



中华人民共和国国家标准

GB/T 28094—2011

GB/T 28094—2011

芒果细菌性黑斑病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv.
mangiferaeindicae (Patel et al.) Robbs et al.

中华人民共和国
国家标准
芒果细菌性黑斑病菌检疫鉴定方法
GB/T 28094—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

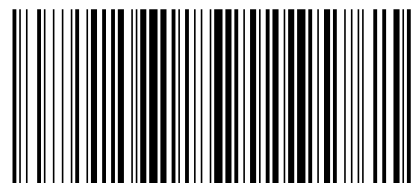
*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 13 千字
2012年4月第一版 2012年4月第一次印刷

*

书号: 155066·1-44648 定价 16.00 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 28094-2011

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 B
(规范性附录)
培养基配制和 PCR 检测方法

B.1 培养基**B.1.1 NCTM3 培养基**

酵母粉 7 g, 蛋白胨 7 g, 葡萄糖 7 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH7.2。121 °C 湿热灭菌 20 min 后, 温度降至 50 °C 左右, 依次加入新霉素 1 mg/L, 头孢氨苄 100 mg/L, 甲氧苄氨嘧啶 5 mg/L, 匹美西林 100 mg/L, 丙环唑 20 mg/L。

B.1.2 KC 培养基

酵母粉 7 g, 蛋白胨 7 g, 葡萄糖 7 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH7.2。121 °C 湿热灭菌 20 min 后, 温度降至 50 °C 左右, 依次加入头孢氨苄 40 mg/L, 春雷霉素 20 mg/L, 丙环唑 20 mg/L。

B.1.3 NA 培养基

蛋白胨 5 g, 牛肉浸膏 3 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1 000 mL。121 °C 湿热灭菌 20 min。

B.2 分子生物学鉴定方法(PCR 方法)**B.2.1 DNA 制备**

纯化后的菌株经 28 °C 培养 24 h 后, 用接种环取一环菌于含 1 mL 无菌双蒸水的离心管中, 用分光光度计调节 A₆₅₀=0.1, 然后将该菌悬液 100 °C 水浴煮沸 8 min, -20 °C 放置 10 min 后待用。

B.2.2 *gyrB* 基因扩增

PCR 扩增 *gyrB* 基因, 引物为 XgyrconpcrF1(5'-AAGAGCGAGCTGTATCTGAAGGACGA-3'), Xgyrconrpr1(5'-CGCGTCCTCGATGCGCACCTGCA-3')。反应体系为(50 μL): 10×PCR 缓冲液(含 MgCl₂) 5 μL, dNTPs(各 2.5 mmol/L) 1 μL; 引物(10 pmol/μL) 各 1 μL; Taq DNA 聚合酶 0.4 μL; DNA 2 μL。用无菌双蒸水代替模板做空白对照。反应条件为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 40 s, 50 °C 50 s, 72 °C 1 min, 共 32 个循环; 72 °C 延伸 7 min。

B.2.3 琼脂糖凝胶电泳检测

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 扩增产物片段大小约为 700 bp。每个样品取 5 μL 的 PCR 产物加 1 μL 的 6×上样缓冲液, 在 120 V 下电泳(约 50 min)。电泳结束后, 放入装有 0.5 μg/μL 的溴化乙锭(EB)溶液的容器中染色, 然后在清水中清洗后, 在凝胶成像系统中观察, 拍照并保存。

B.2.4 测序

将 PCR 产物回收后, 进行克隆、测序, 或者直接测序(测序可由生物公司完成)。测序引物为 Xgyrconfsp1(5'-GAGCTGTATCTGAAGGACGA-3')。测序结果与 GenBank 数据库中的已知序列进行比对。

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: 中华人民共和国天津出入境检验检疫局、中华人民共和国广东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人: 刘鹏、罗加凤、崔汝强、魏亚东、王金成、刘勇、赵立荣、黄国明。

附录 A (资料性附录)

芒果细菌性黑斑病菌其他信息

A.1 分布

巴西、南非、苏丹、埃及、巴拉圭、多米尼加、马拉维、墨西哥、刚果、莫桑比克、法属圭亚那、索马里、摩洛哥、印度、巴基斯坦、澳大利亚、马来西亚、日本、中国(台湾、广东、海南)。

A.2 寄主范围

芒果(*Mangifera indica*)、腰果(*Anacardium occidentale*)、巴西胡椒(*Schinus terebenthifolius*)、加椰芒果(*Spondias cytherea*)、檳榔青(*Spondias mombin*)等漆树科植物。人工接种也可以侵染野芒果(*Spondias mangifera*)和紫葳科(*Bignonia chamberlainii*)植物等。

