



中华人民共和国国家标准

GB/T 28092—2011

落叶松枯梢病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Botryosphaeria laricina* (K. Sawada) Y. Z. Shong

2011-12-30 发布

2012-06-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国植物检疫标准化技术委员会(SAC/TC 271)提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国江苏出入境检验检疫局、中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：吴翠萍、李彬、粟寒、高渊、陆军、吴晶、刘伟、高振兴、安榆林。

落叶松枯梢病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了落叶松枯梢病菌 *Botryosphaeria laricina* (K. Sawada) Y. Z. Shong 1987 的检测和鉴定方法。

本标准适用于对落叶松苗木、接穗以及带小枝梢的原木等样品携带落叶松枯梢病菌的检测和鉴定。

2 落叶松枯梢病菌基本信息

中文名:落叶松枯梢病菌。

学名:*Botryosphaeria laricina* (K. Sawada) Y. Z. Shong 1987。

异名:*Phyalospora laricina* K. Sawada, *Guignardia laricina* (K. Sawada) W. Yamamoto & K. Ito。

病害英文名:shoot blight of larch, twig dieback of larch。

采用 Ainsworth (1973) 真菌分类系统,病原菌为子囊菌亚门 Ascomycotina,腔菌纲 Loculoascomycetes,格孢腔菌目 Pleosporales,葡萄座腔菌科 Botryosphaeriaceae,葡萄座腔菌属 *Botryosphaeria*。

无性阶段为半知菌亚门 Deuteromycotina,腔孢纲 Coelomycetes,球壳孢目 Sphaeropsidales,球壳孢科 Sphaeropsidaceae,大茎点霉属 *Macrophoma*。

落叶松枯梢病菌的其他信息参见附录 A。

3 方法原理

根据病原菌危害的症状特点(参见附录 B)采集样品进行检测,观察病原菌产生的子实体的显微形态特征,并结合病原菌的地理分布和寄主范围等有关信息进行结果判断。

4 仪器和用具

4.1 仪器

体视显微镜、普通光学显微镜(具显微拍摄和测量功能)、光照培养箱、高压灭菌器、干热灭菌器、冰箱等。

4.2 用具

手持放大镜、试剂瓶、纱布、脱脂棉、镊子、剪刀、培养皿、修枝剪、吸管、酒精灯、打孔器(直径5 mm)、瓷盘、解剖刀、酒精灯、解剖针、载玻片、盖玻片、微量移液器、标本盒、海绵、胶带、标签等。

5 试剂

石蜡,70%、95%酒精,二氧化硅干燥剂。

6 检测

6.1 样品采集

根据下列症状等进行样品采集:苗木、接穗上的新梢枯死,并且枯死的梢端呈弯曲状;在病组织上有固着的白色滴状物树脂块;干枯的枝干部为紫褐色或灰褐色;在枯死的枝干、松针上有突出的枯梢病原菌子实体。原木上如果带有的小枝梢,则应仔细观察小枝梢上是否有子实体,若无,则可排除怀疑带有枯梢病原菌。

6.2 样品制备

6.2.1 子实体的制片

用解剖针挑取样品上的子实体少许,置于载玻片上加盖玻片压碎或由发病部位直接切片制成水玻片,在解剖镜或显微镜下观察子实体的形态并确认是否成熟。如果成熟,则观察典型形态特征并测量大小;如果不成熟则需进一步培养。

6.2.2 不成熟子实体的培养

对于实体不成熟的部位,先用无菌水浸泡 2 d~3 d,然后浸泡在 35 ℃ 和 10 ℃ 的无菌水中进行交替变温处理,每次 5 min,重复 1 次,再浸在无菌水中 30 min,最后取出置室温条件下保湿培养中 7 d~12 d,诱导产生成熟子实体并制片镜检。

7 鉴定

7.1 有性阶段子实体形态特征

子囊座为壳状、瓶状或梨形,黑褐色,单生、2 个~5 个群生或丛生在病枝表皮下,成熟后仅孔口外露,大小为 $(170\ \mu\text{m}\sim 500\ \mu\text{m})\times(130\ \mu\text{m}\sim 300\ \mu\text{m})$ 。子囊棍棒状,双壁,无色,顶端圆,下有短柄,平行排列于子囊腔基部,大小为 $(115\ \mu\text{m}\sim 149\ \mu\text{m})\times(20\ \mu\text{m}\sim 45\ \mu\text{m})$ 。假侧丝很多,线形,无色,半永久存在,直径 3 μm 。子囊孢子 8 个,双行排列,椭圆形至纺锤形,单胞,无色,大小为 $(22.5\ \mu\text{m}\sim 40\ \mu\text{m})\times(6.3\ \mu\text{m}\sim 15.5\ \mu\text{m})$ 。参见附录 C。

7.2 无性阶段子实体形态特征

分生孢子器群生于顶梢残留的叶背和顶梢小枝周围的表皮下,并使表皮突起,近球形或扁球形,黑色,大小为 $(120\ \mu\text{m}\sim 249\ \mu\text{m})\times(148\ \mu\text{m}\sim 213\ \mu\text{m})$ 。分生孢子梗短,不分枝,圆柱形, $(5\ \mu\text{m}\sim 7\ \mu\text{m})\times(2.5\ \mu\text{m}\sim 3.2\ \mu\text{m})$ 。分生孢子椭圆形至纺锤形,单胞,无色,大小为 $(24\ \mu\text{m}\sim 30\ \mu\text{m})\times(6\ \mu\text{m}\sim 9\ \mu\text{m})$ 。常见 1~2 个油球。参见附录 C。

