



中华人民共和国国家标准

GB/T 40135—2021

葡萄细菌性疫病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Xylophilus ampelinus* (Panagopoulos)
Willems *et al.*

2021-05-21 发布

2021-12-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
葡萄细菌性疫病菌检疫鉴定方法
GB/T 40135—2021

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址: www.spc.org.cn

服务热线: 400-168-0010

2021年5月第一版

*

书号: 155066 · 1-67505

版权专有 侵权必究

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。

本文件主要起草单位：长沙海关技术中心、中国检验检疫科学研究院、济南海关技术中心。

本文件主要起草人：周慧平、莫瑾、袁小雅、黄迎波、张红梅、王哲、朱金国、栗智平、彭梓、严珺。

葡萄细菌性疫病菌检疫鉴定方法

1 范围

本文件规定了葡萄细菌性疫病菌的分离培养、免疫学及分子生物学等检测鉴定方法。

本文件适用于葡萄及其繁殖材料中葡萄细菌性疫病菌的检疫和鉴定。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

SN/T 2122 进出境植物及植物产品检疫抽样方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 葡萄细菌性疫病菌分类信息

中文名:葡萄细菌性疫病菌、葡萄嗜木质菌

学名:*Xylophilus ampelinus* (Panagopoulos) Willems *et al.*, 1987

异名:*Xanthomonas ampelina* Panagopoulos, 1969

英文名:canker of grapevine, bacterial blight of grapevine

分类地位:细菌(Bacteria),真细菌(Eubacteria),变形菌门(Proteobacteria),变形菌纲(Betaproteobacteria),伯克霍尔德氏菌目(Burkholderiales),丛毛单胞菌科(Comamonadaceae),嗜木质菌属(*Xylophilus*)

其他信息见附录 A。

5 方法原理

根据葡萄细菌性疫病菌与抗体之间特异性反应,对待测物进行免疫学检测;根据葡萄细菌性疫病菌的特异性 DNA 序列进行分子生物学检测;根据葡萄细菌性疫病菌的培养性状、生物学特性以及危害症状等对病原菌进行分离培养,必要时进行致病性检测。

6 试剂、材料和培养基

6.1 试剂和材料

除有说明外,所有试验用试剂均为分析纯或生化试剂。

试剂:75%酒精、葡萄糖、琼脂糖、无菌双蒸水、十二烷基硫酸钠(SDS)、三氯甲烷、异戊醇、苯酚、异丙醇、无水乙醇、蛋白酶 K、核酸染料、DNA 分子质量标准物、50×TAE 电泳缓冲液。

试剂及其配制的信息见附录 B。

材料:植物基因组提取试剂盒、细菌基因组提取试剂盒、普通 PCR 反应试剂盒、荧光 PCR 反应试剂盒等。

6.2 培养基

YPGA 培养基、营养琼脂培养基(NA),培养基及其制备的信息见附录 C。分离培养基推荐用 YPGA,也可用 NA 代替。

7 仪器和用具

7.1 仪器

生物显微镜(放大倍数 400 倍以上)、恒温培养箱、电子天平(千分之一)、植物光照培养箱、冰箱、离心机、酶标仪、电泳仪、PCR 扩增仪、实时荧光定量 PCR 仪等。

7.2 用具

可调移液器(2.5 μ L,10 μ L,20 μ L,100 μ L,1 000 μ L)、吸头、离心管等。

8 检疫鉴定方法

8.1 现场取样

参照附录 A 中的症状描述观察藤茎(图 A.1)和叶片(图 A.2)是否有葡萄细菌性疫病菌的典型症状。对现场发现上述类似症状的植株进行取样。果实和植株取样方法按照 SN/T 2122。

8.2 样品处理

实验室用水应满足 GB/T 6682 要求。根据后续试验的需求可选择无菌水或不同的抽提缓冲液并做适当的稀释。

8.2.1 有症状植物材料

样品中包括多个植物组织或多个样品,应选择具有典型症状的植物组织分别分离病原菌。幼苗和藤茎、叶片的分离如下:

