

除草剂生物测定技术与农药穿透生物学

姚 安 庆

(长江大学 农学院,湖北 荆州 434025)

摘 要:生物测定方法的科学性是决定除草剂新品种筛选准确性的关键因素。除草剂的生物活性是其吸收、传导以及与植物体内作用靶标发生反应等综合信息的最终表现。除草剂活体测定是唯一可包含上述全部信息的生物测定方法。现基于农药穿透生物学的基本原理评价了除草剂主要生物测定方法的特点和适用范围,提出除草剂生物测定必须重视药剂的穿透生物学信息的表达,尤其是在高通量筛选过程中宜优先采用含土介质活体测定法。

关键词:除草剂;穿透生物学;生物测定

中图分类号:S 482.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)20-0190-04

农药穿透生物学是研究靶标生物的生物特性对药剂穿透生物体的规律及其过程影响的理论^[1-3]。农药对生物体的穿透方式或途径是决定其生物活性的基础和前提,而生物测定模型与农药的穿透生物学行为存在密切的关系。除草剂的生物测定主要包括实验室、温室进行的测定^[4]。除草剂作用于相应靶标必须到达杂草一定的生理部位^[5],因此其生物测定一般需采用活体测定法。随着生物化学方法在除草剂生物测定中的应用,除草剂发展了细胞水平和酶水平的测定即离体测定法。由于生物化学的方法脱离了药剂对靶标植物的穿透过程因此其应用范围受到一定限制,尤其是对具有活化代谢性质的除草剂品种而言更显示其应用的局限性^[6]。如水稻田除草剂环酯草醚在离体测定中活性较低,但通过茎叶吸收在植株体内代谢后,产生有活性的代谢物并经内吸传导,使杂草停止生长而后枯死^[7]。20 世纪 80 年代又发展了高通量筛选(High Throughput Screening, HTS)。HTS 是应用生物化学、分子生物学、细胞生物学、计算机、自动化控制等高新技术使筛选样品微量化,筛选方法乃至数据处理高度自动化的测定方法^[8]。随着除草剂生物测定方法向细胞水平以及自动化筛选方

向的发展,不可避免地丧失了化合物许多穿透生物学信息。因此其最终的活性评价仍然需要借助传统的生物测定方法即盆栽法进行活性验证,因为某些情况下除草剂的生物活性在很大程度上取决于其移动性和在植物生长部位的积累^[9-10]。这就是说除草剂的生测方法如果离开了其穿透或传导的过程,其测定结果往往并不能代表其真实的生物活性。由此说明农药穿透生物学是除草剂生物测定必须遵循的基本原理。

1 除草剂生物测定方法的穿透生物学评价

除草剂的常规筛选一般是利用生物活体作靶标,通过观察靶标生物对新化合物在生长发育、形态特征、生理生化等方面的反应来判断新化合物的生物活性。常规筛选方法主要有:培养皿法、小杯法、稗草胚轴法、高粱法、去胚乳小麦幼苗法、玉米幼苗法、萝卜子叶法、浮萍法、绿藻法、黄瓜幼苗形态法、烟草叶片浸渍法等。谭慧芬等^[11]建立了高粱法、小球藻法和萝卜子叶法为主的筛选模式,将这 3 种方法联用,对所有试验除草剂都有反应,且 EC_{50} 均在 100 mg/L 以下,因而可将上述方法联用作为简易的初筛模式。由于常规筛选以活体为对象一般可获得较全面的生物学信息,因此其筛选结果与田间试验具有较好的一致性。但这些方法显然忽略了一个很重要的毒理学因素即药剂的穿透生物学。这些测定方法显然是通过植物出芽的种子吸收或生物直接接触药剂而建立的筛选模型,由于药剂的不同吸收特性可能很容易导致化合物的误筛。有研究表明,许多除草剂

作者简介:姚安庆(1956-),男,湖北天门人,本科,教授,现主要从事农药穿透生物学及有害生物抗药性研究。E-mail: yao990@126.com.

基金项目:农业部公益性行业专项资助项目(200903033)。

收稿日期:2012-05-28

Abstract: Some new hardy resistant pear cultivars ‘Hanhong’, ‘Hanxiang’, ‘Hansu’, ‘Yanxiang’ that released by China in recent years were introduced, including origin, fruit characters, biological characteristics and growth regions, etc. It could be used as a good references for breeder in making program and farmer in building orchard.

