

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4074—2014

### 燕麦全蚀病菌检疫鉴定方法

Detection and indentification of *Gaeumannomyces graminis* var. *avenae*

2014-11-19 发布

2015-05-01 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。本文件的发布机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。

本标准起草单位：中华人民共和国湖南出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国广东出入境检验检疫局、中华人民共和国黄埔出入境检验检疫局、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、中华人民共和国新疆出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：莫瑾、龚强、田茜、王昕、白雪、姜金林、周慧平、彭梓、谭建锡、钟国强、章桂明、张祥林、朱金国。

# 燕麦全蚀病菌检疫鉴定方法

## 1 范围

本标准规定了燕麦全蚀病菌(*Gaeumannomyces graminis* var. *avenae*)的检疫鉴定方法。  
本标准适用于禾本科植物、草本植物的种苗、种子及混杂的植物残体中的燕麦全蚀病菌的检测。

## 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 1809 进出境植物种子检疫规程

SN/T 2122 进出境植物及植物产品检疫抽样

SN/T 2589 植物病原真菌检测规范

## 3 燕麦全蚀病菌基本信息

学名:*Gaeumannomyces graminis* var. *avenae* (E.M. Turner) Dennis

分类地位:子囊菌亚门(Ascomycotina)、核菌纲(Pyrenomycetes)、球壳菌目(Sphaeriales)、间座壳科(Diaporthaceae)、顶囊壳属(*Gaeumannomyces*)、禾顶囊壳菌(*Gaeumannomyces graminis*)。

传播途径:病菌以菌丝体在病株组织或病残体在土壤中越冬(越夏)。禾草的整个生育期及其各个部位均可受到侵染。

燕麦全蚀病菌的其他信息见附录 A。

## 4 方法原理

根据植株的植株病状进行现场检验,并采用形态学特征、分子生物学和致病性测定对植物种苗、植物种子及混杂的植物残体中的燕麦全蚀病菌进行判定。

## 5 仪器和耗材

### 5.1 仪器设备

PCR 仪、超净工作台、体视显微镜、灭菌锅、制冰机、核酸蛋白分析仪、高速冷冻离心机,台式小型离心机、超低温冰箱、人工气候培养箱、常规冰箱、旋涡振荡器、微量进样器、电泳仪、凝胶成像系统、酶标仪。

### 5.2 主要试剂

除另有规定外,所有试剂均为分析纯。PCR 缓冲液、dNTPs(dATP、dTTP、dCTP、dGTP)、*Taq* DNA 聚合酶、PDA 培养基、PDB 培养基、0.001%吐温 20-磷酸盐缓冲液见附录 B。

## 6 抽样

按照 SN/T 1809 及 SN/T 2122 规定进行取样。

## 7 病菌的鉴定

### 7.1 种苗检验

#### 7.1.1 症状检查

观察植株是否带有典型或疑似全蚀病的症状,症状见第 A.2 章。

#### 7.1.2 形态学特征

切取生长有典型或疑似症状植株的染病部位,进行菌丝体和子囊壳的观察,对子囊壳进行徒手切片镜检。

菌丝体形态有两种,少数为纤细而灰色,大多数是厚壁、粗壮的黑褐色菌丝,菌丝体常形成黑色的菌丝束、菌丝团,多呈锐角分支、在主支和侧支交界处各产生一横隔形成“ $\Lambda$ ”形的菌丝体(见第 C.2 章)。瓶梗和瓶梗孢子:较多的是单个的瓶梗侧生在菌丝上,也有松散地集生在菌丝的分支处或菌丝末端呈穗状。瓶梗基部窄缩,中下部较宽、向上渐窄,端部为领带状。瓶梗孢子为  $(3\ \mu\text{m}\sim 7\ \mu\text{m})\times(1\ \mu\text{m}\sim 2\ \mu\text{m})$ , 弯曲呈新月形或半月形。

子囊壳埋生于叶鞘内,烧瓶状,有弯曲的柱状喙部伸出于寄主组织之外,子囊壳表面有栗褐色毛绒状物,子囊壳黑色,直径  $330\ \mu\text{m}\sim 550\ \mu\text{m}$ 。子囊 2~8 个,子囊平行排列于子囊腔内,棒状,无色,直形或弯曲,有多数线状侧丝,子囊大小为  $(110\ \mu\text{m}\sim 150\ \mu\text{m})\times(12\ \mu\text{m}\sim 16\ \mu\text{m})$ (见附录 C.3)。接触液态水时,子囊壁溶化,子囊孢子射出。子囊孢子成束或分散排列,丝状,无色,略弯,多胞有 3~7 个假隔膜,  $(110\ \mu\text{m}\sim 130\ \mu\text{m})\times(2.5\ \mu\text{m}\sim 3.5\ \mu\text{m})$ 。有时子囊孢子萌发时,产生小形单胞、镰形或新月形分生孢子。

