上，因此预期这两个基因在 MON 88017 后代中具有相同的分离比例。预期结果可通过喷洒草甘膦来验证其表型。

所述用于孟德尔遗传分析的 10 个育种世代如 MON 88017 育种系谱图所示。基因型分离频率与 Chi 平方检验的平均值比较。Chi 平方值计算方式如下：

$$\chi^2 = \sum [(|o - e| - 0.5)^2 / e]$$

其中：o = 基因型观察频率，e = 基因型预期频率，
0.5 = 自由度为 1 的 Yates 分析校正因子，(Little and Hills, 1978)。

该分析结果见下表。通过 7 代杂交授粉和 3 代自花授粉，证实了插入序列的遗传稳定性。

MON 88017 后代植株预期分离植株数和实际观测植株数

育种世代	观测值 ^a		预期值 ^a		χ^2
	+	-	+	-	
LH198BC ₀ F ₁	21	14	17.5	17.5	1.03 [†]
LH198BC ₀ F ₂	53	12	48.75	16.25	1.15 [†]
LH198BC ₁ F ₁	21	9	15	15	4.03 [#]
LH198BC ₂ F ₁	10	15	12.5	12.5	0.64 [†]
LH198BC ₃ F ₁	8	5	6.5	6.5	0.31 [†]
LH198BC ₃ F ₂	21	3	18	6	1.39 [†]
LH198BC ₀ F ₁ × LH59	29	0	14.5	14.5	27.03 [*]
LH59BC ₁ F ₁	7	5	6	6	0.08 [†]
LH59BC ₂ F ₁	8	5	6.5	6.5	0.31 [†]
LH59BC ₂ F ₂	35	13	36	12	0.03 [†]

^a 符号 (+) 表示两种性状均为阳性的植株数目；(-) 表示性状为阴性的植株数目。

[†] 在 p≤0.05 水平 (Chi 平方值=3.84, 1df) 上不显著。

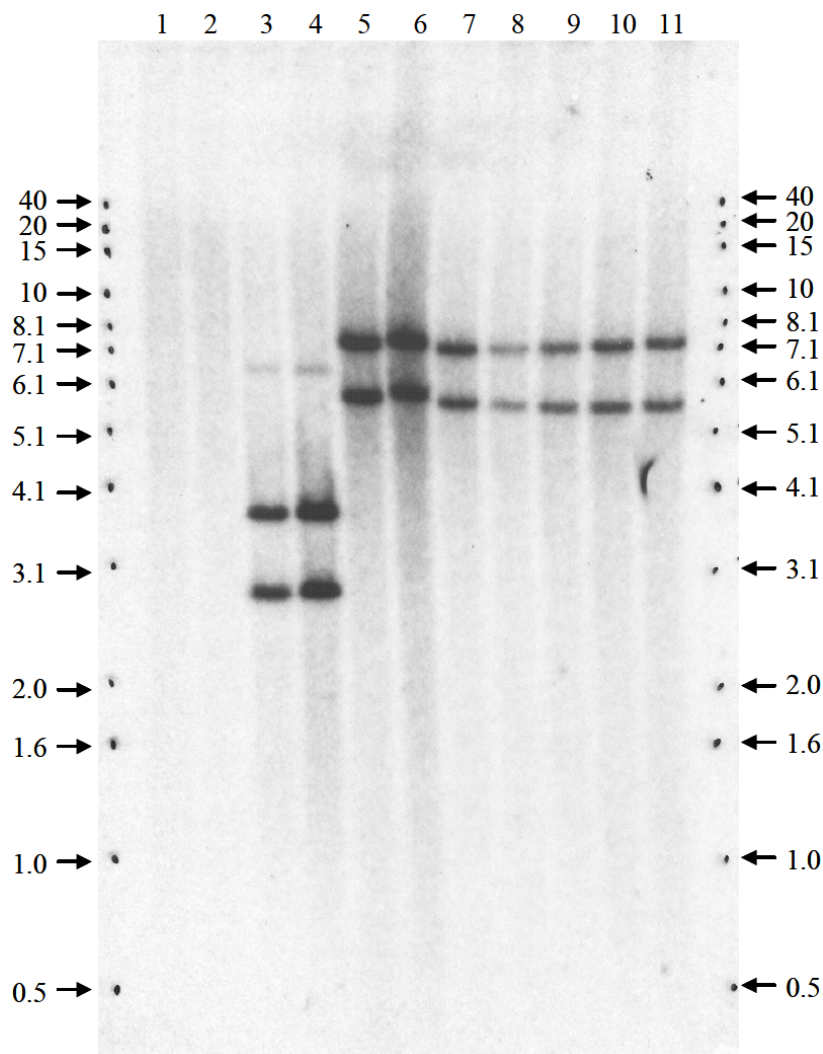
[#] 在 p≤0.05 水平 (Chi 平方值=3.84, 1df) 上显著，但在 p≤0.01 水平 (Chi 平方值=6.63) 上不显著。

^{*} 在 p≤0.05 水平 (Chi 平方值=3.84, 1df) 上显著，且在 p≤0.01 水平 (Chi 平方值=6.63) 上也显著。

T-DNA 整合稳定性的 Southern 杂交分析

从玉米转化事件 MON 88017 的育种后代材料中（见 MON 88017 谱系图）选取多个世代材料进行拷贝数的 Southern 分析，以确定插入的稳定性。所选用于稳定性分析的世代分别为：LH198BC0F₁、LH198BC0F₂、LH198BC1F₁、[LH198BC0F₁×LH59]F₂、LH198BC1F₃×LH59_(H)、LH59×LH198BC3F_{3(H)}、HC33×LH59BC2F_{3(H)}。同时选取自交系 LH198 与杂交种 LH59×LH198 作为亲本对照。

上述多个世代 MON 88017 玉米基因组的 Southern 杂交分析结果如下图所示。本研究中，多个世代的 MON 88017 的 DNA 和对照 DNA 样品用 *Xba* I 消化，*Xba* I 在 PV-ZMIR39 中只有一个酶切位点。同时用四个覆盖全长 T-DNA 的放射性标记探针（探针 1、2、3、4，质粒图）进行 Southern 杂交。预先用 *Eco*R I 消化的质粒 PV-ZMIR39 的 DNA 与消化的对照 DNA 混合上样，产生预期大小的约 6.3 kb、3.5 kb 和 2.6 kb 的条带，与 PV-ZMIR39 的 *Eco*R I 片段相符（第 3、4 泳道）。~6.3 kb 条带的信号较弱，是由于相对于~3.5 kb 和~2.6 kb 的片段，只有小部分靶标 T-DNA 序列存在于这一~6.3 kb 的 *Eco*R I 限制性片段。预先确定的世代（第 5 泳道）产生了之前拷贝数分析中出现的预期大小的约 7.4 kb 和 5.5 kb 的条带（见 MON 88017 的 Southern 杂交分析：插入数和拷贝数）。此外，玉米转化事件 MON 88017 的 6 个世代（第 6-11 泳道）均产生了符合预期大小的条带（~7.4 kb 和~5.5 kb）。这些结果表明，玉米转化事件 MON 88017 插入的预期 Southern 特异带型在测试多个的育种谱系世代中保持一致。因此得出结论为：外源 T-DNA 稳定整合在抗虫抗草甘膦玉米 MON 88017 基因组中。



MON 88017 多个育种世代中外源插入 DNA 的稳定性分析

印迹用 4 个用 ^{32}P 标记的相互重叠探针（探针 1、2、3、4，质粒图）同时进行杂交，各泳道含约 10 ng 酶切消化的基因组 DNA。泳道描述如下：

泳道 1：亲本对照 LH198 (*Xba* I)

泳道 2：亲本对照 LH59×LH198 (*Xba* I)

泳道 3：对照 LH59×LH198 (*Xba* I)与质粒 PV-ZMIR39 (*Eco*R I, 0.5 拷贝当量) 混合

泳道 4：对照 LH59×LH198 (*Xba* I)与质粒 PV-ZMIR39 (*Eco*R I, 1.0 拷贝当量) 混合

泳道 5：MON 88017 [LH198BC0F₁×LH59]F₂ (*Xba* I)

泳道 6：MON 88017 LH198BC0F₁ (*Xba* I)

泳道 7：MON 88017 LH198BC0F₂ (*Xba* I)

泳道 8：MON 88017 LH198BC1F₁ (*Xba* I)

泳道 9：MON 88017 LH198BC1F₃×LH59(H) (*Xba* I)

泳道 10：MON 88017 LH59×LH198BC3F_{3(H)} (*Xba* I)

泳道 11：MON 88017 HC33×LH59BC2F_{3(H)} (*Xba* I)

3-5. MON 88017 目的基因的表达分析

通过有效的酶联免疫吸附试验（ELISA）来评估MON 88017转基因玉米组织中Cry3Bb1和CP4 EPSPS的蛋白水平。组织样本来源于2002年美国田间试验3个试验点（爱荷华州的Benton County，伊利诺斯州的Stark County，以及内布拉斯州的York County）中所种植的作物，所选试点为美国玉米种植的代表性地理区域。在全生长季过程中的不同时间收集全生长季叶片、全生长季全株、全生长季根、花粉、花丝、秸秆、秸秆根、谷粒、干秸秆及衰老根的样品。各类型组织的所有蛋白水平的计算用微克每克组织鲜重（ $\mu\text{g/g fwt}$ ）来衡量，然后测定各组织的含水量，并将所有蛋白水平换算成干重基准（ $\mu\text{g/g dwt}$ ）。

收获于3个田间点整个生长季的叶片、全株和根组织中Cry3Bb1蛋白平均水平范围分别为260-570、88-500和100-370 $\mu\text{g/g dwt}$ 。3个田间点花粉、秸秆、花丝和谷粒组织中的Cry3Bb1蛋白平均水平分别为25、95、380和15 $\mu\text{g/g dwt}$ 。

收获于3个田间点整个生长季的叶片和根组织中CP4 EPSPS蛋白平均水平范围分别为150-220和70-150 $\mu\text{g/g dwt}$ 。3个田间点花粉、秸秆和谷粒组织中的CP4 EPSPS蛋白平均水平分别为390、57和5.8 $\mu\text{g/g dwt}$ 。没有估算全株和花丝组织中的CP4 EPSPS蛋白水平。

