



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3748—2013

柑橘枝瘤病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Sphaeropsis tumefaciens* Hedges

2013-11-06 发布

2014-06-01 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：中华人民共和国广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：王卫芳、赵立荣、华丽、冯黎霞、王振华。

柑橘枝瘤病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了植物检疫中柑橘枝瘤病菌的检疫鉴定方法。

本标准适用于进出境柑橘及其他相关寄主中柑橘枝瘤病菌的检疫鉴定。

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。

SN/T 2455 进出境水果检验检疫规程

3 检疫鉴定原理

根据柑橘枝瘤病菌在寄主上的为害症状、病菌培养性状与形态学特征作为鉴定柑橘枝瘤病菌的依据。柑橘枝瘤病菌的分类地位、分布、为害症状及寄主范围等背景资料参见附录 A。

4 仪器及用具

4.1 仪器

体视显微镜、生物显微镜、超净工作台、高压灭菌器、生物培养箱、pH 计。

4.2 用具

样品袋、标签、放大镜、镊子、解剖刀、酒精灯、接种针、培养皿(直径 9 cm)、烧杯、三角瓶、试管、量筒、载玻片、盖玻片、打孔器(直径 6 mm)。

5 试剂和培养基

95%乙醇、无菌水、马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)(每 1 000 mL PDA 由 200 g 去皮马铃薯,20 g 葡萄糖,18 g 琼脂配制而成)、酸性马铃薯葡萄糖琼脂培养基(APDA)(每 1 000 mL PDA 中加入 4.0 mL 25% 乳酸)。

6 检疫鉴定方法

6.1 口岸现场查验

6.1.1 抽样

口岸现场查验时,按照 SN/T 2455 进行抽样与取样。

6.1.2 症状检查

重点查验枝条,观察枝条、茎干或及主干是否有肿胀突起或瘤状物,发生枝瘤的部位是否形成大量的芽并萌发丛生大量嫩枝,嫩枝长度是否超过 1 m,丛生的嫩枝是否形成肿瘤并最终死亡(检查要点参见 A.3、图 B.1)。

将可疑样品带回实验室做进一步检验,记录样品品种、数量、来源国及取样地点、取样人和取样日期等信息。

6.2 实验室鉴定

6.2.1 直接检验

观察记录枝瘤的外部及剖面症状特点,并置于体视显微镜下检查枝瘤组织外部及内部的质地,组织是否木质化,枝瘤内部之间是否有黑色条纹状菌丝体相连。

6.2.2 分离培养

采用组织分离培养法,用 95%乙醇对枝瘤表皮下组织表面进行火焰消毒处理,将消毒过的组织切成 5 mm×5 mm 小块,放置于酸性马铃薯葡萄糖琼脂培养基(APDA, pH 4)中,在 30℃下分离培养。也可直接挑取枝瘤剖面中的黑色条纹状菌丝体于 APDA 中分离培养。定期观察,将菌落边缘菌丝体置于新鲜的 PDA 平板上纯化,用于后续的病菌培养性状和形态学特征观察。

6.2.3 病菌培养性状观察

将纯化的菌株在 PDA 平板上培养 8 d,用火焰消毒打孔器(直径 6 mm),然后在菌落上打取菌丝体圆片,转接到新的 PDA 平板上,重复 3 次,于 30℃培养,观察记录菌落的生长速度、颜色变化、分生孢子形成速度等培养性状。

6.2.4 病菌形态学特征观察

选取发病枝条上的幼嫩枝瘤肿结,切取有深褐色粒状分生孢子器的枝瘤组织块,再进行组织切片,置于生物显微镜下镜检;分离纯化得到病菌菌株在 PDA 平板上产生分生孢子器后进行显微镜检。观察记录分生孢子器、分生孢子梗、分生孢子的形态大小及排列和着生方式。

7 鉴定特征

7.1 病害症状

主要表现枝瘤和丛枝,症状的详细描述和图片参见 A.3 和图 B.1。

7.2 病菌培养性状

在 30℃温度下,分离物在 PDA 平板上生长茂盛,培养 7 d 后直径达 8.5 cm,初期菌落淡黄色,后转为灰绿色。培养 4 d 后即开始产孢,培养 7 d 后分生孢子器布满整个菌落表面并溢出分生孢子团。分生孢子器深褐色,呈颗粒状,成熟后溢出的分生孢子在分生孢子器顶部聚集成团,乳白色、呈黏稠的液滴状。

