

ICS XXXX

CCS XXXX

DB5108

四川省（广元市）地方标准

DB51/T XXXX—XXXX

猕猴桃雄花粉生产及脱除溃疡病菌技术规程
Technical regulation of kiwifruit male pollen
production and killing *Pseudomonas syringae*
pv. *actinidiae*

（草案）

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

广元市市场监督管理局

发布

目 次

目录

前 言.....II

1 范围.....1

2 规范性引用文件.....1

3 术语和定义.....1

4 雄株园建设.....2

5 雄株园管理.....2

6 雄株生长期溃疡病防控.....3

7 雄花蕾采集与杀菌处理.....3

8 猕猴桃雄花粉生产.....3

9 雄花粉质量及携带活溃疡病菌检测.....4

10 结果记录与资料保存.....4

附录 A.....5

附录 B.....6

附录 C.....8

附录 D.....10

参考文献.....12

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。

本文件由广元市农业农村局提出并归口。

本文件起草单位：四川农业大学、四川省农业科学院园艺研究所、广元市农业科学研究院、广元博创农业科技有限责任公司、都江堰猕多多农业科技有限公司联合提出。

本文件主要起草人：龚国淑、姚凯凯、康超勇、赵柳、何成勇、王玲利、晏志强、马苗苗、周佳佳、陈华保、王正前、吴翠平。

猕猴桃雄花粉生产及脱除溃疡病菌技术规程

1 范围

本文件规定了猕猴桃雄株园建设与管理，雄株生长期溃疡病防控，雄花蕾采集与杀菌处理，雄花粉加工及活力检测，雄花粉质量及携带活溃疡病菌检测方法等内容。

本文件适用于四川省广元市内猕猴桃种植区域雄花粉的生产及溃疡病菌脱除。

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 2828.1-2012 计数抽样检验程序（第1部分）

GB/T 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 8321 （所有部分）农药合理使用准则

DB51/T 3069-2023 猕猴桃主要病虫害绿色防控技术规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

猕猴桃雄花粉 kiwifruit male pollen

指猕猴桃雄花花丝顶端膨大的囊状体以及经加工而成的离体花粉粉末，通常为黄色、橙黄色、灰色或黑色，内含有生活力的花粉颗粒。

3.2

脱菌处理 operation of killing *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* before pollen production

指在不影响花粉活力的情况下，利用杀菌剂或臭氧对待加工雄花蕾表面活的猕猴桃溃疡病菌（*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*，简称 Psa）进行灭活处理的操作。

3.3

雄花粉活力 kiwifruit male pollen particles activity

花粉具有萌发长出花粉管并与雌配子结合完成受精的能力，花粉管的长度超过花粉粒直径的为萌发的花粉，反之为不萌发的花粉。用离体培养条件下的萌发率评价花粉的活力。

3.4

带活菌检测 detection of viable Psa with kiwifruit male pollen

指对所生产的雄花粉进行是否带活的猕猴桃溃疡病菌的抽样检测操作。

4 雄株园建设

4.1 品种选择

4.1.1 宜选择广适性好、花量大、出粉多、抗溃疡病强的美味猕猴桃或中华猕猴桃雄株品种。

4.1.2 宜选用抗涝耐旱型专用砧木。

4.2 建园要求

4.2.1 新建园栽植株行距宜 $(1.5\sim 3.0)\text{ m}\times(3.0\sim 3.5)\text{ m}$ 。用雌株生产园高接换种改建雄株园时，如原株行距过大，宜在株间或行间适当补植新苗木。

4.2.2 藤蔓棚架宜选用T型架或水平棚架。周边宜配置防风林或挡风墙，高度不低于5.5m。

5 雄株园管理

5.1 整形修剪

5.1.1 根据立地条件和栽植株行距选择合理树形，包括单主干单主蔓十侧蔓、单主干双主蔓二十侧蔓或单主干无主蔓多侧蔓等。

5.1.2 雄株冬季修剪宜轻，采花后7 d内重剪一次。修剪过程中每剪一株树须用75%酒精对修剪工具、剪锯口进行消毒，修剪伤口应涂抹保护愈合剂。

5.2 肥水管理

5.2.1 幼树期肥水管理宜遵循勤施薄施原则。

5.2.2 进入大量产花年份后，每年采花后至7月初宜以高氮型复合肥为主，7月中旬至9月下旬宜以均衡型复合肥为主，10月施基肥一次、以腐熟有机肥为主。

6 雄株生长期溃疡病防控

6.1 药剂选择

6.1.1 宜选用中生菌素、梧宁霉素、氢氧化铜、春雷·王铜、春雷霉素、枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌等进行防治。

