

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1465—2004

西瓜细菌性果斑病菌检疫鉴定方法

Methods of quarantine and identification of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*



2004-11-17 发布

2005-04-01 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

本标准的附录 A、附录 B 为规范性附录,附录 C 为资料性附录。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准由中华人民共和国新疆出入境检验检疫局负责起草,南京农业大学参加起草。

本标准主要起草人:张祥林、薛光华、胡白石、张伟、范伟功、余永杰。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

西瓜细菌性果斑病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了植物检疫中西瓜细菌性果斑病菌(*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, 简称 A. a. c)的鉴定方法。

本标准适用于对瓜类植物种子中的西瓜细菌性果斑病菌的鉴定。

2 原理

细菌性果斑病(Bacterial Fruit Blotch)是西瓜、甜瓜等葫芦科作物上的一种危险性病害,此病的病原菌为西瓜细菌性果斑病菌[*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Schaad, Sowell, Goth, Colwell and Webb 1978) Willems, Goor, Thielemans, Gillis, Kersters and De Ley 1992 VP],该菌属原核生物界(Prokaryotae)、薄壁菌门(Gracilicutes)、暗细菌纲(Scotobacteria)、假单胞菌科(Pseudomonadaceae)、嗜酸菌属(*Acidovorax*)。该病菌的形态特征、生物学特性、生化特性、寄主范围、传播途径,以及 PCR 特异性反应等特征是该检疫鉴定方法的依据。

3 仪器和用具

- 3.1 生物显微镜(具照相系统)。
- 3.2 超净工作台。
- 3.3 电子天平(感量 1/10 000)。
- 3.4 光照恒温培养箱。
- 3.5 恒温振荡培养箱。
- 3.6 低温冰箱。
- 3.7 高压灭菌器。
- 3.8 培养皿(直径:7.5 cm)。
- 3.9 恒温水浴锅(30℃~95℃)。
- 3.10 高速冷冻离心机(18 000 r/min 以上)。
- 3.11 小型电动粉碎机。
- 3.12 PCR 仪。
- 3.13 电泳装置(电泳仪、水平电泳槽)。
- 3.14 PCR 管(0.2 mL)。
- 3.15 离心管(12 mL、2 mL、1.5 mL)。
- 3.16 微量可调加样器(2 μL、10 μL、20 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL)。
- 3.17 加样器枪头(2 μL~20 μL、20 μL~200 μL、200 μL~1 000 μL)。

4 主要试剂

蛋白胨、琼脂粉、甘油、升汞、盐酸、次氯酸钠、二甲基对苯二胺盐酸盐、酵母膏、葡萄糖、牛肉浸膏、酚红、小檗碱、羧甲基纤维素、硼酸、亮甲酚蓝、溴甲酚紫、乙醇、放线菌酮、羧苄青霉素、乙二胺四乙酸(EDTA)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、十二烷基磺酸钠(SDS)、液氮、三氯甲烷、异戊醇、异丙醇、琼脂糖(电泳用)、溴化乙锭、*Taq* DNA 聚合酶、磷酸氢二钾(K_2HPO_4)、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、磷酸氢二钠($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)、磷酸二氢铵($NH_4H_2PO_4$)、硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)、氯化钙($CaCl_2 \cdot 7H_2O$)、氯

化钠(NaCl)、氯化钾(KCl)、10×PCR 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L KCl)、10×dNTP 液(2.5 mmol/L dATP, dTTP, dCTP, dGTP)。

5 检疫鉴定方法

5.1 种植观察

将待测的瓜类种子种植于温室或实验室内的育苗钵(纸杯或塑料杯)中,每一育苗钵中种植 2 粒种子,每份种子样品种植 5 000 粒左右,最低不少于 3 000 粒种子,生长环境温度为 25℃~35℃,相对湿度大于等于 70%,种子出苗后 15 d 内观察幼苗发病情况。如果种植期间有发病幼苗,且表现出西瓜细菌性果斑病苗期的典型症状(见附录 A),则采集可疑病株进行分离培养及常规检测,或直接用病叶提取核酸作 PCR 检测。

5.2 分离培养

5.2.1 种子中病原菌的分离培养

分别称取待测瓜类种子样品各 100 g,分装于干净纸袋中,做好标记,供检测用。无菌操作下,将供试样品置于 0.1%升汞溶液中表面消毒 30 s~80 s(也可用含有效氯 1%的次氯酸钠溶液表面消毒 2 min~4 min),无菌水清洗三次,然后将种子移至无菌的小型电动粉碎机中,破碎种子,将处理好的种子装入一灭菌的广口瓶中,加入 200 mL 灭菌的 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液,混匀,25℃下过夜,次日用该溶液在事先制备好的金氏 B 平皿培养基上划线,每一样品做三个皿,28℃恒温培养 48 h。A. a. c 在金氏 B 培养基上生长的菌落呈淡白色、光滑、不粘稠,无荧光。

