

利用人工杂交方法研究转基因对植物遗传多样性的影响

樊龙江¹, 庞洪泉¹, 吴月友¹, 程旺大²

(1. 浙江大学农业与生物技术学院, 杭州 310029; 2. 浙江省嘉兴市农科院, 嘉兴 314016)

摘要: 如何分析转基因对植物遗传多样性的影响一直以来是一个难题。提出了一种所谓“人工杂交”的分析方法, 即利用具有相同遗传背景的转基因及其野生型植物群体, 分别与一组具有代表性的遗传对象进行有性杂交, 通过考察它们后代主要性状分离变异状况来评估转基因导入对群体遗传性状的多样性的影响。作为一个实例, 选用了由转基因水稻及其野生型组成的 3 对不同遗传群体, 分别与 7 个具有代表性(如不同亚种、不同品种类型等)的水稻品种进行杂交, 获得 15 对杂交组合, 经杂种 F_1 自交获得 F_2 种子, 通过观测 F_2 分离世代的主要性状分离状况, 比较和统计转基因水稻群体及其野生型群体后代的性状分离程度。结果表明, 提出的“人工杂交”技术路线是可行的, 为全面和深入开展相关研究开辟了一个新途径。同时根据本研究利用这 3 对转基因水稻及其野生型群体的研究结果表明, 在一些性状上转入的外源基因可以显著地增加种群内的遗传变异而在另外一些性状上却显著地减少了种群内的遗传变异, 但尚不能得出或支持转基因植物可能对遗传多样性产生负面效应的结论。

关键词: 转基因植物安全性; 遗传多样性; 水稻; 人工杂交

Using crossing method to evaluate the transgenic impacts on plant genetic diversity

FAN Long-Jiang¹, PANG Hong-Quan¹, WU Yue-You¹, CHENG Wang-Da² (1. College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 2. Jiaxing Agricultural Science Institute, Jiaxing 314016, Zhejiang Province, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(4): 848~851.

Abstract: A new method called as “crossing method” was proposed in this paper for evaluating the transgenic impacts on plant genetic diversity. In this crossing method, the transgenic plant and its wild type (populations or species with a same genetic background, except the foreign gene) were crossed by using representative plants (cultivars) group and the impacts of transgenics on plant genetic diversity were evaluated based on the genetic variations of important agronomic characters among their offsprings. In our experiment, as an example, three different transgenic rice cultivars, their wild types and a representative group (include 7 paternal representative cultivars) were employed to study the genetic diversity as influenced by transgenic effects by using crossing method. During 2001, transgenic rice and their wild types were crossed by the representative paternal cultivars. The F_1 offsprings were collected and made selfing. After selfing of F_1 hybrids, 30 seeds of F_2 hybrids were obtained during 2002 (15 pairs of transgenic rice and its wild type groups). A normal and strict field test was carried out at Jiaxing, Zhejiang Province in the same year. All the 30 F_2 hybrids seeds were planted in 5.6m×1.8m plot with three replications and randomized complete-block design was used. Some important traits (plant height, setting rate, filled spikelets per panicle, panicle number per plant, heading date, 1000-grain weight and panicle length) of the 30 hybrids were measured and their variation coefficients (CV) were calculated. The results indicated that the genetic variation of traits of rice transgenic offspring were not narrowed in general, i. e. transgenes couldn't significantly change the genetic variation of some important traits in a population (or species). A negative effect of transgenic plants on genetic diversity could not be found or elicited from the results of this transgenic rice experiment. It is a tough task to evaluate the potential impacts of transgenic plants on genetic diversity in view of long-term effects. The results also showed that the “crossing method”, as a compromised

基金项目: 国家和浙江省自然科学基金资助项目(30170181;301315)

收稿日期: 2003-04-11; **修订日期:** 2003-09-06

作者简介: 樊龙江(1965~), 男, 浙江衢州人, 博士, 教授, 主要从事转基因植物遗传生态学研究。E-mail: fanlj@zju.edu.cn

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 30170181); Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No. 301315)

Received date: 2003-04-11; **Accepted date:** 2003-09-06

Biography: FAN Long-Jiang, Ph. D., Professor, mainly engaged in genetic ecology of transgenic crops. E-mail: fanlj@zju.edu.cn

method, was feasible and could give a reliable results for risk assessment of transgenic plant.

