

T/ZBXH

新疆维吾尔自治区植物保护学会团体标准

T/ZBXH 142—2025

甜菜根腐病镰刀菌分子检测与鉴定技术规 程

Technical code of practice for molecular detection and identification of fusarium spp.
of sugar beet root rot

2025 - 9 - 20 发布

2025 - 9 - 27 实施

新疆维吾尔自治区植物保护学会 发 布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件中某些内容可能涉及相关知识产权保护内容，本文件的发布机构不承担相关识别等责任。

本文件由新疆维吾尔自治区农业科学院植物保护研究所提出。

本文件由新疆维吾尔自治区植物保护学会归口。

本文件由新疆维吾尔自治区农业科学院植物保护研究所、中国农业大学起草。

本文件主要起草人：杨安沛，吴学宏，李广阔，张航，韩成贵，白微微，赵灿，曹禹，丁瑞丰，郝志刚，席欧彦，阿勒合斯·加尔得木拉提。

本文件适用于新疆维吾尔自治区内所有相关单位及组织，自愿采用。

本文件由采用本标准的单位及组织自行承担相关责任。

本文件由新疆维吾尔自治区植物保护学会负责解释。

本文件为首次公布。

甜菜根腐病镰刀菌分子检测与鉴定技术规程

1 范围

本文件规定了甜菜根腐病镰刀菌分子检测与鉴定的程序和方法。
本文件适用于甜菜根腐病镰刀菌的分子检测与鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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。

SN/T 2589 植物病原真菌检测规范。

3 术语和定义

3.1

甜菜根腐病 Sugarbeet root rot

由真菌或细菌侵染甜菜引起块根腐烂的一类根病的总称。

3.2

甜菜根腐病镰刀菌 Sugarbeet root rot *Fusarium*

引起甜菜根腐病的镰刀菌属病原菌，其种类有*Fusarium oxysporum*、*F. equiseti*、*F. solani*、*F. proliferatum*、*F. tricinctum*、*F. redolens*、*F. brachygibbosum*、*F. verticillioides*、*F. graminearum*、*F. nygamai*、*F. culmorum*等11种。

3.3

分子鉴定 Molecular identification

利用核酸技术对生物中细胞核或非核区特异性的DNA或RNA进行序列比较，从而区分生物的不同种属。

4 样品采集、分离、纯化和保存

4.1 样品采集

在甜菜种植区域采集疑似根腐病的甜菜病样，症状见附录A，记录采集时间和地点。

4.2 分离

甜菜根腐病菌分离方法见附录B。

4.3 纯化和保存

采用单孢分离法对分离得到的镰刀菌进行纯化和保存（见附录B）。

5 病原菌鉴定

5.1 形态学鉴定

对纯化后的镰刀菌在25℃培养4 d后的菌落直径、菌落颜色、产生色素颜色、大、小型分生孢子的大小及分隔情况、厚垣孢子的有无等几个方面进行形态学观察鉴定（见附录C）。

5.2 分子鉴定

采用真菌通用引物ITS1/ITS4对镰刀菌rDNA-ITS区域以及针对镰刀菌保守基因设计的引物EF1/EF2对镰刀菌EF-1 α 区域进行PCR扩增(见附录D)。将扩增产物连接后测序,测序结果在NCBI和Fusarium MLST数据库中进行BLAST比对分析,确定镰刀菌的种类。

6 病原菌致病性测定

6.1 甜菜植株培育

选取在温室中生长6周后长势一致的甜菜植株用于致病性试验(见附录B)。

6.2 病原菌回接、验证

6.2.1 镰刀菌孢子悬浮液制备

镰刀菌孢子悬浮液制备方法见附录B。

6.2.2 浸根接种

浸根接种方法见附录B。

6.2.3 病原再分离及验证

病原再分离及验证方法见附录B。

7 结果判定

与附录C描述的菌落及孢子等形态相似的分离物可初步判定是否为镰刀菌属。病原菌的ITS和EF-1 α 基因扩增产物与目的片段大小一致,且测序结果与数据库中镰刀菌的一致性超过99%,可判定镰刀菌的具体种类(见附录D)。

附录 A
(资料性)
甜菜根腐病症状

主要症状表现为甜菜地上部分叶片叶脉间黄化，整体变色，萎蔫，最后叶片完全焦枯，与健康植株相比明显矮小；地下部分主根尖端出现明显的黑色腐烂，维管束变褐色，根部内部组织变为浅褐色至深褐色，边缘深棕色至黑色，最后甜菜整株坏死。



图A.1 甜菜根腐病田间症状

^a A 病害前期地上部叶片萎蔫；B 地下部分主根尖端腐烂；C 左边为健康根部，右边为腐烂根部；D 根腐病危害后田间缺苗断垄

附录 B

(资料性)

甜菜根腐病分离、鉴定及致病性测定

B.1 主要仪器和试剂

B.1.1 主要仪器

电子天平、高压灭菌锅、光学显微镜、摇床、培养箱、超净工作台、高速冷冻离心机、PCR仪、凝胶成像系统、电泳仪等。

B.1.2 主要试剂

氨苄青霉素、Tris-HCl缓冲液、EDTA溶液、醋酸钠溶液、CTAB溶液、TE缓冲液、TAE缓冲液、无水乙醇、马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、水琼脂培养基(WA)、液体LB培养基、固体LB培养基；真菌基因组提取试剂盒、2×PCR Mix、DNA marker (DL 2000)、Premix Taq、克隆载体等。

