

# 基因轉殖水稻之農藝性狀與花粉媒介基因流佈於田間評估

曾清山<sup>1</sup> 林彥蓉<sup>2</sup> 關政平<sup>1</sup> 賴明信<sup>3</sup> 吳明哲<sup>4,\*</sup>

## 摘要

曾清山、林彥蓉、關政平、賴明信、吳明哲。2013。基因轉殖水稻之農藝性狀與花粉媒介基因流佈評估。台灣農業研究 62(1):21–31。

本研究利用 3 個台農 67 號 (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* TNG 67) 的基因轉殖水稻為材料，分別為轉殖澱粉普魯南糖水稲、轉殖豬乳鐵蛋白水稻及轉殖植酸酵素水稻，進行農藝性狀調查、花粉性狀評估及基因轉殖水稻藉由花粉媒介的基因流佈頻率之田間評估，以瞭解基因轉殖水稻在商業化生產種植前，對目前之水稻耕作系統有無影響。在農藝性狀調查中，三個轉殖品系每公頃產量皆低於台農 67 號水稻，每穗粒數以轉殖豬乳鐵蛋白水稻最高為 103.3 粒，轉殖植酸酵素水稻最低為 80.3 粒，二者達顯著差異。基因轉殖水稻花粉性狀評估試驗中，結果顯示轉殖澱粉普魯南糖水稲的花粉數量、花粉離體發芽率及花粉活力均低於台農 67 號水稻。基因轉殖水稻花粉媒介基因流佈田間試驗中，結果顯示在交叉種植設計中，以轉殖豬乳鐵蛋白水稻的花粉媒介基因流佈頻率最高為 7.82%，其次台農 67 號水稻及轉殖植酸酵素水稻分別為 7.13% 和 5.91%，最低為轉殖澱粉普魯南糖水稲只有 3.18%。在間隔種植設計中，則以台農 67 號水稻的花粉媒介基因流佈頻率最高為 2.8%，其次轉殖豬乳鐵蛋白水稻及轉殖植酸酵素水稻分別為 2.32% 和 1.53%，最低為轉殖澱粉普魯南糖水稲只有 0.54%。整體而言，三個轉殖品系的花粉媒介基因流佈頻率以轉殖澱粉普魯南糖水稲最低，而轉殖豬乳鐵蛋白水稻最高，可知花粉基因流佈頻率因不同的轉殖基因而異。

**關鍵詞：**基因轉殖水稻、花粉性狀、花粉媒介基因流佈。

## 前言

自 1996 年首例基因轉殖作物，美國 Calgene 公司轉基因耐儲藏番茄在美國商業化種植以來，隨著基因轉殖技術日漸成熟，基因轉殖作物不論種類、栽培面積及種植國家都逐年增加。到 2011 年種植基因轉殖作物面積已達 1.6 億公頃 (Clive 2011)，成為現代農業史上應用最為迅速的作物技術。然而各界對於基因轉殖作物及其產物在人畜食用安全性、基因污染及其他層面的生態環境安全問題仍存有疑慮，亟需在推廣基因轉殖作物前進行相關的科學評估與研究，讓公眾瞭解基因轉

殖作物在生態環境中可能造成的風險，並使其風險降至最低 (Chandler & Dunwell 2008)。

在自然界，植物可透過種內和種間雜交產生新的基因型。基因轉殖作物與非轉殖栽培種或其野生近緣種雜交，就會發生外源基因的流佈，進而污染種原。特別是帶有抗性基因的基因轉殖作物，其外源基因若流佈到雜草上，會對農業生產和生態環境產生巨大的負面影響。因此瞭解作物的花粉特性及花粉擴散距離，將有助於防範基因轉殖作物外源基因藉由花粉媒介基因流佈的發生。

水稻是世界上主要的糧食作物之一，提

投稿日期：2012 年 9 月 3 日；接受日期：2012 年 12 月 24 日。

\* 通訊作者：wu@tari.gov.tw

<sup>1</sup> 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。

<sup>2</sup> 國立台灣大學農藝學系副教授。台灣 台北市。

<sup>3</sup> 農委會農業試驗所作物組副研究員。台灣 台中市。

<sup>4</sup> 農委會農業試驗所生物技術組研究員兼組長。台灣 台中市。

供全球人類 23% 的糧食供給 (Fischer *et al.* 2000)。近年來利用基因轉殖技術培育而成的基因轉殖水稻越來越多，已經有許多基因成功的轉入水稻品種中，如抗病蟲害 (Bishun *et al.* 2008)，抗病毒、抗除草劑 (Kumar *et al.* 2008) 和耐旱、耐鹽 (Hu *et al.* 2006) 等特性。更進一步轉殖不同基因以提高不同成分在稻米中的含量，如  $\beta$ -胡蘿蔔素、高蛋白含量、高鐵含量等亦可見於文獻中 (Krishnan *et al.* 2003; Sivaprakash *et al.* 2006; Paine *et al.* 2005)。

水稻為自花授粉作物，族群間基因流佈的機率相當低，他花授粉的機會小於 1% (Bajaj & Mohanty 2005)，然而在水稻的育種過程中，研究人員仍舊關注花粉污染的問題。Oka (1988) 發現印度型 *indica* 栽培稻和野生種比日本型 *japonica* 栽培稻易發生雜交，其結果造成 *indica* 栽培稻和野生種的株高和開花時間趨近於栽培稻。

近年由於基因轉殖水稻已進入田間試驗和商業生產階段，基因轉殖水稻環境釋放可能帶來的生態風險和環境問題一直受到各國生態學家的關注，其中藉由花粉所引起的基因流佈問題最引人注目。在過去十多年間，許多研究人員利用栽培稻、紅米 (*red rice*, *Oryza sativa* L.) 及野生稻 (*Oryza rufipogon*) 為材料，以不同種植距離來探討水稻的花粉媒介基因流佈程度，藉以估算基因流佈的頻率。結果顯示基因流佈頻率從栽培種水稻至野生稻及紅米分別為 1.21–2.94% 及 0.011–0.046%，最遠距離在 250 m 處，仍然發現雜交種子 (Song *et al.* 2002, 2004; Lu *et al.* 2003; Chen *et al.* 2004; Messeguer *et al.* 2004; Wang *et al.* 2006)。藉由花粉媒介而產生的基因流佈，主要是受到氣候條件，如風向、風速、溫度及濕度等影響，因此不同地區所調查的結果也不同。除此之外，花粉貢獻親與接受親之間的距離 (Manasse 1992)、貢獻親花粉源的大小 (Farris & Mitton 1984)、授粉模式 (Govindaraju 1988)、花器構造 (Ellstrand & Elam 1993) 以及開花時間長短和花粉親和性 (Jarvis & Hodgkin 1999) 等因素，皆會影響花粉媒介基因流佈頻率。

