

第五章 植物、植物产品检疫鉴定

第一节：概述

检疫鉴定是检验检疫物是否附带、混杂、污染有害生物，并对发现有害生物进行种类鉴定，为判定检疫物是否合格或为做检疫处理提供科学依据。检疫鉴定力求准确、快速，这一工作的技术性、政策性强，必须认真按照有关检疫规程和鉴定技术的标准、方法进行。

检疫鉴定主要对现场检疫取回的代表样品和病、虫、杂草籽样本，在实验室作进一步检验鉴定。检验鉴定的方法和技术，因病不同、虫、杂草的种类和不同的植物、植物产品而异。常采用下列一种或几种方法进行检验鉴定：过筛检验、解剖检验、透视检验、染色检验、同功酶电泳检验、比重检验、漏斗分析检验、洗涤检验、直接镜检、分离培养和接种检验、吸水纸检验、荧光显微检验、切片检验、萌发检验、试植检验、鉴别寄主接种检验、噬菌体检验、血清学检验、免疫电镜检验、以及近年来分子生物学技术在植物病原体检测鉴定中的应用方法，如单克隆抗体技术、多聚酶链体反应技术（Polymerase Chain Reaction PCR）等。对病、虫、杂草种类的检验鉴定，应结合有害生物的分布、寄主、主要鉴定特征、生活习性、传播途经等。具体检验方法可参考《中国进出境植物检疫手册》第七章“检疫性有害生物的检验与鉴定”，及有关检疫鉴定的标准和资料。根据现场和室内检验，对检出的病、虫、杂草最后作出正确的种名鉴定。本章介绍植物病、虫、杂草的常用检验方法。

第二节、昆虫检验

（一）直接检验

取样携回室内进行过筛检验，按种子粒形状和大小，选用不同孔径的规格筛。

将需用的筛层，按筛孔大小顺序套好（小筛孔放在下面），将样品放入上层选筛内（不宜过多，约达筛层高度的2/3），套上筛盖，电动或手动回旋转动一定时间后，按筛层将筛上物和筛下物分别倒入白瓷盘中检查，检出昆虫和螨类，同时还可检出虫粒、病粒、杂草籽和其它夹杂物。若检查时室温低于10℃，最下层筛出物须在20-30℃下处理15-20分钟，促使害虫活动，再进行检查。必要时计算含量。计算公式：每kg含量=1000×发现数量/试样重量（g）。

（二）隐蔽害虫的检验

1.染色检查。用不同的化学药品进行染色，根据颜色程度区分有无害虫，并

鉴别害虫种类。如检查粮粒中隐蔽的谷象、米象等可将样品放在铁丝网中，先在 30℃ 水中浸 1 分钟，再移入 1% 高锰酸钾溶液中 1 分钟，然后用清水冲洗或用过氧化氢硫酸液洗涤 20-30 秒。在扩大镜下挑粒面有直径约 0.5 毫米左右黑斑点的籽粒，再进行剖检。豆类可用 1% 碘化钾或 2% 碘酒染色 1-1.5 分钟，再移入 0.5% 氢氧化钠或氢氧化钾溶液中 20-30 秒，取出用水冲洗 30 秒，如粒面有 1-2 毫米直径的黑圆点，则内部可能隐藏豆象。

表 昆虫检验的过筛规格

品种	筛径规格 (mm)	层数	备注
花生、玉米、大豆、 豌豆、蓖麻籽	3.5 ~ 2.5 ~ 1.5	1 ~ 3	圆孔筛
小麦、大麦、高粱、 大米	1.75 × 2.0 或 2.5 ~ 1.5	1 ~ 2	长孔或圆孔筛
谷子、芝麻、苏籽、 小米	2.0 ~ 1.0	1 ~ 2	圆孔筛
面粉	42 目		绢筛或铜丝筛

2. 比重检查。根据有害籽粒和正常籽粒比重不同，用盐溶液漂检。检查谷象可将种子倒入 2% 硝酸铁溶液搅拌，静置后被害粒浮在表面。检查豆象可用 18.8% 的食盐水漂检。比重检查亦适用于检出线虫瘿、菌核和杂草籽等。

3. 解剖检查。对有明显被害状、食痕或有可疑症状的种子、果实以及其它植物产品进行剖开检查。

4. 软 X 光机检验。将样品摊成薄薄一层，放在软 X 光机工作台上或铺在胶带纸上，通过透视和摄影，检查可疑种子内的隐蔽害虫，检出率和检查效率均较高。

5. 饲养检查。将样品定量后置温箱内，定温在 25—26℃ 下饲养 3—5 天或更长时间，测定害虫含量并鉴定虫种。

第三节、螨类检验

除可过筛检查外，还可利用螨类喜湿、怕干、畏热的习性，用螨类分离器，以电热加温的方法检出籽粒中的螨类。将样品均匀平铺在分离器的细铜丝纱盘上，厚度 5mm 左右，使盘面温度保持在 43—45℃，经 20 分钟后详细检查盘下的玻璃板（板四周要预先薄涂甘油）上的螨类，并计算其含量。