- a) 幼苗和藤茎:取葡萄幼苗或藤茎,将表皮或其他腐烂组织去除后,用无菌刀具取病健交界部位的维管束组织 0.5 cm~1 cm 数段放入 3 mL~5 mL 无菌水或无菌磷酸盐缓冲液中静置 10 min~15 min 得到抽提液。

也可取长约 5 cm 的幼苗或藤茎用自来水冲洗后迅速浸入 75%的酒精约 1 min,然后用无菌刀具将两端部分及坏死的病变组织移除,再将剩余部分浸入 75%的酒精后并使之燃烧(此部分仅适用于病原菌的分离)。待幼苗上的酒精烧尽后放入无菌塑料袋中,无菌塑料袋中按无菌水:植物组织=6:1 比例加入无菌蒸馏水,并捶打挤压幼苗。将此抽提液室温下轻轻搅动放置 40 min~60 min,或 5℃静置 16 h,1 000g 离心 5 min 备用。

- b) 叶片:用自来水清洗干净样品,再用 75%的酒精表面消毒并迅速用无菌水漂洗。无菌刀具截取病健交界部位的叶脉和叶柄捣碎后置于无菌水或无菌磷酸缓冲液中,静置 10 min~15 min

得到抽提液。

从幼苗和藤茎、叶片中得到的抽提液应即提即用。长期保存需在抽提液中加入无菌甘油(分析纯),无菌甘油占总体积的 20%~30%(体积分数), $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

8.2.2 无症状植物材料

无症状植物材料按照随机抽取的原则,按照 8.2.1 中方法获取抽提液。

也可将藤茎切成 1 cm~2 cm 长的小段置于 10 mL~15 mL 无菌磷酸缓冲液中,或用 50 mL 无菌注射器吸取收集藤茎汁液约 2 mL 置于无菌磷酸缓冲液中备用。

抽提液应即提即用。长期保存需在抽提液中加入无菌甘油(分析纯),无菌甘油占总体积的 20%~30%(体积分数), $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

8.2.3 葡萄果实

葡萄果实用自来水冲洗后迅速浸入 75%的酒精约 1 min,无菌操作去皮后置于无菌培养皿或无菌均质袋中,捣碎或均质后取葡萄汁液作为抽提液备用。

抽提液应即提即用。长期保存需在抽提液中加入无菌甘油(分析纯),无菌甘油占总体积的 20%~30%(体积分数), $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

8.3 免疫学检测

采用 ELISA 方法进行检测,按照说明书进行操作及结果判定。

8.4 分子生物学检测

8.4.1 模板制备

从 8.2 中得到的抽提液,按照附录 D 中的 D.1 提取总 DNA 作为分子生物学检测反应模板。对于分离培养得到的疑似菌株,可直接作为分子生物学检测反应模板。根据实验室条件,可选择下列任一方法(8.4.2 或 8.4.3)进行检测。

8.4.2 普通 PCR 和巢式 PCR

从抽提液或其他分离物中提取的 DNA 作为模板,进行普通 PCR 和巢式 PCR 检测。检测步骤和条件按照 D.2 进行。

8.4.3 实时荧光 PCR

从抽提液或其他分离物中提取的 DNA 作为模板,进行实时荧光 PCR 检测。检测步骤和条件按照 D.3 进行。

8.5 病原菌分离

8.5.1 有症状植物材料

取 8.2.1 中得到的液体直接涂布于 YPGA 平板,每个样品涂布 5 个~10 个平皿。 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养,从第三天起每天观察平板上菌落生长情况。典型菌落在培养基上生长慢,光滑不黏稠,有光泽,微凸,淡黄色,圆形,边缘整齐规则,培养 7 d~12 d 后大小约 2 mm。必要时可对菌落进行一次纯化培养。

