

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3063—2016

马铃薯抗晚疫病室内鉴定技术规程

Code of practice for evaluation of potato resistance to late blight in greenhouse

2016-12-23 发布

2017-04-01 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则编写。

本标准由农业部种子管理局提出并归口。

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、谢丙炎、冯兰香、茆振川、凌键、陈国华。

马铃薯抗晚疫病室内鉴定技术规程

1 范围

本标准规定了马铃薯抗晚疫病(late blight)离体叶片和盆栽鉴定方法与评价标准。

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

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

马铃薯晚疫病 potato late blight

由致病疫霉[*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary] 侵染马铃薯叶片、叶柄、茎和块茎引起的一种流行性卵菌病害(病害诊断参见附录 A)。

3 试剂与材料

3.1 15%二甲亚砜(DMSO)溶液

在 85 mL 灭菌水中加入 15 mL 二甲亚砜,混匀后贮存于 4℃ 冰箱中。

3.2 抗生素母液

称取 2.0 g 氨苄青霉素、0.2 g 利福平、1.0 g 制霉菌素分别溶于少量水中,其中,利福平需先溶于少量二甲亚砜中,搅拌至溶解后加水定容至 100 mL 制成 3 种抗生素的母液,经细菌过滤器过滤后,贮存于 4℃ 冰箱中备用。

3.3 培养基

3.3.1 黑麦培养基

黑麦粒 60 g、蔗糖 20 g、琼脂粉 15 g、水 1 000 mL。先将黑麦粒用水浸泡 24 h~36 h,用捣碎机捣碎后经 3~4 层纱布过滤,取浸泡水和滤液加水定容至 1 000 mL,加入蔗糖、琼脂,加热并搅拌至琼脂完全溶化后,于(121±1)℃ 高压灭菌 15 min。

3.3.2 选择性黑麦培养基

当 100 mL 灭菌黑麦培养基冷却至约 50℃ 时,加入 3 种抗生素母液各 1 mL。使培养基中氨苄青霉素、利福平和制霉菌素的终浓度分别为 200 μg/mL、20 μg/mL 和 100 μg/mL。

3.3.3 黑麦粒培养基

在 50 mL 离心管中加入 3.3 g 黑麦粒和 20 mL 水,浸泡 12 h 后,于(121±1)℃ 高压灭菌 15 min。注意灭菌时不要将管盖完全拧紧,灭菌后再拧紧管盖备用。

3.4 对照材料

以马铃薯‘底西瑞(Desiree)’或‘费乌瑞它(Favurit)’等感病品种为感病对照。

3.5 育苗基质

将草炭、蛭石和菜田土按体积 2:1:1 混合均匀,于(134±1)℃ 湿热灭菌 1 h。或直接购买商品化蔬菜育苗基质。

3.6 其他用品

培养皿、托盘、离心管、烧杯、量筒、锥形瓶、纱布、滤纸、酒精灯、细菌过滤器、小型手持喷雾器、育苗钵等。

4 仪器设备和设施

4.1 显微镜

放大倍率:40 倍~1 000 倍。

4.2 恒温培养箱

温度范围:0℃~50℃,温度波动不大于 1℃。

4.3 高压灭菌锅

灭菌温度范围:104℃~135℃,灭菌时间范围:4 min~120 min,最高工作压力:0.25 MPa~0.22 MPa。

4.4 移液器

量程体积:2 μL~20 μL,系统误差:±1.2%,随机误差:±0.6%。

4.5 电子天平

称量范围:0 g~1 000 g,分度值:0.01 g。

4.6 捣碎机

额定转速:10 000 r/min~12 000 r/min,处理量:500 mL,工作方法:断续。

4.7 超净工作台

洁净等级:100 级@≥0.5 μm,菌落数:≤0.5 个/(皿·h)(φ90 mm 培养皿),平均风速:0.25 m/s~0.6 m/s。

4.8 人工接种鉴定室

具备人工调节温度、湿度及光照的条件,使人工接种后具备良好的发病环境。

5 鉴定方法

5.1 离体叶片法

5.1.1 材料育苗

将供鉴定材料及感病对照的种薯置于 15℃~20℃下催芽。待薯芽长 1 cm~1.5 cm 时,将种薯切成每块只带 1 个健康芽眼的薯块,芽眼朝下播于装有育苗基质的育苗钵内,每钵播种 1 块,置于日光温室里,温度保持在 18℃~25℃,常规水肥管理,自然光照。待幼苗长到 7 片~10 片复叶时,选择生长一致、健壮的幼苗用于抗病性鉴定。

