

DB33

浙江省地方标准

DB33/T XXXXX—XXXX

甘薯茎腐病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Dickeya dadantii*

(报批稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

浙江省市场监督管理局 发布

前 言

本标准按GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本标准的某些内容可能涉及专利。本标准的发布机构不承担识别专利的责任。

本标准由浙江省农业农村厅提出。

本标准由浙江省种植业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：浙江省植保检疫与农药管理总站、浙江大学、浙江省植物保护学会。

本标准主要起草人：楼兵干、李艳敏、沈肖玲、陆剑飞、施海萍、高其康、李国钧、张莉丽、李月红、刘丽华、仇智灵、姚海峰、王荣洲。

甘薯茎腐病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了术语与定义、缩略语、甘薯茎腐病菌 PCR 反应和实时荧光 PCR 反应体系的构成、试剂和材料、器材与设备、操作步骤和结果判定。

本标准适用于甘薯根、茎、叶等植物材料甘薯茎腐病菌的检测。

2 规范性引用文件

本标准没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

甘薯茎腐病菌 the pathogen of stem and root rot of sweet potato

引起甘薯茎腐病的病原菌，属于细菌界（Bacteria）、变形菌门（Proteobacteria）、伽玛变形菌纲（Gammaproteobacteria）、肠杆菌目（Enterobacterales）、果胶杆菌科（Pectobacteriaceae）、狄克氏菌属（*Dickeya*）、达旦提狄克氏菌（*Dickeya dadantii*）。革兰氏阴性细菌，菌体短杆状，大小约为 $2.36\ \mu\text{m} \times 0.40\ \mu\text{m}$ ，周生鞭毛，可在烟草上激发过敏性反应（HR）。

注：症状特征见附录A。

4 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

bp: 碱基对（Base pair）

CFU: 菌落形成单位（Colony-Forming Unit）

CTAB: 溴代十六烷基三甲胺（Cetyltrimethylammonium bromide）

DNA: 脱氧核糖核酸（Deoxyribonucleic acid）

dNTP: 脱氧核苷三磷酸（Deoxyribonucleoside triphosphate）

HR: 过敏性反应（Hypersensitive Reaction）

MALDI-TOF MS: 软电离高分辨飞行时间串联质谱仪（Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry）

NA: 营养琼脂 (Nutrient Agar)

NGM: 营养琼脂甘油培养基 (Nutrient Agar Glycerol Media)

PCR: 聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction)

RT-PCR: 逆转录-聚合酶链式反应 (Reverse transcription polymerase chain reaction)

Taq: 水生嗜热杆菌 (Thermus aquaticus)

5 方法原理

根据甘薯茎腐病的菌落形态特征、田间危害症状特征、分子生物学PCR或RT-PCR反应特征、蛋白质指纹图谱特征和致病性测试结果等进行检测鉴定。

6 试剂或材料

- 6.1 75%乙醇。
- 6.2 1%次氯酸钠。
- 6.3 蛋白胨。
- 6.4 牛肉浸膏。
- 6.5 氯化钠。
- 6.6 琼脂粉。
- 6.7 蔗糖。
- 6.8 NA、NGM培养基配方，培养基配比按附录B执行。
- 6.9 PCR凝胶电泳检测试剂，制备方法按附录C执行。
- 6.10 实时荧光PCR检测试剂，制备方法按附录D执行。

7 仪器设备

- 7.1 普通冰箱。
- 7.2 超低温冰箱：最低可设定温度-80℃。
- 7.3 台式小型离心机。
- 7.4 低温高速离心机。
- 7.5 PCR仪。
- 7.6 实时荧光定量PCR仪。
- 7.7 电泳仪。
- 7.8 水平电泳槽。
- 7.9 凝胶成像分析仪。
- 7.10 微波炉。

- 7.11 电子天平：最小分度值为 1 mg。
- 7.12 显微镜。
- 7.13 恒温培养箱。
- 7.14 超净工作台。
- 7.15 灭菌锅。
- 7.16 旋涡振荡器。
- 7.17 移液器。
- 7.18 MALDI 质谱仪：需具有细菌鉴定分析模块及含 *D. dadantii* 质谱数据的菌株数据库。

