

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3346—2019

马铃薯抗青枯病鉴定技术规程

Technical code of practice for evaluation of potato resistance to bacterial wilt

2019-01-17 发布

2019-09-01 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、谢丙炎、茆振川、凌键、李彦。

马铃薯抗青枯病鉴定技术规程

1 范围

本标准规定了马铃薯抗青枯病(bacterial wilt)鉴定方法与评价标准。

本标准适用于马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)品种和材料对青枯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应用是必不可少的。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。

NY/T 1858.4 番茄抗青枯病鉴定技术规程

SN/T 1135.9 马铃薯青枯病菌检疫鉴定方法

3 术语和定义

NY/T 1858.4 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

马铃薯青枯病 **Potato bacterial wilt**

由茄科劳尔氏菌[*Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.]侵染马铃薯植株引起的一种全株性萎蔫的细菌性维管束病害。病害症状及病原菌生物学性状参见附录 A。

3.2

生理小种 **physiological race**

病原物种内在形态上无差异,但在不同种植物和品种上具有显著致病性差异的类群。

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 TTC(2,3,5-氯化三苯基四氮唑)母液

称取 1 g TTC 溶于 100 mL 蒸馏水中,完全溶解后,用细菌过滤器过滤灭菌,保存于 4℃ 的棕色试剂瓶中备用。

4.2 培养基

培养基包括青枯菌培养基和马铃薯组培苗培养基。各种培养基的配方及配制方法见附录 B。

4.3 对照材料

以马铃薯‘米拉’或‘合作-88’等感病品种为感病对照。

4.4 育苗基质

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

4.5 其他用品

培养皿、离心管、枪头、冻存管、手术刀、剪刀、移植环、烧杯、量筒、试剂瓶、锥形瓶、酒精灯、组培苗培养盒、育苗钵等。

5 仪器设备和设施

恒温光照培养箱、高压灭菌锅、移液器、电子天平、超净工作台、冰箱、人工接种鉴定室等。

6 材料育苗

育苗包括试管苗培养和盆栽育苗,见附录 C。

7 接种体制备

7.1 青枯病菌分离、纯化

按照 SN/T 1135.9 的规定进行青枯病菌的分离、纯化、鉴定和保存。

7.2 接种体繁殖、制备

选择马铃薯青枯菌的优势小种生理小种 3 号作为接种病原菌,小种鉴定方法参见附录 D。用接种环蘸取菌液在 TTC 培养基平板上划线,在 28℃ 恒温培养箱中培养 48 h 后,挑取边缘乳白色、中间部位淡红色、流动性好的毒性单菌落,移入青枯菌液体培养基中,28℃ 200 r/min 振荡培养 16 h~18 h,加适量无菌水配成接种的病菌悬浮液。

8 鉴定方法

8.1 试管苗接种鉴定

8.1.1 接种时期

在组培苗培养基中培养 3 周的试管苗。

8.1.2 接种浓度

约 1×10^8 CFU/mL ($OD_{600} = 0.1$)。

8.1.3 接种方法

采用伤根接种法。选用生长一致的马铃薯试管苗 3 盒,试管苗繁殖见 C.1.3,使用手术刀片于无菌环境下围绕植株根部在培养基划“#”伤根,随后每盒试管苗注入接种菌液 5 mL。每份材料设 3 个重复,每重复不少于 10 株苗。

8.1.4 接种后管理

接种后置于 $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的光照培养箱内,在每日光照 16 h、黑暗 8 h 条件下培养。

8.1.5 病情调查

8.1.5.1 调查方法

从接种后第 6 d 开始,每隔 2 d 观察鉴定材料的发病情况,待感病对照达到相应病级后,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)。

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

式中:

DI ——病情指数;

$\sum$ ——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。

8.1.5.2 病情级别划分

试管苗植株病情分级及其对应的症状描述见表 1。

表 1 马铃薯抗青枯病接种鉴定的病情级别划分

病情级别	症状描述
0	无发病症状
1	1%~25%的叶片萎蔫
2	26%~50%的叶片萎蔫
3	51%~75%的叶片萎蔫
4	75%以上叶片萎蔫或植株死亡

8.2 温室盆栽鉴定

8.2.1 接种时期

待幼苗长到 6 片~8 片复叶时,选择生长一致、健壮的幼苗用于抗病性鉴定。

8.2.2 接种浓度

同 8.1.2。

8.2.3 接种方法

采用菌液灌根接种法。接种前 2 d 暂停浇水,接种时用锋利的刀片在距根部 1 cm~2 cm 处,下切 5 cm 左右深度将幼苗根部切伤,沿切口倒入 10 mL 青枯菌接种液。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。

