

新疆维吾尔自治区植物保护学会团体标准

T/ZBXH 131-2025

新疆野苹果腐烂病菌检测鉴定方法

Detection and identification of the pathogen on *Malus sieversii*

2025-09-20 发布

2025-09-27 实施

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件中某些内容可能涉及相关知识产权保护内容，本文件的发布机构不承担相关识别等责任。

本文件由新疆农业大学农学院提出。

本文件由新疆维吾尔自治区植物保护学会归口。

本文件起草单位：新疆农业大学、中国科学院新疆地理与生态研究所。

本文件主要起草人：王丽丽、张道远、傅本重、夏红飞、马荣、施宠、张琴、杨杰。

本文件适用于新疆维吾尔自治区内所有相关单位及组织，自愿采用。

本文件由采用本标准的单位及组织自行承担相关责任。

本文件由新疆维吾尔自治区植物保护学会负责解释。

本文件为首次公布。

新疆野苹果腐烂病菌检测鉴定方法

1 范围

本文件规定了新疆野苹果腐烂病菌的分离培养、致病性测定、形态学鉴定和分子生物学等检测鉴定方法。

本文件适用于新疆野苹果腐烂病病原菌的检测和鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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。

NY/T 3344 苹果腐烂病抗性鉴定技术规程

DB65/T 4301 新疆林果资源调查技术规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

新疆野苹果 (*Malus sieversii* (Ledeb.) Roem.)

新疆野苹果又称塞威士苹果、天山野苹果等，隶属于蔷薇科 (Rosaceae) 苹果属 (*Malus*)，乔木。产新疆西部天山野果林，是一种重要的野生果树资源，已被列为中国濒危二级重点保护植物。

4 新疆野苹果腐烂病菌基本信息

腐烂病 (canker disease) 俗称臭皮病、烂皮病，是由无性型真菌壳囊孢属 (*Cytospora* spp.)，其有性型为黑腐皮壳菌 *Valsa* spp.) 侵染危害树木枝干皮层和维管束系统的一种毁灭性枝干病害 (症状及传播途径参见附录A.1、A.2)。目前报道的野苹果腐烂病菌有霍氏壳囊孢 (*Cytospora hoffmannii*)、核果壳囊孢 (*Cytospora leucostoma*)、苹果壳囊孢 (*Cytospora mali*)、寄生壳囊孢 (*Cytospora parasitica*) 和拟李属壳囊孢 (*Cytospora pruinopsis*)，其中，寄生壳囊孢分离频率最高，为优势病原菌 (病原菌基本信息参见附录A.3)。该病害寄主范围广，如蔷薇科樱属、苹果属、桃属、葡萄科葡萄属、杨柳科柳属、鼠李科鼠李属、桦木科桦木属和桤木属等多种木本植物。

5 仪器设备

光学显微镜、生物解剖镜、电子天平、超净工作台、高压灭菌锅、高速冷冻离心机、PCR仪、凝胶成像系统、电泳仪、涡旋振荡器、冰箱、培养箱、移液器。

6 主要试剂及材料

病原菌分离培养所需药剂：无水乙醇、75%酒精、2%次氯酸钠溶液、无菌水、马铃薯葡萄糖琼脂培养基（基本信息参见附B.1）。

病原菌DNA提取试剂或真菌DNA提取试剂盒：CTAB提取液（基本信息参见附录B.1）三氯甲烷，异戊醇，异丙醇，RNase，50×TAE缓冲液、核酸染料、琼脂糖、ddH₂O、DL2000 DNA Maker。

