

## 大豆对草丁膦敏感性研究

李永光, 黄文佳, 周 失, 王朋朋, 李维娜, 王 涛, 李文滨

(东北农业大学 农学院, 大豆生物学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘 要:** 分析了大豆品种东农 50 对不同浓度草丁膦 (Glufosinate) 的敏感性表现。结果表明: 施用  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  草丁膦后 3 d 东农 50 开始表现枯黄、萎蔫, 随着浓度增大毒害作用增强, 扩散整个叶片; 子叶、茎、真叶不同位置的草丁膦处理显示新叶、子叶对草丁膦最敏感, 茎的敏感性最低; 全株喷施  $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  草丁膦时可直接观察到草丁膦对叶片的毒害作用, 二次喷施效果显著, 易于观察。

**关键词:** 大豆; 草丁膦; 敏感性

**中图分类号:** S565.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-9841(2011)04-0749-03

## Sensitivity of Soybean to Herbicide Glufosinate

LI Yong-guang, HUANG Wen-jia, ZHOU Shi, WANG Peng-peng, LI Wei-na, WANG Tao, LI Wen-bin

(Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Ministry of Education, Agronomy college, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

**Abstract:** The sensitivity of soybean Dongnong 50 to herbicide glufosinate was analyzed. The results showed that leaves became withered and yellow after treated with  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  glufosinate for three days. The effect of herbicide phytotoxicity increased with concentration increase. The sensitivity of soybean plants to glufosinate was different, new leaves and cotyledon were more sensitive to glufosinate than stem. Spraying with  $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  glufosinate over the whole plant showed significant phytotoxicity, which was easy to be observed with duplicate spray.

**Key words:** Soybean; Glufosinate; Sensitivity

草丁膦 (Glufosinate), 又名草铵膦, 属膦酸类除草剂, 为非选择性触杀除草剂。草丁膦在叶子内转移, 少量转移到别处, 在植物体内强烈抑制谷氨酰胺合成酶 (Glutamine Synthetase, GS) 活性, 导致铵离子累积, 光合层被破坏、抑制植物的光合作用, 叶片失绿、干枯, 最终引起植物细胞氨中毒死亡<sup>[1-2]</sup>。高湿和高光可增强草丁膦的吸收而显著提高其活性。在土壤中, 草丁膦能迅速被土壤微生物降解, 故草丁膦主要对叶片起作用, 处理后的叶片快速产生药害, 从而限制草丁膦在韧皮部与木质部的传导<sup>[3-5]</sup>。草丁膦作为植物筛选剂在转基因材料的筛选和获得中得到广泛应用, 在玉米、水稻、油菜、大豆等多种作物中获得了草丁膦抗性的材料, 薛仁镐等<sup>[6]</sup>利用在培养基中添加草丁膦筛选大豆, 转化率提高到 6.7%, 浦惠明等<sup>[7]</sup>将草丁膦抗性作为标记性状, 选育工程油菜不育系和恢复系; 同时对多种作物在植物转基因稳定性和抗性遗传上进行了较深入的分析<sup>[8]</sup>。在植物基因工程方面利用草丁膦对转基因植株的进行筛选具有简便、快速、高效等优点。

在大豆转基因的后代选择中, 合适的筛选浓度对于从大量的转基因后代中获得转基因株系至关重要, 该研究以非转基因大豆为材料, 分析大豆自身对草丁膦的敏感程度, 从而为草丁膦抗性转基因大豆的筛选提供参考依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试验材料

东农 50 (小粒豆), 东北农业大学大豆所提供; 草丁膦 (Glufosinate):  $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 拜尔作物科技公司, 韩国。

#### 1.2 试验方法

1.2.1 大豆培养 选取饱满的东农 50 种子于营养钵中, 每钵 3 粒种子, 在  $25^{\circ}\text{C}$ , 16/8 h 光暗周期下培养。

1.2.2 草丁膦溶液配制 草丁膦 + 0.5% SilWet-77, 草丁膦浓度范围为  $25 \sim 250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 梯度为  $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

收稿日期: 2011-03-22

基金项目: 国家转基因作物新品种培育重大专项资助项目 (2008ZX08004-002)。

第一作者简介: 李永光 (1984-), 男, 在读博士, 研究方向为大豆生物技术。E-mail: yongguangli\_0451@yahoo.com.cn。

