NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXXX-202X

油菜品种菌核病抗性鉴定技术规程

**Code of practice for identification of resistance**

**to *Sclerotinia sclerotiorum* in oilseed rape**

（征求意见稿）

**在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。**

**（注：征求意见时必须保留这句话。）**

XXXX -XX-XX 发布 XXXX -XX-XX 实施

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业管理司提出口。

本文件由全国农作物种子标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：中国农业科学院油料作物研究所、全国农业技术推广服务中心。

本标准起草人：任莉、邱军、刘立江、李荣德、黄军艳、刘胜毅、程晓晖、蔡光勤

油菜品种菌核病抗性鉴定技术规程

1. 范围

本文件确立了油菜品种菌核病抗性鉴定的有关定义，抗性评价的鉴定方法、试验设计、调查方法、数据计算等技术及汇总报告格式。

本文件适用于各单位开展的油菜品种菌核病抗性鉴定试验。抗病品种的选育、品种抗性比较试验、主导品种的抗病性监测可参照执行。

1. 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 19557.14 植物品种特异性、一致性和稳定性测试指南 甘蓝型油菜

1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

抗病性自然侵染鉴定 **resistance identification through pathogen natural infection**

在田间通过病原的自然侵染而评定试验品种的抗、感病程度或发病程度的一种作物抗病性鉴定方法。

病圃诱发鉴定 **resistance identification through disease induction in nursery**

在病害圃中，利用病害圃创造的发病条件让植株自然侵染发病而评定试验品种的抗、感病程度或发病程度的一种作物抗病性鉴定方法。

离体人工接种鉴定 ***in vitro* resistance identification through artificial inoculation**

将器官或部分组织从植物体取下，按一定量接种人工培养病原物，模拟自然发病情况，人工创造合适的发病条件让植物器官或部分组织被侵染发病而评定试验品种的抗、感病程度或发病程度的一种作物抗病性鉴定方法。

**活体人工接种鉴定 *in vivo* resistance identification through artificial inoculation**

在健康的植物体上，按一定量接种人工培养病原物，模拟自然发病情况，人工创造合适的发病条件让植株被侵染发病而评定试验品种的抗、感病程度或发病程度的一种作物抗病性鉴定方法。

相对抗性指数  **relative resistance index**

通过对植物群体发病程度数值的计算所获得的一个群体较对照群体的病害减轻程度的数值化描述。

1. 田间自然侵染鉴定
   1. 试验地点选择

按品种试验的大区域（如长江上游、中游、下游），选择若干个试验点作为菌核病田间自然侵染鉴定的试验点。试验点选择要有区域代表性，为菌核病重发区，且试验承担单位技术力量强、经验丰富。

* 1. 试验设计

试验设计按照GB/T 19557.14的规定进行，原则上按随机区组试验设计，每组或每个试验至少3个重复。此外，试验设计应满足下列要求：试验地以往菌核病发病较重；在苗期或冬前每平方米均匀增施2粒～3粒采自当地前一季发病油菜茎秆中的大小适中、有活力的菌核或每行中施1粒～2粒菌核，以维持菌核丰度和分布均匀性。所有试验使用中油821或其他抗性水平相当的品种作为统一抗病对照，统一供种。

* 1. 田间管理

按照GB/T 19557.14的规定进行。薹期不中耕培土，以免破坏子囊盘；蕾期至成熟期不进行任何病害防治措施。全部农事操作要一致，一人完成全部或每人完成一个重复，且在1d内完成，成熟前或病害调查前不在小区中走动，不破坏原植株分布结构。

* 1. 调查时间

在油菜成熟期，收获前7d～10d调查病害。每个重复的调查应在1d内完成。油菜菌核病症状识别参见附录A。

* 1. 调查方法

在油菜成熟期，分级调查菌核病发病程度，调查分级标准见表B.1。每个抗病性鉴定试验点对每组或一个完整试验至少调查3个重复，各重复在小区中心逐行逐株调查（植株数不少于100株），每个重复应由一人完成。结果记入表C.1。

