



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3752—2013

苹果星裂壳孢果腐病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Phacidiopycnis washingtonensis* Xiao & J.D Rogers

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：中华人民共和国广东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：王卫芳、冯黎霞、胡佳、章柱、华丽。

苹果星裂壳孢果腐病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了植物检疫中苹果星裂壳孢果腐病菌的检疫鉴定方法。

本标准适用于进境苹果和梨植株及其果实中苹果星裂壳孢果腐病菌的检疫鉴定。

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 2455 进出境水果检验检疫规程

3 检疫鉴定原理

苹果星裂壳孢果腐病菌在寄主上的症状、病菌形态学特征与培养性状及分子生物学特征是制定本标准的主要依据。该病菌的分类地位、寄主范围、分布和为害症状等背景资料参见附录 A。

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、高压灭菌器、生物培养箱、台式高速离心机、PCR 扩增仪、凝胶成像仪、电子天平(感量 0.01 g)、水浴箱、pH 计。

4.2 用具

样品袋、标签、放大镜、镊子、解剖刀、酒精灯、接种针、培养皿(直径 9 cm)、烧杯、三角瓶、试管、量筒、载玻片、盖玻片、研钵及研杵、微量移液器(可调式范围:2.5 μ L~1 000 μ L)、离心管。

5 试剂和培养基

5.1 试剂

1% NaClO 溶液、无水乙醇、70%乙醇、无菌双蒸水、2% CTAB 提取缓冲液、10% SDS 溶液、3 mol/L 醋酸钠溶液、PCR 试剂(包括 Taq 聚合酶、dNTP、Buffer)、苯酚、三氯甲烷、异戊醇、Tris-HCl、EDTA、琼脂糖、DNA 分子量标准、TBE 电泳缓冲液。

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。

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。

6 检疫鉴定方法

6.1 口岸现场查验

6.1.1 抽样

口岸现场查验时,按照 SN/T 2455 进行抽样与取样。

6.1.2 枝条症状检查

观察嫩枝顶梢是否枯死,树皮是否干枯,病部是否有突起细小的黑色颗粒状分生孢子器及乳黄色分生孢子团等病征(症状特点参见附录 A、图 B.1 图片 10~11)。

6.1.3 果实症状检查

仔细检查果梗凹部、萼凹部是否腐烂,病部质地及颜色,病部是否有突起细小的黑色颗粒状分生孢子器及乳黄色分生孢子团等病征(症状特点参见附录 A、图 B.1 图片 1~9)。

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 实验室鉴定

6.2.1 直接检验

观察记录病果的外观及剖面症状特点,将有明显病征的病枝与病果置于体视显微镜下检查,挑取病部黑色粒状分生孢子器制成玻片,置于生物显微镜下镜检。

6.2.2 保湿培养

如病枝或病果上只有可疑病状而无明显病征,则将病枝(截成 5 cm)或病果置于样品袋中,于 20 ℃ 下保湿培养,观察症状的变化。

6.2.3 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 1% NaClO 溶液或 70% 乙醇对果实表面喷雾消毒,风干后用消毒过的刀片切取病健交界处果肉组织,切成 5 mm×5 mm 小块后放置于 APDA 中,在 20 ℃、黑暗下培养 7 d~14 d,定期观察,将菌落边缘菌丝体置于新鲜的 APDA 平板上进行纯化,以便用于后续的形态学和分子生物学鉴定。

