



中华人民共和国国家标准

GB/T 40252—2021

美澳型核果褐腐病菌活性检测方法

Viability test of *Monilinia fruticola* (G.Winter) Honey

2021-05-21 发布

2021-12-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

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：中华人民共和国深圳海关、深圳市检验检疫科学研究院、深圳市仙湖植物园。

本文件主要起草人：章桂明、王颖、高瑞芳、程颖慧、朱子钦、李娜、黄河清、刘莹。

美澳型核果褐腐病菌活性检测方法

1 范围

本文件描述了应用普通荧光显微镜或激光扫描共聚焦显微镜对美澳型核果褐腐病菌[*Monilinia fruticola* (G. Winter) Honey]进行活性检测的方法。

本文件适用于美澳型核果褐腐病菌相关寄主中携带美澳型核果褐腐病菌的分生孢子活性检测。

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。

SN/T 2589 植物病原真菌检测规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

活性 viability

具有生命力的一种性质。

3.2

分生孢子活性 conidial viability

分生孢子具有生命力的一种性质。

注:分生孢子具有活性,说明分生孢子是活的;分生孢子不具有活性,说明分生孢子是死的。

4 基本信息

中文名:美澳型核果褐腐病菌

英文名: pathogen of American brown rot of stone fruit

学名: *Monilinia fruticola* (G. Winter) Honey

曾用名: *Sclerotinia fruticola* (Winter) Rehm.

无性态: *Monilia fruticola* Batra

分类地位: 属真菌界(Fungi), 子囊菌门(Ascomycota) 子囊菌纲(Ascomycetes), 柔膜菌目(Helotiales), 核盘菌科(Sclerotiniaceae), 链核盘菌属(*Monilinia*)。

美澳型核果褐腐病菌寄主、症状、菌落特征及分生孢子形态学特征见附录 A。

5 原理

分别应用二乙酸荧光素(Flourescein Diacetate, FDA)和碘化丙啉(Propidium Iodide, PI)荧光染料

对美澳型核果褐腐病菌孢子进行染色处理,根据 FDA 可通过细胞代谢留在活细胞内,使具有活性的孢子发出绿色荧光,如果细胞膜损伤,则荧光素流失,因而使不具有活性的孢子不发出荧光;PI 能够穿透正在死亡或者已经死亡的细胞膜,使不具活性的孢子发出红色荧光,PI 不能透过具有活力的细胞膜,使具有活性的孢子不发出荧光。根据上述特点并运用普通荧光显微镜或激光扫描共聚焦显微镜对病菌分生孢子进行活性检测,分析分生孢子的死活。

6 仪器和试剂

6.1 仪器用具

普通荧光显微镜或激光扫描共聚焦显微镜、超净级工作台、天平、高压灭菌锅、生化培养箱、冰箱、离心机。

6.2 试剂

二乙酸荧光素(Flourescein Diacetate,FDA):称取 0.1 g FDA 粉末,加入 10 mL 丙酮,配制成浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的母液,置于棕色瓶 4°C 避光保存。使用前用丙酮稀释,配置成 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的工作液。

碘化丙啶(Propidium Iodide,PI):称取 0.01 g PI 粉末,加入 10 mL 无菌水,配制成浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的母液,置于棕色瓶 4°C 避光保存,使用前用无菌水稀释,配置成 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的工作液。

6.3 主要培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):200 g 去皮马铃薯切成小方块,加入 1 000 mL 自来水,煮沸 15 min,用四层纱布过滤得到滤液,滤液中加入 18 g 葡萄糖、18 g 琼脂粉,加热溶解后将溶液定容至 1 000 mL,分装到三角瓶中, 121°C 高压蒸汽灭菌 20 min。

7 活性检测方法

7.1 检测样品制备

刮取寄主症状病征的分生孢子装入到有无菌水的离心管中,配制成终浓度为每微升含 10 个~100 个孢子的孢子悬浮液,镜检,备用。

7.2 孢子染色

7.2.1 FDA 染色

取 $199 \mu\text{L}$ 孢子悬浮液,加入 $1 \mu\text{L}$ 质量浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 FDA,混匀,于室温下避光染色 15 min, $16\ 000 g$ 离心 1 min,弃上清液终止染色,加入灭菌去离子水洗涤一次,重新悬浮。现配现用,避光放置。

