

ICS 65.020.01 (黑体五号)

CCS X XX (黑体五号)

T/GDNB

广东省农业标准化协会团体标准

T/GDNBXXXX—2022

番石榴叶枯病抗性鉴定技术规程

Technical code of practice for identification of guava resistance to leaf blight

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

广东省农业标准化协会 发布

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。

本文件由广东省农业标准化协会提出并归口。

本文件起草单位：广东省农业科学院果树研究所、广东省中山市坦洲农业服务中心、佛山市千泮农业发展有限公司、广州市成丰生态农场有限公司、广州创鲜农业发展有限公司。

本文件主要起草人：邵雪花、匡石滋、万妍、赖多、黄渭泉、肖维强、徐伟康、刘传和、贺涵、姚志成。

番石榴叶枯病抗性鉴定技术规程

1 范围

本文件规定了番石榴叶枯病抗性鉴定的试剂与耗材、仪器设备、病原准备、室内抗性鉴定、病情调查、抗病性评价和鉴定材料处理。

本文件适用于各种番石榴种质资源对番石榴叶枯病的抗性鉴定及监测。

2 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。

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

番石榴叶枯病 leaf blight of guava

主要发病于7-10月份，在高温多湿、通风不良且植株生长势弱的果园发病较严重。该病主要从叶缘、叶尖侵染发生，病叶初期先变黄，黄色部分逐渐变褐色坏死，由局部扩展到整个叶脉，呈现褐色至红褐色的叶缘病斑，病斑边缘波状，颜色较深。病健交界明显，其外缘有时还有宽窄不等的黄色浅带，随后，病斑逐渐向叶基部延伸，直至整个叶片变为褐色至灰褐色。鉴定表明引起该病的病原病原菌主要有三种，分别为半知菌亚门的链格孢菌（*Alternaria alternata*）、子囊菌亚门的小新壳梭孢菌 *Neofusicoccum parvum*、半知菌亚门的盘多毛孢菌（*Pestalotia*），其中小新壳梭孢菌是引起该病的优势菌群。

3.2

小新壳梭孢菌 *Neofusicoccum parvum*

属于囊菌葡萄座腔菌科（*Botryosphaeriaceae*）成员，是重要的植物病原真菌，主要依靠病株汁液或机械接触等方式传播，但不能通过土壤传播，其自然宿主主要是番石榴、枇杷、蒲桃、梨等果树。番石榴受到 *N. parvum* 侵染后，叶片呈现暗紫色条纹、褪绿黄化、叶面凹凸不平、卷曲畸形，或枝条干枯。后期会抑制植株生长，最终导致落花、落果，果实畸形等。随病情加重可蔓延至全树，最终导致植株凋萎死亡。

4 接种

4.1 病原

采自番石榴主产区的典型病样，经检测、纯化、鉴定、扩繁后保存后续所用的样品。

4.2 机械摩擦接种

机械摩擦接种是证明病菌传染性最简便的方法，是指在叶片上造成微小的伤口，使病菌从伤口进入细胞内而引起发病。

4.3 人工接种

在室内可控的条件下，通过人工操作将病菌接种到寄主植物上并引起发病的过程。

5 试剂与材料

本标准所用试剂在未加说明时均采用分析纯试剂。实验室用水应符合GB/T 6682中规定的三级水要求。

5.1 马铃薯蔗糖琼脂培养基

称取200 g马铃薯，洗净去皮切碎，加入1000 ml水，煮沸30 min，纱布过滤，补水至1000 ml，再加入蔗糖20 g，琼脂20 g，搅拌均匀，高温高压灭菌（121℃，30 min）后在37℃培养箱培养24 h，无菌生长者方可使用。

5.2 耗材

培养皿、锥形瓶、纱布、酒精灯、穴盘等。

5.3 仪器设备

恒温摇床、恒温培养箱、冰箱、灭菌锅、超净工作台、显微镜、移液器、血细胞计数板等。

6 接种体制备

6.1 病原菌分离、纯化与保存

6.1.1 病样采集

田间采集具有典型叶枯病症状的番石榴叶片，放入封口袋密封，登记编号后方入4℃冰箱保存备用。

6.1.2 病原菌分离、鉴定与纯化

参见附录A。

6.2 病原菌的保存

将待保存的菌株接种在PSA培养基上，在27℃的恒温培养箱中培养7 d，置于4℃冰箱内保存。

6.3 接种体准备

6.3.1 接种体选择

接种应采用当地致病力较强的叶枯病病菌株。

6.3.2 接种体繁殖

将叶枯病病菌株移植到PSA培养基的正中央，置于恒温培养箱27℃培养7~10 d。在无菌条件下用直径5 mm的灭菌打孔器，自菌落边缘切取菌饼3块，接种于100 ml的液体培养基中。在黑暗条件下，27℃，150 r/min，震荡培养5~7 d后，获得大量菌丝和分生孢子。将震荡的培养液用纱布过滤后获得分生孢子悬液，在血球计数板下计算孢子浓度，将孢子悬液的浓度调至 5×10^5 个分生孢子，作为接种物备用。

