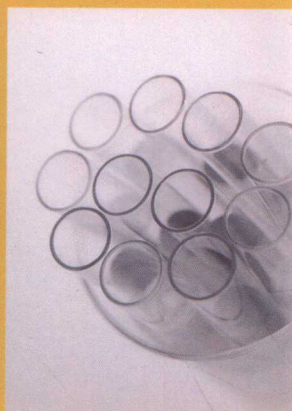


# 植物化学保护实验指导

Zhiwu Huaxue Baohu Shiyan Zhidao

罗兰 主编



中国农业大学出版社

CHINA AGRICULTURAL UNIVERSITY PRESS

# 植物化学保护实验指导

罗 兰 主 编

中国农业大学出版社

· 北京 ·

## 内 容 简 介

本书系统地介绍了植物化学保护的实验技术与方法,共分为5个单元即农药生物活性测定、农药制剂的配制及质量检测、农药毒理与环境毒理、农药残留分析和实习与实训。共有41个实验。第一单元包括杀虫剂、杀菌剂和除草剂的室内生物测定及田间药效试验;第二单元包括粉剂、可湿性粉剂、乳油、水乳剂等农药的剂型配制和质量检测;第三单元包括杀虫剂、杀菌剂和除草剂的毒理与环境毒理实验;第四单元包括蔬菜、水果、牛乳、蘑菇中农药残留的检测技术;第五单元是实践环节。通过这些实验能学习农药应用技术的试验研究方法,更好地消化吸收该学科的基本理论知识,并达到能够初步独立从事植物化学保护工作和科学研究的目的。

本书可作为高等农业院校植物保护专业、制药专业、药学专业以及综合大学生物学专业的本科实验教材,也可供相关专业研究生、教师和科研工作者参考。

### 图书在版编目(CIP)数据

植物化学保护实验指导/罗兰主编. —北京:中国农业大学出版社,2015.10

ISBN 978-7-5655-1390-9

I. ①植… II. ①罗… III. ①植物保护-农药防治-实验-高等学校-教材  
IV. ①S481-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2015)第218256号

书 名 植物化学保护实验指导

作 者 罗 兰 主 编

策划编辑 赵 中

责任编辑 刘耀华

封面设计 郑 川

责任校对 王晓凤

出版发行 中国农业大学出版社

社 址 北京市海淀区圆明园西路2号

邮政编码 100193

电 话 发行部 010-62818525,8625

读者服务部 010-62732336

编辑部 010-62732617,2618

出版部 010-62733440

网 址 <http://www.cau.edu.cn/caup>

E-mail [cbsszs@cau.edu.cn](mailto:cbsszs@cau.edu.cn)

经 销 新华书店

印 刷 北京时代华都印刷有限公司

版 次 2015年10月第1版 2015年10月第1次印刷

规 格 787×980 16开本 8.75印张 155千字

定 价 18.00元

图书如有质量问题本社发行部负责调换

# 编写人员

主 编 罗 兰 青岛农业大学

副主编 杨从军 青岛农业大学

参 编 (按姓氏拼音排序)

董向丽 青岛农业大学

郭 磊 青岛农业大学

李平亮 青岛农业大学

刘向阳 河南农业大学

罗小勇 青岛农业大学

钱 坤 西南大学

邢小霞 青岛农业大学

# 前 言

《植物化学保护实验指导》设有 5 个单元,即农药生物活性测定、农药制剂的配制及质量检测、农药毒理与环境毒理、农药残留分析和实习与实训,共有 41 个实验和实习。通过这些实验和实习能学习农药应用技术的试验研究方法,更好地消化吸收该学科的基本理论知识,并达到能够初步独立从事植物化学保护工作和科学研究的目的。

本书内容丰富、具体细致、简明扼要,本书可作为高等农业院校植物保护专业、制药专业、药学专业以及综合大学生物学专业的本科实验教材,也可供相关专业研究生、教师和科研工作者参考。建议各院校根据自己的实际情况选 20~25 个实验。

