



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3434—2012

杨树炭团溃疡病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Hypoxylon mammatum* (Wahlenberg) J. Miller

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。

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。

本标准主要起草人：吴兴海、陈鹏、白桦、王英超、厉艳。

杨树炭团溃疡病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了进出境种苗、原木及木质包装检疫中杨树炭团溃疡病菌的检疫和鉴定方法。
本标准适用于进出境植物及其产品中杨树炭团溃疡病菌的检疫和鉴定。

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 1157 进出境植物苗木检疫规程

3 杨树炭团溃疡病菌基本信息

学名: *Hypoxylon mammatum* (Wahlenberg) J. Miller

异名: *Hypoxylon pruinatum* (Klotzsch) Cooke; *Entoleuca mammatum*; *Sphaeria mammatum*; *Nemania mammatum*; *Sphaeria pruinata*; *Rosellinia pruinata*; *Hypoxylon pauperatum*; *Anthostoma morsei*; *Hypoxylon morsei*; *Hypoxylon blakei*; *Anthostoma blakei*; *Hypoxylon holwayi*; *Fuckelia morsei*

俗名: Black stem canker

分类地位: 子囊菌门 (Ascomycota), 子囊菌纲 (Ascomycetes), 炭角菌目 (Xylariales), 炭角菌科 (Xylariaceae), 炭团菌属 (*Hypoxylon*)。

传播途径: 杨树炭团溃疡病菌主要是一种气传病害。可通过风、雨、昆虫、修剪工具等进行传播。

杨树炭团溃疡病菌的其他信息参见附录 A。

4 方法原理

根据杨树炭团溃疡病菌的形态特征、致病性测定的症状特征对该病菌进行检疫鉴定及结果判定。

5 仪器和用具

超净台、生物培养箱、荧光显微镜、离心机、涡旋器、生物显微镜、体视显微镜、光照培养箱、高压灭菌器及其他常规实验室设备器具。

6 药品试剂与培养基

NA 培养基、2%次氯酸钠或 75%乙醇、甘露醇、6-苄氨基嘌呤(6-BA)、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、3-吲哚丁酸(IBA)、改良 B5 培养基、WPM 培养基等。

7 现场检疫

7.1 抽样方法

对来自杨树炭团溃疡病菌发生国家和地区(参见附录 A)的寄主植物及其产品按 SN/T 1157 进行抽样。

7.2 症状检查

在寄主植物上,症状在植株外表皮上初期表现为橙黄色、水渍状的凹陷,并逐渐形成绿色块状开裂,周缘黄色;后期在水泡状的外皮下,出现灰色或橄榄绿色团块状组织和特征化的钉状精配子柱;由凹陷处或块状外表皮边缘向内切开皮层、维管束,皮层呈现层状或斑驳状,颜色为淡黄色或黑色,形成层出现白色的扇状菌丝体。在组织培养再生苗上,症状表现为叶片萎缩、茎部表皮变黑。组织收集可疑植物材料一并带回实验室检验。具体症状参见附录 A。

8 实验室检测

8.1 病原菌分离与培养

对于具 7.2 中初期症状的样品材料,则用解剖刀切取长植物茎段,装入铺有潮湿纸巾的广口瓶中,盖上盖子,放入培养箱中,在 24℃~28℃、95%~100%湿度下保湿培养。从第 4 天开始观察,检查外皮症状(表皮由绿色块状变为水泡状,局部表皮向上翘起并进一步裂开,最终露出精配子柱)。

对于具典型症状的样品材料,检查子实体结构,切取白色或黑色子座,在解剖镜(或 100×~200× 的显微镜)下,通过徒手切片或石蜡切片制成玻片,显微镜下观察子囊壳和子囊孢子。若发现子囊孢子,挑取单个孢子进行单孢分离,形成菌落后移至 NA 培养基纯化。若发现菌丝,用灭菌针挑取菌丝分离培养纯化。对于无明显症状的样品,取其伤口或开裂处组织切成细条,在 75% 的酒精溶液中浸泡 1 min,取出后用 2% 次氯酸钠溶液进行表面消毒 5 min,无菌水洗 3 次后转至 NA 培养基,24℃~28℃ 下培养 2 d~4 d,用灭菌挑针挑取组织块边缘的菌丝,将其转移至另外的 NA 培养基上纯化。注意观察菌落特征,记录菌落和菌丝体特征,测定精配子(柱)、子囊和子囊孢子的大小。

