

天然芸苔素内酯缓解胺苯磺隆对 后茬水稻药害的作用机理初探

周小毛^{1*}, 柏连阳¹, 刘雪源², 任新国¹,
李双祁³, 卜小莉¹, 黄柯程¹

(1 湖南农业大学 植物保护学院, 湖南 长沙 410128; 2 湖南农业科学院 植物保护研究所,
湖南 长沙 410125; 3 湖南农业大学 理学院, 湖南 长沙 410128)

摘要: 通过测定天然芸苔素内酯对水稻幼苗谷胱甘肽(GSH)含量、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)活性以及在离体和活体条件下对水稻幼苗乙酰乳酸合成酶(ALS)活力的影响, 研究天然芸苔素内酯减轻胺苯磺隆对水稻药害的作用机理。结果表明, 其作用机理与水稻幼苗 GSH 含量、GST 活性变化没有太大相关性, 可能与其能间接激活水稻幼苗 ALS 活力有较大相关。

关键词: 天然芸苔素内酯; 胺苯磺隆; 水稻; 谷胱甘肽(GSH); 谷胱甘肽-S-转移酶(GST); 乙酰乳酸合成酶(ALS)

中图分类号: S482.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-7303(2003)01-0061-07

胺苯磺隆(ethametsulfuron)是用于油菜田的磺酰脲类除草剂, 其作用靶标为乙酰乳酸合成酶(ALS)^[1]。胺苯磺隆具有以下优点: (1) 对油菜田现用除草剂不能防除的杂草[野田芥 *Nasturtium officinale* R. Br.、遏蓝菜 *Thlaspi arvense* L.、播娘蒿 *Descurainia sophia* (L.) Schur. 等]高效; (2) 有很高的选择性, 有效成分用量为 10~30 g/hm², 用量超过常用量的4倍对油菜亦很安全; (3) 杀草谱广, 对猪殃殃 *Galium aparine* L.、日本看麦娘 *Alopecurus japonicus* Steud. 有特效, 显示了对单子叶杂草的除草活性^[2]。但其最大缺点是在土壤中残留期长, 水稻对其敏感^[3,4], 1995年在江苏油菜田施用胺苯磺隆后, 其在土壤中残留使油菜的后茬作物水稻大面积受害。因此, 一旦发生药害, 如何及时采取有效措施解除药害, 挽回经济损失是一个值得研究的课题。

芸苔素内酯(brassinolide, BR)是一种甾醇类植物激素, 是于1979年首先从油菜花粉中被提取精制出来的, 故又称油菜素内酯。它具有促进生长, 提高植物抗逆性的作用。有关其能缓解除草剂药害方面的研究国内已有报道^[5], 但其作用机理尚未见文献报道。笔者探索性地在田间试验了其缓解胺苯磺隆对后茬水稻药害的作用, 结果表明, 其作用效果显著(另文发表)。通过室内土培法测定, 土壤中胺苯磺隆对水稻(新香优80)的安全临界浓度为 2.64 μg/kg, 用 BR 0.05~10 μg/L 浸种处理和土壤处理均可不同程度减轻土壤中残留的胺苯磺隆对水稻(新香优80)的药害(另文发表)。为进一步深入研究其缓解胺苯磺隆对水稻药害的作用, 笔者对其作用机理进行了初步探索。

作者简介: 周小毛(1972-), 男, 湖南安仁人, 助理研究员, 硕士, 主要从事农药药理学及天然产物农药研究
基金项目: 湖南农业大学青年科研基金资助项目

1 材料与方 法

1.1 供试药剂及试剂

25% 胺苯磺隆(ethametsulfuron)可湿性粉剂(湖南化工研究院提供); 0.15% 天然芸苔素内酯(brassinolide)水剂(皇嘉生化有限公司产品); 双(4-硝基-3-羧基苯)二硫化物(DTNB)、聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)、基质甲贮存液(10 nmol/L CDNB)、黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)、焦磷酸硫胺素(TPP)、牛血清白蛋白(BSA)、肌酸(以上均为 Sigma 公司产品); 3-羟基-2-丁酮(Aceto in)(Fluka 公司产品); 丙酮酸钠、 α -萘酚、考马斯亮蓝 G-250、HgCl₂、50 mg/g 三氯乙酸(TCA)、MgCl₂·6H₂O 及其他所用试剂均为国产分析纯; 试验用配制溶液(磷酸缓冲液、酶提取液、酶溶解液、酶反应液、50 mg/g α -萘酚溶液)按路凯等的方法^[2]配制。

