

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4649—2016

瓜蔓枯病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm

2016-08-23 发布

2017-03-01 实施



中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

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。

本标准负责起草单位：中华人民共和国新疆出入境检验检疫局、石河子大学。

本标准主要起草人：王翀、张小菊、孙燕飞、张祥林、张伟、李亚伟、张瑜。

瓜蔓枯病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了瓜类蔓枯病菌 *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm 的检疫鉴定方法。
本标准适用于进出口瓜类植物种子、植株、果实中瓜类蔓枯病菌的检疫鉴定。

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，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本文件。
SN/T 1809 进出境植物种子检疫规程

3 瓜蔓枯病菌基本信息

学名: *Didymella bryoniae* (Auersw.)

无性世代学名: *Ascochyta citrullina*

有性世代学名: *Didymella bryoniae*

分类地位: 瓜蔓枯病菌属子囊菌门 (Ascomycota)、格孢腔菌目 (Pleosporales)、隔孢假壳科 (Didymosphaeriaceae)、亚隔孢壳属 (*Didymella*)、无性态属球壳孢目 (Sphaeropsidales)、壳霉科 (Sphaeropsicaceae)、壳二孢属 (*Ascochyta*)。

4 方法原理

瓜蔓枯病菌的症状表现、培养性状、形态学特征、致病性及 PCR 特异性扩增检测结果作为瓜蔓枯病菌的检疫鉴定依据。

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、高压灭菌锅、制冰机、PCR 仪、凝胶成像系统、电泳仪、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。

1%次氯酸钠，DNA 提取相关试剂(盒)，PCR 相关试剂，电泳试剂。

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)(配制方法见附录 A)。

6 检验方法

6.1 取样和制样

按照 SN/T 1809 的方法抽取进出境瓜类种子样品。

挑选皱缩、干瘪、变色、残缺的种子或有霉变的籽粒。对送检的植株茎部、叶部和果实进行检查时,选取叶片上呈现近圆形或不规则形的黑褐色病斑;茎部选取呈椭圆形或短条状褐色凹陷斑;果实选取圆形、暗褐色的凹陷斑,病斑表面呈星状开裂,内部呈木栓状干腐,发黑、腐烂的果实(参见附录 B 和附录 C)进行病原菌的分离。

6.2 分离培养

可将挑选出的可疑瓜类种子置于 25℃ 保湿 24 h,再经 -20℃ 下 24 h 冷冻处理后用做培养。叶片、茎秆和果实样品可用无菌刀片切取病健交界处 3 mm~5 mm 左右的组织进行培养。病斑表面散生有黑色小点(病菌的分生孢子器)的,可以直接用挑针挑取移至培养基上培养。

无菌条件下将供试材料用 3% 次氯酸钠表面消毒 5 min~10 min,无菌水洗 3 次。将处理好的材料置于含青/链霉素微酸性的 PDA 培养基平板上,每皿放置 3 粒~4 粒种子或 5 块~6 块组织,于 25℃ 下 12 h 光照黑暗交替培养。培养第 3 天后开始观察,若发现乳白色或白色可疑菌落,立即用 PDA 培养基进行纯化。在无菌条件下挑取菌丝制片,于显微镜下观察菌丝和分生孢子形态。如无分生孢子产生,可在 25℃ 的恒温箱中黑暗条件培养 5 d~7 d,4 d 紫外灯照射(间隔 12 h),再 2 d 暗处理后进行观察,并制片镜检。

6.3 PCR 检测

将分离出的病原菌,接种到 PDA 培养基上,25℃ 培养 5 d,挑取菌丝,用 CTAB 法或商业化试剂盒提取供试菌株 DNA,进行常规 PCR 检测(参见附录 D)。PCR 扩增产物检测中,阳性样品应出现 314 bp 的泳带。

6.4 致病性测定

实验室首次检出该病菌需做致病性测定。将形态特征与瓜蔓枯病菌相符且 PCR 检测阳性的分离物进行致病性测定。用灭菌土播种健康瓜类种子,待长出 3 片~5 片真叶后,用灭菌牙签或刀片在茎秆处穿刺或切开组织,用无菌打孔器在培养基上取瓜蔓枯病菌菌丝块,接种在伤口上,用湿润的脱脂棉包裹伤口,用塑料袋覆盖,28℃ 左右,相对湿度 100%,黑暗条件下保湿 48 h,接种后 5 d~10 d 后观察接种点附近是否出现可疑病斑,观察症状并对发病子叶再做病原菌分离。鉴定再次分离到的病原菌是否与接种用菌为同一种。

