



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4075—2014

## 水稻细菌性条斑病菌、柑桔溃疡病菌、 甘蓝黑腐病菌的基因芯片筛查方法

Screen of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*  
and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by gene array method

2014-11-15 发布

2015-05-01 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

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

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：中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、深圳市检验检疫科学研究院、中华人民共和国伊犁出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：龙海、李一农、李芳荣、凌杏园、余道坚、郑耘、冯建军、乾义柯。

# 水稻细菌性条斑病菌、柑桔溃疡病菌、 甘蓝黑腐病菌的基因芯片筛查方法

## 1 范围

本标准规定了进出境植物检疫中水稻细菌性条斑病菌(*Xanthomonas oryzae* pv.*oryzicola*; Xooc)、柑桔溃疡病菌(*X. axonopodis* pv.*citri*; Xac)和甘蓝黑腐病菌(*X. campestris* pv.*campestris*; Xcc)的基因芯片筛查方法。

本标准适用于进出境水稻及其产品中水稻细菌性条斑病菌,芸香科植物及其产品中柑桔溃疡病菌和十字花科植物及其产品中甘蓝黑腐病菌的基因芯片筛查。

## 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

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

SN/T 2372 水稻白叶枯病菌、水稻细菌性条斑病菌的检测方法

SN/T 2622 柑桔溃疡病菌检疫鉴定方法

## 3 术语、定义和缩略语

### 3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

#### 3.1.1

**基因芯片** gene array

核酸检测探针按照有序的行列格式点制在固相支持物上,通过特定温度下与相应样品进行杂交而用于样品中核酸种类定性分析的一种高通量技术。

#### 3.1.2

**基片** substrate

基因芯片中用于固定探针的基质,通常采用标准的“载玻片或其他固体载体”,经过化学修饰制备而成。

#### 3.1.3

**基因芯片探针** DNA microarray probe

基因芯片中固定于基质表面,能与样本 DNA 互补,用于探测样本 DNA 信息的核酸分子,多用寡核苷酸片段做探针。

#### 3.1.4

**定位探针** positive position probe

是一段与待检测基因无关的寡核苷酸,通过和标记的定位探针互补链杂交显示信号,用于确定点样

矩阵的位置。

### 3.1.5

**阳性质控探针 positive quality control probe**

用于样品抽提、PCR、杂交等反应体系的监控,一般用生物的管家基因来设计阳性质控探针。

### 3.1.6

**阴性质控探针 negative quality control probe**

是一段与待检测基因无关的寡核苷酸,用于基因芯片非特异性杂交背景的监控。

### 3.1.7

**基因芯片空白质控点 no probe microarray spot**

由不含核酸的点样液点制而成,用于基因芯片杂交背景的监控。

### 3.1.8

**目标基因探针 probe for target gene**

用于检测目标基因序列的探针。

### 3.1.9

**信噪比 signal noise ratio**

是杂交信号值与杂交背景值的比值,由图像分析软件自动判读。

## 3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

Cy5-dCTP: Cy5 标记的脱氧胞苷三磷酸(cy5 deoxycytidine triphosphate)

## 4 实验室要求

实验室设施应达到 GB 19489 实验室技术要求。

## 5 方法原理

针对 3 种目标菌的铁载体受体(Putative siderophore receptor)基因序列和 RNA 多聚酶西格玛因子(RNA polymerase sigma factor, rpoD)基因序列设计引物和特异性探针。从待检样品中分离细菌,提取 DNA 为模板进行双重 PCR 扩增。扩增产物与固定有 3 种目标致病菌特异性探针的基因芯片进行杂交,用芯片扫描仪对杂交芯片进行扫描并判定结果。

水稻细菌性条斑病菌和柑桔溃疡病菌为害引起的典型症状及病原菌形态特征等相关资料分别见 SN/T 2372 和 SN/T 2622,甘蓝黑腐病菌的相关资料参见附录 A。

