

不同时期喷施草甘膦对大豆生理指标的影响^{*}

原向阳, 郭平毅, 张丽光, 王 鑫, 赵 锐, 姚满生, 王宏富
(山西农业大学农学院, 山西 太谷 030801)

摘 要: 采用随机区组的设计方法, 分别在第一、二、三复叶期喷施不同剂量的41%草甘膦异丙胺盐水剂, 研究了其对抗草甘膦大豆RR2和普通大豆晋大75叶片叶绿素含量指数、莽草酸质量分数和SOD活性等生理指标的影响。结果表明: 在不同时期喷施 w 为41%草甘膦异丙胺盐水剂均可以抑制RR2和晋大75的叶绿素合成, 促进大豆体内莽草酸的积累, 但RR2对 w 为41%草甘膦异丙胺盐水剂的抗性远高于晋大75。施药时期越早, 大豆的叶绿素含量指数越低, 晋大75叶片的莽草酸质量分数越低。不同时期施药对RR2和晋大75的SOD活性均影响不大。3次施药以第三复叶期对晋大75的伤害最大。所测3个生理指标的敏感性依次为叶片莽草酸含量>叶绿素含量指数>SOD活性。比较不同时期喷施 w 为41%草甘膦异丙胺盐水剂对大豆生理指标的变化, 从一定意义上对于了解转基因大豆和常规大豆对草甘膦的耐药性差异及其他生理响应机制有重要参考价值, 为大豆田合理运用草甘膦提供依据。

关键词: 抗草甘膦大豆; 草甘膦异丙胺盐水剂; 生理指标

中图分类号: S482.4; S565.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579(2009)02-0090-05

Impact of Spraying Glyphosate on Physiologi Physiological Index of Soybean at Different Growth Stages

YUAN Xiangyang, GUO Pingyi, ZHANG Liguang, WANG Xin, ZHAO Rui, YAO Mansheng, WANG Hongfu
(Agronomy College, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: Random complete block design was used to research the impact of spraying 41% Glyphosate-isopropylammonium AS on physiological indexes of glyphosate-resistant soybean cultivars (RR2) and ordinary soybean cultivars (Jinda75) at different growth stages, one-trifoliolate, two-trifoliolate and three-trifoliolate leaf stage. The chlorophyll content index, shikimic acid content and SOD activity were measured. The results indicated that, the chlorophyll content indexes of RR2 and Jinda75 decreased with increasing the dosage of herbicide, while shikimic acid contents increased. The earlier 41% Glyphosate-isopropylammonium AS was applied, the less the chlorophyll content index was; But the shikimic acid content of ordinary soybean was opposite. The impact of 41% Glyphosate-isopropylammonium AS on SOD activity of the soybean was little. The injury of 41% Glyphosate-isopropylammonium AS on ordinary soybean at three-trifoliolate leaf stage was the largest. During these three physiological indexes, shikimic acid content was the most sensitive, and SOD activity was the last. The change of physiological indexes could show the glyphosate-resistance differences of cultivars and had an important significance for applying glyphosate appropriately in soybean field.

Key words: glyphosate-resistance soybean; 41% glyphosate-isopropylammonium AS; physiological index

^{*} 收稿日期: 2008-06-15

基金项目: 国家引进国际先进农业科学技术“948计划”资助项目(2001-102-04)

