

中华人民共和国国家标准

GB/T 45586—2025



葡萄苦腐病菌检疫鉴定方法

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

2025-04-25 发布

2025-11-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 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。

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。

本文件由全国植物检疫标准化技术委员会(SAC/TC 271)提出并归口。

本文件起草单位：宁波检验检疫科学技术研究院(宁波国检贸易便利化服务中心)、中国检验检疫科学研究院、中国科学院微生物研究所、中国农科院植物保护研究所。

本文件主要起草人：段维军、张慧丽、吴品珊、蔡磊、李雪莲、雷荣、赵鹏、高利、陈先锋。

葡萄苦腐病菌检疫鉴定方法

1 范围

本文件描述了葡萄苦腐病菌 *Greeneria uvicola* (Berk. & M.A. Curtis) Punith.的形态学和分子生物学检测方法。

本文件适用于葡萄苦腐病菌寄主植物叶片、茎秆和果实等组织中葡萄苦腐病菌的检疫检测和鉴定。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 基本信息

中文名:葡萄苦腐病菌。

学名:*Greeneria uvicola* (Berk. & M.A. Curtis) Punith.。

分类地位:真菌界(Fungi),子囊菌门(Ascomycota),盘菌亚门(Pezizomycotina),粪壳菌纲(Sordariomycetes),间座壳目(Diaporthales),Melanconiellaceae,盘梭孢属(*Greeneria*)。

分布、寄主等信息见附录 A。



5 鉴定原理

葡萄苦腐病菌危害寄主症状、病菌形态学特征及分子生物学特性是鉴定该病菌的依据。

6 仪器和用具

- 6.1 生物显微镜:具测量功能。
- 6.2 解剖镜:最低 10×。
- 6.3 恒温光照培养箱:5℃~60℃,温度精确度±0.1℃。
- 6.4 电子天平:感量 0.001 g。
- 6.5 高压灭菌锅:最大压力为 0.235 MPa,可调控温度范围为 105℃~135℃。
- 6.6 台式离心机:转速范围在 10 000 r/min~30 000 r/min 之间。
- 6.7 pH 计:量程 pH 0.00~14.00,精度±0.01 pH。
- 6.8 恒温水浴锅:温度范围 4℃~100℃,控温精度±0.3℃。
- 6.9 PCR 仪:温度范围 4℃~100℃,温度均一性±0.4℃。

- 6.10 电泳仪:输出电压 5 V~600 V,输出电流 2 mA~200 mA。
- 6.11 凝胶成像仪:光强连续可调 302 nm 紫外透照仪、顶置白光光源、白光转换板、UV 干涉滤光片、机载头像捕捉软件、图像分析软件。
- 6.12 实时荧光 PCR 仪:温度范围 4 ℃~100 ℃,温度均一性 $\pm 0.4^{\circ}\text{C}$ 。
- 6.13 移液器:0.1 μL ~2.5 μL 、0.5 μL ~10 μL 、2 μL ~20 μL 、20 μL ~200 μL 、100 μL ~1 000 μL 。
- 6.14 镊子:眼用镊 10 cm,直头有齿。
- 6.15 定性滤纸:中性。
- 6.16 培养皿:直径 90 mm~100 mm。
- 6.17 普通手术剪:直尖头。
- 6.18 手术刀:刀片 11[#]。
- 6.19 载玻片:25 mm $\times$ 75 mm,厚度 1 mm~1.2 mm。
- 6.20 盖玻片:24 mm $\times$ 24 mm,厚度 0.13 mm~0.16 mm。
- 6.21 酒精灯。
- 6.22 研钵。

