

· 研究论文 ·

三种杂草对草甘膦的敏感性及处理后植株体内莽草酸积累量差异

陈景超, 张朝贤, 黄红娟*, 魏守辉, 张猛, 郭峰

(中国农业科学院 植物保护研究所/杂草鼠害生物学与治理重点开放实验室,北京 100193)

摘要:为明确不同杂草对草甘膦的敏感性,以稗 *Echinochloa crusgalli*、马唐 *Digitaria sanguinalis*、藜 *Chenopodium album* 为供试材料,采用生物测定法和吸光光度法分别测定了草甘膦对3种杂草的抑制中浓度(GR_{50}),以及不同剂量处理后杂草体内莽草酸积累量的变化。经 410 g/hm^2 (有效成分)的草甘膦处理后,稗体内莽草酸积累量呈上升-下降-上升趋势,而马唐和藜则表现为缓慢上升,根据此剂量处理下莽草酸积累趋势得出,3种杂草对草甘膦的敏感性由高到低依次为稗、藜和马唐,与生测法的结果一致。经 $820\sim 3\,280\text{ g/hm}^2$ (有效成分)的草甘膦处理后,3种杂草体内莽草酸积累量从第2 d开始急剧升高,增长速率随着草甘膦处理剂量的增加而加大;处理后稗、马唐和藜体内莽草酸积累量最高值差异显著,分别为 $1\,137.9$ 、 $4\,989.7$ 和 $2\,084.2\ \mu\text{g/g}$,为各自对照水平的 16.7 、 23.7 和 82.9 倍。该研究结果可为系统检测杂草对草甘膦的敏感性提供依据。

关键词:草甘膦;敏感性;莽草酸;稗;马唐;藜

DOI:10.3969/j.issn.1008-7303.2011.05.06

中图分类号:S481.4;S482.4

文献标志码:A

文章编号:1008-7303(2011)05-0471-04

Sensitivity to glyphosate and dynamics of shikimate accumulation in three weed species following glyphosate application

CHEN Jing-chao, ZHANG Chao-xian, HUANG Hong-juan*, WEI Shou-hui, ZHANG Meng, GUO Feng

(Institute of Plant Protection, Key Laboratory of Weed and Rodent Biology and Management, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: The GR_{50} value and shikimate accumulation in three problematic weed species were determined by whole plant bioassay and spectrophotometric assay, respectively, after treated by glyphosate. After treated by glyphosate at $410\text{ g (a. i.)}/\text{ha}$, shikimate accumulation in *Echinochloa crusgalli* was first increased, then declined, increased slightly finally. However, it kept increasing in *Chenopodium album* and *Digitaria sanguinalis*. Based on the accumulation of shikimate by glyphosate treated within this dosage, the order of sensitivity to glyphosate from high to low was *E. crusgalli*, *C. album* and *D. sanguinalis*, which was similar to the result of whole plant bioassay. Shikimate accumulation was increased rapidly in all three weeds after treated 2 days by glyphosate within the dose range of 820 to $3\,280\text{ g (a. i.)}/\text{ha}$, and the accumulation rate showed positive relationship to the treatment dosage. The highest shikimate accumulation in *E. crusgalli*, *D. sanguinalis* and *C. album* were

收稿日期:2011-04-26;修回日期:2011-07-26.

作者简介:陈景超(1985-),男,山东人,硕士研究生, **E-mail:** jingchao2ban@163.com; * 通讯作者(Author for correspondence):黄红娟(1977-),女,陕西人,博士,副研究员,主要研究方向为杂草生物学与治理,电话:010-62815937, **E-mail:** hjhuang@wssc.org.cn

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08012-025B).

1 137.9 $\mu\text{g/g}$, 4 989.7 $\mu\text{g/g}$ and 2 084.2 $\mu\text{g/g}$, which were 16.7-, 23.7- and 82.9-fold compared to that of the untreated control, respectively. The knowledge obtained in this study will provide basis for developing method to detect the sensitivity of weeds to glyphosate.

