

ICS 65.020.01
CCS B 04

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4931—2025

瓜类种苗种传病害检测技术规程

Technical code of practice for detection of seed-transmitted diseases
of cucurbitaceous crop

2025-12-09 发布

中华人民共和国农业农村部 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。

本文件由农业农村部种业管理司提出。

本文件由全国农作物种子标准化技术委员会(SAC/TC 37)归口。

本文件起草单位：北京市农林科学院蔬菜研究所、全国农业技术推广服务中心、北京蔬菜学会、山东寿光市农业农村局、山东寿光蔬菜种业集团有限公司。

本文件主要起草人：徐秀兰、邱艳红、晋芳、金石桥、任雪贞、芦钰、景琦、孙全、张海军、耿丽华、夏阳、王红阳、范立国、都明霞、韩化雨、程琳。



瓜类种苗种传病害检测技术规程

1 范围

本文件规定了西瓜、甜瓜、黄瓜、南瓜、瓠瓜、西葫芦等瓜类作物重要种传病原微生物的检测流程、检测方法、结果判定、样品及资料保存。

本文件适用于瓜类蔓枯病病原菌(*Didymella bryoniae*)、瓜类果斑病病原菌(*Acidovorax citrulli*)、黄瓜细菌性角斑病病原菌(*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*)、黄瓜绿斑驳花叶病毒(cucumber green mottle mosaic virus, CGMMV)、黄瓜花叶病毒(cucumber mosaic virus, CMV)、甜瓜坏死斑点病毒(melon necrotic spot virus, MNSV)、南瓜花叶病毒(squash mosaic virus, SqMV)和小西葫芦黄花叶病毒(zucchini yellow mosaic virus, ZYMV)的检测。

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 3543.2 农作物种子检验规程 第2部分:扦样

GB/T 28071—2011 黄瓜绿斑驳花叶病毒检疫鉴定方法

GB/T 36781—2018 瓜类种传病毒检疫鉴定方法

GB/T 36822—2018 瓜类果斑病菌检疫鉴定方法

GB/T 36853—2018 黄瓜细菌性角斑病菌检疫鉴定方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

检测样品 working sample

实验室的送验样品中分取用于某个检测项目的样品。

3.2

次级样品 subsample

从检测样品中分取的部分大小适宜的样品。

3.3

感染水平 infection level

携带病原物的种子数量占检测种子总数的比率。

4 方法原理

微生物形态、蛋白、核酸的特征是检测鉴定种传病害的依据。根据真菌、细菌的生物学特性、寄主范围及危害症状等进行分离培养;根据细菌、病毒的蛋白与抗体之间的特异性反应进行免疫学检测;根据真菌、细菌、病毒的特定核酸序列进行分子生物学检测。瓜类种传病害症状相关信息见附录 A,病原真菌、细菌培养形态相关信息见附录 B。

5 主要仪器设备和试剂

5.1 仪器设备

PCR 仪、实时荧光 PCR 仪、超净工作台、高压灭菌锅、恒温培养箱、显微镜、离心机、超低温冰箱、电泳仪、凝胶成像系统等。

5.2 主要试剂

除另有规定外,所有试剂均为分析纯。磷酸缓冲液(pH 7.0)及培养基配制按照附录 C 的规定执行。PCR 凝胶电泳检测的反应体系试剂要求见附录 D。实时荧光 PCR 检测反应体系试剂要求见附录 E 的规定。瓜类种传病毒酶联免疫检测相关试剂按照 GB/T 36781 的规定执行。

6 取样

6.1 种子扦样

按照 GB/T 3543.2 进行种子扦样,送验样品量应达到病害检测样品量要求,扦样过程中应避免由扦样用具造成的样品污染,扦取不同样品应对扦样用具进行消毒处理或更换扦样用具。

瓜类种传病害检测适用于未经过任何处理的种子样品。种子检测样品量和病害的感染水平有关,为确保种传病害检测到的概率为 95%或 99%,可根据病害的感染水平或健康的容许水平确定检测样品量,见附录 F。可根据种子的千粒重推算出所取样品的重量。

