

保护剂减轻氯嘧磺隆对玉米残留药害的作用机理

郭玉莲^{1 2 3}

(1.黑龙江省农业科学院博士后工作站, 哈尔滨 150086; 2.东北林业大学博士后流动站, 哈尔滨 150040; 3.黑龙江省农科院农药应用研究中心, 哈尔滨 150086)

摘要 采用沙培方法, 利用生理生化试验及半定量 PCR 方法, 研究了保护剂 HN 对玉米 ALS、GSTs 活性及 GSTs 的 mRNA 表达量的影响。结果表明, 保护剂对 6 个玉米品种的 ALS、GSTs 均具有诱导作用, 但对不同品种的诱导增加百分率却不同。对氯嘧磺隆敏感的玉米东甜 3 号的 GSTs 诱导增加百分率达到 59.18%, 对其 ALS 的诱导倍数为叶部 1.29 倍, 根部 2.30 倍; 对氯嘧磺隆耐性较高的玉米屯玉 88 GSTs 诱导增加百分率为 19.26%, 其 ALS 的诱导倍数为叶部 1.07 倍, 根部 2.07 倍。氯嘧磺隆和保护剂均可以诱导玉米 GSTs mRNA 的相对表达量的增加, 保护剂的诱导作用更强。

关键词 保护剂; 氯嘧磺隆; 玉米; GSTs; mRNA 表达量

中图分类号: X592 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2011)04-0645-05

Mechanism of Herbicide Safener for Reducing the Phytotoxicity of Chlorimuron-ethyl to Maize

GUO Yu-lian^{1 2}

(1.Post-doctoral Workstations, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China; 2.Post-doctoral Research station, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; 3.Research Center of Pesticide Application, Heilongjiang Academy of Agriculture Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract Herbicide safener can reduce phytotoxicity of herbicides to crops by influencing absorption and conduction of crops, and inducing the activity increase of GSTs and its target enzyme ALS. There may be two mechanisms of inducing the increase of GSTs activity. One is to induce the original GSTs isoenzymes over-expressed, the other is to induce synthesis of new GSTs isoenzymes. In this paper, physiological and biochemical tests and semi-quantitative PCR method were employed to study the effect of herbicide safener HN on the activity ALS and GSTs of maize as well as the effect of both of chlorimuron-ethyl and safener HN on the GSTs mRNA expression. The results showed that herbicide safener HN had effect of induction on ALS and GSTs of six maize varieties, but the increase percentage on different varieties showed a little difference. For chlorimuron-ethyl sensitive maize variety Dongtian 3, the inducing percentage of GSTs reached 59.18%, while its ALS increased 1.29 times in leaf and 2.30 times in root. For chlorimuron-ethyl tolerant maize variety Tunyu 88, the inducing percentage of GSTs was 19.26%, while its ALS increased 1.07 times in leaf and 2.07 times in root. Both of chlorimuron-ethyl and herbicide safener could induce relative increasing expression of GSTs mRNA and herbicide safener had stronger induction than chlorimuron-ethyl.

Keywords herbicide safener; chlorimuron-ethyl; maize; GSTs; expression of mRNA

氯嘧磺隆(chlorimuron-ethyl) ,是用于防除大豆田阔叶杂草和某些莎草科及禾本科杂草的磺酰脲类除草剂,该药剂不易挥发和光解,生物活性高,在土壤中残留时间长,极易对后茬玉米产生药害^[1-2]。

除草剂安全剂(safener)又称保护剂(antidote),可以在不影响除草剂对靶标杂草活性的前提下有选择

地保护作物免遭除草剂的药害, Hoffman 于 1962 年首次提出“除草剂解毒剂”的概念。NA (1- β -naphthalic anhydride)是由 Gulf Oil 公司 1972 年正式推出的世界上第一个商品化安全剂,用以保护玉米、高粱免受硫代氨基甲酸酯类、磺酰脲类和氯代乙酰胺类等除草剂的药害^[3]。国内外学者从其对作物的吸收、传导方面及对作物体内谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽-S-转移酶(GSTs)和乙酰乳酸合成酶(ALS)影响等方面进行了解毒机制的探讨^[4-6],但在分子水平上的作用机制还不十分清楚,对其减轻氯嘧磺隆残留药害的解毒机制国内外还未见报道。

