

# 固殺草(Glufosinate)誘導水稻微芽分化及其衍生植株耐性之研究<sup>1</sup>

林訓仕<sup>2</sup>、王慶裕<sup>3</sup>、周煒裕<sup>3</sup>、蕭巧玲<sup>4</sup>

## 摘 要

固殺草為非選擇性除草劑，可控制多數闊葉雜草。本試驗以TNG67、FSK、Koshihikari、R11-2及R11-3等五個品系水稻為材料，於培養基中添加不同濃度固殺草，觀察能否誘導微芽大量生成，結果顯示，上述水稻幼芽經 $2.5 \times 10^{-7}$  M固殺草培養基培養14天後，繼代至 $2.5 \times 10^{-6}$  M固殺草培養基中30天後發現，R11-2及R11-3有較佳之微芽誘導效果，分別可產生216及120個微芽。試驗將兩階段誘導衍生之植株移植溫室，藉由噴施 $2.6 \times 10^{-4}$  M固殺草，探討其對固殺草耐感性表現，結果顯示，衍生植株在葉綠素及銨累積反應上，具有耐感差異；為探討此耐感差異產生之原因，試驗進一步利用<sup>14</sup>C-glufosinate處理植株，經TLC分析及<sup>14</sup>C同位素放射活性測定，發現在葉綠素及銨累積反應上為耐性之植株，其固殺草代謝物占同位素放射總量顯著高於感性植株，因此，推測微芽衍生植株對固殺草耐感性差異為其代謝能力所致。

**關鍵字：**水稻、固殺草、微芽分化。

## 前 言

1994年初，德國Hoechst 及Schering兩家公司共同組成之農化公司AgrEvo研發出之固殺草(glufosinate)除草劑，其銨鹽形式為ammonium *DL*-homoalanin-4-yl (methyl) phosphinate (IUPAC)，為非選擇性萌後接觸型除草劑，可控制多數的一年生禾草和闊葉雜草，主要針對果園、蔬菜田及不整地玉米田之雜草防除<sup>(21)</sup>。

固殺草為有機磷化合物，拜耳(Bayer)公司製造之百試達(Basta)，為水藍色液體，含有13.5%之有效成分。一般土壤對固殺草的吸附力弱，故淋洗較強，且可快速被微生物分解成不具植物毒性的3-methylphosphinopropionic acid (MPPA-3)<sup>(16,18)</sup>，在土壤中的半衰期約為5~10天，其毒性極低，對成鼠的口服急毒性半致死劑量(LD<sub>50</sub>)為2,000 mg/kg。目前臺灣市售之固殺草登記用於香蕉、木瓜等果園，胡瓜、洋香瓜等蔬菜田及非耕地之雜草防除，於雜草生長旺盛至開花前使用<sup>(1)</sup>。

<sup>1</sup>行政院農業委員會臺中區農業改良場研究報告第0772號。

<sup>2</sup>行政院農業委員會臺中區農業改良場技佐。

<sup>3</sup>國立中興大學農藝系教授、退休講師。

<sup>4</sup>行政院農業委員會農業試驗所作物組助理研究員。

固殺草之作用機制主要是抑制植體中glutamine synthetase (GS; EC 6.3.1.2)酵素活性<sup>(9)</sup>，因為固殺草係一類似glutamate的化合物，會與glutamate競爭GS的作用位置<sup>(10)</sup>。GS分別存在於細胞質及葉綠體中，是催化氮素代謝的必要酵素，其可將glutamate與銨基結合形成glutamine，酵素受到抑制時會造成銨的累積。例如狐尾草(green foxtail; *Setaria viridis*)施用固殺草後葉片上的銨量會增加100倍以上<sup>(14,21)</sup>。通常在噴施固殺草3至5天內會有傷害徵狀出現，尤其在光照下銨累積更明顯增加，過量的銨會造成細胞膜崩解、抑制光合作用及導致植株死亡<sup>(2,19)</sup>。

Toldi *et al.*以水稻為材料，利用glufosinate ammonium (phosphinothricin, PPT)誘導產生微芽(microshoot)，並移植至溫室噴施固殺草，發現經PPT誘導所產生之植株對固殺草有耐性的表現，而未經PPT誘導產生之植株，則全部黃化死亡<sup>(17)</sup>；此外，亦發現溫室所產生的對照組R1種子，於含有3.5 mg/L PPT的培養基中，沒有種子發芽，然而經過PPT誘導的小苗，其產生的R1種子則有78.4%的發芽率。Pornprom *et al.*以大豆幼苗胚軸細胞為材料，利用漸進提高glufosinate濃度方法之懸浮培養，發現也能獲得對glufosinate具耐性之植株<sup>(13)</sup>。

