

DOI:10.13718/j.cnki.zwyx.2022.01.007

11 种盐酸苯肼衍生物 对烟草根结线虫的室内毒力测定

王金峰, 江其朋, 龚杰

西南大学 植物保护学院, 重庆 400715

摘要: 本研究在室内条件下采用直接接触法测定了 11 种苯肼盐酸盐衍生物对烟草根结线虫的毒力。结果显示, 大部分药剂对烟草根结线虫都有较高的毒力, 其中 4-氟苯肼盐酸盐, 4-溴苯肼盐酸盐和 4-氯苯肼盐酸盐对烟草根结线虫的毒力最高, LC_{50} 值分别为 13.275 2 mg/L, 9.824 4 mg/L, 6.955 1 mg/L。且在阿维菌素和 4-氟苯肼盐酸盐的比为 4:1 时, 有明显增效作用。另外, 由于 4-氯苯肼盐酸盐具有一定的腐蚀性, 可以更好地促进阿维菌素发挥药效。本研究对防治南方根结线虫的含有苯肼基团的化合物的制备及功能团的选择具有一定的指导意义。

关键词: 根结线虫; 苯肼盐酸盐; 室内毒力测定

中图分类号: S482.3⁺9

文献标志码: A

文章编号: 2097-1354(2022)01-0048-06

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Toxicity of 11 Phenylhydrazine Derivatives to Tobacco Root Knot Nematode

WANG Jinfeng, JIANG Qipeng, GONG jie

College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Toxicity of 11 kinds of phenylhydrazine hydrochloride derivatives against tobacco root-knot nematodes was determined by direct contact method under laboratory conditions. The results showed that most of the insecticides had high toxicity to tobacco root-tie nematode, among which 4-fluorophenylhydrazine hydrochloride, 4-bromophenylhydrazine hydrochloride and 4-chlorophenylhydrazine hydrochloride had the highest toxicity to tobacco root-tie nematode, with LC_{50} values of 13.275 2 mg/L, 9.824 4 mg/L and 6.955 1 mg/L, respectively. When the ratio of abamectin to 4-chlorophenylhydrazine hydrochloride was 4:1, the synergistic effect was obvious. In addition, because 4-chlorobenzazid hydrochloride is corrosive to some extent, it can better promote the efficacy of avermectin. At the same time, this study has certain guiding significance for the preparation of compounds containing phenylhydrazine group and the selection of functional groups for the control of root-knot nematode.

Key words: root-knot nematode; phenylhydrazine hydrochloride; toxicity measurement

收稿日期: 2021-11-23

作者简介: 王金峰, 硕士, 主要从事烟草根结线虫病的防控。

四川省是中国重要的烟草生产基地,连作栽培较为普遍,土传病害逐年加剧,其中根结线虫病尤为严重,其种类主要为南方根结线虫。根结线虫是一类寄生于根部的植物性害虫,发生较为普遍^[1]。25℃时,20 d即可完成 1 代^[2],在四川一年可发生 5~7 代^[3]。国内外关于根结线虫的防治方法有很多,但仍以化学防治为主,且阿维菌素为主要的防治药剂^[4],其原药对根结线虫的 LC₅₀值(24 h)为 23.89 mg/kg^[5]。另外阿维菌素制剂也多种多样,主要以颗粒剂为主,其制剂 0.26%阿维菌素粉剂 4 kg/667 m² 对花生根结线虫病的防效达 68.2%^[6];0.5%阿维菌素颗粒剂 3.5 kg/667 m² 对胡椒根结线虫病的防效达 74.63%^[7];以阿维菌素和噻唑磷为主的复配药剂 10.5%阿维菌素·噻唑磷颗粒剂 1.8 kg/667 m² 对黄瓜根结线虫病的防效达 83.11%^[8]。生物炭^[9]、生物肥料^[10]、药肥联用^[11]等新型防治技术也广泛用于根结线虫病的防治。

苯胍的分子结构式如图 1 所示。盐酸苯胍及其衍生物对小麦锈病具有良好的防治效果^[12-14]。此外,苯胍衍生物是化工合成中常见的一个起始产物或者中间产物,例如在农药合成中可以以盐酸苯胍为原料合成姜黄素二苯胺^[15]、1,2,4-三唑啉酮类化合物^[16],其衍生物可以合成氰氟虫脒双吡唑类化合物^[17]、吡唑醚菌酯^[18]、杀虫脒^[19]、恶唑酮^[20]、三唑酰草胺^[21]等;在医药合成中,曲坦类药物^[22]等也离不开苯胍盐酸盐;在其他方面也具有较大的用途,如磺酸钠苯胍盐酸盐可以制备毛笔快速清洗液^[23]等。苯胍盐酸盐及其衍生物的合成方法也得到了迅速的发展。然而,目前尚未有人报道其对根结线虫的毒力。本试验选取了 11 种苯胍盐酸盐衍生物,测试了其对根结线虫的毒害作用,以期可以找到一种廉价水溶性化合物来防治根结线虫,并为取代苯胍类化合物的合成提供一定的指导意义。

