

*Bt/CpTI*转基因稻及其非转基因亲本对照 在间隔种植条件下的转基因漂移

戎俊¹ 宋志平¹ 苏军² 夏辉¹ 王锋² 卢宝荣^{1*}

1 (复旦大学生物多样性科学研究所, 生物多样性与生态工程教育部重点实验室, 上海 200433)

2 (福建省农业科学院农业遗传工程重点实验室, 福州 350003)

摘要: 随着转基因技术的迅速发展, 越来越多的转基因作物被培育出来。转基因作物的外源转基因通过花粉传播向非转基因作物的漂移, 会影响非转基因作物品种的种子纯度, 从而可能导致一系列生物安全问题。为了研究转基因栽培水稻(*Oryza sativa*)中的外源转基因通过花粉介导向非转基因水稻品种逃逸的可能性及其频率, 我们选用3个含双价抗虫基因(*Bt/CpTI*)的转基因水稻品系及其相对应的非转基因水稻亲本品种(近等基因系)进行了转基因漂移的实验。为了获取在近距离状况下转基因水稻与非转基因水稻品种之间的转基因漂移频率, 采用了转基因与非转基因水稻品种间隔种植的栽培方式, 分别在福建省福州市和海南省三亚市的转基因环境安全实验地进行实验, 并利用潮霉素抗性筛选标记基因来鉴定转基因和非转基因稻的杂种。共检测了从非转基因水稻品种随机收获的70,056颗种子, 以此计算转基因漂移频率。结果表明, 在相邻种植的情况下, 由这3个转基因水稻向对应的非转基因水稻品种的转基因漂移的频率比较低(0.275–0.832%)。如此近距离条件下获得的低转基因漂移频率表明, 对于严格自花授粉的水稻而言, 通过一定的隔离措施, 能有效地降低由花粉介导的转基因漂移导致的非转基因种子混杂。

关键词: 基因漂移, 转基因水稻, 潮霉素抗性基因, 转基因逃逸

Low frequencies of transgene flow between *Bt/CpTI* rice and their non-transgenic counterparts under alternating cultivation

Jun Rong¹, Zhiping Song¹, Jun Su², Hui Xia¹, Feng Wang², Bao-Rong Lu^{1*}

1 The Ministry of Education Key Laboratory for Biodiversity Science and Ecological Engineering, Institute of Biodiversity Science, Fudan University, Shanghai 200433

2 Fujian Province Key Laboratory of Genetic Engineering for Agriculture, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003

Abstract: With the fast development of biotechnology, many transgenic crops have been developed and are in the pipelines for environmental release or commercialization. Crop-to-crop transgene flow from transgenic to non-transgenic rice varieties will affect seed purity of non-transgenic rice varieties, which might lead to unwanted biosafety problems. To assess the probability of transgene outflow in rice (*Oryza sativa*), gene flow experiments were conducted at two confined biosafety experimental sites in Fuzhou of Fujian Province and Sanya of Hainan Province, with the field design of alternating rows of transgenic rice lines and non-transgenic varieties. Three transgenic rice lines containing two insect-resistance genes (*Bt/CpTI*) and their non-transgenic counterparts (isogenic lines) were used in the experiments to achieve high levels of spontaneous outcrossing. A hygromycin resistance gene tightly linked with the target transgenes was used as a selective marker for identifying transgenic hybrids. Based on examination of 70,056 germinated seeds, we observed low frequencies of transgene outflow (0.275–0.832%) under cultivation of alternating rows between transgenic rice and its non-transgenic counterparts. This result of low crop-to-crop transgene flow in rice at

收稿日期: 2006-01-23; 接受日期: 2006-05-10

基金项目: 国家自然科学基金杰出青年基金(30125029)和上海市科委项目(03dz19309)

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: brlu@fudan.edu.cn

such close spacing can provide scientific support for the safe use of transgenic rice in terms of “contamination” of non-transgenic rice caused by pollen-mediated transgene outflow, if certain isolation measures are taken.

