

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4073—2014

芒果细菌性黑斑病菌快速检测方法

Detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*

2014-11-19 发布

2015-05-01 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

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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：中华人民共和国福建出入境检验检疫局、中华人民共和国厦门出入境检验检疫局、福建农林大学。

本标准主要起草人：王念武、黄伙水、陈劲松、沈建国、王宏毅、翁瑞泉、黄振、胡方平。

芒果细菌性黑斑病菌快速检测方法

1 范围

本标准规定了芒果细菌性黑斑病菌 *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* 的检疫鉴定方法。

本标准适用于进出境芒果的果实、叶片、枝条,组织繁殖材料中可能携带芒果细菌性黑斑病菌的检疫鉴定。

2 芒果细菌性黑斑病菌基本信息

学名: *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*

分类地位:变形细菌门(Proteobacteria), γ -变形细菌纲(Gammaproteobacteria),黄单胞菌目(Xanthomonadales),黄单胞菌科(Xanthomonadaceae),黄单胞菌属(*Xanthomonas*)、黑腐黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*)、黑腐黄单胞菌芒果致病变种(*Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*)

传播途径:远距离传播主要靠带菌苗木、接穗和果实的调运。

其他信息参见附录 A。

3 方法原理

根据芒果细菌性黑斑病菌的致病基因 *hrpB* 特有碱基序列设计引物进行 PCR 扩增,并结合半选择性培养基上的培养性状,对该菌进行检疫鉴定。

4 仪器设备和主要试剂

4.1 仪器设备

PCR 仪、高压灭菌锅、制冰机、高速冷冻离心机、离心机、超低温冰箱、常规冰箱、旋涡振荡器、电泳仪、凝胶成像系统、天平(感量:0.001 g)、高温干燥箱、震荡培养箱、生物安全柜、可调移液枪。

4.2 主要试剂

半选择性培养基 NCTM3 和 NA 培养基试剂见附录 B,PCR 检测试剂见附录 C。

5 检测鉴定方法

5.1 症状检查

仔细观察芒果的果实、叶片和枝条,症状描述参见附录 A。

5.2 检疫样品的采集及制备

取有疑似症状的芒果果实、叶片、枝条等进行实验室检测鉴定。

5.3 特异性引物的 PCR 初筛

提取可疑样品 DNA,采用特异性引物 Xcm1/Xcm2 进行 PCR 检测。设阳性对照、阴性对照和空白对照,进行 PCR 扩增,扩增产物进行电泳分析。具体操作和判定见附录 C。

5.4 细菌分离培养

半选择性培养基 NCTM3 分离,取疑似症状的样品(参见附录 A),用清水冲洗干净,晾干后用灭菌的解剖刀在病健交界处取一小块病变组织,悬浮于少量无菌水中,用无菌玻棒挤压,然后用接菌环蘸取菌悬液,在 NCTM3 培养基(配制方法见附录 B)、平皿上划线分离,28℃下恒温培养 5 d。挑取疑似单菌落(圆形,乳白色,黏液状,中央隆起,边缘清晰,大小 3.0 mm~4 mm),划线纯化四次后备用。

5.5 分离菌株特异性引物 PCR 扩增确认

采用特异性引物 Xcm1/Xcm2 对分离疑似菌株进行 PCR 检测。设阳性对照、阴性对照和空白对照,进行 PCR 扩增,扩增产物进行电泳分析。具体操作和判定见附录 C。

6 结果判定

6.1 在 5.3 特异性引物的 PCR 初筛中,若出现阴性结果,则判定为样品未携带芒果细菌性黑斑病菌,若出现阳性结果,继续 5.4 细菌分离试验。阳性、阴性结果的判定见附录 C。

6.2 在 5.4 细菌分离的基础上,若未出现疑似菌落,则判定样品未携带芒果细菌性黑斑病菌,若出现疑似菌落,则需 5.5 特异性引物 PCR 扩增继续判定。

6.3 在 5.5 分离菌株特异性引物 PCR 扩增确认中,若出现阳性结果,则判定为样品带有芒果细菌性黑斑病菌;若出现阴性结果,判定为样品未携带芒果细菌性黑斑病菌。阳性、阴性结果的判定见附录 C。

7 样品保存

7.1 样品保存与处理

样品经登记和经手人签字后妥善保存。对检出的芒果细菌性过斑病菌的样品应保存于-20℃冰箱中,以备复核。该类样品保存期满后应经高压灭菌杀死病菌后方可做丢弃处理。

7.2 菌株保存与处理

从检测样品中分离并鉴定为芒果细菌性过斑病菌的菌株,应妥善保存。将菌株接种于 NA 培养基斜面上,28℃培养 48 h,然后 4℃冰箱保存,或液体培养至对数生长期,加入 20%灭菌甘油并混匀,-80℃长期保存或用安瓿管冷冻干燥长期保存。对不需要长期保存的菌株应及时高压灭菌处理。

