



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3432—2012

向日葵茎溃疡病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Diaporthe helianthi* Muntanola-Cvetkovic

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：中华人民共和国新疆出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人：王文正、张祥林、杜洪忠、李焱、张江国。

向日葵茎溃疡病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了向日葵茎溃疡病菌的分离培养及分子生物学鉴定方法。

本标准适用于进出境向日葵种子和田间向日葵植株中向日葵茎溃疡病菌的检疫和鉴定。

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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

SN/T 1538.1 培养基制备指南 第1部分:实验室培养基制备质量保证通则

SN/T 1809 进出境植物种子检疫规程

3 向日葵茎溃疡病菌基本信息

学名:有性态:*Diaporthe helianthi* Muntanola-Cvetkovic Mihaljcevic et Petrov;

无性态:*Phomopsis helianthi* Munt. -Cvetk. , Mihaljc. & M. Petrov.

分类地位:有性态为子囊菌亚门(Ascomycotina)、核菌纲(Pyrenomycetes)、球壳目(Sphaeriales)、间座壳科(Diaporthaceae)、间座壳属(*Diaporthe*);无性态为半知菌亚门(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:该病菌近距离传播主要靠分生孢子借助雨水飞溅、病残体以及农事操作工具传播,远距离传播主要通过带菌向日葵种子调运和种子中夹带的病残体传播。

向日葵茎溃疡病菌的其他相关信息参见附录A。

4 鉴定原理

根据向日葵茎溃疡病菌在寄主上的为害症状、形态学特征、培养性状和PCR特异性扩增片段作为鉴定依据。

5 仪器和用具

5.1 仪器

体视显微镜、生物显微镜、超净工作台、PCR扩增仪、电泳仪、凝胶成像仪、光照培养箱、电子天平(1/1 000 g)、高压灭菌器、冰箱。

5.2 用具

手持放大镜、培养皿、酒精灯、镊子、剪刀、解剖刀、样品筛(10目, $\phi 1.7$ mm)、修枝剪、接种针、载玻片、盖玻片、封口膜、菌种保藏管、离心管(1.5 mL)、可调微量加样器及其配套枪头(10 μ L~1 000 μ L)。

6 试剂和培养基

6.1 试剂

葡萄糖、琼脂粉、乳酸、链霉素、次氯酸钠、盐酸、氯化镁、SDS、EDTA、Tris、CTAB、无水乙醇、三氯甲烷、异丙醇、异戊醇、苯酚、溴化乙锭、蛋白酶 K、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP、DNA 相对分子质量 Marker (100 bp)。

6.2 培养基

按照 SN/T 1538.1 制备以下培养基。

马铃薯葡萄糖培养基(PDA):去皮马铃薯 200 g,切碎,加适量蒸馏水煮沸 20 min 左右,双层纱布过滤,滤液中加入葡萄糖 20 g、精琼脂 17 g,继续煮至琼脂完全融化后,调节 pH 至 6.8,加蒸馏水补足 1 000 mL,121 ℃ 高压灭菌 20 min。

酸性马铃薯葡萄糖培养基(APDA):去皮马铃薯 200 g,切碎,加适量蒸馏水煮沸 20 min 左右,双层纱布过滤,在滤汁中加入葡萄糖 20 g、琼脂 18 g,继续煮至琼脂完全融化后,加蒸馏水补足 1 000 mL,121 ℃ 高压灭菌 20 min。当培养基冷却至 55 ℃ 左右时,无菌操作下加入 100 mg 链霉素,并用乳酸调节 pH 至 6.0,摇匀,倒皿后备用。

7 鉴定方法

7.1 取样和制样

按照 SN/T 1806 抽取向日葵种子样品。

选取向日葵种子中具有干瘪、皱缩、霉变或变色等非正常的种子,同时挑选出向日葵种子中夹带的向日葵植株残体,如叶柄、茎秆、花盘碎片等。

有种衣剂包被向日葵种子,需将种衣剂洗掉,晾干后再挑选种子和植株残体进行检测。向日葵种子包衣的洗涤方法参见附录 A。

取田间具有疑似症状的茎秆、病叶或葵盘,在病健交界处剪取组织材料,剪成长 5 mm~10 mm 的小块备用。

7.2 分离培养

无菌操作下将供试样品分别用 3% 次氯酸钠表面消毒 5 min~10 min,灭菌水冲洗 3 次,移至含链霉素的 APDA 培养基平皿中,26 ℃、8 h 光照/16 h 黑暗条件下培养,5 d 后观察。将生长出的可疑菌落分别转到 PDA 平皿上,26 ℃ 纯化培养 5 d 后,观察菌落的特征,制片镜检观察记录分生孢子器和分生孢子的形状、大小等。

7.3 菌种保藏

将所分离的菌种纯化后转接在 PDA 平皿培养基上,待菌落长满后,无菌操作下,用解剖刀将菌落切成若干个边长约 1 cm 左右的小方块,分别放在盛有无菌水的菌种保藏管中,用封口膜封好,室温保存。

7.4 分子生物学鉴定

7.4.1 DNA 提取

将分离出的可疑菌落,接种到液体 PDA 培养基上,28 ℃ 培养 3 d。挑取生长的菌丝,用市售的通用

DNA 提取试剂盒,提取病原菌基因组 DNA。

7.4.2 PCR 检测

向日葵茎溃疡病菌的 PCR 扩增的特异性引物序列为:PHDF1:5'-TCGCCGCTGGATTTC-3'; PHDF2:5'-CCTGGGAACAGGGAGCAGC-3'。

PCR 反应体系:10×缓冲液 2.5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 2.4 μL,10 mmol/L dNTP 0.3 μL,5 U/μL TaqDNA 聚合酶 0.2 μL,10 μmol/L 上、下游引物各 1.5 μL,DNA 模板 1 μL;总体积 25 μL。

