



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 5138—2019

棉花黄萎病菌检疫鉴定方法

Detetion and identification of *Verticillium dahliae* Kleb

行业标准信息服务平台

2019-09-03 发布

2020-03-01 实施

中华人民共和国海关总署 发布

前 言

本标准按照 GB/T1.1—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。

本标准由中华人民共和国海关总署提出并归口。

本标准起草单位：宁波检验检疫科学技术研究院、中华人民共和国宁波海关、中华人民共和国天津海关、中国科学院微生物研究所、中华人民共和国乌鲁木齐海关、中华人民共和国青岛海关。

本标准起草人：段维军、郭立新、廖芳、蔡磊、李雪莲、张祥林、王英超、张慧丽、陈先锋。

行业标准信息平台

棉花黄萎病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了棉花黄萎病菌的检疫鉴定方法。
本标准适用于植物及其产品中棉花黄萎病菌的检测鉴定。

2 定义和术语

下列术语和定义适用于本文件

- 2.1
轮枝状分生孢子梗 verticillate conidiophore
在直立的分生孢子梗每节基部膨大处轮生若干个小梗,一般 1~5 轮,是轮枝菌的分生孢子梗类型。
- 2.2
厚垣孢子 chlamydospore
由菌丝个别细胞膨大形成,具有厚壁和浓缩的原生质,可抵抗不良环境的一种休眠孢子。
- 2.3
微菌核 microsclerotium
由单一菌丝体不断聚集的暗褐色或黑色较为坚硬的休眠体。
- 2.4
休眠菌丝体 resting mycelium
一种菌丝休眠体,暗褐色或近黑色,分隔规则,隔膜间膨大,呈念珠状。

3 基本信息

中文名:棉花黄萎病菌
学名:*Verticillium dahliae* Kleb.
分类地位:棉花黄萎病菌隶属于真菌界(Fungi),子囊菌门(Ascomycota),盘菌亚门(Pezizomycotina),粪壳菌纲(Sordariomycetes)中的小不整球壳科(Plectosphaerellaceae)。
传播途径:棉花黄萎病菌主要由种子传播,也可经土壤、病残体、风、灌溉水和昆虫传播。
近似种:黑白轮枝菌 *Verticillium albo-atrum* Reinke and Berthold、三体轮枝菌 *V. tricorpus* Isaac、变黑轮枝菌 *V. nigrescens* Pethybridge、云状轮枝菌 *V. nubilum* Pethybridge 等。

4 鉴定原理

棉花黄萎病菌的危害症状、形态学特征及分子生物学特征是鉴定该病菌的依据。

5 仪器和试剂

5.1 仪器

高压灭菌锅、显微镜、解剖镜、天平、研钵、摇床、水浴锅、制冰机、纯水仪、旋涡振荡器、台式离心机、

核酸蛋白分析仪、高速冷冻离心机、真空干燥仪、冰箱、超净工作台、生化培养箱、通风橱、实时荧光 PCR 仪、凝胶成像仪、微量移液器(0.1 μL~2.5 μL, 1 μL~10 μL, 10 μL~50 μL, 20 μL~200 μL, 100 μL~1 000 μL)、锥形瓶、试管、培养皿、载玻片、盖玻片。

5.2 试剂

CTAB 提取液(2% CTAB, 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/K EDTA, 100 mmol/L Tris • HCl pH8.0)、Tris 饱和酚、氯仿、异戊醇、异丙醇、无水乙醇、次氯酸钠、RNase、PCR 反应试剂:2×TaqMan Universal PCR Master Mix。

除另有规定外,所有试剂均为分析纯或生化试剂。

5.3 培养基

PDA 培养基。

6 检疫鉴定

6.1 分离培养

挑取感病材料(如植株维管束、种子等),用 1.5%次氯酸钠或 75%酒精浸泡 1 min 进行消毒处理,无菌水冲洗 3 次后置于灭菌滤纸,吸干水分后放置于倒有 PDA 的培养皿中。培养皿倒置在 25 °C 光照培养箱中培养。分离出可疑菌落后转接纯化培养。

