

DB23

黑龙江省佳木斯市地方标准

DB2308/T 184—2023

稻瘟病病菌单孢分离培养技术规范

地方标准信息服务平台

2023-12-11 发布

2024-01-11 实施

佳木斯市市场监督管理局 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。

请注意本文件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。

本文件由黑龙江省佳木斯市农业农村局提出并归口。

本文件由黑龙江省佳木斯市市场监督管理局批准发布。

本文件起草单位：黑龙江省农业科学院水稻研究所。

本文件主要起草人：王桂玲、陆文静、韩笑、周雪松、宋成艳。

本文件 2023 年首次发布。

地方标准信息服务平台

稻瘟病病菌单孢分离培养技术操作规范

1 范围

本文件规定了水稻稻瘟病菌分离所使用的仪器和用具、培养基去杂质方法及单孢分离培养程序和方法等技术规范。

本文件适用于黑龙江省佳木斯市稻瘟病菌单孢分离技术。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的，凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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。

DB2308/T 124-2022 稻瘟病菌生理小种鉴定技术规程。

3 术语和定义

3.1 稻瘟病

由稻梨孢真菌引起的一种水稻病害，又称稻热病、火烧瘟、叩头瘟。病菌侵染叶片、茎秆、穗颈、小穗梗和谷粒。根据受害时期和侵染部位不同，可分别引起苗瘟、叶瘟、节瘟、穗颈瘟和谷粒瘟。

3.2 单孢分离法

由单个孢子繁殖来获得纯菌种的方法。

4 仪器和用具

4.1 常用仪器

4.1.1 超净工作台

洁净等级：100 级 @ $\geq 0.5 \mu\text{m}$ 。平均风速：0.25 m/s~0.6 m/s。

4.1.2 高压灭菌锅

温度范围：0℃~135℃，灭菌时间范围：4 min~120 min，最高工作压力：0.22 MPa~0.25 MPa。

4.1.3 恒温培养箱

温度范围：0℃~50℃。温度波动：± 1℃。光照度：0 LX~7500 LX。

4.1.4 光学显微镜

目镜：10×；物镜：10×、40×。

4.1.5 电子天平

感量 0.01 g。

4.2 常用用具

剪刀、无菌载玻片、试管、接种针、培养皿、医用白瓷盘、滤纸、移液器、医用纱布、酒精灯、记号笔，镊子。

5 分离技术

5.1 分离方法

悬挂震落法分离单孢菌株。

5.2 培养基的配制

酵母淀粉培养基（淀粉 10 g、酵母粉 2 g、琼脂粉 20 g、蒸馏水 1000 mL）、琼脂培养基（琼脂粉 15 g~20 g、蒸馏水 1000 mL），在 121℃ 湿热灭菌 20 min。

5.3 培养基去杂质

琼脂质量的高低对单孢的分离有较大的影响。杂质少，培养基透明度高，孢子震落后在显微镜下易于镜检，可提高挑取单孢效率，如果质量较差，需采用蛋白去杂的方法（每配制 1000 mL 的培养基，可用一颗鸡蛋的蛋清参混。方法是將琼脂粉煮化后，冷却至 40℃~50℃，加入蛋清，并迅速用玻璃棒搅动 5 min 左右，使之成泡沫状，再重新加热煮沸，以此琼脂粉中的杂质附着于凝固的蛋白内，而后先用 1 层~2 层纱布，将大块蛋白滤除，再用 7 层纱布过滤，所得滤液即可装瓶灭菌备用。）

5.4 病菌标样消毒

取新采集的 1 cm 长的发病组织（节瘟或穗颈瘟）用 75% 酒精消毒（30 s 左右），然后用无菌水冲洗。

5.5 病菌标样培养

在干净的培养皿中放入 1 张滤纸或 2 层吸水纸，加入少量无菌水（浸湿吸水纸即可），把冲洗消毒过的发病标样放在吸水纸上盖好后，放在 26℃ 光照培养箱中培养 1 d~2 d，标样表面就会产生深灰色霉层（即孢子）。

5.6 孢子震落

按照 DB2308/T 124-2022 执行。

5.7 单孢镜检

镜检时将培养皿反转放在显微镜的载物台上，在 10×10 倍的显微镜下查找稻瘟病菌孢子，同时在其附近无其他孢子和杂菌存在时，用蘸水钢笔在单孢处轻轻点一墨水小圆点，以小圆点为中心画个小圆圈，将点过的小圆点用酒精棉擦掉，再进一步检查所划圆圈内是否是单个孢子，确定无其它孢子后，

再用蘸水钢笔在单孢处轻轻点一墨水小圆点，在无菌条件下将所画圆圈内的单孢挑入酵母淀粉培养基上。

5.8 单孢提纯

将琼脂培养基上的稻瘟病菌单孢接种到酵母淀粉培养基上，在培养皿上注明菌株编号、分离日期后，放入 26℃培养箱内黑暗培养 3 d~5 d，观察菌落生长情况，单孢菌株的菌落形态为圆形。

5.9 保存

将经鉴定得到的稻瘟病菌单孢菌株移至酵母淀粉斜面培养基上，培养 7 d~10 d 后备用。

地方标准信息服务平台