

草甘膦对转 *EPSPS-G6* 基因棉花种质系配子育性的影响

梅磊, 陈进红, 何秋伶, 祝水金*

(浙江大学农业与生物技术学院, 杭州 310058)

摘要: 以转 *EPSPS-G6* 基因的抗草甘膦棉花种质系为材料, 研究转基因抗草甘膦棉花植株现蕾后喷施不同浓度草甘膦后的花器形态结构和配子育性的影响。结果表明, 苗期的草甘膦处理对转 *EPSPS-G6* 基因的棉花种质系植株生长发育无明显的影响, 但现蕾后可导致转基因抗草甘膦棉花种质系花冠变小, 花丝变短, 柱头变长, 花药皱缩、不能开裂, 呈雄性败育的特征; 高浓度 ($>30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 草甘膦处理尤其明显。花粉粒育性鉴定结果表明, 草甘膦处理 15~20 d 后转基因植株的花朵雄配子即完全败育, 其中, 低浓度 ($<20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 下完全败育的时间为 20 d, 高浓度 ($>30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 下完全败育的时间为 15 d。低浓度草甘膦处理的花粉粒的完全败育持续时间约 20 d, 高浓度草甘膦处理完全败育的持续时间更长。不同间隔时间喷施草甘膦的试验结果表明, 间隔 20 d 喷一次草甘膦, 即可在首次喷药 20 d 后保持完全不育。考虑到气候等因素, 转基因抗草甘膦棉花可在现蕾初期喷施 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的草甘膦, 每隔 15 d (遇特殊气候可延长 5 d) 喷 1 次, 共喷 4 次, 即可进行不去雄杂交棉制种。

关键词: 草甘膦; 杀雄剂; 杂交制种; 不育机理

中图分类号: S562.03 **文献标志码:** A

文章编号: 1002-7807(2013)02-0115-06

Effect of Glyphosate on the Gamete Fertility of Transgenic Glyphosate-resistant Cotton Germplasms with *EPSPS-G6*

MEI Lei, CHEN Jin-hong, HE Qiu-ling, ZHU Shui-jin*

(Agronomy Department, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: The effect of glyphosate on floral organ morphology structure and gamete fertility of transgenic glyphosate-resistant cotton germplasms with *EPSPS-G6* were studied, with the germplasms were treated with different glyphosate concentration started from squaring stage. The results showed that there were not obvious damage on the growth and development of the transgenic germplasms by the treatment of glyphosate before squaring stage, but serious flower characters and male sterility, such as small flowers, short stigmas, wizened and indehiscent anthers etc., when they were treated with glyphosate after squaring stage, especially with the high concentration ($>30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$). Pollen fertility identification showed that male gametes abortion was started in 15 days for high concentration, or 20 days for low concentration ($<20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) after the treatment. The period of male gametes abortion continued for more than 20 days, and much longer for the higher concentration glyphosate. The results of different treatment intervals with different concentrations showed that male gametes abortion could continue in the whole growth period when they were treated every 20 days. The experiment result found that the transgenic cotton germplasms with *EPSPS-G6* could be used as female parent without artificial emasculation to produce hybrid cottonseeds, as long as they were treated by $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ glyphosate with every 15 days (another 5 days delay if the weather was unallowed for spraying) for 4 times, started from squaring stage.

Key words: glyphosate; male killing agent; hybrid seed production; sterile mechanism

除草费用是棉花生产的主要投入之一, 随着 代化农业生产的需求, 化学除草已成为发达国家劳动成本的增加, 传统的除草方式显然不适合现 杂草防治的主要方法^[1]。草甘膦 (Glyphosate) 是有

收稿日期: 2012-02-19 **作者简介:** 梅磊 (1986-), 男, 硕士研究生; * 通讯作者, shjzhu@zju.edu.cn

基金项目: 国家 973 计划项目 (2010CB126006); 公益性行业 (农业) 科研专项经费项目 (nyhyzx07-052) 和国家自然科学基金 (30981720)

