

马铃薯镰刀属真菌病害检测技术规程

Technical code for detection of Fusarium fungi disease in potato

地方标准信息服务平台

2024-03-15 发布

2024-04-15 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马铃薯标准化技术委员会（SAM/TC 40）归口。

本文件起草单位：内蒙古自治区农牧业科学院，内蒙古农业大学，乌兰察布市农林科学研究所、内蒙古自治区农牧业技术推广中心、喀喇沁旗农牧局、武川县农牧技术推广中心。

本文件主要起草人：赵远征、徐利敏、王东、周洪友、邱廷艳、张晓明、王真、王玉凤、贾瑞芳、谢锐、邱鑫泽、牟英男、陈文晋、肖皓文、张宇。

地方标准信息服务平台

马铃薯镰刀属真菌病害检测技术规程

1 范围

本文件规定了马铃薯镰刀属真菌病害检测的原理、仪器设备和用具、形态检验、致病性测定、PCR检验、样品复检等技术要求和方法。

本文件适用于马铃薯镰刀属真菌病害的检测。

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。

SN/T 2729 马铃薯炭疽病菌检疫鉴定方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

镰刀属真菌(*Fusarium* spp.)是一种重要的植物病原菌，属无性真菌类，有性时期为子囊菌门。镰刀属真菌主要危害马铃薯植株和块茎。本标准以病原菌在植株和块茎上的危害症状，菌落、孢子等形态学特征，回接致病性测定及PCR反应结果为鉴定依据，将上述各项措施综合形成一套检测技术体系。

5 仪器设备和用具

5.1 仪器设备

超净工作台、显微镜、高压灭菌锅、光照培养箱、PCR仪、离心机、凝胶电泳仪、漩涡振荡仪、水浴锅、凝胶成像系统、分析天平。

5.2 检测工具

接种针、手术刀、镊子、挑针、载玻片、盖玻片、滴管、离心管、培养皿、三角瓶、酒精灯。

6 形态检验

6.1 调查取样

选取田间萎蔫、干枯发病植株，观察根部腐烂情况，检查是否褐变或出现白色菌丝体；剖开根茎处维管束观察是否出现黄化或褐变；田间或窖藏观察马铃薯块茎病变情况，在块茎脐部下方2 cm左右处横

切，或切取表皮凹陷病斑处进行观察，观察是否出现维管束褐变，块茎中空或腐烂并伴随白色菌丝层。将具有典型特征的病株、病薯取样。

6.2 病原菌分离培养和纯化

将病样表面清洗晾干，选择病斑附近的病健交界处，切取0.3 cm×0.3 cm×0.1 cm大小的薄片，75%酒精消毒30 s，用无菌滤纸吸干，在0.1%次氯酸钠浸泡2 min，再用无菌水冲洗3次。待组织干燥后置于PDA培养基上，在25 ℃恒温下光照、黑暗交替各12 h培养5 d。待组织长出菌丝后，挑取菌丝体转移到新的PDA培养基上进行培养。待菌落长至培养皿2/3时，采用平板稀释法进行单孢分离，并获得纯培养。

6.3 病原菌形态学鉴定

将PDA培养基上培养7 d的菌落拍照并观察其形态，典型菌落气生菌丝多呈絮状或毡状，白色、紫色、淡粉色或黄白色。利用挑针挑取少量菌组织，载玻片上以水浮载制成玻片，显微镜下观察孢子形态，小型分生孢子呈卵圆形或椭圆形，单孢，大小2 μm~4 μm×4 μm~8 μm；大型分生孢子略弯曲，镰刀形或月牙形，2~5个分隔，多为3个分隔，大小3 μm~8 μm×11 μm~70 μm；厚垣孢子球形，表面不光滑，单生或串生。

7 致病性测定

将纯培养物配制成孢子悬浮液，伤口接种法进行马铃薯植株和薯块回接，接种28 d后观察马铃薯的发病情况。如出现与病样一致的症状则判定病原菌能够引起该病害发生。

8 PCR 检验

8.1 DNA 提取

按照SN/T 2729，采用CTAB法提取菌株基因组DNA。

8.2 对照设置

以马铃薯枯萎病病原菌DNA作为阳性对照，以不添加DNA模板反应体系作为阴性对照。

8.3 PCR 扩增

以菌株DNA为模板，利用镰刀菌属真菌的特异性引物EF-1H：（5'-ATGGGTAAGGAAGACAAGAC-3'），EF-2T：（5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3'）进行PCR扩增。PCR反应体系总体积为25 μL，其中模板DNA 1 μL，上下游引物各1 μL，2×Easy Taq PCR Super Mix 12.5 μL，ddH₂O 9.5 μL。PCR扩增程序：95 ℃预变性5 min；95 ℃ 30 s，58 ℃退火45 s，72 ℃延伸1 min，循环35次；72 ℃延伸5 min。

8.4 结果判定

扩增产物的1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增出长度介于700 bp~750 bp之间的清晰单一条带，与阳性对照一致。

9 样品复检

样品检测不成功需要复检，病样置于冰箱-20℃冷冻以备样品检测不成功进行复检，工作完成后集中灭活处理。

地方标准信息服务平台

附录 A

(规范性)

培养配方、DNA 提取方法及发病症状

A.1 培养基配方

WA 培养基：琼脂 15 g，蒸馏水定容至 1000 mL。

PDA 培养基：马铃薯 200 g，葡萄糖 20 g，琼脂 15 g，蒸馏水定容至 1000 mL。

A.2 CTAB 法

CTAB 法如下所示：

- a) 将植物组织置于 2 mL 离心管，加入 2 颗灭菌钢珠，液氮冷冻，球磨仪研碎；
- b) 加入 800 μ L CTAB 提取缓冲液，65 $^{\circ}$ C 水浴 1 h，期间每隔 15 min 颠倒混匀若干次；
- c) 加入 800 μ L 苯酚：氯仿：异丙醇（25:24:1），上下颠倒混匀，12000 rpm 离心 10 min，将上层水相转移至新的 2 mL 离心管；
- d) 加入等体积氯仿：异丙醇（24:1），上下颠倒混匀，12000 rpm 离心 10 min，将上清转移至新的 1.5 mL 离心管；
- e) 加入 0.6 倍体积异丙醇，-20 $^{\circ}$ C 沉淀 30 min 以上；
- f) 12000 rpm 离心 10 min，弃去上清，加入 75%乙醇洗涤两次；
- g) 真空干燥仪干燥 40 min 左右，加水溶解 DNA。

A.3 病害症状

植株症状：苗期主要导致马铃薯根部腐烂，根部褐变，植株萎蔫，严重时根部出现白色菌丝层；开花期前后主要导致植株萎蔫、枯萎，植株维管束出现褐变。

块茎症状：病斑多发生于薯块脐部。发病初期块茎表面出现浅褐色病斑，病斑缓慢扩展，随后扩大形成较多轮纹状褶皱、凹陷；后期块茎内部变空，干燥时内部长满白色菌丝，整个薯块变硬、变轻、干缩，易碎呈灰褐色或深棕色病变。

附录 B
(资料性)
镰刀属真菌形态

B.1 镰刀属真菌孢子形态图见图 B.1。



图B.1 镰刀属真菌孢子形态图

B.2 镰刀属真菌菌落形态图见图 B.2。



图B.2 镰刀属真菌菌落形态图