

# 草甘膦作用机制和抗性研究进展

陈世国\*, 强胜, 毛婵娟

(南京农业大学生命科学学院, 南京 210095)

**摘要** 草甘膦是迄今为止最为重要、应用最广泛和最优秀的除草剂之一。然而, 由于抗草甘膦转基因作物的广泛商业化导致草甘膦使用量迅速增长, 杂草抗药性发生, 这不仅对草甘膦的药效发挥和未来可持续应用造成了严重影响, 而且对现代农业生产安全构成了威胁。本文通过对草甘膦的作用机理、草甘膦抗性杂草发展现状和抗性机制进行系统的总结和分析, 以期为我国草甘膦的抗性研究和科学使用提供参考。

**关键词** 除草剂; 草甘膦; 作用机制; 抗性

**中图分类号:** S 482.4 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.02.003

## Mechanism of action of glyphosate and research advances in glyphosate resistance

Chen Shiguo, Qiang Sheng, Mao Chanjuan

(College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract** Glyphosate has become one of the most important, dominant and perfect herbicide for world agriculture so far. However, the overreliance and intensive use of glyphosate alone to manage weeds has selected populations that are glyphosate-resistant. This threatens not only efficacy and future sustainability of glyphosate as a precious herbicide, but also the safety of modern agricultural production. In this review, we focus on the action mechanism of glyphosate, the current status of evolved glyphosate-resistant weeds worldwide and resistance mechanisms in different weeds. This will provide useful references for Chinese researchers in the study of glyphosate resistance and sustainable use of glyphosate in the future.

**Key words** herbicide; glyphosate; mechanism of action; resistance

自从 1946 年开始使用 2,4-D, 化学除草剂已走过 60 多年的历程, 为全球粮食生产和农业现代化做出了巨大贡献<sup>[1]</sup>。其中草甘膦(N-(膦酰基甲基)甘氨酸)是迄今为止最为重要、应用最为广泛和最优秀的除草剂<sup>[2]</sup>。自 1974 年美国孟山都公司开发草甘膦以来, 由于其具有广谱、低毒、安全、无土壤残留的特点, 迅速占据了世界除草剂的主导地位。尤其是 1996 年后, 随着抗草甘膦转基因作物(如大豆、玉米和油菜)的问世和大规模推广应用, 草甘膦的使用更是出现了迅猛增长<sup>[3]</sup>。目前, 已成为全球销售量最大和增长最快的农药品种<sup>[4]</sup>。

### 1 草甘膦的作用机制

草甘膦是唯一一个以植物叶绿体中 5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合成酶(5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, EPSPS, EC 2.5.1.19)为靶标的除草剂<sup>[2]</sup>。EPSPS 广泛存在于植物和一些真菌及细菌体内, 是莽草酸代谢途径的第 6 个酶。莽草酸途径在植物的生长点最为活跃, 对植物极其重要, 它贡献了植物体干重生物量的 35% 以上<sup>[5]</sup>。在莽草酸途径中, EPSPS 负责催化磷酸烯醇丙酮酸(PEP)和磷酸莽草酸(S3P)生成 5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸(EPSP)。这个步骤是植物细

收稿日期: 2016-04-12 修订日期: 2016-06-09

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项(2016ZX08011-001); 中央高校基本科研业务费专项资金(KYZ201530)

\* 通信作者 E-mail: chenshg@njau.edu.cn

胞合成芳香族氨基酸(色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸),并最终合成激素和许多次生代谢物如类黄酮、木质素、泛醌、维生素 K、植物保卫素和其他酚类化合物的关键(图 1)。草甘膦的作用机理是以竞争 PEP 和非竞争 S3P 的方式同植物体内 EPSPS

进行绑定,形成结构稳定的 EPSPS-S3P-草甘膦复合物。从而引起 EPSPS 活性的丧失,大量碳源流向 S3P,进而造成莽草酸在组织中快速积累。另一方面,蛋白质生物合成所必需的芳香族氨基酸的合成则严重受阻。最终导致植物生长受到抑制<sup>[6]</sup>。

