



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1135.9—2010

马铃薯青枯病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.
1996

2010-11-01 发布

2011-05-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

前 言

SN/T 1135 标准分为以下部分：

- 马铃薯癌肿病检疫鉴定方法；
- 马铃薯黄化矮缩病毒检疫鉴定方法；
- 马铃薯帚顶病毒检疫鉴定方法；
- 马铃薯黑粉病菌检疫鉴定方法；
- 马铃薯环腐病菌检疫鉴定方法；
- 马铃薯维腐病菌检疫鉴定方法；
- 马铃薯 A 病毒检疫鉴定方法；
- 马铃薯坏疽病菌检疫鉴定方法；
- 马铃薯青枯病菌检疫鉴定方法。

本部分为 SN/T 1135 的第 9 部分。

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位：中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局和中华人民共和国黑龙江出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：易建平、周国梁、印丽萍、王有福、于恒纯。

马铃薯青枯病菌检疫鉴定方法

1 范围

SN/T 1135 的本部分规定了进出境植物检疫中马铃薯青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 的检测和鉴定方法。

本部分适用于进出境马铃薯块茎及其产品、番茄种苗及其产品和天竺葵种苗及其产品中马铃薯青枯病菌的检测和鉴定。

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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

SN/T 1157 进出境植物苗木检疫规程

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

SN/T 1809 进出境植物种子检疫规程

SN/T 2122 进出境植物及植物产品检疫抽样

3 原理

马铃薯青枯病菌 *R. solanacearum* race 3 Biovar 2 属细菌域 Bacteria, 变形菌门 Proteobacteria, β 变形菌纲 Betaproteobacteria, 伯克氏菌目 Burkholderiales, 伯克氏菌科 Burkholderiaceae, 劳尔氏菌属 *Ralstonia*。马铃薯青枯病菌的分布、寄主范围、为害症状和生理生化特性等相关信息参见附录 A。根据青枯病菌对不同寄主植物的致病性差异,青枯菌划分为 5 个小种(参见附录 B),马铃薯青枯病菌属于 3 号小种,主要侵染马铃薯和番茄。根据青枯病菌对三种双糖(麦芽糖、乳糖和纤维二糖)和三种乙醇(甘露醇、山梨醇和卫矛醇)氧化产酸能力的差异将青枯菌分为 4 个生物型(参见附录 B),马铃薯青枯病菌属于生物型 2(只能氧化 3 种双糖,不能氧化 3 种乙醇)。马铃薯青枯病菌的形态特征、生物学特性、致病性反应以及分子生物学特征作为制定本检疫鉴定标准的依据。

4 仪器设备和用具

超净工作台、高压灭菌锅、生物培养箱、电子天平、冰箱、离心机、水浴锅、培养皿、三角瓶、剪刀、PCR 仪、实时荧光 PCR 仪、电泳仪、凝胶成像系统、BIOLLOG 微生物鉴定系统、微量可调加样器和离心管。

5 药品试剂

除另有规定外,所有试剂均为分析纯或生化试剂。

蛋白胨、甘油、硫酸镁、磷酸氢二钾、琼脂、*Taq* DNA 聚合酶、溴化乙锭(EB)、琼脂糖和 DNA Marker。SMSA 培养基配方见附录 C,ELISA 试验所需药品试剂见附录 D,PCR 试验和实时荧光 PCR 试验所需药品试剂见附录 E。

