



中华人民共和国国家标准

GB/T 29431—2012

GB/T 29431—2012

番茄溃疡病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Clavibacter michiganensis* subsp.
michiganensis (Smith) Davis et al.

中华人民共和国
国家标准
番茄溃疡病菌检疫鉴定方法
GB/T 29431—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

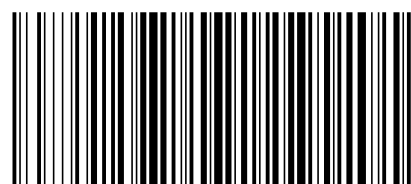
*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 18 千字
2013年4月第一版 2013年4月第一次印刷

*

书号: 155066·1-46464 定价 18.00 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 29431-2012

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

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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:中华人民共和国珠海出入境检验检疫局、华南农业大学、中国农业大学、中华人民共和国北京出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:乐海洋、彭仁、刘琼光、罗来鑫、张建军、刘勇、冯欣、龚忠年、林友伟、张卫东、高文娜。

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 μ L TE 缓冲液溶解 DNA 沉淀。-20 $^{\circ}$ C 长期保存。

C.2.2 病原细菌 DNA 的提取

将供试菌株在 523 斜面培养基上培养 48 h(28 $^{\circ}$ C)。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 μ L,20 mg/mL 蛋白酶 K 30 μ L,混匀,37 $^{\circ}$ C 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,将上清液移到一个新管中。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,将上清液移到一个新管中。加入 0.6 倍体积的异丙醇,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 μ L TE 缓冲液溶解 DNA 沉淀,-20 $^{\circ}$ 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 PCR 检测。

C.3 PCR 检测

C.3.1 PCR 反应体系

C.3.1.1 检测 *Cmm* 采用的 PCR 引物序列见表 C.1。

表 C.1 检测 *Cmm* 的 PCR 引物序列

引物名称	引物序列	PCR 产物大小 bp
Spm4f	正向引物:5'-TCAGGCGTCTGTTCTGGC-3'	223
Spm2r	反向引物:5'-CCCACCACCATCCACAAC-3'	

C.3.1.2 检测 *Cmm* 采用的 PCR 反应体系见表 C.2。

表 C.2 检测 *Cmm* 的 PCR 反应体系

组 成	加样体积 μ L
10 \times PCR 缓冲液(含 MgCl ₂ 浓度为 15 mmol/L)	2.5
dNTP(各 2.5 mmol/L)	2
<i>Taq</i> DNA 聚合酶(2.5 U/ μ L)	0.4
正向引物(10 pmol/ μ L)	1
反向引物(10 pmol/ μ L)	1
模板 DNA(1 ng/ μ L~10 ng/ μ L)	1
双蒸水	17.1
总体积	25

C.3.2 PCR 反应循环参数

检测 *Cmm* 采用的 PCR 反应条件为:

94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;随后 94 $^{\circ}$ C,30 s,60 $^{\circ}$ C,40 s,72 $^{\circ}$ C,1 min,进行 35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸

番茄溃疡病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了番茄溃疡病菌的检疫鉴定方法。

本标准适用于番茄种子、苗木等相关茄科植物材料中番茄溃疡病菌的检疫和鉴定。

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 2122 进出境植物及植物产品检疫抽样

3 番茄溃疡病菌基本信息

中文名:番茄溃疡病菌(密执安棒形杆菌密执安亚种)。

学名:*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith, 1910) Davis et al., 1984, 简称 *Cmm*。

异名:*Corynebacterium michiganense* pV. *michiganense* (Smith) Dye & Kemp; *Corynebacterium michiganense* (Smith) Jensen。

病害英文名: Bacterial canker of tomato。

属细菌域 Bacteria、放线菌门 Actinobacteria、放线菌纲 Actinobacteria、放线菌目 Actinomycetales、微杆菌科 Microbacteriaceae、棒形杆菌属 *Clavibacter*。

该病原菌的远距离传播主要靠带菌种子,番茄种子内外层都可带菌。在田间和温室,该病菌由伤口、气孔和自然孔口侵入寄主组织,主要通过灌溉水、雨水、修枝剪、培养料等传播。该病菌在土壤和病残体组织中可存活 2 年~3 年。

番茄溃疡病菌的其他基本信息参见附录 A。

4 方法原理

根据番茄溃疡病菌的危害状,对检疫现场或田间病害调查中发现的疑似病害症状样品进行采集并带回实验室作进一步分离鉴定,依据病原菌的培养性状、致病性反应以及分子生物学特征对种类进行判定。

5 仪器和用具

生物显微镜、超净工作台、高压灭菌锅、光照恒温培养箱、恒温振荡培养箱、电子天平、低温冰箱、接种环、牙签、注射器、恒温水浴锅、高速冷冻离心机(12 000 r/min 以上)、匀浆机、PCR 仪、电泳装置(电泳仪和水平电泳槽)、凝胶成像分析仪、微量可调加样器等。