

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3685—2013

### 油菜茎基溃疡病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Leptosphaeria maculans* (Desm) Ces. & De Not.

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。

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、中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局、华中农业大学等。

本标准主要起草人：赵晖、王振华、易建平、吴翠萍、李彬、周国梁、曾宪东、吴品珊、李国庆。

## 油菜茎基溃疡病菌检疫鉴定方法

### 1 范围

本标准规定了油菜茎基溃疡病菌的检疫鉴定方法。

本标准适用于十字花科植物及植物产品中油菜茎基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

### 3 油菜茎基溃疡病菌基本信息

学名:*Leptosphaeria maculans* (Desm) Ces. & De Not.

分类地位:真菌界(Fungi),子囊菌门(Ascomycota),座囊菌纲(Dothideomycetes),格孢腔菌目(Pleosporales),格孢腔菌科(Pleosporaceae),小球腔菌属(*Leptosphaeria*),无性态为黑胫茎点霉[*Phoma lingam* (Tode ex Schw.) Desm]。

传播途径:感病的植株、病残体以及受侵染的种子等植物性材料是远距离传播主要途径。

油菜茎基溃疡病菌的其他信息参见附录 A、附录 B。

### 4 方法原理

根据油菜茎基溃疡病菌在寄主上的为害症状,培养基上生长的菌落、菌丝、分生孢子和分生孢子器形态,以及 PCR 特异扩增片段大小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

生物显微镜、体视显微镜、高速冷冻离心机、纯水仪、超净工作台、灭菌锅、制冰机、PCR 仪、凝胶成像系统、电泳仪、实时荧光 PCR 仪、培养箱、超低温冰箱、常规冰箱、旋涡振荡器。

#### 5.2 主要试剂

除另有规定外,所有试剂均为分析纯或生化试剂,实验用水符合 GB/T 6682 中规定的要求。

##### 5.2.1 1%次氯酸钠。

5.2.2 DNA 提取试剂:DNA 提取试剂盒,异丙醇,无水乙醇。尿素提取液(7 mol/L Urea,50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,62.5 mmol/L NaCl,1% SDS),蛋白酶 K(20 mg/mL),苯酚:三氧甲烷:异戊醇(25 : 24 : 1)溶液,3 mol/L NaAc(pH 5.2)。

5.2.3 PCR 试剂:10×PCR 缓冲液(含 25 mmol/L MgSO<sub>4</sub>),Taq 酶,dNTP。

5.2.4 凝胶电泳试剂:琼脂糖,TAE,Loading Buffer,EB。

5.2.5 麦芽琼脂培养基:麦芽提取物 6.0 g,琼脂 3.0 g,蒸馏水 200 mL,调整 pH 至 5.2,121 ℃,15 min 灭菌。

5.2.6 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):马铃薯浸粉 5.0 g,葡萄糖 20.0 g,氯霉素 0.1 g,琼脂 13.0 g,蒸馏水定容至 1 000 mL,调整 pH 值至 5.6,121 ℃高压灭菌 20 min。

## 6 病菌的鉴定

### 6.1 症状检查

#### 6.1.1 取样

取样品量 1%~5%(若样品少可适量增大比例)的种子、植株的茎根部和叶部进行检查。

#### 6.1.2 种子症状检查

在解剖镜下挑选皱缩、干瘪、变色、残缺的种子或有霉变的籽粒或病残体,每份种子样品挑选不少于 500 粒,用做病原菌的分离。另取 1 kg 种子,用孔径 2.5 mm 和 1.5 mm 的网筛过筛,取筛上物、筛下物和种子各 1 g~2 g 用于 DNA 提取。

#### 6.1.3 植株症状检查

主要检查茎根部和叶部。选取叶片上出现圆形或不规则形、稍凹陷、中部灰白色病斑、部分斑内散生许多小黑点症状的病变部位。植茎则选取不规则形淡褐色斑,或灰白色病斑、稍凹陷、上生黑色小点,或茎基及根系溃疡、枯萎症状的病变部位(见附录 B)。

