SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2568—2010

番茄细菌性溃疡病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michganensis*(Smith)Jenen

2010-05-28 发布　　2010-12-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局　发布

中国标准出版社
数码防伪

食品伙伴网http://www.foodmate.net

前　言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国新疆出入境检验检疫局、中华人民共和国甘肃出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：张祥林、刘箐、王翀、赵文军、王有福。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

番茄细菌性溃疡病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了番茄细菌性溃疡病菌[*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*(Smith) Davis et al]的检疫鉴定方法。

本标准适用于进出境番茄种子及其产品中番茄细菌性溃疡病菌的检疫和鉴定。

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。

GB 6682 分析实验室用水规格和试验方法

SN/T 1538.1 培养基制备指南 第1部分：实验室培养基制备质量保证通则

SN/T 1809 进出境植物种子检疫规程

3 原理

番茄细菌性溃疡病菌的分类地位属于厚壁菌门(Firmicutes)、厚壁菌纲(firmibacteria)、真细菌目(Enterobacteriaceae)、棒形杆菌属(*Clavibacter*)。该病菌的生物学特性(参见附录A)、血清学特性和分子生物学特性是制定本标准的主要依据。

4 仪器设备和用具

4.1 仪器设备

电子天平(感量1/1 000 g)、真空泵、恒温培养箱、恒温振荡培养箱、高压灭菌器、超净工作台、生物显微镜(具照相系统)、高速冷冻离心机、Mini个人离心机、纯水器、恒温水浴锅、低温冰箱、酶标仪、PCR仪、电泳仪、电泳槽、凝胶成像分析仪等。

4.2 用具

培养皿、试管、可调式微量进样器(2 μL、10 μL、20 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL)及相应的进样器头、研钵、96孔酶联反应板、离心管(1.5 mL、10 mL)、PCR管(0.2 mL)、量筒、烧杯。

5 试剂

除另有规定外，所有试剂均为分析纯或生化试剂。实验用水应符合GB 6682中一级水的规格。

培养、鉴定番茄细菌性溃疡病菌所用的试剂见附录B、附录C和附录D。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

6 检疫鉴定方法

6.1 常规生物学检测

6.1.1 田间调查及植株检验

番茄细菌性溃疡病在田间所表现的症状参见附录A。田间调查时采集具可疑症状的植株或果实带回实验室，用清水冲洗干净，晾干后用灭菌的解剖刀在病健交界处取一小块病变组织，悬浮于少量无菌水中，用无菌玻棒挤压，然后用接菌环蘸取菌悬液，在523培养基平皿上划线分离，28 ℃恒温培养72 h，番茄细菌性溃疡病菌在523培养基上培养3 d可形成表面光滑、粘稠状、淡黄色至黄色的圆形菌落。根据番茄细菌性溃疡病菌的菌落特征选取可疑菌落做进一步鉴定。也可用发病果实或茎秆作ELISA或PCR检测实验。

6.1.2 种子检验

随机抽取30 g(≥10 000粒)番茄种子为一份样品(少于30 g的番茄种子样品则全部抽取，具体抽样要求参见SN/T 1809的规定，加150 mL预冷的0.05 mol/L、pH7.2的磷酸-吐温缓冲液(PBT)。摇匀使种子完全湿润，在室温真空条件下孵育30 min～60 min，慢慢恢复常压；或在4 ℃下磁力搅拌器上搅24 h～48 h，取50 mL样品抽提液，12 000g离心10 min浓缩，弃上清液，沉淀用0.01 mol/L pH7.2磷酸缓冲液(PB)重新悬浮，制成样品悬浮液，终体积为2 mL，将其均分为两份，其中1份做分离培养检验，另1份加10%甘油保存，以便作ELISA或PCR检测实验。

