

植物种传病害检测鉴定方法

厦门出入境检验检疫局技术中心 编译

封面设计 赵正刚

ISBN 978-7-109-13453-9



9 787109 134539 >

定价：90.00 元



植物种传病害检测鉴定方法

厦门出入境检验检疫局技术中心 编译

中国农业出版社

新华书店
PDG

图书在版编目(CIP)数据

植物种传病害检测鉴定方法/厦门出入境检验检疫局
技术中心编译. —北京: 中国农业出版社, 2009. 3
ISBN 978-7-109-13453-9

I. 植… II. 厦… III. ①种子病—植物病害—检测②种
子病—植物病害—鉴定 IV. S432.9

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 029219 号

中国农业出版社出版
(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)
(邮政编码 100125)
责任编辑 钟海梅

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行
2009 年 3 月第 1 版 2009 年 3 月北京第 1 次印刷

开本: 889mm×1194mm 1/16 印张: 12
字数: 300 千字 印数: 1~1 000 册
定价: 90.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)



参加编译人员

□□□□□□□□

本书编译工作主要由厦门出入境检验检疫局技术中心植物检疫实验室（国家级“蔬菜种子与植物种传病毒检疫重点实验室”）和植检处的部分同志编译，林石明负责总翻译和校对。参加本书编译的其他人员完成了部分翻译和校对工作：翻译部分：廖富荣（11，12，14，PepMV，TRSV），余芳平（辣椒与番茄上的TMV），陈青（16，莴苣种子上的LMV），方志鹏（1a），俞刚（15，Aac），王宏毅（辣椒与番茄上的Xav），陈红运（37~41）；校对部分：廖富荣（11，12，14，15，ES，LMV和部分细菌和病毒，37~41），黄蓬英（菜豆上的Psp），方志鹏（Dib，Pev），高泉准（19，菜豆上的Psp），余芳平（部分病毒）。海南出入境检验检疫局技术中心的李伟东校对了部分病毒的翻译稿。





植物繁殖材料检疫是植物检疫的重要工作。植物繁殖材料大致可以分为种子和苗木两大类。由于种子的含水量一般都比较低，与其他的植物组织器官（叶、芽、穗等）或植物残体不同。在苗木等繁殖材料或组织中存活的植物病原物，不一定能够通过种子传播。由于种子与苗木所携带的有害生物是不同的，其检测方法也有较大的差别。植物种子的检疫很大程度上就是植物病害的检疫。

厦门出入境检验检疫局技术中心的植物检疫实验室是国家质量监督检验检疫总局规划的国家级“蔬菜种子与植物种传病毒检疫重点实验室”。该实验室十分注重跟踪、收集、研究、翻译消化国际上关于植物种传病害检测与鉴定方法国际标准，在进出境种子检疫，特别种传病毒检疫方面取得较好的成绩。

这次，他们将 40 余个国际标准翻译成中文，有助于国际标准在我国广大植物检疫实验室，以及种子检验实验室，特别是种传病害检验的应用和发展，提高种传病害的检测水平和检出率。

陈洪俊

二〇〇九年二月

前言

在实验室,种传病害的检疫工作可以分为检测和鉴定两个阶段。在检测阶段,依据标准,采取各种检测方法(如挑拣、过筛、解剖、浸泡、洗涤、染色、分离培养,及血清学或分子生物学方法),将样品中的植物有害生物检测出来。如果检测阶段没有检出任何有害生物,则检测过程就此中止;如果检出可疑的有害生物,则根据有害生物的鉴定方法标准,采用一种或多种鉴定方法(如形态学、致病性、寄主范围、血清学、分子生物学、生物学或生理生化等特性或特征),对所检出的有害生物进行鉴定,复核。如果实验室也进行隔离检疫的工作,其实也是有害生物的检测与鉴定的过程。

