风速对转基因棉花基因漂移的影响

闫 硕[1,2] 朱家林[1,3] 朱威龙[1,4] 秦 萌[2] 刘 慧[2] 赵守歧[2] 王 璐[2] 张 璟[1] 张青文[1] 刘小侠[1*]

([1]中国农业大学昆虫系, 北京 100193; [2]全国农业技术推广服务中心, 北京 100125; [3]北京出入境检验检疫局, 北京 100026; [4]柳州市农业技术推广中心, 广西柳州 545002)

摘 要 在转基因作物全球商业化推广的20年间,公众对基因漂移生态安全问题的关注持续升温。本试验以转基因双价棉SGK321(*Cry*1Ac/*CpTI*)为花粉供体,常规棉"石远321"和"中棉35"为花粉授体,借助PCR和蛋白检测技术,研究温室中3种风速(0.54、0.92和1.27 m·s^{-1})条件下的*Cry*1Ac基因漂移频率。结果表明:"石远321"作为花粉受体时,基因漂移频率受风速影响,低风速下最高,高风速下最低;"中棉35"作为花粉授体时,基因漂移频率整体较低,不受风速影响;基因漂移频率与所选择的花粉受体品种有关,"石远321"(转基因棉亲本)(10.63%)作为花粉受体时基因漂移频率高于"中棉35"(2.50%);转基因棉花基因漂移频率随着转基因作物种植区与非转基因作物之间距离的增加而下降。本试验为风介导的基因漂移的生态风险评估提供一定的理论参考。

关键词 基因漂移; 转基因棉花; 生态安全; 花粉授体; 定性PCR

The influences of wind speed on pollen-mediated gene flow from transgenic cotton.

YAN Shuo[1,2], ZHU Jia-lin[1,3], ZHU Wei-long[1,4], QIN Meng[2], LIU Hui[2], ZHAO Shou-qi[2], WANG Lu[2], ZHANG Jing[1], ZHANG Qing-wen[1], LIU Xiao-xia[1*] ([1] *Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing* 100193, *China*; [2] *National Agricultural Technology Extension and Service Center, Beijing* 100125, *China*; [3] *Beijing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Beijing* 100026, *China*; [4] *Liuzhou Agriculture Technology Extension Service Center, Liuzhou* 545002, *China*).

Abstract: The genetically modified (GM) crops have been globally commercially cultivated for 20 years, and public concerns are persistent overheating about ecological risk of gene flow. This study investigated the pollen-mediated gene flow (PGF) frequency of *Cry*1Ac from transgenic cotton SGK321 (*Cry*1Ac/*CpTI*) to non-transgenic cottons Shiyuan 321 and Zhongmian 35 under three wind conditions (0.54, 0.92 and 1.27 m·s^{-1}) in greenhouses by PCR and Bt protein assays. Our results revealed that PGF varied depending on the wind speed when Shiyuan 321 was the pollen receptor, and was the highest under low speed wind and the lowest under high speed wind. With Zhongmian 35 as pollen receptor, PGF was very low, and not dependent on the wind speed. PGF depended on the variety of pollen receptors, and total PGF to pollen receptor of Shiyuan 321 (GM parental line) (10.63%) was higher than that of Zhongmian 35 (2.50%). PGF declined exponentially with increasing distance between GM cotton and non-GM receptors. Our research provided some reference for ecological safety assessment of wind-mediated gene flow.

Key words: gene flow; transgenic cotton; ecological safety; pollen receptor; qualitative PCR.

转基因棉花环境安全评价技术项目(2016ZX08011002)资助。
收稿日期: 2016-12-12 接受日期: 2017-05-02
*通讯作者 E-mail: liuxiaoxia611@cau.edu.cn

转基因技术是将人工分离和修饰过的外源基因整合进作物的基因组中,使得农作物产生抗虫(O'Callaghan *et al.*,2005;Gao *et al.*,2016)、抗病(Li *et al.*,2011)、抗除草剂(Messeguer *et al.*,2001)、抗逆境(Donegan *et al.*,1999;Masuda *et al.*,2017)等优良性状。转基因作物全球产业化的20年间虽然创造了可观的农业、环境、经济、健康和社会效益(李静等,2009;James,2016),但也引发了全球对环境生物安全问题的极大关注和争论,基因漂移是其中最主要的风险关注点(Ellstrand,2001;Nap *et al.*,2003;Ammann,2005;Lu *et al.*,2005;Wu,2007)。

