



中华人民共和国国家标准

GB/T 28078—2011

水稻白叶枯病菌、水稻细菌性条斑病菌 检疫鉴定方法

Detection and identification of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Ishiyama) Swings et al., *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Fang et al.) Swings 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 发布
中国国家标准化管理委员会

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：中华人民共和国湖南出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国厦门出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：朱金国、赵文军、唐连飞、朱水芳、莫瑾、彭梓、陈红运、钟文英。

水稻白叶枯病菌、水稻细菌性条斑病菌 检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了水稻种子和其他水稻材料的水稻白叶枯病菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) 和水稻细菌性条斑病菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Xcola) 的检疫鉴定以植物的形态学特征、生理生化特性、分子生物学和酶联免疫学技术作为依据,明确了田间观察、分离鉴定、样品保存的方法。

本标准适用于水稻材料和相关环境中水稻白叶枯病菌、水稻细菌性条斑病菌的检测。

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 15569—1995 农业植物调运检疫规程

ISTA 国际种子检验规程

3 方法原理

根据水稻植株的形态学特征进行田间观察,并采用分离培养、分子生物学和酶联免疫学筛选、生理生化鉴定以及致病性测定对植株材料上的水稻白叶枯病菌、水稻细菌性条斑病菌进行判定。

4 设备和材料

- 4.1 冷冻高速离心机:转速 $\leq 15\,000$ r/min。
- 4.2 PCR 扩增仪。
- 4.3 恒温培养箱:28℃ \pm 1℃。
- 4.4 显微镜:物镜头 10 \times ~100 \times 。
- 4.5 天平:精度 0.001 g。
- 4.6 高压灭菌器。
- 4.7 均质器:转速 4 000 r/min~8 000 r/min。
- 4.8 可调移液器:0.2 μ L~1 μ L,1 μ L~10 μ L,10 μ L~100 μ L,100 μ L~1 000 μ L。
- 4.9 器具:灭菌的镊子、剪刀、称量勺。
- 4.10 吸管:1 mL、10 mL。
- 4.11 灭菌平皿:直径 90 mm,玻璃或一次性塑料平皿。
- 4.12 三角瓶:100 mL。

5 培养基和试剂

- 5.1 SPA 培养基:见 A.1。

- 5.2 0.001%吐温 20-磷酸盐缓冲液。
- 5.3 革兰氏染色试剂:见 A. 2。
- 5.4 鞭毛染色试剂:见 A. 3。
- 5.5 明胶液化培养基:见 A. 4。
- 5.6 氧化酶试剂:见 A. 5。
- 5.7 硝酸盐培养基:见 A. 6。
- 5.8 过氧化氢酶试验试剂:见 A. 7。
- 5.9 石蕊牛乳试剂:见 A. 8。
- 5.10 糖氧化和发酵测定培养基:见 A. 9。
- 5.11 碳源利用试验培养基:见 A. 10。
- 5.12 水杨苷产酸试验培养基:见 A. 11。
- 5.13 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)。

6 田间检验

水稻在整个生育期的叶片均可受害,在苗期、分蘖期受害最重,通过田间观察可直接对水稻受害情况进行判断,水稻细菌性条斑病菌和水稻白叶枯病菌田间症状及相关资料参见附录 B 和附录 C。对田间检验有病害发生的植株,按以下操作进行抽样及实验室检验。

7 抽样

水稻种子抽样可参照 ISTA《国际种子检验规程》或者 GB 15569—1995 6.1 方法进行。

8 样品处理

8.1 水稻种子

大量种子样品通常需先用蒸馏水冲洗以除去残片和表面的污染杂菌,以避免杂菌太多产生干扰。清洗后称取 10 g 或 400 粒种子,放入 0.001%吐温-磷酸缓冲液中低温(5℃~15℃)浸泡 4 h~6 h,用均质器打碎,制备样品提取液。如果是检测少量的种子样品,取 20 粒种子加入 10 mL 灭菌的磷酸缓冲液,用灭菌槌和研钵或是搅拌器将种子完全压碎制成提取液。

将样品提取液于 22℃~25℃环境中放置 4 h~6 h。旋涡混匀悬浮液 5 min,制备 10×、100×和 1 000×三个稀释度的悬浮液,从原液及每个梯度稀释液中取 0.3 mL,分别放入到 3 个 SPA 的平皿中(每个平皿加入 0.1 mL)。用 L-型玻璃棒将液体均匀涂布在 SPA 琼脂的表面。

