



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3749—2013

麦类条斑病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Cephalosporium gramineum* Nisikado & Ikata

2013-11-06 发布

2014-06-01 实施

中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国天津出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：廖芳、郭京泽、崔铁军、罗加凤、刘跃庭、刘鹏、黄国明。

麦类条斑病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了麦类条斑病菌的检疫鉴定方法。

本标准适用于冬小麦、大麦、黑麦等寄主的种子、病残体及随种子携带土壤的麦类条斑病菌的检疫。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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。

SN/T 2088 进境小麦、大麦检验检疫操作规程

SN/T 2122 进出境植物及植物产品检疫抽样

3 病菌基本信息

中文名:麦类条斑病菌

英文名:cephalosporium stripe

学名:*Hymenula cerealis* Ellis & Everh.

无性世代学名:*Cephalosporium gramineum* Nisikado & Ikata

无性世代异名:*Cephalosporium acremonium* Corda

分类地位:麦类条斑病菌属真菌界(Fungi),有丝分裂孢子真菌(Mitosporic fungi),丝孢纲(Hyphomycetes),丛梗孢目(Moniliales),瘤座孢科(Tuberculariaceae)、盘瘤座霉属(*Hymenula*)。无性态属于有丝分裂孢子真菌(Mitosporic fungi),丝孢纲(Hyphomycetes),丛梗孢目(Moniliales),丛梗孢科(Moniliaceae),头孢霉属(*Cephalosporium*)。

传播途径:该真菌主要通过冬小麦、大麦、黑麦等寄主植物种子及种子携带的土壤传播。

麦类条斑病菌的其他信息参见附录 A。

4 方法原理

麦类条斑病菌菌落、分生孢子梗、分生孢子的形态特征、培养性状等特征是其鉴定的依据。

5 仪器及用具

5.1 仪器

体视显微镜、光学显微镜(带显微照相装置)、天平(感量 0.1 g)、生物安全柜、光照培养箱等。

5.2 用具

滤纸、烧杯、培养皿、三角瓶、镊子、载玻片、盖玻片、量筒、酒精灯、吸管、接种针等。

6 主要试剂和培养基

6.1 主要试剂

琼脂、葡萄糖、玉米粉、无菌水、1%次氯酸钠(NaClO)、95%乙醇、25%的乳酸、氯硝胺、甲基立枯磷、三苯基氢氧化锡(又称毒菌锡)等。

6.2 培养基

酸化玉米粉琼脂培养基(acidified corn meal agar, ACMA), 配制见附录 B。

麦类条斑病菌半选择培养基(*Cephalosporium gramineum* semi-selective medium, CGSM), 配制见附录 B。

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar medium, PDA), 配制见附录 B。

7 现场检验

按照 SN/T 2088 和 SN/T 2122 规定进行取样, 结合症状检查留意粮谷或种子携带的植株病残体及土块并带回实验室进一步分离。

8 病菌鉴定

8.1 病原菌的分离培养

8.1.1 土壤中病菌的分离

称取 15 g~25 g 土壤与 100 mL 无菌水混合 15 min, 静置后用吸管将悬浮液滴于麦类条斑病菌的半选择培养基(CGSM)培养皿上, 置于生物培养箱中 15 °C 黑暗下培养, 10 d~12 d 后观察是否出现菌落。并转接到 PDA 培养基上纯化。

8.1.2 种子中病菌的分离及纯化

挑选干瘪的种子和病残体, 将种子和病残体置于 95%的乙醇进行表面消毒 2 min, 灭菌滤纸吸干, 用有效成分为 1%的次氯酸钠(NaClO)溶液表面灭菌 2 min, 灭菌水洗涤 3 次, 置于培养皿中灭菌滤纸上室温(20 °C)24 h, 每皿约 10 粒种子, 然后 -20 °C 冰冻 20 h。将冰冻后的种子移至麦类条斑病菌半选择培养基(CGSM)上, 转至 15 °C 培养箱中黑暗下培养, 10 d~12 d 后观察是否出现疑似菌落。并转接到 PDA 培养基上纯化, 对纯化菌落的分生孢子在光学显微镜下进一步观察其特征。