第四节、杂草籽检验

粮谷和种子样品过筛后检取筛上物和筛下物中的杂草种子（果实），目测或借助解剖镜观察，根据其外观形态特征，诸如形状、大小、颜色、斑纹、种脐以及附属物特征等进行鉴定。应充分注意地理环境、植物本身的遗传变异和种子成熟度等因素对种子外部形态的影响。必要时，将种子浸泡软化后解剖检查其内部形态、结构、颜色、胚乳的质地和色泽以及胚的形状、尺度、位置、颜色、子叶数目等特征。采用上述方法尚不能鉴定的，可进行幼苗鉴定，检查其萌发方式以及胚芽鞘、上胚轴、下胚轴、子叶和初生叶的形态。幼苗期的气味和分泌物有时也有重要鉴定价值。必要时，还应进行种植观察，观察花果特征。

第五节、植物病原真菌的检验

（一）直接检验 以肉眼或借助手持扩大镜、实体显微镜仔细观察种子、苗木、果实等被检物的症状。种子类先过筛，检出变色皱缩粒和菌核、菌瘿以及其它夹杂物。发现明显症状后，挑取病菌制片镜检鉴定。有些带菌种子需用无菌水浸渍软化，释放出病菌孢子后才得以镜检识别。

带病种子可能表现出霉烂、变色、皱缩、畸型等多种病变，种子表面产生病原菌的菌丝体，微菌核和繁殖体。例如，大豆紫斑病（*Cercospora kikuchi*），病种子生紫色斑纹，种皮微裂纹；灰斑病（*Cosmopolina*），病籽生圆形至不规则形病斑，边缘暗褐色，中部灰色；霜霉菌（*Peronospora manshurica*），病粒生溃疡斑，内含大量卵孢子。玉米干腐病（*Diplodia zeae*），病种子变褐色，无光泽，表面生白色菌丝和小黑点状分生孢子器。

种子过筛后可检出夹杂的菌瘿、菌核、病株残屑和土壤，都需仔细鉴别。小麦被印度腥黑穗菌侵染后，籽粒局部受害，生黑色冬孢子堆，而普通腥黑穗病菌和矮腥黑穗病菌为害则使整个麦粒变成菌瘿。形成菌核的真菌很多，常见的有麦角属（*Claviceps* spp.）、核盘菌属（*Sclerotinia* spp.）、小菌核属（*Sclerotium* spp.）、葡萄孢种（*Botrytis* spp.）、丝核菌属（*Rhizoctonia* spp.）、轮枝孢种（*Verticillium* spp.）、核瑚菌属（*Typhula* spp.）以及其它属真菌。菌核可据形状大小、色泽、内部结构等特征鉴别。

直接检验在室内检验中常用作培养检验之前的预备检查。检出的病瘿，常需

作形态观察检测。

(二) 洗涤检验 用于检测种子表面附着的真菌孢子,包括黑粉菌的厚垣孢子、霜霉菌的卵孢子、锈菌的夏孢子以及多种半知菌的分生孢子等。

洗涤检验的操作程序如下:

洗脱孢子:将一定数量的种子样品放入容器内并加入定量无菌水或其它洗涤液,振荡5~10分钟,使孢子脱离种子,转移到洗涤液中。

离心富集:将孢子洗涤液移入离心管,低速离心(1000~1500转/分钟)3~5分钟,使孢子沉集在离心管底部。

镜检计数:弃去离心管内的上清液,加入一定量无菌水或其它浮载液,重新悬浮沉集在离心管底部孢子,取悬浮液,镜检。滴加在血球计数板上,用高倍显微检查孢子种类并计数,据此可计算出种子的带菌量。

孢子生活力测定:用常规孢子萌发测定法、分离培养法、红四氯唑染色法判定孢子死活。

(三) 荧光显微检验 主要适用于检测腥黑粉菌病瘿中冬孢子自发荧光反应等。如用荧光显微观测法判别小麦矮腥(*Tilletia Contraversa* Kiihn)和小麦网腥(*Tilletiacaries* (DC) Yul)冬孢子。其程序为:

a.从菌瘿上刮取少许冬孢子粉至洁净的载玻片上,加适量蒸馏水制成孢子悬浮液,然后任其自然干燥;

b.在干燥并附着于载玻片的孢子上加一滴无荧光浸渍油($N_d=1.516$),加覆盖片;

c.置于激发滤光片485nm、屏障滤光片520nm的落射荧光显微镜下,检测孢子的自发荧光;

d.每视野照射2-5分钟,以激发孢子产生荧光,并在此时开始计数。全过程不得超过3分钟。此外,荧光显微观测法也适用于检查向日葵种子是否带有向日葵霜霉病菌菌丝体(或吸器)。

