

应用化学诱变法筛选抗草甘膦大豆突变株系

张俐俐¹, 谷 维², 雷勃钧¹, 吕晓波¹, 李 铁¹

(1. 黑龙江省农业科学院 生物技术研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 黑龙江省农业科学院 作物营养实用技术研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:利用化学诱变剂甲基磺酸乙酯(EMS)和叠氮化钠,对黑龙江省大面积推广的6个农艺性状优良的大豆品种进行种子处理。不同品种按不同处理剂量分区种植,按常规法单株选择收获。不同浓度诱变剂处理大豆种子的M₁代成活率均高于半致死浓度处理;对M₃代35518个植株于3叶期进行喷洒1.31 ai. kg·hm²草甘膦浓度鉴定,其中40株生长正常,所获抗性植株是经5 mmol·L⁻¹叠氮化钠诱变处理的绥农10和黑农44。2008年继续对M₄代进行鉴定,抗草甘膦特性可以稳定遗传。应用化学诱变法可以在后代群体中筛选到具有抗草甘膦特性的突变株系。

关键词:大豆;甲基磺酸乙酯;叠氮化钠;化学诱变;草甘膦抗性

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2009)05-0938-03

Glyphosate Resistant Mutant Strain of Soybean Filtered by Chemomorphosis

ZHANG Li-li¹, GU Wei², LEI Bo-jun¹, LU Xiao-bo¹, LI Tie¹

(1. Biotechnology Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086; 2. Crop Nutrition Practical Technology Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, Heilongjiang, China)

Abstract:To screen soybean lines resistant to glyphosate through chemomorphosis, six soybean varieties widely planted in Heilongjiang Province were dealt with chemical mutagen ethyl methane sulphonate(EMS) and sodium azide by seed soaking. The survival rate of soybean seeds in M₁ generation was higher than that of semi-lethal concentrations. In M₃ generation, 35518 plants were identified by spraying 1.31 ai. kg·ha⁻¹ glyphosate at three-leaf stage, from which a total of 40 resistant plants showed normal growth, and they were Suinong 10 and Heinong 44 dealt with 5 mmol·L⁻¹ sodium azide. The M₄ generation of the 40 survival lines also showed glyphosate resistance. Results suggest chemical mutagen could be used in selecting soybean mutant lines resistant to glyphosate.

Key words: Soybean; Ethyl methane sulphonate; Sodium azide; Chemomorphosis; Glyphosate resistance

草甘膦(Glyphosate)是美国孟山都公司20世纪70年代开发的一种有机磷类广谱灭生性除草剂,具有很好的内吸性和传导性,对人畜低毒,低残留,不破坏生态环境,在全世界范围内得到了广泛使用。从1996年第一个抗草甘膦大豆在美国开始种植后,抗草甘膦转基因作物的研究发展迅速,目前,已经研制成功并推广应用一批抗草甘膦转基因作物^[1]。而我国在抗除草剂作物选育研究方面起步较晚,截至目前还没有一种广泛推广、大面积种植的抗除草剂作物。然而,现在的抗除草剂作物大多是转基因作物,对其存在的潜在问题的争论从未停止^[2-5]。所以,利用常规育种方法选育非转基因抗除草剂作物更具有广阔的发展前景。研究利用EMS和叠氮化钠

诱变处理目前生产上农艺性状好、产量高、大面积种植的大豆种子^[6-7],在M₃代植株中筛选对草甘膦有抗性的大豆植株,并获得稳定株系,从而达到选育抗草甘膦大豆新品种的目的。同时还探讨EMS和叠氮化钠诱变剂在筛选抗草甘膦突变植株方面的诱变效果,为选育抗草甘膦大豆新品种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于2005~2008年在黑龙江省农业科学院试验田进行。供试大豆种子为黑生101、黑农44、合丰25、合丰35、绥农10、绥农14;供试药剂为41%草甘膦水剂,美国孟山都公司生产。

收稿日期:2009-05-06

基金项目:黑龙江省自然科学基金(B类)资助项目(ZJN04-0402)。

作者简介:张俐俐(1980-),女,硕士,研究实习员,现主要从事大豆诱变育种及生物技术研究。E-mail:zll20041001@163.com。

通讯作者:吕晓波。E-mail:xiaobo6032@163.com

1.2 方法

1.2.1 化学诱变剂诱变处理 将大豆种子置于盆中,用 3、5 mmol·L⁻¹叠氮化钠和 0.4% EMS 浸泡。

1.2.2 种植与收获 M₁代:将化学诱变剂浸泡过的大豆种子 M₀代进行田间播种,单粒点播,每隔 4 行种植对照 2 行,苗期统计发芽率,成熟后按单株摘荚混合收获,得到 M₁代种子。M₂代:单粒点播 M₁代种子,每隔 10 行种植对照 2 行,苗期至成熟期进行田间观察,成熟后按单株摘荚混合收获得到 M₂代种子。M₃代:按株行种植 M₂代种子,每隔 5 行加一个对照,于三叶期喷洒草甘膦筛选,对存活的 M₃代植株进行单株收获得到 M₃代种子;M₄代:按单行种植 M₃代种子,每隔 5 行加一个对照,继续进行抗草甘膦突变株系的鉴定,在每行存活植株中筛选性状优良的单株收获,其余全部混收。