#### 7.1.3 病原菌的分离培养

取待检样品的根、茎基部或叶鞘等部位(如有明显染病症状的部位应取染病部位)切成 1 cm 长的小段,用蒸馏水冲洗掉表面的泥土杂物后,用 0.1% 次氯酸钠或 70% 乙醇消毒 1 min~2 min,无菌水冲洗 3 次后,滤纸吸干水分,用灭菌解剖刀横切成 1 mm~5 mm 的小片,放置在 PDA 培养基上,每皿 5~10 片,  $25\ ^\circ\text{C}\pm 1\ ^\circ\text{C}$  培养 3 d~10 d,全蚀病菌在 PDA 培养基上生长菌落特征为:培养 3 d~5 d 菌落生长出白色絮状菌丝团,然后菌落逐渐产生暗黑色菌丝束,迎光观察菌丝束组成的菌落似绒毛毯状(见第 C.1 章)。将典型或疑似菌落纯化后进行进一步鉴定。

#### 7.1.4 分子生物学鉴定

直接取有明显症状的植物组织进行总 DNA 提取,也可取培养基上生长的菌丝体进行 DNA 提取。提取方法见附录 D。若使用提取试剂盒则按照试剂盒说明进行提取。

两种方法收集菌体:一种是当纯化后菌丝长满培养基表面时,直接从平板上刮取菌丝;另一种是从平板上挑菌饼到液体 PDB 培养基中,  $28\ ^\circ\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 5 d~7 d,过滤收集菌丝,经冷冻抽干收集干燥的菌丝,  $-20\ ^\circ\text{C}$  保存备用。

提取得到的 DNA 按照附录 D 进行分子生物学鉴定。



### 7.1.5 致病性测定

营养钵中装入灭菌沙土,并接入培养 7 d、直径 1 cm 的待测菌饼。将催芽 2 d,出芽一致的燕麦种子播于菌饼上,并覆盖 2 cm 的灭菌土。每天光照 18 h(18 h,18 ℃和 6 h,12 ℃)培养。

培育 4 周后,进行症状检查。观察根部或叶鞘部呈现第 A.2 章中描述的症状的,挑取典型部位进行菌丝和子囊壳的观察,符合燕麦全蚀病菌特征的判断为燕麦全蚀病菌。

## 7.2 种子检验

### 7.2.1 病残体

仔细观察所抽取样本中是否携带有带病残体,将病残体切成 1 cm 长的小段,按照 7.1.3 中方法进行病原菌的分离培养和菌体的观察,纯化后的菌株按 7.1.4 或 7.1.5 进行进一步鉴定。

### 7.2.2 种子

若未发现植物病、残体,可将种子样品充分混匀,制成平均样品,从每份平均样品中取 10 g 作为检验样品加入 90 mL 灭菌的 0.001 %吐温 20-磷酸盐缓冲液(pH 7.0)中,室温静置 10 min,充分振荡,悬液去渣后 8 000 r/min 离心 10 min,小心地弃去上清液,再加入 0.001 %吐温 20-磷酸盐缓冲液(pH 7.0)重悬沉淀,如此反复洗涤三次。加入 10 mL 0.85% 的生理盐水重悬沉淀,得到样本提取液。可取 1.0 mL 样本提取液,8 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液后取沉淀进行分子生物学鉴定,鉴定步骤见附录 D。鉴定结果为阳性的取样品提取液,按 10 倍稀释法进行稀释,取三个适当浓度的稀释液各 1.0 mL 涂布于 PDA 培养基上,25 ℃±1 ℃条件下培养 3 d~10 d 观察菌落生长情况,出现 7.1.3 中菌落形态的菌则进行进一步鉴定。

## 8 结果判定

若从燕麦植株上直接观察到典型的燕麦全蚀病特征,分离得到的菌株符合 7.1.3 燕麦全蚀病菌特征的,可判定为燕麦全蚀病菌。

若从其他样本上分离得到的菌株形态符合 7.1.3 燕麦全蚀病菌特征的,可初步判定为检出燕麦全蚀病菌,需利用 7.1 或 7.2 方法进一步检测。

若致病性测定或者分子生物学测定结果符合燕麦全蚀病菌特征的,可判定为燕麦全蚀病菌。

## 9 样品和菌种的保存

样品和菌种的保存按照 SN/T 2589 执行。

## 10 处理及生物安全措施

对检出燕麦全蚀病菌的样品及其分离菌株、检测过程中的废弃物,需经有效的除害处理方式处理,以防止对环境的扩散。

附 录 A  
(规范性附录)

