

ICS 07.100

CCS B15/19

T/WSWXH

新疆维吾尔自治区微生物学会团体标准

T/WSWXH 002—2022

新疆主要果树和防护林腐烂病菌检测 技术规程

Regulation for rapid detection of Valsa canker of the fruit tree and the shelter forest
of Xinjiang

2022 - 09 - 04 发布

2022 - 09 - 06 实施

新疆维吾尔自治区微生物学会 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
3.1 PCR 检测技术 polymerase chain reaction	1
3.2 ITS 序列 ITS sequences	1
3.3 序列特异性引物 sequence specific primer	1
3.4 分生孢子器 pycnidium	1
3.5 分生孢子 conidium (复数 conidia)	1
4 方法原理	1
4.1 分类地位	2
4.2 鉴定依据	2
5 主要设备及实验用具	2
5.1 设备	2
5.2 实验用具	2
6 试验材料	2
6.1 培养基	2
6.2 试剂	2
7 病害症状	2
8 实验室检测	2
8.1 取样方法	2
8.2 显微观察	2
8.3 保湿培养	3
8.4 病原菌的分离和纯化	3
8.5 病原菌形态鉴定	3
8.6 致病性测定	3
8.7 分子生物学检测及鉴定	3
9 结果判定	3
附录 A (资料性) 培养基	4
附录 B (资料性) 果树腐烂病形态特征	5
附录 C (资料性) 苹果树腐烂病致病性测定方法及步骤	6
附录 D (资料性) 属专化型 PCR 检测方法	7
附录 E (资料性) 种特异性 PCR 检测方法	8

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。

本文件由新疆农业科学院微生物应用研究所提出。

本文件由新疆维吾尔自治区微生物学会归口。

本文件起草单位：新疆农业科学院微生物应用研究所，石河子大学农学院，阿克苏地区食品安全检测中心，阿克苏地区林业技术推广服务中心

本文件主要起草人：宋素琴、赵思峰、高雁、楚敏、张志东、谭慧林、冶海林、曹焕、顾美英、张煜、张振军、刘倩倩

新疆主要果树和防护林腐烂病菌检测 技术规程

1 范围

本文件规定了苹果、梨树、海棠等新疆果树和胡杨、新疆杨、沙枣、毛白杨、刺槐等防护林木腐烂病菌分离鉴定的方法。

本文件适用于苹果、梨树、海棠、胡杨、新疆杨、沙枣、毛白杨、刺槐腐烂病菌的检测和鉴定。

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
GB/T 38488	微生物快速测定方法
SN/T 3069	苹果和梨果实球壳孢腐烂病菌检疫鉴定方法
GB/T 29589	香菜腐烂病菌检疫鉴定方法
SN/T 1157	进出境植物苗木检疫规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 PCR 检测技术 polymerase chain reaction

以DNA为模板，在DNA聚合酶、引物和核苷酸底物（dNTP）共同参与下，通过设置温度的变化，实现模板变性、退火和延伸的多次循环过程，实现指数级扩增目标基因，达到检测判断的技术。

3.2 ITS 序列 ITS sequences

位于18S核糖体DNA（rDNA）和 28S rDNA中间被5.8S rDNA分为两部分的间隔序列称为ITS序列（Internal transcribed spacer），有极大的保守性，即存在着广泛的异种同源性，其长度和序列变化较大，将其扩增物进行 RFLP 或序列分析，可用于对真菌的不同生物型、菌株的属、种进行分类鉴定。

3.3 序列特异性引物 sequence specific primer

根据等位基因的核苷酸序列，设计的等位基因特异性的或组特异性的引物，即为序列特异性引物（sequence specific primer, SSP）。SSP只能与某一等位基因特异性片段的碱基序列互补性结合，可通过PCR特异性地扩增该基因片段，从而达到分析基因多态性的目的。

3.4 分生孢子器 pycnidium

是真菌主要载孢体，由拟薄壁组织形成的球形或烧瓶形的结构，内部着生分生孢子梗。其类型多样，可以是完全封闭，或有一个孔口，或有一个伸向孔口的长脖颈，可以表生或埋生于基质中。