8 甘薯茎腐病菌检测流程

甘薯茎腐病菌检测流程图见图1。

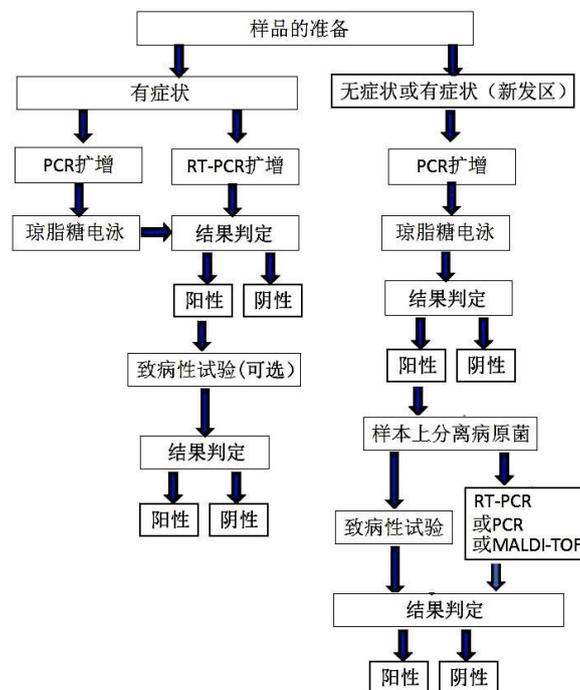


图1 甘薯茎腐病菌检测流程图

9 症状观察

对于植株样品，参见附录A中的症状描述观察有无甘薯茎腐病典型症状，对出现典型症状或可疑症状的植株进行拍照记录，并采集表现症状的块根、藤蔓、叶柄、叶片等进行检测，无症状植株随机取样测试。

10 实验室检测

10.1 样品处理

10.1.1 对于有症样品：取病健交界处组织置于低倍显微镜下观察有无喷菌现象（见附录A）。如观察到喷菌现象，剪取病健交界处3块~5块组织，每块约10 mm × 10 mm，表面消毒后无菌水洗三次，剪碎后加入1 mL 生理盐水，室温浸泡15 min~30 min或4 ℃冰箱8 h以上，取浸泡液12000 r/min（离心力10000 g）离心5 min，1 mL无菌水悬浮沉淀，用于PCR检测或直接平板划线进行病菌分离培养，28℃培养2 d~3 d，获得单菌落。

10.1.2 对于无症状样品：取10块~20块植物材料剪碎，100 mL~200 mL生理盐水4℃冰箱过夜，浸泡液10000 r/min（离心力9000 g）离心20 min，1 mL无菌水悬浮沉淀；12000 r/min（离心力10000 g）离心5 min，沉淀用于提取DNA和PCR检测；如PCR检测为阳性，将上述检测样品表面消毒，无菌水洗三次后，加入100 mL生理盐水，室温浸泡1 h或4 ℃冰箱8 h以上，浸泡液10000 r/min（9000g）离心20 min，1 mL无菌水悬浮沉淀，悬浮液稀释2个~3个梯度，于NGM或NA平板涂布3个~5个平板分离，28℃培养2 d~3 d。

10.1.3 分离培养鉴定

10.1.3.1 用灭菌接种环蘸取样品悬浮液（10.1）在NGM或NA平板上划线分离，同时，将悬浮液进行10倍梯度稀释3次，各取100 μL稀释液涂布培养皿，重复3次，28℃恒温培养2 d，挑取疑似甘薯茎腐病菌单菌落进行转接纯化，菌落形态特征见附录A，再采用本标准10.2或10.3方法进一步鉴定。

10.1.3.2 NGM和NA培养基的配方按附录B执行。

10.2 PCR检测

10.2.1 模板制备

样品DNA的提取可按CTAB方法，也可使用商品化的DNA提取试剂盒提取。提取的核酸用于PCR检测或-20℃保存备用。

10.2.2 常规PCR检测

对于有症样品，以标准菌株做阳性对照，健康植物组织做阴性对照，双蒸水作为空白对照进行PCR检测，具体检测步骤和判定标准按附录C执行。单菌落可制成菌悬液直接进行PCR检测。

