

咪鲜胺及其制剂和主要代谢物对三叶浮萍色素的影响

龚道新¹, 刘明洋¹, 任 竞¹, 汪传刚¹, 卫麦霞²

(1. 湖南农业大学农业环境保护研究所, 湖南 长沙 410128; 2. 湖南农业大学烟草工程技术研究中心, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 为了全面地了解和评价咪鲜胺(Prochloraz)及其制剂施保克(Sportak)使用后的生态环境安全性, 采用恒温光照培养试验, 研究了 Prochloraz 及其制剂和主要代谢物(包括其初级代谢物 BTS44595、BTS44596 和次级代谢物 BTS45186)对三叶浮萍色素含量及组成的影响。结果表明, 随着处理浓度的增加和处理时间的延长, 三叶浮萍体内的色素含量逐渐下降, Prochloraz 和 Sportak 使叶绿素 a/b 比值逐渐下降, 3 种代谢物使叶绿素 a/b 比值逐渐上升。经分析, Prochloraz 在处理时间为 24 h 时对色素含量的影响比 Sportak 小, 但随着处理时间的延长其对色素的影响则高于 Sportak 的影响; Prochloraz 对叶绿素含量的影响高于 BTS44595 而低于 BTS44596 和 BTS45186, 但对类胡萝卜素含量的影响比 3 种代谢物都要大。

关键词: Prochloraz; Sportak; 代谢物; 三叶浮萍; 叶绿素; 类胡萝卜素

中图分类号: X592 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2008)04-1672-05

Influence of Prochloraz, Its Formulation Sportak and Major Metabolites on Pigments in Lesser Duckweed *Lemna Paucicostata*

GONG Dao-xin¹, LIU Ming-yang¹, REN Jing¹, WANG Chuan-gang¹, WEI Mai-xia²

(1. Institute of Agro-Environment Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Research Center of Tobacco Engineering and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: Prochloraz [1-(N-propyl-N-2-(2,4,6-trichlorophenoxy) ethyl carbamoyl) imidazole] is an imidazole fungicide which is widely used to control the rice diseases. Effects of prochloraz and its formulation 25% emusifiable concentrate (sportak) and major metabolite including BTS44595 [N-propyl-N-(2-(2,4,6-trichlorophenoxy) ethyl) urea], BTS44596 [N-methoxyl-N'-propyl-N-(2-(2,4,6-trichlorophenoxy) ethyl) urea] and BTS45186 [2,4,6-trichlorophenol] on the contents and compositions of pigments in lesser duckweed *L. paucicostata* were studied using illuminating incubation method in the laboratory in order to assess the eco-environmental safety after application of prochloraz. Results showed that the pigment contents of the duckweeds decreased gradually with the increasing concentrations of the compounds and treatment time. The ratio of chlorophyll a/b decreased from 1.76 in the control to 1.63 in treatments with 0.1~10 mg·L⁻¹ prochloraz and sportak, and increased from 1.77 in the control to 1.94 in BTS44595, BTS44596 and BTS45186 treatment. However, chlorophyll a was more sensitive to the compounds than chlorophyll b under the same conditions. Prochloraz had a greater effect on the duckweed pigments at 24 h after treatment than sportak, but an opposite result appeared with the prolonging treatment. The five compounds reduced the chlorophyll and carotenoid content of the duckweeds in the order of BTS45186>BTS44596>prochloraz>sportak>BTS44595 and prochloraz>sportak>BTS45186>BTS44596>BTS44595, respectively.

Keywords: prochloraz; sportak; metabolites; *Lemna paucicostata*; chlorophyll; carotenoid

三叶浮萍(*Lemna paucicostata*)为浮水小草本, 广布于我国南方各省区, 生长于水稻田、池塘、湖泊等静水水体中, 既可作家禽家畜的饲料又可作稻田绿肥, 是我国南方水乡“稻-鱼-萍”生态模式中的重要组成

部分^[1]。三叶浮萍的个体小, 可操作性强, 且直接浮于水面, 易从污染水体中快速吸附污染物质, 可十分灵敏地反映出水质状况。

咪鲜胺(Prochloraz)是目前我国稻作区广泛使用的杀菌剂施保克(Sportak)、施保功(Sporgon)的有效成分, 它是咪唑类广谱杀菌剂, 通过抑制甾醇的生物合成而发挥作用, 在环境和生物体中的主要代谢产物有 BTS44595(N-丙基-N-[2-(2,4,6-3-氯苯氧基)乙

