



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3680—2013

---

## 可可链疫孢荚腐病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Moniliophthora roreri* (Ciferri et Parodi) Evans

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：中华人民共和国天津出入境检验检疫局、中华人民共和国厦门出入境检验检疫局、中华人民共和国福建出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：罗加凤、王金成、蔡国瑞、王宏毅、沈建国。

# 可可链疫孢荚腐病菌检疫鉴定方法

## 1 范围

本标准规定了可可链疫孢荚腐病菌检疫鉴定方法。

本标准适用于进境可可种子、苗木中可可链疫孢荚腐病菌的检疫鉴定。

## 2 可可链疫孢荚腐病菌基本信息

学名: *Moniliophthora roreri* (Ciferri et Parodi) Evans.

异名: *Crinipellis roreri* (Cif.) H.C.Evans

*Monilia roreri* Ciferri.

中文名称: 可可链疫孢荚腐病菌

英文名: pod rot of cacao

frosty pod rot

分类地位: 真菌界(Fungi), 担子菌门(Basidiomycota), 担子菌纲(Basidiomycetes), 伞菌目(Agaricales), 皮伞菌科(Marasmiaceae), *Moniliophthora* 属。病菌其他信息参见附录 A。

传播途径: 可可链疫孢荚腐病菌主要通过果荚内部组织和种子表面粘附的孢子、菌丝远距离传播, 病菌也可能侵染植株, 随苗木远距离传播。

## 3 方法原理

通过病菌的分离培养, 依据病菌培养性状、形态学特征对可可链疫孢荚腐病菌进行鉴定。

## 4 仪器及用具

### 4.1 仪器

体视显微镜、生物显微镜、超净工作台、生物培养箱、高压灭菌器、常规冰箱。

### 4.2 用具

培养皿(直径 90 mm~100 mm)、滤纸、三角瓶、镊子、手术剪、手术刀、酒精灯。

## 5 主要试剂和培养基

### 5.1 主要试剂

1.0%次氯酸钠(NaClO)、青霉素、链霉素、无菌水、酒精、马铃薯、葡萄糖、琼脂。

### 5.2 培养基

马铃薯葡萄糖培养基(PDA)、PDA 选择性培养基(参见附录 B)。

## 6 鉴定方法

### 6.1 可疑材料挑选

#### 6.1.1 可可种子中可疑材料挑选

将待检样品倒入洁净白瓷盘内,挑选干瘪、弱小、畸形、变色的可疑病种子(参见图 C.1),用手术刀剥离种皮和种子,将种皮剪成  $0.4\text{ cm} \times 0.4\text{ cm}$  小块,用纱布包好进行下一步分离培养实验。

#### 6.1.2 可可苗可疑材料挑选

仔细检查植株茎部、枝条有无变色、肿胀,树皮开裂症状,发现可疑植株,取有症状的茎部或枝条组织,用剪刀剪成  $0.4\text{ cm} \times 0.4\text{ cm}$  小块,纱布包好进行下一步分离培养实验。

### 6.2 分离培养及形态测定

#### 6.2.1 表面消毒

纱布包好可疑材料,用 1.0% 的次氯酸钠溶液消毒 3 min,无菌水冲洗 3 次,灭菌滤纸吸干水分后用于培养。

#### 6.2.2 分离培养

消毒后的材料置 PDA 选择性培养基平板上,每皿放置 3~4 块,25 °C 黑暗条件下培养。培养 3 d~5 d 后开始观察,发现乳白色或白色可疑菌落,用 PDA 纯化。

#### 6.2.3 形态测定

PDA 上纯化菌落生长 7 d 后,体视显微镜下观测菌落中是否有病菌孢子形成,记录菌落培养性状,包括菌落生长速度、颜色,形状等,如有孢子产生,则将培养皿放在显微镜(100×)或(200×)下观察孢子生长方式,并挑取少许制片,在生物显微镜下镜检,观测菌丝、孢子形态特征,显微镜(1 000×)下测量孢子的形状、大小,孢子胞壁厚度等。

## 7 鉴定特征

### 7.1 培养性状

培养 5 d 左右,病组织周围出现白色菌落,病菌在 PDA 上生长较缓慢,生长速度  $1\text{ mm/d} \sim 3\text{ mm/d}$ ,圆形,不隆起,菌丝致密,平铺于培养基表面形成毡状菌丝层,菌落初为白色,后为奶油肉色,培养 7 d 后菌落中出现粉状棕褐色孢子层(参见图 C.2),并逐渐向菌落边缘扩散加厚,菌落颜色逐渐加深至棕褐色,打开培养皿盖,菌落有蘑菇气味。

