



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3675—2013

---

## 草莓花枯病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Rhizoctonia fragariae* Husain et W.E.McKeen

2013-08-30 发布

2014-03-01 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。

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：中华人民共和国湖北出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局、中华人民共和国厦门出入境检验检疫局、中华人民共和国山东出入境检验检疫局、中华人民共和国天津出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：王振华、冯汉利、张剑锋、李凤新、王宏毅、叶芸、吴品珊、吴翠萍、李彬、王英超、罗加凤。

# 草莓花枯病菌检疫鉴定方法

## 1 范围

本标准规定了草莓花枯病菌检疫鉴定方法。

本标准适用于草莓种子、种苗及果实上的草莓花枯病菌的检疫和鉴定。

## 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,凡是注明日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注明日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

## 3 病菌基本信息

中文名:草莓花枯病菌

学名:*Rhizoctonia fragariae* Husain et W.E.McKeen

分类地位:草莓花枯病菌无性态 *Rhizoctonia fragariae* 属于真菌界 Fungi,半知菌门 Basidiomycota,丝孢纲 Hyphomycetes,无孢目 Agonomycetales,无孢科 Agonomycetaceae,丝核菌属 *Rhizoctonia*。有性态 *Ceratobasidium cornigerum*,属于担子亚门 Basidiomycota,伞菌纲 Agaricomycetes,鸡油菌目 Cantharellales,角担子菌科 Ceratobasidiaceae,角担菌属 *Ceratobasidium*。

传播途径:带菌的草莓、根系、花蕾、土壤是远距离传播主要途径。

其他信息参见附录 A。

## 4 方法原理

根据草莓花枯病菌在寄主上的为害症状、形态特征、培养性状等特征进行结果判定。

## 5 仪器设备和主要试剂

### 5.1 仪器设备

PCR 仪、超净工作台、高压灭菌器、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、常规冰箱、旋涡振荡器、恒温水浴锅、微量进样器、电泳仪、凝胶电泳设备、凝胶成像系统、体视显微镜、生物显微镜(带显微照相装置)、天平(感量 0.1 g)、测微尺、光照培养箱等。

### 5.2 主要试剂和培养基

琼脂糖粉、次氯酸钠(NaClO)、氯霉素、引物、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、十六烷基三乙基溴化铵(CTAB)、乙二胺四乙酸(EDTA)、无水乙醇、蛋白酶 K、苯酚、三氯甲烷、异戊醇、乙酸铵(NH<sub>4</sub>Ac)、氯化镁(MgCl<sub>2</sub>)、PCR 缓冲液、dNTPs(dATP、dTTP、dCTP、dGTP)、TaqDNA 聚合酶、溴化乙锭(EB)、液氮、3.5%甲醛、二氨基-2-苯基吡啶(DAPI)、硝酸钾(KNO<sub>3</sub>)、水琼脂和马铃薯葡萄糖培养基(PDA)。实

验用水应符合 GB/T 6682 中的规定。

## 6 现场检疫

检查根是否根腐,颜色棕色或黑色,植株是否矮小、萎蔫,似冻害状。花开时,花粉囊是否黑色,花梗正常,花心黑色。果实的组织是否变褐,变硬,成熟果实是否变软,表面是否有白色稀疏菌丝体(参见附录 B)。

## 7 实验室检疫

### 7.1 直接镜检

将有明显病症的根系、花蕾或果实材料置于体视显微镜下检查,或直接挑取病部子实体制成玻片,置于生物显微镜下镜检,观察记录菌丝、担子果、担子的形态特征和着生方式,并测量其大小。

### 7.2 保湿培养

如根系、花蕾或病果上只有可疑病状而无明显病症,则将病根(截成 5 cm)或繁殖材料置于样品袋中,于 20℃~25℃下保湿培养,每天观察症状的变化,并进行显微镜检或分离培养。