植物能將L-glufosinate經轉胺基作用生成中間代謝物2-oxo-4-(hydroxymethylphosphinyl)butanoic acid (PPO)，PPO會快速地經去羧化(decarboxylated)生成穩定的代謝物3-(hydroxymethylphosphinyl)propionic acid (MPP)<sup>(5)</sup>；PPO也可由另一途徑還原成少量的2-hydroxy-4-(hydroxymethylphosphinyl)butanoic acid (MHB)，MHB在細胞培養中可代謝成4-(hydroxymethylphosphinyl)butanoic acid (MPB)。Jansen *et al.*調查20種植物的切離根及葉部對固殺草的代謝，發現此20種植物其主要代謝物均為MPP (佔2.4~18.8%)，其中有14種植物具有少量的MHB (0.2~9.6%)，但未偵測到中間產物PPO<sup>(7)</sup>。Pline *et al.*利用TLC分析耐性藜草、決明子(sicklepod; *Cassia obtusifolia*)、馬利筋(milkweed; *Asclepias syriaca* L.)和感性大狗尾草(bauhinia; *Setaria viridis* L.)對固殺草的代謝作用，發現感性植株並無代謝物產生，而耐性藜草則有固殺草的代謝物MPP<sup>(12)</sup>，顯然此試驗中有些耐性雜草可能具有代謝固殺草的能力，而減少傷害程度。

本試驗以5個不同水稻材料，包括臺農67號(TNG 67)、富士光(FSK)、越光(Koshihikari)，以及臺農67號突變體R11-2及R11-3為材料，利用低濃度固殺草誘導水稻產生微芽，觀察不同水稻材料誘導微芽產生之表現，並進一步探討微芽衍生植株對固殺草之耐感性表現及作用機制。

## 材料與方法

### 一、試驗材料

本試驗採用TNG 67、FSK及Koshihikari 水稻品種，及行政院農業委員會農業試驗所分子遺傳研究室提供，經疊氮化鈉( $\text{NaN}_3$ )誘變TNG67獲得之R11-2及R11-3為試驗材料。試驗中使用之固殺草，為拜耳作物科學股份有限公司生產之商品13.5%百試達溶液。本試驗添加至培養基之濃度分別為0、 $2.5 \times 10^{-9}$ 、 $2.5 \times 10^{-8}$ 、 $2.5 \times 10^{-7}$ 、 $2.5 \times 10^{-6}$ M等5種。

## 二、水稻微芽誘導效果之建立－第一階段

水稻種子在脫殼後，先經70%之乙醇震盪清洗1分鐘，共2次，再利用2%及1%之次氯酸鈉(sodium hypochlorite)各震盪10分鐘，然後經無菌水沖洗3次後，將種子的胚朝上，種至含有MS固態培養基的試管中，將種子埋入培養基中約5 mm，待其發芽達5~8 mm時(約3~5天)，從子葉盤處將芽切下，移植至分別含有0、 $2.5 \times 10^{-9}$ 、 $2.5 \times 10^{-8}$ 、 $2.5 \times 10^{-7}$ 、 $2.5 \times 10^{-6}$  M固殺草但不含荷爾蒙的培養基中，每試管種植4顆芽，在培養3、7及14天後調查生長反應，包括株高、發根與否、葉片傷害指數，以及微芽誘導效果。

### 1. 培養基配置

無菌播種培養基主要為MS培養基，並添加30 g/L蔗糖，再以1 N KOH將pH值調至5.7後，再添加2 g/L活性碳(charcoal)及6.5 g/L agar gel。配製完成後分裝至每支試管7.5 ml，放入121°C、 $1.25 \text{ kg/cm}^2$ 滅菌釜滅菌20分鐘，完成後取出試管直立，待其冷卻凝固備用。

### 2. 生長及微芽誘導效果之調查

將水稻幼芽移植至含不同濃度固殺草之MS培養基後3、7及14天，分別調查株高、發根狀況及微芽誘導效果，株高為試管中水稻小苗地上部高度，發根狀況則以小苗根系產生與否為依據，微芽誘導效果則是調查水稻小苗是否有新的分蘖產生。

### 3. 水稻傷害指數等級之建立

傷害指數(injury index)之調查是水稻小苗在處理含有5種不同濃度glufosinate之培養基後，分別於3、7及14天時觀察小苗外表傷害變化，並分級記錄其傷害程度。本研究根據小苗枯黃、捲曲、壞疽及褪綠等不同程度之傷害，訂定五種不同指數植之傷害，其中0代表水稻幼苗鮮綠健康未發生藥害，5代表植株已完全死亡<sup>(3)</sup>。

## 三、誘導效果之建立-第二階段(繼代培養)

將第一階段培養14天之水稻小苗在距離基部8 mm處切下，繼代至含有 $2.5 \times 10^{-6}$  M固殺草培養基中，在第14及30天調查生長反應及微芽誘導效果。之後將水稻微芽從距離基部8 mm處切下，再次繼代至MS培養基中培養14天後，分株分群移至穴盤，並在生長箱中生長7天，接著移植至溫室，作後續之幼苗測試及收穫種子。

## 四、固殺草誘導產生之微芽對除草劑之耐性變異

### 1. 傷害指數

將試管誘導產生之微芽所培育長成之水稻植株移植至溫室，待其生長兩週後，噴施 $7.5 \times 10^{-4}$  M固殺草，調查第7、14及21天葉片之傷害指數，每個水稻材料皆以傷害指數為依據，挑選出耐感植株各4株。

### 2. 鉍累積量

水稻材料於溫室中經由噴施固殺草篩選之結果，挑選出耐感植株各4株，並以TNG 67為對照組進行鉍累積測定。待水稻幼苗生長至分蘖期時，取植株之完全展開葉之葉片片段(約1 cm)放至培養皿中，培養皿中加入5 ml、 $2.6 \times 10^{-4}$  M固殺草溶液，24 hr後分析鉍累積量。