6.1.2 农药使用应符合 GB/T 8321 的规定。

6.1.3 药剂使用浓度以说明书为准。

6.2 施药时间

6.2.1 冬剪后（休眠期至萌芽前），做好冬季清园工作并全园施用 1 次波美 3~5 度石硫合剂。

6.2.2 绒球期选用 6.1.1 药剂种类均匀喷施主干及侧枝，以枝干表面均匀形成一层水膜为宜。

6.2.3 现蕾期至采花前，全园喷施药剂 1~2 次，间隔期约 7 d，着重喷施雄花蕾及花梗，以雄花蕾表面均匀形成一层水膜为宜。采摘雄花蕾前 5 d 内施完最后 1 次药。

6.2.4 全园雄花蕾采完后，7 d 内全园施药 1 次。

6.2.5 落叶前，全园施药 1~2 次，施药间隔期为 7~10 d。

6.2.6 溃疡病以外的其他病虫害防控参照 DB51/T 3069-2023 执行。

7 雄花蕾采集与杀菌处理

7.1 雄花采集

花蕾萼片开裂且膨大处于含苞待放的大蕾期时采集为宜。采集时不应用金属容器盛装。自花朵采摘离树运输至加工场所时间不应超过 5 h。

7.2 雄花蕾加工前臭氧脱菌处理

将运输至加工场所的雄花蕾采用鼓风干燥或经自然阴干，充分除去表面水分后，装入带有臭氧发生器的密闭容器内，雄花蕾量以达 1/3 容器为宜。臭氧浓度为 $630 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ ~ $650 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ 密闭处理 15 min~20 min，处理过程中连续缓慢滚动容器。

8 猕猴桃雄花粉生产

8.1 器具消毒

每批次花粉加工前，对所有雄花粉加工器具表面喷75%的酒精消毒。

8.2 花药分离

经脱菌处理后的待加工雄花蕾通过筛孔孔径0.3 cm~0.5 cm的三级花药脱离装置。雄花蕾进入脱离装置至分离出花药的时间不宜超过1 h。

8.3 花药干燥（散粉）

收集花药均匀摊放于干燥托盘上，厚度约0.3 cm，干燥温度设定为25℃~28℃，相对湿度30%，10~12 h后花药即可开裂，散出雄花粉。

8.4 花粉提取

花药干燥破裂后，用吸尘风机将托盘上的干燥花药吸入花粉提取机用旋风分离法分离出猕猴桃雄花粉，分离后花粉收集于高聚合乙烯瓶内。自干燥完成至分离结束不超过0.5 h。

8.5 花粉保存及运输

长期应在低于-40℃速冻密封贮藏，出贮藏室采取逐级升温。临时保存或运输过程中宜在 0℃~5℃干燥条件下进行，并注意减少温度变幅；临时保存和运输时应防热、防潮、防碰撞和防挤压。

9 雄花粉质量及携带活溃疡病菌检测

9.1 待检测花粉抽样

每批次抽样按照 GB/T 2828.1-2012 的规定执行。

9.2 雄花粉质量要求及活力检测

雄花粉质量及授粉要求、花粉活力检测详见附录A、附录B。

9.3 雄花粉带活菌检测

雄花粉带活菌检测方法及判定结果详见附录C，附录D。

10 结果记录与资料保存

实验记录应包括：样品来源、种类（品种）、采集时间、检测时间、地点和结果等，主要要有检测人员、审核人员签字。上述材料应归档并妥善保存 2 年以上。

附录 A

(资料性)

雄花粉质量及授粉要求

A.1 感官指标

分离获得的猕猴桃雄花粉呈粉末状、易分散，无霉变结块，无可见杂质。

A.2 花粉产品等级指标

按雄花粉纯度及雄花粉活力划分等级。

表 A.1 雄花粉产品质量等级指标

等级	花粉纯度 (%)	花粉活力 (%)
一级	≥90	≥80
二级	70 (含) ~ 90	60 (含) ~ 80
三级	60 (含) ~ 70	40 (含) ~ 60

A.3 不同品种雄花粉授粉适用性参考表

表 A.2 不同类型猕猴桃雄花粉授粉适用雌株参考表

雄花粉类型	适用雌株	适用雌株品种举例
二倍体中华猕猴桃	中华猕猴桃二倍体	红阳、东红、红实 2 号、金红 1 号
四倍体中华猕猴桃	中华猕猴桃二倍体、四倍体	红阳、金实 1 号
六倍体美味猕猴桃	中华猕猴桃二倍体、四倍体和六倍体美味猕猴桃	红阳、金实 1 号、海沃德、翠香、瑞玉等
软枣猕猴桃雄花粉	软枣猕猴桃	
毛花猕猴桃雄花粉	毛花猕猴桃	

