

中国植物病害 化学防治研究

(第七卷)

周明国 主编
刘西莉 刘 勇 陈长军 副主编

中国农业科学技术出版社

中国植物病害 化学防治研究

(第七卷)

周明国 主编
刘西莉 刘 勇 陈长军 副主编

中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

中国植物病害化学防治研究. 第7卷/周明国主编. —北京:
中国农业科学技术出版社, 2010. 10
ISBN 978-7-5116-0269-5

I. ①中… II. ①周… III. ①植物病害-药剂防治-研究-
中国 IV. ①S432

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 157497 号

责任编辑 冯凌云

责任校对 贾晓红

出版者 中国农业科学技术出版社

北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081

电 话 (010) 82109704 (发行部) (010) 82106630 (编辑室)
(010) 82109703 (读者服务部)

传 真 (010) 82106636

网 址 <http://www.castp.cn>

经 销 者 新华书店北京发行所

印 刷 者 北京富泰印刷有限责任公司

开 本 787 mm × 1 092 mm 1/16

印 张 24.5

字 数 614 千字

版 次 2010 年 10 月第 1 版 2010 年 10 月第 1 次印刷

定 价 60.00 元

——版权所有·翻印必究——

内容提要

本书编辑了中国植物病理学会化学防治专业委员会第七届中国植物病害化学防治学术研讨会交流的部分论文 91 篇。本书侧重报道了羧酸酰胺类 (CAAs)、甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂、麦角甾醇生物合成抑制剂、苯并咪唑类杀菌剂和二甲酰亚胺类等杀菌剂的生物学及其应用技术研究进展。特别是反映了最近国内重要农作物病害的化学防治新技术研究和病原菌的抗药性诊断和检测技术、抗药性分子机制、杀菌剂化学合成、生物农药及天然物农药的研究动态,大量报道了一些疑难植物病害和经济作物病害防治中存在的抗药性及其治理、药效分析、对环境和农产品质量的影响及促进作物健康生长等研究成果,充分反映了近两年来中国农药和植物病害化学防治研究的最新进展。该书对从事植物保护和农药学科教学、科研、技术推广和农药开发、生产和经营等科技工作者具有实用和参考价值。

《中国植物病害化学防治研究》

编 委 会

主 编 周明国

副主编 刘西莉 刘 勇 陈长军

编 委 (以姓氏拼音为序)

陈福如 陈绵才 高同春 郭井泉 李 明

李明立 梁桂梅 刘君丽 陆 凡 陆悦健

马忠华 区越富 时春喜 司乃国 宋玉立

王文桥 吴新平 徐大高 赵廷昌 周国义

周金玉

中国植物病理学会化学防治专业委员会 第三届委员会组成名单

主 任	周明国	南京农业大学植物保护学院
副 主 任	梁桂梅	全国农业技术推广服务中心
	吴新平	农业部农药检定所
	刘 勇	湖南省农业科学院植物保护研究所
	刘西莉	中国农业大学
委 员	陈福如	福建省农业科学院植保所
	陈绵才	海南省农业科学院植保所
	高同春	安徽省农业科学院植物保护研究所
	郭井泉	拜耳作物科学（中国）
	李 明	贵州大学农学院
	李明立	山东省植物保护总站
	陆 凡	江苏省农业科学院植物保护研究所
	陆悦健	巴斯夫（中国）有限公司
	马忠华	浙江大学生物技术研究所
	区越富	先正达（中国）投资有限公司
	宋玉立	河南省农业科学院植物保护研究所
	王文桥	河北省农林科学院植物保护研究所
	时春喜	西北农林科技大学植物保护学院
	司乃国	沈阳化工研究院农药生物测定中心
	徐大高	华南农业大学资源环境学院
	赵廷昌	中国农业科学院植物保护研究所
	周国义	江苏省农药检定所
	周金玉	云南省植物保护总站
秘 书	陈长军	南京农业大学植物保护学院

前 言

中国植物病理学会化学防治专业委员会自 1998 年成立以来,已经先后举办了七次全国学术研讨会和多次小型学术活动,开展了有关的科普宣传、科学考察和咨询服务,编辑出版了七卷《中国植物病害化学防治研究》论文集。这为我国广大植物病害防治科技工作者,特别是常年奋战在基层的科技工作者提供了学术交流、展示科研成果的舞台,为推动和促进我国植物病害化学防治科技进步发挥了积极作用。本书汇编了参加第七届中国植物病害化学防治学术研讨会的部分论文,反映了近两年来我国农药化工和植物保护科技工作者最新的科研成果。

随着人民生活水平的提高和科技进步,人们把追求粮食和食品生产数量放在首位的传统观念正在改变,农用化学品在食品中残留的问题越来越受到人们的重视,“无公害食品”、“绿色食品”、“有机食品”正在成为追求的目标。但是,我们应该清醒地认识到农用化学品不仅在保证生产足够数量的粮食和食品,满足不断增加的人口对食品的需求方面发挥了不可替代的巨大作用,而且科学使用农用化学品还能够改善和提高农产品的质量。众所周知,罹病的农产品往往伴随品质下降,有的还因为病原微生物产生毒素而导致食用后的中毒事故。大量研究已经证明科学使用一些新型高效、低毒、低残留的杀菌剂等,除了能有效防治多种植物病害、减少产量损失以外,还能够调节植物生长、延缓植物衰老、增强光合作用、提高农产品的品质。毫无疑问,如果滥用农用化学品,不仅会因为高残留造成粮食和食品质量安全问题,也会因为抑制作物生长甚至破坏农业可持续发展的生态环境,最终导致农产品的产量下降。因此,本次会议提出的主题是:杀菌剂与作物健康和食品安全。