5.1.2 接种体制备

见附录 B。

5.1.3 接种

从植株顶部计起,取第 3、4、5 片展开叶,背面朝上置于双层湿润灭菌滤纸上,在每个小叶叶背主叶脉的一侧用微量移液器滴加 10 μL 浓度为 8×10^3 个孢子囊/mL 的孢子囊悬浮液。每份材料设 3 个重复,每重复不少于 6 片复叶。

5.1.4 接种后管理

接种后将容器用保鲜膜封好,置于 18℃~20℃光照培养箱内,在每日光照 16 h,黑暗 8 h,相对湿度 100%条件下培养。

5.1.5 病情调查

5.1.5.1 调查方法

接种后 5 d~6 d,以复叶的每片小叶为调查单位,测定病斑面积及观察有无孢子囊和霉层,根据表 1 中的病害症状描述,逐份材料进行调查,记载接种叶片病情级别。

5.1.5.2 病情级别划分

马铃薯抗晚疫病离体叶片法鉴定的病情级别划分见表 1。

表 1 马铃薯抗晚疫病离体叶片法鉴定的病情级别划分

病情级别	症状描述
0	接种叶叶片上无症状
1	仅在叶片上出现针尖大小的枯死斑
2	病斑直径小于 0.5 cm,周围无褪绿晕圈
3	病斑直径 0.5 cm ~1.0 cm,病斑水浸状且周围有褪绿晕圈,病斑表面可见到白色菌丝体
4	病斑继续扩大,占叶片总面积的 1/2,病斑周围有明显的褪绿圈,并有明显的白色霉层
5	病斑占叶片面积的 2/3 以上,病斑表面有大量的白色霉状物,并出现组织坏死

5.1.5.3 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：
DI ——病情指数；
s ——各病情级别数值；
n ——各病情级别的病叶(株)数；
N ——调查的总叶(株)数；
S ——病情级别的最高数值。

5.1.6 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。

5.2 盆栽喷雾法

5.2.1 材料育苗

同 5.1.1。

5.2.2 接种

采用喷雾接种法。将在温室内生长 1.5 个月~2 个月的幼苗移到人工接种鉴定室进行喷雾接种,以叶片布满菌液但无滴落为度。接种液浓度为 8×10³个孢子囊/mL。鉴定材料随机或顺序排列,每份鉴定材料设 3 个重复,每一重复不少于 10 株苗。

5.2.3 接种后管理

接种后在 100%相对湿度下保湿 2 d 后,将相对湿度降为 70%左右。接种期间温度保持在 15℃~20℃范围内,每天光照 16 h,待 4 d~5 d 发病后继续盖膜保持 100%的相对湿度,24 h 后进行调查。

5.2.4 病情调查

5.2.4.1 调查方法

接种后 6 d~7 d 调查病情。以植株为单位调查每份鉴定材料接种后植株的发病情况,根据表 2 病害症状描述,逐份材料记载接种植株病情级别,按式(1)计算病情指数(DI)。

5.2.4.2 病情级别划分

接种植株病情分级及其对应的症状描述见表 2。

表 2 马铃薯抗晚疫病盆栽喷雾法鉴定的病情级别划分

病情级别	症状描述
0	全株叶片无病斑
1	1/5 以下叶片上有个别病斑,茎秆无病斑
3	病叶占全株总叶片数的 1/4 以下,或植株上部茎秆有个别小病斑
5	病叶占全株总叶片数的 1/4~1/2,或植株上部茎秆有扩展型病斑
7	病叶占全株总叶片数的 1/2 以上,或植株中下部茎秆上有较大病斑
9	全株叶片几乎都有病斑,或大部分叶片枯死,甚至茎部枯死