8.5.2 无症状植物材料

取 8.2.2 中得到的液体 1.0 mL,用无菌水或磷酸缓冲液进行 10 倍、100 倍、1 000 倍稀释,各取 200 μL

稀释液用于 YPGA 平板涂布分离,每个稀释度涂布 5 个~10 个平皿。培养方法同 8.5.1。

8.6 致病性检测

必要时,可进行致病性测定。

致病性实验在盆栽易感菌葡萄藤茎或新扦插幼苗上进行。将在 YPGA 培养基上新鲜培养的疑似菌收集后用无菌水制成约 1×10^8 CFU/mL 的菌悬液,在幼苗藤茎上用无菌刀具切开 2 cm~4 cm 长并直达维管束深的新鲜伤口,将 1 滴~2 滴菌悬液接种到伤口上,或叶片新鲜伤口上,用无菌水蘸湿的灭菌棉覆盖伤口并用锡箔纸包扎,5 个~10 个重复。同法用葡萄细菌性疫病菌标准菌株做阳性对照,用无菌水做阴性对照,至少 2 个重复。接种后的葡萄幼苗置于 20 °C~27 °C,日照时间为 14 h~18 h、水分肥料充足的环境中培养 3 周~4 周。

致病性实验也可在试管内已生根的易感菌葡萄藤茎上进行,将在 YPGA 培养基上新鲜培养的疑似菌收集后用无菌水制成约 1×10^9 CFU/mL 的菌悬液,用无菌刀具将葡萄藤茎的最顶端切除后,将 1 滴菌悬液接种到伤口上,用无菌水蘸湿的灭菌棉覆盖伤口并用锡箔纸包扎,5 个~10 个重复。同法用葡萄细菌性疫病菌标准菌株做阳性对照,用无菌水做阴性对照,至少 2 个重复。接种后的葡萄幼苗置于 20 °C~27 °C,日照时间为 14 h~18 h 潮湿的环境中培养 3 周~4 周。

9 结果判定

9.1 有典型症状的植物组织

对样品抽提液或疑似菌株按照 8.3 和 8.4 进行检测,两种方法检测结果均为阳性的可判定为检出葡萄细菌性疫病菌;两种方法检测结果均为阴性的可判定为未检出葡萄细菌性疫病菌;检测结果中只有一个结果为阳性的,进行病原菌分离,分离得到典型或疑似菌株,经 8.3 或 8.4 任一方法(与初筛检测出阳性结果不同的方法)进行检测,结果为阳性的即判定为检出葡萄细菌性疫病菌,未分离到典型或疑似菌株,或菌株鉴定结果为阴性的判定为未检出葡萄细菌性疫病菌。

9.2 无典型症状的植物组织

对样品抽提液采用 8.3 和 8.4 方法进行检测筛选,筛选结果有一个阳性结果或两个均为阳性结果,进行病原菌分离,分离得到典型或疑似菌落按照 8.3 和 8.4 进行检测,必要时结合致病性实验结果,出现 2 个阳性结果则可判定检出葡萄细菌性疫病菌;两个均为阴性结果的可判定未检出葡萄细菌性疫病菌;结果有一个阳性的,可采用 8.4 中与检测出阳性结果不同的 PCR 方法或结合致病性实验进行进一步鉴定,进一步鉴定结果为阴性的可判定未检出葡萄细菌性疫病菌。

按 8.3 和 8.4 方法筛选结果均为阴性的可判定未检出葡萄细菌性疫病菌。未分离到典型或疑似菌落的,可判定未检出葡萄细菌性疫病菌。

10 样品保存

检出葡萄细菌性疫病菌的样品经登记和经手人签字后妥善保存 6 个月以上。保存期满后应经高压灭菌后方可处理。

11 菌种保存

分离并最终鉴定为葡萄细菌性疫病菌的菌株转接到 YPGA 培养基试管斜面上,登记和经手人签字后置于 4 °C 冰箱中保存,30 d 转接一次。也可将菌株冻干保存。

附 录 A

(资料性)

葡萄细菌性疫病菌

A.1 分布

该病菌目前分布在：南非、突尼斯、日本、土耳其、奥地利、比利时、保加利亚、法国、希腊、意大利、摩尔多瓦、荷兰、葡萄牙、塞尔维亚、斯洛文尼亚、西班牙、瑞士、联合王国(英国)、阿根廷、乌拉圭。