2002 年美国田间试验生产 MON 88017 全生长季叶片组织中 Cry3Bb1 和 CP4 EPSPS 蛋白表达水平

组织类型 ¹	Cry3Bb1蛋白表达水平		CP4 EPSPS蛋白表达水平	
	平均值 (SD)	平均值 (SD)	平均值 (SD)	平均值 (SD)
	范围 ($\mu\text{g/g fwt}$) ²	范围 ($\mu\text{g/g dwt}$) ³	范围 ($\mu\text{g/g fwt}$)	范围 ($\mu\text{g/g dwt}$)
OSL-1	76 (23) ⁴ 28 – 110 ⁵	570 (170) 230 – 820	30 (5.3) 19 – 36	220 (30) 160 – 260
OSL-2	75 (10) 58 – 92	430 (58) 310 – 510	36 (5.5) 29 – 46	190 (26) 130 – 250
OSL-3	69 (12) 55 – 90	310 (45) 240 – 380	38 (8.6) 28 – 54	170 (37) 140 – 240
OSL-4	62 (9.2) 49 – 77	260 (44) 190 – 340	35 (4.7) 30 – 42	150 (19) 120 – 170

1. OSL-1: V2-V3; OSL-2: V5; OSL-3: V8; OSL-4: V11-V17.

2. 蛋白表达水平以 $\mu\text{g/g fwt}$ 鲜重基准测量，并就方法进行偏差校正。

3. 通过测量各组织含水量，将 $\mu\text{g/g fwt}$ 表达数值转换成 $\mu\text{g/g dwt}$ 。

4. 平均值和标准差 SD 为多点分析结果 (n=9)。

5. 对各组织类型，计算其在多个试点中的最大值和最小值。

2002 年美国田间试验生产 MON 88017 全生长季整株组织中 Cry3Bb1 蛋白表达水平

组织类型 ¹	Cry3Bb1蛋白表达水平	
	平均值 (SD)	平均值 (SD)
	范围 (µg/g fwt) ²	范围 (µg/g dwt) ³
OSWP-1 ⁴	50 (6.4) ⁵ 41 – 59 ⁶	500 (64) 410 – 590
OSWP-2	37 (8.0) 26 – 48	380 (170) 150 – 600
OSWP-3	34 (5.2) 25 – 42	310 (48) 230 – 380
OSWP-4	32 (4.4) 26 – 38	220 (23) 190 – 250

1. OSWP-1: V2-V3; OSWP -2: V5; OSWP -3: V8; OSWP -4: V11-V17.
2. 蛋白表达水平以 µg/g fwt 鲜重基准测量，并就方法进行偏差校正。
3. 通过测量各组织含水量，将 µg/g fwt 表达数值转换成 µg/g dwt。
4. OSWP 组织使用 SOP BR-ME-0884 所述秸秆组织测量方法进行，未对 OSWP 组织的 CP4 EPSPS 蛋白水平进行测量。
5. 平均值和标准差 SD 为多点分析结果 (n=9)。
6. 对各组织类型，计算其在多个试点中的最大值和最小值。

2002 年美国田间试验生产 MON 88017 全生长季根部组织中 Cry3Bb1 和 CP4 EPSPS 蛋白表达水平

组织类型 ¹	Cry3Bb1蛋白表达水平		CP4 EPSPS蛋白表达水平	
	平均值 (SD)	平均值 (SD)	平均值 (SD)	平均值 (SD)
	范围 (µg/g fwt) ²	范围 (µg/g dwt) ³	范围 (µg/g fwt)	范围 (µg/g dwt)
OSR-1	39 (8.1) ⁴ 24 – 51 ⁵	370 (80) 240 – 510	16 (3.3) 10 – 21	150 (34) 110 – 220
OSR-2	34 (8.4) 25 – 55	250 (71) 190 – 420	15 (3.3) 12 – 20	110 (29) 74 – 160
OSR-3	29 (8.2) 21 – 50	210 (78) 150 – 410	13 (3.0) 8.9 – 18	100 (30) 62 – 160
OSR-4	26 (5.4) 16 – 34	180 (37) 110 – 230	14 (2.3) 11 – 18	97 (18) 72 – 130
秸秆根	21 (3.1) 17 – 27	130 (29) 98 – 170	11 (2.8) 6.6 – 15	70 (20) 47 – 110
衰老根 ⁶	18 (2.6) 14 – 22	100 (19) 77 – 140	– –	– –

1. OSR-1: V2-V3; OSR -2: V5; OSR -3: V8; OSR -4: V11-V17; 秸秆根: R4-R6; 衰老根: 籽粒收获后。
2. 蛋白表达水平以 µg/g fwt 鲜重基准测量, 并就方法进行偏差校正。
3. 通过测量各组织含水量, 将 µg/g fwt 表达数值转换成 µg/g dwt。
4. OSWP 组织使用 SOP BR-ME-0884 所述秸秆组织测量方法进行, 未对 OSWP 组织的 CP4 EPSPS 蛋白水平进行测量。
5. 平均值和标准差 SD 为多点分析结果 (n=9)。
6. 对各组织类型, 计算其在多个试点中的最大值和最小值。
7. 未对衰老根组织进行 CP4 EPSPS 蛋白表达水平的测量。

2002 年美国田间试验生产 MON 88017 花粉、花丝秸秆和籽粒组织中 Cry3Bb1 和 CP4 EPSPS 蛋白表达水平

组织类型 ¹	<u>Cry3Bb1蛋白表达水平</u>		<u>CP4 EPSPS蛋白表达水平</u>	
	平均值 (SD)	平均值 (SD)	平均值 (SD)	平均值 (SD)
	范围 (µg/g fwt) ²	范围 (µg/g dwt) ³	范围 (µg/g fwt)	范围 (µg/g dwt)
花粉	14 (2.5) ⁴ 11 – 20 ⁵	25 (4.2) 17 – 32	220 (43) 130 – 280	390 (85) 210 – 470
花丝 ⁶	37 (5.6) 30 – 45	380 (65) 300 – 500	– –	– –
秸秆	27 (5.5) 22 – 39	95 (19) 75 – 130	16 (2.1) 12 – 19	57 (7.6) 42 – 69
籽粒	13 (3.1) 8.7 – 19	15 (3.6) 10 – 22	5.1 (0.89) 3.7 – 6.3	5.8 (0.97) 4.1 – 7.1
干草 ⁷	30 (4.4) 25 – 39	88 (13) 71 – 110	– –	– –

1. 花粉：R1；花丝：R1；秸秆：R4-R6；籽粒：R6；干草：籽粒收获后
2. 蛋白表达水平以 µg/g fwt 鲜重基准测量，并就方法进行偏差校正。
3. 通过测量各组织含水量，将 µg/g fwt 表达数值转换成 µg/g dwt。
4. 平均值和标准差 SD 为多点分析结果 (n=9)。
5. 对各组织类型，计算其在多个试点中的最大值和最小值。
6. 未对花丝和干草组织进行 CP4 EPSPS 蛋白表达水平的测量。
7. 干草组织的分析使用 SOP BR-ME-0884 中秸秆测量方法进行。

3-6. MON 88017 插入序列的表达稳定性分析

MON 88017的选育过程中利用CP4 EPSPS作为育种世代的选择标记，通过对幼苗喷施草甘膦来确保CP4 EPSPS在MON 88017后代植株中的有效表达。

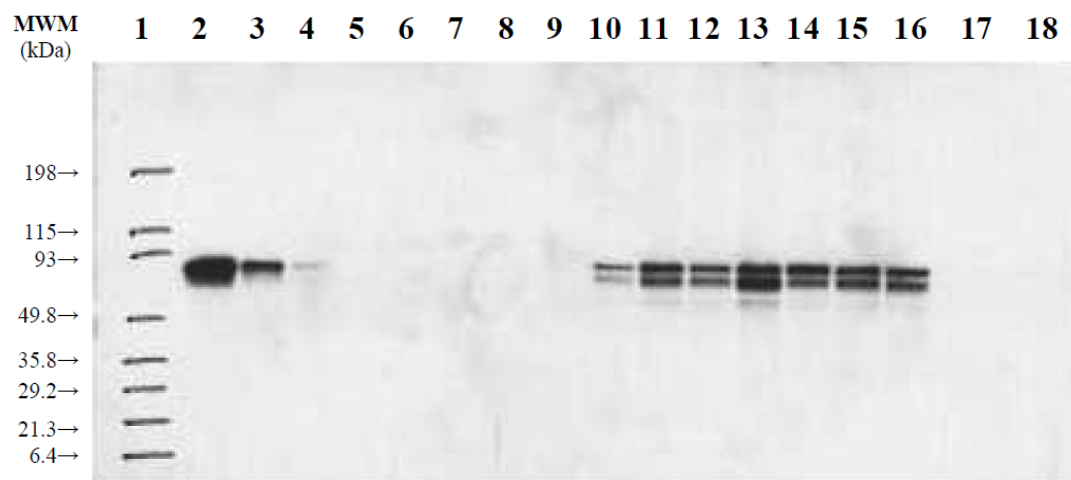
同时，还选取7个代表MON 88017不同育种世代的玉米籽粒组织，利用Cry3Bb1蛋白特异性抗体进行多世代Western印迹分析：LH198BC0F₁、LH198BC0F₂、LH198BC1F₁、(LH198BC0F₁×LH59) F₂、LH198BC1F₃×LH59、LH59×LH198BC3F₃、HC33×LH59BC2F₃。并选用2个商业化应用的常规杂交种和自交系作为对照：商业化常规玉米杂交种LH59×LH198和常规玉米自交系LH198。这两种对照与MON 88017的遗传背景相同。

分析结果表明，在MON 88017玉米的7个不同世代中均检测到全长的Cry3Bb1蛋白，基于电泳迁移率和Western印迹分析方法中特异性多克隆抗体检测结果，发现玉米中的蛋白与大肠杆菌表达Cry3Bb1实质等同。大肠杆菌表达的Cry3Bb1蛋白标准以3个浓度（4、2、1 ng）分别上样于下图中的泳道2、3、4。对照和MON 88017品提取物分别上样至泳道6~7，以及10~16。

MON 88017玉米中插入的cry3Bb1编码序列编码75 kDa的蛋白。从大肠杆菌中分离得到的Cry3Bb1蛋白在约75 kDa分子量处观察到一条主带，符合蛋白标准分析证明中的预期分子量大小。对照物中没有检测到Cry3Bb1蛋白。

此外，MON 88017育种系谱中不同世代MON 88017籽粒提取物的Western分析均证实了Cry3Bb1蛋白在约75、66和55 kDa处存在。之前也观察到Cry3Bb1蛋白的相似带型（Holleschak et al., 2001; Bonner et al., 2003）。几种Cry3蛋白在加工处理后常常会在66和55 kDa处出现额外条带（Carroll et al., 1997; Hori et al., 1994; Rupar et al., 1991; Von Tersch et al., 1994）。最相近的蛋白Cry3Ba1（GenBank Accession No. X17123）和野生型Cry3Bb1（Cry3Bb1, GenBank Accession No. M89794）均在其加工产品的溶液中检测到类似带型。

研究表明，MON 88017玉米中产生的Cry3Bb1蛋白存在于代表MON 88017玉米育种系谱分支上多个世代的MON 88017籽粒提取物中。通过观察比较MON 88017与Cry3Bb1蛋白参照标准所产生条带来证实该蛋白存在于MON 88017玉米多个育种世代中。