中国植物病理学会在本次会议的筹备过程中给予了多方面的支持和指导,海南省农业科学院在筹备和承办这次会议中,克服了特大洪涝灾害的影响,为会议的成功召开付出了辛勤劳动,在此一并致谢。

本书的编者和审稿人员仔细阅读了全部来稿,并对部分论文进行了删减和修改,部分论文由于内容不符合本次会议要求或其他原因未能录用,敬请谅解。由于时间仓促,书中仍然存在不少疏漏和错误,望读者和作者批评指正。

周明国
2010 年 10 月

目 录

杀菌剂毒力及毒力测定	周明国 (1)
杂环杀菌剂的研究进展	李 凝等 (9)
链霉素在农业上的应用及其抗药性机制研究进展	徐 颖 (20)
保护地蔬菜土传病害的发生及防治	赵 杰等 (30)
禾谷镰刀菌毒素合成的分子机制及检测方法的研究进展	周立邦等 (35)
小麦赤霉病防治现状	侯毅平等 (42)
浅谈杀菌剂剂型的发展趋势	王丽颖等 (48)
对实现农药可持续使用的思考	钱忠海等 (53)
油菜菌核病化学防治研究进展	段亚冰等 (56)
生防菌的筛选及对水稻病害的防治作用	张 芬等 (63)
水稻白叶枯病菌总蛋白的提取、纯化及双向电泳图谱的建立	徐 曙等 (70)
15% 井冈·丙环唑 WP 防治水稻纹枯病田间药效试验	汪永祥 (75)
七种杀菌剂对水稻稻瘟病菌的毒力研究	唐正合等 (78)
25% 丙环唑乳油防治水稻纹枯病田间药效试验	唐正合等 (82)
福建省稻瘟病菌的致病型及其对稻瘟灵的敏感性研究	杜宜新等 (84)
水稻纹枯病菌对井冈霉素的抗性检测	张绍亮等 (86)
Benzimidazole Resistance of <i>Gibberella zeae</i> Conferred by Site-Directed	
Mutagenesis of Its β_1 -tubulin	Yu Jun-jie et al. (88)
氰烯菌酯对禾谷镰孢菌分生孢子萌发及菌体呼吸作用的影响	陈 雨等 (102)
抗多菌灵 β 微管蛋白基因转化禾谷镰孢菌的研究	刘圣明等 (111)
2010 年江苏省小麦赤霉病流行特征	仇剑波等 (117)
Moddus 控制小麦倒伏技术研究	郝平顺 (123)
爱秀对小麦白粉病预防和治疗活性研究	黄正银 (127)
300g/L 丙环唑-苯醚甲环唑 (爱苗) 防治小麦纹枯病技术研究	王合松 (131)
几种杀菌剂对小麦全蚀菌的室内毒力测定	杨共强等 (134)
Distribution of Baseline Sensitivities to Dimethomorph Among Isolates of <i>Pseudoperonospora</i>	
<i>cubensis</i> and Resistance Monitoring in the Field in China	Hancheng Wang et al. (137)
Assessment of Alternatives of Benzimidazole Fungicides for Management of	
Tomato Leaf Mould Caused by <i>Cladosporium fulvum</i>	C. Q. Zhang et al. (150)
植物提取液对甜瓜枯萎病的抑菌活性及种子萌发的影响	赵 杰 (160)
有机硅表面活性剂对苯醚甲环唑防治黄瓜白粉病的增效作用	孟润杰等 (168)
75% 肟菌酯·戊唑醇 (NATIVO) 田间防治番茄脐腐病作用初探	宋晓磊等 (173)
乙嘧酚防治黄瓜白粉病的应用效果	于春雷等 (177)

山西省黄瓜主要病害病原菌抗药性现状及原因分析	赵晓军等 (181)
8 种杀菌剂对甜瓜黑斑病菌的毒力测定	周超英等 (185)
几种杀菌剂对瓜类炭疽病菌的室内毒力测定	王会芳等 (192)
多菌灵与咪鲜胺复配对西瓜炭疽病菌的室内毒力及田间防效	韩秀英等 (199)
黄瓜褐斑病菌 [<i>Corynespora cassicola</i> (B. & C.) Wei] 对噁霉胺抗药性研究	祁之秋等 (203)
马铃薯/番茄晚疫病病菌抗药性检测技术	王文桥 (207)
多菌灵和吡唑醚菌酯对两种辣椒炭疽病菌联合毒力的测定	林琳等 (215)
胡萝卜土传病害综合防治技术	樊平声等 (220)
番茄-辣椒细菌性疮痂病菌对硫酸链霉素和硫酸铜的敏感性研究	陈新等 (223)
几种杀菌剂对辣椒疫霉的毒力测定及应用分析	郝永娟等 (226)
几种杀菌剂对辣椒疫霉菌的室内毒力测定	赵卫松等 (230)
几种杀菌剂对茄子灰霉病菌室内抑制效果试验	杨华等 (234)
辣椒疫病拮抗菌的分离与筛选	刘永锋等 (238)
两种生物菌肥对辣椒苗期生长及土传病害发生的影响	齐永志等 (244)
咯菌腈对番茄灰霉病菌的抑菌作用	赵建江等 (249)
农用表面活性剂对加工番茄病害药剂的增效作用	王林霞等 (255)
啶菌噁唑与 3 种杀菌剂混配对灰葡萄孢菌的毒力增效作用	陈治芳等 (260)
20% 烯肟菌胺·戊唑醇悬浮剂防治苹果病害应用研究	兰杰等 (265)
苹果褐斑病化学防治技术田间试验研究	时春喜等 (271)
瑞凡 25% 悬浮剂防治葡萄霜霉病田间药效试验	施楚新 (275)
21 种杀菌剂对人参菌核病菌和人参立枯病菌的室内毒力测定	崔丽丽等 (278)
基于侵染特性的山核桃干腐病防治技术	张传清等 (279)
几种杀菌剂防治槟榔炭疽病的效果评价	肖彤斌等 (285)
烟雾机防治油菜菌核病的效果考察	林邦宜等 (289)
Mandipropamid Effectiveness during the Various Development Stages of <i>Phytophthora nicotiano</i> in vitro	汪汉成等 (293)
烟草黑胫病菌对甲霜灵的抗性风险及其控制	段海明等 (294)
异菌脉对烟草赤星病的室内生测及药效评价	施永平等 (303)
新型杀菌剂苯并咪唑啉铜室内抑菌活性测定	俞文渊等 (308)
新型杀菌剂硝苯菌酯的作用特性及应用技术研究	余晔等 (313)
Antifungal Activity of Several Botanical Compounds Against Several Plant Pathogens in vitro	ZHU Zhi-feng et al. (317)
几种不同类型杀菌剂对食用菌杂菌绿色木霉的毒力测定	王勇等 (322)
创制杀菌剂氰烯菌酯产品介绍	刁亚梅等 (325)
辣椒根腐病的发生特点与防治措施	祁之秋等 (329)
柑橘绿霉菌 (<i>Penicillium digitatum</i>) 对抑霉唑抗性机制的研究	孙学鹏等 (331)