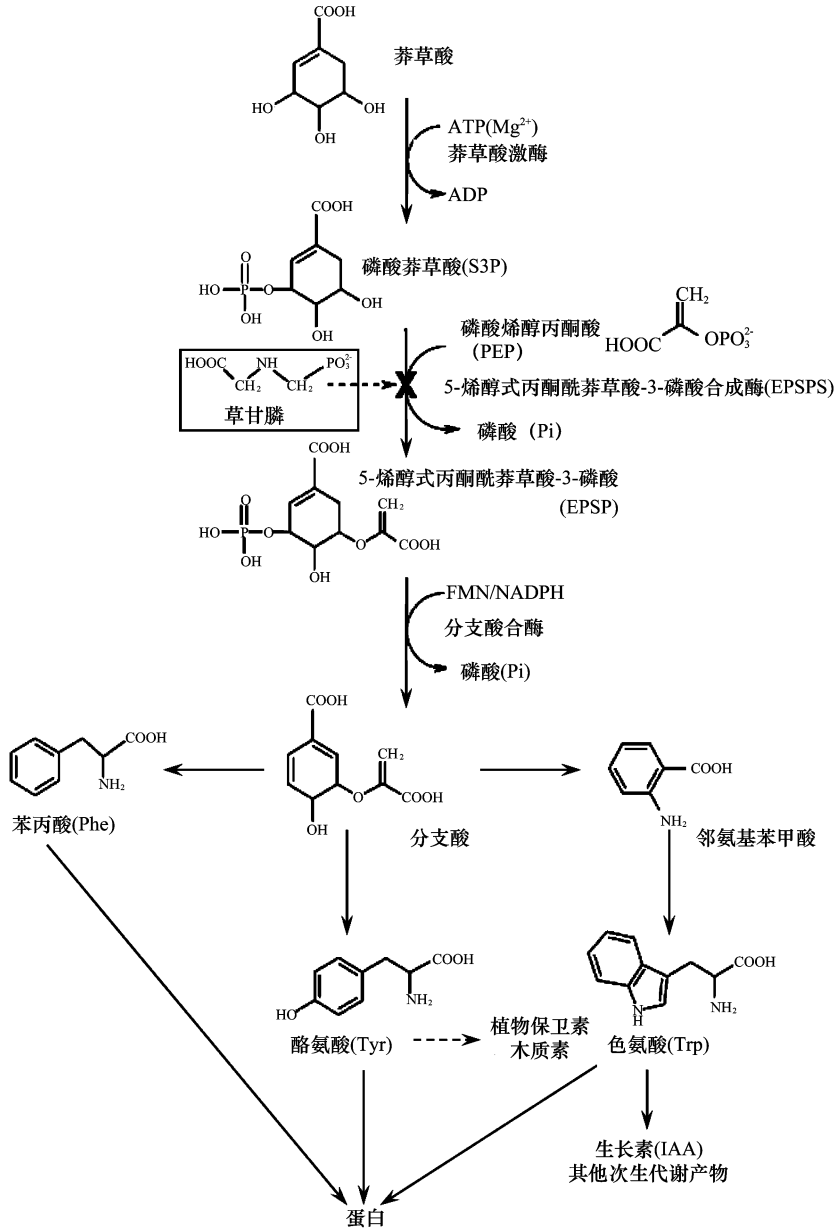


图 1 莽草酸途径和草甘膦作用位点

Fig. 1 The shikimate pathway and the action site of glyphosate

然而,草甘膦是如何通过抑制莽草酸途径杀死植物的至今仍不十分清楚。许多研究认为蛋白质合成所需芳香族氨基酸的缺乏是草甘膦作用的最初影响,这符合草甘膦作用缓慢的特点。同时,大量碳源流向莽草酸途径必然导致其他基本代谢所需碳源的

匮乏,引起植物体内代谢的紊乱。大量证据已经表明草甘膦对其他许多生理生化过程都有明显的影响,例如降低光合作用效率、导致叶绿素降解、抑制叶绿素和胡萝卜素合成、减少光合作用和光呼吸蛋白丰富度、抑制铁还原酶(ferric reductase)活性、抑

制生长素传导和增加生长素氧化等<sup>[7-9]</sup>。有研究显示草甘膦处理甜菜 *Beta vulgaris* L. 叶片后, 叶片中 1,5-二磷酸核酮糖 (RuBP) 含量急剧下降、气孔导度迅速减小、碳同化完全停止、光合作用效率显著降低, 但是对蔗糖的合成和转运没有影响<sup>[10-11]</sup>。Olesen 等也发现在喷洒草甘膦 1 d 后, 大麦 *Hordeum vulgare* 叶片的 CO<sub>2</sub> 同化完全停止了<sup>[12]</sup>。来自非草甘膦抗性玉米的结果表明, 随着草甘膦使用浓度的增加, 叶绿素含量、株高和干生物量逐渐降低<sup>[13]</sup>。草甘膦能够和一些金属离子 (如 Mg<sup>2+</sup>) 发生螯合, 引起一些酶结构和功能发生改变, 可能是叶绿素合成受阻的重要原因<sup>[4]</sup>。而 Zobiole 等发现, 草甘膦抑制转基因大豆 (抗草甘膦) 光合作用并导致生物量和谷物产量减少的原因在于它显著降低了大豆的叶面积及根茎对营养的吸收和积累<sup>[14]</sup>。此外, 草甘膦也被证明能够抑制核酸的生物合成<sup>[15]</sup>。正是由于这样的作用特点使草甘膦成为研究植物学的优秀工具之一。

## 2 草甘膦抗性杂草的现状

草甘膦能够抑制几乎所有高等植物的 EPSPS 活性, 这种非选择性特点使它在很长一段时间内不能够直接在作物田中使用。随着抗草甘膦转基因作物的发展, 使得草甘膦既能杀死所有杂草又不伤害作物的目标得以实现<sup>[2]</sup>。草甘膦的大量使用减少了其他除草剂的用量, 降低了生产投入和管理成本, 同时也减少了对水体和土壤的污染。然而, 过度依赖和长期大量使用单一除草剂, 导致了杂草抗药性的产生和发展, 直接威胁到除草剂的继续使用和农业生产安全<sup>[16]</sup>。据最新统计, 全世界已有 249 种 (144 种双子叶, 105 种单子叶) 杂草的 467 个生物型对 22 类作用位点的 160 种化学除草剂产生了抗药性<sup>[17]</sup>。对于草甘膦而言, 由于在投入市场的最初 20 年间一直没有发现抗性植物的存在, 加上科学家对植物代谢草甘膦分子机制认识的缺乏, 以及草甘膦抗性作物必须转入外源细菌基因才能获得的事实, 人们曾一度认为在田间不可能出现抗草甘膦植物<sup>[18]</sup>。这个神话在 1996 年被彻底打破, Pratley 等首次报道在澳大利亚发现了抗草甘膦的硬直黑麦草 *Lolium rigidum*<sup>[19-20]</sup>。1999 年, Tran 等发现, 在马来西亚连续 10 年使用草甘膦后, 牛筋草 *Eleusine indica* 对草甘膦的抗性提高了 8~12 倍<sup>[21]</sup>。同年末, 在连续

