

羌活粗提物减轻乙草胺对水稻的药害及对 GSTs 的诱导作用

胡利锋¹, 廖晓兰¹, 柏连阳^{1,2*}, 周小毛¹

(1.湖南农业大学 生物安全科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2.湖南人文科技学院 农科所, 湖南 娄底 417000)

摘要:采用室内生物活性测定法,研究了中药羌活粗提物减轻乙草胺对水稻幼苗伤害的效果和对水稻幼苗谷胱甘肽-S-转移酶(GSTs)活性的影响。结果表明:在乙草胺质量浓度为 0.05 mg/L 的条件下,当羌活粗提物质量浓度分别为 0.050 0、0.125 0、0.250 0、1.250 0 g/L 时,水稻幼苗的株高分别恢复到清水对照的 77.9%、95.1%、96.1%、96.2%;株鲜重恢复到清水对照的 80.9%、98.8%、94.0%、98.4%;GSTs 活性检测表明,羌活粗提物能诱导水稻幼苗地上部 GSTs 活性增强,当羌活粗提物的质量浓度为 0.150 0、0.200 0 和 0.250 0 g/L 时,水稻幼苗地上部 GSTs 的活性分别为清水对照的 1.5、2.0 和 2.1 倍。

关键词:水稻;乙草胺;植物源安全剂;谷胱甘肽-S-转移酶;羌活

中图分类号:S482.91 文献标志码:A 文章编号:1007-1032(2012)04-0408-05

Effects of crude extract from *Rhizoma et Radix Notopterygii* on reduction of phytotoxicity of acetochlor and on induction of GSTs in rice

HU Li-feng¹, LIAO Xiao-lan¹, BAI Lian-yang^{1,2*}, ZHOU Xiao-mao¹

(1.College of Bio-Safety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Agriculture Research Institute, Hunan Institute of Humanities, Science and Technology, Loudi, Hunan 417000, China)

Abstract: Indoor bioassay was carried out to study the effects of crude extract of *Rhizoma et Radix Notopterygii* on reducing the phytotoxicity of acetochlor to the rice shoots, and on induction of GSTs of rice shoots. The results showed that under the of acetochlor concentration of 0.05 mg/L, the plant height restored to 77.9%, 95.1%, 96.1%, 96.2% of those in the control, and the plant weight restored to 80.9%, 98.8%, 94.0%, 98.4% of those in the control, when mass concentrations of extract from *Rhizoma et Radix Notopterygii* were 0.05, 0.125, 0.25 and 1.25 g/L, respectively. GSTs activity in the above-ground shoots of rice can be increased by the induction of extract from *Rhizoma et Radix Notopterygii*, when the concentrations of the extract were 0.15 g/L, 0.20 g/L and 0.25 g/L, the GSTs activity in the above-ground shoots was respectively 1.5-, 2.0- and 2.1-fold higher than that of the control.

Key words: rice; acetochlor; botanical safener; GSTs; *Rhizoma et Radix Notopterygii*

乙草胺(acetochlor, 2'-乙基-6'-甲基-N-(乙氧甲基)-2-氯代乙酰替苯胺),属酰胺类除草剂,主要用于玉米、棉花、大豆、油菜等旱地作物防除一年生禾本科杂草及部分阔叶杂草,因其价格低,活性高,药效好而应用非常广泛^[1-2],但易对小麦、烟草、水稻等产生药害^[3-7],特别是水稻对乙草胺非

常敏感^[8],乙草胺在水稻上的应用受到很大限制。

有研究^[9-10]表明,通过在除草剂中加入安全剂,可以大大提高除草剂的选择性和对作物的安全性。安全剂能够诱导特定的与除草剂底物有亲和性的谷胱甘肽-S-转移酶的表达增强,加快除草剂代谢速率,从而减轻除草剂对作物的伤害^[11]。为了扩大乙

收稿日期:2012-03-16

基金项目:国家自然科学基金项目(31171891);湖南省自然科学基金重点项目(10JJ2020)

作者简介:胡利锋(1980—),男,湖南邵阳人,博士研究生,讲师,主要从事除草剂安全剂研究, hf128lucky@126.com; *通信作者, bailianyang2005@yahoo.com.cn

