

新型除草剂丙酯草醚对油菜幼苗生长与根尖细胞活性的影响

张帆, 田甜, 金宗来, 黄冲平, 唐桂香, 叶庆富, 周伟军

(浙江大学农业与生物技术学院, 杭州 310029)

摘要: 【目的】研究新型油菜田除草剂丙酯草醚(ZJ0273)对甘蓝型油菜发芽期幼苗在生长发育及根尖细胞活性等方面的安全性影响,为进一步明确其作用机理奠定理论基础。【方法】利用生理生化方法探讨了ZJ0273处理对发芽期油菜茎根长、干物质积累、根系活力和根细胞膜透性等的影响,并运用FDA-PI荧光对染法及根尖压片法研究了该除草剂对油菜根尖细胞活性及有丝分裂的影响。【结果】ZJ0273处理对油菜幼苗干物质和苗高等性状的抑制作用随着处理浓度的升高和处理时间的延长而显著增强;10与100 mg·L⁻¹处理显著抑制了油菜幼苗根的生长且两处理间抑制效果无明显差异;1 mg·L⁻¹以下浓度的ZJ0273对油菜幼苗根系活力、细胞膜完整性几乎无显著影响,而10 mg·L⁻¹以上浓度处理则明显抑制根系活力且破坏细胞膜完整性;100 mg·L⁻¹ZJ0273处理抑制油菜根尖分生区细胞有丝分裂并使多数细胞停滞于分裂中期。【结论】发芽期是油菜对ZJ0273处理的敏感时期;10 mg·L⁻¹ZJ0273处理即抑制油菜幼苗的生长发育及影响根尖细胞活性,且抑制效果随处理浓度的升高和处理时间的延长而增大;对油菜幼苗较为安全的ZJ0273临界浓度为1 mg·L⁻¹。

关键词: 油菜; 丙酯草醚; 根系活力; 细胞膜透性; FDA-PI; 有丝分裂指数

Effect of New Herbicide ZJ0273 on Seedling Growth and Root Cell Viability of *Brassica napus*

ZHANG Fan, TIAN Tian, JIN Zong-lai, HUANG Chong-ping, TANG Gui-xiang, YE Qing-fu, ZHOU Wei-jun

(College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029)

Abstract: 【Objective】This paper described the response of seedling growth and root cell viability of *Brassica napus* L. (rapeseed) to various concentrations of ZJ0273 treatments at germination stage to define the mechanism of this novel herbicide. 【Method】Effects of different ZJ0273 treatments on dry matter, morphological characters, root oxidizability and cell membrane permeability of rapeseed seedlings were investigated by various physiological measurements. Root cell viability and mitosis as affected by herbicide treatments were also studied based on FDA-PI double staining and root-tip squashing method. 【Result】The results indicated that the inhibitive effects of ZJ0273 treatments on rapeseed dry matter and morphological characters were enhanced along with the increase of treatment concentrations and durations. Both of 10 and 100 mg·L⁻¹ ZJ0273 treatments inhibited root development significantly. There were no distinct difference among 0, 0.1 and 1 mg·L⁻¹ ZJ0273 treatments on root oxidizability and membrane permeability, compared with treatments at 10 and 100 mg·L⁻¹ which obviously inhibited root cell viability and induced cell membrane disintegration. Furthermore, mitotic index of root-tip cells was declined and cell division was stopped at metaphase after being treated by 100 mg·L⁻¹ ZJ0273. 【Conclusion】Rapeseed seedlings are very sensitive to herbicide ZJ0273 at germination stage. Treatment at 10 mg·L⁻¹ ZJ0273 can significantly inhibit rapeseed growth and root viability, and the inhibitive effect is intensified with the increase of treatment concentrations and durations. The application of 1 mg·L⁻¹ (critical concentration) is safe for rapeseed seedling growth.

Key words: rapeseed (*Brassica napus* L.); ZJ0273; root oxidizability; membrane permeability; FDA-PI; mitotic index

收稿日期: 2009-02-22; 接受日期: 2009-05-06

基金项目: 国家高技术研究发展计划(2006AA10A214)、国家自然科学基金(30871652, 20632070)、浙江省自然科学基金(R307095)

作者简介: 张帆(1982-), 女, 浙江建德人, 博士研究生, 研究方向为作物生理与化学调控。E-mail: vangao@163.com。通信作者周伟军(1962-), 男, 浙江鄞县人, 教授, 博士, 研究方向为作物生理与分子生物学。E-mail: wjzhou@zju.edu.cn

0 引言

【研究意义】新型高效油菜田除草剂丙酯草醚(4-(2-(4,6-二甲氧基-2-嘧啶氧基)苄胺基)苯甲酸正丙酯)(产品代号 ZJ0273)是基于一类具有新颖结构和高效除草活性的农药先导化合物 2-嘧啶氧基-N-芳基苄胺类衍生物开发得到的,已获国家发明专利(ZL00130735.5)和美国发明专利(US 6800590 B2)^[1]。该除草剂具有高效、低毒、与环境相容等优点,田间推荐使用浓度为 45g a.i.·hm⁻²,在甘蓝型油菜移栽期一次施用可有效防除看麦娘、日本看麦娘、繁缕、牛繁缕等油菜田中的主要单、双子叶杂草^[2-4],在生产上具有较高的应用价值。ZJ0273 是中国为数不多,拥有自主知识产权的农药新品种,其安全性评价及作用机理研究对该除草剂在生产上的推广应用具有重要意义。

