

# 抗草甘膦转基因大豆基因漂移的研究

## I 大豆风媒介传粉的基因漂移研究

刘 琦, 李希臣, 刘昭军, 李 铁, 雷勃钧  
(黑龙江省农业科学院生物技术研究, 哈尔滨 150086)

**摘要:**田间生殖隔离状态下, 将野生大豆和栽培大豆种植在抗草甘膦转基因大豆周围, 按固定距离收获。每年对一部分实施喷施高剂量草甘膦进行鉴定筛选, 另一部分收获留待下年继续鉴定筛选。对每年连续筛选中存活植株提取 DNA, 进行对目的基因  $CP_4-EPSPS$  的 PCR 检测, 结果为阴性。初步判断在监测的三年时间内没有发现抗草甘膦转基因大豆通过风媒介使花粉传播, 对田间大豆及其近缘种野生大豆产生明显的基因漂移。

**关键词:** 抗草甘膦大豆; 风媒介; 基因漂移  
中图分类号: S565.1      文献标识码: A      文章编号: 1002-2767(2008)01-0014-03

## Study on Roundup Ready Soybean's Round up Ready Gene Flowing

### I Study on Round up Ready Gene Move to Soybean by Anemophily

LIU Qi, LI Xi-chen, LIU Zhao-jun, LI Tie, LEI Bo-jun  
(Biotechnology Technology Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086)

**Abstract:** In reproductive isolation the experiment planted wild soybean and cultivate soybean around Roundup Ready Soybean and harvested soybean according to fixture distance. A part of soybean was inspected with high dosage glyphosate, remaining soybean was harvested and kept on inspecting the next year. Distilled DNA from the survival soybean which maybe resist to glyphosate and inspected  $CP_4-EPSPS$  with PCR, the result was negative. The survey showed that RRS did not transfer pollen to cultivate soybean and wild soybean by anemophily in the inspected three years.  
**Key words:** Roundup Ready Soybean; anemophily; gene flow

随着分子生物学和生物技术的飞速发展, 转基因植物研究的中试、田间释放及商品化种植等取得了一系列突破性成就, 愈来愈受世人瞩目。其中, 最值得关注的是在全球转基因四大作物(大豆、玉米、棉花、油菜)中推广最早、面积最大的大豆。转基因大豆商业种植始于 1994 年美国, 由此迅速扩散到阿根廷、加拿大等国。转基因作物种植面积由 1996 年 170 万  $hm^2$  猛增到 2004 年的 8 100 万  $hm^2$ 。其中转基因大豆由 50 万  $hm^2$  猛增到 4 840 万  $hm^2$ , 至 2005 年, 全球转基因大豆的种植面积是 5 440 万  $hm^2$ , 占

转基因作物种植总面积的 60%, 占全球大豆种植面积的 51%<sup>[1]</sup>。

转基因大豆中主要是抗除草剂(草甘膦)转基因大豆(Roundup Ready Soybean, 简称 RRS)<sup>[2]</sup>, 它的种植可以大大降低种地的费用, 减少大豆生产成本, 并能减少或免耕土地, 从而减少水土流失。在关注 RRS 所带来的巨大社会、经济和生态效益的同时, 转基因大豆的安全性问题也引起了世界范围内的广泛关注<sup>[3]</sup>。对 RRS 科学家预测的某些风险中, 最重要的是如在田间通过花粉传播发生抗除草剂基因漂移到非转基因大豆、特别是近缘野生大豆和豆科杂草, 对大豆资源和生态平衡的破坏将产生不可估量的严重后果<sup>[4-6]</sup>。

尽管已知大豆是较严格的自花授粉作物, 天然杂交率只有 0.5%~1%, 通过花粉传播使基因漂移的可能性极小或不存在。但预测的风险究竟能否发

收稿日期: 2007-05-08  
基金项目: 黑龙江省自然科学基金重点项目(ZJN04-0402)和黑龙江省农科院创新工程青年基金项目  
第一作者简介: 刘琦(1980-), 女, 黑龙江省北安市人, 在读硕士, 从事大豆生物技术研究。  
通讯作者: 雷勃钧(1944-), 女, 研究员, 主要从事大豆生物技术研究。 Tel: 0451-86668649; E-mail: leibojun\_n\_44@163.com。

生, 需要科学准确的试验结果为据, 并要通过较长时间的田间跟踪监测才能得出科学的结论。因此, 为保护生态环境和 RRS 的安全种植, 也为大豆基因工程发展, 特进行本试验研究。