5.2.2 病叶中病原菌的分离培养

用灭菌剪刀剪取病叶上的病斑,用含有效氯 1%的次氯酸钠溶液中表面消毒 50 s~60 s,无菌水清洗三次,然后将其移至灭菌培养皿中,加 5 滴~10 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。用灭菌的移植环蘸取该液,在金氏 B 平皿培养基上划线,每一处理做三个皿,28℃恒温培养 48 h。

5.3 氧化酶反应测定

无菌操作下,在一个无菌培养皿中放一张灭菌滤纸,滤纸上加 5 滴现配的 1%二甲基对苯二胺盐酸盐溶液,挑取生长 24 h 的菌苔涂在滤纸上,若测试菌株的菌苔在 20 s 内变成红色或紫色则为阳性反应,A. a. c 标准菌株呈阳性反应;若菌苔颜色不变则为阴性反应。

5.4 高温培养

将供试菌株的菌落在金氏 B 平皿培养基上划线,每一处理做两个皿,40℃恒温培养 48 h,观察细菌生长情况。A. a. c 标准菌株在 40℃下可以生长,而该菌的几个近似种在 40℃下不能生长。

5.5 半选择性培养基培养

将供试菌株分别在 BFB-08、TWZ 和 EBB 等半选择性培养基所制备的平皿培养基上划线,每一处理做三个皿,28℃恒温培养 48 h。A. a. c 标准菌株在 BFB-08 培养基上产生红褐色、凹陷、光滑的菌落,在 TWZ 培养基上产生深红色、光滑、球形凸起的菌落,在 EBB 培养基上产生淡蓝色、光滑菌落。各种半选择性培养基配方见附录 B。

5.6 致病性测定

将待测菌株在金氏 B 培养基上培养 48 h 左右,配成 10^7 cfu/mL~ 10^8 cfu/mL 的细菌悬浮液,用喷雾法接种在预先培育的、具 2 片~3 片真叶的健康西瓜或甜瓜幼苗上,每一菌株接种 3 株~5 株,用无菌水做对照。接种后用塑料袋罩住植株,使植株在 25℃~35℃、相对湿度大于等于 70%的条件下生长,第三天开始观察发病情况,第十天结束,每天观察一次。A. a. c 标准菌株可形成附录 A 所描述的症状。

5.7 PCR 法检测(可选择项目)

从分离培养的细菌菌株中提取核酸,或从表现典型症状的病叶中提取核酸,进行 PCR 检测和电泳分析。以提取的供试菌株或病叶的核酸为模板 DNA,用 A. a. c 标准菌株的核酸作阳性对照,用非

A. a. c的植物病原细菌的核酸作阴性对照,用双蒸水代替模板 DNA 作为空白对照,进行 PCR 扩增,将扩增产物进行琼脂糖电泳分析。如果测试菌株的 PCR 产物与阳性对照一致,则可判定该批种子带有 A. a. c。否则,可判定该批种子不带 A. a. c。该检测方法参见附录 C。

6 结果判定

在常规生物学方法检测中,如果种植观察出现典型症状的病株、分离到的细菌菌株的氧化酶反应呈阳性、在 40℃ 下可以生长、在选择性培养基上的菌落特征与描述相符、致病性测定表现典型症状,可以判定为检出西瓜细菌性果斑病菌。

在分子生物学方法检测中,如果 PCR 法检测结果为阳性,而且扩增的片断大小与描述相符,可以判定为检出西瓜细菌性果斑病菌。

7 样品保存

保存样品经登记和经手人签字后置于阴凉干燥、防虫防鼠处妥善保存 3 个月。对检出西瓜细菌性果斑病菌的样品应至少保存 6 个月,以备复检、谈判和仲裁,该类样品保存期满后,需经灭菌后方可处理。

8 菌株保存

从检测样品中分离到并鉴定为西瓜细菌性果斑病菌的菌株,应妥善保存。将菌株接种于金氏 B 培养基斜面上,28℃ 恒温培养 48 h。无菌操作下,在一灭菌培养皿中加入 10 mL 无菌水,用灭菌的移植环挑取菌落 5 环,置于无菌水中稀释成细菌悬浮液。用灭菌注射器吸取菌悬液,注入灭菌的菌种保存管中,每一菌种保存管加 1 mL 菌悬液,封口,写好标签,室温下避光保存;或用真空冷冻干燥机制成冻干粉, -20℃ 下保存。

