

## 抗草甘膦野生大豆筛选及其抗性生理机制研究

高越, 刘辉, 陶波

(东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘要:** 利用田间试验对 67 份野生大豆材料进行草甘膦抗性筛选, 结果在草甘膦有效剂量为  $1.23 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$  条件下, 不同野生大豆对草甘膦抗性存在明显差异, 其中 ZYD0685 和 ZYD2405 的存活率最高, 分别为 87% 和 83%; 7 份材料的存活率为 2.7% ~ 38%; 58 份材料死亡。以抗性材料 ZYD0685 和敏感材料 ZYD0790 进行生理指标研究, 结果在未经草甘膦处理时, 二者的叶绿素含量、莽草酸含量及谷胱甘肽-S-转移酶(GSTs)活性基本相同。在草甘膦不同剂量处理下, 抗性材料 ZYD0685 叶绿素和莽草酸含量没有明显变化, GSTs 活性明显增加; 而敏感材料 ZYD0790 莽草酸含量明显升高, 叶绿素含量明显降低, GSTs 活性变化幅度较小。因此, 植物体内莽草酸积累量较少是抗草甘膦的主要生理反应。

**关键词:** 野生大豆; 草甘膦; 莽草酸; 叶绿素含量; 谷胱甘肽-S-转移酶

**中图分类号:** S565.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-9841(2013)01-0076-04

## Screening and Physiological Mechanisms of Resistance to Glyphosate in Wild Soybeans(*Glycine soja*)

GAO Yue, LIU Hui, TAO Bo

(College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

**Abstract:** Sixty-seven wild soybeans(*Glycine soja*) were field planted and their resistance to glyphosate were identified. The resistance to glyphosate of tested materials varied greatly. At  $1.23 \text{ kg a.i.} \cdot \text{hm}^{-2}$  glyphosate, the survival rate of ZYD0685 and ZYD2405 were 87% and 83%, respectively, that of seven wild soybeans ranged from 2.7% to 38%, fifty-eight wild soybeans were died after glyphosate treatment. To elucidate the physiological mechanism of the resistance, chlorophyll content, shikimate accumulation and glutathione S transferases(GSTs) activity between glyphosate resistant and sensitive wild soybean, ZYD0685 and ZYD0790, were compared. The three index for ZYD0685 and ZYD0790 were basically identical before glyphosate treatment. Under varied glyphosate concentration treatment, chlorophyll content and shikimate accumulation remained stable and GSTs activity significantly enhanced for resistant soybean ZYD0685. While shikimate accumulation significantly increased and chlorophyll content significantly increased for sensitive soybean ZYD0790. Results suggest lower shikimate accumulation is the main physiological response for glyphosate resistance in wild soybean.

**Key words:** Wild soybean; Glyphosate; Shikimic; Chlorophyll; GSTs

我国是野生大豆(*Glycine soja*)的起源国, 保存着数量巨大的野生大豆种质资源, 筛选优良野生大豆种质资源对培育抗除草剂野生大豆品种具有重要意义<sup>[1-2]</sup>。

草甘膦[N-(膦羧甲基)甘氨酸](glyphosate), 是一种内吸传导型广谱灭生性除草剂, 其作用机理主要是竞争性抑制莽草酸合成途径中的 5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸合成酶(5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, EPSPS, EC 2.5.1.19)的活性<sup>[3]</sup>。目前, 国外学者对天然抗草甘膦杂草研究比较深入, Dinelli 等<sup>[4]</sup>对抗草甘膦加拿大飞蓬进行抗性机制研究, 认为植物体内莽草酸积累量较少是抗草甘膦主要生理反应。Yannicari 等<sup>[5]</sup>报道了阿根廷黑麦草在草甘膦处理 7 和 10 d 之后, 抗性植株叶绿素

