

杨树叶枯病诊断技术规程

Technical regulations for the diagnosis of poplar leaf blight

(初稿)

2024 - XX - XX 发布

2024 - XX - XX 实施

目 次

前 言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 诊断准备 2

5 杨树叶枯病害诊断 2

6 病害判定 3

附 录 A 4

附 录 B 5

附 录 C 7

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。

本文件由辽宁省林业和草原局提出并归口。

本文件起草单位：辽宁省杨树研究所。

本文件主要起草人：冯连荣，王诗琦，张妍，矫丽曼，刘巍，宋立志，王乃锐，计家宝，李文颖，尹杰、赵鑫闻

本文件发布实施后，任何单位和个人如有问题和意见建议，均可以通过来电和来函等方式进行反馈，我们将及时答复并认真处理，根据实际情况依法进行评估及复审。

归口管理部门通讯地址：辽宁省林业和草原局（辽宁省沈阳市和平区太原北街2号），联系电话：024-23448927。

标准文件起草单位通讯地址：辽宁省杨树研究所（辽宁省盖州市团山镇任屯村），联系电话：0417-7555835。

杨树叶枯病诊断技术规程

1 范围

本文件规定了杨树叶枯病田间诊断及室内技术要求。
本文件适用于辽宁省杨树叶枯病的室内及田间诊断。

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。

GB/T 15161 林业资源分类与代码 林木病害
GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
LY/T 3101 林业有害生物代码

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

杨树叶枯病（poplar leaf blight）

由链格孢菌（*Alternaria alternata*）引起的一种杨树叶部真菌病害。

3.2

链格孢菌（*Alternaria alternata*）

链格孢菌属真菌界子囊菌门（Ascomycota）、座囊菌纲（Dothideo-mycetes）、格孢腔菌目（Pleosporales）、格孢腔菌科（Pleosporaceae），一种典型的腐生性病原真菌，其寄主广泛，可以引起瓜果采后腐烂病、花卉花枯病、中草药及林木等的叶斑病和叶枯病。

3.3

柯赫氏法则（Koch's Rule）

柯赫氏法则又称柯赫氏假设或柯赫氏证病律，是确定侵染性病害病原物的操作程序，主要包括共存性观察、分离、接种和再分离。

在病植物上常伴随有一种病原微生物存在，该微生物可在离体的或人工培养基上分离纯化而得到纯培养，将纯培养接种到相同品种的健康植株上，引起症状相同的病害，从接种发病的植物上再度进行分离到其纯培养，性状与接种物相同。经上述步骤并得到确实的证明，就可以确认该生物即为该病害的病原物。

4 诊断准备

4.1 仪器设备

超净工作台、显微镜、高压灭菌锅、生化培养箱、冰箱、分析天平、电磁炉、不锈钢锅（2 L~4 L）。

4.2 诊断用具

解剖剪、镊子、接种针、载玻片、盖玻片、酒精灯、培养皿、量杯（1 L）、量筒（1 L）、锥形瓶（150 mL）、药匙、自封袋、记号笔、称量纸、酒精棉球、喷壶、封口膜。

4.3 试剂

0.1% 氯化汞（HgCl₂）、75% 酒精、95% 酒精、无菌水（GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法）。

4.4 培养基

马铃薯蔗糖培养基（PDA）：配置方法详见附录A。

5 杨树叶枯病害诊断

5.1 诊断时间

7月上旬至9月中下旬。

5.2 田间诊断

调查有疑似症状的叶片，依据出现典型症状的病状和病症，杨树叶枯病症状见附录B。

5.3 病原物分离培养

5.3.1 病害样本采集

采集疑似病害样品，对其症状特点描述记载，装入自封袋内，做好标记，带回实验室内于4℃冰箱内暂存。

5.3.2 分离培养

采用常规组织分离法进行病原物分离。采集带有典型病斑的病叶，于超净工作台中首先用无菌水清洗病叶3遍，然后经75%酒精消毒2 min，无菌水漂洗3次，再用0.1% HgCl₂消毒2 min，无菌水漂洗3次，剪取病健交界处叶片组织约0.5 cm×0.5 cm接种至马铃薯蔗糖琼脂（PDA）固体平板培养基中，置于25℃生化培养箱中进行培养，待菌落直径达到2 cm左右时，挑取菌落边缘菌丝进行转接、纯化，并于4℃冰箱保存备用。

5.4 致病性测定

根据柯赫氏法则，以菌丝块作为接种材料进行致病性测定。4℃冰箱中保存的菌株接种于PDA平板培养基上，25℃培养7d，用直径为6 mm的打孔器在菌落边缘打取菌饼。选择健康的一年生杨树盆栽苗中上部叶片，叶片表面用75%酒精擦拭消毒后，将菌饼放置在主脉两侧叶片上，每侧放置一个菌饼菌丝面朝下，对照处理接种PDA培养基块，用蘸有无菌水的脱脂棉覆盖后用保鲜膜包好固定保湿，25℃条

件下培养，观察叶片发病情况。叶片发病后，从发病部位进行再次分离，叶片症状与B.1规定一致，获得病原物形态与B.2规定一致，确定分离物为致病菌。

5.5 病原物镜检

5.5.1 病害样本的镜检

选取疑似病害植物组织病健交界处组织，制作徒手切片并进行镜检，观察病原特征菌丝体和分生孢子特征。

5.5.2 病原物纯培养镜检

采用玻片培养法对分离的菌种进行菌丝和孢子形态观察。将分离菌种平板用打孔器（直径6 mm）打取菌饼，接种在培养皿中心位置，将无菌的盖玻片斜插到平板中约呈45°，待菌丝长到盖玻片中央时，用镊子轻轻将盖玻片抽出，盖玻片中有菌丝的一面朝上，用OLYMPUS BX 51显微镜镜检，观察菌丝及孢子形态并拍照。