1 材料与方法

1.1 供试材料

抗草甘膦转基因大豆品种美国 2 号; 非转基因大豆品种黑生 101、黑农 38 和野生大豆。

1.2 引物合成

根据已知抗草甘膦转基因大豆品种基因组中特有基因构件成分的序列, 针对 CP4-EPSPS 基因合成特异引物。

表 1 引物序列和扩增片断大小

检测对象	引物名称	产物长度	引物序列
CP4EPSP 基因	CP4EPSP—1	146bp	5′GCA AAT CCT CTG
			GCC TTT CC3′
	CP4EPSP—2		5′CTT GCC CGT ATT
			GAT GAC GTC3′

1.3 试验方法

1.3.1 草甘膦对栽培和野生大豆致死而转基因大豆存活的适宜浓度筛选试验 分别将 RRS、黑生 101、黑农 38、野生大豆种在田间, 种子密度为 21 粒·行<sup>-1</sup>。出苗 20 d 后对其进行不同浓度的草甘膦喷洒处理。用 41% 农达对栽培大豆及野生大豆和转基因大豆进行筛选, 设了 5 个浓度梯度, 1 845.0 (4 500)、1 230.0 (3 000)、922.5 (2 250)、615.0 (1 500)、307.5 g·ai·hm<sup>-2</sup> (750 mL·hm<sup>-2</sup>) 对黑农 38、黑生 101、RRS、野生大豆进行筛选。

1.3.2 RRS 通过传粉使抗性漂移到栽培和野生大豆及漂移距离的风媒介试验 本试验中的 RRS 风媒传粉试验是在生殖隔离状态下, 种植在固定的地块上。按一定距离交叉取样, 次年分别种植, 进行抗药筛选。(1) 田间喷药鉴定: 2004 年进行了喷药试验, 对 2003 年 RRS 周围种植的栽培大豆喷施 41% 农达, 浓度为 2 460 g·ai·hm<sup>-2</sup> (6 000 mL·hm<sup>-2</sup>)。2005 年将 2004 年喷药后成活的大豆株行种植, 并喷施 41% 农达, 喷药浓度为 2 460 g·ai·hm<sup>-2</sup> (6 000 mL·hm<sup>-2</sup>)。2005 年对 2004 年 RRS 周围种植的栽培大豆喷洒 41% 农达, 浓度为 2 460 g·ai·hm<sup>-2</sup> (6 000 mL·hm<sup>-2</sup>); 2006 年对 2005 年 RRS 周围种植的栽培大豆喷洒 41% 农达, 浓度为 2 460 g·ai·hm<sup>-2</sup> (6 000 mL·hm<sup>-2</sup>)。(2) PCR 检测: 在实验室对成活株进行 PCR 检测, 以鉴定其真伪。引物序列根据 CP4EPSP 基因序列, 设计一对引物; 成活株大豆 DNA 提取采用 CTAB 法; PCR 扩增程序为:

95℃变性 30 s, 62℃复性 30 s, 72℃延伸 25 s, 40 个循环。

2 结果与分析

2.1 非抗草甘膦大豆的致死浓度

草甘膦喷洒处理后, 经表型鉴定发现, 不同的草甘膦浓度处理对美国 2 号均无影响(见图 1)。而随着草甘膦浓度的增大, 黑生 101、黑农 38、野生大豆受害反应越来越明显。

当草甘膦浓度≥1 230 g·ai·hm<sup>-2</sup> (3 000 mL·hm<sup>-2</sup>) 时, 黑农 38 叶片枯黄, 叶边缘卷曲, 生长点坏死, 植株死亡(见图 2)。

当草甘膦浓度≥1 230 g·ai·hm<sup>-2</sup> (3 000 mL·hm<sup>-2</sup>) 时, 黑生 101 叶片枯黄, 叶边缘卷曲, 生长点坏死, 植株死亡(见图 3)。

当草甘膦浓度≥922.5 g·ai·hm<sup>-2</sup> (2 250 mL·hm<sup>-2</sup>) 时, 野生大豆叶片枯黄, 叶边缘卷曲, 生长点坏死, 植株死亡(见图 4)。



图 1 喷药后的 RRS



图 2 黑农 38 在致死浓度下的反应



图 3 黑生 101 在致死浓度下的反应



图 4 野生豆在致死浓度下的反应

2.2 世代遗传跟踪监测

对每一年收获的材料在下年种植时分为两部分处理，一部分进行药剂筛查，另一部分留待再下一年的种植和重复筛查，以完成连续三个世代的跟踪监测。

2.2.1 草甘膦抗性筛查 2004 年对 2003 年 RRS 周围种植的栽培大豆喷施 41% 农达，结果施药 3 d 60% 出现轻度萎蔫；5 d 90% 明显萎蔫；9 d 绝大多数品种均已枯死。筛选出较耐草甘膦大豆 16 株单株收获、脱粒。2005 年将 2004 年喷药后成活的 16 株大豆株行种植，并喷施 41% 农达，又有 6 株成活，其余全部枯死。2005 年对 2004 年 RRS 周围种植的栽培大豆喷洒 41% 农达，结果全部死亡。2006 年对 2005 年 RRS 周围种植的栽培大豆喷洒 41% 农达，结果全部死亡。

