

大蒜抗百草枯愈伤组织变异系的选择

张恩让¹,程智慧²,杨伟林²

(¹贵州大学农学院,贵阳 550025;²西北农林科技大学园艺学院,陕西杨凌 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,在含百草枯浓度分别为0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%、1.5%的培养基上采用直接接种和逐级培养法,选择抗百草枯愈伤组织细胞系。结果表明:4个品种在低浓度(<0.4%)胁迫下都有一定的抗性,经逐级抗百草枯选择后的愈伤组织,其抗性能力有明显提高。在含有百草枯浓度0.6%培养基上,4个品种愈伤组织的成活率为7.8%~20.6%,且发育良好;在浓度0.8%和1.0%的百草枯培养基上也有部分愈伤组织成活。抗性稳定性检验表明,大蒜抗百草枯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;抗百草枯选择

中图分类号:S633.401

文献标志码:A

论文编号:2010-1818

The Selection of Resistant Paraquat Callus Variation Line of Garlic

Zhang Enrang¹, Cheng Zhihui², Yang Weilin²

(¹College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang 550025;

²College of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling Shaanxi 712100)

Abstract: Four different ecotypic garlic cultivars ‘modified garlic’, ‘Jintang early garlic’, ‘Cangshan’ and ‘Europe 01’ were chosen to select for the resistant paraquat callus, in the medium including paraquat concentrations 0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8%, 1.0% and 1.5%, respectively. The results showed that the four cultivars had some resistance under the low concentration stress (<0.4%), and the resistance of the callus were enhanced by step-to-step culturing method. The survival rates of the callus were from 7.8% to 20.6% in the medium including containing 0.6% paraquat. Some callus was also survived in the medium containing 0.8% and 1.0% paraquat. Stability test showed the ability of resistant paraquat could keep for a long time.

Key words: garlic; callus; variation line; resistant paraquat selection

0 引言

体细胞无性系的变异及其筛选应用为大蒜等无性繁殖的蔬菜作物遗传育种开辟了一条令人振奋的途径。近年来此方面的研究十分活跃,利用体细胞无性系变异实现新材料、新种质的创制已经有许多成功的范例^[1-3]。张恩让等^[4-5]曾利用在组织培养过程中添加胁迫剂的方法获得了大蒜抗盐的体细胞无性系和抗草甘磷的细胞系。在大蒜的生产过程中还广泛用到百草枯做蒜田除草剂,百草枯由Zeneca公司研制开发,在田间使用时兼备广谱、高效、对人畜安全和无污染等优点,但它

在发挥除草剂的作用时也对大蒜造成一定的伤害,如能选择出抗百草枯的品系,将对大蒜生产有很大的促进作用。这一方面的系统研究尚未见报道。笔者以4个大蒜品种为试材,进行了大蒜抗百草枯愈伤组织变异系的选择研究,以期抗百草枯大蒜品系选育提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

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。

基金项目:中德政府间合作项目“马铃薯、大蒜体细胞无性系变异筛选利用研究”(CH-01/04)。

第一作者简介:张恩让,男,1960年出生,陕西扶风人,教授,博士,主要从事蔬菜生理生态和生物技术研究。通信地址:550025 贵州省贵阳市花溪区贵州大学农学院, Tel: 0851-3855894, E-mail: gzzer@126.com。

收稿日期:2010-06-12, **修回日期:**2010-08-12。

1.2 试验方法

选择健康饱满的蒜瓣,切去上部的贮藏叶,利用底部3 mm高的部分(带部分贮藏叶和部分茎盘)做外植体,切成3 mm见方的小块。基本培养基为MS+2.4-D 2.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L。选择胁迫剂为百草枯(Zeneca公司生产),胁迫剂浓度分别为0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%和1.5%。具体方法是:(1)直接将外植体接于添加了不同浓度百草枯的基本培养基上,在50天后统计出愈率;(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,然后把增殖的愈伤组织分成2 mm见方的小块,分别转到添加了不同浓度百草枯的基本培养基上,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)每个品种取2份愈伤组织,从0.2%开始,在不同浓度的百草枯培养基上从低到高逐级培养,最高浓度为1.5%;1份在每个培养基上培养4周,另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浓度百草枯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) $\times 100\%$;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) $\times 100\%$;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4~5块,用其算术平均值做比较。

