



中华人民共和国国家标准

GB/T 28096—2011

木薯细菌性萎蔫病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*
(Bondar) Vauterin et al.

2011-12-30 发布

2012-06-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国植物检疫标准化技术委员会(SAC/TC 271)提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国海南出入境检验检疫局、中华人民共和国山东出入境检验检疫局、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:李伟东、封立平、刘福秀、韩玉春、周先超、粟寒、吴翠萍、王英超。

木薯细菌性萎蔫病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了植物检疫中木薯细菌性萎蔫病菌的检疫鉴定方法。

本标准适用于木薯种子、苗木、种茎和其他繁殖材料中木薯细菌性萎蔫病菌的检疫鉴定。

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 食品卫生微生物学检验染色法、培养基和试剂

3 木薯细菌性萎蔫病菌基本信息

中文名:木薯细菌性萎蔫病菌(地毯草黄单胞杆菌木薯致病变种)。

学名: *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Bondar) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings 1995。

异名: *Bacillus manihotis* Arthaud-Berthet and Bondar 1912, *Phytomonas manihotis* (Berthet and Bondar) Viegas, *Xanthomonas manihotis* (Berthet and Bondar) Starr 1946, *Xanthomonas. campestris* pv. *manihotis* (Arthaud and Bondar) Dye 1978。

病害英文名: bacterial blight of cassava, cassava bacterial blight。

属原核生物界 Prokaryotes、变形细菌门 Proteobacteria、 γ -变形细菌纲 Gammaproteobacteria、黄色单胞菌目 Xanthomonadales、黄色单胞菌科 Xanthomonadaceae、黄色单胞菌属 *Xanthomonas*、地毯草黄单胞杆菌 *Xanthomonas axonopodis*。

病菌的远距离传播主要靠带菌种子、苗木和种茎。绝大多数木薯病种子不表现任何症状,病菌以休眠状态存在于种子的胚部和种皮。

木薯细菌性萎蔫病菌的其他信息参见附录 A。

4 方法原理

该病害症状、病菌生物学特性、生理生化特性、致病性测试和基因组 DNA 的特异性 PCR 检测是该病菌检测鉴定的依据。

5 仪器和用具

5.1 仪器

电子天平、实体显微镜、超净工作台、温控培养箱、高压灭菌锅、微生物自动鉴定系统、PCR 仪、电泳仪、紫外检测仪或凝胶成像系统、离心机、恒温水浴锅(30℃~95℃)、超低温冰箱、普通冰箱、纯水机、涡旋振荡器、可调微量加样器。

5.2 用具

解剖刀、裁纸刀、量筒、烧杯、培养皿、三角瓶、离心管、放大镜、手术剪、镊子、接种环等。

6 化学试剂

6.1 试剂

次氯酸钠(NaClO)、磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)、70%乙醇、吐温-60、吐温-80、淀粉、蔗糖、葡萄糖、果糖、海藻糖、PCR 检测所需试剂(参见附录 B)。

6.2 培养基

CTA 和 LPG 培养基及配制(见附录 C)。

7 检测鉴定

7.1 症状检查

首先观察植株是否萎蔫,接着仔细检查植株的嫩芽、茎、叶等各个部位,嫩芽、叶是否出现凋萎;叶片是否出现水渍状,暗绿色多角形的小斑,褐色或深褐色由黄晕围绕的不规则形的病斑,凋萎,干枯脱落;嫩茎和叶柄是否有水渍状,黑褐色下陷的病斑;横切茎干,检查其维管束组织是否变褐坏死、病部受挤压后是否有菌脓溢出。

7.2 快速初筛

对出现典型症状的植株直接进行病菌分离;对症状不典型或不明显的木薯种子、苗木和种茎应用 PCR 法进行快速初筛。

从植物组织(种子或叶片或种茎)中抽提总核酸,用木薯细菌性萎蔫病菌标准菌株作阳性对照,用地毯草黄单胞杆菌其他致病变种的标准菌株和健康植株抽提总核酸作阴性对照,用超纯水作为空白对照,进行 PCR(方法步骤见附录 C)检测分析。若 PCR 检测结果为阳性,继续进行 7.3;若 PCR 检测结果为阴性,则可判定为未检出。

