

麦田不同杂草对苯磺隆敏感性差异的分子机制

隋标峰 王金信* 彭学岗 丁 君 刘 迎

(山东农业大学植物保护学院, 泰安 271018)

摘要: 为了探讨麦田常见杂草对苯磺隆敏感性差异的分子机制, 测定了苯磺隆对4种杂草活性及对杂草体内靶标酶(ALS)和代谢酶(GSTs)的影响差异。结果表明, 泽漆对苯磺隆的敏感性最低, IC_{50} 为 123.16 g ai/hm^2 ; 猪殃殃和荠菜次之, 分别为 8.47 、 1.07 g ai/hm^2 ; 播娘蒿最敏感, 为 0.29 g ai/hm^2 。离体条件下, 苯磺隆对播娘蒿、泽漆 ALS 的 IC_{50} 值分别为 6.40 、 54.90 mg ai/L 。活体条件下, 苯磺隆处理后, 播娘蒿体内 ALS 活力低于对照, 第9天降为对照的 31.20% , 而敏感性低的泽漆处理后1~2天 ALS 活力虽略有下降, 但第3天明显提高, 第4天达到峰值, 为对照的 2.90 倍, 此后逐渐恢复至对照水平。4种杂草本身所含 GSTs 活性存在较大差异, 泽漆 GSTs 活性最高。经苯磺隆处理后, 泽漆与猪殃殃 GSTs 活性明显提高, 第4天时达到峰值, 相对活性分别为 1.23 和 1.25 , 并持续在较高水平; 而荠菜、播娘蒿 GSTs 活性虽分别在第3、5天达到峰值, 但多数时间相对活性低于1。结果表明, 麦田不同杂草体内 ALS 的敏感性差异和 GSTs 的代谢差异是对苯磺隆敏感性不同的两个重要原因。

关键词: 麦田杂草; 苯磺隆; 敏感性; 乙酰乳酸合成酶(ALS); 谷胱甘肽-S-转移酶(GSTs)

Molecular basis of sensitivity difference in wheat weeds to tribenuron-methyl

SUI Biao-feng WANG Jin-xin* PENG Xue-gang DING Jun LIU Ying

(College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong Province, China)

Abstract: In order to study the molecular mechanism of sensitivity difference in common wheat weeds to tribenuron-methyl, the control effects and molecular difference on ALS and GSTs of 4 wheat weeds to tribenuron-methyl were preliminarily determined. It showed that the sensitivity of *Euphorbia helioscopia* L. to tribenuron-methyl was the smallest, and *Descurainia sophia* L. was the strongest. IC_{50} of tribenuron-methyl to *Descurainia sophia* L., *Capsella bursa-pastoris* L., *Galium aparine* L. and *Euphorbia helioscopia* L. were 0.29 , 1.07 , 8.47 and 123.16 g ai/hm^2 , respectively. *In vitro*, IC_{50} of *Descurainia sophia* L. and *Euphorbia helioscopia* L.'s ALS were respectively 6.40 and 54.90 mg ai/L . *In vivo*, ALS specific activities of *Descurainia sophia* L. were all lower than that of contemporaneous comparisons and decreased to 31.20% of it's comparison when it was the 9th day after treated with tribenuron-methyl. Although ALS specific activities of *Euphorbia helioscopia* L. in the first 2 days were slightly falling, it had a rapid increasing tendency on the 3rd day and reached the peak value which was 2.90 times higher than that of comparison on the 4th day, then it renewed the normal level. GSTs activity differed in 4 wheat weeds; after treated with tribenuron-methyl, GSTs relative activities of *Euphorbia helioscopia* L. and *Galium aparine* L. had obvious enhancement on the 1st day and reached the peak value 1.23 , 1.25 on the 4th day, it remained a higher level; although GSTs relative activity of *Capsella bursa-pastoris* L. and *Descurainia*

作者简介: 隋标峰, 男, 1981年生, 硕士研究生, 从事除草剂抗药性研究, email: biaoongsui@tom.com

* 通讯作者 (Author for correspondence), email: wangjx@sdau.edu.cn, Tel: 0538-8241114

收稿日期: 2006-08-14

sophia L. reached respectively their peak values on the 3rd day and 5th day, the values were all lower than 1 in most days. It was induced that the two important reasons of wheat weeds had different sensitivity to tribenuron-methyl were the difference of sensitivity of ALS and the metabolizing mechanism of GSTs.