A.2 寄主

自然寄主：葡萄(*Vitis vinifera* Linn.)是目前知道的其唯一宿主。

A.3 发病特征

每年春季至 6 月在葡萄树上就可以观察到症状。12 cm~30 cm 长的藤条上,下方 2 或 3 节常先发病,然后逐渐向上扩展。初期出现红褐色的条斑,从藤条的茎部向顶端扩展,并逐渐发展成透镜状的开裂或溃疡,有时深达木髓,藤条最后萎蔫、干枯(见图 A.1)。在一些幼嫩的枝条上变色较少,整个枝条枯死,发病枝条较短,使葡萄出现矮化现象。茎秆横切面上,组织呈褐色。主枝、分枝发病和枝梢产生的症状一样。在叶上病菌经由叶柄、维管束侵入叶片,叶片常常枯死(见图 A.2)。另外病菌由气孔直接侵染叶片,这种侵染类型使叶片上产生红褐色的角斑。病菌从气孔侵染时,变成红褐色。温度较高时,病叶上可以看到淡黄色菌脓流出。花受到感染后,成熟前变黑和枯死。病原菌也能侵染葡萄的根,无论是嫁接植株还是自身砧木上的植株,都会使枝梢生长减慢。葡萄细菌性疫病菌的生活周期至今没有完全阐明,初侵染主要发生在 1~2 年生的枝条上,经过叶片、花和果实侵入植株,病原菌随着植株传播,尤其是在潮湿的有风的天气就更容易传播,然后在初夏季节扩散到其他新芽。病害发生需要温暖、潮湿的条件。

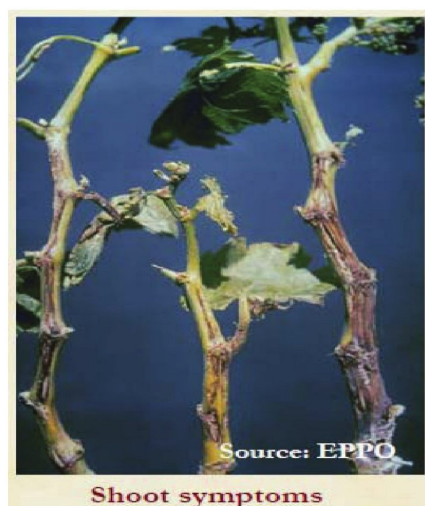


图 A.1 葡萄细菌性疫病在葡萄嫩苗上的危害状



图 A.2 葡萄细菌性疫病在葡萄叶片上的危害状

A.4 病菌生物学特性

菌体杆状、极端具1根鞭毛,大小0.4 mm~0.8 mm,革兰氏阴性菌。在YPGA培养基上,菌落光滑不黏稠,黄色,圆形,边缘整齐规则。在适当的培养基上25℃条件下培养7 d~12 d,菌落最大直径约2 mm。

A.5 传播方式

病原菌可以很容易地通过修剪工具传播,并主要通过修剪的伤口侵入健康组织。病菌可以在木材中存活,因此,可以通过带病插条在各个温室间传播。喷灌则有利于病菌传播。用来防治葡萄根瘤蚜的灌溉水也可能传播病菌。

病菌主要通过带菌的繁殖材料进行远距离传播,自然的传播仅局限于葡萄园内及周围区域。

附录 B

(资料性)

试 剂

B.1 磷酸缓冲液(0.01 mol/L)(PBS 0.01 mol/L)

氯化钠 8.0 g, 十二水磷酸氢二钠 2.7 g, 二水磷酸二氢钠 0.4 g, 蒸馏水 1 000 mL(pH7.2)。
加热煮沸后分装。121 ℃灭菌 15 min 备用。

B.2 TE 缓冲液

10 mmol/L Tris-HCl, pH8.0

1 mmol/L EDTA, pH8.0

B.3 TAE 电泳缓冲液(pH8.5)(50×)

Tris	242 g	冰乙酸	57.1 mL
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	37.5 g	蒸馏水	1 000 mL

B.4 10% 十二烷基硫酸钠(SDS)

