



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4337—2015

番茄灰斑病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Stemphylium solani* G.F.Weber

2015-09-02 发布

2016-04-01 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

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

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：中华人民共和国南通出入境检验检疫局、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局、中华人民共和国厦门出入境检验检疫局、华南农业大学、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：肖杰文、孙民琴、徐宁、吴翠萍、林石明、冉俊祥、姜子德、习平根、彭仁、杨占臣、娄少之、李彬。

番茄灰斑病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了进出境植物检疫中番茄灰斑病菌的检疫鉴定方法。
本标准适用于对番茄灰斑病发生国家和地区的寄主植物或产品上番茄灰斑病菌检疫和鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

- SN/T 1809 进出境植物种子检疫规程
- SN/T 2122 进出境植物及植物产品检疫抽样方法
- SN/T 2589 植物病原真菌检测规范

3 基本信息

学名:*Stemphylium solani* G.F.Weber。
异名:*Stemphylium botryosum* f.sp.*lycopersici*。
分类地位:无性型真菌(Anamorphic fungi)的匍柄霉属(*Stemphylium*)。

传播方式:病菌以菌丝体在土壤中的病残体上越冬,或以分生孢子、菌丝体在种子上越冬,成为翌年的初侵染源。发病后产生的分生孢子随风、雨、喷水及其他农事操作进行传播,成为重复侵染源。病菌可直接穿透植物的表皮,也可从自然孔口或伤口侵入,温度 20℃~25℃、相对湿度 80%以上时最易感病,当土壤肥力较差、植株生长不良时发生严重。番茄灰斑病菌的地理分布、寄主范围、为害症状等其他信息参见附录 A。

4 原理

以番茄灰斑病的症状、病原菌的生物学特性、形态学特征等为检疫鉴定该病菌的依据,番茄灰斑病菌的属种形态鉴定特征参见附录 B。

5 仪器和用具

5.1 仪器设备

体视显微镜、生物显微镜(带显微照相装置)、超净工作台、生化培养箱、高压灭菌器、低温冰箱、普通天平(感量 0.1 g)。

5.2 试验用具

目镜和镜台测微尺、载玻片、盖玻片、培养皿、酒精灯、可调微量移液器、接种针、封口膜(Parafilm)、滤纸、镊子、解剖刀。

6 试剂和培养基

6.1 试剂

0.2%的 2,4-D 钠盐溶液、葡萄糖、琼脂、2%的次氯酸钠、75%乙醇等。

6.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA);马铃薯胡萝卜琼脂培养基(PCA)(配方参见附录 C)。

7 抽样与检查

7.1 现场抽样

按照 SN/T 1809 及 SN/T 2122 规定进行取样。

7.2 现场检查

种子取样时注意检查种子中有无可疑带病种子、残体;植株取样时注意检查有无可疑病株。若有可疑病株应将其挑出来,并送实验室做进一步检验鉴定。

8 制样

按 7.1 的要求抽取的每份样品应充分混匀,制成平均样品,从每份平均样品中取 25 g 作为检验样品。

9 实验室检验

9.1 种子检验

9.1.1 吸水纸培养

用 0.2%的 2,4-D 钠盐溶液浸渍灭菌的吸水纸,每个灭菌的培养皿铺 3 层。将抽取的种子(不经表面消毒)直接放置于吸水纸上,每皿均匀间隔放置 50 粒种子。将培养皿置于 25℃生化培养箱中,8 h 光照/16 h 黑暗条件下培养。7 d 后取出培养皿,用体视显微镜逐粒检查种子,主要根据分生孢子、分生孢子梗及产孢结构形态等特征,挑选出疑似带灰斑病菌种子。

9.1.2 病原菌的分离培养

从疑似带灰斑病菌种子上挑取单个孢子,移至 PDA 平板上进行分离纯化。

9.1.3 病原菌的鉴定

将获得纯化的菌株转到 PCA 培养基上,置于 25℃生化培养箱中培养,培养皿放于白炽灯下方 35 cm~40 cm 处,8 h 光照/16 h 黑暗培养,待充分产孢后,观察分生孢子、分生孢子梗及产孢结构形态等特征,并显微测量其大小。

