

从无芒稗花粉活力评价其与转基因抗除草剂水稻基因漂移的可能性

宋小玲, 强 胜*, 孙明珠

(南京农业大学杂草研究室, 江苏南京 210095)

摘 要: 为给转基因抗除草剂水稻和稗草间的基因漂移研究提供必要的信息, 探寻了无芒稗 (*Echinochloa crusgalli* var. *mitis*) 花粉活力及其测定的最佳方法, 并利用该方法测定了无芒稗开花盛期后离体和活体条件下不同时间的花粉活力。结果表明无芒稗开花盛期取样离体条件下花粉活力下降较快, 3 h 后花粉活力只有 5.41%, 活体条件下花粉活力下降较慢, 3 h 后仍有 17.31% 的花粉有活力。这说明无芒稗花粉在水稻开花时仍有部分保持活力, 因而存在潜在的基因漂移可能性。同时用最佳培养基法测定了不同条件处理下(紫外灯照射, 反复冻融, 黑暗放置)无芒稗花粉活力, 结果表明无芒稗花粉在不利环境条件下活力难以保持。

关键词: 无芒稗; 花粉活力; 抗除草剂转基因水稻; 潜在基因漂移

中图分类号: Q944 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2003)04-0343-04

Assessment on the possibility of gene flow between transgenic herbicide-resistant rice and *Echinochloa crusgalli* var. *mitis* from the pollen vitality of *E. crusgalli* var. *mitis*

SONG Xiao-ling, QIANG Sheng*, SUN Ming-zhu

(Weed Research Laboratory, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The optimal method for testing pollen vitality of *Echinochloa crusgalli* var. *mitis* was researched for providing useful information on gene flow between transgenic herbicide-resistant rice and *E. crusgalli* var. *mitis*. The vitality of pollen putting in natural environment after collection and collecting directly from spikes at different time were tested with the optimal culture medium. The results demonstrated that the vitality of pollen putting in natural environment after collection decreased quickly at different time. And at 3 h after collecting pollen vitality only were 5.41%. The vitality of pollen collecting from spikes directly decreased slower than the former. At 3 h after anthesis, the pollen vitality was still 17.31%. This showed the pollen of *E. crusgalli* var. *mitis*. could keep vitality when rice were blooming. The possibility of potential gene flow could exist between transgenic herbicide-resistant rice and *E. crusgalli* var. *mitis*. The pollen vitality of *E. crusgalli* var. *mitis*. were tested under different conditions (by irradiated under ultraviolet radiation, by repeated freezing and thawing and by put in dark condition). The results showed that it is difficult to keep the pollen vi-

收稿日期: 2002-11-15 修订日期: 2003-02-20

基金项目: 国家科技部转基因专项基金(E200102); 国家自然科学基金(30170164); 国家教育部博士点基金(2000030708)资助项目。

作者简介: 宋小玲(1969-), 女, 内蒙古乌蒙人, 博士生, 主要从事抗除草剂转基因作物安全性评价的方法研究。* 为通讯联系人

tality under adverse condition.

Key words: *Echinochloa crusgalli* var. *mitis*. ; pollen vitality; transgenic herbicide-resistant rice; potential gene flow

随着基因工程的发展,抗除草剂转基因作物的种植也愈加普遍,但同时人们也十分关注转基因抗性作物与野生近缘种之间基因交流,一旦两者发生了稳定的基因交流和基因渗入,将会使抗性作物杂草化或使近缘种携带抗性基因,而给生态环境带来潜在的破坏(Kling, 1996; 钱迎倩等, 1999; 魏伟等, 1999)。因此在抗除草剂转基因作物田间释放前对其潜在的基因漂移作出正确的评估是很必要的。虽然稗草和水稻分属稗属(*Echinochloa*)和稻属(*Oryza*),因稗草在稻田的广泛分布和繁殖量大及危害重,且对水稻有很强的拟态性(Barrett, 1983),人们对两者间能否发生基因交流非常关心。许多研究者(Dale, 1992; Scheffler 等, 1994; Snow 等, 1999)认为抗除草剂转基因作物和野生近缘种成功的基因漂移依赖于作物和接受种之间的有性亲和性,相一致的开花期,在空间上有足够近的距离,使可育花粉转移到接受种的柱头上以及杂交后代和随后后代的可育性和繁殖能力。这些条件中许多是可以满足的。虽然研究证明了稗草与水稻存在一定的花时不遇(宋小玲等, 2002),但如果稗草花粉活力能够延时,则有发生相遇的可能性。相关研究尚未见报道。本研究旨在明确在水稻开花时稗草的花粉活力,进一步确证抗除草剂转基因水稻和稗草间的基因漂移可能性。