若提取液杂菌较多,可考虑增加稀释梯度和接种平板的数量以提高检出率。

8.2 植物组织材料

8.2.1 无症状的组织

可将 10 g 左右样品直接放入 90 mL 0.001%吐温-磷酸盐缓冲液中,均质 1 min 制备成样品提取液。按 8.1 方法进行稀释与涂布。

8.2.2 未显症的可疑组织

用灭菌的剪刀剪成小块,将其置入 SPA 分离平板中,滴入 2 滴~3 滴(约 0.2 mL)的生理盐水,放

置 5 min~10 min,让细菌从这些组织中渗出,用灭菌的接种环蘸取渗出液,在 SPA 培养基上进行分离培养。

8.2.3 受感染组织

从叶片损伤部位的前端切下 2 mm×7 mm 片段。将其放入 70% 的乙醇消毒中 15 s~30 s,然后在试管中用灭菌蒸馏水清洗叶片 2 次~3 次,最后将其置于 SPA 分离平板上。如植物组织材料上出现菌脓或菌痂,直接用接种工具取菌脓或菌痂于 SPA 分离平板上涂布。

9 分离

接种后每天观察 SPA 平板的菌株生长状况。水稻白叶枯病菌(Xoo)生长速度较慢,一般要在 72 h~96 h 才形成可见菌落。菌落呈圆形、光滑、表面凸起、粘稠,由黄白色逐渐变成淡黄色,在发射光下不透明。菌落在第 3 天或第 4 天时只有小圆点般大小,在第 5 天至第 7 天时直径有 1 mm~2 mm。水稻细菌性条斑病菌(Xcola)菌株则在 48 h~72 h 后出现,生长速度比 Xoo 快,菌落圆形、光滑、凸起、粘质,先为白色成熟后变浅黄色。菌落在第 3 天直径达到 1 mm。

培养 24 h 后开始观察菌落生长情况,标记并排除 48 h 之内平板中出现的亮黄色菌落。选择浅黄色且黏液样的单个菌落接种于 SPA 培养基中,每个平皿挑取 5 个以上典型或疑似菌落进一步培养纯化,以进行进一步生化鉴定试验。对疑似菌落也可以采用 PCR 方法进行初筛,或者采用水稻白叶枯病菌和水稻细菌性条斑病菌的 ELISA 试剂盒进行初步筛选(具体检测方法参照试剂盒说明手册),阳性结果再继续通过生化鉴定做进一步证实。

10 PCR 筛选试验

从分离培养的细菌菌株中提取 DNA 作为模板,进行 PCR 检测和电泳分析。用水稻白叶枯标准菌株或水稻细菌性条斑标准菌株基因组 DNA 作为阳性对照,用不含有水稻白叶枯菌株或水稻细菌性条斑菌株的植物组织材料或其他植物病原菌基因组 DNA 为阴性对照,用双蒸水作空白对照,进行 PCR 扩增,将扩增产物进行琼脂糖电泳分析。

将分离得到的可疑菌落接种 SPA 斜面,培养 48 h~72 h 后用无菌水洗下斜面上生长的菌苔,制成菌悬液。使用制备好的菌悬液按照附录 D 进行分子生物学鉴定。若测试菌株的 PCR 产物与阳性对照相对分子质量一致,继续进行生化鉴定试验。

11 生化鉴定

11.1 初步鉴定

挑取分离培养得到的符合特征的可疑菌落分别进行氧化酶试验,过氧化氢酶试验、革兰氏染色和鞭毛染色观察,黄单胞菌属菌为氧化酶阴性或延迟反应(15 s~16 s),过氧化氢酶阳性,革兰氏染色阴性,单生极鞭杆菌。符合以上试验结果的菌落则初步鉴定为疑似黄单胞菌属(*Xanthomonas*)。

11.2 硝酸盐还原试验

于 28 ℃ 培养后的菌悬液中加入硝酸盐还原试剂,观察颜色反应,黄单胞菌不利用硝酸盐,为不变色的阴性反应。

11.3 明胶液化

挑取纯化后菌落穿刺接种营养明胶琼脂后,28℃±1℃培养7 d~14 d。每天观察结果,不加摇动,静置冰箱中待其凝固后,再观察其是否被液化,如确被液化,即为试验阳性。

11.4 石蕊牛乳反应

将纯化后菌接种于石蕊牛乳培养基中,置28℃±1℃孵育3 d、7 d和14 d,定时观察结果。水稻细菌性条斑病细菌能够胨化牛乳中的酪蛋白,使培养基上层液体变澄清,而水稻白叶枯病菌没有胨化作用。

11.5 葡萄糖氧化和发酵测定

挑取纯化后菌落刺接种到底部,厌氧培养的需加1 cm厚的灭菌凡士林油(石蜡油与凡士林等量混合)或3 mL 3%的琼脂封管。每种细菌接种4管,2管封管,2管不封,另设置2管不加菌进行对照。28℃±1℃培养5 d,观察结果。

