



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3435—2012

油棕枯萎病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Fusarium oxysporum*
Schlecht. f. sp. *elaeidis* Toovey

2012-12-12 发布

2013-07-01 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。

本标准负责起草单位：中华人民共和国海南出入境检验检疫局。

本标准参加起草单位：中华人民共和国珠海出入境检验检疫局、中华人民共和国山东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：韩玉春、刘福秀、徐卫、李伟东、林明光、张建军、吴兴海。

油棕枯萎病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了油棕枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *elaeidis* Toovey)的检疫鉴定方法。

本标准适用于植物检疫中油棕上枯萎病菌的检疫鉴定。

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 2122 进出境植物及植物产品检疫抽样

3 原理

学名:*Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *elaeidis* Toovey

中文名:油棕尖镰孢专化种

英文名:vascular oil palm wilt

油棕枯萎病菌属于真菌界 Fungi,半知菌类 Fungi Imperfecti,丝孢纲 Hyphomycetes,瘤座孢目 Tuberculariales,瘤座孢科 Tuberculariaceae,镰孢菌属 *Fusarium* 真菌。

油棕枯萎病菌可侵染油棕的根部并直接在其维管束内生长。该病菌可导致被侵染油棕叶片产生急性或慢性枯萎症状,其典型的内部症状是维管束变褐。病害的症状、病原菌的形态、病原菌的培养性状以及致病性测定是鉴定油棕枯萎病菌的主要依据。

4 试剂与培养基

4.1 试剂

0.1%升汞、0.5%次氯酸钠、吐温-20、链霉素、琼脂粉、马铃薯、葡萄糖。

4.2 培养基

病菌分离和纯化采用 PDA 和 SNA 培养基。

5 仪器和用具

5.1 仪器

生物显微镜、生物培养箱、高压灭菌锅、天平、超净工作台等。

5.2 用具

酒精灯、培养皿、试管、载玻片、盖玻片、三角瓶、量筒、血球计数板、注射器、接种针、接种环、移液器、

手术刀、手术剪、镊子、玻璃棒等。

6 鉴定方法

6.1 现场检疫

6.1.1 样品抽取

按照 SN/T 2122 的方法进行抽样。

6.1.2 症状观察

现场检疫时,应仔细观察油棕根部、枝干、树冠、叶片等部位是否有典型症状或可疑症状,症状描述参见附录 A,症状图片参见附录 B。

如发现可疑植株或植株所带的土壤,带回实验室做进一步鉴定。

6.2 室内检测与鉴定

6.2.1 植物组织中病菌的分离

剪取可疑的植物组织,清水冲洗后,用 0.1% 的升汞消毒 5 min,灭菌水洗 3 次,将再其移到 PDA 的培养基中,置 $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温光照培养箱 12 h 光照与黑暗交替培养。当发现可疑的菌落,及时将菌落移植另一新的 PDA 平板上,进一步纯化培养。记录 4 d 和 7 d 的菌落直径大小,颜色变化;显微镜下观察大、小型分生孢子和厚垣孢子的大小、形状和着生方式;产孢细胞大小和形态特点等情况。

分离出来的病原物产孢后,采用单孢分离法进一步纯化。将分生孢子制成浓度为 10 CFU/mL 的孢子悬浮液。在超净工作台上用接种环将孢子悬浮液涂在 PDA 平板表面,用低倍镜(10×)从培养皿反面检查,如发现视野内只有一个孢子,同时附近也没有孢子存在,就用记号笔在培养皿底部(孢子存在位置)画一个小圆圈作记号,将带有小块单孢子的 PDA 培养基切下,移植到新的 PDA 培养基平板中,用封口膜封好 PDA 平板, $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养。分离纯化的病原菌转到 PDA 斜面上 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

同时尽快将分离得到的培养物转移至营养贫乏的培养基 SNA 上进行培养,并用冷冻干燥或液氮超低温冻结法保藏,以保持菌株的野生型状态;用 PDA 培养基培养观察其显微特征,诸如颜色、气味、生长速度、气生菌丝等。

6.2.2 土壤中病菌的分离

取充分混匀样品 1.0 g 加 10 mL 无菌水,在磁力搅拌器上搅拌 10 min,自然沉淀 5 min 后,取上清液 100 μL ,涂布含 0.3 mg/mL 链霉素的 PDA 培养基平板, $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下,按 6.2.1 的方法培养并纯化。