含量没有明显的变化。Dinelli 等<sup>[6]</sup>在对抗草甘膦西班牙相思草的研究中指出, 草甘膦在抗性植株叶、茎、根部的传导比敏感植株要少, 可能与体内的木质部通道有关。

国内也有学者利用自然选择、组织培养等方法获得抗草甘膦资源, 并对其抗性机理进行研究, Tong 等<sup>[7]</sup>利用  $\gamma$ -射线诱变处理, 结合定向体细胞和再生植株连续抗性筛选, 培育出抗草甘膦除草剂的陆地棉种质系-R1098, 并对产生的抗性机制进行研究。陶波等<sup>[8]</sup>从 66 份菜豆材料中筛选出 2 个高抗草甘膦品种, 并证明其芳香族氨基酸含量明显高于其它品种。本文通过田间试验方法, 对 67 份野生大豆资源进行筛选, 并对筛选得到的抗性材料和敏感材料进行生理分析, 以初步确定抗草甘膦野生大

收稿日期: 2012-11-19

基金项目: 国家自然科学基金(30971834)。

第一作者简介: 高越(1987-), 男, 在读硕士, 研究方向为抗草甘膦野生大豆基因筛选及抗性基因定位。E-mail: gaoyue515@163.com。

通讯作者: 陶波(1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向为抗除草剂作物基因的挖掘。E-mail: botaol@163.com。

豆抗性产生的生理机制,为抗草甘膦大豆育种奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验设计

1.1.1 田间试验 试验于2011年5月在东北农业大学香坊农场实验田进行,野生大豆所有材料由中

国农业科学院种质资源实验室提供;41%草甘膦异丙胺盐水剂,购于美国孟山都公司。筛选的材料按编号顺序进行种植,人工单粒点播,5行区,行长3 m,行距45 cm,株距10 cm,3次重复,常规田间管理,第一片三出复叶完全展开时进行草甘膦茎叶处理,草甘膦有效浓度为1.23 kg·hm<sup>-2</sup>,14 d后调查野生大豆各品系存活率,并观察受害症状,草甘膦抗性分级标准见表1。

表1 草甘膦抗性等级分级标准  
Table 1 Standards classification of glyphosate resistance

级别 Grade	枯叶面积比例 Injury rate/%	药害症状 Injury symptoms
0	0-10.0	无症状
1	10.1-20.0	心叶轻微萎蔫或无显著变化
2	20.1-40.0	心叶变黄,植株整体萎蔫,叶片从叶尖开始黄化卷曲,部分叶片出现枯斑
3	40.1-60.0	心叶黄化卷曲,部分畸形萎缩,植株整体褪绿黄化,植株生长受抑制,并有萎缩的趋势
4	60.1-80.0	心叶畸形卷曲,黄化严重,植株整体黄化严重,植株萎蔫,生长停滞
5	80.1-100.0	植株严重萎缩或整株死亡

1.1.2 生理生化试验 试验于2011年11月在东北农业大学温室进行,将抗性野生大豆品种 ZYD0685 和敏感品种 ZYD0790 种植于20×10 cm的盆中,每盆6粒种子,3次重复,当植株第一片三出复叶完全展开时进行草甘膦茎叶处理,有效喷施剂量分别为0、0.3、0.6、0.9、1.23 kg·hm<sup>-2</sup>,喷药后第3天对根、茎、叶进行取样,于-80℃冰箱中保存。

### 1.2 测定项目与amp;方法

1.2.1 莽草酸含量 莽草酸含量采用分光光度法<sup>[9]</sup>测定,稍做改动:准确称量0.2 g的大豆叶片,放在置于冰块上的研钵中,加入1 mL 0.25 mol·L<sup>-1</sup>的HCl,迅速研磨成匀浆,然后将提取液在4℃、15 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min,取100 μL上清液与2 mL 0.1%过碘酸混合以氧化莽草酸,3 h后将试样与2 mL 1 mol·L<sup>-1</sup>的NaOH混匀之后加1.2 mL 0.1 mol·L<sup>-1</sup>甘氨酸,混匀,然后在380 nm波长下测定光密度;并利用不同浓度莽草酸标样的光密度结果绘制标准曲线,计算样品的莽草酸含量。

