

用荧光显微镜技术观察药用野生稻 (*Oryza officinalis* Wall) 和转基因水稻的不亲和性

刘琳莉, 强 胜, 宋小玲, 胡金良

(南京农业大学杂草研究室, 南京 210095)

摘要: 采用荧光显微镜技术观察转基因水稻花粉在药用野生稻柱头上的萌发及在花柱内的生长过程, 以明确两者之间不亲和性发生的阶段, 为判断其能否发生基因漂流提供依据。结果表明, 两种转基因栽培稻 (Y003 和 99t) 的花粉在药用野生稻柱头上的萌发率均比药用野生稻自花授粉的低, 花粉管在花柱中的生长速度较慢, 且分别在到达花柱中部 (Y003) 或花柱基部 (99t) 时停止生长, 顶端异常膨大, 杂交子房逐渐萎缩, 结实率为 0。药用野生稻与栽培稻杂交不亲和的原因是花粉管在花柱中停止生长、不能进入胚囊完成受精, 在自然条件下转基因栽培稻中的外源基因向药用野生稻漂流的可能性较小。

关键词: 荧光显微镜技术; 药用野生稻; 转基因水稻; 杂交不亲和性; 基因漂流

Observation of the Sexual Incompatibility Between Wild Rice (*Oryza officinalis* Wall) and Transgenic Rice by Fluorescence Microscope

LIU Lin-li, QIANG Sheng, SONG Xiao-ling, HU Jin-liang

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

Abstract: The germination of pollen grains of transgenic rice on the stigma of wild rice (*Oryza officinalis* Wall) and the pollen tube growth in the style of it were observed with fluorescence microscopy in order to find out the cause of incompatibility between them, and offer general message for evaluation of gene flow. The results showed that the germination rate of pollen grains of both transgenic rice (Y003 and 99t) on the stigma of *O. officinalis* was lower than self-pollination, the pollen tubes grew also more slowly and stopped growth when they get to the middle part (Y003) or base (99t) of the style of wild rice and their terminal swelled. Meantime, the ovary of wild rice after cross shrank gradually, and the setting rate was zero. From above results, it could be concluded that the reason of sexual incompatibility was that the pollen tubes of rice stopped growth in the style of wild rice, and couldn't enter the ovary and finally fertilization took place, so possibility of gene flow between them would be low in nature.

Key words: Fluorescence microscopy; Wild rice (*Oryza officinalis* Wall); Transgenic rice (*Oryza sativa* L.); Sexual incompatibility; Gene flow

转基因植物环境释放可能产生的诸如杂草化、生态入侵、基因漂移和影响生物多样性等环境问题已受到广泛关注^[1~5]。目前, 如何科学地评估转基因植物环境释放的风险, 已成为国际生物安全领域最重要的研究主题之一^[6~11]。人们担心抗除草剂转

基因植物释放后, 会通过花粉漂流将外源基因转移到野生近缘种中^[12], 对农田生态环境造成潜在危害。通过人工授粉进行杂交, 研究转基因植物与其野生近缘种是否具有亲和性, 将为其风险评估提供最直接的证据。

收稿日期: 2003-06-10

基金项目: 国家科技部转基因专项基金资助项目 (E200102) 和国家自然科学基金资助项目 (30170619)

作者简介: 刘琳莉 (1977-), 女, 陕西西安人, 主要从事抗除草剂转基因作物安全性评价方法研究。强 胜为通讯作者, Tel: 025-84395117; E-mail: wrl@njau.edu.cn

杂交亲和性的障碍可能发生在生殖过程的不同阶段^[13],如花粉管不能萌发、不能进入柱头、不能到达子房、不能座果或种子发育不良及杂种死亡或不育。寻找简单、快速检测其不亲和阶段的方法,特别是杂交早期的不亲和性观察研究,将为风险评估提供有力的支持。杂交不亲和的第一个阶段,即花粉管能否萌发和到达柱头,用普通显微镜观察即可得到较为满意的结果,而其第二个阶段即花粉管能否进入子房,因花粉管生长在花柱组织内而难以观察,所以必须寻找新的检测方法。

