ICS 65.020.20

CCS B 31

DB21

辽 宁 省 地 方 标 准

DB 21/T XXXX—2023

辣椒细菌性斑点病抗病性鉴定技术规程

Technical regulation for evaluation of pepper resistance to bacterial leaf spot

（报批稿）

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。

XXXX - XX - XX 发布　　XXXX - XX - XX 实施

辽宁省市场监督管理局　　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。

本文件由辽宁省农业农村厅提出并归口。

本文件起草单位：辽宁省农业科学院、辽宁省农业发展服务中心、新民市乡村振兴发展中心、桓仁满族自治县市场监管事务服务中心、大连市现代农业生产发展服务中心、铁岭市农业科学院、喀左县老爷庙镇蔬菜技术服务站、喀左县公营子镇蔬菜站、喀左县草场乡蔬菜技术服务站、喀左县林业和草原事务服务中心、北票市农业综合行政执法队、北票市农业发展服务中心、北票市龙城区农业农村局、北票市龙潭乡林业站

本文件主要起草人：王辉、刘丽、于舒怡、邹春蕾、李柏宏、关天舒、刘长远、张曦、鲁旭鹏、宋露、郑丽娇、樊琳琳、王延安、刘震、王德峰、暴国兴、陶成东、茹威、时春利、梁健、吕丽英、杨永胜、张国辉。

本文件发布实施后，任何单位和个人如有问题和意见建议，均可以通过来电和来函等方式进行反馈，我们将及时答复并认真处理，根据实际情况依法进行评估及复审。

归口管理部门通讯地址：辽宁省农业农村厅（沈阳市和平区太原北街2号），联系电话：024-23447862。

文件起草单位通讯地址：辽宁省农业科学院（沈阳市沈河区东陵路84号），联系电话：024-88419895。

辣椒细菌性斑点病抗病性鉴定技术规程

1 范围

本文件规定了辣椒细菌性斑点病 [(*Xanthomonas campestris* pv.*vesicatoria* (Doidge) Dye] 抗病性鉴定过程的准备、接种、调查和评价等技术内容。

本文件适用于辣椒（*Capsicum annuum* L.）品种或种质资源对细菌性斑点病抗性的室内鉴定及评价。

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 36851 辣椒细菌性斑点病菌检疫鉴定方法

SN/T 1538.1 培养基制备指南 第1部分：实验室培养基制备质量保证通则

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 准备

4.1 培养基制备

肉汁胨培养基（NA）：牛肉浸膏3.0 g，酵母浸膏1.0 g，蛋白胨5.0 g，葡萄糖（或蔗糖）10.0 g，琼脂粉10.0 g，蒸馏水1000 mL，pH 6.8～7.0，高压灭菌121℃ 20 min。

酵母膏葡萄糖培养基：酵母浸膏10.0 g，D-葡萄糖20.0 g，碳酸钙20.0 g，琼脂粉10.0 g，蒸馏水1000 mL，除碳酸钙外，先将其他成分加热溶解，然后加碳酸钙，将pH值调到7.2，再高压灭菌121℃ 20 min。

4.2 接种体制备

4.2.1 病原物分离

从发病植株叶片的典型病斑上采集病样，采用平板划线法或稀释平板法进行分离，挑取单个菌落进行纯化培养，经柯赫氏证病法则测定后，对纯化的分离物进行形态学、分子学鉴定等，确定为辣椒细菌

性斑点病病原菌，并将该病菌4℃保存备用。病原物的分离与鉴定符合GB/T 36851的规定和附录A的要求。

4.2.2 接种体制备

将获得的病原菌在NA平板培养基上进行纯培养，28℃恒温培养36 h～48 h，用接种环刮取病原菌，将其放入装有适量无菌水的三角瓶中，充分搅拌均匀，用稀释平板计数法或血球计数板计数法测定菌悬液浓度，配制成3×10^6cfu/mL病菌悬浮液，供接种使用。

