



中 华 人 民 共 和 国 农 业 行 业 标 准

NY/T 2286—2012

番茄溃疡病菌检疫检测与鉴定方法

Detection and identification for *Clavibacter michiganensis* subsp.
michiganensis(Smith)Davis et al.

2012-12-24发布

2013-03-01实施

中 华 人 民 共 和 国 农 业 部

发 布

前 言

本标准按照GB 1.1给出的规则起草。

本标准由农业部种植业管理司提出。

本标准由全国植物检疫标准化技术委员会(SAC/TC 271)归口。

本标准起草单位：全国农业技术推广服务中心、贵州省植保植检站、贵州省植物保护研究所。

本标准主要起草人：王福祥、张忠民、袁洁、熊红利、吴石平、杨学辉、江兆春、耿坤、郑松、毛东、刘新。

番茄溃疡病菌检疫检测与鉴定方法

1 范围

本标准规定了农业植物检疫中番茄溃疡病菌检疫检测及鉴定的技术方法。
本标准适用于番茄溃疡病菌的检疫检测及鉴定。

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(冠括所有的**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 15569 农**业植 物**调运检疫规程

3 术语和定义

下列术语和**定 义**适用于本**文件**。

3.1

鸟眼斑 **bird's eye spots**

番茄溃疡病菌侵染番茄果实后，果实上出现圆 形，中央浅褐色、边缘为白色晕圈，形似鸟眼状的病斑。

3.2

溃疡斑 **Canker**

番茄溃疡病菌侵染番茄植株后，茎和叶柄上出现褐色条斑，下陷，病斑开裂而露出黄色至红褐色粉状的髓腔的**典型** 溃疡症状

4 原理

番茄溃疡病是一种维管束系统病害，从番茄育苗到收获期均可发生。番茄溃疡病菌主要以带菌种子远距离传播。病种子(病 果实或病残体为初侵染源，通过种子、伤口或植株表皮的水孔等自然孔口侵入植株，造成局部侵染或系统侵染。植株和果实被侵染后，分别出现“溃疡斑和“鸟眼斑”的典型为害症状。该病原菌为害番茄的典型症状、菌落特征、酶联免疫双抗体夹心法(DAS-ELISA) 以及聚合酶链式反应(PCR)检测结果是**鉴定该病菌的依据**。

5 试剂与材料

碳酸氢钠(NaHCO₃)、 碳酸钠(Na₂CO₂)、 叠 氮 化 钠(NaN₂)、 无水磷酸氢二钠(Na₂HPO₄)、 氯化钾 (KCl)、无水磷酸二氢钾(KH₂PO₄)、 无 水 磷 酸 氢 二 钾(KH₂PO₄)、 氯 化 钠(NaCl)、 无水亚硫酸钠 (Na₂SO₃) 、 氯化镁(MgCl₂) 、七水硫酸镁(MgSO₄·7H₂O) 、 硼酸(H₃BO₄) 等。

DAS-ELISA 检测试剂(包被抗体、酶标抗体、包被缓冲液、PBST 洗涤液、样品提取缓冲液、酶标抗体缓冲液、底物对硝基苯磷酸二钠、底物缓冲液、终止液)与mSCM 选择培养基制备方法参见附录B。

除另有规定，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。

6 仪器及用具

PCR 仪、电泳仪、凝胶成像系统、酶标仪、恒温震荡仪、台式离心机、高压灭菌器、超净工作台、生化

培养箱、电子天平及其他用于病害研究的实验室必备用具。

7 取样方法

7.1 田间植株取样

苗期至收获期如在田间发现疑似症状(参见附录A),采集病部3份~5份送实验室鉴定。如未发现疑似症状植株采用随机选点取样,每个点采集3个以上样品,样品注明采集时间、地点、采集人等信息。送实验室检验。