【前人研究进展】陈杰等^[5]研究表明 ZJ0273 能使植物体内必需的 3 种支链氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸)合成受阻,属于乙酰乳酸合成酶(ALS)抑制剂的范畴^[6-8];Fayez 等^[9]研究发现,根尖是萌发种子在土壤中首先接触除草剂的器官,且根系的生长发育易被 ALS 抑制型除草剂抑制;除草剂影响植物根尖有丝分裂并引起染色体凝聚、缩短以及微核、多核等畸形^[10];磺酰脲类(ALS 抑制型除草剂)可通过限制有丝分裂过程中所需的营养物质来抑制细胞进入或完成有丝分裂^[11];张文芳等^[12]研究发现高浓度 ZJ0273 抑制油菜根系 TTC 活力;王伟等^[13]研究表明 ZJ0273 属于不易移动农药,且其在土壤表面的最大淋溶峰出现在 0~2 cm 土层,一方面说明 ZJ0273 的田间使用不易对地下水造成污染,另一方面也说明评价该除草剂对后茬作物及直播油菜的安全性问题迫在眉睫。【本研究切入点】ZJ0273 作为一种新型油菜田除草剂,若要在直播油菜田推广应用,需要评价其对发芽期油菜幼苗的安全性问题包括对油菜幼苗生长发育、根系活力及有丝分裂等方面的影响。但目前的生理研究主要集中于 ZJ0273 对不同植物 ALS 酶活性影响以及对移栽期油菜的安全性及除草效果等方面,在对发芽期油菜的安全性评价方面尚无研究报道。【拟解决的关键问题】本试验通过生理生化方法研究了 ZJ0273 处理对发芽期油菜幼苗干物质、茎根长、侧根数、根系活力和细胞膜透性等的影响,并运用 FDA-PI 荧光对染法及根尖压片法分析了 ZJ0273 对根尖细胞活性及有丝分裂的影响,为评价该除草剂对发芽期油菜的安全性问题,进一步探讨其作用机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验设计

1.1.1 种子萌发 本试验材料选用甘蓝型油菜浙双 758 (*Brassica napus* L. cv. ZS758),该品种在南方江浙地区属生产上的油菜主栽品种。试验用种子收获于浙江大学华家池校区试验农田,4℃黑暗条件下保存。试验时先用 15%NaClO 溶液消毒 15 min,蒸馏水冲洗并在干燥滤纸上吸干,排列于铺有双层灭菌滤纸的 9 cm 培养皿中,每皿 50 粒。培养皿置于 25℃黑暗培养箱中萌发 48 h,种子露白后备用,此时油菜胚根伸出种皮约 0.2~0.3 cm。

1.1.2 除草剂处理 10%丙酯草醚乳液由中国科学院上海有机化学研究所提供。采用改良的直板发芽法^[14]:将生长一致的露白种子整齐排列于铺有单层灭菌滤纸的玻璃板(长 20 cm×宽 8 cm)上,胚根统一向下(每板 20 粒种子),再轻覆一窄滤纸固定种子(窄滤纸上边长以恰好靠着种子上端为宜,以利于种子透气);玻璃板无滤纸面斜靠于敞口大号发芽盒(长 18 cm×宽 12 cm×高 10 cm)中,倾角约为 80°,每盒 2 板。发芽盒中为 100 ml 处理液,即含不同浓度 ZJ0273 (0, 0.1, 1, 10 和 100 mg·L⁻¹)的 1/2 霍格兰营养液^[12],滤纸事先以此处理液湿润。所有发芽盒置于光照培养箱中,培养条件为白天 16 h,温度 25℃,光照 140 μmol·m⁻²·s⁻¹,湿度 60%;黑夜 8 h,温度 20℃,湿度 80%。处理 1、2、3、5 d 后分别对不同处理油菜幼苗拍照并测定干物质、苗高等性状及根系活力,根尖细胞膜透性测定及 FDA-PI 荧光染色则在处理 6、24、48、96 h 后进行。

1.2 方法

1.2.1 幼苗形态性状及干物质测定 在不同处理时间分别测量油菜苗高、根长、侧根数等性状,每处理统计 30 株以上幼苗;幼苗测量后可用于干物质测定,20 株为一个测定样本,每处理设 10 次重复,样品于 105℃烘箱中杀青 30 min 后在 80℃下烘干至恒重并称重。

1.2.2 TTC 法测根系活力 根系活力测定采用氯化三苯基四氮唑(TTC)法^[15]。预实验发现本试验中不同处理间根系发育存在较大差异,且根尖活力对全根总活力有较大影响,故试验分根尖 1 cm 部分和全根分别进行测定。根尖鲜样 0.02 g(全根 0.2 g)分别置于 15 ml 具塞试管中,加入 5 ml 0.4%的 TTC 溶液和 5 ml 1/15 mol·L⁻¹磷酸缓冲液(pH 7.0),暗箱 37℃反应 1 h,

立刻加入 2 ml 2 mol·L⁻¹ 的 H₂SO₄ 中止反应, 取出已染色的根, 在滤纸上吸干后用乙酸乙酯脱色, 脱色液在 485 nm 波长下比色读取 OD 值, 经标准曲线换算以单位鲜重根在单位时间内还原的 TTC mg 数来表示根活力。

1.2.3 电导率法测根尖细胞膜透性 参照 Zabalza 等^[16]的方法, 用电解质渗透率代表处理对细胞膜的伤害度。分别切取不同浓度处理下幼苗的 1cm 长度根尖 10 个, 用双蒸水 (DDW) 冲洗 3 遍去除表面离子, 吸干水分后放入含 10 ml DDW 的试管中 25℃ 浸泡 2 h, 用电导仪 (DDS-11D, 北京) 测定溶液的初始电导值 (EC₀), 然后将试管置于沸水浴中加热 15 min 使样品失活, 冷却到 25℃ 后补充水分至 10 ml 测总电导值 (EC_t), 计算相对电导度 [REC(%) = (EC₀/EC_t) × 100%] 表示电解质渗透率。