### 6.2 PCR 初筛

#### 6.2.1 样品 DNA 提取

取筛上物、筛下物和种子,或植株可疑病变组织各 1 g~2 g,液氮研磨后各取样 0.1 g~0.2 g,采用商业化试剂盒提取 DNA(见附录 C)。

#### 6.2.2 PCR 检测

PCR 检测方法见附录 D 和附录 E,重复 3 次。用油菜茎基溃疡病菌标准菌株 DNA 作阳性对照,用灭菌蒸馏水作空白对照。

若 PCR 初筛结果为阴性,不用做以下实验;若 PCR 初筛结果为阳性,继续以下实验。

### 6.3 分离培养

#### 6.3.1 种子病原菌的分离培养

将挑选的带菌种子置于灭菌蒸馏水中室温浸泡处理 1 d,转入-20 ℃下冷冻处理 1 d,1%次氯酸钠消毒 5 min~7 min,无菌水洗涤 3 次后,按 25 粒/皿置于麦芽琼脂培养基或 PDA 培养基上,在 20 ℃~25 ℃,12 h 黑暗/12 h 光照(12 h 光暗交替)条件下培养,第 5 天开始观察。

#### 6.3.2 植株病原菌的分离培养

用解剖刀取植株病健交界处的组织,剪成约 0.4 cm×0.4 cm 小段,用 1%的次氯酸钠溶液消毒 5 min,无菌水洗涤 3 次,灭菌滤纸吸干水分后置于麦芽琼脂培养基或 PDA 培养基上,同 6.3.1 培养观察。



#### 6.4 鉴定特征

该病菌在培养基上菌落边缘不整齐、有结节状颗粒点,气生菌丝白色、多而致密,分枝较多,有分隔。挑取见到的菌丝结制片,置于体视显微镜下观察。分生孢子器直径  $150\ \mu\text{m}\sim 225\ \mu\text{m}$ ,球形至扁球形,褐色至深黑褐色,散生、埋生或半埋生于菌丝中,有空口 1 个~2 个,部分分生孢子器从孔口处溢出浅粉红色胶质状粘液(见附录 B)。分生孢子(*Phoma lingam*)无色透明,椭圆形至纺锤形,两端常见各 1 个油球,孢子大小  $(3.3\ \mu\text{m}\sim 6.0\ \mu\text{m})\times(1.4\ \mu\text{m}\sim 2.3\ \mu\text{m})$  如产生分生孢子器,转入麦芽琼脂培养基或 PDA 培养基,31℃ 黑暗条件下培养 20 d,观察产生的色素,该病菌在 PDA 上不产生黑色色素。

#### 6.5 PCR 检测

采用商业化试剂盒或尿素法(见附录 C)提取疑似分离物 DNA,按 6.2.2 中的方法进行 PCR 检测。

#### 6.6 致病性测定

在 P3 实验室,选取健康的 westar 或宁波 7 号等感病品种的油莱籽种植,在长出 2 片子叶后做致病性测试。将形态特征与油菜茎基溃疡病菌形态特征相符且 PCR 检测阳性的分离物,用无菌水配制每毫升  $10^7$  个分生孢子液,针刺接种叶片,黑暗保湿 1 d,置于 15℃~20℃ 下生长、观察(剪掉生出的心叶)。接种 5 d~8 d 后接种点附近出现圆形浅褐色枯死斑,稍凹陷,对发病子叶再做病原菌分离。

### 7 结果判定

若 6.2.2PCR 初筛为阴性,可报告未检出油菜茎基溃疡病菌;若 6.2.2PCR 初筛和 6.5 病菌的分离物 PCR 检测为阳性,且形态特征符合 6.4 中的描述,可报告检出油菜茎基溃疡病菌。首次检出油菜茎基溃疡病菌,需做致病性测定实验。