Key words:safety of transgenic plant; genetic diversity; *Oryza sativa*; crossing

文章编号:1000-0933(2004)04-0848-04 中图分类号:S336 文献标识码:A

转基因植物环境释放可能带来的生态风险和环境问题一直来受到各国生态学家的关注^[1,2]。Losey 等和后续的一些有关 Bt 玉米花粉对斑蝶幼虫的影响研究^[3,4]、大量有关转基因植物对相关种群数量和结构的影响^[5~7],以及转基因污染墨西哥玉米等事件^[8,9],使人们更多地注意到转基因植物环境释放对生物遗传多样性的影响。生物遗传多样性一般是指种内不同群体之间或一个群体内不同个体遗传变异的总和。广义而言,它是生物个体的基因中蕴藏的遗传信息的总和,是生态环境中一个非常关键的组成因素。生物遗传多样性的研究(检测)方法包括形态学、染色体、蛋白质、以及 DNA 水平上的各种方法^[10]。由于遗传多样性问题研究的特殊性(如需要比较长的观察周期、自然条件的不可控性等),转基因植物对生物遗传多样性影响的研究结果还很少,特别是转基因对非靶标群体遗传变异的影响研究还未见报道。如何设计一个合理有效的研究路线来分析转基因对生物遗传多样性可能造成的影响,是一项非常重要和紧迫的任务。

本文针对这一任务,提出了一个所谓“人工杂交”的技术路线:利用具有相同遗传背景的转基因及其野生型植物群体,分别与一组具有代表性的遗传对象进行有性杂交,通过考察它们后代主要性状分离变异结果作为评估转基因(即外源基因)导入对群体遗传性状的多样性的影响依据。这一技术思路就如同种子科学中采用所谓“人工老化”分析技术(把种子短时间放到一个人工的模拟恶劣条件下来快速检测种子活力)一样,因为实际评价过程中不可能去全程观测种子在自然条件下生活力保持的状况。根据这一思路,我们选用了由转基因水稻及其野生型组成的 3 对遗传群体,即每一对群体都是由具有相同遗传背景的个体组成,对内两个群体间个体的唯一不同点是转基因的有无,分别与 7 个具有代表性(如不同亚种、不同品种类型等)的作物品种进行杂交,由此组成 15 对(即转基因和其野生型)杂交组合,然后经杂种 F₁ 自交获得 F₂ 种子,通过观测 F₂ 分离世代的主要性状分离状况,比较转基因水稻群体与非转基因群体后代的性状分离程度,并进行统计判断,以此获得转基因对遗传群体遗传多样性可能造成影响的一个大致趋势,为全面和深入开展相关研究开辟一个新途径。

1 材料与方法

1.1 实验材料

3 对转基因粳稻品系:KMD1 及其野生型(秀水 11),导入基因为抗虫 Bt 基因,由浙江大学核技术农业应用研究所育成并提供^[11];TR6 及其野生型(丙 93-63)和春江 03 转及其野生型(春江 03),它们同时导入抗菌肽(Cecropin B)基因和抗除草剂 Bar 基因,由中国水稻研究所育成并提供。以上材料分别在田间种植若干代(大于 3 代),并不断利用常规杂交手段用野生型回交转基因型使转基因型和野生型在遗传背景上完全达到一致,并在田间苗期均分别进行了 GUS 检测和 BASTA 除草剂的检测。选用转基因材料均表现为 GUS 阳性或 BASTA 抗性。以上材料均已被我国批准环境释放(审批书编号分别为农基安审字 98A-01-01 和 98B-01-22)。用于杂交的 7 个代表性籼稻亚种品种:明恢 63、泰粘、光叶 68、R138、滇屯 502、滇陇 201 和 632(广西野生稻与中 86-44 杂交育成的一个品系)。配成的 30 个(15 对)杂交组合见表 1。

1.2 实验方法

2001 年 9 月数据材料播种于浙江大学华家池校区农场,9 月中旬分别以转基因水稻及其野生型为母本,以 7 个代

表 1 由 3 对转基因水稻及其野生型与 7 个代表性品种配成的 30 个(15 对)杂交组合

Table 1 30 hybridized combinations (15 pairs) of 3 transgenic / wild-type varieties with 7 representative varieties