附录 B

(资料性)

雄花粉活力检测方法

B.1 感官检验

在无直射阳光下，用感官检验雄花粉颜色、形状等。

B.2 活力检验

试剂与仪器：蔗糖、硼酸、蒸馏水、琼脂；显微镜、0.001 g 电子天秤、电炉、生化培养箱、烧杯、量筒、玻棒、载玻片。

B.3 分析实验室用水规格

按照 GB/T 6682-2008 的规定执行。

B.4 操作方法

培养基制备：准确称取 100 g 蔗糖、0.15 g 硼酸、10 g 琼脂、1000 ml 蒸馏水，全部倒入烧杯中，放到电炉上加热并不断搅拌至完全溶解。

B.5 待检测样品的制备

将同一个花粉包装单元内的花粉充分混合均匀后，用取样勺取少量（约 30 mg）制成待检测花粉样品。冷藏花粉在室温条件下放置 4 小时后再充分混合取样进行检测。

B.6 载玻片制备

从用吸管或玻棒吸取培养液 4~5 滴，滴在平放的载玻片中心位置，培养液自然扩散。

B.7 花粉接种

用毛发蘸取待检测花粉样品，均匀播种在载玻片培养基上，然后将接种好的载玻片放在铺了湿纸巾的培养皿内。每个样品重复 3 次。

B.8 花粉培养萌发

将接种好的花粉培养皿置于 25℃生化培养箱内暗培养 2 h。

B.8 观测统计

将载玻片取出放在显微镜下（10×10）观测。每个样品至少观测 15~20 个视野画面，在占多数的画面中（超过 70 %）选取 3 个画面进行拍照和活力统计。活力计算方法按 DB61/T 888 执行。

B.9 活力值确定

每一份样品都需要做 3 次重复检测，每一次检测都可拍 3 个画面，每一个画面对应一个活力值，样

品最终活力值取 9 个活力值的平均值。

B.10 纯度检验

检测仪器：显微镜、载玻片、盖玻片、接种针。

样品制备：用接种针取少量花粉于载玻片上，盖上盖玻片。

B.11 纯度统计

在 100 倍的显微镜下观察花粉样品，至少观察 3 个载玻片，每载玻片观察 3 个视野，分别记录每个视野的花粉和非花粉物质比例。纯度计算方法按 DB61/T 888 执行。

B.12 出厂检验

花粉应经出厂检验合格，方可出厂；出厂花粉应附合格标记。

花粉出厂检验项目为感官指标、活力、纯度和净含量。

花粉的出厂检验项目全部合格判为出厂检验合格品；在检验中有一项指标不符合本标准要求，应加倍抽样进行复检，复检中有一项不合格，即判定为不合格产品。

B.13 型式检验

在下列情况之一时，进行型式检验，型式检验为全项检验：

花粉原料发生变化时；

花粉采集、加工程序有变化时；

正常生产时每年进行一次；

和用户发生质量争议需要仲裁时；

有关质量监督部门提出型式检验要求时。

型式检验的样品应在出厂检验合格批中抽取。

B.14 判定规则

型式检验的项目全部合格，判该批花粉为合格品；若有一项不合格，应加倍抽样，重新检验，若还有一项不合格，判该批花粉为不合格品

附录 C

(资料性)

猕猴桃雄花粉带溃疡病(活菌)常规检测方法

C.1 制备样品溶液

超净工作台内准确称取待测花粉样品 0.5 g, 加入装有 5 mL 无菌水的离心管中(内有适量玻璃珠), 迅速震荡待花粉完全分散于水中, 制成 1:10 的样品溶液。

C.1.1 稀释样品

2000 r/min 离心 2 min 后, 无菌环境下吸取上清液至新的无菌离心管内, 得到待检测液。

C.2 平板涂布法活菌检测

C.2.1 梯度稀释

取C.1.1中经离心后的样品待检测液1 mL, 加入到9 mL无菌水中, 连续梯度稀释, 分别制成 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 或其它合适稀释度的样品液。

C.2.2 LB平板计数

无菌条件下各 200 μ L 不同稀释度的样品待检测液, 均匀涂布于固体 LB 平板培养基上, 每个浓度梯度重复 5 次。待平板上的样品检测液完全干燥后, 25℃ 倒置培养 48 h。观察菌落形态, 与 Psa 病原菌形态特征比较。LB 平板上 Psa 菌落呈圆形、乳白色、表面光滑、边缘整齐。病原菌生长最适温度为 25℃-28℃, 培养 24 h 后便可长出菌落。生长最高温度为 35℃, 生长最低温度为-12℃以下, 致死温度为 55℃。

