

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1586.1—2005

菜豆细菌性萎蔫病菌检测方法

Detection for *Curtobacterium*
flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* (Hedges) Collins and Joes

2005-05-20 发布

2005-12-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

383

前 言

本标准的附录 A、附录 B、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：中华人民共和国北京出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：种焱、洪炜、宁跃明、赵纪文、赵汗青。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

菜豆细菌性萎蔫病菌检测方法

1 范围

本标准规定了进境植物检疫中菜豆细菌性萎蔫病菌检测方法。

本标准适用于来自菜豆细菌性萎蔫病发生国家和地区的菜豆、绿豆、豇豆、大豆和丁癸草等植物种子的进境检疫。

2 仪器和试剂

2.1 仪器设备

生物显微镜、荧光显微镜、超净工作台、生物培养箱、天平、高速冷冻离心机、高压灭菌器、烧杯、三角瓶、量筒、试管、培养皿、载玻片、盖玻片、酒精灯等。

2.2 实验用具

手术刀、手术剪刀、镊子等。

2.3 培养基配方

2.3.1 营养葡萄糖琼脂培养基(NDA)

营养琼脂+1%(质量浓度)葡萄糖。

2.3.2 金氏B培养基

20 g 蛋白胨, 10 g 甘油, 1.5 g 磷酸氢二钾(K_2HPO_4), 1.5 g 硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), 15 g 琼脂, 1 000 mL 蒸馏水。pH=7.2。

2.4 浸泡液配方(Lelliott 和 Setar)

20 g 抗泡沫剂复合物, 2 g 焦磷酸钠盐, 1 g Lubrol W Flakes 表面活性剂, 1 000 mL 蒸馏水。

3 现场检疫和抽样

对一批来自菜豆细菌性萎蔫病发生国家和地区(参见附录 A、附录 B)的菜豆、绿豆、豇豆、大豆和丁癸草等植物种子按进境总量的 0.5%~5% 的比例随机扦取样品。

现场检疫和抽样时应重点观察种子表皮的颜色,尤其是种皮下和种脐部位是否带有黄色的细菌粘胶层或细菌粘液。

4 方法和步骤

4.1 外观症状

4.1.1 种子的颜色

菜豆细菌性萎蔫病菌存在于大豆和菜豆的种子内外部。系统侵染的种子在种皮下有一层厚的细菌层,呈亮黄色,表面侵染的种子仅在种脐有一点黄色细菌粘液。若是受其他变种侵染,则呈桔黄色或紫色。一旦发现异常种子需进行隔离种植或间接分离病菌。

4.1.2 植株症状观察

待种植于隔离温室或指定隔离场地的种子长出幼苗后,对其表现进行系统的观察,主要观察出苗情况、植株和叶片有无异常表现及豆荚上有无异常等。一旦发现异常植株需直接进行分离病菌。

4.2 病菌的分离、测定

4.2.1 直接分离

切取病株变色维管束,部分浸于无菌水中镜检。若有大量细菌存在,准备 NDA(营养葡萄糖琼脂)培养基和金氏 B 培养基分离。24℃~27℃下培养 3 d~4 d 后,观察是否有生长相当慢、扁平、流质状的黄色菌落,同时进行革兰氏染色,若阳性,表明可能有此菌存在,若金氏 B 培养基上有绿色荧光菌落,表明可能是菜豆晕疫病菌(*Pseudomonas phaseolicola*)侵染,而非菜豆细菌性萎蔫病菌侵染,需对病原菌作进一步鉴定和确诊。

4.2.2 间接分离

将 4 份(每份 30 g)种子样品在 100 mL 蒸馏水中浸泡 14 h,加入 100 mL 浸泡液,在 5℃ 状态下 3 000 r/min 匀浆 10 min,然后在 180×g、4℃ 下离心 10 min,上清液纱布过滤后再在 4℃ 6 000×g 下离心 10 min,沉淀悬浮于 3 mL 灭菌蒸馏水中。此悬浮液可用于划线分离或稀释分离,以及用于致病性测定和生理生化测试。

