|  |  |
| --- | --- |
| ICS | 65.020 |
| CCS | B 16 |

|  |
| --- |
| 14 |

山西省地方标准

DB14/T 1367—2024

代替 DB14/T 1367-2017

普通菜豆抗普通细菌性疫病田间鉴定技术规范

2024 - XX - XX发布

2024 - XX - XX实施

山西省市场监督管理局  发布

目次

[前言 II](#_Toc182217383)

[1 范围 1](#_Toc182217384)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc182217385)

[3 术语和定义 1](#_Toc182217386)

[4 接种体制备 2](#_Toc182217387)

[5 田间抗性鉴定 2](#_Toc182217388)

[6 病情调查 3](#_Toc182217389)

[7 抗性评价 4](#_Toc182217390)

[8 接种鉴定后材料处理 4](#_Toc182217391)

[9 鉴定记载表 4](#_Toc182217392)

[附录A（资料性） 菜豆普通细菌性疫病病原菌 5](#_Toc182217393)

[附录B（资料性） 牛奶吐温选择性培养基 6](#_Toc182217394)

[附录C（资料性） 牛肉膏蛋白胨液体培养基 7](#_Toc182217395)

[附录D（资料性） 普通菜豆抗普通细菌性疫病鉴定结果记载表 8](#_Toc182217396)

1. 前言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

——增加了“术语与定义”中的内容（见3.4）；

——更改了“病原物的分离、纯化及保存”中的内容（见4.1）；

——更改了“鉴定圃设计”中的内容（见5.2）；

——增加了“鉴定材料要求”（见5.3）；

——更改了“调查时间”中的内容（见6.1）；

——更改了“调查取样”中的内容（见6.2）；

——更改了“抗性鉴定评价标准”标题（见7.2）；

——更改了“接种鉴定后材料处理”的内容（见8.2）；

——更改了“鉴定记载表”中的内容（见第9章）。

本文件由山西省农业农村厅提出、组织实施和监督检查。

山西省市场监督管理局对标准的组织实施情况进行监督检查。

本文件由山西省农业标准化技术委员会（SXS/TC19)归口。

本文件起草单位：山西农业大学。

本文件主要起草人：王燕、郝晓鹏、董雪、朱振东、赵建栋、畅建武。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2017年首次发布为DB14/T 1367—2017；

——本次为第一次修订。

普通菜豆抗普通细菌性疫病田间鉴定技术规范

* 1. 范围

本文件规定了普通菜豆种质抗普通细菌性疫病田间鉴定的术语和定义、接种体制备、田间抗性鉴定、病情调查、抗性评价、接种鉴定后材料处理、鉴定记载表。

本文件适用于普通菜豆对普通细菌性疫病的田间抗性鉴定及评价。

* 1. 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 4404.2 粮食作物种子 第2部分：豆类

NY/T 2060.1 辣椒抗病性鉴定技术规程 第1部分：辣椒抗疫病鉴定技术规程

* 1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。



普通菜豆

豆科（Leguminosae），蝶形花亚科（Papilionoideae），菜豆族（Phaseoleae），菜豆属（*Phaseolus*）中的一个栽培种，一年生草本植物，学名*Phaseolus vulgaris* L.。英文名为Common bean。染色体2n=22。



菜豆普通细菌性疫病

由地毯草黄单胞杆菌菜豆致病变种（*Xanthomonas axonopodis* pv.*phaseoli*）引起的以叶部形成有亮柠檬黄色边缘包围的不规则病斑，病斑合并导致大面积组织损伤，使叶片坏死、脱落，病株呈灼烧状为主的菜豆细菌性病害。该病害在菜豆的整个生育期内均可发生，病菌可侵染叶片、茎蔓、豆荚及种子等产生不同病症。病原菌的生物学特性情况见附录A。



