

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1135.8—2017
代替 SN/T 1135.8—2009

马铃薯坏疽病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Phoma foveata* Foister

2017-07-21 发布

2018-03-01 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

SN/T 1135 共分为 13 部分；

- 第 1 部分：马铃薯癌肿病检疫鉴定方法；
- 第 2 部分：马铃薯黄化矮缩病毒检疫鉴定方法；
- 第 3 部分：马铃薯帚顶病毒检疫鉴定方法；
- 第 4 部分：马铃薯黑粉病菌检疫鉴定方法；
- 第 5 部分：马铃薯环腐病菌检疫鉴定方法；
- 第 6 部分：马铃薯维腐病菌检疫鉴定方法；
- 第 7 部分：马铃薯 A 病毒检疫鉴定方法；
- 第 8 部分：马铃薯坏疽病菌检疫鉴定方法；
- 第 9 部分：马铃薯青枯病菌检疫鉴定方法；
- 第 10 部分：马铃薯 V 病毒检疫鉴定方法；
- 第 11 部分：马铃薯皮斑病菌检疫鉴定方法；
- 第 12 部分：马铃薯 M 病毒检疫鉴定方法；
- 第 13 部分：马铃薯 Y 病毒检疫鉴定方法。

本部分为 SN/T 1135 的第 8 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分代替 SN/T 1135.8—2009《马铃薯坏疽病菌检疫鉴定方法》。

本部分与 SN/T 1135.8—2009 相比，主要技术差异如下：

- 将生物学特性中培养性状与孢子形态进行了补充，增加了分子生物学检测方法。

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：中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局、中华人民共和国甘肃出入境检验检疫局、甘肃省农业科学院植物保护研究所。

本部分主要起草人：李鑫、文朝慧、黑多尔、何苏琴、刘伟、王秀芬、王有福。

本部分所代替标准的历次版本发布情况为：

- SN/T 1135.8—2009。

马铃薯坏疽病菌检疫鉴定方法

1 范围

SN/T 1135 的本部分规定了马铃薯坏疽病菌的检疫鉴定方法。

本部分适用于所有进境马铃薯薯块携带的马铃薯坏疽病菌的检疫鉴定。

2 基本信息

中文名:马铃薯坏疽病菌

英文名:potato gangrene, gangrene of potato, tuber rot, tuber gangrene, dry rot of potato, leaf spot of tobacco, leaf spot of bean

有性态:*Boeremia foveata* (Foister) Aveskamp, Gruyter & Verkley

无性态:*Phoma foveata* Foister

异名:*Phoma exigua* var. *foveata* (Foister) Boerema

Phoma solanicola var. *foveata* (Foister) Malc.

Phoma solanicola f. *foveata* (Foister) Malc.

分类地位:真菌界(Kingdom Fungi),子囊菌门 Ascomycota,座囊菌纲 Dothideomycetes,格孢腔菌目 Pleosporales,Didymellaceae 科,*Boeremia* 属。

传播途径:受侵染的马铃薯种薯的调运是远距离传播蔓延的主要途径。昆虫和线虫有利于病原菌局部传播。

马铃薯坏疽病菌的其他信息参见附录 A。

3 方法原理

本部分以该病菌在马铃薯上的主要危害症状特征、病原菌培养特性、形态特征及特异性 PCR 反应为鉴定马铃薯坏疽病菌的依据。

4 仪器设备和主要试剂

4.1 仪器设备

电子天平(感量 1/10 000 g)、解剖镜、显微镜、超净工作台、温控培养箱、高压灭菌锅、低温冰箱、普通冰箱、镊子、量筒、培养皿、移液器、水平凝胶电泳装置、PCR 仪、凝胶成像系统、高速冷冻离心机等。

4.2 主要试剂和培养基

Taq DNA 聚合酶、DL 2000、dNTP、10×PCR 缓冲液、无水乙醇、次氯酸钠、氨水、马铃薯琼脂培养基(PDA)、燕麦培养基(OA)、麦芽糖琼脂培养基(MEA)(培养基配方参见附录 B)。

