

抗草甘膦转 *EPSPS* 大豆的基因漂移研究

刘 杰^{1,2}, 周 波³, 杨春燕⁴, 李玉荣⁴, 蒋凌雪^{2,3}, 张孟臣⁴, 陶 波³, 邱丽娟²

(1. 南昌大学 生命科学与食品工程学院, 江西 南昌 330031; 2. 中国农业科学院 作物科学研究所/国家农作物基因资源与遗传改良重大科学工程/农业部作物种质资源与生物技术重点开放实验室, 北京 100081; 3. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 4. 河北省农林科学院 粮油作物研究所, 河北 石家庄 050051)

摘要:以抗草甘膦转 *EPSPS* 基因大豆和不同生长类型的非转基因大豆为材料, 通过表型筛选及 PCR 分子检测, 分析不同方向和距离条件下转基因大豆中外源基因通过花粉向非转基因大豆的漂移率, 为制定转基因大豆安全种植隔离措施提供依据。结果表明, 不同生长类型大豆的基因漂移率明显不同, 以育成品种 ZZH015 最高, 在 70 612 株中的漂移率为 0.45%; 半蔓生地方品种 DPZ722 次之, 164 449 株中漂移率为 0.01%, 而 195 088 株野生大豆 YDD080 中没有检测到基因漂移。方差分析表明, 漂移率在不同距离和方向条件下均有显著差异, 随着距离的增加不断递减。在 5 m 处漂移率为 0.03%, 而在 29 m 处降至 0.001%。基因漂移在下风口方向发生较多, 表明风媒可能是影响基因漂移分布的重要因素。如果以 1% 基因漂移率为阈值, 无论是自然条件下还是随机选取 1 000 粒检测, 漂移率都低于阈值, 表明转 *EPSPS* 基因大豆的基因漂移可以忽略不计。

关键词:抗草甘膦转基因大豆; 基因漂移; 距离; 方向

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2012)04-0517-05

Gene Flowing of Genetically Modified Glyphosate-Resistant Soybean with *EPSPS*

LIU Jie^{1,2}, ZHOU Bo³, YANG Chun-yan⁴, LI Yu-rong⁴, JIANG Ling-xue^{2,3}, ZHANG Meng-chen⁴, TAO Bo³, QIU Li-juan²

(1. College of Life Sciences and Food Engineering, Nanchang University, Nanchang 330031, Jiangxi; 2. National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement (NFCRI)/Key Laboratory of Germplasm & Biotechnology (MOA), Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; 3. College of agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang; 4. Institute of Cereal and Oil Crops, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050031, Hebei, China)

Abstract: The study of gene flow is one of the most important part of assessing the environmental safety of transgenic crops. In order to determine the frequency of gene flow from glyphosate-resistant transgenic soybean to nontransgenic soybeans in field condition and provide evidence for formulating security procedure of transgenic crops planting, we planted released cultivar, semi-rampant landrace and wild soybeans around the pollen donor at six different distances in eight directions. The frequency of gene flow was obviously varied with evolution types of soybean. The average outcrossing rate was 0.01% and 0.45% in 164 449 plants of semi-rampant landrace ‘DPZ722’ and 70 612 plants of selected cultivar ‘ZZH015’, respectively. There was no gene flow in 195 088 plants of wild soybean ‘YDD080’. Analysis of variance showed that the rate of gene flow in different distances and direction were significant. The gene flow frequency declined from 0.03% to 0.001% with the isolated distance increase from 5 m to 29 m. Most of the gene flow occurred under the tuiere. Taking 1% as the threshold, the frequency of gene flow under natural condition or random choose 1 000 plants to test were lower than 1%, which can be ignored.

