



野生大豆对草甘膦的耐性筛选及施用草甘膦后叶绿素荧光参数的变化

刘 琪, 相世刚, 胡玉琪, 强 胜, 宋小玲

(南京农业大学 生命科学院/杂草研究室, 江苏 南京 210095)

摘 要:为研究不同种群野生大豆对草甘膦耐性的差异以及草甘膦对其叶绿素荧光参数的影响,在温室条件下测定了 17 个不同地理位置种群野生大豆幼苗对草甘膦的耐性,从中筛选出了对草甘膦耐性最高、较高、较低以及最低的种群,并测定了这 4 个种群在喷施草甘膦后叶绿素荧光参数的变化。结果表明:根据 50% 有效量 (ED50) 值,湖南郴州 (CZ) 种群耐性最低,辽宁铁岭 (TL) 种群耐性较低,安徽舒城 (SC) 种群耐性较高,江苏金坛 (JT) 种群耐性最高,耐性指数分别为 1, 1.78, 2.17, 3.17。在施用不同剂量草甘膦后 2 d, 4 个种群的 PS II 最大光化学效率 (F_v/F_m)、PS II 实际光合效率 ($Y(II)$)、表观电子传递效率 (ETR)、光化学荧光淬灭系数 (qP) 总体上均随着草甘膦剂量的增加而降低。非光化学淬灭系数 (NPQ) 呈现不同的变化趋势, JT 种群 NPQ 随着草甘膦剂量的增加而逐渐升高, SC、TL 及 CZ 种群则呈现先增加后下降的趋势。总体上耐性越高的种群 F_v/F_m 、 $Y(II)$ 、ETR、 qP 在草甘膦处理后下降幅度越小, NPQ 越能够维持稳定上升。在施用 1.2 ~ 2.4, 0.6, 0.6 ~ 1.8, 0.6 ~ 1.2 kg·hm⁻² 有效剂量草甘膦后, JT 种群 F_v/F_m 、 $Y(II)$ 、ETR、 qP 分别显著高于其它种群。因此, 可通过比较不同野生大豆种群喷施草甘膦后叶绿素荧光参数的差异进行野生大豆对草甘膦耐性的快速筛选。

关键词:野生大豆; 草甘膦; 叶绿素荧光参数; 耐性

Tolerance Screening of Wild Soybean to Glyphosate and the Changes of Chlorophyll Fluorescence Parameters after Glyphosate Application

LIU Qi, XIANG Shi-gang, HU Yu-qi, QIANG Sheng, SONG Xiao-ling

(Weed Research Laboratory, College of Life Science of Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In order to study the difference of glyphosate tolerance of wild soybean from different populations and the effects of glyphosate on their fluorescence parameters, the glyphosate tolerance of different wild soybean populations which were sampled from 17 different sites were measured in greenhouse, and 4 populations with the highest, higher, lower, and lowest tolerance to glyphosate were selected to determine the changes of chlorophyll fluorescence parameters after spraying glyphosate. The results showed that, based on ED50 value, the population of Jintan (JT), Shucheng (SC), Tieling (TL) and Chenzhou (CZ) had the highest, higher, lower, and lowest tolerance to glyphosate and their tolerance index was 3.17, 2.17, 1.78 and 1, respectively. Two days after applying different doses of glyphosate, the maximal photochemical efficiency (F_v/F_m) and actual photochemical efficiency ($Y(II)$) of PS II, photochemical quenching (qP) and electron transport rate (ETR) of those 4 populations were generally decreased with the increasing glyphosate doses. The non-photochemical quenching (NPQ) showed different trend of change in different populations, the NPQ of JT population increased while the NPQ of SC, TL and CZ population increased first and then decreased with the increasing glyphosate doses. Consequently, after glyphosate application, the higher the tolerance, the smaller decline rate of F_v/F_m , $Y(II)$, ETR and qP , and the more steady increasing of the NPQ. After the application of 1.2–2.4, 0.6, 0.6–1.8 and 0.6–1.2 kg·ha⁻¹ active ingredients of glyphosate, the F_v/F_m , $Y(II)$, ETR and qP of JT population were significantly higher than that of other populations respectively. Therefore, after glyphosate application, comparing the difference of fluorescence parameters of different wild soybean populations could be used for rapid screening of glyphosate tolerance.

Keywords: Wild soybean; Glyphosate; Chlorophyll fluorescence parameters; Tolerant

野生大豆 (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.) 为一年生草本植物, 在我国广泛分布于 N24° ~ 53°, E97° ~ 135°^[1]。野生大豆生境多样, 多数生活在沟边、滩涂湿地、低洼地等潮湿地方, 也有的生长于路边、荒山或荒坡上, 是栽培大豆的近缘祖先^[2-4]。目前, 我国的栽培大豆产量远不能满足国内的消费需求, 2015

年国内大豆消费对国际大豆市场的进口依存度已达到 87.8% (查询 FAO 数据库 faostat.fao.org, 根据公式: 进口依存度 = 进口量/总消费量 × 100% 计算所得)。在农业部转基因新品种培育重大专项的资助下已有研究单位开始了转基因大豆的研究和开发, 所培育的抗草甘膦转基因大豆具有良好的商业

收稿日期: 2018-03-09

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项 (2016ZX08012005-006)。

第一作者简介: 刘琪 (1993 -), 男, 硕士, 主要从事转基因生物安全评估研究。E-mail: liuqi88@126.com。

通讯作者: 宋小玲 (1969 -), 女, 博士, 教授, 主要从事转基因生物安全评估研究。E-mail: sxl@njau.edu.cn。

化前景^[5]。野生大豆和栽培大豆染色体数同为 2n = 40, 同属 G 染色体组, 种间杂交没有生殖隔离, 极容易杂交^[6]。已有报道表明抗草甘膦转基因大豆能够向野生大豆发生基因漂移^[7-9], 抗草甘膦基因一旦漂移到野生大豆, 会污染野生大豆资源, 如果漂移到天然对草甘膦具有耐性的种群中还有可能产生抗性更强的后代。这种基因漂移的生态风险不容忽视。鉴于全球种植的转基因大豆绝大部分为抗草甘膦转基因大豆^[10-11], 我国进口的转基因大豆也几乎都为抗草甘膦性状, 因此非常有必要对我国野生大豆对草甘膦的耐性进行全面了解。因为对草甘膦耐性不同的野生大豆本身在草甘膦选择压下表现的适合度可能不同, 所以这些耐性不同的野生大豆接受抗草甘膦转基因大豆的抗性基因后, 适合度的表现也可能存在明显差异。因此, 了解不同野生大豆对草甘膦的耐性程度对于正确评估这一生态风险尤为重要。

