



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3750—2013

---

## 苹果壳色单隔孢溃疡病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Botryosphaeria stevensii* Shoemaker

2013-11-06 发布

2014-06-01 实施

---

中 华 人 民 共 和 国 发 布  
国家质量监督检验检疫总局

## 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、中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人：王卫芳、张秋娥、黄英、严进、华丽。

# 苹果壳色单隔孢溃疡病菌检疫鉴定方法

## 1 范围

本标准规定了植物检疫中苹果壳色单隔孢溃疡病菌的检疫鉴定方法。

本标准适用于苹果壳色单隔孢溃疡病菌所有寄主植物的原木、枝条、苗木和果实的检疫鉴定。

## 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

依据苹果壳色单隔孢溃疡病菌的为害症状、菌落特征、病菌的无性型和有性型形态进行该病菌的检疫鉴定。

## 4 试剂及仪器设备

### 4.1 培养基及试剂

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)、燕麦琼脂培养基(OA:每1 000 mL OA由30 g燕麦片,20 g琼脂配制而成),100%乳酸、1%的次氯酸钠( $\text{NaOCl}$ )、70%乙醇、无菌水。

### 4.2 仪器与设备

立体显微镜、生物显微镜(具油镜和测微尺)、普通天平(感量0.1 g)、超净工作台、生物培养箱、高压灭菌器、载玻片、盖玻片、打孔器(直径4 mm)。

## 5 检疫与鉴定

### 5.1 症状检查

检查抽取的原木、木制品、枝条和苗木树皮的表面是否有溃疡,枝条是否有枯死症状,检查果实是否有腐烂症状(症状描述和图片参见A.3、图B.1)。

按SN/T 2122抽样,将有可疑症状的样品带回实验室作进一步检验。

### 5.2 实验室鉴定

#### 5.2.1 样品中的病菌形态学观察

从树皮上采集子实体,横切片后,将切片组织转移到滴有无菌水的载玻片上,在常温下晾干后加

1 滴 100% 乳酸并盖上盖玻片,制成非永久性玻片。观察子实体(尤其是子座)的形态特征,记录分生孢子、产孢细胞或者子囊、子囊孢子的形态。分别测量 50 个子囊孢子、子囊、分生孢子和产孢细胞、10 个无性型子座和 10 个有性型子座的大小,拍摄并保存数码照片,同时将子实体转入培养基中纯化保存。

### 5.2.2 分离培养

在样品中如果没有发现病原菌的子实体,则采用组织分离培养法,分离病部的病原菌。取发病部位的病健交界组织,切成 4 mm×4 mm 的小块,用 1% 的 NaOCl 表面消毒 10 min,无菌水冲洗 3 遍,置于直径 9 cm 的 PDA 平板上,每皿放 4~6 块,于 25 °C 条件下 12 h 黑暗/光照培养,将长出的菌落边缘的菌丝转至新的 PDA 平板上纯化。

### 5.2.3 分离物培养性状和形态学观察

将纯化后的菌株在 PDA 平板上培养 6 d,采用火焰消毒的打孔器从菌落上打取直径 4 mm 的菌丝体块,转移到新的 PDA 平板上,在全黑暗条件下,分别于 20 °C、25 °C 进行培养,每处理重复 3 次,观察菌落形态、计算菌落的生长速度、分生孢子器形成的速度。待分生孢子器形成后,观察分生孢子器及分生孢子的形态,测量其大小,拍摄并保存数码照片。

## 6 鉴定特征

### 6.1 菌落特征

在 PDA 平板上,菌落圆形,初期白色,培养 5 d~6 d 后呈深橄榄色,且有大量的气生菌丝生成,在 20 °C、25 °C 黑暗条件下菌落生长速率分别为 6 mm/d、11 mm/d。培养至 6 d 菌落中央即现纠结成粒状的大量黑褐色分生孢子器。培养至 9 d 少量的分生孢子器顶部即现白色黏稠状分生孢子团,培养至 15 d 整个培养皿布满黑褐色分生孢子器,并且喷出大量白色孢子团(菌落特征图参见图 B.2)。

