

ICS XX. XXX. XX

CCS X XX

T/JSHS

团 体 标 准

T/JSHS X-202X

大豆炭疽病抗性评价技术规程

Technical code of practice for evaluation of soybean resistance to soybean

Anthracnose

202X—XX—XX 发布

202X—XX—XX 实施

江苏省园艺学会 发布

目 次

前 言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 接种体制备.....	1
5 接种鉴定.....	2
6 病情调查.....	2
7 抗性评价.....	2
8 鉴定有效性判定.....	3
9 重复判定.....	3
附录 A（资料性附录）大豆炭疽病.....	4
附录 B（资料性附录）鉴定记载表格.....	6

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》给出的规则编写。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由江苏省园艺学会提出并归口。

本文件起草单位：江苏省农业科学院 南京农业大学 江苏省种子站。

本文件主要起草人：崔晓艳、陈新、赵晋铭、李艺阳、赵可。

大豆炭疽病抗性评价技术规程

1 范围

本文件确立了大豆种质资源抗大豆炭疽病鉴定程序，规定了术语和定义、接种体制备、接种鉴定、抗病性评价、鉴定有效性判定、重复鉴定和抗病性终评等要求。

本文件适用于各类大豆种质资源、品种、品系和材料对大豆炭疽病的抗性鉴定和抗性评价。

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。

GB/T 19557.4-2018 植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南 大豆

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

大豆炭疽病 Soybean anthracnose

由大豆炭疽菌 *Colletotrichum spp.* 侵染大豆所引起的真菌病害，发生在大豆不同生育期的各个部位，主要发病时期为结荚期和鲜荚采收期，在豆荚表面形成不规则的黑褐色斑点，严重影响鲜食（菜用）豆荚的外观商品性和产量，而且病荚上收获的大豆干籽粒萌发率低，种子质量差。大豆炭疽病田间症状、病原信息见附录 A。

4 接种体制备

4.1 病原物分离与保存

采用常规组织分离法，从感染大豆炭疽病的豆荚、叶片、茎的病健交界处分离病原菌，对分离物进行单孢分离纯化和致病性测定，经形态学和分子鉴定，确认为平头炭疽菌（*Colletotrichum. Truncatum*），筛选强致病力菌株，低温保存备用。大豆炭疽病田间症状、病原、分子鉴定用引物及代表菌株关键信息见附录 A。

4.2 接种体制备

在培养5d的XZ-1分离物PDA培养基中用打孔器取10个直径5mm的菌丝块，加入到200mL无菌PDA中，置于恒温摇床120rpm、25℃培养5d。将菌丝球用匀浆机打碎成菌丝悬浮液后，转移到50mL离心管中，

3000rpm离心收集沉淀并用无菌水洗涤3次至菌丝悬浮液呈白色，用浓缩仪滤干水分后称重，按40mg/L的浓度配置菌丝悬浮液备用。

5 接种鉴定

5.1 试验对照品种

设置1个感病对照和1个抗病对照。感病对照要求高度感病，选择标准为规定接种量及适宜环境条件下病情指数能达到50以上，且感病性稳定；抗病对照选用抗大豆炭疽病品种，规定接种量及适宜环境条件下病情指数在30以下，且抗病性稳定。为减缓抗病对照、感病对照的抗性变异，可将对照品种在无病地隔离繁殖，冷库保存，一次繁殖，供5年以上使用。

5.2 鉴定种质准备

精选待鉴定品种种子，剔除斑驳粒种子。种子质量需符合GB/T 19557.4-2018的要求。鉴定种质在温室按同一方法和时间盆栽，日常管理期间不使用杀菌剂，培养至大豆鼓粒期。

5.3 接种方法

采集鼓粒期的豆荚，每个品种取20个豆荚备用。离体豆荚用清水冲洗后放入75%酒精浸泡30s，用无菌水冲洗后放入超净工作台晾干备用。用无菌牙签在每个豆荚上刺穿出一个伤口，在伤口处滴加20 μL菌丝悬浮液（40mg/L）后置入12cm培养皿中。培养皿事先放置无菌滤纸并加入3mL无菌水浸润，每个培养皿中放5个豆荚，3次重复。将接种后的豆荚置于25℃恒温箱内黑暗培养24h，随后12h光照/12h黑暗培养。

6 病情调查

6.1 调查时间

接种后第5d进行调查。

6.2 病情分级

根据发病症状，测量记录每个接种荚的病斑大小，进行病情分级，相对应的描述见表1。

表1 大豆炭疽病病情分级标准

病级	分级标准
0	豆荚上无病斑
1	病斑长度≤0.5 cm
3	0.5 cm < 病斑长度 < 1 cm
5	病斑长度≥1 cm

6.3 病情指数计算

按式（1）计算病情指数。根据此时的病情指数对待鉴定品种的抗性水平进行评价。

$$\text{豆荚接种病情指数 (DI}_p\text{, Disease index)} = \frac{\sum (\text{各级病荚数} \times \text{病级})}{\text{调查总荚数} \times 5} \times 100$$

