

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2602—2010

根癌土壤杆菌的检测鉴定方法

Detection and identification of *Agrobacterium tumefaciens*
(Smith et townsend 1907) Conn 1942

2010-05-27 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



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：中华人民共和国山东出入境检验检疫局，中华人民共和国天津出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：厉艳、王英超、吴兴海、邵秀玲、甘琴华、刘鹏。

根癌土壤杆菌的检测鉴定方法

1 范围

本标准规定了进出境植物检疫中根癌土壤杆菌检测鉴定方法。
本标准适用于进出境植物及其产品上根癌土壤杆菌的检测鉴定。

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 4789.28—2003 食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂

3 原理

根癌土壤杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et townsend 1907) Conn 1942, 属原核生物界 (Procarvocytes), 薄壁菌门 (Gracilicutes), 根瘤菌科 (Rhizobiaceae), 土壤杆菌属 (*Agrobacterium*)。该病菌的形态特征、生物学特性、生化特性、致病性以及 PCR 特异性反应等是本标准检疫鉴定的依据。

4 仪器和用具

生物显微镜、体视显微镜、超净工作台、电子天平、光照恒温培养箱、恒温振荡培养箱、高压灭菌器、培养皿(直径:7.5 cm)、恒温水浴锅(30℃~95℃)、高速冷冻离心机(18 000 r/min 以上)、BIOLOG 鉴定仪、PCR 仪、电泳装置(电泳仪、水平电泳槽)、凝胶成像分析仪、微量可调加样器(2 μL、10 μL、20 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL)。

5 主要试剂

蛋白胨、双氧水(H₂O₂)、甘露醇、酵母膏、硫酸镁(MgSO₄·7H₂O)、琼脂粉、甘油、升汞、盐酸、次氯酸钠、乙二胺四乙酸(EDTA)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、十二烷基硫酸钠(SDS)、液氮、三氯甲烷、异戊醇、异丙醇、琼脂糖(电泳用)、溴化乙锭、TaqDNA 聚合酶、磷酸氢二钾(K₂HPO₄)、磷酸二氢钾(KH₂PO₄)、磷酸氢二钠(Na₂HPO₄·12H₂O)、磷酸二氢铵(NH₄H₂PO₄)、氯化钙(CaCl₂)、氯化钠(NaCl)、氯化钾(KCl)、10×PCR 缓冲液、10×dNTP 液、蒸馏水、牛肉浸膏、盐酸二甲基对苯撑二胺、95%乙醇等。

6 检测鉴定方法

6.1 病原菌的分离

6.1.1 植株中病原菌的分离

对植株进行分离时应选用瘿瘤或疑似瘿瘤,尽量选用白色幼嫩瘿瘤。先将瘿瘤或疑似瘿瘤洗净,去

除腐烂组织,再取表层组织切成小块约 4 mm³,用无菌水洗 3 次,置于灭菌培养皿内滴加 0.5 mL~1 mL 无菌水,压碎并静置 30 min 后,在酵母甘露醇琼脂培养基或营养琼脂培养基上划线分离。

6.1.2 介质土中病原菌的分离

对待测介质土进行分离时先取土样用无菌水配成悬浮液,待土粒沉降后,取上部的悬浮液离心浓缩后,在酵母甘露醇琼脂培养基或营养琼脂培养基上划线分离。

6.2 分离菌的纯化

将接种后的平板置于 25℃~28℃ 培养箱中培养 48 h,检查菌落情况。根据附录 A 中菌落在培养基上的菌落特征,挑取可疑的单个菌落,在平板上进行分离纯化,然后进行下一步鉴定。

6.3 分离菌的鉴定

6.3.1 革兰氏染色反应

按 GB/T 4789.28—2003 中的 2.2 进行革兰氏染色实验,并观察菌体形状。

如果染色结果为革兰氏阴性菌,且菌体形状为杆状,则继续进行下一步工作。否则排除可疑菌落。

6.3.2 生理生化测定

分离菌的生理生化测定,可结合实验室条件,选用以下任一方法进行:

- 分离菌的生理生化测定。*A. tumefaciens* 的主要生理生化特征参见附录 B。如果分离菌的生理生化特征测定结果与 *A. tumefaciens* 相符合,可据此判定生理生化鉴定结果为阳性。
- 应用 BIOLOG 细菌自动鉴定系统鉴定分离菌。按 BIOLOG 规定的操作方法进行,如果鉴定结果为 *A. tumefaciens*,则判定该分离菌 BIOLOG 鉴定结果为阳性。