## 6 仪器设备和主要试剂

### 6.1 仪器设备

高压灭菌锅、恒温培养箱、高速冷冻离心机、低温冰箱( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ )、基片、芯片盖片、芯片围栏、水浴锅、超净工作台、PCR 仪、水平式电泳仪、凝胶成像分析系统、摇床、基因芯片扫描仪、芯片杂交盒、微量可调移液器及相应的灭菌吸头( $2\text{ }\mu\text{L}$ 、 $10\text{ }\mu\text{L}$ 、 $100\text{ }\mu\text{L}$ 、 $200\text{ }\mu\text{L}$ 、 $1\text{ }000\text{ }\mu\text{L}$ )、灭菌 PCR 反应管、涡旋混匀器、电子天平、磁力搅拌器。



## 6.2 主要试剂

除另有规定外,所有试剂均为分析纯和生化级试剂。实验用水均为超纯水,规格符合 GB/T 6682 相关规定。

TE 缓冲液(pH 8.0)、CTAB/NaCl 溶液(10% CTAB、0.7 mol/L NaCl)、十二烷基硫酸钠(SDS)、20 mg/mL 蛋白酶 K、4 mg/mL RnaseA、异丙醇、70% 乙醇、5 mol/L 氯化钠、酚/三氯甲烷/异戊醇(25:24:1)、三氯甲烷/异戊醇(24:1)、DNA 分子量标记 2 000、引物和探针(见附录 B)、ExTaq DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ L)、电泳级琼脂糖、dNTPs 混合液(含 dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP 各 2.5 mmol/L)、氯化镁(25 mmol/L)、10 $\times$ ExTaq 缓冲液(不含镁离子)、10 $\times$ 上样缓冲液、溴化乙锭、Cy5-dCTP、灭菌水、SSPE、洗液 I (0.3 $\times$ SSC,0.2% SDS)、洗液 II (0.06 $\times$ SSC)、培养基配方详见附录 C。

## 7 检测流程

检测流程见附录 B。

## 8 检测

### 8.1 病菌的分离培养

8.1.1 针对水稻细菌性条斑病菌的检测,按照 SN/T 2372 的要求进行病菌的分离培养。

8.1.2 针对柑桔溃疡病菌的检测,按照 SN/T 2622 的要求进行病菌的分离培养。

8.1.3 针对甘蓝黑腐病菌的检测,病菌分离培养的方法见附录 D。

### 8.2 细菌基因组 DNA 的提取

用接种环挑取上述培养的可疑单菌落于 20 mL LB 液体培养基中,30  $^{\circ}$ C、220 r/min 培养过夜;分别取 1.5 mL 菌悬液于灭菌的离心管中 10 000 r/min 离心 5 min 弃去上清;加入 567  $\mu$ L TE 缓冲液悬浮沉淀;加入 30  $\mu$ L 10% SDS 混匀,加入 3  $\mu$ L 20 mg/mL 蛋白酶 K 混匀,37  $^{\circ}$ C 温育 1 h;加入 100  $\mu$ L 5 mol/L NaCl 充分混匀,再加入 80  $\mu$ L CTAB/NaCl 溶液(10% CTAB、0.7 mol/L NaCl)混匀,65  $^{\circ}$ C 温育 10 min;加入等体积的三氯甲烷:异戊醇(24:1)混匀,15 000 r/min 离心 10 min,将上清转移至新的灭菌离心管中;加入等体积的酚:三氯甲烷:异戊醇(25:24:1)混匀,15 000 r/min 离心 10 min,保留上清;加入 0.6 倍体积的异丙醇,混匀,15 000 r/min 离心 10 min,收集 DNA 沉淀,弃上清;用 70% 乙醇洗涤 DNA 沉淀,弃上清;在室温下干燥;用 100  $\mu$ L TE 溶解 DNA,加入终浓度为 20  $\mu$ g/mL 的 Rnase A 消化,-20  $^{\circ}$ C 保存备用。

注:此步骤可略去,直接取分离纯化的细菌菌落,用灭菌去离子水配制  $1 \times 10^8$  CFU/mL 细菌悬浮液,95  $^{\circ}$ C 加热 5 min,立即冰浴 10 min,作为 PCR 模板。