2 结果与分析

2.1 百草枯浓度对出愈率的影响

将大蒜外植体接种于添加有百草枯的培养基上诱导愈伤组织。结果表明,百草枯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天,在添加了百草枯的培养基上均未诱导出愈伤组织。

2.2 愈伤组织对百草枯的抗性

将在无百草枯培养基上诱导出的愈伤组织,转接于含有不同浓度百草枯的培养基上,研究愈伤组织对百草枯的抗性(以愈伤组织成活率衡量),结果见表1。百草枯对愈伤组织的成活率有很大影响,在添加了百草枯的培养基上,愈伤组织的成活率急剧下降,低浓度时(0.2%和0.4%),尚有部分成活,若培养基中百草枯浓度超过0.6%,已很难有愈伤组织成活。‘金堂早蒜’和‘欧引01’对百草枯的抗性能力略强于‘改良蒜’和‘苍山蒜’(表1)。

表1 大蒜愈伤组织在含有不同浓度百草枯培养基上的成活率

| 品种 | 百草枯浓度 | | | | | | | % |
|------|-------|------|------|-----|-----|-----|-----|---|
| | 0 | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1.0 | 1.5 | |
| 改良蒜 | 100 | 27.5 | 15.5 | 3.3 | — | — | — | — |
| 金堂早熟 | 100 | 35.0 | 18.0 | 3.3 | 3.3 | — | — | — |
| 苍山蒜 | 100 | 23.3 | 14.5 | 6.6 | — | — | — | — |
| 欧引01 | 100 | 33.3 | 15.0 | — | 3.3 | — | — | — |

注:“—”表示没有成活的愈伤组织,下同。

2.3 逐级培养对愈伤组织成活率的影响

逐级培养4、8周后,愈伤组织成活率的统计结果列于表2。表2结果表明,愈伤组织经过浓度逐步提升的百草枯培养基多次转移和选择,其抗百草枯的能力有明显提高。‘金堂早蒜’经每级4周培养选择的愈伤组织,在含浓度0.4%、0.6%、0.8%百草枯培养基上的成活率分别由直接接种的18.0%、3.3%、3.3%提高到23.7%、12.9%、6.6%。而经每级8周培养选择的愈伤组织,其抗百草枯的能力提高幅度更大,愈伤组织成活率在浓度0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%和1.5%的百草枯胁迫下分别达到了35.0%、27.2%、20.6%、9.8%、6.6%和3.3%。其他品种表现趋势与‘金堂早蒜’相似。

表3表明,4个品种在经过逐级培养选择后,愈伤组织的平均成活率与直接选择相比,差异均达到极显

著水平。每级4周逐级培养选择和每级8周逐级培养选择相比,差异显著。说明逐级培养选择能有效地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

为研究逐步选择抗百草枯愈伤组织的生长情况,以直接接种于含有不同浓度百草枯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,结果见表4。表4表明,经抗百草枯选择的愈伤组织在含有百草枯的培养基上前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浓度的百草枯培养基上表现尤为显著。如‘改良蒜’,在含有0.6%百草枯的培养基上培养的前4周,对照的生长率分别为0.21、0.11、0.17和0.07,而经抗百草枯选择的愈伤组织生长