收稿日期: 2007-08-14

作者简介: 龚道新(1964—), 男, 博士, 教授, 主要从事农药生态毒理及有机污染物的分析检测与控制技术的研究。

E-mail: gdx4910@163.com

基]脲)、BTS44596(N-甲氧基-N'-丙基-N-[2-(2,4,6-3-氯苯氧基)乙基]脲)和 BTS45186(2,4,6-三氯苯酚)等^[2,3]。Prochloraz 可作种子处理剂和植物叶面喷施剂用于防治水稻恶苗病、胡麻叶斑病等病害^[4,6]。Prochloraz 广泛使用后将不可避免地进入稻田生态环境及地表水体,进而对我国南方的水稻田及地表水体中广泛存在的水生植物如浮萍等产生影响,但目前对 Prochloraz 的生物毒性的研究多集中在温血动物和哺乳动物上^[7]。因此研究 Prochloraz 及其制剂 Sportak 和主要代谢产物 BTS44595、BTS44596 和 BTS45186 对三叶浮萍体内色素(包含叶绿素 a、叶绿素 b、叶绿素 a 与叶绿素 b 之和即叶绿素总量及类胡萝卜素)的影响具有十分重要的意义,既可以丰富有关 Prochloraz 的生物毒性资料,也可以为 Prochloraz 及其制剂施用后的安全性评价提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验用三叶浮萍的采集和培养

从湖南农业大学试验农场的水稻田或稻田周边的沟渠及小水塘中采集纯种的三叶浮萍,放在搪瓷盘中,加入约 1.5 cm 高的培养液(采用美国 EPA 推荐的绿藻培养液配方^[1,8-12],并经修改,其组成情况如下: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.62 g·L⁻¹, CaCl_2 0.41 g·L⁻¹, KNO_3 0.40 g·L⁻¹, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.12 mg·L⁻¹, KH_2PO_4 0.24 g·L⁻¹, $\text{MnCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.47 mg·L⁻¹, H_3BO_3 0.5 mg·L⁻¹, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 50 μg·L⁻¹, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 25 μg·L⁻¹, $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 25 μg·L⁻¹, 配好后,调节 pH 值至 5.5,再加入最终浓度为 100 μg·L⁻¹ 的 NaFeEDTA(乙二胺四乙酸铁钠))。在实验室中用日光灯照射培养,光强为 4 500 lx,每隔两天向盘内添加培养液以保持水面高度。于试验前取外形完好,具有 3 个植物体(每株浮萍有 3 片叶状体,称为植物体),且形状和大小都相近的三叶浮萍进行试验。

1.2 供试药剂

咪鲜胺母体(纯度为 99.0%,用 Prochloraz 表示), Prochloraz 制剂 Sportak(每升含咪鲜胺 250 g,用 Sportak 表示),Prochloraz 的主要代谢物: BTS44595(纯度为 99.3%)、BTS44596(纯度为 98.0%)和 BTS45186(纯度为 99.6%),均为德国艾格福公司(AgrEvo)提供,用前配成 1 000 mg·L⁻¹ 的丙酮溶液(以有效成分计),保存在 0~4℃ 冰箱中,使用时将丙酮吹干后再用蒸馏水稀释至相应浓度。

1.3 试验设计

试验在 25 cm×30 cm×30 cm 的玻璃缸中进行,向每个玻璃缸中分别加入 Prochloraz、Sportak、BTS44595、BTS44596 和 BTS45186 的标准溶液,再用配制好的营养液(经曝气处理的蒸馏水配制而成)稀释至上述各供试药剂的浓度分别为 0、0.1、1.0、10.0 mg·L⁻¹,每个玻璃缸中盛营养液 5 L,每个处理组设 3 次重复,每个玻璃缸放养三叶浮萍 10 g(鲜重),在实验室中用日光灯照射培养,光强约 4 500 lx,控制培养温度为(25±2)℃(用空调调节温度)。在培养 24、48、72 和 96 h 后捞取三叶浮萍样品,分别测定其中色素的含量^[1,8-14]。