1.2.4 FDA-PI 荧光对染法测根尖细胞活性 参照 Ishikawa 等^[17]的方法, 切取经不同浓度 ZJ0273 处理的 0.5 cm 长根尖, 用 DDW 漂洗 3 次后用 Fluorescein diacetate - Propidium iodide [FDA (12.5 μg·ml⁻¹) - PI (5 μg·ml⁻¹)] 复合荧光染料在 25℃ 下染色 10 min, DDW 冲洗 1 min。挑取根尖置于载玻片上, 加一滴 DDW 后盖片, 于激光扫描共聚焦显微镜 (LSM510, Carl-Zeiss, 德国) 低倍镜下 (5×) 观察并拍照。FDA 及 PI 的激发光与发射光分别为: 488/515 nm, 543/585 nm。

1.2.5 压片法观察根尖细胞有丝分裂 将暗培养 48 h 的露白油菜种子转入 100 mg·L⁻¹ ZJ0273 中继续暗培养 24 h (对照为蒸馏水), 于上午 8:00~10:00 间切取根尖 2~3 mm, 用卡诺氏固定液 (无水乙醇: 冰醋酸=3:1) 固定 24 h, 加入 1 mol·L⁻¹ HCl 于 60℃ 水浴解离 15 min, 蒸馏水冲洗。将软化的根尖置于载玻片上, 用改良苯酚品红染液染色压片, 并用 Olympus 光学显微镜 (20×) 镜检, 统计有丝分裂指数 = (分裂细胞数/观察细胞总数) × 100% (分裂细胞包括分裂前期、中期、后期、末期的所有细胞)^[18]; 最后在高倍镜 (40×) 下观察不同分裂时期的细胞及其染色体形态有无异常并进行显微摄影。

1.2.6 统计分析 所有测得的数据均采用 Statistical Analysis System (SAS) 软件进行显著性分析, LSD 的多重比较分析在 0.05 水平上进行。

2 结果与分析

2.1 丙酯草醚对幼苗生长发育的影响

ZJ0273 处理影响发芽期油菜幼苗的生长发育, 其抑制效果随处理浓度的升高和处理时间的延长而增强

(表 1, 图 1)。处理 1 d 后, 1、10 和 100 mg·L⁻¹ ZJ0273 处理植株的干物质、茎长、根长、侧根数等形状与对照存在显著差异, 且差异随处理浓度的升高和处理时间的延长而增大; 10 与 100 mg·L⁻¹ 处理间的干物质、茎长及侧根数等性状不存在显著差异。相比之下, 0.1 mg·L⁻¹ ZJ0273 最低浓度处理植株的茎长与对照无显著差异, 干物质积累及茎根比在处理 5 d 后与对照产

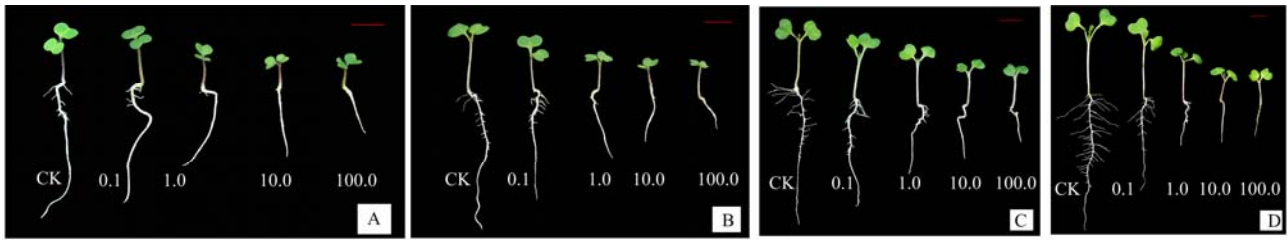
表 1 不同浓度丙酯草醚处理对油菜幼苗干物质及形态性状的影响

Table 1 Effect of herbicide ZJ0273 at different concentrations (0.1-100.0 mg·L⁻¹) on dry matter and morphological characters of *Brassica napus*

性状 Character	处理浓度 Concentration (mg·L ⁻¹)	处理时间 Treatment duration (d)			
		1	2	3	5
干物质 Dry matter (g/20 plants)	0 (CK)	0.061 a*	0.068 a	0.076 ab	0.116 a
	0.1	0.060 a	0.068 a	0.074 ab	0.102 b
	1.0	0.056 b	0.065 b	0.071 b	0.086 c
	10.0	0.054 bc	0.062 c	0.066 c	0.077 c
	100.0	0.053c	0.061 c	0.064 c	0.074 c
苗高 Shoot length (cm)	0.0	1.13 a	1.43 a	2.15 a	2.75 a
	0.1	1.05 a	1.40 a	2.08 a	2.87 a
	1.0	0.84 b	1.24 b	1.61 b	2.07 b
	10.0	0.79 b	1.00 c	1.19 c	1.35 c
	100.0	0.77 b	1.03 c	1.18 c	1.23 c
根长 Root length (cm)	0.0	4.26 a	4.94 a	6.03 a	8.25 a
	0.1	3.76 b	4.66 b	5.66 b	6.01 b
	1.0	2.85 c	3.15 c	3.19 c	3.19 c
	10.0	2.28 d	2.32 d	2.69 d	2.89 c
	100.0	2.17 d	2.20 d	2.21 e	2.25 d
苗高/根长 Shoot length/ Root length	0.0	0.27 b	0.29 c	0.36 c	0.33 d
	0.1	0.28 b	0.30 c	0.37 c	0.48 c
	1.0	0.29 b	0.39 b	0.51 a	0.65 a
	10.0	0.35 a	0.43 ab	0.45 b	0.47 c
	100.0	0.35 a	0.47 a	0.53 a	0.55 b
侧根数 Number of lateral roots	0.0	3.8 a	9.3 a	19.6 a	35.6 a
	0.1	4.0 a	8.4 a	12.7 b	21.2 b
	1.0	1.9 b	4.0 b	5.8 c	7.8 c
	10.0	0.4 c	1.3 c	1.4 d	2.6 d
	100.0	0.0 c	0.2 c	0.8 d	1.2 d

