



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3423—2012

黄瓜黑色根腐病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Phomopsis sclerotioides* van Kesteren

2012-12-12 发布

2013-07-01 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

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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：中华人民共和国宁波出入境检验检疫局、中华人民共和国浙江出入境检验检疫局、中华人民共和国广东出入境检验检疫局、中国计量学院。

本标准主要起草人：张慧丽、张建成、陈先锋、徐瑛、杨红霞、商晗武、郑炜。

黄瓜黑色根腐病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了黄瓜黑色根腐病菌(*Phomopsis sclerotioides* van Kesteren)的检疫鉴定方法。
本标准适用于黄瓜黑色根腐病菌寄主植物的植株、种子上黄瓜黑色根腐病菌的检疫鉴定。

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

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

假子座 pseudostroma

由菌组织和寄主植物组织结合而形成的子座。

3.2

假菌核 pseudosclerotium

由菌组织和寄主组织结合在一起形成的菌核。

4 黄瓜黑色根腐病菌基本信息

学名:*Phomopsis sclerotioides* van Kesteren

异名:*Phomopsis sclerotioides* Kest. spec. nov.

中文名称:黄瓜黑色根腐病菌

英文名:Cucumber Black Root Rot

分类地位:黄瓜黑色根腐病菌属真菌界(Fungi)、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*)。

传播途径:该病菌是一种土传病害,通过空气、水或土壤/介质传播。在不利情况下,病菌形成的菌核可以在土壤中存活多年。

黄瓜黑色根腐病菌的其他信息参见附录 A。

5 方法原理

根据黄瓜黑色根腐病菌在寄主植物上的症状、病原菌的形态特征、生物学特性和 PCR 特异性反应对病菌进行鉴定(参见附录 B、附录 C)。

6 仪器设备和试验用具

显微镜、解剖镜、超净工作台、培养箱、冰箱、高压灭菌器、离心机、PCR 仪、电泳仪、凝胶成像仪、恒温光照培养箱、微量可调加样器(10 μ L、100 μ L、200 μ L、1 000 μ L)、载玻片、盖玻片、滴管、培养皿、镊子、解剖刀、酒精灯、医用手术剪等。

7 试剂和培养基

7.1 试剂

无菌双蒸水、液氮、蛋白酶 K、盐酸、氢氧化钠、醋酸铵、氯化钠、TBE 缓冲液、无水乙醇、溴化乙锭、三氯甲烷、异丙醇、异戊醇、TE 缓冲液(pH8.0)、PCR 试剂(包括 *Taq* DNA 聚合酶、dNTP、缓冲液)、次氯酸钠、葡萄糖、五氯硝基苯(PCNB)、硫酸链霉素、20%乳酸、除另有规定外,所有试剂均为分析纯,所有试验用水均为无菌双蒸水。

7.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)和 PCNB 酸性马铃薯葡萄糖选择性培养基,配制方法见附录 D。

8 现场检疫

在光线充足的场所,借助放大镜重点检查植株的根部,根部的症状是产生灰黑色病斑,病斑边缘有明显的黑色线或带。抽取可疑的植株或种子送实验室做进一步检验。

取样方法和步骤参照 SN/T 2122。

9 实验室检疫

9.1 取样

挑取植株萎蔫,根部变色的可疑植株,镜检。

种子类样品,选取干瘪、皱缩、霉变等非正常的种子,同时挑取夹带的植株残体,进行病原菌的分离和培养。

9.2 镜检

将植物的根在自来水下洗干净,清洗时要注意不要把细根弄断。根部有变黑症状的样品,在解剖镜下观察沿着根纵轴方向上是否有浅灰色或棕黑色假子座(参见图 B.1),在根的皮肤细胞中是否有假菌核(参见图 B.2)。没有明显症状的根冲洗干净后,装入塑料袋内,在室温下保湿培养 3 d~7 d 后观察。

9.3 病原菌的分离和培养

选择较新鲜的发病组织,切取病健交界部位组织(大小约 5 mm×5 mm),1.0%次氯酸钠溶液中表面消毒 5 min(根据分离组织的腐败程度可适当增加或缩短表面消毒时间),灭菌水冲洗 3 次,用灭菌滤纸吸干水分后,置于 PCNB 酸性马铃薯葡萄糖选择性培养基平板上,25 $^{\circ}$ C 黑暗培养。解剖镜下发现有灰色菌丝长出,立即挑取菌落边缘菌丝,转入 PDA 平板纯化,保存备用。非正常种子上病原菌的分离方法同上。

