

文章编号: 1005-0906(2008)01-0122-04

玉米谷胱甘肽转移酶(GSTs)特性 及除草剂的诱导作用

郭玉莲^{1,3}, 陶 波¹, 高希武²

(1. 东北农业大学植物保护系, 哈尔滨 150036; 2. 中国农业大学昆虫系, 北京 100094;

3. 黑龙江省农科院农药应用研究中心, 哈尔滨 150086)

摘要: 对玉米谷胱甘肽转移酶(GSTs)组织分布、发育期变化及乙草胺和阿特拉津对 GSTs 的影响进行了初步研究。结果表明, 以 CDNB 为底物, 玉米不同组织部位的 GSTs 活性具有显著差异, 根中的 GSTs 活性最高, 茎部次之, 叶部最低; 随着发育期的变化, GSTs 活性也随之变化, 除茎部外, 随着发育期的变化, GSTs 比活力也逐渐增加, GSTs 活性到 3 叶期达到峰值, 4 叶期时 GSTs 活性逐渐降低; 乙草胺对不同组织的诱导作用具有一定的差异, 可以诱导叶部 GSTs 活性增加, 对根部的 GSTs 活性呈抑制趋势; 阿特拉津可以增加根部的 GSTs 活性, 对叶部的 GSTs 活性起抑制作用。

关键词: 玉米; 谷胱甘肽转移酶; 乙草胺; 阿特拉津; 诱导作用

中图分类号: S513.01

文献标识码: A

Characteristic of Maize Glutathione S-transferase (GSTs) and Induction Action of Acetochlor

GUO Yu-lian^{1,3}, TAO Bo¹, GAO Xi-wu²(1. *Northeast Agricultural University, Harbin 150030;*2. *Department of Entomology, Chinese Agricultural University, Beijing 100094;*3. *Research Center of Pesticide Application, Heilongjiang Academy
of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)*

Abstract: Preliminary research has been conducted on tissue distribution, change of growth period of maize GSTs and effect of acetochlor and atrazine. The results showed that using CDNB as base substance, GSTs activity took on remarkable difference in various tissue of maize, the root was the highest, stem was second, the lowest was the leaf; with change of growth period, GSTs activity also changes accordingly. Besides stem, with development of growth period, GSTs activity increases gradually, achieves peak in the three-leaf stage, and reduces gradually in the four-leaf stage; induction action of acetochlor on different tissue has definite difference, the induction activity in the leaf GSTs increases, the activity of the roots was a reactive curb the trend; atrazine was different, the activity of the roots GSTs increased, the activity of the leaf was a reactive curb the trend.

Key words: Maize; Glutathione S-transferase; Acetochlor; Atrazine; Induction action

谷胱甘肽 S- 转移酶(Glutathione S-transferase, GSTs)是一个同工酶家族, 由同源或异源二聚体组

成, 广泛分布于原核生物和真核生物(昆虫、哺乳动物和高等植物)中。GSTs 可受多种因素的诱导, 对一些有毒物质, 包括农药、致癌物和诱变剂等起到解毒的作用^[1~4]。作为生物体内重要的解毒酶系, 参与生物体对外源物质的次级代谢, 能催化 GSH 与疏水化合物进行亲核反应, 这种作用是生物体进行脱毒和排毒的重要方式, 其表达具有组织的特异性^[5]。植物 GSTs 由于在一些除草剂代谢中的作用而受到特别的关注, 这些除草剂大体上可以分为 3 类: 氯乙酰胺

收稿日期: 2007-07-10

作者简介: 郭玉莲(1970-), 女, 在读博士, 主要从事农药应用及环境毒理学研究。E-mail: ylguo70@163.com

高希武为本文通讯作者。Tel: 010-62732974

E-mail: gaowu@263.net.cn

类、均三氮苯类及硫代氨基甲酸酯类^[6]。

乙草胺和阿特拉津作为玉米播后苗前土壤处理的除草剂被广泛应用,其长年大量应用造成的药害日趋严重。因此,研究乙草胺和阿特拉津对玉米 GSTs 的影响及玉米体内解毒酶系 GSTs 的特性,对探讨玉米的生长发育及其对乙草胺和阿特拉津的抗性机制等方面都具有重要的意义。本文研究了玉米品种四单 19 体内 GSTs 的组织分布、发育期变化及乙草胺和阿特拉津对玉米 GSTs 的影响,为改良植物品质、提高植物抗逆性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 化学试剂

1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB)、聚乙烯吡咯烷酮(PVPP)和还原型谷胱甘肽(GSH)均为 Sigma 公司产品;牛血清白蛋白(BSA)购自北京同正生物公司;90%乙草胺为大连瑞泽农药厂产品。其它试剂均为国产分析纯。

