

# 保護劑在植體內之生理作用

吳志民 王慶裕

國立中興大學農藝學系 除草劑生理研究室

## 摘 要

保護劑能選擇性保護作物，可降低除草劑在田間防除雜草時之傷害。目前了解保護劑能提高作物對除草劑之耐性，主要是誘導作物體中之解毒酵素如細胞色素 P-450 單加氧酶(cytochrome P450 monooxygenase)及穀胱甘肽轉移酶(glutathione S-transferases)而促進對除草劑之代謝。由於目前廣泛地使用保護劑，因此在考慮如何有效利用保護劑以提高除草劑之選擇性方面，對於保護劑作用機制之了解相當重要。

## Physiological action of safener in plants

Chih-Ming Wu and Ching-Yuh Wang

Lab of Herbicide Physiology, Dept. of Agronomy, NCHU

## Abstract

Herbicide safeners can protect crops from herbicidal injury caused by herbicides. As we know, the primary mechanism of action for herbicide safener is to promote herbicide metabolism by virtue of the induction of detoxifying enzyme system, such as cytochrome P-450 monooxygenase and glutathione S-transferases. In the future more detailed knowledge of safener action is required to improve the effective use of safener in weed control.

## 前 言

除草劑保護劑 (herbicide safener) 於 1947 年開始研究發展，其具有選擇性保護作物之功能，可以降低除草劑在田間防除雜草時對作物之傷害<sup>(3)</sup>。目前保護劑能成功地發展主要原因為：(1) 施用保護劑可以提高作物對除草劑之耐性，(2) 在輪作制度上選擇作物較具有彈性，可使用高效率之除草劑以提高防治雜草效果，(3) 可延長除草劑專利之壽命，使除草劑發展新用途<sup>(16)</sup>。

研究顯示保護劑參與作物體生理生化機制牽涉諸多影響因子<sup>(6)</sup>，由於了解保護劑作用機制有助於提高除草劑之使用效率及選擇性。因此，本文擬探討保護劑在作物體內之生理機制，以期未來能有效運用其機制，提高除草劑之選擇性以避免非目標作物遭受藥害。

## 保護劑的發現

保護劑具有保護作物避免除草劑傷害之特性，首先由 Hoffman 所發現<sup>(18)</sup>，氏將番茄經 2,4,6-T (2,4,6-trichlorophenoxyacetic acid) 處理後再噴施 2,4-D，則 2,4,6-T 能中和 2,4-D 之毒性，使番茄能減輕傷害。另外，於小麥及大麥兩種作物亦發現有相同之結果，可見保護劑在減輕除草劑作用上之重要性<sup>(18, 19)</sup>。

在過去，保護劑之發展主要為保護穀類作物如玉米、高粱、水稻等，通常在植前或萌前與除草劑合併使用。然而，最近隨著保護劑之發展及市場需求，對於萌後處理除草劑如 sulfonylureas、imidazolinone、cyclohexanedione 等，亦有發展保護劑以保護作物<sup>(21)</sup>。目前在商業上常使用之除草劑保護劑大部分均與除草劑混合施用以改善作物對除草劑之耐性，例如除草劑 pretilachlor 與保護劑 fenclorim 混合出售之商品 sofit，此商品常用於在日本、南韓及其他東南亞國家之水稻田以保護水稻免受傷害<sup>(27)</sup>。然而，有時為了達到更佳效果，在穀類作物如玉米及高粱則以保護劑直接處理種子，避免施用保護劑於田間時，反而保護田間雜草而降低除草之效用<sup>(6)</sup>。

## 保護劑的生理作用機制

為了有效利用保護劑以提高除草劑之選擇性，了解保護劑之作用機制相當重要。根據 Davies and Caseley 研究報告指出<sup>(6)</sup>，保護劑具有降低除草劑之

活性及阻止除草劑到達目標位置 (target sites)，或與除草劑分子產生化學作用降低作物對除草劑之吸收及轉運。此外，保護劑亦可促進除草劑代謝而產生解毒作用。本文僅將有關保護劑所參與之數種生理作用機制分述如下：

#### (一) 保護劑對除草劑目標位置之影響

保護劑可與除草劑競爭目標位置，Rubin and Casida<sup>(25)</sup>以保護劑 dichlormid (R-25788)處理對 chlorsulfuron 敏感之玉米雜交種 XL25A，發現玉米根部及地上部 ALS 酵素活性明顯增加約 25%，另外以其他保護劑如 naphthalic anhydride (NA)處理玉米及高粱時，其 ALS 酵素活性亦明顯增加，且能降低植株對 imazaquin 及 metsulfuron-methyl 除草劑之敏感性<sup>(23)</sup>。