Fungicidal Activity of Propiconazole to *Rhizoctonia solani* and Its Use on Rice

.....	TANG Zheng-he et al.	(333)
江苏省油菜菌核病菌对多菌灵、菌核净的抗药性监测	匡 静等	(334)
柑橘绿霉菌对杀菌剂氟咯菌腈抗性分子机制	陈昌胜等	(336)
新型杀菌剂苯并咪唑喹啉铜对禾谷镰孢菌的活性初探	俞文渊等	(338)
大豆疫霉对 9 种不同作用机制杀菌剂的敏感性	蔡 萌等	(339)
异源表达 MfCYP51 验证 <i>Monilinia fruticola</i> 对啉菌恶唑的抗性机制	王景元等	(340)
桃褐腐病菌对啉菌恶唑的抗性机制研究	陈凤平等	(341)
我国植物保护的宏观策略与农业操作	邓玉洁等	(342)
稻瘟病菌对烯肟菌胺的抗性风险评估及抗性分子机制初探	吴隆起等	(347)
几种生产上常用水稻稻曲病防治药剂药效的比较研究	刘连盟等	(348)
水稻恶苗病菌对 DMIs 杀菌剂的抗性检测	范洁茹等	(349)
水稻纹枯病菌对噻呋酰胺的室内抗性风险评估	牟文君等	(350)
A Real-time PCR Assay with Cycling Fluorescent Probe for Detection of Carbendazim		
Resistance in <i>Fusarium graminearum</i>	Hou Yi-ping et al.	(351)
水稻白叶枯病菌链霉素田间抗性菌株抗药性机制研究	徐 颖等	(352)
<i>FgERG24B</i> 基因编码的甾醇 C-14 还原酶控制禾谷镰刀菌对胺类杀菌剂的敏感性		
.....	刘 馨等	(353)
不同小麦品种上赤霉菌对多菌灵的敏感性测定	杨 洋等	(354)
禾谷镰刀菌 <i>veA</i> 基因的功能研究	周立邦等	(357)
辣椒疫霉病菌对丁吡吗啉的敏感基线建立	庞智黎等	(358)
江苏省西瓜枯萎病菌对多菌灵、咪鲜胺和苯醚甲环唑的敏感性检测	孙海燕等	(359)
辣椒疫霉对苯酰菌胺的室内抗性风险评估	毕 扬等	(360)
辣椒疫霉对甲霜灵的抗性检测及抗性菌株的生物学性状研究	胡 健等	(361)
辣椒疫霉对烯酰吗啉和双炔酰菌胺的抗药性研究	贾晓静等	(362)
辣椒疫霉对异丙菌胺和双炔酰菌胺的抗性遗传研究	王 茜等	(363)
禾谷镰孢菌对多菌灵抗性的分子机理	毕朝位等	(364)
禾谷镰孢菌两个 β -微管蛋白对多菌灵的敏感性差异	毕朝位等	(366)
荔枝霜疫霉不同发育阶段对 6 种创制性 QoI 杀菌剂的敏感性	周俞辛等	(368)
六种不同杀菌剂对致病疫霉不同发育阶段的影响	肖 露等	(369)
浙江衢州地区柑橘绿霉菌对抑霉唑和多菌灵的抗性及其抗性分子机制的		
研究	冯 丹等	(370)
高抗多菌灵番茄灰霉病菌株对其他杀菌剂的敏感性	杨晓楠等	(373)

杀菌剂毒力及毒力测定

周明国

(南京农业大学植物保护学院, 江苏南京 210095)

杀菌剂毒力是化合物具有开发和应用价值的基本生物学性质和体现杀菌剂生物活性的重要参数, 杀菌剂毒力测定则是新型杀菌剂开发和评价的重要研究内容之一。本文拟对杀菌剂毒力及生物测定的基本理论、原理及研究技术进行简要综述, 予以交流。