分析方法仿D'Halluin *et al.*之方法<sup>(4)</sup>經部份修改而成，秤取上述剪下之葉片重量，加入少許海砂及適量液態氮將組織磨碎，加入500  $\mu\text{l}$ 內含25 mg PVPP (polyvinyl polypyrrolidone) 之水溶液在冰浴狀態下均質，之後吸取300  $\mu\text{l}$ 研磨液至離心管中，在4 $^{\circ}\text{C}$ 、12,000 g下離心15秒。之後取100  $\mu\text{l}$ 澄清液加300  $\mu\text{l}$ 蒸餾水稀釋，震盪均勻後再從中取30  $\mu\text{l}$ ，加入100  $\mu\text{l}$ 試劑A [內含5 g 酚(phenol)、25 mg 硝普化鈉(sodium nitroprusside)、500 ml蒸餾水和100  $\mu\text{l}$ 試劑B [內含2.5 g NaOH、1.6 ml次氯酸鈉(sodium hypochlorite, 含13%可利用氯)、500 ml蒸餾水，將混合液置在37 $^{\circ}\text{C}$ 下15分鐘，利用ELISA reader 在630 nm波長下讀取吸光值。分析中以0.1~2.0  $\mu\text{g}$   $\text{NH}_4^+\text{-N}$  (3.82 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$  = 1 g  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ )濃度範圍內之 $\text{NH}_4\text{Cl}$ ，作出標準檢量線並估計樣品中銨的含量。

### 3. 葉綠素含量

待水稻幼苗長至分蘗期時，取植株之完全展開葉之葉片片段(約1 cm)於處理固殺草前，利用portable chlorophyll meter (SPAD-502, Minolta Co. Ltd)測試葉片片段之葉綠素色度，接著將葉片片段置入培養皿中，並加入5 ml、 $2.6 \times 10^{-4}$  M固殺草溶液於底部濾紙上，24 hr後再將葉片片段取出以吸水紙吸乾其表面水分，再次測試葉片片段之葉綠素色度，觀察在固殺草處理24 hr下，水稻葉片片段葉綠素之下降比例。

## 五、微芽衍生植株耐固殺草之機制

本試驗利用耐感性差異幅度最大的富士光衍生植株，配合對照組TNG 67，施用10  $\mu\text{l}$   $^{14}\text{C}$ -glufosinate (2,000 Bq/ $\mu\text{l}$ )(內含0.1% Tween-20)，均勻塗抹於水稻植株完全展開葉之中段1 cm葉片上。水稻葉片在處理24 hr後取樣，處理片段先以1 ml蒸餾水洗去外表未吸附之 $^{14}\text{C}$ -glufosinate，之後將葉片處理片段剪碎後，加入少許液態氮研磨後，加入2 ml 甲醇均質萃取，濾液放入離心管中於90 $^{\circ}\text{C}$ 下靜置5分鐘以沉澱蛋白，於13,000 g下離心5分鐘，取其澄清液以真空濃縮機(Model Speed Vac SC 200, Savant Instruments, Inc., 110-103 Bi-County Blvd., Farmingdale, NY 11735)濃縮至乾，再以80%乙醇定量至200  $\mu\text{l}$ 。分析時取植株萃取濃縮液5  $\mu\text{l}$ 及1  $\mu\text{l}$   $^{14}\text{C}$ -glufosinate與其代謝物 $^{14}\text{C}$ -3-(hydroxymethylphosphinyl) propionic acid (MPP)點在TLC (Thin layer chromatography)平板上(Silicagel, 60A. LK6F-254 EM reagents TLC plates, Whatman Lab sales, Inc., Hillsboro, OR 97124)之後置入展開槽中，展開槽內的展開液為isopropyl alcohol : acetic acid :  $\text{H}_2\text{O}$  (2:1:1, v/v/v)混合液，約展開7 hr後取出風乾，之後將TLC平板和X-ray底片(BioMax<sup>TM</sup> MS, Eastman Kodak)共同壓片，利用自動放射顯影術，經5天後可以在TLC平板上顯現 $^{14}\text{C}$ 標定之固殺草及其代謝物，並計算其Rf值<sup>(12)</sup>。

測定 $^{14}\text{C}$ 同位素放射活性時，先將TLC平板上不同Rf值之固殺草及其代謝物，以小刀刮下加入1 ml 甲醇震盪混合，於室溫下靜置18 hr後於18,000 g離心5分鐘，將澄清液放入閃爍計數瓶(6 ml, min poly-Q<sup>TM</sup> vial, Beckman Co. Ltd)，再加入5 ml cocktail solution (Ready safe<sup>TM</sup>, Beckman Co. Ltd)於室溫下經48 hr充分反應後，以閃爍計數儀(Liquid scintillation counter; LS-6000 IC, Beckman Co. Ltd.)測定 $^{14}\text{C}$ 同位素放射活性。

