



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2605—2010

油棕猝倒病菌检疫鉴定方法

Identification of *Pythium splendens* Braun

2010-05-27 发布

2010-12-01 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。

本标准负责起草单位：中华人民共和国宁波出入境检验检疫局检验检疫技术中心。

本标准参加起草单位：中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人：张建成、张慧丽、吴品珊。

油棕猝倒病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了植物检疫中油棕猝倒病菌的检疫和鉴定方法。

本标准适用于油棕猝倒病菌寄主苗木、插枝等植物材料及其土壤和介质的入境检疫。

2 原理

学名: *Pythium splendens* Braun 1925。

异名: *Pythium splendens* var. *hawaiianum* Sideris 1932。

中文名: 油棕猝倒病菌。别名: 油棕苗疫病菌、天竺葵黑胫病菌、华丽腐霉。

油棕猝倒病菌属藻菌界(Chromista), 卵菌门(Oomycota), 卵菌纲(Oomycetes), 腐霉目(Pythiales), 腐霉科(Pythiaceae), 腐霉属(*Pythium*)。

油棕猝倒病菌在世界上分布于温暖和亚热带地区(参见附录 A 第 A.1 章), 其寄主范围很广, 为害上百种植物(参见附录 A 第 A.2 章)。病原菌侵染植物的幼苗和根部, 引起种子腐烂, 幼苗萎蔫、猝倒, 插枝及成株茎部变黑、根腐。其传播途径为土壤、繁殖材料。

以油棕猝倒病菌在寄主植物上的症状、形态学特征和生物学特征为鉴定依据。

3 仪器设备

生物显微镜(具油镜镜头)、具透射光源的体视显微镜(最大放大倍数不低于 50×)、高压灭菌器、分析天平、超净工作台、生物培养箱、解剖针、解剖刀、烧杯(50 mL)、医用手术剪、镊子。

4 试剂和培养基

4.1 抗菌素和杀菌剂

4.1.1 氨苄青霉素(Ampicillin, 研究用纯粉剂或市售医用注射粉剂)。

4.1.2 利福平(Rifampicin, 研究用纯粉剂或市售医用注射粉剂)。

4.1.3 制霉菌素(Nystatin, 研究用纯粉剂或市售医用内服片剂)。

4.1.4 苯菌灵(Benomyl, 研究用纯粉剂或市售可湿性粉剂)。

4.1.5 五氯硝基苯(Pentachloronitrobenzene, 研究用纯粉剂或市售可湿性粉剂)。

4.2 试剂

棉蓝试剂。

4.3 培养基

4.3.1 基础培养基

用于油棕猝倒病菌的保存和培养性状的观察、测定。

采用 10% V8 培养基, 番茄汁培养基, 其配置方法及步骤见附录 B。

4.3.2 选择性培养基

用于油棕猝倒病菌病原菌的分离和纯化。

1 000 mL 基础培养基经常规灭菌并冷却到 55 ℃ 左右时加入下列抗菌素(均为有效成分): 氨苄青霉素 200 mg, 利福平 100 mg, 制霉菌素 50 mg, 苯菌灵 100 mg, 摇匀, 制成平板。其中研究用纯苯菌灵粉剂和纯利福平粉剂需事先配制成酒精溶液(母液), 并使培养基中的最终酒精浓度不大于 0.5%。

苯菌灵可用相同药量的五氯硝基苯替代。

5 症状检查

仔细检查根部, 症状是茎变黑和萎缩, 自基部开始腐烂, 出现灰色或棕黑色水渍状斑点, 病害扩展的最前缘通常清晰可辨。顶端的叶片特征性的杯状凹陷, 比健康植株绿色偏淡, 根系严重腐烂。对可疑植物和繁殖材料的介质土应取样送实验室做进一步检验。

6 实验室检验

6.1 病原菌检查

选取有萎蔫症状的叶片, 根部变褐腐烂的植株, 用解剖针挑取或用解剖刀刮取病斑背面的霉状物或病组织制片, 在显微镜下直接检查有无病菌的菌丝、菌丝膨大体, 记录其形态特征。

6.2 组织分离

选萎蔫及根部变褐但没有完全腐烂的植物材料, 用流动的自来水冲洗干净, 在根茎病健交界处切取 0.5 cm 长的小块, 无菌水浸洗 3 次, 灭菌吸水纸上吸干水分后转移到选择性培养基, 于 25 ℃~30 ℃ 黑暗培养 3 d。