6.2.4 病菌形态特征和培养性状观察

显微镜检分生孢子器及分生孢子的形态特征、产孢方式。在 20 ℃、黑暗条件下,观察记录菌落的生长速度、颜色变化、分生孢子器及分生孢子团的形成情况。

6.2.5 分子生物学鉴定

6.2.5.1 DNA 提取

采用附录 C 中的 CTAB 法提取病菌基因组 DNA。

6.2.5.2 PCR 检测及 ITS 基因分析

采用 C.1、C.2 扩增检测病菌基因组 DNA 中的 ITS 基因,测序后采用 C.3 进行 BLAST 与系统发育

分析。

7 鉴定特征

7.1 病菌形态

在寄主果实上分生孢子器半埋生或几乎表生,亚球形,稍扁平,暗黑色,直径约 0.3 mm~0.8 mm,单腔室或多腔室,开口单个或几个,呈小孔状或不规则孔穴。产孢方式为瓶梗式内壁芽生或合轴式全壁芽生,分生孢子无色透明,单胞,泪滴形、一端平截,或卵形至椭圆形,无胞痕,光滑,油球 2 个。大小为:在栽培苹果(*Malus domestica*)上 $[(4.5\sim)6\sim7.5(\sim9)]\mu\text{m}\times[2\sim4(\sim5)]\mu\text{m}$,平均 $7\mu\text{m}\times3.5\mu\text{m}$;在 PDA 上 $[(5\sim)6\sim7.5(\sim8)]\mu\text{m}\times[3\sim4(\sim4.5)]\mu\text{m}$,平均 $7\mu\text{m}\times3.5\mu\text{m}$;在欧洲森林苹果(*M. sylvestris*)上的大小为 $[(4.5\sim)6\sim7(\sim7.5)]\mu\text{m}\times(2\sim4)\mu\text{m}$,平均 $6\mu\text{m}\times3\mu\text{m}$ (参见图 B.2 图片 1~10)。

7.2 菌落特征

在 20℃、黑暗培养条件下,菌落在 PDA 平板上呈圆形、平铺,气生菌丝旺盛、绒毛状,边缘不整齐,呈裂瓣状。菌落初为纯白色(培养 3 d),菌丝体老熟后逐渐由白色变为鼠灰色、灰黑色,最终变为黑色。培养 7 d 后菌落中部呈鼠灰色至灰黑色,培养 10 d 后菌落形成深浅色交替的菌丝环带,菌落背面从中部至边缘依次呈黑、灰黑、灰、白色共 4 个环带。分生孢子器成熟速度较快且产孢丰富,培养至 7 d 即涌出大量分生孢子,在菌落表面堆集成团,呈黏稠状、乳白色至乳黄色,培养 14 d 后分生孢子团则布满整个菌落(参见图 B.2 图片 11~12)。

7.3 ITS 序列特征

PCR 扩增产物序列测定大小为 513 bp, BLAST 分析表明病菌与 GenBank 中已知的苹果星裂壳孢果腐病菌的 ITS1-5.8S r RNA-ITS2 全序列 AY608643、AY608644、AY608645、AY608646、AY608647、AY608648 的同源性均为 100%,在系统发育树上与苹果星裂壳孢果腐病菌聚在同一簇,支持度为 100%;而与该病菌的近似种梨波氏盘果腐病菌(参见附录 D)相邻,但不聚在同一簇。

8 结果判定

符合下列任一种情况均可判定为检出苹果星裂壳孢果腐病菌:

如果病部有明显的病状和病征,病菌形态学特征与鉴定指标 7.1 吻合,而与该病菌的近似种梨波氏盘果腐病菌的形态特征(附录 D)不吻合;扩增得到的 ITS 序列在系统发育树上与苹果星裂壳孢果腐病菌聚在同一簇,支持度为 100%。

如果病部有病状但无病征,经保湿培养和/或分离培养所产生的病菌形态学特征及培养性状与鉴定指标 7.1~7.2 吻合,而与该病菌的近似种梨波氏盘果腐病菌的形态特征(附录 D)不吻合,并且扩增得到的 ITS 基因在系统发育树上与苹果星裂壳孢果腐病菌聚在同一簇,支持度为 100%。

9 样品和资料的保存

9.1 菌种和 DNA 样品的保存

菌株在含 30%甘油的冻存管中于-80℃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℃下保存,并定期(180 d)转管,标注分离物来源、寄主、分离时间和鉴定人;病菌基因组 DNA 样品于-20℃下保存。

SN/T 3752—2013

9.2 检验资料的保存

妥善保存检验报告包括症状、病菌、电泳图谱等图文资料,以备复验、谈判和仲裁。检验报告应注明检验日期、方法、结果等,并有检验人签名。

附录 A

(资料性附录)

苹果星裂壳孢果腐病菌的分类地位、寄主范围、分布和为害症状

A.1 分类地位

英文名: speck rot on apple; *Phacidiopycnis* rot on apple

学名: *Phacidiopycnis washingtonensis* Xiao & J.D Rogers 2005

在分类上隶属于半知菌亚门(*Deuteromycotina*), 腔孢纲(*Coelomycetes*), 球壳孢目(*Sphaeropsidales*), 球壳孢科(*Sphaeropsidaceae*), 星裂壳孢属(*Phacidiopycnis*)。

A.2 寄主范围

蔷薇科(*Rosaceae*): 苹果属(*Malus*)、梨属(*Pyrus*)、温梓属(*Cydonia*)等果树。

欧洲栽培苹果(*M.domestica*)及欧洲森林苹果(*M.sylvestris*)和西洋梨(*P.communis*)等三个种均可被害。受害的欧洲栽培苹果品种包括 Red Delicious(红元帅)、Golden Delicious(金冠)、Fuji(富士)等, 其中 Red Delicious 最易感病。

