

HNNY

湖南省农业技术规程

HNNY499-2026

青花菜霜霉病抗性接种鉴定技术规程

Code of practice for indoor inoculation and resistance

assessment of brocoli downy mildew

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 6

9 档案管理 7

附录 A（资料性） 青花菜霜霉菌病原特征及传播途径 8

附录 B（资料性） 推荐性抗、感青花菜霜霉病对照材料 10

附录 C（规范性） 青花菜霜霉病抗性鉴定结果原始记录表 11

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、天津市农业科学院。

本文件起草人：吴秋云、罗雅方、黄科、黄露、胡震竺、黄惠萍、张小丽。

青花菜霜霉病抗性接种鉴定技术规程

1 范围

本文件规定了青花菜霜霉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霜霉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。

GB/T 23392.1-2009 十字花科蔬菜病虫害测报技术规范 第1部分：霜霉病

DB43/T 386-2008 十字花科蔬菜霜霉病防治技术规范

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，人为将霜霉病病原物以标准化、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、穴盘、保鲜膜、滤纸等。

5 接种体制备

5.1 接种体采集

田间采集具有典型病症的青花菜霜霉病叶片，放入封口袋密封并登记编号带回实验室。挑取叶背面霉层制作分离物显微观察玻片，在生物显微镜下开展病原菌形态学鉴定。

5.2 接种体纯化

鉴定为携带青花菜霜霉菌的叶片用灭菌蒸馏水冲洗，将叶背朝上平铺于经灭菌湿润过的滤纸上，黑暗环境培养，培养温度22℃，空气相对湿度80%~90%，3 d~5 d后，置于1800 lx~3200 lx的光照条件下，待病斑长出大量灰白色霉层时，用灭菌毛笔蘸无菌水，将病斑上新形成的霉层（孢子囊）刷于无菌培养皿中，获得纯化的接种体。

5.3 接种体鉴定

挑取纯化接种体在生物显微镜下开展病原菌形态学鉴定，结合分子生物学鉴定，初步认定为青花菜霜霉病病原物后，该菌为专性寄生菌，该致病性测定验证确认，保存备用。青花菜霜霉病病原菌相关资料见附录A。

5.4 接种体保存

5.4.1 活体保存

在适宜环境条件下，定期将青花菜霜霉菌人工接种于感病寄主上保存。

5.4.2 冷冻保存

将病叶放入有10%甘油的冻存管储藏于-80℃冰箱中。

5.5 接种体扩繁

选取保存的接种体接种于感病品种中度成熟叶片，具体操作如下：

5.5.1 冲洗

自来水冲洗叶片，75%酒精表面消毒20 s~30 s，无菌水冲洗1次~2次。

5.5.2 接种

将叶片背面朝上置于灭菌瓷盘或塑料盘中，盘底部附有浸透无菌水的滤纸，并用无菌细针对每片叶集中针刺2次~3次，造成细小伤口。用无菌移液器吸取接种液，滴于针刺部位1滴~2滴，每滴15 μL ~20 μL ，用保鲜膜封严繁殖接种盘。

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 $^{\circ}\text{C}$ ~35 $^{\circ}\text{C}$ ，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。推荐性抗、感青花菜种质材料见附录B。

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 接种

6.3.1 接种时期

达到接种材料要求后即可进行接种，接种时间宜在傍晚进行。

6.3.2 接种浓度

接种体悬浮液的游动孢子数为 $(1\sim1.5)\times10^4$ CFU/mL，4 $^{\circ}\text{C}$ ~6 $^{\circ}\text{C}$ 放置2 h，现用现配，悬浮液载体为无菌水。

6.3.3 接种方法

青花菜组培苗采用苗期接种，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。叶片采用离体叶片接种，将准备好的叶片背面朝上置于灭菌瓷盘或塑料盘中，盘底部附有浸透无菌水的滤纸，用无菌移液器吸取接种体悬浮液，每片叶1滴~2滴，每滴15 μL ~20 μL ，每品种离体叶片需重复处理20片。接种完成后接种盘用保鲜膜封严。空白对照采用无菌水代替游动孢子悬浮液进行接种。