作者简介: 原向阳(1981年生), 男, 博士研究生; 通讯作者: 郭平毅; E-mail: pyguo@sxau.edu.cn

中国的大豆生产在世界排名第4位^[1]。转基因抗草甘膦大豆的研制为大豆田除草提供了新的思路和方法。国外关于抗草甘膦大豆方面的研究,多集中在其基因的导入及对环境、土壤、水,及人、畜食用后的安全性方面^[2],关于草甘膦对抗草甘膦大豆的研究多集中在对其形态指标和产量构成的影响上^[3-6],及不同栽培措施、杂草防除方式对抗草甘膦大豆产量和经济效益的影响^[7-9]。在种子萌发及幼苗生长阶段,耐草甘膦大豆对温度、水分及盐胁迫的抗性并没有因为转基因而得到增强,在有些方面还弱于普通大豆^[10]。原向阳等^[11]研究表明,花荚期喷施不同质量分数的农达41%水剂可降低RR大豆(抗草甘膦大豆)的叶绿素含量指数和光合速率,增加气孔导度和蒸腾速率,在超过一定剂量时就会对抗草甘膦大豆造成伤害,影响其生理代谢。而大豆苗期是防除杂草的关键时期,防除效果的好坏直接关系到大豆的产量和品质;而苗期的不同生长时期,大豆对除草剂的耐药性存在差异。本试验于第一、二、三复叶期对不同大豆品种喷施不同剂量的 $w=41\%$ 草甘膦异丙胺盐水剂,测量大豆叶片叶绿素含量指数、莽草酸含量和SOD活性等生理指标的变化,以探明苗期不同时期、不同大豆品种对草甘膦的耐药性差异,及其对草甘膦伤害作出的其他生理响应机制,为大豆田合理运用草甘膦提供参考,对于阐明豆科一些植物对草甘膦耐药性较强的原因有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试土壤 试验于2005年在山西农业大学试验田进行,试验土壤为黄土状母质上发育的碳酸盐褐土,水浇地。0~20 cm土层有机质含量1.74%,全氮0.063 6%,速效磷6.69 mg/kg,速效钾185.2 mg/kg。

1.1.2 供试品种 抗草甘膦大豆RR2(早熟,白花)由山西农业大学农业化学调控中心提供;普通大豆晋大75(早熟,白花)由山西农业大学大豆研究组提供。

1.1.3 供试药剂 $w=41\%$ 草甘膦异丙胺盐水剂(美国孟山都公司北京代表处)

1.2 试验设计

所有品种均种植在山西农业大学试验田里。田间试验于2005年5-9月在山西农业大学农场实验田进行,采样后在山西农业大学作物化学调控山西省重点实验室进行生理指标的测定。采用随机区组

设计方案, $w=41\%$ 草甘膦异丙胺盐水剂分别设5个水平(0.00、0.46、0.92、1.85和3.69 kg/hm²),分别计为剂量1、2、3、4、5、6;3次重复,分别在第一、二、三复叶期用3WSS 0.8型手持压缩喷雾器(浙江台州市助农喷雾器厂)于天气晴朗无风的上午8:00-10:00时进行除草剂处理,其用量均为有效剂量,小区面积为16 m²,每小区喷500 mL药液,3次重复。2005年5月6日早晨漫灌浇地,5月8日中午用旋耕施肥播种一体机进行旋耕播种,出苗后进行间苗定苗,行距0.5 m,株距0.1 m。

1.3 测定指标与方法

分别于6月3日、4日和10日下午用CCM-200 Chlorophyll Content Meter (Opti-Sciences, Inc.)测量大豆活体叶片的叶绿素含量指数。仪器探头均测量第一复叶中间叶片靠近叶尖的部位。

分别于5月30日、6月4日和6月10日上午7时到试验田取大豆植株同一叶位的新鲜叶片,置于冰盒,做好标记,迅速拿回实验室,在-80℃冰箱保存待测。

超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定采用氮蓝四唑法稍做改动:准确称量0.1 g的大豆叶片,放在置于冰块上的研钵中,加入1.5 mL 50 mmol/L的磷酸缓冲液(PH=7.8),迅速研磨成匀浆,做2份重复,分别转入离心管冷冻离心15 min (12 000 × g),取上清液,供测酶活性用。取直径和玻璃厚度均匀一致的试管,放在四壁光亮的反射强度一致的光照培养箱,光照强度为4 000 lx。准备好之后,在较暗的光下向每支试管加入25 μL酶液和6 mL NBT反应液(内含核黄素量为原操作时的2倍),在温度为(27 ± 1)℃下,进行25 min的照光,出现颜色变化后,即可在560 nm波长下进行光密度测定。反应液为6 mL,其余均按标准操作。

莽草酸的含量分析采用分光光度法^[12]稍做改动:准确称量0.1 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的HCl,迅速研磨成匀浆,然后将提取液转入离心管冷冻离心15 min (25 000 × g),取上清液,供测莽草酸含量用。取100 μL上清液与2 mL $w=0.1\%$ 过碘酸混合以氧化莽草酸,3 h后将试样与2 mL 1 mol/L的NaOH混匀之后加1.2 mL 0.1 mol/L甘氨酸,混匀,然后在380 nm波长下进行光密度测定,并利用不同浓度的莽草酸标样进行光密度测定,绘制标准曲线,计算样品的莽草酸含量。