### 6.2 无性繁殖器官的形态

分生孢子器,单生或聚生,埋生于黑色的子座上,成熟时部分开裂,深褐色至黑色,近球形,直径可达 600 μm,壁由三层组成,外层黑褐色,由厚壁细胞组成,中间层由深褐色的薄壁细胞组成,内层由透明的薄壁细胞组成。孔口居中,圆形,具乳突。分生孢子梗圆柱形,透明,无隔膜,极少数分支具隔膜。产孢细胞[(11~)12~15]μm×(4~5)μm,外生芽殖型产孢,离散,圆柱形,透明,光滑,无限生长。分生孢子器成熟后喷射出白色分生孢子团。分生孢子透明,光滑,厚壁,长椭圆形至卵形,大小[(23.5~)25.1~25.7(~27.4)]μm×[(12.4~)13.2~13.5(~14.3)]μm,平均大小为(25.4±1.0)μm×(13.4±0.5)μm,长/宽比率为 1.9±0.1。分生孢子初无色透明,无隔膜,随着培养时间的延长,分生孢子转为褐色,多具 1 隔膜,少数 2~3 隔膜。

### 6.3 有性繁殖器官形态

在自然条件下,如树皮的坏死部位,无性型和有性型可同时产生于同一子座内或不同的子座内。子囊座单腔室,单生或聚生,埋生,成熟时部分开裂,球形,直径可达 300 μm,深褐色至黑色,壁厚,外层由深棕色的厚壁细胞组成,内层由透明的薄壁细胞组成。孔口中生,圆形,具乳突。拟侧丝透明,具分支,具隔膜,宽 2 μm~3 μm。子囊棍棒状,具柄,双囊壁,大小为(100~160)μm×(14~22)μm(包括柄),内含 8 个子囊孢子,双侧排列。子囊孢子大小为[(24.8~)30.8~32.1(~36.2)]μm×[(9.5~)11.2~11.7(~13.4)]μm,长宽比为 2.8±0.3,梭形,中间宽,两端钝圆,透明,壁薄,光滑,初期无隔膜,后期变为淡褐色具 1 隔膜,极少数有 2 个隔膜(病菌的有性型形态图参见图 B.4)。

## 7 结果判定

如病原菌的培养性状与形态特征与 6.1、6.2、6.3 描述的鉴定特征相吻合,即可确定为苹果壳色单隔孢溃疡病菌。

## 8 菌种保存

分离获得的苹果壳色单隔孢溃疡病菌,应转入燕麦琼脂培养基试管斜面上,置于 4℃ 黑暗条件下保存至少 12 个月,以备复验、谈判和仲裁。



SN/T 3750—2013

## 附 录 A

(资料性附录)

### 苹果壳色单隔孢溃疡病菌背景资料

#### A.1 学名及分类地位

学名: *Botryosphaeria stevensii* Shoemaker

异名: *Botryodiplodia malorum* (Berk.) Petr. & Syd.

无性态: *Diplodia mutila* (Fr.) Mont.

分类地位: 子囊菌门 (Ascomycota); 座囊菌目 (Dothideales), 葡萄座腔菌科 (Botryosphaeriaceae), 葡萄座腔菌属 (*Botryosphaeria*)。

