附件7

非专性寄生病原真菌对呼吸作用抑制类杀菌剂的抗性风险评估

（征求意见稿）

**1 范围**

本部分规定了非专性寄生病原真菌对呼吸作用抑制类杀菌剂抗药性风险评估的基本要求、方法及抗药性风险的管理。

本部分适用于真菌界（壶菌门、接合菌门、子囊菌门、担子菌门、无性菌类）和卵菌中的非专性寄生病原真菌对呼吸作用抑制类杀菌剂（糖降解抑制剂、电子传递链抑制剂、氧化磷酸化抑制剂、ATP合成与转运抑制剂等）抗药性风险评估的农药登记试验。其他试验可参照本部分执行。

**2 规范性引用文件**

下列文件对于本部分的应用是必不可少的。凡是注日期的应用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修订单）适用于本文件。

NY/T 1156.1-2006 农药室内生物测定试验准则杀菌剂第1部分：抑制病原真菌孢子萌发试验凹玻片法

NY/T 1156.2-2006 农药室内生物测定试验准则杀菌剂第2部分：抑制病原真菌菌丝生长试验平皿法

NY/T 1667.1~1667.8-2008 农药登记管理术语

NY/T1859.1-2010 农药抗性风险评估第1部分：总则

**3 术语和定义**

NY/T 1667.1~1667.8界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

**3.1 药剂驯化Fungicide adaption**

用杀菌剂亚致死剂量连续对病原菌处理，使其对处理药剂忍受能力增加的过程。

**3.2 紫外诱变 UV- mutagenesis**

用紫外线照射病原菌的菌丝或孢子，诱发病原菌发生与抗药性相关的突变。

**3.3 抗药性突变频率 Fungicide resistance mutation frequency**

指供试靶标病原菌群体中发生与抗药性相关突变的菌株数所占的百分比例。

**3.4 最小抑制浓度 Minimum inhibitory concentration（MIC）**

可完全抑制病原菌孢子萌发或菌丝生长的最低药剂处理浓度。

**3.5 抗性指数 Resistance factor**

抗药性菌株对该药剂的敏感性（一般以EC50或MIC表示）与其亲本菌株敏感性或与敏感基线的平均EC50或MIC的比值。

**3.6 适合度 Fitness**

病原菌存活、生长、致病和繁殖等对环境的适应程度。

**3.7 交互抗药性 Cross-resistance**

病原菌对某一杀菌剂产生抗药性时，也对其他杀菌剂表现抗药性的现象，也称正交互抗药性。

**3.8 负交互抗药性 Negative cross-resistance**

病原菌对一种杀菌剂产生抗药性时，则对其他杀菌剂表现为更加敏感的现象。

**4 抗药性风险评估**

**4.1 抗药性风险的影响因子**

**4.1.1 药剂**

多作用位点、非选择性呼吸作用抑制类杀菌剂如百菌清、克菌丹、福美双、代森类等及重金属离子杀菌剂如铜制剂和有机锡等杀菌剂、氧化磷酸化解偶联剂氟啶胺、ATP转运抑制剂硫硅菌胺等在理论上属于低等抗性风险药剂；单作用位点、选择性强的呼吸作用抑制类杀菌剂如甲氧基丙烯酸酯类和琥珀酸脱氢酶抑制剂类杀菌剂理论上属于高等或中等抗性风险药剂。

