

本诊断规程于 2016 年 8 月由标准委代表植检委通过。  
本附件是 ISPM 27 号标准规定的一部分。

# ISPM 27 号标准 限定有害生物诊断规程

## DP 13 : 梨火疫病菌 ( *Erwinia amylovora* )

2016 年通过 ; 2016 年出台

### 目 录

1. 有害生物信息 .....	3
2. 分类信息 .....	3
3. 检测 .....	4
3.1 显症植物的检测 .....	4
3.1.1 症状 .....	4
3.1.2 取样与样品制备 .....	5
3.1.3 分离 .....	5
3.1.3.1 从显症样品中分离 .....	5
3.1.3.2 富集分离 .....	7
3.1.4 血清学检测 .....	7
3.1.4.1 富集 - DASI-ELISA .....	7
3.1.4.2 直接组织印迹-ELISA .....	8
3.1.4.3 免疫荧光 .....	8
3.1.4.4 侧向层析免疫检测 .....	9
3.1.5 分子检测 .....	9
3.1.5.1 分子检测的对照 .....	9
3.1.5.2 DNA 提取 .....	10
3.1.5.3 通过 PCR 进行 DNA 扩增 .....	11
3.1.5.4 关于 PCR 的一般考虑 .....	13
3.1.5.5 实时 PCR .....	13
3.1.5.6 PCR 结果的解释 .....	15
3.1.5.7 环介导等温扩增 .....	15
3.2 对无症状植物的检测 .....	16
3.2.1 取样和样品制备 .....	16
3.2.2 筛选试验 .....	17
4. 鉴定 .....	17
4.1 营养学与酶学鉴定 .....	18
4.1.1 生物化学特征 .....	19

---

4.1.1.1	营养学与酶学图谱 .....	19
4.1.1.2	自动化鉴定 .....	20
4.1.1.3	脂肪酸分析 .....	20
4.2	血清学鉴定 .....	20
4.2.1	凝集反应.....	20
4.2.2	免疫荧光.....	20
4.2.3	ELISA.....	20
4.2.4	侧向层析免疫 .....	21
4.3	分子鉴定.....	21
4.3.1	PCR .....	21
4.3.2	巨限和脉冲场凝胶电泳.....	21
4.4	致病性技术 .....	21
5.	记录.....	22
6.	获取进一步信息的联络点 .....	22
7.	致谢.....	23
8.	参考文献 .....	23
9.	图 .....	27

## 1. 有害生物信息

梨火疫病菌 (*Erwinia amylovora*) 是火疫病的致病因子, 该病害可危害蔷薇科 (Rosaceae) 苹果亚科 (Maloideae) (绣线菊亚科 (Spiraeoideae)) 多数种类的植物。它是第一个被报道的细菌类植物病原物 (Burrill, 1883)。梨火疫病菌被认为最早在北美洲发生, 北美洲以外则是 1920 年首次在新西兰发现。火疫病 1957 年在英国报道, 此后在栽培感病寄主的欧洲多数地区均有发现。梨火疫病菌目前在 40 多个国家发生。在南美洲和多数非洲、亚洲国家 (地中海周边国家除外) 尚无发生记录, 澳大利亚曾有一例报道, 但随后已被根除 (van der Zwet, 2004)。它代表了对所有这些国家仁果类产业的一大威胁 (Bonn 和 van der Zwet, 2000)。有关地理分布的详细信息可获自欧洲与地中海植物保护组织 (EPPO) 的植物检疫数据检索系统 (Plant Quarantine Data Retrieval System) (EPPO, n.d.)。

从经济学和流行病学角度而言, 最重要的寄主植物包含木瓜属 (*Chaenomeles*)、栒子属 (*Cotoneaster*)、山楂属 (*Crataegus*)、榲桲属 (*Cydonia*)、枇杷属 (*Eriobotrya*)、苹果属 (*Malus*)、欧楂属 (*Mespilus*)、火棘属 (*Pyracantha*)、梨属 (*Pyrus*)、花楸属 (*Sorbus*) 和红果树属 (*Stranvaesia*) (Bradbury, 1986)。美国从悬钩子属植物 (*Rubus* sp.) 中分离到的梨火疫病菌菌株和从其他寄主上分离到的菌株明显不同 (Starr 等, 1951; Powney 等, 2011b)。

梨火疫病在很多国家可能是对梨 (*Pyrus communis*) 和苹果 (*Malus domestica*) 危害最重的细菌性病害。病害零星发生并取决于很多因素, 包含有利的环境条件、果园中有足够高的侵染源水平, 以及寄主的感病性。该病害易于随鸟类、昆虫和风雨传播 (Thomson, 2000)。火疫病症状随着寄主植物的季节性生长发育进程而发展。春季病害随着溃疡斑中越冬细菌产生初侵染源而开始发生 (Thomson, 2000) 并引起花器侵染, 入夏后继续侵染嫩梢和果实, 最后在冬季寄主休眠期形成溃疡斑 (van der Zwet 和 Beer, 1995; Thomson, 2000)。

## 2. 分类信息

**学名:** *Erwinia amylovora* (Burrill, 1883) Winslow 等, 1920

**异名:** *Micrococcus amylovorus* Burrill, 1883; *Bacillus amylovorus* (Burrill, 1883) Trevisan, 1889; “*Bacterium amylovorus*” [sic] (Burrill, 1883) Chester, 1897; *Erwinia amylovora* f.sp. *rubi* (Starr 等, 1951)

**分类地位:** 变形菌门 (Proteobacteria), Y 亚群 (Y subdivision), 肠杆菌目 (Enterobacteriales), 肠杆菌科 (Enterobacteriaceae)

**通用名:** 火疫 (EPPO, 2013)

### 3. 检测

可采用分离和血清学、分子检测方法对火疫病进行诊断。下文提及的检测方法在推荐前均通过以下一组或多组环形试验进行过评估：2003 年 10 个实验室参加的植物有害生物诊断规程（DIAGPRO）项目（López 等，2006）、2009 年 5 个实验室参加的欧洲植物检疫研究协调（EUPHRESKO）项目（Dreo 等，2009），以及 2010 年由世界范围内 14 个实验室共同实施的项目（López 等，2010）。图 1 和 2 说明的检测方法是诊断的最低要求，国家植物保护组织（NPPO）可要求做进一步的检测，在一个国家首次报道发生时尤其如此。例如，血清学方法可基于对某种特定蛋白质的检测来帮助对显症植物材料做出初步诊断；然而，还应使用基于不同生物学原理的其他方法来进行检测。在所有的检测方法中，必须设置阳性和阴性对照。

在本诊断规程中，各种方法（包含引用的商标名）的描述和发表时一样，因为它们决定了最初获得的灵敏度、特异性和/或再现性水平。本诊断规程对试剂、化学品或设备名称的使用，并不意味着对它们的认可，而排斥可能同样适用的其他品牌。只要经过充分验证，本规程提供的实验室程序可根据各个实验室的标准进行调整。

#### 3.1 显症植物的检测

图 1 中的流程图说明了推荐的筛选试验方法。

##### 3.1.1 症状

火疫病在梨、苹果、槭栎属（槭栎）、枇杷（*Eriobotrya japonica*）、栒子属（栒子）、火棘属（火棘）和山楂属（山楂）等多数常见寄主上症状相似且易于识别。该病害的名称形象地说明了其主要特征：嫩枝、花器和叶片出现褐色坏死，好像被火烧过一样。典型症状是感病枝条上的叶片变为褐色至黑色，有菌溢，枝梢呈典型的“牧羊鞭”状。取决于受侵染的植株部位，病害引起花枯、梢或枝枯、叶枯、果枯、大枝或主干枯萎，或“领腐”或砧木枯萎（van der Zwet 和 Keil, 1979; van der Zwet 和 Beer, 1995）。

在苹果和梨树上，最初的症状通常在早春潮湿天气下当平均气温超过 15 °C 时出现。受侵染的花器呈水渍状，随后枯萎、皱缩，变为橘黄色或褐色至黑色。花柄也呈水渍状，变为暗绿色，最终呈褐色至黑色，有时有粘稠状菌脓渗出。受侵染叶片枯萎皱缩，苹果整枝叶片变褐色，梨则变深褐色至黑色，并在树上保留一段时间。幼果受侵染后变褐色，也保留在树上。未成熟果实上的病斑呈油状或水渍状，变为褐色至黑色，并常有菌脓渗出。受侵染的大枝或幼枝剥掉树皮后，皮下组织中经常可以看到典型的红褐色条斑（van der Zwet 和 Keil, 1979; Thomson, 2000）。受侵染植物的嫩枝、大枝或主干树皮上形成褐色至黑色轻微凹陷的溃疡斑。溃疡斑后期因病健组织交界处附近开裂而受到限制（Thomson, 2000）。

火疫病的症状可能和其他病原细菌和真菌、昆虫危害或生理失调引起的枯萎类症状相互混淆，在花朵和花蕾上尤其如此。其他引起火疫病相似症状的细菌包含沙梨（*Pyrus pyrifolia*）（亚洲梨）细菌性梢枯病的致病因子亚洲梨火疫病菌

(*Erwinia pyrifoliae*) (Kim 等, 1999)、从西班牙坏死的梨花中分离到的 *Erwinia piriflorinigrans* (López 等, 2011)、日本最近报道的 *Erwinia uzensis* (Matsuura 等, 2012)、日本报道的引起细菌性枝枯病的其他欧文氏菌属细菌 (Tanii 等, 1981; Kim 等, 2001a, 2001b; Palacio-Bielsa 等, 2012), 以及花枯病的致病因子丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*)。火疫病的确切诊断总要通过实验室检测才能完成。

### 3.1.2 取样与样品制备

植物材料采集后应尽快检测, 处理前也可在 4-8 °C 下最长保存一个星期。采集样品时, 以及在运输和处理过程中应注意避免交叉污染, 在分离细菌或提取 DNA 时尤其如此。

样品处理应采用对分离、血清学检测和多聚酶链式反应 (PCR) 检测都有效的通用程序。如 Gorris 等 (1996) 所述, 为了成功进行富集, 要使用新制备的抗氧化剂浸渍缓冲液 (聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)-10, 20 g; 甘露醇, 10 g; 抗坏血酸, 1.76 g; 还原型谷胱甘肽, 3 g; 磷酸盐缓冲液 (PBS), 10 mM, 1 l; pH 7.2; 过滤除菌)。样品也可以用无菌蒸馏水或 pH 7.2 的 PBS (NaCl, 8 g; KCl, 0.2 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 2.9 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 g; 蒸馏水, 1 l) 处理, 直接用于分离、免疫荧光检测或 PCR。

