



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3751—2013

苹果树炭疽病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Neofabraea malicorticis* H.S.Jacks

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：中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、深圳市检验检疫科学研究院、中华人民共和国厦门出入境检验检疫局、中华人民共和国广东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：王颖、程颖慧、章桂明、王宏毅、汪莹、王卫芳、王红英。

苹果树炭疽病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了苹果树炭疽病菌的检疫鉴定方法。

本标准适用于苹果树炭疽病菌的寄主携带苹果树炭疽病菌的检疫鉴定。

2 基本信息

中文名:苹果树炭疽病菌

学名:*Neofabraea malicorticis* H.Jacks

异名:*Pezicula malicorticis* (H.Jacks) Nannf., *Cryptosporiopsis malicorticis* (Cordley) Nannf., *Cryptosporiopsis curvispora* Peck, *Gloeosporium malicorticis* Cordley, *Macrophoma curvispora* Peck, *Macrophoma curvispora* (Peck) Gremmen, *Myxosporium curvisporum* (Peck) Sacc.

英文名:Bull's eye rot of apple, Anthracnose on apple tree, Anthracnose canker on apple tree

分类地位:真菌界(Fung)、子囊菌门(Ascomycota)、盘菌亚门(Pezizomycotina)、锤舌菌纲(Leotiomycetes)、锤舌菌亚纲(Leotiomycetidae)、柔膜菌目(Helotiales)、皮盘菌科(Dermataceae)、明孢盘菌属(*Neofabraea*)。

近似种:苹果树多年生溃疡病菌(*N. perennans* Kienholz)。

苹果树炭疽病菌的其他信息参见附录 A。

3 方法原理

苹果树炭疽病菌的形态学特征与培养性状是制定本标准的主要依据。

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、生物培养箱、电子天平(感量 0.01 g)、高压灭菌锅、常规冰箱(−20 ℃)。

4.2 用具

样品袋、标签、放大镜、培养皿、烧杯、三角瓶、试管、量筒、载玻片、盖玻片、镊子、手术剪、手术刀、接种针、棉纱、脱脂棉、酒精灯。

5 试剂和培养基

5.1 试剂

马铃薯、葡萄糖、燕麦、麦芽提取物、琼脂、乳酸、无水乙醇、75%乙醇。

5.2 培养基

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,121 ℃ 高压灭菌 20 min。

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。

燕麦培养基(OA):每 1 000 mL OA 由 20 g 燕麦,18 g 琼脂配制而成,121 ℃ 高压灭菌 20 min。

麦芽提取物培养基(MEA):每 1 000 mL MEA 由 20 g 麦芽提取物,18 g 琼脂配制而成,121 ℃ 高压灭菌 20 min。

6 病原菌鉴定

6.1 症状检查

病害初期在枝条或新梢上形成红色或紫色的小圆斑,随着病害的发展在树皮上形成椭圆形下陷的橙色至褐色的溃疡斑,在病健处树皮裂开,并有奶油色的分生孢子盘。病果表面、果洼及萼洼处有牛眼状腐烂病斑,病果腐烂组织表面出现奶油色分生孢子团。参见附录 B。

将可疑枝条和果实样品带回实验室作进一步检验,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 直接镜检

将有明显病症的病枝或病果置于体视显微镜下检查,挑取病部子实体制成玻片,置于显微镜下镜检。

6.3 保湿培养

将无上述明显症状或看似健康的枝条、果,做保湿培养。将枝条或果实置于密闭的塑料盒或袋中,25 ℃ 下培养,待发现病原体时,进行显微镜检及病原菌的分离培养。

6.4 分离培养

直接挑取病部的分生孢子器或分生孢子团,置于 APDA 平板上;或采用组织分离培养法,用 75% 乙醇对果实表面消毒,晾干后用消毒过的刀片切取病健交界处组织,切成 5 mm 见方小块后放置于 APDA 上,在 25 ℃、黑暗下培养,长出菌丝后纯化分别转至 PDA 培养基、OA 培养基、MEA 培养基上培养。

6.5 病菌形态特征和培养性状观察

显微镜检孢子的形态特征、产孢方式。观察记录在 25 ℃ 黑暗条件下菌落的生长速度、颜色变化、分生孢子的形成情况。

7 鉴定特征

7.1 病菌形态

分生孢子盘 0.2 mm~1 mm,生于寄主表皮下,后突出表皮。分生孢子座聚生,其上产生大量简单或分枝的、无色的产孢细胞。大分生孢子单细胞,无色透明,镰刀状至 U 形(偶尔直),成熟后有 1 到数个油球,大小为 (15 μm~24 μm)×(4 μm~6 μm)。小分生孢子大小为 (5 μm~8 μm)×(1.5 μm~2.5 μm)。子囊盘 0.5 mm~1 mm,无柄(偶有短柄),灰色至肉色,在分生孢子盘上很少形成子囊盘。子囊棍棒状,无盖,顶部平截至圆形,

