

DB 2301

黑龙江省哈尔滨市地方标准

DB2301/T 151—2023

大豆疫霉根腐病菌生理小种鉴定技术规程

地方标准信息服务平台

2023 - 12 - 25 发布

2024 - 01 - 22 实施

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。

请注意本文件的某些部分可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由哈尔滨市农业农村局提出并归口。

本文件起草单位：哈尔滨市农业科学院。

本文件主要起草人：陈秋明、田甜、于松涛、王杰、盛慧、李慧、陈刚、李亮、张金凤、雷娜、刘斯斯、刘志洋、曹广禄、陈曦。

地方标准信息服务平台

大豆疫霉根腐病菌生理小种鉴定技术规程

1 范围

本文件规定了大豆疫霉根腐病菌生理小种鉴定技术规程的术语和定义、接种前准备、接种体制备、鉴别寄主的培育、接种、病情调查、生理小种鉴定、灭活、建立鉴定档案。

本文件适用于大豆疫霉根腐病菌生理小种的室内鉴定与评价。

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 5084 农田灌溉水质标准

NY/T 496 肥料合理使用准则 通则

NY/T 2114 大豆疫霉病菌检疫检测与鉴定方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

下胚轴伤口接种

大豆生长至真叶完全展开后，用灭菌解剖刀在大豆苗下胚轴处轻划 1 个伤口（宽度不超过茎粗1/3、长度 1 cm 左右），将接种体贴于伤口处。

4 接种前准备

4.1 蛭石的灭菌

新蛭石经 121 ℃ 湿热灭菌 2 h。

4.2 鉴别寄主准备

国际通用的大豆疫霉根腐病菌生理小种 8 个鉴别寄主为 Harlon (*Rps 1a*)，Harosoy 13XX (*Rps 1b*)，Williams 79 (*Rps 1c*)，PI103091 (*Rps 1d*)，Williams 82 (*Rps 1k*)，Chapman (*Rps 3a*)，Harosoy62XX (*Rps 6*) 和 Harosoy (*Rps 7*)，以 Sloan (*rps*) 为感病对照。

5 接种体制备

5.1 病样的采集

在大豆疫霉根腐病发生或流行时期，采集具有典型症状的大豆疫霉根腐病病株茎部，用灭菌后牛皮纸袋带回实验室，并将采样信息录入大豆疫霉根腐病田间病样采集信息表（见附录 A 表 A.1）。

5.2 培养基

V8培养基：100 ml V8汁，去离子水 900 ml，碳酸钙 0.2 g，琼脂粉 15 g~20 g，121 °C灭菌 20 min。

5.3 病原菌分离纯化

将采回的新鲜病组织用自来水冲洗干净，75% 乙醇溶液浸泡 30 s~40 s 后取出，无菌水冲洗 3 次，用灭菌滤纸吸干表面水分，并在次氯酸钠消毒液中浸泡 3 min，再用灭菌滤纸吸干表面水分，用灭菌解剖刀切取 0.5 cm² 大小的病健交界处组织置于 V8 培养基上进行分离培养，在培养皿上注明菌株编号、培养日期。25 °C 培养箱内黑暗培养 3 d~5 d 后，取菌落边缘菌丝 10×10 倍显微镜下观察，若菌丝无隔，直角分支，平均宽 3.5 μm，产生球形菌丝膨大体（平均直径 23 μm）和同宗配合卵孢子（直径 30 μm~35 μm），在水中产生无乳突、不脱落、倒梨形孢子囊（35 μm~58 μm×34 μm~45 μm），则认定为该菌丝为大豆疫霉根腐病菌。无法判断的，按照NY/T 2114 的规定进行 PCR 检测。将目标菌落转移至 V8 培养基上纯化 4 次~6 次。

5.4 病原菌保存

挑取大豆疫霉根腐病菌菌落边缘的菌丝体，置于 V8 培养基试管斜面上，25 °C 恒温下黑暗培养7 d，当试管斜面培养基长满菌丝后，置于 10 °C~17 °C 冰箱中保存（3 个月~4 个月传代一次）或-80°C 冰箱长期保存。

5.5 接种体的制备

将供试菌株置于V8 培养基的培养皿上，25 °C 恒温下黑暗培养 8 d，用灭菌解剖刀将含有大豆疫霉根腐病菌菌丝的培养基切成小方块（3 mm×3 mm）。接种体在接种当天制备。

6 鉴别寄主的培育

将 8 个鉴别寄主和感病品种的种子播种于 9 cm×12.5 cm×12.5 cm（底径×高×口径）的盆钵中，以灭菌蛭石做为基质，播种量为 15 粒/盆，出苗后间苗至 10 株/盆，3 次重复/处理，播种后置于 18 °C~26 °C 的日光温室中培养。肥料的使用按 NY/T 496 的规定执行、灌溉水质按 GB 5084 的规定执行。

