

· 研究简报 ·

甲基二磺隆及吡唑解草酯对不同品种小麦 ALS 酶的影响

谢艳红¹, 邱立红¹, 蒋家珍¹, 王成菊^{1*}, 由振国²

(1. 中国农业大学 理学院 应用化学系, 北京 100094; 2 拜耳作物科学公司, 北京 100022)

摘要: 采用温室盆栽茎叶喷雾处理, 研究了 3% 甲基二磺隆油悬浮剂以及安全剂吡唑解草酯对不同品种小麦的耐药性及其对靶标酶乙酰乳酸合成酶(ALS)的影响。结果表明, 甲基二磺隆对敏 18 号小麦株高抑制程度明显高于抗 6 号。离体 ALS 酶含量和活力测定结果表明, 抗 6 号 ALS 含量高于敏 18 号, 在 200 和 400 $\mu\text{mol/L}$ 的吡唑解草酯溶液中黑暗培养 7 d, 抗 6 号小麦 ALS 比活力比对照分别增加 1.29 和 1.58 倍, 敏 18 号比对照分别增加 0.25 和 0.15 倍。抗 6 号小麦品种对甲基二磺隆耐药性较强。小麦自身 ALS 含量和比活力差异以及安全剂吡唑解草酯对它们的诱导差异可能是小麦品种对甲基二磺隆耐药性不同的原因之一。

关键词: 甲基二磺隆; 吡唑解草酯; 小麦; 乙酰乳酸合成酶

中图分类号: S481.1

文献标识码: A

文章编号: 1008-7303(2004)03-0081-04

Preliminary Study on the Influence of Mesosulfuron and Mefenpyr-diethyl to the Tolerance of the Various Cultivars of Wheat (*Triticum aestivum* L.)

XIE Yan-hong¹, QIU Li-hong, JIANG Jia-zhen¹, WANG Cheng-ju^{1*}, YOU Zhen-guo²

(1. Department of Applied Chemistry, College of Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. Development Department, Bayer Crop Science, Co. Ltd., Beijing 100022, China)

Abstract: In order to study the mechanism of different tolerance of two wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars against mesosulfuron, the trial was carried out by the comparison between the sensitivities of acetolactate synthase (ALS) to mesosulfuron. The difference sensitivity between two wheat cultivars to mesosulfuron was observed in greenhouse experiments. Seedling height was reduced by foliar application of mesosulfuron plus mefenpyr-diethyl. The level of ALS enzyme extracted from shoot in R-6 was higher than that in S-18. The specific activity of ALS in R-6 was increased to ratio 1.29 and 1.58 by mefenpyr-diethyl treatment in the concentration of 200 and 400 $\mu\text{mol/L}$, while the ratio in S-18 was 0.25 and 0.15. From these experiments, it was concluded that R-6 was more tolerant than S-18 to mesosulfuron, and the difference level and specific activity of ALS induced by mefenpyr-diethyl may partly contribute to the differential tolerance of the two wheat cultivars to mesosulfuron.

Key words: mesosulfuron; mefenpyr-diethyl; wheat; acetolactate synthase (ALS)

甲基二磺隆(mesosulfuron)是新的高效、安全磺酰胺类苗后除草剂,其商品化制剂为3%甲基二磺隆油悬浮剂(世玛),其作用机制为乙酰乳酸合成

酶(ALS)的抑制剂。该药每公顷用有效成分9.0~15.75 g(折成世玛为300~525 mL/hm²),配药同时要桶混加入药液量0.2%~0.5%的非离子表面

* 收稿日期: 2003-12-16; 修回日期: 2004-03-02

作者简介: 王成菊(1964-),女,吉林人,硕士,副教授,主要从事农药毒理与使用技术原理研究

联系电话: 010-62733924; E-mail: wangchengju@cau.edu.cn

基金项目: “十五”国家科技攻关计划项目(2001BA509B08)。

活性剂(如 Genapal 600 mL/hm²)。该药用于小麦、大麦等作物田防除禾本科杂草及部分阔叶杂草,对雀麦 *Bromus japonicus*、黑麦草 *Lolium rigidum* 等恶性禾本科杂草有特效,因此具有广阔的应用前景^[1]。田间试验表明,不同品种小麦对 3% 甲基二磺隆油悬浮剂的耐药性有差异^[1,2]。Bailey 等报道小麦和不同品种的多花黑麦草 *L. multiflorum* 对甲基二磺隆的耐药性可能与 ALS 敏感性差异有关^[3]。

