

· 研究论文 ·

利用 96 孔板建立除草剂微量活体筛选方法初探

逢 森^{1,2}, 袁会珠^{1*}, 李保同², 齐淑华¹, 杨代斌¹

(1. 中国农业科学院 植物保护研究所, 农业部农药化学与应用技术重点开放实验室, 北京 100094;

2. 江西农业大学 农学院, 江西 南昌 330045)

摘 要: 以马唐、稗草、反枝苋 3 种杂草为指示植物, 采用 96 孔板建立了化合物除草活性微量活体筛选方法。从 6 种培养基中筛选出最适合 3 种指示杂草生长的 1 号培养基, 以传统盆栽法为对照, 进行了 96 孔板苗前处理微量活体筛选方法 (以下简称 96 孔板法) 的研究。结果表明: 96 孔板法以指示杂草的株高受抑制情况作为评价指标较为合适; 3 种供试除草剂采用 96 孔板法对 3 种指示杂草所表现出的杀草活性要高于盆栽法; 乙氧氟草醚、二甲戊灵、氟乐灵盆栽法的 EC_{50} 和 EC_{90} 值分别是 96 孔板法的 1.44 ~ 21.47 倍和 1.47 ~ 32.84 倍; 采用 96 孔板法, 乙氧氟草醚对马唐和反枝苋、二甲戊灵对稗草的活性最高, EC_{50} 值分别为 0.79、0.73 和 0.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$, EC_{90} 值也分别只有 3.13、1.72 和 1.36 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。96 孔板法达到了微量、敏感、节省时间和空间的要求, 是发现先导化合物除草活性较适宜的微量活体筛选方法。

关键词: 微量活体筛选; 除草活性; 96 孔板法; 盆栽法

中图分类号: S482.4

文献标识码: A

文章编号: 1008-7303(2005)04-0334-05

Preliminary Study on an in vivo Micro-screening Method for Herbicidal Activity Using 96-well Plates

PANG Sen^{1,2}, YUAN Hui-zhu^{1*}, LI Bao-tong², QI Shu-hua¹, YANG Dai-bin¹

(1. Key Laboratory of Pesticide Chemistry & Application Technology, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China;

(2. College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: Using *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop, *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. and *Amaranthus retroflexus* L. as indicator plants, an in vivo micro-screening method for the herbicidal activity was studied. Firstly, medium I was selected from six mediums, which was the most suitable one for growth of those indicator weeds. Secondly, 96-well plates test was conducted as an in vivo micro-screening method comparing with traditional pot experiment. The results showed that the most suitable evaluation index for 96-well plates test was the inhibition of plant height. The herbicidal activity with 96-well plates test was more sensitive than that of pot experiment. The EC_{50} and EC_{90} value of oxyfluorfen, pendimethalin and trifluralin to weeds by pot experiment were 1.44- to 21.47-folds and 1.47- to

收稿日期: 2005-08-04; 修回日期: 2005-10-19.

作者简介: 逢森 (1978-), 男, 山东胶州人, 硕士研究生; * 通讯作者: 袁会珠 (1967-), 男, 河北藁城人, 农药学博士, 副研究员. 联系电话: 010-62815941; E-mail: yuanhuiizhuz@mail.china.com

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 (973 计划) (2003CB114400).

32 84-folds higher than those by 96-well plates test, respectively. By 96-well plates test, oxyfluorfen showed the highest activity to *D. sanguinalis* and *A. retroflexus*, and pendimethalin showed the highest activity to *E. crus-galli*. The EC_{50} value to the three plants was 0.79, 0.73 and 0.45 $\mu\text{g/mL}$, respectively, and the EC_{90} value was 3.13, 1.72 and 1.36 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The 96-well plates test was sensitive and needed small amount of compounds. This method was suitable for discovering the herbicidal activity of new compounds.