7 室内抗性鉴定

7.1 接种室

室内抗性鉴定通常是在防虫日光温室中进行，具备良好的发病环境。

7.2 育苗

待测番石榴种子经10%磷酸三钠溶液中浸泡20 min，清水冲洗后放置在28℃恒温培养箱催芽，然后直播于8×12 cm黑色塑料育苗杯中，每杯2粒。播种用基质土为经121℃温热灭菌消毒的新鲜育苗基质土，每份材料设置4次重复，每个处理30株。

7.3 接种

7.3.1 接种时间

在番石榴出现3~4个分支时进行接种。

7.3.2 接种浓度

1 g 新鲜病叶加10 ml 磷酸缓冲液（0.01 mol/L, pH 7.2），在灭菌的研钵中匀浆，再经灭菌纱布过滤，其滤液为接种悬浮液。

7.3.3 接种方法

采用1 mL的一次性注射器将叶片针刺10个伤口，将100 μl的病原悬浮液用棉签蘸取接种在叶片的伤口上轻轻摩擦，每株番石榴苗随机选取3片叶。

7.3.4 接种后的管理

保存室内温度为25~30℃，常规光照，正常水肥栽培管理。

8 病情调查

8.1 调查时间

接种后7~60天进行，每隔7天调查一次。

8.2 病情分级标准

番石榴苗期病情级别及其相对应的症状描述见表1。

表1 小新壳梭孢菌引起的番石榴叶枯病病情分级标准

病情级别	症状描述
0 级	全株无症状
1 级	病斑面积占整片叶面积的 5 % 以下
3 级	病斑面积占整片叶面积的 6 %~ 15 %
5 级	病斑面积占整片叶面积的 16 %~ 25 %
7 级	病斑面积占整片叶面积的 26 %~ 50%
9 级	病斑面积占整片叶面积的 51 % 以上

8.3 调查方法

接种7 d后，每周对每个接种植株发病情况进行调查，根据发病症状，按照附表B的格式记载病情级别，按公式（1）计算出病情指数，待各处理病株的病情基本稳定，可以根据此时的病情指数对鉴定品种的抗性水平进行评价。

$$DI = \sum (s \times n) / (N \times 9) \times 100 \dots \dots \dots (1)$$

DI——病情指数；

s——各病情指数级别的级数；

n——各病情指数级别的叶片数；

N——调查总叶片数。

9 抗病性评价

9.1 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），抗病对照材料与实际抗性程度相符，该批次抗叶枯病鉴定视为有效。以对照品种发病程度明显异常时判定该批次鉴定无效。

9.2 抗病性评价标准

根据待测材料4次重复的病情指数平均值确定其抗性水平，划分标准见表2。

表2 番石榴对叶枯病抗性的评价标准

病情指数 (DI)	抗性评价
DI=0	免疫 Immune (I)
0<DI<10	高抗 Highly resistant (HR)
10≤DI<20	抗病 Resistant (R)
20≤DI<40	中抗 Moderately resistant (MR)
40≤DI<60	感病 Susceptible (S)
60≤DI	高感 Highly susceptible (HS)

