



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3289—2012

---

## 苹果果腐病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Diaporthe perniciosa* Marchal & É. J. Marchal

2012-10-23 发布

2013-05-01 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、中华人民共和国嘉兴出入境检验检疫局、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、中华人民共和国烟台出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：王卫芳、胡佳、张建成、程颖慧、栾晶。

# 苹果果腐病菌检疫鉴定方法

## 1 范围

本标准规定了苹果果腐病菌(*Diaporthe perniciosa* Marchal & É. J. Marchal)的检疫鉴定方法。  
本标准适用于相关寄主苗木和新鲜果实的苹果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 1538.1 培养基制备指南 第1部分:实验室培养基制备质量保证通则

SN/T 2077 进出境苹果检疫规程

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件

### 3.1

**子实体 fruiting body**

无性繁殖或有性繁殖、结构简单的或复杂的真菌产孢结构,统称为子实体。

### 3.2

**子座 stroma**

由真菌组织形成的、可产生孢子等繁殖器官的垫状或头状组织。

### 3.3

**子囊壳 perithecia**

子囊菌亚门真菌形成的一种产生子囊孢子、包被有固定的孔口的子实体(子囊果)。

### 3.4

**分生孢子器 pycnidia**

半知菌球壳孢目真菌形成的一种子实体,与子囊菌的子囊壳相似,球形或瓶形,但产生分生孢子。

### 3.5

**$\alpha$ 型、 $\beta$ 型分生孢子 alpha conidia, beta conidia**

拟茎点霉属(*Phomopsis* sp.)分生孢子器中产生的两种类型分生孢子, $\alpha$ 型分生孢子为卵圆形至纺锤形,能萌发, $\beta$ 型分生孢子为线型,不能萌发。

### 3.6

**分生孢子角 cirrus**

从成熟分生孢子器中涌出的大量分生孢子,呈黏稠状堆集。

## 4 检疫鉴定原理

苹果果腐病菌分类、分布及寄主参见附录 A。其既能在果园为害枝条枝干,又能为害采后果实,引

起贮运期果实腐烂。在田间,该病 6、7 月份开始发生,通常在小枝上尤其是树冠下部的小枝上开始发病。

本标准以寄主上的症状特点、病菌形态学特征、培养特性(参见附录 B 和附录 C)作为苹果果腐病菌的主要检疫鉴定依据,致病性测定及病菌 ITS 序列分析结果作为苹果果腐病菌的辅助检疫鉴定依据。

## 5 设备及用具

### 5.1 仪器设备

体视显微镜、生物显微镜、电子天平(感量 0.01 g)、高压灭菌器、超净工作台、生物培养箱(带黑光灯)、高速离心机、PCR 仪、凝胶成像系统。

### 5.2 实验用具

标签、定性滤纸、样品袋、保鲜袋、手持放大镜、镊子、解剖刀、酒精灯、接种针、培养皿、烧杯、量筒、三角瓶、载玻片、盖玻片、微量移液器(可调式范围:2.5  $\mu\text{L}$ ~1 000  $\mu\text{L}$ )。

## 6 试剂和培养基

### 6.1 试剂

1% NaOCl 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 相对分子质量标准、TBE 电泳缓冲液。

### 6.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基 PDA(参见附录 D)。配制培养基时,按照 SN/T 1538.1 的要求。

## 7 抽样

口岸现场查验时,按照 SN/T 2077 进行抽样与取样。

## 8 检疫鉴定方法

### 8.1 现场查验

#### 8.1.1 苗木检验

重点查验枝条和枝干,从树冠下部开始,逐渐向树冠上部观察。观察枝条表面是否有突起的坏死组织,枝干、主干上是否有凹陷的溃疡或者环割和坏死病斑,坏死组织剖面是否褐变,树皮坏死部位是否有树胶分泌,叶片是否变黄,萎蔫或部分萎蔫。