6.2 形态学观察

显微镜检孢子的形态特征、产孢方式。在 25 °C、黑暗条件下,观察记录菌落的生长速度、颜色变化、分生孢子梗和微菌核的形成情况。

6.3 DNA 制备

采用基因组提取试剂盒制备 DNA,或采用改良的 CTAB 提取法,参见附录 A。

6.4 实时荧光 PCR 检测

实时荧光 PCR 检测方法参见附录 B。

7 鉴定特征

7.1 症状

植株受棉花黄萎病菌侵染后,维管束变褐色,该特征是维管束病害的典型特征。受棉花黄萎病菌侵染,植物叶片急剧失水,叶片呈花西瓜皮状,特别是顶部叶片常半边水烫状,不久整株迅速萎焉。

7.2 形态学鉴定特征

菌落呈绒毛状,初生菌丝体无色或白色,有隔膜。培养 10 天以上菌落可产生大量微菌核,菌落变为黑褐色。分生孢子梗轮状分枝,1~5 轮,分枝基部膨大,始终透明,顶端着生分生孢子,无色,单胞,椭圆形或近圆筒形。形态特征参见附录 C 和 D。

7.3 实时荧光 PCR 结果判定

在阴性对照、空白对照正常的情况,则有如下判定:

- 样品无 Ct 值并且无扩增曲线,判定为阴性。
- 样品 Ct 值 ≤ 35.0 ,且出现典型的扩增曲线,判定为阳性。
- 样品 Ct 值在 35.0~40.0 之间时,须重新提取样品 DNA 进行扩增检测。重做结果无 Ct 值,判定为阴性;否则判定为阳性。
- 样品 Ct 值为 40 时,判定为阴性。

8 结果判定

以分离物的培养特征和实时荧光 PCR 检测结果作为鉴定依据,参考症状特点,进行综合判定。

若分离物的培养特征与形态学鉴定特征符合,判定为棉花黄萎病菌。

若分离物未检出微菌核等典型形态特征,实时荧光 PCR 检测为阳性,可判定为棉花黄萎病菌。

9 样品保存与复核

9.1 样品保存

保存样品应置于 2℃~8℃冰箱妥善保存,对检出棉花黄萎病菌的样品应至少保存 6 个月,以备复检、谈判和仲裁。

分离到的棉花黄萎病菌应接种于 PDA 培养基中妥善保存。

9.2 结果纪录与资料保存

包括:样品的来源、种类、采样时间、检测时间、地点、方法、结果等,并有实验人员的签字。实时荧光 PCR 要有检测阳性结果照片。

9.3 复核

由海关总署指定的单位或人员负责,主要考察实验原始数据纪录及实时荧光 PCR 检测结果等资料的完整性和真实性,必要时进行复核实验。

附 录 A
(资料性附录)
DNA 提取方法

- A.1 收集培养分离得到的菌丝,放入浸在液氮里的 1.5 mL 离心管,用无菌塑料杵迅速碾碎。
- A.2 加入 600 μ L 65 $^{\circ}$ C 预热的 CTAB 抽提液,颠倒混匀后于 65 $^{\circ}$ C 水浴 0.5 h~1 h。
- A.3 冷却至室温后,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液至另一离心管中。
- A.4 加入 1/2 体积(300 μ L)的 Tris 饱和酚及 1/2 体积(300 μ L)的氯仿:异戊醇(24 : 1),颠倒混匀后静置至其开始分层。
- A.5 12 000 rpm 离心 10 min,取上清液至另一离心管中。
- A.6 可重复 A.4~A.5 2~3 次,视两相界面处杂质的多少而定。
- A.7 加入等体积氯仿:异戊醇(24 : 1),轻轻颠倒混匀。
- A.8 12 000 rpm 离心 10 min,取上清液至另一离心管中。
- A.9 向上清液中加入等体积异丙醇,轻轻颠倒混合均匀后于 4 $^{\circ}$ C 或 -20 $^{\circ}$ C 沉淀 1 h。
- A.10 12 000 rpm 离心 10 min,弃去上清液,加 500 μ L 70%乙醇悬浮沉淀。
- A.11 12 000 rpm 离心 5 min,弃上清,室温干燥。
- A.12 加 50 μ L 无菌水或 TE 缓冲液(10 mmol/L Tris.HCl, 1 mol/L EDTA pH8.0)溶解沉淀,-20 $^{\circ}$ C 贮存备用。