7 病原菌检测

7.1 病原菌的分离纯化

症状检查：在解剖镜下观察感病枝条病部是否产生点状子实体形态，切取子实体于显微镜观察是否无色腊肠形的分生孢子。

选择表现有典型腐烂病症状的新疆野苹果枝条，将枝条病健交界处切成3 mm×3 mm的小块，依次浸泡于75%酒精消毒30 s，2%的次氯酸钠中浸泡3 min，使用无菌水漂洗3次，利用灭菌滤纸吸除组织块表面残留水分。将组织块接种于PDA培养基平板上，每皿4块，将其置于25℃培养箱中进行培养。恒温培养3 d~5 d，待长出菌落后，挑取菌落边缘菌丝置于PDA培养基平板上，重复多次以获取纯化菌株。

7.2 形态学特征观察

病原菌壳囊孢属真菌形态主要观察产孢结构（子座）、分生孢子及PDA平板上菌落的形态特征。（相关信息参见附录A.3）

7.3 PCR 检测

对纯化菌株进行DNA提取，多基因序列PCR扩增、测序及构建系统发育树进行序列分析。序列包括ITS、TEF、ACT和TUB序列（相关信息参见附录B）。

7.4 致病性测定

将PDA活化菌株用直径5 mm的打孔器制若干菌饼备用。选取粗细均匀且健康的新疆野苹果树枝条剪成15 cm的小段，表面洗净，用75%的酒精消毒，后用无菌水冲洗并风干后，上端封石蜡，下端放入含无菌水的烧杯中。用打孔器烫伤枝条制造伤口，将菌饼菌丝面紧贴伤口处，外覆吸有无菌水的脱脂棉，并用保鲜膜包裹，保湿培养48 h移除接种体和脱脂棉。以接种无菌PDA菌饼的枝条作为对照，每处理设置3次重复。

接菌5 d~7 d后，枝条接种部位表皮初期变红褐色，逐渐出现椭圆形凹陷病斑，其表皮下韧皮部变软并逐渐腐烂。随后，病斑呈环状扩展导致枝条缢缩，病部表面树皮逐渐变干皱缩。20 d后病斑周围出

现凸起的黑色子实体（病菌产孢结构），随后逐渐扩散至整个枝条，潮湿环境其孔口会溢出橘黄色的卷须状物，即分生孢子角。而对照枝条，除烫伤处呈褐色外，其他部位未出现变色、坏死或腐烂的症状。对发病枝条再做病原菌分离培养，观察是否与接种菌株形态特征一致（形态特征参考附录 A）。

8 结果判定

综合形态学特征以及ITS、*TEF*、*ACT*和*TUB*多序列系统发育分析结果作为判定依据：

若植物组织症状与7.1符合，植物组织中病原菌子实体和分生孢子的形态以及分离物菌落特征符合7.2所描述特征，同时PCR检测结果符合7.3，判定为检出新疆野苹果腐烂病病原菌霍氏壳囊孢（*C. hoffmannii*）、核果壳囊孢（*C. leucostoma*）、苹果壳囊孢（*C. mali*）、寄生壳囊孢（*C. parasitica*）和拟李属壳囊孢（*C. pruinopsis*）。

附录 A
(资料性)
新疆野苹果腐烂病相关信息

A.1 新疆野苹果腐烂病危害症状

新疆野苹果腐烂病是一种侵害枝干的病害，主要影响果树主干和主枝的皮层，同时也能危害幼树及苗木，其症状表现有溃疡型和枝枯型两种。

A.1.1 溃疡型

多发生于树木的主干及主要分枝部位。发病初期，病部树皮变为红褐色，略隆起，病部呈水渍状，质地松软，常有酒糟味黄褐色液体流出，病皮极易剥离。发病后期，病部脱水凹陷，呈黑褐色，表面密布黑色小粒点。雨后或空气湿度较大时，分生孢子器会产生橘黄色、卷须状分生孢子角。

A.1.2 枝枯型

主要侵染幼嫩枝条及树势弱的大枝。发病初期，病斑呈红褐色或黑褐色，略显潮湿肿胀，很快变干、下陷，形状不规则，切开表皮可观察到被病原菌感染而腐烂变黑的韧皮部，常在小枝上长一圈，造成枝条枯死，并向下蔓延到大枝上，造成整株枯死。发病后期，病皮部会产生大量的黑色小粒点，即分生孢子器。



