

# 转 $P_{SA\text{Gl}2}$ -IPT 基因小麦安全性的初步研究<sup>\*</sup>

奚亚军<sup>1</sup>, 马晓妮<sup>1</sup>, 刘曙东<sup>1</sup>, 朱建楚<sup>1</sup>, 胡建宏<sup>2</sup>, 伦 玮<sup>1</sup>, 路 明<sup>1</sup>

(1 西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨凌 712100;

2 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

**[摘 要]** 对转  $P_{SA\text{Gl}2}$ -IPT 基因小麦植株根际土壤及其周边小麦、大麦、燕麦进行了基因漂移检测, 并对食用转  $P_{SA\text{Gl}2}$ -IPT 基因小麦混合饲料的小白鼠进行了毒理性试验, 初步研究了转  $P_{SA\text{Gl}2}$ -IPT 基因小麦的安全性。结果表明,  $P_{SA\text{Gl}2}$ -IPT 基因并未通过根系分泌物漂移到土壤中; 除西农 1376 在距离  $T_2$  代西农 1376 小麦 3 和 6 m 处各发现 1 株 PCR 阳性植株外, 在小麦郑 9023 及大麦和燕麦中均未发现  $P_{SA\text{Gl}2}$ -IPT 基因存在; 食用含有转基因小麦混合饲料的小白鼠和对照小白鼠的肝脏和肾脏的结构解剖图未见明显差异, 可以初步认为应用转  $P_{SA\text{Gl}2}$ -IPT 基因小麦是较安全的。

**[关键词]** 小麦;  $P_{SA\text{Gl}2}$ -IPT 基因; 遗传转化; 安全性

**[中图分类号]** S512.103.53

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2004)12-0018-05

植物转基因技术因其能将外源基因转入受体植物, 以达到定向改造植物的优点, 而日益受到人们的重视, 并已发展成为一种新的育种手段。迄今为止, 全世界培育成功的转基因植物超过 200 种, 其中大豆、玉米、棉花、油菜、马铃薯等作物的一些转基因品种已在生产上大面积推广应用, 取得了良好的经济效益<sup>[1]</sup>。然而, 随着农业可持续发展和人们环保意识的增强, 转基因植物的安全性越来越受到各国政府与科学工作者的重视。综合近年的研究<sup>[25]</sup>可以看出, 转基因植物的安全性主要集中在农产品的安全性和其对生态环境、非目标生物的影响 3 个方面, 例如若将转基因植物中的抗除草剂基因, 转移到其他亲缘野生种中会形成超级杂草, 病毒的重组和异源包装能产生超级病毒; 另外, 转基因对抗生素使用的安全性有潜在影响, 并可能破坏生物多样性, 伤害人畜健康及其在环境中残留累积等。这些问题一旦发生, 将会给人类带来不可预料的灾难。因此, 在转基因植物进入大田试验和商品化生产前, 进行生态风险评估是非常必要的。

提高小麦品种的抗旱能力是小麦育种的重要目标, 将叶片衰老抑制基因  $P_{SA\text{Gl}2}$ -IPT 导入小麦后, 可使叶片早衰特性得到改善<sup>[6]</sup>。为了对转  $P_{SA\text{Gl}2}$ -IPT 基因小麦的安全性进行评价, 本研究检测了转  $P_{SA\text{Gl}2}$ -IPT 基因小麦在其植株根际土壤及周边小

麦、大麦、燕麦中的基因漂移情况, 并对其进行了小白鼠饲喂毒性试验, 以期对抗旱转基因小麦安全性评价及其育种应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

小麦材料为西农 1376、郑 9023 和导入了  $P_{SA\text{Gl}2}$ -IPT 基因的  $T_1$ 、 $T_2$  代西农 1376, 均由国家小麦改良中心杨凌分中心小麦分子育种课题组提供。大麦材料为 B2978 和 U241, 燕麦材料为 W96-1 和 W96-16, 均由甘肃武威黄羊河农场提供。供试动物为小白鼠, 由第四军医大学提供。质粒为 pCMLA35-1 (携带叶片衰老抑制基因  $P_{SA\text{Gl}2}$ -IPT)<sup>[7]</sup>, 由华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室提供。