1.2.2 谷胱甘肽-S-转移酶(GSTs)活性 参照 Pamela 等<sup>[10]</sup>的方法,稍加改进。取0.2 g鲜组织,加入3 mL 0.1 mol·L<sup>-1</sup>(pH7.5)的Tris-HCl缓冲液放在置于冰块上的研钵研磨。匀浆液在4℃、15 000 r·min<sup>-1</sup>离心20 min,上清液为待测酶液。取0.5 mL 3.0 mmol·L<sup>-1</sup>谷胱甘肽(溶于0.1 mol·L<sup>-1</sup> pH6.5磷酸钾缓冲液),加入2.3 mL 0.1 mol·L<sup>-1</sup> pH6.5磷酸钾缓冲液,10 μL上述待测酶液,最后加入溶于96%乙醇的20 mmol·L<sup>-1</sup> CDNB 0.15 mL,于340 nm波长处用时间驱动程序自动监测其吸光值在2 min内的变化,记录OD值。

1.2.3 叶绿素含量 使用美达牌 SPAD 502 测定仪对叶绿素含量进行测定,每个叶片测量6次,取平均值。

### 1.3 数据分析

用Excel 2003和DPS 3.01进行方差分析,结果用3次重复的“平均值±标准差”表示。

## 2 结果与amp;分析

### 2.1 野生大豆抗草甘膦材料的筛选

不同野生大豆材料对草甘膦存在明显抗性差异,其中58份野生大豆生长严重受到抑制,植株全部死亡,药害等级均为5级;7份野生大豆材料表现出不同程度的抗性,存活率为2.7%~38.0%;ZYD0685和ZYD2405对草甘膦具有较强的抗性,存活率分别为87.0%和83.0%,植株能够正常生长发育(表2)。根据存活率和药害级别的高低选择了抗性材料ZYD0685和敏感材料ZYD0790进行生理机制的研究。

### 2.2 不同野生大豆材料生理指标分析

2.2.1 莽草酸含量 草甘膦处理前,ZYD0685与ZYD0790叶片中莽草酸含量没有明显差异,随着草甘膦剂量增加,敏感植株ZYD0790中莽草酸含量逐渐增加,在1.23 kg a.i·hm<sup>-2</sup>剂量下莽草酸含量高达376 μg·g<sup>-1</sup>,而抗性植株ZYD0685在各个剂量下,莽草酸含量几乎没有改变(图1)。在草甘膦1.23 kg a.i·hm<sup>-2</sup>剂量处理下,根、茎、叶中的莽草酸含量ZYD0790均有提高,其中在叶片中含量最高,为389 μg·g<sup>-1</sup>,而ZYD0685没有明显的积累(图2)。

表2 不同野生大豆品种对草甘膦抗性反应  
Table 2 Different responses to glyphosate among different wild soybean germplasms

材料 Material	基本株数 Basic number	存活株数 Live number	存活率 Survival rate/%	药害等级 Injury level
ZYD0685	60	52	87.0	0
ZYD2405	60	50	83.0	0
ZYD3472	60	23	38.0	2
ZYD1405-01	60	17	27.0	3
ZYDB10	60	11	18.0	3
ZYD3064	60	8	13.0	3
ZYD3073	60	5	8.0	4
ZYD3074	60	2	3.0	4
ZYD0066	60	1	2.7	4
ZYD0790	60	0	0	5

