

复合性状转基因水稻T1c-19向受体水稻及杂草稻的基因漂移*

黄鸢[#] 李继坤[#] 强胜 骆天鹏 宋小玲^{**}

南京农业大学杂草研究室 南京 210095

摘要 为评估抗虫、抗除草剂复合性状转基因水稻T1c-19的基因漂移风险,以该转基因水稻为花粉供体,受体水稻明恢63(MH63)及广东茂名(WRMM)、江苏泰州(WRTZ)和湖南益阳(WRYY)3种杂草稻为花粉受体,设置隔行和相邻两种种植方式,收获花粉受体的种子,之后分别采用苄胺腈生测法和 $cryIC^*$ 、 bar 基因特异引物进行扩增,检测两种种植方式下转基因水稻向不同杂草稻的基因漂移频率和隔行种植方式下转基因水稻向受体水稻的基因漂移频率。试验结果显示,在隔行和相邻种植方式下检测到该转基因水稻向不同杂草稻的最大基因漂移频率均发生在湖南益阳杂草稻,分别为0.164%和0.230%,向江苏泰州杂草稻的基因漂移频率为0.106%和0.211%,而向广东茂名杂草稻均没有检测到基因漂移。在隔行种植方式下检测到复合性状转基因水稻向受体水稻的基因漂移频率为0.919%。分子检测结果表明生测存活的植株中都携带 $cryIC^*$ 和 bar 两个抗性基因。基因漂移频率与转基因水稻和受体材料的花期重叠天数有显著的相关性($P = 0.013$, $P < 0.01$)。以上研究表明,复合性状转基因水稻T1c-19存在向杂草稻的抗性基因漂移风险,其中向湖南益阳杂草稻的漂移风险最大,向广东茂名杂草稻的基因漂移风险最小。由于该转基因水稻为复合性状,可能引起的生态风险更为复杂,因此在该转基因水稻的环境释放过程中务必重视其向杂草稻的基因漂移。图6表4参54

关键词 复合性状;转基因水稻;T1c-19;杂草稻;基因漂移

CLC S511.03 : Q788

Gene flow from transgenic rice T1c-19 with stacked $cryIC^*/bar$ genes to weedy and cultivated rice species*

HUANG Yao[#], LI Jikun[#], QIANG Sheng, LUO Tianpeng & SONG Xiaoling^{**}

Weed Research Laboratory, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract Gene flow from transgenic rice to weedy and cultivated rice is a key biosafety consideration. This study assessed the gene flow from insect and glufosinate-resistant (IGR) transgenic rice (*Oryza sativa* L.: T1c-19) to three weedy rice (*O. sativa*: WRMM, WRTZ and WRYY) and a cultivated rice (*O. sativa* L.: MH63) using alternating and adjacent cultivations. Seeds of pollen recipients were harvested and detected using both glufosinate-bioassay method and PCR test with specific primers of $cryIC^*$ and bar genes. The results showed that the gene flow from IGR rice to WRYY was the maximum, 0.164% and 0.230% in alternating and adjacent cultivations, respectively; and the gene flow to WRTZ was 0.106% and 0.211%, respectively. However, no gene flow was detected from IGR to WRMM in either cultivation. In addition, the gene flow frequency from IGR rice to the rice recipient of MH63 was 0.919% in experiment of alternating cultivation alone. PCR test showed that all the surviving plants in glufosinate-bioassay test carried both $cryIC^*$ and bar genes. Overall, longer durations in flowering overlap between the pollen donor and the recipients resulted in greater gene flow. This study indicated that gene flow occurs from IGR rice to weedy rice, with high frequency in WRYY and low in WRMM. Due to the complexity of transgenic rice with two exogenous genes, the gene flow might cause more complex and significant ecological risks in the process of transgenic rice environmental release.

Keywords gene stacked; transgenic rice; T1c-19; weedy rice; gene flow

我国是世界最大的水稻生产国和消费国,水稻在我国粮食生产中占有举足轻重的地位。目前已经培育出了大量抗虫、抗病、抗除草剂以及具有其他优良品质性状的转基因水

稻,甚至复合性状的转基因水稻^[1-3]。转基因水稻的种植在带来经济和社会效益的同时,也存在一定的风险,其中重要风险之一是抗性基因通过花粉漂移到杂草上,导致抗性杂草的产生,增加杂草的防除困难。

在水稻的近缘杂草中,最值得关注的是杂草稻。杂草稻(Weedy rice或red rice, *Oryza sativa* f. *spontanea*, AA, $2n = 24$)与栽培水稻(*Oryza sativa* L.)同属于稻属稻种,在世界各地大多数水稻种植区均有发生^[4-6]。杂草稻具有极强的杂草

收稿日期 Received: 2015-05-20 接受日期 Accepted: 2015-06-12

*转基因重大专项(2015ZX08011)资助 Supported by the National Transgenic Major Program of China (2015ZX08011)

[#]共同第一作者 Joint first authors

^{**}通讯作者 Corresponding author (E-mail: sxl@njau.edu.cn)

性状,如强落粒性、休眠性及抗逆性,同时与栽培水稻竞争阳光、水分和养分,从而降低水稻的品质和产量^[7]。另外杂草稻与栽培水稻在形态结构和生理生化代谢等方面的相似性,使得它和栽培水稻对除草剂的反应一致,因此尚无有效的除草剂对其进行有效防治^[8]。目前杂草稻已成为限制拉丁美洲、东南亚国家水稻产量提高的最主要的杂草因素^[4, 9-10]。上世纪50-60年代,杂草稻在我国安徽、江苏、海南、广东等部分稻区就有发生,但随着管理水平的提高,70年代后期已很少发生。近年来随着水稻轻型栽培技术的发展,特别是免、少耕技术的推广应用,造成了有利于杂草稻萌发生长的农田生态环境,导致杂草稻在我国水稻田的危害逐年加重,特别是在黑龙江、辽宁、江苏、广东、海南等省份^[7, 11-13],给水稻生产带来的损失越来越大^[14-16]。到目前为止,针对杂草稻并没有简单有效地的防控措施。如果抗除草剂转基因水稻可以环境释放,杂草稻便可以通过喷施除草剂进行有效防治,但是在转基因水稻环境释放前,需对其抗性基因漂移所带来的潜在生态风险进行充分评估。