### 8.3 荧光标记双重 PCR 扩增

#### 8.3.1 Cy5-dNTPs 的配制

Cy5-dNTPs 的配制见表 1。

#### 8.3.2 PCR 反应体系

反应体系中各试剂的量可根据具体情况进行适当的调整。以目的细菌的 DNA 作为阳性对照,以非目的菌的 DNA 作为阴性对照,以水代替模板作为空白对照。PCR 反应体系的配制见表 2。

表 1 Cy5-dNTPs 的配制

组分	体积/ $\mu\text{L}$
dATP(10 mmol/L)	1.00
dCTP(10 mmol/L)	1.00
dGTP(10 mmol/L)	1.00
dTTP(10 mmol/L)	0.65
Cy5-dCTP(1 mmol/L)	3.50
灭菌 dd H <sub>2</sub> O	2.85

表 2 PCR 反应体系

组分	体积/ $\mu\text{L}$
10×ExTaq 缓冲液(不含 Mg <sup>2+</sup> )	2.50
Cy5-dNTPs	0.50
MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/L)	2.00
XrpoD-F(5 $\mu\text{mol/L}$ )	1.00
XrpoD-R(5 $\mu\text{mol/L}$ )	1.00
PSRGF(5 $\mu\text{mol/L}$ )	1.00
PSRGR(5 $\mu\text{mol/L}$ )	1.00
ExTaq DNA 聚合酶(5 U/ $\mu\text{L}$ )	0.15
DNA 模板	5.00
灭菌 dd H <sub>2</sub> O	10.85

### 8.3.3 PCR 反应的循环参数

94 ℃预变性 5 min; 进入循环, 94 ℃/30 s、60 ℃/30 s、72 ℃/30 s, 共 30 个循环; 最后 72 ℃延伸 10 min。

注: 不同仪器可根据仪器要求将反应参数作适当调整。

### 8.3.4 PCR 扩增结果检测

PCR 反应结束后取 5  $\mu\text{L}$  扩增产物加入 2  $\mu\text{L}$  10×上样缓冲液, 用 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。若在 220 bp 或 152 bp 处出现扩增条带, 即可进行芯片杂交实验。否则判定样品不带有水稻细菌性条斑病菌、柑桔溃疡病菌或甘蓝黑腐病菌。

## 8.4 芯片杂交

### 8.4.1 芯片杂交体系

芯片杂交体系见表 3。

表 3 芯片杂交体系

组分	体积/ $\mu\text{L}$
2% SDS	3.50
5% SSPE	3.50
PCR 产物	6.00
AntiPos-ck	1.00

#### 8.4.2 杂交体系变性

将配制好的 8.4.1 的杂交体系在 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min, 冰浴 5 min。

#### 8.4.3 杂交

将杂交盒平放在桌面上, 在杂交盒底部凹槽内加入约 80  $\mu\text{L}$  灭菌水。将芯片正面朝上(围栏面朝上, 标签朝向操作者)放入杂交盒内两个定位销之间; 放上芯片盖片, 注意有凸台的一面朝向芯片, 上端先接触芯片, 再缓缓盖下; 然后用移液器通过盖片加样孔缓慢注入 12  $\mu\text{L}$  变性后的杂交液, 杂交液会凭借液体表面张力在盖片下面的凸台和芯片表面之间形成一道液膜。注意不要振动盖片或芯片以避免破坏液膜。盖紧杂交盒盖。放入 50  $^{\circ}\text{C}$  恒温水浴中, 静置, 杂交 3 h。

#### 8.4.4 洗片

将洗液 I (0.3  $\times$  SSC, 0.2% SDS) 和洗液 II (0.06  $\times$  SSC) 在 42  $^{\circ}\text{C}$ , 预热 30 min。从杂交盒中取出芯片, 将芯片放入预热好的洗液 I 中, 42  $^{\circ}\text{C}$  水平摇床 90 r/min 振荡清洗 5 min; 再转入预热好的洗液 II 中, 42  $^{\circ}\text{C}$ , 90 r/min 振荡清洗 5 min; 最后用 42  $^{\circ}\text{C}$  预热的灭菌水清洗一次, 清洗后的芯片放在 50 mL 锥形离心管中(标签纸端朝下), 2 000 r/min 离心 1 min, 除去玻片表面的液体, 此时的芯片可以进行扫描。

