

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2035—2007

甜菜霜霉病菌检疫鉴定方法

Identification of *Peronospora farinosa* (Fr.) Fr.
f. sp. *betea* Byford

2007-12-24 发布

2008-07-01 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、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：中华人民共和国黑龙江出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：杨立群、张洪祥、孟玉芹、刘洪义、于恒纯、齐俊杰。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

甜菜霜霉病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了植物检疫中甜菜霜霉病菌的检疫和鉴定方法。

本标准适用于甜菜、甜菜种子、甜菜种苗中甜菜霜霉病菌的检疫和鉴定。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1

菌丝 hyphae

大多数真菌在生长过程中产生茂盛分枝的管状细丝，一条管状细丝称菌丝，真菌的结构单位。多条菌丝聚集在一起称菌丝体。

2.2

孢囊梗 sporangiophore

从营养菌丝分化出着生孢子囊的分枝或不分枝的菌丝。

2.3

孢子囊 sporangia

孢子囊由菌丝分化成孢囊梗的顶端膨大而成的囊状物，是霜霉目等真菌的无性繁殖结构。

2.4

卵孢子 oospore

真菌中卵菌从受精的卵球发展成的休眠孢子。

3 原理

甜菜霜霉病菌[*Peronospora farinosa* (Fr.) Fr. f. sp. *betea* Byford]，属于假菌界(Chromista)，卵菌门(Oomycota)，霜霉目(Peronosporales)，霜霉科(Peronosporaceae)，霜霉属(*Peronospora*)。该病菌具有孢囊梗、孢子囊和卵孢子(参见附录 A)。甜菜霜霉病菌是专性寄生菌，寄主是甜菜属植物，在世界上的分布参见附录 B，是甜菜生产上的危险性病害。该病菌主要侵染幼苗，苗期发病可引起死秧，两年生甜菜感病后，不能抽出花苔或抽出很短，最终很少结实或不结实枯死。该病菌以卵孢子和菌丝形式寄生在甜菜的叶片和甜菜母根上，母根甜菜和田间病残体可提供越冬的菌源，种子可被卵孢子和菌丝污染。病菌的远距离传播主要是通过种子或母根的调运，近距离传播主要是病残体和寄主上产生的孢子囊。该病菌在寄主上的危害症状及病原菌的形态特征是鉴定该病菌的主要依据。

4 仪器及用具

4.1 仪器

体视显微镜、生物显微镜、超净工作台、高压灭菌、光照恒温培养箱、电子天平(1/1 000)、冰箱、振荡器、离心机。

4.2 实验用具

三角瓶(250 mL、500 mL)、培养皿(9 cm)、烧杯(50 mL、100 mL、500 mL)、剪刀、解剖针、解剖刀、滤纸、离心管、透明胶带、吸管(刻度)或可调加样器等。

5 实验试剂

吐温-20、席尔氏溶液(参见附录 C)。

6 现场检查

主要是针对进境种子和种苗。甜菜种子取样时注意检查种子中是否有可疑病粒,种子中是否含有甜菜植株的病残体;植株检查时看是否有发病的可疑病株,将每一可疑病株挑出或采下单独装入塑料袋中,送到实验室做进一步检验鉴定。

7 实验室检验

7.1 普通种子检验

7.1.1 洗涤检验

每份送检样品充分混匀,从样品中取 50 g 作为检验样品。

将称取的样品放入灭过菌的 250 mL 三角瓶中,加入无菌水 150 mL,再加 1 滴~2 滴吐温-20,用胶塞或封口膜将三角瓶封口,以每分钟 260 次的频率振荡 5 min,然后立即将振荡的悬浮液倒入灭菌的离心管,以 1 500 r/min 离心 3 min,倒出上清液,在沉淀物中加入席尔氏液数滴,约 1 mL。然后镜检,至少检查 10 个载玻片,观察有无卵孢子、孢囊梗和孢子囊。

7.1.2 保湿培养检验

将抽取的样品倒入灭菌瓷盘中,检查病残体和可疑的病粒、瘪粒,然后用灭过菌的镊子在无菌的情况下将其放入灭过菌的培养皿中(培养皿中放入三层滤纸,然后高压灭菌,冷却后待用),在培养皿内加入 3 mL 无菌水,每皿放种子 30 粒左右,共 10 皿,将培养皿封闭在透明塑料袋中或用透明胶条封口,在 16℃~18℃ 条件下光暗交替培养 5 d 后,用体视显微镜观察孢囊梗形态特征和孢子囊萌发。

