



中华人民共和国国家标准

GB/T 18085—2000

植物检疫 小麦矮化腥黑穗病菌检疫鉴定方法

Plant quarantine—Methods for inspection and identification
of *Tilletia controversa* Kühn

2000-04-26 发布

2000-10-01 实施

国家质量技术监督局 发布

前 言

小麦矮化腥黑穗病菌(*Tilletia controversa* Kühn)是我国进境植物检疫危险性病害。为了防止该植物病原菌随小麦、大麦、黑麦和其他寄主植物种子传入我国,在进境植物检疫时,需正确掌握小麦矮化腥黑穗病菌的检疫和鉴定方法。

本标准在制定过程中,总结了多年植物检疫的实践经验,吸收了国际和国内的最新研究成果,根据小麦矮化腥黑穗病菌的形态学特征、自发荧光显微学特征和萌发生理学特征,确定了检疫和鉴定小麦矮化腥黑穗病菌的各项技术要求。

本标准的附录 A 是标准的附录。

本标准由农业部提出。

本标准负责起草单位:中华人民共和国大连出入境检验检疫局。

本标准参加起草单位:中华人民共和国国家出入境检验检疫局、中华人民共和国上海出入境检验检疫局。

本标准起草人:彭金火、章正、周国梁、毛志农、黄冠胜。

中华人民共和国国家标准

植物检疫

小麦矮化腥黑穗病菌检疫鉴定方法

GB/T 18085—2000

Plant quarantine—Methods for inspection and identification
of *Tilletia controversa* Kühn

1 范围

本标准规定了进境植物检疫中小麦矮化腥黑穗病菌的检疫和鉴定方法。
本标准适用于进口小麦、大麦和黑麦中小麦矮化腥黑穗病菌的检疫和鉴定。

2 定义

本标准采用下列定义。

2.1 样品 sample

2.1.1 原始样品 original sample

在现场各点扦取的样品。每份原始样品的质量应不少于 50 g。

2.1.2 复合样品 composite sample

未经充分混匀的原始样品的总和。每份复合样品的质量应不少于 1 500 g。

2.1.3 平均样品 average sample

复合样品经充分混合均匀后的样品。

2.1.4 试验样品 test sample

从平均样品中称取的、用于洗涤离心的样品。每份试验样品的质量为 50 g。

2.1.5 保存样品 keep sample

取走试验样品后用来保存以备复检和仲裁的剩余平均样品。保存样品的质量应不少于 1 000 g。

2.2 网脊高度值 reticulum height

冬孢子外胞壁的垂直高度值,在光学显微镜下表现为冬孢子外胞壁的刺状或齿状突起的垂直高度值。

2.3 临界网脊高度指数值 threshold of reticulum height

用来确定单个冬孢子属性的网脊高度值,其数值为 0.95 μm 。

3 原理

小麦矮化腥黑穗病菌是危害麦类作物的一种担子菌,属担子菌亚门(Basidiomycotina),冬孢菌纲(Teliomycetes),黑粉菌目(Ustilaginales),腥黑粉菌科(Tilletiaceae),腥黑粉菌属(*Tilletia*)。病原菌在麦类作物苗期形成系统侵染。被侵染作物结实时,籽粒被病菌的繁殖体——冬孢子侵占,成为菌瘿。该病原菌的冬孢子形态学特征、自发荧光显微学特征和萌发生理学特征与其他腥黑粉病菌不同,是鉴定该病原菌的依据。

3.1 冬孢子形态特征

3.1.1 冬孢子

小麦矮化腥黑穗病菌的冬孢子呈球形、椭圆形或不规则形,具网状饰纹和无色到淡色的胶质鞘,直径(含胶质鞘)为 $16.80\ \mu\text{m}\sim 32.19\ \mu\text{m}$,通常为 $18\ \mu\text{m}\sim 24\ \mu\text{m}$;冬孢子萌发适宜温度为 $2\text{C}\sim 8\text{C}$,萌发时形成先菌丝(担子),在其顶端产生初生小孢子(担孢子),初生小孢子经“H”形交配后产生新月形次生小孢子。