图 A.1 新疆野苹果腐烂病病害症状 (王丽丽 摄)

注：A：主要分枝溃疡型病斑；B：枯死皮下病组织褐色；C：病部皱缩变干；D：产生大量小黑点

A.2 传播途径

腐烂病病原菌是一种典型的弱寄生性真菌，具有潜伏侵染特性。该病菌主要以菌丝、分生孢子器、子囊壳以及子囊孢子等形态在病残枝条上越冬，成为次年病害发生的初侵染源。野苹果树腐烂病菌侵染

途径多样，主要通过伤口侵入，但也能从叶痕、果柄痕和皮孔侵入。伤口包括自然因素（如叶痕、果柄痕、芽眼、皮孔、虫伤、冻伤和灼伤）和人为因素（如修剪和机械损伤）造成的损伤。腐烂病菌的传播途径包括近距离传播和远距离传播两种形式。近距离传播主要通过气流、雨水飞溅、昆虫携带以及鸟类活动等方式进行扩散，其中气流传播是最主要的传播途径。远距离传播则主要依靠染病苗木的人为调运。

A.3 新疆野苹果腐烂病原菌形态特征

在217份病枝样品，分离菌株420株，其中，寄生壳囊孢分离频率最高，约为63.87%，为优势菌株；苹果壳囊孢约占23.10%；核果壳囊孢约占3.09%；霍氏壳囊孢约占2.62%；拟李属壳囊孢约占1.43%；其他约占5.89%。各病原菌形态如下：

A.3.1 霍氏壳囊孢

中文学名：霍氏壳囊孢

拉丁学名：*Cytospora hoffmannii* L. Lin, X.L. Fan & Crous 2024

分类地位：隶属于子囊菌门（Ascomycota）、粪壳菌纲（Sordariomycetes）、间座壳目（Diaporthales）、壳囊孢科（Cytosporaceae）、壳囊孢属（*Cytospora*）。

形态特征（菌株F07）：子座埋生于树枝表皮下，有黑色界限圈，多腔室，不规则排列，共用腔室壁，分生孢子梗无色透明。菌落正面初期白色绒毛状，后期棕褐色，菌落背面黑褐色。分生孢子腊肠形，单胞，无色透明，无隔膜，大小为（3.51 μm ~ 6.77 μm）×（0.72 μm ~ 1.94 μm）（平均值4.83 μm×1.13 μm，n=30）。

A.3.2 核果壳囊孢

中文学名：核果壳囊孢

拉丁学名：*Cytospora leucostoma* (Pers.) Sacc. 1881

分类地位：隶属于子囊菌门（Ascomycota）、粪壳菌纲（Sordariomycetes）、间座壳目（Diaporthales）、壳囊孢科（Cytosporaceae）、壳囊孢属（*Cytospora*）。

形态特征（菌株F06）：子座埋生于树枝表皮下，有黑色界限圈，腔室由多个不规则的小腔室共同组成，不规则排列，呈迷宫状，共用腔室壁，分生孢子梗无色透明。菌落正面初期白色，菌丝质地细密，呈羽毛状，后期颜色加深变为墨绿色、黑色。分生孢子腊肠形，单胞，无色透明，大小为（3.51 μm ~ 6.12 μm）×（0.92 μm ~ 2.24 μm）（平均值4.69 μm×1.49 μm，n=30）。

A.3.3 苹果壳囊孢

中文学名：苹果壳囊孢

拉丁学名：*Cytospora mali* Grove 1935

分类地位：隶属于子囊菌门（Ascomycota）、粪壳菌纲（Sordariomycetes）、间座壳目（Diaporthales）、壳囊孢科（Cytosporaceae）、壳囊孢属（*Cytospora*）。

