ICS 65.020.01
CCS B 16

DB32

江 苏 省 地 方 标 准

DB32/T 4394—2022

梨火疫病监测与检测技术规程

Code of practice for monitoring and detection of pear fire blight

2022-11-14 发布　　2022-12-14 实施

江苏省市场监督管理局　发布
中国标准出版社　出版

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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由江苏省园艺标准化技术委员会归口。

本文件起草单位:江苏省农业科学院、江苏省植物保护植物检疫站。

本文件主要起草人:刘凤权、赵延存、徐高歌、李朝辉、龚伟荣、孙伟波、赵杨扬、明亮、周丽川、胡婕。

梨火疫病监测与检测技术规程

1 范围

本文件规定了梨火疫病监测与检测的原理、监测植物、设备与试剂、病害监测、病菌检测、结果判定和报告、样品和菌株保存及无害化处理等。

本文件适用于梨火疫病监测与病菌检测。

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 15569 农业植物调运检疫规程

GB/T 36852 亚洲梨火疫病菌检疫鉴定方法

DB32/T 3788 梨枯梢病监测与检测技术规程

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

梨火疫病，病原为解淀粉欧文氏菌[Erwinia amylovora (Burrill, 1883) Winslow et al., 1920]，是危害梨、苹果、杜梨、山楂、海棠、榅桲等蔷薇科植物的检疫性有害生物。根据梨火疫病田间症状、病菌生物学特征、致病特性、免疫学和分子生物学反应特征等进行监测和检测。

5 监测植物

梨和苹果。

6 设备与试剂

6.1 用具与仪器

采集夹、采集袋、标本夹、标本纸、修枝剪、纸袋、放大镜、镊子、刀片、标签纸、超净工作台、高压灭菌锅、培养箱、生物显微镜、体视显微镜、低温高速离心机、电泳仪、聚合酶链式反应（PCR）仪、凝胶成像系统、微量移液器、定位器等。

6.2 试剂与材料

监测与检测过程中所有试剂、溶液及培养基配方，参见附录 A。除另有规定外，所用试剂均为分析

纯或生化试剂。

7 病害监测

7.1 监测范围

监测梨、苹果集中种植区。对疫情发生区或高风险区的果园、苗圃和采穗圃，以及从发生区或高风险区调入的苗木、砧木、接穗和花粉等进行重点监测。

7.2 田间监测

7.2.1 监测时期

每年 4 月～7 月，重点在梨树、苹果树开花期到果实膨大中期进行监测调查，尤其是在雨后或浇水后。

7.2.2 访问调查

向当地植保员、农技员、果农、种苗和农药经销商等相关人员询问梨树和苹果树果园、苗圃和采穗圃是否有梨火疫病疑似症状(见附录 B)及其发生地点、时间、危害情况等信息，判断是否存在可疑发生区。每年在花期和幼果期各调查 1 次。

7.2.3 踏查

对访问调查发现的可疑发生区和其他有代表性的果园、苗圃和采穗圃进行踏查，观察田间是否有梨火疫病典型症状(见附录 B)。如发现典型或可疑症状的病株，立刻进行标记和拍照，取样后送实验室检测鉴定。每年在花期和幼果期各踏查 1 次。

7.2.4 定点监测

在踏查确认的发生区或高风险区，选择有代表性的果园、苗圃和采穗圃进行定点调查，每 15 d 调查 1 次。面积小于 50 亩的设置 1 个调查样地，面积每增加 50 亩增设 1 个调查样地，样地面积不小于 5 亩。在样地内采用 5 点取样法，每个点随机调查不少于 20 株，调查并统计病株率。按照附录 C 要求记录相关信息，并将病样送实验室检测鉴定。

7.3 调运监测

7.3.1 苗木、砧木、接穗监测

对来自疫情发生区或高风险地区的种苗、砧木、接穗按 GB 15569 要求进行抽样检查，对病样或疑似病样送实验室进行检测鉴定；对无症状样品，至少随机选取 5 份送实验室检测鉴定。

