

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1135.1—2002

马铃薯癌肿病检疫鉴定方法

Methods of quarantine and identification for *Synchytrium endobiticum* (Schilberszky) Percival

2002-08-02 发布

2003-01-01 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 均为规范性附录。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国云南出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：蒋小龙、沐咏民、寸东义、魏正、白松。

本标准系首次发布的检验检疫行业标准。

马铃薯癌肿病检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了马铃薯癌肿病菌的检疫鉴定方法。

本标准适用于马铃薯种薯、食用薯以及夹带土壤中马铃薯癌肿病菌的检疫和鉴定。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1

癌肿 wart

癌肿病的典型症状,花椰菜形,产生在块茎芽眼部位。初期白浅色,后为深褐色。此外,在芽眼部位还可形成“棒状”、“掌状”等膨大畸形组织。

2.2

泡突 blister

产生于休眠芽、幼芽表面。单个透明,隆起小泡,大小为 0.5 mm 左右。

2.3

莲花座 rosette

产生于休眠芽、幼芽及癌肿组织表皮。形似莲花,其组织切片呈现为大型薄壁细胞组成的环状组织。其中央含夏孢子囊(堆)或休眠孢子囊。

2.4

疮痂 scab

在块茎表面产生不规则形或环形(中央凹陷,形似火山口)隆起组织,沿水平扩展。

2.5

始细胞 protocell

被侵染细胞周围的毗邻细胞呈辐射状的增生,中心被侵染细胞内的菌体为始细胞。

2.6

原孢堆 prosorus

由始细胞逐渐扩大并充满寄主细胞而成,有孢壁。

2.7

泡囊 vacuole

产生于原孢堆外壁上方。原孢堆细胞质和孢核通过外壁小孔排到新薄囊泡内。

2.8

夏孢子囊堆 summer sporangiosorus

由薄囊泡发育而成。呈卵形、扁平或近球形,薄壁,直径为 $47\ \mu\text{m}\sim 72\ \mu\text{m}\times 81\ \mu\text{m}\sim 100\ \mu\text{m}$ (有资料报道为 $40.3\ \mu\text{m}\sim 77\ \mu\text{m}\times 31.4\ \mu\text{m}\sim 64.4\ \mu\text{m}$)。

2.9

夏孢子囊 summer sporangium

由夏孢子囊堆的内含物发育成多角形、卵形或近球形。

2.10

休眠孢子囊 resting sporangium

单个产生于癌组织表层细胞内,卵圆形、长圆形或角形。锈褐色,直径 $25\ \mu\text{m}\sim 75\ \mu\text{m}$ 。壁厚,分三层,其内壁薄,无色。中壁光滑,金褐色,壁厚。外壁厚薄不均,有皱纹(不规则脊突)。成熟休眠孢子囊内含数百个游动孢子。

3 原理

3.1 马铃薯癌肿病菌的分类地位

马铃薯癌肿病菌(*Synchytrium endobiotium* (Schilberszky) Percival, 异名 *S. Salani* Masee 和 *Chrysochlyctis endobiotium* Schilberszky)属壶菌门(Chytridiomycota)壶菌纲(Chytridiomycetes),壶菌目(Chytridiales),集壶菌科(Synchyrtiaceae),集壶菌属(*Synchytrium*),内生集壶菌(马铃薯癌肿病菌),可侵染马铃薯薯块,引起癌肿,英文名 Potato wart disease,简称马铃薯癌肿病。

3.2 检疫原理

该病原真菌是典型的土壤习居菌,主要以抗逆性很强的休眠孢子囊在病薯块内和土壤中越冬并长期生存。当温湿度适宜时,休眠孢子囊萌发形成游动孢子,侵入寄主表皮细胞引起膨大,生长成为单核有壁的菌体,进一步发育成原孢堆。