### 8 样品保存

#### 8.1 样品保存与处理

样品经登记和经手人签字后妥善保存。对检出油菜茎基溃疡病菌的样品应保存于 4℃ 冰箱中,以备复核。该类样品保存期满后应经高压灭菌后方可处理。

#### 8.2 菌株保存与处理

从检测样品中分离并鉴定为油菜茎基溃疡病菌的菌株,应妥善保存。将菌株接种于麦芽琼脂培养基或 PDA 培养基斜面上,20℃~25℃ 培养 4 d,然后 4℃ 冰箱保存,或将菌丝块转入 20% 灭菌甘油并混匀, -80℃ 长期保存。对不需要长期保存的菌株应及时高压灭菌处理。

#### 8.3 结果记录与资料保存

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 3685—2013

## 附 录 A

(资料性附录)

### 油菜茎基溃疡病菌的世界分布

目前在世界范围内,该病原菌广泛分布的国家有:

欧洲:澳大利亚、保加利亚、捷克、丹麦、爱沙尼亚、芬兰、法国、德国、匈牙利、爱尔兰、意大利、拉脱维亚、列支敦士登、立陶宛、马耳他、荷兰、挪威、波兰、罗马尼亚、俄罗斯、斯洛伐克、西班牙、瑞典、瑞士、乌克兰、英国。