#### 8.1.2 果实检验

仔细检查果实的果柄基部、萼部、果面是否腐烂,腐烂组织是否有汁液流出,病部是否有病菌的子实体。

标注品名、数量、生产国及取样地点、取样人和取样日期等样品信息,将可疑苗木和果实样品带回实

实验室作进一步检验。

## 8.2 实验室检验

### 8.2.1 直接镜检

如果病枝或病果有明显病征,直接进行显微镜检查,在体视显微镜下挑取病部子实体制成玻片,置于生物显微镜下镜检,观察记录分生孢子座、分生孢子器、分生孢子及子囊壳、子囊、子囊孢子的形态特征,进行显微计测,同时分离病原菌。

### 8.2.2 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℃~25℃下保湿培养,每天观察症状的变化,并分离病原菌。

### 8.2.3 分离培养

直接挑取病部的子实体或孢子,或切取病健交界的数块组织(大小约 5 mm×5 mm),用 1% NaOCl 进行表面消毒 3 min,无菌水冲洗 3 次,置于 PDA 平板上,于 25℃ 24 h 黑暗培养 14 d,然后转到 20℃ 24 h 荧光条件下培养 10 d,观察记录菌落的培养性状和形态学特征,包括菌落的形态、颜色、大小及子实体、分生孢子的形态和大小,疑似菌株转到 PDA 平板上纯化三次,保存备用。

### 8.2.4 致病性测定

将纯分离物作为供试菌株,水晶富士苹果鲜果为供试材料,接种方法为伤口接种。供试菌株在 PDA 平板上,于 25℃、24 h 黑暗下培养 14 d,然后转到 20℃ 24 h 荧光条件下培养 10 d,挑取菌落上的分生孢子角,用无菌水配制成孢子悬浮液,并将孢子终浓度调整为  $1 \times 10^4$  /mL。

用 70% 乙醇涂抹供试苹果表面,进行表面消毒。用无菌刀片在果身切出宽 1 cm 左右的浅伤痕,将 30 μL 孢子悬浮液注入伤口内,无菌水做对照,将无菌湿润的滤纸盖在伤口处保湿,放入样品袋中,置于 25℃ 下保湿培养。每个菌株接种苹果不少于 10 个。定期观察接种果实的发病情况,发病后按照前述 8.2.3 方法分离病菌,对病菌形态鉴定。

### 8.2.5 分子生物学鉴定

在形态学鉴定的基础上,辅助采用分子生物学鉴定,检测分析病菌基因组中的 ITS 基因序列。DNA 提取方法、引物序列、PCR 扩增及产物测序分析等见附录 E。

## 9 鉴定特征

### 9.1 症状

苗木症状及果实症状文字描述及图片参见 B.1、C.1(1-4)。

### 9.2 病菌培养性状

病菌培养性状文字描述和图片参见 B.2、C.2(1-2)。

### 9.3 病菌形态特征

无性态形态特征和有性态形态特征文字描述和图片参见 B.3、C.2(3-6)。

SN/T 3289—2012

#### 9.4 致病性测定

病菌分离物得到柯赫法则验证,即以苹果果实为接种材料,采用分离物接种 10 d 后,苹果果实即出现褐腐、软化并流出褐色汁液等症状[参见附录 C.1(5)]。从病部得到的分离物培养特征、形态特征与供试接种菌株一致。

#### 9.5 ITS 序列扩增和分析

经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,PCR 扩增产物的片段大小 540 bp。序列测定后与 Genbank 中已知的苹果果腐病菌标准菌株(American Type Culture Collection[ATCC]No. 38578)ITS 序列(登录号 AB302254)进行 BLAST 比对分析,同源率为 100%。

### 10 结果判定

以病害症状、病菌分离物的培养性状及形态学鉴定为主要判断特征,致病性测定和 ITS 序列分析作为辅助判定特征。符合下列任一种情况均可将病菌判定为苹果果腐病菌(*Diaporthe pernicioso*):

- a) 如果病部有明显的病状和病征,其症状特点与病菌形态学特征与鉴定特征 9.1~9.3 吻合,扩增得到的 ITS 序列与 9.5 相符。
- b) 如果病部有病状但无病征,经保湿培养和(或)分离培养所产生病菌的培养性状、形态学特征与鉴定特征 9.1~9.3 吻合,致病性测定结果符合 9.4,扩增得到的 ITS 基因与 9.5 相符。