附 录 A

(规范性附录)

西瓜细菌性果斑病菌(A. a. c)相关资料

A.1 英文名

Bacterial Fruit Blotch of Watermelon

A.2 学名

Acidovorax avenae subsp. *citrulli* (Schaad, Sowell, Goth, Colwell and Webb 1978) Willems, Goor, Thielemans, Gillis, Kersters and De Ley 1992 VP。

A.3 分布

美国、印度尼西亚、关岛、土耳其、澳大利亚、智利、韩国、日本、泰国、中国等。

A.4 寄主范围

西瓜、甜瓜、籽瓜、野西瓜等。

A.5 症状

在西、甜瓜苗期的主要症状为：子叶初生水浸状、近圆形暗绿色的凹陷病斑，后干枯呈褐色。真叶初为水浸状、浓绿色小点，以后逐渐扩大为多角形或不规则形的黄褐色病斑，湿度大时，在病斑背面分泌出白色粘液状菌脓，干燥后为白色菌胶质，病叶很少脱落。西(甜)瓜果实染病后，最初在果皮上出现很小的水浸状病斑，随后迅速扩展，病斑边缘不规则，呈暗绿色，病部果面凹陷，常开裂，向纵深发展，并不断横向扩展，引起果实腐烂。

A.6 分类地位及生理生化特性

西瓜细菌性果斑病菌(A. a. c)属于原核生物界、薄壁细菌门、假单孢菌科、嗜酸菌属的细菌。菌体短杆状，极生单根鞭毛，无荧光，革兰氏染色呈阴性，接种烟草可产生过敏性反应，氧化酶反应呈阳性，不能使明胶液化，可分解果糖、葡萄糖、阿拉伯糖、半乳糖、海藻糖、乙醇、甘油、丙氨酸、亮氨酸等；不能分解蔗糖、乳糖、鼠李糖、纤维二糖、甘露醇、山梨醇、肌醇等。

A.7 传播方式

西瓜细菌性果斑病菌主要通过带菌种子作远距离传播。在田间则通过雨水、农事操作、昆虫等传播。

附录 B

(规范性附录)

西瓜细菌性果斑病菌(A. a. c)常用的培养基配方

B.1 金氏 B 培养基

聚蛋白胨	20 g	琼脂粉	15 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
甘油	10 mL	蒸馏水	1 000 mL

B.2 BFB08 培养基

氯化钠(NaCl)	5 g	磷酸铵	1 g
磷酸氢二钾(K_2HPO_4)	1 g	硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.2 g
酚红	0.01 g	甲基紫	0.01 g
小蘗碱(2 mg/mL)	0.2 mL	蒸馏水	1 000 mL

将上述药品先溶于蒸馏水中,用 1 mol/L 氢氧化钠调节 pH 至 7.2~7.4,然后振荡加入以下药品:
26 g 羧甲基纤维素和 5 g 琼脂粉。

B.3 TWZ 培养基

蛋白胨	5 g	琼脂粉	15 g
氯化钙($\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.25 g	蒸馏水	1 000 mL
高压灭菌,待冷却至 50℃时加入以下药剂:			
Tween 80(灭菌)	10 mL	小蘗碱(30 mg/mL)	5 mL
放线菌酮(25 mg/mL)	2 mL	氯化三苯基四氮唑(TTC)(10 mg/mL)	5 mL

B.4 EBB 培养基

磷酸二氢铵($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)	1 g	氯化钾(KCl)	0.2 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g	酵母浸出汁	0.3 g
硼酸	0.5 g	琼脂粉	16 g
溴甲酚紫	0.6 mL(15 mg/mL)	亮甲酚蓝 R	1 mL(10 mg/mL)
无水乙醇	10 mL	放线菌酮	0.2 g
蒸馏水	1 000 mL		

附录 C

(资料性附录)

西瓜细菌性果斑病菌(A. a. c)的 PCR 检测方法

C.1 试剂制备

C.1.1 DNA 抽提液配方

100 mmol/L Tris-Cl, pH8.0	100 mmol/L EDTA
250 mmol/L NaCl	100 μg/mL 蛋白酶 K

C.1.2 CTAB 沉淀液配方

1% (质量浓度) CTAB (十六烷基三乙基溴化铵)
50 mmol/L Tris-Cl, pH8.0
10 mmol/L EDTA, pH8.0

C.1.3 TE 缓冲液配方

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

C.1.4 TAE 电泳缓冲液(pH8.5)配方

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

灭菌后常温保存,用时稀释 50 倍。

C.1.5 10×电泳上样缓冲液(pH8.5)配方

20% (质量浓度) Ficoll 400	0.1 mol/L Na ₂ EDTA (pH8.0)
1.9% (质量浓度) SDS	0.25% (质量浓度) 溴酚蓝