8.2.4 接种后管理

接种后浇水使土壤湿度保持在 85%~90%。置于室温 28℃~30℃、空气相对湿度 75%左右的日光温室中,自然光照。

8.2.5 病情调查

8.2.5.1 调查方法

调查及计算方法同 8.1.5.1。

8.2.5.2 病情级别划分

接种植株病情级别划分同 8.1.5.2,病情分级及其对应的症状描述见表 1。

8.2.6 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。

9 抗病性评价

9.1 试管苗接种鉴定抗病性评价

9.1.1 评价标准

抗性划分标准见表 2。

表 2 马铃薯抗青枯病试管苗接种鉴定的评价标准

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

9.1.2 鉴定有效性判别

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

9.1.3 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。鉴定结果记录见附录 E。

9.2 温室盆栽鉴定抗病性评价

9.2.1 评价标准

抗性划分标准见表 3。

表 3 马铃薯抗青枯病温室盆栽鉴定的评价标准

病害指数(DI)	抗性评价
$DI \leq 10$	高抗(HR)
$10 < DI \leq 25$	抗病(R)
$25 < DI \leq 50$	中抗(MR)
$50 < DI \leq 75$	感病(S)
$DI > 75$	高感(HS)

9.2.2 鉴定有效性判别

当感病对照的植株达到其相应感病程度($DI > 50$),该批次鉴定结果视为有效。

9.2.3 抗性判断

判断方法同 9.1.3。

附 录 A
(资料性附录)
马 铃 薯 青 枯 病

A.1 症状描述

幼苗和成株期均能发生,多从现蕾开花后急性显症,表现为叶片、分枝和植株急性萎蔫,开始时早晚尚可恢复,4 d~5 d 全株茎叶萎蔫枯死,但病株短期内仍保持绿色,叶片不脱落,随后叶脉逐渐变褐,茎部出现褐色条纹,横切病株茎部可见维管束变褐,用手挤压可见乳白色菌脓从切口处溢出。如将病茎切面插入清水中,约 0.5 min 后可见雾状的菌液自切口处排出。块茎染病后,脐部呈灰褐色水渍状,切开病薯,维管束环变褐,稍挤压便溢出乳白色细菌脓液,严重时块茎外皮龟裂,髓部软腐溃烂。

A.2 病原菌

A.2.1 学名

茄科劳尔氏菌[*Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.],属于薄壁菌门劳尔氏菌属。

A.2.2 形态描述

菌体单细胞,短杆状,两端钝圆,大小为 $(0.9\sim 2.0)\mu\text{m}\times(0.5\sim 0.8)\mu\text{m}$,单生或双生,极生鞭毛1根~3根,无芽孢和荚膜。在肉汁葡萄糖琼脂培养基上,菌落呈圆形或不规则形,稍隆起,平滑有光泽。

A.2.3 生物学特性

革兰氏染色阴性,病菌在 $10^{\circ}\text{C}\sim 40^{\circ}\text{C}$ 均可发育,生长发育最适温度为 $30^{\circ}\text{C}\sim 37^{\circ}\text{C}$,致死温度为 52°C ;酸碱度的适宜范围为 pH 6~8,最适土壤 pH 为 6.6,具有明显的生理分化和菌系多样性,长期人工培养后易失去致病力。

附录 B
(规范性附录)
培养基

B.1 青枯菌培养基

B.1.1 基本培养基

NA 培养基(牛肉膏蛋白胨培养基):牛肉浸膏 3 g、蛋白胨 5 g、葡萄糖 2.5 g、琼脂 17 g、蒸馏水 1 L。

CPG 培养基(酪蛋白氨基酸-蛋白胨-葡萄糖培养基):水解酪蛋白氨基酸 1 g、蛋白胨 10 g、葡萄糖 5 g、琼脂 18 g、蒸馏水 1 L。

YPGA 培养基(酵母膏-蛋白胨-葡萄糖培养基):酵母膏 7 g、蛋白胨 7 g、葡萄糖 7 g、琼脂 15 g、蒸馏水 1 L。

称取培养基的各成分,溶于 1 L 蒸馏水中,用 40% (W/V) NaOH 溶液调节 pH 至 7.0~7.1,加热搅拌以溶解琼脂,分装后于 121℃ 高压灭菌 20 min。在上述固体培养基配方中不加入琼脂,则为相应的液体培养基。

B.1.2 TTC 培养基

将基本培养基加热融化后冷却至 60℃ 左右,加入 TTC 母液,使 TTC 的终浓度达 0.005% (W/V),摇匀。

B.2 马铃薯组培苗培养基

MS 固体培养基(0.5% 甘氨酸+0.5% 铁盐+0.5% 肌醇+0.5% 微量元素+5% 大量元素):20 倍大量元素母液 50 mL,20 倍的维生素、微量元素、肌醇、铁盐、甘氨酸各 5 mL,加蒸馏水至 1 000 mL,加 8 g 琼脂加热溶解,高压灭菌备用。

