

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4648—2016

### 柑橘黑斑病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Guignardia citricarpa* Kiely

2016-08-23 发布

2017-03-01 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。

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、浙江大学、中华人民共和国江西出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国安徽出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：王卫芳、李红叶、王兴红、吕文刚、何瑞芳、何日荣、黄河、吴品珊、陈雪娇。

## 柑橘黑斑病菌检疫鉴定方法

### 1 范围

本标准规定了柑橘黑斑病菌(*Guignardia citricarpa* Kiely)的检疫鉴定方法。

本标准适用于柑橘(柑、橘、柠檬、橙、柚、金橘、枳)水果和苗木生产、加工及进出口贸易中柑橘黑斑病菌的检疫和鉴定。

### 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。

SN/T 1806 出境柑橘鲜果检疫规程

### 3 柑橘黑斑病菌的基本信息

学名:*Guignardia citricarpa* Kiely (1948) (中文名:柑橘球座菌)

无性型:*Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa(1973)

异名:*Phoma citricarpa* McAlpine (1899)

*Phoma citricarpa* McAlpine (1899) var. *citricarpa*

*Phoma citricarpa* var. *mikan* Hara (1925)

*Phyllostictina citricarpa* (McAlpine) Petr. (1953)

分类地位:在分类上隶属于真菌界(Fungi),子囊菌门(Ascomycota),座囊菌纲(Dothideomycetes),葡萄座腔菌目(Botryosphaerales),叶点霉科(Phyllostictaceae),球座菌属(*Guignardia*)。

柑橘黑斑病菌的寄主范围、地理分布、为害症状参见附录 A,病菌的培养性状和形态特征图参见附录 B 和附录 C,柑橘黑斑病菌与近似种比较参见附录 D。

### 4 检疫鉴定原理

以寄主上病果的症状特点、病菌的形态学特征或病菌的形态学特征及培养性状作为柑橘黑斑病菌的检疫鉴定依据。

### 5 仪器及用具

#### 5.1 仪器设备

体视显微镜、生物显微镜、电子天平(感量 0.1 g)、电磁炉、高压灭菌器、超净工作台、培养箱、冰冻切片机。

#### 5.2 实验用具

样品袋、保鲜袋、标签、定性滤纸、手持放大镜、酒精灯、载玻片、盖玻片;火焰消毒的接种针、镊子、解

剖刀及打孔器(直径 4 mm)、培养皿(直径 9 cm)、烧杯(1 000 mL)、量筒(1 000 mL)、三角瓶(250 mL)、玻棒、铝锅(直径 24 cm)。

## 6 试剂和培养基

### 6.1 试剂

1%次氯酸钠(NaOCl)溶液、70%乙醇、蒸馏水、无菌水。

### 6.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)和燕麦琼脂培养基(OA),培养基配方与配制方法见附录 E。

## 7 检疫鉴定方法

### 7.1 产地检疫

在柑橘成熟期、采果期、加工期于出口基地及加工包装厂抽取未采摘、已采摘、已加工、已包装的橘果,检查果皮是否有柑橘黑斑病症状,病斑上是否有黑色小颗粒状分子孢子器(症状描述和图片参见 A.4、附录 B),抽取有可疑症状(包括有明显和无明显分子孢子器)的病果样品带回实验室作进一步检验,抽样与取样按照 SN/T 1806 进行。

### 7.2 实验室检验

#### 7.2.1 症状检查

在体视显微镜下观察记录病斑的细微特征,包括病斑的形态、大小和颜色、病斑上聚生的分生孢子器,并拍摄数码照片。

#### 7.2.2 切片检查

如果病果果皮上的病斑有明显的黑色小颗粒状分生孢子器,则切取病斑,置于体视显微镜下细致观察病斑的形态、颜色及大小,然后对病斑组织进行徒手切片或冰冻切片,将切片置于生物显微镜下观察病菌的形态学特征。

#### 7.2.3 病斑分离培养

##### 7.2.3.1 切取

如果病果果皮上的病斑未形成黑色小颗粒状分生孢子器,则切取病斑,按 7.2.3.2~7.2.3.3 进行分离培养。

##### 7.2.3.2 组织表面消毒

用解剖刀将病健交界组织切成 4 mm × 4 mm 进行表面消毒(70%乙醇浸泡 1 min 或 1% NaOCl 溶液浸泡 1 min,无菌水冲洗 3 次),最后用无菌滤纸吸干表面水分,作为分离培养材料备用。

