



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3682—2013

葡萄茎枯病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Phoma glomerata* (Corda) Wollenw. & Hochapfel

2013-08-30 发布

2014-03-01 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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

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：中华人民共和国天津出入境检验检疫局、中华人民共和国宁波出入境检验检疫局、中华人民共和国新疆出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：贺艳、赵良娟、段维军、罗加凤、牛嘉慧、廖芳、赵卫东。

葡萄茎枯病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了葡萄茎枯病菌 [*Phoma glomerata* (Corda) Wollenw. & Hochapfel] 检疫鉴定的实验步骤、鉴定方法等。

本标准适用于葡萄茎枯病菌寄主植物种苗中葡萄茎枯病菌的检疫鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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。

SN/T 1126 进出境木材检疫规程

SN/T 1157 进出境植物苗木检疫规程

3 葡萄茎枯病菌的基本信息

学名: *Phoma glomerata* (Corda) Wollenweber & Hochapfel

异名: *Coniothyrium glomeratum* Corda

Phoma alternariacea Brooks & Searle

Aposphaeria fibricola (BERK.) SACC.

有性世代学名: *Leptosphaeria sacchari* Breda de Haan (尚未发现其有性型,但曾经有这个定名。)

中文名称: 葡萄茎枯病菌

分类地位: 子囊菌门 (Ascomycota), 子囊菌纲 (Ascomycetes), 粪壳菌亚纲 (Sordariomycetidae), 间座菌目 (Diaporthales), 黑座菌科 (Valsaceae), 茎点霉属 (*Phoma*)。

传播途径: 近距离传播方式为分生孢子随着风雨传播以及密植土壤中休眠的厚垣孢子。远距离传播方式为厚垣孢子随着种子、土壤和植物残渣传播。病菌在土壤中能够长期存活,当年收获遗留田间的植物残渣中的厚垣孢子等成为次年初侵染源。

葡萄茎枯病菌的其他信息参见附录 A。

4 原理

病原菌的培养性状和形态学特征 (见附录 B) 作为葡萄茎枯病菌的检疫鉴定的主要依据。

5 设备和试验用具

5.1 仪器设备

体视显微镜、生物显微镜、超净工作台、生物培养箱、电子天平 (感量 0.01 g)、高压灭菌锅。

5.2 试验用具

放大镜、灭菌培养皿、三角瓶、镊子、手术剪、手术刀、接种针、棉纱、解剖刀、酒精灯、标签、载玻片、盖玻片等。

6 试验和培养基

6.1 试剂

麦芽汁提取物、蔗糖、硝酸钠(NaNO_3)、硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、氯化钾(KCl)、硫酸铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、磷酸氢二钾(K_2HPO_4)、琼脂、链霉素、1.0%次氯酸钠(NaClO)、无菌水、酒精。

6.2 培养基

麦芽汁琼脂培养基、查氏培养基、查氏酵母膏琼脂(CYA)培养基(参见附录 C)。

7 抽样

来自疫区葡萄茎枯病菌寄主的原木或板材按 SN/T 1126 进行抽样。

来自疫区葡萄茎枯病菌寄主的苗木按 SN/T 1157 进行抽样。

8 检验方法

在葡萄上症状为枯萎,在苹果和小麦上为叶斑。实验室分离培养方法如下:

将可疑的病变组织,剪成 $0.4\text{ cm} \times 0.4\text{ cm}$ 小片,在 1.0%的次氯酸钠溶液中消毒 5 min,灭菌水冲洗 3 次,灭菌滤纸吸干水分后,置于麦芽汁选择性培养基平板上,每皿放置 3~4 片,24 °C 培养,3 d 后开始观察。解剖镜下发现有菌丝长出,立即挑取菌落边缘菌丝,转入麦芽汁选择性培养基上纯化培养。7 d 后用显微镜观察,记录其形态特征,并测定病菌生长速度、分生孢子长度和宽度等。继续在选择性培养基上培养,13 h 近紫外等照射 11 h 黑暗条件培养至 10 d,产生厚垣孢子后测量其大小。葡萄茎枯病菌适宜生长温度为 24 °C,暗培养一个星期的菌落直径为 5 cm~7.5 cm。