使用草甘膦 8~10 年的智利果园发现其对多花黑麦草 *Lolium multiflorum* 的防治效果很差<sup>[22]</sup>。2000 年, 在美国东部特拉华州连续 3 年种植抗草甘膦大豆的农田中发现小飞蓬 *Conyza canadensis* 对草甘膦的抗性提高了 8~13 倍<sup>[23]</sup>。2001 年, 在南非及美国的加州也发现了抗草甘膦的硬直黑麦草生物型<sup>[24-25]</sup>。2003 年, 在南非发现了抗草甘膦的长叶车前 *Plantago lanceolata* 和香丝草 *Conyza bonariensis*<sup>[26]</sup>。2004 年, 在美国发现豚草 *Ambrosia artemisiifolia* 对草甘膦产生了抗药性<sup>[17]</sup>。2005 年, Culpepper 等对美国佐治亚州传统棉花、花生和大豆田怀疑具有草甘膦抗性的长芒苋 *Amaranthus palmeri* 进行了抗性鉴定, 结果显示其抗性生物型半致死浓度是敏感生物型的 12 倍, 在大田有效防除抗性长芒苋的用药量也是推荐剂量的 12 倍, 证明长芒苋已经对草甘膦产生了抗性<sup>[27]</sup>。此后, 在美国还发现了抗草甘膦的具瘤苋 *Amaranthus rudis* 和三裂叶豚草 *Ambrosia trifida*、在巴西和阿根廷分别发现了抗草甘膦的猩猩草 *Euphorbia heterophylla* 和假高粱 *Sorghum halepense*、在中国发现了抗草甘膦的野芥菜和小飞蓬 *C. canadensis* 以及田旋花 *Convolvulus arvensis*、在澳大利亚发现了抗草甘膦的光头稗 *Echinochloa colonum*、在巴西和巴拉圭发现了抗草甘膦的马唐属杂草 *Sourgrass Digitaria insularis*<sup>[28-34]</sup>。迄今为止, 在全球不同国家和地区不同栽培方式下共发现了 34 种抗草甘膦杂草<sup>[17]</sup>。草甘膦抗性植物的出现, 将草甘膦这个百年一遇的优秀除草剂置于危险的境地, 更是给全球作物和粮食生产安全带来了巨大威胁<sup>[35]</sup>。

## 3 植物对草甘膦的抗性机制

植物对除草剂的抗性至少有三类不同机制: 作用靶点抗性、非靶点抗性和代谢解毒。前 2 种机制在草甘膦抗性植物中已得到广泛确认<sup>[18,36-37]</sup>。

### 3.1 靶点抗性机制

草甘膦的靶点抗性包括 2 种类型: 靶点 EPSPS 基因突变和靶点 EPSPS 基因扩增。根据对草甘膦敏感性的不同, 来自生物体的 EPSPS 可以被分成两类: I 型和 II 型。几乎所有植物和许多革兰氏阴性细菌 (如大肠杆菌 *Escherichia coli* 和沙门氏菌 *Salmonella typhimurium*) 的 EPSPS 对草甘膦非常敏感, 属于 I 型。从天然草甘膦抗性微生物 (如农杆菌

*Agrobacterium* sp. CP4、无色杆菌 *Achromobacter* sp. LBAA、假单胞菌 *Pseudomonas* sp. PG2982)和一些革兰氏阳性细菌(如金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*)中分离的 EPSPS 则属于 II 型,对草甘膦的抗性非常强。根据最新的 EPSPS 三维晶体结构解析草甘膦与 I 型 EPSPS(PDB:1g6s)和 II 型(PDB:2gga)EPSPS 相互作用的分子模型发现,EPSPS 的活性位点高度保守,2 种 EPSPS 仅有几个氨基酸位点存在差异<sup>[38-39]</sup>。I 型 EPSPS 多肽序列的 96、97、101 和 106 位氨基酸的突变会对草甘膦产生较高抗性,受单核编码基因控制<sup>[18]</sup>。Stalker 等发现草甘膦抗性沙门氏菌的 EPSPS 发生了点突变,101 位脯氨酸被丝氨酸取代(Pro101Ser)。而大肠杆菌 EPSPS 的 97 位甘氨酸被丙氨酸取代(Gly97Ala)可对草甘膦产生 500 倍抗性<sup>[18]</sup>。抗草甘膦的硬直黑麦草不同种群的 EPSPS 的 106 位脯氨酸有 2 种不同突变,被苏氨酸或丙氨酸取代(Pro106Thr/Ala)<sup>[41-42]</sup>。牛筋草 *E. indica* 之所以对草甘膦的抗性提高了 8~12 倍,在于其 EPSPS 的编码基因发生了变化,使第 106 位脯氨酸变成了丝氨酸或苏氨酸(Pro106Ser/Thr)<sup>[43-44]</sup>。来自智利果园的多花黑麦草 *L. multiflorum* 由于 EPSPS 的 106 位脯氨酸被丝氨酸取代(Pro106Ser),对草甘膦敏感性变差<sup>[45]</sup>。研究发现,与脯氨酸不同的是,丝氨酸、苏氨酸含有极性基团—羟基,具有亲水性。随着氨基酸种类的改变,EPSPS 的结构和功能发生变化,从而使其与底物的亲和力增加,导致草甘膦无法再占据 PEP 结合位点,植物因此形成对草甘膦的抗性<sup>[37,46]</sup>。Kaundun 等指出,除了 Pro106Ser/Thr/Ala/Leu 突变外,EPSPS 的 106 位脯氨酸的其他突变也会产生草甘膦抗性<sup>[47]</sup>。最近,Mao 等发现 3 种百合科植物麦冬 *Ophiopogon japonicus*、山麦冬 *Liriope spicata* 和阔叶山麦冬 *L. platyphylla* 对草甘膦有较强的抗性,它们的 EPSPS 基因和氨基酸序列同已知 I 型 EPSPS 存在明显差异,而且其突变位点不在已有专利的保护范围里,属新型抗性基因<sup>[48]</sup>。

