

大蒜抗草甘磷愈伤组织变异系的选择研究^{*}

张恩让, 程智慧

(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 选取改良蒜、金堂早蒜、苍山蒜和欧引01等4个不同生态型的大蒜品种, 采用直接接种和逐级培养法在质量分数0.02%, 0.04%, 0.06%, 0.08%, 0.10%, 0.20%的草甘磷培养基上, 选择抗草甘磷愈伤组织细胞系。结果表明, 草甘磷对大蒜外植体的出愈率有极强的抑制作用, 在试验中均未诱导出愈伤组织。用愈伤组织直接在不同质量分数的草甘磷培养基上选择, 4个品种在低质量分数(< 0.04%)胁迫下都有一定的抗性; 经逐级抗草甘磷选择后的愈伤组织, 其抗性能力有明显提高, 在含有草甘磷质量分数0.06%培养基上, 4个品种愈伤组织的成活率为10.3%~18.2%, 且发育良好; 在质量分数0.08%和0.10%的草甘磷培养基上也有部分愈伤组织成活。抗性稳定性检验证明, 此抗草甘磷能力在一定时间内能够保持下去。

[关键词] 大蒜; 愈伤组织; 变异系; 抗草甘磷选择

[中图分类号] S633.403.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)03-0069-04

在细胞与组织培养基础上出现的细胞自发突变和诱变的现象愈来愈受到育种工作者的重视, 在多种农作物中已进行了体细胞无性系变异及其筛选应用的研究^[1,2], 抗性筛选是其中的主要工作之一。近年来, 用离体方法筛选抗除草剂突变体的研究十分活跃, 现已得到了番茄、胡萝卜、油菜等多种农作物的抗除草剂细胞系, 有的已诱导培养成再生植株^[1~3]。业已证明, 大蒜在组织培养中有高频率的体细胞变异发生^[4], 但对其的筛选和利用却迄今未见报道。草甘磷由美国孟山都公司研制开发, 在田间使用时具有广谱、高效, 对人畜安全和无环境污染等优点, 但其在田间除草的同时也对大蒜造成一定伤害, 若能选择出抗草甘磷的大蒜品系, 将对大蒜生产有很大的促进作用。本研究报道了大蒜抗草甘磷愈伤组织变异系的选择方法和试验结果, 以期抗草甘磷大蒜品系的选育提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试品种为西北农林科技大学园艺学院大蒜课题组提供的“改良蒜”、“金堂早蒜”、“苍山蒜”和“欧引01”, 以蒜瓣为外植体。

1.2 方法

选择健康饱满的蒜瓣, 切去上部的贮藏叶, 将底

部3 mm高(带部分贮藏叶和部分茎盘)的部分, 切成3 mm见方的小块, 作为外植体。基本培养基为MS+2, 4-D 2.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L。选择胁迫剂为草甘磷(孟山都生产, 商品名称为农达), 胁迫剂质量分数分别为0.02%, 0.04%, 0.06%, 0.08%, 0.10%和0.20%。具体方法为: ①直接将外植体接于添加不同质量分数草甘磷的基本培养基上, 50 d后统计出愈率; ②将在无胁迫剂存在的基本培养基中诱导产生的愈伤组织, 通过继代培养, 使其大量增殖, 然后将增殖的愈伤组织分成2 mm见方的小块, 分别转到添加不同质量分数草甘磷的基本培养基上, 在转接后的4周内, 每周测定一次生长率, 同时统计成活率; ③每品种取2份愈伤组织, 从0.02%开始, 在不同质量分数的草甘磷培养基上从低到高逐级培养, 最高质量分数为0.20%; 1份在每个培养基上培养4周, 1份培养8周, 每一级淘汰生长不良或死亡的愈伤组织, 下一级重新观察统计生长情况。

愈伤组织生长情况及在添加不同质量分数草甘磷培养基上的抗性能力用出愈率、愈伤组织成活率及生长率表示。计算公式为: 出愈率=(长出愈伤组织的外植体块数/接种的外植体总块数)×100; 愈伤组织成活率=(成活的愈伤组织块数/接种的愈伤组织块数)×100; 生长率=(培养后鲜重-原鲜重)/原鲜重。每种培养基测定统计8~10瓶, 每瓶接种4~