6.3.3 PCR 法检测

从分离培养的细菌菌株中提取核酸,进行 PCR 检测和电泳分析。以提取的待测菌株的核酸为模板 DNA,用 *A. tumefaciens* 标准菌株的核酸做阳性对照,用非 *A. tumefaciens* 的植物细菌核酸做阴性对照,用双蒸水代替模板 DNA 作为空白对照,进行 PCR 扩增,扩增产物进行电泳分析。如果测试菌株的 PCR 产物与阳性对照一致,则判定该菌株 PCR 鉴定结果为阳性,PCR 检测方法见附录 C。

6.3.4 致病性测定

将待测菌株配成 10⁸ CFU/mL 的菌悬液,用无菌水作空白对照。注射接种于健康的落地生根 (*Bryophyllum* sp.) 植物的茎秆和叶片上,接种点用灭菌的脱脂棉蘸灭菌水保湿 1 d~2 d,于 20℃~27℃ 温室中培养 3 周,*A. tumefaciens* 在茎秆和叶片上产生肿瘤,同时在茎秆产生肿瘤的部位有少量气生根;将发病的落地生根按照 6.2 的方法分离得到的病原菌与标准菌株的培养特征一致,则判定结果为阳性。

7 结果判定

若分离的细菌菌株,其菌落形态特征与描述相符,符合革兰氏染色阴性的结果和菌体形状为杆状、符合生理生化指标或 BIOLOG 鉴定结果或 PCR 鉴定结果为阳性,且致病性测定结果为阳性,可以判定检出根癌土壤杆菌。

8 结果复核

必要时由专家对检测结果进行复核。

9 菌种的保存

分离并最终鉴定为病原细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℃左右冰箱中保存,定期(30 d~60 d)转接,以防止病菌死亡;必要时冻干后长期保存。

附 录 A

(规范性附录)

根癌土壤杆菌常用的培养基配方

A.1 酵母甘露醇琼脂(YEM)

甘露醇 10.0 g, 酵母膏 3.0 g, 氯化钠 0.2 g, 硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.2 g, 磷酸氢二钾($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 0.5 g, 琼脂 17.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, 调整 pH 至 7.2, 121 °C 湿热灭菌 15 min。

A.2 营养琼脂

牛肉浸膏 1.0 g, 酵母膏 2.1 g, 蛋白胨 5.0 g, 氯化钠 5.0 g, 琼脂 17.0 g, 蒸馏水 1 000.0 mL, 调整 pH 至 7.4, 121 °C 湿热灭菌 15 min。

A.3 菌落形态特征

根癌土壤杆菌在 A.1 或 A.2 培养基上形成圆形、隆起、粘稠菌落, 边缘完整, 具有光泽, 半透明, 呈灰白色至淡灰棕色。

附 录 B
(资料性附录)
根癌土壤杆菌相关资料

B.1 学名

Agrobacterium tumefaciens (Smith et townsend 1907) Conn 1942

B.2 分布

分布极广,五大洲均有报道。阿尔及利亚、埃及、埃塞俄比亚、肯尼亚、利比亚、马拉维、摩洛哥、莫桑比克、罗得西亚、塞舌尔、索马里、南非、坦桑尼亚、乌干达、赞比亚、阿富汗、中国、印度、印度尼西亚、伊朗、以色列、日本、朝鲜、黎巴嫩、马来西亚、沙特阿拉伯、斯里兰卡、叙利亚、土耳其、原苏联、澳大利亚、夏威夷、新西兰、奥地利、亚速尔群岛、比利时、英国、保加利亚、塞浦路斯、捷克和斯洛伐克、丹麦、芬兰、法国、德国、希腊、匈牙利、意大利、荷兰、挪威、波兰、罗马尼亚、西班牙、瑞典、瑞士、爱沙尼亚、乌克兰、北高加索、前南斯拉夫、百慕大、加拿大、墨西哥、美国、古巴、法属安的列斯群岛、瓜德罗普、牙买加、波多黎各、阿根廷、玻利维亚、巴西、哥伦比亚、智利、圭亚那、秘鲁、乌拉圭、委内瑞拉。