Key words: Genetically modified glyphosate-resistant soybean; Gene flow; Distance; Direction

转基因作物商业化 10 余年来, 种植面积以每年 1 000 万 hm^2 以上的速度递增。至 2011 年, 全球种植转基因作物超过 20 种, 种植总面积高达 16 亿 hm^2 , 占全球作物种植总面积的 11%^[1]。大豆是重要的食物、饲料、纤维与能源作物, 也是转基因商业化程度最高、推广面积最大的作物。根据国际农业生物技术应用机构 (ISAAA) 最新统计数据 (<http://www.isaaa.org/>) 显示, 2011 年全球转基因大豆种植面积 7 540 万 hm^2 , 占全球转基因作物种植总面积

的 47%, 是最主要的转基因作物^[1]。在商业化的转基因大豆中, 转 *EPSPS* 基因抗除草剂 (草甘膦) 大豆 (Roundup Ready Soybean, 简称 RRS) 的应用最广。

自 1996 年以来我国从大豆出口国变为进口国, 进口量逐年递增, 而进口大豆绝大多数为抗草甘膦转 *EPSPS* 基因大豆。因此, 开展转基因大豆的环境安全评价对研究和推广转基因大豆具有重要意义, 而基因漂移是转基因作物安全评估的一项重要

收稿日期: 2012-04-03

基金项目: 转基因玉米小麦大豆环境安全评价技术课题 (2011ZX08011-003)。

第一作者简介: 刘杰 (1986-), 女, 在读硕士, 研究方向为大豆基因资源挖掘。E-mail: liujie7386@126.com。

通讯作者: 邱丽娟 (1963-), 女, 研究员, 博士生导师, 主要从事大豆基因资源挖掘与利用研究。E-mail: qiu_lujuan@263.net。

内容。

已有的关于自交作物的外源基因漂移研究结果表明,不同作物、同一作物不同类型材料以及环境条件均可能影响漂移率,且漂移率都可能存在差异。奚亚军等^[2]在云南农场对转基因小麦安全性的研究表明,外源基因漂移的最远距离为6 m。而汪越胜等^[3]在武汉利用3种转基因小麦为供体检测外源基因漂移率,基因漂移均发生在3 m以内。利用转 *bar* 基因抗除草剂水稻为供体,以非转基因雄性不育系为受体,5 m 内的最大基因漂移几率可达12.7%^[4],向不同生物类型野生稻的基因漂移率为0~0.67%^[5]。

我国具有丰富的野生大豆资源,除海南、青海和新疆三省(自治区)外,其余各省区均有野生大豆分布。陈新等^[6]于江苏在转基因大豆四周50 m 范围内种植野生大豆 Y-8104,通过对收获的野生大豆种植后苗期喷施高剂量草甘膦和 PCR 分子检测,发现基因漂移植株1个,漂移率小于0.01%。刘琦等^[7]在东北黑龙江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品种周围,连续3 a 喷施高剂量草甘膦进行表型鉴定和 PCR 检测,后代中没有发现抗草甘膦转基因大豆材料。而黄淮地区关于转基因漂移研究尚未见报道。

本研究在河北省以抗草甘膦转 *EPSPS* 基因大豆为供体,3种不同生长类型大豆同时作为受体材料,在自然授粉条件下研究抗草甘膦转基因大豆向非转基因大豆的基因漂移情况。旨在明确转 *EPSPS* 基因大豆花粉向不同生长类型大豆的基因漂移几率及其影响因素,为抗草甘膦转基因大豆的合理种植提供科学依据。

1 材料与方法

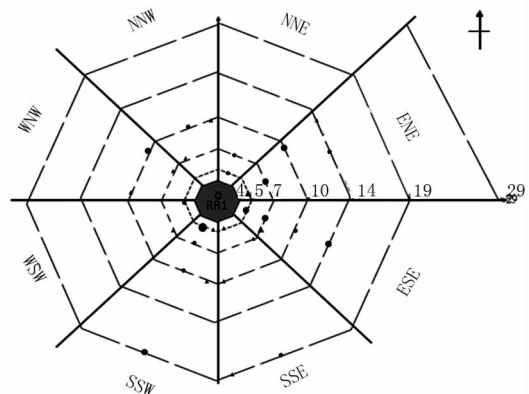
1.1 材料

供体材料为紫花、紫茎的抗草甘膦转 *EPSPS* 基因大豆 RR1,另外3种类型受体材料 ZZH015、DPZ722 和 YDD080 均为白花、绿茎。供体材料转基因大豆 RR1 为黄色种皮,直立生长,百粒重为13.9 g。受体材料 ZZH015 为直立型黄种皮育成品种;DPZ722 为半蔓生型褐种皮地方品种;野生大豆 YDD080 为蔓生型黑种皮大豆。