基于靶点抗性的第二种机制是 EPSPS 基因的扩增。早期,当科学家们企图利用组织培养方法筛选抗草甘膦植物时发现,矮牵牛、烟草、胡萝卜、大豆和紫花苜蓿抗性细胞系的 EPSPS 基因拷贝数至少增加了 20 倍。但是,其抗性在后代的遗传具有非常高的不确定性。因此,科学家不得不放弃用这种策

略来培育抗草甘膦植物,并认为这种抗性机制不可能在田间发生<sup>[18,49-50]</sup>。然而,Gaines 等在研究草甘膦抗性长芒苋 *A. palmeri* 时发现,抗性和敏感型植株的 EPSPS 对草甘膦都非常敏感,没有明显差异。但抗性植株的 EPSPS 基因拷贝数增加了 100 倍,导致 EPSPS 表达量增加了 40 倍。EPSPS 基因的表达量、蛋白的增加水平与基因组中 EPSPS 基因的拷贝数呈正相关。来自荧光原位杂交(FISH)证据进一步显示,每条染色体上均存在 EPSPS 基因。可见,EPSPS 基因的扩增不可能是由染色体的不均等交换引起的。长芒苋的这种扩增特性在后代是可以遗传的,并符合拟 F<sub>2</sub> 群体的抗性<sup>[35,50-53]</sup>。而且,这种抗性机制可以部分传递给近缘种刺苋 *A. spinosus*<sup>[54]</sup>。最近,EPSPS 基因扩增引起草甘膦抗性的产生在意大利黑麦草 *L. perenne* ssp. *multiflorum*<sup>[55]</sup>、糙果苋 *A. tuberculatus*<sup>[56-57]</sup>、地肤 *Kochia scoparia*<sup>[58-59]</sup> 和牛筋草 *E. indica*<sup>[60]</sup> 中也相继被确认。今天,靶基因 EPSPS 扩增已成为一类普遍的草甘膦抗性机制<sup>[37]</sup>。

### 3.2 非靶点抗性机制

草甘膦的非靶点抗性机制主要包括吸收障碍、传导受阻、屏蔽作用或隔离作用、氧化代谢和其他解毒代谢作用。

①吸收障碍。草甘膦主要通过植物叶片表皮组织被快速吸收而进入体内,这可能和植物细胞内存在特殊的草甘膦载体有关<sup>[61]</sup>。与敏感性相比,除草剂抗性生物型植物可能具有不同的叶表面超微结构和组织解剖结构特征,如叶面积减小、蜡质层增厚、表皮气孔数减少等,因而造成对除草剂吸收的减少。最近有研究表明叶片吸收量减少是假高粱 *S. halepense* 和硬直黑麦草对草甘膦产生抗性的原因之一,且这种抗性机制容易受温度的影响<sup>[62-63]</sup>。

②传导受阻。草甘膦通过植物叶片吸收后,伴随光合产物蔗糖的运输通过韧皮部运到分生组织,这对草甘膦发挥毒性至关重要<sup>[1]</sup>。然而,草甘膦传导到韧皮部的生化和分子机制仍不清楚。推测可能是先通过扩散或渗透作用进入叶肉细胞,然后通过胞间连丝运动到木质部或韧皮部。一旦进入筛管,草甘膦独特的化学结构和特性使它能顺利传导到分生组织<sup>[18]</sup>。因此,降低草甘膦向分生组织的传导能够增加植物的抗性。Lorraine-Colwill 等发现一个抗草甘膦生物型硬直黑麦草 EPSPS 序列与敏感生物型

的完全相同,叶片对草甘膦的吸收也没有明显不同<sup>[64]</sup>。两者之间最大的差异是草甘膦在体内的传导速度不同,敏感型体内的草甘膦汇聚在植物的根部,而抗性生物型体内的草甘膦则汇聚在叶尖<sup>[65]</sup>。随后,同样的抗性机制在几个草甘膦抗性假高粱生物型中也得到证实<sup>[1,62]</sup>。

③屏蔽作用或隔离作用。指的是在除草剂到达作用靶点前被固定在植物组织或细胞内某个特殊区域,从而“失去”毒性。Ge 等利用<sup>31</sup>P 核磁共振(NMR)技术研究草甘膦在细胞内的分布时发现,草甘膦快速在液泡中隔离是小蓬草 *Conyza canadensis* 和澳大利亚黑麦草 *Lolium* spp. 产生抗性的主要原因<sup>[66-69]</sup>。分子证据表明,液泡膜相关蛋白如 ATP 结合盒(ABC)转运蛋白和液泡膜内在蛋白(TIP)可能参入了这种抗性机制的形成<sup>[37,69]</sup>。