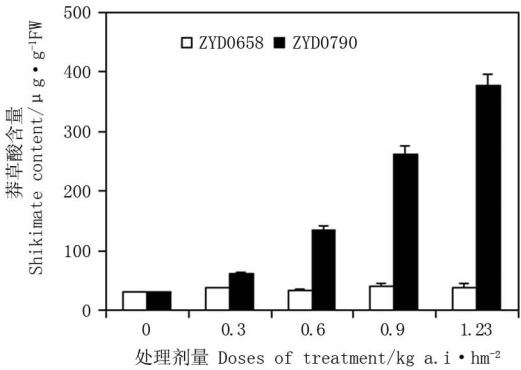


图1 不同草甘膦处理对 ZYD0685(抗)和 ZYD0790(感)品种莽草酸含量影响  
Fig.1 Effects of different glyphosate doses on shikimate accumulation in ZYD0658(R) and ZYD0790(S)

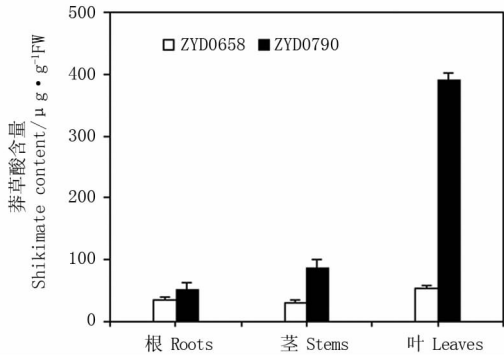


图2 草甘膦 1.23 kg a.i.·hm<sup>-2</sup> 剂量下 ZYD0685(抗)和 ZYD0790(感)根茎叶中的莽草酸含量  
Fig.2 Effects of glyphosate (1.23 kg a.i.·hm<sup>-2</sup>) on shikimate accumulation in three organs of ZYD0658(R) and ZYD0790(S)

2.2.2 谷胱甘肽-S-转移酶(GSTs)活性 如图3所示,在不同草甘膦剂量处理下,抗性材料 ZYD0685

叶片中 GSTs 活性明显增加,在 0.9 kg a.i.·hm<sup>-2</sup> 剂量下,GSTs 活性最高,是对照的 3.8 倍,约为 381 U·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>。敏感材料 ZYD0790 仅在 0.9 和 1.23 kg a.i.·hm<sup>-2</sup> 2 个剂量处理后叶片中 GSTs 活性较对照略有增加,其他剂量处理后 GSTs 活性没有变化,敏感材料的 GSTs 活性较抗性材料低。

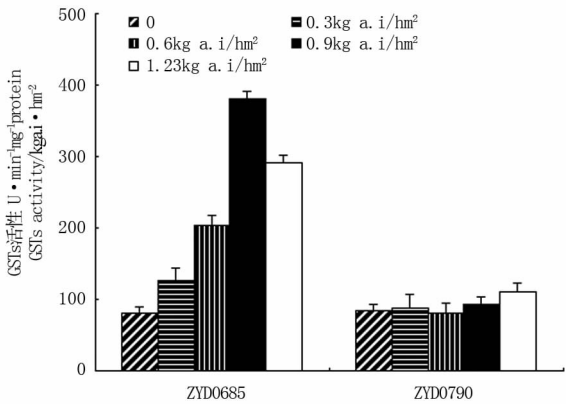


图3 不同剂量草甘膦对抗感野生大豆叶片 GSTs 活性的影响

Fig.3 Effect of different glyphosate doses on leaf GSTs activity in different resistant wild soybean

2.2.3 叶绿素含量 由图4可知,在草甘膦 1.23 kg a.i.·hm<sup>-2</sup> 处理后,敏感材料 ZYD0790 叶绿素含量在不同时间内存在显著性差异,表现为随着时间的延长,叶绿素含量逐渐降低,在 120 h 含量达到最低,为 18.71 (SPAD)。反之,抗性材料 ZYD0685 叶绿素含量在不同时间内没有显著性变化,植株生长正常。