B.3 寄主范围

危害苹果属 *Malus* spp.、梨属 *Pyrus* spp.、山楂属 *Crataegus* spp.、李属 *Prunus* spp.、蔷薇属 *Rosa* spp.、丁香属 *Syringa* spp.、柑橘属 *Citrus* spp.、柿树属 *Diospyros* spp.、山茶属 *Camellia* spp.、杨属 *Populus* spp.、柳属 *Salix* spp.、核桃属 *Juglans* spp.、板栗属 *Castanea* spp.、悬钩子属 *Rubus* spp.、葡萄属 *Vitis* spp.、菊属 *Dendranthema* spp.、冷杉属 *Abies* spp.、铁苋菜属 *Acalypha* spp.、槭属 *Acer* spp.、猕猴桃属 *Actinidia* spp.、桦木属 *Betula* spp.、山茶属 *Camellia* spp.、龙舌兰 *Agave salmiana*、臭椿 *Ailanthus altissima*、油橄榄 *Olea europea*、无花果 *Ficus carica*、油梨 *Persea americana* 等至少包括 93 个科的 331 个属内的 643 个不同种的植物。

B.4 分类地位及生理生化特性

根癌土壤杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et townsend 1907) Conn 1942, 属原核生物界 (Prokaryotes), 薄壁菌门 (Gracilicutes), 根瘤菌科 (Rhizobiaceae), 土壤杆菌属 (*Agrobacterium*)。菌体短杆状, 无芽孢, 能形成荚膜, 大小为 $(0.6\ \mu\text{m} \sim 1.0\ \mu\text{m}) \times (1.5\ \mu\text{m} \sim 3.0\ \mu\text{m})$ 单生或双生。以 1 根 ~ 6 根周生鞭毛运动。好气性, 氧是最终的电子受体, 代谢类型为呼吸型。革兰氏染色阴性, 过氧化氢酶阳性, 氧化酶和尿素酶阳性, 利用氨基酸、硝酸盐和铵盐作为唯一氮源, 产生 3-酮乳糖。不液化明胶; 凝固牛乳但不胨化; 还原石蕊牛乳变蓝; 对硝酸盐轻微还原; 在葡萄糖、果糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露醇、水杨酸上微产酸, 但不产气; 不水解淀粉。

B.5 传播方式

以带菌苗木或带菌土壤进行远距离传播; 以土壤飞扬、水流等进行近距离传播。

B.6 植株症状

观察植株根部是否有瘿瘤。瘿瘤大多发生在土表下的根冠处,瘿瘤初期呈圆形、白色、光滑。多年生木本植物的瘿瘤往往木质化,并随年龄而产生裂缝,瘿瘤最大直径可达 10 cm 以上,有时能环剥茎秆,根部的瘿瘤与茎部相似,但通常较小。