应小心选择表现出最典型症状, 并在可能的情况下带有菌溢的植物部位 (花朵、嫩梢、幼枝、叶片或果实)。处理用的材料要从病斑最先发病部位挑取。将植物组织切成大约 0.1-1.0 g 的小块, 按照 1:50 (w/v) 的比例在抗氧化剂浸渍缓冲液、PBS 或无菌蒸馏水 (如前段所述) 中轻轻挤压, 静置至少 5 min, 并在冰块上放置几分钟。从每份浸出液中取出 3 份样品 (每份 1 ml), 转移至无菌微型离心管中, 其中一管保存在 -20 °C 下供后续 PCR 分析, 另一管调节至含 30% 甘油并保存在 -80 °C 下供必要时的验证检测。第三管在酶联免疫吸附试验 (ELISA) 或 PCR 前置于冰块上进行富集, 并在选择性培养基上进行分离 (图 1)。如果要进行免疫荧光检测 (即免疫荧光检测是选择性的), 应在样品浸渍的同一天制备并固定玻片。方便时应尽快使用保存在 -20 °C 下的浸出样品进行 PCR 检测。

### 3.1.3 分离

#### 3.1.3.1 从显症样品中分离

一般而言, 建议在三种培养基上涂板以尽可能检获梨火疫病病菌, 样品条件不好时尤应如此。取决于样品中微生物群的数量和构成, 每种培养基的效率可能高低不一。已通过两组环形试验对三种培养基 (CCT、金氏 B 和果聚糖) 进行过验证, 其中果聚糖培养基出菌率最高。

当症状到了后期, 或者侵染后的环境条件不适于细菌繁殖时, 可培养的梨火疫病病菌细胞数量可能很少。在这些情况下进行分离可能导致涂板中只有很少几个病原细胞, 因而被腐生和拮抗细菌淹没。如果怀疑出现这种情况, 应重新对样品进行

检测，并且/或者在分离前进行富集。已报道可通过铜处理诱导离体或水果上的梨火疫病病菌进入可逆的活的非可培养状态（VNBC）（Ordax 等, 2009），这可能是导致假阴性分离结果的原因。建议的培养基成分说明如下：

- CCT 培养基分两部分制备。第一部分含：蔗糖，100g；山梨糖醇，10g；硫酸四癸钠，1.2 ml；结晶紫，2 ml（0.1%乙醇溶剂）；营养琼脂，23 g；蒸馏水，1 l；pH 7.0–7.2；115 °C 高压灭菌 10 min。将灭过菌的培养基冷却至大约 45 °C。第二部分含：硝酸铈，2 ml（1% w/v 水溶液）；放线菌酮，0.05 g；过滤除菌。将第二部分加入 1 升无菌的第一部分培养基中（Ishimaru 和 Klos, 1984）。
- 金氏 B 培养基含：3 号示蛋白胨，20 g；甘油，10 ml；K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>，1.5 g；MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O，1.5 g；琼脂，15 g；蒸馏水，1 l；pH 7.0–7.2；120 °C 高压灭菌 20 min（King 等, 1954）。
- 果聚糖培养基含：酵母提取物，2g；细菌蛋白胨，5 g；NaCl，5 g；蔗糖，50 g；琼脂，20 g；蒸馏水，1 l；pH 7.0–7.2；120 °C 高压灭菌 20 min。

预计在分离时有真菌存在时，在金氏与果聚糖培养基中加入 0.05 g/l 放线菌酮。用 PBS（NaCl，8 g；KCl，0.2 g；Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O，2.9 g；KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，0.2 g；蒸馏水，1 l）按 1:10 和 1:100 的比例制备每种浸出液的稀释液。

最好在 130 mm 平板上通过三区划线涂抹 100 µl 浸出液及其稀释液，或在标准的 90 mm 培养皿中涂抹 50 µl。平板在 25 °C 下最多培养 4 天。通常在 72 h 时进行最终读数。梨火疫病病菌在 CCT 培养基上的菌落为淡紫色，圆形，高度凸起至半球状，光滑且呈黏液状，而且比在金氏或果聚糖培养基上生长得更加缓慢。在金氏培养基上的菌落为乳白色，圆形，在 366 nm 的紫外光（UV）下不发生荧光。在果聚糖培养基上为白色，圆形，半球状，光滑且呈黏液状。已有人报道过梨火疫病病菌的果聚糖阴性菌落（Bereswill 等, 1997）。

通过稀释并在金氏 B 培养基上划线可以从每个样品的单个疑似菌落获取纯培养物。最好通过双抗体夹心间接（DASI）-ELISA、PCR 或其他适宜的检测方法（例如生物化学、免疫荧光检测、脂肪酸成分分析）来鉴定梨火疫病病菌的疑似菌落，也可按照 4 节提到的方法，对现有的任一梨火疫病病菌寄主的感病器官进行接种来检测致病性。

检测显症样品时，可以预期细菌分离、免疫荧光检测、富集-DASI-ELISA（3.1.4.1 节）和 PCR 法之间具有良好的关联关系。

在 2003 年和 2010 年环形试验中，金氏 B 培养基的分离准确性为 0.88 和 0.81，果聚糖培养基为 0.92 和 0.89，CCT 培养基为 0.92 和 0.95（López 等, 2006；M.M. Lopez, 个人通讯, 2012）。在 2009 年环形试验中，CCT 培养基的分离准确性为 0.96（Dreo 等, 2009）。

### 3.1.3.2 富集分离

富集用于增殖一个样品中可培养的梨火疫病菌的最初菌群，以便实施富集-DASI-ELISA 或富集-PCR。如果预期可培养的梨火疫病菌数量很少（例如经过铜处理的样品、带有晚期症状的样品，以及在诸如冬天等对梨火疫病不利的天气条件下采集的样品），应在分离前进行富集（即使是显症样品也同样如此）。富集步骤可显著提高 DASI-ELISA 的灵敏度。因为微生物群的构成和菌群大小未知，建议使用两种经过验证的液体培养基进行富集，一种为非选择性（金氏 B 培养基），另一种为半选择性（CCT 培养基）。

按照 3.1.2 节描述的方法对组织样品进行浸渍，随后立即取 0.9 ml 浸出液分别加入两个各装有 0.9 ml 液体富集培养基（无琼脂的金氏 B 和使用营养肉汤而非营养琼脂制备的 CCT 培养基）的 10-15 ml 的无菌试管中（确保通风良好）。试管在 25 °C 下无震荡培养 48-72 h。在处理冬天采集的植物样品时建议培养更长时间。通过三区划线法将用 PBS 制备的富集肉汤和稀释液（1:10 与 1:100）涂抹在 CCT 平板上以获取分离菌落。平板在 25 °C 下培养 72-96 h。72 h 时对 CCT 平板进行最终读数，随后必须对菌落进行纯化和鉴定。

建议用半选择性培养基进行涂抹和稀释，因为富集步骤会让病原菌生长，也会让其他细菌大量繁殖。在 2010 年环形试验中，金氏 B 和 CCT 培养基上富集分离的准确性为 0.97。

### 3.1.4 血清学检测

#### 3.1.4.1 富集 – DASI-ELISA

已在两组环形试验中对一个用于富集-DASI-ELISA 的试剂盒进行过验证，该试剂盒可从 Plant Print Diagnostics SL<sup>1</sup>购得。它以 Gorris 等（1996）描述的两种特异性单克隆抗体的混合液为基础，要求按照前文描述的方法预先对样品进行富集。为了获得最大的准确性，必须严格遵循以下规程。在 ELISA 之前，将所需数量的经过富集的提取物和对照置于 100 °C 水浴中培养 10 min。这一处理对获得最大特异性十分必要。按照商业化试剂盒生产商提供的说明，在同一天通过 ELISA 对水浴过的样品进行处理（室温下）（或将其保存在 -20 °C 下供后续分析）。

如果重复样品孔中平均光密度（OD）读数 < 阴性样品提取物对照孔中 OD 值的 2x，则 ELISA 为阴性（如果经 90 min 培养后阳性对照孔中的 OD 值大于 1.0，且大于阴性样品提取物 OD 值的 2x）。如果重复样品孔中的平均 OD 值读数 > 阴性样品提取物对照孔中 OD 值的 2x，则 ELISA 为阳性（如果所有阴性对照孔低于阳性对照孔中平均 OD 值读数的 2x）。

---

<sup>1</sup> 在本诊断规程中，各种方法（包含引用的商标名）的描述和发表时一样，因为它们决定了最初获得的灵敏度、特异性和/或再现性水平。本诊断规程对试剂、化学品或设备名称的使用，并不意味着对它们的认可，而排斥可能同样适用的其他品牌。只要经过充分验证，本规程提供的实验室程序可根据各个实验室的标准进行调整。

阳性对照孔中负的 ELISA 读数表明未能正确地实施检测和/或未制备好反应物。阴性对照孔中正的 ELISA 读数则表明发生了交叉污染或非特异性抗体结合。在上述两种情况下，都应重新进行检测，或基于 PCR 等不同的生物学原理换一种方法检测。

在 2003 年和 2010 年环形试验中，采用金氏 B 培养基进行富集的 DASI-ELISA（金氏 B-DASI-ELISA）的准确性分别为 0.79 和 0.82，采用 CCT 培养基进行富集（CCT-DASI-ELISA）的则分别为 0.83 和 0.77（López 等，2006，2010）。

#### 3.1.4.2 直接组织印迹 – ELISA

为了生成组织印迹，将新切下来的植物部位轻轻挤压到硝化纤维膜上。制备阳性和阴性对照印迹。带有印迹的纤维膜可于室温下在干燥处保存数月。应使用诸如 Plant Print Diagnostics SL kit<sup>1</sup> 等已经验证的梨火疫病病菌抗体来源。为形成印迹，应遵循生产商的说明。在低倍放大镜（×10 或×20）下观察印迹。当紫色-蓝紫色沉淀出现在印在纤维膜上的植物组织部分，而未出现在阴性对照的植物组织印迹上时，检测结果为阳性。如果压印的是菌脓或菌落，阳性时应显示蓝紫色。和阴性对照一样，未出现紫色-蓝紫色沉淀时检测结果为阴性。

#### 3.1.4.3 免疫荧光

免疫荧光检测是推荐的另一种血清学方法，易于按照标准的规程实施（Anonymous, 1998）。应使用已经验证的梨火疫病病菌抗体来源。两种商业化抗体已在一组环形试验中进行过验证：其中一种单克隆抗体可从 Plant Print Diagnostics SL<sup>1</sup> 购得，另一种多克隆抗体由 Loewe Biochemicals<sup>1</sup> 提供。

应对固定在玻片上的新鲜样品提取物进行免疫荧光检测。将未经稀释的浸出液和用 PBS 按 1:10 与 1:100 比例稀释的稀释液滴加到免疫荧光玻片的小孔中。按适当比例用 PBS 稀释单克隆或多克隆抗体。用 PBS 稀释适宜的异硫氰酸荧光素（FITC）共轭物：单克隆抗体用山羊抗小鼠（GAM-FITC），多克隆抗体则用山羊抗兔（GAR-FITC）或抗山羊。

如果在阳性对照中观察到具有梨火疫病病菌典型形态特征绿色荧光细胞，而样品孔中观察不到，则样品检测为阴性。如果在阳性对照和样品孔中均观察到具有典型形态特征绿色荧光细胞，而阴性对照中观察不到，则样品检测为阳性。由于一般认为  $10^3$  细胞/ml 的菌群是通过免疫荧光检测法进行可靠检测的极限，对  $>10^3$  细胞/ml 的样品而言免疫荧光检测结果可认为是阳性。对于  $<10^3$  细胞/ml 的样品或仅发出微弱荧光的细胞而言，免疫荧光检测的结果可能要判为不确定。