转基因水稻和杂草稻能发生初始杂交这一事实已经得到大量研究工作^[17-20]的证实。外源抗性基因漂移到杂草稻后,有可能产生携带抗性基因的杂交后代^[21-24],这将使得杂草稻的防控工作变得更加困难,并可能危及转基因技术本身^[18, 25]。虽然栽培水稻与杂草稻属于相同物种,并没有生殖隔离,但栽培稻与杂草稻之间以及杂草稻内部仍存在生理和遗传上的差异^[4-5, 12-13]。同时,田间自然情况下的异交率,还与花期重叠的时间长短、植株的高度差异等密切相关^[24]。因此不同研究者由于采用的试验材料、种植方式不同,各研究报道中的基因漂移率也有明显的差异^[18-20, 23, 26-29],但大多数基因漂移率低于1%。常用的方法有同心圆种植、隔行种植和相邻种植等。这3种试验设计各有其优缺点,同心圆种植所需的试验地面积大、收获的花粉受体材料量较大,花费较多的人力、物力和时间,同时也不能反应田间栽培水稻和杂草稻伴生生长的真实环境;隔行和相邻种植保证了杂草稻与转基因水稻的接触机会,相比同心圆种植更适合检测最大基因漂移频率,能在小范围的试验中获得最大的基因漂移风险^[30]。因此选择隔行和相邻种植方式,更能正确估计转基因水稻向杂草稻的基因漂移,充分揭示其风险水平。

目前关于转基因水稻的基因漂移的报道都是针对单一性状的,尚没有针对复合性状基因漂移的报道。复合基因的转化主要有3种方法^[31]:一是杂交(Hybrid stacking),利用已

有的转基因作物,通过常规育种方法将2种基因复合;二是再转化(Re-transformation),将目的基因转入已有的转基因作物中;三是共转化(Co-transformation),将2种基因构建在同一载体上后一次转化到受体中,或是2个独立的基因不进行连接而直接转入目的植物中。由于复合性状的转基因作物转入了多个外源基因,这种复合性状的基因漂移可能比单一性状的基因漂移所致的生态风险更为复杂,因此对复合性状转基因作物的基因漂移风险更应该全面地评价。华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室运用共转化的方式,将人工合成*cry1C**与选择标记基因*bar*连接,运用农杆菌介导法转化明恢63,获得抗虫抗除草剂复合性状的转基因水稻T1c-19。该转基因水稻被证实对靶标害虫有很强的抗性^[32],而对非靶标害虫和微生物群落没有影响^[33-36],目前正在申请安全证书。遵循安全性评估的个案原则,本研究以该转基因水稻为试验材料,设计隔行和相邻2种植方式,检测其向受体水稻和杂草稻的基因漂移频率,研究结果将为该复合性状转基因水稻申请安全证书提供安全性评估资料,同时也为制定复合性状转基因水稻抗性基因漂移风险评价标准提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

复合性状转基因水稻T1c-19,携带人工合成的抗虫基因*cry1C**和抗除草剂基因*bar*,采用共转化的方法将两种基因紧密连接之后通过农杆菌介导转入水稻明恢63(MH63)中获得。该转基因水稻和受体水稻MH63均由华中农业大学提供。

选用该转基因水稻的受体MH63及茂名、泰州和益阳杂草稻为花粉受体。杂草稻均由本实验室人员在广东茂名、江苏泰州、湖南益阳采集,试验材料的基本特性见表1。

1.2 试验设计

供试材料种植在南京农业大学江浦试验农场(N32.011569, E118.624535)杂草研究室的转基因作物安全性评估试验基地进行,该试验基地获得农业部批准。试验设计隔行种植和相邻种植2种植方式。水稻整个生长期按照常规稻田的标准进行水肥和病虫害管理。试验完成后所有剩余材料全部烧毁。试验田四周无水稻种植,并各有100 m的玉米,符合国家标准。

表1 试验材料的来源和主要特征

Table 1 Origin and characteristics of cultivated and weedy rice accessions used in the experiment

实验材料 Material	缩写名 Accession	杂草稻种群编号 Population number of weedy rice	来源 Origin	籼粳型 Subspecies	果皮颜色 Pericarp colour	芒 Awn
花粉受体 Pollen recipients	WRMM	WRGD008	广东茂名 Maoming, Guangdong	籼型 Indica	红色 Red	无 Absent
	WRTZ	WRJS015	江苏泰州 Taizhou, Jiangsu	偏籼型 Indica-clinous	红色 Red	无 Absent
	WRY Y	WRHU011	湖南益阳 Yiyang, Hunan	籼型 Indica	红色 Red	无 Absent
	MH63	--	华中农大 Huazhong Agricultural University	籼型 Indica	白色 White	无 Absent
	T1c-19	--	华中农大 Huazhong Agricultural University	籼型 Indica	白色 White	无 Absent

1.2.1 隔行种植 2014年5月28日育秧, 30 d后将转基因水稻T1c-19、受体水稻MH63及3种杂草稻移栽至隔行种植小区. 株、行距分别为20 cm、30 cm, 种植方式见图1. 每处理小区的面积为15 m² (5 m × 3 m), 每处理重复4次, 小区间隔60 cm. 移栽行的方向为东西方向, 与当地盛行风向垂直, 以保证行间最大可能的花粉漂移.

1.2.2 相邻种植 为最大限度保证杂草稻与转基因水稻花期相遇, 将杂草稻种植一批, 转基因水稻种植4批, 每批间隔5 d. 杂草稻与第一批转基因水稻于2014年5月28日育秧, 30 d后选取生长健壮的杂草稻和4批转基因水稻幼苗移栽至相邻种植小区. 株、距行距分别为20 cm和30 cm, 每处理小区面积为4 m × 2 m, 每处理重复4次, 小区间隔60 cm. 种植方式见图2.

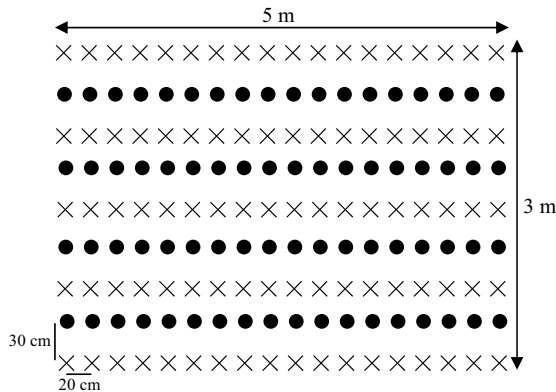


图1 隔行种植示意图. ×: 转基因水稻; ●: 受体水稻或杂草稻.
Fig. 1 Layout of an individual plot in the alternating cultivation experiment. ×: rows of transgenic rice; ●: plants of single pollen recipients.

1.2.3 取样方法及田间调查内容 株高的测定: 每小区在开花期随机测量10株转基因水稻和花粉受体材料的株高.

花期调查: 在开花期间观察并记录转基因水稻和花粉受体材料的花期及花期持续时间, 并统计转基因水稻和花粉受体材料花期重叠时间.

