

氯氟吡氧乙酸异辛酯和百草枯及其混剂 对三叶草生理生化的影响

王学贵^{1,2} 罗明¹ 徐汉虹² 杨钟灵¹ 汤克伟¹ 张敏^{1**}

1. 四川农业大学农学院, 雅安 625014;

2. 农药与化学生物学教育部重点实验室/ 华南农业大学资源环境学院, 广州 510642

摘要 采用盆栽法,以氯氟吡氧乙酸异辛酯和百草枯原药为对照,研究了增效配比氯氟吡氧乙酸异辛酯 + 百草枯(有效成分质量比 4 : 1)混剂对三叶草电导率、叶片氧自由基产生速率及乙酰乳酸合成酶(ALS)比活力等生理生化指标的影响。结果表明:百草枯混剂对三叶草叶片电导率具增效作用,其药后 2 d 氯氟吡氧乙酸异辛酯 + 百草枯混剂实际抑制率与混剂理论抑制率 M 值为 789.44;混剂对叶片氧自由基产生速率表现出增效作用,药后 4 d 其 M 值为 262.12;混剂对 ALS 活力具有相加作用,药后 2 d 其 M 值为 104.12。

关键词 三叶草; 氯氟吡氧乙酸异辛酯; 百草枯; 生理生化

中图分类号 S 451.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)02-0156-04

三叶草(白车轴草,白三叶) *Trifolium repens* Linn. 是农业生产上的常见杂草,也是分布最广的牧草,还可兼作绿化,具有较强的耐贫瘠、耐干旱和耐铜特性^[1-3]。四川省雅安地区是茶文化发源的故乡,种植有大量的茶树。经调查发现,三叶草已成为该地区危害茶叶生产的主要杂草之一,严重影响了茶叶产量和品质。

百草枯(paraquat)属于联吡啶类茎叶处理触杀灭生性除草剂,对植物叶绿体膜破坏力极强,能在绿色植物组织内接受电子,产生超氧阴离子自由基(O_2^-),影响光合作用和叶绿素的合成^[4]。氯氟吡氧乙酸异辛酯(fluroxypyr-methyl)为吡啶类除草剂,能抑制乙酰乳酸合成酶的合成,并阻碍杂草中缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸等支链氨基酸的合成,从而抑制相关蛋白的合成,为内吸传导选择性苗后除草剂^[5]。

笔者曾采用盆栽法对百草枯、氯氟吡氧乙酸异辛酯做了复配筛选试验,按有效成分质量比 4 : 1 将氯氟吡氧乙酸异辛酯与百草枯混配,其混剂具有较强的增效作用。本试验采用复配筛选后的百草枯混剂处理三叶草,测定了三叶草电导率、氧自由基产生速率、乙酰乳酸合成酶(ALS)活性等生理生化指标,旨在探讨百草枯混剂的增效作用机理,为农田杂草

的有效防除提供理论依据。

材料与方法

供试材料

从四川农业大学农场采集三叶草,取其根部进行盆栽,并置于农场温室(20 ~ 25 ℃)大棚中,定期浇水,待其出苗生长一致后待测。

药品及试剂:30.5%的百草枯原药、95.0%的氯氟吡氧乙酸异辛酯原药,由四川绵阳利尔有限责任公司提供;TTC、盐酸羟胺、-萘胺、 H_2SO_4 、肌酸、甲萘酚、TTP、FAD 等均为分析纯(AR)。

试验方法

试验设置百草枯单剂()、氯氟吡氧乙酸异辛酯()和氯氟吡氧乙酸异辛酯 + 百草枯(有效成分质量比为 4 : 1)混剂() 3 个处理,其有效质量浓度均为 200 $\mu g/mL$ (该浓度与每个处理的 IC_{50} 值相当)。每个浓度 3 次重复,同时设置空白对照。每个处理配 500 mL 药液,采用手压喷壶均匀喷雾,并于药后 2 d (初步反应,杂草逐渐萎蔫但不黄化)、4 d (反应较剧烈,部分杂草开始黄化)、8 d (反应剧烈,杂草黄化,逐渐死亡) 3 个阶段分别测定三叶草叶片电导率、氧自由基的产生速率及乙酰乳酸合成酶(ALS)的活力等指标。