收稿日期 2010-09-16

基金项目:黑龙江省农科院博士后基金项目(LRB 08-350),哈尔滨市科技攻关项目(2008AA6CH047)

作者简介:郭玉莲(1970—),女,副研究员,研究方向为农药应用与环境毒理学。E-mail: ylguo70@163.com

HN(主要成分是1,8-naphthalic anhydride)是一种超微粉种衣剂型的保护剂,可以减轻氯嘧磺隆对玉米的残留药害,作者从乙酰乳酸合成酶(ALS)、谷胱甘肽-S-转移酶(GSTs)及分子水平上进行了深入的研究,以期探讨其解毒机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

玉米品种:东农248、屯玉88、丰禾10、本育9、东甜3号和东农888(爆裂型),其中东农888由东北农业大学农学院提供,其余品种由黑龙江阳光种业有限公司提供。

供试药剂:20%氯嘧磺隆可湿性粉剂,大连瑞泽农药股份有限公司产品;保护剂HN(超微粉种衣剂)由本农药应用研究中心自制;2,4-二硝基氯苯(CDNB)、聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)、磺素腺嘌呤二核苷酸(FAD)和还原型谷胱甘肽(GSH)均为Sigma公司产品;牛血清白蛋白(BSA)和考马斯亮蓝G-250,购自北京同正生物公司;丙酮酸钠、氯化硫胺素焦磷酸盐(TPP)、二硫代苏糖醇(DTT)和乙酰甲基甲醇,为Fluka公司产品;TRIZOL试剂盒(Invitrogen);RNA纯化试剂盒(宝生物);cDNA合成试剂盒(BIOER);其他试剂均为国产分析纯。

试验仪器:1-15K高速冷冻离心机,Sigma公司产品;UV-1700型紫外-可见分光光度计,Shimadzu公司产品;SPX-250C型智能生化培养箱,上海博讯实业有限公司;Bio-Rad公司PC3000电泳仪;TC-512梯度PCR扩增仪(Techn公司)。

1.2 试验设计

采用沙培的方法^[7]并稍加改进。将沙洗净,烘干,过40目筛。将氯嘧磺隆配成一定浓度的母液,向沙中加入一定量的药液,使沙中氯嘧磺隆的终浓度为 $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,调节含水量至20%。试验设3个处理:氯嘧磺隆+保护剂包衣;氯嘧磺隆+空白种子;清水+空白种子(CK)。将玉米播入装有洗净河沙的16 cm×12 cm塑料盒中,每盒播玉米种子40粒,每处理5次重复,玉米品种选用东农248等6个品种,保护剂1:200比例包衣。置于光照培养箱中25℃培养,待玉米长至3叶时,取地上部分立即冻于-80℃冰箱,用于ALS和GSTs活性测定。

1.3 试验方法

1.3.1 玉米谷胱甘肽S-转移酶(GSTs)的提取及活性测定

GSTs提取采用文献^[6]的方法。取培养至三叶的玉米鲜叶组织0.5 g,加入1.5 mL $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7.5的Tris-HCl缓冲液(含 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA和 $75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ PVPP),液氮中研磨。匀浆液4℃、15 000 g离心20 min,取上清液作为酶源。

GSTs活性测定采用郭玉莲等^[8]的方法。在室温下,按顺序加入 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7.0的PBS缓冲液、30 mmol CDNB和30 mmol GSH,酶液30 μL,共计1.5 mL体系。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,并记录反应速度,以 $\text{OD}_{340}\cdot\text{min}^{-1}$ 表示。可溶性蛋白含量测定采用考马斯亮蓝G-250方法。计算酶活力及比活力。

1.3.2 玉米乙酰乳酸合成酶(ALS)的提取及活体ALS活性的测定

采用Fan等^[9]方法并稍加改动。取培养至三叶的玉米叶片组织1.0 g放入研钵中,液氮中快速研磨,加入4 mL酶提取缓冲液,研磨充分,转入离心管,25 000 g、4℃下离心20 min,取上清液,用提取液定容至8 mL。缓慢加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 粉末1.5 g,0℃沉降2 h后,25 000 g、4℃离心20 min,弃上清液,将沉淀溶于3 mL酶溶解液(100 mmol pH 7.0的 $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液,内含 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 丙酮酸钠、 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2)中,即为用于酶活力测定的酶液。