6 检测鉴定

6.1 检测鉴定流程

马铃薯青枯病菌的检测鉴定流程图如图 1 所示。

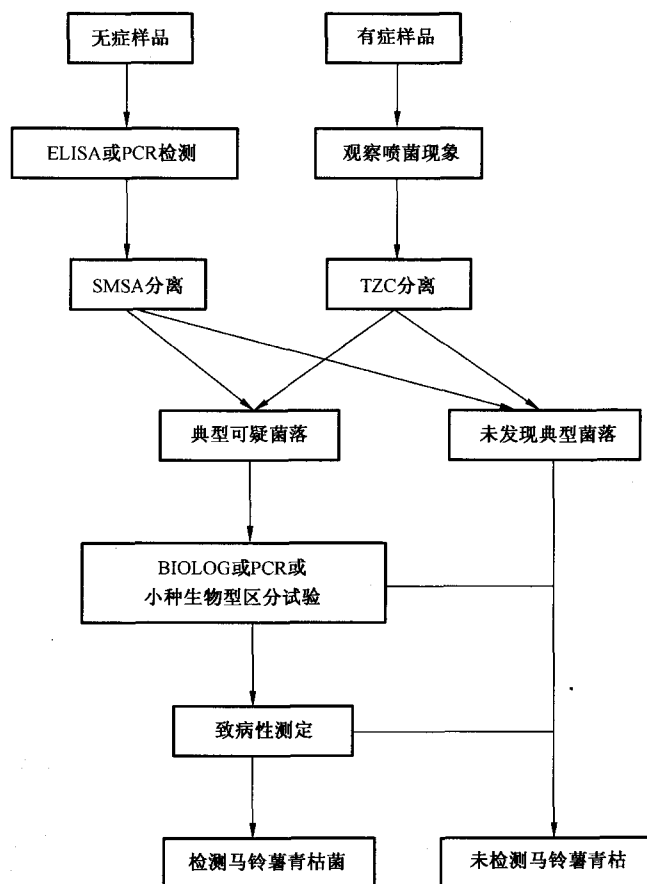


图 1 马铃薯青枯病菌的检测鉴定流程图

6.2 初筛

按照 SN/T 1157、SN/T 1809 和 SN/T 2122 中规定的程序进行现场检疫并抽取样品。实验室内对样品进行症状检查,马铃薯块茎可以通过切开块茎来检查内部症状。如检查发现茎剖面维管束变色等典型症状(参见附录 A),取样品病健交界处进行病菌分离;未发现典型症状的样品,用 ELISA(见附录 D)或 PCR(见附录 E)方法进行初筛检测。经初筛检测,阳性样品进行病菌分离。

6.3 分离

具有典型症状的样品在显微镜下观察有无喷菌现象,取植物组织于灭菌水中,可以看到云雾状细菌从切口处喷出。取典型症状样品病健交界处组织或初筛阳性样品组织少许于 1 mL~5 mL 灭菌水中,静置 15 min~30 min,让细菌从染病组织中游离出来。取组织处理液 1 mL 进行 10 倍系列稀释,分别为 10 倍、100 倍和 1 000 倍稀释液,将每个浓度的稀释液分别进行分离。用无菌接种环蘸取样品处理液在 SMSA 半选择性培养基(见附录 C)上划线分离,培养皿在 28 ℃ 条件下培养,培养 48 h 后

R. solanacearum 菌落呈白色粘稠状,继续培养菌落中央出现血红色螺旋,而非 *R. solanacearum* 的大多数菌落通体红色。

6.4 纯化

根据附录 A 中马铃薯青枯病菌菌落的形态特征,挑取可疑的单个菌落,平板上连续转接 3 次,纯化后得到病菌的可疑分离物,对可疑分离物的菌落特征进行观察和描述记载。

6.5 鉴定

6.5.1 生理生化反应测试

菌株分离物进行生理生化测试,包括糖发酵、淀粉水解、硝酸盐还原、明胶液化、氧化酶、硫化氢产生、生长温度和 pH 范围等试验,或采用 BIOLOG 自动鉴定系统进行鉴定。马铃薯青枯病菌的生理生化特征参见附录 A。

6.5.2 生物型区分

R. solanacearum race 3 biovar 2 生物型的鉴定可以利用生物型试验和实时荧光 PCR 方法,生物型试验是根据病菌从 6 种糖中的产酸能力分成 5 种生化型,马铃薯青枯病菌 *R. solanacearum* race 3 biovar 2 能利用麦芽糖、乳糖和纤维二糖,不能利用甘露醇、山梨醇和半乳糖醇,不同生物型的糖发酵反应参见附录 B。实时荧光 PCR 方法见附录 E。

6.5.3 小种确定

R. solanacearum race 3 biovar 2 小种的鉴定是通过接种不同寄主后产生的接种反应来区分的,小种 3 接种番茄或茄子产生典型的萎焉反应,对白肋烟的过敏性反应不明显,2 d~8 d 后仅表现为失绿变色反应,接种白肋烟和小果野芭蕉无反应。不同小种对不同寄主的接种反应参见附录 B。