在 2003 年环形试验中，使用 Plant Print Diagnostics SL<sup>1</sup> 单克隆抗体的免疫荧光检测的准确性为 0.70，使用 Loewe Biochemicals<sup>1</sup> 多克隆抗体的则为 0.72，确认该技术的灵敏度约为  $10^3$  菌落形成单位（c.f.u.）/ml。



### 3.1.4.4 侧向层析免疫检测

现在可以商业化获得两种用于植物材料快速检测的侧向层析免疫检测设备：Ea AgriStrip (Bioreba<sup>1</sup>) 和 Pocket Diagnostics (Forsite Diagnostics<sup>1</sup>)。根据生产商的说明，在 2009 和 2010 年环形检测中使用 Ea AgriStrip<sup>1</sup> 的准确性分别为 0.66 和 0.55，使用 Pocket Diagnostics<sup>1</sup> 的准确性则分别为 0.64 和 0.56。这些结果是在对梨火疫病菌浓度为 1-10<sup>6</sup> c.f.u./g 的样品进行检测时获得的，但检测浓度为 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> c.f.u./g 的样品时准确性约为 1.0，该浓度为显症样品中预期存在的最低数量 (López 等, 2010)。建议这两种试剂盒仅用于显症样品。

### 3.1.5 分子检测

有几种 PCR 方法和一个环介导等温扩增 (LAMP) 规程<sup>2</sup>可用于梨火疫病菌的检测，它们已由几个实验室通过环形试验进行过广泛评估 (Lopez 等, 2010; M.M. Lopez, 个人通讯, 2012)。Powney 等 (2011a) 已对上述方法中的几种进行过特异性评估。常规 PCR 方法可能更加费钱费时，而且相对于血清学方法通常需要更多的培训，出于上述原因，同时考虑到污染的风险，它们通常并不适用于大规模的检测。然而，实时 PCR、一些常规 PCR 和单管巢式 PCR 规程可产生高度准确的结果，因此是推荐使用的分子方法。由于梨火疫病菌寄主有大量的抑制剂，所有的 PCR 检测都应使用从样品，或从富集过的样品中提取的 DNA，这样可以提高检测的可靠性。

#### 3.1.5.1 分子检测的对照

为了获得可靠的检测结果，应考虑为每组核酸提取和目标核酸扩增设置适宜的对照—该对照取决于所采用的检测类型和所要求的确定性水平。对 PCR 而言，至少应采用一个阳性核酸对照、一个内对照和一个阴性扩增对照 (无模板对照)。

#### 阳性核酸对照

本对照用于监测检测方法 (提取除外)，特别是扩增的效率。可使用预先制备 (储存) 的核酸，全基因组扩增的 DNA 或合成对照 (例如 PCR 克隆产物)。

#### 内对照

对常规和实时 PCR 而言，应在规程中采用植物内对照 (例如一个诸如 COX (Weller 等, 2000) 或 16S 核糖体 (r) DNA (Weisberg 等, 1991) 的管家基因 (HKG)) 来排除因核酸提取失败、降解，或因存在 PCR 抑制剂而引起 PCR 假阴性的可能性。

#### 阴性扩增对照 (无模板对照)

<sup>2</sup> 为保护知识产权，在设有专利系统的地区经常使用 LAMP 时，例如日本 (no. s 3 313 358、3 974 441 与 4 139 424)、美国 (US6 410 278、US6 974 670 与 US7 494 790)、欧盟 (no. s 1 020 534、1 873 260、2 045 337 与 2 287 338)、中国 (ZL008818262)、韩国 (no. 10-0612551)、澳大利亚 (no. 779160) 和俄罗斯 (no. 2 252 964)，使用者必须在使用前获得 Eiken Chemical Co., Ltd 的许可。

常规与实时 PCR 必须设置本对照来排除因为反应混合液制备过程中污染引起的假阳性。在扩增阶段加入制备反应混合液所用的 PCR 级水。

### 阳性提取对照

本对照用于确保所提取的目标核酸的数量和质量足以保证检测到目标。从受侵染的寄主组织或用目标病原物接种过的健康植物组织中提取核酸。

阳性对照应约为每株植物用于 DNA 提取的叶片组织量的十分之一。

对 PCR 而言，应注意避免由阳性对照或阳性样品的气雾引起的交叉污染。必要时应对实验室所用的阳性对照进行测序，以便对该序列和从大小正确的 PCR 扩增产物中获取的序列进行比较。或者，可以合成已知序列的阳性对照，该对照同样可以与大小正确的 PCR 扩增产物进行比较。

### 阴性提取对照

本对照用于监测核酸提取过程中的污染和/或与寄主组织的交叉反应。本对照包含从未受侵染的寄主组织中提取，并随后进行扩增的核酸。预期有大量阳性样品时，建议采用多重对照。

#### 3.1.5.2 DNA 提取

有三种 DNA 提取方法 – Llop 等（1999）、Taylor 等（2001）和 REDExtract-N-Amp Plant PCR Kit（Sigma-Aldrich<sup>1</sup>）- 在 2009 年环形试验（Dreo 等，2009）中进行过评估，4 种 PCR 规程的准确性介于 0.67-0.76 之间。这些方法在 2010 年环形试验（Lopez 等，2010）中获得了具有可比性的结果，具体将在下文不同 PCR 方法的准确性描述中给予说明。在按 1:10 的比例对提取物进行稀释后，它们的效率并未得到改善，表明只有少量，甚至没有抑制剂存在。基于上述发现，建议采用 Llop 等（1999）的提取方法，因为该方法已在很多国家进行过广泛测试，成本低而且易于在实验室中使用。

#### 按照 Llop 等（1999）的方法提取 DNA

取 1ml 按照 3.1.2 节的方法制备的样品浸出液和/或 1 ml 经过富集的浸出液，室温下 10 000g 离心 5 min。倒掉上清液，将沉淀物重新悬浮在 500 µl 提取缓冲液（Tris-HCl pH 7.5，24.2 g；NaCl，14.6 g；乙二胺四乙酸（EDTA），9.3 g；十二烷基硫酸盐（SDS），5 g；PVP-10，20 g；蒸馏水，1 l；过滤除菌）中，室温下培养 1 h，然后 4 000 g 离心 5 min。取大约 450 µl 上清液与等量异丙醇混合，倒置，室温下静置 30 min 至 1 h。沉淀下来的核酸 10 000 g 离心 5 min，倒掉上清液，将沉淀物置于空气中干燥。如果离心管底部仍有带颜色（褐色或绿色）的沉淀物，倒掉上清液时应小心去除沉淀物，从而获得更加干净的 DNA 沉淀物。将沉淀物重新悬浮在 200 µl 水中。应立即用于 PCR 检测或置于-20 °C 下保存。

### 3.1.5.3 通过 PCR 进行 DNA 扩增

已报道过很多用于梨火疫病病菌检测的 PCR 引物和规程，其中有些已表现出特异性问题（Roselló 等，2006；Powney 等，2011a）。Bereswill 等（1992）和 Llop 等（2000）的那些引物和规程已在 2003 年环形试验中经过验证，它们需要或不需要经过提前富集；Taylor 等（2001）、Stöger 等（2006）与 Obradovic 等（2007）的则是在 2009 年和 2010 年经过验证。不带有 pEA29 质粒的梨火疫病病菌的强毒性菌株的发现（Llop 等，2006）和来自不同国家的经验（Powney 等，2011a）表明，应采用两种 PCR 规程：一种使用基于 pEA29 序列的引物，另一种使用以独特的染色体序列为目标的引物。如果采用以 pEA29 引物为基础的规程所做的 PCR 为阴性，而基于染色体引物的规程为阳性，则可认为 PCR 检测对梨火疫病病菌阳性。可采用环形试验验证过的引物和条件进行 PCR 检测，但是应针对不同的热循环仪对扩增条件进行优化。

#### 按照 Bereswill 等（1992）的方法进行的 PCR

引物为：

A（正向）：5'-CGG TTT TTA ACG CTG GG-3'

B（反向）：5'-GGG CAA ATA CTC GGA TT-3'

目标序列位于 pEA29 质粒中。PCR 混合液含：超纯水，17.4 μl；缓冲液 10×，2.5 μl；MgCl<sub>2</sub> 50 mM，1.5 μl；dNTPs 10 mM，0.5 μl；引物 A 10 pmol/μl，0.25 μl；引物 B 10 pmol/μl，0.25 μl；以及 Taq DNA 聚合酶 5 U/μl，0.1 μl。提取的 DNA 样品体积为 2.5 μl，应加入 22.5 μl PCR 混合液中。循环参数为变性步骤 93 °C 5 min，继以 40 个循环的 93 °C 30 s、52 °C 30 s 和 72 °C 1 min 15 s，以及最后的延伸步骤 72 °C 10 min。根据 Bereswill 等（1992），扩增产物的大小为 900 个碱基对（bp），但是取决于扩增片段中 8 bp 重复的数量，大小可在 900 和 1 100 bp 之间变化。

在 2003 年环形试验中准确性为 0.51，但在金氏 B 和 CCT 培养基上对样品进行富集后，分别提高到 0.74 和 0.78（López 等，2006）。

#### 按照 Taylor 等（2001）的方法进行的 PCR

引物为：

G1-F: 5'-CCT GCA TAA ATC ACC GCT GAC AGC TCA ATG-3'

G2-R: 5'-GCT ACC ACT GAT CGC TCG AAT CAA ATC GGC-3'

目标序列位于染色体上。PCR 混合液含：超纯水，14.3 μl；缓冲液 10×，2.5 μl；MgCl<sub>2</sub> 50 mM，0.75 μl；dNTPs 10 mM，0.25 μl；G1-F 10 pmol/μl，1 μl；G2-R 10 pmol/μl，1 μl；以及 Taq DNA 聚合酶 5 U/μl，0.2 μl。取 5 μl 提取到的 DNA 样品，加入 45 μl PCR 混合液。循环参数为：95 °C 3 min，继以 40 个循环的

94 °C 30 s, 60 °C 30 s 和 72 °C 1 min, 以及最后的延伸步骤 72 °C 5 min, 并在 15 °C 下冷却。预期的扩增产物大小为 187 bp。

在 2010 年环形试验中, 采用 Llop 等 (1999) DNA 提取程序的准确性为 0.77。

### **按照 Stöger 等 (2006) 的方法进行的 PCR**

引物 (参考 Llop 等, 2000) 为:

PEANT1-F: 5'-TAT CCC TAA AAA CCT CAG TGC-3'

PEANT2-R: 5'-GCA ACC TTG TGC CCT TTA-3'

