

抗虫耐除草剂转基因玉米花粉生活力研究

刘来盘^{1,2}, 刘 标²

(1. 南京大学生命科学学院, 南京 210023; 2. 生态环境部南京环境科学研究所, 南京 210042)

摘 要: 使用离体培养法检测不同玉米材料花粉萌发率并于显微镜下观察花粉粒直径, 研究转 *Cry1Ab*、*EPSPS* 基因玉米对花粉生活力的影响。结果表明, 刚离体花粉萌发活力最强, 培养 180 min 后花粉萌发率可达 89.4%, 高温 (36℃) 条件下放置 2 h 花粉基本丧失萌发能力。与非转基因对照相比, 转 *Cry1Ab*、*EPSPS* 基因玉米对花粉离体后的生存能力无显著影响, 对花粉粒直径大小无影响。

关键词: 转基因玉米; *Cry1Ab*; *EPSPS*; 花粉萌发; 基因漂移

中图分类号: S513.037

文献标识码: A

Study of Transgenic Insect Resistant and Herbicide-Tolerate Maize on Pollen Viability

LIU Lai-pan^{1,2}, LIU Biao²

(1. College of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210023;

2. Nanjing Institute of Environmental Sciences, Ministry of Ecology and Environment, Nanjing 210042, China)

Abstract: In order to determine the effect of *Cry1Ab* and *EPSPS* gene maize on the pollen viability, the pollen germination rate of different maize materials was detected by the method of vitro culture and the diameter of pollen grains was observed under the microscope. The results showed that pollen germination rate of maize was the strongest when the pollen just in vitro which approximately 89.4% after 180 min. The pollen was almost completely inactivated when put it at high temperature (36℃) for 120 minutes. No significant effect on the viability of pollen in vitro and the diameter of pollen grains between the transgenic maize and the normal control.

Key words: Transgenic maize; *Cry1Ab*; *EPSPS*; Pollen germination; Gene flow

玉米是全球最重要的农业和经济作物之一, 世界上 80% 的淀粉来源于玉米^[1]。随着转基因技术的发展, 人们可以将不同来源的单个或多个不同性状基因转入到玉米中, 获得抗病虫、抗除草剂、抗逆以及品质改良等具有广泛应用前景的玉米材料。2017 年全球转基因玉米种植面积为 5 970 万 hm^2 , 是种植面积第二大的转基因作物, 仅次于大豆。美国转基

因玉米种植面积达 3 384 万 hm^2 , 应用率高达 94.5%^[2]。随着转基因作物种类的不断增多及种植面积的不扩大, 转基因技术及其产品的潜在安全问题及生态安全性引起了广泛的关注及讨论^[3-5], 其中, 基因漂移是安全性评价工作中的重要环节。根据基因漂移的不同媒介, 基因漂移主要通过花粉流、种子传播以及无性繁殖器官介导 3 种途径实现^[6]。其中, 转基因作物通过花粉传播将其外源基因传递至非转基因作物及其野生近缘种以及其导致的环境风险是目前最受关注和争议的领域之一^[7]。由于花粉产量、花粉和受体异交率、花粉的竞争能力和传粉时外界环境的差异, 不同物种间由花粉介导的基因漂移在扩散距离及方向亦有所不同^[8-10]。玉米是异花授粉作物, 主要依靠风媒传播, 不同植株间异交率较高, 因此玉米花粉的活力及其离体后的存活能力是影响转基因玉米外源基因漂移距离的重要因素。

本研究通过对新研发的 *Cry1Ab*、*EPSPS* 转基因

录用日期: 2018-11-27

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项“自然生态风险监测与控制技术”重大课题项目(2016ZX08012-005)、抗虫抗除草剂转基因玉米“C0030.3.5”产业化研究(2015ZX08013002)