9 鉴定特征

9.1 病原菌培养性状

菌落的特征为轻微耸立的菌丝体。菌落颜色为浅褐色,菌丝垫颜色逐渐变暗(砖格状厚垣孢子逐渐增多)。

在 25 °C 下,在 PDA 和 MEA 上日生长速度为 1 cm/d 左右,在 OA 上生长速度略慢,为 0.75 cm/d。在 PDA、MEA、OA 上菌落均仅有轻微耸立的菌丝体,气生菌丝少稀薄,PDA 上菌丝较 MEA 和 OA 上多。在 3 种培养基上,菌落边缘颜色均为白色,较浅,菌落中部颜色有所不同(在 PDA 上,正面/反面:灰褐/灰黑;在 MEA 上,正面/反面:红褐/褐色;在 OA 上,正面/反面:灰黑/灰黑,有大量黑色状小点为病菌分生孢子器)(见附录 B)。在培养早期以产生大量分生孢子器为主,但在 3 种培养基上培养 5 d 后均未观察到厚垣孢子产生,培养后期可产生大量厚垣孢子。

9.2 病原菌形态特征

菌落上形成大量的分生孢子器,直径 $50\text{ }\mu\text{m} \sim 300\text{ }\mu\text{m}$,分生孢子器上形成浅玫瑰红色分生孢子液。分生孢子器通常为规则的球形,但偶尔也会形成长茎状物。小的分生孢子器会形成于砖格状厚垣孢子链之间。分生孢子器壁为拟薄壁组织。分生孢子通常为单细胞,无色透明,椭圆形至近圆柱形,直的或

向内稍弯曲,有油球(1~3个),多为2个, $3.3\text{ }\mu\text{m}\sim 6.15\text{ }\mu\text{m}(5.09)\times 1.91\text{ }\mu\text{m}\sim 3.14(2.67)\text{ }\mu\text{m}$ 。

该种最典型的特征是产生与链格孢属(*Alternaria*)真菌分生孢子相似的砖格状厚垣孢子,通常形成于分生孢子器或伸出的菌丝,形成分枝或不分枝的孢子链。厚垣孢子为砖格状, $18\text{ }\mu\text{m}\sim 48\text{ }\mu\text{m}(35.2)\times 7.4\text{ }\mu\text{m}\sim 18.7(13.8)\text{ }\mu\text{m}$ 。有时孢子链在培养基上是丛生的。葡萄茎枯病菌的砖格状厚垣孢子不脱落。孢子链上相邻的两个厚垣孢子断开后形成粗糙的边缘。砖格状厚垣孢子有一层外壁,能够与组成孢子的细胞壁区分开。显微镜下镜检观察脱落厚垣孢子较少,大多连接在一起。

该病菌有性阶段至今尚未发现,病原菌的鉴定根据该病原菌的无性阶段形态特征。

10 结果判定

病原菌培养性状和形态特征分别符合 9.1 和 9.2 中的描述,即可鉴定为葡萄茎枯病菌。

11 菌株保存与处理

分离并最终鉴定为葡萄茎枯病菌的菌株应转入 PDA 培养基斜面上,存活后经登记和经手人签字,置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下保存,定期(60 d)转接,以防止病原菌死亡,至少保存 6 个月,必要时用病原菌分生孢子作冻干菌种保存。保存期满后高压灭菌灭活处理。