6.3 土壤诱集

对禾本科植物叶片(如: 马唐、狗尾草、稗草等)进行高温高压灭菌处理, 剪成直径 1 cm 大小的小片作为诱饵。取 5 g~20 g 土壤样品研磨破碎放入 50 mL 灭菌洁净烧杯中, 厚度不超过 2 cm, 缓慢加入无菌水没过土表 1 cm~2 cm, 用吸水纸轻轻去掉形成的表面膜和漂浮的有机物残渣, 每烧杯水面放置诱饵 10 片左右。静置过夜, 将感染的诱饵取出, 用无菌水洗净表面, 吹干或无菌吸水纸吸干, 放入选择性培养基平板上培养。待长出菌落后镜检, 菌丝体呈棉絮状, 分枝, 无隔多核的菌落, 挑取菌丝尖端转移到基础培养基上 25 ℃~30 ℃ 黑暗培养 3 d。

6.4 培养物观察

得到病菌纯培养物后, 挑出菌丝制片。用 0.5% 棉蓝乳酚液包埋, 用解剖针将菌丝尽量展开, 观察病菌特征。

6.5 PCR 鉴定方法

PCR 鉴定方法参见附录 C。

P. splendens 的特异性引物 Psp1 和 ITS-2 的序列见表 1:

表 1 特异性引物(P. H. Wang, 2003)

引 物	序列 5'-3'
PspI	GAA GGT CGG AGT AAA ATC TGG C
ITS-2	GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC

7 鉴定特征

7.1 培养性状

在三种基础培养基上气生菌丝发达,蛛丝状。

7.2 形态特征

7.2.1 菌丝和菌丝体

菌丝不规则分枝,菌丝宽 3.5 μm ~9.2 μm ,平均 6.4 μm 。培养基上菌丝膨大体丰富,叶片诱集可产生大量菌丝膨大体。

菌丝膨大体(参见附录 D)球形至近球形,光滑,通常顶生,很少间生,直径 25 μm ~49 μm ,平均 38 μm ,菌丝膨大体内充满颗粒状原生质,菌丝膨大体需在有水的情况下经数小时萌发,萌发时每个膨大体产生 1 个~6 个芽管。不产生游动孢子囊和游动孢子。

7.2.2 有性生殖阶段特征

有性繁殖为异宗配合,但有些分离物单培养也可以形成藏卵器,藏卵器也可以出现在老化的培养物或培养数年的菌株上。藏卵器顶生或间生,球形,器壁光滑、薄,直径 24 μm ~38 μm 。雄器异丝生,顶生,偶尔间生,每个藏卵器 1 个~8 个雄器,柄有时分支或分叉,多个雄器同时围绕一个藏卵器,雄器细胞大,通常 20 μm ×15 μm ,直或颈状弯曲。卵孢子游离在藏卵器内,不满器,与藏卵器的比例为 1 : 1.2,直径 20 μm ~33 μm ,壁光滑,薄,壁厚 1 μm ~2 μm (参见附录 D)。

7.3 PCR 特异性反应

P. splendens 的特异性扩增片段为 150 bp。

8 结果评定

以油棕猝倒病菌在病材料上的症状、分离物的培养特征、无性及有性世代阶段特征等作为鉴定依据,进行综合判定。若以上特征与第 7 章鉴定特征吻合,则鉴定为油棕猝倒病菌。若菌丝膨大体平均值小于 38 μm ,需进行 PCR 鉴定,PCR 产物含有 150 bp 特异性片段的鉴定为油棕猝倒病菌。

9 菌株保存

选择适当的病原菌材料制成永久玻片。油棕猝倒病菌的菌株应移到基础培养基斜面上 25 ℃ 黑暗保存,并定期(每 3 个月)转管,严格防止扩散。菌株至少保存 6 个月,保存期满后,经高温高压灭菌处理。

附录 A

(资料性附录)

油棕猝倒病菌的地理分布和寄主

A.1 地理分布

非洲:刚果、科特迪瓦、马达加斯加、尼日利亚、南非、坦桑尼亚。

亚洲:马来西亚、日本、新加坡、伊朗、印度、越南、中国台湾。

大洋洲:澳大利亚、斐济、夏威夷、新喀里多尼亚、新西兰、巴布亚新几内亚、所罗门群岛、阿曼。

欧洲:爱尔兰、比利时、德国、法国、荷兰、葡萄牙、意大利、英国。

美洲:巴西、波多黎各、哥伦比亚、美国(佛罗里达州、加利福尼亚州、特拉华州、爱荷华州、印第安纳州、密西西比州、马里兰州、北卡罗莱纳州、新泽西州、宾夕法尼亚州、弗吉尼亚州、华盛顿、北达科他州、密苏里州)、特立尼达和多巴哥、牙买加。

A.2 油棕猝倒病菌的寄主

油棕猝倒病菌能够侵染 250 余种植物,主要为害的经济作物有:

芦荟属(*Aloe* sp.)、木波罗(*Artocarpus heterophyllus*)、秋海棠属(*Begonia* spp.)、木豆(*Cajanus cajan*)、洋刀豆(*Canavalia ensiformis*)、辣椒属(*Capsicum* spp.)、番木瓜(*Carica papaya*)、菊属(*Chrysanthemum* spp.)、酸橙(*Citrus aurantium*)、锦紫苏属(*Coleus blumei*)、黄瓜(*Cucumis sativus*)、兰属(*Cymbidium* spp.)、花叶万年青(*Dieffenbachia picta*)、油棕(*Elaeis guineensis*)、老鹳草属(*Geranium* spp.)、向日葵(*Helianthus annuus*)、大麦(*Hordeum vulgare*)、番薯(*Ipomoea batatas*)、莴苣(*Lactuca sativa*)、麝香百合(*Lilium longiflorum*)、亚麻(*Linum usitatissimum*)、木薯(*Manihot esculenta*)、紫苜蓿(*Medicago sativa*)、草木樨属(*Melilotus* spp.)、烟草(*Nautilocalyx lynchei*)、天竺葵属(*Pelargonium* spp.)、绿豆(*Phaseolus aureus*)、菜豆(*Phaseolus vulgaris*)、湿地松(*Pinus elliottii*)、胡椒(*Piper nigrum*)、豌豆(*Pisum sativum*)、洋梨(*Pyrus communis*)、萝卜(*Raphanus sativus*)、大黄(*Rheum officinale*)、甘蔗(*Saccharum officinarum*)、菠菜(*Spinacia oleracea*)、车轴草属(*Trifolium* spp.)、小麦(*Triticum aestivum*)、蚕豆(*Vicia faba*)、豇豆(*Vigna sinensis*)、玉米(*Zea mays*)。

附 录 B
(规范性附录)
培养基及配置方法

B.1 10% V8 培养基

100 mL V8 蔬菜汁, 碳酸钙 0.2 g, 琼脂粉 20 g, 蒸馏水补足到 1 000 mL。121 ℃ 高压蒸汽灭菌 15 min~20 min。

B.2 番茄汁培养基

可作为 V8 培养基的替代, 方便不容易获得 V8 液的实验室。

新鲜番茄洗净, 切片, 食品搅拌器打碎, 汁液通过 1.5 mm 孔径的筛子, 除去种子和大块组织, 滤汁备用。100 mL 番茄汁加水到 1 000 mL, 加热到 100 ℃, 再加入碳酸钙 0.2 g, 琼脂粉 20 g。121 ℃ 高压蒸汽灭菌 15 min~20 min。

附 录 C

(资料性附录)

油棕猝倒病菌的 PCR 鉴定

C.1 仪器设备

高速冷冻离心机、PCR 仪、电泳仪、凝胶成像仪、可调微量加样器、塑料研杵。

C.2 试剂

C.2.1 无菌双蒸水(ddH₂O)、液氮、蛋白酶 K、氯化镁、盐酸、氢氧化钠、乙酸铵、氯化钾、TBE 缓冲液、无水乙醇、溴化乙锭(EB)、三氯甲烷、异丙醇、异戊醇。

C.2.2 TES 提取缓冲液:100 mmol/L Tris-HCl(pH8.0)、10 mmol/L EDTA、2% SDS(质量浓度)。

C.2.3 CTAB/氯化钠溶液:10%CTAB(质量浓度)、0.7 mol/L 氯化钠。

C.2.4 TE 缓冲液(pH8.0)、TaqDNA 聚合酶、dNTP 混合物、10×PCR 缓冲液、琼脂糖、10×上样缓冲液、DNA 分子量 Marker(100 bp)。

C.3 DNA 提取

使用下列方法提取病菌 DNA,或使用市售试剂盒提取 DNA。

C.3.1 收集经干燥过的菌丝约 0.5 g 放入 1.5 mL 浸在液氮里的离心管中,用塑料杵碾碎待用。

C.3.2 离心管中加入 1 mL TES 提取缓冲液,另加入 100 mg~200 mg 蛋白酶 K,55 ℃保温 30 min,期间轻轻混匀。

C.3.3 加入 5 mol/L 氯化钠 28 μL、CTAB 氯化钠溶液 138 μL,65 ℃保温 10 min。

C.3.4 4 ℃ 13 000g 离心 10 min,保留上清液。

C.3.5 加入等体积的三氯甲烷/异戊醇(体积比 24:1),轻轻混匀,冰浴 30 min;4 ℃ 13 000g 离心 10 min,保留上清液。

C.3.6 加入 450 μL 5 mol/L 乙酸铵,冰浴至少 30 min。

C.3.7 4 ℃ 16 000g 离心 10 min,保留上清液。

C.3.8 加入约三分之二体积的异丙醇沉淀 DNA,13 000g 离心 15 min。

C.3.9 DNA 沉淀用 1 mL 70%乙醇洗 2 次;室温干燥,用 100 μL TE 缓冲液溶解 DNA 备用。

C.4 PCR 扩增

25 μL PCR 反应体系中含有:10×PCR 缓冲液 2.5 μL,25 mmol/L 氯化镁 4 μL,5 U/μL Taq 聚合酶 0.25 μL,10 mmol/L dNTP 0.5 μL,10 μmol/L 引物各 0.5 μL,DNA 模板 5 μL,加双蒸水补充至 25 μL,见表 C.1。同时要设置阴性对照,以无菌水代替 DNA 样品。

