

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1271—2003

栎枯萎病菌检疫鉴定方法

Inspection and identification of *Ceratocystis fagacearum* (Bretz) Hunt

2003-05-28 发布

2003-12-01 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

本标准的附录 C 和附录 E 为规范性附录,附录 A、附录 B 和附录 D 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:国家质量监督检验检疫总局动植物检疫实验所。

本标准主要起草人:严 进、吴品珊。

本标准系首次发布的检验检疫行业标准。

栎枯萎病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准确立了入境栎属(*Quercus* L.)植物和其他栎枯萎病菌寄主,包括原木、木制品(含木质包装(铺垫材料))和苗木的栎枯萎病菌检疫检测和鉴定方法。

本标准适用于对来自栎枯萎病发生国家和地区(参见附录 A)的所有栎属植物和栎枯萎病菌其他寄主的入境检疫。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1

传播介体 medium

对于侵染性病害的病原体起转移作用并创造侵入条件的生物,如昆虫、线虫等。

2.2

边材 sapwood

树皮下较软的白木质。

2.3

异宗配合 heterothalism

菌体在性的配合上有雌雄和(或)亲和力的分化,只有一定的异宗菌体(一般以+和-或 A₁ 和 A₂ 加以区别)才能配合。

3 原理

3.1 分类地位

栎枯萎病菌[*Ceratocystis fagacearum* (Bretz) Hunt]属真菌界(Fungi),子囊菌门(Ascomycota),核菌纲(Pyrenomycetes),球壳目(Sphaeriales),长喙壳科(Ophiostomataceae),长喙壳属(*Ceratocystis* Ell. & Halst.)。

3.2 寄主

栎属 *Quercus* L.、栗属 *Castanea* Mill.、锥属 *Castanopsis* Spach 和石栎属 *Lithocarpus* Bl. 的全部种。栎枯萎病菌可以通过寄主原木、木制品和苗木或其上所携带的传播介体在国际上传播。

3.3 鉴定原理

栎枯萎病菌的寄主范围、传播途径、造成的植株症状(见附录 D 图 D.4)和病原形态(见附录 D 图 D.1、图 D.2、图 D.3)是栎枯萎病菌检疫鉴定方法的依据。

4 仪器设备和实验用具

4.1 仪器设备

立体显微镜、生物显微镜(具油镜和测微尺)、电子分析天平(感量 0.001 g)、普通天平(感量 0.1 g)、超净工作台、生物培养箱、高压灭菌器。

4.2 试验用具

斧子、锯子、手持放大镜、培养皿、三角瓶(500 mL)、试管(直径 12 mm)、烧杯(1 000 mL)、手术刀、手术剪、镊子、载玻片、盖玻片、量筒、吸管、酒精灯。

5 试剂和标准菌株

5.1 试剂

葡萄糖($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$)、甲(苯)丙氨酸、磷酸二氢钾(KH_2PO_4 含量不少于 99.0%)、硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 含量不少于 99.0%)、硫酸铁 $[Fe_2(SO_4)_3 \cdot xH_2O]$ 含量(以 Fe 计)21.0~23.0%、硫酸锰($MnSO_4$ 含量不少于 99.0%)、硫酸锌($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 含量不少于 99.0%)、维生素 H(Vitamin H)、琼脂粉。

5.2 标准菌株¹⁾

Ceratocystis fagacearum (Bretz) Hunt A₁ 和 A₂ 标准菌株。

6 抽样

按货物总件数 0.5%~5% 抽查,500 件以下抽查 3 件~5 件,501 件~1 000 件抽查 6 件~10 件,1 001 件~3 000 件抽查 11 件~20 件,3001 件上,每增加 500 件抽查件数增加 1 件。

7 检验方法

7.1 现场检验

将抽取的原木或木制品或苗木用斧子或锯子分别横向和纵向切开,仔细观察横断面和纵断面有无黑褐色条纹(参见附录 D)。如带皮,则要检查树皮和木质部之间是否有垫状菌丝层和边材上是否有传病媒体(参见附录 B)。

标本带回实验室作进一步检验。

7.2 实验室检验

7.2.1 分离培养

采用麦芽浸出液酵母培养基或 NFP 培养基(参见附录 C),用于病原菌的分离、培养形状测定和菌种保存。

在褐色条纹处取一块组织,切成 4 mm×4 mm 的小片,用 0.5% NaOCl 表面灭菌 5 min,无菌水冲洗三遍,放在直径 9 cm 的平板培养基上,每皿放 4 片~6 片,于 24℃ 培养箱内培养,黑暗和光照(320 nm~400 nm)各 12 h 交替。7 d 后用显微镜检查。

若发现传病媒介昆虫,则须检查是否携带柞枯萎病菌。首先进行昆虫形态鉴定,再将其肢解,组织片用上述方法分离培养。

7.2.2 形态观察

从菌落中挑取少量培养物,以水作浮载剂,制成玻片,在显微镜下观察。如为 *Ceratocystis fagacearum* 的无性阶段,即可观察到分生孢子梗和分生孢子。详细记录并测量分生孢子梗和分生孢子大小。