Key words: in vivo micro-screening; herbicidal activity; 96-well plates; pot experiment

农药在保护农作物免受有害生物侵害,保证作物产量和质量方面起着举足轻重的作用。然而由于人们对农药生物活性及环境相容性的要求越来越高,使得新农药的创制难度加大,费用也日益增高,到 20 世纪末,开发一个新农药品种的费用已高达 2 亿美元^[1]。生物测定作为筛选新农药的重要手段,已经得到广泛的应用。新化合物的发现需要生物测定方法的不断革新,发现新的生物测定方法有利于发现新的化合物^[2,3]。因此,生物测定方法的研究越来越受到农药研究人员的关注。

自发现并使用除草剂以来,其筛选方法已经发生了巨大的变化,从传统的筛选方法发展到了高通量 (HTS) 筛选技术。由于高通量筛选技术年筛选量可达 10 万甚至 100 万个化合物,并且具有微量化、自动化、快速、灵敏等优点,目前国外各大农药公司均将其作为发现新化合物的主要手段^[4]。但是,高通量离体筛选是以细胞、酶、受体等为靶标,不包含生物体的全部信息,常因植物体吸收、传导、代谢等因素的影响而出现与常规筛选结果差异很大的现象^[4-7]。因此,自 2004 起,国外农药工作者开始了对微量活体筛选技术的研究,但至今尚未见这方面的公开报道。

我国新农药创制工作起步较晚,目前国内对新化合物除草活性的筛选仍普遍采用传统的平皿法、小杯法、浮萍法、小球藻法以及盆栽法等^[8-12],这些方法需用化合物的量较多,试验占用空间大,并且操作较为复杂,影响了筛选的顺利进行。为了改进筛选方法,作者在除草剂微量活体筛选技术方面进行了探索和研究,采用 96 孔板法对除草剂的除草活性进行评价,目的在于寻找一种既能显著减少化合物用量,又能真实反映其生物活性的微量快速筛选方法,为尽快寻找具有除草生物活性的先导化合物提供技术支持。

1 试验材料

1.1 供试药剂

95% 乙氧氟草醚 (oxyfluorfen) 原药 (浙江巨化股份有限公司兰溪农药厂); 95% 二甲戊灵 (pendimethalin) 原药 (山东华阳农药集团); 97% 氟乐灵 (trifluralin) 原药 (山东侨昌化学有限公司)。

1.2 供试杂草

马唐 *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop、稗草 *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv.、反枝苋 *Amaranthus retroflexus* L.

2 试验方法

2.1 培养基筛选

在 Hoagland 和 Snyder、日本园试配方、Hewitt、Knop、MS 5 种培养液及清水中分别加入质量分数为 1% 的琼脂配制成 6 种培养基^[13], 分别编号为 1 号、2 号、3 号、4 号、5 号、6 号。将 6 种培养基加热溶解,用微量移液器分别加入 96 孔板^[4]的孔内,每孔加 300 μL 。待培养基冷凝后,在每孔的培养基表面种植一粒催芽露白的杂草种子,要求种子大小以及出芽情况一致。每 8 孔作为一个处理,重复 3 次。将放有种子的培养板置于塑料小盒中盖膜保湿,再将小盒放于智能人工培养箱内培养,控制温度为 30 ± 2 , 每天光照 12 h,光照强度 3 000 lx。10 d 后检查结果,利用万分之一电子天平和毫米刻度尺分别测量杂草单株鲜重和株高。

2.2 96 孔板法测定除草剂活性

将筛选出的最适合杂草生长的培养基加入 96 孔板,操作方法同 2.1。以丙酮为溶剂配制系列浓度的供试药液,用微量移液器加于培养基表面^[13],每孔加 10 μL 。对照用丙酮处理,每 8 孔作为一个处理,重复 3 次。待丙酮挥发后,每孔植入一粒杂草种子,种子要求同 2.1。将处理过的 96 孔

板置于与 2.1 相同的条件下培养, 5~7 d 后检查结果, 利用毫米刻度尺测量杂草的单株株高。

2.3 温室盆栽法测定除草剂活性

在花盆中播种 20 粒催芽一致的杂草种子, 根据花盆截面积与 96 孔板孔径的面积关系, 计算出盆栽用药量为 700 μL /盆。用微量移液器吸取 700 μL 药液, 加于 20 g 细土中, 待丙酮挥发后, 将药土混匀, 均匀地撒在花盆表面。每个浓度处理 1 盆, 重复 3 次。将处理过的杂草置于温室中在自然条件下培养, 7~10 d 后检查结果, 利用毫米刻度尺测量杂草的单株株高。