### 8.5 芯片扫描及结果判读

#### 8.5.1 芯片杂交结果扫描

使用微阵列芯片扫描仪进行扫描分析。

#### 8.5.2 结果的判定标准

阴性质控探针杂交信噪比均值小于或等于 3.5, 空白质控点杂交信噪比均值小于或等于 3.5, 阳性质控探针杂交信噪比大于 5.0, 判断杂交合格; 在此基础上, 目标基因探针杂交信噪比均值大于或等于 5.0, 杂交结果判定为阳性, 在 3.5 和 5.0 之间判定为可疑阳性, 小于或等于 3.5 判定为阴性。

## 9 结果报告

若芯片检测结果为阴性, 结果报告未检出目标病原菌; 若检测结果为阳性或者可疑阳性, 结果报告初步检出目标病原菌。

## 10 样品和分离物的保存及处理

### 10.1 样品及分离物的保存

保存样品置于阴凉干燥、防虫防鼠处妥善保存 3 个月。对检出水稻细菌性条斑病菌、柑桔溃疡病菌或甘蓝黑腐病菌的样本和分离菌株应在生物安全措施下保存 6 个月以上。分离菌株接种于 SPA 培养基斜面上, 28℃ 培养 72 h, 4℃ 下可保存 2 周~4 周, 或液体培养基培养至对数生长期, 在 20% 灭菌甘油中, -80℃ 条件下可长期保存。

### 10.2 样品及分离物的处理

对检出水稻细菌性条斑病菌、柑桔溃疡病菌或甘蓝黑腐病菌的样品及其分离菌株、检测过程中的废弃物, 应经有效的除害处理方式处理, 防止扩散。



附 录 A  
(资料性附录)  
甘蓝黑腐病菌的相关资料

### A.1 英文名

Rape black rot; Bacterial black rot of cabbage; Black rot of crucifers

### A.2 学名及分类地位

拉丁名: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson

异名: *Bacillus campestris* Pammel; *Pseudomonas campestris* (Pammel) Smith; *Bacterium campestre* (Pammel 1895) Smith; *Phytomonas campestris* (Pammel) Bergey et al.; *Xanthomonas campestris* var. *aberrans* Knösel; *Xanthomonas campestris* var. *armoraceae* (McCulloch) Starr and Burkholder

分类地位: 该菌属于细菌(Bacteria), 变形菌门(Proteobacteria),  $\gamma$  变形杆菌纲(Gammaproteobacteria), 黄单胞菌目(Xanthomonadales), 黄单胞菌科(Xanthomonadaceae), 黄单胞菌属(*Xanthomonas*)。

### A.3 分布

美国、日本、中国、肯尼亚、马拉维、莫桑比克、南非、乌干达、赞比亚和津巴布韦等国家。

### A.4 寄主范围

十字花科植物, 主要包括: 甘蓝(*Brassica oleracea*)、白菜(*Brassica pekinensis*)、油菜(*Brassica chinensis*)、芥菜(*Brassica juncea*)、萝卜(*Raphanus sativus*)、花椰菜(*Brassica oleracea* var. *botrytis*)、球茎甘蓝(*Brassica oleracea* var. *capitata*)、芥蓝(*Brassica albograbra*)、青花菜(*Brassica oleracea* var. *italica*)、榨菜(*Brassica juncea* var. *tumida*)等, 此外还可以危害桂竹香(*Cheiranthus cheiri*)、紫罗兰(*Matthiola incana*)等花卉, 亦有危害菠菜(*Spinacia oleracea*)和烟草(*Nicotiana tabacum*)的报道。