7.3.2 花粉监测

按 GB 15569 要求进行抽样，并送实验室检测鉴定。

8 病菌检测

8.1 样品处理

8.1.1 病样和疑似病样处理

按照 GB/T 36852 要求执行。

8.1.2 无症状样品处理

先用 75%乙醇对样品表面进行消毒，晾干，然后从每个无症种苗、接穗、砧木随机切取新生树皮（包含维管束部分）2 块～3 块，每块约 20 mm^2，加入到装有 2 mL～3 mL 无菌水的无菌离心管中浸泡 30 min，制备样品浸出液。每份花粉样品取 0.1 g，加入到装有 1 mL～2 mL 无菌水的无菌离心管中浸泡 30 min，制备样品浸出液。

8.2 显微镜检查

按照 DB32/T 3788 要求执行。

8.3 生物学特征观察

将样品浸出液在 NA 培养基平板上划线或梯度稀释分离，28℃培养 24 h～48 h。挑取单菌落在 NA 培养基上进一步划线纯化 2 次～3 次，获得观察记录菌落形态和其他特征，也可用透射电镜观察菌体形态、大小、有无鞭毛及鞭毛着生的位置和数目等（参见附录 B）。

8.4 致病性测定

将纯化的分离物接种幼果，24 h ～48 h 后观察接种部位有无坏死和菌脓产生；或接种嫩梢 48 h ～96 h 后，观察接种点是否出现变黑、组织干瘪、枝梢萎蔫、菌脓溢出等症状。

8.5 ELISA 检测

取样品浸出液或用纯化的分离物配制成的菌悬液进行酶联免疫吸附剂测定（ELISA）检测，检测程序参见附录 D。如采用商品化 ELISA 试剂盒检测，按照说明书操作并进行结果判定。

8.6 PCR 检测

根据实验室条件，可选择 PCR 凝胶电泳检测或实时荧光 PCR 检测，检测程序按照附录 E。

9 结果判定和报告

9.1 结果判定

9.1.1 田间症状初判

田间梨树和苹果树发病症状符合附录 B 描述的典型症状，初步判断为梨火疫病并送实验室检测鉴定。

1）1 亩≈666.7 m^2.

9.1.2 常规检测结果判定

镜检有溢菌现象；分离物生物学特征与梨火疫病菌相符（参见附录 B）；分离物在幼果或嫩梢上的致病性测定结果为阳性，且能再次从接种发病部位分离获得相同的分离物，判定分离物为引起梨火疫病的病原菌即梨火疫病菌。

9.1.3 ELISA 检测结果判定

在阴性对照 OD 值小于或等于 0.1，且阳性对照 OD 值大于或等于阴性对照 OD 值 2 倍的前提下，检测样品 OD 值大于或等于阴性对照 OD 值 2 倍时，判定为阳性反应，即从样品中检出梨火疫病菌；否则判定为阴性反应，即从样品中未检出梨火疫病菌。

9.1.4 PCR 检测结果判定

PCR 检测结果按照附录 E 判定。

9.2 结果报告

9.2.1 监测报告

按照附录 C 填写监测结果，整理汇总后形成监测报告。

9.2.2 检测报告

按照附录 F 填写实验室检测鉴定结果，形成检测鉴定报告。

10 样品和菌株保存及无害化处理

10.1 样品保存

4 ℃下保存，以备复核。保存样品要标明编号、名称、来源、保存人、保存日期和到期日期。样品保存期满后，应灭活销毁处理。

10.2 菌株保存

分离并鉴定为梨火疫病菌的菌株可采用甘油低温保存或冻干保存。

10.3 无害化处理

监测和检测过程中使用过的有关材料、用具、不需要长期保存的菌液、分离菌株等，在使用完毕和试验结束后应及时进行灭活销毁处理。

附　录　A
（资料性）
试剂及培养基配制方法

A.1　ELISA 检测

A.1.1　包被液

Na_2HCO_3 2.93 g、NaCl 1.59 g，用蒸馏水溶解，调整 pH 到 9.6，定容至 1 000 mL。

A.1.2　洗涤液

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 3.58 g、KCl 0.2 g、KH_2PO_4 0.27 g、NaCl 8.01 g、吐温-200.5 g，用蒸馏水溶解，调整 pH 到 7.4，定容至 1 000 mL。

A.1.3　样品提取液

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 3.58 g、KCl 0.2 g、KH_2PO_4 0.27 g、NaCl 8.01 g，用蒸馏水溶解，调整 pH 到 7.4，定容至 1 000 mL。

