

野苧蒿(*Conyza sumatrensis*)抗巴拉刈生物型之 抗氧化活性研究

蔣永正*、王智屏、蔣慕琰

行政院農委會農業藥物毒物試驗所公害防治組

摘要

以葉面積及植株鮮重之 50%抑制濃度，篩選出臺灣地區對巴拉刈具抗性與感性之野苧蒿生物型(抗感比為 16-30 倍)。抗、感植株葉圓片浸置於不同濃度之巴拉刈溶液中，照光 4 小時後，葉片中 MDA 含量均隨處理濃度提高而增加，但抗性植株之累積速率較感性植株明顯為低。抗性植株葉片中之抗壞血酸(ascorbate)在藥劑未處理前之含量較感性葉片高約 60%。感性植株在 25 μ M 低濃度處理下，抗壞血酸含量快速下降約 52%，抗性植株在處理濃度提高至 100 μ M，抗壞血酸含量僅減少 24%左右。藥劑處理前之抗性與感性葉片中穀胱苷肽(glutathione)含量相近，且均隨巴拉刈處理濃度的提高而明顯減少，但感性植株在低濃度 25 μ M 處理下快速減少約 86%，較抗性植株之下降速率顯著為高。巴拉刈處理後抗性與感性葉片中抗壞血酸及穀胱苷肽含量減少時，MDA 累積量則有增加之趨勢。以不同濃度之巴拉刈處理抗、感植株葉圓片，感性植株於 25 μ M 巴拉刈濃度下，DPPH 自由基清除力快速降低至 40%以下，抗性植株在 25-100 μ M 濃度處理下，仍維持 90%以上之自由基清除力。測定抗、感性植株葉圓片之總酚含量、還原力及螯合亞鐵離子能力，顯示感性葉片中之相關反應會明顯

受到藥劑的抑制。以 50 μ M 巴拉刈處理野苧蒿植株，抗、感生物型中總酚含量、還原力及螯合亞鐵離子能力之比值，均較藥劑處理前之比值明顯提高，推測抗性生物型中清除自由基之抗氧化能力可能與降低巴拉刈毒性之抗性機制有關。

關鍵詞：野苧蒿、巴拉刈、抗性生物型、抗氧化活性。

Antioxidant Activity of Paraquat-resistant Biotype of Tall Fleabane (*Conyza sumatrensis*)

Yeong-Jene Chiang*, Zhi-Pin Wang, and Mou-Yen Chiang

Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Wufeng, Taichung Hsien 41358, Taiwan ROC

ABSTRACT

A tall fleabane (*Conyza sumatrensis*) biotype resistant to paraquat was found in upland fields in Taiwan. Based on the reduction of leaf area and plant fresh weight of remaining green evaluated 7 days after paraquat application, the concentration required to achieve 50% inhibition of the resistant (R) biotype was about 16-30 times than that of the susceptible (S) one. Leaf disc assay of R- and S-biotypes, treated with paraquat at different concentrations for four hours, showed a faster accumulation of malondialdehyde (MDA) in S-biotype than in R-biotype after exposed to paraquat. The content of ascorbate was higher in R-biotype, but glutathione contents were similar in both biotypes. Observation on the levels of ascorbate and glutathione after paraquat treatment indicated that this oxidative treatment principally induced a marked reduction of

* 通信作者, cyj@tactri.gov.tw

投稿日期：2009 年 11 月 6 日

接受日期：2009 年 12 月 7 日

作物、環境與生物資訊 6:209-219 (2009)

Crop, Environment & Bioinformatics 6:209-219 (2009)

189 Chung-Cheng Rd., Wufeng, Taichung Hsien 41362, Taiwan ROC

ascorbate and glutathione pools in S-biotype. The MDA accumulation in S-biotype subjected to paraquat treatment could be attributed to the loss of ascorbate and glutathione. In the DPPH assay, R-biotype had higher free radical scavenging capacity than S-biotype after 25-100 μM paraquat treatments. The multiple antioxidant activity of R-biotype was evident with significant total phenol content, reducing power and ferrous ion chelating potency. The results suggested that the observed paraquat resistance may partly be attributed to the antioxidant activity.

Key words: Tall Fleabane (*Conyza sumatrensis*), Paraquat, Resistant biotype, Antioxidant activity.

前言

巴拉刈為臺灣地區普遍使用之非選擇性萌後噴施型除草劑，在植物細胞內的作用位置為葉綠體之類囊膜，會接受光系統 I 之 Fe-S_A/Fe-S_B 的電子，抑制 NADP 還原成 NADPH，並將電子轉移至氧分子，形成具強氧化力之活化氧族分子(reactive oxygen species; ROS)(Lascano *et al.* 2003)。巴拉刈產生之活化氧族分子，如超氧陰離子、過氧化氫等會引起膜脂質的脂肪酸發生過氧化作用，通常測定組織中丙二醛(malondialdehyde; MDA)含量當作脂質過氧化程度的指標，且間接顯示活化氧族分子對細胞之作用強度(Kellog and Fridovic 1975)。活性氧化物為有氧代謝所產生，無可避免且遍存於細胞內各區間，因此植物細胞勢必發展一些抗氧化防禦機制，使細胞免於 ROS 之傷害(Halliwell 1974)。一般抗氧化機制主要分為酵素性與非酵素性兩部分，酵素性系統包括超氧歧化酶(superoxide dismutase; SOD)、觸酶(catalase; CAT)、過氧化酶(peroxidase)、抗壞血酸過氧化酶(ascorbate peroxidase; APX)與穀胱苷肽還原酶(glutathione peroxidase; GR)等，非酵素性系統包括抗壞血酸(ascorbate)、穀胱苷肽(分為 reduced glutathione; GSH 與 oxidized glutathione; GSSG)與胡蘿蔔素