9 鉴定特征

在 PDA 培养基上, 病原菌菌落湿润, 边缘不平滑, 大多埋生于基质中, 白色、灰色或者淡黄色, 由大量的分生孢子梗和分生孢子组成, 菌丝相对较少; 菌丝无色, 宽 1.5 μm ~4 μm (多为 2 μm), 有隔膜, 分枝, 老熟菌丝内含多个颗粒状物和液泡; 分生孢子梗从菌丝长出, 无色透明, 直立, 短小, (5 μm ~20 μm) \times (1.5 μm ~4 μm), 结构简单, 常埋生于基质中; 分生孢子单细胞, 无色, 由分生孢子梗的顶端产生, (5 μm ~11 μm) \times (1.5 μm ~3 μm), 椭圆形、长椭圆形或卵圆形, 分生孢子相继脱落, 由所分泌的胶状物质常常粘连在一起, 内多含有 2 个油滴, 1 个或 3 个较少见, 油滴分布于两端, 分生孢子两端圆形, 较少微尖, 常埋生于基质中, 分生孢子萌发时常膨胀, 有时能观察到隔膜, 一端或两端伸出萌发管, 很少

2 个萌发管均从一端伸出,萌发管宽($1\ \mu\text{m}\sim 2\ \mu\text{m}$),尖端常常能观察到小的次生孢子。

10 结果判定

如分离物的培养性状及形态学特征与 9 描述的麦类条斑病菌培养性状和形态特征相吻合,即可判定为检出麦类条斑病菌(*Cephalosporium gramineum*);否则判定为未检出。

11 样品、菌种、实验记录的保存

11.1 样品保存

如发现麦类条斑病菌,该样品需保存 6 个月,以备复验、谈判和仲裁。期满后,需经灭菌处理方可丢弃。

11.2 菌种保存

将分离到的麦类条斑病菌菌种,转接在 PDA 斜面上培养,待菌丝体长满斜面后,置于 $4\ ^\circ\text{C}$ 下保存,并定期(180 d)转管,标注分离物来源、寄主、分离时间与鉴定人。

11.3 实验记录保存

妥善保存检验报告及实验原始记录,至少保存 2 年。

附录 A (资料性附录)

麦类条斑病菌的其他相关信息

A.1 分布

亚洲:日本、印度、朝鲜、菲律宾。

非洲:埃及、南非。

北美洲:加拿大、墨西哥、美国。

中美洲:多米尼加共和国。

欧洲:奥地利、丹麦、德国、意大利、荷兰、波兰、瑞典、苏格兰、英格兰。

中国无分布。

A.2 寄主

主要侵染冬小麦(*Triticum aestivum* L.)、大麦(*Hordeum vulgare* L.)、黑麦(*Secale cereal* L.)、燕麦(*Avena sativa* L.)、黑小麦(*Triticosecale*)等重要的经济作物,还能侵染禾本科草坪草和牧草,如鸭茅(*Dactylis glomerata* L.)、野燕麦(*Avena fatua* L.)、山地雀麦(*Bromus marginatus* Nees.)、无芒雀麦(*B. sterilis* L.)、粉绿披碱草(*Elymus glaucus* Buckl.)、偃麦草[*Agropyron repens* (L.) Beauv.]、大看麦娘(*Alopecurus pratensis* L.)、大穗看麦娘(*A. myosuroides* Huds.)、粗茎早熟禾(*Poa trivialis* L.)、以及农业上具有经济重要性的多花黑麦草(*Lolium multiflorum* Lam.)和多年生黑麦草(*L. perenne* L.)。

A.3 症状

晚冬或早春感病麦苗叶片上出现镶嵌状黄色斑点,这种叶片常常在条斑形成前死亡。随着生长,叶片上出现明显的纵向褪绿条斑,条斑可能发散或呈斑驳,成熟叶片上表现为细长的黄色条纹,条纹中央为棕色线斑(坏死维管组织)。通常每片叶上有1~3个条纹,条纹会延伸至叶鞘和茎,棕色线斑会延续到叶鞘。感病植株节比正常植株颜色更深,纵向切开,可观察到节组织内部呈棕色。感病植株发育迟缓,梢部白色不育,即使能产生种子,通常也是干瘪。气候炎热加剧水分胁迫时,感病植株会出现烧灼症状。

