

陶 波,王立超,张忠亮. 新型生物助剂活性物质筛选及对除草剂的增效作用[J]. 江苏农业科学,2016,44(10):174-177.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.10.045

新型生物助剂活性物质筛选及对除草剂的增效作用

陶 波,王立超,张忠亮

(东北农业大学农学院,黑龙江哈尔滨 150030)

摘要:分析不同酸根、助剂、糖类和微生物代谢产物对氟磺胺草醚的增效作用,明确几种酸根离子、助剂、糖类和微生物代谢产物对 25% 氟磺胺草醚水剂 300 g a. i. /hm² 具有增效作用,其中硫酸根、碳酸根、有机硅表面活性剂、壳聚糖、生物多糖、青霉发酵液对 25% 氟磺胺草醚水剂 300 g a. i. /hm² 增效作用最明显,通过混用筛选出增效作用最佳的硫酸根、有机硅、生物多糖和青霉发酵液复配形成新型生物助剂 3 号。采用室内植物生物测定、田间试验和仪器分析的方法系统探讨了新型生物助剂 3 号对除草剂的增效机制。

关键词:生物助剂;筛选;增效作用;增效机制;除草剂

中图分类号: S482.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)10-0174-03

除草剂的大面积应用为农作物增产增收提供保障的同时,也给人类的生命安全和生存环境带来了巨大的负面影响。在除草剂应用过程中,由于环境差异、部分农药质量不过关和应用技术不规范等问题,导致除草剂在农业生产上的利用率明显偏低,农药浪费严重,对环境造成了严重的污染^[1]。由于加工质量及应用技术等方面的不足,导致除草剂应用剂量过大,药害发生面积和程度呈逐年扩大、加重的趋势,杂草产生抗药性的周期缩短,土壤和水体污染越来越严重,除草剂残留的问题也日益突出,已严重影响下茬作物的轮作^[2]。因此,如何增加除草剂药效、提高制剂加工质量、降低除草剂用量已经成为农业生产中亟待解决的问题。解决除草剂使用量过大的方法主要有研发除草剂新品种、混用除草剂、开发应用生物源及矿物源农药、研发使用新型助剂等^[3]。开发和使用新型助剂具有研制和开发周期短、效果明显、成本低等特点,已成为提高除草剂药效、降低除草剂使用剂量的有效措施^[4]。新型生物助剂作为助剂的新产品,其组合成分、用量还未确定,对除草剂的增效作用、对不同剂型除草剂的增效程度还未见报道^[5]。本研究采用温室盆栽、田间试验以及仪器分析的方法系统研究几种酸根离子和生物活性物质对氟磺胺草醚的增效作用,筛选出新型生物助剂的最佳配方,并探讨其对除草剂的增效机制。通过本研究不仅能够降低除草剂的用量与抗性杂草的发生率、减轻环境污染、解决除草剂加工质量问题、提高除草剂药效,而且丰富了助剂品种,使助剂的发展方向更趋向于安全、环保。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试杂草 杂草品种有苍耳(*Xanthium sibiricum*)、苘

麻(*Abutilon theophrasti*)、问荆(*Equisetum arvense*)、野黍(*Eriochloa villosa*)、稗草(*Echinochloa crusgalli*)。

1.1.2 供试菌种 主要菌种有青霉菌(东北农业大学农药研究室)、黑曲霉菌(东北农业大学农药研究室)。

1.1.3 试剂与药剂 葡萄糖、蔗糖、壳聚糖(济南海得贝海洋生物工程有限公司);氯化钠、硫酸钠、碳酸钠、硝酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、25% 氟磺胺草醚水剂(大连松辽化工有限公司)。

1.2 试验设计

采用温室盆栽法,供试土壤为黑土(有机质含量为 4%,pH 值 6.75),供试除草剂 25% 氟磺胺草醚水剂的用量为 300 g a. i. /hm²,喷液量为 300 L/hm²,各种酸根离子添加浓度为 0.01 mol/L。青霉发酵产物和黑曲霉发酵产物添加量体积分数为 6%,有机硅添加量体积分数为 0.03%,各种糖类添加量体积分数为 0.01%。挑选籽粒饱满的苘麻种子,在 50 ℃ 水浴中浸泡 2 h,置于 25 ℃ 恒温培养箱中避光催芽,选取长势相近的露白种子 10 粒种植于口径为 10 cm 的盆中,待长至 4~5 叶期进行茎叶喷雾处理。另设清水对照,每个处理重复 3 次。施药后正常管理,处理后 10 d 调查并目测防效,15 d 调查鲜质量防效。