Key words: cold region; cultivar; pear; cultivars

在植物体内的吸收部位与其作用部位并不一致,因而它们在植物体内的传导能力将直影响药效的发挥。如取代脲类除草剂通常用于土壤处理,吸收部位是植物的根部,但其作用点是在地上部绿色组织中的叶绿体内;草甘膦经叶面处理后只有传导到地下的根或根茎中才可发挥它对多年生杂草独特的防治效果^[12]。此外除草剂在植物内的吸收部位也直接影响到生测方法的准确性。比如邻位取代的二苯醚类化合物必须通过植物幼芽吸收,如果采用“小杯法”就可能表现不出生物活性^[13],因为该法通常需要使用发芽的种子,而芽部很难与除草剂接触。同时作为影响除草剂生物活性的另一个因素即土壤的吸附性也被排除在外,这显然与除草剂最为普遍使用的土壤处理方法不符。最为著名的例子是百草枯因土壤的吸附可以完全抵消其生物活性。因此活体筛选时采用不同的吸收模型以及是否引入土壤基质具有重要的实践意义。另有研究发现,平皿法对大部分光合作用抑制型除草剂难以检出^[13]。这显然是因为这种筛选模型受到植物体自身生长期过短(7 d)的限制,因为抑制光合作用的除草剂一般要经过较长的时间才可以表现毒性。尽管有研究表明利用蛋白核小球藻法可快速筛选光合作用抑制剂^[14],但这种方法仍无法提供关于药剂在植物体内吸收和传导的全部信息,所以非土介质的常规筛选结果总是要经过盆栽试验的检验。茎叶处理剂一般必须采用盆栽或模拟盆栽的方法才可以科学地阐明除草剂的生物活性。孙艾蕊等^[15]用子叶涂抹法测定茎叶处理剂的生物活性,不仅可以提高测试的灵敏度,而且可以使测试药剂微量化。从这个意义上来说,盆栽法或模拟盆栽法是除草剂生物测定最重要的方法。这也可能是高通量筛选的最基本模型仍然是活体筛选的主要原因。常规筛选由于受生物体本身生长规律的限制,筛选周期比较长,一般为7 d以上;其次,常规筛选需要化合物的用量较大,在人力、物力方面比较浪费。所有这些都决定了常规筛选难以达到标准化、自动化、规范化的操作要求,因而限制了其筛选的效率及应用范围。如采用活体常规筛选,我国年筛选量仅1 000~2 000个化合物,国外大型农药公司也只有5 000~10 000个化合物^[8],这样的筛选速度显然不能适应组合化学合成筛选的要求。

高通量筛选是应组合化学合成需要而发展起来的现代生测技术,它是一种将组合化学、基因组和自动化仪器、机器人等先进技术进行有机组合而形成的全新的高效筛选体系。除草剂的高通量筛选主要应用于除草剂的活性初筛阶段,对新化合物的生物活性作第一次评价,有活体筛选和离体筛选之分。活体筛选使用生物全体做靶标,利用组织培养技术实现格式化、微型化、自动化和微量化,时间需要5~7 d,容器缩小1/50~1/100,

需要化合物的量为毫克或微克,操作及数据处理全部自动化。高效离体筛选是采用离体单细胞、酶、受体细胞器或基因组为靶标,利用化合物对靶标所参与的生理生化反应的抑制来判断化合物活性的有无。离体筛选的数据分析系统也采用了先进的生化及生物工程技术手段如比色法、放射性同位素标记法、全细胞启动基因记载法等,并实现了数据自动分析处理^[14]。显然高通量筛选弥补了常规筛选技术的缺陷,实现了化合物的海量筛选,同时对于阐明化合物的作用靶标具有直接的生物学意义。但是大多数情况下高通量筛选选择的测定对象与植物本身生存的状态相去甚远,尤其是无法完整地表达农药穿透生物学的过程,因此高通量筛选不可能完全取代常规筛选尤其是盆栽筛选。因此在高通量筛选技术中引入除草剂穿透生物学的理念,设计可以表达化合物吸收或传导信息的测定技术应该具有重要的实践意义。

2 不同传导类型除草剂活性表达的穿透生物学过程简析

前已述及许多除草剂在植物体内的吸收部位与作用部位并不一致,因而它们在植物体内的传导作用必然直接影响其生物活性。所以研究除草剂的穿透生物学与其生物活性表达间的关系对确定除草剂生物测定的方案具有重要意义。