④氧化代谢。在植物体内除草剂的氧化作用是非常普遍的,常是导致除草剂解毒或活化的主要代谢反应。在草甘膦氧化酶(GOX)的作用下,草甘膦氧化产生磷酸和肌氨酸,或者形成氨甲基磷酸(AMPA)和乙醛酸,从而失去除草活性<sup>[70]</sup>。在转基因油菜中就成功应用了 GOX 来增加对草甘膦的抗性<sup>[6,71]</sup>。最近,一个来自黄素蛋白家族的氨基乙酸氧化酶(GO)也被证实能够将草甘膦氧化成 AMPA 和乙醛酸,但是代谢途径和 GOX 有所不同<sup>[37,39,72]</sup>。

⑤其他解毒代谢作用。2004 年,Castle 和他的合作者从土壤微生物地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis* 体内分离到一种草甘膦 *N*-乙酰转移酶(GAT),该酶能有效地将草甘膦乙酰化生成无细胞毒性的 *N*-乙酰草甘膦。转入 *gat* 基因的大肠杆菌、拟南芥、烟草和玉米对草甘膦有明显的抗性。这个发现为转基因抗草甘膦植物的开发提供了一个全新的思路<sup>[39,73-75]</sup>。此外,细胞色素 P450s 能通过羟基化或脱烷基化来代谢乙酰辅酶 A 羧化酶(ACCCase)、乙酰乳酸合成酶(ALS)和光系统II(PSII)抑制剂类除草剂,达到解除细胞毒性的目的<sup>[76]</sup>。谷胱甘肽转移酶(GSTs)也被证明参入了除草剂的解毒代谢过程<sup>[77-78]</sup>。目前,对细胞色素 P450s 和 GSTs 解除除草剂毒性的分子机制仍然知之甚少,在草甘膦抗性植物中还没有关于此类抗性机制的报道。不过,越来越多的研究表明在自然界中任何抗性机制都是可能发生的<sup>[35]</sup>。

事实上,非靶点抗性机制比靶点抗性机制更为普遍,容易产生更高的抗性水平,而且不同植物间

抗性机制存在差异,有些植物还具有多抗性机制。非靶点抗性机制已成为当前除草剂抗性研究的前沿问题<sup>[1]</sup>。

#### 4 草甘膦抗性基因的研究现状及展望

将草甘膦抗性基因通过生物技术手段转入作物中培养的抗草甘膦转基因作物,已经成为目前全球播种面积最大的转基因作物。但抗草甘膦基因(5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合成酶 EPSPS)的核心技术和产业化应用的绝大部分专利由孟山都、拜耳、先锋、先正达、巴斯夫等跨国公司拥有<sup>[79]</sup>。更严峻的事实是,这些跨国公司一直通过对基因序列进行小范围改动和修饰的手段对其核心专利进行延长保护,使其变为“新”专利,从而有效规避所谓的“20 年专利使用期”,试图达到独占这些功能基因和转化技术的目的。根据中国农业部的统计,EPSPS 基因已在 50 多个国家和地区被授予 140 多件专利(截止到 2013 年),而且,近几年申请数量仍在迅速增加。其中,中国已获得 14 件 EPSPS 基因专利授权,位于美国、法国之后。但是,我们的专利总量仍然较少,保护范围也太窄。并且我们多数专利都是建立在国外核心专利的基础之上,如果想要使转基因产业化,国外掌握的“专利使用权”是一道绕不过去的坎。因此,加强除草剂作用机理和植物抗性机制的研究、发掘新的具有完全自主知识产权的除草剂抗性基因资源,对于推动我国杂草科学进步和保障农业生产安全具有十分重要的意义。我国是草甘膦生产和应用大国,从 20 世纪 80 年代开始,草甘膦在我国的茶园、桑园、果园得到了广泛使用。目前,我国正处在农业现代化和实现社会可持续发展的重要时期,经济、高效、环保型除草剂的推广和应用是其中的关键技术环节。如果转基因抗草甘膦作物在我国被批准商业化,草甘膦在我国将有着良好的发展前景和巨大的产业潜力。

20 年来,由于转基因抗草甘膦作物的成功商业化应用而使草甘膦一跃成为全球最主要的除草剂品种。同时,关于草甘膦抗性的研究也已成为国际上植物科学和杂草科学研究的热点之一。我国对草甘膦抗性的研究才刚起步。因此,在生产实践中发掘新的抗草甘膦材料,全面、系统地阐明其对草甘膦产生抗性的机制具有重要的理论和现实意义。一方面,草甘膦抗性机制的阐明有助于我们对基础植物

生化过程和植物对有毒化学物质防卫机制的理解;另一方面,为将来克服杂草抗性的发生和杂草的科学管理提供坚实的理论依据;同时,具有完全自主知识产权抗性新基因的发掘,将为开发抗草甘膦转基因植物提供新的研究思路和方法。

