



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3746—2013

百合枯萎病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Fusarium oxysporum* f.sp.*lilii*

2013-11-06 发布

2014-06-01 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：中华人民共和国上海出入境检验检疫局、上海市农业科学院、中华人民共和国厦门出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：戚龙君、宋绍祎、戴富明、曾蓉、杨翠云、王宏毅。

百合枯萎病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了百合枯萎病菌的检疫鉴定方法。

本标准适用于百合鳞茎中携带的百合枯萎病菌的检疫鉴定。

2 病菌基本信息

中文名:百合枯萎病菌

英文名:lily fusarium wilt

学名:*Fusarium oxysporum* f.sp.*lilii* Snyd. & Hans.

分类地位:无性阶段属于:真菌界(Kingdom Fungi),半知菌亚门(Deuteromycotina),丝孢纲(Hyphomycetes),瘤座孢目(Tuberculariales),瘤座孢科(Tuberculariaceae),镰刀菌属(*Fusarium*)。未见有性阶段。

传播途径:主要有:a) 土壤传播,土壤带菌传播是该病原菌传播的主要途径之一;b) 种球传病,带病的种球通过买卖、运输等途径传播病害;c) 残体带菌,病球的残体存在大量病原菌,在土壤中能长期存活,在再次种植过程中,能传播病菌。

百合枯萎病菌的其他信息参见附录 A。

3 方法原理

本标准根据该病菌在百合鳞茎球上的主要危害症状特征、形态学特征以及 PCR 反应特性为鉴定百合枯萎病菌的依据。

4 仪器和用具

4.1 主要仪器与用具

超净工作台、生化培养箱、生物显微镜、生物体视显微镜、PCR 仪、凝胶电泳仪、台式冷冻离心机、水浴培养箱、制冰机、旋涡振荡器、电泳仪、恒温水浴锅、紫外透射仪、凝胶成像系统、研钵和研棒、天平(感量 0.000 1 g)、白磁盘和尖头镊子、pH 计、塑料袋、离心管等。

4.2 主要试剂和培养基

次氯酸钠、Tris-HCl、氯化钠、EDTA、三氯甲烷、异戊醇、4 种脱氧核苷三磷酸(dNTPs)、溴化乙锭(EB)、RNase 酶、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、异丙醇、巯基乙醇、溴酚蓝、CTAB、Taq 酶等。PSA 培养基(马铃薯 200 g,蔗糖 20 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL)。

5 病原菌鉴定

5.1 症状检查

根据百合枯萎病在百合鳞茎上的特有症状特点,在光线充足处,对于抽取的样品逐个检查块茎表

面是否有典型的病斑,将有典型病症以及有怀疑症状的鳞球茎做进一步的分离和病原菌检疫鉴定。

5.2 病菌分离、纯化及形态观察

鳞球茎表面具有典型病斑的:可将块茎在流水下冲洗去除表面的杂物后,表面用1%的次氯酸钠消毒3 min~5 min,无菌水冲洗2~3次,切下病健交界处的小块组织(3 mm厚直径1 cm),置于PSA上,24℃~26℃下分离培养,3 d~7 d后在体视显微镜下观察。出现菌落后,将菌落的边缘或分生孢子转移到PSA上继续纯化培养,产孢后进行形态鉴定(病原菌图片参见附录B)。

5.3 菌丝的PCR检测

在PSA培养基上25℃培养获得的菌丝可直接进行PCR检测,检测方法见附录C。

5.4 鳞球茎上病原菌的PCR和巢式PCR检测

对于没有典型病斑的鳞球茎,可直接进行PCR和巢式PCR检测,检测方法见附录D。

6 鉴定特征

6.1 菌落特征和病菌形态

病菌在PSA上气生菌丝绒状,洁白丰厚,培养中后期培养物正面或者背面可见牵牛紫色。产孢细胞短,简单瓶梗。小型分生孢子数量多,卵圆形或者椭圆型,0隔~1隔,但多数无分隔,大小在(4.2 μm~11.1 μm)×(1.5 μm~3.6 μm)之间。大型分生孢子组型美丽,月芽形,稍弯,向两端比较均匀变尖,一般3隔~5隔,多数3隔,大小为(12.3 μm~48.3 μm)×(2.0 μm~6.0 μm)。厚垣孢子多为球形,直径为8.0 μm~15.0 μm,间生或顶生。未见有性阶段。

6.2 PCR和巢式PCR检测

百合枯萎病菌培养菌丝的PCR检测:PCR产物在343 bp处有特异性条带;鳞球茎中病菌的巢式PCR检测:在343 bp和326 bp处有特异性条带。

7 结果判定

如症状检查、分离物培养性状与6.1相符合,且其菌丝基因组DNA经6.2的PCR检测在343 bp有特异性条带,而阳性对照也在343 bp有特异性条带、阴性对照在343 bp无特异性条带,可判定该菌株为百合枯萎病菌;如阳性对照在343 bp处有特异性条带,而待测样本和阴性对照在343 bp处无特异性条带,则为非百合枯萎病菌。