## 結果與討論

### 一、固殺草對水稻微芽誘導效果之比較

為抑制水稻小苗生長，促進微芽產生，試驗以TNG67、FSK、Koshihikari、R11-2及R11-3等5個水稻為材料，於誘導系統第一階段培養基中添加 $2.5 \times 10^{-6}$  M固殺草，處理3天後，地上部生長抑制達45~73%，第7天，地上部抑制情形已達81~89%，且以FSK最高，其次為Koshihikari與R11-2，第14天地上部抑制情形則以FSK及R11-2最嚴重，達91及92%；在傷害指數方面，Koshihikari、R11-2及R11-3於第7天時達1.2至1.4，第14天時越趨嚴重，達1.8至2.5；試管中幼苗發根情形則與地上部生長抑制有相同趨勢，其中以第14天Koshihikari發根率最差，僅餘65% (表一)；綜合上述試驗發現，誘導系統第一階段處理 $2.5 \times 10^{-6}$  M固殺草可顯著抑制試管中水稻小苗生長及發根率，且造成不同程度的藥劑傷害，但因未有微芽產生，於是試驗將上述小苗皆繼代至 $2.5 \times 10^{-6}$  M固殺草的培養基中，進行第二階段誘導，觀察後續是否能有微芽產生。

表一、萌芽3天後的5個水稻材料幼芽移植至含有濃度 $2.5 \times 10^{-6}$  M固殺草培養基中，其生長抑制表現

Table 1. Comparison of the effect of glufosinate ( $2.5 \times 10^{-6}$  M) in culture medium on the growth inhibition of buds excised from 3-day-old germinating seeds of rice among five rice plants

Day after treatment	Genotype	Injury index (0-5)	Shoot length		Rooting (%)
			(mm)	(% of control)	
3	TNG 67	0.0	19.5	55	100
	FSK	0.0	7.3	26	63
	Koshihikari	0.4	7.1	27	37
	R11-2	0.0	7.2	28	88
	R11-3	0.0	10.1	33	100
	LSD <sub>0.05</sub>	NS <sup>1</sup>	2.0	8	18
7	TNG 67	0.1	18.1	19	100
	FSK	0.1	10.0	11	88
	Koshihikari	1.3	8.8	12	63
	R11-2	1.2	10.1	12	88
	R11-3	1.4	16.0	18	100
	LSD <sub>0.05</sub>	0.9	1.5	4	11
14	TNG 67	0.3	19.1	16	100
	FSK	0.3	11.0	9	90
	Koshihikari	2.5	10.8	12	65
	R11-2	2.1	10.0	8	90
	R11-3	1.8	18.0	15	100
	LSD <sub>0.05</sub>	0.2	2.3	2	12

<sup>1</sup> NS means non-significant.

試驗將TNG67、FSK、Koshihikari、R11-2及R11-3等5個水稻材料第一階段培養至14天之小苗在距離基部8 mm處切下，將根完全切除並繼代至含有 $2.5 \times 10^{-6}$  M固殺草培養基中，觀察其微芽誘導效果。根據表二顯示，經第二階段誘導14天後，除FSK以外，其餘品系皆已有微芽產生，其中R11-2與R11-3有較佳之微芽誘導效果，分別有108及96個微芽產生，微芽產生率為62~64%，經第二階段誘導30天後，5個水稻品系皆有微芽產生，其中以R11-2有最佳的微芽誘導效果，約有216個微芽產生，微芽產生率約78%，且其母株存活率達100%，誘導效果最差為FSK，僅有12個微芽產生，母株存活率僅17% (表二)，圖一即顯示此5品系水稻經第二階段誘導30天後之微芽誘導效果。Toldi *et al.*以水稻為材料，發現以2 mg/L PPT有最佳的微芽誘導分化效果，然而本試驗所用之固殺草濃度較該研究為低，但仍能有效地促進微芽誘導產生<sup>(17)</sup>。

表二、經兩階段固殺草處理之水稻幼芽，於第二階段第 14 及 30 天的微芽誘導效果

Table 2. Effect of glufosinate applied at two incubation stages on the subsequent production of microshoots derived from excised buds of 3-day germinating seeds of rice. Data were recorded 14 and 30 days after treatment, respectively, at stage II

Genotype	No. of tested plantlet <sup>1</sup>	Survived plantlet		Newly-formed microshoot produced from survived plantlet		
		(No)	(%)	(No)	(%)	
14 DAT <sup>2</sup>	TNG 67	60	60	100	42	41
	FSK	60	60	100	0	0
	Koshihikari	60	60	100	48	17
	R11-2	60	60	100	108	64
	R11-3	60	60	100	96	62
LSD <sub>0.05</sub>	NS <sup>3</sup>	NS	NS	19	612	
30 DAT	TNG 67	60	60	100	72	55
	FSK	60	60	100	12	17
	Koshihikari	60	60	100	90	60
	R11-2	60	60	100	216	78
	R11-3	60	60	95	120	68
LSD 0.05	NS	NS	NS	38	10	

<sup>1</sup> Excised plantlets obtained at the end of stage I were treated with  $2.5 \times 10^{-7}$  M glufosinate at stage II.

