



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3965—2014

桃色欧文氏菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Erwinia persicina* Hao et al.

2014-04-09 发布

2014-11-01 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。

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：中华人民共和国广东出入境检验检疫局、江西农业大学。

本标准主要起草人：冯黎霞、崔汝强、何日荣、武目涛、王卫芳、钟国强。

桃色欧文氏菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了进出境植物检疫中桃色欧文氏菌的检疫鉴定方法。

本标准适用于可能携带桃色欧文氏菌的水果、种子以及苗木等繁殖材料的检疫和鉴定。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

SN/T 1809 进出境植物种子检疫规程

3 方法原理

桃色欧文氏菌(*Erwinia persicina* Hao et al.)属肠杆菌科(Enterobacteriaceae)、欧文氏菌属(*Erwinia*)。该病菌可以通过种子进行远距离传播。该病菌的生物学、生理生化和分子生物学特性是制定本标准的主要依据(见附录A)。

4 仪器设备和用具

4.1 仪器设备

生物显微镜、超净工作台、高压灭菌器、离心机、超低温冰箱、常规冰箱、恒温培养箱、PCR仪、电泳设备及其他常规实验室设备。

4.2 用具

剪刀、解剖刀、接种针(环)、镊子、玻棒、培养皿、酒精灯、三角烧瓶、量筒、移液器。

5 主要试剂

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/T 6682中一级水的规格。桃色欧文氏菌所用的培养基配方和试剂详见附录B和附录C。

6 检疫鉴定方法

6.1 田间调查和植株检验

田间调查时采集具可疑症状的植株或果实带回实验室,用清水清洗干净,切取病健交界部位的组织,用灭菌水冲洗1次,75%乙醇消毒60s,无菌水冲洗3次,然后将其移至灭菌培养皿中,加少量无菌

水,用无菌玻棒挤压或用无菌剪刀将其剪碎,用接菌环蘸取菌液划线接种于 NA 培养基平板上,28℃ 培养 48 h。挑取优势单菌落进行纯化。

6.2 种子处理

对来自桃色欧文氏菌发生国家和疫区(见附录 A)的种子,按照 SN/T 1809 的规定进行检疫抽样。随机选取种子 15 g~100 g 浸泡在无菌水中(按 1:5 质量体积比),4℃ 过夜,并用无菌水清洗种子 2 次,将浸泡液和洗液一并回收至离心管中,然后在 4℃ 下 6 000g 离心 10 min,去上清液,沉淀悬浮于 2 mL 灭菌水中,分别稀释 10^1 、 10^2 、 10^3 倍后在 1/5 NA 培养基上涂平板。28℃ 培养 24 h~72 h,每天观察菌落生长状况,纯化单菌落。或者取每份种子 1 000 粒用无菌水保湿培养种植于温室或光照培养箱中,生长温度为 25℃~28℃,相对湿度大于或等于 70%,种子出苗后一周观察植株感病情况。病变组织处理和病原菌分离培养参照 6.1。

6.3 病原菌的分离培养

根据附录 A 桃色欧文氏菌在 NA 培养基上的菌落特征,挑取可疑的单菌落,在 KB 培养基或 NA 培养基上划线纯化,28℃ 培养 24 h~48 h,对可疑分离物的菌落特征进行观察和描述记载,并按照 6.4、6.5、6.6 步骤操作。

6.4 致病性测定

分离纯化的菌株在 NA 平板上 28℃ 培养 48 h 后,用无菌水配成 10^6 CFU/mL~ 10^8 CFU/mL 的新鲜菌悬液,通过针刺或注射等方法接种健康寄主,用无菌水接种健康植株叶片做阴性对照。置于光照培养箱内,26℃,相对湿度 80%,光照 12 h,每天观察发病情况。

6.5 生理生化测定

将可疑分离物菌株进行生理生化试验,具体生理生化指标见附录 A。

6.6 PCR 检测

对可疑菌株进行 PCR 检测,以桃色欧文氏菌标准菌株作阳性对照,以双蒸水作空白对照,进行 PCR 扩增,扩增产物进行电泳分析。若可疑菌株与阳性对照扩增有 253 bp 条带,空白对照无条带,回收特异性片段进行测序,并利用 Blast 进行序列比对分析。