B.2 样品采集、分离、纯化和保存

B.2.1 样品采集及分离

选取症状较为典型的病根，用自来水将泥土等附着物冲洗干净并晾干。选取甜菜根部病健交界处组织，将其切成5 mm×5 mm的小块。将切好的发病组织依次用70%乙醇浸泡40 s，无菌水洗涤1遍，0.5% NaClO浸泡3 min，无菌水充分洗涤3遍；然后置于灭菌滤纸上，放在超净工作台内吹干。将吹干的病块均匀摆放于直径为9 cm的PDA培养基（马铃薯葡萄糖琼脂培养基，含有50 μg/mL氨苄青霉素）上，每皿7个病块。放置于25℃恒温培养箱中12 h光照/黑暗条件下培养，每天观察一次分离结果并挑取菌落转接到新的PDA平板上培养，观察持续到分菌后第7 d。

B.2.2 纯化和保存

用接种针挑取少量菌丝，放入装有1 mL无菌水的1.5 mL Eppendorf管中，混匀；将混匀液体吸至载玻片上，盖上盖玻片，在10×显微镜下，统计孢子个数，用无菌水将孢子悬浮液浓度调节至每个视野内孢子数量为5个~10个；取调节浓度后的孢子悬浮液120 μL均匀涂在1.5%的WA平板上，放于25℃培养8 h；在超净工作台中将培养皿开盖后置于显微镜下观察，用解剖刀切取单个萌发产生芽管的分生孢子转移到新的PDA平板上，置于25℃的恒温培养箱中培养；纯化的镰刀菌在PDA平板上充分生长后，将PDA平板置于4℃下密封进行短期保存。从培养7 d左右的菌落边缘打孔，将菌饼置于灭菌的2 mL冻存管中并用灭菌的液体石蜡密封进行长期保存。

B.3 致病性测定

B.3.1 甜菜植株培育

将甜菜种子用5%NaClO浸泡5 min，然后用灭菌蒸馏水冲洗3次，晾干备用。将消毒的甜菜种子播种于装有灭菌土的花盆中，每盆4粒，播深2 cm，在温室中（平均温度25℃）培育，根据花盆中土壤的含水量平均7 d浇一次水。约5 d后，幼苗长出，约30 d~40 d后，幼苗长出四片真叶。在温室中生长6周后，挑选长势近似的甜菜植株用于致病性试验。

B.3.2 病原菌回接、验证

B.3.2.1 镰刀菌孢子悬浮液制备

将供试镰刀菌接种于PDA平板培养基上，于25℃下黑暗条件下培养7 d，取3/4培养皿的菌饼接入装有300 mL 液体SNA培养基的500 mL三角瓶内，置于25℃，160 rpm的摇床上培养72 h后，将摇培液用4层纱布过滤，收集滤液于灭菌的500 mL三角瓶中，用血球计数板计算孢子的浓度。用液体SNA培养基调整孢子浓度为 10^5 个/mL。

B.3.2.2 浸根接种

采用浸根接种法，具体操作如下：取长势相近的健康甜菜苗植株，洗净根部，将植株根系浸在 10^5 个/mL的孢子悬浮液中浸泡15 min，使根系与悬浮液充分接触，用液体SNA培养基浸根的甜菜作为空白对照。试验每处理3次重复，每重复10株。接种后温室遮阴3 d缓苗，之后培养条件与接种前保持一致。

B. 3. 2. 3 发病植株的病原再分离及验证

取接种6周后出现病害症状的甜菜根部病健交界处，对病根进行病原物的再分离、纯化，将其与原始接种菌株在生长速率、菌落颜色、孢子形态、孢子着生方式等方面进行形态学方面的比较(见附录C)，并采用引物ITS1/ITS4和EF1/EF2进行PCR扩增后测序(见附录D)，以明确接种镰刀菌即是引起甜菜根腐病的病原镰刀菌。



图B. 1 回接镰刀菌导致甜菜根腐病的症状

^b A 和 F: CK; B: *F. solani*; C: *F. oxysporum*; D: *F. oxysporum*; E: *F. oxysporum*; G: *F. proliferatum*; H: *F. brachygibbosum*; I: *F. redolens*; J: *F. solani*

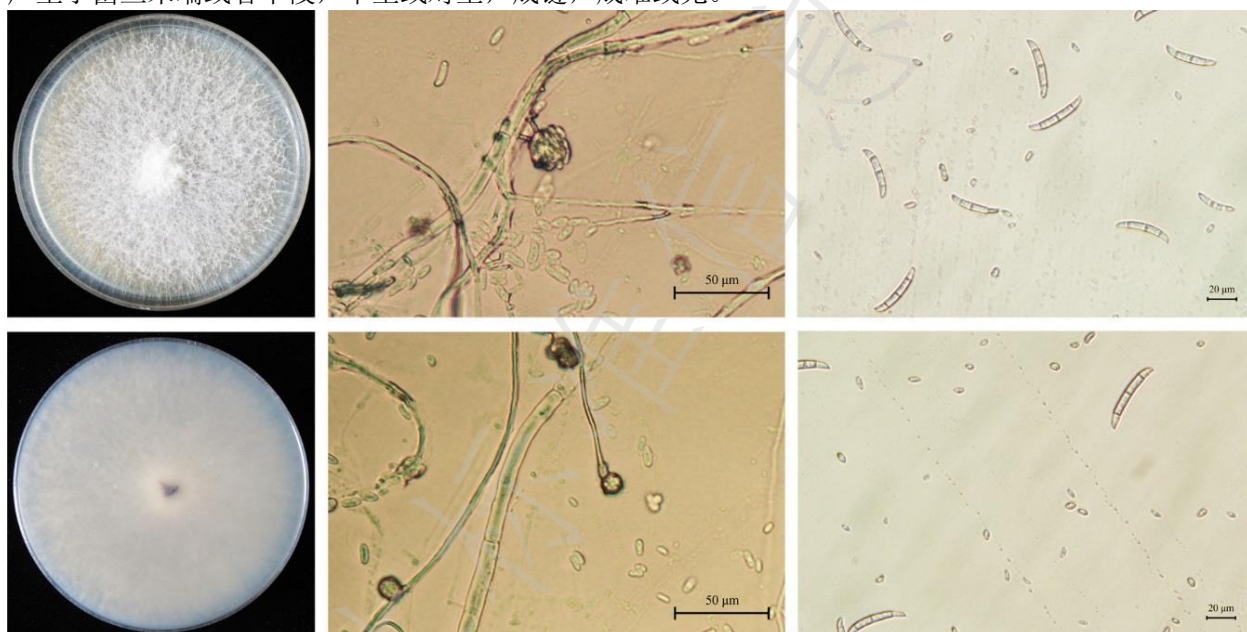
附录 C

(资料性)

