

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3622—2020

马铃薯抗马铃薯Y病毒病鉴定技术规程

Technical code of practice for evaluation of potato
resistance to Potato virus Y

2020-07-27 发布

2020-11-01 实施



中华人民共和国农业农村部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由农业农村部种植业管理司提出并归口。

本标准起草单位：中国农业科学院蔬菜花卉研究所。

本标准主要起草人：杨宇红、茆振川、谢丙炎、凌键、李彦、徐东辉。

马铃薯抗马铃薯 Y 病毒病鉴定技术规程

1 范围

本标准规定了马铃薯抗马铃薯 Y 病毒病(Potato virus Y, PVY)鉴定方法与评价标准。

本标准适用于马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)品种和材料对马铃薯 Y 病毒病抗性的室内鉴定及评价。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的引用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,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(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 36816 马铃薯 Y 病毒检疫鉴定方法

NY/T 1858.6 番茄抗番茄花叶病毒病鉴定技术规程

SN/T 1840 植物病毒免疫电镜检测方法

3 术语和定义

NY/T 1858.6 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

马铃薯 Y 病毒病 potato virus Y

由马铃薯 Y 病毒侵染马铃薯引起的植株表现重型花叶、叶脉坏死和垂叶条斑坏死等症状的病毒性病害。病害症状及病毒主要性状参见附录 A。

4 试剂与材料

除非另有说明,本方法所用试剂均为分析纯或生化试剂。

4.1 0.03 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)(pH 7.0)

先分别配制 A 液和 B 液,再用 B 液调配 A 液至 pH 7.0 即可。

A 液为 0.03 mol/L 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)液:称取 10.74 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶于 1 L 无离子水中,摇匀。

B 液为 0.03 mol/L 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)液:称取 4.08 g KH_2PO_4 溶于 1 L 无离子水中,摇匀。

4.2 感病对照品种

从下列感病品种中选择 1 个~2 个作为感病对照:合作 88、丽薯 6 号、米拉、男爵或夏坡地(Shepody)。

4.3 PVY 繁殖寄主

以黄苗榆烟(*Nicotiana tabacum* cv. Huang miaoyu)、珊西烟(*N. tabacum* cv. Xanthi-NC)、三生烟(*N. tabacum* cv. Samsun)或心叶烟(*N. glutinosa*)为 PVY 繁殖寄主。

4.4 育苗基质

直接购买商品化蔬菜育苗基质,或将草炭、蛭石和菜田土按体积 2 : 1 : 1 混合均匀,于 $(134 \pm 1)^\circ\text{C}$ 湿热灭菌 1 h。

4.5 其他用品

600 目金刚砂、硅胶、氯化钙(CaCl_2)等。

5 抗病性鉴定

5.1 材料育苗

将供鉴定的脱毒健康种薯置于 15℃~20℃下催芽。待薯芽长为 1 cm~1.5 cm 时,播种于装有育苗基质的育苗钵内,每钵播种 1 个小薯;也可将无毒组培苗种于育苗钵中。置于防虫日光温室里育苗,温度保持在 21℃~25℃,常规水肥管理,自然光照。

5.2 接种体制备

5.2.1 病毒分离、纯化

马铃薯 Y 病毒的分离、纯化与保存见附录 B。

5.2.2 接种体繁殖、制备

针对育种目的,选择 PVY 对应株系或混合株系作为接种毒源,PVY 株系鉴定按照 GB/T 36816 的规定执行。取少量马铃薯 Y 病毒供试株系的冻干叶或在繁殖寄主上保存的病叶,加少量 PBS 缓冲液在碾钵中碾碎,人工摩擦接种在 PVY 繁殖寄主幼苗的叶片上,置 25℃~28℃的防虫温室内培养约 2 周后采收病叶。1 g 鲜病叶加 10 mL 的 0.03 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.0),研磨后双层纱布过滤或 3 000 r/min 离心 15 min,其滤液或上清液即为接种悬浮液,用于人工接种。

5.3 接种

5.3.1 接种时期

幼苗生长至 4 叶~6 叶期。

5.3.2 接种浓度

病叶/ PBS 缓冲液(pH 7.0)为 1/10(w/V),配制方法同 5.2.2。

5.3.3 接种方法

接种前 1 d 给植株浇足水分,并将马铃薯幼苗黑暗处理 24 h。接种方法主要有以下 2 种:

- a) 摩擦接种法:接种前用肥皂将手洗净,选取植株上部 3 片复叶的顶叶,在叶面上均匀撒布 1 薄层 600 目金刚砂,然后用一只手掌托起叶片,另一只手用手指蘸取病毒接种悬浮液沿叶脉按顺序轻轻摩擦接种,用力程度以接种叶片表面无严重损伤为度。该方法宜用于少量材料鉴定。
- b) 喷枪接种法:将混有金刚砂的马铃薯 Y 病毒接种悬浮液用喷雾枪距植株 5 cm 左右处喷射接种,接种时喷雾枪压力为 1.5 kg/cm²~2 kg/cm²。该方法宜用于大量材料鉴定。

接种后,用洗瓶轻轻冲洗接种叶片表面的残留物。3 d~5 d 后重复接种 1 次。

鉴定材料随机排列,每份材料设 3 个重复,每重复不少于 10 株苗。

5.3.4 接种后管理

接种后置于白天温度 24℃~30℃、夜间不低于 20℃的防虫日光温室里培养,常规光照,正常栽培管理。

6 病情调查

6.1 调查方法

接种后 25 d~30 d 调查每份鉴定材料接种株发病情况,根据表 1 中的病害症状描述,逐份材料逐株进行调查,记载接种株病情级别,按式(1)计算病情指数(Disease Index, DI)。

6.2 病情级别划分

植株病情分级及其对应的症状描述见表 1。

表 1 马铃薯抗马铃薯 Y 病毒病接种鉴定的病情级别划分

病情级别	症状描述
0	无任何症状
1	心叶明脉或轻花叶
3	上部叶片轻花叶,个别叶脉或叶柄或茎上产生坏死
5	上中部叶片重花叶,少数叶脉、叶柄或茎产生坏死;个别叶片变小、变脆并皱缩
7	多数叶片重花叶,部分叶脉、叶柄或茎产生较多坏死斑;少数叶片变小、变脆并皱缩或落叶,植株稍矮化
9	多数叶片重花叶、变小、变脆并皱缩,叶柄或茎部出现黑褐色坏死条斑,或植株明显矮化、落叶,甚至死亡

6.3 病情指数计算

病情指数(DI)按式(1)计算。

$$DI = \frac{\sum (s \times n)}{N \times S} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中:

$\sum$ ——各病情级别数值与相对应的各病情级别植株数乘积的总和;

s ——各病情级别数值;

n ——各病情级别的病株数,单位为株;

N ——调查的总株数,单位为株;

S ——病情级别的最高数值。

7 抗病性评价

7.1 抗性评价标准

抗性划分标准见表 2。

表 2 马铃薯抗马铃薯 Y 病毒病的评价标准

病情指数(DI)	抗性评价
$DI=0$	免疫(I)
$0 < DI \leq 5$	高抗(HR)
$5 < DI \leq 20$	抗病(R)
$20 < DI \leq 35$	中抗(MR)
$35 < DI \leq 60$	感病(S)
$DI > 60$	高感(HS)

7.2 鉴定有效性判别

当感病对照材料达到其相应感病程度($DI > 35$),该批次鉴定结果视为有效。

7.3 抗性判断

依据鉴定材料 3 个重复的平均病情指数(DI)确定其抗性水平,写出正式鉴定报告,并附原始记录(鉴定结果记录见附录 C)。

8 鉴定材料处理

鉴定完毕后,将马铃薯发病植株、残体集中进行无害化处理,用于鉴定的育苗基质采用高温灭菌。

附 录 A
(资料性附录)
马铃薯 Y 病毒及株系

A.1 症状描述

植株被 PVY 侵染后,主要表现重型花叶、叶脉坏死和垂叶条斑坏死等症状,随感染 PVY 的株系、栽培品种、天气状况和感染类型的不同而各异。一般植株感病初期,叶片呈现花叶、皱缩,小叶叶缘向下卷曲,叶片有坏死斑点,或病叶背面叶脉坏死。严重时,叶柄及茎部均有黑褐色坏死条斑、质脆易折,叶片干枯但基本不脱落,挂于坏死的茎秆上,病株矮小,甚至块茎也坏死。

A.2 学名和主要性状

A.2.1 学名

马铃薯 Y 病毒(Potato virus Y, PVY),属于马铃薯 Y 病毒科(Potyviridae),马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*)。

A.2.2 主要性状

PVY 粒体为弯曲的线条状粒体,无包膜,长 680 nm~750 nm,直径 11 nm~12 nm。粒体螺旋对称结构,螺距 3.4 nm,分子量 $(36\sim39)\times10^6$ 。颗粒含有约 5%的核酸和 95%的蛋白质。病毒基因组为正义单链 RNA,大小为 8 kb~11 kb。在 CsCl 中浮力密度为 1.31 g/cm³。致死温度 52℃~62℃,稀释限点 10⁻³~10⁻²,体外存活期为 48 h~72 h。