SN/T 3682—2013

附 录 A
(资料性附录)
葡萄茎枯病菌基本信息

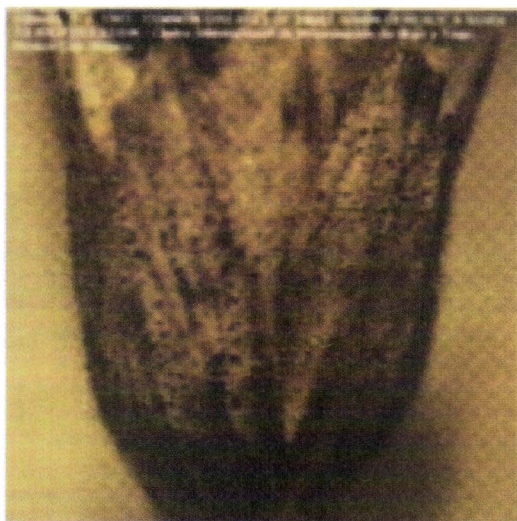
A.1 寄主

葡萄科(*Vitaceae* Lindley)、苹果属(*Malus* Mill.)、小麦(*Triticum aestivum* L.)、燕麦属(*Avena* Linn.)、马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)、甘蔗属(*Saccharum* Linn.)、蚕豆(*Vicia faba*)、柑橘属(*Citrus* L.)、橄榄属(*Canarium* L.)、花旗松[*Pseudotsuga menziesii* (Mirbel) Franco]、大豆[*Glycine max* (Linn.) Merr.]、桃属(*Amygdalus* L.)、番石榴(*Psidium guajava* L.)、杏(*Armeniaca vulgaris* L.)、杨属(*Populus* L.)、苜蓿属(*Medicago* Linn.)、棕榈属(*Trachycarpus* H. Wendland)、蓝花楹属(*Jacaranda* Juss.)、荔枝属(*Litchi* Sonn.)、玫瑰(*Rosa rugosa* Thunb.)、檀香属(*Santalum* L.)、橡皮树(*Ficus elastica*)

A.2 地理分布

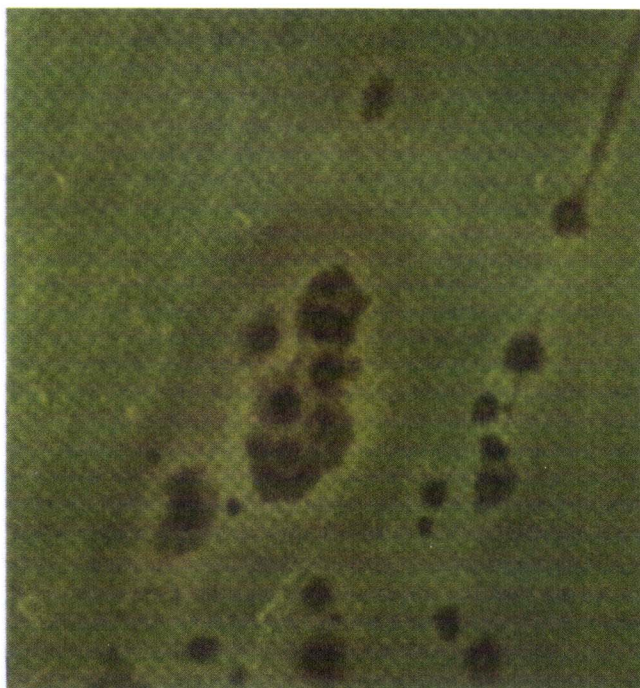
主要分布于意大利、希腊、瑞典、印度、澳大利亚、以色列、秘鲁、匈牙利、美国、加纳、南非、伊朗。

