



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2080—2008

栎树猝死病菌检疫鉴定方法

Identification of *Phytophthora ramorum* Werres, De Cock & Man in't Veld

2008-04-29 发布

2008-11-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

前 言

本标准附录 A、附录 B、附录 C 和附录 D 为资料性附录。

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。

本标准起草人：吴品珊、严进、廖太林、巫燕。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

栎树猝死病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了植物检疫中栎树猝死病菌的检疫鉴定方法。

本标准适用于针对栎树猝死病菌寄主的苗木、原木、树皮、枝条、枝叶等植物部分及其土壤和介质，以及木材、木包装和木制品的入境检疫。

2 原理

2.1 分类地位

英文名: pathogen of sudden oak death, pathogen of ramorum leaf blight

学名: *Phytophthora ramorum* Werres, De Cock & Man in't Veld

栎树猝死病菌(*Phytophthora ramorum*), 也称多枝疫霉, 属真菌界(Fungi), 卵菌门(Oomycota)卵菌纲(Oomycetes), 腐霉目(Pythiales), 腐霉科(Pythiaceae), 疫霉属(*Phytophthora* de Bary)。

Phytophthora ramorum 可侵染多种林木和花卉植物, 造成栎树等树木猝死(Sudden Oak Death, 简称 SOD), 以及杜鹃、英莲等花卉枝叶枯萎(Twig Blight of Rhododendron)。

病菌在世界上的分布和寄主植物参见附录 A 和附录 B。

2.2 鉴定原理

根据栎树猝死病菌在寄主上的为害症状、形态学特性、巢式 PCR 特异性扩增片段作为鉴定依据。

3 仪器和用具

3.1 仪器

- 3.1.1 生物显微镜, 体视显微镜。
- 3.1.2 光照生物培养箱。
- 3.1.3 高压灭菌器。
- 3.1.4 高速离心机。
- 3.1.5 PCR 扩增仪, 电泳仪, 凝胶成像仪。

3.2 用具

- 3.2.1 塑料盒。
- 3.2.2 黑光灯(18 W, 320 nm~380 nm)。
- 3.2.3 塑料研杵, 移液器。

4 试剂和培养基

4.1 试剂

- 4.1.1 琼脂粉, V8 液, 胡萝卜, 杜鹃叶片。
- 4.1.2 50% 匹马霉素, 氨基青霉素钠盐, 利福平钠盐, 五氯硝基苯, 碳酸钙。
- 4.1.3 SDS, Tris-HCl, 氯化镁, 盐酸, EDTA, 氢氧化钠, 乙酸钠, 氯化钾, Tris, CTAB, TBE, 无水乙醇, 苯酚, 溴化乙锭(EB), 三氯甲烷, 异丙醇, 异戊醇。
- 4.1.4 蛋白酶 K, Taq 聚合酶, dNTP, DNA 分子量 Marker(100 bp)。
- 4.1.5 巢式 PCR 引物 Phyto1/Phyto4、Phyto2/Phyto3。

4.2 培养基

4.2.1 选择性培养基 PARP-V8

50 mL 过滤后的 V8 液, 17 g 琼脂, 950 mL 蒸馏水, 灭菌后冷却到 50℃, 加入在 50% 的匹马霉素 0.01 g、氨苄青霉素钠盐 0.25 g、利福平钠盐 0.01 g 和五氯硝基苯 0.05 g (可按比例在二甲基亚砷中溶解后加入)。

4.2.2 胡萝卜丝培养基 CPA

50 g 胡萝卜切丝, 22 g 琼脂, 1 000 mL 蒸馏水, 灭菌。

4.2.3 V8 培养基

V8 液体 100 mL, 加入 2.5 g 碳酸钙, 15 g 琼脂, 蒸馏水 900 mL, 灭菌。

5 鉴定方法

5.1 症状检查

检验苗木时, 主要查验枝梢和叶部。杜鹃花等花卉植物症状为叶片上有黑褐色病斑, 茎部有凹陷溃疡斑, 枝梢和叶常出现枯萎。检验栎树等原木木材时, 重点查验溃疡斑。溃疡凹陷或平坦, 常有暗红至黑色的粘性流胶渗出, 树皮内部组织褪色, 坏死区域的边缘有黑环围绕。取有疑似症状的植物的叶、枝、树皮、根等植物部分做分离培养。