SDS	100 g	蒸馏水	900 mL
-----	-------	-----	--------

加热至 68 ℃溶解, 定容至 1 000 mL。

附 录 C
(资料性)
培 养 基

C.1 YPGA 培养基

酵母浸出粉 5.0 g, 胨蛋白胨 5.0 g, D(+)葡萄糖 10.0 g, 琼脂粉 15.0 g。

将上述成分加入 1 000 mL 蒸馏水中, 加热煮沸至完全溶解, 分装后 121 ℃ 灭菌 15 min 备用 (pH6.5~7.0)。

C.2 NA 培养基

牛肉浸膏 3.0 g, 蛋白胨 5.0 g, NaCl 5.0 g, 琼脂粉 15.0 g。

将上述成分加入 1 000 mL 蒸馏水中, 加热煮沸至完全溶解, 分装后 121 ℃ 灭菌 15 min 备用 (pH7.3±0.1)。

附录 D

(规范性)

葡萄细菌性疫病菌的分子生物学检测方法

D.1 总 DNA 的提取

将 8.2 的步骤得到的液体移至一干净灭菌的离心管中,12 000 r/min 离心 15 min,弃上清。在沉淀中加入 TE 缓冲液 5 mL,10% SDS 溶液 300 μ L,20 mg/mL 蛋白酶 K 30 μ L,混匀,37 $^{\circ}$ C 水浴孵育 1 h。加入等体积的三氯甲烷-异戊醇(24:1),混匀。10 000 r/min 离心 5 min,将上清液移至一个新离心管中。加入等体积苯酚-三氯甲烷-异戊醇(25:24:1),混匀,10 000 r/min 离心 5 min,将上清液移至一新离心管。加入 0.6 倍体积的异丙醇,轻轻混匀,10 000 r/min 离心 5 min,弃上清,管中加入 70%乙醇洗涤沉淀,晾干,加入 50 μ L TE 缓冲液溶解 DNA 沉淀,−20 $^{\circ}$ C 长期保存。

也可采用商业化植物基因组 DNA 提取试剂盒按照操作说明提取样品总 DNA,疑似菌落用细菌基因组 DNA 提取试剂盒操作说明提取总 DNA,−20 $^{\circ}$ C 保存备用。

D.2 普通 PCR 和巢式 PCR 检测

D.2.1 普通 PCR 和巢式 PCR 引物信息

普通 PCR 和巢式 PCR 引物序列见表 D.1。

表 D.1 普通 PCR 和巢式 PCR 引物信息

PCR 类型	引物名称	引物序列	PCR 产物大小	目标基因
普通 PCR	Xa TS1	5'-TGCGTAGTTCAACACCAAAGT-3'	129 bp	ITS 序列 <i>rrn</i> 基因
	Xa TS2	5'-TATGACCCTCTTTCCACCAGC-3'		
巢式 PCR	Xa A1	5'-AGTCGTAACAAGGTAAGCCG-3'	742 bp	16s~23s rDNA
	Xa B1	5'-CYRYTGCCAAGCATCCACT-3'		
	Xa S3	5'-GGTGTTAGGCCGAGTAGTGAG-3'	277 bp	
	Xa S4	5'-GGTCTTTCACCTGACGCGTTA-3'		
注: 普通 PCR 引物信息来源 <i>Xylophilus ampelinus</i> 2009 OEPP/EPPO;巢式 PCR 引物信息来源:Detection of <i>Xylophilus ampelinus</i> in grapevine cuttings using a nested polymerase chain reaction,Plant Pathology。				

D.2.2 普通 PCR 和巢式 PCR 反应体系

检测葡萄细菌性疫病菌的普通 PCR 和巢式 PCR 反应体系见表 D.2。

表 D.2 检测葡萄细菌性疫病菌的 PCR 反应体系

组成		加样体积
普通 PCR 和巢式 PCR 第一轮	巢式 PCR 第二轮	
2 \times PCRMix	2 \times PCRMix	10.0 μ L
正向引物(10 pmol/ μ L)	正向引物(10 pmol/ μ L)	1.0 μ L