用直径 4 mm 的打孔器取菌落边缘的菌块两块,分别放在两个 NFP 培养基平板的一侧;用同法分别取标准菌株 *Ceratocystis fagacearum* A₁ 和 A₂ 交配型的菌块各一块,分别放在上述平板培养基的另一侧,于 24℃ 下培养 7 d~10 d。用立体显微镜观察同一平板培养基上的两菌落交界处是否产生子囊壳。挑取两菌落交界处产生的子囊壳制成玻片,于显微镜下观察。

如与 A₁ 交配型菌落交界处产生子囊壳,则待测菌株为 A₂ 交配型,如与 A₂ 交配型菌落交界处产生子囊壳,则待测菌株为 A₁ 交配型。

测量子囊壳、子囊和子囊孢子大小,并作详细记录。

8 鉴定标准

1) 来自美国的 *Ceratocystis fagacearum* (Bretz) Hunt A₁ 和 A₂ 标准菌株保存于动植物检疫实验所。

8.1.1 营养体形态

菌落呈绒毛状,厚1 mm~3 mm,初为白色,后为淡灰色至黄绿色,常有褐色斑块。

菌丝分枝有横隔,淡色至褐色,宽 $2.5\mu\text{m}\sim 6\mu\text{m}$,菌落中还能形成菌核,菌核茶褐色至黑色,质地疏松,形状不定,直径可达2.5 cm。此外,还可形成一种橄榄色厚垣孢子。

8.1.2 无性繁殖器官形态

分生孢子内生,无色,单胞,圆筒形,两端平截,大小为 $(2\mu\text{m}\sim 4.5\mu\text{m})\times(4\mu\text{m}\sim 22\mu\text{m})$,在培养基上可形成分生孢子链。分生孢子梗分枝或不分枝,宽 $2.5\mu\text{m}\sim 5\mu\text{m}$,长 $20\mu\text{m}\sim 60\mu\text{m}$,淡色至黑色,有分隔,顶端逐渐变尖(参见附录D图D.1)。

8.1.3 有性繁殖器官形态

子囊壳单生或丛生,黑色,瓶形,基部球形,直径 $240\mu\text{m}\sim 380\mu\text{m}$,几乎整个埋于基质内。子囊壳具有长喙,喙长 $250\mu\text{m}\sim 450\mu\text{m}$,顶端生有无色须状物(参见附录D图D.2)。子囊球形到近球形,最大直径 $7\mu\text{m}\sim 10\mu\text{m}$,内含八个子囊孢子。子囊孢子单胞,无色,椭圆形,微弯,大小为 $(2\mu\text{m}\sim 3\mu\text{m})\times(5\mu\text{m}\sim 10\mu\text{m})$ (参见附录D图D.3)。子囊壁易消解,成熟后,子囊孢子从孔口流出,聚集在白色粘液中呈小滴状,在水中不易分散。

9 结果判定

如症状和分离物的各形态特征分别与描述的症状和病原菌形态相吻合,即可鉴定为 *Ceratocystis fagacearum* (Bretz) Hunt。

10 样品保存

10.1 菌种保存

分离到的 *Ceratocystis fagacearum* 菌种,应转入试管斜面上,置于 15°C 黑暗条件下保存至少12个月,以备复验、谈判和仲裁。

10.2 传病介体保存

捕获的传病昆虫除用于分离病原菌外,其余的应使其存活至检验鉴定完成,然后制成标本。尽量保持其身体各部位的完整性。

10.3 检验报告与资料保存

检验报告内容包括:样品来源、种类、数量、实验日期、方法、结果等,并要有检验人员签字(参见附录E)。实验原始记录以及标本和照片等资料需保存完整,以便需要时复验、谈判和仲裁。

11 复核

由国家质量监督检验检疫总局指定的单位或专家负责。主要复核分离到的菌种和捕获到传病昆虫鉴定的正确性,实验原始记录、标本和照片资料的完整性。

附 录 A
(资料性附录)

栎枯萎病菌 *Ceratocystis fagacearum* (Bretz) Hunt 世界分布

A.1 欧洲

保加利亚、波兰、罗马尼亚。

A.2 北美洲

美国(阿肯色、印地安纳、伊利诺斯、依阿华、堪萨斯、肯塔基、马里兰、密执安、明尼苏达、密苏里、内布拉斯加、北卡罗莱纳、南卡罗莱纳、南达科他、俄亥俄、俄克拉荷马、宾夕法尼亚、田纳西、得克萨斯、弗吉尼亚、西弗吉尼亚、威斯康星)。

附 录 B
(资料性附录)

