



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3753—2013

葡萄角斑叶焦病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Pseudopezicula tracheiphila* (Müller-Thurgau)

Korf et Zhuang

2013-11-06 发布

2014-06-01 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：中华人民共和国宁波出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人：段维军、郭立新、陈先锋、杜洪忠、张慧丽、顾建锋。

葡萄角斑叶焦病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了葡萄等寄主植物上的葡萄角斑叶焦病菌的形态学检疫鉴定方法。
本标准适用于葡萄角斑叶焦病菌的检疫鉴定。

2 葡萄角斑叶焦病菌基本信息

学名: *Pseudopeziza tracheiphila* (Müller-Thurgau) Korf et Zhuang (1986)

曾用名: *Pseudopeziza tracheiphila* Müll.-Thurg (1903)

无性型: *Phialophora tracheiphila* (Sacc. & D. Sacc.) Korf 1986

分类地位: 真菌界 (Fungi)、子囊菌门 (Ascomycota)、锤舌菌纲 (Leotiomycetes)、柔膜菌目 (Helotiales)、柔膜菌科 (Helotiaceae)、无柄盘菌属 (*Pseudopezicola*)。

传播途径: 病菌可随风、雨、昆虫和田间操作传播, 随感病叶片和果穗远距离传播。

该病菌的其他相关资料参见附录 A。

3 方法原理

以葡萄角斑叶焦病菌的培养性状和病原菌形态特征作为鉴定依据。

4 仪器设备和主要试剂

4.1 仪器设备

生物显微镜、超净工作台、高压灭菌器、生物培养箱、滤纸、手持放大镜、培养皿、烧杯、镊子、剪刀、载玻片、盖玻片、量筒、吸管、滤纸、酒精灯。

4.2 试剂

除另有规定外, 所有试剂均为分析纯。麦芽汁、琼脂、次氯酸钠、无菌水、氢氧化钾、三氯乙酸、碘化钾、碘、蒸馏水。

5 病菌的鉴定

5.1 症状检查

挑取病株, 进行观察。病害症状描述参见附录 A。

5.2 染色观察

5.2.1 染剂

梅瑞氏染剂 (Melzer's reagent): 称取三氯乙酸 100 g、碘化钾 5 g、碘 5 g, 加蒸馏水定容至 100 mL

后使用。

梅瑞氏染剂可直接滴加于玻片作为负载剂使用。

5.2.2 染色方法

挑取病叶,将坏死和健康交界处表现红色或黄色叶片用2%氢氧化钾液体煮沸2 min~3 min,将剪碎叶片放置在玻片上,盖上盖玻片,滴加梅瑞氏染剂后,在显微镜下镜检观察子囊和子囊孢子的有无。

5.3 病菌的分离培养

5.3.1 培养基

麦芽汁培养基(MEA):称取麦芽汁 25 g、琼脂 20 g,加热煮至琼脂完全溶化后,加蒸馏水补足 1 000 mL,121 °C 高压灭菌 20 min。

或选用市售麦芽汁培养基,高压灭菌后使用。

5.3.2 分离培养

将病健交界处剪成 1 mm²~2 mm² 的小块,将这些小块用 0.5%次氯酸钠溶液消毒 30 s 后,吸干水分,放置在 2.5%麦芽汁培养基平皿上,将平皿放置在 20 °C 培养箱中,每天 16 h 荧光照射,以诱发子囊孢子的产生。培养 10 d~15 d 后,观察并记录菌落特征。在显微镜下观察有性繁殖器官,如子囊盘、子囊、子囊孢子等形态特征。

6 鉴定特征

6.1 培养性状

葡萄角斑叶焦病菌的菌落正面白褐色,气生菌丝少,背面浅褐色,参见附录 B。

6.2 病原菌形态特征

子囊盘垫状,无柄,新鲜时直径可达 0.6 mm,裂出于叶部组织,大多生长在叶背面;子实层新鲜时白色,干燥时浅褐色。子实层平均厚度为 105 μm~130 μm。

子囊无囊盖,内有 8 个子囊孢子,子囊一端膨大成棍棒状,另一端渐细,用氢氧化钾进行前处理后再用梅瑞氏染剂对子囊顶端进行染色实验,可在顶端产生蓝色有顶环(J+),如果不用氢氧化钾进行前处理则无法看到蓝色有顶环,子囊大小为(115 μm~145 μm)×(18 μm~28 μm)。