MON 87017 中 Cry3Bb1 蛋白表达的多世代稳定性

泳道	样品描述	上样量
1	分子量标准	8 μ l
2	Cry3Bb1 蛋白参照标准	4 ng
3	Cry3Bb1 蛋白参照标准	2 ng
4	Cry3Bb1 蛋白参照标准	1 ng
5	空白泳道	-
6	LH59×LH198（对照物）	30 μ l
7	LH198（对照物）	30 μ l
8	空白泳道	-
9	空白泳道	-
10	MON 88017 / LH198BC0F ₁	30 μ l
11	MON 88017 / LH198BC0F ₂	30 μ l
12	MON 88017 / LH198BC1F ₁	30 μ l
13	MON 88017 / (LH198BC0F ₁ ×LH59) F ₂	30 μ l
14	MON 88017 / LH198BC1F ₃ ×LH59	30 μ l
15	MON 88017 / LH59×LH198BC3F ₃	30 μ l
16	MON 88017 / HC33×LH59BC2F ₃	30 μ l
17	空白泳道	-
18	空白泳道	-

4. 转基因性状及产物的检测和鉴定技术（CBI）

4-1. MON 88017 定性 PCR 检测方法

涉及商业保密资料，故从该版本中删除

4-2. MON 88017 实时定量 TaqMan[®] PCR 检测方法

涉及商业保密资料，故从该版本中删除

5. 各试验阶段审批书的复印件（进口转基因生物直接申请安全证书的，本项不填写）

本申请书为申请 MON 88017 作为加工原料进口的安全证书。

6. 各试验阶段的安全性评价试验总结报告（进口转基因生物直接申请安全证书的，本项不填写）

本申请书为申请 MON 88017 作为加工原料进口的安全证书。

7. 转基因植物对生态环境安全性的综合评价报告

1) 摘要（转述转基因作物的遗传性状、试验年限、评价或检测指标及结论）

孟山都公司应用现代生物技术，将有效耐受草甘膦的 *cp4 epsps* 基因和抗玉米根虫的 *cry3Bb1* 基因构建在同一质粒载体 PV-XMIR39 的 T-DNA 区域中，借助于农杆菌介导的转化方法引入常规玉米中，筛选得到抗虫抗草甘膦玉米 MON 88017。MON 88017 中含有来源于土壤细菌农杆菌属 *Agrobacterium* CP4 菌株的 *cp4 epsps* 基因，其编码合成的 CP4 EPSPS 蛋白（5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸合成酶）对草甘膦的生物抑制作用不敏感，因此可耐受有效成分为草甘膦的除草剂。同时，MON 88017 中还含有来源于苏云金芽胞杆菌的 *cry3Bb1* 基因，其编码合成的 Cry3Bb1 蛋白特异性针对玉米根虫具有杀伤作用。

通过 PCR、Southern 杂交等分子生物学分析，证明了插入表达盒的完整性，以及插入为单一位点的单拷贝插入，并且证明了插入序列在不同世代能够稳定存在。此外，Western 杂交分析也证明了 CP4 EPSPS 蛋白和 Cry3Bb1 蛋白在不同世代能够稳定表达。

受农业部的委托，中国疾病预防控制中心营养与食品安全所于 2006 年对 MON 88017 进行食用安全性检测。检测实验设置 3 个剂量转基因 MON 88017 玉米粉饲料（12.5%、25%和 50%）进行 90 天大鼠喂养实验。结果表明，转基因玉米 MON 88017 掺入饲料喂养大鼠 90 天后，动物活动、生长未见异常，被毛浓密有光泽。未发现转基因玉米 MON 88017 对大鼠体重、食物利用率、血液学指标、脏器重量、脏器比以及组织病理学观察有生物学意义的改变。

综合受体植物（玉米）、基因供体（苏云金芽胞杆菌、土壤农杆菌 CP4 菌株）、转基因操作（农杆菌介导转化）以及转基因玉米新表达蛋白的毒性、致敏性、全食品动物喂养试验等多方面资料进行综合分析，可认为 MON 88017 玉米与常规玉米之间不存在生物学和营养学上的显著差异，现有的食用安全性资料未发现 MON 88017 玉米与常规玉米在食用安全性上存在差异。

同样受农业部委托，山东省农业科学院植物保护研究所于 2007 年在山东省转基因作物试验基地（济南）开展了 MON 88017 转基因玉米的环境安全性检测。基因漂移检测结果表明，转基因玉米通过花粉向其它玉米风传的漂移距离一般不超过 150 m。对生物多样性影响的检测中，除蚜虫外，转基因玉米田和其亲本对照田中各物种包括害虫及其天敌的种群数量无显著差别，说明转基因玉米 MON 88017 对玉米田生物群落没有明显的影响。生存竞争能力检测结果表明，转基因玉米 MON 88017 及其亲本对照在栽培地、荒地和拓荒地条件下，其出苗率、长势、株型、生育期、株高等方面均无显著差异，在栽培地条件下二者产量、与杂草的竞争力、后代种子发芽率等方面也无明显差异。此外，转基因玉米叶斑病及褐斑病的发生明显重于当地玉米品种，其成为有害杂草作物的可能性极低。

各项环境安全性检测数据均表明，与常规玉米相比，MON 88017 没有增加对环境的风险，除了引入了抗虫抗除草剂性状外，MON 88017 与常规玉米是实质等同的。

2) 背景介绍

在抗虫、抗草甘膦玉米 MON 88017 上市之前，孟山都公司按照美国法规监管机构美国农业部动植物检疫局、美国联邦食品与药品管理局的有关法规要求对 MON 88017 进行了大量的环境及食用安全评价研究，包括对环境的影响、成为杂草的潜在可能性、对非靶标生物、遗传物质转移、环境的竞争能力、适应性等，以及转入基因的分子生物

“定值”，营养成分的分析比较、毒理试验等，这些评价结果表明，MON 88017 在环境安全、营养组成、食品安全等方面和其亲本 Hi-II 及常规玉米品种是实质等同的。

抗虫抗草甘膦玉米 MON 88017 已于 2005 年获得美国农业部（USDA）、美国食品与药品管理局（FDA）以及美国环保署（EPA）的相关批准。孟山都公司按照中华人民共和国农业部的有关法规要求，现向中国农业部提出 MON 88017 作为加工原料进口的安全证书的申请，望予以审查批准。

3) 受体生物学特性

用于 MON 88017 转化的最初玉米受体名为“Hi-II”，是 A188 和 B73 自交系玉米的衍生物。它们分别是由美国明尼苏达大学和衣阿华州立大学开发的自交系，市售可得，属栽培类玉米。栽培玉米在分类上属于单子叶植物纲、禾本科（*Gramineae*）、玉蜀黍族（*Maydeae*）、玉蜀黍属（*Zea* L.）。

在早期的分类系统中，玉蜀黍属仅有栽培玉米（*Zea mays* L.）一个种。Wilkes（1967）将类蜀黍属（大刍草“*Teosinte*”）归入玉蜀黍属，成为其中的一个亚属，包括两个种：一年生墨西哥玉米（*Zea mexicana*）和多年生玉米（*Zea perennis*）。根据新的研究结果，Doebly 领导的研究小组对玉蜀黍属内各分类单位的地位进行重新划分，制定了新的分类系统（Iltis and Doebly, 1980; Doebly and Iltis, 1980）：

Gramineae（禾本科）

Maydeae（玉蜀黍族）

Genus *Zea*（玉蜀黍属）

Zea mays L（玉米种）

ssp. mays（栽培玉米亚种）

大量研究表明，玉米很可能于 7,000 到 10,000 年前在墨西哥南部开始驯化。玉米公认的起源尚有争议，但墨西哥类蜀黍很可能在玉米的遗传背景中起了重要作用。玉米在 100 多个国家有商业化种植。主要的玉米生产国是美国、中国、巴西、墨西哥、法国和印度，占全世界玉米总产量的 75%。种植玉米主要是为了收获玉米籽粒，大多数用作动物饲料，也有相当大部分用于食品、制药和工业产品等加工领域。

玉米引入中国的确切时间尚无定论，公元 1511 年的《颍州志》中可找到有关玉米的记载。玉米在中国分布很广，南起海南岛，北到北纬 50° 的黑龙江，东起台湾及沿海各省，西到新疆、青藏高原，都有玉米栽培。东北及西南高寒山区为春播玉米，黄淮海流域为夏播玉米，在广西、海南等省可一年两季种植。根据各地气候条件、生产条件和种植制度，从东北到西南的狭长区域内，形成了中国玉米的主要种植区，即北方春播玉米区、黄淮海夏播玉米区、西南山地玉米区、南方丘陵玉米区、西北灌溉玉米区、青藏高原玉米区。

玉米是一种植株高大粗壮、雌雄同株的一年生自花受粉植物，主要依靠风媒传粉，生存和生殖受到低温条件的限制，其生育期的长短取决于品种特性和生长环境。由于含有较多的遗传位点，玉米通过自交和回交可以稳定遗传。玉米在某些农田和路边以再生植物出现，但如果不进行栽培则不能成长结实（Gould, 1968），没有明显的杂草化倾向。

玉米已有广泛种植和长期安全使用的历史，玉米及其产品没有对人类健康或环境产生不良影响的记载。根据《农业转基因生物安全评价管理办法》第二章第十一条的规定，玉米作为受体植物的安全等级为 I。

4) 基因操作

抗根虫抗草甘膦玉米 MON 88017 是将 *cp4 epsps* 和 *cry3Bb1* 基因构建到同一转化载体 PV-ZMIR39 的 T-DNA 区域内,然后借助于农杆菌介导的转化方法将质粒 PV-ZMIR39 转入常规玉米细胞中,再通过常规选育过程得到的。

通过 PCR、Southern 杂交等分子生物学分析,证明了插入表达盒的完整性,以及插入为单一位点的单拷贝插入,并且证明了插入序列在不同世代能够稳定存在。而质粒中其余部分(质粒骨架)并未整合到植物基因组内。外源 T-DNA 插入玉米基因组时也没有发生植物遗传物质的删除。插入序列包含有 *cp4 epsps* 和 *cry3Bb1* 两个基因表达盒,插入序列大小约为 7.1 kb。在 *cp4 epsps* 基因表达盒中包含有水稻肌动蛋白 1 基因(*actin1*)的启动子(934 bp)、*actin1* 的内含子(461 bp)、拟南芥叶绿体转移肽(*CTP2*)序列(228 bp)、*cp4 epsps* 基因(1368 bp)和 NOS 终止子(256 bp)。而在 *cry3Bb1* 基因表达盒中则包含 35S 启动子(613 bp)、小麦叶绿素 A/B 结合蛋白的非翻译前导序列(251 bp)、*actin1* 的内含子(461 bp)、*cry3Bb1* 基因(1962 bp)、小麦 HSP17 蛋白的 3'端非翻译区编码序列(234 bp)。