土壤和栽培介质也是传播病菌的主要途径, 检验时收集被携带进境的土壤和栽培介质, 做诱集试验。

5.2 分离培养和诱集

5.2.1 植物组织和木材的分离培养

取植物组织或木材上的病健交界处(无明显症状的取靠近地下部的组织)5 mm~10 mm, 0.5% 次氯酸钠消毒 2 min~5 min, 在选择性培养基 PARP-V8 和胡萝卜丝培养基 CPA 上, 20℃~22℃ 黑暗培养 1 周~2 周。如有白色真菌菌落出现, 可转入 V8 培养基上 20℃ 12 h 光照/12 h 黑暗培养。

5.2.2 土壤和栽培介质的诱集

塑料盒中放入土壤或介质, 加入 2 倍体积的无菌双蒸水, 将数张健康的杜鹃叶片(国内市场上杜鹃品种即可)流水冲洗干净, 滤纸吸干水分, 叶面朝上漂放在水上, 盖上盒盖, 15℃ 12 h 光照/12 h 黑暗培养。3 d 后开始检查, 取有失绿或水浸状斑的叶片, 切取病健交界处, 在胡萝卜丝培养基 20℃~22℃ 黑暗培养 1 周~2 周。

5.3 分子生物学鉴定

5.3.1 DNA 提取

将有疑似症状的植物叶片、枝条、茎, 以及分离出的菌丝, 按 CTAB 法提取 DNA (参见附录 C)。

5.3.2 巢式 PCR 检测

P. ramorum 首轮 PCR 特异性引物 Phyto1 和 Phyto4 序列分别为 5'-CAT GGC GAG CGC TTG A-3', 5'-GAA GCC GCC AAC ACA AG-3', 第 2 轮引物 Phyto2 和 Phyto3 的序列分别为 5'-AAA GCC AAG CCC TGC AC-3', 5'-GGT GGA TGG GGA CGT G-3'。

两轮 PCR 的反应体系和反应条件相同, 第 2 轮 DNA 样品为稀释 500 倍的首轮 PCR 产物。

25 μL 的反应体系有样品 DNA 5 μL, 10X PCR buffer 2.5 μL, 25 mmol/L 氯化镁 4 μL, 10 mmol/L dNTPs 0.5 μL, 5 μmol/L Primers 1.25 μL/1.25 μL, 5 U/μL *Taq* 聚合酶 0.25 μL, 双蒸水 10.25 μL。

反应条件为 94℃ 85 s→93℃ 35 s, 62℃ 55 s, 72℃ 50 s, 35 个循环→72℃ 10 min。

在 0.5×TBE 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。

必要时做荧光 PCR 检测 (参见附录 D)。

5.4 菌种保藏

将分离菌接在 V8 培养基上,待菌落长满后,切成边长 1 cm 小块,放在有无菌水的试管中,封好,室温保存。

6 鉴定标准

6.1 菌落特征和病菌形态

P. ramorum 的生长速度相对较慢,在 PARP-V8 和 CPA 上为 2 mm/d~3 mm/d。PARP-V8 上的菌落稀薄,菌丝在培养基间生长,珊瑚状,气生菌丝极少;CPA 上菌落呈同心环,稍稀疏,气生菌丝不多。V8 培养基上生长较好,菌落致密、平铺。*P. ramorum* 在生长 3 d 后开始产生大量的厚垣孢子,分生孢子囊在有光照时可大量生成。

P. ramorum 的菌丝多节,高度分枝,弯曲,成树枝状结构,产生孢子囊、厚垣孢子和卵孢子。

孢子囊大多为椭圆形、纺锤体形或长卵形,有半乳突,易脱落,无柄或具有短柄,长×宽范围值为 (25 μm~97 μm)×(14 μm~34 μm),平均 24 μm×52 μm,长宽比范围为 1.8~2.4,*P. ramorum* 孢子囊较长的特征是它与其他近似种区分的重要特性。

厚垣孢子由菌丝端产生,球形,壁薄,在培养基上先为透明,然后发展至浅褐色、褐色,形态很大,直径一般为 46.4 μm~60.1 μm,最大可达 88 μm,*P. ramorum* 的厚垣孢子大、产生丰盛也是它的主要特征之一。