基因漂移又称基因漂流或基因流,是指一个生物群体的遗传物质通过媒介转移到另一个生物群体中的现象(卢宝荣等,2011;韦祖生等,2011)。基因漂移是一种基因交流的自然过程,其为实现遗传信息交流和传播提供基础,本身并不存在危害,但如果外源基因释放到环境中,就会产生潜在的生态风险。随着转基因作物的商业化种植,花粉介导的基因漂移作为自然界最普遍的基因漂移形式已成为国内外研究的热点,其一般借助风力和传粉昆虫的辅助而实现(贺娟等,2013;朱家林等,2013;Yan *et al.*,2015)。已有的研究表明:基因漂移受外界多种因子影响,一般随着转基因作物与受体植株的种植距离增大而显著性下降(Llewellyn *et al.*,1996;Ma *et al.*,2004;Song *et al.*,2004;Goggi *et al.*,2006;Dong *et al.*,2016;Hu *et al.*,2017);一般在存在传粉昆虫的环境下更易发生(Van Deynze *et al.*,2005;Johnson *et al.*,2006;Llewellyn *et al.*,2007;Yan *et al.*,2015);亲缘关系近的品系间基因漂移更易发生(朱家林等,2013;Yan *et al.*,2015);非定向风较定向风而言可以提高基因漂移的频率(朱家林等,2013)。前人有关于花粉借助风远距离传播的研究报道(鲁先文等,2008),但尚未见有关风速对基因漂移频率影响的研究。

棉花(*Gossypium hirsutum* L.)是异花授粉植物,花粉容易借助风力和传粉昆虫进行远距离传播。自1997年为防治棉铃虫引进Bt棉以来,中国转基因棉花已广泛种植于长江流域和黄河流域棉区,其在我国国民经济中占有重要地位(Wu *et al.*,2002,2008)。本研究以转基因双价棉为试验材料,设置3种风速条件,结合PCR检测和蛋白检测手段,对温室内转基因棉花基因漂移进行了检测,意在探讨:(1)风速对基因漂移的影响;(2)受体植物对基因漂移的影响;(3)转基因作物与受体植株的种植距离对基因漂移的影响。本试验对转基因棉花环境释放的生态风险评估具有一定的参考价值,也为有效设置隔离带提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

花粉供体是转基因双价抗虫棉SGK321(*Cry*1Ac和*CpTI*)。35S启动子加强了外源基因的表达,通过分子手段在转基因棉花与常规棉杂交代中可以检测到外源基因的表达,因此该转基因棉花适于基因漂移研究(朱家林等,2013)。本试验中花粉受体选择亲本石远321和陆地棉中棉35。试验材料均由中国农业科学院棉花研究所提供。

1.2 温室布局设计

试验于2012—2013年在北京市中国农业大学上庄试验基地(40°14′N,116°19′E)3个日光温室(40 m × 8 m × 4 m)内进行。具体温室布局如图1所示,转基因棉花SGK321种在温室西侧(4 m × 8 m),"石远321"和"中棉35"种在温室两侧,3个温室布局一致,棉花株距0.5 m,行距0.8 m,田间管理按照常规棉生产方式进行。3个温室分别设置低、中、高档风速,在转基因区设置2台面向东侧鼓风的落地风扇(FS40-8A2型,广东美的环境电器制造公司),其扇叶5片,直径约0.5 m,高度约1.2 m;在温室设置8台面向东侧鼓风、风程约5 m的风扇(FB40-1205型,上海华生电器有限公司),其扇叶3片,直径约0.5 m,高度约2 m,水平倾角约25度,每隔4.5 m设置一台,以保证区域内风力均匀持久,使转基因棉花花粉充分扩散。由于棉花仅白天开花,电风扇工作时间设置为每天06:00—21:00。

风速测定借助热球微风仪(ZRQF F303型,北京检测仪器有限公司)完成。以转基因区与非转基因区相邻处记为0 m,距转基因区每隔4.5 m作为一个风速测量点。为避免误差,风速于当日的上午和下午各测量2次,记录数值并分析结果。

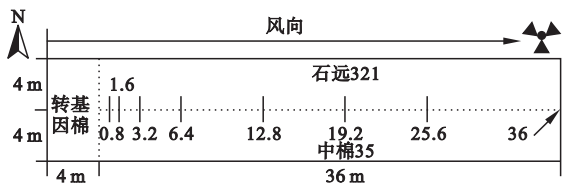


图1 温室内种植布局

Fig.1 Greenhouse layout

1.3　种子采样

在棉花收获期对棉花种子进行采样,以转基因区与非转基因区相邻处记为 0 m,在距离转基因区 0.8、1.6、3.2、6.4、12.8、19.2、25.6、36 m 处进行取样。Umbeck 等(1991)的研究表明,转基因棉花的异交率与棉株上种子的采集位置无关,因此,本试验选取同品种同行的棉花植株上、中、下部种子为 3 个重复。将采集的种子轧花脱绒后在温室内种植,每个位置行、每个品种选取 30(10 × 3)株幼苗进行分子检测,共计取样 2880 株幼苗。