收稿日期:2009-08-04; 修回日期:2009-12-21

* 四川省科技厅项目(07ZS001)资助

** 通讯作者。E-mail: yalanmin@126.com

王学贵,男,1976年生,博士,讲师。研究方向:植物源农药以及农药制剂加工与应用。E-mail: wanderwxg76@126.com

1) 叶片电导率的测定^[6]。选取三叶草叶片,用纱布擦去尘土,用打孔器取样 3 等份,每等份 10 片。取出材料依次用自来水,去离子水冲洗数次,用洁净的滤纸吸干水分。然后放进加有一定体积的去离子水的烧杯中,室温下浸提 1~2 h。用去离子水进行电导仪校正后,测定室温下各处理材料浸出液电导率(因后期草都枯死且长出新叶,故百草枯后期取叶时取新叶)。

2) 氧自由基产生速率的测定^[7]。称取处理后的叶片 2 g,加入少量石英砂和 10 mL pH 7.8 的磷酸缓冲液研磨,然后在 4 层纱布上过滤,滤液在 5 000 r/min 离心 10 min。取上清液 0.5 mL 加入 50 mmol/L 磷酸缓冲液 0.5 mL 和 1 mL 1 mmol/L 盐酸羟胺,摇匀,在 25℃ 条件下保温 1 h。然后再加入 1 mL 17 mmol/L N-萘胺混合于 25℃ 中保温 20 min,测定 530 nm 下的吸光值。根据 $A_{530\text{ nm}}$ 值计算得到反应后的氧自由基,再根据于羟胺反应的时间和蛋白质的含量,求得样品氧自由基产生速率 (nmol/min·mg)。

3) ALS 的提取及其活力的测定。剪取三叶草的茎 10 根,每根长 10 cm,洗净晾干后称取 3 g,剪碎于冰浴瓷研钵中,按 1:2 (W/V) 的比例加入酶提取缓冲液,研磨匀浆。

将匀浆液于 4℃、25 000 r/min 下离心,取上清液后即为粗酶液,置 4℃ 下保存待用。在试管中加入 0.8 mL 酶促反应缓冲液和 0.2 mL 粗酶液,于 37℃ 水浴中温育 1 h 后加 50 μL 3 mol/L H₂SO₄ 以终止反应(对照在温育前先加 50 μL 3 mol/L 以终止反应),将反应产物在 60℃ 下继续进行脱羧反应 15 min,再顺次加入 0.5 mL 0.083% 肌酸(溶于蒸馏水)和 0.5 mL 0.83% 甲萘酚(溶于的 2.5 mol/L NaOH),于 60℃ 下显色反应 15 min。待显色反应后其温度降至室温时,经 2 000 r/min 离心并去除沉淀,在 530 nm 处用分光光度进行比色测

定^[8],并用吸光度(A)表示 ALS 活力^[9]。其中 ALS 提取液中 K₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液的配制: 1 mmol/L 丙酮酸钠,5 mmol/L MgCl₂,0.5 mmol/L TTP,10 μmol/L FAD;酶反应液中 K₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液的配制: 24 mmol/L 丙酮酸钠,6 mmol/L MgCl₂,1 mmol/L TTP,20 μmol/L FAD。

数据分析

将试验结果所得数据用 Excel 软件进行统计,计算出各药剂处理对三叶草生理生化指标的抑制率及混剂实际抑制率与理论抑制率的百分比 $M^{[10]}$ (参照共毒系数 CTC 的计算方法)。 M 接近 100(一般为 120 以内)表明相加作用; M 明显大于 100(120 以上)表示增效作用; M 显著小于 100(一般小于 80)表示拮抗作用。

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{对照处理指标} - \text{混剂处理指标}}{\text{对照处理指标}} \times 100$$

$$M = \frac{\text{混剂实际抑制率}}{(\text{单剂 1 抑制率} \times \text{在混剂中的比例} + \text{单剂 2 抑制率} \times \text{在混剂中的比例})} \times 100$$