本书由青岛农业大学、西南大学和河南农业大学的 9 位老师共同完成。第一单元农药生物活性测定,由董向丽、杨从军、罗小勇共同撰写;第二单元农药制剂的配制及质量检测,由罗兰、李平亮共同撰写;第三单元农药毒理与环境毒理,由郭磊、杨从军、罗小勇和李平亮共同撰写;第四单元农药残留分析,由杨从军撰写;第五单元实习与实训,由罗兰撰写。刘向阳、钱坤和邢小霞在联系和修改稿件后的排版和样稿校对等方面做了大量的工作。全书最后由罗兰汇总、定稿。

值本书出版之际,我们向书中引用著作的中外编著者们表示真挚的感谢。

由于编者的学识水平有限,本书难免存在欠妥乃至错误之处,敬请读者批评指正。

编 者

2015 年 7 月

# 实验须知

植物化学保护是以化学、昆虫学和植物病理学等学科为基础,并紧密联系其他学科,直接为农业生产服务的一门学科,而植物化学保护实验则是这门课程教学内容的重要环节。通过实验,加深巩固对教学内容的理解,学习和掌握植物化学保护的基本研究方法,培养良好的工作作风和严格的科学态度以及独立分析问题的能力,而且能把所学的基本原理和技能运用到实践中去。为了上好实验课,望同学们遵守下列规章制度。

一、实验前要认真阅读实验指导及有关教材,明确实验的目的与要求,了解熟悉实验的原理、方法及操作步骤。

二、进行实验时必须细心、严肃认真、节省药品、爱护仪器,如有损坏,要报告给实验指导教师,进行适当的处理。

三、实验时应独立思考,明确实验中的注意事项,认真操作,注意观察,做好实验记录,按时完成作业和实验报告。

四、农药对人体均有毒性,所以必须严防农药经口或经皮进入体内,未经允许不准任意将农药带出实验室外,实验中的废液及残渣,按要求倒入指定缸内,严禁乱倒乱放。

五、防止有机溶剂靠近火源,以免发生火灾;使用电源插头时,应注意所用仪器所需电源电压是否相符,切勿插错。

六、实验室应保持清洁,严禁在实验室内放置食物,吃东西或抽烟。

七、实验结束后,清理实验材料及用具,洗刷干净、清扫实验室后方可离开。

# 目 录

<b>第一单元 农药生物活性测定</b> .....	1
实验一 杀虫剂胃毒毒力测定——夹毒叶片法 .....	3
实验二 杀虫剂触杀毒力测定——点滴法 .....	7
实验三 杀虫剂熏蒸作用测定 .....	11
实验四 杀虫剂内吸作用测定——根部内吸法 .....	13
实验五 杀虫剂的田间药效试验 .....	16
实验六 杀菌剂的生物测定——生长速率法 .....	20
实验七 杀菌剂的生物测定——抑菌圈法 .....	23
实验八 杀菌剂的生物测定——孢子萌发法 .....	26
实验九 杀菌剂混合毒力生物效应的初步判断——滤纸条交叉法 .....	28
实验十 杀菌剂防治草莓白粉病——田间药效试验 .....	31
实验十一 除草剂的生物测定——平皿法 .....	35
实验十二 除草剂的生物测定——琼脂法 .....	38
实验十三 除草剂的生物测定——茎叶喷雾法 .....	41
实验十四 除草剂的生物测定——土壤喷雾法 .....	44
实验十五 除草剂的田间药效试验 .....	47
<b>第二单元 农药制剂的配制及质量检测</b> .....	51
实验一 农药质量检测 .....	53
实验二 农药辅助剂的作用和液体表面张力的测定 .....	56
实验三 烟剂和颗粒剂的制备 .....	59
实验四 石硫合剂的配制及质量检测 .....	61
实验五 波尔多液的配制及质量检测 .....	64
实验六 5%硫黄粉剂的制备及质量检测 .....	66
实验七 60%代森锌可湿性粉剂的制备及质量检测 .....	68
实验八 20%三唑酮乳油的配制及质量检测 .....	70

