



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3424—2012

---

## 黄瓜细菌性角斑病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*

2012-12-12 发布

2013-07-01 实施

---

中 华 人 民 共 和 国  
国家质量监督检验检疫总局 发 布

## 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：中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国厦门出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：赵文军、陈青、田茜、牟海青、陈红运、鲁洁、李玲、王哲。

# 黄瓜细菌性角斑病菌检疫鉴定方法

## 1 范围

本标准规定了黄瓜细菌性角斑病菌的样品制备、检测方法、结果判定及菌株保藏等。  
本标准适用于可能携带黄瓜细菌性角斑病菌的黄瓜种子、苗木及其产品的检疫鉴定。

## 2 基本信息

学名: *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*

异名: *Pseudomonas lachrymans* (Smith & Bryan) Carsner 1918, *Bacillus lachrymans* (Smith & Bryan) Holland 1920, *Bacterium burgeri* (Potebnya) Burgvits 1935, *Bacterium lachrymans* Smith & Bryan 1915, *Chlorobacter lachrymans* (Smith & Bryan) Patel & Kulkarni 1951, *Phytomonas lachrymans* (Smith & Bryan) Bergey et al. 1923, *Pseudomonas lachrymans* f. *cucumis* Gorlenko 1961, *Pseudomonas burgeri* (Potebnya) Korobko & Nikiforuk 1972

分类地位: 细菌界(bacteria), 变形菌门(Proteobacteria),  $\gamma$ -变形菌纲(Gammaproteobacteria), 假单胞菌目(Pseudomonadales), 假单胞菌科(Pseudomonadaceae), 假单胞菌属(*Pseudomonas*)。

传播途径: 带菌种子是远距离传播的主要方式, 病菌由气孔、伤口、水孔侵入寄主, 通过灌水、风雨、气流、昆虫及农事作业在田间传播蔓延。

黄瓜细菌性角斑病菌的其他信息参见附录 A。

## 3 方法原理

根据黄瓜细菌性角斑病菌与抗体之间的特异性反应, 对黄瓜种子或产品进行 ELISA 检测; 根据该病菌 DNA 序列的多态性进行 PCR 特异性检测, 通过电泳条带大小进行结果判定。

## 4 仪器设备和主要试剂

### 4.1 仪器设备

酶标检测仪、生物显微镜、生物安全柜、高压灭菌锅、生化培养箱、离心机、PCR 仪、电泳设备、凝胶成像系统等。

### 4.2 主要试剂

除另有规定外, 所有试剂均为分析纯。PCR Premix、牛肉膏蛋白胨、胰蛋白胨、 $K_2HPO_4$ 、 $KH_2PO_4$ 、 $MgSO_4$ 、琼脂, ELISA 检测试剂见附录 B。

## 5 检疫鉴定方法

### 5.1 检测步骤

对叶片、幼苗等可直接进行 5.3 ELISA 或 5.4 PCR 检测, 对种子可进行 5.2 种植观察或直接进行

5.3 ELISA 或 5.4 PCR 检测。若结果为阳性,进行 5.5,对可疑菌株再进行 5.3 ELISA 及 5.4 PCR 检测确认,若仍为阳性最后进行 5.6 生物学接种。

## 5.2 种植观察

取 2 000 粒种子(重点挑取畸形、不成熟的种子)播于灭菌土中,18℃~26℃,相对湿度 75%以上,待长出 3~4 片叶后观察,若种植期间有发病幼苗,且表现出黄瓜角斑病苗期典型症状(参见附录 A),则可采集可疑病株进行 5.3 ELISA 或 5.4 PCR 检测。若该批次种植苗未表现症状,则采集无症状植株叶片分组,进行 5.3 ELISA 或 5.4 PCR 检测。

## 5.3 ELISA 检测

将种子、叶片或幼苗等进行 ELISA 检测,每个样品平行加到两个孔中。健康的植物组织作阴性对照,感染黄瓜细菌性角斑病菌的植物组织作阳性对照,样品提取缓冲液作空白对照,其中阴性对照种类和材料(如种子或叶片)应尽量与检测样品一致。