A.3 地理分布

美国华盛顿州。

A.4 病害症状

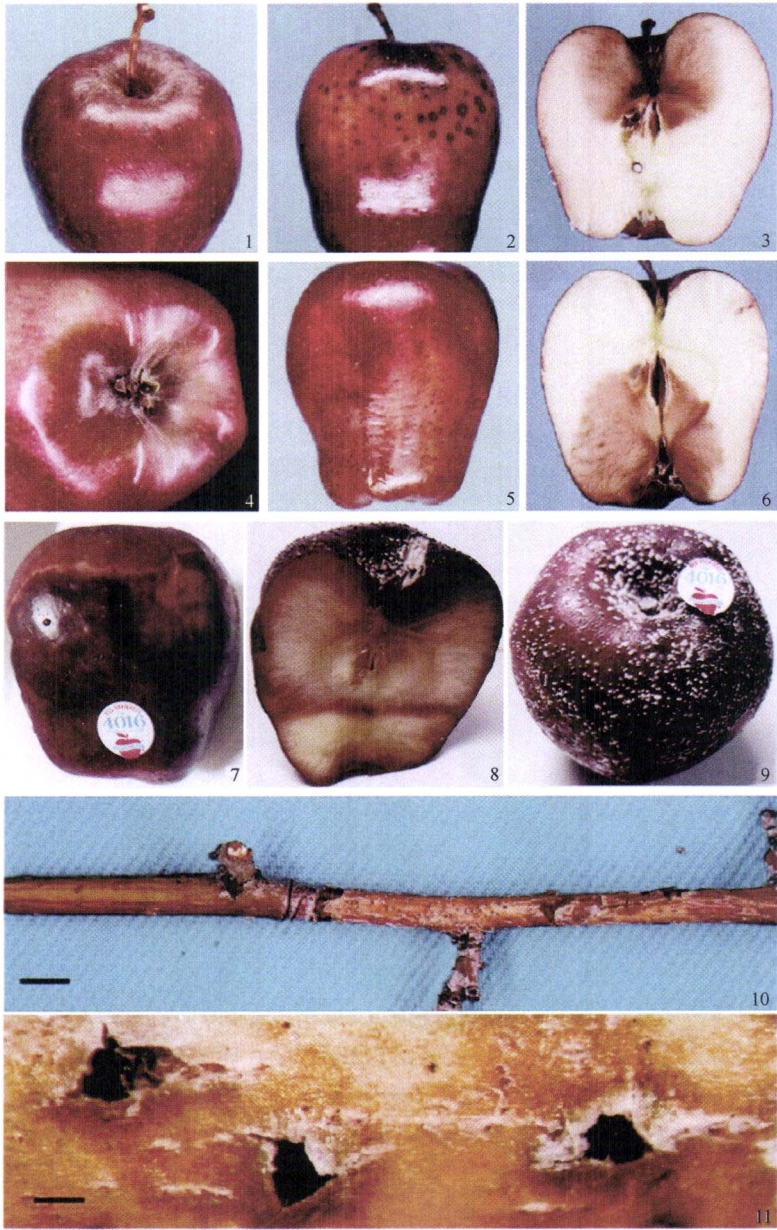
枝条症状: 苹果星裂壳孢果腐病菌能为害苹果树及梨树的枝干和枝梢, 造成欧洲森林苹果嫩枝顶梢枯死和苹果授粉树树皮溃疡、西洋梨树嫩枝坏死。后期在坏死的树皮表面可见突起细小的黑色颗粒状分生孢子器(参见图 B.1 图片 10~11)。

果实症状: 典型症状为果梗凹腐(蒂腐)、果萼凹腐(底腐)。分别从果梗基部或萼凹基部开始侵染, 至贮藏阶段在果梗凹部、果萼凹部腐烂开始发病, 呈现浅褐色至暗褐色, 其中果梗凹腐症状在苹果品种 Red Delicious、Golden Delicious 较为普遍, 果萼凹腐则多出现在苹果品种 Fuji 上。病部果皮暗褐色至黑色, 病健交界明显, 有黑褐色分界纹带, 果肉组织褐变, 淡褐色至褐色, 呈海绵状, 质地稍硬。剖开病果, 可见褐变腐烂区域呈 V 或 U 形, 病健交界处可见明显的褐色鲜亮纹带, 储藏后期, 病果表面可见黑色、颗粒状分生孢子器及乳白色至乳黄色黏质状分生孢子团, 分生孢子器在立体显微镜下呈半球形, 在果皮上表生或部分埋生。后期病果呈暗褐色或黑色, 散发浓烈的酸臭味(参见图 B.1 图片 1~9)。

