

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1820—2006

20071423

隐地疫霉菌检疫鉴定方法

Identification of *Phytophthora cryptogea* Pethybridge & Lafferty

2006-11-10 发布

2007-05-16 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、附录 C、附录 D 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。

本标准起草单位：中华人民共和国珠海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：谭群英、廖力、喻国泉、陈其文、张卫东。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

隐地疫霉菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了进出境植物检疫中隐地疫霉菌的检疫和鉴定方法。
本标准适用于进出境植物及介质土中隐地疫霉菌的检疫和鉴定。

2 原理

2.1 分类地位

隐地疫霉菌 (*Phytophthora cryptogea* Pethybridge & Lafferty) 属藻菌界 (Chromista), 卵菌门 (Oomycota), 腐霉目 (Pythiales), 腐霉科 (Pythiaceae), 疫霉属 (*Phytophthora*)。

2.2 检疫原理

隐地疫霉菌的寄主植物很广, 为害上百种经济作物, 是非洲菊、翠菊、麝香石竹、圣诞花、番茄等植物的重要病原菌 (参见附录 A)。主要以抗逆性很强的卵孢子在介质土中及寄主残体内越冬并长期生存, 当田间温度和湿度适宜时, 卵孢子打破休眠萌发, 产生孢子囊。孢子囊在雨后或灌溉后有积水时, 很快释放出大量游动孢子, 最终通过幼根或伤口侵入寄主, 可造成根、茎部腐烂, 致使植物受侵染后叶片迅速萎蔫枯死。

2.3 鉴定依据

隐地疫霉菌在寄主植物上的症状、病原菌形态学特征、生物学特征是鉴定该菌的依据。

3 仪器设备及实验用具

3.1 仪器设备

生物显微镜、体视显微镜、高压灭菌器、干热灭菌器、普通天平、分析天平、超净工作台、生物培养箱。

3.2 实验用具

酒精灯、医用手术剪、镊子、烧杯、培养皿、载玻片、盖玻片、三角瓶、量筒、吸管、广口瓶。

4 试剂

氨苄青霉素 (ampicillin)、五氯硝基苯 (PCNB)、次氯酸钠 (NaClO)、苯莱特 (benomyl)、多菌灵 (carbendazim)、硝酸钙 $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2]$ 、磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)、硝酸镁 $[\text{Mg}(\text{NO}_3)_2]$ 、氯化钙 (CaCl_2)、利福平 (rifampicin)、碳酸钙 (CaCO_3)、无水乙醇 (ethanol)。

5 培养基

5.1 基础培养基

用于隐地疫霉菌的保存和培养性状的观察、测定。

采用胡萝卜培养基 (CA)、V₈ 培养基 (V₈A) 或利马豆培养基 (LBA), 其配制方法及步骤见第 B.1 章。

5.2 选择性培养基

用于隐地疫霉菌游动孢子的萌发、病原菌的分离和纯化。

1 000 mL 基础培养基经常规灭菌并冷却到 55℃ 左右时加入下列抗菌素 (均为有效成分): 氨苄青霉素 50 mg、利福平 20 mg、多菌灵 25 mg、五氯硝基苯 25 mg, 摇匀, 制成平皿。

在缺乏五氯硝基苯时可用相同药量的苯莱特替代。

5.3 液体培养基

用于病原菌的液体培养以及产生孢子囊。

采用皮氏培养液,其配制方法及步骤参见第 B.2 章。

6 实验室检验

6.1 病原菌检查

选取有萎蔫症状叶片,根部变褐腐烂植株,用解剖针挑取或刀片刮取病斑背面的霉状物或病组织制片,在显微镜下直接检查有无病菌的菌丝、孢子囊、卵孢子,记录其形态特征。

6.2 组织分离

如果发现可疑症状,但不能从病部获得病原菌做“6.1”检查,应采取分离、培养的方法作进一步鉴定。选萎蔫及根部变褐腐烂的植株,将病株在自来水下冲洗干净,在病健交界处切取 0.5 cm^2 左右的小块,用 70% 酒精消毒 2 s~3 s 后,置于 3% 次氯酸钠(NaClO)水溶液中消毒 3 min~5 min,再用灭菌水浸洗 3 次,用灭菌滤纸吸干水分后移置选择性培养基,于 25°C ~ 28°C 下培养 5 d。

