

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4720—2025

莲藕腐败病抗性鉴定技术规程

Technical code of practice for evaluation of lotus resistance to
lotus rhizome rot disease

2025-04-27 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：江苏省农业科学院、全国农业技术推广服务中心、南京市浦口区现代农业发展服务中心、南京市高淳区植保植检站、武汉市农业科学院、广昌县白莲产业发展中心、广西壮族自治区农业科学院、金华市农业科学研究院。

本文件主要起草人：魏利辉、夏华兴、吴承东、周阳、邓晟、朱红莲、逯佳琪、杨良波、江文、张尚法、檀时山、周冬梅、王楠、王晓宇、赵敏、张金凤、王凌云、宋瑞琪、滕辉、王贝、刘书勤。



莲藕腐败病抗性鉴定技术规程

1 范围

本文件确立了莲藕腐败病抗性鉴定程序,规定了接种方法和抗性鉴定的步骤与基本要求,描述了对应的证实方法。

本文件适用于莲藕(*Nelumbo nucifera* Gaertn)品种及种质资源对腐败病的抗性鉴定。

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。

NY/T 837 莲藕栽培技术规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

莲藕腐败病 **lotus rhizome rot disease**

由尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *nelumbicola*)及其近缘种(*F. commune*)侵染莲藕而引起的一种土传、种传真菌病害。病原及发病症状见附录 A。

3.2

接种体 **inoculum**

用于接种以引起病害发生的病原物或病原物的一部分。

3.3

莲子实生苗 **seedlings from lotus seeds**

成熟莲种子在适宜条件下发芽生长,形成具有独立根系、茎和叶的正常植株个体。

3.4

种藕营养体繁殖苗 **seedlings from lotus rhizome**

莲藕节上的芽在适宜条件下生长,形成具有独立根系、茎和叶的植株个体。

4 鉴定程序

莲藕腐败病抗性鉴定程序包括接种体的准备、病原菌接种和抗性鉴定三个阶段,流程如图 1 所示。

5 试剂与材料

除非另有说明,在本文件中仅使用确认的分析纯试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

葡萄糖、马铃薯和琼脂,用于制备马铃薯葡萄糖(potato dextrose broth, PDB)培养基和马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基。

蛭石和营养土用于植物材料的种植。

6 仪器及用具

高压灭菌锅、摇床、培养箱、显微镜、培养瓶、血球计数板和纱布等。

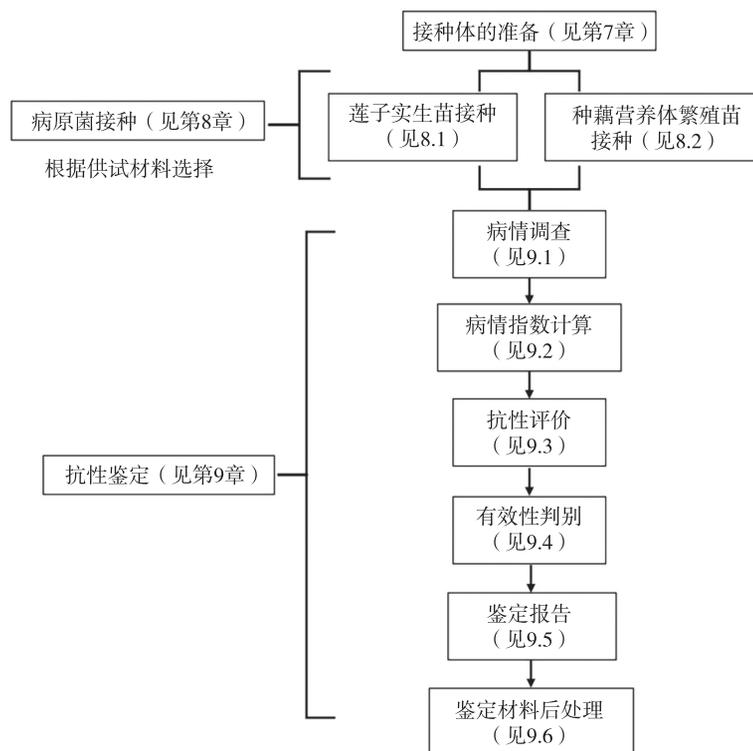


图 1 鉴定流程

7 接种体的准备

接种的病原应选择当地致病性较强或致病频率较高的优势病原菌，其分离、鉴定和保存按照附录 B。保存的菌株首先转接至无菌的 PDA 培养基上活化，培养箱内 25 ℃ 生长 7 d；然后将适量活化的培养物转接至装有无菌 PDB 培养基的培养瓶中，置于摇床内，在 25 ℃、120 r/min~180 r/min 条件下振荡培养 5 d~7 d。

