

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1390—2004

香蕉细菌性枯萎病菌检疫鉴定方法

Methods for quarantine and identification of *Ralstonia solanacearum*
(Smith) Yabuuchi et al race 2

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

本标准的附录 A、附录 B 和附录 C 为资料性附录。

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：中华人民共和国广州出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：张传飞、钟国强、赵立荣、司徒保禄。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

香蕉细菌性枯萎病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了进出境植物检疫中香蕉细菌性枯萎病菌检疫鉴定方法。

本标准适用于香蕉、大蕉、蝎尾蕉等寄主植物之果实、吸芽、试管苗和其他繁殖材料的香蕉细菌性枯萎病菌检疫鉴定。

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

香蕉细菌性枯萎病菌的分类地位 学名 *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al race 2, 异名 *Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith race 2, 病害英文名 Moko disease of banana 或者 Bacterial wilt of banana。该病菌隶属于原核生物界 Procarvayotes, 薄壁细菌门 Gracilicutes, Ralstoniaceae 科, *Ralstonia* 属。

香蕉细菌性枯萎病菌在寄主范围、症状特点、培养性状及生物学特性等方面,不同于近似种,也不同于青枯菌的其他生理小种或生物型,是该病菌的鉴定依据(参见附录 A、附录 B)。

4 仪器和试剂

4.1 仪器、器具

- 4.1.1 生物显微镜。
- 4.1.2 体视显微镜。
- 4.1.3 超净工作台。
- 4.1.4 生物培养箱。
- 4.1.5 高压灭菌器。
- 4.1.6 恒温干燥箱。
- 4.1.7 电冰箱。
- 4.1.8 普通天平(感量 0.01 g)。
- 4.1.9 试管(15 mm×130 mm)。
- 4.1.10 小件用器具:培养皿、酒精灯、试管、载玻片、盖玻片、接种针、接种环、移液器、白瓷盘、烧杯、记号笔、小剪刀、镊子、刀片等。

4.2 试剂

- 4.2.1 TTC 培养基(参见附录 C)。
- 4.2.2 95%乙醇(C₂H₆O)。
- 4.2.3 次氯酸钠溶液(NaClO)。
- 4.2.4 无菌水。

5 实验室检验

5.1 症状检查

首先应看植株是否萎蔫,检查植株的根茎叶果等各个部位,叶片是否变黄、折挂,果实是否质地变硬、颜色变褐、干腐。如果发现上述任何一种症状,应及时用解剖刀横向剖开病株假茎基部,检查其维管束组织是否变褐色、病部受挤压后是否有菌脓溢出,如果是则应进一步分离纯化菌种。

本病症状易与香蕉巴拿马萎蔫病(*Fusarium oxysporium* f. sp. cubensis)混淆,但前者通常是植株上部的三片幼叶先褪绿黄化,而后者往往是下部老叶先发病、病部无菌脓、为害不产生褐色干腐的病果。

5.2 细菌的分离纯化

5.2.1 分离:采用选择性 TTC 培养基,用平板划线法或稀释分离法分离细菌。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 0.3%次氯酸钠溶液处理 5 min,再用无菌水清洗两次,最后把病组织置放在洁净的载玻片上捣碎,静置 20 s,用接种环蘸取汁液在 TTC 平板上划线,35℃~37℃下培养 2 d~4 d 后,检查并筛选培养基上的菌落。青枯菌在 TTC 上特征:无致病力或致病力很弱的菌落为深红色,致病性菌落为流质状、白色或中央带淡红的白色。

5.2.2 菌种纯化:采用平板划线法,即用灭菌的移种针针头蘸取 TTC 上可疑的致病性菌落后,在 TTC 平板上多次划线纯化,在 35℃~37℃温度下培养 2 d~4 d,移出单个菌落后进一步扩大繁殖。

5.3 革兰氏染色反应(可省略本步骤)

革兰氏阴性反应,按 GB/T 4789.28—1994 中的 2.2 进行实验。

5.4 致病性测试

5.4.1 测试植物

测试植物除香蕉外,还应在马铃薯、番茄、烟草、茄子、姜五种植物中任选两种。香蕉枯萎病菌属于 2 号小种,寄生专化性强,只为害香蕉不为害其他测试植物。

5.4.2 接种方法

接种采用针刺加注射的方法,用消毒的挑针蘸上菌龄为 24 h、浓度为 10^7 cfu/mL 的细菌悬浮液后,针刺植株的上部幼叶或(假)茎基部。注射法采用注射器在每株植物的茎基部注射 10 mL 左右的接种液,接种浓度 10^7 cfu/mL。阴性对照用无菌水代替接种液。

接种后的植株置放在 28℃~35℃温度下,先在 100%相对湿度保湿 24 h~48 h,然后转移到 80%左右的相对湿度下,每天在 7 000 lx~10 000 lx 下光照培养 16 h,暗室培养 8 h。接种 7 d 后开始观察症状,接种后 40 d 不表现症状的视为不发病,植株表现出萎蔫、在(假)茎基部横切面出现褐变且有菌脓溢出的视为感病。

6 鉴定特征

6.1 症状特点

维管束病害,病株假茎基部横切面可见组织变褐、挤压病部有污白色菌脓溢出。

6.2 病原菌的培养特征

在 TTC 培养基上产生白色、粘质、光滑的菌落,菌落颜色不为深红色。

6.3 致病性特征

寄生专化性强,为害香蕉,不为害马铃薯、番茄、茄和姜等非蕉属植物。

7 结果判定

凡症状、培养特征及致病性特征均与第 6 章所述内容相吻合的,鉴定为香蕉细菌性枯萎病菌。

8 样品和菌种保存

抽样样品(包括健康和发病的植株或组织)拍照后均应制成一部分干标本,室温或低温干燥条件下

妥善保存。

新鲜菌种在 TTC 培养基上(35℃~37℃下)培养 24 h 后用针刮取细菌,放入装有灭菌水的消毒玻璃管中,封口后室温或低温 4℃下保存(菌种的致病力数年不会丧失)。菌种保存时间至少一年。对欲废弃的菌种应做灭活处理。

附录 A

(资料性附录)

青枯菌小种、寄主与生物型的关系

迄今为止,青枯菌共报道了 5 个小种和 5 个生物型(关系见表 A. 1),香蕉枯萎病菌属小种 2 生物型 1。

表 A. 1 青枯菌不同生理小种、寄主与生物型之间的关系

小种编号	寄 主	生物型编号
1	番茄、烟草、多种茄科植物	1,3,4
2	三倍体香蕉、大蕉、蝎尾蕉	1
3	马铃薯、番茄	2
4	桑树	5
5	主要是姜,次要的有番茄、茄子	3,4

附录 B

(资料性附录)

香蕉细菌性枯萎病菌的分布国家和地区

主要分布在东南亚、中南美洲及加勒比海地区。

菲律宾、印度尼西亚、印度、美国夏威夷、墨西哥、留尼旺、格林纳达、危地马拉、伯里兹、萨尔瓦多、洪都拉斯、哥斯达黎加、巴拿马、特立尼达、多巴哥、哥伦比亚、委内瑞拉、圭亚那、苏里南、秘鲁和巴西。

附录 C

(资料性附录)

TTC 培养基的配制

蛋白胨 10 g/L、酪朊水解物 1 g/L、葡萄糖 5 g/L、琼脂 15 g/L,加蒸馏水定容至 1 L,pH 调至 7.0,在 121℃ 灭菌 15 min,加 1% 过滤灭菌的 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)至 55℃ 培养基中,使其终浓度达到 0.005%。