##### 7.2.3.3 分离培养

将表面消毒好的病组织块移至 PDA 平板上,在 27 °C/24 h 全黑暗下培养。培养第 5 d,用无菌接种针从菌落边缘挑取菌丝块移至新的 PDA 平板上纯化培养 10 d,将纯菌株置于 4 °C 下保存待用。



### 7.2.4 培养性状观察

用直径 4 mm 的打孔器从单胞分离后的菌株菌落边缘取菌丝体块,置于 PDA 平板上和 OA 平板中央,每种培养基各重复 3 皿。在 PDA 平板上于 27 °C/24 h 黑暗下进行培养 15 d,每隔 1 d 观察记录菌落的形态、颜色及质地、子座的颜色和质地、分生孢子器的颜色和形态、分生孢子颜色和形态特征;在 OA 平板上于 22 °C/24 h 荧光条件下培养,观察菌落在 OA 上是否产生黄色色素及产生色素的天数。

### 7.2.5 病菌形态学特征观察

将 7.2.2 的病斑果皮组织切片,或从 7.2.3.3 分离获得的菌落上挑取分生孢子团制成的玻片,置于生物显微镜下,观察记录分生孢子器和分生孢子的形态特征并拍摄数码照片,显微计测 10 个分生孢子器的直径和 30 个分生孢子的大小、胶质鞘厚度、尾端纤丝长度。

## 8 鉴定特征

### 8.1 病害症状

病斑深度至果皮,圆形、褐色,直径为 1 mm~3 mm,后期在病斑中部形成黑色粒状分生孢子器,严重时病害深入果肉,使全果腐烂(症状的详细描述和图片特征参见附录 A 和附录 B)。

### 8.2 病菌培养性状

在 PDA 培养基上、27 °C/24 h 黑暗条件下,菌落平铺,呈白色,菌丝体短而密集;培养至第 5 天,从菌落中央开始变成灰橄榄色,黑灰色至黑色,逐渐菌落边缘菌丝体颜色也逐渐加深,菌落中央隆起,质地逐渐变硬,边缘呈裂瓣状;约 7 d 后菌落上形成黑色隆起的硬块状子座,炭质、坚硬、表面凹凸不平,子座上密集散生大量黑色粒状分生孢子器,分生孢子器半埋生,培养 10 d~12 d 后分生孢子器逐渐成熟,从中溢出分生孢子,在菌落表面形成明显可见的乳白色黏性分生孢子团。菌落上的分生孢子器如同柑橘果实病斑上的分生孢子器产生大量倒卵形、单细胞的分生孢子,有时还产生短杆状分生孢子。22 °C/24 h 荧光条件下,在 OA 培养基平板上,菌落产生特殊黄色素扩散至菌落周围的培养基中(病菌培养性状图参见附录 C)。

### 8.3 病菌形态学特征

分生孢子器呈近球形,黑色,炭质,直径为 $(115\ \mu\text{m}\sim 132.5\ \mu\text{m})\times(92.5\ \mu\text{m}\sim 112.5\ \mu\text{m})$ ,厚壁,孔口深,稍乳头状突起。分生孢子成熟后从分生孢子器溢出形成乳白色胶质流称为分生孢子团。分生孢子无色透明,单胞,倒卵形,分生孢子一端大,一端小,细的一端稍平钝,大小为 $[(10\sim)11\ \mu\text{m}\sim 12(\sim 14)\ \mu\text{m}]\times[(6\sim)7(\sim 8)\ \mu\text{m}]$ ,平均为 $(11\ \mu\text{m}\sim 12\ \mu\text{m})\times(6\ \mu\text{m}\sim 8\ \mu\text{m})$ 。分生孢子表面包裹一层透明的胶质鞘,厚度 $1(\sim 2)\ \mu\text{m}$ ,通常 $<1.5\ \mu\text{m}$ ,尾端常有一条无色胶状物形成的纤细附属丝(简称纤丝),长度 $[5\ \mu\text{m}\sim 10(\sim 17)\ \mu\text{m}]\times(1\ \mu\text{m}\sim 1.5\ \mu\text{m})$ ,平均长度 $4\ \mu\text{m}\sim 10\ \mu\text{m}$ ,胶质鞘及纤丝遇水均易溶化。在培养状态下及寄主落叶上,病菌有时可形成小型分生孢子,短杆状,圆柱形,直或稍弯,大小 $(5\ \mu\text{m}\sim 8\ \mu\text{m})\times(0.5\ \mu\text{m}\sim 1\ \mu\text{m})$ 。分生孢子和小型分生孢子产生在不同的分生孢子器中(病菌形态特征图参见附录 C)。