在本文中所指的种子包括植物学概念的真种子和作为繁殖植物用的果实。即,由植物的母株花器发育而来的,经过雌雄配子的有性结合所产生的真种子和作为繁殖植物用的果实(如颖果、假果和瘦果等),但是不包括农业生产概念的“种子”,如营养器官的块根、块茎、鳞茎和地下或地上茎。植物繁殖材料(Plant propagating materials),或称为植物种苗、种植用植物(Plants for planting)等,是指活的植物和植株的部分,包括种子、鳞茎和块茎等无性繁殖材料(整棵植株或部分植株,如切枝芽条),以及已种植植物、盆栽植物(如盆景)。与苗木和其他的植物组织器官(叶、芽、穗等)不同,由于种子含水量一般都比较低等原因,种子所传带的有害生物种类不同,其数量和活性也存在较大的差异。

植物有害生物包括植物病原真菌、植物病原细菌、植物病毒和类病毒、寄生性植物(杂草)、节肢动物(昆虫)、软体动物(蜗牛)、扁形动物(蚯蚓)和原生动物等。据报道,种传病害为植物病原真菌、细菌、病毒(含类病毒)和线虫,还没有发现种子传播植原体、类细菌、类立克次氏体、螺旋体等植物病原微生物。

本书收集了植物种传病原真菌、细菌和病毒的41个检验鉴定方法的国际标准,其中真菌22个、细菌9个、病毒10个。这些标准中,第1~22是国际种子检验协会(International Seed Testing Association, ISTA)所出版(原编号为7:001a, 1b, 2a, 2b, ~20)、病害检验委员会方法验证分会(Plant Disease Committee, Method Validation Sub-committee)组织验证的《种子健康检验方法》。第22~35、41是国际种子联合会(International Seed Federal, ISF)的国际种子健康计划——蔬菜组(International Seed Health Initiative-Vegetables, ISHI-Veg)所验证的标准。ISHI-Veg的标准多数是已经正式出版,少数目前还正在进行审核之中,分为3个等级:1级为ISHI的标准方法。已通过ISHI的比对试验和同等评审,且为ISHI所接受;2级为复核后就ISHI-Veg接受的方法。已发表和/或者已分发,通常在制种业中用于检验种子健康。正在进行比对试验,或其中的某些方面可能会被限制使用或删除;3级为ISHI接收的方法,已发表

和/或者已分发，通常在制种业中用于检验种子健康。目前还没有进行比对试验。以及美国的《国家种子健康体系——种子健康检验手册》(National seed health system-Seed health testing manual, 第 36 号)和欧洲及地中海植物保护组织 (EPPO) 的《限定性有害生物检测诊断规程, Diagnostic Protocols for Regulated Pests》的检验方法标准 (第 37~40)。

这些标准多数经过多年的完善，在不同国家、不同实验室内通过多次比对试验的验证，经过大量的修订，吸收了一些现代的检测技术，比较严谨，系统性强，具有较强的可操作性，实用而简便。与国内的检验检疫行业标准或国家标准相比较，具有以下的特点：

1. 侧重有害生物的检测方法

目前国内的“有害生物检疫鉴定”标准 (检验检疫行业标准或国家标准) 多数缺少检测过程的规范，而侧重鉴定方法。在本书所收集的国际标准，多数对于更加注重归于：①检测数量：规定检测样品的最少数量；②样品的前处理：规定样品的处理方法，如有些种子是采用直接检测，有些需要萌发后检测，采取哪些方法进行萌发等；③各种检测方法的选择：规定所采用的培养基 (一种或多种，选择性和/或通用性) 等。有些标准还绘制检测鉴定过程的流程图，更加适用于我们在日常检测鉴定工作的应用。

2. 规范有害生物的鉴定方法的综合利用

在有害生物的鉴定方面，除非具有极为特征性的形状，一般重大危险性的植物有害生物的鉴定需要多项特性或特征才能够进行准确的鉴定。这些标准还规定了根据有害生物的形态学、致病性、寄主范围、血清学、分子生物学、生物学或生理生化等特性或特征，采用单独一项或多项特性或特征 (一种或多种方法) 进行鉴定的程序。