(carotenoids)等(Asada and Takahashi 1987, Halliwell 1974)。

目前植物細胞內抗氧化酵素的解毒作用，仍被認為與巴拉刈抗性機制有密切關係(Chiang *et al.* 2008, Pyo *et al.* 2004)。在許多抗巴拉刈、光氧化或乾旱逆境之生物植株中，已發現植體內之抗氧化酵素活性與抗氧化物含量會明顯增加(Tzeng and DeVay 1993, Wu *et al.* 2007)。Halliwell (1984)與 Asada and Takahashi (1987)提出抗氧解毒途徑(oxidant-detoxifying pathway)與抗氧化酵素活性與抗氧化物含量有關(Amsellem *et al.* 1993)。抗性加拿大蓬植株噴施巴拉刈後，雖然光合作用中的 CO₂ 固定與 O₂ 的產生受到抑制，但 3 小時後光合作用受抑制的情形停止，且恢復正常機能，顯示存在葉綠體內的活性氧化物消除機制已被活化(Shaaltiel and Gressel 1987)。在水稻切離葉片發現，巴拉刈引起脂質過氧化毒害時，會伴隨 APX、GR 及 CAT 活性降低，SOD 則在毒害發生至某一程度才會降低；此外，若以 GSH 等活性氧族清除劑外施方式，可明顯抑制巴拉刈引起之脂質過氧化作用，及增加 CAT 與 POD 等抗氧化酵素活性，因此抗氧化酵素活性與擔任活性氧族清除劑之抗氧化物，皆與巴拉刈導致脂質過氧化毒害程度有關(Chang and Kao 1998)。

本研究將針對具巴拉刈抗性與感性的野萵蒿植株，除比較兩種生物型對巴拉刈脂質過氧化傷害作用之濃度差異及抗氧化物含量的變化外，同時測定兩者在巴拉刈處理前後，對自由基之清除能力及抗氧化活性的變化趨勢，以探討巴拉刈抗性植物之抗氧化機制與降低巴拉刈毒害作用之關係。

材料與方法

將採集自臺中及花蓮地區不同農地之野萵蒿種子，播種於臺中縣霧峰鄉農業藥物毒物試驗所溫室之栽植盆內。生長至 15-20 葉齡(株高約 15-18 cm)時，置於壓力 2.1 kg cm⁻¹，

噴嘴型號 TeeJet 8002E (Spraying System Co., P.O. Box 7900, Wheaton, Illinois 60189-7900, USA), 速度 1 m sec^{-1} 之自動噴藥機(SB6, R&D Sprayers, Inc. Co., P.O. Box 267 Opelousas, LA. 70571-0267, USA)下, 進行巴拉刈 $0\text{-}1.5 \text{ kg ha}^{-1}$ 不同劑量之噴施處理, 施藥後 7 日調查葉面積及鮮重。由葉面積與植株鮮重之劑量反應估算 50%抑制值 (ED_{50}), 抗感比依序為 30 及 16 倍, 且抗性植株較感性之株間變異為小(Table 1)。篩選出之抗性與感性生物型植株, 作為後續相關試驗之測試材料。

劑量反應試驗所用之成品藥劑, 為 24% 巴拉刈溶液(臺灣嘉泰企業股份有限公司)。抗氧化活性測試中之處理藥劑, 為純度 $>95\%$ 之分析級化學試劑—甲基紫(methyl viologen) (Sigma)。

一、丙二醛(malondialdehyde; MDA) 含量測定

將篩選出對巴拉刈具抗性及感性之野苘蒿植株, 摘取第 15-18 葉位之完全展開葉, 分別取直徑 0.6 cm 之葉圓片 50 片, 浸泡於含有 20 mL 不同濃度($0\text{-}100 \mu\text{M}$)之巴拉刈溶液, 於光強度 $300 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 下照光 4 h 後, 以去離子水清洗葉圓片, 並進行 MDA 含量分析。

依據 Heath and Packer (1968)方法, 將處理後之葉圓片(50 片, 鮮重約 0.3 g)經液態氮磨成細粉後, 加入 1.5 mL 之 5%三氯乙酸

