

通过转 *bar* 基因水稻与稗草杂交的亲性和 研究评价基因漂移

宋小玲, 强 胜, 刘琳莉, 徐言红

(南京农业大学杂草研究室, 南京 210095)

摘要: 采用生殖生物学方法研究了转 *bar* 基因水稻品种 Y0003 和 99-t(父本)与无芒稗(母本)的基因漂移。通过光学显微镜观察稗草与转 *bar* 基因水稻手工杂交后 30 min、1~4 h 水稻花粉在稗草柱头上的萌发、生长情况,并与稗草开花后相应时间的花粉萌发、生长情况相比较。结果表明,2 个水稻品种的花粉在稗草柱头上的萌发生长情况相似,且与稗草自花授粉相应时间的花粉萌发、生长情况有极明显差异。稗草自花授粉后花粉粒萌发生长正常,在 30 min 时 85% 的花粉粒花粉管穿过柱头,正在凝缩和释放内容物或内容物已经释放的花粉粒百分率逐渐增加;杂交后转基因水稻花粉在稗草柱头上都不能正常萌发生长并未能穿过稗草柱头。从而判定稗草与转 *bar* 基因水稻的不亲和性,表现在水稻花粉不能在稗草柱头上正常萌发生长,更不能穿过稗草柱头。同时通过去雄稗草授转基因水稻花粉后不结籽也证明了两者的不亲和性。

关键词: 基因漂移; 亲和性; 转 *bar* 基因水稻; 稗草

Assessment on Gene Flow Through Detection of Sexual Compatibility Between Transgenic Rice with *bar* Gene and *Echinochloa crusgalli* var. *mitis*

SONG Xiao-ling, QIANG Sheng, LIU Lin-li, XU Yan-hong

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

Abstract: The gene flow between two varieties of transgenic rice with *bar* gene (Y0003 and 99-t) (♂) and barnyard grass (*Echinochloa crusgalli* var. *mitis*) (♀) were studied by means of reproductive biology. The germination and growth of rice pollen grains on barnyard grass stigmas at 30 min, 1-4 h after crossing by hand were observed with optical microscope. The cross results were compared with the germination and growth of barnyard grass pollen grains at the corresponding time after self-pollination. The results showed that the pollen grains germination and growth of the two varieties were similar on barnyard grass stigmas and differed from self-pollination of barnyard grass significantly. Pollen grains germinated and pollen tubes penetrated stigmas normally, and the number of pollen grains being condensing or releasing their inclusions or having released them increased with the time after self-pollination during experimental period. Pollen grains of transgenic rice on the stigmas of barnyard grass could not germinate or grow normally after cross, nor could they penetrate the stigmas of barnyard grass. From above results, it could be concluded that the sexual incompatibility lay in the rice pollen could not penetrate the stigma of barnyard grass. The fact that emasculated barnyard grass pollinated with the rice pollen grains could not seed, and further proved the incompatibility of between them.

Key words: Gene flow; Sexual compatibility; Transgenic rice with *bar* gene; *Echinochloa crusgalli* var. *mitis*

收稿日期: 2001-12-14

基金项目: 国家科技部转基因专项基金资助项目(E200102)