6.5.4 致病性测试

可疑分离物菌株在 SMSA 培养基上 30 ℃ 培养 48 h,配制成 10^6 CFU/mL 的细菌悬浮液,针刺接种 5 棵~10 棵感病品种番茄(Moneymaker)或茄子(Black Beauty)等植株(第三真叶期前后)。25 ℃~28 ℃ 高湿条件下培养 2 周,观察是否出现萎焉或变色症状。

7 结果判定

根据样品初筛结果,对可疑样品进行病菌分离;如分离物的生理生化特性和马铃薯青枯病菌相符,BIOLOG 试验或常规 PCR 方法检测为阳性,判定为检测出青枯病菌,生物型小种试验的结果为小种 3 生物型 2,且致病性测试表现为典型症状,判定为检出马铃薯青枯病菌;其余情况判定为未检出青枯病菌。

8 样品保存

对样品做好记录后妥善保存。对检出马铃薯青枯病菌的样品应保存于 4 ℃ 冰箱中,以备复核,该类样品保存期满后,需经灭菌后方可处理。

9 菌株保存

从样品中分离并鉴定为马铃薯青枯病菌的菌株,应妥善保存。将菌株接种于15%~30%灭菌甘油中于-80℃冰箱中保存;或用冷冻干燥机制成冻干粉,-80℃下长期保存。以备复验、谈判和仲裁。保存期满后,需经灭菌处理。

附 录 A
(资料性附录)
马铃薯青枯病菌相关资料

A.1 英文名

Brown rot (potato), Southern bacterial wilt (tomato), Moko disease (banana), Granville Wilt (tobacco)。

A.2 学名

Ralstonia solanacearum (Smith) Yabuuchi et al. 1996

异名 *Burkholderia solanacearum* (Smith) Yabuuchi 1992

Pseudomonas solanacearum (Smith, 1896) Smith 1914

A.3 地理分布

EPPO 地区: 阿尔及利亚(可能)、奥地利(可能, 1995 年是个孤立事件)、白俄罗斯(未证实)、比利时(1992 年唯一一次爆发, 1994 年以后没有再发现)、保加利亚(可能, 1940 年至 1950 年曾发现但未定殖)、塞浦路斯(1950 年曾发现但未定殖)、埃及、芬兰(截获一次)、法国(1995 年是个孤立事件)、希腊、以色列(1970 年曾发生, 已根除)、意大利(1950 年曾发生, 1995 年是个孤立事件)、拉脱维亚(有未证实记录, 现在未发现)、黎巴嫩(可能)、利比亚(可能)、摩尔多瓦(可能)、摩洛哥(有未证实记录, 马铃薯上从未发现, 现在未发现)、荷兰(1990 年早期是个孤立事件, 1995 年爆发数次)、波兰(1940 年起有未证实报道, 现在未发现)、葡萄牙(1995 年在大陆发生是个孤立事件, Madeira 岛上有未证实报道, 现在未发现)、罗马尼亚(1950 年有症状报道, 现在未发现)、西班牙(可能, 1981 年在 Canary 岛上发现但未定殖, 大陆从未发现)、瑞典(可能, 1970 年在 *Solanum dulcamara* 上发现并根除)、突尼斯(有未证实报道, 最近调查未发现)、土耳其、英国(1993 年马铃薯上爆发过一次, 此后马铃薯上未发现, 但在 *S. dulcamara* 上发现)、乌克兰(有未证实的报道, 现在未发现)和前南斯拉夫(可能);

亚洲: 中国、塞浦路斯、印度、印度尼西亚、伊朗、以色列、日本、尼泊尔、菲律宾(可能)和土耳其。

非洲: 阿尔及利亚(可能)、布隆迪、埃及、肯尼亚、利比亚(可能)、摩洛哥、南非、突尼斯和赞比亚。

北美洲: 墨西哥。

南美洲: 阿根廷、巴西、智利、秘鲁和乌拉圭。

中美洲和加勒比地区: 哥斯达黎加。

大洋洲: 澳大利亚。

A.4 寄主范围

马铃薯青枯病菌 *R. solanacearum* race 3 biovar 2 寄主广泛, 主要侵染马铃薯 *Solanum tuberosum* 和番茄 *Lycopersicon esculentum*; 对其他茄科作物的致病力不强, 包括: 茄子 *S. melongena*、龙葵 *S. nigrum*、小癞茄 *S. dulcamara* 和曼陀罗 *Datura stramonium*; 非茄属植物: 油菜 *Brassica* spp.、球序