7.2.2 PI 染色

取 $199 \mu\text{L}$ 孢子悬浮液,加入 $1 \mu\text{L}$ 质量浓度为 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 PI,混匀,于室温下避光染色 4 min, $16\ 000 g$ 离心 1 min 弃上清液终止染色,加灭菌去离子水洗涤一次,重新悬浮。现配现用,避光放置。

7.3 普通荧光显微镜或激光扫描共聚焦显微镜活性检测

7.3.1 普通荧光显微镜检测

7.3.1.1 制片

吸取 5 μL 活性染料处理之后的样品制备玻片,封片。

7.3.1.2 检测

将制好的破片立即放置于普通荧光显微镜载物台上,在低倍镜下找到孢子,然后转至 40 倍镜下观察,微调至视野内图像清晰下观察并计数。至少检测 30 个孢子,观察染色情况。

FDA 染色检测:将荧光光路打开,设置荧光通道的激发波长 488 nm,收集荧光信号的发射波长 530 nm,收集荧光信号。微调至视野内图像清晰。(见附录 B)

PI 染色检测:将荧光光路打开,设置荧光通道的激发波长 534 nm,收集荧光信号的发射波长 617 nm,收集荧光信号。微调至视野内图像清晰。(见附录 B)

注:为了保证图像能够反映出孢子最真实的荧光染色情况,特别需要观察明场通道下所得到孢子图像是否清晰。

7.3.2 激光扫描共聚焦显微镜活性检测

7.3.2.1 制片

吸取 5 μL 活性染料处理之后的样品制备玻片,封片。

7.3.2.2 激光设置

选择相应的激光管(氩离子激光器)激发荧光信号,FDA 检测设置荧光通道的激发波长(488 nm),收集荧光信号的发射波长(530 nm),并设置一个明场通道作为对照。PI 检测设置荧光通道的激发波长(534 nm),收集荧光信号的发射波长(617 nm),并设置一个明场通道作为对照。

7.3.2.3 扫描设置

选择低像素扫描模式扫描(xy:512 \times 512),重复扫描次数 Average 为 1 次,扫描速度 Speed 为 9,根据成像效果调整探测针孔 Pinhole、光电倍增管增益 Gain 和激光扫描强度 Scan Str 等参数,将图像调整至质量较好的效果。再用精确扫描方式(xy:2 048 \times 2 048)然后根据信噪比调整扫描模式,选择精确像素的平面扫描方式进行粗略扫描(xy:2 048 \times 2 048),重复扫描次数 Average 为 2 次,扫描速度 Speed 为 6,获取最终图像。

7.3.2.4 检测

将制好的破片立即放置于激光扫描共聚焦显微镜载物台上,低倍镜下找到孢子,转到 40 倍镜下观察,微调至视野内图像清晰,扫描至少 30 个孢子,观察染色结果。(见附录 C)

注:为了保证图像能够反映出孢子最真实的荧光染色情况,特别需要观察明场通道下所得到孢子图像是否清晰。

8 结果判断与表述

通过普通荧光显微镜或激光共聚焦显微镜扫描检测分别经 FDA 和 PI 处理至少 30 个分生孢子。结果判断与表述如下:

——如经 FDA 处理检测到分生孢子发绿色荧光,以及经 PI 处理检测到分生孢子不发荧光,则判定该分生孢子具有活性;

——如经 PI 处理检测到分生孢子发红色荧光,以及经 FDA 处理检测到分生孢子不发荧光,则判定该分生孢子不具有活性。

9 样品与原始数据集保存

9.1 样品保存

存查样品应视样品的状态采用相应的保存方式,妥善保存 6 个月。如发现具有活性的美澳型核果褐腐病菌孢子的,进行斜面保存,如涉及贸易纠纷则应保存到纠纷解决完毕。保存期满后,需经灭菌处理。样品保存方法应符合 SN/T 2589 的规定。

9.2 原始数据保存

样品检测结束后,其原始记录单和检验结果或证书应归档,妥善保管,以备复验、谈判和仲裁。

附录 A

(资料性)

