

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4457—2025

水稻细菌性穗枯病抗性鉴定技术规程

Technical code of practice for resistance identification of rice
to bacterial panicle blight

2025-01-09 发布

中华人民共和国农业农村部 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。

本文件由农业农村部种植业管理司提出并归口。

本文件起草单位：中国水稻研究所、全国农业技术推广服务中心。

本文件主要起草人：侯雨萱、黄世文、卓富彦、梁燕、季芝娟、曾宇翔。



水稻细菌性穗枯病抗性鉴定技术规程

1 范围

本文件确立了水稻细菌性穗枯病抗性鉴定程序,规定了鉴定程序、接种体准备、鉴定材料种植、接种、病情调查、抗病性评价、鉴定后材料处理、记录。

本文件适用于水稻资源、品种和品系等材料对水稻细菌性穗枯病的抗性鉴定和评价。

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 4404.1 粮食作物种子 禾谷类
- NY/T 496 肥料合理使用准则 通则
- NY/T 1276 农药安全使用规范总则
- NY/T 4248 水稻生产全程质量控制技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

水稻细菌性穗枯病 rice bacterial panicle blight

是由颖壳伯克氏菌(*Burkholderia glumae*)引起的一种水稻细菌性病害,主要危害幼苗和谷穗,导致烂秧、谷粒变色和稻穗枯死。

4 鉴定程序

鉴定程序包含 6 个阶段,程序流程图如图 1 所示。

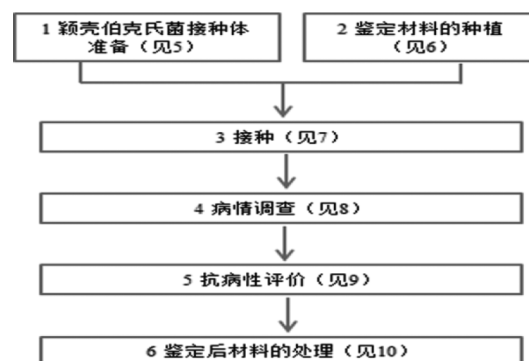


图 1 水稻细菌性穗枯病抗性鉴定流程

5 接种体准备

5.1 接种体选择

根据试验需要选取当地的优势菌株作为接种体,菌株见附录 A。

5.2 接种体繁殖、制备

取-80℃冻存的颖壳伯克氏菌株,以 1:1 000 的比例转接 NA 液体培养基,培养基中含有 50 μg/mL 的

氨苄青霉素,在 37 ℃、200 r/min 的条件下培养 16 h~24 h,采用灭菌的蒸馏水稀释菌液,使其在 600 nm 处的吸光值(OD_{600})为 0.2~0.3(含 0.01%的吐温-20),作为接种体备用。

6 鉴定材料种植

6.1 鉴定圃选择

应设置在土地平整、土质肥沃、排灌方便的细菌性穗枯病常发田。

6.2 种子质量

应符合 GB 4404.1 常规稻或杂交稻一级种的要求,不应带检疫性病虫害。

6.3 种植要求

鉴定材料播种时间与大田生产播种时间相同或适当调整,以使植株接种期和发病期能够与适宜水稻细菌性穗枯病发生流行的气候条件(日均气温大于 25 ℃,相对湿度大于 70%)相遇,保证鉴定结果的准确性。鉴定材料的育苗和移栽按 NY/T 4248 的规定执行。

6.4 种植设计

每份鉴定材料种植 4 行,每行 6 丛,行间距为 20 cm,丛距为 16 cm,3 次重复。鉴定材料按顺序或随机排列,每 50 份鉴定材料设附录 B 中已知抗病和感病对照材料,或设当地种植的抗病品种和感病品种作为对照。

6.5 保护行设置

在鉴定材料四周种植不少于 2 行的保护行品种,丛行距与鉴定材料相同。保护行品种应选择相对抗病的品种。

6.6 田间管理

耕作方式和田间管理按照当地常规的大田生产习惯进行。肥料施用应符合 NY/T 496 的要求。农药使用应符合 NY/T 1276 的要求。鉴定材料在全生育期内不使用杀菌剂。

