

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1450—2004

咖啡美洲叶斑病菌鉴定方法

Methods for identification of *Mycena citricolor* (Berk. & Curt.) Sacc

2004-06-01 发布

2004-12-01 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

本标准的附录 A 和附录 B 为资料性附录。

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：中华人民共和国广州出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：钟国强、张传飞、司徒保禄、赵立荣。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

咖啡美洲叶斑病菌鉴定方法

1 范围

本标准规定了咖啡美洲叶斑病菌的鉴定方法。

本标准适用于来源于咖啡美洲叶斑病疫区(参见附录 A)的咖啡和其他主要寄主植物苗木(参见附录 B)携带的咖啡美洲叶斑病菌的鉴定。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1

芽孢 gemmae

咖啡美洲叶斑病菌的无性繁殖体,一种黄色的针状结构,由茎和飞碟状芽孢体组成,是该病的主要传播繁殖结构。

2.2

担子果 basidiocarp

咖啡美洲叶斑病菌的有性生殖体,一种黄色的伞状小菇。

3 原理

3.1 咖啡美洲叶斑病菌的分类地位

咖啡美洲叶斑病菌 [*Mycena citricolor* (Berk. & Curt.) Sacc], 属担子菌亚门(Basidiomycotina)、层菌纲(Hymenomycetes)、伞菌目(Agaricales)、伞菌科(Agaricaceae)、小菇属(*Mycena*)。咖啡美洲叶斑病现局限发生在美洲的一些国家和地区,主要为害咖啡属植物的叶片、嫩枝和嫩果,气候条件与环境条件适合时,也可受害其他科属植物。病害英文名: American Leaf Spot of Coffee。

3.2 检疫原理

咖啡美洲叶斑病菌为美洲热带潮湿山区和森林地区的一种弱寄生菌,通常腐生于腐朽的树干或腐殖质中,在适宜的气候和环境下,病原菌的菌丝体可以寄生咖啡和其他寄主植物组织,使寄主发病,产生坏死病斑。病原菌产生两种繁殖结构:无性生殖的芽孢和有性生殖的担子果(担子果的产生通常需要用青霉菌诱发)。通过检疫来自该病发生地区的寄主苗木,分离纯化病原菌,利用该病的症状特征和病原特征进行鉴定。

3.3 鉴定原理

咖啡美洲叶斑病的症状、病原菌形态特征和生物学特性(培养性状和生物荧光的产生)是该病鉴定的主要依据。

4 仪器和试剂

4.1 生物显微镜。

4.2 体视显微镜。

4.3 高压灭菌器。

4.4 超净工作台。

4.5 生物培养箱。

4.6 塑料盒(28 cm×22 cm)。

4.7 5%次氯酸钠(NaClO)溶液。

4.8 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基。

5 检验方法

5.1 组织保湿法

用塑料盒作为培养器皿,在盒内铺上保湿滤纸,将采集的病叶组织样品置于滤纸上,喷雾保持病叶高度湿润,置25℃培养箱内在自然光或弱光下培养,3 d后取出叶片观察病斑上是否有针状、黄色的芽孢产生,如发现芽孢,将芽孢移至PDA培养基内继续培养,观察菌落形态、颜色、芽孢以及担子果的产生情况。

5.2 培养基法

剪取可疑的病斑组织,用5%次氯酸钠溶液消毒5 min,灭菌水洗三至四次,将病斑组织移到PDA的培养基中,置25℃培养,3 d后观察菌落的形态、颜色、芽孢以及担子果的产生情况。

5.3 生物荧光观察方法

将病叶或培养菌落,带进黑暗的房间中,停留15 min以适应黑暗的环境,肉眼观察病叶上病斑或培养的菌落是否可以产生生物荧光。

5.4 担子果诱发试验

取分离纯化的咖啡美洲叶斑病菌可疑待测菌和青霉菌 *Penicillium* spp. 的菌落,分别接种于同皿PDA培养基的一侧培养,培养3 d后该菌与青霉菌菌落交界处拮抗带的边沿可产生大量芽孢及黄色、伞状的担子果。

5.5 致病性试验

按5.1组织保湿法在盒内平铺三层保湿滤纸,取分离纯化得到的芽孢或菌丝(注:不能用担子果)接种在冲洗干净的健康咖啡或其他寄主叶片上,每天喷雾保湿,观察症状和病原的产生情况。