5 病原菌鉴定

5.1 症状检查

观察马铃薯薯块是否有病斑及菌丝、分生孢子器等,如有病斑,将其刨开。马铃薯坏疽病菌在马铃薯块茎上的症状为暗色凹陷病斑。病斑易皱缩或剥离,内部常形成干的空腔。干空腔常扩展,产生带有灰色或暗褐色到紫色的菌丝,并产生分生孢子器。(参见附录 A)

小茎点霉变种(*P.exigua* var.*exigua*)在马铃薯薯块上可产生与马铃薯坏疽病菌相同的症状,该菌为弱寄生菌,可以用培养特征进行区别。

由 *Fusarium* spp.引起的干腐病通常产生比较平整的同心轮纹病斑,病斑表面经常可见白色、粉白色或蓝紫色的真菌垫。

5.2 直接镜检

挑取疑似样品病斑部位的菌丝或分生孢子器,用移植环移于载玻片中央的水滴中,在显微镜下观察,拍照记录。

5.3 病菌的分离、纯化及形态观察

取有马铃薯坏疽病可疑症状的薯块,切开并在其病健交界处取样,切成小块,0.5%的次氯酸钠表面消毒 5 min,无菌水冲洗 3 遍,置于 PDA 平板上,每皿放置 5 块~6 块;或在无菌状态下直接挑取菌丝置于 PDA 培养基上,20℃~22℃ 黑暗条件下培养 7 d~9 d,进行菌落形态观察,培养大约 20 d~30 d 出现分生孢子器。

在 PDA 平板上,20℃ 培养 7 d,菌落直径(69.7 ± 0.5)mm,菌落灰褐色,边缘白色,菌落背面黄褐色;培养 20 d,菌落红褐色,表层的网状菌丝上散生大量黑色微粒状分生孢子器,菌落表面散布无色透明微小水珠,菌落背面可见大小不等的黑褐色斑块。

在 OA 培养基上,20℃ 培养 7 d,菌落直径(72.2 ± 0.6)mm,菌落黄褐色,边缘整齐,几乎没有气生菌丝,菌落背面黄褐色;培养 14 d,菌落深豆沙色,气生菌丝薄而稀疏,边缘稍多;培养基内生大量深褐色斑块,菌落背面与正面色同。

在 MEA 培养基上,20℃ 培养 7 d,菌落直径(70.7 ± 1.2)mm,菌落淡黄褐色,边缘整齐,气生菌丝薄毡状,菌落背面亮黄褐色;培养 14 d,菌落黄褐色,气生菌丝薄毡状,菌落表面散生暗褐色分生孢子器,菌落背面亮黄褐色,可见黄色粉粒状结晶。

马铃薯坏疽病菌的分生孢子器褐色,球形、扁圆形,散生或多个聚集,具孔口,内生大量分生孢子,遇水或挤压后分生孢子从孔口涌出,分生孢子短柱状、长椭圆形或卵圆形,单胞、无色,偶双胞,有的两端各具 2 个油球,在 PDA 培养基上分生孢子大小为($4.7 \mu\text{m} \sim 9.2 \mu\text{m}$) $\times$ ($2.5 \mu\text{m} \sim 4.4 \mu\text{m}$),分生孢子器大小约为($82 \mu\text{m} \sim 210 \mu\text{m}$) $\times$ ($64 \mu\text{m} \sim 175 \mu\text{m}$),厚垣孢子球形或近球形,多串生,大小为($27 \mu\text{m} \sim 81 \mu\text{m}$) $\times$ ($18 \mu\text{m} \sim 63 \mu\text{m}$) (参见附录 B)。

