



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3754—2013

松干基褐腐病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Phellinus weirii* (Murrill) R.L. Gilbertsons

2013-11-06 发布

2014-06-01 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。

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这些专利的责任。

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：中华人民共和国江苏出入境检验检疫局、中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中华人民共和国苏州出入境检验检疫局、中华人民共和国南京出入境检验检疫局、中华人民共和国湖北出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：吴翠萍、焦彬彬、陈云芳、张勇、栗寒、李彬、杨静、王振华、安榆林。

松干基褐腐病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了进出境针叶树中松干基褐腐病菌的分离培养及分子生物学鉴定等方法。

本标准适用于对来自松干基褐腐病发生国家和地区的苗木、原木、木制品(含木质包装、铺垫材料)等所有寄主植物中松干基褐腐病菌的检疫和鉴定。

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 1157 进出境植物苗木检疫规程

SN/T 1126 进出境木材检疫规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

刚毛状菌丝 setal hyphae

在菌肉或菌髓中形态像菌丝,但明显比菌丝宽,且具有厚壁,顶端尖锐的结构。

3.2

生殖菌丝 generative hyphae

担子果中基本的菌丝类型。在刺革菌科(Hymenochaetaceae)种类中,生殖菌丝只形成简单分隔,不形成锁状联合,通常无色、浅黄色或浅黄褐色,薄壁或厚壁,分枝或很少分枝。

3.3

囊状体 cystidium

囊状体生在担子间,它们的起源多数如同担子,分布在菌褶的整个表面,因为它着生位置不同,又给以不同名称。生在菌褶两侧的叫囊状体。

3.4

次生菌丝 secondary hyphae

次生菌丝是一种具有分枝状的菌丝,一般由担子菌中异性的初生菌丝进行体细胞接合而形成的菌丝。

4 病菌基本信息

中文名:松干基褐腐病菌

学名:*Phellinus weirii* (Murrill) R.L. Gilbertson

异名:*Inonotus weirii*, *Poria weirii*, *Fomitiporia weirii*

分类地位:真菌界(Fungi),担子菌门(Basidiomycota),担子菌纲(Basidiomycetes),刺革菌目

(Hymenochaetales), 刺革菌科(Hymenochaetaceae), 木层孔菌属(*Phellinus*)。

传播途径:该病菌主要通过原木、苗木、接穗以及各种无性繁殖材料进行远距离传播。

该病原菌根据寄主的差异,分为花旗松型(the Douglas-fir form)和雪松型(the redcedar form),两型的主要区别在于:花旗松型的子实体为一年生,在培养基上的颜色较浅,寄主范围包含了花旗松等在内的一些针叶树;雪松型的子实体为多年生,在培养基上的颜色较深,寄主范围窄,仅侵染雪松。两者的病原形态没有明显的区别。

5 方法原理

根据松干基褐腐病菌在寄主上的症状特征,针对病原菌进行分离与培养,根据病原菌 DNA 通用引物 PCP-RFLP 和特异性引物 PCR 检测结果进行综合判定。

6 仪器设备和主要试剂

6.1 仪器设备

PCR 仪、超净工作台、灭菌锅、制冰机、生物培养箱、台式小型离心机、超低温冰箱、常规冰箱、旋涡振荡器、微量进样器、电热恒温水浴锅、电泳仪、凝胶成像系统。

6.2 用具

斧头、手持放大镜、灭菌培养皿、镊子、手术剪、手术刀、酒精灯、载玻片、盖玻片等。

6.3 主要试剂和培养基

PCR 缓冲液、dNTPs(dATP、dTTP、dCTP、dGTP)、*Taq* DNA 聚合酶、DNA 提取试剂盒、马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、引物(由生物试剂公司合成)。

7 现场检疫

按 SN/T 1126、SN/T 1157 结合症状检查进行抽样。挑出可疑症状的样品(参见 A.4),送实验室作进一步检疫鉴定。

8 实验室检疫

8.1 病原菌的分离培养

将带病木段用自来水冲洗干净并用吸水纸吸干。用消毒的解剖刀片将表面部分去除,放入无菌的密封塑料袋内,袋内以无菌湿棉球保湿,置于 22℃~27℃ 培养箱内 12 h 光暗交替培养。每天取出于解剖镜下观察,长出菌丝后将之分割成约 3 mm×3 mm×6 mm 小块,置于 PDA 培养基平板上,每个培养皿放置 5 块,27℃ 黑暗培养。3 d 后开始观察。解剖镜下发现有白色菌丝长出,立即挑取菌落边缘菌丝,转入 PDA 中纯化培养。长满平板后,检查培养性状,在光学显微镜下观察菌落特征及进行 PCR 检测。