### 11 样品和资料的保存

#### 11.1 菌种和 DNA 样品的保藏

苹果果腐病菌纯分离物要标注菌株来源、寄主、分离时间、鉴定人;菌株在含 30% 甘油的冻存管中于 -80 °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 °C 下保存,并定期(180 d)转管。病菌基因组 DNA 样品于 -20 °C 下保存。

#### 11.2 检验资料的保存

妥善保存检验资料,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;检验图片包括症状、病菌、电泳等。

## 附录 A

(资料性附录)

## 苹果果腐病菌的分类、分布和寄主

## A.1 苹果果腐病菌的分类地位

英文名: pathogen of fruitrot on apple

有性型: *Diaporthe pernicios*a Marchal & E. J. Marchal 1921, 属于真菌界(Fungi), 子囊菌亚门(Ascomycota), 粪壳菌纲(Sordariomycetes), 间座壳目(Diaporthales), 间座壳科(Diaporthaceae), 间座壳属(*Diaporthe*)。

无性型: *Phomopsis prunorum* (Cooke) Grove 1917 (异名: *Phomopsis mali* Robe, s, 1921), 属于真菌界(Fungi), 半知菌亚门(Deuteromycotina), (Coelomycetes), 球壳孢目(Sphaeropsidale), 球壳孢科(Sphaeropsidaceae), 拟茎点霉属(*Phomopsis*)。

苹果果腐病英文名: *Phomopsis* canker, *Phomopsis* fruit decay

## A.2 分布范围

亚洲: 日本、韩国。

欧洲: 保加利亚、塞浦路斯、英国、希腊。

大洋洲: 新西兰。

美洲: 加拿大、美国、巴西。

## A.3 寄主范围

可侵染 4 个科 7 个属的植物植株及果实。

猕猴桃科(Actinidiaceae): 猕猴桃属(*Actinidia* spp.);

柿科(Ebenaceae): 柿属(*Diospyros* spp.);

蔷薇科(Rosaceae): 榅桲属(*Cydonia* spp.), 苹果属(*Malus* spp.), 李属(*Prunus* spp.); 梨属(*Pyrus* spp.);

葡萄科(Vitaceae): 葡萄属(*Vitis* spp.)。



## 附录 B

(资料性附录)

## 苹果果腐病症状、病菌培养性状与形态特征

## B.1 症状

## B.1.1 苗木(枝条、枝干)症状

一年生的枝条最感病,小枝形成层变色区域的树皮表面出现突起的坏死组织,很少或没有树胶分泌,剖面褐变,褐变范围有几厘米,可至坏死组织以外。以突起的死组织为中心向四周迅速扩展,产生狭长、凹陷的溃疡病斑,严重时引起小枝环割,导致枝条上部叶片黄化、生长不良。有时大枝甚至主干也受侵染,树皮病斑下陷,黑色,开裂,边缘不平整,最终形成粗皮。后期树皮病部形成黑色颗粒状分生孢子器及黑色子囊壳,子囊壳的长喙突破病部皮层而外露呈毛发状,潮湿时溢出奶油色的分生孢子角。

## B.1.2 果实症状

侵染初期果实较硬,发病果实病部较软,果皮褐色。在果柄凹处常见多汁的渗出物、白色菌丝体和黑色颗粒状分生孢子器。剖开病果,可见果肉组织呈水浸状,软腐,颜色为浅褐色。发病后期,病果颜色呈黑褐色,病果剖面可见灰白色菌丝体。

## B.2 病菌培养性状

分离物菌落在 25℃ 24 h 黑暗下,PDA 平板上的平均生长速率为 4.5 mm/d,菌落白色,菌丝致密,从平板背面观察,菌落背面无色。14 d 后,菌落上形成黑色、圆形的子座,转至 20℃ 24 h 荧光条件下培养,10 d 左右产生淡橘红色的分生孢子角,在以上培养条件下,病菌只产生无性态,而不产生有性态。