5.4 生化特征

取 5.3 中分离纯化的菌落,用直径 5 mm 的打孔器取菌丝圆片移植于 OA、MEA 平板中央,20℃ 黑暗条件下培养 7 d,测量菌落直径,描述菌落形态;然后在 20℃ 下进行 13 h 近紫外灯+11 h 黑暗/d,培养 7 d,以刺激菌落色素的产生,并在菌落边缘滴加 1 mol/L NaOH 水溶液,观察色斑反应。

NaOH 斑反应显示出特有的紫红色,表明有可扩散的蒽醌色素产生(参见附录 B)。

5.5 PCR 检测

将纯化产物采用常规商品化 DNA 提取试剂盒提取总 DNA, 利用特异性引物 Phoma-2/Phoma-7 进行 PCR 扩增, 电泳检测, 具体步骤见附录 C。

采用引物 Phoma-2/Phoma-7 可扩增出约 474bp 的特异性条带, 测序后进行 Blast 比对分析, 与 *Phoma foveata* 的序列同源性 $\geq 99\%$ 时, 表示检出。

6 结果判定

符合 5.1 的症状、5.3 形态、5.5 分子生物学特征则判定该病菌为马铃薯坏疽病菌。

马铃薯坏疽病菌与小茎点霉变种的区别可采用 5.4 生化特征和 5.5 分子生物学特征区分, 参见附录 D。

7 样品保存与复核

7.1 样品保存与处理

制作 2% 麦芽琼脂斜面培养基, 把纯化的菌落接种到斜面培养基上, 置于冰箱中 4℃ 保存, 以备谈判、仲裁使用。

7.2 结果记录与资料保存

保存样品应按品种分别存放, 经登记和经手人签字后置冰箱冷藏保存 2 个月。马铃薯坏疽病菌样品至少需保存 6 个月, 同时保留电子图片, 以备复验、谈判和仲裁。保存期满后, 灭菌处理。

附录 A

(资料性附录)

马铃薯坏疽病菌的其他信息

A.1 寄主范围

主要寄主为马铃薯(*Solanum tuberosum*)。在安第斯山地区还危害昆诺藜(*Chenopodium quinoa*)和野生马铃薯。病菌可从其他的栽培寄主以及从受侵染的马铃薯田间的杂草上分离出来。

A.2 地理分布

欧洲的丹麦、爱尔兰、瑞典、英国、比利时、芬兰、法国、德国、荷兰、挪威、波兰、罗马尼亚、瑞士、葡萄牙、西班牙、前苏联；非洲的埃及、摩洛哥；北美洲的加拿大；南美洲的安第斯地区；大洋州的澳大利亚、新西兰。

A.3 表现症状

病种薯造成出苗延迟，株茎数量增加，茎的基部出现褐斑，并向上扩散，在茎和叶柄交接处症状明显。病组织变干凹陷。在衰老的茎组织上有大量分生孢子器，在块茎上发生小而暗的凹陷斑，斑内腐烂较大，橙红色—橙色—紫灰色，常形成洞穴。斑面生菌丝，为灰色—暗褐—紫色。病斑有明显的边缘。病斑表面可见分生孢子器，针头大小，从表皮内突出。



图 A.1 马铃薯坏疽病菌症状(左:表面症状,引自
http://www.tarkkelysperuna.info/evi_images/PhomaAH1.jpg;右图:内部症状)

附录 B

(资料性附录)