Key words: gene flow, transgenic rice, hygromycin resistance gene, transgene escape

转基因生物技术的快速发展和转基因作物的不断培育,为全球特别是第三世界国家的粮食安全保障带来了新的机遇(Huang *et al.*, 2002)。但是,转基因作物的环境释放和商品化生产也引起了全世界对转基因作物生物安全(biosafety)问题的极大关注(Ellstrand, 2001; Snow, 2002)。有关生物安全争论比较多的问题是:外源转基因是否会通过花粉和种子的传播,从转基因作物逃逸到非转基因作物(crop-to-crop)及其野生近缘种(包括杂草类型)(crop-to-wild)?转基因逃逸一旦发生是否会带来一系列的生态后果(Ellstrand *et al.*, 1999; Stewart *et al.*, 2003)?

研究转基因逃逸及其潜在的生态风险,对于转基因技术和转基因作物的安全利用具有非常重要的意义。而研究转基因逃逸的可能性及其频率,是转基因逃逸生物安全评估的第一步,能够为转基因作物的环境释放和商品化生产提供必要的科学数据支持(Ellstrand *et al.*, 1999; Lu & Snow, 2005)。

水稻(*Oryza sativa*)是一种非常重要的粮食作物,也是应用转基因生物技术较早且较成功的作物(Tyagi & Mohanty, 2000; Huang *et al.*, 2002; Jia, 2004)。目前已经培育出了包含不同性状的转基因水稻品种(Huang *et al.*, 2002; Jia & Peng, 2002),其中一些已经被释放到环境中进行环境安全和生产性实验(Messeguer *et al.*, 2001, 2004; Chen *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005)。伊朗已成为世界上第一个进行转基因稻商品化生产的国家(B. Ghareyazie 私人通讯)。水稻的转基因品种很有可能在不久的将来获得许可进行更大规模的环境释放和商品化生产(Chen *et al.*, 2004; Jia, 2004)。我国已经育成具抗虫基因(如 *Bt* 和 *CpTI* 基因)、抗病基因(*Xa21*)和抗除草剂基因(*bar*, *EPSPs*)的转基因水稻品系,它们的商品化生产正等待着国家的批准(Jia, 2002)。因而,对转基因水稻,尤其是那些已经接近商品化生产的转基因水稻和非转基因水稻之间的基因漂移进行研究和评估,是当前一项非常紧迫的任务。此外,栽培稻之间转基因漂移的研究也能为栽培稻向其野生近缘

种(包括杂草稻)的转基因漂移研究提供重要的参考信息,并为制定相应的评估、监测和管理办法以及控制措施提供科学依据(Lu *et al.*, 2003; Messeguer, 2003; Lu & Snow, 2005)。

尽管已经有不少对水稻品种间基因漂移的研究工作(Diao *et al.*, 1996; Rong *et al.*, 2004),但是以往的研究主要是用形态和分子标记的方法对基因漂移频率进行检测,而关于外源转基因漂移的研究却报道甚少(Messeguer *et al.*, 2001, 2004; Jia, 2002)。转基因漂移频率的精确检测可以通过与插入的外源转基因紧密连锁的筛选标记基因(如潮霉素抗性基因)或外源转基因(如抗除草剂基因)本身的特性获得(Paul *et al.*, 1995; Messeguer *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2004)。潮霉素抗性基因是在水稻遗传工程上普遍应用的一个标记基因。携带潮霉素抗性基因的植物幼苗能够在含有一定浓度潮霉素的选择培养基上正常生长,这就提供了一种快速有效的筛选鉴定携带有潮霉素抗性标记基因的水稻杂种的方法,从而可以进行大量的检测实验来评估转基因漂移的频率。

本研究的目的是通过检测转基因水稻及其非转基因亲本在间隔种植条件下的近距离转基因漂移频率,估测在田间生产的自然条件下水稻转基因逃逸的可能性及其频率。

1 材料和方法

1.1 植物材料

本实验采用了3个双价抗虫转基因(*Bt/CpTI*)水稻品系:即稳定遗传的科丰6号恢复系(MSR+)、II优科丰6号杂交稻(HY1+)以及两优科丰6号杂交稻(HY2+)作为花粉供体,并以它们对应的非转基因亲本品种,即明恢86恢复系(MSR-)、II优明86杂交稻(HY1-)以及两优2186杂交稻(HY2-)作为花粉受体。*Bt*基因(*CryIAC*)、*CpTI*基因与选择标记基因(*hpt*, 潮霉素抗性基因)紧密连锁(Chen *et al.*, 2006)。本实验所用的转基因水稻及其非转基因亲本的开花期均相同。所有实验材料均由福建省农科院农业遗传工

