

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1106—2002

### 橡胶南美叶疫病菌检疫鉴定方法

Methods for the quarantine and identification  
of south american leaf blight

[*Microcyclus ulei* (P. Henn.) Von Arx] in rubber tree

2002-05-20 发布

2002-11-01 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

橡胶南美叶疫病是我国进境植物检疫危险性病害。为了防止该病菌随寄主传入我国,需正确掌握橡胶南美叶疫病菌的检疫鉴定方法。

本标准在制定过程中,分析了国内外有关资料,总结了多年来植物检疫经验,根据橡胶南美叶疫病菌的形态学、生物学特性及植物病理学原理,确定各项鉴定技术指标。

本标准给出橡胶南美叶疫病菌的有性态和无性态的形态特征,以及在寄主上所表现的病征和病状,鉴定时可以综合采取有性态和无性态的形态特征,或者其中的一个世代的形态特征作为鉴定依据。

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准负责起草单位:中华人民共和国厦门出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:林石明、余芳平、陈勇。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

## 橡胶南美叶疫病菌检疫鉴定方法

### 1 范围

本标准规定了进境植物检疫中橡胶南美叶疫病菌的检疫鉴定方法。

本标准适用于进境三叶橡胶属(*Hevea* spp.)植物的芽条、芽穗、蒴果等繁殖材料的橡胶南美叶疫病菌的检疫鉴定。

### 2 原理

橡胶南美叶疫病菌是活体营养真菌,可以侵染三叶橡胶的叶片、枝条、茎杆、花序、蒴果,造成橡胶树的持续落叶。该病菌有3种类型的繁殖体,即子囊孢子、器孢子和分生孢子。该病菌可依据其极具扭曲的无性态的分生孢子特征,有性态的形态特征和生物学特征,以及在三叶橡胶属植物上的症状特征进行鉴定。

### 3 仪器、试剂

3.1 手持式扩大镜。

3.2 双目解剖镜(10×~50×)。

3.3 显微镜(100×~1 000×)。

3.4 切片机。

3.5 小器具和器皿:刀片、解剖刀、解剖剪、镊子、记号笔、酒精灯或煤气灯、纱布、烧杯、搪瓷杯、移植接种针、移植环、培养皿、烧杯、三角瓶、玻片、盖玻片、铝铂纸、Parafilm膜等。

3.6 超净工作台。

3.7 乳酚油:由苯酚(由水浴加热融化)20 mL、甘油 40 mL、乳酸 20 mL、蒸馏水 20 mL 混合配制而成。

3.8 次氯酸钠。

3.9 酒精。

3.10 琼脂。

### 4 现场检疫

查验待检货物的有关单证,核实产地、包装、唛头、品名及数量。逐件检查橡胶树繁殖材料的芽条、芽穗、蒴果等是否有可疑疫情,重点应检查叶片。对于来自疫区的材料,还应仔细检查装载交通工具和包装材料。然后,直接扞取有可疑症状的部位;如果没有发现任何可疑症状,则按5%的繁殖材料比例扞取样品,带回实验室检查;如果样品数量少于10件,则全部扞取。

### 5 检验方法

#### 5.1 症状检查

仔细检查橡胶的叶片、枝条、茎杆和蒴果尤其是嫩叶是否有橡胶南美叶疫病感病症状。该病的病斑通常有半透明的橄榄绿色斑点,暗淡青灰色或发黑,穿孔。叶片卷曲,畸形,皱缩变黑呈火烧状。病斑的背面灰白色,其上密生绒毛物(即分生孢子梗和分生孢子),病斑的四周轮生小黑点(即分生孢子器或子座)。叶柄呈螺旋状扭曲。花序变黑、卷缩。枝条、茎杆坏死。果实上有隆起的褐色病斑。在感病组织上,

最常见是散生的分生孢子梗和其上所产生的分生孢子。

## 5.2 病原菌检查

用解剖针挑取或刀片刮取病斑上的绒毛状物,制片,在显微镜下直接检查有无病菌的子实体,记录其形态特征,必要时还应测量分生孢子梗和分生孢子的大小。在解剖镜下检查可疑病斑上的小黑点,切取带有病菌子实体的组织,用冰冻切片机或手工将组织切成厚度约为 $10\ \mu\text{m}\sim 20\ \mu\text{m}$ 的薄片,制片,在显微镜下检查子囊壳和/或分生孢子器,记录形态特征,并测量大小。

## 5.3 分离培养

如果发现可疑症状,或没有发现该病菌的任何子实体,应采取分离、培养的方法作进一步鉴定。直接刮取病斑上的分生孢子放入 HMA 培养基(参见附录 A.2)培养,或选择新鲜病组织(叶片、枝条或蒴果的表皮组织),切成小块,用 70% 酒精消毒几秒钟后,置于 3% 次氯酸钠水溶液中消毒 5 min~15 min,再用灭菌水连续泡洗 3 次,用灭菌滤纸吸干水分后移置在 HMA 培养基平板上、于 24 C~28 C 下培养。