^{*} [收稿日期] 2002-12-18

[基金项目] 中德政府间合作项目(CH-01/04)

[作者简介] 张恩让(1960-), 男, 陕西扶风人, 副教授, 在读博士, 主要从事蔬菜生态生理和生物技术研究。

5 块, 用其算术平均值作比较。

2 结果与分析

2.1 草甘磷质量分数对出愈率的影响

将大蒜外植体接种于添加有草甘磷的培养基上诱导愈伤组织, 结果表明, 草甘磷对愈伤组织的长出有极强的抑制作用。接种后连续观察到 70 d, 在所进

行的不同质量分数草甘磷的试验中, 均未诱导出愈伤组织。

2.2 愈伤组织对草甘磷的抗性

将在无草甘磷培养基上诱导出的愈伤组织, 转接于含有不同质量分数草甘磷的培养基上, 研究愈伤组织对草甘磷的抗性(以愈伤组织成活率衡量)。结果见表 1。

表 1 大蒜愈伤组织在含有不同质量分数草甘磷培养基上的成活率

Table 1 The survival rate of callus on the medium containing different concentration of Glyphosate %

品种 Cultivars	草甘磷质量分数/% Concentration of Glyphosate in medium						
	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1	0.2
改良蒜 Gailiang	100	34.5	11.3	2.5	-	-	-
金堂早熟 Jintang early	100	28.8	9.2	-	3.3	-	-
苍山蒜 Cangshan	100	37.5	17.5	8.8	-	-	-
欧引 01 Europe 01	100	20.7	9.6	-	-	-	-

表 1 结果表明, 草甘磷对愈伤组织的成活率有很大影响, 在添加了草甘磷的培养基上, 愈伤组织的成活率急剧下降, 低质量分数时(0.02% 和 0.04%) 尚有部分成活, 若培养基中草甘磷质量分数超过 0.06%, 已很难有愈伤组织成活。改良蒜和苍山蒜对草甘磷的抗性能力略强于金堂早熟, 欧引 01 的抗性能力最差。

2.3 逐级培养对愈伤组织成活率的影响

逐级培养 4 或 8 周后, 愈伤组织成活率的统计结果见表 2。表 2 结果表明, 愈伤组织经过质量分数逐步提升的草甘磷培养基多次转移和选择, 其抗草

甘磷的能力有明显提高。改良蒜经每级 4 周培养选择的愈伤组织, 在含质量分数 0.04% 和 0.06% 草甘磷培养基上的成活率分别由直接接种的 11.3% 和 2.5% 提高到 27.8% 和 16.6%。即使草甘磷质量分数升高到 0.08% 和 0.10%, 也有愈伤组织成活。而经每级 8 周培养选择的愈伤组织, 其抗草甘磷能力的提高幅度更大, 在质量分数 0.02%, 0.04%, 0.06%, 0.08% 和 0.10% 的草甘磷胁迫下, 愈伤组织成活率分别达到了 34.5%, 30.3%, 18.2%, 9.8% 和 6.6%。其他品种与改良蒜的表现趋势相同。

表 2 愈伤组织在含有不同质量分数的草甘磷培养基上逐级培养的成活率

Table 2 The survival rate of calls cultured by step-to-step increasing concentration of Glyphosate %

品种 Cultivars	培养时间/周 Culture times	培养基中草甘磷的质量分数 Concentration of Glyphosate in medium						
		0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10	0.20
改良蒜 Gailiang	4	100	34.5	27.8	16.6	9.3	3.3	-
	8	100	34.5	30.3	18.2	9.8	6.6	-
金堂早熟 Jintang early	4	100	28.8	20.4	12.9	6.6	-	-
	8	100	28.8	23.7	13.1	7.8	3.3	-
苍山蒜 Cangshan	4	100	37.5	21.8	14.6	10.2	5.0	3.3
	8	100	37.5	29.2	15.5	9.7	3.3	-
欧引 01 Europe 01	4	100	20.7	18.5	13.0	8.3	-	-
	8	100	20.7	19.8	10.3	9.0	-	-

