



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4865—2017

大豆拟茎点种腐病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Phomopsis longicolla* Hobbs

2017-07-21 发布

2018-03-01 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。本文件的发布结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。

本标准负责起草单位：中华人民共和国安徽出入境检验检疫局、中华人民共和国宁波出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：陈雪娇、李云飞、宗凯、姚剑、段维军、孙娟娟、郑海松。

大豆拟茎点种腐病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了进出境大豆种子及其夹带的植物残体中大豆拟茎点种腐病菌(*Phomopsis longicolla* Hobbs)的检疫鉴定方法。

本标准适用于大豆拟茎点种腐病菌的检疫和鉴定。

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 2122 进出境植物及植物产品检疫抽样方法

3 基本信息

学名:*Phomopsis longicolla* Hobbs

分类地位:半知菌亚门 Deuteromycotina,腔孢纲 Coelomycetes,球壳孢目 Sphaeropsidales,球壳孢科 Sphaeropsidaceae,拟茎点霉属 *Phomopsis*。其有性态为间座壳属,自然界内未发现。

传播途径:随带菌种子、植株或残体的调运作远距离传播。

大豆拟茎点种腐病的地理分布、寄主、为害状等信息参见附录 A。

4 原理

以大豆拟茎点种腐菌培养性状、形态特征及实时荧光 PCR 检测结果作为检疫鉴定的主要依据,寄主、地理分布及为害症状作为辅助鉴定依据。

5 仪器和用具

5.1 仪器

生物显微镜(带显微照相装置)、体式显微镜、超净工作台、电子天平、光照培养箱、高压灭菌锅、实时荧光 PCR 仪、高速冷冻离心机、金属浴、冰箱、移液器等。

5.2 用具

培养皿、烧杯、三角瓶、镊子、手术刀、剪刀、载玻片、盖玻片、量筒、吸管、酒精灯、挑针、滤纸、标签等。

6 试剂和培养基

6.1 试剂

75%酒精、85%乳酸、1%次氯酸钠、实时荧光 PCR 反应预混液、去离子水等。除另有规定外,所有

试剂均为分析纯。

6.2 培养基

马铃薯葡萄糖培养基(PDA):称取马铃薯浸粉 3 g,葡萄糖 20 g,琼脂粉 18 g,加入 1 000 mL 蒸馏水后加热搅拌溶解,121 ℃ 高压灭菌 15 min,冷却至 50 ℃ 后倒平板。

酸性马铃薯葡萄糖培养基(APDA):按照 PDA 配方配制,高压灭菌后冷却至 50 ℃,用过滤除菌的 85%乳酸调节 pH 至 4.5 后倒平板。

7 抽样方法

按照 SN/T 2122 中的规定进行抽样。

8 鉴定方法

8.1 症状检查

搜集并检查样品中夹带的豆荚或茎秆上是否有沿着茎秆成行排列的黑色斑点,观察种子是否存在皱缩、延长、开裂、扁平状,是否覆盖有白色霉层。

8.2 保湿培养

8.2.1 种子保湿培养

选取疑似感病样品,用 1%次氯酸钠处理 60 s 进行表面灭菌,无菌水漂洗 3 次后,放在垫有三层灭菌湿滤纸的培养皿中,25 ℃~28 ℃ 12 h 光照 12 h 黑暗交替条件下保湿培养 7 天以上,观察是否出现白色菌丝。

8.2.2 APDA 培养

挑取少量白色菌丝转到 APDA 上,25 ℃~28 ℃ 12 h 光照 12 h 黑暗交替条件下培养,长出典型菌落和产孢结构后,转接至 PDA 培养基上,待长出分生孢子后,观察分生孢子器、分生孢子梗、产孢结构及分生孢子的形状,并测量大小。

8.3 实时荧光 PCR 检测

采用特异性引物探针 pltef-F/pltef-R/pltef-P 对分离出的疑似菌株 DNA 进行实时荧光 PCR 检测,用大豆拟茎点种腐菌株作阳性对照,用非大豆拟茎点种腐菌的植物病原细菌 DNA 作阴性对照,用无菌水作空白对照,进行实时荧光 PCR 扩增(见附录 B)。