亚洲:亚美尼亚、格鲁吉亚、印度、伊朗、以色列、日本、哈萨克斯坦、韩国、朝鲜、吉尔吉斯斯坦、马来西亚、巴基斯坦、菲律宾、泰国、土耳其。

非洲:埃及、埃塞俄比亚、肯尼亚、莫桑比克、尼日利亚、南非、赞比亚、津巴布韦。

中美洲和地中海地区:哥斯达黎加、萨尔瓦多、巴拿马、波多黎各。

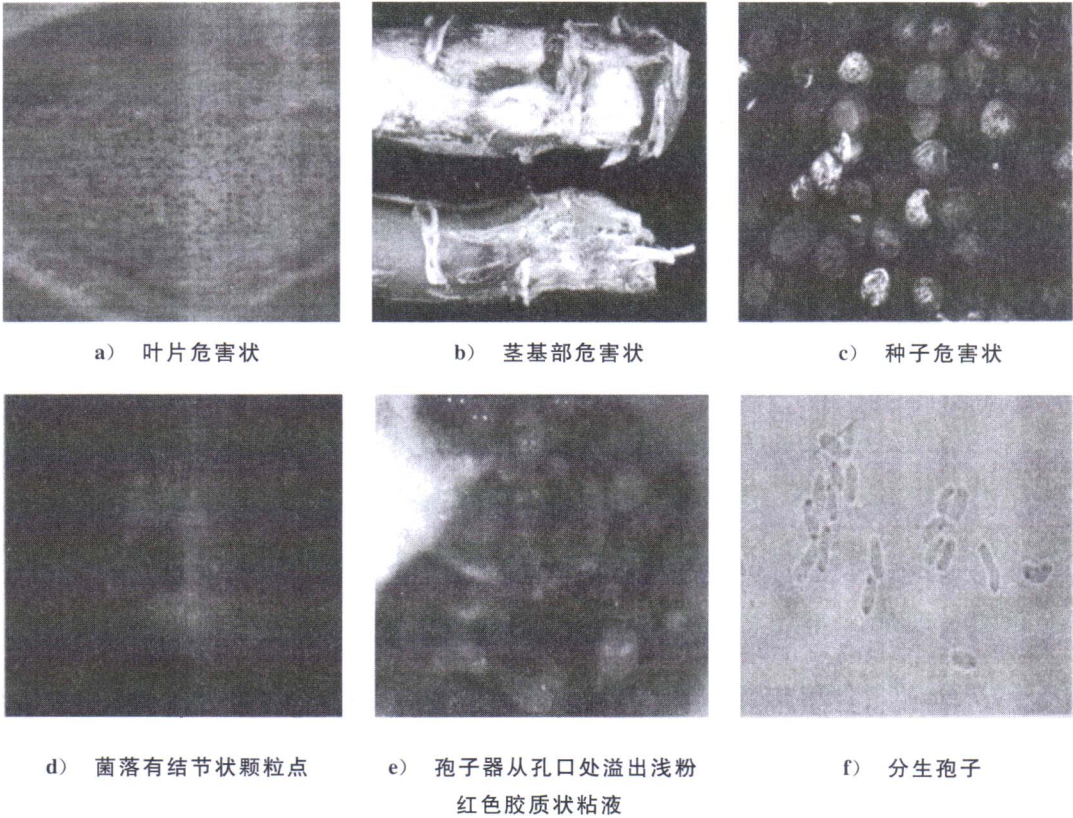
北美洲:加拿大、墨西哥、美国。

南美洲:阿根廷、巴西。

大洋洲:澳大利亚、新喀里多尼亚、新西兰、巴布亚新几内亚。

附 录 B  
(规范性附录)

感病植株和种子的症状、病菌形态特征图



注：引自刘胜毅和 Bruce Fitt。

图 B.1 感病植株和种子的症状、病菌形态特征图



## 附录 C

### (规范性附录)

#### 油菜茎基溃疡病菌 DNA 的提取方法

##### C.1 试剂盒提取 DNA 的方法

C.1.1 将油菜籽、菜粕用液氮碾碎。

C.1.2 取 40 mg 到 1.5 mL EP 管,加 600  $\mu$ L 核酸裂解液。

C.1.3 65  $^{\circ}$ C 水浴 20 min,温和的混匀。

C.1.4 取出回温到 37  $^{\circ}$ C,加 RNA 酶 3  $\mu$ L。

C.1.5 温和的混匀,放 37  $^{\circ}$ C 15 min。

C.1.6 冷却至室温,加蛋白沉淀液 200  $\mu$ L,混匀。

C.1.7 14 000 r/min 离心 3 min,取上清液 600  $\mu$ L。

C.1.8 加入异丙醇 600  $\mu$ L,温和的混匀,静置 5 min。

C.1.9 14 000 r/min 离心 1 min,弃掉上清液,加 70%乙醇 600  $\mu$ L,温和的颠倒混匀。

C.1.10 14 000 r/min 离心 1 min,弃上清液(用枪吸干),放置于吸水纸上晾干(15 min)。

C.1.11 加入 100  $\mu$ L DNA 重悬液,如果 DNA 很少,就加 30  $\mu$ L,65  $^{\circ}$ C 温育 1 h 或 4  $^{\circ}$ C 过夜。

C.1.12 14 000 r/min 离心 1 min,取 1  $\mu$ L 进行 PCR 扩增。

##### C.2 尿素法提取菌丝 DNA 的方法

C.2.1 取 500  $\mu$ L 尿素提取液(7 mol/L Urea、50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0、62.5 mmol/L NaCl、1% SDS)与 10  $\mu$ L 20 mg/mL 蛋白酶 K 至 EP 管中,挑取 200 mg 菌丝至 EP 管,混匀。

C.2.2 55  $^{\circ}$ C 温育 30 min,每隔 10 min 振荡混匀 1 次,12 000 r/min 离心 5 min,将上清液移入另一 EP 管中,加入等体积的苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)溶液,颠倒混匀,13 000 r/min 离心 10 min。

C.2.3 取上清到另一 EP 管中加入等体积的异丙醇和 1/10 体积的 3 mol/L NaAc(pH 5.2), $-20^{\circ}$ C 放置 20 min,13 000 r/min 离心 10 min。