卷耳 *Cerastium glomeratum*、藜 *Chenopodium album*、荷莲豆 *Drymaria cordata*、美兰菊 *Melampodium perfoliatum*、天竺葵 *Pelargonium hortorum*、头花蓼 *Polygonum capitatum*、马齿苋 *Portulaca oleracea*、繁缕 *Stellaria media*、旱金莲 *Tropaeolum majus*、异株荨麻 *Urtica dioica*；野生寄主：茄科植物。

A.5 为害症状

马铃薯青枯病菌在不同的寄主上不同时期的症状不同，主要寄主上的症状如下：

马铃薯块茎：块茎上症状随病害的发展阶段而定，有隐症现象。症状和马铃薯环腐病菌 *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* 症状相似，容易混淆，但青枯病菌的细菌菌脓常常出现在芽眼和茎的端部，菌脓固定在病薯上，当芽眼上的细菌液干化时，常有一块粘附在芽眼上。切开病薯，可以看到褐色坏死维管束环紧密地包围着组织，环边厚达 0.5 cm。切口表面的维管束环上常常出现乳白色的菌脓。

番茄：首先最嫩的叶片被浸染，并表现出衰退现象。有利的环境条件情况下，整株迅速地出现萎焉。不利条件下，病害发展较慢，茎上产生大量的不定根，茎部的维管束组织变褐，横向切开茎可以看到切口处有白色或黄色菌脓。

烟草：植株单边萎焉，植株一边叶片或植株一半叶片出现萎焉症状。发病严重时，萎焉叶片不变色，而且保留在茎秆上。茎部维管束组织变褐，初生根和次生根变成褐色至黑色。

香蕉：青枯菌引起的 Moko 病容易与镰刀菌 *Fusarium axysporum* f. sp. *cubense* 引起的病害混淆。果实受到青枯病菌感染时，引起褐色干腐，幼小和快速生长的植株上最嫩叶片变成淡褐色或黄色，呈萎焉状。1 周内，植株所有的叶片全部变成萎焉状，幼根变黑、变短而扭曲。

天竺葵：植株出现系统性萎焉，初始阶段症状轻微，低温或夜间症状消失。低位叶片首先萎焉，失绿，然后出现 V 形失绿或坏死症状，和 *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* 引起的细菌性疫病症状相似，有时可见维管束变成褐色，最终植株萎焉而死。叶片很少出现叶斑症状。

A.6 生理生化特性

马铃薯青枯病菌为革兰氏阴性杆菌，长 0.5 μm~1.5 μm，极生鞭毛 1 根~3 根，无荧光。常产生可扩散的棕色色素，苏丹黑 B 液染色表现为阳性反应。在琼脂培养基上形成污白色、暗褐色乃至黑褐色的圆形或不整圆形菌落，平滑，有光泽。不能从蔗糖形成果聚糖；明胶水解阴性或很弱；不能水解淀粉和七叶灵；不能产生吲哚；能还原硝酸盐；不能产生酸，可以产生气体。氧化酶和过氧化氢酶阳性；精氨酸水解酶，卵磷脂酶和脂肪酶(吐温-80)阴性；生长最适温度为 27 ℃，最高 40 ℃，最低 4 ℃，致死温度为 52 ℃。酸碱的适应范围为 pH6~pH8，最适 pH6.6。长期人工培养后易失去致病力。马铃薯青枯病菌和相关的非荧光植物病原菌近似种的生理生化特征见表 A.1。

表 A.1 青枯病菌和相关的非荧光植物病原菌近似种的生理生化特征(OEPP/EPPO Bulletin, 2004)

品 种	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia gladioli</i>	<i>Burkholderia caryophylli</i>	<i>Pseudomonas corrugata</i>	<i>Acidovorax avenae</i>
可溶性色素	+	+	+	+	—	—
氧化酶	—	+	V	+	+	+

表 A.1 (续)