1.1.2 供试材料

供试玉米品种为四单 19。

1.2 试验方法

1.2.1 盆栽试验

将供试材料种在 20 cm×25 cm 的花盆中,内装等量蛭石。共设 6 个处理,分别将 90%的乙草胺按 0、10、20、40、60、120 mL/667 m² 配制不同浓度的药液,在每个处理的花盆中加入相应浓度的药液 100 mL。种子催芽后播种,每盆 50 粒,覆上蛭石。每个处理设 3 次重复,每个重复种 5 盆。置于温室中,常规管理。

1.2.2 酶液制备

参照 Pamela 等的方法^[7],稍加改进。取 1 g 鲜组织,加入 3 mL 0.1 mol/L(pH 7.5)的 Tris-HCl 缓冲液(含 1 mmol/L EDTA 和 75 g/kg 的 PVPP),液氮中研磨。匀浆液在 4℃、15 000 r/min 离心 20 min,取上清液作为酶源。

1.2.3 酶活性测定

参照 Gerard 等方法^[8],稍加改进。在室温下,加入 0.1 mol/L(pH 7.0)的 PBS(含 1 mmol/L 的 EDTA)缓冲液、30 mmol 的 CDNB 和 30 mmol 的 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(OD₃₄₀/min),按下式计算酶活力:

$$\text{GSTs 活力}(\text{nmol}/\text{min})=(\Delta \text{OD}_{340} \cdot v)/(\varepsilon \cdot L)$$

式中 ΔOD₃₄₀ 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[0.0 096 L/(μmol·cm)],*L* 为比色杯的光程(1 cm)。

1.2.4 蛋白含量测定

参照 Bradford(1976)考马斯亮蓝 G-250 方法。采用 3 mL 的反应体系。对照缓冲液(pH 7.0)500 μL,考马斯亮蓝 2.5 mL,处理缓冲液(pH 7.0)490 μL,酶液 10 μL,考马斯亮蓝 2.5 mL。混匀后 2~60 min 内测定 OD_{595nm} 值。以牛血清白蛋白作标准曲线,由标准曲线计算酶液中蛋白质含量。

1.2.5 酶比活力计算

酶比活力[nmol/(min·mg)]=酶活性单位/蛋白含量。

2 结果与分析

2.1 玉米 GSTs 组织分布和发育期变化

表 1 玉米各组织部位和不同发育时期 GSTs 对 CDNB 的活性

Table 1 Specific activity of GSTs conjugating with CDNB in various tissues and different growth date

组 织 Tissue	nmol/(min·mg)		
	2 叶期 2 leaf stage	3 叶期 3 leaf stage	4 叶期 4 leaf stage
叶	90.38 ± 5.96 A	125.13 ± 4.70 A	103.85 ± 6.55 A
茎	184.51 ± 11.36 B	517.74 ± 98.60 B	609.05 ± 177.75 B
根	1214.10 ± 25.24 C	6091.50 ± 352.28 C	2301.60 ± 274.40 C

由表 1 可以看出,以 CDNB 为底物,玉米不同组织部位的 GSTs 活性具有显著差异,总的变化趋势为根>茎>叶。随着发育期的变化,GSTs 活性有所变化,叶和根的变化趋势是随着发育期的增加,GSTs 比活力也逐渐增加,到 3 叶期达到峰值,4 叶期 GSTs 比活力呈下降趋势;茎部的变化趋势是随

着生育期的增加,GSTs 比活力逐渐增大。

2.2 乙草胺对玉米 GSTs 活性的影响

由表 2 可以看出,处理 1 剂量下,四单 19 的叶部 GSTs 比活力为(134.30 ± 11.44)nmol/(min·mg),诱导增加百分率为 32.7%,随着乙草胺处理剂量的增加,叶部 GSTs 比活力增加的幅度不大,诱导增加百

分率基本上保持在 28%~29%,处理间差异不显著;茎部的 GSTs 比活力随着处理剂量的增加,诱导增加百分率也加大,处理 5 与对照差异显著,其余处理与对照间差异不显著,各处理间差异也不显著,诱导率最高增加 27.37%。乙草胺对不同组织的诱导作用

具有一定的差异,对叶部的诱导作用大于茎部;由于根部直接接触药剂,随着药剂在根部的不断积累,对根部的 GSTs 活性则呈抑制趋势,随着处理剂量的加大,乙草胺对根部 GSTs 的抑制率明显增加,最高抑制率达 53.57%。