然而 Lamoureux and Rusness<sup>(22)</sup>則未發現保護劑會影響 ALS 酵素活性，氏等以保護劑 BAS 145138處理對 sulfonylureas 敏感之玉米幼苗，其 ALS 酵素活性與未處理之對照組無明顯之差異。相同地，具有對 primisulfuron 及 nicosulfuron 除草劑耐性之 Landmark 與感性 Merit 甜玉米品種，在施用 BAS 145138 後，ALS 酵素活性並不受影響，但能促進二種除草劑之代謝<sup>(4)</sup>。由此可知，保護劑除了可能影響除草劑競爭作用目標位置之外，其作用機制可能與代謝作用有關。

#### (二) 影響植物對除草劑之吸收及轉運

根據研究報告指出，由於除草劑與保護劑化學結構相似，因此保護劑可能會與除草劑競爭作物吸收藥劑之位置，降低作物對除草劑之吸收能力<sup>(5)</sup>。Ezra *et al.*<sup>(11)</sup>同時添加 S-ethyl dipropyl thiocarbamate (EPTC)除草劑及結構相似之保護劑 *N,N*-diallyl 2,2-dichloroacetamide (DDCA)於玉米懸浮細胞中，觀察細胞對除草劑吸收是否受影響，結果顯示 DDCA 具有抑制 EPTC 吸收之能力，在 100  $\mu$ M DDCA 下則隨著濃度之提高，抑制<sup>[14C]</sup> EPTC 吸收能力亦隨之增加。此外，氏等也發現與 EPTC 結構相似之保護劑 *N,N*-diallyl 2-chloroacetamide (CDAA)同樣具有抑制吸收之能力，但抑制能力低於 DDCA。

另一方面，Ezra *et al.*<sup>(11)</sup>進一步處理其他與除草劑結構相異之保護劑，觀察是否有類似現象，結果發現在不同濃度<sup>[14C]</sup> EPTC 下施用其他藥劑如 gibberellic acid ( $GA_3$ ) 及 NA 則反而促進 EPTC 之吸收。因此，根據前述學者推測保護劑與除草劑相互競爭吸收之位置可能與化學結構相似有關，其中 Yenne and Hatzios<sup>(28)</sup>以電腦模擬分子結構模式 (computer assisted molecular modelling; CAMM)，發現似乎大部分能與除草劑相互作用之保護劑分子，其化學結構具有相類似之特性。

保護劑亦具有降低除草劑轉運之能力，Davies *et al.*<sup>(7)</sup>以 NA 處理玉米種

子，待幼苗生長至二天大時，於營養液中添加 $[^{14}\text{C}]\text{AC} 263222$  除草劑後 24 小時，觀察 $[^{14}\text{C}]\text{AC} 263222$  除草劑在玉米地上部及根部之分配，其中種子經 NA 前處理後生長至第七天之玉米幼苗，發現自根部吸收轉運至地上部的 $[^{14}\text{C}]\text{AC} 263222$  僅有 9%，而未經保護劑前處理之玉米種子其生長七天後約有 30%  $[^{14}\text{C}]\text{AC} 263222$  轉運至地上部，顯然保護劑明顯降低除草劑配置至地上部的量。由此可知，保護劑也會影響除草劑之吸收及轉運。

### (三) 增加植物體對除草劑之代謝

#### (1) 氧化代謝作用

大部份植物對除草劑具有某程度之耐性，主要為植物體具有代謝解毒之能力，目前已證實植物內細胞色素 P-450 單加氧酶 (cytochrome P450 monooxygenases) 參與對除草劑代謝解毒之角色<sup>(15)</sup>。細胞色素 P-450 單加氧酶是一種血紅素蛋白 (heme protein)，在植物體內為一重要複合蛋白酵素系統，當外來有害物質 (xenobiotic) 進入植物體，其細胞色素 P-450 系統即利用 NADPH 及氧催化加氧化作用<sup>(26)</sup>。

目前已知作物經保護劑處理能誘導除草劑氧化作用 (oxidation)，而增加作物對除草劑之耐性<sup>(24)</sup>。Jablonkai and Hatzios<sup>(20)</sup>以對 EPTC 及 acetochlor 兩種除草劑具有耐性之玉米雜交種 XL72AA 及感性 XL67 為材料，將兩玉米雜交種分別經保護劑 MG-191 處理後，均能減少 EPTC 及 acetochlor 之傷害，且經活體外 (*in vitro*) 分析顯示，在施用保護劑 NA 及 MG-191 前處理 (pretreatment) 下，兩雜交種植株地上部及地下部均會誘導微粒體氧化酶 (microsomal oxidase) 之活性，其中會明顯促進 EPTC 硫氧化作用 (sulfoxidation) 及 acetochlor 之氧化，進一步與 glutathione 結合，降低除草劑之毒性。