9.4 分子生物学鉴定

如未观察到假子座和假菌核还需进行 PCR 鉴定,PCR 鉴定方法见附录 C。

黄瓜黑色根腐病菌的特异性引物 CPs-1 和 CPs-2 的序列见表 1。

表 1 特异性引物序列及产物(Shishido M,2010)

引 物	序列 5'-3'	产 物
CPs-1	GCC TCG GCG CAG GCC GGC CTC ACC	392bp
CPs-2	GGG GCC TTC CAG AAC GAA ATA TAA TTT	

10 鉴定特征

10.1 病原菌特征

10.1.1 假子座和假菌核

黄瓜黑色根腐病典型的特征为:在根纵轴方向上产生浅灰色或棕黑色假子座(即病斑边缘黑褐色的线或带),假子座也常围绕侧根和根毛的连接处(参见图 B.1);在根的皮层细胞中产生棕黑色的假菌核,假菌核的大小和形态随皮层细胞的大小和形状的不同而变化(参见图 B.2)。

10.1.2 培养性状

在 PDA 培养基上,黄瓜黑色根腐病菌通常会形成薄的、暗灰色至灰棕色的菌落(参见图 B.3)。菌落由两种菌丝构成:一种为薄壁透明的菌丝(直径 $2\ \mu\text{m}\sim 4.5\ \mu\text{m}$),另一种为厚壁黑褐色菌丝(直径 $10\ \mu\text{m}\sim 17.5\ \mu\text{m}$)。载孢体亚球形到不规则形,厚壁,外部棕色或黑色,无明显的孔口,内腔被突起的增殖层分开, α 孢子($7.5\ \mu\text{m}\sim 10.5\ \mu\text{m}\times 2.5\ \mu\text{m}\sim 4.5\ \mu\text{m}$)透明,椭圆形至卵圆形,顶端稍尖,常有油球(参见图 B.4)。

10.2 与近似种区别

拟茎点霉属中引起葫芦科果腐和茎腐的种是 *P. cucurbitae*,它与黄瓜黑色根腐病的区别见表 2。

表 2 黄瓜黑色根腐病菌与近似种的区别

特征	种 类	
	<i>P. cucurbitae</i>	<i>P. sclerotioides</i>
α 孢子	大小($4\ \mu\text{m}\sim 9\ \mu\text{m}$) \times ($1.5\ \mu\text{m}\sim 3\ \mu\text{m}$),绝大多数($5.5\ \mu\text{m}\sim 7\ \mu\text{m}$) \times ($1.5\ \mu\text{m}\sim 2\ \mu\text{m}$),平均 $6.2\ \mu\text{m}\times 1.9\ \mu\text{m}$,透明,纺锤状,常有油球	($7.5\ \mu\text{m}\sim 10.5\ \mu\text{m}$) \times ($2.5\ \mu\text{m}\sim 4.5\ \mu\text{m}$),透明,椭圆形至卵圆形,顶端稍尖,常有油球
β 孢子	($14\ \mu\text{m}\sim 34\ \mu\text{m}$) \times ($0.5\ \mu\text{m}\sim 1.8\ \mu\text{m}$),绝大多数($19\ \mu\text{m}\sim 28\ \mu\text{m}$) \times ($0.7\ \mu\text{m}\sim 1.0\ \mu\text{m}$),平均 $23.8\ \mu\text{m}\times 0.9\ \mu\text{m}$,单细胞,透明,线状或钩状,强烈弯曲(参见图 B.5)	无
菌核	不产生任何菌核	寄主根部产生假菌核
侵染部位	可以引起叶片、叶柄、果实和茎秆腐烂	主要引起根腐

11 结果判定

根据黄瓜黑色根腐病菌的鉴定特征对病原菌分离物进行综合判定,如病菌在寄主植物上的症状、形态学特征符合第9章的描述,可判定为黄瓜黑色根腐病菌(*P. sclerotioides*)。如未观察到假子座和假菌核还需进行PCR鉴定,PCR产物含有392bp特异性片段的确定为黄瓜黑色根腐病菌。

12 菌种和DNA样品的保藏

黄瓜黑色根腐病菌(*P. sclerotioides*)纯分离物要标注菌株来源、寄主、分离时间、鉴定人,菌株在含20%甘油的冻存管中于-80℃保存,或将菌株转接在PDA斜面上培养,待菌丝体长满斜面后,置于4℃下保存,并定期(180 d)转管。病菌基因组DNA样品于-20℃下保存。保存期满后,需经灭菌处理。