具体操作见附录 B。

## 5.4 PCR 检测

以菌株、叶片或种子的 DNA 为模板,采用特异性引物 PSL-F/PSL-R 对样品进行 PCR 检测,用黄瓜细菌性角斑病菌株作阳性对照,用非黄瓜细菌性角斑病菌的植物病原细菌作阴性对照,用无菌水作空白对照,扩增产物进行电泳分析。在阳性对照扩增片段大小为 179 bp 单带,阴性及空白对照无条带,样品扩增结果与阳性对照一致,可判定 PCR 检测结果为阳性。具体操作步骤和试剂配制见附录 C。

## 5.5 病原菌分离

具体操作步骤见附录 D。对纯化的可疑菌落进行 5.3 ELISA 及 5.4 PCR 检测。

## 5.6 生物学接种

采用刺伤喷雾接种,接种后塑料袋保湿 24 h,对照喷无菌水。

黄瓜:潜育期 5 d,黄瓜上表现为多角形水浸状病斑。

## 6 结果判定

经 5.3 ELISA 方法或 5.4 PCR 方法检测结果为阴性,可判定该样品不携带黄瓜细菌性角斑病菌。若检测结果为阳性,初步判定该样品携带黄瓜细菌性角斑病菌,需进行分离培养后检测确认。

样品经 5.5 病原菌分离培养后可疑菌落进行 5.3 及 5.4 检测结果为阳性,并经 5.6 生物学接种后显示典型症状,即可判定该样品携带黄瓜细菌性角斑病菌。若该部分检测结果为阴性,可判定该样品不携带黄瓜细菌性角斑病菌。

## 7 菌株保藏

分离并最终鉴定为黄瓜细菌性角斑病菌的菌株应转接到试管斜面上,经登记和经手人签字后置于 4℃低温冰箱中保存,定期(30 d~60 d)转接,必要时冻干后长期保存。



附 录 A  
(资料性附录)  
黄瓜细菌性角斑病菌其他信息

#### A.1 英文名

*Cucurbit angular leaf spot.*

#### A.2 分布

在世界各地均有分布,主要分布在世界上温暖,潮湿的地区。具体如下:

欧洲:奥地利、白俄罗斯、捷克、斯洛伐克、丹麦、南斯拉夫、法国、德国、英国、希腊、匈牙利、意大利、摩尔多瓦、荷兰、波兰、罗马尼亚、俄罗斯、瑞士、乌克兰。

亚洲:中国、印度、伊朗、以色列、日本、哈萨克斯坦、朝鲜、韩国、老挝、菲律宾、新加坡、塔吉克斯坦、泰国、土耳其、乌兹别克斯坦。

非洲:阿尔及利亚、埃及、加蓬、肯尼亚、南非、津巴布韦。

中美洲:马提尼克、瓜德罗普岛、尼加拉瓜、波多黎各、特立尼达、多巴哥。

北美洲:加拿大、美国。

南美洲:阿根廷、巴西、哥伦比亚、委内瑞拉。

大洋洲:澳大利亚、新西兰。

#### A.3 寄主范围

黄瓜(*Cucumis sativus*)、冬瓜(*Benincasa hispida*)、西瓜(*Citrullus lanatus*)、西印度黄瓜(*Cucumis auguria*)、甜瓜(*Cucumis melo*)、南瓜(*Cucurbita moschata*)、丝瓜(*Luffa acutangula*)、佛手瓜(*Sechium edule*)等。

#### A.4 危害症状

主要危害叶片、叶柄、卷须和果实,苗期至成株期均可受害。幼苗期子叶染病,开始产生近圆形水浸状凹陷斑,以后变褐色干枯。成株期叶片上初生针头大小水浸状斑点,病斑扩大受叶脉限制呈多角形,黄褐色,湿度大时,叶背面病斑上产生乳白色粘液,干后形成一层白色膜,或白色粉末状物,病斑后期质脆,易穿孔。茎、叶柄及幼瓜条上病斑水浸状,近圆形至椭圆形,后呈淡灰色,病斑常开裂,潮湿时瓜条上病部溢出菌脓,病斑向瓜条内部扩展,沿维管束的果肉变色,一直延伸到种子,引起种子带菌。病瓜后期腐烂,有臭味,幼瓜被害后常腐烂、早落。