水稻在台灣栽培面積達 22 萬公頃，是種植面積最廣的糧食作物。台灣稻米產業屬小農制，平均每戶可耕作面積近於 1 ha。在水稻生產區內，栽種許多不同水稻品種的現象非常普遍。倘若基因轉殖水稻一旦獲得政府核可，進行大規模的環境釋放和商業化生產，當基因轉殖水稻和非轉殖栽培種水稻在同一地點相鄰栽種時，基因轉殖水稻的外源基因可能藉由花粉傳播而轉移至非轉殖栽培種水稻，將可能會污染非轉殖栽培種水稻種子的純度和品質，影響在同一區域內的生產佈局，對食品安全和有機食品的生產構成威脅。2006 年台灣第一個基因轉殖水稻商業化生產申請案件中，審查委員考量基因轉殖水稻會藉由花粉媒介基因流佈影響到本國糧食產業而遭議決不予通過，因此水稻的花粉媒介基因流佈備受關注，也是基因轉殖水稻是否可以商業化生產的重要關鍵。本試驗目的將探討不同基因轉殖水稻花粉媒介基因流佈的可能性及其頻率，藉以瞭解外源基因對基因轉殖水稻花粉媒介基因流佈的影響程度。

## 材料與方法

### 試驗地點

本試驗實施地點為行政院農業委員會農業試驗所之基因轉殖植物田間試驗隔離園區 (TARI, 24°01'N, 120°41'E)。所有田間管理試驗依據農業試驗所「基因轉殖植物田間試驗作業管理規範」之規定執行。

### 試驗材料

本試驗利用了 3 個基因轉殖水稻品系，分別為轉殖澱粉普魯南糖水稻 (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*; APU)、轉殖豬乳鐵蛋白水稻 (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*; LAC) 及轉殖植酸酵素水稻 (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*; AAN)，並以其非基因轉殖水稻受體品種台農 67 號 (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. 'Tainung 67'; TNG 67) 當對照組。APU 轉殖品系之外源基因是來自美國黃石國家公園之熱溫泉

細菌 *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E 品系 ATCC53033 之澱粉普魯南糖酵素基因，主要作用是使米粒中的澱粉在高溫中同時液化及糖化，進而生產糖漿及高蛋白漿 (Chiang *et al.* 2005)。LAC 轉殖品系之外源基因為豬乳鐵蛋白的基因，主要作用是促進免疫系統表現，調控鐵之吸取及細胞生長等生物功能，可有效保護仔豬生長時，免於病菌感染及造成貧血等導致仔豬死亡的病變 (Chang *et al.* 2003)。AAN 轉殖品系之外源基因是 *Selenomonas ruminantium* 植酸酵素基因 (*SrPif6*)，其主要作用是使發芽水稻種子含有大量植酸酵素，這些發芽種子經過加工後添加到豬或家禽的飼料中，將可使所飼養動物同時獲得種子中的各種養分、礦物元素及磷 (Hong *et al.* 2004)。每一個基因轉殖水稻及其非基因轉殖對照品種除了外源基因外，其他的遺傳背景幾乎完全一致。

### 花粉性狀調查

花粉性狀調查包括花粉數量計數及花粉活性檢測，花粉數量計數為早上八點前抽取未開花的 APU、LAC、AAN 轉殖品系及 TNG 67 稻穗。將稻穗插在水瓶中置於室內 32°C 的烘箱中 30–60 min，待穎花開花後取六個花藥置於 1.5 mL 離心管中，加入 1 mL 蒸餾水，充分搗碎震盪均勻後，使花粉均勻散佈在溶液中。取 10  $\mu$ L 花粉液滴於載玻片上，在顯微鏡下觀察統計其花粉數量，每一處理 3 重複，每一重複統計 10 次，花粉數量估算公式為：每枚花藥花粉數量 (粒/花藥) = (每個載玻片上總花粉粒數  $\times$  100)/6。

花粉活性檢測採用離體發芽測定法 (*in vitro* germination) 及螢光染色法 (fluorescent diacetate; FDA) 二種方法檢測。離體發芽測定法檢測採用液體培養基方法 (Shivanna & Rangaswamy 1992)，培養基成分為 100 mL 蒸餾水中含 15 g 蔗糖、0.02 g  $H_3BO_3$  及 0.06 g  $Ca(NO_3)_2$ 。在乾淨載玻片上滴上適量液體培養基，在水稻即將開花前，取下小穗用鑷子取出花藥，放進液體培養基中，夾破花藥釋放出花

粉粒，蓋上玻片於 28°C  $\pm$  1°C 下保溫 60 min，在顯微鏡下觀察 APU、LAC、AAN 轉殖品系與 TNG 67 花粉的離體萌發情況。以花粉管長度大於或等於 1/2 花粉粒直徑作為萌發花粉，每一處理 3 重複，每一重複統計 500 粒花粉粒以上。

螢光染色法依 Heslop-Harrison & Heslop-Harrison (1970) 所提步驟，將 fluorescein diacetate 以 2 mg mL<sup>-1</sup> 溶於丙酮中 (A 液)。將 A 液緩緩加入含糖量 30% 的糖水溶液中直至出現白色混濁為止 (B 液)。將花粉置於載玻片上並滴以 B 液 1 到 2 滴，約 15 min 後於螢光顯微鏡 (Nikon eclipse E600) 下計算其螢光花粉的百分比，每一處理 3 重複，每一重複統計 500 粒花粉粒以上。