3 结果与分析

3.1 培养基筛选结果

从表 1 可见, 鲜重和株高两个指标能够较为明显地显示稗草、马唐、反枝苋 3 种杂草在 6 种培养基中的生长差异。稗草从鲜重方面看, 号 > 号 > 号 > 号 > 号 > 号; 从株高方面看, 号 > 号 > 号 > 号 > 号; 马唐从鲜重方面看, 号 > 号 > 号 > 号 > 号 > 号; 从株高

方面看, 号 > 号 > 号 > 号 > 号 > 号; 而反枝苋无论是从鲜重还是株高方面看, 均是 号 > 号 > 号 > 号 > 号。综合以上鲜重和株高的数据, 3 种杂草在 1 号培养基中的生长情况优于其他 5 种培养基, 说明 1 号培养基更适合这 3 种杂草的生长, 故本试验选用 1 号培养基代替土壤作为种植杂草的培养基质。

3.2 三种除草剂对三种杂草鲜重和株高影响的比较

由表 2 可见, 3 种除草剂对 3 种杂草的鲜重和株高抑制情况存在明显的差异。在相同浓度药剂处理下, 药剂对杂草株高的抑制率明显高于对杂草鲜重的抑制率, 在株高抑制率达到 90% 以上的药剂浓度下, 鲜重的抑制率仅为 60.7%~76.3%。说明药剂对杂草株高的影响比对鲜重的影响更大, 以株高为指标能够更快速地评价出药剂的除草活性。此外, 利用 96 孔板培养的指示杂草个体较小, 其根部常粘有水分和培养基, 对鲜重的测量结果影响较大, 容易出现较大的误差。故本研究将采用杂草株高抑制率作为评价化合物除草活性的指标。

Table 1 Fresh weight and plant height of three weeds after growing 10 days in six mediums

Medium	Echinochloa crus-galli (L.) Beauv		Digitaria sanguinalis (L.) Scop		Amaranthus retroflexus L.	
	Average of fresh weight /mg	Average of plant height /cm	Average of fresh weight /mg	Average of plant height /cm	Average of fresh weight /mg	Average of plant height /cm
	24.1 a \pm 0.3	6.29 a \pm 0.25	12.8 a \pm 0.1	2.25 a \pm 0.07	5.1 a \pm 0.3	1.69 a \pm 0.11
	20.3 b \pm 0.9	5.83 b \pm 0.01	10.3 b \pm 1.3	2.14 ab \pm 0.04	4.3 ab \pm 0.1	1.59 a \pm 0.02
	20.5 b \pm 0.4	5.75 bc \pm 0.13	9.2 b \pm 0.1	2.11 ab \pm 0.01	4.4 ab \pm 0.6	1.65 a \pm 0.05
	14.8 c \pm 0.6	5.42 cd \pm 0.06	6.4 cd \pm 0.2	1.95 bc \pm 0.06	3.4 b \pm 0.1	1.32 ab \pm 0.11
	9.9 d \pm 2.0	5.02 e \pm 0.16	8.6 bc \pm 1.8	1.87 c \pm 0.06	3.6 b \pm 0.7	1.39 a \pm 0.16
	10.1 d \pm 2.5	5.11 de \pm 0.09	4.7 d \pm 0.4	1.82 c \pm 0.21	2.1 c \pm 0.7	0.95 b \pm 0.35

* Different letters after data mean significant difference at $P=0.05$ of SSR test

3.3 96 孔板法和盆栽法测定除草剂对马唐的活性

结果见表 3。可见, 采用 96 孔板法测定时, 3 种除草剂对马唐的生物活性均高于盆栽法。其中乙氧氟草醚采用 96 孔板法测定时对马唐的活性最高, EC_{50} 值只有 0.79 $\mu\text{g}/\text{mL}$, EC_{90} 值也只有 3.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 而盆栽法的 EC_{50} 和 EC_{90} 值分别是 96 孔板法的 7.09 和 5.36 倍。