7 接种

7.1 接种时期

当水稻 30%~40%的穗抽出时,于 16:00~18:00 时进行接种。

7.2 接种方法

接种采用喷雾法。将 OD_{600} 值为 0.2~0.3 的菌液(含 0.01%的吐温-20)装入容积为 1 000 mL 的塑料喷壶,对整个稻穗均匀喷雾,直至叶片有微小菌液滴形成,隔 1 d 喷雾 1 次,共喷 3 次。每份鉴定材料重复 3 次,每个重复接种不少于 20 株。

7.3 接种前后的田间管理

接种前后应及时进行田间灌溉,使田间保持 2 cm~3 cm 的水层。

8 病情调查

8.1 调查时间

接种后 21 d。

8.2 调查与记载

观测鉴定材料的发病情况,每份鉴定材料随机调查 10 丛,计算每丛发病最严重稻穗的病粒(变色谷粒)比率。调查结果的记载采用附录 C 中的表 C.1。

9 抗病性评价

9.1 病情级别划分

依据鉴定材料稻穗上谷粒的病粒比率,进行病情分级,病情级别及其对应的症状描述见表 1。

表 1 水稻细菌性穗枯病病情级别划分

病情级别	病情
0	稻穗没有病粒
1	稻穗上有少量病粒,每穗病粒数占总谷粒数的 0.1%~20.0%
3	稻穗上有小部分病粒,每穗病粒数占总谷粒数的 20.1%~40.0%
5	稻穗上有一半左右病粒,每穗病粒数占总谷粒数的 40.1%~60.0%
7	稻穗上有大部分病粒,每穗病粒数占总谷粒数的 60.1%~80.0%
9	稻穗上基本全部为病粒,每穗病粒数占总谷粒数的>80.1%

9.2 病情指数计算

根据病情症状描述,调查每穗的病粒比率,记载病情级别,计算鉴定材料的病情指数(DI)。病情指数按公式(1)计算。

$$DI = \frac{\sum (Bi \times Bd)}{M \times Md} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

DI ——病情指数的数值;
Bi ——各病情级别的稻穗数的数值;
Bd ——各病情级别的代表数值的数值;
M ——调查总稻穗数的数值;
Md ——最高病情级别的代表数值(此处为 9)。

9.3 抗病性评价指标

根据表 2 的抗病性评价指标,依据鉴定材料 3 次重复的病情指数(DI)平均值确定其对水稻细菌性穗枯病的抗性水平。

表 2 水稻细菌性穗枯病抗性评价指标

病情指数(DI)	抗性评价
0.0≤DI≤10.0	高抗(HR)
10.0<DI≤20.0	抗病(R)
20.0<DI≤40.0	中抗(MR)
40.0<DI≤60.0	中感(MS)
60.0<DI≤75.0	感病(S)
75.0<DI≤100.0	高感(HS)

9.4 抗病鉴定有效性判别

当鉴定圃中感病对照品种病情指数(DI)大于 60,该次水稻细菌性穗枯病抗性鉴定视为有效。

9.5 重复鉴定

初次鉴定中表现为抗、中抗、中感的材料,翌年用相同的病原菌进行重复鉴定。当年度间或批次间鉴定结果不一致时,通常以最高病情指数为准。经 2 年~3 年重复鉴定,最高病情指数(DI)为 20 以下的材料才能定为抗病材料。

9.6 抗性评价结果

抗性评价结果记载采用表 C. 2,并对试验结果加以分析,原始资料应保存完整备考察验证。

10 鉴定后材料的处理

10.1 接种体处理

剩余接种体带回实验室灭菌处理。

10.2 田间病株处理

鉴定后的田间病株应烧毁或带出稻田外深埋等无害化处理。

11 记录

应建立水稻细菌性穗枯病抗性鉴定全过程记录。包括病原菌的来源,接种体的制备,鉴定材料的种植、肥水农药管理,接种的浓度、时期、方法,病情调查的时间、方法,抗性评价的方法和结果,鉴定后材料的处理等信息。形成档案,定期归档。档案保存时间不少于 2 年,做到可追溯。