马铃薯坏疽病菌的培养性状及病菌形态

B.1 培养基配方：

马铃薯琼脂培养基(PDA)：马铃薯 200 g，葡萄糖 15 g，琼脂粉 12 g，蒸馏水 1 000 mL，121 ℃ 高压灭菌 20 min。

燕麦培养基(OA)：20 g 燕麦，12 g 琼脂，自来水定容至 1 000 mL，121 ℃ 高压灭菌 20 min。

麦芽糖琼脂培养基(MEA)：麦芽浸粉 20 g，12 g 琼脂，自来水定容至 1 000 mL，121 ℃ 高压灭菌 20 min。

B.2 马铃薯坏疽病菌菌落形态及 NaOH 色斑反应见图 B.1。

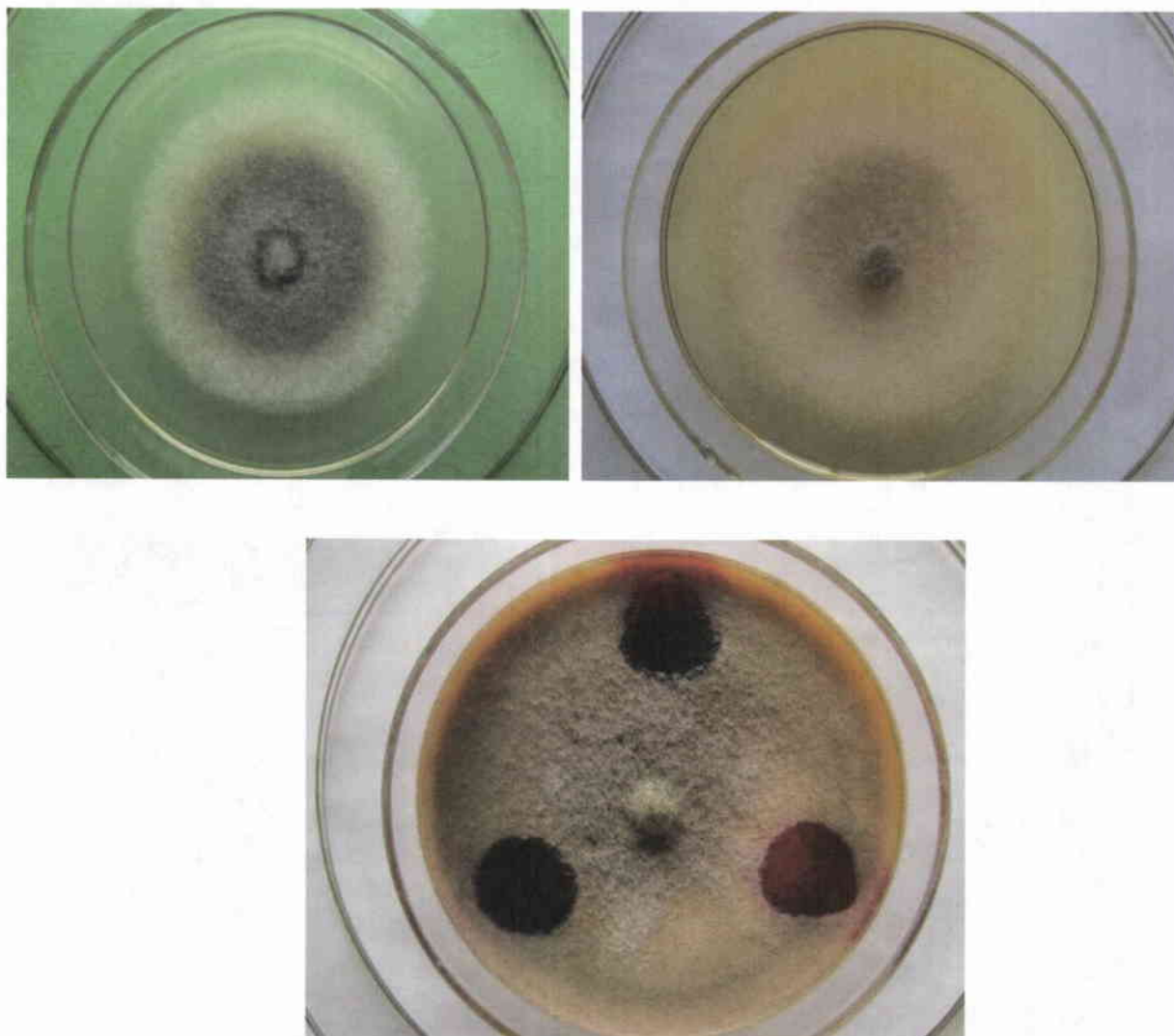


图 B.1 马铃薯坏疽病菌菌落形态及 NaOH 色斑反应
(左：PDA 6 d；右：MEA 7 d；下：NaOH 色斑-MEA)