4.2.3 致病性测定

致病性测定可选用感病品种(如 Nano Borlotti di Vigevano)菜豆苗,温室条件下培育至二叶期,在子叶和初生叶间的茎上纵切—2 cm 的伤口,涂抹菌液或样品制备液(见 4.2.2),菌液浓度为 10⁶ cfu/mL~10⁷ cfu/mL,然后用凡士林封伤口,接种苗在 16℃~18℃ 下生长 20 d,观察症状,再用 4.2.1 法分离病原菌。

4.2.4 生理生化测试

将分离到的病菌接种在相应的培养基上对其耐盐性,与温度的关系,好氧性和厌氧性,碳化合物的利用和分解,氮素化合物的利用和分解及大分子化合物的分解能力进行测试。

5 鉴定依据

5.1 症状

菜豆萎蔫病菌通过带病种子或越冬病残体侵染种苗,通常可导致幼苗死亡,若种苗存活,则无叶片生长。菜豆最典型的症状是种苗叶片逐渐萎蔫,伴随褪色,植株矮化。幼枝枯死。褪色叶片通常具深绿色、褐色或红褐色病斑,变色区首先软化,随后干枯,叶片水渍状接种点产生白泡。有时缺乏上述症状,叶片表现为金黄色坏死斑或叶片仅部分萎蔫,与菜豆普通疫病(*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*)相似,但后者在茎、叶上有水渍状斑。

染病的菜豆茎上一般有锈色病斑,病菌在维管束中存活,并使其变褐,茎接种产生叶片脉间变黄和坏死。菜豆茎染病后,沿荚缝有变色病斑,通常黄绿色,有些萎蔫,有时表面凹陷。在成熟豆荚上,病斑部位绿褐色,其余黄色。染病种子具不同大小和形状黄色病斑,与健康种子极易区别。打开豆荚,可见有黄色细菌菌脓。菜豆萎蔫病菌的桔黄色变株或紫色变株侵染种子,分别在种皮上有桔黄色或紫色的褪色斑。

大豆的幼苗和成株均感病。叶片首先出现褪绿小斑,后扩大,沿叶片边缘开始褪绿至中脉。染病组织干燥、变褐而死亡,在有风的情况下,变褐部位脱落,叶片显得粗糙。当种植带菌种子时,种苗矮化,叶片边缘坏死或叶片上有坏死斑,豆荚形成不正常,但在豆荚和茎上没有症状。

5.2 病原特征

菜豆细菌性萎蔫病菌为短小杆菌,革兰氏阳性,能运动,不产孢,(0.3 μm~0.5 μm)×(0.6 μm~3.0 μm),1~3 根侧或极鞭,直至略弯或楔形,单个或 V、Y 形或栅栏状排列。在酵母膏葡萄糖琼脂培养基上,菌落光滑,完整,低隆不粘,黄色、桔黄色、粉红色或紫色。3 d~4 d 菌落直径 1 mm~4 mm。生长最适温度 24℃~27℃,最高温度 35℃~37℃,氯化钠最大忍耐力为 7%~9%,生长需要生物素,维生素 B、泛醌。主要生化特征参见附录 C。

6 结果判定

依据第 5 章对分离物的特性进行综合判定,与各项指标吻合即可鉴定为菜豆细菌性萎蔫病菌。在有条件的情况下,可用专化性的分子探针检测或免疫荧光反应进行辅助鉴定。

7 菌样保存

将鉴定为菜豆细菌性萎蔫病菌的菌样至少保存 12 个月,以备复验、谈判和仲裁。保存期满后,对该菌样做销毁处理。



附录 A
(资料性附录)
菜豆细菌性萎蔫病菌相关资料

A.1 学名

Curtobacterium flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* (Hedges) Collins and Jones

A.2 异名

Bacterium flaccumfaciens Hedges;
Corynebacterium flaccumfaciens Dowson;
Phytomonas flaccumfaciens (H.) Bergey et. al;
Corynebacterium flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* (H.) Dowson;
Corynebacterium flaccumfaciens subsp. *flaccumfaciens* (H.) Dowson.