9 病菌形态特征

大豆拟茎点种腐病菌的培养性状、形态特征及与近似种的区别见附录 C。

10 结果判定

如分离菌的形态特征与附录 C 中描述的大豆拟茎点种腐病的特征相符,且实时荧光 PCR 检测结果为阳性,即可判定为大豆拟茎点种腐病菌 *Phomopsis longicalla* Hobbs。

11 样品与菌种保存

分离得到的大豆拟茎点种腐菌转接在 PDA 培养基斜面上,待斜面表面长满菌丝后,置于 4℃ 保存,定期转接。有条件可进行冷冻干燥保存。检出大豆拟茎点种腐菌的样品妥善保存 6 个月。保存期满灭活处理。

附 录 A
(资料性附录)
大豆拟茎点种腐病菌相关资料

A.1 分布

亚洲:韩国、中国。
美洲:美国、阿根廷。
欧洲:意大利、克罗地亚、希腊、前南斯拉夫。
大洋洲:澳大利亚。

A.2 寄主

苘麻 *Abutilon theophrasti*、元宝槭 *Acer truncatum*、三裂叶豚草 *Ambrosia trifida*、*Aster exilis*、*Caperonia palustris*、*Desmanthus illinoensis*、斑地锦 *Euphorbia maculata*、鳢肠 *Eclipta prostrata*、大地锦 *Euphorbia nutans*、大豆 *Glycine max*、*Ipomoea lacunose*、扁蓄蓼 *Polygonum aviculare*、皱叶酸模 *Rumex crispus*、*Sida spinosa*、茄子 *Solanum melongena*、豇豆 *Vigna unguiculata*、苍耳子 *Xanthium strumarium* 等。

A.3 为害状

大豆拟茎点种腐病的主要症状表现为当植株进入成熟期,豆荚和茎秆明显枯萎,茎秆和豆荚上覆盖有黑色的小斑点,这些斑点就是病原真菌的子实体,通常沿着茎秆上成行排列。气候不适宜时,病菌只发生在茎秆的部分区域,发病区域接近土壤表面,处在茎秆的结点上。病斑有时也可在干扁的豆荚上呈现无规则点状。受感染的种子显现出从无症状到症状明显不同的等级,外观健康的种子也能在种皮上带菌,受感染但不表现症状。严重感染的种子皱缩、延长、开裂、扁平,并呈白垩状,部分或全部覆盖白色霉层。感病种子常不发芽或发芽缓慢。

附录 B

(规范性附录)

大豆拟茎点种腐病菌分子生物学检测

B.1 菌株 DNA 的制备

挑取少量培养物置于 1.5 mL 离心管中,加入 300 μ L 无菌去离子水,沸水浴 20 min。冷却后备用。

B.2 引物和探针

大豆拟茎点种腐病菌特异性引物及探针:pltef-F;5'-AGCATCACTTTCATTCCCACTT-3';pltef-R;5'-GGCTGTGTAGAAAGAGTCAGCAT-3';pltef-P;5'-FAM-TCTGCTCCAGAGAGCTT-MGB-3'。引物和探针由提供商品化服务的公司合成。

B.3 反应体系

用 pltef-F、pltef-R 和 pltef-P 对模板 DNA 进行实时荧光 PCR 反应,反应体积 20 μ L;2 \times PCR 反应预混液 10 μ L、10 μ M 引物和探针各 1 μ L、模板 2 μ L,无菌去离子水补足至 20 μ L。将反应体系混匀后置于实时荧光 PCR 仪中进行反应。

以无菌去离子水为空白对照,以大豆拟茎点种腐病菌 DNA 为阳性对照,以不含有大豆拟茎点种腐病菌 DNA 的模板为阴性对照,每个样品重复 2 次。

B.4 扩增条件

94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 15 s;60 $^{\circ}$ C 30 s;40 个循环。