9.2 种苗、植株的检验

9.2.1 症状检查

用肉眼查看种苗、植株样品,根据番茄灰斑病菌的症状挑选出怀疑发病的植株,带入实验室做进一步检验。

9.2.2 病原菌的分离培养

选取新鲜的带有典型病斑的番茄叶片,先用自来水冲洗干净,进行保湿处理 24 h,然后使用解剖刀将病斑切下。选取 5 mm^2 大小的病叶组织块,在 75%乙醇中浸泡约 3 s,然后用镊子将其放入 2%的次氯酸钠水溶液中处理 3 min~5 min,再用无菌水冲洗 3 次,最后移入到 PDA 平板培养基上,于 25℃的恒温培养箱中培养,7 d~10 d 后观察菌落性状和病原菌特征。对菌落进行纯化,并将所获得纯化的菌株保存于 PDA 斜面上 4℃冰箱中保藏。

9.2.3 病原菌的鉴定

按照 9.1.3 所述步骤,进行病原菌的鉴定。

9.3 致病性测定

9.3.1 配制孢子悬浮液

将已经分离纯化后的病原菌接种于 PDA 培养基上,置于 25℃恒温培养箱中培养,7 d~10 d 后收集其分生孢子配制孢子悬浮液,孢子浓度约 1.0×10^4 个孢子/mL。

9.3.2 接种方法

待番茄苗生长到 2 片~4 片真叶时,将配置好的孢子悬浮液用毛笔进行涂抹接种。每个病原菌接种 6 盆苗,其中 3 盆为正面接种,另 3 盆为背面接种,每盆接种 2 张叶片。植株在 100%相对湿度下保湿 24 h,然后移至 20℃~25℃温室。对照植物使用无菌水进行喷洒。

9.3.3 症状观察

在接种的 5 d~7 d 后,观察叶部是否出现较为典型的番茄灰斑病症状。

9.3.4 病原菌再分离及鉴定

选取发病的叶片进行病原菌的再分离试验。

10 鉴定标准

10.1 病原菌形态特征

菌丝灰色,分枝,分隔。分生孢子梗直立单生,暗色,具隔膜,比不育菌丝稍大,约 $(130\text{ }\mu\text{m} \sim 240\text{ }\mu\text{m}) \times (4\text{ }\mu\text{m} \sim 7\text{ }\mu\text{m})$,顶端产孢处囊状膨大,基部呈不规则形。分生孢子顶生,多单生于分生孢子梗的顶端。在较老的培养基上,分生孢子梗有分支,分生孢子侧生。分生孢子深褐色至黑色,长椭圆至矩形,成熟分生孢子基部可见一个颜色较深的脐部,顶端略带小突起。分生孢子砖格状分隔,视成熟度不同,隔膜数常有变化,通常具 2 个~11 个横隔膜,1 个~6 个纵隔膜,中间隔膜处缢缩,未成熟孢子壁光滑,成熟后略带网状。分生孢子大小为 $(24\text{ }\mu\text{m} \sim 69.6\text{ }\mu\text{m}) \times (9.6\text{ }\mu\text{m} \sim 28\text{ }\mu\text{m})$,平均长宽比约 2:1。番茄灰斑病菌的形态特征图参见附录 D。

SN/T 4337—2015

10.2 接种苗症状

接种后 2 d,在番茄叶片上形成灰色不规则型小斑点并逐渐扩展,病斑中部褪绿变为灰白色至灰褐色或黄褐色稍凹陷的病斑(病斑边缘有黄褐色晕圈),湿度大时病斑表面会出现暗灰色霉状物,极薄,后期易破裂穿孔,直至全叶干枯、脱落。

11 结果判定

以番茄灰斑病菌的危害症状、菌落形态、分生孢子梗和分生孢子的形态特征等作为鉴定依据,进行综合判定。若发现形态特征与 10.1 所描述一致,且病症症状与 10.2 相符,即判定为番茄灰斑病菌。不符合 10.1 形态特征和 10.2 症状的,判定为不带番茄灰斑病菌。