* 1. 数据统计与分析
     1. 数据有效性、准确性和精确性

在一组或一个完整试验中，发病重的品种的发病率大于15%方为有效试验，否则为无效试验，数据不进行统计和分析。该发病重的品种可以为参试品种中较感的或试验感病对照品种。在发病重的品种发病率大于15%的条件下，若试验重复间相关性都很低且不显著，则田间发病条件（菌原数量和分布及发病的环境气候条件等）均匀一致性差，鉴定准确性未达到控制标准。当病害数据（发病率和病情指数等）分布集中在10%以内或80%以上时，鉴定的灵敏性和精确性未达到控制标准。

* + 1. 发病率计算

以小区为单位统计总株数和发病株数，按式（D.1）计算菌核病发病率（*P*）。各试验点内每组或每个试验按随机区组试验统计分析方法对发病率进行方差分析，并计算获得每点每个品种的平均发病率。各点间按多点试验统计分析方法对发病率进行方差分析，并计算每个品种的总平均发病率。

* + 1. 病情指数计算

以小区为单位，按式（D.2）计算菌核病病情指数（*DI*）。用病情指数衡量病害严重度。各试验点内每组或每个试验按随机区组试验统计分析方法对病情指数进行方差分析，并计算获得每点每个品种的平均病情指数。各点间按多点试验统计分析方法对病情指数进行方差分析，并计算每个品种的总平均病情指数。

* + 1. 相对抗性指数计算

以每个试验每个品种的平均病情指数，按式（D.3）计算每个试验品种的相对抗性指数（*RRI*）；对于多点试验，用总平均病情指数计算；对照为对应试验中的抗病对照品种。所有试验都使用中油821或其他抗性水平相当的品种作为统一抗病对照，使各品种的相对抗病性水平具有可比性。

* 1. 抗性等级划分

根据计算的相对抗性指数（RRI），按附录B表B.2所示的标准划定每个品种的抗病等级。对两年或多年的鉴定结果，则计算平均病情指数，然后计算相对抗性指数，划定抗病等级。

1. 病圃诱发鉴定
   1. 病圃设计
      1. 病圃选址

抗性鉴定病圃宜设置在具有代表性的油菜菌核病常发病区，选择交通便利、土壤类型具有代表性、地势平坦、不受荫蔽、远离畜禽、形状规整、大小合适、排灌方便、地力均匀、肥力中等的地块。新建病圃至少培育2年并检测田间病原分布均匀一致后才可用于正式抗病性鉴定试验。

* + 1. 田间菌源

应保持病圃土壤表层每平方米至少有2粒～3粒有活力菌核，且分布均匀。定期土壤取样，检测土层中菌核丰度和分布均匀性。田间除油菜收获后留下的菌核外，每年在苗期或冬前每平方米均匀增施2粒～3粒采自当地前一季发病油菜茎秆中的大小适中、有活力的菌核或每行中施1粒～2粒菌核，以维持菌核丰度和分布均匀性。采用旱旱轮作或多次灌溉、翻耕以消除自生苗。

* + 1. 病害诱发

在病圃中安装人工喷雾系统，出水为细雾（液滴直径在100μm以内），喷头间间距根据有效射程设置，高度约2.8m。在油菜初花至终花期，当空气湿度在90%以下时，以一定的时间间隔喷雾，使田间植株冠层的相对湿度始终维持在90%以上，喷雾系统及喷雾操作不能影响植株的正常生长发育，不能破坏或改变植株的群体和冠层结构；或在田间罩上纱网，以保持田间植株冠层的湿度在90%以上。

* 1. 试验设计

试验设计按照GB/T 19557.14的规定进行，采用随机区组设计，将区域来源相同的品种安排在一个随机区组试验中，每个品种设置3次重复，小区面积不小于2.66 ㎡（植株数不少于30株）。试验地四周设置保护行。

试验增设1个抗病对照，为中油821或其他抗性水平相当的品种，统一供种。以各试验品种与抗病对照相比的相对抗性来判定各试验品种的相对抗病性，并划定各试验品种的抗病等级。

* 1. 田间管理

按照GB/T 19557.14的规定进行。薹期不中耕培土，以免破坏子囊盘；蕾期至成熟期不进行任何病害防治措施。全部农事操作要一致，一人完成全部或每人完成一个重复，且在1d内完成，成熟前或病害调查前不在小区中走动，不破坏原植株分布结构。