### A.5 典型症状

幼苗期发病症状: 子叶感病, 病原菌从叶缘侵入引起发病, 初呈黄色萎蔫状, 之后逐渐枯死。幼苗发病严重时, 可导致幼苗萎蔫、枯死或迅速蔓延至真叶。真叶感病, 形成黄褐色坏死斑, 病斑具明显的黄绿色晕边, 病健界线不明显, 且病斑由叶缘逐渐向内部扩展, 呈“V”字形, 部分叶片发病后向一边扭曲。成株期发病症状: 病原菌以多种形式侵染植株, 主要危害叶片, 被危害叶片呈现不同发病症状。病原菌多从叶缘处的水孔侵入引起发病, 形成“V”字形的黄褐色病斑, 病斑周围具黄色晕圈, 病健界线不明显。病原菌还可沿叶脉向内扩展, 形成黄褐色大斑并且叶脉变黑呈网状。病原菌还可通过害虫取食或机械操作造成的伤口侵染, 形成不规则形的黄褐色病斑。此外, 病原菌沿侧脉、主脉、叶柄进入茎维管束, 并沿维管束向下蔓延, 在晴天时可导致植株萎蔫, 傍晚和阴天时恢复。球茎受害时维管束变为黑色或腐



烂,但无臭味,干燥时呈干腐状。种株发病,病原菌从果柄维管束进入角果,或从种脐侵入种子内部,造成种子带菌。花梗和种荚上病斑椭圆形,暗褐色至黑色。留种株发病严重时叶片枯死,茎上密布病斑,种荚瘦小,种子干瘪。参见图 A.1 和图 A.2。



图 A.1 黑腐病在白菜上的症状  
(采自 KennyS 等,2008)

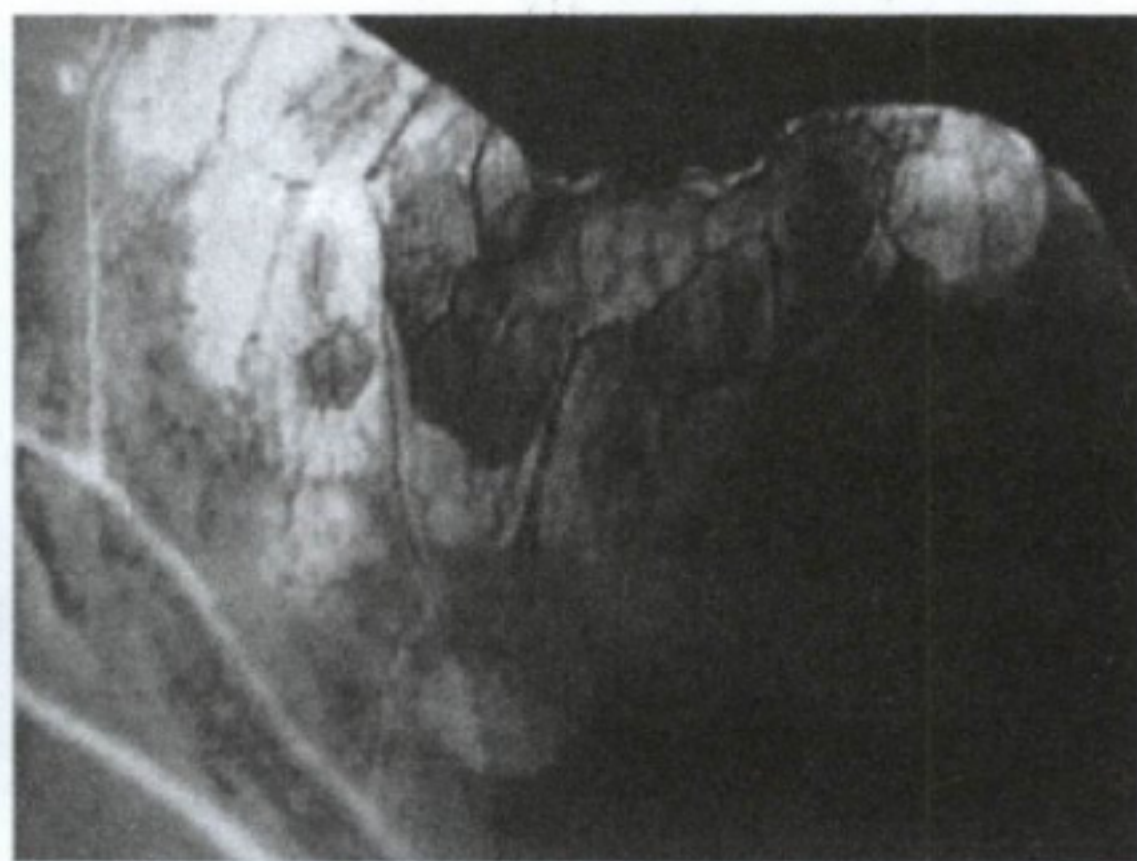


图 A.2 黑腐病菌在白菜叶上引起的典型 V 形  
坏死斑(采自 LangstonDB,2008)