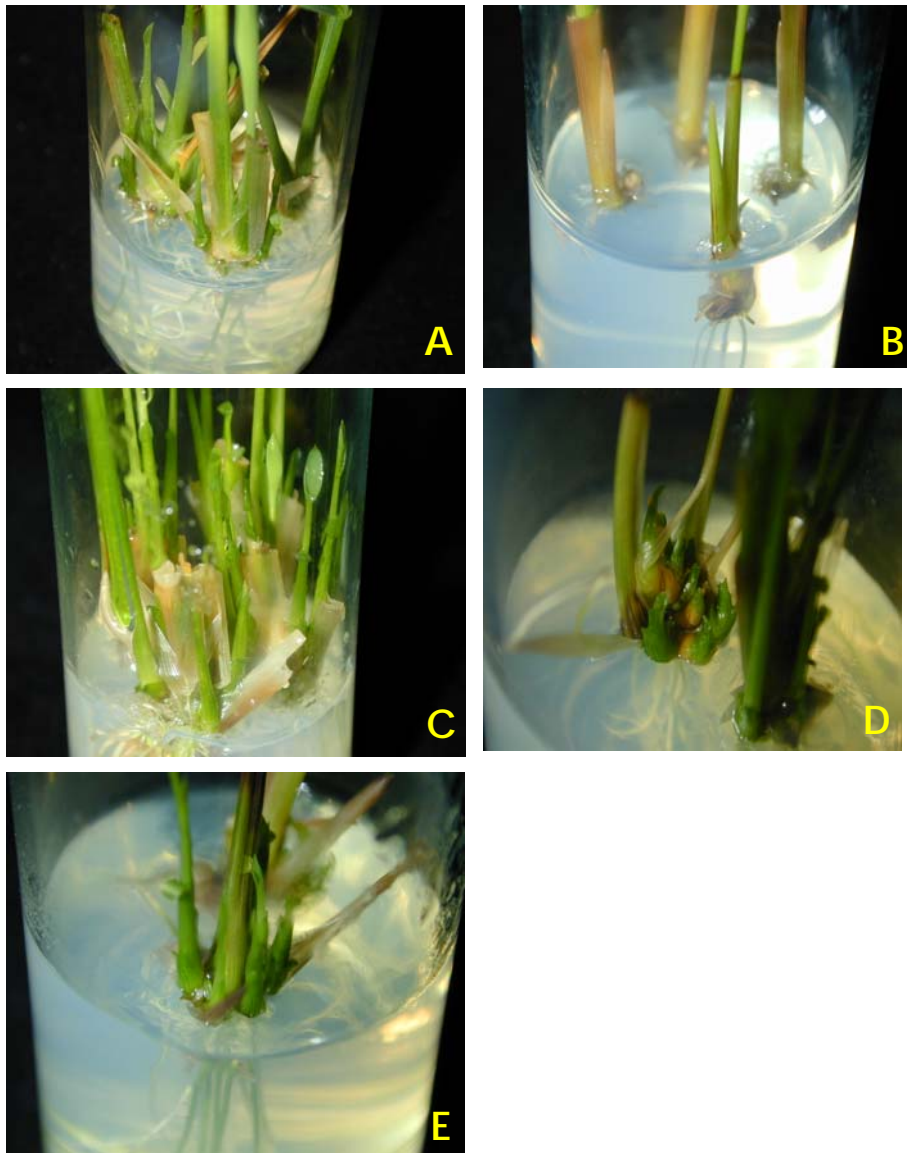
<sup>2</sup> Days after treatment.

<sup>3</sup> NS means non-significant.

## 二、固殺草誘導產生之微芽其衍生植株對固殺草之耐性變異

試管誘導產生之水稻植株歷經馴化、移植及噴施固殺草篩選耐感植株後，置於溫室中待植株恢復生長，俟植株生育至分蘖期，取其完全展開葉之葉片片段(約1 cm長)放至培養皿中，處理5 ml、 $2.6 \times 10^{-4}$  M固殺草24 hr，分析其銨累積及葉綠素含量，結果顯示，經固殺草處理之

5品系水稻耐感植株葉片，其葉綠素相對對照組皆呈下降趨勢，且以感性R11-2下降比例最高，達26.2%；在銨累積上，則以感性TNG67累積量最高，達8.2 mg/g.Fw；試驗同時發現，TNG67、FSK、R11-2感性植株在銨累積量及葉綠素下降比例中，皆顯著高於其耐性植株，Koshihikari及R11-3雖未達顯著差異，但仍具感性植株高於耐性植株之相同趨勢(表三)，由此得知，經固殺草誘導可產生不同耐感性植株，且其葉綠素及銨累積反應亦與其耐感性表現有相同趨勢。



圖一、經第一階段  $2.5 \times 10^{-7}$  M 及第二階段  $2.5 \times 10^{-6}$  M 固殺草處理 30 天後之水稻(A)臺農 67 號、(B)富士光、(C)越光、(D) R11-2 及(E) R11-3 微芽誘導表現

Fig. 1. Microshoot production of rice, (A) TNG 67, (B) FSK, (C) Koshihikari, (D) R11-2, and (E) R11-3, respectively, 30 days after  $2.5 \times 10^{-6}$  M glufosinate treatment at stage II. Five sets of rice plants were pretreated with  $2.5 \times 10^{-7}$  M glufosinate at stage I.