附 录 A

(资料性)

颖壳伯克氏菌的生物学特性、水稻危害症状及分离鉴定和保存方法

A.1 分类地位

颖壳伯克氏菌(*Burkholderia glumae*)属原核生物界(Prokaryotae)细菌门(Bacteria) β -杆菌纲(Betaproteobacteria)伯克氏菌目(Burkholderiales)伯克氏菌科(Burkholderiaceae)伯克氏菌属(*Burkholderia*)。

A.2 生物学特性

A.2.1 形态特征

革兰氏阴性杆菌,好氧,有荚膜,无芽孢,在 NA、LB、PDA 培养基上菌落呈灰白色、圆形隆起且光滑,在 KB 培养基上产生黄色素,长 $1.5\ \mu\text{m}\sim 2.5\ \mu\text{m}$,宽 $0.5\ \mu\text{m}\sim 0.7\ \mu\text{m}$,有 1 根~7 根极生鞭毛。

A.2.2 生理生化特性

过氧化氢酶和卵磷脂酶呈阳性反应,氧化酶、酪氨酸酶、精氨酸双水解酶、苯丙氨酸脱氨酶呈阴性反应。能利用阿拉伯糖、果糖、半乳糖、葡萄糖、甘油、甘露醇、甘露糖、山梨醇、木糖、乳糖和棉籽糖产酸。能水解吐温-80、淀粉,还原石蕊和硝酸,不能水解熊果苷和七叶苷,不产生吡啶及硫化氢。抗生素敏感性:对氨苄青霉素产生抗性,对卡那霉素、链霉素、氯霉素和利福平敏感。

生长温度:在 $25\ ^\circ\text{C}\sim 40\ ^\circ\text{C}$ 都可生长,最适生长温度为 $30\ ^\circ\text{C}\sim 40\ ^\circ\text{C}$ 。

生长 pH:最适 pH 为 $6.0\sim 7.5$ 。

A.3 水稻细菌性穗枯病田间典型症状

由颖壳伯克氏菌引起的水稻细菌性穗枯病以种子带菌为主传染。种子带菌重时,播后不发芽或发芽后染病,水渍状黑褐色,很快死亡;种子带菌轻时,能发芽,秧苗正常生长,只是生长细弱,移栽后一直生长正常,直到孕穗-抽穗期表现症状。感病植株在大田期一般叶片上不表现病症,只在剑叶叶鞘和穗部表现症状。感病植株剑叶叶鞘部位有褐色条斑,感病轻时褐色病斑仅在叶鞘内显现,严重时可在叶鞘外表现褐色病斑。抽穗时病原菌侵染谷粒,起初呈现似缺水状萎凋的苍白色,后逐渐变为黄褐色或深褐色,颖壳颜色也发生变化,表现为内外颖尖端或基部呈紫褐色,护颖呈暗紫褐色;一般感病谷粒颖壳不闭合,发病严重时稻穗枯萎不实,不勾头;田间表现为“穗腐,谷枯”的症状。

A.4 分离、鉴定和保存

A.4.1 分离

选取具有细菌性穗枯病典型症状的谷粒 3 粒~5 粒,分别用 70%酒精、1%次氯酸钠溶液消毒 1 min 和灭菌的蒸馏水冲洗后,剪碎谷粒,加入 1 mL 灭菌的蒸馏水,用灭菌的镊子挤压剪碎的谷粒,用接种环蘸取挤压液,在含有 $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 NA 培养基平板上划线, $37\ ^\circ\text{C}$ 培养 16 h~24 h,挑取单菌落纯化培养。