采用Fan等方法^[9]。在各试管中加入0.6 mL酶反应缓冲液和0.4 mL酶液,摇匀后在35℃恒温水浴中暗反应1 h,用 $0.1 \text{ mL } 3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2SO_4 终止反应,于60℃脱羧15 min。分别加入0.5 mL 0.5%肌酸和5%α-萘酚溶液,60℃显色15 min,冷却后,在525 nm处比色,以 nmol 乙酰甲基甲醇 $\cdot(\text{mg}$ 蛋白质 $\cdot\text{h})^{-1}$ 表示,蛋白含量采用考马斯亮蓝G-250法测定。

1.3.3 氯嘧磺隆和保护剂对玉米不同品种GSTs mRNA含量的影响

根据玉米ZmGST12基因(GenBank注册号:AF244677)和玉米内标基因GAPDH(GenBank注册号:X75326)的基因序列,用Primer 5.0软件设计两对特异引物。

表1中引物由上海博亚生物技术有限公司合成。玉米内标基因GAPDH引物的PCR预期产物为492 bp;玉米GSTs引物PCR预期产物为415 bp。

RNA提取利用TRIZOL试剂盒(Invitrogen);RNA纯化利用RNA纯化试剂盒(宝生物);cDNA合成利用cDNA合成试剂盒(BIOER);确定适宜的模板量和循环次数,选取筛选的最佳条件进行半定量PCR,以

表1 两对特异引物

Table 1 Two pair of primers

引物 Primer	序列 Sequences
正向引物(GSTs) Forward primer(GSTs)	5'CCAAACTCCACTACATCG3'
反向引物(GSTs) Reverse primer(GSTs)	5'GGTCACCATACAATACCCAGA3'
正向引物(GAPDH) Forward primer(GAPDH)	5'GACCACCACCCACTCTACA3'
反向引物(GAPDH) Reverse primer(GAPDH)	5'GCAACGCTTCACTCCAC3'

凝胶定量分析软件 Bandscan 对电泳图进行条带密度扫描,分别获得各基因的条带整合光密度值(integrated optical density IOD)。目的条带 IOD/同组 GAPDH 的 IOD 即为目的基因的相对表达量,计算 3 次重复的平均值及标准偏差。

1.4 数据处理分析方法

数据处理分析方法应用 SAS 软件、Excel 2003 进行分析处理,采用 Duncan's 新复极差测验法进行方差分析。统计分析参考文献[10]的方法。

2 结果与讨论

2.1 保护剂对玉米 GSTs 活性的影响

保护剂对玉米 GSTs 活性的诱导作用见表 2。结果表明,保护剂对 6 个玉米品种 GSTs 活性均具有诱导作用,但活性诱导增加百分率却不同,保护剂可以大幅度诱导对氯嘧磺隆敏感的玉米品种 GSTs 活性增加,经保护剂处理后,敏感品种东甜 3 号、东农 888 的 GSTs 活性增加百分率分别达到 59.18%、41.69%,耐性较高的屯玉 88 的 GSTs 活力百分率增加了 19.26%。

2.2 保护剂对玉米 ALS 活性的影响

保护剂对玉米 ALS 的比活力影响很大,结果见表 3。由表中的数据可以看出,经保护剂处理的玉米,ALS 的比活力均有不同程度的提高,其对玉米不同品种的 ALS 比活力诱导增加的程度不同,保护剂对敏感玉米东甜 3 号 ALS 的诱导倍数为叶部 1.29 倍,根部 2.30 倍,对耐性玉米屯玉 88 的诱导倍数叶部是 1.07 倍,根部是 2.07 倍,对敏感玉米 ALS 的诱导倍数

表2 保护剂对玉米不同品种 GSTs 活性的诱导作用

Table 2 Inducement of antidote to GSTs enzyme activities of different corn varieties

玉米品种 Maize variety	GSTs 比活力 Specific activity of GSTs/nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹		GSTs 活力百分率 Increasing percentage of GSTs/%
	保护剂处理 antidote	对照 CK	
东甜 3 号 Dongtian 3	669.94±29.98a	420.67±33.45b	59.18
东农 248 Dongnong 248	556.95±54.12b	470.64±51.36b	18.34
东农 888 Dongnong 888	673.35±19.26a	475.22±42.32b	41.69
丰合 10 Fenghe10	721.275±16.47a	545.14±40.47a	32.31
本育 9 Benyu 9	636.56±35.12a	557.75±50.21a	14.13
屯玉 88 Tunyu 88	725.56±16.18a	608.38±38.86a	19.26

注 GSTs 比活力 3 次重复的平均值±标准差。大写字母表示 $P<0.01$ 水平,小写字母表示 $P<0.05$ 水平,同一列数据中不同字母代表差异显著。下同。

Note: Specific activity of GSTs \pm SD. The capital letters means $P<0.01$ level, the small letters means $P<0.05$ level, the different letters in the same column means differences were significant. The same below.