程重点实验室提供。

1.2 田间实验设计和取样

实验于2003年分别在两个指定的转基因水稻生物安全实验地进行,即福建省福州市(26.1°N, 119.3°E)和海南省三亚市(18.33°N, 109.52°E)。以转基因水稻及其非转基因亲本为一组,共组成3个基因漂移处理(MSR+和MSR-, HY1+和HY1-以及HY2+和HY2-)。水稻种植的株距和行距均为20 cm。每一实验点的每一处理的面积为4 m×15 m,其中转基因水稻和非转基因水稻隔行交替种植,栽种行的方向与花期的风向垂直,以保证行间最大限度的基因漂移(图1)。于种子成熟期,从每一处理的每一非转基因水稻种植行随机收获约1,500粒成熟种子进行杂种鉴定,以评估该行转基因杂种出现的频率,每一实验点的每一处理收获7-8行。

1.3 转基因和非转基因水稻的杂种鉴定

对收获的种子样本进行风干处理并在干燥的条件下保存3个月以上,以打破种子休眠。在杂种鉴定前,对收获的种子浸种约2 d,然后于37°C培养箱内培养1-3 d进行萌发。发芽率(*GR*)的计算方法为: $GR = G/N$,其中*G*为萌发种子的数量,*N*为浸种种子的数量。

萌发的种子转移至培养皿中,以潮霉素浓度为

50 μg/mL的(hygromycin B, Roche Diagnostics Ltd., 上海)0.5×的简化MS (Murashige & Skoog, 1962)培养液(仅含大量和微量元素)浸润,于25-27°C光照培养室内培养约5 d,对潮霉素有抗性而存活的幼苗被鉴定为转基因杂种。为了进一步确保上述杂种鉴定的可靠性,随机抽取10%的存活幼苗分别提取叶片DNA并进行*Bt*、*CpTI*和*hpt*基因特异性PCR检测。叶片全基因组DNA的提取方法以及特异性的PCR引物序列和反应体系分别参照Doyle和Doyle (1987)以及Rong等(2005)。PCR产物用1.5%琼脂糖胶进行电泳分辨。

1.4 转基因漂移频率的计算

每一非转基因行(*i*)的转基因漂移频率(F_i)为: $F_i = H_i / G_i$,其中*H_i*为在第*i*行检测到的杂种数量,*G_i*为在第*i*行萌发种子的数量。每一实验点的每一处理的转基因漂移频率(*F*)为: $F = (F_1 + F_2 + \dots + F_N) / N$,其中*N*为该处理检测的总行数。

2 结果

本实验检测的所有供试品种的种子平均萌发率在90-97%之间。共有约74,000颗非转基因水稻种子萌发,共获得70,056株幼苗用于潮霉素抗性筛选(HY1-: 20,942株, HY2-: 23,851株, MSR-: 25,263株)。

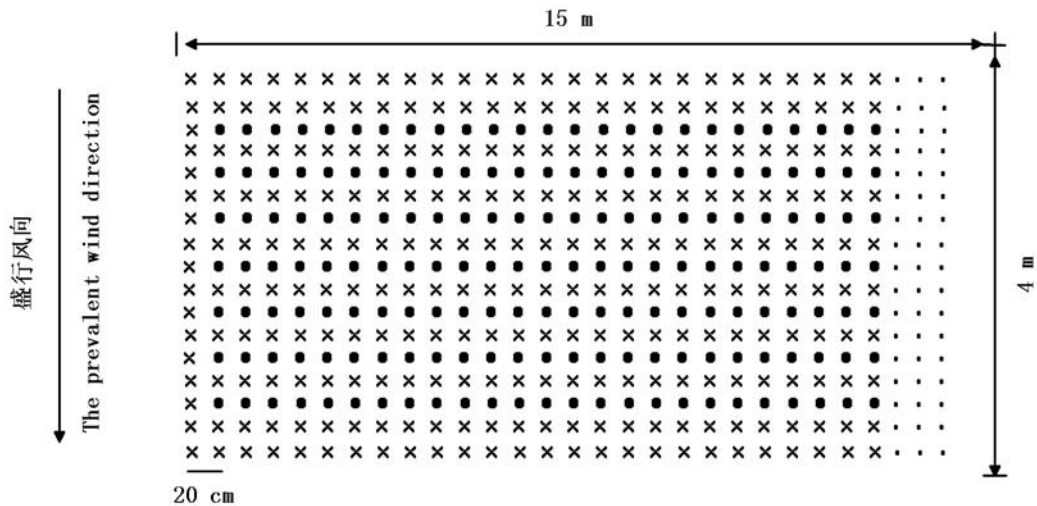


图1 转基因水稻和非转基因亲本对照间隔栽种示意图(其中转基因水稻(×)和非转基因亲本对照(●)隔行交替种植)