7.3 病菌分离

7.3.1 种子带菌的分离

称取木薯种子样品 20 g,置于 1%次氯酸钠溶液浸泡消毒 2 min~4 min,无菌水洗涤三次,然后将种子磨碎,装入一灭菌的三角瓶中,加入 100 mL 灭菌的 0.1 mol/L 磷酸二氢钠缓冲液,混匀,25℃下静置过夜,次日用该溶液在事先制备好的 CTA 平板培养基上划线,30℃恒温培养 48 h 后,检查并筛选培养基上的菌落。

7.3.2 病组织(病叶或茎段)中病菌的分离

将病组织切成 3 mm 见方的小块,先用 70%乙醇浸泡 30 s,捞出后用 1%次氯酸钠溶液浸泡 2 min,再用无菌水洗涤三次,最后把病组织置于消毒的小培养皿(直径 6 cm)中,加几滴无菌水,捣碎,静置 10 min~15 min,制成悬浮液,用接种环蘸取汁液在 CTA 平板上划线,30℃下培养 2 d 后,检查并筛选培养基上的菌落。

7.3.3 形态特征

病菌为革兰氏阴性，菌体短杆状，大小 $(0.3\ \mu\text{m}\sim 0.4\ \mu\text{m})\times(1.1\ \mu\text{m}\sim 1.2\ \mu\text{m})$ ，多数单个排列，少数3个~4个连接成短链。不产生芽孢，无荚膜。鞭毛单根极生。在CTA培养基上生长的菌落呈灰白色到奶油色，隆起，光滑，有光泽，边缘整齐，培养2 d菌落直径可达1 mm。开始时菌落透明，渐渐混浊不透明，最后变成表面有一层粘质的固体物。在LPG平板上恒温 $(27\ ^\circ\text{C}\sim 28\ ^\circ\text{C})$ 培养5 d，菌落突起，表面光滑，乳白色，有光泽，菌落边缘完整，直径3 mm~5 mm，粘稠。

如果发现可疑的菌落，采用平板划线法，即用灭菌的接种环蘸取CTA平板上菌落后，在LPG平板上多次划线纯化，在 $30\ ^\circ\text{C}$ 下恒温培养2 d~4 d，纯化三次后进行鉴定。

7.4 革兰氏染色

按GB/T 4789.28中2.2的方法进行革兰氏染色反应。若染色结果为革兰氏阴性菌，则进行下一步检测。

7.5 生理生化指标测定

结合实验条件对分离菌株进行生理生化指标测定。

应用微量发酵管对分离菌株进行生理生化指标的测定。若分离菌株能水解吐温-60、吐温-80、淀粉、蔗糖、葡萄糖、果糖和海藻糖，液化明胶，强烈水解卵磷脂，使石蕊牛乳产碱、胨化，则生理生化指标测定结果为阳性。

应用微生物自动鉴定系统对分离菌株进行生理生化指标的测定。按照微生物鉴定系统规定的操作方法进行，鉴定结果为木薯细菌性萎蔫病菌，则判定该分离菌株的微生物鉴定系统的鉴定结果为阳性。

7.6 PCR检测

取经分离纯化的细菌菌落，配备 $1\times 10^8\ \text{CFU/mL}$ 的细菌悬浮液，进行PCR检测，无需抽提总核酸。检测方法步骤见附录C。

7.7 致病性测定

将在LPG培养基上培养48 h后的菌株，配成 $1\times 10^8\ \text{CFU/mL}$ 的细菌悬浮液，采用针刺接种法，用消毒的接种针蘸上细菌悬浮液，针刺木薯植株的第三片、第四片叶和嫩茎等，每一菌株接种5株，阴性对照用无菌水代替接种液。接种后的植株置放于人工气候箱，在 $28\ ^\circ\text{C}\sim 32\ ^\circ\text{C}$ 温度下，先在100%相对湿度保湿24 h~48 h，然后在80%左右的相对湿度下，每天在 $7\ 000\ \text{lx}\sim 10\ 000\ \text{lx}$ 下光照培养16 h，黑暗下培养8 h。接种7 d后开始观察症状，每天观察一次，连续观察30 d。植株上的叶片出现黑绿色到蓝色水渍状不规则斑（直径1 cm~4 cm），病斑迅速扩展并且不规则形斑沿着叶脉和叶片边缘结合在一起，对着光线可看到半透明的斑，叶片感病部分周围变成亮褐色；整株植物表现出萎蔫、在茎横切面出现褐变且挤压有菌脓溢出的视为发病，表明从种子或植株或种茎上分离到的菌株具有致病性，而且需要从接种病斑上再次分离出来；不表现症状的接种植株视为不发病。

