



中华人民共和国国家标准

GB/T 31793—2015

油菜茎基溃疡病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Leptosphaeria maculans* (Fuckel) Ces. et De Not.

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
中国国家标准化管理委员会 发布

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:中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国上海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:吴品珊、易建平、周国梁、杜洪忠。

油菜茎基溃疡病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了油菜茎基溃疡病菌的检疫鉴定方法。

本标准适用于油菜和油菜茎基溃疡病菌其他十字花科寄主种子和植株中油菜茎基溃疡病菌的检疫和鉴定。

2 仪器和用具

2.1 仪器

电子天平(感量 0.01 g)、生物显微镜、体视显微镜、高速冷冻离心机、纯水仪、超净工作台、高压灭菌锅、制冰机、PCR 仪、凝胶成像系统、电泳仪、实时荧光 PCR 仪、培养箱、冰箱。

2.2 用具

烧杯、三角瓶、量筒、培养皿、酒精灯、镊子、剪刀、解剖刀、接种针、载玻片、盖玻片、研钵、移液器、移液器吸头、离心管、液氮罐、孔径 2.5 mm 和 1.5 mm 的网筛。

3 试剂和培养基

3.1 试剂

1.0%次氯酸钠(NaClO),琼脂粉,马铃薯,葡萄糖,乳酸,琼脂糖,无菌双蒸水,液氮,蛋白胨,磷酸二氢钾,硫酸镁,链霉素,新霉素,五氯硝基苯,氯四环素,利福平,Tris-HCl, MgCl₂, HCl, EDTA, NaOH, NaOAc, KCl, Tris, CTAB, TAE, 无水乙醇(ethanol), 苯酚(phenol), 溴化乙锭(EB), 三氯甲烷(chloroform), 异丙醇(isopropanol), 异戊醇(isoamyl alcohol), 蛋白酶 K, *Taq* DNA 聚合酶, dNTP, DNA 相对分子质量标准物, PCR 特异性引物和实时荧光 PCR 特异性引物及探针。

3.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA), 酸性马铃薯葡萄糖琼脂培养基(APDA)。具体配方参见附录 A。

4 检疫鉴定方法

4.1 种子检测

未带有种衣剂的种子,解剖镜下挑取皱缩、干瘪、变色、畸形、残缺或有霉变的种子 1 g~2 g;带有种衣剂的种子,先用自来水浸泡洗去种衣剂,或用纱布包裹浸泡搓洗种子,自来水冲洗去种衣剂,待风干后挑取异常种子,做分离培养。

商用油菜籽样品取 1 kg,用孔径 2.5 mm 和 1.5 mm 的网筛过筛,孔径 2.5 mm 筛上物多为豆荚和茎等植株残体,孔径 1.5 mm 筛下物多为碎屑和细小油菜籽。筛上物和筛下物混匀后,取 1 g~2 g 制样,进行 PCR 初检,初检如果阳性,再挑取异常种子做分离培养。