8.2 致病性测定

8.2.1 致病性接种应在无菌的条件下完成,接种寄主可选用易感品种美洲山杨(*Populus tremuloides*) 的无性繁殖体系。选取高度为 2 cm 左右的组培幼苗作为接种材料,用无菌手术刀在茎部(第一真叶和培养基平面之间的茎段)划开直径为 2 mm 左右的伤口。

8.2.2 孢子接种

8.2.2.1 直接摩擦接种:用无菌刷将子囊孢子轻柔地刷在伤口处,以划伤的幼苗作为空白对照。

8.2.2.2 针刺或喷雾法接种:将子囊孢子和无菌水混合制成孢子悬浮液,浓度为 10^6 个/mL,利用针刺法或喷雾法进行接种。接种后,伤口用杨树炭团溃疡病菌过滤液浸过的湿棉包裹(过滤液制备:将菌丝(在 NA 培养基上培养时间达到 14 d 以上)和无菌水的混合液吸入注射器,然后通过压力使混合液通过滤器(其中含有孔径为 0.22 微米的滤膜)进入无菌容器,制成过滤液),对照用无菌水接种并使用无菌水浸泡的棉花团包裹伤口。

8.2.3 菌丝块接种

切开外皮,粘或贴上菌丝块,用杨树炭团溃疡病菌过滤液浸湿的棉花团保湿(必要时用胶带封住伤

口),对照用无菌水接种并使用无菌水浸泡的棉花团包裹伤口。最后将这些接种后的幼苗转入含有 0.3 mol/L 甘露醇的改良 B5 培养基或 WPM 培养基培养基中继续培养 15 d,观察并记录病害发展和幼苗生长情况。美洲山杨组织培养方法及配方参见附录 B。

9 鉴定特征

9.1 形态特征

9.1.1 有性世代

子座开裂,球形(直径 3 mm~8 mm)或长方体((5 mm~12 mm)×(3 mm~5 mm)×(2 mm~4 mm),初期白色粉状,后期形成黑色、炭质,通常形成多个子囊壳。子囊壳球形或卵球形,大小 1.2 mm×1.8 mm。子囊壳半埋生于白色或灰褐色子座表层。孔口呈乳突状,边缘粗糙。子囊圆筒形,大小(85 μm~110 μm)×(11 μm~13 μm),长柄,内含单行排列的 8 个子囊孢子。顶端变厚形成淀粉质的顶环构造,壶形或立方形,遇碘变蓝色,大小(4 μm~6 μm)×(5 μm~6.8 μm)。子囊孢子褐色,大多椭圆形或不正椭圆形,两侧不对称,两端钝圆,加厚变暗,有时外形不规则(柳树分离物)。子囊孢子大小(17.5 μm~30 μm)×(7.5 μm~11 μm),在凸面有平行于纵轴的发芽缝,形状为直线或倾斜曲线,长度和纵轴相近;在 10% KOH 溶液中,孢子外壁不开裂,保持平滑。该菌在培养基上无法形成有性世代。

9.1.2 无性世代

自然界中尚未被发现。自然状态下,该菌可产生一种传统上一直被沿用下来的名为分生孢子(Conidia)但具有有性孢子(Asexual spores)功能的精配子(Spermatia),其主要特征为单生,单核,长卵圆形,透明状,(4 μm~7 μm)×(1 μm~2 μm)。孢子梗长为 75 μm~150 μm,二歧分支,着生于(0.83 mm~0.87 mm)×(1.3 mm~1.7 mm)的钉状精配子柱(Conidial pillars)。精配子发育形成大量的突起,在水泡状开裂的外皮下呈灰色或橄榄绿色粉末团块。该孢子在培养基上的分离培养过程中,无法形成无性世代。