在微粒體酵素系統中，保護劑亦能誘導細胞色素 P-450 單加氧酶生成而促進除草劑之代謝。例如以保護劑 benoxacor (CGA 154281) (2.5 及 5.0 g/kg 種子) 處理玉米種子後 48 小時，自玉米幼苗中萃取之微粒體其細胞色素 P-450 含量明顯增加兩倍以上，且與未處理保護劑相比較下，其羥基化酶 (hydroxylase) 所催化之 chlortoluron 羥基化代謝物亦提高 15 倍以上<sup>(13)</sup>。

有關保護劑誘導植物體內細胞色素 P-450 生成之原因，Barret<sup>(1)</sup>認為保護劑所誘導之細胞色素 P-450 可能為單一基因編碼所控制，而在除草劑代謝過程中可能由單一細胞色素 P-450 參與不同除草劑之代謝。然而其他研究也指出，單一除草劑之代謝可能

由細胞色素 P-450 之同功酶 (isoenzymes) 所控制<sup>(14)</sup>。

## (2) 影響植物體內 glutathione 之含量及合成

還原態 glutathione (GSH) 在植物代謝過程中是一重要抗氧化物，當植物為了適應逆境如過氧化之傷害及乾旱，或者進行除草劑之解毒作用時，常需 glutathione 之參與。Glutathione 係由  $\gamma$ -巰胺酸 (Glu) - 胱胺酸 (Cys) - 甘胺酸 (Gly) 所組成之三肽 (tripeptide)，在除草劑代謝解毒過程中，glutathione 主要經由 glutathione S-transferases (GSTs) 之催化，利用胱胺酸位置之親電性 (electrophilic) 與有毒物質如除草劑進行結合作用，結合形成之代謝物再經液胞膜上 ATP binding cassette (ABC) 轉運儲存於液胞內而降低毒性<sup>(9)</sup>。

研究報告指出，保護劑可以誘導增加 glutathione 之含量以保護作物<sup>(22)</sup>。Ekler *et al.*<sup>(10)</sup> 以五種保護劑 AD-67、BAS-145138、dichlormid、DKA-24 及 MG-191 個別混合 acetochlor 除草劑處理玉米幼苗，結果在所有的處理條件下玉米幼苗之非蛋白硫醇 (non-protein thiol) 之含量均明顯增加，其中 dichlormid 處理者使非蛋白硫醇含量增加 87%，而僅噴施 acetochlor 除草劑但未施加保護劑者非蛋白硫醇含量僅增加 17%。由於分析中測得之非蛋白硫醇大部分係 glutathione，因此推測保護劑亦能間接誘導與 glutathione 合成有關之酵素。

在 glutathione 合成途徑中具有 ATP-sulfotransferase 與 adenosine-5'-phosphosulfate sulfotransferase (APSSTase) 兩關鍵酵素，當施用保護劑 dichlormid 及 benoxacor 於玉米幼苗時，發現此兩酵素之活性明顯增加；而相對的 glutathione 含量亦隨之提升<sup>(12)</sup>。

其他研究報告發現，保護劑處理後除了誘導增加 glutathione 含量外亦會間接地誘導 glutathione reductase (GR) 活性。其中在保護劑 dichlormid、MG-191、fenclorim 及 fluxofenim 處理下，水稻、玉米及高粱組織中均會明顯誘導 GR 之活性；且會促使氧化態 glutathione (GSSG) 還原成為還原態 glutathione<sup>(16)</sup>。

## (3) 誘導 glutathione S-transferases 活性

Edwards and Cole<sup>(8)</sup> 以保護劑 fenclorazole-ethyl 處理六倍體之栽培種普通小麥 (*Triticum aestivum* L.) 幼苗，觀察植株各部位 GSTs 活性之變化，結果顯示處理保護劑之小麥幼苗 GSTs 活性明顯較對照組增加 4-5 倍，尤其以根部 GSTs 之活性為最高；另外以除草劑 metolachlor、fluorodifen 及 fenoxaprop 為 GST 酵素反應基質 (substrates) 時，經保護劑處理後其 GSTs 活性亦明顯提升，且以 HPLC 分析下可知 glutathione