5.2.5 鉴定材料处理

同 5.1.6。

6 抗病性评价

6.1 离体叶片法抗病性评价

6.1.1 评价标准

抗性划分标准见表 3。

表 3 马铃薯抗晚疫病离体叶片法鉴定的评价标准

病情指数(DI)	抗性评价
$DI \leq 20$	高抗(HR)
$20 < DI \leq 40$	抗病(R)
$40 < DI \leq 60$	中感(MS)
$60 < DI \leq 80$	感病(S)
$DI > 80$	高感(HS)

6.1.2 鉴定有效性判别

当感病对照材料达到其相应感病程度($DI > 60$),该批次抗晚疫病鉴定结果视为有效。

6.1.3 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(参见附录 C)。

6.2 盆栽喷雾法抗病性评价

6.2.1 评价标准

抗性划分标准见表 4。

表 4 马铃薯抗晚疫病盆栽喷雾法鉴定的评价标准

病害指数(DI)	抗性评价
$DI \leq 1$	高抗(HR)
$1 < DI \leq 10$	抗病(R)
$10 < DI \leq 20$	中抗(MR)
$20 < DI \leq 30$	中感(MS)
$30 < DI \leq 40$	感病(S)
$DI > 40$	高感(HS)

6.2.2 鉴定有效性判别

当感病对照的植株达到其相应感病程度($DI > 30$),该批次鉴定结果视为有效。

6.2.3 抗性判断

同 6.1.3。

附 录 A
(资料性附录)
马铃薯晚疫病

A.1 症状描述

主要受害部位为叶片、叶柄、茎和块茎,多从植株下部叶片开始。叶片染病在叶尖或叶缘出现水渍状、绿褐色斑点,病斑周围具浅绿色晕圈,湿度大时病斑迅速扩大为褐色,并在其周围产生一圈白霉,尤以叶背最明显;茎部或叶柄的病斑为褐色条斑,气候潮湿或多雾重露之后,病斑上也可产生白色霉层,多雨条件下整个植株腐败变黑;感病块茎上形成大小不等、不规则形、微凹陷的病斑,病斑组织为浅褐色至深褐色的坏死,病薯入窖后往往大批腐烂。

A.2 病原菌

A.2.1 学名

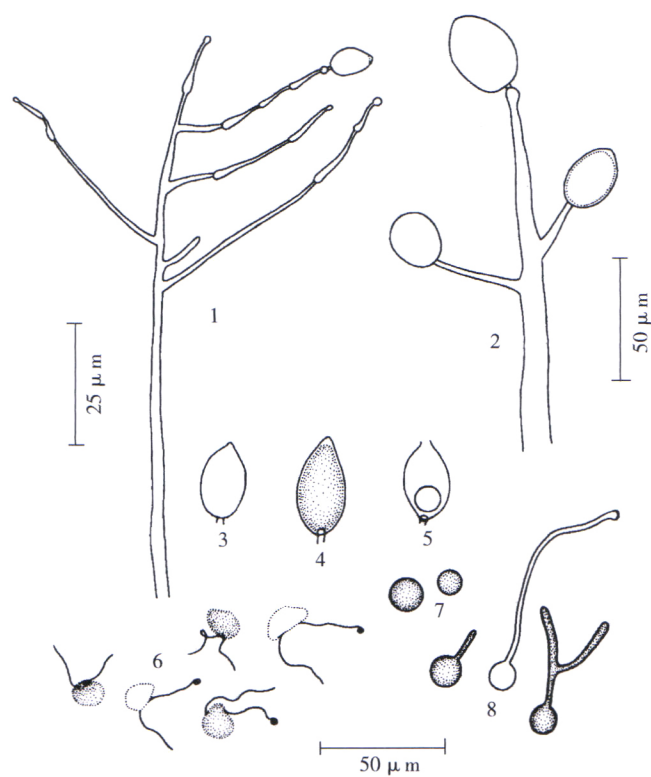
致病疫霉 [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary]。属于卵菌纲 (Oomycetes) 霜霉目 (Peronosporales) 腐霉科 (Pythiaceae) 疫霉属 (*Phytophthora*)。