#### A.2 分布

亚洲: 印度。

非洲: 摩洛哥。

北美洲: 加拿大、美国。

南美洲: 委内瑞拉、秘鲁。

大洋洲: 澳大利亚、新西兰。

欧洲: 阿尔巴尼亚、保加利亚、德国、意大利、匈牙利、波兰、葡萄牙、西班牙、瑞典、乌克兰、英国。

#### A.3 症状

苹果壳色单隔孢溃疡病菌 (*B. stevensii*) 主要为害寄主植物的叶和枝干, 在不同寄主上的为害症状较相似。

在苹果和梨上, 主要引起枝干溃疡及干枯症状。在致病性测定时, 接种苹果树 6 周后, 枝条出现溃疡症状, 接种 7 d~14 d 的苹果果实表现出腐烂病斑。

橡树被 *B. stevensii* 侵染后, 主要引起树皮坏死或在枝条上尤其是枝条的顶端形成直径 2 cm~6 cm 的溃疡, 并伴有流胶症状。当病斑包围了枝干以后, 其顶端很快萎蔫随后枯死, 叶片变黄并最后萎蔫, 萎蔫的叶片通常依旧粘附在死亡的枝干上。在病部有可能观察到分生孢子器, 看起来像黑色的脓包。坏死的树皮很容易被剥掉, 露出黑色的韧皮部。在其他阔叶树上, *B. stevensii* 可引起类似的症状, 例如, 在欧洲白蜡的嫩枝上, 树皮上形成黑褐色坏死斑, 有时会引起叶子变色及萎蔫。在意大利西西里岛上, 5 年~7 年树龄的花桤枝条坏死并开裂, 溃疡下面的嫩条和顶端坏死。

在柏树上, 被 *B. stevensii* 感染后, 会引起新枝基部溃疡, 顶端变为黄色或褐色。

#### A.4 传播途径

该菌可以菌丝、子座和分生孢子器在发病枝干的树皮内越冬, 或以菌丝在枝条和芽内越冬, 当环境条件适宜时开始侵染。 *B. stevensii* 的分生孢子在整个生长季节均可通过风雨传播: 雨滴可溶解包有分生孢子的流胶, 并使它们溅起, 在风的作用下转移到新的寄主上。同时, 在风的作用下, 子囊孢子的传播更加容易。在意大利中部, *B. stevensii* 可通过一些长蠹科昆虫 (*Sinoxylon perforans*, *S. sexdentatum*),

以及一些吉丁科昆虫(*Coroebus florentinus*)在橡树间传播。当分生孢子器裂开时,它们会用分生孢子将自己覆盖起来,并作为新侵染的媒介。该菌可随寄主植物的茎、枝条、叶、苗木及果实的调运进行远距离传播。