附录 A

(资料性附录)

黄瓜黑色根腐病菌基本信息

A.1 地理分布

欧洲:丹麦、德国、法国、荷兰、挪威、瑞典、瑞士、英国、苏格兰、波兰、意大利。

大洋洲:新西兰。

亚洲:马来西亚、西印度群岛、日本。

北美洲:加拿大。

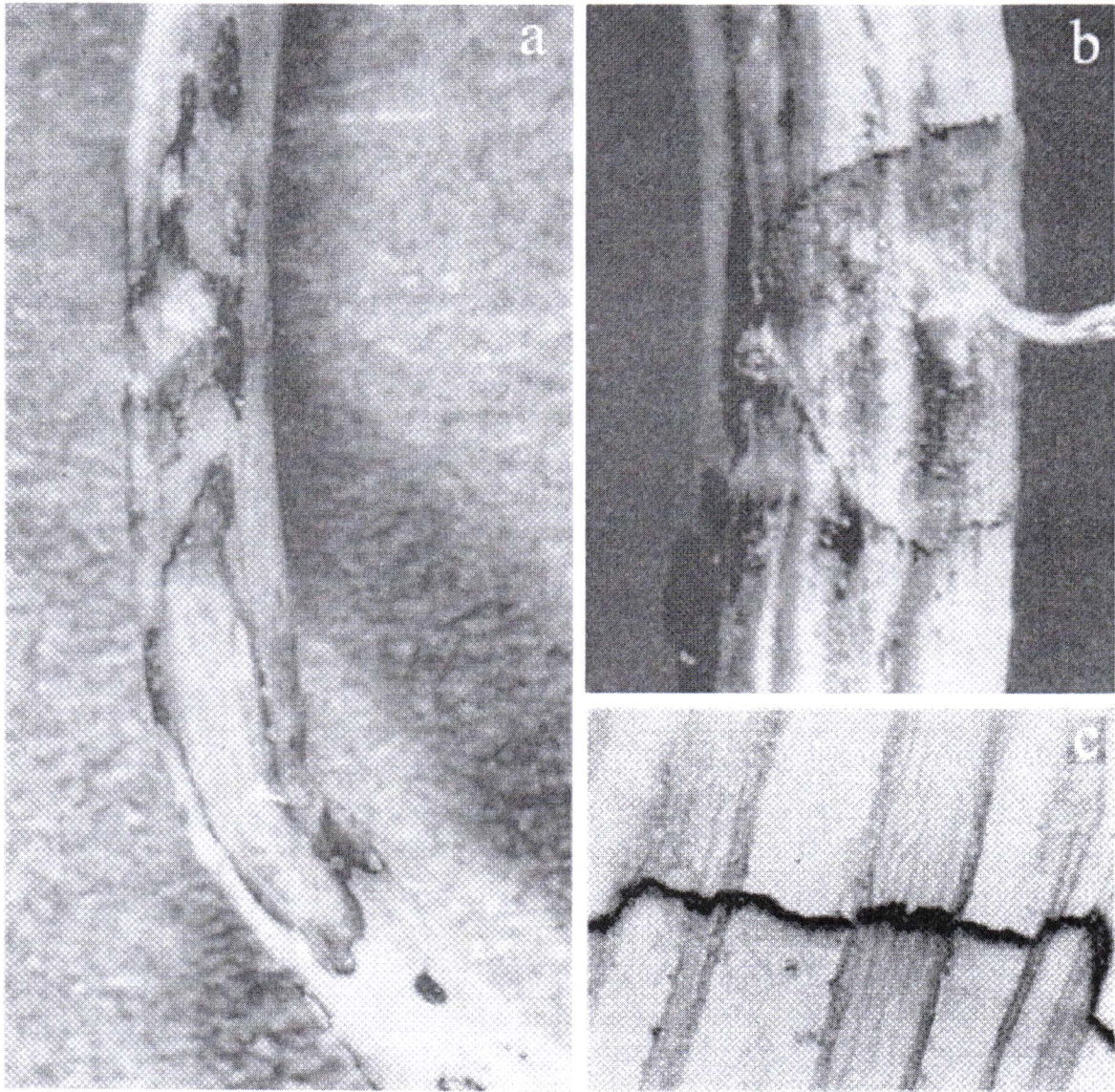
A.2 寄主

黄瓜黑色根腐病菌主要侵染葫芦科植物,已报道的自然寄主有黄瓜(*Cucumis sativus*)、黄瓜变种(*Cucumis sativus* var *anglicus*)、南瓜(*Cucurbita moschata*)、笋瓜(*Cucurbita maxima*)、西瓜(*Citrullus lanatus*)、甜瓜(*Cucumis melo*)、黑籽南瓜(*Cucurbita ficifolia*)。

