



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1135.11—2013

马铃薯皮斑病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Polyscytalum pustulans* (M.N.Owen et Wakef.)

M.B.Ellis

2013-11-06 发布

2014-06-01 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

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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：中国检验检疫科学研究院。

本部分起草人：吴品珊、杜洪忠、严进、张秋娥。

马铃薯皮斑病菌检疫鉴定方法

1 范围

SN/T 1135 的本部分规定了马铃薯皮斑病菌的检疫鉴定方法。
本部分适用于马铃薯块茎上马铃薯皮斑病菌的检疫和鉴定。

2 病菌的基本信息

中文名:马铃薯皮斑病菌
英文名:Skin spot of potato
学名:*Polyscytalum pustulans* (M.N.Owen et Wakef.) M.B.Ellis
异名:*Oospora pustulans* M.N.Owen & Wakef.
分类地位:真菌界(Fungi),有丝分裂孢子真菌(Mitosporic fungi),蛇孢霉属(*Polyscytalum*)。
传播途径:病菌的初侵染源是块茎,病菌孢子可以通过雨水、灌溉近距离传播,远距离通过种薯或带病土壤进行传播。
马铃薯皮斑病菌的其他信息参见附录 A。

3 方法原理

以马铃薯皮斑病菌形态学特征和分子生物学特征为鉴定依据。

4 仪器和用具

4.1 仪器

生物显微镜(具测量功能),体视显微镜,超净工作台,生物培养箱,天平,高压灭菌锅,台式高速离心机,pH 计,水浴箱,实时荧光 PCR 扩增仪。

4.2 用具

烧杯,三角瓶,量筒,试管,培养皿,酒精灯,镊子,剪刀,解剖刀,接种针,载玻片,盖玻片,塑料研杵,移液器,移液器吸头,离心管,液氮罐。

5 试剂和培养基

5.1 试剂

葡萄糖,琼脂粉,液氮,Tris-HCl, MgCl₂, HCl, EDTA, NaOH, NaOAC, KCl, Tris, CTAB, TAE, 无水乙醇(Ethanol), SYBR Green I 核酸染料,氯仿(Chloroform),异丙醇(Isopropanol),异戊醇(Isoamyl alcohol),蛋白酶 K, Taq DNA 聚合酶, dNTP, 通用引物 ITS5 和 ITS4, 实时荧光 PCR 特异性引物 PpustF1、PpustR2 及探针 PpustPr1。

5.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)。具体配方参见附录 A。

6 实验室检疫

6.1 症状检查

观察马铃薯块茎上是否具有浅棕色的病斑以及紫黑色且略微凸起的病斑。挑选具类似病斑的马铃薯块茎进行分离及保湿培养。病害症状图参见附录 A。

6.2 分离培养

取疑似症状病斑的病健交界处组织,用 70%乙醇表面消毒 1 min,灭菌水冲洗 3 次,置于 PDA 培养基平皿中,20℃培养,培养 3 d~5 d 后开始观察。若发现白色或灰白色菌落,转接到新的 PDA 培养基平皿上,培养 5 d 后开始观察病菌的菌落培养性状,同时在显微镜下观察记录分生孢子、产孢细胞的形状、大小等。

6.3 保湿培养

将疑似症状的马铃薯块茎,置密闭塑料盒中 15℃~20℃高湿度下培养 5 d,若病斑处长出病菌的子实体或菌丝体,用接种针挑子实体或菌丝体直接制片,置显微镜下观察,记录分生孢子、产孢细胞的形状、大小等。

6.4 分子生物学检测

6.4.1 DNA 提取

按 CTAB 方法提取 DNA 参见附录 B。

6.4.2 实时荧光 PCR 检测

实时荧光 PCR 引物序列为 PpustF1:5'-AGCGCCCCACAGAAGCC-3',PpustR2:5'-GACCGAACTTCTCCGAGAGGT-3, *Taq* Man 探针 PpustPr1:5'-FAM-CGGCTCTAAACCCTACCGAAGTAGGGTAGC-BHQ-3'。探针 5'端标记的荧光报告基团为 FAM,3'端标记的荧光猝灭基团为 BHQ-1。

25 μL 反应体系中含:样品 DNA 1 μL,10×PCR buffer 2.5 μL,25 mM MgCl₂ 2 μL,2.5 mM dNTPs 2 μL,10 μM Primers 各 1 μL,10 μM 探针 PpustPr1 1.5 μL,5 U/μL *Taq* DNA polymerase 0.5 μL,ddH₂O 12.5 μL。同时要设置空白对照,以 Tris-EDTA 缓冲液代替 DNA 样品。