Fig. 1 Illustration of alternating cultivation of transgenic rice and non-transgenic counterparts. One row of transgenic rice (×) is alternately cultivated with one row of non-transgenic counterparts (●)

对潮霉素抗性苗鉴定的统计结果表明,从转基因杂交稻II优科丰6号到其相同组合的非转基因杂交稻II优明86的平均转基因漂移频率为0.629–0.832%;从杂交稻两优科丰6号到其相同组合的杂交稻两优2186的为0.474–0.792%;从转基因恢复系科丰6号到其亲本对照明恢86的为0.275–0.362%。对随机抽取的10%的潮霉素抗性苗进行的特异性PCR扩增结果表明,所有样本都出现了相应的*Bt*、*CpTI*和*hpt*基因的特异性条带,进一步证明潮霉素筛选所得的抗性苗确为转基因漂移产生的杂种,从而证明了潮霉素鉴定实验的可靠性。虽然转基因漂移频率在不同处理间和不同实验地点间会有一定的波动(图2),但是这3种*Bt/CpTI*转基因水稻到其邻近的非转基因亲本对照的转基因漂移频率均比较低,平均值都在0.9%以下。此外,杂交稻之间的转基因漂移频率略高于常规稻恢复系品种之间。

3 讨论

在我国,转基因水稻面临商品化生产和环境释放的压力,其原因是1999–2003年间,水稻产量的持续下降影响了我国的粮食安全(Jia, 2004)。本研究采用的3个转基因水稻是成熟的转基因水稻品系,都已进入生产性实验阶段,一旦获得国家的批准将会转入商品化生产。目前亟待解决的问题之一是利用有效的方法精确检测水稻品种间转基因漂移的频率,为转基因水稻生产的安全管理提供科学依据。

由花粉介导的外源转基因从转基因稻向非转基因稻逃逸,将会导致后者的品种产生混杂。如果在田间生产的自然条件下,外源转基因能够高频率地从转基因水稻漂移到非转基因水稻,那么将会严重影响非转基因水稻品种的种子生产纯度,从而影响转基因和非转基因品种在某一地区内的生产布局。如果非转基因品种的种子中无意中混入大量的转基因稻种子,将影响到地区间和国际间的正常贸易,尤其是如果涉及到对转基因产品标识要求严格的国家(Messeguer, 2003),会引起更多的国际贸易纠纷。

本研究所采用的3个*Bt/CpTI*转基因水稻品系及其非转基因亲本对照,在转基因稻和非转基因稻隔行相邻种植的条件下,转基因漂移的频率仅在0.275–0.832%之间。这表明本研究涉及的转基因水稻的转基因漂移频率非常低,平均值均低于0.9%。本实验总共检测了七万多株非转基因水稻幼苗,并且采用潮霉素抗性筛选和PCR鉴定相结合的杂种鉴定方法,充分保证了实验结果的可靠性。本研究结果与我们以前采取不同方法和不同种植模式得出的水稻基因漂移频率(0.04–0.78%)(Rong *et al.*, 2004, 2005)以及其他学者利用分子标记技术研究的结果(0.01–0.53%)(Messeguer *et al.*, 2001, 2004; Bashir *et al.*, 2004)基本一致。Oka和Morishima(1967)以及Diao等(1996)用传统形态性状标记的方法检测了水稻的异交率,发现水稻的异交率在1–2%之间,该结果与本实验所获得的基因漂移的频率