(四) 萌发检验 主要适用于鉴别进口小麦中小麦矮腥和小麦网腥等。鉴于小麦矮腥病瘿和小麦网腥病瘿萌发生理特点的不同,如需进一步鉴定病原,可根据小麦矮腥病菌在15℃—17℃时不萌发,在5℃光照下需3-5周萌发的特点,而小麦网腥在以上两种温度下经1-2周后均可萌发的情况,来区别鉴定病原。

(五)吸水纸培养检验 主要用于检测在培养中能产生繁殖结构的多种种传半知菌,包括交链孢属(*Alternaria* spp.)、离蠕孢属(*Bipolaris* spp.)、葡萄孢属(*Botrytis* spp.)、尾孢属(*Cercospora* spp.)、芽枝孢属(*Cladosporium* spp.)、弯孢霉属(*Cruvaria* spp.)、炭疽菌属(*Colletotrichum* spp.)、德氏霉属(*Drechslera* spp.)、镰刀菌属(*Fusarium* spp.)、捷氏霉属(*Gerlachia* spp.)、茎点霉属(*Phoma* spp.)、喙孢霉属(*Rhynchosporium* spp.)、壳针孢属(*Seporia* spp.)、匍柄霉属(*Stemphylium* spp.)和轮枝孢属(*Verticillium* spp.)等属种传真菌。

通常用底部铺有三层吸水纸的塑料培养皿或其它适用容器作培养床。先用蒸馏水湿润吸水纸,将种子按适当距离排列在吸水纸上,再在一定条件下培养,对多数病原真菌,适宜的培养温度为 20-30℃,每天用近紫外光灯或日光灯照明 12 小时。培养 7-10 天后检查和记载种子带菌情况,检查时,用两侧照明的实体显微镜逐粒种子检查。本法依据种子上真菌菌落的整个形象,即“吸水纸鉴别特征”来区分真菌种类。检查时应特别注意观察种子上菌丝体的颜色、疏密程度和生长特点、真菌繁殖结构的类型和特征。例如,分生孢子梗的形态、长度、颜色和着生状态,分生孢子的形状、颜色、大小、分隔数,在梗上的着生特点等。在疑难情况下,需挑取孢子制片,用高倍镜作精细的显微检查和计测。

吸水纸培养检验法简便、快速,可在较短时间内检查大量种子,是许多种传半知菌检验的适宜方法,但不能用于检测在培养中不产生有性繁殖体的种类。另外,植物营养器官的发病部位未产生真菌繁殖体时,常用吸水纸保湿培养诱导孢子产生,以确切地诊断鉴定。

(六)琼脂培养基培养检验 主要用于病植物中病原真菌的常规分离培养,以获得病原菌纯化培养,进行种类鉴定,也适用于快速检验生长迅速且生成特定培养特征的种传真菌。常用的琼脂培养基有马铃薯葡萄糖琼脂培养基、麦芽浸汁琼脂培养基、燕麦粉琼培养基等。在检测特定种类的病原真菌时,还可选用适宜的选择性培养基。

用琼脂培养基法检验种子带菌时,种子先用 1-2%次氯酸钠溶液或抗菌素表面消毒 3-5 分钟,然后植床于培养基平板上,在适宜温度和光照下培养 7-10 天

后检查。为便于检测大量种子，多用手持放大镜从培养皿两面观察，依据菌落形态、色泽来鉴别真菌种类，必要时挑取培养物制片，用高倍显微镜检查。有些种传真菌在培养中生成特定的营养体和繁殖体结构，可用于快速鉴定。例如，带有蛇眼病菌（*Phoma betae*）的甜菜种球，植床于含 50mg/kg 24-D 的 1.6% 水琼脂培养基平板上，在 20℃，不加光照的条件下培养 7 天后移去种子，用实体显微镜由培养皿背面观察菌落，可见由菌丝分化的膨大细胞团。带有颖枯病菌（*Septoriana odorum*）的小麦种子用马铃薯葡萄糖琼脂培养基在 15℃ 和连续光照的条件下培养 7 天后，种子周围形成大量分生孢子器。

