

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2615—2010

---

### 苹果边腐病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Phialophora malorum* (Kidd & Beaumont)  
McColloch

2010-05-27 发布

2010-12-01 实施

---

中 华 人 民 共 和 国  
国 家 质 量 监 督 检 验 检 疫 总 局 发 布

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中国检验检疫科学研究院，中华人民共和国新疆出入境检验检疫局，中华人民共和国浙江出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：吴品珊、杜洪忠、王文正、吴志毅、严进。

# 苹果边腐病菌检疫鉴定方法

## 1 范围

本标准规定了植物检疫中苹果边腐病菌的检疫鉴定方法。  
本标准适用于进出境苹果和梨果实中苹果边腐病菌的检疫和鉴定。

## 2 原理

苹果边腐病菌在寄主上的症状、形态学特征及分子生物学特性是制定本标准的主要依据。

## 3 仪器和用具

### 3.1 仪器

生物显微镜(具测量功能),体视显微镜,超净工作台,光照生物培养箱,天平,高压灭菌器,台式高速离心机,pH计,水浴箱,PCR扩增仪,电泳仪,凝胶成像仪。

### 3.2 用具

烧杯,三角瓶,量筒,试管,培养皿(直径9 cm),载玻片,盖玻片,酒精灯,塑料研杵,移液器,移液器吸头,离心管,液氮罐。

## 4 试剂和培养基

### 4.1 试剂

琼脂粉,马铃薯,葡萄糖,乳酸,琼脂糖,无菌双蒸水,液氮,Tris-HCl,氧化镁,盐酸,EDTA,氢氧化钠,乙酸钠,氯化钾,Tris,CTAB,TAE,无水乙醇,苯酚,溴化乙锭(EB),三氯甲烷,异丙醇,异戊醇,蛋白酶K,TaqDNA聚合酶,dNTP,DNA分子量Marker,PCR特异性引物PMA-1和PMA-2,实时荧光PCR特异性引物PMA-P1、PMA-P2及探针PMA-Probe-457。

### 4.2 培养基

马铃薯葡萄糖培养基(PDA):马铃薯200 g,葡萄糖20 g,琼脂20 g,1 000 mL蒸馏水,灭菌。

微酸性马铃薯葡萄糖培养基(APDA):制备1 000 mL PDA,灭菌后冷却到50℃,加入1.5 mL 85%的乳酸。

## 5 鉴定方法

### 5.1 症状检查

病害症状参见附录A。

## 5.2 分离培养

从病健交界处切取边长为 5 mm~10 mm 的样品,70%酒精表面消毒 10 s~30 s,放在 APDA 培养基上,24 ℃ 12 h 光照/12 h 黑暗培养 1 周~2 周,待真菌菌落出现,转到 PDA 上。

## 5.3 生物学鉴定

培养 1 周后观测记录菌落的颜色、生长速度,分生孢子和产孢细胞的形状、大小等。培养皿观察保留到第 3 周。

## 5.4 分子生物学鉴定

### 5.4.1 DNA 提取

按 CTAB 方法提取 DNA 见附录 B。

### 5.4.2 PCR 检测

苹果边腐病菌的常规 PCR 检测方法和实时荧光 PCR 检测方法见附录 B。

## 6 鉴定特征

### 6.1 生物学特性

#### 6.1.1 病菌形态

菌丝:初期透明,逐渐呈浅褐色、褐色;直径  $1\ \mu\text{m}\sim 4\ \mu\text{m}$ ,有分隔,稍有分支,常聚集在一起呈绳索状。

分生孢子:从内壁芽生式瓶梗状产孢细胞上产生,成熟时脱落,常聚集在粘液中。单细胞、无色、椭圆形,两端通常各有一个油球,孢子大小为  $(1.5\ \mu\text{m}\sim 4\ \mu\text{m})\times(4\ \mu\text{m}\sim 8\ \mu\text{m})$ 。

产孢细胞:典型的瓶梗状,单一或簇状的沿菌丝侧生或在菌丝尖端生长,单细胞,  $5\ \mu\text{m}\sim 10.8\ \mu\text{m}$  长,基部稍尖、中部膨胀、有收缩的颈,顶部呈杯状张开,其上形成分生孢子。