荧光显微镜技术20世纪初已开始应用,后来发明的荧光染料大大促进了它的扩大应用^[14,15],在植物胚胎学研究中显示了极大的优越性。荧光染料水溶性苯胺蓝脱色(碱性)溶液,可与花粉管的胼胝质特异性结合,在356 nm左右紫外光激发下呈明亮的黄绿色,而花柱和子房组织的自发弱荧光呈较暗的颜色,花粉管、花柱和子房组织反差明显极易区分^[16,17],便于确定花粉管在花柱中的位置,对于判断不亲和性的第二阶段十分方便和有效。

药用野生稻是我国的3种野生稻之一,研究栽培稻中的转入基因是否会漂流到药用野生稻中有一定的意义。先前研究已经表明,转基因栽培稻和药用野生稻通过人工授粉杂交不能结实^[18],但其不亲和性究竟发生在生殖过程的哪一阶段,尚不清楚。用普通光学显微镜,可以观察到转基因栽培稻的花粉可以在药用野生稻的柱头上萌发并进入柱头,表明不亲和性不在花粉管萌发和穿过柱头这一阶段。笔者应用荧光显微镜技术,进一步确定杂交不亲和发生的阶段,为转基因水稻基因漂移的安全性评价提供更直接的证据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

转 *bar* 基因水稻的两个粳稻品种 Y003 和 99t 与药用野生稻 (*Oryza officinalis* Wall) 由中国水稻研究所提供。

1.2 方 法

试验于2001年6~8月在南京农业大学网室和实验室进行。6月8日将药用野生稻移栽于钵钵内,7月8日成活后,每日8:00~17:00照光^[19],促进花芽分化和开花。8月6日药用野生稻始花后分别进行如下试验。

1.2.1 药用野生稻的去雄 利用真空泵抽气去雄。

去雄后,部分取柱头,临时制片后观察柱头上是否有花粉粒;部分不授粉,套袋,7d后检验去雄率;部分于第2天开花高峰期授粉并套袋,7d后检验结实率。每处理不少于150朵小花。

1.2.2 取样 药用野生稻自花授粉和药用野生稻去雄后分别授供体水稻花粉,分别取授粉后0.5、1、1.5、2、3、5、8、10、24、48、72h的小花,用FAA固定液固定。

1.2.3 结实率观察 药用野生稻去雄后分别授供体水稻花粉,每处理各800朵颖花,授粉后套袋观察结实率。

1.2.4 荧光显微镜观察 从不同阶段的固定材料中剥取雌蕊,用5% KOH 软化和透明40 min,漂洗,依 Kho 和 Baer 的方法^[15],以0.1% 苯胺蓝(0.033 mol·L⁻¹ K₃PO₄ 溶液配制)染色约3 h以上,压片后用 Olympus BHF 荧光显微系统对花粉粒在柱头上的萌发及花粉管在雌蕊组织中的生长进行观察并摄影。

2 结果与分析

2.1 真空泵抽气去雄

药用野生稻经真空泵抽气去雄后,170朵颖花的柱头上未见有花粉粒,238朵去雄后不授粉套袋的颖花没有结籽,表明去雄达100%;药用野生稻自花授粉后套袋的189朵颖花中,171朵结籽,结实率为90.5%,说明抽气去雄基本没有伤害柱头。

2.2 花粉萌发率

药用野生稻自花授粉0.5h后柱头上的花粉粒已有60%萌发,授粉后1h,90%以上的花粉萌发,萌发率比用普通显微镜观察结果要高^[18],这可能是因为荧光显微镜观察更清楚和明显。

两种转基因水稻花粉均能在药用野生稻柱头上萌发并穿入柱头,授粉0.5h萌发的花粉为40%左右,至5h,穿过柱头的花粉粒百分率随时间增长而有所增加,达到60%左右(图1)后停止。

2.3 花粉管生长速率

药用野生稻自花授粉0.5h花粉管多数达花柱之1/2(图版-1);授粉1h花粉管生长十分整齐,90%以上穿过柱头进入花柱,大多数到达或接近子房并有条数花粉管到达珠孔(图版-2);授粉5h花粉管到达胚珠(图版-3)。药用野生稻授Y003的花粉,0.5h花粉管到达柱头羽状分枝处(图版-4),1h到达花柱上部(图版-5),5h到达花柱下部,花粉管顶端膨大,停止生长(图版-6);授99t的花粉,