形态特征（菌株F04）：子座埋生于树枝表皮下，无黑色界限圈，多腔室，共用腔室壁，分生孢子梗无色透明。菌落正面呈棕色绒毛状，背面棕褐色且有同心轮纹。分生孢子腊肠形，单胞，无色透明，无隔，大小为（3.95 μm ~ 5.61 μm）×（0.97 μm ~ 2.11 μm）（平均值4.58 μm×1.48 μm，n=30）。

A. 3. 4 寄生壳囊孢

中文学名：寄生壳囊孢

拉丁学名：*Cytospora parasitica* Norph., Bulgakov & K.D. Hyde 2015

分类地位：隶属于子囊菌门（Ascomycota）、粪壳菌纲（Sordariomycetes）、间座壳目（Diaporthales）、壳囊孢科（Cytosporaceae）、壳囊孢属（*Cytospora*）。

形态特征（菌株F02）：子座树枝表皮下埋生，腔室内褶形成不规则的多腔室，呈迷宫状排列，共用腔室壁，分生孢子梗无色透明。菌落正面乳白色绒毛状，背面淡黄色。分生孢子腊肠形，无色透明，且无隔，大小为（3.99 μm ~ 7.03 μm）×（1.21 μm ~ 2.76 μm）（平均值5.56 μm×1.57 μm，n=30）。

A. 3. 5 拟李属壳囊孢

中文学名：拟李属壳囊孢

拉丁学名：*Cytospora pruinopsis* C. M. Tian & X. L. Fan 2015

分类地位：隶属于子囊菌门（Ascomycota）、粪壳菌纲（Sordariomycetes）、间座壳目（Diaporthales）、壳囊孢科（Cytosporaceae）、壳囊孢属（*Cytospora*）。

形态特征（菌株F10）：子座在树枝表皮下埋生，无黑色界限圈，突出，灰色至黑色，分生孢子梗无色透明。菌落正白色，菌丝致密且呈放射状生长，背面淡黄色。分生孢子腊肠形，无色透明，单胞，大小为（3.12 μm ~ 5.61 μm）×（0.84 μm ~ 2.43 μm）（平均值5.37 μm×1.21 μm，n=30）。