**4.1.2 靶标生物**

真菌界（壶菌门、接合菌门、子囊菌门、担子菌门、无性菌类）和卵菌中的非专性寄生病原真菌。如：引起烟草赤星病的链格孢菌（*Alternariaalternata*）、引起果蔬灰霉病的灰葡萄孢菌（*Botrytis cinerea*）、引起黄瓜褐斑病的多主棒孢霉（*Corynesporacassiicola*）、引起香蕉叶斑病的黑条叶斑病菌（*Mycosphaerellafijiensis*）、引起水稻稻瘟病的稻梨孢菌（*Pyriculariaoryzae*）、引起苹果黑星病的黑星病菌（*Venturiainaequalis*）等，由于药剂上市后短时间内在世界大部分地区能够检测到以上病原菌的抗性，所以国际杀菌剂抗药性行动委员会（Fungicide Resistance Action Committee, FRAC）将以上病原菌归为高等抗药性风险的病原菌；引起马铃薯或番茄早疫病的茄链格孢菌（*Alternariasolani*）、引起玉米小斑病的玉蜀黍平齐蠕孢（*Bipolarismaydis*）和大斑病的玉蜀黍凸齐蠕孢（*Setosphaeriaturcica*）、引起各种作物炭疽病的炭疽病菌（*Colletotrichumgloeosporoides*）引起大豆或花生叶片枯萎的紫斑病菌（*Cercosporakikuchii*）、引起大豆灰斑病的大豆尾孢病菌（*Cercosporasojina*）、引起水稻恶苗病的串珠镰刀菌（*Gibberellafujikuori*）、引起各种作物绿霉病的指状青霉（*Penicilliumdigitatum*）和引起青霉病的扩展青霉（*Penicilliumexpansum*）、引起马铃薯或番茄晚疫病的致病疫霉（*Phytophthorainfestans*）、梨黑星病的黑星病菌（*Venturiapirina*）归为中等抗药性风险的病原菌；引起小麦赤霉病、香蕉枯萎病等的镰刀菌（*Fusarium*spp.）、引起各种作物冠腐病的恶疫霉（*Phytophthoracactorum*）、引起各种作物猝倒病的腐霉（*Pythium*spp.）、引起各种作物根腐病的丝核菌（*Rhizoctonia*spp*.*）、引起大麦叶枯病的黑麦喙孢菌（*Rhynchosporiumsecalis*）、引起各种作物菌核病的核盘菌（*Sclerotiniasclerotiorum*）归为低等抗药性风险的病原菌。

**4.1.3 农事操作及生态环境风险**

大面积种植单一感病品种作物、单作或连作、保护地种植、重施氮肥、单一使用作用机理相同的杀菌剂等利于病害发生的农事操作，以及连续阴雨等利于病害发生和流行的生态环境条件等均会增加抗药性风险。

**4.2 抗性风险评估内容**

**4.2.1 敏感基线的建立**

从未使用过某种药剂及其相同作用机理药剂的多个代表性地区采集供试菌株（≥100株）。按照农药室内生物测定试验准则NY/T 1156.2-2006中的菌丝生长抑制法或NY/T 1156.1-2006中的孢子萌发法等准则方法测定其对该药剂的敏感性分布曲线，计算EC50值或MIC值及剂量反应速率（剂量反应曲线斜率）。如果供试菌株敏感性呈单峰分布，则这些菌株可视为野生敏感菌株，其对药剂的敏感性(EC50值或MIC值)的平均值可作为靶标菌对该药剂敏感基线的EC50或MIC值参数。

**4.2.2靶标病原菌产生抗药性的潜能**

采用紫外诱变或药剂驯化的方法在室内进行抗药性菌株的诱导。紫外诱变时以紫外光照射后菌丝或孢子致死率为90%～95%的照射剂量处理，以杀菌剂1~2倍的MIC剂量进行抗药性突变体筛选；药剂驯化时须将靶标菌接种于含药浓度接近MIC的培养基平板上，培养数天后挑取孢子能够萌发并正常扩展的菌落或出现角突变的菌落边缘菌丝。在含药浓度逐步提高的含药平板上连续培养多代之后，将在含MIC药剂浓度之上还能生长的菌落，确定为疑似突变体。在无药培养基平板上转接继代培养10代后测定其对杀菌剂的敏感性，获得抗药性状能够稳定遗传的菌株。靶标病原菌产生抗药性的潜能以抗性突变频率和抗性指数表示。

