

ICS 65.020

CCS B 15

T/CSTC

中国热带作物学会团体标准

T/CSTC 0002—2023

甘蔗梢腐病抗性评价技术规程

Technical code of practice for resistant evaluation of sugarcane pokkah boeng disease

2023 - 10 - 10 发布

2023 - 11 - 15 实施

中国热带作物学会 发布

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、广西壮族自治区农业科学院、广东省农业科学院。

本文件主要起草人：张木清、姚伟、许誉芝、暴怡雪、史梦雅、陈保善、姚姿婷、邹承武、徐世强、王继华、王泽平、胡琴、黄江锋、肖胜华、余凡、张积森、蒋洪涛、林镇跃、黄振、张桂英。

甘蔗梢腐病抗性评价技术规程

1 范围

本文件确立了甘蔗梢腐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）对梢腐病的抗性评价。

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

甘蔗梢腐病 sugarcane pokkah boeng disease

由藤仓镰孢菌种复合体（*Fusarium fujikuroi* Complex, FFC）的四个种“甘蔗镰孢菌（*F. sacchari*, Fs）、层出镰孢菌（*F. proliferatum*, Fp）、轮枝镰孢菌（*F. verticillioides*, Fv）和新知镰孢菌（*F. andiyazi*, Fa）”引起的发生在甘蔗上的病害。

4 评价程序

甘蔗梢腐病评价流程包括 6 个步骤，评价流程图见图 1。

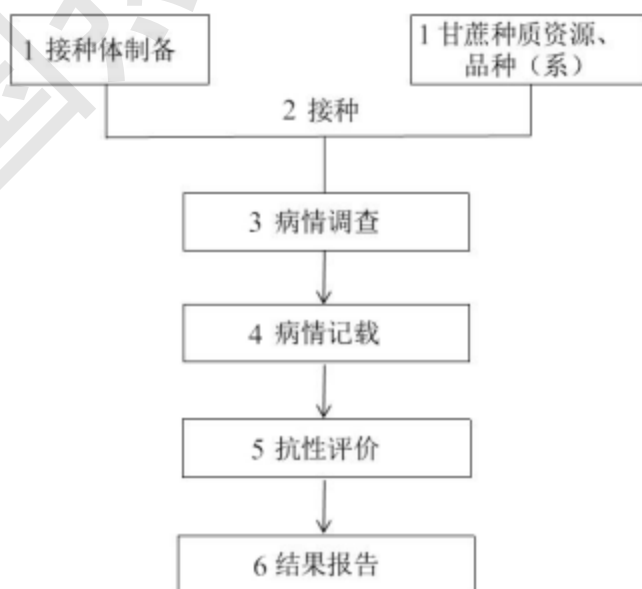


图 1 甘蔗梢腐病抗性评价流程

5 接种体制备

5.1 病原菌分离评价

用真菌分离培养的方法从梢腐病病叶上分离梢腐病病原物，并用病原物的特异引物 ITS1/ITS4 和 EF1/EF2 进行 PCR 分子评价。梢腐病病原菌的详细信息见附录 A。

5.2 病原菌的保存

用 50 %甘油悬浮，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 PDA 培养基平皿上，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 PDW 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 的真菌悬浮液。

6 接种

6.1 田间自然接种

6.1.1 田间鉴定圃

通过人工营造，或设计在病害常发区域。鉴定圃的栽培条件（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。

6.1.2 田间试验设计

每个材料挑选蔗芽饱满、一致的种芽 300 个于春季种植在鉴定圃中。试验采用完全随机区组设计，单行区，行长 7 m ~ 10 m、行距 1.2 m，3 次重复，每个小区种植 100 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。

6.2 人工接种

6.2.1 室内苗期接种

在温室中，采用完全随机区组设计，设置 3 个重复，将待评价品种（系）种植于塑料方盒内，每个塑料方盒内种植 10 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。待甘蔗材料长到 4 叶 ~ 5 叶期时，使用无菌接种注射器吸取加入 0.05 %吐温 20 的 100 μ L 真菌悬浮液（ 1×10^6 个/mL）在幼苗基部叶鞘 0.5 cm ~ 1 cm 处进行注射接种，用 ddH₂O 作阴性对照。