续表4

| 品种 | 百草枯浓度/% | 对照 | | | | 选择愈伤组织 | | | |
|------|---------|------|------|------|------|--------|------|------|------|
| | | 1周 | 2周 | 3周 | 4周 | 1周 | 2周 | 3周 | 4周 |
| 苍山蒜 | 0 | 3.01 | 0.57 | 0.43 | 0.17 | 3.01 | 0.57 | 0.43 | 0.17 |
| | 0.2 | 1.01 | 0.82 | 0.53 | 0.25 | 1.01 | 0.82 | 0.53 | 0.25 |
| | 0.4 | 0.43 | 0.28 | 0.13 | 0.15 | 0.65 | 0.53 | 0.27 | 0.19 |
| | 0.6 | 0.11 | 0.08 | 0.02 | 0.01 | 0.33 | 0.30 | 0.19 | 0.10 |
| | 0.8 | — | — | — | — | 0.23 | 0.18 | 0.15 | 0.03 |
| | 1.0 | — | — | — | — | 0.12 | 0.08 | 0.10 | 0.04 |
| 欧引01 | 0 | 3.47 | 0.82 | 0.51 | 0.08 | 3.47 | 0.82 | 0.51 | 0.08 |
| | 0.2 | 0.55 | 0.32 | 0.41 | 0.27 | 0.55 | 0.32 | 0.41 | 0.27 |
| | 0.4 | 0.21 | 0.15 | 0.09 | 0.07 | 0.43 | 0.27 | 0.21 | 0.12 |
| | 0.6 | — | — | — | — | 0.37 | 0.25 | 0.15 | 0.10 |
| | 0.8 | — | — | — | — | 0.18 | 0.11 | 0.03 | 0.01 |
| | 1.0 | — | — | — | — | — | — | — | — |

率则分别达到了0.49, 0.33, 0.35和0.21, 增加均在1倍以上。培养基中百草枯浓度在0.8%和1.0%时, 对照的愈伤组织全部死亡, 而经抗百草枯选择的愈伤组织仍保持一定的生长率。

2.5 抗性稳定性检验

把在百草枯培养基上经诱导选择可在浓度0.6%百草枯的培养基中稳定生长的抗百草枯愈伤组织, 转移到不含百草枯的培养基中培养45天, 再直接转回到含有浓度0.6%百草枯的培养基中, 统计成活率和前4

周的生长率进行抗性稳定性检验, 结果见表5。选择出的愈伤组织仍保持较高的抗百草枯的能力, 在0.6%百草枯的培养基中生长良好, 4个品种的成活率分别为65%、81%、72%、79%。从生长率上看, 与逐步选择的愈伤组织生长率相比没有多大差别, 但显著高于在浓度0.6%百草枯的培养基上直接选择的愈伤组织生长率, 证明经过这种方法选择的抗百草枯愈伤组织变异系, 在一定的时间内能够保持其抗性, 且有抗性下降的趋势。

表5 在含0.6%百草枯的培养基上经无百草枯培养的愈伤组织成活率和生长率

| 品种 | 成活率/% | 生长率 | | | |
|------|-------|------|------|------|------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 改良蒜 | 65 | 0.23 | 0.20 | 0.28 | 0.10 |
| 金堂早蒜 | 81 | 0.30 | 0.21 | 0.25 | 0.08 |
| 苍山蒜 | 72 | 0.18 | 0.21 | 0.18 | 0.04 |
| 欧引01 | 79 | 0.25 | 0.20 | 0.22 | 0.14 |

3 讨论

(1)关于抗性机理和创制抗性品系问题。百草枯是联吡啶类除草剂, 是典型的光合系统I (PS I) 抑制剂。它的除草机制是竞争PS I 中主要电子受体中的电子, 形成游离基, 进而再氧化, 产生超氧化物, 成为氧化或还原剂而使植物受害。目前创制抗百草枯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^[2,6-7]。Botterman和Leemans^[8]报道了利用基因工程技术创制抗除草剂的研究进展, 在烟草上已有成功的例子。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百草