### 7.2 形态特征

菌丝无色,细长,新鲜菌丝分隔分枝很少,老熟的菌丝分隔稍多,分隔处有轻微缢缩,菌丝宽  $1.5\text{ }\mu\text{m} \sim 3.5\text{ }\mu\text{m}$ (参见图 C.3a)。

孢子淡黄色至淡褐色,串生长链状,孢子链分枝或不分枝(参见图 C.3b),孢子形状有变异,不成熟孢子椭圆形或长椭圆形,孢壁不明显(参见图 C.3c),成熟孢子球形、亚球形或长椭圆形,大小为  $(5\text{ }\mu\text{m} \sim 14\text{ }\mu\text{m}) \times (8\text{ }\mu\text{m} \sim 20\text{ }\mu\text{m})$ ,具明显胞壁,厚  $0.9\text{ }\mu\text{m} \sim 2.0\text{ }\mu\text{m}$ (参见图 C.3d)。

## 8 结果判定

病菌培养性状与 7.1 中描述相符,形态特征与 7.2 中描述相符,即可鉴定为可可链疫孢荚腐病菌。

## 9 菌株保存与处理

分离并最终鉴定为可可链疫孢荚腐病菌的菌株应转入 PDA 培养基斜面上,存活后经登记和经手人签字,置于 4℃~8℃ 黑暗条件下保存,定期(3 个月)转接,以防止病菌死亡,菌种至少保存 6 个月,必要时用病菌孢子作冻干菌种保存,保存期满后高压灭菌灭活处理。



SN/T 3680—2013

附 录 A  
(资料性附录)

可可链疫孢荚腐病菌其他信息

A.1 分布

中美和加勒比海:墨西哥、伯利兹、哥斯达黎加、危地马拉、洪都拉斯、尼加拉瓜、巴拿马。  
南美:委内瑞拉、秘鲁、哥伦比亚、厄瓜多尔。

A.2 寄主

主要寄主:可可 *Theobroma cacao* L.。

其他寄主:野生 *Herrania* spp.和野生 *Theobroma gileri*, *Theobroma* spp.。

A.3 为害症状

可可链疫孢荚腐病菌为害可可果荚,感染初期果荚显示轻微褪绿、肿胀,种子周围组织变软水样状,后期果荚褪色,扭曲变形,膨大坏死,表面覆盖稠密毡状乳白色菌丝及浅褐色粉状孢子,有蘑菇气味,病荚内部组织紧密成粘稠状,病荚种子早熟,瘦小,形状不规则,严重时种子腐烂坏死。如果病菌在果荚成熟中后期侵染果荚,外部症状不明显或只有局部有限的坏死,果荚表面稍凹陷,早熟,果荚内部,果皮、种子全部或部分呈红褐色坏死,种子很难与果皮分开。人工接种幼苗下胚轴表现出胚轴变色、肿胀,树皮开裂症状,极端情况下,致使幼苗死亡。

A.4 传播方式

可可链疫孢荚腐病菌主要通过果荚内部组织和种子表面粘附的孢子、菌丝远距离传播,病菌也可能侵染植株,随苗木远距离传播。

**附 录 B**  
**(资料性附录)**  
**培养基配制方法**

**B.1 马铃薯培养基 PDA**

马铃薯去皮后洗净,切成小块,称取 200 g,蒸馏水中煮 30 min,用 4 层纱布过滤,加入 20 g 蔗糖、18 g 琼脂,加热使之完全溶解,蒸馏水定容至 1 000 mL,分装于三角瓶中,121 ℃高压灭菌 15 min。