### 1.2 方 法

1.2.1 根际土壤的检测 田间试验在陕西杨凌西北农林科技大学农一站进行。在小麦抽穗前和乳熟期, 分别取西农 1376 和导入了  $P_{SA\text{Gl}2}$ -IPT 基因的  $T_2$  代西农 1376 植株根部附近土壤, 用去离子水浸提 12 h, 以 pCML35-1 质粒为阳性对照, 进行 PCR 检测。PCR 引物依据叶片衰老启动子  $PSA\text{Gl}2$  序列进行设计,  $PSA\text{Gl}2$ -R 序列为: 5' TGGCTGAA GTGA TAACCGTC3',  $PSA\text{Gl}2$ -F 序列

\* [收稿日期] 2004-06-13

[基金项目] 科技部国家转基因植物研究与产业化开发专项“抗叶片早衰转基因小麦的选育”(JY03-B-23-02)

[作者简介] 奚亚军(1969-), 男, 陕西白水人, 副研究员, 博士, 主要从事小麦基因工程研究。

为:5' GCAAA GAGACGAGGAACAAA3'。扩增片段长度为 526 bp。PCR 反应体系:DNA 模板 1.0  $\mu$ L, 10  $\times$ buffer 2.0  $\mu$ L, 2 mmol/L dNTP 1.0  $\mu$ L, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.8  $\mu$ L, 10 pmol/L Primer-F 0.4  $\mu$ L, 10 pmol/L Primer-R 0.4  $\mu$ L, Tag 酶(5 U/ $\mu$ L) 0.2  $\mu$ L, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 20  $\mu$ L。PCR 反应条件:94 预变性 4 min, 94 1 min, 56 1 min, 72 1.5 min, 35 个循环, 72 延伸 7 min, 4 保存。质量分数 1.0 % 琼脂糖凝胶电泳, EB (溴化乙锭) 染色, 紫外分析仪观察并照相。小麦总 DNA 的提取采用 CTAB 法<sup>[8]</sup>。

1.2.2 花粉漂移的检测 田间试验在云南元谋县农场进行。依据当地小麦开花期的主要风向, 在 20 m<sup>2</sup> 的转 P<sub>SA<sub>Gl2</sub></sub>-IPT 基因 T<sub>2</sub> 代西农 1376 田下风口(正南方)3 和 6 m 处, 分别种植与 T<sub>2</sub> 代西农 1376 开花期基本一致的西农 1376, 郑 9023, B2978, U241, W96-1 和 W96-16 等 6 个材料, 每个材料种植 2 行, 南北行向, 行长 1 m。小麦开花期自由授粉, 收获后随机取 3 和 6 m 处的每个参试材料种子 500

粒, 盆栽播种, 苗期提取叶片 DNA 进行 PCR 检测。  
1.2.3 小白鼠的毒理性检测 在小麦拔节期, 分别取西农 1376 和导入了 P<sub>SA<sub>Gl2</sub></sub>-IPT 基因的 T<sub>2</sub> 代西农 1376 植株部分叶片, 105 快速烘干后研磨至粉状, 分别与西农 1376、T<sub>1</sub> 代西农 1376 (包括部分分离的阴性植株) 种子、乳猪料按质量比 1 1 1 配成混合饲料, 其中处理的饲料配方为: F<sub>2</sub> 代西农 1376 叶片 + T<sub>1</sub> 代西农 1376 种子 + 乳猪料, 对照饲料配方为西农 1376 叶片 + 西农 1376 种子 + 乳猪料。小白鼠按性别分开饲养, 每组 2 只, 处理和对照各 5 组, 自由采食, 饲养 90 d 后解剖, 取肝脏和肾脏作切片观察。

2 结果与分析

2.1 转 P<sub>SA<sub>Gl2</sub></sub>-IPT 基因小麦根际土壤的检测

由图 1 可以看出, 阳性对照和转基因小麦植株均能扩增出目标片段, 而并未在阴性对照和土壤浸提液中扩增出相应片段。在小麦乳熟期重复进行 PCR 检测验证(图 2), 与抽穗前所得结果完全相符, 表明 P<sub>SA<sub>Gl2</sub></sub>-IPT 基因并未通过根系分泌物漂移到转基因植株根际土壤中。



图 1 转基因小麦抽穗前根际土壤 PCR 分析

1. Ladder DNA; 2. 阳性对照; 3. 阴性对照; 4, 6, 8, 10, 12, 14. 转基因植株; 5, 7, 9, 11, 13, 15. 根际土壤浸提液  
Fig. 1 PCR analysis for rhizospheric soil of transgenic wheat before earing stage  
1. Ladder DNA; 2. Positive CK; 3. Negative CK; 4, 6, 8, 10, 12, 14. Transgenic plants; 5, 7, 9, 11, 13, 15. Drench of rhizospheric soil

