

# T/GXSES

团 体 标 准

T/GXSES XXXX—2026

## 甘蔗黑穗病与梢腐病双病害检测技术指南

Technical guidelines for simultaneous detection of sugarcane smut and  
pokkah boeng

(征求意见稿)

2026 - XX - XX 发布

2026 - XX - XX 实施

广西环境科学学会 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。

本文件由广西壮族自治区产品质量检验研究院提出。

本文件由广西环境科学学会归口。

本文件起草单位：广西壮族自治区产品质量检验研究院、广西民族大学、广西大学、广西益谱科技有限公司、中国质量检验检测科学研究院。

本文件主要起草人：

# 甘蔗黑穗病与梢腐病双病害检测技术指南

## 1 范围

本文件界定了甘蔗黑穗病与梢腐病双病害检测的相关术语和定义，规定了检测的基本要求、样品采集与预处理、双病害检测技术、质量控制、结果判定与报告、注意事项及质量监督与改进的技术要求。本文件适用于甘蔗的黑穗病与梢腐病双病害检测。

## 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。

- GB/T 27402 实验室质量控制规范 植物检疫
- GB/T 35874 甘蔗黑穗病抗性鉴定技术规程
- NY/T 1488 农作物种质资源鉴定技术规程 甘蔗
- SN/T 1870 出口食品中食源性致病菌检测方法 实时荧光PCR法
- DB45/T 2172 甘蔗黑穗病的鉴定方法 PCR法
- DB45/T 2418 甘蔗梢腐病诊断技术规程

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**甘蔗梢腐病** sugarcane pokkah boeng disease

本文所检测的甘蔗梢腐病仅由轮枝镰孢菌（*Fusarium verticillioides*）引起的发生在甘蔗上的病害。

### 3.2

**判定阈值** decision threshold

用于区分双病害检测结果阳性与阴性的临界值。

### 3.3

**基质干扰** matrix interference

样品基质中某些成分对目标病原菌检测过程产生的非特异性影响。

注：在本文件中，基质干扰主要指甘蔗茎秆、梢、叶、根部组织中含有的高糖或高纤维等成分对病原菌提取和生物传感信号识别产生的干扰。

### 3.4

**专用提取液** special extraction liquid

液氮研磨植物组织提取液：2×CTAB提取液（已加β-巯基乙醇）；快速提取时专用提取液：主要成分为十二烷基磺酸钠（SDS）+EDTA+Tris-HCl。

## 4 基本要求

### 4.1 总体原则

双病害检测需遵循精准性、快速性、标准化、可操作性四大核心原则，具体要求如下：

——精准性原则：检测方法需满足两种病原菌的特异性识别，避免相互交叉干扰，检测结果假阳性≤15%。

——快速性原则：田间筛查场景需在7h内完成双病害检测，实验室精准检测需在12h内完成。

- 标准化原则：统一样品采集、预处理、检测操作的全流程技术参数，确保不同检测单位、不同检测场景的结果具有可比性。
- 可操作性原则：检测方法适配田间现场快速检测需求，仪器设备便携化，操作步骤简化，基层检测人员经专项培训后可独立完成。

## 4.2 仪器设备要求

本文件规定的双病害检测核心仪器设备及技术参数见表1。

表1 双病害检测核心仪器设备及技术参数表

仪器设备名称	技术参数要求	适用场景
生物传感器	可识别两种病原菌，信号含有光热、比色等信号源，相对偏差 $\leq 10\%$	流动车间检测、实验室检测、
高速冷冻离心机	转速 $\geq 10000$ r/min，温控范围 $0\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，适配病原菌核酸/蛋白提取	田间/实验室预处理
便携式样品研磨仪	适配甘蔗茎秆、梢、叶、和根部组织研磨，可无菌操作，研磨时间 $0\text{ min}\sim 30\text{ min}$ 可调	田间/实验室样品预处理
暗箱	可提供稳定的检测环境，含有光热、比色窗口。	田间检测

## 4.3 试剂材料要求

- 4.3.1 双病害检测用生物传感探针，需为针对两种病原菌的特异性探针，试剂需冷藏保存，特异性探针需在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 及以下冷冻保存。
- 4.3.2 阳性对照为经鉴定的甘蔗黑穗病菌质粒悬液和梢腐病质粒悬液，阴性对照为健康甘蔗组织提取液，对照样品需现配现用或低温冻存。
- 4.3.3 基因提取，严格按照真菌类DNA商品化提取试剂盒步骤进行。

## 5 样品采集与预处理

### 5.1 样品采集

#### 5.1.1 采样原则

随机采样与典型症状采样相结合，田间筛查按五点取样法采样。

#### 5.1.2 采样部位

针对黑穗病和梢腐病的发病位置，统一采集甘蔗蔗梢、茎节、嫩叶作为检测样品，这些部位为两种病原菌的主要富集部位，可实现一次采样覆盖双病害检测。

#### 5.1.3 采样时间

田间采样避免雨天、露水未干时采样。

#### 5.1.4 采样数量

田间筛查每块地块采样不少于20株，每株采集1份样品，混合为5份复合样品（每份4株）。

#### 5.1.5 采样方法

采集样品，装入密封袋中，做好样品标记（样品编号、甘蔗品种、采样地点、采样时间、采样人），田间样品采集后尽快完成预处理，无法及时处理的样品需置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰盒中运输保存。