各生理指标的数据均采用 Excel 2000 和统计分析软件 SAS8.0 进行处理。

2 结果与分析

2.1 不同时期喷施 $w = 41\%$ 草甘膦异丙胺盐水剂对大豆叶片叶绿素含量指数的影响

不同时期喷施 $w = 41\%$ 草甘膦异丙胺盐水剂均可降低大豆的叶绿素含量指数, 且剂量越高, 下降程度越大 (图 1、图 2)。抗草甘膦大豆 RR2 叶绿素含量指数的变化小于普通大豆晋大 75。对于 RR2, 3 个时期之间 ($F = 0.33$), 时期与剂量的互作之间差异不显著 ($F = 1.05$), 剂量 1 与 3 之间差异显著。对于晋大 75, 3 个时期之间 ($F = 40.85^{**}$), 剂量之间 ($F = 136.3^{**}$), 时期与剂量的互作之间 ($F = 10.71^{**}$) 均差异极显著; 第三复叶期的叶绿素含量指数 > 第二复叶期 > 第一复叶期, 第二复叶期和第一复叶期之间差异显著。表明 $w = 41\%$ 草甘膦异丙胺盐水剂可降低大豆的叶绿素含量, 且对普通大豆的影响大于抗草甘膦大豆; 施药时期越早, 叶绿素含量越低。

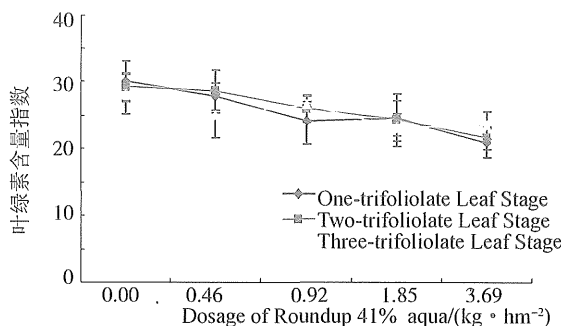


图 1 不同生育时期喷施 $w = 41\%$ 草甘膦异丙胺盐水剂对 RR2 叶绿素含量的影响

Fig. 1 Effect of Roundup 41% aqua on the chlorophyll content of RR2 at different growth stages

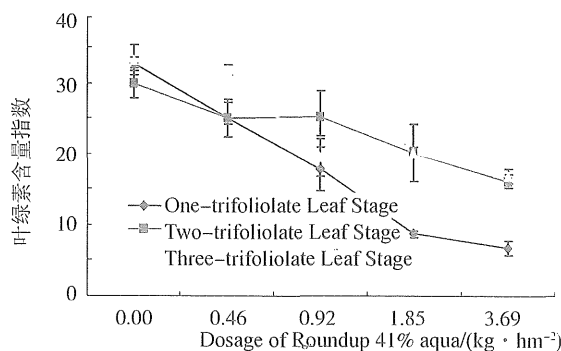


图 2 不同生育时期喷施 $w = 41\%$ 草甘膦异丙胺盐水剂对晋大 75 叶绿素含量的影响

Fig. 2 Effect of Roundup 41% aqua on the chlorophyll content of Jinda75 at different growth stages

2.2 不同时期喷施 $w = 41\%$ 草甘膦异丙胺盐水剂对大豆叶片 SOD 活性的影响

不同时期喷施 $w = 41\%$ 草甘膦异丙胺盐水剂对两种大豆 SOD 活性的影响各不相同, 随着剂量的增加, RR2 的 SOD 活性基本呈缓慢增加趋势, 而晋大 75 的 SOD 活性却先增加后降低 (图 3、图 4)。抗草甘膦大豆 RR2 与普通大豆晋大 75 的 SOD 活性在剂量之间 ($F = 0.4$; $F = 0.85$), 及剂量与施药时期的互作之间 ($F = 0.18$; $F = 0.23$) 均差异不显著。RR2 和晋大 75 的 SOD 活性在 3 个施药时期分别为第二复叶期 > 第一复叶期 > 第三复叶期。RR2 的 SOD 活性在第一复叶期与第三复叶期之间差异显著。在许多逆境条件下, 植物体内活性氧代谢系统的平衡会受到影响, 但本试验表明 $w = 41\%$ 草甘膦异丙胺盐水剂对抗草甘膦大豆和普通大豆体内的活性氧代谢影响不大。