* 各处理样本均重复 10 次。根据 LSD 检验, 表中字母每个性状内纵向比较, 相同的表示无显著差异 (P=0.05)

* Each value represents the mean of ten replicates of each treatment. Within each character, means followed by same small letters are not significantly different by the LSD test at P=0.05



照片分别拍摄于处理 1(A)、2(B)、3(C)及 5(D)天后。标尺为 1.0 cm
Photos were taken at 1(A), 2(B), 3(C) and 5(D) days after treatment. Bar=1.0 cm

图 1 不同浓度丙酯草醚处理对油菜幼苗生长发育的影响

Fig. 1 Growth response of *Brassica napus* seedlings treated with different concentrations of herbicide ZJ0273 (0.1-100.0 mg·L⁻¹) and different treatment durations

生显著差异,根长与侧根数分别从处理 1 d 及 2 d 后与对照产生显著差异。除草剂处理对地上部的影响比对地下部小:处理 5 d 后各浓度处理植株与对照植株都产生了真叶(图 1-D);低浓度处理植株茎长不受抑制,且 100 mg·L⁻¹ 处理最多抑制茎长 55%;相比之下,低浓度处理分别抑制植株的根长及侧根数 25% 和 40%,且高浓度处理分别抑制根长和侧根数 70% 和 95% 以上。茎根比的变化趋势较为复杂:处理前 2 d,茎根比随着处理浓度的增大而增大;处理 3 d 后,1 mg·L⁻¹ 处理植株的茎根比最大(表 1)。

2.2 丙酯草醚对根系 TTC 活性的影响

ZJ0273 对油菜幼苗根尖 TTC 活力的抑制作用随处理浓度的升高和处理时间的延长而增强(表 2):0.1 mg·L⁻¹ 处理与对照无显著差异;1 mg·L⁻¹ ZJ0273 在处理 2 d、3 d 时显著低于对照,但在处理 5 d 后恢复

至对照水平;10 mg·L⁻¹ 以上浓度处理 1 d 后即显著低于对照,且 10 与 100 mg·L⁻¹ 浓度的抑制效果在处理 2 d 后彼此无显著差异。除草剂处理对全根 TTC 活力的抑制趋势在处理 1 d 时与根尖一致;所有浓度处理 2 d 后对全根 TTC 活力的影响与对照均无显著差异;处理 3 d 及 5 d 后,油菜幼苗全根 TTC 活力随处理浓度的升高而增大。

2.3 丙酯草醚对根尖细胞膜透性的影响

研究表明,0.1 mg·L⁻¹ ZJ0273 处理对细胞膜透性无显著影响;较高浓度 ZJ0273 处理导致油菜幼苗根尖细胞电解质渗漏率显著升高,并随处理时间的延长和处理浓度的升高而加强(表 3)。100 mg·L⁻¹ 处理对根尖细胞电解质渗漏的影响最显著,该浓度处理根系 6 h 和 96 h 引起的电解质渗漏率分别为 16.94% 和 51.08%。

表 2 不同浓度丙酯草醚处理对油菜幼苗根系活力 (mg TTC·g⁻¹ FW·h⁻¹) 的影响

Table 2 Effect of herbicide ZJ0273 at different concentrations (0.1-100.0 mg·L⁻¹) on root oxidizability (mg TTC·g⁻¹ FW·h⁻¹) of *Brassica napus*

取样部位 Sampling position	处理时间 Treatment duration (d)	处理浓度 Treatment concentration (mg·L ⁻¹)				
		0	0.1	1.0	10.0	100.0
根尖 Root tip	1	3.261 a*	3.190 a	2.998 a	2.300 b	1.853 c
	2	3.300 a	3.171 a	2.708 b	1.963 c	1.813 c
	3	3.450 a	3.461 a	2.753 b	1.910 c	1.733 c
	5	3.360 a	3.403 a	3.410 a	1.648 b	1.581 b
全根 Whole root	1	0.662 a	0.651 a	0.605 b	0.501 c	0.483 c
	2	0.620 a	0.633 a	0.635 a	0.615 a	0.610 a
	3	0.510 c	0.573 b	0.571 b	0.604 b	0.761 a
	5	0.493 c	0.502 c	0.558 b	0.628 a	0.653 a

* 各处理样本均重复 4 次。根据 LSD 检验,表中字母横向比较,相同的表示无显著差异 (P=0.05)

* Each value represents the mean of four replicates of each treatment. Within each row, means followed by same small letters are not significantly different by the LSD test at P=0.05

表 3 不同浓度丙酯草醚处理对油菜种子萌发期幼苗根系细胞膜透性的影响

Table 3 Effect of herbicide ZJ0273 at different concentrations (0.1-100.0 mg·L⁻¹) on root cell membrane permeability of *Brassica napus* represented by electrolyte leakage (%)

参数 Parameter	处理时间 Treatment duration (h)	处理浓度 Treatment concentration (mg·L ⁻¹)				
		0	0.1	1.0	10.0	100.0
电解质渗漏率 Electrolyte leakage (%)	6	8.43 c [*]	8.09 c	8.32 c	12.17 b	16.94 a
	24	7.94 c	7.98 c	9.07 c	19.68 b	27.12 a
	48	8.57 c	8.24 c	10.19 c	28.63 b	38.26 a
	96	9.29 d	8.23 d	12.83 c	36.05 b	51.08 a