如前所述，有时无法将检测与鉴定过程截然分开，因为有些方法既是检测的方法也是鉴定的方法。但是，在具体有害生物的鉴定，可以规定哪个 (些) 初步鉴定的方法，哪个 (些) 方法为确认 (复核) 的方法。随着科学技术的发展，应该有越来越多的检测鉴定方法来补充。

3. 采用参照物质

在有害生物的鉴定过程中，需要标本 (如杂草、昆虫) 和参照物质 (Reference Material, Reference Culture)，如病原菌的致病性测定等生物学特征，进行比对试验，避免鉴定结果的主观性。实验室应该尽可能地收集，采购自权威机构的标本和参照物质。但是，目前国内实验室较难于收集到有用的参照物质 (特别是参照菌株)。影响了国际标准的采用。

将这些标准翻译成中文，有助于国际标准在我国广大植物检疫实验室，以及种子检验实验室，特别是种传病害检验的应用和发展，提高种传病害的检测水平和检出率。为了使用方便，本书还附上英文的对照，但是删除了其中的参考文献和插图，以及重复的部分。

本译文得到 ISTA 秘书处 Bettina Kahlert 博士的大力支持，并由其授权中文版本的

翻译和出版。

在此，对给予我们工作大力支持与帮助的领导和同事，一并表示衷心的感谢！

虽然经过多次的校对，但是由于水平有限，加之检测技术发展甚快，翻译的疏漏、不当或错误之处在所难免，恳请大家对方法所存在的问题提出宝贵的意见，以便汇总、修改。

编译者

二〇〇九年二月八日



目 录

序 前言

一、吸水纸法检测胡萝卜种子中胡萝卜链格孢 (<i>Alternaria dauci</i>)	1
二、麦芽汁琼脂法检测胡萝卜种子中胡萝卜链格孢 (<i>Alternaria dauci</i>)	4
三、吸水纸法检测胡萝卜种子中根链格孢 (<i>Alternaria radicina</i>)	7
四、麦芽汁琼脂法检测胡萝卜种子中根链格孢 (<i>Alternaria radicina</i>)	10
五、向日葵种子中灰葡萄孢 (<i>Botrytis cinerea</i>) 的检验方法	13
六、芸薹属种子中黑胫茎点霉 (<i>Phoma lingam</i>) 的检验方法	16
七、豌豆种子中豌豆壳二孢 (<i>Ascochyta pisi</i>) 的检验方法	19
八、菜豆种子中豆刺盘孢 (<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>) 的检验方法	23
九、麻种子中灰葡萄孢 (<i>Botrytis cinerea</i>) 的检验方法	26
十、云杉属种子中 <i>Caloscypha fulgens</i> 的检验方法	29
十一、松树种子中串珠镰刀菌亚黏变种 (<i>Fusarium moniliforme</i> var. <i>subglutinans</i>) 的 检验方法	32
十二、水稻种子中稻德氏蠕霉 (<i>Drechslera oryzae</i>) 的检验方法	36
十三、水稻种子中稻梨孢 (<i>Pyricularia oryzae</i>) 的检验方法	38
十四、水稻种子中帕氏链格孢 (<i>Alternaria padwickii</i>) 的检验方法	41
十五、大麦种子中散黑粉菌 (<i>Ustilago nuda</i>) 的检验方法	43
十六、小麦种子中颖枯壳针孢 (<i>Septoria nodorum</i>) 的检验方法	47
十七、免疫印迹法检测羊茅属和黑麦属种子中 <i>Neotyphodium</i> spp.	50
十八、酸性 PDA 法检测大豆种子中拟茎点霉 (<i>Phomopsis</i> spp.)	54
十九、麦芽汁琼脂法检测亚麻种子中亚麻生链格孢 (<i>Alternaria linicola</i>)	58
二十、麦芽汁琼脂法检测亚麻种子中亚麻炭疽菌 (<i>Colletotrichum lini</i>)	61
二十一、西瓜上泻根亚隔孢壳 (<i>Didymella bryoniae</i>) 的检验方法	64
二十二、野蒿苣上野苣霜霉 (<i>Peronospora valerianellae</i>) 的检验方法	65
二十三、芸薹属种子中野油菜黄单胞杆菌野油菜致病型 (<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>) 的检验鉴定方法	67
二十四、胡萝卜上天竺葵黄单胞杆菌胡萝卜致病型 (<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i>) 的检验鉴定方法	76
二十五、菜豆上萨氏假单胞菌菜豆生致病型 (<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>) 的 检验方法	88
二十六、菜豆上地毯草黄单胞杆菌菜豆致病型 (<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>) 的 检验方法	96
二十七、番茄密执安棒形菌密执安亚种 (<i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>michiganensis</i>) 的 检验方法	101