A.3 英文名

Bacterial vascular wilt of beans(菜豆萎蔫病);
Bacterial tan spot of soybean(大豆褐斑病);
Bacterial wilt of Zornia sp.(丁癸草萎蔫病)。

A.4 分类地位

菜豆细菌性萎蔫病菌属原核生物界(Prokaryotes),厚壁菌门(Firmicutes),厚壁细菌纲(Firmibacteria),短小杆菌属(*Curtobacterium*)。

A.5 寄主植物

菜豆细菌性萎蔫病菌自然条件下主要危害菜豆(*Phaseolus vulgaris*)、多花菜豆(*P. coccineus*)、利马豆(*Phaseolus lunatus*)、赤豆(*Vigna angularis*)、豇豆(*V. unguiculata*)、绿豆(*Vigna radiata*)、扁豆(*Lablab purpureus*)、大豆(*Glycine max*)、丁癸草(*Zornia glabra*);人工接种能侵染黑吉豆(*Vigna-mungo*)、豌豆(*Pisum sativum*)、玉米(*Zea mays*)。

A.6 传播途径

菜豆萎蔫病是一个典型的维管束病害,主要靠种子传播,远距离传播主要是国际贸易中带病的菜豆和大豆、绿豆种子。种子子叶带菌传给叶片或直接进入维管束组织,引起系统发病。病菌在没雨的情况下也能侵染,但不能通过气孔侵入。病菌一旦进入植株,即在维管束组织定殖。病菌再侵染主要通过伤口,萎蔫的发生率随茎和叶片组织的伤口增加而增加。在一定条件下,南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*)提供病原侵入的伤口。灌溉水有利于局部传播。砂性土壤比粘性土壤发病重,低温、下雨和大风有利于病害的发生和流行。

A.7 鉴定原理

菜豆萎蔫病是典型的维管束病害,主要靠豆类种子远距离传播。种子子叶带菌传给叶片或直接进入维管束组织,引起系统发病。

菜豆细菌性萎蔫病菌是植物棒杆菌唯一能运动的,是相对生长较快的细菌,其鉴定主要是依靠该病菌的生理生化特征和致病性试验。致病性试验可用 10^7 cfu/mL的菌液,穿刺接种二、三叶期菜豆苗,10 d~14 d内萎蔫,即可确认。

附 录 B

(资料性附录)

菜豆细菌性萎蔫病菌世界分布

前苏联(格鲁吉亚、克拉斯诺达尔地区,俄罗斯,远东地区的库班等,乌克兰)、土耳其、匈牙利、意大利、前南斯拉夫、罗马尼亚、保加利亚、希腊、突尼斯、澳大利亚(南部及昆士兰)、加拿大、美国(东北各州,康涅狄格至弗吉尼亚、俄亥俄、密执根;西部各州零星发生:威斯康星至科罗拉多,爱达荷,俄勒冈,蒙大拿)、肯尼亚、毛里求斯、巴西、委内瑞拉、阿尔巴尼亚、哥伦比亚。

附 录 C
(资料性附录)
植病棒杆菌主要生化特征表

表 C. 1

细 菌	运动性	色素	生化		产 酸			利用		水解	
			CNS	TTC	核糖	山梨醇	菊粉	乙酸盐	甲酸盐	酪蛋白	七叶苷
<i>Arthrobacter ilicis</i>	+	黄色	-	-	+	-	-	+	+	+	+
<i>Claibacter iranicum</i>	-	黄色	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>insidicus</i>	-	黄色 蓝色	-	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	-	黄色	+	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>nebraskchsis</i>	-	桔黄	+	-	-	+	-	+	-	-	+
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	-	白/无色	-	-	-	+	-	+	-	-	+
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>tessellarius</i>	-	桔黄	+	+	-	+	-	-	-	-	+
<i>C. rathayi</i>	-	黄色	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>C. tritici</i>	-	黄色	+	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>C. xyli</i> subsp. <i>cylicdoritis</i>	-	黄色	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	-	白色	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Curtobacterium flaccumfuciens</i> subsp. <i>betae</i>	+	黄色	+	-	+	+	-	+	-	-	+
<i>C. flaccumfuciens</i> subsp. <i>flaccumfuciens</i>	+	黄色 桔黄色	+	-	+	-	-	+	-	+	+
<i>C. flaccumfuciens</i> subsp. <i>cortii</i>	+	黄色	+	-	+	-	-	-	-	+	+
<i>C. flaccumfuciens</i> subsp. <i>poinsetlise</i>	+	桔黄	+	-	+	+	-	+	-	+	+
<i>Rhodococcus fascians</i>	-	桔黄	-	-	+	+	-	+	+	-	-