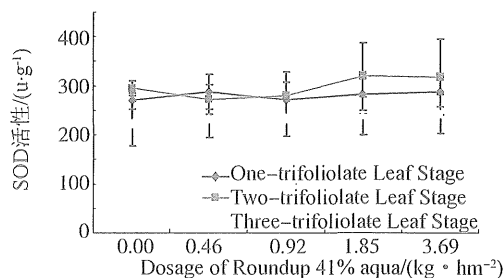


图 3 不同生育时期喷施 $w = 41\%$ 草甘膦异丙胺盐水剂对 RR2 SOD 活性的影响

Fig. 3 Effect of Roundup 41% aqua on the SOD activity of RR2 at different growth stages

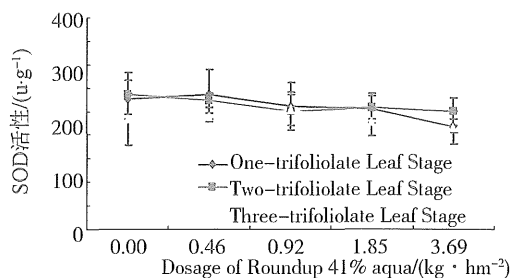


图 4 不同生育时期喷施 $w = 41\%$ 草甘膦异丙胺盐水剂对晋大 75 SOD 活性的影响

Fig. 4 Effect of Roundup 41% aqua on the SOD activity of Jinda75 at different growth stages

2.3 不同时期喷施 $w = 41\%$ 草甘膦异丙胺盐水剂对大豆叶片 w (莽草酸) 的影响

不同时期喷施 $w = 41\%$ 草甘膦异丙胺盐水剂均可增加抗草甘膦大豆 RR2 和普通大豆晋大 75 的莽草酸质量分数, 但是二者的增加程度却大为不同 (图 5、图 6)。晋大 75 的莽草酸质量分数在施药时

期之间 ($F = 22.75^{**}$), 以及剂量之间 ($F = 53.74^{**}$) 均差异极显著。RR2 的施药时期与剂量的互作之间 ($F = 0.31$) 差异不显著, 而晋大 75 的施药时期与剂量之间的互作 ($F = 2.75^{*}$) 差异显著。由图可知抗草甘膦大豆 RR2 的与烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合成酶 (EPSPS) 活性较高, 可以将体内多余的莽草酸代谢掉, 保证芳香族氨基酸的正常代谢, 能够忍受较高剂量 $w = 41\%$ 草甘膦异丙胺盐水剂, 而普通大豆晋大 75 在超过较低剂量 $0.46 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 时体内莽草酸就大量积累, 受害比较严重。对于普通大豆, 施药时期越晚, 大豆体内莽草酸积累越多, 受害越严重; 虽然抗草甘膦大豆的莽草酸质量分数在第二复叶期高于第一、三复叶期, 但其绝对质量分数仍然很低。

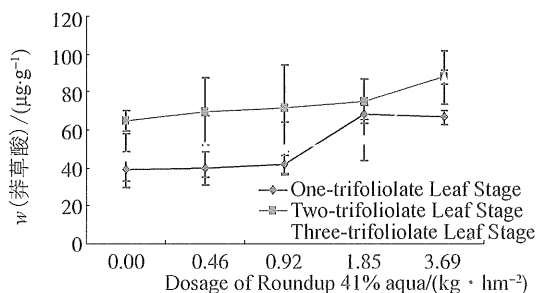


图5 不同生育时期喷施 $w = 41\%$ 草甘膦异丙胺盐水剂对 RR2 w (莽草酸) 的影响

Fig. 5 Effect of Roundup 41% aqua on the Shikimic acid content of RR2 at different growth stages

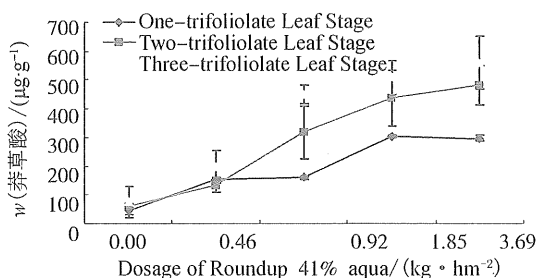


图6 不同生育时期喷施 $w = 41\%$ 草甘膦异丙胺盐水剂对晋大 75 w (莽草酸) 的影响

Fig. 6 Effect of Roundup 41% aqua on the Shikimic acid content of Jinda 75 at different growth stages

