

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1135.6—2008

马铃薯缜腐病菌检疫鉴定方法

Identification of *Phytophthora erythroseptica* Pethybridge

2008-04-29 发布

2008-11-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国 家 质 量 监 督 检 验 检 疫 总 局

前 言

SN/T 1135 共分为六个部分：

- 马铃薯癌肿病检疫鉴定方法；
- 马铃薯黄化矮缩病毒检疫鉴定方法；
- 马铃薯帚顶病毒检疫鉴定方法；
- 马铃薯黑粉病菌检疫鉴定方法；
- 马铃薯环腐病菌检疫鉴定方法；
- 马铃薯维腐病菌检疫鉴定方法。

本部分是 SN/T 1135 的第 6 部分。

本部分的附录 A、附录 B 为资料性附录。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位：中华人民共和国云南出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：曹云华、周力兵、蒋小龙、丁元明、寸东义、杜宇、刘忠善、和捷。

本部分系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

马铃薯缜腐病菌检疫鉴定方法

1 范围

SN/T 1135 的本部分规定了马铃薯缜腐病菌检疫鉴定方法。

本部分适用于马铃薯中缜腐病菌的检疫和鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本部分的引用而成为本部分的条款。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部分,然而,鼓励根据本部分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部分。

SN/T 1131—2002 大豆疫霉病菌鉴定方法

3 原理

马铃薯缜腐病菌(*Phytophthora erythroseptica* Pethybridge)属真菌界(Fungi),卵菌门(Oomycota),腐霉目(Pythiales),腐霉科(Pythiaceae),疫霉属(*Phytophthora*)。该病菌是世界马铃薯种植地区一很严重的病菌,它主要以卵孢子在土壤中存活,存活期至少7年,受侵染的种薯和种薯上附着的土壤是远距离传播的初侵染源。该病原菌的为害症状、孢子囊和卵孢子的形态特征是鉴定该病菌的依据。

4 仪器、设备

- 4.1 多功能显微镜(含照相装置、测量及显示器)。
- 4.2 体视显微镜。
- 4.3 恒温恒湿培养箱。
- 4.4 光照培养箱。
- 4.5 高压灭菌器。
- 4.6 超净工作台。
- 4.7 普通天平(感量1/100)。
- 4.8 电子天平(感量1/1 000)。
- 4.9 干热灭菌箱。
- 4.10 普通冰箱。
- 4.11 -20℃低温冰箱。
- 4.12 培养皿(直径9 cm)。
- 4.13 三角烧瓶(1 000 mL,500 mL,250 mL,50 mL)。
- 4.14 载玻片(25 mm×75 mm,厚0.8 mm)。
- 4.15 盖玻片(18 mm×18 mm)。
- 4.16 Parafilm膜或铝铂纸。
- 4.17 冻存管(1.8 mL,5.0 mL)。

5 试剂

- 5.1 次氯酸钠溶液。
- 5.2 碳酸钙。

- 5.3 琼脂粉。
- 5.4 琼脂糖。
- 5.5 匹马霉素。
- 5.6 万古霉素。
- 5.7 阿莫西林。
- 5.8 利福平。
- 5.9 制霉菌素。
- 5.10 五氯硝基苯。

6 培养基

6.1 基础培养基

黑麦番茄汁琼脂培养基、V8培养基(V8A),其配制方法及步骤参见第A.1章。

6.2 选择性培养基

使用玉米琼脂粉加抗菌素培养基(P10VP+)或加抗菌素的黑麦番茄汁琼脂培养基,在此培养基上培养的疫霉菌菌丝,再转移到V8培养基上可促进藏卵器的形成。配制方法参见第A.2章。