B.5 结果判读

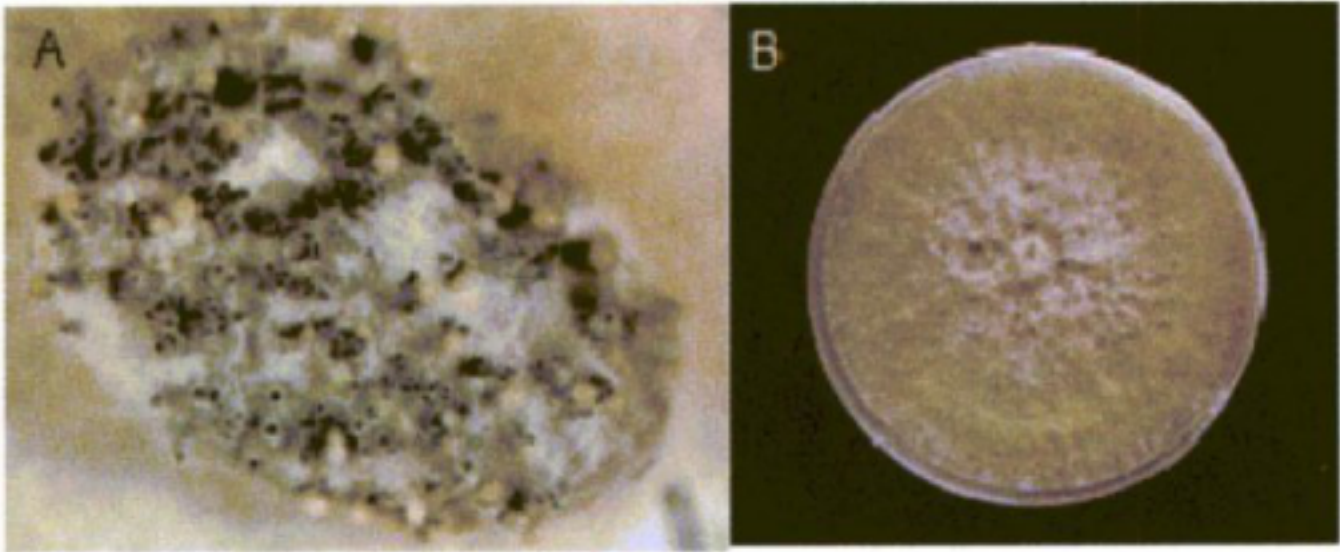
在阳性对照能够正常扩增的前提下,若待检样品扩增结果 Ct 值小于 35,则判定实时荧光 PCR 检测结果为阳性;若待检样品扩增结果 Ct 值大于或等于 35,则重新制备浓度较高的 DNA 模板,重新扩增。再次扩增后,若待检样品 Ct 值仍大于或等于 35,则判定该样品实时荧光 PCR 检测为阴性;若待检样品 Ct 值小于 35,则判定该样品实时荧光 PCR 检测为阳性。

附 录 C
(规范性附录)