葡萄糖氧化产酸只在开管的上部产酸,指示剂的颜色由橄榄绿色转黄;发酵产酸则在开管和闭管中都可产生酸,如果同时还产生气体,则培养基内可以看到气泡。

好氧性细菌,只在开管的上部生长;兼性厌氧性细菌,则在开管的上下部都能生长;厌氧性细菌,则只能在开管的下部和闭管中生长。

黄单胞菌为严格好氧性,属于氧化型(O)。

11.6 阿拉伯糖发酵

步骤同葡萄糖发酵步骤。阳性菌产酸,培养基变黄色,阴性细菌不利用阿拉伯糖,培养基不变色。

11.7 利用天冬酰胺为唯一碳源和氮源试验

挑取纯化培养后菌落接种天冬酰胺为唯一碳源和氮源的培养基,28℃±1℃培养3 d、7 d和14 d后,观察生长情况,有菌落生长者为阳性。

11.8 利用丙氨酸为唯一碳源试验

挑取纯化培养后菌落接种丙氨酸为唯一碳源和氮源的培养基,28℃±1℃培养3 d、7 d和14 d后,观察生长情况,有菌落生长者为阳性。

11.9 水杨苷产酸试验

挑取纯化后菌落接种至含有1%水杨苷的培养基上,28℃±1℃培养5 d,观察培养基颜色变化情况。产酸培养基变为黄色,产碱则变为蓝色。

11.10 青霉素敏感试验

挑取纯化后菌落接种至含有20 μg/mL青霉素的SPA蛋白胨培养基上,28℃培养3 d~5 d,观察菌落生长情况,有菌落生长者为阳性。

11.11 TTC生长试验

挑取纯化后菌落接种至含有0.1%TTC的SPA培养基上,28℃±1℃培养3 d~5 d,观察菌落生长情况,有菌落生长者为阳性。

11.12 0.001% Cu(NO₃)₂ 生长试验

挑取纯化后菌落接种至含有 0.001% Cu(NO₃)₂ 的 SPA 培养基上, 28 ℃ ± 1 ℃ 培养 3 d~5 d, 观察菌落生长情况, 有菌落生长者为阳性。

11.13 黄单胞菌主要生化特征及 Xoo 和 Xcola 主要生化差别

见表 1, 表中部分结果相同的生化试验用以区分黄单胞菌属和假单胞菌属(参见附录 E)。

表 1 黄单胞菌主要生化特征及 Xoo 和 Xcola 主要生化差别

生化反应	白叶枯病细菌	细菌性条斑病细菌
氧化酶反应	—(延迟反应)	—(延迟反应)
在 0.1% TTC 上生长	—	—
利用天冬酰氨为唯一碳源和氮源	—	—
自水杨苷产酸	—	—
黄单胞色素	+	+
生长速度	慢	快
硝酸盐还原	—	—
水解淀粉	不水解	水解
液化明胶	不能液化	液化
牛乳培养	不能胨化	可以胨化
葡萄糖氧化和发酵	0	0
阿拉伯糖发酵	不能利用, 不产酸	可以利用而产酸
青霉素	敏感	不敏感
丙氨酸为唯一碳源	不生长	生长
0.001% Cu(NO ₃) ₂ 生长	生长	不生长
注: “+”为阳性反应, “—”为阴性反应。		

12 致病性测定

如有需要, 可进一步进行致病性测试。

用灭菌棉签蘸取在 SPA 培养基上新鲜的菌落, 转接于灭菌水中制备成 10⁷ CFu/mL~10⁸ CFu/mL 的菌悬液, 接种 0.5 mL 于金刚 30 等易感水稻品种的水稻叶片, 接种 3 株~5 株, 同时接种阳性菌液和灭菌水做为阳性和阴性对照, 2 周~4 周后观察叶片, 水稻细菌性条斑病菌和水稻白叶枯病菌典型病症参见 B. 6 和 C. 6。

13 结果报告

SPA 未生长典型或疑似菌落, PCR 结果阴性或 ELISA 检测阴性, 相关生化鉴定不符合水稻细菌性条斑病菌或水稻白叶枯病菌的生理及生化特征的, 报告为未检出水稻细菌性条斑病菌或未检出水稻白

叶枯病菌。

分离出的典型或疑似菌株 PCR 检测阳性或 ELISA 检测结果阳性,并通过生化鉴定符合水稻细菌性条斑病菌或水稻白叶枯病菌的生理及生化特征,报告为检出水稻细菌性条斑病菌或检出水稻白叶枯病菌。