在每个KBT培养基或KBP培养基平板上各加50 μL样品悬浮液，用灭菌玻璃棒涂布，每个样品至少要用2个平皿。在另外的平皿上接种标准番茄细菌性溃疡病菌得到阳性对照菌落。25 ℃培养4 d后开始出现番茄细菌性溃疡病菌菌落。在KBT培养基上菌落圆形、隆起、深灰白色、边缘黄至琥珀色；在KBP上菌落为淡黄色。6 d时检查平皿，并将可疑菌落转移到普通培养基(如：NA培养基)上进行纯化、培养。有些番茄细菌性溃疡病菌菌株在选择性培养基上生长较慢，为了使这些菌落充分表现，应将原始平皿再继续培养3 d以上，用双抗体夹心酶联免疫吸附法或PCR法作进一步鉴定。

上述几种培养基的配方见附录B。

6.2 双抗体夹心酶联免疫吸附法检测

见附录C。

6.3 PCR法检测

见附录D。

7 鉴定特征

7.1 常规生物学检测

番茄细菌性溃疡病菌在523培养基上可形成黄色、圆形表面光滑、边缘整齐、粘稠状的菌落；在KBT培养基上菌落圆形、隆起、深灰白色、边缘黄至琥珀色；在KBP上菌落为淡黄色。该特征可作为常规生物学鉴定指标。根据上述菌落特征选取可疑菌落做进一步鉴定。

7.2 DAS-ELISA检测

当待检样品孔和阳性样品孔有颜色反应，阴性对照孔和空白对照孔无颜色反应，且酶标仪检测阴性

食品伙伴网http://www.foodmate.net

对照的 OD 值小于 0.15，则判定检测结果有效。计算待测样品 OD 值(P)与阴性对照 OD 值(N)之比值，若 P/N 大于 2，则检测结果判定为阳性；若 P/N 小于 2，则检测结果判定为阴性。

7.3 PCR 检测

观察 PCR 产物的电泳结果时，若供试样品和阳性对照在 250 bp 处有条带出现，阴性对照和空白对照无条带出现，即可判定供试样品为阳性，即供试样品中携带番茄细菌性溃疡病菌；否则为阴性。

8 结果判定

在常规生物学方法检测中，如果田间观察到具典型症状的病株、且从该病株中分离培养到的细菌菌株在选择性培养基上的菌落特征与描述相符，可以判定为检出番茄细菌性溃疡病菌。如果从番茄种子中分离培养到的细菌菌株在选择性培养基上的菌落特征与描述相符，可以初步判定为检出番茄细菌性溃疡病菌，并需要进行 ELISA 或 PCR 法检测。

如果分离培养到细菌菌落特征与描述相符，且 ELISA 检测为阳性，可以判定为检出番茄细菌性溃疡病菌。

如果分离培养到细菌菌落特征与描述相符，且 PCR 法检测结果为阳性，扩增产物的片断大小与描述相符，可以最终判定为检出番茄细菌性溃疡病菌。

9 样品保存

保存样品经登记和经手人签字后妥善保存。对检出番茄细菌性溃疡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。

10 菌株保存

从检测样品中分离到并鉴定为番茄细菌性溃疡病菌的菌株，应妥善保存。将菌株接种于 523 培养基斜面上，28 ℃恒温培养 48 h。然后置于 4 ℃冰箱中保存；或用真空冷冻干燥机制成冻干粉，－80 ℃下长期保存。

11 结果记录与资料保存

实验记录应包括：样品来源、种类、时间，检测的时间、地点、方法和结果等，并要有检测人员、审核人员的签字。生物学测定需要有寄主的症状照片、培养菌落照片等，酶联免疫测定要有酶联板反应的照片和原始数据，PCR 检测需要有电泳结果照片，上述资料应归档并妥善保存。

12 复核

必要时由专家对检测结果进行复核。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附 录 A
（资料性附录）
番茄细菌性溃疡病菌相关资料