9.1.3 培养阶段

子囊孢子在 NA 培养基上萌发,初期形成白色或淡黄色的具有不规则边缘的菌落,后期形成灰色的扇状菌丝(精配子的培养形态与子囊孢子相似)。

杨树炭团溃疡病菌形态学特征及其与近似种的主要区别参见附录 C、附录 D。

9.2 致病性测定

幼苗接种 10 d 左右,叶片萎蔫卷曲,接种处可以明显观察到坏死反应,茎部周皮变黑并逐渐枯萎弯曲。随后,坏死部的菌丝将继续扩展,严重破坏植株细胞及组织结构,15 d 左右时,植株表现为顶部萎缩、整体干枯倒伏并死亡(参见附录 E)。致病菌的再分离和鉴定:用接种发病的叶片作常规病组织分离,获得的分离菌与原接种菌形态特征相同。

10 结果判定

以分离物的子囊孢子作为主要鉴定依据,致病性测定、其他有性特征、培养特征及精配子(柱)形态特征等作为辅助鉴定依据,进行综合判定。若以上特征与第 9 章鉴定特征吻合,鉴定为杨树炭团溃疡病菌。

SN/T 3434—2012

11 菌种和阳性样品的保存

分离并最终鉴定为杨树炭团溃疡病菌的菌株应转接到试管斜面上,经登记和经手人签字后置于4℃左右冰箱中保存,并定期(30 d~60 d)转管,防止因斜面干燥而造成病原菌死亡。菌株至少需保存6个月,保存期满后,需经灭菌处理。

检出病菌的样品妥善保存,保存期限为不少于12个月。保存期满灭活处理。

附 录 A
(资料性附录)
杨树炭团溃疡病菌相关资料

A.1 地理分布

欧洲:安道尔、克罗地亚、法国、德国、意大利、俄罗斯(欧洲部分)、瑞典、英国(英格兰、海峡岛屿群)、乌克兰、前南斯拉夫地区。

北美地区:加拿大(艾伯特省和魁克北省)、美国(密歇根州、明尼苏达州、威斯康星州、阿拉斯加州、爱荷华州、蒙大纳州、新罕布什尔州)。

A.2 寄主范围

杨属(*Populus* spp.)、桤木属(*Alnus* spp.)、鹅耳枥属(*Carpinus* spp.)、云杉属(*Picea* spp.)、梨属(*Pyrus* spp.)、花楸属(*Sorbus* spp.)、榆属(*Ulmus* spp.)、槭树(*Acer* spp.)、白桦(*Birch*)、柳(*Salix*)、山毛榉(*Fagus*)、马占相思(*Acacia mangium*)等。

A.3 传播方式

杨树炭团溃疡病菌通常在寄主组织内以菌丝体或孢子形式越冬(深度不超过 8 mm)。孢子主要包括两种类型:

- a) 子囊孢子,在感染后的 3 年里,在相对高湿、低温的环境里释放;
- b) 精配子在感染后的 5~14 个月产生,但其在病害的传播过程中的作用目前尚未发现。

风传子囊孢子可以通过周皮上的伤口侵入,也可直接侵染健康外皮下的组织。杨树炭团溃疡病的传播大多数情况下起源于昆虫伤口。几种昆虫以杨树溃疡组织为食物,携带了子囊孢子在不同溃疡区传播。Graham 等(1963)提到杨树溃疡甲虫 *Astyloposis macula* (Say)(= *Amniscus macula* (Say))以发病外皮为食,其近缘甲虫 *Astyleiopus variegates* (Haldeman)主要以菌丝体和孢子为食,孢子能够以甲虫为介体在树木间传播。自然状态下,该菌不会经由芽、叶片、叶柄或叶腋侵入。

A.4 生物学特征

杨树炭团溃疡病菌是一种在高湿条件下易于侵染的病原菌,侵染的最低温度为 8℃,最高 32℃,最适温度为 24℃~28℃。

A.5 症状特征

受侵染的树木在 15 年~40 年的时候遭受的破坏程度最为严重。病症首先出现在外表皮,形成淡黄色或橙色的凹陷,边缘不规则。而后,外皮出现水泡状碎片翘起并逐渐脱落,露出黑色组织;这些黑色组织在绿色的树干形成突起。除厚壁组织外,所有类型细胞都会被破坏。病史长的溃疡组织可以长达 2.5 m。一般情况下,当溃疡扩散迅速的时候,愈伤组织的形成是受限的。叶片可能出现枯萎,一旦树木整体被溃疡包围,叶片就会全部死亡。树木有时可能会在抑制溃疡发展的同时产生新芽。当树木生长变弱时,病菌将会再一次侵入并加速树体的死亡进程。