Key words: glyphosate; sensitivity; shikimate; *Echinochloa crusgalli*; *Digitaria sanguinalis*; *Chenopodium album*

稗 *Echinochloa crusgalli*、马唐 *Digitaria sanguinalis* 和藜 *Chenopodium album* 是我国农田常见恶性杂草,对农作物产量和品质危害严重^[1-2]。草甘膦是美国孟山都公司研发的内吸传导型灭生性除草剂,通过竞争性抑制莽草酸合成途径中 5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸合成酶 (EPSPS, EC 2.5.1.19) 与底物莽草酸-3-磷酸 (S3P) 的结合,导致植物体内莽草酸积累过量,阻断苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的合成而使植株死亡^[3]。由于其独特的作用方式及抗草甘膦作物的大面积种植,使得草甘膦被迅速推广,已成为全球用量最大的除草剂^[4-5]。

由于草甘膦的长期及单一使用,其抗性杂草不断涌现^[6]。宋晓玲等^[7]已在我国浙江发现了抗草甘膦的小蓬草 *Conyza canadensis* 种群。随着少耕、免耕农业措施的增加以及抗草甘膦转基因作物在全球的迅猛发展,草甘膦在我国的应用将越来越广泛^[8]。因此,明确不同杂草对草甘膦的敏感性,并研究出可系统检测杂草对草甘膦敏感性的方法十分重要。

莽草酸积累是经草甘膦处理后植物体内特有的生理现象,根据杂草体内莽草酸积累量的大小可判断草甘膦防除杂草效果的优劣^[9]。已有研究表明,草甘膦处理后抗性杂草体内莽草酸的积累量明显低于敏感杂草,因此莽草酸可作为检测植物对草甘膦敏感性的指示物质^[10-12]。

本研究采用吸光光度法测定了稗、马唐、藜 3 种杂草经草甘膦处理后其体内莽草酸的积累量,并用生物测定法测定了草甘膦对 3 种杂草的抑制中浓度 (GR_{50}),以明确草甘膦处理后杂草体内莽草酸积累量变化情况以及各杂草对草甘膦的敏感性差异。

1 材料与方 法

1.1 供试材料及仪器

41% 草甘膦异丙胺盐水剂 (glyphosate isopropylamine salt, 410 AS) (美国孟山都公司); 莽草酸 (shikimate) 标准品 (纯度 > 99.0%, Sigma 公司); 其余试剂均为国产分析纯。

ASS-3 型自动控制农药喷洒试验系统 (国家农业

信息化工程技术研究中心研制); UV-2102 PC 型紫外-可见分光光度计 [尤尼柯 (上海) 仪器有限公司]。

稗 *E. crusgalli*、马唐 *D. sanguinalis* 和藜 *C. album* 种子均于 2008 年采自北京,无草甘膦施用史。

1.2 试验方法

1.2.1 供试杂草的培养 选取成熟且饱满度一致的 3 种杂草种子,用质量分数为 0.3% 的高锰酸钾溶液浸泡消毒 10 min,用无菌水清洗 3 次,分别播种于盛有表层土和有机质 (体积比 3:1) 混合土壤的花盆中 (直径 10.5 cm, 高 8.5 cm),于温室条件下光暗交替培养 (光照 12 h, 温度 28 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 60%; 黑暗 12 h, 温度 20 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 50%)。选择保留生长一致的杂草: 稗每盆留 12 株, 马唐每盆留 25 株, 培养至 3 叶 1 心期; 藜每盆留 6 株, 培养至 6 叶期备用。

1.2.2 杂草对草甘膦的敏感性测定 分别用 41% 草甘膦异丙胺盐水剂对上述 3 种供试杂草进行茎叶喷雾处理,施药剂量见表 1。每处理重复 3 次,处理后先于黑暗条件下吸收 12 h,再进行光暗交替培养,14 d 后剪取地上部分,称量鲜重,计算生长抑制率 [生长抑制率/% = (对照鲜重 - 处理植株鲜重)/对照鲜重 \times 100],用 DPS 统计软件求出 GR_{50} 及 95% 置信限。

表 1 41% 草甘膦异丙胺盐水剂试验剂量
Table 1 Dosages of glyphosate isopropylamine salt 410 AS in the experiments

处理编号 Number of treatment	制剂用量 Dosage of preparation /(g/hm ²)	有效成分用量 Dosage, a. i. /(g/hm ²)
1/8 X	250	103
1/4 X	500	205
1/2 X	1 000	410
X	2 000	820
2 X	4 000	1 640
4 X	8 000	3 280
8 X	16 000	6 560
对照 CK	-	-

注: X 表示推荐剂量。

Note: X means the recommend dose.