**B.2 PDA 选择性培养基**

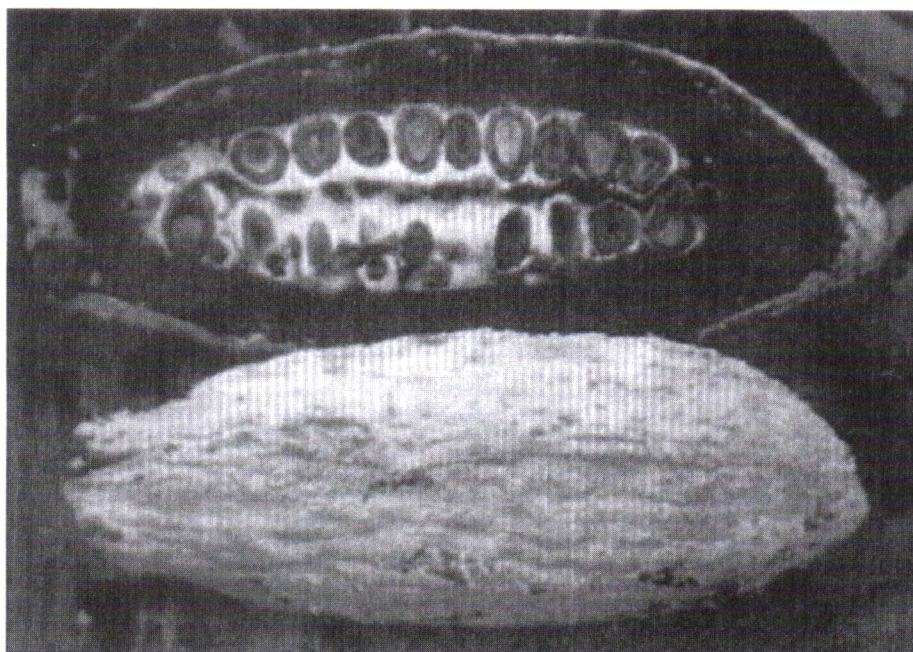
高压灭菌后的 PDA 冷却至 45 ℃~50 ℃时,无菌操作下 1 000 mL 培养基中分别加入 0.3 g 链霉素和 0.3 g 青霉素,混匀,倒平板,静置备用。

SN/T 3680—2013

## 附 录 C

(资料性附录)

可可链疫孢荚腐病菌为害、菌落性状及形态特征



注：引自 Evans HC, et al.2003

图 C.1 病果荚内部腐烂种子

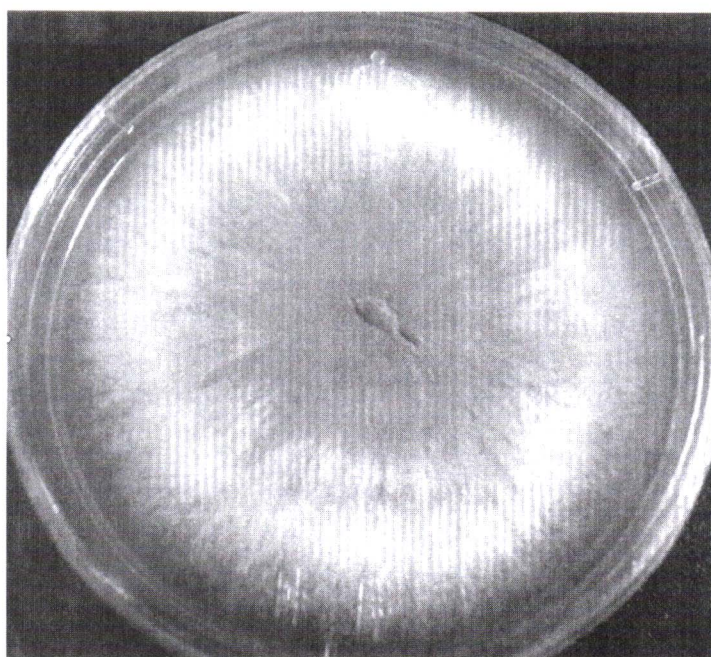
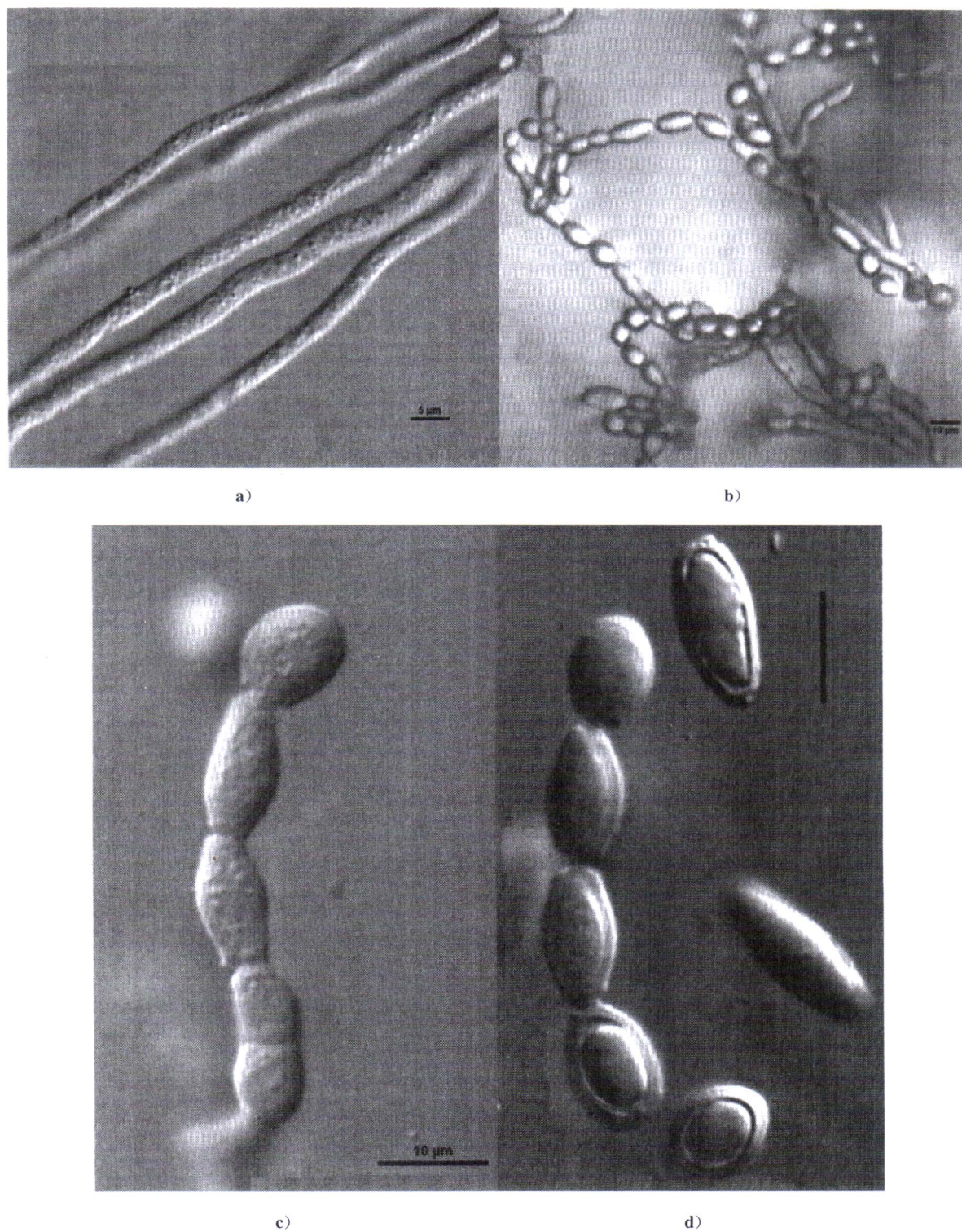