1 材料与方 法

1.1 材料

稗草为南京稻田常见种无芒稗。种子采集于南京农业大学网室 2001 年种植的稗草,于 2002 年 4 月底至 6 月底每隔 15 d 播种 1 批。

1.2 方法

为确保所取花粉为当日的新鲜花粉,在测定的前天下午把准备取样的稗穗轻轻拍打,抖落残余花粉。花粉的取样分抖落花粉和新鲜花粉两种。抖落花粉每处理选处于盛花期的无芒稗 30 株,每 10 株为 1 组,根据实验需求轻轻拍打稗穗抖落花粉;新鲜花粉取样时把载玻片置于正在开放的稗穗小花下,待花药自然散粉后立即测定,每处理从 3 株不同的

稗株上取样。所采集的花粉重复测定 5 次,每次不少于 500 粒花粉。不同条件处理对无芒稗花粉活力的影响研究中只采用盛花期的抖落花粉。所有花粉活力的观察都在装有测微尺的显微镜下进行并测量花粉管长度,以花粉管长度超过花粉直径的 1.5 倍为萌发。数据经 SPSS 统计软件统计分析。

1.2.1 无芒稗花粉活力的测定方法 (1)染色法。联苯胺染色法:参照胡晋等(1996)方法,染色液成分为 A 液:0.5%联苯胺溶液;B 液:0.5% α -萘酚溶液;C 液:0.25%碳酸钠。将 A、B、C 三液等体积混合作为 I 液,0.3% H_2O_2 作为 II 液,使用时在载玻片上放少量待测花粉,滴 I 液 1~2 滴,再滴上 II 液 1~2 滴。TTC 染色法:参照胡晋等(1996)和胡适宜(1993)方法,称取 0.5 g TTC 用 100 mL pH7.0 磷酸缓冲液配成 0.5%浓度的溶液。使用时在载玻片上放少量待测花粉,滴 1~2 滴 TTC 染色液,即放入垫有湿润滤纸的培养皿中,加盖后放入 37 °C 培养箱中黑暗培养。

联苯胺染色法立即在显微镜下观察花粉染色情况,TTC 染色片 20 min 后镜检。用染色法测定从花药中散落的花粉活力和从稗穗上抖落的花粉离体条件下放置 1~3 h 的无芒稗花粉活力。

(2)培养基培养测定法。培养液蔗糖浓度的确定:设 10%,15%,20%,30%,40%共 5 个的蔗糖浓度,观察从花药中散落的花粉在不同蔗糖浓度中的反应,确定最适蔗糖浓度。培养基的确定:参照胡适宜(1993)方法,设最适蔗糖浓度+10%营养液(硼酸 0.1 g,硝酸钙 0.3 g,硫酸镁 0.2 g,硝酸钾 0.1 g,蒸馏水 100 mL,下同),最适蔗糖浓度+10%营养液+30mg/kg GA_3 ,最适蔗糖浓度+10%营养液+30mg/kg GA_3 +1%琼脂共 3 种培养基。比较从花药中散落的无芒稗花粉和从稗穗上抖落的花粉在三种培养基上的萌发情况,确定最适培养基。液体培养基首先在干净的载玻片上滴 1~2 滴培养液,再把所测花粉均匀散布在上面,为防止水分的蒸发,需把制好的载玻片放入垫有湿润滤纸的培养皿内;固体培养基现配现用,把配制好的固体培养基均匀涂布在灭菌的载玻片上,待冷却后再把待测花粉均匀散布在上面。之后置于 30 °C 环境下培养 40 min 后观

察。

1.2.2 无芒稗花粉活力的测定 每日 6:30 无芒稗开花高峰期从开花的稗穗上轻轻拍打抖落花粉,于取样后 0,30 min,1 h,2 h,3 h,用最佳培养基测定花粉活力。并于无芒稗开花高峰期后 0,30 min,1 h,2 h,3 h 后轻轻拍打抖落花粉,用最佳培养基测定花粉活力,比较无芒稗花粉离体和活体条件下的活力。无芒稗花粉在培养基上置于 30 °C 环境下培养 40 min,之后观察。