A.5 寄主范围

苹果壳色单隔孢溃疡病菌寄主广,包括 11 科、18 属(参见表 A.1)。

表 A.1 苹果壳色单隔孢溃疡病菌的寄主种类

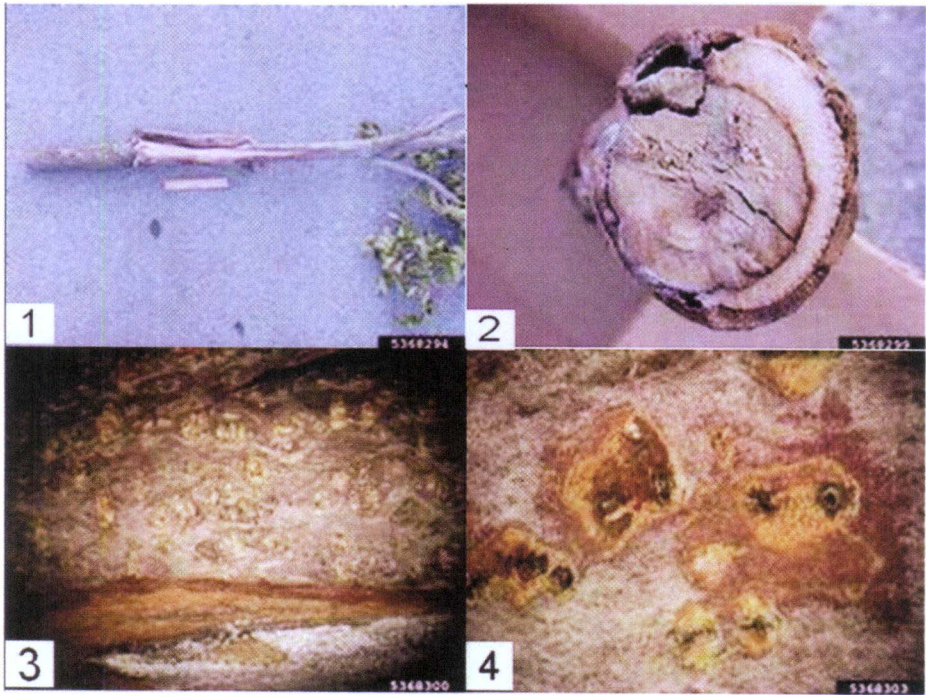
科	属
蔷薇科 Rosaceae	苹果属 <i>Malus</i> ( <i>M.domestica</i> , <i>M.pumila</i> , <i>M.sylvestris</i> ), 李属 <i>Prunus</i> (李 <i>P.salicina</i> , 桃 <i>P.persica</i> , 稠李 <i>P.padus</i> , 杏 <i>P.armeniaca</i> ), 梨属 <i>Pyrus</i> (梨 <i>P.communis</i> ), 枇杷属 <i>Eriobotrya</i> (枇杷 <i>E.japonica</i> )
葡萄科 Vitaceae	葡萄属 <i>Vitis</i> (葡萄 <i>V.vinifera</i> )
棕榈科 Palmae	棕榈属 <i>Trachycarpus</i> (棕榈 <i>T.fortunei</i> ), 刺葵属 <i>Phoenix</i> (海枣 <i>P.dactylifera</i> ), 假槟榔属 <i>Archontophoenix</i> (假槟榔 <i>A.alexandrae</i> )
壳斗科 Fagaceae	栎属 <i>Quercus</i> (欧洲栓皮栎 <i>Q.suber</i> , 橡树 <i>Q.aliena</i> )
木犀科 Oleaceae	白蜡树属 <i>Fraxinus</i> (欧洲白蜡木 <i>F.excelsior</i> )
柏科 Cupressaceae	圆柏属 <i>Sabina</i> spp., 刺柏属 <i>Juniperus</i> (沙皮刺柏 <i>J.Sabina</i> , 刺柏 <i>J.scopulorum</i> ), 扁柏属 <i>Chamaecyparis</i> (美国扁柏 <i>C.lawsoniana</i> )
榆科 Ulmaceae	榆属 <i>Ulmus</i> (榆树 <i>U.pumila</i> )
樟科 Lauraceae	鳄梨属 <i>Persea</i> (鳄梨 <i>P.americana</i> )
胡桃科 Juglandaceae	山核桃属 <i>Carya</i> (美国薄壳山核桃 <i>C.Illinoensis</i> )
含羞草科 Mimosaceae	金合欢属 <i>Acacia</i> (金合欢 <i>A.farnesiana</i> )
豆科 Leguminosae	长角豆属 <i>Ceratonia</i> (长角豆 <i>C.siliqua</i> )



SN/T 3750—2013

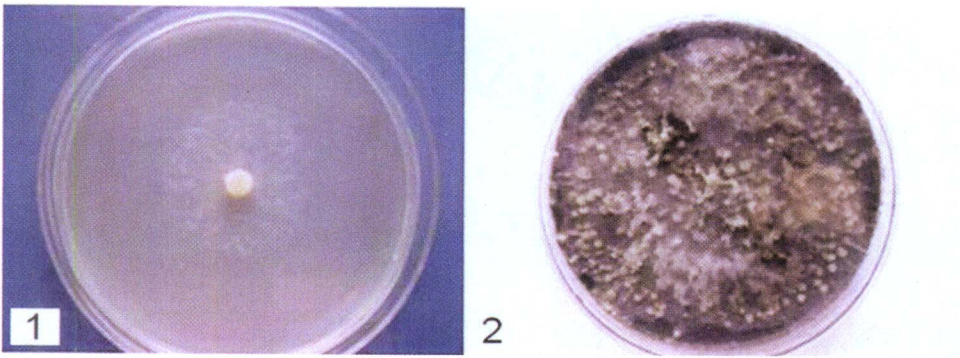
附录 B  
(资料性附录)