C.2.3 直接PCR检测

C.2.2 中每个平板菌落 30 个以内的全选, 菌落数为 30-100 个/板则随机挑取 30 个疑似菌落进行 PCR 检测确认。PCR 检测所用引物对、反应体系及反应程序如下:

引物对 1: Psa-F1/R2 (正向引物: 5'-TTTTGCTTTGCACACCCGATTTT-3'、反向引物: 5'-CACGC ACCCTTCAATCAGGATG-3, 扩增片段长度为 280 bp) ; Psa 3 类群特异性引物对 HopZ5-F/R (正向引物: 5'-TCACTCCTAGACTGGAATAC-3', 反向引物: 5'-GGCTATCATGAAGGCTGTCA-3', 扩增片段长度为 550 bp); 使用无菌 ddH₂O 将合成的引物干粉稀释成 10 μ mol/L 储存液。

菌落 PCR 扩增反应体系: 2×Taq Master mix 12.5 μ L, 上下游引物 (10 μ M) 各 0.5 μ L, 加 ddH₂O 补足到 25 μ L, 无菌牙签挑取单菌落少许作为模板, 混匀瞬时离心后进行 PCR 反应。

PCR 扩增程序: 将配制完成的反应管放入 PCR 仪中, Psa-F1/R2 引物对反应程序为: 94℃ 4 min, 94℃ 30 sec, 58℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 35 个循环, 72℃ 10 min, 4℃保存; HopZ5-F/R 引物对反应程序为: 94℃ 4 min, 94℃ 30 sec, 55℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 35 个循环, 72℃ 10 min, 4℃保存。

PCR 产物检测：扩增结束后取 5 μ L PCR 产物于 2%琼脂糖凝胶中进行电泳分离，电泳结束后在凝胶成像系统下观察并成像，比对是否获得目标片段。

阳性对照与空白对照：用已知的 Psa 标准菌株作为阳性对照；无菌 ddH₂O 作为空白对照。

C.3 结果判定

若待测样品和阳性对照存在 280 bp 条带/550 bp 条带，阴性对照和空白对照无此条带，则判定待测花粉样品为阳性即携带有活菌，否则为阴性。

附录 D

(资料性)

PMA——PCR 雄花粉带活菌检测相关资料

D.1 PMA名称

叠氮溴化丙锭 (propidium monoazide, PMA)

D.2 PMA检测活菌原理

叠氮溴化丙锭 (propidium monoazide, PMA) 是一种光反应的 DNA 结合染料, 具有极高的 DNA 亲和结合能力, PMA 可进入死亡和外膜损伤严重的微生物内部, 并插入 DNA 结构中, 经可见光刺激发生光裂解后, 同 DNA 结合发生共价交联反应, 共价交联产物可以抑制 DNA 的 PCR 扩增。

D.3 PMA浓度

向规格为 1 mg/瓶的 PMA 试剂中加入 1mL 二甲基亚砷 (Dimethyl sulfoxide) 充分溶解, 4℃条件储存备用。

D.4 PMA处理程序

取溶解后的 PMA 试剂 10.5 μL, 加入体积为 90 μL 已制备好的样品待检测液中 (C.1.1), 迅速混匀后, 黑暗 (避光) 室温孵育 8 min 后, 再置于强光 (500 W 卤素灯光) 下照射 20 min, 用于后续 DNA 提取。

D.5 热裂解法制备DNA模板及PCR检测方法

将D.4中经PMA处理后的样品待检测液于12000 r/min 离心5 min, 弃上清液, 再加入1 ml无菌ddH₂O, 充分震荡后100℃条件下置于金属浴中热裂解10 min, 再经冰浴冷却后, 12000 r/min离心5 min, 弃去上清液; 按1:10的比例用ddH₂O进行稀释即为DNA模板; 取2 μL DNA模板进行PCR检测。PCR制样、检测方法如下:

PCR扩增反应体系: 取2 μL DNA作为模板, 2×Taq Master mix 12.5 μL, 上下游引物 (10 μM) 各0.5 μL, 加ddH₂O补足到25 μL, 混匀瞬时离心后进行PCR反应。