作者简介: 宋小玲(1969-), 女, 内蒙古乌盟人, 博士研究生, 主要从事抗除草剂转基因作物安全性评价的方法研究。本文通讯联系人: 强 胜,

Tel: 025-4395117; E-mail: wrl@njau.edu.cn

抗除草剂转基因作物给人类带来巨大效益的同时,抗性基因也会通过基因交流转移到野生近缘种,给农田生态环境造成潜在危害。在特定的环境中,有些作物的近缘种是危害很大的杂草,如果野生植物因抗除草剂基因而提高适合度,这种植物就可能成为极难防治的害草,给农田杂草防除带来新的难题,对生态环境造成冲击^[1~4]。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。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,且稗草对水稻有很强的拟态性^[5],人们对稗草是否会和转基因水稻发生基因交流非常关心。目前尚未见有关抗除草剂转基因作物和稗草的基因漂移研究报道。国际上用于评价抗除草剂转基因作物的基因漂移方法概括起来有3种:第一,检测自然杂交率^[6~8],该方法与所采用的试验设计及外界环境有明显的相关性,且所经历的周期长,所需的试验规模较大;第二,通过人工授粉条件下的杂交^[9,10],该方法大多是在蕾期授粉,人为增加了花粉杂交的可能性。此外,杂交子代的抗性检测需在下一个生长季节才能进行,因而周期也较长;第三,通过胚珠培养或胚胎挽救技术得到杂交种^[11,12]。该技术是当遗传上营养缺乏,或是远源杂交时胚胎在发育过程中通常会夭亡的情况下使用的一种技术,但通过这种技术得到杂交种并不表示在自然条件下能发生杂交。重要的是3种方法都忽略了基因漂移的首要条件即:种和种的有性亲和性,都不能明确杂交不亲和的具体原因和时期,不能早期客观、快速地评价基因漂移。

笔者以2种转 *bar* 基因水稻为父本,稻田常见杂草无芒稗为母本,采用生殖生物学方法,结合人工杂交试验,对其基因漂移的安全性评价方法进行了研究,目的是探寻早期检测抗除草剂转基因作物基因漂移的方法。此外,也是为转基因水稻和稗草是否能发生基因漂移提供更直接的证据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用的2种转 *bar* 基因粳稻 Y0003 和 99-t 由中国水稻研究所提供;稗草为江苏常见种无芒稗,采自南京水稻田。试验土壤为南京农业大学的菜园土。

1.2 试验方法

试验于2001年5~9月在南京农业大学网室和

杂草研究实验室进行。用光学显微镜观察花粉的萌发生长,每处理不少于30朵颖花。

1.2.1 稗草去雄技术 选盛花期的稗穗,于开花当日颖壳刚张口时,用真空抽气泵吸取花药,共处理10个穗,对当日开的颖花标记,并去除其余的颖花,5个穗授稗草花粉并套袋,其余5个穗不授粉套袋。于处理后10d考种,统计结果,检查去雄率和柱头活力。

1.2.2 稗草开花不同时间花粉的萌发、生长观察 于稗草开花后0.5h和1~4h,每隔1h小心取柱头做临时制片,观察花粉在柱头上的萌发生长情况,并拍照。

1.2.3 室内杂交试验 选盛花期的稗穗,去雄后授供试水稻花粉。部分于授粉后0.5h和1~4h,每隔1h观察水稻花粉在稗草柱头上的萌发生长情况,并拍照。另外一部分授粉后套袋,观察授粉后的结籽情况,每处理总计不少于550朵颖花。

2 结果与分析

2.1 稗草去雄技术的研究

真空泵抽气去雄效果理想,去雄不授粉398朵颖花,无结籽,去雄率100%,去雄授粉298朵颖花,结籽295粒,结实率达98.9%,这说明柱头活力不受影响。因此本试验采用真空抽气法去雄,以便能正确判断水稻花粉在稗草柱头上萌发、生长情况。

2.2 稗草开花后花粉萌发、生长观察

稗草开花后0.5h,即有近85%的花粉粒萌发,花粉管生长穿过柱头,16.79%的花粉已释放了或正在凝缩释放内容物;开花后1~4h,穿过柱头的花粉数相差不大,达90%左右;内容物正在凝缩释放或已释放了花粉百分率1h比0.5h时增加近1倍;2h和3h百分率相近,比1h增加10%左右;开花4h后,内容物释放的花粉百分率比4h前有明显增加,达57%,内容物正在凝缩释放的花粉百分率略有下降(图)。各时期的稗草花粉见图版-1~7。

2.3 室内杂交试验

2种水稻花粉在稗草柱头上的萌发生长情况类似,授粉0.5h,95%的花粉没有萌动,仅有5%刚刚萌动,花粉粒在萌发处长出圆球型的花粉管,且未穿过柱头;授粉1~4h的情况相似,大约55%的花粉粒萌发,但花粉管不能进入柱头而生长异常,花粉管有的呈螺旋状、有的顶端膨大、有的呈钩状(遇见柱头后,因不能进入柱头而改变生长路线)、有的绕花粉粒或柱头缠绕生长,有的背离柱头生长,总之花