Leski 等证明通过人工接种黄瓜黑根腐病菌可以侵染更多的植物,如:芸豆,利马豆,大豆,豌豆,黄秋葵,茄子,葵花,*lupinus sativus*(羽扇豆属一种),大巢菜,翠菊,红三叶,紫花苜蓿。但是只在苜蓿和红三叶上产生典型的黑斑。

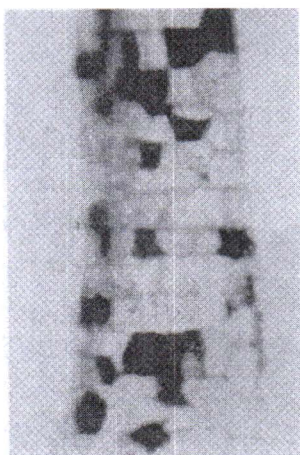
附 录 B
(资料性附录)

黄瓜黑色根腐病菌危害症状及病原菌形态特征



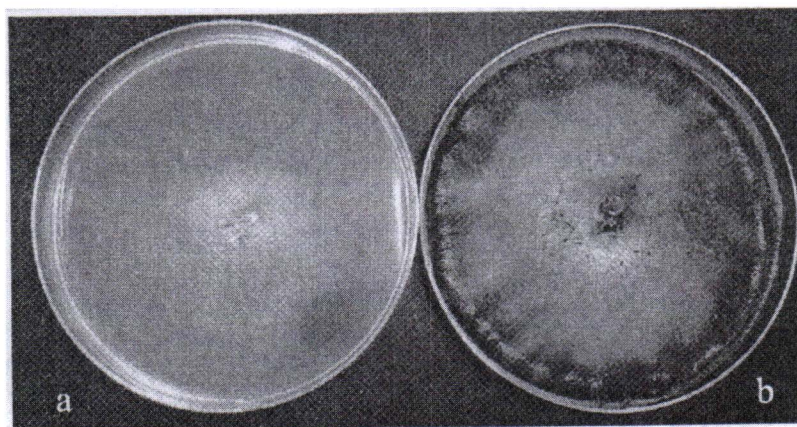
说明：
a、b —— 受 *P. sclerotioides* 侵染的黄瓜根部；
c —— 假子座部分截图。
注：引自 H. A. VAN KESTEREN 1966。