抗药性突变频率X（%）按式（1）计算。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| X= | N*1* | ×100 ………………（1） |

N*2*

式中：X-抗药性突变频率，单位为百分率（%）；

N1-筛选获得的抗药性菌体数量，单位为个；

N2-用于抗药性筛选的供试靶标病原菌群体数量总和（孢子数或菌饼数），单位为个。

抗性指数*RF*按式（2）计算。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| *RF=* | E*1* | ………………………（2） |

E*2*

式中：RF-抗性指数；

E1-抗药性菌株对该药剂的敏感性（EC50），单位为μg/ml；

E2-亲本菌株对该药剂的敏感性（EC50），单位为μg/ml。

**4.2.3抗药性水平及交互抗性**

抗药性水平以抗药性指数表示。在含药系列浓度的培养基上测定抗药性突变体的药敏性水平，并以出发菌株为对照，计算突变体的EC50和/或MIC值与出发菌株相同药敏性参数的比值，即抗药性指数（倍数）。另外，根据病害特点在药剂处理的寄主植物上对抗药性菌株进一步验证，确认在活体上是否表现抗药性及相应的抗药性水平。

选择2-3株不同抗药性水平的突变体，测定对其他相同化学类别或相同作用方式的杀菌剂及已经登记防治该病原菌的其他杀菌剂的敏感性，分析其交互抗药性模式，明确有无交互抗药性及正负交互抗药性。

**4.2.4 抗药性菌株的适合度测定**

测定靶标病原菌的菌丝生长速率、温度敏感性、分生孢子产生能力、孢子萌发能力、致病力、竞争力等适合度相关的生物学性状指标，比较抗药性菌株和敏感菌株（包括亲本菌株）有无差异，具体方法参见附录A。如果抗性群体的适合度明显低于敏感群体（包括亲本菌株），则待评估药剂田间使用后靶标菌对其产生抗药性的风险较低。如果抗性群体的适合度接近或高于敏感群体（包括亲本菌株），待评估药剂产生抗性风险较高。

**4.2.5 抗性风险级别分析**

依据突变体的突变频率、抗药性水平、交互抗药性模式、抗药性突变体的适合度、抗性遗传等参数，结合评估药剂所属类型、作用方式及其活性和持效期、该药剂（或同类药剂）在当地使用的历史、使用频率，具有交互抗性的杀菌剂登记使用情况及可能的选择压力和病害特征，当地习惯的农艺措施和是否采取了抗药性治理等综合分析，评估杀菌剂的抗性风险级别。

**4.2.5.1高等抗性风险**

如果药剂持效期长、作用位点单一、田间有同类药剂使用的历史、靶标病原菌易于产生抗药性突变、抗性指数很高，抗药性菌株适合度接近或高于敏感群体（包括亲本菌株），且防治对象为气流和雨水传播的多循环病害，则该药剂的田间使用风险较高。

**4.2.5.2中等抗性风险**

如果药剂作用位点单一、田间有同类药剂使用的历史、靶标菌易于产生抗药性突变、抗性指数低到中等、抗药性菌株适合度低于敏感群体（包括亲本菌株），则该药剂的田间使用风险级别为中等风险。

**4.2.5.3 低等抗性风险**

如果药剂为多作用位点，田间没有同类药剂使用的历史、抗性菌株突变频率较低、抗性指数低、抗药性菌株的适合度显着低于敏感群体亲本菌株，则该药剂的田间使用风险级别为低等风险。

**5 抗性风险管理**

**5.1 抗性风险的可接受性**

要求确定抗性风险的级别后，要考虑抗性风险的可接受性。属于低等抗性风险级别的药剂，不需要采取抗性管理措施；属于中等抗性风险的药剂，必要时应考虑采取抗性风险管理措施；属于高等抗性风险级别的药剂，应采取抗性风险管理措施。