7.3 病菌形态学特征

分生孢子器产生在皮层上,半埋生,球形至亚球形、深褐色,具孔口,单生或聚生,直径 180 μm~

220 μm 。分生孢子器壁由多层长形细胞排列组成,外层细胞壁比内层细胞壁厚。分生孢子梗无色透明,倒梨形至圆柱形,(5 μm ~10 μm) \times (3 μm ~5 μm),排列在分生孢子器内壁细胞层上。病菌产生大小两种类型的分生孢子,大型分生孢子无色透明至淡黄色,椭圆形至倒卵形,顶部圆基部平,(20 μm ~34 μm) \times (6 μm ~10 μm)(酸橙上),31 μm \times 4.6 μm (夹竹桃上),无隔,偶 1 隔,但在人工培养条件下 0~2 隔。小型分生孢子透明,椭圆形至卵圆形,两端圆,每端有液泡 2 个,大小为(5 μm ~10 μm) \times (3 μm ~5 μm)(酸橙上),4 μm \times 1.5 μm (鳄梨上)(病菌形态图参见图 B.2)。

8 结果判定

病害的症状与病菌的培养性状及形态学特征与 7.1、7.2 和 7.3 特征描述相吻合,即可判定为检出柑橘枝瘤病菌(*Sphaeropsis tumefaciens* Hedges)。

9 样品和资料的保存

9.1 菌种和 DNA 样品的保存

菌株在含 30%甘油的冻存管中于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存,或将菌株转接在 PDA 斜面上培养,待菌丝体长满斜面后,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存,并定期转管,标注分离物来源、寄主、分离时间和鉴定人。

9.2 检验资料的保存

妥善保存检验报告,包括症状、病菌等图文资料,以备复验、谈判和仲裁。检验报告应注明检验日期、方法、结果等,并有检验人签名。

SN/T 3748—2013

附 录 A

(资料性附录)

柑橘枝瘤病菌的分类地位、地理分布和为害症状

A.1 分类地位

英文名: *Sphaeropsis knot*, *Sphaeropsis tumor*, *Sphaeropsis gall*, *Sphaeropsis tip blight*

学名: *Sphaeropsis tumefaciens* Hedges (1911)

在分类上隶属于无性型真菌,腔孢纲(Coelomycetes)、球壳孢目(Sphaeropsidales)、球壳孢科(Sphaeropsidaceae)、球壳孢属(*Sphaeropsis*)。

有性态:在自然条件下未发现有性态。

A.2 地理分布

亚洲:以色列、印度、斯里兰卡。

欧洲:英国、法国、德国、意大利、波兰、葡萄牙、罗马尼亚、西班牙。

大洋洲:澳大利亚。

美洲:美国(加利福尼亚、佛罗里达州、夏威夷)、牙买加、古巴、印度尼西亚、秘鲁、委内瑞拉。

非洲:喀麦隆、埃及、圭亚那。

A.3 病害症状

A.3.1 在柑橘上症状(包括酸橙、甜橙、粗皮柠檬和柑和橘的杂交种)

表现枝瘤(the gall or knot effect)和丛枝(witches' broom effect)两类症状,但以枝瘤及枝瘤溃疡为主(参见图 B.1 图片 1,3~4)。

