ICS 点击此处添加 ICS 号
CCS 点击此处添加 CCS 号

T/XSM

新疆维吾尔自治区微生物学会团体标准

T/XXX XXXX—XXXX

新疆果树和防护林腐烂病快速检测技术规程

Regulation for rapid detection of valsa canker of the fruit tree and the protection forest of Xinjiang

（征求意见稿）

（本草案完成时间：2022.8.1）

XXXX－XX－XX 发布　　XXXX－XX－XX 实施

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。

本文件中某些内容可能涉及相关知识产权保护内容，本文件的发布机构不承担相关识别等责任。

本标准由新疆农业科学院微生物应用研究所和新疆维吾尔自治区微生物学会提出

本标准由新疆维吾尔自治区微生物学会归口。

本标准由新疆农业科学院微生物应用研究所、石河子大学农学院、新疆农业科学院植物保护研究所起草。

本标准主要起草人：宋素琴，赵思峰，郭文超，张志东，张王斌，高雁，楚敏，谭慧林，唐琦勇，冶海林，曹焕，刘倩倩，顾美英。

本标准适用于新疆维吾尔自治区内所有相关单位及组织，自原采用。

本标准由采用本标准的单位及组织自行承担相关责任。

本标准由新疆维吾尔自治区微生物学会负责解释。

本标准为首次公布。

新疆果树和防护林腐烂病快速检测技术规程

1 范围

本标准规定了新疆果树（苹果、梨树、海棠）和防护林（胡杨、新疆杨、沙枣、毛白杨、刺槐）腐烂病分离鉴定的方法。

本标准适用于阿克苏红富士苹果、库尔勒香梨，胡杨、新疆杨、沙枣、毛白杨、刺槐腐烂病菌的检测和鉴定。

1 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 38488-2021 微生物快速测定方法

DB51/T 2166-2016 微生物检测领域培养基和试剂验证指南

GB/T 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法。

SN/T 3069-2011 苹果和梨果实球壳孢腐烂病菌检疫鉴定方法

2 术语和定义

请选择适当的引导语

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

PCR 聚合酶链式反应，Polymerase Chain Reaction

PCR 是利用一段 DNA 为模板，在 DNA 聚合酶和核苷酸底物共同参与下，将该段 DNA 扩增至足够数量，以便进行结构和功能分析。*PCR* 检测方法在临床上快速诊断细菌性传染病等方面具有极为重要的意义。

3.2 特异性引物 sequence special primer

序列特异性引物指一种测定基因突变的方法。即利用针对点突变的 2 个等位特异性寡核苷酸(ASO)引物(A、B 标记其中之一)与另一共同引物（C）组成引物系统；在引物延伸时，A 与 B 同时竞争靶序列上同一复性位点，扩增反应后，经凝胶电泳及放射自显影，胶片上的显带是标记同位素的引物所扩增的产物。

3.3 分生孢子器 spoorodochidium

半知菌球壳孢目真菌形成的一种子实体，球形或瓶型，由菌组织构成的一般有固定孔口的产生内生分生孢子

的器官。

3.4 分生孢子 conidium (复数 conidia)

常指由子囊菌或半知菌，在无性生殖过程中，产生的一种孢子。菌丝从菌丝体上生出，延长形成分生孢子梗，分生孢子梗末端生出成串的或成簇的无性孢子，即分生孢子。这些单倍体孢子可借助风、水和动物传播。

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；Valsa mali；Tree rot

腐烂病菌有性阶段属于真菌界 Fungi，子囊菌亚门 Ascomycotina，子囊菌黑腐皮壳属（*Valsa* sp.）。病菌无性阶段属于真菌界 Fungi，半知菌亚门 Deuteromycotina，壳囊孢属（*Cytospora* sp.）。

4.2 鉴定依据

以病原菌在寄主上的症状特点、病菌形态学特征及其培养特性，病菌种的特征以及基因组序列作为新疆果树（苹果、梨树、海棠）和防护林（胡杨、新疆杨、沙枣、毛白杨、刺槐）腐烂病菌的检测鉴定依据，必要时辅助进行致病性鉴定。