7.3 结果记录与资料保存

完整的实验记录包括:样品的来源、种类、时间,实验的时间、地点、方法和结果等,并要有实验人员和审核人员签字。PCR 凝胶电泳检测需有电泳结果照片。

附录 A (资料性附录)

芒果细菌性黑斑病菌相关资料

A.1 分类地位

芒果细菌性黑斑病菌 *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* (Patel et al.) Robbs et al., 变形菌门 (Proteobacteria)、γ-变形菌纲 (Gammaproteobacteria) 黄单胞菌目 (Xanthomonadales)、黄单胞菌科 (Xanthomonadaceae)、黄单胞菌属 (*Xanthomonas*)、黑腐黄单胞杆菌 (*Xanthomonas campestris*)、黑腐黄单胞杆菌芒果致病变种 (*Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*)。

黑腐黄单胞杆菌 (*X. campestris*) 有很多不同的致病变种, 根据不同的寄主大约有 70 多种致病变种, 如感染十字花科的 *X. campestris* pv. *Campestris*, 感染葡萄的 *X. campestris* pv. *Vitiscarnosae* 等。

A.2 地理分布

亚洲: 印度, 巴基斯坦, 马来西亚, 日本。我国分布在广东、广西、云南、福建和台湾。

非洲: 南非, 苏丹, 埃及, 马拉维共和国, 刚果, 莫桑比克, 索马里, 摩洛哥。

大洋洲: 澳大利亚。

北美洲: 多米尼加共和国。

南美洲: 巴西, 巴拉圭, 法属圭亚那。

A.3 寄主范围

自然条件下侵染芒果 *Mangifera indica*、腰果 *Anacardium occidentale*、巴西胡椒 *Schinus terebenthifolius*、加椰芒果 *Spondias cytherea*、槟榔青 *Spondias monbin* 等漆树科 Anacardiaceae 植物。人工接种可侵染野芒果 *Spodias mangifera* 和紫葳 *Bignonia chamberlaynii* 等。

A.4 细菌学性状

该菌为短杆状, 有 1~5 根极生鞭毛, 革兰氏染色反应阴性。不产生芽孢, 无荚膜, 多数单排列, 鞭毛单根极生。NA 平板培养 72 h, 菌落圆形, 乳白色, 稍隆起, 表面光滑, 有光泽, 边缘完整, 大小 1.0 mm~1.5 mm。菌体接种于 NA 液体培养基置于 36 °C 下不能生长, 培养液澄清。在 22 °C 下培养, 菌体能生长, 培养液稍混浊, 在 27 °C~32 °C 下培养, 生长良好, 培养液混浊不透明。

A.5 生物学特性

病菌潜伏在病叶、病枝条、病果等病组织中越冬, 是主要的初侵染源。次年春季在温湿度适宜的条件下, 病部溢出菌脓, 借风雨、流水或昆虫传播, 从伤口和水孔等自然孔侵入, 初侵染发病后病部又溢出菌脓, 经传播不断进行再侵染。此病全年均可发生。高温、及暴风雨为促进病害主要因子。

A.6 传播途径

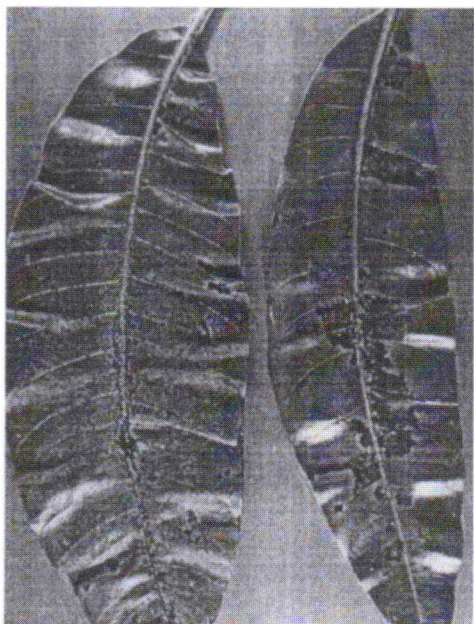
在芒果园内,病菌可以通过容器、工具、土壤、飞溅的雨水传播扩散,并且扩散速度较快。远距离传播主要靠带菌苗木、接穗和果实的调运。

A.7 危害症状

嫩叶感病后,最初出现油渍状小黑点,后扩大成不规则黑褐色斑,常受叶脉限制,呈多角形,发病严重时,几个小斑汇合成不规则大斑,周围有黄晕(见图 A.1),叶中脉变黑,局部开裂,老病斑最后转为灰白色;嫩茎感病后,病部明显退色并纵向开裂,渗出胶液变成黑斑;果柄受害,组织坏死引起落果。幼果受害出现暗绿色斑块,周围有油渍状晕圈,后期果肉变为黑褐色,潮湿时病部溢出菌脓(见图 A.2),严重的引起大量落叶和落果。该病和芒果炭疽病症状有些相似,芒果炭疽病在叶部症状表现为点状分布,一般不会出现不规则的大斑块(见图 A.1),在果实上炭疽病有典型的“泪痕”斑,而细菌性黑斑病则有细菌粘液浸出(见图 A.2)。

