ICS 65.020.20
CCS B15

DB21

辽 宁 省 地 方 标 准

DB 21/T XXXX—XXXX

玉米 高粱主要病害抗病性鉴定技术规范

第7部分：玉米青霉穗腐病

Rules for evaluation of sorghum and maize for resistance to diseases
Part 7：Penicillium ear rot of maize

（征求意见稿）

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：丹东农业科学院、沈阳农业大学。

本文件主要起草人：那明慧、赵睿杰、高越、王作英、陈晓旭、王应玲、高伟、高艳、黄宇飞、李岩、陈丽、左青、赵成昊、娄志东、王小芬、高宇、金晓明、张照然、徐连营。

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。

文件起草单位通讯地址：丹东农业科学院 (辽宁省凤城市草河街道99号)，联系电话： 0415-8295346。

玉米 高粱主要病害抗病性鉴定技术规范
第7部分：玉米青霉穗腐病

1 范围

本文件规定了玉米抗青霉穗腐病病原物的分离制备、接种和田间鉴定及抗性评价方法。

本文件适用于栽培玉米（*Zea mays* L.）自交系和杂交种等种质资源对玉米青霉穗腐病抗性的人工接种鉴定及评价。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

玉米青霉穗腐病 Penicillium ear rot of maize

由青霉属*Penicillum* spp.真菌所引起的玉米穗部病害。

3.2

籽粒伤口接种 kernel inoculation

利用可定量的连续注射器于果穗中部进行创伤注射的接种技术或采用长有青霉菌菌丝体的牙签刺穿苞叶并保留在籽粒上的接种技术。

4 接种体的分离鉴定和制备

4.1 分离、鉴定

以常规组织分离法和单孢分离法（见附录 A ）从田间采集的具有典型玉米青霉穗腐病症状的果穗分离获得纯培养物，利用形态学和分子生物学鉴定为青霉属真菌草酸青霉（*Penicillum oxalicum* Currie et Thom），4 ℃ 保存备用。

4.2 制备

4.2.1 分生孢子悬浮液的制备

挑取 4.1 保存的青霉菌接种于马铃薯葡萄糖琼脂（Potato Dextrose Agar，简称 PDA ）培养基 25 ℃ 培养 5 d 后，用无菌打孔器打取菌落边缘直径 5 mm 的菌饼，将其接种于马铃薯葡萄糖培养液（Potato Dextrose，简称 PD ）中 120 r/min 培养 5d 。培养物经灭菌的双层纱布过滤，获得分生孢子悬浮液，用无菌水将孢子浓度调至 2×10^6个/mL，即可用于接种。PDA和PD培养基配方见附录 C 。

4.2.2 带菌牙签的制备

将灭菌木质牙签均匀铺在PDA平板上，在平板上接种青霉菌。黑暗下培养 7 d～10 d，待菌丝长满牙签后即可用于接种。

5 鉴定圃设置

5.1 试验设计

鉴定材料随机排列或顺序排列。在进行选育品种抗病性鉴定时，每30行鉴定材料设1组已知抗病和感病对照材料（见附录B）。在进行种质资源抗病性鉴定时，每50行鉴定材料设1组已知抗病和感病对照材料，鉴定圃周边应设置保护行。鉴定圃应具备良好的自然发病环境和排灌设施，鉴定圃确定后不应随意更换

5.2 种植要求

鉴定材料播种时间与生产播种时间相同。

鉴定小区行长 5m ，行距 0.6 m ，条播或穴播，每行保苗 21 株，低于 13 株时视为该品种/材料鉴定无效。鉴定种质资源时，每份鉴定材料种植 1 行；鉴定选育品种时，每份材料种植 2 行。土壤肥力水平和耕作管理与大田生产相同。

6 接种

6.1 接种时期

接种时期为果穗吐丝后14 d～ 21 d，接种可全天进行。

6.2 接种方法

6.2.1 针刺接种

用侧孔空心金属针连接有注射接种液的器具在雌穗中上部苞叶外进行穿刺，当金属针刺入籽粒时，注射 2ml 接种液。

6.2.2 牙签接种

将经过培养后带有大量病原菌菌丝的牙签直接在雌穗中上部苞叶外刺入并达到籽粒中部。为确保菌丝被带入籽粒，接种采用双牙签法，也可用尖的金属器具先在雌穗上钻孔，然后插入带菌牙签。

6.3 接种前后的田间管理

接种鉴定田不应特殊管理。玉米接种后适度保持田间大气湿度即可满足发病要求。

7 调查

7.1 时间

在玉米生理成熟后进行调查，同批次接种材料应在同一天完成。

7.2 方法

采收接种的雌穗，去除苞叶后逐穗调查并对雌穗籽粒被病菌侵染的面积进行分级记载。

7.3 病情分级

依据表1中的描述，逐个记载调查雌穗的发病级别。

表1　　玉米对穗腐病抗性鉴定的病情级别划分

病情分级	描述
1	发病面积占雌穗总面积0～1%
3	发病面积占雌穗总面积2%～10%
5	发病面积占雌穗总面积11%～25%
7	发病面积占雌穗总面积26%～50%