草胺的应用范围,提高其对作物的安全性,对乙草胺安全剂的研发受到了世界各国的重视,并已取得一定进展。二氯丙烯胺(R-25788)、R-29148、BAS-145138、解草啶(CGA₁₂₃₄₀₇)、解草胺、苯叉酰胺和 NA 等对乙草胺有一定的解毒作用^[4,12-15],但这些安全剂均为化学安全剂,且多针对旱地作物。笔者所在的课题组曾对 97 种植物材料进行筛选,发现中药材羌活(Rhizoma et Radix *Notopterygii*,为伞形科植物羌活 *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang 或宽叶羌活 *Notopterygium forbesii* Boiss 的干燥根茎及根)具有减轻乙草胺对水稻幼苗伤害的作用。在此基础上,笔者进一步研究了羌活粗提物减轻乙草胺对水稻药害的效果,并测定了羌活粗提物对水稻幼苗体内 GSTs 活性的诱导效果,初步探讨了羌活粗提物对水稻解毒的作用机理,以期寻找新型的能有效减轻乙草胺对水稻伤害的植物性安全剂,使乙草胺的应用范围扩大而不对环境造成新的压力。

1 材料与方 法

1.1 材 料

水稻陆两优 611 种子由湖南隆平高科种业有限公司生产;中药羌活购自湖南省药材公司;900 g/L 乙草胺乳油,美国孟山都公司出品。

1.2 方 法

1.2.1 羌活粗提物的制备

称取羌活粉末 25 g,用滤纸包裹,置于 250 mL 索氏提取器中,加入 200 mL 的无水乙醇,在 90 °C 水浴中回流提取 6~8 h,直至提取液无色为止,浓缩得胶状物,置于冰箱中备用。

1.2.2 羌活粗提物减轻乙草胺对水稻药害的生物活性试验

水稻种子在 28 °C 清水中浸泡 2 d,30 °C 下催芽 1 d,露白后选出芽齐整的种子播于塑料盒(规格 13 cm×8 cm×5 cm,装 200 g 过 3 mm 筛的风干土)中,每盒 15 粒,播种后置于恒温光照培养箱中,

每天 12 h 光照培养。培养箱白天温度 (26±2) °C,晚上(22±2) °C,3 d 后进行药剂处理。

1) 将 900 g/L 乙草胺分别配制成质量浓度为 0.000 4、0.002 0、0.010 0、0.050 0、0.250 0、1.250 0、6.250 0 mg/L 的药液,取 100 mL 加入塑料盒,每个药剂浓度设 3 次重复,用清水作对照,用于评价水稻幼苗对乙草胺的敏感性,同时确定羌活粗提物对水稻乙草胺解毒试验中的乙草胺的使用浓度。

2) 将羌活粗提物分别用去离子水稀释成质量浓度为 2.500、0.500 0、0.250 0、0.100 0、0.020 0、0.004 0、0.000 8 g/L 的药液,每盒分别加入 50 mL 质量浓度为 0.10 mg/L 的乙草胺和 50 mL 不同浓度的羌活粗提物(混合后的质量浓度都降低一半),设 0.05 mg/L 的乙草胺(AC)和清水对照(CK),每个处理 3 次重复。

将以上各处理施药后继续在光照培养箱中每天 12 h 光照培养。处理后第 7 天测定水稻幼苗的株高和株鲜重。在每盒中随机取 10 株水稻幼苗测量株高,对每 10 株水稻称鲜重,结果取其平均值。株高、株鲜重的抑制率和恢复率的计算:株高抑制率=(对照株高-处理株高)/对照株高;株鲜重抑制率=(对照株鲜重-处理株鲜重)/对照株鲜重;相对恢复率=(安全剂处理值-乙草胺处理值)/(清水对照-乙草胺处理值)。

1.2.3 水稻幼苗 GSTs 活性的测定

在 250 mL 烧杯中加入 200 mL 0.3%的琼脂培养基,并加入羌活粗提物,使培养基中羌活粗提物质量浓度分别为 0.050 0、0.100 0、0.150 0、0.200 0、0.250 0 g/L,另设 0.05 mg/L 乙草胺处理,每处理设 3 个重复。水稻种子经催芽后播于培养基中,28 °C 黑暗培养 5 d,测定幼苗 GSTs 活力,方法参照文献[16-17],略有改进。

1.2.4 数据分析

试验数据用 SPSS 中的 LSD 多重比较法进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 水稻幼苗对乙草胺的敏感性

