

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2473—2010

芦笋枯萎病菌检疫鉴定方法

Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *asparagi*



2010-01-10 发布

2010-07-16 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

本标准的附录 A、附录 B 和附录 C 均为资料性附录。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准主要起草单位：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。

本标准主要起草人：程颖慧、章桂明、王颖、龙海、徐浪、郑耘、杨伟东、陈枝楠、谭彦彩。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

芦笋枯萎病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了芦笋(*Asparagus officinalis* Linn)种子及新鲜芦笋组织上的芦笋枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *asparagi* Cohen & Heald)的检疫和鉴定方法。

本标准适用于对来自芦笋枯萎病疫区的芦笋种子和新鲜芦笋组织的检疫。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

SN/T 1809 进出境植物种子检疫规程

SN/T 2122 进出境植物及植物产品检疫抽样

3 原理

3.1 分类学地位

英文名: Fusarium Wilt of Asparagus

学名: *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *asparagi* Cohen and Heald 1941

芦笋枯萎病菌属真菌界(Fungi),有丝分裂孢子真菌[1](Mitosporic fungi)、丝孢菌纲(Hyphomycetes),丛梗孢目(Monilales),瘤座孢科(Tuberculariaceae),镰刀菌属(*Fusarium*)。

3.2 鉴定原理

该真菌可以通过种子传播,其为害症状、形态特征、培养性状、寄主范围等特征是其鉴定的依据。依照这些特征能将该菌与其他真菌尤其是与芦笋上的其他致病镰刀菌区别开来。

4 仪器和用具

4.1 仪器

体视显微镜、光学显微镜(带显微照相装置)、测微尺、天平(感量0.1 g)、超净工作台、光照培养箱或光照培养架等。

4.2 用具

紫外灯管、手持放大镜、滤纸、烧杯、培养皿、三角瓶、镊子、剪刀、载玻片、盖玻片、量筒、酒精灯、吸管等。

5 试剂和培养基

5.1 试剂

琼脂粉、蔗糖、无菌水、1.25%次氯酸钠(NaClO)、75%酒精、蛋白胨、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、硫酸链霉素、硫酸新霉素、胍菌唑等。

5.2 培养基

马铃薯蔗糖培养基(PSA)、胍菌唑培养基(MBA)和马铃薯葡萄糖培养基(PDA)。

6 现场抽样

按照 SN/T 1809 及 SN/T 2122 规定进行取样。

7 实验室检验

7.1 症状检查

受侵染的植株的症状参见附录 A 第 A.3 章。

7.2 保湿培养

7.2.1 种子保湿培养

将检验样品用有效成分为 1.25% 的次氯酸钠 (NaClO) 溶液表面灭菌 3 min~4 min 后,用灭菌水洗涤两次,放在垫有 3 层已灭菌湿滤纸的培养皿中,每皿 10 粒,在 20℃~22℃ 下放置 24 h 后, -20℃ 冷冻 24 h,转至 25℃ 培养箱或培养架上培养,黑暗和紫外光照各 12 h 交替,14 d 后观察种子上是否出现白色菌丝或霉状物。药剂处理过的种子需先洗去表面的种衣剂,再按照上述方法保湿培养。

7.2.2 新鲜植物组织保湿培养

取待检样品的茎切成 1 cm 长的小段,冲洗掉表面的泥土杂物后,在 75% 的酒精溶液中浸泡 1 min,经灭菌水洗涤后,用灭菌解剖刀横切成长度为 1 mm~4 mm 的小片,放置在垫有 3 层灭菌湿滤纸的培养皿中,每皿 5 片~10 片,转至 25℃ 培养箱或培养架上培养,黑暗和紫外光照各 12 h 交替,观察植物残体表面是否出现白色菌丝或霉状物。

7.3 分离培养性状

保湿培养发现疑似带病种子或组织,表面消毒后置于 MBA 培养基上,20℃ 黑暗条件下培养 5 d 以上,培养基表面生长出白色菌丝,菌丝生长速度慢,菌落小。

取 MBA 培养基上生长的培养物,置于 PSA 培养基上,20℃ 黑暗条件下培养 4 d~5 d,气生菌丝绒状,白色、粉色至淡青色,基物表面淡青色。有时产生蓝绿色菌丝团。培养基配方参见附录 B。

7.4 形态学特征

在显微镜下观察,菌丝体纤细,小型分生孢子着生于单出瓶状小梗上,假头状着生,通常生长茂盛,可变异,数量多,卵形至椭圆形,平直或弯曲,大小为 (5 μm~12 μm) × (2.5 μm~3.5 μm)。大型分生孢子着生于分支的分生孢子梗上,薄壁,通常具有 3 个~5 个分隔,镰型,具钩状的顶端,在基部有小柄,大小:3 个分隔 (27 μm~46 μm) × (3 μm~5 μm);5 个分隔 (35 μm~60 μm) × (3 μm~5 μm)。厚垣孢子,间生或顶生,多单独生长,偶尔也可以对生或串生,球形,直径 6 μm~8 μm。参见附录 C。