吡唑解草酯是 1999 年英国 Brighton 植保会议公布的新的除草剂安全剂,它与一些除草剂一起使用,可使小麦、大麦等作物免受伤害。3% 甲基二磺隆油悬浮剂中含有安全剂吡唑解草酯,甲基二磺隆与吡唑解草酯的体积比为 1:2。吡唑解草酯能否提高小麦对甲基二磺隆的耐药性以及其作用机理如何,目前国内外尚未见报道。为此,作者研究了甲基二磺隆及吡唑解草酯对不同品种小麦 ALS 含量及比活力的影响,以期不同品种小麦对甲基二磺隆耐药性机理研究提供科学根据。

1 材料与方 法

1.1 供试药剂及试剂

98.1% 甲基二磺隆原药(meso-sulfuron), 96.0% 吡唑解草酯原药(mefenpyr-diethyl), 3% 甲基二磺隆油悬浮剂(meso-sulfuron OF)(甲基二磺隆:吡唑解草酯=1:2, 体积比),均由德国拜耳作物科学公司提供。

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(均为 Sigma 公司产品); 3-羟基丁酮(Acetoin)(Fluka 公司产品); 丙酮酸钠、*a*-萘酚、考马斯亮蓝 G-250、MgCl₂·6H₂O 及其他所用试剂均为国产分析纯。

1.2 供试小麦品种

敏 18 号(S-18, 95-33, 籽粒瘦型, 深色, 半硬质), 抗 6 号(R-6, 蒙麦 36, 籽粒饱满, 浅色, 硬质, 蛋白含量高),均由内蒙农科院植物保护研究所提供。

1.3 试验方法

1.3.1 不同品种小麦对甲基二磺隆的耐药性 将供试小麦种子用清水浸种 12 h, 常温条件下催芽 24 h 至露白, 挑选大小一致、露芽整齐的种子 20 粒, 播种在规格为 12 cm × 12 cm 的营养钵中, 放入温室内(16~27℃)。正常日照, 定时定量浇水, 待幼苗生长至 3~4 叶龄期备用。

试验设 5 个浓度, 有效成分含量分别为 45、

56.25、1.13 × 10³、2.25 × 10³、4.50 × 10³ μg/L, 设清水对照, 每个处理重复 3 次。待盆栽小麦培养至 3~4 叶期, 将供试小麦(每盆 20 株, 每个处理 6 盆)置于自动喷雾装置中, 将 3% 甲基二磺隆油悬浮剂 450 mL/hm² 加专用展着剂 Genapal 600 mL/hm², 用水稀释成系列浓度, 在 0.4 MPa 压力、53 cm/s 移动速度下喷雾处理, 另设不喷药的清水对照。30 d 后测量小麦的株高, 求出株高抑制率, 并以抑制率机率值(Y)和浓度对数值(X)建立回归方程(Y=A+BX), 求出株高抑制率 IC₅₀ 值。数据用 SPSS 软件处理。

1.3.2 安全剂对小麦 ALS 含量及比活力的影响

1.3.2.1 ALS 提取样本的培养 将一定量的供试小麦种子用蒸馏水浸种至露白, 挑选大小一致、露芽整齐的种子, 播种于直径 120 mm 培养皿中(内装清洗干净的河沙)。每皿分别加入不同浓度(0~400 μmol/L)的吡唑解草酯水溶液 75 mL, 放入恒温箱中, 27℃ 避光培养 7 d。以小麦幼芽作为 ALS 的提取样本。每个处理重复 3 次。

1.3.2.2 ALS 的提取 参照文献[4~7]的方法并加以改进。取 5 g 样本加 10 mL 提取液(0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液, pH 7.5, 其中含 1 mmol/L 丙酮酸钠、0.5 mmol/L TPP、10 μmol/L FAD 和 0.5 mmol/L MgCl₂), 在冰浴中用少许石英砂研磨, 0~4℃ 25 000 g 离心 20 min, 取上清液, 用 50% 饱和度的硫酸铵沉淀 1 h, 再经 25 000 g 离心。弃去上清液, 沉淀用 10 mL 酶溶解液(0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液, pH 7.5, 其中含 20 mmol/L 丙酮酸钠、0.5 mmol/L MgCl₂)溶解, 得粗酶液。