### 7.3 病原菌的分离培养

取具有疑似发病症状的根或繁殖材料,用自来水冲洗并用吸水纸吸干表面水分。用 1% NaClO 表面消毒 1 min~2 min,用无菌水冲洗 3 次,用无菌吸水纸吸干表面水分后,放入水琼脂(含 250 μg/mL 氯霉素)表面,当组织表面长出菌丝后,将菌丝转移至 PDA 平板(含 250 μg/mL 氯霉素)上,继续培养 2 d~3 d。小心挑取新长出的菌丝,转接到新的 PDA 平板上进行真菌的纯化培养。连续转接 3 次,获得真菌的纯培养物。

### 7.4 菌丝和菌核的形态观察

将纯培养物接种在含有 1 mm 厚 PDA 的平板上,培养 3 d~5 d,在菌丝生长最旺盛的边缘取出带有菌丝的琼脂碟片,在 3.5% 的甲醛中固定,用无菌水冲洗,然后在二氨基-2-苯基吡啶(DAPI)染色 4 min,再用无菌水褪色 3 min。在生物显微镜的紫外光下观察菌丝的形态及菌核的数量。

### 7.5 分子生物学鉴定

DNA 提取方法、引物、PCR 扩增及产物测序分析等参见附录 C。

## 8 鉴定特征

在生物显微镜下观察,菌丝细胞有双核,菌丝初无色,宽 3 μm~9 μm,无锁状连接,老熟后呈褐色,在分枝处缢缩。在培养基上,很少产生菌核,菌核表面粗糙,褐色至黑色,表里颜色相同,菌核之间有丝状体相连,不产生无性孢子,可产生大量的念珠形孢子链。担子果(子实体)平展、薄、白色。担子为椭球状至近似棒状,(9 μm~14 μm)×(8 μm~12 μm),有 4 个孢子梗。担孢子为椭球状和近似纺锤状,(6 μm~11 μm)×(4 μm~6 μm)(参见附录 D)。

## 9 结果判定

根据草莓花枯病菌的鉴定特征对分离物进行综合判定,如病菌的形态学特征与第 8 章中描述的鉴



定指标相符,则可鉴定为草莓花枯病菌。7.5 中描述的分子生物学鉴定作为病菌形态学鉴定的辅助判定特征。

## 10 样品保存与处理

样品经登记和经手人签字后妥善保存。对检出草莓花枯病菌的样品保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中 6 个月,以备复核。该类样品保存期满后须经高压灭菌后方可处理。

## 11 菌株保存与处理

从检测样品中分离并鉴定为莓花枯病菌的菌株,纯分离物要标注菌株来源、寄主、分离时间、鉴定人;菌株在含 30%甘油的冻存管中于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存,并定期(180 d)转管。病菌基因组 DNA 样品于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存。对不需要长期保存的菌株应及时高压灭菌处理。

## 12 实验记录与保存

完整的实验记录包括:样品的来源、种类、时间,实验的时间、地点、方法和结果等,并要有实验人员和审核人员签字。PCR 凝胶电泳检测需有电泳结果照片。

SN/T 3675—2013

附 录 A  
(资料性附录)

草莓花枯病菌其他相关信息

A.1 症状特征

A.1.1 根系症状

感染病害的根系症状最为明显。整个根系比健康植株的明显小,侧根数量减少,白色肉质根上分布有不规则的黑色块状,根内为黄色到白色。严重感染时,这些黑色区域连成片,使整个白色肉质根变黑。感染的木质根初期外部变为黑色,后来根内也完全变黑,横切木质根时根内完全变黑,主根全部或部分(特别是根尖部分)死亡。

A.1.2 花症状

病菌主要侵染未开放的花蕾。花初开时,花药暗褐色,雌蕊区域光滑,雌蕊缺失。侵染发生在花冠出现之前,或者之后的短时间内,在花蕾开放后很快结束。被严重侵染的花,在开花前花药和雌蕊都被破坏,当花蕾隆起花瓣可见时,花瓣外可见褐色的损伤,花瓣区域呈粉红色。颜色逐渐变深为黑色,花心变黑,类似于冻害症状。果实表现不同程度的畸形。