3.5 分生孢子 conidium（复数 conidia）

是一类外生无性孢子的统称，主要由芽殖和断裂方式产生，包括芽殖产生的芽孢子和芽殖型分生孢子，以断裂方式产生的节孢子、裂殖方式产生的裂殖孢子以及其他各种类型的分生孢子。

4 方法原理

4.1 分类地位

中文名：腐烂病又称烂皮病、臭皮病等

病害英文名：Valsa Canker; Tree rot

腐烂病菌为真菌界Fungi, 子囊菌门Ascomycota, 壳囊孢属*Cytospora*, 此前有性阶段为真菌界Fungi, 子囊菌亚门Ascomycotina, 黑腐皮壳属*Valsa*; 无性阶段为真菌界Fungi, 半知菌亚门Deuteromycotina, 壳囊孢属*Cytospora*。

4.2 鉴定依据

苹果、梨树、海棠等新疆果树和胡杨、新疆杨、沙枣、毛白杨、刺槐等防护林腐烂病菌的检测鉴定依据, 应根据病原菌在寄主上的症状特点、分生孢子形态、病菌形态学特征及其培养特性, 病菌种的特征以及rDNA-ITS特异序列基因组序列, 必要时应辅助进行致病性鉴定。

5 主要设备及实验用具

5.1 设备

包括高压灭菌锅、恒温培养箱、-20℃冰箱、PCR管离心机、超净工作台、PCR扩增仪、凝胶电泳和凝胶成像系统、体式显微镜等。

5.2 实验用具

实验用具可包括接种环、接种针、样品袋、标签、酒精灯、解剖刀、医用手术剪刀、镊子、三角瓶、培养皿、量筒、滤纸、载玻片、盖玻片、微量移液器及相应型号的无菌吸头等。

6 试验材料

6.1 培养基

培养基宜采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA), 含氯霉素0.1 g/L(见附录A)。

30%苹果树皮琼脂(ABA)培养基(见附录A)。

6.2 试剂

试剂可包括真菌DNA提取试剂盒、PCR鉴定相关Taq PCR Mix预混液(包含Taq DNA聚合酶、dNTP、MgCl₂、PCR buffer、PCR反应增强剂、稳定剂和一种蓝色示踪染料)、ddH₂O、氯霉素、1.2%NaClO、75%的酒精、0.1%HgCl₂、石蜡、无菌蒸馏水、扩增引物、TBE电泳缓冲液。

7 病害症状

a) 腐烂病发病初期, 撕开枝干的表皮, 可见暗褐色至红褐色湿润的小斑或黄褐色的干斑。发病较重时皮层腐烂坏死, 用手指按下可下陷; 病皮极易剥离, 烂皮层红褐色, 湿腐状时有酒糟味。

b) 发病后期, 病部失水干缩, 变黑褐色下陷, 并在其表皮产生黑褐色小点粒, 即病菌的分生孢子器, 成为再次发病的传染源。除侵染枝干外, 有时也侵染果实。果实上病斑症状为暗红色的圆形或不规则形, 有轮纹, 边缘清晰。发病部位腐烂软化, 略带酒糟味, 病果表皮易剥离。

8 实验室检测

8.1 取样方法

抽样应采用棋盘式、五点式随机取样。对苹果、梨树、海棠等果树和胡杨、新疆杨、沙枣、毛白杨、刺槐等防护林的树干、幼树、苗木, 应先检查树茎、枝干腐烂症状, 采集病部样品带回实验室检测。(见附录B)

8.2 显微观察

挑取病害组织制成玻片，置于显微镜下检查，观察记录病菌的分生孢子和分生孢子器的形态特征。

8.3 保湿培养

有病状但并无明显病症的树皮应置于样品袋中，于20℃~25℃下保湿培养，定期观察症状变化，并进行显微镜检和分离培养。

8.4 病原菌的分离和纯化

取疑似腐烂病的病样，在超净工作台，切取病健交界处病样组织1 cm×1 cm先用75%的酒精消毒30 s，再用1.2%NaClO消毒3 min进行表面消毒，然后用无菌蒸馏水清洗3次，放在无菌滤纸上晾干。再切成5 mm×5 mm的组织块，放置于含氯霉素PDA平板上，28℃恒温培养5~7 d后，挑取菌落进行纯化培养。