10.2.3 实时荧光PCR检测

检测步骤按附录D执行，对照设置按本标准10.2.2执行。单菌落可制成菌悬液直接进行实时荧光PCR检测。

10.3 MALDI-TOF 质谱鉴定

单菌落按MALDI-TOF MS质谱进行检测，具体鉴定步骤和判定标准按附录E执行。

10.5 致病性测试（可选）

挑取疑似甘薯茎腐病菌单菌落制成 10^8 CFU/mL 菌悬液，用针刺接种方法对甘薯藤蔓进行致病性测试。对照为无菌水接种，保湿 1 d， $25^{\circ}\text{C}\sim 30^{\circ}\text{C}$ ，12h/12h 生长。接种 2 d~4 d 后观察接种位置附近是否出现症状。根据柯赫氏法则，对发病处组织再分离病菌，分离单菌落进行 PCR 检测，完成验证。

11 结果判定

对于有症状样品，PCR检测结果为阳性，即判定为检出甘薯茎腐病菌；无症状样品或新发生区的有症状样品，PCR检测结果阳性，且分离到病菌，参考致病性测试结果，判定检出甘薯茎腐病菌。其中，PCR检测可根据实验条件，选择本标准10.2.2或10.2.3的一种进行检测，任意一种检测方法的结果为阳性则判定为PCR检测结果为阳性。分离的疑似甘薯茎腐病菌单菌落鉴定可选用本标准10.2.2或10.2.3或10.3中的一种进行检测，任意一种检测方法的结果为阳性则判定结果为阳性，即分离的单菌落鉴定为甘薯茎腐病菌 *D. dadantii*。

12 样品及检测结果保存

12.1 样品保存与处理

样品经登记和经手人签字后妥善保存。对检出甘薯茎腐病的样品应妥善保存，以备复核。该类样品保存期满后应经高压灭菌处理。

12.2 菌株保存与处理

从检测样品中分离并鉴定为甘薯茎腐病菌的菌株，可采用甘油保存或冻干保存，对不需要长期保存的菌株应及时灭菌处理。

12.3 结果记录与资料保存

实验记录包括：样本来源、采样时间、采样地点、品种、样本的具体症状特点、送样时间、送样人、送样人联系方式和联系地址、检测时间、地点、方法和鉴定者。疑似症状等应及时拍照保存，PCR 检测结果需有原始实验数据及相关结果图片。

附录 A
(资料性)
甘薯茎腐病菌基本信息

A.1 症状

在甘薯苗期、生长期至贮藏期均可发生，可为害薯块、薯苗、藤蔓、叶柄和叶片。植株早期发病，叶片萎蔫，茎部、叶柄出现暗褐色至黑褐色软腐，维管束黑褐色，叶脉有变黑坏死的现象发生，叶片上出现黑褐色斑，见图 A.1。早期发病全株枯死。中后期发病，在病斑部位上端的藤蔓有不定根深入土中吸取营养而使植株“假健康”，到收获时发现藤蔓基部腐烂变成纤维状，薯块变黑腐烂。贮藏期薯块初发病斑一般以芽眼为中心圆形，稍凹陷，黑褐色，后逐渐扩大引起整薯腐烂，病部软化腐烂有臭味。



图A.1 甘薯茎腐病症状

A.2 病原菌形态及培养性状

病原菌是革兰氏阴性细菌，菌体短杆状，大小约为 $2.36 \mu\text{m} \times 0.4 \mu\text{m}$ ，周生鞭毛，见图 A.2。可在烟草上激发过敏性反应(HR)，见图 A.3。病原菌在 NA 平板上 28°C 培养 2 d 后，菌落淡土黄色、不透明、边缘不整齐、表面凸起稍皱缩，直径 $2 \text{ mm} \sim 3 \text{ mm}$ ，见图 A.4 的左图。在 NGM 平板上 28°C 培养 2 d 后，菌落呈煎鸡蛋状，边缘不整齐，表面略凸起，产生靛蓝，直径 $2 \text{ mm} \sim 3 \text{ mm}$ ，见图 A.4