1.4　基因漂移检测

采用 CTAB 法提取 1 cm^2棉株叶片 DNA(Ma *et al.*, 2004;朱家林等,2013;朱威龙等,2015),利用 NanoDrop 2000 测定样本 DNA 浓度,将样本统一稀释至 40 ng · μL^{-1}用于后续检测。选用特异性引物 5′-GAAGGATTGAGCAATCTCTAC-3′ 和 5′-CAATCAGCCTAGTAAGGTCGT-3′对靶标基因 *Cry*1Ac 进行 PCR 扩增检测(朱家林等,2013;Yan *et al.*, 2015),PCR 反应体系:2 × Taq PCR Master Mix (PC0902,北京艾德莱生物科技有限公司)10 μL,上下游引物(上海生工生物技术有限公司)各 0.5 μL,DNA 模板 2 μL,双蒸水 7 μL;PCR 反应程序:预变性 95 ℃ 4 min,变性 94 ℃ 60 s、退火 56 ℃ 60 s、延伸 72 ℃ 90 s,30 个循环,循环结束后总延伸 72 ℃ 5 min。反应结束后用 2%的琼脂糖凝胶电泳检测目的条带。

采用 Bt 蛋白检测试纸条(金标 Bt-*Cry*1Ab/Ac 免疫检测试剂盒,北京银土地生物技术有限公司)对存在 *Cry*1Ac 靶标基因的样本进行表达检测,检测线和质控线均出现条带的样本记为阳性结果;检测线未出现条带,质控线出现条带的样本记为阴性结果。

1.5　数据分析

通过 PCR 和蛋白检测结果计算基因漂移频率和假阳性频率。

基因漂移频率(%) = (表达靶标基因 *Cry*1Ac 的样本数/总检测样本数) × 100%

假阳性频率(%) = (蛋白检测阴性结果样本数/表达靶标基因 *Cry*1Ac 的样本数) × 100%

数据分析借助 SPSS 16.0 软件完成,不同常规棉品种基因漂移的差异采用独立样本 t 检验,其他数据的分析采用 Tukey 多重比较方法,$P < 0.05$ 视为显著性差异。回归分析借助 SigmaPlot 10.0 软件完成,基因漂移频率和距离的相关系数 R^2由 SigmaPlot 10.0 软件得出。

2　结果与分析

2.1　温室观察和风速测定

供试棉花在温室中生长状况良好,转基因棉花和非转基因棉花开花期一致,利于基因漂移的发生。风速测定结果如图 2 所示,设置的低、中、高风速区平均风速分别为 0.54、0.92 和 1.27 m · s^{-1},3 种风速之间均存在显著性差异($F_{2,93}$ = 76.021, P<0.001),达到了设置不同档风速的试验目的。

2.2　风速对基因漂移频率的影响

两年试验中不同风速条件下的具体基因漂移频率见表 1。对于“石远 321”作为花粉授体而言,两年的试验结果均表明低速风介导的基因漂移频率最高,高速风最低,2013 年尤为明显,其中低速风介导的基因漂移频率在 2012 年平均达到 14.17%,最高达 40%,2013 年平均达到 16.67%,最高达 43.33%;而高速风介导的基因漂移频率在 2012 和 2013 年平均分别为 7.08%和 5.42%,最高只达到 13.33%。对于“中棉 35”作为花粉授体而言,基因漂移频率整体较低,并未展现出风速对于基因漂移的影响,低速风介导的基因漂移频率在 2012 和 2013 年平均分别为 3.33%和 3.75%,高速风分别为 2.50%和 2.08%。

2.3　花粉授体对基因漂移频率的影响

无论在低速、中速或高速风条件下,“石远 321”较“中棉 35”更易发生基因漂移(表 2)。综合 2 年基因漂移的结果,“石远 321”的基因漂移频率高达 10.63%,而“中棉 35”的基因漂移频率只有 2.50%。