8.5 病原菌形态鉴定

观察菌落形态、颜色、大小及子实体等培养性状，显微镜观察分生孢子、分生孢子座以及分生孢子器的形态特征和着生方式。

8.5.1 病原菌培养特征

病菌可根据在PDA上的菌落颜色、产孢情况划分为：黄褐色类群、乳白色不产孢类群和灰褐色易产孢类群（见附录B）。

a) 黄褐色类群：菌落初为白色，5~6 d后菌落背面中心变为黄褐色，边缘黄绿色，10 d后菌落整体为黄褐色，其正面为浅黄褐色，气生菌丝少，观察期内有的菌株可产生子实体。

b) 乳白色不产孢类群：菌落初为白色，后期中央乳白色，外围白色，呈放射状，观察期内不产生子实体（分生孢子器）。

c) 灰褐色易产孢类群：菌落边缘羽毛状，可产生大量的灰褐色气生菌丝，菌落初期为白色，后期灰褐色，在培养的第5 d可产生大量子实体。

8.6 致病性测定

a) 接种、致病性检测可按附录C执行。

b) 接种材料应呈现典型的腐烂病的症状，经病原菌再分离获得的纯菌株应具有与原菌株一致的培养特征，同时对照不出现腐烂病典型症状。

8.7 分子生物学检测及鉴定

8.7.1 DNA 提取

DNA提取可参照真菌DNA提取试剂盒。

8.7.2 属专化型 PCR 检测

对提取的DNA，利用设计的属专化型引物VF/VR（见附录D）进行PCR扩增，反应完成后，利用10 g/L琼脂糖凝胶电泳检测PCR反应产物，可快速检测材料上是否携带腐烂病菌。

8.7.3 种特异性 PCR 检测

对已检测出携带有腐烂病菌的材料的DNA，利用设计的种特异性引物VmmF/VmmR、VsF/VsR、VnF/VnR、VmF/VmR（见附录E）进行PCR扩增，反应完成后，利用10 g/L琼脂糖凝胶电泳检测PCR反应产物，可快速确定所检测的腐烂病病原的种。

9 结果判定

根据发病症状、病原菌分生孢子形态、菌落培养特性和致病性测定，以及本文件中的属、种特异性引物PCR检测菌株的rDNA-ITS序列，从GENBANK获取相似序列，使用BLAST和DNAMAN工具对rDNA-ITS序列进行比对分析，可判定为腐烂病菌，并确定种名。

附录 A
(资料性)
培养基

A.1 马铃薯琼脂 (PDA) 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂粉剂40 g, 加入800 mL蒸馏水混匀后, 加热使之完全溶解, 定容为1000 mL, 分装于三角瓶中, 121℃高压灭菌20 min。

A.2 30%苹果树皮琼脂 (ABA) 培养基

采用一年生苹果树皮300 g, 切成2 cm左右小段, 加入800 mL蒸馏水煮沸, 过滤取上清, 加入琼脂粉20 g, 再用水定容至1000 mL, 混匀后分装于三角瓶中, 121℃高压灭菌20 min。

