不同玉米品种对氯嘧磺隆的耐药性差异及其机制

郭玉莲[1,2] 陶 波[2*] 翟喜海[1] 潘亚清[1] 宋伟丰[1] 李 明[1]

(1. 黑龙江省农业科学院农药应用研究中心, 哈尔滨 150086; 2. 东北农业大学农学院, 哈尔滨 150036)

摘要: 采用玉米沙培法测定9种玉米品种对氯嘧磺隆的敏感性。结果显示,屯玉88和丰合10对氯嘧磺隆的耐药性较强,IC_{50}值分别为23.98 μg/kg和17.83 μg/kg;东甜3号的IC_{50}值为0.48 μg/kg,对氯嘧磺隆最敏感。氯嘧磺隆对活体ALS的抑制作用远低于离体试验结果,离体条件下不同来源的ALS对氯嘧磺隆的敏感性差异不明显;活体条件下耐药性品种屯玉88和中等耐药品种本育9的ALS活力分别是离体条件下的2.50和2.19倍,而敏感品种东甜3号、东农248和东农888的ALS活力分别是离体条件下的1.02~1.45倍。不同玉米品种ALS和GSTs活性存在差异,耐药性品种ALS和GSTs的活性大于敏感品种。此外,氯嘧磺隆可以诱导GSTs活性增加。

关键词: 玉米; 氯嘧磺隆; 敏感性; 谷胱甘肽S-转移酶; 耐药性

Drug resistance and mechanism between different maize varieties to chlorimuron-ethyl

Guo Yulian[1,2] Tao Bo[2*] Zhai Xihai[1] Pan Yaqing[1] Song Weifeng[1] Li Ming[1]

(1. Research Center of Pesticide Application, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China; 2. Agricultural College, Northeast Agricultural University, Harbin 150036, Heilongjiang Province, China)

Abstract: This paper determined the drug resistance of 9 maize varieties to chlorimuron-ethyl with sand culture experiment. The results showed that IC_{50} value for Tunyu 88 and Fenghe 10 was 23.98 μg/kg and 17.83 μg/kg respectively, the tolerance was strong. Dongtian 3 was sensitive to chlorimuron-ethyl. The IC_{50} was 0.48 μg/kg. The inhibition of chlorimuron-ethyl to ALS *in vivo* was much lower than *in vitro*. *In vitro*, there was no significant difference in the drug resistance of different sources ALS to chlorimuron-ethyl. *In vivo*, tolerance varieties ALS activity Tunyu 88 and Benyu 9 respectively was 2.5 and 2.19 times than those *in vitro*, but sensitive varieties Dongtian 3 and Dongnong 248 and Dongnong 888 was 1.02-1.45 times than those *in vitro*, there was significant difference in maize varieties ALS and GSTs activities, the activities of tolerant varieties ALS and GSTs higher than sensitive varieties. The chlorimuron-ethyl induced GSTs activities increased.

Key words: maize; chlorimuron-ethyl; sensitivity; GSTs; tolerant mechanism

氯嘧磺隆(chlorimuron-ethyl),亦称豆磺隆,是Du Pont公司开发的磺酰脲类除草剂,其作用靶标是乙酰乳酸合成酶(ALS)。该药主要用于防除大豆田阔叶杂草和某些莎草科及禾本科杂草[1],是我国东北地区春大豆田化学除草的主要药剂之一。该药剂不易挥发和光解,生物活性高,在土壤中残留时间长,易对后茬玉米产生药害[2-3],但不同作物间或同种作物不同品种之间对磺酰脲类除草剂的耐药性存

基金项目:国家科技支撑计划(2007BAD87B03)
作者简介:郭玉莲,女,1970年生,副研究员,研究方向为农药应用与环境毒理学, email: ylguo70@163.com
*通讯作者(Author for correspondence), email: botaol@163.com
收稿日期: 2008-09-22

在差异。已有研究表明,不同玉米自交系间对单嘧磺隆活性存在差异[4],玉米不同类型品种对烟嘧磺隆耐药性不同[5]。多数情况下,除草剂的选择性与其代谢作用密切相关,耐药性植物能够迅速代谢除草剂使其丧失活性,谷胱甘肽 S－转移酶(GSTs)能够催化三氮苯、二苯醚、磺酰脲等多类除草剂与还原型谷胱甘肽(GSH)或高谷胱甘肽(hGSH)进行不可逆的缀合作用促进代谢,对大多数除草剂在植物体内的代谢解毒起着重要作用[6]。目前,不同玉米品种对氯嘧磺隆的耐药性还未见报道,作者测定了生产上常规种植的 9 种玉米品种对氯嘧磺隆的耐药性,并以 ALS 和 GSTs 为研究对象,探讨不同玉米品种对氯嘧磺隆产生耐药性差异的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