6.2 种苗取样

具有典型或疑似症状的幼苗,单株取样,加贴标识。无症状幼苗,随机采样,10 株~20 株为一组,加贴标识。

7 检测方案

7.1 检测流程

种子扦样或种苗取样获得检测样品,根据检测的目标病害,按照图 1 瓜类种传病害检测流程进行检测。

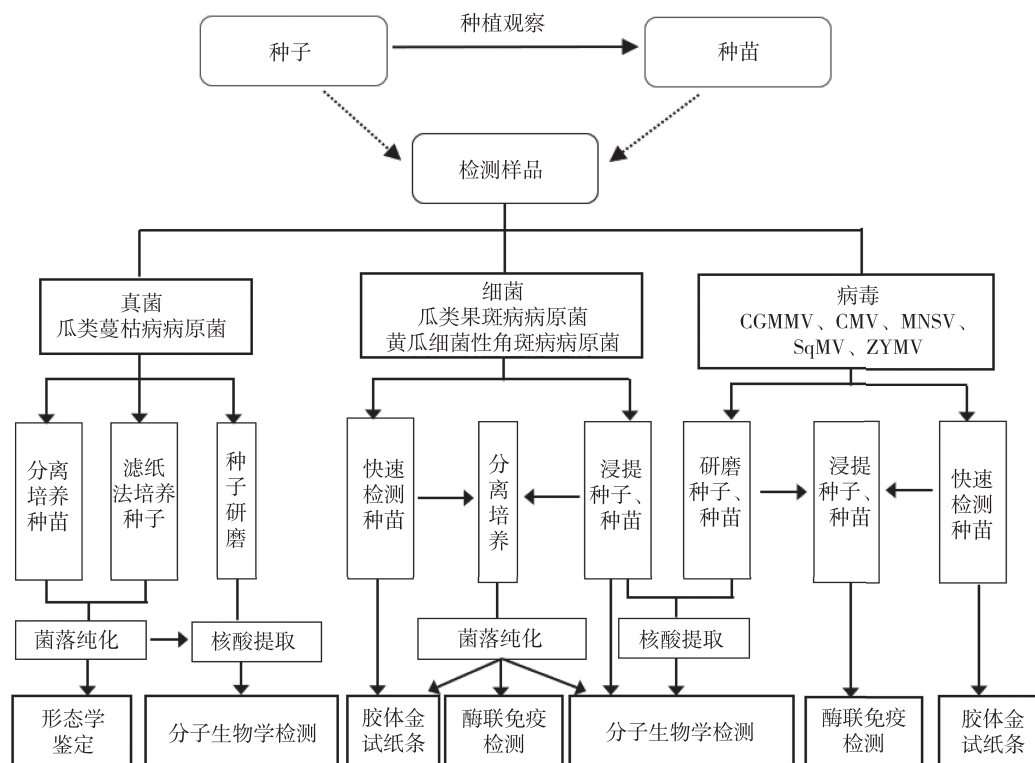


图 1 瓜类种传病害检测流程

7.2 种植观察与种苗快速检测

瓜类蔓枯病、瓜类果斑病、黄瓜细菌性角斑病及瓜类病毒病均可通过种植观察方法进行检测。

7.2.1 种植条件

种子播种于灭菌土,环境温度控制在 24 ℃ ~ 35 ℃,保持温室自然光照,或者人工气候室设置 12 h 光照,12 h 黑暗。对于瓜类蔓枯病、瓜类果斑病、黄瓜细菌性角斑病检测,环境相对湿度应保持 70% 以上。种植 18 d ~ 30 d,观察症状。瓜类病毒病症状观察时间可延长。

7.2.2 苗期症状观察

出苗后,定期对幼苗进行症状观察。对出现疑似症状的幼苗可按照 7.1.3 进行快速检测,典型症状见附录 A;无症状幼苗按照 6.2 种苗取样,分组进行实验室检测。

- a) 瓜类蔓枯病典型症状:子叶黄褐色或青灰色圆形或不规则形斑。
- b) 瓜类果斑病与黄瓜细菌性角斑病典型症状:子叶出现水浸状病斑,穿孔,真叶褐色至黑色病斑。
- c) 瓜类病毒病典型症状:叶片花叶、褪绿、黄化、皱缩、畸形。

7.2.3 快速检测

对于有商品化免疫胶体金试纸条的病害,可按照使用说明书进行现场快速检测及初步结果判读。

7.3 瓜类蔓枯病检测

7.3.1 样品制备

对于种子样品,可划分为 100 粒~500 粒种子的次级样品,进行分离培养检测或分子生物学检测。

对于有疑似症状的幼苗或植株样品,刮取病斑部位病原菌,进行显微镜镜检观察及分离培养检测。

7.3.2 分离培养检测

种子样品采用 0.5% 次氯酸钠浸泡 10 min,无菌水冲洗 3 遍,用灭菌滤纸吸干种子表面水分。将灭菌滤纸置于培养皿中加入无菌水浸湿,种子间距 2 cm 以上,置于 25 ℃ 恒温黑暗培养 10 d,取出培养皿光照条件下培养 4 d,待种子上长出菌落后,挑选疑似菌落,接种 PDA 培养基进行分离纯化。

对于幼苗或植株样品,切取病健交界处组织,表面消毒后放入 PDA 培养基进行病原菌分离培养。

挑取疑似菌落进行转接纯化,菌落形态特征见附录 B,纯化菌株进行形态学鉴定和分子生物学检测确认。

7.3.3 分子生物学检测

种子样品用微型粉碎机进行研磨,取 3 g~5 g 粉末加入液氮研磨,提取种子总 DNA 进行分子生物学检测。参照 7.2.2 分离培养获得的疑似菌株,收集真菌菌丝提取 DNA 进行检测。DNA 提取可采用 CTAB 方法或商品化 DNA 提取试剂盒提取,提取的 DNA 保存在 -20 ℃ 备用。

种子样品直接提取核酸检测宜采用实时荧光 PCR 方法;菌株鉴定确认可采用 PCR 凝胶电泳检测或实时荧光 PCR 检测。PCR 凝胶电泳具体检测步骤参照附录 C 的规定执行。实时荧光 PCR 检测具体步骤参照附录 D 的规定执行。分子生物学检测以瓜类蔓枯病菌菌株 DNA 为阳性对照,以双蒸水为阴性对照。