目标序列位于 pEA29 质粒中。Stöger 等 (2006) 建议本方法与采用 REDEExtract-N-Amp Plant PCR Kit (Sigma-Aldrich<sup>1</sup>) 提取的 DNA 结合使用。PCR 混合液含: 超纯水, 5 µl; REDEExtract-N-Amp PCR ReadyMix (Sigma-Aldrich<sup>1</sup>), 10 µl; PEANT1-F 10 pmol/µl, 0.5 µl; PEANT2-R 10 pmol/µl, 0.5 µl; 以及提取的 DNA, 4 µl。循环参数为: 95 °C 5 min, 继以 35 个循环的 95 °C 15 s, 58 °C 30 s 和 72 °C 45 s, 以及最后的延伸步骤 72 °C 5 min, 并 15 °C 下能冷却。预期的扩增产物大小为 391 bp。

使用推荐的 DNA 提取试剂盒在 2009 年环形试验中的准确性为 0.76, 在 2010 年环形试验中则为 0.72。

### **按照 Gottsberger (2010) (改编自 Obradovic 等 (2007)) 的方法进行的 PCR**

引物为:

FER1-F: 5'-AGC AGC AAT TAA TGG CAA GTA TAG TCA-3'

rgER2-R: 5'-AAA AGA GAC ATC TGG ATT CAG ACA AT-3'

目标序列位于染色体上。PCR 混合液含: 超纯水, 14.3 µl; 缓冲液 10×, 2.5 µl; MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0.75 µl; dNTPs 10 mM, 0.25 µl; FER1-F 10 pmol/µl, 1 µl; rgER2-R 10 pmol/µl, 1 µl; Taq DNA 聚合酶 5 U/µl, 0.2 µl; 以及提取的 DNA, 5 µl。循环参数为: 94 °C 3 min, 继以 41 个循环的 94 °C 10 s, 60 °C 10 s 和 72 °C 30 s, 以及最后的延伸步骤 72 °C 5 min, 并在 15 °C 下冷却。预期的扩增产物大小为 458 bp。

使用 Llop 等 (1999) 描述的 DNA 提取方法在 2009 年环形试验中的准确性为 0.76, 在 2010 年环形试验中则为 0.68。

### **按照 Llop 等 (2000) 的方法进行的巢式 PCR**

Llop 等 (2000) 的巢式 PCR 使用两组引物, 在单一反应管中结合使用。由于引物的退火温度不同, 两组 PCR 先后进行。外引物基于 pEA29 质粒上的序列, 由 McManus and Jones (1995) 设计。内引物由 Llop 等 (2000) 描述。

外引物为：

AJ75-F: 5'-CGT ATT CAC GGC TTC GCA GAT-3'

AJ76-R: 5'-ACC CGC CAG GAT AGT CGC ATA-3'

内引物为：

PEANT1-F: 5'-TAT CCC TAA AAA CCT CAG TGC-3'

PEANT2-R: 5'-GCA ACC TTG TGC CCT TTA-3'

PCR 混合液含：超纯水，36.25  $\mu\text{l}$ ；缓冲液 10 $\times$ ，5  $\mu\text{l}$ ；MgCl<sub>2</sub> 50 mM，3  $\mu\text{l}$ ；dNTPs 10 mM，0.5  $\mu\text{l}$ ；AJ75-F 0.1 pmol/ $\mu\text{l}$ ，0.32  $\mu\text{l}$ ；AJ76-R 0.1 pmol/ $\mu\text{l}$ ，0.32  $\mu\text{l}$ ；PEANT1-F 10 pmol/ $\mu\text{l}$ ，1  $\mu\text{l}$ ；PEANT2-R 10 pmol/ $\mu\text{l}$ ，1  $\mu\text{l}$ ；以及 Taq DNA 聚合酶 5 U/ $\mu\text{l}$ ，0.6  $\mu\text{l}$ 。应往 48  $\mu\text{l}$  PCR 混合液中加入体积为 2  $\mu\text{l}$  的 DNA 样品。循环参数为：变性步骤 94 °C 4 min，继以 25 个循环的 94 °C 60 s 和 72 °C 90 s。首轮 PCR 完成后，在同一热循环仪中继续进行第二个变性步骤 94 °C 4 min，40 个循环的 94 °C 60 s，56 °C 60 s 和 72 °C 60 s，以及最后的延伸步骤 72 °C 10 min。预期的扩增产物大小为 391 bp，但是大小会有变化。

在 2003 年和 2010 年环形试验中，准确性分别为 0.69 和 0.72，富集后在 2003 年环形试验中提高到 0.84（金氏 B 培养基）和 0.86（CCT 培养基），在 2010 年提高到 0.79（金氏 B 培养基）和 0.88（CCT 培养基）。

#### 3.1.5.4 关于 PCR 的一般考虑

使用不同反应物或热循环仪时可能需要对 PCR 规程进行调整（优化）。

PCR 扩增后，可通过 PCR 产物测序或限制性片段长度多态性（RFLP）分析来确认存在梨火疫病病菌。和已知对照菌株的限制性图谱进行对比时，在使用 Bereswill 等（1992）引物或采用 Llop 等（2000）巢式 PCR 获取的扩增产物中观察到的限制性图谱可用于确认 PCR 检测的特异性。应采用内切酶 DraI 和 SmaI 进行限制性酶切。

如果在样品中未检测到，却在所有阳性对照中检测到了预期大小的梨火疫病病菌特异性扩增产物（以及适用情况下的限制性酶切图谱或扩增产物序列），则样品的检测为阴性。在任一阴性对照都没有扩增，而且限制性酶切图谱或扩增产物序列（适用时）显示有梨火疫病病菌的情况下，如果检测到了预期大小的梨火疫病病菌特异性扩增产物，则样品的检测为阳性。

#### 3.1.5.5 实时 PCR

根据 2009 年和 2010 年环形试验对实时 PCR 规程的评估（Dreo 等，2009；Lopez 等，2010），建议采用 Pirc 等（2009）描述的以染色体序列为目标的规程。还有一种基于染色体序列的多重实时 PCR 方法可供使用，但尚未经过环形试验（Lehman 等，2008）。

### 按照 Pirc 等 ( 2009 ) 的方法进行的实时 PCR

使用以下寡核苷酸:

Ams116F 引物: 5'-TCC CAC ATA CTG TGA ATC ATC CA-3'

Ams189R 引物: 5'-GGG TAT TTG CGC TAA TTT TAT TCG-3'

Ams141T 探针: FAM-CCA GAA TCT GGC CCG CGT ATA CCG-TAMRA

反应在最终体积为 25  $\mu$ l 的体系中进行。PCR 混合液含: 超纯水, 2.5  $\mu$ l; 2 $\times$  TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems<sup>1</sup>), 12.5  $\mu$ l; Ams116F 10 pmol/ $\mu$ l, 2.25  $\mu$ l; Ams189R 10 pmol/ $\mu$ l, 2.25  $\mu$ l; FAM-labelled Ams141T 10 pmol/ $\mu$ l, 0.5  $\mu$ l; 以及 5  $\mu$ l DNA 提取物 (加入 20  $\mu$ l PCR 混合液中)。循环参数为: 50  $^{\circ}$ C 2 min; 95  $^{\circ}$ C 10 min; 以及 40 个循环的 95  $^{\circ}$ C 15 s 和 60  $^{\circ}$ C 1 min。在 7900HT 和 7900HT Fast (Applied Biosystems<sup>1</sup>) 分析仪上变温速率的标准模式为: 1.6  $^{\circ}$ C/s 升温和 1.6  $^{\circ}$ C/s 降温。也可能在更低的变温速率下进行反应, 但如果采用较高的变温速率 (约 3.5  $^{\circ}$ C/s 升降), 则结果无法接受。预期的扩增产物大小为 74 bp。

就实时 PCR 结果分析而言, 通常有几种不同的方法可用于设定信号和干扰极限, 有的是自动化操作, 有的需要人工完成。应遵循适宜软件的使用说明。基线应自动设定, 阈值应人工设定, 使其穿过对照扩增曲线的指数增长阶段。

在 2010 年环形试验中, 使用 Llop 等 (1999)、REDExtract-N-Amp Plant PCR Kit (Sigma-Aldrich<sup>1</sup>) 和 Taylor 等 (2001) DNA 提取方法的准确性分别为 0.80、0.85 和 0.76。

### 按照 Gottsberger ( 2010 ) 的方法进行的实时 PCR

采用以下以梨火疫病菌染色体为目标的寡核苷酸:

hpEaF 引物: 5'-CCG TGG AGA CCG ATC TTT TA-3'

hpEaR 引物: 5'-AAG TTT CTC CGC CCT ACG AT-3'

hpEaP 探针: FAM-TCG TCG AAT GCT GCC TCT CT-MGB

反应在最终体积为 20  $\mu$ l 的体系中进行。PCR 混合液含: 超纯水, 6  $\mu$ l; 2 $\times$  TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems<sup>1</sup>), 10  $\mu$ l; hpEaF 10 pmol/ $\mu$ l, 1  $\mu$ l; hpEaR 10 pmol/ $\mu$ l, 1  $\mu$ l; hpEaP 1 pmol/ $\mu$ l, 1  $\mu$ l; 以及 1  $\mu$ l DNA 提取物 (加入 19  $\mu$ l PCR 混合液中)。循环参数为: 50  $^{\circ}$ C 2 min; 95  $^{\circ}$ C 10 min; 以及 50 个循环的 95  $^{\circ}$ C 15 s 和 60 $^{\circ}$ C 1 min。预期的扩增产物大小为 138 bp。

就实时 PCR 结果的分析而言, 通常有几种不同的方法可用于设定信号和干扰极限, 有的是自动化操作, 有的需要人工完成。应遵循适宜软件的使用说明。基线应自动设定, 阈值应人工设定, 使其穿过对照扩增曲线的指数增长阶段。

在 2010 年环形试验中，未对本实时 PCR 的准确性进行测试；然而有 1 个实验室将其和 Pirc 等（2009）的实时 PCR 方法做过平行测试，使用 Llop 等（1999）DNA 提取方法获得了相同的定性结果。

### 3.1.5.6 PCR 结果的解释

#### 常规 PCR

病原特异性 PCR 可判为有效，如果：

- (1) 阳性对照产生该细菌大小正确的扩增产物；且
- (2) 阴性提取对照和阴性扩增对照未产生该细菌大小正确的扩增产物。

如同时使用了 16S rDNA 内对照引物，则阴性（健康植物组织）对照（如有使用）、阳性对照，以及每个检测样品都要产生一个 1.6 千碱基对（kb）的扩增产物（16S rDNA）。要注意的是，合成的或质粒阳性对照不会产生 1.6 kb 的扩增产物。使用内对照引物不能扩增样品说明，例如，DNA 提取失败、反应混合液不含核酸、DNA 提取物中含有抑制 PCR 的化合物，或 DNA 已经降解。

一个样品的检测可判为阳性，如果它产生大小正确的扩增产物。

#### 实时 PCR

实时 PCR 可判为有效，如果：

- (1) 阳性对照使用病原特异性引物可产生一条扩增曲线；且
- (2) 阴性提取对照和阴性扩增对照不产生扩增曲线（即循环阈（Ct）值为 40）。

如果同时使用了 COX 内对照引物，则阴性对照（如有使用）、阳性对照，以及每个检测样品都要产生一条扩增曲线。样品使用内对照引物不能产生一条扩增曲线说明，例如，DNA 提取失败、反应混合液不含核酸、DNA 提取物中含有抑制 PCR 的化合物，或 DNA 已经降解。