表3 保护剂对玉米 ALS 的影响

Table 3 Inducement of antidote to ALS enzyme activities of different corn varieties

品种 Variety	保护剂 1:200 包衣 Antidote 1:200					
	叶部 Leaf			根部 Root		
	ALS 比活力 ALS activity/nmol·mg ⁻¹ ·h ⁻¹	诱导倍数 Induce multiple	对照 CK	ALS 比活力 ALS activity/nmol·mg ⁻¹ ·h ⁻¹	诱导倍数 Induce multiple	对照 CK
东农 248Dongnong 248	571.24±16.16cC	701.69±4.23cC	1.23	256.20±17.74bB	583.42±14.29cC	2.28
屯玉 88Tunyu 88	940.97±9.82aA	1 002.94±9.56aA	1.07	330.8±13.89aA	683.97±11.05aA	2.07
丰合 10Fenghe10	789.73±4.21bB	836.40±25.79bB	1.06	326.10±14.98aA	658.11±14.22bB	2.02
本育 9Benyu 9	785.35±8.02bB	828.60±5.93bB	1.06	318.02±24.85aA	649.69±17.25bB	2.04
东甜 3 号 Dongtian 3	444.97±5.82dD	576.07±13.01eE	1.29	233.92±6.55cC	538.90±7.56dD	2.30
东农 888Dongnong 888	580.59±15.07cC	659.33±14.93dD	1.14	269.88±11.96bB	602.06±6.83cC	2.23

要高于对耐性玉米 ALS 的诱导倍数 ;同时 ,保护剂对玉米根部 ALS 的诱导作用要远远大于对叶部 ALS 的诱导作用。

2.3 不同品种玉米 GSTs mRNA 相对表达量的差异

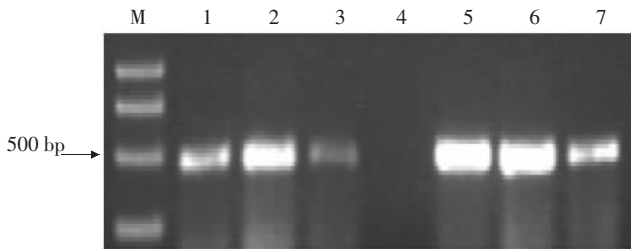
对 3 种不同品种玉米的 GSTs mRNA 相对表达量进行了比较(如图 1、图 2) 结果表明 3 种不同玉米品种的 GSTs mRNA 表达存在极显著差异。玉米屯玉 88 的 GSTs mRNA 表达最强 ,其次是品种丰禾 10 ,东甜 3 号的 GSTs mRNA 表达最弱。

2.4 除草剂和保护剂对玉米 GSTs mRNA 表达的作用

关于植物 GSTs 诱导表达的分子机制 ,目前所知甚少 ,L.Rossini 等^[11]研究表明 ,除草剂 alachlor 能够增加 GSTs-27mRNA 的稳定水平 ,诱导 GSTs-27 基因的转录。诱导引起 GSTs 活性增加可能有两种机制 :一

种是诱导引起植物体内原有的一种或几种 GSTs 同功酶过量表达 ,另一种是诱导引起合成新的同功酶。

由图 3 和图 4 可以看出 ,10 μg·kg⁻¹ 的氯嘧磺隆和保护剂 HN 对玉米 GSTs mRNA 的表达均具有诱导作用 ,其中 10 μg·kg⁻¹ 的氯嘧磺隆可以诱导玉米 GSTs mRNA 的表达量增加 1.17 倍 ,保护剂诱导玉米 GSTs mRNA 的表达量增加 1.38 倍。氯嘧磺隆和保护剂对玉米 GSTs mRNA 诱导表达的结果与酶活性测定的结果基本一致 ,说明氯嘧磺隆和保护剂对玉米 GSTs mRNA 的诱导作用 ,使 GSTs 活性的增加是 mRNA 表达量增加的结果。