**5.2 抗性风险管理的一般原则**

对于高等抗性风险的药剂，农药生产企业需要为登记的产品提供抗性风险评估资料及管理措施，并在产品标签和使用说明书上注明如何避免和降低抗性风险。对于中等抗性风险的药剂，鼓励农药生产企业为登记的产品提供抗性风险评估资料及管理措施，并在产品标签和使用说明书上注明如何避免和降低抗性风险。

对高抗药性风险的药剂，抗性风险管理需要农药生产（经营）企业、登记管理部门、科研和植保推广部门及使用者共同参与。

**5.3 抗性风险管理措施**

**5.3.1 有害生物综合治理**

除了采取化学防治措施外，还利用轮作、抗性品种、生物防治以及其它有利于减轻病害发生和危害的非化学防治措施。

**5.3.2 杀菌剂限制性使用技术**

对于高、中等抗性风险的药剂应规定每个生长季节使用次数。对于单作用位点、选择性强的高等抗性风险药剂，如嘧菌酯、烯肟菌酯、醚菌酯、肟菌酯、氯啶菌酯等甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂，使用次数2次～3次。对于中到高等抗性风险的药剂，如氟吡菌酰胺、噻呋酰胺、氟唑菌酰胺、啶酰菌胺等琥珀酸脱氢酶抑制剂，使用3次～4次。

**5.3.3 混合用药**

利用抗性机制不同的药剂进行混合使用，延缓抗药性发展。混合用药时，药剂组分的选择、配比、用量以及混合的程序等要符合农药兼容性和延缓抗药性的要求。

**5.3.4 轮换用药**

采用抗性机制或作用机制不同的药剂进行轮换使用，延缓抗药性的发展。轮换使用时药剂组合的选择要符合延缓抗药性的要求。

**5.3.5 使用负交互抗性药剂**

使用通过试验证明与供试药剂具有负交互抗性的杀菌剂防治病害。

**5.3.6 监测抗药性发生和发展**

对于高、中等抗性风险的杀菌剂应实施抗药性发生和发展监测。

**5.3.7 产品标签标注**

在产品标签上标注抗性风险级别，并标明相应抗性风险管理的措施。

**附录A**

**（规范性附录）**

**抗药性菌株的适合度测定**

适合度是指抗药性病原菌在存活、生长、致病、繁殖等方面与敏感群体的生存竞争能力。试验中通过测定靶标病原菌的抗药稳定性、菌丝生长速率、温度敏感性、分生孢子产生能力、分生孢子萌发能力、致病力、竞争力等适合度相关的生物学性状指标，比较不同抗性水平的抗药性菌株和敏感菌株（包括亲本菌株）有无差异，来评价抗药性菌株的适合度。如果抗药性群体的适合度明显低于敏感菌体（包括亲本菌株），则该药剂田间使用后靶标菌对其产生抗药性的风险较低。如果抗药性群体的适合度接近或高于敏感群体（包括亲本菌株），则该药剂具有一定的抗性风险。如果抗药性群体的适合度明显高于敏感群体（包括亲本菌株），该药剂产生田间抗性风险较高。

A.1 抗药性菌株的抗性稳定性

将抗药性菌株在无药平板上培养，待产生分生孢子后进行转代，转接10代，分别测量各菌株第1代和第10代对药剂的敏感性；或4℃保存30后测定对药剂的敏感性。比较培养不同代数或低温保存后菌株对药剂敏感性有无明显变化。

A.2 菌丝生长速率

无菌条件下，用直径5mm的灭菌打孔器在已培养好的敏感和抗药性菌株的菌落边缘切取菌饼，用接种器将其分别接种于直径为9mm的平板中央，盖上皿盖，置于适宜温度的培养箱中培养。根据不同靶标菌的生长速率差异，每间隔12h或24h测定一次菌落直径，每菌株重复4次。计算菌落的平均直径，绘制各菌株生长曲线，比较调查时间内抗药性菌株与其亲本菌株的菌丝生长速率。