如上所述,用于 MON 88017 开发的基因操作使受体生物表现型发生改变但不影响人类健康或环境条件,根据《农业转基因生物安全评价管理办法》第二章第十二条的相关划分标准,应当归于类型 2,即“不影响受体生物安全性的基因操作”。

5) 遗传稳定性

从玉米转化事件 MON 88017 的育种后代中选取多个世代进行拷贝数的 Southern 分析,以确定插入的稳定性。结果表明,7 个世代 LH198BC0F₁、LH198BC0F₂、LH198BC1F₁、[LH198BC0F₁×LH59]F₂、LH198BC1F₃×LH59_(H)、LH59×LH198BC3F_{3(H)}、HC33×LH59BC2F_{3(H)}均表现出一致的 Southern 杂交带型。基于此证据,推论外源 T-DNA 稳定地整合在抗虫抗草甘膦玉米 MON 88017 的基因组中。

对 MON 88017 育种后代 10 个世代的分离数据进行卡方分析(χ^2)以确认插入的数目以及目标性状分离的稳定性,用 ELISA 分析和草甘膦表型选择等方法判断子代性状。分析结果支持 MON 88017 中 T-DNA 为单一位点的插入,其抗虫、抗草甘膦性状符合孟德尔法则遗传。

此外,还利用 Cry3Bb1 蛋白的特异性抗体对上述 7 个世代的 MON 88017 植株进行 Western 分析,分析结果表明,在 MON 88017 玉米的 7 个不同世代玉米籽粒提取物中均在约 75、66 和 55 kDa 处检测到 Cry3Bb1 蛋白的特征条带。由于在 MON 88017 的选育过程中会利用 CP4 EPSPS 作为育种世代的选择标记,通过对幼苗喷施草甘膦来确保 CP4 EPSPS 在 MON 88017 后代植株中的有效表达。因此可以判断,Cry3Bb1 蛋白和 CP4 EPSPS 蛋白均在 MON 88017 多个世代中稳定且有效表达。

6) 环境安全评价

生存竞争能力: 山东济南试验基地进行的生存竞争能力测试中,生存竞争能力测试结果表明,转基因玉米 MON 88017 及其亲本对照在栽培地、荒地和拓荒地条件下,其出苗率、长势、株型、生育期、株高等方面均无显著差异,在栽培地条件下二者产量、与杂草的竞争力、后代种子发芽率等方面也无明显差异。此外,转基因玉米叶斑病及褐斑病的发生明显重于当地玉米品种,其成为有害杂草作物的可能性极低。

基因漂移：在自然生态条件下，有些栽培植物会和周围生长的近缘野生种发生天然杂交，从而将栽培植物中的基因转入近缘野生种中。对玉米而言，异交率受花期株高、花粉量、降水、温度、湿度和传粉昆虫等因子的影响。基因漂移测试结果表明，转基因玉米通过花粉向其它玉米风传的漂移距离一般不超过 150 m。由于在中国目前还没有发现能与玉米异交的近缘种，所以转基因玉米通过花粉向近缘种扩散的风险性较小。

生物多样性：对生物多样性影响的检测中，除蚜虫外，转基因玉米田和其亲本对照田中各物种包括害虫及其天敌的种群数量无显著差别，说明转基因玉米 MON 88017 对玉米田生物群落没有明显的影响。

7) 食用安全评价

营养学评价：孟山都公司在 2002 年美国主要玉米种植区进行 3 个试点的 MON 88017 田间试验，分析秸秆样本和籽粒样本的营养成分，以比较 MON 88017 与非转基因对照在营养成分构成上是否存在差异。结果表明，MON 88017 与非转基因对照间营养成分数据的 248 个对比中，有 232 个没有达到统计学显著水平差异。秸秆的所有均没有达到显著差异。籽粒成分分析方面，有 16 个数据对比的差异达到显著水平，包括 16:0 棕榈酸、18:1 油酸、18:3 亚麻酸、20:0 二十烷酸、铜、甲硫胺酸、含水量、烟酸和丝氨酸（各有一组对比显著）、18:2 亚油酸和维生素 B1。但 MON 88017 籽粒中维生素 B1 数据仍介于文献参考范围内。在 MON 88017 与非转基因对照之间的 16 次显著差异对比中，MON 88017 的分析值均落在以 4 个商业化玉米杂交种分析值为基础得出的 99% 容许区间内。因此，不认为这些差异具有生物学意义。这些分析证明了 MON 88017 玉米的营养成分与对照品系以及其它商业化玉米的营养成分实质相同。

另对 MON 88017 籽粒中已知的玉米抗营养因子（植酸和棉子糖）以及二次代谢产物（阿魏酸和 p-香豆酸）含量进行了测量，并与常规玉米进行对比。没有观察到统计学显著差异。因此，可断定 MON 88017 中抗营养因子和次生代谢产物的含量与非转基因玉米对照是实质等同的。

毒理学评价：CP4 EPSPS 蛋白来源于土壤农杆菌，是自然界中植物和微生物普遍具有的 EPSPS 蛋白的一种，具有长期安全应用历史。MON 88017 表达的 CP4 EPSPS 蛋白，在结构上和其它粮食作物（如大豆和玉米）和微生物食品来源（如面包酵母）的内源 EPSPS 是一样的。同时，MON 88017 表达的 CP4 EPSPS 蛋白质的氨基酸序列与已经获得商业化批准（FDA 和 USDA）的抗农达®作物（如 40-3-2 大豆、NK 603 玉米、1544 棉花和油菜等）中表达的 CP4 EPSPS 具有 >99% 的结构是相似的。另外，天然的 CP4 EPSPS 蛋白质广泛分布在环境中，已有的研究也表明抗农达作物（表达 CP4 EPSPS）不会对环境中的其它生物产生毒性，也不会对人体或动物的健康产生不良的影响。生物信息学分析结果表明，MON 88017 表达的 CP4 EPSPS 蛋白与 TOX_2012 数据库中已知的毒素蛋白没有序列和结构上的相似性。证实了 MON 88017 玉米中表达 CP4 EPSPS 蛋白与大肠杆菌表达蛋白的理化特性及功能的等效性后，对 10 只雄性和 10 只雌性 CD-1 小鼠进行大肠杆菌来源 CP4 EPSPS 蛋白灌胃，采用 3 个剂量（分别为 49、154 和 572 mg/kg bwt）处理。实验中没有发现 CP4 EPSPS 蛋白处理对于小鼠的存活率、临床表现、增重、饲料吸收利用或总的病理学观察有什么不利影响。因此，CP4 EPSPS 蛋白的“未见不良反应剂量”（NOAEL）至少为试验设置最高剂量 572 mg/kg bwt。

® 抗农达是孟山都技术有限公司的注册商标。

苏云金杆菌 (*B.t.*) 的Cry蛋白同样也具有长期安全、广泛使用的历史。MON 88017产生的Cry3Bb1蛋白是Cry3Bb蛋白质家族的一个成员,与已经商业化应用的微生物叶面喷施产品Raven®生物杀虫剂内含有的野生型Cry3Bb1蛋白质相比,在氨基酸序列和性质上有>99%的相似性。MON 88017产生的Cry3Bb1蛋白的氨基酸序列,与保丰(YieldGard®)抗根虫玉米(MON 863)的Cry3Bb1蛋白的氨基酸序列有>99.8%的相似性(仅有1个氨基酸不同),而后者已经获得USDA、US-FDA和中国农业部的批准。此外,以前还针对MON 863进行过的广泛的生物学危害评估,包括几个Cry3Bb1蛋白变体的试验、调查它们对鸟类、鱼类和陆地上非靶标昆虫等代表性物种的影响、估测其在土壤中分解代谢的时间以及评估其对濒危物种和土壤微生物的影响。MON 88017产生的Cry3Bb1蛋白的对非靶标生物(NTO)的曝露临界值(MOE)的值域同MON 863观察发现的值域十分近似。因此,MON 88017产生的Cry3Bb1蛋白质不会对非靶标生物和环境产生有害的影响。在确定植物来源和大肠杆菌来源Cry3Bb1的等效性基础上,根据蛋白最大可得浓度(~37 mg/ml)和66.6 ml/kg体重计算总剂量水平,用纯化的Cry3Bb1蛋白饲喂CD1小鼠,对定量液的分析表明,实际Cry3Bb1蛋白的浓度为靶标剂量的79%。因此,实际剂量为1930 mg/kg。该剂量饲喂小鼠时,没有观察到食物消耗差异。尸解检验时,没有观察到任何与Cry3Bb1蛋白消耗有关的大体病理学症状。该试验条件下,没有观察到小鼠的不良效应,因此,Cry3Bb1对小鼠的急性经口毒性剂量应大于1930 mg/kg体重,即NOEL。

此外,中国疾病预防控制中心营养与食品安全所于2006年对MON 88017进行食用安全性检测。检测实验设置3个剂量转基因MON 88017玉米粉饲料(12.5%、25%和50%)进行90天大鼠喂养实验。结果表明,转基因玉米MON 88017掺入饲料喂养大鼠90天后,动物活动、生长未见异常,被毛浓密有光泽。未发现转基因玉米MON 88017对大鼠体重、食物利用率、血液学指标、脏器重量、脏器比以及组织病理学观察有生物学意义的改变。

致敏性评价: CP4 EPSPS 蛋白的编码序列来源于一个天然存在的土壤常见菌,目前尚无研究表明该菌株为致敏原。此外,大量的理化性质定性和安全性评价研究结果证明了 CP4 EPSPS 蛋白对人类和哺乳动物的安全性,具有长期的安全使用历史。Cry3Bb1蛋白是从苏云金杆菌 *kumamotoensis* 亚种 EG4691 中分离出的野生型 Cry3Bb1 蛋白变体。自 1958 年以来,苏云金杆菌一直被商业化用于微生物杀虫剂(EPA, 1988),目前尚无报道表明人类对苏云金杆菌及其产品发生过敏事件。

还通过生物信息学方法,将 CP4 EPSPS 蛋白与 Cry3Bb1 蛋白与已知过敏原数据库进行搜寻比对,未发现有任何与其相同氨基酸序列和特性的已知过敏原。此外,体外消化实验表明,这两种蛋白在模拟胃肠液条件下被快速消化降解,不具备致敏条件。

抗生素抗性: MON 88017 转化所用的表达载体 PV-ZMIR39 质粒中不含任何抗生素抗性基因,因此所得到的 MON 88017 玉米也不会含有抗生素抗性基因。质粒 PV-ZMIR39 的 T-DNA 区域外构建有 *aad* 选择基因,仅用于细菌和质粒的筛选,它受质粒上的细菌启动子调控,在植物体内不能表达。此外, Southern 杂交分析表明,质粒上除 T-DNA 以外的骨架序列在 MON 88017 基因组中均未检出。