- a) 枝瘤:感病部位肿胀,形成肿结(knot)、瘤状物(gall-like)和肿瘤(tumor)。枝瘤圆球形,直径 1 cm~7 cm,但在茎干上有时变长,直径 1 cm~7 cm。肿瘤幼嫩时表面软但很快变硬,开始被正常的树皮覆盖,后来树皮变成白色、粗糙、类似软木塞一样的组织。病变树皮面积逐渐伸展扩大成枝瘤,表面出现裂缝而膨胀开裂、溃疡,而内部组织坚硬、木质化。分生孢子器在田间不常见,但枝瘤形成的早期(即在枝条上形成肿结),分生孢子器大量产生在肿结的表面,然而枝瘤形成后期,因枝瘤颜色加深且组织溃疡、开裂,坚硬、木质化,分生孢子器不容易被发现,但枝条上可发生多个枝瘤,枝瘤内部之间有黑色条纹状菌丝体相连。枝瘤紧紧地贴在茎干上,当多个枝瘤环绕茎干常导致茎干死亡。
- b) 丛枝:一个枝瘤可形成大量的芽,并萌发出多达 40 根嫩枝,有些嫩枝可长达 1 m 以上,并且这种新生的嫩枝上也常常带有结或瘤,这些新生的不正常嫩枝将枯萎并最终死亡。肿瘤也能发生在主干上,严重时导致整个植株死亡。

A.3.2 在鳄梨上的症状

鳄梨肿瘤半圆形至不规则形,小至直径达 8 cm。初期,肿瘤表面浅褐色,老熟后表面开裂,颜色变深,并出现许多细小的黑色分生孢子器。肿瘤在树冠上不规则分布,最终引起枝条死亡。嫩枝肿瘤的纵

切面呈现形态不正常的皮层和木质部组织,组织变黄,部分坏死。幼嫩肿瘤表面软但很快变硬。

A.3.3 病害在冬青上的症状

冬青症状与柑橘基本相似,但以枝条肿胀、轻微溃疡、嫩枝增生为主(参见图 B.1 图片 2,5~6)。

A.4 侵染传播

A.4.1 侵染途径

在人工接种条件下柑橘枝瘤病菌需要机械伤口进行侵染;在田间,嫁接、修剪造成的机械损伤及鸟、昆虫、冰雹和风害等自然因素造成的伤口均可引起病菌的侵染。

A.4.2 传播方式

柑橘枝瘤病菌可借风、雨进行近距离传播,通过嫁接病株砍伐、修剪工具、雨水溅泼在苗圃、田间和果园之间传播;病菌可在贮运中存活,带病的植物组织如树枝、病叶以及接穗等繁殖材料调运是病菌远距离传播的主要途径。在下雨条件下,发病及死亡枝条上的分生孢子器释放分生孢子进行病害传播。

潮湿的天气有利于分生孢子的萌发与侵染。

A.5 致病性测定

柑橘枝瘤病菌经伤口或切口能侵染柑橘,接种 4 h 后分生孢子萌发,穿刺树皮,引起侵染细胞肿大、增殖。接种 2 周~3 周后,酸橙嫩枝上发现分生孢子器的产生。接种 25 d 后,枝瘤进一步增大,接种 75 d 后侵染组织坏死。

A.6 柑橘枝瘤病菌的寄主范围(参见表 A.1)

表 A.1 柑橘枝瘤病菌的寄主种类

科	属
芸香科 Rutaceae	柑橘属 <i>Citrus</i> spp., 主要包括酸橙 <i>Citrus hystrix</i> , 莱蒙 <i>Citrus aurantifolia</i> 、橙 <i>Citrus sinensis</i> 、粗皮柠檬 <i>Citrus jambhiri</i> 、葡萄柚 <i>grapefruit/Citrus Paradisi</i> 、橘 <i>Citrus reticulata</i> 等, 枳属 <i>Poncirus</i> spp., 甜橙与桔的杂交种 <i>ortanique</i> , 柑橘与金桔的杂交种 (<i>Citrus reticulata</i> × <i>Fortunella margarita</i>)
冬青科 Aquifoliaceae	冬青属 <i>Ilex</i> spp.
桑科 Moraceae	桑属 <i>Morus</i> spp.
漆树科 Anacardiaceae	芒果属 <i>Mangifera</i> spp., 肖乳香属 <i>Schinus</i> spp., 巴西胡椒木 <i>Schinus terebinthifolius</i>
杨梅科 Myricaceae	杨梅属 <i>Myrica</i> spp.
夹竹桃科 Apocynaceae	假虎刺属 <i>Carissa</i> spp., 夹竹桃属 <i>Nerium</i> spp.
桃金娘科 Myrtaceae	红千层属 <i>Callistemon</i> spp., 油加利属 <i>Eucalyptus</i> spp., 蒲桃属 <i>Eugenia</i> spp.
藤黄科 Clusiaceae	元宝草属 <i>Hypericum</i> spp.