6.2.2 离体叶段接种

选取长势一致的待评价甘蔗材料，包括高感和抗病对照种（见附录 B）的 +1 叶，剪取 8 cm ~ 10 cm 整齐对称无裂痕叶段，3 次重复，用蘸有真菌悬浮液的剪刀在叶脉一侧剪开 1 cm 切口，置于含有三层消毒湿润滤纸的培养皿中，25 °C ~ 30 °C 光照培养箱中培养，用 ddH₂O 作阴性对照。

7 病情调查

7.1 调查时间

7.1.1 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。

7.1.2 室内苗期

在接种后 7 d～10 d 观察到梢腐病症状，每隔 24 h 记录发病情况，持续观察 15 d 直至病情稳定。

7.1.3 离体叶段

在接种后 24 h 观察到梢腐病症状，每隔 24 h 记录发病情况，持续观察 7 d 直至病情稳定。

7.2 分级标准

梢腐病评价分级标准见附录 C。

7.3 记载方法

田间自然接种和室内苗期抗性评价记载方式为分别记录每个重复的总株数，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。甘蔗梢腐病田间自然接种和室内苗期抗性评价调查记载表见附录 E 表 E.1。

离体叶段抗性评价记载方式为通过观察和测量病斑的长度，统计记录甘蔗叶段的病害级别。甘蔗梢腐病离体叶段抗性评价调查记载表见附录 E 表 E.2。

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。

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

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 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.1。

8.2.2 室内苗期抗性评价标准

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 离体叶段抗性评价标准

依据评价材料叶片切口处的病害扩展程度确定抗性水平，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.3，原始记录应保存完好备查。

附录 A

(资料性)

甘蔗梢腐病原菌的生物学特性及分离鉴定和保存方法

A.1 生物学特性

甘蔗梢腐病原菌为藤仓镰孢菌种复合体 (*Fusarium fujikuroi* Complex, FFC) 的四个不同种: 甘蔗镰孢菌 (*F. sacchari*, Fs)、层出镰孢菌 (*F. proliferatum*, Fp)、轮枝镰孢菌 (*F. verticillioides*, Fv) 和新知镰孢菌 (*F. andiyazi*, Fa)。菌丝絮凝丰富, 具有不规则边缘, 菌丝颜色从白色到淡紫色不等, 大分生孢子通常有3个~5个分隔, 较细, 呈镰刀状; 小分生孢子呈棒状或卵球形, 基部扁平, 通常为0个~1个隔膜; 甘蔗镰刀菌分生孢子由多个假头组成, 新知镰刀菌含有假厚垣孢子, 层出镰刀菌分生孢子链通常短于轮枝镰刀菌, 轮枝镰刀菌产生的分生孢子座呈兔耳状 (图A.1)。