A.4 生物学特性

麦类条斑病菌是一种侵染小麦维管系统的病原真菌,阻止小麦通过维管系统输送水分和营养,分蘖在成熟前死亡或使穗上籽粒皱缩、数量减少,可造成小麦50%~80%的减产。麦类条斑病菌生活史有寄生和腐生两个阶段。夏天麦类条斑病菌在麦秸上腐生时能在分生孢子座上产生小分生孢子,秋天和冬天,植物的春化作用或土壤中昆虫的叮咬损伤植物根部,小分生孢子作为初始侵染源从根部伤口入侵小麦维管系统,通过维管蔓延至全株,春天和夏天能观察到条斑。夏天该病菌在病残体中腐生,可在未腐烂的麦秆中存活3年以上,并能在潮湿环境下大量产孢,通过雨水传播。麦类条斑病菌适于在低洼湿润的偏酸性土壤生存,不具有微菌核和厚垣孢子等结构,分生孢子形成的温度范围为10℃~22℃,最适温度为15℃,分生孢子梗无色,细长,(5 μm~20 μm)×(1.5 μm~4 μm),分生孢子单细胞无色,由菌丝或分生孢子梗的顶端产生,(5 μm~11 μm)×(1.5 μm~3 μm),椭圆形、长椭圆形或卵圆形。

附 录 B
(规范性附录)
培养基的配制

B.1 酸化玉米粉琼脂培养基(acidified corn meal agar, ACMA)

B.1.1 成分

玉米粉 200 g, 琼脂 20 g, 25% 的乳酸 1.25 mL, 水 1 000 mL。

B.1.2 制法

称取 200 g 玉米粉及琼脂 20 g, 加灭菌水 1 000 mL, 混合均匀, 然后进行高压灭菌(121 ℃, 15 min), 待冷却至 48 ℃ 时, 加入 25% 的乳酸(lactic acid) 1.25 mL, 混匀。

B.2 麦类条斑病菌半选择培养基(*Cephalosporium gramineum* semi-selective medium, CGSM)

B.2.1 成分

1 000 mL 玉米粉琼脂培养基, 25% 的乳酸(lactic acid) 1.25 mL, 氯硝胺(dicloran) 0.5 mg, 甲基立枯磷(tolclofos-methyl) 1.0 mg, 三苯基氢氧化锡(毒菌锡, triphenyltin hydroxide) 0.5 mg。

B.2.2 制法

将玉米粉琼脂(CMA) 121 ℃ 处理 15 min。然后冷却至 48 ℃ 时, 加入 1.25 mL 25% 的乳酸(lactic acid) (调节 pH 值至 4.0)、0.5 mg 氯硝胺(dicloran)、1.0 mg 甲基立枯磷(tolclofos-methyl)、0.5 mg 三苯基氢氧化锡(毒菌锡, triphenyltin hydroxide), 充分溶解。

B.3 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar medium, PDA)

B.3.1 成分

马铃薯(去皮切块) 300 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL。

B.3.2 制法

将马铃薯去皮切块, 加 1 000 mL 蒸馏水, 煮沸 10 min~20 min。用纱布过滤, 补加蒸馏水至 1 000 mL。加入葡萄糖和琼脂, 加热溶化, 分装, 121 ℃ 高压灭菌 20 min。

参 考 文 献

- [1] Bochs WW, Bowden RL, Hunger RM, Morrill WL, Murray TD, Smiley RW. Compendium of wheat diseases and pests (third edition). The American Phytopathological Society Press, USA, 2010: 23-26.
- [2] Bruehl GW, Lai P, Huisman O. Isolation of *Cephalosporium gramineum* from buried naturally infected host debris. *Phytopathology*, 1964, 54: 1035-1036.
- [3] Howell MJ and Burgess PA. *Cephalosporium gramineum* causing leaf stripe in grasses, and its sporodochial stage, *Hymenula cerealis*, on cereals and grasses. *Plant pathology*, 1969, 18: 67-70.
- [4] Johnston RH and Mathre DE. Effect of Infection by *Cephalosporium gramineum* on winter Wheat. *Crop Science*, 1972, 12(6): 817-819.
- [5] King JE. Relationship between yield loss and severity of yellow rust recorded on a large number of single stems of winter wheat. *Plant Pathology*, 1976, 25(4): 172-177.
- [6] Martyniuk S. Studies on *Cephalosporium* stripe disease of cereals. *Rozprawa Habilitacyjna* 1993, 5: 65.
- [7] Murray TD. Seed transmission of *Cephalosporium gramineum* in winter wheat. *Plant disease*, 2006, 90(6): 803-806.
- [8] Schotman CYL. Plant pests of quarantine importance to the Caribbean. *Rlac-Proveg*, 1989, 21: 80.
- [9] Wiese MV, Ravenscroft AV. Sporodochium development and conidium production in *Cephalosporium gramineum*. *Phytopathology*, 1978, 68: 395-401.
- [10] 华丽, 王定国, 黄挺等. 危害美国小麦的 3 种检疫性病原真菌. *植物检疫*, 2010, 24(1): 30-32.
-