8 结果判定

若植株呈现典型症状，或初筛PCR检测结果为阳性，要对可疑样品进行病菌的分离，根据分离菌株在培养基上的形态特征，确定可疑菌落，至少采用一种方法（生理生化指标测定和分子检测方法）对可疑菌落进行鉴定，最后进行寄主的致病性测定以确诊。如果一种或一种以上鉴定方法为阳性，且致病性测定表现为典型症状，则判定为检出木薯细菌性萎蔫病菌；如果任一种鉴定方法都为阴性，则判定为未检

出木薯细菌性萎蔫病菌。

9 样品和菌种保存

9.1 样品保存

样品(种子或植株或种茎)拍照后均应制成干标本,经登记和签字后置于阴凉干燥、防虫防鼠处妥善保存3个月。对鉴定为木薯细菌性萎蔫病菌的样品至少应保存6个月,以备复检、谈判和仲裁,样品保存期满后,需经灭菌处理。

9.2 菌种保存

从样品中分离并鉴定为木薯细菌性萎蔫病菌的菌株应转接到试管斜面,经登记和签字后置于4℃冰箱中保存,定期转接;或病菌悬浮液加60%甘油置于超低温冰箱(−70℃)长期保存,或用真空干燥机制成病菌冻干粉置于超低温冰箱(−70℃)长期保存。

附录 A

(资料性附录)

木薯细菌性萎蔫病菌其他信息

A.1 地理分布

美洲：墨西哥、古巴、巴拿马、特立尼达和多巴哥、巴西、阿根廷、哥伦比亚、委内瑞拉、法属圭亚那、尼加拉瓜。

非洲：尼日利亚、刚果金、加纳、贝宁、喀麦隆、中非共和国、马达加斯加、毛里求斯、科特迪瓦、马拉维、马里、卢旺达、南非、苏丹、坦桑尼亚、多哥、乌干达。

亚洲：印度、印度尼西亚、马来西亚、泰国、日本、菲律宾及中国的局部木薯种植地区。

A.2 寄主植物

木薯 *Manihot esculenta*，木薯其他野生种 *M. apii*，*M. glaziovii*，*M. palmata*。人工接种寄主为大戟科的 *Euphorbia repanda*，*E. pulcherrima*，*Pedilanthus tithymaloides* (Dedal et al, 1980)。在委内瑞拉高湿多雨地区则发现转主寄主除大戟科的 (Euphorbiaceae) 几个种以外，还有苋科中的苋属 *Amaranthus* spp.、禾本科黍属中的 *Panicum fasciculatum* 和石茅高粱 *Sorghum halepense* 及锦葵科的黄花稔属 *Sida* spp.。

A.3 症状

带病种子往往能正常发芽，但不久就会在叶片和嫩茎上表现症状。木薯细菌性萎蔫病的主要症状有角斑、枯萎、青枯、梢枯、流脓及根茎部分的维管束坏死。种植带病种茎生长的植株表现为系统的维管束病害症状，即刚生长的嫩芽就出现凋萎。田间感染的植株，初现角斑，随后引发枯萎，落叶，凋萎或顶枯。叶片发病初出现水渍状，暗绿色多角形的小斑，病斑随后变成褐色或深褐色由黄晕围绕，这种黄晕主要由细菌分泌的毒素甲硫基丙酸所致。病斑愈合成不规则形的大斑，最后叶片凋萎，干枯脱落。潮湿时，叶片和嫩茎上的病部常溢出橙黄色的菌脓。嫩茎和叶柄上的病斑水渍状，黑褐色，下陷，叶片常呈凋萎状，当病斑扩展，绕茎一周时，引起其上部枝叶的凋萎枯死。横切病茎，可见其维管束组织变褐坏死。

附录 B
(资料性附录)

木薯细菌性萎蔫病菌 PCR 检测方法

B.1 试剂制备(或使用商品化的试剂盒)