每日开花节律调查: 在盛花期选取转基因水稻和花粉受体材料大小适中且穗子中部开花的10个穗子, 从第一朵小花开始, 每隔30 min统计一次每穗新增加的开花数量, 直至穗子当天开花结束. 最后统计当日每个穗子总花数量 (包括开过的和未开的小花), 计算每个时间段开花百分率.

1.2.4 抗性检测 对收获的花粉受体材料种子打破休眠 (放入55 ℃烘箱5 d) 后进行发芽率检测, 把装有100粒种子的培养皿放置于30 ℃光照培养箱培养7 d, 测定每种花粉受体材料的发芽率, 试验重复4次. 每种受体材料选取10 000粒种子 (大于总重量的10%), 参照Song等 (2011) 的方法^[37]进行抗性筛选, 重复4次. 将待测花粉受体收获的种子用70%的乙醇溶液消毒30 s, 然后浸泡在无菌水中15 min, 吸干水后再用无菌水反复冲洗种子5次. 将待测的种子置于两层滤纸的周转

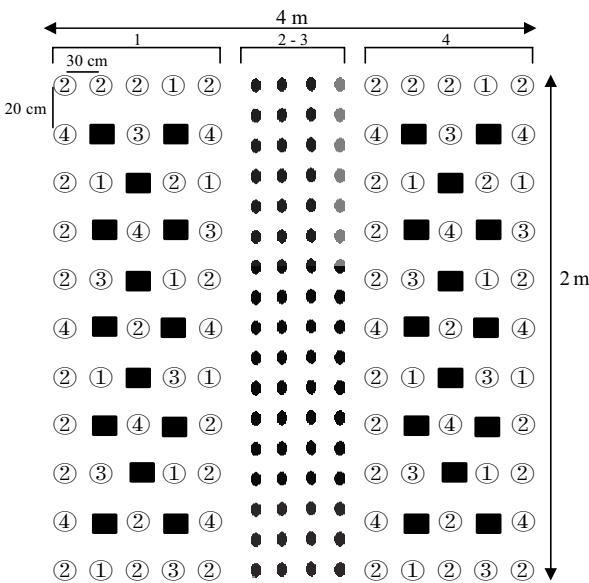


图2 相邻种植示意图. 黑色方块代表杂草稻; 圆圈代表转基因水稻, 其中的数字代表批次.
Fig. 2 Field experimental layout of the adjacent cultivation experiment. Squares represent single pollen recipient per block; circles with numbers represent each of the four batches of transgenic rice in each block.

箱中, 用浓度为40 mg/L的草铵膦溶液浸泡, 放在温室内培养10 d后测量胚芽鞘的长度. 若胚芽鞘长度长于2 cm, 则认为该幼苗携带有抗性基因. 抗性筛选工作在南京农业大学杂草研究室的温室内进行. 将筛选出来的幼苗移栽在育苗盘内培养至3叶期, 采取叶片, 进行分子检测.

PCR反应体系 (表2): 2 × Taq PCR Mix 12.5 μL, ddH₂O 9.5 μL, 引物P1、P2 各1 μL, DNA 1 μL. PCR反应程序: 94 ℃, 变性5 min, 94 ℃变性30 s, 55 ℃退火30 s, 72 ℃延伸1 min, 35个循环; 72 ℃延伸10 min, 降温至4 ℃, 结束反应后用1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR片段. 其中2 × Taq PCR Mix由南京基天生物技术有限责任公司提供, 成分为dNTP 0.2 mmol/L each、KCl 100 mmol/L、Tris-HCl (pH 8.5) 20 mmol/L、Taq Polymerase 5 U/100 μL、MgCl₂ 3.0 mmol/L, PCR反应由TAKARA (TaKaRa PCR Thermal cycler) 热循环仪完成.

1.2.5 基因漂移频率计算 漂移频率 = (抗性种子数/检测种子总数/发芽率) × 100%.

1.2.6 数据统计 运用SPSS17.0中的独立样本T检验法 (Independent samples T-test), 比较转基因水稻与受体材料的株高的差异, 运用相关性分析 (Analysis of correlations) 比较漂移频率与株高、花期重叠的相关性.

2 结果与分析

2.1 花期观察

对转基因水稻、受体水稻和杂草稻的花期进行观察, 结

表2 *cry1C**、*bar*基因扩增引物序列及扩增产物大小
Table 2 Amplified primer sequences and production of *cry1C** and *bar*

基因 Gene	P1 (forward)	P2 (reverse)	扩增片段 PCR amplification product size
<i>cry1C*</i>	5'-TTCTACTGGGGAGGACATCG-3'	5'-CGGTATCTTCGGGTGATTGG-3'	602 bp
<i>bar</i>	5'-GCACCATCGTCAACCACTAC-3'	5'-GCCAGAAACCCACGTCAT-3'	429 bp

果发现在2种植方式下,转基因水稻T1c-19与其受体水稻MH63及3种杂草稻均发生花期重叠(表3,表4)。

隔行种植方式下, T1c-19与其受体MH63花期一致,在9月15日进入始花期,9月24日达到盛花期,花期持续16 d。3种杂草稻开花均早于转基因水稻。其中WRMM开花最早,在9月4日进入始花期,9月12日达到盛花期,花期持续14 d,与T1c-19花期重叠4 d; WRTZ花期持续19 d,与T1c-19花期重叠10 d; WRYY花期持续14 d,与T1c-19花期重叠为8 d。

相邻种植方式下, WRMM仅与第1批转基因水稻花期发生重叠,重叠时间为4 d; WRTZ与第1、2、3批转基因水稻的花期发生均重叠,与第1批转基因水稻重叠时间最长(10 d),与第3批转基因水稻重叠时间最短(3 d); WRYY与第1、2批转基因水稻花期发生重叠,与第1批转基因水稻花期重叠8 d,与第2批转基因水稻花期重叠4 d。

2.2 转基因水稻与受体水稻及杂草稻的每日开花节律

在隔行种植中,转基因水稻T1c-19在10:30左右开始开花,11:00进入盛花时间,在11:30达到开花高峰期,持续2 h。受体水稻与转基因水稻开花节律一致;3种杂草稻中,WRMM、WRYY开花节律与T1c-19一致,每日的盛花时间为11:00-11:30, WRTZ的盛花时间较与T1c-19有所提前,在11:00达到开花高峰期(图3)。所有受体材料均与转基因水稻的每日开花时间均有2 h左右重叠。相邻种植中水稻的每日开花节律与隔行种植表现一致。

2.3 转基因水稻与受体水稻和杂草稻的株高

隔行种植中,转基因水稻T1c-19与受体水稻MH63的株高没有显著差异,均在92-95 cm。3种杂草稻中WRMM平均株高为155.3 cm,显著高于T1c-19, WRTZ平均株高为76.7 cm,显著低于T1c-19; WRYY与T1c-19株高没有显著差异(图4)。相邻种植中转基因水稻与杂草稻的株高与隔行种植表现一致。