一个样品的检测可判为阳性，如果它产生一条典型的指数形态的扩增曲线。每个实验室在第一次进行检测时都需要对 Ct 值进行验证。

### 3.1.5.7 环介导等温扩增

LAMP 规程由 Temple 等（2008）及 Temple 和 Johnson（2011）建立与描述。因被认为适用于未配备 PCR 设备的实验室而且易于实施，该方法在 2010 年环形试验中进行过评估。在该环形试验中，发现 LAMP 规程使用检测梨火疫病菌染色体基因 *amsL* 的引物时对检测低细菌菌群样品缺少必要的灵敏度。因此，建议下文描述的用于检测染色体 *amsL* 的 LAMP 规程仅用于检测超过  $10^5$ – $10^6$  c.f.u./ml 的显症样品。环形试验未对 Temple 和 Johnson（2011）规程使用检测 pEA29 的引物进行评估。

检测 *amsL* 的 LAMP 引物为:

ALB Fip: 5'-CTG CCT GAG TAC GCA GCT GAT TGC ACG TTT TAC AGC TCG CT-3'

ALB Bip: 5'-TCG TCG GTA AAG TGA TGG GTG CCC AGC TTA AGG GGC TGA AG-3'

ALB F: 5'-GCC CAC ATT CGA ATT TGA CC-3'

ALB B: 5'-CGG TTA ATC ACC GGT GTC A-3'

引物 Fip 和 Bip 的最终使用浓度为 2.4  $\mu\text{M}$ ，引物 F 和 B 则为 0.2  $\mu\text{M}$ 。引物的解链温度介于 58 和 60  $^{\circ}\text{C}$  之间。LAMP 反应混合液包含：10 $\times$  ThermoPol 缓冲液（New England Biolabs<sup>1</sup>），5  $\mu\text{l}$ ；dNTPs 10 mM，5  $\mu\text{l}$ ；MgSO<sub>4</sub> 100 mM，2  $\mu\text{l}$ ；牛血清白蛋白（BSA）10 mg/ml，2  $\mu\text{l}$ ；ALB Fip 100  $\mu\text{M}$ ，1.2  $\mu\text{l}$ ；ALB Bip 100  $\mu\text{M}$ ，1.2  $\mu\text{l}$ ；ALB F 10  $\mu\text{M}$ ，1  $\mu\text{l}$ ；ALB B 10  $\mu\text{M}$ ，1  $\mu\text{l}$ ；*Bst* DNA 聚合酶 8 U/ $\mu\text{l}$ ，2  $\mu\text{l}$ ；模板 DNA，5  $\mu\text{l}$ ；以及超纯水，24.6  $\mu\text{l}$ 。注意 *Bst* DNA 聚合酶、模板 DNA 和超纯水未加入预混母液，而是在量取预混母液后单独加入。在开始 LAMP 反应前，将水浴或热循环仪设定为 65  $^{\circ}\text{C}$ 。制备预混母液并用移液管将 18.4  $\mu\text{l}$  转移进每个 0.2 ml 的 PCR 管中。随后用移液管分别将 *Bst* DNA 聚合酶、模板 DNA 和超纯水转移进每个装有预混母液的 PCR 管中。PCR 管用微孔板离心机离心（1 000 r.p.m. 30 s），并用支架固定在水浴中（65  $^{\circ}\text{C}$ ），使反应端浸没其中，也可以在热循环仪中放置 55 min。取出反应管，冷却 10 s。

和阳性对照一样，如果在 PCR 管中观察到云状沉淀物，或在管底观察到固态白色焦磷酸酶沉淀物，则样品的检测为阳性。和阴性对照中应观察到的情况一样，清澈的溶液表明检测结果为阴性。

在 2010 年环形试验中的准确性为 0.64，但使用  $10^5$ – $10^6$  c.f.u./ml 的样品时准确性达到 0.80。为此建议 LAMP 只用于显症样品的检测。

### 3.2 对无症状植物的检测

图 2 中的流程图说明了推荐的筛选试验方法。

#### 3.2.1 取样和样品制备

无症状样品可单个处理（最好如此），或者最多 100 个一组（EPPO，2013）。采集样品时和提取过程中应小心避免交叉污染。可按照以下规程之一进行取样和样品制备。

- 在夏季或早秋，当平均气温上升超过约 15  $^{\circ}\text{C}$ ，出现对梨火疫病病菌繁殖有利的条件后，采集花器、嫩梢、幼果或茎段，装入无菌袋或容器中（van der Zwet 和 Beer，1995）。从疑似植株上剪下长度约为 20 cm 的嫩梢，或花期时的花器。如果在冬天进行分析，要从每株植物上采集 5-10 个花蕾。在实验室内，



从挑选的植株上剪下花期时的花器、花梗和嫩梢下部几个叶片的叶柄基部，或茎段。称取 0.1–1.0 g 植物材料，浸渍在按照 3.1.2 节描述的规程制备的抗氧化剂缓冲液中。

- 下文介绍一种已报道但未经验证的，用于检测来自苗圃的无症状木本植物嫩枝的一种取样方法。一个样品包含来自 100 株植物的 100 条嫩枝，每条嫩枝长约 10 cm。如果一批样品中有几个植物属，这些属应在样品中占有同样的比重（每个样品最多包含 3 个属）。从每个样品中随机抽取 30 条嫩枝，将每条嫩枝切成 4 份（产生 120 个茎段）。将样品装入锥形瓶，浸泡在 0.1% Tween 20 的无菌 PBS 中，锥形瓶在室温下用旋转振荡器剧烈震荡 1.5 h。用真空泵通过固定在垂熔玻璃滤器上的滤纸对提取物进行过滤，收集滤出液。滤出液直接用于分析或 10 000 g 离心 20 min。将沉淀物重新悬浮在 4.5 ml 无菌 PBS 中。应用下文介绍的检测技术。类似的规程可用于叶片、嫩梢、花朵和花蕾。

取决于取样时期，检获梨火疫病病菌的可能性不同，夏季可能性最大（如果气候条件对梨火疫病病菌有利），冬季可能性变小。应立即对样品进行富集处理，随后采用 López 等（2006）描述的用于显症样品的每种技术规程进行 DASI-ELISA、PCR 检测和分离。可选用免疫荧光检测；如选用，则必须在富集前直接用于提取物。

### 3.2.2 筛选试验

因为细菌菌群少，对无症状样品直接进行检测时通常对梨火疫病病菌表现为阴性。因此，在检测无症状材料时，绝对有必要在 25 °C 左右对用抗氧化剂缓冲液制备的样品（3.2.1 节）（Gorris 等，1996）进行 72 h 富集。建议至少采用那些基于不同生物学原理的筛选试验方法中的两种方法：

- 富集分离。采用针对显症样品的程序（3.1.3.2 节）。
- 富集-DASI-ELISA。采用针对显症样品的程序（3.1.4.1 节）。
- 富集-PCR 或富集-实时 PCR。取 500–1000 µl 在金氏 B 和/或 CCT 培养基中富集的样品用于提取 DNA，随后按照 Taylor 等（2001）或 Llop 等（2000）（3.1.5.3 节）或实时 PCR 规程（3.1.5.5 节）实施扩增程序。

如果上述任何一种筛选试验为阳性，但是分离结果为阴性，应尝试从–80 °C 下用甘油保存的提取物中或从富集过的样品中分离病原物。如果三种或更多检测方法表现为阳性，而且分离结果为阴性，则有理由强烈怀疑样品中有梨火疫病病菌，但是要进行鉴定和确认，就要从新样品中分离病原物并随后进行细菌鉴定。

## 4. 鉴定

由于 *E. piriflorinigrans*（López 等，2011）、亚洲梨火疫病病菌（Kim 等，1999；Rhim 等，1999）、*E. uzenensis*（Matsuura 等，2012）和欧文氏菌属其他一些种类（Kim 等，2001a，2001b；Palacio-Bielsa 等，2012）具有与梨火疫病病菌相似的形态学、血清学和分子特征，应根据几种技术获得的结果进行鉴定。可联合

使用 3 种基于不同生物学原理的技术将梨火疫病菌和其他一些密切相关的欧文氏菌属细菌（可在一些寄主具有相似症状的组织中发现）区分开：

- 基于染色体 DNA 的 PCR（3.1.5.2 和 4.3.1 节）
- 如检测部分所描述，使用特异性单克隆抗体的 DASI-ELISA（3.1.4.1 节，富集步骤除外）。
- 接种到梨火疫病寄主上以满足柯赫氏假设的要求，包括对接种病原物的再分离（4.4 节）。

为了对菌落进行鉴定，建议采用上述 3 种技术中的至少 2 种。取决于实验室的经验，也可以采用其他检测方法；这些方法将在下文中加以说明。必要时，对培养物鉴定结果的最终确认应包含致病性检测。

建议用作阳性对照的梨火疫病病菌分离物为 NCPPB 683 和 CFBP 1430。以下保藏中心，还有其他一些保藏中心，可以提供不同的梨火疫病病菌参考菌株：位于英国约克的粮食与环境研究院（Fera）的国家植物病原细菌保藏中心（NCPPB）、位于法国昂热的法国农业研究科学院（INRA）植物细菌研究所的法国植物病原细菌保藏中心、位于比利时根特的比利时微生物联合保藏中心 BCCM/LMG 细菌保藏中心、位于新西兰奥克兰的 Manaaki Whenua 土地保护研究所的国际植物微生物保藏中心（ICMP），以及位于美国弗吉尼亚马纳萨斯的美国模式培养物保藏中心（ATTC）。只有直接从培养物保藏中心获得时，菌株的可靠性才能得到保证。

#### 4.1 营养学与酶学鉴定

关键性表型检测十分有用，目前仍用于鉴定，但建议将它们与致病性检测以及某种血清学或分子检测方法结合使用。欧文氏菌属的各个成员确定为革兰氏阴性，兼性厌氧，周生鞭毛，能运动，杆状，能从葡萄糖、果糖、半乳糖和蔗糖产酸。按照 Jones 和 Geider（2001）的方法，梨火疫病病菌多数菌株常见的关键性表型特征（Paulin, 2000）为：氧化酶检测（-）、氧化/发酵（O/F）检测（+/+）、紫外光下在金氏 B 培养基中的荧光色素（-）、果聚糖形成（+）、硝酸盐还原（-）、柠檬酸盐利用（+）、明胶液化（+）、脲酶和吲哚（-），以及在 CCT 培养基上的菌落形态。

使用以下检测方法可以识别梨火疫病病菌和亚洲梨火疫病病菌、*E. piriflorinigrans*，尽管一些生理学和生物化学特征在部分菌株中可能发生变化（表 1）。