1 杀菌剂毒力

1.1 杀菌剂毒力的定义

Anon (1943) 最早给出了杀菌剂毒力的定义: 一种化合物通过生理化学方式对某种真菌生命功能进行反向的干扰能力。随着不同作用方式的新型杀菌剂开发应用, 我们可以完善杀菌剂毒力的定义为“一种化合物通过生物化学方式对某种病原菌生命功能进行反向干扰的能力或通过寄主—病原物—环境的互作防治植物病害的效力”。通常所说的杀菌剂毒力是指对病原菌的直接作用, 只有那些对病原菌没有直接作用的杀菌剂毒力才考虑防治植物病害的效力。杀菌剂的毒力实际上是其化学分子与靶标病原菌的受体分子相互作用的结果。多数情况下药剂与靶标的互作极为精致, 只要药剂分子结构发生轻微改变, 甚至是手性结构变化也很可能引起与受体分子互作的改变, 从而表现毒力变化。同样, 药剂的受体分子尤其是与药剂互作的结构域发生遗传变异, 甚至是靶标基因的单核苷酸或受体蛋白的单个氨基酸变化也会显著改变病原菌对药剂的敏感性。因此, 杀菌剂毒力属于一种化合物对某种病原菌活性的固有性质。基于这种理论, 以提高化合物活性的药剂分子结构优化和杀菌剂毒力参数分别成为农药研发单位和农药登记部门研究和注册的重要内容和依据之一。

1.2 杀菌剂的毒力与分子结构的关系

大多数情况下, 杀菌剂分子结构上必须同时具有毒力基团和辅助基团或成型基团。毒力基团是指杀菌剂分子结构上与作用的分子靶标发生亲和互作的部分, 毒力基团与精细结构的受体分子互作的亲和性是杀菌剂毒力的决定性因素, 往往具有质量性状的生物学性质。一般情况下, 具有相同毒力基团的杀菌剂具有相同的作用机理, 常常归属一类, 如多菌灵、苯菌灵和硫菌灵等分子含有或经过生物转化形成苯并咪唑基团的杀菌剂都称为苯并咪唑类杀菌剂; 氯苯嘧啶醇、咪鲜胺、己唑醇、噻胺灵等含有 N 杂环结构, 并作用于细胞色素 P_{450} 加单氧酶 ($C_{14}\alpha$ -脱甲基酶) 的杀菌剂都称为麦角甾醇生物合成抑制剂。辅助基团或成型基团是利于杀菌剂分子到达作用靶标发挥作用的分子部分。辅助基团决定药剂到达作用位点的途径、速度和数量, 往往具有数量性状的生物学性质。有些分子结构比较简单的杀菌剂, 毒力基团也同时具有辅助基团的生物学性质。杀菌剂分子要到达作用靶标的部位需要通过菌体亲脂性的细胞壁和双分子层的生物膜, 用于处理植物的杀菌剂还需要通过疏水性的叶面角质层、蜡质层或根部处理需要通过疏水性很强的内皮层凯氏带等障碍, 这就需要杀菌剂分子具有较强的非极性和适当的极性。药剂的非极性和极性分配以脂/水系数 (辛醇—水分配系数) $\log K_{ow}$ 值表示。改变辅助基团可以改善杀菌剂分子的脂/水系数, 在一定范围内增加药

剂分子的脂溶性有利于提高活性。一般情况下,对卵菌表现高活性的杀菌剂脂/水系数小于对子囊菌、半知菌和担子菌表现高活性的杀菌剂,因为卵菌的细胞壁主要成分是非极性相对较低的纤维素,而高等真菌的细胞壁主要组分是非极性很强的几丁质。药剂的脂水系数与其电离常数及介质中的二价阳离子对药剂的内吸输导性能具有决定性作用。

1.3 杀菌剂的毒力行为

杀菌剂对病原菌表现的直接毒力是其对病原菌生命活动干扰的总体效应。通常包括形态效应和生化效应。形态效应包括抑制孢子萌发、菌丝生长、附着胞和各种子实体的形成,及导致细胞膨胀、原生质体液化、线粒体瓦解以及细胞壁和细胞膜的破坏等。生化效应包括呼吸强度下降、几丁质、蛋白质、脂类、核酸、激素、维生素和其他维持细胞结构和生命活动必须物质的生物合成量减少等。

杀菌剂对病原菌表现的间接毒力是其对“病原菌—寄主”在一定环境条件下互作干扰的总体效应。通常以对病害发生度的抑制作用作为毒力效应的评价参数。

因为不同的化合物对病原菌的作用机制不同,所以无法依据对某一指标的效应对各种化合物进行正确的毒力评价。只有选择适合于某种化合物的效应指标如对形态效应,或生化效应,或防治病害的效力进行毒力测定,才能客观评价和比较不同化合物的毒力。因此,在实践中测定抑制呼吸作用和抑制生物合成的混剂毒力,或测定其他不同作用方式的杀菌剂混剂毒力时,应该考虑采用不同的毒力测定方法进行综合评价。