12 样品和菌种的保存

样品和菌种的保存按照 SN/T 2589 执行。

13 处理及生物安全措施

对检出番茄灰斑病菌的样品及其分离菌株、检测过程中的废弃物,需经有效的除害处理方式处理,以防止对环境的扩散。

附录 A
(资料性附录)
番茄灰斑病菌其他信息

A.1 名称

中文名称:番茄灰斑病菌

英文名称:grey leaf spot; stemphylium blight of tomato; grey tomato leaf spot

A.2 地理分布

世界范围内均有发生,但温暖潮湿地区发生严重,主要分布在非洲(安哥拉、冈比亚、象牙海岸、利比亚、毛里求斯、尼日利亚、罗得西亚、塞内加尔、塞舌尔、苏丹、坦赞尼亚、赞比亚)、亚洲(印度、印尼、日本、阿曼、沙特、泰国、亚美尼亚、前苏联的远东地区)、澳洲与大洋洲(澳大利亚、夏威夷、新喀里多尼亚、美属萨摩亚)、欧洲(意大利,包括西西里)、北美洲(加拿大、墨西哥、美国)、中美洲与西印度群岛(巴巴多斯、古巴、洪都拉斯、牙买加、特立尼达)、南美洲(巴西、哥伦比亚、圭亚那、秘鲁),中国台湾、香港等地区也有分布。

A.3 寄主范围

主要包括番茄(*Lycopersicon esculentum*)、茄子(*Solanum melongena*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*)、辣椒(*Capsicum* spp.)、烟草(*Nicotiana tabacum*)等茄科(*Solanaceae*)作物。此外,棉花(*Gossypium hirsutum*)、大蒜(*Allium sativum*)、毛羽扇豆(*Lupinus pubescens*)、豇豆(*Vigna unguiculata*)、苦蕒(*Sonchus oleraceus*)、苦瓜(*Momordica charantia*)、白菜(*Brassica pekinensis*)、蕹菜(*Ipomoea aquatica*)、莴苣(*Lactuca sativa*)、长寿花(*Kalanchoe blossfeldiana*)等也有危害报道。

A.4 为害症状

叶片发病初呈散生的褐色小点,外围具黄色的晕圈,迅速扩大后为圆形或不规则形病斑,中间灰白色,边缘暗褐色,直径几毫米不等,病斑中央坏死处常脱落穿孔,病叶易脱落。如果苗期感染,落叶之外还伴有黄化;成株叶片上的病斑一般由下部向上扩展,如果比较多,也会发生黄化。病斑越多,落叶越严重,严重时整株叶片脱光成秃枝。经常可以在叶片两面的叶斑边缘见到暗色成团的分生孢子梗。

SN/T 4337—2015

附 录 B
(资料性附录)
番茄灰斑病菌的属种形态鉴定特征

表 B.1 匍柄霉属(*Stemphylium*)与链格孢属(*Alternaria*)和细基格孢属(*Ulocladium*)的区别

	<i>Alternaria</i>	<i>Stemphylium</i>	<i>Ulocladium</i>
产孢梗	合轴式延伸	层出式即环痕式延伸,顶端产孢区域明显膨大,并留下一系列球状孢痕	向顶式弯曲延伸
幼小分生孢子	基部钝圆,端部尖细	卵形或倒卵形,成熟后呈球形、卵形、倒卵形、长椭圆形、圆柱形	倒卵形,基部尖细,端部钝圆

