

### 油菜菌核病菌对甾醇脱甲基抑制剂类杀菌剂的抗药性检测技术规程

Technical code of practice for detecting sterol demethylation inhibitor fungicide resistance of sclerotinia sclerotiorum isolated from oilseed rape

地方标准信息服务平台

2023-08-25 发布

2023-09-25 实施



## 前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由内蒙古自治区农牧厅提出。

本文件由内蒙古自治区农业标准化技术委员会（SAM/TC 20）归口。

本文件起草单位：内蒙古自治区农牧业科学院、呼伦贝尔农垦集团特泥河农牧场有限公司、赤峰市农牧业综合检验检测中心。

本文件主要起草人：杨永青、赵丽丽、李子钦、宋培玲、皇甫海燕、燕孟娇、贾晓清、郭晨、皇甫九茹、张英、郝贵宾、刘铭、霍宏丽。

地方标准信息服务平台



# 油菜菌核病菌对甾醇脱甲基抑制剂类 杀菌剂的抗药性检测技术规程

## 1 范围

本文件规定了油菜菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 对甾醇脱甲基抑制剂类杀菌剂的抗药性检测的技术要求, 主要包括样品采集、纯化及保存、抗药性检测方法、抗药性评价。

本文件适用于油菜菌核病菌对苯醚甲环唑、戊唑醇、咪鲜胺的抗药性检测。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中, 注日期的引用文件, 仅该日期对应的版本适用于本文件; 不注日期的引用文件, 其最新版本 (包括所有的修改单) 适用于本文件。

NY/T 1667.3 农药登记管理术语 第3部分: 农药药效

NY/T 1859.1 农药抗性风险评估 第1部分: 总则

NY/T 1859.6 农药抗性风险评估 第6部分: 灰霉病菌抗药性风险评估

SN/T 2589 植物病原真菌检测规范

## 3 术语和定义

NY/T 1667.3、NY/T 1859.1和NY/T 1859.6 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**有效中浓度** median effective concentration,  $EC_{50}$

能使某生物群体半数产生某种药剂反应所需的药剂浓度。

### 3.2

**植物病原菌抗药性** fungicide resistance

本来对农药敏感的野生型植物病原菌个体或群体, 由于遗传变异而对药剂出现敏感性下降的现象。

### 3.3

**抗药性检测** detection for resistance

通过常规的生物测定手段判断病原群体中是否存在抗药性菌株及抗药菌株的出现频率。

## 4 主要试剂

#### 4.1 供试杀菌剂

苯醚甲环唑 (Difenoconazole)、戊唑醇 (Tebuconazole)、咪鲜胺 (Prochloraz), 药剂为原药。

#### 4.2 化学试剂

葡萄糖、琼脂粉、吐温-80、次氯酸钠、无水乙醇、二甲基亚砷 (DMSO) 均为国产分析纯试剂。

### 5 含药培养基的配制

将原药溶解于二甲基亚砷 (DMSO) 中, 制成浓度为 10 mg/mL 的母液, 用已灭菌的 0.05%吐温-80 稀释成工作液, 将配制好的工作液加入已灭菌、冷却至 45 °C~50 °C 的 PDA 培养基中, 倒平板, 每皿 20 mL 培养基, 制成系列浓度梯度的含药培养基。

培养基中农药的终浓度及加入体积参见附录 A 中表 A.1, 加药体积计算方法参见附录 B。母液和工作液现用现配。

### 6 样品采集、纯化和保存

#### 6.1 样品采集

在油菜菌核病发生田块中按照随机取样法采样, 样本间隔距离不低于 30 m, 同一病株上采集的多个菌核为同一份样品, 如果病原群体中抗性产生情况未知, 一般需采集 60~100 份菌株样本。菌核样本采集后装入纱网袋或纸袋中, 记录采样地点和时间。

#### 6.2 样品的纯化

按照 SN/T 2589, 采用组织分离法对菌核样品进行纯化, 菌核表面消毒后置于马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA) 上, 25 °C 黑暗培养。