5 主要设备及实验用具

5.1 设备

高压灭菌锅、恒温培养箱、-20℃低温冰箱、离心机（适用于 PCR 管离心操作）、超净工作台、PCR 扩增仪、沙盘、凝胶电泳和成像系统、体式显微镜。

5.2 实验用具

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、载波片、盖玻片、微量移液器及相应型号的无菌吸头等。

6 培养基及试剂

6.1 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)，含氯霉素（见附录 A）。

30%ABA 培养基（见附录 A）。

6.2 试剂

真菌 DNA 提取试剂盒、PCR 鉴定相关 *Taq* PCR Mix 预混液（*Taq* DNA 聚合酶、dNTP、$MgCl_2$、PCR buffer、PCR 反应增强剂、稳定剂和一种蓝色示踪染料）、ddH_2O、氯霉素、1.2%NaClO、75%的酒精、0.1%$HgCl_2$、石蜡、无菌蒸馏水、引物、0.5×TBE 电泳缓冲液。

7 现场检验

7.1 抽样方法

采用棋盘式、五点式进行随机取样。

7.2 症状检查

腐烂病发病初期不易识别，掀开枝干的表皮，可见到暗褐色至红褐色湿润的小斑或黄褐色的干斑。受害较重时皮层腐烂坏死，用手指按下即下陷。病皮极易剥离，烂皮层红褐色，湿腐状时有酒糟味。发病后期，病部失水干缩，变黑褐色下陷，并在其表面产生黑褐色小点粒，即病菌的分生孢子器，成为再发病的传染源。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。

对果树（苹果、梨树、海棠）和防护林（胡杨、新疆杨、沙枣、毛白杨、刺槐）的树干、幼树、苗木和果实，注意检查树茎、枝干部有腐烂的症状，采集材料带回实验室检测。（见附录 B）

8 实验室检测

8.1 分生孢子的直接显微镜检观察

将有明显病症的样品直接挑取病部分生孢子制成玻片，置于显微镜下检查，观察记录有无病菌的分生孢子、分生孢子座以及分生孢子器的形态特征，后进行分离培养。

8.2 保湿培养

病枝上有可疑病状但并无明显病症的样品，将其置于样品袋中，于 20℃-25℃下保湿培养，定期观察症状变化，并进行显微镜检或分离培养。

8.3 植株上病菌的分离和纯化

取疑似腐烂病的病样，在超净工作台中，取病健交界处先用 75%的酒精消毒 30 s，其次 1.2%NaClO 消毒 3 min，然后用无菌蒸馏水清洗 3 次进行表面消毒，放在无菌滤纸上晾干。切取 5 mm×5 mm 左右具有腐烂病病征的组织块，置于准备好的 PDA (含氯霉素) 平板上，置于 28℃恒温培养 5-7d 后，挑取菌落进行纯化培养。

8.4 病原鉴定

观察菌落的形态、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。

8.4.1 病菌培养特征

病菌在 PDA 培养基上生长良好，菌落生长较快，根据在 PDA 上的菌落颜色、产孢情况将划分为 3 类: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）。

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) 。

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，有灰褐色易产孢类群：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。

8.5 致病性测定

按照附录 C 的方法进行接种、致病性检测。

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。

8.6 分子生物学检测及鉴定

8.6.1 DNA 提取

参照真菌 DNA 提取试剂盒。

8.6.2 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 10g/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。

8.6.3 种特异性引物检测

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 10g/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、病原特征和致病性测定，以及属、种特异性引物 PCR 检测结果与上述鉴定特征吻合,可判定为腐烂病菌，并确定其种名。

附录 A

培养基配方

A.1 PDA 培养基

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

A.2 30%ABA (apple bark agar)