泳道 M :标准分子量 DL2000 ;泳道 1 :丰禾 10 的 GSTs ;泳道 2 :屯玉 88 的 GSTs ;泳道 3 :东甜 3 号的 GSTs ;泳道 4 :阴性对照 ;泳道 5 :丰禾 10 的 GAPDH ;泳道 6 :屯玉 88 的 GAPDH ;泳道 7 :东甜 3 号的 GAPDH。

Lane M :Molecular weight marker DL2000 ;Lane 1 :GSTs of Fenghe 10 ;Lane 2 :GSTs of Tunyu88 ;Lane 3 :GSTs of Dongtian3 ;Lane 4 :Negative control ;Lane 5 :GAPDH of Fenghe10 ;Lane 6 :GAPDH of Tunyu88 ;Lane 7 :GAPDH of Dongtian3。

图 1 不同品种玉米的 GSTs mRNA 表达

Figure 1 Expression of GSTs mRNA in four varieties

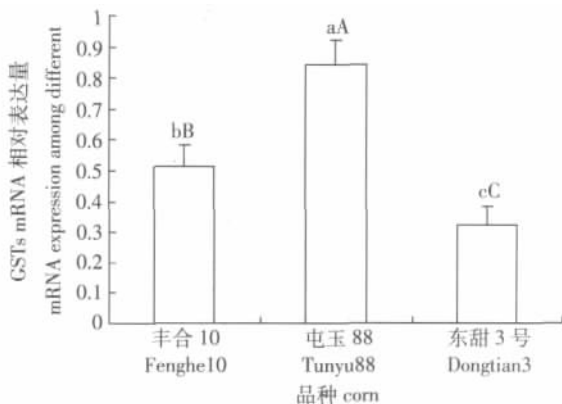


图 2 不同品种玉米 GSTs mRNA 相对表达量的差异比较

Figure 2 Comparison of GSTs mRNA expression among different corn varieties

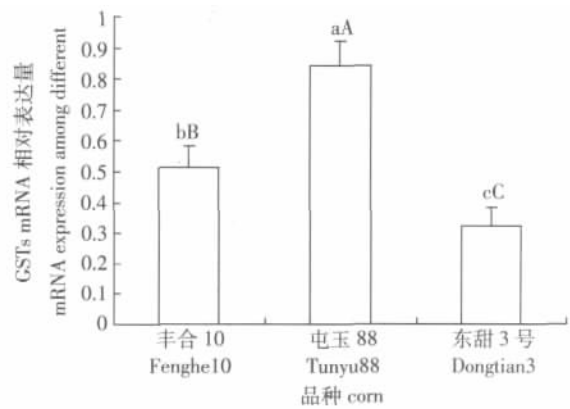
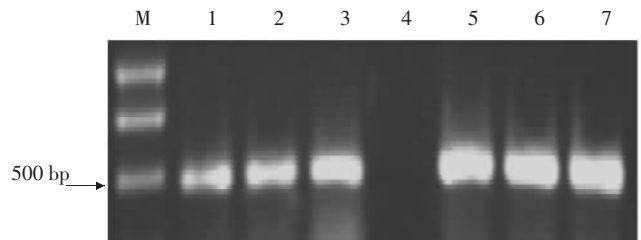


图 2 不同品种玉米 GSTs mRNA 相对表达量的差异比较

Figure 2 Comparison of GSTs mRNA expression among different corn varieties



泳道 M :标准分子量 DL2000 ;泳道 1 :丰禾 10 的 GST ;泳道 2 :10 μg·kg⁻¹ 氯嘧磺隆处理丰禾 10 的 GST ;泳道 3 :保护剂处理的丰禾 10 的 GST ;泳道 4 :阴性对照 ;泳道 5 :丰禾 10 的内标 ;泳道 6 :10 μg·kg⁻¹ 氯嘧磺隆处理的丰禾 10 的内标 ;泳道 7 :保护剂处理的丰禾 10 的内标

Lane M: Molecular weight marker DL2000 ;Lane 1: GSTs of Fenghe 10 ;Lane 2: GST of Fenghe10 that treated by 10 μg·kg⁻¹ Chlorimuron-ethyl; Lane 3: GSTs of Fenghe10 that treated by antidote ;Lane 4: Negative control ;Lane 5: GAPDH of Fenghe10; Lane 6: GAPDH of Fenghe10 that treated by 10 μg·kg⁻¹ chlorimuron-ethyl; Lane 7 : GAPDH of Fenghe10 that treated by antidote.