7.2 种衣剂种子检验

7.2.1 直接保湿培养检验

将带有药包衣的种子不经过任何处理直接放入灭过菌的培养皿中,方法同 7.1.2。

7.2.2 洗涤后保湿培养

取样品 50 g 放在 500 mL 的三角瓶中加 400 mL 无菌水振荡 10 min,倒出清洗液,然后重复冲洗 3 次,包衣洗掉,用灭过菌的镊子在无菌条件下挑出瘪粒、小粒、可疑粒,并切开放入灭菌的培养皿中,方法同 7.1.2。

7.3 进境种苗检验

7.3.1 直接镜检

采集带有霉层的病叶,可直接用灭菌解剖针挑取霉层,或者用透明胶带直接粘取霉层后镜检,观察孢囊梗形态特征,孢子囊萌发。

7.3.2 保湿培养镜检

采集不带霉层的病叶可用自来水冲洗干净,然后用无菌水冲洗 3 次后,在无菌条件下用灭菌解剖刀在病健交界处切取 4 cm 左右放入灭菌培养皿保湿培养 2 d~3 d。用体视显微镜每天观察 1 次,待长出霉层后,用镊子取小块带有霉层的叶肉,在显微镜下观察孢囊梗形态特征、孢子囊萌发。

8 隔离种植检验

进境种子经过实验室检疫后,应进行 1 年~2 年的田间隔离种植检疫。近几年进境的甜菜种子有 95%~100% 都进行了药包衣,给种子的检验带来干扰,在实验室的有限条件下不能完全检出种子所携带的病菌,所以田间隔离种植检疫尤其重要,是不可缺少的重要检疫手段。

甜菜霜霉病多发生在潮湿多雨阴凉的春秋季节,蔓延迅速,一般可选择 6 月和 9 月份调查,可根据

症状(参见附录 D),采集可疑病叶,封在塑料袋中,带回实验室,如不能及时检查,可暂放入冰箱冷藏待检。检验方法同 7.3。

9 鉴定特征

甜菜霜霉病菌孢囊梗单个或多个从寄主气孔抽出,孢囊梗无色,长(190 μm ~550 μm) \times 6 μm ,在全长二分之一至三分之二处分枝,呈锐角或直角叉状 3 次~8 次,以 6 次为多,顶端小梗分叉成锐角,分枝端部呈锥形,顶部钝圆,部分孢囊梗基部膨大。孢子囊单个着生在孢子梗分枝的顶端,孢子囊圆形或卵形,无色透明至淡褐色、淡紫色,光滑无乳突,壁厚均匀,孢子囊大小(21 μm ~27 μm) \times (16 μm ~19 μm),萌发产生芽管。卵孢子球形,浅黄至黄褐色,壁厚,直径 30 μm \times 36 μm 。菌丝体无色多核,寄主细胞间生长,具指状分枝的吸器(参见附录 A)。

霜霉科的孢囊梗发达,有一定的分枝方式,孢囊梗是有限生长,成熟后就停止生长,然后在它分枝顶端的小梗上产生大量孢子囊,孢子囊单生于孢囊梗顶端,同步形成同时成熟,易脱落。这一特点区别于霜霉目里其他科的真菌,在霜霉科里与霜霉属孢囊梗形态相近的是假霜霉属(*Pseudoperonospora*),它们的孢囊梗都成锐角叉状分枝,有逐渐变细而优美弯曲的尖端,其上着生孢子囊。它们的区别在于假霜霉属孢囊梗的分枝不对称,孢子囊具有象透镜状的囊盖变形顶区,萌发时从这里开孔放出游动孢子。而霜霉属的孢囊梗分枝左右对称,孢子囊壁厚度均匀,不具顶孔,常以芽管萌发,芽管可以从壁的任何地方生出。

10 结果评定

10.1 种子检验

主要看种子和种子中携带的病残体上是否带有该病菌,通过以上 7.1 或 7.2 检验观察孢囊梗、孢子囊、卵孢子的形态特征与第 9 章中所描述的形态特征相吻合可判定为甜菜霜霉病菌。

10.2 种苗检验

主要通过种苗田间表现症状,根据病菌危害的症状描述(参见附录 D)采集病样,经过 7.3 的检验结果与第 9 章中的描述相吻合,可判定为甜菜霜霉病菌。

11 结果保存

镜检后如发现甜菜霜霉病菌,建议(有条件的单位)进行显微摄影或保存病原菌形态图像和相应的文字说明,这样便于追溯和资料积累。

12 样品保存与处理

现场抽取的种子样品应分别留一半,放置在冷凉干燥、防虫防鼠防霉处妥善保存 6 个月,如发现甜菜霜霉病菌保存 1 年,保存期满后,应经高压灭菌处理。

附录 A
(资料性附录)