7 抗性评价

7.1 抗性评价标准

根据所鉴定品种 3 次重复病情指数的平均值确定品种抗性水平，划分标准见表 2。

表 1 大豆种质对大豆炭疽病抗性的评价标准

抗性水平	病情指数 (DI)
免疫 (I)	DI=0
高抗 (HR)	0<DI≤15
抗病 (R)	15<DI≤30
中抗 (MR)	30<DI≤50
感病 (S)	50<DI≤65
高感 (HS)	DI>65

7.2 结果记录

抗病性评价结果按附录 B 中的表 B.1 填写

8 鉴定有效性判定

感病对照品种通豆 6 号达到相应感病程度 (DI>50) 时，该批次鉴定视为有效。

9 重复鉴定

鉴定品系初次鉴定表现为高抗或抗病，再种植一批，采鲜荚进行重复鉴定。

附录 A
(资料性附录)
大豆炭疽病

A.1 病原菌

目前已发现的引起大豆炭疽病的病原菌包括：平头炭疽菌 (*C. truncatum*)、短孢炭疽菌 (*C. brevisporum*)、毁灭炭疽菌 (*C. destructivum*)、胶孢炭疽菌 (*C. gloeosporioides*)、球炭疽菌 (*C. coccodes*)、禾生炭疽菌 (*C. graminicola*)、剪炭疽菌 (*C. cliviae*)、兰生炭疽菌 (*C. chlorophyti*)、黑线炭疽菌 (*C. dematium*) 等，种类繁多，而且每一类炭疽病菌在形态特征、致病性、侵染规律、杀菌剂敏感性等方面都不尽相同。目前，平头炭疽菌是引起我国大豆炭疽病的主要种类。

A.2 症状

感病豆荚的表面均产生大小不一的深色斑块，有的病斑有晕圈，形状圆形至不规则形，表面产生轮纹状排列的小黑点，随着病原菌侵染程度的加深，病斑面积也逐渐扩大，直至侵染整个豆荚，使豆荚干枯、籽粒干瘪，严重时会导致大豆颗粒无收 (图 A.1)。

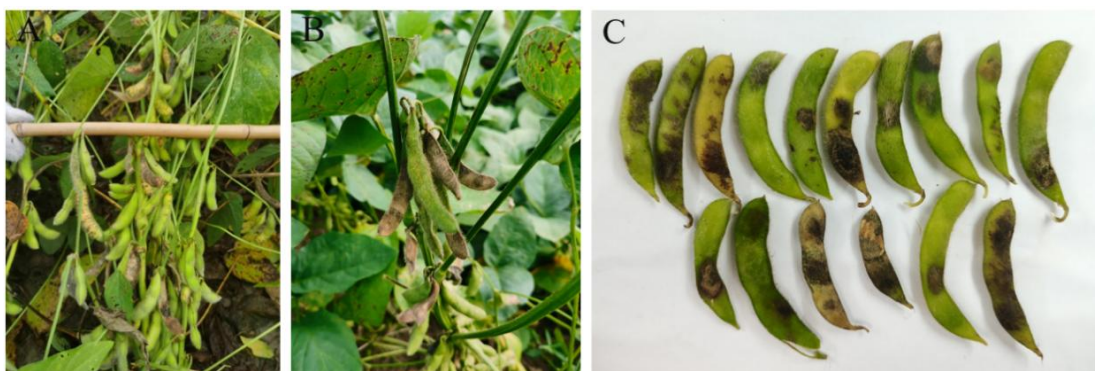


图 A.1 大豆豆荚病害的发病症状

A.3 病原菌形态

平头炭疽菌 (*C. truncatum*) 分离物 HADJ20、XZ-1 和 XZ-2 的菌落从初始的白色逐步转化为深灰，外观多数是圆形或近圆形，菌丝紧密 (图 A.2 A1-A3、B1-B3)；分生孢子盘黑色堆状突起，单生或丛生，刚毛是深棕色，有分隔 (图 A.2 C1-C3)；单孢的分生孢子呈镰刀状略微弯曲，无隔膜，无色，两头钝尖，大小为 $(15-38) \mu\text{m} \times (2-5) \mu\text{m}$ (图 A.2 D1-D3)。

