



中华人民共和国国家标准

GB/T 31809—2015

油棕猝倒病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Pythium splendens* Braun

2015-07-03 发布

2015-11-27 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
油棕猝倒病菌检疫鉴定方法
GB/T 31809—2015

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址: www.gb168.cn

服务热线: 400-168-0010

010-68522006

2015年9月第一版

*

书号: 155066·1-49880

版权专有 侵权必究

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国植物检疫标准化技术委员会(SAC/TC 271)提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国宁波出入境检验检疫局、中华人民共和国浙江出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人:张慧丽、张建成、顾建锋、郑炜、徐瑛、陈先锋、段维军、陈吴健、吴志毅、杜洪忠、吴品珊。

油棕猝倒病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了油棕猝倒病菌的形态学和分子生物学检疫鉴定方法。

本标准适用于油棕猝倒病菌寄主植物的植株、插枝等植物材料及介质的检疫鉴定。

2 仪器设备

生物显微镜(具油镜镜头)、具透射光源的体视显微镜(最大放大倍数不低于 $50\times$)、高压灭菌锅、天平(感量 $1/100\text{ g}$, $1/10\ 000\text{ g}$)、研钵、制冰机、纯水仪、涡旋振荡器、台式离心机、分光光度计、高速冷冻离心机、真空抽干仪、低温冰箱、冷藏冷冻冰箱、超净工作台、普通 PCR 仪、光学 PCR 反应管、pH 计、电泳仪、水平电泳槽、实时荧光 PCR 仪、微量移液器($0.5\ \mu\text{L}$ 、 $2\ \mu\text{L}$ 、 $10\ \mu\text{L}$ 、 $20\ \mu\text{L}$ 、 $100\ \mu\text{L}$ 、 $200\ \mu\text{L}$ 、 $1\ 000\ \mu\text{L}$)、PCR 反应管($0.2\ \text{mL}$ 、 $0.5\ \text{mL}$)、锥形瓶、试管、培养皿、载玻片、盖玻片。

3 主要试剂和培养基

除另有规定外,所有试剂均采用分析纯。无菌双蒸水、液氮、蛋白酶 K、氢氧化钠、醋酸铵、氯化钾、无水乙醇、溴化乙锭、三氯甲烷、异丙醇、异戊醇、氨苄青霉素、利福平、制霉菌素、苯菌灵、氯化钠、CTAB、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP 混合物、 $10\times$ PCR 缓冲液、琼脂糖、DNA 分子量标准、Tris/EDTA/SDS 提取缓冲液(TES)、Tris/EDTA 缓冲液(TE)、Tris 硼酸盐 EDTA 缓冲液(TBE)等。培养基及缓冲液配制方法见附录 B。

4 检疫鉴定

4.1 症状检查

仔细检查根部,根部症状是软化变褐,腐烂;茎部症状是出现灰色或棕黑色水渍状斑点(参见附录 A)。对可疑植物和繁殖材料的介质土应取样做进一步检验。

4.2 组织分离

选萎蔫及根部变褐但没有完全腐烂的植物材料,用流动的自来水冲洗干净,在根茎病健交界处切取 $0.5\ \text{cm}\times 0.5\ \text{cm}$ 的小块组织,用 1% 次氯酸钠进行表面消毒 $3\ \text{min}$,无菌水冲洗 3 次,灭菌滤纸吸干表面水分后,置于选择性培养基上, $25\ ^\circ\text{C}\sim 30\ ^\circ\text{C}$ 黑暗培养,每天观察,待长出菌丝后,挑取菌丝尖端转移到基础培养基上纯化,保存备用。

4.3 土壤诱集

对禾本科植物叶片(如:马唐、狗尾草、稗草等)进行高温高压灭菌处理,剪成直径 $1\ \text{cm}$ 大小的小片作为诱饵。取 $5\ \text{g}\sim 20\ \text{g}$ 土壤样品研磨破碎放入 $50\ \text{mL}$ 灭菌洁净烧杯中,厚度不超过 $2\ \text{cm}$,缓慢加入无菌水没过土表 $1\ \text{cm}\sim 2\ \text{cm}$,用吸水纸轻轻去掉形成的表面膜和漂浮的有机物残渣,每烧杯水面放置诱饵 10 片左右。静置过夜,体式显微镜下观察,将有菌丝体长出的诱饵取出,用无菌水洗净表面,无菌吸