7 试剂材料

7.1 试剂

除另有规定外,所有试剂均为分析纯或生化试剂。

- 7.1.1 70%(体积分数)乙醇。
- 7.1.2 次氯酸钠。
- 7.1.3 十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyltrimethylammonium bromide,CTAB)。
- 7.1.4 氯化钠(NaCl)。
- 7.1.5 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid,EDTA)。
- 7.1.6 Tris $\cdot$ HCl。
- 7.1.7 Tris 饱和酚。
- 7.1.8 三氯甲烷。
- 7.1.9 异戊醇。
- 7.1.10 异丙醇。
- 7.1.11 无菌双蒸水 PCR 试剂(包括 *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、PCR 缓冲液)。
- 7.1.12 DNA 分子量 Marker。
- 7.1.13 Tris 乙酸盐 EDTA 缓冲液(Tris acetate-EDTA buffer,TAE)。
- 7.1.14 琼脂糖。
- 7.1.15 Gelred 或其他核酸染料。
- 7.1.16 2 $\times$ *Taq* Man Universal PCR Master Mix(推荐使用,亦可自行配制)。

7.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar,PDA)培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂粉 20 g,1 000 mL 水,121 ℃高压灭菌 15 min~20 min。

也可采用商业化培养基制备或商业化 PDA 培养基平板。

8 鉴定方法

8.1 症状检查

病害症状见附录 A, 葡萄果实上症状见图 A.1 和图 A.2。

8.2 分离培养

取感病植物组织枝叶或果实等, 自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), 果实样品经 70 % (体积分数) 乙醇(7.1.1)消毒 10 s~30 s, 植物组织枝叶等样品用 1.0 % 的次氯酸钠(7.1.2)溶液消毒 5 min, 无菌水漂洗 3 次后, 无菌滤纸吸干, 放在 PDA 培养基(7.2)上, 25 ℃ 恒温光照培养箱(6.3)中 12 h 光照/12 h 黑暗交替条件下培养 1 周~2 周, 待真菌菌落出现, 再转到 PDA 培养基上纯化。

8.3 生物学鉴定

纯化菌落培养 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及大小。

8.4 分子生物学鉴定

8.4.1 DNA 提取

按 CTAB 方法提取 DNA(或采用商业化试剂盒), 按照附录 B 规定的方法。

8.4.2 分子生物学检测

葡萄苦腐病菌的 PCR 检测方法和实时荧光 PCR 检测方法, 按照附录 B 规定的方法。

9 鉴定特征

9.1 生物学特性



9.1.1 菌落特征

菌丝灰色, 像棉花覆盖在培养基上, 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。

9.1.2 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 μm ~250 μm 。

分生孢子梗: 无色, 有隔膜, 不规则分枝, 3 μm ~30 μm 。产孢细胞肠形或瓶颈形, 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 μm ~10 μm) $\times$ (3 μm ~4 μm)。

病菌形态特征图见附录 C。

10 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。

若所获得分离物无法产生可供鉴定的形态学特征,PCR 检测结果或实时荧光 PCR 检测结果与鉴定指标吻合,可判定为检出葡萄苦腐病菌。

11 样品、菌种与结果记录

11.1 样品保存与处理

样品经登记和经手人签字后妥善保存。对检出葡萄苦腐病菌的样品应保存于冰箱中,以备复核。该类样品应至少保存 6 个月,保存期满后须经高压灭菌后方可处理。

11.2 菌株保存与处理

将菌株妥善保存,标注分离物来源、寄主、分离时间和鉴定人。对不需要长期保存的菌株应及时高压灭菌处理。

11.3 结果记录

需要保存的记录包括:样品的种类、自然状态、来源、为害状及为害程度(无症状也要说明),病菌宏观形态特征以及微观形态图像等图文资料,PCR 或实时荧光 PCR 应有扩增图片,鉴定实验室的名称,负责人和复核人的签字等。



附 录 A
(资料性)
葡萄苦腐病菌的相关资料

A.1 寄主范围

大部分葡萄(*Vitis* sp.)的栽培种和野生种,如夏葡萄(*Vitis aestivalis*)、美洲葡萄(*Vitis labrusca*)、圆叶葡萄(*Vitis rotundifolia*)、葡萄(*Vitis vinifera*)等。