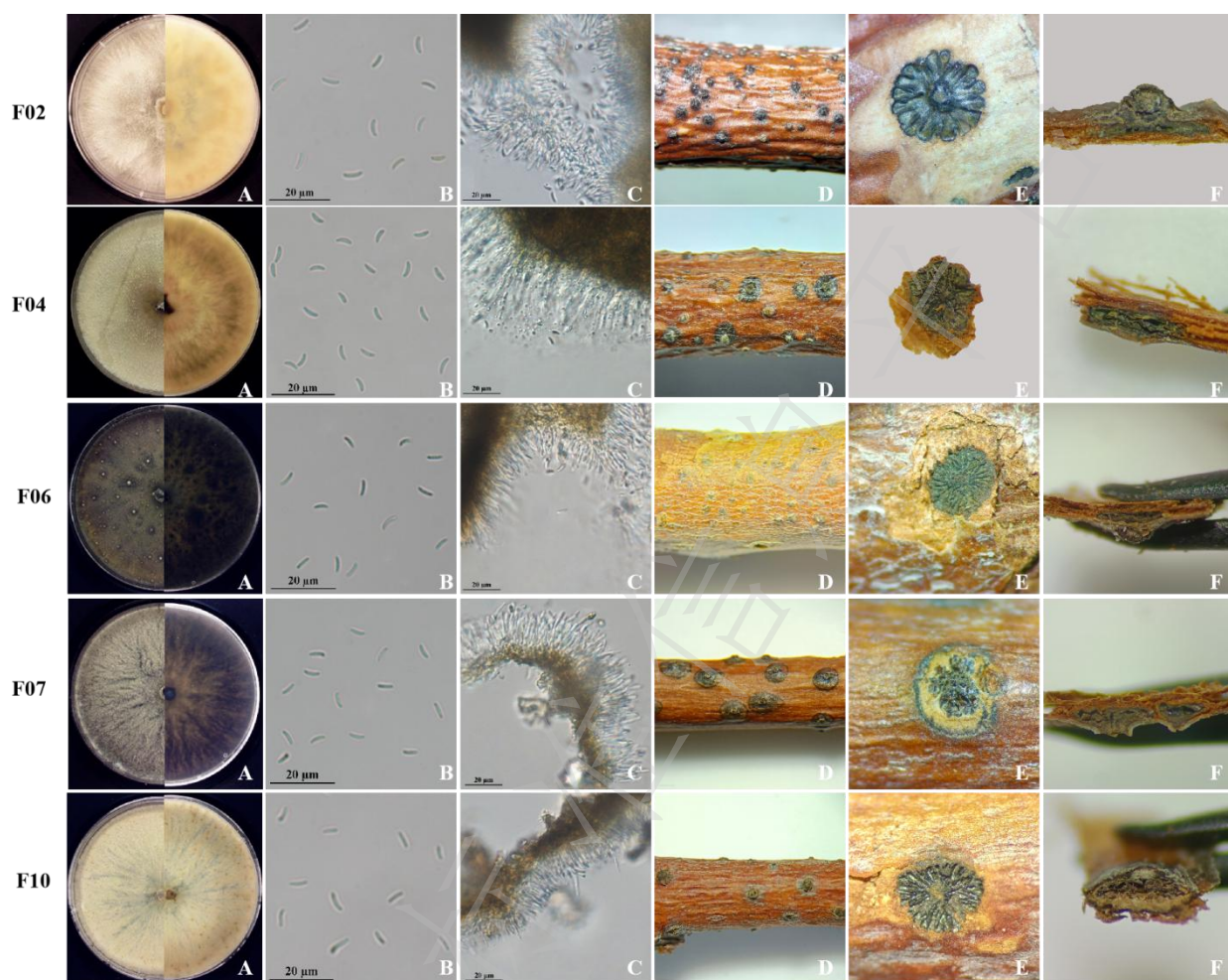


图 A.2 病原菌形态特征（张琴 摄）

注：A：菌落正反面形态；B：分生孢子；C：分生孢子梗；D：子座；E：分生孢子器横切面；F：分生孢子器纵切面

附 录 B
(资料性)
新疆野苹果腐烂病菌 PCR 检测方法

B.1 DNA提取

将纯化的待测菌株接种于PDA培养基(马铃薯200 g、琼脂粉15 g、葡萄糖20 g、加蒸馏水定容至1000 mL, 121°C高压灭菌20 min灭菌)平板上, 25°C培养5 d后, 刮取少量菌丝100 mg(液氮处理研磨), 加入至1.5 mL离心管中, 加入65°C预热的600 μ L CTAB(2%CTAB, 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 100 mmol/L Tris·HCl pH 8.0)裂解液振荡混匀, 置于65°C水浴中每隔10 min混匀一次, 处理30 min后取出冷却至室温, 加入等体积的三氯甲烷/异戊醇(24: 1), 充分混匀, 室温15000 g离心15 min。小心吸取上清液(约600 μ L)至新的1.5 mL离心管, 加入2.5倍体积预冷的无水乙醇或0.8倍体积的异丙醇, 再加入 1/10体积的3 mol/L, 乙酸钠(pH 4.8), 充分混匀, -20°C(加入无水乙醇时)或4°C(加入异丙醇时)放置 30 min 以上。4°C, 15000 g离心15 min弃上清液。加入70%的乙醇500 μ L, 洗涤沉淀两次, 室温15000 g离心5 min弃上清(注意不要把沉淀倒出), 晾干沉淀, 至乙醇挥发殆尽后, 加入 0 μ L的去离子水或TE缓冲液溶解沉淀, -20°C保存待用。