的右图。

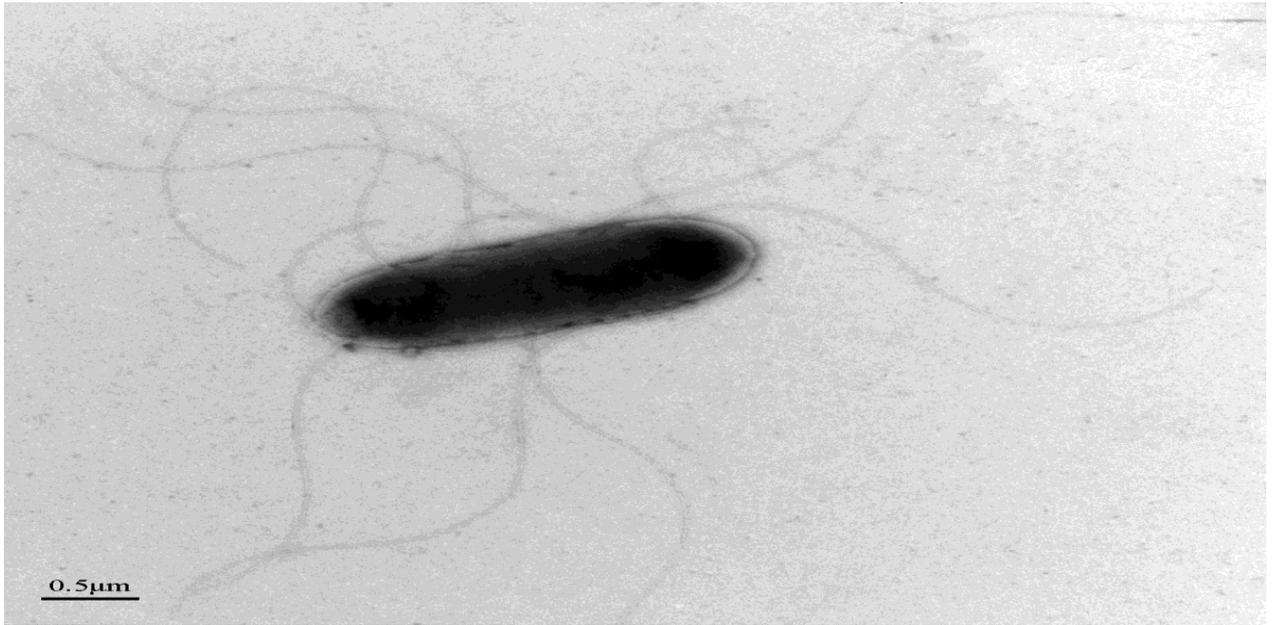


图 A.2 *D. dadantii*菌体形态图

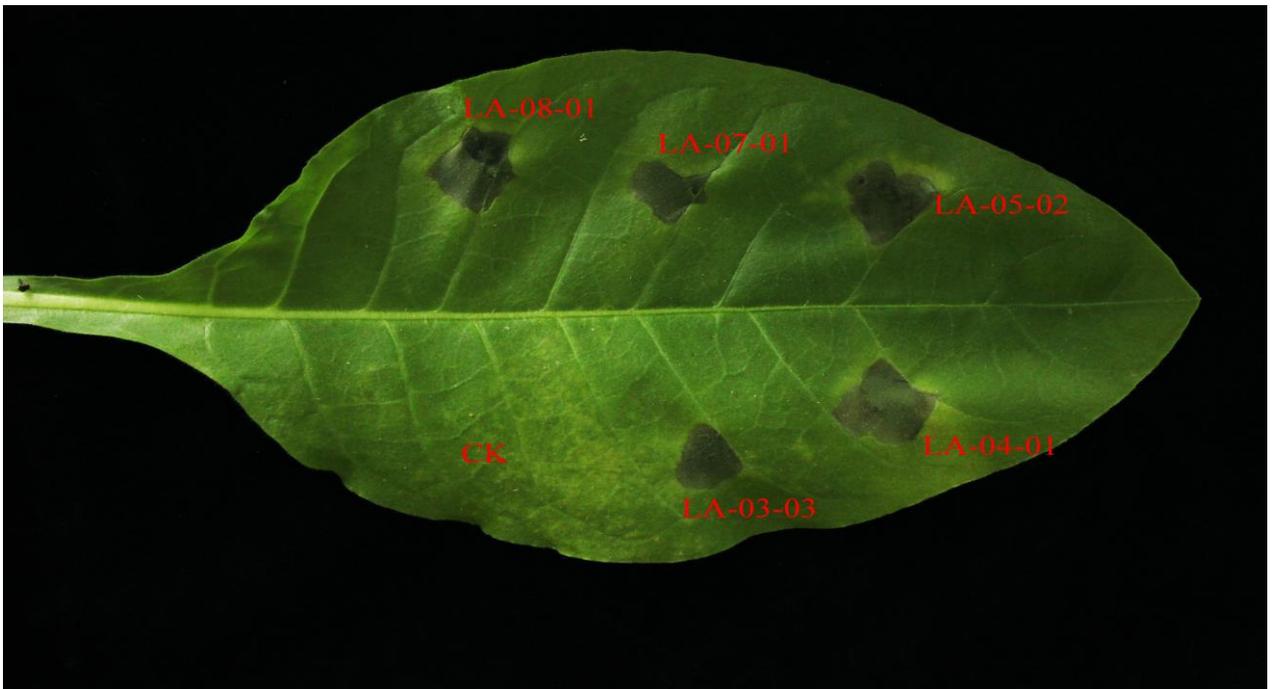


图 A.3 烟草过敏性反应

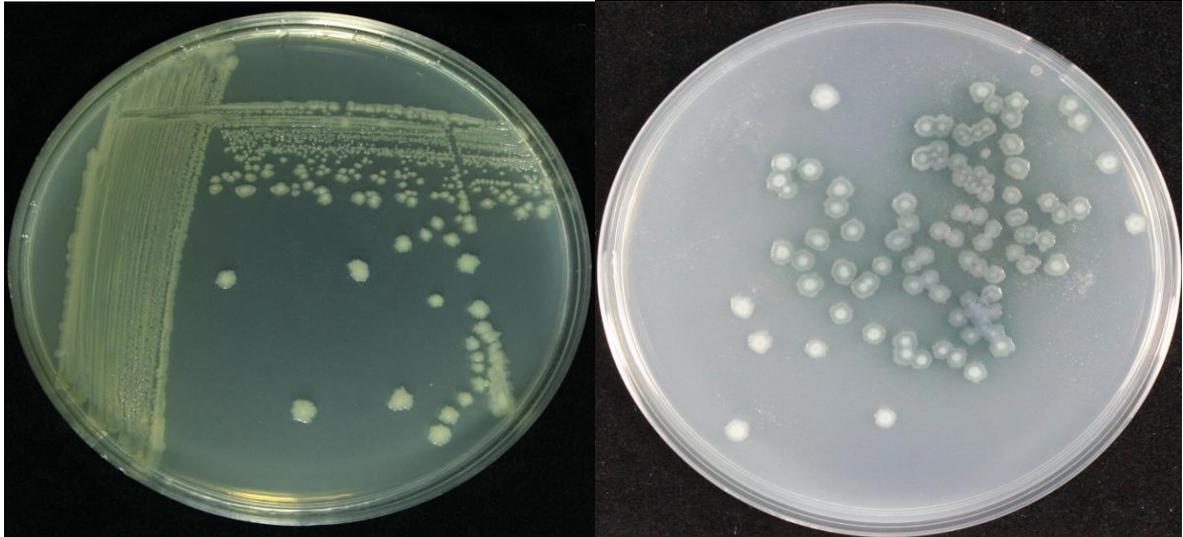


图 A.4 *D. dadantii*在培养基上的菌落形态

注：左图：NA培养基；右图：NGM培养基。

A.3 接种症状

分离物 10^8 CFU/mL菌悬液针刺接种甘薯藤蔓进行致病性测试。对照为无菌水接种，保湿1 d， $25^{\circ}\text{C}\sim 30^{\circ}\text{C}$ 生长。接种2 d~4 d后观察接种位置附近是否出现症状，见图A.5。根据柯赫氏法则，对发病处组织再分离病菌，进行PCR检测。



图 A.5 甘薯藤蔓上的接种症状

注：左图为对照，右图为分离物。

附录 B
(规范性)
培养基

B.1 NA培养基 (1L)