7 结果判定

所分离的细菌菌株菌落特征与描述相符,且至少采用致病性测定(见 6.4)、生化试验(见 6.5)、分子生物学(见 6.6)其中两种以上方法的鉴定、复核,结果为阳性者,判定为检出桃色欧文氏菌;否则为未检出。

8 样品保存

8.1 样品保存与处理

样品经登记和经手人签字后妥善保存。对检出桃色欧文氏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应经高压灭菌后方可处理。

8.2 菌株保存与处理

从检测样品中分离并鉴定为桃色欧文氏菌的菌株,应妥善保存。将菌株接种于 KB 培养基斜面上, 28 ℃ 培养 48 h, 然后 4 ℃ 冰箱保存, 或液体培养至对数生长期, 加入 20% 灭菌甘油并混匀, -80 ℃ 长期保存或用安瓿管冷冻干燥长期保存。对不需要长期保存的菌株应及时高压灭菌处理。

9 结果资料与记录保存

完整的实验记录包括样品来源、种类、时间, 实验的时间、地点、方法和结果等, 并要有检测人员、审核人员的签字。生物学测定需要症状、菌落培养等照片, PCR 检测需要电泳照片和序列测定结果。

SN/T 3965—2014

附录 A

(规范性附录)

桃色欧文氏菌其他信息

A.1 名称

学名:*Erwinia persicina* Hao et al.

异名:*Erwinia persicinus* Hao et al., *Erwinia nulandii* Schuster et al.

A.2 症状特征

豌豆:桃色欧文氏菌可引起豌豆叶片及卷须褪绿坏死,叶片背面有褐色坏死枯斑,有明亮光泽。

菜豆:可造成植株萎蔫,叶片沿叶脉变色、黄化,有坏死斑,在叶片背部有坏死斑点,叶片往往卷曲、畸形,叶片上有明显的疱状突起。在豆荚和种子上有坏死斑点。

番茄:叶片沿叶脉变色、坏死、干枯,植株茎秆产生不定根。在发病初期,叶片和茎秆上有很小的紫色斑点,叶背部出现银色坏死斑。

瓜类:叶片有疱状突起,植株叶片沿叶脉变色、坏死、干枯,植株藤上有损伤病斑。在发病初期,感病植株叶背部出现银色坏死斑,叶片向内卷曲,茎秆上生满不定根,尤其是根部。

A.3 寄主范围

菜豆(*Phaseolus vulgaris*)、豌豆(*Pisum sativum*)、棉花(*Gossypium* spp.)、葱(*Allium fistulosum*)、茄子(*Solanum melongena*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)、黄瓜(*Cucumis sativus*)、香蕉(*Musa paradisiaca*)、水稻(*Oryza sativa*)、玉米(*Zea mays*)、紫花苜蓿(*Medicago sativa*)等作物。

A.4 分布

美国、日本、西班牙、澳大利亚等国家和地区。

A.5 病原菌培养形状及形态特征

细胞为直杆状,菌体大小为 $(0.5\ \mu\text{m}\sim 1.0\ \mu\text{m})\times(1.0\ \mu\text{m}\sim 3.0\ \mu\text{m})$ 。革兰氏染色阴性,无芽孢,无荚膜,兼性厌氧型,能运动。最适生长温度为 $28\ ^\circ\text{C}\sim 30\ ^\circ\text{C}$, $36\ ^\circ\text{C}$ 能生长,能在5%NaCl营养肉汤中生长。在NA培养基上菌落小,呈桃红色或黄色,圆形,表面凸起,光滑不透明,边缘整齐。

A.6 生理生化特性

发酵型,能从葡萄糖、阿拉伯糖、乳糖、棉籽糖、鼠李糖、甘露醇、蔗糖、甘油产酸,不能从木糖、肌醇、松三糖、苦杏仁苷产酸。氧化酶阴性,接触酶阳性。还原硝酸盐。不能液化明胶,不产生吡啶、精氨酸双水解酶、苯丙氨酸脱氨酶以及脲酶。V-P 阳性,ONPG 阳性。水解酪蛋白。能利用柠檬酸盐。

附录 B

(规范性附录)

桃色欧文氏菌常用的培养基配方

B.1 1/5 NA 培养基(pH 7.2)

蛋白胨 10.0 g,牛肉膏 0.2 g,酵母粉 0.4 g,氯化钠(NaCl)1.0 g,琼脂 17.0 g,蒸馏水 1 000 mL,121 ℃ 湿热灭菌 20 min。