本标准根据病原菌的这一特性,首先检查薯块是否有癌肿病变,并将可疑薯块进行切片检查病原菌;其次是收集随马铃薯携带的土壤,检查其中是否有休眠孢子囊并检测其活力。

3.3 鉴定原理

马铃薯癌肿病菌引起的主要症状特征、病原菌在不同浸染时期的繁殖体和形态特征是鉴定该病原菌的依据。

4 仪器及用具

- a) 体视显微镜;
- b) 荧光显微镜;
- c) 培养皿:直径 $4\ \text{cm}$ 、 $5\ \text{cm}$ 、 $6\ \text{cm}$;
- d) 小烧杯: $50\ \text{mL}$ 、 $150\ \text{mL}$ 、 $250\ \text{mL}$;
- e) 样筛:孔径为 $105\ \mu\text{m}$ 、 $74\ \mu\text{m}$ 、 $37\ \mu\text{m}$;
- f) 载玻片;
- g) 盖玻片;
- h) 滴管: $2\ \text{mL}$ 、 $3\ \text{mL}$;
- i) 移液管: $10\ \text{mL}$ 。

5 试剂

本标准所用试剂为化学纯。

- a) 氯化钠(NaCl);
- b) 氯化铵(NH_4Cl);
- c) 硝酸铵(NH_4NO_3);
- d) 四氯化碳(CCl_4);
- e) 2%酸性品红($\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{O}_9\text{N}_3\text{S}_3\text{Na}_2$);
- f) 1%碱性品红($\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{ClN}_3$);
- g) 0.1%升汞(HgCl_2);
- h) 吡啶橙($\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{ClZnCl}_2$);
- i) 曲拉通 X-100($\text{C}_{34}\text{H}_{62}\text{O}_{11}$)。

6 现场检疫

6.1 直观检查

重点检查是否有腐烂、开裂、孢斑、肿块等病害症状和土壤等。最低抽检 10 件且不少于 1 000 粒。

6.2 抽样

随机抽样,每份样品的抽样点不少于五个。

500 粒以下取一份;501~2 000 粒取二份;2 001~5 000 粒取三份;5 001~10 000 粒取四份;10 001 粒以上每增加 10 000 粒增取一份样品,不足 10 000 粒的余量计取一份样品。

每份样品为 20 粒。

6.3 土壤的收集

通过毛刷或水洗(少量水)方法小心收集块茎表面土壤,并注意收集包装内外散落的土壤。土壤样品重量在 500 g~1 000 g 左右。将土样风干、研细、分别用 105 μm 、74 μm 、37 μm 的样筛过筛,除去石块等杂质,取底层筛下土壤,待检。

7 鉴定特征

7.1 症状主要特征

马铃薯癌肿病菌可引起癌肿、泡突、莲花座、疮痂等典型症状。

7.2 病原主要特征

马铃薯癌肿病菌以菌体进行繁殖,其特征是菌体内生,整个菌体转化为一个或多个繁殖体,根据不同的发育阶段可观察到始细胞、原孢堆、孢囊、夏孢子囊堆、夏孢子囊、休眠孢子囊等病原特征。

8 试验室鉴定

8.1 薯块检验

首先将现场抽样的可疑薯块,借助体视显微镜检查,观察是否有癌肿、泡突、莲花座及各畸形癌肿组织表层内是否有夏孢子囊(浅色)或休眠孢子囊(深色);其次再将薯芽及其周围组织连同表皮作断面切片,在显微镜下检查有无原孢堆和休眠孢子囊。

8.2 病组织检查

将肉眼可见的癌变组织置于灭菌水玻片上静置 30 min 左右,即可见大量游动孢子释出。用 0.1% 升汞水一滴杀死固定,在空气中晾干,再用 1% 碱性品红染色,洗去染色液镜检,可见单鞭毛的游动孢子和双鞭毛的结合子。

8.3 土壤检查

将 6.3 制备的土壤样品用四氯化碳-乳酚油进行萃取,制成土壤悬浮液,即刻取悬浮液制片镜检是否有休眠孢子囊(方法见附录 A)。

8.4 休眠孢子囊的提取

将带菌的土壤采用“清水漂浮法”提取休眠孢子囊,方法是将菌土样风干、研细、分别用 105 μm 、74 μm 、37 μm 的样筛过筛,除去石块等杂质,取底层筛下土壤 1 g 左右,放入试管中,然后连续加水,充分搅拌,静置 3 min~5 min,清液上浮,缓缓移去,休眠孢子囊浮在此清液中。