#### A.5 菌体形态及培养特性

菌体短杆状相互连接呈链状,端生1~5根鞭毛,大小( $0.7\ \mu\text{m}\sim 0.9\ \mu\text{m}$ ) $\times$ ( $1.4\ \mu\text{m}\sim 2\ \mu\text{m}$ )有荚

SN/T 3424—2012

膜,无芽孢,革兰氏染色阴性。在金氏 B 平板培养基上,菌落白色,近圆或略呈不规则形,扁平,中央凸起,污白色,不透明,具同心环纹,边缘一圈薄且透明,菌落直径 5 mm~7 mm,外缘有放射状细毛状物,具黄绿色荧光。该菌属好气性,不耐酸性环境。生长适温 24 ℃~28 ℃,范围 4 ℃~39 ℃,48 ℃~50 ℃经 10 min 致死。

附 录 B  
(规范性附录)  
PTA-ELISA 检测

B.1 试剂

B.1.1 酶标抗体

碱性磷酸酯酶标记的黄瓜细菌性角斑病菌抗体。

B.1.2 底物

对硝基苯磷酸二钠(*p*NPP)。

B.1.3 PBST 缓冲液(洗涤缓冲液 pH7.4)

NaCl	8.0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g
KCl	0.2 g
吐温-20	0.5 mL

加入 900 mL 蒸馏水溶解,用 NaOH 或 HCl 调节 pH 值到 7.4,蒸馏水定容至 1 L。  
每升 PBS 中加入 0.5 mL 的吐温-20。

B.1.4 样品抽提缓冲液(pH7.4)

PBST	1 L
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	1.3 g
PVP (MW24 000~40 000)	20 g
NaN <sub>3</sub>	0.2 g

用 NaOH 或 HCl 调节 pH 值到 7.4。4℃ 储存。

B.1.5 包被缓冲液(pH9.6)

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1.59 g
NaHCO <sub>3</sub>	2.93 g
NaN <sub>3</sub>	0.2 g

加入 900 mL 蒸馏水溶解,用 HCl 调节 pH 值到 9.6,蒸馏定容至 1 L。4℃ 储存。

B.1.6 封闭缓冲液

脱脂干奶粉	5 g
PBST	100 mL

B.1.7 酶标抗体稀释缓冲液(pH7.4)

PBST	1 L
------	-----

## SN/T 3424—2012

BSA(牛血清白蛋白)或 脱脂奶粉 2.0 g  
用 NaOH 或 HCl 调节 pH 值到 7.4。4℃ 储存。

**B.1.8 底物(*p*NPP)缓冲液(pH 9.8)**

MgCl<sub>2</sub> 0.1 g  
NaN<sub>3</sub> 0.2 g  
二乙醇胺 97 mL

溶于 800 mL 蒸馏水中,用 HCl 调 pH 值至 9.8,蒸馏水定容至 1 L。4℃ 储存。

**B.2 程序****B.2.1 包被样品**

待测样品按 1:4(质量:体积)加入包被缓冲液,用研钵研磨成浆,轻微离心后上清液即为制备好的检测样品。健康的植物组织作阴性对照,感染黄瓜细菌性角斑病菌的植物组织作阳性对照,样品提取缓冲液作空白对照,酶联板中加入制备好的检测样品、空白对照、阴性对照、阳性对照,100 μL/孔,加盖,4℃ 冰箱孵育过夜,清空酶联板孔中溶液,PBST 洗涤 4~6 次。