性孢子器球形至扁球形,单个或几个丛生于病枝表皮下,大小为 $(115\ \mu\text{m}\sim 214\ \mu\text{m})\times(109\ \mu\text{m}\sim 190\ \mu\text{m})$ 。性孢子梗细长,无色,2 个~3 个分隔,大小为 $(12\ \mu\text{m}\sim 16\ \mu\text{m})\times(3\ \mu\text{m}\sim 5\ \mu\text{m})$ 。性孢子短杆状或椭圆状,无色,大小为 $(3\ \mu\text{m}\sim 6\ \mu\text{m})\times(1\ \mu\text{m}\sim 2\ \mu\text{m})$ 参见附录 C。

8 结果判定

如有性阶段、无性阶段的形态特征符合第 7 章鉴定特征的描述,即可判定为落叶松枯梢病菌。

9 标本和样品保存

发现落叶松枯梢病菌的样品,需制作成标本在室温条件下进行干燥保存,或将样品置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存,保存至少6个月,以备复检、谈判和仲裁。保存期满后,进行灭活处理。

附 录 A
(资料性附录)

落叶松枯梢病菌其他信息

A.1 地理分布

国外:日本、朝鲜、韩国、俄罗斯(远东)。

国内:黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古、山东、陕西、甘肃、青海、宁夏。

A.2 寄主

落叶松属(*Larix* spp.):华北落叶松(*L. principisrupprechtii*)、长白落叶松(*L. olgensis* var. *changpaiensis*)、朝鲜落叶松(*L. olgensis* var. *koreana*)、海林落叶松(*L. olgensis* var. *heilingensis*)、日本落叶松(*L. leptolepis*)、黄花落叶松(*L. olgensis*)、欧洲落叶松(*L. decidua*)、美国西部落叶松(*L. occidentalis*)、美加落叶松(*L. laricina*)等。

A.3 发病规律

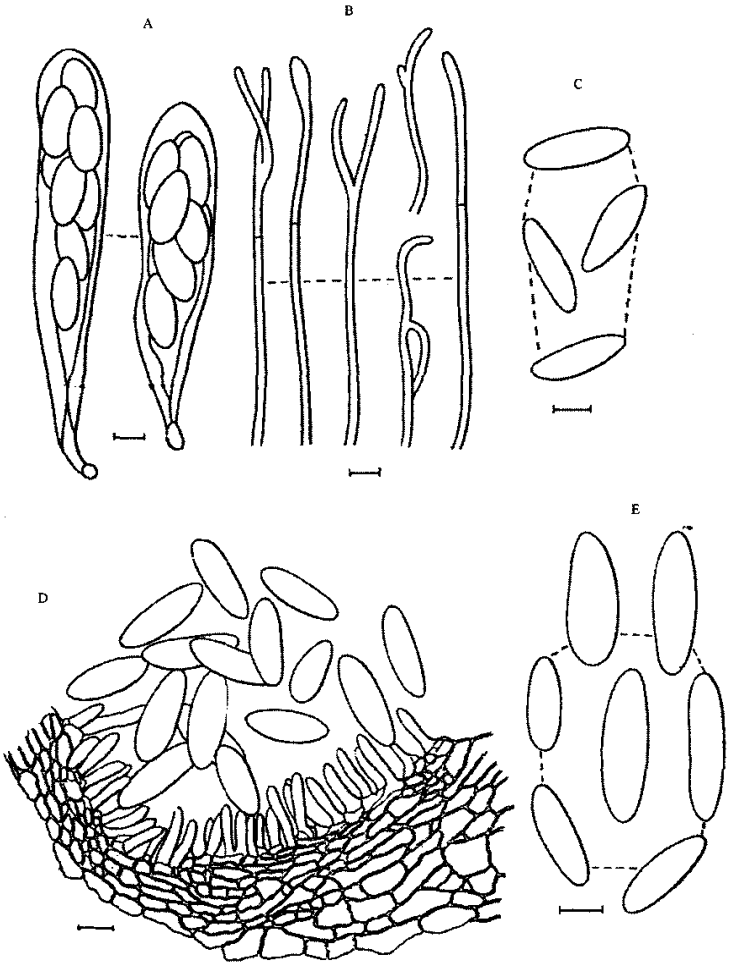
该病从幼苗、幼树到成林的当年新梢都能发病,但幼树发病重。7月上旬开始发病显症状,7月中、下旬发病最明显。一般都先从主梢发病,然后由树冠上部向下蔓延,加重病情。病后新梢渐渐褪色,顶部弯曲下垂呈勾状,而顶梢与弯曲部分变紫褐色或灰褐色,从弯曲部分逐渐向下脱叶、干枯,茎收缩变细,仅在顶部残留一簇叶子,枯萎呈紫灰色。次年春天,由侧芽生小枝代替原来主梢,连年发病、为害严重的,树冠出现扫帚状丛枝,高度生长停止,形成小老树或全株枯死(为害症状参见附录B)。在枝梢受害部位,多数有松脂溢出,凝成块状。8月末至翌年6月,在枯梢上特别是弯曲部分的枝皮及凹陷处,生长着梭形小黑点,初埋生,至翌年6月突破寄主,形成病原菌子囊座。发病10余天后,在顶梢残留叶上或弯曲部位可见圆形的散生小黑点,形成病原菌的分子孢子器。有时在病枝上可见圆形黑色突起,即性孢子器。

附 录 B
(资料性附录)
落叶松枯梢病症状



图 B.1 8 年生日本落叶松枯梢病症状(图片来源 T. Kobayashi, Japan)

附录 C
(资料性附录)
落叶松枯梢病原形态特征



- A —— 子囊；
B —— 侧丝；
C —— 子囊孢子；
D —— 分生孢子器；
E —— 分生孢子。

注 1：图片仿 Kazuo Ito

注 2：图片比例尺为 10 μm

图 C.1 落叶松枯梢病的病原特征