* 1. 调查时间

在油菜成熟期，收获前7d～10d调查病害。每个重复的调查应在1d内完成。油菜菌核病症状识别参见附录A。

* 1. 调查方法

在油菜成熟期，分级调查菌核病发病程度，调查分级标准见表B.1。各小区逐行逐株调查，每个重复由一人完成，结果计入表C.1。

* 1. 数据统计与分析
     1. 数据有效性、准确性和精确性

每个试验发病重的品种发病率大于15%方为有效试验，否则为无效试验，数据不进行统计和分析。该发病重的品种可以为参试品种中较感的或试验感病对照品种。在发病重的品种发病率大于15%的条件下，若试验重复间相关性很低且不显著，且田间有活力菌原数量和分布不均匀，则田间发病条件（菌原数量和分布及发病的环境气候条件等）均匀一致性差，鉴定准确性未达到控制标准。当病害数据（发病率和病情指数等）分布集中在20%以内或80%以上时，此病圃鉴定的灵敏性和精确性未达到控制标准。

* + 1. 发病率计算

以小区为单位统计总株数和发病株数，按式（D.1）计算菌核病发病率（*P*）。每组或每个试验按随机区组试验统计分析方法对发病率进行方差分析，并计算每个品种的平均发病率。

* + 1. 病情指数计算

以小区为单位，按式（D.2）计算菌核病病情指数（*DI*），用病情指数衡量病害严重度。每组或每个试验按随机区组试验统计分析方法对病情指数进行方差分析，并计算每个品种的平均病情指数。

* + 1. 相对抗性指数计算

以各试验品种和对应抗病对照品种平均病情指数，按式（D.3）计算每个试验品种的相对抗性指数（*RRI*）。所有试验都使用中油821或其他抗性水平相当的品种作为统一抗病对照，使各品种的相对抗病性水平具有可比性。

* + 1. 抗性等级划分

根据计算的相对抗性指数（*RRI*），按表B.2所示的标准划定每个品种的抗病等级。对2年或多年的鉴定结果，则计算平均病情指数，然后计算相对抗性指数，划定抗病等级。当某一特定品种的自然侵染鉴定结果和病圃诱发鉴定结果不一致时，以病圃诱发鉴定结果为主。

1. 苗期离体叶片接种鉴定
   1. 试验设计

将参试油菜采用土壤盆栽或按照各地正常播种时间播种在大田，待5～6叶期取大小相当、叶位（第3或第4叶）相同的健康叶片，每份材料取30片，设置三次重复，每个重复10片叶用于叶片接种。

* 1. 接种体的制备

将无菌保存的致病力正常的菌核放置于马铃薯葡萄糖琼脂（PDA）培养基上，（22±1）°C培养至菌丝即将长满培养皿时，用直径5mm打孔器沿菌落边缘打孔取菌丝块用于接种。

* 1. 人工接种

将叶片顺序摆放于接种盘内饱和湿度的纱布或纸巾上。取菌丝块放置于叶片中上部偏离主叶脉的位置，使菌丝块长满菌丝的一面紧贴叶片，接种过程中避免菌丝块移动。接种后用水喷雾并用塑料保鲜膜覆盖接种盘保湿，放置于（22±1）­°C，相对湿度（95±5）%的人工接种鉴定温室中培养。

* 1. 调查方法

接种后24h开始，每12h测量一次病斑的长径和短径，直至病斑扩展到叶片边缘。每次测量时间控制在2小时之内，整个试验每个重复由一人测量完成，如有特殊情况应在记录表备注栏中标出。调查记录表参见附录C表C.2。

* 1. 数据统计与分析

试验品种发病率大于80%方为有效试验，否则为无效试验，数据不进行统计和分析。若某个单叶测量值与平均值之差的绝对值大于或等于3倍的标准偏差，即｜Xi-‾X｜≥3σ，则该测量值被判定为异常值，在后续分析中应予以去除。每个试验品种异常值数量应不超过两个，否则为无效试验。

在有效试验中，以每个病斑长径和短径的平均值代表该病斑的直径(D)，进而计算病斑大小［S1=π× (D/2)2］，用病斑大小来衡量病害严重度。

* 1. 品种抗病等级划分

以各试验品种和对应抗病对照品种的平均病斑大小计算相对抗性指数RRI，按附录B表B.2的标准划定每个品种的抗病等级。对于有多个测量时间点的鉴定结果，计算平均相对抗性指数，划定抗病等级。