7.4 瓜类果斑病与黄瓜细菌性角斑病检测

7.4.1 样品制备

对于种子样品,可划分为 500 粒~1 000 粒种子的次级样品,进行分离培养检测或分子生物学检测。

对于带有疑似症状的幼苗或植株,显微镜下观察病健交接处组织是否有溢菌现象。有溢菌现象,进行分离培养、免疫学检测或分子生物学检测。

7.4.2 分离培养检测

种子样品用微型粉碎机轻微破碎(至 2/3 以上种子破碎)或直接浸提,加入适量磷酸缓冲液或无菌水,使种子完全浸没,室温振荡 4 h(100 r/min 左右)或 4 ℃ 浸泡过夜,收集缓冲液并通过 1 000 r/min 离心 1 min~5 min,去沉淀,取清液 10 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,管中沉淀加入 1 mL ~ 2 mL 无菌水悬浮制成样品浸提液。

幼苗或植株样品,选取样品病健交界处的新鲜组织,用 75% 的乙醇进行表面消毒晾干,切成 0.5 cm × 0.5 cm 左右的小块,放入装有无菌水的 EP 管中,涡旋振荡 30 s 以上,制成样品浸提液。

制备的种子或植株样品浸提液进行 10 倍梯度稀释 3 次,用灭菌接种环蘸取样品浸提液原液在培养基

上划线,每个梯度稀释液取 100 μL 涂布培养皿,重复 3 次。瓜类果斑病检测使用 KB 培养基和半选择性 EBBA 培养基(或 TWZ 培养基),黄瓜细菌性角斑病检测使用 KB 培养基和 NA 培养基。28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 2 d,半选择性培养基需培养 5 d~8 d,挑取疑似菌落(见附录 B)进行转接纯化。纯化菌株进行免疫学或分子生物学检测确认;黄瓜细菌性角斑病菌的致病性测定按照 GB/T 36853 的规定执行。

7.4.3 免疫学检测

疑似症状幼苗或植株、纯化菌株可采用商品化酶联免疫检测试剂盒或商品化免疫胶体金试纸条进行检测,按照说明书进行操作及结果判读。

7.4.4 分子生物学检测

对于种子样品,可使用样品浸提液原液及其 10^{-1} 稀释液为模板进行实时荧光 PCR 检测,或提取样品浸提液的 DNA 进行实时荧光 PCR 检测;对于疑似菌株鉴定,挑取单菌落至灭菌水中制成菌悬液作为模板或提取菌株 DNA 作为模板进行 PCR 凝胶电泳检测或实时荧光 PCR 检测。

对于种子样品,以带菌种子和健康种子浸提液分别作为阳性对照和阴性对照;对于植株样品,以已知感染的植物病组织浸提液或瓜类果斑病病原菌(黄瓜细菌性角斑病病原菌)菌株作为阳性对照,以健康植物组织浸提液作为阴性对照;对于菌株鉴定,以目标瓜类果斑病病原菌(黄瓜细菌性角斑病病原菌)作为阳性对照,以其他非目标细菌的菌株作为阴性对照。双蒸水代替模板作为空白对照进行分子生物学检测。

PCR 凝胶电泳检测具体检测步骤按照附录 D 的规定执行。实时荧光 PCR 检测可同步进行瓜类果斑病病原菌和黄瓜细菌性角斑病菌的双重检测,具体检测步骤按照附录 E 的规定执行。瓜类果斑病病原菌的锁式探针检测按照 GB/T 36822 的规定执行。

7.5 瓜类种传病毒检测

7.5.1 样品制备

对于种子样品,可划分为 100 粒~500 粒种子的次级样品。用微型粉碎机破碎至每粒种子均破碎,进行免疫学检测或分子生物学检测。

对于幼苗或植株样品,可根据有无症状分组,分别进行免疫学检测或分子生物学检测。

7.5.2 免疫学检测

对于种子、植株样品,可采用商品化酶联免疫检测试剂盒进行检测,按照说明书进行操作及结果判读。对于免疫检测阳性样品需进行分子生物学检测确认。

7.5.3 分子生物学检测

种子样品粉碎后,取 0.3 g~0.5 g 加入液氮研磨成粉末,提取 RNA 进行分子生物学检测,以已知带毒种子和健康种子分别作为阳性对照和阴性对照。对于植株样品,以已知感染病毒的植物组织或标准病毒核酸作为阳性对照,以健康植物组织作为阴性对照,以双蒸水代替模板作为空白对照。种子样品宜采用荧光 PCR 方法。

提取种子或植物样品 RNA,反转录合成 cDNA 进行 PCR 扩增,也可采用一步法 RT-PCR 试剂盒扩增,具体操作按照附录 D 的规定执行。黄瓜绿斑驳花叶病毒可采用实时荧光 PCR 检测,具体操作按照附录 E 的规定执行。

8 检测结果判定

8.1 瓜类蔓枯病检测结果判定

对于幼苗或植株样品,分离培养检测为阳性可判定为检出瓜类蔓枯病病原菌。

对于种子样品直接进行分子生物学检测结果为阳性,初步判定为检出瓜类蔓枯病病原菌;若分离培养检测为阳性,确定种子样品检出具有活性的瓜类蔓枯病病原菌。

注:必要时,可进一步测序验证。

8.2 瓜类果斑病、黄瓜细菌性角斑病检测结果判定

对于具有典型症状的幼苗或植株样品,免疫学或分子生物学检测结果为阳性,可判定为检出瓜类果斑病病原菌或黄瓜细菌性角斑病病原菌。无症状幼苗或植株样品,免疫学或分子生物学检测结果为阳性,经