大豆拟茎点种腐病菌培养性状、形态特征及与近似种的区别

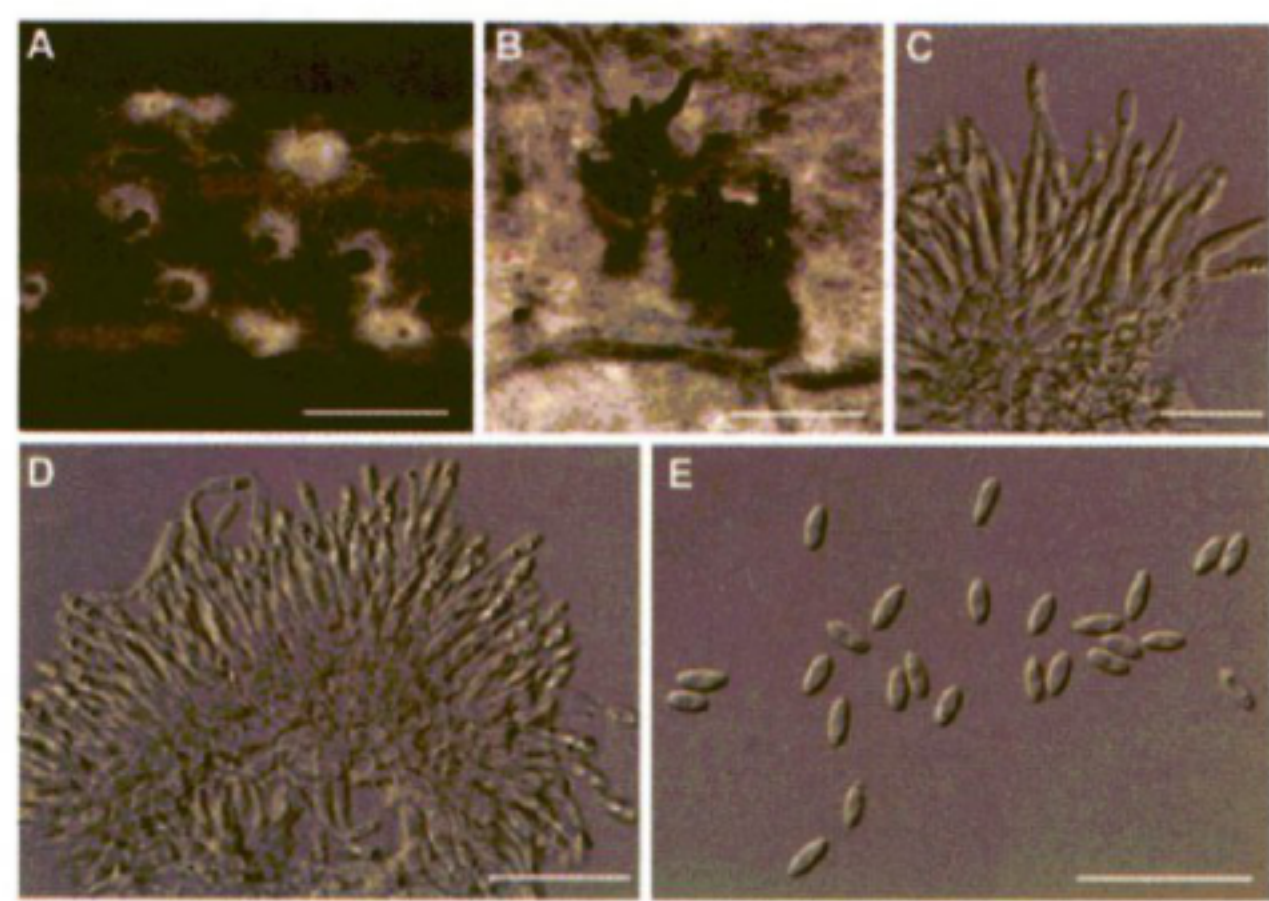
C.1 培养性状及形态特征

保湿培养后,受该病菌感染的植物材料表面长出白色、絮状、致密的菌丝,并常伴有小黑点(分生孢子器)。该病菌在 PDA 培养基上 25 ℃ 12 h 光照 12 h 黑暗培养 1 周左右能够长满培养皿,2 周后开始长出子实体,培养基背面可见较大的黑色的子座。菌落白色,呈密集的丛卷毛状,有时部分区域显黄绿色(图 C.1)。分生孢子器着生于黑色子座上,长度 100 μm~250 μm,黑色圆筒状,单生或聚生,分生孢子器基部略膨大,顶部钝圆,颈部突出,腔室有单孔或多孔口,球形。有时可见其顶端有黄白色分生孢子液溢出(图 C.1)。分生孢子梗无色,单生或者有分枝,具分隔,大小(3.9 μm~23.8 μm)×(1.5 μm~3.9 μm)。α 型分生孢子纺锤形,两端稍钝,透明,单胞,通常含 2 个油球,大小(4.87 μm~8.21 μm)×(1.69 μm~3.02 μm),平均 6.43 μm×2.31 μm,长宽比 2.81 左右(图 C.2)。β 型分生孢子为长针状,较为罕见。未发现性世代。



说明:
A——感染大豆拟茎点种腐病菌的大豆种子在 PDA 培养基上培养 20 天(来源 https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phomopsis_longicollis.tif#/media/File:Phomopsis_longicollis.tif);
B——大豆拟茎点种腐病菌在酸性 PDA 上培养 14 天(25 ℃,12 h 光照 12 h 黑暗)。

