

HNNY

湖南省农业技术规程

HNNY497-2026

青花菜黑腐病抗性接种鉴定技术规程

Code of practice for indoor inoculation and resistance

assessment of broccoli black rot

2026-07-08 发布

2026-07-08 实施

湖南省农业农村厅发布

目 次

前言 1

1 范围 2

2 规范性引用文件 2

3 术语和定义 2

4 设施设备及耗材 2

5 接种体制备 3

6 抗性接种 4

7 鉴定评价 5

8 废弃物处理 7

9 档案管理 7

附录 A 青花菜黑腐病野油菜黄单胞菌鉴定 8

附录 B 青花菜叶片黑腐病病情级别划分标准 10

前 言

本文件按《湖南省农业技术规程制定与发布管理规范》相关规定起草。

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这些专利的责任。

本文件由湖南省农业标准化技术委员会提出并技术归口。

本文件起草单位：湖南农业大学、岳麓山实验室、天津科润农业科技股份有限公司。

本文件起草人：胡震竺、张小丽、黄科、吴秋云、黄惠萍、黄露、罗雅方、孙德岭、江汉民。

青花菜黑腐病抗性接种鉴定技术规程

1 范围

本文件规定了青花菜黑腐病抗性接种鉴定的设施设备及耗材、接种体制备、抗性接种、鉴定评价和废弃物处理等内容。

本文件适用于青花菜黑腐病室内抗性接种鉴定。

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。

NY/T 3080-2017 大白菜抗黑腐病鉴定技术规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 人工接种

在可控室内试验条件下，人为将黑腐病病原物以标准化、可重复的方式接种至青花菜感病植株的叶片上，人为构建稳定发病体系的试验操作技术。

3.2 接种体

人工接种试验中人为施加，能够侵染青花菜植株的病原繁殖体。

3.3 抗病性鉴定

在可控室内条件下，以感病青花菜为试验材料，统一供给标准化接种体人工接种，系统调查植株发病程度、统计病情指标，定量、客观划分病情等级。

3.4 室内接种鉴定

在可控室内条件下，统一苗龄和叶片成熟度、温/湿度、光照、基质等环境条件，采用已鉴定的纯化接种体对青花菜幼苗或成株开展人工接种，控制侵染微环境稳定发病，再依据统一病情分级标准调查发病状况、计算病情指数，定量评价材料抗性水平。

4 设施设备及耗材

4.1 设施

隔离温室、鉴定室。

4.2 设备

恒温培养箱、冰箱、灭菌锅、超净工作台、显微镜、移液器、血球计数板等。

4.3 耗材

接种盘、培养皿、锥形瓶、纱布、酒精灯、滤纸等。

5 接种体制备

5.1 接种体采集

5.1.1 田间采集

从田间采集具有典型青花菜黑腐病症状的叶片，采用适宜于病原菌分离的组织分离法进行菌株分离纯化。

5.1.2 菌株购买

可通过中国农业微生物菌种保藏管理中心（ACCC）等购买。

5.2 接种体纯化

超净台无菌环境下，用灭菌刀具从病斑的病健交界处剪取约4 mm×4 mm的叶片组织，经过表面消毒和灭菌水漂洗3次后。将组织块置于1 mL~2 mL无菌水中充分研磨，用接种环蘸取菌液，在淀粉酪蛋白琼脂（NSCA）选择性培养基上划线。将平板倒置于28 °C恒温培养箱中培养48 h~96 h。挑取周围形成透明圈的典型浅黄色粘液状单菌落，在新培养基上划线纯化，直至获得形态一致的培养物。

5.3 接种体鉴定

结合菌落形态、分生孢子形态学特征鉴定，经致病性测定验证，并结合分子生物学方法对菌株进行鉴定，确认目标菌株为野油菜黄单胞菌（详见附录A），最终将鉴定准确、纯度一致的菌株纯培养物置于4 °C环境保存备用。

5.4 接种体保存

5.4.1 试管斜面保存

选用YDC或NSCA培养基制备固体斜面，无菌条件下接种活化后的野油菜黄单胞菌，28 °C恒温培养24 h~48 h，待斜面长满饱满菌落后，用无菌封口膜密封试管管口，置于4 °C冰箱保存。