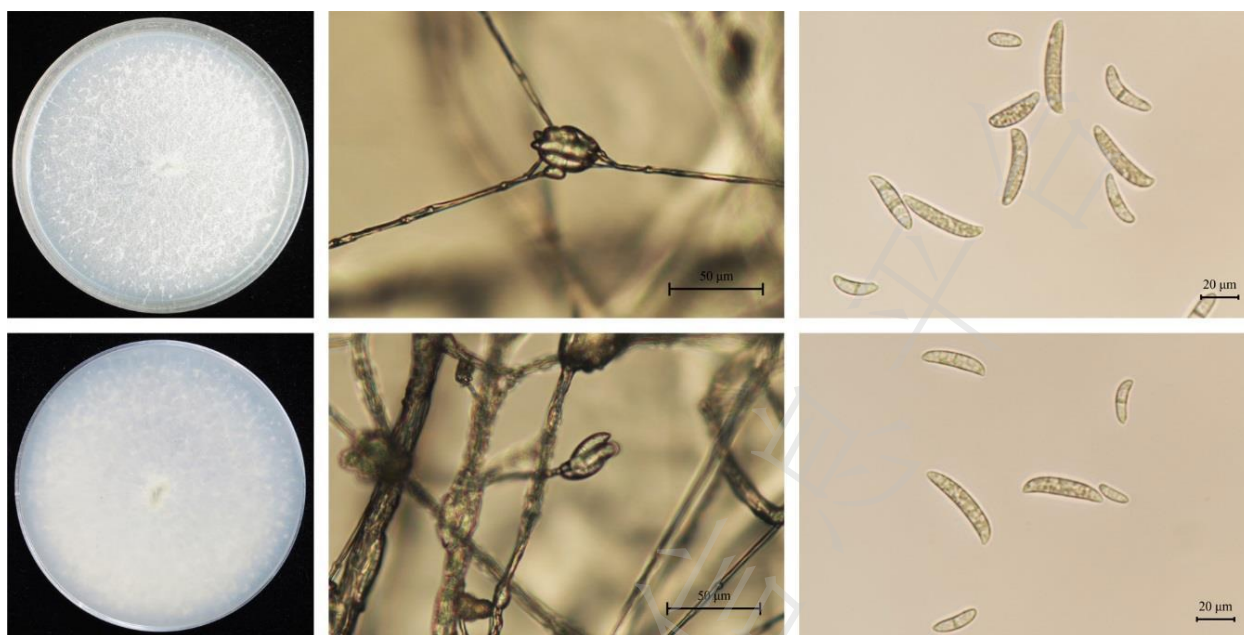
甜菜根腐病镰刀菌病原形态描述

C.1 尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum*

PDA平板培养4 d后，菌落直径在41.3 mm~54.2 mm之间，菌丝致密的绒毛状或者稀疏的絮状，产生苍白色到深紫色或浅粉色色素。大型分生孢子略微弯曲呈镰刀型，细长而壁薄，长24.87 μm ~38.17 μm ；小型分生孢子极其丰富，椭圆形，长椭圆形，肾脏形，0隔~1隔，长7.47 μm ~9.74 μm ；厚垣孢子产生于菌丝末端或者中段，单生或对生，成链，成堆或无。

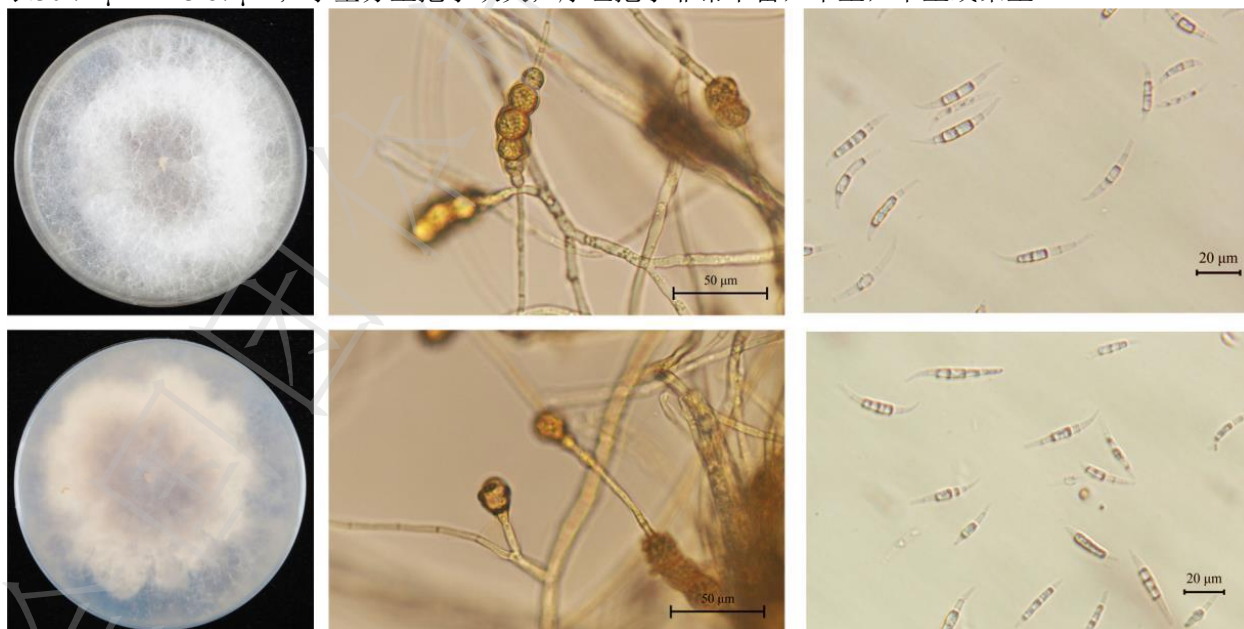
图C.1 *F. oxysporum* 菌落及孢子形态C.2 茄病镰刀菌 *F. solani*