(trichloroacetic acid; TCA)研磨均勻, 並於 4°C , $12,000 \text{ g}$ 下離心 10 min。取 0.4 mL 上清液加入 1.6 mL 之 0.5% 2-硫巴比妥酸(thiobarbituric acid; TBA, 溶於 20% TCA), 振盪均勻, 於 95°C 水浴反應 30 min, 迅速移入冰浴終止反應。再於 4°C 下, 以 $12,000 \text{ g}$ 離心 10 min, 於室溫下靜置 15 min 後, 取上清液, 置於分光光度計(DU Series 60 Spectrophotometer, Beckman)中, 測定 532 nm 與 600 nm 波長之吸光值, 再以消光係數(extinction coefficient) $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 計算 MDA。

$$\text{MDA (nmol g}^{-1} \text{ FW)} = (\text{OD}_{532} - \text{OD}_{600}) / 155 * 2$$

$$(\text{反應體積; mL}) * (1.5 / 0.4) (\text{稀釋倍數}) / \text{FW}(\text{樣品鮮重; g})$$

二、巴拉刈對抗、感植株之抗氧化物含量變化

1. 抗壞血酸(ascorbate)含量測定

依 Law *et al.* (1983)之方法, 將處理後之葉圓片 50 片(鮮重約 0.3 g)經液態氮磨碎後, 加入 1.5 mL 之 5%三氯乙酸研磨均勻, 於 4°C 下以 $12,000 \text{ g}$ 離心 10 min。取 0.3 mL 上清液, 依序加入 0.3 mL 之 150 mM 磷酸鈉緩衝溶液(pH 7.4)、0.3 mL 去離子水、0.6 mL 10% 三氯乙酸、0.6 mL 44%磷酸與 0.6 mL 之 4% 聯吡啶(bipyridyl; 溶於 70% ethanol)。振盪均勻後, 再加入 0.6 mL 之 3%氯化鐵(FeCl_3), 充分混合後, 於 37°C 水浴反應 60 min。取反

Table 1. Estimated concentrations which cause 50% injury by reduction of leaf area and plant fresh weight remaining green

Parameter of estimation of injury	ED_{50} (g ha^{-1}) ^x		Resistance ratio ^y
	Resistant biotype	Susceptible biotype	
Leaf area	720 ± 11	24 ± 3	30
Plant fresh weight	560 ± 8	36 ± 5	16

^x ED_{50} was the concentration of paraquat that reduced 50% leaf area and plant fresh weight of tested plants.

^y The resistance ratio was estimated by dividing the ED_{50} for the resistant biotype by the ED_{50} for the susceptible biotype.

應液 2 mL，置於分光光度計(DU Series 60 Spectrophotometer, Beckman)中，測定 525 nm 波長下之吸光值。並配製 0-500 μ M 不同濃度之抗壞血酸製作標準曲線($y = 637.4x - 10.6$, $R^2 = 0.997$)，估算樣品中抗壞血酸的含量。

2. 穀胱苷肽(glutathione)含量測定

依 Smith (1985)之方法，將處理後之葉圓片 100 片(鮮重約 0.6 g)經液態氮磨碎後，加入 2 mL 之 5% 磺基水楊酸(sulfosalicylic acid)研磨均勻，於 4°C 下以 12,000 g 離心 10 min。取 200 μ L 上清液加入 200 μ L 之 0.5 M 磷酸鉀緩衝溶液(pH 7.5)充分混合後，取出 140 μ L 混合液，依序加入 700 μ L 之 0.1 M 磷酸鈉緩衝溶液(pH7.5，內含 5 mM EDTA-Na)、280 μ L 之 6 mM 二硫硝基苯甲酸(dithionitrobenzoic acid; DTNB，溶於磷酸鈉緩衝溶液)、140 μ L 之 2 mM NADPH(溶於磷酸鈉緩衝溶液)、及 140 μ L 之 2 unit/mL glutathione reductase (溶於磷酸鈉緩衝溶液)，置於分光光度計(DU Series 60 Spectrophotometer, Beckman)中，測定 415 nm 波長下 10 min 內之吸光值變化，並配製 0-500 μ M 不同濃度之穀胱苷肽製作標準曲線($y = 573.4x - 7.4$, $R^2 = 0.9887$)，估算樣品中穀胱苷肽的含量。

三、抗氧化力之測定

1. DPPH 自由基清除能力之測定

依 Shimada *et al.* (1992)之方法，將抗性及感性植株之葉圓片(50 片，鮮重約 0.3 g)以液態氮磨碎後，加入 1.5 mL 之 90% 丙酮研磨均勻，於 4°C 下以 12,000 g 離心 10 min。取上清液 2 mL，並加入 1.5 mL 新鮮配製之 0.2 mM DPPH (α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl)(溶於甲醇)，振盪均勻後，靜置於暗處理中 30 min，置於分光光度計(DU Series 60 Spectrophotometer, Beckman)中，測定 517 nm 波長之吸光值，由下列公式計算樣品之 DPPH 自由基清除力。

$$\text{DPPH 自由基清除力 (\%)} = [1 - (A_{517\text{nm}} \cdot \text{of Sample} / A_{517\text{nm}} \cdot \text{of Blank})] \times 100$$

2. 總酚含量(total phenol content)之測定

依 Ragazzi and Veronese (1973)之方法，將抗性及感性植株之葉圓片(50 片，鮮重約 0.3 g)以液態氮磨碎後，加入 1.5 mL 之 90% 乙醇研磨均勻，於 4°C 下以 12,000 g 離心 10 min。取 0.2 mL 上清液，加入 1 mL 磷鉬酸酚試劑(Folin-Ciocalteu phenol reagent; Merck)與 0.8 mL 之 7.5% 碳酸鈉溶液，混合均勻後，於暗處理之 25°C 水浴中 30 min。再以 12,000 g 離心 10 min，取上清液，置於分光光度計(DU Series 60 Spectrophotometer, Beckman)中，測定 765 nm 波長之吸光值。並以不同濃度 0-500 mg L⁻¹ gallic acid 製作標準曲線($y = 136.8x - 0.6$, $R^2 = 0.998$)，估算樣品中之總酚含量。