分离培养测定为阳性,可判定为检出具有活性的瓜类果斑病病原菌或黄瓜细菌性角斑病病原菌。

对于种子样品浸提直接进行分子生物学检测为阳性,初步判定为检出瓜类果斑病病原菌或黄瓜细菌性角斑病病原菌;若分离培养结果为阳性,确定种子样品检出具有活性的瓜类果斑病病原菌或黄瓜细菌性角斑病病原菌。

注:必要时,可进一步测序验证。

8.3 瓜类种传病毒检测结果判定

对于种子、幼苗样品,免疫学检测与分子生物学检测均为阳性,判定为检出特定病毒;或分子生物学检测为阳性,判定为检出特定病毒。

注:必要时,可进一步测序验证。

9 样品及资料保存

检测样品应妥善保存,以备复核。保存期满后,检测阳性样品应经高压灭菌后方可处理。

分离纯化得到的真菌菌株采用斜面培养基石蜡封层后保存于4℃;细菌菌株采用甘油保存法保存于-80℃。

10 记录

完整的实验记录应包括:样品编号、作物种类、检测时间、样品状态、样品处理方法、检测结果等,症状照片,PCR凝胶电泳照片,分子生物学检测的原始数据及相关结果图片。

附 录 A
(资料性)
瓜类重要种传病害特性

A.1 瓜类蔓枯病

A.1.1 病原菌信息

中文名称:瓜类蔓枯病菌

英文名称:gummy stem blight

病原学名:*Didymella bryoniae*, 无性态 *Phoma cucurbitacearum*, 同义名 *Stagonosporopsis cucurbitacearum*

A.1.2 寄主范围

主要危害黄瓜(*Cucumis sativus*)、西瓜(*Citrullus lanatus*)、甜瓜(*Cucumis melo*)、葫芦(*Lagenaria siceraria*)、丝瓜(*Luffa cylindrica*)、苦瓜(*Momordica charantia*)等多种葫芦科植物。

A.1.3 分布

中国、印度、伊拉克、以色列、日本、德国、希腊、爱尔兰、意大利、荷兰、加拿大、古巴、美国、巴西、智利、澳大利亚、肯尼亚、南非、坦桑尼亚等。

A.1.4 病害症状

见表 A.1、图 A.1。

表 A.1 瓜类蔓枯病发病症状及特征

病害部位	发病症状及特征
子叶	病斑初呈水渍状小点,逐渐扩大为黄褐色或青灰色圆形或者不规则形斑,不久扩展至整个子叶,引起子叶枯死,见图 A.1
茎	初现水渍状小斑,后迅速向上、下扩展,并可环绕幼茎,引起幼苗枯萎死亡。成株期发病多见于茎蔓基部分支处,病斑初为水渍状,表皮淡黄色,后变灰色至深灰色,其上密生小黑粒点,随病势发展病部溢出琥珀色胶状物,干后为赤褐色小硬块,表皮纵裂脱落。潮湿时表皮腐烂,露出维管束,呈麻丝状
茎节	茎节部受害产生黄白色病斑,潮湿时软化、变黑,后密生小黑粒点,流出胶状物质
叶片	叶部发病多从叶缘开始,产生V形或半圆形黄褐色到深褐色大病斑,多具或明或隐的轮纹,后期产生小黑粒点,病斑易干枯破碎。叶柄发病产生褐色不规则病斑,表面粗糙,有小黑粒点,下雨后病部腐烂,易折断
果实	果实上发病,初呈油渍状小斑点,后变暗褐色圆形大凹陷斑,表面干烈,内部木栓化,常呈星裂状,后期病斑上密生小黑粒点

A.1.5 侵染循环

病原菌以菌丝体、分生孢子器和子囊座随植物病残体附着在地表、土壤及环境中越冬。在适宜的环境条件,病原菌释放出分生孢子和子囊孢子,借风、雨及浇水传播蔓延,病原菌从伤口侵入或直接侵入,引起植株发病。种子可带菌,播种后易导致子叶和嫩茎发病。

A.2 瓜类果斑病

病害信息、寄主范围及分布、病害症状参见 GB/T 36822。西瓜、甜瓜幼苗典型症状参见图 A.2。

A.3 黄瓜细菌性角斑病

病害信息、寄主范围及分布及病害症状参见 GB/T 36853。



图 A.1 西瓜幼苗子叶蔓枯病症状



a) 西瓜幼苗子叶

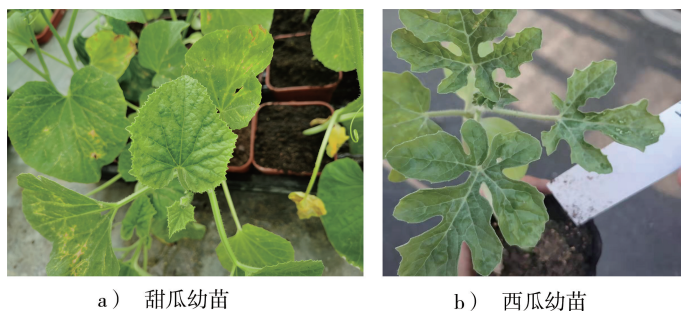
b) 西瓜嫁接苗

d) 甜瓜幼苗

图 A.2 瓜类果斑病症状

A.4 瓜类种传病毒

病害信息、寄主范围及分布及病害症状参见 GB/T 36781。黄瓜绿斑驳病毒感染甜瓜幼苗、西瓜幼苗症状参见图 A.3,小西葫芦黄花叶病毒感染黄瓜幼苗症状参见图 A.4。