1.2.3 抗草甘膦大豆植株的筛选 对 35518 株 M₃代植株进行田间抗草甘膦突变株筛选。于大豆 3 叶期喷洒草甘膦,浓度为 1.31 ai. kg·hm²,对存活 M₃植株挂牌,并以没处理的大豆植株为对照。第 2 年继续以此浓度进行田间抗草甘膦突变株系的筛选鉴定。

2 结果与分析

2.1 叠氮化钠诱变大豆种子的 M₁代田间成活率

经不同浓度叠氮化钠诱变,从表 1 可以看出 6 个品种间的成活率有明显差异。叠氮化钠 3 mmol·L⁻¹处理, M₁代成活率为 68.5% ~ 88.5%;叠氮化钠 5 mmol·L⁻¹处理, M₁代成活率为 52.5% ~ 76.0%。由此可以初步推断,叠氮化钠对不同大豆品种的化学诱变效果不同。叠氮化钠处理后种子的成活率均高于半致死剂量的成活率(50%)。

表 1 叠氮化钠处理大豆种子 M₁代成活率

Table 1 Survival rate of M₁ soybean seeds by Sodium azide treatment

叠氮化钠浓度 Concentration of NaN ₃ /mmol·L ⁻¹	成活率 Survival rate/%					
	黑生 101 Heisheng 101	黑农 44 Heinong 44	合丰 25 Hefeng 25	合丰 35 Hefeng 35	绥农 10 Suinong 10	绥农 14 Suinong 14
0	95.5	96.0	92.5	93.0	96.5	94.0
3	85.3	88.5	75.3	72.0	68.5	79.8
5	73.5	72.5	56.3	65.3	52.5	76.0

2.2 EMS 诱变大豆种子的 M₁代田间成活率

从表 2 中可以看出 6 个品种间的成活率有明显差异。0.4% EMS 处理 6 个大豆品种, M₁代成活率为 56.5% ~ 72.0%,说明 EMS 对不同大豆品种的化学诱变效果不同。EMS 处理后种子的成活率均高于半致死剂量的成活率(50%)。

表 2 EMS 处理大豆种子 M₁代成活率

Table 2 Survival rate of M₁ soybean seeds by EMS treatment

材料 Material	EMS 浓度 Concentration of EMS/%	成活率 Survival rate/%
黑生 101 Heisheng 101	0.4	72.0
	0	95.5
黑农 44 Heinong 44	0.4	70.3
	0	96.0
合丰 25 Hefeng 25	0.4	62.5
	0	92.5
合丰 35 Hefeng 35	0.4	56.5
	0	93.0
绥农 10 Suinong 10	0.4	65.3
	0	96.5
绥农 14 Suinong 14	0.4	58.3
	0	94.0

2.3 筛选、鉴定抗草甘膦突变大豆植株

在 3 叶期,对 M₃代 35518 个植株进行田间喷洒草甘膦筛选突变植株,浓度为 1.31 ai. kg·hm⁻²。如图 1,喷洒草甘膦后共筛选出 40 株抗草甘膦植株,其中 38 株为绥农 10, 2 株为黑农 44,均为 5 mmol·L⁻¹叠氮化钠诱变处理而获得。

