

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1586.2—2008

菜豆晕疫病菌检疫鉴定方法

Identification of *Pseudomonas savastanoi* pv.
phaseolicola (Burkholder) Gardan et al.

2008-09-04 发布

2009-03-16 实施

中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

本部分的附录 B 和附录 C 为规范性附录,附录 A 为资料性附录。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位:中华人民共和国天津出入境检验检疫局。

本部分主要起草人:刘鹏、崔铁军、廖芳、刘跃庭、冯洁、王金成。

本部分系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

菜豆晕疫病菌检疫鉴定方法

1 范围

SN/T 1586 的本部分规定了进出境植物检疫中菜豆晕疫病菌(*Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*)的检疫鉴定方法。

本部分适用于进出境菜豆(*Phaseolus vulgaris*)、大豆(*Glycine max*)等的植物种子中菜豆晕疫病菌的检疫和鉴定。

2 原理

2.1 病菌分类地位和重要特征

菜豆晕疫病(Halo blight of beans)是菜豆、大豆等豆科植物上的严重病害,该病的病原菌为菜豆晕疫病菌(*Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*)。菜豆晕疫病菌属原核生物界(Prokaryotes),薄壁菌门(Gracilicutes),假单胞菌科(Pseudomonaceae),假单胞菌属(*Pseudomonas*);单胞,杆状,直或微弯,革兰氏阴性,极鞭单生或多生,能运动,无鞘,无孢子,一般大小($0.5\ \mu\text{m}\sim 1.0\ \mu\text{m}$) $\times$ ($0.4\ \mu\text{m}\sim 1.5\ \mu\text{m}$),代谢呼吸型,化能有机营养型,接触酶阳性,精氨酸双水解酶阴性,氧化酶阴性。相关资料参见附录 A。

2.2 鉴定原理

菜豆晕疫病菌的形态特征、生物学特性、生化特性、寄主范围、传播途径,以及分子生物学特征作为制定本检疫鉴定标准的依据。

3 仪器、用具

- 生物显微镜;
- 生物安全柜(或超净工作台);
- 高压灭菌器;
- 小型电动粉碎机;
- 恒温培养箱;
- 离心机;
- PCR 仪;
- 电泳设备;
- 凝胶成像系统;
- 其他常规实验室设备、器具及试剂。

4 主要试剂

除非另有说明,在分析中仅使用分析纯试剂和去离子水。PCR 反应体系用水双蒸水。其他试剂比如各种溶液、缓冲液和培养基都是检测方法特有的,都应按附录要求准备。商品化试剂参见其使用说明。

双氧水(3%),蛋白胨,酵母粉,硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$),蔗糖($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$),磷酸氢二钾(K_2HPO_4),琼脂,多聚蛋白胨,甘油,乙二胺四乙酸(EDTA),三羟甲基氨基甲烷(Tris),盐酸,冰乙酸,磷酸二氢钾(KH_2PO_4),磷酸氢二钠(NaH_2PO_4),琼脂糖,溴化乙锭, *Taq* DNA 聚合酶, $10\times$ PCR 缓冲液, dNTP (2.5 mmol/L each), 溴酚蓝,二甲苯青 FF, 2 000 bp Marker。

细菌微量生化鉴定管:D-甘露醇,戊二酸盐。

生化鉴定试纸条:氧化酶试纸条。

5 检疫鉴定方法及步骤

5.1 病原菌的分离

5.1.1 植株分离方法

5.1.1.1 种植观察

将待测的种子种植于温室或实验室的育苗钵中,每一育苗钵种植2粒种子,每份种子样品种植不少于3 000粒,生长环境适宜温度为20℃~25℃,相对湿度大于或等于70%,种子出苗1周后开始观察。发生病害的典型症状为种植期间有发病的幼苗,叶片表现为褪色花叶型,有萎蔫的情况。若观察到有典型症状的发生,则采集可疑病株进行病原菌的分离培养。

5.1.1.2 病叶中病原菌的分离

用灭菌剪刀剪取病叶上的病斑,用含有效氯1%的次氯酸钠溶液表面消毒1 min,无菌水清洗三次,然后将其移至灭菌培养皿上,加5滴~6滴无菌水,用灭菌镊子将病斑夹碎,使病组织液溶于无菌水中。用接种环蘸取该液,在选择性培养基(MSP,见附录B)上划线,每一处理做三个平皿(规格直径为90 mm,下同),28℃恒温培养48 h。