PDA平板培养4 d后，菌落直径在36.1 mm~45.6 mm，短毡状或稀疏絮状，不产生色素，但菌落常产生有不规则墨绿色扇形斑，或墨绿色颗粒（分生孢子座）。大型分生孢子棍棒状，较宽，直或稍弯曲，两端钝圆，3隔~4隔，长27.10 μm ~40.76 μm ；小型分生孢子肾形，椭圆形或者长卵圆形，1隔，单瓶梗出，长10.24 μm ~13.27 μm ；厚垣孢子产生于菌丝中段，单生，少数串生。

图C. 2 *F. solani* 菌落及孢子形态

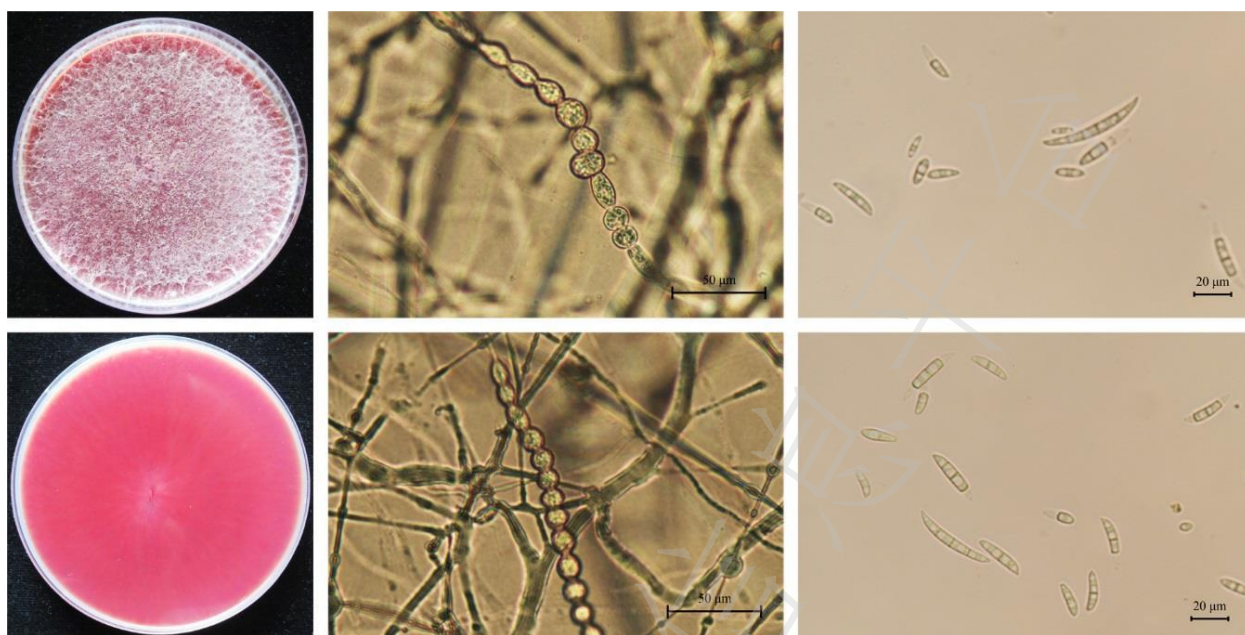
C. 3 木贼镰刀菌 *F. equiseti*

PDA平板培养4天后，菌落直径在36.7 mm~54.2 mm之间，菌丝均一致密，丛卷毛状，菌丝起初为白色，随菌落生长菌丝颜色逐渐加深，最终变为棕黄色，产生的色素颜色也同步逐渐加深，初为橘色，以后变为浅黄褐色，最后成深棕色。大型分生孢子长鞭状，顶细胞较尖，弯曲，足细胞明显，通常5隔，长30.72 μm~43.87 μm；小型分生孢子缺失；厚垣孢子非常丰富，单生，串生或聚生。