（七）种子分部透明检验 主要用于检测大、小麦散黑穗病菌，谷类与豆类霜霉病菌等潜藏在种子内部的真菌。

该法先用化学方法或机械剥离方法分解种子，分别收集需要检查的胚或种皮等部位，经脱水和组织透明处理后，镜检菌丝体和卵孢子。以检测大麦种子传带的散黑穗病菌为例，其操作过程如下：先将种子在加有锥虫蓝的 5% 氢氧化钠溶液中浸泡 22 小时，再将浸泡过的种子用 60-65℃ 的热水冲击或小心搅动，使种胚分离，并用孔径分别为 3.5mm、2.0mm 和 1.0mm 三层套筛收集种胚。种胚用 95% 乙醇脱水 2 分钟，再转移到装有乳酸酚和水（3:1）混合的漏斗中，胚漂浮在上部，夹杂的种子残屑沉在底部并通过连在漏斗下端的胶管排出。纯净的种胚用乳酸酚煮沸透明 2 分钟，冷却后用实体显微镜检查并计数含有散黑穗菌菌丝体的种胚，计算带菌率。再如大豆疫霉菌以卵孢子和菌丝体存在于种皮内部，种子检验时应检查种皮里是否带有疫霉菌卵孢子，其检验方法是將大豆种子在 10% KOH 或自来水中浸泡一夜，取出后剩下种皮，在解剖镜下制片，然后在显微镜下检查是否见到大豆疫霉菌卵孢子。

（八）生长检验 供试材料种植在经过高压蒸汽灭菌处理或干热灭菌的土壤、沙砾、石英砂或各种人工基质中，在隔离场所和适宜条件下栽培，根据幼苗和成株的症状鉴定。检测种子传带的真菌还可用试管幼苗症状检验法，即在试管中水琼脂培养基斜面上播种种子，在适宜条件下培养，根据幼苗症状，结合病原菌检查，确定种传真菌种类。生长检验花费时间长，使其应用受到限制。

（九）免疫技术检验 用真菌的完全细胞、菌丝体或孢子、破碎的细胞、细胞的液体过滤液或固体培养物浸提液、以及纯化的蛋白质、酶、毒素和多糖等为抗原物质，与特异性抗体结合并通过一定的指示剂表现出这种特异反应，达到检

测目标菌的目的。常用的方法主要是酶联免疫吸附法。此外还有放射免疫吸附法、点免疫法、试纸法、免疫印渍法、免疫荧光技术等。抗原选择的是否得当，是决定这种检测技术成功的关键。

多聚酶链反应技术（PCR）在病原真菌鉴定方面也有应用，如采用 PCR 技术来鉴别小麦样品中是否带有小麦印腥黑穗病菌等。

第六节、植物病原细菌的检验

（一）直接检验

植物细菌病害有软腐、环腐、萎蔫、溃疡、疮痂、枝枯、叶斑、组织增生（瘿瘤、须根）等多种症状。叶片上病斑常呈水渍状，上有细菌溢脓。病部切片镜检可见细菌溢。检验甘薯瘟（*Pseudomonas solanacearum*），可选取可疑薯块未腐烂部位，取一小块变色维管束组织，制片镜检，若有细菌溢出现，结合症状特点，可诊断为甘薯瘟。检验马铃薯环腐病菌（*Corynebacterium michiganense* pv. *sepedonicum*），尚需挑取病薯维管束的乳黄色菌脓涂片，革兰氏染色测定呈现阳性反应。

某些病原细菌侵染的种子可能表现症状。例如，菜豆普通疫病（*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*），病种子种脐部变黄褐色。感染溃疡病菌（*Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense*）的辣椒种子瘦小变褐色。白色种皮的菜豆种子在紫外光照射下发出浅蓝色的荧光，表明可能受到晕蔫病菌（*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*）侵染。但是，并非所有带菌种子都表现症状，直接检验有很大的局限。即使表现症状的种子，仍需用较精密的方法进一步鉴定。

（二）细菌分离培养法

常用普通营养培养基、鉴别性培养基或选择性培养基分离纯化提取到的细菌。在鉴别性培养基上，目标细菌菌落有明确的鉴别特征，选择性培养基则促进目标菌生长，而抑制其它微生物生长。如：检测菜豆种子传带晕蔫病菌（*Syringae* pv. *phaseolicola*），可将提取液系列稀释后分别在金氏 B 培养基平板上涂布分离，在 25℃和无光条件下培养 3 天后，在紫外光或近紫外光照射下有蓝色荧光的菌落，为假单胞杆菌，可能是晕蔫病菌，需选择典

型菌落作进一步的鉴定。检测甘蓝黑腐病病原细菌时，提取液在蛋白胨肉汁淀粉琼脂培养基在检出的黄色菌落上滴加鲁戈尔试液，若菌落周边培养基不被染色，则表示淀粉已被水解，该菌落可能为目标菌，再用生物学方法或血清学方法鉴定。