C.2.4 弃上清液,倒置晾干,用 70%乙醇洗涤,室温倒置于吸水纸上晾干,溶于 20  $\mu$ L TE 溶液中,加入 RNase A(1  $\mu$ g/ $\mu$ L)1  $\mu$ L,13 000 r/min 离心 10 min,弃上清,37  $^{\circ}$ C 水浴 30 min, $-20^{\circ}$ C 保存备用。



附 录 D  
(规范性附录)  
定性 PCR 方法

D.1 PCR 扩增

D.1.1 定性 PCR 选择一

油菜茎基溃疡病菌 *L. maculans* 特异性引物一, LMR1-D: 5'-GCGTAAGAAGCGTGCCT-TAGAGTC-3'/5'-TCCTGCTCCTACTCCTTCTCTAGC-3', 预期扩增产物为 580 bp。  
油菜茎基溃疡病菌定性 PCR 检测反应体系见表 D.1。  
PCR 反应程序为 94 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 40 s, 35 个循环; 72 ℃ 7 min。

D.1.2 定性 PCR 选择二

油菜茎基溃疡病菌 *L. maculans* 特异性引物二, Lmb: 5'-CACCAATTGGATCCCCCTA-3'/5'-AG-GCGAGTCCCAAGTGGAACA-3', 预期扩增产物为 276 bp。  
油菜茎基溃疡病菌定性 PCR 检测反应体系见表 D.1。  
PCR 反应程序为 94 ℃ 3 min; 94 ℃ 30 s, 56 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 35 个循环; 72 ℃ 5 min。

表 D.1 检测油菜茎基溃疡病菌定性 PCR 反应体系

试剂名称	浓 度	加样量/ $\mu$ L
PCR buffer(含 25 mmol/L $MgSO_4$ )	10 $\times$	2.5
dNTP	各 2.5 mmol/L	2.0
正义引物	10 $\mu$ mol/L	1.0
反义引物	10 $\mu$ mol/L	1.0
<i>Taq</i> DNA 聚合酶	5 U/ $\mu$ L	0.5
DNA 模板	$\geq$ 50 ng/ $\mu$ L	1.0
ddH <sub>2</sub> O		补至 25 $\mu$ L

D.2 PCR 扩增产物检测

扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶在 1 $\times$ TAE 缓冲液中电泳, EB 染色后用凝胶成像系统分析。

D.3 结果判定

PCR 扩增产物检测, 阳性对照出现一条 580 bp(定性 PCR 选择一)或 276 bp(定性 PCR 选择二)的 DNA 片段, 阴性对照和空白对照没有该核酸条带, 待检样品如出现 580 bp(定性 PCR 选择一)或 276 bp(定性 PCR 选择二)的 DNA 片段为检测结果阳性, 如未出现 580 bp(定性 PCR 选择一)或 276 bp(定性 PCR 选择二)的 DNA 片段为检测结果阴性。

附 录 E  
(规范性附录)  
实时荧光 PCR 方法

### E.1 荧光 PCR 检测

- E.1.1 荧光 PCR 选择一:上游 Forward Primer:5'-CCCCCTACTAGAAGAGTTATAGCACTT-3';  
下游 Reverse Primer:5'-CCTAAGATCCTCCTATTATAGAGAGCC-3';  
MGB-TaqMan 探针:5'-FAM-CTTATTAAAGAGCGCTAAGTA-MGB-3'。
- E.1.2 荧光 PCR 选择二:LMf 上游:5'-GTTTCCTTGGTGGGCTTGC-3',  
LMr 下游:5'-TGTTACTGACGCTGACTGCAATT-3',  
MGB-TaqMan 探针:5'-(FAM)ATTGGATCCCCTAAAACC (NFQ-MGB)-3'。
- E.1.3 荧光 PCR 选择三:Lmb3:5'-CACCAATTGGATCCCCTA-3',  
R2:5'-GGCGCAAAATGTGCTGCGCT-3',  
Probe-M 探针:5'-(FAM)CACTTGGGACTCGC(MGB)-3'。