5.1.2 种子分离方法

选取待测菜豆种子150 g,用75%酒精浸泡1 min,无菌水清洗三次,在无菌环境中晾干;将种子放入经灭菌处理的小型电动粉碎机中破碎(或将晾干的种子放入灭菌纸袋中,用锤子砸碎),之后装入一灭菌的大三角瓶中,加灭菌水200 mL,4℃振荡过夜;取浸出液进行差速离心,1 000 r/min离心10 min,弃沉淀,取上清液再进行8 000 r/min的离心10 min,之后将沉淀用2 mL无菌水稀释;取稀释液1 mL再进行系列浓度的稀释,分别为1/10,1/100,1/1 000,1/10 000,1/100 000;将每个浓度的稀释液在MSP培养基平皿上进行涂布,10 μL/平皿,每个浓度做三个平皿。培养皿在28℃恒温条件下培养48 h。

5.2 可疑菌株的分离纯化

根据附录B中菌落在MSP培养基上的菌落特征,挑取可疑的单个菌落,在523或金氏B培养基上连续转接2次~3次,可得到纯化后的分离菌。对可疑菌株进行下一步骤。

5.3 革兰氏染色

对可疑菌株进行革兰氏染色。用牙签挑取菌落放在载玻片上与3%氢氧化钾(KOH)液滴搅拌,然后慢慢拉出,有拉丝现象的为革兰氏阴性菌,无拉丝现象的一般为革兰氏阳性菌。

对可疑菌株进行革兰氏染色。可用革兰氏染色试剂进行简单染色观察菌体形状。

若可疑菌株经鉴定为革兰氏阴性菌,且菌体形状为杆状,则进行下一步骤(见5.4)。否则排除可疑菌落。

5.4 生化指标初筛检测

对可疑菌株进行以下四项生化指标的检测。对于能够符合生化指标(接触酶阳性,氧化酶阴性,D-甘露醇阴性,戊二酸盐阴性)的菌株,则进行下一步骤(见5.5)。否则排除可疑菌落。

5.5 分子生物学检测

采用特异性引物P1/P2对可疑菌株进行PCR检测,用菜豆晕疫病菌标准菌株作阳性对照,用非菜豆晕疫病菌的植物病原细菌作阴性对照,用水作空白对照,进行PCR扩增,扩增产物进行电泳分析。在阳性对照扩增片段大小为0.5 kb的单带的前提下,可疑菌株扩增结果与阳性对照一致,可判断分子生物学检测结果为阳性。具体实验步骤和试剂配置见附录C。

6 结果判定

若分离的细菌菌株在选择性培养基上的菌落特征与描述相符、符合革兰氏染色阴性的结果和菌体

形状为杆状、符合 5.4 中各项生化指标的检测结果、分子生物学检测为阳性,可以判定检出菜豆晕疫病菌。

7 菌株保存

分离并最终鉴定为菜豆晕疫病菌的菌株应转接到试管斜面上,经登记和经手人签字后置于 4℃ 左右低温冰箱中保存,定期(30 d~60 d)转接,以防止病菌死亡;必要时冻干后长期保存。



附 录 A

(资料性附录)

菜豆晕疫病菌(*Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*)相关资料

A.1 英文名

Halo blight of beans。

A.2 学名

Pseudomonas savastanoi pv. *phaseolicola*。

A.3 分布

埃塞俄比亚,肯尼亚,马达加斯加,马拉维,毛里求斯,摩洛哥,罗德里格斯岛,卢旺达,南非,坦桑尼亚,乌干达,刚果,赞比亚,津巴布韦,印度,以色列,日本,巴基斯坦,沙特阿拉伯,土耳其,也门,澳大利亚,斐济,新西兰,奥地利,比利时,英国,保加利亚,捷克,斯洛伐克,丹麦,法国,德国,匈牙利,爱尔兰,意大利,荷兰,波兰,罗马尼亚,西班牙,瑞典,瑞士,前苏联,前南斯拉夫,加拿大,墨西哥,美国,巴巴多斯,哥斯达黎加,多米尼加共和国,瓜德罗普群岛,马提尼克,圣文森特,阿根廷,智利,哥伦比亚,秘鲁,苏里南,委内瑞拉,中国(黑龙江)。

A.4 寄主范围

菜豆(*Phaseolus vulgaris*)、大豆(*Glycine max*)、豌豆(*Pisum sativum*)、绿豆(*Vigna radiata*)、木豆(*Cajanus cajan*)、多花菜豆(*Phaseolus coccineus*)、月豆(*Phaseolus lunatus*)、葛(*Pueraria lobata*)、野葛(*Pueraria thunbergiana*)、豇豆(*Vigna unguiculata*)、桑橙(*Macroptilium atropurpureum*)、*Glycine javanica*、*Glycine wightii*。