栎枯萎病菌 *Ceratocystis fagacearum* (Bretz) Hunt 传病媒介

B.1 果实露尾甲属 *Carpophilus* Stephens

C. lugubris

B.2 露尾甲属 *Glischrochilus* Reiffer

G. sanguinolentus

G. quadrisignatus

G. fasciatus

G. siepmanni

B.3 梨额小蠹属 *Pseudopityophthorus* Swaine

P. minutissimus

P. pruinosis

B.4 毛束小蠹 *Scolytus intricatus* Ratzeburg

附 录 C
(规范性附录)
培养基配方

C.1 麦芽浸出液酵母培养基

麦芽浸出液	5 g
酵母	1 g
琼脂粉	20 g
蒸馏水	1 000 mL

先调酸度至 pH 6.0, 然后在 151 b. 或 121℃ 下灭菌 15 m。

C.2 NFP²⁾ 培养基

葡萄糖	3 g
甲(苯)丙氨酸	0.5 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	1 g
硫酸镁(MgSO ₄)	0.5 g
硫酸铁(Fe ₂ (SO ₄) ₃)	0.2 g
硫酸锰(MnSO ₄)	0.2 g
硫酸锌(ZnSO ₄)	0.2 g
维生素 H(Vitamin H)	5 μg
琼脂粉	20 g
蒸馏水	1 000 mL

在 151 b. 或 121℃ 下灭菌 15 m。

2) NFP: 南京林业大学(原南京林产工业学院)森林病理教研组配方(摘自《植物检疫》(浙江农业大学汇编)——上海科学技术出版社 1979)。

附录 D
(资料性附录)
病原菌形态示意图和症状

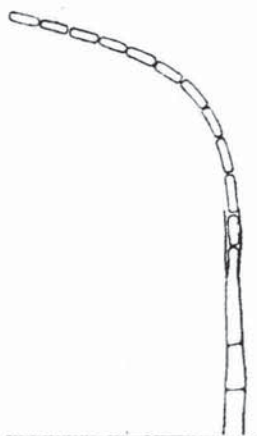


图 D.1 栎枯萎病菌分生孢子和分生孢子梗

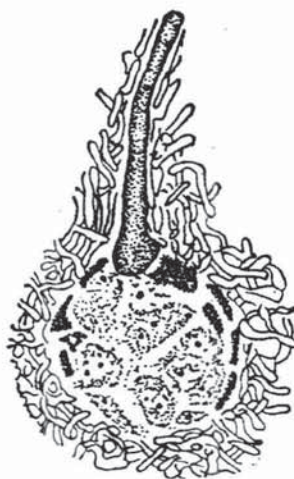


图 D.2 栎枯萎病菌子囊壳

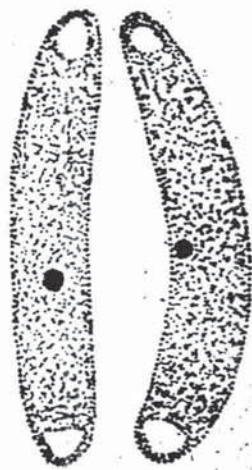


图 D. 3 栎枯萎病菌子囊孢子



图 D. 4 栎枯萎病菌造成栎树边材上黑褐色条斑

附 录 E
(规范性附录)
检疫鉴定报告单示例

样品

报验号	名称	品种	数量/质量	产地	审批号	取样时间
输出国家或地区：						
运输线路及方式：						
用途：			计划种植地区：			
检疫要求：						

鉴定结果

检验日期：	检验员：
检验方法：	
结果：	
实验室主任：	单位负责人：
日期： 年 月 日	(盖章) 日期： 年 月 日

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国动植物检疫局等 1997 中国进境植物检疫有害生物选编 中国农业出版社
 - [2] 林传光 1981 植物学名词解释——病理分册 科学出版社
 - [3] 浙江农业大学汇编 1979 植物检疫 上海科学技术出版社
 - [4] Bretz T. W. 1952 The Ascigerous Stage of the Oak Wilt Fungus *Phytopathology* 42:435-437
 - [5] Henry B. W. 1944 *Chalara quercina* n. sp. , the cause of oak wilt *Phytopathology* 34:631-635
 - [6] CABI & EPPO 1997 Quarantine Pests for Europe(2nd Edition)CAB International
 - [7] OEPP/EPPO 1997 Data sheets on quarantine organisms No. 6 *Ceratocystis fagacearum* Bulletin OEPP/EPPO Bulletin9(2)
 - [8] IMI 1993 Distribution Maps of Plant Diseases No. 254(edition4)CAB International
 - [9] Splawa N. S et al. 1985 Bluestain of oak sapwood caused by *Ceratocystis fagacearum* *Sprawozdania Komisja Technologii Drewna*, Poland
 - [10] Rosnev B. et al. 1982, Vascular mycosis disease of *Quercus petraea* in the eastern Stara Planina mountains *Gorsko-Stopanstvo*. 38:8, 50-54
 - [11] Haring P. et al. 1982 Wilt disease of sessile oak(*Quercus petraea* Lieb.)caused by *Ceratocystis fagacearum*(Bretz.)*Hunt Contributii-Botanice.* ,77-85
-