SN/T 3434—2012

附录 B

(资料性附录)

美洲山杨(*Populus tremuloides*)组织培养方法及培养基配方

B.1 美洲山杨组织培养方法

选取杨树叶片切块在 6-苄氨基嘌呤(6-BA)和 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)浓度为 0.1 mg/L 和 0.5 mg/L 的改良 B5 培养基进行愈伤组织诱导。将诱导形成的愈伤组织转移至 6-BA 浓度为 0.5 mg/L 的木本植物培养基(Woody Plant Medium, WPM)上完成再生芽的诱导分化。将诱导形成的再生芽转移至 3-吲哚丁酸(IBA)浓度为 0.2 mg/L 的改良 B5 培养基或 WPM 培养基进行再生根培养,直至株高满足致病性测定需求。

B.2 培养基配方

改良 B5 培养基和 WPM 培养基配方见表 B.1。

表 B.1 改良 B5 培养基和 WPM 培养基配方

成份	使用浓度 mg/L	
	改良 B5 培养基	WPM 培养基
NH_4NO_3	1 650	400
KNO_3	1 900	900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	96
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	370
KH_2PO_4	170	170
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	—	556
KI	0.83	—
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3	22.5
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	8.6
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.25
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	—
H_3BO_3	—	6.2
肌醇	100	100
烟酸	1.0	0.5
盐酸吡哆醇	1.0	—
盐酸硫铵	10	—

表 B.1 (续)

成份	使用浓度 mg/L	
	改良 B5 培养基	WPM 培养基
盐酸硫胺素 VB ₁	—	1.0
盐酸吡哆辛 VB ₆	—	0.5
蔗糖	30 g/L	30 g/L
琼脂	7 g/L	7 g/L

附 录 C
(资料性附录)

杨树炭团溃疡病菌形态特征图

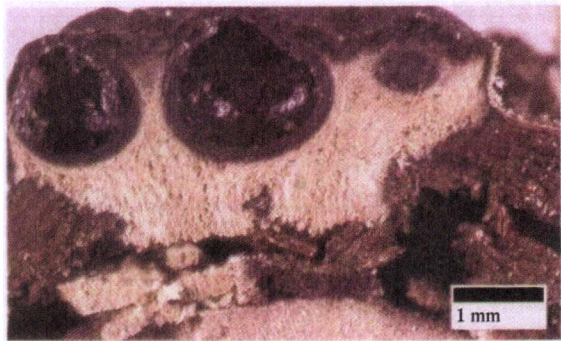


图 C. 1 子座及着生其上的子囊壳
(引自 Ariège 等,1995 年)



图 C. 2 子囊及子囊顶环(Ascal apical apparatus)
(引自 Ariège 等,1995 年)

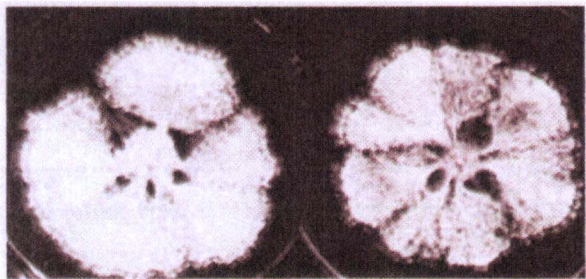


图 C. 3 单子囊孢子 24 °C 培养 14 d 后的形态
(引自 Davinderjit K,1974 年)



图 C. 4 精配子柱
(引自 P. D. Manion 等,1986 年)

