

转基因玉米外源基因通过花粉漂移的频率和距离

路兴波^{1,2}, 孙红炜², 杨崇良², 刘开启^{3,*}, 尚佑芬², 赵玖华²

(1. 山东农业大学植保学院, 泰安 271018; 2. 山东省农科院植物保护研究所, 济南 250100, 3. 广东仲凯农业技术学院, 广州 510225)

摘要: 基因漂移是转基因生物可能引起生态环境安全性问题的主要风险之一, 选用美国孟山都公司的转基因抗除草剂玉米 GA21 进行了外源基因向周边环境遗传漂移的距离和频率的研究, 结果表明: 转基因玉米的外源基因可以向周边玉米品种进行漂移, 其最大漂移频率为 45.10%, 150m 处仍能检测到外源基因的漂移, 防止转基因玉米基因向外扩散的最佳途径为设置隔离带, 隔离距离以 200m 以上为好。

关键词: 转基因玉米; 基因漂移; 抗除草剂基因 EPSPS; 定性 PCR

文章编号: 1000-0933(2005)09-2450-04 **中图分类号:** Q948, S181 **文献标识码:** A

Gene flow of transgenic corn to cultivated relatives in China

LU Xing-Bo^{1,2}, SUN Hong-Wei², YANG Chong-Liang², LIU Kai-Qi^{3,*}, SHANG You-Fen², ZHAO Jiu-Hua²

(1. Plant Protection Academy, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China; 2. Institute of Plant Protection, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China; 3. Zhongkai Agricultural College, Guangzhou 510226, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(9): 2450~2453.

Abstract: Genetic engineering is becoming a useful tool in plants to improve quality, stress tolerance, and pest, disease and herbicide resistance etc., however, many concerns have been expressed about whether the transgenic products would pose negative influences on plants and animals, human life and health, as well as on genetic resources and environment. Among many controversial biosafety issues, the potential environmental risks of transgenes flowing from a crop to the environment become one of major topics. Corn is one of major transgenic crops in the world and transgenic pollen dispersal is considered as a major issue in the risk assessment of transgenic corn. The objective of this study was to determine the gene flow of transgenic corn under ecologic environment condition in China. A transgenic corn variety GA21 carrying the EPSPS gene was planted in the 5×5m² plot, while Luyu No. 10, a non-transgenic corn variety was grown surrounding them. From non-transgenic corn plants with various distance from the transgenic corn plot, seeds were collected and then screened for the EPSPS gene using herbicide spray and PCR assay. Highest frequency of the transgene was observed at 0 to 5m distance from transgenic plot and the frequency decreased with increase of the distance. The transgene even could be detected from seeds of non-transgenic plants that were up to 150m away from the transgenic plants. From this experiment, it can be concluded that for a small-scale field test, The possibility of escapes of engineered gene to wild relatives was also discussed.

Key words: transgenic corn; gene flow; herbicide resistant gene epsps; qualitative PCR

随着转基因技术的飞速发展以及 GMC 的大面积推广, 在关注 GMC 所带来的巨大社会、经济和生态效益的同时, GMC 及其产品的安全性问题也引起了世界范围内的广泛关注^[1~5]。通过转基因方法改良的农作物具有得到性状稳定的后代植株所需要的时间短; 仅对特定目的基因进行操作; 打破不同物种之间的天然杂交屏障, 可以在不同物种之间进行基因转移等优点^[6,7]。

基金项目: 国家 863 资助项目 (2002AA212161)

收稿日期: 2004-11-25; **修订日期:** 2005-05-11

* 通讯作者 Author for correspondence.

