

猪毛蒿精油光活化抑制稗草生长及作用机理

杨淑娟¹, 万树青¹, 蒋志胜², 尚稚珍²

(1 华南农业大学 资源环境学院, 广东 广州 510642; 2 南开大学 元素有机化学研究所, 天津 300071)

摘要: 采用小杯法, 测定猪毛蒿精油在 0.1 ~ 10.0 mg/L 质量浓度范围内, 对稗草光活化抑制根、茎伸长的效果。结果表明: 光照与非光照猪毛蒿精油均表现对稗草根伸长的抑制活性, 光照显示更强抑制效果, 特别对茎长的抑制活性更为显著。利用生化酶学方法, 测定精油对稗草细胞保护酶活力的影响。结果表明: 在 0.1 ~ 10.0 mg/L 浓度范围内, 猪毛蒿精油能诱导激活 GST、GSH-Px 和 POD, 而且光照可显著提高 3 种酶的活力。但对 SOD 则具有抑制活性。电镜观察, 猪毛蒿精油可引起稗草愈伤组织细胞结构的严重损伤。

关键词: 猪毛蒿; 精油; 稗草; 光活化作用; 作用机理

中图分类号: Q946.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2004)04-0023-04

Activity of photodynamic inhibiting growth to weed and action mechanism of essential oil from *Artemisia scoparia*

YANG Shu-juan¹, WAN Shu-qing¹, JIANG Zhi-sheng², SHANG Zhi-zhen²

(1 College of Resources and Environment, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

2 Institute of Element-Organic Chemistry, Nankai Univ., Tianjin 300071, China)

Abstract: Using the method of small glass, bioassay was conducted to study the activity of the essential oil extracted from *Artemisia scoparia* at different concentration on growth inhibition of root and stem of the weed *Echinochloa crusgalli*. The results showed that the essential oil inhibited the growth of root and stem of the weed under light and non-light, while the activity was higher under light than that under non-light. Activity assayed of several protective enzymes indicated that except the superoxide dismutase (SOD) was inhibited, the activities of glutathione-S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GSH-Px) and peroxidase (POD) were induced and enhanced greatly by essential oil in the callus of *E. crusgalli* under light. The observation under electron microscope showed that the membrane in cell of callus exposed to the essential oil was damaged under light. The cells of callus were destroyed totally because of a great stress of oxidation in the callus caused by the essential oil. It was indicated that the biological membrane was the main target for the essential oil action.

Key words: *Artemisia scoparia*; essential oil; *Echinochloa crusgalli*; photo-activity; action mechanism

猪毛蒿 *Artemisia scoparia* 为菊科蒿属植物, 1~2 年生草本, 分布于全国各地。利用水蒸馏法和石油醚萃取可得油状的液体即为精油^[1]。生物活性测定表明: 猪毛蒿精油对储粮害虫具有忌避作用、生长发育和繁殖抑制作用^[1,2]。对农田害虫具有拒食和光活化毒杀作用。徐汉虹等^[1]通过化学分析确定活性成

分为茵陈二炔。除草生物活性测定发现猪毛蒿精油对稗草、马唐、含羞草等杂草具有光活化防除效果^[3]。为了进一步明确猪毛蒿精油在防治杂草中的作用, 寻找新的结构母体, 本研究在生物活性测定的基础上, 开展了光活化抑制稗草生长的作用机理的研究, 为开发新型天然源生物除草剂提供科学依据。

收稿日期: 2003-09-27

作者简介: 杨淑娟(1977-), 女, 硕士。通讯作者: 万树青(1953-), 男, 副教授, 博士。

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(990703 和 010319); 南开大学元素有机化学所国家重点实验室资助项目(2002)

1 材料与方法

1.1 药液的配制

猪毛蒿 *A. scoparia* 精油由华南农业大学昆虫毒理室提供. 用少量丙酮 ($\varphi < 1\%$) 溶解精油, 滴加吐温-80 乳化, 加蒸馏水配成所需的测定浓度.

1.2 稗草愈伤组织培养

稗草 *Echinochloa crusgalli* 种子采自广州市郊, 晾干后置冰箱 ($4 \sim 10\text{ }^{\circ}\text{C}$) 约 1 年备用. 采用 MS 培养基, 内加 2 mg/L 2, 4-D, 诱导稗草茎叶产生愈伤组织, 继代培养 15~20 d 后的愈伤组织待用.