1. 花期活体茎秆接种鉴定
   1. 试验设计

将参试油菜采用温室土壤盆栽或者按照各地正常播种时间播种在大田，在油菜生长到初花期～盛花期时，选择健康且长势一致（株高、株型等）的植株，每份材料选取30株，设置三次重复，每个重复10株用于茎秆接种。

* 1. 人工接种

参考7.2的方法制备接种体菌丝块，将菌丝块置于5.0cm×2.5cm的封口膜上，无菌丝的一面朝下。利用封口膜将琼脂块绑缚在提前喷雾过的茎秆上，接种点为距地面30cm左右两茎节中间的位置，菌丝面贴在茎秆上，确保菌丝块密封保湿。室内接种的植株，接种后放置于（22±1）℃，相对湿度（95±5）%的人工接种鉴定温室中培养。大田种植的油菜，尽量选择阴天无强烈阳光时接种。

* 1. 调查方法

根据发病情况，于接种后7d~14d调查，测量各接种单株的病斑长度。每次测量时间控制在2小时之内，整个试验每个重复由一人测量完成，如有特殊情况应在记录表备注栏中标出。调查记录表参见附录C的表C.2。

* 1. 数据统计与分析

试验品种发病率大于80%方为有效试验，否则为无效试验，数据不进行统计和分析。若某个单株测量值与平均值之差的绝对值大于或等于3倍的标准偏差，即｜Xi-‾X｜≥3σ，则该测量值被判定为异常值，在后续分析中应予以去除。每个试验品种异常值数量应不超过两个，否则为无效试验。

在有效试验中，根据病斑长度来衡量病害严重度。

* 1. 品种抗病等级划分

以各试验品种和对应抗病对照品种病斑大小（病斑长×绕茎度）的平均值计算相对抗性指数RRI，并按附录B表B.2所示的标准划定每个品种的抗病等级。

1. 总结报告格式
   1. 试验概况

概述试验目的、鉴定材料、鉴定单位、鉴定地点、鉴定方法与评价标准的基本情况。

* 1. 结果与分析

在分析试验数据有效性的基础上，以各试验组别为单位，评价各品种的抗性表现，列出相应的数据表。油菜菌核病抗性鉴定结果统计表见表C.3。

* 1. 小结与讨论

首先对有效的试验数据，从总体上对抗性鉴定的结果进行简要描述；然后分析讨论抗性鉴定结果的准确性、精确性；最后对试验中存在的问题或后续试验中需要注意和改进的地方作必要的分析。

（资料性附录）

油菜菌核病基本信息

* 1. 病原菌

油菜菌核病又称白腐病、茎腐病、杆腐病、白杆病等，其病原菌为核盘菌（*Sclerotinia sclerotiorum*），属子囊菌亚门核盘菌属真菌。

* 1. 病害症状

油菜各生育阶段均可感染菌核病，以终花期以后发病最盛。病菌能侵染油菜地上部分的各器官组织，尤以茎秆发病受害后造成的损失最重。

苗期感病后，一般首先在接近地面的根颈和叶柄上形成红褐色斑点，后转为白色，病组织变软腐烂，其上长出大量白色棉絮状菌丝。病斑绕茎后幼苗死亡，病部形成黑色菌核。

成株期花瓣感病后，变成暗黄色，水渍状，有时可见到油渍状暗褐色无光泽小点，晴天可凋萎，极易脱落，潮湿情况下可长出菌丝。

花药受侵染后，变成苍黄色，并且通过蜜蜂携带有病的花粉，在植株间传播，引起顶枯。

叶片感病，初生暗青色水渍状斑块，后扩展成圆形或不规则形大斑，病斑灰褐色或黄褐色，有同心轮纹，外围暗青色，外缘具黄晕。潮湿时病斑迅速扩展，全叶腐烂，上面生出白色菌丝；干燥时则病斑破裂穿孔。

主茎与分枝感病后，病斑初呈水渍状，浅褐色，椭圆形，后发展成长椭圆形、棱形直至长条状绕茎大斑。病斑略凹陷，有同心轮纹，中部白色，边缘褐色，病健交界明显。在潮湿条件下，病斑扩展迅速，病部软腐，表面生出白色絮状菌丝。至病害晚期，组织腐烂，髓部消解，皮层纵裂，维管束外露呈纤维状，极易折断，剖视病茎，可见黑色鼠粪状菌核。严重感病植株，当病斑绕茎后，病斑上部的茎枝枯死，以致角果早熟，籽粒不饱满。