3.4 96 孔板法和盆栽法测定除草剂对稗草的活性

结果见表 4。采用 96 孔板法测定, 3 种除草剂对稗草的生物活性同样均高于盆栽法。与 3.3 不

同的是, 采用 96 孔板法测定时二甲戊灵对稗草的活性最高, EC_{50} 和 EC_{90} 值分别只有 0.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 1.36 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 与盆栽法差异明显, 盆栽法的 EC_{50} 和 EC_{90} 值分别是 96 孔板法的 21.47 和 20.79 倍。

3.5 96 孔板法和盆栽法测定除草剂对反枝苋的活性

结果见表 5。采用 96 孔板法测定, 3 种除草剂对双子叶杂草反枝苋的生物活性也均高于盆栽法, 其中乙氧氟草醚对反枝苋的活性最高, EC_{50} 和 EC_{90} 值分别为 0.73 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 1.72 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 其 EC_{90} 值比盆栽法低 31.84 倍。

Table 2 The influence of three herbicide on fresh weight and plant height of three weeds

Weed	Oxyfluorfen			Pendimethalin			Trifluralin		
	Conc. / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	Fresh weight inhibition (%)	Plant height inhibition (%)	Conc. / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	Fresh weight inhibition (%)	Plant height inhibition (%)	Conc. / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	Fresh weight inhibition (%)	Plant height inhibition (%)
<i>E. crus-galli</i>	0.5	2.2 \pm 0.4	16.3 \pm 2.7	0.2	7.3 \pm 1.3	8.3 \pm 2.3	0.5	7.0 \pm 2.4	11.9 \pm 0.6
	1.0	4.1 \pm 0.4	18.5 \pm 3.3	0.3	12.9 \pm 2.0	35.0 \pm 1.9	1.0	34.6 \pm 3.8	37.8 \pm 1.1
	3.0	43.6 \pm 3.5	56.7 \pm 1.2	0.5	24.0 \pm 1.8	62.5 \pm 1.5	3.0	37.2 \pm 0.7	55.9 \pm 1.4
	5.0	58.5 \pm 3.4	79.0 \pm 3.2	1.0	59.1 \pm 3.6	85.7 \pm 1.9	5.0	62.7 \pm 1.4	78.2 \pm 1.6
	10.0	67.1 \pm 2.8	94.1 \pm 1.5	2.0	73.6 \pm 1.2	90.6 \pm 1.7	10.0	66.2 \pm 4.5	91.9 \pm 1.5
<i>D. sanguinalis</i>	0.1	3.4 \pm 1.2	2.8 \pm 1.6	0.1	2.6 \pm 1.1	4.9 \pm 1.8	0.5	6.2 \pm 1.8	1.2 \pm 0.8
	0.5	34.5 \pm 4.1	38.8 \pm 1.9	0.5	11.6 \pm 1.6	25.0 \pm 3.0	1.0	18.0 \pm 6.9	17.9 \pm 2.3
	1.0	45.0 \pm 2.3	49.1 \pm 2.7	1.0	52.8 \pm 1.9	63.8 \pm 1.2	5.0	33.8 \pm 2.5	50.0 \pm 1.5
	2.0	70.9 \pm 2.4	73.0 \pm 1.8	5.0	64.4 \pm 2.5	77.7 \pm 2.7	10.0	43.2 \pm 8.1	68.1 \pm 2.7
	3.0	76.3 \pm 3.5	94.0 \pm 1.2	10.0	72.0 \pm 3.7	91.2 \pm 2.6	20.0	63.5 \pm 2.3	92.6 \pm 2.2
<i>A. retroflexus</i>	0.1	0.9 \pm 0.8	0.1 \pm 0.5	0.5	3.6 \pm 1.3	17.1 \pm 1.9	0.5	20.1 \pm 2.7	35.9 \pm 1.7
	0.5	24.7 \pm 3.8	39.5 \pm 2.1	1.0	7.3 \pm 1.4	27.0 \pm 2.8	1.0	25.9 \pm 1.2	52.4 \pm 1.9
	1.0	59.0 \pm 5.3	64.7 \pm 1.3	5.0	13. \pm 2.5	65.7 \pm 2.1	5.0	39.3 \pm 1.6	71.2 \pm 0.8
	2.0	71.2 \pm 3.5	93.1 \pm 2.3	10.0	27.6 \pm 1.6	79.7 \pm 1.7	10.0	50.8 \pm 1.8	72.4 \pm 2.3
	3.0	96.4 \pm 0.8	98.0 \pm 2.3	20.0	64.5 \pm 2.0	90.0 \pm 1.3	20.0	60.7 \pm 1.6	90.2 \pm 2.1