作者简介: 路兴波 (1970~), 男, 山东人, 博士生, 主要从事转基因生物安全性评价和技术标准、植物病害防治研究。E-mail: luxb99@sina.com

Foundation item: National "863" (No. 2002AA212161)

Received date: 2004-11-25; **Accepted date:** 2005-05-11

Biography: LU Xing-Bo, Ph. D. candidate, mainly engaged in safety assessment of transgenic crops and plant disease control. E-mail: luxb99@sina.com

转基因植物的生态环境安全性问题,主要包括 5 个方面:①GMC 本身对生态环境的影响,如转变为杂草等;②GMC 中外源基因向相关物种的漂移;③抗病抗虫 GMC 对非靶标生物的影响;④抗病毒转基因作物对环境的影响;⑤转基因作物对生物多样性的影响^[6,7]。

玉米是世界上主要的粮食和饲料作物,常年种植 14000 万 hm^2 ,中国是世界第二大玉米生产国,常年种植 2400 万 hm^2 。近年来,转基因玉米面积逐年增加,2003 年世界种植转基因玉米 1550 万 hm^2 ,占玉米总面积的 11%,2004 年达到 20%以上。我国转基因玉米研究进展较快,转基因玉米在我国即将进入生产阶段,国外公司的 7 个转基因玉米品种已获得向我国进口的安全证书,有 1 个品种正在国内进行生产性试验,因此迫切需要进行转基因玉米对我国生态环境安全性进行研究,在充分利用生物技术造福人类的同时,最大限度的保护生态环境。

1 材料和方法

1.1 材料

转基因玉米材料为抗除草剂玉米 GA21,所有转基因玉米种子及其亲本对照均有孟山都公司提供,抗性基因均为纯合,普通玉米为鲁玉 10 号。

1.2 方法

1.2.1 基因漂移的距离和频率测定 选择一平整地块,在中央种植 $5\text{m} \times 5\text{m}$ 的转基因玉米(为保证花期相遇,转基因玉米各行分 2 期播种,间隔 7d),在外围播种非转基因玉米鲁玉 10 号,按常规播量播种、管理。在玉米花期记载风向、风力和降雨等天气情况,在玉米成熟期分东南、东北、西南、西北 4 个方向在离转基因玉米 1.5、10、15、30、60m,在北方方向 50、100、150、200 m 处随机各收取 20 个玉米果穗(第 1 果穗),晾干后待检测用。

1.2.2 检测方法

①生物测定 选取 10 个玉米果穗的玉米种子分类全部播种,播种部分鲁玉 10 号玉米种子和非转基因亲本对照作空白对照,待玉米长到 3~4 叶时,先调查玉米株数,然后按规定浓度喷施农达除草剂(孟山都公司生产, $200\text{g}/667\text{m}^2$),待 2 周后调查成活株数。调查各小区玉米存活株数,测定不同方向、距转基因玉米不同距离收获的玉米籽粒中表现转基因玉米特性的数量,初步确定花粉传播的距离和不同距离的异交率。

②PCR 测定 对初步确认的转基因籽粒或植株进行检测,将玉米植株分类别(生长完全正常、植株黄化、植株生长受抑制、植株死亡)随机各采取 20 株,用 CTAB 法提取 DNA,设计 4 对引物进行 PCR 反应,检测样品中是否含有抗除草剂基因。

③引物序列 Cp4-epsps 基因 CE-F:5'CCTTCATGTTCGGCGGTCTCG3';

CE-R:5'GCGTCATGATCGGCTCGATG3';预期扩增片段为 498bp。

Nos 终止子基因 Pnos-F:5'GAATCCTGTTGCCGGTCTTG3';

Pnos-R:5'TTATCCTAGTTTGCGCGCTA3';预期扩增片段为 180bp。

CaMV35S 启动子基因 35s-F:5'GTCCTACAAATGCCATCATTGC3';

35S-R:5'GATAGTGGGATTGTGCGTCATCCC3';预期扩增片段为 195bp。

IVR 基因 F1:5'CCGCTGTATCACAAGGGCTGGTACC3';

R1:5'GGAGCCCGTGTAGAGCATGACGATC3';预期扩增片段为 225bp。

2 结果与分析

当喷施农达除草剂 2 周后,玉米植株出现了生长完全正常、植株黄化、植株生长受抑制、植株死亡等 4 种主要类型,其中以生长正常和植株死亡两种为主,PCR 检测结果表明,生长正常玉米植株中含有 EPSPS 基因,植株生长受抑制和植株死亡两种类型均不含有 EPSPS 基因,黄化玉米植株中 90%不含有 EPSPS 基因。

