

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1465—2004

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*

中华人民共和国出入境检验检疫
行业标准
西瓜细菌性果斑病菌检疫鉴定方法
SN/T 1465—2004

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.bzcb.com

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 15 千字

2005年2月第一版 2005年2月第一次印刷

*

书号: 155066·2-16064 定价 8.00 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)68533533



SN/T 1465-2004

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

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

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。

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。

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)、假单孢菌科(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(K₂HPO₄)、磷酸二氢钾(KH₂PO₄)、磷酸氢二钠(Na₂HPO₄·12H₂O)、磷酸二氢铵(NH₄H₂PO₄)、硫酸镁(MgSO₄·7H₂O)、氯化钙(CaCl₂·7H₂O)、氯