抗病性田间鉴定

将一定浓度病原菌悬浮液直接接种到田间植株的叶片、果实、茎秆及根等部位，依据植株的发病情况进行抗病性鉴定。



抗病性

植物体所具有的能够减轻或克服病原物致病作用的可遗传性性状。普通菜豆对普通细菌性疫病的抗病性依据病情指数划分为高抗、抗、中抗、感、高感五个抗性水平。

* 1. 接种体制备
     1. 病原物的分离、纯化及保存

采集具有典型病斑的普通菜豆叶片或病荚，采用常规组织分离方法在牛奶吐温选择性培养基（成分及制备见附录B）上分离病原物。分离物经菌落形态鉴定确认为地毯草黄单胞杆菌菜豆致病变种后，进行分离物纯化，经致病性测定后，在4 ℃低温下保存备用。

* + 1. 接种体

选用地毯草黄单胞杆菌菜豆致病变种作为抗病性田间鉴定的接种体。

* + 1. 接种体的繁殖和保存
       1. 繁殖

将将纯化的菌株于牛肉膏蛋白胨液体培养基（成分及制备见附录C）中，在28 ℃、200 r/min条件下振荡培养48 h，用灭菌蒸馏水稀释至菌液浓度为1×108 cfu/mL，接种悬浮液用于田间接种。

* + - 1. 保存

挑取病原菌的单菌落接种于装有1 mL牛肉膏蛋白胨液体培养基的菌种保藏管中，在28 ℃、200 r/min条件下振荡培养过夜。离心后，加入50%灭菌甘油，在-80 ℃低温下保存备用。

* 1. 田间抗性鉴定
     1. 鉴定圃选择

鉴定圃选择在普通细菌性疫病常发区，该区排灌方便、土地平整、肥力水平中等以上。

* + 1. 鉴定圃设计

适期播种，鉴定材料随机或顺序排列，3次重复；每份材料播种3 m2，行长3 m，行宽0.5 m，每行留苗15株，株距约0.2 m。鉴定圃周围设保护行或保护区。

* + 1. 鉴定材料要求

鉴定材料的种子质量应符合GB 4404.2—2010 4.2.3中赤豆的要求，其中品种纯度符合大田用种要求。播种使用的种子大小、色泽均匀一致，不作物理或化学处理。

* + 1. 鉴定对照品种

每10份～15份鉴定材料设1组已知抗病、感病对照材料。抗病对照品种为“洋菜豆（F0001292）”，感病对照品种为“黑金豆（F0001585）”。

* + 1. 接种时期

植株生长到第1片三出复叶至开花期前期均可接种。

* + 1. 接种方法

人工接种鉴定采用喷雾接种法。用喷雾器对叶片上、下表面均匀喷雾，接种至整个植株完全湿润。

* + 1. 接种后管理

接种后田间应充分灌溉，保证病菌的入侵、扩展。接种前后避免施用任何药剂。

* 1. 病情调查
     1. 调查时间

病情调查于接种后20天左右，即感病对照病状达到其相应感病程度时进行。

* + 1. 调查取样

每份鉴定材料棋盘式取样，田块均匀划成4个小区，每区随机取5株，共调查20株。

* + 1. 调查部位

植株叶片和荚的外部症状。

* + 1. 病情级别划分

接种植株病情分级及其相对应的症状描述见表1。

1. 病情级别划分

|  |  |
| --- | --- |
| 病情级别 | 症状描述 |
| 0 | 没有可见症状。 |
| 1 | 局部可见轻微水渍状病斑；荚上没有病斑。 |
| 3 | 有少量小病斑，发病面积约占整叶的2%；一般荚上没有病斑。 |
| 5 | 小病斑开始合并，有的被黄色晕圈包围，轻微枯萎，发病面积约占整叶的5%；荚上病斑小，不合并。 |
| 7 | 中等和大病斑被黄色晕圈和坏死组织包围，发病面积约占整叶的10%；荚上病斑大，合并，常常有菌脓产生。 |
| 9 | 大病斑合并坏死，发病面积约占整叶的25%以上，导致叶片脱落；荚上病斑合并扩展，产生大量菌脓，有的导致荚变形或空荚。 |

* + 1. 调查及计算

根根据病害症状描述，调查每份鉴定材料接种单株的发病情况，确定病情级别，并计算每份鉴定材料的病情指数（*DI*）。

按如下公式计算病情指数：

 ()