### 產量構成要素性狀調查

水稻產量構成要素性狀包含穗數 (panicle number, no.)、每穗粒數 (spikelet/panicle, no.)、稔實率 (percent filled grains, %)、千粒重 (1,000-grain weight, g) 及公頃產量 (grain yield, kg ha<sup>-1</sup>)。試驗期間調查 APU、LAC、AAN 轉殖品系及 TNG 67 之各性狀，各性狀參照國際稻米研究所 (IRRI 1996) 訂定之標準或作部分之修改進行調查。穗數：調查每一單株可抽穗之穗數；每穗粒數：計算各單株中結實粒數與空穎粒數，合計為總粒數，再除以穗數；稔實率：計算各單株中結實粒數與空穎粒數，合計為總粒數，再計算結實粒數與總粒數的比率；千粒重：測量結實粒數，除以總粒數，再換算成 1,000 粒重，以 g 為單位；公頃產量：以小區產量評估，每一小區種植 100 株水稻，行株距 0.25 m  $\times$  0.25 m，小區面積 4.5 m<sup>2</sup>，穀粒經脫粒烘乾調整水分含量至 13%，並風選後所得穀粒重換算成每公頃之穀粒重量。

### 花粉媒介基因流佈田間設計

本試驗利用 APU、LAC、AAN 轉殖品系及 TNG 67 為花粉貢獻親，台農糯 73 號 (TNG 73) 為花粉接受親，利用稈糯雜交特性來檢測雜交種子的糙米外觀，可以很容易評估花

粉媒介基因流佈頻率。本試驗有二個田間設計，第一個為交叉種植設計 (checker-board pattern)，即種植 1 株 APU、LAC、AAN 轉殖品系或 TNG 67 當貢獻親後再種植 1 株 TNG 73 當接受親，因此 1 株貢獻親周圍有 4 株接受親 (圖 1A)。第二個為間隔種植設計 (alternating row arrangement)，種植 1 行 APU、LAC、AAN 轉殖品系或 TNG 67 當貢獻親後再種植 1 行 TNG 73 當接受親，因此 1 株貢獻親旁有 2 株接受親 (圖 1B)。根據 APU、LAC、AAN、TNG 67 及 TNG 73 歷年播種至開花期天數的觀察記載，調整播種期使其開花期一致，APU、LAC、AAN 和 TNG 67 於 2007 年 2 月 2 日播種，TNG 73 晚一星期於 2 月 9 日播種，所有材料於 4-5 葉齡時移植於田間。試驗田區採逢機完全區集設計，三重複，多本植，每小區種植 10 行，每行種植 10 株，行株距為 0.25 m × 0.25 m。每公頃 N、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>、K<sub>2</sub>O 施用量分別為 120、72 及 48 kg，硫酸銨為氮肥 (N) 的來源，過磷酸鈣 (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) 及氯化鉀 (KCl) 分別為磷肥及鉀肥的來源，

田間管理依一般慣行法進行。於種子成熟期，收穫每一小區 TNG 73 種子混合經風選後隨機選取 6,000 粒種子分成 3 袋，每袋含 2,000 粒進行檢定，每一參試材料總計共有 18,000 粒種子進行花粉媒介基因流佈頻率的評估。

### 花粉媒介基因流佈頻率評估

利用稈糯雜交特性來檢測雜交種子，如果糯稻 TNG 73 接受了稈稻 APU、LAC、AAN 轉殖品系或 TNG 67 的花粉，其糙米外觀呈透明狀；反之，若 TNG 73 自花授粉，則糙米外觀呈不透明狀。TNG 73 水稻上收穫的種子，以 45°C 恆溫將種子烘乾至水分含量為 14%，再以脫殼機 (THU35B, Satake Corp., Japan) 脫殼成糙米，用肉眼觀察糙米透明度。為避免人為影響外觀檢測，呈現透明之糙米再進行碘液 (iodine solution) 反應檢定。將 0.2 g 碘與 2 g 碘化鉀 (KI) 溶解於蒸餾水中並稀釋至 100 mL，且予充分混合置於深棕色瓶中為原液，檢驗時將碘試劑原液稀釋 10 倍，即為試劑。用刀片將糙米橫切為兩半後置於培養皿

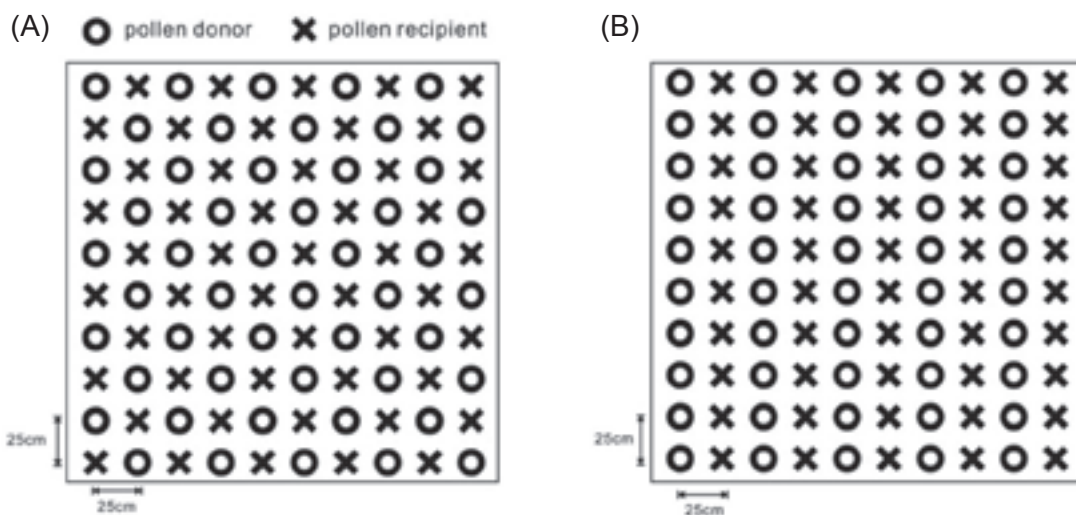


圖 1. 轉殖澱粉普魯南糖水稻 (APU)、轉殖豬乳鐵蛋白水稻 (LAC)、轉殖植酸酵素水稻 (AAN) 及非基因轉殖水稻台農 67 號 (TNG 67) 花粉媒介基因流佈評估田間示意圖。(A) 交叉種植設計；(B) 間隔種植設計。O 表示 APU、LAC、AAN 轉殖品系和 TNG 67 花粉貢獻親，X 表示 TNG 73 花粉接受親。

**Fig. 1.** Pollen-mediated gene flow estimation of APU (amylopullulanase-transgenic), LAC (lactoferrin-transgenic), AAN (phytase-transgenic) and TNG 67 in open plots under the checker-board pattern (A) and the alternating row arrangement (B). Circles represented hills of pollen donor plants, TNG 67 or transgenic line of APU, LAC, or AAN, and crosses represented hills of pollen recipient plants, TNG 73.