苹果壳色单隔孢溃疡病症状、病菌菌落及形态特征图



说明：  
1~2——病菌在树枝和树干上形成的症状；  
3~4——病菌在树皮表面形成分生孢子器。  
注：图片来自 Paul Bachi; <http://www.forestryimages.org/support/contactus.cfm>。

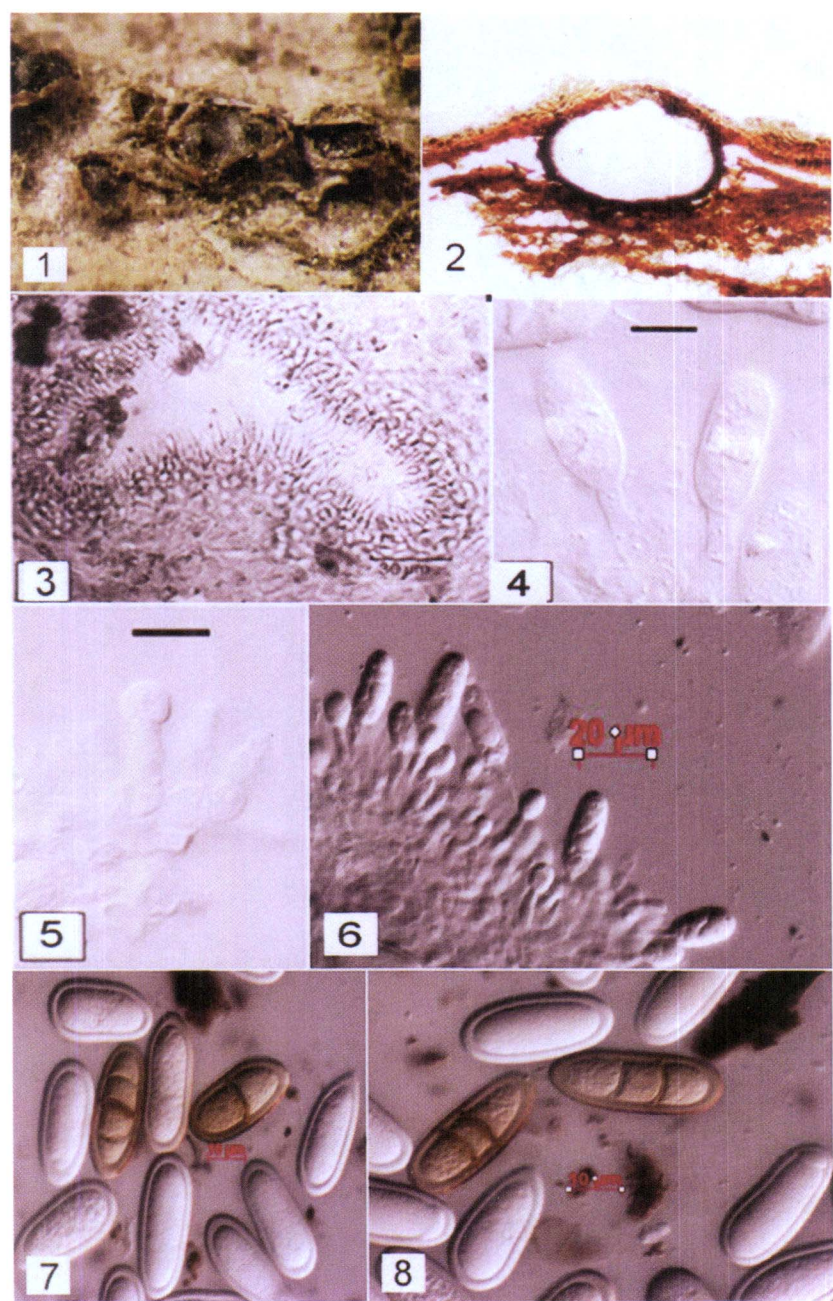
图 B.1 *B.stevensii* 侵染 *Carya illinoensis* 的病状及病征