图C. 3 *F. equiseti* 菌落及孢子形态

C. 4 三线镰刀菌 *F. tricinctum*

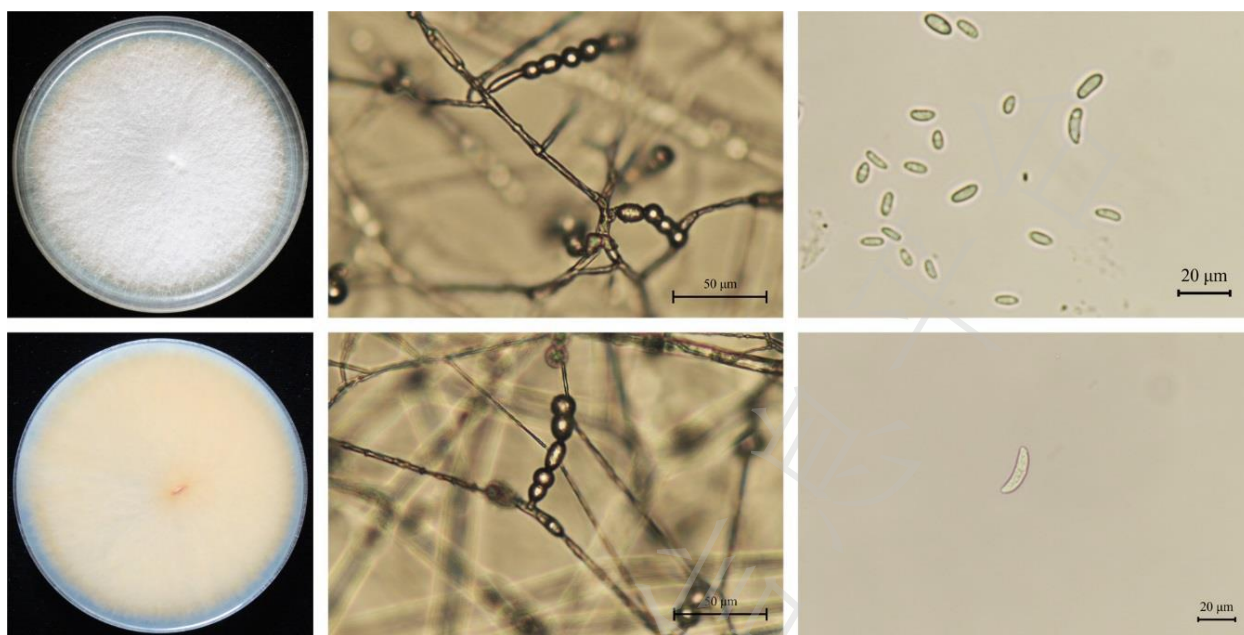
PDA平板培养4天后，菌落直径在31.4 mm~39.0 mm，菌落生长较缓慢，气生菌丝长，长毛状，菌丝起初为白色，随菌落生长菌丝颜色逐渐加深，最终变为红色，产生红色色素。大型分生孢子细长，两端尖，弯月状，足细胞明显，3隔~5隔，长27.77 μm~45.12 μm；小型分生孢子常缺失，若产生为长椭圆形或纺锤形，0分隔或1分隔，长9.16 μm~11.25 μm；厚垣孢子簇生或串生。

图C. 4 *F. tricinctum* 菌落及孢子形态C. 5 海枣镰刀菌 *F. brachygibbosum*

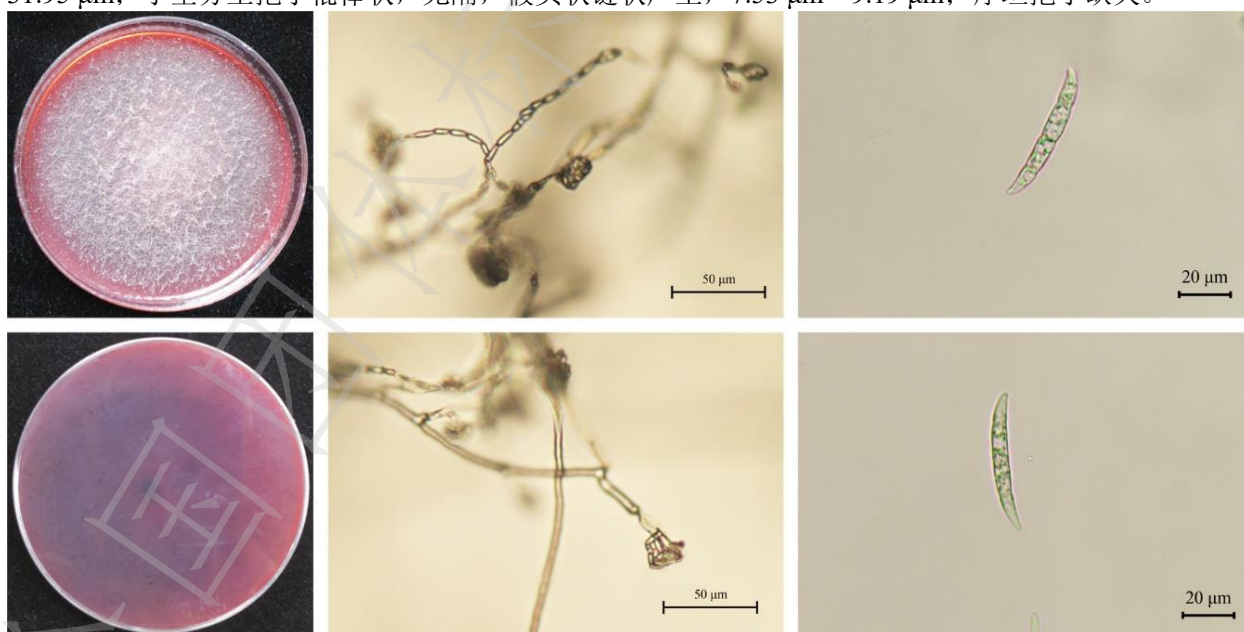
PDA平板培养4天后，菌落直径在55.8 mm~61.6 mm，菌丝茂盛，棉絮状，不产色素或产生红色色素。大型分生孢子稀缺、分散，香蕉形两端尖，分隔处缢缩，多3分隔，长22.85 μm~28.17 μm；小型分生孢子卵圆形、梭型或肾脏型，0分隔或1分隔，长6.38 μm~9.47 μm；厚垣孢子间生、单生或串生。

