



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3679—2013

咖啡浆果炭疽病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Colletotrichum kahawae* J.M.Waller et Bridge

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。

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：中华人民共和国珠海出入境检验检疫局、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、华南农业大学。

本标准主要起草人：彭仁、程颖慧、李敏慧、习平根、张卫东、廖力、黎财慧、乐海洋、吴长坤、张建军、冯欣、石振。

咖啡浆果炭疽病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了咖啡种子及无性繁殖材料上的咖啡浆果炭疽病菌的检疫鉴定方法。
本标准适用于咖啡浆果炭疽病菌的检疫鉴定。

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 1809 进出境植物种子检疫规程

SN/T 2122 进出境植物及植物产品检疫抽样

3 咖啡浆果炭疽病菌基本信息

学名:*Colletotrichum kahawae* J.M.Waller et Bridge

异名:*Colletotrichum coffeanum* var.*virulans*

分类地位:真菌界(Fungi),无性型真菌(Anamorphic fungi),炭疽菌属(*Colletotrichum*)。

传播途径:咖啡浆果炭疽病菌可以通过寄主植物的花、叶、枝条、果实以及种子带菌传播。

其他信息参见附录 A。

4 方法原理

根据症状检查、保湿培养、分离培养、分生孢子萌发试验、碳源代谢试验等方法对病原菌进行鉴定。

5 仪器和用具

5.1 仪器

体视显微镜、光学显微镜(带显微照相装置)、测微尺、天平(感量 0.1 g)、超净工作台、光照培养箱等。

5.2 用具

手持放大镜、滤纸、烧杯、培养皿、三角瓶、镊子、剪刀、载玻片、盖玻片、量筒、酒精灯、吸管等。

6 试剂和培养基

6.1 试剂

琼脂、麦芽糖、1.25%次氯酸钠、70%乙醇、糊精、蛋白胨、丙三醇、柠檬酸、酒石酸铵、溴甲酚紫、氢氧

化钠、磷酸二氢铵、氯化钾、硫酸镁等。

6.2 培养基

麦芽浸粉琼脂培养基(Malt Extract Agar, MEA), 马铃薯琼脂培养基(Potato Dextrose Agar, PDA), 水琼脂培养基(Water Agar, WA), 各培养基配方参见附录 B。

7 现场检疫

按照 SN/T 1809 及 SN/T 2122 的规定结合症状检查进行抽样, 重点检查花、叶、枝条、果实等, 咖啡浆果炭疽病菌侵染后会产生黄褐色凹陷病斑或坏疽状病斑等, 详细症状参见附录 A。抽取代表性样品送实验室检验。

8 病原菌鉴定

8.1 症状检查

对于有病征出现的病部, 用解剖针挑取或用刀片刮取病组织表面的小黑点或分生孢子团制片, 置于显微镜下镜检。

8.2 保湿培养

无上述明显症状或看似健康的寄主组织材料, 进行保湿培养。将寄主组织材料充分湿润后, 置于垫有 3 层湿滤纸的塑料盒或袋中, 在 25 ℃、密闭条件下培养, 观察症状的变化, 进行显微镜检及病原菌的分离培养。药剂处理过的种子需先洗去表面的种衣剂, 再按照上述方法保湿培养。

8.3 分离培养

直接挑取病部的分生孢子盘或分生孢子团置于 PDA 平板上; 或采用组织分离培养法, 取新鲜病组织, 冲洗掉表面的泥土杂物后, 用剪刀或解剖刀切取病健交界处组织, 切成 5 mm 见方小块, 用 70% 的酒精溶液浸泡 30 s, 经灭菌水洗涤后, 移至 PDA 平板上, 每皿 5~10 片, 在 25 ℃、黑暗条件下培养; 对种子样品可先将种子切开, 用有效成分为 1.25% 的次氯酸钠溶液表面灭菌 3 min~4 min 后, 用灭菌水洗涤两次, 移至 PDA 平板上, 每皿 4~5 粒, 进行分离培养。待上述分离培养长出菌丝后纯化再转至 MEA 培养基上培养 7 d~14 d, 观察其纯培养性状及病菌形态学特征。