A.1.3 果实症状

侵染初期发病果实病部变褐,变硬。成熟果实变软,表面有白色稀疏菌丝体。

A.1.4 植株症状

植株长势较差、矮化,产果小且少。叶片面积变小,单片或多片叶可能萎蔫、褪色甚至死亡。严重时,整个植株死亡。

A.2 寄主范围

在自然条件下,只侵染蔷薇科草莓属 *Fragaria* 植物。

A.3 分布

主要分布在美洲、欧洲、亚洲。

美洲:美国、加拿大、海地、牙买加、墨西哥、巴西。

欧洲:法国、意大利、波兰、西班牙、荷兰、比利时、俄罗斯、罗马尼亚、英国。

亚洲:日本。

附 录 B  
(资料性附录)

草莓花枯病菌病害症状特征图

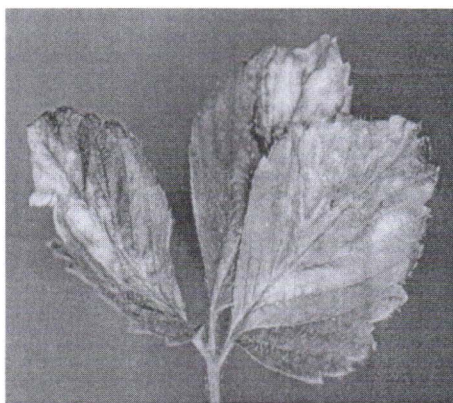


图 B.1 草莓叶片症状



图 B.2 草莓果实症状



图 B.3 侵染植株症状



图 B.4 侵染植株后期症状



SN/T 3675—2013



图 B.5 侵染根系症状

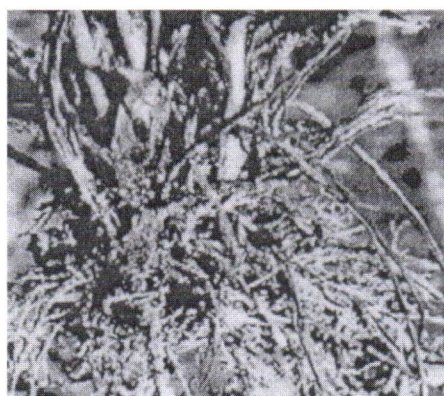


图 B.6 侵染根系后期症状

注：图片来自 <http://www.omafra.gov.on.ca/>



## 附录 C

(资料性附录)

## 草莓花枯病菌分子生物学鉴定

## C.1 DNA 提取——CTAB 提取法

在 PDA 培养基中接种活化的供试分离物,在 25 ℃ 条件下培养 3 d~5 d,应用滤纸过滤收集菌丝,于 -20 ℃ 下储存备用。菌丝采取 CTAB 法,具体操作如下:收集培养的菌丝于研钵中,加入液氮和少许石英砂研磨成菌丝粉,取 0.2 g 菌丝粉于 2 mL 离心管内,加入细胞裂解缓冲液(1%CTAB;50 mmol/L Tris-CL,pH 8.0;10 mmol/L EDTA,pH 8.0)1 mL,20 mg/mL 蛋白酶 K 5  $\mu$ L,于涡旋器上充分混合后,55 ℃ 水浴 1 h~3 h;将离心管于 12 000 r/min,离心 10 min;取上清液 800  $\mu$ L,加入等体积的苯酚:三氯甲烷:异戊醇(25:24:1),轻轻颠倒混匀,12 000 r/min,离心 10 min;取上层水相 600  $\mu$ L,加入等体积的三氯甲烷:异戊醇(24:1),轻轻颠倒混匀,12 000 r/min,离心 10 min;取上层水相 400  $\mu$ L,加入 2 倍体积的冰无水乙醇和 1/10 体积的 3 mol/L 乙酸钠,置于 -20 ℃ 沉淀 1 h~3 h;将离心管于 12 000 r/min,离心 10 min;弃上清液,沉淀用 70%乙醇洗涤一次;干燥后,用 100  $\mu$ L 双蒸水溶解,加入 RNase 于 37 ℃ 消解 1 h 后,-20 ℃ 下保存备用。

