



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3681—2013

魔芋细菌性叶斑病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Acidovorax konjaci* (Goto, 1983) Willems, et al. 1992

2013-08-30 发布

2014-03-01 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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

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：中华人民共和国山东出入境检验检疫局、中华人民共和国湖北出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：甘琴华、厉艳、邵秀玲、封立平、刘彩霞、王英超、赵晖、李凤新、纪瑛。

魔芋细菌性叶斑病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了进出境植物及其产品中魔芋细菌性叶斑病菌的检疫鉴定方法。

本标准适用于进出境魔芋细菌性叶斑病菌寄主植物及其繁殖材料中该病菌的检疫和鉴定。

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 1157 进出境植物苗木检疫规程

3 魔芋细菌性叶斑病菌基本信息

学名:*Acidovorax konjaci* (Goto, 1983) Willems, *et al.* 1992.

异名:*Pseudomonas avenae* subsp. *konjaci* (Goto, 1983) Hu, *et al.*, 1991; *Acidovorax avenae* subsp. *konjaci*; *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *konjaci* Goto 1983.

分类地位:原核生物界(Prokaryotae)、薄壁菌门(Gracilicutes)、暗细菌纲(Scotobacteria)、假单胞杆菌目(Pseudomonadales)、假单胞杆菌科(Pseudomonadaceae)、嗜酸菌属(*Acidovorax*)。

传播途径:带菌的种芋是远距离传播主要途径。在田间和温室,主要通过灌溉水、雨水、风力、修剪枝等传播,由伤口、气孔和自然裂口侵入寄主组织。

魔芋细菌性叶斑病菌的其他信息参见附录 A。

4 方法原理

根据症状现场采集病样,实验室开展分离培养纯化,及革兰氏染色、生理生化、致病性测定和分子生物学的检测,鉴定特征吻合,检测结果为阳性的,判定为魔芋细菌性叶斑病菌。

5 仪器用具和主要试剂

5.1 仪器及用具

生物显微镜、具透射光源的体视显微镜、超净工作台、电子天平、光照恒温培养箱、PCR 扩增仪、电泳仪、凝胶成像仪、高压灭菌器、酒精灯、培养皿(直径:7.0 和 9.0 cm)、医用注射器(10 mL)、针头(18 号)、医用手术剪、镊子、解剖刀、烧杯(500 mL)、试管(直径 12 mm)、载玻片、盖玻片、量筒(500 mL)。

5.2 主要试剂

除另有规定外,所有试剂均为分析纯。蒸馏水、蛋白胨、0.1%次氯酸钠或 75%乙醇、PPSM 培养基、

YP 培养基、金氏 B(KB)培养基。培养基配制方法见附录 B。

6 现场检测

6.1 抽样

块茎或植株按 SN/T 1157 中的规定进行抽样。

6.2 症状检查

首先应查看植株是否萎蔫,检查植株的根茎叶等各个部位,叶片是否有斑点、下垂,根、茎或块茎是否腐烂。如果发现上述任何一种症状,切取或将整棵植株取回实验室检验。

7 实验室检测

7.1 病原菌的分离培养

7.1.1 病原菌的分离

用灭菌剪刀(或解剖刀)剪取可疑症状的植物组织,取表层组织切成约 2 mm^2 小块,先用 75% 的乙醇浸泡 30 s 表面消毒,捞出后用无菌水洗 3 次,最后把病组织置放在装有 2 mL 1% 蛋白胨水溶液的无菌离心管中,用无菌的玻璃棒捣碎,用无菌接种环蘸取汁液在 PPSM 平板上划线,28 °C 恒温培养 2 d~3 d 后,检查是否有菌落产生。

7.1.2 菌种纯化

采用平板划线法,即用无菌的接种环蘸取穹隆状、全缘、中央部淡紫桃色、周边透明的菌落后,在 YP 或 KB 平板上多次划线纯化,28 °C 恒温培养 2 d~3 d,移出单个菌落后进一步扩大繁殖。