4.2.3 菌种保存

4.2.3.1 斜面保存

将纯化的病原物划线转接到试管斜面培养基上，28℃恒温培养36 h～48 h，待病菌长满斜面后放4℃条件下冷藏保存，保存期为1周～10周。

4.2.3.2 超低温甘油保存

将获得的病原菌在NA平板培养基上培养，28℃恒温培养36 h～48 h，用接种环挑取病原菌放入装有灭菌的甘油（甘油:水=1:4）冻存管中混匀，放于-80℃超低温冰箱下长期保存。

4.3 鉴定对照品种选择

抗病性鉴定时选择“early calwonder”（甜椒品种）为感病对照品种。

4.4 鉴定设计

鉴定材料随机排列，每份材料重复3次，每次重复10株苗。

4.5 鉴定材料育苗

选择颗粒饱满、无病虫害的辣椒种子，将其放入高锰酸钾溶液中浸泡10 min～15 min，捞出放入温水中浸泡8 h～12 h，取出用湿毛巾包裹放于恒温箱内进行催芽，温度保持在25℃～30℃，待种子露白后即可进行播种。将种子均匀地撒在育苗盘上，覆盖一层薄土，覆地膜保湿，夏季需遮阴。育苗期间保持温度在20℃～30℃，当辣椒苗长出6片～10片真叶时，在接种室接种病原菌进行抗病性鉴定。

4.6 接种室与鉴定室设置

4.6.1 接种室设置

接种室又称无菌室，是分离和移接菌种的小房间，应包括接种间和缓冲间。接种室的地板、墙壁、天花板要平整光滑，以便擦洗消毒。门窗应密闭，关闭后应与外界隔绝空气流通，房间应设有工作台，

以便放置酒精灯、常用接种工具，工作台上方和缓冲间天花板上应安装能任意升降的紫外线杀菌灯和日光灯。

4.6.2 鉴定室设置

人工接种室内应具备人工调节温度、湿度及稳定的光照条件；亦可使用恒温光照箱，温度设定25℃～27℃，光暗交替12 h，光照6000 Lx，内部空间保持相对湿度90%～100%。

5 接种

5.1 接种期

抗性鉴定接种期为6片～10片真叶期。

5.2 接种浓度

接种用病原物菌悬浮液浓度为3×10^6 cfu/mL。

5.3 接种方法

通常采用喷雾接种法或涂抹法。

——喷雾接种法：用小型手持喷雾器将准备好接种的病原物菌悬浮液均匀地喷雾到每片叶片的正反面，以不流水滴为宜。

——涂抹接种法：用毛笔蘸取接种用病原物菌悬浮液涂抹于叶片正反面，以不流水滴为宜。

5.4 接种后管理

接种后将植株置于鉴定室或恒温保藏箱内，温度设定25℃～27℃，光暗交替12 h，光照6000 Lx，覆盖塑料薄膜保湿，湿度保持90%～100%。

6 调查

6.1 调查时间

病情调查于接种后20 d～25 d进行，对发病情况进行调查并记录。

6.2 调查方法与病指计算

根据病害分级标准，逐份调查植株叶片发病情况，记载接种的调查总叶数、各病情级别的叶片数、病情级别，计算出病情指数（*DI*）。

病情指数（*DI*）按下列公式计算：

$$DI = \frac{\sum（s \times n）}{} \times 100$$

$$S \times N$$

式中：

DI—病情指数；

s—各级代表值；

n—各级叶片数；

S—发病最高代表值；

N—调查总叶数。

6.3 病情分级

病情分级及其对应的症状描述见表1。

表 1 辣椒细菌性斑点病鉴定病情级别划分指标

病情级别	病害症状描述
0	全叶无病斑
1	病斑占叶面积的5%以下
2	病斑占叶面积的6%～10%
3	病斑占叶面积的11%～25%
4	病斑占叶面积26%～50%
5	病斑占叶面积的51%以上