® Raven 是 Ecogen 公司的注册商标。

® YieldGard 是孟山都技术公司的注册商标。

8) 非预期效应

MON 88017 于 2005 年在美国进行了大量的环境安全、食用安全评价试验。结果如预期的一样, MON 88017 是安全的, 未发现非预期效应。2005 年在美国被批准商业化应用, 2006 年又在加拿大被批准商业化种植。迄今为止并没有关于转基因玉米对人类、动物和环境产生不利影响的报道。MON 88017 在产地国种植或作为食用/饲用进口过程中未发现对人类健康和环境产生不利影响, 未发现非预期效应。MON 88017 在中国境内的环境安全和食用安全检测结果也是如此, 未发现非预期效应。

9) 生产应用前景及拟采取的安全监控措施

中国曾经是全球最主要的玉米生产国、消费国和出口国。随着中国人口的增长, 城镇化步伐加快, 人民生活水平不断提高, 对肉类消费需求的日益增加, 中国国内的玉米消费也出现大幅上涨。同时水资源缺乏和耕地面积缩减, 使得国内的供求关系发生明显的变化。从全球最主要的玉米出口国转变为“潜在的全球最大的玉米进口”。

在全球范围内, 虫害和杂草是影响玉米产量的重要因素。抗虫抗草甘膦玉米由于其出色的二价性状, 为广大农民提供了更简单、便捷的选择。

孟山都公司在中国申请抗虫抗草甘膦玉米 MON 88017 安全证书的目的在于进口用作加工原料, 主要作为饲料或其它加工产品, 并不用于种植目的。作为抗虫抗草甘膦玉米 MON 88017 的技术研发商, 孟山都公司会在进口安全证书的使用上, 严格按照相应的法律法规以及农业部批准的安全证书的要求, 使用和管理 MON 88017 安全证书。并会明确要求贸易商清楚了解批准的安全证书应用范围和有效期, 要求贸易商在有效期范围内向孟山都公司申请 MON 88017 进口安全证书的复印件, 并要求贸易商采取措施, 确保按照安全证书批复要求来使用安全证书复印件, 不得改变进口用途。

10) 结论

综上所述, 通过对受体植物(玉米)、基因供体(苏云金芽胞杆菌、土壤农杆菌 CP4 菌株)、转基因操作(农杆菌介导转化)以及转基因玉米新表达蛋白的毒性、致敏性、全食品动物喂养试验等多方面资料进行综合分析, 可认为 MON 88017 玉米与常规玉米之间不存在生物学和营养学上的显著差异。大量的研究结果表明, 抗虫抗草甘膦玉米 MON 88017 对人类健康和环境安全没有不良影响, 与其受体亲本及常规玉米品种实质等同。

8. 食品安全性的综合评价报告，包括：A) 必要的动物毒理试验报告；B) 食品过敏性评价试验报告；C) 与非转基因植物比较，其营养成分及抗营养因子分析报告等

见附件资料 7 的相关内容。

9. 该类转基因植物国内外生产应用概况

2007 年，利用转基因技术开发的遗传改良（genetically modified, GM）作物在全球的种植面积达到 1.143 亿公顷，比 2006 年增长 12%，占全球可耕地面积的 8%，种植转基因作物的国家也从 2004 年的 17 个增加到 23 个。其中美国、阿根廷、巴西、加拿大、印度和中国是主要转基因作物种植国家。1996 年世界第一个转基因作物被批准商业化。从 1996 年至 2007 年，转基因作物的商业化发展速度很快，从 1996 年 170 万公顷到 2007 年的 1.143 亿公顷，12 年间增长了 67 倍，特别是在一些工业化国家。就转基因性状而言，目前通过转基因技术导入并商业化开发的最重要性状当属抗除草剂，2007 年抗除草剂的转基因作物（主要包括大豆、玉米、棉花、油菜和苜蓿）种植面积为 7220 万公顷，占全球转基因作物种植面积的 63%；其次是抗虫性，抗虫转基因作物（主要是玉米、棉花和其他作物）面积为 2030 万公顷，占 18%。2007 年全球首次出现了复合转基因性状（2 个基因和 3 个基因复合）产品应用大幅度增加，种植面积达到 2180 万公顷，占全球转基因作物应用面积的 19%。还有其他一些转基因性状也已被商业化利用，如抗病毒，只是种植面积相对较少。对于转基因作物，抗除草剂大豆，包括复合性状产品，是最大的转基因作物，2007 年的种植面积达到 5860 万公顷，占全球转基因作物总面积的 51%；转基因玉米占第二位，但发展很快，达到 3520 万公顷，占 31%，转基因棉花 1500 万公顷，占 13%，转基因油菜为 550 万公顷，占 5%（James, 2007）。

抗虫抗草甘膦玉米 MON 88017 已经获得了美国农业部（USDA）、美国食品与药品管理局（FDA）以及美国环保署（EPA）的相关批准，在美国开始商业化种植。

MON 88017 中表达的 CP4 EPSPS 和 Cry3Bb1 蛋白分别与 NK 603 和 MON 863 相同。NK 603 和 MON 863 已经商业化种植超过 10 年。自投放市场以来，这两个玉米转化事件已经广泛种植并作为食品和饲料消费。并且中国也已经于 2004 年批准 NK 603 和 MON 863 进口用作加工原料的安全证书。

10. 田间监控方案，包括监控技术、抗性治理措施、长期环境效应的研究方法等

抗虫抗草甘膦玉米 MON 88017 只在中国申请了用作加工原料的进口安全证书，并未申请用于商业化种植。

如果能够获得 MON 88017 的进口安全证书，孟山都公司会按照相关的法律法规和农业部批准的安全证书上的要求严格使用和管理安全证书，并要求贸易商清楚了解批准的安全证书应用范围和有效期，要求贸易商在有效期范围内向孟山都公司申请 MON 88017 进口安全证书的复印件。孟山都公司对贸易商在安全证书使用上的要求将包括：

- 1、 要求贸易商必须持有相应转化事件的进口安全证书才能进口含有相应转化事件的商品。
- 2、 孟山都公司提供的安全证书复印件只供申请的贸易商自用或其拥有或控制的子公司使用。
- 3、 贸易商必须同意只按照安全证书的批准范围使用安全证书，不得将其复印件提供给任何第三方。
- 4、 贸易商在使用安全证书进行交易时必须严格遵守相关的法律和法规。
- 5、 所提供的安全证书只允许作为加工原料用于食用及饲用的原料的进口，不支持作为遗传研究或种植的材料进口。贸易商必须同意采取必要合理的安全控制手段，以保证进口原料不会被释放到环境中或者被用于可能对生物多样性、可持续利用或人类健康存在潜在风险的用途。
- 6、 如果贸易商没有按照规定使用安全证书，孟山都公司保留收回安全证书使用权的权力。

除了安全证书使用上对贸易商提出明确要求外，孟山都公司还会详细记录并保存所有申请过安全证书复印件的贸易商信息，包括公司名称、地址、联系人、联系电话和电子邮箱地址，以便更好的对使用孟山都公司安全证书的贸易商进行监督。此外，孟山都公司还会就包装/标识和运输环节，对从事转基因产品贸易的贸易商提出要求，并不定期的回访贸易商，对进口产品进行监督，如发现任何违规操作或意外事件发生，立即向当地的农业行政主管部门和农业部报告。

11. 审查所需的其它相关资料

随本申请书一起提交的还包括一些关于 MON 88017 在输出国进行的安全评价研究报告, 以及由农业部制定的检测机构在中国进行的环境安全和食用安全检测报告。提交的研究报告包括:

报告 1	保丰抗根虫、抗农达玉米 MON 88017 的分子生物学分析 (孟山都公司报告: MSL-17609)	142
报告 2	在 2002 年美国进行的田间试验中采集的 MON 88017 组织中 Cry3Bb1 蛋白和 CP4 EPSPS 蛋白表达水平 (孟山都公司报告: MSL-18823)	207
报告 3	用 Western-blotting 证明 MON 88017 多个世代间 Cry3Bb1 蛋白的表达 (孟山都公司报告: MSL 18854)	232
报告 4	2001 年在美国进行的田间试验中 MON 88017 的表现型和生态学观察: 实质等同和杂草化倾向的评估 (孟山都公司报告: MSL 17652)	250
报告 5	2002 年在美国进行的田间试验中 MON 88017 的表现型和生态学观察: 实质等同和杂草化倾向的评估 (孟山都公司报告: MSL 18944)	286
报告 6	Cry3Bb1 蛋白对靶标生物和非靶标生物 (NTO) 的影响 (孟山都公司研究报告)	327
a	对玉米根虫 (WCRW) 的影响 (MSL 18799)	327
b	对瓢虫 (<i>Coleomegilla maculata</i>) 幼虫的影响 (MSL 16907)	352
c	对瓢虫 (<i>Coleomegilla maculata</i>) 成虫的影响 (MSL 16936)	379
d	对瓢虫 (<i>Hippodamia convergens</i>) 的影响 (MSL 17171)	404
e	对蜜蜂 (<i>Apis mellifera</i> L.) 幼虫的影响 (MSL 17761)	422
f	对寄生蜂 (<i>Nasonia vitripennis</i>) 的影响 (MSL 18136)	442
g	对花蝽象 (<i>Orius insidiosus</i>) 的影响 (MSL 19697)	463
报告 7	CP4 EPSPS 蛋白与 AD4、TOXIN5 和 ALLPEPTIDES 数据库中已知蛋白的生物信息学分析 (孟山都公司报告: MSL 18752)	506
报告 8	Cry3bb1 蛋白与 AD4、TOXIN5 和 ALLPEPTIDES 数据库中已知蛋白的生物信息学分析 (孟山都公司报告: MSL 18709)	528
报告 9	利用 AD7 数据库更新 CP4 EPSPS 的生物信息学分析 (孟山都公司报告: MSL 20627)	550