1.3 测定项目与方法

取各单因素的较佳条件,组合后选择最优的生物助剂 3 号,研究对氟磺胺草醚药液表面张力、扩展直径、干燥时间、最大持留量、杂草叶片吸收的影响^[6]。采用全自动界面张力仪测定表面张力,以不加生物助剂为对照,试验平行重复 3 次。用微量移液枪取上述药液 5 μL 滴在载玻片表面,5 min 后用显微镜测定上述氟磺胺草醚药液液滴的最大、最小直径,取二者平均值即为药液液滴直径,以不加助剂为对照,每个处理重复 3 次^[7]。计时、记录液滴完全干燥所需要的时间^[8]。剪取苘麻叶片,用万分之一分析天平称质量(m_0),然后用镊子夹持,放入药液中 10 s,迅速将叶片拉出液面,垂直悬置,待其不再有液滴流淌时称质量(m_1),用叶面积仪测定叶片的面积(S),计算叶片的最大稳定持留量 $R(\text{mg}/\text{cm}^2)$ ^[9]。重复 3 次,取平均值。计算公式: $R = (m_1 - m_0) \times 1\,000/S$ 。用二氯甲烷

收稿日期:2016-04-11

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2012BAD19B02)。

作者简介:陶 波(1963—),男,黑龙江哈尔滨人,博士,教授,博士生导师,主要从事除草剂生物化学及应用技术研究。E-mail: botaol@163.com。

冲洗处理叶片表面 3 次,收集冲洗液,旋转蒸发至干,乙腈定容至 10 mL,过膜,用于高效液相色谱分析^[10]。

目测调查时将杂草根据药效反应症状分 5 级,分级标准:5 级,心叶全部枯死;4 级,心叶一半至大部分枯死;3 级,心叶少量枯死;2 级,心叶稍微受害;1 级,心叶无明显药效反应症状,植株株高受抑制;0 级,无药效反应症状,与对照植株没有差异。相关公式:目测防效 = Σ (各级株数 \times 级数)/(总株数 \times 5) \times 100%;鲜质量防效 = (空白对照区杂草鲜质量 - 药剂处理区杂草鲜质量)/空白对照区杂草鲜质量 \times 100%。

2 结果与分析

2.1 不同酸根离子对氟磺胺草醚增效作用

从表 1 可以看出,25% 氟磺胺草醚水剂 300 g a. i./hm² 加入 CO₃²⁻ 对阔叶杂草苘麻的目测防效增加了 5.34%,鲜质量防效增加了 4.65%;添加 CO₃²⁻、SO₄²⁻ 对苘麻的目测防效和鲜质量防效均高于 NO₃⁻,且对苘麻的目测防效与其他处理相比具有显著性差异;CO₃²⁻、SO₄²⁻ 对氟磺胺草醚的增效作用明显高于 NO₃⁻、Cl⁻、HPO₄²⁻、H₂PO₄⁻。因此,筛选时选取 CO₃²⁻、SO₄²⁻ 进行新型助剂研究。

表 1 酸根离子对氟磺胺草醚的增效作用

酸根离子	目测防效		鲜质量防效	
	防效 (%)	增加 (百分点)	防效 (%)	增加 (百分点)
—	43.33c		46.79c	
Cl ⁻	45.67b	2.34	49.15b	2.36
SO ₄ ²⁻	48.33a	5.00	51.66a	4.87
NO ₃ ⁻	46.00b	2.67	50.10ab	3.31
CO ₃ ²⁻	48.67a	5.34	51.44a	4.65
HPO ₄ ²⁻	45.33b	2.00	49.19b	2.40
H ₂ PO ₄ ⁻	45.67b	2.34	49.51b	2.72

