

ICS 65.020.99

B 16

中华人民共和国国家质量监督
检验检疫总局备案号：58152-2018

DB53

云南省地方标准

DB53/T 861—2018

香蕉枯萎病 PCR 检测技术规程

2018 - 03 - 01 发布

2018 - 06 - 01 实施

云南省质量技术监督局 发布

前 言

本标准按GB/T 1.1—2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》给出的规则起草。

本标准由云南省农业科学院农业环境资源研究所提出。

本标准由云南省农业标准化技术委员会（YNTC07）归口。

本标准的起草单位：云南省农业科学院农业环境资源研究所。

本标准主要起草人：番华彩、曾莉、杨佩文、郭志祥、白亭亭、郑泗军、徐胜涛、李迅东、尹可锁。

香蕉枯萎病 PCR 检测技术规程

1 范围

本标准规定了香蕉镰刀菌枯萎病的原理、符号、代号和缩略语、检测鉴定等。

本标准适用于尖孢镰刀菌古巴专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) 4号生理小种侵染而引起的香蕉镰刀菌枯萎病的诊断。

2 规范性引用文件

下列文件对于本标准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标准。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

NY/T 1807 香蕉镰刀菌枯萎病诊断及疫情处理规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

香蕉枯萎病 (Banana Fusarium Wilt)

由尖孢镰刀菌古巴专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, 缩与为FOC) 4号生理小种侵染引起的香蕉植株病害。

3.2

聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)

简称PCR，是一种对特定的核酸片段在体外进行快速、特异、高效扩增的方法，模板基因序列经高温变性成单链，在适宜的反应条件和DNA聚合酶作用下，根据模板序列设计的两条引物分别与模板DNA两条链上相应的一段互补序列发生退火而互相结合，接着在DNA聚合酶的作用下以脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTP) 为底物，使引物得以延伸，然后不断重复变性、退火和延伸这一循环，从而实现扩增的基因片段以几何倍数扩增的过程。

4 原理

香蕉镰刀菌枯萎病由半知菌亚门丝孢纲瘤座孢目镰刀菌属尖孢镰刀菌古巴专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) 4号生理小种侵染引起的香蕉植株病害。利用尖孢镰刀菌古巴专化型4号生理

小种特异性引物，对待检样品进行PCR扩增，依据扩增产物的有无，判断样品是否为尖孢镰刀菌古巴专化型4号生理小种侵染引起。该病原菌的分子生物学特性是本规程制定的主要依据，其分类地位、病原菌形态特征、寄主范围、病害症状、分布、传播途径等参见附录A。

5 符号、代号和缩略语

下列缩略语适用于本标准。

PCR：聚合酶链式反应

DNA：脱氧核糖核酸

bp：碱基数

6 仪器用具、试剂和材料

所需仪器用具、试剂和材料按附录C中C.1、C.2准备。

7 检测鉴定

7.1 田间取样

田间取样按以下步骤进行：

- a) 取样时进行针对性检查，根据附录A的描述，初步确定香蕉植株是否为香蕉枯萎病疑似病株。
- b) 症状识别、检查、取样、保存等方法按NY/T 1807 香蕉镰刀菌枯萎病诊断及疫情处理规范规定进行。
- c) 取样后填写附录B。

7.2 PCR 鉴定

设尖孢镰刀菌古巴专化型4号生理小种为阳性对照，双蒸溜水作空白对照，香蕉镰刀菌枯萎病疑似病株为检测样品，具体操作程序见附录C。

8 结果判定与记录

8.1 PCR检测结果判定

PCR 检测结果判定见表1。

表 1 PCR 检测结果判定

判定条件					结果判定
序号	空白对照 (双蒸溜水)	阳性对照 (尖孢镰刀菌古巴专化 型 4 号生理小种)	检测样品	片段大小 (bp)	
1	无	有	有	815	检测样品为尖孢镰刀菌古巴 专化型 4 号生理小种
2	无	有	无	815	检测样品为非尖孢镰刀菌古 巴专化型 4 号生理小种
3	有/无	无	有/无	815	检测结果无效，将实验中的所 有试剂更换，并重新提取样品 的 DNA，进行 PCR 检测
4	有	有/无	有/无		

8.2 如果 7.2 PCR 扩增到 815 bp 片段，则可判定该检测样品为尖孢镰刀菌古巴专化型 4 号生理小种。PCR 扩增无 815 bp 片段，则可判定该检测样品为非尖孢镰刀菌古巴专化型 4 号生理小种。