1.4 杀菌剂的毒力作用

杀菌剂的毒力作用包括杀菌剂作用(Fungicidal action)和抑(静)菌作用(Fungistatic action)。前者是指病原菌不仅在杀菌剂处理的条件下停止生命活动,而且在脱离药剂后也不能恢复生命活动,即杀菌剂对病原菌的毒力是一种永久性作用。后者是指病原菌在杀菌剂处理下虽然停止了生命活动,但脱离药剂后能够恢复生命活动,即杀菌剂对病原菌的毒力是一种暂时性作用。虽然杀菌剂的毒力作用是由化合物本身的性质决定的,但是杀菌剂的杀菌作用和抑菌作用在很多情况下也是相对的,与使用浓度及作用时间的长短密切相关。例如,一些含铜、汞等重金属的杀菌剂、二硫代氨基甲酸酯/盐类的福美双、代森锰锌等杀菌剂对真菌的毒力主要表现为杀菌作用,但降低药剂处理浓度或缩短处理时间也可能会表现抑菌作用。相反,大多数现代选择性杀菌剂如苯并咪唑类的多菌灵等、三唑类的戊唑醇等一般认为是抑菌作用,但如果提高处理浓度和延长处理时间,也会因生命必须物质的耗尽而表现杀菌作用。当然,也有一些具有抑菌作用的现代选择性杀菌剂的处理浓度提高100倍以上也不表现杀菌作用,如氰烯菌酯对小麦赤霉病原菌和速克灵对番茄早疫病病原菌的毒力作用。

随着新概念抗菌化合物的发展,一些新型杀菌剂对病原菌既没有直接的杀菌作用,也没有直接的抑菌作用。但是他们可以通过影响寄主植物的代谢,使植物产生抗病性物质从而抑制或杀死病原菌,间接地对病原菌产生毒力。或者通过干扰病原菌与寄主的相互识别,达到防治植物病害的目标。这类仅在寄主上才表现抗菌活性的杀菌剂又称为间接作用杀菌剂。间接作用的杀菌剂作用机制目前研究得还不够细致,认为他们具有诱导寄主的免疫功能还缺乏确切的证据。但是随着大量研究的深入,越来越多的证据表明这类化合物很可能是通过干扰病原菌的致病因子或寄主的受体、或调节病原菌或寄主的信号传导系统、或调节基因沉默及激活的机制而发挥作用的。

2 杀菌剂毒力测定

2.1 杀菌剂毒力测定的常见方法

杀菌剂毒力测定是杀菌剂的一种生物测定。测定杀菌剂毒力的方法有多种多样,但总体上可以分成两种类型。一是离体毒力测定方法,即用药剂直接处理病原菌或病原菌在含药基质上培养,测定药剂对病原菌生长发育的影响。这种方法只考虑药剂与靶标病原生物的相互作用,排除了环境条件的影响,测定的药剂毒力体现了化合物对病原菌的直接作用。二是活体毒力测定方法,即将病原菌接种到药剂处理过的植物体,在适宜发病条件下培养,测定药剂对病害发生的抑制作用。这种方法考虑了药剂—病原物—寄主之间的相互作用,测定的杀菌剂毒力是对病原菌的间接作用。离体毒力测定又可以分为针对抑制孢子萌发和菌体生长的形态效应测定及针对分子靶标和生理生化指标的效应测定。孢子萌发法是杀菌剂离体毒力测定的传统方法,20世纪50~60年代以前有许多文献研究了孢子萌发法测定和评价杀菌剂毒力的方法。随着现代选择性杀菌剂的诞生和病原物抗药性问题的出现,杀菌剂的毒力测定及病原菌对杀菌剂的敏感性测定方法更多地是基于对菌体生长所需物质的生物合成抑制而产生的菌体生长抑制效应,包括药剂对菌丝的线性生长、干重增加、细胞分裂指数(浊度)的抑制作用等。随着现代生物技术的快速发展,测定杀菌剂与体外表达纯化的药剂分子靶标的亲和性,或对靶标生物学功能的抑制活性,正在成为新型杀菌剂高通量筛选和毒力评价技术的研究热点。

在室内的离体毒力测定,能够在较小的空间内测定和比较多种药剂的毒力,测定条件容易控制,结果能够反映化合物本身的绝对毒力大小,重复性好和可比性强,所以常常被指定为大多数杀菌剂的毒力测定方法。活体毒力测定包括用药处理植物部分器官或组织后接种和处理盆栽小苗后接种对病害发生严重度的抑制效应。病害严重度的记载常常从无病至全部发病划分5~6个相等间隔空间或梯度的病级。Horsfall-Barratt早期建立的病害严重度分级系统则是根据肉眼可辨的对数差异等级从0~11分成12个病级。分别代表发病率或病斑占叶片面积的0%、0%~3%、3%~6%、6%~12%、12%~25%、25%~50%、50%~75%、75%~87%、87%~93%、93%~96%、96%~100%。事实上,病害发生严重度的分级标准应该依据不同病害的经济危害性进行区别分级,如草莓等浆果一旦发病则可能完全失去可用价值。活体毒力测定引入了寄主植物及可能的环境影响因子,其结果的重复性取决于测试条件的控制,不同条件下测定的结果可比性差,但是测定的杀菌剂毒力更接近于应用的实际效果,应用价值较高。

杀菌剂毒力测定还常常依据药剂的作用机制或用途采用其他适当的测定方法。如用药剂处理病斑后培养一段时间,计数分生孢子的数量,测定其抗产孢的毒力;或在密闭的空间里培养病原菌,让其接触药剂挥发性气体,测定药剂的熏蒸毒力等。

2.2 杀菌剂毒力测定的意义

通过杀菌剂毒力测定,可以在人为控制的条件下研究田间可能影响药剂毒力的因素,如光照、温度、雨水、酸碱度等。通过在植物器官、组织、小苗上的毒力测定,可以评价杀菌剂的保护和治疗作用及内吸、输导性能。通过杀菌剂的毒力测定还可以评价其在植物表面的沉积和持效性及其残留活性,预测和评估其在自然界的行。通过测定药剂在病原菌不同发育阶段的毒力作用,可以指导防治病害的用药时间等。