Table 3 Toxicity of three herbicides to *D. sanguinalis* using 96-well plates and pot experiment

Herbicide	Method	Regression equation	Related coefficient	$EC_{50} / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	95% confidence limit of $EC_{50} / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$EC_{90} / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
Oxyfluorfen	96-well plates	$y = 2.15x + 5.22$	0.9633	0.79	0.57 ~ 1.03	3.13
	Potted plant	$y = 2.69x + 2.99$	0.9766	5.60	4.29 ~ 7.30	16.78
Pendimethalin	96-well plates	$y = 1.42x + 4.89$	0.9511	1.19	0.82 ~ 2.10	9.47
	Potted plant	$y = 2.82x + 3.07$	0.9979	4.82	3.61 ~ 6.45	13.71
Trifluralin	96-well plates	$y = 2.06x + 3.58$	0.9463	4.89	3.74 ~ 6.41	20.47
	Potted plant	$y = 2.60x + 2.72$	0.9663	7.55	5.01 ~ 11.37	23.51

Table 4 Toxicity of three herbicides to *E. crus-galli* using 96-well plates and pot experiment

Herbicide	Method	Regression equation	Related coefficient	$EC_{50} / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	95% confidence limit of $EC_{50} / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$EC_{90} / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
Oxyfluorfen	96-well plates	$y = 2.05x + 4.36$	0.9598	2.04	1.61 ~ 2.59	8.65
	Potted plant	$y = 1.77x + 4.17$	0.9679	2.95	12.28 ~ 3.83	5.59
Pendimethalin	96-well plates	$y = 2.69x + 5.92$	0.8903	0.45	0.36 ~ 0.57	1.36
	Potted plant	$y = 2.75x + 2.29$	0.9264	9.66	8.37 ~ 11.15	28.27
Trifluralin	96-well plates	$y = 1.76x + 4.47$	0.9732	2.00	1.51 ~ 2.65	10.66
	Potted plant	$y = 2.28x + 2.74$	0.9876	9.86	8.43 ~ 11.52	36.02

Table 5 Toxicity of three herbicides to *A. retroflexus* using 96-well plates and pot experiment

Herbicide	Method	Regression equation	Related coefficient	$EC_{50} / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	95% confidence limit of $EC_{50} / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$EC_{90} / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
Oxyfluorfen	96-well plates	$y = 3.41x + 5.48$	0.9932	0.73	0.55 ~ 0.95	1.72
	Potted plant	$y = 1.90x + 2.95$	0.9501	11.95	8.39 ~ 17.03	56.49
Pendimethalin	96-well plates	$y = 1.38x + 4.43$	0.9990	2.57	1.73 ~ 3.82	21.72
	Potted plant	$y = 1.32x + 3.50$	0.9194	13.77	8.97 ~ 21.15	129.8
Trifluralin	96-well plates	$y = 0.85x + 4.95$	0.9455	1.15	0.50 ~ 2.62	37.31
	Potted plant	$y = 2.24x + 2.33$	0.9695	15.54	11.51 ~ 20.99	57.89

4 讨论

本试验所采用的 96 孔板微量活体筛选技术,是采用活体植物进行化合物筛选,克服了高通量离体筛选不能反映生物体全部信息的缺点,不会因植物的吸收、传导、代谢等原因而出现阳性率高和漏筛现象。与传统盆栽法相比,96 孔板微量活体筛选技术在保留了盆栽法以活体为靶标,结果直观、可靠,不易产生漏筛等优点的基础上,完成一次筛选试验所需的药液量和药剂浓度明显降低,从而大大降低了化合物的用量。此外,以自配的培养基代替土壤,因培养基对药剂没有吸附性,避免了盆栽法因土壤的吸附作用而增大化合物用量的问题,提高了指示杂草对药剂的敏感度,达到了微量化、敏感化的目的。并且以 96 孔板代替花盆,操作简单方便,节省时间和空间,大大地增加了一次筛选化合物的数量,为实现高效、快速、准确筛选打下了基础。