图C. 5 *F. brachygibbosum* 菌落及孢子形态C. 6 芬芳镰刀菌 *F. redolens*

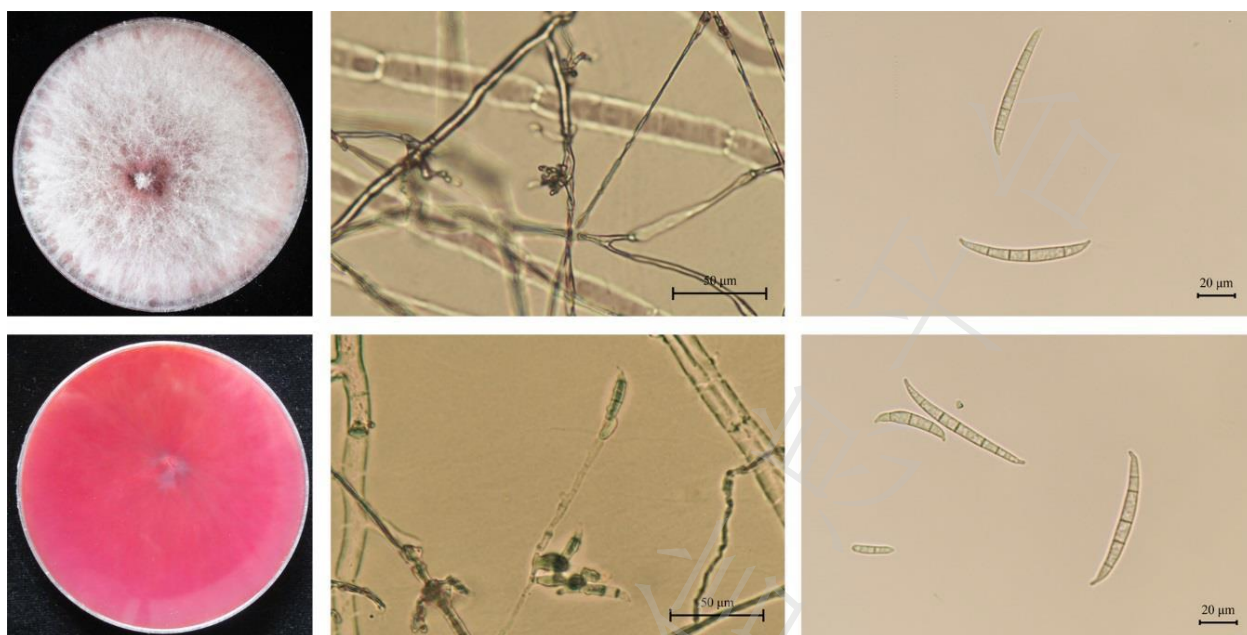
PDA平板培养4天后，菌落直径在43.3 mm~48.5 mm之间，菌丝呈致密绒毛状，产生荧光黄色色素。大型分生孢子钩状，产生极少，长31.63 μm~43.28 μm；小型分生孢子纺锤型，两端尖，0分隔或1分隔，长6.79 μm~11.70 μm；厚垣孢子常生长于菌丝末端，成链。

图C.6 *F. redolens* 菌落及孢子形态C.7 再育镰刀菌 *F. proliferatum*

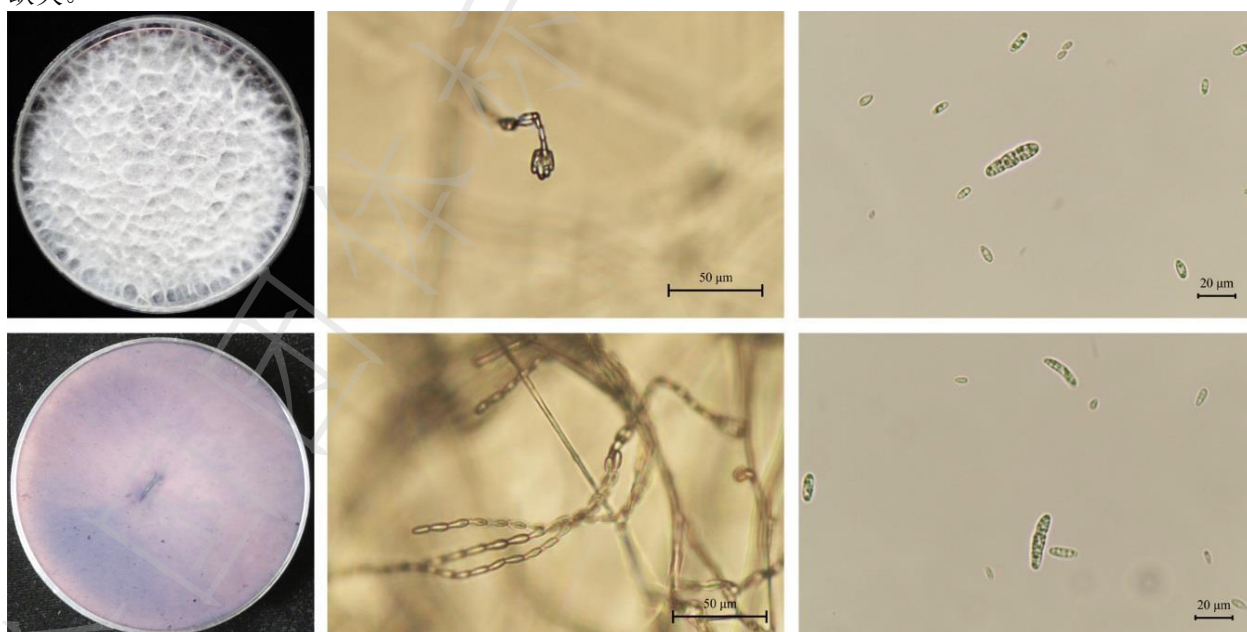
PDA平板培养4天后，菌落直径在51.4 mm~57.9 mm之间，菌丝棉絮状，边缘清晰，菌丝白色至紫色，产生紫色色素。大型分生孢子较直且细长，顶细胞弯曲，足细胞不明显，3隔~5隔，长23.75 µm~31.95 µm；小型分生孢子棍棒状，无隔，假头状链状产生，7.53 µm~9.19 µm；厚垣孢子缺失。