A.1 英文名称

Bacterial Canker and Wilt of Tomato

A.2 学名

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*(Smith)Davis et al

A.3 分布地区

日本、印度、伊朗、以色列、黎巴嫩、土耳其、亚美尼亚、中国、澳大利亚、新西兰、汤加、奥地利、比利时、保加利亚、白俄罗斯、俄罗斯、芬兰、法国、德国、希腊、匈牙利、爱尔兰、意大利、立陶宛、荷兰、挪威、波兰、葡萄牙、罗马尼亚、西班牙、瑞士、英国、乌克兰、埃及、肯尼亚、马达加斯加、摩洛哥、南非、多哥、突尼斯、乌干达、赞比亚、津巴布韦、加拿大、墨西哥、美国、伯利兹、哥斯达黎加、古巴、多米尼加、巴拿马、阿根廷、巴西、智利、哥伦比亚、秘鲁。

A.4 寄主范围

该病菌自然侵染的寄主有：番茄、龙葵、裂叶茄；人工接种可侵染树番茄、心叶烟、乳茄、马铃薯、小麦、大麦、黑麦、燕麦、向日葵、西瓜、黄瓜、辣椒、茄子、醋栗等。

A.5 病害症状

番茄细菌性溃疡病是一种维管束系统病害，病株从幼苗到座果期都可发生萎蔫和死亡，大田定植后造成缺株断垄。在温室条件下，最初症状是叶片表现出可逆性萎蔫，在叶脉之间产生白色至褐色的坏死斑点，最后表现出永久性萎蔫，致使整株干枯死亡。田间最初症状为低位叶片小叶的边缘出现卷缩、下垂、凋萎，似缺水状，病原菌未达到的部位，其枝叶生长正常。植株枯萎很慢，一般不表现出萎蔫。有时植株一侧或部分小叶出现萎蔫，而其余部分生长正常，病情继续发展，叶脉和叶柄上出现小白点，在茎和叶柄上出现褐色条斑，下陷，向上下扩展，并且爆裂，露出黄到红褐色的髓腔，呈溃疡症状。病原菌通过维管束侵染果实，也可侵染胎座和果肉。幼果发病后皱缩、滞育、畸形，病果内的种子小、黑色、不成熟；正常大小的果实感病后外观正常，偶尔有少数种子变黑或有黑色小点，其发芽率仍然很高。在暴风雨多的地区或喷灌条件下，果实上往往出现白色圆形小点，扩展后变为褐色，中心粗糙、略微突起，直径约3 mm 左右，斑点边缘围绕着白色晕圈，呈典型的“鸟眼状”。许多小斑点可联合成不规则的斑块，但仍有白色的晕圈。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

A.6 病原菌形态特征、生理生化特性及培养性状

番茄细菌性溃疡病菌为好氧细菌，革兰氏染色阳性，无鞭毛，无芽孢，有荚膜，棒杆形，菌体大小为(0.3 μm～0.4 μm)×(0.6 μm～1.2 μm)。能利用葡萄糖、蔗糖、阿拉伯糖、甘露糖、麦芽糖、甘油、苯甲酸、柠檬酸、延胡羧酸、苹果酸，不能利用鼠李糖、棉籽糖、乳糖、木糖、甘露醇、山梨醇、草酸、酒石酸、丙二酸、半乳糖酸等，硝酸盐还原阴性，尿酶阴性，明胶液化慢，可水解七叶苷，水解淀粉能力弱。生长需要氨基酸、生物素、烟酸和硫胺素。最适生长温度 24 ℃～27 ℃；在 523 培养基上 28 ℃培养，72 h 后出现黄色、圆形表面光滑、边缘整齐、粘稠状的菌落。

A.7 传播途径

该病原菌的远距离传播主要靠带菌种子，番茄种子内外层都可带菌。在田间和温室，该病菌主要通过灌溉水、雨水、修枝剪、培养料等传播，由伤口、气孔和自然孔口侵入寄主组织。该病菌在土壤和病残体组织中可存活 2 年～3 年。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附 录 B
（规范性附录）
番茄细菌性溃疡病菌（*C. m. m*）常用培养基、缓冲液配方