图 B. 1 黄瓜黑色根腐病菌在黄瓜上引起的症状



注：引自 H. A. VAN KESTEREN 1966。

图 B.2 根皮层细胞中的假菌核



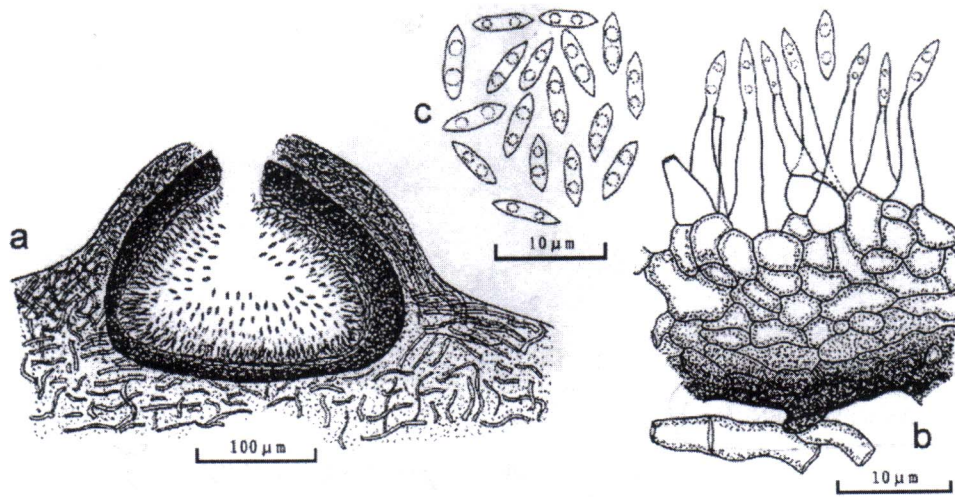
说明：

a——培养 2 d；

b——培养 12 d。

注：引自門田育生 2008。

图 B.3 黄瓜黑色根腐病菌在 PDA 平板上的菌落形态



说明：

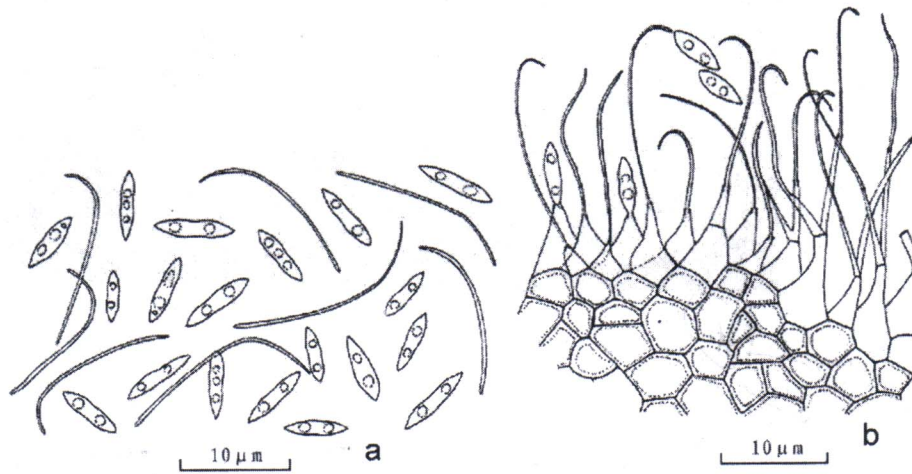
a——载孢体；

b——分生孢子梗及产孢细胞；

c——分生孢子。

注：引自 H. A. VAN KESTEREN 1967。

图 B.4 黄瓜黑色根腐病菌的载孢体和分生孢子梗及产孢细胞



说明：

a——分生孢子；

b——分生孢子梗及产孢细胞。

注：引自 McKeen 1957。

图 B.5 *Phomopsis cucurbitae* 分生孢子梗及产孢细胞

附录 C

(规范性附录)

黄瓜黑色根腐病菌的 PCR 鉴定

C.1 试剂

C.1.1 TES 提取缓冲液

100 mmol/L Tris-HCl(pH8.0)、10 mmol/L EDTA、2% SDS(质量浓度)。

C.1.2 CTAB/NaCl 溶液

10% CTAB(质量浓度)、0.7 mol/L NaCl。

C.1.3 TBE 电泳缓冲液

Tris 108 g, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 7.44 g, 硼酸 55 g 于 1 L 烧杯中; 加入约 800 mL 去离子水, 搅拌均匀; 用 NaOH 调 pH 至 8.3, 加去离子水定容至 1 L, 室温保存。使用时稀释 10 倍即 $1 \times \text{TBE}$ 电泳缓冲液。

C.2 DNA 提取方法

采用 CTAB 法提取病菌 DNA, 或使用市售试剂盒提取 DNA。

CTAB 法具体步骤如下:

- 收集经干燥过的菌丝约 0.5 g 放入 1.5 mL 浸在液氮里的离心管中, 用塑料杵碾碎待用;
- 离心管中加入 1 mL TES 提取缓冲液, 另加入 100 mg~200 mg 蛋白酶 K, 55 °C 保温 30 min, 期间轻轻混匀;
- 加入 5 mol/L NaCl 28 μL 、CTAB/NaCl 溶液 138 μL , 65 °C 保温 10 min;
- 4 °C 13 000g 离心 10 min, 保留上清液;
- 加入等体积的三氯甲烷/异戊醇(体积比 24 : 1), 轻轻混匀, 冰浴 30 min; 4 °C 13 000g 离心 10 min, 保留上清液;
- 加入 450 μL 5 mol/L NH_4AC , 冰浴至少 30 min;
- 4 °C 16 000g 离心 10 min, 保留上清液;
- 加入约三分之二体积的异丙醇沉淀 DNA, 13 000g 离心 15 min;
- DNA 沉淀用 1 mL 70% 乙醇洗 2 次; 室温干燥, 用 100 μL TE 缓冲液(pH8.0)溶解 DNA 备用。