1.2.3 植株样本采集及其中莽草酸的提取 按表 1 中设计的剂量 (推荐剂量的 1/2 ~ 4 倍), 采用 41% 草甘膦异丙胺盐水剂分别对 3 种供试杂草进行

茎叶喷雾,以清水处理为对照。在与 1.2.2 节相同条件下培养,每 48 h 取样 1 次(剪取植株地上茎叶部分),共取 7 次。将样本剪碎,于研钵中用液氮研磨,取 0.5 g,加入 1.0 mL、0.25 mol/L 的盐酸溶液,于 4 °C、12 000 r/min 下离心 30 min,收集上清液,4 °C 保存待测。每处理重复 3 次。

1.2.4 莽草酸积累量测定 参照 Gaitonde 等^[13]和娄远来等^[14]的方法。分别取 200 μ L 1.2.3 节收集到的样本上清液,加入 2.0 mL、1% 的过碘酸溶液,3 h 后再加入 2.0 mL、1.0 mol/L 的氢氧化钠溶液,混匀后加入 1.2 mL、0.1 mol/L 的甘氨酸,静置 5 min,于 380 nm 处比色,记录吸光度(OD_{380})值。

将 10 mg 莽草酸标准品溶于 1.0 mL、0.25 mol/L 的盐酸溶液中,分别取其 0、1.0、2.5、5.0、10.0、12.5、25.0 μ L,用 0.25 mol/L 的盐酸定容至 1.0 mL。同法测定 OD_{380} 值,绘制标准曲线。

依据莽草酸标准曲线计算待测样品中莽草酸的含量,采用 DPS 统计软件对莽草酸积累量进行多重比较分析($P \leq 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 供试杂草对草甘膦的敏感性

测定结果(见表 2)表明:3 种杂草对草甘膦的敏感性由高到低依次为稗、藜和马唐。

表 2 供试 3 种杂草对草甘膦的敏感性

Table 2 Sensitivity of three weed species to glyphosate

杂草 Weeds	回归方程 Regression equation	抑制中浓度(95%置信限) GR_{50} (95% CL), $a. i. / (g/hm^2)$	相关系数 Regression coefficient, r
稗 <i>E. crusgalli</i>	$Y = 2.1779 + 1.2631x$	171.5 (83.5 ~ 352.4)	0.9307
马唐 <i>D. sanguinalis</i>	$Y = 1.7879 + 1.2665x$	343.8 (181.6 ~ 650.9)	0.9136
藜 <i>C. album</i>	$Y = 1.5636 + 1.5013x$	194.5 (105.1 ~ 360.1)	0.9434

2.2 植株体内莽草酸积累量变化

经 410 g/hm² (有效成分) 的草甘膦处理后,稗、马唐和藜分别在施药后 2、4 和 4 d 出现轻微心叶萎蔫,叶片边缘变黄;14 d 后 3 种杂草虽均未死亡,但植株矮小。经该剂量草甘膦处理后,稗体内莽草酸积累量呈上升-下降-上升趋势,而马唐与藜体内莽草酸的积累量则缓慢上升。其中稗体内莽草酸的积累量在 8 d 时达到最高值(图 1),是对照的 6.2 倍;而马唐、藜都在 14 d 时达到最高值,分别是对照的 0.92 和 3.5 倍。

在试验调查期间,经 410 g/hm² 草甘膦处理后马唐体内莽草酸的积累量低于对照,藜与稗的积累量则均高于对照,可见马唐对莽草酸的代谢能力较稗和藜强,对草甘膦的敏感程度低于另外两种杂草。稗在药后 4~6 d 之间莽草酸的积累量迅速增长且明显高于对照,藜体内的莽草酸则缓慢积累且积累量与对照相当,稗出现叶片黄化现象的时间比藜早 2 d。由此可以得出,3 种杂草对草甘膦的敏感性从高到低依次是稗、藜和马唐,这与第 14 d 时通过测定地上部分鲜重得出的 GR_{50} 结果一致。