报告 10 利用 AD7 数据库更新 Cry3Bb1 的生物信息学分析(孟山都公司报告: MSL 20693)	583
报告 11 CP4 EPSPS 蛋白的小鼠急性经口毒理学研究(孟山都公司报告: MSL 13077)	595
报告 12 MON 88107 和大肠杆菌生产的 CP4 EPSPS 蛋白理化性质和功能等同性评价(孟山都公司报告: MSL 18815)	627
报告 13 大肠杆菌生产的 Cry3Bb1 蛋白的小鼠急性经口毒理学研究(孟山都公司报告: MSL 18711)	666
报告 14 MON 88107 和大肠杆菌生产的 CP4 EPSPS 蛋白理化性质和功能等同性评价(孟山都公司报告: MSL 18816)	699
报告 15 MON 88017 籽粒的 90 天大鼠喂养试验(孟山都公司报告: MSL19792)	742
报告 16 大肠杆菌生产的 CP4 EPSPS 蛋白在离体模拟胃液(SGF)条件下的消化试验(孟山都公司报告: MSL 17566)	868
报告 17 大肠杆菌生产的 Cry3Bb1 蛋白在离体模拟胃液(SGF)和模拟肠液(SIF)条件下的消化试验(孟山都公司报告: MSL 18662)	887
报告 18 在 2002 年美国进行的田间试验中采集的 MON 88017 不同组织的成分分析(孟山都公司报告: MSL 18661)	912
报告 19 MON 88017 进口到中国的膳食风险评估(孟山都公司报告: MSL 20911)	941
报告 20 MON 88017 籽粒经热处理后 CP4 EPSPS 蛋白的免疫学检测(孟山都公司报告: MSL 19317)	1012
报告 21 MON 88017 籽粒经热处理后 Cry3Bb1 蛋白的免疫学检测(孟山都公司报告: MSL 18980)	1029
报告 22 山东农科院植保所关于 MON 88017 在中国境内的环境安全检测报告	1059
报告 23 中国疾病预防控制中心营养与食品安全中心关于 MON 88017 的食用安全检测报告	1089

12. 转基因生物在输出国家或地区已经允许作为相应用途并投放市场的证明文件（境内单位申请安全证书的，本项不填写）

MON 88017 在国外获得批准文件目录

- 1、美国食品与药品管理局（US-FDA）关于 MON 88017 批复函及复印件及中文翻译
- 2、美国环保署（US-EPA）关于 MON 88017 的批准文件复印件及中文翻译件
- 3、美国农业部（USDA）关于 MON 88017 批准文件复印件及中文翻译

1 美国食品药品监督管理局（FDA）批准文件复印件及翻译



DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES

Public Health Service

Food and Drug Administration
College Park, MD 20740

JAN 12 2005

Ravinder S. Sidhu, Ph.D.
Regulatory Affairs Manager
Monsanto Company
800 North Lindbergh Boulevard
St. Louis, MO 63167



Dear Dr. Sidhu:

This is in regard to Monsanto Company's (Monsanto) consultation with the Food and Drug Administration (FDA) (Center for Food Safety and Applied Nutrition and Center for Veterinary Medicine) on genetically engineered corn line MON 88017. According to Monsanto, this new line is genetically engineered to express two new proteins, Cry3Bb1 and CP4 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase (CP4 EPSPS). The Cry3Bb1 protein confers resistance to Coleopteran insects such as corn rootworm; CP4 EPSPS confers tolerance to glyphosate and is used as a selectable marker. All materials relevant to this notification have been placed in a file designated BNF 0097. This file will be maintained in the Office of Food Additive Safety.

As part of bringing the consultation regarding this product to closure, Monsanto submitted a summary of its safety and nutritional assessment of the genetically engineered corn on March 30, 2004. Monsanto submitted additional information on May 18, June 22, and October 18, 2004. These communications informed the FDA of the steps taken by Monsanto to ensure that this product complies with the legal and regulatory requirements that fall within FDA's jurisdiction. Based on the safety and nutritional assessment Monsanto has conducted, it is our understanding that Monsanto has concluded that corn grain and forage derived from the new variety are not materially different in composition, safety, and other relevant parameters from corn grain and forage currently on the market and that genetically engineered corn line MON 88017 does not raise issues that would require premarket review or approval by FDA.

Because the Environmental Protection Agency (EPA) regulates pesticidal substances and pesticidal inert ingredients, FDA has not evaluated the information related to the safety of the Cry3Bb1 and CP4 EPSPS proteins. It is Monsanto's responsibility to obtain all appropriate clearances, including those from the EPA and the United States Department of Agriculture, before marketing food or feed derived from corn line MON 88017.



Page 2 – Dr. Sidhu

Based on the information Monsanto has presented to FDA, we have no further questions concerning grain and forage derived from corn line MON 88017 at this time. However, as you are aware, it is Monsanto's continued responsibility to ensure that foods marketed by the firm are safe, wholesome, and in compliance with all applicable legal and regulatory requirements.

Sincerely yours,

A handwritten signature in cursive script that reads "Laura M. Tarantino".

Laura M. Tarantino, Ph.D.
Director
Office of Food Additive Safety
Center for Food Safety
and Applied Nutrition

2005 年 1 月 12 日

Dr. Ravinder S. Sidhu Ph.D.
法规事务经理
孟山都公司
North Lindberg 大街 800 号
圣路易斯，密苏里州 63167

尊敬的 Dr. Sidhu:

此信是对孟山都公司关于遗传改良玉米 MON88017 寻求 FDA 咨询的回复，根据孟山都公司提供资料，转基因玉米 MON88017 表达来源于 CP4 菌株的 5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶（CP4 EPSPS）和 Cry3Bb1 蛋白。Cry3Bb1 蛋白能够杀害鞘翅类昆虫，例如玉米根虫；CP4 EPSPS 蛋白使得作物能够耐受草甘磷类除草剂，同时也可用作选择标记。所有关于此项申请的材料均归档于 BNF0097，这些资料将由食品添加剂安全办公室保存管理。

孟山都公司曾经在 2004 年 3 月 30 日向本机构提交了转基因玉米 MON 88017 在安全及营养评估方面的总结性材料，孟山都分别在 5 月 18 日、6 月 22 日和 10 月 18 日又提供了补充材料，我们理解孟山都公司所做的这些沟通并通知 FDA 都是为确保此产品遵循联邦食品、药品及化妆品的有关法律。同时我们也认为根据你公司所进行的安全及营养评估，你们得出的结论是转基因玉米 MON88017 在玉米安全性、组成成份以及其他相关要素与常规玉米没有实质性的不同，因此不需要进行市场准入前的复审及批准。

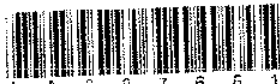
由于美国环境保护署（EPA）在杀虫剂物质等方面进行管理，为此食品与药品管理局就 CP4 EPSPS 和 Cry 3Bb1 蛋白质的杀虫活性等相关的安全性就不再审查。孟山都公司在上市 MON88017 衍生的食品和饲料产品之前，还需要获得其他相关部门如美国农业部、美国环保局的批准。

根据这次咨询的有关数据的描述及提供的信息，我们没有其他意见，但是孟山都公司有责任来保证此产品在市场上是安全的，有益健康的并遵循其他相关的法律与法规。

您诚挚的

Laura M. Tarantino 博士
主任
食品添加剂安全办公室
食品安全与应用营养中心

2 美国环境保护署（EPA）批准文件复印件及翻译

 U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY Office of Pesticide Programs Biopesticides and Pollution Prevention Division (7511C) 1200 Pennsylvania Avenue NW Washington, DC 20460 NOTICE OF PESTICIDE: ☒ Registration ☐ Reregistration (under FIFRA, as amended)	EPA Reg. Number: 524-551	Date of Issuance: 12/13/05
	Term of Issuance: Conditional	
	Name of Pesticide Product: MON 88017	
Name and Address of Registrant (include ZIP Code): Monsanto Company 1300 I Street, NW, Suite 450 East Washington, DC 20005		
Note: Changes in labeling differing in substance from that accepted in connection with this registration must be submitted to and accepted by the Biopesticides and Pollution Prevention Division prior to use of the label in commerce. In any correspondence on this product always refer to the above EPA registration number.		
On the basis of information furnished by the registrant, the above named pesticide is hereby registered/reregistered under the Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act. Registration is in no way to be construed as an endorsement or recommendation of this product by the Agency. In order to protect health and the environment, the Administrator, on his motion, may at any time suspend or cancel the registration of a pesticide in accordance with the Act. The acceptance of any name in connection with the registration of a product under this Act is not to be construed as giving the registrant a right to exclusive use of the name or to its use if it has been covered by others. The registration application referred to above, submitted in connection with registration under § 3(c)(7)(C) of the Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act, as amended, is acceptable provided that you do the following terms and conditions. 1) Submit/cite all data required for registration of your product under FIFRA § 3(c)(5) when the Agency requires all registrants of similar products to submit such data. 2) The subject registration will automatically expire on midnight September 30, 2010. 3) The subject registration will be limited to <i>Bacillus thuringiensis</i> Cry3Bb1 protein and the genetic material necessary for its production (Vector ZMIR39) in MON 88017 corn (OECD Unique Identifier: MON-88017-3 for use in field corn).		
 A A 0 8 7 6 5 1 RECEIVED DEC 14 2005 		
Signature of Approving Official:  (See Signature on Page 6)		Date: 12/13/05

EPA Form 8570-6

4) Submit all data required to support the individual plant-incorporated protectant in Event MON863 (YieldGard Rootworm), 524-528. In the event that the Agency concludes MON 863 (YieldGard Rootworm) studies do not sufficiently demonstrate a lack of significant adverse effects, additional data with MON 88017 corn must be submitted. These data may include a) laboratory toxicity testing with *Orius insidiosus* (minute pirate bug), b) laboratory toxicity testing with a carabid (ground beetle), c) long range effects testing on invertebrate populations in the field, and d) long range soil persistence testing.

5) You must commit to do the following Insect Resistance Management Program:

a. Refuge Requirements

These refuge requirements do not apply to seed increase/propagation of inbred and hybrid seed corn.

1. Grower agreements (also known as stewardship agreements) will specify that growers must adhere to the refuge requirements as described in the grower guide/product use guide and/or in supplements to the grower guide/product use guide.
2. Specifically, growers must plant a structured refuge of at least 20% non-corn rootworm protected Bt corn that may be treated with insecticides as needed to control corn rootworm larvae. Growers will not be permitted to apply CRW labeled insecticides to the refuge for control of insect pests while adult corn rootworm are present unless the Cry3Bb1 field is treated in a similar manner.
3. Refuge planting options include: refuge acres should be planted as blocks adjacent to MON 88017 corn fields, perimeter strips, or as in-field strips.
4. External refuges must be planted adjacent (e.g., across the road) to Cry3Bb1 MON 88017 fields.
5. When planting the refuge in strips across the field, refuges must be at least 4 rows wide, preferably 6 consecutive rows wide.
6. Insecticide treatments for control of corn rootworm larvae may be applied. Instructions to growers will specify that insecticides labeled for control of corn rootworm adults cannot be applied while adults are present in the refuge unless the Cry3Bb1 field is treated in a similar manner.
7. If the refuge is planted in a field that is in a crop rotation system, then MON 88017 must also be planted in a field that is in a crop rotation system.
8. If the refuge is planted on continuous corn, then the MON 88017 field may be planted on either continuous or in a field that is in a crop rotation system.

b. Grower Agreements

- 1] Persons purchasing the Bt corn product must sign a grower agreement. The term "grower agreement" refers to any grower purchase contract, license agreement, or similar legal document.
- 2] The grower agreement and/or specific stewardship documents referenced in the grower agreement must clearly set forth the terms of the current IRM program. By signing the grower agreement, a grower must be contractually bound to comply with the requirements of the IRM program.
- 3] You must develop a system (equivalent to what is already approved for MON 810, EPA Reg. No. 524-489) which is reasonably likely to assure that persons purchasing the Bt corn product will affirm annually that they are contractually bound to comply with the requirements of the IRM program. The proposed system will be submitted to EPA within 90 days from the date of registration.
- 4] You must use grower agreements and submit to EPA within 90 days from the date of registration a copy

of that agreement and any specific stewardship documents referenced in the grower agreement. If Monsanto wishes to change any part of the grower agreement or any specific stewardship documents referenced in the grower agreement that would affect either the content of the IRM program or the legal enforceability of the provisions of the agreement relating to the IRM program, thirty days prior to implementing a proposed change, you must submit to EPA the text of such changes to ensure that it is consistent with the terms and conditions of the amendment.