行业标准信息平台

附 录 B
(规范性附录)
实时荧光 PCR 方法

B.1 引物及探针序列

正向引物 VD3F: 5'- CGT ACG ATT GAG AAG TTT GAG ATA AGT G-3';

反向引物 VD3R: 5'- CGT CGG AAA CCA TGA AAA CA-3';

探针 VDMGB3: 5'- CTG CTT GAA TCT ACA C-3', 探针 5'端含有 FAM 报告荧光染料, 3'端含有不发荧光的淬灭基团并具有 MGB 分子。

B.2 扩增体系

PCR 扩增反应体系为: $2 \times$ TaqMan Universal PCR Master Mix 12.5 μ L、引物 VD3F/VD3R 各 0.4 μ mol/L、探针 VDMGB3 0.2 μ mol/L。反应总体积为 25 μ L。将反应体系混合均匀后置于荧光 PCR 仪中进行反应。

以棉花黄萎病菌 DNA 作阳性对照、不含棉花黄萎病菌的 DNA 作阴性对照、以无菌蒸馏水作空白对照, 每个样品设置 3 个重复。

B.3 扩增反应条件

扩增反应条件为: 50 $^{\circ}$ C 30 min; 95 $^{\circ}$ C 15 min; 然后 94 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s, 共 40 个循环。