子囊孢子椭圆形或一端扁平形,单核,透明无色,有油滴,(19.8 μm~25.7 μm)×(9.3 μm~14.0 μm)。侧丝丝状,有隔膜,透明,分枝且弯曲,或者在尖端略微变形,宽 2.2 μm~2.7 μm。

无性型 *Phialophora tracheiphila* 分生孢子椭圆形,透明,单细胞,其上有油滴,平均直径为(2.0 μm~3.7 μm)×(1.4 μm~1.9 μm)。分生孢子梗在形态上与营养菌丝有所不同,为烧瓶状单瓶梗,有时轻微弯曲。

葡萄角斑叶焦病菌与近似种病原形态图及其区别,参见附录 C 和附录 D。

7 结果判定

以分离物的培养特征和培养性状作为鉴定依据,进行综合判定。若以上特征与 6.1、6.2 鉴定特征符合,判定为葡萄角斑叶焦病菌。

8 样品保存与处理

样品经登记和经手人签字后妥善保管。对检出葡萄角斑叶焦病菌的样品应保存于 4℃ 冰箱中,以备复核。该类样品保存期满后应经高压灭菌后方可处理。

9 菌株保存与处理

将菌株转接在麦芽汁斜面上培养,待菌丝体长满斜面后,置于 4℃ 下保存,并定期(180 d)转管,标注分离物来源、寄主、分离时间和鉴定人。对不需要长期保存的菌株应及时高压灭菌处理。

10 结果记录与资料保存

妥善保管检验报告,包括症状、病菌、形态特征宏观以及微观图像等图文资料,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。

SN/T 3753—2013

附 录 A

(资料性附录)

葡萄角斑叶焦病菌的相关资料

A.1 地理分布

欧洲:俄罗斯、比利时、瑞士、德国、奥地利、法国、南斯拉夫(前)、罗马尼亚、乌克兰。

亚洲:土耳其、约旦。

北美洲:美国。

非洲:阿尔及利亚、突尼斯。

A.2 寄主范围

葡萄属(*Vitis* spp.)植物,包括甜冬葡萄(*Vitis cinerea*)、美洲葡萄(*Vitis labrusca*)、欧洲葡萄(*Vitis vinifera*)等。

A.3 病害症状

植株叶片受侵染后,初期受叶脉限制表现局部角斑状变色褪绿,形成红色或黄色斑块,随后受侵染部位开始坏死,晚秋季节受侵染叶片似雀斑状,可导致未成熟叶片落叶。病菌也可侵染花穗,造成干枯。果实不会直接受侵染。但是花梗和穗轴部分可能会被侵染,造成受侵染果实末梢干枯。