6.4 接种后管理

接种植株置于隔离鉴定温室内，温度保持为20 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$ ，空气相对湿度80%~90%，每天植株套袋表面喷雾无菌水1次保湿，正常水肥管理；离体叶片接种盘置于光照培养箱或鉴定培养室内，黑暗24 h后每天光照14 h，温度和湿度条件同上。

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。

表 1 青花菜幼苗霜霉病病情级别划分

病情级别	症状描述
0	整株叶片无症状
1	病叶占全株展开叶1%~10%，霜霉病症不明显
3	病叶占全株展开叶11%~25%，霜霉病症较明显
5	病叶占全株展开叶26%~50%，霜霉病症明显
7	病叶占全株展开叶51%~75%，病叶部分枯萎、脱落
9	病叶占全株展开叶75%以上，叶片大部分发黄枯萎、脱落

表 2 青花菜叶片霜霉病病情级别划分

病情级别	症状描述
0	叶片无症状
1	病斑占叶片单面积1%~10%，霜霉病症不明显
3	病斑占叶片单面积11%~25%，霜霉病症较明显
5	病斑占叶片单面积26%~40%，病斑灰褐色
7	病斑面积占单片叶面积41%~60%，病斑呈现焦枯状
9	病斑面积占单片叶面积60%以上或病叶枯死，病斑呈现灼烧状

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)；

U_i ——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

青花菜叶片接种3 d~4 d后调查病情，根据接种后感病对照品种病情发展到病情级别的时间，作适当调整。

7.3 抗性评价

7.3.1 鉴定有效性判别

当感病对照材料达到其相应感病程度（ $DI > 20.00$ ），抗病对照材料与实际抗性程度相符，该批次抗性鉴定视为有效；以对照品种发病程度明显异常时判定该批次鉴定无效。

7.3.2 抗性分级

依据鉴定材料的病情指数（DI）平均值确定其抗性水平，划分标准见表3。

表 3 青花菜对霜霉病抗性水平评价指标

抗性评价（级别）	病情指数（DI）
免疫 Immune（I）	$DI = 0.00$
高抗 Highly resistant（HR）	$1 < DI \leq 5.00$
抗病 Resistant（R）	$5.00 < DI \leq 10.00$
中抗 Moderately resistant（MR）	$10.00 < DI \leq 20.00$
感病 Moderately susceptible（S）	$20.00 < DI \leq 40.00$
高感 Highly susceptible（HS）	> 40.00

7.3.3 鉴定规则

当感病对照材料病情指数达到感病级别（ $DI \geq 50$ ），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、中抗的品种，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） ≤ 20.00 的材料才能定为抗病材料。将不同病情级别的株数/叶片数、病情指数、3个重复的平均病情指数、抗性评价（抗感水平）等鉴定结果填入附录C。

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

应建立青花菜霜霉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；记录档案保存2年以上。

附 录 A
(资料性)
青花菜霜霉菌病原特征及传播途径

A.1 病原特征及病害传播途径

青花菜霜霉病由寄生霜霉菌 (*Peronospora parasitica*) 侵染所致。该病菌菌丝无色，无隔膜，蔓延于寄主细胞间，通过吸器伸入细胞内吸收营养。孢子囊无色，单胞；有性生殖产生卵孢子，直径范围为 $27.9\ \mu\text{m}$ ~ $45.3\ \mu\text{m}$ 。寄生霜霉菌为专性寄生菌，仅能在活体寄主上存活，且具有明显生理分化现象。病原菌主要以卵孢子在病残体、土壤中或附着在种子上越冬，也可以菌丝体在留种株内越冬。翌年，卵孢子或菌丝体产生的孢子囊萌发，通过气孔或表皮细胞间侵入寄主。病菌借助风雨、灌溉水或气流传播，实现再侵染。孢子囊萌发和侵入的适宜温度在 $7\ ^\circ\text{C}$ ~ $16\ ^\circ\text{C}$ ，菌丝发育适温为 $20\ ^\circ\text{C}$ ~ $24\ ^\circ\text{C}$ 。高湿（相对湿度90%以上）和昼夜温差大的条件，有利于病害流行；当光照时间少于16 h时，幼苗在子叶阶段即可受到侵染。在我国，该病春季（3月~5月）和秋季（9月~11月）均可发生，其中以春季为害最为严重。