與除草劑結合之代謝物。

由於六倍體之普通小麥(*Triticum aestivum* L.; AABBDD)其主要由二倍體一粒小麥(*T. tauschii*; DD)與四倍體二粒小麥(*T. turgidum dicoccum*; AABB)雜交所產生,因此 Edwards and Cole<sup>(8)</sup>進一步探討,在兩親本及其他野生小麥其保護劑是否亦具有誘導 GSTs 之特性,結果發現所有經保護劑 fenchlorazole-ethyl 處理之小麥均具有高活性之 GSTs,且能催化 glutathione 與 fluorodifen 及 fenoxaprop 除草劑結合<sup>(8)</sup>。

除了從小麥族群中證實保護劑能誘導提高 GSTs 之活性,其他研究也發現在水稻、玉米、高粱等作物施用保護劑亦可提高 GSTs 之活性<sup>(27)</sup>。目前了解不同保護劑所誘導之 GSTs 活性反應可能由不同 GSTs 同功酶所調控,且已鑑定出玉米植物中 GSTs 同功酶至少有六種參與除草劑解毒作用,其中兩種具有與 atrazine 除草劑結合作用之功能,而其他四種(GSTI、GSTII、GSTIII 及 GSTIV)中以 GST I 及 GST III 為主要構成分子,而 GST II 及 GST IV 則由保護劑所誘導,主在參與除草劑之解毒作用<sup>(8)</sup>。

#### (4) 影響除草劑葡萄糖之結合作用 (glucose conjugation)

一些植物體對除草劑產生解毒作用主要藉由解毒酵素如細胞色素 P-450 單加氧酶之作用,最後羥基化除草劑分子會進行糖苷化作用 (glucosylation),即與葡萄糖結合以降低毒性<sup>(15)</sup>。施用保護劑亦可發現其具有促進糖苷化作用之能力, Lamoureux and Rusness<sup>(22)</sup>指出在保護劑 BAS 145 138 施用下玉米除了可明顯增加 chlorimuron ethyl 與 glutathione 結合外,其中 chlorimuron ethyl 經羥基化作用後有利於糖苷化作用之進行。氏等認為保護劑會提升糖苷化作用主要是因為誘導 UDP-glucosyl transferase 或者調節  $\beta$ -glucosidase 之活性;然而,保護劑如何誘導及影響這些機制目前尚不清楚。

#### (5) 其他

Blee<sup>(2)</sup>將玉米種子處理保護劑 dichlormid 後,可抑制微粒體之過氧化酶 (peroxidase) 對 EPTC 除草劑之硫氧化作用 (sulfoxidation) 活性,而降低 EPTC 硫氧化後所產生之植物毒素。然而目前有關這些研究僅有少數報告證實,其真正作用機制目前尚不清楚。

## 結語

保護劑能提高作物對除草劑之耐性，主要是因其能增加除草劑之代謝。此外，由於大部分保護劑其結構與除草劑有相類似之特性，亦能與除草劑相互競爭吸收之位置，減少除草劑之吸收，達到減輕藥害的效果。由於了解保護劑之作用機制，有助於改善除草劑之選擇性，解決雜草管理問題，因此未來對保護劑之研究發展，除了針對非選擇除草劑發展及改進相關保護劑之外，應進一步了解保護劑參與作物生理之調控機制，以有效運用其作用機制而發揮保護劑之最大效用。

## 引用文獻

1. Barrett, M. 1995. Metabolism of herbicide by cytochrome P450 in corn. *Drug Metab. Drug Interact.* 12 : 299-315.
2. Blee, E. 1991. Effect of the safener dichlormid on maize peroxygenase and lipoxygenase. *Z. Naturforsch.* 46 : 920-925.
3. Breaux, E. J., M. A. Hoobler, J. E. Patanella, and G. A. Leyes. 1989. Mechanisms of action of thiazole safener, *In Crop safeners for herbicide : development, uses, and mechanisms of action* (Hatzios, K. K., and R. E. Hoagland, Eds.) , pp. 163-175, Academic Press, San Diego.
4. Burton. J. D., E. P. Maness, D. W. Monks, and D. K. Robinson. 1994. Sulfonylurea selectivity and safener activity in 'Landmark' and 'Merit' sweet corn. *Pestic. Biochem. Physiol.* 48 : 163-172.
5. Chang, F. Y., J. D. Bandeen, and G. R. Stephenson. 1972. A selective antidote for prevention of EPTC injury in corn. *Can. J. Plant Sci.* 52 : 707.
6. Davies, J., and J. C. Caseley. 1999. Herbicide safeners : a review. *Pestic. Sci.* 55 : 1043-1058.
7. Davies, J., J. C. Caseley, O. T. G. Jones, M. Barrett, and N. D. Polge. 1998. Mode of action of naphthalic anhydride as a safener for the herbicide AC 263222 in maize. *Pestic. Sci.* 52 : 29-38.
8. Edwards, R., and D. J. Cole. 1996. Glutathione transferases in wheat (*Triticum*) species with activity toward fenoxaprop-ethyl and other herbicides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 54 : 96-104.
9. Edwards, R., D. P. Dixon, and V. Walbot. 2000. Plant glutathione S-transferases : enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci.* 5 : 193-198.
10. Ekler, Z., F. Dutka, and G. R. Stephenson. 1993. Safener effects on acetochlor

