

· 研究论文 ·

烟草抗苯磺隆变异体的筛选及变异体种子活力测定

丁 君¹, 王金信^{*1}, 于天丛², 张 猛¹, 陈业兵¹

(1. 山东农业大学 植物保护学院, 山东 泰安 271018; 2. 湖南化工研究院 农药剂型及应用系统研究所, 长沙 410007)

摘 要:采用组织培养技术,将烟草(NC-82)叶片诱导产生的胚性愈伤组织转移到加有半致死浓度苯磺隆的Murashige-Skoog(MS)培养基上,经3代筛选,获得抗苯磺隆愈伤组织。抗性愈伤组织在加有苯磺隆的分化培养基上分化出植株。再生植株移栽成活后,对获得的再生植株种子与对照种子活力及抗性指数进行检测。结果表明:苯磺隆诱导再生植株种子与对照种子的简化活力指数分别为10.81和9.53;过氧化物酶活力分别为47.36和29.44 $U \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$,酸性磷酸酯酶活力分别为2.927和2.447 $nmol \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$ 。潜在抗性趋势检测表明,再生植株种子对苯磺隆的抗性显著提高,抗性指数为3.18。再生种苗和对照种苗的乙酰乳酸合成酶活力分别为10.41和6.67 $nmol \cdot h^{-1} \cdot mg^{-1}$ 。

关键词:烟草;苯磺隆;抗性;变异体;种子活力

中图分类号:S481.4

文献标志码:A

文章编号:1008-7303(2007)04-0346-05

Selection of Tribenuron-methyl Resistance Variants and Seed Vigor Evaluation in Tobacco

DING Jun¹, WANG Jin-xin^{*1}, YU Tian-cong², ZHANG Meng¹, CHEN Ye-bing¹

(1. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong Province, China;

2. Institute of Pesticide Formulations and Application Systems, Hunan Research Institute of Chemical Industry, Changsha 410007, China)

Abstract: Using tissue culture technique, embryonic callus derived from tobacco (NC-82) leaf were transferred to Murashige and Skoog (MS) media supplemented with median lethal concentration of tribenuron-methyl and selected for 3 generations. The resistant calli were cultured on hormone-free media supplemented with tribenuron-methyl and regenerants were induced. The tobacco regenerants that resistant to tribenuron-methyl were screened, the regenerant seeds vigor and resistance ratio were determined. It was found that the regenerant seeds vigor index and that of the control were 10.81 and 9.53, respectively, the peroxidase activity were 47.36 and 29.44 $U \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$, while acid phosphatase activity were 2.927 and 2.447 $nmol \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$, respectively. The identification of resistance potential indicated that the herbicide resistance of regenerant seeds increased, the resistance ratios was 3.18. The ALS activity of the regenerant seedlings and that of the control were 10.41 and 6.67 $nmol \cdot h^{-1} \cdot mg^{-1}$, respectively.

Key words: tobacco; tribenuron-methyl; resistance; callus variants; seed vigor

收稿日期:2007-07-19;修回日期:2007-09-18

作者简介:丁君(1981-),女,山东青岛人,硕士研究生,从事除草剂抗药性研究, E-mail: jund822@163.com; *通讯作者(Author for correspondence):王金信(1962-),男,山东胶南人,理学博士,教授,从事除草剂毒理及应用技术研究,联系电话:0538-8241114; E-mail: wangjx@sdau.edu.cn

苯磺隆 (tribenuron methyl) 是由美国 Du Pont 公司开发的一种超高效磺酰脲类除草剂,能够防除绝大部分一年生和越年生麦田阔叶杂草。其作用靶标乙酰乳酸合成酶 (acetolactate synthase, ALS), 也称乙酰羟氨酸合成酶 (AHAS)^[1,2], 该酶是支链氨基酸生物合成第一阶段的关键性酶, 苯磺隆对该酶具有强烈的抑制作用, 致使缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸的合成受阻, 导致蛋白质合成停止, 植物最终死亡。由于 ALS 抑制剂类除草剂的作用位点单一, 连续使用该类除草剂容易使杂草对其产生抗药性^[3,4]。随着苯磺隆长时间大面积应用, 杂草的抗性将成为阻碍该除草剂发展的重要因素。因此, 研究杂草对苯磺隆产生抗药性的机理, 对于延缓杂草抗性及其抗性杂草的治理具有重要意义。