2.4 抗性筛选及cry1C*和bar基因检测

对收获的受体材料种子进行萌发率检测,结果发现每种受体材料的发芽率均达到94%以上。对每种受体材料进行抗性筛选时以转基因水稻作为阳性对照,杂草稻作为阴性对照,结果发现用浓度为40 mg/L的草铵膦溶液浸泡10 d后,转基因水稻的胚芽鞘能正常生长(长度大于2 cm),杂草稻的胚芽鞘不能正常生长(长度小于2 cm)。2种植方式下的WRMM的胚芽鞘均不能正常生长,其他受体材料都有部分

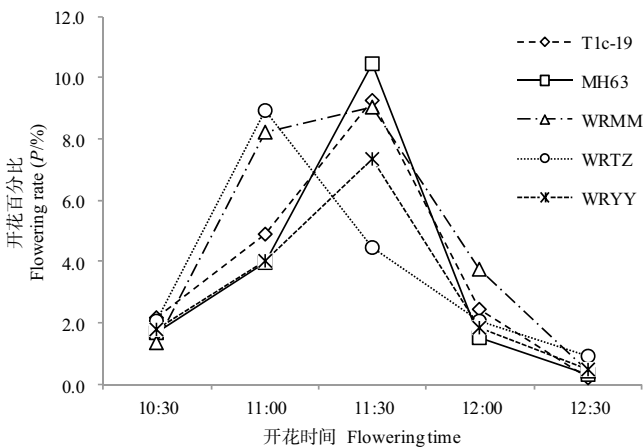


图3 隔行种植下转基因水稻与受体材料的每日开花节律。
Fig. 3 Daily flowering rhythm of rice accessions in the alternating experiment.

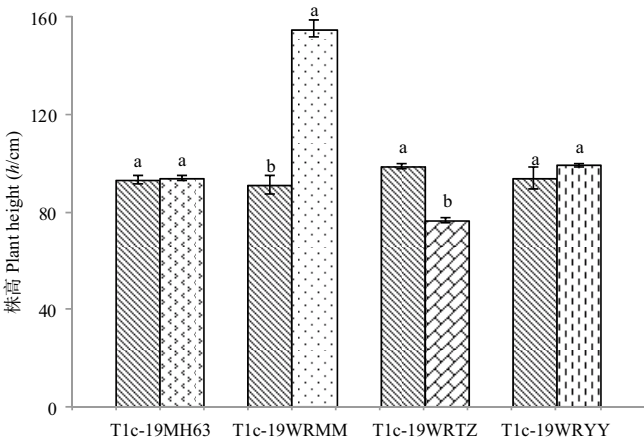


图4 隔行种植下转基因水稻与受体材料的株高。
Fig. 4 Plant height of pollen donor and recipients in the alternating cultivation experiment.

种子胚芽鞘长度能正常生长。将胚芽鞘能正常生长的种子放入离心管中培养成幼苗植株,结果发现隔行种植中MH63、WRTZ、WRYY存活幼苗总数分别为348株、40株和64株。相邻种植中WRTZ、WRYY存活幼苗数分别为81株和91株。

根据设计的特异性引物对存活植株的总DNA进行扩增。

表3 隔行种植中转基因水稻和花粉受体材料的花期及重叠天数

Table 3 Flowering periods and overlaps among rice accessions in the alternating experiment

供试材料 Accession	始花期 Beginning flowering date		盛花期 Peak flowering date		终花期 Final flowering date		重叠天数 Overlaps (t/d)
T1c-19	9月15日	Sep.15th	9月24日	Sep.24th	9月30日	Sep.30th	-
MH63	9月15日	Sep.15th	9月24日	Sep.24th	9月30日	Sep.30th	15
WRMM	9月4日	Sep.4th	9月12日	Sep.12th	9月18日	Sep.18th	4
WRTZ	9月6日	Sep.6th	9月20日	Sep.20th	9月24日	Sep.24th	10
WRYY	9月9日	Sep.9th	9月15日	Sep.15th	9月22日	Sep.22nd	8

表4 相邻种植中转基因水稻与花粉受体材料花期及重叠天数(t/d)。

Table 4 Flowering durations and overlaps of weedy rice with IGR rice in adjacent cultivation (t/d)

供试材料 Accession	IGR水稻第一批 First batch of IGR rice	IGR水稻第二批 Second batch of IGR rice	IGR水稻第三批 Third batch of IGR rice	IGR水稻第四批 Fourth batch of IGR rice
WRMM	4	0	0	0
WRTZ	10	5	3	0
WRYY	8	4	0	0

电泳结果显示,筛选出的抗性植株均有 bar 基因的429 bp扩增条带和 $cryIC^*$ 基因的602 bp扩增条带,和作为阳性对照的转基因水稻T1c-19扩增出来的条带一致.而作为阴性对照的杂草稻亲本没有发现扩增产物(图5).从而进一步证明了种子浸泡筛选出来的植株携带了复合性状转基因水稻的 bar 基因和 $cryIC^*$ 基因.

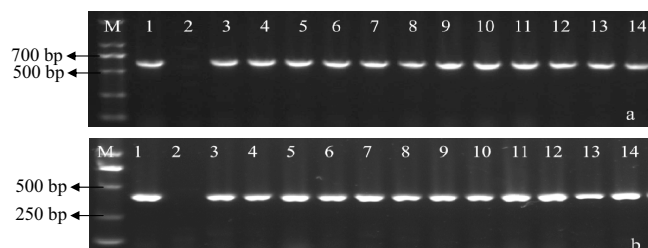


图5 隔行和相邻种植下受体材料F1存活幼苗 $cryIC^*$ 与 bar 基因的PCR检测.图a为 $cryIC^*$ 基因,图b为 bar 基因.M: Marker; 1: 转基因水稻; 2: WRY; 3-5: 隔行种植下WRTZ; 6-8: 隔行种植下WRY; 9-11: 相邻种植下WRTZ; 12-14: 相邻种植下WRY.

Fig. 5 Polymerase chain reaction (PCR) detection of $cryIC^*$ (a) and bar (b) in the surviving F1 seedlings in the alternating and adjacent cultivation experiments. M: Marker; 1: transgenic rice; 2: WRY; 3-5: transgenic rice $\times$ WRTZ (F1) in the alternating cultivation; 6-8: transgenic rice $\times$ WRY (F1) in the alternating cultivation; 9-11: transgenic rice $\times$ WRTZ (F1) in the adjacent cultivation; 12-14: transgenic rice $\times$ WRY (F1) in the adjacent cultivation.