B.2 NA 培养基(pH7.2)

蛋白胨 10.0 g,牛肉膏 3.0 g,酵母粉 0.4 g,氯化钠(NaCl)5.0 g,琼脂 17.0 g,蒸馏水 1 000 mL,121 ℃ 湿热灭菌 20 min。

B.3 KB 培养基(pH7.2)

蛋白胨 20.0 g,甘油 10.0 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 15.0 g,蒸馏水 1 000 mL,121 ℃ 湿热灭菌 20 min。

B.4 5%营养肉汤(pH7.2)

牛肉膏 3.0 g,蛋白胨 5.0 g,氯化钠(NaCl)5.0 g,蒸馏水 1 000 mL,121 ℃ 湿热灭菌 20 min。

附 录 C
(规范性附录)
PCR 检测方法

C.1 PCR 反应模板制备

称取感病的植物组织 100 mg,放入离心管中,加入 1 mL 双蒸水振荡洗涤 10 min 后,吸取上清液,4 000g 离心 5 min,去上清液,加入 100 μL 双蒸水和 900 μL 0.1%的吐温-80,于 100 ℃水浴中煮沸 8 min,取上清液作为模板 DNA。

或者直接用培养的菌株稀释悬浊液作为模板进行 PCR 反应。待检测菌落经 28 ℃振荡培养 24 h 后,取菌液 1 mL,4 000g 离心 5 min,去上清液,加入双蒸水 100 μL,于 100 ℃水浴中煮沸 8 min,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液作为模板 DNA。

C.2 PCR 检测

C.2.1 检测用引物

参考 1. Gehring (2012) 发表的引物序列 recA-5/recA-5c。引物序列为: recA-5 (5'-GTCAT-CATCGTCTCGACTCCGTA-3'), recA-5c (5'-CCAGACGGACAGAAGCGTAG-3'), 扩增产物 253 bp。

C.2.2 PCR 反应体系

PCR 反应体系见表 C.1。

表 C.1 PCR 反应体系

试剂名称	体积
10×PCR 反应缓冲液	2.5 μL
dNTPs (2.5 mmol/L)	1 μL
引物 recA-5 (10 mmol/L)	1 μL
引物 recA-5c (10 mmol/L)	1 μL
Taq DNA 聚合酶(5 U/L)	0.5 μL
DNA 模板	0.5 μL
补 ddH ₂ O 至	25 μL

C.2.3 PCR 反应程序

95 ℃/3 min; 94 ℃/30 s, 63 ℃/30 s, 72 ℃/30 s, 共 10 循环; 94 ℃/30 s, 58 ℃/30 s, 72 ℃/30 s, 20 循环; 72 ℃/10 min。

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 PCR 反应扩增产物的检测

将 5 μL PCR 产物用 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离,经 DNA 染料染色后于紫外凝胶成像系统下根据扩增产物的大小判定结果,并拍照,记录实验结果。PCR 产物经纯化后,送生物公司测序。PCR 产物测序,测序结果与 GenBank 中的已知序列进行 Blast 比较。

参 考 文 献

- [1] Brenner D J, Krieg N R, Staley J T. *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2nd ed.) [M]. USA: Springer, 2005: 670-678.
- [2] Brenner D J, Rodrigues N J, Steigerwalt A G, et al. "*Erwinia nolandii*" is a subjective synonym of *Erwinia persicinus* [J]. *International Union of Microbiological Societies*, 1994, 44(2): 282-284.
- [3] González A J, Tello J C, M de Cara. First report of *Erwinia persicina* from *Phaseolus vulgaris* in Spain [J]. *Plant Disease*, 2005, 89(1): 109.
- [4] González A J, Tello J C, Rodicio M R. *Erwinia persicina* causing chlorosis and necrotic spots in leaves and tendrils of *Pisum sativum* in Southeastern Spain [J]. *Plant Disease*, 2007, 91(4): 460.
- [5] Hao M V, Brenner D J, Steigerwalt A G, et al. *Erwinia persicinus*, a new species isolated from plants [J]. *International Union of Microbiological Societies*, 1990, 40(4): 379-383.
- [6] I. Gehring, K. Geider. Identification of *Erwinia* species isolated from apples and pears by differential PCR [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2012, (89): 57-62.
-