8.4 分生孢子萌发试验

直接挑取病组织产生的分生孢子团, 或取少许培养产生的新鲜分生孢子用无菌水配成孢子悬浮液。将融化的 1% 水琼脂培养基滴一滴于经灭菌的载片上, 并迅速让其展开, 再滴孢子悬浮液于展开的水琼脂上, 置培养皿中保湿, 温度控制在 25 ℃、黑暗条件下培养 24 h 后, 在显微镜下检查分生孢子萌发产生附着胞的情况。

8.5 碳源代谢试验

利用柠檬酸盐或酒石酸盐作为唯一碳源进行试验, 具体方法参见附录 C。

9 鉴定特征

9.1 病菌形态

分生孢子无色单胞, 圆柱形或卵圆形, 顶端钝圆, 基部钝圆或稍尖, $(12.5\ \mu\text{m}\sim 19\ \mu\text{m})\times 4\ \mu\text{m}$; 有部

分较大型分生孢子大小为 $20\ \mu\text{m} \times 6\ \mu\text{m}$ 。附着胞较丰富,灰白色至黑褐色,圆形或稍不规则, $(8.0\ \mu\text{m} \sim 9.5\ \mu\text{m}) \times (5.5\ \mu\text{m} \sim 6.5\ \mu\text{m})$ 。

9.2 病菌培养性状

病菌在 $25\ ^\circ\text{C}$ 、MEA 培养基上培养 7 d 后的菌落直径为 $14\ \text{mm} \sim 28\ \text{mm}$,气生菌丝体稀疏至茂密,绒毛状,菌落颜色通常初期为灰白至深橄榄色,培养皿背面为暗绿色,后期颜色多变,通常为灰白或褐色。不产生分生孢子盘,分生孢子直接从菌丝上产生。

9.3 碳源代谢

病原菌 *Colletotrichum kahawae* 均不能利用柠檬酸盐或酒石酸盐作为唯一碳源,而咖啡上与其形态特征相似的炭疽菌至少能利用其中的一种作为唯一碳源。

9.4 与近似种的区别

咖啡浆果炭疽病菌 (*Colletotrichum kahawae*) 在咖啡上的近似种主要是胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 和尖孢炭疽菌 (*Colletotrichum acutatum*),三者之间的区别包括培养性状、形态特征、碳源代谢、寄主范围等方面,具体参见附录 D。

10 结果判定

以分离物的培养特征、培养性状、碳源代谢试验结果作为鉴定依据,进行综合判定。若以上特征与 9.1、9.2、9.3 鉴定特征相符合,判定为咖啡浆果炭疽病菌。

11 样品保存

发现带有咖啡浆果炭疽病菌的样品至少保存 6 个月,以备复验、谈判和仲裁。保存期满后,需经灭菌后方可处理。

12 菌种保存

分离到的咖啡浆果炭疽病菌菌种,转入 MEA 试管斜面培养基上,置于 $4\ ^\circ\text{C}$ 黑暗条件下保存至少 12 个月,以备复验、谈判和仲裁。

13 实验记录与保存

实验记录包括样品的来源、种类、时间,实验的时间、地点、方法和结果等,并要有实验人员和审核人员签字。

SN/T 3679—2013

附 录 A (资料性附录)

咖啡浆果炭疽病菌其他相关信息

A.1 名称及分类地位

中文名称:咖啡浆果炭疽病菌、咖啡刺盘孢致病变种、咖啡刺盘孢毒性变种

英文名称: pathogen of coffee berry disease、anthracnose pathogen of coffee、brown blight pathogen of coffee

英文缩写: CBD pathogen

分类地位: 根据《菌物字典》第 10 版(2008)的菌物新分类系统,咖啡浆果炭疽病菌属于真菌界(Fungi),无性型真菌(Anamorphic fungi),炭疽菌属(*Colletotrichum*)。该真菌的有性态暂未发现。

