

抗草铵膦转基因水稻品种 99-1 对该除草剂抗性的评价

张宏军 倪汉文* 周志强 江树人 杨逢玉 李晓晶

(中国农业大学, 北京 100094)

摘要 在温室盆栽试验中, 评价抗草铵膦转基因水稻品种 99-1 不同叶期对该药的抗性。与非转基因水稻品种越富比较, 该转基因品种对草铵膦具有较强的抗性。但不同叶期的抗性存在差异: 2 叶期的抗性较差, 1~ 2 kg·hm⁻² 草铵膦处理时药害较严重, 生长明显抑制; 4- 8 叶期的抗性明显增强, 中毒症状轻, 即使在高剂量 2 kg·hm⁻² 处理下, 生物量的积累也不受影响。不同生育期 *bar* 基因表达量、谷氨酰胺合成酶活性变化与抗性的关系尚需深入研究。

关键词 除草剂抗性; 转基因水稻; 草铵膦

中图分类号 S481.4; Q789

Evaluation of the Resistance of Glufosinate Resistant Transgenic Rice Cultivar 99-1 to Glufosinate

Zhang Hongjun Ni Hanwen Zhou Zhiqiang Jiang Shuren Yang Fengyu Li Xiaojing

(China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract A greenhouse experiment was conducted to evaluate the resistance of glufosinate-resistant transgenic rice cultivar 99-1 to glufosinate. The glufosinate-resistant transgenic rice 99-1 was highly resistant to glufosinate compared to nontransgenic cultivar Yuefu. However, there were differences in the resistance to different herbicide rates among different growth stages. Plant height and biomass of the 2-leaf seedlings were significantly inhibited at 1.0 to 2.0 kg·hm⁻² glufosinate. The 4- to 8-leaf seedlings had higher resistance to any of the herbicide rates. Neither of the above ground nor the under ground biomass was reduced even at the highest rate of 2.0 kg·hm⁻². The relationships of *bar* gene express to the degree of resistance, the amount of glutamine synthase at different stages of the transgenic rice cultivar, and the effect of environmental conditions on the resistance are being further studied.

Key words herbicide-resistance; transgenic rice; glufosinate

抗除草剂转基因作物作为杂草治理的一个新措施, 受到极大的重视。世界各国已经相继开展了大量的研究工作。如, 抗灭生性有机磷类除草剂草甘膦和草铵膦的转基因作物的研究, 还有抗三氮苯类、磺酰脲类、咪唑啉酮类、腈类, 以及环己烯酮类除草剂转基因作物的研究等^[1-2]。欧美等发达国家已经开发出, 并商品化了一些抗除草剂的作物品种^[3-8]。

草铵膦是德国艾格福公司开发的有机磷广谱灭生性茎叶处理除草剂, 作用靶标为谷氨酰胺合成酶, 具有活性高、药效快、无土壤活性等优点^[9], 已得到广泛应用。而种植抗草铵膦转基因

收稿日期: 2002-04-19

国家转基因农作物生物安全研究专项基金资助项目(J00-C-002)

* 倪汉文, 副教授, 研究方向为杂草生物学、生物除草剂、抗除草剂转基因作物安全性等。北京圆明园西路 2 号

因作物可以促进使用草铵膦代替其他除草剂品种从而减少环境污染。艾格福公司先后培育出多种抗草铵膦转基因作物: 抗草铵膦玉米 1997 年在美国种植面积达 40 万 hm^2 ; 抗草铵膦大豆 1998 年在美国开始商品化; 抗草铵膦油菜 1995 年最先在加拿大种植了 20.4 万 hm^2 , 1997 年扩大到 50 万 hm^2 ; 抗草铵膦的甜菜和棉花也陆续推广^[10]。