杂草抗性机理及生物学研究的关键是供试材料的获得。常规获得试材的方法是采集田间抗性杂草种子, 但这种方法存在杂草用药历史不明、耗时间较长的问题。而采用组织培养技术, 可在精确控制的人工环境条件下, 不受时间、空间的限制, 在较短的时间内获得具有期望性状的个体。近年来利用培养细胞筛选抗病突变体已有一些成功的报道。Carlson^[5]通过组培技术, 首次筛选出烟草抗野火病的植株。王延峰等用玉米胚性愈伤组织筛选出抗绿磺隆 (chlorsulfuron) 的突变体^[6]。本试验以模式植物烟草为诱导材料, 利用组培技术, 以苯磺隆为选择药剂, 筛选出抗苯磺隆的烟草愈伤组织并再生植株, 首次测定了再生植株种子的活力变化及对苯磺隆的潜在抗性趋势, 旨在为苯磺隆抗性机理研究及抗性作物的选育提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

烟草 (NC-82), 山东农业大学植保学院烟草研究室提供, 未施用过任何除草剂。

1.2 供试药剂

94% 苯磺隆 (tribenuron methyl) 原药, 山东华阳科技股份有限公司提供。6-苄氨基嘌呤 (6-BA, 上海伯奥生物科技有限公司); 2, 4-滴 (2, 4-D, 上海试剂四厂); 4-硝基苯基磷酸二钠盐 (pNPP, 洛阳天聘化学试剂有限公司, 进口分装); 琼脂粉 (上海稼丰园艺用品有限公司, 进口分装); 黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD, Fluka 公司); 氯化硫胺素焦磷酸 (TPP, E Merck 公司); 牛血清蛋白 (BAS, 进口分装, 上海伯奥

生物科技有限公司), 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 烟草愈伤组织抗性诱导与检测

1.3.1 烟草愈伤组织的诱导和培养 烟草种子用 0.1% 的升汞溶液消毒后植于 Murashige-Skoog (MS) 培养基中培养出无菌苗。选取 3~5 叶期的烟草无菌苗叶片, 植于 MS + 1.5 mg/L 的 2, 4-D + 0.5 mg/L 的 6-BA 诱导培养基中, 以诱导形成愈伤组织。选择生长旺盛、组织松脆、淡黄绿色的胚性愈伤组织转入上述培养基进行继代培养^[7]。20 d 左右继代一次。本试验培养条件均为光照培养箱 (25 ± 1)、光照 12 h/d、光照强度 12 000 lx。

1.3.2 培养基苯磺隆选择浓度的确定 将培养的愈伤组织切成大小一致的小块, 分别转移到含有系列浓度苯磺隆的培养基上, 定期观察 30 d 后, 统计愈伤组织死亡率, 以死亡率的机率值 (Y) 和苯磺隆浓度对数值 (X) 建立回归方程 ($Y = a + bx$), 求得 LC_{50} 值, 并以此确定选择培养基苯磺隆的浓度。

1.3.3 抗苯磺隆愈伤组织的筛选及植株再生

将 0.1 g 块愈伤组织转移到含有半致死浓度苯磺隆的诱导培养基 (MS + 1.5 mg/L 的 2, 4-D + 0.5 mg/L 的 6-BA) 上培养, 选择生长旺盛、淡黄绿色的愈伤组织继续筛选。将连续抗性诱导筛选 3 代的愈伤组织植入到含相同浓度苯磺隆的分化培养基 (MS + 2 mg/L 的 6-BA + 0.5 mg/L 的 2, 4-D) 上进行植株再生。30 d 后将分化烟苗转入生根培养基 (MS + 2.5 mg/L 的 2, 4-D) 上生根^[6]。20 d 后将生根的再生苗移入 180 mm × 140 mm 塑料营养钵中, 置于温度 18~30, 相对湿度 75% ± 5% 的可控日光温室常规培养, 同时以种植未经组培处理的烟草为对照。待种子成熟后收获不同处理种子进行以下检测。