A.2 分布

安哥拉、布隆迪、喀麦隆、中非、刚果(布)、刚果(金)、埃塞俄比亚、肯尼亚、马拉维、莫桑比克、卢旺达、坦桑尼亚、乌干达、赞比亚、津巴布韦、古巴。

A.3 寄主

阿拉伯种咖啡(*Coffea arabica*),甘弗拉种咖啡(*Coffea canephora*),利比里亚种咖啡(*Coffea liberica*)。

A.4 症状

病菌可以侵染从花到成熟果子(偶尔在叶片上)的所有时期。主要危害未成熟的咖啡浆果,刚开始会产生针尖大小的斑点,之后迅速扩大呈黑褐色,病部向下凹陷,产生黑色小颗粒,此为病菌的分生孢子盘。在高湿条件下,会溢出粉红色的黏状物,为病原菌的分生孢子团。有时有潜伏侵染的情形发生,即病原菌在幼果期侵入寄主,但未表现症状,而是在果实成熟过程中逐渐表现症状。若花瓣被感染,则会在花瓣上产生深褐色病斑,花朵会提早凋谢;若病原菌侵染植株枝条,则会在枝条上形成黄褐色凹陷病斑,严重时呈坏疽状或溃疡状,病部以上的组织因水分运输受阻而呈萎凋状。

A.5 生物学特性

病菌可依靠带菌咖啡果实、种子、种苗和病残体进行远距离传播。在田间,病菌的分生孢子主要借风、雨、流水、鸟类、昆虫和人畜活动等进行传播,也可能传播很长的距离。病菌孢子通过寄主体表自然孔口或伤口侵染植株,发病植株上产生大量的分生孢子可进行再侵染。

附 录 B
(资料性附录)
培养基配方

B.1 麦芽浸粉琼脂培养基(Malt Extract Agar, MEA)

B.1.1 成分

麦芽糖 12.75 g, 糊精 2.75 g, 丙三醇 2.35 g, 蛋白胨 0.78 g, 琼脂 17.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH4.7±0.2(25±5 ℃)。

B.1.2 制法

先将除琼脂以外的其他成分溶解于蒸馏水中, 调节 pH, 再加入琼脂, 加热煮沸, 琼脂溶化后分装进行高压灭菌(121 ℃, 20 min)。

B.2 马铃薯琼脂培养基(Potato Dextrose Agar, PDA)

B.2.1 成分

马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 17 g, 蒸馏水 1 000 mL。

B.2.2 制法

先将马铃薯切块, 于少量水中煮 20 min~30 min 后, 加入葡萄糖和琼脂煮至全部溶解。加蒸馏水定容至 1 000 mL 并过滤, 分装后进行高压灭菌(121 ℃, 20 min)。

B.3 水琼脂培养基(Water Agar, WA)

B.3.1 成分

琼脂 10 g, 蒸馏水 1 000 mL。

B.3.2 制法

加入琼脂粉到少量蒸馏水中, 煮至全部溶解并过滤, 加蒸馏水定容至 1 000 mL, 分装后进行高压灭菌(121 ℃, 20 min)。

SN/T 3679—2013

附 录 C
(资料性附录)
碳源代谢试验方法

C.1 原理

病原菌 *C.kahawae* 不能利用柠檬酸盐或酒石酸盐作为唯一碳源,此可以作为该病原菌的一个重要判定依据。

C.2 培养基

Medium B(每 1 000 mL 水中含有: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 1.0 g; KCl , 0.2 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g)。

C.3 试剂

柠檬酸、酒石酸铵、氢氧化钠、溴甲酚紫。

C.4 柠檬酸盐利用试验

将 10 g 柠檬酸溶解于 1 000 mL Medium B 中,加入 0.05 g 溴甲酚紫,加氢氧化钠调节 pH 至 4.5,再加入 17 g 琼脂,加热煮沸,琼脂溶化后分装进行高压灭菌(121 °C, 20 min),制成试验用培养基。将纯化后的待测病原菌培养 5 d~7 d,挑取菌丝接种于该培养基平板,随后观察培养基中溴甲酚紫指示剂颜色的变化情况,共观察 5 d~7 d。试验中采用葡萄糖为唯一碳源作为阳性对照,不加任何碳源物质培养作为阴性对照。

C.5 酒石酸盐利用试验

方法同上,只需将酒石酸铵代替柠檬酸即可。

C.6 结果分析

将待测病原菌培养 5 d~7 d,然后分别接种于上述两种试验用培养基(含柠檬酸盐培养基和含酒石酸盐培养基),如观察到上述两种试验用培养基的颜色均未发生变化,与阴性对照结果一致,则判定该病原菌可能是咖啡浆果炭疽病菌;如上述两种培养基中的任何一种颜色发生变化,与阳性对照结果一致(一般随 pH 值的升高,溴甲酚紫指示剂颜色由深蓝会逐渐变成紫色),则判定该病原菌不是咖啡浆果炭疽病菌。