B.1.1 总核酸抽提缓冲液

100 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl) pH 8.0、10 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)、2% 十二烷基硫酸钠(SDS)、100 μg/mL 蛋白酶 K、1% 聚乙烯吡咯烷酮。

B.1.2 TE 缓冲液(pH 8.0)

1 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0
0.1 mmol/L EDTA。

B.1.3 50×TAE 电泳缓冲液(pH 8.0)

Tris	242 g
冰醋酸	57.1 mL
0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)	100 mL

B.1.4 6×上样缓冲液

0.25% 溴酚蓝、40% 蔗糖。

B.1.5 其他试剂

3 mol/L 氯化钠、三氯甲烷、异戊醇(24:1)、异丙醇、相对分子质量标准、溴化乙锭。

B.1.6 PCR 反应试剂

10×PCR 缓冲液、MgCl₂、dNTP、Taq DNA 聚合酶、琼脂糖。

B.2 总核酸提取

将种子 1 g(约 15 粒)或叶片 1 g 或种茎 1 g 放入灭菌研钵中,加入液氮用研杵研成粉状,取粉末移入 1.5 mL 离心管中,加入 1 000 μL 抽提取缓冲液,在 65 ℃ 水浴孵育 30 min;室温 14 000 g 离心 15 min;取上清液加入等体积的三氯甲烷和异戊醇(24:1)混合溶液,混匀,放置 15 min,14 000 g 离心 15 min;取上清液加入等体积的三氯甲烷和异戊醇(24:1)溶液混匀,放置 15 min,14 000 g 离心 15 min;取上清液加入 0.6 倍的异丙醇混匀,14 000 g 离心 30 min;弃上清液,用 70% 乙醇洗涤两次,无水乙醇洗涤两次,并倒置离心管 1 min;加入 100 μL TE 缓冲液悬浮总核酸,置于 -20 ℃ 下保存备用。

B.3 PCR 检测

在 PCR 薄壁管中分别加入以下试剂(25 μL 体系):1 μL 的悬浮液或样品总核酸,每对引物(见

表 B.1) 20 $\mu\text{mol/L}$ 各 1.0 μL , 0.15 mmol/L 的 dNTP 混合物 2.0 μL , 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μL , 2.5 μL 1.5 mmol/L MgCl_2 溶液, *Taq* DNA 聚合酶(2.5 U/ μL)0.2 μL , 超纯水 14.8 μL 。

表 B.1 PCR 检测的引物序列及扩增产物

引 物	引 物 序 列	扩 增 产 物
1	5'-TTC GGC AAC GGC AGT GAC CAC C-3'	898 bp
2	5'-TCA ATC GGA GAT TAC CTG AGC G-3'	

反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min(提纯核酸则为 2 min), 然后进行 30 个循环(95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 61 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s), 最后一个循环结束后 72 $^{\circ}\text{C}$ 继续延伸 5 min。

PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。每个样品取 5 μL 的 PCR 产物与 1 μL 的 6 $\times$ 上样缓冲液混匀, 并加到置于 1 $\times$ TAE 缓冲液的 1.5% 琼脂糖凝胶孔中, 然后在 120 V 下电泳。电泳结束后, 放入装有 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的溴化乙锭溶液的容器中染色, 然后在清水中清洗后, 在凝胶成像系统中观察, 拍照, 并保存照片。

附 录 C
(规范性附录)
培养基制作方法

C.1 CTA 培养基

3.0 g 磷酸氢二钾(K_2HPO_4), 1.0 g 磷酸二氢钠(NaH_2PO_4), 0.3 g 硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 1.0 g 氯化铵(NH_4Cl), 9.0 g D(+)-海藻糖, 1.0 g D(+)-葡萄糖, 1.0 g 酵母粉, 14.0 g 琼脂, 加蒸馏水定容至 1 L, pH 7.2。103.43 kPa (121 ℃) 高压灭菌 15 min。灭菌后冷却至 50 ℃ 下加入 0.025 g 头孢菌素, 0.001 2 g 林可霉素, 0.002 5 g 磷霉素, 0.25 g 放线菌酮。

C.2 LPG 培养基

5.0 g 葡萄糖, 5.0 g 酵母膏, 5.0 g 蛋白胨, 15.0 g 琼脂, 加蒸馏水定容至 1 L, pH 7.1。103.43 kPa (121 ℃) 高压灭菌 15 min。