1.2 供试水稻品种

新香优 80(湖南农业大学水稻科学研究所提供)。

1.3 试验方法

1.3.1 谷胱甘肽(GSH)含量及谷胱甘肽-S-转移酶(GST)活性测定的试材培养 在 13 cm × 8 cm × 5 cm 的塑料盒中装 200 g 风干过筛土,加 100 mL 药液分别配制成含以下药剂浓度的药土: (1)6.25 μ g/kg 胺苯磺隆; (2)12.5 μ g/kg 胺苯磺隆; (3)6.25 μ g/kg 胺苯磺隆+ 10 μ g/kg BR; (4)12.5 μ g/kg 胺苯磺隆+ 10 μ g/kg BR; (5)清水对照。每处理重复 3 次。水稻种子用 1 mg/g HgCl₂消毒 15 min, 28℃下清水浸泡 24 h, 30℃下催芽 12 h, 露白后播于塑料盒中, 每盒 42 粒, 置于 28℃的恒温光照培养箱中避光培养 6 d 后进行指标测定。

1.3.2 GSH 的提取和测定 取 0.5 g 黄化(避光培养,下同)的新鲜叶片前端 1.8 cm 部分放入研钵中,加入 3 mL 50 mg/g 的三氯乙酸,并加入少许石英砂快速研磨,再用 3 mL 50 mg/g 的三氯乙酸洗下研钵中的残留物,然后于 23 000 g、-4℃离心 10 min,取上清液参照文献^[6]方法,以 DTNB 显色,于 412 nm 波长测定 OD 值,以 GSH 作标准曲线。

1.3.3 GST 的提取及活性测定 取 0.5 g 黄化的新鲜叶片前端 1.8 cm 部分于液氮中速冻 24 h,加入 PVPP(质量浓度 0.5%)研磨后,再加入 7.5 mL 磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH = 6.8, 1 mmol/L sodium metabisulfite),搅拌过滤后于 20 000 g、-4℃离心 20 min,取上清液参照文献^[7]方法进行,加入 CDNB 反应,在 340 nm 吸收 90~120 s 测定 GST 的活性。

1.3.4 ALS 的提取^[2,8] 所有提取步骤均在冰浴 0~4℃下进行。将 50 g 水稻幼芽剪碎放入研钵中,加入 3 倍于水稻幼芽鲜重的酶提取液,加入少许石英砂快速研磨后,用 8 层纱布过滤,定容至 20 mL,然后于 25 000 g、4℃离心 20 min。取上清液慢慢加入 7.5 g (NH₄)₂SO₄ 粉末调至 50% 饱和度,0℃沉降 2 h 后,于 25 000 g、4℃离心 30 min,弃去上清液,沉淀溶于 15 mL 溶解液中。此酶溶解液是直接用于活力测定的酶液。

1.3.5 ALS 的活力测定^[2] 由于加入酶反应底物丙酮酸钠后,经过 ALS 催化反应生成的产物是乙酰乳酸,加入硫酸脱羧基后,生成 3-羟基-2-丁酮(Aceto in),所以可通过测量 Aceto in 的量来计算乙酰乳酸的量,即在含 Aceto in 的溶液中加入肌酸和溶于 NaOH 溶液的 α -萘酚进行显色反应,来测量 Aceto in 的量,从而计算 ALS 活力,单位表示为 nmol Aceto in · mg⁻¹ pro · h⁻¹,简化为 nmol · mg⁻¹ · h⁻¹。

取 0.4 mL 酶提取液,加入 0.1 mL、50 mmol/L 磷酸缓冲液,再加入 0.5 mL 反应液,摇匀后放于 35℃恒温水浴 15 min 进行脱羧反应;最后进行 Aceto in 的测量,依次加入 0.5 mL

5 mg/g肌酸和 0.5 mL 50 mg/g α-萘酚溶液(溶于 2.5 mol/L NaOH 溶液中), 60℃反应 15 min, 于 525 nm 处比色。试验平行测定 3 次。