对鳞茎球的巢式PCR检测,在343 bp和326 bp处有特异性条带,而阳性对照也在343 bp和326 bp有特异性条带、阴性对照在343 bp和326 bp无特异性条带,可判定样本带有百合枯萎病菌;如阳性对照在343 bp和326 bp处有特异性条带,而待测样本和阴性对照在343 bp和326 bp处无特异性条带,则判定样本无百合枯萎病菌。

8 样品保存与处理

发现带有百合枯萎病菌的样品至少保存6个月,以备复检、谈判和仲裁。保存期满后进行了灭活处理。

9 菌种保存与处理

分离获得的百合枯萎病菌单孢分离培养物,保存在 PSA 斜面培养基上,4℃冰箱中保存至少 6 个月,以备复检、谈判和仲裁。保存期满后,进行灭活处理。

10 实验室记录与保存

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的签字。

SN/T 3746—2013

附 录 A
(资料性附录)
百合枯萎病菌的其他信息

A.1 寄主范围

目前已经报道的寄主有:百合、洋葱。

A.2 地理分布

亚洲:韩国、日本、中国台湾。

欧洲:西班牙、荷兰、意大利、波兰。

美洲:美国。

A.3 病害症状

百合枯萎病菌在百合鳞茎球上的主要为害症状特征:病菌从肉质根或鳞茎盘基部伤口侵入,造成肉质根和盘基变褐腐烂,并逐渐向上发展,鳞片出现褐色凹陷病斑,后期鳞片从盘基散开而剥落。

附录 B

(资料性附录)

百合枯萎病菌的培养特征和形态特征

B.1 百合枯萎病菌在 PSA 上菌落形态见图 B.1。

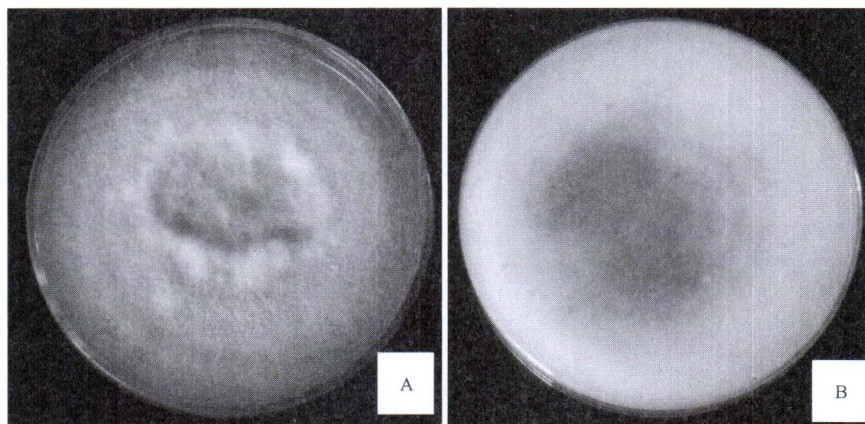


图 B.1 百合枯萎病菌在 PSA 上菌落形态(A:正面;B:反面)