式中：

*DI*——病情指数

*Ci* ——病情级别

*N*i ——各病情级别的植株数

*N* ——调查总植株数

* 1. 抗性评价
     1. 鉴定有效性判别

当感病对照材料达到其相应感病程度（*DI*＞50），该次材料的抗病性鉴定为有效。

* + 1. 抗性鉴定评价

依据病情指数3次重复的平均值评价各鉴定材料的抗性水平，划分标准见表2。

1. 抗性评价标准

|  |  |
| --- | --- |
| 病情指数 | 抗性评价 |
| 0.00＜*DI*≤10.00 | 高抗（HR） |
| 10.00＜*DI*≤30.00 | 抗（R） |
| 30.00＜*DI*≤50.00 | 中抗（MR） |
| 50.00＜*DI*≤70.00 | 感病（S） |
| *DI*＞70.00 | 高感（HS） |

* 1. 接种鉴定后材料处理
     1. 将接种后剩余接种体集中灭菌处理。
     2. 将鉴定后的田间病株集中销毁。
  2. 鉴定记载表

普通菜豆抗普通细菌性疫病鉴定结果记载表参照NY/T 2060.1，记载表见附录D。

2. （资料性）  
   菜豆普通细菌性疫病病原菌
   1. 学名

地毯草黄单胞杆菌菜豆致病变种（*Xanthomonas axonopodis* pv.*phaseoli*）

* 1. 生物学特性

病原菌属好气性革兰氏阴性菌，极生单根鞭毛，杆状，菌体长0.5 μm～3.0 μm，宽0.3 μm～0.8 μm，有荚膜，不产生芽孢。在含碳源的固体培养基上形成圆滑、黄色、黏稠状菌落。生长最适温度为30 ℃，最高为38 ℃，致死温度为50 ℃，10 min。酸碱度范围为pH5.7～8.4，最适为pH7.3。能液化明胶，使石蕊牛乳变蓝并凝固；不能液化果胶凝胶，不产生果胶酶。在含有乙酸的培养基上生长的细胞具有乙醛酸循环的酶类，能产生类似细菌素的物质。

1. （资料性）  
   牛奶吐温选择性培养基
   1. 成分

10 g示蛋白胨（Oxoid）、0.25 g无水氯化钙、0.5 g酪氨酸、15 g琼脂粉、10 g脱脂奶粉、40 mg制霉素，80 mg头孢氨苄，10 mg盐酸万古霉素、10 ml吐温80和1 000 ml去离子水。

* 1. 制备

1. 称取10 g示蛋白胨（Oxoid）、0.25 g无水氯化钙、0.5 g酪氨酸和15 g琼脂粉溶解到500 ml蒸馏水；
2. 称取10 g脱脂奶粉溶解到500 ml蒸馏水；
3. 取10 ml吐温80装入独立三角瓶中；
4. 上述三组成分在121 ℃高压蒸汽灭菌15 min；
5. 灭菌后上述三组成分在无菌条件下混合；
6. 将40 mg制霉素、80 mg头孢氨苄、10 mg盐酸万古霉素分别溶解于10 ml 70%酒精；
7. 当培养基冷却至50 ℃左右时，在无菌条件下加入三种抗生素溶液，混合均匀，之后培养基倒入直径9 cm的培养皿中，每皿15 ml。
8. （资料性）  
   牛肉膏蛋白胨液体培养基

成分及配置：5 gNaCl、3 g牛肉膏、10 g胰蛋白胨和1 000 mL蒸馏水，调节pH值为6.8～7.2，121 ℃高压蒸汽灭菌20 min。

1. （资料性）  
   普通菜豆抗普通细菌性疫病鉴定结果记载表

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 编 号 | 品种/种质名称 | | 来 源 | 重复区号 | 病情级别 | | | | | | 病情指数 | 平均指数 | 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 | |  | | 接种病原菌分离物编号 | | | |  | | | | | |
| 变种类型 | |  | | 调查日期 | | | |  | | | | | |
| 鉴定地点 | |  | | 鉴定技术负责人签字 | | | |  | | | | | |

