

ICS 65.020

CCS B 04

T/GXAS

团 体 标 准

T/GXAS 237—2021

番茄细菌性斑点病抗性鉴定技术规程

Technical code of practice for evaluation of tomato for resistance to
bacterial spot

2021-09-27 发布

2021-10-04 实施

广西标准化协会 发 布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 试剂与材料	1
5 接种体制备	1
6 病原菌鉴定	2
7 鉴定条件和实验设计	3
8 接种	3
9 病情调查	3
10 抗病性评价	4

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。

本文件由广西大学提出。

本文件起草单位：广西大学、广西壮族自治区农业科学院蔬菜研究所。

本文件主要起草人：于文进、钟川、阳燕娟、莫天利、郑旭阳、彭杰椿、郑洁明。

番茄细菌性斑点病抗性鉴定技术规程

1 范围

本文件确立了番茄细菌性斑点病抗性鉴定的程序，界定了番茄细菌性斑点病的术语和定义，给出了试剂与材料的信息，规定了接种体制备、病原菌鉴定、鉴定条件和实验设计、接种、病情调查的操作指示，描述了抗病性评价方法。

本文件适用于广西行政区域内番茄苗期细菌性斑点病抗病性室内鉴定和评价。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

NY/T 1858.1 番茄主要病害抗病性鉴定技术规程 第1部分：番茄抗晚疫病鉴定技术规程

3 术语和定义

NY/T 1858.1界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

番茄细菌性斑点病 bacterial spot

由丁香假单胞杆菌番茄致病变种 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) 引起。在植株苗期和成株期均可发生，可对叶片、茎、果柄、萼片和果面造成危害。叶缘及未成熟果实发病明显。叶片发病产生深褐色或黑色小点，周围有黄色晕圈。茎染病产生黑色斑点，无晕圈。果实发病，初期病部隆起绿色小点，逐步变为褐色、凹陷。茎干和果实发病后期病部有白色菌脓出现。

4 试剂与材料

4.1 试剂

所用试剂在未加说明时均采用分析纯试剂。实验室用水应符合GB/T 6682中规定的三级水要求。

4.2 NA 液体培养基

牛肉浸膏3 g，蛋白胨8 g，蔗糖或葡萄糖10 g，酵母浸膏1 g，加蒸馏水至1 000 mL，加热煮沸，调节pH至7.0，分装，高压灭菌(121 ℃，25 min)。

4.3 NA 固体培养基

牛肉浸膏3 g，蛋白胨8 g，蔗糖或葡萄糖10 g，酵母浸膏1 g，加蒸馏水至1 000 mL，先将琼脂加热融化于大部水中，再将其余各成分用少量水化开加入，煮沸，调节pH至7.0，分装，高压灭菌(121 ℃，25 min)。

5 接种体制备

5.1 病原菌分离

5.1.1 采样

选取新发病的、病症典型的番茄叶片，用封口袋保存，记录采集地点、时间，及时带回实验室。

5.1.2 病菌分离法

采用常规组织分离法，具体操作步骤如下：

- a) 将工具放置在超净工作台上，紫外灯灭菌 40 min；
- b) 剪取病、健交界处组织并制片，在显微镜下进行观察，将出现喷菌现象的组织，用 75% 的乙醇溶液消毒 30 s 后，用无菌水冲洗 1 次，再用 0.1% HgCl₂ 消毒 20 s，用无菌水冲洗 3 次；
- c) 将清洗后的组织剪碎，加入 3 mL 无菌水，静置 10 min；
- d) 用接种环挑取菌液，在 NA 固体培养基上划线，不宜划破培养基。于 28 °C 恒温培养箱下培养。

5.2 病原菌纯化

分离培养 2 d 后，用消毒接种环挑选单菌落在 NA 固体培养基上进行划线。重复进行纯化操作，直至菌落形态一致，无杂菌。

5.3 接种体保存

将纯化菌落移至 1 mL 灭菌离心管中，放置在 -25 °C 冰箱中保存。

6 病原菌鉴定

6.1 致病性鉴定

6.1.1 接种悬浮液制备

将保存的病原菌转移到 NA 液体培养基中，温度 28 °C，转速 120 r/min，震荡培养 48 h。在波长 $\lambda = 600$ 的条件下测定 OD 值，将菌液稀释至 OD 值 0.6~0.8，菌液浓度为 1×10^8 cfu/mL。