## 9 结果判定

病害症状与鉴定指标 8.1 吻合,并符合下列任一种情况均可判定为检出柑橘黑斑病菌:

- 如果病斑尚未形成分生孢子器,经保湿培养或分离培养所产生的病菌培养性状及形态学特征

## SN/T 4648—2016

与鉴定指标 8.2~8.3 吻合。

- b) 如果病斑有明显的分生孢子器,病菌形态学特征与鉴定指标 8.3 吻合。

### 10 样品和资料的保存

#### 10.1 菌种保藏

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(180 d)转管,标注分离物来源、寄主、分离时间、鉴定人。

#### 10.2 检验资料的保存

妥善保存检验报告包括症状、病菌形态特征和培养性状等图文资料,以备复验、谈判和仲裁。检验报告必须注明检验日期、方法、结果等,并有检验人签名。

## 附 录 A

(资料性附录)

## 柑橘黑斑病菌的背景资料

## A.1 病害名称

柑橘黑斑病(Citrus black spot)。

## A.2 寄主范围

芸香科柑橘属 *Citrus* [柚 (*C. maxima*) 除外], 枳属 *Poncirus*, 金橘属 *Fortunella*。柑橘属中柠檬、甜橙最易感病。

## A.3 地理分布

澳洲, 南美洲、南非洲、美国佛罗里达州, 东南亚、中国。

## A.4 病害症状

柑橘黑斑病主要为害其果实, 病害潜育期长, 果实接近成熟才表现症状。采后果实症状越发明显, 新、旧病斑常愈合连片, 致使果实外观品质严重下降, 病果不耐贮藏, 发病果实在贮藏过程中很快腐烂, 瓢瓣变黑。果实受害后, 为害深度通常只限于果皮, 不深入果肉。病果表皮表面可见凹陷、褐色至黑褐色的圆形病斑, 病斑较小, 直径为 1 mm~3 mm, 多数 2 mm~3 mm。发病初期病斑通常呈红色至棕色, 发病后期病斑逐渐变为褐色至黑褐色。在体视显微镜下可见病斑中部稍凹陷、呈灰黄至黄褐色, 并散生很多突起的细小黑色粒点, 即病菌的分生孢子器, 病斑边缘有明显的一圈深红至砖红色纹带, 这种典型症状通常在近成熟的果实上表现明显, 病斑数量从数个、十几个至几十个不等, 这种症状通常称黑星型, 也称硬斑型(Hard spot/shot-hole spot)。发生严重时, 病斑多达几百个, 连成一片并愈合成圆形或不规则形褐色至黑色大斑, 储藏两个月后病斑可扩大蔓延至全果、深入至果肉, 使全果腐烂, 瓢瓣变黑, 干缩脱水后如炭状, 这种症状亦称毒性斑型、黑斑型、恶性斑(virulent lesions)。果实病斑最早出现 7 月份下旬, 8 月~9 月发展最为迅速, 而夏橙则在 5 月~6 月发病最烈。