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下表同。

2.2 微生物发酵产物对氟磺胺草醚增效作用

不同微生物发酵产物可以提高氟磺胺草醚对阔叶杂草苘麻的防除效果。由表 2 可以看出,添加青霉发酵液可以增加氟磺胺草醚目测防效 9.67%、鲜质量防效 9.88%,均高于黑曲霉发酵产物。因此,选取青霉发酵液进行新型生物助剂的研究。

表 2 微生物发酵液对氟磺胺草醚的增效作用

发酵液	目测防效		鲜质量防效	
	防效 (%)	增加 (百分点)	防效 (%)	增加 (百分点)
—	43.33b		46.79b	
青霉发酵液	53.00a	9.67	56.67a	9.88
黑曲霉发酵液	48.67b	5.34	52.22b	5.43

2.3 不同种类助剂对氟磺胺草醚药效的影响

由表 3 得出,有机硅助剂对氟磺胺草醚的增效作用显著好于甲酯化植物油和非离子表面活性剂。因此选取有机硅表面活性剂用于新型生物助剂研究。

2.4 生物糖类对氟磺胺草醚增效作用

由表 4 可以看出,添加壳聚糖、生物多糖对苘麻的目测防效和鲜质量防效均显著高于蔗糖和葡萄糖;壳聚糖、生物多糖对 25% 氟磺胺草醚水剂 300 g a. i./hm² 的增效作用明显高于

蔗糖和葡萄糖,但是壳聚糖与其他因素混配后效果不及生物多糖。因此,选取生物多糖来进行新型生物助剂的配方筛选。

表 3 助剂对氟磺胺草醚的增效作用

助剂	目测防效		鲜质量防效	
	防效 (%)	增加 (百分点)	防效 (%)	增加 (百分点)
—	43.33d		46.79d	
非离子表面活性剂	67.33b	24.00	71.74b	24.95
甲酯化植物油	63.33c	20.00	68.29c	21.50
有机硅表面活性剂	71.67a	28.34	75.36a	28.57

表 4 糖类物质对氟磺胺草醚的增效作用

糖类	目测防效		鲜质量防效	
	防效 (%)	增加 (百分点)	防效 (%)	增加 (百分点)
—	43.33e	—	46.79d	—
葡萄糖	46.67d	3.34	48.13d	1.34
蔗糖	48.33c	5.00	51.21c	4.42
壳聚糖	50.67a	7.34	53.94a	7.15
生物多糖	50.00a	6.67	53.87ab	7.08

2.5 生物助剂 3 号增效机理

2.5.1 生物助剂 3 号对氟磺胺草醚药液表面张力的影响

由表 5 可知,25% 氟磺胺草醚水剂 300 ga. i./hm² 中加入用量 0.01% ~ 0.05% 的生物助剂后,药液的表面张力得到显著降低,并且随着新型生物助剂浓度的不断增加,降低 25% 氟磺胺草醚水剂 300 g a. i./hm² 药液表面张力的能力越强。未添加新型生物助剂时,25% 氟磺胺草醚水剂 300 g a. i./hm² 药液相比自来水表面张力降低幅度为 20.12%,添加生物助剂后 25% 氟磺胺草醚水剂 300 g a. i./hm² 药液的表面张力降低幅度均提高到 65% 以上。

表 5 生物助剂 3 号对氟磺胺草醚药液表面张力的影响

生物助剂添加量 (%)	表面张力 (mN/m)	比自来水降低 (%)
0	58.94b	20.12
0.01	23.89c	67.62
0.02	23.03c	68.83
0.03	21.91cd	70.31
0.04	21.27cd	71.17
0.05	20.36d	72.41
自来水 (CK)	73.79a	

2.5.2 生物助剂 3 号对氟磺胺草醚药液扩展直径的影响

除草剂药液扩展直径越大,除草剂的展布性越好,越有利于药液在杂草叶片铺展,促进叶片对药液的吸收。由表 6 可以看出,添加 0.01% 新型生物助剂时,25% 氟磺胺草醚水剂 300 g a. i./hm² 药液扩展直径比单剂增加 34.15%,具有显著性差异;添加 0.05% 新型生物助剂时,可明显增加扩展直径 92.68%。