（三）生理生化测定

用细菌培养物接种于特定的培养物或检测管，通过产酸、产气、颜色变化等反应，检测细菌的耐盐性、好氧或厌氧性、对碳素化合物的利用和分解能力、对氮素化合物的利用和分解能力、对大分子化合物的分解能力等，达到鉴别目的。如梨火疫病菌（*Erwinia amylovora* (Burriel) Winslow et al.）属兼性厌氧，在葡萄糖、半乳糖、果糖、蔗糖和-甲基葡萄糖苷、海藻糖中产酸不产气，不能利用木糖和鼠李糖，水解明胶，不水解酪蛋白，不还原硝酸盐，不产生吲哚和二氧化硫。

Biolog 细菌自动化鉴定系统是美国研制的一种专门用于细菌鉴定的专家系统，该系统将细菌生理、生化过程的检测与先进的计算机管理手段有机地结合起来。应用时只需将经过纯化后的病原细菌制成菌悬液，再接种到反应板上，在 4-24 小时便可得到准确的鉴定结果。为此该系统的使用，在很大程度上简化了传统的细菌鉴定程序。目前应用 3.70 版数据库软件可鉴定 567 种 G-菌和 256 种 G+菌。

（四）致病性测定

用植物病部的细菌溢或分离纯化的细菌培养物接种寄主植物，检查典型的症状。例如，鉴定甘蓝黑腐病黄单胞杆菌时，用针刺接种甘蓝叶片中肋的切片，切片置于 1.5%水琼脂平板上，在 28℃和黑暗无光条件下培养 3 天。如确系该菌，则接种部位软腐、维管束褐变。致病性测定是一种辅助鉴定方法，多用于验证分离菌的致病性以排除培养性状与病原菌相近的腐生菌。

（五）过敏性反应测定

用接种寄主植物的方法测定细菌培养物的致病性要花费较长的时间，用过敏反应鉴定，只需 24-48 小时，便能区分病原菌和腐生菌。烟草是最常用的测定植物。取待测细菌的新鲜培养，制成细菌悬浮液，用注射器接种。注射针头由烟草叶片背面主脉附近插入表皮下，注入菌悬液。若为致病细菌，1-2 天后，注射部位变为褐色过敏性坏死斑块，叶组织变薄变褐，具黑褐色边缘。

（六）噬菌体检验

噬菌体是感染细菌的病毒，能在活细菌细胞中寄生繁殖，破坏和裂解寄主细胞。在液体培养时，使混浊的细菌悬浮液变得澄清，在固体平板上培养时，则出现许多边缘整齐、透明光亮的圆形无菌空斑，称为“噬菌斑”，肉眼即可分辨。噬菌体法的主要优点是简便、快速，能直接用种子提取液测定。缺点是非目标菌多量存在时敏感性较差，噬菌体的寄生专化性和细菌对噬菌体的抵抗力都可能影响检验的准确性。

（七）血清学（鉴定）

检验最常用的血清学检验方法是玻片沉淀法和琼脂双扩散法，近年趋向于利用荧光抗体法和酶联免疫吸附法。

荧光抗体法（*fluorescent antibody technique*）先将荧光染料与抗体以化学方法结合起来形成标记抗体，抗体与荧光染料结合不影响抗体的免疫特性，当与相应的抗原反应后，产生了有荧光标记的抗体抗原复合物，受荧光显微镜高压汞灯光源的紫外光照射，便激发出荧光。荧光的存在就表示抗原的存在。荧光抗体法有直接法和间接法两种。直接法是将标记的特异抗体直接与待查抗原产生结合反应，从而测知抗原的存在。间接法是标记的抗体与抗原之间结合有未标记的抗体。国内用间接法检测玉米种子传带的玉米枯萎菌（*Erwinia stewartii*），该法先将种子提取液在载玻片上涂片，火焰固定后滴加目标菌抗血清，在 38℃ 下培养 30 分钟后，用磷酸缓冲液冲洗玻片，晾干后再滴加羊抗兔 IgG 荧光抗体（异硫氰酸荧光黄标记的羊抗兔-球蛋白，用葡聚糖凝胶 G-25 过滤层析法除去游离荧光素制成），培育、冲洗、晾干后用荧光显微镜检查。