7 抗病性评价

7.1 鉴定有效性判别

当感病对照材料达到感病程度（S级）时，该批次材料抗细菌性斑点病鉴定视为有效（表2）。

7.2 评价标准

依据鉴定材料的病情指数确定其抗性水平，划分标准见表2。

表 2 辣椒细菌性斑点病抗病性划分指标

病情指数（*DI*）	抗病性评价
$DI=0$	免疫 Immune（I）
$0<DI<15$	抗病 Resistant（R）
$15\leq DI<30$	中抗 Moderately resistant（MR）
$30\leq DI<40$	感病 Susceptible（S）
$40\leq DI\leq 100$	高感 Highly susceptible（HS）

7.3 鉴定记载表格

辣椒细菌性斑点病抗病性鉴定结果记载表格见图 1。

表 辣椒细菌性斑点病抗病性鉴定结果记载表

编号	品种名称	来源	病情级别						平均病指	抗性评价
			0级	1级	2级	3级	4级	5级		
播种日期：					接种日期：					
接种生育期：					接种病原菌分离物编号：					
调查日期：										
[a]鉴定技术负责人（签字）：										

图1 辣椒细菌性斑点病抗病性鉴定结果记载表样式图

附　录　A
（资料性）
辣椒细菌性斑点病

A.1　病名和症状描述

A.1.1　病名

辣椒细菌性斑点病 Bacterial spot disease of pepper，又称细菌性疮痂病。

A.1.2　田间症状

细菌性斑点病主要侵染辣椒、番茄及其他多种茄科作物，幼苗、叶、茎和果实均能发病，但以叶片发病较为普遍。危害叶片时病斑周围有黄色晕圈，最初产生水渍斑，黄绿色，病斑逐渐扩大后病斑呈圆形或不规则形，边缘暗褐色，稍隆起，中央色淡，稍凹陷，表面粗糙如疮痂状，病斑还可连成大型不规则斑块，严重时叶尖和叶缘变黄干枯、破裂、穿孔、落叶。后期可造成叶片穿孔，易脱落。

图A.1 辣椒细菌性斑点病田间症状

A.2　病原菌学名和形态描述

A.2.1　病原菌

该病害病原主要为野油菜黄单胞菌疮痂致病变种[(*Xanthomonas campestris* pv.*vesicatoria* (Doidge)Dye]。

A.2.2　形态描述

该病菌菌体杆状，单生，革兰氏染色阴性，单鞭毛，生长最适温度为25℃～30℃。在 NA 培养基上菌落呈黄色，菌体粘稠、凸起、有光泽、不透明、边缘整齐。

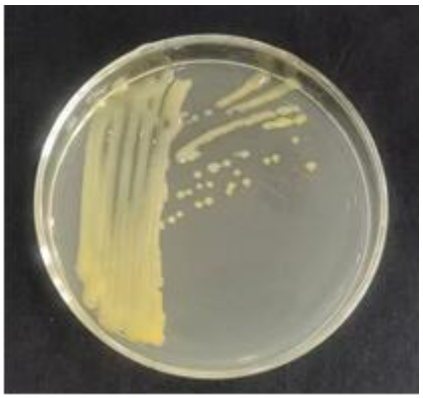

图 A.2 辣椒细菌性斑点病病菌菌落形态（NA 培养基）

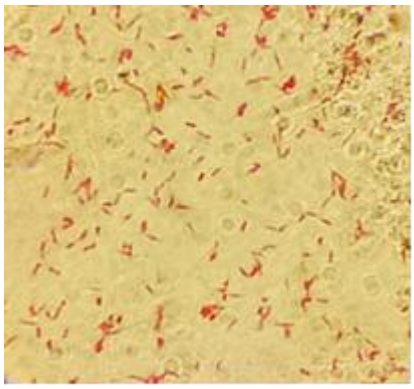

图 A.3 辣椒细菌性斑点病病菌革兰氏染色及菌体形态（1000×）