2.5.3 生物助剂 3 号对氟磺胺草醚药液干燥时间的影响

在外界环境相同的情况下,药液干燥时间越短说明叶片吸收除草剂的速度越快。由表 7 可以看出,添加 0.01% 新型生物助剂时,25% 氟磺胺草醚水剂 300 g a. i./hm² 药液干燥时间比单剂降低 40.93%,具有显著差异;添加 0.05% 新型生物助剂时,25% 氟磺胺草醚水剂 300 g a. i./hm² 药液干燥时间比

表 6 生物助剂 3 号对氟磺胺草醚药液扩展直径的影响

生物助剂添加量 (%)	扩展直径 (mm)	比单剂增加 (%)
0	4.1c	
0.01	5.5b	34.15
0.02	6.1b	48.78
0.03	6.8ab	65.85
0.04	7.4a	80.49
0.05	7.9a	92.68
自来水 (CK)	3.6c	

表 7 生物助剂 3 号对氟磺胺草醚药液干燥时间的影响

生物助剂添加量 (%)	干燥时间 (min)	比单剂降低 (%)
0	36.4a	
0.01	21.5b	40.93
0.02	18.1c	50.27
0.03	17.8c	51.10
0.04	14.6d	59.89
0.05	13.2e	63.74

单剂降低 63.74%。

2.5.4 生物助剂 3 号对氟磺胺草醚药液最大持留量的影响

最大持留量是指叶片对药液的最大承受能力。由表 8 可知,新型生物助剂能够增加 25% 氟磺胺草醚水剂 300 g a. i. /hm² 药液在苘麻叶片上的最大持留量,随着新型生物助剂用量的不断增加,最大持留量也逐渐增加。添加 0.01% 新型生物助剂时,25% 氟磺胺草醚水剂 300 g a. i. /hm² 药液最大持留量比单剂提高了 42.62%,具有显著性差异;添加 0.05% 新型生物助剂时,可明显提高最大持留量 73.77%。因此,新型生物助剂能够显著提高杂草叶片对氟磺胺草醚药液的最大持留量。

表 8 生物助剂对氟磺胺草醚药液最大持留量的影响

生物助剂添加量 (%)	最大持留量 (mg/cm ²)	比单剂增加 (%)
0	24.4d	
0.01	34.8c	42.62
0.02	35.6c	45.90
0.03	37.9b	55.33
0.04	41.4ab	69.67
0.05	42.4a	73.77

2.5.5 生物助剂 3 号对杂草叶片吸收除草剂药液的影响

随着药液处理时间延长,苘麻叶片对氟磺胺草醚药液的吸收率也逐渐提高。在氟磺胺草醚药液中添加生物助剂 3 号能够明显提高苘麻叶片对氟磺胺草醚的吸收。随着时间增加,生物助剂 3 号对氟磺胺草醚的吸收促进率增加更明显,处理 24 h 后,可发现苘麻对氟磺胺草醚的吸收率仅为 19.49%,加入生物助剂 3 号的氟磺胺草醚的吸收率可达到 55.37%,可提高 2.84 倍(图 1)。

3 讨论

除草剂助剂能够促使除草剂从高用量降至低用量,在差异环境条件下充分发挥除草剂的活性与效果,从而达到减少除草剂使用量、降低使用成本、提高经济效益,同时有利于生态环境的目的^[11]。第 1 个应用的除草剂助剂为肥皂液,可以用来提高砷制剂对杂草的毒性。1900 年以前,生产常用的除草剂助剂为动物油制肥皂,随后研究糖与胶用作除草剂的黏

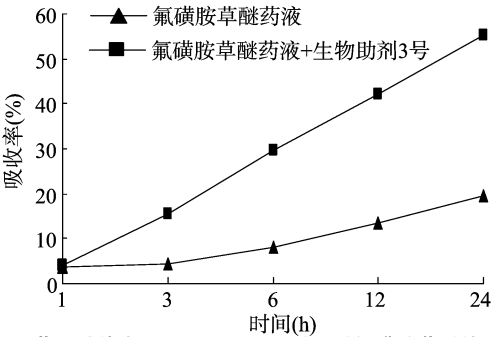


图1 苘麻叶片在不同处理、不同时间对氟磺胺草醚的吸收率

着剂,其后研究开发了多种助剂^[12]。近年来,除草剂的大面积应用给环境造成了不可挽回的污染,人们开始认识到环境保护的重要性,因此如何降低除草剂污染成为亟须解决的重要问题^[13]。但是目前除草剂开发难度大,活性物质研发困难,新结构的除草剂鲜有报道。因此,助剂凭借在除草剂剂型加工及使用中的显著作用,开始引起人们的广泛重视,开发能够显著增加药效,且对环境 and 作物友好的新型生物助剂将成为助剂发展的新方向^[14]。