经 820~3 280 g/hm² (有效成分) 的草甘膦处理后,3 种杂草体内莽草酸的积累量均急剧增长,且增长幅度随处理剂量的增高而加大。其中经 820 g/hm² 草甘膦处理后,3 种杂草体内莽草酸积累

量除稗在 6 和 12 d、马唐在 6 d 时稍有下降外,其余时间均持续上升。该剂量处理下,稗、马唐、藜植株的死亡时间分别是处理后 12、14 和 14 d,此时莽草酸的积累量分别为 1 007.2、4 407.2 和 1 086.1 μ g/g (植株死亡后莽草酸积累量视为恒定,下同),分别是对照的 14.8、37.0 和 41.1 倍。

经 1 640 和 3 280 g/hm² 的草甘膦处理后,3 种杂草均在 2 d 内出现叶片黄化并伴有褐色枯斑,植株体内莽草酸迅速积累。其中,1 640 g/hm² 剂量处理后,稗、马唐、藜植株死亡的时间分别是 12、12 和 10 d,此时 3 种杂草体内莽草酸的积累量分别为 1 137.9、4 575.6 和 2 084.2 μ g/g,分别是对照的 16.7、33.2 和 82.9 倍;经 3 280 g/hm² 草甘膦处理后,稗、马唐、藜植株死亡的时间分别是 10、8 和 10 d,此时植株体内莽草酸的积累量分别为 1 050.2、4 989.7 和 2 012.2 μ g/g,分别是对照的 13.9、23.7 和 80.1 倍。

3 小结与讨论

植物种类不同,对草甘膦的敏感性不同,植株体内莽草酸的积累量也不同。本试验中经相同剂量草甘膦处理后,3 种杂草体内莽草酸的积累量差异显著。经 820 g/hm² (有效成分) 的草甘膦处理后,藜体内莽草酸的积累量变化趋势与 Mueller 等^[15]报道

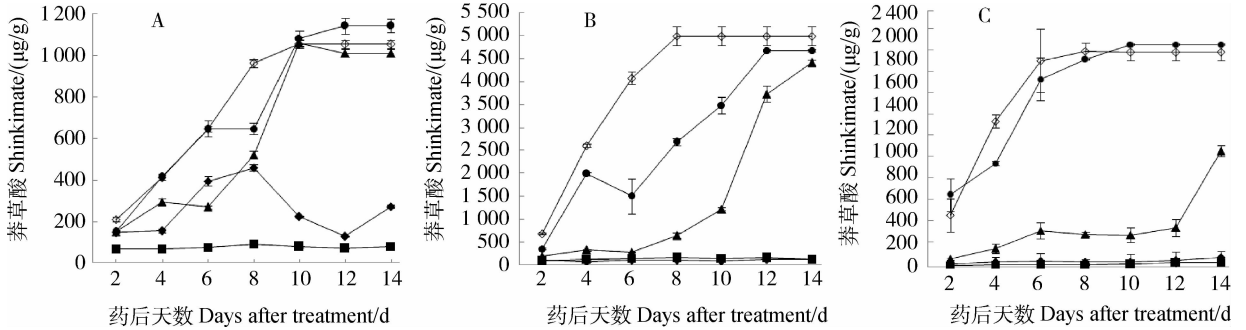


图 1 草甘膦处理后 3 种杂草体内莽草酸积累量变化

Fig. 1 Shikimate accumulation in three weed species after treated by glyphosate

A. 稗 *Echinochloa crusgalli*; B. 马唐 *Digitaria sanguinalis*; C. 藜 *Chenopodium album*

■—CK; ◆—410 g(a. i.)/hm²; ▲—820 g(a. i.)/hm²; ●—1 640 g(a. i.)/hm²; ◇—3 280 g(a. i.)/hm²

的田间有效成分 840 g/hm² 草甘膦的处理相似,但莽草酸积累量的最高值却差异明显,这可能与培养条件及喷药时杂草的生长期不同有关。

通过植株体内莽草酸积累量的变化趋势可比较不同杂草对草甘膦的敏感性——敏感性越低,杂草对莽草酸的代谢能力越强。本试验中通过 410 g/hm² (有效成分)的草甘膦处理后 3 种杂草体内莽草酸积累量的变化情况,得出 3 种杂草对草甘膦的敏感性从高到低依次为稗、藜和马唐。