附录 B
(资料性)
果树腐烂病形态特征

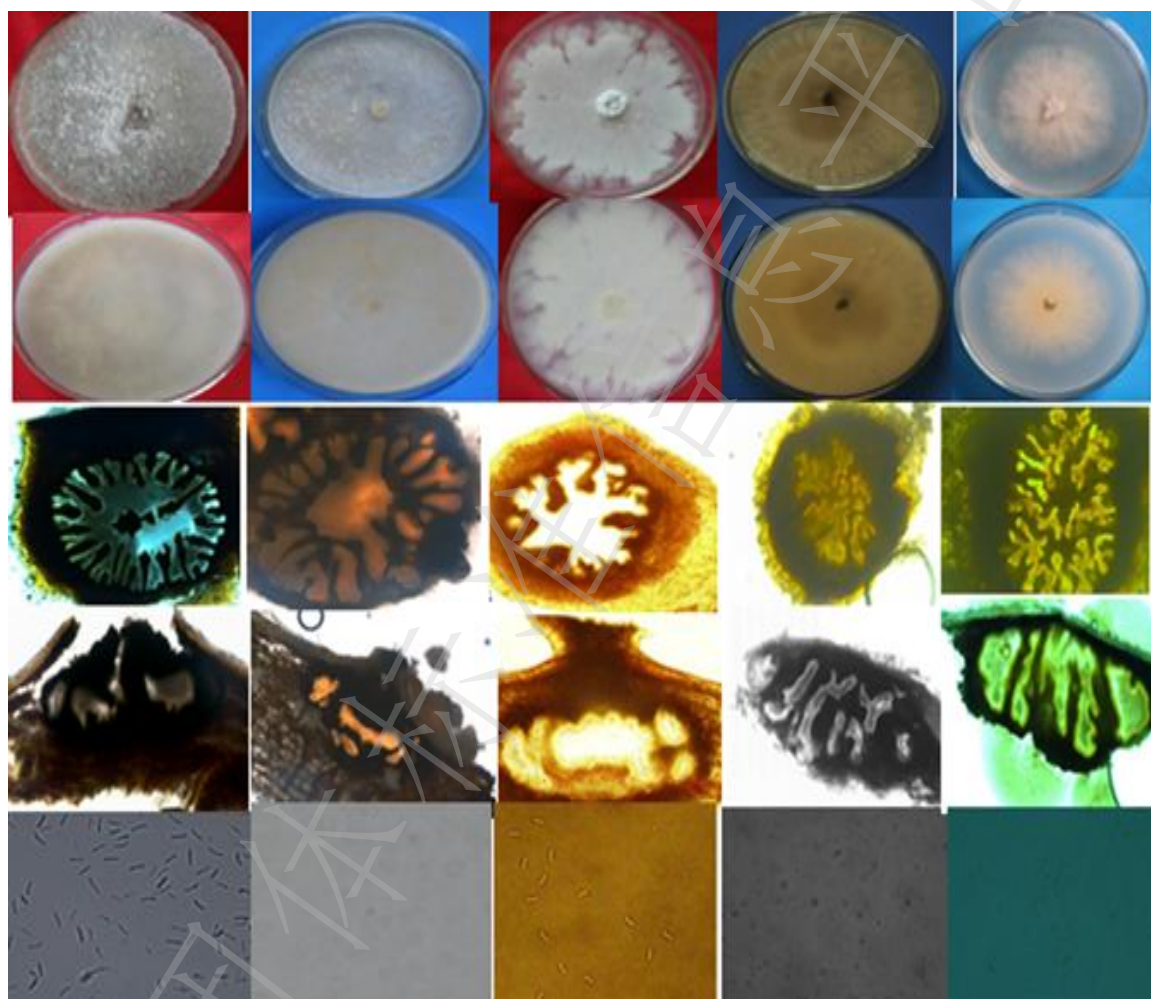


图 B.1 新疆五种主要果树、防护林腐烂病病菌形态

注：第一列：*C. mali*（有性型：*V. mali*）在PDA培养基上菌落特征（正面；背面）；分生孢子器横切；分生孢子器纵切；分生孢子；二列：*C. chrysosperma*（有性型：*V. sordida*）在PDA培养基上菌落特征（正面；背面）；分生孢子器横切；分生孢子器纵切；分生孢子；第三列：*C. schulzeri*（有性型：*V. malicola*）在PDA培养基上菌落特征（正面；背面）；分生孢子器横切；分生孢子器纵切；分生孢子；第四列：*C. nivea*（有性型：*L. niveum*）在PDA培养基上菌落特征（正面；背面）；分生孢子器横切；分生孢子器纵切；分生孢子；第五列：*C. pullmanensis*（有性型：*C. pullmanensis*）在PDA培养基上菌落特征（正面；背面）；分生孢子器横切；分生孢子器纵切；分生孢子。

附录 C

(资料性)

