

T/CSTC

中国热带作物学会团体标准

T/CSTC 01—2023

甘蔗白条病抗性评价技术规程

Technical code of practice for resistant evaluation of sugarcane leaf scald disease

2023 - 10 - 10 发布

2023 - 11 - 15 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。

本文件由中国热带作物学会提出并归口。

本文件起草单位：广西大学、全国农业技术推广服务中心。

本文件主要起草人：张木清、李奕莎、姚伟、史梦雅、杜金霞、李美霖、陈保善、暴怡雪、张桂英、胡琴、黄江锋、温荣辉、张积森、肖胜华、余凡、蒋洪涛、陈文晗、吴广悦。

中国热带作物学会

甘蔗白条病抗性评价技术规程

1 范围

本文件确立了甘蔗白条病抗病性评价技术规程，规定了术语和定义、评价程序、接种体制备、接种、病情调查及抗病性评价的要求。

本文件适用于甘蔗种质资源和甘蔗品种（系）对白条病的抗性评价。

2 规范性引用文件

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

甘蔗白条病 sugarcane leaf scald disease

是由白条黄单胞菌 *Xanthomonas albilineans* 引起的发生在甘蔗上的病害。

4 评价程序

甘蔗白条病评价流程包括6个步骤，评价流程图见图1。

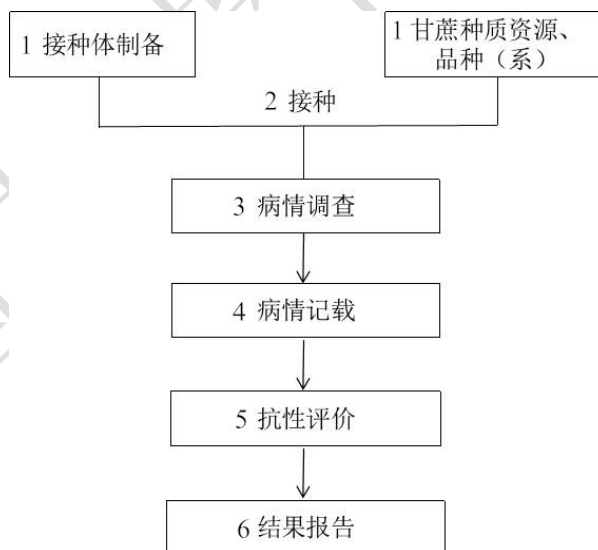


图1 甘蔗白条病抗性评价流程

5 接种体制备

5.1 病原菌分离评价

用细菌分离培养的方法从白条病病叶上分离白条病病原物，并用病原物的特异引物XAF/XAR进行PCR分子评价。白条病病原菌的详细信息见附录A。

5.2 病原菌的保存

用ddH₂O悬浮，于-80 °C超低温冰箱进行长期保存。

5.3 病原菌接种体制备

将保存的菌株活化至XAS培养基平板上，置于28 °C 培养箱培养2 d，再用无菌牙签挑取平板上的菌落，接种到XAS液体培养基中，28 °C摇床200 rpm震荡培养5 d，确定菌株生长至指数生长期。离心去上清培养液，用ddH₂O把菌液配制成浓度为 1×10^6 个/mL细菌悬浮液。

6 接种

6.1 人工接种

6.1.1 截头法接种

试验设计在田间，采用完全随机区组设计，单行区，行长1.0 m、行距1.2 m，3次重复，每个小区种植10个芽；试验区四周设置保护行。待甘蔗材料长到5个节间时，用蘸有细菌悬浮液的剪刀剪切甘蔗生长点上方，每个材料剪切5株甘蔗，试验材料包括高感和抗病对照种，标准对照品种见附录B。不同基因型植株剪切后用酒精棉擦拭剪刀，随后用棉花蘸取500 μL细菌悬浮液（ 1×10^6 个/mL）置于斜切面上，用ddH₂O作阴性对照。

6.1.2 浸种法接种

在温室中，采用完全随机区组设计，设置三个重复，单行区，行长2.0 m，同一行的两个材料间间距0.5 m，行距0.8 m，每个小区的下种量为30个芽，试验材料包括高感和抗病对照种，标准对照品种见附录B。甘蔗砍成单芽，种茎浸没于 1×10^6 个/mL细菌悬浮液中3 h后再种植，栽培管理上应确保70 %的湿度。

6.2 田间自然接种

6.2.1 田间病理圃

通过人工营造，或设计在病害常发区域。病理圃的栽培条件（品种、土壤类型及施肥）应均匀一致，且符合良好农业规范（GAP），设立保护区。

6.2.2 田间试验设计

每个材料挑选蔗芽饱满、一致的种芽90个于春季种植在病理圃中。试验采用完全随机区组设计，单行区，行长3.0 m、行距1.2 m，3次重复，每个小区种植30个芽，试验区四周设置保护行。试验材料包括高感和抗病对照种，标准对照品种见附录B。