2.4　距离对基因漂移频率的影响

以“石远 321”作为受体,综合 2 年的试验数据对基因漂移频率和取样距离做回归分析表明(图 3):基因漂移频率随着非转基因棉花与转基因棉花

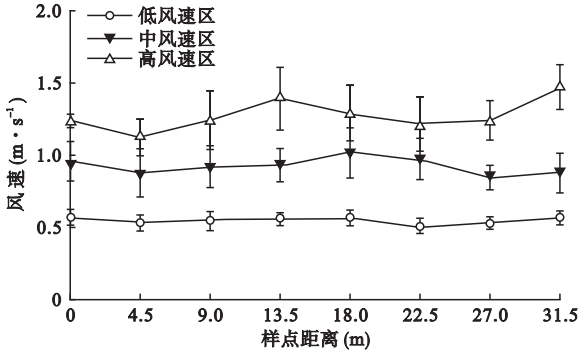


图 2　风速测定结果

Fig.2　Measurement of wind velocities

表 1 不同风速条件下花粉介导的基因漂移频率(%)

Table 1 Pollen-mediated gene flow (%) under different wind speed conditions

2012 距离(m)	石远 321					中棉 35				
	低速	中速	高速	$F_{2,69}$	P	低速	中速	高速	$F_{2,69}$	P
0.8	40.00±5.77	40.00±5.77	13.33±3.33	–	–	10.00±5.77	6.67±3.33	3.33±3.33	–	–
1.6	13.33±6.67	10.00±5.77	10.00±5.77	–	–	3.33±3.33	0.00±0.00	6.67±3.33	–	–
3.2	26.67±6.67	3.33±3.33	0.00±0.00	–	–	6.67±6.67	3.33±3.33	3.33±3.33	–	–
6.4	16.67±8.82	13.33±6.67	13.33±3.33	–	–	3.33±3.33	0.00±0.00	0.00±0.00	–	–
12.8	10.00±5.77	6.67±6.67	6.67±6.67	–	–	0.00±0.00	3.33±3.33	3.33±3.33	–	–
19.2	6.67±3.33	3.33±3.33	13.33±6.67	–	–	3.33±3.33	3.33±3.33	3.33±3.33	–	–
25.6	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	–	–	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	–	–
36	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	–	–	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	–	–
平均	14.17±3.12 A	9.58±2.92 A	7.08±1.75 A	1.815	0.171	3.33±1.30 A	2.08±0.85 A	2.50±0.90 A	0.377	0.687
2013 距离(m)	石远 321					中棉 35				
	低速	中速	高速	$F_{2,69}$	P	低速	中速	高速	$F_{2,69}$	P
0.8	36.67±6.67	33.33±6.67	13.33±3.33	–	–	6.67±3.33	3.33±3.33	0.00±0.00	–	–
1.6	43.33±8.82	10.00±5.77	10.00±5.77	–	–	10.00±10.00	0.00±0.00	6.67±6.67	–	–
3.2	16.67±3.33	23.33±8.82	0.00±0.00	–	–	3.33±3.33	3.33±3.33	3.33±3.33	–	–
6.4	20.00±5.77	10.00±5.77	10.00±5.77	–	–	3.33±3.33	0.00±0.00	3.33±3.33	–	–
12.8	6.67±3.33	3.33±3.33	6.67±6.67	–	–	3.33±3.33	0.00±0.00	0.00±0.00	–	–
19.2	3.33±3.33	0.00±0.00	3.33±3.33	–	–	0.00±0.00	3.33±3.33	3.33±3.33	–	–
25.6	6.67±3.33	3.33±3.33	0.00±0.00	–	–	3.33±3.33	0.00±0.00	0.00±0.00	–	–
36	0.00±0.00	3.33±3.33	0.00±0.00	–	–	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	–	–
平均	16.67±3.44 A	10.83±2.75 AB	5.42±1.59 B	4.328	0.017	3.75±1.45 A	1.25±0.69 A	2.08±1.04 A	1.328	0.272

同一处理不同字母代表具有显著性差异(Tukey 多重比较方法,$P<0.05$)。

之间距离的增大而下降。低风速和中风速条件下,基因漂移频率均在0.8 m处达到最高,分别为38.33%和36.67%,二者分别在25.6和36 m处仍能检测到基因漂移的发生。高风速条件下,基因漂移频率相对较低,其与取样距离的相关性不强。

表 2 不同花粉受体基因漂移频率的比较(%)

Table 2 Comparison of pollen-mediated gene flow (%) to different pollen receptors

	石远 321	中棉 35	t	df	P
低速	15.42±2.31	3.54±0.96	4.752	94	<0.001
中速	10.21±1.99	1.67±0.54	4.148	94	<0.001
高速	6.25±1.18	2.29±0.68	2.910	94	0.005
平均	10.63±1.12	2.50±0.44	6.738	286	<0.001