苹果树腐烂病致病性测定方法及步骤

C.1 接种物的准备

用无菌水收集在PDA平板培养7 d的孢子，或采用菌块切割保湿培养的方法获得分生孢子，并配制成 $10^5\sim 10^6$ CFU/mL以上的孢子悬浮液。

C.2 接种方法

苹果树枝条接种：取2~3年生健康枝条，截成40 cm长的小段，自来水冲洗后用0.1% HgCl_2 浸泡10 min，然后用无菌水冲洗、晾干，枝条顶端用石蜡封口。在树皮上间隔一定的距离做出人造伤口，分别以菌饼和用10%的树皮煎汁配制的分生孢子悬浮液（ $1\times 10^5\sim 1\times 10^6$ CFU/mL）作为接种体（各分离株均采用30% ABA培养基诱导获得分生孢子），用接种针和毛笔将其分别涂抹于伤口部位，在接种部位上方1~2 cm处加一块湿的脱脂棉，用保鲜膜将其和接种体一同包扎。每个枝条上随机选取一个伤口，以无菌PDA圆饼或10%的苹果树皮煎汁作为空白接种对照。接种后的枝条插入湿沙盘置25℃培养，保湿48h，于接种后6、10和15 d观察记录枝条的发病情况。

附录 D
(资料性)
属专化型 PCR 检测方法

D.1 引物序列

VF: GTTGCCTCGGCGCTGGCT

VR: GCGAGGGTTTTACTACTGC

VF/VR为属专化型引物，用于快速检测材料上是否携带腐烂病菌。

D.2 PCR反应体系

PCR Taq Mix 10 μL ，10 $\mu\text{mol/L}$ 引物各1 μL ，样品DNA模板0.5 μL ，ddH₂O 12.5 μL ，终体积为25 μL 。

D.3 PCR反应参数

94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性4 min；94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸40 s，30个循环；最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。

D.4 PCR产物检测

10g/L琼脂糖凝胶电泳检测，目的条带500 bp。

附录 E (资料性) 种特异性 PCR 检测方法

E.1 引物序列

VmmF: GCCGGCGGCCCAATTAA

VmmR: CGCCCGGAGGCGGTCTC

VmmF/VmmR对*V.mail*具有相对专一性, 可用于腐烂病菌*V.mail*的快速分子检测。

VsF: TCGTAAAACACCTGGGGAAAA

VsR: AAATTTTCAGAAGTTGGGGGT

VsF/VsR对*V.sordida*具有相对专一性, 可用于腐烂病菌*V.sordida*的快速分子检测。

VnF: CTGGTCGTCAAAGCCAGGGGA

VnR: TTCTGTAAACAGTCAGGTAATGCCCC

VnF/VnR对*L.niveum*具有相对专一性, 可用于腐烂病菌*L.nivea*的快速分子检测。

VmF: TTGGCTGCCTCTCCCCTCGG

VmR: GGAAGGTAATGCCCAACACC

VmF/VmR对*V.malicola*具有相对专一性, 可用于腐烂病菌*V.malicola*的快速分子检测。

E.2 PCR反应体系

PCR Taq Mix 10 μ L, 10 μ mol/L引物各1 μ L, 样品DNA模板0.5 μ L, ddH₂O 12.5 μ L, 终体积为25 μ L。

E.3 PCR反应参数

VmmF/ VmmR: 94 $^{\circ}$ C 预变性4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性30 s, 72 $^{\circ}$ C 退火30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸40 s, 30个循环; 最后72 $^{\circ}$ C 延伸10 min。

VsF/VsR: 94 $^{\circ}$ C 预变性4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性30 s, 72 $^{\circ}$ C 退火30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸40 s, 30个循环; 最后72 $^{\circ}$ C 延伸10 min。

VnF/VnR: 94 $^{\circ}$ C 预变性4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性30 s, 72 $^{\circ}$ C 退火30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸40 s, 30个循环; 最后72 $^{\circ}$ C 延伸10 min。

VmF/VmR: 94 $^{\circ}$ C 预变性4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性30 s, 72 $^{\circ}$ C 退火30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸40 s, 30个循环; 最后72 $^{\circ}$ C 延伸10 min。

E.4 PCR产物检测

10g/L琼脂糖凝胶电泳检测, 目的条带约500 bp。