编号 Serial number	杂交组合(* /野生型群体) Crossing combinations (* /wild-type)	杂交组合(* /转基因群体) Crossing combinations (* /transgenic)
1	R138/秀水 11 R138/Xiushui11	R138/KMD1
2	明恢 63/秀水 11 Minghui63/ Xiushui11	明恢 63/KMD1 Minghui63/KMD1
3	泰粘/秀水 11 Tainian/Xiushui11	泰粘/KMD1 Tainian /KMD1
4	光叶 68/秀水 11 Guangye68/ Xiushui11	光叶 68/KMD1 Guangye68/KMD1
5	光叶 68/丙 93-63 Guangye68/Bing93-63	光叶 68/TR6 Guangye68/TR6
6	光叶 68/春江 03 Guangye68/ Chunjiang03	光叶 68/春江 03 转 Guangye68/ T-Chunjiang03
7	632/秀水 11 632/ Xiushui11	632/KMD1
8	632/丙 93-63 632/Bing93-63	632/TR6
9	632/春江 03 632/Chunjiang03	632/春江 03 转 632/T-Chunjiang03
10	滇屯 502/秀水 11 Diantun502/ Xiushui11	滇屯 502/KMD1 Diantun502/ KMD1
11	滇屯 502/丙 93-63 Diantun502/Bing93-63	滇屯 502/TR6 Diantun502/TR6
12	滇屯 502/春江 03 Diantun502/Chunjiang03	滇屯 502/春江 03 转 Diantun502/T-Chunjiang03
13	滇陇 201/秀水 11 Dianlong201/Xiushui11	滇陇 201/KMD1 Dianlong201/ KMD1
14	滇陇 201/丙 93-63 Dianlong201/ Bing93-63	滇陇 201/TR6 Dianlong201/ TR6
15	滇陇 201/春江 03 Dianlong201/ Chunjiang03	滇陇 201/春江 03 转 Dianlong201/T-Chunjiang03

表 2 转基因对水稻性状表现(平均值和变异)的影响

Table 2 Transgenic effects on averages and variations of rice traits

项目 Item	穗长 Panicle length	单株穗数 Panicle number per plant	每穗实粒数 Filled spikelets per panicle	千粒重 1000-grain weight	结实率 Seed setting rate	株高 Plant height	齐穗期 Heading date	平均理论产量 Average theoretical yield (kg/hm ²)
平均值 Mean								
转基因群体 Transgenic population	23.935	14.092	117.731	26.344	73.808	120.588	104.702	14653
野生型群体 Wild-type population	24.021	13.849	127.246	27.168	75.234	120.519	104.857	15489
变异系数平均值 Mean of CV								
转基因群体 Transgenic population	0.159	0.208	0.309*	0.109	0.175*	0.134*	0.108	—
野生型群体 Wild-type population	0.150	0.302*	0.201	0.120	0.107	0.121	0.108	—

* 转基因及其野生型群体间达到显著性(0.05%)差异 The differences between transgenic and its wild-type groups were significant at 0.05% level

表性水稻品种为父本进行杂交实验。采用真空泵去雄。共获得 30 个(15 对)杂交组合的 F₁ 种子。当年冬季将 F₁ 种子带到海南省陵水县自交繁种,2002 年 4 月获得 F₂ 种子。带回的 F₂ 种子当年 5 月播种于浙江省嘉兴市农科院实验场,进行性状分离考察实验。实验具体过程如下:5 月 20 日 F₂ 种子浸种,5 月 25 日播种,6 月 24 日移栽,龄期 29d。播种量 450kg/hm²。每组合种植面积 5.6m×1.80m,3 次重复,随机区组设计,种植密度 23cm×13cm,即每小区种植约 344 株,单本插。实验田肥力水平均匀,按照常规办法进行基本农事管理。齐穗期和株高性状在田间测定(每小区均按固定位置测定 32 株),其它性状待实验材料成熟后在 3 个小区中随机选取 3~5 株(平均每株有效穗 13.9 个,即每杂交组合测定 42~70 穗)进行室内考种。对每一组合的各个性状分离情况(变异系数,CV)进行统计分析。除穗长性状按每穗为单位进行性状分离统计外,其他性状均按株为单位进行。