#### A.6 形态特征及生物学特性

菌体杆状,大小为 $(0.7\ \mu\text{m}\sim 3.0\ \mu\text{m})\times(0.4\ \mu\text{m}\sim 0.5\ \mu\text{m})$ ,极生单鞭毛,无芽孢,具荚膜,菌体单生或链生。革兰氏染色阴性,不抗酸,好气性。在 SPA 培养基上培养 48 h~96 h,菌落近圆形,初呈淡黄色,后变腊黄色,边缘完整,略凸起,薄或平滑,具光泽,老龄菌落边缘呈放射状。病菌生长发育温度范围  $5\ ^\circ\text{C}\sim 38\ ^\circ\text{C}$ ,最适温度  $25\ ^\circ\text{C}\sim 30\ ^\circ\text{C}$ ,致死温度  $51\ ^\circ\text{C}$  经 10 min,耐酸碱度范围 pH 6.1~6.8,最适宜 pH 6.4。最适湿度为 80%~100%,尿酶阴性,过氧化氢酶阳性,能液化明胶,能在蛋白胨中产生硫化氢,不还原硝酸盐,耐氯化钠 2.0%~5.0%,G+C 含量  $64\pm 1\%$ 。Xcc 还能产生一种独特的不溶于水的黄色素,能产生胞外多糖又称黄原胶(Xanthangum),还能分泌淀粉酶、纤维素酶、蛋白酶、果胶酶、磷脂酶等。

#### A.7 传播途径和发病条件

该菌在种子或遗留在土壤中的病残体内及采种株上越冬。如播种带病种子,幼苗出土时依附在子叶上的病菌从子叶边缘的水孔或伤口侵入,引起发病。成株叶片染病,病原细菌在薄壁细胞内繁殖,再迅速进入维管束,引起叶片发病,再从叶片维管束蔓延至茎部维管束,引致系统侵染。采种株染病,细菌由果柄处维管束侵入,进入种子皮层或经荚皮的维管束进入种脐,致种内带菌。此外也可随病残体碎片混入或附着在种子上,致种外带菌,病菌在种子上可存活 28 个月,成为远距离传播的主要途径。在生长期主要通过病株、肥料、风雨或农具等传播蔓延。

病菌喜高温高湿的条件。 $25\ ^\circ\text{C}\sim 30\ ^\circ\text{C}$  利于病菌的生长发育;多雨高湿、叶面结露、叶缘吐水均有利于病害的发生。低洼地块,排水不良,浇水过多,病害严重。此外,播期偏早,与十字花科蔬菜连作,水肥管理不当,植株徒长、早衰以及病虫害防治不及时病害发生严重。环境条件适宜时,病菌大量繁殖,再侵染频繁,遇暴风雨后,病害极易流行。