Peronospora farinosa 形态特征图

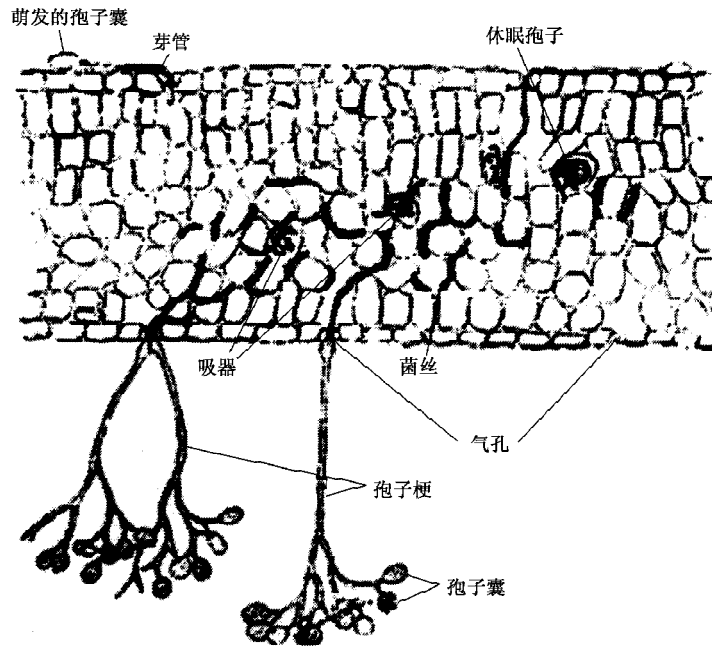


图 A.1 *Peronospora farinosa* 在甜菜叶片上的形态特征图(仿 E. G. Ruppel)



- 1——孢囊梗；
- 2——孢子囊；
- 3——孢子囊萌发出芽管；
- 4——卵孢子。

图 A.2 *Peronospora farinosa* 形态特征图

附录 B

(资料性附录)

甜菜霜霉病菌的分布范围

该病菌国外分布:日本、以色列、前苏联、肯尼亚、摩洛哥、美国、加拿大、阿根廷、澳大利亚、新西兰、欧洲广泛分布。国内分布:云南、贵州、四川和新疆伊犁地区。

附录 C

(资料性附录)

席尔氏液的配制方法

C.1 麦可凡氏缓冲液

配制 0.1 g 分子柠檬酸(即 1 L 中 21.008 g),溶化 21.008 g 水化合的结晶柠檬酸,在 500 mL 蒸馏水内加纯净的中和性甲醇,总量达 1 000 mL,应小心混合。

配置 0.2 g 分子磷酸一氢二钠(即 1 L 中 28.40 g),溶化 28.40 g 磷酸一氢二钠在 500 mL 蒸馏水内,加甲醇,总量到 1 000 mL。

取 0.1 g 分子柠檬酸 0.55 mL 与 0.2 g 分子磷酸一氢二钠 19.45 mL 混合,即得麦克凡氏 pH 8 缓冲液。

C.2 席尔氏缓冲液

2%乙酸钾溶于麦克凡氏 pH 8 缓冲液内,300 mL(甘油 120 mL;乙醇 180 mL)。

附录 D

(资料性附录)

甜菜霜霉病菌的寄主及田间危害症状

寄主:甜菜属 *Beta* L.,包括糖用、饲用、食用和叶用甜菜。

田间危害状:主要危害甜菜植株叶部、包叶中心的嫩叶,受侵染的叶片变淡绿至黄色,叶片变厚变脆,叶片边缘向下卷曲,在潮湿情况下叶片背面长有灰紫色厚霉层,为病原菌孢囊梗和孢子囊。

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
甜菜霜霉病菌检疫鉴定方法
SN/T 2035—2007

*

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.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

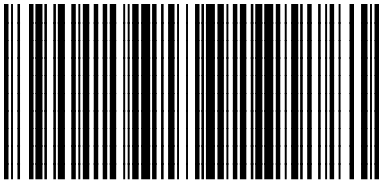
开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 12 千字

2008年3月第一版 2008年3月第一次印刷

印数 1—2 000

*

书号: 155066·2-18509 定价 8.00 元



SN/T 2035-2007