培养 5 d 的菌丝块移入皮氏培养液中,在 23°C ~ 28°C 、黑暗条件下培养 3 d~4 d,倾去皮氏培养液,换上无菌水,并加入由打孔器制成的直径 1 cm 非洲菊叶碟,每瓶 10 片左右。非洲菊叶碟以感病品种“鸡蛋黄”、“粉色”的新鲜嫩叶制成为好,24 h~72 h 内取叶碟制片,于显微镜下观察菌丝及孢子囊形态特征。

6.3 土壤诱集

将采集的土壤预先风干后,缓慢加入含有杀菌剂的无菌水,使其均匀湿润(含水量约 35%),装在密闭的塑料袋中, 25°C 下 12 h 光暗交替孵育 5 d~7 d 诱导卵孢子萌发产生游动孢子囊。然后取 5 g~20 g 土壤磨碎放入烧杯,加混有杀菌剂的灭菌蒸馏水浸过土面 1 cm~2 cm,用吸水纸轻轻去掉形成的表面膜和漂浮的有机物残渣,每烧杯水面放直径 1 cm 的叶碟 10 片左右。孵育 2 h 后用消毒镊子将叶碟取出,并用无菌吸水纸吸干表面水分,叶碟放入选择性培养基中,在 25°C 黑暗条件下孵育 3 d。最后在体视显微镜下检查叶碟边缘和表面有无孢子囊,观察其形态特征。

6.4 单孢分离及菌种纯化

将有孢子囊的叶碟转移到具 1 mL 左右无菌水的 5 mL 烧杯中,待孢子囊释放出游动孢子后,吸取该悬浮液至选择性培养基平板上,置于 23°C ~ 28°C 黑暗条件下培养,使游动孢子萌发。在体视显微镜下挑取萌发的单个游动孢子到选择性培养基平板上,置于 23°C ~ 28°C 黑暗条件下培养。在培养过程中如有污染,应在选择性培养基上进行 2 次~3 次纯化。获纯培养物后,进行培养特性和有性生殖阶段特征的观察、测量,并进行致病性测定。

6.5 致病性测定

6.5.1 幼苗准备

采用感病品种如:90 d 苗龄的非洲菊(品种为“鸡蛋黄”、“粉色”)和 20 d 苗龄的黄瓜、西瓜及番茄幼苗。

6.5.2 病原菌准备

采用在基础培养基上培养 5 d 的菌落。

6.5.3 接种方法

采用菌丝块接种法:用针刺或解剖刀轻削植物根茎部后,将菌丝块贴于伤口上,保湿培养 24 h~48 h。设无菌水和健康苗作对照。每处理 20 株。

7 鉴定特征

7.1 培养性状

本菌在 CA 培养基上,只长菌丝,不产生孢子囊;菌落灰白色,分布均匀,呈放射状,气生菌丝较少,

边缘明显。在无菌水或皮氏培养液中,可产生少量的孢子囊,加入叶则诱导大量孢子囊产生。

7.2 形态特征

7.2.1 菌丝和菌丝体

在 CA 培养基上,菌丝体大量产生。菌丝无色无隔、粗细均匀;粗 $4\ \mu\text{m}\sim 6.5\ \mu\text{m}$,可产生球形、角形或不规则形菌丝膨大体,串生或交织成网状。

7.2.2 无性生殖阶段特征(参见附录 C)

在皮氏培养液中,孢囊梗直接来源于菌丝,不分枝,粗 $3.0\ \mu\text{m}\sim 6\ \mu\text{m}$ 。孢子囊椭圆形,罕卵形,有时中部缢缩, $(34\ \mu\text{m}\sim 64\ \mu\text{m})\times(17\ \mu\text{m}\sim 36\ \mu\text{m})$,平均 $46.4\ \mu\text{m}\times 27.8\ \mu\text{m}$,长宽比值为 $1.4\sim 2.2$,平均 1.66 ,顶部平展,无乳突,排孢孔宽 $10\ \mu\text{m}\sim 17\ \mu\text{m}$,不脱落,内部层出 3 次~6 次。游动孢子囊在冷凉条件下释放游动孢子,游动孢子肾形, $(10\ \mu\text{m}\sim 13\ \mu\text{m})\times(8\ \mu\text{m}\sim 10\ \mu\text{m})$,鞭毛长 $21\ \mu\text{m}\sim 34\ \mu\text{m}$,休止孢子球形,直径 $8\ \mu\text{m}\sim 13\ \mu\text{m}$ 。厚垣孢子未见。