通讯作者: 李文滨 (1958-), 男, 教授, 主要从事大豆遗传育种方面的研究。E-mail: wenbinli@neau.edu.cn。

1.2.3 不同浓度草丁膦叶片处理 大豆培养 28 d 后,用移液枪取 50  $\mu\text{L}$  各浓度 (25 ~ 250  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 草丁膦溶液,轻轻滴于三出复叶中间叶片的不同点,并用枪头侧面轻轻摊开,表面活性剂 SilWet-77 的添加使得溶液在叶子表面快速扩散,每种处理 5 株,3 次重复。处理后的植株正常光照培养,观察记录处理 3、5、7 d 后叶片表现。

1.2.4 大豆植株不同部位的草丁膦处理 由于 50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  以上浓度可直接观察到叶片的变化,考虑草丁膦筛选的实际应用,选取发生显著变化的处理浓度 75  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  作为进一步试验的浓度。用移液枪取 50  $\mu\text{L}$  的 75  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的草丁膦溶液,小心涂于子叶、茎、真叶、第 1 和第 2 片三出复叶的中间叶片,每种处理 5 株,3 次重复。处理后植株正常光照培

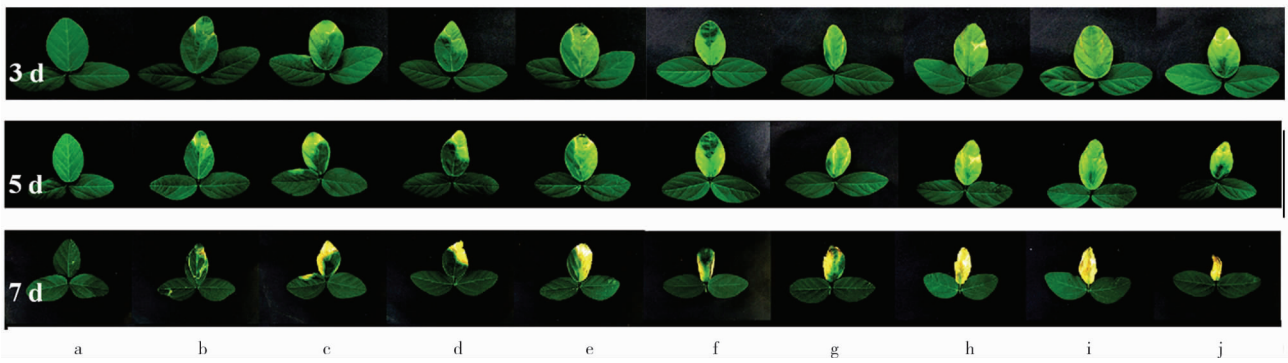
养,7 d 观察记录。

1.2.5 全株喷施 用喷壶对大豆植株全株喷施草丁膦溶液,草丁膦浓度梯度为 0、50、75、100、150  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,待叶面布满草丁膦恰滴水为止。每种处理 5 株,3 次重复,7 d 观察记录。

## 2 结果与分析

### 2.1 东农 50 叶片对不同浓度草丁膦的抗性表现

草丁膦引起植物体内氨的积累,破坏光合层,所以大豆叶片对草丁膦的敏感程度可以直接从叶片的颜色和形态变化来观察。该研究对大豆三出叶进行不同浓度梯度的草丁膦溶液涂抹,从 25 ~ 250  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,以 25  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度递增,分别观察了涂抹后 3、5、7 d 叶片的变化,结果见图 1。



a、b、c、d、e、f、g、h、i 和 j 分别代表草丁膦处理浓度为 25、50、75、100、125、150、175、200、225 和 500  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时大豆叶片的表现。

a、b、c、d、e、f、g、h、i 和 j represents soybean screened by 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225 and 500  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  glufosinate, respectively.