B.1 523 培养基（pH7.2）

蔗糖	10 g
聚蛋白胨或酪蛋白水解物	8 g
酵母膏	4 g
磷酸氢二钾（K_2HPO_4）	2 g
硫酸镁（$MgSO_4 \cdot 7H_2O$）	0.3 g
琼脂	18 g
蒸馏水	1 000 mL

B.2 KBT 培养基（pH7.2）

蛋白胨	20 g
蔗糖	10 g
琼脂	17 g
硫酸镁（$MgSO_4 \cdot 7H_2O$）	1.5 g
磷酸氢二钾（K_2HPO_4）	1.5 g
H_2BO_3	1.5 g
甘油	10 mL
蒸馏水	1 000 mL

高压灭菌后，冷却至 50 ℃时加入 3 mL 萘啶酮酸钠（10 mg/mL，溶解于 0.1 mol/L NaOH 中），2 mL 放线菌酮（20 mg/mL，溶解于乙醇中），0.05 mL 百菌清（1∶37 水液），1 mL 亚硫酸钾（1%水溶液）。

B.3 KBP 培养基（pH7.2）

蛋白胨	20 g
蔗糖	10 g
琼脂	17 g
硫酸镁（$MgSO_4 \cdot 7H_2O$）	1.5 g
磷酸氢二钾（K_2HPO_4）	1.5 g
H_2BO_3	1.5 g
甘油	10 mL
蒸馏水	1 000 mL

高压灭菌后，冷却至 50 ℃时加入 3 mL 萘啶酮酸钠（10 mg/mL，溶解于 0.1 mol/L NaOH 中），2 mL放线菌酮（20 mg/mL，溶解于乙醇中），0.05 mL 百菌清（1∶37 水液），1 mL 多粘菌素（40 mg/mL，溶解于无菌水中）。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

B.4 NA 培养基(pH7.2)

酵母膏	1 g
牛肉浸膏	3 g
蛋白胨	5 g
葡萄糖	10 g
琼脂	15 g
蒸馏水	1 000 mL

注：该配方中不加琼脂则为 NA 液体培养基。

B.5 磷酸-吐温缓冲液(PBT,pH7.2)

磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	7.75 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	1.65 g
蒸馏水	1 000 mL

121 ℃高压灭菌 15 min,冷却至 50 ℃时加入 0.2 mL 单独灭菌的吐温-20。

B.6 磷酸缓冲液(PB,pH7.2)

磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.4 g
磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	2.7 g
蒸馏水	1 000 mL

121 ℃高压灭菌 15 min。

注：各种培养基制备的操作技术要求按 SN/T 1538.1 的规定执行。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附 录 C
（规范性附录）
双抗体夹心酶联免疫法检测番茄细菌性溃疡病菌(*C. m. m*)

C.1 试剂

C.1.1 包被抗体

特异性的番茄溃疡病菌抗体。

C.1.2 酶标抗体

碱性磷酸酯酶标记的番茄溃疡病菌抗体。

C.1.3 10×PBST 缓冲液

将氯化钾(KCl)2 g、氯化钠(NaCl)80 g、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)2 g、磷酸氢二钠($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)11.5 g、吐温-20(Tween-20)5 mL，用浓盐酸(HCl)调节 pH 至 7.4，加蒸馏水定溶至 1 L，4 ℃下储存。

C.1.4 样品抽提缓冲液

将亚硫酸钠(Na_2SO_3)1.3 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、吐温-20(Tween-20)20 mL 溶解于 1 000 mL PBST 中，用浓盐酸(HCl)调节 pH 至 7.4，4 ℃下储存。

C.1.5 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 ℃下储存。

C.1.6 洗涤缓冲液

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

C.1.7 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 ℃下储存。

C.1.8 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 ℃下储存。

C.1.9 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。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

C.1.10 终止反应液

将氢氧化钠(NaOH)40 g溶解于1 000 mL蒸馏水中。

C.2 检测方法

C.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 ℃孵育2 h，清空孔中溶液，PBST洗涤4次，每次3 min。

