



中华人民共和国国家标准

GB/T ****—****

玉米南方锈病病原菌检测鉴定方法

Method for detection and identification of the pathogen of southern corn rust

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

（注：征求意见时必须保留这句话。）

20**-**-** 发布

20**-**-** 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会

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。

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专利的责任。

本文件由中华人民共和国农业农村部提出并归口。

本文件起草单位：江苏省农业科学院、全国农业技术推广服务中心、江苏省种子管理站、伊犁哈萨克自治州农业科学研究所。

本文件主要起草人：季英华、李硕、周阳、任春梅、张玉明、任磊、张学慧、周冬梅、邓晟、程兆榜、陈艳萍、王海涛、陆芳、魏利辉。

玉米南方锈病病原菌检测鉴定方法

1 范围

本文件描述了玉米南方锈病病原菌检测鉴定的原理、主要仪器和试剂、形态学鉴定、分子生物学鉴定和结果判定。

本文件适用于玉米南方锈病病原菌的检测鉴定。

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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

玉米南方锈病 Southern Corn Rust

一种由多堆柄锈菌（*Puccinia polysora* Underw.）侵染引起，在植株叶片、叶鞘、苞叶和雄穗等部位产生锈状病斑症状的玉米真菌病害。

4 原理

4.1 形态学鉴定原理

利用盐酸处理病原菌夏孢子，在显微镜下观察，所有夏孢子的原生质体均与细胞壁分离，收缩为球状团块，根据此形态特征，可判定为玉米南方锈病病原菌。

4.2 分子生物学鉴定原理

通过对病原菌的内部转录间隔区（ITS）序列特定区域设计引物，进行PCR扩增，获得特异性DNA片段，经测序比对，与多堆柄锈菌标准序列相似性大于98%，可判定为玉米南方锈病病原菌。

5 主要仪器和试剂

5.1 主要仪器

5.1.1 显微镜

放大倍数100倍、200倍、400倍。

5.1.2 离心机

转速不低于12000 r/min。

5.1.3 PCR 仪

温度范围4℃~100℃。

5.1.4 电泳仪

5.1.5 凝胶成像仪

5.1.6 电子天平

精度0.001 g。

5.2 主要试剂

除有特殊说明外，所有试剂均为分析纯或生化试剂。试验用水符合GB/T 6682中二级水的规定。

5.2.1 盐酸检测液

浓盐酸（36%~38%）与蒸馏水按体积比为95: 5配制。

5.2.2 DNA 提取试剂

2×CTAB提取缓冲液：2%（W/V）CTAB，100 mmol/L Tris（pH 8.0），20 mmol/L EDTA，1.4 mol/L NaCl。

5.2.3 PCR 分子试剂

Taq DNA聚合酶、dNTP、引物。

5.2.4 电泳缓冲液 TBE

在1000 mL蒸馏水中加入Tris 54 g、硼酸27.5 g、0.5 mol/L EDTA（pH 8.0）20 mL，电泳时使用蒸馏水10倍稀释，即为0.5×TBE。

5.2.5 琼脂糖凝胶

在0.5×TBE工作液中加入1%（W/V）琼脂糖，加热融化，冷却至60℃倒入已插入制胶板的胶槽中，冷却凝固后点样电泳。

5.2.6 上样缓冲液

取溴百里酚蓝 0.025 g，乙二醇 3 g，加 10 mL 蒸馏水。

6 形态学鉴定

6.1 样品采集

在田间观察玉米等禾本科植物的叶片或叶鞘处是否有铁锈色孢子堆。采集有典型症状（附录 A）或疑似症状的样本进行形态学鉴定。

6.2 鉴定方法

挑取少量新鲜夏孢子粉，置于载玻片上，滴加盐酸检测液（5.2.1）使其充分散开，盖上盖玻片，于 10 倍×10 倍和 10 倍×40 倍显微镜（5.1.1）下观察原生质体收缩情况。选取 3 个视野，每个视野随机选取 50 个~80 个夏孢子，统计原生质体发生变化的个数，并计算比例，每个处理重复 3 次，以蒸馏水处理为对照。