* 各处理样本均重复 4 次。根据 LSD 检验, 表中字母横向比较, 相同的表示无显著差异 ($P=0.05$)

* Each value represents the mean of four replicates of each treatment. Within each row, means followed by same small letters are not significantly different by the LSD test at $P=0.05$

2.4 丙酯草醚对幼苗根尖细胞 FDA-PI 复合荧光染色活力的影响

根尖经 FDA-PI 对染后, 活性较强的细胞在蓝光下激发出亮绿色荧光, 而核膜裂解的凋亡细胞则在绿光下激发出点状的亮红色荧光; 且由于植物细胞在绿光下还存在红色的自发荧光, 因此活性较弱的细胞会由于蓝光激发的绿色荧光较弱而在叠加了红色的自发荧光后表现为桔黄色或暗红色荧光。试验结果表明, 0.1 mg·L⁻¹ ZJ0273 处理 6~96 h, 油菜根尖细胞与对照发出同样强度均匀的绿色荧光 (图 2-A); 1 mg·L⁻¹ 处理根尖在 48 h 后绿色荧光比对照略微减弱 (图 2-B)。而高浓度处理显著抑制根尖细胞活性, 且导致根尖伸长区膨大和畸形; 10 mg·L⁻¹ 处理根尖在 24 h 后分生区绿色荧光减弱, 96 h 后根尖分生区以下部分

无绿色荧光发出 (图 2-C); 100 mg·L⁻¹ 处理 6 h 后整个根尖的绿色荧光迅速减弱, 24 h 后伸长区发出红色荧光, 96 h 后根尖荧光整体呈暗红色 (图 2-D)。

2.5 丙酯草醚对油菜根尖细胞有丝分裂的影响

100 mg·L⁻¹ ZJ0273 处理和对照根尖的有丝分裂指数分别为 14.86‰和 17.57‰, 处理显著低于对照 (表 4)。不同分裂相细胞百分数比较结果表明, 处理根尖的分裂中期细胞数在分裂细胞总数中的比例显著高于对照, 其它分裂相细胞所占百分数与对照无显著差异。油菜根尖分生区细胞形态观察结果表明 (图 3): 处理根尖的分生区中仍存在相当数量的分裂前期、中期、后期和末期的分裂相细胞; 与对照相比, 各分裂相细胞未出现明显畸形和染色体加倍、微核、多极分裂等异常现象。

表 4 丙酯草醚处理对油菜根尖分生区细胞有丝分裂的影响

Table 4 Effect of herbicide ZJ0273 treatment on mitosis of *Brassica napus* root tip cells in meristematic zone

处理浓度 Concentration (mg·L ⁻¹)	有丝分裂指数 Mitotic index (%)	分裂细胞中不同分裂时期的细胞百分数 Percent of different mitosis phase cells (%)			
		前期 Prophase	中期 Metaphase	后期 Anaphase	末期 Telophase
0 (CK)	17.57 a [*]	37.22 a	25.83 b	19.92 a	17.03 a
100.0	14.86 b	30.82 a	40.16 a	15.68 a	13.34 a

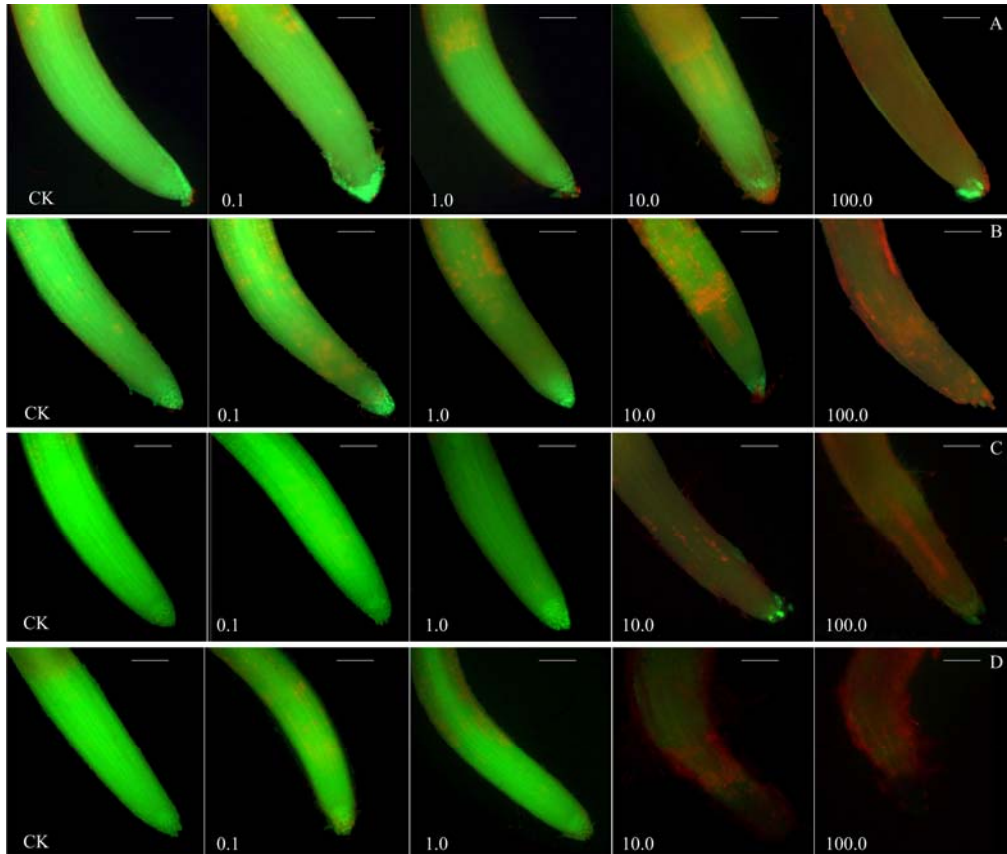
* 各处理样本均重复 6 次。根据 LSD 检验, 表中字母纵向比较, 相同的表示无显著差异 ($P=0.05$)