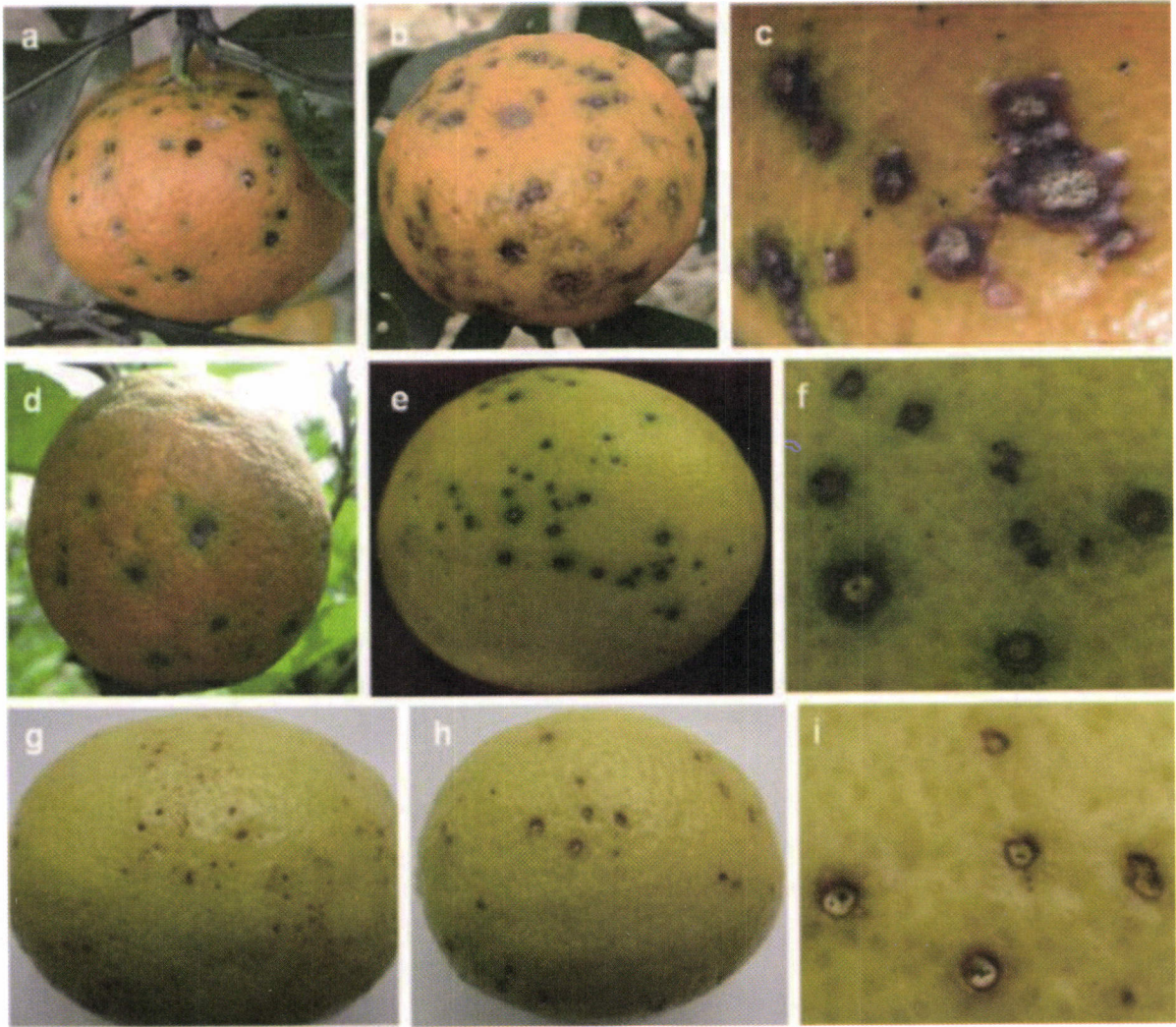
树梢和叶片也能被害, 但很少发生。叶片上的症状与果实上的黑斑型类似, 常发生在老叶上, 通常圆形, 中央稍凹陷, 褐色至灰白色, 常有黑色的分生孢子器着生, 病斑周围有明显的黄色晕圈。有性阶段形成假子囊壳, 但不在果实和叶片中形成, 通常只在落叶中形成。



SN/T 4648—2016

附 录 B  
(资料性附录)  
柑橘黑斑病症状图

柑橘黑斑病症状如图 B.1 所示。



说明：  
a~c——蜜橘(*Citrus reticulata*)症状；  
c ——放大病斑上的分生孢子器；  
d~f——甜橙(*C. sinensis*)症状；  
f ——放大病斑上的分生孢子器；  
g~i——柠檬(*C. limon*)症状；  
i ——放大病斑上的分生孢子器。  
注：引自 Wang XH et al., 2012。