燕麦全蚀病菌症状特征及相关信息

A.1 名称

中文名:禾顶囊壳燕麦变种、全蚀病菌燕麦变种  
英文名:Take-all patch

A.2 症状特征

染病植株根部、茎基部、地下茎等地下器官变为黑色,根系很短小,病株很易由土壤中拔出,后来茎基部和叶鞘内侧以及茎表面出现灰黑色菌丝体,后呈栗褐色,膏药状。土壤湿度较大时,病叶鞘内侧出现黑褐色小粒,即病菌的子囊壳。干旱时,子囊壳很少产生,病株地上部分发黄,矮小细弱,穗部白色,籽粒不实。草地发生此病后出现大小不一的枯草区,直径数厘米至1 m以上,呈浅黄色、红褐色或赤铜色,稍凹陷。病区初起近似圆形,不断向外扩伸,最终变为浅褐色、灰色。后来死草区内部因有抗病的禾草种类侵入,成为中央绿色、四周变色的“蛙眼”状。

A.3 寄主范围

冰草属(*Agropyron*)、剪股颖属(*Agrostis*)、燕麦草属(*Arrhenatherum*)、燕麦属(*Avena*)、雀麦属(*Bromus*)、发草属(*Deschampsia*)、披碱草属(*Elymus*)、羊茅属(*Festuca*)、大麦属(*Hordeum*)、黑麦草属(*Lolium*)、蒭草属(*Phalaris*)、梯牧草属(*Phleum*)、早熟禾属(*Poa*)、黑麦属(*Secale*)、小麦属(*Triticum*)、狗尾草属(*Setaria*)的多种作物和牧草。

A.4 分布

世界各国分布广泛,我国尚未有该病害发生的报道。

A.5 传播途径和发病条件

全蚀病侵染的最适土温为12℃~18℃,但6℃~8℃的低温也能侵染,土温5℃~15℃发病最重。一旦浸染成功,温度的影响就不明显了。而多雨、灌溉、积水等使土壤表层有充足水分的环境都有利于病菌的侵染发病。在凉爽而潮湿的天气,病菌侵入地下组织,并通过根部或匍匐茎生长及植物间的接触扩展蔓延。随着气温变暖,空气变得干燥,开始显症。子囊壳在秋季产生,暖和的冬季也可能产生。

附 录 B  
(规范性附录)  
培养基及试剂

B.1 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)

马铃薯	50 g
葡萄糖	5 g
琼脂粉	12 g
蒸馏水	1 000 mL

将上述成分煮沸充分溶解后,调节 pH 值至 6.8,121 ℃ 高压灭菌 20 min,使用前添加已过滤除菌的链霉素溶液和 L-半胱氨酸溶液,使其终浓度分别为 300 μg/mL 和 0.1%。

B.2 马铃薯葡萄糖培养基(PDB)

马铃薯	100 g
葡萄糖	10 g
酵母膏	2 g
蒸馏水	1 000 mL

将上述成分煮沸充分溶解后,121 ℃ 高压灭菌 20 min,4 ℃ 保存备用。

B.3 0.001%吐温 20-磷酸盐缓冲液

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	2.9 g
NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
吐温-20	0.01 mL
水	1 000.0 mL