品 种	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia gladioli</i>	<i>Burkholderia caryophylli</i>	<i>Pseudomonas corrugata</i>	<i>Acidovorax avenae</i>
精氨酸水解酶	—	—	—	+	—	—
还原硝酸盐	—	—	—	+	+	+
41 生长	—	V	V	+	—	+
半乳糖	+ / V	+	+	—		
甘油	+ W	—	—	+ W		
甘露糖	+ / V	—	+	—		
纤维二糖	V	+	+	V	—	
海藻糖	V	V	+	+		
D-阿拉伯糖	—	+	+	+	—	—
D-酒石酸	— / V	— / W	+	—	V	
甘露糖	V	+	+	+		+
山梨醇	V	+	+	+		+
L-鼠李糖	—	—	—	—	—	
乙酰丙酸	V	+	— / W	—		
蔗糖	+	+	+	+		—
葡萄糖	+	+	+	+	+	+
安息香酸盐	V	— / V	+	—		
正丙醇	+	+	—	+ W	—	—
β -丙氨酸	V	—	—	—	—	+
甜菜碱	—	+	+	+		
精氨酸	—	+	+	+		
赖氨酸	—	+	+	V		
庚酸	—	+	+	—		
岩藻糖	—	+	+	+		
棉子糖	—	V	—	+		

注：+为阳性反应；—为阴性反应；V为可变化；W为反应很弱。

A.7 传播和扩散

马铃薯青枯病菌通过根或茎上的伤口及气孔侵入植株，能通过土壤、灌溉水扩散传播。主要传播途径是马铃薯贸易及其繁殖材料运输。由于不利的天气条件，或部分品种存在抗性，或病菌菌系的致病性较弱等原因，马铃薯块茎带菌的情况下，病菌可能呈潜伏侵染，不表现出症状。病菌潜伏侵染是国际间最可能传播的方式。

附录 B

(资料性附录)

马铃薯青枯病菌的小种和生物型区分

根据青枯病菌对不同寄主植物的致病性差异,将青枯病菌划分为不同的小种 Race(见表 B.1)。小种 1 号可侵染茄科植物和其他科植物;小种 2 号只侵染香蕉、大蕉和 *Heliconia*;小种 3 号只侵染马铃薯,偶尔侵染番茄和茄子;小种 4 号只对姜致病力很强。

表 B.1 青枯病菌的小种鉴定(Janse, 1991)

寄 主	接 种 反 应				
	小种 1	小种 2	小种 3	小种 4	小种 5
番茄/茄子	萎蔫	无反应	萎蔫	无反应	无反应
白肋烟(茎接种)	萎蔫	无反应	无反应	无反应	无反应
白肋烟 (过敏性反应 HR)	坏死(48 h), 萎蔫(7 d~8 d)	HR (12 h~24 h)	失绿变色 (2 d~8 d)	无反应	无反应
小果野芭蕉	无反应	萎蔫	无反应		
生姜	无反应	无反应	无反应	萎蔫	无反应
桑树	无反应	无反应	无反应	无反应	萎蔫

根据青枯病菌对三种双糖(麦芽糖、乳糖、和纤维二糖)和三种乙醇(甘露醇、山梨醇和卫矛醇)氧化产酸能力的差异将青枯菌分为 4 个生物型(见表 B.2):生物型 1(不能氧化 3 种双糖和 3 种乙醇);生物型 2(只能氧化 3 种双糖,不能氧化 3 种乙醇);生物型 3(能氧化 3 种双糖和 3 种乙醇);生物型 4(只能氧化 3 种乙醇,不能氧化 3 种双糖)。

表 B.2 青枯病菌的生物型区分(OEPP/EPPO Bulletin, 2004)

生物型	1	2	3	4	5
麦芽糖	—	+	+	—	+
乳糖	—	+	+	—	+
纤维二糖	—	+	+	—	+
甘露醇	—	—	+	+	+
山梨醇	—	—	+	+	—
卫矛醇	—	—	+	+	—
注: + 为阳性反应;— 为阴性反应。					

小种和生物型的关系为:小种 1 包含生物型 1、3 和 4;小种 2 包含生物型 1 和 3;小种 3 包含生物型 2;小种 4 包含生物型 4。

从桑树分离的一些菌株与以往确定菌系不同,其对几种代表性茄科植物的致病力很弱或不致病,而且它们具有氧化 3 种双糖和甘露醇的能力,因而鉴定为一种新菌系,命名为小种 5 和生物型 5。