图 C.2 PDA 上菌落培养性状 示褐色粉状孢子层(罗加凤摄)





说明：

- a)——细长的营养菌丝；
- b)——孢子串生形成的孢子链；
- c)——未成熟的孢子；
- d)——成熟具厚壁的孢子，标尺=10 μm。

图 C.3 病菌形态特征(罗加凤摄)

## 参 考 文 献

- [1] Aime MC, Phillips-Mora W, 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cocoa (*Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia*, In Press.
- [2] CAB International, 2007. Crop Protection Compendium, 2007. Edition. Wallingford, UK, Taxonomy and nomenclature for *Moniliophthora roreri*. CAB International. [www.cabicompendium.org/cpc](http://www.cabicompendium.org/cpc).
- [3] Desrosiers R. and Suarez C, 1974. *Monilia roreri* pod rot of cacao. In *Phytophthora Disease of Cocoa*. (P.H. Gregory, ed.), 273-277.
- [4] Evans HC, Stalpers JA, Samson RA, and Benny GL, 1978. On the taxonomy of *Monilia roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* (Cacao). *Can. J. Bot.*, 56(20): 2528-2532.
- [5] Evans HC, 1981. Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora* (*Monilia*) *roreri*. *Phytopathological papers* 24. Kew, UK: Commonwealth Mycological Institute.
- [6] Evans HC, Holmes KA, Phillips W, Wilkinson MJ, 2002. What's in a name: *Crinipellis*, the final resting place for the frosty pod rot pathogen of cocoa?. *Mycologist*, 16(4): 148-152.
- [7] Evans HC, Holmes KA, Reid AP, 2003. Phylogeny of the frosty pod rot pathogen of cocoa. *Plant Pathology*, 52: 476-485.
- [8] Fulton RH, 1989. The cacao disease trilogy: black pod, *Monilia* pod rot, and witches' broom. *Plant Disease* 73(7): 601-603.
- [9] Griffith GW, Nicholson J, Nenninger A, Birch R N, Hedger IN, 2003. Witches' brooms and frosty pods: Two major pathogens of cacao. *New Zealand Journal of Botany*, Volume 41: 423-435.
-