然而,在室内筛选获得的有活性化合物不一定就可以开发为田间有效的杀菌剂。因为室

内测定接种孢子悬浮液时,其中的水能够使病原菌和药剂直接接触,而自然界的一些真菌孢子通过气流传播到叶面,无须液态水即可萌发侵入,接触药剂的概率较低。因此,能够获得成功的杀菌剂,应该在植物表面具有良好的扩散性能,特别是可以通过挥发或渗透作用扩散,增加接触病原菌的概率。室内测定的杀菌剂毒力是药剂对病原菌的直接作用,而在自然界使用还受药剂的有效沉积、植物代谢、光解、雨水冲刷、微生物降解、有机质的吸附钝化等药剂与寄主—环境—病原互作的影响。因此,成功的杀菌剂应该具有理想的理化性能。通过受体分子与药剂的亲合性测定获得的高效杀菌剂,也不一定对病原菌的生长发育表现毒力。因为药剂处理病原菌需要通过细胞壁和细胞膜才能达到发挥毒力的场所,而且还可能在传导和扩散过程中与植物的木质素、菌体细胞质中的脂质、蛋白质、酶等发生反应而被储存、钝化和降解。因此,成功的杀菌剂还应该具备良好的生物学性状。也正因为这些原因,至今还没有针对分子受体/靶标设计杀菌剂的成功事例。

2.3 杀菌剂毒力测定应该注意的问题

绝大多数杀菌剂的毒力表型不外乎两种效应之一。质量效应如处理的真菌孢子萌发或不萌发,或数量效应如处理的菌体生长快慢或酶促反应等生化指标的强弱。因此,在测定杀菌剂毒力时应该首先考虑该药剂的毒力表型,选择合适的毒力测定方法。一般抑制能量合成的杀菌剂具有抑制孢子萌发的质量性状,孢子萌发较呼吸强度及菌体生长对能量抑制剂更为敏感。

培养基常常也会影响杀菌剂毒力测定的结果。用孢子萌发法测定杀菌剂毒力时,一般需要对照的孢子萌发率能够达到95%以上,测定的结果才有较高的可靠性。配制孢子悬浮液或稀释药液时最好不要使用蒸馏水或去离子水,因为自来水中的矿质往往有助于孢子萌发。对于一些孢子萌发率较低的真菌,为了提高对照处理的孢子萌发率,确保实验结果的可靠性,常常在孢子悬浮液中加入1%的葡萄糖或橘子汁。用生长速率法测定杀菌剂的毒力时还应该考虑药剂的作用方式,采用合适的培养基配方。如已知可醇解糖对QoI类杀菌剂毒力有颉颃作用,所以常常采用甘油作为培养基碳源,磷酸根离子对烷基亚磷酸盐类杀菌剂毒力有颉颃作用,所以应该采用不含磷酸根的合成培养基测定乙磷铝的毒力。一些离子型的杀菌剂毒力测定时还要考虑培养基的酸碱度,防止药剂活性的钝化。

病原物群体中的遗传差异决定了不同个体对药剂的敏感性差异,病原群体对药剂表现相同效应的敏感性分布往往呈正态分布。正态分布曲线下面积反映了病原菌群体中在不同药剂剂量下产生相同效应的比例,说明群体中绝大多数个体的敏感性相似处于中等。只有少数比较敏感或耐药。当然,也可能存在频率极低的个别突变体而表现对药剂的抗性或超敏感,也可能因为与已用杀菌剂存在交互抗药性而对测定的药剂表现不敏感。因此,在测定杀菌剂毒力时应该选择有代表性的菌株作为实验材料,防止采用超敏感菌株或抗药性菌株,即毒力测定的菌株应该包含在野生型敏感群体一定变异的范围之内,最好是经过单细胞分离纯化和遗传稳定、表现中等敏感性的菌株。菌龄可能增加或减少病原菌对药剂的敏感性。一般来说,生长旺盛的菌体对药剂比较敏感,例如在一周内连续测定酵母对克菌丹的敏感性,每天转接测定发现 ED_{50} 从周一至周四依次降低为0.35 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 、0.29 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 、0.27 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 、0.25 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 干重。因为,周一接种体中老化的母细胞群体比例最高,周四是最底的。

杀菌剂毒力测定时的处理剂量或浓度设置,理论上应该在其产生0%~100%效应的范围内,但是,考虑到不同剂量效应变化的速率,最好在产生5%~95%的效应范围内设置至少5个剂量。以其毒力与剂量变化的效应关系,常按等差或倍量或对数的梯度设置处理

剂量。

由于大多数有活性的杀菌剂是难溶性化合物，而不溶解的杀菌剂一般不能发挥毒力作用。因此应该选择适当的溶剂将药剂溶解，再与培养基质混合进行毒力测定。有的药剂在水中的溶解度极低，高剂量或高浓度的药剂溶液与培养基质混合后很可能形成不能发挥活性的结晶。这也是我们在测定杀菌剂毒力时常常发现病原群体敏感性分布曲线偏向剂量较高一侧的主要原因。尽管随着菌体生长和培养基质中溶解的药剂被吸收而促进结晶体或未溶解的药剂逐步溶解，但是其作用的剂量无法估计。因此，配制药液的溶剂及设置的毒力测定剂量范围会影响毒力测定的结果。一般选择溶解度高、具有极性而能与培养基质相容的有机溶剂配制药液，并尽可能多地加大溶剂用量。但是必须防止溶剂对测定病原菌产生过高毒力和对作物产生药害，并应设置溶剂处理做对照。