7.2.3 有性生殖阶段特征(参见附录 C)

有性繁殖为异宗配合。藏卵器球形,壁薄,褐色, $21\ \mu\text{m}\sim 31\ \mu\text{m}$,柄棍棒状或圆锥状;雄器球形或圆筒形,围生, $(10\ \mu\text{m}\sim 15\ \mu\text{m})\times(7\ \mu\text{m}\sim 18\ \mu\text{m})$,具 1 个~2 个细胞。卵孢子球形,直径 $17\ \mu\text{m}\sim 27\ \mu\text{m}$,平均 $21.8\ \mu\text{m}$,壁薄,平滑,不满器。

7.3 菌丝最高温度测定

从新鲜培养的菌落边缘挑取直径 2 mm 左右的菌丝块,移至基础培养基平板上,菌丝块等距离接种于培养皿周缘,每培养皿(直径 9 cm)4 块~6 块,置于 35°C 培养,设三个重复,5 d 后测量菌落直径。隐地疫霉菌丝在 35°C 不能生长。

7.4 致病性试验

接种 15 d 内,非洲菊出现典型的萎蔫症状,番茄猝倒死亡,而黄瓜、西瓜不发病。必要时,在病健交界处但远离接种点的部位,切取数段发病植株的茎秆,直接放在选择性培养基上进行分离培养,观察分离到菌株的形态特征(参见 7.2)。

7.5 隐地疫霉菌与其近似种的主要区别

隐地疫霉菌与其近似种掘代疫霉菌的主要区别参见附录 D。

8 结果评定

以隐地疫霉菌在非洲菊上产生的症状,分离物的培养特征、无性及有性阶段特征、致病性特征及菌丝生长最高温度等作为鉴定依据,进行综合判定。若以上特征与第 7 章鉴定特征吻合,则鉴定为隐地疫霉菌。

9 菌株保存

隐地疫霉菌的菌株应移到试管斜面上,经登记后置于 $10^{\circ}\text{C}\sim 15^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下保存,并定期(每 3 个月)转管,防止因斜面干燥而造成病原菌死亡。菌株至少保存 6 个月,保存期满后,需经灭菌处理。

附录 A

(资料性附录)

隐地疫霉菌的寄主与地理分布

A.1 寄主

隐地疫霉菌的寄主范围很广,寄主包括 23 科近百种植物,其中主要的经济作物有:非洲菊(*Gerbera jamesonii* Bolus)、翠菊(*Callistephus chinensis* Ness.)、康乃馨(*Dianthus caryophyllus* L.)、紫罗兰(*Matthiola incana* R. Br.)、郁金香(*Tulipa gesneriana* Linn.)、大岩桐(*Sinningia speciosa* Benth)、香雪兰(*Freesia refracta* Klatt.)、瓜叶菊(*Cineraria cruenta* Masson)、矮牵牛(*Petunia hybrida* Vilm.)、圣诞花(*Euphorbia pulcherrima* Willd.)、麒麟菊(*Liatris spicata* Willd.)、菊苣(*Cichorium intybus* L.)、番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)、向日葵(*Helianthus annuus* L.)、马铃薯(*Solanum tuberosum* Linn.)、密瓜(*Cucumis melo* L.)、草莓(*Fragaria ananassa* Duch)、樱桃(*Cerasus pserdocerasus* G. Don)、莴苣(*Lactuca sativa* Linn.)、菠菜(*Spinacia oleracea* L.)、甜菜(*Beta vulgaris* Linn.)、皱叶欧芹(*Petroselinum crispum* Mill.)、小白菜(*Brassica chinensis* L.)、苜蓿(*Medicago sativa* L.)、红花(*Carthamus tinctorius* L.)、冷杉(*Abies fabri* Craib.)、山松(*Pinus montezumae* Lamb.)等。