结果与分析

药剂对三叶草叶片电导率的影响

试验结果表明,3 个药剂处理对三叶草叶片组织内容物外渗有促进作用,与对照相比其电导率均增大(表 1)。其中百草枯单剂作用效果明显,在药后 4 d 可造成处理叶片死亡,导致叶片电导率降低。氯氟吡氧乙酸异辛酯+百草枯混剂对叶片电导率的作用随着时间的增长而增加。

在 3 次测定中,氯氟吡氧乙酸异辛酯+百草枯混剂的抑制率分别为 -58.82%、-721.10%、-1 045.04%,与对照差异显著,其 M 值分别为 789.44、108.90 和 229.05。这表明三叶草叶片组织经氯氟吡氧乙酸异辛酯+百草枯混剂处理后,相对单剂处理促进了叶片浸出液的浸出效果,使其电导率增强,表现出增效作用。

表 1 各处理对三叶草叶片的电导率的影响¹⁾

Table 1 Effects of treatments on conductivity of *Trifolium repens*

处理 Treatment	2 d		4 d		8 d	
	电导率/(μS/cm) Conductivity	抑制率/% Inhibition rate	电导率/(μS/cm) Conductivity	抑制率/% Inhibition rate	电导率/(μS/cm) Conductivity	抑制率/% Inhibition rate
	3.000 0 ± 0.152 8 a	- 76.47	2.266 7 ± 0.042 1 b	- 257.92	1.847 3 ± 0.033 3 b	- 683.43
	1.866 7 ± 0.057 7 b	- 9.82	5.466 7 ± 0.106 0 a	- 763.20	1.177 8 ± 0.318 0 c	- 399.48
	2.700 0 ± 0.100 0 a	- 58.82	5.200 0 ± 0.260 3 a	- 721.10	2.700 0 ± 0.321 5 a	- 1 045.04
CK	1.700 0 ± 0.264 6 b		0.633 3 ± 0.016 4 c		0.235 8 ± 0.088 2 d	
	$M = 789.44$		$M = 108.90$		$M = 229.05$	

1) 表中纵列数据后字母相同者表示差异不显著 ($P > 0.05$, 下表同)。

The data within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% level (the same as following tables).

药剂对三叶草氧自由基产生速率的影响

试验结果表明,各处理对三叶草叶片氧自由基产生速率表现出不同程度的抑制作用(表 2)。药后 2 d,氯氟吡氧乙酸异辛酯 + 百草枯混剂氧自由基产生速率为 8.694 3 nmol/(min·mg),抑制率为 -53.29%;药后 4 d 混剂氧自由基产生速率为

7.724 8 nmol/(min·mg),抑制率为 -41.03%;药后 8 d,混剂氧自由基产生速率为 6.292 3 nmol/(min·mg),抑制率为 -22.34%,与对照差异显著。3 次测定的混剂 M 值分别是 228.41、262.12 和 210.95。这表明三叶草叶片组织经氯氟吡氧乙酸异辛酯 + 百草枯混剂处理后,其增效作用显著。

表 2 各处理对三叶草叶片氧自由基产生速率的影响

Table 2 Effects of treatments on oxygen free radical produced rate of *Trifolium repens*

处理 Treatment	2 d		4 d		8 d	
	速率/(nmol/min·mg) Produced rate	抑制率/% Inhibition rate	速率/(nmol/min·mg) Produced rate	抑制率/% Inhibition rate	速率/(nmol/min·mg) Produced rate	抑制率/% Inhibition rate
	10.606 9 ± 0.217 1 a	- 87.01	9.954 0 ± 0.222 5 a	- 81.73	7.554 9 ± 0.259 8 a	- 28.51
	6.085 3 ± 0.317 6 c	- 7.29	5.951 7 ± 0.890 6 c	- 8.66	6.238 2 ± 0.131 1 ab	- 6.11
	8.694 3 ± 0.980 3 b	- 53.29	7.724 8 ± 0.826 4 b	- 41.03	6.292 3 ± 0.284 3 ab	- 22.34
CK	5.671 8 ± 0.342 5 c		5.477 4 ± 0.745 2 c		5.879 0 ± 0.331 9 b	
	$M = 228.41$		$M = 262.12$		$M = 210.95$	