PCR扩增程序: 将配制完成的反应管放入PCR仪中。Psa-F1/R2引物对反应程序为: 94 ℃ 4 min, 94 ℃ 30 sec, 58℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 35个循环, 72℃ 10 min, 4℃保存; HopZ5-F/R引物对反应程序为: 94 ℃ 4 min, 94 ℃ 30 sec, 55℃ 30 sec, 72℃ 1 min, 35个循环, 72℃ 10 min, 4℃保存。

PCR产物检测: 扩增结束后取5 μL PCR产物于2%琼脂糖凝胶中进行电泳分离, 电泳结束后在凝胶成像系统下观察并成像, 比对是否获得目标片段。

阳性对照与阴性对照：用经PMA处理过的Psa标准菌株作为阳性对照，经高温高压灭菌处理后死的Psa标准菌株作为阴性对照，无菌ddH₂O作为空白对照。

D.6 结果判定

若待测样品和阳性对照存在 280 bp 条带/550 bp 条带，阴性对照和空白对照无此条带，则判定待测花粉样品为阳性即携带有活菌，否则为阴性。

参考文献

- [1] DB36/T 1169-2019 猕猴桃雄株建园及授粉技术规程[S]. 江西农业大学, 2019.
- [2] DB61/T 1369-2020 猕猴桃细菌性溃疡病早期监测技术规范[S]. 西北农林科技大学陕西省植物保护工作总站, 2020.
- [3] DB61/T 888-2014 猕猴桃花粉[S]. 西北农林科技大学等, 2014.
- [4] T/DJYMHT 0001—2023 猕猴桃雄花粉生产与质量控制技术规程[S]. 四川省农业科学院园艺研究所, 2023.
- [5] T/DJYMHT 0001—2024 猕猴桃雄花粉脱除溃疡病菌生产技术规程[S]. 四川农业大学, 2024.
- [6] 龚国淑, 李庆, 张敏, 等. 猕猴桃病虫害原色图谱与防治技术[M]. 北京: 科学出版社. 2020.
- [7] 涂美艳, 祝进. 图说红肉猕猴桃丰产优质高效栽培技术[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社. 2022.
- [8] 李黎, 冯丹丹, 潘慧, 等. 猕猴桃花粉灭菌方法比较及对果实品质的影响[J]. 园艺学报, 2022, 49(4): 769-777.
- [9] 胡月, 陈航, 杨巽喆, 等. 酶联免疫吸附反应对猕猴桃溃疡病菌效应子 Hopz5 多克隆抗体的特性分析[J]. 生物技术通报, 2018, 34(1): 84-89.
- [10] 肖妍, 刘芸宏, 高贵田, 等. PMA-qPCR 方法检测陕西猕猴桃溃疡菌优势病原菌活菌的研究[J]. 食品与机械, 2019, 35(4): 48-53+59.
- [11] Stefani E and Giovanardi D. Dissemination of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* through pollen and its epiphytic life on leaves and fruits[J]. Phytopathologia Mediterranea, 2011, 50(3): 489-496.
- [12] Flay C, Symonds V V, Storey R, et al. Map** QTL associated with resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in kiwifruit (*Actinidia chinensis* var. *chinensis*) [J]. Frontiers in Plant Science, 2024, 14: 1255506.
- [13] Vanneste J L. The scientific, economic, and social impacts of the New Zealand outbreak of bacterial canker of kiwifruit (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*) [J]. Annual Review of Phytopathology, 2017, 55 (1): 377-399.
- [14] Buriani G, Donati I, Cellini A, et al. New insights on the bacterial canker of kiwifruit (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*)[J]. Journal of Berry Research, 2015, 4(2): 53-67.
- [15] Pei Y, Ma L, Zheng X, et al. Identification and genetic characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* from kiwifruit in Sichuan, China[J]. Plant Disease, 2023, 107(10): 3248-3258.

- [16] 高小宁, 赵志博, 黄其玲, 等. 猕猴桃细菌性溃疡病研究进展[J]. 果树学报, 2012, 29(2): 7.
- [17] 金平涛, 王亚红, 黄丽丽. 周至县猕猴桃溃疡病绿色防控“两前两后”关键技术[J]. 陕西农业科学, 2022, 68(5): 97-99.
- [18] 姚凯凯, 朱宇航, 陈稳, 等. 四川省猕猴桃溃疡病主要防控技术与应用情况调研初报[J]. 中国果树, 2024, (11): 85-92+107.
- [19] Athanasios Koukounaras. Advanced greenhouse horticulture: New technologies and cultivation practices[J]. Horticulturae, 2021, 7(1): 1.
- [20] 石艳萍, 陈弟诗, 王印, 等. PMA-PCR 诊断技术研究进展[J]. 中国动物检疫, 2023, 40(3): 72-78.
-