SN/T 3752—2013

附 录 B
(资料性附录)

苹果星裂壳孢果腐病症状、病原形态特征及培养性状图



说明：

1~3——梗凹腐；

4~6——萼凹腐；

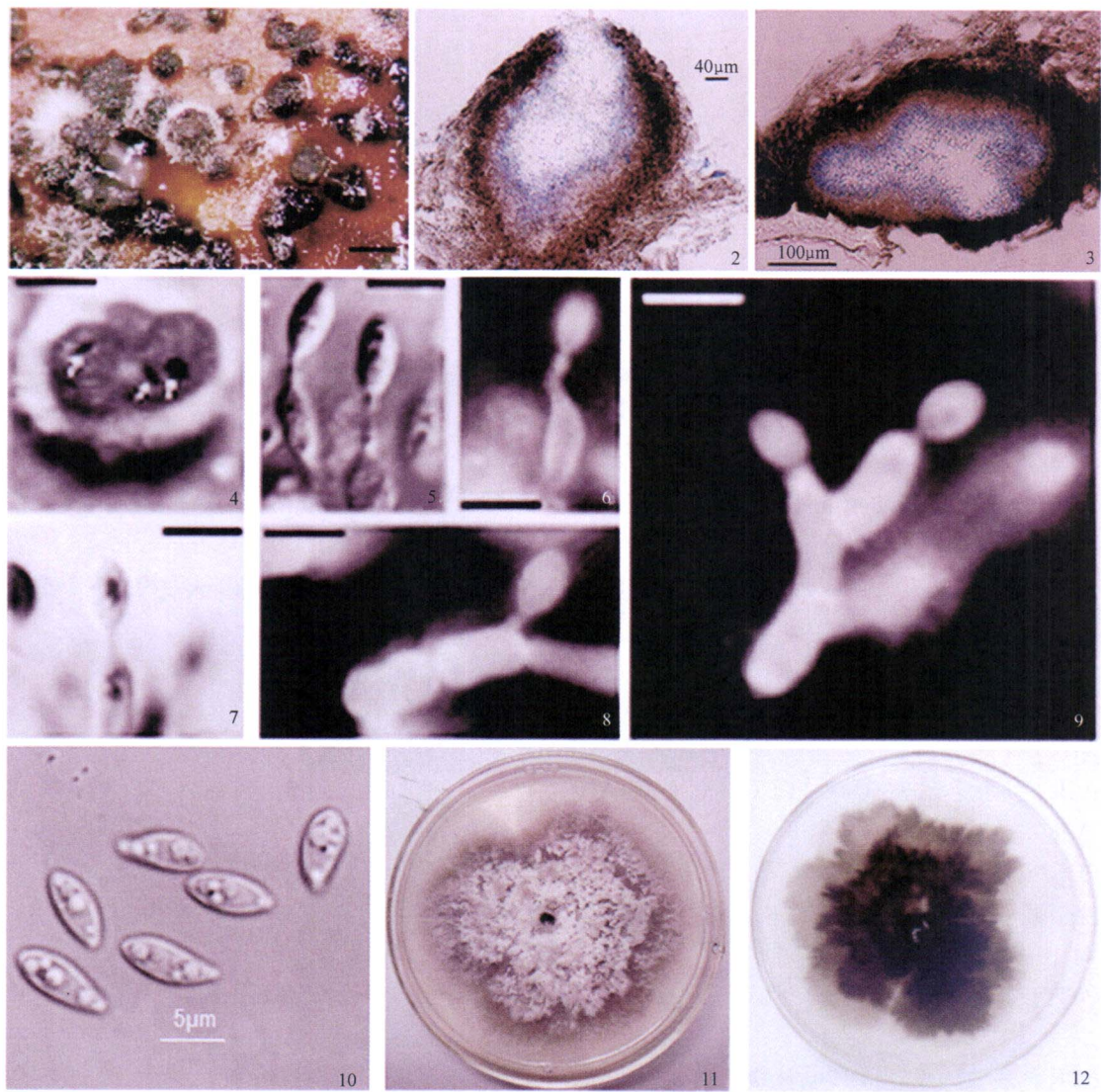
7~9——广东口岸进境截获的美国红元帅苹果病果；

10 ——分生孢子器形成在枯死的苹果嫩枝上；

11 ——枯死苹果嫩枝上分生孢子器的近摄照片。

注：图片 1~6、10~11 引自 Xiao CL 等, 2005, 2006; 图片 7~9 引自王卫芳等, 2011。

图 B.1 苹果星裂壳孢果腐病菌为害所致的症状图



说明：

1 ——果实表面上分生孢子器的近摄照片；

2 ——具单个开口孔的分生孢子器；

3 ——具几个不规则孔穴的分生孢子器；

4 ——具三个开口(箭头示)的分生孢子器；

5、7 ——瓶梗式内壁芽生产孢方式：分生孢子着生在明显的瓶梗上；

6、8~9——分生孢子着生在产孢细胞上，图片 6 分生孢子下的曲膝状表示合轴式全壁芽生产孢方式；

10 ——分生孢子(DIC 下拍摄)；

11 ——菌落正面；

12 ——菌落反面

注：图片 1、4~9 引自 Xiao CL 等,2005;图片 2~3、10~12 引自王卫芳等,2011。标尺：图片 1:0.41 mm,图片 4~9: 6.6 µm。

图 B.2 苹果星裂壳孢果腐菌形态和菌落图

附 录 C
(规范性附录)
ITS 序列测定

C.1 DNA 提取——CTAB 提取法

采用常规 CTAB 法提取病菌基因组 DNA 作扩增模板,分离材料可选寄主病部的分生孢子器、分生孢子团或菌丝体,也可选分离物菌落边缘新鲜菌丝(培养基 APDA、20 ℃、黑暗条件下培养 5 d)20 mg。加入 570 μL 2% CTAB DNA 提取液,30 μL 10% SDS 溶液,充分研磨,65 ℃水浴 30 min,加入 600 μL 酚三氯甲烷液(酚:三氯甲烷:异戊醇 25:24:1)抽提 2 次,11 000g 常温离心 5 min,取上清液,加入 1/10 体积 3 mol/L 醋酸钠溶液和 2 倍体积无水乙醇混匀,室温静置 20 min,11 000g 4 ℃离心 10 min,弃上清液,沿离心管壁加入 1 mL 70%乙醇溶液清洗 DNA 沉淀,11 000g 4 ℃离心 5 min,弃上清液,加入 40 μL Tris-EDTA 缓冲液溶解,置于-20 ℃备用。