2.1 非传导型除草剂生物活性表达

非传导型除草剂是指药剂被植物吸收后不向其它部位转移的除草剂。二硝基苯胺类是非传导型除草剂的典型代表。研究表明,氟乐灵及有关化合物是通过抑制植物根或芽的生长发育而发挥除草作用的。Strang等用微量放射自显影技术研究了棉花和大豆对氟乐灵的吸收和运转。氟乐灵在这2种植物根里的积累很大程度上是由于角质层、表皮层和细胞壁吸附的结果所致,在活的根细胞内似乎没有主动的积累。另一个比较特殊的例子是属于联吡啶类化合物。营养液中的杀草快和百草枯容易被植物根系吸收,在很低的浓度下就可引起植物地上部分的严重矮化和黄化,然而在土壤中的药剂一般不易被植物根部吸收。这是由于它们完全地和不可逆地为土壤所吸附的缘故^[16]。正因为如此,百草枯可安全地被用来杀死生长在定植作物行间的杂草或防除作物出苗之前刚刚出苗的杂草。杀草快和百草枯只是应用于植物地上部分时才有效,同时它们的作用与光照有关。由于应用后很快降雨也不影响其效果,所以进入植物的过程一定是很快的。试验表明百草枯处理后经过24 h黑暗处理再置于光照下即可在植物的木质部发生迅速的反向移动^[17]。这是由于药剂在黑暗中有较多的药剂渗入叶片和进入输导组织。但当植物用除草剂处理后受到连续照光时,局部的叶组织迅速地被伤害致使大部分的杀草快不能够到达维管束系统。从这2

个例子中可知,非传导型除草剂可区分为无条件非传导型和有条件非传导型2类。对于前者而言一般的活性皿法即可检测其生物活性,但必须根据药剂的吸收部位设计不同的方法。比如邻位和间位取代二苯醚类除草剂分别由植物的芽和根吸收^[13],因此前者生测方案必须保证药剂能充分与植物的芽接触。有条件非传导型除草剂显然必须在给定的条件下进行活体测定,才可能得到与生产实践相吻合的生物活性。

2.2 木质部传导型除草剂生物活性表达

药剂在植物体内吸收传导过程分为3个阶段:进入组织内部的自由空间、在质外体内移动、进入共质体。仅发生在自由空间或质外体内者宏观上表现为在植物体内单向输导;有些化合物能进入共质体,宏观上表现为在植株内双向输导。传导型除草剂多半都是通过木质部即质外体系传导,也就是说药剂在韧皮部传导较木质部困难。药剂进入木质部以后由于木质部运输的是光合作用所需的无机盐溶液,呈无机相向上输至叶部,因此药剂在植物体内传导与水分移动有极其密切的关系^[18]。吸收与传导速度受到化合物性质、植物种类、植物代谢以及环境条件的制约。Briggs 阐明了化合物的亲脂性与其蒸腾流浓度因子(TSCF)的关系。在植物木质部中传导能力最好的除草剂是那些 $\log P$ (化合物的透膜性)介于1.5~2.0之间即亲脂性中等的化合物。因为亲脂性太弱,跨膜扩散能力差,难以抵达导管;而亲脂性太强,极易牢固地吸附在根表面及内皮层的凯氏带上,或固定在主要由脂类物质组成的细胞膜体系上而不能够再自由扩散了。既然木质部传导的除草剂可由蒸腾流迅速带至植物的叶部,故其作用靶标主要是对光合作用和色素合成的抑制。生物测定方法也就必须确保化合物能够顺利地通过植物根部进行吸收。如取代脲类、三氮苯类以及异恶草酮等除草剂是典型的通过植物根部吸收以后传导至叶部产生生物活性。此类除草剂一般简单地通过活性皿法所测结果很难与田间实际情况相符,而适宜采用土壤介质混土培养法进行生物测定。因为该类方法既可以满足除草剂足够长的起效时间要求,同时也确保了化合物顺利地经过根部进入植物体内。同时这种方法最接近除草剂使用的真实环境,故其测定的准确性和精确性均最高。

2.3 韧皮部传导型除草剂生物活性表达

真正单纯性从韧皮部传导的除草剂较少。能够进入筛管中的除草剂并不一定显示韧皮部的运输特性。如果这些化合物仅能较快地进出筛管细胞而不能在筛管中滞留较长时间,那么比同化产物大许多倍的蒸腾流将会把它们迅速卷走,经木质部分散到蒸腾作用强烈的部位^[19]。草甘膦和马来酰肼是最典型的韧皮部输导型除草剂。苯氧羧酸类和芳氧苯氧基丙酸酯类除草剂也是较理想的韧