6.3 结果判定

夏孢子粉经 6.2 处理后，原生质体可与细胞壁分离，收缩为球状团块，且发生变化的比例为 100%（附录 A），可判定为玉米南方锈病病原菌。

7 分子生物学鉴定

7.1 样品采集

采集典型症状（附录 A）或疑似症状的叶片，或夏孢子粉，进行分子生物学鉴定。

7.2 DNA 提取

称取 0.1 g 病叶组织或夏孢子粉，采用 CTAB 法或试剂盒法提取 DNA，具体方法按附录 B。

7.3 PCR 扩增

PCR 反应体系、扩增程序及引物序列按附录 B。

7.4 结果判定

扩增产物在 375 bp 左右处出现条带，空白对照无条带出现，其序列与多堆柄锈菌标准序列（附录 B）相似性大于 98%，可判定为玉米南方锈病病原菌。

附录 A

（资料性）

多堆柄锈菌的相关资料

A.1 分布

北美洲、南美洲、非洲；泰国，菲律宾，中国南部的海南、广西、台湾等，中国黄淮海夏玉米种植区等。

A.2 寄主植物

玉米等禾本科植物。

A.3 传播途径

病原菌以冬孢子在病残体上、土壤中或其他寄主上越冬。翌年条件适宜时，冬孢子萌发产生担孢子侵入幼叶，形成性子器，后在病斑背面产生锈子器，器内锈孢子飞散传播后，在叶片上有水珠时萌发，也可从叶片侵入，形成夏孢子堆和夏孢子，夏孢子借气流传播，进行多次再侵染。玉米接近收获时，在产生夏孢子堆的地方，形成冬孢子堆，又以冬孢子越冬。7月~8月雨季易发病。

A.4 发病症状

病原菌侵染后，在叶片上初生褪绿小斑点，很快发展成为黄褐色突起的疱斑，即病原菌夏孢子堆。与普通锈病不同的症状特点主要有，夏孢子堆生于叶片正面，数量多，分布密集，很少生于叶片背面（图 A.1）。有时叶背出现少量夏孢子堆，但仅分布于中脉及其附近。夏孢子堆圆形、卵圆形，比普通锈病的夏孢子堆更小，色泽较淡。覆盖夏孢子堆的表皮开裂缓慢而不明显。发病后期，在夏孢子堆附近散生冬孢子堆。冬孢子堆深褐色至黑色，常在周围出现暗色晕圈。冬孢子堆的表皮多不破裂。



图 A.1 玉米南方锈病的症状（A：叶片，B：叶鞘）

A.5 孢子形态

夏孢子椭圆形或卵形，少数近圆形，单孢。(28~38) μm × (23~30) μm ，壁厚 1 μm ~1.5 μm ，淡黄色到金黄色，上有细突起，芽孔腰生，4 个~6 个；冬孢子形状不规则，常有棱角，多为近椭圆形或近倒卵球形，(30~50) μm × (18~30) μm ，顶端圆或平截，基部圆或狭，隔膜处略缢缩，表面光滑，栗褐色，壁厚 1 μm ~1.5 μm ，中间一个隔膜（图 A.2）。当使用盐酸检测液（5.2.1）处理多堆柄锈菌夏孢子时，夏孢子原生质体可与细胞壁分离，收缩为球状团块，且发生变化的比例为 100%（图 A.3）。