附 录 B
(规范性附录)
葡萄茎枯病菌症状和形态特征



注：(引自 Scholefield)。

图 B.1 小麦穗表面的葡萄茎枯病菌的分生孢子器



注：(引自 Aghapour 2009)。

图 B.2 葡萄茎枯病菌在橡皮树(*Ficus elastica*)上形成的叶斑病

SN/T 3682—2013

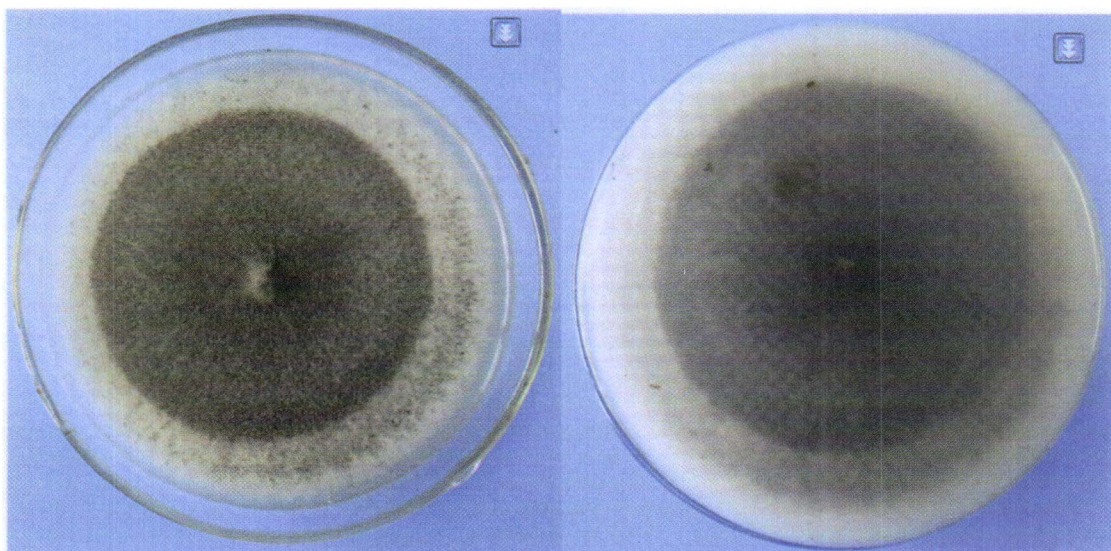


图 B.3 葡萄茎枯病菌在 PDA 培养基的培养性状(左边为正面,右边为背面)

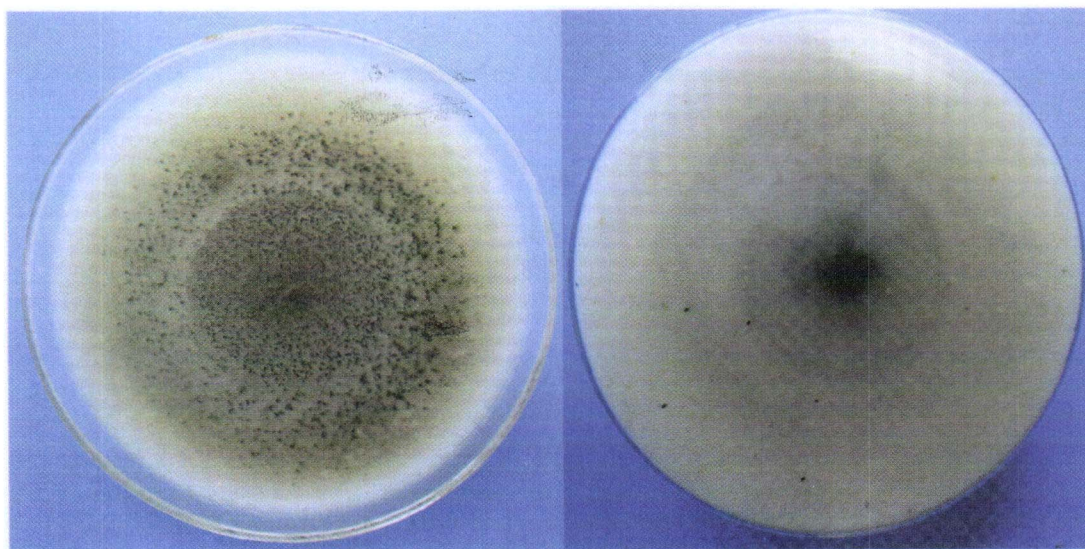


图 B.4 葡萄茎枯病菌在 OA 培养基的培养性状(左边为正面,右边为背面)