C.2 样品 DNA 的提取

C.2.1 病叶中总 DNA 的提取

将待检的新鲜病叶约 0.2 g 用剪刀剪碎,置于一灭菌研钵中,加入适量液氮,迅速进行研磨,使叶片成粉状。然后将其转移至 1.5 mL 离心管中,加入 1.2 mL DNA 抽提缓冲液(含 2%β-巯基乙醇),充分混匀,65℃水浴中孵育 30 min。室温 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液 700 μL 移至另一 1.5 mL 离心管中,加入 5 μL Rnase A (10 μg/mL),37℃水浴中孵育 30 min。加入等体积的三氯甲烷-异戊醇(24:1),颠倒混匀。室温 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液 600 μL 移至另一 1.5 mL 离心管中,加入等体积的 CTAB 沉淀液,混匀,室温 12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液。加入 600 μL 氯化钠(1.2 mol/L)溶解沉淀,室温静置 5 min,加入等体积的三氯甲烷-异戊醇(24:1),颠倒混匀。室温 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液 600 μL 移至另一 1.5 mL 离心管中,加入 0.6 倍体积的异丙醇,混匀,室温静置 30 min。12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液。用 70%冷乙醇洗涤沉淀两次,无水乙醇洗涤沉淀一次,晾干。加入 50 μL TE 缓冲液溶解 DNA 沉淀。-20℃长期保存。

C.2.2 病原细菌 DNA 的提取

将供试菌株在试管中的 KB 斜面培养基上培养 48 h (28℃)。在每一试管中加入 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液 10 mL 洗下菌苔。将细菌悬浮液转移至一干净的 12 mL 离心管中,12 000 r/min 离心 15 min,弃上清液。在沉淀中加入 TE 缓冲液 5 mL、10% SDS 溶液 300 μL、20 mg/mL 蛋白酶 K 30 μL,混匀,37℃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管中。加入等体积的酚-三氯甲烷-异戊醇(25:24:1),混匀,10 000 r/min 离心 5 min,将上

清液移至一个新管中。加入 0.6 体积的异丙醇,轻轻混合至 DNA 沉淀,10 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,用 70%乙醇洗涤沉淀,晾干,加入 50 μL TE 缓冲液溶解 DNA 沉淀, -20°C 长期保存。

(注:此步也可省略。可直接用培养的菌株稀释成 $\geq 10^5$ cfu/mL 的菌悬液作模板进行定性 PCR 检测。)

C.3 定性 PCR 检测

C.3.1 PCR 反应体系

C.3.1.1 检测 A. a. c 采用的 PCR 引物序列见表 C.1。

表 C.1 检测 A. a. c 的 PCR 引物序列

引物名称	引物序列	PCR 产物大小
WFB51	正链:5' GAC CAG CCA CAC TGG GAC 3'	360 bp
	负链:5' CTG CCG TAC TCC AGC GAT 3'	

C.3.1.2 检测 A. a. c 采用的 PCR 反应体系见表 C.2。

表 C.2 检测 A. a. c 的 PCR 反应体系

次序	组 成	加样体积
1	10 $\times$ PCR 缓冲液	8 μL
2	氯化镁(25 mmol/ μL)	3 μL
3	dNTP(10 mmol/ μL)	5 μL
4	Taq 酶(2 IU/ μL)	1 μL
5	正链引物(10 pmol/ μL)	1 μL
6	负链引物(10 pmol/ μL)	1 μL
7	模板 DNA(1 ng/ μL ~10 ng/ μL)	3 μL
8	双蒸水	28 μL
	总体积	50 μL

C.3.2 PCR 反应循环参数

检测 A. a. c 采用的 PCR 反应循环参数为:

95 $^{\circ}\text{C}$ /2 min;95 $^{\circ}\text{C}$ /20 s,55 $^{\circ}\text{C}$ /20 s,72 $^{\circ}\text{C}$ /35 s,循环 35;72 $^{\circ}\text{C}$ /7 min,最后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。

C.3.3 PCR 扩增产物的检测

用 TAE 电泳缓冲液制备 1.5%的琼脂糖凝胶,按比例混匀电泳上样缓冲液和 PCR 扩增产物,将混有上样缓冲液的 PCR 扩增产物加入样品孔中,用 DNA Maker 做分子量标记,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。