本研究对采集于全国不同地区的 17 个野生大豆种群进行草甘膦耐性筛选, 获得供试材料中耐性

水平最高、较高、较低以及最低的种群, 对这 4 个种群进行叶绿素荧光参数的比较, 探讨草甘膦对不同耐性野生大豆种群叶绿素荧光参数的影响, 以期进一步了解不同野生大豆种群对草甘膦的耐性程度以及不同耐性种群在施用草甘膦后叶绿素荧光参数的差异, 找出利用叶绿素荧光参数快速鉴定出草甘膦耐性种群的方法, 为评估抗草甘膦转基因大豆向不同草甘膦耐性野生大豆的基因漂移奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为 2015 年 8 - 10 月采集于全国不同地理位置共 17 个种群的野生大豆种子, 各种群野生大豆地理位置信息见表 1。栽培容器为盆口直径 23 cm、高 25 cm、盆底部有孔的普通花盆。栽培基质为有机含量 2.5% ~ 5.0%、pH7.0 ~ 7.5 的营养土。草甘膦为美国孟山都有限公司生产的农达(41% 草甘膦异丙胺盐水剂)。

表 1 供试野生大豆种群地理位置信息

Table 1 Geographic location information of wild soybean populations

种群 Population	编号 No.	经纬度 Longitude and latitude	生境 Habitat	种群 Population	编号 No.	经纬度 Longitude and latitude	生境 Habitat
湖南郴州 Chenzhou, Hunan	CZ	N25. 74°, E112. 96°	山坡	吉林白城 Baicheng, Jilin	BC	N45. 49°, E123. 28°	河边
辽宁沈阳 Shenyang, Liaoning	SY	N41. 86°, E122. 96°	河边	湖南张家界 Zhangjiajie, Hunan	ZJJ	N29. 15°, E110. 46°	河边
吉林长春 Changchun, Jilin	CC	N43. 79°, E125. 48°	水渠边	安徽舒城 Shucheng, Anhui	SC	N31. 36°, E117. 02°	荒地
河南郑州 Zhengzhou, Henan	ZZ	N34. 74°, E113. 87°	农田旁	安徽安庆 Anqing, Anhui	AQ	N31. 13°, E117. 01°	山坡
广西桂林 Guilin, Guangxi	GL	N25. 27°, E110. 37°	路边	河南漯河 Luohe, Henan	LH	N33. 60°, E113. 84°	农田旁
辽宁铁岭 Tieling, Liaoning	TL	N42. 21°, E123. 94°	山坡	河北邯郸 Handan, Hebei	HD	N36. 52°, E114. 77°	河边
黑龙江巴彦 Bayan, Heilongjiang	BY	N46. 05°, E127. 44°	农田旁	湖南怀化 Huaihua, Hunan	HH	N27. 54°, E109. 93°	水渠边
浙江上饶 Shangrao, Zhejiang	SR	N28. 48°, E117. 99°	山坡	江苏金坛 Jintan, Jiangsu	JT	N31. 66°, E119. 47°	农田旁
浙江海宁 Haining, Zhejiang	HN	N30. 47°, E120. 50°	荒地				

1.2 方法

1.2.1 野生大豆对草甘膦的耐性筛选 试验在南京农业大学牌楼试验基地的温室内进行, 播种 17 个供试种群的野生大豆种子, 每种群设 4 次重复, 每重复 4 盆, 每盆播种 2 粒种子, 出苗后间苗为 1 株, 待

植株长至 3 ~ 4 片复叶期用草甘膦处理。供试 41% 草甘膦异丙胺盐水剂的有效剂量梯度设置为 0, 0. 6, 1. 2, 1. 8, 2. 4 kg · hm⁻², 0 kg · hm⁻² 为对照处理 (CK), 采用手持式喷雾器对整株均匀喷雾, 兑水量为 45 mL · m⁻²。药后第 2 ~ 9 天每天上午 10:00 观

察并记录不同野生大豆种群的药害症状,参照文献^[12]分级标准,进行药害分级。当最高剂量下药害症状达到 5 级时,计算 1-药害综合指数。根据不同野生大豆的 50% 有效量(ED50)及 90% 有效量(ED90)分析不同种群野生大豆对草甘膦的耐性水平,筛选出对草甘膦耐性最高、较高、较低及最低的种群,用于后续叶绿素荧光参数分析。

1.2.2 叶绿素荧光参数测定 播种 1.2.1 中筛选出的对草甘膦耐性最高、较高、较低及最低的野生大豆种群种子,播种及施药方法同 1.2.1,药后第 2 天上午 9:00-11:00,每盆取植株从根部向上第三片复叶中间小叶离体进行叶绿素荧光参数的测定,4 次重复,每种群每梯度共计取 16 片。

叶绿素荧光参数测定仪器为 Imaging-PAM-MAXI 新型调制荧光成像系统,德国 Walz 公司生产。测定前将叶片暗适应 30 min,参考文献^[13]的测定方法,记录并计算 PS II 最大光化学效率(F_v/F_m)、PS II 实际光合效率($Y(II)$)、表观电子传递效率(ETR)、光化学荧光淬灭系数(qP)、非光化学荧光淬灭系数(NPQ)等叶绿素荧光参数。

1.3 数据分析

根据 GB/T 17980.121.27.127-2004 规定,

1-药害综合指数计算方法为:1-药害综合指数(%) = 1 - $\sum[(\text{每小区各受害级别株数} \times \text{级别})/(\text{每小区株数} \times \text{最高级别})] \times 100$,用 Origin 8 分析软件进行剂量和 1-药害综合指数的回归,得出回归方程及 ED50 和 ED90。采用 Excel 2013 和 SPSS 20.0 软件对试验数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 17 个不同种群野生大豆对草甘膦的耐性

