

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4519—2025

热带作物种质资源抗病虫害鉴定技术规程  
咖啡炭疽病

Technical code of practice for resistance identification to diseases and  
pests of tropical crops—Coffee anthracnose

2025-01-09 发布

中华人民共和国农业农村部 发布





## 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。

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专利的责任。

本文件由农业农村部农垦局提出。

本文件由农业农村部热带作物及制品标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：中国热带农业科学院环境与植物保护研究所。

本文件主要起草人：陆英、易克贤、贺春萍、吴伟怀、梁艳琼、李锐。





# 热带作物种质资源抗病虫鉴定技术规程

## 咖啡炭疽病

### 1 范围

本文件确立了咖啡种质资源抗炭疽病鉴定程序,规定了术语和定义、接种体制备、接种鉴定、田间抗病性评价、鉴定有效性判定、重复鉴定和抗病性终评等要求。

本文件适用于咖啡种质抗炭疽病鉴定及评价。

### 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。

NY/T 922 咖啡栽培技术规程

### 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

#### 3.1

**咖啡炭疽病 coffee anthracnose**

由胶孢炭疽菌复合群(*Colletotrichum gloeosporioides* complex)的 *C. siamense*, *C. theobromicola*, *C. nupharricola* 或喀斯特炭疽菌(*Colletotrichum karstii*) 侵染。在咖啡枝条、叶片和果实等部位产生褐色病斑、灼烧凹陷,造成咖啡的枝条干枯、落叶和落果等症状。

### 4 接种体制备

#### 4.1 病原菌分离与保存

采用常规组织分离法,从感染咖啡炭疽病的叶片、枝条、果实的病健交界处分离病原菌,对分离物进行单孢分离纯化和致病性测定,经形态学和分子鉴定,确认为胶孢炭疽菌或喀斯特炭疽菌,筛选强致病力菌株,低温保存备用。咖啡炭疽田间症状、病原、分子鉴定用引物及代表菌株关键信息见附录 A。

#### 4.2 接种体制备

将保存的供试菌接种到马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)平板上,28℃,暗培养3d,在超净工作台内用无菌牙签将菌落菌丝表面划破,继续培养3d。用无菌水将培养基表面孢子洗下,孢子悬浮液用4层灭菌纱布过滤,显微镜下用血球计数板计数滤液中的孢子数,用无菌水调节孢子浓度为 $10^6$ 个/mL,加入0.02%(V/V)吐温20作为接种体,即配即用。

### 5 接种鉴定

#### 5.1 鉴定对照品种

设“Typica(铁皮卡)”为感病对照品种,“德热3号”为抗病对照品种。

#### 5.2 鉴定种质准备

鉴定种质在温室按同一方法和时间盆栽,日常管理期间不使用杀菌剂。接种前1d浇足水,在无病斑、完整幼嫩叶柄上挂标签,标明接种日期和接种体编号,每株苗选择2片~4片叶,每份种质重复3次,每重复5株苗。采用完全随机区组排列。

#### 5.3 接种

5.3.1 接种时间

在 16:00 后进行,同批次鉴定种质在同一天内完成接种。

5.3.2 接种方法

采用喷雾接种法。用弥雾喷雾器(雾滴的体积中值直径 50 μm~100 μm)在挂标签的叶片的正反两面喷施孢子悬浮液直至叶片挂满水滴为止,以喷施无菌水[加 0.02%(V/V)吐温 20]作对照,用塑料袋套住接种叶片保湿 3 d。

5.4 接种后管理

接种后将咖啡材料置于温室,日常管理期间不使用杀菌剂。

5.5 病情调查

5.5.1 调查时间

接种后第 7 d 进行调查。同批次接种材料在同一天完成调查。

5.5.2 调查方法

调查对象为全部接种叶片。每株调查 2 片~4 片叶,每份种质重复 3 次,每重复 5 株苗,共 30 片~60 片叶。

5.5.3 病情分级

病情分级见表 1。

表 1 咖啡炭疽病病情分级标准

病情级别	分级标准
0	叶片无病斑
1	0<病斑面积占叶片面积<5%
2	5%≤病斑面积占叶片面积<15%
3	15%≤病斑面积占叶片面积<25%
4	25%≤病斑面积占叶片面积<50%
5	病斑面积占叶片面积≥50%

5.5.4 病情指数计算

调查记载每个种质叶片的病情,并按照式(1)计算病情指数。

$$DI = \frac{\sum(A \times B)}{C \times 5} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中:

DI —— 病情指数;

A —— 各级叶片数;

B —— 病情级别代表值;

C —— 调查的总叶片数。

5.6 抗病性评价

5.6.1 评价标准

依据病情指数(DI)平均值确定抗病级别,评价标准见表 2。

表 2 咖啡种质对炭疽病抗性评价标准

病情指数(DI)	抗病级别
DI=0	免疫(I)
0<DI<10.0	高抗(HR)
10.0≤DI<20.0	抗(R)
20.0≤DI<30.0	中抗(MR)
30.0≤DI<40.0	感(S)
DI≥40.0	高感(HS)