中，加入適量的試劑，稍加搖動，靜置 3 min 後，觀察顏色變化。若為 TNG 73 自交種子其胚乳呈褐色，若為 TNG 73 和 APU、LAC、AAN 或 TNG 67 雜交種子，其胚乳則呈紫黑色。花粉媒介基因流佈頻率 = 檢測到 TNG 73 和 APU、LAC、AAN 轉殖品系或 TNG 67 之雜交種子數目/檢測種子數目 × 100%。

## 結果

### 水稻花粉性狀調查

花粉數量、花粉離體發芽率及花粉活力是影響水稻不同品種間花粉媒介基因流佈的重要因子，表 1 為 APU、LAC、AAN 轉殖品系與非基因轉殖水稻 TNG 67 花粉數量、花粉離體發芽率及花粉活力的檢測結果。結果顯示，在花粉數量上以 LAC 轉殖品系最高每個花藥有 66,200 個花粉，其次為 TNG 67 有 64,600 個，最低為 AAN 轉殖品系有 57,200 個，但 4

個參試材料並未達顯著差異。所有參試材料的花粉離體發芽率介於 28.32–51.72% 之間，其中 LAC 轉殖品系和 TNG 67 比較高分別為 51.72% 和 49.76%，二者間未達顯著差異。另 2 個參試材料 AAN 和 APU 轉殖品系的花粉離體發芽率比較低分別為 37.51% 和 28.32%，二者亦未達顯著差異 (表 1)，但與 LAC 和 TNG 67 轉殖品系有達顯著差異。另外，在螢光染色法的花粉活力檢測中，以 TNG 67 最高為 76.95%，其次為 AAN 轉殖品系 73.18%，LAC 轉殖品系 72.75%，最低為 APU 轉殖品系 61.4%；APU 轉殖品系在螢光染色法的花粉活力檢測中顯著低於其他 3 個參試材料。

### 產量構成要素性狀調查

表 2 為 APU、LAC、AAN 轉殖品系與非基因轉殖水稻 TNG 67 產量構成要素性狀調查結果。結果顯示 LAC 轉殖品系穗數最高為 16.4 穗，其次為 TNG 67 的 14.9 穗，

表 1. 轉殖澱粉普魯南糖水稻 (APU)、轉殖豬乳鐵蛋白水稻 (LAC)、轉殖植酸酵素水稻 (AAN) 與非基因轉殖水稻台農 67 號 (TNG 67) 水稻花粉貢獻親其花粉數量、花粉離體發芽率及花粉活力的檢測結果。

**Table 1.** The quantity, germination rate and viability of rice pollens generated by the 4 pollen donors, transgenic lines APU (amylopullulanase-transgenic), LAC (lactoferrin-transgenic) and AAN (phytase-transgenic) and non-transgenic line TNG 67.

Pollen donor	Pollen number/anther	Germination rate (%)	Viability (%)
APU	59,200 ± 3,305.9 a <sup>z</sup>	28.32 ± 0.02 b	61.40 ± 0.04 b
LAC	66,200 ± 2,563.9 a	51.72 ± 0.09 a	72.75 ± 0.03 a
AAN	57,200 ± 2,484.6 a	37.51 ± 0.01 b	73.18 ± 0.02 a
TNG 67	64,600 ± 3,242.8 a	49.76 ± 0.03 a	76.95 ± 0.01 a

<sup>z</sup> Mean ± SE (*n* = 3). Values with the different letters are significantly different at level of *P* < 0.05 according to LSD test.

表 2. 2007 年第一期作轉殖澱粉普魯南糖水稻 (APU)、轉殖豬乳鐵蛋白水稻 (LAC)、轉殖植酸酵素水稻 (AAN) 及非基因轉殖水稻台農 67 號 (TNG 67) 產量構成要素性狀之評估。

**Table 2.** Assessments of rice yield components of three transgenic lines APU (amylopullulanase-transgenic), LAC (lactoferrin-transgenic) and AAN (phytase-transgenic) and non-transgenic line TNG 67 grown in first crop season of 2007.

Accession	Panicle number (no.)	Spikelets/panicle (no.)	1000-grain weight (g)	PFG <sup>z</sup> (%)	Yield (kg ha <sup>-1</sup> )
APU	13.9 ± 1.2 a <sup>y</sup>	87.7 ± 1.7 bc	21.2 ± 0.6 c	81.7 ± 4.0 a	5,515.6 ± 225.6 b
LAC	16.4 ± 0.9 a	103.3 ± 4.7 a	24.5 ± 0.2 b	89.3 ± 0.4 a	6,522.1 ± 124.4 a
AAN	13.3 ± 1.4 a	80.3 ± 6.8 c	25.1 ± 0.4 b	87.0 ± 1.7 a	5,630.3 ± 109.5 b
TNG 67	14.9 ± 0.8 a	100.1 ± 2.5 ab	26.6 ± 0.5 a	89.6 ± 0.7 a	6,898.3 ± 154.5 a

<sup>z</sup> PFG: percent filled grains.

<sup>y</sup> Mean ± standard error. Means within each column followed by the same letter are not significantly different (*P* > 0.05) according to LSD test.