机类强内吸型茎叶处理灭生性除草剂,对植物无选择性,可杀死所有的绿色植物。草甘膦作用机理是特异性地抑制植物和细菌中5-烯醇式丙酮酸-3-磷酸莽草酸合成酶(5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate, EPSPS)的活性,阻断芳香族氨基酸的合成,造成芳香族氨基酸缺乏,从而导致植株死亡^[2-4]。同时,草甘膦除草剂对于植物配子具有较强的杀伤作用,是一种植物杀配子剂^[5-6]。

抗除草剂棉花品种最早由美国孟山都公司于1997年商业化^[7]。浙江大学从假单胞杆菌中克隆了抗草甘膦的EPSPS-G6基因,并通过花粉管通道技术将该基因导入棉花品种—中棉所49,获得了抗性强而稳定的转基因抗草甘膦棉花种质,为培育和推广具有我国自主知识产权的抗草甘膦棉花品种奠定了基础^[8-9]。本研究通过对转EPSP-G6基因抗除草剂种质雌雄配子体对不同浓度草甘膦除草剂的反应,研究草甘膦除草剂对其雌雄配子的杀伤作用,为该种质的安全使用提供依据。同时,评价其在杂交棉制种中的应用价值。

1 材料和方法

1.1 供试材料

本研究应用的实验材料有:GRR-83-21,由本实验室通过花粉管通道技术,将本校克隆的具有自主知识产权的EPSPS-G6基因导入到中棉所49中获得的转基因抗草甘膦除草剂棉花种质系;中棉所49为非转基因棉花品种,为GRR-83-21遗传背景亲本,由中国农科院棉花研究所提供。YZ-1:超鸡脚叶棉花种质系,由华中农业大学提供。

试验用草甘膦为95%草甘膦原药,由浙江新安化工生产。因原药微溶于水,使用时配制草甘膦钠盐母液,并配制成试验浓度。

1.2 研究方法

2009—2010年于浙江杭州浙江大学试验农场进行。现蕾开始,按试验设计对转基因抗草甘膦棉花植株喷施不同浓度的草甘膦。

试验采取裂区设计,以6个浓度梯度(0, 1.0, 10.0, 20.0, 30.0和50.0 mmol·L⁻¹)为主区,6个喷药间隔期(5 d, 10 d, 15 d, 20 d和25 d)为副区。

花粉育性调查:自棉花开花开始,每天上午9:00—11:00取样,观察花药开裂情况。每处理取

花3朵,用联苯胺-甲奈酚对花粉进行染色,显微镜下观察,每处理8个视野统计花粉育性。镜下显红色、圆形、饱满的花粉粒为可育花粉,黄色、半透明、不规则的为败育花粉。

花粉育性 = 所有视野中的可育花粉 / 所有视野中的所有花粉 × 100%

配子育性鉴定:为了进一步鉴定雌雄配子的育性,本试验采用自交和杂交方法对各处理进行雌雄配子的育性鉴定,杂交亲本为鸡脚叶陆地棉种质系YZ-1。

2 结果与分析

2.1 草甘膦对抗草甘膦棉花花器官形态的影响

棉花成株期用草甘膦处理,中棉所49生长点最早死亡,最后全株枯死,但低浓度(5 mmol·L⁻¹)下,中棉所49植株虽生长点死亡,但叶腋能再生。转EPSPS-G6基因的棉花种质系,用不同浓度的草甘膦溶液处理后植株生长正常,但高浓度(50 mmol·L⁻¹)处理下的植株生长略受到抑制。说明外源EPSPS-G6基因能有效地提高棉花对草甘膦抗性。

然而,转EPSPS-G6基因的棉花种质系成株期经不同浓度的草甘膦处理后虽能正常开花,但花器却发生明显的形态学变化。与清水处理(对照)相比,草甘膦处理后的棉花明显呈雄性败育的特征(图1):花冠明显变小,花瓣开张角度小,呈皱缩状;柱头弯曲,花丝变短,柱头相对于雄蕊的距离变长;花药皱缩、不能开裂;整个雄蕊群颜色较对照浅。