6 鉴定特征

6.1 症状特征

6.1.1 病叶上病斑大小为3 mm~10 mm,多数为4 mm~6 mm,典型的病斑为圆形,黄褐色至浅红褐色,病部正面稍凹陷,病斑中央往往残留着芽孢入侵叶片时留下稻秆颜色的芽孢体。病健交界明显,形状如鸡眼(又叫鸡眼病)。当两个以上病斑连接时,病斑形状不规则形。干旱季节,病部的坏死组织会脱落,流下空洞。叶脉上的病斑向两边稍伸长,凹陷,浅灰色,病部有散生的乳黄色晕圈,晕圈外有狭窄的暗色边缘。

6.1.2 枝条上病斑症状为长椭圆形,黑褐色,中间浅灰,病部稍凹陷。受害果实产生近圆形斑点,后期病部变灰白色至浅红褐色。

6.2 病原特征

6.2.1 在显微镜下观察菌丝无色,有分隔,菌丝细胞双核并具典型的锁状联合体菌丝。在PDA培养基中,菌丝初呈白色,成放射状紧贴着培养基表面向四周扩展,气生菌丝少,培养3 d后中央开始产生黄色色素,然后产生黄色的芽孢。

6.2.2 菌落的生长速率平均为0.35 cm/d。菌落在培养后期产生一些颗粒状黄色的菌丝团。该病原的菌丝和芽孢在黑暗的环境中都能发出生物荧光。

6.2.3 无性生殖体的芽孢小,黄色、针状,由芽孢的茎和芽孢体组成,茎细长圆柱状,长约2 mm,茎的顶部有飞碟状的芽孢体。芽孢体展开时,直径约0.33 mm,表面中间稍凹陷。芽孢体易脱落,萌发时边缘长出放射状有分隔的侵染丝(侵染体)。

6.2.4 有性生殖体的担子果黄色,由菌柄和菌盖组成,形状如微型的小伞。菌柄直立,黄色,有细小绒毛,长0.6 cm~1.4 cm。连接菌柄的菌盖,黄色、半球形、伞面状,菌体薄、膜质、中间稍凹陷,边缘扁平、

光洁、可透光。菌盖直径 0.8 mm~4.3 mm,通常 2.0 mm,辐射状条纹 7 条~15 条。菌褶少,离得较开,黄色,有蜡质。担子棍棒状,(14.0 μm ~17.4 μm) \times 5 μm 。担孢子非常小,椭圆形或卵形,无色,(4 μm ~5 μm) \times (2.5 μm ~3.0 μm)。

7 结果判定

如病原菌可产生生物荧光,其症状特征和病原特征符合 6.1、6.2 项的特征描述,鉴定为咖啡美洲叶斑病。必要时,按 5.5 项进行致病性试验。

8 菌株的保存

将鉴定为咖啡美洲叶斑病的菌株移至装有 PDA 培养基的试管内,放 15 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存,定期(两个月)转管。菌株至少需保存十二个月,保存期满后,需经灭菌处理。

附 录 A
(资料性附录)

咖啡美洲叶斑病的分布范围

哥斯达黎加、巴拿马、尼加拉瓜、危地马拉、萨尔瓦多、古巴、洪都拉斯、特立尼达和多巴哥、多米尼加、波多黎各、牙买加、海地、圭亚那、苏里南、墨西哥、玻利维亚、巴西、秘鲁、委内瑞拉、哥伦比亚、美国(佛罗里达、夏威夷)、瓜德罗普岛、马提尼克岛、西印度群岛。

附 录 B
(资料性附录)

一些咖啡美洲叶斑病的主要寄主

小果咖啡 <i>Coffea arabica</i>	肖竹芋 <i>Calathea warscewiczii</i>
中果咖啡 <i>Coffea canephora</i>	竹芋 <i>Maranta arundinacea</i>
大果咖啡 <i>Coffea liberica</i>	花烛 <i>Anthurium myosuroides</i>
咖啡 <i>Coffea stenophylla</i>	五彩芋 <i>Caladium</i> sp.
正金鸡纳树 <i>Cinchona officinalis</i>	龟背竹 <i>Monstera gigantea</i> ; <i>M. pittieri</i>
甜橙 <i>Citrus sinensis</i>	三裂喜林芋 <i>Philodendron tripartitum</i>
辣椒 <i>Capsicum frutescens</i>	西番莲 <i>Passiflora coriacea</i>
可可 <i>Theobroma cacao</i>	蒲桃 <i>Eugenia jambos</i>
牛心番荔枝 <i>Annona reticulata</i>	秋海棠 <i>Begonia involucrata</i> ; <i>B. pittieri</i>
榕树 <i>Ficus colubrina</i> ; <i>F. torresiana</i>	鳄梨 <i>Persea americana</i> ; <i>P. caerulea</i>
果子蔓 <i>Guzmania</i>	大胡椒 <i>Pothomorphe umbellata</i>
蕉芋 <i>Canna edulis</i>	