本项筛选方法所采用的 96 孔板孔径较小,加入的培养基有限,只能采用小粒植物种子进行试验,生长时间也不宜超过 10 d,不能满足大粒种子、长时间试验的要求。此外,培养基中的营养成分也有限,不如土壤中的丰富,并且指示杂草的生长条件是受人为控制的,不如盆栽法接近自然条件,从而导致指示杂草的长势较弱。除培养基对药剂无吸附性外,指示杂草的长势较弱也可能是造成其对药剂敏感的原因之一,故还需对导致指示杂草对药剂敏感度提高的原因做进一步的研究,以便对本筛选方法进行改进。

96 孔板微量活体筛选技术只适用于具有苗前处理活性的化合物的筛选,还不能满足具有茎叶处理活性化合物筛选的需要。因此,仍需要加快茎叶处理微量活体筛选方法的研究。

参考文献:

[1] QIAN Xu-hong (钱旭红), XU Xiao-yong (徐晓勇), SONG Gong-hua (宋恭华), et al 二十一世纪新农药研发趋势 [J]. J Guizhou Univ (Natural Sciences) [贵州大学学报 (自然科学

版)], 2003, 20(1): 83-90.

- [2] LI Shu-zheng (李树正). 农药生物测定方法及其问题 [J]. Pestic Trans (农药译丛) 1990, 12(5): 48-51.
- [3] WU Chang-xing (吴长兴), SUN Feng (孙枫), WANG Qiang (王强), et al 几种除草剂的生物测定及复配效应研究. Acta Agriculturae Zhejiangensis (浙江农业学报), 2000, 12(6): 374-377.
- [4] QIU Li-hong (邱立红), ZHANG Wen-ji (张文吉), WANG Cheng-ju (王成菊), et al 高通量筛选在新农药创制研究中的应用 [J]. Pestic Sci Admin (农药科学与管理), 2002, 23(5): 20-24.
- [5] WANG Shu-feng (王树凤), XU Li-gen (徐礼根), MA Jian-yi (马建义), et al 除草剂生物筛选研究进展 [J]. Chin J Pestic Sci (农药学报), 2002, 4(4): 3-9.
- [6] Ridley SM, 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.
- [7] Hess FD, Anderson R J, Reagan J D. High throughput synthesis and screening: The partner of genomics for discovery of new chemicals for agriculture [J]. Weed Science, 2001, 49: 249-256.
- [8] TAN Hui-fen (谭惠芬), CHENG Mu-ru (程慕如), SUN Xi-zhi (孙锡治). 除草剂简易生物测定方法 [J]. Plant Protection (植物保护), 1983, 9(5): 35-36.
- [9] CHENG Mu-ru (程慕如), SHEN Xiao-xia (沈晓霞). 酰胺类除草剂除草活性研究 [J]. Tianjin Agric Sci (天津农业科学), 2000, 6(2): 17-19.
- [10] MA Jian-yi (马建义), CHEN Jie (陈杰), CHAI Wei-gang (柴伟纲), et al 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]. Chin J Pestic Sci (农药学报), 2000, 2(2): 29-34.
- [11] MA Jian-yi (马建义), HUANG Song-qi (黄松其), CHEN Jie (陈杰), et al 新除草剂微型筛选方法——蛋白核小球藻法的研究 (续) [J]. Zhejiang Chem Ind (浙江化工), 2000, (S1): 40-42.
- [12] SONG Xiao-ling (宋小玲), MA Bo (马波), HUANGFU Chao-he (皇甫超河), et al 除草剂生物测定方法 [J]. Weed Sci (杂草科学), 2004, (3): 1-5.
- [13] ZHANG Zong-jian (张宗俭), LIU Jun-li (刘君丽), QIN Xiaoran (秦宵然), et al 新化合物除草活性微量筛选方法的研究 [J]. Zhejiang Chem Ind (浙江化工) 2000, (S1): 92-93.

(Ed JIN S H)