1.2.3 影响无芒稗花粉活力的因素 (1)紫外灯照射。采集无芒稗新鲜花粉,部分立即测定花粉活力,部分置于 20 w 紫外灯下分别照射 5 min 和 6 min,之后测定花粉活力。(2)反复冻融。在当日无芒稗盛花期用铺有一层氯化钙和滤纸的培养皿采集稗草花粉,部分用于测定花粉活力,部分立即放入冰箱中冷冻 30 min,30 min 后再置于自然条件下融化 30 min,反复进行 1~6 次。之后立即测定花粉活力,确定不同冻融次数后无芒稗花粉活力。(3)黑暗放置。于无芒稗开花盛期用培养皿采集花粉,部分用于测定花粉活力,部分用黑色纸包裹,放置于黑暗地

方,分别于放置 1、2、3 d 测定花粉活力。

2 结 果

2.1 无芒稗花粉活力的测定方法

2.1.1 染色法 用联苯胺染色法测定无芒稗花粉活力,无论新鲜的还是放置一定时间的花粉,都能被染色成蓝褐色,虽然颜色深浅有一定差异,但不明显,不能很好地用来判断花粉活力。

表 1 稗草花粉萌发最适蔗糖浓度的筛选

Table 1 The selection of optimal sugar concentration for pollen germination of *E. crusgalli* var. *mitis*

蔗糖浓度 Sugar concentration (%)	内容物外溢或花粉破裂百分率 The percent of pollen overflowing their inclusions or pollen splitting (%)			
	处理 1 Treatment 1	处理 2 Treatment 2	处理 3 Treatment 3	平均 Average
10	52.12	49.32	55.68	52.37ABb
15	29.12	30.56	32.96	30.88Cb
20	5.53	6.89	4.92	5.78De
30	40.23	45.12	44.13	43.16aBc
40	59.27	58.74	61.33	59.78Aa

表 2 不同培养基上无芒稗花粉萌发率

Table 2 Pollen germination rate of *E. crusgalli* var. *mitis* at different culture mediums

培养基 Culture medium	从花药中散落的花粉 Pollen scattering from anthers				稗穗上抖落花粉活力 Pollen falling from spikes by flapping			
	处理 1 Treatment 1	处理 2 Treatment 2	处理 3 Treatment 3	平均 Average	处理 1 Treatment 1	处理 2 Treatment 2	处理 3 Treatment 3	平均 Average
I	16.78	19.56	23.36	19.90Aa	15.54	16.12	20.54	17.40Bb
II	26.29	30.02	29.79	28.70Bb	19.65	18.97	25.13	21.25Bb
III	69.58	72.13	71.89	71.20Cc	54.23	51.69	63.16	56.36Aa

注: I: 20%蔗糖+10%营养液; II: 20%蔗糖+10%营养液+30 mg/kg GA₃; III: 20%蔗糖+10%营养液+30mg/kg GA₃+1%琼脂。
Note: I: 20% sugar+10% nutritional liquid; II: 20% sugar+10% nutritional liquid+30 mg/kg GA₃; III: 20% sugar+10% nutritional liquid+30 mg/kg GA₃+1% agar.

用 TTC 染色法测定无芒稗花粉活力,培养 20 min 后,无论新鲜的还是放置一定时间的花粉,着色都不明显,但随着在空气中放置时间的延长又全部着色,因此两种染色法不适合测定无芒稗花粉活力。
2.1.2 最适蔗糖浓度的确定 蔗糖是起维持渗透压作用的,不同植物的花粉对蔗糖浓度的要求不一致,过高或过低都不能使花粉正常萌发。研究结果表明 10%和 15%的浓度下花粉出现了内容物的外溢,30%和 40%浓度下出现了花粉破裂现象,都不是无芒稗花粉适合萌发的最适浓度。20%的蔗糖浓度适合无芒稗花粉的萌发(表 1)。

2.1.3 培养基的确定 不同取样方式的无芒稗花粉在三种培养基上虽都有一定比例的萌发,但在不同

培养基上萌发比例相差较大,其中 20%蔗糖+10%营养液的萌发比例最差,20%蔗糖+10%营养液+30 mg/kg GA₃ 的萌发率居中,而固体培养基的效果最好(表 2)。因此以 20%蔗糖+10%营养液+30 mg/kg GA₃+1%琼脂为测定无芒稗花粉活力的培养基。虽然不同培养基无芒稗花粉萌发率不同,但在花粉管的长度基本一致,长度从 1 500~5 500 μm,平均 3 150 μm。

2.2 无芒稗花粉活力的测定

在无芒稗开花高峰期从稗穗上轻轻抖落的花粉在离体条件下花粉活力有明显下降,从 56.36%,下降到 3 h 后的 5.41%,而开花高峰期后不同时间从活体取样得到的花粉活力测定结果来看,从