A.3 温度敏感性

接种抗药性菌株和敏感菌株于适宜培养基的平板上，分别在4℃、10℃～18℃、20℃～25℃、26℃～30℃和37℃下培养，每菌株重复4次。根据敏感菌株的生长情况，测量各温度下靶标菌的菌落直径，确定敏感菌株和抗药性菌株的最适生长温度，并明确抗性水平的高低与温度的敏感性是否相关。

A.4 分生孢子产生能力

将抗药性菌株及其亲本菌株在适宜产孢的培养基平板（直径9cm）上或液体培养基中培养（根据不同菌的产孢条件，可能需要14h光照、10h黑暗交替培养7d～10d，促进其产生分生孢子；或使用黑光灯与日光灯12h交替照射5d～7d，以获得大量的分生孢子）。若在固体培养基平板上产孢，产孢完成后加入20mL无菌水于培养皿中，用涂布器将菌丝上分生孢子刮下，经3～4层纱布过滤后收集孢子悬浮液，再用振荡器震荡1min，使孢子充分的分散均匀，用血球计数板测定各菌株孢子悬浮液的浓度，统计分析抗药性菌株与其亲本菌株之间产孢能力的差异。

A.5 孢子萌发能力

将孢子悬浮液稀释成适当浓度（10倍×10倍显微镜下每个视野50个～100个孢子），取40μL于凹玻片中，在合适的培养温度和时间下培养，检查抗药性菌株和亲本敏感菌株的分子孢子的萌发率。统计分析抗药性菌株与其亲本菌株的分生孢子萌发率的差异。每菌株重复4次，各重复随机观察3个以上视野，调查孢子总数不少于300个。

A.6 菌核产生的能力

从敏感菌株及抗药性菌株的菌落边缘切取菌饼，将其接种于产菌核培养基平板中央，每菌株3次重复，于合适温度条件下培养数天，将各皿中所有菌核用接种针挑下，50℃烘16h，称量各皿中菌核的质量，取3次重复的平均值作为各菌株的平均产菌核量。

A.7 菌核活力测定

从敏感菌株及抗药性菌株的菌落边缘切取菌饼，将其接种于产菌核培养基平板中央，每菌株3次重复，于合适温度条件下培养数天，将各皿中所有菌核用接种针挑下，用灭过菌的双层干燥滤纸包裹菌核，每包20粒。将纸包装入保鲜袋中置于20℃黑暗环境中，30d后将菌核取出，使用1%NaClO溶液表面消毒1min，无菌水清洗2次，干燥后置于合适固体培养基平板上培养，3d～5d后观察菌核萌发、菌丝生长的情况，以萌发率作为菌核活力的参考指标并比较在不同温度下放置30d后的菌核在萌发率方面的差异。

A.8 致病力及活体产孢能力

将抗药性菌株及亲本菌株在适宜的培养基上培养，切取菌饼或制备孢子悬浮液，按照适宜的接种方法将其接种于已准备好的活体组织（叶片、果实等）或植株上。置于合适温度（如15℃～21℃）、RH>80%的光照条件下培养，待接种敏感亲本菌株的组织或植株发病后，进行病斑面积或病情严重度的调查。每菌株重复4次。并将发病部位的组织全部放入离心管中，加入无菌水后用振荡器震荡3min，收集分生孢子，使其分散均匀。用血球计数板计数各菌株孢子悬浮液的浓度。计算每个植株或叶片（果实）病斑单位面积上的产孢量，并分析抗药性菌株与敏感亲本菌株产孢量的差异。

A.9 竞争力

选择产孢能力、孢子萌发能力或致病力相当的抗药性菌株和敏感菌株，制备同等浓度的孢子悬浮液，分别按照1:1、1:3和3:1的比例混合，选择适宜的接种方法将其分别接种于已准备好的寄主活体组织（叶片、果实等）或植株上，待其发病后进行菌株分离，检测其中抗药性菌株和敏感菌株的比例。