将上述成分煮沸充分溶解后,调节 pH 值至 7.0,121 ℃ 高压灭菌 20 min。



附 录 C  
(规范性附录)  
燕麦全蚀病菌形态图

C.1 菌落形态图

见图 C.1。

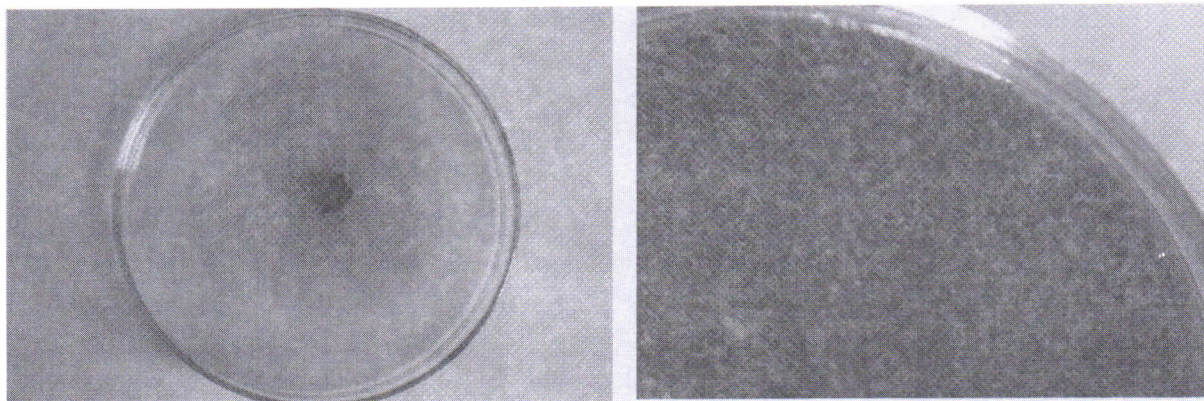


图 C.1 PDA 培养基上燕麦全蚀病菌生长情况

C.2 菌丝体形状图

见图 C.2。

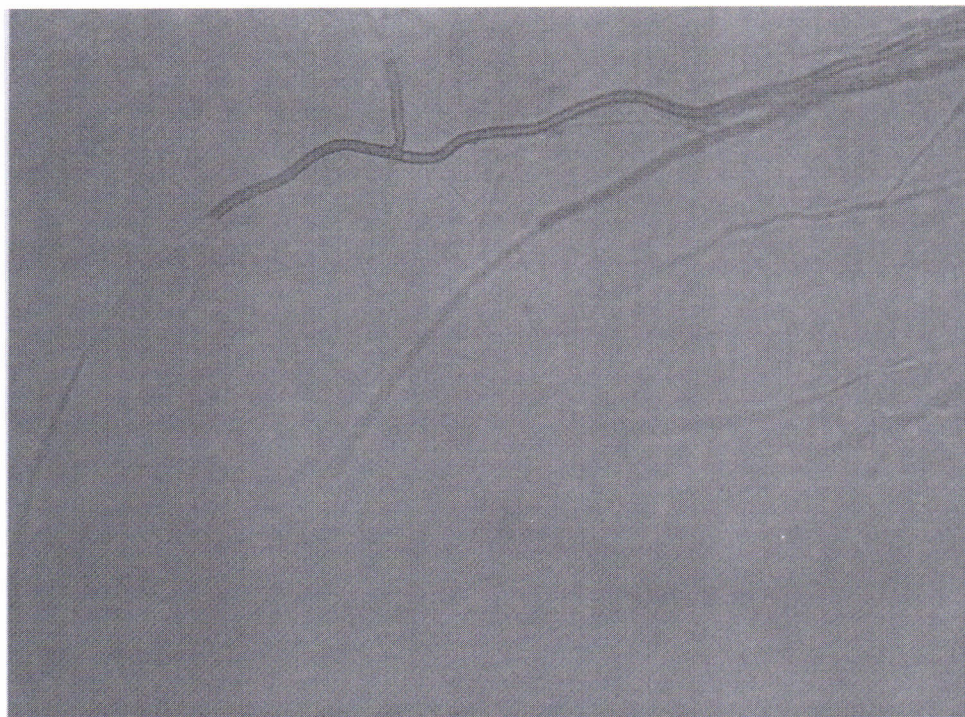
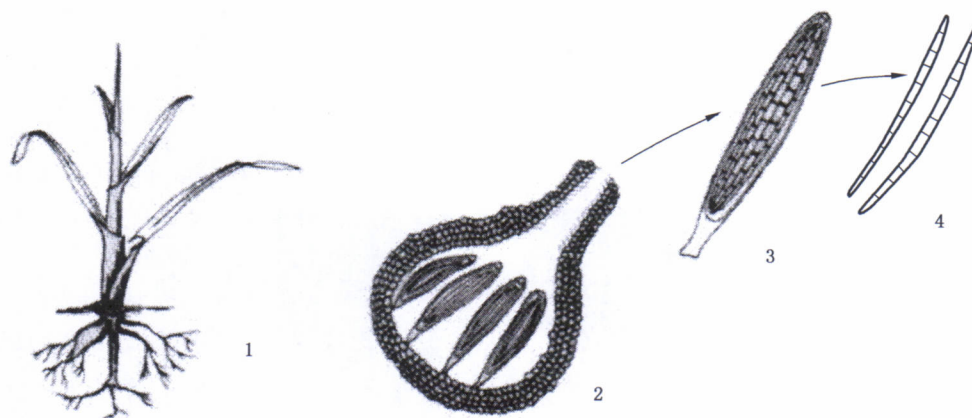