二十八、番茄上野油菜黄单胞杆菌辣椒斑点病致病型 (<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>) 的检验方法	106
二十九、辣椒上野油菜黄单胞杆菌辣椒斑点病致病型 (<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>) 的检验方法	110
三十、西瓜上燕麦嗜酸菌西瓜亚种 (<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>) 的检验方法	114
三十一、ELISA 方法检测玉米细菌性枯萎病菌 (<i>Erwinia stewartii</i>)	116
三十二、番茄中香瓜茄花叶病毒 (<i>Pepino mosaic virus</i>) 的检测方法	118
三十三、莴苣小苗中莴苣花叶病毒 (<i>Lettuce mosaic virus</i>) 的检测方法	126
三十四、莴苣种子中莴苣花叶病毒 (<i>Lettuce mosaic virus</i>) 的检测	131
三十五、辣椒中烟草花叶病毒属 (<i>Tobamoviruses</i>) 病毒的检测方法	135
三十六、番茄中烟草花叶病毒属 (<i>Tobamoviruses</i>) 病毒的检测方法	139
三十七、烟草环斑病毒 (<i>Tobacco ringspot virus</i>)	141
三十八、番茄环斑病毒 (<i>Tomato ringspot virus</i>)	147
三十九、番茄斑萎病毒 (<i>Tomato spotted wilt virus</i>), 凤仙花坏死斑点病毒 (<i>Impatiens necrotic spot virus</i>) 和西瓜银斑病毒 (<i>Watermelon silver mottle virus</i>)	155
四十、番茄黄曲叶病毒 (<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>) 和番茄斑驳病毒 (<i>Tomato mottle virus</i>)	168
四十一、豌豆中豌豆早枯病毒 (<i>Pea early-browning virus</i>) 和豌豆种传花叶病毒 (<i>Pea seed-borne mosaic virus</i>) 的检测	177

一、吸水纸法检测胡萝卜种子中胡萝卜链格孢 (*Alternaria dauci*)

(ISTA 标准: 7-001a; 2003 年 1 月 1 日起生效)

作物: 胡萝卜 (*Daucus carota*)

病原物: 胡萝卜链格孢菌 (*Alternaria dauci*)

标准起草人: Sheppard, J. W., Cockerell, V. and Roberts, S. J. (国际种子检验协会病害检验委员会方法验证分会)

标准起草单位: 国际种子检验协会病害检验委员会方法验证分会

修订记录: 版本 1.0, 完成于 2003 年 1 月 1 日

背景

本方法最早是 1964 年 11 月作为 ISTA《种子健康检验手册》第 4 号 S.3 手册, 而后 Gambogi 于 1987 年进行修订。2002 年编入《国际种子检验规程》第七章之附件“种子健康检验方法”, 标准号为 7-001 (Sheppard & Cockerell, 2002)。1999 年和 2001 年, 由国际种子健康计划——蔬菜组的 11 个实验室进行 6 个种子批的验证试验, 修改方法后改编号为 7-001a (Van Bilsen, 2003)。验证试验比较了吸水纸法和麦芽汁琼脂法, 认为这两个方法是等效的。注意到, 如果种子中存在 *Alternaria radicina*, 应用同样的方法 (见 7-002a) 也可以同时检出。