图 1 大豆叶片对不同浓度梯度草丁膦的敏感性

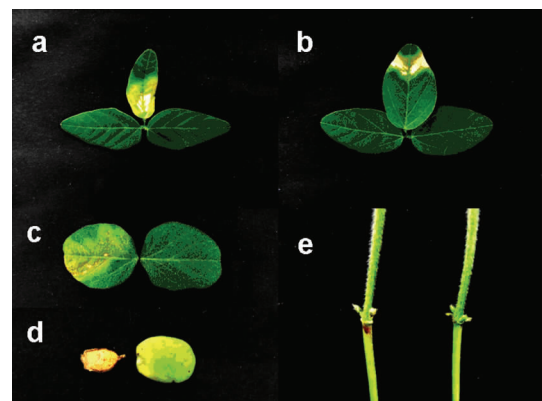
Fig. 1 Sensitivity of soybean to glufosinate in different concentrations

由图 1 可知,低浓度 (25  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 草丁膦的施用对大豆三出叶无明显影响,叶片保持完好。浓度为 50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  处理在第 3 天时开始出现叶片少部分轻度失绿、干枯表现,当草丁膦处理浓度增大到 200  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,叶片第 3 天时失绿面积达 80%,到第 7 天时叶片完全干枯死亡。在 50 ~ 250  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度处理下,从第 3 天均可用肉眼明显观察到叶片失绿、变黄,随天数和草丁膦浓度的增加,失绿的程度和面积增加。另外,单片叶涂抹草丁膦时,只作用在涂抹叶片而邻近叶片未见显著变化,说明草丁膦主要在处理部位发生作用。

### 2.2 东农 50 不同部位对草丁膦的抗性表现

利用 75  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度的草丁膦对大豆的近顶端第 1 片三出复叶,第 2 片三出复叶、茎、真叶、子叶进行敏感试验,结果见图 2。

75  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  草丁膦对大豆不同部位的处理 7 d 后,不同生长程度叶片对涂抹草丁膦的敏感程度不同,新叶对草丁膦敏感性较强,新展开的第 2 片三出叶出现了大面积的失绿、枯黄区域 (图 2 a),而第 1



a: 第一片三出复叶; b: 第二片三出复叶; c: 真叶; d: 子叶; e: 茎

a: the first terately compound leaf; b: the second terately compound leaf; c: true leaf d: cotyledon; e: stem

图 2 大豆不同部位对 75  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  草丁膦的敏感性表现

Fig. 2 Sensitivity of different parts of soybean to 75  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  glufosinate

片三出叶片只在局部出现显著变化 (图 2 b); 真叶出现失绿枯黄,但枯黄坏死面积较小 (图 2 c); 子叶

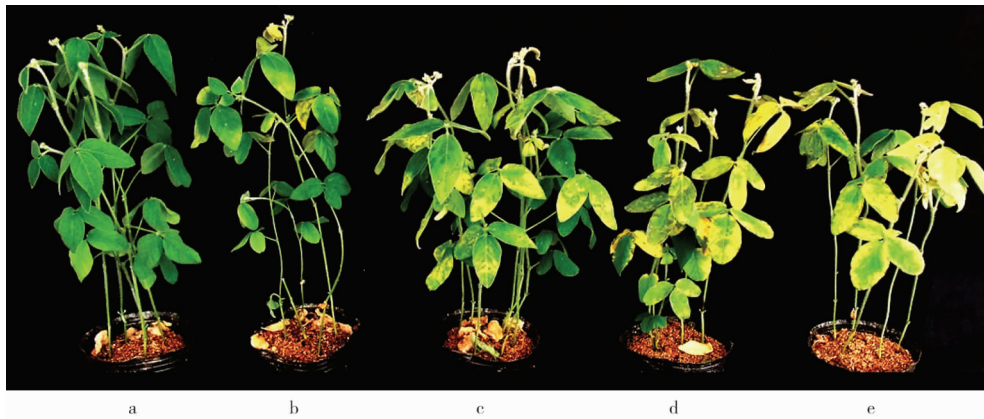
在涂抹草丁膦 7 d 后普遍脱落、皱缩剧烈,枯黄反应明显(图 2 d);茎部涂抹表现出极少区域的破坏(图 2 d),说明草丁膦在茎中运输较慢。不同部位的试验结果表明,幼嫩叶片和子叶表现敏感,草丁膦对于幼嫩的新鲜叶片毒害作用较强,在叶片内部转移迅速,而茎对草丁膦的敏感性最低。

### 2.3 大豆全株喷施不同浓度草丁膦表现

根据大面积筛选实际应用的需要,利用喷雾方式对大豆全株进行喷施,梯度分别为 0、50、75、100、125、150  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,7 d 后观察结果见图 3。