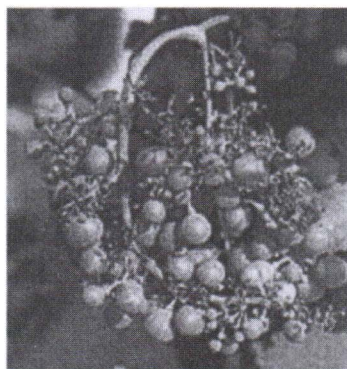
注:引自 W.Siegfried und O.Viret,1996。

图 A.1 葡萄角斑叶焦病菌侵染初期葡萄叶片表现症状



注：引自 W.Siegfried und O.Viret,1996。

图 A.2 葡萄角斑叶焦病菌侵染葡萄后期植株表现症状



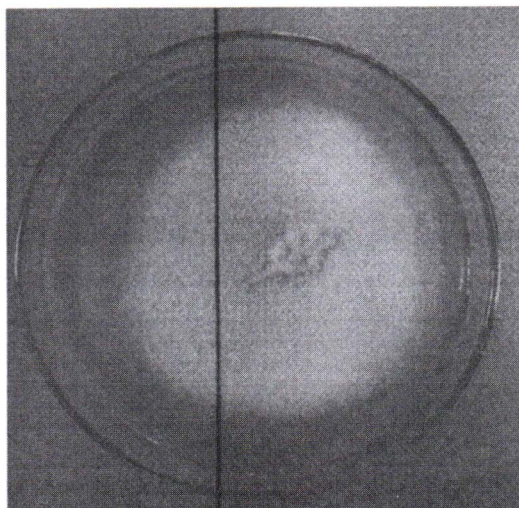
注：引自 W.Siegfried und O.Viret,1996。

图 A.3 葡萄角斑叶焦病菌侵染葡萄果穗表现症状

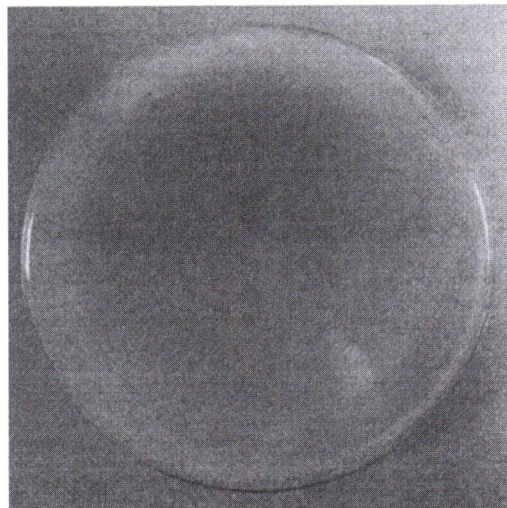
SN/T 3753—2013

附 录 B
(资料性附录)

葡萄角斑叶焦病菌的菌落形态特征



a) 麦芽汁培养基正面



b) 麦芽汁培养基反面

注: *Pseudopezizicula tracheiphila* 菌株来自 CBS 308.86, 段维军摄。

图 B.1 葡萄角斑叶焦病菌在麦芽汁培养基平板上的菌落形态特征

附 录 C
(资料性附录)