病菌为异宗配合,卵孢子大小为 27.2 μm~31.4 μm。

6.2 PCR 特异性产物

巢式 PCR 的首轮特异性扩增片段为 687 bp,第 2 轮特异性扩增片段为 291 bp。

7 结果判定

根据栎树猝死病菌的鉴定标准(见第 6 章),对分离菌和核酸提取物进行判定。如分离菌的形态特征或 PCR 产物与鉴定指标吻合,可鉴定为栎树猝死病菌,否则,不视为栎树猝死病菌。

附 录 A
(资料性附录)

栎树猝死病菌的世界分布

北美洲:美国(加利福尼亚州、俄勒冈州)。

欧洲:德国、荷兰、波兰、西班牙、英国、比利时、法国、意大利、丹麦、瑞典、爱尔兰、斯洛文尼亚、芬兰、瑞士、挪威。

附 录 B
(资料性附录)
栎树猝死病的主要寄主

表 B.1 栎树猝死病的主要寄主

编号	学 名	英 文 名	中 文 名
1	<i>Abies concolor</i>	White fir	白冷杉
2	<i>Abies grandis</i>	Grand fir	巨冷杉
3	<i>Abies magnifica</i>	Red fir	加州红冷杉
4	<i>Acer circinatum</i>	Vine maple	圆叶槭
5	<i>Acer davidii</i>	Striped bark maple	大卫槭
6	<i>Acer laevigatum</i>	Evergreen maple	光叶槭
7	<i>Acer macrophyllum</i>	Big leaf maple	大叶槭
8	<i>Acer pseudoplatanus</i>	Planetree maple	欧洲槭
9	<i>Adiantum aleuticum</i>	Western maidenhair fern	铁线蕨
10	<i>Adiantum jordanii</i>	California maidenhair fern	加州铁线蕨
11	<i>Aesculus californica</i>	California buckeye	加州七叶树
12	<i>Aesculus hippocastanum</i>	Horse chestnut	欧洲七叶树
13	<i>Arbutus menziesii</i>	Madrone	优材草莓树
14	<i>Arbutus unedo</i>	Strawberry tree	草莓树
15	<i>Arctostaphylos columbiana</i>	Manzanita	毛枝熊果
16	<i>Arctostaphylos manzanita</i>	Manzanita	北加州熊果树
17	<i>Arctostaphylos uva-ursi</i>	Kinnikinnick, Bearberry	熊果
18	<i>Ardisia japonica</i>	Ardisia	紫金牛
19	<i>Calluna vulgaris</i>	Heath	欧洲石楠
20	<i>Calycanthus occidentalis</i>	Spicebush	加州蜡梅
21	<i>Camellia</i> spp.	Camellia	山茶属
22	<i>Castanea sativa</i>	Sweet chestnut	欧洲栗
23	<i>Castanopsis orthacantha</i>	Castanopsis	元江栲
24	<i>Ceanothus thyrsiflorus</i>	Blueblossom	青花
25	<i>Cinnamomum camphora</i>	Camphor tree	樟树
26	<i>Clintonia andrewsiana</i>	Andrew's clintonia bead lily	安德鲁七筋姑
27	<i>Cornus kousa</i> × <i>Cornus capitata</i>	Cornus Norman haddon	四照花
28	<i>Corylus cornuta</i>	California hazelnut	加州榛子
29	<i>Distylium myricoides</i>	Myrtle-leaved Distylium	杨梅蚊母树
30	<i>Drimys winteri</i>	Winter's bark	卤室木

表 B.1 (续)