PCR 反应条件:预变性 95 ℃ 3 min 95 ℃ 1 min,62 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,共 35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。

将 PCR 扩增产物进行电泳分析。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 作为相对分子质量标记,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。

PCR 检测实验中所用的水按照 GB/T 6682 执行。

8 鉴定标准

8.1 菌落特征和病菌形态

向日葵茎溃疡病菌在 PDA 培养基上生长的菌落初期为白色,菌丝体较密集,两周后菌落基质渐渐变为红褐色至深褐色,其间形成暗褐色分生孢子器。

向日葵茎溃疡病菌的形态特征参见附录 A。

8.2 PCR 扩增产物

经琼脂糖凝胶电泳分析,向日葵茎溃疡病菌的 PCR 特异性扩增产物大小为 326 bp。

9 结果判定

根据向日葵茎溃疡病菌的鉴定标准(见第 8 章),对分离菌和核酸提取物进行判定。如分离菌的形态特征或 PCR 产物与鉴定指标吻合,可判定为向日葵茎溃疡病菌,否则,不视为向日葵茎溃疡病菌。

SN/T 3432—2012

附 录 A
(资料性附录)
向日葵茎溃疡病菌其他相关信息

A.1 寄主范围

向日葵(*Helianthus annuus*)。

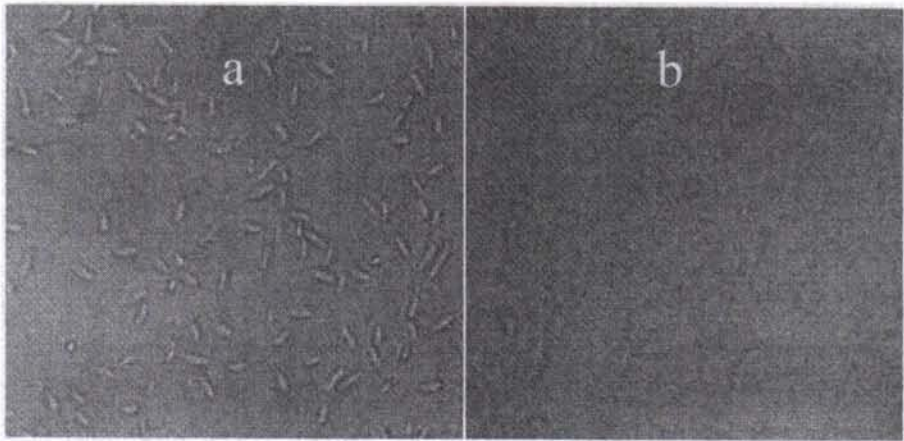
A.2 地理分布

波黑、克罗地亚、塞尔维亚、法国、匈牙利、意大利、摩尔多瓦、罗马尼亚、俄罗斯、斯洛伐克、西班牙、乌克兰、巴基斯坦、摩洛哥、美国(明尼苏达州、俄亥俄州、德克萨斯州)、墨西哥、阿根廷和委内瑞拉。

A.3 病原菌形态特征

向日葵茎溃疡病菌的菌丝体有分隔,分生孢子器聚生或散生,浅褐色、褐色至黑色,球形或扁球形,直径 $120\ \mu\text{m}\sim 450\ \mu\text{m}$,含有 α 和 β 两种类型的分生孢子。 α 型分生孢子无色、单胞,纺锤形或椭圆形,常有 2~4 个油滴,大小为 $(8\ \mu\text{m}\sim 21\ \mu\text{m})\times(1.7\ \mu\text{m}\sim 5.5\ \mu\text{m})$; β 型分生孢子无色、单胞,丝状线形,一端常为钩状,无油球,大小 $(16\ \mu\text{m}\sim 42\ \mu\text{m})\times(0.5\ \mu\text{m}\sim 0.9\ \mu\text{m})$ 。

该病菌在病残体上可形成有性器官。子囊壳直径 $350\ \mu\text{m}\sim 450\ \mu\text{m}$,有喙状突起长 $350\ \mu\text{m}\sim 600\ \mu\text{m}$;子囊无色,大小 $(44\ \mu\text{m}\sim 67\ \mu\text{m})\times(7.5\ \mu\text{m}\sim 12.5\ \mu\text{m})$,含 8 个子囊孢子;子囊孢子双胞、无色、椭圆形,大小 $(12.5\ \mu\text{m}\sim 19\ \mu\text{m})\times(2.8\ \mu\text{m}\sim 7.5\ \mu\text{m})$ 。



说明:
a——向日葵茎溃疡病菌 α 型分生孢子;
b——向日葵茎溃疡病菌 β 型分生孢子。

图 A.1 向日葵茎溃疡病菌分生孢子形态

A.4 病害典型症状

在向日葵茎秆和叶柄结合处产生枯黄色至淡褐色大型病斑,边缘呈日烧状;发病严重时,病斑逐步

扩展并包围茎秆,导致茎秆上部干枯,易折断,茎秆和叶柄的髓部腐烂坏死。叶片上的病斑呈棕色或褐色,严重时整叶萎蔫、干枯变黑。花盘受害后发育不良,不能形成成熟的种子,或干枯败育。发病严重时可导致整个植株死亡。

向日葵茎溃疡病典型症状见图 A.2。



图 A.2 向日葵茎溃疡病典型症状

A.5 向日葵种子包衣的洗涤方法

将种子放入样品筛(10 目, $\phi 1.7$ mm)中,然后将样品筛置于一个盛有灭菌水的小盆中浸泡 3~5 遍,每一遍浸泡 20 min~30 min,期间缓慢摇晃样品筛 3~5 次,以便洗去向日葵种子包衣。