3 讨论

不同地区的生态环境和不同施药时期会影响大豆的生长发育、对除草剂的吸收以及除草剂对作物的药害。草甘膦施用后可被植物迅速吸收, 并随同化产物传导至整个植株, 对植物细胞分裂、叶绿素合成、蒸腾、呼吸以及蛋白质等代谢过程发生影响而导致植物死亡^[13]。原向阳等^[11]研究表明, 花荚

期喷施不同浓度的农达 $w = 41\%$ 水剂可降低 RR 大豆 (抗草甘膦大豆) 的叶绿素含量指数和光合速率。本试验结果也表明, 喷施草甘膦后, $w = 41\%$ 草甘膦异丙胺盐水剂可降低大豆的叶绿素含量指数, 且对普通大豆的影响大于抗草甘膦大豆; 施药时期越早, 叶绿素含量越低。在植物细胞中, EPSPS 基因存在于细胞核中, 但成熟蛋白位于叶绿体内^[14]。草甘膦使大豆叶片的叶绿素含量降低的原因是否与此有关还有待研究。

作为清除体内活性氧的重要抗氧化酶, 当植物暴露于逆境胁迫时, 其 SOD 活性的诱导已得到许多实验的证实^[15]。喷施除草剂可以防除田间杂草, 但对作物来说是一种逆境处理, 已有关于除草剂对作物体内保护酶活性影响的报道。研究表明^[16] 乙草胺与赛克的适量混用以及速收可以增加大豆叶片的 SOD 活性。不同除草剂及其不同剂量对大豆叶片 SOD 活性的影响不同, 有的促进 SOD 活性, 有的降低其活性。在本试验中, 草甘膦对两个大豆品种叶片 SOD 活性的影响也不相同, 3 个时期中以第三时期的 SOD 活性最低, 各剂量之间差异不显著。说明 SOD 活性不可作为大豆对草甘膦抗性强弱的生理指标。

EPSPS 是真菌、细菌、藻类、高等植物体内芳香族氨基酸 (包括色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸) 生物合成过程中一个关键性的酶。草甘膦专一性地抑制 EPSPS 的活性, 当 EPSPS 受抑制时, EPSPS 脱磷酸化底物莽草酸便会大量积累, 阻断芳香族氨基酸和一些芳香化合物的生物合成, 从而扰乱了生物体正常的氮代谢而使其死亡。Bijay K. Singh 等人检测出经 $23 \text{ g}/\text{hm}^2$ 草甘膦处理的玉米植株中莽草酸的含量约为 $2.5 \mu\text{mol}/\text{g}$ 以鲜质量计, 而未处理的玉米植株中莽草酸的含量以鲜质量计低于 $0.4 \mu\text{mol}/\text{g}$ ^[12]。本试验结果表明, 经草甘膦处理后, 普通大豆随着施药时期的推迟和剂量的增加, 体内莽草酸积累越多, 受害越严重; 虽然抗草甘膦大豆的莽草酸含量在第二复叶期高于第一、三复叶期, 但其绝对含量仍然很低。此结果正符合了草甘膦的作用机理。

4 结论

本试验表明在不同时期喷施 $w = 41\%$ 草甘膦异丙胺盐水剂均可以抑制 RR2 和晋大 75 的叶绿素合成, 促进大豆体内莽草酸的积累, 但抗草甘膦大豆 RR2 对 $w = 41\%$ 草甘膦异丙胺盐水剂的抗性远高于普通大豆晋大 75。施药时期越早, 大豆的叶绿素

含量指数越低,但随着施药时期的推迟,普通大豆体内的莽草酸质量分数显著增加。不同时期喷施 $w=41\%$ 草甘膦异丙胺盐水剂对 RR2 和晋大 75 的 SOD 活性均影响不大。本试验中苗期的 3 次施药以第三复叶期草甘膦对普通大豆的伤害最大,建议适当提前施药时期。所测 3 个生理指标中,敏感性依次为叶片莽草酸质量分数 > 叶绿素含量 > SOD 活性。

参考文献:

- [1] 原向阳,郭平毅,任一新. 转基因大豆存在的问题及应对措施[J]. 山西农业科学, 2005, 33(3): 19-22.
YUAN Xiangyang, GUO Pingyi, REN Yixin. Problem in genetically modified soybean and its counter-measures [J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2005, 33(3): 19-22.
- [2] ANTONIO L, CERDEIR A, STEPHEN O. D. The current status and environmental impacts of glyphosate-resistant crops: a review [J]. Environmental Quality, 2006, 35: 1633-1658.
- [3] NELSON K A, RENNER K A. Soybean growth and development as affected by glyphosate and postemergence herbicide tank mixtures [J]. Agronomy Journal, 2001, 93: 428-434.
- [4] DELANNAY X, BAUMAN T T, BEIGHLEY D H, et al. Yield evaluation of a glyphosate-tolerant soybean line after treatment with glyphosate [J]. Crop Science, 1995, 35(5): 1462-1467.
- [5] ROGER W E, FRED W R, ROBERT N K, et al. Glyphosate-resistant soybean cultivar response to glyphosate [J]. Agronomy Journal, 2001, 93: 404-407.
- [6] BRYAN G Y, JULIE M Y, JOSEPH L M, et al. Soybean development and yield as affected by three postemergence herbicides [J]. Agronomy Journal, 2003, 95: 1152-1156.
- [7] HEATHERLY L G, SPURLOCK S R, REDDY K N. Weed management in nonirrigated glyphosate-resistant and non-resistant soybean following deep and shallow fall tillage [J]. Agronomy Journal, 2004, 96: 742-749.
- [8] LARRY G, HEATHERLY, KRISHNA N, et al. Weed Management in Glyphosate-Resistant and Non-Glyphosate Resistant Soybean Grown Continuously and in Rotation [J]. Agronomy Journal, 2005, 97: 568-577.
- [9] KRATOCHVIL R J, PEARCE J T, HARRISON Jr R M. Row-spacing and seeding rate effects on glyphosate-resistant soybean for mid-atlantic production systems [J]. Agronomy Journal, 2004, 96: 1029-1038.
- [10] 周军英,王长永,续卫利. 温度、水分和盐度对转基因耐草甘膦大豆种子萌发和幼苗生长的影响[J]. 生态与农村环境学报, 2006, 22(2): 26-30.
ZHOU Junyin, WANG Changyong, XU Weili. Comparison between transgenic soybean and non-transgenic soybean in resistance to stresses [J]. Journal of Ecology and Rural Environment 2006, 22(2): 26-30.
- [11] 原向阳,毕耀宇,王鑫,等. 除草剂对抗草甘膦大豆光合作用和蒸腾作用的影响[J]. 农业现代化研究, 2006, 27(4): 311-313.
YUAN Xiangyang, BI Yaoyu, WANG Xin, et al. Effect of herbicides on photosynthesis and transpiration of glyphosate-resistant soybean [J]. Research of Agricultural Modernization, 2006, 27(4): 311-313.
- [12] 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 Yuanyu. Detection of glyphosate residues and its utilization [J]. Weed Science, 2002(2): 37-38.
- [13] 朱玉,于中连,林敏. 草甘膦生物抗性和生物降解及其转基因研究[J]. 分子植物育种, 2003, 1(4): 435-441.
ZHU Yu, YU Zhonglian, LIN Min. Bioresistance or biodegradation of glyphosate and construction of transgenic plants [J]. Molecular Plant Breeding, 2003, 1(4): 435-441.
- [14] DELLA-CIOPPA G, BAUER S C, KLEIN B K, et al. Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants in vitro [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83(18): 6873-6877.
- [15] 刘宛,李培军,周启星,等. 短期胁迫对大豆幼苗超氧化物歧化酶活性及丙二醛含量的影响[J]. 应用生态学报, 2003, 14(4): 581-584.
LIU Wan, LI Peijun, ZHOU Qixing. Effect of short term phenanthrene stress on SOD activities and MDA contents in soybean (*Glycine max*) seedlings [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2003, 14(4): 581-584.
- [16] 亢秀丽. 除草剂在夏大豆田的安全性及药效研究[D]. 太谷: 山西农业大学, 2003: 17-26.
KANG Xiuli. Study on safety aspects and performance of herbicides on the summer soybean [D]. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2003.