病菌形态图见附录 C。

#### 6.1.2 菌落特征

*P. malorum* 在许多培养基上都能生长。菌落羊毛状质地,灰色、橄榄色或深灰色茸毛状,边缘白色,底部呈现黑色,产孢丰富。病菌生长速度较慢,培养 1 周后菌落直径为 20 mm 左右。

#### 6.1.3 分子生物学特征

常规 PCR 检测结果,若在 471bp 处有条带,阴性与空白对照无条带出现,可判定检测结果为阳性。实时荧光 PCR 检测结果,若供试样品与阳性对照的 FAMCt 值小于 36,可判定检测结果为阳性。

## 7 结果判定

形态学鉴定中,分离菌的形态特征与鉴定指标吻合,可判定为检出苹果边腐病菌。

常规 PCR 产物与鉴定指标吻合,可判定为苹果边腐病菌。

实时荧光 PCR 检测结果与鉴定指标吻合,可判定为苹果边腐病菌。

## 8 菌种保藏

将分离菌接在 PDA 培养基的斜面上,待斜面表面布满菌丝后,封好斜面的盖子,置于 4 ℃ 保存,每年转接复活一次。

## 9 复核

必要时由专家对检测结果进行复核。

附录 A  
(资料性附录)  
苹果边腐病菌的相关资料

A.1 分类地位

英文名: apple fruit rot, side rot

学名: *Phialophora malorum* (Kidd & Beaumont) McColloch

异名: *Sporotrichum malorum* Kidd & Beaumont, *Sporotrichum carpogenum* Ruehle

苹果边腐病菌(*Phialophora malorum*)属真菌界(Fungi),有丝分裂孢子真菌(Mitosporic fungi),瓶霉属(*Phialophora*)。

A.2 寄主范围

主要为害储藏期的苹果和梨,在荷兰有侵染芦笋的记载。

A.3 病害症状

症状一般出现在果实低温存储( $-1\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ )3个月后。病斑圆形至卵圆形,直径小于2 cm。病斑表面多为淡褐色、轻微下陷,内部腐烂的组织呈海绵状,浅褐色至黑色,腐烂组织很容易剥离下来,留下干净的盘状凹坑,这是边腐病的重要特征。

苹果上的病斑表面中心浅褐色,组织较软,轻压可开裂;在梨上,病斑颜色呈均匀的深褐色,组织较硬,在病斑或伤口周围有时可见一簇簇灰色的菌丝。

A.4 地理分布

分布在美国、意大利、英国和荷兰,我国无分布。

**附录 B**  
(规范性附录)  
分子生物学鉴定

### B.1 DNA 提取方法

样本为植物组织时,将植物组织洗净消毒后切成小块,冷冻加液氮研磨,放入 1.5 mL 离心管中待用。样本为真菌时,收集菌丝放入 1.5 mL 浸在液氮里的离心管中,用塑料杵碾碎待用。

离心管加入 300  $\mu\text{L}$ ~500  $\mu\text{L}$  CTAB 缓冲液(其中含 0.1 g 蛋白酶 K)混匀,65  $^{\circ}\text{C}$  水浴 1 h;13 000g 离心 5 min~10 min,保留上清液;加 500  $\mu\text{L}$  Tris 饱和酚:三氯甲烷:异戊醇(体积为 25:24:1)混匀,13 000g 离心 5 min~10 min,保留上清液;再加 500  $\mu\text{L}$  三氯甲烷:异戊醇(体积为 24:1)混匀,13 000g 离心 5 min~10 min,保留上清液;加入 1 mL 异丙醇混匀,-70  $^{\circ}\text{C}$  下放置 1 h,或-20  $^{\circ}\text{C}$  过夜;13 000g 离心 30 min,可见 DNA 沉淀;70%乙醇洗 DNA 沉淀,室温干燥;用 30  $\mu\text{L}$ ~50  $\mu\text{L}$  Tris-EDTA 缓冲液溶解 DNA,待用。

### B.2 常规 PCR 检测

特异性引物 PMA-1 序列为 5'-TTGCTTAGTGGGGTGTTCGAG-3',PMA-2 序列为 5'-TTGCTG-GCAAGTAGACTACC-3'。

25  $\mu\text{L}$  反应体系中含:样品 DNA 1  $\mu\text{L}$  (1 ng~50 ng),10 $\times$ PCR buffer 2.5  $\mu\text{L}$ ,25 mmol/L 氯化镁 2  $\mu\text{L}$ ,2.5 mmol/L dNTPs 2  $\mu\text{L}$ ,10  $\mu\text{mol/L}$  Primers 0.5  $\mu\text{L}$ /0.5  $\mu\text{L}$ ,5 U/ $\mu\text{L}$  *Taq* DNA polymerase 0.2  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 16.3  $\mu\text{L}$ 。同时要设置阴性对照,以 Tris-EDTA 缓冲液代替 DNA 样品。