### 5.6.2 结果记录

评价结果按附录 B 中的表 B.1 填写。

## 6 田间抗病性评价

### 6.1 鉴定对照品种

按 5.1 的规定进行。

### 6.2 鉴定圃建设与管理

选择地势平坦、土壤理化性质均一，四周无高大乔木，立地环境一致，咖啡炭疽病常发生区作为鉴定圃。每份种质重复 4 次，每重复 5 株。采用完全随机区组排列，种植规格及除草、浇水、施肥等田间管理按 NY/T 922 的规定执行。

### 6.3 调查时间

在每年 10 月咖啡炭疽病发病高峰期进行调查。

### 6.4 调查方法

按 5 点取样法，每份种质重复 3 次，每重复 5 株。每株选择东、西、南、北枝条从顶端开始第 1 对~第 3 对成熟叶片，共 12 片叶片。每个种质调查 180 片叶片。

### 6.5 病情调查

按 5.5 的规定执行。

### 6.6 抗病性评价

按 5.6 的规定执行。

### 6.7 记录结果

抗病性评价结果按表 B.2 填写。

## 7 鉴定有效性判定

咖啡感病对照品种“Typica(铁皮卡)”达到相应感病程度( $DI \geq 30$ )时，该批次鉴定视为有效。

## 8 重复鉴定

鉴定种质初次鉴定表现为免疫、高抗或抗病，翌年进行重复鉴定。

## 9 抗病性终评

同一年接种鉴定与田间抗病性鉴定结果不一致时，以记载抗病性水平低的为准。

进行重复鉴定后，以记载抗病水平低的评价结果作为鉴定种质最终评价结果，并按表 B.3 填写。

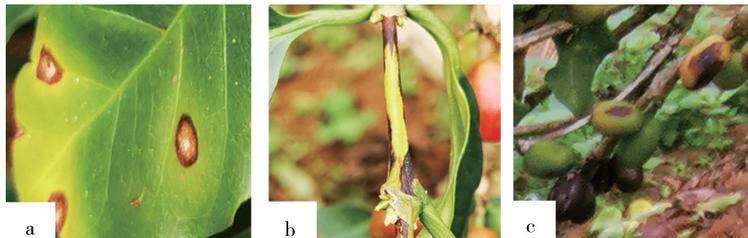
附 录 A  
(资料性)  
咖啡炭疽病

### A.1 病原菌

病原菌无性态为半知菌亚门腔孢纲黑盘孢目小丛壳科刺盘孢属,胶孢炭疽菌复合群(*Colletotrichum gloeosporioides* complex)中的 *C. siamense*, *C. theobromicola*, *C. nupharricola* 中的一个种或半知菌亚门、腔孢纲、黑盘孢目、黑盘孢科、炭疽菌属,喀斯特炭疽菌(*Colletotrichum karstii*)。

### A.2 田间症状

%1.3 叶片染(发)病多在叶尖和叶缘产生褐色病斑,随病斑的不断扩大,后期病斑中心呈灰褐色且具同心轮纹排列的黑色小点,边缘为暗褐色,其外缘有黄色晕圈;发病严重的则数个病斑交汇成大病斑,叶片干枯、脱落。高温条件下,叶片边缘出现黑色圆形病斑,病斑中央呈灰白色,病斑外缘有黄色晕圈,叶背有同心轮纹,上有黑色小点(图 A.1 a);枝条染(发)病时,病斑褐色、不规则形(图 A.1 b);浆果染(发)病时,在果实向阳面出现深褐色灼伤凹陷斑,斑痕扩展形成不规则凹陷灼伤区,最后果皮干褐挂于枝上(图 A.1 c);旱季小树和弱树易感病,出现大量落叶,并伴随有枯枝症状。



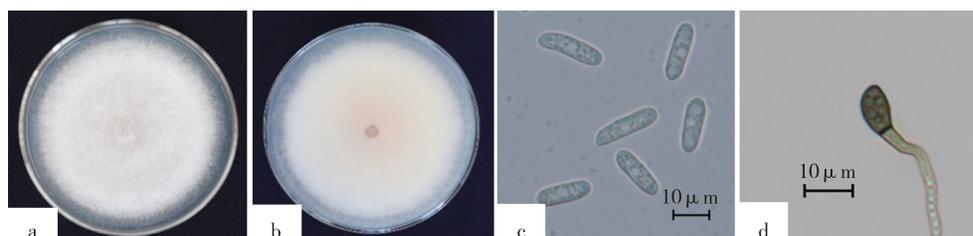
标引序号说明:  
a——叶片症状;  
b——枝条症状;  
c——果实症状。