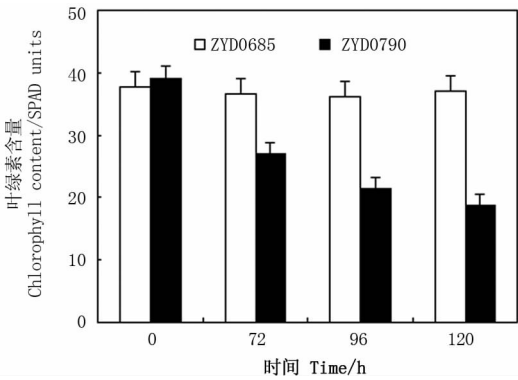


图4 不同时间下,草甘膦 1.23 kg a.i.·hm<sup>-2</sup> 对 ZYD0685 和 ZYD0790 叶绿素含量的影响  
Fig.4 Effects of glyphosate(1.23 kg a.i.·hm<sup>-2</sup>) on chlorophyll content of ZYD0658 and ZYD0790 in different times (SPAD)

3 讨论

抗草甘膦资源的获得有多种手段,Widholm 等<sup>[11]</sup>通过对烟草、大豆、紫花苜蓿的梯度筛选培养都获得了抗草甘膦细胞株系。Papanikou 等<sup>[12]</sup>将植

物细胞悬浮培养在浓度不断增加的草甘膦培养液中,逐步筛选耐草甘膦的 *EPSPS* 基因,发现通过提高 *EPSPS* 酶的 mRNA 含量和酶活性从而产生草甘膦耐性。但是,细胞悬浮培养的抗性机制并非适用于整株植株,植物组织培养效果会随时间变化影响草甘膦抗性的产生<sup>[13-14]</sup>。本研究在大田条件下人工喷施草甘膦药剂,对不同野生大豆进行抗草甘膦基因型筛选,结果获得抗草甘膦材料 ZYD0658 和 ZYD2405。

草甘膦主要抑制莽草酸途径中的 EPSP 合成酶,因此可以通过植物体内莽草酸积累量的多少初步判断期对草甘膦的耐性程度<sup>[15-17]</sup>。Tong 等<sup>[7]</sup>报道了在 1.5 kg a. i·hm<sup>-2</sup> 草甘膦剂量下,敏感棉花植株叶片中莽草酸积累量是抗性棉花植株的 13.1 倍。本试验也表明,在剂量为 1.23 kg a. i·hm<sup>-2</sup> 草甘膦处理后,敏感品系莽草酸积累量是抗性品系的 9.9 倍,进一步说明莽草酸积累量是抗草甘膦生理机制中最重要的指标。

叶绿素含量变化能反映植物受逆境伤害程度。Moldes 等<sup>[18]</sup>报道在草甘膦胁迫下,非抗草甘膦大豆品种 DM48 的叶绿素含量下降。本研究中,在草甘膦处理后,抗性材料 ZYD0685 叶绿素含量没有发生变化,而感性材料 ZYD0790 叶绿素含量显著降低。

谷胱甘肽-S-转移酶(GSTs)在除草剂代谢中起重要作用。丁伟等<sup>[19]</sup>报道了土壤中氯嘧磺隆 0.5~1.5 g a. i·hm<sup>-2</sup> 剂量下,耐性甜菜品系叶片中 GST 活性明显增加。本研究中,在草甘膦不同剂量处理下,抗性野生大豆的 GSTs 活性迅速增加,高于敏感野生大豆品系,表明抗性野生大豆体内可能由于解毒酶活性的增加而使草甘膦轭合失去活性。