附 录 B  
(规范性附录)  
检测流程、引物及探针

B.1 检测流程

检测流程见图 B.1。

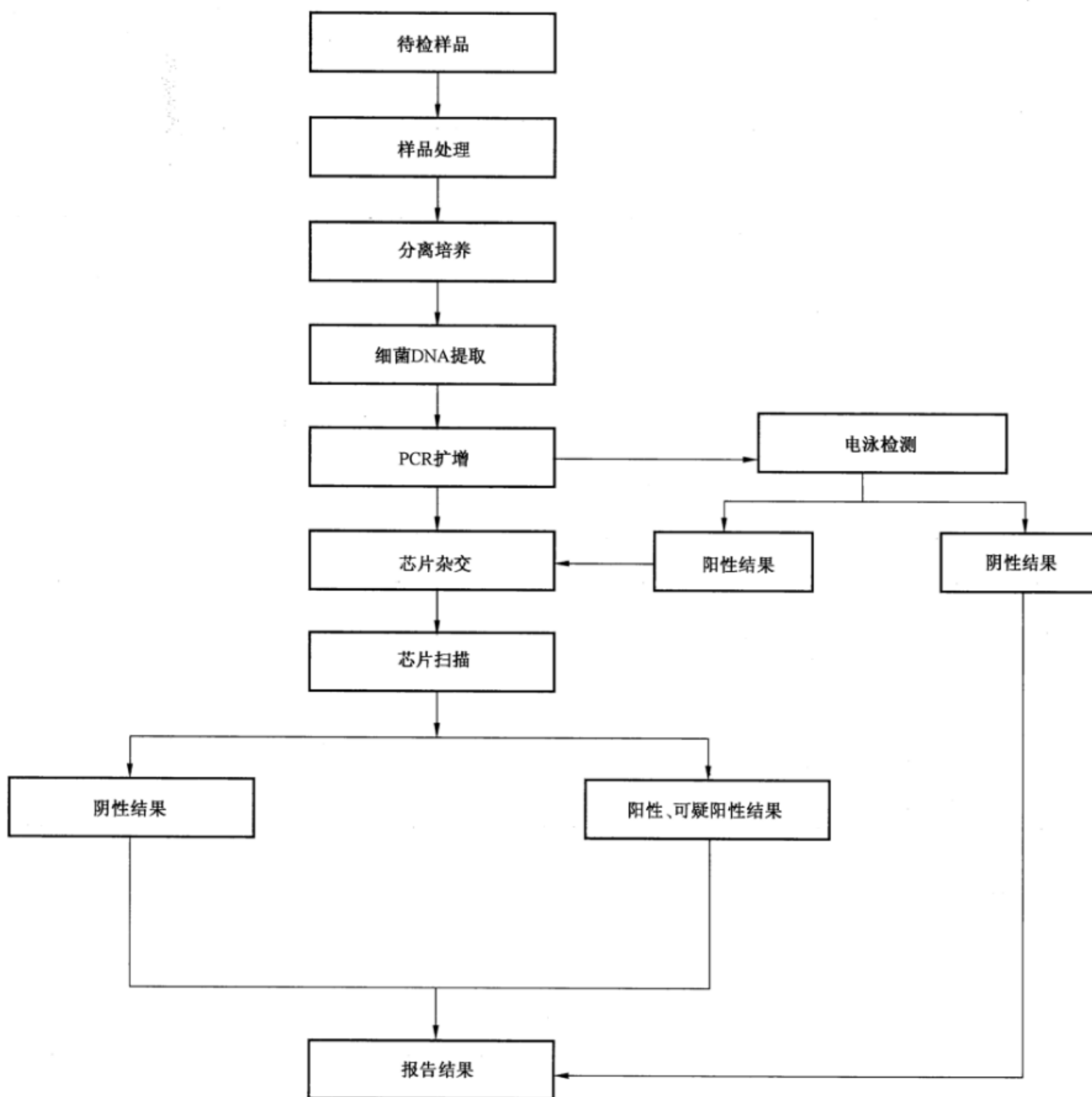


图 B.1 基因芯片检测流程

B.2 引物

PCR 反应使用的引物序列见表 B.1。

表 B.1 PCR 反应使用的引物序列

名称	靶细菌	目标基因	序列(5'—3') <sup>a</sup>	扩增片段大小 /bp
XrpoD-F XrpoD-R PSRGF <sup>b</sup> PSRG <sup>b</sup>	Xooc, Xac, Xcc  Xooc, Xcc	<i>rpoD</i>  铁载体受体	CGGCTTCAACGACCTGATY GAYCTTCTTGAACCTGGCGTAT GAATATCAGCATCGGCAACAG TACCGGAGCTGCGCGTT	220  152
<sup>a</sup> 对于核酸序列, Y 代表 T 或 C。 <sup>b</sup> 引自廖晓兰等, 2003。				