美澳型核果褐腐病菌寄主、症状、菌落特征及分生孢子形态学特征

A.1 主要寄主

主要寄主有苹果 (*Malus domestica*)、番木瓜 (*Carica papaya*)、欧李 (*Cerasus Humilis*)、樱桃 (*Cerasus pseudocerasus*)、欧洲山茱萸 (*Cornus mas*)、杏 (*Prunus armeniaca*)、欧洲甜樱桃 (*Prunus avium*)、欧洲酸樱桃 (*Prunus Cerasus*)、欧洲李 (*Prunus domestica*)、扁桃 (*Prunus dulcis*)、桃 (*Prunus persica*)、李 (*Prunus salicina*)、杏李 (*Prunus simonii*)、葡萄 (*Vitis vinifera*)、枇杷 (*Eriobotrya Japonica*)，病菌还可在木瓜属 (*Chaenomeles*)、山楂属 (*Crataegus*)、榲桲属 (*Cydonia*)、枇杷属 (*Eriobotrya*)、刚竹属 (*Phyllostachys*)、李属 (*Prunus*)、梨属 (*Pyrus*) 等寄主上为害。

A.2 为害症状

该病害主要为害果实，病害发生初期果实表面上形成灰褐色圆形病斑，随后病斑迅速蔓延扩展至全果，并使果肉变褐软腐，病部表面产生散生的灰褐色绒球状霉层，最后病果大部分或完全腐烂脱落，或干缩成僵果悬挂枝条上经久不落。若在低湿度条件下，整个果实皱缩，干瘪。受侵染的花和叶变褐，枯萎，形成一个典型的枯萎状，在茎上造成褐色的凹陷区域(溃疡斑)，通常其表面聚集着树胶。潮湿条件下，在这些受侵染的组织上产生分生孢子梗束。

美澳型核果褐腐病菌为害症状见图 A.1。



a) 美澳型核果褐腐病在苹果上症状 b) 美澳型核果褐腐病在李上症状 c) 美澳型核果褐腐病在桃上症状

图 A.1 美澳型核果褐腐病菌为害症状图

A.3 菌落特征

菌落生长速度快，在 PDA 培养基上 22 ℃ 培养 8 d 左右，菌落可布满整个培养皿，呈同心轮纹状，菌落边缘完整，质地均匀，气生菌丝中等发达、呈绒球状，菌落颜色初期灰白，后期呈灰黄色或灰褐色、产孢量丰富、菌落表面的分生孢子堆呈同心轮纹圆环。

菌株在 PDA 培养基上生长菌落形态见图 A.2。



图 A.2 菌株在 PDA 上生长菌落形态

A.4 分生孢子形态学特征

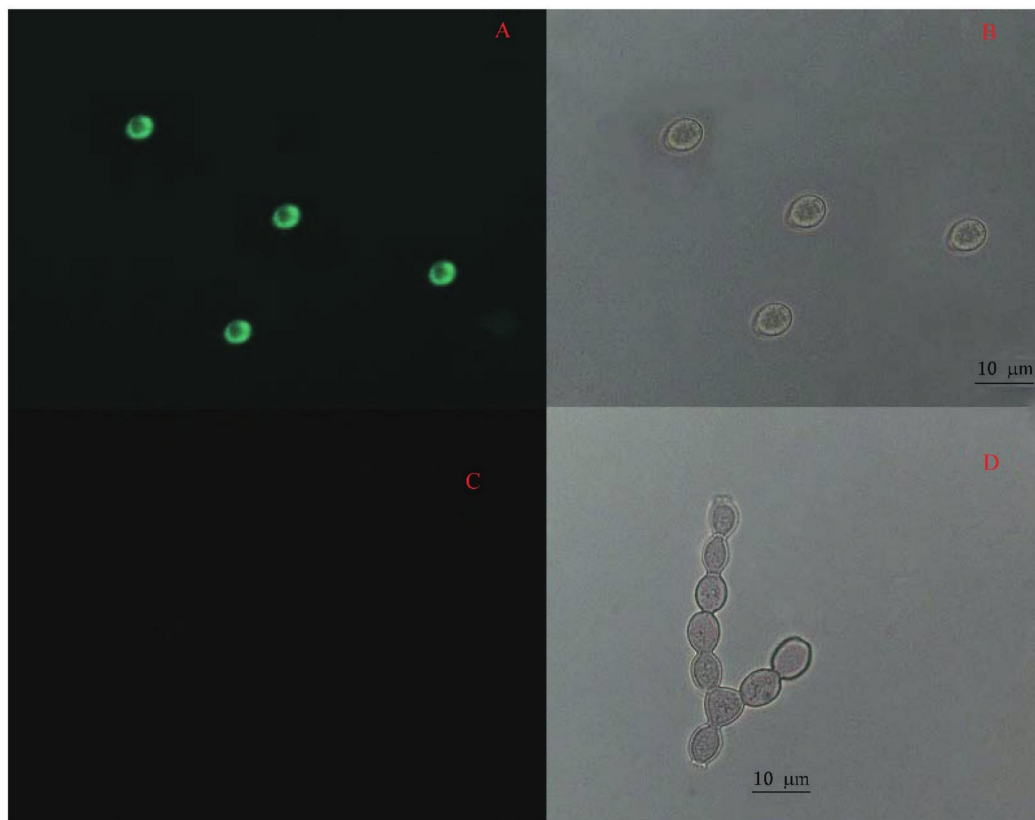
孢子链呈念珠状,柠檬形至椭圆形,有时顶部平截,大小为 $(8\ \mu\text{m}\sim 28\ \mu\text{m})\times(5\ \mu\text{m}\sim 19\ \mu\text{m})$,无色透明,聚集时为灰黄色。分生孢子梗较短,分枝或不分枝,顶端串生分生孢子。