愈伤组织成活率的差异显著性分析结果(表 3)表明, 4 个品种经逐级培养选择后, 愈伤组织的平均成活率与直接选择相比, 差异均达极显著水平。每级 4 周逐级培养选择和每级 8 周相比, 差异达显著水平, 说明逐级培养选择可有效提高愈伤组织的成活率, 而且适当延长每级培养时间也能增加愈伤组织

的成活率。

2.4 愈伤组织生长情况

为研究逐级抗草甘磷选择愈伤组织的生长情况, 以直接接种于含有不同质量分数草甘磷的培养基上的愈伤组织生长率为对照, 测定统计前 4 周的生长情况, 结果列于表 4。

表 3 愈伤组织成活率的差异显著性分析

Table 3 Significant differences among the survival rate of callus

品种 Cultivars	草甘磷质量分数/% Concentration of Glyphosate	选择方式 Selection form	平均成活率/% Means of survival rate	差异显著性 Significant difference	
				$\alpha=0.05$	$\alpha=0.01$
改良蒜 Gailiang	0.04	*	11.3	a	A
	0.04	**	27.8	b	B
金堂早蒜 Jintang early	0.04	***	30.3	c	B
	0.04	*	9.2	a	A
	0.04	**	20.4	b	B
	0.04	***	23.7	c	C
苍山蒜 Cangshan	0.04	*	17.5	a	A
	0.04	**	21.8	b	B
	0.04	***	29.2	c	C
欧引 01 Europe 01	0.04	*	9.6	a	A
	0.04	**	18.5	b	B
	0.04	***	19.8	b	B

注: * 表示直接选择; ** 表示每级 4 周逐级培养选择; *** 表示每级 8 周逐级培养选择。
Note: * means direct selection; ** means selection by step-to-step (4 weeks/step); *** means selection by step-to-step (8 weeks/step).

表 4 在不同质量分数草甘磷培养基上经抗性选择的愈伤组织和对照的生长率

Table 4 The growth rate of selected Glyphosate-tolerance callus and control on medium containing different concentration of Glyphosate

品种 Cultivars	草甘磷 质量分数/% Concentration of Glyphosate	对照 Control				选择愈伤组织 Selected callus			
		1	2	3	4	1	2	3	4
改良蒜 Gailiang	0	3.32	0.88	0.76	0.10	3.32	0.88	0.76	0.10
	0.02	0.89	0.72	0.70	0.34	0.89	0.72	0.70	0.34
	0.04	0.57	0.32	0.27	0.18	0.77	0.70	0.61	0.32
	0.06	0.21	0.11	0.17	0.07	0.49	0.33	0.35	0.21
	0.08	-	-	-	-	0.24	0.17	0.06	0.10
	0.1	-	-	-	-	0.13	0.05	0.09	0.02
金堂早蒜 Jintang early	0	3.45	0.89	0.78	0.13	3.45	0.89	0.78	0.13
	0.02	0.71	0.59	0.37	0.22	0.71	0.59	0.37	0.22
	0.04	0.34	0.20	0.23	0.11	0.61	0.43	0.51	0.20
	0.06	-	-	-	-	0.27	0.18	0.08	0.03
	0.08	-	-	-	-	0.08	0.12	0.01	0.02
	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-
苍山蒜 Cangshan	0	3.01	0.57	0.43	0.17	3.01	0.57	0.43	0.17
	0.02	1.01	0.82	0.53	0.25	1.01	0.82	0.53	0.25
	0.04	0.43	0.28	0.13	0.15	0.65	0.53	0.27	0.19
	0.06	0.11	0.08	0.02	0.01	0.33	0.30	0.19	0.10
	0.08	-	-	-	-	0.23	0.18	0.15	0.03
	0.1	-	-	-	-	0.12	0.08	0.10	0.04
欧引 01 Europe 01	0	3.47	0.82	0.51	0.08	3.47	0.82	0.51	0.08
	0.02	0.55	0.32	0.41	0.27	0.55	0.32	0.41	0.27
	0.04	0.21	0.15	0.09	0.07	0.43	0.27	0.21	0.12
	0.06	-	-	-	-	0.37	0.25	0.15	0.10
	0.08	-	-	-	-	0.18	0.11	0.03	0.01
	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-

注: 1, 2, 3, 4 表示周次。下表同。
Note: 1, 2, 3, 4 stands for weeks. The following table is the same.