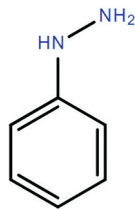


图 1 苯胍的分子结构式

1 材料与方法

1.1 供试根结线虫

根结线虫选自在烟草(品种:“云烟 87”)上繁育的烟草根结线虫,后经贝尔曼漏斗法分离所得的二龄根结线虫,制成 2 000~3 000 头/mL 二龄线虫悬液。

1.2 供试药剂

4-磺酰胺基苯胍盐酸盐、2-氯苯胍盐酸盐、3,4-二甲基苯胍盐酸盐、4-硝基苯胍盐酸盐、3-氯苯胍盐酸盐、4-特丁基胍盐酸盐、4-氯苯胍盐酸盐、4-氟苯胍盐酸盐、4-溴苯胍盐酸盐、4-甲基苯胍盐酸盐、4-甲氧基苯胍盐酸盐,共 11 种药剂,市购;5%阿维菌素乳油,上海沪联生物药业(夏邑)股份有限公司提供。

1.3 药剂的两次初筛

所有试验均采用直接接触法进行。首先进行初次筛选,将药剂用蒸馏水分别配制成 1.25 g/L 的母液,在 96 孔细胞培养板上分别滴加 100 μL 药液和 100 μL 二龄线虫悬液,置于 25℃(黑

暗)条件下的培养箱中培养 24 h 后调查线虫死亡数量和存活数量, 计算死亡率. 紧接着进行二次筛选, 对上述死亡率超过 90% 的药剂进行二次试验. 分别将 3, 4-二甲基苯胂酸盐、3-氯苯胂酸盐、4-氯苯胂酸盐、4-氟苯胂酸盐、4-溴苯胂酸盐、4-甲基苯胂酸盐、4-甲氧基苯胂酸盐配制 100 mg/L 的溶液按照上述方法进行试验.

1.4 对死亡率 95% 以上的药剂及 5% 阿维菌素乳油的 LC_{50} 值的测定

称取 4-氯苯胂酸盐、4-氟苯胂酸盐、4-溴苯胂酸盐和 5% 阿维菌素乳油(4 种)药剂, 并配制为 100 mg/L 的标液, 置于 4 °C 冰箱保存. 后将 3 种苯胂酸盐药剂分别稀释为 100 mg/L, 50 mg/L, 25 mg/L, 12.5 mg/L, 6.25 mg/L, 3.125 mg/L, 1.562 5 mg/L. 在 96 孔细胞培养板上分别滴加 100 μ L 药液和 100 μ L 二龄线虫悬液, 置于 25 °C (黑暗)条件下的培养箱中培养 24 h 后对线虫死亡数量和存活数量进行计数.

1.5 5% 阿维菌素乳油与 3 种苯胂酸盐混合后对烟草根结线虫的增效作用

将 3 种苯胂酸盐衍生物稀释至 20 mg/L, 5% 阿维菌素乳油稀释至 1.25 mg/L, 按照 0:5, 1:4, 2:3, 3:2, 4:1, 5:0 的比例混合. 取混合后的药剂 100 μ L 和 100 μ L 二龄线虫悬液(根结线虫数量大于 50 头/ μ L)置于 96 孔细胞培养皿中, 置于黑暗、25 °C 培养箱中培养 24 h 后, 于倒置显微镜下观察根结线虫死亡数量和存活数量并计数.

1.6 数据分析

试验数据处理使用 SPSS 26.0 和 Excel 软件, 计算毒力回归方程, LC_{50} 值及 95% 的置信区间, 并标出 r^2 . 按下列公式计算死亡率和校正死亡率.

$$\text{死亡率}(\%) = \frac{\text{死亡线虫数量}}{\text{存活线虫数量} + \text{死亡线虫数量}} \times 100\%$$

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

2 结果与分析

2.1 药剂两次筛选结果

由试验对药剂的 2 次筛选结果可以看出, 当浓度较高时, 3, 4-二甲基苯胂酸盐、3-氯苯胂酸盐、4-氯苯胂酸盐、4-氟苯胂酸盐、4-溴苯胂酸盐、4-甲基苯胂酸盐、4-甲氧基苯胂酸盐对二龄根结线虫有较好的效果. 当浓度降低时, 仅有 4-氯苯胂酸盐、4-氟苯胂酸盐、4-溴苯胂酸盐 3 种苯胂酸盐的防效可以达到 95% 以上(表 1).