a) 甜瓜幼苗

b) 西瓜幼苗

图 A.3 黄瓜绿斑驳病毒症状



图 A.4 黄瓜幼苗小西葫芦黄花叶病毒症状

附 录 B
(资料性)
分离培养形态鉴定

B.1 瓜类蔓枯病

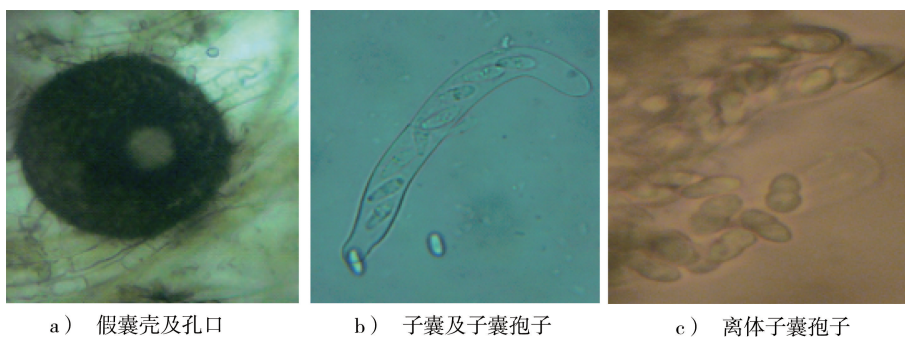
B.1.1 病原菌分类地位

真菌界(Fungi),子囊菌门(Ascomycota),盘菌亚门(Pezizomycotina),座囊菌纲(Dothideomycetes),格孢菌亚纲(Pleosporomycetidae),格孢菌目(Pleosporales),亚隔孢壳科(Didymellaceae),亚隔孢壳属(*Didymella*)。

B.1.2 病原菌形态及培养性状

病原菌 *Didymella bryoniae* 的假囊壳为球形,具不明显短颈,假囊壳绝大部分突起于表皮,散生、单生,黑色,直径 $80\ \mu\text{m}\sim 136\ \mu\text{m}$,孔口圆形。假囊壳内无侧丝,子囊着生在假囊壳底部,束状生,圆筒形或棍棒形,以直型为主,多数两侧稍屈曲,子囊基部处明显地向下渐变细,末端锐或钝圆,无色透明,子囊大小 $(33.8\sim 78.0)\ \mu\text{m}\times(7.8\sim 13.0)\ \mu\text{m}$ 。子囊孢子为二胞,呈单行或双行排列,隔膜处明显缢缩,椭球形,近基部向下变细,末端呈楔形,无色,子囊孢子大小 $(10.4\sim 15.6)\ \mu\text{m}\times(3.9\sim 8.3)\ \mu\text{m}$ 。参见图 B.1。

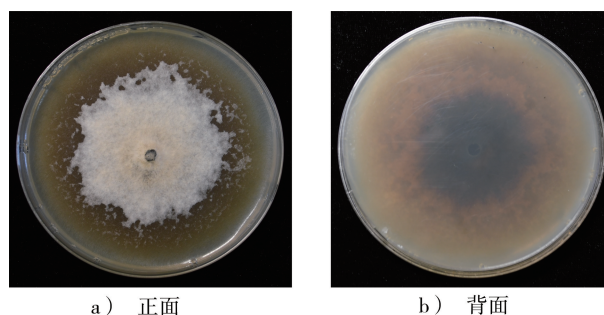
病原菌的培养性状可分为 5 种类型,A 型较为常见。在 PDA 培养基 $25\ ^\circ\text{C}$ 黑暗条件培养 7 d,菌落背面初为白色,后期变为灰黑色,基生菌丝深褐色;气生菌丝发达,絮状,中间稠密,略隆起,初为白色,老化后为灰白色,不形成子囊座和分生孢子器。参见图 B.2。



a) 假囊壳及孔口 b) 子囊及子囊孢子 c) 离体子囊孢子

注:引自张学军,王登明,伊鸿平.海南甜瓜蔓枯病病原菌的有性阶段鉴定[J].中国蔬菜,2013(6):81-83.