56.36%下降到3h的17.31%下降幅度没有取样后离体条件下的快(图1)。这说明在自然状态下无芒稗花粉活力可以延时,在开花高峰期后3h仍有近20%的花粉具有活力。而据观察转基因水稻在晴天9:30时,有少部分小花的颖壳已张开,这样仍可能无芒稗有活力的花粉会漂移到转基因水稻柱头上,存在潜在的基因漂移风险性。

2.3 影响无芒稗花粉活力的因素

2.3.1 紫外灯照射法 无芒稗花粉在盛花期采集,有54.12%的花粉可以萌发生长,照射5min有个别花粉可以正常萌发生长,萌发率为0.40%,照射6min则没有花粉萌发生长。

2.3.2 反复冻融法 无芒稗花粉在盛花期采集,有59.20%的花粉可以萌发生长,经反复冻融1~6次所测定的所有花粉未见萌发。

2.3.3 黑暗放置法 无芒稗花粉在盛花期采集,有56.24%的花粉可以萌发生长,经黑暗放置1~3d后,所测定的花粉都未见萌发。

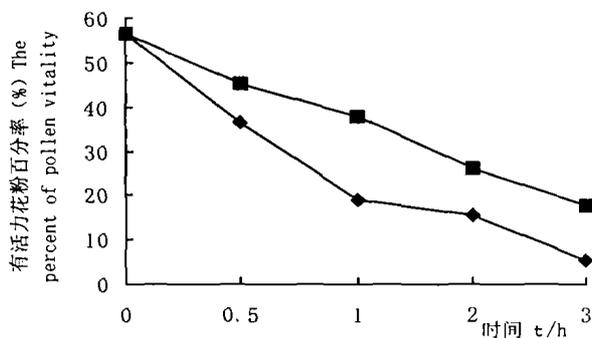


图1 不同时间稗草花粉活力

Fig. 1 The pollen vitality of *E. crusgalli* var. *mitis* at different time

◆—无芒稗开花取样后不同时间的花粉活力

The vitality of pollens after collectin at different times;

■—无芒稗开花后不同时间取样的花粉活力

The vitality of pollens collecting after anthesis at different times.

3 讨论

(1)花粉活力测定的方法主要有染色法和培养基培养法。染色法中主要有联苯胺染色法和氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法,染色法测定花粉活力,往往被染色的花粉百分率高于花粉实际的存活率。而且各种方法都有缺陷,TTC法对实验的温度、光

照要求严格,必须在一定的温度下黑暗进行,且随着时间的延长,由于空气中氧的作用使花粉染色变红,无生活力而有内含物的花粉也会变红(胡晋,1996)。而联苯胺法对不同的植物花粉染色深浅不同,且对不同植物有活力的花粉和没有活力的花粉着色差异很大,有时对一种植物而言被染色的为有活力的,有时对另外一种植物则不被着色的为有活力的(Richards,1997)。在本实验中用染色法测定无芒稗花粉活力,均未取得满意的结果。改用培养基培养法能得到满意的结果。

(2)花粉生活力的长短一方面是由遗传基因决定;另一方面也受环境的影响。根据系统的研究,普遍认为2-细胞型花粉的生活力较3-细胞型的高(Richards,1997;胡适宜,1987)。禾本科植物大多为3-细胞花粉,其外壁较薄,对干燥敏感,对外界不良条件抵抗力差,因而寿命短。无芒稗花粉活力测定结果表明在采集后不经任何处理的离体条件下其活力下降很快,3h后花粉活力只有5%左右。而开花高峰期后不同时间活体花粉活力则可以维持一定时间,3h后仍有17.31%的花粉活力,这可能和花粉在花药的特定环境中受到一定的保护有关。在不良环境条件下,无芒稗花粉活力难以保持。从这一角度来讲即使在9:30时无芒稗花粉仍有部分保持活力,但一旦进入自然环境中,受到外界条件的影响,例如紫外线照射,其活力下降的非常快,发生基因漂移的可能性也会减小。

(3)从测定结果来看,在自然状态下,在9:30左右无芒稗花粉还有近20%的活力,而这时水稻也开始开花,所以无芒稗花期与水稻花期仍然可以相遇,因而存在潜在基因漂移的危险。

参考文献:

- 胡适宜. 1987. 被子植物胚胎学[M] 北京: 高等教育出版社, 12, 54-58.
- Barrett SCH. 1983. Crop mimicry in weeds[J]. *Economic Botany*. 37(3): 25-282.
- Dale PJ. 1992. Spread of engineered genes to wild relatives [J]. *Plant Physiol*, 100: 13-15.
- Hu J(胡晋), Guo CG(郭长根). 1996. Studies on the crypreservation(-196 °C) pollen of restoring line in hybrid rice(超低温(-196 °C)保存杂交水稻恢复系花粉的研究) [J]. *Acta Agronomica Sinica*(作物学报), 22(1): 72-77.