实验九	4.5%高效氯氰菊酯水乳剂的配制及质量检测	72
实验十	20%吡虫啉可溶性液剂的配制及质量检测	74
<b>第三单元</b>	<b>农药毒理与环境毒理</b>	<b>77</b>
实验一	昆虫乙酰胆碱酯酶的动力学测定及 $I_{50}$ 测定	79
实验二	昆虫体内解毒酶——酯酶同工酶的活性测定	83
实验三	杀菌剂对菌体细胞膜麦角甾醇合成的影响测定	86
实验四	杀菌剂对病原真菌琥珀酸脱氢酶活性的影响测定	88
实验五	除草剂作用症状的观察	90
实验六	除草剂诱导电解质漏出的测定	92
实验七	农药在土壤中的降解试验	94
实验八	农药对水生生物的安全性评价——急性毒性试验	97
<b>第四单元</b>	<b>农药残留分析</b>	<b>101</b>
实验一	速测卡法快速检测蔬菜样品中的农药残留	103
实验二	分光光度法快速检测蔬菜样品中的农药残留	105
实验三	气相色谱法测定牛乳中的有机磷类农药残留	108
实验四	固相萃取-高效液相色谱法测定蘑菇中的咪酰胺残留	111
实验五	水果和蔬菜中 450 种农药及相关化学品残留量测定 (GB/T 20769—2008)	114
<b>第五单元</b>	<b>实习与实训</b>	<b>119</b>
实验一	参观农药厂	121
实验二	参观农药销售环节	122
实验三	了解农药使用情况	123
<b>参考文献</b>		<b>124</b>
<b>附表</b>	<b>实验相关数值</b>	<b>125</b>
附表一	死亡率换算成概率值表	125
附表二	比重波美度折合表	125
附表三	石硫合剂重量倍数稀释表	126
附表四	石硫合剂容量倍数稀释表	127



# 第一单元

## 农药生物活性测定

杀虫剂生物测定(insecticide bioassay)是以昆虫(包括螨类)为测试对象,评价各种杀虫剂对昆虫的毒力。广义地说,杀虫剂生物测定技术就是利用生物(昆虫、螨类)对杀虫剂的反应,来鉴别某一种农药或化合物的生物活性,是评价杀虫剂对昆虫、螨类的毒力或药效的一种基本方法。毒力测定要求在室内采用标准化饲养的试虫和严格控制环境条件下进行。

生物测定技术在新型化合物的活性筛选与构效关系的研究、高效农药剂型的开发、杀虫剂间的联合作用、抗药性监测与检测、农药残留检测方面具有重要意义。

## 一、对供试昆虫的要求

标准试虫是指被普遍采用的具有一定代表性和经济意义的昆虫群体,群体中试虫的虫态、龄期、活力、耐药性等均匀一致。有一些昆虫种群数量大,发生相对集中,如蚜虫、螨类,从田间采集可以在数量上和质量上满足上述要求。但是大多数昆虫必须进行人工饲养,通过饲养条件的控制才能获得符合要求的目标昆虫。对田间害虫进行抗性监测或检测,要求从田间采集虫子,室内稳定一代,用 $F_1$ 代进行测定。

室内饲养的昆虫对药剂的耐受性较为一致,测得的结果可比性强。需要饲养的试虫要求室内容易饲养,繁殖力强,不互相残杀。一些鳞翅目幼虫可以用人工饲料饲养,但蚜虫、螨类一般用盆栽植物幼苗饲养。饲养条件需要控温控湿,光照充足,昼夜交替光照。

## 二、测试的环境条件

毒力测定一般多在室内进行。室内的温度、湿度、光照等环境条件对毒力测定结果有显著的影响,毒力测定时要求处理前、处理中、处理后的温度尽量保持一致,湿度恒定,光照强度因试虫不同而不同,光照应昼夜交替进行。另外,营养条件和虫口密度都可能影响毒力测定结果。测定时,要保证试虫营养,及时更换饲料;盛放试虫的器皿大小要适宜,试虫密度不能过大。

# 实验一 杀虫剂胃毒毒力测定——夹毒叶片法

胃毒作用是杀虫剂被昆虫取食后,经过口腔进入消化道,被消化道吸收进入血淋巴,最后到达作用靶标使昆虫中毒甚至死亡的作用。测定杀虫剂胃毒毒力时应避免杀虫剂接触昆虫体壁。