表 1 试剂筛选试验结果

%

化学试剂名称	第 1 次筛选		第 2 次筛选	
	死亡率	校正死亡率	死亡率	校正死亡率
4-磺酰胺基苯胂酸盐	80.01	77.35	—	—
2-氯苯胂酸盐	54.90	48.89	—	—
3, 4-二甲基苯胂酸盐	98.22	97.98	70.73	63.78
4-硝基苯胂酸盐	75.00	71.67	—	—
3-氯苯胂酸盐	96.72	96.28	90.27	87.98
4-特丁基胂酸盐	28.33	18.78	—	—
4-氯苯胂酸盐	100.00	100.00	99.67	99.59
4-氟苯胂酸盐	100.00	100.00	99.74	99.67
4-溴苯胂酸盐	100.00	100.00	100.00	100.00
4-甲基苯胂酸盐	100.00	100.00	61.61	52.49
4-甲氧基苯胂酸盐	100.00	100.00	92.52	90.74
对照(空白)	11.76	—	19.20	—

2.2 3 种苯胍盐酸盐的对根结线虫的毒力

试验结果看出, 3 种药剂对根结线虫的毒力从大到小依次为 4-氟苯胍盐酸盐、4-溴苯胍盐酸盐、4-氯苯胍盐酸盐, 其 LC_{50} 值分别为 13.275 2 mg/L, 9.824 4 mg/L, 6.955 1 mg/L(表 2).

表 2 3 种苯胍盐酸盐对根结线虫的毒力(24 h)

药剂	回归方程	LC_{50} 值/mg · L ⁻¹	95% 置信区间	相关系数(r^2)
4-氟苯胍盐酸盐	$y=2.758 5x+2.676 5$	6.955 1	3.438 1~20.584 3	0.986 8
4-氟苯胍盐酸盐	$y=1.467 8x+3.351 6$	13.275 2	10.948 5~30.795 2	0.989 6
4-溴苯胍盐酸盐	$y=2.962 8x+2.060 0$	9.824 4	5.059 7~24.244 6	0.993 1
5%阿维菌素乳油	$y=2.066 9x+4.764 3$	1.300 3	0.891 8~2.531 2	0.978 2

注:所有的回归方程及 LC_{50} 相对于有效成分而言.

2.3 阿维菌素与 3 种苯胍盐酸盐混配后对根结线虫的毒力

试验结果看出, 当 1.25 mg/L 阿维菌素和 20 mg/L 的 4-氟苯胍盐酸盐按照 4 : 1 混合后, 对烟草根结线虫的毒力变大, 具有明显的增效作用(表 3).

表 3 5%阿维菌素乳油与 3 种苯胍盐酸盐混合对二龄根结线虫的毒杀效果

药剂	实际死亡率/%	预期死亡率/%	毒效比	评价
阿维菌素	27.17			
阿维菌素 : 4-氟苯胍盐酸盐 = 1 : 4	12.80	16.11	0.794 3	相加
阿维菌素 : 4-氟苯胍盐酸盐 = 2 : 3	16.59	18.88	0.878 6	相加
阿维菌素 : 4-氟苯胍盐酸盐 = 3 : 2	22.05	21.64	1.018 7	相加
阿维菌素 : 4-氟苯胍盐酸盐 = 4 : 1	61.17	24.41	2.506 4	增效
4-氟苯胍盐酸盐	13.35			
阿维菌素	23.10			
阿维菌素 : 4-氯苯胍盐酸盐 = 1 : 4	28.55	32.86	0.868 7	相加
阿维菌素 : 4-氯苯胍盐酸盐 = 2 : 3	13.52	30.42	0.444 3	拮抗
阿维菌素 : 4-氯苯胍盐酸盐 = 3 : 2	28.98	27.98	1.035 6	相加
阿维菌素 : 4-氯苯胍盐酸盐 = 4 : 1	40.55	25.54	1.587 9	增效
4-氯苯胍盐酸盐	35.31			
阿维菌素	30.83			
阿维菌素 : 4-溴苯胍盐酸盐 = 1 : 4	27.51	26.59	1.034 7	相加
阿维菌素 : 4-溴苯胍盐酸盐 = 2 : 3	17.78	27.65	0.643 0	拮抗
阿维菌素 : 4-溴苯胍盐酸盐 = 3 : 2	16.01	28.71	0.557 7	拮抗
阿维菌素 : 4-溴苯胍盐酸盐 = 4 : 1	23.14	29.77	0.777 3	相加
4-溴苯胍盐酸盐	25.53			