1.3.6 蛋白质含量测定 采用考马斯亮蓝 G-250 法。

1.3.7 BR 对水稻幼苗ALS 的影响及解毒机制^[2]

1.3.7.1 离体试验方法 浸种至露白的种子放入培养皿中, 加入 50 mL 蒸馏水, 26℃避光培养 72 h 后, 再加 50 mL 蒸馏水, 避光培养 72 h, 剪断幼芽作为ALS 的提取样本, 进行ALS 提取和测定。在离体ALS 活力测定中, 将上述方法中磷酸缓冲液用 0.1 mL 不同浓度的BR、胺苯磺隆或二者混合液代替, 其他步骤同ALS 活力测定。求得酶活力百分率, 用浓度(X)-百分率(Y)作图, 或者以浓度(X)-酶活力(Y)作图来比较BR 对胺苯磺隆抑制ALS 的影响, 以及BR 对ALS 的作用。

1.3.7.2 活体试验方法 1)测量BR 对ALS 活力的影响: 用蒸馏水或者不同BR 浓度的溶液浸种至露白后放入培养皿, 加 50 mL 蒸馏水, 26℃避光培养 72 h 后, 再加50 mL 蒸馏水, 避光培养 72 h, 剪断幼芽作提取ALS 样本, ALS 提取和活力测定如上所述。2)测量BR 对胺苯磺隆抑制ALS 活力的影响: 将上述“再加 50 mL 蒸馏水”换成“再加 50 mL 不同浓度的胺苯磺隆药液”, 其他如上所述。

2 结果与分析

2.1 BR 和胺苯磺隆对水稻体内 GSH 含量及 GST 活性的影响

测定结果见图 1、图 2。

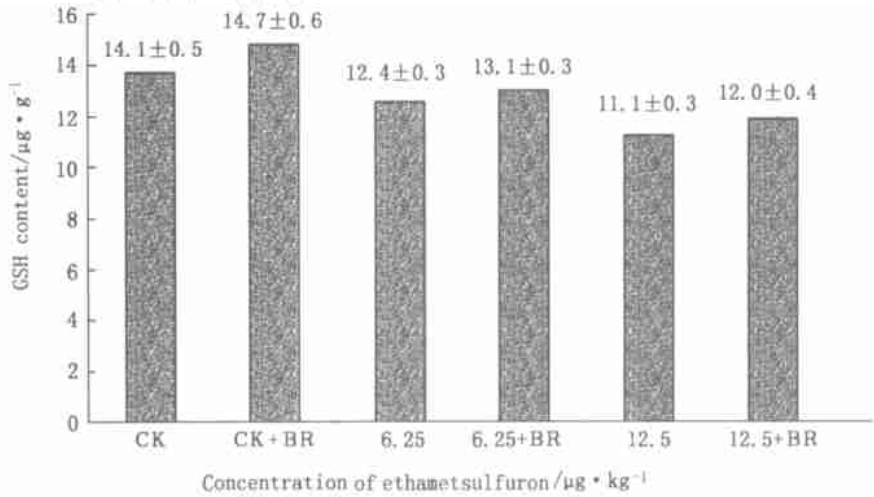


Fig 1 The effect of brassinolide (BR, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and ethametsulfuron on GSH content of rice

由图 1 可知, 胺苯磺隆对水稻叶片中 GSH 含量有一定影响。清水对照, 胺苯磺隆浓度分别为 6.25 和 12.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时, GSH 含量分别为 14.1、12.4、11.1 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。BR 对水稻体内 GSH 含量具有一定提高作用, 加入 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BR 后, 以上三处理 GSH 含量分别为 14.7、13.1、12.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

由图 2 可知, 胺苯磺隆对水稻叶片中 GST 活性影响较大, 清水对照时, 水稻叶片中 GST 活性为 221.8 $\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 当胺苯磺隆浓度为 6.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 其 GST 活性下降到 155.6 $\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 胺苯磺隆浓度为 12.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时, GST 活性下降到