基部有短蒂,大小($75\text{ }\mu\text{m}\sim 150\text{ }\mu\text{m}$) \times ($10\text{ }\mu\text{m}\sim 20\text{ }\mu\text{m}$),内含8个子囊孢子。子囊孢子单细胞,椭圆形,无色透明,无隔,壁薄,内含大颗粒或小油球,大小($12.5\text{ }\mu\text{m}\sim 26\text{ }\mu\text{m}$) \times ($5\text{ }\mu\text{m}\sim 9\text{ }\mu\text{m}$)。随着孢子老熟,子囊孢子变为1~5隔,子囊孢子壁逐渐增厚,颜色变为淡褐色。参见附录B。

7.2 病菌培养性状

苹果树炭疽病菌在培养基上菌落边缘整齐。在OA培养基上培养14d后菌落直径约为60mm,气生菌丝稀少,菌落棕色至赭色,色素不扩散。球形分生孢子器埋生在培养基中,部分埋生的球形分生孢子器有白色的菌丝。在MEA培养基上培养14d后菌落直径约为30mm,气生菌丝发达,灰色,部分变为肉色至珊瑚色,色素扩散使培养基变为红色或黄色。参见附录B。

7.3 与近似种的区别

Neofabraea malicorticis 的近似种主要是苹果树多年生溃疡(*N. perennans* Kienholz),二者的主要区别在于 *N. malicorticis* 的分生孢子盘可产生高度弯曲的大分生孢子,而 *N. perennans* 的大分生孢子直或稍弯。参见附录C。

8 结果判定

病菌形态学特征符合7.1、培养性状符合7.2则可判定为苹果树炭疽病菌(*Neofabraea malicorticis* H.S.Jacks)。

9 样品保存与处理

保存样品应视样品的状态采用相应的保存方式,妥善保存6个月。如发现苹果树炭疽病菌,该样品应保存1年,以备复验。保存期满后,需经灭菌处理。

10 菌种保存与处理

菌株在含30%甘油的冻存管中于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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。

11 实验记录保存

妥善保存检验报告,包括症状、病菌等图文资料。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 3751—2013

附 录 A
(资料性附录)

苹果树炭疽病菌的相关资料

A.1 寄主范围

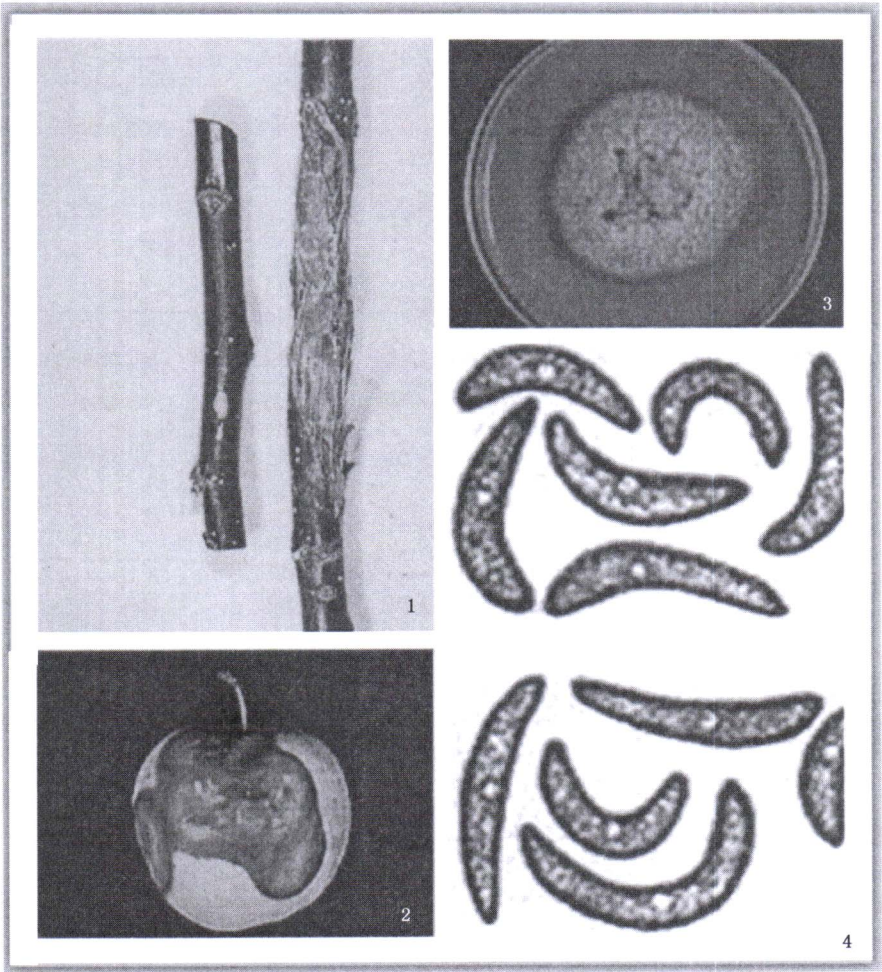
蔷薇科(Rosaceae):苹果属(*Malus*)包括欧洲栽培苹果(*M.domestica*)、苹果(*M.pumila*)、海棠果(*M.fusca*)、欧洲森林苹果(*M.sylvestris*);梨属(*Pyrus*)包括西洋梨(*P.communis*)、楸子(*P.malus*);
榲桲属(*Cydonia*)包括榲桲(*C.oblonga*)等,均可被害。