7 鉴定特征

该病菌在 PDA 培养基上的菌落边缘稀薄,中间稠密,略隆起,背面初为白色至黄色,后期变为黑色,正面颜色与菌龄有关,基质内的菌丝深褐色,有同心轮纹,不形成子囊座和分生孢子器,打开培养皿盖时可闻到“灰土味”。分生孢子器黑褐色至黑色,球形至扁球形,直径 47.7 μm~325.1 μm,分生孢子椭圆形或圆筒形,无色,单孢、双孢,偶有三孢,大小为 (4.5 μm~11.5 μm) × (2.5 μm~6.5 μm),平均 9.0 μm × 4.1 μm。

8 结果判定

8.1 若供试样品中分离出的菌株培养性状和形态特征符合第7章中描述,且PCR扩增结果呈阳性,可判定检出瓜蔓枯病菌。

8.2 若分离菌株的培养性状和形态特征符合第7章中描述,但PCR扩增结果阴性,可判定未检出瓜蔓枯病菌。

8.3 若分离菌株的培养性状和形态特征不符合第7章中描述,可判定未检出瓜蔓枯病菌。

9 样品保存

9.1 样品保存与处理

样品经登记和经手人签字后妥善保存。对检出瓜蔓枯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。

9.2 菌株保存与处理

从检测样品中分离并鉴定为瓜蔓枯病菌的菌株,应妥善保存。将菌株接种于PDA培养基斜面上,20℃~25℃培养5d,4℃冰箱保存;或将菌丝块转入30%灭菌甘油,4℃冰箱保存;或将菌株冷冻干燥后,-40℃以下冰箱保存。

9.3 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 4649—2016

附 录 A

(规范性附录)

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)制备方法

青/链霉素微酸性 PDA 培养基:将洗净后去皮的马铃薯 200 g 切碎,加水 1 000 mL 煮沸半小时,用纱布滤去马铃薯,加水补足 1 000 mL,然后加 20 g 葡萄糖和 15 g~20 g 琼脂,加热使琼脂完全溶化后,分装在三角瓶中,调整 pH 至 5.6,121 ℃ 高压灭菌 20 min。培养基中加入链霉素或青霉素,使抗生素浓度为 50 单位/mL~100 单位/mL,也可再加入 3 mL 乳酸(终浓度 0.3%),倒皿备用。

附 录 B
(资料性附录)
瓜蔓枯病菌相关信息

B.1 寄主范围

瓜类蔓枯病菌在葫芦科植物范围内有广泛的侵染性。常见的9种葫芦科植物:黄瓜(*Cucumis sativus* L.)、冬瓜(*Benincasa hispida* Cogn.)、南瓜(*Cucurbita moschata* Duch.)、甜瓜(*Cucumis melo* L.)、葫芦[*Lagenaria siceraria* (Mo.) S.]、西瓜(*Citrullus vulgaris* Schrad.)和丝瓜(*Luffa cylindrica* Roem.)、苦瓜(*Momordica charantia* L.)、瓠瓜(*Lagenaria vulgaris* Schrad.)。这些瓜类作物均可受蔓枯病菌感染,其中以黄瓜、西瓜、冬瓜、瓠瓜、甜瓜和葫芦受害最重,丝瓜次之,南瓜和苦瓜仅轻微受害。

B.2 症状

瓜蔓枯病菌在瓜的整个生育期地上各部均可受害,以叶片、瓜蔓受幼苗子叶受害,先出现水浸状小点,后扩展为青灰色大圆斑,如从叶缘扩展到整个子叶,引起子叶枯死。幼苗茎部受害,初现水浸状小斑,后死亡;叶片受害后,最初为浅褐色水浸状小点,后逐渐扩大成直径为1 cm的黑褐色大斑;叶缘受害,则形成黑褐色弧形、楔形大斑,病部干枯,表皮分生孢子器。蔓茎受害,早期多发生在茎基部的分枝处,呈水浸状灰绿伤害处初现椭圆形或短条状、褐色凹陷斑,并不断分泌黄色胶汁,干涸后凝结成深红色至黑红色的颗粒状胶质物,附着在病部表面,多密生黑色小点,致使蔓叶枯萎,横切病茎,可见茎周一圈表皮层变褐,其维管束不变色,仍为绿色,这一点与枯萎有明显不同。果实受害,初为水浸状的小斑,后扩大成圆形、暗褐色的凹陷斑,在一些品种的果实上,病斑表面常呈星状开裂,内部呈木栓状干腐,发黑后则腐烂。病斑上也可产生许多分散的黑色小点。果实染病,病斑圆形,初亦呈油渍状,浅褐色或黑色凹陷斑,斑上有很多小黑点,同时出现不规则圆形龟裂斑,后期果实腐败。