必要时可进行致病性测定。

14 样品及分离物的保存

保存样品由鉴定人标识确认、样品管理员登记,进行防虫处理后,阴性样品于阴凉干燥、防虫防鼠处妥善保存 6 个月。对检出水稻细菌性条斑病菌或水稻白叶枯病菌的样本和分离菌株应在生物安全措施下至少保存 1 年,有特殊需求保存期可适当延长。保存期满,经灭活后妥善处理。

分离菌株接种于 SPA 斜面上培养,4 ℃ 下可保存几周。菌株在 10%~20% 甘油中或冻干,在 -80 ℃ 条件下可长期保存。

15 处理及生物安全措施

对检出水稻细菌性条斑病菌或水稻白叶枯病菌的样品及其分离菌株、检测过程中的废弃物,需经有效的除害处理方式处理,以防止对环境的扩散。

附录 A
(规范性附录)
培养基及试验方法

A.1 SPA 培养基及配制方法

A.1.1 成分

蛋白胨	5.0 g
蔗糖	20.0 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.25 g
琼脂	17.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.1.2 配制方法

pH 7.2~7.4, 121 °C 高压灭菌 20 min。

A.2 革兰氏染色法

A.2.1 结晶紫染色液

结晶紫	1.0 g
95%乙醇	20.0 mL
1%草酸铵水溶液	80.0 mL

将结晶紫溶解于乙醇中,然后与草酸铵溶液混合。

A.2.2 革兰氏碘液

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
蒸馏水	300.0 mL

将碘与碘化钾先进行混合,加入蒸馏水少许,充分振摇,待完全溶解后,再加蒸馏水至 300 mL。

A.2.3 沙黄复染液

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10.0 mL
蒸馏水	90.0 mL

将沙黄溶解于乙醇中,然后用蒸馏水稀释。

A.2.4 染色法

A.2.4.1 将涂片在火焰上固定,滴加结晶紫染色液,染 1 min,水洗。

A.2.4.2 滴加革兰氏染液,作用 1 min,水洗。

A.2.4.3 滴加 95%乙醇脱色,约 30 s;或将乙醇滴滴整个涂片,立即倾去,再用乙醇滴滴整个涂片,脱色 10 s。

A.3 鞭毛染色法

A.3.1 染色液的配制

A.3.1.1 甲液:称单宁酸 5 g、氯化高铁(FeCl_3)1.5 g,溶于 100 mL 蒸馏水中,待溶解后加入 1%的氢氧化钠溶液 1 mL 和 15%的甲醛溶液 2 mL。

A.3.1.2 乙液:称 2 g 硝酸银溶于 100.0 mL 蒸馏水中。在 90.0 mL 乙液中滴加浓氢氧化铵溶液,到出现沉淀后,再滴加使其变为澄清,然后用其余 10 mL 乙液小心滴加至澄清液中,至出现轻微雾状为止(此为关键性操作,应特别小心)。滴加氢氧化铵和用剩余乙液回滴时,要边滴边充分摇荡,染液当天配,当天使用,2 d~3 d 基本无效。

A.3.2 染色法

在风干的载玻片上滴加甲液,4 min~6 min 后,用蒸馏水轻轻冲净。再加乙液,缓缓加热至冒汽,维持约半分钟(加热时注意勿使出现干燥面)。在菌体多的部位可呈深褐色到黑色,停止加热,用水冲净,干后镜检,菌体及鞭毛为深褐色到黑色。

A.4 明胶液化

A.4.1 培养基

蛋白胨	5.0 g
牛肉膏	3.0 g
明胶	120.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL
pH6.8~7.0	

A.4.2 制法

加热溶解、校正 pH7.4~7.6,分装小管,121 °C 高压灭菌 10 min,取出后迅速冷却,使其凝固。复查最终 pH 应为 6.8~7.0。

A.4.3 试验方法

用琼脂培养物穿刺接种,放在 28 °C \pm 1 °C 培养,每天取出,放冰箱内 30 min 后再观察结果,记录液化时间。

A.5 氧化酶试验

A.5.1 试剂

A.5.1.1 1%盐酸二甲基对苯二胺溶液:少量新鲜配制,于冰箱内避光保存。

A.5.1.2 1% α -萘酚-乙醇溶液。

A.5.2 试验方法

取白色洁净滤纸沾取菌落。加盐酸二甲基对苯二胺溶液一滴,阳性者呈现粉红色,并逐渐加深;再加 α -萘酚溶液一滴,阳性者于30 s内呈现鲜蓝色。阴性于2 min内不变色。