2 结果与分析

2.1 转基因对水稻性状表现(平均值)的影响

从转基因群体及其野生型各性状表现的平均值来看,两者间均无显著差异(表 2)。这意味着本研究使用的转基因材料,其导入的外来基因除了发挥其目标功能(如抗虫性、抗除草剂,试验结果略)外,并没有直接影响其主要性状的总体表现。另外从植株田间生长情况观察,除了转 Bt 材料(KMD1)有芒率较其野生型有所增加外(可能是转基因插入位点的遗传效应),其他两对材料的转基因材料与其野生型间均没有明显外观差异。

2.2 转基因对水稻性状表现(变异程度)的影响

从 15 对转基因与其野生型群体的性状分离(变异系数)比较结果(图 1)可以看出,两者间在某些性状变异幅度上存在明显的差异。从图 1 可见,株高、结实率和每穗实粒数(A~C)3 个性状在 15 对组合中,转基因群体内的变异程度大多低于其野生型,单株穗数(D)则正好相反;齐穗期、千粒重和穗长 3 个性状(E~G)两者则各有高低。从这些性状的变异系数平均值和统计分析结果表明(表 2),前 4 个性状(A~D)转基因与其野生型群体间的性状变异达程度到显著差异,而后 3 个性状(E~G)则不存在显著差异。这说明转基因对植物群体内遗传变异有可能产生一些明显的影响,而且这种影响是双向的,一方面可能使群体内这种遗传变异减少(如本研究中的单株穗数),也有可能增加(如本研究中的每穗实粒数、结实率和株高性状)。当然人们更关注的是变异的减少,这是一种所谓转基因植物可能造成的生

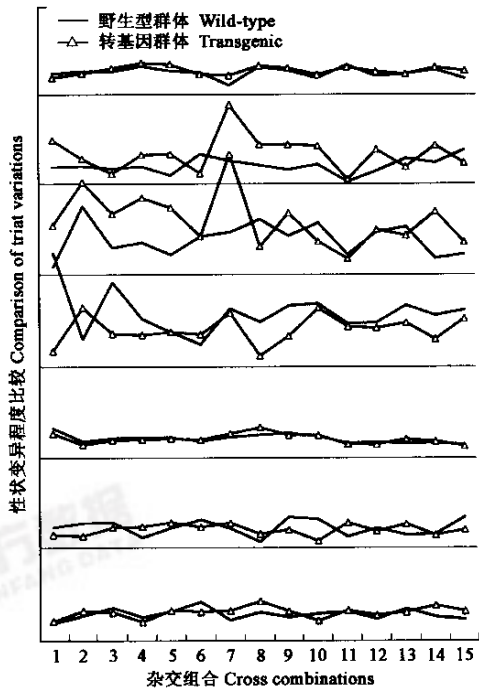


图 1 15 对杂交组合中转基因及其野生型杂交后代(F₂)性状变异程度(变异系数)的比较

Fig. 1 The coefficients of variation (CV) of 7 traits between transgenic rice and its wild-type groups at their F₂ generation across 15 pairs of combinations

A~G 依次为株高、结实率、每穗实粒数、单株穗数、齐穗期、千粒重和穗长 7 个性状,其中 A~D 性状变异在转基因及其野生型群体间达到显著水平(0.05%)A~G refer to 7 traits: plant height, setting rate, filled spikelets per panicle, panicle number per plant, heading date, 1000-grain weight and panicle length, in which, the differences of A~D traits between transgenic rice and its wild-type group were significant (0.05%)

态负面效应。总体上看,本研究得到的结果并不支持或可以得出转基因植物可能对遗传多样性产生负面效应的结论。

3 讨论

本文利用“人工杂交”的技术路线研究了转基因对其生物遗传多样性可能产生的影响,这是一个目前普遍关心但又难以研究的问题。研究表明,该技术路线是可行的,可以获得了一些评价转基因对其生物遗传多样性可能产生影响的依据,为全面和深入开展该领域研究开辟了一个新途径。同时,根据本研究利用 3 对转基因水稻及其野生型群体的研究结果,并不支持或可以得出转基因植物可能对遗传多样性产生负面效应的结论。

