

GB 12743—2003

C.3.1 生长试验

C.3.1.1 取种样:原原种按种重 1/10,最多不超过 500 粒;原种取 500 粒。

C.3.1.2 播种:在防虫条件下播种和培育幼苗。种距约 3 cm~5 cm。即于上述规格的塑料果盘中每行播 10 粒,10 行,共播 100 粒/盘。其他盘则以此类推。培育温度不低于 15℃,不高于 28℃,以 18℃~23℃为宜。

C.3.1.3 观察记载:第一次于单叶展平时,记下症状明显的病苗数,第二次于第一复叶平展时,记下症状明显的病苗数,拔除病苗和健苗,留下可疑而未确定的苗。

C.3.2 接种指示植物

取可疑苗的叶片少许,在加有少许金刚砂(或硅藻土)的消毒研钵中研成汁液状,常规接种菜豆“monroe bean”。观察指示植物接种叶的病斑或幼叶的系统症状,判断可疑苗是否有病毒病。

C.3.3 琼脂双扩散血清反应

平皿中倾入熔化的培养基(NaN_3 1%, SDS 0.5%, 优质琼脂粉 0.8%, 蒸馏水配制)。凝固后打二或四组孔,中央孔滴入抗血清,四周孔滴入待测植株的汁液。每克叶片加 1 mL pH7.2~7.4 的磷酸缓冲液研磨,并加 1 mL 3% SDS 液处理,吸出汁液,加入平皿孔中(测定球状病毒时不用 SDS 处理)。平皿加盖,放 25℃~37℃ 孵育 1 d。样品孔与中央孔(抗血清)之间出现沉淀线为阳性反应。

C.3.4 电镜观察

切取一小块(1 mm×3 mm)叶片,放入一滴 2%~3% 的磷钨酸(PTA)液中,用玻棒捣碎叶组织,取液滴放在被有福尔马膜的铜网上,浮载 30 s,取出吸去多余的液体,即可在电镜下观察。如观察 CMV,可用乙酸铀 2% 液染色。

GB 12743—2003

ICS 65.020.40
B 21



中华人民共和国国家标准

GB 12743—2003
代替 GB 12743—1991

大豆种子产地检疫规程

Plant quarantine rules for
soybean seeds in producing areas



GB 12743—2003

版权专有 侵权必究

*

书号:155066·1-19951

定价: 10.00 元

2003-06-02 发布

2003-11-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

表 B.1 疫霉菌和霜霉菌卵孢子比较

项 目	疫霉菌卵孢子	霜霉菌卵孢子
卵孢子直径/ μm	23.2~31.9	23.2~29.0
卵孢子壁厚/ μm	2.3~3.2	1.3~2.6
卵孢子形态及颜色	球形、黄褐色	球形、淡黄色
卵孢子着生部位及特点	种皮里面、分散	种皮表面、集中成堆
病种子表面特征	无霉层	灰白色干粉状霉层

B.3 常用培养基及其配方

B.3.1 胡萝卜琼脂培养基(CA):胡萝卜 200 g,加 200 mL 蒸馏水组织捣碎,过滤,汁液中加 20 g 琼脂加热融化,蒸馏水补足至 1 000 mL,分装灭菌 30 min。

B.3.2 利马豆琼脂培养基(LA):利马豆 25 g,加水浸胀后加入 1 000 mL 蒸馏水,高温灭菌 30 min,过滤,加 20 g 琼脂,将溶液体积补充至 1 000 mL,高温灭菌 30 min。

B.3.3 在 CA 或 LA 培养基中添加不同药剂即配置成多种选择性培养基,常用的有以下几种:

B.3.3.1 PARP 选择性培养基:在 CA 或 LA 基础培养基中添加匹马霉素(Pimaricin)10 mg/L,安比西林(Ampicillin)250 mg/L,利福平(Rifampicin)10 mg/L,五氯硝基苯(PCNB)50 mg/L。

B.3.3.2 PARPH 选择性培养基:在 CA 或 LA 基础培养基中添加匹马霉素(Pimaricin)10 mg/L,安比西林(Ampicillin)250 mg/L,利福平(Rifampicin)10 mg/L,五氯硝基苯(PCNB)50 mg/L,恶霉灵(Hymexazol)50 mg/L。

B.3.3.3 PBNC 选择性培养基:在 LA 基础培养基中添加五氯硝基苯(PCNB)20 mg/L,苯莱特(Benlate)5 mg/L,硫酸新霉素(Neomycin Sulfate,新丝霉素)100 mg/L,氯霉素(Chloroampheicol)10 mg/L。

附 录 C

(规范性附录)

大豆病毒病种传率的检测技术

C.1 检测范围

原原种和原种。

C.2 器材

C.2.1 防虫温室或网室。

C.2.2 河沙、砾石、珍珠岩或消过毒土壤,任选一种。

C.2.3 花盆或塑料果盘(长方形,约长 45 cm、宽 33 cm、高 10 cm,底有细孔)供播种。

C.2.4 消毒钵体。

C.2.5 电镜。

C.2.6 硅藻土或金刚砂(400 目~600 目)。

C.2.7 指示作物菜豆品种“monroe bean”,供试幼苗,要求在防虫温室培育,在单叶到一片复叶时使用。

C.3 检测步骤

以生长试验为主,必要时进行指示植物反应、血清反应和电镜观察。

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
大 豆 种 子 产 地 检 疫 规 程

GB 12743—2003

*

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街 16 号
邮政编码:100045

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

开本 880×1230 1/16 印张 3/4 字数 17 千字

2003 年 11 月第一版 2003 年 11 月第一次印刷

印数 1—1 500

*

书号: 155066·1-19951 定价 10.00 元

网址 www.bzchs.com

版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68533533

A. 5.3.1 花生轻性斑驳病毒病(Peanut mild mottle virus)

叶上有黄斑、枯斑、脉坏死、斑驳或皱缩。

A. 5.3.2 苜蓿花叶病毒病(Alfalfa mosaic virus)

叶片上呈现黄色斑驳或花叶。

附 录 B

(规范性附录)