1.4 再生植株种子潜在抗性趋势检测及 ALS 酶活力测定

1.4.1 烟草再生植株种子抗性潜势检测 随机选取烟草再生植株种子和对照种子各 100 粒播在铺有双层滤纸、直径为 9 cm 的培养皿中, 滤纸分别用 0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.5、1 mg/L 的苯磺隆药液 5 mL 润湿, 于 25 下萌发。每处理设 4 次重复, 统计幼根长度, 以幼根长度抑制率的机率值 (Y) 和苯磺隆浓度对数值 (X) 建立回归方程 ($Y = a + bx$), 求得 IC_{50} 值, 并以此计算抗性指数。

$$\text{抗性指数} = \frac{\text{抗性烟草种子 } IC_{50}\text{值}}{\text{对照烟草种子 } IC_{50}\text{值}}$$

1.4.2 再生植株种子 ALS 活性测定 分别取烟草再生植株种子和对照种子播种在育苗盘中,置于光照培养箱(温度 25)内常规育苗。待烟苗长出真叶时,剪取地上部分,参照范志金等的方法^[8]测定 ALS 酶活力。以每小时生成单位 mmol 乙酰乳酸所需蛋白的量(mg)为一个酶活力单位。可溶性蛋白含量测定采用考马斯亮蓝 G-250 法。

1.5 再生植株种子活力测定

1.5.1 种子萌发试验 参照孙光玲等^[9]的方法,并稍加改进。随机选取再生烟草植株种子和对照种子各 100 粒播种在铺有双层滤纸、直径为 9 cm 的培养皿中,加水润湿,于 25 下萌发。每处理重复 4 次。统计发芽势(第 7 d 种子的发芽总数)、发芽率(第 14 d 种子的发芽总数),并测量幼根长度(胚根+下胚轴,mm),计算简化活力指数。

简化活力指数 = 发芽率(%) × 幼根长度

1.5.2 种子电导率测定 称取烟草再生植株种子和对照种子各 0.100 g,先后用自来水和蒸馏水冲洗,去除种子表面的各种杂质,用滤纸吸干水分后置于加有 20 mL 蒸馏水的具塞试管中浸泡。每份试验材料设 4 次重复,用同等大小试管加入 20 mL 蒸馏水作对照。室温下分别在浸泡后 8、16、24、48 h,使用 DDS-11A 型电导仪测定种子浸出液的电导率^[9],并对测定结果进行统计分析。

1.5.3 种子酶活性测定 过氧化物酶(POD)活性测定(愈创木酚法)采用李合生^[10]的方法,以每分钟内 A_{470} 增加 0.01 为一个酶活力单位,记为 U;酸性磷酸酯酶活性测定参照张玲等^[11]的方法,酶活力单位以每克种子每分钟生成磷酸的纳摩尔数

(mmol · g⁻¹ · min⁻¹)表示。

2 结果与分析

2.1 培养基中苯磺隆浓度对烟草愈伤组织成活率及选择浓度的确定

将培育的烟草愈伤组织分别转入至含有不同浓度苯磺隆的培养基上进行培养,发现高浓度苯磺隆可使烟草愈伤组织的生长速率明显减慢,褐化率较高,4~5 d 后发现部分愈伤组织周围出现粘液,最终变褐、变黑、变粘直至死亡;而存活的愈伤组织生长缓慢,部分丧失胚性。低浓度苯磺隆对烟草愈伤组织生长的抑制作用不明显。30 d 后,统计愈伤组织的死亡率,求得 LC₅₀ 值为有效浓度(a.i) 2.95 mg/L,以此确定苯磺隆的选择剂量为(a.i) 3 mg/L。经该选择压力诱导烟草愈伤组织 3 代后进行分化,苯磺隆对愈伤组织的分化有显著影响,经 3 代筛选存活的愈伤组织只有不足半数能保持胚性并再生植株。

2.2 再生烟草植株种子潜在抗性趋势检测

不同浓度苯磺隆处理烟草种子后,对种子胚根长度(胚根+下胚轴)的影响结果见表 1。结果显示处理及对照种子的胚根长度均随苯磺隆浓度的增加而下降,但苯磺隆对再生种子胚根的影响明显低于对照,两者的抑制中浓度分别为 0.258 8 和 0.081 4 mg/L,再生种子胚根的抗性指数为 3.18。