（八）生长检验

常用幼苗症状检验法，即将种子播种在湿润吸水纸上或水琼脂培养基平板上，根据幼芽和幼苗症状作出初步诊断，然后接种证实病部细菌的致病性或作进一步的鉴定。检验甘蓝种子传带黑腐病菌（*Xanthomonas campestris pv. campestris*）的 Srinivasan 方法用 200mg/kg 的金霉素浸种 3-4 小时后，播种于培养皿内的 1.5% 水琼脂平板上，在 20℃ 和黑暗条件下培养 8 天，用实体显微镜观察幼芽和幼苗的症状。带菌种子萌发后芽苗变褐色，畸形矮化，迅速腐烂，表面有细菌溢脓，由子叶边缘开始形成“V”型褐色水渍状病斑。幼苗症状检验需占用较大空间，花费较长时间，难以检

测大量种子。有时发生真菌污染，症状混淆，难以鉴定。带有细菌的种子还可能丧失萌发能力，从而逃避了检验。在检疫中生长检验多作为初步检验或预备检验。

（九）分子生物学检验

近些年来，分子生物学技术被越来越多的应用于植物病原的检验。应用聚合酶链式反应（PCR）可以非常简便快速地从微量生物材料中以体外扩增的方式获取大量的遗传物质，并有极高的灵敏度和显著的专一性，从而大大地提高了对DNA分子的检测能力。由于这一技术具有快速简便、灵敏度高、特异性强的优点，故而在各个领域包括植物检疫方面得到广泛应用和迅速发展，并成为现代分子克隆技术的基本手段。随机扩增多态DNA（RAPD）即为以PCR为基础发展起来的一项DNA水平上的大分子多态检测技术，由于无需专门设计的RAPD扩增反应引物，所以其应用范围更加广泛。E.J.A Blackmore等人曾利用RAPD制作DNA探针，成功地完成了对玉米枯萎菌的检测和鉴定工作。此外，分子生物学技术还被广泛地应用于病毒鉴定、线虫鉴定、昆虫分类等方面。

第七节、植物病原病毒的检验

（一）直接检验

带毒种子或其它植物材料表现明显症状，能以肉眼和手持扩大镜直接识别的实例甚少，大豆花叶病毒（Sowbane Mosaic Virus）侵染的大豆种子有以种脐为中心的放射形黑褐色斑纹，豌豆种传花叶病毒（Peasee d b o r n e m o s a i c v i r u s）造成种皮变色和开裂，蚕豆色病毒（Brodbean Stain Virus）使蚕豆种子产生坏死斑。但是，种子症状仅表示母株受到病毒侵染，而不一定表明胚内有病毒侵染，从而不一定传毒。

（二）生长检验

种子、苗木需在实验室内或防虫温室内适于植物生长与症状表现的条件栽培，在生长期根据症状检出病株。种子带毒可根据幼苗症状作初步鉴定，但仅适用于苗期有特征性症状的少数寄主——病毒组合。例如，检验莴苣种子传带莴苣花叶病毒（Lettuce mosaic virus），大麦种子传带大麦条纹化叶病毒（Barley stripe mosaic virus），菜豆种子传带菜豆普通花叶病毒（Bean common mosaic virus）等。通常单凭症状难以做出诊断，这是因为病毒症状常与其它病原微生物引起的症状，甚至缺素症相混

淆,病毒症状还因品种和病毒株系不同而有较大变化,以及可能发生潜伏侵染等,这些均限制了生长检验的应用。

(三) 指示植物鉴定

种子、苗木带毒以及在生长期检验中所发现的潜伏侵染的可疑病株,常用接种指示植物的方法予以鉴定。鉴定时多用病植物汁液、种子浸渍液或种子研磨制成的提取液摩擦接种指示植物,依据指示植物症状鉴定病毒种类。种传病毒的带毒率很低,对于危险性的病毒即使指示植物鉴定得出阴性结果,仍需采用血清学方法或电镜观察作进一步鉴定,使用指示植物鉴定法时要正确选择指示植物,适时接种。不同的环境条件对指示植物的表症有很大影响,甚至会表现隐症。

(四) 血清学检验

血清学检验依据抗原与抗体反应的高度特异性,在具备高效价抗血清情况下,血清学方法不需要复杂的设备,便于推广使用。常用的血清检验方法有以下几种:

1. 沉淀反应测定。

含有抗原的植物汁液与稀释的抗血清在试管中等量混合,孵育后即可产生沉淀反应,在黑暗的背景下可见絮状或致密颗粒状沉淀。为节省抗血清,提出了许多改进方法,如微滴测定法(micro-droplet method)、玻璃毛细管法(glass capillary method)等,这些方法都适用于检疫检验中的病毒检索,但是灵敏度较低。