A.4.2 鉴定

以上述获得的分离物单菌落为模板,PCR 特异性扩增 16S rRNA 基因和 DNA 解旋酶基因(DNA gyrase subunit B, *gyrB*),通过获得的扩增片段与颖壳伯克氏菌株 336gr-1(GCA_000503955)、BGR1 (GCA_000022645)和 LMG2196 (GCA_000300755)等的序列同源性来确定其种属。其鉴定为颖壳伯克氏菌(*Burkholderia glumae*)的分离物经柯赫氏法则(Koch's postulates)验证为细菌性穗枯病菌后保存备用。

PCR 反应的引物:见表 A. 1。

表 A. 1 颖壳伯克氏菌株鉴定所用引物序列

目标基因	引物名称	引物序列(5'-3')
16S rRNA	27F	AGAGTTTGATCATGGCTCAG
	1492R	AAGGAGGTGATCCAGCCGC
<i>gyrB</i>	BGgyr	GCAGCGGCAAGGAAGACG
	BGgyrR	GTCGTCGCCCCGACGTCTC

PCR 反应的体系(20 μ L): $2\times$ KOD FX 缓冲液 10 μ L ,10 μ mol/L 正反引物各 0.5 μ L ,KOD FX DNA 聚合酶 0.5 μ L,含模板 ddH₂O 溶液 8.5 μ L。

PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;98 $^{\circ}$ C 变性 15 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,68 $^{\circ}$ C 延伸 30 s~60 s,35 个循环;最后 68 $^{\circ}$ C 延伸 7 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

PCR 产物的检测:扩增产物用浓度为 1%的琼脂糖凝胶电泳并用凝胶成像仪观察,目标片段分别约为 1 525 bp 和 317 bp。

PCR 产物的序列比对:扩增的 PCR 产物,直接 Sanger 测序,测序结果在 NCBI 数据库(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)中进行 BLAST 分析,明确菌株的分类地位。

A. 4. 3 保存

将分离纯化的颖壳伯克氏菌 100 μ L 涂布 NA 培养基平板,放置恒温培养箱中 37 $^{\circ}$ C 培养 16 h~24 h 后,转至 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存;或将在液体 NA 培养基中 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 震荡培养 16 h~24 h 的颖壳伯克氏菌,加甘油(终浓度为 25%)后,-80 $^{\circ}$ C 下储存。

附 录 B
(资料性)
鉴 别 品 种

水稻细菌性穗枯病抗性鉴定采用的 5 个鉴别品种,特青(籼型常规稻)为抗病品种,明恢 63(籼型常规稻)为中抗品种,中丝 3 号(籼型常规稻)为中感品种,鄂宜 105(粳型常规稻)为感病品种,松早香 1 号(粳型常规稻)为高感品种。

附 录 C
(资料性)

水稻细菌性穗枯病抗性鉴定结果记录表式

C.1 水稻细菌性穗枯病抗性鉴定记录表见表 C.1。

表 C.1 水稻细菌性穗枯病抗性鉴定记载表

品种名称	重复区号	病粒率(%)(/穗/丛)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	I										
	II										
	III										
	I										
	II										
	III										
	I										
	II										
	III										
	I										
	II										
	III										
1. 播种日期：2. 接种日期： 3. 接种生育期：4. 接种病原菌分离物编号： 5. 菌株致病力类型：6. 调查日期：											

鉴定人：年 月 日

复核人：年 月 日

C.2 水稻细菌性穗枯病抗性评价记载表见表 C.2。

表 C.2 水稻细菌性穗枯病抗性评价记载表

品种名称	重复区号	病情级别						病情指数	平均病指	抗性评价
		0	1	3	5	7	9			
	I									
	II									
	III									
	I									
	II									
	III									
	I									
	II									
	III									
	I									
	II									
	III									

表 C.2（续）

品种名称	重复 区号	病情级别						病情 指数	平均 病指	抗性 评价
		0	1	3	5	7	9			
	I									
	II									
	III									
	I									
	II									
	III									
1. 播种日期：2. 接种日期： 3. 接种生育期：4. 接种病原菌分离物编号： 5. 菌株致病力类型：6. 调查日期：										

鉴定人：年 月 日

复核人：年 月 日