用 Origin 8 软件进行 logistic 曲线拟合,得到了 17 个种群野生大豆施用草甘膦的有效剂量与 1-药害综合防效指数的拟合曲线,计算出各种群野生大豆的 ED50 与 ED90 值。

17 个供试野生大豆种群对草甘膦的耐性指数由大到小为 JT、HH、HD、LH、AQ、SC、ZJJ、BC、HN、SR、BY、TL、GL、ZZ、CC、SY、CZ。供试野生大豆种群中对草甘膦耐性最高的是 JT 种群,最为敏感的是 CZ 种群。TJ 种群的 ED50 为 CS 种群的 3.17 倍,从国际上评估耐药性的标准来看,JT 种群属于耐性种群。选择 17 个供试种群中不同耐性种群,即耐性指数排列第 1(JT)、6(SC)、12(SC)、17(TL)位的种群用于后续叶绿素荧光参数分析(表 2)。

表 2 17 个种群野生大豆施用草甘膦有效剂量与 1-药害综合指数拟合结果

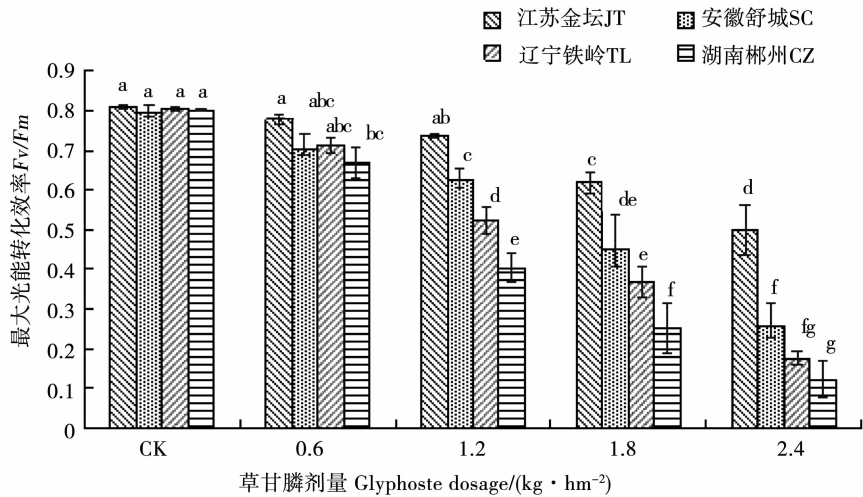
Table 2 Fitting results of glyphosate effective dosage and 1-Phytotoxicity index of 17 wild soybean populations					
种群编号 Population No.	剂量-作用反应曲线 Dose-response curves	50%有效量 ED50	90%有效量 ED90	相关系数 R^2	耐性指数 Tolerance index
CZ	$y = -0.15 + 1.15/(1 + (X/0.07)^{1.36})$	0.055	0.173	0.99	1.00
SY	$y = -0.21 + 1.20/(1 + (X/0.08)^{1.19})$	0.058	0.189	0.99	1.06
CC	$y = -33.72 + 34.72/(1 + (X/2111.12)^{0.40})$	0.06	0.264	0.99	1.11
ZZ	$y = -0.35 + 1.35/(1 + (X/0.11)^{0.99})$	0.064	0.215	0.99	1.17
GL	$y = -0.46 + 1.45/(1 + (X/0.16)^{1.31})$	0.094	0.231	0.98	1.72
TL	$y = -1.78 + 2.78/(1 + (X/0.96)^{0.56})$	0.064	0.208	0.99	1.78
BY	$y = -63.82 + 64.81/(1 + (X/376.99)^{0.59})$	0.097	0.270	0.98	1.78
SR	$y = -0.33 + 1.33/(1 + (X/0.14)^{1.38})$	0.100	0.242	0.99	1.83
HN	$y = -0.28 + 1.28/(1 + (X/0.14)^{1.82})$	0.115	0.236	0.96	2.11
BC	$y = -0.31 + 1.30/(1 + (X/0.16)^{1.65})$	0.118	0.254	0.97	2.16
ZJJ	$y = -0.13 + 1.13/(1 + (X/0.13)^{2.26})$	0.118	0.239	0.99	2.17
SC	$y = -0.08 + 1.05/(1 + (X/0.13)^{3.11})$	0.118	0.258	0.97	2.17
AQ	$y = -0.06 + 1.03/(1 + (X/0.12)^{3.27})$	0.118	0.207	0.96	2.17
LH	$y = -0.37 + 1.36/(1 + (X/0.17)^{1.80})$	0.124	0.243	0.98	2.28
HD	$y = -1.08 + 2.07/(1 + (X/0.32)^{1.42})$	0.137	0.258	0.96	2.51
HH	$y = -1.24 + 2.22/(1 + (X/0.35)^{1.74})$	0.170	0.252	0.97	3.11
JT	$y = -0.04 + 1.01/(1 + (X/0.18)^{5.20})$	0.173	0.279	0.97	3.17

X、Y 分别表示施用草甘膦的有效剂量和 1-药害综合指数。
X、Y indicate effective dosage of glyphosate and 1-Phytotoxicity index respectively.

2.2 JT、SC、TL、CZ 种群野生大豆施用草甘膦后叶绿素荧光参数的变化

2.2.1 草甘膦对 PS II 最大光能转化效率 (F_v/F_m) 的影响 F_v/F_m 是 PS(II) 的最大捕光效率,表示 PS(II) 反应中心完全开放时的最大光化学效率,可以判断 PS(II) 受抑制的程度^[14]。由图 1 可见施用草甘膦后所有供试种群野生大豆 F_v/F_m 值均随着草甘膦剂量的增加而降低,说明在施用草甘膦后各野生大豆种群均受到一定程度光抑制,且随着草甘

膦剂量的增加光抑制程度逐渐增强。耐性最高种群 JT 在 0.6 和 1.2 $\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 时 F_v/F_m 值与对照无显著差异,1.8 和 2.4 $\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 剂量下显著低于对照。耐性最低种群 CZ F_v/F_m 值在所有剂量处理下均显著低于对照。耐性较高、较低种群 SC、TL 在 0.6 $\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 时与对照无显著差异,其余剂量下均显著低于对照。多重比较结果显示,除草甘膦有效剂量 0.6 $\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 外,SC、TL 种群 F_v/F_m 值均显著低于 JT 种群,CZ 种群 F_v/F_m 值显著低于其它 3 个种群。



草甘膦剂量指有效剂量;不同小写字母表示在 5% 水平上差异显著 ($P < 0.05$)。下同。
Glyphosate dose refers to the active ingredients; different lowercase indicate significant difference at 5% level ($P < 0.05$). The same as below.