B.2 百合枯萎病菌孢子形态见图 B.2~图 B.4。



图 B.2 百合枯萎病菌两种不同类型的分生孢子

SN/T 3746—2013

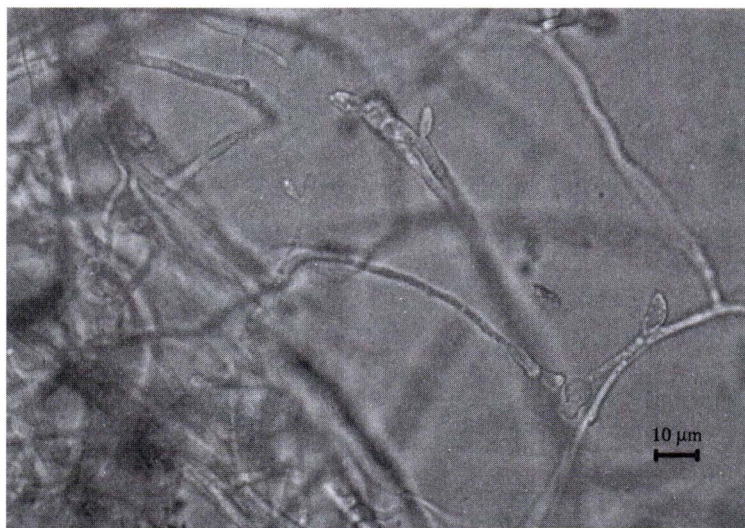


图 B.3 百合枯萎病菌小型分生孢子着生方式

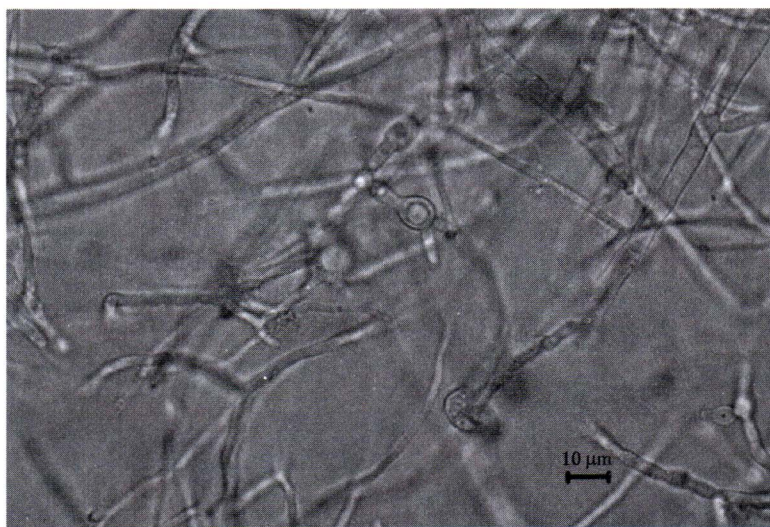


图 B.4 百合枯萎病菌的厚垣孢子

附 录 C
(规范性附录)
百合枯萎病菌丝的 PCR 检测

C.1 试剂

C.1.1 提取缓冲液

2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 1 mmol/L EDTA (pH 8.0)。

C.1.2 电泳缓冲液: TAE 缓冲液(50×)

Tris	242 g
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	37.2 g

然后加入 800 mL 的去离子水,充分搅拌溶解。加入 57.1 mL 的冰醋酸,充分混匀。加去离子水定容至 1 L,室温保存。

C.1.3 上样缓冲液

0.25%溴酚蓝,40%(质量分数)蔗糖。

C.2 菌丝体 DNA 的提取(改良的 Bustin'Grab 法)

菌落在 PSA 培养基上 25 °C 培养 5 d~7 d,刮取 10 mg~20 mg 的菌丝加入 200 μL 提取缓冲液中,剧烈混匀后置于 75 °C 下 30 min,旋涡振荡 30 s 后加入 500 μL 三氯甲烷,旋涡振荡 2 min,12 000 r/min 离心 3 min,上层水相转入另一 1.5 mL 的离心管中,加入 400 μL 的预冷的无水乙醇,上下颠倒轻柔混匀,-20 °C 放置 30 min。12 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加 0.5 mL 70%乙醇,12 000 r/min 离心 1 min 弃上清。室温条件下自然干燥后加入 20 μL~30 μL ddH₂O,加 1 μL RNaseA(10 μg/mL),37 °C 30 min。

C.3 PCR 扩增

C.3.1 百合枯萎病菌特异性引物

上游引物 BK-F60: 5' TGAACATACCACTTGTTGCCTC 3'

下游引物 BK-R402: 5' CGCCAATCAATTTGAGGAA 3'

C.3.2 PCR 反应

PCR 扩增的反应体系体积 20 μL,其中包括 1 μL 病样模板 DNA,2 μL 10×PCR 反应缓冲液,2 μL MgCl₂(25 mmol/L),2 μL dNTPs(每种 2.5 mmol/L),2 μL 正向引物(10 μmol/L),2 μL 反向引物(10 μmol/L),0.4 μL Taq 酶(1 U/μL)。

反应条件:95 °C 变性 3 min,然后在 95 °C 变性 45 s,57 °C 退火 30 s,53 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 45 s 条件下循环重复 35 次,最后 72 °C 延伸 10 min。

C.3.3 对照

阳性对照:以百合枯萎病菌的基因组 DNA(10 ng)代替待鉴定菌株的基因组 DNA,其他条件相同。

阴性对照:为 1 μ Ldd H₂O 代替鉴定病原菌的基因组 DNA,其他条件相同。

C.3.4 产物分析

制备 1.0%琼脂糖凝胶,移液器取 10 μ L 扩增产物和 2 μ L 上样缓冲液混合,点样到凝胶上的样品孔中,用 DNA Marker 作为分子量标记,1 V/cm~5 V/cm 电压下电泳。电泳结束经 EB 染色后在凝胶成像系统观察、照相并记录。

C.4 结果判断

PCR 扩增结果为待测样本和阳性对照在 343 bp 处有特异性条带,而阴性对照在 343 bp 处无特异性条带,则菌株为百合枯萎病菌。PCR 扩增结果为阳性对照在 343 bp 处有特异性条带,而待测样本和阴性对照在 343 bp 处无特异性条带,则为非百合枯萎病菌。



