



中华人民共和国国家标准

GB/T 28078—2011

GB/T 28078—2011

水稻白叶枯病菌、水稻细菌性条斑病菌 检疫鉴定方法

Detection and identification of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Ishiyama) Swings et al., *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Fang et al.) Swings et al.

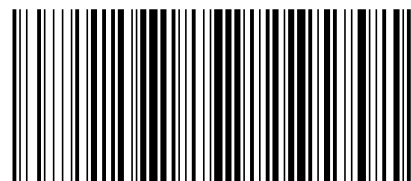
中华人民共和国
国家标准
水稻白叶枯病菌、水稻细菌性条斑病菌
检疫鉴定方法
GB/T 28078—2011

*
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 36 千字
2012年4月第一版 2012年4月第一次印刷

*
书号: 155066·1-44634 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 28078-2011

2011-12-30 发布

2012-06-01 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

附录 E
(资料性附录)

黄单胞菌属(*Xanthomonas*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)主要生化差别

表 E.1 *Xanthomonas* 属和 *Pseudomonas* 属之间的主要表型差异

主要特征	<i>Xanthomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>
氧化酶反应	—(延迟反应)	+
在 0.1%TTC 上生长	—	+
利用天冬酰胺为唯一碳源和氮源	—	+
自水杨苷产酸	—	+
黄单胞色素	+	—

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:中华人民共和国湖南出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国厦门出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:朱金国、赵文军、唐连飞、朱水芳、莫瑾、彭梓、陈红运、钟文英。

附录 D (规范性附录)

水稻白叶枯病菌、水稻细菌性条斑病菌的 PCR 检测方法

D.1 试剂及配方

D.1.1 DNA 抽提液配方

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

D.1.2 CTAB 沉淀液配方

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

D.1.3 TE 缓冲液配方

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

D.1.4 TAE 电泳缓冲液(pH8.5)配方(50×)

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

D.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

D.2 细菌 DNA 的提取

将制备好的菌悬液移至一干净灭菌的离心管中,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 °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,将上清液移至一个新离心管中。加入等体积酚-三氯甲烷-异戊醇(25 : 24 : 1),混匀,10 000 r/min 离心 5 min,将上清液移至一新离心管。加入 0.6 倍体积的异丙醇,轻轻混匀,10 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,管中加入 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:此步骤可省略。可直接用培养的菌株稀释成 $\geq 10^5$ CFU/mL 的菌悬液做模板进行定性 PCR 检测。

D.3 定性 PCR 检测

D.3.1 PCR 反应体系

D.3.1.1 检测水稻白叶枯病菌、水稻细菌性条斑病菌采用的 PCR 引物序列见表 D.1。

水稻白叶枯病菌、水稻细菌性条斑病菌 检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了水稻种子和其他水稻材料的水稻白叶枯病菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*(Xoo) 和水稻细菌性条斑病菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*(Xcola) 的检疫鉴定以植物的形态学特征、生理生化特性、分子生物学和酶联免疫学技术作为依据,明确了田间观察、分离鉴定、样品保存的方法。

本标准适用于水稻材料和相关环境中水稻白叶枯病菌、水稻细菌性条斑病菌的检测。

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。

GB 15569—1995 农业植物调运检疫规程

ISTA 国际种子检验规程

3 方法原理

根据水稻植株的形态学特征进行田间观察,并采用分离培养、分子生物学和酶联免疫学筛选、生理生化鉴定以及致病性测定对植株材料上的水稻白叶枯病菌、水稻细菌性条斑病菌进行判定。

4 设备和材料

- 4.1 冷冻高速离心机:转速 $\leq 15\ 000$ r/min。
- 4.2 PCR 扩增仪。
- 4.3 恒温培养箱:28 °C \pm 1 °C。
- 4.4 显微镜:物镜头 10×~100×。
- 4.5 天平:精度 0.001 g。
- 4.6 高压灭菌器。
- 4.7 均质器:转速 4 000 r/min~8 000 r/min。
- 4.8 可调移液器:0.2 μL~1 μL,1 μL~10 μL,10 μL~100 μL,100 μL~1 000 μL。
- 4.9 器具:灭菌的镊子、剪刀、称量勺。
- 4.10 吸管:1 mL、10 mL。
- 4.11 灭菌平皿:直径 90 mm,玻璃或一次性塑料平皿。
- 4.12 三角瓶:100 mL。

5 培养基和试剂

5.1 SPA 培养基:见 A.1。