验证试验

由 Van Bilsen 于 2003 年所完成。发电子邮件 ista.office@ista.ch 或从 ISTA 秘书处可获得该复印件。

安全注意事项

确认检验人员熟悉所存在的危险, 并采取必要的安全防护措施。检验人员应该是在微生物实验室内进行, 并且熟悉《良好的实验室操作规范 (GLP)》和《良好的微生物操作规范 (GMP)》, 及其无菌操作等原理。正确处置废弃物 (如消毒、灭菌等), 并且遵守当地的健康、环境和安全之规章制度。

种子处理

处理过的种子可能影响检验结果, 本方法只适用在未经处理的种子。

试验材料

参考物质: 推荐采用参照菌株或其他适宜的物质作为参照。

基质: 直径为 9 cm, 不含微生物或抑制物的吸水纸或滤纸 (如瓦特曼 1 号或相似的, 每皿 3 张)。

培养皿: 9.0 cm 的无菌培养皿 (每培养皿 10 粒种子)。

培养箱：温度为 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，带定时器，光线接近紫外光（波长峰值在 360 nm）。

冰箱：温度为 $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

样品制备

1. 去除任何可能交叉污染的因素。用 70% 酒精擦洗或喷洒所有使用的器具，戴手套操作。

2. 依据“国际种子检验规程”之 7.4.1 所描述的方法（见以下附件）制备检验样品。

（附件—国际种子检验规程：根据测定方法，可以把整个送检样品或其中的一部分作为试验样品。所收到的送检样品，通常须减少为等于或大于供各项测定用规定的试样重量。首先将送检样品充分混合，用多次的对分法或随机抽提与组合小量成分的方法取得试验样品。

通常试验样品不得少于 400 粒净种子，或从送检样品中取得相当重量的种子。如果有必要，要设置一定数量种子的重复，则应从一个经充分混合的次级样品中随机数取种子。

检验方法（关键控制点用 CCP 表示）

1. 在每个培养皿中放 3 张 9.0cm 滤纸，并用无菌蒸馏水浸透。倒去多余的水。

2. 在无菌条件下，在每个培养皿的滤纸上均匀地摆放 10 粒种子。

3. 在 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 条件下，黑暗中培养 3 d。

4. 将培养皿转移到冰箱，在 $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。

5. 冰冻后，在 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 下，在 12h 黑暗和 12 h 近紫外光照的交替培养 6 d（ISTA, 1984; Tempe, 1968）。培养皿在光管下约 25cm 处，不要重叠。

6. 在 30 倍解剖镜下检查种子上真菌生长情况，在 80 倍以上的显微镜下鉴定分生孢子。分生孢子梗不分枝或偶有分枝（见图 1），单生或成小簇，生长于种子表面或气生菌丝体上。分生孢子通常单生，倒棍棒形，长达 $450\mu\text{m}$ （包括喙），初为淡橄榄褐色，成熟后变褐色，其灰色的长喙可以达孢子长度的 3 倍（Ellis, 1971）。通过集聚在一起发亮的长喙，有时可以见到深色的分生孢子团（原文为：Groups of sunken conidia are sometimes visible by the emerging clusters of their bright long beaks，见图 1，左下角）。记录每个培养皿中感染的种子数（CCP）。

通用方法（适用于多个检验步骤）

1. 检查容许差距。容许差距是评价每个检验或多个检验之间的结果差异是否显著，足以对结果的准确性产生怀疑的方法。适用于大多数种子健康的直接检验的“容许差距表”可以查阅《国际种子检验规程》