由表 1 可以看出,当乙草胺质量浓度低于 0.01 mg/L 时,对水稻幼苗的生长几乎没有影响,株高和株鲜重与对照均没有差别。但当乙草胺质量浓度达到 0.05 mg/L 时,会对水稻幼苗的生长产生明显的抑制作用,株高和株鲜重的抑制率分别为 55.4%和 32.9%。随着乙草胺质量浓度的加大,对水稻株高和株鲜重的抑制率显著增大。

表 1 乙草胺对水稻幼苗生长的影响

Table 1 The influence of acetochlor on growth of rice shoots				
质量浓度/ (mg·L ⁻¹)	株高/cm	株高抑 制率/%	每 10 株 鲜重/g	株鲜重抑 制率/%
0.000 0	(21.07±3.12)a	0.0	(0.626±0.025)a	0.0
0.000 4	(21.01±1.28)a	0.3	(0.630±0.027)a	-0.6
0.002 0	(20.91±2.40)a	0.7	(0.622±0.031)a	0.6
0.010 0	(21.01±1.98)a	0.3	(0.640±0.030)a	-2.2
0.050 0	(9.40±3.31)b	55.4	(0.420±0.020)b	32.9
0.250 0	(4.95±0.56)c	76.5	(0.263±0.021)c	58.0
1.250 0	(3.84±0.92)cd	81.8	(0.152±0.025)d	75.7
6.250 0	(3.50±0.73)d	83.4	(0.150±0.028)d	76.0

2.2 羌活粗提取物减轻乙草胺对水稻药害的效果

选择在接近株高抑制中浓度剂量 0.05 mg/L 条件下,测定羌活粗提取物作为安全剂对乙草胺的解毒效果。结果表明,在乙草胺质量浓度为 0.05 mg/L 条件下,当羌活粗提取物质量浓度为 0.050 0、0.125 0、0.250 0 和 1.250 0g/L 时,对水稻幼苗有较好的保护效果,株高分别为对照的 77.9%、95.1%、96.1%、96.2%(图 1);株鲜重分别为对照的 80.9%、98.8%、94.0%、98.4%(图 2),均明显高于乙草胺对照($P<0.05$);当羌活粗提取物质量浓度为 0.002 0~0.010 0 g/L 时,对水稻幼苗株高的保护效果相对较弱,但与乙草胺对照相比仍达到显著水平;当羌活粗提取物质量浓度低于 0.002 0 g/L 时,水稻幼苗的株高和株鲜重与乙草胺对照(AC)均没有显著差别,即对水稻没有保护效果。

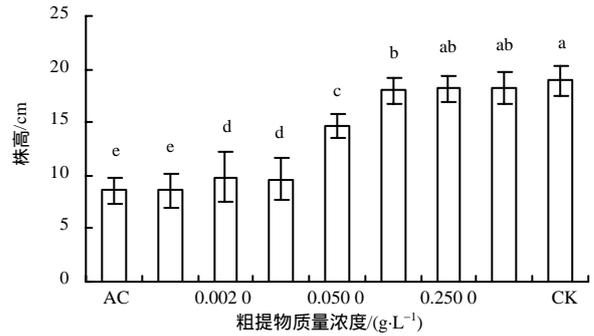


图 1 羌活粗提取物对水稻幼苗株高的保护效果

Fig. 1 Protective effect of crude extract of *Rhizoma Radix Notopterygii* to plant height of rice shoots

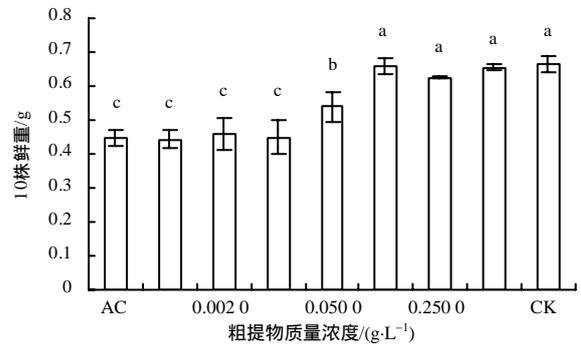


图 2 羌活粗提取物对水稻幼苗株鲜重的保护效果

Fig. 2 Protective effect of crude extract of *Rhizoma Radix Notopterygii* to fresh weight of rice shoots