花粉管生长速度比 Y003 略快(图版-7, 8), 5 h 后到达花柱基部, 顶端也膨大并停止生长(图版-9)。药用野生稻自花授粉和去雄后授 Y003 和 99t 的花粉生长速率比较见图 2。

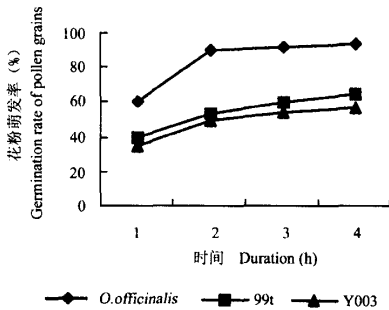
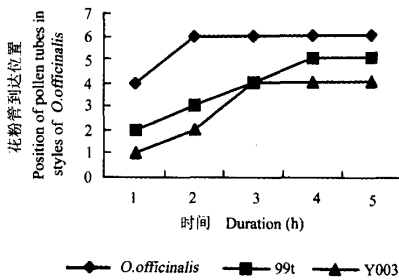


图1 花粉萌发率

Fig.1 Rate of pollen germination



花粉管到达位置: 1. 柱头羽状分枝; 2. 花柱上部; 3. 花柱中部; 4. 花柱下部; 5. 花柱基部; 6. 子房

Positions of pollen tubes reached into styles of *O. officinalis*: 1. Penniform branch of stigma; 2. The top of stigma; 3. The middle of stigma; 4. The lower part of stigma; 5. The base of stigma; 6. Ovary

图2 花粉管生长速度

Fig.2 Speed of pollen tube growth

2.4 药用野生稻授转基因水稻花粉后的结实率

药用野生稻去雄授 Y003 和 99t 花粉, 分别处理 988 和 873 朵颖花, 结实率均为 0, 杂交不能产生种子。

3 讨论

3.1 荧光显微观察只需用一种染料整染, 软化及染色仅几小时, 观察效果好, 很适合检查花粉管生长到子房的过程, 因而是一种简单、快速的方

法, 可作为评判有性亲和性的重要依据。但该染色法无法区分自身花粉和外来花粉, 只能在确保去雄率达到 100% 时, 才能做出有效判断, 所以若能找出特异标记的染料或先对父本花粉活体标记的方法, 将可省去去雄这一步骤, 且与母本自身花粉混合授粉更接近自然条件。

3.2 转基因栽培稻的花粉虽能在药用野生稻柱头上萌发生长并进入柱头, 但最终没有杂交种产生, 这与两者的亲缘关系较远有关。药用野生稻(基因组为 CC 型)与栽培稻(AA 型)分属不同的基因组型, 亲缘关系较远^[20, 21], 但经形态学、细胞遗传学及分子生物学研究表明, 药用野生稻与栽培稻有较大的相似性, 说明它们有一定的亲缘关系^[22]。许多育种方面的研究以栽培稻为母本药用野生稻为父本进行人工杂交, 辅以胚胎拯救获得杂交种^[23]; 也有以雄性不育系为母本不经幼胚培养获得杂种的报道^[24]。本试验为研究栽培稻转基因向药用野生稻的漂移, 以药用野生稻为母本, 其亲缘关系可能仍是导致杂交不结实的主要原因。但杂交不亲和障碍可能发生在授粉后到胚胎发育成熟间的各个阶段, 此前一直没有探明这种不亲和性发生在什么时期。