1.3.2.3 ALS 比活力测定^[4~7] 0.5 mL 酶促反应液(0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液, pH 7.0, 其中含 0.5 mmol/L MgCl₂、20 mmol/L 丙酮酸钠、0.5 mmol/L TPP 和 10 μmol/L FAD)加 0.4 mL 粗酶液, 分别加入 0.1 mL 不同浓度的甲基二磺隆, 35℃ 下黑暗中水浴处理 1 h 后, 加 0.1 mL 3 mol/L H₂SO₄。对照不加甲基二磺隆, 直接加入 0.1 mL 3 mol/L H₂SO₄ 停止反应。60℃ 下水浴处理 15 min, 脱羧。再分别加入 0.5 mL 质量分数为 0.5% 的肌酸水溶液和 0.5 mL 质量分数为 5% 的 *a*-萘酚(新配, 溶解在 2.5 mol/L 的 NaOH 溶液中), 60℃ 恒温水浴处理 15 min。冷却到室温, 在 525 nm 波长下测 OD 值。试验平行测定 3 次, 整个试验重复 2 次。

2 结果与分析

2.1 不同品种小麦对甲基二磺隆的耐药性

于 3% 甲基二磺隆油悬浮剂中加入非离子表面活性剂 Genapol, 稀释后(有效成分含量分别为 45、562.5、 1.13×10^3 、 2.25×10^3 、 $4.50 \times 10^3 \mu\text{g/L}$)茎叶喷雾处理 3~4 叶期的小麦。30 d 后, 抗 6 号小麦的株高抑制中浓度 IC_{50} 值为 $1.18 \times 10^4 \pm 303 \mu\text{g/L}$, 敏 18 号的 IC_{50} 值为 $2.24 \times 10^3 \pm 68.7 \mu\text{g/L}$, 前者约为后者的 5 倍。由此可见抗 6 号小麦的耐药性明显强于敏 18 号。

由图 1 也可以看出, 甲基二磺隆处理 30 d 后两种小麦的耐药性趋势。在 $45 \mu\text{g/L}$ 的浓度下, 敏 18 号小麦的株高与对照相比下降了 12%, 而抗 6 号只下降了 2%。随着药剂浓度增加, 二者的受抑制程度均增加, 但敏 18 号小麦受抑制程度较大, 在 $2.25 \times 10^3 \mu\text{g/L}$ 浓度下抑制率已达到 50%, 最高浓度 $4.50 \times 10^3 \mu\text{g/L}$ 处理的株高只有对照的 34%, 而抗 6 号 $4.50 \times 10^3 \mu\text{g/L}$ 处理的抑制率为 44%, 仍未达到抑制中浓度。

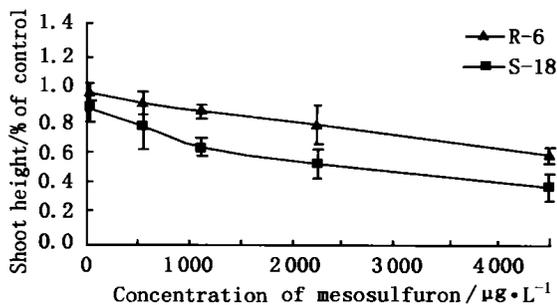


Fig 1 Shoot height of R-6 and S-18 wheat after 30 days of folia application of mesosulfuron and mefenpyr-diethyl

2.2 安全剂对小麦 ALS 含量及比活力的影响

2.2.1 安全剂对 ALS 含量的影响 正常培养条件下(未加甲基二磺隆和吡唑解草酯)两个品种的 ALS 含量分别为 16.0 ± 1.00 (抗 6 号对照)和 $8.47 \pm 0.27 \mu\text{g/g}$ FW (敏 18 号对照)。抗 6 号小麦的 ALS 含量明显高于敏 18 号的, 二者差异显著, 如图 2 所示。

加入吡唑解草酯水溶液培养 7 d 后测定各个处理小麦的 ALS 含量, 当浓度为 50 和 $100 \mu\text{mol/L}$ 时, 敏 18 号的 ALS 含量分别是 10.4 ± 0.25 和