## 参考文献

- [1] Powles S B, Yu Q. Evolution in action: plants resistant to herbicide [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2010, 61: 317 - 347.
- [2] Duke S O, Powles S B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide [J]. *Pest Management Science*, 2008, 64(4): 319 - 325.
- [3] Prado J R, Segers G, Voelker T, et al. Genetically engineered crops: from idea to product [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2014, 65: 769 - 790.
- [4] Baylis A D. Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects [J]. *Pest Management Science*, 2000, 56(4): 299 - 308.
- [5] Roberts F, Roberts C W, Johnson J J, et al. Evidence for the shikimate pathway in apicomplexan parasites [J]. *Nature*, 1998, 393: 801 - 805.
- [6] Dill G M. Glyphosate-resistant crops: history, status and future [J]. *Pest Management Science*, 2005, 61(3): 219 - 224.
- [7] Ozturk L, Yazici A, Eker S, et al. Glyphosate inhibition of ferric reductase activity in iron deficient sunflower roots [J]. *New Phytologist*, 2008, 177(4): 899 - 906.
- [8] Vivancos P D, Driscoll S P, Bulman C A, et al. Perturbations of amino acid metabolism associated with glyphosate-dependent inhibition of shikimic acid metabolism affect cellular redox homeostasis and alter the abundance of proteins involved in photosynthesis and photorespiration [J]. *Plant Physiology*, 2011, 157(1): 256 - 268.
- [9] Gomes M P, Smedbol E, Chalifour A, et al. Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(17): 4691 - 4703.
- [10] Geiger D R, Kapitan S W, Tucci M A. Glyphosate inhibits photosynthesis and allocation of carbon to starch in sugar beet leaves [J]. *Plant Physiology*, 1986, 82(2): 468 - 472.
- [11] Servaites J C, Tucci M A, Geiger D R. Glyphosate effects on carbon assimilation, ribulose biphosphate carboxylase activity, and metabolite levels in sugar beet leaves [J]. *Plant Physiology*, 1987, 85(2): 370 - 374.
- [12] Olesen C F, Cedergreen N. Glyphosate uncouples gas exchange and chlorophyll fluorescence [J]. *Pest Management Science*, 2010, 66(5): 536 - 542.
- [13] Reddy K N, Ding Wei, Zablotowicz R M, et al. Biological responses to glyphosate drift from aerial application in non-glyphosate resistant corn [J]. *Pest Management Science*, 2010, 66(10): 1148 - 1154.
- [14] Zobiolo L H S, Kremer R J, de Oliveira Jr. R S, et al. Glyphosate effects on photosynthesis, nutrient accumulation, and nodulation in glyphosate-resistant soybean [J]. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2012, 175(2): 319 - 330.
- [15] Foley M E, Nafziger E D, Wax L M, et al. Effect of glyphosate on protein and nucleic acid synthesis and ATP levels in common cocklebur (*Xanthium pensylvanicum*) root tissue [J]. *Weed Science*, 1983, 31(1): 76 - 80.
- [16] Green J M. Current state of herbicides in herbicide-resistant crops [J]. *Pest Management Science*, 2014, 70(9): 1351 - 1357.
- [17] Heap I. The International survey of herbicide resistant weeds [EB/OL]. [2016 - 03 - 24]. [http://www. weedscience. org](http://www.weedscience.org).
- [18] Shaner D L, Lindenmeyer R B, Ostlie M H. What have the mechanisms of resistance to glyphosate taught us? [J]. *Pest Management Science*, 2012, 68(1): 3 - 9.
- [19] Pratley J, Baines P, Eberbach P. Glyphosate resistance in annual ryegrass [C]//The Grassland Society of NSW. Proceeding of the 11th Annual Conference of the Grassland Society of NSW. Australia; 1996: 122.
- [20] Powles S B, Lorraine-Colwill D F, Dellow J J, et al. Evolved resistance to glyphosate in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) in Australia [J]. *Weed Science*, 1998, 46(5): 604 - 607.
- [21] Tran M, Baerson S, Brinker R, et al. Characterization of glyphosate resistant *Eleusine indica* biotypes from Malaysia [C]//The Asian-Pacific Weed Science Society. Proceeding of the 17th Asia-Pacific Weed Science Society Conference. Bangkok, Thailand, 1999: 527 - 536.
- [22] Perez A, Kogan M. Glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* in Chilean orchards [J]. *Weed Research*, 2003, 43(1): 12 - 19.
- [23] Vangessel M J. Glyphosate-resistant horseweed from Delaware [J]. *Weed Science*, 2001, 49(6): 703 - 705.
- [24] Cairns A L P, Eckstein F H. Glyphosate resistance in *Lolium rigidum* (Gaud.) in South Africa [C]. Proceedings of resistance 2001, UK: IACR-Rothamsted, 2001: 1 - 4.
- [25] Simarmata M, Kaufmann J E, Penner D. Progress in determining the origin of the glyphosate-resistant ryegrass in California [C]//NC Weed Science Society of America. The 41st Meeting. Greensboro, 2001: 95.
- [26] Nandula V K, Reddy K N, Duke S O, et al. Glyphosate-resistant weeds: current status and future outlook [J]. *Outlooks on Pest Management*, 2005, 16(4): 183 - 187.
- [27] Culpepper A S, Grey T L, Vengill W K. Glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) confirmed in Georgia [J]. *Weed Science*, 2006, 54(4): 620 - 626.
- [28] Qiang S, Song X, Wu Jiajun. Horseweed (*Conyza canadensis*) has evolved in glyphosate resistance in China [J/OL]. *Resistant Pest Management Newsletter*, 2006, 16: 1.
- [29] Vila-Aiub M M, Balbi M C, Gundel P E, et al. Evolution of