A.8 经济影响

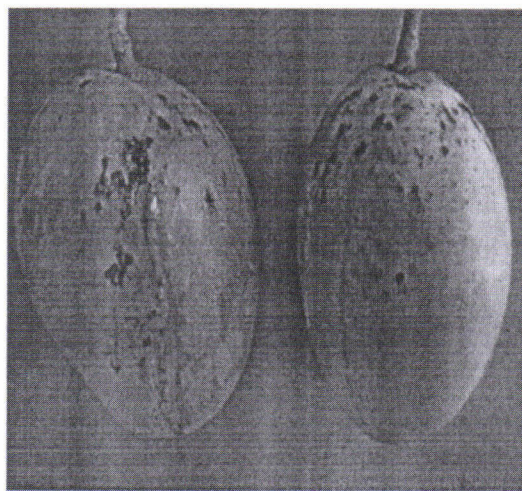
芒果是重要的热带水果,在热带和亚热带 100 多个国家和地区广泛种植。全世界每年总产量约为 2 600~3 000 万吨,仅次于葡萄、柑桔、香蕉和苹果,位居第五位。亚洲是芒果的重要产地,约占世界总产量的 70%,在热带和亚热带水果出口中占有重要地位。芒果细菌性黑斑病是芒果上重要的细菌病害,严重影响芒果生产。该病造成的产量损失一般为 15%~30%,严重的可达 50%。



左:芒果炭疽病,右:芒果细菌性黑斑病

(引自 G.E.Stovold)

图 A.1 叶片受害状



(引自 G.E.Stovold)

图 A.2 芒果果实受害状

附 录 B
(规范性附录)

芒果细菌性黑斑病菌选择性培养基 NCTM3 和 NA 培养基配制方法

B.1 YPGA 培养基(pH 7.2)

酵母膏	7.0 g
蛋白胨	7.0 g
葡萄糖	7.0 g
琼脂	18.0 g
蒸馏水	1 000 mL

按以上配方配好后,调节 pH 值至 7.2,120 ℃ 高压灭菌 20 min。

B.2 NCTM3 培养基

新霉素	1 mg
头孢苄胺	100 mg
甲氧苄啶	5 mg
匹美西林	100 mg
丙环唑	20 mg

将以上药品加入到 1 000 mL 的 YPGA 培养基中。

B.3 NA 培养基(pH 7.2)

酵母膏	1.0 g
牛肉浸膏	3.0 g
蛋白胨	5.0 g
葡萄糖	10.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000 mL

按以上配方配好后,调节 pH 值至 7.2,120 ℃ 高压灭菌 20 min。

注:该配方中不加琼脂则为 NA 液体培养基。

附 录 C

(规范性附录)

芒果细菌性黑斑病菌的特异性引物 PCR 检测方法

C.1 PCR 反应模板的制备

无菌操作下,挑取待测菌的单菌落于 NA 液体培养基中,28 ℃、220 r/min 振荡培养 36 h,取 1 mL 菌悬液,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,提取 DNA(可按 CTAB 方法提取,也可按市场商品化 DNA 提取试剂盒提取),提取的 DNA 保存在-20 ℃备用。也可制成菌悬液作为模板,方法是,在离心后的沉淀中加灭菌双蒸水配成 1×10^8 CFU/mL 的菌悬液,作为 PCR 模板备用。模板首先 DNA,备选菌悬液。

C.2 PCR 检测

C.2.1 特异性引物

Xcm1:5'-AGG CCC TGG AAG GTG CCC TGG A-3'

Xcm2:5'-AGT TCG ACC ACC TTG CCA CA-3'

C.2.2 PCR 反应体系

见表 C.1。

表 C.1 PCR 反应体系

试剂名称	终浓度	加样量 μL
10×Taq 酶缓冲液	1×	
MgCl ₂	1.5 mmol/L	
dNTPs	0.2 mmol/L	
正向引物	0.5 $\mu\text{mol/L}$	
反向引物	0.5 $\mu\text{mol/L}$	
Taq DNA 聚合酶	2.0U	
DNA 模板		1 μL
补 ddH ₂ O 至		25 μL

C.2.3 PCR 的反应程序

PCR 的反应条件:95 ℃/5 min;95 ℃/30 s,64 ℃/30 s,72 ℃/40 s,35 个循环;72 ℃/10 min 产物片段长度约为 340 bp。

C.2.4 PCR 扩增产物的检测

产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳,再经凝胶成像仪拍照、分析,记录实验结果。

C.3 结果判定

特异性引物 Xcm1/Xcm2, 预计扩增片段约为 340 bp, 当阳性对照出现目标条带, 而阴性对照及空白对照均未出现目标条带时, 实验结果有效。

实验结果有效时, 若 PCR 扩增产物经凝胶电泳检测结果出现 340 bp 目标条带, 则判定为阳性; 若未出现目标条带, 则判定为阴性。