5] You must establish a system (equivalent to what is already approved for MON 810, EPA Reg. No. 524-489) which is reasonably likely to assure that persons purchasing the Bt corn sign grower agreement(s), and must provide within 90 days from the date of the registration a written description of that system.

6] You shall maintain records of all Bt corn grower agreements for a period of three years from December 31st of the year in which the agreement was signed.

7] Beginning on January 31, 2007 and annually thereafter, you shall provide EPA with a report showing the number of units of its Bt MON 88017 corn seeds sold or shipped and not returned, and the number of such units that were sold to persons who have signed grower agreements. The report shall cover the time frame of the twelve-month period covering the prior August through July.

8] You must allow a review of the grower agreements and grower agreement records by EPA or by a State pesticide regulatory agency if the State agency can demonstrate that confidential business information, including names, personal information, and grower license number, will be protected.

c. IRM Education and IRM Compliance Monitoring Programs

1] Monsanto must design and implement a comprehensive, ongoing IRM education program designed to convey to Bt MON 88017 corn users the importance of complying with the IRM program. The program shall include information encouraging Bt MON 88017 corn users to pursue optional elements of the IRM program relating to refuge configuration and proximity to Bt MON 88017 corn fields. The education program shall involve the use of multiple media, e.g. face-to-face meetings, mailing written materials, EPA reviewed language on IRM requirements on the bag or bag tag, and electronic communications such as by Internet, radio, or television commercials. Copies of the materials will be provided to EPA for its records. The program shall involve at least one written communication annually to each Bt MON 88017 corn user separate from the grower technical guide. The communication shall inform the user of the current IRM requirements. Monsanto shall coordinate its education programs with educational efforts of other registrants and other organizations, such as the National Corn Growers Association and state extension programs.

2] Annually, you shall revise, and expand as necessary, your education program to take into account the information collected through the compliance survey required under paragraph 6] and from other sources. The changes shall address aspects of grower compliance that are not sufficiently high.

3] On January 31, 2007, you must provide a report to EPA summarizing the activities carried out under the education program for the prior year. Annually thereafter, you must provide EPA any substantive changes to your grower education activities as part of the overall IRM compliance assurance program report. The required features of the compliance assurance program are described in paragraphs 4]-15] below.

4] You must design and implement an ongoing IRM compliance assurance program designed to evaluate the extent to which growers purchasing its MON 88017 Bt corn product are complying with the IRM program and that takes such actions as are reasonably needed to assure that growers who have not complied with the program either do so in the future or lose their access to the MON 88017 Bt corn product. You shall coordinate with other Bt corn registrants in designing and implementing its compliance assurance program and integrate the Cry3Bb1 CAP with the CAP already approved for

MON810, EPA Registration Number 524-489. You must prepare and submit within 90 days of the date of registration a written description of their compliance assurance program. Other required features of the program are described in paragraphs 5] - 15] below.

5] You must establish and publicize a “phased compliance approach,” i.e., a guidance document that indicates how you will address instances of non-compliance with the terms of the IRM program and general criteria for choosing among options for responding to any non-compliant growers. The options shall include withdrawal of the right to purchase MON 88017 Bt corn for an individual grower or for all growers in a specific region. An individual grower found to be significantly out of compliance two years in a row would be denied sales of the product the next year. Similarly, seed dealers who are not fulfilling their obligations to inform/educate growers of their IRM obligations will lose their opportunity to sell MON 88017 Bt corn.

6] The IRM compliance assurance program shall include an annual survey of a statistically representative sample of Bt corn growers conducted by an independent third party. The survey shall measure the degree of compliance with the IRM program by growers in different regions of the country and consider the potential impact of non-response. The sample size and geographical resolution may be adjusted annually, based upon input from the independent marketing research firm and academic scientists, to allow analysis of compliance behavior within regions or between regions. The sample size must provide a reasonable sensitivity for comparing results across the U.S. The survey will include only growers planting at least 200 acres of corn in the Corn Belt or 100 acres of corn in corn/cotton growing regions.

7] The survey shall be designed to provide an understanding of any difficulties growers encounter in implementing IRM requirements. An analysis of the survey results must include the reasons, extent, and potential biological significance of any implementation deviations.

8] The survey shall be designed to obtain grower feedback on the usefulness of specific educational tools and initiatives.

9] You shall provide a final written summary of the results of the prior year’s survey (together with a description of the regions, the methodology used, and the supporting data) to EPA by January 31 of each year, beginning with 2007. You shall confer with EPA on the design and content of the survey prior to its implementation.

10] Annually, you shall revise, and expand as necessary, your compliance assurance program to take into account the information collected through the compliance survey required under paragraphs 6] through 8] and from other sources. The changes shall address aspects of grower compliance that are not sufficiently high. You must confer with the Agency prior to adopting any changes to a previously approved CAP.

11] You shall train its representatives who make on-farm visits with MON 88017 Bt corn growers to perform assessments of compliance with IRM requirements. In the event that any of these visits result in the identification of a grower who is not in compliance with the IRM program, you shall take appropriate action, consistent with your “phased compliance approach,” to promote compliance. This on-farm assessment program has no minimum acreage threshold for growers.

12] You shall carry out a program for investigating legitimate “tips and complaints” that its growers are not in compliance with the IRM program. Whenever an investigation results in the identification of a grower who is not in compliance with the IRM program, you shall take appropriate action, consistent with your “phased compliance approach.”

13] If a grower, who purchases MON 88017 Bt corn for planting, was specifically identified as not being in compliance during the previous year, You shall visit with the grower and evaluate whether that the grower is in compliance with the IRM program for the current year.

14] Beginning January 31, 2007 and annually thereafter, Monsanto shall provide a report to EPA

summarizing the activities carried out under their compliance assurance program for the prior year and the plans for the compliance assurance program during the current year. The report will include information regarding grower interactions (including, but not limited to, on-farm visits, verified tips and complaints, grower meetings and letters), the extent of non-compliance, corrective measures to address the non-compliance, and any follow-up actions taken.

15] Monsanto and the seed corn dealers for Monsanto must allow a review of the compliance records by EPA or by a State pesticide regulatory agency if the State agency can demonstrate that confidential business information, including the names, personal information, and grower license number of the growers will be protected.

9d. Insect Resistance Monitoring

The Agency is imposing the following conditions for this product:

You must monitor for Cry3Bb1 resistance and/or trends in increased tolerance for corn rootworm. Sampling should be focused in those areas in which there is the highest risk of resistance development.

1. You must provide EPA its resistance monitoring plan for approval. A revised monitoring plan must be submitted to the Agency with 3 months of the date of registration consisting of a description of the steps to be taken to establish corn rootworm baseline sensitivity and damage guidelines. A detailed resistance monitoring plan must be submitted to the Agency for review by January 31, 2008. This plan must include: baseline sensitivity data, sampling (number of locations, samples per locations), sampling methodology and life-stage sampled, bioassay methodology, standardization procedures (including QA/QC provisions), detection technique and sensitivity, the statistical analysis of the probability of detecting resistance, and an interim description of rootworm damage guidelines.
2. You must develop and validate an appropriate discriminating or diagnostic dose assay by January 31, 2010.
3. You must finalize rootworm damage guidelines and submit these to BPPD by January 31, 2010.
4. You must follow-up on grower, extension specialist or consultant reports of unexpected damage or control failures for corn rootworm.
5. You must provide EPA with an annual resistance monitoring report by August 31st of each year beginning with 2007, reporting on populations collected the previous year.

e. Remedial Action Plans

Once a remedial action plan is approved for MON 863, it also must be used for corn rootworm suspected and confirmed resistance in MON 88017. If corn rootworm resistance is confirmed, all acres (MON 88017 and refuges) must be treated with insecticides targeted at CRW adults as well as larvae.

The annual reporting requirements are as follows:

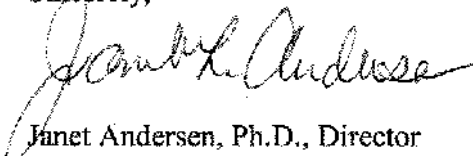
- 1) Annual Sales: reported and summed by state (county level data available by request), January 31st each year;

- 2) Grower Agreement: number of units of *Bt* corn seeds shipped or sold and not returned, and the number of such units that were sold to persons who have signed grower agreements, January 31st each year;
- 3) Grower Education: substantive changes to education program completed previous year, January 31st each year;
- 4) Compliance Assurance Plan: Compliance Assurance Program activities and results, January 31st each year;
- 5) Compliance: to include annual survey results and plans for the next year; full report January 31st each year;
- 6) Insect Resistance Monitoring Results: results of monitoring and investigations of damage reports, August 31st each year.

If these conditions are not complied with, the registration will be subject to cancellation in accordance with FIFRA sec. 6(e). Your release for shipment of the product constitutes acceptance of these conditions.

A stamped copy of the label is enclosed for your records.

Sincerely,



Janet Andersen, Ph.D., Director
Biopesticides and Pollution
Prevention Division (7511C)

MON 88017

Rootworm-Protected Corn Seed (OECD Unique Identifier: MON-88Ø17-3)

This product is effective in controlling damage caused by corn rootworm larval feeding on corn roots.

Active Ingredient:

Bacillus thuringiensis Cry3Bb1 protein and the genetic material necessary for its production (Vector ZMIR39) in event MON 88017 corn (OECD Unique Identifier: MON-88Ø17-3).....0.0075 - 0.013%

Other Ingredients:

Substance produced by a marker gene and the genetic material necessary for its production (Vector ZMIR39) in event MON 88017 corn (OECD Unique Identifier: MON-88Ø17-3).....0.0042 - 0.0069%

Percentage (wt/wt) on a dry weight basis whole plant (forage).