## C.2 PCR 扩增及 PCR 产物检测分析

应用通用引物对 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 和 ITS5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3') 对 rDNA-ITS 片段(核糖体 ITS1、ITS2 和 5.8S 基因)进行 PCR 扩增。

PCR 反应总体积为 25  $\mu$ L,含有 50 mmol/L KCl、20 mmol/L Tris-HCl(pH 8.4)、2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、200  $\mu$ mol/L dNTPs、0.2  $\mu$ mol/L 同源引物和互补引物、2 U Taq 酶和 1  $\mu$ L DNA 模板。

PCR 反应程序:95 ℃ 预变性 5 min,95 ℃ 变性 30 s,50 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 45 s,共 40 循环,最后补时延伸 10 min。

扩增产物在 1.2%的琼脂糖凝胶上电泳,经溴化乙锭染色后,在紫外灯下观察扩增结果。670 bp DNA 片段经纯化后测序,应用 BLAST 与 GenBank 内同源序列进行比对分析。

附 录 D  
(资料性附录)

草莓花枯病菌菌落和菌丝形态特征图

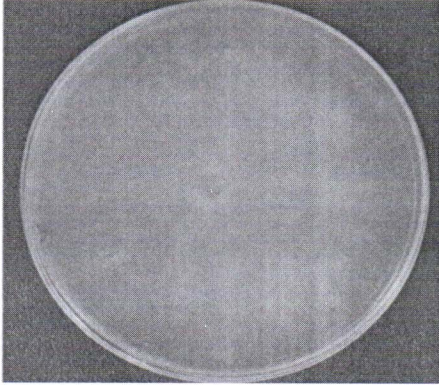


图 D.1 菌落生长初期形态特征

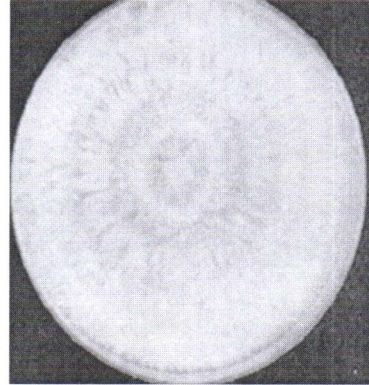


图 D.2 菌落生长后期形态特征

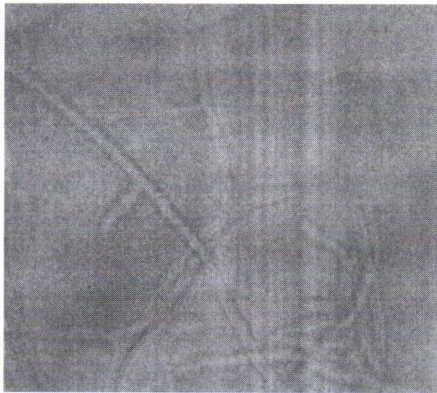


图 D.3 菌丝在分枝处缢缩

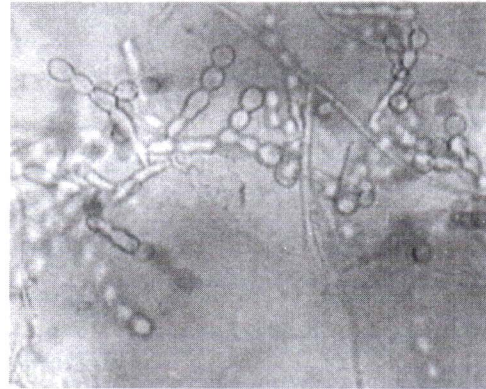


图 D.4 念珠形孢子链



## 参 考 文 献

- [1] Grönberg H, Paulin L and Sen R. ITS probe development for specific detection of *Rhizoctonia* spp. and *Suillus bovinus* based on Southern blot and liquid hybridization—fragment length polymorphism. *Mycology Research*, 2003, 107(Pt 4): 428-38.
- [2] Howard CM and Albregts EE. Anther and pistil blight of strawberry blossoms caused by *Rhizoctonia* species. *Phytopathology*, 1981, 71: 882.
- [3] Kasiamdari RS, Smith SE, Scott ES and Smith FA. Identification of binucleate *Rhizoctonia* as a contaminant in pot cultures of arbuscular mycorrhizal fungi and development of a PCR-based method of detection. *Mycological Research*, 2002, 106: 1417-1426. doi:10.1017/S0953756202006834.
- [4] LaMondia JA. Influence of rotation crops on the strawberry pathogens *Pratylenchus penetrans*, *Meloidogyne hapla*, and *Rhizoctonia fragariae*. *Journal of Nematology*, 1999, 31 (4S): 650-655.
- [5] LaMondia JA. Interaction of *Pratylenchus penetrans* and *Rhizoctonia fragariae* in strawberry black root rot. *Journal of Nematology*, 2003, 35 (1): 17-22.
- [6] Martin FN. *Rhizoctonia* spp. Recovered from strawberry roots in central coastal California. *Phytopathology*, 2000, 90 (4): 345-353.
- [7] Martin SB. Anastomosis groups among binucleate *Rhizoctonia* associated with strawberry root-rot in Connecticut. *Phytopathology*, 1987, 76(10): 1141.
- [8] Martin SB. Identification, isolation frequency, and pathogenicity of anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* spp. from strawberry roots. *Phytopathology*, 1988, 78 (4): 379-384.