作者简介: 刘来盘(1989-), 博士, 主要研究方向为转基因生物安全。

Tel: 025-85287263 E-mail: liulaipan@163.com

刘 标为本文通讯作者。Tel: 025-85287064

E-mail: liubiao@nies.org

玉米材料其受体对照以及常规玉米的花粉形态及萌发活力进行测定,评估不同玉米材料对花粉萌发活力的影响,通过花粉离体后的存活能力评价转基因玉米花粉的传播能力。根据已有大田试验结果预测转基因玉米的基因漂移距离,为转基因玉米新品种田间应用推广前的评价工作提供重要的数据支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用转 *Cry1Ab*、*EPSPS* 基因玉米材料 DBN9936、受体材料 DBN318 和常规对照先玉 335、农华 101、郑单 958 均由北京大北农生物技术有限公司提供。第一批玉米种植日期为 2017 年 7 月 7 日,第二批种植时间为 2017 年 7 月 14 日,以确保花期一致。花粉活力测定时间为 2017 年 8 月 23 日。试验于环境保护部南京环境科学研究所国家生物安全重点实验室温室进行。

1.2 花粉采集方法

玉米开始散粉后,于上午 8:00~10:00 时,直接将玉米雄蕊摘下进行处理。将不同材料花粉室外(约 36℃)分别放置 0、0.5、1、2 h 后,置于培养基培养,观察花粉萌发情况。放置 0 min 的培养 60、120、180 min 后分别统计萌发率,室外放置 0、0.5、1、2 h 的花粉培养 180 min 后观察统计萌发率。

1.3 花粉培养方法

玉米花粉采用固体培养基培养。培养基包括蔗糖 0.35 mol/L、CaCl₂ 0.02%、硼酸 0.01%、琼脂 0.7%。上述成分按照所需培养基的体积换成成具体质量,加入超纯水后,高压灭菌锅灭菌,稍微冷却后倒入培养皿中,以刚好覆盖培养皿为宜,冷却凝固后将玉米花粉抖落至培养基表面,置于恒温培养箱内 25℃ 静置培养,特定时间后观察统计花粉萌发情况。

1.4 花粉萌发率的测定

萌发率的测定:培养后使用莱卡 DM750 型显微镜进行观测。当花粉管的长度大于花粉粒的直径时计为萌发。统计萌发、未萌发的花粉粒数,萌发率=萌发的花粉数/总的花粉数×100%。每个试验处理设置 3 个生物学重复,每个重复随机选取 3 个视野,每个视野所统计的花粉粒不少于 100 粒。

1.5 花粉粒直径的测定

玉米雄蕊取下后,将花粉抖落至培养基,于带标尺的显微镜下观察花粉粒并记录花粉粒直径。每个玉米材料设置 3 个重复,每个重复统计 100 粒花粉粒直径。

1.6 数据处理

采用方差分析方法对试验数据进行统计,分析比较转基因玉米和常规非转基因玉米材料的花粉粒直径以及花粉室外放置不同时间后的萌发率。

2 结果与分析

2.1 不同玉米材料花粉的活力测定

将不同玉米材料花粉取下后直接放置培养基培养,分别培养 60、120、180 min 后,显微镜下观察花粉的萌发情况,处理的 5 个玉米材料 DBN9936、DBN318、先玉 335、农华 101、郑单 958 在相同的培养时间内其花粉萌发率均不存在显著差异(表 1)。培养 180 min 后, DBN9936、DBN318、先玉 335、农华 101、郑单 958 的花粉萌发率分别为 89.0%、90.9%、87.2%、89.6%、90.1%,转基因玉米和受体玉米及常规玉米间花粉萌发活力不存在显著差异。结果表明,转基因玉米 DBN9936 与非转基因受体对照 DBN318 及常规对照先玉 335、农华 101、郑单 958 的花粉萌发率之间无显著差异。

表 1 转基因玉米和常规非转基因玉米花粉培养不同时间后的萌发率
Table 1 Germination rate of transgenic maize and non transgenic maize after different time %

