

ICS

DB51

四川省地方标准

DB51/T 1682—2013

十字花科根肿病土壤带菌生物 检测技术规程

2013 - 12 - 2 发布

2014 - 03 - 01 实施

四川省质量技术监督局

发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 原理	1
4 试剂和材料	1
5 仪器与用具	1
6 待测土壤采集	1
7 实验室检测	2
8 结果判断与记录	3
9 除害处理	3
附录 A（资料性附录） 十字花科根肿病基本信息	4

前 言

本标准附录为资料性附录。

本标准由四川省农业厅提出并归口。

本标准由四川省质量技术监督局批准。

本标准起草单位：四川省农业科学院植物保护研究所。

本标准主要起草人：刘勇、张蕾、黄小琴、周西全。

十字花科根肿病土壤带菌生物 检测技术规程

1 范围

本标准规定了十字花科植物根肿病带菌土壤检测技术。

本标准适用于十字花科植物根肿病的早期土壤带菌诊断检测及病害早期预测。

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，仅所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。

GB/T 6682-1992 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

根肿病是由芸苔根肿菌(*Plasmodiophora brassicae* Woron) 侵染十字花科植物引起的专性寄生性土传病害(附录A)，该病菌以休眠孢子(囊)随病残体在土壤中越冬并长期存活(最长达15年以上)。由于根肿病菌不能离体人工培养，而根肿病初侵染源是土壤中存活的休眠孢子。根肿病早期预测只能通过带菌土壤致病性检测进行判断，采用带菌土壤生物测定法(即采用感病十字花科作物盆栽法观察苗期根肿病发病)可以实现对土壤是否携带致病性病原菌进行快速、有效的检测和判断。

4 试剂和材料

除非另有说明，在本标准中仅使用确认的分析纯试剂和符合GB/T 6682-1992的灭菌蒸馏水。

——蔗糖。

——氯化钙(CaCl_2)。

——盐酸(HCl , 1mol/L)。

——氢氧化钠(NaOH , 5 mol/L)。

——供试种子：未包衣的大白菜感病品种：如山东四号、丰抗70、西白夏绿55等。

——花盆：直径 14.5×14.5 cm。

5 仪器与用具

高压灭菌锅、冰箱、电子天平、IQ150 pH仪、台式离心机、多功能食品加工机、生物显微镜、血球计数板、塑料量杯、400目滤布。

6 待测土壤采集

在十字花科蔬菜播种前、十字花科蔬菜移栽前或前茬作物收割后,对计划种植十字花科蔬菜的田块进行土壤采样检测。土壤样品采用“S”形采集法,采集0~15 cm耕层土壤,每个土样由15个样点组成,每个样点取样2~3 kg,等量混合后采用四分法称取10 kg土样,1 kg/袋分装入干净塑料自封袋。土壤取样点分布范围根据种植面积大小确定(表1)。

表1 十字花科根肿病田间土壤带菌检测取样标准

种植面积 (m ²)	采样标准
<2000	以田块为单位进行土壤取样
2000~20000	东、南、西、北、中五个方位,每方位随机选择3~5块面积较大田块,一个田块取一个样品。
>20000	“米”字形划分种植区域,每个区域随机选择3~5块面积较大田块,一个田块取一个样品。

7 实验室检测

7.1 样品制备

7.1.1 根肿病菌休眠孢子悬浮液

将植物根肿组织切碎,加入适量无菌水后在室温下用多功能食品加工机搅成匀浆,400目滤布过滤,收集滤液,3100 r/min离心10 min,加入60 mL无菌水重悬沉淀再3100 r/min离心10 min,重复3次收集沉淀;加入10 mL 50%蔗糖溶液均匀混合,3100 r/min离心10 min后收集上清液及少量上层灰色沉淀,加入60 mL无菌水,3100 r/min离心10 min,收集沉淀重溶于50 mL无菌水,3100 r/min离心10 min,重复3次,收集沉淀,重溶于50 mL无菌水,生物显微镜下血球计数板计数,加入无菌水,制成浓度为 1×10^6 个/mL的根肿病菌休眠孢子悬浮液,保存于4 °C冰箱内备用。