A.2 地理分布

- 南美洲:乌拉圭。
- 北美洲:美国、古巴。
- 大洋洲:澳大利亚、新西兰。
- 欧洲:希腊、意大利、波兰、保加利亚、乌克兰。
- 非洲:巴西、南非。
- 亚洲:印度、日本、泰国。

A.3 病害症状

病菌主要危害葡萄的果穗,在新梢和叶片也有症状。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,有小疤,病斑内有分生孢子盘(见图 A.1)。图 A.2 展示了葡萄果实上病菌从侵染到发病整个过程的症状。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,果实在成熟期蔓延迅速,易引起软腐。

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。



图 A.1 葡萄苦腐病菌危害葡萄浆果的症状

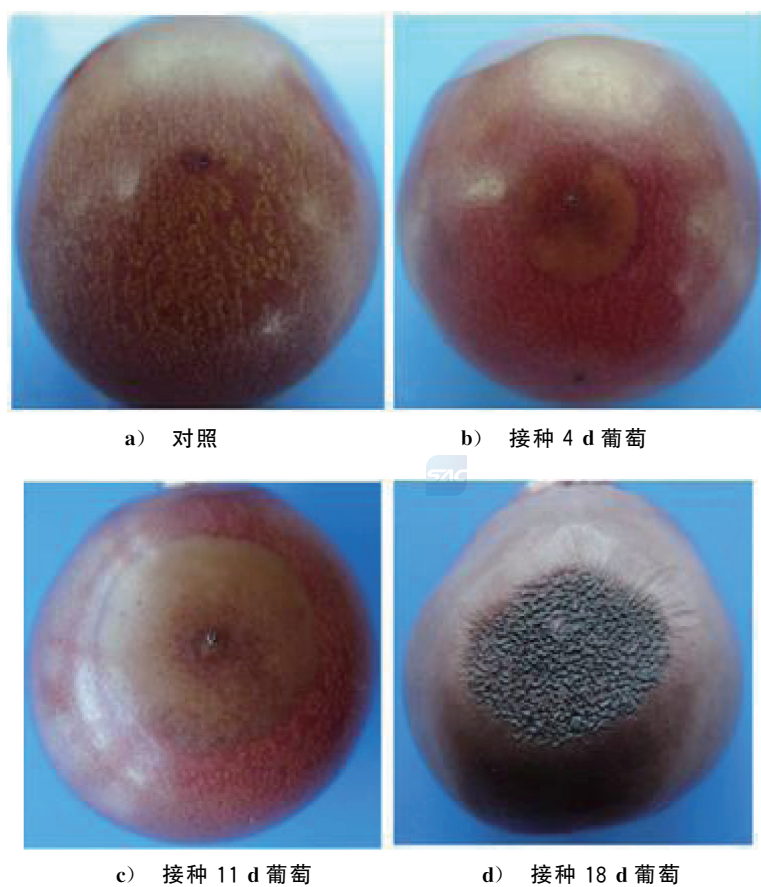


图 A.2 葡萄苦腐病菌接种的症状

A.4 传播途径

据资料报道,病菌从葡萄落花后,果梗形成木栓化皮孔疣突时开始,病菌侵染这些疣突的死细胞,并潜隐至果粒成熟。然后侵染果梗并转移到果粒,4 d 内便形成分生孢子。近距离传播由分生孢子通过伤口、自然孔口等侵入,不断进行再次侵染,蔓延迅速。远距离通过带病种苗或葡萄果实等,通过长途运输传播。

附 录 B

(规范性)