A.1.4　封闭液

脱脂奶粉 5 g，溶解于 100 mL 样品提取液。

A.1.5　抗体稀释液

脱脂奶粉 2.5 g，溶解于 100 mL 洗涤液。

A.1.6　TMB 显色液

A.1.6.1　底物缓冲液

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 2.375 g、柠檬酸 1.167 5 g，用蒸馏水溶解，调整 pH 到 5.0，定容至 250 mL。

A.1.6.2　TMB 母液

10 mg TMB 溶于 1 mL 二甲亚砜(DMSO)中，4℃保存。

A.1.6.3　0.75%H_2O_2

取 25 μL 30% H_2O_2 用超纯水定容到 1 mL，4℃避光保存。

A.1.6.4　显色液

在 10 mL 底物缓冲液加入 100 μL TMB 母液和 32 μL 0.75% H_2O_2 混匀后使用，现配现用。

A.1.7　终止液

浓硫酸 11.1 mL，用蒸馏水定容到 100 mL。

A.2 PCR 检测

A.2.1 电泳缓冲液 TBE

在 1 000 mL 去离子水中加入 Tris 碱 54 g、硼酸 27.5 g、20 mL 0.5 M EDTA(pH 8.0),使用时利用去离子水 10 倍稀释,即为 0.5×TBE。

A.2.2 琼脂糖凝胶

在 0.5×TBE 工作液中加入 1% (w/v)的琼脂糖,融化,冷却至 60℃后添加 0.01%(v/v)的核酸染料并混匀,然后倒入插入梳子的制胶槽中,冷却凝固后点样电泳。

A.3 实时荧光 PCR 预混液

商品化的实时荧光 PCR 预混液,按照商品说明书使用。

A.4 NA 培养基

取蛋白胨 5 g,蔗糖 10 g,酵母提取物 1 g,牛肉浸膏 3 g,琼脂 16 g,加水定容至 1 000 mL,调 pH 至 6.8～7.2,121 ℃湿热灭菌 20 min。

附　录　B
（资料性）
梨火疫病基本信息

B.1　分类地位

细菌界（EubaC$_t$eria），变形菌门（ProteobaC$_t$eria），γ-变形菌纲（GammaproteobaC$_t$eria），肠杆菌目（EnterobaC$_t$erales），肠杆菌科（EnterobaC$_t$eriaceae），欧文氏菌属（Erwinia），解淀粉欧文氏菌（*E. amylovora* (Burrill) Winslow et al.）。

B.2　生物学特征

革兰氏阴性细菌，菌体短杆状，有荚膜，周生鞭毛，大小为（0.6 μm ～0.8 μm）×（1.0 μm ～3.0 μm），多数单生。最适生长温度 25 ℃～28 ℃，最适 pH 6.0～6.5。在 NA 培养基上 28 ℃培养 2 d 后，菌落直径达到 1 mm ～2 mm，乳白色、圆形、凸起、平滑、不透明、有光泽、边缘完整。图 B.1 为梨火疫病菌（erwinia amylovora）的菌落及菌体形态。

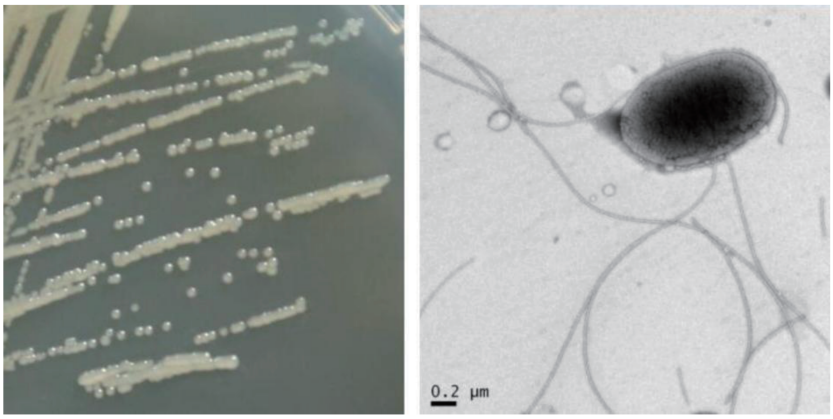

图 B.1　梨火疫病菌（*Erwinia amylovora*）的菌落及菌体形态

B.3　田间症状特征

病原菌主要通过伤口和自然孔口（气孔、蜜腺、水孔等）侵入寄主组织。受害花、叶、嫩梢和果实等枯萎变黑，引起花腐、枝枯和僵果，但不脱落，被侵染的嫩枝呈“牧羊鞭状”。遇潮湿、温暖天气，从病部溢出大量乳白色黏稠状菌脓。图 B.2 为梨火疫病田间典型病害症状。