AAN 轉殖品系最低為 13.3 穗，各品系間皆未達顯著差異。每穗粒數以 LAC 轉殖品系最高為 103.3 粒，AAN 轉殖品系最低為 80.3 粒，二者有達顯著差異。千粒重以 TNG 67 最高為 26.6 g，其次為 AAN 轉殖品系 25.1 g，APU 轉殖品系最低為 21.2 g，三者間皆達顯著差異水準。稔實率則以 TNG 67 最高為 89.6%，其次 LAC 轉殖品系為 89.3%，AAN 及 APU 轉殖品系分別為 87.0% 及 81.7%，各品系間亦未達顯著差異。水稻單位面積產量由產量構成要素所決定，由表 2 結果顯示 TNG 67 每公頃產量最高為 6,898.3 kg，其次 LAC 轉殖品系為 6,522.1 kg，AAN 與 APU 轉殖品系最低分別為 5,630.3 kg 及 5,515.6 kg。TNG 67 和 LAC 轉殖品系二者間未達顯著差異，但與 AAN 和 APU 轉殖品系則有達顯著差異。

### 不同基因轉殖水稻花粉媒介基因流佈結果

本試驗藉由調整花粉貢獻親與接受親之播種期，確保其開花期重疊，由田間觀察結果顯示 APU 轉殖品系水稻開花期為 5 月 11–16 日；LAC 轉殖品系為 5 月 10–16 日；AAN 為 5 月 10–17 日；TNG 67 為 5 月 11–17 日；TNG 73 為 5 月 9–17 日。每一花粉貢獻親與接受親間至少有 7 天的花期重疊，有最大的機會發生雜交。

本試驗每一參試材料共有 18,000 粒種子進行花粉媒介基因流佈評估檢測，所有參試材料的種子平均發芽率介於 93–97% 之間。結果顯示在交叉種植設計中，花粉媒介基因流佈的頻率介於 3.18–7.82% 之間，以 LAC 轉殖品系的花粉媒介基因流佈頻率最高為 7.82%，其次 TNG 67 及 AAN 轉殖品系分別為 7.13% 和 5.91%，最低為 APU 轉殖品系只有 3.18% 且與其他三個參試材料有顯著差異 (圖 2)。在間隔種植設計中，花粉媒介基因流佈的頻率介於 0.54–2.8% 之間，以 TNG 67 的花粉媒介基因流佈頻率最高為 2.8%，其次 LAC 及 AAN 轉殖品系分別為 2.32% 和 1.53%，最低為 APU 轉殖品系只有 0.54% 亦與其他 3 個參

試材料有顯著差異 (圖 2)。在交叉種植設計中的花粉媒介基因流佈頻率平均為 6.01%，高於間隔種植設計的 1.8%。整體而言，基因轉殖水稻 APU、LAC 及 AAN 轉殖品系的花粉媒介基因流佈頻率平均為 3.55%，低於其非基因轉殖的受體品種 TNG 67 的 4.97%。

## 討論

花粉性狀和產量性狀是影響基因轉殖水稻基因流佈潛力的重要因子，水稻之產量性狀主要由穗數、每穗粒數、稔實率及千粒重所構成，除穗數在營養生長期形成外，其餘三個構成要素均是在生殖生長期形成，因此影響稻穀產量的先決因子為花粉活力 (Wu *et al.* 2008)。Wang *et al.* (1994) 研究指出花粉離體發芽率與結實率顯著相關。Satake & Yoshida (1978) 研究報導水稻開花期間隨脅迫溫度的上升和時間的延長，花粉發芽率及花粉活力都大幅度下降，變化趨勢與結實率一致。本研究結果顯示，LAC 轉殖品系與 TNG 67 的花粉離體發芽率 (51.72%, 49.76%) 及花粉活力 (72.75%, 76.95%) 皆高於 APU 轉殖品系 (28.32%, 61.4%)，這個結果與稔實率及產量所顯示的結果甚為一致。LAC 轉殖品系與 TNG 67 的稔實率分別為 89.3% 及 89.6%，產量則為 6,522.1 kg ha<sup>-1</sup> 及 6,898.3 kg ha<sup>-1</sup>，而 APU 轉殖品系的稔實率及產量分別為 81.7% 及 5,515.6 kg ha<sup>-1</sup>。

基因轉殖作物花粉數量、花粉活力及傳播距離是花粉媒介基因流佈研究的主要內容。花粉媒介基因流佈是基因轉殖作物外源基因逃逸的主要方式，研究外源基因逃逸的可能性及其頻率，是基因轉殖作物生物安全評估的第一步 (Lu & Snow 2005)。Song *et al.* (2004) 研究指出，水稻花粉媒介基因流佈頻率在不同的品種之間有很大的差異，主要取決於花粉貢獻親的花粉數量、花粉接受親的異交率、不同品種之間的雜交親和性以及花粉競爭能力。Li *et al.* (2002) 研究顯示花粉活力是雜交成功的先決因素，不僅與品種有關，同時與開