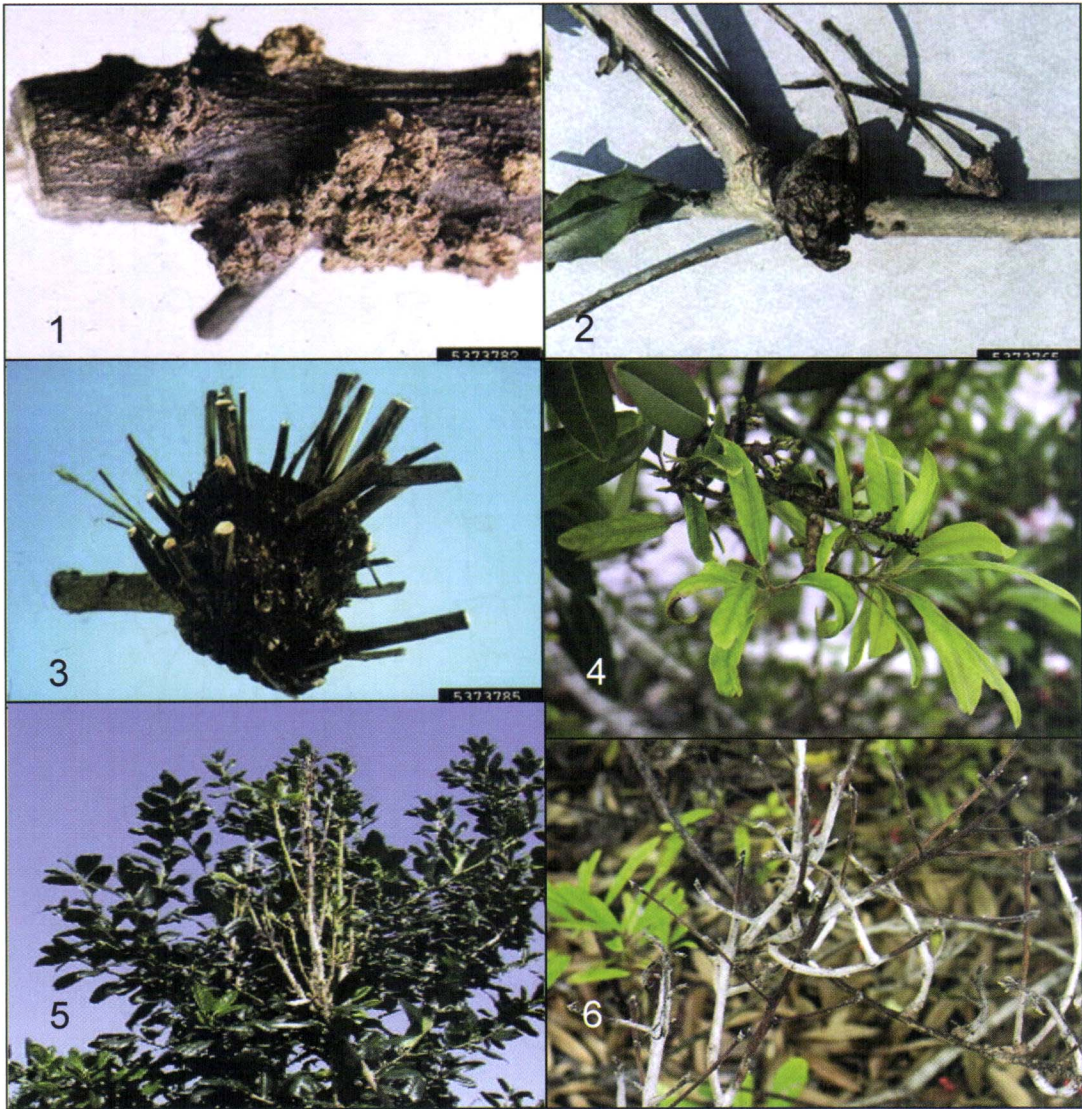
SN/T 3748—2013

表 A.1 (续)

