ICS 65.020.20
CCS B 15

DB21

辽 宁 省 地 方 标 准

DB 21/T 2219.8—XXXX

玉米 高粱主要病害抗病性鉴定技术规范 第8部分：玉米木霉穗腐病

Rules for evaluation of sorghum and maize for resistance to diseases
Part 8：Trichoderma ear rot of maize

（报批稿）

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。

本文件是DB21/T 2219《玉米 高粱主要病害抗病性鉴定技术规范》的第8部分。DB21/T 2219已经发布和计划发布以下部分：

——第 1 部分：高粱靶斑病；

——第 2 部分：高粱煤纹病；

——第 3 部分：高粱镰孢菌茎腐病；

——第 4 部分：高粱丝黑穗病；

——第 5 部分：玉米灰斑病；

——第 6 部分：玉米弯孢菌叶斑病：

——第 7 部分：玉米青霉穗腐病；

——第 8 部分：玉米木霉穗腐病；

……。

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、锦州市科学技术研究院、朝阳市农业发展服务中心。

本文件主要起草人：赵睿杰、那明慧、王作英、高越、陈晓旭、王应玲、高伟、高艳、黄宇飞、李岩、陈丽、左青、赵成昊、刘晓馨、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。

归口管理部门联系方式：辽宁省农业农村厅（沈阳市和平区太原北街2号），联系电话：024-23447862。

文件起草单位联系方式：丹东农业科学院（辽宁省凤城市草河区草河大街99号），联系电话：0415-8295346。

引　言

玉米、高粱种植面积约占辽宁省谷类作物一半以上。近年来，在玉米、高粱生产中病害的发生趋于严重，已成为制约玉米、高粱生长发育和优质高产的重要因素。因此，开展玉米、高粱主要病害抗病性鉴定，为抗病育种和病害流行预测预警提供技术支撑意义重大。为确保标准制定的系统性和应用的便利性，针对辽宁省玉米、高粱主要病害抗病性鉴定技术需求，特制定本系列标准。DB21/T 2219本次发布两个部分：

——第7部分：玉米青霉穗腐病；

——第8部分：玉米木霉穗腐病。

本系列标准还将陆续发布其他玉米、高粱主要病害的抗病性鉴定技术部分。

玉米 高粱主要病害抗病性鉴定技术规范
第 8 部分：玉米木霉穗腐病

1 范围

本文件规定了玉米木霉（*Trichoderma* sp.）穗腐病抗病性鉴定技术的准备、接种和评价等要求。

本文件适用于栽培玉米（*Zea mays* L.）种质资源和杂交种对玉米木霉穗腐病抗性的人工接种鉴定及评价。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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。

NY/T 1248.8 玉米抗病虫性鉴定技术规范 第8部分：镰孢穗腐病

3 术语和定义

NY/T 1248.8界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

花丝通道接种 silk channel inoculation

采用木霉菌分生孢子悬浮液经玉米花丝通道注射而进行玉米抗木霉穗腐病鉴定的技术。

4 准备

4.1 接种物准备

4.1.1 接种物的分离、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木霉穗腐病症状的果穗分离获得纯培养物，结合形态学和分子生物学鉴定为木霉菌，4℃保存备用。

4.1.2 接种物的制备

挑取4.1.1保存的木霉菌接种于马铃薯葡萄糖琼脂（Potato Dextrose Agar，简称 PDA）培养基25℃自然光培养5d后，用无菌打孔器打取菌落边缘直径5mm的菌饼，将其接种于马铃薯葡萄糖培养液（Potato Dextrose，简称PD）培养基中25℃、120r/min摇培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1×10^5个/mL，即可用于接种。PDA和PD培养基配方见附录B。

4.2 鉴定圃准备

4.2.1 鉴定圃设置

鉴定圃应具备良好的自然发病环境。

4.2.2 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C）。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。鉴定圃应具备良好的自然发病环境和排灌设施，周边应设置保护行。

4.2.3 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0.6m，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。