138.0 mol · mg⁻¹ · min⁻¹; 而BR 对水稻 GST 活性提高作用不大。

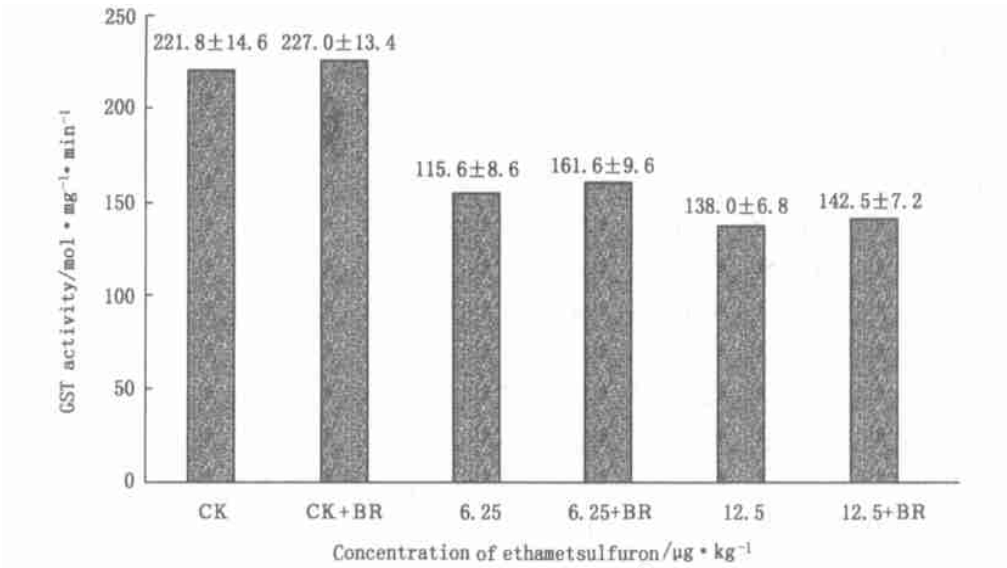


Fig 2 The effect of BR (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and ethametsulfuron on GST activity of rice

2 2 离体条件下 BR 和胺苯磺隆对水稻ALS 活力的影响

图 3 表明, 离体条件下, BR 各处理浓度对水稻幼苗ALS 的活力有影响, 但影响不大。表 1 中结果表明, 胺苯磺隆对水稻幼苗ALS 抑制作用强烈, 浓度越高, 抑制作用越强。BR 在 1 和 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 浓度下能在一定程度上减轻胺苯磺隆对ALS 的抑制作用, 但不明显。

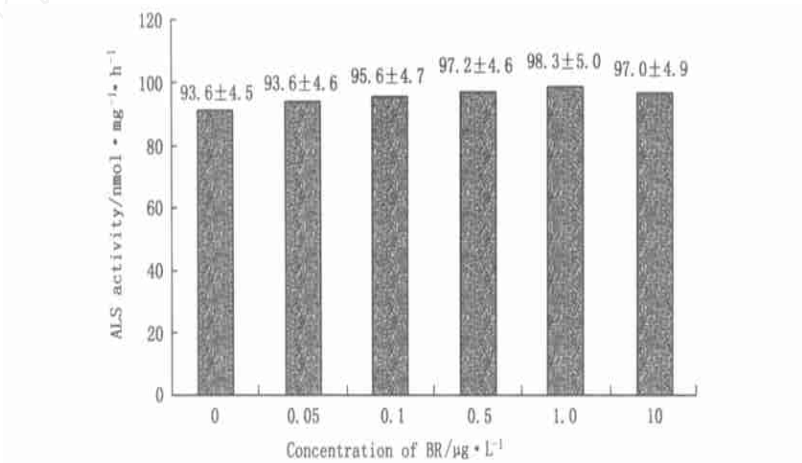


Fig 3 The effect of BR on ALS activity of rice *in vitro*

2 3 活体条件下 BR 和胺苯磺隆对水稻ALS 活力的影响

表 2 结果表明 在活体条件下, BR 能提高水稻幼苗ALS 活力, 当BR 浓度为 0.05、0.10、0.50、1.0 和 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 时, ALS 活力分别为 122.3、128.0、153.2、147.5 和 157.7 $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。活体条件下, 胺苯磺隆对水稻幼苗ALS 有一定抑制作用, 其浓度为 0.125、1.25、5.0、20 和 80 $\mu\text{g}/\text{L}$ 时, 水稻幼苗ALS 活力分别为 86.9、84.6、74.3、80.0 和 70.9 $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。而

当胺苯磺隆处理的同时加入BR, 能提高水稻幼苗的ALS 活力, 以上胺苯磺隆浓度范围内, 同时加入 0.5 $\mu\text{g/L}$ 的BR 处理, 其ALS 活力分别为 101.7、125.7、131.4、117.7 和 112.0 $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 。

Table 1 The effect of various ethametsulfuron concentrations on the ALS activity with 0, 1 and 10 $\mu\text{g/L}$ BR *in vitro**