图 1 野生大豆幼苗在不同剂量草甘膦处理 2 d 后最大光能转化效率 F_v/F_m 的变化
Fig. 1 Changes in the maximum energy conversion efficiency (F_v/F_m) of the wild soybean seedlings exposed to various dosages of glyphosate for 2 days

2.2.2 草甘膦对 PSII 实际光合效率 ($Y(II)$) 的影响

$Y(II)$ 表示 PS(II) 反应中心电荷分离的实际光合量子效率, $Y(II)$ 值较高表示能够为暗反应 C 同化积累更多能量^[15]。从图 2 中可以看出,供试种群野生大豆 $Y(II)$ 值均随着草甘膦剂量的增加而降低,说明在施用草甘膦后对各种群野生大豆暗反应 C 同化造成不同程度的影响。所有供试种群在施用草甘膦后 $Y(II)$ 值均显著低于对照。在草甘膦有效剂量为 1.8 $\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 时,耐性最低 CZ 种群 $Y(II)$ 值变为 0,在最高剂量 2.4 $\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 下除耐性最高种群 JT 外,其余 3 个种群 $Y(II)$ 值均下降为 0。多重比较结果显示,较高耐性种群 SC 在剂量为 0.6 $\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 时 $Y(II)$ 值显著低于耐性最高种群 JT,其余剂量下均与 JT 种群差异不显著。耐性较低及最低种群 TL、CZ 在剂量 0.6, 1.2 $\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 下显著低于 JT 种群,其余剂量下也与 JT 种群差异不显著。

2.2.3 草甘膦对表观电子传递效率 (ETR) 的影响

表观电子传递效率 (ETR) 反映光化学反应时碳固定的电子传递情况,由光强、叶片吸收光系数和有效荧光产量计算得到^[16]。由图 3 可见,在对照条件下,耐性较低种群 TL 及最低种群 CZ 均显著低于耐性较高种群 SC 及最高种群 JT,说明在无草甘膦选择压下耐性高的种群比耐性低的种群本身电子传递效率高,较高的光化学电子传递效率可能也是对草甘膦有更高耐受性的原因。供试种群 ETR 值均随着草甘膦剂量的增加而降低,所有供试种群在施用草甘膦后 ETR 值均显著低于对照。在草甘膦有效剂量为 1.8 $\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 时,耐性最低 CZ 种群 ETR 值下降为 0,在草甘膦剂量为 2.4 $\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 时除耐性最高 JT 种群,其余种群 ETR 值均下降为 0。多重比较结果显示,除最高剂量下 4 个种群间 ETR 值无显著差异,其余剂量下 JT 种群显著高于其它 3 个种群。

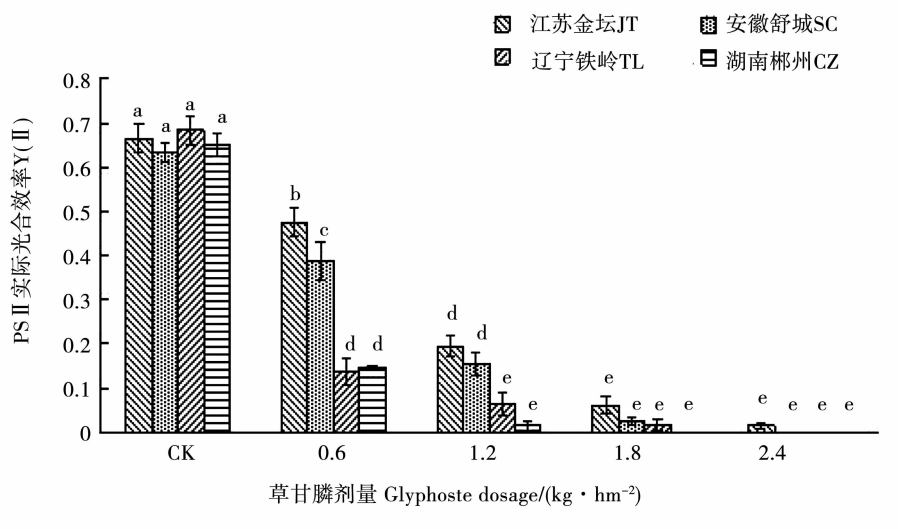


图2 野生大豆幼苗在不同剂量草甘膦处理2 d后 PS(Ⅱ)实际光合效率 Y(Ⅱ)的变化

Fig.2 Changes in the actual photochemical efficiency of PS(Ⅱ) (Y(Ⅱ)) of the wild soybean seedlings exposed to various dosages of glyphosate for 2 days

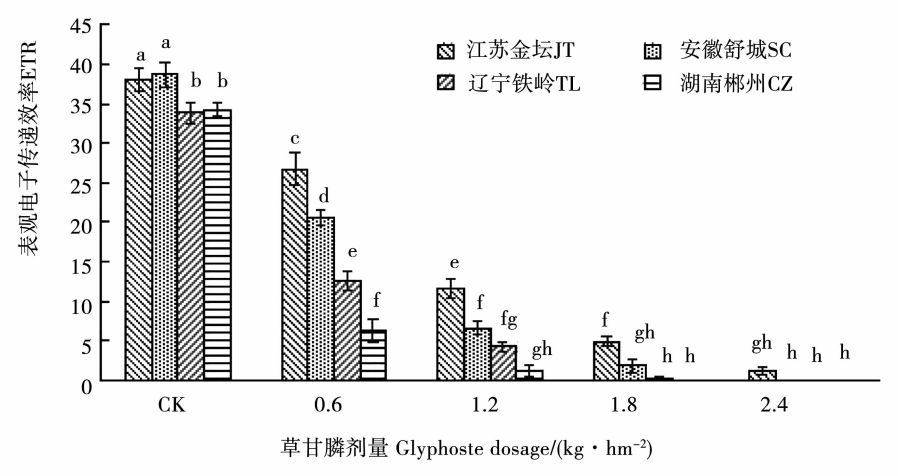


图3 野生大豆幼苗在不同剂量草甘膦处理2 d后表观电子传递效率 ETR 的变化

Fig.3 Changes in the electron transport rate (ETR) of the wild soybean seedlings exposed to various dosages of glyphosate for 2 days