## 6 鉴定特征

### 6.1 形态特征

#### 6.1.1 有性态

子囊壳阶段 [*Microcyclus ulei* (P. Henn.) Von Arx in Müller & Von Arx; = *Dothidella ulei* P. Henn.; = *Melanospsammopsis ulei* (P. Henn.) Stahel], 属子囊菌门 (Ascomycota), 座囊菌目 (Dothideales), 小球腔菌科 (Mycosphaerellaceae), 小环座囊菌属 (*Microcyclus* Sacc., Syd. & P. Syd., 1904)。其形态特征为: 子座球形或近球形, 碳质, 表生于叶片或植物组织上, 通常聚生, 有时着生于穿孔病斑的周围, 直径  $200\ \mu\text{m}\sim 450\ \mu\text{m}$ , 但常侧面融合; 拟薄壁组织的细胞壁均匀加厚, 色暗; 子座内有一个至多个腔, 成熟时具乳突状孔口。子囊壳散生, 具乳突状孔口, 内径  $100\ \mu\text{m}\sim 200\ \mu\text{m}$ 。子囊从腔的基部长出, 有侧丝, 双层壁, 棍棒形, 顶端稍厚, 大小为  $(50\sim 80)\ \mu\text{m}\times (12\sim 16)\ \mu\text{m}$ , 具 8 个近双行排列的子囊孢子。子囊孢子无色透明, 单隔膜, 分隔处缢缩, 近椭圆形, 2 个细胞不相等, 较长的一端顶端较尖, 朝下排列, 大小为  $(12\sim 20)\ \mu\text{m}\times (2\sim 5)\ \mu\text{m}$ 。参见附录 A 之图 A.1。

#### 6.1.2 无性态

该病菌有两种类型, 一类是分生孢子器和器分生孢子, 另一类只产生散生的分生孢子梗, 其上着生分生孢子。

##### 6.1.2.1 橡胶离球壳菌 (*Aposphaeria ulei* P. Henn.)

分生孢子器黑而发亮, 碳质, 圆形或椭圆形, 表生, 具乳突状孔口, 直径为  $120\ \mu\text{m}\sim 160\ \mu\text{m}$ , 单腔, 薄壁, 由浅褐色、厚壁的角细胞组成外层, 由更薄的、无色透明的小细胞组成内层。孢子梗由分生孢子器的内壁细胞长出, 无色透明, 于基部分枝, 丝状, 大小为  $(12\sim 20)\ \mu\text{m}\times (2\sim 3)\ \mu\text{m}$ 。产孢细胞内壁芽殖, 瓶梗型, 聚生或离散生, 无色透明, 表面光滑。器孢子哑铃形, 直或稍弯, 无色, 常含 2 个~3 个油滴, 单胞, 大小为  $(6\sim 10)\ \mu\text{m}\times (0.8\sim 1)\ \mu\text{m}$ 。

##### 6.1.2.2 大孢黑星孢 (*Fusicladium macrosporum* Kuypers)

属有丝分裂真菌 (Mitosporic Fungi), 丝孢纲 (Hyphomycetes), 黑星菌科 (Venturiaceae), 黑星孢属 (*Fusicladium* Bonorden, 1851)。其形态特征为: 菌落散生, 灰色, 粉状。菌丝体埋生。子座表生, 由相当松散的细胞组成。分生孢子梗由表皮下的子座伸出, 初为单胞, 后期形成多个隔膜而基部为亚球形膨大 (宽约  $10\ \mu\text{m}$ ), 由无色透明变成灰榄褐色, 直或稍为弯曲, 有时为曲膝状, 具 1 个~4 个孢痕, 有时长度可达  $140\ \mu\text{m}$ , 但是通常小于  $50\ \mu\text{m}$ , 宽  $3\ \mu\text{m}\sim 7\ \mu\text{m}$ 。产孢细胞合轴状芽殖。分生孢子顶生, 单生, 直或弯曲, 椭圆形或长梨形, 初无色, 后变成淡灰褐色, 光滑或具微小的疣突, 通常具 1 个隔膜, 偶而单胞。双细胞的分生孢子于分隔处缢缩; 靠基部的细胞较宽, 基部截形、加厚, 经常具有典型特征性的单向扭曲; 其大小为: 长  $(23\sim 63)\ \mu\text{m}$ , 平均  $45\ \mu\text{m}$ , 最宽处孢子的宽度  $(5\sim 10)\ \mu\text{m}$ , 平均  $8.5\ \mu\text{m}$ 。单细胞的分生孢子大小为:  $(15\sim 43)\ \mu\text{m}\times (5\sim 9)\ \mu\text{m}$ 。分生孢子基部的孢痕宽为  $(2.5\sim 4)\ \mu\text{m}$ 。参见附录 A 之图 A.2。