- glyphosate-resistant johnsongrass (*Sorghum halepense*) in glyphosate-resistant soybean [J]. *Weed Science*, 2007, 55(6): 566-571.
- [30] de Carvalho L B, Cruz-Hipolito H, González-Torralva F, et al. Detection of sourgrass (*Digitaria insularis*) biotypes resistant to glyphosate in Brazil [J]. *Weed Science*, 2011, 59(2): 171-176.
- [31] Storrie A, Cook T, Boutsalis P, et al. Glyphosate resistance in awnless barnyard grass link and its implications for Australian farming systems [C]//Proceedings of the 16th Australian Weeds Conference North Queensland, Australia, 2008: 74-76.
- [32] 张朝贤, 倪汉文, 魏守辉, 等. 杂草抗药性研究进展 [J]. *中国农业科学*, 2009, 42(4): 1274-1289
- [33] 强胜, 宋小玲, 戴伟民. 抗除草剂转基因作物面临的机遇与挑战及其发展策略 [J]. *农业生物技术学报*, 2010, 18(1): 114-125.
- [34] 张猛, 刘延, 张朝贤, 等. 田旋花对草甘膦的耐药性机制 [J]. *植物保护学报*, 2011, 38(6): 551-556.
- [35] Powles S B. Gene amplification delivers glyphosate-resistant weed evolution [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(3): 955-956.
- [36] Busi R, Vila-Aiub M M, Beckie H J, et al. Herbicide-resistant weeds: from research and knowledge to future needs [J]. *Evolutionary Applications*, 2013, 6(8): 1218-1221.
- [37] Sammons R D, Gaines T A. Glyphosate resistance: state of knowledge [J]. *Pest Management Science*, 2014, 70(9): 1367-1377.
- [38] Funke T, Han H, Healy-Fried M L, et al. Molecular basis for the herbicide resistance of roundup ready crops [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(35): 13010-13015.
- [39] Pollegioni L, Schonbrunn E, Siehl D. Molecular basis of glyphosate resistance-different approaches through protein engineering [J]. *FEBS Journal*, 2011, 278(16): 2753-2766.
- [40] Stalker D M, Hiatt W R, Comai L. A single amino acid substitution in the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase confers resistance to the herbicide glyphosate [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1985, 260(8): 4721-4728.
- [41] Wakelin A M, Preston C. A target-site mutation is present in a glyphosate-resistant *Lolium rigidum* population [J]. *Weed Research*, 2006, 46(5): 432-440.
- [42] Yu Qin, Cairns A, Powles S B. Glyphosate, paraquat and AC-Case multiple herbicide resistance evolved in a *Lolium rigidum* biotype [J]. *Planta*, 2007, 225(2): 499-513.
- [43] Baerson S R, Rodriguez D J, Tran M, et al. Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase [J]. *Plant Physiology*, 2002, 129(3): 1265-1275.
- [44] Ng C H, Wickneswari R, Salmijah S, et al. Gene polymorphisms in glyphosate-resistant and susceptible biotypes of *Eleusine indica* from Malaysia [J]. *Weed Research*, 2003, 43(2): 108-115.
- [45] Perez-Jones, Park K W, Polge N, et al. Investigating the mechanisms of glyphosate in *Lolium multiflorum* [J]. *Planta*, 2007, 226(2): 395-404.
- [46] Ng C H, Wickneswary R, Salmijah S, et al. Glyphosate resistant in *Eleusine indica* from different origins and polymerase chain reaction amplification of specific alleles [J]. *Australian Journal of Agricultural Research*, 2004, 55(4): 407-414.
- [47] Kaundun S S, Dale R P, Zelaya I A, et al. A Novel P106L mutation in EPSPS and an unknown mechanism(s) act additively to confer resistance to glyphosate in a South African *Lolium rigidum* population [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(7): 3227-3233.
- [48] Mao Chanjuan, Xie Hongjie, Chen Shiguo, et al. Multiple mechanism confers natural tolerance of three lilyturf species to glyphosate [J]. *Planta*, 2016, 243(2): 321-335.
- [49] Daniell H, Datta R, Varma S, et al. Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome [J]. *Nature Biotechnology*, 1998, 16(4): 345-348.
- [50] Gaines T A, Zhang Wenli, Wang Dafu, et al. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(3): 1029-1034.
- [51] Gaines T A, Shaner D L, Ward S M, et al. Mechanism of resistance of evolved glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(11): 5886-5889.
- [52] Mohseni-Moghadam M, Schroeder J, Ashigh J. Mechanism of resistance and inheritance in glyphosate resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) populations from New Mexico, USA [J]. *Weed Science*, 2013, 61(4): 517-525.
- [53] Ribeiro D N, Pan Zhiqiang, Duke S O, et al. Involvement of facultative apomixis in inheritance of EPSPS gene amplification in glyphosate-resistant *Amaranthus palmeri* [J]. *Planta*, 2014, 239(1): 199-212.
- [54] Nandula V K, Wright A A, Bond J A, et al. EPSPS amplification in glyphosate-resistant spiny amaranth (*Amaranthus spinosus*): a case of gene transfer via interspecific hybridization from glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) [J]. *Pest Management Science*, 2014, 70(12): 1902-1909.
- [55] Salas R A, Dayan F E, Pan Zhiqiang, et al. EPSPS gene amplification in glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium perenne* ssp. *multiflorum*) from Arkansas [J]. *Pest Management Science*, 2012, 68(9): 1223-1230.
- [56] Lorentz L, Gaines T A, Nissen S J, et al. Characterization of glyphosate resistance in *Amaranthus tuberculatus* populations [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(32): 8134-8142.
- [57] Chatham L A, Bradley K W, Kruger G R, et al. A multistate study of the association between glyphosate resistance and EPSPS gene amplification in waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) [J]. *Weed Science*, 2015, 63(3): 569-577.