2.2.4 草甘膦对光化学荧光淬灭系数(qP)的影响

光化学荧光淬灭系数(qP)反映 PS(Ⅱ)天线色素吸收的光能用于光化学反应的份额^[13]。由图4可见供试种群 qP 值均随着草甘膦剂量的增加而降低,所有供试种群在施用草甘膦后 Y(Ⅱ)值均显著低于对照。在草甘膦有效剂量为 1.2 kg·hm⁻²时,耐性最低 CZ 种群 qP 值已下降为 0,在草甘膦剂量为 1.8 kg·hm⁻²时,耐性较低 TL 种群 qP 值也下降为 0,在草甘膦剂量为 2.4 kg·hm⁻²时,除耐性最高种群 JT,其余种群 qP 值均下降为 0。多重比较结果显示,除最高剂量下 4 个种群间 ETR 值无显著差异,其余剂量下 JT 种群显著高于其它 3 个种群。

2.2.5 草甘膦对非光化学荧光淬灭系数(NPQ)的影响

NPQ 的变化反映热耗散的变化,表示 PS(Ⅱ)天线色素吸收的光能不能用于光化学电子传递,而以热能的形式耗散^[17]。从图5可知,耐性种群 JT 在所有剂量下 NPQ 值均显著高于对照,且随着剂量的增加而升高,但在剂量为 2.4 kg·hm⁻²时只有轻微升高,与剂量为 1.8 kg·hm⁻²时无显著差异。SC 种群在剂量为 0.6 和 1.2 kg·hm⁻²时 NPQ 值随着剂量的增加显著升高,当剂量大于 1.2 kg·hm⁻²时,NPQ 值逐渐下降。TL 种群 NPQ 值仅在 0.6 kg·hm⁻²时显著升高,在剂量为 1.2 kg·hm⁻²时无显著上升,当剂量大于 1.2 kg·hm⁻²时 NPQ 值显著下降。CZ

种群 NPQ 值在所有剂量下均无明显上升,且在剂量大于 0.6 kg·hm⁻²后逐渐下降,2.4 kg·hm⁻²时下降为 0。多重比较显示,SC 种群在 0.6 ~ 1.2 kg·hm⁻² 剂量下 NPQ 值与 JT 种群无显著差异,当剂量大于 1.2 kg·hm⁻²时 SC 种群 NPQ 值均显著低于 JT 种

群。TL 种群在剂量 0.6 kg·hm⁻²下 NPQ 值显著高于 JT 种群,在剂量 1.2 kg·hm⁻²下 NPQ 值与 JT 种群无显著差异,当剂量大于 1.2 kg·hm⁻²时 TL 种群 NPQ 值均显著低于 JT 种群。CZ 种群在所有剂量下 NPQ 值均显著低于其它 3 个种群。

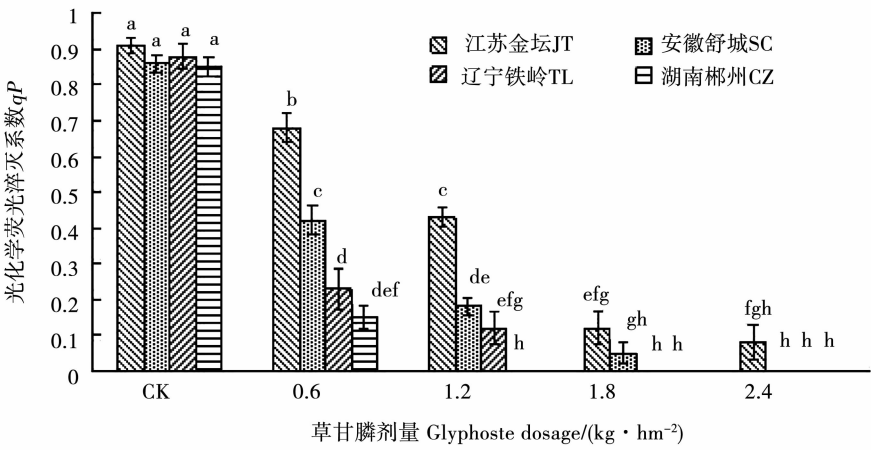


图 4 野生大豆幼苗在不同剂量草甘膦处理 2 d 后光化学荧光淬灭系数 qP 的变化
Fig. 4 Changes in the photochemical quenching coefficient (qP) of the wild soybean seedlings exposed to various dosages of glyphosate for 2 days

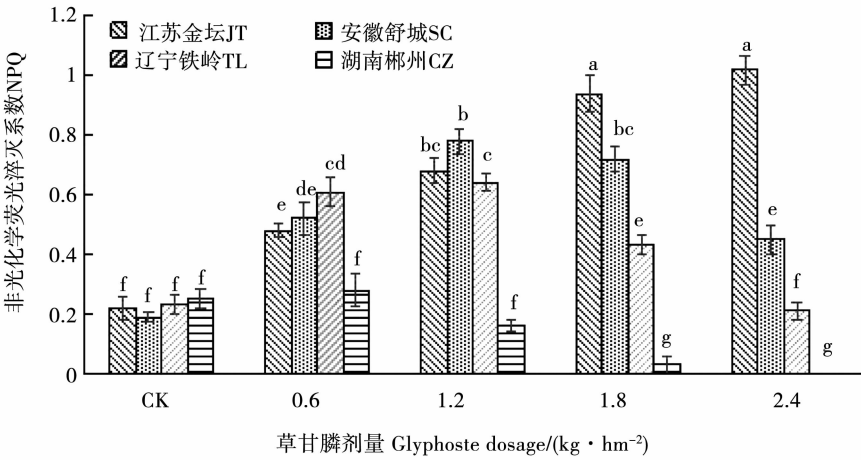


图 5 野生大豆幼苗在不同剂量草甘膦处理 2 d 后非光化学荧光淬灭系数 NPQ 的变化
Fig. 5 Changes in the non-photochemical quenching coefficient (NPQ) of the wild soybean seedlings exposed to various dosages of glyphosate for 2 days