6.3 液体培养基

使用豌豆液体培养基,其配制方法及步骤参见第A.3章。

7 检疫鉴定方法

7.1 症状检查

马铃薯维腐病菌侵染的种薯有弹力,但不软腐似海绵状。受侵染组织易被细菌性软腐病菌感染而产生软腐。块茎末端或附近出现粉红的腐烂。侵染的块茎用水清洗后,病健交界明显。切开表面暴露在空气中20 min会变成粉红色,随后由于氧化而变成黑色或紫褐色。这些颜色变化也和细菌性软腐相关,但维腐病菌常常有氨的刺激性气味。地下马铃薯组织如根,匍匐茎,块茎和茎基都会受到侵染。手压侵染块茎,有汁液流出,不能恢复到原来的形状。

7.2 分离方法

7.2.1 将现场收集的土样称量,每份样10 g碾碎放入50 mL的灭菌洁净烧杯中。加入适量的灭菌蒸馏水,使土壤呈饱和湿润状态,但避免出现流水,然后用parafilm膜封口保湿,也可用无色透明塑料袋保湿。并将土样置于22℃~26℃,光照条件下4 d~6 d。

7.2.2 在处理好的土壤中加入10 mL~15 mL蒸馏水,水面距土表1.0 cm~1.5 cm,然后可放入0.6%次氯酸钠处理过的马铃薯叶片(直径6 mm)或番茄幼苗(在经过灭菌的蛭石里生长4星期)诱集。

7.2.3 马铃薯叶片诱集48 h~72 h后取出,在灭菌纸上晾干,然后在P10VP+或加抗菌素的黑麦番茄汁培养基上培养;24 h后用无菌的镊子把番茄幼苗水面位置的茎掐掉,使其受伤。48 h~72 h后,取出幼苗,在灭菌纸上放干,将其放在P10VP+或加抗菌素的黑麦番茄汁培养基中22℃~25℃做进一步培养。

7.2.4 在无菌操作台上,从块茎内部坏死区域边缘切10 mm×5 mm×3 mm的小块,用0.6%次氯酸钠表面消毒30 s,用无菌水冲洗两次,放在无菌滤纸上晾干,然后将其放在1.5%水琼脂(9 mm培养皿)在22℃黑暗下培养3 d~4 d,然后用无菌环将边缘旺盛生长的菌丝尖移植到V8培养基或黑麦番茄汁培养基中作纯化培养。

8 鉴定特征

马铃薯维腐病菌的菌丝很整齐,最大直径可达7 μm,水中悬着的菌丝呈圆形或多角形。孢子囊水中产生,形状变化大,椭圆形或倒梨形,中部常缢缩。孢囊孢子43(~47) μm×26(~69) μm,无乳突,顶

端加厚不明显,具有内层出现象。培养形成的藏卵器大小为 $30\sim 35(\sim 46)\mu\text{m}$,壁光滑,厚 $1\mu\text{m}$ 。雄器穿雄生,椭圆形或多角形, $14(\sim 16)\times 13\mu\text{m}$ 。卵孢子充满了藏卵器,壁厚 $2.5\mu\text{m}$ 。形态特征图参见附录B。

9 结果评定

如马铃薯块茎感染症状符合7.1的相应症状、分离培养的病原菌特征与第8章描述特征吻合,鉴定为马铃薯缜腐病菌。

10 菌株的保存

可将菌丝移到V8或黑麦番茄汁斜面培养基上,放入 4°C 冰箱中保存;也可将分离到的菌丝移入豌豆汤培养基中,在 25°C 下生长1星期,然后倾去培养液,把菌丝放入冻存管在 -20°C 保存。

附 录 A

(资料性附录)

基础培养基、选择性培养基和液体培养基的配制方法

A.1 基础培养基

A.1.1 黑麦番茄汁培养基

120 g 黑麦加水浸提 36 h,用纱布过滤,滤液备用,过滤后的黑麦再加水,放于 50℃ 中浸提 3 h,用纱布过滤并挤压,过滤干净,滤液备用;量番茄汁 150 mL 和黑麦滤液 450 mL 混合,加水至 1 000 mL,加琼脂 17 g,碳酸钙(CaCO₃)1.2 g,调 pH 值至 7.0,121℃ 灭菌 20 min。