苹果树皮 300 g、琼脂粉 10 g, 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

果树腐烂病菌形态特征图

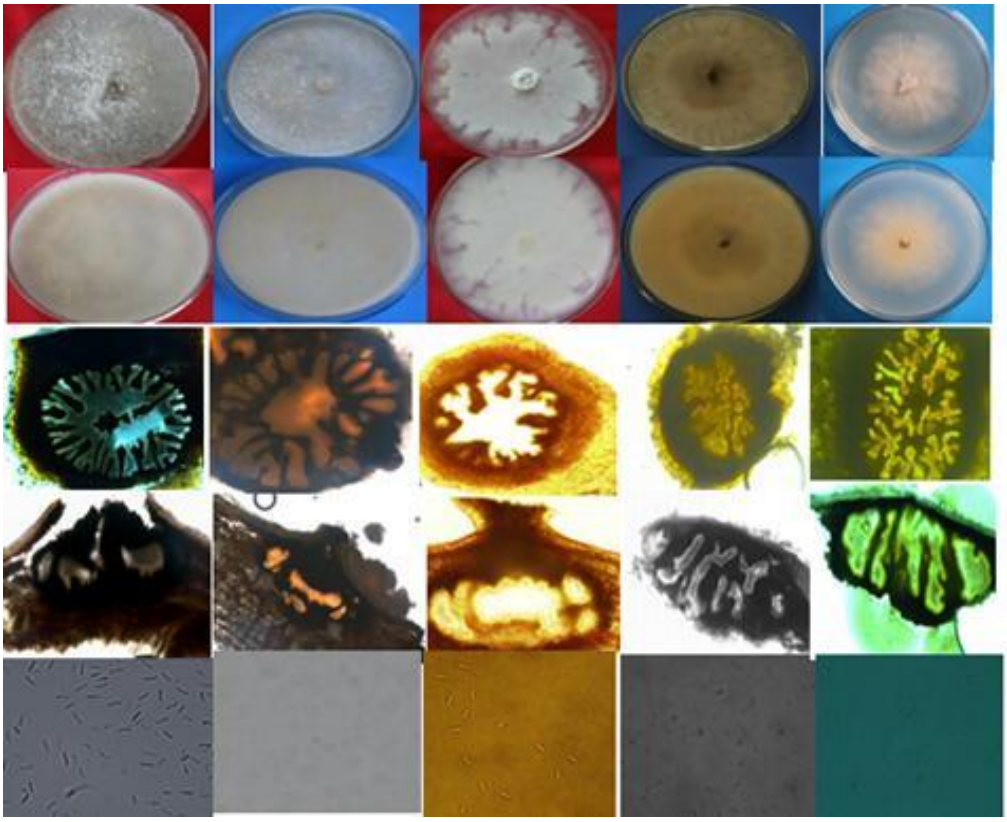

图 1 新疆五种主要林果腐烂病病菌形态

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；

第二列：*C. chrysosperma* (有性型: *V. sordida*)在 PDA 培养基上菌落特征(正面；背面)；

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；

杨树腐烂病　　苹果树腐烂病

图 2 杨树和苹果树腐烂病菌分生孢子角

附录 C

苹果树腐烂病致病性测定方法及步骤

B.1 接种物的准备

用无菌水收集在 PDA 平板培养 7d 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 10^5-10^6 个/ml 以上的孢子悬浮液。

B.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（1×10^5～1×10^6 个/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 48 h，于接种后 6、10 和 15 d 观察记录枝条的发病情况。

附录 D

属专化型 PCR 引物检测方法

B.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。

B.2 PCR 反应体系

PCR *Taq* Mix 10μl，10μmol/L 引物各 1μl，样品 DNA 模板 0.5μl，ddH_2O 12.5μl，终体积为 25μl。

B.3 PCR 反应参数

94℃预变性 4 min；94℃变性 30 s，引物退火 30 s，72℃ 延伸 40 s，30 个循环；最后 72℃延伸 10 min。

附录 E

种特异性 PCR 引物检测方法

C.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: CTGGTCGTCAAAAGCCAGGGGA

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: GGAAGGTAATGCCCCAACACC

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。

C.2 PCR 反应体系

PCR *Taq* Mix 10μl，10μmol/L 引物各 1μl，样品 DNA 模板 0.5μl，ddH_2O 12.5μl，终体积为 25μl。

C.3 PCR 反应参数

94℃预变性 4 min；94℃变性 30 s，引物退火 30 s，72℃ 延伸 40 s，30 个循环；最后 72℃延伸 10 min。