## B.3 病菌形态特征

## B.3.1 无性态形态特征

子座黑色、圆形,直径 1 mm~2 mm,最大可达 5 mm,分生孢子器埋生在子座内,褐色至暗褐色,球形、烧瓶形或扁球状。分生孢子器产生两种类型的分生孢子, $\alpha$  型分生孢子长卵圆形,无色,单胞,含多个油球; $\beta$  型分生孢子丝状,无色,单胞,无油球,一端弯曲。 $\alpha$  型、 $\beta$  型分生孢子的大小分别为  $(7\ \mu\text{m}\sim 9.5\ \mu\text{m})\times(2.2\ \mu\text{m}\sim 3.8\ \mu\text{m})$ 、 $(20\ \mu\text{m}\sim 34\ \mu\text{m})\times(1.1\ \mu\text{m}\sim 1.5\ \mu\text{m})$ (Marchal & E. J. Marchal 1921 描述); $(6.5\ \mu\text{m}\sim 9.3\ \mu\text{m})\times(2.1\ \mu\text{m}\sim 3.0\ \mu\text{m})$ 、 $(26.1\ \mu\text{m}\sim 33.0\ \mu\text{m})\times(1.1\ \mu\text{m}\sim 1.8\ \mu\text{m})$ (*Diaporthe pernicios* ATCC No. 38578 菌株在 20℃、24 h 荧光条件下培养)。