表 1 不同剂量苯磺隆对再生烟草种子生长的影响

Table 1 Effect of different dose of tribenuron methyl on growth of tobacco seed

苯磺隆浓度/(mg/L) Dose of tribenuron methyl	再生烟种 Regenerants tobacco seed		对照烟种 CK	
	胚根长/mm (胚根+下胚轴) Root length (Radicle and hypocotyl)	根长抑制率(%) Root length inhibition rate	胚根长/mm (胚根+下胚轴) Root length (Radicle and hypocotyl)	根长抑制率(%) Root length inhibition rate
0.01	10.36	5.82	7.1	25.71
0.05	9.84	10.55	6.2	35.02
0.1	8.64	21.45	5.4	43.37
0.2	6.35	42.27	3.5	64.01
0.3	5.01	54.55	2.7	72.00
0.5	3.31	69.91	2.2	82.95
毒力回归线 LC ₅₀ line	Y=6.056 9+1.800 1X R=0.995 4		Y=6.081 2+0.992 3X R=0.951 7	
IC ₅₀ (95% FL)/(mg/L)	0.258 8(0.212 3~0.307 9)		0.081 4(0.011 0~0.227 0)	

2.3 再生烟草植株种子的活力

2.3.1 再生植株种子的萌发 由表 2 数据可以看出,经过苯磺隆诱导愈伤组织产生的再生烟草种子具有较高的发芽势和发芽率,且均与对照相当,二者间不存在显著性差异;但各处理间根长存

在显著性差异,再生烟草种子根长明显长于对照;另外,两种烟草种子的简化活力指数分别为 10.81 和 9.53,二者间无显著性差异,说明再生烟草植株种子具有较高的活力。

表 2 再生烟草植株种子萌发测定结果

Table 2 Seedling growth evaluation of regenerative seeds

材料 Material	发芽势 (%) Energy of germination	发芽率 (%) Germination percentage	幼根长度 /mm (胚根 + 下胚轴) Root length (Radicle and hypocotyl)	简化活力指数 Seed vigor index
再生植株 Regenerants	96.00 a ±0.41	97.25 a ±0.75	11.21 a ±0.030	10.81 a
对照 CK	95.75 a ±0.48	99.25 a ±0.48	9.59 b ±0.042	9.53 a

注:简化活力指数 = 发芽率 (%) × 幼根长度。表中数据后不同字母表示经 Duncan 氏新复极差测试,在 $P_{0.05}$ 水平上差异显著。下表同。

Note: Seed vigor index = germination percentage (%) × root length. Data in a column followed by the different capital letters means significant different at $P_{0.05}$ by Duncan's multiple range test, respectively. The same as in the following table.

2.3.2 再生植株种子电导率及几种酶活力 由表 3 电导率测定结果可以看出,随着浸泡时间的延长,再生烟草种子浸出液中电导率值均显著增加,即种子活力随着浸泡时间的延长而呈下降趋势,这一规律与对照组相同;在相同浸泡时间下,再生烟草种子电导率虽然略高于对照组,但两者

间差异不显著。

过氧化物酶、酸性磷酸酯酶及乙酰乳酸合成酶活性试验结果见表 3。可见再生烟草种子过氧化物酶和酸性磷酸酯酶活力均明显高于对照;处理与对照的 ALS 酶活力分别为 10.41 和 6.67 $\text{mmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$,差异显著。

表 3 再生烟草植株种子电导率及酶活性测定

Table 3 Conductivity and activity of POD and acid phosphatase of regenerative seeds

材料 Material	电导率 / ($\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) Conductivity				过氧化物酶活性 /($\text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) Peroxidase activity	酸性磷酸酯酶活性 /($\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) Acid phosphatase activity	乙酰乳酸合成酶活力 /($\text{nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) ALS activity
	8 h	16 h	24 h	48 h			
再生烟草种子 Regenerants seeds	9.50 a	12.99 a	14.00 a	15.35 a	47.36 a	2.927 a	10.41 a
对照烟草种子 CK	9.17 a	12.33 a	13.07 a	14.87 a	29.44 b	2.447 b	6.67 b

3 讨论

通过植物组织培养技术进行抗除草剂细胞突变体的筛选研究,可以从大量的细胞中诱导出所需的抗性品质,并且具有节省人力物力、缩短培养周期的优点,是研究植物体对除草剂抗性发展、抗性机理和抗性植株筛选的一种有效途径。本研究选用烟草这一模式植物进行了苯磺隆抗性植株的筛选,并得到了抗性植株。同时发现,再生植株具有更好的幼苗品质,这为今后常规植物的研究提供了理论依据和实践基础。