* Each value represents the mean of six replicates of each treatment. Within each column, means followed by same small letters are not significantly different by the LSD test at $P=0.05$

3 讨论

新型除草剂 ZJ0273 是一种作用效果类似于 ALS 抑制剂的前体农药^[4,7]。磺酰脲类和嘧啶水杨酸类等 ALS 抑制型除草剂通过抑制杂草 ALS 酶活性, 阻止其支链氨基酸合成, 导致细胞有丝分裂和蛋白质合成异常, 从而使植株不能正常生长而死亡^[6,11,19-21]。此外,

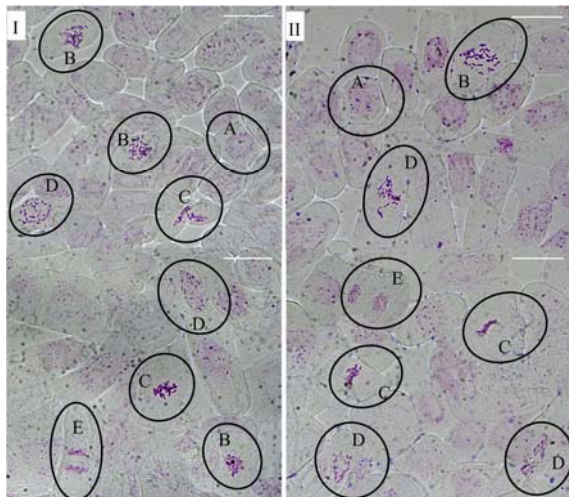
已有研究报道表明 ZJ0273 主要以根茎吸收为主^[22], 且具有运输性差等特点^[13]; 而根尖是萌发种子在土壤中首先接触除草剂的器官, 根系的生长发育易被 ALS 抑制型除草剂抑制^[9]。本研究结果表明, ZJ0273 处理抑制发芽期油菜幼苗的生长发育, 这与 ALS 抑制型除草剂的作用效果类似; 此外, 该除草剂对地下部的影响大于地上部, 根据报道推测可能是最先接触 ZJ0273



照片分别拍摄于处理 6 (A)、24 (B)、48 (C) 及 96 (D) 小时后。标尺为 0.2 mm
Photos were taken at 6(A), 24(B), 48(C) and 96(D) hours after treatment. Bar=0.2 mm

图 2 不同浓度丙酯草醚 (0.1~100.0 mg·L⁻¹) 对油菜根尖 FDA-PI 荧光染色活力的影响

Fig. 2 Histochemical demonstration of cell activity in root tip of *Brassica napus* as affected by different concentrations (0.1-100.0 mg·L⁻¹) of ZJ0273 treatments



I: 对照; II: 100 mg·L⁻¹ 丙酯草醚处理。A: 间期; B: 前期; C: 中期; D: 后期; E: 末期。标尺为 25 μm
I: CK, II: 100.0 mg·L⁻¹ ZJ0273. A: interphase, B: prophase, C: metaphase, D: anaphase, E: telophase. Bar=25 μm

图 3 丙酯草醚处理对油菜根尖分生区细胞有丝分裂各时期细胞及染色体形态的影响

Fig. 3 Effect of herbicide ZJ0273 treatment on cell and chromosome morphologies of *Brassica napus* root tip cells in meristematic zone at different mitosis phases

的胚根生长发育受影响较显著所致。

张文芳等^[12]研究表明高浓度 ZJ0273 处理明显降低油菜根系 TTC 活力，本试验中不同浓度 ZJ0273 处理对油菜幼苗根尖 TTC 活力影响的结果与之相符，但处理对油菜幼苗全根 TTC 活力抑制作用的变化趋势与根尖不一致。通常正常根系中根尖及侧根等新生部分活力高于成熟部分，本试验中高浓度 ZJ0273 处理显著抑制油菜根的伸长，导致根尖占全根的比例高于对照，此因素掩盖了处理本身的影响，从而产生了高浓度处理下全根 TTC 活力反而高于对照的现象。故在类似研究中，统一采用根尖为材料比全根更可靠。

植物组织受到除草剂伤害时，由于蛋白质合成受阻，细胞膜结构破坏而使其透性增大，从而引起细胞内各种水溶性物质外渗，导致电解质渗漏率升高^[23]。本试验结果表明，10 mg·L⁻¹ 以上浓度 ZJ0273 处理导致油菜幼苗根细胞电解质外渗，且该影响随处理时间的延长和处理浓度的升高而加强。

进一步采用 FDA-PI 荧光对染法直观检测 ZJ0273

对油菜根尖细胞活性和膜透性的影响。已知当活性细胞具有完整细胞膜时, FDA 被胞内酶水解产生荧光素并在胞内积累即发出亮绿色荧光, 因此绿色荧光的强弱代表了细胞膜的完整性和细胞活性水平^[17,24]。本试验结果表明低浓度 ZJ0273 对油菜根尖细胞膜及细胞活性无明显影响, 但 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上浓度下处理根尖几乎无绿色荧光, 表明细胞膜破损, 细胞活性显著下降, 与电解质渗漏试验的结果一致。PI 性质与 FDA 相反, 当细胞膜完好时, 它不能进入细胞内; 当细胞凋亡或死亡后, 它会因细胞膜、核膜的缺损而进入细胞, 并可与核内 DNA 等物质结合形成亮红色荧光物^[24]。本研究发现, 虽然高浓度 ZJ0273 处理根尖仅发出微弱的绿色荧光, 但其红色荧光主要为自发荧光, 并未出现大量的红色亮点, 说明细胞核膜未受破坏, PI 不能进入细胞核内。推测 ZJ0273 主要影响胞质中的细胞器如线粒体膜上的 ALS 等蛋白酶, 但对细胞核的破坏作用较小。