胃毒毒力测定方法主要有夹毒叶片法、液滴饲喂法和口腔注射法,其中以夹毒叶片法最为常用,其优点是将药剂封闭在两片叶片之间,昆虫只有取(啃)食才能接触药剂,避免了触杀等其他途径发生作用。

## 一、实验目的

(1)学习掌握杀虫剂胃毒毒力测定方法及统计分析方法,了解胃毒作用测定时应该注意的事项。

(2)通过实验了解一种杀虫剂是否具有胃毒作用及胃毒毒力的大小。

## 二、实验原理

用两张叶片,中间均匀地分布一层杀虫剂,饲喂试虫,按吞食叶片面积计算吞食药量。夹毒叶片法适于植食性、取食量大的咀嚼式口器昆虫,如鳞翅目幼虫、蝗虫、蜚蠊等。

## 三、试剂和仪器设备

(1)仪器用品:电子天平(感量 0.001 g)、微量注射器、直径 6 cm 培养皿、坐标纸、打孔器、砧板、镊子、新鲜淀粉糊(禁用化学糨糊和胶水)、圆滤纸片或棉花等。

(2)供试杀虫剂、试剂:高效氯氰菊酯原药、丙酮。

(3)供试昆虫及其饲料:棉铃虫 3 龄幼虫、甜菜夜蛾 3 龄幼虫或小菜蛾 4 龄幼虫任选,均为室内饲养的虫子。新鲜的试虫喜食的叶片,棉铃虫选用棉叶片,甜菜夜蛾选用甘蓝叶片或玉米叶片,小菜蛾选用甘蓝叶片。

## 四、实验步骤

### 1. 药剂的配制

根据实验需要称取一定量的高效氯氰菊酯原药,用丙酮溶解并稀释成所需要的浓度。

### 2. 夹毒叶片的制备

选择新鲜干净的叶片,用打孔器打取圆叶片 50~60 片,放在培养皿中保湿。用微量进样器吸取 10  $\mu\text{L}$  杀虫剂丙酮液,点滴到一片圆叶片上,迅速涂抹均匀,自然晾干。另取一片无药的圆叶片涂一层薄薄的淀粉糊,与涂药圆叶片对合,即成夹毒叶片。

### 3. 饲喂方法

胃毒试验前试虫应饥饿 3~5 h,最长不超过 12 h。在电子天平上逐头称重,放入培养皿中,每皿一头,编号,并标记虫重。饲喂时,一个皿中放入一片夹毒叶片。为了不使叶片干缩,在培养皿上盖内沾一片湿滤纸,用以保湿。置于(27 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度 70%条件下保存等观察结果。

### 4. 结果观察

观察昆虫取食,控制食叶量的多少,一部分幼虫取食叶片的 1/3 左右,一部分幼虫取食叶片的 1/2 左右,一部分幼虫取食叶片的大部分或全部。取出剩余的夹毒叶片,更换新鲜叶片。经 24 h、48 h 检查昆虫生存和死亡状况。

将取出的夹毒叶片放在坐标纸上,用放大镜或肉眼计算食去多少小方格(每个小方格面积为 1  $\text{mm}^2$ ),根据取食面积计算受药量( $\mu\text{g}/\text{g}$ )。最后将结果填写在表 1-1-1 内。

## 五、实验数据及其处理

根据每头试虫所食药量的多少,由少至多按次序排列,并注明生存或死亡状态(按照表 1-1-2 的格式)。根据幼虫的生死反应进行分组,可分生存组、生死组和死亡组。从第一头死虫开始,到最后头活虫结束,为生死组,其中既有生存的,也有死亡的。

中间生死组用于计算致死中量( $\text{LD}_{50}$ )。

表 1-1-1 高效氯氰菊酯对棉铃虫 3 龄幼虫的食药量反应

编号	昆虫体重 /g	食量		单位体重所接受 的药量/( $\mu\text{g/g}$ )	取食后经不同时间的反应	
		叶面积/ $\text{mm}^2$	药量/ $\mu\text{g}$		24 h	48 h