3. 還原力(reducing power)之測定

依 Oyaizu (1986)之方法，將抗性及感性植株之葉圓片(50 片，鮮重約 0.3 g)以液態氮磨碎後，加入 1.5 mL 之 90% 乙醇研磨均勻，於 4°C 下以 12,000 g 離心 10 min。取 0.5 mL 上清液，加入 0.5 mL 之 0.2 M 磷酸緩衝溶液(pH 6.6)與 0.5 mL 之 1% 赤血鹽(potassium ferricyanide)，於離心管中混合均勻，並置於 50°C 水浴中反應 20 min 後急速冷卻，再加入 0.5 mL 之 10% 三氯乙酸溶液，於 3220 g 下離心 10 min。取上清液 1 mL 並加入 1 mL 去離子水與 2 mL 之 0.1% 氯化鐵(FeCl₃)溶液混合均勻，於暗處理下靜置 10 min 後，置於分光光度計(DU Series 60 Spectrophotometer, Beckman)中，測定 700 nm 波長之吸光值。吸光值越高表示樣品還原力越強。

4. 螯合亞鐵能力(ferrous ion chelating potency)之測定

依 Boyer and McCleary (1987)之方法，將抗性及感性植株之葉圓片(50 片，鮮重約 0.3 g)以液態氮磨碎後，加入 1.5 mL 之 90% ethanol 研磨均勻，於 4°C 下以 12,000 g 離心

10 min。取 1 mL 上清液，加入 3.7 mL 之 100% 乙醇與 0.1 mL 之 2 mM 氯化亞鐵(FeCl₂)溶液混合均勻 30 s 後，加入 0.2 mL 之 5 mM Ferrozine，充分混合 10 min 後，置於分光光度計 (DU Series 60 Spectrophotometer, Beckman) 中，測定 562 nm 波長之吸光值。以 EDTA 作為標準品，1 mL 之 90% 乙醇取代樣品作為對照組。

$$\text{螯合率(\%)} = [1 - (A_{562} \text{ of Sample} / A_{562} \text{ of Blank}) * 100\%]$$

四、統計分析

本研究各試驗分別重複三次，每次試驗之各項處理皆為三重複數以上。試驗結果以三次獨立試驗的平均值±標準機差值(mean ± standard error)表示。

結果

一、巴拉刈對抗、感植株脂質過氧化反應之影響

將抗、感植株之葉圓片浸置於 0、25、50、75、100 μM 不同濃度之巴拉刈溶液中，照光 4 h 後，分析葉片中 MDA 之含量變化。試驗

結果發現，感性植株於 25 μM 巴拉刈處理下，MDA 含量較對照處理明顯增加約 50%，當藥劑濃度提高至 50 μM，MDA 累積為對照處理的 2 倍，75-100 μM 之處理濃度與 50 μM 的影響無明顯差異(Fig. 1)。抗性植株於 50 μM 巴拉刈處理下，MDA 含量開始上升，較對照處理增加 38%，且隨處理濃度提高含量增加，至 75 μM 達最高累積量(Fig. 1)。巴拉刈 50 μM 以下之處理濃度，抗性植株 MDA 累積速率皆較感性植株為低(Fig. 1)。

二、巴拉刈對抗、感植株之抗氧化物含量影響

將抗、感植株之葉圓片浸置於不同濃度之巴拉刈溶液中，照光 4 h 後，分析葉片中抗壞血酸及穀胱甘肽之含量變化。抗性葉片中之抗壞血酸含量在未處理藥劑前即較感性葉片中高約 60%(Fig. 2)。巴拉刈 25 μM 處理後，感性葉片中之抗壞血酸含量即減少為對照處理之 48% 左右，但隨藥劑濃度提高，抗壞血酸含量未出現明顯的變化(Fig. 2)。抗性葉片在 50 μM 處理濃度下，抗壞血酸含量減少約 6%，至 100 μM 最高處理濃度時，抗壞

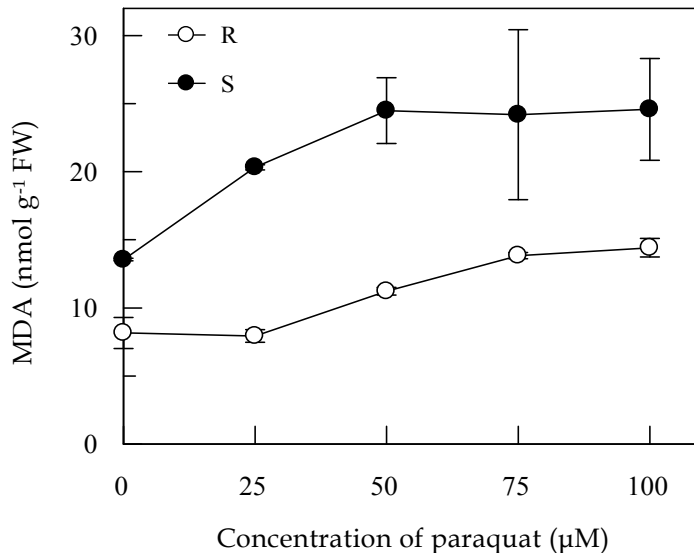


Fig. 1. MDA accumulation in leaf discs of both susceptible (S) and resistant (R) biotypes of *Conyza sumatrensis*. Leaf discs were treated with 0~100 μM paraquat in light for 4 hours.

