



中华人民共和国国家标准

GB/T 28066—2011

GB/T 28066—2011

丁香假单胞杆菌豌豆致病型 检疫鉴定方法

Detection and identification of *Pseudomonas syringae*
pv. *pisi* (Sackett) Young et al.

中华人民共和国
国家标准
丁香假单胞杆菌豌豆致病型
检疫鉴定方法
GB/T 28066—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 字数 17 千字
2012年5月第一版 2012年5月第一次印刷

*

书号: 155066·1-44582 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 28066-2011

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

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:中华人民共和国厦门出入境检验检疫局、中华人民共和国上海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:林石明、黄蓬英、易建平、陈青、廖富荣、吴媛、陈红运、王宏毅。

附录 D
(规范性附录)
PCR 方法

D.1 PCR 模板的制备

D.1.1 菌悬液 PCR 模板的制备

取 3 μL 的 10^8 CFU/mL ($\text{OD}_{600}=0.1$) 的菌体悬浮液, 转入装有 100 μL 无菌双蒸水的 1.5 μL 离心管中, 在 99 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min, 10 000 g 离心 10 min, 冷却后, 取上清液作为 PCR 反应模板。

D.1.2 DNA 的提取

取 1 mL 在 NB 培养基中振荡培养过夜的菌液, 10 000 g 离心 2 min, 提取沉淀的 DNA; 或者取 0.1 g 的发病植物组织, 研磨后, 提取植物总 DNA。提取步骤根据商用试剂盒说明进行。

D.2 引物序列

用于检测 Pspi 的特异性引物及其序列见表 D.1, 经合成纯化后, 冻干备用。

表 D.1 用于 PCR 扩增的引物及其序列

引物名称	引物序列	扩增产物
EFEP1	5'-ACGCTGGGATGTTACTTG-3'	303 bp
EFEP2	5'-GCCTGTTCAAAACGTGTG-3'	

D.3 PCR 反应

50 μL 反应体系中加入: 10 \times PCR 缓冲液(含 MgCl_2) 5.0 μL , 10 mmol/L 的 dNTP 混合物 1.0 μL , TaqDNA 聚合酶(5 U/ μL) 0.5 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 的上下引物各 2.0 μL , DNA 模板 2 μL , 去离子水补足至 50 μL 。

在 PCR 仪上完成以下程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 30 个循环; 最后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 下保持 10 min。

D.4 电泳分析

取 5 μL 扩增产物与 1 μL 的 6 \times 上样缓冲液混合均匀, 在 0.5 \times TBE 缓冲液配制的 1.5% 琼脂糖凝胶中, 4 V/cm~6 V/cm 电泳 50 min, 溴化乙锭(EB)染色后在凝胶成像系统中观察, 拍照并保存。

丁香假单胞杆菌豌豆致病型 检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了丁香假单胞杆菌豌豆致病型生物学、血清学及分子生物学的检测鉴定方法。本标准适用于植物种子、苗木等植物及其产品中丁香假单胞杆菌豌豆致病型的检测和鉴定。

2 丁香假单胞杆菌豌豆致病型基本信息

中文名: 丁香假单胞杆菌豌豆致病型。

中文别名: 豌豆(细菌性)枯萎病菌或豌豆细菌性叶斑病菌、豌豆假单胞菌枯萎病菌或茎枯病菌等。

学名: *Pseudomonas syringae* Van Hall, 1902 pv. *psii* (Sackett, 1916) Young, Dye and Wilkie, 1978。

病害英文名: bacterial blight of pea。

异名: *Bacterium psii* (Sackett) Smith, 1920; *Chlorobacter psii* (Sackett) Patel & Kulkarni, 1951; *Pseudomonas psii* Sackett, 1916; *Pseudomonas syringae* Van Hall, 1902; *Pytomonas* (Sackett) Bergey, et al., 1923。

属原核生物界 Prokaryotes, 变形细菌门 Proteobacteria, γ -变形细菌纲 Gammaproteobacteria, 假单胞杆菌目 Pseudomonadales, 假单胞杆菌科 Pseudomonadaceae, 假单胞杆菌属 *Pseudomonas*。

丁香假单胞杆菌豌豆致病型的其他信息参见附录 A。

3 方法原理

依据病菌在培养基上生长的菌落形态、碳源的利用情况、基于抗原抗体反应的双抗夹心酶联免疫吸附测定(DAS-ELISA)、基于体外 DNA 扩增技术的聚合酶链式反应(PCR), 以及病菌接种后的致病特征等进行检测鉴定。

4 主要试剂

本标准的检测鉴定方法主要使用以下试剂:

硫酸镁、磷酸氢二钾、蔗糖、甘油、硼酸、氯化镁、蛋白胨、生理盐水、三氯甲烷、异戊醇、异丙醇、Tris-盐酸、EDTA、SDS(十二烷基硫酸钠)、CTAB(十六烷基三甲基溴化胺)、溴化乙锭、头孢氨苄、万古霉素、头孢呋辛酸、溴酚蓝、放线(菌)酮或制霉菌素和 PCR 相关试剂。

5 主要仪器

本标准的检测鉴定方法主要使用以下仪器:

超净工作台、高压灭菌锅、显微镜、培养箱、电子天平、离心机、PCR 仪、电泳仪、凝胶成像系统、BIOLOG 微生物鉴定系统和酶标仪。