（a） 花和幼果受害症状

（b） 嫩稍和叶柄受害症状

（c） 枝干和树皮受害症状

（d） 整株枯死症状

图 B.2 梨火疫病田间典型病害症状

附　录　C
（规范性）
梨火疫病田间调查/监测结果记录表

调查机构：　　调查时间：　　调查人：

编号	调查地点	果树/材料	品种/树龄	生育期	来源	种植面积（亩）	调查面积（亩）	发生面积（亩）	调查株数（株）	发病株数（株）	病株率（%）	检测鉴定结果	备注

注：材料指苗木、砧木、接穗和花粉等；备注栏可填写田间症状、农事操作、抽样检测情况等信息。

调查人（签字）：

附　录　D
（资料性）
梨火疫病菌双抗夹心 ELISA 检测程序

D.1　包被

捕获抗体提前按照市售产品要求用包被液进行稀释，然后每孔加入 100 μL 包被于 96 孔酶标板上。4 ℃孵育 12 h～16 h 后弃去孔中液体，用洗涤液加满每个反应孔，静置 1 min～2 min 后，将洗涤液缓慢倒出，重新加入新的洗涤液，重复上述步骤 3 次。洗板完成后将酶标板倒置于干净的吸水纸上，吸干反应孔中的水分。

D.2　封闭

酶标板中每孔加入 200 μL 封闭液，37 ℃封闭 1.5 h 后弃去封闭液，用洗涤液洗板 3 次，每次 2 min。洗板完成后将酶标板倒置于干净的吸水纸上，吸干反应孔中的水分。

D.3　加样

加入梯度稀释的样品浸出液或菌悬液、梨火疫病菌菌悬液（10^8 CFU/mL，阳性对照）和样品提取液（阴性对照），每孔 100 μL。室温孵育 1 h 后弃去孔中液体，用洗涤液洗板 4 次，每次 2 min。洗板完成后将酶标板倒置于干净的吸水纸上，吸干反应孔中的水分。每个检测样品至少重复 3 次。

D.4　加酶标检测抗体-HRP 复合物

每孔加入 100 μL 检测抗体-HRP 复合物，抗体-HRP 复合物提前按照市售产品要求进行稀释，置于保湿容器中，25 ℃孵育 1 h。用洗涤液洗板 4 次，每次 2 min。洗板完成后将酶标板倒置于干净的吸水纸上，吸干反应孔中的水分。

D.5　显色

提前 15 min 配好显色液，每孔加入 100 μL，25℃避光显色 20 min 至阳性对照显色。

D.6　终止反应

显色后在每孔加入 50 μL 终止液。

D.7　测定

在波长 450 nm 下用酶标仪测量结果，读取各孔溶液的光密度值（OD 值），记录结果。

附　录　E
（规范性）
PCR 检测

E.1　PCR 凝胶电泳检测

E.1.1　引物序列

表 E.1 为引物序列。

表 E.1　引物序列

引物	序列
pEA29A	5′-CGGTTTTTAACGC$_t$GGG-3′
pEA29B	5′-GGGCAAATAC$_t$CGGATT-3′

E.1.2　PCR 反应体系及扩增条件

25 μL 反应体系：2×PCR 反应预混液 12.5 μL，上游引物（10 μmol/L）1 μL，下游引物（10μmol/L）1 μL，模板 1 μL，补充超纯水至 25 μL。

PCR 反应程序：94 ℃ 5 min；94 ℃ 1 min，52℃ 1 min，72 ℃ 1 min，35 个循环；72 ℃ 10 min；4 ℃ 保存。

注：不同仪器可根据仪器要求将反应参数作适当调整。

E.1.3　琼脂糖凝胶电泳

PCR 产物用 1.5%琼脂糖凝胶进行电泳，电泳结束后，凝胶成像系统观察、拍照。扩增产物片段大小约为 1 000 bp。图 E.1 为梨火疫病 PCR 检测凝胶电泳图谱。