附录 C
(规范性附录)

马铃薯青枯病菌 SMSA 半选择性培养基

蛋白胨 20 g, 甘油 10 g, 硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 1.5 g, 磷酸氢二钾(K_2HPO_4) 1.5 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1 000 mL。调整 pH 至 7.2, 121 °C 湿热灭菌 20 min。

附录 D

(规范性附录)

马铃薯青枯病菌 ELISA 检测方法

D.1 试剂

D.1.1 包被抗体

特异性马铃薯青枯病菌抗体。

D.1.2 酶标抗体

碱性磷酸酯酶标记的马铃薯青枯病菌抗体。

D.1.3 10×PBS 缓冲液

氯化钾(KCl)2 g、氯化钠(NaCl)80 g、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)2 g、磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)11.5 g、吐温 20(Tween-20)5 mL 溶解于 1 000 mL 蒸馏水中,用浓盐酸(HCl)调节 pH 至 7.4,4℃下贮存。

D.1.4 包被缓冲液

将碳酸钠(Na_2CO_3)1.59 g、碳酸氢钠(NaHCO_3)2.93 g、叠氮钠(NaN_3)0.2 g,溶解于 1 000 mL 蒸馏水中,用浓盐酸(HCl)调节 pH 至 9.6,4℃下贮存。

D.1.5 洗涤缓冲液

将 1×PBST 缓冲液用浓盐酸(HCl)调节 pH 至 7.4,4℃下贮存。

D.1.6 酶标抗体缓冲液

将 1×PBST 缓冲液 800 mL、小牛血清白蛋白(BSA)2 g、聚乙烯基吡咯烷酮(MW 2 400~4 000, PVP)20 g、叠氮钠(NaN_3)0.2 g,用无菌蒸馏水定溶至 1 000 mL,4℃下贮存。

D.1.7 底物(PNPP)缓冲液

将二乙醇胺 97 mL、叠氮钠(NaN_3)0.2 g 溶解于 1 000 mL 蒸馏水中,用浓盐酸(HCl)调节 pH 至 9.8,4℃下贮存。

D.1.8 底物(PNPP)溶液

将 4-硝基酚磷酸钠盐(PNPP)100 mg 溶解于 PNPP 底物缓冲液 100 mL 中,现配现用。

D.1.9 终止反应液

将氢氧化钠(NaOH)40 g 溶解于 1 000 mL 蒸馏水中。

D.2 检测方法

D.2.1 包被抗体

用包被缓冲液将抗体按说明稀释,加入酶联板的孔中,100 μL /孔,加盖,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,清空孔中溶液,PBST 洗涤 4 次,每次 3 min。

D.2.2 样品制备

将待测样品组织剪碎后浸泡于 200 mL PBS 中,0.5 h~1 h 后浸泡液滤纸过滤,10 000 r/min 离心去上清液,沉淀用包被缓冲液 1 mL 悬浮,再次 10 000 r/min 离心去上清液,沉淀悬浮后作为检测样品。

D.2.3 加样

加入制备好的检测样品、阴性对照、阳性对照,100 μL /孔,加盖,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜;PBST 溶液洗涤 4 次,每次 3 min。

D.2.4 加酶标抗体

用酶标抗体稀释缓冲液按说明将酶标抗体稀释至工作浓度,加入酶联板中,100 μL /孔,加盖,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h;PBST 溶液洗涤 4 次,每次 3 min。

D.2.5 加底物

将底物(PNPP)加入到底物缓冲液中使终浓度为 1 mg/mL,加入酶联板中,100 μL /孔,室温避光孵育。

D.2.6 读数

30 min 后在酶联仪(405 nm)读 OD 值。

D.3 结果判定

D.3.1 对照孔的 OD_{405} 值(缓冲液孔、阴性对照及阳性对照孔),应该在质量控制范围内

缓冲液孔和阴性对照孔的 $\text{OD}_{405} < 0.15$,当阴性对照孔的 $\text{OD}_{405} < 0.05$ 时,按 0.05 计算;阳性对照 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值 $> 5 \sim 10$;重复性基本一致。