玉米品种:东农 248、屯玉 88、丰合 10、本育 9、龙单 13、四单 19、东甜 3 号、垦粘 1 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:97.4% 氯嘧磺隆(chlorimuron-ethyl)原粉和 20% 氯嘧磺隆可湿性粉剂,大连瑞泽农药股份有限公司产品;2,4－二硝基氯苯(CDNB)、聚乙烯聚吡咯啶酮(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,Fluka 公司产品;其它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－可见分光光度仪,Shimadzu 公司产品;SPX-250C 型智能生化培养箱,上海博迅实业有限公司。

1.2 不同玉米品种对氯嘧磺隆的敏感性

采用沙培法[7]并稍加改动。在 8 cm × 7 cm 的小塑料杯中,放入 190 g 洗净的河沙,铺平后再均匀放入 5 粒已挑选好的玉米种子(浸种 12 h,27 ℃催芽至根长约 1 mm),覆沙 90 g,加入预先配置好的一定浓度的药液 50 mL,使沙中药剂的最终浓度为 0.5、1.0、5.0、10.0、20.0、30.0、40.0 和 50.0 μg/L,以加等量蒸馏水为空白对照。放入 25 ℃完全黑暗的恒温培养箱中培养 3 天。每浓度 3 次重复,每品种 3 次重复。培养结束后,取出幼苗,冲洗沙子。测量主根长,计算抑制率,并以抑制率概率值(Y_1)和浓度对数值(X_1)建立回归方程,求出 IC_{50}值[8]。

1.3 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[9]的方法并稍加改进。取培养至三叶时的玉米鲜叶组织 0.5 g,加入 1.5 mL 0.1 mol/L pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液(含 1 mmol/L EDTA 和 75 g/L 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[10]的方法。在室温下,按顺序加入 0.1 mol/L 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 OD_{340}/min 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。

$$\text{GSTs 活力} = (\Delta OD_{340} \cdot v)/(\varepsilon \cdot L)$$

式中 ΔOD_{340}为每分钟光吸收的变化值,v 为酶促反应体积(1.5 mL),ε 为产物的消光系数,L 为比色杯的光程(1 cm)。

$$\text{比活力} = \text{酶活性单位}/\text{蛋白含量}$$

1.4 玉米乙酰乳酸合成酶(ALS)的提取

采用 Fan 等[11]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 $(NH_4)_2SO_4$ 粉末 1.5 g,0 ℃沉降 2 h 后,25 000 g、4 ℃下离心 20 min,弃上清液,将沉淀溶于 3 mL 酶溶解液(100 mmol pH 7.0 的 K_2HPO_4-KH_2PO_4 缓冲液,内含 1 mmol/L 丙酮酸钠和 5 mmol/L $MgCl_2$)中,即为用于酶活力测定的酶液。

1.5 离体条件下 ALS 的测定

采用Fan等[11]方法。在试管中分别加入0.01、0.1、1、10 和 100 μg/mL 的 97.4% 氯嘧磺隆原液 0.1 mL,在各管中加入 0.5 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 mL 3 mol/L 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/(mg 蛋白质 · h)表示,蛋白含量采用考马斯亮蓝 G-250 法测定。

1.6 活体条件下 ALS 的测定

将催芽后的玉米播入装有洗净河沙的塑料杯中,每杯播玉米种子 5 粒,每处理 5 次重复。将氯嘧磺隆配置成一定浓度的母液,按设定比例加入一定量的氯嘧磺隆溶液,以等量清水作空白对照,待幼苗长至三叶时取样。酶液提取同 1.4,活性测定同 1.5,0.1 mL 氯嘧磺隆溶液用磷酸缓冲液代替。

2 结果与分析

2.1 不同玉米品种对氯嘧磺隆的耐药性

氯嘧磺隆对不同玉米品种主根均有较强的抑制作用,但该作用因品种及药液浓度不同而存在差异,各品种的 IC_{50} 值在 0.48 ~ 23.98 之间,其中屯玉 88 耐药性最强,IC_{50} 值为 23.98(19.91 ~ 25.66);东甜 3 号最敏感,IC_{50} 值为 0.48(0.31 ~ 0.61)。各品种敏感性(IC_{50})由高到低依次为:屯玉 88 > 丰合 10 > 本育 9 > 四单 19 > 龙单 13 > 东农 888 > 垦粘 1 号 > 东农 248 > 东甜 3 号(表 1)。