粉管扭曲成各种形状但都不能进入柱头,其余大约45%的花粉不能萌发(图版-8~19)。这与稗草自花授粉花粉的萌发生长情况存在极明显的差异。同时试验期间在稗草柱头上未观察到花粉内容物凝缩和释放的水稻花粉粒。水稻花粉不能在稗草柱头上正常萌发、生长,说明稗草和水稻有性亲和性极差。

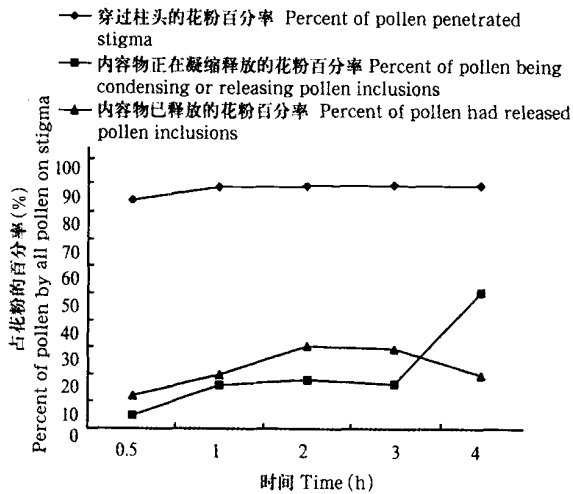


图 稗草自花授粉花粉的萌发生长

Fig. 1. Pollen grain germination and growth of barnyardgrass after self-pollination

稗草去雄授 Y0003 花粉和 99-t 花粉分别为 620 朵和 570 朵颖花,结实率为 0。在去雄为 100% 的情况下授水稻花粉套袋后不结籽也证明了稗草和水稻的不亲和性。

3 讨论

因稗草一直是水稻的伴生种,有人怀疑两者间存在基因漂移的可能性,但也有人认为稗草与水稻的亲缘关系较远,基因漂移的可能性较小,但究竟它们之间是否亲和,或不亲和性发生在什么时期,什么程度的不亲和,尚未见报道。本研究为早期证明这种不亲和性提供了直接证据。花粉在柱头表面的萌发需要细胞之间的信号交流。柱头既是外源花粉侵入的一个重要屏障,又为亲和性花粉的萌发提供萌发环境和花粉识别的信号^[13]。在本试验中转基因抗除草剂水稻花粉虽能在稗草柱头上部萌发,但花粉管生长异常,不能穿过稗草柱头,这说明转基因水稻的花粉和稗草柱头不能进行正常的信号交流,转基因水稻花粉不能被稗草柱头识别。

许多研究者^[14-16]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有性亲和性相一致的开花期。如果是虫媒传粉,必须有共同的传粉昆虫,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形成杂交后代以及子二代的可育性和繁殖能力。虽然所有这些条件对成功的抗性基因的漂移都是很重要的一条,没有这一条作为基础,发生基因漂移的可能性就相当小。在本试验条件下,转基因水稻和稗草不亲和,说明抗除草剂转基因水稻向稗草的基因漂移的可能性极小,安全性相对较高。另外,去雄稗草授转基因水稻的花粉不能结实,即没有杂交种的产生,进一步说明两者不能通过花粉杂交发生基因交流。

稗草和转基因水稻的杂交属种间杂交。孟金陵等^[17]认为,种间杂交不亲和性的表达部位有柱头不亲和、花柱不亲和及胚囊不亲和。稗草和转基因水稻在本试验条件下的不亲和性表现在杂交不亲和的第一步。这样大大减少了抗性基因水平转移的可能性。抗性基因的逃逸除通过与野生近缘种发生花粉杂交(cross-pollination)外,还可通过水平基因转移(horizontal gene transfer)发生逃逸^[18,19]。基因工程通过人工媒介把抗性基因整合到某种作物的基因组中,这个人工媒介也可能重新把抗性基因整合到其它植物细胞中。如果稗草和转基因水稻的不亲和性不是发生在第一步,那么转基因水稻的花粉中携带抗性基因的物质就有可能释放到稗草的胚囊中,增加了水平基因转移的风险。通过本试验,证明了两者间水平基因转移的可能性也较小。本方法可为花粉早期萌发阶段就不亲和的物种提供快速检测方法。