皮部输导型除草剂。但苯氧羧酸类在韧皮部系统中倾向于被韧皮部系统中薄壁细胞所积累,并从这里脱离同化流传导的主流而向侧向流动。不过快速的传导过程可把这类除草剂的滞留作用降低到最小限度。因此在根苗壮生长时,除草剂将随同化流下行,此时用叶面处理的办法来防除杂草是最能达到目的的选择^[22]。从这个意义上来说,纯粹的韧皮部输导型除草剂是通过茎叶处理的方法使药剂传导到植物的根部,且传导的过程显然依赖于植物生理学的过程。这种作用方式显然对于那些深根性多年生杂草的防除具有重要意义。对于此类除草剂的生测方法必须采用标准的盆栽试验法。

2.4 双向传导型除草剂

双向传导型除草剂介于木质部输导型和韧皮部输导型化合物之间。那些能够扩散进入筛管中但在其中滞留能力比木质部输导型化合物强但比典型的韧皮部输导型化合物弱的除草剂,在随着同化物移动的过程中,不断地有一些分子扩散到质外体而随着蒸腾流移动,因而这些化合物在植物体内既可传导至幼嫩组织,又可传导至蒸腾作用强烈的成熟叶片中。应当指出的是,同步输导型除草剂与韧皮部输导型除草剂之间的区分并不是很严格的,有些除草剂如苯氧羧酸类化合物既可说是韧皮部输导型的亦可说是双向输导型除草剂。所以这些除草剂一般仍然以茎叶处理为主要的施药方式。较重要的双向传导型除草剂有磺酰脲类、咪唑啉酮类、磺酰胺类等。3类除草剂均为乙酰乳酸合成酶的抑制剂。它们通过土壤处理或茎叶处理同样可获得很高的除草效果。由于此类化合物较特殊的传导特性,一般来说它们的离体测定和活体测定结果具有较高的相关性。尽管如此,由于活体测定中植物的代谢作用的影响,2类测定方法仍然存在许多差异^[20]。

3 基于除草剂穿透生物学的生物测定技术设计原则

新药登记严格的环境要求和生物对农药抗性问题的加重以及由此产生的组合化学在农药合成中的应用,快速而准确的生物测定方法显得更为重要。遗憾的是快速与准确之间往往存在较大的矛盾和冲突。一般来说除草剂的活体测定结果最具有准确性,但往往测定步骤复杂且耗时长,而以自动化和快速见长的高通量筛选却往往不具有准确性。也就是说高通量筛选中有活性的品种可能通过活体筛选并不表现出原有的生物活性;相反在高通量筛选中没有活性的品种可能在活体筛选中有很好的除草活性^[21]。因此研究快速准确的生物测定方案对于增加发现新化合物的几率,降低寻找新化合物的成本以及提高杂草抗药性测定的准确性显然具有重要的实践意义。

3.1 常规筛选由于包含了农药作用于生物体的全部信

息,与在田间条件下获得的结果更加接近,而且不容易漏筛。因此对于作用方式明确的新化合物如模板化合物衍生物的筛选,宜直接进行常规筛选,从而省略其初筛过程。

3.2 尽可能在高通量筛选中采用活体筛选法。虽然高通量筛选中的活体筛选是在微型的 96 孔板中进行,活体模型中也不包含有土壤介质,但这种方法较细胞或分子筛选还是可以获得植物代谢与化合物传导的部分信息,因此具有更高的准确性。如果能够通过研究含土的介质取代琼脂营养液培养基,理论上可以提供更多的关于除草剂吸收、传导以及代谢的信息,因而使之更接近于田间实际情况,避免假阳性率和漏筛出现的机会^[22]。

3.3 提高常规筛选技术的现代化和自动化水平。通常常规筛选需要较多(质量)的化合物,如拜耳公司需要 50~80 mg,而组合化学库有时只能提供几毫克的样品。许多国际性大公司已实现了温室筛选的微型化(Micro-screening)和自动化,使筛选速度更快,成本更低,而且更为重要的是所需化合物的量可低于 1 mg^[23]。