1.2 方法

1.2.1 田间设计及抗性基因漂移植株的表现型鉴定 试验于2004年在石家庄共种植4个受体材料,以转 *EPSPS* 基因大豆 RR1 为花粉和基因供体,种在半径为4 m 的中心,在其北东北(NNE)、东东北(ENE)、东东南(ESE)、南东南(SSE)、南西南

(SSW)、西西南(WSW)、西西北(WNW)和北西北(NNW)共8个方向分别设置6个不同隔离距离,距中心分别为5、7、10、14、19和29 m,种植3行受体品种,试验地四周100 m 以内均无大豆种植(图1)。5 m 处行长为1 m,7 m 处行长1.5 m,10 m 处行长2.3 m,14、19和29 m 处行长均为3 m,株距10 cm,单穴双粒点播,调整播期使4份材料花期相遇,成熟时收获受体种子,于次年播于田间,观察记载幼苗茎色。紫茎植株初步判定为已接受外源花粉,但是否来自供体材料 RR1 需经过进一步的 PCR 和抗性鉴定验证。



“●”:发生基因漂移的 ZZH015 植株;“▲”:发生基因漂移的 DPZ722 植株;“·”代表基因漂移率为0.001~0.01%的 ZZH015,“●”代表基因漂移率为0.01%~0.1%的 ZZH015,“●”代表基因漂移率为0.1%~1%的 ZZH015;“▲”代表基因漂移率为0.0001%~0.001%的 DPZ722,“▲”代表基因漂移率为0.001~0.01%的 DPZ722。

“●”:Gene flown individual of ZZH015;“▲”:Gene flown individual of DPZ722;“·”indicate 0.001-0.01% gene flow frequency of ZZH015, “●”indicate 0.01%-0.1% gene flow frequency of ZZH015, “●”indicate 0.1%-1% gene flow frequency of ZZH015;“▲”indicate 0.0001%-0.001% gene flow frequency of DPZ722, “▲”indicate 0.001-0.01% gene flow frequency of DPZ722。

图1 田间设计以及基因漂移植株在田间分布图

Fig.1 Degination and distribution of gene flow individuals in the field

1.2.2 田间喷药抗性鉴定 待次年播种后植株生长至第一片三出复叶完全展开时,喷施草甘膦($3\ 250\ \text{mL}\cdot\text{hm}^{-2}$)。30 d 后观察植株的存活情况,确认其对草甘膦的抗性,计算抗性阳性率。抗性阳性率(%) = 存活植株数/紫茎植株数 $\times 100$ 。

1.2.3 PCR 检测 待次年播种后的紫茎植株生长至3~5片叶子时,取1~2片叶片提取DNA。DNA提取采用 Fermentas 公司的 Genomic DNA Purification Kit,方法详见试剂盒说明书。根据 GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=nucleotide>) 公布的抗草甘膦基因序列分别设计 NOS 终止子和 *CP4-EPSPS* 特异引物及吕山花等^[8]设计的 CaMV35S 启动子引物和凝

集素基因引物(由上海生工生物技术有限公司合成),对紫茎植株进行 PCR 检测(表 1)。PCR 检测阳性率(%) = 阳性植株/紫茎植株 × 100。

1.3 统计分析

基因漂移频率以公式“漂移率(%) = PCR 及抗除草剂阳性株数/次年播种受体总株数 × 100”计算;应用 Excel(Microsoft Office 2010)对所得不同方向和隔离距离的漂移频率进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同生长类型非转基因大豆漂移率比较