附录 D

(资料性附录)

咖啡上的三种炭疽病菌比较

表 D.1 三种炭疽病菌比较表

| 比较项目 | <i>C.kahawae</i> | <i>C.gloeosporioides</i> | <i>C.acutatum</i> |
|--------|---|---|---|
| 培养性状 | 菌落在培养基上生长较慢(2 mm~4 mm/d at 25 °C),菌落颜色易变,通常为橄榄色至深灰绿色,后转为浅灰色或浅褐色。气生菌丝体稀疏至茂密,绒毛状,分生孢子粘孢团无,菌核无(参见图 D.1) | 菌落在培养基上生长很快(3 mm~6 mm/d at 25 °C),菌落颜色多变,通常初白色,后转为淡粉色至褐色,气生菌丝体稀疏至茂密,绒毛状,培养皿背面呈现不均衡的灰白色至黑褐色,分生孢子粘孢团通常呈桔黄色。菌核有或无;刚毛有或无(参见图 D.2) | 菌落在培养基上生长较慢并紧贴基质生长,气生菌丝较少,菌落通常呈白色、灰白色或浅橙黄色,有时会产生浅紫红色色素,分生孢子粘孢团桔红色,刚毛极少或无,菌核无(参见图 D.3) |
| 分生孢子 | 分生孢子直接从菌丝上产孢细胞的顶端产生,分生孢子无色单胞,圆柱形或卵圆形,顶端钝圆,基部钝圆或稍尖,(12.5 μm~19 μm)×4 μm;有部分较大型分生孢子大小为20 μm×6 μm(参见图 D.4) | 分生孢子产生于分生孢子盘或直接从菌丝上产孢细胞的顶端产生,分生孢子梗无色或基部淡褐色,分枝有或无;分生孢子无色单胞,圆柱形或长椭圆形,顶端钝圆,基部钝圆或稍尖,(9 μm~24 μm)×(3 μm~6 μm)(参见图 D.5) | 分生孢子通常直接产生于菌丝,典型的分生孢子呈纺锤形,两端稍尖,(8.0 μm~16 μm)×(2.5 μm~4 μm);有时也会产生一些非典型的分生孢子,包括两端钝圆和一端稍尖一端钝圆(参见图 D.6) |
| 附着胞 | 附着胞灰褐色,不规则棍棒形或椭圆形,(8.0 μm~9.5 μm)×(5.5 μm~6.5 μm) | 附着胞丰富,黑褐色,棍棒形或椭圆形,边缘大多规则,(6 μm~20 μm)×(4 μm~12 μm) | 附着胞灰褐色,不规则棍棒形或椭圆形,(6.5 μm~11 μm)×(4.5 μm~7.5 μm) |
| 碳源代谢 | 不能利用柠檬酸盐或酒石酸盐作为唯一碳源 | 能代谢柠檬酸盐和酒石酸盐或至少能利用其中的一种作为唯一碳源 | 能代谢柠檬酸盐和酒石酸盐或至少能利用其中的一种作为唯一碳源 |
| 有性态 | 暂未发现 | <i>Glomerella cingulata</i> | <i>Glomerella acutata</i> |
| 对咖啡致病性 | 能侵染花、叶、枝条、果实以及种子,尤其能侵染未成熟的绿色浆果 | 一般只在果实成熟后期才侵染其果实,不侵染生长发育期的浆果及咖啡幼苗 | 一般只在果实成熟后期才侵染其果实,不侵染生长发育期的浆果及咖啡幼苗 |
| 寄主范围 | 咖啡是唯一寄主 | 寄主范围十分广泛,可危害多种果树与其他作物,是炭疽菌属中最普遍存在的种 | 寄主范围较广泛,包括草莓、番茄、茄、辣椒等 |