花器官形态学特征的变化因草甘膦处理的不同而不同,其中花器大小随着草甘膦处理浓度的梯度增大而变小,花丝长度则随草甘膦浓度的增加而缩短,柱头长度(相对于雄蕊的距离)则随草甘膦浓度的增加而明显变长。另外,花药的皱缩程度、开裂程度和开裂时间等也随草甘膦浓度的增加而更加异常。30 mmol·L⁻¹及以上高浓度草甘膦处理的植株,其花朵雄蕊已基本退化,表现为完全败育(图1)。

2.2 草甘膦处理对抗草甘膦棉花育性的影响

转EPSPS-G6基因棉花植株现蕾以后喷施一定浓度的草甘膦,处理约20 d后,其花粉粒的生

活率明显下降或完全丧失(图 2);而清水处理的对照植株的花药开裂正常,花粉粒多(图 2-1)。花药开裂与散粉情况与处理的草甘膦浓度有关,当处理浓度达到 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,花药已不能正常开裂(图 2-2、图 2-3)。花粉粒染色结果表明,对照

花粉粒大小一致,染色均匀鲜艳(图 2-4)。 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 草甘膦处理后,部分花粉粒不能染色,花粉无活力(图 2-5)。 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 草甘膦处理后,花粉粒形状不规则,较正常花粉粒小,均不能染色,表现为花粉粒完全不育(图 2-6)。

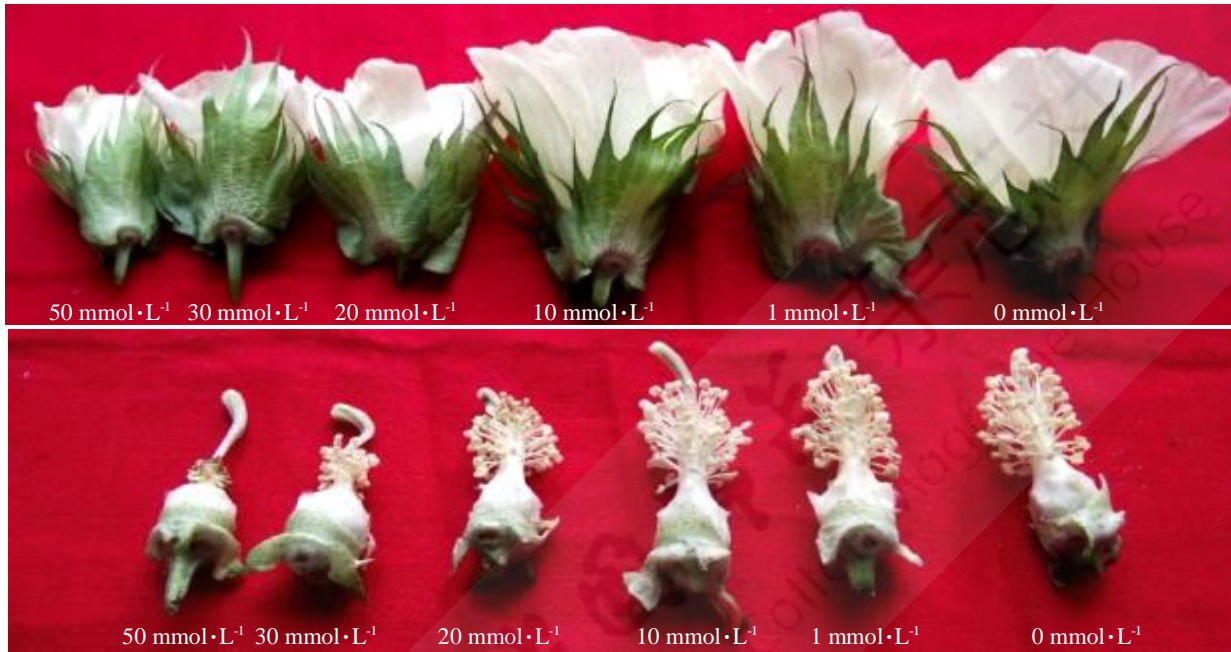
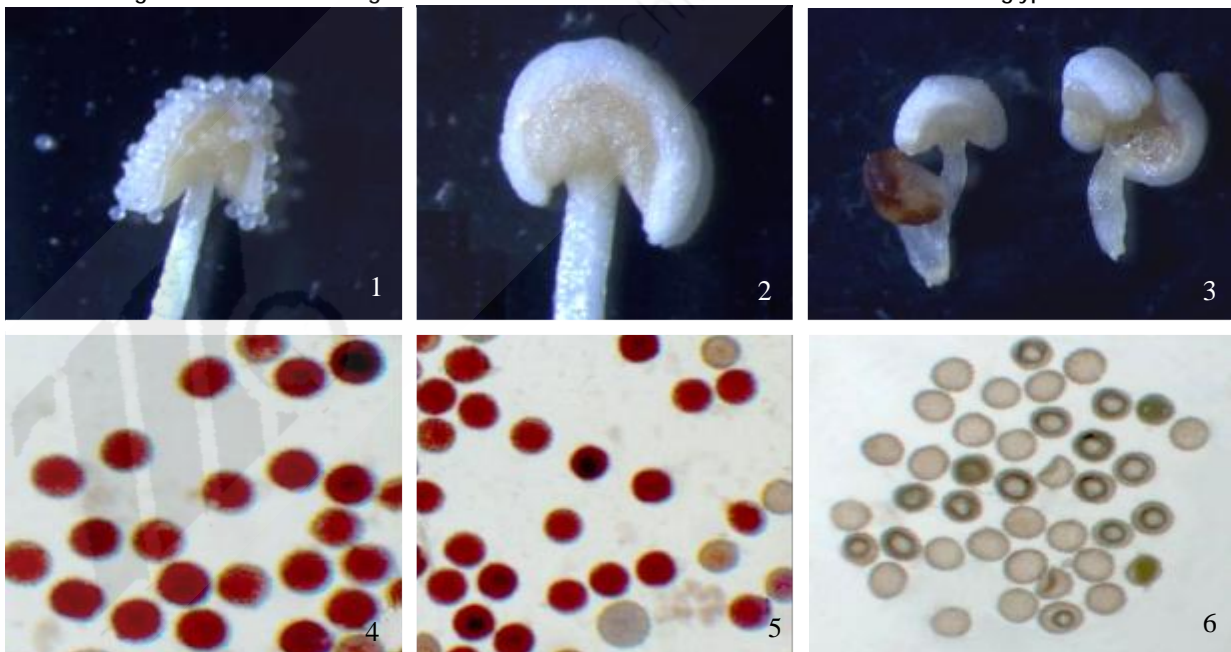