### 5.2 样品预处理

#### 5.2.1 总体要求

统一的预处理流程需严格按照真菌快速/常规试剂盒说明书进行，以保证消除甘蔗基质干扰，以及提取液适用于生物传感检测。

注：快速提取时，对于便携条件下，可使用真菌快速试剂盒进行，但需注意可能对灵敏度的影响。

## 5.2.2 样品保存

采集的新鲜样品尽快完成预处理；需运输的样品采用冰盒低温冷藏运输，保存时间不超过48 h，冷冻保存-20 ℃以下时间不超过1月内，严禁反复冻融。

## 5.2.3 研磨

5.2.3.1 将无菌研磨珠加入装有蔗梢样品的研磨管中，加入 1mL 专用提取剂和适量液氮，置于便携式研磨仪中研磨 30 s，研磨转速 8000 r/min，得到样品冷冻粉末。

5.2.3.2 将样品冷冻粉末经基因试剂提取盒处理后置于离心机中（室温，10000 r/min）离心 5 min，取上清液。

## 5.2.4 纯化

针对甘蔗高糖基质干扰，向提取液/滤液中加入0.2 mL植物基因试剂盒中的基质净化剂（PVP（18 %）+亚硫酸钠（0.1 %）+乙醇（0.1倍体积）），充分混匀后静置2 min，得到纯化后的检测液，该检测液可直接用于生物传感检测。

# 6 双病害检测技术

## 6.1 总体要求

本文件以双模式生物传感技术为核心，实现双病害的快速检测，实验室精准检测和疑似结果使用阳性对照液（甘蔗黑穗病菌质粒悬液和梢腐病质粒悬液），检测操作需严格按照仪器设备操作规程和试剂说明书执行。

## 6.2 生物传感检测方法

### 6.2.1 生物传感检测

双模式检测黑穗病和梢腐病病菌过程中，除核苷酸序列不同外操作方法均一致，将检测物质统称为提取样品进行就检测。

### 6.2.2 检测预准备

检测预准备应按以下步骤进行：

- a) MBs-S3 的制备：为将探针 DNA 连接至磁珠（MBs），向 500  $\mu$ L 浓度为 2  $\mu$ M 的 S3 溶液中加入 200  $\mu$ L 含有 EDC/NHS（1 mg/mL）的混合液。反应在 37 ℃ 下进行 1 小时，以活化 DNA 上的羧基。随后，将活化后的 DNA 溶液加入至 100  $\mu$ L 浓度为 5 mg/mL 的磁珠悬液中，于 37 ℃ 孵育 4 小时，促进酰胺键的形成。所得 MBs-S3 复合物经磁分离收集，并于 4 ℃ 保存备用。
- b) S1/S2-Au@Cu<sub>2</sub>O 的制备。巯基化 DNA 与 Au@Cu<sub>2</sub>O 纳米颗粒的缀合分三步进行。首先，使用 TCEP 缓冲液在 37 ℃ 下还原 DNA 探针（S1 和 S2）的二硫键，处理 1 小时。接着，将 200  $\mu$ L 还原后的 DNA 溶液（各 2  $\mu$ M）与 200  $\mu$ L Au@Cu<sub>2</sub>O 溶液（3 mg/mL）混合，在 37 ℃ 下孵育 3 小时。最后，混合物在 8000 rpm 下离心 5 分钟，所得沉淀经洗涤后重新分散于 200  $\mu$ L Tris-HCl 缓冲液中。
- a) 将 50  $\mu$ L 浓度为 2  $\mu$ M 的 Au@Cu<sub>2</sub>O-S1、2  $\mu$ M 的 Au@Cu<sub>2</sub>O-S2 与 MBs-S3 在 37 ℃ 下孵育 2 小时，形成三元复合物。通过磁分离收集所得产物，并重新分散于 150  $\mu$ L Tris-HCl 缓冲液中。

### 6.2.3 反应检测

取 50  $\mu$ L 三元复合物与提取样品混合，在 37 ℃ 下反应 2 小时以启动链置换反应，释放副产物 Au@Cu<sub>2</sub>O-S1。接着，向体系中加入 50  $\mu$ L 燃料链 F，继续在 37 ℃ 下反应 2 小时。此步骤生成 MBs-S3-F 复合物和副产物 Au@Cu<sub>2</sub>O-S2。通过磁性分离，吸取上清液转移至含有 200  $\mu$ L 5 mM TMB 和 400  $\mu$ L 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的体系中，随后放入便携式检测暗箱中，进行拍照比色分析。随后，用功率密度为 1 W/cm<sup>2</sup> 的 808 nm 红外