A.2.2 形态描述

晚疫病菌适宜在黑麦琼脂培养基或黑麦番茄汁培养基上生长,菌落白色。菌丝无色、无隔、自由分枝。孢囊梗由菌丝生出,直立、合轴分枝,顶端膨大形成 1 个孢子囊后,孢囊梗又向上生长,将孢子囊推向一侧,顶端再次膨大形成新的孢子囊,使整个孢囊梗呈粗细相间的结节状;孢囊梗顶端尖细,孢子囊顶生或侧生,无色、单胞、卵圆形或近圆形,大小为 $(21\sim38)\mu\text{m}\times(12\sim23)\mu\text{m}$;顶端有半乳突,基部具短柄,较易脱落。每个孢子囊可释放 5~12 个游动孢子。游动孢子肾形、双鞭毛,在水中游动片刻后静止,鞭毛收缩成为休止孢(见图 A.1)。卵孢子橘黄色,球形或近球形,尺度为 $(24.5\sim49.1)\mu\text{m}\times(23.5\sim47.2)\mu\text{m}$ 。藏卵器近球形,橘黄色至橘红色,尺度为 $(29.5\sim54.1)\mu\text{m}\times(29.0\sim53.2)\mu\text{m}$,藏卵器穿过雄器,雄器半球形至近球形,无色,尺度为 $(18.5\sim23.2)\mu\text{m}\times(10.5\sim15.5)\mu\text{m}$ 。

A.2.3 生物学特性

晚疫病菌的菌丝生长温度为 $10^{\circ}\text{C}\sim30^{\circ}\text{C}$,最适为 $20^{\circ}\text{C}\sim23^{\circ}\text{C}$,适宜 pH 为 5~9,最适 pH 为 6~7;孢子囊形成温度为 $3^{\circ}\text{C}\sim26^{\circ}\text{C}$,最适为 $18^{\circ}\text{C}\sim22^{\circ}\text{C}$,在 $10^{\circ}\text{C}\sim13^{\circ}\text{C}$ 下孢子囊间接萌发产生游动孢子,若温度超过 15°C ,孢子囊直接萌发,高于 35°C 则不能萌发;孢子囊形成要求相对湿度高于 97%,萌发及侵入均要有水滴存在。光照不利于病菌的生长及产孢,且抑制孢子囊的萌发。卵孢子存活能力很强,在 35°C 和 -80°C 下可存活 48 h,在 8°C 时卵孢子产量最大。



说明：

1、2——孢囊梗和孢子囊；

6——游动孢子；

3、4——孢子囊；

7——休止孢子；

5——空孢子囊留有一休止孢子；

8——休止孢子萌发。

图 A. 1 致病疫霉的形态特征[引自《中国真菌志》(第 6 卷), 1998]

附 录 B
(规范性附录)
接种体制备

B.1 晚疫病菌分离、保存

B.1.1 分离

将具有典型晚疫病症状的病叶用水冲洗去表面的污物后,叶背朝上置于灭菌的 1.6%~2.0%水琼脂培养基上,或叶背朝上放在灭菌的培养皿内。用 95%酒精火焰消毒马铃薯薯块表面,切成厚约 5 mm 的薄片,放于病叶上。封盖后将培养皿放在 $(19\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 培养箱内黑暗保湿培养,待叶背或薯片表面长出白色霉层(菌丝体和孢囊梗)时,用灭菌挑针挑取白色霉层至选择性黑麦培养基上培养。分离物鉴定参照附录 A,确认为致病疫霉后,采用挑取单孢子囊的方法进行分离物纯化,并保存备用。