B.3 病菌分生孢子器、菌丝及孢子形态观察见图 B.2。

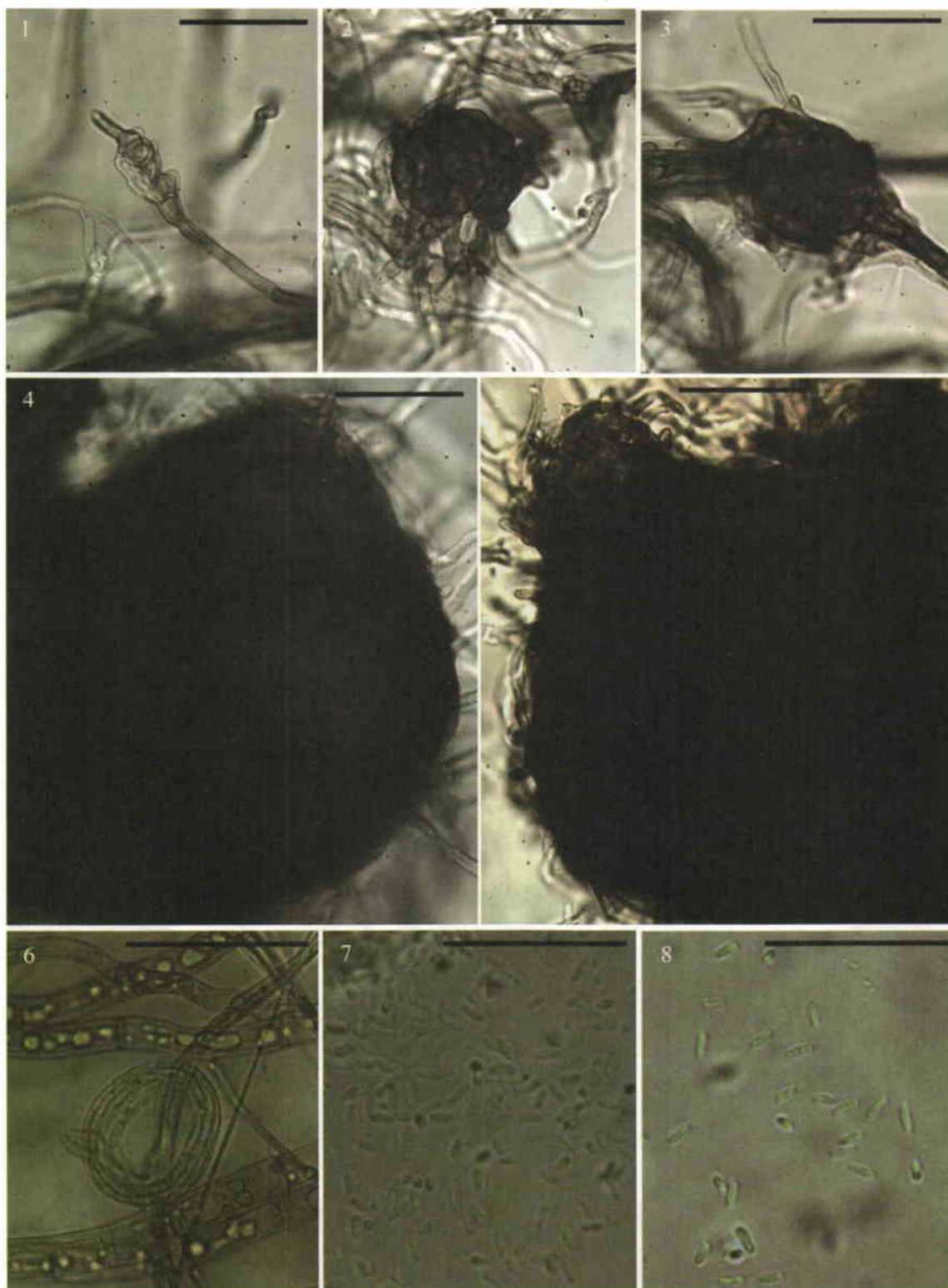


图 B.2 病菌分生孢子器、菌丝及孢子(1 分生孢子器原基;2、3 发育中的分生孢子器;4、5 成熟的分生孢子器;6 菌丝;7、8 孢子;标尺=40 μm)

附 录 C
(规范性附录)
PCR 凝胶电泳检测

C.1 引物序列

见表 C.1。

表 C.1 引物序列

引物名称	引物序列 5'-3'	扩增产物长度
Phoma-2	GGACCCCTGTACTGACGTC	474 bp
Phoma-7	AGCGGCTAGGATAGACAGGCG	

C.2 PCR 反应体系及参数

C.2.1 PCR 反应体系

见表 C.2。

表 C.2 PCR 反应体系

试剂名称	加样量/ μL
10 $\times$ PCR 缓冲液	2.5
2.5 mol/L dNTP	2.0
10 $\mu\text{mol/L}$ 上游引物	1.0
10 $\mu\text{mol/L}$ 下游引物	1.0
5U/ μL <i>Taq</i> DNA 聚合酶	0.2
10 ng/ μL 模板 DNA	2.0
双蒸水	16.3
总体积	25.0

C.2.2 阴性对照、阳性对照和空白对照的设置

阴性对照:以健康马铃薯叶片 DNA 为阴性对照;阳性对照:以马铃薯坏疽病菌总 DNA 为阳性对照;PCR 反应的空白对照:以灭菌去离子水代替 DNA 模板。

C.2.3 PCR 的反应条件

反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ /3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ /15 s,62 $^{\circ}\text{C}$ /30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ /1 min,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ /10 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