B.3 分布范围

全国各地均有发生,广泛分布在世界各地,包括美国、加拿大、荷兰、瑞典、日本、印度、中国台湾等地,在我国北京、山东、新疆、江苏、浙江、上海、甘肃、湖北、海南等地的瓜类产区均有蔓枯病的报道。

B.4 传播方式

该病是一种可积累流行的土传、种传病害。病菌以子囊壳、分生孢子器、菌丝体潜伏在病残组织上留在土壤中越冬,翌年产生分生孢子进行初侵染。植株染病后释放出分生孢子借风雨传播,进行再侵染。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。

SN/T 4649—2016

附 录 C
(资料性附录)
感病植株的症状、病菌形态特征图

图 C.1~图 C.3 给出了感病植株的症状、病菌形态特征。



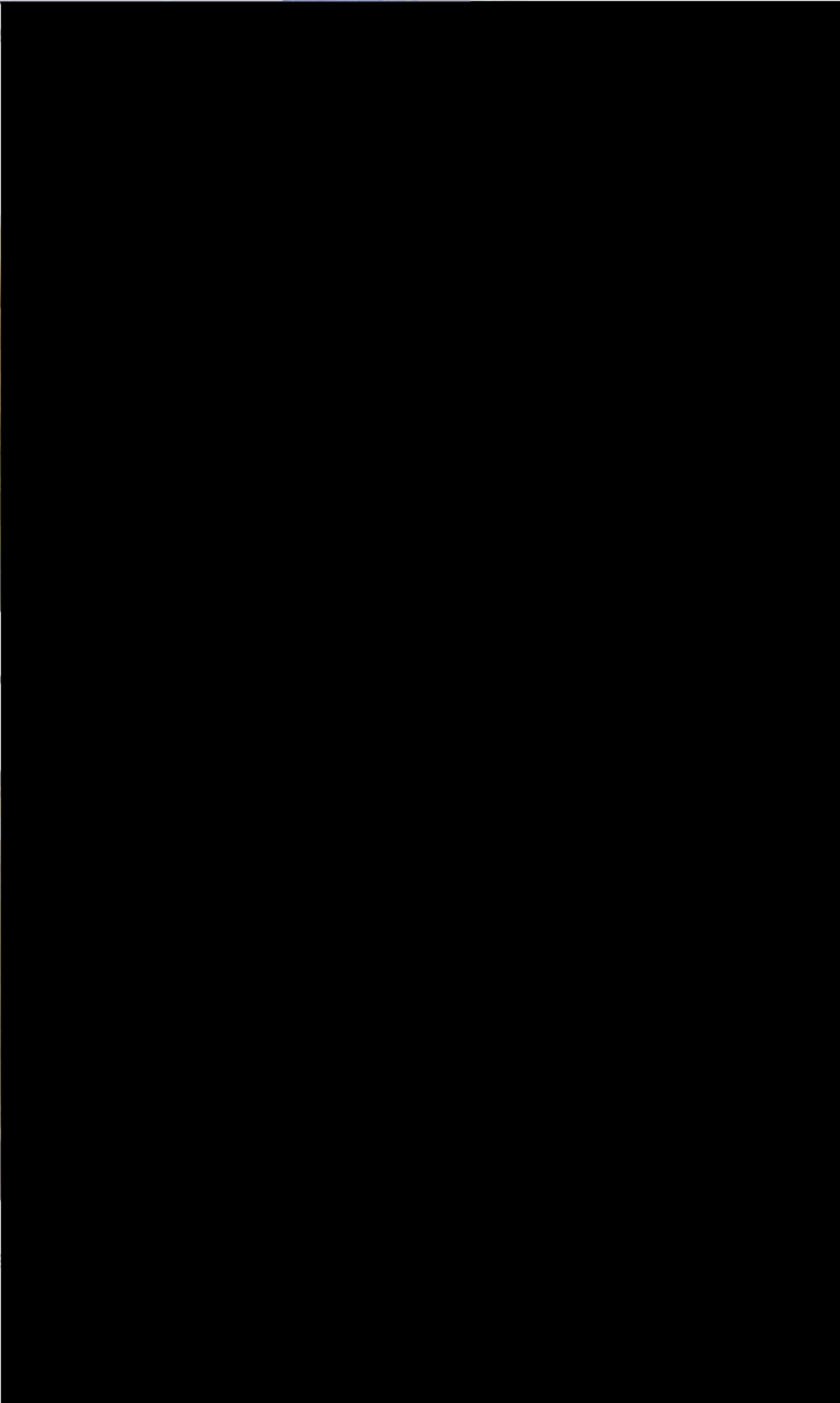
图 C.1 瓜蔓枯病菌感病植株的症状

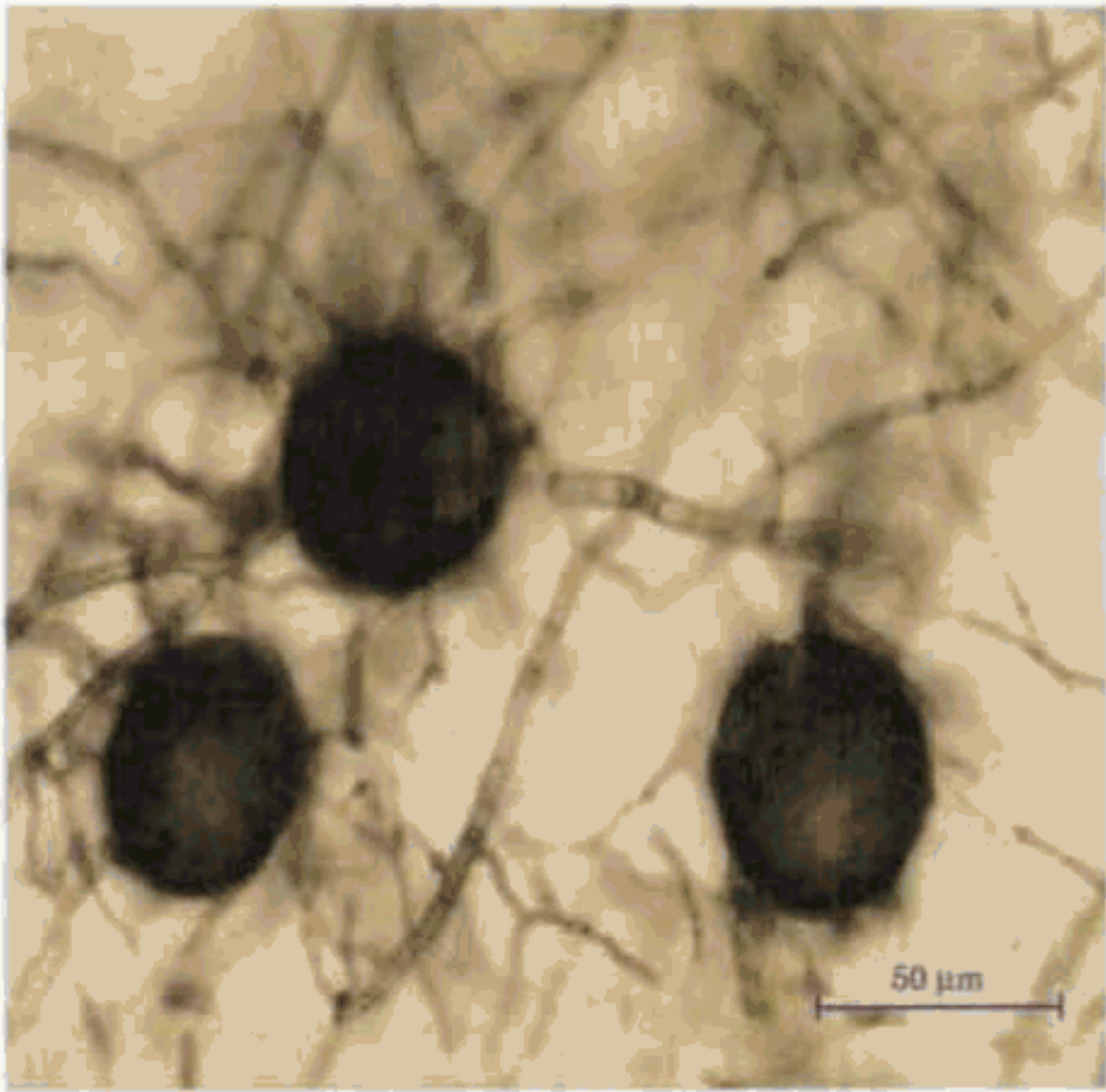


注：4



注：3





a) 病菌分生孢子器



b) 病菌分生孢子

注：王骞拍摄。

图 C.3 病原菌形态

附录 D

(资料性附录)

