



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3579—2013

大豆疫霉病菌活性检测方法

Viability detection of *Phytophthora sojae* Kaufmann & Gerdemann

2013-03-01 发布

2013-09-16 实施

中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布结构不承担识别这些专利的责任。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、深圳市检验检疫科学研究院、广东省微生物研究所、中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人：章桂明、程颖慧、王颖、陈枝楠、仲建忠、李秋枫、向才玉、代京莎、汪莹、陈洪俊。

大豆疫霉病菌活性检测方法

1 范围

本标准规定了应用激光扫描共聚焦显微镜对大豆疫霉病菌(*Phytophthora sojae* Kaufmann & Gerdemann)的活性进行检测的方法。

本标准适用于大豆及土壤中携带的大豆疫霉病菌的活性检测。

2 原理

应用荧光染料对大豆疫霉病菌的卵孢子进行染色处理,根据大豆疫霉病菌不具活性的卵孢子染色后卵质体断裂、边集,呈致密浓染绿色和具有活性的卵孢子染色后卵质体呈均匀绿色的染色效果差异,运用激光扫描共聚焦显微镜对病菌孢子进行检测,分析其活性情况。

3 仪器用具和试剂

3.1 仪器用具

激光扫描共聚焦显微镜、显微镜、高压灭菌锅、生物安全柜、生化培养箱、冰箱。

3.2 试剂

吖定橙、磷酸缓冲液(PBS, 0.1 mol/μL, pH7.0)、水琼脂培养基。

4 活性检验方法

4.1 病原菌孢子获取

在显微镜下,将发现并鉴定为大豆疫霉病菌卵孢子挑到灭菌水中,配制成浓度大于1个孢子/μL的孢子悬浮液,镜检,备用。

4.2 孢子染色

使用质量浓度为100 μg/mL(溶剂为PBS)的吖定橙染色剂与孢子悬浮液以1:20体积比均匀混合,室温下避光染色15 min,16 000g离心1 min去上清液终止染色,灭菌去离子水洗涤1次,重悬,孢子浓度大于1个孢子/μL。避光放置备用。

4.3 激光扫描共聚焦显微镜活性检测

4.3.1 将完成染色样品制备玻片,封片,倒置于激光扫描共聚焦显微镜载物台上,低倍镜下找到孢子,转到63倍油镜下观察,微调至视野内图像清晰。

4.3.2 选择相应的激光管(氩离子激光器)激发荧光信号,设置荧光通道的激发波长(488 nm),收集荧光信号的发射波长(505 nm),并设置一个明场通道作为对照。

4.3.3 选择低像素的平面扫描方式进行粗略扫描(xy:512×512),依据扫描成像效果中荧光信号强弱

可调整探测针孔(Pinhole:300,即 $3.12\text{Airy Units}=2.2\text{ }\mu\text{m}$)、光电倍增管增益(Gain:500)、激光扫描强度(Scan Str:7.9%),根据图像信噪比调整扫描模式(line)、重复扫描次数(Average:2)和扫描速度(Scan speed:6)。

4.3.4 调整至成像质量较好时,再用精确扫描方式(xy:2 048×2 048)获取最终图像。

4.3.5 扫描至少 30 个孢子,观察染色情况。

注:因大豆疫霉病菌卵孢子有一定厚度,为保证图像能反映出卵孢子最真实的荧光染色情况,特别要注意观察明场通道下所得卵孢子图像是否清晰。

4.4 孢子萌发

取孢子悬浮液 100 μL ,35 $^{\circ}\text{C}$ 条件下放置 5 d,或者用 0.4%的高锰酸钾处理 20 min,打破孢子休眠后,均匀涂布于水琼脂培养基,用封口膜封口,24 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗培养,7 d 起开始观察,连续培养观察 30 d,记录孢子萌发情况。

5 结果判断与表述

结果判断与表述如下:

- 孢子染色后通过激光共聚焦显微镜随机扫描至少 30 个卵孢子,所扫描的卵孢子中,检测到含有卵质体呈均匀的绿色荧光的卵孢子(参见附录 A.1),判定该大豆疫霉病菌卵孢子具有活性;
- 孢子染色后通过激光共聚焦显微镜随机扫描至少 30 个卵孢子,所有的卵孢子染色后卵质体断裂、边集,呈致密浓染的绿色荧光(参见附录 A.2),判定大豆疫霉病菌卵孢子不具活性;
- 当上述染色特征不明显或无法进行准确判断时,再进行孢子萌发实验,根据萌发情况判定。

6 样品与原始数据保存

6.1 样品保存

存查样品应视样品的状态采用相应的保存方式,妥善保存 6 个月。如发现具有活性的大豆疫霉病菌孢子,该样品应保存 1 年,以备复验,如涉及贸易纠纷则应保存到纠纷解决完毕。保存期满后,需经灭菌处理。

6.2 原始数据保存

样品检测结束后,其原始记录单和检验报告或证书应归档,妥善保管,以备复验、谈判和仲裁。

附 录 A
(资料性附录)
大豆疫霉病菌卵孢子染色结果图

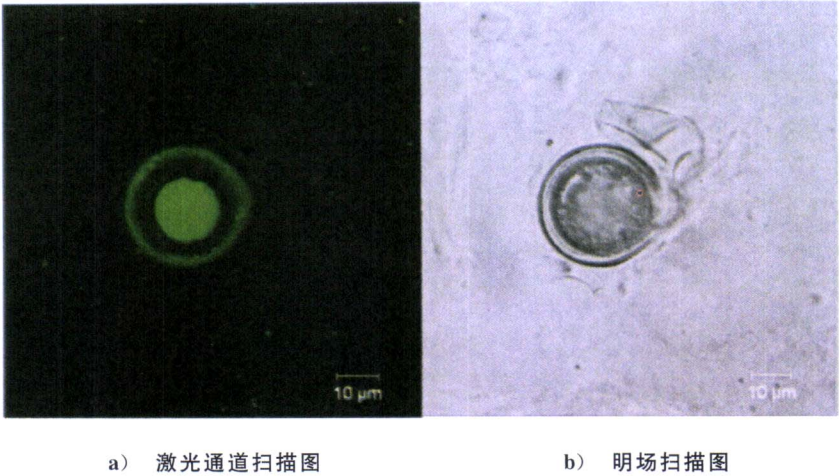


图 A. 1 大豆疫霉病菌活性卵孢子染色图

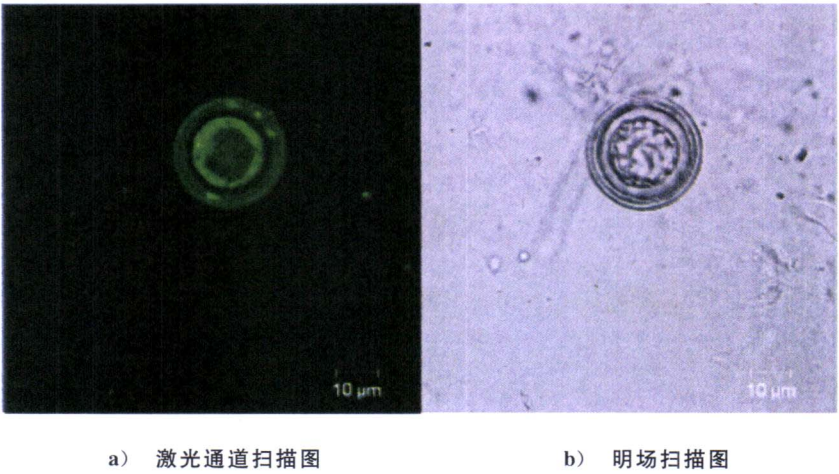


图 A. 2 大豆疫霉病菌不具活性的卵孢子染色图