(下转第342页 Continue on page 342)

击后再处理 24 h 可以提高转化效率。可能是由于高渗处理使细胞质壁分离,从而减轻轰击时钨粉对细胞的伤害(徐子勤,2001)。

参考文献:

- 金冬雁,黎孟枫. 1992. 分子克隆实验指南(第2版)[M]. 北京:科学出版社,26—27.
- Bower R, Birch R G. 1992. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment [J]. *Plant Journal*, 2: 409—416.
- Christou P, Ford T L, Kofron M. 1991. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) Plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos[J]. *Bio/Tech*, (9): 957—962.
- Malhotra S D. 1994. Biotechnology and Sugarcane[J]. *Sugar Cane*, (3): 2—4.
- Maretzki A, Sun SSM, Nagai C, et al. 1990. Development of a transformation system for sugarcane[J]. *Proc Int Assoc Plant Tissue Cult*, 8: 68.
- Qin XM(秦新民), Gao CW(高成伟), Li CY(李春瑶), et al. 1999. Transformation of bacillus thuringiensis Cry IB gene of *B. campestris* L. ssp. *Chinensis* (L.) Makina var. *Commanis* Tsen et Lee(小白菜苏云金芽孢杆菌 Cry IB 基因的遗传转化)[J]. *Journal of Guangxi Normal University*(广西师范大学学报), 17(3): 77—82.
- Robert Bower, Robert G Birch. 1992. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment [J]. *The Plant Journal*, 2(3): 409—416.
- Vaisil IK, Vasil V. 1999. Transformation of wheat via particle bombardment[J]. *Methods in Molecular Biology*, 111: 349—358.
- Wan Y, Witholdm JM, Lemaux PG. 1995. Type I callus as a bombardment target for generating fertile transgenic maize(*Zea mays* L.)[J]. *Planta*, 196: 7—14.
- Xu ZQ(徐子勤). 2001. Transgenic Researches of Important Cereal Species(重要禾谷类植物转基因研究)[J]. *Progress in Biotechnology*(生物工程进展), 21(1): 59—74.
- Zhang SZ(张树珍), Zheng XQ(郑学勤). 2001. Genetic Transformation of Sugar cane Via Microprojectile Bombardment(基因枪介导甘蔗遗传转化研究初报)[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*(热带作物学报), 3: 35—41.
- Hu SY(胡适宜). 1993. Experimental methods in plant embryology(I) determination of pollen viability(植物胚胎学实验方法(一)花粉生活力的测定)[J]. *Chinese Bulletin of Botany*(植物学通报), 10(2): 60—62.
- Kling J. 1996. Could transgenic super crops one day breed super weeds? [J]. *Science*, 274: 180—181.
- Qian YQ(钱迎情), Wei W(魏伟), Tian Y(田彦), et al. 1999. Application and potential problems of transgenic crops(转基因作物在生产中的应用及某些潜在问题)[J]. *Chin J Appl Environ Biol*(应用与环境生物学报), 5(4): 427—423.
- Richards AJ. 1997c. *Plant Breeding System*[M]. London: Chapman and Hall.
- Schefler JA, Philip JD. 1994. Opportunities for gene transfer from transgenic oilseed rape(*Brassica napus*) to related species[J]. *Transgenic Research*, 3: 263—278.
- Snow AA, Anderson B, Jorgensen RB. 1999. Costs of transgenic herbicide resistance introgressed from *Brassica napus* into weedy *B. rapa*[J]. *Molecular Ecol*, 8: 605—615.
- Song XL(宋小玲), Qiang S(强胜), Xu YH(徐言红), et al. 2002. Biological characters of anthesis *Echinochloa* spp. (稗类植物的开花生物学特性)[J]. *Journal of Plant Resources and Environment*(植物资源与环境学报), 11(3): 12—15.
- Wei W(魏伟), Qian YQ(钱迎情), Ma KP(马克平). 1999. Gene flow between transgenic crops and their wild related species(转基因作物与野生亲缘种间的基因流)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), 41(4): 343—348.

(上接第 346 页 Continue from page 346)