表 4 表明, 在含有草甘磷的培养基上, 经抗草甘磷选择的愈伤组织前 4 周的生长率比对照有明显提高, 这种生长率的提高在较高质量分数的草甘磷培养基上表现得尤为显著。如改良蒜, 在含有 0.06%

的草甘磷培养基上培养的前 4 周, 对照的生长率分别为 0.21, 0.11, 0.17 和 0.07, 而经抗草甘磷选择的愈伤组织的生长率则分别达到了 0.49, 0.33, 0.35 和 0.21, 增加均在 1 倍以上。培养基中草甘磷质量分数在 0.08% 和 0.1% 时, 对照的愈伤组织全部死亡, 而经抗草甘磷选择的愈伤组织仍保持一定的生长率。

表 5 在 0.06% 草甘磷的培养基上经无草甘磷培养的愈伤组织成活率和生长率

Table 5 Frequency and Growth rate of tested callus after passages in the absence of Glyphosate on medium containing 0.06% Glyphosate

品种 Cultivars	成活率/% Survival rate	生长率 Growth rate			
		1	2	3	4
改良蒜 Gailiang	88	0.41	0.28	0.25	0.22
金堂早蒜 Jintang early	79	0.30	0.21	0.09	0.02
苍山蒜 Cangshan	91	0.27	0.17	0.11	0.04
欧引 01 Europe 01	70	0.33	0.21	0.13	0.07

表 5 结果表明, 选择出的愈伤组织仍保持较高的抗草甘磷能力, 在 0.06% 草甘磷的培养基中生长良好, 4 个品种的成活率分别为 88%, 79%, 91% 和 70%。从生长率上看, 与逐步选择的愈伤组织相比虽无多大差别, 但显著高于在质量分数 0.06% 草甘磷培养基上直接选择的愈伤组织生长率, 说明经过此方法选择的抗草甘磷愈伤组织变异系, 在一定的时间内能够保持其抗性。

3 讨 论

草甘磷是惟一一种抑制 EPSP 的除草剂品种。目前创制抗草甘磷作物品种的方法主要有细胞和组织培养, 细胞、原生质体和酶融合, 抗性基因的分离与转移等^[2,5]。Botteman 和 Leemans^[6]报道了利用基因工程技术创制抗除草剂的研究进展, Comai 等^[7]也对抗草甘磷的基因进行了研究。细胞和组织培养技术是创制抗除草剂作物品种的重要方法, 因为细胞能繁殖成植株, 而且培养的细胞是遗传变异

2.5 抗性稳定性检验

将经草甘磷培养基诱导选择, 可在质量分数 0.06% 草甘磷培养基中稳定生长的抗草甘磷愈伤组织, 转移到不含草甘磷的培养基中培养 45 d, 再直接转回到质量分数 0.06% 草甘磷的培养基中, 统计其成活率和前 4 周的生长率, 并进行抗性稳定性检验, 结果列于表 5。