激光照射该溶液120秒。通过蓝牙热成像仪与智能手机联用，实时监测并记录光热信号，从而实现双模式比色和光热检测。

#### 6.2.4 信号读取

检测程序结束后，手机程序自动输出检测信号值，记录仪器显示的原始数据，不得擅自修改检测结果。

#### 6.2.5 双模式结果初步印证

若两种生物传感技术的检测结果一致（同阳/同阴），完成初步一致性验证，可直接作为初步检测结果；若结果矛盾，需立即重新取平行样进行重复检测。

### 7 质量控制

#### 7.1 空白实验

每次检测需设置至少1组空白对照（无菌水替代检测液），空白对照的生物传感信号光热强度需 $\Delta \leq 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ；生物传感信号比色强度需 $\text{RGB BuLe } \Delta \leq 50$ （肉眼可观测）。

#### 7.2 样品复测

7.2.1 每次检测需设置至少2组平行样，平行样的检测结果相对偏差 $\leq 10\%$ ，若偏差超出范围，需重新检测该样品。

7.2.2 田间快速筛查可适当减少平行样数量，但每批次检测需设置1组平行样，平行样相对偏差 $\leq 15\%$ ，超出偏差范围需重新检测，确保检测结果的可靠性。

#### 7.3 阳性对照验证

每次检测需设置1组阳性对照，阳性对照的生物传感光热信号强度需 $\geq 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，生物传感信号比色强度需 $\text{RGB BuLe } \Delta \leq 60$ ，判定本次检测试剂或仪器存在故障，需更换试剂、校准仪器后重新检测。

### 8 结果判定与报告

#### 8.1 判定规则

双病害检测结果分为阳性、阴性、疑似阳性三类，判定结合生物传感两种模式进行互相验证，具体规则见表2，疑似阳性结果需在48 h内在实验室环境中完成复核。

表2 甘蔗黑穗病与梢腐病双病害检测结果判定规则

检测结果类型	生物传感结果	判定结论
阳性	两种模式均为阳性	对应病原菌阳性，判定为该病害感染/双病害共感染
阳性	任一生物传感模式为阳性	对应病原菌阳性
阴性	两种模式均为阴性	未检出双病害病原菌，判定为阴性
阴性	单一生物传感模式为疑似	判定为阴性
疑似阳性	两种模式结果矛盾	需重新采样并采用PCR+传统培养法复核
疑似阳性	单一/两种模式为疑似	需补充平行样检测后复核

#### 8.2 单方法判定阈值

本文件规定的核心检测方法阈值均基于实验室100组验证数据和广西主产区田间500组实测数据制定，具体阈值见表3。

表3 双病害检测单方法判定阈值

检测方法	检测指标	甘蔗黑穗病	甘蔗梢腐病
生物传感	光热信号强度	空白对照 $\Delta$ 温度 $\geq 14^{\circ}\text{C}$ 为阳性, $< 6^{\circ}\text{C}$ 为阴性, $6\sim 14$ 为疑似	空白对照 $\Delta$ 温度 $\geq 14^{\circ}\text{C}$ 为阳性, $< 6^{\circ}\text{C}$ 为阴性, $6\sim 14$ 为疑似
	比色	空白对照 $\Delta$ RGB Bu1e $\geq 40$ 为阳性, $< 30$ 为阴性, $30\sim 60$ 为疑似	空白对照 $\Delta$ RGB Bu1e $\geq 40$ 为阳性, $< 30$ 为阴性, $30\sim 60$ 为疑似

### 8.3 检测报告

双病害检测报告需统一格式,内容详实、可追溯,检测单位需对报告的真实性、准确性负责。报告编制需参考附录A的相关记录,其电子档和纸质档均需单独存档,保存期限不少于5年,且至少包含以下核心内容:

- 样品信息:样品编号、甘蔗品种、采样点位(经纬度)、采样时间、采样人、样品状态(新鲜/冷藏)。
- 检测信息:检测方法(本文件编号)、检测仪器型号、试剂批次、检测时间、检测人员。
- 检测结果:各单一方法的原始数据(光热信号强度、比色结果)、平行样偏差、质量控制结果(空白/阳性对照)、双病害检测综合判定结论。
- 判定依据:本文件的具体条款、引用的国家标准/行业标准。
- 防控建议:根据判定结论提出针对性的田间防控、原料蔗处置建议。
- 签字盖章:检测人员、复核人员、技术负责人签字,检测单位公章,报告出具日期。

## 附录 A

(资料性)

## 甘蔗黑穗病与梢腐病双病害检测相关记录表

甘蔗黑穗病与梢腐病双病害检测相关记录表见表A.1。

表 A.1 甘蔗黑穗病与梢腐病双病害检测相关记录表

样品采集记录表	检测原始数据记录表	仪器校准记录表
样品编号	检测日期	仪器名称
甘蔗品种	样品编号	型号
种植地块	仪器型号	校准日期
采样经纬度		校准项目
采样时间	各方法检测数据	校准结果
采样人	平行样偏差	校准人员
样品状态	空白/阳性对照结果	下次校准日期
病害症状描述	检测人员	备注
备注	备注	/