7.2 调运种子和果实取样

散装或包装调运的番茄果实、种子,按GB 15569进行取样,送实验室检验。

8 检疫鉴定

8.1 症状鉴定

直接观察样品是否具有番茄溃疡病典型症状(参见附录A)。

8.2 病原菌菌落特征鉴定

病原菌菌落特征鉴定方法见附录C。

8.3 酶联免疫吸附测定法

酶联免疫吸附测定法参见附录D。如采用市售的试剂盒,按说明操作。

8.4 PCR 检测

PCR 检测鉴定方法参见附录E。如采用市售的试剂盒,按说明操作。

9 结果判定和报告

9.1 结果判定

9.1.1 根据症状进行结果判定

表现的症状完全符合番茄溃疡病典型症状的样品,判定为番茄溃疡病病菌。

9.1.2 室内鉴定结果判定

当植株或种子样品上表现的症状不典型时,需进行以下检测并根据检测结果判定样品是否带有番茄溃疡病病菌

9.1.2.1 根据菌落特征鉴定结果判定

分离的病原菌在选择性培养基上的菌落特征符合C.3 描述的典型特征,且革兰氏染色为阳性的样品,判定为样品带番茄溃疡病病菌。

9.1.2.2 根据酶联免疫吸附法鉴定结果判定

在阴性对照OD 值 ≤ 0.1 ,且阳性对照OD 值大于阴性对照OD 值2倍的前提下,样品孔OD 值大于阴性对照OD 值2倍时,判定为阳性反应,即样品带番茄溃疡病病菌。

9.1.2.3 根据PCR 检测结果判定

观察电泳结果，在阳性对照在268 bp处有条带出现，且阴性对照无条带出现的前提下，待测样品在268 bp处有条带出现，判断样品带番茄溃疡病病菌。

9.1.2.4 综合结果判定

当情况复杂时可进行综合判定，以上3种室内鉴定方法中有两种鉴定结果为阳性时，可判定为番茄溃疡病病菌。

9.2 结果报告

将实验室检验鉴定结果填入《植物有害生物样本鉴定报告》（见附录F）。

10 除害处理

检验过程中使用的有关材料和用具，在使用完毕后须进行消毒和除害处理。经检疫鉴定后的种子样品应保存在4℃冰箱内，叶片和果实样品应保存在-20℃以下或冻干保存三个月；保存期满后，进行灭活处理。

附录 A (资料性附录)

番茄溃疡病基本信息

A.1 学名和分类地位

学名 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al., 简称: CMM。

分类地位: 属厚壁菌门的微杆菌科 (Microbacteriaceae), 棒形杆菌属 (*Clavibacter*)。

A.2 典型症状

A.2.1 果实: 番茄溃疡病菌侵染番茄果实后, 果实上出现圆形病斑, 中央浅褐色, 边缘有白色晕圈, 病斑直径 3 mm, 形似鸟眼状。许多小病斑可联合成不规则的斑块, 见图A.1。

A.2.2 植株: 番茄溃疡病菌侵染番茄植株后, 通常是一侧先发病, 叶片边缘坏死、叶片萎蔫至枯死、植株矮化、茎秆开裂, 茎和叶柄上出现褐色条斑, 下陷, 病斑开裂而露出黄色至红褐色粉状的髓腔, 形成典型溃疡症状, 见图A.2。



图A.1 番茄溃疡病果实上的典型症状



图A.2 番茄溃疡病在茎秆上的典型症状

A.3 寄主范围

自然寄主主要是番茄、龙葵、裂叶茄和其他茄科植物。接种可发病的寄主有乳茄、马铃薯、醋栗番茄、树番茄、心叶烟等。此外, 还有小麦、大麦、黑麦、燕麦、向日葵、西瓜、黄瓜等。

A.4 病原形态及生物学特性

该病原细菌为好氧细菌，革兰氏染色阳性，菌体短杆状或棍棒形，无鞭毛，无芽孢。细胞大小为 $0.4\mu\text{m}\sim 0.7\mu\text{m}\times 0.7\mu\text{m}\sim 1.2\mu\text{m}$ ，以单个或成对方式存在。碳水化合物氧化代谢，硝酸盐还原阴性，脲酶阴性，明胶液化缓慢，水解七叶苷，水解淀粉能力很弱或不水解。生长需要氨基酸、生物素、烟酸和硫胺素。最适生长温度是 $24^{\circ}\text{C}\sim 27^{\circ}\text{C}$ ，最高 35°C 。在土豆片上生长的菌落为橘黄色。在普通523细菌培养基上 28°C 培养，72 h后出现针尖状菌落，96 h菌落直径达1 mm，1周后菌落圆形，略隆起，全缘不透明，

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：

<https://d.book118.com/237143036103006136>