也可用商品化的适合真菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌丝 DNA。

C.2 PCR 扩增及 PCR 产物检测分析

PCR 引物: ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATT-GATATGC-3')

PCR 反应体系总体积为 25 μL :10 倍 PCR 缓冲液(含 MgCl_2)2.5 μL ,dNTPs(2.5 mmol/L)2 μL ,上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL ,*Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μL)0.125 μL ,模板 DNA 2 μL (50 ng),ddH₂O 16.375 μL 。

PCR 反应程序:94 ℃预变性 2 min;94 ℃ 45 s,60 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min,30 个循环;72 ℃延伸 10 min。

PCR 产物在 0.5×TBE 电泳缓冲液中,1%琼脂糖凝胶电泳及凝胶成像分析。

C.3 PCR 产物测序、ITS 序列 BLAST 及系统发育分析

PCR 产物纯化后测序,测序结果与 NCBI/GenBank 数据库中的已知序列进行 BLAST 比较,确定与试验菌株亲缘关系最近的种。从 GenBank 获得与试验菌株 ITS 序列同源性较高的相关种属的 ITS 序列,构建系统发育树。用 MEGA version 4.0.1 进行进化分析,进化树的构建采用 Neighbour-joining 方法,设置均为默认值,同时计算进化距离及各分支的置信度。

附 录 D

(资料性附录)