附录 B

(资料性)

普通荧光显微镜对美澳型核果褐腐病菌孢子染色观察结果图

普通荧光显微镜观察 FDA 对美澳型核果褐腐病菌孢子染色效果见图 B.1。



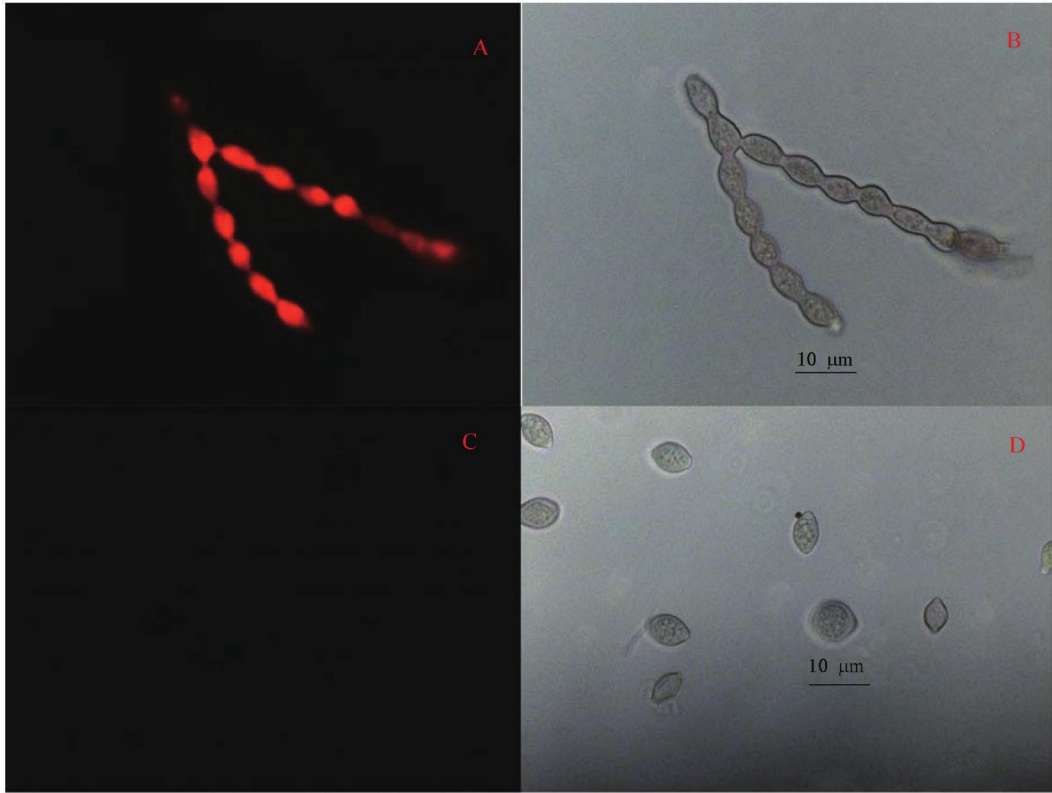
标引序号说明：

A,B —— 活孢子染色结果,A 为荧光通道,B 为明场；

C,D —— 死孢子染色结果,C 为荧光通道,D 为明场。

图 B.1 普通荧光显微镜观察 FDA 对美澳型核果褐腐病菌孢子染色效果图

普通荧光显微镜观察 PI 对美澳型核果褐腐病菌孢子染色效果见图 B.2。



标引序号说明:

A, B ——死孢子染色结果,A 为荧光通道,B 为明场;