共筛选受体植株 430 149 个,其中紫茎植株 355 个,对这些紫茎植株进行转基因成分检测,338 个呈阳性,17 个呈阴性(表 2),PCR 检测阳性率达 95%。

表 1 转基因分子检测引物序列
Table 1 Primer sequence and length of production

检测对象 Detect target	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	扩增产物长度 Production length/bp	基因库中序列号 Accession number of Gene bank
CaMV35S 启动子 CaMV35S promoter	35S-F 35S-R	TACTCCCTTACG TACGTGGAG CCATCATTCGCGATAAAAGAAA	165	I08076
NOS 终止子 NOS terminator	NOS-F NOS-R	CATTTCGGCAATAAAGTTTCT ATTTTGTTTCTATCGCGTA	186	I08076
农杆菌 CP4-EPSPS <i>Agrobacterium</i> CP4-EPSPS	CP4-EPSPS-F CP4-EPSPS-R	GGCACAAGGGATACAAACC ACCGCCGAACATGAAGGAC	313	AB209952
凝集素基因 <i>Lectin</i> gene	LECTIN-F LECTIN-R	CTTCGCCGCTTCCTTCAAC GAGTCCCGTGGCAGCAGAG	436	K00821

表 2 不同生长类型非转基因大豆的漂移率比较
Table 2 Comparison of gene flow frequency in different growth habit types

受体名称 Acceptor name	筛选植株总数 Total individuals	紫茎株数 Purple stem individuals	抗性阳性株数 Positive individuals	存活株数 Survival individuals	漂移率 Gene flow frequency/%	每 1000 粒种子漂移率 Gene flow frequency/‰
ZZH015	70612	335	319	319	0.45	0.6
DPZ722	164449	20	19	19	0.01	0.4
YDD080	195088	0	0	0	0	0
共计 Total	430149	355	338	338	0.08	0.2

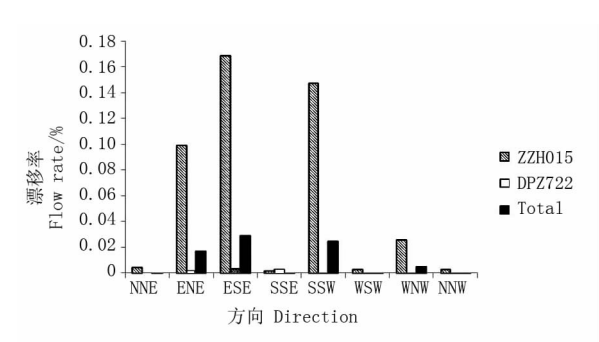


图 2 不同方向基因漂移率
Fig.2 Gene flow frequency in different directions

草甘膦喷洒紫茎植株,经分子检测为阳性的植株均对草甘膦具有抗性,植株生长正常,而 PCR 鉴定为阴性的紫花植株全部死亡,证明了 PCR 检测的正确性。PCR 阳性率与除草剂鉴定的符合率为 100%。

在 3 种生长类型受体材料中,以育成品种 ZZH015 漂移率为最高,达 0.45%;其次是半蔓生地方品种 DPZ722(0.01%),在野生大豆 YDD080 中没有检测到基因漂移。在不同的受体材料中随机选取 1 000 粒种子 5 次,检测漂移率,育成品种平均漂移率为 0.6‰,半蔓生地方品种平均漂移率为 0.4‰。在所有受体材料中 5 次随机选取 1 000 粒种子的漂移率则为 0.2‰。如果以 1% 基因漂移率为阈值,本研究检测的栽培大豆育成品种和半蔓生地方品种的基因漂移率均可忽略不计。