表 C.1 特异性 PCR 反应体系

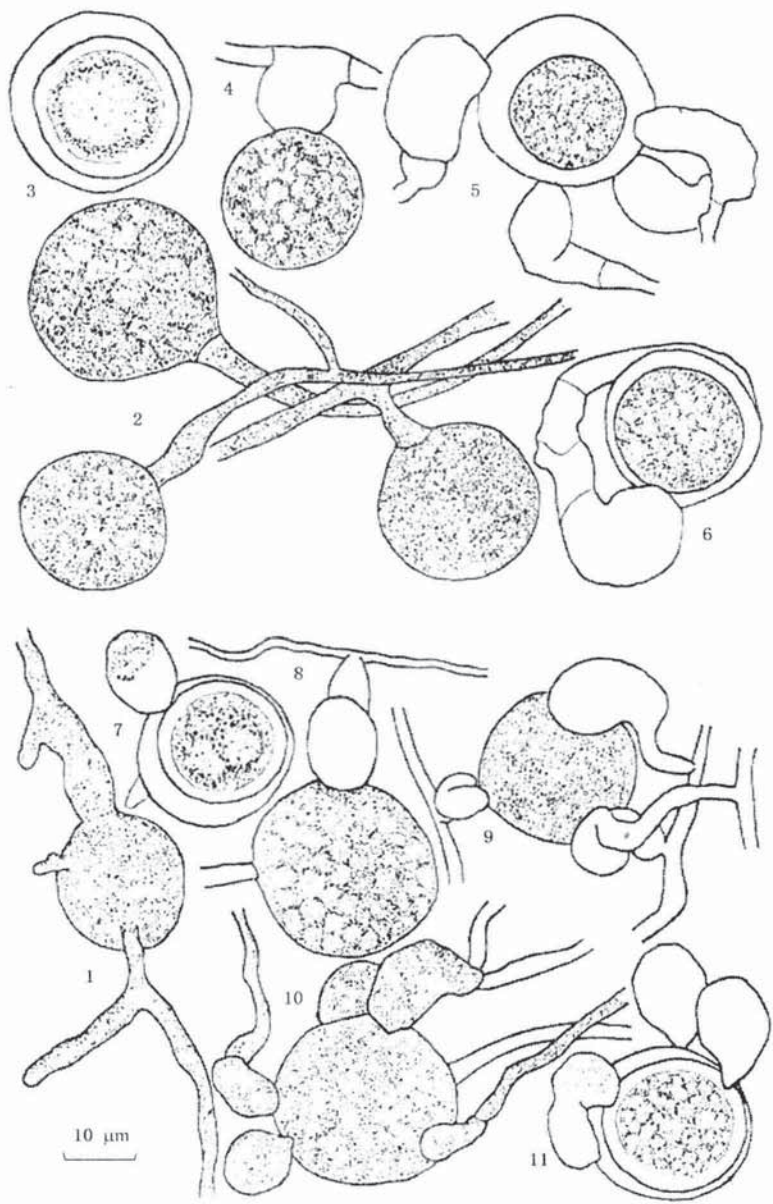
试剂名称	储备液浓度	25 μL 反应体系加样体积/ μL
10 $\times$ PCR 缓冲液	—	2.5
氯化镁	25 mmol/L	1.5
dNTP 混合物	2.5 mmol/L	2
<i>Taq</i> DNA 聚合酶	5 U/ μL	0.2
引物	10 $\mu\text{mol/L}$	各 0.5
DNA 模板	50 ng/ μL ~100 ng/ μL	1~2
双蒸水	—	补至 25

PCR 反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,62 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

C.5 产物检测

在 0.5 $\times$ TBE 电泳缓冲液中,1.5%琼脂糖凝胶电泳,5 V/cm,0.5%EB 染色 20 min,凝胶成像仪分析结果。

附录 D
(资料性附录)
油棕猝倒病菌的形态特征图



说明：
1~2——菌丝膨大体；
3~11——藏卵器、雄器、卵孢子。

图 D.1 油棕猝倒病菌的形态特征图(仿 Van der Plaats-Niterink, 1969)