C.2.2 样品制备

将待测样品按1∶10(质量:体积)加入抽提缓冲液，用研钵研磨成浆，500 r/min离心5 min，上清液即作为检测样品。阴性、阳性对照作相应的处理或按照试剂盒说明书进行。

C.2.3 加样

将制备好的检测样品和阴性、阳性对照样品依次加入酶标板的孔中，100 μL/孔，加盖，4 ℃冰箱孵育过夜，PBST洗涤4次，每次3 min。

C.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，加入至酶标板的孔中，100 μL/孔，加盖，37 ℃孵育2 h(或4 ℃冰箱过夜)。清空孔中溶液，PBST洗涤4次，每次3 min。

C.2.5 加底物

每孔加200 μL现配的底物溶液，室温避光孵育0.5 h～1 h。

C.2.6 观察检测结果

肉眼观察判断酶标板颜色反应结果，并用酶标仪检测各样品孔和对照孔在A_{405} nm处的吸光值(OD值)。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

附 录 D
（规范性附录）
番茄细菌性溃疡病菌（*C. m. m*）的 PCR 检测方法

D.1 试剂制备

D.1.1 TAE 电泳缓冲液（pH8.5）配方

Tris	242 g
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	37.5 g
冰乙酸	57.1 mL
蒸馏水定溶至	1 000 mL

灭菌后常温保存，用时稀释 50 倍。

D.1.2 10×电泳上样缓冲液（pH8.5）配方

20%（质量浓度）Ficoll400
1.9%（质量浓度）SDS
0.1 mol/L Na_2EDTA（pH8.0）
0.25%（质量浓度）溴酚蓝

D.2 细菌 DNA 模板的制备

无菌操作下，挑取待测菌的单菌落于 NA 液体培养基中，22 ℃、220 r/min 摇培 36 h，取 1 mL 菌悬液，10 000 r/min 离心 5 min，弃上清液，沉淀中加灭菌双蒸水配成 1×10^8 CFU/mL 菌悬液，作为 PCR 模板。

D.3 定性 PCR 检测

检测番茄溃疡病菌采用的 PCR 扩增引物序列为：
ClaF1：5'-TCA TTG GTC AAT TCT GTC TCC C-3'
ClaR2：5'-TAC TGA GAT GTT TCA CTT CCC C-3'。

PCR 反应体系为：10×PCR 缓冲液（无 Mg^{2+}）2.5 μL、25 mmol/L 氯化镁（$MgCl_2$）1.5 μL、2.5 mmol/L dNTPs 0.25 μL、5 U/L*Taq* DNA 聚合酶 0.25 μL、10 umol/L 引物各 1 μL、菌悬液 1.5 μL，三蒸水 17 μL，反应体系总体积为 25 μL。

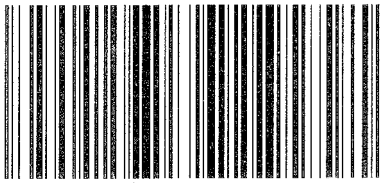
PCR 扩增条件为：94 ℃/3 min；94 ℃/30 s，62.5 ℃/45 s，72 ℃/30 s，30 cycles；72 ℃/5 min，4 ℃∞。

在进行 PCR 检测时应设阳性对照、阴性对照和空白对照各 2 个。

用 TAE 电泳缓冲液制备 1.5%的琼脂糖凝胶，按比例混匀电泳上样缓冲液和 PCR 扩增产物，将混有上样缓冲液的 PCR 扩增产物加入样品孔中，用 DNA Maker 做分子量标记，进行电泳分析，电泳结束后，在凝胶成像分析仪下观察是否扩增出预期的特异性 DNA 电泳带，拍摄并记录实验结果。

食品伙伴网http://www.foodmate.net

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
番茄细菌性溃疡病菌检疫鉴定方法
SN/T 2568—2010
*
中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045
网址 www.spc.net.cn
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 1 字数 19 千字
2010年10月第一版 2010年10月第一次印刷
印数 1—1 600
*
书号:155066·2-21184 定价 18.00 元



食品伙伴网http://www.foodmate.net