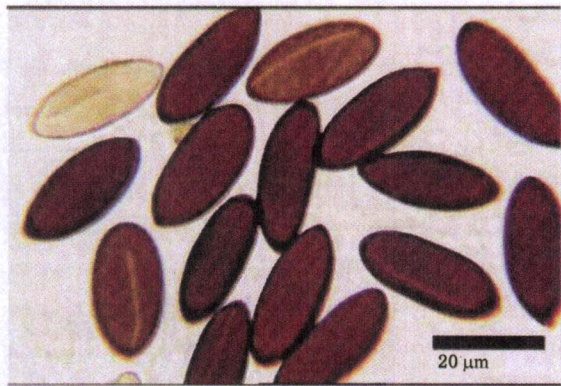


图 C. 5 杨树(*Populus tremula*)上分离的子囊孢子
(引自 Ariège 等,1996 年)



图 C. 6 柳树(*Salix caprea*)上分离的子囊孢子
(引自 Ariège 等,1995 年)

附 录 D
(资料性附录)

杨树炭团溃疡病菌与近似种的主要区别

表 D.1 杨树炭团溃疡病菌与其他炭团菌属菌的主要区别

病害特征	杨树炭团溃疡病菌	其他炭团菌属菌
芽缝	位于子囊孢子凸面	位于子囊孢子凹面
顶环	柱高大于直径,壶形或立方形	直径大于柱高,碟状或盘状
孢子壁浸泡于 10% KOH 溶液时	不开裂、保持平滑	开裂

表 D.2 炭团菌属与其他炭角菌科菌属检索表

1. 子座不发达,或形成盾状的假子座	2
1. 子座发达,由菌丝体形成	4
2. 子囊壳生于子座内,壁革质或炭质	1. 座坚壳属[Rosellinia de Not.]
2. 子囊壳生于假子座内,假子座形成盾状菌座	3
3. 子囊孢子单细胞;子囊壳壁革质	2. 小花口壳属[Anthostomella Sacc.]
3. 子囊孢子多细胞,长形;子囊壳壁亚膜质	3. 盾座球壳属[Clypeosphaeria Fuckel]
4. 子座生于基物内;子囊壳以后外露	4. 花口壳属[Anthostoma Nits.]
4. 子座生于基物外	5
5. 子座皮壳状、盾状、球形或半圆形,没有不孕的基部	6
5. 子座直立,单枝或分枝,棍棒形,顶部头状或碟状,有不孕的基部	11
6. 分生孢子层在子座表层之下形成,以后外露	5. 盘座壳属[Nummularia Tul.]
7. 子座扩展型	8
7. 子座碟形至半圆形,可互相融合成壳状	9
8. 孢子单细胞	6. 团粒壳属[Bolinia (Nits) Sacc.]
8. 孢子双细胞	7. 圆顶壳属[Camarops Karst.]
9. 子座初期肉质,后变为炭质	8. 焦菌属[Ustulina Tul.]
9. 子座始终为炭质或木质	10
10. 子座无同心圈层	9. 炭团菌属[Hypoxylon Bull. ex Fr.]
10. 子座有同心圈层	10. 轮层炭壳属[Daldinia Ces. et de Not.]
11. 子座分枝,顶部不扩大	12
11. 子座分枝,顶部扩大作碟形	11. 孔座壳属[Poronia Willd. ex Fr.]
12. 子座的不孕部份不由索状组织构成,孕育部分棍棒形、球形、头状或分枝	13
12. 子座的不孕部份由索状组织构成,孕育部分棍棒形	12. 丛枝壳属[Thamnomycetes Ehrenb. ex Fr.]
13. 子座平秃;子实体生于顶部的凹陷部份	13. 褶座壳属[Camillea Fr.]
13. 子座构造与上不同	14
14. 子座头状,积累成片	14. 克氏头座菌属[Kretzschmaria Fr.]
14. 子座棍棒形,分枝,少有头状的,尖端不孕	15. 鹿角菌属[Xylaria Hill ex Grev.]