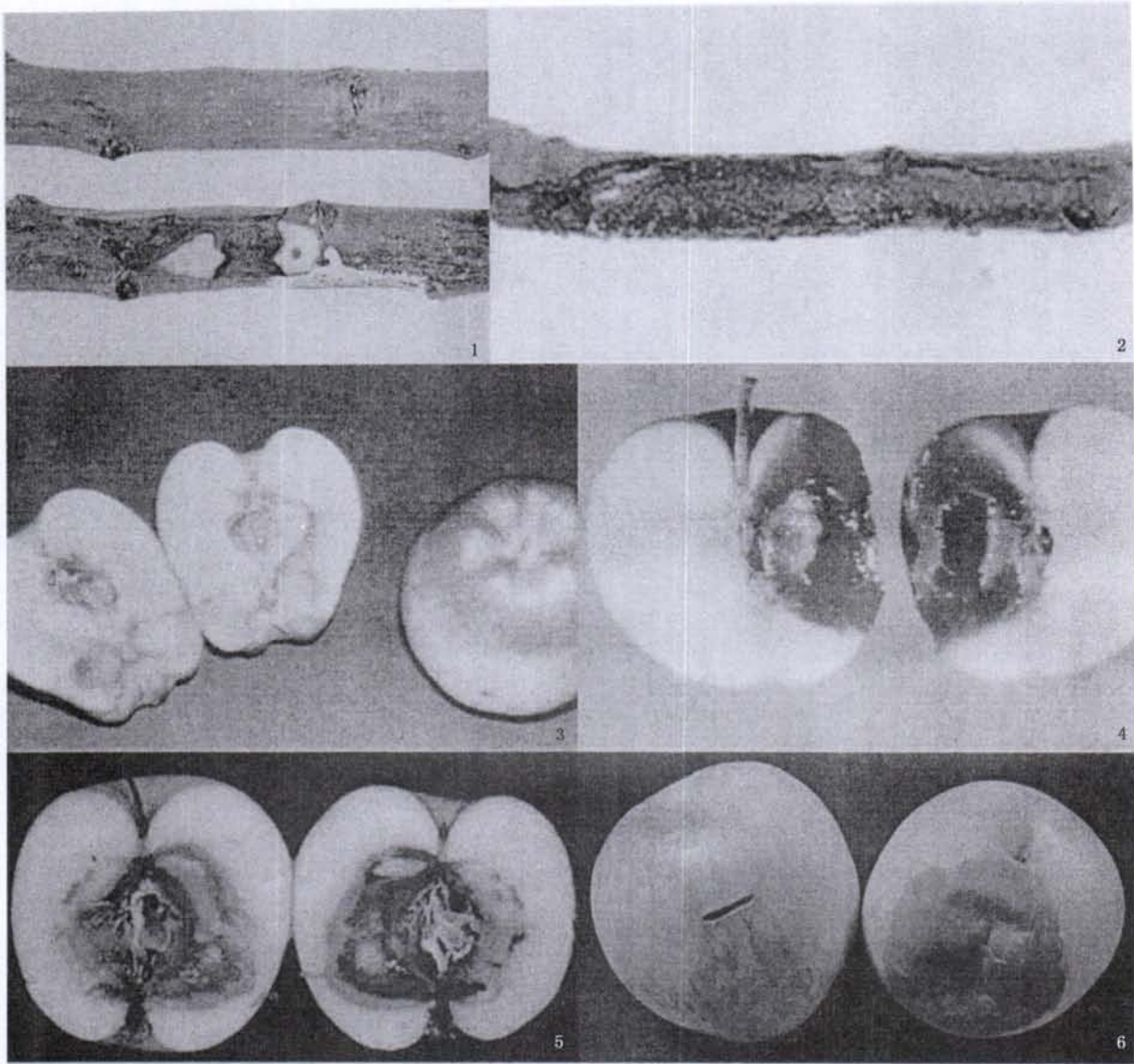
## B.3.2 有性态形态特征

子囊壳黑色,球形,埋生在子座中,具长而突出的喙。子囊无柄、长棍棒状、壁薄易消溶,内含 8 个子囊孢子,排列成斜两列。子囊孢子椭圆形,无色,双细胞,分隔处稍缢缩。Marchal & E. J. Marchal 1921 描述的子囊、子囊孢子大小分别为  $(50\ \mu\text{m}\sim 64\ \mu\text{m})\times(5\ \mu\text{m}\sim 5.7\ \mu\text{m})$ 、 $(11.5\ \mu\text{m}\sim 14\ \mu\text{m})\times(3.2\ \mu\text{m}\sim 4.2\ \mu\text{m})$ 。在 8.2.3 培养条件下,病菌不产生子囊壳。