图 A.1 咖啡炭疽病症状

### A.3 病原菌形态

*C. siamense*, *C. theobromicola*, *C. nupharricola* 菌落特征:在 PDA 培养基菌株生长速度较快,菌落呈圆形,边缘整齐规则;菌丝为纯白色,气生菌丝茂密,菌株生长一周后菌落背面开始出现黑色小点,形成分生孢子盘,随后表面产生分生孢子,后形成粉红色孢子堆。分生孢子椭圆形,单孢无间隔,内部不含油滴,无色透明;分生孢子梗较短,光滑无色;刚毛及菌核未发现;附着胞形状为球形、近球形或椭圆形,边缘完整平滑,少数为不规则状(图 A.2)。

*Colletotrichum karstii* 菌落特征:菌株在 PDA 培养基上生长速度较慢,菌落呈圆形,边缘整齐规则;菌丝生长初期为纯白色,气生菌丝稀疏,一周后菌丝逐渐变淡粉色,菌落背面明显变为橘红色至暗红色。分生孢子盘产生较慢,孢子数量明显较少。分生孢子椭圆形,单孢无间隔,内部不含油滴,无色透明,边缘光滑,孢子长度较短;附着胞近球形或椭圆形,部分边缘完整平滑或边缘有起伏隆起,少数为不规则状,深褐色,内部可观察到数个粒融物(图 A.3)。



标引序号说明：

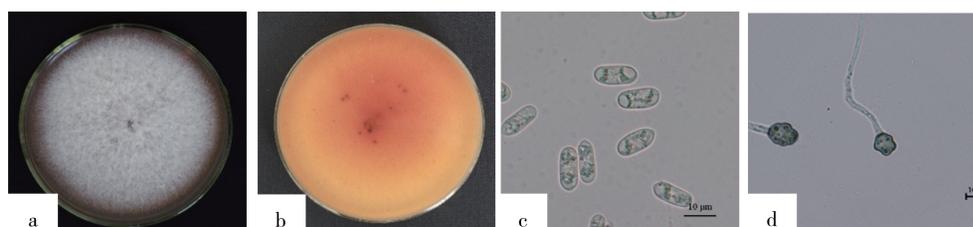
a——菌落正面；

b——菌落背面；

c——分生孢子；

d——附着胞。

图 A.2 *C. siamense*, *C. theobromicola*, *C. nupharricola* 纯培养和形态特征图



标引序号说明：

a——菌落正面；

b——菌落背面；

c——分生孢子；

d——附着胞。

图 A.3 *Colletotrichum karstii* 纯培养和形态特征图

#### A.4 病原菌分子鉴定

分子鉴定所用引物及序列见表 A.1

表 A.1 分子鉴定所用引物及序列

基因	引物名称	引物序列(5'-3')
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ACT	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC
	ACT-783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT
CHS-1	CHS-79F	TGGGGCAAGGATGCTTGGTTGAAG
	CHS-354R	TGGAAGAACCATCTGTGAGAGTTG
GAPDH	GDF	GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA
	GDR	GGGTGGAGTCGTACTIONGAGCATGT
GS	GSF1	ATGGCCGAGTACATCTGG
	GSR1	GAACCGTCGAAGTTCCAC
ApMat	AMF	TCATTCTACGTATGTGCCCG
	AMR	CCAGAAATACACCGAACTTGC

PCR 扩增程序：

*ITS*、*ACT*、*CHS-1*、*GAPDH* 基因：94 ℃ 预变性 3 min、94 ℃ 变性 1 min、55 ℃ 退火 45 s、72 ℃ 延伸 1 min，循环次数 35 次，72 ℃ 延伸 10 min；

*GS* 基因：94 ℃ 预变性 3 min、94 ℃ 变性 1 min、60 ℃ 退火 30 s、72 ℃ 延伸 1 min，循环次数 35 次，72 ℃ 延伸 10 min。

*ApMat* 基因：94 ℃ 预变性 3 min、94 ℃ 变性 1 min、55 ℃ 退火 30 s、72 ℃ 延伸 1 min，循环次数 35 次，72 ℃ 延伸 10 min。

**附录 B**  
(规范性)  
咖啡炭疽病抗病性评价记录表

**B.1 接种抗病性评价结果**

见表 B.1。

**表 B.1 咖啡种质抗炭疽病接种评价表**

鉴定单位						
鉴定时间						
病原菌及编号						
序号	种质名称	来源	重复	病情指数	平均病情指数	抗病级别
			I			
			II			
			III			
鉴定负责人(签字)		年 月 日				

**B.2 田间抗病性评价结果**

见表 B.2。

**表 B.2 咖啡种质抗炭疽病田间发病评价表**

鉴定单位				
鉴定时间				
序号	种质名称	病情指数	抗病级别	
鉴定负责人(签字)		年 月 日		

**B.3 抗病性评价终评**

见表 B.3。

**表 B.3 咖啡炭疽病(病原)抗病性终评结果**

鉴定单位					
鉴定时间					
序号	种质名称	来源	抗病级别		抗病性终评
			人工接种	自然发病	
鉴定负责人(签字)		年 月 日			