以毛细吸管吸取试剂,直接滴加于菌落上,其显色反应与以上相同。

A.6 硝酸盐培养基

A.6.1 成分

KNO ₃	0.2 g
蛋白胨	5.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL
pH7.4	

A.6.2 制法

溶解,校正pH,分装试管,每管约5 mL,121 ℃高压灭菌15 min。

A.6.3 硝酸盐还原试剂

A.6.3.1 甲液:将对氨基苯磺酸0.8 g溶解于2.5 mol/L乙酸溶液100 mL中。

A.6.3.2 乙液:将甲萘胺0.5 g溶解于2.5 mol/L乙酸溶液100 mL中。

A.6.4 试验方法

接种后在28 ℃ \pm 1 ℃培养3 d~5 d,加入甲液和乙液各一滴,观察结果。硝酸盐还原为亚硝酸盐时于立刻或数分钟内显红色。

A.7 过氧化氢酶试验

A.7.1 试剂

3%过氧化氢溶液:临用时配制。

A.7.2 试验方法

挑取固体培养基上菌落一接种环,置于洁净试管内,滴加3%过氧化氢溶液2 mL,观察结果。

A.7.3 结果

于30 s内发生气泡者为阳性,不发生气泡者为阴性。

A.8 石蕊牛乳培养基、配制方法及反应结果

A.8.1 培养基

脱脂牛乳	1 000.0 mL
石蕊液(4%)	15.0 mL~20.0 mL

A.8.2 配制方法

间歇灭菌3次,每次通气20 min~30 min。

石蕊液的制备是将石蕊浸泡在蒸馏水中过夜或更长的时间,溶解后过滤。

A.8.3 反应结果

产酸:发酵乳糖产酸,使指示剂变为粉红色。

产气:发酵乳糖而同时产气,可冲开上面的凡士林。

凝固:因产酸太多而使牛乳中的酪蛋白凝固。

胨化:将凝固的酪蛋白继续水解为胨,培养基上层液体变清,底部可留有未被完全胨化的酪蛋白。

产碱:乳糖未发酵,因分解含氮物质,生成胺及氨,培养基变碱,指示剂变为蓝色。

A.9 糖氧化和发酵培养基及配制方法

A.9.1 Hayward(1964)培养基

蛋白胨	1.0 g
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1.0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
KCl	0.2 g
溴百里酚蓝(1.6%酒精溶液)	1.5 mL
H_2O	1 000.0 mL
pH7.1	

A.9.2 配制方法

每支管分装9 mL灭菌,然后用无菌技术加入过滤灭菌或115 °C,10 min高压灭菌的10%糖溶液。

A.10 碳源利用培养基及配制方法

A.10.1 SMB培养基

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.75 g
KH_2PO_4	0.5 g
NH_4Cl	1.0 g
K_2HPO_4	4.53 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g
5%柠檬酸铁铵	1.0 mL
0.5% CaCl_2	1.0 mL
琼脂	17.0 g
蒸馏水	900.0 mL
pH7.0	

A.10.2 配制方法

121 °C灭菌20 min,在基本培养基中加入过滤除菌或115 °C,20 min灭菌的氨基酸,使其终浓度为0.2%。

A.11 水杨苷产酸试验培养基及配制方法

A.11.1 Ayers 培养基及配制方法

A.11.1.1 培养基

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1.0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
KCl	0.5 g
NaCl	5.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL
溴百里酚蓝(1.6%酒精溶液)	1.5 mL
pH7.0, 121 °C 灭菌 20 min。	

A.11.1.2 配制方法

必要时可补充 0.2 g 酵母膏以促进细菌生长。

A.11.2 Dye 培养基 C 及配制方法

A.11.2.1 培养基

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0.5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
K_2HPO_4	0.5 g
NaCl	5.0 g
酵母膏	1.0 g
琼脂	17.0 g
溴百里酚蓝(1.6%酒精溶液)	1.5 mL
H_2O	1 000.0 mL

A.11.2.2 配制方法

pH7.0, 121 °C 灭菌 20 min。待测定的水杨苷单独灭菌或过滤除菌, 在培养基中的最终添加浓度为 1%。产酸培养基变为黄色, 产碱则变为蓝色。

附录 B

(资料性附录)

水稻细菌性条斑病菌基本信息

B.1 中文名

水稻细菌性条斑病菌(水稻黄单胞菌水稻生致病变种;黄单胞菌条斑致病变种)。

B.2 学名

Xanthomonas oryzae pv. *oryzicola* (Fang et al.) Swings et al.

异名: *Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola* (Fang et al) Dye; *Xanthomonas translucens* f. sp. *oryzicola* (Fang et al.) Bradbury

B.3 病害英文名

bacterial leaf streak of rice.