表 B.2 番茄灰斑病菌(*S.solani*)与其近似种的形态学比较

	<i>S.solani</i>	<i>S.lycopersici</i>	<i>S.floridanum</i>
分生孢子梗	分生孢子梗直立,单生,暗色,具隔膜,比不育菌丝稍大,约(130 μm~240 μm)×(4 μm~7 μm),顶端产孢处囊状膨大,基部呈不规则形	分生孢子梗单生,圆柱状,光滑,具4~6个隔膜,约(80.2 μm~107.8 μm)×(4.3 μm~5.1 μm),顶端囊状膨大部位直径8.6 μm~9.4 μm	分生孢子梗单生,直立,半透明,青褐色至灰褐色,分隔,少有分枝,圆柱状,约(70.5 μm~245.5 μm)×(4.0 μm~4.5 μm),顶端囊状膨大部位颜色较深,直径7.8 μm~8.6 μm,1~7次层出式延伸,表面光滑,具2~6个隔膜
分生孢子	分生孢子深褐色至黑色,棍棒状,(24 μm~69.6 μm)×(9.6 μm~28 μm),平均长宽比约2.0。成熟分生孢子基部可见一个颜色较深的脐部,顶端略带小突起,未成熟孢子壁光滑,成熟后略带网状。分生孢子通常具2~11个横隔膜,1~6个纵隔膜,中间隔膜处缢缩	分生孢子淡褐色或灰褐色,长方形或圆柱形,直立或稍弯曲,(49.5 μm~75.7 μm)×(12.5 μm~19.5 μm),平均长宽比约3.0,基部有一深褐色的圆形脐,孔径4.3 μm~6.0 μm;顶端细胞似假喙状尖细,分生孢子表面除顶端尖细部位光滑外,其余部位均密集刺状突起。分生孢子具1~8个横隔膜,几个纵、斜隔膜,其中有3个明显缢缩的横隔膜	分生孢子青褐色,淡褐色至深褐色,长圆形、圆柱形,大小(18.1 μm~58.5 μm)×(9.4 μm~22.5 μm),平均44.0 μm×16.8 μm,长宽比约3.0~3.6。顶端细胞多数钝圆,少数尖细或似喙状,基部细胞近平齐或钝圆,常有一个深色圆孔状脐部,孔径3.4 μm~4.3 μm,表面具明显刺突。分生孢子具1~6个横隔膜,其中1~3个显著缢缩的横隔膜,多个纵隔膜
注:以上使用培养基质均为PCA。			

附 录 C
(资料性附录)
培养基配方

C.1 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(Potato Dextrose Agar, 简称 PDA)

C.1.1 成分

马铃薯 200 g; 葡萄糖 20 g; 琼脂 17g; 蒸馏水 1 000 mL; 用于制作平板单孢分离和制作试管斜面保存菌种。

C.1.2 制法

称取 200 g 马铃薯, 洗净去皮切碎, 加水 1 000 mL 煮沸半小时, 用纱布滤去马铃薯, 加入 20 g 葡萄糖, 充分溶解后再加 17 g 琼脂, 加热使琼脂完全熔化后, 趁热用纱布过滤, 然后分装进行高压灭菌(121 ℃, 20 min)。

C.2 马铃薯胡萝卜琼脂培养基(Potato Carrot Agar, 简称 PCA)

C.2.1 成分

马铃薯 200 g; 胡萝卜各 200 g; 琼脂 17 g; 蒸馏水 1 000 mL; 用于物种在统一培养条件下描述所选择的培养基。

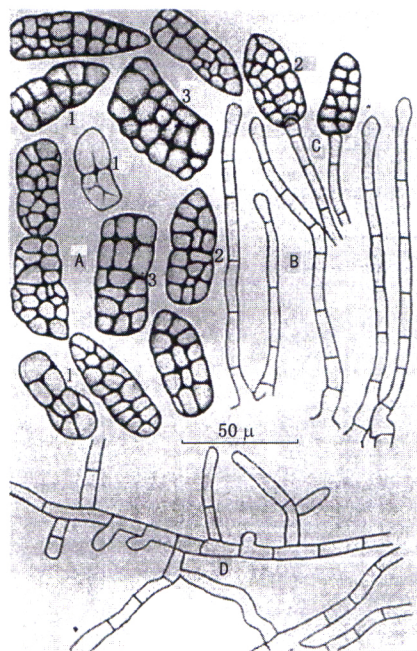
C.2.2 制法

称取马铃薯和胡萝卜各 200 g, 洗净去皮切碎, 加水 1 000 mL 煮沸半小时, 用纱布滤去马铃薯和胡萝卜, 再加 17 g 琼脂, 加热使琼脂完全熔化后, 趁热用纱布过滤, 然后分装进行高压灭菌(121 ℃, 20 min)。

附录 D

(资料性附录)

番茄灰斑病菌的形态特征图



说明：

A —— 来自寄主的分生孢子：(1)未成熟；(2)成熟(典型)；(3)老熟；

B —— 来自寄主的分生孢子梗；

C —— 培养物的分生孢子梗及附着的分生孢子；

D —— 培养物的菌丝。

图 D.1 番茄灰斑病菌的形态特征(引自 Weber, 1930)