C.3 PCR 检测

PCR 反应体系(见表 C.1): 总体积 25 μL , $10 \times \text{PCR}$ 缓冲液 2.5 μL , 25 mmol/L MgCl_2 2.5 μL , 5 U/ μL *Taq* 聚合酶 0.2 μL , 10 mmol/L dNTP 2 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 引物各 0.5 μL , DNA 模板 5 μL , 加无菌双蒸水补至 25 μL 。同时要设置阳性对照, 阴性对照, 空白对照(以无菌水代替 DNA 样品)。

表 C.1 PCR 反应体系

试剂名称	储备液浓度	加样体积 μL
10×PCR 缓冲液	—	2.5
MgCl ₂	25 mmol/L	1.5
dNTP 混合物	2.5 mmol/L	2
Taq DNA 聚合酶	5 U/ μL	0.2
CPs-1	10 $\mu\text{mol/L}$	0.5
CPs-2	10 $\mu\text{mol/L}$	0.5
DNA 模板	50 ng/ μL ~100 ng/ μL	5
无菌双蒸水		补至 25

PCR 反应条件:94 ℃ 5 min;94 ℃ 1 min,67 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,38 个循环;72 ℃ 7 min。

C.4 产物检测

在 1×TBE 电泳缓冲液中,2%琼脂糖凝胶电泳,5 V/cm 恒压,电泳 20 min~30 min,0.5% EB 染色 20 min,凝胶成像系统下观察电泳结果,拍照并记录结果。

附 录 D
(规范性附录)
试剂和培养基配制

D.1 马铃薯葡萄糖琼脂培养基

马铃薯	200 g
蔗糖	20 g
琼脂	18 g

称取 200 g 马铃薯,洗净去皮切成小块,加水煮沸 30 min,用四层纱布过滤,滤液加入葡萄糖 20 g、琼脂 18 g,继续加热搅拌均匀,稍冷却后定容至 1 000 mL,分装三角瓶,加塞、包扎,121 ℃ 高压灭菌 20 min。

D.2 PCNB 酸性马铃薯葡萄糖选择性培养基

马铃薯	200 g
蔗糖	20 g
琼脂	18 g
硫酸链霉素	0.3 g
五氯硝基苯	0.3 g
蒸馏水	1 000 mL

配制方法前面步骤同 D.1,待定容至 1 000 mL 后,用乳酸(20%)将 pH 值调至 4.0,分装于三角瓶中,121 ℃ 高压灭菌 20 min。培养基冷却至 47 ℃ 时无菌操作下添加硫酸链霉素和五氯硝基苯并混匀,将大约 15 mL 的培养基倒入无菌平板中,静置备用。

参 考 文 献

- [1] Cappelli C, Stravato, V. M., Carannante, G., Parisella, R. First Report of Cucumber Black Root Rot Caused by *Phomopsis sclerotioides* in Italy [J]. Plant Dis. 2004, 88(4):425.
- [2] Gindrat D, Moody A. Rapid induction of sporulation of *Phomopsis sclerotioides* Van Kesteren in pure culture [J]. Ann Phytopathol. 1973, 5(2):219~222.
- [3] Leski B. Black root rot caused by *Phomopsis sclerotioides* Van Kest-The most destructive disease of glasshouse cucumbers new to Poland [J]. International Society for Horticultural Science. 1985, 156:209~214.
- [4] Masahiro Shishido, Nanako Yoshida, Toshiyuki Usami, Tetsuo Shinozaki, Masanobu Kobayashi, Taeko Takeuchi. Black root rot of cucurbits caused by *Phomopsis sclerotioides* in Japan and phylogenetic grouping of the pathogen [J]. J Gen Plant Pathol. 2006, 72:220~227.
- [5] Masahiro Shishido, Kyoko Sato, Nanako Yoshida, Rie Tsukui, Toshiyuki Usami. PCR-based assays to detect and quantify *Phomopsis sclerotioides* in plants and soil [J]. J Gen Plant Pathol. 2010, 76:21~30.
- [6] Mckeen C. D. *Phomopsis* black rot of cucurbits. Canadian Journal of Botany [J]. 1957, 35, 43~50.
- [7] OEPP/EPPO. Good plant protection practice Cucurbits under protected cultivation. OEPP/EPPO Bulletin. 2004, 34:91~100.
- [8] Van Kesteren. "Black root rot" in cucurbitaceae caused by *Phomopsis sclerotioides* nov. spec [J]. Neth J Plant Pathol 1966, 73:112~116.
- [9] 門田育生主編. キュウリホモ フシス根腐病防除 マニュアル[EB/OL]. [2011-7-30]. http://tohoku.naro.affrc.go.jp/periodical/pamphlet/file/hom_full.pdf.
-