

马铃薯腐烂茎线虫分离、鉴定及培养 技术规程

Technical code of practice for isolation, identification and culture
of potato rot nematode disease

地方标准信息服务平台

2024-08-20 发布

2024-09-20 实施

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由内蒙古自治区农牧厅提出。

本文件由内蒙古自治区农业标准化技术委员会（SAM/TC 20）归口。

本文件起草单位：内蒙古自治区农牧业科学院、内蒙古自治区植保植检中心、内蒙古农业大学、鄂托克前旗农牧业技术推广中心、鄂尔多斯市农牧技术推广中心。

本文件主要起草人：霍宏丽、融晓君、席先梅、萨其仍贵、李正男、张冬梅、张溪、路奇、苗春乐、纪永祥、尤俊文、陈文晋、张磊、孙平平、张朋飞、王欣、高健、孙佳颖、聂利珍、田晓燕、苏雅杰、杨帆、韩平安、范雅芳、云晓鹏。

地方标准信息服务平台

马铃薯腐烂茎线虫分离、鉴定及培养技术规程

1 范围

本文件规定了所用试剂、培养基及引物序列、样品采集及分离、鉴定、培养和样品保存与处理技术要求。

本文件适用于马铃薯种植区土壤和马铃薯块茎中的腐烂茎线虫的分离鉴定与培养。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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。

GB/T 29577 腐烂茎线虫检疫鉴定方法

NY/T 1121.1 土壤检测 第1部分：土壤样品的采集、处理和贮存

SN/T 1132 松材线虫检疫鉴定方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

马铃薯腐烂茎线虫病 potato rot nematode disease

由马铃薯腐烂茎线虫引起的植物检疫性病害，可导致马铃薯植株叶片黄化、萎蔫，块茎表皮皴裂、干腐等症状，导致马铃薯产量和品质降低。

4 试剂、培养基及引物序列

4.1 试剂和培养基

葡萄糖、琼脂、0.5%的次氯酸钠、0.5%青霉素、0.5%硫酸链霉素、4%甲醛溶液、10×Buffer(mg²⁺)、1 mg/mL蛋白酶K、2×Taq PCR MasterMix、50×TAE、核酸染料、DL2000 DNA Marker。

马铃薯葡萄糖琼脂（PDA）培养基。

4.2 引物序列

引物序列按照GB/T 29577的要求。

5 样品采集及分离

5.1 采集

土壤样品采集应符合NY/T 1121.1的规定。取样深度应在15 cm~20 cm之间，且每份土样重量以500 g~1000 g为宜。

马铃薯块茎采集方法：收集有腐烂茎线虫病症的马铃薯薯块（见附录A）。

5.2 分离

将土壤称取50 g、块茎切成1 cm的小块，采用改进贝尔曼漏斗法进行分离，应符合SN/T 1132的规定。

将分离得到的线虫置于显微镜观察，初步挑选出带有口针的寄生性线虫。

5.3 玻片制备

于65 °C水浴锅中处理3 min，热杀离线虫后，用4%甲醛进行固定，制成临时玻片备用。

6 鉴定

6.1 形态学鉴定

使用上述制备好的临时玻片，每个样品各选取20条雌雄虫进行测量，主要测量线虫体长（L）、体宽（W）、口针长度（Stylet）、尾长（tail）、线虫体长与最大体宽之比（a）、线虫体长与体前部至肠前端的距离之比（b）、线虫体长与其尾长比（c）、体前端至阴门的距离×100/体长（V）。显微镜观察，初步明确是否为马铃薯腐烂茎线虫（见附录B）。

6.2 分子生物学鉴定

DNA提取：将线虫放入ddH₂O清洗，挑取单条线虫放入200 μL PCR管中（含8 μL ddH₂O和1 μL 10×PCR Buffer），液氮中放置1 min，85 °C加热2 min，向PCR管中加入1 μL 1 mg/mL蛋白酶K，56 °C加热15 min，95 °C加热10 min，得到DNA提取液，-20 °C保存。

以DNA为模板，进行PCR反应，反应体系见表1。

表1 PCR反应体系（20 μL）

2×Taq PCR MasterMix	10 μL
F（10 μM）	1 μL
R（10 μM）	1 μL
DNA 模板	1 μL
ddH ₂ O	补至 20 μL

腐烂茎线虫PCR反应体系如表所示。反应条件为：95 °C 5 min；95 °C 30 s，55 °C 30 s，72 °C 1 min共30个循环；72 °C 5 min，4 °C保存。

将PCR产物送至上海生工测序。测序结果在NCBI中进行BLAST比较，用DNAMAN 8.0.8.789软件进行序列比对分析，从NCBI GenBank数据库中根据E-score的高低排序，下载同源性较高的部分马铃薯腐烂茎线虫ITS序列，之后使用MEGA 7.0.26软件构建系统发育树。