2.2 漂移率与方向的关系

将育成品种 ZZH015 和半蔓生地方品种 DPZ722 的漂移率按不同方向统计(图 2),育成品种 ZZH015 的漂移几率在东东南方向最高(0.17%),在南东南方向最低(0.001%)。半蔓生地方品种 DPZ722 在东东南漂移率最高(0.003%),在在东北方向没有发生基因漂移。总漂移率最高在东东南方向为 0.03%。整个南方花粉漂移共计 19 处高于北方 13 处,结合石家庄气象资料(表 3),在花期的 20 d 内,东东北风为 4 d,北风为 6 d,东北风为 2 d,北西北风的天数为 1 d,偏北风占据主导风向,

表 3 石家庄 2004 年 6 月 20 日至 7 月 10 日气象资料

Table 3 Meteorologic document of Shijiazhuang from 20 June to 10 July in 2004

日期 Date Month/Day	平均气温 Average temperature /℃	平均湿度 Average humidity /%	平均风速 Average wind /m·s ⁻¹	风向 Wind direction	日期 Date Month/Day	平均气温 Average temperature /℃	平均湿度 Average humidity /%	平均风速 Average wind /m·s ⁻¹	风向 Wind direction
6/21	27.4	68	1.6	S	7/1	22.8	84	2.2	S
6/22	25.8	65	2.2	NNE	7/2	28.4	66	1.9	N
6/23	25.1	79	1.6	SW	7/3	29.5	65	2.6	SE
6/24	24.5	78	2.3	N	7/4	26.7	77	1.9	N
6/25	25.9	76	1.1	S	7/5	26.5	68	2.2	N
6/26	27.2	78	1.4	NNE	7/6	28.6	61	1.6	NNW
6/27	29.0	71	1.7	SE	7/7	29.4	62	2.5	NE
6/28	30.5	66	1.7	NE	7/8	27.9	70	1.5	NNE
6/29	25.4	92	2.5	N	7/9	26.1	79	2.2	NNE
6/30	19.1	97	3.1	N	7/10	26.5	81	1.6	SSE

累计共 13 d,这可能是导致下风口南方的基因漂移分布多于北方的原因。

2.3 漂移率与隔离距离的关系

随着隔离距离的增加,漂移率整体呈下降趋势(图 3)。育成品种 ZZH015 在 5 m 处的漂移率最高,为 0.2%,而在 29 m 处锐减到 0.008%。半蔓生地方品种 DPZ722 的漂移率在 7 m 处最高,为 0.005%,在 29 m 处没有发生基因漂移。

不同距离和不同方向的漂移率进行分析显示(表 4),育成品种 ZZH015 的漂移率在不同方向间差异显著,半蔓生地方品种 DPZ722 在不同距离条件下的漂移率差异极显著。总漂移率在不同距离以

及不同方向间均有显著差异,表明漂移率与方向(即风向)及隔离距离有关。

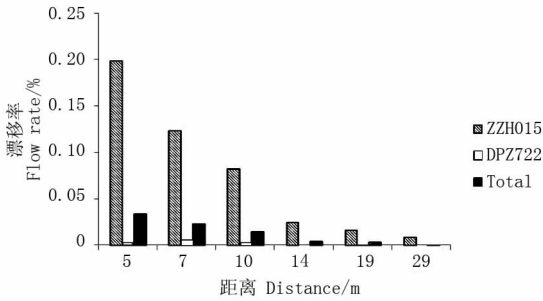


图 3 不同隔离距离的基因漂移率

Fig. 3 Gene flow frequency in different isolated distance

表 4 不同生长类型间漂移率在不同距离和不同方向间的方差分析结果

Table 4 Variance analysis of thegene flow frequency of different growth habits type in different distance and direction

变异来源 Source of Variation	自由度 Degree of freedom	ZZH015 漂移率		DPZ722 漂移率		总漂移率	
		Flow frequency of ZZH015		Flow frequency of DPZ722		Total flow frequency	
		均方 Mean square	F 值 F value	均方 Mean square	F 值 F value	均方 Mean square	F 值 F value
方向 Direction	7	0.0008	2.9 *	1.50E ⁻⁰⁷	1.73	2.30E-05	3.2 *
距离 Distance	5	0.0007	2.4	5.10E ⁻⁰⁷	5.5 *	2.10E-05	2.8 *
误差 Error	35	0.00028	—	9.10E ⁻⁰⁸	—	7.40E-06	—

* 代表在 0.05 水平上差异显著,** 代表在 0.01 水平上差异极显著。

* means the difference issignificant in 0.05 level, ** means the difference is extremely significant in 0.01 level.