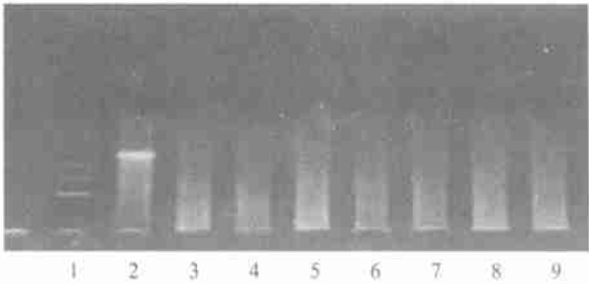


图 2 转基因小麦乳熟期根际土壤 PCR 分析

1. Ladder DNA; 2. 转基因植株; 3. 阴性对照; 4, 9. 根际土壤浸提液  
Fig. 2 PCR analysis for rhizospheric soil of transgenic wheat at milk stage  
1. Ladder DNA; 2. Transgenic plant; 3. Negative CK; 4, 9. Drench of rhizospheric soil

2.2 转 P<sub>SA<sub>Gl2</sub></sub>-IPT 基因小麦花粉漂移的检测

表 1 结果表明,除西农 1376 在距离 T<sub>2</sub> 代西农 1376 小麦 3 和 6 m 处各发现 1 株阳性植株外,其余材料中均未出现 PCR 阳性植株。这一结果说明,

P<sub>SA<sub>Gl2</sub></sub>-IPT 基因除随小麦花粉散布到西农 1376 小麦外,并未漂移到小麦郑 9023 和其余 4 个大麦、燕麦材料中。

表 1 转 P<sub>SA<sub>Gl2</sub></sub>-IPT 基因小麦花粉漂移的 PCR 分析

Table 1 PCR analysis pollen drift of transgenic wheat with P<sub>SA<sub>Gl2</sub></sub>-IPT gene

材料 Material	种子数 No. of seed	出苗数 No. of seedling	PCR 阳性株数 No. of PCR positive plants
西农 1376 Xinong 1376	1 000	903	2
郑 9023 Zheng 9023	1 000	940	0
B2978	1 000	878	0
U241	1 000	935	0
W96-1	1 000	836	0
W96-16	1 000	770	0

2.3 小白鼠毒理性检测结果

肝脏和肾脏是哺乳动物最重要的两个解毒器官,若长期食用对肝脏和肾脏有危害的物质,则肝肾的组织结构会受到不同程度的影响。从图 3、图 4

可以看出,食用含有转基因植株混合饲料的小白鼠和对照小白鼠的肝脏和肾脏组织解剖图无明显差异,初步表明,食用转 P<sub>SA<sub>Gl2</sub></sub>-IPT 基因小麦对小白鼠是安全的。