8.5 土壤中休眠孢子囊活力测定

8.5.1 染色法

将 8.4 提取的休眠孢子囊,用 2% 酸性品红热处理 2 min~3 min,制片镜检,活的染色慢且呈浅玫瑰色,死的染色快且深红色。

8.5.2 质壁分离方法

将 8.4 提取的休眠孢子囊,用无机盐水溶液如氯化钠(36 g/100 mL)或氯化铵(48 g/100 mL)或硝

酸铵(48 g/100 mL)处理 5 min~10 min,在这些盐溶液中,活的孢子囊全部呈现质壁分离,死的孢子囊则无质壁分离现象。

8.5.3 荧光反应法

将 8.4 提取的休眠孢子囊,用吖啶橙染色制片,在荧光显微镜蓝色光下观察休眠孢子囊荧光反应。活休眠孢子囊内含物清晰,囊壁及内含物产生强烈荧光反应。死休眠孢子囊内含物不清晰,无荧光反应,呈暗色(方法见附录 B)。

9 结果判定

凡同时具备本标准 7.1 症状特征之一和 7.2 病原特征之一的,可判定为马铃薯癌肿病菌。

凡符合 8.5.1、8.5.2、8.5.3 活性特征之一的,可判定为土壤带有马铃薯癌肿病菌的活性休眠孢子囊。

10 样品留存

经鉴定确定为马铃薯癌肿病的样品,将病原菌切片制成永久玻片,病薯或病土密封在塑料袋中 4℃ 保存,以便接受复核或进行重复鉴定。

附 录 A

(规范性附录)

四氯化碳-乳酚油漂浮法

称取备好的土样 1.5 g~2 g 倒入试管内,加 8 mL 四氯化碳,充分搅拌,静置 2 min~3 min 让土壤颗粒等杂质沉降,休眠孢子悬浮在四氯化碳液中,然后将沉淀后的悬浮液倒入另一个试管中,加入 2 mL 的乳酚油,充分搅拌,使四氯化碳悬浮液与乳酚油混合均匀,然后静置,乳酚油密度小于四氯化碳密度,逐渐上浮分层,最后完全分层,形成明显的乳酚油和四氯化碳两层,休眠孢子囊也随着漂浮在乳酚油中,成乳酚油休眠孢子囊悬浮液。

用移液管定量吸取乳酚油孢子囊悬浮液 0.1 mL,制片镜检。

附录 B

(规范性附录)

荧光反应法操作步骤

B.1 称取 0.5 g 待检土壤,倒入试管内,加入 10 mL 0.1% 曲拉通 X-100 1×10^{-4} 磷酸缓冲液 (pH7.4) 浸泡 6 min~10 min,然后充分震荡摇匀,通过 150 μm 、105 μm 、37 μm 网筛湿滤,再先后用 1×10^{-4} 磷酸缓冲液和 0.85% 氯化钠溶液冲洗 37 μm 筛的筛上物,将经过冲洗的筛上物(休眠孢子囊)收集到离心管中,离心 5 min (2 000 r/min),移去上清液,留下沉淀物,即休眠孢子囊。

B.2 向离心管内加入新配制的 5×10^{-4} mol/L 的吖啶橙染液 3 mL~5 mL,染色约 10 min 左右,然后离心 5 min (2 000 r/min),移去离心管上清液。

B.3 向离心管中加入 2 mL~4 mL 磷酸缓冲液,摇匀,离心,移去上清液,然后再加入 10% 水合甘油清洗液,摇匀,再离心,达到洗去多余染色剂的目的。

B.4 镜检荧光反应,取一滴清洗干净的休眠孢子囊液,制片检查,所用载玻片需经过酒精冲洗。镜检光源在蓝光下,激发光源为 400 nm,阻断光源为 530 nm。镜检时,有活力孢子囊,发生明显荧光反应,无活力的死休眠孢子囊则无荧光反应。

配制好的染料母液 (5×10^{-4} mol/L) 保存在棕色玻璃瓶中,在 4℃ 下保存。