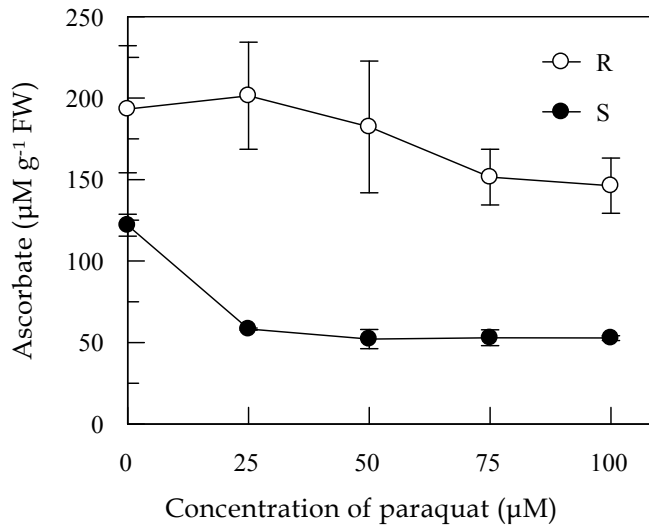


Fig. 2. Changes of ascorbate content in leaf discs of both susceptible (S) and resistant (R) biotypes of *Conyza sumatrensis*. Leaf discs were treated with 0~100 µM paraquat in light for 4 hours.

血酸含量降低為對照組之 76%左右 (Fig. 2)。感性植株在 25 µM 低處理濃度下，抗壞血酸含量即明顯下降約 52%，與抗性植株在 100 µM 高處理濃度下，抗壞血酸含量僅減少 24%有顯著差異(Fig. 2)。

抗性葉片中之穀胱苷肽含量在未處理藥劑前與感性葉片相接近，約為 24 µM g⁻¹ FW (Fig. 3)。巴拉刈 25 µM 處理後，感性葉片中之穀胱苷肽含量減少為對照處理之 14%左右，但當藥劑濃度提高至 50 µM 即無法偵測到葉片中之穀胱苷肽含量 (Fig. 3)。抗性葉片在 50 µM 處理濃度下，穀胱苷肽含量亦減少約 42%，至 100 µM 最高處理濃度時，穀胱苷肽含量降低為對照組之 38%左右 (Fig. 3)。抗性與感性野苧蒿葉片中之穀胱苷肽含量，均隨巴拉刈處理濃度的提高而明顯減少，但感性植株在低濃度 25 µM 處理下，即快速減少約 86%，顯著高於抗性植株之下降速率(Fig. 3)。由測試結果，感性植株中抗壞血酸及穀胱苷肽含量，隨巴拉刈處理濃度提高而減少的速率，均顯著高於抗性植株(Fig.2、3)。

三、巴拉刈對抗、感植株 DPPH 自由基清除能力之影響

以不同濃度之巴拉刈溶液處理抗、感植株之葉圓片，照光 4 h 後，測定植株清除 DPPH 自由基之能力。感性植株於 25 µM 巴拉刈處理濃度下，自由基清除力驟然減少為對照處理之 40%以下，但未隨藥劑濃度的提高產生明顯變化(Fig. 4)。抗性植株在 25-100 µM 巴拉刈處理濃度下，自由基清除能力與對照組相近，維持在 90-92%之間(Fig. 4)。

四、巴拉刈對抗、感植株抗氧化力之影響

測定對巴拉刈具抗、感性植株葉圓片之總酚含量變化，在未處理藥劑前抗感葉片比例為 1.68 倍，以 50 µM 巴拉刈處理後抗感比例上升為 2.72 倍(Table 2)。抗性葉片之總酚含量減少為對照處理之 73%，感性葉片則降低為對照組之 45% (Table 2)。

抗、感性植株葉圓片之還原力測定，在未處理藥劑前抗感葉片比例為 1.06 倍，以 50 µM 巴拉刈處理後抗感比例上升為 2.15 倍 (Table 2)。抗性葉片之還原力活性僅減少約 2%，感性葉片則降低為對照組之 50%左右 (Table 2)。

測定對巴拉刈具抗、感性植株葉圓片之螯合亞鐵離子能力，在未處理藥劑前抗感葉

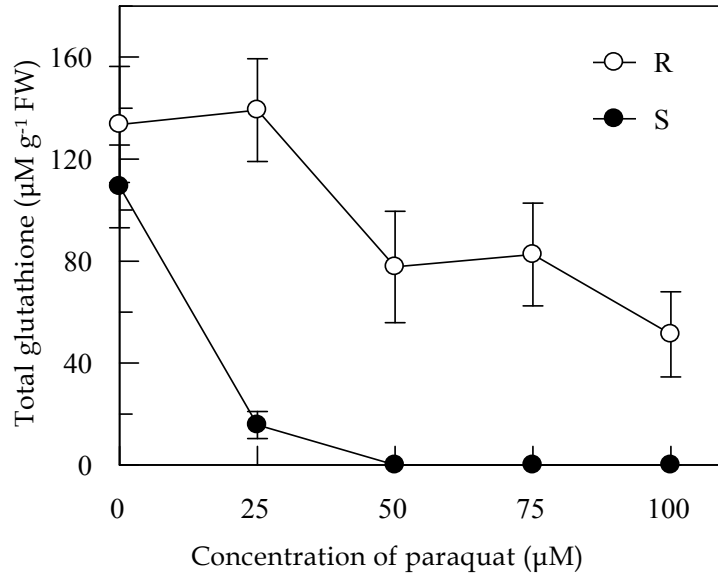


Fig. 3. Changes of total glutathione content in leaf discs of both susceptible (S) and resistant (R) biotypes of *Conyza sumatrensis*. Leaf discs were treated with 0~100 µM paraquat in light for 4 hours.

