



中华人民共和国国家标准

GB/T 28978—2012

GB/T 28978—2012

马铃薯环腐病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

中华人民共和国
国家标准
马铃薯环腐病菌检疫鉴定方法
GB/T 28978—2012

*

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(100013)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
网址 www.spc.net.cn
总编室:(010)64275323 发行中心:(010)51780235
读者服务部:(010)68523946
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 1.5 字数 37 千字
2013年4月第一版 2013年4月第一次印刷

*

书号: 155066·1-46396 定价 24.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107



GB/T 28978-2012

2012-12-31 发布

2013-06-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

——或者在茎杆上以约 5°的斜角进行斜切,切口长约 1.0 cm、深约茎杆直径的三分之二;

注:解剖刀必需在 70%酒精浸泡后、然后燃烧消毒,以避免交叉污染。

——在切口上加入 1 滴(约 5 μL ~10 μL)的马铃薯块茎悬浮液(见附录 D),或加入 1 滴约 10⁶ CFU/mL 的菌悬液;

——用无菌的凡士林(或用 1:1 配制的石蜡油和凡士林)封住切口。

G.3.2.2 接种对照样品

用已知的 Cms 菌株配制成 10⁵~10⁶ 的菌悬液,用相同方法接种 5 株的茄子,作为阳性对照。用无菌的 10 mmol/L 磷酸缓冲液(见 B.9),使用相同的接种方法接种 5 株的茄子,作为阴性对照。

G.3.3 注射接种

用无菌的注射器把马铃薯块茎悬浮液(见附录 D)、或用纯培养制备的约 10⁶ CFU/mL 的菌悬液注射到子叶上方的茎杆中。

G.4 培养与观察

G.4.1 把接种后的茄子苗放在 18 °C~24 °C 的温室中,至少培养 4 周,并保证充足的光照(每天光照 16 h)和湿度(最好高于 70%)、以及充足的水分以避免因水分流失或缺少水分而萎蔫。最适宜的温度是 21 °C。

G.4.2 1 周后定期检查症状,并计算显示症状的植物数量。Cms 在茄子上引起叶片萎蔫,可能开始于叶缘。萎蔫组织可能最初显示暗绿色或斑驳,但在变坏死前转暗淡。脉间萎蔫经常有油脂状的水渍出现,而坏死组织经常有一个明亮的黄色边缘。

G.4.3 一旦症状出现,按附录 C 给出的方法从萎蔫的叶片或茎杆上重新分离。用 70%酒精擦拭叶片和茎杆进行表面消毒。

G.4.4 用 PCR 等方法对茄子汁液和重新分离的纯培养进行检测验证。或对重新分离的纯培养进行革兰氏染色。

G.4.5 在某些情况下(特别是生长条件不理想情况下),Cms 可能以潜伏侵染形式存在茄子内,甚至在接种 4 周后也没有显示症状。如果观察到 4 周后还没有症状产生,在接种位置的上方切取 1 cm 的茎杆,然后采用 PCR 等方法进行检测。如果检测结果是阳性的,则按附录 C 给出的方法重新分离。

G.5 生物学测定结果的判定

在阳性对照的茄子上显示出典型的症状,并且阴性对照的茄子上没有发现症状:

——如果接种的茄子未显示症状,且 PCR 等方法检测结果为阴性,生物学检测结果则是阴性的;

——如果从接种的茄子上重新分离到 Cms,生物学检测结果则是阳性的。

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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这些专利的责任。

本标准由全国植物检疫标准化技术委员会(SAC/TC 271)提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国厦门出入境检验检疫局检验检疫技术中心、中华人民共和国福建出入境检验检疫局检验检疫技术中心、中华人民共和国浙江出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:廖富荣、林石明、吴媛、沈建国、吴志毅、陈青、张明哲、陈红运、黄蓬英。

F.3.3 实时荧光 PCR 结果的判定

在阳性对照 Ct 值 ≤ 34 , 阴性对照和空白对照的 Ct 值 ≥ 40 前提下:

——如果检测样品的 Ct 值 ≤ 35 时, 则判定为阳性;

——如果检测样品的 Ct 值 ≥ 40 时, 则判定为阴性;

——如果 $35 < Ct < 40$ 时, 则应重新测试。重新测试后, 如果仍然为 $35 < Ct < 40$, 则判定为阳性。

马铃薯环腐病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了基于生理生化特性、致病性特征、血清学、分子生物学特征的马铃薯环腐病菌检测和鉴定方法。

本标准适用于马铃薯环腐病菌在马铃薯块茎、植株上的检测与鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件, 仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 1135.5—2007 马铃薯环腐病菌检疫鉴定方法

3 马铃薯环腐病菌基本信息

中文名称: 密执安棒状杆菌环腐亚种

俗名: 马铃薯环腐病菌

拉丁学名: *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

属于微杆菌科(Microbacteriaceae)、棒形杆菌属(*Clavibacter*)的成员。

马铃薯环腐病菌(以下简称 Cms)引起马铃薯环腐病, 可通过带病的种薯进行远距离传播, 也报道可通过番茄等种子传播, 关于 Cms 的其他信息参见附录 A。

4 方法原理

马铃薯环腐病菌具有独特的培养性状和生理生化特征, 该病菌的生理生化特性、致病性特征, 以及血清学、分子生物学特征是制定本标准的主要依据。

5 主要仪器设备

本标准的检测鉴定方法主要使用以下仪器设备:

微量榨汁机、酶标仪、洗板机、微量天平(感量: 0.001 g)、生物培养箱、荧光显微镜、PCR 仪、荧光 PCR 仪、电泳仪、水平电泳槽、凝胶成像仪、高速冷冻台式离心机、BIOLOG 自动微生物鉴定系统、浊度计、水浴槽或恒温孵育器、pH 计、各种量程的可调移液器(1 000 μ L、200 μ L、100 μ L、20 μ L、10 μ L、2 μ L)。

6 检测与鉴定

6.1 症状检查

马铃薯环腐病菌侵染马铃薯植株后, 在马铃薯块茎、植株上可产生症状(参见附录 A), 通过症状检查可以初步判断是否为 Cms 引起的病害。