D.3.2 满足 C.3.1 质量要求,结果判定

在阳性对照和阴性对照吸光值正常,重复性好的情况下,样品 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值明显 ≥ 2 ,判定为阳性结果;样品 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值在阈值附近,判为可疑样品,需重新做一次,或用其他方法加以验证;样品 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值明显 < 2 ,判定为阴性结果。

如采用商品化试剂盒,按照试剂盒说明操作并判定结果。

附录 E
(规范性附录)

马铃薯青枯病菌常规 PCR 和实时荧光 PCR 检测方法

E.1 试剂

E.1.1 TAE 电泳缓冲液(50×储存液,pH8.5)

242 g Tris 碱,57.1 mL 冰乙酸,37.5 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,加水至 1 L,用蒸馏水稀释 50 倍。

E.1.2 TE 缓冲液

10 mmol/L Tris · Cl,pH8.0,1 mmol/L EDTA,pH8.0。

E.2 PCR 反应模板制备

待测样品组织剪碎后浸泡于 200 mL PBS 中,0.5~1 h 后浸泡液用滤纸过滤,10 000 r/min 离心去上清液,沉淀按《精编分子生物学实验指南》中的方法提取细菌基因组 DNA;纯培养的细菌菌株稀释成菌悬液($>10^7$ CFU/mL)也可以作为 PCR 反应模板。

E.3 常规 PCR 检测

E.3.1 检测引物

引物 RS32/RS37 可检测青枯菌所有小种和生物型,扩增产物分别为 583 bp。引物序列如下;RS32:5'-gggttttgcgtttggcatt-3';RS37:5'-gtacacctagtccacaatac-3'

E.3.2 PCR 反应体系

PCR 反应总体积为 30 μL ,包含:10 mmol/L Tris-HCl 50 mmol/L 氯化钾(pH8.3);1.5 mmol/L 氯化镁;dATP,dGTP,dCTP,dTTP 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$;引物浓度 100 nmol/L;1 μL 模板 DNA;1 U *Taq* DNA 聚合酶。

E.3.3 PCR 反应程序

94 $^{\circ}\text{C}$ /3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ /30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ /30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ /1 min,30 循环;72 $^{\circ}\text{C}$ /5 min。

E.3.4 PCR 扩增产物的检测

取扩增产物 10 μL ,加入 3 μL 上样缓冲液(0.25%溴酚蓝,40%(质量浓度)蔗糖水溶液),混匀,1.5%琼脂糖凝胶电泳。电泳后于凝胶成像仪中成像,记录实验结果。

E.4 实时荧光 PCR 检测

E.4.1 检测引物和探针

引物 B-I/B-II 和探针 B-P 检测马铃薯青枯菌即 race 3 biovar 2(Weller *et al.* 2000),引物和探

针序列如下: B2-I: 5'-tggcgcactgcactcaac-3'; B2-II: 5'-aatcacatgcaattgcctacg-3'; B2-P(VIC): 5'-ttcaagccgaacacctgctgcaag-3'(TAMRA)。

E.4.2 实时荧光 PCR 反应体系

实时荧光 PCR 扩增体系 25 μL : 5 $\times$ real time PCR 缓冲液(Mg^{2+}) 5 μL , Mg^{2+} 溶液(250 mmol/L) 0.5 μL , dNTP mixture(各 10 mmol/L) 0.75 μL , Real time PCR 专用 *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μL) 0.25 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL , RS-P 探针或 B2-P 探针(5 $\mu\text{mol/L}$)各 0.6 μL , DNA 模板 2 μL , 超纯水补至 25 μL 。

E.4.3 实时荧光 PCR 反应程序

实时荧光 PCR 扩增在定量 PCR 扩增仪上进行。两步法扩增反应程序: 50 $^{\circ}\text{C}$ /2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ /10 min; 然后 95 $^{\circ}\text{C}$ /10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ /1 min 循环 40 次。

E.5 PCR 结果判定

常规 PCR 检测结果为阳性, 分离物为青枯病菌; 实时荧光 PCR 检测结果为阳性, 分离物为马铃薯青枯病菌。

PCR 试验用水以及方法参照 GB/T 6682 和 SN/T 1193。