2.5 基因漂移频率

检测结果显示,两种种植方式下,转基因水稻向WRMM均没有发生基因漂移.隔行种植下转基因水稻T1c-19向其受体水稻MH63的漂移频率为0.919%,显著高于向杂草稻的漂移频率.而T1c-19向WRTZ和WRY的基因漂移没有显著性差异,分别为0.106%和0.164%;相邻种植下转基因水稻T1c-19向WRTZ和WRY的漂移频率没有显著差异,分别为0.211%和0.230%.相关性分析表明,转基因水稻T1c-19向花粉受体的漂移频率与株高、花期重叠有显著的相关性(图6).

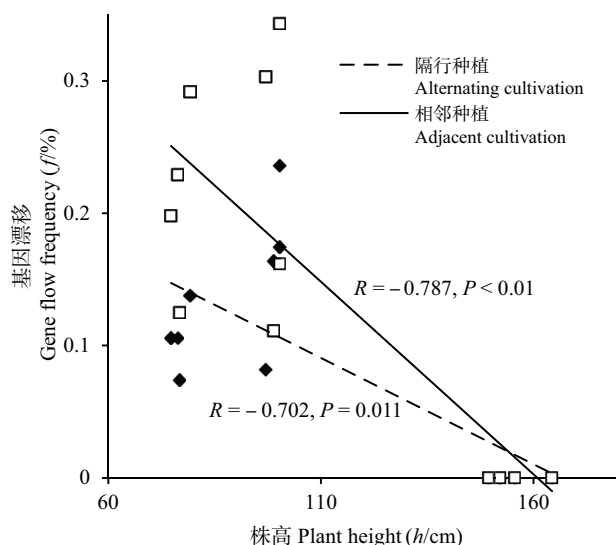


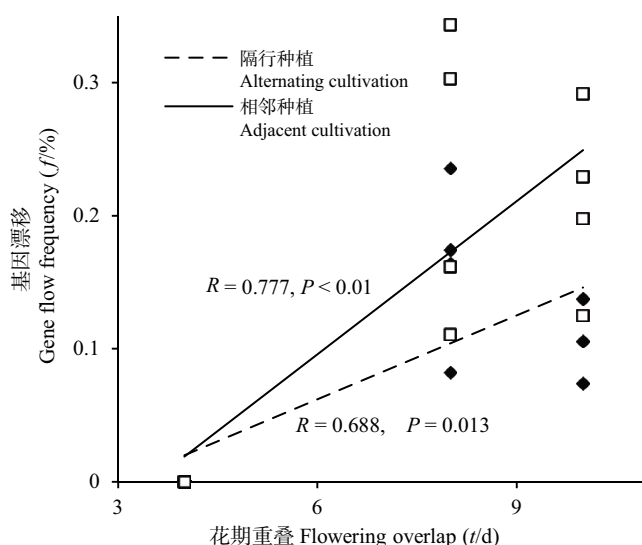
图6 基因漂移频率与株高、花期重叠的相关性.

Fig. 6 Correlation of gene flow frequency to plant height and flowering overlap.

3 讨论

尽管单一性状转基因水稻的基因漂移已有很多报道,但针对复合性状转基因水稻向受体水稻和杂草稻的基因漂移上尚没有报道,复合性状的抗性基因漂移所致的风险更为复杂,因此更应该全面评估.本研究所用的复合性状转基因水稻T1c-19,具有很好的抗虫和抗除草剂效果,具备良好的商业化前景,MH63作为转基因水稻的受体,具有良好的农艺性状,是持续应用时间最长、效益最显著的恢复系水稻,在我国华中地区广泛应用.选用的3种杂草稻WRMM、WRTZ和WRY分别采集于广东茂名、江苏泰州和湖南益阳,是我国华南、华东和华中地区主要的杂草稻类型,同时这3种杂草稻具有不同的株高,也便于我们考察株高对基因漂移频率的影响.试验结果表明复合性状转基因水稻的基因漂移与单一性状转基因水稻并无明显差异,在我们的试验中,隔行种植下转基因水稻向受体水稻和杂草稻的最大基因漂移频率为0.919%和0.164%,相邻种植下转基因水稻向杂草稻的最大基因漂移频率为0.230%.这与已有的研究结果一致,如戎俊等采用隔行种植的方式发现抗虫转基因水稻向其非转基因亲本的最大基因漂移频率为0.832%^[38];Rong等和Zuo等采用相邻种植方式,前者发现供试转基因水稻向其邻近的非转基因亲本的最大基因漂移频率为0.79%^[3],后者发现供试转基因水稻向杂草稻的最大基因漂移为0.666%^[24];Sun等采用同心圆、隔行和相邻的种植方式研究了抗草铵膦转基因水稻向不同杂草稻的基因漂移,结果发现3种植方式下抗性基因的最大基因漂移频率分别为0.302%、0.470%和0.187%^[30].因此,不同转基因水稻向不同杂草稻的基因漂移不完全相同,这与水稻品种、杂草稻生物类型、栽培稻与杂草稻的亲及环境因素有关.因此,在正确评估复合性状转基因水稻的基因漂移风险时,应该充分考虑影响其基因漂移的因素.

转基因水稻和杂草稻的亲及性是基因漂移发生的生物学基础^[22].本研究中所采用的试验材料除WRTZ属偏粳型



外,转基因水稻和受体及其他杂草稻均属籼型,根据花粉供体和受体的亲和性我们预测转基因水稻向WRTZ的基因漂移频率可能低于其他杂草稻。研究结果表明在隔行和相邻种植方式下转基因水稻向WRTZ的基因漂移频率为0.106%和0.211%,低于其向WRYY的基因漂移(0.164%和0.230%)。因此,在该转基因水稻环境释放时应充分考虑当地的水稻和杂草稻的生物类型,利用其与转基因水稻的亲合性以降低风险。

其他因素也对基因漂移有很大的影响,包括转基因水稻与杂草稻的花期重叠时间、每日开花节律以及株高差异。花粉供体与受体的花期重叠及每日开花节律决定了花粉供体的花粉量,是基因漂移的关键因素。Olguin等的研究发现和转基因水稻花期重叠时间短(4-9 d)的杂草稻平均基因漂移率为0.1%,明显低于重叠时间长(10-14 d)的杂草稻的平均异交率0.3%^[21]。Zuo等研究也表明转基因水稻与杂草稻花期相遇时间长短与异交率大小成正相关^[24]。在我们的试验中,两种种植方式下的表现结果一致,即与转基因水稻花期重叠时间短的WRMM没有发生基因漂移,而重叠时间长的WRTZ和WRYY均发生了基因漂移。