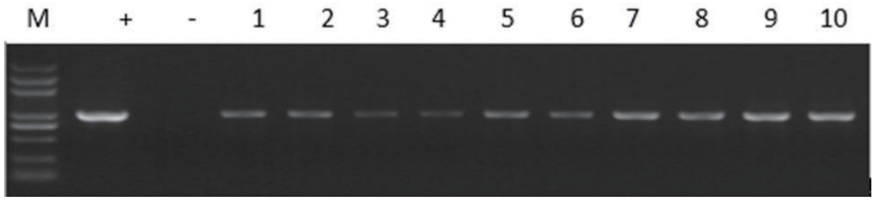

图 E.1　梨火疫病样 PCR 检测凝胶电泳图谱

E.1.4　结果判定

在阳性对照在预期位置产生明显条带，阴性对照和空白对照在预期位置未产生条带的前提下：

a）　如果检测样品出现与阳性对照大小一致的条带，则为阳性；

b）　如果检测样品没有出现与阳性对照大小一致的条带，则为阴性；

c）　检测结果至少重复 3 次。

E.2 实时荧光 PCR

E.2.1 实时荧光 PCR 引物及探针序列

表 E.2 为实时荧光 PCR 引物及探针序列。

表 E.2 实时荧光 PCR 引物及探针序列

序号	引物或探针	序列
1	Ea－lscF	5′-CGC$_t$AACAGCAGATCGCA-3′
	Ea-lscR	5′-AAATACGCGCACGACCAT-3′
	Ea-lscP(探针)	FAM-5′-CtGATAATCCGCAATTCCAGGATG-3′-BHQ
2	hpEaF	5′-CCGTGGAGACCGATCtTTTA-3′
	hpEaR	5′-AAGTTTCtCCGCCCtACGAT-3′
	hpEaP(探针)	FAM-5′-TCGTCGAATGCtGCCtCtCt-3′-MGB

E.2.2 实时荧光 PCR 反应体系及程序

20 μL 反应体系：2×Premix 10 μL，引物(10 μmol/L)各 1 μL，探针(10 μmol/L)1μL，模板 1 μL，补充超纯水至 20 μL。

PCR 反应程序：第 1 个循环为 95 ℃ 5 min；随后 40 个循环，95 ℃ 10 s，60 ℃ 1min。

注： 不同仪器可根据仪器要求将反应参数作适当调整。

E.2.3 结果判定

在阳性对照的 C_t 值≤35，阴性对照和空白对照的 C_t 值≥40 前提下。

a) 如果检测样品的 C_t 值≤35 时，则判定为阳性。

b) 如果检测样品的 C_t 值≥40 时，则判定为阴性。

c) 如果 35＜C_t 值＜40 时，增加模板用量 2 倍～5 倍再次测试，C_t 值≤35，判定为阳性；其余情况判定为阴性。若检测结果为阳性，判定为检出梨火疫病菌；若检测结果为阴性，判定为未检出梨火疫病菌。检测结果至少重复 3 次。

附　录　F
（规范性）
植物有害生物样本检测鉴定报告

<table>
<tr><td>植物名称</td><td colspan="3"></td><td>品种名称</td><td></td></tr>
<tr><td>植物生育期</td><td></td><td>样品数量</td><td></td><td>取样部位</td><td></td></tr>
<tr><td>样品来源</td><td></td><td>送检日期</td><td></td><td>送检人</td><td></td></tr>
<tr><td>送检单位</td><td colspan="3"></td><td>联系电话</td><td></td></tr>
<tr><td colspan="6">检测鉴定方法：</td></tr>
<tr><td colspan="6">检测鉴定结果：</td></tr>
<tr><td colspan="6">备注：</td></tr>
<tr><td colspan="6">鉴定人（签名）：

审核人（签名）：

鉴定单位盖章：
年 月 日</td></tr>
<tr><td colspan="6">**注**：本单一式三份，检测单位、受检单位和检疫机构各一份。</td></tr>
</table>