油菜茎基溃疡病菌实时荧光 PCR 检测反应体系见表 E.1。

表 E.1 油菜茎基溃疡病菌的实时荧光 PCR 反应体系

试剂名称	浓 度	加样量/ $\mu\text{L}$
PCR buffer(含 25 mmol/L $\text{MgSO}_4$ )	10 $\times$	2.5
dNTP	各 2.5 mmol/L	2.0
正义引物	10 $\mu\text{mol/L}$	1.0
反义引物	10 $\mu\text{mol/L}$	1.0
Taq DNA 聚合酶	5 U/ $\mu\text{L}$	0.5
探针	10 $\mu\text{mol/L}$	1.0
DNA 模板	$\geq 50$ ng/ $\mu\text{L}$	1.0
ddH <sub>2</sub> O		补至 25 $\mu\text{L}$

PCR 反应程序:95  $^{\circ}\text{C}$  10 min;95  $^{\circ}\text{C}$  15 s,60  $^{\circ}\text{C}$  1 min,循环 40 次。

### E.2 结果判定

阳性对照 Ct 值 $\leq 27$ ,阴性对照和空白对照没有扩增或 Ct 值 $> 40$ ;

样品 Ct 值 $\leq 35$ 为阳性;若在 35 与 40 之间,需重复试验,重复结果 Ct 值仍在 35 与 40 之间,判为阳性,否则判为阴性;

样品无扩增或 Ct 值 $> 40$ ,为阴性。

## 参 考 文 献

- [1] 王振华,李凤新,赵晖,等.加拿大进境油菜籽加工过程中油菜茎基溃疡病菌的检测与鉴定.2010年进出境植物检疫学术研讨会论文集.155-156.
- [2] 易建平,周国梁,印丽萍,等.进境澳大利亚油菜籽中茎基溃疡病菌的检测.2010年进出境植物检疫学术研讨会论文集.232-234.
- [3] 王振华,赵晖,宋祺,等.油菜茎基溃疡病菌基因组 DNA 提取方法的比较.湖北农业科学,2011,50(3):511-513.
- [4] 王振华,杨武,赵晖,等.加拿大进境油菜籽茎基溃疡病菌的检测与鉴定.华中农业大学学报,2011,30(1):66-69.
- [5] 周国梁,尚琳琳,林泓,等.油菜茎基溃疡病菌的实时荧光 PCR 检测.植物病理学报.2011,41(1):10-17.
- [6] JANET L.TAYLOR.1993.A Simple, Sensitive, and Rapid Method for Detecting Seed Contaminated with Highly Virulent *Leptosphaeria maculans*. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. p.3681-3685.
- [7] S. Y. Liu, Z. Liu, B. D. L. Fitt, N. Evans, S. J. Foster, Y. J. Huang, A. O. Latunde-Dada and J. A. Lucas. 2006. Resistance to *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in *Brassica napus* (oilseed rape) induced by *L. biglobosa* and chemical defence activators in field and controlled environments. Plant Pathology (2006) 55, 401-412.
- [8] O. Moreno-Rico, G. Séguin-Swartz, J. A. Nettleton, J. J. Luna-Ruiz, A. G. Frias-Treviño, and S. Romero-Cova. 2002. Mexican isolates of *Leptosphaeria maculans* belong to the aggressive strain of the fungus. Can. J. Plant Pathol.
- [9] Y. Dion, R. K. Gugel, G. F. W. Rakow, G. Séguin-Swartz, B. S. Landry. 1995. RFLP mapping of resistance to the blackleg disease [causal agent, *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not.] in *canola* (*Brassica napus* L.). Theor Appl Genet (1995) 91:1190-1194.
- [10] G. A. Petrie and P. A. Lewis. 1985. Sexual compatibility of isolates of the rapeseed blackleg fungus *Leptosphaeria maculans* from Canada, Australia, and England. CANADIAN JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY 7:253-255.