2.2 离体条件下玉米 ALS 对氯嘧磺隆的敏感性

在离体条件下氯嘧磺隆对供试玉米品种的 ALS 均存在抑制作用,且差异不显著,敏感品种东甜 3 号和东农 248 的 IC_{50} 值分别为 19.66 nmol/L 和 20.76 nmol/L,与相对耐药性品种屯玉 88 的 IC_{50} 值 19.97 nmol/L 相近,略高于中等耐药品种本育 9。

表 1 不同玉米品种对氯嘧磺隆的相对耐药性

Table 1 Relative sensitivity of different maize varieties to chlorimuron-ethyl

玉米品种 Maize variety	毒力回归方程 Y = Toxicity regression equation	相关系数 r Relational coefficient	IC_{50}(95% 置信限)(μg/kg) IC_{50}(95% CL)
屯玉 88 Tunyu 88	$0.6357x + 4.2050$	0.9722	23.98(19.91 ~ 25.66)aA
丰合 10 Fenghe 10	$0.5548x + 4.4275$	0.9803	17.83(15.21 ~ 19.28)aA
本育 9 Benyu 9	$0.3178x + 4.5615$	0.9720	10.93(8.84 ~ 12.87)bA
四单 19 Sidan 19	$0.4038x + 4.5817$	0.9802	10.81(8.64 ~ 12.39)bA
龙单 13 Longdan 13	$0.3564x + 4.8196$	0.9942	3.20(2.85 ~ 4.14)cB
东农 888 Dongnong 888	$0.4829x + 4.8184$	0.9956	2.38(2.06 ~ 3.12)cB
垦粘 1 号 Kennian 1	$0.3172x + 4.9944$	0.9942	1.04(0.87 ~ 1.86)cdB
东农 248 Dongnong 248	$0.4009x + 5.0350$	0.9883	0.82(0.68 ~ 1.02)dB
东甜 3 号 Dongtian 3	$0.3451x + 5.1103$	0.9768	0.48(0.31 ~ 0.61)dB

注:Y 为玉米主根长抑制率转换的概率值;x 为药剂浓度转换的浓度对数;IC_{50} 数据后标有相同小写字母者表示在 5% 水平差异不显著,标有相同大写字母者表示在 1% 水平差异不显著。Note: Y is probability value transform by inhibition rate; x is log concentration; the same small letters in the same column means differences were not significant at 5% and 1% levels by Duncan's multiple range test.

2.3 活体条件下玉米 ALS 对氯嘧磺隆的敏感性

活体条件下氯嘧磺隆对不同玉米品种 ALS 活力的影响存在相同的趋势,当浓度为 0.1 ~ 100 μg/L 时,氯嘧磺隆对玉米 ALS 具有抑制作用,且随着浓度的升高,抑制作用加大;当浓度超过 10 μg/L 时,抑制率趋于平稳;但当氯嘧磺隆作用浓度为 0.01 μg/L 时,玉米 ALS 活性反而高于对照(表 2)。从表 2 可以看出,不同玉米品种 CK 的 ALS 活性不同,且与其耐药性成正相关,耐性品种屯玉 88 的 ALS 活性最高,为 940.97 nmol/(mg · h),是敏感品种东甜 3 号 ALS 活性的 2.11 倍;除东农 248 和东农 888 ALS 活性之间差异不显著外,其余品种间 ALS 活性均差异显著。

2.4 活体与离体条件下玉米 ALS 活力的比较

氯嘧磺隆在浓度相同的情况下,对活体 ALS 的抑制作用远远低于离体的试验结果,当氯嘧磺隆浓度为 100 μg/L 时,活体条件下,耐药性品种屯玉 88 和中等耐药品种本育 9 的 ALS 活力分别是离体条件下的 2.50 和 2.19 倍,而敏感品种东甜 3 号、东农 248 和东农 888 的 ALS 活力分别是离体条件下的 1.02 ~ 1.45 倍。敏感性品种东甜 3 号、东农 248 和东农 888 的 ALS 活性之间差异不显著,与耐药性品种屯玉 88 和本育 9 的 ALS 活性差异显著(图 1)。

2.5 氯嘧磺隆对玉米 GSTs 活性的影响

活体条件下,氯嘧磺隆对不同玉米品种 GSTs 活性影响很大。其中,耐药性较高的品种屯玉 88 和本育9的 GSTs 活性提高较少,分别为 3.13% 和 2.56%;而敏感品种东甜 3 号、东农 248 和东农 888 的 GSTs 活性提高较多,分别提高了 21.08%、6.34 和 13.28%。对照组和处理组中,不同玉米品种 GSTs