1.3 光活化抑制生长测定

采用小杯法, 加入已配制好的猪毛蒿精油药液, 放入小杯内, 每杯放 20 粒露白的稗草种子. 置恒温箱 [$(25 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$] 内处理 10 h 后, 稗草种子分为两部分, 一部分(光照组)置紫外灯下, 光照 3 h (光强 15 W/m^2). 另一部分(非光照组)继续在暗条件下, 待光照组光照处理后, 置恒温箱暗处理 3 d, 测量各处理的稗草根长、茎长. 计算根长、茎长的抑制率. 3 次重复.

$$\text{抑制率} = [(I_{\text{对照}} - I_{\text{处理}}) / I_{\text{对照}}] \times 100\%$$

1.4 稗草愈伤组织保护酶的活力测定

1.4.1 谷胱甘肽S-转移酶(GST)活性测定: 将稗草愈伤组织置入含有不同浓度的药液培养液中, 移置至恒温箱 [$(25 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$] 内黑暗处理 10 h 后, 处理后的愈伤组织分为两部分, 一部分移置近紫外光下 (15 W/cm^2) 光照 3 h (光照组), 另一部分继续在暗条件下 (非光照组). 照光组与未经照光组药剂处理以及未加药剂的照光与未经照光处理, 每种处理 3 个重复. 24 h 后, 称取各种处理的愈伤组织 0.2 g, 加适量的 50 mmol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液冰浴匀浆, 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下, 以 $10\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 15 min, 取上清液为酶源. 酶活性测定参照 Habig 等^[3] 方法. 蛋白质含量测定参照 Bradford^[4] 的方法.

1.4.2 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性测定: 参考张嘉麟等^[5] 和荣征星等^[6] 的方法. 药剂处理、酶源制备和蛋白含量测定与 1.4.1 相同.

1.4.3 过氧化物酶(POD)活性测定: 参考袁庆华等^[7] 的方法. 取处理后的稗草愈伤组织 0.2 g, 加入预冷的 0.05 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 5.29) 1.5 mL 冰浴匀浆, 匀浆液在低温下 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) $12\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 15 min, 取上清液为酶源. 蛋白含量参考 Bradford^[4] 的方法.

1.4.4 超氧化物歧化酶(SOD)活性测定: 参考张宪政^[8] 和沈文颺^[9] 的方法. 根据 SOD 抑制 NBT 光化学还原计算酶活性. 一个酶活力单位相当于能引起反

应液达到 50% 抑制时所需的酶量, 记为“U”.

酶活抑制率计算公式:

$$\text{酶活抑制率} = \frac{\text{对照酶比活力} - \text{处理酶比活力}}{\text{对照酶比活力}} \times 100\%$$

1.5 电镜观察

按照 1.4.1 方法处理愈伤组织, 光照与非光照组愈伤组织经 4% (φ) 戊二醛浸泡, 1% (φ) 钨酸固定. 磷酸缓冲液冲洗, 不同浓度梯度脱水, 然后用环氧丙烷和环氧树脂包埋. 超薄切片, 透射电镜观察.

1.6 数据统计分析

计算平均值、标准误和作图用 EXCEL2000 软件处理, 并用 SAS 统计软件分析数据. 用邓肯氏新复极差多重比较法 (Duncan's multiple rang test. DMRT) 进行差异显著性检验.

2 结果与分析

2.1 猪毛蒿精油对稗草根、茎生长抑制活性

抑制活性测定表明, 猪毛蒿精油对稗草根、茎具有生长抑制活性, 光照组中, 随着处理浓度的提高, 茎长抑制率也逐渐增大. 1 mg/L 时, 茎长抑制率为 60.73%; 10 mg/L 时, 抑制率达 88.03%. 非光照组中, 各处理的抑制率之间无显著差异. 0.1 mg/L 时茎长与对照差异显著. 在根长抑制方面, 光照与非光照处理对根长都表现出较强的活性, 10 mg/L 时, 光照与非光照的抑制率分别是 80.23% 和 70.88%. 在对茎长抑制方面, 10 mg/L 时, 光照与非光照的抑制率差异显著, 光照与非光照的抑制率分别是 88.03% 和 17.13% (表 1).