1.4 三叶浮萍中色素的含量的测定

称取三叶浮萍样品 0.5 g(样品经洗净、用滤纸吸干)置于玻璃研钵中,并且加入 2 mL 80% 丙酮和少许 CaCO_3 粉末研磨,再加入 5 mL 80% 的丙酮研磨成匀浆,充分研磨后倒入容量瓶中,然后用丙酮分几次洗涤研钵并倒入容量瓶中,将匀浆用 80% 的丙酮定容至 50 mL,充分振摇后,用漏斗过滤。取滤液在 722B 分光光度计上,用 80% 丙酮做参比,分别在波长为 440、645、663 nm 处测定其吸光度值(记为 A_{440} 、 A_{645} 和 A_{663})。根据 Lambert-Beer 定律可得出叶绿素 a、叶绿素 b 及类胡萝卜素的浓度(μg·mL⁻¹)与它们在 440、645 和 663 nm 处的吸光度之间的关系,并用下列公式求出叶绿素 a(用 C_A 表示)、叶绿素 b(用 C_B 表示)及叶绿素总量(用 C_{A+B} 表示)和类胡萝卜素(用 C_K 表示)在溶液中的浓度。

$$C_A = 12.7A_{663} - 2.69A_{645}$$

$$C_B = 22.9A_{645} - 4.68A_{663}$$

$$C_{A+B} = 20.2A_{645} + 8.02A_{663}$$

$$C_K = 4.7A_{440} - 0.27C_{A+B}$$

所得 C_A 、 C_B 、 C_{A+B} 及 C_K 的浓度值再乘以 0.10,即得每克(鲜重)样品所含叶绿素 a、b 及叶绿素总量和类胡萝卜素的含量(mg·g⁻¹)^[15]。

2 结果与分析

2.1 咪鲜胺、施保克对三叶浮萍色素含量与组成的影响

表 1 和图 1 列出了 Prochloraz 和 Sportak 对三叶浮萍色素含量及组成的影响。结果表明:①较低浓度(如 0.1 mg·L⁻¹)的 Prochloraz 和 Sportak 对三叶浮萍体内色素含量的影响较小,处理时间较短(如处理 24 h)时甚至还出现轻微的刺激作用,不过与对照组相比差异都在 2.59%之内,未达到显著或极显著水平;而较高浓度(如 1.0 mg·L⁻¹ 和 10.0 mg·L⁻¹)的 Prochloraz 和 Sportak 对三叶浮萍体内色素含量的影响则较大,

表 1 5 种供试药剂对三叶浮萍色素含量的影响

Table 1 Effects of five substances tested on pigment of *L.paucicostata*

供试药剂	处理浓度/ mg·L ⁻¹	叶绿素总量占对照的百分比/%				类胡萝卜素含量占对照的百分比/%			
		24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h
对照	0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Prochloraz	0.1	101.15	99.79	98.90	97.41**	100.73	100.99	99.92	99.65
	1.0	99.26	93.62**	90.79**	87.47**	97.76	94.23**	91.95**	89.03**
	10.0	86.35**	75.84**	56.69**	47.14**	93.78**	77.63**	74.48**	57.63**
Sportak	0.1	101.68	99.47	98.54*	98.38**	100.97	99.52	99.65	99.03
	1.0	94.37*	95.07**	92.73**	89.79**	95.89**	94.86**	92.21**	91.93**
	10.0	82.55**	78.25**	60.60**	51.34**	91.54**	83.1**	78.27**	59.11**
BTS44595	0.1	102.44**	102.23*	100.59	99.62	101.73	100.99	100.89	100.64
	1.0	99.38	97.36**	93.81**	92.50**	98.92	96.70**	95.88**	91.26**
	10.0	86.75**	78.61**	60.94**	55.84**	97.13*	94.26**	93.89**	74.79**
BTS44596	0.1	100.83	98.00**	97.35**	96.66**	100.81	99.28	100.08	97.32*
	1.0	96.27**	89.82**	87.50**	86.73**	97.67*	95.73**	93.65**	86.24**
	10.0	82.52**	68.72**	53.94**	47.97**	95.94**	94.42**	90.40**	65.32**
BTS45186	0.1	98.24**	94.96**	92.30**	89.42**	99.49	98.85	96.15**	91.47**
	1.0	81.76**	76.82**	73.15**	68.96**	97.13**	94.21**	91.93**	80.95**
	10.0	61.40**	48.00**	29.39**	25.38**	94.86**	88.89**	85.81**	63.75**

注:* 和 ** 分别表示与对照组相比有显著和极显著差异。

Note: * and ** denote significant and very significant difference compared to the control group, respectively.