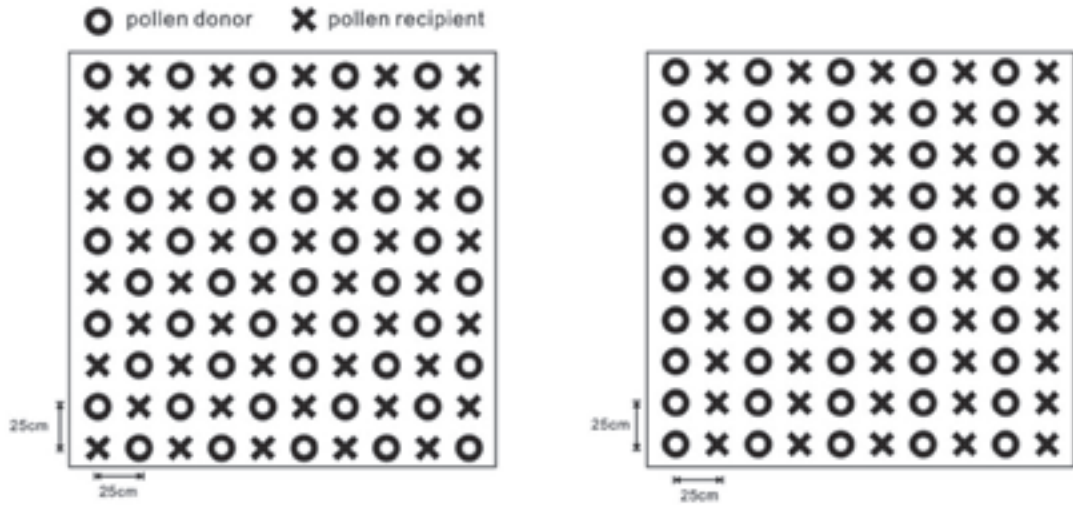


圖 2. 轉殖澱粉普魯南糖水稻 (APU)、轉殖豬乳鐵蛋白水稻 (LAC)、轉殖植酸酵素水稻 (AAN) 及非基因轉殖水稻台農 67 號 (TNG 67) 的花粉媒介基因流佈評估結果。左邊為交叉種植設計中花粉媒介基因流佈頻率 (%) 的結果，右邊為間隔種植設計中花粉媒介基因流佈頻率 (%) 的結果。

**Fig. 2.** The frequency of outcrossed seeds measured from two different field plot designs, checker-board pattern (left) and alternating row arrangement (right). APU, LAC, AAN and TNG 67 indicated the hybrid grains of TNG 73 derived from three transgenic lines APU (amylopullulanase-transgenic), LAC (lactoferrin-transgenic) and AAN (phytase-transgenic) and non-transgenic line TNG 67, respectively. Error bars represent standard error of three replications. Values with the different letters are significantly different at level of  $P < 0.05$  according to LSD test.

花時外界環境因素 (溫度、濕度等) 密切相關。螢光染色法基本原理是螢光染劑可自由透過完整的原生質膜，當此種染劑進入原生質後，產生螢光的極性物質 (螢光素) 只在細胞內累積，故可以根據花粉產生螢光的情況判斷花粉活性，該法可同時反映出酶的活性及質膜情況兩種指標 (Song *et al.* 2002)。螢光染色法雖可判斷花粉活力，但花粉離體發芽率與結實率顯著相關，是一個直觀的花粉活力指標 (Xu *et al.* 2001)。花粉數量越多，花粉活力越強，對異交就越有利 (Kato & Namai 1987)。本研究結果花粉數量以 LAC 轉殖品系 (66,200 個) 最高，其次為 TNG 67 (64,600 個)，而在

花粉離體發芽率中也以 LAC 轉殖品系最高為 51.72%，其次為 TNG 67 為 49.76%，AAN 和 APU 轉殖品系分別為 37.51% 和 28.32%，此種結果反應在田間的花粉媒介基因流佈試驗中甚為一致。LAC 轉殖品系在交叉種植和間隔種植田間設計中，其花粉媒介基因流佈平均頻率最高為 5.07%，其次為 TNG 67 為 4.97%，AAN 和 APU 轉殖品系分別為 3.72% 和 1.86%。

TNG 67 為 APU、LAC 和 AAN 轉殖品系的受體品種，彼此之間的差別僅在於外源基因的有無。TNG 67 的花粉數量高於 APU 和 AAN 轉殖品系，低於 LAC 轉殖品系，皆

未達顯著差異。但在花粉離體發芽率中 APU 和 AAN 轉殖品系 (28.32%, 37.51%) 顯著低於 TNG 67 (49.76%)。另外, 螢光染色法的花粉活力檢測中, APU 轉殖品系 (61.40%) 亦顯著低於 TNG 67 (76.95%)。Ishida & Sasahara (1989) 調查 125 個日本栽培品種、18 個秈稻品種、12 個爪哇稻品種和一個野生稻 (*Oryza sativa* L. f. *Spontanea*) 的花粉粒數量, 顯示不同品種間差異很大。Bergelson *et al.* (1998) 研究發現基因轉殖阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) 與非基因轉殖突變體相比, 異交率增強高達近 20 倍, 指出外源基因可能會提高植物的異交潛力。Lefol *et al.* (1996) 利用轉 *bar* 基因油菜 (*Brassica napus*) 與野生近緣種的雜交授粉特性研究則表明, 花粉萌發率在基因轉殖油菜與非基因轉殖油菜間無顯著差異, 但 Mikkelsen (1996) 的田間試驗表明其雜種回交第一代可產生高活力的花粉。由於 APU 轉殖品系是將 *Thermoanaerobacter ethanolicus* 導入 TNG 67 中, 以提高水稻種子內的澱粉 (Chiang *et al.* 2005); 而 AAN 轉殖品系是將 *Selenomonas ruminantium* 植酸酵素基因 (*SrPf6*) 導入 TNG 67 中, 以提高水稻種子植酸酵素的表現 (Hong *et al.* 2004)。外源基因插入會對非目標性狀造成影響, 可能由於外源基因的過度表達, 破壞受體基因的活性, 影響受體植物的代謝過程, 使性狀發生改變, 進而影響花粉離體發芽率和花粉活力 (Leuhrsen *et al.* 1990)。Ting *et al.* (2008) 研究顯示將 *Thermoanaerobacter ethanolicus* 導入 TNG 67 水稻中會降低轉殖澱粉普魯南糖水稻對胡麻葉枯病 (brown spot disease) 的抗性。不同外源基因插入對基因轉殖水稻花粉媒介基因流佈頻率的影響存在一定的差異, 這表明每一個基因轉殖材料可能具有不一樣的生態效應, 對基因轉殖品種的生態評價也應以個案為研究對象。

當基因轉殖水稻和非基因轉殖水稻植株在同一地點相鄰栽種時, 如果花期完全重疊, 而非基因轉殖水稻植株的附近又有著高密度的基因轉殖水稻, 那麼就可能發生高頻率的

以花粉傳播為媒介的基因流佈。Rong *et al.* (2010) 利用統計模擬結果, 顯示花粉媒介基因流佈頻率隨著花粉密度增加而呈現上升趨勢。本試驗中, 花粉貢獻親與接受親間的種植距離只有 25 cm, 在這樣的近距離內, 相鄰水稻植株的稻穗部分重疊在一起, 貢獻親水稻上的花粉很容易與接受親授粉雜交。在交叉種植田間試驗下, 花粉接受親周圍有 4 株花粉貢獻親圍繞, 而間隔種植則為 2 株, 顯示在交叉種植時貢獻親花粉密度相對地比間隔種植時高, 其花粉媒介基因流佈頻率也顯著增加, 交叉種植的花粉媒介基因流佈頻率平均為 6.01%, 遠高於間隔種植的 1.8%。