5.4.2 甘油保存

取新鲜对数生长期菌体，用无菌生理盐水或液体培养基制备高浓度菌悬液，用20%无菌甘油（终浓度10%~15%）重悬，分装冻存管，-80 °C冰箱保存。

5.5 接种体扩繁

5.5.1 培养基保存菌株扩繁

取出4℃保存菌种，无菌挑取菌落，划线接种至新YDC或NSCA培养基，28℃培养24 h~48 h即可完成活化扩繁，可连续转接继代扩繁。

5.5.2 甘油保存菌株扩繁

取出-80℃甘油保存菌株快速解冻，取少量菌液划线于YDC或NSCA培养基，28℃培养复苏活化，长出菌落再转接扩繁。

5.5.3 培养

培养方法同5.2。

6 抗性接种

6.1 鉴定室准备

人工接种鉴定室应具备人工调节温度、湿度及光照条件。温度可调范围为1℃~35℃，湿度可调范围为60%~100%，光照可调范围为0 lx~6000 lx。

6.2 植株准备

以高抗青花菜种质设置1个~2个抗病对照组，以高感青花菜种质设置1个~2个感病对照组，同时设置空白对照组。

选择植株中上部生长状态较一致的健康展开叶，用自来水冲洗后，75%酒精表面消毒叶片10 s~15 s，再用无菌水冲洗干净后置于无菌滤纸，背面朝上，晾干待用。

6.3 抗性鉴定接种

6.3.1 接种时期

青花菜黑腐病抗性鉴定采用苗期接种法，接种苗龄以3~4片真叶期为宜，接种时间宜在傍晚进行。

6.3.2 接种浓度

利用分光光度法测定并调整菌悬液浓度，接种体悬浮液的游动孢子数为浓度调节至 1×10^8 CFU/mL，4℃~6℃可放置2 h，宜现用现配。

6.3.3 接种方法

青花菜组培苗采用苗期接种，采用叶片喷雾接种法进行接种，将制成的接种体悬浮液用喷雾器喷雾接种于鉴定材料植株叶片的正面和背面，重点喷叶片背面，为叶片布满细密水珠、叶尖有少量水滴溢出为宜，每个品种处理20株。接种后套袋保湿，3 d~6 d后揭去袋子。空白对照采用无菌水代替接种体悬浮液进行接种。

6.4 接种后管理

接种后25℃~28℃恒温培养，密闭保湿24 h~48 h，相对湿度85%以上；之后恢复正常温光水肥管理，避免大水漫灌，定期观察记录发病情况。

7 鉴定评价

7.1 病情分级

幼苗病情级别及相应症状描述见表1；叶片病情级别及相应症状描述见表2。

0级，接种叶片无任何病斑症状；1级，接种叶片水孔处有黑色枯死斑点，无扩展；3级，接种叶片病斑从水孔向外扩展，占叶面积1%~5%（不含5%）；5级，接种叶片病斑从水孔向外扩展，占叶面积5%~25%（不含25%）；7级，接种叶片病斑从水孔向外扩展，占叶面积25%~50%（不含50%）；9级，接种叶片病斑从水孔向外扩展，占叶面积50%以上（附录B）。

表 1 青花菜叶片黑腐病病情级别划分

病情级别	症状描述
0	整株叶片无症状。
1	出现少量点状小病斑，病斑面积占叶片<5%。
3	病斑扩展，面积占叶片5%~20%（不含上限）。
5	病斑连片发黄坏死，面积占叶片20%~50%（不含上限）。
7	叶片大半枯死，病斑面积占叶片50%~80%（不含上限）。
9	叶片全部枯黄坏死，病斑面积≥80%

表 2 青花菜幼苗黑腐病病情级别划分

病情级别	症状描述
0	全株无病，所有叶片无症状。
1	仅下部少数叶片轻微发病，上部叶片无症状。
3	半数以下叶片发病，病斑较轻，植株生长正常。
5	半数以上叶片染病，病斑明显，长势受抑制。
7	绝大部分叶片严重发病，植株明显萎蔫矮缩。
9	整株叶片枯死，幼苗濒临死亡或枯死。

7.2 病情调查

7.2.1 病情指数统计方法

按病情级别划分调查、记录每份鉴定材料发病情况，根据病害症状描述，逐份材料记载单株/单片叶片病情级别。

计算每份鉴定材料的病情指数（DI），计算结果取3次重复平均值，保留小数点后2位。病情指数按公式（1）计算。

$$DI = \frac{\sum (Fi \times Ui)}{U \times S} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中：

DI ——病情指数；

Fi ——第i级病情级别(i=0, 1, 3, 5, 7, 9)；

Ui ——第i级病情级别对应植株数/叶片数；

U——调查总植株数/叶片数；

S ——最高级病情级值。

7.2.2 调查时间

接种后第7天至第10天统一开展病情调查，于每日上午9:00 - 11:00完成植株病情分级与病情指数统计。

7.2.3 抗性分级

根据调查结果计算各青花菜品种的病情指数，并按照表3评定青花菜黑腐病的抗性。

表 3 青花菜黑腐病抗性评价标准

抗病类型	病情指数（DI）
免疫 Immune（I）	$DI = 0.00$
高抗 Highly resistant（HR）	$DI < 10$
抗病 Resistant（R）	$10 \leq DI < 30$
中抗 Moderately resistant（MR）	$30 \leq DI < 50$
感病 Moderately susceptible（S）	$50 \leq DI < 70$
高感 Highly susceptible（HS）	$DI \geq 70$