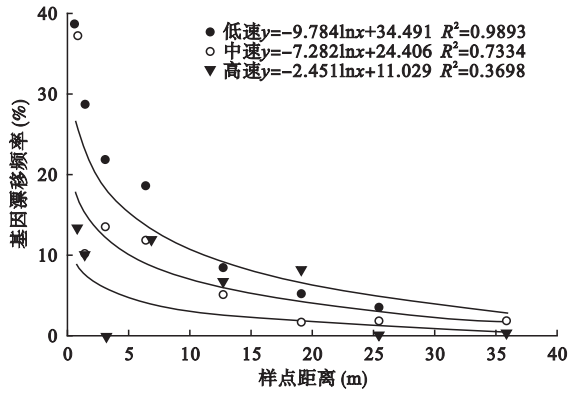


图 3 基因漂移频率与取样距离的回归分析

Fig. 3 Regression analysis for the pollen-mediated gene flow as a function of the distance

2.5 基因漂移和 Bt 蛋白表达的一致性分析

在 2880 株子代幼苗中,共检测到基因漂移的样本 189 株,经蛋白检测共计检测到 6 株假阳性结果,假阳性概率为 3.17%,全部是“石远 321”的后代,“中棉 35”后代未检测到假阳性结果。

3 讨 论

基因漂移频率是转基因安全性评价的一个重要指标,一般可以借助分子手段进行准确检测(Messeguer *et al.*, 2001; Heuberger *et al.*, 2010; Scorza *et al.*, 2013; Zapiola *et al.*, 2017),也有一些研究通过对杂种抗性(如抗除草剂性)进行检测来确定基因漂移频率(Lavigne *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2011),但 Yan 等(2015)的研究表明,转入 *Bt* 基因的杂种棉花幼苗的抗除草剂性和抗虫性均有所减弱,所以借助分子手段检测更加科学准确。本试验采用 PCR 扩增靶基因的方法检测温室环境下基因漂移,较大田得到的基因漂移频率略高(Umbeck *et al.*, 1991; 张长青等, 1997; Johnson *et al.*, 2006; 王长永等, 2007; Rong *et al.*, 2007),温室环境

提供了一个封闭稳定的条件,可以避免传粉昆虫对基因漂移的影响,通过设置人工风来单独探讨风速对基因漂移的影响。

棉花是异花授粉植物,花粉可以借助昆虫和风力为媒介进行远距离传播。鲁先文等(2008)的研究表明,在风速小于 3 m·s^{-1}时,中国沙棘花粉的传播距离主要集中于 15~25 m,当风速大于 3 m·s^{-1}时,花粉可顺风漂移 85 m 之外。朱家林等(2013)关于转基因棉花基因漂移的研究表明,温室中定向风和非定向风处理区基因漂移最远距离分别为 25.6 和 36 m,二者的基因漂移频率显著高于对照区,同时非定向风介导的基因漂移频率高于定向风。本试验结果表明,"石远 321"作为花粉授体时,低风速介导的基因漂移频率最高,高风速最低。高风速一般情况下会促进花粉的远距离传播,而试验中高风速下基因漂移频率低可能与不同风速下花粉活力有关。花粉必须在具有活力时到达柱头才能完成传粉过程,不同风速条件下的花粉活力有待进一步研究。研究表明,花粉在贮藏过程中仍进行新陈代谢活动,低温、干燥和无氧环境下花粉的新陈代谢作用较弱,容易保持花粉活力,而高温、高湿和有氧条件下花粉代谢活跃,酶活性衰退,易丧失活力(金文林等,2003;殷东生等,2013;杜晋城等,2014)。在"中棉 35"作为花粉授体时,风速对基因漂移频率并没有显著性影响,我们认为这主要是因为"中棉 35"作为花粉受体时基因漂移处于较低水平。基因漂移频率不只与花粉漂流有关,还与花粉活性以及花粉受体的亲和性相关,本试验所选取的"石远 321"是转基因棉花的亲本,所以其与转基因棉花亲缘关系近,这就导致二者花粉亲和性高。与 Yan 等(2015)的研究相似,亲本"石远 321"作为受体时的基因漂移频率显著高于海 7124;亲本"石远 321"作为受体时的基因漂移频率显著高于"中棉 35"和"吉扎 1 号"(朱家林等,2013)。