科	属
海桐花科 Pittosporaceae	海桐花属 <i>Pittosporum</i> spp.
柏科 Cupressaceae	柏木属 <i>Cupressus</i> spp.
大戟科 Euphorbiaceae	麻疯树属 <i>Jatropha</i> spp.
豆科 Fabaceae	羊蹄甲属 <i>Bauhinia</i> spp., 紫藤属 <i>Wisteria</i> spp.
樟科 Lauraceae	樟属 <i>Cinnamomum</i> spp.
蔷薇科 Rosaceae	李属 <i>Prunus</i> spp., 火棘属 <i>Pyracantha</i> spp.
茜草科 Rubiaceae	龙船花属 <i>Ixora</i> spp., 绢冠茜属 <i>Portlandia</i> spp.
木犀科 Oleacea	女贞属 <i>Ligustrum</i> spp.
樟科 Lauraceae	鳄梨 <i>Persea americana</i> Mill.

附录 B
(资料性附录)

柑橘枝瘤病的症状与病原菌形态特征图



说明：

1——主干肿瘤；

2——支干肿瘤；

3——肿瘤上枝条丛生；

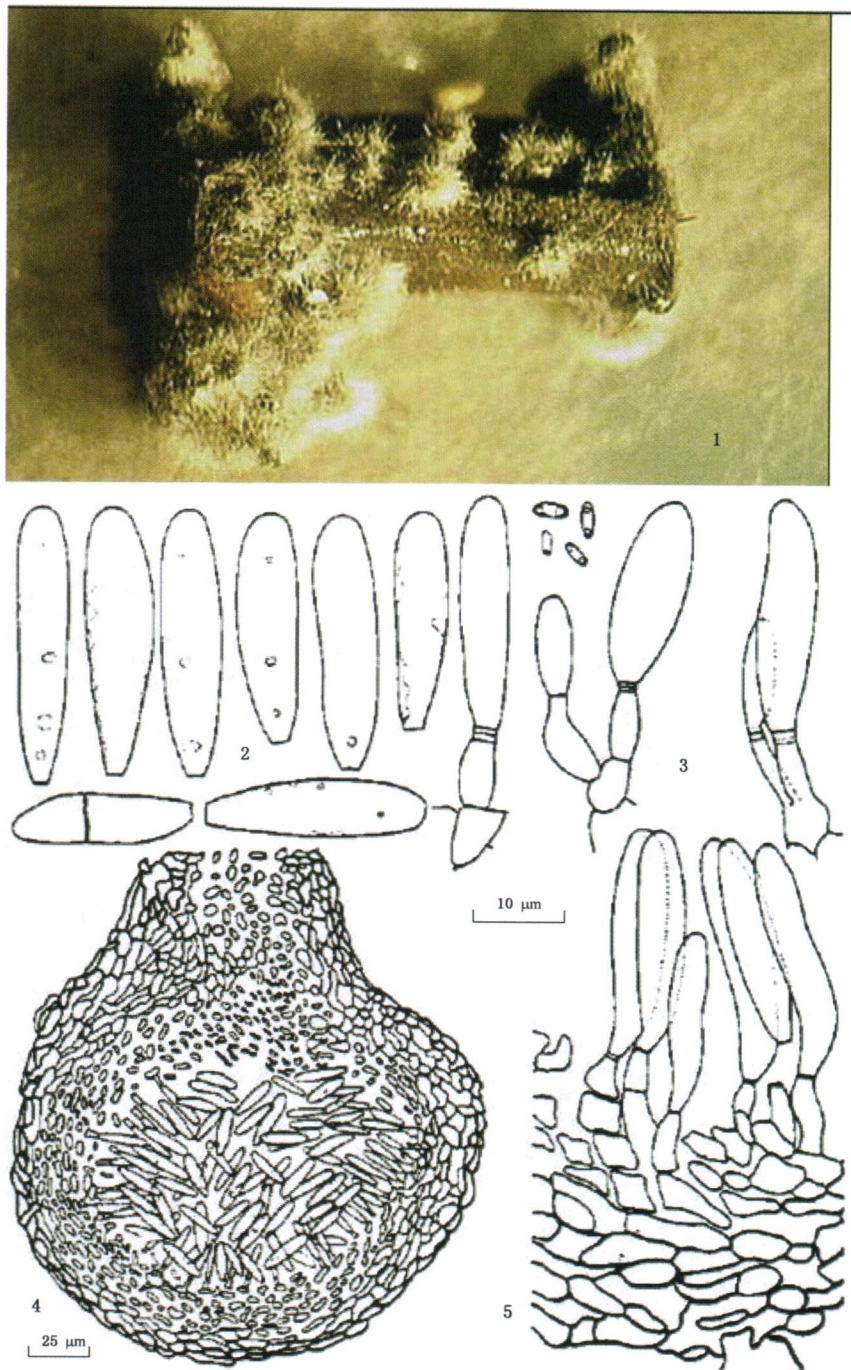
4——新生嫩枝节膨大；

5——女巫扫把状丛枝；

6——丛枝枯死。

注：1,3,5:寄主为柑橘 *Citrus* spp.,2,4,6:寄主为(冬青 *Ilex* spp.),图片 1~3 引自 <http://www.ipmimages.org/> Florida Division of Plant Industry Archive;图片 4~6 引自 James O.Strandberg。

图 B.1 柑橘枝瘤病菌为害所致的症状图



说明：

- 1——病枝上的分生孢子器；
- 2——分生孢子；
- 3——分生孢子梗和大型及小型分生孢子；
- 4——分生孢子器的纵切面；
- 5——分生孢子器的部分器壁和分生孢子梗。

注：寄主：图片 1 冬青 *Ilex* spp, 图片 2~5 酸橙 *Citrus hystrix*。标尺：图片 2~3、5 = 10 μm , 图片 4 = 25 μm 。

图片 1 引自 James O.Strandberg; 图片 2~5 引自 D.W.Fry。

图 B.2 柑橘枝瘤病菌形态图

参 考 文 献

- [1] C.H.Blazquez, A.G.Naylor, and D.Hastings, 1966, *Sphaeropsis* Knot of Lime, Florida state horticultural society, 344-350.
 - [2] C.H.Blazquez and P.Hunt, 1967, *Sphaeropsis* knot, a disease of rough lemon rootstock, 46-52.
 - [3] Hedges F. 1911, *Sphaeropsis tumefaciens*, nov.sp., the cause of the Lime and Orange knot. *Phytopathology*, 1: 63-65.
