

文章编号 :1003-8701(2005)04-0022-03

大豆和苜蓿对除草剂的抗性研究

刘艳芝,王玉民,王中伟,董英山

(吉林省农业科学院生物技术研究中心,吉林 公主岭 136100)

摘 要:设计大豆无菌苗生长和苜蓿无菌苗子叶诱导愈伤组织的培养基,附加不同梯度浓度的除草剂,将受体材料置于培养基上培养并观察生长或诱导状况。以未附加除草剂的培养基接种同样的受体材料为对照。结果表明,草丁膦对大豆和苜蓿的致死浓度都是 2 mg/L,草甘膦对大豆的致死浓度是 300 mg/L,对苜蓿的致死浓度是 150 mg/L。

关键词:大豆;苜蓿;组织培养;除草剂

中图分类号: S565.103.53; S551.703.53

文献标识码: A

抗除草剂作物选育这一构想是作为一种杂草防除对策而被提出的。随着植物组织培养技术、分子生物学理论和转基因方法的发展,目前可以通过生物技术手段来培育抗除草剂的作物品种主要有两种方法:通过植物组织或细胞培养并结合理化诱变,获得具有抗性的突变体;通过基因工程的方法,把抗除草剂基因导入现有的作物品种。无论通过哪种方法对受体材料进行除草剂抗性实验,获得致死浓度都是十分必要的^[1]。本文对吉林 35 大豆和公农 2 号苜蓿在组织培养过程中,对草丁膦和草甘膦两种除草剂的抗性表现进行报道,此结果将为除草剂突变体筛选和转基因工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

吉林 35 大豆种子(吉林省农科院大豆中心提供)和公农 2 号苜蓿种子(吉林省农科院草地所提供)。

1.2 种子消毒方法

将大豆种子(平铺在培养皿中)和装有 100 mL 次氯酸钠(10%)的烧杯同时置于干燥器中,然后向烧杯中徐徐加入 3.5 mL 发烟盐酸(12 mol/L),密封干燥器处理 12~14 h 后取出种子接种于 MS₀(MS 基本培养基,不加激素,3%蔗糖,0.8%琼脂,pH 值 6.0)培养基中。

苜蓿种子用 0.1%L 汞溶液浸泡 20 min,无菌水冲洗 4 次。然后置于无菌培养皿中的湿润滤纸上,置于 4℃冰箱中发芽,2 d 后选发芽种子接种于 MS₀ 培养基中。

1.3 受体材料抗性培养

选取接种后 2 d 长出胚根的种子,转移到附加不同浓度草丁膦和草甘膦的 MS₀ 培养基上,观察苗的生长状况。

切取 5~7 d 苗龄的无菌苗子叶,近轴面向上斜插入附加不同浓度草丁膦和草甘膦的 UM(MS 基本培养基+2,4-D 2 mg/L+KT 0.25 mg/L+3%蔗糖,0.8%琼脂,pH 值 6.0)培养基中,观察愈伤组织的诱导状况。

收稿日期:2005-04-12

作者简介:刘艳芝(1964-),女,吉林省公主岭人,吉林省农科院生物技术研究中心副研究员,主要从事大豆和牧草转基因研究。

2 结果与分析

2.1 大豆对草丁膦的抗性

草丁膦浓度设为 5 个梯度 :0、1、2、3 和 5 mg/L ,种子接种 2 周 ,部分植株的根系出现褐化现象 ,植株生长较对照缓慢。5 周后根系严重褐化 ,并且在下胚轴与子叶结合部位也出现褐化 ,最后导致营养成分无法向上运输 ,植株死亡。对照植株生长正常 ,叶色浓绿。