本研究获得的转基因对遗传多样性唯一的负面效应的结果来自单株穗数性状。由于单株穗数是一个较易受环境因素影响的性状,这一单一结果还不足以得出负面效应的结论。最终结论的得出,还有赖于今后利用更多转基因群体在更多物种和环境下的实验结果。但是,本研究表明,转基因对植物群体内遗传变异会产生一些显著的影响。这提醒我们,必须重视转基因对植物遗传多样性可能造成的影响,防止负面生态效应的产生。单纯从概率的角度出发,在某一基因组中导入外源基因(特别是非同源性基因,如 Bt 基因序列来自于细菌)将增加受体植物基因组遗传交换重组的数量,其遗传多样性势必增加。这一现象在本研究中的几个重要性状表现上均得到了验证。但这并不意味着就可以不必担心转基因对遗传多样性的影响问题。而是应该关心的是这种影响的方向问题。由于基因间的互作,插入基因组中的外源基因是否会对其他重要的性状基因产生抑制、失活等生物学效应,从而导致一些重要功能(如抗性)的丧失,这对植物野生种群来说尤其重要,因为野生种群必须依靠其广谱的抗性才能在自然界中生存下去。

本研究利用 3 对转基因水稻及其野生型群体获得的研究结果还只是一个初步的结果,还有待于利用更多转基因群体、更多物种和环境条件下进一步研究,同时本研究在多样性检测方法上仅利用了传统的形态学分析方法,这还有待在染色体、蛋白质和 DNA 水平上进行研究,如限制性片段长度多态性(RFLP)和聚合酶链式反应(PCR)等方法检测 DNA 水平上的多样性等。同时,在研究对象和内容上,可以从基因、细胞到种群、群落乃至自然生态系统等不同层次和范围上进行研究。

References:

[1] Qian Y Q, Ma K P. Progress in the study on genetically modified organism, and the impact of its release on the environment. *Acta Ecologica Sinica*, 1998, **18**(1):1~9.

[2] Fan L J and Zhou X P. *Transgenic Crops: Debates and Facts*. Beijing: Chinese Agriculture Press, 2001. 159~161.

[3] Losey J E, Rayor L S, Carter M E. Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature*, 1999, **399**: 214.

[4] Zangerl A R, Mckenna D, Wraight C L, *et al*. Effects of exposure to event 176 corn pollen on monarch and black swallowtail caterpillars under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, **98**(21):11908~11912.

[5] Tabashnik B E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.*, 2001, **126**(1):133~144.

[6] Daly J C. Ecology and resistance management for *Bacillus thuringiensis* transgenic plants. *Biocontrol Science and Technology*, 1994, **4**: 563~571.

[7] Buckelew L D, Pedigo L P, Mero H M, *et al*. Effects of weed management systems on canopy insects in herbicide-resistant soybeans. *J. Econ. Entomol.*, 2000, **93**(5):1437~1443.

[8] Quist, D and Chapela, I H. Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. *Nature*, 2001, **414**:541~543.

[9] Metz M and Futterer J. Suspect evidence of transgenic contamination. *Nature*, 2002, **416**:600~601.

[10] Qiu F, Fu J M, Jin D M, *et al*. The molecular detection of genetic diversity. *Chinese Biodiversity*, 1998, **6**(2): 143~150.

[11] Shu Q Y, Ye G Y, Chui H Y, *et al*. Bt rice “KMD”. *Journal Zhejiang Agricultural University*, 1998, **24**(6):579~580.

参考文献:

[1] 钱迎倩, 马克平. 经遗传修饰生物体的研究进展及其释放后环境的影响. *生态学报*, 1998, **18**(1):1~9.

[2] 樊龙江, 周雪平. 转基因作物安全性——争论与事实. 北京: 中国农业出版社, 2001. 159~161.

[3] 邱芳, 伏建民, 金德敏, 等. 遗传多样性的分子检测. *生物多样性*, 1998, **6**(2):143~150.

[4] 舒庆尧, 叶恭银, 崔海瑞, 等. Bt 转基因水稻“克螟稻”选育. *浙江农业大学学报*, 1998, **24**(6):579~580.