附录 D

(规范性附录)

鳞球茎中病原菌巢式 PCR 检测

D.1 试剂

D.1.1 提取缓冲液

STE 缓冲液: 0.1 mol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-Cl (pH 8.0), 1 mmol/L EDTA (pH 8.0)。

CTAB 缓冲液 (2×): 20 g/L CTAB, 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA (pH 8.0), 2% 巯基乙醇 (体积分数)。

D.1.2 电泳缓冲液: TAE 缓冲液 (50×)

Tris 242 g

Na₂EDTA · 2H₂O 37.2 g

然后加入 800 mL 的去离子水, 充分搅拌溶解。加入 57.1 mL 的醋酸, 充分混匀。加去离子水定容至 1 L, 室温保存。

D.1.3 上样缓冲液

0.25% 溴酚蓝, 40% (质量分数) 蔗糖。

D.2 鳞球茎 DNA 的提取

取百合鳞叶, 剪成小碎片, 置冷冻的研钵中加 10% PVP 粉末后速加液氮研成粉末。

取 50 mg 粉末, 迅速转入至预冷的离心管中, 即加 0.5 mL 预冷的 STE 缓冲液迅速混匀, 放置 2 min 后置冷冻离心机中 (4 °C) 3 000 r/min 离心 4 min, 弃上清液, 留沉淀。

重复操作 1 次, 沉淀, 备用。

往沉淀中加入 0.4 mL 65 °C 预热的 2×CTAB 提取缓冲液, 迅速混匀, 置 65 °C 中水浴 60 min, 其间不断振摇。

取出放置至冷, 吸取上清液至另一离心管中。加入等体积的三氯甲烷-异戊醇 (24 : 1) 轻柔倒转完全混匀, 静置至分层。于室温, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。重复以上步骤 1 次, 留上清液。

往上清液中加入 1/2 倍体积 5 mol/L NaCl 后混匀, 再往其中加入等体积倍异丙醇颠倒混匀, 置 -20 °C 冰箱中放置 20 min 使 DNA 沉淀。

用 70% 乙醇洗 2 次, 干燥。

往沉淀中加入 30 μL ~ 40 μL ddH₂O 溶解 DNA 沉淀, 再加入 2 μL RNase (10 μg/mL), 37 °C 水浴 30 min。

D.3 PCR 扩增

D.3.1 引物

第一轮引物 BK-F60/BK-R402

BK-F60: 5' TGAACATACCACTTGTTGCCTC 3'

BK-R402: 5' CGCCAATCAATTTGAGGAA 3'

第二轮引物 BK-F60/BK-R385

BK-F60: 5' TGAACATACCACTTGTTGCCTC 3'

BK-R385: 5' AACGCGAATTAACGCGAGT 3'

D.3.2 反应体系

PCR 扩增的反应体系体积 20 μL , 其中包括 1 μL 病样模板 DNA, 2 μL 10 \times PCR 反应缓冲液, 2 μL MgCl_2 (25 mmol/L), 2 μL dNTPs (每种 2.5 mmol/L), 2 μL 正向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$), 2 μL 反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$), 0.4 μL *Taq* 酶 (1 U/ μL)。

第一轮引物 PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 min, 然后在 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s、57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s、53 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s 条件下循环重复 35 次, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

取 1 μL 第一轮 PCR 反应产物, 用作第二对引物 PCR 反应的模板, 进行第二轮 PCR 反应。第二轮引物 PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 min, 然后在 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s、55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s 条件下循环重复 35 次, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

D.3.3 对照

阳性对照: 以百合枯萎病菌的基因组 DNA (10 ng) 代替待鉴定菌株的基因组 DNA, 其他条件相同。

阴性对照: 为 1 μL dd H_2O 代替鉴定病原菌的基因组 DNA, 其他条件相同。

D.3.4 产物分析

制备 1.0% 琼脂糖凝胶, 移液器取 10 μL 扩增产物和 2 μL 上样缓冲液混合, 点样到凝胶上的样品孔中, 用 DNA Marker 作为分子量标记, 1 V/cm \sim 5 V/cm 电压下电泳。电泳结束经 EB 染色后在凝胶成像系统观察、照相并记录。

D.4 结果判断

PCR 扩增结果为待测样本和阳性对照在 343 bp 和 326 bp 处有特异性条带, 而阴性对照在 343 bp 和 326 bp 处无特异性条带, 则判定样本带有百合枯萎病菌。PCR 扩增结果为阳性对照在 343 bp 和 326 bp 处有特异性条带, 而待测样本和阴性对照在 343 bp 和 326 bp 处无特异性条带, 则判定样本无百合枯萎病菌。