Key words: Wheat weeds; tribenuron-methyl; sensitivity; ALS; GSTs

苯磺隆(tribenuron-methyl)是 Du Pont 公司开发的一种磺酰脲类选择性内吸传导型除草剂,其作用靶标是乙酰乳酸合成酶(acetolactate synthase, ALS),它抑制植物体内支链氨基酸——亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸的生物合成^[1]。苯磺隆可广泛用于冬小麦、春小麦、大麦和燕麦等麦类作物,有效防除一年生及多年生阔叶杂草,如播娘蒿、荠菜等^[2~4]。作物和杂草之间、不同作物之间和同种作物不同品种之间对磺酰脲类除草剂的敏感性均存在差异。谭小平等^[5]研究表明,不同水稻品种之间对甲磺隆的耐药性存在差异。而且,除草剂的选择性与其代谢作用密切相关,耐药性植物能够快速代谢除草剂使其活性丧失。谷胱甘肽转移酶(glutathione transferases, GSTs)对大多数除草剂在植物体内的代谢起着重要作用^[6]。刘伟等^[7]研究证实,不同小麦品种对苯磺隆耐药性差异的主要原因是小麦 GSTs 对苯磺隆的代谢。我国麦田杂草种类繁多,有关麦田杂草对苯磺隆敏感性差异的机制尚未见报道。冬小麦田常见杂草有荠菜、播娘蒿、泽漆、猪殃殃等,田间应用发现苯磺隆对这些阔叶杂草防效差异较大。本研究在温室条件下利用盆栽法测定了上述 4 种杂草对苯磺隆的敏感性差异,并从分子水平上初步研究了苯磺隆对 4 种杂草体内靶标酶(ALS)和代谢酶(GSTs)的影响。以期探讨其对苯磺隆敏感性差异的分子机制,为苯磺隆的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

除草剂:10% 苯磺隆(tribenuron-methyl)可湿性粉剂、98% 苯磺隆原粉,山东华阳科技股份有限公司提供。

杂草:播娘蒿 *Descurainia sophia* L.、荠菜 *Capsella bursa-pastoris* L.、猪殃殃 *Galium aparine* L.、泽漆 *Euphorbia helioscopia* L.,采自泰山天烛峰附近,未施用过除草剂。

试剂:丙酮酸钠,天津市博迪化工有限公司;甲萘酚,中国医药上海化学试剂站;肌酸,上海恒信化学试剂有限公司;黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD),Fluka 公司;氯化硫胺素焦磷酸(TPP),E. MERCK 公

司;硫酸铵,天津市四通化工厂;考马斯亮蓝 G-250,进口分装,上海化学试剂公司;牛血清蛋白(BAS),进口分装,上海伯奥生物科技有限公司;2,4-二硝基氯苯(CDNB),Sigma 公司;还原型谷胱甘肽,进口分装,上海蓝季公司;聚乙烯吡咯烷酮(PVP),上海试剂公司;Tris-HCL,上海试剂公司;均为分析纯。