**表 1.** 梨火疫病、亚洲梨火疫病与 *Erwinia piriflorinigrans* 的区别

微生物学检测	梨火疫病	亚洲梨火疫病	<i>Erwinia piriflorinigrans</i>
明胶水解	+	-	-
肌醇 <sup>†</sup>	-	ND	+
山梨醇 <sup>†</sup>	+	+	-
七叶甙 <sup>†</sup>	V	-	+
蜜二糖 <sup>†</sup>	-	-	+
D-棉子糖 <sup>†</sup>	-	-	+
β-龙胆二糖 <sup>†</sup>	+	-	+
用 EP16A/EPI62C CPS1/CPS2C 繁殖 <sup>‡</sup>	-	+	ND

<sup>†</sup> 引自 Roselló 等 (2006) 和 López 等 (2011)。使用 López 等 (2011) 描述的方法，对 API 50 CH 试纸条 (bioMérieux) 中的底物进行氧化。90% 以上的菌株显示出提到的结果。

<sup>‡</sup> 根据 Kim 等 (2001b)。

ND, 不确定; V, 有变化。

#### 4.1.1 生物化学特征

##### 4.1.1.1 营养学与酶学图谱

可通过 API system 20 E 和 50 CH 试纸条 (bioMérieux<sup>1</sup>) 图谱对梨火疫病进行生物化学鉴定。

**API 20 E<sup>1</sup>.** 应按照生产商的说明制备悬浮液和接种试纸条。试纸条在 25–26 °C 下培养。48 h 后典型的梨火疫病培养物的读数结果应为：赖氨酸脱羧酶 (LDC)、鸟氨酸脱羧酶 (ODC)、柠檬酸盐利用 (CIT)、H<sub>2</sub>S 产生 (SH<sub>2</sub>)、脲酶 (URE)、色氨酸脱氨酶 (TDA)、吲哚产生 (IND) 和鼠李糖氧化 (RHA) 检测应为阴性，然而蔗糖氧化 (SAC) 应为阳性。根据 Donat 等 (2007)，其他检测可能随菌株发生变化。

**API 50 CH<sup>1</sup>.** 用 PBS 制备 OD 1.0 (波长 600 nm) 悬浮液。在 20 ml Ayers 培养基 (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g; KCl, 0.2 g; MgSO<sub>4</sub>, 0.2 g; 0.2% 溴百里酚蓝, 75 ml; 蒸馏水, 1 l; pH 7; 120 °C 灭菌 20 min) 中加入 1 毫升悬浮液 (Ayers 等, 1919)。应按照生产商的说明接种试纸条。有氧条件下将试纸条置于 25–26 °C 下培养。通过孔中黄色素的产生来观察对不同碳水化合物的利用情况。72 h 后典型的梨火疫病

培养物的读数结果应是 L-阿拉伯糖、核糖、D-葡萄糖、D-果糖、甘露醇、山梨醇、N-乙酰葡萄糖胺、蔗糖、海藻糖和  $\beta$ -龙胆二糖阳性。根据 Donat 等（2007），梨火疫病病菌在上述条件下不会利用其它糖类，但是一些菌株可以利用甘油和 D-岩藻糖。

#### 4.1.1.2 自动化鉴定

可商业化购得基于微孔板中 94 个表型检测的识别性结果建立的一套自动化鉴定系统及配套的分析软件（OmniLog<sup>1</sup>，Biolog<sup>1</sup>）。应按照生产商的说明对疑似的梨火疫病病菌分离物进行初步鉴定。

#### 4.1.1.3 脂肪酸分析

在脂肪酸分析（FAP）中，28 °C 培养 48 h 后，商业化购得的胰蛋白大豆琼脂上会长出果聚糖阳性、无荧光的菌落（Sasser, 1990）。根据 Wells 等（1994），采用适宜的脂肪酸提取程序，并用商业化购得的 Sherlock Microbial Identification System（MIS）（MIDI<sup>1</sup>）或其他适宜的软件对提取物进行分析，可以对梨火疫病病菌进行初步鉴定。

### 4.2 血清学鉴定

#### 4.2.1 凝集反应

可通过玻片凝集试验对疑似的梨火疫病病菌菌落进行初步鉴定。在玻片上将高浓度细胞悬浮液和一滴 PBS，以及一滴梨火疫病病菌特异性抗血清（未稀释，或仅按 1:5-1:10 比例稀释）混合在一起。可使用单克隆单体，如果它们能够凝集参考菌株。必须提前确认抗体的特异性。

#### 4.2.2 免疫荧光

用 PBS 从果聚糖阳性、无荧光菌落中制备约  $10^6$  cells/ml 的悬浮液，采用 3.1.4.3 节描述的免疫荧光程序。应提前确认抗体的特异性。

#### 4.2.3 ELISA

可使用前述用于检测的特异性单克隆抗体，通过直接组织印迹-ELISA（3.1.4.2 节）、DASI-ELISA（3.1.4.1 节）和间接 ELISA（见下文）对分离物进行鉴定。在两组环形试验中，已对用于 DASI-ELISA 的一种单克隆抗体混合物进行过验证。用 PBS 从疑似菌落制备大约  $10^8$  cells/ml 的悬浮液。可采用 3.1.4.1 节的 DASI-ELISA 程序，但无需富集步骤。

#### 间接 ELISA

用水浴或加热板对疑似分离物的纯培养物 100 °C 处理 10 min，以减少和商业性单克隆抗体的非特异性反应。取 200  $\mu$ l 培养物，和等量碳酸盐缓冲液（Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>，1.59 g；NaHCO<sub>3</sub>，2.93 g；蒸馏水，1 l；pH 9.6）混合，将混合溶液加到微孔板上至少两个孔中。将微孔板置于 37 °C 下培养 1 h 或在 4 °C 下过夜。从孔中弹出提取物，用洗涤缓冲液（参看 DASI-ELISA 规程）清洗微孔板 3 次。按照推荐的稀释倍

数制备购自 Plant Print Diagnostics SL<sup>1</sup> 的抗梨火疫病菌的特异性商业化抗体。往每个孔中加入 200  $\mu$ l 稀释过的抗梨火疫病菌的抗体溶液，将微孔板置于 37 °C 下培养 1 h。从孔中弹出抗体溶液，按照前述方法清洗孔板。按照适宜的稀释倍数用含 0.5% BSA 的 PBS 制备二级抗体-碱性磷酸酶共轭物（GAM-AP）。往每个孔中加入 200  $\mu$ l 稀释过的共轭抗体，将微孔板置于 37 °C 下培养 1 h。从孔中弹出共轭抗体，按照前述方法清洗孔板。用底物缓冲液（二乙醇胺，97 ml；800 ml 蒸馏水；用浓盐酸调节到 pH 9.8；随后用蒸馏水将体积调节到 1 000 ml）制备 1 mg/ml 的碱性磷酸酶底物（p-对硝基苯磷酸盐）。往每孔中加入 200  $\mu$ l 碱性磷酸酶底物溶液。室温下将微孔板置于暗室中培养，90 min 内定期在 405 nm 下观察。底物转变为黄色就表明检测结果阳性。

#### 4.2.4 侧向层析免疫

制备  $10^7$  c.f.u./ml 纯培养物悬浮液供初步鉴定。如 3.1.4.4 节所述，采用生产商通过试剂盒提供的缓冲液和程序。

### 4.3 分子鉴定

#### 4.3.1 PCR

用分子级无菌水从纯化的果聚糖阳性、无荧光菌落制备  $10^6$  细胞/ml 悬浮液，100 °C 处理 10 min。如 3.1.5.2 至 3.1.5.4 节所述（直接，无 DNA 提取），采用适宜的 PCR 程序或 LAMP 规程。采用 PCR 对分离出的菌落进行鉴定时，应使用 1 U Taq DNA 聚合酶（而非植物材料所用的 2 U）。

#### 4.3.2 巨限和脉冲场凝胶电泳

根据 Jock 等（2002），对 *Xba*I 酶切后的基因组 DNA 进行脉冲场凝胶电泳（PFGE）分析显示梨火疫病菌欧洲菌株有 6 种图谱。这种方法可以为菌株识别提供有用信息，已被用于解释梨火疫病在欧洲的扩散（Jock 等，2002；Donat 等，2007）。

### 4.4 致病性技术

应将疑似的梨火疫病菌菌落接种回寄主植物，完成柯赫氏假设，并验证其致病性。就接种植物而言，可采用感病品种的梨（例如康佛伦斯、考蜜斯、威廉斯、帕西）、苹果（例如富士、嘎啦、艾达红、红玉）、枇杷（如 *Algerie*、*Tanaka*）、山楂属、栒子属或火棘属。在嫩梢上接种时，在以 PBS 制备的每种分离物的  $10^9$  c.f.u./ml 悬浮液中浸一下剪刀，然后沿中脉切开嫩叶。植物在 20–25 °C 和大约 80% 的相对湿度下保持 1-2 周。从温室生长的植物上剪下嫩梢，经过表面消毒（用 70% 乙醇处理 30 s，然后用无菌蒸馏水冲洗 3 次）后也可通过同样的方法接种，并用 1% 无菌琼脂保存在试管中。试管应保存在 20–25 °C 下，每天 16 h 光照。

也可在摘下的感病品种的梨、苹果和枇杷的未成熟果实上接种，具体是将 10  $\mu$ l 浓度为  $10^9$  c.f.u./ml 的 PBS 分离物悬浮液滴加到消过毒（使用 70% 的商品氯

处理 30 min，随后用无菌蒸馏水冲洗 3 次）的果实表面的新鲜伤口上。果实应置于恒湿箱中，在 25 °C 下培养 3-5 天。

从表现出典型火疫病症状的接种器官上重新分离并鉴定和梨火疫病菌类似的菌落。如果阴性对照伤口处未观察到病变或只有一个很小的坏死性病变，而且和梨火疫病菌阳性对照中观察到的现象一样，2-7 天后有菌脓溢出且接种部位周围发生褐变，则表明检测结果为阳性。

也可采用其他接种技术。在烟草叶片上高度灵敏的反应可能表明梨火疫病菌 *hrp* 基因获得了表达，但这一检测方法可能对很多其他植物病原细菌都表现为阳性。应使用烟草 Xanthi 或 Samsun 品种的 5-6 叶植株。制备  $10^9$  c.f.u./ml（600 nm 下 OD 值，1.0）细菌悬浮液，用解剖针和注射器将悬浮液注射进成熟叶片的细胞内空隙中。和在梨火疫病菌阳性对照中观察到的现象一样，如果室温下 24-48 h 后注射过的组织完全崩解则可记录为阳性。

## 5. 记录

应依照 ISPM 27（限定有害生物诊断规程）2.5 节的要求保存记录和证据。

在其他缔约方可能受到诊断结果影响的情况下，特别是在违规（ISPM 13 违规和紧急行动通知准则）或在一个地区首次发现该有害生物时，应将以下记录、证据和其他材料至少妥善保存 1 年，以保持可追溯性：原始样品、有害生物培养物、经过防腐处理或用玻片封装的标本，或检测材料（例如，凝胶照片、ELISA 平板结果照片和 PCR 扩增产物）。

## 6. 获取进一步信息的联络点

有关本诊断规程的进一步信息可获自：

Centro de Protección Vegetal, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera Moncada-Náquera km 4.5, 46113 Moncada (Valencia), Spain (María M. López; 电子邮件: [mlopez@ivia.es](mailto:mlopez@ivia.es); 电话: +34 963424000; 传真: +34 963424001)。