分子生物学鉴定

B.1 DNA 提取方法

使用下列方法提取病菌 DNA,或使用商业化试剂盒提取 DNA。

- a) 将灭菌的钢珠放在收集样品的 2 mL 离心管中,置于组织破碎仪上破碎组织细胞壁,加入 600 μ L 65 $^{\circ}$ C 预热的 CTAB 提取液:2% CTAB(7.1.3),1.4 mol/L NaCl(7.1.4),20 mmol/L EDTA(7.1.5),100 mmol/L Tris $\cdot$ HCl (7.1.6)pH 8.0,颠倒混匀后于 65 $^{\circ}$ C 水浴 0.5 h~1 h。
- b) 冷却至室温后,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液至另一离心管中。
- c) 加入 1/2 体积(300 μ L)的 Tris 饱和酚(7.1.7)及 1/2 体积(300 μ L)的三氯甲烷(7.1.8)、异戊醇(7.1.9)(三氯甲烷、异戊醇体积比为 24:1),颠倒混匀后静置至其开始分层。
- d) 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液至另一离心管中。
- e) 可重复 c)~d)2 次~3 次,视两相界面处杂质的多少而定。
- f) 加入等体积三氯甲烷、异戊醇(体积比为 24:1),轻轻颠倒混匀。
- g) 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液至另一离心管中。
- h) 向上清液中加入等体积异丙醇(7.1.10),轻轻颠倒混合均匀后于 4 $^{\circ}$ C 或 -20 $^{\circ}$ C 沉淀 1 h。
- i) 12 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液,加 500 μ L 70%(体积分数)乙醇(7.1.1)悬浮沉淀。
- j) 12 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,室温干燥。
- k) 加 50 μ L 无菌双蒸水(7.1.11)或 TE 缓冲液:10 mmol/L Tris $\cdot$ HCl(7.1.6),1 mol/L EDTA (7.1.5)pH 8.0 溶解沉淀,-20 $^{\circ}$ C 贮存备用。

B.2 PCR 检测

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

反应体系(25 μ L):样品 DNA(1 ng~50 ng)1 μ L,10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ L,25 mmol/L 氯化镁 2 μ L,2.5 mmol/L dNTPs 2 μ L,10 μ mol/L Primers 0.5 μ L /0.5 μ L,5 U/ μ L Taq DNA polymerase 0.2 μ L,无菌双蒸水 16.3 μ L。以含葡萄苦腐病菌的 DNA 作阳性对照、不含葡萄苦腐病菌的 DNA 作阴性对照、以无菌双蒸水作空白对照,每个样品设置 3 个重复。PCR 反应体系也可采用其他商业化试剂盒,具体操作步骤按试剂盒说明进行。

PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 1 min,53 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。

PCR 产物的检测在 1 $\times$ TAE(7.1.13)中,1.5%琼脂糖(7.1.14)凝胶电泳,5 V/cm,凝胶成像仪(6.11)分析结果。

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。

B.3 实时荧光 PCR 检测

实时荧光 PCR 引物序列为 PAF:5'-GCTTTCCGATGGTCGATTAGG-3',PAR:5'-GCGAGAA-CACATACCCATGGT-3',探针 PAP:5'-FAM-CGATGCAGCTTCTATT-MGB-3',探针的 5'端含有 FAM 报告荧光染料,3'端为含有不发荧光的淬灭基团并具有 MGB 分子。

反应体系(20 μ L):10 μ L 2 $\times$ Taq Man Universal PCR Master Mix(7.1.16),0.5 μ L 引物 PAF (20 μ mol/L),0.5 μ L 引物 PAR(20 μ mol/L),0.5 μ L 探针 PAP(20 μ mol/L),1 μ L 模板,无菌双蒸水补

足 20 μL 。实时荧光 PCR 反应体系也可采用其他商业化试剂盒,具体操作步骤按试剂盒说明进行。

反应条件:50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,共 40 个循环。

实时荧光 PCR 检测结果,在阳性对照、阴性对照、空白对照正常的情况,则有如下判定:

- 样品 Ct 值不小于 40.0 时,判定为阴性;
- 样品 Ct 值不大于 35.0,且出现典型的扩增曲线,判定为阳性;
- 样品 Ct 值在 35.0~40.0 之间时,增加 DNA 模板至 2 μL ~5 μL 再次测试,出现典型扩增曲线,且 Ct 值不大于 35,判定为阳性;其余情况判定为阴性。

附录 C

(资料性)