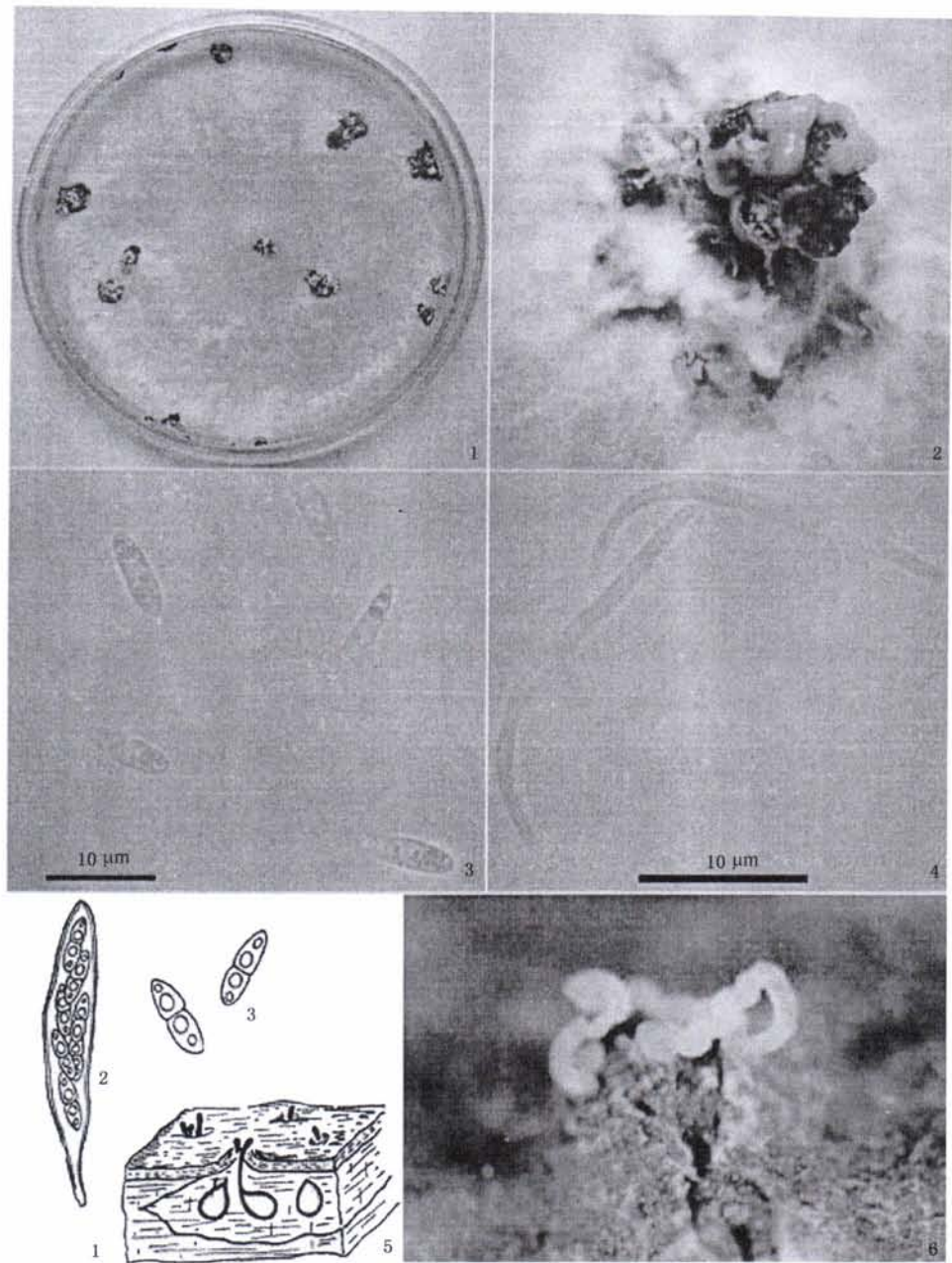
附录 C  
(资料性附录)

苹果果腐病症状、病原培养性状及形态特征图



说明：  
1——初期的褐变病枝及病枝剖面(引自 <http://plant-clinic.bpp.oregonstate.edu/content>)；  
2——后期的坏死、凹陷、溃疡病枝(引自 <http://www.agro.basf.it/it/diagnostic>)；  
3——病果剖面初期呈现褐色腐烂状；  
4——病果剖面后期呈现黑褐色腐烂状；  
5——病果剖面后期可见灰白色菌丝体(3-5 引自 [www.fomesa.comCalidadFactoresF\\_03\\_11\\_1\\_08.htm](http://www.fomesa.comCalidadFactoresF_03_11_1_08.htm))；  
6——经伤口接种导致苹果褐腐(左:对照果,右:发病果,接种菌株:ATCC No. 38578)。

图 C.1 苹果果腐病菌的症状图



说明:

- 1——菌落;
- 2——菌落上形成分生孢子座和分生孢子角;
- 3—— $\alpha$ 型长卵圆形分生孢子;
- 4—— $\beta$ 型丝状分生孢子;
- 5——子囊壳<sup>1</sup>、子囊<sup>2</sup>、子囊孢子<sup>3</sup>;
- 6——病枝上形成的子囊壳及其溢出的子囊孢子。

注: 1~4 引自: *Diaporthe pernicios* ATCC No. 38578 菌株在 20 ℃、24 h 荧光条件下培养; 5 引自: <http://www.agro.basf.it/it/diagnostic/>; 6 引自: [http://dic.academic.ru/dic.nsf/enc\\_iology/1976/](http://dic.academic.ru/dic.nsf/enc_iology/1976/)。

图 C.2 苹果果腐病菌的培养性状和形态特征图

## 附 录 D

(资料性附录)