以 MS 固体培养基为基本培养基,附加 4% 蔗糖和 0.7% 琼脂,灭菌前 pH 调到 5.8,pH 调节和灭菌方法同 B.1.1。

附 录 C
(规范性附录)
材 料 育 苗

C.1 试管苗培养

C.1.1 实生籽试管育苗

将实生籽放置于 1.5 mL~2 mL 离心管中,加入少量 65℃ 温水热激,室温下自然冷却后浸泡于 0.7 mg/L 的赤霉素(GA3)溶液中 2 d~3 d,用无菌水冲洗 2 次~3 次后,在超净工作台上将实生籽浸泡于 0.1% HgCl₂ 溶液中消毒 2 min~3 min,再用无菌水清洗 2 次~3 次,移至 MS 固体无糖培养基中。置于温度(20±1)℃,光强度 3 000 lx~4 000 lx,每日光照 16 h 的条件下培养。

C.1.2 薯块试管育苗

将供试薯块材料置于室温黑暗处,任其自然发芽,待发芽后,掰取所长出的幼芽,用清水冲洗干净,以 0.1% 的 HgCl₂ 溶液消毒 5 min~8 min,然后用无菌水冲洗 3 次,接种于组培苗培养基中。培养条件同 C.1.1。

C.1.3 试管苗的繁殖和保存

上述试管育苗的材料成活且长出新芽后,切取腋芽茎段和茎尖移入组培苗培养基中进行繁殖和保存,培养条件同 C.1.1,相对湿度为 60%,采用单节段繁殖。

试管苗接种鉴定时,每份材料按照马铃薯切段培养方法在装有组培苗培养基的培养盒中接入 10 个节段,每份材料接种数盒,培养 3 周后待用。

C.2 盆栽育苗

C.2.1 组培苗盆栽培养

将培养 3 周的组培苗移栽至装有育苗基质的 10 cm×10 cm 的育苗钵中,每钵 1 株苗。置于日光温室里,第 1 周温度保持在 22℃~25℃,相对湿度 70%~90%,然后温度调至 26℃~30℃至全试验期。常规水肥管理,自然光照。

C.2.2 种薯盆栽培养

将供鉴定材料的种薯置于 15℃~20℃ 下催芽。待薯芽长为 1 cm~1.5 cm 时,将种薯切成每块只带一个健康芽眼的薯块,播于装有育苗基质的 10 cm×10 cm 的育苗钵内,每钵播种 1 块,置于日光温室中培养,培养条件同 C.2.1。

附 录 D
(资料性附录)
青枯病菌生理小种

青枯病菌鉴别寄主谱有烟草、番茄、马铃薯、茄子、香蕉、姜、桑树和海里康等,按照寄主的不同将青枯病菌划分为 5 个生理小种(表 D. 1)。

表 D. 1 青枯病菌生理小种的划分

生理小种	寄 主
生理小种 1 号	大多数茄科植物(番茄、马铃薯、茄子、烟草等)
生理小种 2 号	3 倍体香蕉、海里康和大蕉
生理小种 3 号	马铃薯(主要)、番茄和烟草
生理小种 4 号	姜
生理小种 5 号	桑

附 录 E
(规范性附录)
鉴定结果原始记录表

马铃薯抗青枯病接种鉴定见表 E. 1。

表 E. 1 马铃薯抗青枯病鉴定结果原始记录表

编 号	品种/种质 名 称	来 源	重复 区号	病情级别					病情 指数	平均 病指	抗性 评价
				0	1	2	3	4			
			I								
			II								
			III								
	感病对照		I								
			II								
			III								
播种日期			接种日期								
接种生育期			接种病原菌菌株编号								
小种类型			调查日期								

鉴定技术负责人(签字):

中 华 人 民 共 和 国
农 业 行 业 标 准
马 铃 薯 抗 青 枯 病 鉴 定 技 术 规 程
NY/T 3346—2019

* * *

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

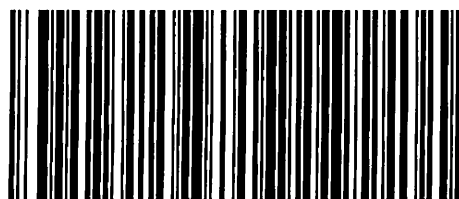
* * *

开 本 880mm×1230mm 1/16 印 张 1 字 数 20 千 字

2019 年 8 月 第 1 版 2019 年 8 月 北 京 第 1 次 印 刷

书 号: 16109 · 4796

定 价: 24.00 元



NY/T 3346—2019

版 权 专 有 侵 权 必 究
举 报 电 话: (010) 59194261