CAUTION

KEEP OUT OF REACH OF CHILDREN

NET CONTENTS_____

EPA Registration No. 524-~~XXXX~~ 551

EPA Establishment No. 524-MO-002

Monsanto Company
800 North Lindbergh Blvd.
St. Louis, MO 63167

ACCEPTED
with COMMENTS
In EPA Letter Dated

December 12, 2005

Under the Federal Insecticide,
Fungicide, and Rodenticide Act
as amended, for the pesticide
registered under EPA Reg. No.
524-551

DIRECTIONS FOR USE

It is a violation of Federal law to use this seed in any manner inconsistent with this labeling.

The following information regarding commercial production must be included in the MON 88017 corn Technology Use Guide (IRM Guide).

INSECT RESISTANCE MANAGEMENT

Growers of MON 88017 must adhere to the following refuge requirements. Growers must plant a structured refuge of at least 20% non-corn rootworm protected corn.

Refuge planting options include: adjacent blocks, perimeter strips or in-field strips. If blocks are implemented they must be adjacent (e.g., across the road) to the MON 88017 field. If perimeter strips are implemented, the strips must be at least 4, and preferably 6 consecutive rows wide. If strips within a MON 88017 field are implemented, the strips must be at least 4, and preferably 6 consecutive rows wide.

The refuge and MON 88017 acres should be managed under comparable agronomic regimes. If the refuge is planted in a field that is in a crop rotation system, then MON 88017 must also be planted in a field that is in a crop rotation system. If the refuge is planted on continuous corn, then the MON 88017 field may be planted on either continuous or in a field that is in a crop rotation system.

Growers have the option of applying conventional insecticides to the corn refuge for control of corn rootworm larvae and other soil pests. The corn refuge can be treated with a non-*B.t.* insecticide to control late season pests such as corn borer or corn rootworm adults. However, if growers opt to treat the refuge while adult corn rootworm are present, then the MON 88017 acres must be treated in a like manner.

These refuge requirements will not apply to operations engaged in the propagation of inbred seed corn.

CORN INSECTS CONTROLLED OR SUPPRESSED

This field corn has been transformed using biotechnology to produce the *B.t.* protein, Cry3Bb1, for control or suppression of the following coleopteran insects:

Western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*)
Northern corn rootworm (*Diabrotica barberi*)
Mexican corn rootworm (*Diabrotica virgifera zea*)

MON 88017 is a product of Monsanto's research program offering unique genetic characteristics for specific grower needs and may be protected by one or more of the following U.S. Patents: 4,940,835, 5,164,316, 5,188,642, 5,196,525, 5,322,938, 5,359,142, 5,633,435, 5,641,876, 5,717,084, 5,728,925, 5,804,425, and 6,501,009.

美国环境保护署 农药计划办公室 生物农药与污染预防分部（7511C） 1200 Pennsylvania Avenue NW Washington DC 20460	EPA 登记 号 524— 551	发行日期 2005 年 12 月 13 日
农药公告	发行期	条件
X 登记 登记	农药产品名称 MON88017	
登记人的姓名和地址（包括邮政编码） 孟山都公司 1300 I Street, NW, Suite 450 East Washington DC 20005		
（略）		
根据登记人员提供的信息，以上命名的农药遵照联邦杀虫剂、杀菌剂和灭鼠剂法令进行登记/重新登记。登记绝不能认为是环境保护署对产品的签署或建议。为了保护健康和环境，管理人员可以遵照法令随时延迟或取消农药登记。产品名称以及根据法令进行的产品登记不能认为是给予登记人员使用该产品名称或产品应用（如果产品已被其它人覆盖）的独有权力。 如果确实遵守了如下术语和条件，并遵照联邦关于杀虫剂、杀菌剂和灭鼠剂的法令 3（c）（7）（c），以上提到、登记和登记的登记申请是被认可的。 （1） 需按照 FIFRA § 3（C）(5)提交产品登记所需的所有数据，前提是环保署要求类似产品的所有登记人员需提交这些数据。 （2） 登记应当于 2010 年 9 月 30 日零点前自动废止 （3） 登记只限于苏云金芽孢杆菌 <i>Bacillus thuringiensis</i> 中分离的 Cry3Bbl 蛋白，以及 MON 88017 中产生该蛋白的遗传材料（载体 ZMIR39）（OECD 特有的鉴别标志为：应用于田间的玉米 MON 88017-3） （4） 提交 MON 863 申请（524-528）时所有要求的关于单个植株交互保护的资料。环保署确认 MON 863 的研究资料不足以表明该蛋白没有显著的不良影响，因此必须在 MON 88017 申请时提交这方面资料，包括：a) <i>Orius insidiosus</i> 的毒理学试验；b) 步甲的毒理学试验；c) 田间软体动物的长期影响试验；d) 长期土壤存在试验 （5） 必须承诺遵守下述昆虫抗性治理（IRM）计划		
批准部门的签名 （见第 6 页的签名）	日期 2005 年 12 月 13 日	
EPA Forua 8570—6		

3 美国农业部（USDA）批准文件复印件及翻译



United States
Department of
Agriculture

Animal and
Plant Health
Inspection
Service

4700 River Road
Riverdale, MD
20737

December 29, 2005

Dr. Ravinder Sidhu
Monsanto Company
1300 I St., NW
Suite 450 East
Washington, DC 20005

Dear Dr. Sidhu,

Your petition numbered 04-125-01p for determination of non-regulated status for corn rootworm and glyphosate herbicide resistant corn event MON 88017 submitted to the USDA, Animal and Plant Health Inspection Service/Biotechnology Regulatory Services (APHIS/BRS) on April 30, 2004 was approved on December 14, 2005. Enclosed is a signed copy of the Environmental Assessment (EA) and Finding of No Significant Impact (FONSI), with the attached summary and response to comments on the EA and petition, and the determination statement. These documents will also be posted on the BRS website after a notice announcing the determination is published in the Federal Register at http://www.aphis.usda.gov/brs/not_reg.html. Should you have any questions about these documents, please contact Ms. Ingrid Berlinger, Document Control Officer, BRS Document Management Branch at (301) 734-4885.

The Animal and Plant Health Inspection Service must be notified within 5 days in writing if any information comes to the applicant's attention that differs substantially from what was described in the petition and our environmental analysis.

A notice advising the public of our determination that the transformation event and their progeny are no longer considered regulated articles under 7 CFR 340 has been prepared for publication in the Federal Register. The anticipated publication date will be during the week of January 9th. We will notify you if this date changes.

Sincerely,

Cindy Smith
Deputy Administrator
Biotechnology Regulatory Services

Enclosure:

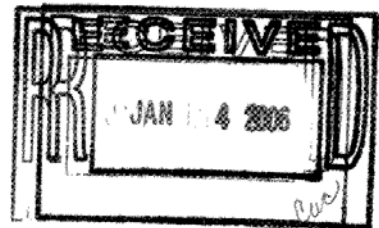
1 EA/FONSI

cc:

Dr. Rebecca Stankiewicz-Gabel, BRS, Policy Coordination
Dr. Robyn Rose, Lead Reviewer and EA Preparer
File: 04-125-01p



Safeguarding American Agriculture
APHIS is an agency of USDA's Marketing and Regulatory Programs
An Equal Opportunity Provider and Employer



美国农业部
动植物检疫局



4700 River Road
Riverdale, MD 20737

2005 年 12 月 29 日

Dr. Ravinder Sidhu
Monsanto Company
1300 I St., NW
Suite 450 East
Washington, DC 20005

尊敬的 Dr. Sidhu,

贵公司编号为 04-125-01p 的关于抗玉米根虫并耐受草甘膦的玉米转化事件 MON 88017 取消监管状态的申请已于 2004 年 4 月 30 日提交至 USDA-动植物检疫局/生物技术法规服务中心 (APHIS/BRS)，并于 2005 年 12 月 14 日获得批准。另附已签署的环境评价(EA)复本和附有对 EA 和本申请意见的回复及决议的“无显著影响的发现”。在本决议的通知发布于“*Federal Register*” (http://www.aphis.usda.gov/brs/not_reg.html) 后，上述文件也会在 BRS 网站上公布。如对本文件有任何疑问，请与 Ingrid Berlinger 小姐联系，电话号码为 (301) 734-4885。

如申请人得到任何与申请和我们环境分析中描述的情况存在显著不同的信息，动植物检疫局必须在 5 天内得到通知。

一个通知公众我们决定该转基因品系及其后代不再是受制于 7 CFR 340 的受监管产品的通知将发布在“*Federal Register*”上，预期公布时间将在 1 月 9 日左右，通知准备好后我们会通知您发布时间。

您诚挚的

Cindy Smith
副处长
生物技术法规处

七、本单位农业转基因生物安全小组审查意见

MON 88017 是孟山都公司应用转基因技术开发出的抗玉米根虫和抗草甘膦除草剂转基因玉米。该产品中表达的 CP4 EPSPS 蛋白与已经广泛应用的抗农达大豆 40-3-2 表达的 CP4 EPSPS 蛋白及其相似。40-3-2 抗农达除草剂大豆已经在中国取得进口安全证书。另外，MON 88017 表达的另外一个蛋白为 Cry3Bb1，与 MON 863 中的 Cry3Bb1 属于同一类蛋白，二者在功能上是一致的。MON 863 也已经在中国获得进口的安全证书。如果 MON 88017 也能够获得中国的进口安全证书，会给中国提供更多的选择产品，同时有助于解决玉米进口贸易中由于混杂而引起贸易纠纷和中断。

大量的安全评价资料表明，MON 88017 转化用的遗传表达与调控元件是安全的，并且转化方法也不会改变转化事件的安全性；外源基因为单个位点的单拷贝插入，且遗传表现稳定；表达的 CP4 EPSPS 蛋白和 Cry3Bb1 对人类和动物健康没有不良影响，CP4 EPSPS 和 Cry3Bb1 也不属于致敏或毒性蛋白；MON 88017 在营养成分上与受体品种以及传统的非转基因玉米是实质等同的；MON 88017 也不具有转变为有害生物倾向，对生态环境没有不利影响。孟山都公司已经制定了相应的安全控制措施，并会对贸易商严格要求和进行技术指导。

因此，根据《农业转基因生物安全管理条例》及其它相关法规的规定，同意上报该申请。

小组组长（签章）

2007 年 9 月 25 日

八、本单位审查意见

MON 88017 是孟山都公司应用转基因技术开发出的抗农达除草剂和抗玉米根虫的转基因玉米。大量的研究资料表明，MON 88017 对人类健康和生态环境是安全的。MON 88017 已经被美国政府主管部门批准投入市场，准予用作食品、饲料，或作为其它加工原料。

根据中国相关法律法规的要求，同意上报本申请书。

单位公章

负责人（签章）

2007 年 9 月 25 日

九、所在省（市、自治区）的农业行政主管部门的审查意见

（进口转基因生物直接申请安全证书的，本项不填写）

单位公章

负责人（签章）

日期： 年 月 日