A.2 地理分布

大洋州:澳大利亚、新西兰。

美洲:墨西哥、智利、美国、加拿大。

欧洲:荷兰、希腊、丹麦、意大利、保加利亚、瑞士、奥地利、英国、捷克、德国、法国、爱尔兰、波兰、俄罗斯。

亚洲:印度、埃及、韩国、日本、伊朗、中国(台湾、浙江、广东、云南)。

非洲:埃及、津巴布韦。

附录 B
(资料性附录)
培养基及配制方法

B.1 基础培养基**B.1.1 胡萝卜培养基(CA)**

将 200 g 新鲜胡萝卜切成小片,加去离子水 500 mL,用组织捣碎机捣碎约 40 s,用 4 层纱布过滤去渣,补足水至 1 000 mL,加入琼脂粉 15 g~20 g,121℃ 高压蒸汽灭菌 15 min~20 min。

B.1.2 5%V₈ 培养基

5 mL V₈ 汁加去离子水 90 mL,碳酸钙 0.02 g,琼脂粉 2 g,补足水至 100 mL。121℃ 高压蒸汽灭菌 15 min~20 min。

B.1.3 利马豆培养基(LBA)

干利马豆粉 60 g,琼脂粉 20 g,蒸馏水 1 000 mL。

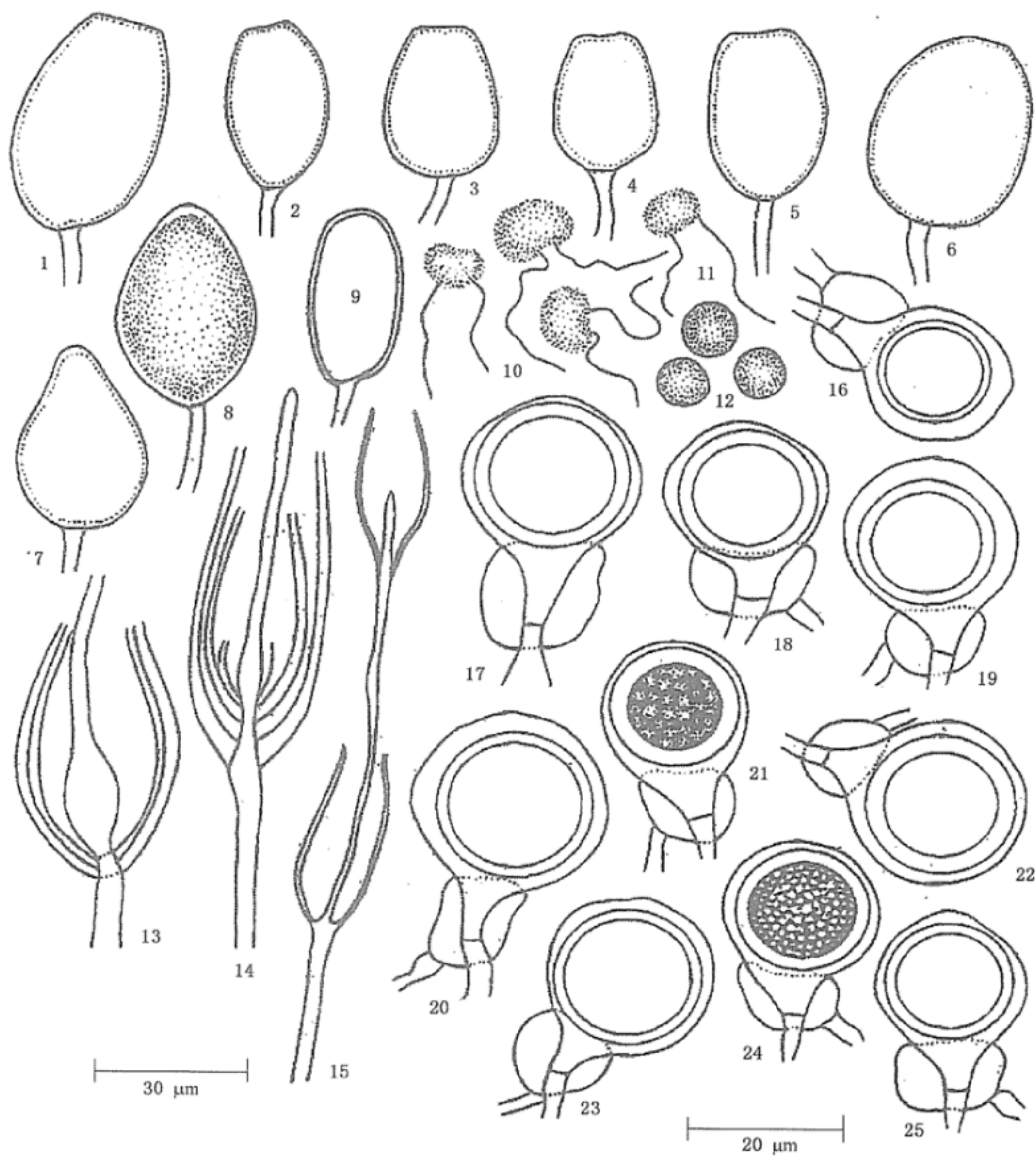
利马豆粉 60 g 加水 1 000 mL,在 60℃ 下水浴 1 h,双层纱布过滤去渣。上清液补足水至 1 000 mL,加入琼脂粉 20 g,煮沸后持续沸腾数分钟。121℃ 高压蒸汽灭菌 15 min~20 min。