表 D.2 检测葡萄细菌性疫病菌的 PCR 反应体系 (续)

组成		加样体积
普通 PCR 和巢式 PCR 第一轮	巢式 PCR 第二轮	
反向引物(10 pmol/ μ L)	反向引物(10 pmol/ μ L)	1.0 μ L
模板 DNA(1 ng/ μ L~10 ng/ μ L)	第一轮 PCR 产物(10~100 倍稀释)	1.0 μ L
双蒸水	双蒸水	7.0 μ L
总体积	总体积	20 μ L

D.2.3 普通 PCR 和巢式 PCR 反应循环参数

普通 PCR:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C:30 s,60 $^{\circ}$ C:45 s,72 $^{\circ}$ C:45 s,进行 40 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min;4 $^{\circ}$ C 保存。

巢式 PCR:第一轮(引物对 Xa A1、Xa B1):94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C:30 s,56 $^{\circ}$ C:60 s,72 $^{\circ}$ C:60 s,进行 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min;4 $^{\circ}$ C 保存。

巢式 PCR:第二轮(引物对 Xa S3、Xa S4):94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C:30 s,60 $^{\circ}$ C:45 s,72 $^{\circ}$ C:45 s,进行 40 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min;4 $^{\circ}$ C 保存。

D.2.4 普通 PCR 和巢式 PCR 扩增及产物分析

D.2.4.1 普通 PCR

用葡萄细菌性疫病菌标准菌株基因组 DNA 作为阳性对照,用不含有葡萄细菌性疫病菌的葡萄植物组织材料或其他植物病原菌基因组 DNA 为阴性对照,用双蒸水作空白对照,进行 PCR 扩增。

用 TAE 电泳缓冲液制备 2%的琼脂糖凝胶,按比例混匀电泳上样缓冲液和 PCR 产物,将混有上样缓冲液的 PCR 扩增产物加至样品孔中,用 DNA Maker 作分子量的标记,进行电泳分析,电泳结束后,在凝胶成像分析仪下观察是否扩增出预期的特异性 DNA 电泳带,拍摄并记录实验结果。

待测样品扩增产物的电泳结果与阳性对照一致,阴性对照和空白对照未出现条带,则判断为阳性,未出现与阳性对照一致的条带则判断为阴性。

D.2.4.2 巢式 PCR

巢式 PCR 第一轮反应:以抽提液中提取的 DNA 或疑似菌株作为模板,用葡萄细菌性疫病菌标准菌株基因组 DNA 作为阳性对照,用不含有葡萄细菌性疫病菌的葡萄植物组织材料或其他植物病原菌基因组 DNA 为阴性对照,用双蒸水作空白对照,进行第一轮扩增和琼脂糖电泳分析。电泳结果显示,空白对照无扩增条带,阳性对照出现特异性带条,阴性对照和待测样品均出现数条条带。

巢式 PCR 第二轮反应:以第一轮扩增产物作为模板,进行第二轮扩增和琼脂糖电泳分析。待测样品扩增产物的电泳结果与阳性对照一致,阴性对照和空白对照未出现条带,则判断为阳性,未出现与阳性对照一致的条带则判断为阴性。

D.3 实时荧光 PCR 检测

D.3.1 实时荧光 PCR 引物信息

葡萄细菌性疫病菌实时荧光 PCR 检测的引物和探针见表 D.3。

表 D.3 实时荧光 PCR 引物和探针

引物名称	引物探针序列	PCR 产物大小	目标基因
Xamp 14F	5'-CCCGATGATAAATACCGAAAACTC-3'	91 bp	Xamp 1.27A, 16s rDNA
Xamp 104R	5'-TGTCTTCTGGTTGTTTTGGTTTAAAT-3'		
Xamp 14F/104 MGB	5'-FAM-AGCGCCTGACGCAT-MGB-3'		
注：实时荧光 PCR 引物和探针信息来源 <i>Xylophilus ampelinus</i> 2009 OEPP/EPPO。			