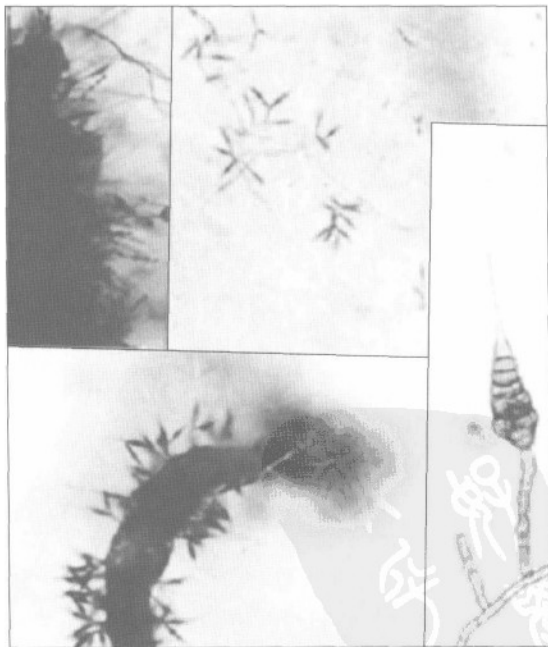


图 1 上：*Alternaria dauci* 单个分生孢子和腐生菌 *A. tenuis* 在种子表面的串生分生孢子（左）；从匍匐菌丝长出的 *A. dauci* 不分枝或少分枝的分生孢子梗（80×，右）；下：在刚长出须根上，不分枝或少分枝的分生孢子梗上的 *A. dauci* 的分生孢子（80×，左）；*Alternaria radicina* 没有分枝分生孢子梗和单个分生孢子（350×，右）

附件 16 之附表 5.1, 或《种子检验容许差距和精确度测定手册》之表 G1 (Miles, 1963)。

2. 结果报告。种子健康检验的结果应该注明所检查出的病原物学名和检验方法。出具 ISTA 的证书时, 结果填写在“其他测定”栏中。

阴性的检验结果 (没有检出病原物), 结果应该注明容许差距标准 (如 95% 概率的感染水平小于 1%)。容许差距标准根据所检验的种子数量 (n) 而定, 大约为 $3/n$ ($P=0.95$) (见 Roberts *et al.*, 1993)。

阳性的检验结果应该标明种子感染的百分率。

质量保证

1. 专门培训。应该由接受过真菌鉴定培训的人员进行检验, 或者在其直接监督下操作完成。

2. 关键控制点 [方法中以 CCP 表示]。菌丝扩展可能会污染其它种子, 所以种子之间距离最少应有 20mm, 也就是每个直径 9cm 的培养皿中的种子不超过 10 粒 (步骤 2)。

可能会因为污染菌 (尤其是细链格孢菌或根生链格孢菌) 而难于检查, 所有环节需要经验和细心 (ISTA 1984, 步骤 6)。

为了抑制污染物, 或获得更加成熟的分生孢子, 在培养 13~14 d 后可能要附加检查 (Hewett, 1964, 步骤 6)。

> 参考文献

Ellis, M. B. (1971) *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 609

Gambogi, P. (1987) International Seed Testing Association, Handbook on Seed Health Testing, Working Sheet No 4 (2nd Ed.): *Alternaria dauci* on *Daucus carota*. International Seed Testing Association, Zurich, Switzerland

Hewett, P. D. (1964) Testing carrot seed infected with *Alternaria porri* f. sp. *dauci*. Proceedings of the International Seed Testing Association, 29, 463~471

International Seed Testing Association (1984) Report of the 18th International Seminar on Seed Pathology, 9~16 July, 1984, Washington State University, Puyallup, U. S. A.

