

# DB2308

## 黑龙江省佳木斯市地方标准

DB2308/T XXXX—2023

### 稻瘟病病菌单孢分离培养技术规范

(征求意见稿)

起草单位：黑龙江省林业科学院水稻研究所

联系人：王桂玲

联系电话：13845419594

邮箱：guiling31@163.com

2023-XX-XX 发布

2023-XX-XX 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场监督管理局批准发布。

本文件起草单位：黑龙江省林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。

# 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:0.25m/s~0.6m/s。

#### 4.1.2 高压灭菌锅

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

#### 4.1.3 恒温培养箱

温度范围:0C~50°C. 温度波动: $\pm 1^\circ\text{C}$ . 光照度:0lx~7500lx。

#### 4.1.4 光学显微镜

目镜:10×; 物镜:10×、40×。

#### 4.1.5 电子天平

感量0.01g。

#### 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

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

#### 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 1000ml 的培养基, 可用一只鸡蛋的蛋清参混。配法是将琼脂粉煮化后, 冷却至 40~50℃, 加入蛋清, 并迅速用玻棒搅动 5 分钟左右, 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 1~2 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 1cm 长发病组织(节瘟或穗颈瘟)用 75%酒精消毒(30s 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), 把冲洗消毒过的病组织放在吸水纸上盖好后, 放在 26℃光照培养箱中培养 1~2 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℃ 培养箱内黑暗下培养 3d~5d，观察菌落生长情况，单孢菌株的菌落为圆形。

### 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 7d~10d 后备用。

---