传统的培养皿试验与盆钵试验等生物测定方法均能有效测定杂草对草甘膦的敏感性差异^[16]。本试验明确了草甘膦处理后 3 种杂草体内莽草酸的积累情况及其差异,并通过将莽草酸积累量变化趋势与生物测定结果相关联,比较了 3 种杂草对草甘膦的敏感性。Harring 等^[9]也通过油菜体内莽草酸的积累量变化确定了草甘膦对油菜的 GR₅₀ 值。因此可根据我国杂草的发生情况,尝试通过测定杂草体内莽草酸积累量这一快速、简便的方法来确定农田重要杂草对草甘膦的敏感程度,以便为抗草甘膦杂草监测体系的建立提供依据。

参考文献:

[1] LI Yang-han (李扬汉). Weed Flora in China (中国杂草志) [M]. Beijing (北京): Agricultural Press of China (中国农业出版社), 1998: 1216 - 1217.

[2] Chinese Academy of Science, Editorial Board of Flora of China (中国科学院中国植物志编委会). Flora of China (中国植物志) [M]. Beijing (北京): Science Press (科学出版社), 1980.

[3] AMRHEIN N, DEUS B, GEHRKE P, et al. The site of inhibition of the shikimate pathway by glyphosate II. Interference of glyphosate with chorismate formation *in vivo* and *in vitro* [J]. *Plant Physiol*, 1980, 66(5): 830 - 834.

[4] YOUND B. Changes in herbicide use patterns and production practices resulting from glyphosate-resistant crops [J]. *Weed*

Technol, 2006, 20(2): 301 - 307.

[5] POWLES S B, PRESTON C. Evolved glyphosate resistance in plants: biochemical and genetic basis of resistance [J]. *Weed Technol*, 2006, 20(2): 282 - 289.

[6] PRATLEY J E, URWIN N, STANTON R, et al. Resistance to glyphosate in *Lolium rigidum* I. Bioevaluation [J]. *Weed Sci*, 1999, 47(4): 405 - 411.

[7] SONG X L, WU J J, QING S. Establishment of a test method of glyphosate-resistant *Conyza canadensis* in China [C] // The 20th Asian-Pacific Weed Science Society Conference Agriculture Publishing, Ho Chi Ming City, 2005: 499 - 504.

[8] LIU Yan (刘延), CUI Hai-lan (崔海兰), HUANG Hong-juan (黄红娟), et al. 抗草甘膦杂草及其抗性机制研究进展 [J]. *Chin J Pestic Sci* (农药学报), 2008, 10(1): 10 - 14.

[9] HARRING T. Accumulation of shikimic acid: a technique screening glyphosate efficacy [J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46(10): 4406 - 4412.

[10] PLINE W A, WILCUT J W, DUKE S O, et al. Tolerance and accumulation of shikimic acid in response to glyphosate applications in glyphosate resistant and non-glyphosate resistant cotton [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(3): 506 - 512.

[11] SINGH B K. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate resistant plants [J]. *Weed Technol*, 1998, 12(3): 527 - 530.

[12] LORRAINE-COLWILL D F, HAWKES T R, WILLIAMS P H, et al. Resistance to glyphosate in *Lolium rigidum* [J]. *Pestic Sci*, 1999, 55(4): 486 - 503.

[13] GAITONDE M, GORDON M. A microchemical method for the detection and determination of shikimic acid [J]. *J Biol Chem*, 1958, 230(2): 1043 - 1050.

[14] LOU Yuan-lai (娄远来), DENG Yuan-yu (邓渊钰), SHEN Jin-liang (沈晋良), et al. 甲磺隆和草甘膦对空心莲子草乙酰乳酸合成酶活性和莽草酸含量的影响 [J]. *Acta Phytophylacica Sinica* (植物保护学报), 2005, 32(2): 185 - 188.

[15] MUELLER T C, BEELER J E, SHARMA S D, et al. Shikimate accumulation in nine weedy species following glyphosate application [J]. *Weed Res*, 2008, 48(5): 455 - 460.

[16] PEREZ A, KOGAN M. Glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* in Chilean orchards [J]. *Weed Res*, 2003, 43(1): 12 - 19.