3 讨 论

本研究对不同生长类型大豆品种的基因漂移率进行检测,由于花粉源为紫花、紫茎转基因大豆,三类受体材料均为白花、绿茎,因此,可借助茎色对发生基因漂移植株加以初步选择。在发现的 355 株紫茎植株中,经 PCR 检测阳性率为 95%。PCR 反应因设置了内标 *lectin* 和转基因对照,避免了假

阳性的产生。草甘膦喷洒紫茎植株,经分子检测为阳性的紫茎植株,表现为对草甘膦具有抗性,植株生长正常,而 PCR 鉴定为阴性的植株全部死亡。草甘膦抗性鉴定与 PCR 鉴定的阳性吻合率达 100%。在 17 株阴性单株中,有 16 株为育成品种 ZZH015,1 株为地方品种 DPZ722。推测阴性紫茎植株的存在有可能是由于机械混杂或其他人为因素所引起。

大豆作为自花授粉植物,也有一定的异交率。栽培大豆之间自然异交率通常低于 3.0%,当距离

花粉供体 4.6 m 时异交率极低^[9-10];野生大豆之间异交率为 2.4% ~ 19%^[11-12],而栽培大豆与不同野生大豆间的杂交率不同,在相距 0.5 m 时存在 0.73% 的异交率,在 5 ~ 25 m 处异交率为 0%^[13-14]。本研究中转基因大豆向非转基因大豆的漂移率均小于大豆之间的自然杂交率且小于转基因漂移阈值 1%。栽培大豆的漂移率远远大于野生大豆,推测可能是大豆不同进化类型的生物学特性差异造成的。例如本试验中育成品种 ZZH015 的花朵大于野生大豆,增加了花粉落到柱头上的几率。Zuo 等^[5]提出在水稻中花期相遇的持续时间是影响不同野生稻自然异交率的关键因素。本试验调整了不同生长类型大豆播种时间使花期最大限度相遇,为转基因大豆的异交传粉创造了有利条件。研究发现漂移率在不同方向及不同距离条件下差异均显著,结合当时的气象,分析天气对基因漂移的影响,发现风力是影响基因漂移的一个重要因素,同时证实基因漂移率随着隔离距离的增加而呈递减趋势。

我国是大豆的发源地,目前还没有种植转基因大豆,合理设置安全隔离距离对保护我国大豆种质资源具有重要作用。Abud 等^[15]对转 *EPSPS* 基因抗草甘膦大豆大田条件下向非转基因大豆的漂移情况进行研究,当距离转基因大豆花粉供体 1 m 处,漂移几率为 0.52%;当距离增至 10 m 时未检测到基因漂移。大田条件下,转基因大豆向非转基因大豆基因漂移的最远距离为 20 m^[16-17]。而本研究证明在距转基因大豆 29 m 处,在栽培大豆中检测到基因漂移植株,但漂移率小于阈值 1%,这为隔离带的设置提供了参考。值得一提的是,本研究在野生大豆中没有检测到天然异交植株,这可能与材料有关,但另一方面也说明转基因大豆向野生大豆基因漂移的几率微乎其微。