材 料 Maize material	培养时间(min) Culture time		
	60	120	180
DBN9936	62.3±6.3 a	78.5±5.6 a	89.0±4.5 a
DBN318	64.4±7.4 a	79.6±5.3 a	90.9±4.2 a
先玉 335	66.6±9.9 a	79.4±4.8 a	87.2±3.6 a
农华 101	64.8±10.1 a	78.4±4.6 a	89.6±3.0 a
郑单 958	59.7±9.9 a	78.9±3.9 a	90.1±4.3 a

注:数据以“平均值±标准差”形式展示,采用 LSD 法分析;同列字母相同表示同列各材料萌发率无显著性差异($P>0.05$)。下表同。
Note: The data were displayed in the form of "mean standard deviation". The same letter showed no significant difference in the pollen germination rate of the materials analyzed by the LSD method($P>0.05$). The same below.

2.2 室外放置不同时间对玉米花粉活力的影响

将各玉米材料花粉取下后,室外放置0、30、60、120 min后分别放置培养基培养,180 min后显微镜下观察各玉米材料花粉的萌发情况。表2结果显示,随着室外放置时间的延长,玉米花粉的活力显著下降。在相同的处理时间内,转基因玉米和常规玉米花粉活力没有显著差异。在室外放置120 min后, DBN9936、DBN318、先玉335、农华101、郑单958的

花粉萌发率分别为3.0%、1.9%、1.6%、2.2%、3.1%,花粉几近完全失活,与未室外放置时存在显著差异。因此,刚离体的花粉活力最强,随着离体时间延长,玉米花粉的活力随之下降。表明与非转基因受体对照 DBN318 及常规对照先玉335、农华101、郑单958相比,转基因玉米 DBN9936对花粉离体后的生存能力无显著影响。

表2 室外放置不同时间培养180 min后各玉米材料的萌发率
Table 2 Pollen germination of maize materials after 180 min treatment at room temperature %

玉米材料 Maize material	处理时间(min) Processing time			
	0	30	60	120
DBN9936	89.0±4.5 a	56.1±6.5 b	22.0±5.7 c	3.0±2.5 d
DBN318	90.9±4.2 a	55.9±4.6 b	21.3±5.6 c	1.9±2.1 d
先玉335	87.2±3.6 a	54.2±7.4 b	24.4±5.9 c	1.6±1.6 d
农华101	89.6±3.0 a	55.4±7.0 b	20.0±3.7 c	2.2±2.6 d
郑单958	90.1±4.3 a	52.2±6.3 b	22.5±5.7 c	3.1±1.4 d

2.3 转基因玉米和受体材料花粉粒直径测定

在带标尺显微镜下观察统计转基因、受体及常规玉米材料花粉粒直径。表3结果显示, DBN9936、DBN318、先玉335、农华101、郑单958的花粉粒直径

分别为85.5、84.1、85.2、84.5、84.1 μm,没有显著差异,表明与非转基因对照相比,转基因玉米 DBN9936对花粉粒直径大小无显著影响。

表3 不同玉米材料的花粉粒直径
Table 3 The diameter of the pollen grains of different maize materials μm

玉米材料 Maize material	DBN9936	DBN318	先玉335	农华101	郑单958
花粉粒直径	85.5±1.5 a	84.1±1.9 a	85.2±1.1 a	84.5±1.4 a	84.1±1.2 a

3 结论与讨论

已有研究表明,离体培养法是检测玉米花粉活力最直接有效的方法^[11,12]。王艳哲等采用离体培养法25℃培养散粉第1天的玉米花粉180 min后,玉米花粉萌发率均在90%以上,随着散粉天数的增加,玉米花粉的萌发率及花粉管长度均显著下降;在同一天,上午8:00~10:00时玉米花粉萌发活力最强,然后显著下降,到下午16:00时基本丧失活力^[13]。本试验于玉米散粉第1天的8:00~10:00时采集花粉,花粉离体后即刻进行培养,室温培养180 min后,5种玉米材料花粉萌发率无显著差异,表明玉米中转入 *Cry1Ab*、*EPSPS* 基因对其花粉萌发力无显著影响,离体培养法可有效检测玉米花粉活力。