图 1 不同浓度草甘膦处理后的转 *EPSPS-G6* 基因棉花的花器形态结构

Fig. 1 Flowers of transgenic cotton with *EPSPS-G6* treated with different levels of glyphosate



1: 对照花药; 2: $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 草甘膦处理后的花药; 3: $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 草甘膦处理后的花药; 4: 对照花粉粒; 5: $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 草甘膦处理后的花粉粒; 6: $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 草甘膦处理后的花粉粒。

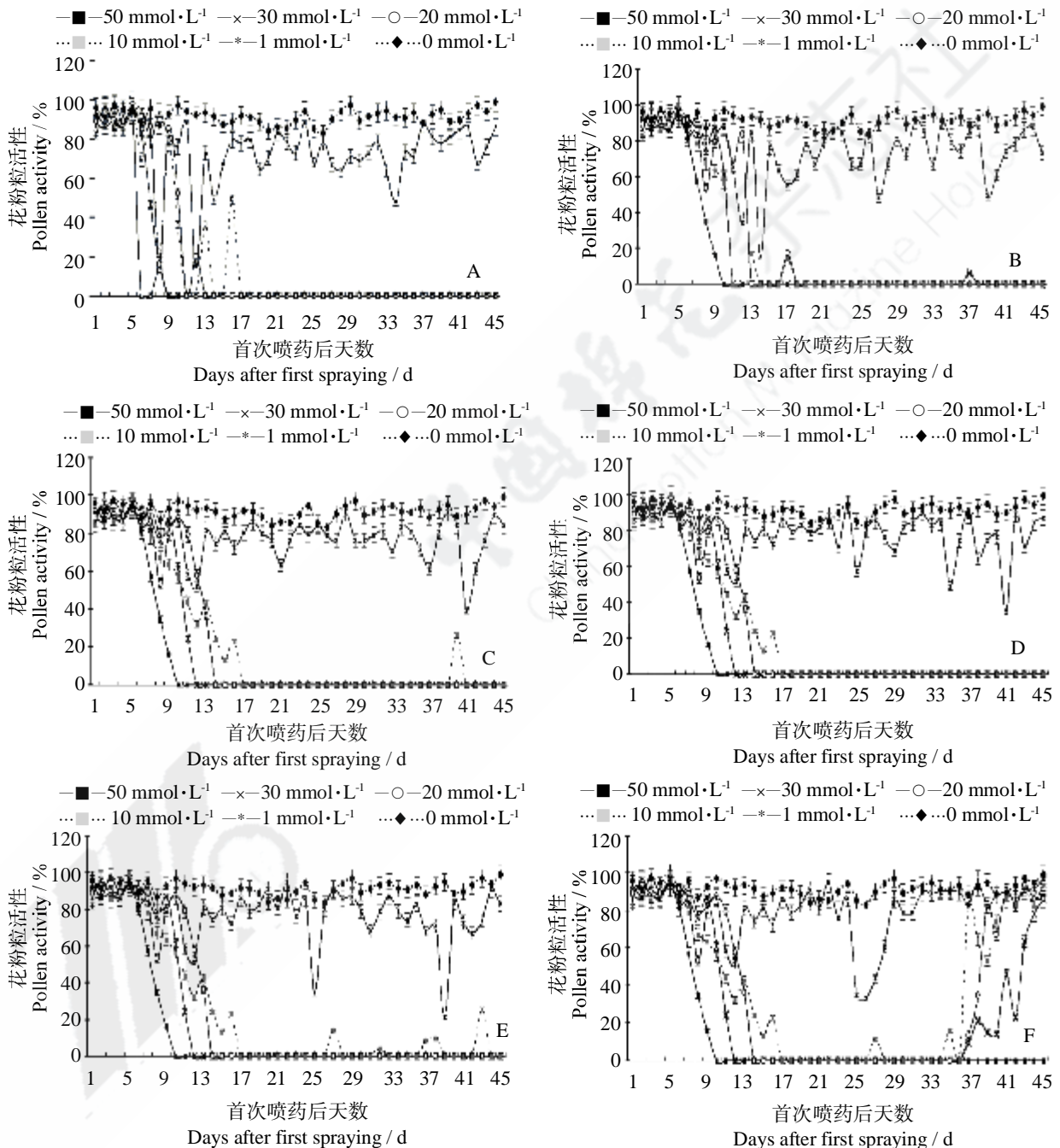
1: Anthers of CK; 2: Anthers treated with $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ glyphosate; 3: Anthers treated with $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ glyphosate; 4: Pollens of CK; 5: Pollens treated with $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ glyphosate; 6: Pollens treated with $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ glyphosate.

图 2 不同浓度草甘膦处理后的转 *EPSPS-G6* 基因棉花雄配子育性表现

Fig. 2 The performance of the male gametes of the transgenic cotton with *EPSPS-G6* treated with different levels of glyphosate

棉花现蕾后,每隔5、10、15、20和25 d 喷施不同浓度的草甘膦后,每天分别取各处理的花粉粒进行育性鉴定,共观察鉴定45 d。由图3可以看出,5种草甘膦浓度均能导致转 *EPSPS-G6* 基因棉花的花粉育性的降低,其中 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 草甘膦处

理均表现完全雄性不育,但 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 草甘膦处理虽花粉育性有所降低,但未表现为完全不育。完全不育开始的时间随处理浓度的增加而提前,其中 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 草甘膦处理后第7天即出现完全不育; $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及其以下浓度的草甘膦喷处理后,第15天才出现完全不育。除 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$



A: 每5 d 喷1次; B: 每10 d 喷1次; C: 每15 d 喷1次; D: 每20 d 喷1次; E: 每25 d 喷1次; F: 只喷1次。

A: Spraying in 5 days interval; B: Spraying in 10 days interval; C: Spraying in 15 days interval; D: Spraying in 20 days interval; E: Spraying in 25 days interval; F: Spraying one time only.