A.2 地理分布

美国、加拿大、英国、日本、南非、澳大利亚、新西兰、津巴布韦、葡萄牙、丹麦、荷兰。

附录 B
(资料性附录)

苹果树炭疽病菌症状、病原形态特征及培养性状图



说明：
1——枝条上的症状(引自 H.J.Larsen,2008)；
2——果实上的症状(引自 H.J.Larsen,2008)；
3——培养性状(引自 G.J.M.Verkey,1999)；
4——大分生孢子图(引自 F.M.Dugan,1993)。

图 B.1 苹果树炭疽病菌症状、病原形态特征及培养性状图

SN/T 3751—2013

附 录 C
(资料性附录)

苹果树炭疽病菌与近似种苹果树多年生溃疡病菌的区别

表 C.1 苹果树炭疽病菌与近似种苹果树多年生溃疡病菌的区别

项目	苹果树炭疽病菌	苹果树多年生溃疡病菌
无性型	<i>Cryptosporiopsis curvispora</i> (Peck)Gremmen	<i>C.perennans</i> (Zeller & Childs) Wollenw
有性型	<i>Neofabraea malicorticis</i> H.Jacks	<i>N.perennans</i> Kienholz
分布	美国、加拿大、英国、日本、南非、澳大利亚、新西兰、津巴布韦、葡萄牙、丹麦、荷兰	美国、澳大利亚、加拿大、荷兰、英国
寄主	欧洲栽培苹果 (<i>Malus domestica</i>)、苹果 (<i>M.pumila</i>)、海棠果 (<i>M.fusca</i>)、欧洲森林苹果 (<i>M.sylvestris</i>)、西洋梨 (<i>Pyrus communis</i>)、楸子 (<i>P. malus</i>)、榲桲 (<i>Cydonia oblonga</i>)	欧洲栽培苹果 (<i>M.domestica</i>)、苹果 (<i>M.pumila</i>)、欧洲森林苹果 (<i>M.sylvestris</i>)、西洋梨 (<i>P.communis</i>)、榲桲 (<i>C.oblonga</i>)、桤叶唐棣 (<i>Amelanchier alnifolia</i>)
症状	病害初期在枝条或新梢上形成红色或紫色的小圆斑，随着病害的发展在树皮上形成椭圆形下陷的橙色至褐色的溃疡斑，在病健处树皮裂开，并有奶油色的分生孢子盘	病斑椭圆形，下陷，橙色、紫色或褐色，并产生轮状愈合组织。分生孢子盘黑色，突破表皮生
病果症状	果实上腐烂病斑呈牛眼状	果实上腐烂病斑呈牛眼状
病原菌大分生孢子形态特征	单细胞，无色透明，镰刀状至 U 形	单细胞，无色透明，直或稍弯

参 考 文 献

- [1] Verkley G J M. A monograph of the genus *Pezicula* and its anamorphs. *Stud. in Mycol.* 1999, 44: 129-171.
 - [2] Grove G. G. Anthracnose and Perennial canker. pp36-38. in: Jones, A. L. & Aldwinckle H. S. (des.). *Compendium of apple and pear diseases*. APS Press, St. Paul, Minnesota.
 - [3] Dogan F M, Grove G. G., Rogers J D. Comparative Studies of *Cryptosporiopsis curvispora* and *C. perennans*. I. Morphology and Pathogenic Behavior. *Mycologia*, 1993, 85(4): 551-564.
 - [4] Kienholz J R. Comparative Study of the Apple Anthracnose and Perennial Canker Fungi. *Journal of Agricultural Research*, 1939, 59(9): 635-664.
-