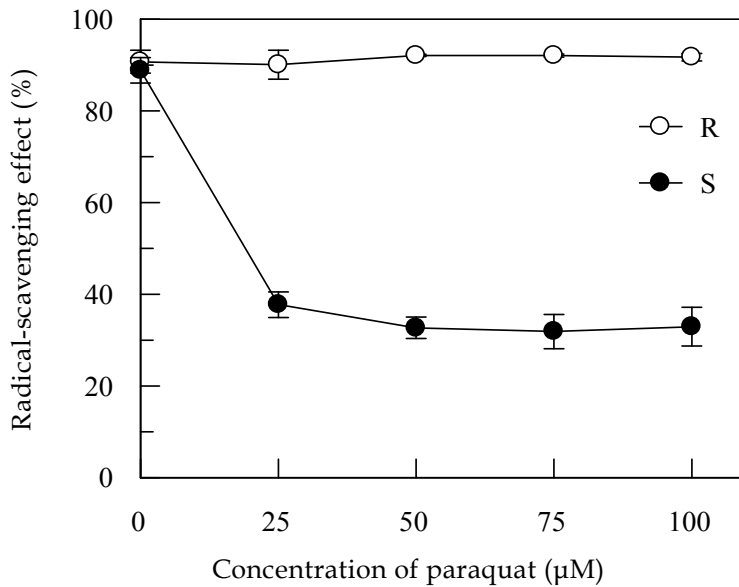


Fig. 4. Changes of radical-scavenging effect in leaf discs of both susceptible (S) and resistant (R) biotypes of *Conyza sumatrensis*. Leaf discs were treated with 0~100 µM paraquat in light for 4 hours.

Table 2. Antioxidant activities in leaf discs of both susceptible and resistant biotypes of *Conyza sumatrensis*

Antioxidant activity	Paraquat concentration (μM)	Biotype		Resistance ratio \times
		Resistant	Susceptible	
Total phenol content (Gallic acid; mg g^{-1} FW)	0	2066 \pm 38	1230 \pm 11	1.68
	50 ^y	1506 \pm 50	554 \pm 9	2.72
Reducing power (Absorbance at 700 nm)	0	2.53 \pm 0.02	2.39 \pm 0.26	1.06
	50	2.49 \pm 0.01	1.16 \pm 0.14	2.15
Ferrous ion chelating potency (%)	0	65 \pm 2	55 \pm 3	1.18
	50	59 \pm 4	38 \pm 5	1.55

^x The resistance ratio was estimated by dividing the I_{50} for the resistant biotype by the I_{50} for the susceptible biotype.

^y Leaf discs were treated with 50 μM paraquat in light for 4 hours.

片比例為 1.18 倍，以 50 μM 巴拉刈處理後抗感比例略為上升至 1.55 倍 (Table 2)。抗性葉片之螯合亞鐵離子減少約 9%，感性葉片則降低為對照組之 69% (Table 2)。

抗、感性植株在 50 μM 巴拉刈處理後，以還原力之抗感比例增加最多，提高為藥劑未處理前之 2 倍，總酚含量及螯合亞鐵離子能力依序增加約 60% 及 30% (Table 2)。

討論

由試驗結果顯示，隨著巴拉刈處理濃度增加，感性植株 MDA 將大量累積，而抗壞血酸與穀胱甘肽含量則明顯降低，顯示巴拉刈處理所產生的活化氧族，導致膜脂質發生過氧化作用，也影響到抗氧化物—抗壞血酸與穀胱甘肽之產生。抗性植株因抗氧化物含量較高，且未隨巴拉刈處理濃度增加而驟減，故其受脂質過氧化的毒害程度較低，MDA 累積量較少。Chang and Kao (1998) 以巴拉刈處理水稻切離葉片後，MDA 含量明顯增加，顯示巴拉刈造成脂質過氧化作用。此結果與巴拉刈造成毒害的主要因為脂質過氧化作用之假說 (Hart and DiTomaso 1994) 相符合。脂質過氧化為自由基作用之過程 (Slater 1984)，自由基清除劑 ascorbate、sodium benzoate (SB)、sodium azid (SA) 與 thiourea (TU) 可減少巴拉刈的毒害 (Tzeng

and DeVay 1993)。本研究中抗性植株以不同濃度巴拉刈處理後，葉片中之抗壞血酸及穀胱甘肽含量減少之速率，較感性葉片明顯為低 (Figs. 2、3)。當葉片中抗壞血酸及穀胱甘肽含量減少時，MDA 累積量則有增加之趨勢 (Figs. 1、2、3)，推測抗性植株降低巴拉刈傷害程度的作用與抗氧化物抗壞血酸及穀胱甘肽的含量較高有關。Kuk *et al.* (2006) 於胡瓜葉片施用巴拉刈前，先以活性氧清除劑處理 24 h，其葉片受害程度減少，且抗壞血酸處理之葉片受害較穀胱甘肽處理葉片輕微。此與蘋果葉片以抗壞血酸前處理，導致葉片葉綠素含量高於巴拉刈單一處理之結果一致 (Schmitz-Eiberger and Noga 2001)，顯示抗壞血酸與穀胱甘肽確實具有清除自由基之能力。