6.1.2 烟草过敏反应

用注射器吸取菌液，沿着叶脉注射到烟草叶片叶肉组织中，24 h 后观察是否出现斑枯过敏反应。

6.1.3 接种

用注射器吸取菌液，沿着叶脉注射到健康番茄植株叶片组织中，接种后，置于温度 25 °C，空气湿度 90%~100% 的人工气候箱中培养。

6.1.4 结果判定

烟草发生斑枯过敏反应和接种健康番茄植株后，叶片出现斑点，斑点有黄色晕圈等典型症状可初步判定病原菌为番茄细菌性斑点病致病菌。

6.2 病原菌 16s rDNA 分子鉴定

6.2.1 DNA 制备

保存的接种体活化后，用接种环挑取 1 环新鲜的菌落放入装有 0.5 mL 灭菌水的离心管中，置于震荡器充分震荡混匀。放入 100 °C 水中加热 5 min 后，快速转入冰水混合物中放置 10 min。在转速 4 000 r/min 离心机中，离心 10 min，取上清液。

6.2.2 PCR 扩增

以病原菌的总基因 DNA 为模板，上游引物 27F (5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')，下游引物 1942R (5' -GGTACCTGTTACGACTT-3') 进行扩增。

6.2.3 结果判定

将 PCR 扩增产物进行测序，测序结果在 Gen Bank 中进行序列比对，比对结果与丁香假单胞杆菌番茄致病变种的同源性达 99%，可判定病原菌为丁香假单胞杆菌番茄致病变种。

7 鉴定条件和实验设计

7.1 鉴定室

苗期抗病性鉴定的鉴定室能够人工调节室内温度、湿度和光照，使之具备良好的发病环境。

7.2 鉴定设计

随机区组排列，3次重复，每个重复不少于10株苗。

7.3 鉴定材料育苗

7.3.1 将鉴定材料的种子放入 50℃~55℃的温水中浸泡 20 min~30 min，待水温降至室温后，再浸种 6 h。浸种结束后，将种子包裹在湿布中，放入 30℃恒温培养箱中催芽。

7.3.2 待种子露白后播于 72 孔穴盘中。育苗基质为椰糠、泥炭和珍珠岩（2:1:1），经高温蒸汽灭菌后方可使用。

7.3.3 育苗期，鉴定室室内温度 18℃~25℃，幼苗应生长健壮、一致。育苗期间不应使用杀菌剂。

8 接种

8.1 接种时期

幼苗3~5片真叶期。

8.2 接种方法

采用伤茎喷雾法。用小刀在番茄的茎部刮出1条1.5 cm长的伤口，用小型喷雾器将配制的接种悬浮液（配制方法见6.1.1）均匀喷雾到伤口处，每隔2 h重复操作，共重复3次。

8.3 接种后管理

接种后，室内温度为23.6℃~28.0℃，湿度为90%~100%，保持96 h后，转入正常栽培管理。

9 病情调查

9.1 调查时间

接种后12 d~16 d。

9.2 调查方法

调查每株除顶部嫩叶外的所有真叶对应的病斑面积占叶片面积比率。

9.3 病情级别划分

幼苗病情级别及相对应的症状描述见表1。

表1 番茄细菌性斑点病病情级别划分

病情级别	症状描述
0	无症状
1	病斑面积占叶片面积≤5%
2	5%<病斑面积占叶片面积≤10%
3	10%<病斑面积占叶片面积≤25%
4	25%<病斑面积占叶片面积≤50%
5	50%<病斑面积占叶片面积<100%

9.4 病情记载

调查记载每一鉴定植株的病情级别，并计算病情指数，按公式（1）计算：

$$DI = \frac{\sum (s \times n)}{5 \times N} \dots\dots\dots (1)$$

式中：
DI——病情指数；
s——各病情级别的代表数值；
n——各病情级别的植株数；
N——调查总株数。

10 抗病性评价

依据鉴定材料3次重复的病情指数（*DI*）平均值确定其抗病性水平，评价标准见表2。

表2 番茄对细菌性斑点病抗性的评价标准

病情指数（ <i>DI</i> ）	抗性评价
<i>DI</i> =0	免疫（I）
0< <i>DI</i> ≤5	高抗（HR）
5< <i>DI</i> ≤20	抗病（R）
20< <i>DI</i> ≤40	耐病（T）
40< <i>DI</i> ≤60	感病（S）
<i>DI</i> >60	高感（HS）

中华人民共和国团体标准
番茄细菌性斑点病抗性鉴定技术规程
T/GXAS 237—2021
广西标准化协会统一印制
版权专有 侵权必究