苹果星裂壳孢果腐病菌与近似种梨波氏盘果腐病菌的区别

表 D.1 苹果星裂壳孢果腐病菌与梨波氏盘果腐病菌的比较

项 目	苹果星裂壳孢果腐病菌	梨波氏盘果腐病菌
无性型	<i>Phacidiopycnis washingtonensis</i> Xiao&J. D Rogers	<i>Phacidiopycnis piri</i> (Fuckel) Weindlmayr
有性型	尚未报道	<i>Potebniamyces pyri</i> (Berk. & Br.) Dennis
分布	美国(华盛顿州)	德国、英国、乌克兰、俄罗斯、塞浦路斯、美国(华盛顿州、俄勒冈州)、加拿大、印度
寄主	欧洲栽培苹果(<i>Malus domestica</i>)及欧洲森林苹果(<i>M. sylvestris</i>)和西洋梨(<i>Pyrus communis</i>)。欧洲栽培苹果品种中红元帅(Red Delicious)最易感病	皇家嘎拉苹果(<i>Malus × dome、stica</i>), 温梓(<i>Cydonia vulgaris</i>), 西洋梨(<i>P. communis</i>), 沙梨(<i>P. pyri folia</i>)。西洋梨中冬梨(d’Anjou)最易感病
为害	苹果树和梨树树皮溃疡或坏死, 枝梢枯死, 储藏期苹果腐烂	苹果树和梨树树皮的溃疡或坏死, 枝梢枯死, 储藏期梨果腐烂
病果症状	<p>主要为果梗凹腐、果萼凹腐, 也有经皮孔侵染导致的腐烂。</p> <p>腐烂组织海绵状, 质地稍硬。腐烂组织水浸状不如梨果腐病明显, 边缘不太透明。</p> <p>烂果无特殊的香味</p>	<p>主要为果梗凹腐、果萼凹腐, 也有经伤口侵染导致的腐烂。</p> <p>腐烂组织海绵状。发病初期至后期腐烂组织边缘及剖面果肉组织均呈透明的水浸状。</p> <p>烂果散发特殊的香味</p>
病原菌无性型的形态特征	分生孢子器单腔室或多腔室, 半埋生或几乎表生, 只产生一种类型孢子。分生孢子无色透明, 单胞, 泪滴形、一端平截, 或卵形至椭圆形, 无胞痕, 光滑, 具 2 个油球, 平均大小为 7 μm×3.5 μm	分生孢子器多腔室, 埋生、半埋生, 可产生大、小两种类型的孢子。大孢子无色透明至淡黄色, 光滑, 一端平钝, 亚球形至椭圆形或卵形, 老熟后具油滴, 平均大小为 11.5 μm×7.5 μm; 小孢子不如大分生孢子常见, 大小为 (4~6 μm)×(2~2.5 μm)
生长温度	范围: -3 ℃~25 ℃; 最适: 20 ℃~25 ℃	范围: -3 ℃~25 ℃; 最适: 20 ℃~25 ℃
ITS 序列	有 4 个的差异碱基位点: 3 个在 ITS1 区, 1 个在 ITS2 区; 在系统发育树上苹果星裂壳孢果腐病菌与梨波氏盘果腐菌相邻但不聚在同一簇, 而与其他亲缘关系较低的种属距离远	
注: 引自 Xiao CL 等(2004, 2005, 2006)、王卫芳等(2009)。		

参 考 文 献

- [1] Xiao CL, Rogers JD, Kim YK, *et al.* *Phacidiopycnis washingtonensis*—a new species associated with pome fruits from Washington State[J]. *Mycologia*, 2005, 97(2): 464-473.
- [2] Kim YK and Xiao CL. A postharvest fruit rot in apple caused by *Phacidiopycnis washingtonensis*[J]. *Plant disease*, 2006, 90(11): 1376-1381.
- [3] White TJ, Bruns T, Lee S, *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocols: a guide to methods and applications[M]. San Diego, California: Academic Press, 1990, 315-322.
- [4] Xiao CL, and Boal RJ. Prevalence and incidence of *Phacidiopycnis* rot in d'Anjou pears in Washington State[J]. *Plant Disease*, 2004, 88(4): 413-418.
- [5] Xiao CL and Boal RJ. Distribution of *Potebniamyces pyri* in the U.S. Pacific Northwest and its association with a canker and twig dieback disease of pear trees[J]. *Plant Disease*, 2005, 89(9): 920-925.
- [6] DiCosmo F., Nag Raj TR and Kendrick WB. A revision of the *Phacidiaceae* and related anamorphs[J]. *Mycotaxon*, 1984, 21: 1-234.
- [7] 王卫芳, 胡佳, 赵立荣等. 进境美国苹果星裂壳孢果腐病菌的首次截获——病原真菌的鉴定及风险分析[J]. *植物病理学报*, 2011, 41(3): 232-239.
- [8] 王卫芳, 胡佳, 崔汝强等. 进境水果重要真菌病害——星裂壳孢梨果腐病和苹果果腐病[J], *植物检疫*, 2009, 23(1): 26-30.
-