A.5 传播方式

菜豆晕疫病菌主要通过带菌种子作远距离传播。在田间则通过风雨、灌溉传播。

附录 B

(规范性附录)

菜豆晕疫病菌(*Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*)常用的培养基配方

B.1 金氏 B 培养基

蛋白胨 20 g, 甘油 10 g, 硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 1.5 g, 磷酸氢二钾(K_2HPO_4) 1.5 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1 000 mL。调整 pH 值至 7.2, 121 °C 湿热灭菌 20 min。

B.2 523 培养基

蛋白胨 8 g, 酵母粉 4 g, 硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.3 g, 蔗糖($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) 10 g, 磷酸氢二钾(K_2HPO_4) 2 g, 琼脂 18 g, 水(H_2O) 1 000 mL。调整 pH 值至 7.0~7.1, 121 °C 湿热灭菌 20 min。

B.3 MSP 培养基

蛋白胨 5 g, 硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.025 g, 蔗糖($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) 20 g, 磷酸氢二钾(K_2HPO_4) 0.5 g, 琼脂 20 g, 水(H_2O) 1 000 mL。调整 pH 值至 7.2~7.4, 121 °C 湿热灭菌 20 min, 之后冷却到 45 °C, 加入下列经过细菌滤膜过滤的试剂:

放线菌酮(100 mg/mL, 用 75% 的甲醇溶解)	2 mL
头孢氨苄(10 mg/mL, 用水溶解)	8 mL
万古霉素(10 mg/mL, 用水溶解)	1 mL
溴百里酚蓝(15 mg/mL, 用 95% 的酒精溶液溶解)	1 mL

B.4 选择性培养基上的菌落形态特征

菜豆晕疫病菌在 MSP 培养基上形成圆形、边缘整齐、黄色的菌落, 48 h 菌落直径在 1 mm~1.5 mm, 典型的特征是生长期间有浅蓝色色素产生, 366 nm 紫外光下观察有蓝色荧光, 并扩散到培养基中。

B.5 普通培养基上的菌落形态特征

菜豆晕疫病菌在 523 培养基上形成圆形、黄绿色菌落, 48 h 菌落直径在 1 mm~1.5 mm (随转接代数增加, 菌株的生长速度会加快), 边缘整齐, 典型的特征是生长期间有浅黄绿色色素产生, 并扩散到培养基中。

菜豆晕疫病菌在金氏 B 培养基上的菌落形态与 523 培养基类似, 但菌落颜色较 523 稍浅。

附 录 C (规范性附录)

菜豆晕疫病菌(*Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*)的 PCR 检测方法

C.1 试剂制备

C.1.1 TAE 电泳缓冲液(50×储存液,pH 约 8.5):

242 g Tris 碱,57.1 mL 冰乙酸,37.5 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
加 H_2O 至 1 L,
用时蒸馏水稀释 50 倍。

C.1.2 TE 缓冲液:

10 mmol/L Tris · Cl,pH8.0,
1 mmol/L EDTA pH8.0

C.2 PCR 反应模板制备

可直接用培养的菌株稀释成菌悬液($>10^7$ CFU/mL)作为 PCR 反应模板。¹⁾

C.3 定性 PCR 检测

C.3.1 检测引物

P1:5'-AGCTTCTCCTCAAAACACCTGC

P2:5'-TGTTCGCCAGAGGCAGTCATG

(扩增产物 0.5 kb)

C.3.2 PCR 反应体系(30 μL)

10×PCR 缓冲液	3 μL
dNTP(2.5 mmol/L each)	1.2 μL
引物 P1(10 mmol/L)	1 μL
引物 P2(10 mmol/L)	1 μL
Taq(5 U/ μL)	0.2 μL
H_2O	22.6 μL
模板 DNA	1 μL

C.3.3 PCR 反应程序

94 $^{\circ}\text{C}$ /3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ /30 s;60 $^{\circ}\text{C}$ /30 s;72 $^{\circ}\text{C}$ /40 s;38 循环;72 $^{\circ}\text{C}$ /5 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 。

C.3.4 PCR 扩增产物的检测

1.5%的琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像仪下进行分析并拍照,记录实验结果。

1) 可按《精编分子生物学实验指南》中的方法提取细菌基因组 DNA,提取后可用 TE 缓冲液溶解,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。