3.1.2 网脊高度值

该特征是小麦矮化腥黑穗病菌和其近似种——小麦网腥黑穗病菌(*Tilletia caries* Tul.)冬孢子最重要的区别特征,前者的网脊高度值(平均值 \pm 标准差)为 $1.43\ \mu\text{m}\pm 0.14\ \mu\text{m}$,后者为 $0.53\ \mu\text{m}\pm 0.19\ \mu\text{m}$ 。

3.1.3 临界网脊高度指数值

当某个冬孢子的网脊高度值大于 $0.95\ \mu\text{m}$ 时,视为小麦矮化腥黑穗病菌冬孢子,小于或等于 $0.95\ \mu\text{m}$ 时,视为小麦网腥黑穗病菌冬孢子。

3.2 冬孢子自发荧光显微学特征

在激发滤光片 $485\ \text{nm}$ 、屏障滤光片 $520\ \text{nm}$ 的激发下,小麦矮化腥黑穗病菌冬孢子在 $3\ \text{min}$ 内可产生自发荧光,其近似种小麦网腥黑穗病菌则不具备该能力。

3.3 冬孢子萌发

小麦矮化腥黑穗病菌冬孢子在 5C 萌发、 17C 不能萌发,而小麦网腥黑穗病菌冬孢子在 5C 和 17C 均可萌发。

4 仪器设备

- 4.1 万能显微镜:具落射汞灯装置、摄像转换器及监视器。
- 4.2 滤光片组: $450\sim 490\ \text{nm}$ 激发, $520\ \text{nm}$ 屏障。
- 4.3 目镜和镜台测微尺。
- 4.4 往复式振荡器。
- 4.5 低速离心机。
- 4.6 干热灭菌器。
- 4.7 高压灭菌器。
- 4.8 普通天平:感量 $1/100$ 。
- 4.9 超净工作台。
- 4.10 生物培养箱:具光照,低温可调至 5C 。
- 4.11 可调微量加样器: $5\ \mu\text{L}\sim 200\ \mu\text{L}$ 。
- 4.12 三角烧瓶: $250\ \text{mL}$ 。
- 4.13 刻度离心管: $10\ \text{mL}$ 或 $20\ \text{mL}$ 。
- 4.14 培养皿:直径 $9\ \text{cm}$ 。
- 4.15 载玻片:长 \times 宽为 $25.4\ \text{mm}\times 76.2\ \text{mm}$,厚 $0.8\ \text{mm}$ 。
- 4.16 盖玻片: $18\ \text{mm}\times 18\ \text{mm}$ 。
- 4.17 孔筛:长孔筛直径 $20\ \text{cm}$,孔径 $1.7\ \text{mm}\times 20\ \text{mm}$;圆孔筛直径 $20\ \text{cm}$,孔径 $2.5\ \text{mm}$ 。
- 4.18 Parafilm 膜或铝铂纸。

5 药品

除非另作说明,以下药品的纯度均为化学纯。

- 5.1 次氯酸钠溶液或漂白粉精片。
- 5.2 吐温-20(Tween-20)。

5.3 席尔氏浮载剂,也可由下述药品配制(见附录A)。

5.3.1 乙酸钾(CH_3COOK)。

5.3.2 甘油[$\text{CH}_2(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2(\text{OH})$]。

5.3.3 乙醇($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)。

5.3.4 柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)。

5.3.5 甲醇(CH_3OH)。

5.3.6 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)。

5.4 青霉素、链霉素(医用注射粉剂)。

5.5 琼脂粉。

5.6 无荧光显微镜物镜头油($\text{Nd}=1.516$)。

5.7 永久封片剂。

6 现场检疫

6.1 船运散装货物的原始样品的扦取和复合样品的制备

船运散装小麦、大麦、黑麦和其他小麦矮化腥黑穗病菌的寄主植物籽粒分舱别、分层次、分品种、分等级按棋盘式选30点~50点扦取原始样品并制成复合样品。必要时,取样点可增至90个,复合样品的质量可增至4500g。使用一次性塑料袋盛放样品。