图 B.1 *Didymella bryoniae* 的假囊壳及子囊孢子



a) 正面 b) 背面

图 B.2 *Didymella bryoniae* 在 PDA 培养基上的菌落形态

B.1.3 带菌种子滤纸法检测

见图 B.3。

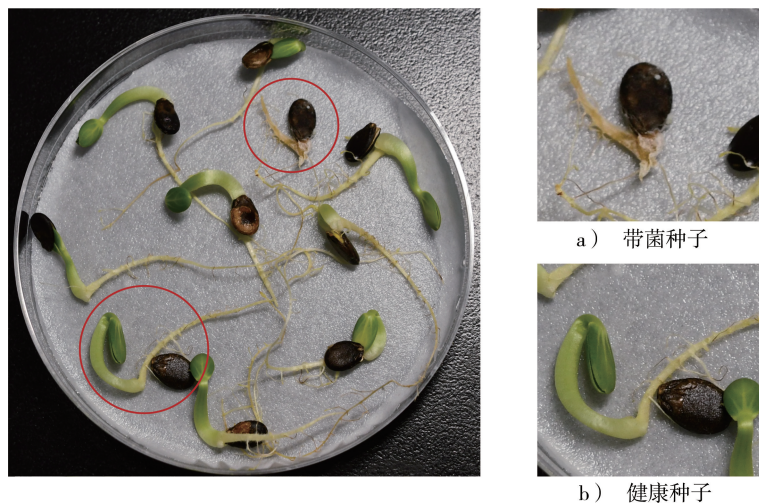


图 B.3 滤纸法检测带菌西瓜种子

B.2 瓜类果斑病

B.2.1 病原菌分类地位

细菌界(Bacteria),变形菌门(Proteobacteria), β -变形菌纲(Betaproteobacteria),伯克氏菌目(Burkholderiales),丛毛单胞菌科(Comamonadaceae),嗜酸菌属(*Acidovorax*)。

B.2.2 病原菌形态及培养性状

瓜类果斑病菌在 KB 培养基上形成不透明、圆形、光滑、略有扇形扩展的边缘和突起的菌落,28℃培养 2 d~3 d 菌落直径可达 1 mm~2 mm,不产生荧光。在 EBBA 培养基中 37℃ 黑暗培养 7 d,其菌落直径约为 1.5 mm~2.0 mm,微凸起、带有透明边缘的轻微扩展,菌落颜色呈绿色至蓝绿色。在 TWZ 培养基 28℃ 培养 24 h 以上产生深红色、光滑、球形凸起的菌落。瓜类果斑病菌在 EBBA 培养基和 KB 培养基上的菌落形态见图 B.4。

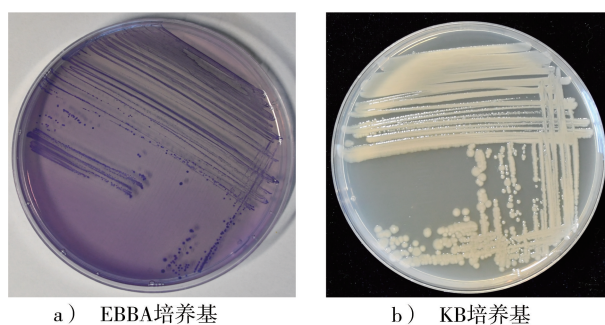


图 B.4 *Acidovorax citrulli* 菌落形态

B.3 黄瓜细菌性角斑病

B.3.1 病原菌分类地位

细菌界(Bacteria),变形菌门(Proteobacteria), γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria),假单胞菌目(Pseudomonadales),假单胞菌科(Pseudomonadaceae),假单胞菌属(*Pseudomonas*)。

B.3.2 病原菌形态及培养性状

黄瓜细菌性角斑病菌在 KB 平板培养基上,菌落白色,近圆或略呈不规则形,扁平,中央凸起,污白色,不透明,具同心环纹,边缘一圈薄且透明,菌落直径 5 mm~7 mm,外缘有放射状细毛状物,具黄绿色荧

光。黄瓜细菌性角斑病病原菌在 KB 培养基上的菌落形态见图 B. 5。

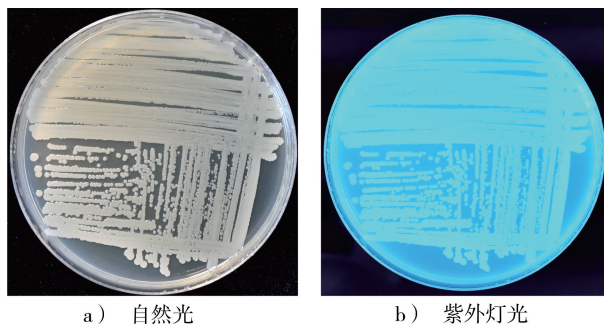


图 B. 5 *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* 在 KB 培养基菌落形态

附 录 C
(规范性)
试剂及培养基配制

C.1 试剂配制

磷酸缓冲液(0.01 mol/L)配制:氯化钠(NaCl)7.9 g,氯化钾(KCl)0.2 g,磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)1.44 g,磷酸二氢钾(KH_2PO_4)0.24 g,溶于800 mL蒸馏水中,用盐酸(HCl)或氢氧化钠(NaOH)调节溶液的pH至7.0,最后加蒸馏水定容至1 L。

C.2 培养基配制**C.2.1 NA培养基**

酵母膏	1.0 g
牛肉浸膏	3.0 g
蛋白陈	5.0 g
葡萄糖	10.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水定容至	1 000 mL
调节 pH 至 7.2,湿热灭菌(121 °C,15 min)。	

C.2.2 KB培养基

多聚蛋白胨	20 g
甘油	10 g
七水硫酸镁	1.5 g
琼脂	15 g
蒸馏水定容至	1 000 mL 调节 pH 至 7.2,湿热灭菌(121 °C,15min)。