反应循环为 94℃ 10 min→94℃ 15 s、56℃ 60 s 循环 40 次。

6.4.3 ITS 序列比对

利用真菌通用引物 ITS5(5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')进行扩增。

25 μL 反应体系中含:样品 DNA 1 μL,10×PCR buffer 2.5 μL,25 mM MgCl₂ 2 μL,2.5 mM dNTPs 2 μL,10 μM Primers 各 1 μL,5 U/μL *Taq* DNA polymerase 0.3 μL,ddH₂O 15.2 μL。同时要设置空白对照,以 Tris-EDTA 缓冲液代替 DNA 样品。

PCR 反应条件为:预变性,94℃ 4 min→变性,95℃ 1 min、退火 56℃ 30 s、72℃ 45 s,35 个循环→

72 ℃ 10 min→4 ℃ 保存。

PCR 产物的检测,在 1×TAE 电泳缓冲液中,1.5% 琼脂糖(含 SYBR Green I 核酸染料)凝胶电泳,5 V/cm,凝胶成像仪分析结果。如有 1 000 bp 左右大小的单带出现,将扩增产物进行序列测定。

将测序获得的序列与 GenBank 中公开发表的 *Polyscytalum pustulans* 的序列进行同源性比对分析。

7 鉴定特征

7.1 培养性状

马铃薯皮斑病菌在 PDA 培养基上的菌落白色至灰白色。有些菌株在 15 ℃ 下培养 1~2 个月后可以形成菌核,直径 60 μm~1 000 μm。

7.2 形态特征

马铃薯皮斑病菌的分生孢子梗具分枝,宽 2 μm~4 μm,最长达 140 μm,下部淡褐色,基部偶粗大;分生孢子透明,平滑,卵圆形至圆柱形,带有圆形的断点,大多数情况下是单细胞,有时会形成用隔膜分开的多细胞结构,大小为(6 μm~8 μm)×(2 μm~3 μm),可以形成具分枝的分生孢子链,易断裂。分生孢子产生需要较高的相对湿度(>85%RH)。

马铃薯皮斑病菌形态图参见附录 C。

7.3 实时荧光 PCR 检测

若空白对照的 Ct 值大于或等于 40,供试菌 Ct 值小于 36,可判定检测结果为阳性。

7.4 序列比对

序列比对结果与 GenBank 中公开发表的 *Polyscytalum pustulans* 的序列 99%~100% 同源,则判定为阳性。

8 结果判定

病菌的培养性状和形态特征与 7.1 和 7.2 的描述一致,且实时荧光 PCR 检测结果呈阳性,可判定为马铃薯皮斑病菌。

病菌的培养性状和形态特征与 7.1 和 7.2 的描述一致,按照 6.4.3 的方法进行测序比对,判定为阳性,可判定为马铃薯皮斑病菌。

9 样品保存与处理

样品经登记和经手人签字后妥善保存。对检出马铃薯皮斑病菌的样品应保存于 4 ℃ 冰箱中,以备复核。该类样品保存期满后应经高压灭菌后方可处理。

10 菌株保存与处理

从检测样品中分离并鉴定为马铃薯皮斑病菌的菌株,应妥善保存。将菌株接种于 PDA 培养基斜面上,20 ℃ 培养 5 d,4 ℃~8 ℃ 黑暗条件下保存,定期(60 d)转接防止病菌死亡,至少保存 6 个月。必要时用病菌的分生孢子作冻干菌种保存。保存期满后高压灭菌灭活处理。

11 结果记录与资料保存

完整的实验记录包括:样品的来源、种类、时间,实验的时间、地点、方法和结果等,并要有实验人员和审核人员签字。

附 录 A
(资料性附录)
马铃薯皮斑病菌的其他信息

A.1 症状特征

马铃薯受 *P. pustulans* 为害一般会在储藏期潜伏 1~2 个月发病,发病后块茎上有紫黑色、略微凸起的斑点形成。症状如图 A.1 所示。这类紫黑色突起斑点可以聚集在芽眼和损坏的表皮周围产生,病斑可深入表皮 1 mm~2 mm,也可在受感染块茎的表面上随机分布。芽眼中的幼芽可能会被杀死,块茎会失去繁殖能力。在块茎表面如果先前有表皮损坏,有时会形成较大的坏死区域。如果种植了带有受损幼芽的马铃薯块茎,植株的发育会延迟,分布也不均匀。



图 A.1 马铃薯块茎受害症状(引自 Stuart Carnegie)

A.2 寄主范围

主要寄主马铃薯(*Solanum tuberosum*),次要寄主茄属植物(*Solanum* L.)。

A.3 地理分布

爱沙尼亚、德国、爱尔兰、立陶宛、南斯拉夫、挪威、罗马尼亚、俄罗斯、英国、南非、加拿大、美国、澳大利亚、新西兰。

A.4 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):去皮马铃薯 200 g,切碎,加适量蒸馏水煮沸 20 min 左右,双层纱布过滤,在滤汁中加入葡萄糖 20 g、琼脂 18 g,继续煮至琼脂完全溶化后,加蒸馏水补足 1 000 mL, 121 °C;高压灭菌 20 min。