注：温度 \_\_\_\_\_  $^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度 \_\_\_\_\_ %。

$$A = \frac{\sum \text{生死组活虫剂量}}{\text{生死组活虫数}} \qquad B = \frac{\sum \text{生死组死虫剂量}}{\text{生死组死虫数}}$$

$$\text{LD}_{50} = \frac{A + B}{2}$$

表 1-1-2 某种杀虫剂对某种昆虫的胃毒毒力测定范例

 $\mu\text{g/g}$ 

剂量	反应	剂量	反应	剂量	反应	剂量	反应
0	生	0.24	生	0.35	生	0.5	生
0.11	生	0.25	死	0.36	死	0.55	死
0.12	生	0.25	死	0.37	生	0.6	生
0.13	生	0.26	生	0.37	死	0.65	死
0.15	生	0.27	生	0.38	死	0.67	死
0.17	生	0.28	死	0.38	死	0.7	死
0.18	生	0.29	死	0.39	生	0.74	死
0.19	生	0.3	生	0.4	生	0.75	死
0.19	生	0.31	死	0.41	生	0.8	死
0.2	死	0.32	死	0.42	死		
0.21	生	0.33	生	0.43	死		
0.22	死	0.33	生	0.44	生		
0.23	生	0.34	死	0.45	生		

根据表 1-1-2 结果可知:

$$A = \frac{0.21 + 0.23 + 0.24 + 0.26 \cdots + 0.6}{17} = 0.3576$$

$$B = \frac{0.20 + 0.22 + 0.25 + 0.28 \cdots + 0.55}{17} = 0.3346$$

$$\text{LD}_{50} = \frac{A+B}{2} = \frac{0.3576 + 0.3346}{2} = 0.3461$$

## 六、问题讨论或作业

- (1) 胃毒毒力测定的意义有哪些? 试验过程中应注意哪些事项?
- (2) 除了夹毒叶片法外, 还有哪些胃毒测定方法?
- (3) 实验报告。

## 实验二 杀虫剂触杀毒力测定——点滴法

杀虫剂触杀作用是指杀虫剂通过昆虫表皮进入昆虫体内,到达作用靶标,引起昆虫中毒死亡的作用。测定杀虫剂触杀作用时,要求杀虫剂只与试虫体壁接触,避免通过口腔等其他途径进入体内而发挥作用。点滴法是杀虫剂触杀毒力测定中最准确的方法,也是目前普遍采用的一种杀虫剂毒力测定方法。适合于大多数目标昆虫的触杀毒力测定,如蚜虫、鳞翅目幼虫、椿象等。

优点:①耗用样品少(毫克级);②每头虫体点滴量一定,可以准确地计算出每头试虫或每克虫体重的用药量;③方法比较精确,试验误差小;④可以避免胃毒作用的干扰。

缺点:①处理目标昆虫的数量不能太多;②操作技术难以掌握,点滴操作技术要熟练,否则对结果准确性影响较大。

### 一、实验目的

- (1)学习杀虫剂触杀作用及触杀毒力测定方法和毒力回归统计分析方法。
- (2)通过实验确定一种杀虫剂是否具有触杀作用以及触杀毒力的大小。

### 二、实验原理

具有触杀作用的杀虫剂可以通过昆虫体壁进入体内到达作用靶标,将一定剂量的药液点滴到供试昆虫体壁的一定部位,处理一定时间后,昆虫出现中毒症状甚至死亡,说明所试杀虫剂具有触杀作用。处理剂量不同,中毒程度或死亡率不同,剂量小死亡率低,剂量大死亡率高,因此可以绘制剂量-反应(死亡)曲线,以此计算毒力。

但是昆虫对杀虫剂的敏感性分布是一个偏常态分布,即昆虫的反应不是随着剂量的增加而成比例地增加,剂量-反应不是直线关系,而是一条不对称的“S”形曲线(图 1-2-1,左)。如果将剂量(或浓度)换算成对数,使偏常态分布变成正态分布,则不对称的“S”变成对称的“S”形曲线(图 1-2-1,右)。如果将死亡率换算成概率

值,则对称的“S”形曲线变为直线。一般生物测定时用5~6个剂量(浓度),以剂量对数为横坐标,每个剂量所对应的死亡率的概率值为纵坐标,可以绘制出一条直线LD-P线,即毒力回归直线(图1-2-2)。回归直线上,当 $y=5$ 时(死亡率为50%),所对应的 $X$ 即是 $LD_{50}$ 的对数, $X$ 的反对数即是 $LD_{50}$ 。这种统计方法称为概率值分析法(也称为Bliss法)。