C.2.3 EBBA培养基

磷酸二氢铵	1.0 g
氯化钾	0.2 g
七水硫酸镁	0.2 g
酵母粉	0.3 g
硼酸	0.25 g
琼脂粉	16 g
蒸馏水定容至	1 000 mL

调节 pH 为 5.3~5.5,加入 600 μL 的 15 mg/mL 溴甲酚紫母液和 1 mL 的 10 mg/mL 亮蓝 R 母液;121 °C 高温灭菌 15 min 后冷却至 55 °C,再加入 10 mL 95%的乙醇,1 mL 过滤灭菌的 250 mg/mL 放线菌酮及 1 mL 10 mg/mL 氨苄青霉素。

C.2.4 TWZ培养基

蛋白胨	5.0 g
氯化钙	0.25 g
琼脂粉	15 g
蒸馏水定容至	1 000 mL

高压灭菌,待冷却至 50 ℃时加入以下药剂:

吐温-80(灭菌)	10 mL
放线菌酮(25 mg/mL)	2 mL
小檗碱(30mg/mL)	5 mL
氯化三苯基四氮唑(10mg/mL)	5 mL

C.2.5 PDA 培养基

马铃薯	200 g
葡萄糖	20 g
琼脂	15 g

称取 200 g 马铃薯洗净去皮,切小块加水煮烂(煮沸 20 min ~30 min,能被玻璃棒戳破即可),用 8 层纱布过滤,加热,加 15 g 琼脂,继续加热搅拌混匀,待琼脂完全溶解,加入葡萄糖,搅拌均匀,稍冷却后补足水分至 1 000 mL,调节 pH 至 7.2,湿热灭菌(121 ℃,15 min)。

附录 D
(规范性)
PCR 凝胶电泳检测

D.1 引物序列

表 D.1 规定了 PCR 检测引物序列。

表 D.1 PCR 引物序列

检测靶标	引物名称	引物序列(5'~3')	退火温度 ℃	片段大小 bp	引用标准
瓜类蔓枯病菌 (<i>Didymella bryoniae</i>)	Db-5F Db-5R	CGAGTCTGAGCGGAAAGAGT TTGCGGGACCTTGAGACTT	55	256	本文件
瓜类果斑病菌 (<i>Acidovorax citrulli</i>)	BX-L1 BX-R2	CAGCTGGGAGCGATCTTCAT GCGTCAGGAGGGTGAGTAGCA	68	279	GB/T 36822—2018
	SEQ4 SEQ5	GTCATTACTGAATTTCAACA CCTCCACCAACCAATACGCT	53	246	
黄瓜角斑病菌 (<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>)	PSL-F PSL-R	GTTGCGGACGCAATCAATG GTTGACTTCTTCGGCGGTGG	58	179	GB/T 36853-2018
黄瓜绿斑驳 花叶病毒 (CGMMV)	CGMMV-1 CGMMV-2	CGTGGTAAGCGGCATTCTAAACCTC CCGAAACCAATGAGCAAACCG	60	654	GB/T 28071-2011
	CGMMV-F CGMMV-R	ATGGCTTACAATCCGATCAC CTAAGCTTTCGAGGTGGTAGC	53	486	GB/T 36781-2018
黄瓜花叶病毒 (CMV)*	CMV I-F CMV II-F CMV-R	CGACTTAATAAGACGTTAGCAGC TCCCAA TGCT AGT AGAACCTCC TGCTCRAYGTCRACATGAAG	46/50	500/600	GB/T 36781—2018
甜瓜坏死 斑点病毒 (MNSV)	MNSV-F MNSV-R	GTGAAGCTCGCTAARCAGGC ACRTARAGATCACRTGGGC	50	711	GB/T 36781—2018
南瓜花叶 病毒 (SqMV)	SqMV-F SqMV-R	CATGGTACAGCAGCTTGGAAC GAAGCCACAACAAAACCCAGA	60	597	GB/T 36781—2018
小西葫芦黄花 叶病毒 (ZYMV)	ZYMV-F ZYMV-R	GGTTCATGTCCCACCAAGC ATGTCGAGTATCACATTTCC	55	605	GB/T 36781—2018

* CMV 的 PCR 反应程序设置 95 ℃ 30 s, 46 ℃ 45 s, 72 ℃ 45 s, 5 个循环;而后 95 ℃ 30 s, 50 ℃ 45 s, 72 ℃ 45 s, 30 个循环;CMV I-F 与 CMV-R 检测 CMV 亚组 I 的分离物,扩增产物为 500 bp;CMV II-F 与 CMV-R 检测 CMV 亚组 II 的分离物,扩增产物为 600 bp。

D.2 PCR 反应体系

25 μL 反应体系:2×PCR Pre mix 12.5 μL,灭菌 H₂O 9.5 μL,模板 1 μL,10 μmol/L 引物各 1 μL。

病毒检测 RNA 样品应先进行 cDNA 合成;采用 20 μL 反应体系;在 0.2 mL 反应管中加入 RNA 样品 6 μL (约 100 ng),1 μL 下游引物(20 μmol/L),DEPC 水 4 μL,10 mmol/L dNTPs 1 μL,65 ℃ 水浴 5

min,取出后立即放在冰上,加入 5×First Strand Buffer 4 μL ,40 U/L RNase Block Ribonuclease Inhibitor 1 μL ,0.1 mol/L DTT 2 μL ,42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 min,然后再加入 200 U/ μL Reverse Transcriptase 1 μL ,混匀后 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 50 min,70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min,合成 cDNA。First Strand Buffer 和 Reverse Transcriptase 的用量应依据反转录酶的品牌进行调整。