2.2 大豆对草甘膦的抗性

草甘膦浓度梯度为 0、50、100、125、150、200、300、400 和 500 mg/L。种子接种 5 周后 ,在 300、400 和 500 mg/L 草甘膦的培养基上 ,无菌苗根系生长受到严重阻碍 ,只有主根稍有生长 ,根尖变褐 ,茎与子叶呈白色 ,变粗壮、肥厚 ,生长点变黄 ,不能长出新芽。其余培养基上都不同程度出现畸形苗 ,表现为胚轴变粗大 ,根尖变褐色 ,茎尖不生长 ,呈白绿色簇状芽。

2.3 苜蓿对草丁膦的抗性

草丁膦浓度同样也设为 5 个梯度 :0、1、2、3 和 5 mg/L ,无菌苗子叶接种 15 d 后 ,不加草丁膦的对照诱导出大量的愈伤组织 ,并伴随着体细胞胚胎发生。其余培养基上的部分外植体出现愈伤组织 ,同时也出现褐化死亡现象。3 周后草丁膦浓度为 2、3 和 5 mg/L 培养基上的外植体连同愈伤组织大量褐化变软 ,4 周后全部死亡 ,失去生长能力 ,其数据统计与大豆相似 ,只是外植体受毒害的速度快 ,这可能与所选用的外植体类型不同有关。

2.4 苜蓿对草甘膦的抗性

草甘膦浓度梯度为 0、10、50、100、125、150、200 和 300 mg/L。外植体接种 5 周后 ,各草甘膦浓度培养基上的无菌苗子叶均受到不同程度的伤害。死亡的子叶褐化变软 ;受伤害轻一些的子叶呈黑绿色 ,一部分可出现愈伤组织 ,但愈伤组织生长较对照愈伤组织生长缓慢 ,单块外植体上产生的愈伤组织量也少(表 3)。

表 1 大豆无菌苗对不同浓度草丁膦的抗性结果

草丁膦浓度(mg/L)	接种数	死亡数	死亡率(%)
0	50	0	0
1	50	30	60
2	50	50	100
3	50	50	100
5	50	50	100

表 2 大豆无菌苗对不同草甘膦浓度抗性结果

草甘膦浓度(mg/L)	接种数	畸形苗	畸形苗率(%)
0	60	0	0
50	60	3	5
100	60	9	15
125	60	24	40
150	60	27	45
200	60	54	90
300	60	60	100
400	60	60	100
500	60	60	100

表 3 公农 2 号苜蓿对不同草甘膦浓度抗性结果

草甘膦浓度(mg/L)	接种数	愈伤组织(块)	死亡数	死亡率(%)
0	60	43	0	0.0
10	60	31	11	18.3
50	60	3	50	83.3
100	60	0	58	96.7
125	60	0	59	98.3
150	60	0	60	100.0
200	60	0	60	100.0
300	60	0	60	100.0

3 小结与讨论

从实验结果可以看出 ,草丁膦对大豆和苜蓿的致死浓度均为 2 mg/L ,大豆和苜蓿虽同属于豆科植物 ,两者种子和植株性状都有明显差异 ,但是在对草丁膦的抗性表现上却表现相同的结果。研究表明 ,草丁膦通过植物的叶片或其他绿色部分快速吸收 ,它抑制 GS 活性 ,导致细胞内氨的含量迅速积累。而氨的积累直接抑制光系统 I 和光系统 II 反应 ,减少跨膜 pH 梯度 ,使光合磷酸化解偶联 ,随之叶绿体结构解体 ,最后整个植物体死亡^[2]。草甘膦对大豆的致死浓度是 300 mg/L ,而苜蓿的致死浓度却是 150 mg/L ,两者抗性表现差异较大 ,其原因有待于进一步研究。