参考文献

- [1] James C. Executive summary: Global status of commercialized biotech/GM crops [R]. ISAAA Briefs No 43, 2011.
- [2] 奚亚军,马晓妮,刘曙东,等. 转 *P_{SAG12}-IPT* 基因小麦安全性的初步研究 [J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2004, 32 (12): 18-22. (Xi Y J, Ma X N, Liu S D, et al. Preliminary study on safety about transgenic wheat with *P_{SAG12}-IPT* gene [J]. Journal of Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forest (Natural Science Edition), 2004, 32 (12): 18-22.)
- [3] 汪越胜,覃建兵,李克秀,等. 转基因小麦环境释放中基因漂移研究 [J]. 华中科技大学学报 (自然科学版), 2004, 32 (12): 91-93. (Wang Y S, Qin J B, Li K X, et al. Assessment of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) by gene flow [J]. Journal of Huazhong University of Science and Technology (Nature Science Edition), 2004, 32 (12): 91-93.)
- [4] 渠开山. 富阳地区稻田杂草及抗除草剂转基因水稻 99-1 *bar* 基因漂移评价研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2004. (Qu K S. Weed survey in Fuyang paddy fields and *bar* gene flow of herbicide resistant rice 99-1 [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2004.)
- [5] Zuo J, Zhang L J, Song X L, et al. Innate factors causing differences in gene flow frequency from transgenic rice to different weedy rice biotypes [J]. Pest Management Science, 2011, 67 (6): 677-690.
- [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]. 中国油料作物学报, 2004, 26 (2): 89-91. (Chen X, Yan J Y, Gao B. Preliminary study on roundup ready soybean's round-up ready gene move to wild soybean [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2004, 26 (2): 89-91.)
- [7] 刘琦,李希臣,刘昭军,等. 抗草甘膦转基因大豆基因漂移的研究 [J]. 江苏农业学报, 2008, 24 (增刊): 84-87. (Liu Q, Li X C, Liu Z J, et al. Study on gene flow of roundup ready soybean with *CP4 EPSPS* [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Science, 2008, 24: 84-87.)
- [8] 吕山花,常汝镇,陶波,等. 抗草甘膦转基因大豆 PCR 检测方法的建立与应用 [J]. 中国农业科学, 2003, 36 (8): 883-887. (Lü S H, Chang R Z, Tao B, et al. Methodological research on PCR based detection of genetically modified soybean resistant to glyphosate [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2003, 36 (8): 883-887.)
- [9] Caviness C E. Estimates of natural cross pollination in Jackson soybeans in Arkansas [J]. Crop Science, 1966, 6 (2): 211-212.
- [10] Ahrent D K, Caviness C E. Natural cross-pollination of twelve soybean cultivars in Arkansas [J]. Crop Science, 1993, 34 (2): 376-378.
- [11] Kiang Y T, Chiang Y C, Kaizuma N. Genetic diversity in natural populations of wild soybean in Iwate Prefecture, Japan [J]. Journal of Heredity, 1992, 83 (5): 325-329.
- [12] Fujita R, Ohara M, Okazaki K, et al. The extent of natural cross-pollination in wild soybean (*Glycine soja*) [J]. Journal of Heredity, 1997, 88 (2): 124-128.
- [13] Nakayama Y, Yamaguchi H. Natural hybridization in wild soybean (*Glycine max* ssp. *soja*) by pollen flow from cultivated soybean (*Glycine max* ssp. *max*) in a designed population [J]. Weed Biology and Management, 2002, 2 (1): 25-30.
- [14] Kuroda Y, Kaga A, Tomooka N, et al. Gene flow and genetic structure of wild soybean (*Glycine soja*) in Japan [J]. Crop Science, 2008, 48 (3): 1071-1079.
- [15] Abud S, Souza P I M de, Vianna G R, et al. Gene flow from transgenic to non-transgenic soybean plants in the Cerrado region of Brazil [J]. Genetics and Molecular Research, 2007, 6 (2): 445-452.
- [16] Yoshimura Y, Matsuo K, Yasuda K. Gene flow from GM glyphosate-tolerant to conventional soybeans under field conditions in Japan [J]. Environmental Biosafety Research, 2006, 5: 169-173.
- [17] Yoshimura Y. Wind tunnel and field assessment of pollen dispersal in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] [J]. Journal of Plant Research, 2011, 124 (1): 109-114.