待菌核萌发出菌丝后, 从培养皿中菌落的边缘挑取少量菌丝转接至 PDA 培养基上进行纯化培养, 纯化 2~3 代后, 且能够在培养基上产生黑色菌核的确定为菌核病菌, 分别用“年份-采样地-序号”进行编号。

#### 6.3 菌种保存

菌核病菌的保存方法可将菌核收集、自然晾干, 保存于纸袋或纱网袋中, 置于阴凉干燥处; 或在长满菌丝的 PDA 培养基 3/4 处, 用打孔器制成直径为 5 mm 的菌丝块, 装入 1.5 mL 的无菌离心管或菌种保存管中 (4~8 个菌丝块/管), 用无菌水浸没, 拧紧管盖并用封口膜密封, 常温可保存 6~12 个月。

### 7 抗药性检测方法

#### 7.1 室内敏感性测定

打取上述已纯化的核盘菌菌块转接到 PDA 平板上进行培养。待菌落长到 3/4 培养皿时, 在菌落的边缘用直径 5 mm 打孔器打取相同菌龄的菌块, 菌面向下置于系列浓度梯度的含药 PDA 培养基中央, 以加入相同体积的 0.05%吐温-80 为对照, 25 °C 黑暗培养 2 d 后, 采用十字交叉法测量菌落直径 (mm), 每个浓度设置 3 次重复。

## 7.2 有效中浓度 (EC<sub>50</sub>) 的计算

用7.1中菌落直径的平均值 (mm)，根据公式 (1) 计算菌丝生长抑制率：

$$IR = \frac{D_1 - D_2}{D_1 - D_3} \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

IR——为菌丝生长抑制率，单位%；

D<sub>1</sub>——为照菌落直径，单位 mm；

D<sub>2</sub>——为含药处理菌落直径，单位 mm；

D<sub>3</sub>——为菌块直径，单位 mm。

菌丝生长抑制率转换的机率值为 y，杀菌剂浓度的对数值 (log<sub>10</sub>) 为 x，根据 x 与 y 的线性关系得出其毒力回归方程 y=ax+b，计算抑制率为 50% 时对应的 x 值，再计算 10<sup>x</sup> 所对应的浓度值，即为有效中浓度 EC<sub>50</sub> 值 (μg/mL)。

## 8 抗药性评价

### 8.1 敏感基线的建立

按照 NY/T 1859.6 标准中的方法建立敏感基线。

### 8.2 抗性指数

杀菌剂施用一定时间后，若出现田间防效下降，可通过测定供试菌株的 EC<sub>50</sub> 值，根据公式 (2) 计算出抗性指数 (resistance factor, RF)，RF 的大小反映供试菌株的抗药性水平。

$$RF = \frac{E_1}{E_2} \times 100 \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中：

RF——为抗性指数，单位%；

E<sub>1</sub>——为供试菌株的 EC<sub>50</sub> 值，单位 μg/mL；

E<sub>2</sub>——为敏感菌株平均 EC<sub>50</sub> 值，单位 μg/mL。

### 8.3 抗药性菌株的判定

根据供试菌株的抗性指数判定其抗性水平，不同药剂的判定标准见表 1。

表1 不同药剂的抗药性菌株判定标准

杀菌剂名称	敏感菌株	低抗菌株	中抗菌株	高抗菌株	参考文献
戊唑醇	抗性指数 < 3	3 ≤ 抗性指数 < 10	10 ≤ 抗性指数 < 100	抗性指数 ≥ 100	[2]
咪鲜胺	抗性指数 < 3	3 ≤ 抗性指数 < 10	10 ≤ 抗性指数 < 100	抗性指数 ≥ 100	[3]
苯醚甲环唑	抗性指数 < 5	5 ≤ 抗性指数 < 10	10 ≤ 抗性指数 < 100	抗性指数 ≥ 100	[4]