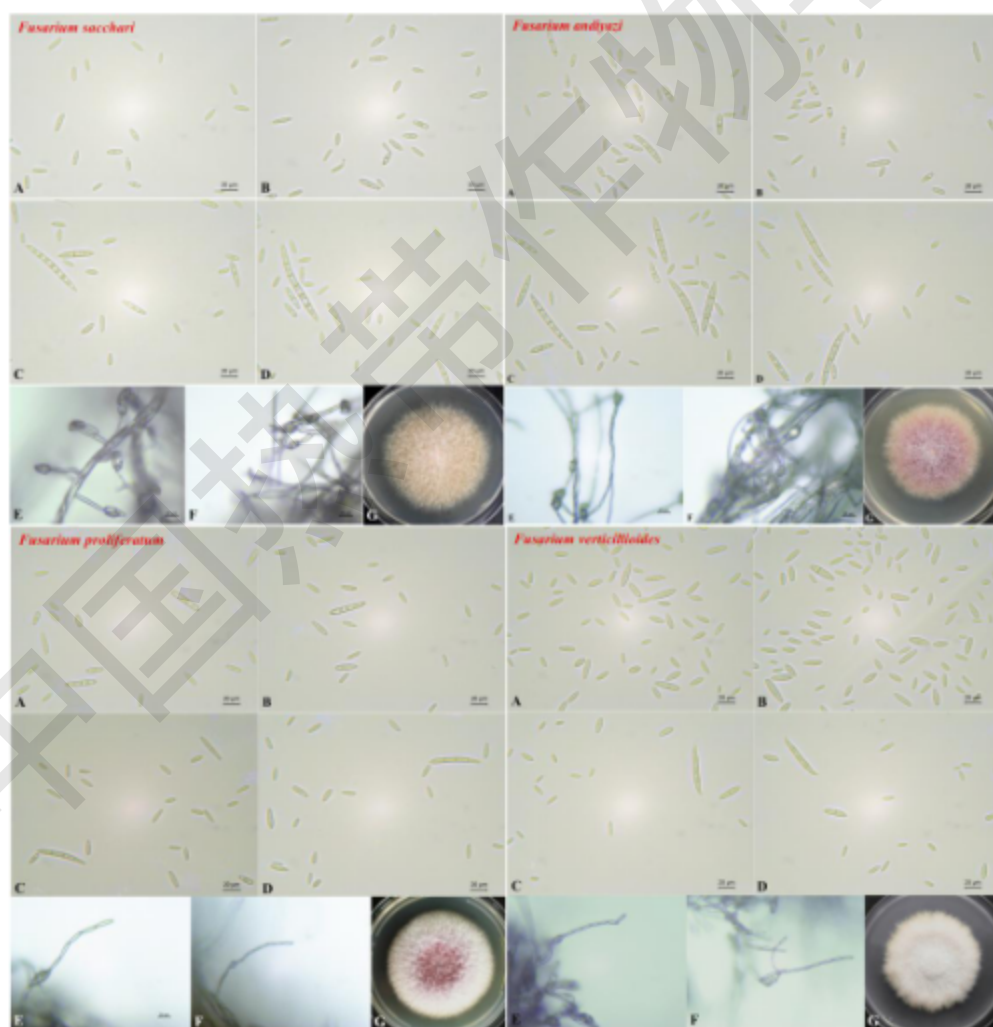
单位为 μm 

图 A.1 甘蔗梢腐病菌的菌落和分生孢子形态

A.2 病原菌分离、保存与鉴定

A.2.1 分离

A.2.1.1 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，而后在 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。用镊子将 3 片 ~ 5 片叶片置于含 100 µg/mL 氯霉素素的 PDA 培养基上，28 °C 倒置暗培养 3 d ~ 4 d。

A.2.1.2 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.2.1.3 真菌微生物的制备

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真菌置于 PDW 液体培养基中，于 28 °C 摇床 200 rpm 震荡培养 5 d。

A.2.2 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 50 % 甘油混匀，用封口膜密封，置于 -80 °C 保存菌株。基因组 DNA 使用真菌基因组试剂盒提取。

A.2.3 鉴定

A.2.3.1 病原菌分子鉴定

利用特异引物 ITS1/ITS4 和 EF1/EF2 进行 PCR 评价 (ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'; EF1 5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3', EF2 5'-GGAAGTACCAGTSATCATGTT-3')。PCR 反应体系总体积为 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.2.3.2 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 25 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 PDW 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 的孢子悬浮液。采用针刺法接种于易感品种中蔗 1 号，7 d 时开始记录发病情况，此后每 24 h 调查一次，持续观察 15 d，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，待测材料的抗性要参照已知抗性的标准对照品种见表 B.1。

表 B.1 甘蔗梢腐病抗性对照品种

抗性类别	对照品种
高抗 (HR)	桂柳 05136、新台糖 4 号、粤糖 12614
抗病 (R)	新台糖 22 号、新台糖 23 号、中糖 12-02
中抗 (MR)	CP89-2143、CP94-1100、新台糖 26 号
感病 (S)	NCo310、CP81-1254、新台糖 25 号
高感 (HS)	中蔗 9 号、Co1001、CP94-1340