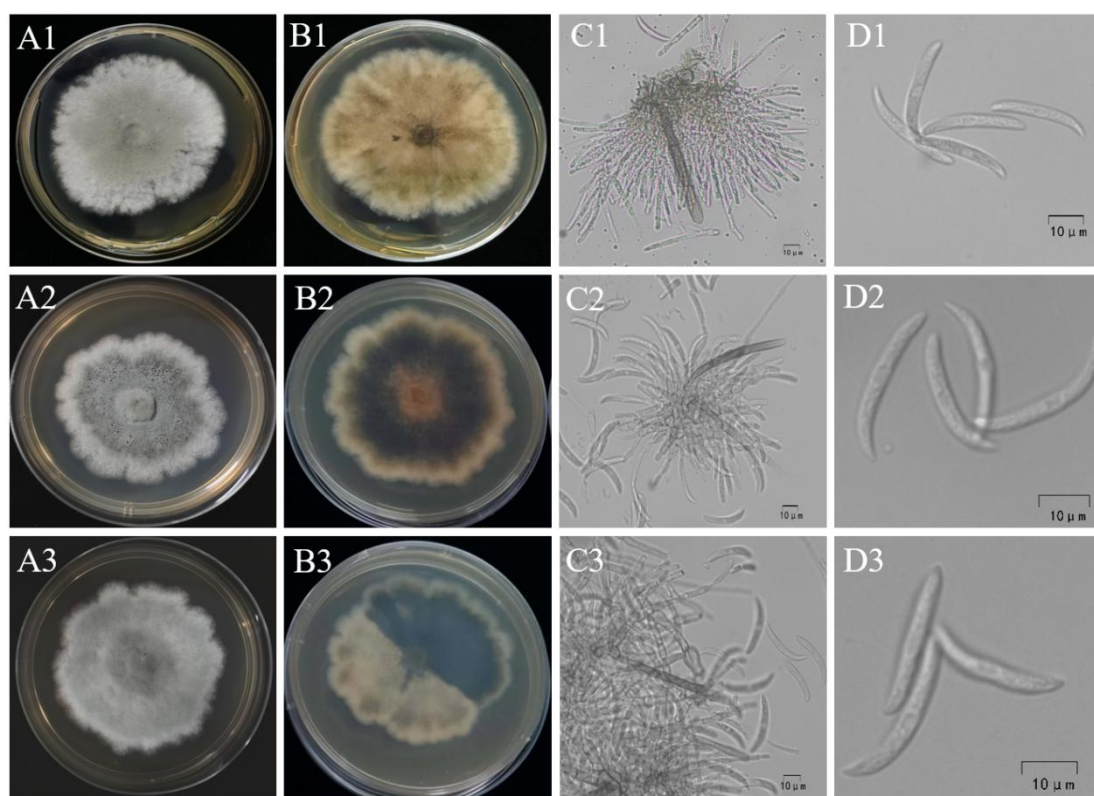


图 A.2 平头炭疽菌 (*C. truncatum*) 分离物 HADJ20、XZ-1 和 XZ-2 培养性状及形态学特征

注：A1-D1 是 HADJ20，A2-D2 是 XZ-1，A3-D3 是 XZ-2；A1-A3，菌落正面形态；B1-B3，菌落背面形态；C1-C3，分生孢子盘和刚毛；D1-D3，分生孢子。

A.4 病原菌分子鉴定

用 CTAB 法^[1]提取病原菌基因组 DNA，以核糖体 DNA 内转录间隔区 (*ITS*)、 β -微管蛋白 2 (*TUB2*) 基因和组氨酸脱氢酶 3 (*HIS3*) 基因为分子鉴定基因，进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系 (25 μ L)：Vazyme 2 \times Taq Plus Master Mix 12.5 μ L、上下游引物 (10ng/ μ L) 各 1 μ L、DNA 模板 1 μ L，加入 ddH₂O 9.5 μ L。PCR 反应程序：95 $^{\circ}$ C 预变性 3min；95 $^{\circ}$ C 变性 15s，55 $^{\circ}$ C–62 $^{\circ}$ C 退火 20s，72 $^{\circ}$ C 延伸 45s，35 个循环；72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。

表 A.1 扩增 ITS 和 TUB2 基因序列的引物

目标基因	引物名称	引物序列 (5'-3')
ITS	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
<i>TUB2</i>	T1	AACATGCGTGAGATTGTAAGT
	Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGCC
<i>HIS3</i>	CYLH3F	AGGTCCACTGGTGGCAAG
	H3-1b	GCGGGCGAGCTGGATGTCCTT

附录 B
(规范性附录)
鉴定记载表格

大豆品种抗大豆炭疽病鉴定结果记载表见表 B.1。

表 B 1 _____ 年大豆品种抗大豆炭疽病鉴定结果记载表

材料编号	品种/材料 名称	重复	病情级别 (荚数)				病情指数	平均病 情指数	抗性
			0	1	3	5			
		1							
		2							
		3							
		1							
		2							
		3							
接种日期 (月/日):					调查日期 (月/日):				
病原菌及编号:					鉴定单位:				

鉴定技术负责人 (签字):

江苏省园艺学会团体标准
《大豆炭疽病抗性评价技术规程》

版权专有 不得翻印