药剂对三叶草 ALS 比活力的影响

试验结果表明,各处理对三叶草 ALS 活力均表现出不同程度的抑制作用(表 3)。药后 2 d,氯氟吡氧乙酸异辛酯 + 百草枯混剂处理的三叶草茎中 ALS 的活力为 0.182 3 ($A_{530\text{nm}}$),抑制率为 67.54%;药后 4 d,混剂处理的三叶草茎中 ALS 的活力为

0.254 0 ($A_{530\text{nm}}$),抑制率为 48.58%;药后 8 d,混剂处理的三叶草茎中 ALS 比活力为 0.241 7 ($A_{530\text{nm}}$),抑制率为 48.27%,且与对照差异显著。3 次测定的混剂 M 值分别是 104.12、103.48 和 85.17,表明氯氟吡氧乙酸异辛酯 + 百草枯混剂对三叶草 ALS 比活力的抑制具有相加作用。

表 3 各处理对三叶草 ALS 比活力的影响

Table 3 Effects of treatments on acetolactate synthase(ALS) activity of *Trifolium repens*

处理 Treatment	2 d		4 d		8 d	
	ALS 比活力($A_{530\text{nm}}$) ALS activity	抑制率/% Inhibition rate	ALS 比活力($A_{530\text{nm}}$) ALS activity	抑制率/% Inhibition rate	ALS 比活力($A_{530\text{nm}}$) ALS activity	抑制率/% Inhibition rate
	0.145 3 ± 0.008 7 c	74.13	0.299 0 ± 0.007 6 b	39.47	0.366 3 ± 0.009 0 b	23.54
	0.210 3 ± 0.011 3 b	62.55	0.253 3 ± 0.021 3 b	48.72	0.163 7 ± 0.035 9 c	64.96
	0.182 3 ± 0.074 7 bc	67.54	0.254 0 ± 0.004 4 b	48.58	0.241 7 ± 0.012 3 bc	48.27
CK	0.561 7 ± 0.063 8 a		0.494 0 ± 0.023 8 a		0.467 3 ± 0.007 4 a	
	$M = 104.12$		$M = 103.48$		$M = 85.17$	

讨 论

三叶草因其具备很强的环境适应能力和耐贫瘠、耐干旱、生长快、侵占能力强等特点,已逐步成为危害严重的恶性杂草,对其防治的研究具有重大意义。本试验结果表明,氯氟吡氧乙酸异辛酯与百草枯混配,其混剂对三叶草叶片的电导率和叶片氧自由基产生速率有较强的增效作用。袁巧霞等^[11]研究了大棚土壤浸提液电导率与盐分的关系,结果表明浸提液总盐含量越大,电导率越大。

本试验结果还表明,氯氟吡氧乙酸异辛酯与百草枯复配混剂对三叶草组织有很大的破坏作用,能导致叶片细胞组织液泄漏,电导率相对于单剂明显增强,表现出很强的增效作用。近年来,大量研究亦表明,植物在逆境胁迫下超氧阴离子自由基(O_2^-)

产生的速率都会增加^[12-14]。本试验中三叶草经药剂处理后,各处理叶片氧自由基产生速率明显高于空白对照,且混剂处理 4 d 后 M 值达到 262.12,增效作用非常显著。 O_2^- 具有极强的氧化性,能造成细胞膜脂质过氧化,从而导致膜系统损伤和细胞氧化^[15]。