C,D ——活孢子染色结果,C 为荧光通道,D 为明场。

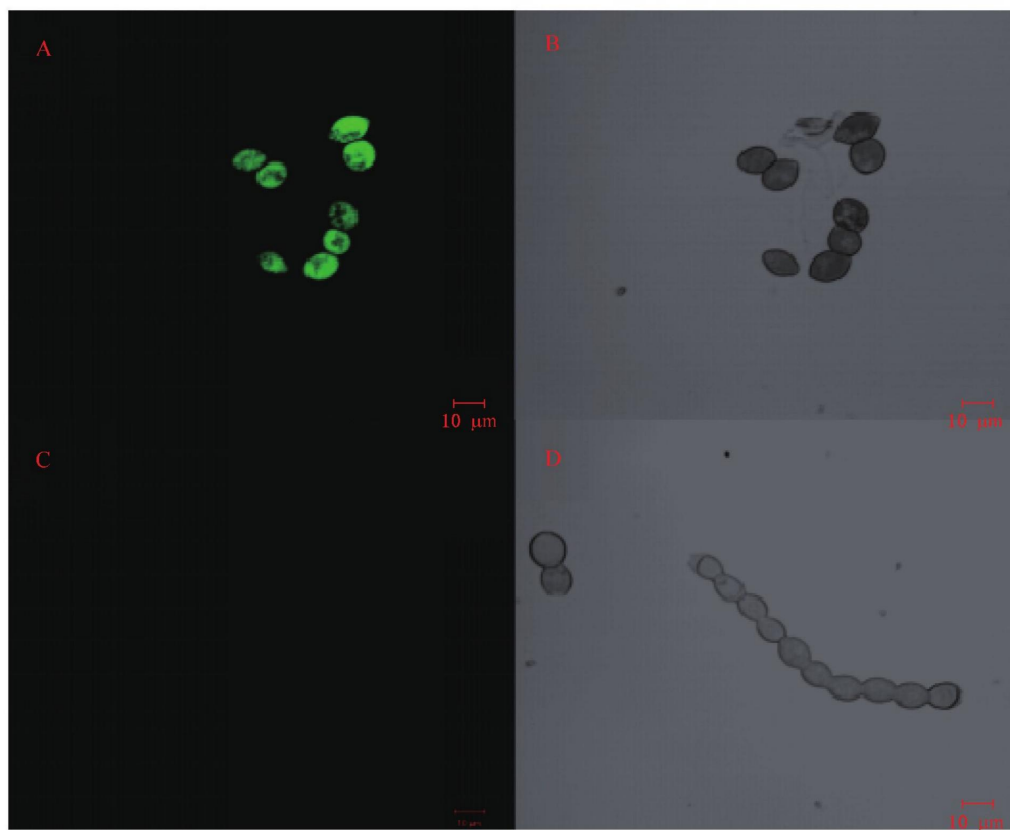
图 B.2 普通荧光显微镜观察 PI 对美澳型核果褐腐病菌孢子染色效果图

附录 C

(资料性)