7.2 革兰氏染色反应

按 GB/T 4789.28—2003 中的 2.2 进行实验。

7.3 生理生化测定

分离菌的生理生化测定,可结合实验室条件,选用以下任一方法进行。

——应用生化管或微量发酵管进行分离菌的生理生化测定。*A. konjaci* 标准菌株革兰氏反应阴性,氧化酶反应阳性,能分解丙二酸,不能利用 D-半乳糖、2-氨基乙醇。若上述特征符合则选取可疑菌落作进一步鉴定。

——应用 BIOLOG 全自动微生物鉴定系统鉴定分离菌。按 BIOLOG 规定的操作方法进行,如果 24 h 鉴定结果为 *A. konjaci*,则判定该分离菌 BIOLOG 鉴定结果为阳性,选取可疑菌落作进一步鉴定。

7.4 致病性测定

将培养 24 h~48 h 的分离菌用灭菌水配成浓度为 10^7 CFU/mL ~ 10^8 CFU/mL 的菌悬液,用注射法接种到具 2~3 片真叶的健康魔芋苗叶片上,分别设置阴性对照和空白对照。接种后植株在 27 °C~30 °C 保湿培养,24 h 后开始观察发病症状,每隔 24 h 观察一次。*A. konjaci* 标准菌株在接种 48 h 后接种部位开始出现小的水浸状病斑,5 d~7 d 后非接种部位出现病斑,随着时间的延长,病斑迅速扩展蔓延,1 周后病斑达到 $(10\text{ mm}\sim 20\text{ mm})\times(2\text{ mm}\sim 4\text{ mm})$ 的大小。

7.5 分子生物学检测

分子生物学检测见附录 C。通过电泳观察,若有 872 bp 大小的产物带出现,且扩增产物与魔芋细菌性叶斑病菌(GenBank: AY572033.1)同源性达到 99% 以上,则判定结果为阳性,否则判定结果为阴性。

8 结果判定

凡培养特征、生理生化特征与 *A. konjaci* 吻合,且采用致病性测定或分子生物学检测其中之一结果为阳性的,判定为检测样品中带有魔芋细菌性叶斑病菌;否则判定为检测样品中不带有魔芋细菌性叶斑病菌。

9 样品保存

9.1 样品保存与处理

保存样品经登记和经手人签字后置于阴凉干燥、防虫防鼠处妥善保存 3 个月。对检出魔芋细菌性叶斑病菌的样品应至少保存 6 个月,以备复检、谈判和仲裁,该类样品保存期满后,需经灭菌后方可处理。

9.2 菌株保存与处理

从检测样品中分离到并鉴定为魔芋细菌性叶斑病菌的菌株,应妥善保存。将菌株转接到试管斜面上,28℃ 恒温培养 48 h。然后置于 4℃ 冰箱中保存,定期(30 d~60 d)转接,防止病菌死亡;或在菌悬液中加入 15%~30% 的甘油于-80℃ 下保存;必要时将菌株用真空冷冻干燥机制成冻干粉,-80℃ 下长期保存。

9.3 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。

SN/T 3681—2013

附 录 A
(资料性附录)
魔芋细菌性叶斑病菌其他信息

A.1 名称

中文名称:魔芋细菌性叶斑病菌
异名:类产碱假单胞菌魔芋亚种、燕麦假单胞菌魔芋亚种、燕麦食酸菌蘑芋亚种
英文名称:Bacterial leaf blight of the konjac plant;leaf spot and leaf blight.