7 培养

7.1 真菌培养

在PDA培养基平板上纯化链格孢菌 (*Alternaria tenuis*) 和茄腐镰刀菌 (*Fusarium solani*)，之后接入1000条马铃薯腐烂茎线虫，25℃暗培养30 d，可获得大量马铃薯腐烂茎线虫虫体。

7.2 薯块培养

线虫悬浮液制备：将分离得到的线虫用0.5%次氯酸钠溶液消毒1 min后，3000 r/min离心2 min，弃上清液；加入0.5%硫酸链霉素和0.5%青霉素的混合液中消毒10 min，离心后弃上清液，用无菌水冲洗3次，线虫悬浮液（约1000条/mL），4℃保存备用。

腐烂茎线虫培养扩繁：将健康马铃薯薯块用流动水冲洗、去芽去泥，75%酒精表面消毒。用灭菌的打孔器在薯块中央打孔；每个孔内接入线虫约500条，将取下的薯块组织塞回原处，石蜡封口。接种后置于25℃培养箱中进行暗培养，40 d后进行马铃薯腐烂茎线虫的分离，于4℃保存备用。

8 样品保存与处理

对检出马铃薯腐烂茎线虫的土壤及块茎样品可保存于4℃冰箱6个月，以备后续研究和生产需要。保存或培养菌株后的PDA培养基及玻璃器皿应经高压蒸汽灭菌后方可清洗和处理，使其达到对环境的无害化方可处理。

地方标准信息服务平台

附录 A

(资料性)

马铃薯腐烂茎线虫病危害症状及发生规律

马铃薯腐烂茎线虫病危害症状及发生规律见表A.1。

表A.1 马铃薯腐烂茎线虫病危害症状及发生规律

名称	危害症状	发生规律
马铃薯腐烂茎线虫病	<p>线虫可从匍匐茎或块茎的皮孔和薯眼等处入侵薯块，导致马铃薯幼苗矮化、加粗和分支。整体长势偏弱，同时叶片会出现变淡发黄症状。线虫侵染马铃薯薯块初期形成侵染点，薯块表皮呈浅灰色，表皮易脱落，随着线虫在薯内聚集，侵染部位会逐渐扩大，颜色呈灰褐色，到了后期病变组织变干或海绵状表现为干腐或湿腐，表皮皱缩、凹陷、龟裂，呈暗黑色，线虫在侵染块茎的病健交界处繁殖，同时会加重细菌、真菌和螨类复合侵染，导致整薯腐烂变质。</p>	<p>以卵、幼虫和成虫寄生马铃薯的块茎以及根部在窖中越冬，同时幼虫和成虫在块茎、土壤和肥料中越冬，在土壤中可存活5~6年。</p> <p>线虫在5℃~34℃条件下均能发育、繁殖，20℃~27℃为最适宜的繁殖温度，在27℃~28℃下，完成一代需要18 d；20℃~24℃下则需20 d~26 d；6℃~10℃下需68 d。</p> <p>通过被侵染的植物的地下器官如根茎、鳞茎、块茎等以及粘附在这些器官上的土壤进行传播，在田间还可以通过农事操作和流水进行传播。</p>

地方标准信息服务平台

附录 B

(资料性)

马铃薯腐烂茎线虫分类、形态特征及与腐生性线虫的形态学区别

马铃薯腐烂茎线虫分类、形态特征及与腐生性线虫的形态学区别见表B.1。

表B.1 马铃薯腐烂茎线虫分类、形态特征及与腐生性线虫的形态学区别

名称	学名及分类地位	形态特征	与腐生性线虫的形态学区别
马铃薯腐烂茎线虫 (<i>Ditylenchus destructor</i> Thorne)	分类: 线虫门 (Nematoda)、侧尾腺纲 (Secernrntea)、垫刃目 (Tylenchida)、粒科 (Anguinidae)、茎线虫属 (<i>Ditylenchus</i> Filipjev)	线虫虫体呈线型且细长, 两端稍尖, 尾部狭小圆锥形, 线虫唇区低平, 口针细小, 食道腺从背面略覆盖到肠的前端, 雌虫阴门清晰稍突起; 后子宫囊较长, 常延伸到肛阴距的 $3/4$ 处; 雄虫交合刺略向腹面弯曲, 基部膨大; 交合伞从交合刺前端的水平处向后延伸至尾长的 $1/3$ 处。	1、马铃薯腐烂茎线虫具有口针; 而腐生性线虫没有口针。 2、腐烂茎线虫依赖于宿主提供营养物质和居住场所; 而腐生性线虫从腐烂组织获取营养。 3、在水中, 马铃薯腐烂茎线虫活动比较缓慢, 不会过于剧烈; 而腐生线虫活动剧烈。 4、尾巴形态: 腐生线虫的尾巴细尖。

地方标准信息服务平台