目前 ZJ0273 的田间推荐使用浓度为 $45 \text{ g a.i.}\cdot\text{hm}^{-2}$, 换算成实验室用量为 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[15]。本试验结果表明, 10 与 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 两处理对油菜幼苗干物质、苗高等性状和根细胞活性等方面的抑制效果无显著差异, 说明 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ZJ0273 即可抑制发芽期油菜幼苗的生长, 而 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为相对安全的临界浓度, 比常规田间推荐浓度低 100 倍, 这主要是处理时期不同引起的。萌发阶段通常是植物对胁迫敏感的时期, 且越幼嫩的植物组织 ALS 酶活性越高, 对 ALS 抑制剂也越敏感^[21]。生产上应用 ZJ0273 一般在油菜移栽前整地后进行土壤表面喷施, 此时 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ZJ0273 处理能有效防除油菜全生育期的杂草且对移栽后油菜的生长安全甚至有一定的促进作用^[25]。本研究以发芽期油菜为材料, 试验结果一方面验证了 ZJ0273 具有 ALS 抑制型除草剂的特征, 另一方面表明发芽期油菜对 ZJ0273 敏感。因此, 控制作物苗龄对该除草剂田间应用的安全性有重要意义。

已有研究报道表明, 多数除草剂品种是通过抑制、破坏有丝分裂来干扰杂草生长发育^[26-28], 但也有少数如磺酰脲类等 ALS 抑制型除草剂通过限制有丝分裂过程中所需的营养物质从而抑制细胞进入或完成有丝分裂^[11]。本研究表明 ZJ0273 处理引起油菜根尖细胞有丝分裂指数下降, 分裂中期相的细胞比例增大等现象, 但并未发现染色体异常和细胞分裂畸形, 这与根尖细胞活性试验的结果相符合。当前 ALS 抑制型除草剂引起的杂草可遗传突变抗性已引起重视; ZJ0273 对细胞核及遗传物质影响较小使得其不易引起杂草抗性

突变的产生, 有利于该除草剂在生产上的规模化应用及其使用期限的延长。

4 结 论

ZJ0273 处理抑制发芽期油菜幼苗干物质积累、苗高等性状、根系脱氢酶活力和细胞活性, 影响根尖细胞膜完整性, 且抑制效果随处理浓度的升高和处理时间的延长而显著增强; ZJ0273 处理抑制根尖细胞有丝分裂并使较多分裂细胞停滞于分裂中期。研究表明, 发芽期油菜对新型除草剂 ZJ0273 处理敏感, 此时对油菜幼苗生长发育安全的临界浓度为 $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

References

- [1] 唐庆红, 陈 杰, 吕 龙. 新型高效油菜田除草剂丙酯草醚的创制研究. 农药, 2005, 44(11): 496-502.
Tang Q H, Chen J, Lü L. An innovative research for novel rape herbicide ZJ0273. *Chinese Journal of Pesticides*, 2005, 44(11): 496-502. (in Chinese)
- [2] 杨征敏, 叶庆富, 唐庆红, 吕 龙. 新型除草剂丙酯草醚的微量合成. 核农学报, 2006, 20(5): 423-428.
Yang Z M, Ye Q F, Tang Q H, Lü L. Microsynthesis of a novel herbicide, Propyl-(2-(4, 6-dimethoxy-pyrimidin-2-yl-oxo) benzylamino) benzoate. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2006, 20(5): 423-428. (in Chinese)
- [3] 惠秀娟, 孟玲玲, 曹向宇, 谢 明, 王 捷. 丙酯草醚对小鼠不同细胞 DNA 的损伤作用. 中国公共卫生, 2005, 21(8): 932-933.
Hui X J, Meng L L, Cao X Y, Xie M, Wang J. Effect of new pesticide on DNA damage in different mice cells. *Chinese Journal of Public Health*, 2005, 21(8): 932-933. (in Chinese)
- [4] 付群梅, 陈 杰, 王静华, 徐小燕. 10% 丙酯草醚悬浮剂防除油菜田杂草试验. 农药, 2005, 44 (7): 331-333.
Fu Q M, Chen J, Wang J H, Xu X Y. Weed control in rape with ZJ0273 10% SC. *Chinese Journal of Pesticides*, 2005, 44 (7): 331-333. (in Chinese)
- [5] 陈 杰, 袁 军, 刘继东, 付群梅, 吴 军. 新型除草剂丙酯草醚的作用机理. 植物保护学报, 2005, 32(1): 48-52.
Chen J, Yuan J, Liu J D, Fu Q M, Wu J. Mechanism of action of the novel herbicide ZJ273. *Acta Phytologica Sinica*, 2005, 32(1): 48-52. (in Chinese)
- [6] Cobb A H, Kirkwood R C. *Herbicides and Their Mechanism of Action*. Sheffield Academic Press, Sheffield, 2000: 73-82.
- [7] Ray T B. Site of action of chlorsulfuron: Inhibition of valine and isoleucine biosynthesis in plants. *Plant Physiology*, 1984, 75: 827-831.