主要仪器:UV-2201 型紫外分光光度计,日本岛津公司;CR22 高速冷冻离心机,日本日立公司;水浴恒温振荡器,江苏太仓医疗器械厂。

1.2 方法

1.2.1 麦田不同杂草对苯磺隆敏感性测定

采用温室盆栽法,将饱满的播娘蒿、荠菜、猪殃殃、泽漆种子播种在表面积为 100 cm² 的盆中,内装未使用除草剂的表层过筛土壤,置于温室内培养。室内温度白天为 16 ± 5℃,晚上为 11 ± 5℃,每天光照 11 h,相对湿度为 75% ± 5%。出苗后 2 周进行处理,间苗后每盆杂草 7 株,待杂草 3~4 叶期,将其置于 3WT-II 型喷雾塔中,将 10% 苯磺隆可湿性粉剂,用水稀释成系列浓度(对播娘蒿处理剂量为 0、0.075、0.15、0.3、0.6、1.2、2.4、4.8 g ai/hm²;荠菜为 0、0.3125、0.625、1.25、2.5、5、10 g ai/hm²;猪殃殃为 0、0.625、1.25、2.5、5、10、100、300 g ai/hm²;泽漆为 0、2.5、5、50、100、500、1000、1500 g ai/hm²),在 0.2 mPa 压力下喷雾处理,另设清水为空白对照。所有处理重复 3 次,16 天后称量杂草地上部分鲜重,求出鲜重抑制率,并以抑制率概率值(Y_1)和浓度对数值(X_1)建立回归方程($Y_1 = A + BX_1$),求出 IC₅₀、IC₉₀ 值。数据用 DPS 软件处理。

1.2.2 乙酰乳酸合成酶提取方法

参照范志金等^[8]的方法。将 3~4 叶期的杂草地上部分 1 g 剪碎放入预冷玻璃研钵中,加入 4 mL 酶提取液(含 1 mmol/L 丙酮酸钠,0.5 mmol/L MgCl₂, 0.5 mmol/L TPP, 10 μmol/L FAD 的 0.1 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液)和适量石英砂,冰浴条件下快速研磨匀浆,置于离心管中定容至 8 mL,于 14 400 r/min、4℃ 下离心 20 min;取上清液缓慢加入 (NH₄)₂SO₄ 晶体至 50% 饱和度,沉淀 2 h 后,于 14 400 r/min、4℃ 下离心 30 min,弃上清液,沉淀溶于 6 mL 酶溶解液(含

20 mmol/L 丙酮酸钠, 0.5 mmol/L MgCl_2 的 0.1 mol/L pH7.0 的磷酸缓冲液) 中待测。以上操作均在 0 ~ 4℃ 条件下进行。

1.2.3 乙酰乳酸合成酶活性测定方法

参照范志金等^[8]的方法, 在 10 mL 具塞试管中加入 0.9 mL 酶反应液(含 20 mmol/L 丙酮酸钠, 0.5 mmol/L MgCl_2 , 0.5 mmol/L TPP, 10 $\mu\text{mol/L}$ FAD 的 0.1 mol/L pH7.0 的磷酸缓冲液)、1 mL 酶液和 0.1 mL 0.1 mol/L pH7.0 的磷酸缓冲液, 摇匀后在 35℃ 恒温水浴中暗反应 1 h, 加入 0.2 mL 的 3 mol/L H_2SO_4 中止反应, 60℃ 水浴脱羧 15 min。加入 1 mL 0.5% 肌酸和 1 mL 5% 甲萘酚(2.5 mol/L NaOH 溶液配制), 60℃ 水浴显色 15 min, 迅速置于冰浴中冷却 1 min, 于 525 nm 比色。以每小时生成单位纳摩尔乙酰乳酸所需毫克蛋白的量为一个活力单位。可溶性蛋白含量测定采用考马斯亮蓝 G-250 法。

1.2.4 乙酰乳酸合成酶离体活性测定

将 1.2.3 方法中磷酸缓冲液用 0.1 mL 不同浓度的苯磺隆溶液代替, 其它步骤同 ALS 测定步骤。以酶活力抑制率概率值(Y_2)和苯磺隆浓度对数值(X_2)建立回归方程($Y_2 = A + BX_2$)。求 IC_{50} 值, 数据用 DPS 软件处理。

1.2.5 乙酰乳酸合成酶活体活性测定

待杂草长至 3 ~ 4 叶期, 用 10% 的苯磺隆可湿性粉剂 18 g ai/hm² 茎叶喷雾, 设清水为对照, 每天取样 1 次, 共计 9 次。ALS 提取同 1.2.2, 活性测定同 1.2.3。

1.2.6 谷胱甘肽-S-转移酶活性测定

待杂草长至 3 ~ 4 叶期, 用 10% 苯磺隆可湿性粉剂 18 g ai/hm² 茎叶喷雾, 设清水为对照, 分别于施药后 1 ~ 9 天采样。参照吴进才等^[9]方法, 取经处理的新鲜杂草地上部分 0.5 g, 在 8 mL Tris-HCL 缓冲液(0.1 mol/L, pH 8.0 含还原型谷胱甘肽 25 mmol/L, 5% PVP) 中冰浴匀浆, 4000 r/min 离心 10 min, 取