大豆疫病实验室检验方法**B.1 病原菌分离和培养****B.1.1 从病组织分离**

选择典型病株,切取病斑边缘病健组织交界处约 5 cm 长的一段组织,放入滤网中,自来水冲洗 10 min,然后切成 0.5 cm 见方的小块,放入 0.1%次氯酸钠水溶液中浸泡 0.5 min~1 min 后取出,立即放入无菌水中冲洗 3 次~4 次,用选择性培养基进行分离,室温 22℃~25℃下培养 3 d,在实体解剖镜下观察,挑取疫霉菌丝,转移到胡萝卜(CA)或利马豆(LA)培养基上繁殖。

B.1.2 从土壤分离

将土壤风干,研碎,过筛(孔径 2 mm),加蒸馏水润湿,使土壤含水量达到或接近饱和,24℃~26℃光照条件下培养 4 d~6 d后,加适量蒸馏水浸泡,浸泡水面高出土表不超过 1.5 cm,加感病大豆品种 5 mm叶碟诱集 6 h~12 h,取出叶碟,光照条件下用无菌水培养,1 d~3 d后镜检叶碟边缘有无孢子囊。若有,则吸取游动孢子悬浮液,涂于选择性培养基上,24℃~26℃黑暗条件下培养 4 h~12 h,显微镜下选择已萌发的单个孢子,用接种针挑取含单个孢子的琼脂块转移到选择性培养基上,25℃黑暗条件下继续培养,4 h~6 h后继续转皿纯化。取得单游动孢子菌株后,以形态和致病性作最终鉴定。

B.2 鉴别特征

大豆疫霉菌在 PDA 培养基上生长缓慢,气生菌丝致密,幼龄菌丝无隔多核,分枝大多呈直角,分枝基部稍有缢缩,菌丝老化时产生隔膜,并形成结节状或不规则膨大。膨大部球形、椭圆形,大小不等。菌丝体宽 3 μm~9 μm。可以产生厚垣孢子。

该菌在利马豆培养基和自来水中可以形成大量孢子囊。孢囊梗单生,无限生长,多数不分枝,孢子囊顶生,倒梨形,顶部稍厚,乳突不明显。新孢子囊在旧孢子囊内以层出方式产生,孢子囊不脱落,(23~89) μm×(17~52) μm,平均 58 μm×38 μm。游动孢子在孢子囊内形成,卵形,一端或两端钝尖,具两根鞭毛,茸鞭朝前,尾鞭长度为茸鞭的 4 倍~5 倍。

利马豆不易购得,可以用“白芸豆琼脂培养基”代替。该培养基用干豆吸胀 24 h,取吸胀豆 150 g,加 300 mL 蒸馏水,用高压灭菌锅 121℃煮 20 min,双层纱布过滤,滤汁加水补足至 1 000 mL,加琼脂制成含 2%琼脂的培养基。在白芸豆琼脂培养基平板上,菌落边缘整齐,菌丝致密,气生菌丝白色,菌落前沿有环形半透明带(淀粉利用带),菌落上可产生大量卵孢子。

用胡萝卜或利马豆固体培养基培养,一周后可产生大量卵孢子。藏卵器壁薄,球形至扁球形,直径 29 μm~46 μm,一般在 40 μm 以下。雄器侧生,长形或圆形。卵孢子球形,直径 19 μm~38 μm,有光滑的内壁和外壁,淡黄色,壁厚 1 μm~3 μm。由于常规洗涤检验也可洗下大豆霜霉菌卵孢子,为免混淆,可根据表 B.1 进行甄别。

前 言

本标准代替 GB 12743—1991《大豆种子产地检疫规程》。

GB 12743—1991《大豆种子产地检疫规程》已执行了十余年,目前,大豆上的危险性有害生物种类已经发生了变化,检验检疫技术也有了发展和提高,原规程已不适应大豆生产发展的需要,特对原标准进行修订。修订后的标准增加了 1995 年新公布的国内检疫对象——大豆疫病,该病也是我国 1993 年公布的一类进境植物检疫对象;同时,由于大豆菌核病是土传病害,种子本身并不带菌传病,因此修订后不再列为应检有害生物。有害生物的综合治理措施也做了相应的调整,增加了一些新的技术内容。

本标准的附录 B、附录 C 为规范性附录,附录 A 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由农业部种植业管理司归口。

本标准负责起草单位:全国农业技术推广中心、东北农业大学、辽宁省植保植检站、吉林省植物检疫站、黑龙江省植保植检站、农业部大豆种子质量监督检验中心、黑龙江省富锦市植保站。

本标准主要起草人:王福祥、吴立峰、文景芝、蔡明、吴雨泉、杜淑梅、孙波、万振家。

本标准委托全国农业技术推广服务中心负责解释。

本标准 1991 年首次发布,本次为第一次修订。