D.3.2 实时荧光 PCR 反应体系

实时荧光 PCR 反应体系见表 D.4。每个样品进行实时荧光 PCR 检测时应设置 2 个平行。

表 D.4 实时荧光定性 PCR 反应体系

组成	加样体积
2×PCRMix	10.0 μ L
正向引物(10 pmol/ μ L)	1.0 μ L
反向引物(10 pmol/ μ L)	1.0 μ L
探针(10 pmol/ μ L)	1.0 μ L
模板 DNA(1 ng/ μ L~10 ng/ μ L)	1.0 μ L
双蒸水	6.0 μ L
总体积	20 μ L

D.3.3 实时荧光 PCR 反应条件

实时荧光 PCR 反应循环参数为：预变性 95 $^{\circ}$ C, 10 min; 95 $^{\circ}$ C, 15 s, 60 $^{\circ}$ C, 1 min, 40 个循环。使用不同荧光 PCR 仪, 可对参数做适当调整。设置荧光 PCR 反应管荧光信号收集条件, 应与探针标记的报告基团一致。具体设置方法可参照仪器使用说明书。

D.3.4 实时荧光 PCR 结果判断

用葡萄细菌性疫病菌标准菌株基因组 DNA 作为阳性对照, 用不含有葡萄细菌性疫病菌的葡萄植物组织材料或其他植物病原菌基因组 DNA 为阴性对照, 用双蒸水作空白对照, 进行实时荧光 PCR 扩增。

在阳性对照、阴性对照和空白对照均成立的情况下：

- 疑似分离物：出现典型扩增曲线判定为阳性；无典型扩增曲线判定为阴性。
- 样品检测：出现典型扩增曲线, 且 CT 值 ≤ 35 , 判定为阳性； $35 < \text{Ct 值} \leq 40$, 增加 DNA 用量 2~10 倍再次测试, 出现典型扩增曲线, 且 CT 值 ≤ 35 , 判定为阳性；其余情况判定为阴性。

参 考 文 献

- [1] *Xylophilus ampelinus* 2009 OEPP/EPPO, Bulletin 39, 403-412.
- [2] T. Dreo, G. Seljak, J. D. Janse, I. Van der Beld, L. Tjou-Tam-Sin, P. Gorkink-Smits, M. Ravnikar. First laboratory confirmation of *Xylophilus ampelinus* in Slovenia. 2005, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 35, 149-155.
- [3] W. J. Botha, S. Serfontein, M. M. Greyling, D. K. Berger. Detection of *Xylophilus ampelinus* in grapevine cuttings using a nested polymerase chain reaction. Plant Pathology(2001)50, 515-526.
- [4] Tsutomu Komatsu, Norio Kondo. Winter habitat of *Xylophilus ampelinus*, the cause of bacterial blight of grapevine, in Japan. J Gen Plant Pathol(2015)81:237-242.
- [5] Data Sheets on Quarantine Pest *Xylophilus ampelinus* Prepared by CABI and EPPO for the EU under Contract 90/399003.
- [6] T. Dreo, K. Gruden, C. Manceau, J. D. Janse, M. Ravnikar. Development of a real-time PCR-based method for detection of *Xylophilus ampelinus*. Plant Pathology(2007)56, 9-16.
- [7] A. Willems, M. Gillis, K. Kersters, L. Van Den Broecke, J. De Ley. Transfer of *Xanthomonas ampelina* Panagopoulos, 1969 to a New Genus, *Xylophilus* gen. nov., as *Xylophilus ampelinus* (Panagopoulos 1969) comb. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, Oct. 1987, p. 422-430.
- [8] Tsutomu Komatsu, Akinori Shinmura, Norio Kondo. DNA type analysis to differentiate strains of from Europe and Hokkaido. Japan, J Gen Plant Pathol(2016)82:159-164.
- [9] CABI, Crop Protection Compendium; <http://www.cabi.org/cpc>.
- [10] EPPO Global Database, <https://gd.eppo.int>.



GB/T 40135-2021



码上扫一扫 正版服务到

版权专有 侵权必究

*

书号:155066 • 1-67505