B.4 分布

亚洲:孟加拉、柬埔寨、中国、印度、印尼、老挝、马来西亚、缅甸、尼泊尔、巴基斯坦、菲律宾、泰国、越南;非洲:马达加斯加、尼日利亚、塞内加尔;大洋州:澳大利亚。

B.5 寄主范围

水稻 *Oryza sativa*、虬子草 *Leptochloa filiformis*、雀稗 *Paspalum scrobiculatum*、沼生蕺 *Zizania palustris*、结缕草 *Zoysia japonica*、假稻属 *Leersia*、稻属 *Oryza*。

B.6 症状

病斑在叶尖、叶缘发生。也可在中肋两侧发生,叶鞘发生较少。病斑初呈暗绿色水渍状半透明的小点,沿叶脉扩大成为宽四分之一至三分之一,长 1 mm~4 mm 的水渍状条斑。以后还可继续扩大,颜色由黄褐转橙褐色,但两段仍呈暗绿色,对光观察叶片,条斑呈半透明状。病斑上常泌出许多露珠状的蜜黄色菌脓。严重时,许多条斑融合、连接在一起,成为不规则的黄褐色至枯白色大斑块,外形与白叶枯有点相似。病情严重时叶片卷曲,远望呈现一片黄白色。

B.7 分类地位及生理生化特性

水稻细菌性条斑病是由黄单胞菌条斑致病变种(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*)病原菌引起,该菌属原核生物界(Prokaryotae)、变形菌门(Proteobacteria)、丙型变形菌纲(Gammaproteobacteria)、黄单胞菌目(Xanthomonadales)、黄单胞菌科(Xanthomonadaceae)、黄单胞菌属(*Xanthomonas*)。

病原菌菌体单生,短杆状,大小 $(1.0\ \mu\text{m}\sim 2.0\ \mu\text{m})\times(0.3\ \mu\text{m}\sim 0.5\ \mu\text{m})$,少数成对但不成链状,不形成芽孢荚膜,极生鞭毛一根。革兰氏染色阴性,在 NA 培养基上菌落呈蜜黄色,圆形,边缘整齐,光滑发亮,黏稠,好气。最适生长适温 $28\ ^\circ\text{C}\sim 30\ ^\circ\text{C}$,生理生化反应与白叶枯菌相似,不同之处该菌能使明胶液化,使牛乳胨化,使阿拉伯糖产酸,对青霉素、葡萄糖反应不敏感,它可产生 3-羧基丁酮,以 L-丙氨酸为唯一碳源,在 0.2% 无维生素酪蛋白水解物上生长,以及对 0.001% $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 有抗性,这些特点可与白叶枯病菌相区别。该菌与水稻白叶枯病菌的致病性和表现性状虽有很大不同,但其遗传性及生理生化性状又有很大相似性。

B.8 传播途径和发病条件

病田收获的种子、病残株带病菌,为下季初侵染的主要来源。病粒播种后,病菌侵害幼苗的芽鞘和叶梢,插秧时又将病秧带入本田,主要通过气孔侵染。在夜间潮湿条件下,病斑表面溢出菌浓。干燥后成小的黄色株状物,可借风、雨、露水、泌水叶片接触和昆虫等蔓延传播,也可通过灌溉水和雨水传到其他田块。远距离传播通过种子调运。

附 录 C
(资料性附录)
水稻白叶枯病菌基本信息

C.1 中文名

水稻白叶枯病菌(稻生黄单胞菌:水稻黄单胞菌白叶枯致病变种)。

C.2 学名

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* (Ishiyama) Swings et al.

异名:*Pseudomonas oryzae* Ishiyama; *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* (Ishiyama) Dye; *Xanthomonas itoana* (Tochinai) Dowson; *Xanthomonas kressek* Schure; *Xanthomonas translucens* f. sp. *oryzae* (Ishiyama) Pordesimo。

C.3 英文名

bacterial blight of rice; bacterial leaf blight of rice

C.4 分布

亚洲:孟加拉、柬埔寨、中国、印度、印尼、伊朗、日本、朝鲜、韩国、老挝、马来西亚、缅甸、尼泊尔、巴基斯坦、菲律宾、斯里兰卡、中国台湾、泰国、越南;非洲:布基纳法索、喀麦隆、加蓬、马里、尼日尔、塞内加尔、多哥、西非;美洲:玻利维亚、中美洲、哥伦比亚、哥斯达黎加、厄瓜多尔、萨尔瓦多、洪都拉斯、墨西哥、巴拿马、美国、委内瑞拉;大洋州:澳大利亚。

C.5 寄主范围

水稻(*Oryza sativa*)、蓉草(*Leersia oryzoides*)、虬子草(*Leptochloa panicea*)、雀稗(*Paspalum scrobiculatum*)、沼生菰(*Zizania palustris*)、结缕草(*Zoysia japonica*)、稻属(*Oryza*)、假稻属(*Leersia*)、千金子属(*Leptochloa*)、菰属(*Zizania*)。