B.3 探针

B.3.1 探针序列

探针序列见表 B.2。

表 B.2 探针序列

名称	序列(5'—3')	备注
Xoo-S1	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTGAGGATGCGGTGGATGAAG	Xooc 特异性探针
Xac-A1	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTGACACGGCGACCGGAC	Xac 特异性探针
Xcc-S2	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTCTCGGGTATCAGCCGTGGTCGC	Xcc 特异性探针
Pos-ck <sup>a</sup>	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTGGGTGGGATCAATTTGG	阳性定位点探针
AntiPos-ck <sup>a</sup>	Cy5-CCAAATTGATCCCACCC	检测阳性定位点探针的互补链
Neg-CK <sup>a</sup>	NH <sub>2</sub> -TTTTTTTTTTCTGGAACAGCCAGAAGGAC	阴性质控探针
<sup>a</sup> 引自章桂明等, 2005。		

B.3.2 探针布局

检测探针在芯片表面的布局见表 B.3。

表 B.3 探针布局

Pos-ck	Pos-ck	Pos-ck	Pos-ck	Pos-ck	Pos-ck	Pos-ck	Pos-ck	Pos-ck	Pos-ck	Pos-ck
Pos-ck	Xoo-S1	Xoo-S1	Xoo-S1	Xoo-S1	Xoo-S1	Xac-A1	Xac-A1	Xac-A1	Xac-A1	Xac-A1
Pos-ck	Xcc-S2	Xcc-S2	Xcc-S2	Xcc-S2	Xcc-S2	Neg-CK	Neg-CK	Neg-CK	Neg-CK	Neg-CK
Pos-ck	空白对照	空白对照	空白对照	空白对照	空白对照	空白对照	空白对照	空白对照	空白对照	空白对照

附 录 C  
(规范性附录)  
培养基及其配方

C.1 SPA 培养基

蛋白胨	5 g
蔗糖	20 g
磷酸氢二钾	0.5 g
七水合硫酸镁	0.25 g
琼脂	17 g
蒸馏水	1 000 mL
pH 7.2~7.4, 121 °C 高压灭菌 20 min。	

C.2 LB 液体培养基

胰蛋白胨	10 g
酵母提取物	5 g
氯化钠	10 g

将以上各成分溶解于蒸馏水内,用 5 mol/L 氢氧化钠调 pH 至 7.0,再用蒸馏水定容至 1 L。在 121 °C 高压灭菌 20 min。



## 附录 D

(规范性附录)

## 甘蓝黑腐病菌的分离培养

## D.1 样品处理

## D.1.1 植物组织材料

无菌操作条件下,切取叶片病健交界处数块,放在 70% 的酒精中 15 s~30 s,再用无菌水洗 3~4 次,挑入盛有 2 mL~3 mL 无菌水的试管中研磨,制成菌悬液,静置 15 min 后用移菌环移取一环在 SPA 培养基上划线。如植物组织材料上出现菌脓或菌痂,直接用接种工具取菌脓或菌痂于 SPA 培养基上涂布。在 28 ℃~30 ℃恒温培养箱里培养 48 h~96 h。

## D.1.2 种子

量取 50 mL 4 ℃预冷的无菌缓冲液(0.85%氯化钠、0.02%吐温 20)倒入 250 mL 的灭菌锥形瓶中,称取 5 000 粒种子放入缓冲液中,于摇床上,室温(20 ℃~25 ℃)、100 r/min~125 r/min,震荡 2.5 h。将锥形瓶中的种子提取液摇匀,制备 10×和 100×两个稀释度的悬浮液:吸取 0.5 mL 种子提取液加到 4.5 mL 无菌生理盐水中,旋涡混合;吸取 0.5 mL 10×稀释的种子提取液加到 4.5 mL 无菌生理盐水中,旋涡混合。从原液及每个梯度稀释液中取 100 μL,分别加入到 SPA 培养基上,用 L 型玻棒将液体均匀涂布在培养基的表面。平板在 28 ℃~30 ℃培养 48 h~96 h。

## D.2 分离

培养 24 h 后开始观察菌落生长情况,一般要在 72 h~96 h 才形成可见菌落。菌落呈圆形、光滑、表面凸起、粘稠,由黄白色逐渐变成黄色。每个平皿挑取 5 个以上典型或疑似菌落在 SPA 培养基上进一步培养纯化,并进行后续试验。

---