表 2　活体条件下氯嘧磺隆对玉米 ALS 活力的影响

Table 2　Effect of chlorimuron-ethyl on ALS activity of various maize varieties *in vivo*

玉米品种 Maize variety	氯嘧磺隆浓度 Concentration of chlorimuron-ethyl (μg/L)	ALS 比活力 ALS activity (nmol/(mg·h))	活力百分率 Percentage activity (%)	玉米品种 Maize variety	氯嘧磺隆浓度 Concentration of chlorimuron-ethyl (μg/L)	ALS 比活力 ALS activity (nmol/(mg·h))	活力百分率 Percentage activity (%)
东甜 3 号	CK	444.97 ± 24.36d	—	东农 888	1	471.24 ± 20.21	81.17b
Dongtian 3	0.01	466.67 ± 18.77	104.88a	Dongnong 888	10	411.79 ± 21.56	70.93b
	0.1	378.78 ± 19.65	85.12b		100	394.38 ± 24.33	67.96b
	1	359.65 ± 30.12	80.83b	本育 9	CK	785.35 ± 28.65b	—
	10	297.43 ± 25.63	66.84c	Benyu 9	0.01	832.34 ± 24.35	105.98a
	100	263.62 ± 22.31	59.24c		0.1	734.12 ± 21.23	93.48a
东农 248	CK	571.24 ± 14.35c	—		1	632.11 ± 28.33	80.49ab
Dongnong 248	0.01	588.95 ± 16.36	103.10a		10	548.64 ± 31.01	69.86b
	0.1	519.37 ± 21.32	90.92a		100	534.78 ± 20.52	68.09b
	1	450.19 ± 24.33	78.81b	屯玉 88	CK	940.97 ± 16.35a	—
	10	348.57 ± 21.01	61.02b	Tunyu 88	0.01	1 022.74 ± 24.52	108.69a
	100	337.09 ± 28.62	59.01bc		0.1	886.77 ± 31.21a	94.24a
东农 888	CK	580.59 ± 15.07c	—		1	815.54 ± 35.16	86.67a
Dongnong 888	0.01	608.98 ± 21.36	104.89a		10	687.28 ± 20.31	73.04b
	0.1	545.34 ± 18.74	93.93a		100	666.68 ± 26.11	70.85b

注:ALS 比活力为:平均数 ± 标准差。活力百分率数据后标有相同字母者表示在 5% 水平差异不显著。Note: ALS activity: $\overline{X} \pm SD$. The same small letters in the same column means differences were not significant at 5% level by Duncan's multiple range test.

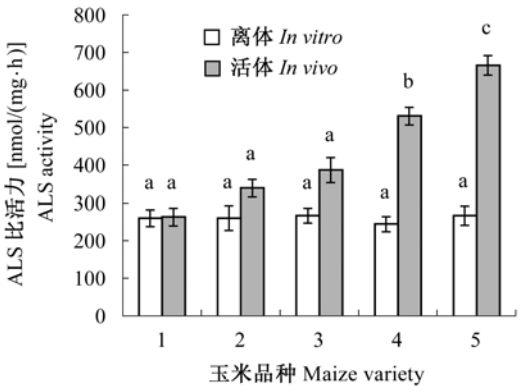

图 1　氯嘧磺隆为 100 μg/L 时离体和活体条件下玉米 ALS 活力比较

Fig. 1　Comparison of ALS activity between *in vitro* and *in vivo* at 100 μg/L of chlorimuron-ethyl

注:1:东甜 3 号;2:东农 248;3:东农 888;4:本育 9;5:屯玉 88。数据为平均数 ± 标准差。柱上方字母相同者表示在 5% 水平差异不显著。Note: 1: Dongtian 3; 2: Dongnong 248; 3: Dongnong 888; 4: Benyu 9; 5: Tunyu 88. The data show as $\overline{X} \pm SD$. The same small letters were not significant at 5% level by Duncan's multiple range test.