PCR 反应条件为:预变性,94  $^{\circ}\text{C}$  5 min $\rightarrow$ 变性,94  $^{\circ}\text{C}$  1 min,退火 55  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  45 s,35 个循环 $\rightarrow$ 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min $\rightarrow$ 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

PCR 产物的检测在 1 $\times$ TAE 电泳缓冲液中,1.5%琼脂糖凝胶电泳,5 V/cm,0.5%EB 染色 20 min,凝胶成像仪分析结果。

### B.3 实时荧光 PCR 检测

实时荧光 PCR 引物序列为 PMA-P1:5'-ATAACCACTCAAGCTCTCG-3',PMA-P2:5'-GTT-GCTGGCAAGTAGACTAC-3, *Taq* Man 探针 PMA-Probe-457:5'-FAM-TTCGCGGTTCCGCAGGCC-TAMRA-3'。探针 5'端标记的荧光报告基团为 FAM,3'端标记的荧光猝灭基团为 TAMRA。

25  $\mu\text{L}$  反应体系中含:样品 DNA 1  $\mu\text{L}$ ,10 $\times$ PCR buffer 2.5  $\mu\text{L}$ ,25 mmol/L 氯化镁 2  $\mu\text{L}$ ,2.5 mmol/L dNTPs 2  $\mu\text{L}$ ,10  $\mu\text{mol/L}$  Primers 1  $\mu\text{L}$ /1  $\mu\text{L}$ ,10  $\mu\text{mol/L}$  探针 Probe-117 1.5  $\mu\text{L}$ ,5 U/ $\mu\text{L}$  *Taq* DNA polymerase 0.3  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 12.7  $\mu\text{L}$ 。

反应循环为 94  $^{\circ}\text{C}$  10 min $\rightarrow$ 94  $^{\circ}\text{C}$  15 s,56  $^{\circ}\text{C}$  60 s 循环 40 次。

附录 C  
(规范性附录)  
病菌形态图

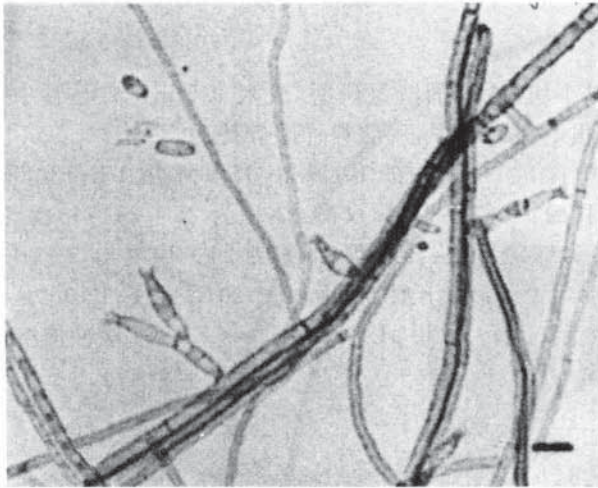


图 C.1 产孢细胞, 线长 = 5  $\mu\text{m}$

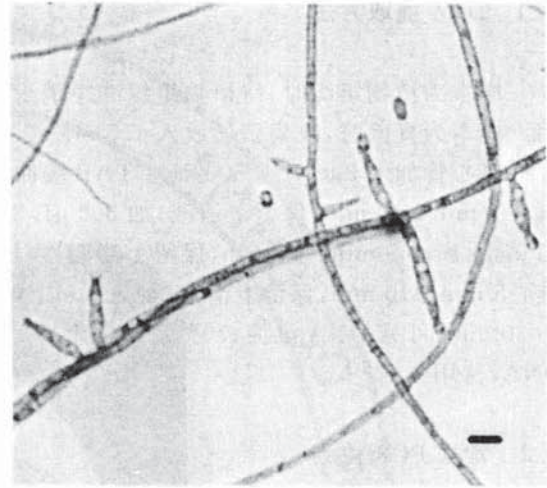


图 C.2 分生孢子及菌丝, 线长 = 5  $\mu\text{m}$