上清液 12000 r/min 离心 5 min, 取上清液作为提取酶液, 以上操作均在 -4℃ 条件下进行。在 3 mL 0.1 mol/L pH8.0 Tris-HCL 缓冲液中加入 0.1 mL 酶液, 25℃ 保温 10 min, 加入 0.1 mL 无水乙醇配制的 13 mmol/L CDNB, 反应 10 min 后, 于 340 nm 处测得 OD 值, 并作为活性单位。设 GSTs 相对活性为 GSTs 施药 OD 值与对照同期 OD 值的比值。

2 结果与分析

2.1 麦田不同杂草对苯磺隆敏感性差异

结果显示, 泽漆对苯磺隆的敏感性最低, 猪殃殃次之, 而播娘蒿对苯磺隆最敏感。播娘蒿的 IC_{50} 和 IC_{90} 分别为 0.29 和 1.71 g ai/hm²; 而泽漆的 IC_{50} 和 IC_{90} 分别为 123.16 和 3848.71 g ai/hm² (表 1)。

2.2 离体条件下苯磺隆对麦田不同杂草的 ALS 活力的影响

结果显示, 麦田不同杂草 ALS 活力的抑制率均与苯磺隆浓度对数成直线相关。敏感性高的播娘蒿 ALS 的 IC_{50} 为 6.40 mg ai/L, 敏感性低的泽漆 ALS 的 IC_{50} 为 54.90 mg ai/L。表明苯磺隆对泽漆、播娘蒿 ALS 活力的 IC_{50} 值与该两种杂草对苯磺隆的耐受能力一致。

2.3 活体条件下苯磺隆对麦田不同杂草 ALS 活力的影响

结果显示, 无论是敏感性低的泽漆还是敏感性高的播娘蒿, 在正常情况下(未处理), 其体内 ALS 活力相差不大, 为 17.38 ~ 22.31 nmol · h⁻¹ · mg⁻¹ 蛋白质; 经苯磺隆茎叶处理后, 播娘蒿体内 ALS 活力均低于对照, 到第 9 天时其 ALS 活力降至对照的 31.20%; 而泽漆虽然在喷施苯磺隆后 1 ~ 2 天 ALS 活力略有下降, 但是第 3 天其 ALS 活力有明显的提高, 到第 4 天其 ALS 活力达到峰值, 为对照的 2.90 倍, 此后其 ALS 活力逐渐恢复至对照水平(图 1)。

表 1 麦田不同杂草对苯磺隆的敏感性

Table 1 Sensitivity of wheat weeds to tribenuron-methyl

杂草 Wheat weed	回归方程 Regression equation	IC_{50} (95% 置信区间) 95% CL(g ai/hm ²)	IC_{90} (95% 置信区间) 95% CL(g ai/hm ²)
播娘蒿 <i>D. sophia</i>	$Y_1 = 6.1874 + 1.6538 X_1$	0.29(0.23 ~ 0.35)	1.71(1.60 ~ 1.83)
芥菜 <i>C. bursa-pastoris</i>	$Y_1 = 5.2226 + 1.5370 X_1$	1.07(0.90 ~ 1.19)	7.33(6.52 ~ 8.23)
猪殃殃 <i>G. aqarine</i>	$Y_1 = 3.8721 + 1.5006 X_1$	8.47(6.58 ~ 10.48)	60.50(51.36 ~ 69.91)
泽漆 <i>E. helioscopia</i>	$Y_1 = 3.3588 + 0.8573 X_1$	123.16(108.49 ~ 152.55)	3848.71(3252.73 ~ 4014.46)