3 讨论

本研究对全国不同地区 17 个供试野生大豆种群对草甘膦的耐性进行了测定,耐性从高到低依次为 JT > HH > HD > LH > AQ > SC > ZJJ > BC > HN > SR > BY > TL > GL > ZZ > CC > SY > CZ,耐性最高种群 JT 耐性指数为耐性最低种群 CZ 的 3.17 倍。高越^[18]对 92 份野生大豆材料的草甘膦耐性筛选结果表明,最高耐性材料的耐性指数为最低耐性材料的 9.2 倍。而本研究结果耐性最高种群的耐性指数仅

为耐性最低种群的 3.17 倍,可能是因为本研究筛选的样本量不够多故研究结果存在差异。

对耐性差异明显的 4 个野生大豆种群叶绿素荧光参数的变化结果分析表明,施用草甘膦后对各供试种群叶绿素荧光参数都产生显著变化,这说明草甘膦对野生大豆的光合作用有显著影响。供试种群 F_v/F_m 、 $Y(II)$ 、ETR、 qP 均随着施用草甘膦剂量的增加呈现不同程度降低趋势,但耐性越高的种群 F_v/F_m 、 $Y(II)$ 、ETR、 qP 在草甘膦处理后下降幅度越小,NPQ 越能够维持稳定上升。其中耐性最高 JT

种群 NPQ 值随着草甘膦剂量的增加而逐渐上升,其余 3 个种群则呈现先上升后下降的趋势。上述研究结果表明施用草甘膦均不同程度上对供试种群在光能捕获、电子传递、光合机构自我保护等方面产生不利影响。喷施草甘膦能够显著降低光合速率,导致 PS II 反应中心的开放程度降低,活性减弱,参与 CO₂ 固定的电子减少,光化学效率降低,耐性较高的种群在施用草甘膦后所产生的不利影响相对较小。

暗适应后叶片 F_v/F_m 的大小是判断植物是否受到光抑制的主要指标,在没有环境胁迫的条件下植物暗适应后的 F_v/F_m 值一般为 0.80 ~ 0.85^[19],不同植物对环境胁迫的反应不同,其 F_v/F_m 值的下降幅度也有所差异。对两种草甘膦耐性不同的假稻 [*Leersia japonica* (Makino) Honda] 种群的研究结果表明,在非农田生境(没有使用除草剂)采集的金华种群在草甘膦处理下 F_v/F_m 值低于长期施用草甘膦田边采集的上海种群^[20]。可能是因为在长期的草甘膦选择压下上海假稻种群对草甘膦产生了一定抗性,而使得草甘膦对其光合作用的影响较没有抗性的种群低。对两种耐性不同的牛筋草研究结果表明,耐性种群 Y(II) 值显著高于敏感性种群^[21]。本研究结果显示,总体上抗性较高的种群在同一剂量下 F_v/F_m 、Y(II) 要高于抗性较低的种群。较高的光能转化效率可能也是具有较高的草甘膦耐性的原因。对牛筋草在 20 mmol·L⁻¹ 草甘膦处理后不同曝光强度下 ETR 值的变化研究发现,在任何曝光强度下抗性种群的 ETR 值均高于敏感性种群^[21]。本研究对 4 种耐性不同的野生大豆种群喷施草甘膦后 ETR 变化分析表明,在无草甘膦选择压下,抗性较高的种群本身相对于抗性较低的种群就具有较高的电子传递速率,而在喷施草甘膦后,草甘膦耐性相对较高的种群 ETR 都高于草甘膦耐性较低的种群。通过研究苯磺隆、使它隆、异丙隆、骠马、绿麦隆 5 种除草剂对小麦叶绿素荧光参数的影响发现随着除草剂浓度的增加所有小麦品种的 qP 值均逐步下降^[22]。本研究结果同样表明,随着草甘膦剂量的增加,野生大豆叶片 qP 值也逐渐降低,抗性较高的种群在同一剂量下 qP 同样高于抗性较低的种群。当 PS II 反应中心天线色素吸收了过量的光能时,如不能及时耗散将对光合机构造成失活或破坏,所以非光化学淬灭是一种自我保护机制,对光合机构起一定的保护作用^[23-24]。当施用草甘膦剂量增加时 JT 种群 NPQ 值随着剂量的增加而升高,植物体内的光合机构保护机制可能也随着剂量的增加进一步发挥作用,在草甘膦有效剂量达到

2.4 kg·hm⁻², NPQ 无显著升高,可能此时 PS II 天线色素吸收的光能已无法增加热能耗散,保护机制作用已无法增强。在剂量较低时 JT 种群 NPQ 的上升幅度小于 SC 及 TL 种群,可能是较低剂量下耐性相对较低的种群 SC、TL 已经发挥出最大的保护作用来以热能形式耗散过量的光能,而此时 JT 种群光合保护机制仍然没有发挥最大的保护作用,当施用草甘膦剂量大于 1.2 kg·hm⁻² 时, JT 种群光合保护机制进一步增强,而 SC、TL 种群光合机构可能已经造成破坏,保护机制已逐渐失活。CZ 种群在所有剂量下 NPQ 无显著升高,施用草甘膦有效剂量为 2.4 kg·hm⁻² 时 NPQ 值下降为 0,推测可能是较低草甘膦剂量已经对 CZ 种群的光合保护机制造成破坏,继续增加草甘膦剂量光合机构保护机制突破极限彻底破坏而丧失保护作用。