培养结束后，用无菌纱布过滤 PDB 培养物以去除菌丝，之后在显微镜下检查滤出液，并用血球计数板对滤出液中的分生孢子进行浓度计数，最后用无菌蒸馏水调整分生孢子浓度至 1×10^6 个分生孢子/mL，备用。

8 病原菌接种

8.1 莲子实生苗接种

8.1.1 实生苗准备

在成熟种子的胚芽侧(较圆滑的一侧)，将种皮剪开直径 5 mm~7 mm 的圆形口，在加热至 60 ℃ 的蒸馏水中浸种 15 min，其间不定期搅拌，以清除种子表皮潜在病原物，同时促进后期种皮开裂和芽的萌发。浸种后，将种子在无菌蒸馏水中浸泡 4 d~5 d，直到大多数种子幼芽长度达到 0.5 cm~1.0 cm，其间需更换无菌蒸馏水，使水质始终保持清澈干净。

8.1.2 实生苗的接种方法

将发芽的莲子实生苗在上述病原菌的孢子悬浮液(1×10^6 个孢子/mL)中浸泡 60 min，每个品种或资源至少接种 30 粒发芽的种子，每 10 粒种子作为一个重复。

8.1.3 实生苗的接种后管理

将处理的发芽莲子种植于湿润的灭菌混合基质中(营养土与蛭石体积比为 1 : 5)，用少量蛭石覆盖后，加入无菌蒸馏水，水层刚刚覆盖基质表面即可。种植环境需满足日平均环境温度大于等于 20 ℃，具备自然光照，或光照 16 h、黑暗 8 h 的人工补光条件。此外，需要定期补充水分，同时做好虫害的防控。

8.2 种藕营养体繁殖苗接种

8.2.1 营养体繁殖苗准备

种藕质量应符合 NY/T 837 的要求,其顶芽完整,且两侧至少具有 2 个完整节间,栽种于灭菌的混合基质中(营养土与蛭石体积比为 1:2)。其间正常水肥管理,同时做好虫害的防控。

8.2.2 营养体繁殖苗的接种方法

种植 30 d~45 d 后,待 4 片~5 片叶长出,每节不定根 8 根~10 根时即可接种。将生长的藕苗连根小心挖出,将根系浸泡于含有上述病原分生孢子的悬浮液(1×10^6 个孢子/mL)中 30 min。每个品种或资源至少接种 15 株苗,每 5 株为一个重复。

8.2.3 营养体繁殖苗的接种后管理

将接种后的植株移栽至湿润的灭菌混合基质中(营养土与蛭石体积比为 1:5),缓慢加水,待水层没过栽培基质 1 cm~1.5 cm 后即可。种植环境需满足日平均环境温度大于等于 20 °C,具备自然光照,或光照 16 h、黑暗 8 h 的人工补光条件。其间正常水肥管理,同时做好虫害的防控。

9 抗性鉴定

9.1 病情调查

根据当地环境温度、光照等条件,不定期观察全体植株的发病情况,当感病对照材料病情指数大于 60 即可开展调查。

统计各处理中每株苗枯死叶片数占其所有可统计叶片数的比例,并按表 1 划分等级,然后将对应病情级别的植株数量填入附录 C 中。

表 1 病情级别的划分

病情级别	症状描述
0	无枯死叶片
1	枯死叶片占可统计叶片数量的比例小于等于 25%
2	枯死叶片占可统计叶片数量的比例大于 25%,小于等于 50%
3	枯死叶片占可统计叶片数量的比例大于 50%,小于等于 75%
4	枯死叶片占可统计叶片数量的比例大于 75%

9.2 病情指数计算

病情指数(DI)按公式(1)计算。

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

式中:

s ——各病情级别数值;

n ——各病情级别植株数;

N ——调查总株数;

S ——最高病情级别数值。

9.3 抗性评价

抗性水平划分为 5 个级别,见表 2。

表 2 莲藕对腐败病抗性水平的分级

病情指数(DI)	抗性水平
$DI=0$	免疫(IM)
$0 < DI \leq 30$	抗病(R)
$30 < DI \leq 60$	中抗(MR)
$60 < DI \leq 85$	感病(S)
$DI > 85$	高感(HS)