- [8] 苏少泉. 生物技术与抗除草剂作物. 北京: 化学工业出版社, 2002: 53-55.
Su S Q. *Biotechnology and Herbicide-Resistant Plants*. Beijing: Chemical Industry Press, 2002: 53-55. (in Chinese)
- [9] Favez K A, Kristen U. The influence of herbicides on the growth and proline content of primary roots and on the ultrastructure of root caps. *Environmental and Experimental Botany*, 1996, 36(1): 71-81.
- [10] 张宗俭, 李扬汉, 张智敏. 除草通对玉米幼苗根尖细胞有丝分裂的影响. 西北植物学报, 1995, 15(6): 32-35.
Zhang Z J, Li Y H, Zhang Z M. Effect of pendimethalin on mitosis of maize seedling root meristematic cells. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 1995, 15(6): 32-35. (in Chinese)
- [11] 曹塍程. 乙酰乳酸合成酶抑制剂开发中的问题及对策. 植物保护, 1997, 23(5): 38-41.
Cao A C. Problems and countermeasures in exploitation of acetolactate synthase inhibitors. *Plant Protection*, 1997, 23(5): 38-41. (in Chinese)
- [12] Zhang W F, Zhang F, Raziuddin R, Gong H J, Yang Z M, Lu L, Ye Q F, Zhou W J. Effects of 5-aminolevulinic acid on oilseed rape seedling growth under herbicide toxicity stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2008, 27: 159-169.
- [13] 王 伟, 岳 玲, 丁 炜, 余志扬, 汪海燕, 叶庆富, 吕 龙. [A 环-U-¹⁴C]丙酯草醚在土壤中的迁移和淋溶. 核农学报, 2007, 21(3): 283-286.
Wang W, Yue L, Ding W, Yu Z Y, Wang H Y, Ye Q F, Lü L. Leaching and movement of [A ring-U-(14)C] Pyribambenz-Propyl in soil. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2007, 21(3): 283-286. (in Chinese)
- [14] 颜启传. 种子检验原理和技术. 杭州: 浙江大学出版社, 2001: 56-57.
Yan Q C. *Principles of Seed Testing and Technology*. Hangzhou: Zhejiang University Press, 2001: 56-57. (in Chinese)
- [15] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 2000: 119-120.
Li H S. *Principles and Techniques of Plant Physiological Biochemical Experiment*. Beijing: Higher Education Press, 2000: 119-120. (in Chinese)
- [16] Zabalza A, Gaston S, Sandalio L M, Rio L A, Royuela M. Oxidative stress is not related to the mode of action of herbicides that inhibit acetolactate synthase. *Environmental and Experimental Botany*, 2007, 59: 150-159.
- [17] Ishikawa S, Wagatsuma T, Ikarashi T. Rapid changes in levels of mineral nutrients in root-tip cells following short-term exposure to aluminium. *Plant and Soil*, 2003, 255: 245-251.
- [18] 李集临, 徐香玲. 细胞遗传学. 北京: 科学出版社, 2006: 211-216.
Li J L, Xu X L. *Cytogenetics*. Beijing: Science Press, 2006: 211-216. (in Chinese)
- [19] Zhou Q Y, Liu W P, Zhang Y S, Liu K K. Action mechanisms of acetolactate synthase-inhibiting herbicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2007, 89: 89-96.
- [20] Leyval D, Uy D, Delaunay S, Goergen J L, Engasser J M. Characterisation of the enzyme activities involved in the valine biosynthetic pathway in a valine-producing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*, 2003, 104: 241-252.
- [21] Shim S I, Lee B M, Ryu E I, Kang B H. Response of leaf acetolactate synthase from different leaf positions and seedling ages to sulfonylurea herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2003, 75: 39-46.
- [22] 唐庆红, 陈 杰, 沈国辉, 付群梅, 钱振官. 油菜田新型除草剂丙酯草醚的应用技术. 植物保护学报, 2006, 33(3): 328-332.
Tang Q H, Chen J, Shen G H, Fu Q M, Qian Z G. Research on application techniques for a novel herbicide 10% ZJ0273 EC on transplanted rapes. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2006, 33(3): 328-332. (in Chinese)
- [23] Heim D R, Skomp J R, Tschabold E E. Isoxaben inhibits the synthesis of acid insoluble cell wall materials in *Araidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 1990, 93: 695-700.
- [24] Veal D A, Deere D, Ferrari B, Piper J, Attfield P V. Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *Journal Immunological Methods*, 2000, 243: 191-210.
- [25] 陈仕高, 谢雪梅, 蒲正国, 刘 春, 肖晓华, 譙青春, 朱明华. 10% 丙酯草醚 EC 防除油菜杂草效果及药害分析. 农药, 2007, 6(3): 199-201.
Chen S G, Xie X M, Pu Z G, Liu C, Xiao X H, Qiao Q C, Zhu M H. Controlling effect and security for a novel herbicide ZJ0273 10% EC on oilseed rapes. *Agrochemicals*, 2007, 6(3): 199-201. (in Chinese)
- [26] Chauhan L K S, Gupta S K. Combined cytogenetic and ultrastructural effects of substituted urea herbicides and synthetic pyrethroid insecticide on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2005, 82: 27-35.
- [27] Yemets A, Stelmakh O, Blume Y B. Effects of the herbicide isopropyl-N-phenyl carbamate on microtubules and MTOCs in lines of *Nicotiana sylvestris* resistant and sensitive to its action. *Cell Biology International*, 2008, 32: 623-629.
- [28] Srivastava K, Mishra K K. Cytogenetic effects of commercially formulated atrazine on the somatic cells of *Allium cepa* and *Vicia faba*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2009, 93: 8-12.

(责任编辑 毕京翠, 李 莉)