基因轉殖水稻在研究和商業生產過程中最主要在於防止外源基因的向外擴散, 目前各國對於防範基因轉殖水稻的污染皆採取距離隔離, 以降低花粉飛散雜交而造成的混雜風險。從距離隔離避免基因轉殖水稻花粉流佈的要求來看, 由於複雜的氣象因子如風向和風速, 即使是相隔很遠, 也不能完全防止其與非基因轉殖水稻間的基因流佈 (Wang *et al.* 2006)。台灣地狹人稠, 當基因轉殖水稻和非轉殖栽培種水稻在同一地點相鄰栽種時, 基因轉殖水稻的外源基因可能藉由花粉傳播而轉移至非轉殖栽培種水稻, 將可能會污染非轉殖栽培種水稻種子的純度和品質。因此, 如何在隔離距離、基因轉殖水稻種植規模大小及花粉媒介基因流佈等面向取得平衡, 將是未來基因轉殖水稻商業生產重要的依據。

## 引用文獻

- Bajaj, S. and A. Mohanty. 2005. Recent advances in rice biotechnology - towards genetically superior transgenic rice. *Plant Biotechnol. J.* 3:275-307.
- Bergelson, J., C. B. Purington, and G. Wichmann. 1998. Promiscuity in transgenic plants. *Nature* 395:25.
- Bishun, D. P., J. Sanjay, and B. C. Bharat. 2008. Transgenic indica rice expressing *Mirabilis jalapa* antimicrobial protein (Mj-AMP2) shows enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Plant Sci.* 175:364-371.
- Chandler, S. and J. M. Dunwell. 2008. Gene flow, risk

- assessment and the environmental release of transgenic plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 27:25–49.
- Chang, J. C., H. Y. Yang, R. B. Chen, J. Y. Tsay, C. S. Wang, S. R. Wang, and L. J. Chen. 2003. Production of porcine lactoferrin in transgenic rice. p.72. *in: International Symposium on Plant Biotechnology*. October 1–4, 2003. Ilan, Taiwan.
- Chen, L. J., D. S. Lee, Z. P. Song, H. S. Suh, and B. R. Lu. 2004. Gene flow from cultivated rice (*Oryza sativa*) to its weedy and wild relatives. *Ann. Bot.* 93:67–73.
- Chiang, C. M., F. S. Yeh, T. H. Tseng, C. S. Wang, H. S. Lur, J. F. Shaw, and S. M. Yu. 2005. Expression of a bifunctional and *Thermostable amylopullulanase* in transgenic rice seeds leads to starch autohydrolysis and altered composition of starch. *Mol. Breed.* 15:125–143.
- Clive, J. 2011. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011. ISAAA Briefs 43. ISAAA. Ithaca. 32 pp.
- Ellstrand, N. C. and D. R. Elam. 1993. Population genetic consequences of small population size: implication for plant conservation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 24:217–242.
- Farris, M. A. and J. B. Mitton. 1984. Population density, outcrossing rate, and heterozygote superiority in ponderosa pine. *Evolution* 38:1151–1154.
- Fischer, K. S., J. Barton, G. S. Khush, H. Leung, and R. Cantrell. 2000. Genomics and agriculture. *Collaborations in rice*. *Science* 290:279–280.
- Govindaraju, D. R. 1988. Relationship between dispersal ability and levels of gene flow in plants. *Oikos* 52:31–35.
- Heslop-Harrison, J. and Y. Heslop-Harrison. 1970. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Technol.* 45:115–120.
- Hong, C. Y., K. J. Chen, L. F. Liu, T. H. Tseng, C. S. Wang, and S. M. Yu. 2004. Production of two highly active bacterial phytases with broad pH optima in germinating transgenic rice seeds. *Transgenic Res.* 13:29–39.
- Hu, H., M. Dai, J. Yao, B. Xiao, X. Li, Q. Zhang, and L. Xiong. 2006. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:12987–12992.
- IRRI. 1996. Standard Evaluation System for Rice. IRRI. Manila. 52 pp.
- Ishida, H. and T. Sasahara. 1989. Correlations between floral characters and the days to heading in rice (*Oryza sativa* L.). *Jpn. J. Breeding.* 39:275–283.
- Jarvis, D. I. and T. Hodgkin. 1999. Wild relatives and crop cultivars: detecting natural introgression and farmer selection of new enetic combinations in agroecosystems. *Mol. Ecol.* 8:159–173.
- Kato, H. and H. Namai. 1987. Floral characteristics and environment factors for increasing natural outcrossing rate for F<sub>1</sub> hybrid seed production of rice *Oryza sativa* L. *J. Breed.* 37:318–330. (in Japanese with English summary)
- Krishnan, S., K. Datta, N. Baisakh, M. D. Vasconcelos, and S. K. Datta. 2003. Tissue specific localization of  $\beta$ -carotene and iron in transgenic *indica* rice (*Oryza sativa* L.). *Curr. Sci.* 84:1232–1234.
- Kumar, V., R. R. Bellinder, D. C. Brainard, R. K. Malik, and R. K. Gupta. 2008. Risks of herbicide-resistant rice in India: a review. *Crop Prot.* 27:320–329.
- Lefol, E., A. Fleury, and H. Darmency. 1996. Gene dispersal from transgenic crops II. Hybridization between oilseed rape and the wild hoary mustard. *Sex Plant Reprod.* 9:189–196.
- Leuhrsen, K. R. 1990. Insertion of Mulelements in the first intron of the *Adh 12S* gene of maize results in novel RNA processing events. *Plant Cell* 2:1225–1238.
- Li, X. Z., M. Z. Liang, G. Q. Zhou, and L. B. Chen. 2002. Effect of environment condition on pollen vigor and seed set during flowing time of rice. *Acta Agron. Sin.* 28:417–420.
- Lu, B. A. and A. A. Snow. 2005. Gene flow from genetically modified rice and its environmental consequences. *BioScience* 55:669–678.
- Lu, B. A., Z. P. Song, and J. K. Chen. 2003. Can transgenic rice cause ecological risks through transgene escape? *Prog. Nat. Sci.* 13:17–24.
- Manasse, R. S. 1992. Ecological risks of transgenic plants: effects of spatial dispersion on gene flow. *Ecol. Appl.* 2:431–438.
- Messeguer, J., V. Marfà, M. M. Català, E. Guiderdoni, and E. Melé. 2004. A field study of pollen-mediated gene flow from Mediterranean GM rice to conventional rice and the red rice weed. *Mol. Breed.* 13:103–112.
- Mikkelsen, T. R. 1996. The risk of crop transgene spread. *Nature* 380:31.
- Oka, H. I. 1988. Origin of Cultivated Rice. *Jpn. Sci. Soc. Press*. Tokyo. 254 pp.
- Paine, J. A., C. A. Shipton, S. Chaggar, R. M. Howells, M. J. Kennedy, G. Vernon, S. Y. Wright, E.