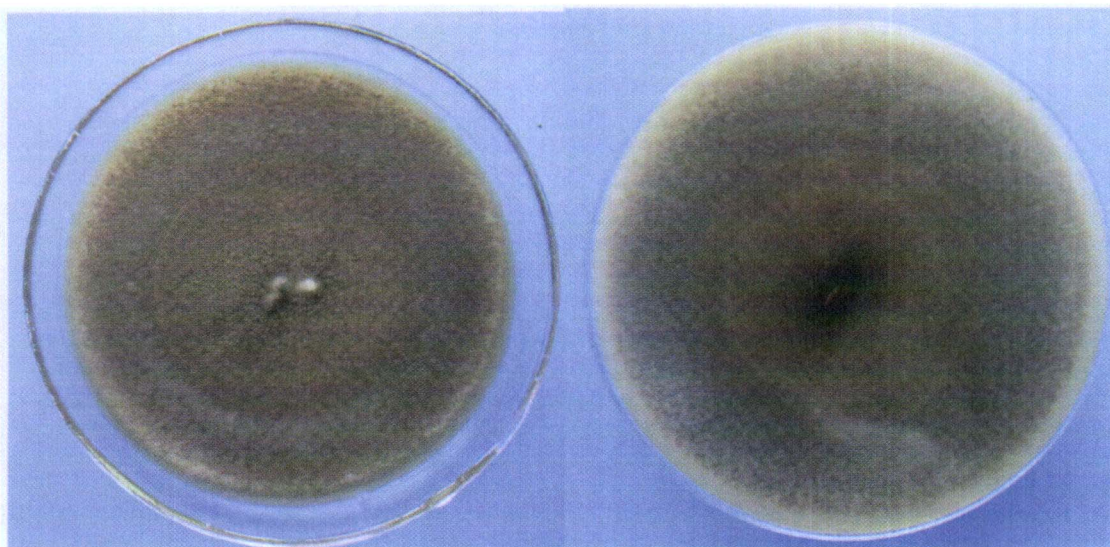
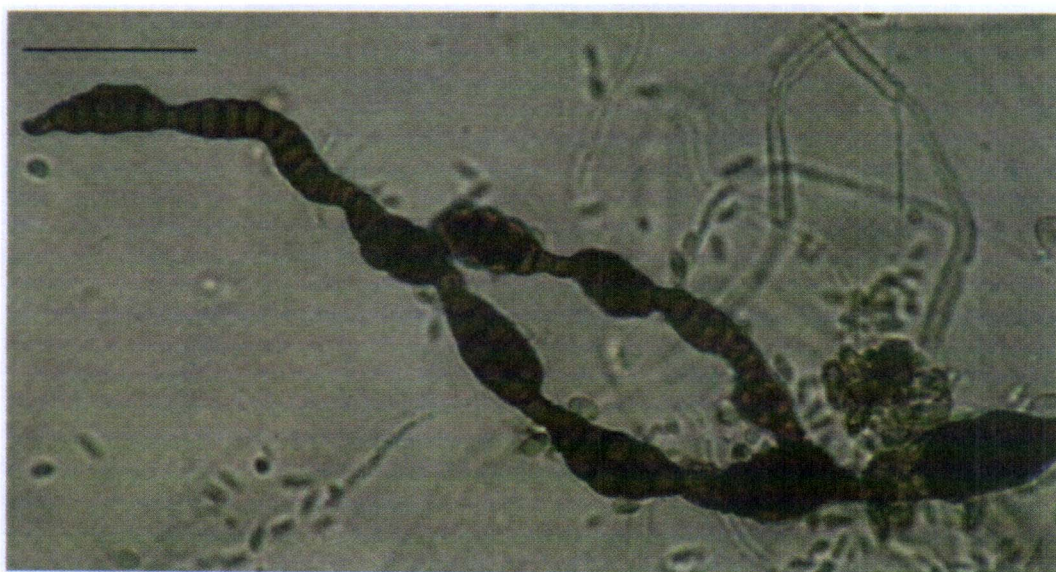
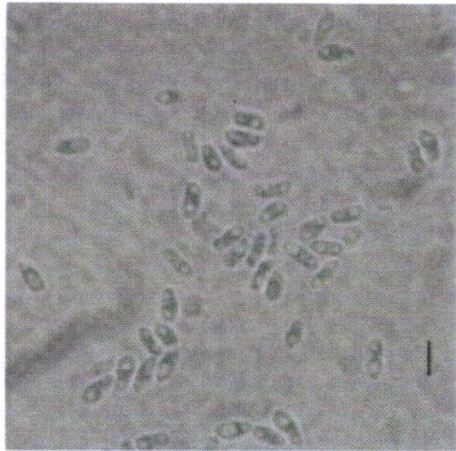