附 录 C
(资料性附录)
棉花黄萎病菌形态特征

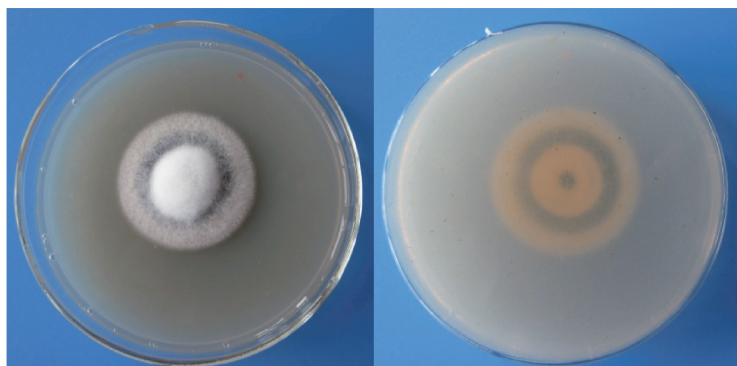


图 C.1 菌落形态特征

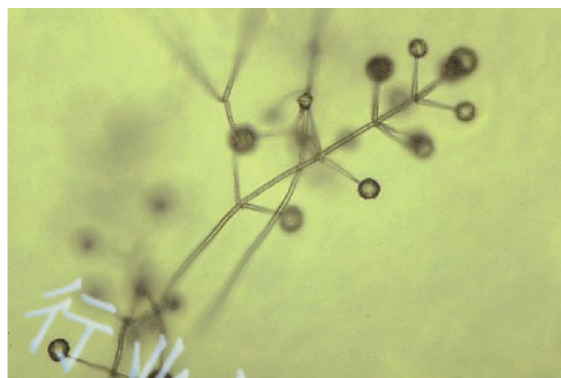


图 C.2 轮枝状分生孢子梗形态特征

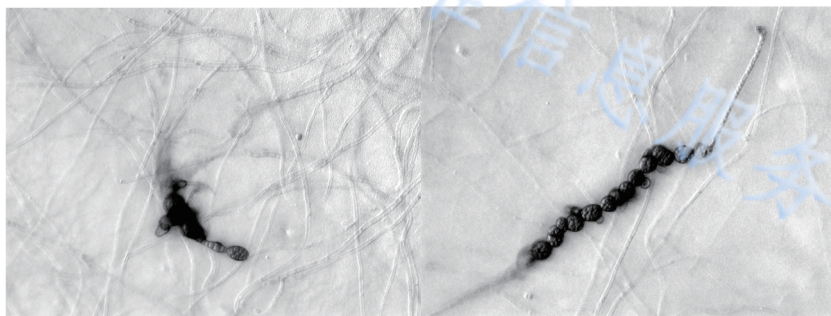


图 C.3 微菌核形态特征

附 录 D
(资料性附录)
棉花黄萎病菌与近似种形态比较

表 D.1 棉花黄萎病菌与近似种形态特征差异 单位:μm

种类	分生孢子	休眠菌丝	微菌核	厚垣孢子
<i>Verticillium dahliae</i>	3.4~6.9×1.5~3.4	—	15.3~178×18.3~85.2	—
<i>V. albo-atrum</i>	3.7~7.1×1.7~3.4	+	—	—
<i>V. nigrescens</i>	2.5~5.1×1.3~2.5	—	—	4.1~7.2×3.2~6.2
<i>V. nubilum</i>	4.1~8.3×1.4~2.5	—	—	7.8~12.5×5.0~8.4
<i>V. tricornis</i>	4.3~6.1×2.0~2.8	—	34.3~74.4×19.4~47.0	6.1~8.7×5.2~7.0

注：+表示有,—表示无

行业标准信息平台

参 考 文 献

- 段维军, 郭立新, 顾建锋, 等. 基于 COI 基因分析的植物病原性轮枝菌条形码评价. 植物检疫, 2013, 27(6): p. 41-45.
- 段维军, 郭立新, 张慧丽, 等. 进境台湾芹菜上一株变黑轮枝菌的鉴定. 植物检疫, 2012, 26(4): p. 30-34.
- 段维军, 郭立新, 张祥林, 等. 检疫性轮枝菌及其近似种的鉴定. 植物病理学报, 2013, 43(3): p. 274-285.
- 段维军, 张慧丽, 郭立新, 等. ITS 片段作为轮枝菌 DNA 条形码的评价研究. 植物保护, 2013, 39(4): p. 72-77.
- Nees von E, Gottfried C. Das System der Pilze und Schwamme. [M]. Würtzburg, Germany: Stahlschen Buchhandlung, 1817.
- Kirk P M, Cannon P F, Minter D W, et al. Dictionary of the fungi [M]. Wallingford: CABI, 2008. 724.
- Barbara D J, Clewes E. Plant pathogenic *Verticillium* species: how many of them are there? [J]. Molecular Plant Pathology, 2003, 4: 297-305.
- Qin Q M, Vallad G E, Wu B M, et al. Phylogenetic analyses of phytopathogenic isolates of *Verticillium* spp. [J]. Phytopathology 2006, 96(6): 582-592.
- Klosterman S J, Atallah Z K, Vallad G E, et al. Diversity, pathogenicity, and management of *Verticillium* Species [J]. Annual Review of Phytopathology, 2009, 47: 39 - 62.
- Inderbitzin P, Davis R M, Bostock R M, et al. The ascomycete *Verticillium longisporum* is a hybrid and a plant pathogen with an expanded host range [J]. PLoS ONE, 2011, 6(3): e18260.
- Pramateftaki P V, Antoniou P P, Typas M A. The complete DNA sequence of the nuclear ribosomal RNA gene complex of *Verticillium dahliae*: intraspecific heterogeneity within the intergenic spacer region [J]. Fungal genetics and biology, 2000, 29(2): 19-27.
- Camele I, Marcone C, Caponero A, et al. First report of *Verticillium dahliae* causing verticillium wilt of *Solanum aethiopicum* in Italy [J]. Plant Pathology, 2006, 55(4): 581-581.
- Zhang H W, Zhang W, Zhou J, et al. First report of wilt of *Amygdalus communis* caused by *Verticillium dahliae* in China [J]. Plant Pathology, 2008, 57(4): 781-781.
- Debode J, Van Poucke K, França S C, et al. Detection of multiple *Verticillium* Species in soil using density flotation and real-time polymerase chain reaction [J]. Plant Disease, 2011, 95(12): 1571-1580.
- Collins A, Okoli C A N, Morton A, et al. Isolates of *Verticillium dahliae* pathogenic to crucifers are of at least three distinct molecular types [J]. Phytopathology, 2003, 93: 364-376.