## 马铃薯葡萄糖琼脂培养基 PDA 的配制

## D.1 每升培养基中马铃薯、葡萄糖、琼脂的含量

马铃薯	200 g
葡萄糖	20 g
琼脂	18 g

## D.2 制方法

称取洗净去皮的马铃薯 200 g,切成小块,加水煮沸 30 min,用四层纱布过滤,滤液加入葡萄糖 20 g、琼脂 18 g,继续加热搅拌混匀,稍冷却后定容至 1 000 mL,分装三角瓶,加塞、包扎,121 ℃ 高压灭菌 20 min。



附录 E  
(规范性附录)  
ITS 序列测定

E.1 DNA 提取——CTAB 提取法

病菌在 PDA, 25 °C 黑暗条件下培养 7 d, 从其菌落边缘挑取新鲜菌丝 20 mg 或直接刮取病部的菌丝体及/或子实体, 加入 570  $\mu$ L 2% CTAB DNA 提取液, 30  $\mu$ L 10% SDS 溶液, 充分研磨, 65 °C 水浴 30 min, 加入 600  $\mu$ L 酚三氯甲烷液(酚: 三氯甲烷: 异戊醇 25: 24: 1), 大力振荡至均一状态, 11 000 g 常温离心 5 min, 取上清液后再加入等体积酚三氯甲烷液进行抽提, 取上清液, 加入十分之一体积 3 mol/L 醋酸钠溶液和 2 倍体积无水乙醇, 上下颠倒混匀, 室温静置 20 min, 11 000 g 4 °C 离心 10 min, 弃上清液, 沿离心管壁加入 1 mL 70% 乙醇溶液, 上下颠倒数次, 11 000 g 4 °C 离心 5 min, 弃上清液, 加入 40  $\mu$ L Tris-EDTA 缓冲液溶解 DNA 沉淀, 置于 -20 °C 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。

E.2 PCR 引物

ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', ITS5: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'

E.3 POR 扩增及 PCR 产物检测分析

PCR 反应总体积 50  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 37.75  $\mu$ L, 10 $\times$ PCR 缓冲液(含 MgCl<sub>2</sub>) 5  $\mu$ L, dNTP(2.5 mmol/L each) 4  $\mu$ L, 上下游引物(10  $\mu$ mol/L) 各 2  $\mu$ L, Taq DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ L) 0.25  $\mu$ L, DNA 模板 1  $\mu$ L。

PCR 反应程序: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 45 s, 60 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。

PCR 产物在 0.5 $\times$ TBE 电泳缓冲液中, 1% 琼脂糖凝胶电泳及凝胶成像分析。PCR 产物纯化后测序, BLAST 比对分析。

## 参 考 文 献

- [1] D. C. HARRIS. 1988. *Diaporthe perniciosa* associated with plum dieback. Plant Pathology, 37:604-606.
- [2] DOROTHY M. CAYLEY. 1931. The inheritance of the capacity for showing mutual aversion between mono-spore mycelia of *Diaporthe perniciosa* (Marchal). Journ. of Genetics XXIV, 1:1-63. J. M. Dingley, 1996. Records of plant diseases in New Zealand. Annual Review of Phytopathology, 34: 413-434.
- [3] Latham, A. J. , Morgan-Jones, G. , and Campbell, H. L. 1992. Phomopsis dieback of peach shoots in Alabama. Pl. Dis. 76: 426.
- [4] Marchal & E. J. Marchal, 1921. Bulletin de la Société Royale de Botanique de Belgique, 54:117.
- [5] Roberts, J. W. 1913. The Rough Bark disease of the Yellow Newtown apple. U. S. Agr. Dept. Plant Indus. Bur. Bul. 280: 7-15.
- [6] Tsutomu SAKUMA, Lekh BATRA, Fusaharu NAKATANI, et al. 1982. European pear dieback (*Diaporthe* sp. ) in Japan and its comparison with pear fire blight (*Erwinia amylovora* ). Bull. Fruit Trss Res. Stn. , 9:79-89.
- [7] White T. J. , Bruns T. , Lee S. , et al. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: A guide to methods and applications, 315-322.
-