相邻种植下转基因水稻T1c-19向WRTZ的基因漂移频率(0.211%)高于隔行种植下的基因漂移频率(0.106%),向WRYY的基因漂移频率也有同样的表现,相邻种植(0.230%)高于隔行种植(0.164%)。这与Sun等的研究结果隔行种植相比其他种植方式能检测最大的基因漂移^[30]稍有不同,原因可能是本研究中杂草稻与转基因水稻每日开花节律一致,在相邻种植下,杂草稻与相邻转基因水稻植株的穗子是部分交叠在一起的,转基因水稻上散发的花粉几乎可以马上落到邻近杂草稻穗子的柱头上,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隔行种植情况的。由此可见,基因漂移频率与多种因素有关,包括环境条件和种植方式,环境条件差异不大的情况下,不同的种植方式得下的漂移频率也是不同的。因此采用合理的种植方式才能对转基因水稻的安全性进行充分的评估。

花粉供体与受体的株高也影响它们之间的基因漂移频率^[6, 24]。通常情况下转基因水稻花粉更容易飘落到株高与之相近或矮于它的杂草稻穗子上。本研究中,在与转基因水稻T1c-19株高无显著差异的WRYY和显著低于转基因水稻的WRTZ中均有基因漂移发生,而在显著高于转基因水稻的WRMM中没有检测到基因漂移,原因可能是WRMM高出转基因水稻50-60 cm,导致转基因水稻的花粉难以飘落到WRMM上,因此很难发生基因漂移。

综上所述,复合性状转基因水稻向杂草稻的基因漂移率及影响因素与单一性状转基因水稻并无区别。花粉介导的基因漂移受很多生物和非生物的影响,如花粉供体和受体的亲和性、花期重叠时间、每日开花节律、株高差异及天气因素等,因此在T1c-19环境释放时应充分考虑这些因素,通过种植与T1c-19亲和性低、花期重叠短或株高显著大于T1c-19的水稻以及增大种植间距等措施,以降低该转基因水稻的漂移风险。

转基因水稻在环境释放过程中一旦发生基因漂移,产生的携带抗性基因的杂交后代,就有可能引起基因漂移事件

的逐年累加,所带来的生态风险也会越来越严重。但与单一性状相比,复合性状的基因漂移可能带来的生态风险更应该引起高度重视。首先是抗草铵膦基因漂移到杂草稻,杂草稻由于具备了对草铵膦的抗性,会成为在抗草铵膦转基因田中难以防除的杂草;又由于具备了抗虫基因,可能在适合的虫压下提高其生存适合度,形成竞争能力比杂草稻更强的杂交后代;同时两个抗性基因还有可能存在基因互作,导致尚不可预料的生态后果。因此应全面防范复合性状转基因水稻的基因漂移,同时需要对其杂交后代的生存适合度进行深入研究。

适合度(Fitness)是个体在特定环境条件下的生存和繁殖能力,它决定杂交后代能否在自然界中生存定居,并建立种群^[39-40]。因此携带转基因的杂交后代适合度是评价抗性基因是否成功漂移的重要指标^[41-44]。针对单一性状的杂交后代,大量研究表明杂交后代的适合度和环境条件有密切关系,包括是否存在选择压和竞争等^[27, 45-49]。不同研究者由于试验材料和环境条件的不同,各研究报道中的后代适合度也有差异,但大多数研究表明,在选择压存在的情况下,携带抗性基因的后代比亲本、不携带抗性基因的后代适合度高,且在选择压越高的情况下适合度提高越大^[23, 47, 50-53]。对复合性状的杂交后代,由于同时携带2个抗性基因,可能的生存环境比单一性状更复杂,充分了解携带抗性基因的杂交后代在不同环境条件下的适合度表现,才能从更深层次评价转基因水稻释放给环境造成的潜在危害^[54]。

参考文献 [References]

- Huang JK, Rozelle S, Pray C, Wang QF. Plant biotechnology in China [J]. *Science*, 2002, **295**: 674-677
- Jia SR, Peng YF. GMO biosafety research in China [J]. *Environ Biosaf Res*, 2002, **1**: 5-8
- Rong J, Song ZP, Su J, Xia H, Lu BR, Wang F. Low frequency of transgene flow from *Bt/CpTI* rice to its nontransgenic counterparts planted at close spacing [J]. *New Phytol*, 2005, **168**: 559-566
- Arrieta-Espinoza G, Sánchez E, Vargas S, Lobo J, Quesada T, Espinoza AM. The weedy rice complex in Costa Rica: I. Morphological study of relationships between commercial rice varieties, wild *Oryza* relatives and weedy types [J]. *Genet Res Crop Evol*, 2005, **52**: 575-587
- Olsen KM, Caicedo AL, Jia YL. Evolutionary genomics of weedy rice in the USA [J]. *J Integr Plant Biol*, 2007, **49**: 811-816
- Shivrain VK, Burgos NR, Sales MA, Mauromoustakos A, Gealy DR, Smith KL, Black HL, Jia M. Factors affecting the outcrossing rate between ClearfieldTM rice and red rice (*Oryza sativa*) [J]. *Weed Sci*, 2009, **57**: 394-403
- Dai L, Dai WM, Song XL, Lu BR, Qiang S. A comparative study of competitiveness between different genotypes of weedy rice (*Oryza sativa*) and cultivated rice [J]. *Pest Manage Sci*, 2013, **70** (1): 113-122
- Valverde BE. The Damage by Weedy Rice-Can Feral Rice Remain Undetected? [M]//Gressel J. *Crop Fertility and Volunteerism*. Boca Raton: CRC, 2005: 279-294
- Ferrero A. Biology and control of red rice (*Oryza sativa* L. var. *sylvatica*) Infesting European rice fields [J]. *Medoryzae*, 2001, **9**: 2-4
- Preecha P. Seed morphological traits and genotypic diversity of weedy