如图 2,在 3 叶期,对 M₄代 40 个株系继续进行田间喷洒草甘膦筛选,浓度与 M₃代相同,鉴定结果表明 M₄代植株全部存活,均表现为抗草甘膦特性。



图 1 草甘膦筛选后 M₃代成活植株

Fig. 1 M₃ generation survival plants by glyphosate screening

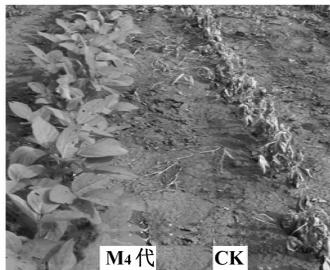


图2 草甘膦鉴定 M_4 代与对照

Fig.2 M_4 generation and CK after 7 day spraying

3 结论与讨论

化学诱变技术是丰富作物种质资源、选育作物新品种的重要手段之一。应用不同浓度的化学诱变剂 EMS 和叠氮化钠对黑龙江省 6 个大面积推广的大豆品种进行诱变处理,经 M_3 代苗期喷洒草甘膦浓度 $1.31 \text{ ai} \cdot \text{kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 田间筛选,获抗草甘膦植株 40 株是 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 叠氮化钠诱变处理的绥农 10 和黑农 44。在 M_4 代对 M_3 代抗性植株进一步筛选,结果植株全部存活,均表现为抗草甘膦特性。在诱变处理中,通常采用半致死剂量作为大田处理浓度。处理浓度不同导致诱变效果不同,不同的材料对化学诱变剂的敏感性不同,所以不同的材料应采用不同处理浓度。结果表明, $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 叠氮化钠处理后, M_1 代成活率为 $68.5\% \sim 88.5\%$ 和 $52.5\% \sim 76.0\%$; EMS 0.4% 处理后, M_1 代成活率为 $56.5\% \sim 72.0\%$ 。

确定适宜的化学诱变剂处理浓度难度较大,浓度太高毒害作用加大, M_1 代存活率降低;浓度太低,

诱变效果差,降低筛选有益突变的概率。试验获得的抗草甘膦大豆材料为 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 叠氮化钠诱变处理,说明叠氮化钠对大豆诱变的效果比 EMS 好,叠氮化钠更适于大豆化学诱变育种。

参考文献

- [1] 苏少泉. 抗除草剂作物的过去、现在与未来[J]. 世界农药, 2006, 28(2): 1-4. (Su S Q. The past, present and future of atrazine residues plant[J]. World Pesticide, 2006, 28(2): 1-4.)
- [2] 贾士荣. 转基因植物的环境及食品安全性[J]. 生物工程进展, 1997, 17(6): 37-42. (Ja S R. The safety evaluation of transgenic plants[J]. Biology Engineering Evolve, 1997, 17(6): 37-42.)
- [3] 苏少泉. 转基因抗除草剂作物与除草剂开发及应用[J]. 农药, 2002, 41(7): 3-7. (Su S Q. Exploitation and application of transgenic of plants resistant to Herbicide and Herbicide[J]. Pesticide, 2002, 41(7): 3-7.)
- [4] James C. Global status and distribution of commercial transgenic crop in 1997[J]. Biotech Develop Monitor, 1998, 35: 9-12.
- [5] 杨崇良, 路兴波, 张君亭. 世界农业转基因生物、产品研发及其安全性监管Ⅲ·农业转基因生物及其产品安全评价与管理[J]. 山东农业科学, 2005, 3: 67-70. (Yang C L, Lu X B, Zhang J T. Management of investigation and invent and safty of transgenic biology production of world agriculture Ⅲ Safety appraisal and management of agricultural transgenic biology and its production[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2005, 3: 67-70.)
- [6] 李海军, 孟庆民, 祝丽英, 等. 抗除草剂作物的选育研究概况[J]. 杂粮作物, 2003, 23(1): 30-32. (Li H J, Meng Q M, Zhu L Y. Development of breeding Herbicide-resistant crops[J]. Rain Fed Crops, 2003, 23(1): 30-32.)
- [7] 马惠平, 赵永亮, 杨光宇. 诱变技术在农作物育种中的应用[J]. 遗传, 1998, 20(4): 41-43. (Ma H P, Zhao Y L, Yang G Y. Application of induced technology on the breeding of plant[J]. Heredity, 1998, 20(4): 41-43.)

黑龙江省农业科学院出版中心关于抵制学术不端行为的联合声明

近年来中国学术界有了空前的发展和繁荣。与此同时,学术界也频频出现一稿多投、抄袭剽窃、重复发表、伪造实验数据、虚假注释、不实参考文献等学术不端行为。

尽管媒体曾多次揭露报道违背学术道德、无视学术规范的不端行为,学术管理部门也相继出台了各种条例,但各种形形色色的学术不端行为依然存在。

为尊重和保护知识产权,维护正常的学术生态,促进学术事业的健康发展,黑龙江省农业科学院出版中心下属三个编辑部:《大豆科学》、《北方园艺》、《黑龙江农业科学》,共同发表如下声明:

一、从本声明公布之日起,凡向以上三个编辑部投稿的文章如出现以下任何一种情况者:一稿多投、抄袭剽窃、重复发表、伪造数据、虚假注释、不实参考文献,一经发现,立即撤稿(包括已通过终审的文章);

二、三刊将相互通报行为不端者的有关情况,并在各自刊物上对其曝光,揭露其欺骗行径,清除其不良影响;