A.2 症状特征

在潮湿的自然条件下,魔芋叶柄伤口处被感染,感染处迅速扩大,叶斑出现。叶片产生斑点、下垂、腐烂,块茎腐烂,挤压病部有污白色菌脓溢出。人工接种,48 h 后接种部位开始出现小的水浸状病斑,5 d~7 d 后非接种部位出现病斑,随着时间的延长,病斑迅速扩展蔓延,一周后病斑达到(10 mm~20 mm)×(2 mm~4 mm)大小。

A.3 寄主范围

魔芋(*Amorphophallus konjac*)。

A.4 分布

日本。

A.5 病原菌培养性状及形态特征

在 YP 培养基上生长白色、圆形、透明、表面光滑、略微突起,28 ℃ 培养 5 d 后菌落直径 2 mm~3 mm。在 KB 培养基上产生棕褐色水溶物。
该病菌菌体杆状,0.5 μm×(1.8 μm~2.3 μm),好氧型,极生单根鞭毛,无荧光,革兰氏反应阴性。(G+C)mol% 占 66%~68%。

A.6 近似种生理生化特征

见表 A.1。

表 A.1 近似种生理生化特征表

菌种 反应	<i>A.konjaci</i>	<i>Acidovorax cattleyae</i>	<i>Acidovorax citrulli</i>
氧化酶	+	+	+
明胶液化	—	—	—

表 A.1 (续)

菌种 反应	<i>A.konjaci</i>	<i>Acidovorax cattleyae</i>	<i>Acidovorax citrulli</i>
精氨酸双水解酶	—	—	—
葡萄糖产酸	—	+	—
丙二酸	+	—	—
D-半乳糖	—	+	+
2-氨基乙醇	—	+	+
注：“+”表示阳性反应；“—”表示阴性反应。			

SN/T 3681—2013

附 录 B
(规范性附录)

魔芋细菌性叶斑病菌常用的培养基配方

B.1 选择性培养基(PPSM)

B.1.1 成分

磷酸二氢钾	0.5 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	3.0 g
酒石酸钠	6.0 g
硫酸胺	2.0 g
L-白氨酸	10 μg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.29 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	67 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25 mg
酚红	20 mg
甲基紫	2 mg
氨苄青霉素钠	12.5 mg
放线菌酮	25 mg
双硫胺甲酰苯菌灵粉剂	50 mg
琼脂粉	15 g

B.1.2 配制方法

将除氨苄青霉素钠、放线菌酮、双硫胺甲酰苯菌灵粉剂以外的成分充分溶解，加蒸馏水至 1 000.0 mL，121 ℃ 湿热灭菌 15 min~20 min。使用前再添加已过滤除菌的三种溶液。

B.2 YP 培养基

酵母膏	5.0 g
蛋白胨	10.0 g
琼脂	15.0 g

加蒸馏水至 1 000.0 mL
调整 pH 至 7.4，121 ℃ 湿热灭菌 15 min~20 min。

B.3 金氏 B 培养基(KB)

蛋白胨	20 g
甘油	10 mL

磷酸氢二钾	1.5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.5 g
琼脂	15 g

加蒸馏水至 1 000.0 mL

调整 pH 至 7.2, 121 °C 湿热灭菌 15 min~20 min。

附 录 C
(规范性附录)
分子生物学检测

C.1 病原细菌 DNA 的提取

C.1.1 将供试菌株在斜面培养基上 28 ℃ 培养 48 h。

C.1.2 将细菌悬浮液转移至一干净的 10 mL 离心管中, 10 000 *g* 离心 10 min, 弃上清液, 加入 TE 缓冲液 5 mL、10% SDS 溶液 300 μ L, 20 mg/mL 蛋白酶 K 30 μ L, 混匀, 37 ℃ 水浴孵育 1 h。

