

HNNY

湖南省农业技术规程

HNNY496-2026

青花菜黑斑病抗性接种鉴定技术规程

Code of practice for indoor inoculation and resistance

assessment of broccoli black spot

2026-07-08 发布

2026-07-08 实施

湖南省农业农村厅发布

目 次

前言 1

1 范围 2

2 规范性引用文件 2

3 术语和定义 2

4 设施设备及耗材 3

5 接种体制备 3

6 抗性接种 4

7 鉴定评价 5

8 废弃物处理 7

9 档案管理 8

附录 A 青花菜黑斑病芸薹生链格孢菌检疫鉴定方法 9

附录 B 青花菜黑斑病感病叶片病情级别划分标准 11

前 言

本文件按《湖南省农业技术规程制定与发布管理规范》相关规定起草。

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这些专利的责任。

本文件由湖南省农业标准化技术委员会提出并技术归口。

本文件起草单位：湖南农业大学、岳麓山实验室、天津市农业科学院。

本文件起草人：黄科、黄露、吴秋云、罗雅方、胡震竺、张小丽、黄惠萍。

青花菜黑斑病抗性接种鉴定技术规程

1 范围

本文件规定了青花菜黑斑病抗性接种鉴定的设施设备及耗材、接种体制备、抗性接种、鉴定评价和废弃物处理等内容。

本文件适用于青花菜黑斑病室内抗性接种鉴定。

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。

DB43/T 1956 十字花科蔬菜黑斑病综合防治技术规程

DB5301/T 70 十字花科蔬菜主要病害综合防控技术规程（含黑斑病）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 人工接种

在可控室内试验条件下，人为将黑斑病病原物以标准化、可重复的方式接种至青花菜感病植株的叶片上，人为构建稳定发病体系的试验操作技术。

3.2 接种体

人工接种试验中人为施加，能够侵染青花菜植株的病原繁殖体。

3.3 抗病性鉴定

在可控室内条件下，以感病青花菜为试验材料，统一供给标准化接种体人工接种，系统调查植株发病程度、统计病情指标，定量、客观划分病情等级。

3.4 室内接种鉴定

在可控室内条件下，统一苗龄和叶片成熟度、温/湿度、光照、基质等环境条件，采用已鉴定的纯化接种体对青花菜幼苗或成株开展人工接种，控制侵染微环境稳定发病，再依据统一病情分级标准调查发病状况、计算病情指数，定量评价材料抗性水平。

4 设施设备及耗材

4.1 设施

隔离温室、鉴定室。

4.2 设备

恒温培养箱、冰箱、灭菌锅、超净工作台、显微镜、移液器、血球计数板等。

4.3 耗材

接种盘、培养皿、锥形瓶、纱布、酒精灯、滤纸等。

5 接种体制备

5.1 接种体采集

5.1.1 田间采集

田间采集具有典型病症的青花菜黑斑病叶片，采用适宜于病原真菌分离的组织分离法进行菌株分离纯化。

5.1.2 菌株购买

可通过中国农业微生物菌种保藏管理中心（ACCC）等购买。

5.2 接种体纯化

超净台无菌环境下，用灭菌刀具在病叶病健交界处切取5 mm×5 mm病组织；无菌水冲净杂质，75%乙醇表面消毒20 s，无菌水洗3次去除酒精，滤纸吸干水分。将组织块接种于马铃薯葡萄糖琼脂（PDA）培养基，每皿3~5块并设重复，26℃±1℃避光培养3 d~4 d。选取菌落初期白色至灰白色、后期转为灰褐色至黑褐色，呈绒状或絮状的典型单菌落，多次纯化得到纯菌株。

5.3 接种体鉴定

结合菌落形态、分生孢子形态学特征鉴定，后经致病性测定验证（将纯化菌株孢子悬浮回接青花菜健康叶片，产生典型黑斑病症状后，从病斑处再次分离获得相同菌株），并结合分子生物

学方法对菌株进行鉴定，确认目标菌株为芸薹生链格孢菌（详见附录A），最终将鉴定准确、纯度一致的菌株纯培养物置于4℃环境保存备用。

5.4 接种体保存

5.4.1 培养皿保存

纯化菌株接种PDA斜面，25℃培养7 d，长满菌丝并产生黑色分生孢子；螺旋盖拧紧/棉塞外包保鲜膜，4℃冰箱直立存放。每3个月须转接一次，防止菌种衰退、产孢与致病性下降。复苏菌株可挑取少量菌丝转接新鲜PDA，25℃避光培养5 d~7 d即可。