8.3 检测鉴定结果填入《香蕉枯萎病鉴定报告》（见附录 D）。

附录 A
(资料性附录)
香蕉枯萎病

A.1 分类地位

香蕉枯萎病4号生理小种为半知菌亚门丝孢纲瘤座孢目镰刀菌属尖孢镰刀菌古巴专化型4号生理小种，学名为 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*。

A.2 病原菌形态特征

病原菌产生大型分生孢子、小型分生孢子和厚垣孢子。大型分生孢子镰刀形，无色，3~5个隔膜，多数为3个分膜，大小为(30~43) μm × (3.5~4.3) μm；小型分生孢子呈单胞或双胞，卵形或圆形。菌核蓝黑色，大小为0.5~1 μm。厚垣孢子椭圆形至球形，间生或顶生，单个、两个或串生，单个的大小为(5.5~6) μm × (6~7) μm。

A.3 寄主范围

对巴西蕉栽培品种(AAA)以及粉蕉栽培品种(ABB)都具致病性，如Cavendish、大蜜哈、矮香蕉、野蕉(BB)和棱香蕉。

A.4 病害症状

植株感病初期，植株不显症，直到中后期才显症，出现病状。受害蕉株初期下部叶片边缘及其叶鞘外部发黄，并且逐渐向中肋扩展，致使整叶发黄迅速枯萎，叶柄在靠近叶鞘处下折，致使叶片下垂。随后叶片自下而上相继发黄，凋萎，倒挂，最后整株枯死。有些病株从假茎外围的叶鞘近地面处开裂，逐渐向内扩展，层层开裂，裂口褐色。横剖病株假茎，维管束中柱髓部和皮层薄壁组织间可见黄红色或红棕色的斑点，最终转变成紫色至黑色，分散或连续；纵剖病株假茎，可见黄褐色或紫红色的条状坏死线，越近茎基部颜色越深。主根局部紫红色，根毛变红，须根变黑，根系腐烂坏死。

A.5 分布地区

该病最早于1874年在澳大利亚被发现，1904年在美国夏威夷也有发现，1910年巴拿马因该病造成巨大损失。该病分布于亚洲、非洲、澳大利亚、南太平洋及热带美洲的香蕉产区。1967年我国台湾省报道有该病危害，20世纪70年代在广东、福建、广西和海南等省区陆续发现，目前我国香蕉主产区均有发生。2009年在云南首次发现香蕉枯萎病的入侵，目前云南香蕉产区均有香蕉枯萎病的发生危害。

A.6 传播途径

其侵染来源主要是带菌的吸芽、病株残体及带菌土壤。香蕉枯萎病菌可通过病株残体、耕作工具、带菌土壤、以及病区灌溉水、雨水、虫等进行近距离传播蔓延；带病菌的吸芽、土壤及二级苗是远距离传播的主要方式。



图A.1 香蕉枯萎病田间症状及病原菌形态

附录 B
(规范性附录)

香蕉枯萎病疑似植株调查取样记录表

B. 1 香蕉枯萎病疑似植株调查取样记录表

香蕉枯萎病疑似植株调查取样记录表见表B. 1。

表 B. 1 香蕉枯萎病疑似植株调查取样记录

编号:

生产/经营者		地址及邮编	
联系/负责人		联系电话	
调查日期		取样地点	
样品 编号	品种	植物生育期	调查代表株数或面积(亩) 植物来源
症状描述:			
发生与防控情况及原因:			
取样方法、部位和取样比例:			
备注:			
取样单位(盖章):		生产/经营者:	
取样人(签名):		现场负责人:	
年 月 日		年 月 日	
注: 本表一式两份, 取样单位和受检单位各一份。			

附录 C
(规范性附录)
香蕉枯萎病 PCR 检测

C.1 仪器、用具

超净工作台、微量可调移液器(0.01 μL~2 μL, 1 μL~10 μL, 10 μL~100 μL, 10 μL~1000 μL)、可调移液器头、恒温水浴锅、PCR 管、离心管、震荡器、高速冷冻离心机、PCR 扩增仪、电泳仪、水平电泳槽、电子分析天平(感量为 0.1 mg)、微波炉、凝胶成像分析系统、超低温冰箱等。