枯的大蒜变异细胞系, 取得了一定的进展, 所选出的细胞系抗百草枯能力提高了很多。但离百草枯在大田的使用浓度(1.5%~2.5%)还有一定距离, 笔者曾尝试提高培养基中百草枯浓度去做进一步的筛选, 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系, 也可能是因为在培养基中的细胞不断分化, 对百草枯特别敏感, 而使它的适应能力降低, 如能诱导成再生植株, 那么, 植株的抗百草枯能力可能会有所提高。因此还需做进一步深入研究。

(2)关于体细胞无性系变异离体筛选的方式问题。在进行植物的抗性变异系选择时, 目前常用的方

式归纳有二,其一是适应性选择,具体做法是将诱导出的愈伤组织在加了较低浓度胁迫剂的培养基中继续培养,随后不断加大培养基中胁迫剂浓度,使愈伤组织逐渐适应胁迫环境,并在胁迫环境中能够增殖和分化,进一步形成完整的再生植株。但更多的资料报道是利用诱导突变选择,即在高水平选择压力下经长时间选择培养,诱导产生遗传上发生变异的细胞,将此变异细胞诱导成再生植株。不同的选择方式代表了不同的抗性机制,一般认为适应性细胞不能遗传。大蒜是无性繁殖作物,其母体获得的某种抗性不会因有性繁殖而丧失,故能保持较长的时间,在大蒜上进行适应性选择获得抗性植株是有意义的。但本研究的抗性筛选结果证明,适应性选择只能在一定的时间内保持其抗性,且有抗性下降的趋势,但这并不能完全否定适应性选择的方法,为了更好的利用适应性选择,对这一方法还需在以后的工作中进行更多的探索和研究。

(3)关于胁迫剂浓度的问题。培养基中的除草剂应以生产中使用的,或稍高一点的浓度做胁迫浓度,这样才能筛选到能用于生产的抗性品系,但不同的作物在生产中使用的浓度不同。本研究所采用的浓度是按照百草枯商品说明书中所列的菜田使用浓度换算的,但筛选的结果离使用浓度还有一些差距,尚需进一步研究。

(4)关于体细胞无性系变异的遗传稳定性问题。Skirvin等^[9]将体细胞无性系变异分为可遗传的变异(heritable variation)和外遗传变异(epigenetic variation)2类。前者是指可以在有性世代和无性繁殖世代稳定保持的变异。后者指在有性世代,即使在无性世代都不能稳定保持的变异。外遗传变异也称发育变异(developmental variation),即由于外部影响导致基因表达的改变,从而引起表型上的变异。在组织培

养中,细胞经历了脱分化、分裂、增殖和再分化等过程,人为影响因素很多,即细胞的外部环境变化较大,这就增加了变异的复杂性。在体细胞无性系变异中,既有可遗传变异,也有外遗传变异,不论那种变异,对于以大蒜为代表的无性繁殖作物来说,都能保持较长的时间,但是要真正解决遗传稳定性的问题,还是要筛选出从基因水平上发生改变的突变体,这就需要时间,所以,研究大蒜体细胞无性系变异的遗传稳定性是一个长期性的问题。本研究所获得的大蒜抗百草枯细胞系,其抗性能力的稳定性检验需要一个长期的过程,要经过大田实际检验才能说明问题,后面还有大量的工作要做。

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] 胡含,王恒立主编.植物细胞工程与育种[M].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] 张恩让,程智慧.大蒜耐盐愈伤组织变异系的选择研究[J].西北植物学报.2003,23(9):1571-1576.
- [5] 张恩让,程智慧.大蒜抗草甘磷愈伤组织变异系的选择研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2003,31(3):69-72,76.
- [6] 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.
- [7] Mazur B J, Falco S C. The Development of Herbicide Resistant Crops[J]. Annu Rev, Plant Physiol, 1989(40):441.
- [8] Botterman J, Leemans J. Engineering of Herbicide Resistance in Plants[J]. Biotechnology & Genetic Engineering reviews, 1988(6): 321-324.
- [9] Skirvin R M, Janick J. 'Velvet Rose' Pelargonium accented geranium[J]. Hortscience, 1976(11):61-62.