Umbeck 等(1991)借助 PCR 方法检测了大田中转基因棉花基因漂移频率,结果表明,在距转基因棉花种植区 7 m 范围内,杂交率最高达 5%,随着距离的增大杂交率不断下降,在 25 m 处仍能检测到基因漂移,且频率小于 1%。Van Deynze 等(2005)的研究结果类似,转基因棉花基因漂移频率随着距离的增加而下降,在 0.3 m 处高达 7.65%,在 9 m 处小于 1%。在中国福建对转基因水稻的研究发现,基因漂移频率在 0.2 m 处达到 0.28%,在 6.2 m 处小于 0.01%(Rong *et al.*,2007)。与前人研究类似(Song *et al.*,2004;Goggi *et al.*,2006;赵宗潮等,2013;Baltazar *et al.*,2015),本试验结果表明:以"石远 321"作为受体,在低风速和中风速条件下,基因漂移频率随着非转基因棉花与转基因棉花之间距离的增大而下降。这是由于随着转基因花粉源距离的增加,空气中转基因花粉的密度下降,同时随着传播距离的增加,转基因花粉活力有所下降。值得注意的是,有个别取样点基因漂移频率具有一定的随机性,这可能是取样点采集的种子范围和数量有限造成的,也可能与取样点微环境有关。本试验中 PCR 检测结果与蛋白检测结果基本一致,也存在标靶基因转入但未表达的假阳性现象,但频率较低,与前人的研究结果(朱家林等,2013;Yan *et al.*,2015)相似。综上所述,基因漂移产生的杂种后代一般均存在 Bt 蛋白的表达,本试验未开展其抗性(抗虫和抗除草剂性)检测,对基因漂移产生后代的适生性无法评价。

转基因作物技术在改变作物的遗传性能,增产丰收、提高营养和消费品质等方面做出了重大贡献(朱彦涛等,2008;Hermannsson *et al.*,2010;Chen *et al.*,2016;James,2016;Tsai *et al.*,2017;Wang *et al.*,2017)。我国应加强对基因漂移的基础理论研究,不断探索完善一种适应国情的转基因作物生物安全和生态风险评价体系,充分利用基因漂移生物学限制和物理学限制措施对转基因作物潜在的生态风险进行科学管控(Grevich *et al.*,2005;Mlynárová *et al.*,2006;Hvarleva *et al.*,2009;Benitez *et al.*,2010;卢宝荣等,2011;牟文雅等,2016)。

参考文献

杜晋城, 涂美艳, 周正华, 等. 2014. 核桃离体花粉贮藏条件及活力研究. 西北农业学报, **27**(4): 1682-1685.

贺　娟, 朱威龙, 朱家林, 等. 2013. 风、蜜蜂因素对转*Cry*1Ac 基因棉花花粉介导的基因漂移的影响. 棉花学报, **25**(5): 453-458.

金文林, 王　媛, 濮绍京, 等. 2003. 小豆花粉生活力的初步观察. 北京农学院学报, **18**(1): 1-6.

李　静, 李红芳, 张换样, 等. 2009. 全球转基因作物的产业化发展. 山西农业科学, **37**(1): 3-8.

卢宝荣, 夏　辉. 2011. 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. 生命科学, **23**(2): 186-194.

鲁先文, 马瑞君, 孙　坤. 2008. 中国沙棘(*Hippophae rhamnoides* L. ssp. *sinensis* Rousi)的开花特性及风媒传粉距离的检测. 生态学报, **28**(6): 2518-2525.