 - [4] Hedges F and L.S.Tenny. 1912. A knot of citrus trees caused of *Sphaeropsis tumefaciens* Hedges. U.S.D.A. Bureau Plant Industry Bull. 247: 1-69.
 - [5] H.N.Miller, J.J.McRitchie, and C.P.Seymour, 1977, *Sphaeropsis* Witches' Broom of Holly.
 - [6] Holliday, P.; Punithalingam, E. *Sphaeropsis tumefaciens*. [Descriptions of Fungi and Bacteria]. IMI Descriptions of Fungi and Bacteria 1970 No.28 pp. Sheet 278.
 - [7] [http://www.ipmimages.org/Florida Division of Plant Industry Archive](http://www.ipmimages.org/Florida%20Division%20of%20Plant%20Industry%20Archive).
 - [8] James O.Strandberg, *Sphaeropsis* gall of holly and other landscape ornamental plants.
 - [9] James O.Strandberg, 2002, *Sphaeropsis* gall of holly and other landscape ornamental plants, Research Report.
 - [10] Leopold Fucikovsky, 1992, *Sphaeropsis* Tumor of Avocado, Proc. of Second World Avocado Congress, 129-132.
 - [11] Ridings, W.H. and R.B. Marlatt. 1976. *Sphaeropsis* witches' broom of *Nerium oleander*. Proceedings of the Florida State Horticultural Society. 89: 302-303.
 - [12] Rodriguez, R., and Melendez, P.L. 1984. Occurrence of *sphaeropsis* knot on citron (*Citrus medica* L.) in Puerto Rico. *J. Agric. Univ. Puerto Rico* 68: 179-183.
 - [13] Pest risk assessment made by France on *Sphaeropsis tumefaciens* Hedges considered by France as harmful in French overseas departments of French Guiana, Guadeloupe and Martinique, The EFSA Journal (2008) 683, 1-16.
-