7 病情调查

7.1 调查时间

7.1.1 截头法

在接种后一个月观察到白条病症状，每隔15 d记录发病情况，持续观察2个月直至病情稳定。

7.1.2 浸种法

待甘蔗长到五叶期观察到病症，间隔15 d后继续观察，持续观察2个月直至病情稳定。

7.1.3 田间自然接种

在甘蔗伸长初期（6月）、中期（7月）和盛期（8月~9月）各调查一次。

7.2 分级标准

白条病评价分级标准见附录C。

7.3 记载方法

先记录一个小区的总株数，用目测法统计甘蔗叶片的发病株数及每一株的病害级别，调查并记载病害级别。甘蔗白条病抗性评价调查记载表见附录E表E.1。

8 抗病性评价

8.1 病情指数计算

根据病情症状描述，计算病情指数（*DI*）。病情指数按式（1）计算。

$$DI = \frac{\sum (n \times s)}{S \times N} \times 100 \dots \dots \dots (1)$$

式中：

- DI*——为病情指数；
- S*——为最高病级值；
- N*——为调查总株数；
- n*——为各级病株数；
- s*——为发病等级值。

8.2 抗性评价标准

8.2.1 截头法抗性评价标准

依据评价材料的最高病情指数确定抗性水平，划分标准见附录D表D.1。

8.2.2 浸种法抗性评价标准

依据评价材料的最高病情指数确定抗性水平，划分标准见附录D表D.2。

8.2.3 田间自然接种抗性评价标准

依据评价材料的最高病情指数确定抗性水平，划分标准见附录D表D.3。

8.3 有效性判别

感病品种对照或任一评价材料的抗性类别达到感病或以上时，该批次评价有效。

8.4 重复评价

初次评价中表现为抗、中抗、中感的材料，用相同的病原菌进行重复评价，不同批次间评价结果不一致时，宜以最高抗性类别为准。

8.5 抗病性评价报告

宜以单个品种单独出具，如集中批量送样，也可多个品种出一份报告。评价结果报告单见附录E表E.2，原始记录应保存完好备查。

附录 A (资料性)

甘蔗白条病病原菌的生物学特性、甘蔗危害症状及分离鉴定和保存方法

A.1 生物学特性

白条黄单胞杆菌 (*Xanthomonas albilineans*)，其菌落颜色是蜜黄色，菌体光亮、平滑、质地为黏稠状 (图A.1A)；菌体为杆状细长，极生单根鞭毛 (图A.1B)。



图A.1 白条黄单胞杆菌的菌落和电镜形态

A.2 甘蔗白条病田间典型症状

叶片上的线条、条纹类似于直铅笔线，宽度可达1 cm，逐渐沿着叶片展开，叶片上的颜色由白色变为黄色，变得更具扩散性；叶片尖端枯萎和向内卷曲；在成熟的侵染茎上，侧芽表现出与主茎相同的症状；感染茎的纵截面特点是节和节间出现明显的红色。

A.3 病原菌分离、保存与鉴定

A.3.1 分离

A.3.1.1 配制培养基

XAS培养基 (每升含量)：葡萄糖10 g，蛋白胨5 g，磷酸氢二钾0.5 g，硫酸镁0.25 g，亚硫酸钠0.05 g，溴化钾5 g，pH 6.8 ~ 7.0，琼脂15 g。配置完成的培养基置于高压灭菌锅中 (121 °C，1×105 Pa) 湿热灭菌25 min备用。在使用前每升添加抗生素100 mg放线菌酮 (Cycloheximide)，2 mg苯菌灵 (Benomy1)，25 mg头孢氨苄 (Cephalexin)，30 mg新生霉素 (Novobiocin)，50 mg春雷霉素 (Kasugamycin)。

A.3.1.2 分离病原菌

取病健交界处 (病斑与健康部分的交界处) 的甘蔗叶片，剪成边长为0.3 cm ~ 1.5 cm大小的长方形叶片，在超净工作台中，将叶片置于0.1 %升汞中灭菌30 s，然后在70 %的酒精溶液中浸泡30 s，最后用ddH₂O清洗三遍，置于灭菌滤纸上自然晾干，用无菌剪刀剪碎叶片，再用镊子夹起碎片置于含有1 mL ddH₂O的1.5 mL离心管中，将叶片浸没于ddH₂O中使细菌释放，室温放置4 h后，按照1: 100稀释后涂布于XAS培养基上，将平皿置于28 °C温箱倒置培养7 d。

A.3.1.3 培养纯化

待菌落长出后，挑取不同形态的菌落进行划线纯化培养，28 °C倒置培养2 d ~ 3 d后，纯化3 ~ 4代，直到菌株为纯合。

A.3.1.4 细菌微生物的制备

在无菌操作的条件下，取二代纯化后的培养平板，使用灭菌的无菌枪头挑取单个菌落边缘的细菌置于XAS液体培养基中，于28 °C摇床200 rpm震荡培养5 d。

A.3.2 菌株保存及病原菌DNA提取

无菌操作条件下，吸取菌液400 μL于2 mL离心管中，加入等体积的ddH₂O混匀，用封口膜密封，置于-80 °C保存菌株。基因组DNA使用细菌基因组试剂盒提取。