表 2 乙草胺对玉米 GSTs 诱导的剂量效应
Table 2 Effect dosage of acetochlor induction on GSTs in maize

处 理 Treatment	叶 Leaf		茎 Stems		根 Root	
	GSTs 比活力	诱导增加百分率(%)	GSTs 比活力	诱导增加百分率(%)	GSTs 比活力	抑制百分率(%)
	[nmol/(min·mg)]	Percentage of induction	[nmol/(min·mg)]	Percentage of induction	[nmol/(min·mg)]	Percentage of
	GSTs specific activity	increased	GSTs specific activity	increased	GSTs specific activity	inhibition
0(CK)	90.38 ± 5.96 a		184.51 ± 11.36 a		1214.10 ± 25.24 a	
1	134.30 ± 11.44 a	32.70	190.58 ± 1.59 ab	3.29	996.00 ± 158.00 ab	17.96
2	127.30 ± 6.55 a	29.00	197.84 ± 18.35 ab	6.74	881.81 ± 60.52 ab	27.37
3	122.21 ± 7.30 a	26.05	207.55 ± 10.13 ab	11.10	855.19 ± 40.67 ab	29.56
4	125.64 ± 5.14 a	28.06	215.58 ± 6.65 ab	14.41	718.78 ± 102.87 bc	40.80
5	126.23 ± 15.99 a	28.40	254.05 ± 23.12 b	27.37	563.75 ± 62.83 c	53.57

2.3 阿特拉津对玉米谷胱甘肽转移酶的影响
由表 3 可以看出,随着阿特拉津剂量的增加,根

部的 GSTs 比活力增加;叶部的 GSTs 比活力随着阿特拉津剂量的增加逐渐增大,但均低于对照。

表 3 阿特拉津对玉米 GSTs 诱导的剂量效应
Table 3 Effect dosage of atrazine induction on GSTs in maize

处 理 Treatment	叶 Leaf		根 Root	
	GSTs 比活力[nmol/(min·mg)]	抑制百分率(%)	GSTs 比活力[nmol/(min·mg)]	诱导增加百分率(%)
	GSTs specific activity	Percentage of inhibition	GSTs specific activity	Percentage of induction increased
1	131.42 ± 5.96 a	33.66	1268.51 ± 96.12 a	4.29
2	150.28 ± 9.84 a	16.88	1301.29 ± 170.70 ab	6.70
3	151.61 ± 1.40 a	15.86	1370.58 ± 173.36 ab	11.42
4	175.58 ± 8.62 a	0.04	2967.00 ± 566.98 b	59.08
5	153.29 ± 12.53 a	14.59	1667.67 ± 340.94 ab	21.20
CK	175.65 ± 18.03 a		1104.10 ± 25.24 ab	

2.4 乙草胺和阿特拉津对玉米 GSTs 作用的比较

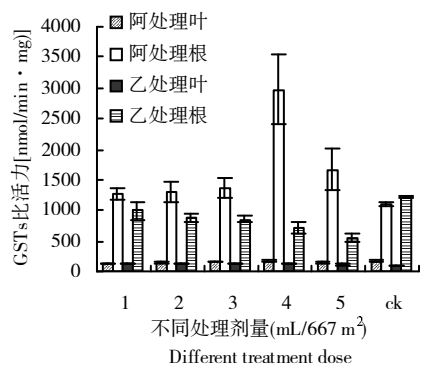


图 1 阿特拉津和乙草胺对玉米叶和根中 GSTs 的影响
Fig.1 Influence comparison of atrazine and acetochlor to GSTs of leaf and root in maize

由图 1 可以看出,阿特拉津可以诱导玉米根中的 GSTs 活性增加,抑制叶中的 GSTs 活性;乙草胺可诱导玉米叶中的 GSTs 活性增加,增加幅度不大,但抑制玉米根中的 GSTs 活性。因此,玉米四单 19 的叶和根中的 GSTs 有可能不是同一类型,阿特拉津和乙草胺可能分别诱导不同类型的 GSTs 活性增加。

3 结论与讨论

研究表明,玉米 GSTs 在各组织部位均有活性分布,在玉米根、茎、叶中均检测到 GSTs 活性,其中根部 GSTs 活性最高,其次是茎,这种组织活性分布特征可能是与各个组织的不同功能机制相适应。随

着植物发育期的变化,GSTs 活性随之变化,GSTs 活性到 3 叶期达到峰值,4 叶期时 GSTs 活性逐渐降低,这方面的研究以前未见报道。

参与解毒的 GSTs 是一个由多种同工酶组成的家族^[9]。GSTs 在植物对不同类型除草剂的抗性中起主要作用^[10]。研究表明,对不同的刺激物(如病原物和化学品)GSTs 可被特异性的诱导,具有明显的特异性和表达模式^[11~15]。迄今为止,玉米中有 7 个 GST 同工酶被鉴定出来,亦有证据表明,他们的数量可能更多^[16,17]。