以其他方式进口的小麦、大麦、黑麦和其他小麦矮化腥黑穗病菌的寄主植物籽粒(含种质资源)以车、车皮或其包装为单位,扦取1份复合样品。其余按照本标准执行。

6.1.1 第一次取样

卸货前在表层进行。

6.1.2 卸货期间取样

每1000t货物扦取、制备一份复合样品。

6.1.3 样品登记

扦取的样品必须登记。登记项目包括船名、发货港、原产地、品种及等级、舱别和层次、扦样时间、样品编号、扦样员姓名等。

6.2 菌瘿检查

在虫害和杂草检验时同时进行。

6.2.1 获取筛下物

在扦取原始样品的同时,每点至少另取2000g样品至孔筛进行筛检。每筛旋转(10~20)次,弃筛上物,留筛下物。

6.2.2 挑取菌瘿

仔细检查筛下物中有无可疑菌瘿碎块。如有,编号装管,带回实验室制片镜检。必要时,将筛下物携回实验室作进一步检查。

7 实验室检验

7.1 制备平均样品

在样品预处理室内将按6.1条获取的各个复合样品在原扦样袋中分别充分混匀,制成平均样品。

7.2 样品检验

7.2.1 称样

按7.1条制成的各平均样品中称取50g作为试验样品。

7.2.2 洗涤和离心。

7.2.2.1 加水

将试验样品倒入经干热灭菌(165℃, 1.5 h)后的 250 mL 三角烧瓶内, 加蒸馏水 100 mL, 再加表面活性剂吐温-20 1~2 滴。

7.2.2.2 封口

用铝铂纸或 Parafilm 膜将三角烧瓶封口。

7.2.2.3 振荡洗涤

将三角烧瓶放在往复振荡器上振荡洗涤 5 min。

7.2.2.4 离心

立即取下三角烧瓶, 将洗涤悬浮液注入经干热灭菌的 10 mL~20 mL 刻度离心管内, 1 000 r/min 离心 3 min。

7.2.2.5 混合离心

取出离心管, 倾去上清液, 再加剩余洗涤悬浮液, 混合离心, 直至所有洗涤悬浮液离心完毕, 留沉淀物。

7.2.3 定溶

在沉淀物中加入席尔氏浮载剂使之悬浮, 视沉淀物多少定溶至 1 mL~3 mL。

7.2.4 制片

用可微量加样器吸取 5 μ L~20 μ L 沉淀物悬浮液至载玻片上, 加盖玻片。制片用沉淀物悬浮液的体积以加盖玻片后悬浮液不外溢为宜。

7.2.5 镜检

每份试验样品的沉淀物悬浮液至少镜检 5 张玻片, 每片按视野依次全部检查。

7.2.6 测量

如发现可疑小麦矮化腥黑穗病菌冬孢子, 随机测量 30 个成熟冬孢子的网脊高度值。测量应在油镜(100 \times)下进行(见 8.1 条)。如测量 5 张玻片后仍不足 30 个冬孢子, 增加玻片检查数量, 直至所有沉淀物悬浮液用毕。

7.3 菌瘿检查

如发现腥黑粉菌菌瘿, 刮取少许冬孢子粉加适量席尔氏液镜检, 作初步鉴定。如怀疑是小麦矮化腥黑穗病菌, 按 7.2.6 条对冬孢子进行测量。鉴定方法见第 8 章, 结果评定见 9.3 条。

8 鉴定方法

8.1 冬孢子形态学鉴定方法(见 3.1 条和 7.2.6 条)

通过油镜在监视器屏幕上(或用目镜测微尺)对每个冬孢子按上下左右随机地测量 4 个网脊高度, 并求出平均网脊高度值, 用该平均网脊高度值代表该冬孢子的网脊高度值进行鉴定。

如发现菌瘿, 还需求出随机测量的 30 个成熟冬孢子的平均网脊高度值。

8.2 冬孢子自发荧光显微学鉴定方法(见 3.2)

发现菌瘿时使用本方法。

8.2.1 制片

从菌瘿上刮取少许冬孢子粉至洁净的载玻片上, 加适量蒸馏水制成冬孢子悬浮液(浓度以 10 \times 100 倍下每视野不超过 40 个冬孢子为宜), 置于防尘处任其自然干燥。然后在干燥并附着于载玻片的冬孢子上加一滴无荧光显微镜物镜镜头油, 加盖玻片, 再加上镜头油。