不同抗草铵膦转基因作物, 对该药的抗性程度有所差异。研究表明, 喷施 $0.5 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 的草铵膦对抗该除草剂的转基因大豆品种 (A SGROW A 5403-IT) 无影响, 而非转基因大豆品种在 $0.25 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 剂量处理时被完全杀死^[11]。抗草铵膦油菜品种可承受 $2.25 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 的剂量^[12]。Dilday 等报道抗草铵膦转基因水稻品种 (Brazil、Colombia2、ICA10、Colombia3 和 IITA) 在 $0.46 \sim 2.77 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 草铵膦处理时生长明显受抑制, 从成株到抽穗经历的时间变长, 产量降低^[13,14]。Kransz 等人研究结果显示抗草铵膦的转基因玉米品种在 $0.4 \sim 1.2 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 剂量处理下, 虽然前期有一定的药害, 但对产量无影响^[15]。

中国水稻所在国内率先开展了抗草铵膦转基因水稻的研究, 并已经培育出了抗性水稻品种粳稻 99-1。本试验旨在评价该品种不同生长期对草铵膦的抗性程度。

1 材料与方法

1.1 材料

抗草铵膦转基因水稻品种粳稻 99-1 由中国水稻研究所提供, 对照的普通水稻品种越富由中国农业大学作物学院农学系水稻组提供。除草剂草铵膦为德国艾格福公司生产的 18.5% Basta 水剂。供试土壤取自北京市海淀区西北旺村的稻田, 为沙壤土。

1.2 方法

试验在北京中国农业大学温室进行。土壤过筛后, 称重装盆, 土壤重量为每盆 4.25 kg, 灌水至饱和状态, 以备播种。水稻种子经过晒种、浸种、表面灭菌、水洗、催芽, 于 2001-07-18, 选择芽壮的种子播于土表, 再覆盖 1 cm 厚的干土。水稻播种量每盆 15 粒, 待成苗后, 每盆保苗 12 株。从出苗定植后至试验结束, 一直保持水层。在水稻 3 叶期施用尿素, 折合施入量 (N) $160 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 。分别在水稻 2, 4, 6, 8 叶龄, 喷施草铵膦, 处理剂量为 $0, 0.5, 1.0, 2.0 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ (有效量)。用 PWT-510 型喷雾塔施药, 喷雾压力为 0.5 kPa, 雾滴沉降 3 min, 喷液量为 $255 \text{ L} \cdot \text{hm}^{-2}$ 。

在试验进行的同时, 对照普通水稻品种越富 (粳稻) 生长到 2 和 4 叶龄时, 分别喷施 $0.5 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 的草铵膦, 处理方法同上。

1.3 调查及统计分析

施药后第 3, 5, 7 天, 记载各处理的中毒症状。2 叶期水稻处理在施药后第 8, 12 天; 4, 6, 8 叶期处理在施药后 10 和 20 d 测量稻苗株高。在施药后 20 和 30 d, 2 次取样测量水稻的地上部分和地下部分的干重 (2 叶期在施药后 12 和 23 d 取样), 每次每个处理取 4 盆。在处理 25 d 记载死亡株数。用 SAS 统计软件对数据进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 药害症状及对生长的影响

在转基因水稻品种 99-1 的 2 叶期喷施草铵膦, 药害症状明显: 在施药后第 2 天, $1.0 \sim 2.0 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 处理的稻苗就出现药害症状, 叶片的尖部出现小枯斑, 然后整个尖部失绿而枯萎, 随施药量增加, 药害加重, 第 3 片叶抽出缓慢, 生长受到抑制, 株高显著低于不施药的对照 (表 1), 甚至一些植株逐渐死亡。施药后 23 d, 1.0 和 $2.0 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 处理的稻株死亡率分别达 5.15% 和 16.5%。上述转基因水稻品种 99-1 生长到 4~6 叶期, 对草铵膦的抗性明显增强, 高

剂量处理时才有明显药害症状出现, 主茎受到抑制, 但无植株死亡; 在 8 叶期处理, 受害症状消失快, 即使高剂量对主茎生长也无显著影响, 但对分蘖的生长还是有一定抑制作用(表 1)。

普通水稻品种越富对草铵膦非常敏感。在 2 叶期施药, 2 d 后就表现出明显的药害症状, 到第 7 天, 死亡率达 100%。4 叶期虽然对草铵膦抗性有增强, 但施药后 12 d, 也都全部死亡。