C.6 症状

水稻各个器官均可染病,叶片最易染病。其症状因病菌侵入部位、品种抗病性、环境条件有较大差异,常见分3种类型。

叶枯型:主要为害叶片,严重时也为害叶鞘,发病先从叶尖或叶缘开始,先出现暗绿色水浸状线状斑,很快沿线状斑形成黄白色病斑,然后沿叶缘两侧或中肋扩展,变成黄褐色,最后呈枯白色,病斑边缘界限明显。在抗病品种上病斑边缘呈不规则波纹状。感病品种上病叶灰绿色,失水快,内卷呈青枯状,多表现在叶片上部。

急性凋萎型:苗期至分蘖期,病菌从根系或茎基部伤口侵入维管束时易发病。主茎或2个以上分蘖

同时发病,心叶失水青枯,凋萎死亡,其余叶片也先后青枯卷曲,然后全株枯死,也有仅心叶枯死。病株茎内腔有大量菌脓,有的叶鞘基部发病呈黄褐或褐色,折断用手挤压溢出大量黄色菌脓。有的水稻自分蘖至孕穗阶段,剑叶或其下1叶~3叶中脉淡黄色,病斑沿中脉上下延伸,上可达叶尖、下达叶鞘,有时叶片折叠,病株未抽穗而死。

褐斑或褐变型:抗病品种上较多见,病菌通过剪叶或伤口侵入,在气温低或不利发病条件,病斑外围出现褐色坏死反应带,病情扩展停滞。黄化型症状不多见,早期心叶不枯死,上有不规则褪绿斑,后发展为枯黄斑,病叶基部偶有水浸状断续小条斑。

天气潮湿或晨露未干时上述各类病叶上均可见乳白色小点,干后结成黄色小胶粒,很易脱落。水稻白叶枯病造成的枯心苗,在分蘖期开始出现,病株心叶或心叶以下1层~2层叶出现失水、卷筒、青枯等症,最后死亡。白叶枯病形成枯心苗后,其他叶片也逐渐青枯卷缩,最后全株枯死,剥开新青卷的心叶或折断的茎部或切断病叶,用力挤压,可见有黄白色菌脓溢出,即病原菌菌脓,别于大螟、二化螟及三化螟为害造成的枯心苗。

C.7 分类地位及生理生化特性

水稻白叶枯病是由水稻黄单胞菌白叶枯致病变种(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)病原菌引起。该病原菌属原核生物界(Prokaryotae)、变形菌门(Proteobacteria)、丙型变形菌纲(Gammaproteobacteria)、黄单胞菌目(Xanthomonadales)、黄单胞菌科(Xanthomonadaceae)、黄单胞菌属(*Xanthomonas*)。

病原菌菌体为短杆状,两端钝圆,大小为(1.0 μm~2.0 μm)×(0.8 μm~1.0 μm);单鞭毛极生,长6 μm~8 μm;不形成芽孢和荚膜,但在菌体表面有一层胶质分泌物。在琼脂培养基上生长缓慢,菌落呈蜜黄色或淡黄色,圆形,边缘整齐,质地均匀,表面隆起,光滑发亮,无荧光,有黏性。革兰氏染色阴性。好气性、代谢呼吸型。不水解淀粉和明胶;能使石蕊牛乳变红,但不凝固;不还原硝酸盐;产生氮和硫化氢,不产生吲哚;能利用蔗糖、葡萄糖、木糖和乳糖发酵产酸,但不产气。一般不利用无机氮和硝态氮,只能利用部分氨态氮。在含3%葡萄糖或20 mg/kg青霉素的培养基上不能生长。生长温度范围为5℃~40℃,最适温度26℃~30℃。致死温度在无胶膜保护下为53℃ 10 min;在有胶膜保护下为57℃ 10 min。病菌最适宜pH6.5~7.0。

C.8 传播途径和发病条件

带菌种子、带病稻草和残留田间的病株稻桩是主要初侵染源。李氏禾等田边杂草也能传病。细菌在种子内越冬,播后由叶片水孔、伤口侵入,形成中心病株,病株上分泌带菌的黄色小球,借风雨、露水、灌水、昆虫、人为等因素传播。病菌借灌溉水、风雨传播距离较远,低洼积水、雨涝以及灌漫灌可引起连片发病。晨露未干病田操作造成带菌扩散。高温高湿、多露、台风、暴雨是病害流行条件,稻区长期积水、氮肥过多、生长过旺、土壤酸性都有利于病害发生。

附录 D

(规范性附录)