在采用毒力测定的方法测定药剂的治疗和传导性能时，应该根据实际情况考虑药剂施用位点至病原菌侵入位点的行为。药剂处理位点与接种位点不一致时需要考虑药剂的传导时间。一般温室里对作物小苗根部处理，测定对地上部位的保护作用，需要在药剂处理 24h 后接种。测定治疗作用则在接种后 24h 施药处理。大部分内吸性杀菌剂的输导方向是向顶性的，其输导速度与蒸腾作用及作物茎秆的木质化程度密切相关。在阴雨天气、作物较高大、茎基部木质化程度高、药剂脂水系数大的情况下，应该适当延长药剂根部处理与地上接种的间隔时间。同时还要考虑接种病原菌的量及其生长扩展速度，防止药剂到达某位点之前病原菌已经到达并侵入为害。

2.4 杀菌剂毒力分析

2.4.1 剂量反应曲线 (Dosage-Response Curves)

以剂量反应曲线评估杀菌剂毒力需要将原始的数据资料进行处理，得到线性曲线才能进行分析。对杀菌剂的剂量进行对数转换，消除曲线的 *s*-形态组分。Horsfall 称此为递减率规律 (the law of diminishing returns)，就是说随着剂量增加，药剂对病原菌的效应越来越小。因此，生物学效应的变化在数学上是随处理剂量的对数变化而变化的。当分级的效应数据与剂量对数作曲线，则形成 *s* 形曲线。该曲线的中间部分可用来该曲线的线性表达。然而，以孢子萌发抑制率相对于剂量对数作出的 *S* 曲线，其中间部分是非线性的。这种 *S* 曲线对于大多生物现象来说，是真菌对药剂敏感性的频率正态分布变化。Bliss (1957) 将这种对称性的 *S* 曲线定义为累加性正态分布。就是说只有少数孢子对药剂特别敏感或抗性，大多数属于中等。因此，增加药剂剂量，对每个孢子的影响是一致的。某剂量抑制孢子萌发的百分率也代表着该剂量抑制某一个孢子的概率。Bliss 还发现如果所有孢子对药剂的反应概率是呈正态分布的话，将这些数值作点，就完全可以作出直线。孢子萌发抑制率可以通过直接在对数—概率图纸上作点，获得真菌反应的概率和药剂的剂量对数之间的相互关系。

2.4.2 毒力指数 (Index of Fungitoxicity)

从剂量反应曲线可以求出毒力指数。等量效应的杀菌剂剂量，如 ED_{50} 或 ED_{95} ，常用于表示杀菌剂的毒力。尽管杀菌剂的最低抑制浓度 MIC 值 (杀死群体 100% 的最低浓度) 能够获得化学防治的理想效果，但是群体中个体的敏感性是不同的，总有一些是比较耐药的，实际上不可能杀死 100% 的病原物。随着对病原物的效应增加，杀菌剂的用量则是以对数级别增加。因此，应该根据病害或病原菌的危害性，确定可采用的、经济的毒力指数。

从防治效果看，毒力指数 ED_{95} 比 ED_{50} 更有价值。但在条件可以控制的室内毒力测定中常用 ED_{50} 作为毒力比较的参数，这不仅因为与 ED_{95} 相比，以较少的工作量和较少的原药材

料就可以得到 ED_{50} 值, 而且还因为在 ED_{50} 处理剂量下, 杀菌剂在培养基中的溶解度高, 并基本都可以被菌体吸收而发挥作用, 所以 ED_{50} 具有更高的可信度。在杀菌剂活性低而处理浓度较高的情况下, 杀菌剂在培养基中会有一部分处于不能发挥活性的非溶解态, 虽然随着在细胞生理作用下对药剂的不断降解或钝化, 菌体细胞从培养基中对药剂的吸收补充而增加培养基中非溶解态的药剂溶解, 但是这种发挥活性的动态剂量无法确定和比较, 特别是在比较活性差异很大以致设置的试验剂量水平不同情况下的杀菌剂毒力时, 用 ED_{95} 或 MIC 值为毒力参数可靠性更低。

为了满足人们对降低农药在自然界释放量的要求, 活性更高的新型杀菌剂成为研发的目标。因此, 评价新型杀菌剂的毒力应该计算相对毒力指数, 与已有的标准杀菌剂毒力进行比较。相对毒力指数 (T) = 标准药剂毒力指数 (B) / 测定的药剂毒力指数 (A)。当 $T > 1$ 时, 说明测定的药剂活性高于现有的标准药剂, $T < 1$ 时, 则说明测定的药剂毒力活性低于现有标准药剂。

2.4.3 斜率 (Slope)

剂量反应曲线的斜率是病原菌对相应药剂剂量变化的反应速率, 同时也体现了药剂在剂量变化条件下的效价。更准确地说, 在孢子萌发测定中斜率是每剂量对数单位的抑制概率。因此, 斜率也是杀菌剂本身的固有特性, 随药剂而异。斜率可以完善 ED_{50} 值对药剂毒力的评价。在比较剂量反应曲线斜率差异很大的杀菌剂毒力时, 应该考虑曲率对毒力指数的影响。

斜率的坡度受测定的真菌、试验条件和药剂的影响。一种真菌对不同药剂的效应斜率不同, 不同真菌对同种药剂的效应斜率也不同。同种真菌对同一药剂的效应斜率也会因测定条件而异。幼孢子比老孢子对药剂的效应斜率高; pH 及其他任何利于孢子萌发和生长的因子都有利于剂量反应曲线斜率增加。接种量一般对斜率没有影响。相反, 改变最适宜的条件或增加孢子萌发和生长限制因子的强度, 剂量反应曲线则会变得平坦。杀菌剂在田间的实际剂量反应曲线要比实验室测定的曲线平坦, 剂量增加的效能递增率较小。在杀菌剂应用过程中, 改善药剂在处理表面的覆盖率、气候及其他任何不利于病害发生的因子都能使田间处理的剂量反应曲线变得平坦。说明改善施药技术和降低病害发生压力比在一定范围内提高杀菌剂的使用剂量所获得的效果更加明显。此外, 缩短培养时间, 剂量反应曲线的斜率也较低。