角果感病后，初期形成水渍状浅褐色病斑，后变成白色，边缘褐色。潮湿时可全果变白腐烂，长有白色菌丝，在角果内面和外面形成黑色小菌核。

种子感病后，表面粗糙，无光泽，灰白色，皱秕，含油量降低。

（规范性附录）

油菜菌核病分级标准及抗性等级划分标准

* 1. 成熟期油菜菌核病调查分级标准

见表B.1。

表B.1 成熟期油菜菌核病调查分级标准（5级）

|  |  |
| --- | --- |
| 病 级 | 病 情 |
| 0 | 全株茎、枝、果轴无症状。 |
| 1 | 全株1/3以下分枝数（含果轴，下同）发病或主茎有小型病斑；全株受害角果数（含病害引起的非生理性早熟和不结实，下同）在1/4以下。 |
| 2 | 全株1/3-2/3分枝数发病，或分枝发病数在1/3以下而主茎中上部有大型病斑；全株受害角果数达1/4～2/4。 |
| 3 | 全株2/3以上分枝数发病，或分枝发病数在2/3以下而主茎中下部有大型病斑；全株受害角果数达2/4～3/4。 |
| 4 | 全株绝大部分分枝发病，或主茎有多数病斑，或主茎下部有大型绕茎病斑；全株受害角果数达3/4以上。 |

* 1. 油菜菌核病抗性等级划分标准

见表B.2。

表B.2 油菜菌核病抗性等级划分标准

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 抗级 | 抗性等级 | 相对抗性指数（RRI） |
| 1 | 高抗（HR） | RRI ≤ -1.2 |
| 2 | 中抗（MR） | -1.2 < RRI ≤ -0.7 |
| 3 | 低抗（R） | -0.7 < RRI ≤ 0 |
| 4 | 低感（S） | 0 < RRI ≤ 0.9 |
| 5 | 中感（MS） | 0.9 < RRI ≤ 2.0 |
| 6 | 高感（HS） | RRI > 2.0 |

（资料性附录）

油菜菌核病抗性鉴定记载表

* 1. 油菜菌核病田间调查记录表

见表C.1。

1. 表C.1 油菜菌核病田间调查记录表

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 调查地点： 调查时间： 调查人： 记录人： 【第 页，共 页】 | | | | | | |
| 田间小区  编号 | 各病级株数 | | | | | 备注 |
| 0级 | 1级 | 2级 | 3级 | 4级 |
|  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |

* 1. 油菜菌核病人工接种调查记录表

见表C.2。

表C.2 油菜菌核病人工接种调查记录表

调查时间（接种后）： 调查人： 记录人： 【第 页，共 页】

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 编号 | 品种名称 | 重复 | 叶片号/株号 | 长径/病斑长度（cm） | 短径（cm） | 备注 |
|  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |

* 1. 油菜菌核病抗性鉴定结果统计表

见表C.3。

1. 表C.3 油菜菌核病抗性鉴定结果统计表

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 编号 | 品种名称 | 田间/病圃鉴定 | | 人工接种鉴定 | *RRI* | 抗性等级 |
| 发病率，% | 病情指数 | 病斑大小 |
|  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |

（规范性附录）

油菜菌核病发病率、病情指数、相对抗性指数计算方法

* 1. 发病率计算方法

油菜菌核病发病率按式（D.1）计算。



式中：

1. P —菌核病发病率，单位为百分率（%）；
2. d —发病植株数，单位为株；
3. N —调查总株数，单位为株。
   1. 病情指数计算方法

油菜菌核病病情指数按式（D.2）计算。



1. 式中：
2. DI —菌核病病情指数；
3. s —各病情级别（如数值0-4）；
4. n —对应各病情级别的株数；
5. N —调查总株数；
6. S —最高病情级别。
   1. 相对抗性指数计算方法

油菜菌核病相对抗性指数按式（D.3）计算。



1. 式中：
2. *RRI* —相对抗性指数；
3. DIck —抗病对照的病情指数；

DI —待评价品种的病情指数。

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_