C.1.3 加入等体积的三氯甲烷/异戊醇(24 : 1)混匀, 12 000 *g* 离心 10 min, 取上清液。

C.1.4 加入等体积三氯甲烷/异戊醇(24 : 1)混匀, 12 000 *g* 离心 10 min。

C.1.5 将上清液转移至一离心管, 加入 0.6 倍体积的异丙醇, 混匀, 12 000 *g* 离心 10 min, 弃上清液。

C.1.6 70% 乙醇洗涤沉淀, 室温干燥后, 用 100 μ L 灭菌双蒸水溶解。

注: 也可用细菌 DNA 提取试剂盒。病原菌 DNA 提取也可省略, 直接用培养的菌株稀释悬浊液作为模板进行 PCR 反应。

C.2 引物序列

采用如下引物: PF: 5'-TGYACACACCGCCCGT-3', PR: 5'-GGGTTBCCCCATTTCRG-3'。其中, Y=C/T, B=G/T/C, R=A/G。

C.3 PCR 反应体系及参数

C.3.1 PCR 反应体系

PCR 反应体系见表 C.1。

表 C.1 PCR 反应体系

试剂名称	终浓度
10×PCR 反应缓冲液	1×
MgCl ₂	2.5 mmol/L
dNTPs	0.2 mmol/L
PF	0.2 μ mol/L
PR	0.2 μ mol/L
<i>Taq</i> plus DNA 聚合酶	2.5 U
DNA 模板	20 ng~100 ng
补 ddH ₂ O 至 50 μ L	

C.3.2 阴性对照、阳性对照和空白对照的设置

阴性对照、阳性对照和空白对照的设置; 阳性对照: 采用魔芋细菌性叶斑病菌或含有待测基因序列

的质粒;空白对照:设两个,一是提取 DNA 时设置的提取空白对照(以 H₂O 代替样品),二是 PCR 反应的空白对照(以水代替 DNA 模板)。

C.3.3 PCR 的反应参数

95 °C/1 min; 94 °C/30 S, 57 °C/40 S, 72 °C/2 min, 35 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。

注:不同仪器可根据仪器要求将反应参数作适当调整。

C.4 琼脂糖凝胶电泳

制备 1% 的琼脂糖凝胶,按比例混匀电泳上样缓冲液和 PCR 扩增产物,用 DNA Marker 作为分子量标记,进行电泳分析,电泳结束后在凝胶成像仪的紫外透射光下观察是否扩增出预期的 DNA 条带,并拍摄记录。

C.5 BLAST 同源性比较

将扩增产物纯化后进行测序。测序结果在 GenBank 中进行 BLAST 比对,比较 PCR 产物与魔芋细菌性叶斑病菌的同源性。

C.6 结果判断

通过电泳观察,若有 872 bp 大小的产物带出现,且扩增产物与魔芋细菌性叶斑病菌(GenBank: AY572033.1)同源性达到 99% 以上,则判定结果为阳性,否则判定结果为阴性。

参 考 文 献

- [1] 回文广,赵廷昌,Schaad N W 等. 哈密瓜细菌性果斑病菌快速检测方法的建立. 中国农业科学, 2007, 40: 2495-2501.
- [2] Willems A, Goor M, Thielemans S, *et al.* Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* Species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. nov., *comb. nov.*, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjaci*. International Journal of Systematic Bacteriology, 1992, 1:107-119.
- [3] Postnikova E, Baldwin C, Whitehouse C A, *et al.* Identification of bacterial plant pathogens using multilocus polymerase chain reaction/electrospray ionization-mass spectrometry. Phytopathology, 2008, 98:1156-1164.
- [4] Hu F P., Young J M., Triggs C M., *et al.* Relationships within the Proteobacteria of plant pathogenic *Acidovorax* species and subspecies, *Burkholderia* species, and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* by sequence analysis of 16SrDNA, numerical analysis and determinative tests. Antonie van Leeuwenhoek, 2001, 80:201-214.
- [5] Goto M. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *konjaci* subsp. nov., the causal agent of bacterial leaf blight of konjac (*Amorphophalus konjac* Koch.). International Journal of Systematic Bacteriology, 1983, 33:539-545.
- [6] Hayashi N. Selective medium for the detection of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *Konjaci*, the causal agent of bacterial leaf blight of Konnyaku (*Amorphophallus konjac*). Ann. Phytopath. Soc. Japan, 1987, 53:489-494.
- [7] Schaad N M., Postnikova E., Sechler A., *et al.* Reclassification of subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. Avenae* (Manns 1905) emend., *A. cattleyae* (Pavarino, 1911) comb.nov., *A. citrulli* Schaad et al., 1978) comb.nov., and proposal of *A. oryzae* sp. nov. Systematic and Applied Microbiology, 2008, 31:434-446.