表三、微芽誘導分化產生之水稻植株之分蘗期葉片片段經  $2.6 \times 10^{-4}$  M 固殺草處理 24 hr 後，其銨累積及葉綠素下降之表現

Table 3. Chlorophyll reduction and ammonium accumulation in leaf segment of 5 rice plants, 24 h after  $2.6 \times 10^{-4}$  M glufosinate treatment. Leaf segment was sampled at tillering stage of microshoot-derived rice plants

	Microshoot-derived plant <sup>1</sup>	Chlorophyll index <sup>2</sup>			Ammonium (mg/g.Fw)
		Control	Glufosinate	% of control	
Tolerant	TNG67	41.4	33.2	80.3	6.5
	FSK	41.5	36.9	88.8	3.5
	Koshihikari	23.3	21.7	93.0	1.7
	R11-2	39.2	32.1	82.0	4.0
	R11-3	41.9	39.4	94.0	2.8
Sensitive	TNG67	41.6	30.9	74.3	8.2
	FSK	41.8	32.6	77.8	5.4
	Koshihikari	22.8	20.1	89.0	2.2
	R11-2	41.0	30.2	73.8	5.0
	R11-3	43.5	40.0	92.0	3.3
LSD <sub>0.05</sub>		4.0	4.03	5.1	0.9

<sup>1</sup> Microshoot-derived plants were selected from the both extremes (T&S) of the frequency distribution of injury index in rice seedlings caused by glufosinate.

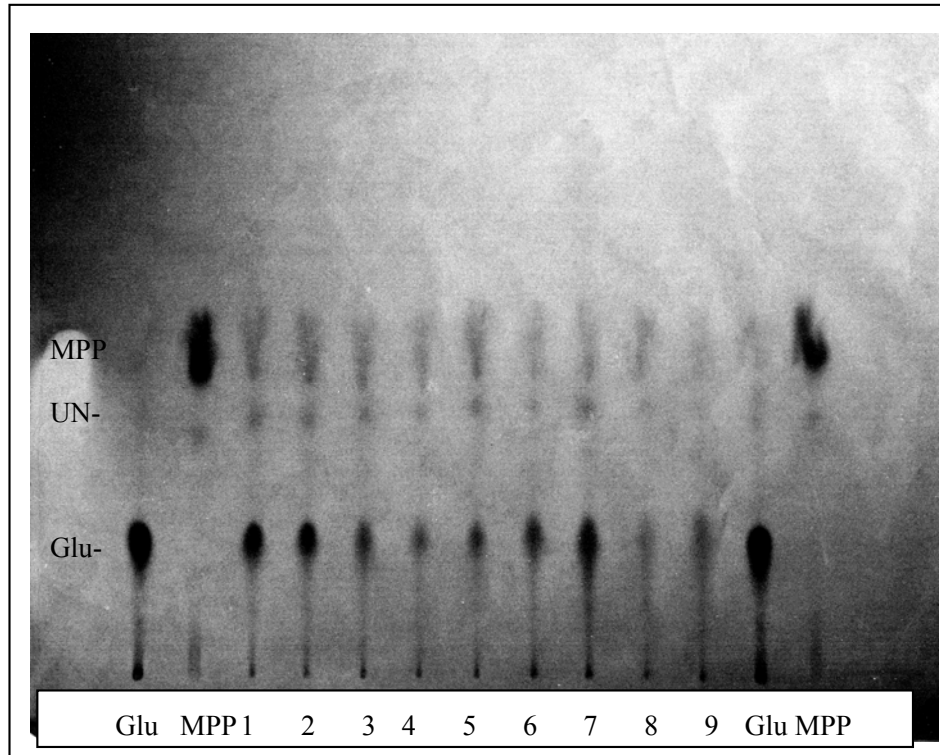
<sup>2</sup> Chlorophyll index was measured by using portable chlorophyll meter.

### 三、微芽衍生植株對固殺草耐性變異之可能原因

試驗以經噴施  $7.5 \times 10^{-4}$  M 固殺草，並配合傷害指數篩選出之耐性 FSK 與感性 FSK 及對照組 TNG 67 植株為材料，利用  $10 \mu\text{l}$   $^{14}\text{C}$ -glufosinate (2,000 Bq/ $\mu\text{l}$ ) (內含 0.1% Tween-20) 標定處理，在處理 24 hr 後取樣洗去外部未吸收之除草劑，將植株萃取液濃縮點在 TLC 平板上，約展開 7~8 hr 後取出風乾，風乾後將含有  $^{14}\text{C}$ -glufosinate 之 TLC 平板和 X-ray 的底片共同壓片，利用自動放射顯影，經 5 天後可顯現  $^{14}\text{C}$ -glufosinate (Rf: 0.20)、unknown metabolite (Rf: 0.34) 及其代謝物 MPP (Rf: 0.55) 之位置(圖二)。由圖二得知，耐感性品系均有代謝物 MPP 生成，但無法由圖判斷其含量，因此，試驗進一步取下此 3 種成分，利用液態閃爍計數儀分析平板上固殺草、未知代謝物及固殺草代謝物的放射活性，以確認造成耐感性差異的原因是否與代謝有關。