说明：  
1——在 PDA 上培养 3 d；  
2——在 PDA 上培养 14 d(可见颗粒状分生孢子器)。  
注：菌株来源：美国菌种保藏中心，菌株编号：ATCC MYA-3696™，图片拍摄：张秋娥。

图 B.2 *B.stevensii* 的菌落特征





说明：

1 ——载孢体；

2 ——载孢体纵切面；

3 ——产生分生孢子的子座腔室纵切面；

4 ——产生大型分生孢子的产孢细胞；

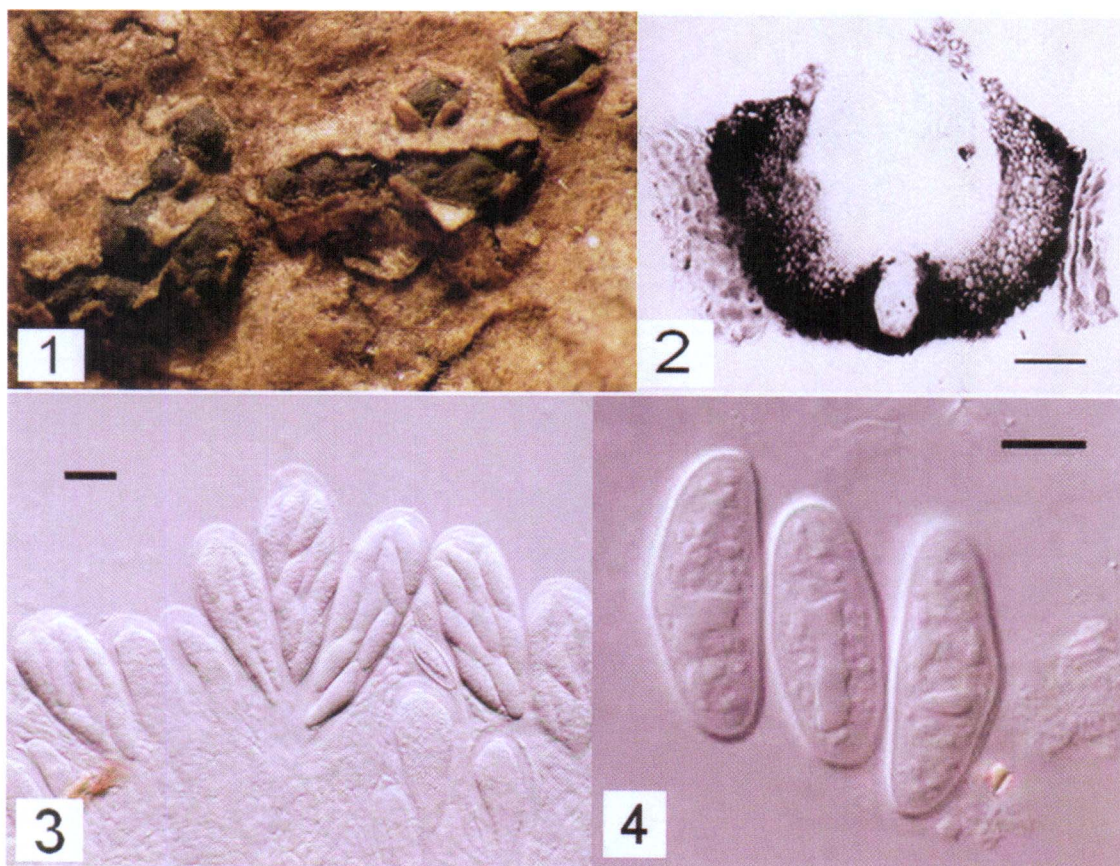
5 ——产生小型分生孢子的产孢细胞；

6 ——产生大、小型分生孢子的分生孢子器腔纵切面的一部分；

7~8——大型分生孢子(0~3 隔膜)。

注：标尺：图片 4~5、7~8:10 μm,图片 6:20 μm。图片 1~2、4~5 来自 Alves,A.,图片 3 来自 Vajna,L.,图片 6~8 王卫芳拍摄。6~8 菌株来源:美国菌种保藏中心,菌株编号:ATCC MYA-3696™。