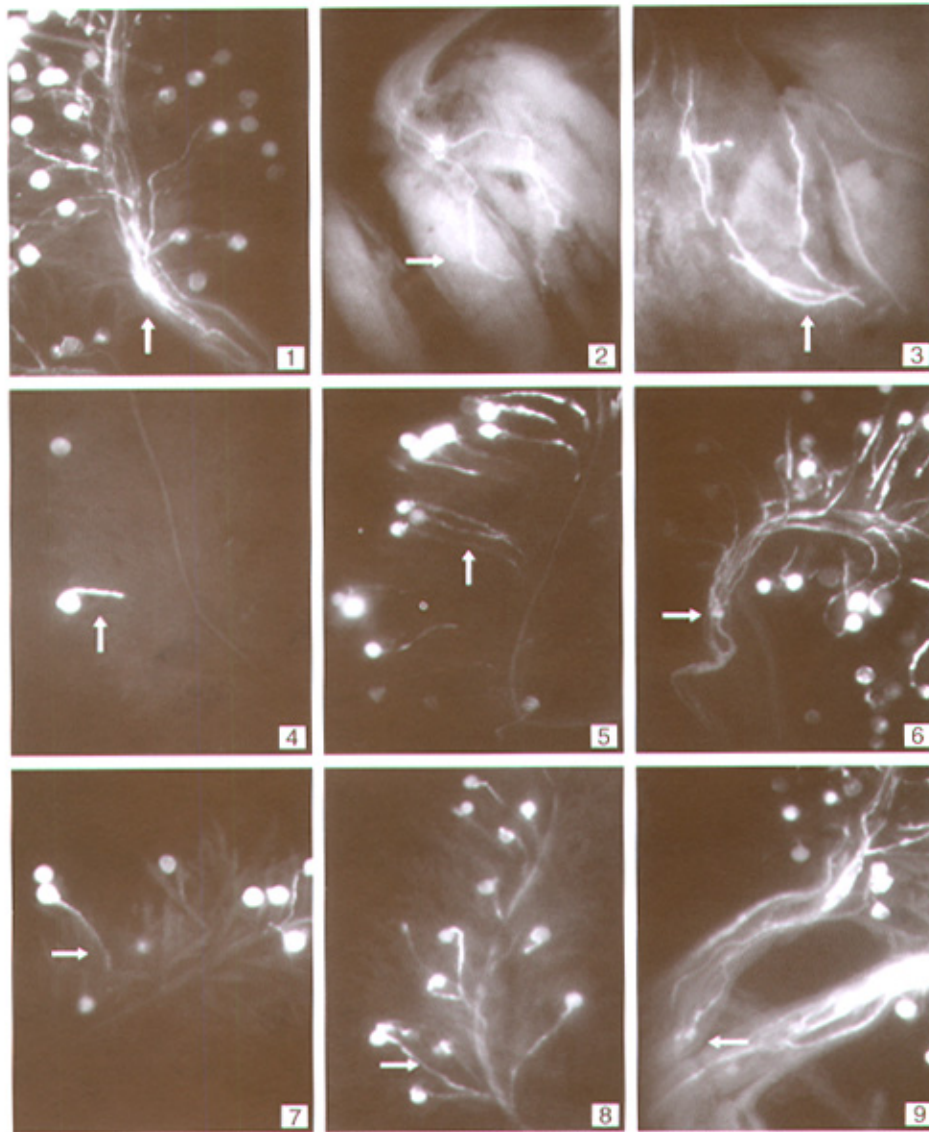
通过荧光显微镜观察, 转基因栽培稻的花粉在药用野生稻的柱头上基本上能正常萌发生长, 但花粉管生长速度明显变慢, 到达花柱基部则停止生长, 花粉管顶端异常膨大, 最终没有结实, 这说明两者的不亲和性主要是花粉管在花柱中生长受阻, 不能到达子房完成受精, 不能产生种子发生基因漂流。上述结果说明栽培稻中的转基因向药用野生稻漂移的可能性较小, 因为两性配子的结合是实现基因转移的重要条件。但这一结果只能从普通的生物学角度说明它们存在不亲和性, 而不亲和的程度有多高, 是否可能随着环境条件的改变或其它偶然因素克服这一阶段的障碍而发生基因漂流, 都有待进一步研究。