6.3 致病性测定

6.3.1 供试植物材料准备

致病性测定采用感病非洲油棕 *Elaeis guineensis* (LMC96)。油棕种子催芽前需用清水浸种 4 d~6 d(新鲜种子的浸种时间可适当缩短),再用清水洗净、阴干,并用 0.5% 次氯酸钠表面消毒 5 min,无菌水冲洗 5 min,将处理好的种子放在人工气候箱 $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ 进行催芽。取萌芽种子播在 30 cm×50 cm 的塑料盆中,种植介质为灭菌的细沙和有机土(比例为 1:2)。植株在室温下生长出 2 片子叶时即可用于接种实验。为防止病菌扩散,整个接种实验均在在负压温室中进行。

6.3.2 孢子悬浮液接种

供试菌株在 PDA 平板上 $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养 10 d, 用 0.025% 的吐温-20 无菌水溶液将其中的分生孢子冲洗下来, 制成 1×10^6 CFU/mL 的孢子悬浮液。用注射针在供试植株主秆的树皮上扎一个小洞, 再用注射器在小洞中注射 10 μL 的孢子悬浮液。将无菌水湿润的灭菌吸水纸或棉花团敷于洞口, 并用封口膜封好以防水分流失。接种 0.025% 的吐温-20 无菌水溶液作为对照。实验重复 3 次, 每个重复的菌株及对照接种至少 3 棵植株。

接种后进行日常水肥管理。接种 7 d 后观察植株叶片是否变白、枯萎, 背面是否有褐色斑点; 维管束是否变色; 根部是否有微红病斑等症状, 每天观察一次, 接种 45 d 后所有植株均不发病视为不致病。

6.3.3 病原菌再分离

检查植株是否有 7.1 描述的症状出现, 并按 6.2.1 方法对 6.3.2 发病并表现典型症状的植株接种部位附近的组织进行病菌再分离, 按 7.2 描述的病原特征对分离物进行观察。

7 鉴定特征

7.1 症状特征

初期发病时, 患病幼苗生长停滞、矮小; 内层叶片短、窄, 呈束状, 形成 2 种平顶的外观, 顶端中央有时下陷; 外层叶片变褐色、干枯。树冠中的叶片先变成黄色或灰白色, 随着病菌的扩散, 叶片自下而上全部变成白色。同时叶片背面会出现褐色的斑点, 发病后期, 树冠两边的叶片也逐渐变白, 枯死。染病植株枝干横切面, 能看到已经变成褐色、微红褐色或黑色的维管束。被油棕枯萎病菌感染的植株根系的中柱变浅色至深褐色, 并有大量变色、微红的病斑, 根的基部病斑最为明显。

7.2 病原特征

按 Booth(1971)分类鉴定系统对镰孢菌菌株进行形态学鉴定。

于高倍显微镜(400 \times)下随机测量大型和小型分生孢子各 30 个, 取测量值的平均值。

油棕枯萎病菌在 PDA 上 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 4 d, 菌落直径 45 mm~55 mm, 菌落突起絮状, 菌丝白色质密。气生菌丝羊毛状, 白色、粉色至紫色, 菌落背面通常产生粉色或紫色色素。大型分生孢子镰刀形, 足细胞较明显, 多为 3~5 分隔, ($27\text{ }\mu\text{m} \sim 60\text{ }\mu\text{m}$) \times ($3\text{ }\mu\text{m} \sim 5\text{ }\mu\text{m}$); 小型分生孢子卵形、椭圆形或肾形, 假头生, 0~1 分隔, ($5\text{ }\mu\text{m} \sim 12\text{ }\mu\text{m}$) \times ($2.2\text{ }\mu\text{m} \sim 3.5\text{ }\mu\text{m}$); 产孢细胞为单瓶梗, 较短, 单生或具分枝, ($3.75\text{ }\mu\text{m} \sim 25\text{ }\mu\text{m}$) \times ($2.5\text{ }\mu\text{m} \sim 3.75\text{ }\mu\text{m}$); 厚垣孢子大多单生、对生、间生或顶生, 球形 $5.5 \sim 10\text{ }\mu\text{m}$ 。