- [58] Jugulam M, Niehues K, Godar A S, et al. Tandem amplification of a chromosomal segment harboring 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase locus confers glyphosate resistance in *Kochia scoparia* [J]. *Plant Physiology*, 2014, 166(3): 1200 - 1207.
- [59] Wiersma A T, Gaines T A, Preston C, et al. Gene amplification of 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase in glyphosate-resistant *Kochia scoparia* [J]. *Planta*, 2015, 241(2): 463 - 474.
- [60] Chen Jingchao, Huang Hongjuan, Zhang Chaoxian, et al. Mutations and amplification of *EPSPS* gene confer resistance to glyphosate in goosegrass (*Eleusine indica*) [J]. *Planta*, 2015, 242(4): 859 - 868.
- [61] Preston C, Wakelin A M. Resistance to glyphosate from altered herbicide translocation patterns [J]. *Pest Management Science*, 2008, 64(4): 372 - 376.
- [62] Vila-Aiub M M, Balbi M C, Distéfano A J, et al. Glyphosate resistance in perennial *Sorghum halepense* (Johnsongrass), endowed by reduced glyphosate translocation and leaf uptake [J]. *Pest Management Science*, 2012, 68(3): 430 - 436.
- [63] Vila-Aiub M M, Gundel P E, Yu Qin, et al. Glyphosate resistance in *Sorghum halepense* and *Lolium rigidum* is reduced at suboptimal growing temperatures [J]. *Pest Management Science*, 2013, 69(2): 228 - 232.
- [64] Lorraine-Colwill D F, Powles S B, Hawkes T R, et al. Investigations into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum* [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2003, 74(2): 62 - 72.
- [65] Yu Qin, Abdallah I, Han H P, et al. Distinct non-target site mechanisms endow resistance to glyphosate, ACCase and ALS-inhibiting herbicides in multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum* [J]. *Planta*, 2009, 230(4): 713 - 723.
- [66] Ge Xia, d'Avignon D A, Ackerman J J H, et al. Rapid vacuolar sequestration; the horseweed glyphosate resistance mechanism [J]. *Pest Management Science*, 2010, 66(4): 345 - 348.
- [67] Ge Xia, d'Avignon D A, Ackerman J J H, et al. Glyphosate-resistant horseweed made sensitive to glyphosate; low-temperature suppression of glyphosate vacuolar sequestration revealed by  $^{31}\text{P}$  NMR [J]. *Pest Management Science*, 2011, 67(10): 1215 - 1221.
- [68] Ge Xia, d'Avignon D A, Ackerman J J H, et al. Vacuolar glyphosate-sequestration correlates with glyphosate resistance in ryegrass (*Lolium* spp.) from Australia, South America, and Europe; a  $^{31}\text{P}$  NMR investigation [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(5): 1243 - 1250.
- [69] Ge Xia, d'Avignon D A, Ackerman J J H, et al. In vivo  $^{31}\text{P}$ -nuclear magnetic resonance studies of glyphosate uptake, vacuolar sequestration, and tonoplast pump activity in glyphosate-resistant horseweed [J]. *Plant Physiology*, 2014, 166(3): 1255 - 1268.
- [70] Duke S O. Glyphosate degradation in glyphosate-resistant and susceptible crops and weeds [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(11): 5835 - 5841.
- [71] Barry G F, Kishore G A. Glyphosate tolerant plants. US, NO. 5463175 [P]. 1995.
- [72] Job V, Marcone G L, Pilone M S, et al. Glycine oxidase from *Bacillus subtilis* characterization of a new flavoprotein [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(9): 6985 - 6993.
- [73] Castle L A, Siehl D L, Gorton R, et al. Discovery and directed evolution of a glyphosate tolerance gene [J]. *Science*, 2004, 304(5674): 1151 - 1154.
- [74] Stokstad E. A new tack on herbicide resistance [J]. *Science*, 2004, 304(5674): 1089.
- [75] Siehl D L, Castle L A, Gorton R, et al. The molecular basis of glyphosate resistance by an optimized microbial acetyltransferase [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(15): 11446 - 11455.
- [76] Kreuz K, Tommasini R, Martinoia E. Old enzymes for a new job. Herbicide detoxification in plants [J]. *Plant Physiology*, 1996, 111(2): 349 - 353.
- [77] Riechers D E, Kreuz K, Zhang Qin. Detoxification without intoxication; herbicide safeners activate plant defense gene expression [J]. *Plant Physiology*, 2010, 153(1): 3 - 13.
- [78] Gao Yue, Tao Bo, Qiu Lijuan, et al. Role of physiological mechanisms and *EPSPS* gene expression in glyphosate resistance in wild soybeans (*Glycine soja*) [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2014, 109(2): 6 - 11.
- [79] 宋敏, 刘丽军, 苏颖异, 等. 抗草甘膦 *EPSPS* 基因的专利保护分析 [J]. *中国生物工程杂志*, 2010, 30(2): 147 - 152.

(责任编辑: 田 喆)