编号	学 名	英 文 名	中 文 名
31	<i>Dryopteris arguta</i>	California wood fern	加州木蕨
32	<i>Eucalyptus haemastoma</i>	Scribbly gum	红口桉
33	<i>Euonymus kiautschovicus</i>	Spreading euonymus	胶东卫矛
34	<i>Fagus sylvatica</i>	European beech	紫叶水青冈
35	<i>Frangula californica</i> (= <i>Rhamnus californica</i>)	California coffeeberry	加州鼠李
36	<i>Frangula purshiana</i> (= <i>Rhamnus Purshiana</i>)	Cascara	北美鼠李
37	<i>Fraxinus excelsior</i>	European ash	欧洲白蜡树
38	<i>Fraxinus latifolia</i>	Oregon ash	阔叶白蜡树
39	<i>Garrya elliptica</i>	Silk tassel tree, Coast silk tassel	海岸丝穗木
40	<i>Gaultheria shallon</i>	Salal, Oregon wintergreen	柠檬叶白珠树
41	<i>Griselinia littoralis</i>	Griselinia	滨海山茱萸
42	<i>Hamamelis mollis</i>	Chinese witchhazel	金缕梅
43	<i>Hamamelis virginiana</i>	Witch-hazel	美洲金缕梅
44	<i>Hamamelis intermedia</i> (<i>H. mollis</i> & <i>H. japonica</i>)	Hybrid witchhazel	戴安娜金缕梅
45	<i>Heteromeles arbutifolia</i>	Toyon	加州冬青
46	<i>Ilex purpurea</i>	Oriental holly	冬青
47	<i>Kalmia</i> spp.	Mountain laurel-all species, hybrids and cultivars	山月桂属
48	<i>Laurus nobilis</i>	Bay laurel	月桂
49	<i>Leucothoe axillaris</i>	Dog hobble, Fetterbush	腋花木藜芦
50	<i>Leucothoe fontanesiana</i>	Drooping leucothoe	垂植木藜芦
51	<i>Lithocarpus densiflorus</i>	Tanoak	密花石栎
52	<i>Lonicera hispidula</i>	California honeysuckle	加州忍冬
53	<i>Loropetalum chinense</i>	Loropetalum	檵木
54	<i>Magnolia grandiflora</i>	Southern magnolia	荷花玉兰
55	<i>Magnolia stellata</i>	Star magnolia	日本毛木兰
56	<i>Magnolia</i> × <i>loebneri</i>	Loebner magnolia	淡玫瑰星花木兰
57	<i>Magnolia</i> × <i>soulangeana</i>	Saucer magnolia	二乔玉兰
58	<i>Mahonia aquifolium</i>	Oregon grape	冬青叶十大功劳
59	<i>Maianthemum racemosum</i> (= <i>Smilacina racemosa</i>)	False Solomon's seal	舞鹤草
60	<i>Manglietia insignis</i>	Red lotus tree	红花木莲
61	<i>Michelia doltsopa</i>	Michelia	南亚含笑
62	<i>Michelia maudiae</i>	Michelia	深山含笑

表 B.1 (续)

编号	学 名	英 文 名	中 文 名
63	<i>Michelia wilsonii</i>	Michelia	峨眉含笑
64	<i>Nerium oleander</i>	Oleander	欧洲夹竹桃
65	<i>Nothofagus obliqua</i>	Roble beech, Southern beech	歪叶假山毛榉
66	<i>Osmanthus decorus</i> (= <i>Phillyrea decora</i> ; <i>P. vilmoriniana</i>)	Osmanthus	木犀
67	<i>Osmanthus delavayi</i>	Delavay Osmanthus, Delavay tea olive	南桂花
68	<i>Osmanthus fragrans</i>	Sweet olive	桂花
69	<i>Osmanthus heterophyllus</i>	Holly olive	柃树
70	<i>Osmorhiza berteroi</i>	Sweet cicely	香根芹
71	<i>Parakmeria lotungensis</i>	Eastern joy lotus tree	拟单性木兰
72	<i>Parrotia persica</i>	Persian ironwood	波斯铁木
73	<i>Photinia fraseri</i>	Red tip photinia	红叶石楠
74	<i>Pieris</i> spp.	Andromeda, Pieris-all species hybrids and cultivar	马醉木属
75	<i>Pittosporum undulatum</i>	Victorian box	岛海桐花
76	<i>Prunus laurocerasus</i>	English laurel, cherry laurel	桂樱
77	<i>Prunus lusitanica</i>	Portuguese laurel cherry	葡萄牙稠李
78	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Douglas fir	花旗松
79	<i>Pyracantha koidzumii</i>	Formosa firethorn	台湾火棘
80	<i>Quercus acuta</i>	Japanese evergreen oak	日本常绿栎
81	<i>Quercus agrifolia</i>	Coast live oak	加州栎
82	<i>Quercus cerris</i>	European turkey oak	土耳其栎
83	<i>Quercus chrysolepis</i>	Canyon live oak	黄鳞栎
84	<i>Quercus falcata</i>	Southern red oak	西班牙栎
85	<i>Quercus ilex</i>	Holm oak	圣栎
86	<i>Quercus kelloggii</i>	California black oak	加州黑栎
87	<i>Quercus parvula</i>	Shreve oak	希氏栎
88	<i>Quercus petraea</i>	Sessile oak	无梗花栎
89	<i>Quercus rubra</i>	Northern red oak	红槲栎
90	<i>Rhododendron</i> spp.	Rhododendron	杜鹃花属
91	<i>Rosa</i> (specific cultivars)	Hybrid rose, Royal bonica, Pink meidiland, Pink sevilla	粉色美地澜杂交月季
92	<i>Rosa gymnocarpa</i>	Wood rose	木蔷薇
93	<i>Rosa rugosa</i>	Rugosa rose	玫瑰
94	<i>Rubus spectabilis</i>	Salmonberry	北美悬钩子
95	<i>Salix caprea</i>	Goat willow, Kilmarnock willow	黄花柳