3.4 加强新化合物生物学、生物化学、穿透生物学等基本信息的收集与评估,按除草剂作用方式、作用靶标以及植物类型建立与之相适应的生物测定技术体系。采用科学的抽样技术与生测组合策略,形成高效、准确、快速的多层次、多通道的除草剂生物测定筛选模型,以满足现代除草剂研究与开发新品种的需要。

参考文献

- [1] 杨健,王真,姚安庆.应用昆虫学报[J].昆虫抗药性测定与杀虫剂穿透生物学,2011,48(2):421-425.
- [2] 姚安庆,杨健.基于农药穿透生物学的杀菌剂生物测定[J].中国植保导刊,2010,30(11):13-16.
- [3] 杨健,杜晓英,王真,等.杀螨剂穿透生物学与杀螨剂生物测定[J].江苏农业科学,2011,39(3):141-143.
- [4] 宋小玲,马波,皇甫超河,等.除草剂生物测定方法[J].杂草科学,2004(3):1-6.
- [5] 韩庆莉,沈嘉祥.杂草抗药性的形成、作用机理研究进展[J].云南农业大学学报,2004,19(5):556-561.
- [6] 王树凤,徐礼根,马建义,等.除草剂生物筛选研究进展[J].农药学报,2002,4(4):3-9.
- [7] 刘长令,李继德,董英刚.新型稻田除草剂环酯草醚[J].农药,2001,40(8):46.
- [8] 邱立红,张文吉,王成菊,等.高通量筛选在新农药创制研究中的应用[J].农药科学与管理,2002,23(5):20-24,32.
- [9] Ridley S M, Elliott A C, Yeung M, et al. High-throughput screening as a tool for agrochemical discovery: Automated synthesis, compound input, assay design and process management [J]. Pestic Sci, 1998, 54: 327-337.
- [10] Grossmann K, Berghaus R, Retzlaff G. Heterotrophic plant cell suspension cultures for monitoring biological activity in agrochemical research. Comparison with screens using algae, germinating seeds and whole plants [J]. Pestic Sci, 1992, 35: 283-289.
- [11] 谭慧芬,程慕耳,孙锡治.除草剂简易生物测定方法[J].植物保护,1983,9(5):35-36.
- [12] 苏少泉.除草剂作用靶标与新品种创制[M].北京:化学工业出版社,2001:13-19.
- [13] 童哲.二苯醚类除草剂[J].生命世界,1987(6):26-27.
- [14] 马建义,陈杰,柴伟纲,等.用蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)评价除草剂活性的微型筛选方法研究[J].农药学报,2000,2(2):29-34.
- [15] 孙艾蕊,倪汉文,韦韬,等.茎叶处理除草剂微量活体筛选方法初探[J].农药,2008,47(9):686-688.
- [16] Tsai W T, Hsieh M F, Sun H F, et al. Adsorption of paraquat onto activated bleaching earth[J]. Environmental Contamination and Toxicology, 2002, 69: 189-194.
- [17] Draoui K, Denoyel R, Chgoura M, et al. Adsorption of paraquat on minerals[J]. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 1999, 58: 597-606.
- [18] 戴建昌,张兴.杀虫剂在木本植物体内传导理论研究进展[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2001,29(4):125-135.
- [19] 刘支前.除草剂在植物体内的传导机理[J].植物生理学通讯,1992,8(3):226-229.
- [20] 刘亚光,杨谦.长残留除草剂广灭灵的生物测定方法[J].东北农业大学学报,2005,36(4):463-466.
- [21] 王树凤,徐礼根,马建义,等.除草剂生物筛选研究进展[J].农药学报,2002,4(4):3-9.
- [22] 范志金,陈俊鹏,党宏斌,等.单啉磺隆对靶标乙酰乳酸合成酶活性的影响[J].现代农药,2003,2(2):15-17.
- [23] 逢森,袁会珠,李保同,等.利用 96 孔板建立除草剂微量活体筛选方法初探[J].农药学报,2005,7(4):334-338.

Herbicide Bioassay and Their Penetration Biology

YAO An-qing

(Department of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025)

Abstract: The scientific of bioassay technique is a key factor of screening new herbicide. Bioactivity of herbicide are comprehensive performance about the absorb, transmission and reaction to target in plants. Determination of living is the method of only include all information. On the basic principle of pesticide penetration biology evaluated main methods characteristic and applicable scope of herbicide bioassay, herbicide bioassay paying attention to expression of information of the penetration biology was put forward, and determination of living containing soil medium method in high-throughput screening should be used.

Key words: herbicide; penetration biology; bioassay