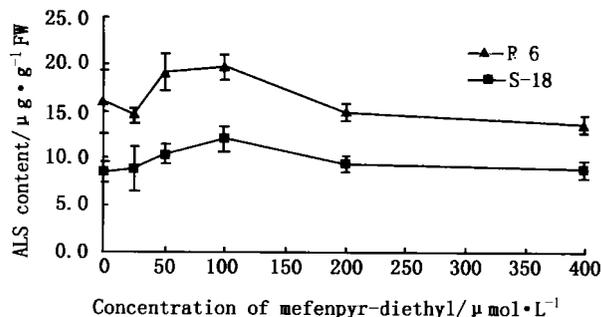


Fig 2 The effects of mefenpyr-diethyl on ALS level in wheat

$11.9 \pm 0.29 \mu\text{g/g}$ FW, 二者都明显高于敏 18 号对照的 ALS 含量。当吡唑解草酯浓度为 $100 \mu\text{mol/L}$ 时, 抗 6 号的 ALS 含量为 $19.6 \pm 0.33 \mu\text{g/g}$ FW, 也明显高于抗 6 号对照的。当浓度为 200~400 $\mu\text{mol/L}$ 时, 两个小麦品种的 ALS 含量都略有降低, 但都与对照没有明显差异。

2.2.2 安全剂对 ALS 比活力的影响 正常培养条件下(未加甲基二磺隆和吡唑解草酯), 敏 18 号和抗 6 号 ALS 比活力分别为 55.8 ± 2.51 和 $84.6 \pm 5.37 \text{mmol} \cdot (\text{mg pro})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 可见抗 6 号 ALS 比活力明显高于敏 18 号的比活力。经吡唑解草酯水溶液处理 7 d 后, 两个小麦品种的 ALS 活力产生了变化, 见图 3。

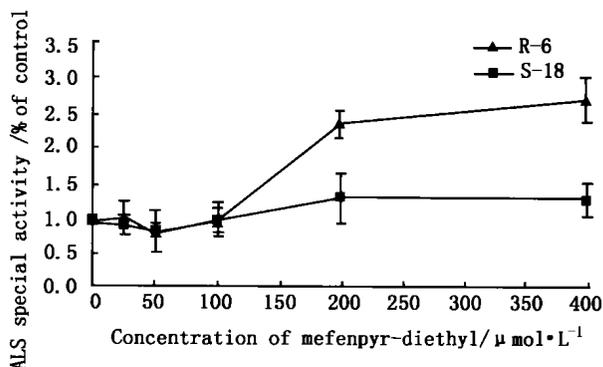


Fig 3 The effects of mefenpyr-diethyl on ALS special activity in wheat

当吡唑解草酯为 200 和 $400 \mu\text{mol/L}$ 时, 敏 18 号 ALS 比活力分别是对照的 1.25 和 1.15 倍, 抗 6 号的分别是对照的 2.29 和 2.58 倍。可见经吡唑解草酯水溶液培养 7 d 后, 抗 6 号的 ALS 比活力提高比敏 18 号的明显。说明吡唑解草酯在一定浓度 (25~100 $\mu\text{mol/L}$) 下对敏感和耐性小麦 ALS 活性均无明显影响, 但在高浓度 (200~400 $\mu\text{mol/L}$) 下

能够明显提高小麦ALS酶比活力,且抗6号小麦ALS活性的增加较敏18号品种显著。

3 讨论

耐药性试验表明,3%甲基二磺隆油悬浮剂加入非离子表面活性剂Genapol,稀释后进行茎叶喷雾处理,耐性小麦品种的株高抑制率是敏感品种的5.3倍(IC₅₀值比),抗6号耐药性强于敏18号。正常培养条件下(未加甲基二磺隆和吡唑解草酯),离体测定抗6号的ALS含量明显高于敏18号的,前者是后者的1.89倍;抗6号ALS比活力也明显高于敏18号的,前者是后者的1.51倍。这说明两个小麦品种自身ALS就有差异。低浓度的吡唑解草酯(25~100 μmol/L)对两个小麦品种ALS活力均无明显影响,但当药剂浓度为200和400 μmol/L时则可明显提高其ALS比活力,敏18号的ALS比活力分别提高了25%和15%,而抗6号的分别提高了129%和158%。100 μmol/L吡唑解草酯能提高两个品种ALS含量;50 μmol/L的吡唑解草酯能提高敏18号的ALS含量。这些都说明吡唑解草酯可以间接诱导小麦ALS活性。