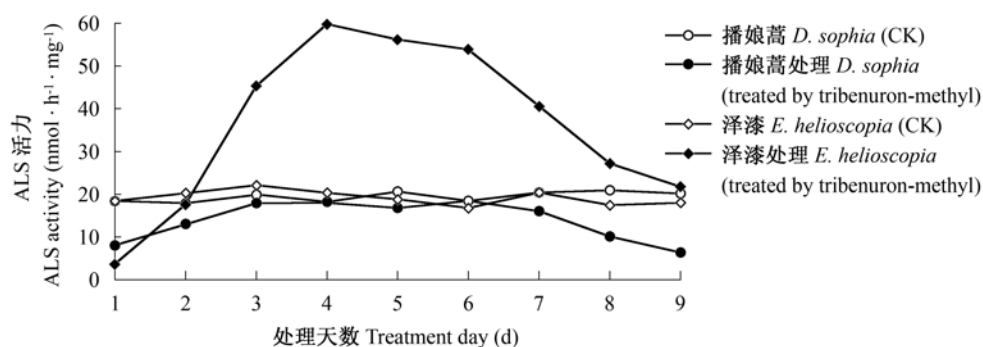


图1 活体条件下苯磺隆对麦田播娘蒿和泽漆 ALS 活力的影响

Fig. 1 Effect of tribenuron-methyl *in vivo* ALS activity of *D. sophia* and *E. helioscopia*

2.4 苯磺隆对杂草 GSTs 活性的影响

对照处理中,麦田4种杂草体内本身所含的GSTs活性存在较大差异(图2)。对照处理第3天时敏感性低的泽漆 GSTs 活性为敏感性高的播娘蒿 GSTs 活性的1.89倍;活体条件下,苯磺隆对麦田4种杂草 GSTs 活性有明显影响,并且其影响有所差异(图3)。敏感性低的泽漆与猪殃殃 GSTs 活性第

1天就有明显提高,第4天时达到峰值,相对活性分别为1.23和1.25,持续在较高水平;而芥菜、播娘蒿 GSTs 活性虽分别在第3、5天达到峰值,但多数时间相对活性低于1。敏感性高的播娘蒿 GSTs 活性第1天明显下降,之后逐渐升高,第5天时达到峰值,随后 GSTs 活性明显下降,第9天时其 GSTs 活性降到同期对照活性的0.56倍。

