

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1400—2004

甘蔗流胶病菌检疫鉴定方法

Methods for the quarantine and identification of *Xanthomonas axonopodis* pv.
vasculorum (Cobb 1894) Vauterin, Hoste, Kerster & Swings 1995

2004-06-01 发布

2004-12-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

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：中华人民共和国广西出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：张君潮、黄胜光、叶盛华、文新。

本标准系首次发布的检验检疫行业标准。

甘蔗流胶病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了进境植物检疫中甘蔗流胶病菌的检疫和鉴定方法。

本标准适用于进境甘蔗蔗茎、甘蔗叶片中甘蔗流胶病菌的检疫和鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 4789.28—1994 食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂

3 原理

甘蔗流胶病菌属于原核生物总界细菌界(Procaryotes)，薄壁细菌门(Gracilicutes)，假单胞杆菌科(Pseudomonadaceae)，黄单胞杆菌属(*Xanthomonas*)，地毡草流胶病黄单胞菌维管束致病变种(*X. axonopodis* pv. *vasculorum*)，可侵染甘蔗的叶片和蔗茎，形成条斑和流胶症状。该菌引起的甘蔗流胶病有明显的症状，病原菌有独特培养性状和生理生化特征。病害的症状、病原菌的形态、病原菌的培养、生理生化性状以及致病性测定是鉴定甘蔗流胶病菌的依据。

4 仪器和用具

4.1 仪器

生物显微镜、生物培养箱等。

4.2 用具

高压灭菌器、普通天平、超净工作台、酒精灯、培养皿、试管、载玻片、盖玻片、接种针或缝纫针、接种环、移液器、小刀、剪刀、镊子、玻璃棒等。

5 培养基和试剂

5.1 YPGA 培养基配方：酵母膏 5 g/L，葡萄糖 20 g/L，蛋白胨 10 g/L，琼脂 15 g/L，pH7.2。

5.2 YDC 培养基配方：酵母膏 10 g/L，D-葡萄糖 20 g/L，碳酸钙 20 g/L，琼脂 15 g/L，pH7.2。

5.3 GYCA 培养基配方：酵母膏 5 g/L，葡萄糖 5 g/L，碳酸钙 40 g/L，琼脂 15 g/L。

5.4 明胶、升汞液(氯化汞 12 g，蒸馏水 80 mL，浓盐酸 16 mL)。

5.5 磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、硫酸钠、硝酸钠。

5.6 蛋白胨、磷酸氢二钾、七叶苷、柠檬酸铁。

5.7 牛肉浸膏、氯化钠、琼脂、可溶性淀粉。

5.8 产酸产气及利用碳源、氮源试验用试剂：木糖、阿拉伯糖、果糖、葡萄糖、甘露糖、半乳糖、蔗糖、纤维二糖、甘油、麦芽糖、鼠李糖、菊粉、水杨苷、甘露醇、山梨醇、半乳糖醇、阿东糖醇、 α -甲基-D-葡萄糖苷溶液，乙酸盐、丙酸盐、柠檬酸盐、苹果酸盐、琥珀酸盐、乳酸盐、苯甲酸盐、草酸盐、酒石酸盐、葡萄糖酸盐，天冬酰胺。

5.9 灭菌水。

6 现场检疫

在现场检疫时,应仔细检查蔗茎、蔗叶有无病变症状,如发现黄色至白色纵条纹且在叶尖处较多的叶片,或切口有黄色至橙色的胶状团块、蔗节上维管束变红色的蔗茎等流胶病可疑症状时,应取样作实验室鉴定。

在产地检疫和隔离试种期间,还要注意检查有无生长矮小或生长点死亡的植株,当发现可疑症状应取样作实验室鉴定。

7 实验室鉴定

7.1 病原菌分离纯化

7.1.1 分离纯化

发现菌脓的蔗茎或蔗叶,直接在无菌操作条件下将菌脓用无菌水制成分离用悬液,用 YPGA 培养基加胆盐进行稀释分离,置培养箱内 27℃~28℃ 条件培养 3 d~7 d。然后再进行一次至二次的纯化,最后获得纯菌株。

7.1.2 保湿培养

将怀疑有症状而没有菌脓流出的蔗茎砍断,栽植于湿透细砂中,或将怀疑有症状的叶片切断,置于湿润的容器中。置于 27℃~28℃ 条件下培养 4 d~6 d,在横切面上见到流出菌脓后用 7.1.1 方法获得纯菌株。