菌株之间形态差异较大, 有些菌株产生淡黄色分生孢子和蓝色至蓝黑色的菌核。油棕枯萎病菌和近似种区别参见附录 C。

8 结果判定

若菌落特征、病原菌形态鉴定和致病性测定三者结果均与油棕枯萎病菌的鉴定特征和致病性相符合, 判定为检出油棕枯萎病菌, 否则判定为未检出油棕枯萎病菌。

9 样品保存与复核

9.1 样品保存与处理

样品经登记和签字后置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱或阴凉干燥、防虫防鼠处妥善保存; 样品中分离出的油棕枯萎病

SN/T 3435—2012

菌,在 PDA 斜面培养基 $25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 7 d 后,置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,并定期转接;或将菌种用冷冻干燥机制成冻干粉置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱长期保存。

对鉴定为油棕枯萎病菌的样品至少应保存 6 个月,以备复检、谈判和仲裁,样品保存期满后,需经无害化处理。

9.2 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。

9.3 复核

由国家质量监督检验检疫总局指定的单位或人员负责。主要考察实验记录、照片等资料的完整性和真实性,必要时进行复核实验。



附 录 A
(资料性附录)
油棕枯萎病菌相关信息

A.1 名称及分类地位

学名: *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *elaeidis* Toovey

中文名: 油棕尖镰孢专化种

英文名: vascular wilt of oil palm

油棕枯萎病菌属于真菌界 Fungi, 半知菌类 Fungi Imperfecti, 丝孢纲 Hyphomycetes, 瘤座孢目 Tuberculariales, 瘤座孢科 Tuberculariaceae, 镰孢菌属 *Fusarium* 真菌。

A.2 症状

油棕幼苗感病后, 生长矮小, 外轮叶片干枯, 纵切面显示出茎干组织的维管束变褐色、粉红色或黑色, 剖开茎基部至顶芽附近的维管束呈褐色; 其中层叶片和嫩叶首先变黄, 以后长出的叶片逐渐变短, 使病株外貌呈平顶状, 外轮叶片干枯, 心叶变得细小和紧缩成束, 呈现淡黄色至象牙白色。

该病在成年树上表现为急性枯萎和慢性枯萎 2 种症状。一种是急性枯萎, 表现为叶片干枯并迅速死亡, 但仍保持直立状态直至折断, 通常从离基部 1 m~2 m 的地方被风吹断。这种症状发病迅速, 植株会在 2~3 个月内死亡; 另一种是慢性枯萎, 表现为植株矮小, 可存活数月甚至数年之久。被侵染油棕首先是外层叶片干枯并垂挂于树干上, 随后逐渐蔓延到新叶。同时, 当新叶长出时, 仍保持直立, 但一般是萎黄色, 并且比正常叶片小很多, 整个树冠扁平, 树干顶部也逐渐缩小。染病植株枝干横切面, 能看到已经变成微红褐色的维管束, 有许多症状介于急性枯萎和慢性枯萎之间。

A.3 寄主范围

该菌主要危害非洲油棕 *Elaeis guineensis*, 但通过人工接种从西非分离到的菌株也可使南美棕 *Elaeoleifera* 发病。此外, 把从刺苋 *Amaranthus spinosus*、飞机草 *Eupatorium odoratum*、白茅 *Imperata cylindrica* 和 *Mariscus alternifolius* 这些无症状杂草中分离到的镰刀菌 *F. oxysporum* 人工接种到油棕幼苗上也可致病。