图 B.3 *B.stevensii* 无性繁殖器官形态图



说明:

- 1——子囊座;
- 2——子囊座纵切面;
- 3——子囊;
- 4——子囊孢子。

注: 标尺: 图片 2: 100  $\mu\text{m}$ , 图片 3: 20  $\mu\text{m}$ , 图片 4: 10  $\mu\text{m}$ 。图片 1~4 来自 Alves, A. 等。

图 B.4 *B. stevensii* 有性繁殖器官形态图



## 参 考 文 献

- [1] Alves, A., Correia, A., Luque, J., and Phillips, A. 2004. *Botryosphaeria corticola*, sp. nov. on *Quercus* species, with notes and description of *Botryosphaeria stevensii* and its anamorph, *Diplodia mutila*. *Mycologia* 96:598-613.
- [2] Sanchez, M. E., Venegas, J., Romero, M. A., Phillips, A. J. L., and Trapero, A. 2003. *Botryosphaeria* and related taxa causing oak canker in southwestern Spain. *Pl. Dis.* 87:1515-1521.
- [3] Luque, J., and Girbal, J. 1989. Dieback of cork oak (*Quercus suber*) in Catalonia (NE Spain) caused by *Botryosphaeria stevensii*. *Eur. J. Forest Pathol.* 19:7-13.
- [4] Flynn, P. H., and Gleason, M. L. 1993. Isolation of *Botryosphaeria stevensii*, cause of *Botryosphaeria* canker from Rocky Mountain juniper in Iowa. *Pl. Dis.* 77:210.
- [5] Alvarez-Loayza, P., White J. E., Jr., Bergen, M., and Cadenas, C. 2008. *Diplodia mutila* causing seedling mortality of the palm *Iriateia deltoidea*. *Pl. Pathol.* 57:382.
- [6] Lazzizzera, C., Frisullo, S., Alves, A., Lopes, J., and Phillips, A. J. L. 2008. Phylogeny and morphology of *Diplodia* species on olives in southern Italy and description of *Diplodia olivarum*. *Fungal Diversity Press, Hong Kong* 31:63-71.
- [7] Abdollahzadeh, J., Goltapeh, E. M., Javadi, A., Shams-Bakhsh, M., Zare, R., and Phillips, A. J. L. 2009. *Barriopsis iraniana* and *Phaeobotryon cupressi*: two new species of the *Botryosphaeriaceae* from trees in Iran. *Persoonia* 23:1-8.
- [8] Aegerter, B. J., Gordon, T. R., Slippers, B., and Wingfield, M. J. 2004. Branch dieback of raywood ash in California. *Phytopathology* 94:S149.
- [9] Slippers, B., Smit, W. A., Crous, P. W., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D., and Wingfield, M. J. 2007. Taxonomy, phylogeny and identification of *Botryosphaeriaceae* associated with pome and stone fruit trees in South Africa and other regions of the world. *Pl. Pathol.* 56:128-139.
- [10] CPC2007.
- [11] Jone, A. L., Aldwinckle H. S. 1990. *Compendium of Apple and Pear Diseases*, The American Phytopathological Society, 41.
- [12] Vajna, L. 1986. Branch canker and dieback of sessile oak (*Quercus petraea*) in Hungary caused by *Diplodia mutila*. I. Identification of the pathogen. *European Journal of Forest Pathology*, 16 (4):223-229.
- [13] <http://www.forestryimages.org/support/contactus.cfm>.