

水稻二化螟抗药性检测技术规范-饲料混毒法

1 范围

本标准规定了饲料混毒法检测二化螟 (*Chilo suppressalis* (Walker)) 抗药性的方法。

本标准适用于杀虫剂对二化螟室内毒力测定和抗药性评估。

2 术语和定义

2.1 抗药性 Resistance

昆虫忍耐杀死正常种群大部分个体的药量的能力，并在其种群中发展起来的能力。

2.2 敏感基线 Susceptibility baseline

在某种农药使用之前，该种药剂对昆虫敏感品系的毒力基线及 LD₅₀ 或 LC₅₀。

2.3 饲料混毒法 Artificial diet incorporation bioassay method

二化螟幼虫接触、取食混药的人工饲料而中毒死亡的毒力测定方法。

3 试剂与材料

3.1 生物试材：

二化螟：4 龄初期幼虫。

3.2 试验试剂与药剂：

试剂为分析纯，药剂为原药。

4 主要仪器设备

电子天平（感量 0.0001g），手持搅拌机，料理机，毛笔，眼科镊，移液器，平底玻璃管（直径 3cm，高 5cm），1000ml 烧杯（直径 13cm，高 15cm），恒温培养箱、恒温养虫室或人工气候箱，高温高压湿热灭菌锅，微波炉。

5 试验步骤

5.1 卵块采集、管理及混毒饲料配制

5.1.1 卵块采集：

在成虫盛发期，可从田间诱蛾带回室内产卵或从水稻田直接采集二化螟卵块。

5.1.2 卵块孵化及幼虫管理

在玻璃培养皿（直径 9cm）中放入滤纸 3-4 片，并加入适量灭菌蒸馏水保湿，将卵块放入其中，保湿培养至卵块黑头时，将黑头卵块放入装有饲料的玻璃管中，每个玻璃管中放入 1-2 个卵块，塞上棉花塞。待幼虫从卵块中孵出并爬至饲料上后，将卵块残余部分从玻璃管中挑出来，然后将幼虫放置于温度 $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度 60%-70%，光照比（L: D）16: 8hrs（下光照）的光照培养箱中培养至 4 龄。

5.1.3 药剂配制

用电子天平或移液器称量若干原药，加入水或有机溶剂（如丙酮、二甲基甲酰胺等）溶解配制成药剂母液，然后按所需浓度的量用移液器加入到已装有 30ml 含 10%（m/v）Triton-X 100（或吐温 80）灭菌蒸馏水的烧杯（直径 13cm，高 15cm）中，充分混匀后备用。

5.1.4 人工饲料配制方法

按中国农科院植保所（2009）的人工饲料配方进行配制（见附录 B）。具体如下：

- （1） 将各组分按配比称重，备用；
- （2） 将新鲜的茭白切碎，加入水，放入料理机中磨碎并匀浆，匀浆后将其倒入盛有大豆粉、酵母粉、干酪素和蔗糖的灭菌桶中，将上述 5 种组分充分搅拌均匀后，置于高压蒸汽灭菌锅中，于 125°C 下灭菌 30min，灭菌完毕后，取出备用；
- （3） 琼脂中加入纯净水，用微波炉加热并煮至完全溶解后，将其倒入步骤（2）中已灭菌好的饲料中，用手持搅拌机搅拌混匀，并冷却至 60°C 左右备用；
- （4） 将称好的抗坏血酸钠、尼泊金酯、山梨酸、胆固醇、氯化胆碱、威氏盐、复合维生素放入烧杯中，用少量温开水溶解，然后将其倒入步骤（3）中的饲料中，再加入 40% 的甲醛，搅拌直至完全均匀；
- （5） 将搅拌好的饲料倒入无菌的保鲜盒中，完全冷却凝固后存放于 4°C 冰箱中备用。

5.1.5 混毒人工饲料的配制方法

按上述方法制备人工饲料，在加入 40% 的甲醛并搅拌均匀后，在预先盛有 30ml 药液（含 10%（m/v）的 Triton-X 100（或吐温 80））的烧杯中快速加入 270 克人工饲料，并用手持搅拌机充分搅拌混匀制得混毒饲料，然后快速地用 10ml 移液器将混毒饲料分装至平底玻璃管（直径 3cm，高 5cm）中，饲料含量为 8ml/管，然后塞上棉花塞，贴好标签，用橡皮筋按 5 管/组扎好，待其完全冷却凝固后存放于 4°C 冰箱中备用。空白对照处理的饲料中，以不含药剂的 30ml 灭菌蒸馏水（含 10%（m/v）的 Triton-X 100（或吐温 80））代替药液，其余处理同混毒饲料。