图 4 除草剂和保护剂对玉米 GSTs mRNA 表达的作用

Figure 4 Effect of herbicide and antidote on GSTs mRNA expression in corn

3 结论

试验结果表明,保护剂 HN 的保护机理是通过提高玉米尤其是敏感玉米体内的 ALS 和 GSTs 的活性来增强作物对氯嘧磺隆的抗性,通过 ALS 和 GSTs 协同保护作用,减轻该除草剂对玉米的残留药害。

不同品种玉米 GSTs mRNA 的相对表达量的差异导致了 GSTs 酶活性的不同,氯嘧磺隆和保护剂对玉米 GSTs mRNA 的表达均具有诱导作用,其中保护剂对玉米 GSTs mRNA 的表达量的诱导作用更强。氯嘧磺隆和保护剂对玉米 GSTs mRNA 诱导表达的结果与酶活性测定的结果是一致的,GSTs mRNA 转录量的增加可能是该除草剂和保护剂诱导玉米 GSTs 活性增加的主要机制。

参考文献:

- [1] 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.
SU S Q. Target of herbicides and formulate of new varieties[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2001.
- [2] 苏少泉. 长残留除草剂对后茬作物安全性问题[J]. 农药, 1998, 37(12): 4-7.
SU S Q. The influence on the subsequent crops of long residue herbicides[J]. *Pesticide Ticides*, 1998, 37(12): 4-7.
- [3] 叶非, 徐伟钧. 除草剂安全剂的生理生化作用机制研究进展[J]. 植物保护学报, 2008, 35(4): 367-372.
YE F, XU W J. Advances in the studies on physiological mechanism of safener[J]. *Acta Phytopylacica Sinica*, 2008, 35(4): 367-372.
- [4] 路凯, 钱传范. 萘二甲酸酐减轻胺苯磺隆对水稻药害的作用机理[J]. 植物保护学报, 2000, 27(3): 268-272.
LU K, QIAN C F. The mechanism of naphthalic anhydride reducing toxicity of ethametsulfuron on rice[J]. *Acta Phytopylacica Sinica*, 2000, 27(3): 268-272.
- [5] 范志金, 钱传范, 等. 1, 8-萘二甲酸酐对高浓度单嘧磺隆胁迫下玉米的解毒作用[J]. 农药学报, 2004, 6(4): 55-61.
FAN Z J, QIAN C F, et al. Detoxification of naphthalic anhydride to maize(*Zea Mays* L.) treated with high concentration of monosulfuron[J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2004, 6(4): 55-61.
- [6] Hatton P J, Dixon D, Cole D J, et al. Glutathione transferase activities and herbicide selectivity in maize and associated weed species[J]. *Pesticide Science*, 1996, 46(3): 267-275.
- [7] DeRidder B P, Dixon D P, Beussman D J, et al. Induction of glutathione S-transferases in Arabidopsis by herbicide safeners[J]. *Plant Physiology*, 2002, 130: 1497-1505.
- [8] 郭玉莲, 陶波, 高希武. 玉米谷胱甘肽转移酶(GSTs)特性及除草剂的诱导作用[J]. 玉米科学, 2008, 16(1): 122-125.
GUO Y L, TAO B, GAO X W. Drug resistance and mechanism between different maize varieties to chlorimuron-ethyl[J]. *Journal of Maize Sciences*, 2008, 16(1): 122-125.
- [9] Fan Z J, Qian C F, Li Z M, et al. Specific activity determination of aceto-lactate synthase from maize(*Zea mays* L.)[C].//The Proceedings of the 18th Asian-Pacific Weed Science Society Conference, Beijing, China, 2001: 515-522.
- [10] 金益, 吕龙岩. 生物统计与田间试验[M]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 1998: 126-128
JIN Yi, LV Long-yan. Bio-statistics and Field Experiment [M]. Harbin: Harbin Institute of Technology press, 1998, 126-128
- [11] Rossini L, Frova C, Mario Enrico Pe, et al. Alachlor regulation of corn glutathione s-transferases genes[J]. *Pestic Biochemisiry and Physiol*, 1998, 60: 205-211.