图3 不同间隔时间用不同浓度的草甘膦处理后转 *EPSPS-G6* 基因植株花粉活性表现

Fig. 3 The pollen activity of transgenic cotton plant with *EPSPS-G6* treated with different levels of glyphosate in different time intervals

草甘膦处理的植株花粉粒在观察期内未见育性恢复外,其余浓度处理的植株花粉育性均可得到恢复。花粉完全不育的持续的时间随处理浓度的增加而增加,其中 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 草甘膦处理完全不育持续时间约为 20 d,其中个别观察时期出现了约 10%的可育花粉。 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 草甘膦处理下的完全不育持续时间约 25 d; $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 草甘膦处理下的完全不育持续时间约 30 d(图 3-F)。

不同间隔时间喷施一次草甘膦试验结果表明,在首次喷施 15~20 d 以后,除低浓度 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理偶有 10%~20%的可育花粉出现外,其余浓度均未出现可育花粉,表明其杀雄配子效果稳定(图 3-A~F)。

为了进一步鉴定草甘膦处理对于雌雄配子育性的影响,在首次喷施草甘膦后 20 d 后用超鸡脚棉种质系 YZ-1 的花粉对各处理进行不去雄人工授粉。结果表明:结铃率随处理浓度增加而降低,其中 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 草甘膦处理植株未获得杂交铃,其余处理的结铃率分别为 41.5%、56.4%、51.1%、53.5%和 54.4%;且 $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 草甘膦处理的结铃率明显低于对照,而其余处理的结铃率与对照无明显差异。说明 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 草甘膦对雌配子的育性造成严重损害, $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 草甘膦对雌配子的育性也有一定的损害,而 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以下浓度草甘膦处理对于转基因抗草甘膦棉花的雌配子的育性无影响。

杂交所得杂交种于 2011 年冬种于海南三亚中国农科院棉花研究所南繁基地种植,除对照($0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)和 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 草甘膦处理的杂交后代(F_1)中出现叶型分离外,其余处理的杂交后代均为半鸡脚棉,纯度达 100%;说明草甘膦作为转 *EPSPS-G6* 基因棉花的杀雄剂杀雄彻底。即使低浓度处理在镜检时发现少量可育的花粉粒,但它们无法与正常花粉粒竞争。

3 讨论

化学杀雄杂交棉制种除不需要人工去雄而大幅度降低了杂交种生产的成本外,还具有免除不育系制种中育性配套和保持所必需的繁琐工序,且亲本选择更加广泛,杂交组合选配自由,更易选出具超优势的杂交种^[10]。因此,化学杀雄技术

在棉花杂交优势利用和杂交制种上有着广阔的市场前景。转 *EPSPS-G6* 基因棉花种质系高抗草甘膦除草剂,但现蕾后喷施草甘膦会引起配子败育而造成损失^[11-14]。然而,正是由于转 *EPSPS-G6* 基因棉花种质系这一特点,决定其在棉花杂交棉高效制种中的利用价值。考虑到气候因素等的影响,选择 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的草甘膦浓度,间隔 15 d (遇特殊天气可延长 5 d)可确保化学杀雄制种安全,整个生育期喷 4 次,即可达到彻底杀雄的目的,且杀雄效果稳定、异交结实率高,在生产实践中具有重要的应用价值。