表 B.1 (续)

编号	学 名	英 文 名	中 文 名
96	<i>Schima wallichii</i>	Chinese guger tree, Needlewood	峨眉木荷
97	<i>Sequoia sempervirens</i>	Coast redwood	北美红杉
98	<i>Syringa vulgaris</i>	Lilac	欧洲丁香
99	<i>Taxus baccata</i>	European yew	欧洲红豆杉
100	<i>Taxus brevifolia</i>	Pacific yew	短叶红豆杉
101	<i>Taxus × media</i>	Yew	曼地亚红豆杉
102	<i>Torreya californica</i>	California nutmeg	加州榧树
103	<i>Toxicodendron diversilobum</i>	Poison oak	毒橡
104	<i>Trientalis latifolia</i>	Western starflower	西部七瓣莲
105	<i>Umbellularia californica</i>	California bay laurel, Pepperwood, Oregon myrtle	加州桂
106	<i>Vaccinium ovatum</i>	Evergreen huckleberry	加州越橘
107	<i>Vancouveria planipetala</i>	Redwood ivy	范库弗草
108	<i>Viburnum</i> spp.	All species of viburnum	荚蒾属
注：本表来源于 2007 年 8 月 APHIS List of Regulated Hosts and Plants associated with <i>Phytophthora ramorum</i> 。			

附录 C (资料性附录) 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,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。

离心管中加入 300 μ L~500 μ L CTAB 缓冲液(其中含 0.1 g 蛋白酶 K)混匀,65℃ 水浴 1 h;13 000g 离心 5 min~10 min,保留上清液;加 500 μ 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 μ 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℃ 下放置 1 h,或-20℃ 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 μ L~50 μ L Tris-EDTA 缓冲液溶解 DNA,待用。

附录 D (资料性附录) 荧光 PCR 方法

引物序列为 Pram 114-FC:5'-TCA TGG CGA GCG CTG CA-3',Pram 1527-190-R:5'-AGT ATA TTC AGT ATT TAG GAA TGG GTT TAA AAA GT-3';*Taq* Man 探针 Pram 1527-134-T:5'-FAM-TTC GGG TCT GAG CTA GTA G-TAMRA-3';植物内标引物 COX-F:5'-CGT CGC ATT CCA GAT TAT CCA-3',COX-RW:5'-CAA CTA CGG ATA TAT AAG RRC CRR AAC TG-3';*Taq* Man 内标探针 COX-P:5'-VIC-AGG GCA TTC CAT CCA GCG TAA GCA-TAMRA-3'。

25 μ L 反应体系有样品 DNA 1 μ L,10X PCR buffer 2.5 μ L,25 mmol/L 氯化镁 1 μ L,10 mmol/L dNTPs 1 μ L,5 μ mol/L Primer(Pram 114-FC/Pram 1527-190-R)2 μ L/2 μ L,5 μ mol/L Probe Pram 1.5 μ L,5 μ mol/L Primer(COX-F/COX-RW)1.5 μ L/1.5 μ L,5 μ mol/L Probe COX 1.5 μ L,5 U/ μ L *Taq* 聚合酶 0.25 μ L,双蒸水 9.25 μ L。

反应循环为 94℃ 10min→94℃ 15 s,60℃ 60 s 循环 40 次。

样本为植物组织时,FAM Ct 值和 VIC Ct 值均小于 36,可鉴定为栎树猝死病菌。样本为纯菌时,FAM Ct 值小于 36,可鉴定为栎树猝死病菌。