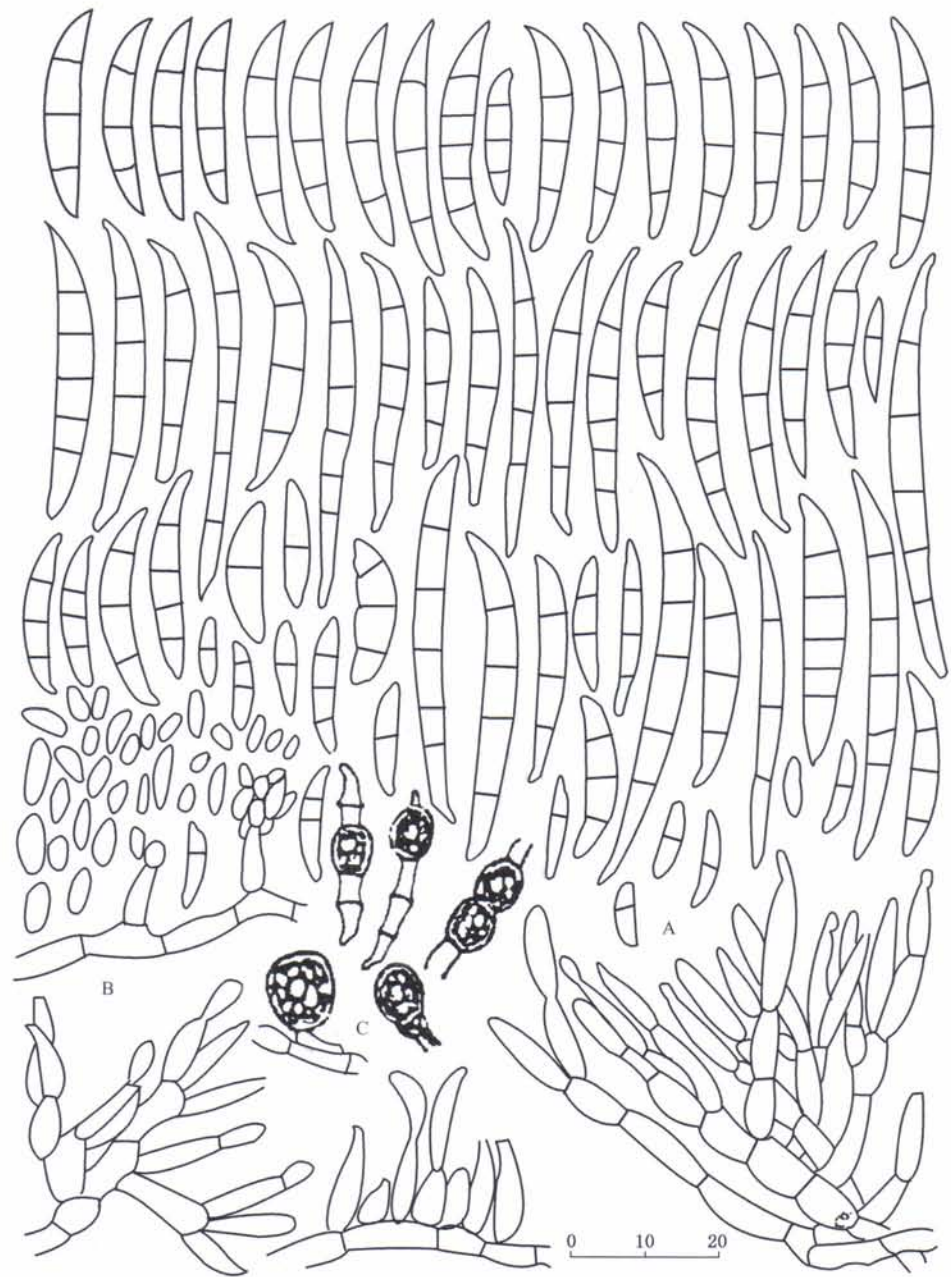
A.4 传播途径

该菌为土壤习居菌, 菌丝体和厚垣孢子可以在土壤中长期存活, 特别是厚垣孢子的存活力更强。可通过土壤、繁殖材料和种子等进行远距离传播。

A.5 地理分布

油棕枯萎病最早见报道于刚果民主共和国, 现在主要分布于科特迪瓦、扎伊尔、尼日利亚、加纳、喀麦隆、象牙海岸、贝宁湾、圣多美和刚果, 巴西和厄瓜多尔局部也有爆发。亚洲未有分布。

附 录 B
(资料性附录)
油棕枯萎病病菌形态示意图



说明：
A——大型分生孢子及分生孢子梗；
B——小型分生孢子及分生孢子梗；
C——厚垣孢子。

图 B. 1 油棕枯萎病菌 *F. oxysporum* f. sp. *elaeidis* 形态示意图
(引自 Courtesy Gerlach & Nirenberg, 1982)

附 录 C
(资料性附录)