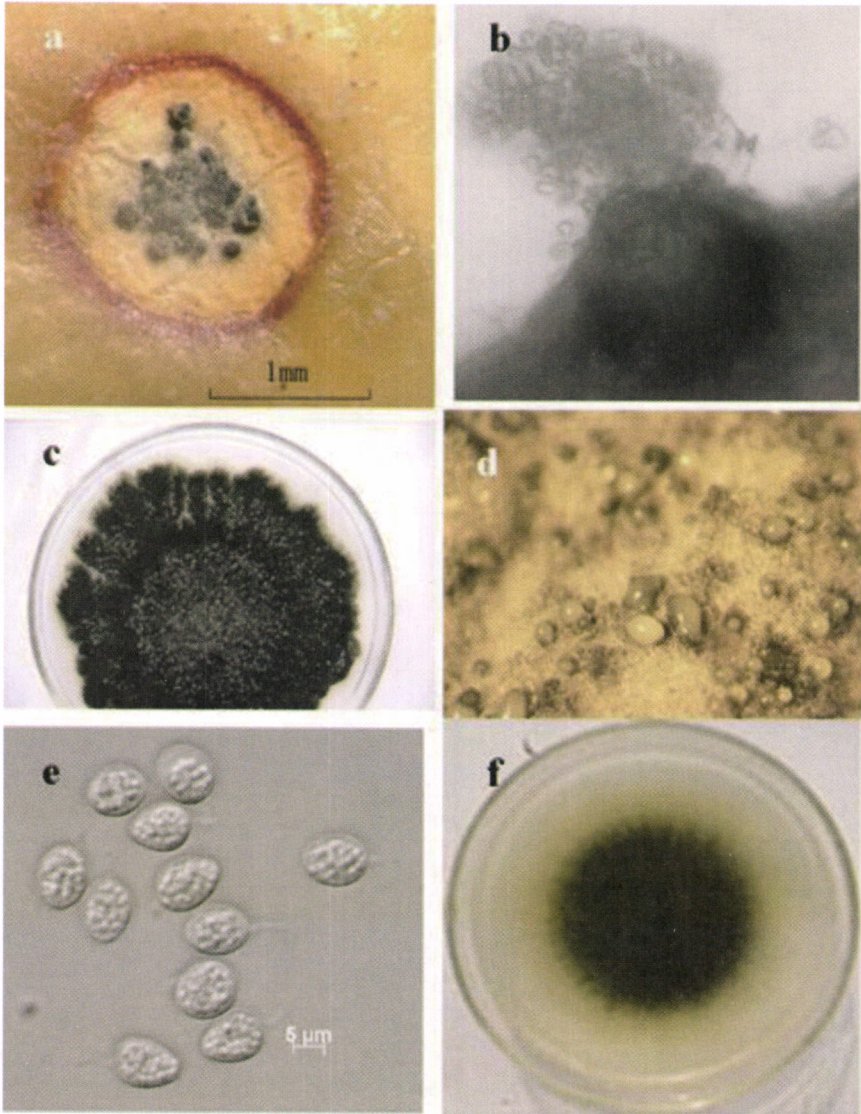
图 B.1 柑橘黑斑病菌引起的症状



附 录 C  
(资料性附录)

柑橘黑斑病菌形态特征及培养性状图

柑橘黑斑病菌形态特征及培养性状图见图 C.1。



说明：

- a~b——单个病斑上聚生的多个分生孢子器放大及单个分生孢子器纵切面；
- c~d——PDA 上的菌落及分生孢子团；
- c——黑色颗粒状物为菌落表面的分生孢子器；
- d——乳白色黏质团为从菌落上分生孢子器中溢出的分生孢子团；
- e——分生孢子，尾部具胶质纤丝(40×物镜)；
- f——在 OA 上培养的菌落产生黄色色素扩散至菌落周围的培养基中。

注：a~e 王卫芳拍摄，f 引自 Wang XH et al., 2012。

图 C.1 柑橘黑斑病菌形态特征和培养特性

附 录 D  
(资料性附录)