表 1 猪毛蒿精油对稗草根、茎生长抑制活性

Tab. 1 The inhibited activity of growth of root and stem to *E. crusgalli* by essential oil from *A. scoparia*

$\rho/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	处理 treatment	根长 length of root		茎长 length of stem	
		l/cm	抑制率 inhibiting rate/%	l/cm	抑制率 inhibiting rate/%
0.1	光照	$1.30 \pm 0.08\text{ b}$	70.45	$3.62 \pm 0.16\text{ b}$	22.65
	非光照	$2.23 \pm 0.18\text{ b}$	55.22	$4.60 \pm 0.24\text{ b}$	5.64
1.0	光照	$1.38 \pm 0.46\text{ b}$	68.64	$1.84 \pm 0.14\text{ c}$	60.73
	非光照	$1.99 \pm 0.31\text{ bc}$	60.04	$4.54 \pm 0.25\text{ b}$	6.87
10.0	光照	$0.87 \pm 0.06\text{ c}$	80.23	$0.56 \pm 0.13\text{ d}$	88.03
	非光照	$1.45 \pm 0.13\text{ c}$	70.88	$4.04 \pm 0.24\text{ b}$	17.13
control	光照	$4.40 \pm 0.23\text{ a}$		$4.68 \pm 0.11\text{ a}$	
	非光照	$4.98 \pm 0.45\text{ a}$		$4.87 \pm 0.24\text{ a}$	

1) 表中同列数据有相同字母者表示 5% 水平差异不显著 (DMRT)

2.2 猪毛蒿精油光照与非光照对稗草愈伤组织保护酶系的影响

2.2.1 对 GST 活力的影响 从表 2 可知,猪毛蒿精油处理稗草愈伤组织 24 h 后,GST 酶的活性是随处理的浓度的增加而呈上升的趋势.猪毛蒿精油质量浓度为 0.1、1.0 和 10.0 mg/L 时,光照增强酶活性分别为 18.90%、42.68%和 62.19%.而非光照中,不同浓度间所测的酶活性差异不显著.表明猪毛蒿精油在光的作用下,在一定浓度范围内,可激活稗草愈伤组织 GST 的活性,激活率与浓度呈线性关系.

2.2.2 对 GSH-Px 活力的影响 在 GSH-Px 活性测定中.光照与非光照各对应浓度所测得的 GSH-Px 活性差异很大.光照处理的 0.1 mg/L 猪毛蒿精油质量浓度,酶活力增高 8.73%,1.0 mg/L 时,则增加了 134.93%.显示出了诱导激活的作用.但质量浓度升至 10.0 mg/L 时,却表现抑制活性,酶活抑制率为 31.95%.非光照组中处理质量浓度为 0.1 和 1.0 mg/L 时的酶活力与对照比差异不显著,而 10.0

mg/L 时显示出酶活抑制作用,抑制率为 19.58% (表 2).

2.2.3 对 POD 活力的影响 在对 POD 活性测定中发现,光照组与对照酶活性相比,光照组 POD 的活性均有所增加,但随处理浓度的升高,活性具有先增后降的趋势,在 1.0 mg/L 时,POD 的活性增加了 115.42%.而 10.0 mg/L 时,酶活性则增加 59.87% (呈下降的趋势).非光照的处理,各浓度间对 POD 的活性影响不显著.但在 1.0 和 10.0 mg/L 的质量浓度处理,对 POD 的活性也具有一定的激活作用 (表 2).

2.2.4 对 SOD 活力的影响 猪毛蒿精油对稗草愈伤组织 SOD 活性表现出强烈的抑制作用.随处理浓度的升高,光照对酶的抑制活性显著增强,10.0 mg/L 时,抑制率为 95.24%;非光照组中,猪毛蒿精油对稗草愈伤组织 POD 活性抑制作用也随处理浓度的升高而增大,但与光照组比,非光照组的抑制率远小于光照组中相对应的值(表 2).