近年来,植物抗除草剂的基因工程已经取得了较大的进展,我国在这方面也开展了大量的工作。在植物转抗除草剂基因过程中,无论选用哪一种转化方法,都需要对转化后的外植体进行除草剂的抗性筛选。通常都选用致死浓度的80%作为筛选浓度,经多次筛选,才能有效地去除假转体,最后获得抗性植株。此外,在植物转基因过程中,利用抗生素类抗性基因作为标记基因已引起人们普遍关注,人们担心携带这类基因的重组微生物或转基因植物可能将其抗性基因转移到环境或肠道微生物中,导致抗生素抗性的广泛传播。草丁膦和草甘膦具有对人畜无毒,且能在土壤中迅速被降解的优点,因此还可以作为理想的筛选剂^[3,4]。由于Bar基因和EPSPS基因为最常用的两个基因,其对应的除草剂就是草丁膦和草甘膦,本项研究结论可作为大豆和苜蓿转基因工作的参考数据直接用于转化程序。但是,田间抗除草剂作物的抗性程度除了受除草剂浓度影响外,还会受环境条件和肥、水管理的影响,因此,本研究结果只能表明组织培养过程中大豆和苜蓿对除草剂的抗性,至于在田间大豆和苜蓿的抗性有待研究。

参考文献：

[1] 王关林,等.植物基因工程原理与技术[M].科学出版社,1998.
[2] 段发平,等.Bar基因和转Bar基因作物的研究进展[J].广西植物,2001,21(2):166-172.
[3] 谢龙旭,等.抗草甘膦抗虫植物表达载体的构建及其转基因烟草的分析[J].生物工程学报,2003,9(5):545-551.
[4] 张宏军,等.抗草铵膦转基因作物及其生物安全性研究进展[J].中国农业大学学报,2002,7(5):54-56.

(上接第5页)

0.89~1.18万lx、下部光强0.82~0.67万lx,提高中部透光率9.2~8.2个百分点、下部透光率7.8~6.5个百分点。不同行向密植栽培条件下的影响大于稀植栽培。

表4 插秧行向对水温、地温、光强及透光率的影响

行向	密度 (穴/m ²)	℃、万lx、%							
		水温		地温(15 cm)		光强(14点)		透光率(14点)	
		8点	14点	8点	14点	中部	下部	中部	下部
南北	30 cm × 26.7 cm (12.5)	22.2	28.7	21.7	24.2	3.95	2.49	50.3	30.7
	30 cm × 13.3 cm (25)	22.1	28.1	21.4	24.0	3.68	2.04	44.6	25.1
东西	30 cm × 26.7 cm (12.5)	22.1	28.5	21.5	23.8	3.06	1.67	41.1	22.9
	30 cm × 13.3 cm (25)	21.9	27.9	20.7	22.3	2.50	1.37	36.4	18.6

3 讨 论

加宽水稻移植行距和减少插秧密度在提高稻田水温、地温及增强光照强度、透光率等方面效果明显。这对促进水稻的早期分蘖、增强光照强度、保持水稻根系活力和活秆成熟而达到稳产高产是非常有效的栽培措施之一。但是从抗冷害角度看,加宽水稻移植行距和减少插秧密度可提高水温和地温,对于减轻延迟型冷害能起到比较大的作用。而对防止障碍型冷害来说,我们认为,增加水稻移植行距和减少插秧密度虽然增加水温和地温,但只能减轻冷害的发生,达不到完全预防的目的。所以,防止冷害应采取选育抗冷品种、减少氮施用量、减少插秧密度、灌深水和使用药剂等综合措施。

参考文献：

[1] 金爱芬,等.延边地区粮豆作物延迟型冷害频率的地理分布规律[J].延边大学农学学报,2002,(2):99-102.
[2] 徐明阳,译.防御水稻冷害的栽培技术和作物学[J].锦阳经济技术高等专科学校学报,1997,(2):72-76.
[3] 叶昌荣,等.低温冷害影响水稻结实要因分析[J].西南农业大学学报,2000,(4):308-309.
[4] 孙 福,等.寒地水稻冷害临界积温指标初探[J].现代农业,1999,(8):2-3.
[5] 魏喜陆,等.关于水稻冷害指标调整问题的商榷[J].垦殖与稻作,2000,(2):9-10.