种子活力是评价种子质量的重要标准,而发

芽势、发芽率、胚根长度以及简化活力指数是评价种子活力的重要指标。另外,种子浸出液的电导率作为检测种子活力高低的指标已成为种子活力检验中的常规方法,可以反映出细胞膜透性的大小^[12]。本研究表明,苯磺隆诱导烟草愈伤组织后培育获得的再生植株烟草种子与对照的活力相当。

过氧化物酶是与种子活力有关的氧化酶之一,具有清除植物代谢过程中产生的过氧化物,保持细胞结构的完整性,从而延缓植物体衰老的作用;而酸性磷酸酯酶在植物体内具有水解磷酸酯

键,为植物的代谢活动提供能量的作用。烟草中过氧化物酶及酸性磷酸酯酶活性的差异可以反映出烟草代谢能力的差异。本试验测定结果发现,培育获得的再生植株种子的过氧化物酶和酸性磷酸酯酶活力均高于对照,说明再生植株种子活力不低于正常种子。同时通过测定种苗的 ALS 酶活性发现,再生种苗的酶活力高于对照种苗,这可能是由于抗性再生种苗 ALS 酶的含量增加或酶过量表达造成的。

试验中作者仅筛选了 3 代苯磺隆抗性愈伤组织,对于选育代数与抗性的关系以及如何获得更高抗性倍数的愈伤组织和抗性植株还有待于进一步研究。从种子发芽势、发芽率等宏观指标数据分析可知,再生植株烟草种子与对照种子的活力相当,但从微观指标如过氧化物酶和酸性磷酸酯酶的活性来看,再生烟草种子活力高于对照。对产生两者差别的原因及 ALS 酶的改变与种子活力的变化是否存在相关性还有待于更深入的研究。

参考文献:

- [1] SHA Jia-jun (沙家骏). Chemical Products Manual—Agrochemicals (化工产品手册——农用化学品) [M]. Beijing (北京): Chemistry Industry Press (化学工业出版社), 1999: 274.
- [2] DUGGLEBY R G, PANG S S. Acetohydroxyacid Synthase [J]. Biochem Mol Biol, 2000, 33 (1): 1-36.
- [3] PRESTON C, POWLES S B. Evolution of Herbicide Resistance in Weeds: Initial Frequency of Target Site-based Resistance to Acetolactate Synthase Inhibiting Herbicides in *Lolium Rigidum* [J]. Heredity, 2002, 88: 8-13.
- [4] STEPHEN B P, DALE L S. Herbicide Resistance and World Grains [M]. USA: CRC Press LLC, 2001.
- [5] CARLSON PS. Methionine Ulfloxim ine-resistant Mutants of Tobacco [J]. Science, 1973, 180: 1366-1317.
- [6] WANG Yan-feng (王延峰), LI Guo-sheng (李国胜). 玉米抗除草剂体细胞变异体的筛选及植株再生 [J]. J Henan Agric Sci (河南农业科学), 2001, (12): 16-19.
- [7] YAN Chang-jing (颜昌敬). Plant Tissue Culture Manual (植物组织培养手册) [M]. Shanghai (上海): Shanghai Scientific and Technical Publishers (上海科学技术出版社), 1990: 114-115.
- [8] FAN Zhi-jin (范志金), QIAN Chuan-fan (钱传范), YU Wei-qiang (于维强), et al. 氯磺隆和苯磺隆对玉米乙酰乳酸合成酶抑制作用的研究 [J]. Scientia Agricultura Sinica (中国农业科学), 2003, 36 (5): 536-541.
- [9] SUN Guang-ling (孙光玲), WANG Da-zhou (王大洲), LEI Yun-qing (雷云青), et al. 烤烟种子活力的测定 [J]. Tobacco Science & Technology (烟草科技), 2003, (9): 32-35.
- [10] LI He-sheng (李合生). Principle of Plant Physiological and Biochemical Experiments and Technology (植物生理生化实验原理和技术) [M]. Beijing (北京): Higher Education Press (高等教育出版社), 2000: 164-165.
- [11] ZHANG Ling (张玲), MA Chun-hui (马春晖), DUAN Huang-jin (段黄金), et al. 新疆高羊茅成熟过程中种子活力变化的研究 [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica (西北农业学报), 2003, 12 (2): 1-4.
- [12] WOODSTOCK L W, TAO K L. Prevention of Imbibitional Injury in Low Vigour Soybean Embryonic Axes by Osmotic Control of Water Uptake [J]. Physiologia Plantarum, 1981, 51: 133-139.

(Ed. J N S H)