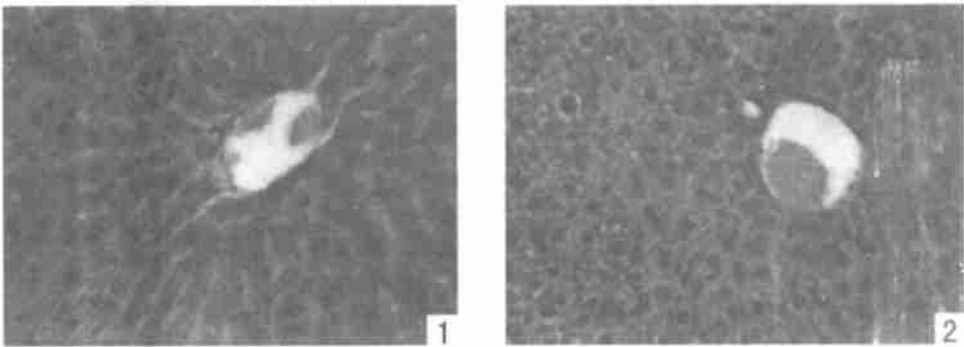


图 3 小白鼠肝脏组织学图谱

1. 食用含有转基因植株混合饲料的小白鼠;2. 未食用含有转基因植株混合饲料的小白鼠

Fig. 3 The liver histological map of small white rats

1. The small white rats that had eaten the mixed feed containing transgenic plants;2. CK

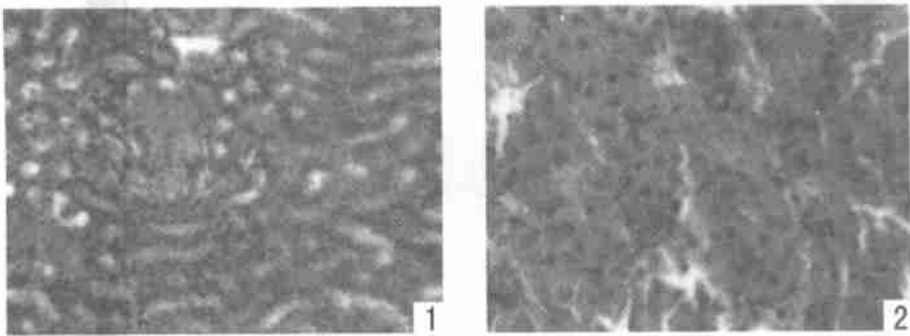


图 4 小白鼠肾脏组织学图谱

1. 食用含有转基因植株混合饲料的小白鼠;2. 未食用含有转基因植株混合饲料的小白鼠

Fig. 4 The nephros histological map of small white rats

1. The small white rats that had eaten the mixed feed containing transgenic plants;2. CK

### 3 讨 论

外源基因能否通过根系分泌物进行逃逸,目前尚无定论。Smalla 等和 Saxena 等<sup>[9]</sup>分别报道在转基因植物的根际土壤中发现外源 DNA。在本研究中,叶片衰老抑制基因  $P_{SA\text{Gl}2^-}$  IPT 采用衰老叶片特异表达启动子,但在转基因小麦叶片衰老阶段,即抽穗前和乳熟期的根际土壤中并未检测到外源 DNA,表明  $P_{SA\text{Gl}2^-}$  IPT 基因并未通过根系分泌物漂移到土壤中。

外源基因随植物花粉散布可能是基因漂移的主要途径之一。前人研究表明<sup>[10~12]</sup>,在距离转基因植物不同位置收集的花粉中含有外源基因。与非转基因植物相似,外源基因随花粉散布的频率因植物种类、气象条件、种植环境、释放面积和传粉途径而有所不同<sup>[4]</sup>。参照小麦、水稻、玉米和油菜等主要农作物的杂交育种实践,外源基因能否漂移到非转基因植物中,除了受外源基因散布频率的影响外,与转基因植物和受体植物的亲缘关系、开花期、受粉方式、颖壳开张角度及持续时间也有关系。在本研究

中,除在开花习性、开花期和亲缘关系与  $T_2$  代西农 1376 小麦一致的西农 1376 中,发现 2 株 PCR 阳性植株外,在小麦郑 9023 和 4 个大麦、燕麦材料中并未检测到该基因,也说明了这一现象。由于  $T_2$  代转基因小麦可分离出部分不含外来目的基因的植株,本研究中  $P_{SA\text{Gl}2^-}$  IPT 基因随花粉散布的频率小于基因型纯合的转基因小麦。

在转基因植物食品安全性研究方面,目前还未见到转基因食品对人类有害的报道。本研究结果表明,食用含有转基因小麦混合饲料的小白鼠,和对照小白鼠的肝脏和肾脏的组织解剖图无明显差异,说明转  $P_{SA\text{Gl}2^-}$  IPT 基因小麦对小白鼠是安全的。由于人类和小白鼠的消化系统基本相同,可以初步认为食用转  $P_{SA\text{Gl}2^-}$  IPT 基因小麦对人类也是安全的。

由于转基因植物安全性的研究尚处于起步阶段,有关转基因技术的安全性评价还存在许多不确定性,本试验对与转  $P_{SA\text{Gl}2^-}$  IPT 基因小麦安全性的相关的花粉受体,如土壤中的残枝落叶、微生物群落、动物食物链及其抗生素基因的漂移等均未能涉及,故还需作进一步的研究。