## 参考文献

- [1] 李向华,王克晶,李福山,等. 野生大豆(*Glycine soja*)研究现状与建议[J]. 大豆科学,2005,24(4):305-307. (Li X H, Wang K J, Li F S, et al. Research progress of wild soybean (*Glycine soja*) and suggestions for improving its effective utilization and protection [J]. Soybean Science, 2005, 24(4):305-307.)
- [2] 陈新,严继勇,高兵. 野生大豆抗草甘膦基因漂移的初步研究[J]. 中国油料作物学报,2004,26(2):91-92. (Chen X, Yan J Y, Gao B. Preliminary study on roundup ready soybean's round-up ready gene move to wild soybean[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2004, 26(2):90-91.)
- [3] Amrhein N, Deus B, Gehrke P, et al. The site of inhibition of the shikimate pathway by glyphosate II. Interference of glyphosate with ehofisme formation in vivo and vitro[J]. Plant Physiology, 1980, 66:830-834.
- [4] Dinelli G, Marotti I, Bonetti A, et al. Physiological and molecular insight on the mechanisms of resistance to glyphosate in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. biotypes [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2006, 86:30-41.
- [5] Marcos Y, Carolina I, Daniel O, et al. Glyphosate resistance in perennial ryegrass(*Lolium perenne* L.) from Argentina[J]. Crop Protection, 2012, 32:12-16.
- [6] Dinelli G, Marotti I, Bonetti A, et al. Physiological and molecular bases of glyphosate resistance in *Conyza bonariensis* biotypes from Spain[J]. Weed Research, 2008, 48:257-265.
- [7] Tong X H, Daud M K, Sun Y Q, et al. Physiological and molecular mechanisms of glyphosate tolerance in an in vitro selected cotton mutant [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2009, 94:100-106.
- [8] 陶波,秦智伟,曲贵芹. 菜豆抗草甘膦基因筛选的研究[J]. 中国农学通报,1993,9(5):31-33. (Tao B, Qin Z W, Qu G Q. Study on selection for resistance gene glyphosate of bean[J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 1993, 9(5):31-33.)
- [9] 邓渊钰. 草甘膦药害的检测及其应用[J]. 杂草科学,2002(2):37-38. (Deng Y Y. Detection of glyphosate residues and its utilization[J]. Weed Science, 2002(2):37-38.)
- [10] Pamela J H, David D. Glutathione transferase activities and herbicide selection in maize and associated weed species[J]. Pesticide Science, 1996, 46:267-275.
- [11] Widholm J M, Chinnala A R, Ryu J H. Glyphosate selection of gene amplification in suspension cultures of 3 plant species[J]. Physiologia Plantarum, 2001, 112(4):540-545.
- [12] Papanikou E, Brotherton J E, Widholm J M. Length of time in tissue culture can affect the selected glyphosate resistance mechanism [J]. Planta, 2004, 218(4):589-598.
- [13] Dyer W E, Weller S C, Bressan R A. Glyphosate tolerance in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) [J]. Plant Physiology, 1988, 88:661-666.
- [14] Jones J D, Goldsbrough P B, Weller S C. Stability and expression of amplified *EPSPS* genes in glyphosate resistant tobacco cells and plantlets[J]. Plant Cell Reports, 1996, 15:431-436.
- [15] Buehring N W, Massey J H, Reynolds D B. Shikimic acid accumulation in field grown corn (*Zea mays*) following simulated glyphosate drift[J]. Agricultural Food Chemistry, 2007, 55:819-824.
- [16] 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-resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Agricultural Food Chemistry, 2002, 50:506-512.
- [17] Shaner D L, Hassar-Nadler T, Henry W B. A rapid in vivo shikimate accumulation assay with excised leaf discs [J]. Weed Science, 2005, 53:769-774.
- [18] Moldes C A, Medici L O, Azevedo R A, et al. Biochemical responses of glyphosate resistant and susceptible soybean plants exposed to glyphosate [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2008, 30:469-479.
- [19] 丁伟,马凤鸣,程苗,等. 甜菜耐氯嘧磺隆生化机理的研究[J]. 中国农业科学,2009,42(3):906-911. (Ding W, Mang F M, Cheng Z, et al. Effect of chlorimuron-ethyl on biochemical mechanism in tolerant sugar beet[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2009, 42(3):906-911.)