9.3 鉴定结果

根据8.1和8.2，将不同病情级别的株数/病情指数、3个重复的平均病情指数、抗性评价等鉴定结果录入附录B。

9.4 鉴定材料处理

鉴定完毕后，集中焚烧所有植株材料，带有病菌的基质应彻底灭菌，宜采用蒸汽高温消毒处理，温度达到134 ℃以上并保持60 min。

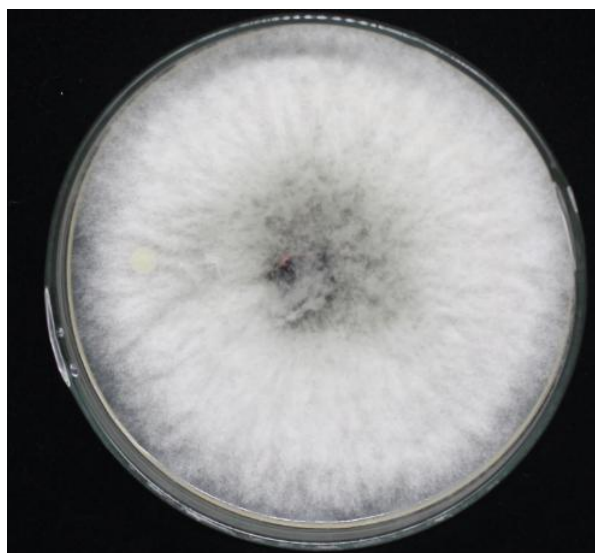
附 录 A
(资料性)
叶枯病病原菌

A.1 病样采集

从广东番石榴主产区采集表现皱缩、褪绿黄化等症状的番石榴病叶。

A.2 病原菌的分离

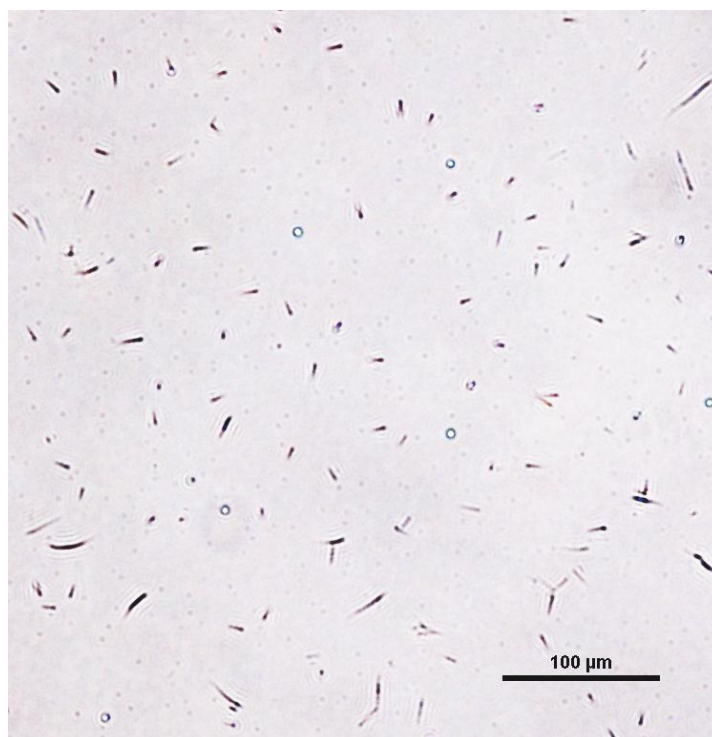
用自来水将感病叶片和枝条的表面颗粒污染物清洗干净，在75% 乙醇（V/V）中浸泡约30 s，随后在5%NaClO 溶液中表面消毒4 min，再次在 75% 乙醇中漂洗30 s（去除残余的 NaClO），最后用无菌蒸馏水清洗多次并用无菌滤纸吸干水分。用无菌手术刀片在病健交界处切取4–5 mm的组织块，置于 PDA 培养基上 28 ℃ 黑暗条件培养2–3 d。培养基中预先加入硫酸链霉素（50 mg/L）和盐酸四环素（20 mg/L）以防止细菌的污染。待长出菌丝后，取菌落边缘菌丝置PDA培养基上进行纯化，连续纯化 3 次后，转接于PDA斜面，4 ℃冰箱保存（图A.1）。



图A.1 叶枯病菌培养性状

A.3 病原菌形态观察

将分离得到的菌株接种在PDA培养基上，28 ℃ 黑暗培养2 d 后观察记录菌落的形状、颜色及基质颜色。孢子悬浮液制备：将纯化的菌株接种在PDA平板上，28 ℃ 黑暗培养2–3 d后，加入10 ml的无菌水刮洗菌丝，所得到的悬浮液经 3 层纱布过滤，滤液于10000 r/min 离心5 min，弃掉上清液，将分生孢子重新悬浮在10 ml 的无菌水中。在Olympus BX51光学电子显微镜下观察分生孢子的形态、大小并拍照（图A.2）。