三、凡被发现有任何一种学术不端行为者,三刊将在 5 年之内拒发其任何文章。

三刊发表的声明旨在抵制学术不端行为,促进学术事业健康发展,创造良好的学术氛围。

发表声明单位:

《大豆科学》编辑部 《北方园艺》编辑部 《黑龙江农业学》编辑部
2009 年 7 月 10 日

镧与酸雨对大豆幼苗叶绿素含量和光合速率的复合影响

周倩倩^{1,2}, 杨维², 梁婵娟², 周青^{1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 环境与土木工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要:为探索稀土元素镧和酸雨对大豆幼苗光合作用的复合影响, 采用水培实验方法研究了 La(Ⅲ) 与酸雨 (AR) 复合处理对大豆幼苗叶片叶绿素含量 (Chl) 及光合速率 (P_n) 的影响。结果表明: 在酸雨 (AR₁/pH3.0、AR₂/pH3.5、AR₃/pH4.0、AR₄/pH4.5 和 AR₅/pH5.0) 单独作用下, Chl 含量与 P_n 均低于对照组稀土 La (RE₁/20 mg·L⁻¹、RE₂/60 mg·L⁻¹、RE₃/100 mg·L⁻¹、RE₄/300 mg·L⁻¹ 和 RE₅500 mg·L⁻¹) 单独作用时, 2 个指标均呈现“低促高抑”规律。RE + AR 复合作用影响下, Chl 含量与 P_n 低于 CK 值, 且 AR 的 pH 越低, RE 的浓度越高, 抑制作用越明显。RE₁ 和 AR 复合对大豆幼苗的抑制程度低于 AR 单独作用, 呈拮抗效应, RE₂ ~ RE₅ 与 AR 对大豆幼苗的复合影响表现为协同作用。

关键词: La(Ⅲ); 酸雨; 光合作用; 大豆幼苗

中图分类号: X517; Q945

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2009)05-0941-04

Effects of La and Acid Rain on Chlorophyll Content and Photosynthetic Rate of Soybean Seedling

ZHOU Qian-qian^{1,2}, YANG Wei², LIANG Chan-juan², ZHOU Qing^{1,2}

(1. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122; 2. College of Environment and Civil Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: To explore the combined effects of acid rain and rare earth on photosynthesis, with soybeans cultivated under laboratory conditions as test materials, the effects of simulated acid rain and lanthanum on chlorophyll content (Chl) and photosynthetic rate (P_n) in soybean seedlings were studied. The results showed that under acid rain (AR₁/pH3.0, AR₂/pH3.5, AR₃/pH4.0, AR₄/pH4.5 and AR₅/pH5.0) stress alone, Chl content and P_n were both inhibited. Under single La (RE₁/20 mg·L⁻¹, RE₂/60 mg·L⁻¹, RE₃/100 mg·L⁻¹, RE₄/300 mg·L⁻¹ and RE₅500 mg·L⁻¹) treatment, the two indexes were both promoted under low concentration and inhibited under high concentration. With RE and AR combined treatments, Chl content and P_n had declined compared with the CK group. The inhibition degree was larger under lower pH value of AR and higher concentration of RE solution. Moreover, inhibition degree of the two indexes under RE₁ and AR combined treatment was lighter than that under AR or RE₁ treatment alone, so they showed antagonistic action, while RE₂-RE₅ and AR combined treatment showed synergetic effect.

Key words: Lanthanum (La); Acid rain; Photosynthesis; Soybean seedling

范金凤等在前期中工作中已获得了 La(Ⅲ) 和酸雨 (AR) 对大豆幼苗生长复合影响的基础数据。初步发现 La(Ⅲ) 和 AR 对大豆幼苗生长的影响规律受 AR 的 pH 和 La(Ⅲ) 浓度的制约^[1]。鉴于影响植物生长的因素很多, 如光合效率、营养元素吸收、生长激素调控等^[2-4]。其中光合效率是植物生产和作物产量高低的根本决定因素^[5], 也是阐明环境因素

影响植物生物量, 乃至生态系统稳定的重要线索之一。因此, 进一步研究稀土与酸雨对植物光合作用的影响尤显必要。选取 2 个重要光合参数—光合速率 (P_n) 和叶绿素含量 (Chl) 为考察目标, 分析 2 者对不同浓度的 La(Ⅲ) 和不同 pH 酸雨的响应规律, 以及 2 个环境因子复合影响 P_n 和 Chl 的作用类型。

收稿日期: 2009-03-13

基金项目: 江苏省大学生实践创新训练资助项目, 院长基金资助项目 (HT2008-6-1)。

作者简介: 周倩倩 (1989-), 女, 学士, 研究方向为环境生态学。

通讯作者: 周青, 教授。E-mail: zhouqeco@yahoo.com.cn。