从相对恢复率来看,当羌活粗提取物质量浓度分别为 0.050 0、0.125 0、0.250 0、1.250 0 g/L 时,水稻幼苗的株高恢复率分别为 59.2%、91.0%、92.9%、93.0%;株鲜重恢复率分别达 18.4%、73.1%、58.7%、72.0%(图 3)。说明在本试验条件下,羌活粗提取物对水稻的株高和株鲜重均有一定的保护作用,质量浓度为 0.010 0~0.125 0 g/L 时,随着羌活粗提取物剂量的增加,其保护作用逐渐增强。

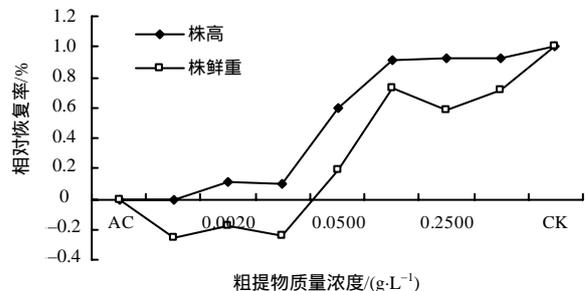


图 3 羌活粗提取物保护水稻幼苗免受乙草胺药害的效果

Fig. 3 Protective effect of crude extract of *Rhizoma Radix Notopterygii* in reducing the phytotoxicity of acetochlor to rice shoots

2.3 羌活粗提物对水稻幼苗 GSTs 活性的影响

羌活粗提物对水稻幼苗地上部 GSTs 活性影响与剂量存在较大的关系,当羌活粗提物质量浓度为 0.050 0 和 0.100 0 g/L 时,其 GSTs 活性与清水对照无明显差别,而当羌活粗提物质量浓度为 0.150 0、0.200 0 和 0.250 0 g/L 时,其 GSTs 活性分别为 244.4、323.0 和 342.0 nmol/(mg·min),分别是对照的 1.5、2.0 和 2.1 倍。而乙草胺处理不能诱导水稻幼苗地上部 GSTs 活性的增加(图 4)。

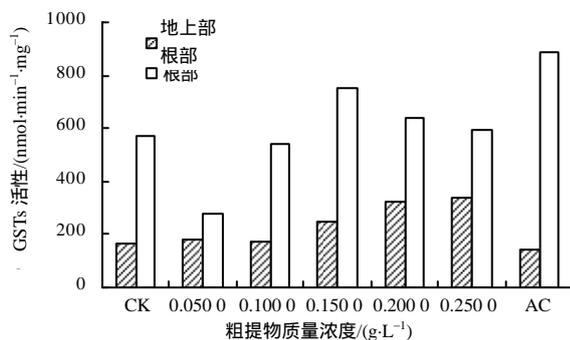


图 4 羌活粗提物对水稻幼苗 GSTs 活性的影响

Fig. 4 Influence of crude extract of *Rhizoma et Radix Notopterygii* on GSTs activity in rice shoots

与地上部 GSTs 活性相比,根中 GSTs 活性受羌活粗提物诱导的效果有明显不同。在粗提物质量浓度小于 0.150 0 g/L 时, GSTs 活性随着浓度的增加逐渐增大,但都低于对照;当羌活粗提物质量浓度为 0.150 0 g/L 时,活性则增强为对照的 1.3 倍;当粗提物质量浓度为 0.200 0 和 0.250 0 g/L 时, GSTs 活性又随之降低。而乙草胺处理的 GSTs 活性明显高于对照,意味着乙草胺对根部 GSTs 活性有一定的诱导作用。水稻根部 GSTs 活性显著高于地上部。

3 讨论

安全剂保护作物免受氯乙酰胺类除草剂的药害,被认为与它们能增加 GSTs 活性有关^[18-20]。本研究结果表明,在羌活粗提物质量浓度为 0.150 0~0.250 0 g/L 时,水稻地上部 GSTs 活性能够被羌活粗提物显著诱导增强。与此对应,在此剂量范围内,羌活粗提物对乙草胺有较好的解毒效果,说明 GSTs

活性与水稻对乙草胺的抗性密切相关,这种植物性安全剂能通过诱导水稻幼苗体内 GSTs 活性增强,从而提高水稻对乙草胺的耐受能力。这与一些化学安全剂对水稻上氯乙酰胺类除草剂的解毒机理相似^[21-22]。另外,发现乙草胺不能提高水稻地上部 GSTs 活性,这可能是水稻对乙草胺抗性较差的原因之一^[8]。水稻根中 GSTs 活性与地上部 GSTs 有明显不同,说明水稻根和茎叶中的 GSTs 可能是不同类型的同工酶,这种组织活性分布特征与各个组织的不同功能机制相适应。