葡萄苦腐病菌的形态特征

葡萄苦腐病菌的菌落形态见图 C.1, 微观形态特征见图 C.2~图 C.4。

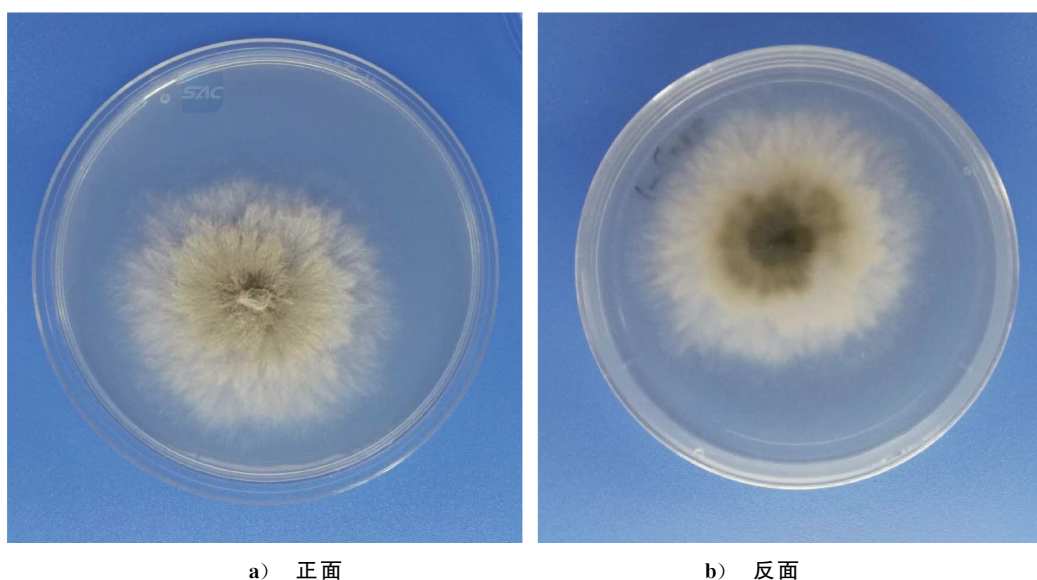


图 C.1 葡萄苦腐病菌在 PDA 培养基上的形态特征(培养 7 d)