结合生物测定和 PCR 测定的结果,不同距离不同方向玉米花粉的漂移率见表 1,玉米的漂移率与距离成正相关,在 1m 时漂移率均在 40%以上,5m 以内玉米的漂移率较高,均在 9%以上,15m 外漂移率明显降低,在 60m 时最大漂移率仍达到 1%,玉米花粉的最大漂移距离为 150m,在 200m 处没有检测到外源基因。显著性检验结果表明,不同距离上玉米的漂移率差异显著。因此建立漂移率与距离相关方程为:

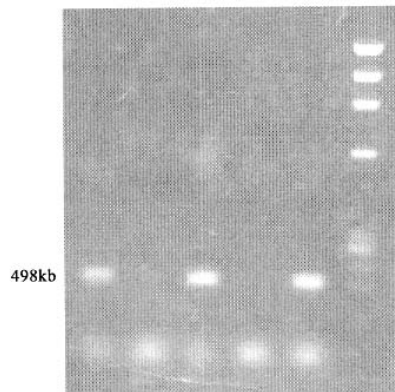


图 1 PCR 结果图谱

Fig.1 EPSPS

$y=0.31703-0.07239\ln x, \quad r=-0.88091$

不同方向(东北、西北、西南、东南)上玉米花粉的传播频率存在差异,以东北方向最高,西北、东南次之,西南最低,在 1m 处差异不明显,在 5m 处不同方向漂移率差异显著,东北方向最高为 19.58%,西南方向最低为 9.32%,相差 1.10 倍,到 15m 时差别为 1.15 倍,到 30m 时相差 2.05 倍,到 60m 时相差 4 倍,距离越大差异越明显,显著性检验表明,在 0.05 水平上,东北与东南和西南方向上漂移率差异极显著,西北与西南差异显著。不同方向上漂移率的差异与试验地玉米花期风向直接相关,根据试验记载,当时风向主要为东和北方向,所以东北和西北方向漂移率大些。

表 1 不同距离不同方向玉米花粉漂移率
Table 1 Corn Gene flow rates in different distances and direction

距离(m) Distances	方向 Direction	药前玉米株数 Corn seedlings number before praying	药后玉米株数 Corn seedlings number after praying	漂移率(%) Gene flow rates	显著性 Different	
					0.05	0.01
1	东北 Northeast	4210	1893	44.96	a	A
	西北 Northwest	3806	1657	43.54		
	西南 Southwest	4090	1733	42.37		
	东南 Southeast	3978	1794	45.10		
5	东北 Northeast	2865	561	19.58	b	B
	西北 Northwest	2756	509	18.47		
	西南 Southwest	2791	260	9.32		
	东南 Southeast	2974	323	10.86		
10	东北 Northeast	2796	363	12.98	c	BC
	西北 Northwest	2651	329	12.41		
	西南 Southwest	2650	160	6.04		
	东南 Southeast	2568	179	6.97		
15	东北 Northeast	2954	197	6.67	d	C
	西北 Northwest	2910	158	5.43		
	西南 Southwest	2389	74	3.10		
	东南 Southeast	2380	117	4.92		
30	东北 Northeast	3109	54	1.74	d	C
	西北 Northwest	2960	31	1.05		
	西南 Southwest	2456	14	0.57		
	东南 Southeast	2658	41	1.54		
60	东北 Northeast	2699	27	1.00	e	D
	西北 Northwest	2743	24	0.87		
	西南 Southwest	2467	5	0.20		
	东南 Southeast	2290	8	0.35		
50	北 North	3678	65	1.77		
100	北 North	3980	5	0.13		
150	北 North	4026	2	0.05		
200	北 North	3510	0	0.00		