References

- [1] Snow A A, Palma P M. Commercialization of transgenic plants: potential ecological risks. *BioScience*, 1997, 47 (2):86-96.
- [2] Ellstrand N C, Hoffman C A. Hybridization as avenue of escape for engineered genes. *BioScience*, 1990, 40:438-442.
- [3] Rogers H J, Parkes H C. Transgenic plants and the environment. *Journal of Experimental Botany*, 1994, 46(286): 467-488.
- [4] 樊龙江, 周雪平. 转基因植物的基因漂流风险. 应用生态学报,

- 2001, 12(4):630-632.
- Fan L J, Zhou X P. Gene dispersal risk of transgenic plant. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2001, 12(4): 630-632. (in Chinese)
- [5] 钱迎倩, 田彦, 魏伟. 转基因植物的生态风险评价. 植物生态学报, 1998, 22(4): 289-299.
- Qian Y Q, Tian Y, Wei W. Ecological risk assessment of transgenic plants. *Acta Phytocologica Sinica*, 1998, 22(4): 289-299. (in Chinese)
- [6] Messegue J, Fogher C, Guiderdoni E, Marfà V, Català M M, Baldi G, Melé E. 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*, 2001, 103:1151-1159.
- [7] Lefol E, Fleury A, Darmency H. Gene dispersal from transgenic crops II. hybridization between oilseed rape and the wild hoary mustard. *Sex Plant Reproduce*, 1996, 9: 189-196.
- [8] Lavigne C, Klein E K, Couvet D. Using seed purity data to estimate an average pollen mediated gene flow from crops to wild relatives. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 104:139-145.
- [9] Hancock J F. A framework for assessing the risk of transgenic crops. *BioScience*, 2003, 53: 512-519.
- [10] Ritala A, Nuutila A M, Aikasalo R, Kauppinen V, Tammissola J. Measuring gene flow in the cultivation of transgenic barley. *Crop Science*, 2002, 42(1): 278-285.
- [11] Desplanque B, Boudry P, Broomberg K, Saumitou-Laprade P, Cuguen J, Dijk H V. Genetic diversity and gene flow between wild, cultivated and weedy forms of *Beta vulgaris* L. (Chenopodiaceae), assessed by RFLP and microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, 98:1194-1201.
- [12] Rieger M A, Lamond M, Preston C, Powles S B, Ruash R T. Pollen-mediated movement of herbicide resistance between commercial canola field. *Science*, 2002, 296:2386-2388.
- [13] 孟金陵, 刘定富, 罗鹏. 植物生殖遗传学. 北京: 科学技术出版社, 1995:296-307.
- Meng J L, Liu D F, Luo P. *Plant Reproductive Genetics*. Beijing: Science Press, 1995: 296-307. (in Chinese)
- [14] Martin F W. Stain and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technology*, 1959, 34:125-128.
- [15] Philbrick C T. Pollen tube growth within vegetative tissues of Callitriche (Callitrichaceae). *American Journal of Botany*, 1984, 71(6):882-886.
- [16] 王金平. 矮慈菇人工授粉后花粉管生长的荧光显微观察. 信阳师范学院学报(自然科学版), 1999, 12(2):185-189.
- Wang J P. An observation of pollen tube growth after artificial pollination in *Sagittaria pygmaea* miq by fluorescence microscopy. *Journal of Xinyang Teachers College* (Natural Science Edition), 1999, 12(2):185-189. (in Chinese)
- [17] 魏琴, 周黎军, 陈东林. 十字花科10属种与油菜萝卜胞质不育系杂交的花粉管萌发情况观察. 植物学通报, 2000, 17(3):260-265.
- Wei Q, Zhou L J, Chen D L. The observation on pollen germination in crossings between ten taxa of cruciferae and ogo CMS. *Chinese Bulletin of Botany*, 2000, 17(3):260-265. (in Chinese)
- [18] 宋小玲, 强胜, 刘琳莉. 药用野生稻(*Oryza officinalis* Wall)和转bar基因水稻(*Oryza sativa* L.)花粉杂交的基因漂移. 南京农业大学学报, 2002, 25(3): 5-8.
- Song X L, Qiang S, Liu L L. Gene flow of pollen cross between *Oryza officinalis* Wall and transgenic rice with bar gene. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2002, 25(3): 5-8. (in Chinese)
- [19] 王明全, 唐明. 野生稻光周期反应研究. 武汉植物学研究, 1998, 16(30):213-218.
- Wang M Q, Tang M. Studies on photoperiodical response of wild rice. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 1998, 16(30):213-218. (in Chinese)
- [20] 范树国, 张再君, 刘林, 刘鸿先, 梁承邨. 中国野生稻的遗传学研究. 广西农业生物科学, 1999, 18(4):298-303.
- Fan S G, Zhang Z J, Liu L, Liu H X, Liang C Y. Research outline on wild rice genetics in China. *Journal of Guangxi Agricultural and Biological Science*, 1999, 18(4):298-303. (in Chinese)
- [21] 谭光轩, 王红军. 野生稻亲缘关系研究进展. 大自然探索. 1999, 18(67):75-80.
- Tan G X, Wang H X. Advances in the relationships of wild rice. *Exploration of Nature*, 1999, 18(67):75-80. (in Chinese)
- [22] 周毅, 邹喻莘, 洪德元, 周骏马, 陈受宜. 中国野生稻及栽培稻核糖体DNA第一转录间隔区序列分析及其系统学意义. 植物学报, 1996, 38(10):785-791. (英文)
- Zhou Y, Zou Y P, Hong D Y, Zhou J M, Chen S Y. ITS1 sequences of nuclear ribosomal DNA in wild rice and cultivated rice of China and their phylogenetic implications. *Acta Botanica Sinica*, 1996, 38(10):785-791.
- [23] 钟代彬, 罗利军, 郭龙彪, 应存山. 野裁杂交转移药用野生稻抗褐飞虱基因. 西南农业学报, 1997, 10(2):5-9.
- Zhong D B, Luo L J, Guo L B, Ying C S. Studies on resistance to brown planthopper (BPH) of hybrid between *Oryza sativa* and *Oryza officinalis*. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 1997, 10(2):5-9. (in Chinese)
- [24] 余文金, 罗科, 郭学兴. 以水稻雌性不育系为母本不经幼胚培养获得 *Oryza sativa* × *O. officinalis* 杂种的研究. 遗传学报, 1993, 20(4):348-353.
- Yu W J, Luo K, Guo X X. Obtaining the hybrids of *Oryza sativa* × *O. officinalis* without embryo culture by using male-sterile lines. *Acta Genetica Sinica*, 1993, 20(4): 348-353. (in Chinese)