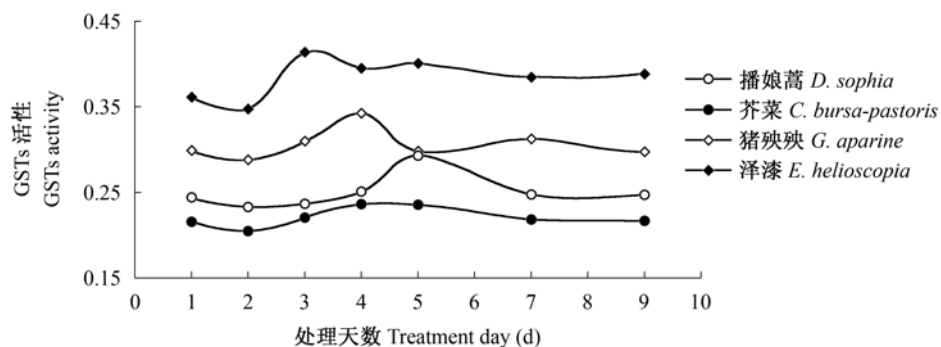


图2 麦田不同杂草对照处理 GSTs 活性

Fig. 2 GSTs activity of wheat weeds

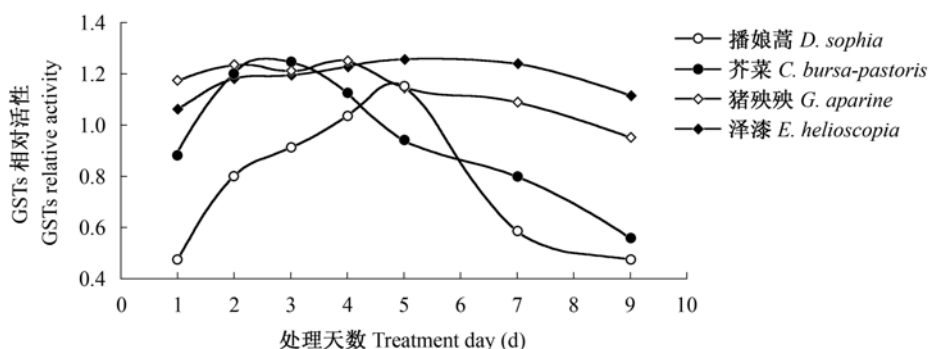


图3 苯磺隆对麦田不同杂草 GSTs 相对活性的影响

Fig. 3 Effect of tribenuron-methyl on GSTs relative activity of wheat weeds

3 讨论

本研究表明,麦田不同杂草对苯磺隆的敏感性

有较大差异。离体条件下,不同来源的 ALS 对苯磺隆的敏感性差异明显,不同杂草 ALS 活力的 IC_{50} 值与其对苯磺隆的耐受能力一致,这与Ray^[10]、Hart

等^[11]的研究结论一致;活体条件下,敏感性高的播娘蒿在喷施苯磺隆后,其体内 ALS 活力受到强烈的抑制,这是造成其对苯磺隆敏感的原因,而敏感性低的泽漆在喷施苯磺隆后能够保持苯磺隆靶标酶(ALS)的较高活性,从而引起靶标酶水平的过量表达,这在对苯磺隆耐药性提高上起关键作用。

GSTs 是生物体内广泛存在的一类催化谷胱甘肽与多种疏水化合物的亲电子基团相连接的胞质酶,这种连接作用是生物体进行脱毒和排毒的重要方式^[12]。试验表明,GSTs 的活性与杂草对苯磺隆的敏感性明显相关,说明不同杂草对苯磺隆代谢能力的差异是其对苯磺隆敏感性产生差异的另一个重要原因。

细胞色素 P450s 酶系也是植物体代谢除草剂的重要酶类^[13],杂草体内 P450s 酶系对苯磺隆的代谢作用,还有待于进一步研究。

参 考 文 献(References)

- 1 Duggleby R G, Pang S S. Acetohydroxyacid synthase. *Biochemistry and Molecular Biology*, 2000, 33(1): 1-36
- 2 陈子俊,沙莉,邢建安. 苯磺隆防除麦田杂草试验示范. *农药*, 1998, 37(9): 40
- 3 蒋仁棠,谈文瑾,刘忠德,等. 20% 苯磺隆防除冬小麦田阔叶杂草试验. *安徽农业科学*, 2002, 30(4): 568-569
- 4 张玉聚,孙化田,王春生. 除草剂及其混用与农田杂草化学防治. 北京:中国农业科技出版社,2000, 309-316
- 5 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. *农药学学报*, 2002, 4(2): 45-49
- 6 苏少泉. 除草剂在植物体内的代谢与选择性及使用. *现代农药*, 2003, 2(6): 14-17
- 7 刘伟,王金信,杨广玲,等. 不同小麦品种对苯磺隆敏感性差异及其机理. *植物保护学报*, 2005, 32(3): 300-304
- 8 范志金,钱传范,于维强,等. 氯磺隆和苯磺隆对玉米乙酰乳酸合成酶抑制作用的研究. *中国农业科学*, 2003, 36(2): 173-178
- 9 吴进才,许俊峰,冯绪猛,等. 稻田常用农药对水稻 3 个品种生理生化的影响. *中国农业科学*, 2003, 36(5): 536-541
- 10 Ray T B. Site of action of chlorsulfuron: inhibition of valine and isoleucine biosynthesis in plants. *Plant Physiology*, 1984, 75(3): 827-831
- 11 Hart S E, Saunders J W, Penner D, *et al.* Chlorsulfuron-resistant sugarbeet: cross-resistance and physiological basis of resistance. *Weed Science*, 1992, 40(3): 378-383
- 12 Reinemer P, Prade L, Hof P, *et al.* Three-dimensional structure of glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana* at 2.2 Å resolution: structural characterization of herbicide-conjugating plant glutathione S-transferases and a novel active site architecture. *The Molecular Biology*, 1996, 255: 289-309
- 13 张山,李平,刘德立. 细胞色素 P450 酶系与除草剂代谢. *中国生物工程杂志*, 2004, 24(10): 18-21