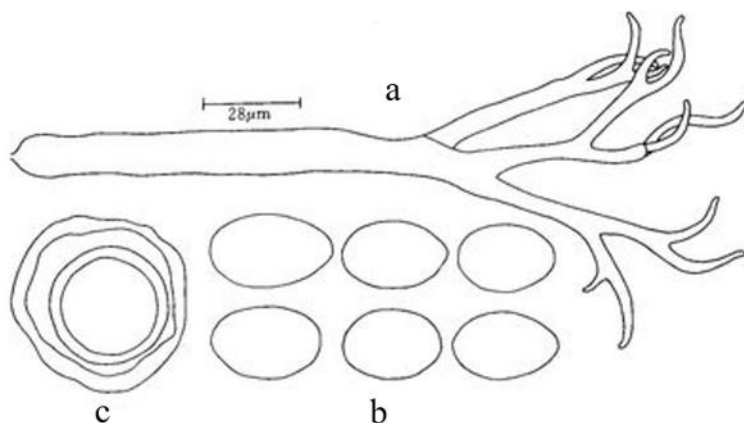


图 A.1 青花菜霜霉菌形态特征(a. 孢囊梗；b. 孢子囊；c. 卵孢子)



图A.2 青花菜霜霉病症状(a 幼苗发病；b. 成株发病；c. 成株发病晚期)

A.2 青花菜霜霉病 PCR 鉴定引物

表A. 2青花菜霜霉病PCR鉴定扩增引物

分子鉴定方法	引物名称	引物序列	产物大小	标记类型
PpIS2普通PCR	PpITS2-F	5'-GCT TGT TTG CTT GGT GCT GT-3'	340 bp	显性
	ITS4	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'		
ITS4 普通 PCR	ITS5	5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'	600 bp	显性
	ITS4	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'		
cox2 SYBR qPCR	Pp-cox2-F	5'-TTC GGA TCA TTT TGG CTC GG-3'	182 bp	显性
	Pp-cox2-R	5'-TGA ACA CTA ATC CAA AGT CC-3'		
ITS2 TaqMan 探针体系	PpITS2-F	5'-GCT TGT TTG CTT GGT GCT GT-3'	115 bp	显性
	PpITS2-R	5'-GTT TCG CTG CGT CTT TGC-3'		
TaqMan水解探针 (5'FAM, 3'BHQ1)	Probe-Pp	5'-FAM-TGG TTG CGG CTT GCG CTT T-BHQ1-3'		

附 录 B

(资料性)

推荐性抗、感青花菜霜霉病对照材料

推荐抗、感青花菜霜霉病对照材料见表 B. 1。

表 B. 1 抗、感青花菜霜霉病推荐材料

项目	抗病材料	感病材料
品种/种质名称	碧杉、碧松、上海1号	晚生圣绿

附 录 C

(规范性)

青花菜霜霉病抗性鉴定结果原始记录表

C.1 推荐对照材料

推荐抗、感青花菜霜霉病对照材料见表C.1。

表 C.1 青花菜种质材料对青花菜霜霉病抗性评价调查表(第 次重复)

品种(品质)名称	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
病情级别											
品种(品质)名称	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
病情级别											

C.2 种质材料

青花菜种质材料对青花菜霜霉病抗性评价调查表见表C.2。

表 C.2 青花菜种质材料对青花菜霜霉病抗性评价调查表(第 次重复)

编号	品种/种质名称	来源	重复	病情级别（株/叶片）						病情指数	平均病情指数	抗性评价（级别）
				0级	1级	3级	5级	7级	9级			
			I									
			II									
			III									
定植日期												
接种材料类型												
调查日期												