**B.2.2 封闭**

在每一个检测孔中加入 200 μL 封闭缓冲液,将酶联板密封,在 37℃ 下孵育 1 h,清空酶联板孔中溶液,PBST 洗涤 4~6 次。

**B.2.3 加检测抗体**

用酶标抗体稀释缓冲液稀释探针抗体,在每个检测孔中加入 100 μL,将酶联板密封,在 37℃ 下孵育 2 h,清空酶联板孔中溶液,PBST 洗涤 4~6 次。

**B.2.4 加酶标抗体**

用酶标缓冲液稀释酶标抗体,在每个检测孔中加入 100 μL,将酶联板密封,在 37℃ 下孵育 1 h,清空酶联板孔中溶液,PBST 洗涤 4~6 次。

**B.2.5 加底物**

将底物 *p*NPP 加入到底物缓冲液中使终浓度为 1 mg/mL(现配现用),按 100 μL/孔,加入到酶联板中,室温避光孵育。

**B.2.6 读数**

用酶标仪在 30 min、1 h 和 2 h 于 405 nm 处读 OD 值。

**B.3 结果判定**

**B.3.1** 对照孔的 OD<sub>405</sub> 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,即:空白对照孔和阴性对照孔的 OD<sub>405</sub> 值<0.15,当阴性对照孔的 OD<sub>405</sub> 值<0.05 时,按 0.05 计算。阳性对照有明显的颜色反应,阳性对照 OD<sub>405</sub> 值/阴性对照 OD<sub>405</sub> 值>2,孔的重复性基本一致。

**B.3.2** 在满足了 B.3.1 质量要求后,结果原则上可判定如下:



样品  $OD_{405}$  值/阴性对照  $OD_{405}$  值明显  $>2$ , 判定为阳性。

样品  $OD_{405}$  值/阴性对照  $OD_{405}$  值在阈值附近, 判定为可疑样品, 需重复一次, 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。

若满足不了 B.3.1 质量要求, 则不能进行结果判定。

附 录 C  
(规范性附录)  
PCR 检测

### C.1 PCR 反应模板制备

对于种子、叶片等可直接用商业化植物总 DNA 提取试剂盒提取总 DNA, 菌株可直接将培养的菌株稀释成菌悬液( $>10^7$  CFU/mL)作为 PCR 反应模板。

### C.2 PCR 检测

#### C.2.1 检测引物

PSL-F: 5'-GTTTCGGCGACGCAATCAAT-3'

PSL-R: 5'-GTTGACTTCTTCGGCGG-3' 扩增片段为 179 bp。

#### C.2.2 PCR 反应体系

primer P1(20 $\mu$ mol/L)	1 $\mu$ L
primer P2(20 $\mu$ mol/L)	1 $\mu$ L
PCR Premix	12.5 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	9.5 $\mu$ L
DNA 模板	1 $\mu$ L

#### C.2.3 PCR 反应程序

94  $^{\circ}$ C/5 min; 94  $^{\circ}$ C/30 s, 57  $^{\circ}$ C/30 s, 72  $^{\circ}$ C/30 s, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C/8 min; 4  $^{\circ}$ C 保存。

注: 不同仪器可根据仪器要求将反应参数作适当调整。

#### C.2.4 琼脂糖凝胶电泳

制备 2% 的琼脂糖凝胶, 按比例混匀电泳上样缓冲液和 PCR 扩增产物, 用 DNA Marker 作为相对分子质量标记, 进行电泳分析, 电泳结束后在凝胶成像仪的紫外透射光下观察是否扩增出预期的特异性 DNA 条带, 并拍摄记录。

## 附 录 D

### (规范性附录)

#### 黄瓜细菌性角斑病菌分离培养

##### D.1 NA 培养基

牛肉膏蛋白胨 3 g,胰蛋白胨 5.0 g,琼脂 15.0 g,水( $\text{H}_2\text{O}$ )1 000 mL。调整 pH 值至 6.6~7.0,121 ℃湿热灭菌 15 min。

##### D.2 分离培养、纯化

用灭菌剪刀剪取病变组织(叶片、茎秆、果实)上的病健交界处,在 70%酒精或含有效氯 1%的次氯酸钠溶液中表面消毒 50 s~60 s,无菌水清洗 3 次,然后将其移至灭菌培养皿中,加 5~10 滴无菌水,用灭菌镊子和剪刀将病组织捣碎,静置 5 min~10 min,即制成组织液,在 NA 培养基平板(直径 90 mm)上划线分离,至少 3 个平板。对于种子,可以 4 ℃无菌水过夜浸泡液直接涂板或划线。

经划线分离的平板在 26 ℃培养 72 h 后观察是否有直径 1 mm~1.5 mm,白色,有光泽,圆形,边缘整齐的可疑菌落产生。

挑取可疑单菌落进行分离纯化,转接 2~3 次。

---