- [9] Miller P.W. Studies on the cause of strawberry root rot in Oregon; second report of progress. *Plant Disease Reporter*, 1948, 32: 309-316.
- [10] Perez L, Martinez E and Gonzalez M. First disease report on root and rhizome rot of banana by *ceratobasidium* sp. AG-G (*Rhizoctonia fragariae*). *Fitosanidad*, 2009, 13 (1): 56.
- [11] Santos B, Barrau C and Romero F. Strawberry fungal diseases. *Food, Agriculture & Environment*, 2003, 1 (3&4): 129-132.
- [12] Scott R, Pritts M. and Kelly M J. Effects of *Rhizoctonia fragariae* infection on growth and productivity of strawberry plants grown under different temperature regimes. *Advances in Strawberry Research*, 2004, 22: 26-33.
- [13] Sharon M, Freeman S, Kuninaga S and Sneh B. Genetic diversity, anastomosis groups and virulence of *Rhizoctonia* spp. from strawberry. *European Journal of Plant Pathology*, 2007, 117 (3): 247-265.
- [14] Sharon M, Kuninaga S, Hyakumachi M and Sneh M. The advancing identification and classification of *Rhizoctonia* spp. using molecular and biotechnological methods compared with the classical anastomosis grouping. *Mycoscience*, 2006, 47 (6): 299-316. DOI:10.1007/s 10267-006-0320-x.
- [15] Sharon M, Sneh B and Freeman S. Pathogenicity, morphological and molecular characterization of *rhizoctonia* spp. isolates from strawberry plants in Israel. *Acta Horticulture (ISHS)* 2006, 708: 155-160.
- [16] Sneh B, Jabaji—Hare S, Neate S and Dijst G. *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 1996.
- [17] Sutton JC. Botrytis fruit rot (gray mold) and blossom blight. In: Maas JL (ed.). *Compendi-*

um of strawberry diseases 2nd Edition. APS Press. 1998,28-31.

[18] Thornton CR, Groenhof AC, Forrest R, and Lamotte R. A one-step, immunochromatographic lateral flow device specific to *Rhizoctonia solani* and certain related species, and its use to detect and quantify *R. solani* in soil. *Phytopathology* 2004,94:280-288.

[19] Vico I Investigation of anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* spp. isolated from strawberries. *Phytopathologia Mediterranea*,1994,33 (2):165-167.

[20] White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In innis DGM, Sninsky J, and White T. [eds.], *PCR protocols: a guide to methods and applications*,1990,315-322. Academic Press, San Diego, CA.

[21] Wing KB, Pritts MP, and Wilcox WF. Strawberry black root rot; a review. *Advances in Strawberry Research*.1994,13:13-19.