9.4 有效性判别

感病对照材料病情指数大于 60 即认为该批次抗性鉴定判定为有效。对于同一个鉴定材料,如果 3 次重复抗性评价级别出现差异,且相差 2 级以上(含 2 个级别),则应对该材料做重复抗性鉴定。

9.5 鉴定报告

依据实生苗或种藕营养体繁殖苗 3 次重复鉴定的病情指数(DI)的平均值,确定抗性水平,按照附录 C 填写鉴定表格,撰写正式鉴定报告。

9.6 鉴定材料后处理

鉴定完毕后将莲藕植株、残体及相关培养基质集中进行无害化处理。

10 证实方法

10.1 标记方法

在莲藕腐败病抗性鉴定材料准备阶段需要对所用的莲藕品种(资源)进行标记,标记的内容包括:

- a) 品种(资源)名称;
- b) 标记的编号;
- c) 做标记的试验人员姓名;
- d) 标记的时间;
- e) 其他。

10.2 过程记录

在执行第 6 章和第 7 章所规定的各个阶段的程序指示过程中,记录并保留以下内容:

- a) 执行各个阶段程序指示的人员姓名;
- b) 时间;
- c) 地点;
- d) 具体操作内容;
- e) 操作的结果;
- f) 其他。

附录 A

(资料性)

莲藕腐败病病原及发病症状

A.1 学名和形态描述

A.1.1 学名

莲藕腐败病病原为尖孢镰刀菌 [*Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *nelumbicola* (Nis. & Wat.) Booth] 及其近缘种 *Fusarium commune*, 属真菌界 (Fungi)、子囊菌门 (Ascomycota)、丛赤壳科 (Nectriaceae)、镰刀菌属 (*Fusarium*)。

A.1.2 形态描述

尖孢镰刀菌在 PDA 培养基上生长良好。初期菌落为白色, 4 d~5 d 后菌落中心可见紫红色, 随着菌落生长, 紧贴培养基的菌丝颜色逐渐加深至紫色, 菌落气生菌丝白色, 绒状, 致密 (见图 A.1)。病原菌在 PDA 培养基上 1 周内能产生较多小型分生孢子, 2 周内可产生大型分生孢子 (见图 A.1)。小型分生孢子椭圆形, 无色, 单生或聚生, 一般为单胞, 间有一隔膜, $(5.0\sim 12.0)\mu\text{m}\times(2.5\sim 5.0)\mu\text{m}$ 。大型分生孢子镰刀形, 两端细胞逐渐狭细变尖, 基部有足胞, 椭圆状弯曲, 或平直, 一般有 3 个隔, 少数有 2 个隔或 4 个~5 个隔。3 隔分生孢子大小为 $(26.2\sim 52.5)\mu\text{m}\times(3.1\sim 4.5)\mu\text{m}$ 。

F. commune 在 PDA 培养基上生长良好。初期菌落为白色, 4 d~5 d 后菌落中心可见淡紫黄色或淡黄色, 菌落气生菌丝发达, 白色, 绒状, 致密 (见图 A.1)。病原菌在 PDA 培养基上 1 周内能产生较多小型分生孢子, 2 周内可产生大型分生孢子 (见图 A.1)。小型分生孢子长椭圆形、纺锤形、直或略弯曲成肾形等, 大小为 $(5.3\sim 13.1)\mu\text{m}\times(2.8\sim 4.2)\mu\text{m}$ 。大型分生孢子纺锤形或近似镰刀形, 为 3 个~5 个分隔, 4 隔~5 隔的大型分生孢子大小为 $(29.6\sim 55.1)\mu\text{m}\times(2.9\sim 5.1)\mu\text{m}$ 。

