

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2614—2010

葡萄苦腐病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Greeneria uvicola* (Berk. & Curtis)

Punithalingam

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、中华人民共和国浙江出入境检验检疫局，中华人民共和国新疆出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：杜洪忠、吴品珊、吴志毅、王文正、严进。

葡萄苦腐病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了进出境植物检疫中葡萄苦腐病菌的检疫鉴定方法。
本标准适用于进出境葡萄果实和插条中葡萄苦腐病菌的检疫和鉴定。

2 原理

葡萄苦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,琼脂糖,无菌双蒸水,液氮,Tris-HCl,氯化镁,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, *Taq* DNA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,1000 mL 蒸馏水,灭菌。

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

病健交界处切取边长为 5 mm~10 mm 的样品(成熟的浆果取表皮),70%酒精消毒 10 s~30 s,放在 PDA 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,再转到 PDA 上纯化。

5.3 生物学鉴定

培养 5 d 后观测记录菌落的颜色、分生孢子盘、分生孢子和分生孢子梗的形状大小。

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

葡萄苦腐病菌的常规 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

分生孢子盘：散生或群生在寄主组织角质层或表皮下，初期埋生，成熟后外露；黑色，圆锥形或杯形，直径 $80\ \mu\text{m}\sim 250\ \mu\text{m}$ 。

分生孢子梗：无色，有隔膜，不规则分枝， $30\ \mu\text{m}\times 3\ \mu\text{m}$ 。产孢细胞肠形或瓶颈型，无色光滑。

分生孢子：单胞、深色、壁薄，纺锤形到卵形，基部平，上端钝，大小为 $(7.5\ \mu\text{m}\sim 10\ \mu\text{m})\times (3\ \mu\text{m}\sim 4\ \mu\text{m})$ 。

病菌形态图见附录 C。

6.1.2 菌落特征

灰色，紧致，气生菌丝稀疏，有黑色子座产生，后期释放出深绿至黑色的分生孢子团。

6.1.3 分子生物学特征

常规 PCR 检测结果，若在 354 bp 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 FAM Ct 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，可判定为检出葡萄苦腐病菌。

常规 PCR 产物与鉴定指标吻合，可判定为葡萄苦腐病菌。

实时荧光 PCR 检测结果与鉴定指标吻合，可判定为葡萄苦腐病菌。

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 $4\ ^\circ\text{C}$ 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)
葡萄苦腐病菌的相关资料

A.1 分类地位

英文名: Bitter rot of grape

学名: *Greeneria uvicola* (Berk. & Curtis) Punithalingam

曾用名: *Melanconium fuligineum*

有性态: 未确定

葡萄苦腐病菌(*Greeneria uvicola*)属真菌界(Fungi),有丝分裂孢子真菌(Mitosporic fungi)。

A.2 寄主范围

大部分葡萄的栽培种和野生种。

A.3 病害症状

果实发病通常在近果蒂处出现斑痕,后逐渐扩大变软、腐烂。在浅白色浆果上产生褐色斑,其上常着生轮纹状排列的分生孢子盘,整果发病时更为明显。紫色浆果上表现为表面粗糙,有小泡,内有分生孢子盘。浆果在感病几天后变软,易脱落,此时浆果的味道为最苦,苦腐病由此而得名。不脱落的浆果则变干、皱缩,与黑腐病、炭疽病、房枯病较难区别。

叶片症状为叶柄出现浅褐色、边缘不清晰的病斑,病斑可环绕叶柄至整个叶片,造成叶片下垂、干枯、掉落。新梢和嫩叶上可有黑褐色小点,后期着生分生孢子盘。枝条上的症状主要表现在不均匀的变色,病斑褐色、稍凹陷,与健康组织交界处有暗黑色周缘。