注:1. 阿维菌素的浓度为 1.25 mg/L, 3 种苯胍盐酸盐均为 20 mg/L, 按照上图比例将两种药剂混合后与二龄烟草根结线虫 1 : 1 混合; 2. 所有的药品在稀释后均在 4 °C 冰箱保存 6 d.

3 结论与讨论

不同结构的化学物质对根结线虫的毒力有着较为明显的差别. 经过两次筛选和室内毒力测定, 可以得出 4-氟苯胍盐酸盐在根结线虫防治效果最好, 4-氯苯胍盐酸盐和 4-溴苯胍盐酸盐次之, 且 4-氟苯胍盐酸盐的毒性远远大于 4-氯苯胍盐酸盐及 4-溴苯胍盐酸盐; 3 种化合物中,

4-氯苯胂盐酸盐和 4-氟苯胂盐酸盐与阿维菌素按照一定比例混合后, 具有明显的增效作用。

3 种化合物均具有一定的腐蚀性. 盐酸苯胂具有中等毒性, 可经呼吸道、胃肠道、皮肤吸收^[24], 与牛血清蛋白相互作用^[24]; 致使小鼠血液中网织红细胞下降^[25], 造成血虚症^[26], 轻则可恢复, 严重时导致死亡; 与人大量接触后, 可致使头昏、恶心、乏力^[27], 具有很大的毒性. 大量的苯胺类、盐酸苯胂衍生物类试剂是芳香烃受体(Ah 受体)激动剂^[28], 这可能与苯胂盐酸盐类衍生物对根结线虫有较高的毒力有关。

综合比较 11 种盐酸苯胂衍生物与阿维菌素原药和噻唑膦原药对南方根结线虫的室内毒力, 发现 4-氯苯胂盐酸盐、4-氟苯胂盐酸盐和 4-溴苯胂盐酸盐 3 种化合物对根结线虫的毒力远远大于阿维菌素和噻唑膦, 阿维菌素原药和噻唑膦原药对根结线虫的 LC_{50} 值(24 h)为 23.89 mg/kg 和 56.55 mg/kg^[5], 约为 23.89 mg/L 和 56.55 mg/L. 另外经研究发现, 1.25 mg/L 的阿维菌素乳油与 20 mg/L 的 4-氟苯胂盐酸盐复配, 比例在 4:1 时具有增效作用, 且增效作用明显. 另外, 汪学伦^[29]、王先锋^[30]、王洋^[31]、张力志^[32] 陆续通过化学合成的方法合成了多种含有苯胂基团化合物, 并测试了其杀菌活性. 盐酸苯胂类衍生物大部分为水溶性盐, 不仅可以直接运输, 也可以制备成高浓度的水剂, 减少有机溶剂的使用量。

本研究通过室内毒力测定的方法测试了 11 种盐酸苯胂衍生物对烟草根结线虫的室内毒力; 该研究对防治根结线虫的含有苯胂基团的化合物的制备及功能团的选择具有一定的指导意义. 最后, 由于本试验是在室内进行的毒力测定, 缺少田间实践证明(田间自然环境复杂, 变化因素较多), 可能在使用时会有较大差异, 但该研究对防治烟草根结线虫的化学物筛选及药剂复配具有很大意义。

参考文献:

- [1] 王金峰, 江连强, 刘东阳, 等. 烟草根结线虫病防治方法及发展趋势[J]. 植物医生, 2021, 34(2): 9-12.
- [2] 孔凡玉, 王静. 烟草根结线虫病研究进展[J]. 沈阳农业大学学报, 2001, 32(3): 232-235.
- [3] 唐唯生, 谢小波, 陈昌权, 等. 利用天敌和抗病品种防治烟草根结线虫研究[J]. 烟草科技, 1998, 31(5): 45-46.
- [4] 刘芳, 李劲松, 廖新福, 等. 几种复混药剂防治厚皮甜瓜南方根结线虫的效果[J]. 中国瓜菜, 2016, 29(2): 27-29.
- [5] 王泊理, 赵江克. 阿维菌素与噻唑膦混配对南方根结线虫的联合毒力测定[J]. 植物医生, 2019, 32(6): 24-27.
- [6] 陈兵, 韩佩娥, 朱凤香, 等. 生物农药阿维菌素防治果蔬根结线虫病试验[J]. 浙江农业科学, 2003, 44(2): 87-89.
- [7] 马世龙. 0.5%阿维菌素颗粒剂防治黄瓜根结线虫病药效试验[J]. 北方园艺, 2012(4): 138-139.
- [8] 鲁毅, 张毅, 周玲. 10.5%阿维菌素·噻唑膦颗粒剂防治黄瓜根结线虫病田间药效试验[J]. 陕西农业科学, 2018, 64(5): 34-36.
- [9] 张涵, 焦永吉, 赵世民, 等. 利用生态炭肥修复土壤防治烟草根结线虫病与黑胂病[J]. 烟草科技, 2016, 49(6): 30-35.
- [10] 谢平. 生物肥料“宁盾”对药用植物根结线虫病防治及促生研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- [11] 梁兵, 黄坤, 李宏光, 等. 肥料和农药协同作用防治烟草根结线虫病研究[J]. 西南农业学报, 2016, 29(8): 1894-1898.
- [12] 中国科学院微生物研究所. 治疗剂对小麦锈病田间防治效果检查报告[J]. 农药技术报导, 1959(8): 5-7.
- [13] 中国科学院微生物研究所. 小麦锈病治疗剂的研究[J]. 科学通报, 1959, 4(20): 695-696.
- [14] 潘仁瑞, 冯芝英, 陆师义, 等. 苯胂类药剂防治小麦锈病试验[J]. 安徽农业科学, 1982, 10(4): 55-60, 45.
- [15] 冯小桂. 姜黄素二苯胺衍生物的合成及生物活性评价[D]. 重庆: 西南大学, 2007.
- [16] 衡京. 具有生物活性的 1, 2, 4-三唑啉酮类化合物的合成研究[D]. 南京: 南京工业大学, 2007.
- [17] 姬文娟, 许天明, 魏优昌, 等. 取代双吡唑类化合物的合成及杀虫活性[J]. 农药学报, 2011, 13(2): 121-126.
- [18] 谷顺明, 何庆雅, 高正华, 等. 一种吡唑醚菌酯中间体的合成方法: 201810184435.4[P]. 20180307.
- [19] 沈文英, 沈笑平. 杀虫脒的检验[J]. 刑事技术, 1981(6): 28-30.
- [20] 陈霖, 于海波, 宋玉泉, 等. 噁虫酮的合成[C]. 中国化工学会农药专业委员会第十五届年会论文集, 2012: 233-236.
- [21] 刘安昌, 郑怡倩, 汪焱鲁, 等. 水稻田除草剂三唑啉草胺的合成[J]. 农药, 2019, 58(1): 23-25.

- [22] 周光华, 欧阳班来, 葛文, 等. 曲坦类药物中间体苯胍盐酸盐的合成工艺研究[C]. 中国化学会第 30 届学术年会摘要集-第九分会: 有机化学, 2016: 138.
- [23] 戴新育. 一种毛笔快速清洗液: CN103756400A[P]. 20140430.
- [24] 付彩霞, 王晓艳, 高宗华. 盐酸苯胍与牛血清白蛋白相互作用的研究[J]. 化学研究与应用, 2013, 25(5): 642-646.
- [25] 曹玲玲, 何超, 薛建有, 等. 盐酸苯胍诱发小鼠网织红细胞条件的优化[J]. 基础医学与临床, 2013, 33(6): 749-751.
- [26] 任德旺, 叶婷婷, 倪必辉, 等. 盐酸苯胍致小鼠化学损伤性血虚证模型的改良[J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(8): 108-110.
- [27] 戴凌云, 吴德军. 盐酸苯胍中毒 4 例[J]. 中华急诊医学杂志, 2003, 12(5): 347.
- [28] NAGY S R, LIU G, LAM K S, et al. Identification of Novel Ah Receptor Agonists Using a High-Throughput Green Fluorescent Protein-Based Recombinant Cell Bioassay[J]. Biochemistry, 2002, 41(3): 861-868.
- [29] 汪学伦. 几种含苯胍基团的五元杂环类化合物的研制与应用研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2017.
- [30] 王先锋. 含氨基或胍基的 tetramic acid 类衍生物的合成与生物活性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- [31] 王洋. 1-(未)取代吡咯烷-2, 4-二酮取代苯胍衍生物的合成及杀菌活性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [32] 张立志. 含二取代胍基的 tetramic acid 类衍生物的合成及杀菌活性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.