9	发病面积占雌穗总面积51%～100%

8 抗性评价

8.1 鉴定有效性判别

当设置的感病对照材料平均病情级别≥5.6 时，该批次鉴定视为有效。

8.2 抗性评价标准

计算每份鉴定材料雌穗的平均病情级别，并依据平均级别确定该鉴定材料对穗腐病的抗性，抗性的划分标准见表2。

表2 玉米对青霉穗腐病抗性评价标准

平均病情级别	抗性
≤1.5	高度抗病 Highly resistant （高抗 HR）
1.6～3.5	抗病 Resistant （抗 R）
3.6～5.5	中度抗病 Moderately resistant（中抗 MR）
5.6～7.5	感病 Susceptible （感 S）
7.6～9.0	高度感病 Highly susceptible （高感 HS）

8.3 重复鉴定

若鉴定材料初次鉴定时表现为高抗、抗、中抗，应在次年进行重复鉴定。

8.4 抗性评价

对初次鉴定结果和重复鉴定结果进行比较，以记载的最高病情级别为最终鉴定结果，并依此结果对鉴定材料进行抗性评价。

9 鉴定结果汇总

玉米抗青霉穗腐病鉴定结果整理后填入鉴定结果表格，见表3。

表3 _____年玉米抗青霉穗腐病鉴定结果表

编 号	品种/种质名称	来 源	平均病级	抗性评价
注 1: 鉴定地点 注 2: 接种病原菌菌株编号及来源 注 3: 接种日期 调查日期				

附　录　A
（资料性）
玉米青霉穗腐病病原菌

A.1　青霉菌的形态学鉴定

引起玉米青霉穗腐病的主要致病菌是草酸青霉。

无性态学名：*Pennicillium oxalicum* Currie et Thom

草酸青霉无性态特征：病菌菌落灰绿色，圆形，平坦，质地绒状，分生孢子易脱落。分生孢子梗发生于基质，长约 400 μm。顶端为帚状分枝，上生 2 个 ~ 4 个轮生梗基。分生孢子椭圆形或长圆形，无色，单孢，直径 3.5 μm ~ 5.0 μm。

A.2　青霉菌的分子鉴定

对青霉菌脱氧核糖核酸（Deoxyribonucleic acid，DNA）中的内转录间隔区（Internal Transcribed Spacer，ITS）进行PCR扩增。对扩增片段进行测序和比对，确定种的分类地位。

PCR反应体系：扩增的引物为真菌的通用引物：PCR反应体系（ 25 μL）：上下游引物（ 10 μmol/L）各 1 μL，模板DNA（ 100 ng/μL）1 μL，2 ×*Taq* PCR mix 12.5 μL，ddH_2O 9.5μL。

PCR反应条件： 95 ℃ 5 min; 95 ℃ 1 min, 55 ℃ 1min, 72 ℃ for 5 min, 30 cycles; 72 ℃ for 5 min.

PCR扩增引物及条件见表A.1。

表A.1　PCR扩增引物及条件

基因	引物名称	序列（5'-3'）
ITS	ITS 1/ITS 4	TAATTCACAATGGAGGGTAGG
		GTAAGGATACCACGCTTGG
BenA	Bt2a/Bt2b	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC
		ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC
CaM	CMD5/CMD6	CCGAGTACAAGGAGGCCTTC
		CCGATAGAGGTCATAACGTGG

附　录　B
（资料性）
玉米青霉穗腐病抗性鉴定对照材料

B.1　抗病鉴定对照材料

X178，对穗腐病表现抗病（Resistant，R），选自美国玉米杂交种P 78599。

B.2　感病对照自交系

B73，对穗腐病表现高感（Highly susceptible，HS），属于BSSS种质。

附 录 C
（资料性）
青霉菌培养基配方

C.1 青霉菌培养与保存

C.1.1 马铃薯葡萄糖琼脂培养基（Potato dextrose agar medium，PDA）

马铃薯 200 g，葡萄糖 20 g，琼脂 18 g～ 20 g，蒸馏水 1000 mL。分装在三角瓶中后 121 ℃高压灭菌 20 min后备用。PDA培养基用于青霉菌生长培养，培养温度为25℃。

C.1.2 马铃薯葡萄糖液体培养基（Potato dextrose medium，PD）

马铃薯 200 g，葡萄糖 20 g，蒸馏水 1000 mL。分装在三角瓶中（ 500 mL 三角瓶中分装 150 mL），121℃高压灭菌 20 min后备用。PD培养基用于青霉菌的菌丝培养（用于病菌DNA提取）和产孢培养。

C.2 无菌牙签制备

市售木质牙签以清水浸泡 2 h，期间换水数次，最后煮沸以彻底去除牙签中的消毒药剂成分：牙签晾干并包成 100根/包 ～ 200 根/包，在 121 ℃下高压灭菌 30 min后即可均匀铺在PDA平板上带菌培养。