B.2 皮氏(Petri)培养液

Ca(NO ₃) ₂	0.4 g	KH ₂ PO ₄	0.15 g
Mg(NO ₃) ₂	0.15 g	CaCl ₂	0.06 g
蒸馏水	1 000 mL		

在 121℃ 下高压蒸汽灭菌 15 min~20 min。

附录 C
(资料性附录)
隐地疫霉的形态特征图



- 1~9——孢子囊；
10~11——游动孢子；
12——休止孢子；
13~15——孢囊层出；
16~25——藏卵器、雄器和卵孢子。

图 C.1 隐地疫霉的形态特征图(仿余永年,1998)

附 录 D
(资料性附录)
隐地疫霉及近似种的主要区别

表 D. 1

病害	隐地疫霉	掘氏疫霉
菌丝	菌丝形态简单,较粗。平均直径大于 6 μm 。	菌丝粗细均匀,较细。平均直径小于 6 μm 。
菌丝生长温度	35℃ 停止生长。	大于 35℃ 仍可生长。最高达 36℃~37℃。
孢子囊	椭圆形,罕卵形,有时中部缢缩,(34 μm ~64 μm) ×(17 μm ~36 μm),平均 46.4 μm ×27.8 μm ,长 宽比值为 1.4~2.2,平均 1.66。顶部平展,无乳 突,排孢孔宽 10 μm ~17 μm ,不脱落,内部层出 3 次~6 次。	卵圆形至长卵形,孢子囊较长,其基部渐狭, (24 μm ~80 μm)×(20 μm ~40 μm),平均 51.7 μm ×29.1 μm ,长宽比值为 1.2~2.2,平均 1.76。 排孢孔宽(9 μm ~10 μm)~(14 μm ~18 μm),无 乳突,不脱落,内层出 3 次~6 次,最多可达 17 次。
藏卵器	球形,壁薄,褐色,直径 21 μm ~31 μm ,柄棍棒状 或圆锥状。	球形或亚球形,向基部渐狭,壁薄,浅褐色,直径 19 μm ~46 μm ,平均 30.4 μm 。
卵孢子	球形,直径 17 μm ~27 μm ,平均 21.8 μm ,壁薄, 平滑,不满器。	球形或近球形,单个,浅褐色,直径 16 μm ~ 38 μm ,平均 28.9 μm ,外壁平滑,厚 2.0 μm ~ 3.8 μm 。满器或几乎满器。

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
隐地疫霉菌检疫鉴定方法
SN/T 1820—2006

*

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.bzcbs.com

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

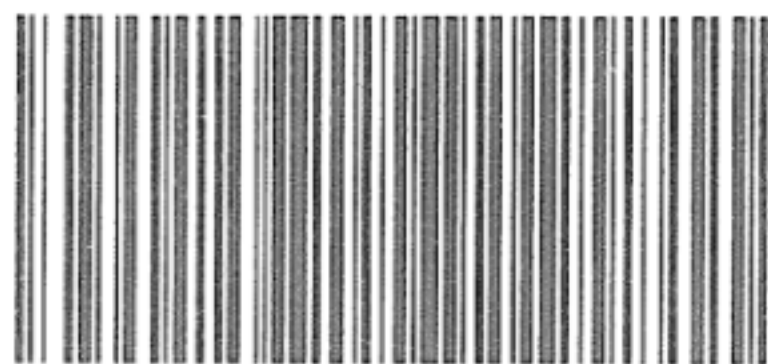
开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 14 千字

2007年3月第一版 2007年3月第一次印刷

印数 1—2 000

*

书号: 155066·2-17488 定价 8.00 元



SN/T 1820-2006