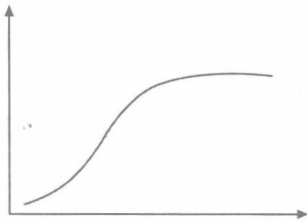


图 1-2-1 “S”形曲线

左:不对称 右:对称

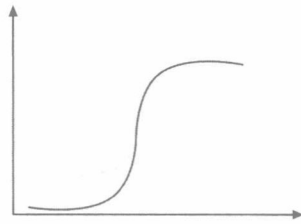


图 1-2-2 LD-P 线

采用 Excel、SAS 等统计软件进行计算,得到毒力回归方程和 $LD_{50}$ 值及其置信区间,进行 $\chi^2$  测验。

### 三、试剂和仪器设备

(1)仪器用品:电子天平(感量 0.1 mg)、微量注射器(可用 0.2~2.5  $\mu\text{L}$  移液器代替)、1~5 mL 移液器、直径 9 cm 培养皿、5 mL 小烧杯、直径 9 cm 滤纸、镊子、剪刀、棉花、记号笔等。

(2)供试药剂:高效氯氰菊酯原药(丙酮作为溶剂,用以配制高效氯氰菊酯溶液。触杀作用测定时所用的溶剂应具挥发性强,对药剂溶解度高的无毒物,丙酮是最常用的溶剂),试验浓度为 10、2.5、0.625、0.156、0.039、0.009 75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

(3)供试昆虫:小菜蛾 4 龄幼虫、甜菜夜蛾 3 龄幼虫或棉铃虫 3 龄幼虫。均在室内条件下饲养。

### 四、实验步骤

#### 1. 药剂配制

用电子天平(感量 0.1 mg)称取一定质量的高效氯氰菊酯原药,用丙酮溶解并



配制成  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  的药液,然后依次 4 倍量稀释成 2.5、0.625、0.156、0.039 和  $0.00975 \mu\text{g}/\text{mL}$  的丙酮液(注意,配制药液时,先配最高浓度,由高浓度向低浓度依次倍量稀释)。

## 2. 试虫称重

试验时,选取大小、活力一致的试虫作为测试对象。用镊子将试虫转移到培养皿中,每皿 10 头,共 3 皿。分别在电子天平上称重,去掉皿重,取单头平均值,即为本次实验试虫的平均体重,单位克(g)。

## 3. 处理方法

直径 9 cm 的培养皿皿底铺 3 层滤纸,用水湿润。然后将试虫移至皿中,每皿 10 头。

用微量注射器(或微量移液器)吸取药液点滴于试虫前胸背板上, $1 \mu\text{L}/\text{头}$ (从低到高,对照用丙酮),每个浓度重复 3 次,每个重复 10 头,共 30 头虫。处理后的培养皿中加入试虫饲料(人工饲料或者新鲜植物叶片),盖好皿盖,标记清楚,然后置于  $(27 \pm 2)^\circ\text{C}$  温度条件下饲养。24 h、48 h 后分别检查试验结果,检查时用镊子轻触虫体,虫体不动无生命迹象者即为死亡。

# 五、实验数据及其处理

将检查结果填入表 1-2-1 中。

用 Abbott's 公式计算死亡率和校正死亡率。

$$\text{死亡率} = \frac{\text{死亡数}}{\text{试虫数}} \times 100\%$$

$$\text{校正死亡率} = \frac{\text{处理组死亡率} - \text{对照组死亡率}}{1 - \text{对照组死亡率}} \times 100\%$$

如果对照组死亡率  $< 20\%$ ,实验结果可信,实验结果需进行校正;若对照死亡率  $< 5\%$ ,不必校正。

$$\text{单位体重受药量}(\mu\text{g}/\text{g}) = \frac{\text{处理浓度}(\mu\text{g}/\text{mL}) \times \text{点滴量}(\mu\text{L})}{\text{试虫平均体重}(\text{g}) \times 100}$$

将剂量转换成对数值,校正死亡率转换为概率值,统计分析求出  $\text{LD}_{50}$  值。