表 1 不同叶期施用草铵膦对抗该除草剂转基因水稻品种 99-1 主茎高和蘖高的影响*

调查时间	施药叶期	主茎高/cm				蘖高/cm			
		剂 量/(kg·hm ⁻²)							
		0.0	0.5	1.0	2.0	0.0	0.5	1.0	2.0
施药后 10 d	2 叶(8 d)	24.7 a*	24.9 a	21.3 b	20.1 c				
	4 叶	49.2 a	48.6 a	48.2 a	43.5 b	25.2 a	24.4 a	19.2 b	15.8 c
	6 叶	61.4 a	61.4 a	52.7 b	53.9 b	35.6 a	33.5 b	31.1 c	31.2 c
	8 叶	70.2 a	70.0 a	70.2 a	69.0 a	45.9 a	43.6 b	40.0 d	41.5 c
施药后 20 d	2 叶(13 d)	26.7 a	26.2 a	22.9 b	20.5 c				
	4 叶	58.4 a	57.8 a	57.0 ab	54.1 b	31.3 a	28.3 b	21.2 c	18.0 d
	6 叶	66.1 a	63.9 a	55.7 b	55.7 b	40.0 a	36.6 b	33.2 c	32.7 c
	8 叶	72.0 a	72.2 a	71.7 a	73.6 a	48.2 a	44.8 b	43.6 b	41.6 c

* 数字后面的字母表示 0.05 水平上, 不同剂量间差异显著性。下同。

2.2 对生物量的影响

转基因水稻品种在 2 叶期时, 对草铵膦抗性较差。在此时期喷施草铵膦, 对其地上、地下部分干物质积累均有明显抑制作用, 其抑制作用随施药剂量的增加而加重。在 4 和 6 叶期喷施, 施药后 20 d, 高剂量处理的地上生物量积累明显受到抑制, 低剂量处理则无影响; 在施药后 30 d, 各处理间的稻苗生物量则无差异, 显示生长受抑制的稻苗已恢复。在 8 叶期, 草铵膦各剂量处理间对稻苗地上、地下生物量积累无明显的影响(表 2)。

表 2 不同叶期施用草铵膦对抗该除草剂转基因水稻 99-1 地上和地下生物量抑制率的影响 (抑制率, %)

调查时间	施药叶期	地上生物量抑制率/%			地下生物量抑制率/%		
		剂 量/(kg·hm ⁻²)					
		0.5	1.0	2.0	0.5	1.0	2.0
施药后 20 d	2 叶(12 d)	2.45 a	14.0 b	30.8 c	1.81 a	6.23 b	9.49 c
	4 叶	1.63 a	1.73 a	4.20 b	0.421 a	1.684 a	2.180 a
	6 叶	0.60 a	3.14 b	7.39 c	1.522 a	2.192 a	4.271 a
	8 叶	0.25 a	1.09 a	2.30 a	0.392 a	1.214 a	2.223 a
施药后 30 d	2 叶	4.81 a	27.2 b	64.5 c	12.20 a	30.82 b	42.50 c
	4 叶	-0.55 a	1.01 a	1.09 a	0.06 a	0.89 a	1.25 a
	6 叶	-0.15 a	2.15 a	3.01 a	1.20 a	1.49 a	3.67 a
	8 叶	-0.04 a	1.38 a	1.33 a	0.09 a	1.00 a	2.15 a

3 结论与讨论

与非转基因水稻品种越富比较, 抗草铵膦水稻品种 99-1 对该除草剂具有较高的抗性, 不同叶期的水稻对草铵膦的抗性有所不同, 抗性程度随着叶龄增加而提高。2 叶期抗性较差, 只能承受 0.5 kg·hm⁻² 的剂量。4~8 叶期抗性增强, 能承受 2.0 kg·hm⁻² 剂量。