8.2.2 选择滤光片组

将制好的玻片置于激发滤光片 485 nm, 屏障滤光片 520 nm 的落射荧光万能显微镜上。

8.2.3 计时和计数

确定观察视野, 同时开始计时。每视野照射 2.5 min 后开始检查视野中呈自发荧光正反应和负反应的冬孢子数。全过程不得超过 3 min。

8.2.4 计算自发荧光百分率

每份菌瘿样品至少观察5个视野、200个冬孢子,然后计算呈自发荧光正反应冬孢子的百分率,以该百分率代表该菌瘿的自发荧光率进行鉴定。

8.3 冬孢子萌发生理学鉴定方法

当发现菌瘿,但形态学和自发荧光显微学均不能正确鉴定时,可根据这两种腥黑穗病菌冬孢子在5℃、17℃温度下不同的萌发特性作鉴定。

8.3.1 制平板

3%的水琼脂经常规高压湿热灭菌后冷却至50℃左右,倒入直径9cm的培养皿内,每皿20mL。制平板时需防止形成表面流动水。

8.3.2 涂平板

取部分菌瘿加适量灭菌蒸馏水制成冬孢子悬浮液,均匀地涂在水琼脂平板上。冬孢子悬浮液的浓度以低倍(10×10)下每视野40个~60个冬孢子为宜。

8.3.3 培养

将涂有冬孢子的平板置于5℃±1℃和17℃±1℃、有连续(或与12h黑暗交替)光照的条件下进行培养。

8.3.4 观察和观察时间

在显微镜(10×10)下观察冬孢子的萌发。第1次观察可在培养10天时进行,以后每隔3天~7天观察一次,记录萌发情况并计算萌发率。

9 结果评定

9.1 未发现菌瘿

9.1.1 未发现网脊高度值大于临界网脊高度指数值(0.95 μm)的冬孢子,视为不带小麦矮化腥黑穗病菌。

9.1.2 在该货物的任一试验样品的沉淀物悬浮液中,随机测量的30个成熟冬孢子中有网脊高度值大于临界网脊高度指数值的可疑小麦矮化腥黑穗病菌冬孢子时,应进一步检查。

9.2 发现菌瘿

9.2.1 菌瘿的30个成熟冬孢子的网脊高度平均值大于或等于1.43 μm时,菌瘿定为小麦矮化腥黑穗病菌。

9.2.2 菌瘿的30个成熟冬孢子的平均网脊高度值小于或等于0.70 μm时,菌瘿不是小麦矮化腥黑穗病菌。

9.2.3 菌瘿的30个成熟冬孢子的网脊高度平均值为0.71 μm~1.42 μm:

9.2.3.1 菌瘿冬孢子自发荧光率大于或等于80%时,菌瘿定为小麦矮化腥黑穗病菌。

9.2.3.2 菌瘿冬孢子自发荧光率小于或等于30%时,菌瘿不是小麦矮化腥黑穗病菌。

9.2.3.3 菌瘿冬孢子自发荧光率为31%~79%:

9.2.3.3.1 5℃下萌发,17℃下不萌发,菌瘿定为小麦矮化腥黑穗病菌。

9.2.3.3.2 5℃和17℃下均可萌发,菌瘿不是小麦矮化腥黑穗病菌。

10 样品的保存

保存样品应按舱别、层次、品种、等级分别存放。保存样品经登记和经手人签字后置低温干燥、防虫防鼠处妥善保存2个月。如发现小麦矮化腥黑穗病菌,该样品至少需保存6个月,以备复验、谈判和仲裁。保存期满后,需经灭菌处理。

附录 A

(标准的附录)

席尔氏浮载剂的配制方法

A1 麦克凡氏缓冲液

A1.1 配制 0.1 mol/L 的柠檬酸溶液

称取 19.21 g 无水柠檬酸溶于 500 mL 蒸馏水中,加甲醇至 1 000 mL。甲醇可用蒸馏水代替。

A1.2 配制 0.2 mol/L 的磷酸氢二钠溶液

称取 28.40 g 无水磷酸氢二钠溶于 500 mL 蒸馏水中,加甲醇至 1 000 mL。甲醇可用蒸馏水代替。

A1.3 混合

取 0.1 mol/L 的柠檬酸溶液 5.5 mL 和 0.2 mol/L 的磷酸氢二钠溶液 194.5 mL 混合,即可得 pH 为 8 的麦克凡氏缓冲液。

A2 席尔氏浮载剂的配制

称取 6 g 无水乙酸钾溶于 300 mL 麦克凡氏缓冲液中,加甘油 120 mL 和乙醇 180 mL 混匀,即成席尔氏浮载剂。