7 接种

7.1 接种时间

大豆真叶期。

7.2 接种方法

下胚轴伤口接种法。

7.3 接种后管理

将人工接种后的大豆苗置于相对湿度 90 % 以上、温度为 20 ℃~25 ℃ 环境 48 h 后，转入 20 ℃~30 ℃ 温室正常管理，保持土壤含水量达到 70 %~80 %。

8 病情调查

8.1 调查时间

接种后 5 d~7 d 进行病情调查。

8.2 调查方法

按照附录 B 中规定的鉴别寄主对大豆疫霉根腐病菌生理小种反应类型进行调查记载。

8.3 无效数据重复测定

若某菌株对某鉴别寄主出现“中间类型（IRT）”反应，或某菌株对所有鉴别寄主无致病力，则不能定类群，需重复实验或不计结果。

9 生理小种鉴定

调查供试菌株与 8 个鉴别寄主互作反应结果，列出感病互作中 *Rps* 基因，即为该菌株致病型。按照大豆疫霉根腐病菌 55 个国际通用的生理小种表（见附录 C）确定生理小种。

10 灭活

将接种鉴定的接种体、基质等在 121 ℃ 经 20 min 灭活处理，将生理小种鉴定后的病株集中焚烧处理，用于栽培应用的盆钵 80 ℃ 水浴处理 2 h 以上。

11 建立鉴定档案

建立鉴定档案，内容包括大豆疫霉根腐病样品采集、接种前准备、鉴别寄主培育、接种、调查、生理小种鉴定、灭活及建立鉴定档案。档案保存 3 年以上，建档备查。

附录 A
(资料性)

大豆疫霉根腐病田间病样采集信息表

A.1 大豆疫霉根腐病田间病样采集信息表

见表A.1。

表 A.1 大豆疫霉根腐病田间病样采集信息表

地块	采样时间	详细地点	种植品种	生育期	记录人
1					
2					
3					
4					

地方标准信息服务平台

附录 B
(规范性)

鉴别寄主对大豆疫霉根腐病菌生理小种反应类型

B.1 鉴别寄主对大豆疫霉根腐病菌生理小种反应类型

见表B.1。

表 B.1 鉴别寄主对大豆疫霉根腐病菌生理小种反应类型

序号	反应类型	植株死亡率
1	感病(S)	$100\% \geq P \geq 70\%$
2	抗病(R)	$0 \leq P \leq 30\%$
3	中间类型(IRT)	$30\% < P < 70\%$

地方标准信息服务平台

附录 C

(资料性)

大豆疫霉根腐病菌 55 个国际通用生理小种表

C.1 大豆疫霉根腐病菌 55 个国际通用生理小种表

见表C.1。

表 C.1 大豆疫霉根腐病菌 55 个国际通用生理小种表

生理小种	毒力公式	生理小种	毒力公式
1	7	29	1a, 1b, 1k, 6, 7
2	1b, 7	30	1a, 1b, 1k, 3a, 6, 7
3	1a, 7	31	1b, 1c, 1d, 1k, 6, 7
4	1a, 1c, 7	32	1b, 1k, 6, 7
5	1a, 1c, 6, 7	33	1a, 1b, 1c, 1d, 1k
6	1a, 1d, 3a, 6, 7	34	1a, 1k, 7
7	1a, 3a, 6, 7	35	1a, 1b, 1c, 1d, 1k
8	1a, 1d, 6, 7	36	3a, 6
9	1a, 6, 7	37	1a, 1c, 3a, 6, 7
10	1b, 3a, 6, 7	38	1a, 1b, 1c, 1d, 1k, 3a, 6, 7
11	1b, 6, 7	39	1a, 1b, 1c, 1k, 3a, 6, 7
12	1a, 1c, 1d, 1k, 3a	40	1a, 1c, 1d, 1k, 7
13	6, 7	41	1a, 1b, 1d, 1k, 7
14	1c, 7	42	1a, 1d, 3a, 7
15	3a, 7	43	1a, 1c, 1d, 7
16	1b, 1c, 1k	44	1a, 1d, 7
17	1d, 3a, 6, 7	45	1a, 1b, 1c, 1k, 6, 7
18	1c	46	1a, 1c, 3a, 5, 6
19	1a, 1b, 1c, 1d, 1k, 3a	47	1a, 1b, 1c, 7
20	1a, 1b, 1c, 3a, 7	48	5, 7
21	1a, 3a, 7	49	1a, 1c, 4, 6, 7
22	1a, 1c, 3a, 6, 7	50	4, 6, 7
23	1a, 1b, 6, 7	51	1c, 5, 6, 7
24	1b, 3a, 7	52	3b, 5, 7
25	1a, 1b, 1c, 1k, 7	53	1a, 1b, 1c, 3a, 5, 7
26	1a, 1d, 3a, 6, 7	54	1d, 7
27	1b, 1c, 1k, 3a, 6, 7	55	1d, 3a, 3c, 4, 5, 6, 7
28	1a, 1b, 1k, 7		