(责任编辑 孙雷心)



1~3. 药用野生稻自花授粉：1. 授粉后0.5h, 大多数花粉管到达花柱中部, 少数花粉管到达子房; 2. 授粉后1h, 大多数花粉管到达珠孔; 3. 授粉后5h观察结果同2; 4~6. 药用野生稻授转基因水稻Y003花粉：4. 授粉后0.5h, 花粉管刚到达柱头羽状分支; 5. 授粉后1h, 多数花粉管到达花柱上部; 6. 授粉5h, 花粉管到达花柱下部, 末端膨大; 7~9. 药用野生稻授转基因水稻99t花粉：7. 授粉0.5h, 花粉管到达花柱上部; 8. 授粉后1h, 多数花粉管到达花柱中部; 9. 授粉5h, 花粉管到达花柱基部, 末端膨大
 1-3. *O. officinalis* self-pollination: 1. After pollination for 0.5-h, the pollen tube entered the style and reached the middle of the style and a few got to the ovary even; 2. After 1h, reached the extome; 3. After 5h, at the extome; 4-6. Transgenic rice(Y003) pollinate *O. officinalis*; 4. After pollination for 0.5h, the pollen tube stayed at the top of wild rice stigma; 5. After 1h, pollen tube entered the stigma; 6. After 5h, pollen tube got to the base of the style of *O. officinalis* and terminal of pollen tube swelled; 7-9. Transgenic rice(99t) pollinate *O. officinalis*; 7. After pollination for 0.5h, the pollen tube stayed at the top of *O. officinalis* stigma; 8. After 1h, pollen tube entered the stigma; 9. After 5h, pollen tube got to the base of the style of *O. officinalis* and terminal of pollen tube swelled