7.3 评价规则

当感病对照材料病情指数达到感病级别（DI ≥ 50），抗病对照材料与实际抗性程度相符时，该批次抗性鉴定视为有效；否则该批次鉴定无效，应重新进行。

鉴定材料若初次表现为抗病、中抗的表型，应进行重复鉴定。当2次鉴定结果一致时鉴定完成，当2次鉴定结果不一致时，应进行第3次鉴定，最终以3次中病情指数最高者为准。

重复鉴定时，鉴定2次的以抗性水平最低的评价结果作为供试材料最终抗性评价结果；鉴定次数为2次以上的，以出现频率最多的抗性水平评价结果作为供试材料最终抗性评价结果。平均病情指数（DI）≤ 30.00的材料才能定为抗病材料。

8 废弃物处理

鉴定完毕后，集中所有病株、叶片材料做无害化处理，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130 ℃以上并保持30 min。

9 档案管理

应建立青花菜黑腐病抗性接种鉴定档案，其内容包括但不限于青花菜农事记录、样品采集、抗性鉴定以及抗性评价等内容；保存期2年以上。

附 录 A
(资料性)
青花菜黑腐病野油菜黄单胞菌鉴定

A.1 野油菜黄单胞菌的形态学鉴定

野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) 属于黄单胞菌科, 是一种革兰氏阴性、极生单鞭毛、无芽孢的短杆状细菌, 菌体大小约 $0.5\ \mu\text{m} \times 3.0\ \mu\text{m}$ 。该菌是青花菜黑腐病的病原菌, 其典型特征之一是产生黄原胶, 因此在培养基上常形成黄色、粘液状的菌落。其菌落形态因培养基而异: 在YDC培养基上呈典型黄色、凸起、半透明且具粘性; 在NSCA培养基上呈浅黄色, 并伴有淀粉水解透明圈; 而在Xan-D显色培养基上, 则表现为湿润光泽的黄绿色菌落, 周围环绕乳白色晕圈及透明圈。其中Xan-D显色培养基因有良好的鉴别效果, 常被用作该菌的快速鉴定培养基。

A.2 野油菜黄单胞菌的分子鉴定

野油菜黄单胞菌包含9个生理小种, 使用PCR扩增技术可以对分离纯化的菌株进行快速鉴定。扩增引物见表A.1。

表 A.1 野油菜黄单胞菌 PCR 鉴定扩增引物

生理小种	引物名称	引物序列	产物大小/bp
Xcc specific	XCF	CGATTCGGCCATGAATGACT	525/535
	XCR	CTGTTGATGGTGGTCTGCAA	
	rpfH-F	AGTTGCAGCAGCTGTTCT	304
	rpfH-R	ATAGCACGTATTGGCAGGG	
Race 1	Xcc-85R1-F	GCGGCTCGGCTTCACGGTCAGC	467(Race 1)/872(其他)
	Xcc-85R1-R	GCCCAGGATGCAGCGCAGCGT	
Race 2	Xcc-R2-89.2-F	CGCCTTGATGTAGCCCAGTA	929
	Xcc-R2-89.2-R	GGTGGCTTGGACAACGTTC	

生理小种	引物名称	引物序列	产物大小/bp
Race 3	XccR3-49-F	AAAGAGCCAATGAAGGGCGAACA	867
	XccR3-49-R	TATGTCAGGCGCATAATCCGCAAT	
Race 4	Xcc2-46R4-F	GCGTAGCGAAAACCTGGTAGTTC	578
	Xcc2-46R4-R	GCACAGGCGCACCAAGCATATGGC	
Race 5	XccR5-89.2-F	GCGAGCGATTTACCTTCAT	1515
	XccR5-89.2-R	AATTCGGACAACAGCGCAAT	
Race 6	XccR6-60-F	TGTAGAATCTTTAGCTGGCGC	693
	XccR6-60-R	TTCAATGCATTCCCGACACG	
Race 7	30-7-F	TTTACCACATCGCGAACGCGCC	320
	30-7-R2	GCGGAGGTCTATAATTCACCTG	
Race 8	30-8-1-F2	CACGCTTGTTGTTGGTGCGTAG	352(Race8)/1405(其他)
	30-8-1-R	GACGGCATGCTCGGTTATCTCG	
Race 9	XccR9-2F2	CGAACAGCAAAGGCAGATACAG	830
	XccR9-2R1	CATGCGCATAGCGGCCCGCCTTG	

附录 B

(规范性)

青花菜叶片黑腐病病情级别划分标准

青花菜黑腐病的典型症状为病斑从叶片水孔处的褪绿斑点逐渐扩展，颜色由黄色逐渐变为褐色，终至黑褐色（见图B.1）。



图 B.1 青花菜叶片黑腐病病情级别划分标准