图C.7 *F. proliferatum* 菌落及孢子形态C.8 禾谷镰刀菌 *F. graminearum*

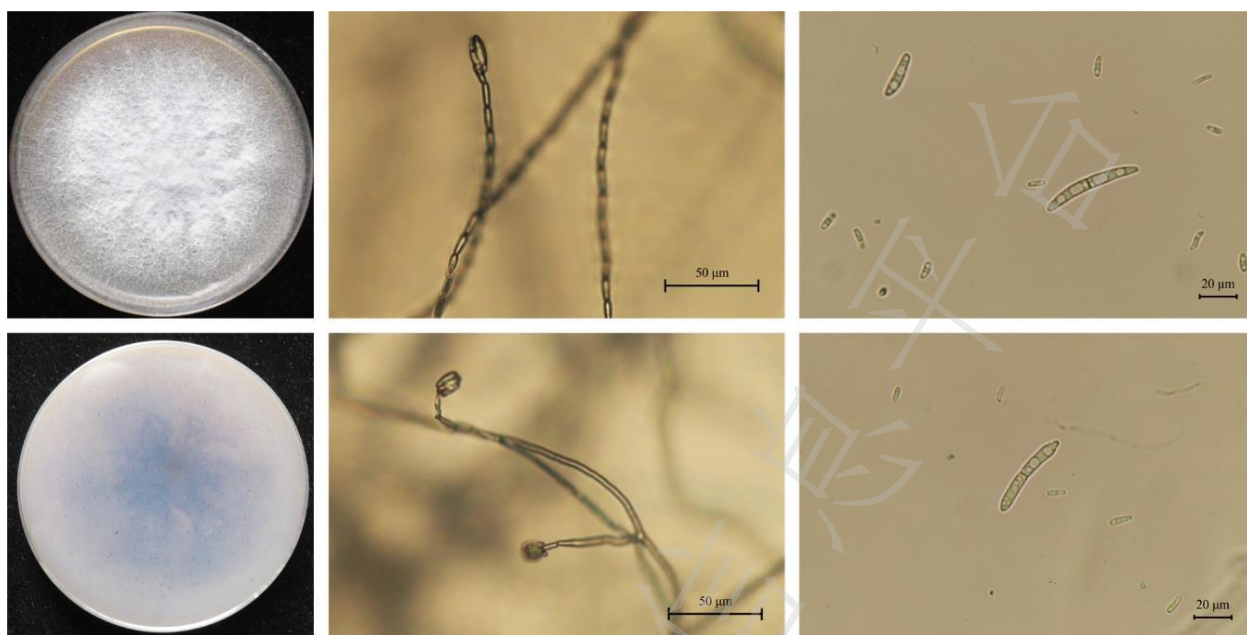
PDA平板培养4天后，菌落直径在23.7 mm~52.2 mm之间，菌丝白色、橘红色或黄色，产生明显红色色素。大型分生孢子边缘粗糙，5隔~6隔，壁薄，直或略微弯曲；小型分生孢子及厚垣孢子较少见。

图C.8 *F. graminearum* 菌落及孢子形态C.9 轮枝样镰刀菌 *F. verticillioides*

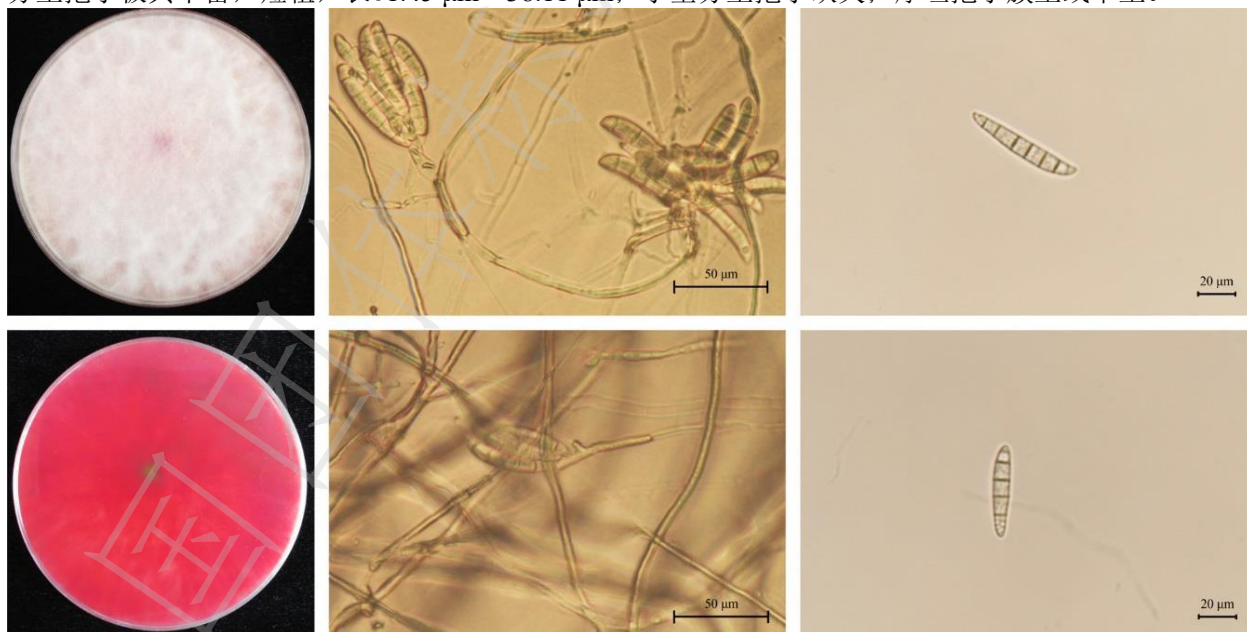
PDA平板培养4天后，菌落直径在46.7 mm~50.2 mm之间，菌丝白色，产生紫色色素，生长后期可能会产生墨绿色的菌核。大型分生孢子极少，细长；小型分生孢子丰富，0隔~1隔，呈链状；厚垣孢子缺失。