牟文雅, 贾艺凡, 赵宗潮, 等. 2016. 转基因作物外源基因漂

移风险及其控制技术研究进展. 生态学杂志, **35**(1): 243-249.
王长永, 刘 燕, 周 骏, 等. 2007. 花粉介导的转 *Bt* 基因棉花田间基因漂流监测. 应用生态学报, **18**(4): 801-806.
韦祖生, 田益农, 马崇熙. 2011. 作物基因漂移研究综述. 现代农业科技, (13): 13-15.
殷东生, 周志军, 葛文志, 等. 2013. 沙棘开花动态、花粉生活力和柱头可授粉研究. 安徽农业科学, **41**(33): 12902-12904.
张长青, 吕群燕, 王志兴, 等. 1997. 抗2,4-D转基因棉花基因漂流频率的研究. 中国农业科学, **30**(1): 92-93.
赵宗潮, 郭维维, 苏 营, 等. 2013. 转植酸酶基因玉米花粉漂移扩散频率与距离. 生态学杂志, **32**(11): 3004-3009.
朱家林, 贺 娟, 牛建群, 等. 2013. 风向因素对转基因抗虫棉花基因漂移效率的影响. 生态学报, **33**(21): 6803-6812.
朱威龙, 闫 硕, 石冀哲, 等. 2015. 棉花不同组织DNA的不同提取方法比较. 安徽农业科学, **43**(2): 16-18, 22.
朱彦涛, 徐 虹, 郭蔼光, 等. 2008. 植物转基因技术与当代社会发展. 中国农学通报, **24**(4): 509-522.
James C. 2016. 2015年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势. 中国生物工程杂志, **36**(4): 1-11.
Ammann K. 2005. Effects of biotechnology on biodiversity: Herbicide-tolerant and insect-resistant GM crops. *Trends in Biotechnology*, **23**: 388-394.
Baltazar BM, Espinoza LC, Banda AE, *et al*. 2015. Pollen-mediated gene flow in maize: Implications for isolation requirements and coexistence in Mexico, the center of origin of maize. *PLoS ONE*, **10**: e0131549.
Benitez ER, Khan NA, Matsumura H, *et al*. 2010. Varietal differences and morphology of cleistogamy in soybean. *Crop Science*, **50**: 185-190.
Chen Y, Han Y, Zhang M, *et al*. 2016. Overexpression of the wheat expansin gene *TaEXPA*2 improved seed production and drought tolerance in transgenic tobacco plants. *PLoS ONE*, **11**: e0153494.
Donegan KK, Seidler RJ, Doyle DJ, *et al*. 1999. A field study with genetically engineered alfalfa inoculated with recombinant *Sinorhizobium meliloti*: Effects on the soil ecosystem. *Journal of Applied Ecology*, **36**: 920-936.
Dong S, Liu Y, Yu C, *et al*. 2016. Investigating pollen and gene flow of WYMV-resistant transgenic wheat N12-1 using a dwarf male-sterile line as the pollen receptor. *PLoS ONE*, **11**: e0151373.
Ellstrand NC. 2001. When transgenes wander, should we worry. *Plant Physiology*, **125**: 1543-1545.
Gao S, Yang Y, Wang C, *et al*. 2016. Transgenic sugarcane with a *cry1Ac* gene exhibited better phenotypic traits and enhanced resistance against sugarcane borer. *PLoS ONE*, **11**: e0153929.
Goggi AS, Caragea P, Lopez-Sanchez H. 2006. Statistical analysis of crossing between adjacent maize grain production fields. *Field Crops Research*, **99**: 147-157.
Grevich JJ, Daniell H. 2005. Chloroplast genetic engineering: Recent advances and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **24**: 83-107.
Hermannsson J, Kristjansdottir TA, Stefansson TS, *et al*. 2010. Measuring gene flow in barley fields under Icelandic subarctic conditions using closed-flowering varieties. *Icelandic Agricultural Sciences*, **23**: 51-59.
Heuberger S, Ellers-Kirk C, Tabashnik BE, *et al*. 2010. Pollen- and seed-mediated transgene flow in commercial cotton seed production fields. *PLoS ONE*, **5**: e14128.
Hu J, Zhang J, Chen X, *et al*. 2017. An empirical assessment of transgene flow from a *Bt* transgenic poplar plantation. *PLoS ONE*, **12**: e0170201.
Hvarleva T, Hristova M, Bakalova A, *et al*. 2009. CMS lines for evaluation of pollen flow in sunflower relevance for transgene flow mitigation. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, **23**: 1309-1315.
Johnson PG, Larson SR, Anderton AL, *et al*. 2006. Pollen-mediated gene flow from Kentucky bluegrass under cultivated field conditions. *Crop Science*, **46**: 1990-1997.
Lavigne C, Klein EK, Vallée P, *et al*. 1998. A pollen-dispersal experiment with transgenic oilseed rape. Estimation of the average pollen dispersal of an individual plant within a field. *Theoretical and Applied Genetics*, **96**: 886-896.
Li C, Xiao P, Gray SJ, *et al*. 2011. Combination therapy utilizing shRNA knockdown and an optimized resistant transgene for rescue of diseases caused by misfolded proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**: 14258-14263.
Llewellyn D, Fitt G. 1996. Pollen dispersal from two field trails of transgenic cotton in the Namoi Valley, Australia. *Molecular Breeding*, **2**: 157-166.
Llewellyn, D, Tyson C, Constable G, *et al*. 2007. Containment of regulated genetically modified cotton in the field. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **121**: 419-429.
Lu BR, Snow AA. 2005. Gene flow from genetically modified rice and its environmental consequence. *BioScience*, **55**: 669-678.
Ma BL, Subedi KD, Reid LM. 2004. Extent of cross-fertilization in maize by pollen from neighboring transgenic hybrids. *Crop Science*, **44**: 1273-1282.
Ma X, Du XM. 2004. Preliminary study on the methods of extracting cotton genomic DNA. *Cotton Science*, **16**: 40-43.
Masuda H, Shimochi E, Hamada T, *et al*. 2017. A new transgenic rice line exhibiting enhanced ferric iron reduction and phytosiderophore production confers tolerance to low iron availability in calcareous soil. *PLoS ONE*, **12**: e0173441.
Messeguer J, Fogher C, Guiderdoni E, *et al*. 2001. Field assessments of gene flow from transgenic to cultivated rice (*Oryza sativa* L.) using a herbicide resistance gene as tracer marker. *Theoretical and Applied Genetics*, **103**: 1151-1159.
Mlynárová L, Conner A, Nap JP. 2006. Directed microspore-