常見的抗氧化物是藉由氫來清除脂質過氧化物自由基，進而達到抑制過氧化作用所造成之傷害。在抗氧化的研究中，常利用 DPPH· 來評估抗氧化劑的供氫能力 (Williams *et al.* 1995)。本研究中抗性植株清除自由基能力較感性植株為強，推測抗性植株植體內含有較高量之清除脂質過氧化物自由基之抗氧化物質，以減輕巴拉刈造成的過氧化傷害。

試驗發現，在多種植物中所含有之酚類化合物為抗氧化系統中之有效抗氧化物 (Lai

et al. 1991, Pan et al. 2007)。酚類化合物具有取代 OH 基的高反應活性，以消除自由基，因此在具有抗氧化生物活性的成分中，許多皆為多酚類衍生物。而多酚類化合物具有可作為氫提供者之化學特性，因此許多的多酚類化合物成為抗氧化物之主要成分，用於食品中增加抗氧化物的活性達到清除自由基之作用(Amic et al. 2003, Pyo 2004)。還原作用可終止自由基的反應，將脂質過氧化過程中被氧化的中間物還原(Yen and Chen 1995)，故還原力可作為樣品萃取物抗氧化活性潛力之指標，同時這些化合物亦可成為電子供應者(Meir et al. 1995)。還原力的測定主要以普魯士藍 (Prussian blue, $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$) 的生成量為指標，此錯合物於 700 nm 有最大吸光值，因此在 700 nm 偵測普魯士藍的含量以推估其還原力，吸光值越高表示樣品的還原力也愈強(Yen and Chen 1995)。金屬離子的促氧化作用經常是造成脂質過氧化的主要原因之一，藉由 redox cycle 反應，只要少量的金屬離子便可有效的產生自由基，並加速脂質氧化的進行(Chang and Kao 1997)。在多種金屬離子中， Fe^{2+} 經常是最具影響力的促氧化劑，它會促進脂質氧化作用的進行，因此化合物對亞鐵離子的螯合力往往與其抗氧化也有密切關係(Sahu and Gray 1997, Sugihara et al. 1999)。本研究中抗性植株在 50 μM 巴拉刈處理所產生之氧化逆境下，總酚含量、還原力與亞鐵離子螯合力皆較感性植株顯著為高，顯示抗性植株具有較強的抗氧化能力。

研究顯示萃取物的抗氧化活性、清除 DPPH 自由基能力與總酚含量呈高度相關。Sanchez et al. (2007)將萃取出的橄欖油做抗氧化活性測試，試驗結果顯示橄欖油清除 DPPH 自由基能力與總酚含量呈高度相關性。Pan et al. (2007)以藥用植物虎杖 (*Polygonum cuspidatum*) 之萃取液做抗氧化能力之測定，發現萃取液之總酚含量、清除 DPPH 自由基能力與還原力間皆呈正相關。Liyana-Pathirana and Shahidi (2007)以小麥

萃取液測試其抗氧化力與清除自由基活性，結果顯示萃取液之總酚含量、清除 DPPH 自由基能力、還原力與亞鐵螯合力皆呈正相關。

本研究中，對巴拉刈具不同忍受性之抗性及感性野苘蒿植株，在藥劑處理下，由脂質過氧化反應及抗氧化物抗壞血酸及穀胱甘肽含量的各項測試，顯示野苘蒿對巴拉刈之抗性機制，與細胞內抗氧化物的含量有關。至於總酚含量、還原力與亞鐵離子螯合力等與自由基清除有關之反應，可能與降低巴拉刈之毒性密切相關。

引用文獻

- Amic D, D Davidovic, Amic, D Beslo, N Trinajstic (2003) Structure radical scavenging activity relationship of flavonoids. **Croatia Chem. Acta** 76: 55-61.
- Amsellem Z, MAK Jansen, ARJ Drieseaar, J Gressel (1993) Developmental variability of photooxidative stress tolerance in paraquat-resistant *Conyza*. **Plant Physiol.** 103: 1097-1106.
- Asada K, M Takahashi (1987) Production and Scavenging of Active Oxygen in Photosynthesis. p. 227-287. In: Photoinhibition, Topics of Photosynthesis. Vol 9. DJ Kyle, CB Osmond, CJ Arntzen (eds.) Elsevier, Amsterdam.
- Boyer RF, CJ McCleary (1987) Superoxide ion as a primary reductant in ascorbate-mediated ferritin iron release. **Free Radical Biol. Medicine** 3: 389-395.
- Chang CJ, CH Kao (1997) Paraquat toxicity is reduced by metal chelators in rice leaves. **Physiol. Plant.** 101: 471-476.
- Chang CJ, CH Kao (1998) Lipid peroxidation and antioxidative enzymes in detached rice leaves exposed to paraquat. **Chinese Agron. J.** 8: 135-141.
- Chiang YJ, YX Wu, MY Chiang, CY Wang (2008) Role of antioxidative system in paraquat resistance of tall fleabane (*Conyza sumatrensis*). **Weed Sci.** 56: 350-355.
- Halliwell B (1974) Superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase. Solutions to the