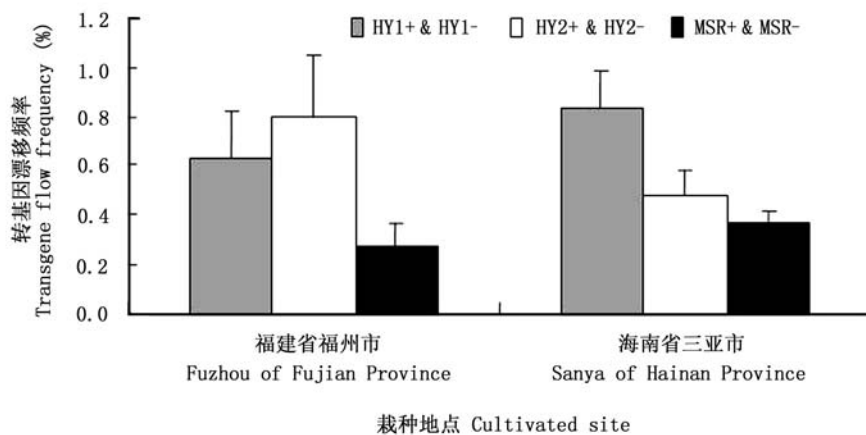


图2 不同转基因水稻到非转基因亲本对照在不同实验点的转基因漂移频率(%)

Fig. 2 Frequencies of transgene flow (%) from transgenic rice to their non-transgenic counterparts at different experimental sites

结果也比较吻合。以上结果均支持了Stewart等(2003)的结论:就转基因逃逸而言,水稻是一种低风险作物。

此外,Song等(2003)和Chen等(2004)分别检测了栽培稻向普通野生稻(*Oryza rufipogon*)以及杂草稻(*O. sativa* f. *spontanea*)的基因漂移频率,发现前者的频率较高(最大为2.94%),而后者较低(0.01–0.05%)。这是因为与栽培稻相比,普通野生稻和杂草稻具有不同水平的异交率(Oka & Morishima, 1967; Bajaj & Mohanty, 2005)。本实验也观察到,杂交稻品种之间基因漂移的频率略高于常规稻品种之间,这是因为杂交稻的异交率通常比常规稻要高。这就表明,应该依据不同水稻品种之间基因漂移频率的研究结果来制定相应的转基因水稻生物安全监测和管理措施。

本实验中,转基因和非转基因植株间的距离只有20 cm,在这样的近距离内,相邻水稻植株的穗子是部分交叠在一起的,一株水稻上散发的花粉几乎可以马上落到邻近水稻穗子的柱头上。在这种极端条件下检测到的转基因漂移频率是要高于通常的田间栽培情况的。

Song等(2004)在对水稻品种明恢-63的花粉流研究中观察到,随着与花粉源空间距离的不断增大,空气中的花粉密度迅速衰减。根据上述结论,我们推测,随着转基因和非转基因水稻之间空间距离的增加,花粉介导的转基因漂移频率也将会迅速衰减。此外,实际大田种植的转基因和非转基因水稻品种之间通常不会有完全重叠的开花时期,这将进一步降低田间转基因漂移的频率。根据本实验的结果,我们认为在我国的水稻种植状况下,转基因水稻品种向相邻田块的非转基因水稻品种转基因漂移频率将会低于0.9%;如果在两者之间设置一定的空间和时间隔离,转基因稻向非转基因稻转基因漂移的频率会更低。

按照目前欧盟对转基因产品标识的严格管理要求,如果产品中转基因个体的含量低于0.9%,便可以不进行转基因标识。因此我们认为,对于严格自花授粉的作物水稻而言,通过有效的隔离措施,由花粉介导的转基因漂移导致非转基因水稻产生转基因标识问题的可能性很低。当然,我们的这一推论并不涉及杂交稻生产的制种情况,因为杂交稻制种过程中所用的不育系品种的异交率很高,属于

非自然状况。

本研究同时也提供了一套快速高效和操作性强的转基因漂移频率检测的实验评估体系,特别是潮霉素抗性筛选标记的利用,能够对大样本量的供试材料进行快速准确检测,这是用分子标记检测手段无法轻易达到的。