specific recombination of transgenic alleles to prevent pollen-mediated transmission of transgenes. *Plant Biotechnology Journal*, **4**: 445-452.

Nap JP, Metz PLJ, Escaler M, *et al*. 2003. The release of genetically modified crops into environment. Part I. Overview of current status and regulations. *The Plant Journal*, **33**: 1-18.

O'Callaghan M, Glare TR, Burgess EPJ, *et al*. 2005. Effects of plants genetically modified for insect resistance on nontarget organisms. *Annual Review of Entomology*, **50**: 271-292.

Rong J, Lu BR, Song ZP, *et al*. 2007. Dramatic reduction of crop-to-crop gene flow within a short distance from transgenic rice fields. *New Phytologist*, **173**: 346-353.

Scorza R, Kriss AB, Callahan AM, *et al*. 2013. Spatial and temporal assessment of pollen- and seed-mediated gene flow from genetically engineered plum *Prunus domestica*. *PLoS ONE*, **8**: e75291.

Song ZP, Lu BR, Chen JK. 2004. Pollen flow of cultivated rice measured under experimental conditions. *Biodiversity and Conservation*, **13**: 579-590.

Tsai AYL, Chan K, Ho CY, *et al*. 2017. Transgenic expression of fungal accessory hemicellulases in *Arabidopsis thaliana* triggers transcriptional patterns related to biotic stress and defense response. *PLoS ONE*, **12**: e0173094.

Umbeck PF, Barton KA, Nordheim EV, *et al*. 1991. Degree of pollen dispersal by insects from a field-test of genetically engineered cotton. *Journal of Economic Entomology*, **84**: 1943-1950.

Van Deynze AE, Sundstrom FJ, Bradford KJ. 2005. Pollen-mediated gene flow in California cotton depends on pollinator activity. *Crop Science*, **45**: 1565-1570.

Wang H, Niu L, Fu C, *et al*. 2017. Overexpression of the *WOX* gene *STENOFOLIA* improves biomass yield and sugar release in transgenic grasses and display altered cytokinin homeostasis. *PLoS Genetics*, **13**: e1006649.

Wu KM, Lu YH, Feng HQ, *et al*. 2008. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with Bt toxin-containing cotton. *Science*, **321**: 1676-1678.

Wu KM. 2007. Monitoring and management strategy for *Helicoverpa armigera* resistance to Bt cotton in China. *Journal of Invertebrate Pathology*, **95**: 220-223.

Wu K, Li W, Feng H, *et al*. 2002. Seasonal abundance of the mirids, *Lygus lucorum* and *Adelphocoris* spp. (Hemiptera: Miridae) on Bt cotton in northern China. *Crop Protection*, **21**: 997-1002.

Yan S, Zhu JL, Zhu WL, *et al*. 2015. Pollen-mediated gene flow from transgenic cotton under greenhouse conditions is dependent on different pollinators. *Scientific Reports*, **5**: 15917.

Zapiola ML, Mallory-Smith CA. 2017. Pollen-mediated gene flow from transgenic perennial creeping bentgrass and hybridization at the landscape level. *PLoS ONE*, **12**: e0173308.

Zhang K, Li Y, Lian L. 2011. Pollen-mediated transgene flow in maize grown in the Huang-huai-hai region in China. *Journal of Agricultural Science*, **149**: 205-216.

作者简介　闫　硕,男,1986 年生,农学博士,农艺师,研究方向为转基因棉花安全性评价和昆虫分子生态学。E-mail: yanshuo2011@ foxmail.com

责任编辑　李凤芹