氯氟吡氧乙酸异辛酯与百草枯复配混剂处理三叶草之后,对 ALS 活力的抑制表现为相加作用,可能是因为 2 个单剂在作用原理和时效的差异,导致 2 种有效成分在发生作用时形成作用空间上(百草枯为触杀作用,氯氟吡氧乙酸异辛酯为内吸输导作用)和时间(百草枯效果较快,氯氟吡氧乙酸异辛酯效果较慢)的差异。该种差异也为研究混剂对三叶草根系活力的作用和增效作用机理增加了难度。如何选择有效方法进行测定还有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 向佐湘,肖润林,王久荣,等. 间种白三叶草对亚热带茶园土壤生态系统的影响[J]. 草业学报,2008,17(1):29-35.
- [2] 储玲,刘登义,王友保,等. 铜污染对三叶草幼苗生长及活性氧代谢影响的研究[J]. 应用生态学报,2004,15(1):119-122.
- [3] BIJAY K S, DALE L S. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants [J]. Weed Technology, 1998, 112:527-530.
- [4] 朴仁哲,赵洪颜,金玉姬. 地黄田专用除草剂百草枯的初步研究[J]. 农药,2008,47(4):288-291.
- [5] 徐汉虹. 植物化学保护[M]. 4版. 北京:中国农业出版社,2007:211-212.
- [6] 熊庆娥. 植物生理实验教程[M]. 成都:四川科技出版社,2003:30-31.
- [7] 王爱国,罗广华. 植物超氧自由基与羟胺反应的定量关系[J]. 植物生理学通讯,1990(6):55-57.
- [8] 娄远来,邓渊钮,沈晋良,等. 甲磺隆和草甘膦对空心莲子草乙酰乳酸合酶活性和莽草酸含量的影响[J]. 植物保护学报,2005,32(2):185-188.
- [9] 陈以峰,李宜慰,汤日圣,等. 乙酰乳酸合酶活性的简易测定方法建立[J]. 江西农业大学学报,1996,18(2):213-217.
- [10] 张敏,沈丽淘,王学贵,等. 草甘膦铵盐、氟氧吡氧乙酸异辛酯及其混剂对空心莲子草生理指标的影响[J]. 农药学报,2008,10(2):200-204.
- [11] 袁巧霞,朱端卫,张观长. 大棚土壤浸提液电导率与盐分关系的研究[J]. 华中农业大学学报,2008,27(2):239-242.
- [12] HDGES D M, ANDREWS C J, JOHNSON D A, et al. Antioxidant enzyme response to chilling stress in differently sensitive in bred maize lines[J]. Journal of Experimental Botany, 1997(8):1105-1113.
- [13] 於丙军,刘有良. 盐胁迫对一年生也野大豆幼苗活性氧代谢的影响[J]. 西北植物学报,2003,23(1):11-22.
- [14] 朱雪梅,柯永培,绍继荣,等. 高温胁迫对重穗型水稻品种叶片活性氧代谢的影响[J]. 种子,2005,24(3):25-32.
- [15] 姜卫东,高光林,俞开锦,等. 水分胁迫对果树光合作用及同化代谢的影响研究进展[J]. 果树学报,2002,19(6):416-420.

Effects of Physiology and Biochemistry of the Fluroxypr-Mepthyl, Paraquat and Their Mixture on *Trifolium repens* Linn.

WANG Xue-gui^{1,2} LUO Ming¹ XU Han-hong² YANG Zhong-ling¹ TANG Ke-wei¹ ZHANG Min¹

1. Agricultural College, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;

2. Key Laboratory of Natural Pesticides and Chemical Biology, Ministry of Education/ College of Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract *Trifolium repens* Linn. is one of the familiar herbs in agricultural production and it is significant to study how to control it. Effects of physiology and biochemistry of the mixture of fluroxypr mepthyl and paraquat (4:1, the proportion of effective ingredients) against *T. repens* were studied with pot screening, including conductivity, oxygen free radical produced rate, acetolactate synthase (ALS) activity and so on, with fluroxypr mepthyl and paraquat as controls. The results indicated that the mixture treatment showed very strong synergism against *T. repens*'s conductivity and oxygen free radical produced rate, which the *M* value of the actual to the theoretical inhibition ratio of conductivity was 789.44 after 2 days treatment and the *M* value of the actual to the theoretical inhibition ratio of oxygen free radical produced rate was 262.12 after 4 days treatment. The addition function was also displayed on ALS activity with the *M* value of 104.12 after 2 days treatment. Therefore, the synergism proportion is worthy of a further study.

Key words *Trifolium repens* Linn.; fluroxypr-mepthyl; paraquat; physiology and biochemistry

(责任编辑:陈红叶)