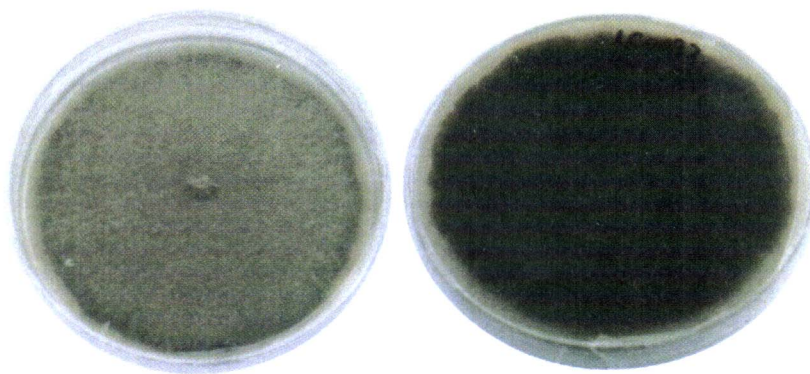


图 D.1 *C.kahawae* 的平板培养性状

(注：左边为平板正面，右边为平板反面，下同)



图 D.2 *C.gloeosporioides* 的平板培养性状

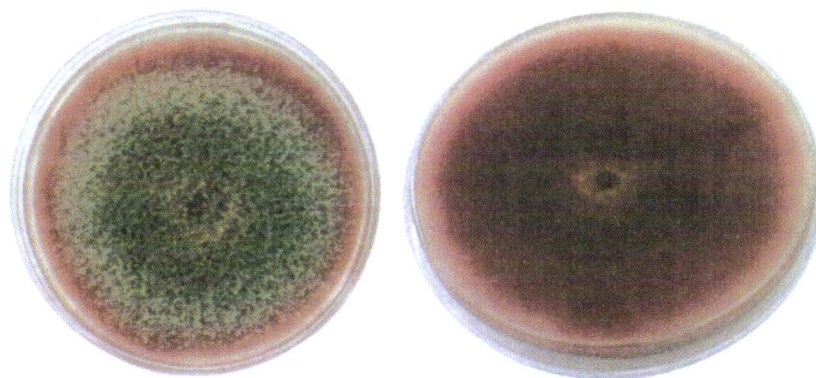


图 D.3 *C.acutatum* 的平板培养性状



说明：

A —— 菌丝；

B —— 分生孢子；

C —— 附着胞。

图 D.4 *C.kahawae* 的形态学特征(引自 CAB International,2005)

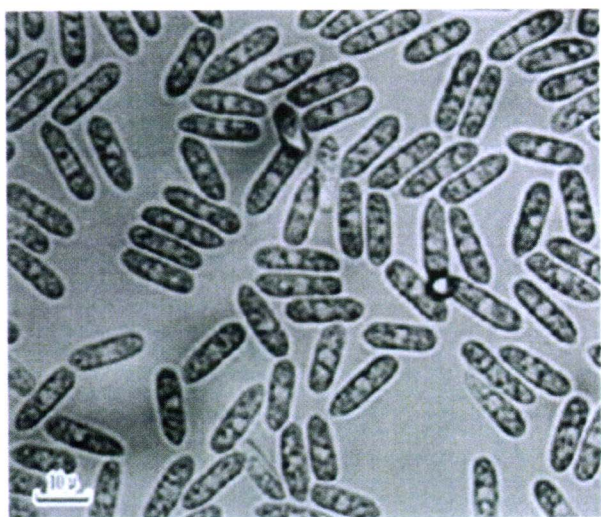


图 D.5 *C.gloeosporioides* 的分生孢子

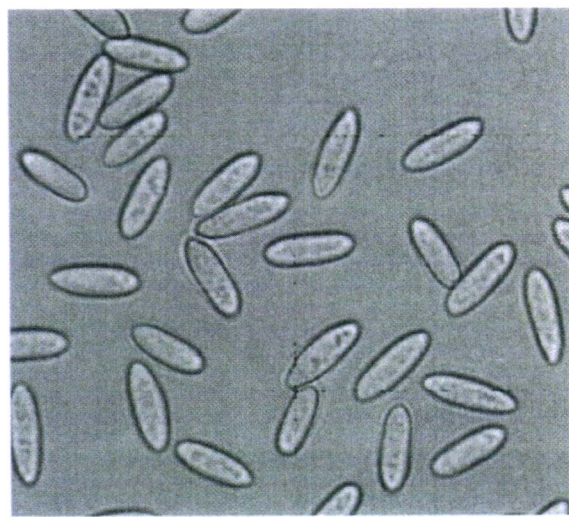


图 D.6 *C.acutatum* 的分生孢子(引自 Schnabel)