图 C.1 大豆拟茎点种腐病菌培养特征



说明：
A ——PL 为害大豆茎秆状；
B ——PL 在 PDA 培养基上形成的子座；
C、D ——分生孢子梗；
E ——α 型分生孢子。
比例尺：A=900 μm；B=800 μm；C、D=12 μm；E=20 μm。（来源：Udayanga et al,2015）

图 C.2 大豆拟茎点种腐病菌(PL)为害状、培养性状及孢子形态

C.2 与近似种的区别

大豆拟茎点种腐病菌与近似种的区别见表 C.1。

表 C.1 大豆拟茎点种腐病菌与近似种的区别

病菌名称	大豆拟茎点种腐病	大豆北方茎溃疡病菌	大豆南方茎溃疡病菌
无性型	<i>Phomopsis longicalla</i>	<i>Phomopsis phaseoli</i> f.sp. <i>Caulivora</i> Kulik	<i>Phomopsis</i> sp.
有性型	未发现	<i>Diaporthe phasolorum</i> var. <i>caulivora</i>	<i>Diaporthe phasolorum</i> var. <i>meridionalis</i>
PDA 上菌落形态	菌落白色,呈密集的丛卷毛状,有时部分区域显黄绿色	丛毛状的白色菌落,后期变为黄色至茶色	白色,丛生长毛,老熟后变成深褐色
无性型形态	分生孢子器长度 100 μm ~ 250 μm, α 型分生孢子透明,单胞,梭形,含 2 个油球,大小 (4.87 μm~8.21 μm)×(1.69 μm~3.02 μm),β 型分生孢子极少见	未发现分生孢子和分生孢子器	在 PDA 培养基上生长 4 周后形成钝圆的分生孢子器,内生大量 α 型分生孢子。分生孢子无色单胞,常含 2 个油球,孢子大小 (5.9 μm ~ 8.0 μm) × (2.0 μm~2.7 μm)

表 C.1 (续)

病菌名称	大豆拟茎点种腐病	大豆北方茎溃疡病菌	大豆南方茎溃疡病菌
有性型形态	未发现	子囊壳在不发达的小子座上形成。子囊(5.0 μm~6.5 μm)×(29.8 μm~31.0 μm),长棍棒状,壁薄,易消解,顶部有清晰的折光环。子囊孢子(2.43 μm~3.24 μm)×(10.1 μm~11.3 μm),透明,纺锤形,双胞,分隔处略缢缩,两室两油球	子囊、子囊孢子与北方茎溃疡病菌类似,但更大。子囊壳扁球形,着生于小而不发达的子座;子囊(4.8 μm~8.7 μm)×(34.8 μm~41.1 μm),长棍棒状,壁薄,易消解,顶部有清晰的折光环;子囊孢子(2.3 μm~4.2 μm)×(7.4 μm~13.2 μm),无色,双胞,纺锤形,含 4 个油球

参 考 文 献

- [1] SN/T 1189—2007 大豆茎溃疡病菌检疫鉴定方法
- [2] 张建成,顾建锋,徐瑛,等.大豆拟茎点种腐病的研究进展及其检疫意义[J].植物检疫,2005,19(3):163-167.
- [3] 顾建锋,杨额,张建成,等.大豆拟茎点种腐病菌的分离与鉴定[J].植物检疫,2006,20(3):133-136.
- [4] 崔友林,段灿星,丁俊杰,等.一种新发生的大豆茎枯病病原菌鉴定[J].中国油料作物学报,2010,32(1):99-103.
- [5] 王颖,陈枝楠,程颖慧,等.用形态学方法检测大豆拟茎点种腐病菌 *Phomopsis longicolla*.中国植物病理学会学术年会,2008.
- [6] Udayanga D, Castlebury L A, Chukeatirote E, et al. The *Diaporthe sojae* species complex: Phylogenetic re-assessment of pathogens associated with soybean, cucurbits and other field crops[J]. Fungal Biology, 2015, 119: 383-407.
- [7] 严进,吴品珊.中国进境检疫性有害生物——菌物卷[M].北京:中国农业出版社,2013.
- [8] 陆家云.植物病原真菌学[M].北京:中国农业出版社,2001.