病菌形态描述见附录B。

5.6 病原菌分子鉴定

4℃冰箱中保存的菌株接种于PDA平板培养基上，25℃培养7 d，无菌刀片刮取平板菌丝约0.1 g，用TIANGEN 快捷型植物基因组DNA提取系统（非离心柱型）进行DNA提取试剂盒提取菌丝总DNA，利用PCR（聚合酶链式反应）技术扩增链格孢菌ITS特异片段并进行测序鉴定。引物序列、反应体系及反应程序附录C。

6 病害判定

6.1 田间观测判定

通过田间观测，杨树出现附录B.1表述症状时，可初步诊断为叶枯病。

6.2 显微镜观察判定

按照5.5.1、5.5.2镜检观察，发现与B.2描述症状一致时，样品可判定为杨树叶枯病。

6.3 接种观察判定

当按照5.4接种后杨树出现B.1描述症状，且按5.5.1、5.5.2镜检观察与B.2一致时，可判定为杨树叶枯病。

6.4 测序结果判定

测序结果登录NCBI进行BLAST比对，序列相似性 $\geq 99\%$ ，可以鉴别为相同种，确定菌种为链格孢菌，可判定为杨树叶枯病病原菌。

附 录 A

(资料性)

马铃薯蔗糖培养基成分及配制方法

A.1 培养基成分及含量

新鲜去皮马铃薯200 g、蔗糖20 g、琼脂20 g、水1000 mL。

A.2 配制方法

新鲜马铃薯去皮，洗净后称取200 g,切成约1 cm³的小块，放入1000 mL水中，煮沸10 min~20min。用8层纱布进行过滤，然后补水至1000 mL，加入称好的蔗糖20 g、琼脂20 g,不断搅拌至琼脂完全溶化，停止加热。培养基分装于锥形瓶中，封口并加注标记，置于高压灭菌锅中，121℃灭菌20 min，备用。

附 录 B
(资料性)

杨树叶枯病症状及病菌形态描述

B. 1 病名和症状描述

B. 1. 1 病名

杨树叶枯病 (poplar leaf blight)。

B. 1. 2 症状描述

杨树叶枯病是一种由链格孢菌引起的发生较为普遍的真菌病害，主要危害叶片，同时还可危害幼树的嫩梢，使之发生枯梢病。危害叶片时，发病初期，感病叶片上产生隐约可见的褐色斑，以后病斑逐渐扩大，病斑黄色，中央褐色；发病后期，病斑上产生黑褐色霉状物，为病原菌的分生孢子梗和分生孢子，病斑可相互联成大片，严重时导致全叶枯死。杨树叶枯病症状见图A.1。



图 B. 1 杨树叶枯病症状

B. 2 病原菌和形态描述

B. 2. 1 病原菌

杨树叶枯病病原菌为链格孢菌 (*Alternaria alternata* (Fr.) Keissl)。

B. 2. 2 形态描述

链格孢菌在PDA培养基上25℃培养24 h长出白色气生菌丝，培养7 d左右菌落直径可达7~9 cm,生长速度快，菌落平展，近圆形，绒毛状,厚实,菌落边缘整齐为白色环带，中央稍隆起。初时菌落灰白色，后颜色变为深色,橄榄绿色，可产生色素，背面蓝黑色至黑色，有同心轮纹。链格孢菌菌落特征见图A.2。菌丝单生或有分枝，有隔，有索状联合。分生孢子梗直立或弯曲，分生孢子梗淡褐色，分生孢子淡黄褐色至深褐色，倒棒状、倒梨形、卵形、近卵形或椭圆形，脐部明显。具有若干横、纵隔膜，分隔处平滑或缢缩，大小 9.9~70 μm× 7.2~16.3 μm。链格孢菌菌丝及分生孢子特征见图A.3。

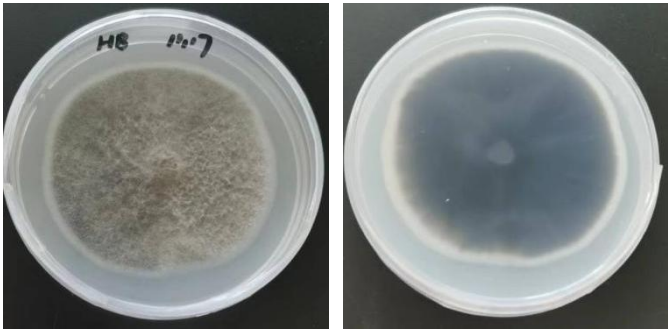


图 B.2 链格孢菌菌落特征



图 B.3 链格孢菌菌丝及分生孢子特征

附 录 C
(资料性)

链格孢菌分子鉴定

C.1 鉴定方法

利用核糖体DNA内部转录间区(internal transcribed spacer, ITS)进行PCR鉴定。

C.1.1 引物

采用真菌通用引物ITS1/ITS4进行PCR鉴定，引物序列及扩增产物长度见附表B.1。

表 C.1 引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')	扩增产物 长度(bp)
ITS1	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	600-700
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

C.1.2 反应体系

PCR反应体系 (25 μL)：10×PCR Buffer 2.5 μL、dNTP (2.5 mmol/L) 2.0μL、上游引物 (10 μmol/L) 0.5 μL、下游引物 (10 μmol/L) 0.5 μL、模板1.0 μL、*Ex Taq*酶0.25 μL、ddH₂O 补足反应体系至25 μL。

C.1.3 反应程序

94 °C预变性3 min、94 °C变性 30s、53 °C退火30 s、72 °C延伸45 s，30个循环，72 °C延伸10 min，4 °C终止。
反应结束后对扩增出目的条带的PCR产物进行测序。