5.4.2 甘油保存

刮取孢子，无菌水制成孢子悬液，与20%无菌甘油等体积混合（终浓度10%甘油）；分装冻存管，-80℃冰箱保存。

5.5 接种体扩繁

5.5.1 培养基保存菌株扩繁

取用4℃存放的PDA保存菌株，挑取带孢子菌丝块转接到新鲜PDA斜面，25℃培养7 d完成扩繁。

5.5.2 甘油保存菌株扩繁

-80℃甘油冻存管温水融化，无菌吸取孢子悬液转接PDA平板/斜面，25℃避光培养5 d~7 d，获得长满黑色分生孢子的活化菌种。

5.5.3 培养

培养方法同5.2。

6 抗性接种

6.1 鉴定室准备

人工接种鉴定室应具备人工调节温度、湿度及光照条件。温度可调范围为1℃~35℃，湿度可调范围为60%~100%，光照可调范围为0 lx~6000 lx。

6.2 植株准备

以高抗青花菜种质设置1个~2个抗病对照组，以高感青花菜种质设置1个~2个感病对照组，同时设置空白对照组。

选择植株中上部生长状态较一致的健康展开叶，用自来水冲洗后，75%酒精表面消毒叶片10 s~15 s，再用无菌水冲洗干净后置于无菌滤纸，背面朝上，晾干待用。

6.3 抗性鉴定接种

6.3.1 接种时期

青花菜黑斑病抗性鉴定采用苗期接种法，接种苗龄以4~5片真叶期为宜，接种时间宜在傍晚进行。

6.3.2 接种浓度

利用血球计数板测定并调整菌悬液浓度，分生孢子悬浮液浓度调节至 1×10^6 个/mL，4℃~6℃放置2 h，现用现配，悬浮液载体为无菌水。接种前加入0.02%吐温-20作为黏附剂，充分混匀。

6.3.3 接种方法

本试验所有接种方法均设置空白对照植株，对照植株与处理植株苗龄、生长状态、培养环境、管理方式完全一致，仅不接种病原菌孢子悬液，统一喷洒含0.2%吐温-20的无菌水，排除溶剂、操作及环境等无关变量对试验结果的干扰，具体方法如下：

孢子悬液点滴接种法：离体叶片病害测定采用孢子悬液点滴接种法，选取健康完整的青花菜真叶，每片叶片精准滴加10~20 μL孢子悬液。幼苗整株接种采用表1分级标准，离体叶片接种采用表2分级标准。

6.4 接种后管理

接种植株置于隔离鉴定温室内，温度保持为25℃~28℃，空气相对湿度90%~95%，每天植株套袋表面喷雾无菌水1次保湿，正常水肥管理；离体叶片接种盘置于光照培养箱或鉴定培养室内，黑暗24 h后每天光照12 h，光照强度约2000 lx~3000 lx。温度和湿度条件同上。

7 鉴定评价

7.1 病情分级

幼苗病情级别及相应症状描述见表1；叶片病情级别及相应症状描述见表2。

表 1 青花菜幼苗黑斑病病情级别划分

病情级别	症状描述
0	整株叶片无症状
1	病叶占全株展开叶 1%~10%，病斑为针尖状小黑点，无明显扩展
3	病叶占全株展开叶 11%~25%，病斑圆形、褐色，直径2 mm以下，轮纹不明显
5	病叶占全株展开叶 26%~50%，病斑扩大呈黑褐色，有明显同心轮纹，部分病斑周围有黄色晕圈
7	病叶占全株展开叶 51%~75%，病斑连片，部分病斑穿孔，病叶轻度黄化
9	病叶占全株展开叶 75%以上，病斑大量融合穿孔，叶片大部分枯黄、脱落

表 2 青花菜叶片黑斑病病情级别划分

病情级别	症状描述
0	叶片无症状
1	病斑占叶片单面积 1%~10%，病斑为针尖状小黑点或褪绿小斑，直径1 mm以下
3	病斑占叶片单面积 11%~25%，病斑圆形、灰褐色，直径1~3 mm，轮纹不明显
5	病斑占叶片单面积 26%~40%，病斑黑褐色，直径3~6 mm，有明显同心轮纹，周围伴有黄色晕圈
7	病斑面积占单片叶面积 41%~60%，病斑扩大连片，部分病斑中央穿孔，呈焦枯状
9	病斑面积占单片叶面积 60%以上或病叶枯死，病斑大量融合穿孔，叶片呈灼烧状枯死