5 接种

5.1 接种时期

接种时期为玉米雌穗吐丝后14d～21d，接种可全天进行。

5.2 接种方法

宜采用花丝通道注射法。将注射器吸液管置于病原菌的分生孢子悬浮液中，金属的注射针管从雌穗顶端上方的花丝通道部位侧边插入至花丝通道中间，定量注入2mL接种液，器具为可进行连续定量注射的连动注射器。每株仅接种第1个雌穗。

5.3 接种前后的田间管理

接种后对鉴定圃进行常规田间管理。

6 调查

6.1 调查时间

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。

6.2 调查方法

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。

表1 玉米木霉穗腐病田间调查结果表

编号	1级	3级	5级	7级	9级
1					
2					
3					
4					
……					

6.3 病情分级

依据表2中的描述，逐个记载调查雌穗的发病级别。

表 2　玉米对穗腐病抗性鉴定的病情级别划分

病情分级	描述(发病面积占雌穗总面积比例)
1	A≤1%
3	1%＜A≤10%
5	10%＜A≤25%
7	25%＜A≤50%
9	A＞50%
注：发病面积占雌穗总面积比例以A表示。	

7　抗性评价

7.1　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。

7.2　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3。

表 3　玉米对穗腐病抗性鉴定的病情级别划分

平均病情级别	抗性
D≤1.5	高度抗病Highly resistant（高抗HR）
1.5＜D≤3.5	抗病Resistant（抗R）
3.5＜D≤5.5	中度抗病Moderately resistant（中抗MR）
5.5＜D≤7.5	感病Susceptible（感S）
7.5＜D≤9.0	高度感病Highly susceptible（高感HS）
注：平均病情级别以D表示。	

7.3　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。

7.4　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。

8　鉴定结果汇总

玉米抗木霉穗腐病鉴定结果整理后填入鉴定结果表格，见图1。

_____年玉米木霉穗腐病鉴定结果

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

注4：调查日期

注5：调查人

图1　玉米抗木霉穗腐病鉴定结果汇总表样式图

附 录 A
（资料性）
玉米木霉穗腐病病原菌

A.1 主要致病菌种学名和形态学鉴定

A.1.1 绿色木霉

无性态学名：*Trichoderma viride* Pers.ex Fries

绿色木霉无性态特征：病菌菌落生长迅速，初白色，后出现松散的絮状气生菌丝，渐黄绿色至蓝绿色；分生孢子梗顶部多次分枝，小梗呈锥状；分生孢子聚生于小梗上，球形，单孢，无色至淡色，直径2.5μm～4.0μm。

A.1.2 哈茨木霉

无性态学名：*Trichoderma harzianum* Rifai

哈茨木霉无性态特征：病菌菌落生长迅速，气生菌丝为白色，产孢区黄绿色，培养基背面呈暗黄色；菌丝透明，壁光滑，初级分枝与主枝多呈直角或略向上弯曲，分枝呈金字塔结构，多对生；分生孢子亚球状，浅绿色，较小，约3μm×2.6μm。

A.2 木霉菌的分子鉴定

对木霉菌脱氧核糖核酸（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，确定其分类地位。

PCR反应体系（25μL）：上、下游引物（10μmol/L）各1μL，模板DNA（50ng/μL）1μL，2×Taq PCR mix 12.5μL，ddH20 9.5μL。

PCR反应条件：94℃预变性3min；94℃ 30s，退火52℃ 30s，72℃ 1min，循环35次；最后72℃延伸5min。PCR扩增引物见表A.1。

表 A.1 PCR 扩增引物

基因	引物名称	序列（5'-3'）
ITS	ITS1/ITS4	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
		TCCTCCGCTTATTGATATGC

附 录 B
（资料性）
木霉菌培养基配方

B.1 PDA 培养基

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

B.2 PD 培养基

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

附　录　C
（资料性）
玉米木霉穗腐病抗性鉴定对照材料

C.1　抗病鉴定对照材料

X178，对穗腐病表现抗病，选自美国玉米杂交种P78599。

C.2　感病对照自交系

B73，对穗腐病表现高感，属于BSSS种质。