### 8.4 抗性频率

根据公式 (3) 计算抗性频率，能够反映病原菌群体中抗药性菌株出现频率。

$$X = \frac{N_1}{N_2} \times 100 \dots\dots\dots (3)$$

式中：

X——为抗性频率，单位%；

N<sub>1</sub>——为抗药性菌株的数量，单位株；

N<sub>2</sub>——为供试菌株的总数，单位株；

计算结果保留小数点后2位。

地方标准信息服务平台



## 附录 A

(资料性)

## 室内药剂敏感性试验中系列浓度参考值

在具体检测过程，含药培养基中药剂的终浓度可根据实际用药情况、田间发病程度、田间用药时长等适当调整，先选取1~2个表1系列浓度中的中间浓度进行预实验，如果对病原菌的菌丝生长抑制率大于50%，则需要降低系列浓度值，如果对病原菌的菌丝生长抑制率小于50%，则需要提高系列浓度值，调整浓度时通常以浓度的2倍降低或提高。表A.1中药剂的系列浓度值参考值是由2019~2021年间内蒙古地区油菜菌核病菌的敏感性试验得出。

表A.1 含药培养基中农药系列浓度的参考值

杀菌剂名称	终浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	加入体积 (mL)
戊唑醇	0.0、0.08、0.16、0.32、0.64、1.28	0.0、0.016、0.032、0.064、0.128、0.256
咪鲜胺	0.0、0.02、0.04、0.08、0.16、0.32	0.0、0.004、0.008、0.016、0.032、0.064
苯醚甲环唑	0.0、0.16、0.32、0.64、1.28、2.56	0.0、0.032、0.064、0.128、0.256、0.512

表A.1中加入体积计算以1000.00  $\mu\text{g/mL}$  农药工作液、200 mL PDA培养基为例，计算方法参考附录B中公式(B.1)。

地方标准信息服务平台

## 附录 B

(资料性)

## 含药培养基的配制及试验药剂计算方法

称取杀菌剂农药原药或高纯试剂0.01 g充分溶解于1.00 mL二甲基亚砜(DMSO),即浓度为10000 μg/mL的母液,取母液500.00 μL溶于5.00 mL已灭菌的0.05%吐温-80中,稀释成1000.00 μg/mL的工作液。已灭菌的PDA培养基200 mL(可根据待测样品数量按需调整),冷却至45℃~50℃,分别加入一定体积的杀菌剂使用液,根据公式(4)计算所需的工作液体积,充分摇匀后倾倒平板,制成系列浓度梯度的含药培养基,培养基中杀菌剂的推荐终浓度参见附录A。

$$V_2 = \frac{C_1 \times V_1}{C_2} \dots\dots\dots (B.1)$$

式中:

- $V_2$ ——为加入农药工作液的体积,单位 mL;
- $C_1$ ——为含药培养基中的最终质量浓度,单位 μg/mL;
- $V_1$ ——为待配制含药培养基的体积,单位 mL;
- $C_2$ ——为农药工作液质量浓度,单位 μg/mL。

地方标准信息服务平台

## 参 考 文 献

- [1] 刘西莉, 苗建强, 张灿. 植物病原菌抗药性及其抗性治理策略[J/OL]. 农药学学报. 2022, 24(05): 921-936
- [2] 鲜菲, 刘顺涛, 李雨, 陈杰, 裴丽丽, 余洋, 杨宇衡, 毕朝位. 西南地区稻瘟病菌对戊唑醇的敏感性基线建立及抗性监测[J]. 农药学学报, 2015, 17(6): 753-756
- [3] 赵东磊, 辛文静, 杨莹, 卢飞, 效雪梅, 段亚冰, 周明国. 稻瘟病菌对咪鲜胺的抗药性风险评估[J]. 南京农业大学学报, 2019, 42(3):440-447
- [4] 陈长卿, 王润林, 姜云, 牛俊轲, 闫东, 苗成琪, 高洁, 赵雪, 田馨月, 张小蕊. 烟草赤星病菌对菌核净和苯醚甲环唑的抗药性检测[J]. 中国烟草科学, 2020, 41(02):48-53
- 

地方标准信息服务平台