本試驗將 TLC 平板上固殺草、固殺草未知代謝物及其代謝物刮下，以甲醇溶解後離心，取其上層液以閃爍計數瓶收集，加入 cocktail solution 反應後，以液態閃爍計數儀測定  $^{14}\text{C}$  同位素放射活性。試驗結果發現，耐感性植株對固殺草皆具有代謝能力，但在耐性 FSK 植株所測得之固殺草代謝物佔同位素放射總活性 46%，顯著大於感性 FSK 植株所測得之固殺草代謝物 20%，由此推測耐性 FSK 與感性 FSK 對固殺草之耐感差異原因，可能與其對固殺草代謝活性的差異有關(表四)。





圖二、<sup>14</sup>C-固殺草(Glu; Rf: 0.20)、未知代謝物(UN; Rf: 0.34)及固殺草代謝物(MPP; Rf: 0.55)之薄層色層分析及放射自動顯影表現。參試樣品萃取自經 <sup>14</sup>C-固殺草標定後之耐性富士光(1-3)、感性富士光(4-6)及對照品種臺農 67 號(7~9)葉片。

Fig. 2. Autoradiography, coupled with TLC separation, of the <sup>14</sup>C-glufosinate (Glu; Rf: 0.20), unknown metabolite (UN; Rf: 0.34) and its metabolite (MPP; Rf: 0.55). Samples were extracted from <sup>14</sup>C-glufosinate treated rice included the tolerant FSK (1-3), sensitive FSK (4-6) and control line TNG 67 (7-9), respectively, 24 h after treatment.

表四、分蘖期 FSK 葉片經 <sup>14</sup>C-固殺草處理 24 hr 後其代謝產物之表現

Table 4. Metabolism of <sup>14</sup>C-glufosinate in 24 h in leaves of rice plants at tillering stage

	<sup>14</sup> C-Radioactivity						
	Total	Glufosinate (Rf: 0.20)		Unknown metabolite (Rf: 0.34)		MPP (Rf: 0.55)	
	(dpm)	(dpm)	(%)	(dpm)	(%)	(dpm)	(%)
Tolerant FSK	2133	559	26	588	28	986	46
Sensitive FSK	1748	1143	66	247	14	358	20
TNG 67	1807	927	51	344	19	537	30
LSD <sub>0.05</sub>		364	24	271	12	397	13

有關固殺草代謝與耐性之間的關係，Jansen *et al.* 調查20種植物切離根及葉部對固殺草的代謝能力，其中篷子菜(yellow bedstraw; *Galium verum*)的代謝量最高，但其傷害徵狀最為嚴重；而代謝量最小的反枝莧(redroot pigweed; *Amaranth retroflexus* L.)，其植物毒害反而輕微<sup>(7)</sup>。另外，Skora Neto *et al.* 分析蒼耳、牽牛花和白竹仔菜三種感性雜草對固殺草的代謝能力，結果發現不論是處理葉片或根部，三種敏感性不同的雜草皆無代謝物生成<sup>(15)</sup>。Kumaratilake *et al.* 及Mersey *et al.* 發現大麥及黑麥田中難以控制之雜草如牛筋草(goose grass; *Eleusine indica*)及馬唐草(large crabgrass; *Digitaria sanguinalis*)，對固殺草具有較低轉運能力但具較高代謝能力之特性<sup>(8,11)</sup>；在Everman *et al.* 探討經基因轉殖之抗固殺草玉米、牛筋草、馬唐草及決明子(Sicklepod; *Senna obtusifolia*)對固殺草吸收、轉運、代謝表現上亦發現，雜草對固殺草代謝能力在其抗性表現上扮演很重要的角色<sup>(6)</sup>。至於Pline *et al.* 分析耐感雜草發現，感性植株並無代謝物產生，而在耐性藜草則有固殺草代謝物MPP<sup>(12)</sup>。顯然，本試驗與上述研究有類似結果，發現耐性FSK對固殺草具有較佳代謝能力。

## 參考文獻

1. 費雯綺、王喻其、陳富翔、林曉民、李貽華 2010 植物保護手冊 行政院農業委員會農業藥物試驗所編印 臺中，臺灣。
2. Bellinder, R. R., R. E. Lyons, S. E. Scheckler and H. P. Wilson. 1987. Cellular alterations resulting from foliar applications of HOE-39866. *Weed Sci.* 35: 27-35.
3. Bradshaw, L. D., M. Barrett and C. G. Poneleit. 1994. Inheritance of bentazon susceptibility in a corn (*Zea mays*) line. *Weed Sci.* 42: 641-647.
4. D'Halluin, K., M. DeBlock, J. Janssens, J. Leemans, A. Reynaerts and J. Botterman. 1992. The *bar* gene as a selectable marker in plant engineering. *Methods Enzymol.* 216: 415-441.
5. Droge, W., I. Broer and A. Puhler. 1992. Transgenic plants containing the phosphinothricin-*N*-acetyl-transferase gene metabolize the herbicide L-phosphinothricin (glufosinate) differently from untransformed plants. *Planta* 187: 142-151.
6. Everman, W. J., C. R. Mayhew, J. D. Burton, A. C. York and J. W. Wilcut. 2009. Absorption, translocation, and metabolism of <sup>14</sup>C-glufosinate in glufosinate-resistant corn, goosegrass (*Eleusine indica*), large crabgrass (*Digitaria sanguinalis*), and sicklepod (*Senna obtusifolia*). *Weed Sci.* 57: 1-5.
7. Jansen, C., I. Schuphan and B. Schmidt. 2000. Glufosinate metabolism in excised shoots and leaves of twenty plant species. *Weed Sci.* 48: 319-326.
8. Kumaratilake, A. R., D. F. Lorraine-Colwill and C. Preston. 2002. A comparative study of glufosinate efficacy in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) and sterile oat (*Avena sterilis*). *Weed Sci.* 50: 560-566.
9. Lea, P. J., K. W. Joy, J. L. Ramos and M. G. Guerrero. 1984. The action of the 2-amino-4-(methylphosphinyl)-butanoic acid (phosphinothricin) and its 2-oxo-derivative on the metabolism of cyanobacteria and higher plants. *Phytochemistry.* 23: 1-6.