图 C.2 菌丝体形态



### C.3 成株症状及子囊

见图 C.3。



说明

1——成株症状；

2——子囊壳；

3——子囊；

4——子囊孢子。

注：此图引自 Samantha L.Thomas(2004)。

图 C.3 成株症状及子囊

附录 D  
(规范性附录)  
分子生物学检测方法

D.1 DNA 提取

取植物材料或菌丝 0.1 g 于液态氮中研磨至粉末状,置于 1.5 mL 离心管,离心得到的沉淀样品直接用于提取,加入 300  $\mu$ L~500  $\mu$ L CTAB 缓冲液(其中含 0.1 g 蛋白酶 K)混匀,65  $^{\circ}$ C 水浴 1 h;13 000 r/min 离心 5 min~10 min,保留上清液;加 500  $\mu$ L Tris 饱和酚:三氯甲烷:异戊醇(体积为 25:24:1)混匀,13 000 r/min 离心 5 min~10 min,保留上清液;再加 500  $\mu$ L 三氯甲烷:异戊醇(体积为 24:1)混匀,13 000 r/min 离心 5 min~10 min,保留上清液;加入 1 mL 异丙醇混匀,−70 $^{\circ}$ C 下放置 1 h,或−20 $^{\circ}$ C 过夜;13 000 r/min 离心 30 min,可见 DNA 沉淀;70%乙醇冲洗 DNA 沉淀,室温干燥;用 50  $\mu$ L~100  $\mu$ L TE 溶解 DNA,置于−20  $^{\circ}$ C 下保存备用。

使用 0.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性。利用紫外分光光度计检测 DNA 样品的纯度及浓度;根据  $OD_{260}/OD_{280}$  的值比较所提取的总 DNA 的纯度, $OD_{260}/OD_{280}$  的比值在 1.8~2.0 时表明具有较高纯度。DNA 浓度计算公式:DNA 浓度( $ng/\mu$ L)= $OD_{260} \times 50 \times$ 核酸稀释倍数。

D.2 引物信息

PCR 检测引物根据 *Gaeumannomyces graminis avenacinase* gene, complete cds. (GenBank: U35463.1) 进行设计,引物序列见表 D.1。

表 D.1 检测燕麦全蚀病菌的 PCR 引物

引物序列	PCR 产物大小
5'-ACGGCGGTGGATGGCAAGAC-3'	617 bp
5'-TGCTCATGGTGGTTCCTGCG-3'	

D.3 PCR 反应体系及参数

D.3.1 质控

PCR 扩增采用已知阳性 DNA 和阴性 DNA 作为阳性和阴性对照,以实验室 I 级水作为空白对照。

D.3.2 反应体系

检测燕麦全蚀病菌采用的 PCR 反应体系见表 D.2。

表 D.2 检测燕麦全蚀病菌的 PCR 反应体系

组成	加样体积 $\mu\text{L}$
10×PCR 缓冲液( $\text{Mg}^{2+}$ free)	2.0
氯化镁(25 mmol/ $\mu\text{L}$ )	1.0
dNTP(10 mmol/ $\mu\text{L}$ )	0.4
<i>Taq</i> DNA 聚合酶(1 U/ $\mu\text{L}$ )	0.7
正向引物(10 pmol/ $\mu\text{L}$ )	1.5
反向引物(10 pmol/ $\mu\text{L}$ )	1.5
模板 DNA(1 ng/ $\mu\text{L}$ ~10 ng/ $\mu\text{L}$ )	5.0
双蒸水	7.9
总体积	20.0

### D.3.3 反应参数

95 °C/5 min; 94 °C/30 s, 68 °C/30 s, 72 °C/40 s, 35 个循环; 72 °C/5 min; 4 °C 保存。

注：不同仪器可根据仪器要求将反应参数作适当调整。

### D.3.4 琼脂糖凝胶电泳

制备 2% 的琼脂糖凝胶, 按比例混匀电泳上样缓冲液和 PCR 扩增产物, 用 DNA Marker 作为分子量标记, 进行电泳分析, 电泳结束后在凝胶成像仪的紫外透射光下观察是否扩增出预期的特异性 DNA 条带, 并拍摄记录。

### D.3.5 结果观察

通过观察, 待测样品若有 617 bp 大小的与阳性对照一致产物带出现, 阴性对照和空白对照未出现条带, 则判定为阳性。