B.7 根癌土壤杆菌实验室接种落地生根后的症状

根癌土壤杆菌接种落地生根后的症状见图 B.1。
接种无菌水后的落地生根见图 B.2。

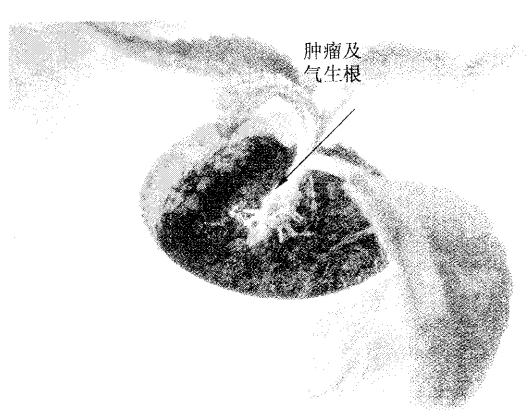


图 B.1 根癌土壤杆菌接种落地生根后的症状

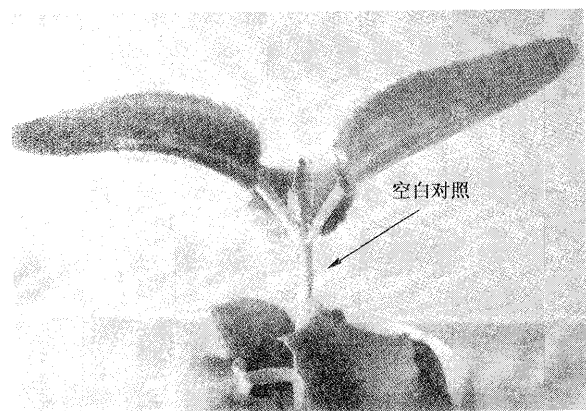


图 B.2 接种无菌水后的落地生根

B.8 植株(1年半生苹果苗)根部危害症状

侵染植株后根部症状见图 B.3。

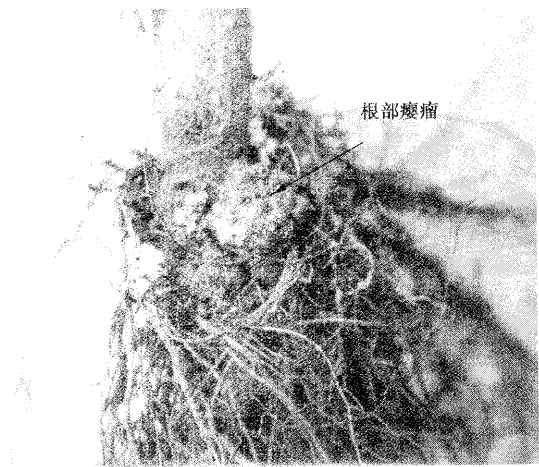


图 B.3 *A. tumefaciens* 侵染植株后根部症状

附录 C

(规范性附录)

根癌土壤杆菌的 PCR 检测方法

C.1 试剂制备

20 mmol/L Tris-HCl(pH8.0), 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L 氯化钠, 0.5 mmol/L Triton X-100。

C.2 DNA 提取

刮取约 1 mm² 菌斑, 放入 0.5 mL 的 Eppendorf 管中, 加入 100 μ L 细菌 DNA 抽提液(20 mmol/L Tris-Cl(pH8.0), 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L 氯化钠, 0.5 mmol/L Triton X-100), 100 $^{\circ}$ C 处理 2 min, 冰浴 2 min, 10 000 r/min 离心 12 min, 取上清液作为细菌模板 DNA 备用。

C.3 PCR 检测

C.3.1 引物及待扩增 DNA

PCR 扩增的 DNA 样品包括待检测 DNA、阳性对照根癌土壤杆菌 DNA。特异性引物一对, 序列为:

CYT1: 5'-GATCCCGTCCAATGCTGT-3'

CYT2: 5'-GATATCCATCGATCTCTT-3'

C.3.2 反应体系及扩增条件

利用上述引物, 将待测扩增 DNA 样进行 PCR 扩增。扩增时, 设置双蒸水为空白对照, 并按以下 PCR 反应体系(50 μ L)进行 PCR 扩增: 3 μ L 模板 DNA(1 ng/ μ L~10 ng/ μ L), 1 μ L 10 mmol/L dNTP, 5 μ L 10 \times PCR 缓冲液, 3 μ L 25 mmol/ μ L Mg²⁺, 10 pmol/ μ L 的正、反向引物各 1 μ L, 后加入 1 U TaqDNA 酶, 然后加双蒸水至 50 μ L。

扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C, 45 s; 52 $^{\circ}$ C, 80 s; 72 $^{\circ}$ C, 90 s。扩增 33 个循环, 然后以 72 $^{\circ}$ C, 10 min 的条件进行扩增。扩增产物置于一20 $^{\circ}$ C 保存备用。

C.3.3 琼脂糖凝胶电泳

用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 电泳结束后, EB 染色, 凝胶成像系统观察、拍照。

C.3.4 PCR 结果判定

对待测样品 DNA 提取液进行特异性 PCR 扩增检测, 如果阴性对照未出现 427 bp 大小的特异性扩增条带, 待测样品和阳性对照均出现 427 bp 大小的特异性扩增条带, 则判定为阳性; 待检测 DNA 经特异性引物扩增后未出现长度为 427 bp 的 DNA 片段, 则 PCR 特异性反应呈阴性, 结果判定为阴性。

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
根癌土壤杆菌的检测鉴定方法
SN/T 2602—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

*

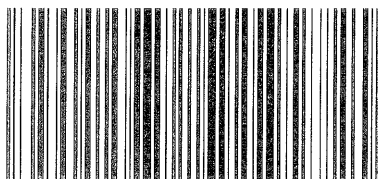
开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 13 千字

2010年11月第一版 2010年11月第一次印刷

印数 1—1 600

*

书号:155066·2-21169 定价 18.00 元



SN/T 2602-2010