A.1.2 V8 培养基

300 mL V8 汁,17℃ 4 000 g 离心 20 min,上清液与碳酸钙(CaCO₃)1.2 g,琼脂 15 g 混合,加无菌水至 1 000 mL,121℃ 灭菌 20 min。

A.2 选择性培养基

A.2.1 P10VP+ 培养基

Difco 玉米粉琼脂 17 g,400 μL 匹马霉素,0.2 mg 万古霉素,160 mg 五氯硝基苯,加无菌水至 1 000 mL,121℃ 灭菌 20 min。

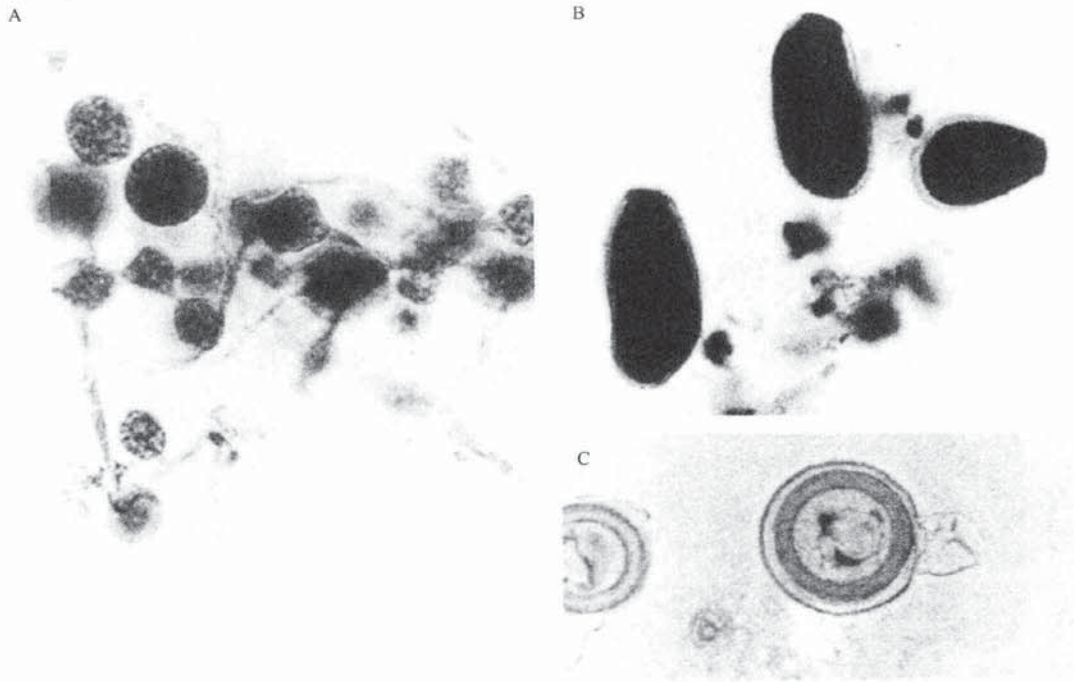
A.2.2 加抗菌素黑麦番茄汁培养基

80 g 黑麦,浸提方法同 A.1.2,取黑麦浸提液 450 mL,加番茄汁 150 mL,琼脂 17 g,碳酸钙(CaCO₃)1.2 g,阿莫西林 100 mg,五氯硝基苯 30 mg,利福平 10 mg,制霉菌素 10 mg,无菌水 400 mL,121℃ 灭菌 20 min。

A.3 液体培养基

120 g 冷冻豌豆,加 500 mL 蒸馏水高压锅煮 5 min,过滤,滤液补足至 1 000 mL,121℃ 灭菌 20 min。

附录 B
(资料性附录)
病原菌形态特征图



- A——悬于水中的菌丝体；
B——孢子囊；
C——有穿雄生雄器的藏卵器和卵孢子，×500。

图 B. 1 病原菌形态特征图

(图片引自《Scientific Proceeding of the Royal Dublin Society N. S. 》13:547-548,1913)