10. Lea, P. J. and S. M. Ridley. 1989. Glutamine synthetase and its inhibition. In A. D. Dodge, ed. *Herbicides and plant metabolism* Cambridge: University Press, Soc. of Exp. Biol. Seminar Series 38. p.137-170.
11. Mersey, B. G., J. C. Hall, D. M. Anderson and C. J. Swanton. 1990. Factors affecting the herbicidal activity of glufosinate-ammonium: absorption, translocation, and metabolism in barley and green foxtail. *Pestic. Biochem. Physiol.* 37: 90-98.
12. Pline, W. A., J. Wu and K. K. Hatzios. 1999. Absorption, translocation, and metabolism of glufosinate in five weed species as influenced by ammonium sulfate and pelargonic acid. *Weed Sci.* 47: 636-643.
13. Pornprom, T., S. Surawattananon and P. Srinives. 2000. Ammonia accumulation as an index of glufosinate-tolerant soybean cell lines. *Pest. Biochem. Physiol.* 68: 102-106.
14. Shelp, B. J., C. J. Swanton, B. G. Mersey and J. C. Hall. 1991. Glufosinate (phosphinothricin) inhibition of nitrogen metabolism in barley and green foxtail plants. *J. Plant Physiol.* 139: 605-610.
15. Skora Neto, F., H. D. Coble and F. T. Corbin. 2000. Absorption, translocation, and metabolism of <sup>14</sup>C-glufosinate in *Xanthium strumarium*, *Commelina diffusa*, and *Ipomoea purpurea*. *Weed Sci.* 48: 171-175
16. Smith, A. E. 1989. Transformation of the herbicide [<sup>14</sup>C] glufosinate in soils. *J. Agric. Food Chem.* 37: 267-271.
17. Toldi, O., S. Toth, A. S. Oreifig, E. Kiss and B. Jenes. 2000. Production of phosphinothricin-tolerant rice (*Oryza Sativa* L.) through the application of phosphinothricin as growth regulator. *Plant Cell Rep.* 19: 1226-1231.
18. Ullrich, W. R., C. I. Ullrich-Eberius and H. Kocher. 1990. Uptake of glufosinate and concomitant membrane potential changes in *Lemna gibba* G1. *Pest. Biochem. Physiol.* 37: 1-11.
19. Wendler, C., M. Barniske and A. Wild. 1990. Effect of phosphinothricin (glufosinate) on photosynthesis and photorespiration of C3 and C4 plants. *Photosyn. Res.* 24: 55-61.
20. Wild, A. and C. Ziegler. 1987. The effect of bialaphos on ammonium-assimilation and photosynthesis. I. Effect on the enzymes of ammonium assimilation. *Z. Naturforsch.* 44: 263-269.
21. Wilson, H. P., T. E. Hines, R. R. Bellinder and J. A. Grande. 1985. Comparisons of HOE-39866, SC-0224, paraquat, and glyphosate in no-till corn (*Zea mays*). *Weed Sci.* 33: 531-536.

# Studies on Differentiation and Resistance Ability of the Glufosinate Induced Microshoot in Rice<sup>1</sup>

Hsun-Shih Lin<sup>2</sup>, Ching-Yuh Wang<sup>3</sup>, Wei-Yu Chou<sup>3</sup> and Chiao-Ling Hsiao<sup>4</sup>

## ABSTRACT

Glufosinate is a nonselective herbicide to control broadleaf weeds. In order to induce microshoot production of rice, different concentrations of glufosinate were applied in tissue culture of TNG67, FSK, Koshihikari, R11-2 and R11-3. The results showed that the best effect of microshoot induction was obtained from 14 days after treatment (DAT) of  $2.5 \times 10^{-7}$  M glufosinate at stage I and 30 DAT of  $2.5 \times 10^{-6}$  M glufosinate at stage II in both rice species R11-2 and R11-3. Based on the response of chlorophyll reduction and ammonium accumulation, microshoot-derived plants produced from this method expressed differential sensitivities to glufosinate in greenhouse experiment. Both TLC and <sup>14</sup>C-glufosinate radioactivity assay showed that glufosinate metabolism was increased in tolerant rice.

**Key words:** rice, glufosinate, microshoot differentiation.

---

<sup>1</sup> Contribution No. 0772 from Taichung DARES, COA.

<sup>2</sup> Assistant Specialist of Taichung DARES, COA.

<sup>3</sup> Professor and Former Lecturer of Department of Agronomy, National Chung-Hsing University.

<sup>4</sup> Assistant Researcher of Crop Division, TARI, COA.