也可用相应市售DNA提取试剂盒提取DNA。

B.2 引物序列

运用PCR技术对ITS (ITS1/ITS4)、*TEF* (EF1-728F/EF1-986R)、*ACT* (ACT512F/ACT783R) 及 *TUB* (BT2A/BT2B) 4种序列进行扩增(见表B.1)。

表 B.1 引物序列

基因片段	引物	引物序列(5'至3')	产物
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	600 bp
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
<i>TEF</i>	EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	279 bp
	EF1-986R	TACTTGAAGGAACCCTTACC	
<i>ACT</i>	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGTTTCGC	257 bp
	ACT-783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	
<i>TUB</i>	BT2A	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	522 bp
	BT2B	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	

B.3 PCR扩增

PCR反应体系25 μ L: 2 \times Taq Master Mix 12.5 μ L, 上、下游引物各1 μ L, DNA模板1 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。
PCR反应程序见表B.2。

表 B. 2 PCR 反应程序

基因片段及引物	反应程序	温度 $^{\circ}$ C	时间	循环
ITS (ITS1/ITS4)	预变性	94	5 min	35
	变性	94	40 s	
	退火	56	40 s	
	延伸	72	1 min	
	最终延伸	72	7 min	
TEF (EF1-728F/EF1-986R)	预变性	94	5 min	35
	变性	94	30 s	
	退火	55	30 s	
	延伸	72	1 min	
	最终延伸	72	10 min	
TUB (BT2A/BT2B)	预变性	95	5 min	35
	变性	95	30 s	
	退火	58	30 s	
	延伸	72	1 min	
	最终延伸	72	10 min	
ACT (ACT-512F/ACT-783R)	预变性	94	5 min	35
	变性	94	30 s	
	退火	58	30 s	
	延伸	72	1 min	
	最终延伸	72	10 min	

B. 4 PCR产物检测

PCR反应程序结束后, 取5 μ L扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳 (120 V, 17 min ~ 30 min), 使用凝胶成像系统观察电泳结果。

B. 5 建立系统发育树

通过对供试菌株 ITS、TEF、ACT 和 TUB 基因序列进行 PCR 扩增和测序, 分别获得大小约为 600、280、250 和 520 bp 的片段。利用 NCBI 的 Blast 工具, 将测序获得的序列与数据库进行 Blast 同源性比对分析, 搜索同源性较高的基因序列, 下载相似度较高的相关病原菌序列作为构建发育树所用的参考序列, 以 *Diaporthe vaccinia* (CBS 160.32) 菌株作为外群。利用 MEGA11.0 软件进行多序列比对分析, 采用最大似然法 (Maximum Likelihood, ML) 构建多基因联合系统发育树, 重复 1000 次。

系统发育树显示,各供试菌株与不同已知种分别聚于一个分支,具有高度同源性,如菌株 F02 (ITS、TEF、ACT 和 TUB 登录号:PV173303、PV199496、PV221111、PV200206)与 *C. parasitica*、F04 (PV173302、PV199497、PV221112、PV200207)与 *C. mali*、F06 (PV173304、PV199498、PV199478、PV200208)与 *C. leucostoma*、F07 (PV173305、PV199499、PV199479、PV200209)与 *C. hoffmannii*、F10 (PV173307、PV199500、PV199480、PV200210)与 *C. pruinopsis*。结合形态学观察与分子系统发育学分析结果,确定病原菌 F02、F04、F06、F07 和 F10 分别为寄生壳囊孢 *C. parasitica*、苹果壳囊孢 *C. mali*、核果壳囊孢 *C. leucostoma*、霍氏壳囊孢 *C. hoffmannii*、拟李属壳囊孢 *C. pruinopsis*。