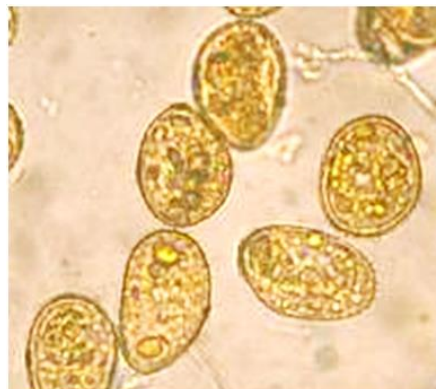


图 A.2 多堆柄锈菌 *Puccinia polysora* Underw.的孢子形态

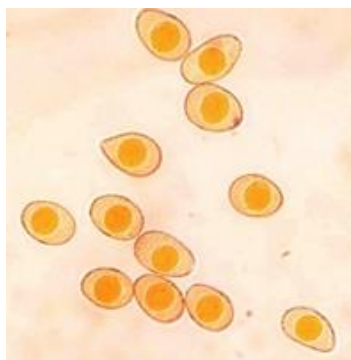


图 A.3 盐酸处理后显微镜观察多堆柄锈菌夏孢子原生质体形态

附 录 B

（规范性）

分子检测方法

B.1 DNA 提取

B.1.1 CTAB法

称取0.1 g样品（7.1）用液氮研成粉末，移入2 mL离心管中，加入预热的800 μL 2 $\times$ CTAB提取缓冲液（5.2.2）后吹打或振荡混匀，立即置于65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育15 min。加入等体积的氯仿/异戊醇（24:1），充分振荡混匀30 s，12000 r/min离心（5.1.2）5 min后取上清液，加入0.8倍~1倍体积的异丙醇，轻轻混匀30 s，12000 r/min离心（5.1.2）5 min，弃去上清液，加入500 μL 70%乙醇洗涤沉淀物2次，室温干燥10 min~20 min后，加入50 μL ~100 μL 无菌双蒸去离子水（ddH₂O，含10 mg/mL RNase）充分溶解，备用。

B.1.2 试剂盒法

选用合格的DNA提取试剂盒，按其说明书进行操作。

B.2 引物信息

多堆柄锈菌的检测引物信息见表B.1。

表 B.1 玉米南方锈病病原菌检测引物信息

引物名称	序列（5'-3'）	扩增长度（bp）	退火温度（ $^{\circ}\text{C}$ ）
HN-ITS-F	TTGAAATCTGCATTATCCCC	375	52~54
HN-ITS-R	GCTCCAAGAACTTCCTCCTC		

B.3 PCR 扩增

25 μL PCR反应体系及程序见表B.2。以ddH₂O作空白对照，每个样品设置3个重复。PCR反应体系也可采用商业化试剂盒，按其说明书进行操作。

表 B.2 PCR 反应体系及程序

组分	加入量（ μL ）
10 $\times$ PCR Buffer（含有 Mg^{2+} ）	2.5
40 mmol/L dNTPs（每种 10 mmol/L）	0.5
HN-ITS-F（10 $\mu\text{mol/L}$ ）	0.5
HN-ITS-R（10 $\mu\text{mol/L}$ ）	0.5
<i>Taq</i> DNA 聚合酶（5 U/ μL ）	0.5
DNA（1 ng~100ng）	3
ddH ₂ O	17.5

PCR 仪（5.1.3）反应程序：94℃预变性 5 min；94℃变性 30 s，52℃～54℃退火 30 s，72℃延伸 30 s，循环 34 次；72℃延伸 10 min，4℃保存。

B.4 电泳检测

配制 1%琼脂糖凝胶（5.2.5），浸没入电泳缓冲液（5.2.4）中，将 5 μL PCR 产物与 1 μL 上样缓冲液（5.2.6）混合加入样品孔中，电泳仪（5.1.4）电压 100 V 电泳 30 min。核酸染料染色 10 min，凝胶成像仪（5.1.5）拍照观察。

B.5 序列比对

测定扩增产物序列，序列比对参照的多堆柄锈菌标准序列信息如下：

atacactatg aaacttgaat gatcatatat aaattatcat aacttttaac aatggatctc ttggctctca catcgatgaa
gaacacagtg aaatgtgata agtaatgtga attgcagaat tcagtgaatc attgaatctt tgaacgcacc ttgcaccttt tggatttcca
agaggtagac ctgtttgagt gtcataaac ccttctcatt attaaattta ttttaatat tggatgttga atgttgcaaa atgaagttca
tttgctcat tttaaatgca acaaagtat attcaggaaa agaaaaaaaa aaaggaaact cagatggagt ggattgactt gatgtgtaat
aatgtttta actg