传统检测植物对草甘膦耐性的方法有整株生测法、药害分级法、莽草酸测定法、EPSPS 酶活测定法等,整株生测法、药害分级法从植株出苗开始到检测结果完成至少需要 14 d 时间,而莽草酸测定法、EPSPS 酶活测定法则操作步骤复杂,需要仪器花费成本高,检测时间成本高。通过本研究发现喷施草甘膦后 2 d,不同草甘膦耐性野生大豆种群叶绿素荧光参数就存在较大差异。叶绿素荧光参数检测具有准确、快速、高效的特点,已有研究发现可以通过测定植株的叶绿素荧光参数来检测植物的耐旱性^[25-26]、耐盐性^[27-29]、耐热性^[30-31]。如果抗草甘膦转基因大豆在我国能够商业化种植,那么抗草甘膦基因向不同草甘膦耐性野生大豆基因漂移的风险将不容忽视。准确、快速、高效地鉴定出对草甘膦天然存在耐性的野生大豆将为我们的风险评估奠定基础。

本研究发现,在施用有效剂量 1.2 ~ 2.4 kg·hm⁻² 草甘膦后, JT 种群 F_v/F_m 显著高于其它种群。在施用有效剂量 0.6 kg·hm⁻² 草甘膦后, JT 种群 Y(II) 显著高于其它种群。在施用有效剂量 0.6 ~ 1.8 kg·hm⁻² 草甘膦后, JT 种群 ETR 显著高于其它种群。在施用有效剂量 0.6 ~ 1.2 kg·hm⁻² 草甘膦后, JT 种群 qP 显著高于其它种群。在检测天然对草甘膦存在耐性的野生大豆时,可先通过传统生测法确定几个对草甘膦耐性不同的样本,测定其上述叶绿素荧光参数值,再对大量待测样本喷施上述剂量草甘膦,通过对应叶绿素荧光参数的测定,对大量样本的检测结果进行方差分析,结合测定出的参数值,快速筛选出对草甘膦存在耐性的种群。

4 结 论

综合本研究结果,在草甘膦有效剂量 2.4 kg·hm⁻²

下测定 F_v/F_m 、在 $0.6\text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 下测定 Y(II)、ETR、 qP 可快速、准确、高效地鉴定出天然存在草甘膦耐性的野生大豆种群。

参考文献

[1] 燕雪飞. 中国野生大豆遗传多样性及其分化研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学,2014. (Yan X F. Genetic diversity and differentiation of the wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.) in China [D]. Shenyang:Shenyang Agricultural University,2014.)

[2] Fukuda Y. Cytogenetical studies on the wild and cultivated Manchurian soybeans. (*Glycine* L.) [J]. Japanese Journal of Botany, 1933, 6:489-506.

[3] 李福山. 大豆起源及其演化研究[J]. 大豆科学,1994,13(1): 61-66. (Li F S. Study on the origin and evolution of soybean[J]. Soybean Science,1994,13(1): 61-66.)

[4] 董英山,庄炳昌,赵丽梅,等. 中国野生大豆遗传多样性中心[J]. 作物学报,2000,26(5):521-527. (Dong Y S,Zhuang B C, Zhao L M,et al. The genetic diversity centers of annual wild soybean in China[J]. Acta Agronomica Sinica,2000, 26(5): 521-527.)

[5] 崔宁波,张正岩. 转基因大豆研究及应用进展[J]. 西北农业学报,2016,25(8):1111-1124. (Cui N B,Zhang Z Y. Advance of research and application of transgenic soybean[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica,2016,25(8):1111-1124.)

[6] 王克晶,李福山. 中国河北省和日本东北部天然野生大豆群体性状调查比较[J]. 中国油料作物学报,2000,22(4): 17-22. (Wang K J,Li F S. Comparison of population characteristics about natural wild soybean in Hebei and Northeastern Japan[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences,2000,22(4):17-22.)

[7] 陈新,严继勇,高兵. 野生大豆抗草甘膦基因漂移的初步研究[J]. 中国油料作物学报,2004,26(2):89-91. (Chen X,Yan J Y,Gao B. Preliminary study on the drifting of glyphosate resistance gene in wild soybean[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2004,26(2):89-91.)

[8] 刘杰,周波,杨春燕,等. 抗草甘膦转 EPSPS 大豆的基因漂移研究[J]. 大豆科学,2012,31(4):517-521. (Liu J,Zhou B, Yang C Y,et al. Gene flowing of genetically modified glyphosate-resistant soybean with EPSPS[J]. Soybean Science,2012,31(4): 517-521.)

[9] 周波,关荣霞,陶波,等. 抗草甘膦转基因大豆基因逃逸检测及分子验证[C]. 福建:全国作物生物技术与诱变技术学术研讨会论文摘要集,2005. (Zhou B,Guan R X,T B,et al. Detection of glyphosate-resistant transgenic soybean gene flowing and molecular identification[C]. Fujian:Summary of the 2005 National Symposium on Crop Biotechnology and Mutagenesis,2005.)

[10] 崔云云,曹越平. 抗草甘膦转基因大豆的获得[J]. 上海交通大学学报(农业科学),2016,1(34),1-4. (Cao Y Y,Cao Y P. Obtaining of transgenic glyphosate-resistant soybean[J]. Journal of Shanghai Jiao Tong University (Agricultural Science),2016,1 (34),1-4.)

[11] 路超,袁建琴,马艳琴,等. 转基因大豆的食用安全性研究进展[J]. 农学学报,2015,12(5),82-85. (Lu C,Yuan J Q, Ma Y Q,et al. Research progress of food safety of genetically modified

soybeans[J]. Journal of Agriculture,2015,12(5),82-85.)

[12] 高越. 抗草甘膦野生大豆种质挖掘及抗性机制研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2013. (Gao Y. Study on screening and resistant mechanism of germplasm resources to glyphosate-resistance in wild soybean [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2013.)

[13] 原向阳,郭平毅,黄洁,等. 缺磷胁迫下草甘膦对抗草甘膦大豆幼苗光合作用和叶绿素荧光参数的影响[J]. 植物营养与肥料学报,2014,20(1):221-228. (Yuan X Y,Guo P Y,Huang J,et al. Effect of glyphosate on photosynthesis and chlorophyll fluorescence of leaves of glyphosate-resistant soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] seedlings under phosphorus deficiency stress[J]. 2014,20 (1):221-228.)

[14] 许大全,张玉忠,张荣铤. 植物光合作用的光抑制[J]. 植物生理学通讯,1992,28(4):237-243. (Xu D Q,Zhang Y Z,Zhang R X. Photoinhibition of photosynthesis in plants[J]. Plant Physiology Communications,1992,28(4):237-243.)