References

- [1] Kling J. Could transgenic super crops one day breed super weeds? *Science*, 1996, 274:180-181.
- [2] Qian Y Q, Wei W, Tian Y, Ma K P. Application and potential problems of transgenic crops. *Chin. J. Appl. Environ. Biol.* 1999, 5(4):427-428. (in Chinese)
钱迎倩,魏伟,田彦,马克平.转基因作物在生产中的应用及某些潜在问题.应用与环境生物学报,1999,5(4):427-428.
- [3] Wei W, Qian Y Q, Ma K P. Gene flow between transgenic crop and their wild related species. *Acta Botanica Sinica*, 1999, 41(4):343-348. (in Chinese)
魏伟,钱迎倩,马克平.转基因作物与其野生亲缘种间的基因流.植物学报,1999,41(4):343-348.
- [4] Gressel J. Molecular biology of weed control. *Transgenic Re-*

- search, 2000, 9:355 - 382.
- [5] Barrett S C H. Crop mimicry in weeds. *Economic Botany*, 1983, 37(3):255 - 282.
- [6] Thomas R M, Charters Y M, Jorgensen R B. The risks of crop transgene spread. *Nature*, 1996, 380:31.
- [7] Chevre A M, Eber F, Baranger A, Renard M. Gene flow from transgenic crops. *Nature*, 1997, 389:924.
- [8] Darmency H, Fluery A. Mating system in *Hirschfeldia incana* and hybridization to oilseed rape. *Weed Research*, 2000, 40:231 - 238.
- [9] Lefol E, Danielou V, Darmency H. Predicting hybridization between transgenic oilseed rape and wild mustard. *Field Crops Research*, 1996, 45:153 - 161.
- [10] Metz P L J, Jacobsen E, Nap J P, Pereira A, Stiekema W J. The impact on biosafety of the phosphinothricin tolerant transgene in interspecific *B. rapa* × *B. napus* hybrids and their successive backcrosses. *Theor. Appl. Genet.* 1997, 95:442 - 450.
- [11] Kerlan M C, Cherve A M, Eber F, Baranger A, Renard M. Risk assessment of outcrossing of transgenic rapeseed related species: interspecific hybrid production under optimal condition with emphasis on pollination and fertilization. *Euphytica*, 1992, 62:145 - 153.
- [12] Lefol E, Seguir-Swartz G, Downey R K. Sexual hybridisation in crosses of cultivated Brassica species with the crucifers *Erucastrum gallicum* and *Raphanus raphanistrum* potential for gene introgression. *Euphytica*, 1997, 95:127 - 139.
- [13] Chen S R, Yang H Y. The mechanism of pollen-pistil interaction. *Plant Physiology Communications*, 2000, 36(4):356 - 360. (in Chinese)
陈绍荣,杨弘远.花粉-雌蕊的相互作用机制.植物生理学通讯,2000,36(4):356 - 360.
- [14] Dale P J. Spread of engineered genes to wild relatives. *Plant Physiol*, 1992, 100:13 - 15.
- [15] Scheffler J A, Philip J D. Opportunities for gene transfer from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) to related species. *Transgenic Research*, 1994, 3:263 - 278.
- [16] Snow A A, Anderson B, Jorgensen R B. Costs of transgenic herbicide resistance introgressed from *Brassica napus* into weedy *B. rapa*. *Molecular Ecol.* 1999, 8:605 - 615.
- [17] Meng J L, Liu D F, Luo P. *Plant Reproductive Genetics*. Beijing: Science Press, 1995:296 - 308. (in Chinese)
孟金陵,刘定富,罗鹏.植物生殖遗传学.北京:科学出版社,1995:296 - 308.
- [18] Lorenz M G, Wackernagel W. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev.* 1994, 58:563 - 602.
- [19] Gebhard F, Smalla K. Monitoring field releases of genetically modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 28:261 - 272.