Miles, S. R. (1963) Proceedings of the International Seed Testing Association, 28 (3), 644

Roberts, S. J., Phelps, K., Taylor, J. D. and Ridout, M. S. (1993) Design and interpretation of seed health assays. In: Sheppard, J. W., (Ed.) Proceedings of the First ISTA Plant Disease Committee Symposium on Seed Health Testing, Ottawa, Canada. pp. 115~125. Agriculture Canada, Ottawa, Canada

Sheppard, J. W. and Cockerell, V. (2002) Detection of *Alternaria dauci* on *Daucus carota* (Carrot). International Rules for Seed Testing. Annex to Chapter 7: Seed Health Testing Methods. 7~001

Tempe, J. de (1968) The quantitative effect of light and moisture on carrot seed infections in blotter medium. Proceedings of the International Seed Testing Association, 33, 547~553

Van Bilsen, J. G. P. M. (2003) Report of a comparative test on *Alternaria dauci* and *Alternaria radicina* on carrot seed. ISTA Method Validation Reports

二、麦芽汁琼脂法检测胡萝卜种子中胡萝卜链格孢 (*Alternaria dauci*)

(ISTA 标准: 7-001b; 2003 年 1 月 1 日起生效)

作物: 胡萝卜 (*Daucus carota*)

病原菌: 胡萝卜链格孢 (*Alternaria dauci*)

标准起草者: Van Bilsen, J.¹, Cockerell, V.² & Roberts, S.J.² (1 Bejo Zaden B.V., P.O. Box 50, 1749 ZH Warmerhuizen, The Netherlands., E-mail: J.vanBilsen@bejo.nl; 2 ISTA-PDC Method Validation Sub-committee)

起草单位: 国际种子健康计划——蔬菜组 (International Seed Health Initiative-Vegetables)

修订记录: 2003 年 1 月 1 日第一版。2003 年 1 月 1 日起生效

背景

本方法最早发表于 1964 年 11 月的 ISTA《种子健康检验手册》(第 4 号之 S.3), 而后 Gambogi 于 1987 年进行修订。1999 年和 2001 年, 由国际种子健康计划——蔬菜组的 11 个实验室进行 6 个种子批的验证试验后, 对方法进行修改 (Van Bilsen, 2003)。验证试验比较了吸水纸法和麦芽汁法后认为这两个方法是等效的。主要的修改内容是对培养 10 d 和 7 d 的结果评价。注意到, 如果种子中存在 *Alternaria radicina*, 应用同样的方法 (见 7-002b) 也可以同时检出。

验证试验

由 Van Bilsen 于 2003 年所完成。发电邮 ista.office@ista.ch 或向 ISTA 秘书处索取该复印件。

安全注意事项

确认检验人员熟悉危险数据, 并采取必要的安全防护措施, 特别是配制培养基过程中的高压灭菌和药剂称取等步骤。检验人员应该是在微生物实验室内进行, 并且熟悉《良好的实验室操作规范 (GLP)》和《良好的微生物操作规范 (GMP)》, 及其无菌操作等原理。正确处置废弃物 (如消毒、灭菌等), 并且遵守当地的健康、环境和安全之规章制度。

种子处理

经种衣剂处理的种子可能影响检验结果, 应采用没有处理过的种子进行检验。

试验材料

参照物质: 推荐采用参照菌株或其它适宜的质控物。

培养基: 麦芽汁琼脂培养基 (详见 7-002b)。

次氯酸钠溶液: 1%有效成分的次氯酸作为种子消毒之用。

培养皿: 直径为 9.0cm 培养皿 (每个培养皿 10 粒种子为宜)。

培养箱: $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 带有定时器, 光线接近紫外光 (波长峰值在 360nm)。

样品制备

1. 排除任何可能的交叉污染因素。用 70% 酒精擦洗或喷洒所有使用的器具, 戴手套操作。
2. 依据“国际种子检验规程”之 7.4.1 部分所描述的方法对检验样品进行检验 (见 7-001a 之样品制备)。

检验方法 [关键控制点用 CCP 表示]