瓜蔓枯病菌普通 PCR 检测方法

D.1 瓜蔓枯病菌 DNA 提取

称取充分混匀的待测培养物 10 g，加入 600 μ L 预热的 600 μ L CTAB 裂解液，振荡混匀；冷却至室温后，加入等体积的氯仿，振荡混匀；离心 15 min；小心吸取上清液(约 600 μ L)至一新的 1.5 mL 离心管中，加入 0.8 倍体积的异丙醇，再加入 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠(加入异丙醇时)放置 30 min 以上；4 $^{\circ}$ C，15 000 g 离心 5 min；弃去上清液，沉淀两次，室温 15 000 g 离心 5 min；加入 50 μ L 的去离子水或 TE 缓冲液，振荡混匀；也可用相应市售 DNA 提取试剂盒。

D.2 PCR 检测

Db-1:(5'-3') CCACCACT
Db-2:(5'-3') AGAGTTG
PCR 产物的目标条带为 314 bp
PCR 检测反应体系: 10 \times 缓冲液 10 μ L; Db-1: 0.5 μ L; Db-2: 0.5 μ L;
PCR 反应程序为 95 $^{\circ}$ C 5 min;

D.3 PCR 扩增产物检测

扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。

D.4 结果判定

PCR 扩增产物检测, 阳性对照出现一条 314 bp 的泳带, 阴性对照和空白对照没有该泳带, 待检样品如出现 314 bp 的泳带为检测结果阳性, 如未出现 314 bp 的泳带为检测结果阴性。

管中, 加入 65 $^{\circ}$ C
min 混匀一次; 取
心 15 min; 小心
0.8 倍体积的异
时) 或 4 $^{\circ}$ C (加入
500 μ L, 洗涤沉
挥发殆尽后, 加

(2.5 mmol/L);

10 min。

统分析。

参 考 文 献

- [1] 戴富明,刘少华,任小杰,等.西瓜蔓枯病分子诊断技术研究[J].植物病理学报,2006,36(5): 439-445.
 - [2] 陈熙,胡龙灯,鲍建荣,等.西瓜蔓枯病研究 1.症状及病原[J].浙江农业大学学报,1989,15 (4):329-333.
 - [3] 戴富明,陆金萍,顾卫红,等.西瓜蔓枯病菌子实体的诱导及抗性鉴定[J].植物保护学报,2(X) 3,30(2):138-142.
 - [4] 王晓东,李国英.哈密瓜蔓枯病菌分生孢子器诱发及室内品种抗病性测定[J].新疆农业科学, 2004,41(5):341-344.
 - [5] 陈秀蓉,魏勇良.瓜类蔓枯病的寄主及越冬菌态研究[J].中国西瓜甜瓜,1997,2:7-10.
 - [6] 李英.瓜蔓枯病菌的生物学特性和黄瓜抗病资源的筛选.南京:南京农业大学,2007.
 - [7] 贾菊生,马德英,张丽,等.新疆瓜类蔓枯病病原的有性阶段新发现[J].新疆农业科学,2003, 40(5):303-304.
 - [8] 张学军,王登明,伊鸿平.海南甜瓜蔓枯病病原菌的有性阶段鉴定[J].中国蔬菜,2013,(6): 81-83.
 - [9] 王晓东,李国英.新疆哈密瓜蔓枯病菌的生物学特性及其室内药剂筛选试验[J].石河子大学 学报,2004,22(4):301-304.
 - [10] 吴海波,伊鸿平,冯炯鑫,等.4种甜瓜蔓枯病菌形态特征及其致病力比较[J].新疆农业科学, 2008,45(1):28-30.
 - [11] 陈秀蓉,魏勇良.瓜类蔓枯病的寄主及越冬菌态研究[J].中国西瓜甜瓜,1991,(2):7-9.
-

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
瓜蔓枯病菌检疫鉴定方法
SN/T 4649—2016

*

中国标准出版社出版
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
总编室:(010)68533533

网址 www.spc.net.cn

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 22 千字
2017年12月第一版 2017年12月第一次印刷
印数 1—500

*

书号: 155066·2-32291 定价 21.00 元



SN/T 4649-2016