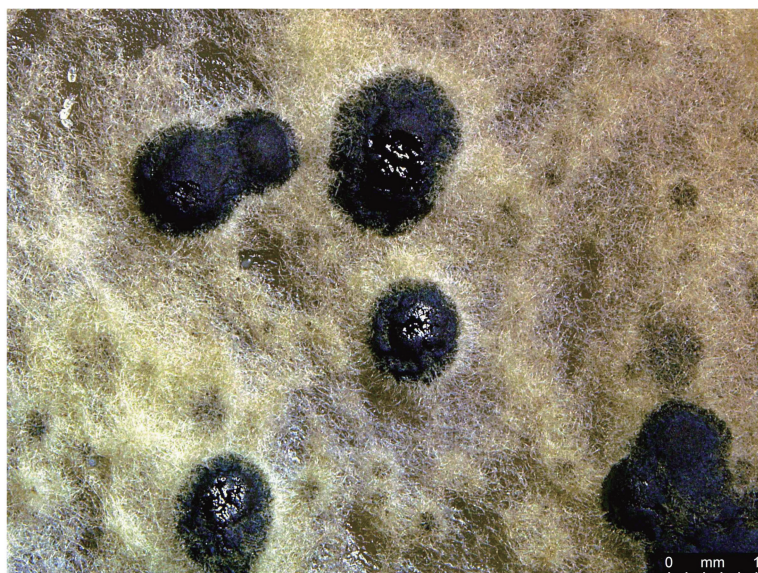


图 C.2 葡萄苦腐病菌 PDA 培养基上产生的子座

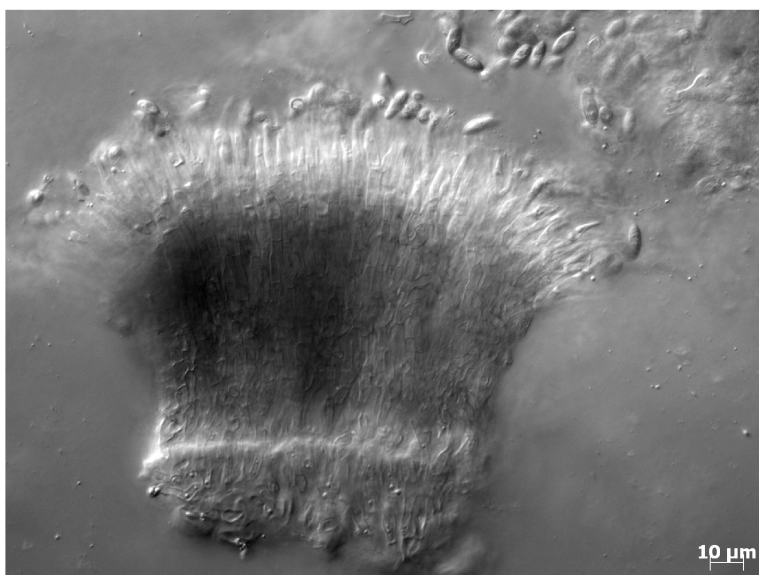


图 C.3 葡萄苦腐病菌分生孢子盘

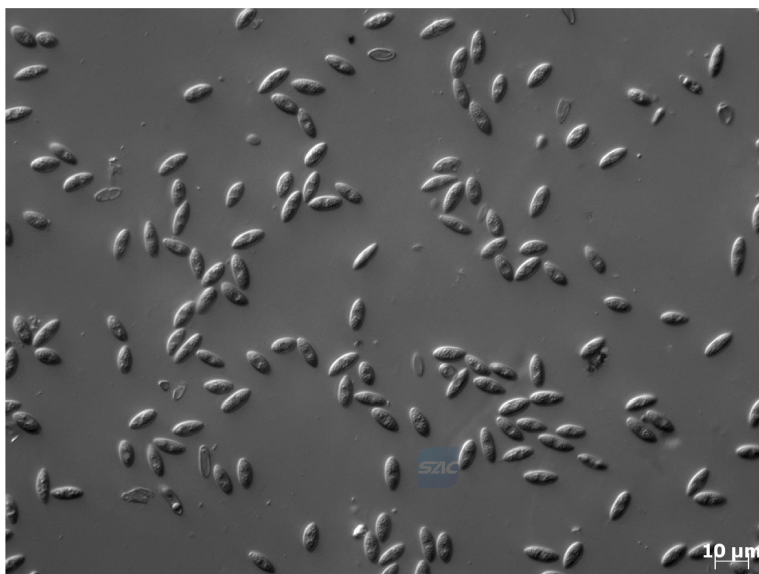


图 C.4 葡萄苦腐病菌分生孢子

参 考 文 献

- [1] SN/T 2614—2010 葡萄苦腐病菌检疫鉴定方法
 - [2] 杜洪忠, 吴品珊, 严进. 葡萄苦腐病菌的分子检测方法[J]. 植物检疫, 2009, 23(6): 13-15.
 - [3] 张慧丽, 段丽君, 李雪莲, 等. 来自于台湾地区葡萄苦腐病菌的检疫鉴定[J]. 植物检疫, 2018, 32(06): 38-45.
 - [4] Samuelian S K, Greer L, Savocchia S, etc. Detection and monitoring of *Greeneria uvicola* and *Colletotrichum acutatum* development on grapevines by Real-Time PCR [J]. Plant Disease, 2011, 95: 298-303.
 - [5] Chaoyu Cui, Junxi Jiang, Hui Ouyang. etc. First Report of *Greeneria uvicola* Causing Bitter Rot of Grape in China[J]. Journal of Phytopathology, 2015, 163(9): 780-782.
-