- problems of living with oxygen. **New Phytol.** 73: 1075-1086.
- Halliwell B (1984) The Toxic Effects of Oxygen in Plant Tissues. p.180-206. *In: Chloroplast Metabolism*. Ch 8, rev. ed. Clarendon Press, Oxford, UK.
- Hart JJ, JM DiTomaso (1994) Sequestration and oxygen radical detoxification as mechanisms of paraquat resistance. **Weed Sci.** 42: 277-284.
- Heath RL, L Packer (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Arch. Biochem. Biophys.** 125: 189-198.
- Kellog WW, I Fridovich (1975) Superoxide, hydrogen peroxide and singlet oxygen in lipid production by a xanthin oxidase system. **J. Biol. Chem.** 250: 8812-8817.
- Kuk YI, JS Shin, HI Jung, JO Guh, S Jung, NR Burgos (2006) Mechanism of paraquat tolerance in cucumber leaves of various ages. **Weed Sci.** 54: 6-15.
- Lai S M, JI Gray, DM Smith, AM Booren, RL Crackel, DJ Buckley (1991) Effects of oleoresin rosemary, tertiary butylhydroquinone, and sodium tripolyphosphate on the development of oxidative rancidity in restructured chicken nuggets. **J. Food Sci.** 56: 616-620.
- Lascano, HR, MN Melchiorre, CM Luna, VS Trippi (2003) Effect of photooxidative stress induced by paraquat in two wheat cultivars with differential tolerance to water stress. **Plant Sci.** 164: 841-848.
- Law MY, SA Charles, B Halliwell (1983) Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and of paraquat. **Biochem. J.** 210: 899-903.
- Liyana-Pathirana CM, F Shahidi (2007) Antioxidant and free radical scavenging activities of whole wheat and milling fractions. **Food Chem.** 101: 1151-1157.
- Meir S, J Kanner, B Akiri, SP Hadas (1995) Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. **J. Agric. Food Chem.** 443: 1813-1817.
- Oyaizu M (1986) Antioxidative activities of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi** 35: 771-775.
- Pan Y, X Zhang, H Wang, Y Liang, J Zhu, H Li, Z Zhang, Q Wu (2007) Antioxidant potential of ethanolic extract of *Polygonum cuspidatum* and application in peanut oil. **Food Chem.** 105: 1518-1524.
- Pyo, YH, TC Lee, L Logendrac, RT Rosen (2004) Antioxidant activity and phenolic compounds of Swiss chard (*Beta Vulgaris* subspecies *cycla*) extracts. **Food Chem.** 85: 19-26.
- Pyon JY, RZ Piao, SW Roh, SY Shin, SS Kwak (2004) Differential levels of antioxidants in paraquat-resistant and -susceptible *Erigeron canadensis* biotypes in Korea. **Weed Biol. Manag.** 4: 75-80.
- Ragazzi E, G Veronese (1973) Quantitative analysis of phenolic compounds after thin-layer chromatographic separation. **J. Chromatography** 77: 369-375.
- Sahu SC, GC Gray (1997) Lipid peroxidation and DNA damage induced by morin and naringenin in isolated rat liver nuclei. **Food Chem. Toxicol.** 35: 443-447.
- Sanchez CS, AMT Gonzalez, MC Garcia-Parrilla, JJQ Granados, HLG Serrana, MCL Martinez (2007) Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. **Anal. Chimica Acta** 593: 103-107.
- Schmitz-Eiberger M, G Noga (2001) Reduction of paraquat-induced oxidative stress in *Phaseolus vulgaris* and *Malus domestica*. **Sci. Hort.** 91: 153-167.
- Shaaltiel Y, J Gressel (1987) Kinetic analysis of resistance to paraquat in *Conyza*: evidence that paraquat transiently inhibits leaf chloroplast reactions in resistant plants. **Plant Physiol.** 85: 869-871.
- Shimada K, K Fujikawa, K Yahara, T Nakamura (1992) Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. **J. Agric. Food Chem.** 40: 945-948.

- Slater TF (1984) Free-radical mechanisms in tissue injury. **Biochem. J.** 222: 1-15.
- Smith IK (1985) Stimulation of glutathione synthesis in photorespiring plants by catalase inhibitors. **Plant Physiol.** 79: 1044-1047.
- Sugihara N, T Arakawa, M Ohnishi, K Furuno (1999) Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with alpha-linolenic acid. **Free Radic. Bio. Med.** 27: 1313-1323.
- Tzeng DD, JE DeVay (1993) Role of oxygen radicals in plant disease development. **Adv. Plant Pathol.** 10: 1-23
- Williams WB, ME Curelier, C Berset (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm-Wiss. Technol.** 18: 25-30.
- Wu YX, YJ Chiang, MY Chiang, CY Wang (2007) Responses of antioxidative system to increasing dosage of paraquat in resistant tall fleabane (*Conyza sumatrensis* (Retz.) Walker). **Plant Prot. Bull.** 49: 229-243.
- Yen GC, HY Chen (1995) Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **J. Agric. Food Chem.** 43: 27-32.