与对照组相比差异在 0.74%~62.37% 之间, 均达显著或极显著水平。②随着 Prochloraz 或 Sportak 处理浓度的增加和处理时间的延长, 三叶浮萍体内叶绿素 a 和叶绿素 b 之间的比值(用叶绿素 a/b 表示)逐渐下降, 由对照组的 1.77 下降到 1.62 左右。③相同浓度处理组的 Prochloraz 和 Sportak 对三叶浮萍体内叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素的影响程度存在差异, 其中最敏感的是叶绿素 a、其次是叶绿素 b, 再次为类胡萝卜素。④Prochloraz 和 Sportak 对三叶浮萍体内色素含量与组成的上述影响随着处理浓度的增加或处理时间的延长而逐渐增大, 表现出良好的“浓度(时间)-效应”关系。⑤在 24 h 处理时间内, Prochloraz 对三叶浮萍体内叶绿素 a、叶绿素 b 及叶绿素总量和类胡萝卜素的影响小于 Sportak 的影响; 但处理时间超过 48 h 时, Prochloraz 对三叶浮萍体内叶绿素 a、叶绿素 b 及叶绿素总量和类胡萝卜素的影响则大于 Sportak 的影响, 造成这种现象的原因可能是由于在 Prochloraz 加工成 Sportak 的过程中, 由于添加了一些乳化剂、助溶剂等助剂致使 Prochloraz 在较短时间内进入三叶浮萍体内, 从而对其体内色素合成产生抑制作用, 但也正是由于乳化剂和助溶剂等助剂的加入也增加了 Sportak 中的活性成分咪鲜胺在溶液中的溶解度, 进而在较长时间内减少了咪鲜胺进入三叶浮萍体内的数量。

2.2 BTS44595、BTS44596 和 BTS45186 对三叶浮萍色素含量与组成的影响

Prochloraz 的初级代谢产物 BTS44595 和 BTS44596 以及它的次级代谢产物 BTS45186 对三叶浮萍色素体内色素含量与组成的影响见表 1 和图 1。结果表明: ①较低浓度(如 0.1 mg·L⁻¹)的 BTS44595 和 BTS44596 在较短时间(如 24 h)内对三叶浮萍体内色素含量的影响较小, 甚至还表现出轻微的刺激作用; 较高浓度(如 1.0 和 10.0 mg·L⁻¹)的 BTS44595 和 BTS44596 则会使三叶浮萍体内色素含量降低, 表现出较强的抑制作用; 3 种处理浓度的 BTS45186 均降低了三叶浮萍体内色素含量。②BTS44595、BTS44596 和 BTS45186 对三叶浮萍体内色素含量影响的大小顺序为: BTS45186>BTS44596>BTS44595。③三叶浮萍体内叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素受供试 3 种代谢物影响的强弱顺序为: 叶绿素 a>叶绿素 b>类胡萝卜素; ④三叶浮萍体内色素含量受供试 3 种代谢物的影响随处理浓度的增加或处理时间的延长而得以加重, 表现出良好的“浓度(时间)-效应”关系; ⑤供试 3 种代谢物能使三叶浮萍体内叶绿素 a/b 比值逐渐上升, 由对照组的 1.77 逐渐上升到 1.94 左右, 而且处理浓度不同导致的影响大于同一浓度不同作用时间所引起的。