图C.9 *F. verticillioides* 菌落及孢子形态C.10 *F. nygamai*

PDA平板培养4天后，菌落直径在49.1 mm~51.6 mm之间，菌丝白色，产生浅紫色或灰紫色色素。大型分生孢子3隔，壁薄，镰刀状，长25.64 μm~31.07 μm；小型分生孢子卵圆形，无隔，长7.10 μm~8.86 μm；厚垣孢子稀缺。

图C. 10 *F. nygamai* 菌落及孢子形态C. 11 黄色镰刀菌 *F. culmorum*

PDA平板培养4天后，菌落直径在71.5 mm~72.3 mm之间，菌丝白色，产生明显的红色色素。大型分生孢子极其丰富，短粗，长31.45 µm~38.11 µm；小型分生孢子缺失；厚垣孢子簇生或串生。

图C. 11 *F. culmorum* 菌落及孢子形态

附 录 D
(规范性)
PCR 扩增反应及凝胶电泳检测

D. 1 基因组 DNA 的提取

采用CTAB法（Das *et al.*, 2014）提取真菌基因组DNA。

D. 2 引物序列见表 D. 1。

表D. 1

引物名称	引物序列
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
EF1	5'-ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC-3'
EF2	5'-GGA(G/A) GTACCAGT(G/C)ATCATGTT-3'

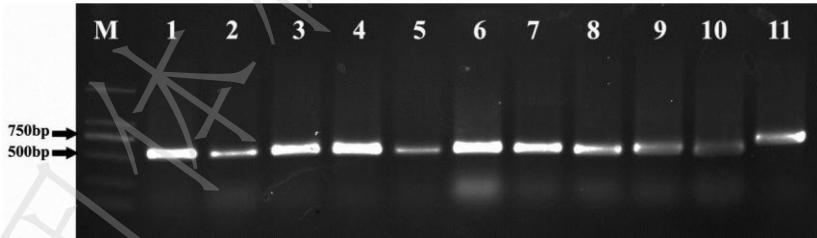
D. 3 PCR 反应

rDNA-ITS区域PCR扩增反应体系（总体积25 μL）：2×PCR mix buffer 12.5 μL，模板DNA 1 μL，引物各1 μL（10 ng），ddH₂O 9.5 μL。扩增条件：94℃预变性3 min；94℃变性40 s，56℃退火40 s，72℃延伸1 min，共30个循环； 72℃延伸10 min。

EF-1α区域PCR扩增反应体系（总体积25 μL）：2×PCR mix buffer 12.5 μL，模板DNA 1 μL，引物各1 μL（10 ng），ddH₂O 9.5 μL。扩增条件：94℃预变性3 min；94℃变性40 s，53℃退火40 s，72℃延伸1 min，共30个循环； 72℃延伸10 min。

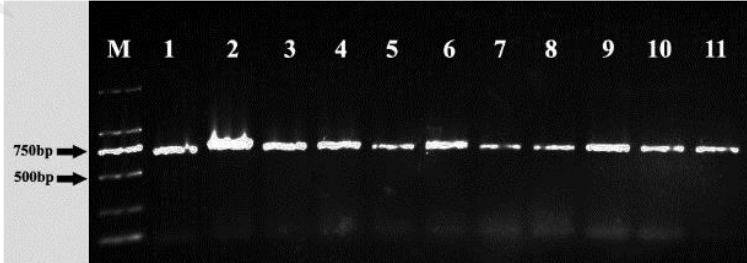
D. 4 凝胶电泳检测

PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测目的片段大小，并送测序公司测序。



图D. 1 rDNA-ITSPCR 扩增产物琼脂糖电泳检测（引自曹莎，2018）

^a M: DNA marker (DL2000); 1: *F. oxysporum*; 2: *F. equiseti*; 3: *F. solani*; 4: *F. proliferatum*; 5: *F. tricinctum*; 6: *F. redolens*; 7: *F. brachygibbosum*; 8: *F. verticillioides*; 9: *F. graminearum*; 10: *F. nygamai*; 11: *F. culmorum*



图D. 2 EF-1α PCR 扩增产物琼脂糖电泳检测（引自曹莎，2018）

^b M: DNA marker (DL2000); 1: *F. oxysporum*; 2: *F. equiseti*; 3: *F. solani*; 4: *F. proliferatum*; 5: *F. tricinctum*; 6: *F. redolens*; 7: *F. brachygibbosum*; 8: *F. verticillioides*; 9: *F. graminearum*; 10: *F. nygamai*; 11: *F. culmorum*

参 考 文 献

- [1] 吴学宏, 郝京京, 王红梅, 等. 西瓜枯萎病菌几种接种方法比较试验[J]. 长江蔬菜, 2003, (3): 38-39.
- [2] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [3] Leslie J F, Summerell B A. The *Fusarium* laboratory manual [M]. London: Blackwell Press, 2007.
- [4] Harveson R M, Rush C M. Characterization of *Fusarium* root rot isolates from sugar beet by growth and virulence at different temperatures and irrigation regimes [J]. Plant Disease, 1998, 82(9): 1039-1042.
- [5] Fiely M B, Correll J C, Morelock T E. Vegetative compatibility, pathogenicity, and virulence diversity of *Fusarium oxysporum* recovered from spinach [J]. Plant Disease, 1995, 79(10): 990-993.
- [6] 彭姗, 吕学莲, 高峰, 等. 一种新的棉花黄、枯萎病快速接种方法的研究[J]. 棉花学报, 2008, 20 (3): 174-178.