附 录 C
(规范性)
甘蔗梢腐病分级标准

C.1 甘蔗梢腐病分级标准

甘蔗梢腐病分级标准，田间自然接种和室内苗期划分标准图见图C.1，对应症状描述见表C.1。

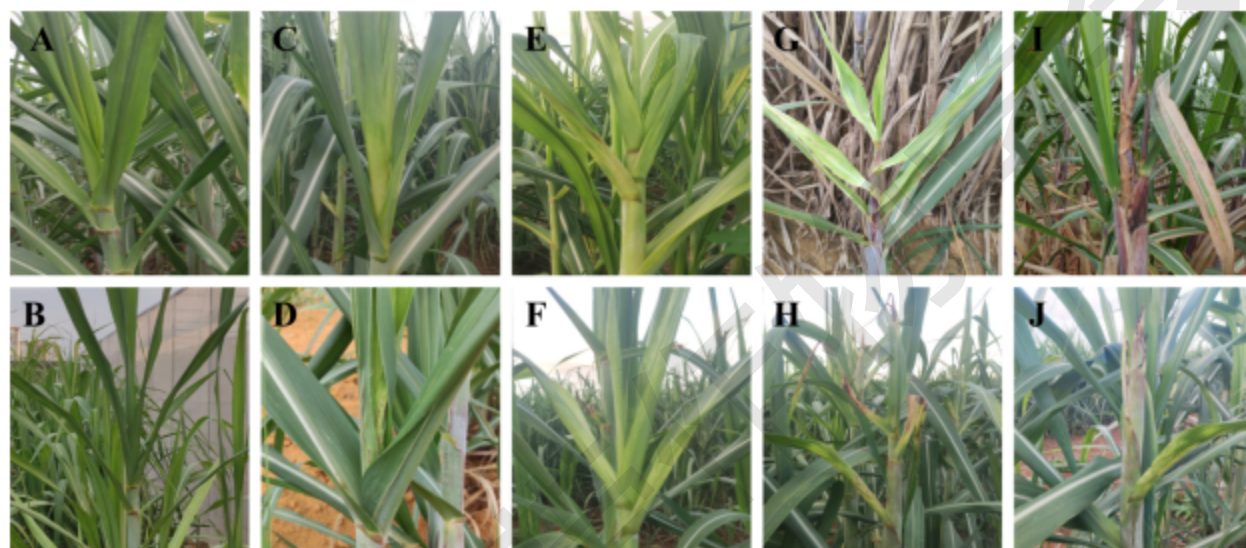


图 C.1 甘蔗梢腐病田间自然接种和室内苗期分级标准图

注：(A, B) 0级；(C, D) 1级；(E, F) 2级；(G, H) 3级；(I, J) 4级。

表 C.1 甘蔗梢腐病田间自然接种和室内苗期病害级别

病害级别	症状描述
0	无症状
1	1~2张叶片有症状，即叶片基部或其他部分褪绿；轻微皱缩呈波纹状；有少许红褐色斑点或条纹。
2	3~4张叶片有以下症状，即心叶皱缩呈阶梯状，显著黄化、扭曲、纠缠且有红褐色条纹；叶片缠绕扭曲或缺刻，出现褐色病斑。
3	4张叶片以上有以上症状，或多片叶明显褶皱、扭曲、缠绕，有明显的红褐色条病斑，叶子变短并呈匕首状，生长受阻，但蔗株尚未出现顶腐
4	心叶和生长点腐烂死亡，梢部幼嫩组织形成顶腐状，整个顶端死亡或长出侧芽