## 6.2 培养特征

在 HMA 培养基上,菌落生长很慢,首先产生橄榄绿色的菌丝体,后形成淡黑色的、埋生或表生的子座组织。表生的结构是大量的分生孢子器,并在子座的表面产生分生孢子;埋生的结构主要是菌丝体和分生孢子,在培养基表面为橄榄绿色。培养 26 d 后菌落直径为 5 mm~6 mm。

## 6.3 生物学特征

子囊孢子和分生孢子的最适萌发温度为 24 C~28 C、最适 pH 值为 7.8。在露水或雨滴中要 8 d 后萌发,产生附着胞、侵染菌丝,直接穿透叶片的角质层而侵入寄主植物组织,5 d~8 d 后产生症状。

## 7 结果判定

以橡胶南美叶疫病菌在三叶橡胶属植物上产生的症状,有性态的子囊壳、子囊、子囊孢子以及 6.1.2.2 所描述的分生孢子梗和分生孢子的形态特征为鉴定依据,进行综合判定。器孢子的特征作为检疫鉴定的参考依据,不能单独作为鉴定的依据。

## 8 检疫处理与样品保存

### 8.1 检疫处理

如果检出橡胶南美叶疫病菌,则应对该批货物及其包装铺垫材料等全部进行销毁,并对交通工具作消毒处理;如果没有检出橡胶南美叶疫病菌,则应将全批货物在隔离温室内作至少一个生长周期的隔离试种、检疫观察。

### 8.2 样品保存

发病的繁殖材料应及时销毁。可将病菌制成永久玻片,或培养物经过高温灭菌后保存。



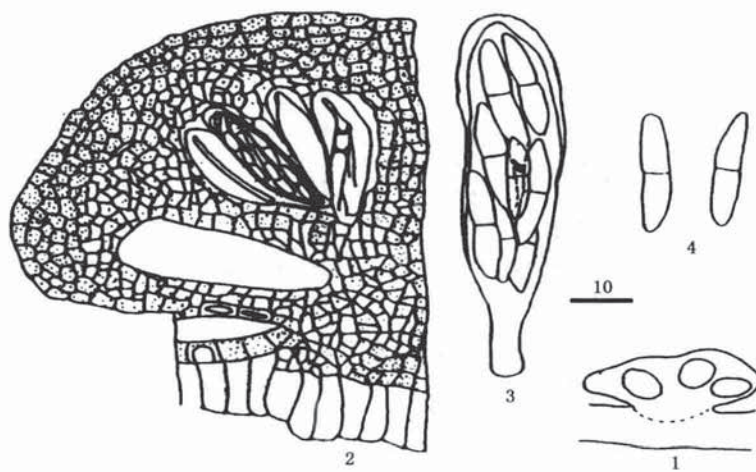
附录 A  
(资料性附录)

橡胶南美叶疫病菌的形态特征及 HMA 培养基

A.1 橡胶南美叶疫病菌

橡胶南美叶疫病菌分为有性态(见图 A.1)和无性态(散生的分生孢子梗和分生孢子,见图 A.2)。

单位为微米



- 1—子座;
- 2—子囊壳;
- 3—子囊;
- 4—子囊孢子。

图 A.1 橡胶南美叶疫病菌的有性态

单位为微米

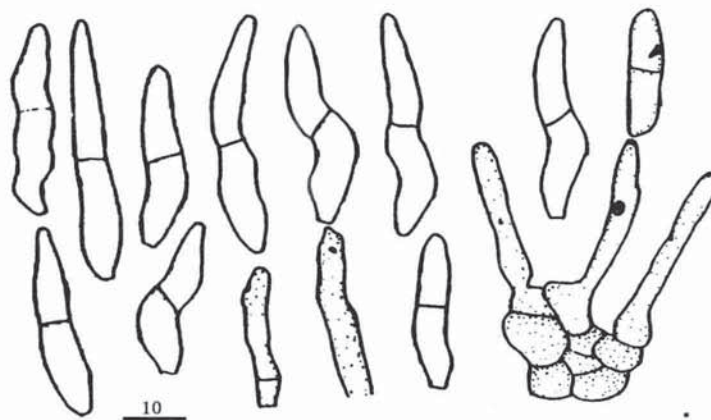


图 A.2 橡胶南美叶疫病菌的无性态

注: 散生的分生孢子梗和分生孢子。

## A.2 HMA 培养基

20 g 三叶橡胶树叶片的提取液〔制做方法:将 20 g 干叶片切成方形小块,用适量的蒸馏水(约 50 mL)煮 30 min 后,过滤去除残渣,取其滤液〕、2.5 g 麦芽汁、20 g 琼脂,加蒸馏水至 1 000 mL,121 C 下湿热灭菌 30 min。

---