甲基二磺隆是一个新的磺酰脲除草剂。有研究表明,不同品种的多花黑麦草对甲基二磺隆耐药性可能与ALS靶标敏感性不同有关^[3]。从本试验结果看,两个品种小麦ALS含量及比活力差异以及安全剂吡唑解草酯对两个品种ALS活性诱导能力差异可能是这两个小麦对甲基二磺隆耐药性不同的原因之一。

路凯等研究表明,NA能间接激活ALS活性,从而减轻胺苯磺隆对水稻的药害^[7];Baker等认为,不同品种美洲雀稗 *Paspalum notatum* Fluegge 的ALS活力对甲磺隆的敏感性不同,可能与作用靶标的突变有关^[8];Carey等人证明,对氟嘧磺隆敏感的龙葵 *Solanum nigrum* 其ALS对氟嘧磺隆也比较敏感,而对烟嘧磺隆耐药性高的品种ALS含量高^[9]。也有一些研究表明,不同作物品种对磺酰脲除草剂耐药性差异与ALS无关,主要是代谢差异造成的^[10-12]。由此看来,植物对磺酰脲除草剂耐药性机理比较复杂,值得深入研究。

参考文献

[1] GUO Qing-yun (郭青云), XN Cun-yue (辛存岳), GUO Liang-zhi (郭良芝). 世玛3% OF 防除春麦田禾

本科杂草药效试验[J]. *Pesticides* (农药), 2002, 41(3): 38-40

[2] YUAN Guo-hui (原国辉), GAO Yi-feng (高一风), ZHOU Yong-ling (周永玲), et al. 3% 世玛乳油防除麦田雀麦等杂草试验[J]. *Pesticides* (农药), 2002, 41(2): 35-36

[3] Bailey W A, Hatzios K K, Wilson H P. Responses of winter wheat and diclofop methyl-sensitive and -resistant Italian ryegrass to AE F130060 03 [J]. *Weed Science*, 2003, 51: 515-522

[4] FAN Zhi-jin (范志金). Studies on Environmental Behavior of New Sulfonylurea Herbicide Mono-sulfuron [D]. Beijing (北京): China Agricultural University (中国农业大学), 2000

[5] Ray T B. Site of action of chlorsulfuron [J]. *Plant Physiol*, 1984, 75: 827-831

[6] TAN Xiao-ping (谭小平), BA I Lian-yang (柏连阳), XIAO Q i-ming (肖启明), et al. 水稻不同品种或组合对甲磺隆耐药性差异的机制研究[J]. *Chin J Pestic Sci* (农药学报), 2002, 4(2): 45-49

[7] LU Kai (路凯), Q IAN Chuan-fan (钱传范). 萘二甲酸酐减轻胺苯磺隆对水稻药害的作用机制[J]. *Acta Phytophylacaca Sinica* (植物保护学报), 2000, 27(3): 268-272

[8] Baker R D. Differential susceptibility of five bahiagrass to metsulfuron methyl [J]. *Plant Physiology*, 1997, 57: 5395-5399

[9] Carey J B. Refining postemergence weed control in corn: Herbicide selectivity and timing (*Zea mays*) [J]. *Plant Physiology*, 1995, 55: 2445-2450

[10] Cotteman J C, Saari L L. Rapid metabolic inactivation is the basis for cross-resistance to chlorsulfuron in diclofop methyl-resistant rigid ryegrass (*Lolium rigidum*) biotype SR4/84 [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1992, 43: 182-192

[11] Dastgheib F, Field R J, Namjou S. The mechanism of differential response of wheat cultivars to chlorsulfuron [J]. *Weed Research*, 1994, 34: 299-308

[12] LI Yong-hong (李永红), FAN Zhi-jin (范志金), Q IAN Chuan-fan (钱传范), et al. 单嘧磺隆对不同小麦品种的耐药性研究[J]. *Pesticides* (农药), 2002, 41: 32-33

(责任编辑: 金淑惠)