激光共聚焦显微镜对美澳型核果褐腐病菌孢子染色观察结果图

激光共聚焦显微镜观察 FDA 对美澳型核果褐腐病菌孢子染色效果见图 C.1。



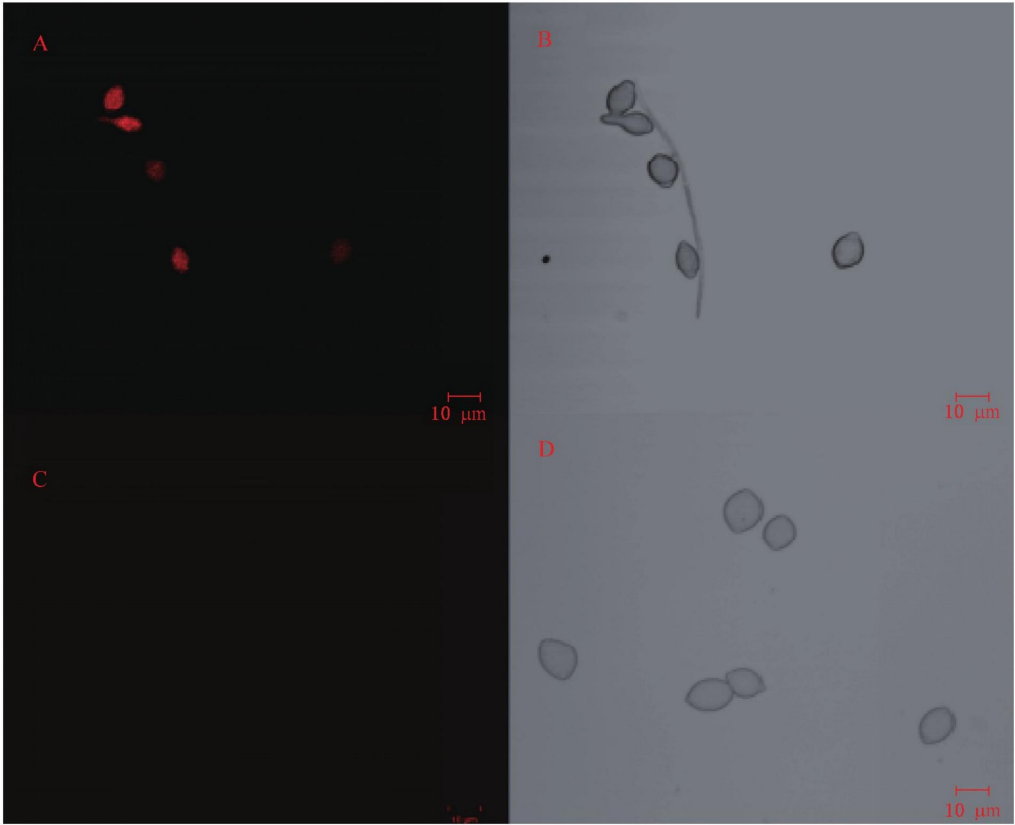
标引序号说明：

A,B —— 活孢子染色结果,A 为荧光通道,B 为明场；

C,D —— 死孢子染色结果,C 为荧光通道,D 为明场。

图 C.1 激光共聚焦显微镜观察 FDA 对美澳型核果褐腐病菌孢子染色效果图

激光共聚焦显微镜观察 PI 对美澳型核果褐腐病菌孢子染色效果见图 C.2。



标引序号说明：

A, B ——死孢子染色结果,A 为荧光通道,B 为明场；

C,D ——活孢子染色结果,C 为荧光通道,D 为明场。

图 C.2 激光共聚焦显微镜观察 PI 对美澳型核果褐腐病菌孢子染色效果图

参 考 文 献

- [1] SN/T 1871—2007 美澳型核果褐腐病菌检疫鉴定方法
- [2] 柴阿丽, 韩云, 武军, 等. 基于FDA-PI双荧光复染法的茄病镰刀菌孢子活性检测[J]. 中国农业科学, 2015, 48(14):2757-2766.
- [3] 陈耀文, 赖效莹. 激光扫描共聚焦显微镜系统及其在细胞生物学中的应用[J]. 激光生物学报, 1998(2):131-134.
- [4] 湛丽斌, 梁文艳, 曲久辉, 等. FDA-PI双色荧光法检测蓝藻细胞活性的研究[J]. 环境化学, 2005, 24(5):554-557.
- [5] 胡晓棣, 李熠, 任蜀豫, 等. 冬虫夏草、蛹虫草菌丝隔膜和细胞核荧光染色[J]. 菌物学报, 2016, 35(9):1099-1105.
- [6] 黄跃才, 章桂明, 刘作易, 等. 大豆猝死综合症病菌枝状镰孢的活性检测研究[J]. 菌物学报, 2009, 28(2):236-243.
- [7] 李叶, 黄华平, 林培群, 等. 激光扫描共聚焦显微镜[J]. 实验室研究与探索, 2015, 34(7):262-265.
- [8] 吴品珊, 严进, 国立耘. 美澳型核果褐腐病菌的检疫鉴定方法[J]. 植物检疫, 2007, 21(4):215-216.
- [9] Fan J Y, Guo L Y, Jian-Ping X U, et al.. Genetic Diversity of Populations of *Monilinia fructicola* (Fungi, Ascomycota, Helotiales) from China[J]. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2010, 57(2):206-212.
- [10] Hu M J, Chen Y, Chen S N, et al.. First report of brown rot of peach caused by *Monilinia fructicola* in southeastern China.[J]. Plant Disease, 2011, 95(2):225-225.
- [11] Hu M J, Cox K D, Schnabel G, et al.. *Monilinia* Species Causing Brown Rot of Peach in China[J]. Plos One, 2011, 6(9):e24990.

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
美澳型核果褐腐病菌活性检测方法
GB/T 40252—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 · 1-67752

版权专有 侵权必究



GB/T 40252-2021



码上扫一扫 正版服务到