



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 28106—2011

---

## 郁金香黄色疱斑病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Curtobacterium*  
*flaccumfaciens* pv. *oortii* Collins & Jones

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:中华人民共和国天津出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:郭京泽、魏亚东、张裕君、刘跃庭、刘鹏、罗加凤、廖芳、王金成。

# 郁金香黄色疱斑病菌检疫鉴定方法

## 1 范围

本标准规定了郁金香黄色疱斑病菌的检疫鉴定方法。

本标准适用于栽培及其他用途的郁金香球茎、郁金香植株上郁金香黄色疱斑病菌的检疫和鉴定。

## 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

SN/T 2122 进出境植物及植物产品检疫抽样

## 3 郁金香黄色疱斑病菌基本信息

中文名:郁金香黄色疱斑病菌。

学名:*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *oortii*。

异名:*Corynebacterium flaccumfaciens* pv. *oortii* (Saaltink & Maas Geesteranus 1969) Dye & Kemp 1977, *Corynebacterium flaccumfaciens* subsp. *oortii* (Saaltink & Maas Geesteranus 1969) Carlson & Vidaver 1982, *Corynebacterium oortii* Saaltink & Maas Geesteranus 1969。

病害英文名:tulip bacterial canker, tulip yellow pustule。

属原核生物界 Prokaryotes, 厚壁菌门 Firmicutes, 厚壁细菌纲 Firmibacteria, 短小杆菌属 *Curtobacterium*。

该病菌随带病球茎调运远距离传播。带病球茎通过无性繁育将该病菌传播给子球。植株间通过带病菌叶扩散传播。

郁金香黄色疱斑病菌其他信息参见附录 A。

## 4 方法原理

从病部样品中分离病菌并纯化,然后通过革兰氏染色、生理生化测定进行该病原细菌的鉴定。郁金香黄色疱斑病菌的寄主范围、病害症状特征、生物学特性、生理生化特性(参见附录 A 和附录 B)是该病菌的检疫鉴定依据。

## 5 仪器、设备

生物显微镜、超净工作台、高压灭菌锅、恒温培养箱、八道移液器, BIOLOG 细菌自动鉴定系统。

## 6 试剂和培养基

无水乙醇、微量发酵管、革兰氏染色液。

523 培养基:蛋白胨 8 g,酵母粉 4 g,硫酸镁( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )0.3 g,蔗糖( $C_{12}H_{22}O_{11}$ )10 g,磷酸氢二钾( $K_2HPO_4$ )2 g,琼脂 18 g,水( $H_2O$ )1 000 mL。调整 pH 值至 7.0~7.1,121 °C 湿热灭菌 20 min。  
BUG 培养基。

## 7 对照菌株

已知标准菌株作阳性对照菌。选用本属不同种的菌株作为阴性对照菌。

## 8 检测鉴定

### 8.1 现场检测

按照 SN/T 2122 的规定进行检疫并抽取样品。

若发现郁金香病株矮化,叶片出现银灰色斑,上下表皮开裂,茎秆内部变黄,球茎最外层鳞片上出现白色斑,在球茎储藏后期病斑隆起变黄(参见 A.3),应取样带回实验室做病菌分离鉴定。

### 8.2 病原菌分离

取带病样品,用脱脂棉蘸取 75%乙醇擦拭表面,晾干或用灭菌水冲洗 3 次。切取病健交界部位组织置于灭菌的培养皿中加少量灭菌生理盐水,用玻棒碾碎,用接种环蘸取悬液在 523 培养基平板上进行划线分离。每个样品接种不少于 3 个平板。接种后的平板置于 30 °C 培养箱中培养 24 h~72 h,检查出现的菌落情况。

### 8.3 分离菌的纯化

观察 523 培养基平板上产生的菌落,有黄色、有光泽、圆形、边缘整齐、直径 1 mm~1.5 mm 的菌落为可疑菌落。

挑取单个可疑菌落,在 523 培养基平板上划线,接种后的平板置于 30 °C 培养箱中培养 24 h~72 h。一般连续转接 2 次~3 次可得到纯化的分离菌。

### 8.4 革兰氏染色

按 GB/T 4789.28—2003 中 2.2 规定的方法进行。

### 8.5 生理生化测定

从郁金香上分离纯化的细菌经过革兰氏染色测定后,若分离菌为革兰氏染色阳性菌,则结合实验条件任选下列一种方法对分离菌进行生理生化测定:

——应用 BIOLOG 细菌自动鉴定系统对分离菌进行生理生化测定。按照 BIOLOG 细菌自动鉴定系统规定的操作方法进行,鉴定结果为 *Curtobacterium flaccumfaciens*,则判定该分离菌的 BIOLOG 鉴定结果为阳性;

——应用微量发酵管对分离菌进行生理生化测定。测定结果与表 B.1 结果一致,则生理生化测定结果为阳性。否则生理生化测定结果为阴性。

## 9 结果评定

从郁金香上进行细菌分离纯化,若分离菌经过革兰氏染色为阴性菌,则判定检测结果为样品不带郁金香黄色疱斑病菌。

从郁金香上进行细菌分离纯化,分离菌经过革兰氏染色为阳性菌,BIOLOG 鉴定结果为阳性,或用微量发酵管进行生理生化测定其结果为阳性,则判定检验样品带有郁金香黄色疱斑病菌。否则判定检验样品不带郁金香黄色疱斑病菌。

#### 10 菌株和样品的保存

分离并鉴定为郁金香黄色疱斑病菌的菌株应转接到 523 培养基试管斜面上,经登记和经手人签字后置于 4 ℃低温冰箱中保存,定期转接,以防止病菌死亡;必要时冻干后长期保存。

检出郁金香黄色疱斑病菌的样品至少保存 6 个月;保存期满后,需经灭菌处理。

**附 录 A**  
**(资料性附录)**  
**郁金香黄色疱斑病菌其他信息**

**A.1 分布**

丹麦、荷兰、罗马尼亚、英国、日本、韩国,在我国台湾和杭州有报道。

**A.2 寄主范围**

郁金香(*Tulip gesneriana*)。

**A.3 危害症状**

郁金香黄色疱斑病菌能系统性侵染郁金香,引起郁金香维管束病害,造成郁金香植株叶斑和郁金香球茎黄色疱斑。感染郁金香黄色疱斑病菌的郁金香病株严重时可出现矮化症状,叶片出现银灰色斑,上下表皮开裂,茎秆内部变黄,郁金香球茎最外层鳞片上出现白色斑,在球茎储藏后期病斑隆起变黄。在春季温度低时易于发病。

**A.4 生物学特性**

菌体杆状,大小 $(0.4\ \mu\text{m}\sim 0.6\ \mu\text{m})\times(0.6\ \mu\text{m}\sim 3.0\ \mu\text{m})$ ;周生鞭毛,革兰氏染色阳性,最适生长温度为 $25\ ^\circ\text{C}\sim 30\ ^\circ\text{C}$ 。能水解酪蛋白,能利用乳酸、苹果酸、葡萄糖酸、醋酸盐,不能利用阿拉伯糖、山梨糖、蔗糖、丙酸、甲酸盐。

**附录 B**  
(规范性附录)

**郁金香黄色疱斑病菌的生理生化特性**

**表 B.1 郁金香黄色疱斑病菌的生理生化特性**

项目	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>oortii</i>	<i>C. albidum</i>	<i>C. citreum</i>	<i>C. luteum</i>	<i>C. plantarum</i>	<i>C. pusillum</i>	<i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>batae</i>
酪蛋白水解	+	+	-	+	-	+	-
树胶醛糖产酸	-	-	+W	+W	d	+W	-
山梨糖产酸	-	-	+W	-	-	-	-
蔗糖产酸	-	-	-	-	-	+W	-
乳酸同化	+	+	+	-	ND	+	+
苹果酸同化	+	-	+	+	d	-	+
葡萄糖酸同化	+	+	+	+	+	-	+
醋酸盐利用	-						+

注：+：90%以上菌株为阳性；-：90%以上菌株为阴性；d：11%~89%菌株为阳性；W：弱反应；ND：未测定。