不同仪器可根据仪器要求将反应参数作适当调整。

C.3 测序

将上述 PCR 产物进行序列测定,并与 Genbank 中已知序列进行比对,并构建系统发育树。

C.4 琼脂糖凝胶电泳

将产物用 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳分析,电泳结束后在凝胶成像仪观察并记录结果。

附 录 D
(资料性附录)

马铃薯坏疽病菌与近似种的区别

马铃薯坏疽病菌与近似种的区别见表 D.1。

表 D.1 马铃薯坏疽病菌与近似种、近似病的区别

项目	马铃薯坏疽病菌 孔穴茎点霉(<i>Phoma foveata</i>)	小茎点霉变种 (<i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i>)
症状	在马铃薯块茎上的症状为暗色凹陷小病斑,常不超过拇指大小。病斑皱缩容易剥离,留下一个干空腔,产生带有灰色或暗褐色到紫色的菌丝线	与马铃薯坏疽病菌的孔穴茎点霉产生的症状相似
培养性状	麦芽琼脂培养基上 <i>P.foveata</i> 的菌落呈放射状,色苍白至微黄,有可扩散性的蒽醌色素产生	<i>P.exigua</i> var. <i>exigua</i> 的菌落呈同心轮纹,颜色为橄榄灰色到白色,不产生蒽醌色素
寄生性	专性寄生性强,一般只侵染马铃薯	弱寄生菌,寄主广泛

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
马铃薯坏疽病菌检疫鉴定方法
SN/T 1135.8—2017

*

中国标准出版社出版
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
总编室:(010)68533533

网址 www.spc.net.cn

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 20 千字
2018年5月第一版 2018年5月第一次印刷
印数 1—500

*

书号: 155066·2-33222 定价 21.00 元



SN/T 1135.8—2017