该病菌与其他几个近似种的形态学上的比较见表 1。

表 1 芦笋上的三种镰刀菌形态学特征比较表

比较项目	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>asparagi</i>	<i>F. redolens</i>	<i>F. moniliiforme</i>
培养性状	培养 4 d~5 d,菌落直径约 2.5 cm~4.5 cm,气生菌丝绒状,白色、粉色至淡青色,基物表面淡青色,基物无色。有时产生蓝绿色菌丝团。	气生菌丝绒状至粉状,菌落灰色至微红褐色或浅褐色,菌落较平坦。	培养 4 d~5 d,菌落直径约 3.2 cm~4 cm,气生菌丝绒状至粉状,白色、至淡牵牛紫,有时产生桔橙色分生孢子座。基物表面淡牵牛紫,培养基不变色。
大型分生孢子	着生于分支的分生孢子梗上,薄壁,通常具有 3 个~5 个分隔,镰型,具钩状的顶端,在基部有小柄,大小:3 个分隔 (27 μm~46 μm) × (3 μm~5 μm);5 个分隔 (35 μm~60 μm) × (3 μm~5 μm)。	形成于分生孢子梗上或粘孢团层上,镰刀型,有足细胞,大型分生孢子大小为 (20 μm~55 μm) × (4.5 μm~5.5 μm)。	镰刀型,细长,顶胞渐尖,基胞足跟明显至不明显,隔膜易消解,3 个~5 个分隔,多数 3 隔, (25 μm~55 μm) × (3 μm~4.5 μm)。

表 1 (续)

比较项目	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>asparagi</i>	<i>F. redolens</i>	<i>F. moniliiforme</i>
小型分生孢子	着生于单出瓶状小梗上,假头状着生,通常生长茂盛,可变异,数量多,卵形至椭圆形,平直或弯曲,大小为 $(5\ \mu\text{m}\sim 12\ \mu\text{m})\times(2.5\ \mu\text{m}\sim 3.5\ \mu\text{m})$ 。	数量多,卵形或圆柱形,略微弯曲,端部有节点。大小为 $(7\ \mu\text{m}\sim 14\ \mu\text{m})\times(3\ \mu\text{m}\sim 4\ \mu\text{m})$ 。	数量多,卵形至椭圆形,在产孢细胞上串生,单瓶梗,也有假头生, $(7\ \mu\text{m}\sim 15\ \mu\text{m})\times(2\ \mu\text{m}\sim 3\ \mu\text{m})$ 。
厚垣孢子	间生或顶生,数量较多,多单独生长,偶尔也可以对生或串生,球形,直径 $6\ \mu\text{m}\sim 8\ \mu\text{m}$ 。	间生或顶生,球形或椭圆形,直径 $7\ \mu\text{m}\sim 11\ \mu\text{m}$ 。	未见。

7.5 致病性测定

将粟米与水(2:1,体积比)连续湿热灭菌两次,每次1 h,冷却后接种分离物于其中,20℃培养3周风干,加入土中(1 kg 土壤加8 g 粟米培养物)拌匀,种植苗龄为13周的芦笋幼苗于其中,20℃、9 h光照条件下种植8周后,检查植株有无发病,并再次从病部分离病原菌,观察其形态是否与7.4一致。

8 结果判定

如分离物的各种形态特征与7.3、7.4描述的芦笋枯萎病菌培养性状和形态特征相吻合,且致病性测定结果符合芦笋枯萎病症状特征且重新分离获得的病原菌形态学特征与7.4描述吻合,可判定为芦笋枯萎病菌。

9 样品保存

如发现芦笋枯萎病菌,该样品至少保存6个月,以备复验、谈判和仲裁。保存期满后,需经灭菌处理。

10 菌种保存

分离到的芦笋枯萎病菌菌种,转入PDA试管斜面培养基上,置于5℃黑暗条件下保存至少12个月,以备复验、谈判和仲裁。

附 录 A

(资料性附录)

芦笋枯萎病菌的分布、寄主、症状及生物学特性

A.1 分布

德国、荷兰、法国、意大利、比利时、西班牙、希腊、坦桑尼亚、南非、澳大利亚、新西兰、加拿大、美国、日本、中国(台湾)。

A.2 寄主

芦笋(*Asparagus officinalis* Linn)。

A.3 症状

发病植株表现为黄化矮小、凋萎而枯死。病菌侵染芦笋的营养根,表皮呈红棕色病斑或者凹陷的褐色病斑,根茎部维管束变褐色,地面植株上部呈黄化、矮化、凋萎、落叶或枯死状。幼笋期染病,幼笋细小或难以出土,嫩茎染病,茎基部变褐或纵裂,拟叶凋萎。潮湿时表面出现白色至粉红色薄霉层病征(病菌分生孢子梗及分生孢子)。