7.1.2 土壤样品

7.1.2.1 待测土样

pH仪测定土壤pH值,然后每千克待测土样加入1.1 g CaCl₂,用5 mol/L NaOH或1 mol/L HCl调节pH 6.0~6.5。分装入花盆,每盆1 kg。

7.1.2.2 土壤阳性对照

待测土样经121°C湿热灭菌1 h后,pH仪测定土壤pH值,每千克土样加入1.1 g CaCl₂,用5 mol/L NaOH或1 mol/L HCl调节pH 6.0~6.5,按 1×10^4 个/g干土的接种量均匀混入根肿病菌休眠孢子悬浮液。按每盆1 kg土样装入花盆。

7.1.2.3 土壤阴性对照

待测土样经121°C湿热灭菌1 h后,用5 mol/L NaOH或1 mol/L HCl调节pH 6.0~6.5。按每盆1 kg土样装入花盆。

7.2 白菜种子催芽、育苗

选取饱满、大小一致的白菜种子均匀地撒在铺有润湿滤纸的培养皿(直径为14 cm)中,室温(25 °C左右)下培养6 d,备用。

7.3 白菜植株移栽

将长势一致的供试白菜幼苗分别移栽至盛有不同土壤样品的花盆中，每个土壤样品定植5盆，每盆均匀定植10株，每株浇定根水50 mL。于20~25℃自然光照条件下培养，幼苗生长期每盆用pH 6.0的自来水200 mL每天浇灌一次。

7.4 调查

白菜在不同土壤样品中生长30 d后逐株调查供试白菜植株根部的肿大情况。以阴性土壤中生长的植株为对照进行比较，若待测土壤样品中生长的植株主根或须根出现肿大，记为发病；根部生长正常，记为无病。

8 结果判断与记录

8.1 试验结果成立条件

若阳性对照土壤样品中供试的白菜植株根部发生根肿病（主根或须根出现肿大），而阴性对照不发病，试验结果成立；反之则不成立。

8.2 结果判断

在试验结果成立（阳性对照土壤样品中供试的白菜植株根部出现肿大）的前提下，如果待测土壤样品中生长的白菜植株发生根肿病，则说明田间采集的土壤中携带有能够致病的根肿病菌。

9 除害处理

检测后的土壤样品及供植株，集中收集后121℃湿热高压灭菌处理。

附 录 A
(资料性附录)
十字花科根肿病基本信息

A.1 病原及其分类地位

十字花科作物根肿病由芸苔根肿菌(*Plasmodiophora brassicae*)引起,其分类地位存在争议,目前公认的观点是将根肿病菌归到原生动物界、根肿菌门(*Plasmodiophoromycota*)。

A.2 病原特征

根肿病菌的休眠孢子囊在寄主根部薄壁组织细胞内形成,球形或扁圆形、单胞、无色或略带灰色,大小1.6~4.6,常密集呈鱼卵状。条件适宜时休眠孢子萌发释放出1个具有一长一短2条鞭毛的游动孢子,肾形或椭圆形、近球形。游动孢子经过一段时间后鞭毛脱落而囊化形成休止孢。休止孢萌发形成一管状结构穿透寄主细胞壁,将原生质注入寄主细胞内,发育成原质团。

A.3 症状及危害

根肿病主要危害十字花科植物,如油菜、白菜、甘蓝、抱子芥、榨菜、萝卜、芜菁等植物。在十字花科作物栽培过程中,根肿病主要危害植物根部,侵染初期在根部形成形状及大小不一的肿瘤,后期肿瘤易被杂菌侵入造成腐烂。条件适宜时植株整个生育期均可发病,植株受侵染时间愈早,发病愈重。发病初期,地上部症状不明显。随着受害根部的逐渐膨大,病株叶片淡绿、生长缓慢。基部叶片在晴天中午常萎蔫,早晚恢复,严重者整株枯死。