柑橘黑斑病菌(*Guignardia citricarpa* Kiely)与近似种的区别

表 D.1 给出了柑橘黑斑病菌(*Guignardia citricarpa* Kiely)与近似种的区别。

表 D.1 柑橘上五种 *Phyllosticta* spp. 的比较

|  |                                   |  |                                     |  |  |
|--|-----------------------------------|--|-------------------------------------|--|--|
| 有性型  | <i>G. citricarpa</i>              | 未知   | 异名 <i>G. mangiferae</i>             | 未知                                       | 未知                                     |
| 无性型  | <i>P. citricarpa</i> <sup>1</sup> | <i>P. citriasiana</i> <sup>2</sup>         | <i>P. capitalensis</i> <sup>3</sup> | <i>P. citribraziliensis</i> <sup>4</sup> | <i>P. citrichinaensis</i> <sup>5</sup> |
| 分 布  | 亚洲、澳洲、南美洲、南非洲、美国佛罗里达州             | 中国、泰国、越南                                   | 世界广泛分布                              | 巴西                                       | 中国                                     |
| 寄 主  | 除酸橙、柚及其杂交种和柚类外的所有柑橘种              | 蜜柚和沙田柚                                     | 各种柑橘品种和其他非柑橘寄主植物                    | 柠檬                                       | 蜜桔、柚、甜橙和柠檬                             |
| 致病性  | 具致病性                              | 具致病性                                       | 无致病性(内生菌)或弱致病性                      | 无致病性(内生菌)                                | 无致病性或弱致病性                              |
| 症状表现   | 果皮病斑上可产生分生孢子器                     | 与柑橘黑斑病症状相似,称 citrus tan spot,果皮病斑上可产生分生孢子器 | 无症状或产生小病斑                           | 无症状                                      | 叶片和果实,症状轻微,病斑上不产生分生孢子器                 |
| 分生孢子<br>μm   | (11~12)×(6~8)                     | (12~14)×(6~7)                              | (11~12)×(6~7)                       | (10~12)×(6~7)                            | (8~12)×(6~9)                           |
| 胶质鞘厚度<br>μm  | 1                                 | <1.5                                       | 2~4                                 | 2~4                                      | <1.5                                   |
| 纤丝长度   | 4~10                              | 7~14                                       | 4~8                                 | (7~15)×(1.5~2)                           | (14~26)                                |
| 小型分生孢子<br>μm   | (5~8)×(0.5~1)                     | (3~5)×(1~2)                                | (7~8)×(1.8~2.5)                     | 未知                                       | (7~9)×(1~2)                            |
| 子囊果  | 在落叶上产生,在PDA上培养和果实不产生              | 未知   | 在PDA上培养产生                           | 未知                                       | 在PDA上培养产生                              |
| 子囊孢子<br>μm   | (12.5~16)×(4.5~6.5)               | 未知   | (15~17)×(5~6)                       | 未知                                       | (14~20)×(7~8)                          |
| OA上培养  | 产生黄色色素                            | 不产生黄色色素                                    | 不产生黄色色素                             | 不产生黄色色素                                  | 不产生黄色色素                                |
| G.= <i>Guignardia</i> , P.= <i>Phyllosticta</i> , PDA=马铃薯葡萄糖琼脂培养基,OA=燕麦培养基,最适生长温度:培养2周达到菌落最大直径,最高生长温度:菌落生长的最高温度。   |                                   |  |                                     |  |  |
| 1 引自 Sutton & Waterston (1966), Baayen et al. (2002)。2 引自 Wulandari et al., 2009。3 引自 van der Aa (1973), Baayen et al. (2002) and Glienke et al. (2011)。4 引自 Glienke et al. (2011)。5 引自 Wang et al., 2012。 |                                   |  |                                     |  |  |

附 录 E  
(规范性附录)  
培养基的配方和配制方法

**E.1 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)**

200 g 马铃薯,15 g 葡萄糖,15 g 琼脂。马铃薯去皮切成小块后加水煮沸 20 min~30 min,纱布过滤后加入 15 g 琼脂,溶化后加入 15 g 葡萄糖,加水补足 1 000 mL,将培养基的 pH 调至 5.6,121 ℃下灭菌 20 min。也可采用商品化 PDA 粉按使用说明进行配制。

**E.2 燕麦琼脂培养基(OA)**

30 g 燕麦片,20 g 琼脂,1 000 mL 蒸馏水。燕麦片用纱布包裹于沸水浴上加热 2 h,纱布过滤,加琼脂 20 g,溶化后加水补足 1 000 mL,将培养基的 pH 调至 5.6,在 121 ℃下灭菌 20 min,将培养基的 pH 调至 5.6。

---



中华人民共和国出入境检验检疫  
行 业 标 准  
柑橘黑斑病菌检疫鉴定方法  
SN/T 4648—2016

\*

中国标准出版社出版  
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)  
北京市西城区三里河北街16号(100045)  
总编室:(010)68533533

网址 [www.spc.net.cn](http://www.spc.net.cn)

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

\*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 20 千字  
2018年1月第一版 2018年1月第一次印刷  
印数 1—500

\*

书号: 155066 • 2-32254 定价 21.00 元



SN/T 4648—2016