由于喷施的剂量相对涂抹较难控制,该研究喷

施的程度为叶片布满溶液,恰滴水的程度,喷施的剂量相对偏大,所以叶片变化显著。由图 3 可观察到 7 d 后的叶片反应,随浓度的增大叶片枯黄程度增加,50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时少部分叶片出现局部失绿斑块,当草丁膦浓度增加到 75  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,明显观察到全株叶片普遍出现失绿枯黄区域,100 和 150  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  枯黄区域增加,草丁膦对叶片的毒害程度加剧,且叶片反应时间较短,在处理后的第 3 天即可直接观察到叶片的部分失绿现象。另外,相同浓度梯度间隔 1 d 喷施 2 次会显著增加草丁膦的作用效果,失绿枯黄区域增加,叶片反应时间较 1 次喷施缩短。



a、b、c、d 和 e 分别代表喷洒 0、50、75、100、125 和 150  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  草丁膦时大豆植株的表现。

a, b, c, d and e represents soybean sprayed by 0, 50, 75, 100, 125 and 150  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  glufosinate, respectively.

图 3 不同浓度草丁膦全株喷施

Fig. 3 Spraying of the herbicide glufosinate at different concentration over whole plant

## 3 结论与讨论

该研究主要分析了大豆对草丁膦敏感性,结果表明草丁膦产生的毒害直接作用在涂抹叶片内部并迅速扩散,在 50 ~ 250  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度处理下,第 3 天时时均可用肉眼明显观察到叶片失绿变黄,随着处理浓度和天数的增加,变黄的程度和面积增加并扩散整个处理叶片;子叶、茎、真叶不同位置的草丁膦处理显示新叶和子叶对草丁膦最敏感,茎的敏感性最低。全株喷施草丁膦研究表明 75  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时可直接观察到草丁膦对叶片的显著毒害作用。

对于叶片来说,不同浓度草丁膦产生不同程度的破坏作用,筛选浓度的选择因试验目的而异。当试验目的仅需观察到叶片的显著变化而不破坏植株时,可选取相对较低浓度,如转带有 *bar* 基因的当代植株,由于叶片小、植株长势较弱,可选用 75 或 100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。而对于大量的转基因后代全体的筛选来说,则需要较大浓度进行喷施方式处理,并且建议 2 次喷施,以提高筛选效率。

另外,通过对大豆不同部位草丁膦的敏感性分

析,对于大豆转基因过程中筛选剂草丁膦的使用也提出了新的疑问,草丁膦是对其直接作用的部位快速产生作用,但多数大豆遗传转化过程将筛选剂直接加到培养基中,草丁膦通过下胚轴运输到转化部位,如下胚轴转化法、子叶节转化法等<sup>[9-10]</sup>,但这种筛选方式对直接接触培养基的下胚轴(非转化部分)伤害较大,由于铵的大量积累,导致下胚轴中组织细胞受到破坏,进而影响了营养和水分的向上运输,最终导致了外植体的大量淘汰。所以为了避免这种破坏,建议转基因工作者在筛选方式上尝试新的直接作用在转化部位的筛选方法,提高筛选效率,以增加基因转化率。

**致谢:**该研究得到农业部大豆产业技术研发中心和黑龙江省教育厅创新团队项目的支持,在此表示感谢。

## 参考文献

- [1] 张宏军,倪汉文,周志强,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.

(下转第 756 页)

- transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer[J]. *Bio/Technology*, 1988, 6:92-99.
- [6] Owens L D, Cress D E. Genotypic Variability of soybean response to *Agrobacterium tumefaciens* strains harboring Ti or Ri plasmids [J]. *Plant Physiology*, 1985, 77:87-94.
- [7] 许智宏. 植物生物技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998:321. ( Xu Z H. Plant biotechnology[M]. Shanghai: Science and Technology Press of Shanghai, 1998:321. )
- [8] Paula M, Olhoft L E, Fligel C M, et al. Efficient soybean transformation using Hygromycin B selection in the cotyledonary node method[J]. *Planta*, 2003, 216:723-735.
- [9] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1987, 5: 387-405.
- [10] Wang L Z, Pei Y L, Fu Y Q, et al. Soybean mutation breeding and tumor formation by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. IAEA SM340/202p, FAO/IAEA International Symposium on the Use of Induced Mutations and Molecular Techniques for Crop Improvement. 1995, 7:19-23.
- [11] 李文霞, 宁海龙, 李文滨, 等. 6-BA 对大豆子叶节再生的影响 [J]. 核农学报, 2007, 21(5):502-505. ( Li W X, Ning H L, Li W B. Effect of 6-BA on regeneration of soybean cotyledonary node [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2007, 21(5):502-505 )
- [12] Harold N T, Randy D D, Elian R S, et al. Recent advances in soybean transformation[J]. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 1997, 3:9-26.
- [13] 卜云萍, 李明春, 胡国武, 等. 大豆子叶节组培再生系统与农杆菌介导的基因转化系统的比较研究[J]. 南开大学学报(自然科学版), 2003, 36(1):103-108. ( Bu Y P, Li C M, Hu G W, et al. The study of comparing the transformation system of *Agrobacterium*-mediated and regeneration system of cotyledon nod of soybean culture [J]. *Journal of Nankai University ( Nature Science Edition )*, 2003, 36(1):103-108. )
- [14] 王岚, Clemente T, 王连铮, 等. 大豆品种的再生性能及对 EHA 101 农杆菌的敏感性[J]. 作物学报, 2003, 29(5):664-669. ( Wang L, Clemente T, Wang L J, et al. Regeneration study of soybean cultivars and their susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2003, 29(5):664-669. )

(上接第 751 页)

- ( Zhang H J, Ni H W, Zhou Z Q, et al. Major progress on biosafety of glufosinate resistant transgenic crops[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2002, 7(5):54-56. )
- [2] 张宏军, 刘学, 张佳, 等. 草铵膦的作用机理及其应用[J]. 农药科学与管理, 2004(4):23-27. ( Zhang H J, Liu X, Zhang J. Mechanism and utilization of glufosinate-ammonium [J]. *Pesticide Science and Administration*, 2004(4):23-27. )
- [3] 刘洪艳, 弭晓菊, 崔继哲. *bar* 基因、PAT 蛋白和草丁膦的特性与安全性[J]. 生态学杂志, 2007(6):938-942. ( Liu H Y, Mi X J, Cui J Z. Characteristics and safety of *bar* gene, PAT proteins and glufosinate [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2007(6):938-942. )
- [4] 段发平, 梁承邳, 黎垣庆. *Bar* 基因和转 *bar* 基因作物的研究进展[J]. 广西植物, 2001(2):166-172. ( Duan F P, Liang C Y, Li Y Q. Research advances of *bar* gene and its transgenic crops [J]. *Guihaia*, 2001(2):166-172. )
- [5] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998. ( Wang G L, Fang H J. *Plant genetic engineering* [M]. Beijing: Science Press, 1998. )
- [6] 薛仁镐, 谢宏峰. 利用改良的草丁膦筛选系统快速而有效筛选转基因大豆[J]. 大豆科学, 2006, 25(4):373-378. ( Xue R G, Xie H F. Rapid and efficient selection for transgenic soybean plants with the improved glufosinate selection system [J]. *Soybean Science*, 2006, 25(4):373-378. )
- [7] 浦惠明, 高建芹, 戚存扣. 油菜抗草丁膦性状的遗传与利用 [J]. 江苏农业科学, 2003(2):15-18. ( Pu H M, Gao J Q, Qi C K. Heredity and use of resistance to phosphinothricin in rape seed [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2003(2):15-18. )
- [8] 陈浩, 陈社员, 官春云. 转 *bar* 基因油菜对非选择性除草剂草丁膦的抗性研究[J]. 作物研究, 2010(3):160-163. ( Chen H, Chen S Y, Guan C Y. Resistance of *bar*-transgenic rape seed (*Brassica napus* L.) to herbicide PPT [J]. *Crop Research*, 2010(3):160-163 )
- [9] 刘海坤, 卫志明. 大豆遗传转化研究进展[J]. 植物生理与分子生物学报, 2005, 31(2):126-134. ( Liu H K, Wei Z M. Recent advances in soybean genetic transformation [J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2005, 31(2):126-134. )
- [10] 梁雪莲, 王引斌. 作物抗除草剂转基因研究进展[J]. 生物技术通讯, 2001(2):17-21. ( Liang X L, Wang Y B. The progress of studies on herbicide resistance gene of crop [J]. *Biotechnology Information*, 2001(2):17-21. )