离体叶段划分标准图见图C.2，对应症状描述见表C.2。

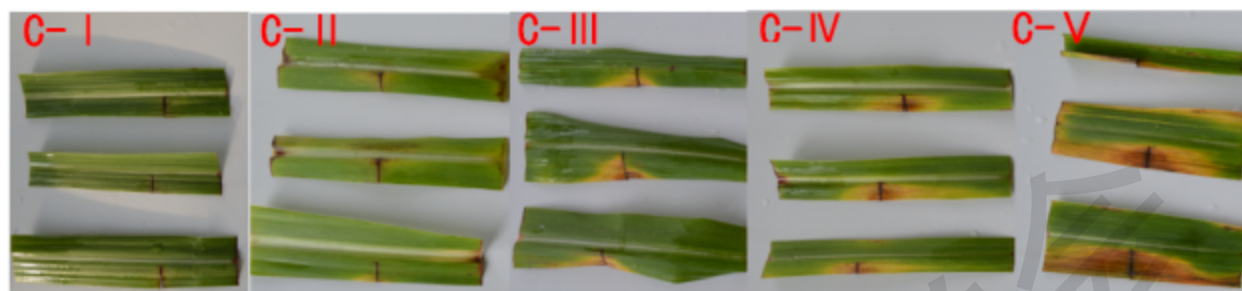


图 C.2 甘蔗梢腐病离体叶段分级标准图

注：(C-I) 0级；(C-II) 1级；(C-III) 2级；(C-IV) 3级；(C-V) 4级。

表 C.2 甘蔗梢腐病离体叶段病害级别

病害级别	症状描述
0	基本无症状
1	叶片剪接处出现轻微褪绿症状
2	叶片出现褪绿黄化病斑，并小范围蔓延
3	叶片褪绿黄化面积迅速加大，并出现明显的红褐色条病斑
4	整个叶片几乎均为红褐色条病斑，出现腐烂现象

附录 D
(规范性)
抗性评价标准

D.1 田间自然接种抗性评价标准见表 D.1。

表 D.1 田间自然接种抗性评价标准

抗性级别	发病率 (IC)	病情指数 (DI)	抗性类别
0	$0 < IC \leq 10\%$	$0 < DI \leq 5$	高抗 (HR)
1	$10 < IC \leq 20\%$	$5 < DI \leq 10$	抗病 (R)
2	$20 < IC \leq 35\%$	$10 < DI \leq 15$	中抗 (MR)
3	$35 < IC \leq 45\%$	$15 < DI \leq 25$	感病 (S)
4	$> 45\%$	> 25	高感 (HS)

D.2 室内苗期抗性评价标准见表 D.2。

表 D.2 室内苗期抗性评价标准

抗性级别	发病率 (IC)	病情指数 (DI)	抗性类别
0	$0 < IC \leq 10\%$	$0 < DI \leq 5$	高抗 (HR)
1	$10 < IC \leq 20\%$	$5 < DI \leq 10$	抗病 (R)
2	$20 < IC \leq 35\%$	$10 < DI \leq 15$	中抗 (MR)
3	$35 < IC \leq 45\%$	$15 < DI \leq 25$	感病 (S)
4	$> 45\%$	> 25	高感 (HS)

D.3 离体叶段抗性评价标准见表 D.3。

表 D.3 离体叶段抗性评价标准

抗性级别	发病症状 (病斑长度)	抗性类别
0	基本无症状 (病斑晕圈沿叶脉方向长度 $\leq 1.00\text{ cm}$)	高抗 (HR)
1	剪接处出现轻微褪绿 (病斑晕圈沿叶脉方向长度 $1.01\text{ cm} \sim 3.00\text{ cm}$)	抗病 (R)
2	叶片出现褪绿黄化病斑, 并小范围蔓延 (病斑晕圈沿叶脉方向长度 $3.01\text{ cm} \sim 5.00\text{ cm}$)	中抗 (MR)
3	叶片受害面积迅速加大, 出现明显的红褐色条病斑 (病斑晕圈沿叶脉方向长度 $5.01\text{ cm} \sim 8.00\text{ cm}$)	感病 (S)
4	整个叶片几乎均为红褐色条病斑 (病斑晕圈沿叶脉方向长度 $\geq 8.01\text{ cm}$)	高感 (HS)

附录 E
(资料性)
调查记载表和结果报告单

E.1 甘蔗梢腐病田间自然接种和室内苗期抗性评价调查记载表见表 E.1。

表 E.1 甘蔗梢腐病田间自然接种和室内苗期抗性评价调查记载表

品种	鉴定方法	调查株数	各级病情株数					病情指数	抗病性水平
			0 级	1 级	2 级	3 级	4 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，经复核人员确定后记载。									

E.2 甘蔗梢腐病离体叶段评价调查记载表见表 E.2。

表 E.2 甘蔗梢腐病离体叶段抗性评价调查记载表

品种	离体叶片数量	各级叶片数量					抗病性水平
		0 级	1 级	2 级	3 级	4 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，经复核人员确定后记载。							

E.3 甘蔗品种（系）梢腐病抗性评价结果报告单见表 E.3。

表 E.3 甘蔗品种（系）梢腐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			
非自然接种的接种体组成			
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