油棕枯萎病菌与近似种的区别

表 C.1 油棕枯萎病菌与近似种的区别

病害名称	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>elaeidis</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>
英文名称	vascular wilt of oil palm	vascular wilt of date palm
中文名称	油棕枯萎病	海枣枯萎病
寄主范围	主要危害非洲油棕 <i>Elaeis guineensis</i> 等油棕属 <i>Elaeis</i> 植物。详见第 A.3 章	主要危害刺葵属 <i>Phoenix</i> spp. 散沫花 <i>Lawsonia inermis</i> 三叶草 <i>Trifolium</i> sp.
地理分布	刚果民主共和国,现在主要分布于科特迪瓦、扎伊尔、尼日利亚、加纳、喀麦隆、象牙海岸、贝宁湾、圣多美和刚果,巴西和厄瓜多尔	摩洛哥、阿尔及利亚,毛里塔尼亚
形态特征	大型分生孢子镰刀形,多为 3~5 分隔,大小:(27 μm~60 μm)×(3 μm~5 μm)。 小型分生孢子卵形、椭圆形或肾形,假头生,0~1 分隔,大小:(5 μm~12 μm)×(2.2 μm~3.5 μm)。 厚垣孢子大多单生、对生、间生或顶生,球形 5.5 μm~10 μm。 菌株之间形态差异较大,有些菌株产生淡黄色分生孢子和蓝色至蓝黑色的菌核	大型分生孢子镰刀形,多为 3 分隔,大小:(20 μm~35 μm)×(3 μm~5 μm)。 小型分生孢子卵形、椭圆形或肾形,假头生,大小:(5 μm~12 μm)×(3 μm~5 μm)。 厚垣孢子多单生、对生、球形 4 μm~8 μm。 菌核黑色,少见

参 考 文 献

- [1] 余凤玉,覃伟权,朱辉,等. 油棕枯萎病研究综述[J]. 中国热带农业, 2009, 02: 46-48.
- [2] 韦爱梅,黄茂俊,王军. 三角椰、油棕枯萎病的病原鉴定和毒力测定初报[J]. 广东园林, 2005, 30(4): 33-34.
- [3] Flood J. A review of *Fusarium* wilt of oil palm caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeidis*[J]. Phytopathology, 2006, 96: 660-662.
- [4] Flood J. ,Cooper R. M. and Lees RE. An investigation of pathogenicity of four isolates of *Fusarium oxysporum* from South America, Africa and Malaysia to clonal oil palm [J]. Phytopathology, 1989, 124: 80-88.
- [5] Flood J. ,Mepsted R. ,and Cooper R. M. Contamination of oil palm pollen and seeds by *Fusarium* spp. [J]. Mycol. Res. , 1990, 94: 708-709.
- [6] Flood J. ,Mepsted R. ,and Cooper R. M. Population dynamics of *Fusarium* species on oil palm seeds following chemical and heat treatments[J]. Plant Pathol. , 1994, 43: 177-182.
- [7] Flood. J. ,Whitehead. D. S. and Cooper. R. M. Vegetative compatibility and DNA polymorphisms in *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeidis* and their relationship to isolate virulence and origin[J]. Physiol. Mol. Plant Pathol. , 1992, 41: 201-215.
- [8] Mouyna I. ,Renard J. L. ,Brygoo. DNA polymorphism among *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeidis* populations from oil palm, using a repeated and dispersed sequence “Palm”[J]. Curr Genet, 1996, 30: 174-180.
- [9] Mepsted R. ,Flood. J. and Cooper R. M. *Fusarium* wilt of oil palm I. Possible causes of stunting[J]. Physiol. Mol. Plant Pathol. , 1995, 46: 361-372.
- [10] Mepsted R. ,Flood. J. and Cooper R. M. *Fusarium* wilt of oil palm II. Stunting as a mechanism to reduce water stress. [J]Physiol. Mol. Plant Pathol. , 1995, 46: 373-387.
- [11] Renard J. L. and de Franqueville H. Oil palm vascular wilt[J]. Oleagineux. , 1989, 44: 342-347.
- [12] Renard J. L. and de Franqueville H. Effectiveness of crop techniques in the integrated control of oil palm vascular wilt disease[J]. Oleagineux. , 1991, 46: 255-265.
- [13] Renard J. L. ,Noiret J. M. and Meunier J. Sources and ranges of resistance to *Fusarium* wilt in the oil palms *Elaeis guineensis* and *Elaeis melanococca*[J]. Oleagineux. , 1980, 35: 387-393.
- [14] Renard J. L. and Quillec G. *Fusarium* disease and replanting. Elements to be considered when replanting oil palm in a *Fusarium* zone in West Africa[J]. Oleagineux. , 1983, 38: 421-427.
- [15] Gerlach W. and Nirenbery H. The Genus *Fusarium*-a Pictorial Atlas. BBA, 1982, Berlin (DE).