(引自邵力平等,1984 年)

附录 E
(资料性附录)
杨树炭团溃疡病菌致病性测定

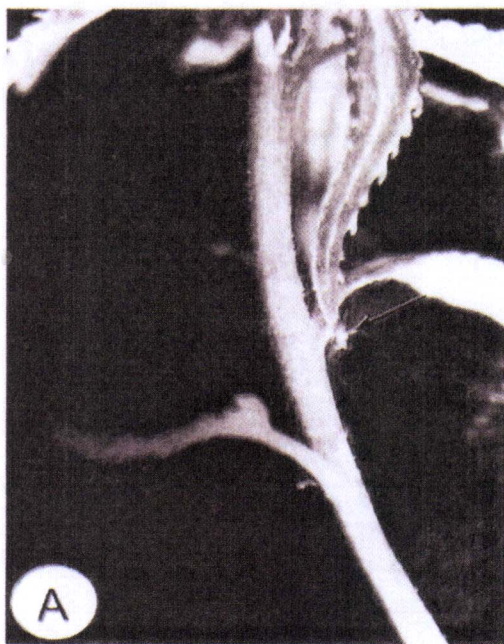


图 E.1 杨树幼苗接种孢子后 5 d 时的症状
(引自 P. D. Manion 等, 1989 年)

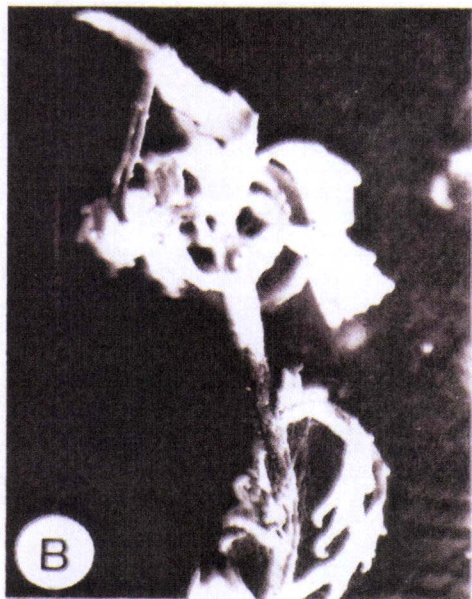


图 E.2 杨树幼苗接种孢子后 10 d 时的症状
(引自 P. D. Manion 等, 1989 年)



图 E.3 杨树幼苗接种孢子后 15 d 时的症状
(引自 P. D. Manion 等, 1989 年)

参 考 文 献

- [1] J. Pinon. Situation d'*Hypoxylon mammatum* en Europe. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 1986,16:543~546.
- [2] 邵力平,沈瑞祥,张素轩,等. 真菌分类学. 北京:中国林业出版社. 1984,12:11-12.
- [3] 魏景超. 真菌鉴定手册. 上海:科学技术出版社. 1979,9:220-221.
- [4] M. E. Ostry, N. A. Anderson. Genetics and ecology of the *Entoleuca mamata* *Populus* pathosystem: Implications for aspen improvement and management. *Forest Ecology and Management* 2009,257(3):390-400.
- [5] R. R. Belanger, P. D. Manion, D. H. Griffin. *Hypoxylon mammatum* Ascospore Infection of *Populus tremuloides* Clones; Effects of Moisture Stress in Tissue Cultural. *Phytopathology* 1989,79(3):315-317.
- [6] D. K. Bagga, E. B. Smalley. Variation of *Hypoxylon pruinaum* in Culture. *Phytopathology*. 1974,64(5):663-667.
- [7] I. H. Chapela. Fungi in healthy stems and branches of American beech and aspen: a comparative study. *New Phytopathology*. 1989,113(5):65-75.
- [8] D. K. Bagga, E. B. Smalley, J. G. Berbee. Conidia Stage of *Hypoxylon pruinaum*; Factors Influencing Pillar Production and Conidial Germination. *Phytopathology* 1974,64(3):411-413.
- [9] Angelo Mazzaglis, Naldo Anselmi, Saverio Vicario et al. Sequence analysis of the 5.8S rDNA and ITS regions in evaluating genetic relationships among some species of *Hypoxylon* and related genenra. *Mycol. Res.* 2001,105(6):670-675.
- [10] E. W. Noh, S. C. Minocha. High efficiency shoot regeneration from callus of quaking aspen (*Populus tremuloides* Michx). *Plant Cell Rep.* 1986,114(5):464-467.
-