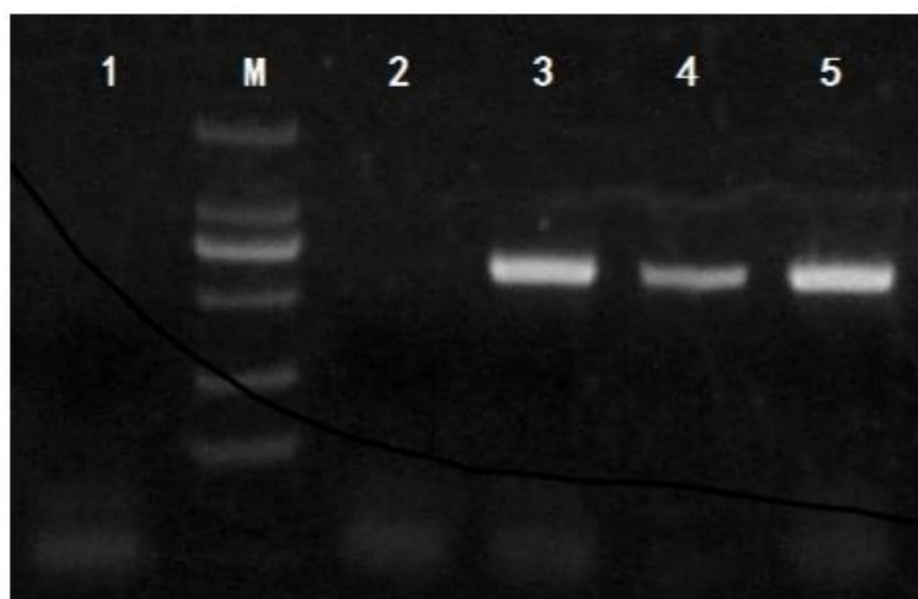


图A.2 叶枯病菌孢子的形态特征

A.4 分子生物学鉴定

收集在PDA平板上28℃培养2-3d的菌丝体，采用基因组DNA快速抽提法提取病原菌基因组DNA。利用真菌扩增的特异引物（ITS: 5' -TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' / 5' - TCCTCCGCTTATTGAT ATGC-3' ; β -tubulin: 5' -GGTGCTGCTTTCTGTTTGT-3' / 5' - GTGACCCTTGCCCAGTTG-3' ; TEF: 5' -AGCGTACCATCGAGAAGTTCG-3' / 5' - GCCGTTGAAGCCGGAGATG-3' ），引物由华大基因（深圳）生物科技有限公司合成。采用Taq PCR Master Mix试剂盒进行扩增，PCR反应体系总体积为：50 μ l，模板DNA 2 μ l，ddH₂O 19 μ l，（ITS1）P12 μ l，（ITS4）P22 μ l，MIX 25 μ l。PCR扩增程序：94℃预变性3 min，94℃变性30 s，55℃退火25 s，72℃延伸30 s，35个循环后，72℃延伸7 min，4℃保存。

扩增产物用0.8%琼脂糖凝胶电泳检测后，用凝胶成像仪进行观察并拍照（图A.3），利用DNA凝胶回收试剂盒（BioTeke）进行胶回收，回收产物交由华大基因（深圳）生物科技有限公司测序。将测序结果在GenBank数据库里进行序列比对，通过NCBI提供的Blast工具，搜索同源性较高的序列。



图A.3 叶枯病菌菌的分子鉴定

A.5 致病性测定

按柯赫氏法则进行致病性测定，剪取病健交界处的叶片，先用 75 % 酒精对表面进行消毒，再利用无菌水冲洗3遍后放入干净保鲜盒中。将纯化的菌株在PDA平板上28 ℃ 培养2-3 d 后，取长满平皿的培养物菌块（直径5mm），紧贴在表面用无菌接种针轻刺表皮的叶片上，对照组为只加无菌PDA小块，接种后放入铺有用无菌水浸湿的双层滤纸的保鲜盒中，恒温培养，保持 95% 相对湿度，培养一定时间后观察发病情况并记录病症（图A.4）。每处理设3次重复，对回接后具典型症状的发病枝条，将病原菌重新进行分离纯化，观察新分离物与接种菌是否相同，分离方法同 A.2。



图A.4 番石榴叶枯病原菌接种叶片的症状

A.6 扩繁保存

将经过二次纯化后的病斑摩擦接种于健康的番石榴植株上，接种15天开始产生症状，主要表现为叶片上出现不规则暗紫色条纹、褪绿黄化、叶面凹凸不平。新叶显症后，进行RT-PCR 分子检测，确保 *N. parvum* 得到纯化，没有其他病菌污染。将纯化的 *N. parvum* 广东分离物，保存于-80 ℃冰箱中。

附 录 B
(规范性)
调查记录表

番石榴品种小新壳梭孢菌鉴定调查记录表。

表 B. 1 番石榴品种小新壳梭孢菌鉴定调查记录表

育苗时间		接种时间						调查时间			
品种名称	处理	病情级别						病株数	总株数	病情指数	平均病指
		0	1	3	5	7	9				
品种1	1-1										
	1-2										
	1-3										
	1-4										
品种2	2-1										
	2-2										
	2-3										
	2-4										
品种3	3-1										
	3-2										
	3-3										
	3-4										

鉴定技术负责人（签字）：