单孢子囊挑取方法:在超净台里,挑取薯片上或黑麦培养基平板上的菌丝,移入蔗糖溶液($1\,000\ \mu\text{g/L}$)中,配成孢子囊液。用移液枪取 $2\ \mu\text{L}$ 孢子囊液置于灭菌盖玻片上,镜检。当检查到该 $2\ \mu\text{L}$ 液滴里只有 1 个孢子囊时,将该盖玻片放入培养皿里,盖玻片上面压上薯片,置于 $(17\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 恒温生化培养箱里培养,约 5 d 后薯片上长出的菌丝即为单孢子囊分离物。

B.1.2 保存

将孢子囊悬浮液与 15%二甲亚砜等量混合后置于液氮中保存;或将菌株移至黑麦粒培养基中, $(18\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 培养 15 d 左右,置于 $(14\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱内保存。

B.2 接种体繁殖、制备

针对育种目的,选择相应的优势小种(小种鉴定方法参见附录 D)或混合小种作为接种病原菌。将纯化的晚疫病菌株接种到黑麦培养基或表面消毒的感病马铃薯薯片上,置 $(18\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 条件下黑暗培养,待孢子囊大量产生后(黑麦培养基上培养 10 d~14 d、马铃薯薯片上培养 3 d~5 d),用无菌水洗下孢子囊,双层纱布过滤后制成孢子囊悬浮液,血球计数器计数,加适量无菌水调整至接种浓度,接种前置 4°C 冰箱中 2 h~3 h 诱发游动孢子的释放即为接种孢子悬浮液。

附 录 C
(资料性附录)
鉴定结果原始记录表

C.1 马铃薯抗晚疫病离体叶片法鉴定结果记录表

见表 C.1。

表 C.1 马铃薯抗晚疫病离体叶片法鉴定结果记录表

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	2	3	4	5			
			I									
			II									
			III									
	感病对照		I									
			II									
			III									
播种日期		接种日期										
接种生育期		接种病原菌株编号										
小种类型		调查日期										

鉴定技术负责人(签字):

C.2 马铃薯抗晚疫病盆栽喷雾法鉴定结果记录表

见表 C.2。

表 C.2 马铃薯抗晚疫病盆栽喷雾法鉴定结果记录表

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									
	感病对照		I									
			II									
			III									
播种日期		接种日期										
接种生育期		接种病原菌株编号										
小种类型		调查日期										

鉴定技术负责人(签字):

附 录 D
(资料性附录)
马铃薯晚疫病菌生理小种

D.1 鉴别寄主

国内外普遍采用的鉴别寄主为 11 个含有主效抗病基因 $R1—R11$ 和 1 个不含抗病基因 $R0$ 的马铃薯品种： $R1$ (CEBECO 43154 - 5)、 $R2$ (CEBECO 44158 - 4 或 Black 1512c)、 $R3$ (CEBECO 4642 - 1)、 $R4$ (CEBECO 4431 - 5)、 $R5$ (Black 3053 - 18)、 $R6$ (Black XD2 - 21)、 $R7$ [Black 2182ef(7)]、 $R8$ [Black 2424a(5)]、 $R9$ [Black 2573(2)]、 $R10$ [Black 3681ad(1)]、 $R11$ [Black 5008ab(6)]和 $R0$ (Bintje)。

D.2 生理小种鉴定

根据病原菌菌株对鉴别寄主的侵染性,以特定的侵染反应组合划分生理小种(见表 D.1)。

表 D.1 马铃薯晚疫病菌生理小种的鉴定

鉴别寄生	生理小种																					
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	1.2	1.3	1.4	2.4	3.4	1.2.4	1.3.4	2.3.4	...	
Bintje	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
CEBECO 43154 - 5	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R		
CEBECO 44158 - 4 或 Black 1512c	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R	S		
CEBECO 4642 - 1	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S		
CEBECO 4431 - 5	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S		
Black 3053 - 18	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
Black XD2 - 21	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
Black 2182ef(7)	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
Black 2424a(5)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
Black 2573(2)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
Black 3681ad(1)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
Black 5008ab(6)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R		
注:S表示感病;R表示抗病。																						