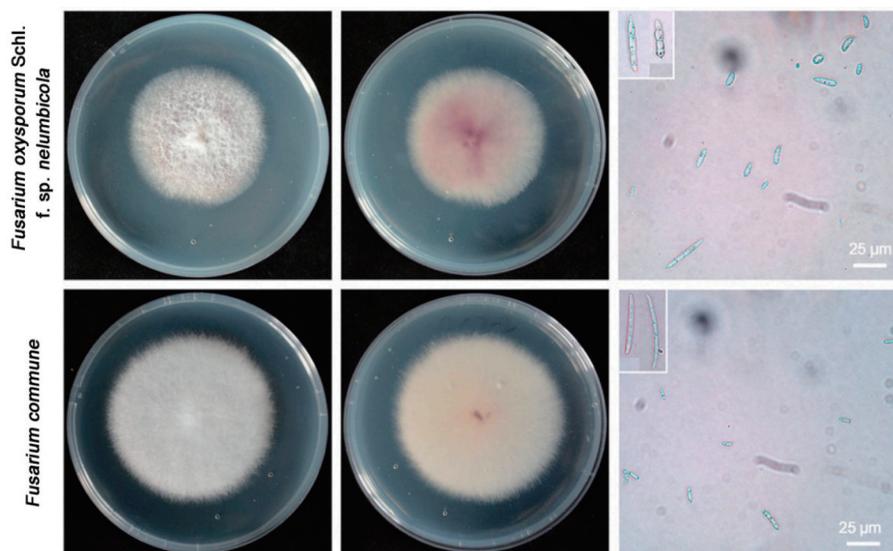


图 A.1 尖孢镰刀菌及 *Fusarium commune* 的菌落形态、大小孢子形态

A.2 莲藕腐败病症状

病原菌的菌丝体及厚垣孢子随病残体在藕田土壤中越冬, 在条件适宜时, 从地下茎或根系侵入, 随后病原菌在维管束内定殖并通过维管束进行系统扩散和侵染。在发病初期, 植株地上部没有明显症状, 地下茎中心维管束呈现淡褐色或褐色; 随着病情发展, 部分植株表现矮化, 叶片边缘因缺水而呈现开水烫状青

枯,并逐渐扩展至全叶;发病后期,莲根坏死,地下茎疏导组织完全变褐甚至腐烂,通气孔内常充满白色或粉色菌丝(见图 A. 2)。



图 A. 2 莲藕腐败病症状

附 录 B

(规范性)

莲藕腐败病菌的分离、鉴定及保存

B.1 分离

将采集的病藕用清水冲洗清除泥土,从发病藕组织的病健交界处切取病变组织,在70%乙醇溶液中浸泡1 min,然后用灭菌水冲洗1次。之后,将组织浸泡在3%的次氯酸钠溶液5 min,其间不规则地振动溶液。处理后的组织被转移放入无菌培养皿中,用灭菌水清洗5次,去除残留次氯酸钠。然后,将组织小心地转移到含有氯霉素(50 μg/mL)的PDA培养基上,28℃培养3 d。随后,将组织中生长出来的菌丝挑出,继代培养用于单孢子纯化。

B.2 鉴定

形态学观察以及利用表B.1所列引物对ITS、*EF1a*和*mtSSU*位点进行PCR扩增,并对PCR产物进行测序,通过National Center for Biotechnology Information(NCBI)网站的BLAST工具进行序列的比对,实现对分离菌物物种的鉴定。对经过单孢纯化的分离菌物进行培养后,将其产生的分生孢子按照前文所述,回接莲藕实生苗或植株,产生相同症状,并最终再次分离到靶标病原物,完成柯赫氏法则验证。

表 B.1 鉴定引物

引物名称	引物序列	说明
EF1a 上游	ATCACAAACCATTCACAACCGTC	扩增产物约 700 bp
EF1a 下游	AATGATGAGAATGGCGCAATCAG	
mtSSU-NMS1	CAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATG	扩增产物约 740 bp
mtSSU-NMS2	GCGGATCATCGAATTAATAACAT	
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	扩增产物约 600 bp
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

B.3 保存

采用分生孢子甘油冻存法进行保存:将莲藕腐败病菌株接种至PDB中,置于25℃、150 r/min摇床中振荡培养4 d~5 d后,取出部分培养悬浮液,加入等体积50%的灭菌甘油溶液,振荡混匀,做好标记后置于-80℃冰箱中保存。

附 录 C

(规范性)

莲藕抗腐败病鉴定结果记录表

莲藕抗腐败病鉴定结果记录表见表 C.1。

表 C.1 莲藕抗腐败病鉴定结果记录表

编号	鉴定材料名称	来源	重复区号	病情级别					病情指数	平均病指	抗性评价
				0	1	2	3	4			
1	感病对照		A								
			B								
			C								
			...								
2	鉴定品种 1		A								
			B								
			C								
			...								
3	鉴定品种 2		A								
			B								
			C								
			...								
...	...		A								
			B								
			C								
			...								
接种日期							地点				
调查日期							记录人				

鉴定人：

记录人：

审核人(签字)：