2. 琼脂扩散法。

将加热融化的琼脂或琼脂糖注入培养皿中,冷却后形成凝胶平板,在板上打孔,孔的直径为0.3-0.4cm,两孔间距0.5cm,然后将待测植株种子提取液和抗血清加到不同的孔中。测定液中若有抗原存在,则抗原、抗体同时扩散,相遇处形成沉淀带。经典的琼脂扩散法只适于鉴定能在凝胶中自由扩散的球形病毒。杆形和线形病毒粒子大于琼脂网径时,就不能在琼脂中自由扩散。加入SDS后,使病毒蛋白质外壳破碎,即克服这一缺陷而适用于多种形状 of 病毒。在检验大麦种子传带大麦条纹花叶病毒时,有人用剥离的种胚压碎后直接测定;在检测大豆花叶病毒和豌豆黑眼花叶病毒时,用幼苗胚轴切片供测,均取得较好的结果。在检疫检验中,琼脂双扩散法可用作常规病毒检索方法,该法灵敏度较高。用豆科植物种子提取液测定时,常出现非特异性沉淀,这可能是由于豆科种子富含凝集素

(lectin) 的缘故。

3. 乳胶凝集法。

用致敏乳胶吸附抗体制成特异性抗体致敏乳胶悬液，它与抗原反应后，乳胶分子吸附的抗体与抗原结合，凝集成复杂的交联体，凝集反应清晰可辨。检查大麦种子传带大麦条纹花叶病毒时，可取 1 周龄大麦幼苗嫩尖的榨取汁测定。

4. 酶联免疫吸附法。

该法是用酶作为标记或指示剂进行抗原的定性、定量测定。直接酶联法用特异性酶标抗体球蛋白检出样品中的抗原。操作时，先将等测抗原置入微量反应板凹孔中培育，在吸附抗原后洗涤，保留吸附孔壁的抗原，随后加入特异性酶标记抗体，经洗涤后保留与抗原相结合的酶标抗体，形成抗原抗体复合物，再加酶的底物形成有色产物，用肉眼定性判断或用酶标仪定量测定。间接酶联法利用抗家兔或鸡球蛋白的山羊抗体与酶结合制备的酶标记抗体，只要制备出抗原的家兔特异抗血清。不需要再制备酶标记抗体就可用以检出抗原。国内多用辣根过氧化物酶标记。操作时先将待测抗原吸附于微量反应板孔壁上，培育一定时间后洗涤，加入特异性抗血清，经培育和洗涤后再加入羊抗兔酶标抗体，最后加入酶的底物，并及时观察结果。酶联法已成功地用于检测包括种传病毒在内的多种病毒，其灵敏度高，有些病毒的浓度低至 $0.1 \text{ g} \mu / \text{ml}$ 也能被检测出来，用种子提取液供测，效率高，可快速检测大量种子。该法有高度的株系专化性，可能将某些病毒感染的材料误判为健康的。

5. 免疫电镜法。

该法将病毒粒体的直接观察与血清反应的特异性结合起来检测病毒。现已用于检测多种作物种子传带的各类病毒。该法对抗血清质量的要求不甚严格，能使用效价较低或混杂有非特异性（寄主）抗体的抗血清，另外，该法灵敏度高，特异性范围较宽，无严格的病毒株系专化性，尤适于种传病毒检验。从干种子磨粉用缓冲液悬浮起到透射电镜观察的整个操作过程最快只需 1.5 小时。

6. 分子生物学检验。

用于病毒检测的技术主要有核酸分子杂交技术和聚合酶链式反应（PCR）。

分子杂交技术是基于病毒 RNA 或 DNA 链之间碱基互相配对的基本原理，是对病毒基因组的分析和鉴定。因此，具有灵敏度高，特异性强的特点。在病毒及类病毒的鉴定工作中愈来愈被广泛应用。通过一定的技术，制备带有标记物的

目标病毒检测探针，和待检 RNA 或 DNA 进行核酸链之间碱基的特异配对，形成稳定的双链分子，然后通过放射性自显影或液闪计数来检测标样的核苷酸片段，达到检测目的。

PCR 是一种体外快速扩增特定的 DNA 片段的技术。根据目标病毒的核酸序列合成特异性的两个 3' 端互补寡核苷酸引物（其他生物同理），在 Taq 聚合酶的作用下，以假定目标检测物的核酸为模板，从 5' → 3' 进行一系列 DNA 合成，由高温变性、低温退火和适温延伸三个反应组成一个周期，循环进行扩增 DNA。目标 DNA 的出现，间接目标病毒的存在。PCR 的检测灵敏度可达到 fg 水平。

第八节、植物寄生线虫的检验

（一）直接检验

适用检验固着在植物体内或以休眠状态生存于植物组织内线虫，如粒瘿线虫（*Anguina*）、根结线虫（*Meloidogone*）、胞囊线虫（*Heterodera*）、水稻干尖线虫等。