7.2 病原菌形态观察及生理生化测定

7.2.1 形态观察

对分离纯化获得的纯菌株,经染色制成玻片,在显微镜下观察形状,测量大小。

7.2.2 菌落颜色和粘液的形成

待测菌在 GYCA 或 YDC 培养基上划线培养,置培养箱内 27℃~28℃ 条件下培养 3 d~7 d,观察菌落的颜色和粘液的形成。

7.2.3 鞭毛染色法

按 GB/T 4789.28—1994 中 2.7 规定的方法进行。

7.2.4 革兰氏染色法

按 GB/T 4789.28—1994 中 2.2 规定的方法进行。

7.2.5 明胶液化试验

在培养皿中倒入 15 mL 新鲜配制和灭菌的加了 0.4% 明胶的营养琼脂培养基凝固后,在表面点接或单划线。27℃ 培养 72 h,用 5 mL~10 mL 的酸性升汞液浸没培养基表面。清晰的带表示明胶液化为阳性反应。

7.2.6 淀粉水解试验

培养基:蛋白胨 5 g,牛肉浸膏 3 g,氯化钠 5 g,琼脂 15 g,可溶性淀粉 20 g,水 1 000 mL。

将前 4 种成分加热溶于 500 mL 水中,另将淀粉溶于 25 mL 水中,将两液混合、补水至 1 L、调至 pH7.0,于 115℃ 灭菌 15 min。倾注灭菌平皿或在灭菌前分装试管,灭菌后制成琼脂斜面,亦可用牛肉浸汤琼脂加入淀粉代替本培养基。

称取碘片 1 g 和碘化钾 2 g,放烧瓶中,加少量水、以玻璃棒研碎,使碘片完全溶解,再加水至 300 mL,制成碘试剂,移装棕色试剂瓶中,保存于冰箱,避免光线照射。

以 18 h~24 h 的纯待测菌,涂布接种于淀粉琼脂斜面或平板(一个平板可分区接种,试验数种培养

物)或直接移种于淀粉肉汤中,于 $28^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养24 h~48 h。然后将碘试剂直接滴浸于培养物表面,若为液体培养物,则加数滴碘试剂于试管中。

立即检视结果,阳性反应(淀粉被分解)为琼脂培养基呈深蓝色、菌落或培养物周围出现无色透明环、或肉汤颜色无变化。阴性反应则无透明环或肉汤呈深蓝色。

7.2.7 产酸产气及利用碳源、氮源试验

培养基:磷酸二氢钾 1.3 g,磷酸氢二钠 3.2 g,硫酸钠 0.8 g,硝酸钠 1 g,分别加入 5.8 中的待测试剂 2 g~10 g,水 1 000 mL。

将以上各成分溶于 1 L 水中,调整 pH 值至 7.2。于 115°C 灭菌 15 min,如制成固体培养基,则加入 1.5%的琼脂。

将待试菌制成较稀薄的生理盐水菌悬液,接种于培养基中,于适当温度下培养 24 h~48 h,若有生长即为阳性。

7.2.8 水解七叶苷试验

培养基:蛋白胨 5 g,磷酸氢二钾 1 g,七叶苷 3 g,柠檬酸铁 0.5 g,水 1 000 mL。

将各成分加热溶于 1 L 水中,调至 pH7.2~pH7.4。加入 Andrade 氏指示剂 10 mL,混匀,分装试管,于 121°C 灭菌 15 min。接种待试菌培养物后,于 $28^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,观察结果,培养基变为棕黑色为阳性。