参考文献:

- [1] 张一宾,张悻.农药[M].北京:中国物资出版社,1997:403.
- [2] Nemeth-Konda L, Fuleky G Y, Mororjan G Y, et al. Sorption behavior of acetochlor, atrazine, carbendazim, diazinon, imidacloprid and isoproturon on Hungarian agricultural soil[J]. Chem J, 2002, 48: 545-552.
- [3] 刘宝生,高俊凤,刘亦学,等.乙草胺对小麦出苗及幼苗生长的安全性评价[J].天津农业科学,2006,12(2):34-36.
- [4] Jablonkai I, Hatzios K K. Microsomal oxidation of the herbicides EPTC and acetochlor and of the safener MG-191 in maize[J]. Pwstic Biochem Physiol, 1994, 48: 98-109.
- [5] 程新胜,任勇.乙草胺对烟草生长的影响[J].安徽农业科学,2004,32(6):1192-1194.
- [6] 张金艳,曹先良.除草剂解毒剂解除乙草胺对水稻残留药害的活性研究[J].黑龙江八一农垦大学学报,2009,21(3):39-41.
- [7] Huang H, Xiong Z T. Toxic effects of cadmium, acetochlor and bensulfuron-methyl on nitrogen metabolism and plant growth in rice seedlings[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2009, 94(2/3): 64-67.
- [8] 丘银清,候任昭,江如蓝.水稻对丁草胺和乙草胺抗性的比较研究[J].华南师范大学学报:自然科学版,2001(4):79-83.
- [9] Farago S, Brunold C, Kreuz K. Herbicide safeners and glutathione metabolism[J]. Physiol Plant, 1994, 91: 537-542.
- [10] Abu-Qare A W, Duncan H J. Herbicide safeners: Uses,

- limitation, metabolism and mechanism of action[J]. *Chemosphere*, 2002, 48(9):965-974.
- [11] Hatzios K K, Burgos N. Metabolism-based herbicide resistance: Regulation by safeners[J]. *Weed Sci*, 2004, 52: 454-467.
- [12] 李绍峰, 付颖, 叶非. 除草剂安全剂 R-29148 对乙草胺解毒的生测研究[J]. *农药*, 2000, 39(10): 35-37.
- [13] 孔凡彬, 徐瑞富, 刘起丽, 等. 两种安全剂对小麦上乙草胺的解毒作用[J]. *湖北农业科学*, 2008, 47(1): 42-44.
- [14] 毕洪梅, 张金艳, 叶非, 等. 除草剂安全剂的研究发展现状及商用前景[J]. *世界农药*, 2007, 29(2): 15-18.
- [15] 叶惠, 刘伟, 陈建勋, 等. 乙草胺对水稻的伤害及 CGA₁₂₃₄₀₇ 对其伤害的保护作用[J]. *华南农业大学学报*, 2000, 21(2): 61-63.
- [16] Deng F, Hatzios K K. Purification and characterization of two glutathione S-transferase isozymes from indica-type rice involved in herbicide detoxification[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2002, 72: 10-23.
- [17] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 143-147.
- [18] Gronwslid J W, Fuerst E P, Eberlein C X, et al. Effect of herbicide antidotes on glutathione content and glutathione S-transferase activity of sorghum shoots[J]. *Pestic Biochem Physiol*, 1987, 29: 66-76.
- [19] Marrs K A. The function and regulation of glutathione S-transferase in plants[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1996, 47: 127-158.
- [20] Scarponi L, Buono D D, Vischetti C. Persistence and detoxification of pretilachlor and fenclorim in rice (*Oryza sativa*). *Agronomie*, 2003, 23: 147-151.
- [21] Wu J R, Cramer C L, Hatzios K K. Characterization of two cDNAs encoding glutathione S-transferases in rice and induction of their transcripts by the herbicide safener fenclorim[J]. *Physiologia Plantarum*, 1999, 105: 102-108.
- [22] Scarponi L, Buono D D, Vischetti C. Effect of pretilachlor and fenclorim on carbohydrate and protein formation in relation to their persistence in rice[J]. *Pest Management Science*, 2005, 61(4): 371-376.

责任编辑: 罗慧敏