首先以肉眼和手持放大镜仔细检查种子，检出畸形、变色、干秕种子以及夹杂的土粒杂质等，作进一步检查。小麦粒瘿线虫（*Anguinatritici*）和剪股颖线虫（*A. agrostis*）都使寄主子实形成虫瘿。水稻茎线虫（*Ditylenchus angustus*）侵染的病粒变褐色，颖部不闭合，谷形瘠细或成为空谷。无性繁殖材料，从根系到茎、叶、芽、花等部位均应仔细检查，要特别注意根、块茎等部位有无根结、瘿瘤，根部有无黄色、褐色或白色针头大小的颗粒状物，须根有否增生，根部有否产生斑点、斑痕等症状。块根、块茎是否干缩龟裂和腐烂，叶、茎或其它组织是否肿大、畸形等症状。病材料可用浸泡、解剖和染色等方法检出线虫。可疑种子放入培养皿内，加入少量净水浸泡后，在解剖镜下剥离颖壳，挑破种子检查有无线虫。根、茎、叶、芽或其他植物材料洗净后切成小段置于培养皿内加水浸泡一定时间后，在解剖镜下解剖检查植物组织中有无线虫。检查水稻茎线虫可将病粒连颖及米粒在室温（20—30℃）下加灭菌水浸泡 4-12 小时，振荡 10 分钟，低速（1500 转/分钟）离心 3 分钟，弃去离心管内的上清液，吸取沉淀物制片镜检。

（二）染色检验

适于检验植物组织中的内寄生线虫。烧杯中加入酸性品红乳酸酚溶液，加热

至沸腾，加入洗净的植物材料，透明染色 1-3 分钟后取出用冷水冲洗，然后转移到培养皿中，加入乳酸酚溶液褪色，用解剖镜检查植物组织中是否有染成红色的线虫。

（三）分离检验

将病原线虫由寄主体内、土壤或其它载体中分离出来，再鉴定种类。

1. 改良贝尔曼漏斗法。

此法适于分离少量植物材料中有活动能力的线虫。基本装置是一个直径适当的漏斗，漏斗颈末端接一段乳胶管，用弹簧夹把管子夹住。漏斗放置在支架上，其内盛满清水。把检验的植物材料洗掉泥土后，切成 0.5cm 长的小段，放在纱布中包起来，轻轻地浸入漏斗内。线虫从植物组织中逸出，经纱布沉落到漏斗颈底，经 12 小时或过一夜后，打开弹簧夹使胶管前端的水流到玻皿内，镜检线虫。

2. 过筛检验法。

本法用于从大量土壤中分离各类线虫。将充分混匀的土壤样品置于不锈钢盆或塑料盆中，加入 2-3 倍的冷水，搅拌土壤并振碎土块后过 20 目筛，土壤悬浮液流入第二个盆中并喷水洗涤筛上物，弃去第一个盆中和筛上的剩余物，第二个盆中的土壤悬浮液经 1 分钟沉淀后再按上法过 150 目筛，从筛子背面将筛中物冲洗到烧杯中，盆中土壤悬浮液再继续过 325 目和 500 目筛。筛中物收集在烧杯中静置 20-30 分钟，线虫沉集底部，弃去上清液，将沉集物转移到玻皿内镜检或吸取线虫鉴定。

3. 漂浮分离法。

本法利用干燥的线虫胞囊能漂浮在水面的特性分离土壤中的马铃薯金线虫 (*Globodera rostochiensis*) 和各种胞囊线虫 (*Heterodera*)。

芬威克漂浮法利用称为芬威克罐的装置进行分离。使用时先将漂浮筒注满水，并打湿 16 目筛和 60 目筛。风干的土壤经 6mm 筛过筛并充分混匀后取 200g 土样，放在 16 目筛内用水流冲洗，胞囊和草屑漂在水面并溢出，经簸箕状水槽流到底部 60 目筛中，用水冲洗底筛上的胞囊于瓶内，再往瓶内注水但不溢出，静置 10 分钟，胞囊即浮于水面，然后轻轻倒入铺有滤纸的漏斗中过滤，胞囊附着滤纸上，滤纸晾干后，放在双目解剖镜下观察。

简易漂浮法适于检查少量含有胞囊的土样。该法用粗目筛筛去风干土土样中

的植物残屑等杂物，称取 50g 筛底土放在 750ml 三角瓶中，加水至 1/3 处，摇动振荡几分钟后再加水至瓶口，静置 20-30 分钟，土粒沉入瓶底，孢囊浮于水面，把上层漂浮液倒于铺有滤纸的漏斗中，孢囊沉着在滤纸上，再镜检晾干后的滤纸。