7.2 病情调查

7.2.1 病情指数统计方法

按病情级别划分调查、记录每份鉴定材料发病情况，根据病害症状描述，逐份材料记载单株/单片叶片病情级别。

计算每份鉴定材料的病情指数（DI），计算结果取3次重复平均值，保留小数点后2位。病情指数按公式（1）计算。

$$DI = \frac{\sum (Fi \times Ui)}{U \times S} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中：

DI ——病情指数；

Fi ——第i级病情级别(i=0, 1, 3, 5, 7, 9);

Ui ——第i级病情级别对应植株数/叶片数;

U——调查总植株数/叶片数;

S ——最高级病情级值。

7.2.2 调查时间

接种后第7天至第10天统一开展病情调查，于每日上午9:00–11:00完成植株病情分级与病情指数统计。

7.2.3 抗性分级

根据调查结果计算各青花菜品种苗期的病情指数，并按照表3划分青花菜黑斑病的抗性。

表 3 青花菜黑斑病苗期抗性评价标准

抗病类型	病情指数 (DI)
免疫 Immune (I)	$DI = 0.00$
高抗 Highly resistant (HR)	$DI < 10$
抗病 Resistant (R)	$10 \leq DI < 30$
中抗 Moderately resistant (MR)	$30 \leq DI < 50$
感病 Moderately susceptible (S)	$50 \leq DI < 70$
高感 Highly susceptible (HS)	$DI \geq 70$

7.3 评价规则

当感病对照材料病情指数达到感病级别 ($DI \geq 50$)，抗病对照材料与实际抗性程度相符时，该批次抗性鉴定视为有效；否则该批次鉴定无效，应重新进行。

鉴定材料若初次表现为抗病、中抗的品种，应进行重复鉴定。当2次鉴定结果一致时鉴定完成，当2次鉴定结果不一致时，应进行第3次鉴定，最终以3次中病情指数最高者为准。

重复鉴定时，鉴定2次的以抗性水平最低的评价结果作为供试材料最终抗性评价结果；鉴定次数为2次以上的，以出现频率最多的抗性水平评价结果作为供试材料最终抗性评价结果。平均病情指数 (DI) ≤ 30.00 的材料才能定为抗病材料。

8 废弃物处理

鉴定完毕后，集中所有病株、叶片材料做无害化处理，带有病菌的基质应彻底灭菌，宜采用蒸汽高温消毒处理，温度达到130℃以上并保持30 min。

9 档案管理

应建立青花菜黑斑病抗性接种档案，其内容包括但不限于青花菜农事记录、样品采集、抗性鉴定以及抗性评价等内容；记录档案保存2年以上。

附 录 A
(资料性)
青花菜黑斑病芸薹生链格孢菌检疫鉴定方法

A.1 病原形态学鉴定

青花菜黑斑病主要由芸薹生链格孢 (*Alternaria brassicae*) 侵染所致。该病可危害植株茎、花梗、种荚及叶片等多个部位,田间典型发病症状如下:叶片染病初期产生大量细小病斑,病斑边缘呈淡褐色至紫褐色,小病斑直径极小,发育成熟后最大可达0.4 cm;随着病情发展,多个小型坏死斑相互融合,形成大小可达2 cm~5 cm的不规则大型坏死病斑。病斑最先大量出现于叶片背面,且多从叶片气孔处发生侵染。病菌亦可侵染叶脉,导致叶片生长受阻、叶面皱缩畸形,病害持续扩展;高湿环境下,叶面病斑呈现明显油渍状,由褐色逐渐加深为深褐色、黑褐色,病斑形态多为不规则形或多角形,病部组织呈薄纸状干枯状态,病害通常由植株外层叶片始发,逐步向内层叶片蔓延。茎秆与花梗染病初期产生油渍状细小斑点,后期扩展形成紫黑色长条病斑;种荚染病后出现圆形或不规则形病斑,病斑略微凹陷,严重影响植株生长与结实。

