

ICS 65.020
B 16



中华人民共和国国家标准

GB/T 18085—2000

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

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

*

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045
电话:68522112

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售
版权专有 不得翻印

*

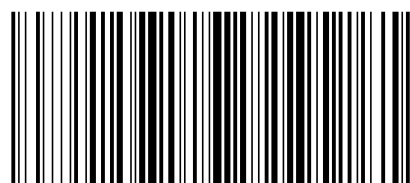
开本 880×1230 1/16 印张 3/4 字数 12 千字
2000年9月第一版 2000年9月第一次印刷
印数 1—1 000

*

书号: 155066·1-16950 定价 10.00 元

*

标目 418—34



GB/T 18085—2000

2000-04-26 发布

2000-10-01 实施

国家质量技术监督局 发布

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。

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。

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 震荡洗涤

将三角烧瓶放在往复式震荡器上震荡洗涤 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

用可调微量加样器吸取 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,再加上上述镜头油。

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。

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 μ m。

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

国家质量技术监督局 2000-04-26 批准

2000-10-01 实施