我们经过检测发现, 抗草铵膦转 *bar* 基因水稻 99-1 是以 CaMV 35S 为启动子, 该启动子为

高组成型,其在植物所有组织中指令转录,不依赖于发育或环境信号^[17~19]。目前,还未见到抗草铵膦转 *bar* 基因的表达量受生育期的影响和草铵膦的靶标酶-谷氨酰胺合成酶的活性是否随其生育期变化的确切报道。所以研究水稻不同生育期谷氨酰胺合成酶活性和 *bar* 基因表达量变化对于分析以上试验结果会有帮助,这方面的工作还需深入研究。

另外,抗除草剂作物的抗性程度会受环境条件和肥、水管理的影响。本研究结果只能说明在本试验条件下的抗性情况,至于在其他环境条件下该转基因品种的抗性有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 黄大年. 农作物抗除草剂遗传工程研究进展. 生物工程进展, 1997, 17(5): 14~ 17
- 2 吴爱忠, 唐克轩, 潘俊松, 等. 转基因培育抗除草剂水稻. 遗传学报, 2000, 21(17): 992~ 998
- 3 Manabe T. Benefits of glyphosate tolerant soybeans in Japanese soybean production. The 18th Asian-Pacific Weed Science Society Conference. Beijing, P R China. 2001, 449~ 452
- 4 Marlender B. Genetically modified varieties in Germany - status and prospects with special respect of sustainable sugar beet cultivation. Zuckerindustrie, 1999, 124(12): 943~ 946
- 5 Oard J H, et al. Development, field evaluation, and agronomic performance of transgenic herbicide resistant rice. Mol Breed, 1996, 2(4): 359~ 368
- 6 Schmutzler K. Chances and risks of genetically engineered herbicide tolerance. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 1999, 32(2): 83~ 87
- 7 Wheeler C C. Efficacy of Liberty (glufosinate) in Liberty-tolerant rice. Research Series Arkansas Agricultural Experiment Station, 1998, 460: 330~ 335
- 8 Wheeler C C. Weed control in Liberty-tolerant rice. Research Series Arkansas Agricultural Experiment Station, 1997, 456: 64~ 66
- 9 Vasil I K. Phosphinothricin-resistant crops. In: Duck S O, ed. Herbicide-resistant crops. CRC, N. Y., 1996, 85~ 89
- 10 Wert S V an. Marketing AgrEvo's genetically modified crop plants including herbicide-tolerant corn and canola. The third JRCAS International Symposium: "The fourth International Symposium on the Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms". JRCAS-International Symposium-Series. 1997, 5, 185~ 189
- 11 Lee I Y, et al. The effect of glutamine synthetase inhibitors on glufosinate-tolerant and susceptible soybean. The 18th Asian-Pacific Weed Science Society Conference. Beijing, P R China. 2001, 442~ 444
- 12 Kohne S, et al. The heat-treatment induced reduction of the pat gene encoded herbicide resistance in *Nicotiana tabacum* is influenced by the transgene sequence. Plant Physiol, 1998, 153: 631~ 642
- 13 Dilday R H, et al. Herbicide tolerance in rice to glyphosate and sulfosate. Research Series Arkansas Agricultural Experiment Station, 1996, 453: 55~ 60
- 14 Dilday R H, et al. Rice genoplasm tolerant to sulfosate (Touchdown). Research Series Arkansas Agricultural Experiment Station, 1998, 460: 336~ 340
- 15 Kransz R F, et al. Evaluation of glufosinate-resistance corn (*Zea mays*) and glufosinate: efficacy on annual weeds. Weed Tech, 1999, 13(4): 691~ 696
- 16 Alam M F, et al. Production of transgenic deepwater indicate rice plant expressing a synthetic *Bacillus thuringiensis* cryA (b) gene with enhanced resistance to yellow stem borer. Plant Science, 1998, 135: 25~ 30
- 17 Datta K, et al. Constitutive and tissue-specific differential expression of cryA (b) gene in transgenic rice plants conferring resistance to rice insect pest. Theor Appl Genet, 1998, 97: 20~ 30
- 18 Lin W, et al. Genetic engineering of rice for resistance to sheath blight. Bio Tech, 1995, 13: 686~ 691