玉米花粉的寿命除因自身遗传特性而不同外还

与温湿度、花粉含水量等密切相关^[14]。其中,高温会显著抑制花粉发育,在高温条件下(32℃~35℃),花粉因水分丧失会迅速失活^[15~17]。本试验采集玉米花粉后直接室外放置处理,更好地模拟玉米散粉时的外界环境条件,调查当日室外温度在36℃左右,随着处理时间的延长,花粉萌发活力显著下降;当处理2 h后,5种玉米材料花粉几近完全失活。转基因玉米 DBN9936 与其受体及常规材料相比,在相同处理时间内花粉萌发率无显著差异,因此,转基因玉米花粉离体后在外界环境中的存活时间与试验中常规玉米相似,其传播能力无显著差异。

目前,我国已有多个转基因玉米外源基因可以向非转基因漂移的报道。路兴波等^[18]在距离转基因抗除草剂玉米150 m处的常规玉米中仍能检测到外源基因。邸宏等^[19]采用转 *Bar* 基因的抗除草剂玉米

为材料,在距离转基因玉米 1 m 处异交率为 37.78%,120 m 处最大异交率仍有 0.05%,距离为 150 m 时未检测到外源基因。卢宗志等^[20]通过模拟玉米花粉扩散实验,当受体与供体间距离为 45 m 时基因漂流阈值为 1%,距离增加至 300 m,基因漂流阈值为 0.1%。本研究结果表明,与非转基因受体 DBN938 和常规栽培品种先玉 335、农华 101 及郑单 958 相比,转 *Cry1Ab*、*EPSPS* 基因玉米 DBN9936 其花粉的传播能力与之相比亦无显著变化。参照已有研究结果,转 *Cry1Ab*、*EPSPS* 基因玉米 DBN9936 仍有较大基因漂移的风险,但由于实验室条件的局限性,不能完全模拟田间的种植情况,该转基因玉米外源基因的漂移距离仍需传统大田同心圆试验进行验证。

参考文献:

- [1] Paul S M, Pollak L M. Transgenic maize[J]. *Starch-Stärke*, 2005, 57: 187-195.
- [2] ISAAA. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2017: Biotech Crop Adoption Surges as Economic Benefits Accumulate in 22 Years[R]. 2017, ISAAA Brief No. 53. ISAAA: Ithaca, NY.
- [3] 钱迎倩,田彦,魏伟.转基因植物的生态风险评价[J].植物生态学报,1998,22(4):289-299.
Qian Y Q, Tian Y, Wei W. Ecological risk assessment of transgenic plant[J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 1998, 22(4): 289-299. (in Chinese)
- [4] 卢宝荣,张文驹,李博.转基因的逃逸及生态风险[J].应用生态学报,2003,14(6):989-994.
Lu B R, Zhang W J, Li B. Escape of transgenes and its ecological risks[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2003, 14(6): 989-994. (in Chinese)
- [5] Conner A J, Glare T R, Jan-peter N. The release of genetically modified crops into the environment: Part II. Overview of ecological risk assessment[J]. *The Plant Journal*, 2003, 33(1): 19-46.
- [6] Lu B R. Transgene escape from GM Crops and potential biosafety Consequences: An environmental perspective[J]. *Collection of Biosafety Reviews*, 2008, 4: 66-141.
- [7] Song Z, Lu B, Zhu Y, et al. Pollen Competition between cultivated and wild rice species(*Oryza sativa* and *O. rufipogon*)[J]. *New Phytologist*, 2002, 153(2): 289-296.
- [8] Song Z P, Lu B R, Zhu Y G, et al. Pollen competition between cultivated and wild rice species(*Oryza sativa* and *O. rufipogon*)[J]. *New Phytologist*, 2002, 153: 289-296.
- [9] Rong J, Lu B R, Song Z P, et al. Dramatic reduction of crop-to-crop gene flow within a short distance from transgenic rice fields[J]. *New Phytologist*, 2007, 173(2): 346-353.
- [10] 张士龙,王冰,李伟彦,等.玉米花粉量、散落分布及有效授粉范围研究[J].黑龙江八一农垦大学学报,2006,18(1):30-34.
Zhang S L, Wang B, Li W Y, et al. Study on the distribution of maize tassel pollen and the effective pollinating range[J]. *Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural Reclamation University*, 2006, 18(1): 30-34. (in Chinese)
- [11] 常胜合,陈彦惠,苏明杰,等.鉴定玉米花粉活力4种方法的比较[J].安徽农业科学,2009,37(30):14562-14563.
Chang S H, Chen Y H, Su M J. Comparison of four methods of maize(*Zea mays* L.) pollen viability identification[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2009, 37(30): 14562-14563. (in Chinese)
- [12] 王艳哲,崔彦宏,张丽华,等.玉米花粉活力测定方法的比较研究[J].玉米科学,2010,18(3):173-176.
Wang Y Z, Cui Y H, Zhang L H, et al. Comparative study on methods for testing pollen viability of maize[J]. *Journal of Maize Sciences*, 2010, 18(3): 173-176. (in Chinese)
- [13] 史桂荣.玉米花粉生活力的研究[J].黑龙江农业科学,1996(2):13-15.
Shi G R. Study on the pollen viability of maize[J]. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 1996(2): 13-15. (in Chinese)
- [14] 王艳哲,崔彦宏,张丽华.玉米花粉生活力研究进展[J].玉米科学,2008,16(5):144-146.
Wang Y Z, Cui Y H, Zhang L H. Progress in research on viability of pollen grain in Maize(*Zea Mays* L.)[J]. *Journal of Maize Sciences*, 2008, 16(5): 144-146. (in Chinese)
- [15] 逯明辉,巩振辉,陈儒钢,等.农作物花粉高温胁迫研究进展[J].应用生态学报,2009,20(6):1511-1516.
Lu M H, Gong Z H, Chen R G, et al. High temperature stress on crop pollen: A review[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2009, 20(6): 1511-1516. (in Chinese)
- [16] 宋方威,吴鹏,邢吉敏,等.高温胁迫对玉米自交系父本花粉生活力的影响[J].玉米科学,2014,22(3):153-158.
Song F W, Wu P, Xing J M, et al. Influences of high temperature stress on viability of pollen grain inbred lines of male parent[J]. *Journal of Maize Sciences*, 2014, 22(3): 153-158. (in Chinese)
- [17] 降志兵,陶洪斌,吴拓,等.高温对玉米花粉活力的影响[J].中国农业大学学报,2016,21(3):25-29.
Jiang Z B, Tao H B, Wu T. Effects of high temperature on maize pollen viability[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2016, 21(3): 25-29. (in Chinese)
- [18] 路兴波,孙红伟,杨崇良,等.转基因玉米外源基因通过花粉漂移的频率和距离研究[J].生态学报,2005,25(9):2450-2453.
- [19] 邸宏,刘昭军.转*Bar*基因玉米基因漂移的研究[J].中国农学通报,2008,24(12):111-113.
Di H, Liu Z J. Gene flow of *Bar* transgenic Maize(*Zea Mays* L.)[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2008, 24(12): 111-113. (in Chinese)
- [20] 卢宗志,江晓东,张明,等.玉米花粉扩散频率及距离研究[J].玉米科学,2012,20(2):149-152.
Lu Z Z, Jiang X D, Zhang M, et al. Diffusion frequency and distance assessment of Corn pollen[J]. *Journal of Maize Sciences*, 2012, 20(2): 149-152. (in Chinese)

(责任编辑:朴红梅)