3 讨论

外源基因是通过花粉传播漂移的,其向其他品种的渗透是通过自然杂交完成的,因此能够造成花粉传播的所有因素均能引起转基因植物中外源基因的漂移。

玉米花粉传播的距离和频率受玉米的株高、花粉量以及气候因子(风向、降雨、湿度、温度等)的影响,试验地花期以西南风为主,所以东北方向漂移率大于其它方向。

玉米可以自花授粉,也可以异花授粉,玉米花粉的离体存活时间最大为 3d,蜜蜂等多种昆虫可以传粉^[8],因此天然杂交率一般较高。由于花粉传播的距离比较远,所以转基因玉米的基因漂移问题十分严重。花粉受风力可以传播很远^[8],同时昆虫传粉也常常发生,因此自然杂交率较高。因为转基因玉米和非转基因玉米品种的生育期、开花习性都非常相似,外源基因如果漂移到非转基因品种,将大大的影响非转基因玉米的纯度,特别是向玉米反种地扩散,而无意识的增大了转基因玉米品种的分布和带来不可预测的风险。这种漂移不仅能带来难以预测的环境问题,也会影响粮食进出口,引起一些有关法规、法律方面的纠纷^[9]。

在种植转基因玉米时,玉米内的外源基因向周围漂流的频率如何?距离多远是有效控制转基因玉米对环境条件造成危害的关键所在,只有明确了这两个问题才能有效地设置隔离带,减少甚至是杜绝基因漂流的发生,而有关这方面的报道还不多见。用

转 EPSPS 基因抗除草剂玉米进行了研究,初步弄清了转基因玉米花粉漂移的频率和距离。转基因玉米在研究和生产过程中最主要的一点是防止外源基因的向外扩散,所以在田间释放时一定要注意安全隔离措施,设置隔离带是通常采用的方法,本实验证明转基因玉米花粉漂移的最大距离为 150~200m,所以有效隔离距离最低为 200m 以上,才能保证外源基因的扩散得到有效地控制。

根据相关文献,在我国未发现玉米田及周边杂草能够和玉米进行杂交的记载^[6],并且没有能够和玉米杂交的其它作物或物种种植,所以存在物种间基因漂移的可能性很小。

References:

- [1] Bergelson J, Purrington CB, Wichmann G. Promiscuity in transgenic plants. *Nature*, 1998, **395**: 25.
- [2] Ellstrand NC. When transgenes wander, should we worry? *Plant Ecology*, 2001, **125**: 1543~1545.
- [3] Prakash CS. The genetically modified crop debate in the context of agricultural evolution. *Plant Physiology*, 2001, **126**: 8~5.
- [4] Schiermeier P. German transgenic crop trails face attack. *Nature*, 1998, **394**: 819.
- [5] Crawley M J, Brown S L, Hails R S, *et al.* Biotechnology-Transgenic crops in natural habitats. *Nature*, 2001, **409**: 682~683.
- [6] Liu Q, Zhu X Q. *Biosafety*. Beijing: China Scientific & Technological Press, 2001.
- [7] Jia S R, Guo S D, An D C. *Transgenic cotton*. Beijing: China Scientific & Technological Press, 2001.
- [8] Wang N X. *Shandong corn*. Beijing: China Agricultural Press, 1998.
- [9] Lu B R, Zhang W J, Li B. Escape of transgenes and its ecological risks. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2003, **14**(6): 989~994.
- [10] British crop protection council. Gene flow and agriculture-relevance for transgenic crops. The University of Keele, Staffordshire, UK, 1999.

参考文献:

- [6] 刘谦,朱鑫泉. 生物安全. 北京: 科学出版社, 2001.
- [7] 贾士荣, 郭三堆, 安道昌主编. 转基因棉花(“863”生物高技术丛书). 北京: 科学出版社, 2001.
- [8] 王农孝. 山东玉米. 中国农业出版社, 1998.
- [9] 卢宝荣, 张文驹, 李博. 转基因的套以及生态风险, 应用生态学报, 2003. **14**(6): 989~994.