PVY 寄主范围较广,能侵染茄科多种植物。主要通过桃蚜(*Myzus persicae* Sulzer)等 20 多种有翅蚜以非持久性方式传播,无潜育期,蚜虫持毒时间不超过 1 h,不能跨龄期传毒。汁液和嫁接也可传毒,块茎可能带毒,部分寄主作物中 PVY 还可以通过种子传播。在马铃薯生产中,PVY 主要通过带毒种苗种薯传播。

A.3 PVY 株系分化

De Bokx 等将 PVY 划分为 3 个株系:PVY^O(普通株系),引起马铃薯严重的系统性花叶、卷曲、叶和茎的坏死等症状;PVY^N(脉坏死株系),几乎在所有的马铃薯栽培品种上,仅引起轻度的斑驳,但却造成烟草严重的系统性脉坏死;PVY^C(点刻条斑株系),在许多含有 *Nc* 基因的马铃薯品种上产生过敏性坏死反应,在另一些品种上造成系统花叶。我国主要发生的是 PVY^N株系与 PVY^O株系。近年来,一些新的变异或重组株系陆续地被鉴定,如 PVY^Z、PVY^E、PVY^{NTN}、PVY^{N:O}、PVY^{NW}、PVY^{SYR}、PVY^{N-Wi}、PVY^{NTN-NW}等。

附 录 B
(规范性附录)
病毒分离、纯化

B.1 PVY 分离、纯化

在马铃薯 Y 病毒(PVY)发生期,采集疑似感染马铃薯 Y 病毒的马铃薯叶片,采用汁液磨擦法接种在 PVY 的特定分离寄主苋色藜(*Chenopodium amaranticolor*)的叶片上,10 多 d 后,待苋色藜接种叶上出现具红褐色边缘的局部枯斑时,取新鲜枯斑连续 3 次在苋色藜叶片上进行单斑转移接种以纯化病原物,并将纯化的病原物分别接种到珊西烟或黄苗榆烟幼苗的叶片上进行繁殖,再用血清学检测、电子显微镜观察病毒粒子形态及 RT-PCR 等方法对纯化病原物进行鉴定,鉴定方法按 GB/T 36816 和 SN/T 1840 的规定执行,确定为马铃薯 Y 病毒分离物后,最后经柯赫氏法则(Koch's Rule)验证,保存备用。

B.2 毒源保存

纯化后的毒源可常年保存在 PVY 繁殖寄主上,植株置于无虫、温度 20℃~28℃、自然光照的防虫温室内;也可将分离鉴定的 PVY 毒株接种到易感马铃薯品种的无病毒组培苗上,在 7℃~8℃低温、光照培养箱中继代繁殖。或将鲜病叶制作成冻干叶放在装有硅胶或氯化钙的容器里,置-20℃或更低温度的低温冰箱中保存。

冻干叶的简易制作法:将鲜病叶剪成小块,与干燥硅胶或氯化钙隔层(用滤纸隔开)放置在密封的容器里,再将容器置于 4℃冰箱里,前 2 d 每天换 1 次干燥剂,以后每 2 d 换 1 次,直到病叶彻底干燥即成冻干叶。整个制作过程应防止其他病毒污染。

附 录 C
(规范性附录)
马铃薯抗马铃薯 Y 病毒病鉴定结果记录表

马铃薯抗马铃薯 Y 病毒病接种鉴定结果记录表见表 C.1。

表 C.1 马铃薯抗马铃薯 Y 病毒病鉴定结果记录表

编 号	品种/种质 名 称	来 源	重复	病情级别						病情 指数	平均 病指	抗性 评价
				0	1	3	5	7	9			
			I									
			II									
			III									
播种日期			接种日期									
接种生育期			接种病毒分离物编号									
株系类型			调查日期									

记录人(签字):

审核人(签字):



中 华 人 民 共 和 国
农 业 行 业 标 准

马铃薯抗马铃薯 Y 病毒病鉴定技术规程

NY/T 3622—2020

* * *

中国 农业 出版社 出版

(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)

(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)

北京印刷一厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 0.75 字数 15 千字

2020 年 10 月第 1 版 2020 年 10 月北京第 1 次印刷

书号: 16109 · 8175

定价: 18.00 元



NY/T 3622—2020

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261