A.3.3 鉴定

A.3.3.1 病原菌分子鉴定

利用特异引物 XAF/XAR 进行 PCR 评价（XAR 5'-CGATCAGCGATGCACGCAGT-3'，XAF 5'-CCTGGTGATGACGCTGGGTT-3'）。PCR反应总体积分别为25 μL，内含2 × Taq mix 12.5 μL，引物（10 μmol/L）各1.0 μL，40 ng模板DNA 1 μL，ddH₂O 9.5 μL。反应结束后，PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳，用Bio-Rad公司凝胶成像系统照相，PCR产物放入4 °C冰箱保存。

A.3.3.2 致病性测定

依据接种高感材料的病情指数确定菌株的致病力，当病情指数达到50以上，表明菌株致病力强。抗病性评价应选取致病力强的菌株进行。

取纯化后目标菌株的培养平板，无菌条件下挑取单菌落边缘菌丝接种于MW培养基，28 °C，200 rpm培养5 d，即菌株处于生命力极旺盛的指数生长期时，获取大量分生孢子。用无菌水将其配制成浓度为1×10⁶ 个/mL的细菌悬浮液。采用截头法接种于高感品种桂糖46号，一个月时开始记录发病情况，此后每15 d调查一次，持续观察2个月，直至病情稳定。

附 录 B
(资料性)
标准对照品种

B.1 标准对照品种

在同一试验环境下，待测材料的抗性可参照已知抗性的标准对照品种，见表B.1。

表 B.1 甘蔗白条病抗性对照品种

抗性类别	对照品种
高抗 (HR)	中蔗 1 号、粤糖 93-159
附抗病 (R)	新台糖 22 号、桂糖 92-66
中抗 (MR)	桂柳 05-136、新台糖 25 号
感病 (S)	福农 0335、桂糖 02-390
高感 (HS)	桂糖 46 号、粤甘 24 号

附 录 C
(规范性)
甘蔗白条病分级标准

C.1 甘蔗白条病分级标准

甘蔗白条病分级标准，划分标准图见图C.1，对应症状描述见表C.1。



图 C.1 甘蔗白条病分级标准图

注：a 为健康叶片（0 级）；b 为 1 级；c 为 2 级；d 为 3 级；e 为 4 级；f 为 5 级。

表 C.1 甘蔗白条病病害级别

病害级别	症状描述
0 级	无症状
1 级	1~2 个铅笔状发病叶
2 级	多于 2 个铅笔状发病叶
3 级	黄化叶片
4 级	叶片坏死
5 级	植株死亡

附录 D
(规范性)
抗性评价标准

D.1 截头法抗性评价标准见表D.1。

表 D.1 截头法接种抗性评价标准

抗性级别	病情指数 (DI)	抗性类别
1	$DI \leq 10.0$	高抗 (HR)
2	$10.0 < DI \leq 30.0$	抗病 (R)
3	$30.0 < DI \leq 40.0$	中抗 (MR)
4	$40.0 < DI \leq 50.0$	感病 (S)
5	$DI > 50.0$	高感 (HS)

D.2 浸种法抗性评价标准见表 D.2。

表 D.2 浸种法接种抗性评价标准

抗性级别	病情指数 (DI)	抗性类别
1	$DI \leq 0.0$	高抗 (HR)
2	$0.0 < DI \leq 3.0$	抗病 (R)
3	$3.0 < DI \leq 6.0$	中抗 (MR)
4	$6.0 < DI \leq 10.0$	感病 (S)
5	$DI > 10.0$	高感 (HS)

D.3 田间自然接种抗性评价标准见表 D.3。

表 D.3 田间自然接种抗性评价标准

抗性级别	病情指数 (DI)	抗性类别
1	$DI \leq 1.0$	高抗 (HR)
2	$1.0 < DI \leq 2.5$	抗病 (R)
3	$2.5 < DI \leq 5.0$	中抗 (MR)
4	$5.0 < DI \leq 10.0$	感病 (S)
5	$DI > 10.0$	高感 (HS)

附 录 E
(资料性)
调查记载表和结果报告单

E.1 甘蔗白条病抗性评价调查记载表见表 E.1。

表 E.1 甘蔗白条病田间抗性评价调查记载表

品种	评价方法	调查株数	病害级别株数					病情指数	抗病性水平
			1级	2级	3级	4级	5级		

评价人员：_____ 复核人员：_____ 日期：_____

注：在开展评价调查时，评价人员与复核人员一同进行，评价人员对评价植株病害级别进行判断，经复核人员确认后记载。

E.2 甘蔗品种（系）白条病抗性评价结果报告单见表 E.2。

表 E.2 甘蔗品种（系）白条病抗性评价结果报告单

品种编号		品种名称	
委托评价单位		评价编号	
样品接收时间		样品数量	
评价项目		评价依据	
评价结果			
评价地点			
评价依据			
评价方法			
种植日期			
接种日期			
调查日期			
病情指数			
抗病性水平			
结论			
备注			

制表人：_____ 审核人：_____ 批准人：_____ 日期：_____

注：评价结果报告应盖评价单位公章，应有制表人、审核人和批准人签字。

参 考 文 献

- [1] 《中华人民共和国农产品质量安全法》（2022年修订）
-

中国热带作物学会