水稻白叶枯病菌、水稻细菌性条斑病菌的 PCR 检测方法

D.1 试剂及配方

D.1.1 DNA 抽提液配方

100 mmol/L Tris-HCl, pH8.0	100 mmol/L EDTA
250 mmol/L NaCl	100 μg/mL 蛋白酶 K

D.1.2 CTAB 沉淀液配方

1%CTAB(质量浓度)(十六烷基三乙基溴化铵)
50 mmol/L Tris-HCl, pH8.0
10 mmol/L EDTA, pH8.0

D.1.3 TE 缓冲液配方

10 mmol/L Tris-HCl, pH8.0
1 mmol/L EDTA, pH8.0

D.1.4 TAE 电泳缓冲液(pH8.5)配方(50×)

Tris	242 g	冰乙酸	57.1 mL
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	37.5 g	蒸馏水	1 000 mL

D.1.5 10×电泳上样缓冲液(pH8.5)配方

20%(质量浓度)Ficoll 400	0.1 mol/L Na ₂ EDTA(pH8.0)
1.9%(质量浓度)SDS	0.25%(质量浓度)溴酚蓝

D.2 细菌 DNA 的提取

将制备好的菌悬液移至一干净灭菌的离心管中,12 000 r/min 离心 15 min,弃上清液。在沉淀中加入 TE 缓冲液 5 mL,10%SDS 溶液 300 μL,20 mg/mL 蛋白酶 K 30 μL,混匀,37 °C 水浴孵育 1 h。加入等体积的三氯甲烷-异戊醇(24:1),混匀。10 000 r/min 离心 5 min,将上清液移至一个新离心管中。加入等体积酚-三氯甲烷-异戊醇(25:24:1),混匀,10 000 r/min 离心 5 min,将上清液移至一新离心管。加入 0.6 倍体积的异丙醇,轻轻混匀,10 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,管中加入 70%乙醇洗涤沉淀,晾干,加入 50 μL TE 缓冲液溶解 DNA 沉淀,-20 °C 长期保存。

注:此步骤可省略。可直接用培养的菌株稀释成 $\geq 10^5$ CFU/mL 的菌悬液做模板进行定性 PCR 检测。

D.3 定性 PCR 检测

D.3.1 PCR 反应体系

D.3.1.1 检测水稻白叶枯病菌、水稻细菌性条斑病菌采用的 PCR 引物序列见表 D.1。

表 D.1 检测水稻白叶枯病菌和水稻细菌性条斑病菌的 PCR 引物

引物名称	引物序列	PCR 产物大小	含铁细胞接受 因子基因
F1	正向引物:5'-GAATATCAGCATCGGCAACAG-3'	152 bp	
R1	反向引物:5'-TACCGGAGCTGCGCGTT-3'		

D.3.1.2 检测水稻白叶枯病菌、水稻细菌性条斑病菌采用的 PCR 反应体系见表 D.2。

表 D.2 检测水稻白叶枯病菌和水稻细菌性条斑病菌的 PCR 反应体系

组 成	加样体积
10×PCR 缓冲液(Mg ²⁺ free)	2.5 μL
氯化镁(25 mmol/μL)	2 μL
dNTP(10 mmol/μL)	0.5 μL
Taq 酶(1 U/μL)	0.7 μL
正向引物(10 pmol/μL)	1.5 μL
反向引物(10 pmol/μL)	1.5 μL
模板 DNA(1 ng/μL~10 ng/μL)	5 μL
双蒸水	11.3 μL
总体积	25 μL

D.3.2 PCR 反应循环参数

94 °C 预变性 3 min;94 °C,30 s;59 °C,30 s;72 °C,20 s,进行 30 个循环;72 °C 延伸 5 min,并置于 4 °C 保存。

D.3.3 PCR 扩增产物的检测

用 TAE 电泳缓冲液制备 2% 的琼脂糖凝胶,按比例混匀电泳上样缓冲液和 PCR 产物,将混有上样缓冲液的 PCR 扩增产物加至样品孔中,用 DNA Maker 做相对分子质量的标记,进行电泳分析,电泳结束后,在凝胶成像分析仪下观察是否扩增出预期的特异性 DNA 电泳带,拍摄并记录实验结果。

附录 E
(资料性附录)

黄单胞菌属(*Xanthomonas*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)主要生化差别

表 E.1 *Xanthomonas* 属和 *Pseudomonas* 属之间的主要表型差异

主要特征	<i>Xanthomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>
氧化酶反应	—(延迟反应)	+
在 0.1% TTC 上生长	—	+
利用天冬酰胺为唯一碳源和氮源	—	+
自水杨苷产酸	—	+
黄单胞色素	+	—