斜率对杀菌剂毒力指数存在不同的影响。其影响程度取决于与毒力指数相关的等量反应水平。通过控制影响斜率的因子, 药剂的剂量反应曲线斜率就趋于 100% 抑制率时的斜率范围。所以测定条件变化而引起的斜率改变, 导致 ED_{50} 值变化幅度远远大于 ED_{95} 的变化幅度。从理论上来说, MIC 值不受斜率的影响, 所以测定的 MIC 值可重复性好。然而, 在测定 ED_{50} 时则必须精确控制测定条件, 尽量减少对剂量反应曲线斜率的影响。

当一种药剂对某种病原菌不同个体的 ED_{50} 值分布范围很大时, 说明病原菌对剂量变化的反应速率相对较小。因此, 在毒力测定过程中影响斜率变化的因子一般对该药剂毒力评价的影响较小。相反, 当 ED_{50} 值分布范围很小时, 必须注意药剂毒力以外的影响因子的作用。

孢子萌发的剂量反应曲线斜率在某种程度上可以反映杀菌剂的作用机制。相同的斜率说明病原菌与不同药剂发生互作的机制可能是相同的。结构上相关或相似的不同杀菌剂的剂量反应曲线斜率如果相同, 可能是因为他们具有相同的作用因子 (毒力基因) 而说明他们具有相同的作用机制, 不同的斜率则可能具有不同的作用机制。然而, 结构上差别很大的不同杀菌剂, 他们的毒力因子可能完全不同, 即使具有相同的斜率, 也不能说明他们是否具有共

同的作用机制。

2.4.4 剂量 (Dosage)

只要评价农药的活性高低或毒力大小,我们就必须考虑剂量。因此,剂量是评价一种化合物或农药的关键因子。不考虑效应或防治效果与剂量相互关系的任何新农药研发都是不可信的。通过相同效应剂量的 ED_{50} 值比较是发现新杀菌剂的基础。因为只有通过与已有杀菌剂的相同效应剂量比较,才能筛选出活性更高的化合物,推动杀菌剂的发展和进步。然而,不同杀菌剂的作用方式可能完全不同,甚至会发现全新作用方式的新型杀菌剂,因此,以何种效应评价和比较新的杀菌剂活性十分重要。如能量抑制剂往往以抑制孢子萌发的相同效应剂量进行比较,抑制病原菌生物合成的杀菌剂以抑制菌体生长的相同效应剂量进行比较,干扰病原菌的致病性或病原菌与寄主的早期识别、或诱导寄主抗病性等,往往以抑制发病率或病害扩展的相同效应剂量进行比较。

一般来说,剂量取决于杀菌剂的使用浓度,通常以农药的使用浓度来表示剂量,常用剂量单位为 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或 mg/L 。早期研发的非内吸保护性杀菌剂,也有以受药表面单位面积的药量作为剂量的表达方法。以浓度表示剂量的方法,对于指导农业生产上的农药使用,如喷雾器里需要加入多少农药或每单位面积需要用多少药具有实际意义。在实验室研究中,对于不知道分子重量的那些化合物,如一些抗菌素和生物源农药,以有效成分或活性物质的重量或处理浓度来表示相同效应的剂量,也可以说明化合物的生物活性。在实验室的杀菌剂活性精确研究中,则常常以单位接种体重量的 ED_{50} 值表示杀菌剂的毒力。因为,过高的接种量会增加 ED_{50} 值。

在研究结构与活性时,也常常以药剂的重量来表示剂量。因为各同系物的分子量差异对于真菌对不同化合物的反应来说,误差不大。但是,研究杀菌剂的作用机制时,以摩尔浓度表示剂量则比较准确。

一些作用于细胞内分子靶标的杀菌剂必须进入菌体细胞才能发挥毒力。在细胞内发挥毒力反应的剂量又称为吸收剂量或内剂量。吸收剂量在菌体细胞内往往会保持在一定的动态水平,但一般都能够达到或超过 ED_{50} 剂量的水平,这也是认为 ED_{50} 值作为毒力评价参数具有较高可信度的重要依据。

对于活体微生物农药来说,剂量(活菌数)效应在很大程度上受微生物的活力(繁殖力)和定殖能力的影响。因此,提高微生物的活力和改善使用后微生物的定殖条件,对于确保微生物农药的效果十分重要。

参考文献

- [1] Anon, 1943, Definition of fungicide terms. *Phytopathology*, 33: 624 - 626.
- [2] Anon, 1991, FRAC methods for monitoring fungicide resistance. *EPPO Bulletin*, 21: 291 - 354.
- [3] Bliss C. I., 1957, Some principles of bioassay. *American Scientist*, 45: 449 - 466.
- [4] Horsfall J. G., Barratt, R. W., 1945, An improved grading system for measuring plant diseases. *Phytopathology*, 35: 655.
- [5] Horsfall J. G., *Fungicides and their action*, pp. 1 ~ 41. Waltham (Mass.): Chronica Botanica Company, 1945.
- [6] Hutson D. & Miyamoto J., *Fungicidal activity*. John Wiley & Sons Ltd., 1998.
- [7] Lyr H., *Modern selective fungicide: Properties, application and mechanisms of action*. Gustav Fischer Verlag, 1995.