- toxicity, uptake, metabolism and glutathione S-transferases activity in maize. *Weed Res.* 33 : 311-318.
11. Ezra, G., E. Krochmal, and J. Gressel. 1982. Competition between a thiocarbamate herbicide and herbicide protectants at the level of uptake into maize cells in culture. *Pestic. Biochem. Physiol.* 18 : 107-112.
  12. Farago, S., C. Brunold, and K. Kreuz. 1994. Herbicide safeners and glutathione metabolism. *Physiol. Plant.* 91 : 537-542.
  13. Fonné-Pfister, R., and K. Kreuz. 1990. Ring-methyl hydroxylation of chlortoluron by an inducible cytochrome P450-dependent enzyme from maize. *Phytochemistry* 29 : 2793-2796.
  14. Frear, D. S., H. R. Swanson, and F. S. Tanaka. 1993. Metabolism of flumetsulam (DE 498) in wheat, corn and barley. *Pestic. Biochem. Physiol.* 45 : 178-192.
  15. Gronwald, J. W., and J. A. Connelly. 1991. Effect of monooxygenase inhibitors on bentazon uptake and metabolism in maize cell suspension cultures. *Pestic. Biochem. Physiol.* 40 : 284-294.
  16. Hatzios, K. K. 1991. An overview of the mechanisms of action of safeners. *Z. Naturforsch.* 46 : 819-827.
  17. Hatzios, K. K. 1993. Mode of action of naphthalic anhydride as a maize herbicide safener for thifensulfuron-methyl. *Proc. Brighton Crop Protec. Conf. Weeds* 3 : 1259-1266.
  18. Hoffman, O. L. 1953. Inhibition of auxin effects by 2,4,6-trichlorophenoxyacetic acid. *Plant Physiol.* 28 : 622-628.
  19. Hoffman, O. L., P. W. Gull, H. C. Zeisig, and J. R. C. Epperley. 1960. Factors influencing wild oat control with barban. *Proc. North. Cen. Weed Cont. Conf.* 17 : 20.
  20. Jablonkai, I., and K. K. Hatzios. 1994. Microsomal oxidation of the herbicide EPTC and acetochlor and of the safener MG-191 in maize. *Pestic. Biochem. Physiol.* 48 : 98-109.
  21. Kreuz, K. 1993. Herbicide safeners : Recent advances and biochemical aspects of their mode of action. *Proc. Brighton Crop Protec. Conf. Weeds* 3 : 1249-1258.
  22. Lamoureux, G. L., and D. G. Rusness. 1992. The mechanism of action of BAS 145 138 as safener for chlorimuron ethyl in corn : effect on hydroxylation, glutathione conjugation, glucoside conjugation, and acetolactate synthase. *Pestic. Biochem. Physiol.* 42 : 128-139.



23. Milhomme, H., C. Roux and J. Bastide. 1991. Safeners as corn seedling protectants against acetolactate synthase inhibitors. *Z. Naturforsch.* 46 : 945-949.
24. Moreland, D. E., F. T. Corbin, and J. E. McFarland. 1993. Oxidation of multiple substrates by corn shoot microsomes. *Pestic. Biochem. Physiol.* 47 : 206-214.
25. Rubin, B., and J. E. Casida. 1985. R-25788 effects on chlorsulfuron injury and acetohydroxyacid synthase activity. *Weed Sci.* 33 : 462-468.
26. Werck-Reichhart, D., A. Hehn, and L. Didierjean. 2000. Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. *Trends Plant Sci.* 5 : 116-123.
27. Wu, J., H. Omokawa, and K. K. Hatzios. 1996. Glutathione *S*-transferases activity in unsafened and fenclorim-safened rice (*Oryza sativa*). *Pestic. Biochem. Physiol.* 54 : 220-229.
28. Yenne, S. P., and K. K. Hatzios. 1990. Molecular comparisons of selected herbicide and their safeners by computer-aided molecular modeling. *J. Agric. Food Chem.* 38 : 1950-1956.