A.4 生物学特征

病菌依靠带菌种子、种苗和病残体进行远距离传播,在田间主要通过芦笋潜叶蝇(*Ophiomyia simplex*)、风雨和流水进行传播。病原菌长期栖息于土壤中,能大量繁殖,抗逆性强。通过寄主植株根部自然孔口或伤口侵染植株,发病后产生大量的分生孢子进行再侵染。

附 录 B
(资料性附录)
培养基配方

B.1 MBA 培养基配方(1 L)

蛋白胨 20 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4) 1 g
硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.5 g
琼脂 20 g
硫酸链霉素(streptomycin sulphate) 100 mg
硫酸新霉素(neomycin sulphate) 12 mg
胍菌唑(myclobutanil) 200 mg

B.2 PSA 培养基配方(1 L)

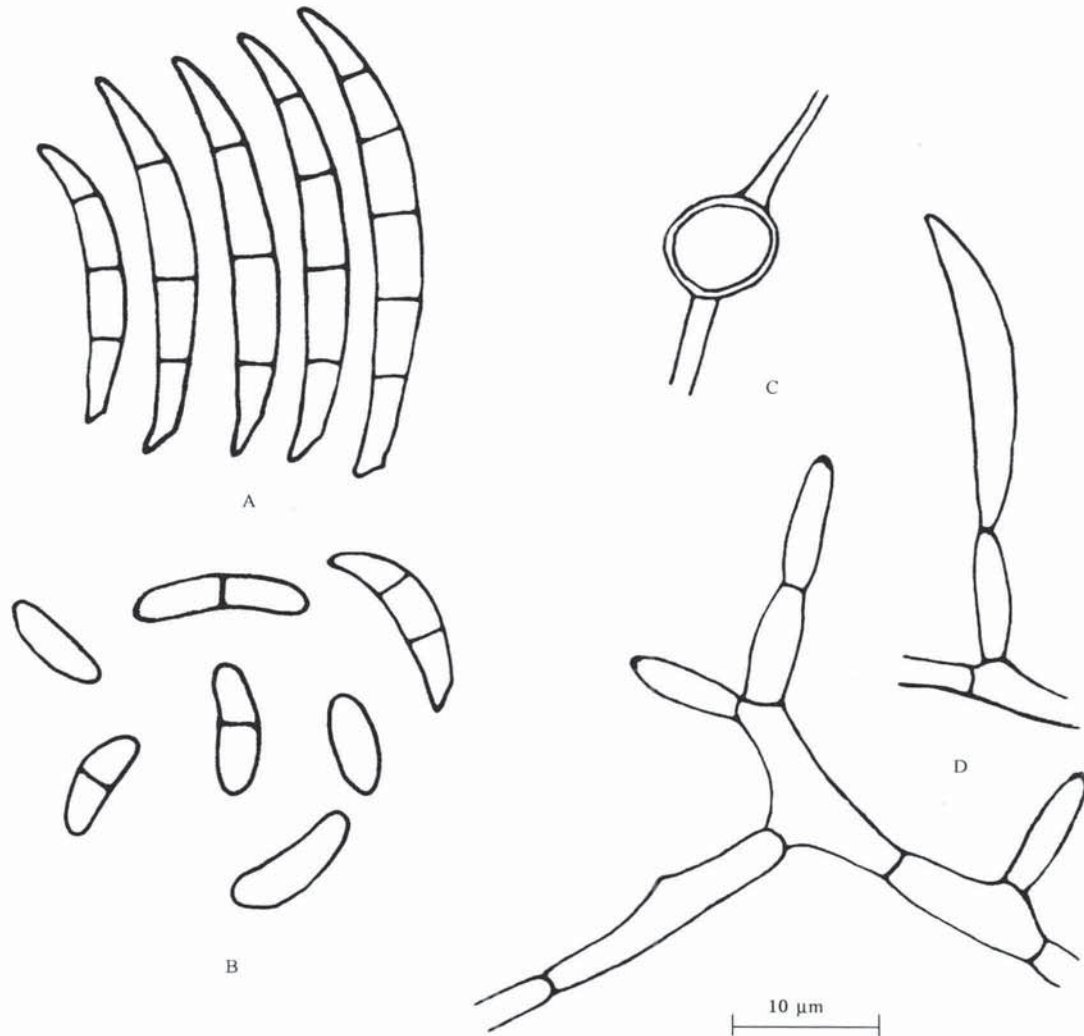
马铃薯 200 g
蔗糖 20 g
琼脂 20 g

B.3 制作方法

将配方中的各成分加水煮沸溶解后,补水至 1 000 mL,pH 值调到 7.2~7.4,分装后 121 ℃ 15 lb 湿热灭菌 20 min。

附录 C
(资料性附录)

F. oxysporum 形态特征图



- A——大型分生孢子；
B——小型分生孢子；
C——厚垣孢子；
D——产孢细胞。
(仿 陈鸿逵, 1992)

图 C.1 *F. oxysporum* 形态特征图