表 2 猪毛蒿精油对稗草愈伤组织几种保护酶活力的影响¹⁾

Tab. 2 The activity of protective enzyme in callus of *E. crusgalli* is influenced by essential oil

p/(mg·L ⁻¹)	处理 treatment	GST		GSH-Px		POD		SOD	
		比活力	酶活抑制率	比活力	酶活抑制率	比活力	酶活抑制率	比活力	酶活抑制率
		specific activity	inhibiting rate/ %	specific activity	inhibiting rate/ %	specific activity	inhibiting rate/ %	specific activity	inhibiting rate/ %
0	光照	1.64±0.06 cd		9.39±0.65 bc		21.15±0.21 f		32.57±0.21 a	
	非光照	1.57±0.05 d		8.58±1.22 c		22.79±0.39 e		30.86±0.39 a	
0.1	光照	1.95±0.07 c	-18.90	10.21±0.49 b	-8.73	23.85±0.11 e	-12.77	18.31±0.11 c	43.78
	非光照	1.67±0.11 c	-6.37	5.98±0.85 c	30.30	23.21±0.45 e	-1.84	25.75±0.45 b	16.56
1.0	光照	2.34±0.07 b	-42.68	22.06±0.58 a	-134.93	45.56±0.82 a	-115.41	13.02±0.82 d	59.96
	非光照	1.75±0.06 c	-12.10	9.96±1.36 bc	-16.08	30.71±0.75 c	-34.75	25.06±0.75 b	18.79
10.0	光照	2.66±0.15 a	-62.19	6.34±0.11 d	31.95	33.81±0.19 b	-59.86	1.55±0.19 e	95.24
	非光照	1.87±0.12 c	-19.11	6.90±0.24 d	19.58	26.95±0.63 d	-18.25	12.49±0.63 d	59.53

1) 表中同列数据有相同字母者表示 5% 水平差异不显著 (DMRT); “-” 表示具促进活性

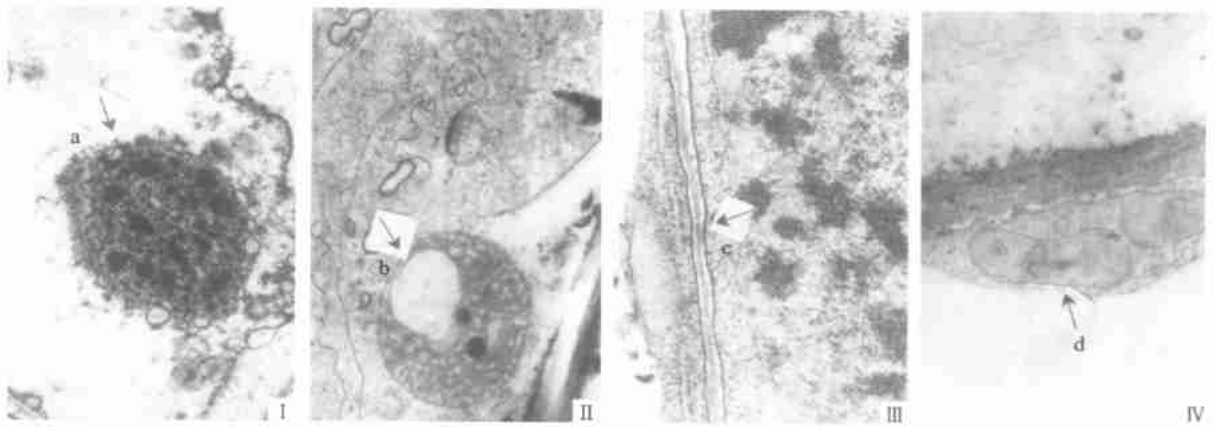
2.3 电镜观察

猪毛蒿精油对稗草愈伤组织细胞的损伤见图 1,光照与非光照处理都可见细胞结构受损.在 10.0 mg/L 质量浓度处理,非光照的细胞膜出现萎缩,核膜破损,胞内有许多小空泡(图 1-I).光照处理后的细胞,可见线粒体内有一大空泡,核结构破坏(图 1-II).而未经猪毛蒿精油处理的光照与非光照对照细胞膜和线粒体结构完整(图 1-III, 1-IV).因此可以推测,猪毛蒿精油对稗草的毒杀作用靶标主要是生物膜系统,破坏细胞器的结构,造成植株死亡.