为精准完成病原菌鉴定,在田间症状观察基础上,结合菌株培养特征与显微形态开展系统形态学鉴定,主要包含菌落形态、分生孢子形态、分生孢子链形态三大核心指标:分离菌株在PDA培养基、25℃恒温培养条件下生长态势稳定,初期菌落为白色至灰白色,质地均匀、表面平整、边缘圆润规整;培养后期菌落中央隆起,表面形成明显皱褶,整体呈绒状、絮状质感,色泽转为灰褐色,经254 nm紫外线照射可产生黄绿色扩散性荧光,菌落特征特异性显著。显微观察结果显示,病菌分生孢子多为倒棍棒状、椭圆形,孢身分化清晰,具典型横隔及少量纵隔,孢子顶端带有特征性喙状结构,孢子整体呈浅褐色至黄褐色,胞壁光滑、形态饱满。菌株培养过程中,菌丝顶端可持续产生分生孢子,呈串生方式有序排列,形成长短不一、直立或微弯的典型分生孢子链,为芸薹生链格孢菌的典型鉴别特征。综合田间发病症状、菌落培养特征及显微孢子形态特征,可准确鉴定该致病菌为芸薹生链格孢菌。

A.2 PCR 分子鉴定

从分离培养的菌株中提取DNA作为模板,利用鉴定引物进行PCR检测和电泳分析(表A.1)。用青花菜黑斑病芸薹生链格孢菌标准菌株基因组DNA作为阳性对照,用不含有黑斑病芸薹生链格孢菌的青花菜组织基因组DNA为阴性对照,用双蒸水作空白对照,进行PCR扩增,将扩增产物进

行琼脂糖电泳分析。待测样品扩增产物的电泳结果与阳性对照一致，阴性对照和空白对照未出现条带，则判断为阳性，未出现与阳性对照一致的条带则判断为阴性。

表 A. 1 检测青花菜黑斑病芸薹生链格孢菌 PCR 鉴定扩增引物

引物名称	引物序列	
ITS1	F:5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	R:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
ITS5	F:5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'	R:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
AbF1	F:5'-CAGACATGAACACGCCAACATGACTA GACC-3'	R:5'-GTGAGGCTTAGCGTAGAGTGTC ACGGTTC-3'
S1	F:5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	R:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
S2	F:5'-ATGCAGTTCACCACCATCGC-3'	R:5'-ACGAGGGTGAYGTAGGCGTC-3'

附录 B

(规范性)

青花菜黑斑病感病叶片病情级别划分标准

青花菜接种黑斑病菌的症状表现为叶片出现淡褐色小斑点，逐渐扩展为圆形或近圆形暗褐色至黑褐色病斑，病斑中央凹陷，表面产生黑色霉层，严重时病斑连片致叶片枯死（如图B.1）。

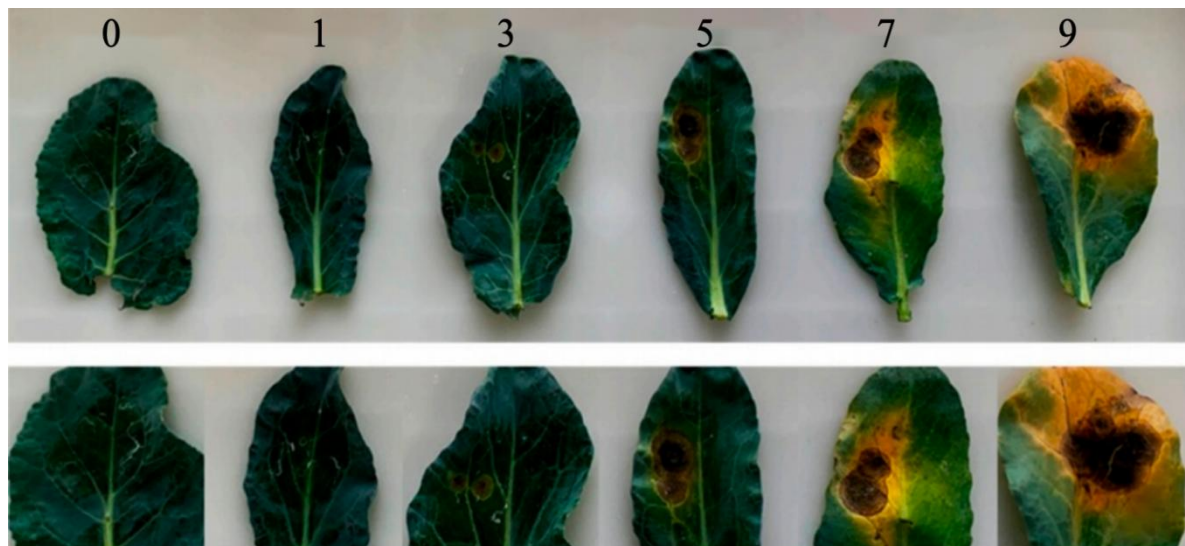


图 B.1 青花菜黑斑病感病叶片病情级别划分标准