棉花花粉发育一般分为造孢细胞增殖时期、减数分裂时期、四分体时期、花粉发育时期、花粉成熟 5 个时期,在减数分裂的第 1 次分裂末不产生分隔壁,而是形成 1 个二核细胞(无二分体时期),第 2 次分裂中 2 个核同时分裂形成 4 个核,并产生细胞壁分隔成 4 个子细胞,这种类型称为同时型。同时型形成的四分体呈四面体形。棉花花粉发育是一个系统发育过程,其中任何一个环节发生差错,都可导致小孢子的败育,从而表现雄性败育。雄性不育系败育过程中经常出现胞原细胞不分化、药室合并、造孢细胞粘连、花粉母细胞异常、花粉母细胞减数分裂异常、减数分裂后孢质不分离、四分体异常、花粉粒异常等异常现象。本试验结果表明,现蕾后喷施草甘膦即可导致雄性不育。可以推测,草甘膦导致转基因抗草甘膦棉花雄性不育的时间应发生在减数分裂期及其以后各个时期。雄配子对于外界环境比雌配子敏感。草甘膦是内吸型除草剂,它阻断植物芳香族氨基酸的合成^[2-4]而导致其缺乏该类氨基酸而死亡。转 *EPSPS-G6* 抗草甘膦棉花种质系生长发育过程中缺少与其相结合的底物而表现为抗草甘膦除草剂。雄配子对草甘膦的敏感性是由于该基因在转基因植株不同器官中的表现差异造成的,还是雄配子对于芳香族类氨基酸的要求更苛刻所致,还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 任不凡. 草甘膦研究进展[J]. 农药,1998,37(7):1-3.
REN Bu-fan. Research advances in glyphosate [J]. Pesticide, 1998,37 (7): 1-3.

- [2] GRUYS K Y, Marzabadi M R, Pansegrau P D, et al. Steady-state kinetic evaluation of the reverse reaction for *Escherichia coli* 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1993, 304 (2): 345-351.
- [3] GRUYS K Y, Walker M C, Sikorski J A. Substrate synergism and the steady-state kinetic reaction mechanism for EPSP synthase from *Escherichia coli* [J]. Biochemistry, 1992, 31 (24): 5534-5544.
- [4] HERRMANN K M, Weaver L M. The shikimate pathway [J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1999, 50: 473-503.
- [5] PLINE W A, Viator R, Wilcut J W, et al. Reproductive abnormalities in glyphosate-resistant cotton caused by lower cp4-epsps levels in the male reproductive tissue [J]. Weed Science, 2002, 50(4): 438-447.
- [6] 纪从亮, 邹芳刚, 史伟. 杂交棉化学杀雄制种技术进展 [J]. 中国棉花, 2010, 37(7): 2-4.
JI Cong-liang, Zou Fang-gang, Shi Wei. The advance in chemical emasculation of hybrid cotton [J]. China Cotton, 2010, 37(7): 2-4.
- [7] MAY O L, Bourland F M, Nichols R L. Challenges in testing transgenic and nontransgenic cotton cultivars [J]. Crop Science, 2003, 43: 1594-1601.
- [8] 赵特. 一种抗草甘膦基因的发现和抗草甘膦转基因水稻的培育 [D]. 杭州: 浙江大学, 2008.
ZHAO Te. Discovered of a glyphosate resistant gene and bred of transgenic rice with glyphosate resistance [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2008.
- [9] 燕树锋. 转基因抗草甘膦棉花种质系的创造及利用 [D]. 杭州: 浙江大学, 2011.
YAN Shu-feng. Developing and utilization of transgenic glyphosate resistant cotton germplasms [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2011.
- [10] 王强, 王邦俊, 李学刚. 化学杀雄剂 1 号对棉花过氧化酶、蔗糖酶活性的研究 [J]. 棉花学报, 2003, 15(6): 353-356.
WANG Qiang, Wang Bang-jun, Li Xue-gang. Studies on activity of POD and sucrose of cotton plant treated with chemical emasculation-1 [J]. Cotton Science, 2003, 15(6): 353-356.
- [11] VIATOR R P, Senseman S A, Cothem J T. Boll abscission responses of glyphosate-resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L) to glyphosate [J]. Weed Technology, 2003, 17(3): 571-575.
- [12] VIATOR R P, Jost P H, Senseman S A, et al. Effect of glyphosate application timing and methods on glyphosate-resistant cotton [J]. Weed Science, 2004, 52(1): 147-151.
- [13] YASUOR H, Abu-Abied M, Belausov E, et al. Glyphosate-Induced anther indehiscence in cotton is partially temperature dependent and involves cytoskeleton and secondary wall modifications and auxin accumulation [J]. Plant Physiology, 2006, 141(4): 1306-1315.
- [14] YASUOR H, Riov J, Rubin B. Glyphosate-induced male sterility in glyphosate-resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.) is associated with inhibition of anther dehiscence and reduced pollen viability [J]. Crop Protection, 2007, 26(3): 363-369.
-