[15] 马玉心,崔大练. 野生大豆与栽培大豆荧光特性比较研究[J]. 大豆科学,2009,28(4):651-654. (Ma Y X, Cui D L. Comparison of chlorophyll II fluorescence parameters in *Glycine soja* and *Glycine max* [J]. Soybean Science,2009,28(4):651-654.)

[16] 李强,王国祥,潘国权,等. 水体浊度对菹草萌发及萌发苗光合荧光特性的影响[J]. 生态学报,2006,26(11):3594-3601. (Li Q,Wang G X,Pan G Q,et al. Influence of water turbidity on germination of *Potamogeton crispus* and growth of germinated seedling[J]. Acta Ecologica Sinica,2006,26(11):3594-3601.)

[17] 张守仁. 叶绿素荧光动力学参数的意义及讨论[J]. 植物学通报,1999,16(4):444-448. (Zhang S R. A discussion on chlorophyll fluorescence kinetics parameters and their significance[J]. Chinese Bulletin of Botany,1999,16(4):444-448.)

[18] 高越. 抗草甘膦野生大豆种质挖掘及抗性机制研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2013. (Gao Y. Study on screening and resistant mechanism of germplasm resources to glyphosate-resistance in wild soybean [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2013.)

[19] 张静,唐继军,王岩,等. 华北高寒区北沙参光合特性研究[J]. 华北农学报,2011,26(2):218-222. (Zhang J,Tang J J, Wang Y,et al. The photosynthetic characteristic of *Glehnia littoralis* in the northwest of Hebei [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2011,26(2):218-222.)

[20] 管铭,郭水良,裴立,等. 基于光合和叶绿素荧光参数评判两个假稻种群对草甘膦的敏感性[J]. 上海师范大学学报(自然科学),2012,41(2):171-178. (Guan M, Guo S L, Pei L, et al. Assessment on sensitiveness of *leersia japonica* to glyphosate based on photosynthetic and chlorophyll fluorescence parameters [J]. Journal of Shanghai Normal University (Natural Sciences), 2012, 41(2):171-178.)

[21] Zhang T,Li F,Tian X,et al. Use of chlorophyll fluorescence and P700 absorbance to rapidly detect glyphosate resistance in goosegrass (*Eleusine indica*) [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2015,14(4):714-723.

[22] 王正贵,周立云,郭文善,等. 除草剂对小麦光合特性及叶绿素荧光参数的影响[J]. 农业环境科学学报,2011,30(6):7-13. (Wang Z G,Zhou L Y,Guo W S,et al. Effects of herbicides on

photosynthesis and chlorophyll fluorescence parameters in wheat leaves[J]. Journal of Agro-Environment Science,2011,30(6):7-13.)

[23] 周朝彬,宋于洋,王炳举,等. 干旱胁迫对胡杨光合和叶绿素荧光参数的影响[J]. 西北林学院学报,2009,24(4):5-9. (Zhou C B,Song Y Y,Wang B J,et al. Effects of drought stress on photosynthesis and chlorophyll fluorescence parameters of *populus euphratica*[J]. Journal of Northwest Forestry University,2009,24(4):5-9.)

[24] Jin E S, Yokthongwattana K, Polle J E W, et al. Role of the reversible xanthophyll cycle in the photosystem II damage and repair cycle in *Dunaliella salina*[J]. Plant Physiology, 2003, 132(1): 352-364.

[25] 何文铸,张彪,王培,等. 利用叶绿素含量及荧光动力学参数评价青贮玉米耐旱关键指标研究[J]. 干旱地区农业研究,2013,31(3):31-38. (He W Z,Zhang B,Wang P,et al. Evaluation of drought tolerance in silage maize based on chlorophyll content and fluorescence kinetics parameters[J]. Agricultural Research in the Arid Areas,2013,31(3):31-38.)

[26] 童小芹,王淑智,夏咏,等. 应用叶绿素荧光技术快速预警乌鲁木齐典型农作物干旱胁迫[J]. 干旱区研究,2013,30(5):860-866. (Tong X Q,Wang S Z,Xia Y,et al. Early-warning of drought stress for typical crops in urumqi with chlorophyll fluorescence technique [J]. Arid Zone Research,2013,30(5):860-866.)

[27] 张会慧,张秀丽,王娟,等. 利用快相叶绿素荧光参数综合评价3种丁香耐盐性[J]. 南京林业大学学报(自然科学),2013,37(5):13-19. (Zhang H H,Zhang X L,Wang J,et al. A comprehensive evaluation of salt resistance in three clove varieties by the fast fluorescence transient parameters [J]. Journal of Nanjing Forestry University(Natural Science),2013,37(5):13-19.)

[28] 黄有总,张国平. 叶绿素荧光测定技术在麦类作物耐盐性鉴定中的应用[J]. 麦类作物学报,2004,24(3):114-116. (Huang Y Z,Zhang G P. Application of measuring chlorophyll fluorescence in identification of salinity tolerance in triticeae crops[J]. Journal of Triticeae Crops,2004,24(3):114-116.)

[29] 彭振,何守朴,孙君灵,等. 陆地棉苗期耐盐性的高效鉴定方法[J]. 作物学报,2014,40(3):476-486. (Peng Z,He S P,Sun J L,et al. An efficient approach to identify salt tolerance of upland cotton at seedling stage [J]. Acta Agronomica Sinica,2014,40(3):476-486.)

[30] 姜建福,马寅峰,樊秀彩,等. 196份葡萄属(*Vitis* L.)种质资源耐热性评价[J]. 植物遗传资源学报,2017,18(1):70-79. (Jiang J F, Ma Y F, Fan X C, et al. Evaluation of 196 *Vitis* L. germplasm resources to heat tolerance[J]. Journal of Plant Geneti Resources,2017,18(1):70-79.)

[31] 周桂英,王四清,许建新,等. 8种大花蕙兰耐热性指标筛选及其评价[J]. 安徽农业科学,2016,44(16):20-22. (Zhou G Y, Wang S Q,Xu J X,et al. Heat resistance indexes identification and comprehensive evaluation of 8 species of cymbidium hybridium [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences,2016,44(16):20-22.)