光活化抑制根、茎生长的活性,同一浓度处理,光照与非光照的抑制效果存在显著性差异,尤其对茎的抑制更为突出.在一定的处理浓度下,猪毛蒿精油除了对 SOD 具有显著的抑制活性外,对其他的几种保护酶在有光照的条件下,则具诱导激活作用.在 10.0 mg/L 的浓度下,猪毛蒿精油可引起稗草细胞结构损伤,特别在有光照的条件下,损伤程度更加严重.这是因为猪毛蒿精油能造成稗草细胞内的氧化胁迫作用,致使激活细胞内的抗氧化体系,抵御猪毛蒿精油对细胞的氧化损伤,但它对 SOD 却具有抑制效应,使细胞内积累超氧自由基,当积累到一定程度,超出防御能力,最终细胞氧化死亡.

3 结论

实验结果表明,猪毛蒿精油对稗草具有显著的



a: 核膜破裂; b: 线粒体内的大空泡; c: 核膜完整; d: 线粒体结构完整

a: damaged nuclear envelope; b: big empty bubble in mitochondria; c: intact nuclear envelope; d: intact mitochondria

I. 非光照处理($\times 6521$); II. 光照处理($\times 12500$); III. 非光照对照($\times 30000$); IV. 光照对照($\times 10714$)

I. treatment of non-light; II. treatment of light; III. control of non-light; IV. control of light

图1 光照与非光照稗草愈伤组织细胞的亚微结构

Fig. 1 The structure of electron microscope for callus of *E. crusgalli* under light and non-light

除草剂在农田杂草防除中发挥重要作用,但目前普遍使用的品种如磺酰脲类和生长素类除草剂会产生土壤农药残留和对后茬作物产生药害问题。其他的光动力除草剂如二苯醚类等,由于它们作用于卟啉代谢途径,也会影响人、畜的血红素的代谢合成,产生光动力损伤,特别是卟啉代谢遗传缺陷型病人——杂质斑卟啉病产生更为严重的毒性效应^[10],此类除草剂因毒性问题将限制它的使用。猪毛蒿精油为植物次生代谢产物,在环境中易降解,对人、畜低毒,加上此类物质又具光活化特性,可利用自然界取之不尽的光能提高除草活性,将成为新型除草剂开发的重要内容之一。猪毛蒿内的光敏异株克生物质,将为开发光活化除草剂提供重要的线索。

参考文献:

[1] 徐汉虹. 植物精油对仓库害虫的活性与有效成分研究 [D]. 广州: 华南农业大学, 1992.

[2] 徐汉虹, 赵善欢, 周俊, 等. 猪毛蒿精油杀虫有效成分的研究 [J]. 昆虫学报, 1994, 37(4): 411—416.

[3] HABIG W H. Assays for differentiation of glutathione-S-transferase [A]. WILLIAM B J. Methods of enzymology [C]. New York: Academic Press. 1981. 398—405.

[4] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analyt Biochem, 1976, 72: 248—254.

[5] 张嘉麟, 方允中. 血液中谷胱甘肽过氧化物活力微量测定 [J]. 中华医学检验杂志, 1985, 8(4): 199—201.

[6] 荣征星, 刘慧中, 鲍景奇. 小鼠全血中谷胱甘肽过氧化物酶活力的微量测定法 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1994, 21(4): 45—47.

[7] 袁庆华, 桂枝, 张文淑. 苜蓿抗感褐斑病品种内超氧化物歧化酶、过氧化物酶、多酚氧化酶活性的比较 [J]. 草业学报, 2001, 11(2): 100—104.

[8] 张宪政. 作物生理研究法 [M]. 北京: 农业出版社, 1992. 208—209.

[9] 沈文飏. 1996 氮蓝四唑光化还原法测定超氧化物歧化酶的适宜条件 [J]. 南京农业大学学报, 1996, 19(2): 101—102.

[10] FRANCK E D, STEPHEN O D. Phytotoxicity of protoporphyrinogen oxidase inhibitors: phenomenology. Mode of action and mechanisms of resistance [A]. ROE R M. Herbicide activity: Toxicology, biochemistry and molecular biology [C]. Washington D C: IOS Press. 1997. 11—35.

【责任编辑 周志红】