A.3 危害

芒果细菌性黑斑病主要危害芒果叶片、枝条、花芽、花和果实。感病叶片开始时呈水渍状斑,后扩展为褐色至黑色的多角形病斑,表面隆起,周围常有黄晕,大小约 1 mm~3 mm,病斑边缘常受叶脉限制,有时多个病斑融合成较大的病斑,老病斑最后转为灰白色。枝条和花穗发病呈黑褐色溃疡斑,有些病斑开裂,伴有胶黏汁液渗出;果实上病斑呈水渍状小点,直径 1 mm~1.5 mm,常有胶黏汁液流出,后扩大成黑褐色,表面隆起,溃疡开裂。嫩茎感染后明显褪绿,并纵向开裂,渗出胶液变成黑斑。各部位病组织作显微镜检查,有大量细菌溢出。

A.4 生物学特性

病原菌在 NCTM3 和 KC 培养基上菌落特征相似,培养 6 d 后菌落直径 3 mm~4 mm,圆形,轻微凸起,边缘整齐,白色或乳白色(少见黄色),黏液状。

在营养琼脂(NA)培养基上菌落圆形,白色至乳白色,也有黄色。

在 KB 培养平板上,菌落为薄圆型,轻微凸起,边缘整齐。菌落颜色最初为灰白色,逐渐变为白色到乳白色。老龄菌落逐渐变为浅黄褐色。不产生荧光。

病原菌菌体杆状,(0.3 μm~0.6 μm)×(0.9 μm~1.6 μm),极生单鞭毛,革兰氏染色阴性,运动,好氧,葡萄糖氧化非发酵型,氧化酶阴性,接触酶阳性,淀粉水解阳性,明胶液化阳性,牛奶解脲阳性,硝酸盐还原阴性,H₂S 产生阳性,吡啶产生阴性,尿酶阴性,脂肪酶阳性,纤维素酶阳性,酪蛋白酶阳性,果聚糖阳性,精氨酸双水解阴性,七叶灵水解阳性;能从阿拉伯糖、甘露糖、果糖、纤维二糖、半乳糖和海藻糖产酸。可利用 D-葡萄糖,纤维二糖,麦芽糖,D-甘露醇,D-甘露糖,赤藓糖醇,棉籽糖,L-鼠李糖,D-核糖,蔗糖,海藻糖,D-木糖,卫矛醇,D-半乳糖,肌醇,菊粉,甘油,醋酸盐,柠檬酸盐,延胡索酸盐,苹果酸盐,水杨苷,淀粉;不利用 D-葡萄糖醇,D-葡糖酸盐,松三糖,草酸盐,苯丙氨酸,核糖醇,酒石酸盐。对部分重金属和抗生素敏感,在番茄上产生过敏性反应,最适生长温度 28 ℃,37 ℃能生长,41 ℃不生长。

芒果细菌性黑斑病菌与相近种的主要区别见表 A.1。

芒果细菌性黑斑病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了芒果细菌性黑斑病菌的检疫鉴定方法。

本标准适用于芒果果实、苗木等植物材料中芒果细菌性黑斑病菌的检疫和鉴定。

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 1193 基因检验实验室技术要求

SN/T 2122 进出境植物及植物产品检疫抽样

3 芒果细菌性黑斑病菌基本信息

中文名:芒果细菌性黑斑病菌。

学名:*Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* (Patel, Moniz & Kulkarni 1948) Robbs, Ribeiro & Kimura 1974。

病害英文名:mango bacterial black spot。

属细菌界 Bacteria,变形细菌门 Proteobacteria,γ-变形细菌纲 Gammaproteobacteria,黄单胞菌目 Xanthomonadales,黄单胞菌科 Xanthomonadaceae,黄单胞菌属 *Xanthomonas*。

病菌潜伏在病叶、病枝条、病果等组织内越冬,是主要的初侵染源。病菌借风雨、流水和接触传播,远距离传播主要是带菌苗木、接穗和果实等。

芒果细菌性黑斑病菌的其他信息参见附录 A。

4 方法原理

依据症状特征,以及该病菌的生物学特性、生理生化特性、分子生物学特性和致病性特征等进行检测鉴定。

5 仪器用具

生物显微镜、超净工作台、高压灭菌器、恒温培养箱、离心机(12 000 r/min)、分光光度计、PCR 仪、电泳仪、凝胶成像仪、电子天平(感量 0.000 1 g)、恒温水浴锅、恒温光照培养箱、低温冰箱、微量可调加样器(10 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL)等。

6 试剂和培养基

6.1 试剂

MgCl₂, dNTPs(dATP、dTTP、dCTP、dGTP), *Taq* 酶,氧化酶试纸条,细菌微量生化鉴定管,引物