1. 无菌条件下, 每个装有麦芽汁琼脂培养基的培养皿上, 间隔均匀地摆放 10 粒种子。
2. $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 下, 黑暗/近紫外光交替培养 10 d。培养皿在光管下约 25cm 处, 不要重叠。
3. 同时在同样条件下用麦芽汁琼脂培养参照菌株。种子摆放方式和培养方法与上同。
4. 肉眼或 30 倍的解剖镜下检查真菌的生长情况。在 50~80 倍的显微镜下检查分生孢子。其菌落为褐色或暗褐色, 具有榄灰色的气生菌丝体, 在培养基上产生可以扩散的褐色色素。分生孢子梗不分枝或少分枝, 单生或成簇生长于种子的表面或气生菌丝体上。分生孢子通常单生, 倒棍棒形, 长达 $450\text{ }\mu\text{m}$ (包括喙), 初为榄灰褐色, 成熟后变褐色, 其灰色的长喙可以达到孢子长度的 3 倍 (Ellis, 1971)。通过集聚在一起发亮的长喙, 有时可以见到深色的分生孢子团。记录每个培养皿中感染的种子数 (CCP)。

通用方法 (适用于多个检验步骤)

1. 检查容许差距。容许差距是评价每个检验或多个检验之间的结果差异是否显著, 足以对结果的准确性产生怀疑的方法。适用于大多数种子健康的直接检验的“容许差距表”可以查阅《国际种子检验规程》附件 16 之附表 5.1, 或《种子检验容许差距和精确度测定手册》之表 G1 (Miles, 1963)。

2. 结果报告。种子健康检验的结果应该注明所检查出的病原物学名和检验方法。出具 ISTA 的证书时, 结果填写在“其他测定”栏中。

对于阴性的检验结果 (没有检出病原物), 结果应该注明容许差距标准 (如 95% 概率的感染水平小于 1%)。容许差距标准根据所检验的种子数量 (n) 而定, 大约为 $3/n$ ($P=0.95$) (见 Roberts *et al.*, 1993)。

阳性的检验结果应该标明种子感染的百分率。

质量保证

1. 专门培训。应该由接受过真菌鉴定培训的人员进行检验, 或者在其直接监督下操作完成。
2. 关键控制点 [方法中以 CCP 表示]。菌丝扩展可能会污染其它种子, 所以种子之间距离最少应有 20mm, 也就是每个直径 9cm 的培养皿中的种子不超过 10 粒 (步骤 2)。

图片省略 (见 7-001a)。

麦芽汁琼脂培养基的制备

按照制造商的要求, 在 1000ml 或 500ml 的去离子水或蒸馏水中加入麦芽汁琼脂粉 (CCP)。制备方法如下:

1. 称取所有的组分倒入可消毒的容器中;
2. 加 1000 (或 500) ml 的蒸馏水;
3. 加热溶解;
4. 在 15 磅 121°C 下灭菌 15 min;

5. 使琼脂冷却到大约 50℃;

6. 每个 9cm 的培养皿中倒入 15~22 ml 的培养基, 使用前在室温下冷却凝固 24h。

贮存: 麦芽汁琼脂培养基平板可以在柜中室温下或 4℃冰箱保存至少一个月。

> 参考文献

Ellis, M. B. (1971) Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 609

Gambogi, P. (1987) International Seed Testing Association, Handbook on Seed Health Testing, Working Sheet No 4 (2nd Ed.): *Alternaria dauci* on *Daucus carota*. International Seed Testing Association, Zurich, Switzerland

Miles, S. R. (1963) Proceedings of the International Seed Testing Association, 28 (3), 644

Roberts, S. J., Phelps, K., Taylor, J. D. and Ridout, M. S. (1993) Design and interpretation of seed health assays. In: Sheppard, J. W., (Ed.) Proceedings of the First ISTA Plant Disease Committee Symposium on Seed Health Testing, Ottawa, Canada. pp. 115~125. Agriculture Canada, Ottawa, Canada

Van Bilsen, J. G. P. M. (2003) Report of a comparative test on *Alternaria dauci* and *Alternaria radicina* on carrot seed. ISTA Method Validation Reports