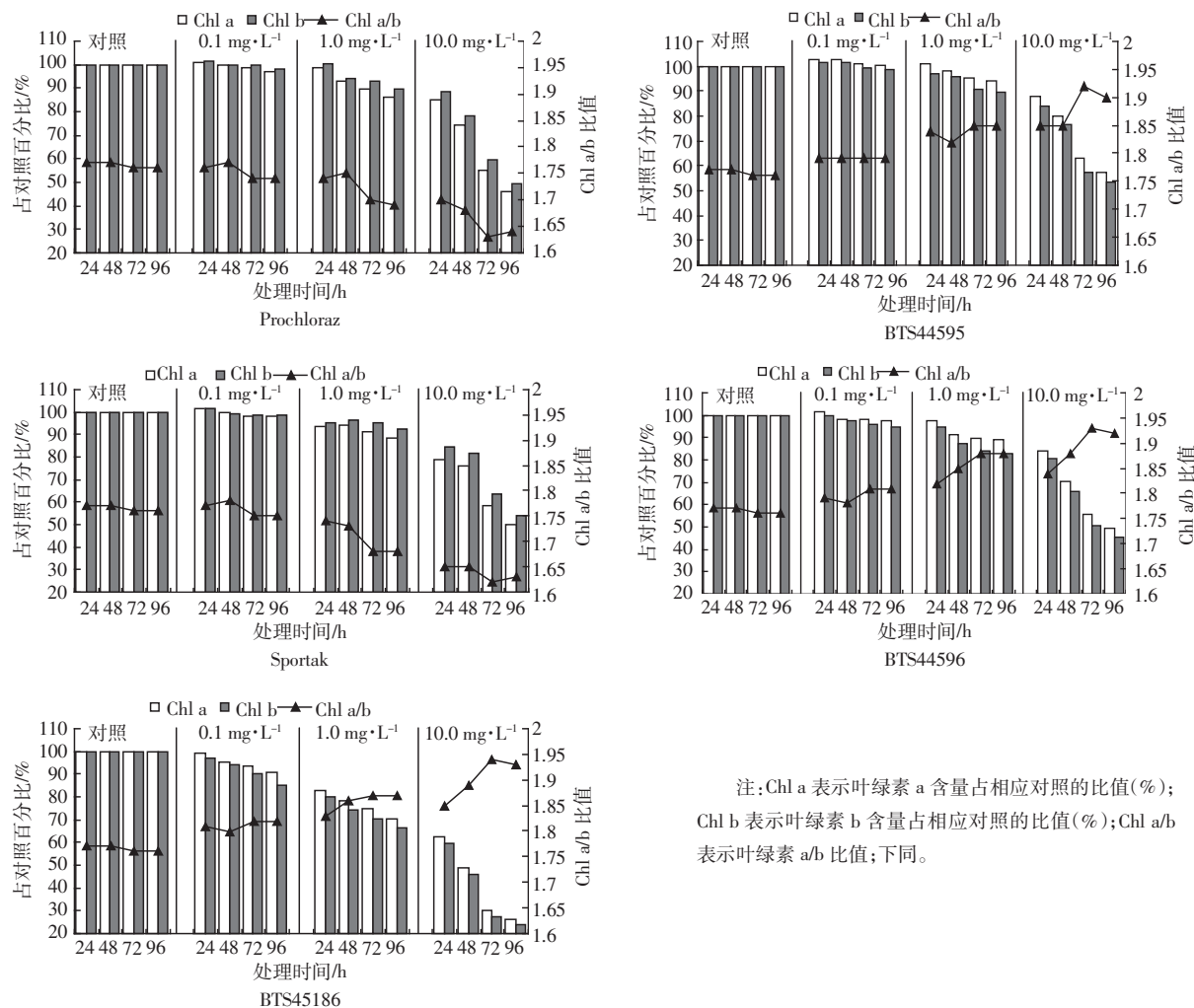


图 1 5 种供试药剂对三叶浮萍体内叶绿素的影响

Figure 1 Effect of five substances tested on chlorophyll content of *L. Paucicostata*

3 讨论与结论

3.1 讨论

Prochloraz 与 Sportak 对三叶浮萍体内色素含量的影响在时间上表现出一定的差异性,这可能是因为 Prochloraz 加工成 Sportak 的过程加入了某些乳化剂和溶剂等助剂致 Prochloraz 较易在短时间内进入三叶浮萍体内,对其体内的叶绿素合成产生抑制,但是由于乳化剂和溶剂等的加入也增加了 Sportak 中的活性成分咪鲜胺在水溶液中的溶解度,进而在较长时间减少了进入三叶浮萍体内的咪鲜胺量。

比较发现,BTS45186 对三叶浮萍体内色素的影响比 BTS44595 和 BTS44596 大,且对叶绿素含量的影响还大于 Prochloraz,这表明 Prochloraz 的代谢并不一定会降低其毒性^[16,17]。Prochloraz 与其代谢物之间所

表现的差异可能是因为 Prochloraz 能与植物叶绿素卟啉环中的中心离子 Mg^{2+} 等作用而形成络合物,同时 Prochloraz 还可以破坏植物体内叶绿体的生物膜,造成叶绿体内的细胞质外渗,从而破坏植物色素,影响植物色素的组成和含量;Prochloraz 代谢后,其分子中的咪唑环断裂,这会增加其代谢物 BTS44595、BTS44596 的水溶性,使它们进入植物体内的量相对较少;BTS45186 较 Prochloraz 对色素含量影响程度大的原因有待进一步的研究。

叶绿素 a 和叶绿素 b 是结构相近的化合物,不同的只是叶绿素 a 的卟啉环 II 上含的是甲基,而叶绿素 b 则是甲酰基,可能正是这点不同,使得二者在不同药剂的作用下表现出了差异性。