### [参考文献]

- [1] 王 念,王军辉,张建国,等.转基因植物发展现状及外源基因在后代中遗传分离研究进展[J].生物技术通报,2004,(1):13-17.
- [2] Mikkelsen T R, Andersen B, Jorgensen J H. The risk of crop transgene spread[J]. Nature, 1996, 380:31.
- [3] 朱 祯,刘 翔.转基因作物——恶魔还是救星[J].农业生物技术学报,2000,8(1):1-6.
- [4] 魏 伟,钱迎倩,马克平.转基因作物与其野生亲缘种间的基因流[J].植物学报,1999,41(4):343-348.
- [5] 刘 谦,朱鑫泉.生物安全[M].北京:科学出版社,2002.
- [6] 奚亚军.叶片衰老抑制基因  $P_{SA\text{Gl}2^-}$  IPT 转化普通小麦的研究[D].陕西杨凌:西北农林科技大学,2002.
- [7] 曹孟良,周 智,张启发.  $P_{SA\text{Gl}2^-}$  IPT 转基因植物的抗旱衰研究[J].云南大学学报(自然科学版),1999,21(4):25-26.
- [8] Clark M S. 植物分子生物学实验手册[M].顾红雅,翟礼嘉,译.北京:高等教育出版社,1998.326-328.
- [9] Saxena D, Florest S, Stotzky G. Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn[J]. Nature, 1999, 402:480.
- [10] Paoletti M G, Pimentel D. Genetic engineering in agriculture and the environment[J]. Bioscience, 1996, 46(9):655-673.
- [11] Rogers H J, Parkes H C. Transgenic plants and the environment[J]. J of Exp Botany, 1995, 46:467-488.
- [12] Snow A A, Palma P M. Commercialization of transgenic plants: potential ecological risks[J]. Bioscience, 1997, 47(2):86-96.

## Preliminary study on the safety of the transgenic wheat with $P_{SA\text{Gl}2^-}$ IPT gene

XI Ya-jun<sup>1</sup>, MA Xiao-ni<sup>1</sup>, LIU Shu-dong<sup>1</sup>, ZHU Jian-chu<sup>1</sup>,  
HU Jian-hong<sup>2</sup>, LUN Wen<sup>1</sup>, LU Ming<sup>1</sup>

(1 College of Agronomy, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** The safety of the transgenic wheat with  $P_{SA\text{Gl}2^-}$  IPT gene was analyzed by testing gene drifted to the rhizospheric soil and peripheral wheat, barley and oat and conducting the toxic experiment with small

white rats fed with the forage containing transgenic plants. The results showed that the gene didn't drift to

Smalla K, Gebhard F, Elsas J D. Bacterial communities influenced by transgenic plants[M]. Monterey, California, USA, Proceedings of the 3rd international symposium, 1994, 11: 157 - 167.

soil with secretory product of root system. The  $P_{SA\text{Gl}2^-}$  IPT gene was not found in peripheral wheat Zheng 9023, barley and oat in the distance of 3 and 6 m from  $T_2$  transgenic wheat except 2 plants of wheat Xinong 1376. There were no obvious differences between the small white rats that had eaten the mixed forage containing transgenic plants and those that had not eaten. The preliminary results indicated that transgenic wheat with  $P_{SA\text{Gl}2^-}$  IPT was relatively safe.

**Key words :** wheat ;  $P_{SA\text{Gl}2^-}$  IPT gene ; genetic transformation ; safety

(上接第 12 页)

## Effects of soaking of seeds with different chemical regulators on the germination and seedling growth and water use efficiency of maize

TANG Hai-jun, ZHOU Jian-bin, ZHENG Xian-feng

( College of Resource and Environment, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract :** Cultured experiment and pot experiment were used to evaluate the effects of soaking of seeds with chemical regulators (GA,  $\text{ZnSO}_4$ , CCC) on the germination, seedling growth and water use efficiency of maize. The result showed that germination ratio (GR), germination index (GI), and dry matter of the maize cultivars of Nongda 108 and Shaandan 902 were enhanced by chemical regulators used; but the response of two cultivars to chemical regulators was different. In cultured experiment, dry matter of Nongda 108 was increased by the rate of 5.02 % - 40.83 %, Shaandan 902 was in the range of 0.15 % - 33.14 %. At the same time, there have different effects of different chemical regulators on the growth of seedling, GA enhanced the height of seedling,  $\text{ZnSO}_4$  and CCC enhanced the diameter of maize seedling. In pot experiment, the increase rate of dry matter was in the range of 3.99 % - 19.66 %. Compared to the control, water use efficiency of maize seedling was also increased, Nongda 108 was in the range of 3.68 % - 19.47 %, and the highest increase rate of water use efficiency was 17.12 % for Shaandan 902.

**Key words :** chemical regulators; soaking of seeds; germination of maize; accumulation of dry matter; water use efficiency