- rice (*Oryza sativa* f. *spontanea*) populations found in the Thai Hom Mali rice fields of north-eastern Thailand [J]. *Weed Biol Manage*, 2009, **9**: 1-9
- 11 Yu G, Bao Y, Shi C, Dong C, Ge S. Genetic diversity and population differentiation of Liaoning weedy rice detected by RAPD and SSR markers [J]. *Biochem Genet*, 2005, **43**: 261-270
 - 12 Cao QJ, Lu BR, Xia H, Rong J, Sala F, Spada A, Grassi F. Genetic diversity and origin of weedy rice (*Oryza sativa* f. *spontanea*) populations found in North-eastern China revealed by simple sequence repeat (SSR) markers [J]. *Ann Bot*, 2006, **98**: 1241-1252
 - 13 Zhang LJ, Dai WM, Wu C, Song XL, Qiang S. Genetic diversity and origin of Japonica- and Indica-like rice biotypes of weedy rice in the Guangdong and Liaoning provinces of China [J]. *Genet Resour Crop Evol*, 2012, **59**: 399-410
 - 14 马殿荣, 陈温福, 徐正进, 张文忠. 辽宁省杂草稻的发生及其控制措施[J]. 中国农学通报, 2005, **21** (8): 358-360 [Ma DR, Chen WF, Xu ZJ, Zhang WZ. Origin and control measurement of weedy rice in Liaoning [J]. *Chin Sci Bull*, 2005, **21** (8): 358-360]
 - 15 戴伟民, 宋小玲, 吴川, 张连举, 左然林, 张峥, 李淑顺, 曹旦, 左娇, 杨琳, 刘琳莉, 强胜. 江苏省杂草稻危害情况的调研[J]. 江苏农业学报, 2009, **25** (3): 712-714 [Dai WM, Song XL, Wu C, Zhang LJ, Zuo RL, Zhang Z, Li SS, Cao D, Zuo J, Yang L, Liu LL, Qiang S. Investigation of weedy rice (*Oryza sativa* f. *spontanea*) occurrence in Jiangsu Province [J]. *Jiangsu J Agric Sci*, 2009, **25** (3): 712-714]
 - 16 刘睿, 强胜, 宋小玲, 陈世国, 戴伟民. 杂草稻苗期强竞争性的生理机制[J]. 植物保护学报, 2015, **42** (1): 138-144 [Liu R, Qiang S, Song XL, Chen SG, Dai WM. Physiological mechanisms of strong competition of weedy rice at seedling stage [J]. *Chin J Plant Prot*, 2015, **42** (1): 138-144]
 - 17 Messegue J. Gene flow assessment in transgenic plants [J]. *Plant Cell*, 2003, **73**: 201-212.
 - 18 Messegue J, Marfa V, Catala MM, Guiderdoni E, Mele EA. Field study of pollen-mediated gene flow from Mediterranean GM rice to conventional rice and the red rice weed [J]. *Mol Breed*, 2004, **13**: 103-112
 - 19 Chen LJ, Li DS, Song ZP, Suh HS, Lu BR. Gene flow from cultivated rice (*Oryza sativa*) to its weedy and wild relatives [J]. *Ann Bot (London)*, 2004, **93** (1): 67-73
 - 20 Zhang WQ, Linscombe SD, Webster E, Tan S Y, Oard J. Risk assessment of the transfer of imazethapyr herbicide tolerance from Clearfield rice to red rice (*Oryza sativa*) [J]. *Euphytica*, 2006, **152**: 75-86
 - 21 Olguin ER, Arrieta-Espinoza G, Lobo JA, Espinoza-Esquivel AM. Assessment of gene flow from a herbicide-resistant indica rice (*Oryza sativa* L.) to the Costa Rican weedy rice (*Oryza sativa*) in Tropical America: factors affecting hybridization rates and characterization of F1 hybrids [J]. *Transgenic Res*, 2009, **18**: 633-647
 - 22 Song XL, Liu LL, Wang Z, Qiang S. Potential gene flow from transgenic rice (*Oryza sativa* L.) to different weedy rice (*Oryza sativa* f. *spontanea*) accessions based on reproductive compatibility [J]. *Pest Manage Sci*, 2009, **65**: 862-869
 - 23 Chun YJ, Kim DI, Park KW, Kim HJ, Jeong SC, An JH, Cho KH, Back K, Kim HM, Kim CG. Gene flow from herbicide-tolerant GM rice and the heterosis of GM rice-weed F2 progeny [J]. *Planta*, 2011, **233** (4): 807-815
 - 24 Zuo J, Zhang LJ, Song XL, Dai WM, Qiang S. Innate factors causing differences in gene flow frequency from transgenic rice to different weedy rice biotypes [J]. *Pest Manage Sci*, 2011, **67**: 677-690
 - 25 Busconi M, Baldi G, Lorenzoni C, Fogher C. Gene flow from transgenic rice to red rice (*Oryza sativa* L.) in the field [J]. *Plant Biol*, 2014, **16**: 22-27
 - 26 Zhang NY, Linscombe S, Oard J. Out-crossing frequency and genetic analysis of hybrids between transgenic glufosinate herbicide-resistant rice and the weed, red rice [J]. *Euphytica*, 2003, **130** (1): 35-45
 - 27 Shivrain VK, Burgos NR, Anders MM, Rajguru SN, Moore J, Sales MA. Gene flow between Clearfield™ rice and red rice [J]. *Crop Prot*, 2007, **26**: 349-356
 - 28 Yuan QH, Shi L, Wang F, Cao B, Qian Q, Lei XM, Liao YL, Liu WG, Cheng L, Jia SR. Investigation of rice transgene flow in compass sectors by using male sterile line as a pollen detector [J]. *Theor Appl Genet*, 2007, **115**: 549-560
 - 29 Zhang WQ, Linscombe SD, Oard JH. Genetic and agronomic analyses of red rice-Clearfield hybrids and their progeny produced from natural and controlled crosses [J]. *Euphytica*, 2008, **164**: 659-668
 - 30 Sun GH, Dai WM, Cui RR, Qiang S, Song XL. Gene flow from glufosinate-resistant transgenic hybrid rice Xiang 125S/Bar68-1 to weedy rice and cultivated rice under different experimental designs [J]. *Euphytica*, 2015, **204** (1): 1-17
 - 31 Halpin C. Gene stacking in transgenic plants—the challenge for 21 st century plant biotechnology [J]. *Plant Biotechnol J*, 2005, **3**: 141-155
 - 32 Tang W, Chen H, Xu CG, Li XH, Lin YJ, Zhang QF. Development of insect-resistant transgenic indica rice with a synthetic cry1C gene, Development of insect-resistant transgenic indica rice with a synthetic cry1C gene [J]. *Mol Breed*, 2006, **18**: 1-10
 - 33 Han Y, Xu XL, Ma WH, Yuan BQ, Wang H, Liu FZ, Wang MQ, Wu G, Hua HX. The influence of transgenic *Cry1Ab/Cry1Ac/Cry1C* and *Cry2A* rice on non-target planthoppers and their main predators under field conditions [J]. *Chin J Agric Sci*, 2011, **10** (11): 1739-1747
 - 34 Xu XL, Han Y, Wu G, Cai WL, Yuan BQ, Wang H, Liu FZ, Wang MQ, Hua HX. Field evaluation of effects of transgenic cry1Ab/cry1Ac, cry1C and cry2A rice on *Cnaphalocrocis medinalis* and its arthropod predators [J]. *Sci Chin Life Sci*, 2011, **54** (11): 1019-1028
 - 35 张岚, 林克剑, 李飞, 侯茂林. 转cry1c和cry2A不同抗虫基因水稻品种对非靶标害虫灰飞虱生物学特性的影响[J]. 植物保护, 2011, **37** (6): 120-125 [Zhang L, Lin KJ, Li F, Hou ML. The biological effects of transgenic rice varieties with cry1C or cry2A on the non-target insect pest *Laodelphax striatellus*. *Plant Prot*, 2011, **37** (6): 120-125]
 - 36 戚琳, 陈法军, 刘满强, 陈小云, 祝向钰, 李辉信, 胡锋. 三种转Bt水稻短期种植对土壤微生物生物量和线虫群落的影响[J]. 生态学杂志, 2013, **32** (4): 975-980 [Qi L, Chen JF, Liu MQ, Chen XY, Zhu XY, Li HX, Hu F. Effects of short-term planting of three transgenic Bt rice lines on soil microbial biomass and soil nematode assemblage. *Chin J Ecol*, 2013, **32** (4): 975-980]
 - 37 Song XL, Wang Z, Qiang S. Agronomic performance of F1, F2 and F3 hybrids between weedy rice and transgenic glufosinate-resistant rice [J]. *Pest Manage Sci*, 2011, **67**: 921-931
 - 38 戎俊, 宋志平, 苏军, 夏辉, 王锋, 卢宝荣. 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[J]. 生物多样性, 2006, **14** (4): 309-314 [Rong J, Song ZP, Su J, Xia H, Wang F, Lu BR. Low frequencies of transgene flow between Bt/CpTI rice and their non-transgenic counterparts under alternating cultivation [J]. *Biodivers Sci*, 2006, **14** (4): 309-314]
 - 39 Jenczewski E, Ronfort J, Chèvre AM. Crop-to-wild gene flow, introgression and possible fitness effects of transgenes. *Environ Biosaf*