活性不同,耐药性品种 GSTs 比活力均高于敏感性品种,二者之间差异显著(表 3)。

3　讨论

玉米不同品种对氯嘧磺隆均较敏感,但其敏感性存在一定的差异,同样是硬粒型品种,东农 248 和屯玉 88 对氯嘧磺隆的耐药性差异很大,说明玉米对氯嘧磺隆的耐药性与玉米的品质特性无关。离体条件下不同来源的 ALS 对氯嘧磺隆的敏感性差异不明显,与植株耐药性差异不一致。表明玉米不同品种的 ALS 对氯嘧磺隆的敏感性差异不是其耐药性机制;在氯嘧磺隆浓度相同的情况下,活体条件下玉米品种 ALS 活力均明显高于离体条件下的 ALS 活力,这可能是由于活体试验除草剂在培养过程中一直存在于植物体内,存在一定的代谢失活作用。不同玉米品种间 ALS 活性不同,且与耐药性成正相关,表明玉米品种间 ALS 活性差异是不同玉米品种对氯嘧磺隆产生耐药性差异的原因之一。

GSTs 是一类诱导酶,其活性是植物抵抗除草剂能力的一项重要指标,与除草剂耐药性有密切关系[12]。本研究结果表明,不同玉米品种 GSTs 活性存在差异,耐药性品种的 GSTs 活性高于敏感品种,氯嘧磺隆可以诱导玉米 GSTs 活性增加,这与刘伟等[13]的研究结果一致。可以推断,解毒酶GSTs活

表 3 氯嘧磺隆对玉米谷胱甘肽 S－转移酶的影响

Table 3 Effect of chlorimuron-ethyl on maize GSTs

玉米品种 Maize variety	GSTs 比活力 Specific activity of GSTs [nmol/(min·mg)]		GSTs 活力百分率(%) Increasing percentage of GSTs
	处理 Treatment	对照 CK	
东甜 3 号 Dongtian 3	509.34 ± 19.31b	420.67 ± 33.45b	21.08
东农 248 Dongnong 248	500.47 ± 12.39b	470.64 ± 51.36b	6.34
东农 888 Dongnong 888	538.34 ± 25.0b	475.22 ± 42.32b	13.28
本育 9 Benyu 9	572.05 ± 12.09ab	557.75 ± 50.21a	2.56
屯玉 88 Tunyu 88	627.42 ± 17.11a	608.38 ± 38.86a	3.13

注:GSTs 比活力:平均数 ± 标准差。同列数据后标有相同字母者表示在 5% 水平差异不显著。Note: Specific activity of GSTs: $\overline{X}$ ± SD。The same small letters in the same column means differences were not significant at 5% level by Duncan's multiple range test.

性差异是导致玉米不同品种对氯嘧磺隆耐药性差异的主要原因。

参 考 文 献(References)

[1] 苏少泉. 除草剂作用靶标与新品种创制. 北京:化学工业出版社, 2001

[2] 苏少泉. 长残留除草剂对后茬作物安全性问题. 农药, 1998, 37(12):4－7

[3] 陶波,何钟佩. 豆磺隆在土壤中残留动态及对后茬作物的影响. 西北植物学报,2000, 20(6):1229－1233

[4] 范志金,陈俊鹏,党宏斌,等. 单嘧磺隆对靶标乙酰乳酸合成酶活性的影响. 现代农药,2003,2(2):15－17

[5] 董晓雯,王金信,毕建杰,等. 不同玉米品种对烟嘧磺隆的敏感性差异. 植物保护学报,2007,34(2):182－186

[6] 范志金,于维强,艾应伟,等. 玉米乙酰乳酸合成酶活性的测定及其性质初探. 安全与环境学报,2003,3(2):19－23

[7] DeRidder B P, Dixon D P, Beussman D J, et al. Induction of glutathione S-transferases in *Arabidopsis* by herbicide safeners. Plant Physiology, 2002, 130: 1497－1505

[8] 陈锡岭. 三种磺酰脲类除草剂对玉米敏感性及残留的研究. 河南职业技术师范学院学报,2004,32(2):24－26

[9] Hatton P J, Dixon D, Cole D J, et al. Glutathione transferase activities and herbicide selectivity in maize and associated weed species. Pesticide Science, 1996, 46(3): 267－275

[10] 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. 玉米科学, 2008,16(1):122－125

[11] Fan Z J, Qian C F, Li Z M, et al. Specific activity determination of acetolactate synthase from maize (*Zea mays* L). // The Proceedings of the 18th Asian－Pacific Weed Science Society Conference, Beijing, China, 2001, May 28－June 2: 515－522

[12] 刘伟,邱银清,侯任昭. 谷胱甘肽转移酶与植物对除草剂的抗性. 世界农业,1997(1):43－44

[13] 刘伟,王金信,杨广玲,等. 不同小麦品种对苯磺隆耐药性差异及其机理. 植物保护学报,2005,32(3):300－304