病毒检测 RNA 样品也可采用一步法 RT-PCR 试剂盒进行检测,反应体系和参数参照说明书进行设置。

D.3 PCR 反应参数

94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,退火(见表 D.1 退火温度)45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s(或参照使用试剂盒说明书),35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min;12 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

注:病毒检测 RNA 样品采用一步法 RT-PCR 试剂盒检测时,根据试剂盒说明先设置反转录温度与时间。

D.4 琼脂糖凝胶电泳

制备 1.5%的琼脂糖凝胶,按比例混匀电泳上样缓冲液和 PCR 扩增产物,用 DNA 片段作为分子量标记,进行电泳,电泳结束后在凝胶成像仪中观察是否扩增出预期的特异性 DNA 条带,并拍摄记录。扩增片段大小见表 D.1。

D.5 结果判定

在阳性对照出现预期大小条带、阴性对照和空白对照无特异性扩增的情况下:

- a) 样品出现与阳性对照一致的扩增条带,判定 PCR 结果为阳性;
- b) 样品未出现与阳性对照一致的扩增条带,判定 PCR 结果为阴性。

注:必要时,可进一步测序验证。

附录 E
(规范性)
实时荧光 PCR 检测

E.1 引物及探针序列

表 E.1 规定了实时荧光 PCR 检测引物及探针序列

表 E.1 实时荧光 PCR 检测引物及探针序列

检测靶标	引物名称	引物序列(5'-3')	引用标准
瓜类蔓枯病菌 (<i>Didymella bryoniae</i>)	Db-F Db-R Db-P	GTCCAGAGATGAGGATGGAGT GCTTGTAGGCGAATAATGAGCC Texas Red-CGAAGGATATTGATCTAGACCGCACTTTC-BHQ2	本文件
瓜类果斑病菌 (<i>Acidovorax citrulli</i>)	AC-FP AC-RP AC-P	CTGATAATCCTCGGCTCAACAA TGAGCGCATTTCTGACGAG FAM - AAGAAATACGCCCTCGCCAATCTCC-BHQ1	GB/T 36822—2018
黄瓜角斑病菌 (<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>)*	PSL-F PSL-R PSL-PB1	GTTTCGGCGACGCAATCAATG GTTGACTTCTTCGGCGGTGG HEX -CCGGAGCTGGCAGGCAAACCTCAC-BHQ1	GB/T 36853—2018
黄瓜绿斑驳花 叶病毒 (CGMMV)	CGMMV-F CGMMV-R CGMMV-P	GCATAGTGCTTTCCCGTTCAC TGCAGAATTACTGCCCATAGAAAC FAM-CGGTTTGCTCATTGGTTTGCGGA-BHQ1	GB/T 28071-2011
* 进行 <i>Acidovorax citrulli</i> 和 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> 同步实时荧光 PCR 检测时,将 GB/T 36853—2018 标准中探针 PSL-PB1 的 5' 荧光信号由 FAM 改为 HEX。			

E.2 实时荧光 PCR 反应组分及条件

25 μL 反应体系:实时荧光 PCR premix 12.5 μL ,正向引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL ,反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL ,Taq Man 探针 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL ,模板 1 μL ,补充超纯水至 25 μL 。

E.3 实时荧光 PCR 反应程序

第一个循环为 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min;随后 40 个循环,94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min。

注:病毒检测 RNA 样品采用一步法 RT-PCR 试剂盒检测时,根据试剂盒说明先设置反转录温度与时间。

E.4 结果判定

在阳性对照 Ct 值 <34,阴性对照和空白对照的 Ct 值 \geq 40 前提下:

- a) 如果检测样品的 Ct 值 \leq 35 时,则判定为阳性;
- b) 如果检测样品的 Ct 值 \geq 40 时,则判定为阴性;
- c) 如果 35 <Ct <40 时,则应重新测试。重新测试后,如果仍然为 35 <Ct <40,则判定为阳性。

附 录 F
(资料性)
种子感染水平和取样量

种传病害感染水平与种子取样量见表 F.1

表 F.1 种子感染水平与取样量

感染水平 %	样品量 粒	
	95% 概率	99% 概率
0.01	29 960	46 050
0.02	14 980	23 020
0.05	5 990	9 210
0.1	2 990	4 600
0.2	1 500	2 300
0.5	600	920
1	300	460
2	150	230
50	4	10

参 考 文 献

- [1] 黄大跃,程瑞,徐兵划,等.西瓜蔓枯病研究进展[J].安徽农业科学,2020,48(22):1-3
- [2] 魏梅生,李桂芬,朱水芳,等.种子健康检测的抽样、方法选择和结果解读[J].种子,2014,33(6):111-114
- [3] 赵子婧,芦钰,田文,等,2021.应用微滴数字PCR同时检测瓜类种子携带果斑病菌和角斑病菌[J].植物保护,47(2):156-163
- [4] 张学军,王登明,伊鸿平.海南甜瓜蔓枯病病原菌的有性阶段鉴定[J].中国蔬菜,2013(6):81-83
- [5] Ling, K S, Wechter, W P, Somai, B M, et al. An improved Real-time PCR system for broad-spectrum detection of *Didymella bryoniae*, the causal agent of gummy stem blight of cucurbits [J].Seed Science and Technology, 2010, 38:692-703
-