附 录 B
(资料性附录)
DNA 提取方法

将分离获得的真菌,收集菌丝放入 1.5 mL 浸在液氮里的离心管中,用塑料杵碾碎待用。

离心管加入 300 mL~500 μ L CTAB 缓冲液(其中含 0.1 g 蛋白酶 K)混匀,65 $^{\circ}$ C 水浴 1 h;13 000 g 离心 5 min~10 min,保留上清液;加 500 μ L 三氯甲烷:异戊醇(体积比为 24 : 1)混匀,13 000 g 离心 5 min~10 min,保留上清液;再加 500 μ L 三氯甲烷:异戊醇(体积比为 24 : 1)混匀,13 000 g 离心 5 min~10 min,保留上清液;加入 1 mL 异丙醇混匀,-70 $^{\circ}$ C 下放置 1 h,或-20 $^{\circ}$ C 过夜;13 000 g 离心 30 min,可见 DNA 沉淀;70%乙醇洗 DNA 沉淀,室温干燥;用 30 mL~50 μ L Tris-EDTA 缓冲液溶解 DNA,待用。

附 录 C
(规范性附录)
马铃薯皮斑病菌形态图

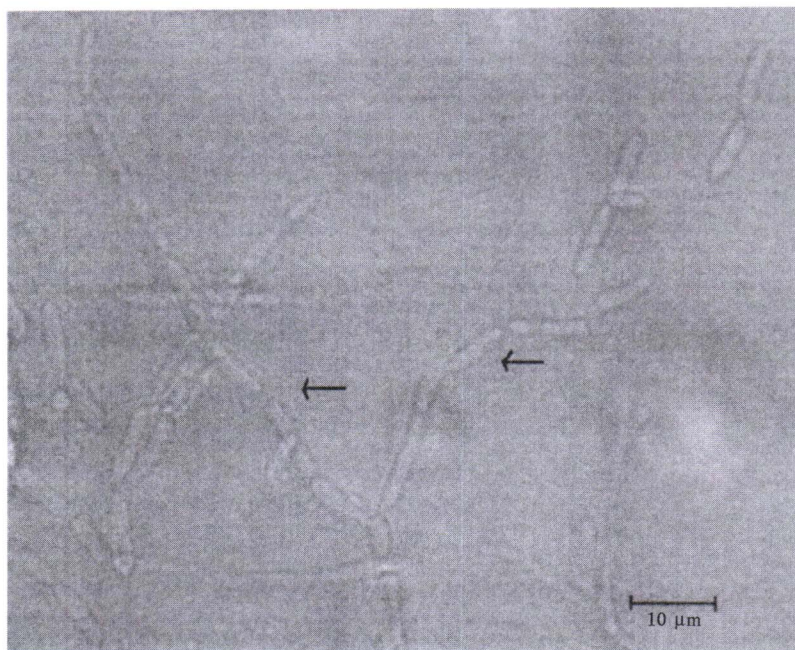


图 C.1 分生孢子和分生孢子链(杜洪忠拍摄)

参 考 文 献

- [1] Compendium of Potato Diseases.Second Edition,2001.
 - [2] Hide G.A.,Ibrahim L..Infection of potato stem bases,stolons and tubers by *Polyscytalum pustulans* (Owen & Wakef.) Ellis and development of sclerotia.Potato-Research.1994,37(1):35-42.
 - [3] Carnegie S.F., Cameron A.M..Occurrence of *Polyscytalum pustulans*, *Phoma foveata* and *Fusarium solani* var.*coeruleum* in field soils in Scotland.Plant Pathology.1990,39(3):517-523.
 - [4] Carnegie S.F.,Cameron A.M..Contamination of healthy seed tubers by *Polyscytalum pustulans* and *Phoma exigua* var.*foveata* in potato stores.Potato Research.1987,30:1,79-88.
 - [5] Quarantine Pests for Europe.Second Edition,1997.
 - [6] CABI.Crop Protection Compendium,2007.
 - [7] Vico I.,Krstic B.,Stojanovic G..THE OCCURRENCE OF *POLYSCITALUM PUSPULANS* ON POTATOES IN YUGOSLAVIA.ISHS Acta Horticulturae.462:339-343.
 - [8] Carnegie S.F.,Cameron A.M..Occurrence of *Polyscytalum pustulans*, *Phoma foveata* and *Fusarium solani* var.*coeruleum* in field soils in Scotland.Plant pathology.1990,39:517-523.
 - [9] Hide G.A.,Hirst J.M.,Stedman O.J..Effects of skin spot(*Oospora pustulans*) on potatos. Ann.appl.biol.1973,73:151-162.
 - [10] Lees A.K.,Sullivan L.,Cullen D.W..A Quantitative Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of *Polyscytalum pustulans*, the Cause of Skin Spot Disease of Potato.J.Phytopathol. 2009,157 (3):154-158.
-