本试验通过研究酸根离子及微生物代谢产物对氟磺胺草醚的增效作用,筛选出活性最高的几种物质用于新型生物助剂的研究开发,并研制出增效作用最明显的生物助剂 3 号。

4 结论

确定几种酸根离子、助剂、糖类和微生物代谢产物对 25% 氟磺胺草醚水剂 300 g a. i. /hm² 具有增效作用,其中硫酸根、碳酸根、有机硅表面活性剂、壳聚糖、生物多糖、青霉代谢产物增效作用最明显。

筛选出新型生物助剂,由有机硅、生物多糖、青霉发酵液和硫酸根组成的生物助剂 3 号对 25% 氟磺胺草醚水剂 300 g a. i. /hm² 增效作用最突出。

通过增效机制研究表明,生物助剂 3 号能够显著降低 25% 氟磺胺草醚水剂 300 g a. i. /hm² 药液的表面张力和干燥时间,增加扩展直径和最大持留量。采用仪器分析的方法研究温室盆栽条件下生物助剂 3 号对除草剂吸收的影响,结果表明生物助剂 3 号能够明显促进植物对除草剂的吸收。

参考文献:

[1]侯磊. 玉米田除草剂的使用现状和发展趋势[J]. 科技传播, 2011,7(14):84.
[2]钟世民,刘春祥. 大豆田除草剂应用现状及发展方向[J]. 现代农业科技,2010(11):190.
[3]陶波. 杂草化学防除使用技术[M]. 北京:化学工业出版社,2013.
[4]苏少泉,滕春红. 稻田除草剂的新发展[J]. 世界农药,2010,32(3):1-6.
[5]胡笑彤. 世界农药发展趋势及重点专利农药潜力分析[J]. 精细与专业化学品,2014,22(11):1-9.
[6]张一宾. 全球主要农药品种的发展概况、特点及主要作物的农药使用概况[J]. 今日农药,2010(12):23-27.
[7]陶波. 除草剂药害发生状况及解决方案[J]. 农药市场信息, 2013(10):20-22.

韩长志. 希金斯炭疽菌磷脂酰肌醇特异性磷脂酶 C 生物信息学分析[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(10): 177–180.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.10.046

希金斯炭疽菌磷脂酰肌醇特异性磷脂酶 C 生物信息学分析

韩长志

(西南林业大学林学院云南省森林灾害预警与控制重点实验室, 云南昆明 650224)

摘要:希金斯炭疽菌侵染菜心、萝卜等十字花科植物引起炭疽病, 给各国农业生产造成了巨大的经济损失。基于酿酒酵母典型的磷酸肌醇特异性磷脂酶 C (PI-PLC) 序列, 利用 Blastp 以及关键词对该菌蛋白质数据库进行比对、搜索, 以及通过 SMART 分析, 明确该菌存在 8 个典型的 PI-PLC 序列; 通过生物信息学分析, 明确上述 PI-PLC 序列在蛋白质二级结构组成、信号肽等方面均具有一定差异。遗传关系比较分析明确该菌中的 PI-PLC 序列与禾谷炭疽菌 (*Colletotrichum graminicola*)、松针炭疽菌 (*C. fioriniae*) 等炭疽菌属中的病菌具有较近的亲缘关系。

关键词:希金斯炭疽菌; 磷脂酰肌醇特异性磷脂酶 C; 亚细胞定位; 二级结构; 炭疽菌属

中图分类号:S432.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)10-0177-04

植物与病原菌互作过程中, 众多细胞信号转导途径参与其中, 现已明确 G 蛋白信号途径及其下游的 MAPK 信号传导途径和 cAMP 信号传导途径具有重要的作用。因此, 学术界关于真菌 RGS 的研究产生了较多成果^[1], 磷脂酰肌醇特异性磷脂酶 C (PI-PLC) 的一种异构体 PI-PLC β 为磷脂肌醇信号途径 PKC 系统中的重要效应物^[2], 可以将 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇水解为三磷酸肌醇和二酰甘油, 而上述分子均作为细胞信号转导的第二信使, 发挥着重要作用。