葡萄角斑叶焦病菌与近似种的比较

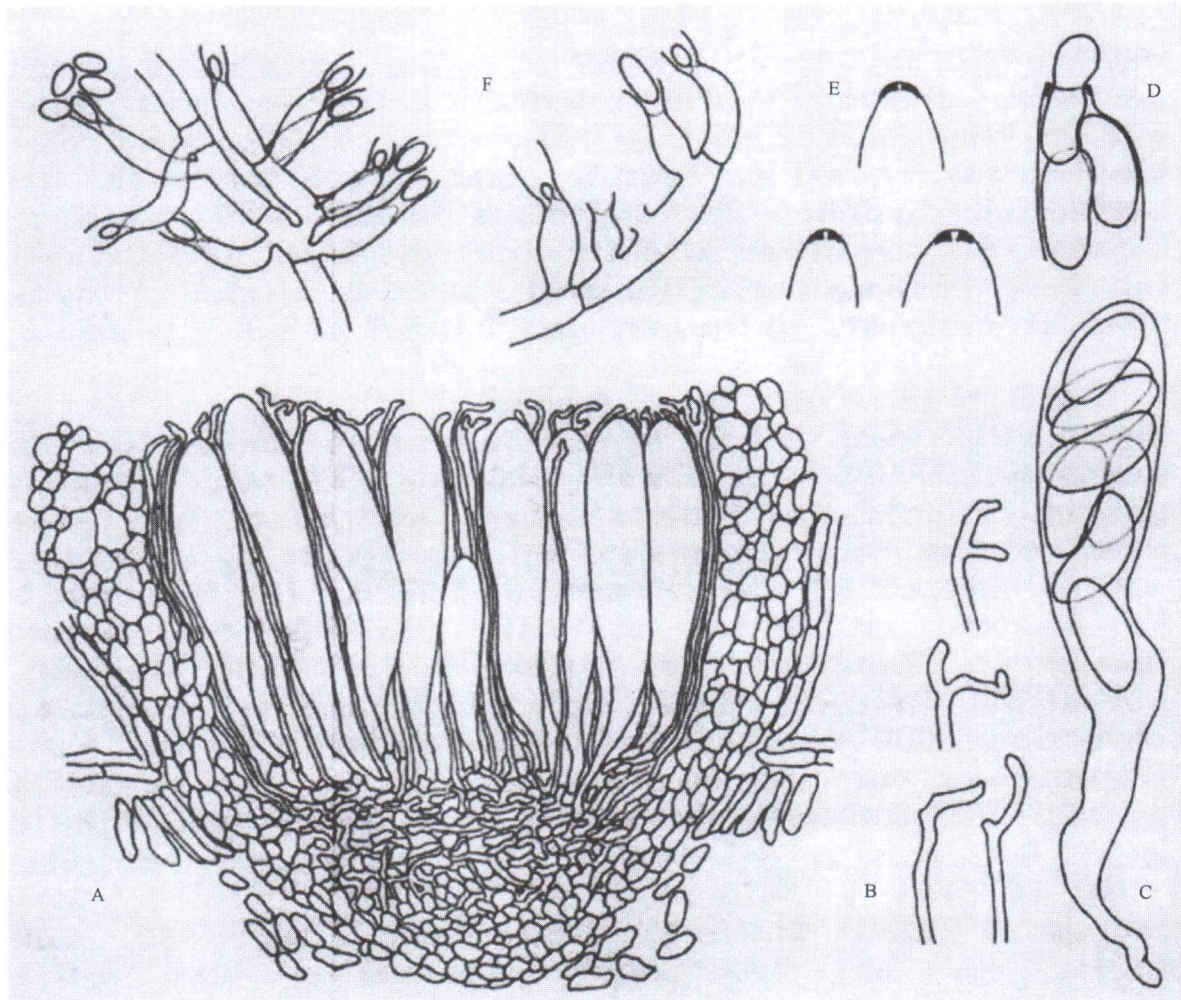
表 C.1 葡萄角斑叶焦病菌与近似种的比较

项 目	葡萄角斑叶焦病菌(八孢假无柄盘菌)	四孢假无柄盘菌
有性型	<i>Pseudopeziza tracheiphila</i>	<i>Pseudopeziza tetraspora</i>
无性型	<i>Phialophora tracheiphila</i>	<i>Phialophora</i> sp.(未定名)
无性型形态	分生孢子梗为烧瓶状单瓶梗,透明,有隔膜,较营养菌丝粗糙和短小。分生孢子椭圆形,透明,单细胞,内有油滴状物,平均直径为(2.0 μm~3.7 μm)×(1.4 μm~1.9 μm)	分生孢子梗与分生孢子形态与葡萄角斑叶焦病菌相似,分生孢子平均直径为(3.5 μm~5.5 μm)×(2.0 μm~2.3 μm)
有性型形态	子囊盘垫状,无柄,新鲜时直径可达0.6 mm;子囊无囊盖,具有 8 个子囊孢子,子囊一端膨大成棍棒状,另一端逐渐尖细,子囊大小为(115 μm~145 μm)×(18 μm~28 μm);子囊孢子椭圆形或一端扁平形,单核,透明无色,有油滴,(19.8 μm~25.7 μm)×(9.3 μm~14.0 μm)	子囊盘垫状,无柄,新鲜时直径可达0.1 mm~0.3 mm;子囊无囊盖,具有 4 个子囊孢子,子囊大小为(80 μm~100 μm)×(20 μm~22 μm);子囊孢子椭圆形或一端扁平形,双核,(24.2 μm~32.5 μm)×(11.0 μm~14.7 μm)

附录 D

(资料性附录)

葡萄角斑叶焦病菌与近似种的形态特征示意图



说明:

A ——子囊盘侧面观;

B ——4根侧丝顶部示意图;

C ——子囊和子囊孢子;