- Hinchliffe, J. L. Adams, A. L. Silverstone, and R. Drake. 2005. Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nat. Biotechnol.* 23:482–487.
- Rong, J., Z. Song, T. J. de Jong, X. Zhang, S. Sun, X. Xu, H. Xia, B. Liu, and B. R. Lu. 2010. Modelling pollen-mediated gene flow in rice: risk assessment and management of transgene escape. *Plant Biotechnol. J.* 8:452–464.
- Satake, T. and S. Yoshida. 1978. High temperature induced sterility in indicarices at flowering. *Jpn. J. Crop Sci.* 47:6217.
- Shivanna, K. R. and N. S. Rangaswamy. 1992. *Pollen Biology: A Laboratory Manual*. Springer. Berlin. 119 pp.
- Sivaprakash, K. R., S. Krishnan, S. K. Datta, and A. K. Parida. 2006. Tissue-specific histochemical localization of iron and ferritin gene expression in transgenic *indica* rice Pusa Basmati (*Oryza sativa* L.). *J. Genet.* 85:157–160.
- Song, Z. P., B. R. Lu, and J. K. Chen. 2004. Pollen flow of cultivated rice measured under experimental conditions. *Biodivers. Conserv.* 13:579–590.
- Song, Z. P., B. R. Lu, Y. G. Zhu, and J. K. Chen. 2002. Pollen competition between cultivated and wild rice species (*Oryza sativa* and *O. rufipogon*). *New Phytol.* 153:289–296.
- Ting, M. Y., H. D. Shih, and C. Y. Lin. 2008. Increased susceptibility of rice following insertion of *amylo-pullulanase* gene, to brown spot caused by *Bipolaris oryzae*. *J. Phytopathol.* 156:530–533.
- Wang, F., Q. H. Yuan, L. Shi, Q. Qian, W. G. Liu, B. G. Kuang, D. L. Zeng, Y. L. Liao, B. Cao, and S. R. Jia. 2006. A large-scale field study of transgene flow from cultivated rice (*Oryza sativa*) to common wild rice (*O. rufipogon*) and barnyard grass (*Echinochloa crusgalli*). *Plant Biotechnol. J.* 4:667–676.
- Wu, C., S. M. Tang, Y. Zhang, and C. L. Zhong. 2008. Advances of research on plant pollen culture. *Chinese Agric. Sci. Bull.* 24:146–149. (in Chinese with English abstract)
- Xu, H. B., G. M. Wang, and M. Wei. 2001. Correlation analysis of the characters of pollen grains and seed-setting of rice under high temperature stress. *J. Southwest Agric. Univ.* 23:205–207. (in Chinese with English abstract)

# Field Assessment of Agronomic Traits and Pollen-Mediated Gene Flow of Transgenic Rice

Ching-Shan Tseng<sup>1</sup>, Yann-Rong Lin<sup>2</sup>, Cheng-Ping Kuan<sup>1</sup>, Ming-Hsing Lai<sup>3</sup>, and Min-Tze Wu<sup>4,\*</sup>

## Abstract

Tseng, C. S., Y. R. Lin, C. P. Kuan, M. H. Lai, and M. T. Wu. 2013. Field assessment of agronomic traits and pollen-mediated gene flow of transgenic rice. *J. Taiwan Agric. Res.* 62(1):21–31.

Three transgenic rice lines, AAN, LAC, and APU, which were the phytase-, lactoferine-, and amylopullulanase-gene transformed cv. Tainung 67 (*Oryza sativa* L. ssp *japonica*, TNG 67), respectively, were employed for the assessments of agronomic traits, pollen characters, and pollen-mediated gene flow in a field study. The objective of this study was to provide information to clarify whether transgenic rice would affect the production of the current rice cultivation system prior to its commercialization. Results showed that yields of three transgenic lines were lower than those of TNG 67. The spikelets per panicle of LAC (103.3) were significantly higher than those of AAN (80.3). All three important factors accounting for capabilities of pollen-mediated gene flow, i.e., quantity, germination rate and viability of pollens, were lower in APU than in TNG 67. The mean frequency of outcrossed seeds was significantly lower in APU (3.18%) than in TNG 67 (7.13%). In the experiment of checker-board pattern, the mean frequency of outcrossed seeds in a descending order was 7.82%, 7.13%, 5.91% and 3.18% for LAC, TNG 67, AAN and APU, respectively. In the alternating row arrangement experiment, the mean frequency of outcrossed seeds was 2.8%, 2.32%, 1.53% and 0.54% for TNG 67, LAC, AAN and APU, respectively. Overall, the mean frequency of outcrossed seeds of APU was the lowest while that of LAC was the highest, indicating that the pollen-mediated gene flow varied among different transgenic lines.

**Key words:** Transgenic rice, Pollen characters, Pollen-mediated gene flow.

---

Received: September 3, 2012; Accepted: December 24, 2012.

\* Corresponding author, e-mail: wu@tari.gov.tw

<sup>1</sup> Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>2</sup> Associate Professor, Department of Agronomy, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.

<sup>3</sup> Associate Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

<sup>4</sup> Research Fellow and Director of Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.