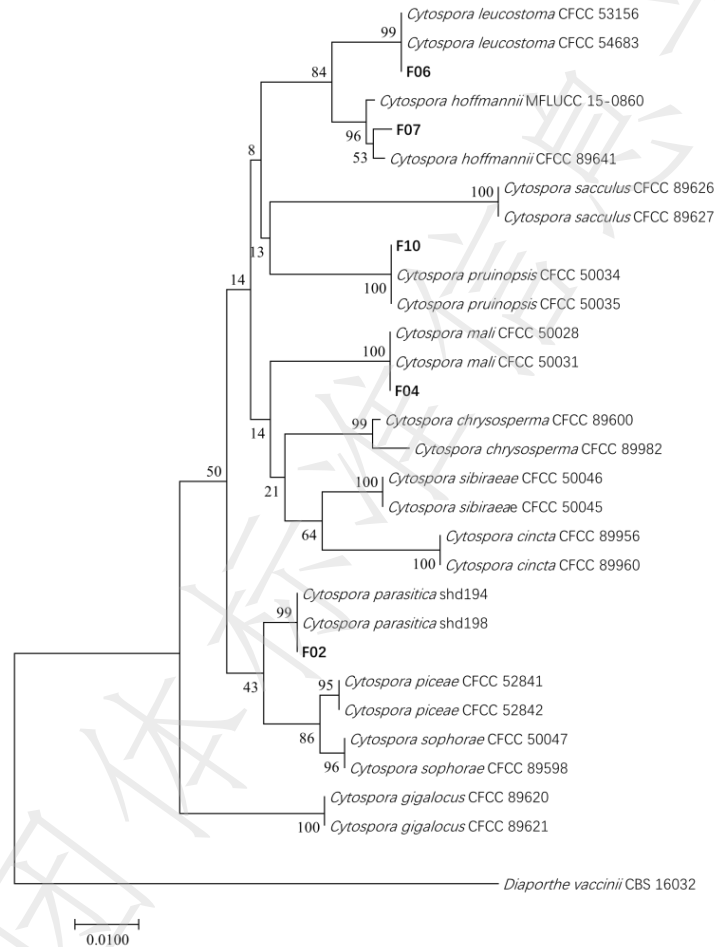


图 B.1 基于 ITS - ACT - TEF - TUB 序列联合构建系统发育树

参 考 文 献

- [1] 臧睿, 黄丽丽, 康振生, 王旭丽. 陕西苹果树腐烂病菌(*Cytospora* spp.)不同分离株的生物学特性与致病性研究[J]. 植物病理学报, 2007, (04): 343-351.
- [2] 傅立国. 中国植物红皮书[M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- [3] 何治政, 宋金艳, 尚巧霞, 周莹. 桃树上壳囊孢属真菌的生物学特性研究[J]. 北京农学院学报, 2025, 40(01): 25-30.
- [4] 李江舟, 王耀, 李元秀, 卓馨怡, 王子烜, 赵雪丽, 王美超, 侯义龙, 李晓艳. 苹果树腐烂病研究进展与展望[J]. 分子植物育种, 2019, 17(21): 7222-7227.
- [5] 刘爱华, 张新平, 温俊宝, 岳朝阳, 阿里木, 焦淑萍, 张静文, 克热曼. 天山野苹果林苹果小吉丁与苹果腐烂病复合危害研究[J]. 新疆农业科学, 2014, 51(12): 2240-2244.
- [6] 田呈明, 马荣. 新疆林木腐烂病菌图志[M]. 北京: 中国林业出版社, 2019.
- [7] 赵颖. 新疆苹果属植物上壳囊孢属真菌的种类及致病性研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2020.
- [8] Wang Z, Hao H T, Sha S S, Yan C C, Peng S S, Zhang X L, Feng H Z, Wang L. First report of *Valsa nivea* causing valsa canker on Korla Pear (*Pyrus sinkiangensis*) in the world[J]. Plant Disease, 2023, 107(8): 2534.
-