希金斯炭疽菌 (*Colletotrichum higginsanum* Sacc.) 可以侵染菜心、萝卜等十字花科蔬菜引起炭疽病, 该菌现主要分布于美国、日本、印度等国家^[3-5], 在我国, 由该菌侵染菜心引起的炭疽病成为影响菜心产量和品质的重要危害之一^[6]。国内外对该菌的研究主要集中在病菌的生物学特性^[7]、生防菌筛选^[8]、遗传转化^[9-10]以及不同营养元素(硅、氮、钾等)^[11-14]、外源酚酸类物质 pHBA^[15]控制病害等方面, 同时, 随着该基因

组序列的释放^[16], 林春花等对其开展了 MAPK 途径相关基因的找寻及信号通路简图的绘制工作^[17], 韩长志对其进行了 RGS^[18]、14-3-3^[19]、sepin^[20]、AC、PITP 等蛋白生物信息学分析。此外, 对于该菌致病基因的研究, 建立根癌农杆菌介导的转化技术及直接重复重组介导的基因打靶等技术^[9-10]。华中农业大学黄俊斌教授实验室建立了希金斯炭疽菌转化子的突变体库, 为进一步对这些转化子基因功能研究提供了技术支持^[21-22]。然而, 对于该菌中存在的 PI-PLC 数量、功能尚不清楚。本研究利用酿酒酵母 S288c (*Saccharomyces cerevisiae* S288c) 中已经报道的 PI-PLC 氨基酸序列, 通过在炭疽菌属蛋白质数据库中进行 Blastp 比对分析^[23], 以及通过关键词搜索, 获得与酿酒酵母 PI-PLC 同源的希金斯炭疽菌序列, 并通过保守结构域分析、疏水性分析、二级结构预测位等生物信息学分析以及遗传关系分析, 以期为进一步开展希金斯炭疽病菌的研究提供重要的指导。

1 材料与与方法

1.1 材料

根据酿酒酵母 S288c 中含有的 1 个 PI-PLC 氨基酸序列, 利用炭疽菌属蛋白质数据库在线 Blastp 比对, 同时通过输入“phosphatidylinositol-specific Phospholipase”“Phospholipase C”“PLC”关键词在上述数据库中进行检索 PLC(表 1)。

1.2 方法

1.2.1 保守结构域预测 利用 SMART 网站^[24]在线分析

收稿日期: 2015-08-28

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31560211); 云南省森林灾害预警与控制重点实验室开放基金(编号: ZK150004); 云南省优势特点重点学科生物学一级学科建设项目(编号: 50097505); 云南省高校林下生物资源保护及科用科技创新团队项目(编号: 2014015); 云南省教育厅科学研究基金(编号: 2014Y330)。

作者简介: 韩长志(1981—), 男, 河北石家庄人, 博士, 讲师, 主要从事经济林木病害生物防治与真菌分子生物学研究。Tel: (0871) 63862918; E-mail: hanchangzhi2010@163.com。

[8] 王兆振, 毕亚玲, 丛 聪. 除草剂对作物的药害研究[J]. 农药科学与管理, 2013, 34(5): 68–73.

[9] 张 静. 我国除草剂的登记现状及其发展趋势分析[D]. 保定: 河北农业大学, 2013.

[10] 金景学. 杂草抗性发展趋势及杂草综合管理策略[J]. 湖北植保, 2012(6): 56–58.

[11] James C. Global status and distribution of commercial transgenic crop in 1997 [J]. Biotechnology Development Monitor, 1998(35): 9–12.

[12] Owen M D K. North America Development in herbicide resistant crops [C]. Brighton, England: British Crop Protection Conference, 1997: 955–963.

[13] Kudsk P, Streibig J C. Herbicides – a two-edged sword [J]. Weed Research, 2003, 43(2): 90–102.

[14] Aliakbari F, Karami – osboo R, Mazhar S F, et al. Essential oils usage as a natural pesticide. Journal of Biotechnology, 2010, 150(3): 481.