B.1.1 蛋白胨 10 g。

B.1.2 氯化钠 5 g。

B.1.3 蔗糖 5 g。

B.1.4 牛肉浸膏 3 g。

B.1.5 琼脂粉 15 g。

B.1.6 蒸馏水 1000 mL。

B.1.7 pH 7.0~7.2, 121℃ 高压蒸汽灭菌 15 min。

B.2 NGM培养基 (1L)

B.2.1 营养琼脂 (Becton Dickinson and Company Sparks, MD) 23 g。

B.2.2 甘油 (1% v/v) 10 mL。

B.2.3 四水氯化锰 0.4 g。

B.2.4 pH 6.5, 121℃ 高压蒸汽灭菌 10 min。

附录 C
(规范性)
常规 PCR 检测方法

C.1 引物及序列

Ddad5 (5' -gtctgcagagcagtatcaatc-3') / Ddad9 (5' -aaacttcaacggcaaagcg-3')。

C.2 反应体系

25 μL 反应体系: 10 \times PCR Buffer 2.5 μL , Mg^{2+} 2 μL , dNTP (10 mmol/L) 2 μL , 正反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , 模板 DNA 1 μL , *Taq* 酶 0.2 μL (1 u), ddH₂O 15.3 μL 。

C.3 反应程序

PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。反应参数可根据不同仪器的要求作适当调整。

C.4 琼脂糖凝胶电泳分析

PCR 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳检测, 凝胶成像系统观察拍照, 预期扩增片段大小为 222 bp。

C.5 结果判定

在阳性对照、阴性对照和空白对照均正常的情况下, 检测样品出现与阳性对照大小一致条带, 判定为阳性, 否则为阴性。

附录 D
(规范性)
实时荧光 PCR 检测方法

D.1 引物、探针及序列

D.1.1 引物为 Ddad3 (5' - acccaggccaccagaagt -3') / Ddad4: 5' - gacggtagctgtaccgctac -3' 。

D.1.2 TaqMan 探针 ADdad (5' - FAM-cagtggtagcctgcgccaac-MGB -3')。

D.2 反应体系

25 μ L 反应体系: 荧光 PCR Premix 12.5 μ L, 引物 Ddad3 (5 μ mol/L) 1 μ L, 引物 Ddad4 (5 μ mol/L) 1 μ L, TaqMan 探针 (10 μ mol/L) 1 μ L, ROX Reference Dye II 0.5 μ L, 模板 DNA 1 μ L, ddH₂O 8 μ L。

D.3 扩增程序

95 $^{\circ}$ C 预变性 10 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 63 $^{\circ}$ C 退火延伸 1 min, 40 个循环。

D.4 结果判定

在阳性对照、阴性对照和空白对照均正常的情况下, 疑似分离物出现典型扩增曲线判定为阳性; 无典型扩增曲线判定为阴性。检测样本出现典型扩增曲线, 且 Ct 值 ≤ 35 时, 则判定为阳性; $35 < \text{Ct 值} < 40$, 增加 DNA 用量至 2 μ L ~ 5 μ L 再次检测, 出现典型扩增线, 且 Ct 值 ≤ 35 时, 则判定为阳性; 其余情况判定为阴性。

附录 E
(规范性)
MALDI-TOF-MS 鉴定

E.1 样品的准备和鉴定

在NA培养基上28℃培养24 h挑取单菌落，直接涂抹到质谱专用靶板上，再将肉桂酸(HCCA)基质1 μL滴在样本上，自然干燥后，在MALDI-TOF质谱仪上进行测定，线性扫描质量范围设定为2000~20000。所获得的质谱图用微生物鉴定分析软件BioTyper直接进行MBT菌株数据库检索完成鉴定。

E.2 结果判定

MALDI-TOF MS质谱技术对微生物种属鉴定的判断标准是：分值在2.300~3.000，完全可靠地鉴定到种，2.000~2.299鉴定到种，1.700~1.999鉴定到属，0.000~1.699鉴定结果不可用。当供测菌株或菌落的质谱图谱与Bruker MBT菌株数据库中的*D. dadantii*质谱图比较，鉴定分值大于2.000时，判定为阳性，否则为阴性。