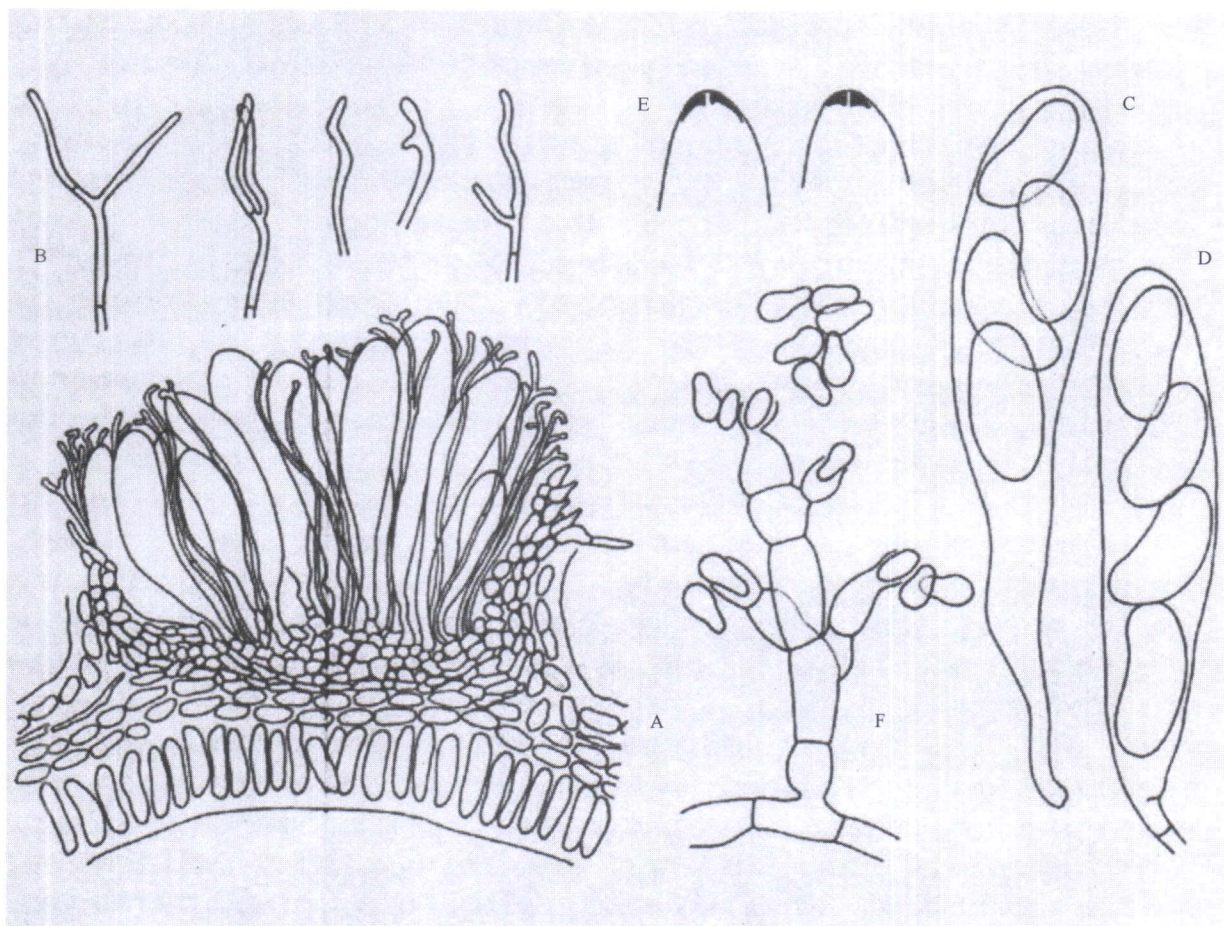
D ——子囊孔口和子囊孢子;

E ——用氢氧化钾进行前处理后再用梅瑞氏染剂对子囊顶端进行染色,3个子囊顶端均显示有蓝色环(J+);

F ——无性型 *Phialophora tracheiphila* 的培养形态示意图。

注: 引自 Korf, R.P., Pearson, R.C., Zhuang, W.Y. 和 Dubos, B. 1986. Mycotaxon。

图 D.1 葡萄角斑叶焦病菌形态特征示意图



说明：

A ——子囊盘侧面观；

B ——5根侧丝顶部示意图；

C、D——子囊和子囊孢子；

E ——用氢氧化钾进行前处理后再用梅瑞氏染剂对子囊顶端进行染色,2个子囊顶端均显示有蓝色环(J+)；

F ——无性型 *Phialophora* sp.的培养形态。

注：引自 Korf, R.P., Pearson, R.C., Zhuang, W.Y. 和 Dubos, B. 1986. Mycotaxon。

图 D.2 四孢假无柄盘菌形态特征示意图

参 考 文 献

- [1] Korf, R.P., Pearson, R.C., Zhuang, W.Y. and Dubos, B. *Pseudopezicula* (Helotiales, Pezizuloideae), a new discomycete genus for pathogens causing an angular leaf scorch disease of grapes ("Rotbrenner"). *Mycotaxon*, 1986, 26: 457-471.
- [2] Pearson, R.C., Siegfried, W., Bodmer, M. and Schüepp, H. Ascospore Discharge and Survival in *Pseudopezicula tracheiphila*, Causal Agent of Rotbrenner of Grape. *Journal of Phytopathology*, 1991, 132: 177-185.
- [3] Pearson, R.C., Smith, F.D. and Dubos, B. Angular Leaf Scorch, a New Disease of Grapevines in North America Caused by *Pseudopezicula tetraspora*. *Plant disease*, 1988, 72: 796-800.
-