- Res, 2003, **2**: 9-24
- 40 卢宝荣, 夏辉. 转基因植物的环境生物安全: 转基因逃逸及其潜在生态风险的研究和评价[J]. 生命科学, 2011, **23** (2): 186-194 [Lu BR, Xia H. Environmental biosafety of transgenic plants: research and assessment of transgene escape and its potential ecological impacts [J]. *Chin Bull Life Sci*, 2011, **23** (2): 186-194]
 - 41 Hauser TP, Damgaard C, Jørgensen RB. Frequency-dependent fitness of hybrids between oilseed rape (*Brassica napus*) and weedy *B. rapa* (Brassicaceae) [J]. *Am J Bot*, 2003, **90** (4): 571-578
 - 42 Song ZP, Lu BR, Wang B, Chen JK. Fitness estimation through performance comparison of F1 Hybrids with their parental species *Oryza rufipogon* and *O. sativa* [J]. *Ann Bot*, 2004, **93**: 311-316
 - 43 Devos Y, Schrijver AD, Reheul D. Quantifying the introgressive hybridisation propensity between transgenic oilseed rape and its wild/weedy relatives [J]. *Environ Monit Assess*, 2009, **149**: 303-322
 - 44 Londo JP, Bautista NS, Sagers CL, Lee EH, Watrud LS. Glyphosate drift promotes changes in fitness and transgene gene flow in canola (*Brassica napus*) and hybrids [J]. *Ann Bot*, 2010, **106** (6): 957-965
 - 45 Campbell LG, Snow AA. Competition alters life history and increase the relative fecundity of crop-wild radish hybrids (*Raphanus* spp.) [J]. *New Phytol*, 2007, **173**: 648-660
 - 46 Di K, Stewart CN, Wei W, Shen BC, Tang ZX, Ma KP. Fitness and maternal effects in hybrids formed between transgenic oilseed rape (*Brassica napus* L.) and wild brown mustard [*B. juncea* (L.) Czern et Coss.] in the field [J]. *Pest Manage Sci*, 2009, **65** (7): 753-760
 - 47 Xia H, Chen L, Wang F, Lu BR. Yield benefit and underlying cost of insect-resistance transgenic rice: implication in breeding and deploying transgenic crops [J]. *Field Crops Res*, 2010, **118** (3): 215-220
 - 48 Yang X, Wang F, Su J, Lu BR. Limited fitness advantages of crop-weed hybrid progeny containing insect-resistant transgenes (*Bt/CpTI*) in transgenic rice field [J]. *Plos One*, 2012, **7** (7): 398
 - 49 Hovick SM, Campbell LG, Snow AA, Whitney K D. Hybridization alters early life-history traits and increases plant colonization success in a novel region [J]. *Am Nat*, 2012, **179** (2): 192-203
 - 50 宋小玲, 强胜. 三种类型油菜(*Brassica* spp.)和野芥菜(*B. juncea* var. *gracilis* Tsen et Lee)杂交亲和性及F1的适合度[J]. 应用与环境生物学报, 2003, **9** (4): 357-361 [Song XL, Qiang S. Sexual compatibility of three species of oilseed rape (*Brassica* spp.) with wild rapes (*B. juncea* var. *gracilis* Tsen et Lee) and the fitness of F1[J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2003, **9** (4): 357-361]
 - 51 郑爱琴, 强胜, 宋小玲. 抗除草剂转基因油菜与野芥菜的杂交1代与5种常规栽培油菜回交后代的适合度[J]. 应用与环境生物学报, 2014, **20** (3): 337-344 [Zheng AQ, Qiang S, Song XL. Fitness of backcross between F1 (wild *B. juncea* × herbicide-resistant transgenic oilseed rape) and 5 conventional cultivate varieties [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2014, **20** (3): 337-344]
 - 52 Yang X, Xia H, Wang W, Wang F, Su, J, Snow AA, Lu BR. Transgenes for insect resistance reduce herbivory and enhance fecundity in advanced generations of crop-weed hybrids of rice [J]. *Evol Appl*, 2011, **4** (5): 672-684
 - 53 张富丽, 刘勇, 佟洪金, 尹全, 陶李, 王东, 周西全, 常丽娟, 宋君, 刘文娟, 雷绍荣, 郭灵安. 不同虫压下转*Bt*基因水稻与非转基因水稻生态适合度差异[J]. 应用与环境生物学报, 2012, **18** (1): 35-41 [Zhang FL, Liu Y, Tong HJ, Yin Q, Tao L, Wang D, Zhou XQ, Chang LJ, Song J, Liu WJ, Lei SR, Guo LA. Differences in ecological fitness between *Bt* transgenic rice and regular rice under different insect-infestation pressures[J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2012, **18** (1): 35-41]
 - 54 Campbell LG, Snow AA. Can feral weeds evolve from cultivated radish (*Raphanus sativus*, Brassicaceae)? [J]. *Am J Bot*, 2009, **96** (2): 498-506