参考文献

- Bajaj S, Mohanty A (2005) Recent advances in rice biotechnology – towards genetically superior transgenic rice. *Plant Biotechnology Journal*, **3**, 275–307.
- Bashir K, Husnain T, Fatima T, Latif Z, Mehdi SA, Riazuddin S (2004) Field evaluation and risk assessment of transgenic Indica Basmati rice. *Molecular Breeding*, **13**, 301–312.
- Chen LJ, Lee DS, Song ZP, Suh HS, Lu BR (2004) Gene flow from cultivated rice (*Oryza sativa*) to its weedy and wild relatives. *Annals of Botany*, **93**, 67–73.
- Chen LY, Snow AA, Wang F, Lu BR (2006) Effects of insect-resistance transgenes on fecundity in rice (*Oryza sativa*, Poaceae): a test for underlying costs. *American Journal of Botany*, **93**, 94–101.
- Diao LP(刁立平), Di SN(狄圣南), Zhang JB(张继本), Yang TN(杨图南) (1996) The strength of biological mixture among rice varieties and its strategy. *Seed* (种子), **81**, 43–45. (in Chinese)
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin*, **19**, 11–15.
- Ellstrand NC, Prentice HC, Hancock JF (1999) Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **30**, 539–563.
- Ellstrand NC (2001) When transgenes wander, should we worry? *Plant Physiology*, **125**, 1543–1545.
- Huang JK, Hu RF, Rozelle S, Pray C (2005) Insect-resistant GM rice in farmers' fields: assessing productivity and health effects in China. *Science*, **308**, 688–690.
- Huang JK, Rozelle S, Pray C, Wang QF (2002) Plant biotechnology in China. *Science*, **295**, 674–677.
- Jia HP (2004) China ramps up efforts to commercialize GM rice. *Nature Biotechnology*, **22**, 642.
- Jia SR (2002) Studies on gene flow in China—a review. In: *Proceedings of the 7th International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms*, pp. 110–116. Beijing, China.
- Jia SR, Peng YF (2002) GMO biosafety research in China. *Environmental Biosafety Research*, **1**, 5–8.
- Lu BR, Snow AA (2005) Gene flow from genetically modified rice and its environmental consequences. *BioScience*, **55**, 669–678.
- Lu BR, Song ZP, Chen JK (2003) Can transgenic rice cause ecological risks through transgene escape? *Progress in*

- Natural Science*, **13**, 17–24.
- Messeguer J (2003) Gene flow assessment in transgenic plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **73**, 201–212.
- Messeguer J, Fogher C, Guiderdoni E, Marfa V, Catala MM, Baldi G, Mele E (2001) Field assessments of gene flow from transgenic to cultivated rice (*Oryza sativa* L.) using a herbicides resistance gene as tracer marker. *Theoretical and Applied Genetics*, **103**, 1151–1159.
- Messeguer J, Marfa V, Catala MM, Guiderdoni E, Mele E (2004) A field study of pollen-mediated gene flow from Mediterranean GM rice to conventional rice and the red rice weed. *Molecular Breeding*, **13**, 103–112.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, **15**, 473–497.
- Oka HI, Morishima H (1967) Variations in the breeding systems of a wild rice, *Oryza perennis*. *Evolution*, **21**, 249–258.
- Paul EM, Capiou K, Jacobs M, Dunwell JM (1995) A study of gene dispersal via pollen in *Nicotiana tabacum* using introduced genetic markers. *Journal of Applied Ecology*, **32**, 875–882.
- Rong J, Xia H, Zhu YY, Wang YY, Lu BR (2004) Asymmetric gene flow between traditional and hybrid rice varieties (*Oryza sativa*) indicated by nuclear simple sequence repeats and implications for germplasm conservation. *New Phytologist*, **163**, 439–445.
- Rong J, Song ZP, Su J, Xia H, Lu BR, Wang F (2005) Low frequency of transgene flow from *Bt/CpTI* rice to its non-transgenic counterparts planted at close spacing. *New Phytologist*, **168**, 559–566.
- Snow AA (2002) Transgenic crops—why gene flow matters. *Nature Biotechnology*, **20**, 542.
- Song ZP, Lu BR, Chen JK (2004) Pollen flow of cultivated rice measured under experimental conditions. *Biodiversity and Conservation*, **13**, 579–590.
- Song ZP, Lu BR, Zhu YG, Chen JK (2003) Gene flow from cultivated rice to the wild species *Oryza rufipogon* under experimental field conditions. *New Phytologist*, **157**, 657–665.
- Stewart CN, Halfhill MD, Warwick SI (2003) Transgene introgression from genetically modified crops to their wild relatives. *Nature Reviews Genetics*, **4**, 806–817.
- Tyagi AK, Mohanty A (2000) Rice transformation for crop improvement and functional genomics. *Plant Science*, **158**, 1–18.

(责任编辑: 葛颂 责任编辑: 时意专)