初级产业部调查与诊断中心植物健康与环境实验室, 新西兰奥克兰 1140, 圣约翰 Morrin 路 231 号 (Robert Taylor; 电子邮件: [Robert.Taylor@mpi.govt.nz](mailto:Robert.Taylor@mpi.govt.nz); 电话: +64 99093548; 传真+64 99095739)。

国家植物保护机构 (NPPOs)、区域植物保护组织 (RPPOs) 或植物检疫措施委员会 (CPM) 附属机构可通过国际植物保护公约秘书处 ([ippc@fao.org](mailto:ippc@fao.org)) 提出对诊断规程进行修订的申请, 此类申请会被转交给诊断规程技术小组 (TPDP)。

## 7. 致谢

本规程初稿由 M.M. López (Centro de Protección Vegetal, IVIA, Spain (参看前节)) 起草, 由 R. Taylor (新西兰初级产业部调查与诊断中心植物健康与环境实验室(参看前节)) 和 R. Roberts (美国农业部农业研究中心(USDA-ARS) 木本水果研究实验室) 修改。

所描述的多数技术在 2003 年欧盟资助的 DIAGPRO 项目、2009 年 EUPHRESKO 项目, 以及 2010 年一个西班牙项目中进行过环形试验。

## 8. 参考文献

本附件同时引用了国际植物检疫措施标准 (ISPMs)。ISPMs 可从国际植物检疫门户网站 (IPP) 获取: <https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/ispms>。

- Anonymous.** 1998. Council Directive 98/57 EC of 20 July 1998 on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* *Official Journal of the European Communities*, L235: 1–39.
- Ayers, S.H., Rupp, P. & Johnson, W.T.** 1919. A study of alkali-forming bacteria in milk. *US Department of Agriculture Bulletin*, 782.
- Bereswill, S., Jock, S., Aldridge, P., Janse, J.D. & Geider, K.** 1997. Molecular characterization of natural *Erwinia amylovora* strains deficient in levan synthesis. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 51: 215–225.
- Bereswill, S., Pahl, A., Bellemann, P., Zeller, W. & Geider, K.** 1992. Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 3522–3526.
- Bonn, W.G. & van der Zwet, T.** 2000. Distribution and economic importance of fire blight. In J. Vanneste, ed. *Fire blight: The disease and its causative agent, Erwinia amylovora*, pp. 37–54. Wallingford, UK, CABI. 370 pp.
- Bradbury, J.F.** 1986. *Guide to plant pathogenic bacteria*. Kew, Surrey, UK, CAB International Mycological Institute. 332 pp.
- Burrill, T.J.** 1883. New species of *Micrococcus* (bacteria). *The American Naturalist*, 17: 319.
- Donat, V., Biosca, E.G., Peñalver, J. & López, M.M.** 2007. Exploring diversity among Spanish strains of *Erwinia amylovora* and possible infection sources. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 1639–1649.
- Dreo, T., Duffy, B., López, M., Paulin, J.P., Poliakoff, F. & Reisenzein, H.** 2009. *Development and validation of innovative diagnostic tools for the detection of fire blight (Erwinia amylovora)*. York, UK, EUPHRESKO. Available at <http://www.euphresco.org/downloadFile.cfm?id=662> (last accessed September 2012).
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization).** 2013. PM 7/20 (2) *Erwinia amylovora*. *EPPO Bulletin*, doi:10.1111/epp.12019.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization).** n.d. EPPO Plant Quarantine Data Retrieval System. Paris, EPPO. Available at <http://www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm>.
- Gorris, M.T., Cambra, M., Llop, P., López, M.M., Lecomte, P., Chartier, R. & Paulin, J.P.** 1996. A sensitive and specific detection of *Erwinia amylovora* based on the ELISA-DASI enrichment method with monoclonal antibodies. *Acta Horticulturae*, 411: 41–45.

- Gottsberger, R.A.** 2010. Development and evaluation of a real-time PCR assay targeting chromosomal DNA of *Erwinia amylovora*. *Letters in Applied Microbiology*, 51: 285–292.
- Ishimaru, E.S. & Klos, E.J.** 1984. New medium for detection of *Erwinia amylovora* and its use in epidemiological studies. *Phytopathology*, 74: 1342–1345.
- Jock, S., Donat, V., López, M.M., Bazzi, C. & Geider, K.** 2002. Following spread of fire blight in Western, Central and Southern Europe by molecular differentiation of *Erwinia amylovora* strains with PFGE analysis. *Environmental Microbiology*, 4: 106–114.
- Jones, A. & Geider, K.** 2001. II Gram negative bacteria. B. *Erwinia* and *Pantoea*. In N.W. Schaad, J.B. Jones & W. Chum, eds. *Guide for identification of plant pathogenic bacteria*, 2nd edn. St Paul, MN, APS Press.
- Kim, W.S., Gardan, L., Rhim, S.L. & Geider, K.** 1999. *Erwinia pyrifoliae* sp., a novel pathogen that affects Asian pear trees (*Pyrus pyrifolia* Nakai) *International Journal of Systemic Bacteriology*, 49: 899–906.
- Kim, W.S., Hildebrand, M., Jock, S. & Geider, K.** 2001a. Molecular comparison of pathogenic bacteria from pear trees in Japan and the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Microbiology*, 147: 2951–2959.
- Kim, W.S., Jock, S., Rhim, S-L. & Geider, K.** 2001b. Molecular detection and differentiation of *Erwinia pyrifoliae* and host range analysis of the Asian pear pathogen. *Plant Disease*, 85: 1183–1188.
- King, E.O., Ward, M. & Raney, D.E.** 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44: 301–307.
- Lehman, S.M., Kim, W.K., Castle, A.J. & Svircev, S.M.** 2008. Dualplex real-time polymerase chain reaction reveals competition between *Erwinia amylovora* and *E. pyrifoliae* on pear blossoms. *Phytopathology*, 98: 673–679.
- Llop, P., Bonaterra, A., Peñalver, J. & López, M.M.** 2000. Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2071–2078.
- Llop, P., Caruso, P., Cubero, J., Morente, C. & López, M.M.** 1999. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods*, 37: 23–31.
- Llop, P., Donat, V., Rodríguez, M., Cabrefiga, J., Ruz, L., Palomo, J.L., Montesinos, E. & López, M.M.** 2006. An indigenous virulent strain of *Erwinia amylovora* lacking the ubiquitous plasmid pEA29. *Phytopathology*, 96: 900–907.
- López, M.M., Llop, P., Gorris, M.T., Keck, M., Peñalver, J., Donat, V. & Cambra, M.** 2006. European protocol for diagnosis of *Erwinia amylovora*. *Acta Horticulturae*, 704: 99–103.
- López, M.M., Peñalver, J., Arilla, A., Morente, C., Dreo, T., Pirc, M., Poliakoff, F., Dousset, C., Visage, M., Achbani, E., Bersgma-Vlami, M., Drenova, N., Duffy, B., Marín, M., Meekes, E., Moumni, M., Obradovic, A., Palomo, J., Taylor, R., Stockwell, V. & Reisenzein, H.** 2010. Ring test evaluation of techniques for *Erwinia amylovora* diagnosis and detections. ISHS 12th International Workshop on Fire Blight. Warsaw, Poland, 16–20 August 2010, abstract 18.
- López, M.M., Roselló, M.M., Llop, P., Ferrer, S., Christen, R. & Gardan, L.** 2011. *Erwinia piriflorinigrans* sp. nov., a novel pathogen that causes necrosis of pear blossoms. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, 61: 561–567.
- McManus, P.S. & Jones, A.L.** 1995. Detection of *Erwinia amylovora* by nested-PCR and PCR-dot-blot and reverse blot hybridisations. *Phytopathology*, 85: 618–623.



- Matsuura, T., Mizuno, A., Tsukamoto, T., Shimizu, Y., Saito, N., Sato, S., Kikuchi, S., Uzuki, T., Azegami, K. & Sawada, H.** 2012. *Erwinia uzenensis* sp. nov., a novel pathogen that affects European pear trees (*Pyrus communis* L.). *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, doi:10.1099/ijes.0.032011-0.
- Obradovic, D., Balaz, J. & Kevresan, S.** 2007. Detection of *Erwinia amylovora* by novel chromosomal polymerase chain reaction primers. *Mikrobiologija*, 76: 844–852.
- Ordax, M., Biosca, E.G., Wimalajeewa, S.C., López, M.M. & Marco-Noales, E.** 2009. Survival of *Erwinia amylovora* in mature apple fruit calyces through the viable but nonculturable (VBNC) state. *Journal of Applied Microbiology*, 107: 106–116.
- Palacio-Bielsa, A., Roselló, M., Llop, P. & López, M.M.** 2012. *Erwinia* spp. from pome fruit trees: Similarities and differences among pathogenic and nonpathogenic species. *Trees*, 26: 13–29.
- Paulin, J.P.** 2000. *Erwinia amylovora*: General characteristics, biochemistry and serology. In J. Vanneste, ed. *Fire blight: The disease and its causative agent*, *Erwinia amylovora*, pp. 87–116. Wallingford, UK, CABI. 370 pp.
- Pirc, M., Ravnikar, M., Tomlinson, J. & Dreo, J.** 2009. Improved fireblight diagnostics using quantitative real-time PCR detection of *Erwinia amylovora* chromosomal DNA. *Plant Pathology*, 58: 872–881.
- Powney, R., Beer, S., Plummer, K., Luck, J. & Rodoni, B.** 2011a. The specificity of PCR-based protocols for detection of *Erwinia amylovora*. *Australian Plant Pathology*, 40: 87–97.
- Powney, R., Smits, T.H., Sawbridge, T., Frey, B., Blom, J., Frey, J.E., Plummer, K.M., Beer, S.V., Luck, J., Duffy, B. & Rodoni, B.** 2011b. Genome sequence of an *Erwinia amylovora* strain with pathogenicity restricted to *Rubus* plants. *Journal of Bacteriology*, 193: 785–786.
- Rhim, S-L., Völksch, B., Gardan, L., Paulin, J-P., Langlotz, C., Kim, S-L. & Geider, K.** 1999. *Erwinia pyrifoliae*, an *Erwinia* species different from *Erwinia amylovora*, causes a necrotic disease of Asian pear trees. *Plant Pathology*, 48: 514–520.
- Roselló, M., Peñalver, J., Llop, P., Gorris, M.T., Charter, R., Cambra, M. & López, M.M.** 2006. Identification of an *Erwinia* sp. different from *Erwinia amylovora* and responsible for necrosis on pear blossoms. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 28: 1–12.
- Sasser, M.** 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis. In F. Klement, K. Rudolf & D.C. Sands, eds. *Methods in phytobacteriology*, pp. 199–204. Budapest, Akademiai Kiadó.
- Starr, M.P., Cardona, C. & Folsom, D.** 1951. Bacterial fire blight of raspberry. *Phytopathology*, 41: 9515–9559.
- Stöger, A., Schaffer, J. & Ruppitsch, W.** 2006. A rapid and sensitive method for direct detection of *Erwinia amylovora* in symptomatic and asymptomatic plant tissues by polymerase chain reaction. *Journal of Phytopathology*, 154: 469–473.
- Tanii A., Tamura, O. & Ozaki, M.** 1981. The causal agent of a fire blight-like disease. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 47: 102.
- Taylor, R.K., Guilford, P.J., Clark, R.G., Hale, C.N. & Forster, R.L.S.** 2001. Detection of *Erwinia amylovora* in plant material using novel polymerase chain reaction (PCR) primers. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 29: 35–43.
- Temple, T.N. & Johnson, K.B.** 2011. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *Erwinia amylovora* on pear and apple fruit flowers. *Plant Disease*, 95: 423–430.
- Temple, T.N., Stockwell, V.O. & Johnson, K.** 2008. Development of a rapid detection method for *Erwinia amylovora* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Acta Horticulturae*, 793: 497–504.