Concentrations of ethametsulfuron/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	ALS activity/ $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$		
	BR 0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	BR 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	BR 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
0.125	89.2 a	92.3 a	89.5 a
1.25	79.2 ab	80.8 ab	79.0 ab
5.0	60.0 b	61.2 b	63.2 b
20.0	41.3 c	44.5 c	45.4 c
80.0	36.6 c	38.0 c	37.9 c

*Data mean of 3 duplications of different treatment and the data followed by the same signal are not significantly different ($P=0.05$, SSR test). The same as following table

Table 2 The effect of ethametsulfuron and BR on ALS specific activity of rice (*in vivo*)*

Treatment (conc) / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Aceto in / $\text{nmol}\cdot\text{h}^{-1}$	Protein /mg	Specific activity / $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	Percentage of specific activity (%)
CK	11604.6	101.5	114.3b	/
BR (0.05)	12768.2	104.4	122.3 ab	107
BR (0.1)	13428.9	104.9	128.0 ab	112
BR (0.5)	16909.1	110.4	153.2 a	134
BR (1)	16558.3	112.3	147.5 a	129
BR (10)	18801.9	119.2	157.7 a	138
ethametsulfuron (1.25)	8565.2	98.6	86.9 c	76
ethametsulfuron (2.5)	8289.0	98.0	84.6 c	74
ethametsulfuron (5.0)	6998.6	94.2	74.3 c	65
ethametsulfuron (20)	7520.9	94.0	80.0 c	70
ethametsulfuron (80)	6540.9	92.3	70.9 c	62
ethametsulfuron (0.125)+BR (0.5)	10091.3	99.2	101.7 b	89
ethametsulfuron (1.25)+BR (0.5)	13063.3	103.9	125.7 ab	110
ethametsulfuron (5.0)+BR (0.5)	14406.4	109.6	131.4 ab	115
ethametsulfuron (20)+BR (0.5)	11996.6	101.9	117.7 b	103
ethametsulfuron (80)+BR (0.5)	11145.4	99.5	112.0 b	98

3 讨论

GSH 是生物细胞中普遍存在的一种具有特殊功能的多肽, 在生物的许多代谢生理过程中

起到重要的生理作用。除草剂与谷胱甘肽的轭合反应是植物耐药性和除草剂选择性的主要原因之一,植物体内的 GST 可催化这种反应^[9]。某些物质(如除草剂安全剂)可以提高植物体内 GSH 含量和 GST 活性,促使除草剂与 GSH 轭合,从而解除除草剂对作物的伤害^[10]。

乙酰乳酸合成酶(ALS)是支链氨基酸(缬氨酸、亮氨酸与异亮氨酸)生物合成起始阶段的关键性酶,这种酶催化两分子丙酮酸或一分子丙酮酸与 α -丁酮酸缩合,分别形成乙酰乳酸或乙酰羟丁酸,进而通过一系列反应而形成缬氨酸、亮氨酸与异亮氨酸。研究证明,胺苯磺隆的作用机理是抑制 ALS 活性,造成支链氨基酸合成停止,从而影响蛋白质合成及植物生长^[11]。因此,反过来思考,如某物质能提高植物体 ALS 活性,可能会减轻甚至解除胺苯磺隆对植物的伤害。路凯、钱传范研究表明 NA 能间接激活 ALS 活性,从而减轻胺苯磺隆对水稻的药害^[2]。

本研究从水稻幼苗 GSH 含量、GST 活性、ALS 活力三方面对 BR 减轻胺苯磺隆对水稻药害的作用机理进行了初步探讨,结果表明,胺苯磺隆对水稻幼苗 GST 活性影响较大,对 GSH 含量影响不大,加入 BR 后,其 GST 活性、GSH 含量均有提高,但提高程度不大。

在离体条件下,胺苯磺隆对水稻幼苗 ALS 抑制作用强烈,加入 BR 后,能在一定程度上减轻胺苯磺隆对水稻幼苗 ALS 的抑制作用,但作用不显著。

在活体条件下,胺苯磺隆对水稻幼苗 ALS 有抑制作用,加入 BR 后,能较大幅度的提高水稻幼苗的 ALS 活力。

综上所述,笔者认为,根据本次试验,BR 减轻胺苯磺隆对水稻药害的作用机理与 GSH、GST 没有太大的相关性,可能与其能间接激活水稻幼苗 ALS 活力有较大相关。这尚需进一步进行研究。

参考文献:

- [1] 王焕民 磺酰脲类及咪唑啉酮类除草剂的特性及其应用问题 [J] 农药科学与管理, 1995(1): 18-21
- [2] 路凯, 钱传范 苯二甲酸酐减轻胺苯磺隆对水稻药害的作用机制 [J] 植物保护学报, 2000, 27(3): 268-272
- [3] 黄建中, 姜群峰, 叶建强 胺苯磺隆和灭草嗪对水稻及玉米幼苗生长的影响 [J] 杂草学报, 1995, 9(1): 38-42
- [4] 褚建君 胺苯磺隆在土壤中的残留和对后茬水稻安全性的影响 [J] 江苏农业科学, 1998(6): 32-35
- [5] 黄允才, 张格成, 胡光华 天然芸苔素内酯解除除草剂药害的作用 [J] 农药, 2000 39(6): 40-42
- [6] Istvan J K. Role of glutathione and glutathione S-transferase in the selectivity of acetochlor in maize and wheat [J] *Pestic Biochem and Physiol*, 1991(41): 221-231
- [7] John W G. Effect herbicide antidotes on glutathione content and glutathione S-transferase activity of Sorghum shoots [J] *Pestic Biochem and Physiol*, 1987(29): 66-76
- [8] 谭小平, 柏连阳, 肖启明, 等 水稻不同品种或组合对甲磺隆耐药性差异的机制研究 [J] 农药学报, 2002, 4(2): 45-49
- [9] Lamoureux G L. The role of glutathione and glutathione S-transferase in pesticide methabliism, selectivity and mode of action in plants and insects [J] *Pestic Biochem and Physiol*, 1991(25): 153-196
- [10] 姜林, 李正名 除草剂安全剂应用研究近况 [J] 农药学报, 1999, 1(2): 1-8
- [11] 苏少泉 除草剂作用靶标与新品种创制 [M] 北京: 化学工业出版社, 2001: 96-97

Studies on the Mechanism of Activity of Brassinolide for Reducing the Phytotoxicity of Ethametsulfuron on Rice

ZHOU Xiao-mao^{1*}, BA IL ian-yang¹, L IU Xue-yuan²,
REN Xin-guo¹, L I Shuang-qi³, BU Xiao-li, HUANG Ke-cheng¹

(1. College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2. Institute of Plant Protection, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, China;

3. College of Science, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: The mechanism of brassinolide reducing the phytotoxicity of ethametsulfuron to rice was studied through the experiments on the influence of brassinolide to rice glutathione (GSH) content, glutathione-S-transferase (GST) activity and acetolactate synthase (ALS) activity *in vitro* and *in vivo*. The results showed that it was not directly related to the GSH content and GST activity of rice but indirectly acted on the target enzyme of ALS.

Key words: brassinolide; ethametsulfuron; rice; glutathione (GSH); glutathione-S-transferase (GST); acetolactate synthase (ALS)

欢迎订阅 2003 年《农药学学报》

《农药学学报》于 1999 年 6 月创刊, 主要面向农药研究工作者、植保工作者及大专院校师生。旨在及时、全面报道农药学各分支学科有创造性的最新研究成果与综合评述, 是了解我国农药研究动态的园地。现设三个栏目: 综合评述、研究论文及研究简报。本刊已被列为“中国科学引文数据库扩展库的来源期刊”, 并入选了美国《化学文摘》“CA 千种表”, 同时还已被英国《国际农业与生物科学研究中心》(CABI) 及美国《剑桥科学文摘: 污染文摘》、《剑桥科学文摘: 水产与渔业文摘》等收录。

《农药学学报》为季刊, 16 开, 96 页, 彩色四封, 国内外公开发行。每期定价 15 元, 全年共 60 元。本刊已加入全国邮发报刊统一征订(邮发代号 2-949), 订户可查阅当年的《报刊简明目录》(北京报刊发行局出版), 并通过当地邮局统一订阅, 也可上中国报刊网(<http://www.china-bk.com>)查询。若有不便, 也可直接向本刊编辑部索取订单或从邮局汇款(1999~2002 年已出版期刊, 本编辑部还有少量库存, 欢迎订阅)。

汇款请寄: 北京海淀区圆明园西路 2 号中国农业大学理学院《农药学学报》编辑部

邮政编码: 100094 联系人: 金淑惠、唐静

银行汇款 开户名称: 农药学学报编辑部

开户行: 海淀联社营业部东北旺农信社农大分社 行号: 70004

帐号: 0407030103000000706

联系电话: 010-62893003 E-mail: nyxuebao@263.net

欢迎单位和个人踊跃订阅!