5.2 处理方法

将混毒饲料（或无毒饲料）挑入平底玻璃管中。然后将 4 龄初期幼虫挑入，虫量为 10 头/管，并把相同浓度处理的玻璃管用橡皮筋扎好。将其置于温度 $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度 60%-70%，光照比（L: D）16:

8hrs（下光照）的培养箱中。每个浓度处理 4 次重复。

5.3 结果检查

根据杀虫剂的杀虫特性分别于接虫后的 48-144 小时检查。菊酯类、有机磷类、大环内酯类药剂在药后 48 小时检查；苯基吡唑类、酰胺类和沙蚕毒素类在药后 96 小时检查；昆虫生长调节剂类药剂在药后 144 小时检查。死亡标准为：以小毛笔或尖锐镊子轻触虫体，不能正常爬行者视作为死亡个体。

6 数据统计与分析

6.1 计算方法

根据调查数据，计算各处理的校正死亡率。按公式（1）和（2）计算，计算结果均保留到小数点后两位：

$$P_1 = \frac{K}{N} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

P_1 ——死亡率，单位为百分率（%）；

K ——表示死亡虫数，单位为头；

N ——表示处理总虫数，单位为头。

$$P_2 = \frac{P_t - P_0}{1 - P_0} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中：

P_2 ——校正死亡率，单位为百分率（%）；

P_t ——处理死亡率，单位为百分率（%）；

P_0 ——空白对照死亡率，单位为百分率（%）。

若对照死亡率<5%，无需校正；对照死亡率在5%~20%之间，应按公式（2）进行校正；对照死亡率>20%，试验需重做。

6.2 统计分析

采用SAS、EPA、POLO、BA、DPS等统计分析系统软件的机率值分析法进行统计分析，求出每个药剂的毒力回归方程式、 LC_{50} 值及其95%置信限、b值及其标准误。

7 抗性水平评估

7.1 二化螟敏感毒力基线的制定

二化螟抗性监测的敏感毒力基线见附录A。

7.2 抗性水平的分级标准

抗性水平的分级标准见表1。

表1 二化螟抗性水平的分级标准

抗性水平分级	抗性倍数
敏感	$RR \leq 5.0$ 倍
低水平抗性	$5.0 < RR \leq 10.0$
中等水平抗性	$10.0 < RR \leq 100.0$
高水平抗性	$RR > 100.0$

7.3 抗性水平的计算与评估

根据敏感品系的 LC_{50} 值和测试种群的 LC_{50} 值，计算测试种群的抗性倍数。按下式计算，计算结果均保留到小数点后一位：

$$\text{抗性倍数} = \text{测试种群的} LC_{50} / \text{敏感品系的} LC_{50}$$

按照抗性水平的分级标准，对测试种群的抗性水平作出评估。

8 监测报告编写

根据统计结果和抗性水平评估，写出正式抗性检（监）测报告，并列原始数据。

附录A
(资料性附录)
部分杀虫剂对水稻二化螟的敏感毒力基线

表 A 1. 部分杀虫剂对二化螟敏感品系的毒力基线

药剂	LD-P 线 Y=	LC ₅₀ (95%置信限) (mg a. i. /Kg)
阿维菌素	9.0687+2.4126X	0.0206 (0.0169-0.0250)
杀虫单	4.4854+2.7473X	1.54 (1.32-1.79)
氯虫苯甲酰胺	6.0179+2.8121X	0.4345 (0.3746-0.5041)
氟虫双酰胺	4.8056+1.4738X	1.355 (1.036-1.772)
甲氨基阿维菌素苯甲酸盐	12.8128+2.9423X	0.0022 (0.0019-0.0026)
三唑磷	5.303+2.9728X	0.7908 (0.6764-0.9246)
毒死蜱	5.1034+3.0929X	0.9259 (0.787-1.089)

注：敏感品系为2010年引自中国农科院植保所，且在本研究室内经3代次单卵块筛选，在室内不接触任何药剂的情况下以人工饲料饲养30余代的二化螟品系。

附录 B
(资料性附录)
二化螟人工饲料的组份及其配比

A、主要组分配比：

大豆粉 4.37%；酵母粉 2.91%；干酪素 1.46%；蔗糖 1.46%；鲜茭白 14.56%；琼脂 1.75%； 辅
料 0.71%；水 72.78%。

B、每种辅料中各成份配比：

抗坏血酸钠 (Vc) 0.437%；山梨酸 0.146%；胆固醇 0.029%；氯化胆碱 0.044%；威氏盐 0.015%；复
合维生素B 0.002%；40%甲醛 0.044%。

资料选自：中国农业科学院植物保护研究所，专利号：CN200910080336.2。