图 B.5 葡萄茎枯病菌在 MEA 培养基的培养性状(左边为正面,右边为背面)



注：(引自 Aghapour 2009)。

图 B.6 葡萄茎枯病菌在 PDA 培养基上形成的具网格的厚垣孢子(标尺 = 30 μm)



注：(引自 Aghapour 2009)。

图 B.7 葡萄茎枯病菌在水琼脂培养基上形成的分生孢子(标尺为 5 μm)



注：(引自 Aghapour 2009)。

图 B.8 葡萄茎枯病菌在水琼脂培养基上形成的分生孢子器(标尺为 50 μm)

附 录 C
(资料性附录)
培养基的配方和配制方法

C.1 麦芽汁琼脂培养基(OA)(pH 6.5)成分

麦芽汁提取物(Difco 0024)	30 g
琼脂(Difco 0140)	15 g
蒸馏水	定容至 1 000 mL,调 pH 至 6.5 ± 0.2

C.2 PDA 培养基

马铃薯	200 g
葡萄糖	20 g
琼脂	18 g
链霉素	0.3 g
蒸馏水	1 000 mL

C.3 MEA 培养基

麦芽汁提取物(Difco 0024)	30 g
大豆蛋白胨	3 g
琼脂(Difco 0140)	15 g
蒸馏水	定容至 1 000 mL,调 pH 至 5.6 ± 0.2

C.4 配制方法

按照配方准确称量,加入少量水,加热使之完全溶解,用蒸馏水定容至 1 000 mL,调节 pH 值,混匀后分装于三角瓶中,121 ℃高压灭菌 15 min。培养基冷却至不烫手时无菌操作下添加链霉素并混匀,将大约 15 mL 的培养基倒入无菌平板中,静置备用。该配制方法适用于上述 3 种培养基的配制。

参 考 文 献

- [1] Crop Protection Compendium 2007 Edition(ISSN:1365-9065,ISBN:978-1-84593-357-9).
 - [2] CAB Abstracts,1973-1998.Data mined from CAB Abstracts database,years 1973 to 1998.
Wallingford,UK:CAB International.
 - [3] George M.Luedemann,The Dictyochlamydospore of *Peyronellaea Glomerata*(Corda)Goidanich
exTogliani Contrasted With the Dictyoporospore of *Alternaria Tenuis* Auct.Mycologia,1959,51(6):
772-780.
 - [4] G. H. Boerema, Maria M. J. Dorenbosch, The *Phoma* and *Ascochyta* species described by
Wollenweber and Hochapfel in their study on fruit-rotting, Mycology, 1973, 15(3).
 - [5] G. H. Boerema, M. J. Dorenbosch, H. A. Vesteren, Remarks on Species of *Phoma* Referred to
Peyronellaea, V, Kew Bulletin 1977, 31(3): 533-544.
 - [6] John Michael McPartland, Robert Connell Clarke, Hemp diseases and pests: management
and biological control.
 - [7] Scholefield Robinson Horticultural Services Pty Ltd.
 - [8] R. M. Hosford, Jr., *Phoma glomerata*, a New Pathogen of Wheat and Triticales, Cultivar
Resistance Related to Wet Period, Phytopathology, 1975, 65: 1236-1239.
 - [9] Raymond F. Sullivan and James F White, Jr. *Phoma glomerata* as a Mycoparasite of
Powdery Mildew, Appl Environ Microbiol. 2000 January, 66(1): 425-427.
 - [10] B. Aghapour, K. B. Fotouhifar, A. Ahmadpour et. al, First report of leaf spot disease on *Ficus*
elastica caused by *Phoma glomerata* in Iran, Australasian Plant Disease Notes, 2009, 4, 82-83.
-