7.2.9 脲酶反应试验

按 GB/T 4789.28—1994 中 3.15 规定的方法进行。

7.2.10 硫化氢产生试验

按 GB/T 4789.28—1994 中 3.14 规定的方法进行。

7.2.11 甘蔗流胶病菌与其近似种甘蔗叶灼病菌的区别

甘蔗流胶病菌与其近似种甘蔗叶灼病菌的区别见表 1。

表 1

试验项目	甘蔗流胶病菌	甘蔗叶灼病菌
YDC 生长菌落	粘	不粘
蛋白酶	+	-
阿拉伯糖产胶	+	-
35℃ 生长	+	+
水解七叶苷	+	+
尿酶	+	+

7.3 致病性测定

7.3.1 菌种的制备

YDC 斜面培养的待测试菌用无菌水调节到 10^6 菌数/mL~ 10^7 菌数/mL 的接种用悬浮液。

7.3.2 针刺接种

选择完全健康的甘蔗感病品种(如无感病品种,可引进澳大利亚的品种,如 H. Q. 426, M. 189, S. J. 4 等)植株,用缝纫针或接种针通过滴在叶面上的待测试菌悬浮液小心扎刺叶面,在直径 2 mm~3 mm 的圆圈内扎刺 20 次~30 次,最好不要扎穿叶子,设五个重复和对照。在 $27^{\circ}\text{C}\sim 28^{\circ}\text{C}$ 的隔离温室条件下,7 d 后观察症状。

7.3.3 病原菌分离纯化

出现症状后,用 7.1.1 方法进行病原菌再分离、纯化。

8 鉴定特征

8.1 症状特征

甘蔗流胶病症状分为两个阶段,初为条斑期,后为系统侵染。

8.1.1 条斑症状(叶片症状)

叶片上症状初为3 mm~6 mm宽,黄或桔黄色条斑,后变灰白色。症状先从叶边缘至基部,或从伤口中心沿叶脉扩展。叶片在系统侵染期主要为褪绿,条斑症状在成熟叶片上发展最快,条件适宜时,叶片上均有许多条斑,并延伸至叶鞘,这样病菌进入茎秆引起系统侵染。该病与甘蔗叶灼病(*Xanthomonas albilineans*)区别是条斑的颜色和类型,叶灼病形成长,窄且直的白色条斑,一般占叶片的大部分,严重时整个叶片变黄,通常叶尖开始死亡,产生“灼烧”感。

8.1.2 系统侵染阶段(蔗茎症状)

茎秆维管束组织特别是节间变红色,组织破坏或形成空腔,填满菌脓和多糖类物质,植株矮小,严重时引起生长点的死亡。亦可使茎秆一边形成过度生长而畸形或形成“刀切口”症状,有时填满菌脓,切开茎秆可见菌脓流出。

8.2 病原特征

8.2.1 形态、染色、菌落生长及生理特性

有荚膜杆菌,单个、成双或成短链,具单根极鞭,革兰氏染色阴性,大小约(0.4 μm~0.5 μm)×(1 μm~1.5 μm)。

病菌生长较慢,7 d后形成菌落。营养琼脂上,菌落光滑,有光泽,圆形,黄色奶油状,在含碳水化合物的培养基上较粘。

好氧菌,氯化钠(NaCl)最大忍耐力为3%~5%,生长最适温度27℃~28℃,最高温度为37℃~39℃,最低温度5℃,致死温度50℃。

8.2.2 生化性状

明胶液化、淀粉水解、水解七叶苷、硫化氢反应阳性,脲酶反应阴性。

从木糖、阿拉伯糖、果糖、葡萄糖、甘露糖、半乳糖、蔗糖、纤维二糖和甘油溶液产酸不产气。不从麦芽糖、鼠李糖、菊粉、水杨苷、甘露醇、山梨醇、半乳糖醇、阿东糖醇和α-甲基-D-葡萄糖苷溶液产酸。

能利用乙酸盐、丙酸盐、柠檬酸盐、苹果酸盐、琥珀酸盐、乳酸盐作碳源,不能利用苯甲酸盐、草酸盐、酒石酸盐、葡萄糖酸盐作碳源。不能利用天冬酰胺作唯一碳源和氮源。

8.3 致病性特征

针刺接种后,在7 d左右应出现甘蔗流胶病症状,经病原菌再分离获得的纯菌株应具有与原菌株一致的病原特征。而所设对照并没有出现症状。

9 结果评定

症状、病原特征以及致病性特征与第8章鉴定特征吻合的,鉴定为甘蔗流胶病菌。

10 样品保存

经检疫鉴定后,应妥善保存样品及菌株,以备复验、谈判和仲裁,保存期满后,需经灭菌处理。

10.1 样品的保存

发现甘蔗流胶病菌,应妥善保存蔗茎或蔗叶六个月。

10.2 菌株的保存

分离并鉴定为甘蔗流胶病的菌株应移到试管斜面上,冷藏保存,并定期(每三个月)转管,防止因斜面上干燥而造成病菌死亡。菌株至少需保存六个月。