的丰富来源, 通过此种方法所选择的抗除草剂细胞系能够成功地得到抗性植株。Jain 等^[1]应用离体培养技术选出了 3 个对草甘磷具有耐性的花生细胞系, 其耐性提高了 20 倍, 此类细胞系是通过靶酶过量形成而产生耐性的, 这种 EPSP 合成酶的过量形成与此种酶基因扩增及其高度转录活性有关。本试验利用大蒜在组织培养过程中的体细胞无性系变异筛选抗草甘磷的大蒜变异细胞系, 取得了一定的进展, 所选出的细胞系抗草甘磷能力有了较大提高。但离草甘磷在大田的使用质量分数(0.12%~0.15%) 还有一定距离, 笔者曾尝试提高培养基中草甘磷质量分数去做进一步的筛选, 可是没有找到成活的愈伤组织, 这可能与试验数量不够大有关, 也可能是因为在培养基中的细胞不断分化, 对草甘磷特别敏感, 而使其适应能力降低, 若能诱导成再生植株, 那么, 植株的抗草甘磷能力可能会有所提高。因此, 还需做进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 刁现民, 孙敬三. 植物体细胞无性系变异的细胞学和分子生物学研究进展[J]. 植物学通报, 1999, 16(4): 1- 7.
- [2] 孙敬三, 朱至清. 体细胞无性系变异与突变体筛选[A]. 胡 含, 王恒立. 植物细胞工程与育种[C]. 北京: 北京工业大学出版社, 1990. 209- 213.
- [3] 苏少全. 除草剂作用靶标与新品种创制[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001.
- [4] Maggioni L, Cordi C, Fogher C. Callus induction, ploidy lever and plant regeneration in vitro garlic (*Allium sativum* L.) culture[J]. Journal of Genetics and Breeding, 1989, 43(4): 251- 254.
- [5] Mazur B J, Falco S C. The development of herbicide resistant crops[J]. Annu Rev Plant Physiol, 1989, 40: 441.
- [6] Botteman J, Leemans J. Engineering of herbicide resistance in plants[J]. Biotechnology & Genetic Engineering reviews, 1988, 6: 321- 324.
- [7] Comai L, Sen L C, Stalker D M. An altered aro A gene product confers resistance to the herbicide glyphosate[J]. Science, 1983, 221(4608): 370.

(下转第 76 页)

- [6] 王美林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学技术出版社, 1998
- [7] Nishi A, Yoshida A, Mori M, et al. Isolation of variant carrot cell lines with altered pigmentation[J]. *Phytochemistry*, 1974, 13: 1653-1656
- [8] Andrew J H, David C B. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants[J]. *Science*, 1999, 286: 950-951
- [9] Wassenegger M, Pelissier T. A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants[J]. *Plant Mol Biol*, 1998, 37: 349-362
- [10] Sharp R A, Zamore P D. RNA interference[J]. *Science*, 2000, 287: 2431-2433

Transformation of anti-lyc-b in carrot to tobacco

L IANG Yan¹, WANG Ming¹, CHEN Hang², CHEN Da-ming²

(1 College of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 National Vegetable System Engineering Center, Beijing 100081, China)

Abstract: Transformation of anti-lyc-b in carrot to tobacco varieties SR I and Xanthi was done by infecting leaf plates with *Agrobacterium tumefaciens* carrying expression vector of the gene GUS test and Southern hybridization revealed that the rates of transformation basing on the GUS test were all 41.7%; Southern hybridization of Xanthi plants positive to GUS test showed the transformation ratio was 67%. Analysis on the contents of lycopene and carotene in Xanthi transgenic plants indicated that there were differences not only between transgenic and non-transgenic plants but also between two different transgenic plants

Key words: tobacco; anti-lyc-b; transformation

(上接第 72 页)

Study on *in vitro* selection for glyphosate-resistant callus of garlic

ZHANG En-rang, CHENG Zhi-hui

(College of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Four different ecotypic garlic cultivars: Gailiang, Jintang early, Cangshan and Europe 01 were chosen for this experiment. Their store-leaf with part of stem plate and callus established from it was used to select glyphosate-resistant on solid MS medium containing gradually increased concentrations of Glyphosate from 0.02%, 0.04%, 0.06%, 0.08% to 0.10%. The results show that Glyphosate inhibited callus growth completely in all tested concentration levels; direct selection on medium containing different concentration of Glyphosate showed that callus of four cultivars all had Glyphosate-resistant at lower concentration (< 0.04%) of Glyphosate; Glyphosate-resistant of callus enhanced obviously when selected by step-to-step increasing concentration of Glyphosate from MS medium. The survival rate of callus of four garlic cultivars on medium containing 0.06% glyphosate was in the range of 10.3%~18.2%; Measurement of growth rate indicates that callus development was good. Some callus were survivor on medium containing 0.08% and 0.10% Glyphosate. Stability test of glyphosate-resistant showed the induced glyphosate-resistant could keep for a long time.

Key words: garlic; callus; variation; selection of glyphosate-resistant