C.2 试剂和材料

DNA 提取试剂盒

PCR 反应试剂: 10×PCR 缓冲液 (Mg²⁺ Plus)、Taq 聚合酶、dNTP、ddH₂O

电泳检测试剂: 琼脂糖 (电泳级)、核酸染料、6×加样缓冲液 (0.25%溴酚蓝, 40%蔗糖水溶液)、50×TAE 缓冲液 (Tris 242 g, 乙酸 52.1 mL, Na₂EDTA·2H₂O 37.2 g, 加无菌水至 1L, 用时加水稀释至 1×TAE)、DNA 分子量标准物。

C.3 总DNA提取

按照试剂盒说明书提取样品总 DNA。

C.4 PCR反应

C.4.1 引物序列

引物 1: 5' - GGC CTG CAC TCT GTA TAC ACT GAA-3'

引物 2: 5' - TAG TAG GTG ACC TAG TCA GCT AGC-3'

PCR 产物大小为 815 bp。

引自植物病理学报 (2006, 36 (1): 28-34.)

C.4.2 PCR 扩增

反应体系: 10×PCR缓冲液 (Mg²⁺ Plus) 2.5 μL, Taq 聚合酶0.25 μL (1.25 U), dNTP 0.5 μL (100 nmol·L⁻¹), 上下游引物各 1 μL (400 nmol·L⁻¹), 加 ddH₂O补足25 μL。

PCR 反应条件: 94℃ 4 min, 进入循环: 94℃ 1 min, 56℃ 40 s, 72℃ 1.5 min, 共 35 个循环, 最后 72℃延伸 10 min。

C.5 琼脂糖电泳

C.5.1 制备凝胶

1.0%琼脂糖在微波炉中溶化混匀，冷却至55℃左右。

C.5.2 加核酸染料

加入核酸染料，混匀，倒入已封好的凝胶平台上，插上样品梳。待凝胶凝固后，从制胶平台上除去封带，拔出梳子，加入足够量的1×TAE（缓冲液没过凝胶表面约1mm）。

C.5.3 加样

取4 μL 加样缓冲液与6 μL PCR 的反应产物混合，分别将其和5 μL-106 μL 的DNA 分子量标准物（DL 2000）加入样品孔中。

C.5.4 电泳

接通电源进行电泳。以加样缓冲液中溴酚蓝迁移距离为参照，对电泳时长进行控制。电泳程度达到足以对DNA 特异扩增片段进行清晰分辨时，停止电泳。将整个胶置于凝胶成像分析系统上观察结果，并拍照，参考图C.1。

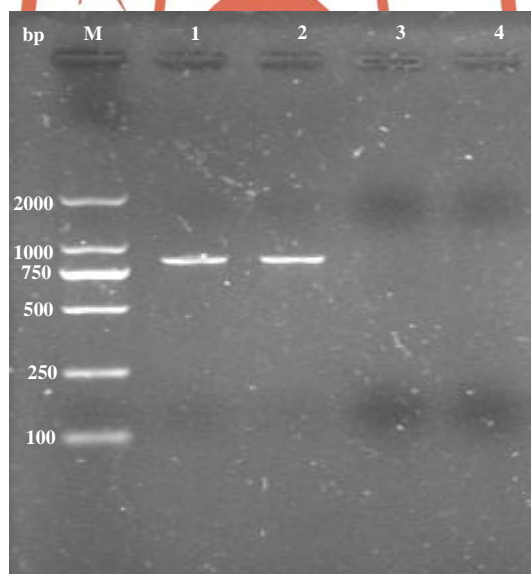


图 C.1 PCR 检测结果电泳图

注：M 为标准分子量（DL2000），1、2：阳性对照；3、4：空白性对照；

附录 D
(规范性附录)
香蕉枯萎病鉴定报告

D.1 香蕉枯萎病鉴定报告

香蕉枯萎病鉴定报告见表D.1。

表D.1 香蕉枯萎病鉴定报告

编号：

品种名称					
植物生育期		样品数量		取样部位	
取样地点		送检日期		送检人	
送检单位				联系电话	
检测鉴定方法：					
检测鉴定结果：					
备注：					
该报告检测结果只对取样样品负责					
鉴定人（签名）：					
审核人（签名）：					
鉴定单位盖章：					
年 月 日					
注：本单一式二份，检测单位和受检单位各一份。					