A.4 地理分布

美国、澳大利亚、新西兰、巴西、南非、希腊、印度、日本和中国台湾,我国大陆没有明确记录。

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

B.2 常规 PCR 检测

特异性引物 GUA-1 序列为 5'-GTGGCCCTGTAAACTCTTGT-3', GUA-2 序列为 5'-GGC-CGCTAAGTCAACCTAAG-3'。

25 μL 反应体系中含:样品 DNA 1 μL (1 ng~50 ng),10 \times PCR buffer 2.5 μL ,25 mmol/L 氯化镁 2 μL ,2.5 mmol/L dNTPs 2 μL ,10 $\mu\text{mol/L}$ Primers 0.5 μL /0.5 μL ,5 U/ μL *Taq* DNA polymerase 0.2 μL ,ddH₂O 16.3 μL 。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 53 $^{\circ}\text{C}$ 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 GUA-P1:TCGCGGCTGGAGAAGG,GUA-P2:TCGATGCCAGAACAAGAGAT, *TaqMan* 探针 GUA-Probe-117:5'-FAM-TGCCGGTGGCCCTGTAAACTCTTGT-TAMRA-3'。探针 5'端标记的荧光报告基因为 FAM,3'端标记的荧光猝灭基因为 TAMRA。

25 μL 反应体系中含:样品 DNA 1 μL ,10 \times PCR buffer 2.5 μL ,25 mmol/L 氯化镁 2 μL ,2.5 mmol/L dNTPs 2 μL ,10 $\mu\text{mol/L}$ Primers 1 μL /1 μL ,10 $\mu\text{mol/L}$ 探针 Probe-1 171.5 μL ,5 U/ μL *Taq* DNA polymerase 0.3 μL ,ddH₂O 12.7 μL 。

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

附录 C
(规范性附录)
病菌形态图

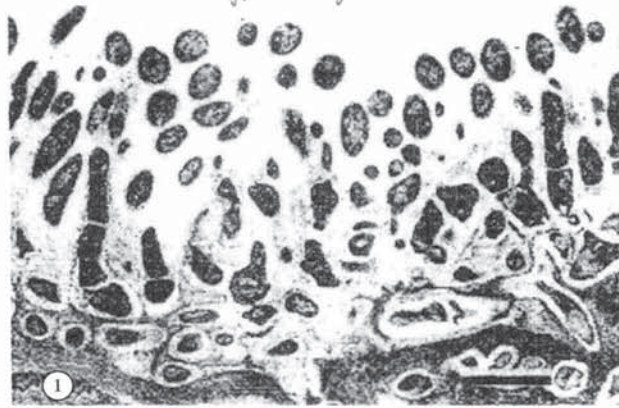


图 C.1 分生孢子盘, 线长 = 6 μm (采自高清文, 1990)

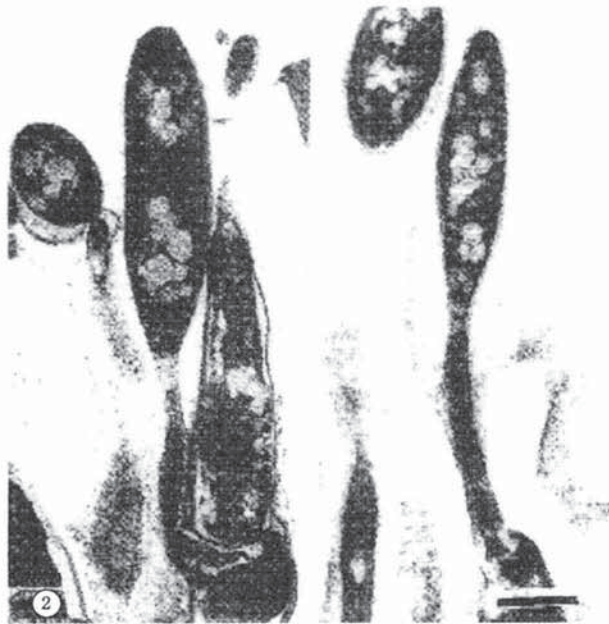


图 C.2 分生孢子梗及分生孢子, 线长 = 2 μm (采自高清文, 1990)