3.2 结论

随着处理浓度的升高或作用时间的延长,Prochlo-

raz、Sportak、BTS44595、BTS44596和BTS45186均能使三叶浮萍体内的叶绿素下降,表现为负效应,且BTS45186表现出较大的破坏性。Prochloraz和Sportak使叶绿素a/b比值下降,而BTS44595、BTS44596和BTS45186使叶绿素a/b比值上升。Prochloraz和Sportak对叶绿素a的影响比叶绿素b要大,但BTS44595、BTS44596和BTS45186对叶绿素a的影响比叶绿素b要小。5种药剂对类胡萝卜素的影晌也随着处理浓度的增加或作用时间的延长表现为抑制作用,其中Prochloraz的抑制作用最大。

Prochloraz及其制剂和主要代谢物均可对三叶浮萍体内的色素含量及其组成情况产生一定的影响,并且符合现代有关化合物对生物毒性的一般规律,即“浓度(时间)-效应”。因此,在研究Prochloraz的生物毒性时,应综合考虑其母体化合物和其代谢转化的主要代谢物(包括所有有毒理学意义的代谢产物)的毒性,从而能全面正确的评价Prochloraz施用后的生态安全性。

参考文献:

- [1] 张 彤,金洪钧.用浮萍试验检测4种污染物的植物毒性[J].中国环境科学,1995,15(4):266-271.
- [2] Cravedi J P, Boudry G, Baradat M, et al. Metabolic fate of 2,4-dichloroaniline, prochloraz and nonylphenol diethoxylate in rainbow trout: a comparative in vivo/in vitro approach [J]. *Aquatic Toxicology*, 2001, 8, 53(3-4):159-172.
- [3] Laignelet L, Riviere J L, Lhugunot J C. Metabolism of an imidazole fungicide (Prochloraz) in the rat after oral administration[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 1992, 7, 30(7):575-583.
- [4] 陈道茂.杀菌剂扑霉灵(咪鲜胺)[J].农药译丛,1995,17(3):63-65.
- [5] 彭晓春,杨仁斌,郭正元,等.咪鲜胺的残留毒理研究现状[J].世界农药(原农药译丛),2000,22(2):52-55.
- [6] Dyer P S, Lucas J A. Incidence of apothecia of *Tapesia yellundae* at set-aside sites in England and sensitivity of the ascospore offspring to the fungicides benomyl and Prochloraz[J]. *Plant Pathol*, 1995, 44:796-804.
- [7] Fauconneau B, Paboeuf G. Sensitivity of muscle satellite cells to pollutants: an in vitro and in vivo comparative approach[J]. *Aquatic Toxicology*, 2001, 53(3-4):247-263.
- [8] 徐 楠,施国新,杜开和,等. Hg、Cd及其复合污染对浮萍叶片的毒害研究[J]. 南京师范大学学报(自然科学版),2002,25(3):109-115.
- [9] 马剑敏,杜晋立,吴晶敏,等. Hg²⁺、DBS对浮萍的伤害研究[J]. 河南师范大学学报(自然科学版),2001,29(1):114-116.
- [10] 刘红玉,周朴华,杨仁斌,等. 非离子型表面活性剂AE对稀脉浮萍的损伤作用[J]. 应用与环境生物学报,2001,7(3):224-227.
- [11] 周红卫,施国新,徐勤松,等. Cr⁶⁺和Cr³⁺对水生几种植物生理生化指标的影响比较[J]. 农村生态环境,2002,18(4):35-40.
- [12] Wiese F W, Chang H C, Lloyd R V, et al. Peroxidase-catalyzed oxidation of 2, 4, 6-trichlorophenol[J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 1998, 34(3):217-22.
- [13] 任安芝,高玉葆,刘 爽. 铬、镉、铅胁迫对青菜叶片几种生理生化指标的影响[J]. 应用与环境生物学报,2000,6(2):112-116.
- [14] 谢 荣,唐学玺,李永祺,等. 丙溴磷影响海洋微藻生长机制的初步研究[J]. 环境科学学报,2000,20(4):473-477.
- [15] 杨敏文. 化学科技活动一则——分光光度法测定叶片叶绿素a、叶绿素b和类胡萝卜素含量[J]. 化学教学,2002,8:44-45.
- [16] 龚道新,樊德方,杨仁斌,等. 咪鲜胺及其主要代谢物的紫外光谱吸收特性和对蝌蚪急性毒性的研究[J]. 农业环境科学学报,2003,22(6):749-753.
- [17] 龚道新,樊德方,杨仁斌. 咪鲜胺及其主要代谢物对常见水生动物的急性毒性研究[J]. 湖南农业大学学报,2003,29(3):223-225.