- Thomson, S.V.** 2000. Epidemiology of fire blight. In J. Vanneste, ed. *Fire blight: The disease and its causative agent, Erwinia amylovora*, pp. 9–36. Wallingford, UK, CABI. 370 pp.
- Van der Zwet, T.** 2004. Present worldwide distribution of fire blight and closely related diseases. *Acta Horticulturae*, 704: 35.
- Van der Zwet, T. & Beer, S.** 1995. Fire blight: Its nature, prevention and control. A practical guide to integrated disease management. *USDA Agricultural Information Bulletin*, No. 631.
- Van der Zwet, T. & Keil, H.L.** 1979. *Fire blight: A bacterial disease of rosaceous plants*. United States Department of Agriculture (USDA) Handbook 510. Washington, DC, USDA.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. and Lane, D.J.** 1991. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2): 697–703.
- Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N.C., Boonham, N. & Stead, D.E.** 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2853–2858
- Wells, J.M., van der Zwet, T. & Hale, C.N.** 1994. Differentiation of *Erwinia* species in the “*amylovora*” group by class analysis of cellular fatty acids. *Journal of Phytopathology*, 140: 31–38.

9. 图

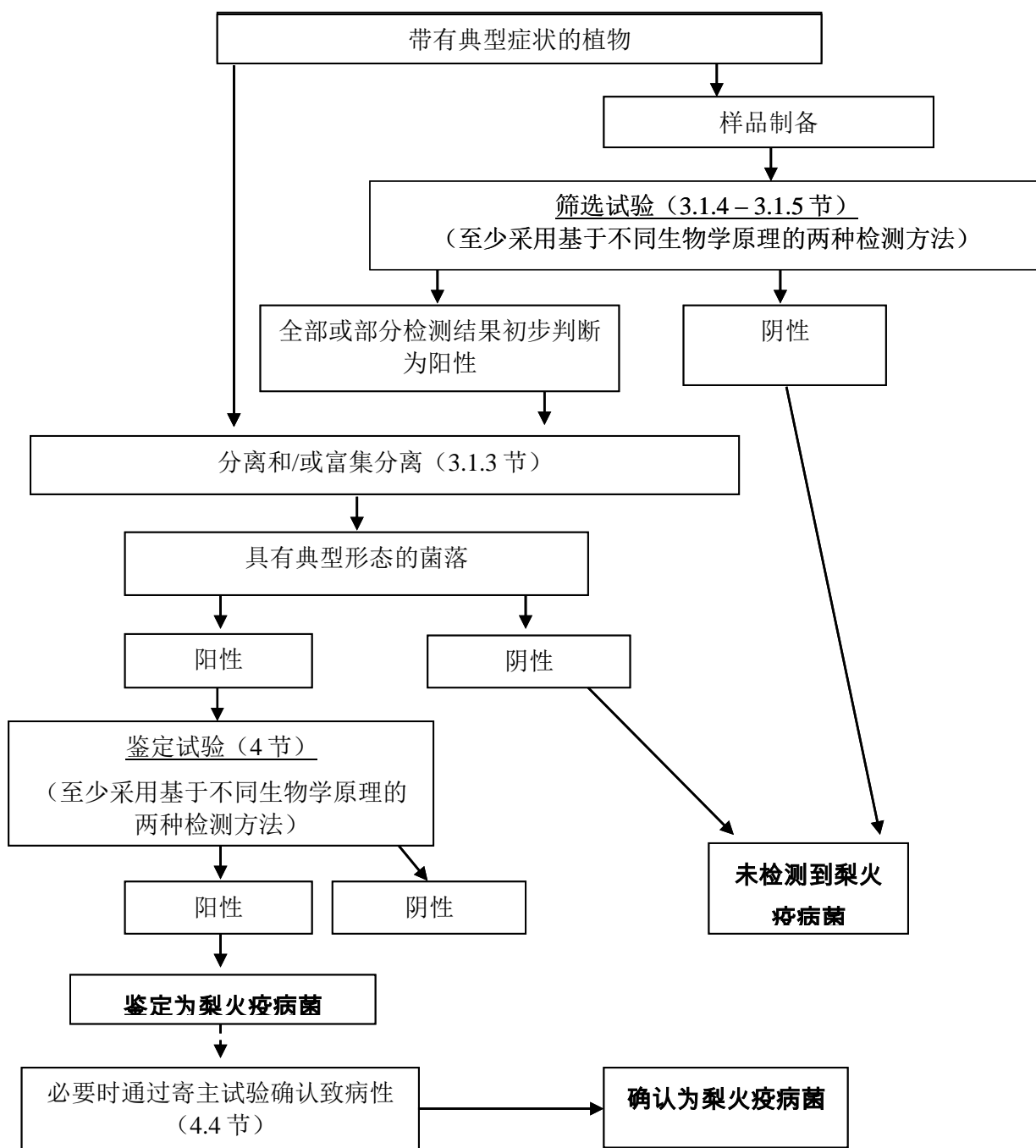


图 1. 在表现出梨火疫病症状的样品中鉴定梨火疫病菌的流程图。

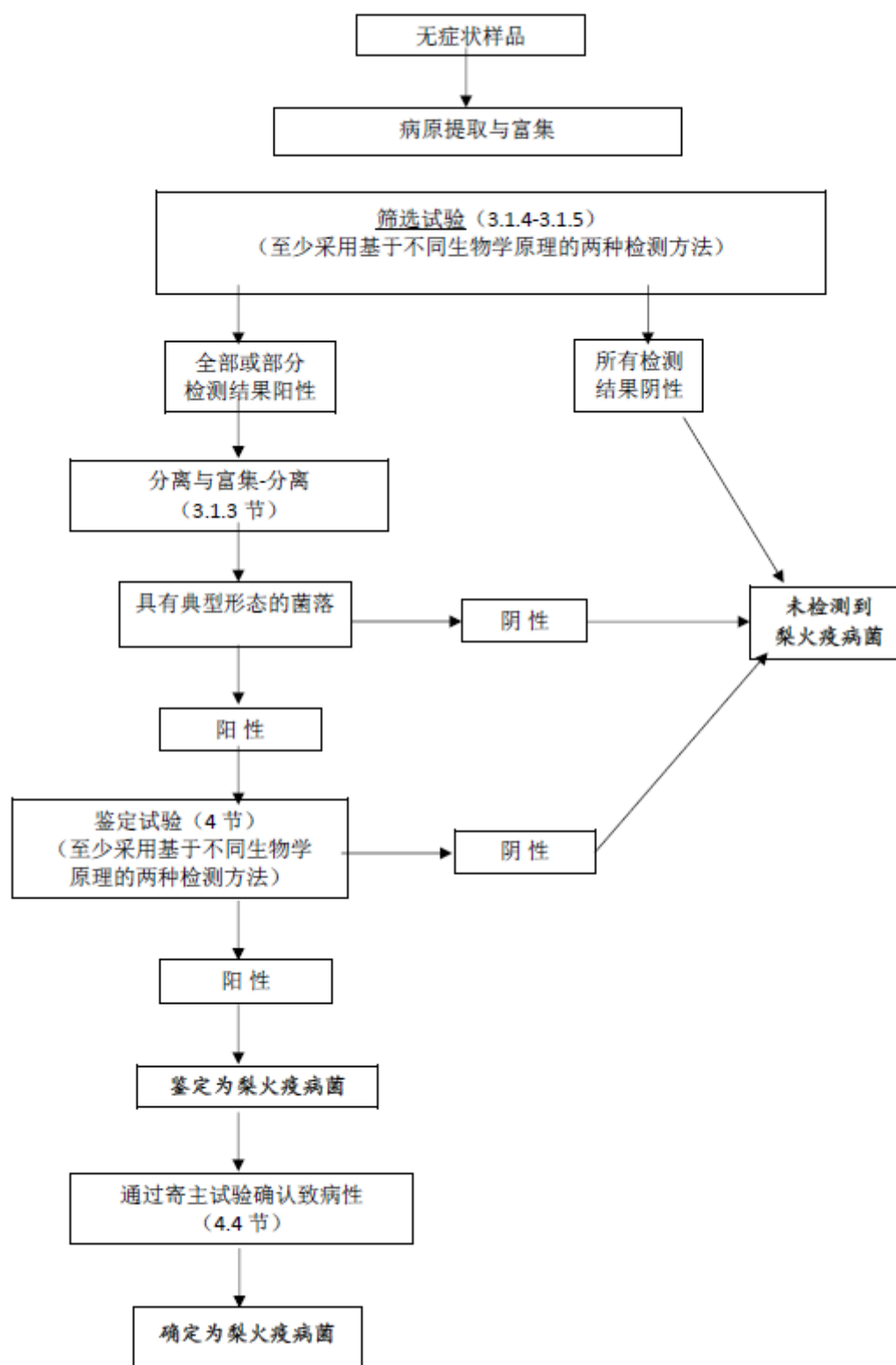


图 2. 在无症状样品中鉴定梨火疫病菌的流程图。

\* 有理由强烈怀疑样品中存在梨火疫病菌，但鉴定要求从新样品中分离出病原并随后对细菌进行鉴定。

### 出台背景

这部分不属于本标准的正式内容。

2004年11月，标准委引入最初主题：梨火疫病菌（2004-009）

2006年4月，植检委第一届会议（CPM-1）将主题增列进工作计划主题：细菌

2012年11月，第一稿提交诊断规程技术小组（会议）

2013年6月，草案提交诊断规程技术小组（会议）

2014年5月，标准委批准提交成员磋商（2014\_eSC\_May\_08）

2014年7月，成员磋商

2015年12月，诊断规程起草小组审议草案并对成员评议意见做出回应

2016年3月，诊断规程技术小组通过电子决策批准提交审议（2016\_eTPDP\_Mar\_01）

2016年5月，标准委通过电子决策批准提交进入为期45天的诊断规程通报期（2016\_eSC\_May\_12）

2016年7月，诊断规程通报期

2016年8月，标准委代表植检委通过诊断规程（未收到正式反对意见）

**ISPM 27。附件 13。梨火疫病菌（*Erwinia amylovora*）（2016）。**

罗马，国际植保公约，粮农组织。

出台背景最后更新：2016年10月。