有研究表明,发现 *GST-27* 基因在玉米的叶部和根部组成性表达^[18]。也有相反的结果表明,*GST-27* 基因在玉米叶部没有表现组成性表达^[19]。本实验结果表明,乙草胺对不同组织的诱导作用具有一定的差异,可以诱导叶部 GSTs 活性增加,对根部的 GSTs 活性呈抑制趋势;阿特拉津不同,它可以诱导玉米根中的 GSTs 活性增加,抑制叶中的 GSTs 活性。说明玉米根和叶中的 GSTs 可能是不同类型的同工酶,乙草胺和阿特拉津可能分别诱导不同类型的 GSTs 同工酶活性。

参考文献:

- [1] Mannervik B. The isozymes of glutathione S-transferase, Adv[J]. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.,1985, 57, 357.
- [2] Mannervik B, Danielson U H. Glutathione S-transferase:structure and catalytic, CRC Crit[J]. Rev. Biochem., 1988, 23: 283.
- [3] Hayes J D, Wolf C R. Role of glutathione transferase in drug resistance, in glutathione conjugation: mechanisms and biological significance[A]. Academic Press, London, 1988.
- [4] Tsuchida S, Sato K. Glutathione S-transferase and cancer, CRC Crit[J]. Rev.Biochem. Mol. Biol., 1990, 27: 337.
- [5] 高希武,董向丽,郑炳宗,等.棉铃虫的谷胱甘肽 S- 转移酶(GSTs): 杀虫药剂和植物次生物质的诱导与 GSTs 对杀虫药剂的代谢[J]. 昆虫学报,1997,40(2):122-127.
- [6] Laura R, Carla F, et al. Alachlor regulation of maize glutathione S-transferase genes[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 1998, 60: 205-211.
- [7] Pamela J H, David D D P. Glutathione transferase activities and herbi-

cide selectivity in maize and associated weed species[J]. Pestic. Sci., 1996, 46: 267-275.

- [8] Gerard P, Irzy K, Patrick Fuest E. Purification and characterization of a glutathione s-transferase from benoxacor-treated maize(*Zea mays*)[J]. Plant Physiol, 1993, 102: 803-810.
- [9] Edwards R, Dixon D P. The role of glutathione transferases in herbicide metabolism, in: A.H.Cobb, R.C. Kirkwood(Eds.), Herbicides and Their Mechanisms of Action[A]. Sheffield Academic Press, Sheffield, UK, 2000.
- [10] Timmerman K. Molecular characterization of corn glutathione s-transferases isozymes involved in Herbicide detoxification[J]. Physiol. Plant, 1989, 77: 456.
- [11] Droog F N J. Plant glutathione s-transferases,a tale of theta and tau[J]. Plant Growth Regul, 1997, 16:95.
- [12] Marrs K A. The functions and regulation of glutathione s- transferases in plants[J]. Plant. Mol. Biol., 1996, 47: 127.
- [13] Alfred S, Peter B. Characterization of recombinant corn glutathione s-transferase isoforms I , II , III and IV[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 1999, 63: 127-138.
- [14] David D, David J. Characterization of multiple glutathione transferases containing the GST I subunit with activities toward herbicide substrates in maize(*zea mays*)[J]. Pestic. Sci., 1997, 50: 72-78.
- [15] Andrews C J, Cummins I, Mark S, et al. Purification and characterization of a family of glutathione transferases with roles in herbicide detoxification in soybean(*Glycine max* L.); selective enhancement by herbicides and herbicide safeners[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2005, 82: 205-219.
- [16] Sari G M, Ferrario S, Rossini L. Developmental expression of glutathione s-transferases in maize and its possible connection with herbicide tolerance[J]. Euphytica, 1993, 67: 221.
- [17] Fuerst E P, Irzyk G P. Partial characterization of glutathione s- transferases isozymes induced by the herbicide safener benoxacor in maize [J]. Plant Physiol., 1993, 102: 795.
- [18] Rossini L, Frova C, et al. Alachlor regulation of maize glutathione s-transferases genes[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 1998, 60: 205-211.
- [19] Jepson I, Lay V J, Holt D C, et al. Cloning and characterization of maize herbicide safener-induced cDNAs encoding subunits of glutathione s-transferases isoforms I , II and IV[J]. Plant Mol. Biol., 1994, 26, 1885.

(责任编辑:张 英)