2.2.2 PCR 检测 在实验室提取 6 株成活株的 DNA 进行 PCR 检测发现，6 株成活株没有阳性带（见图 5）。说明并没有发生基因漂移。6 株成活株喷洒草甘膦没有死亡，可能是着药不均造成的。

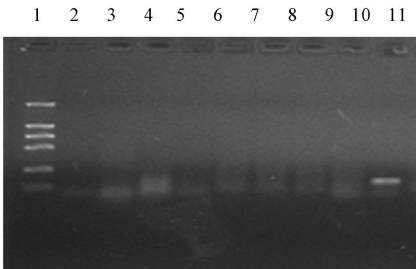


图 5 成活株 CP4—EPSPS 基因的 PCR 检测

1 Marker 2 水, 3 绥农 20, 4~9 筛查后的成活株  
10 美国 2 号, 11 野生豆

3 结论

从本试验结果可以初步得出  $1\ 230\ \text{g}\cdot\text{ai}\cdot\text{hm}^{-2}$  ( $3\ 000\ \text{mL}\cdot\text{hm}^{-2}$ ) 为栽培大豆的致死浓度； $922.5\ \text{g}\cdot\text{ai}\cdot\text{hm}^{-2}$  ( $2\ 250\ \text{mL}\cdot\text{hm}^{-2}$ ) 为野生大豆的致死浓度；栽培大豆和野生大豆的生育时期不同，所以同时喷药致死浓度有差异。

经连续三年的监测，在较短的时间内没有发现通过风媒介使花粉传播，发生对田间大豆及其近缘种野生大豆产生明显的基因漂移。

4 讨论

在众多转基因检测方法中，当蛋白质不表达或对转基因原料进行加工时，用 ELISA 法、Western 法、酶法可能无法检测出外源基因的表达产物。而 Southern、Northern 等方法成本大，耗时耗力，不适合进行大量材料的检测。相对而言，对植株进行田间抗性筛查和表型鉴定及 PCR 检测相结合的检测方法则简便易行，成本相对较低，便于进行大规模检测<sup>[7]</sup>。

田间药剂筛查中的少量成活株被疑似抗草甘膦植株，但进一步筛查不能成活，并且 PCR 鉴定为阴性。其原因是由于试验地有限，材料较多，致使田间种植密度过大，造成了植株着药不均，而出现了能继续生长发育的植株。

大豆在田间自然状态下，由风媒介的传粉而发生的基因漂移现象带有很大的偶然性，它与当年的风力、温度、湿度等气象因子等关系十分密切；大豆又是比较严格的自花授粉作物且花粉数量少、粘重，花药和柱头不外露等不利于接受外来花粉即不利于风传粉<sup>[8]</sup>。因此，种植一个世代或者仅监测一年是得不到结果的，即使偶然发生了，是否能遗传下去需要进行较长时期的跟踪监测，三年的试验只能得到初步的结果，还不能得出最终的结论。

参考文献:

[ 1 ] 杨家银. 转基因大豆生产的现状与趋势[ J ]. 世界农业, 2002 (6): 40-42.  
[ 2 ] 韩天富. 转基因大豆及其安全管理办法[ J ]. 粮食与油脂, 2001 (2): 10-12.  
[ 3 ] 杨昌举, 宋林, 王竹. 转基因大豆对生物多样性的影响[ J ]. 环境保护, 2002(11): 24-27.  
[ 4 ] 陈继承, 周瑞宝. 转基因大豆及其安全性[ J ]. 粮食与油脂 2004 (9): 36-39.  
[ 5 ] 郭斌, 陈勇, 黄斌. 转基因大豆食品安全性及对生态环境影响初探[ J ]. 农业环境与发展, 2002(6): 29-31.  
[ 6 ] 陈新, 严继勇, 高兵. 野生大豆抗草甘膦基因漂移的初步研究[ J ]. 中国作物学报, 2004(2): 89-91.  
[ 7 ] 宋扬, 吴存祥, 候文胜, 等. 对引进的美国大豆品种进行转基因成分的检测[ J ]. 大豆科学, 2005(2): 116-120.  
[ 8 ] 赵丽梅, 孙襄, 王曙明, 等. 自然条件下大豆花粉的田间漂移[ J ]. 大豆科学, 2006(1): 84-86.