8.2 子实体的观察

该病原菌在自然界和培养条件下均不易发现子实体。如果发现病菌子实体,仔细观察是否符合松

干基褐腐病子实体的特征并进一步做 PCR 检测。

8.3 PCR 检测

8.3.1 通用引物 PCR 凝胶电泳及 RFLP 检测

对经分离培养获得的菌株以及采集的子实体进行 PCR 扩增检测。

通用引物 PCR 凝胶电泳见 B.2。

通用引物 PCR 产物 RFLP 检测见 B.3。

8.3.2 特异性引物 PCR 凝胶电泳检测

对经分离培养获得的菌株以及采集的子实体进行特异性引物 PCR 凝胶电泳检测,见 B.4。

9 鉴定特征

9.1 病害危害症状

在林间立木上,可见被侵染的树表现为顶枝生长减慢,叶片变轻、脱落,球果会比正常的小,树逐渐死亡。多数腐烂的根折断聚集在根颈部周围,形成独特的球根。木质部被破坏,呈黄色、块状、纹孔状腐烂,愈伤组织在根的端部形成。在林间倒木或进境的寄主植物上病原危害症状参见 A.4。

9.2 形态特征

9.2.1 无性特征

该病菌在 PDA 培养基上生长良好,适宜生长温度为 $21^{\circ}\text{C}\sim 27^{\circ}\text{C}$,平板在 1 周内覆盖。菌落前缘菌丝气生至平伏,初始白色至亮淡黄色,渐渐转为黄褐色至褐色(参见附录 A 中的图 A.3)。

9.2.2 有性特征

菌丝透明到褐色,不产生锁状联合。担孢子球形或椭圆形,无色,薄壁, $(3.6\ \mu\text{m}\sim 4.5\ \mu\text{m})\times (2.7\ \mu\text{m}\sim 3.5\ \mu\text{m})$ 。担子近棍棒状,大小为 $(10\ \mu\text{m}\sim 13\ \mu\text{m})\times (4\ \mu\text{m}\sim 6\ \mu\text{m})$ 。囊状体棍棒状,大小为 $(13\ \mu\text{m}\sim 15\ \mu\text{m})\times (3.5\ \mu\text{m}\sim 5\ \mu\text{m})$ 。刚毛状菌丝明显,厚壁并具有一狭窄内腔,宽 $5\ \mu\text{m}\sim 10\ \mu\text{m}$ 。次生菌丝丰富,无色,薄壁,常分枝,宽 $3\ \mu\text{m}\sim 5\ \mu\text{m}$ 。生殖菌丝很少分枝,常见隔膜,宽 $3\ \mu\text{m}\sim 6\ \mu\text{m}$ (参见图 A.4)。

10 结果判定

表型症状与 9.1 描述基本一致,在 8.1、8.2 的检测中结果与 9.2.1、9.2.2 吻合,可初步判定该样品可能携带松干基褐腐病,但需通过 8.3 进一步确认。

在 8.3.1 的检测中,若 PCR 产物凝胶电泳检测结果为阳性,RFLP 的分析片段大小与描述相符,并且样品 DNA 经 8.3.2 方法扩增后 PCR 产物凝胶电泳检测结果为阳性,则可以确定该样品携带雪松型松干基褐腐病菌。

在 8.3.1 的检测中,若 PCR 产物凝胶电泳检测结果为阳性,而且 RFLP 的分析片段大小与描述相符,且 PCR 产物的序列与 Genbank 中 *Phellinus weirii* 的花旗松型基因组序列一致,则可以判定为该样品携带花旗松型松干基褐腐病菌。

SN/T 3754—2013

11 样品保存与处理

样品经登记和经手人签字后妥善保存。对检出松干基褐腐病菌的样品应保存于 4℃ 冰箱中,以备复核。该类样品保存期满后应经高压灭菌后方可处理。

12 菌株保存与处理

分离并最终鉴定为松干基褐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,以备复核。样品保存期满后应经高压灭菌后方可处理。

13 实验记录与保存

完整的实验记录包括: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。PCR 凝胶电泳检测应有电泳结果照片。

附录 A

(资料性附录)

松干基褐腐病菌其他相关信息

A.1 名称

中文名称:松干基褐腐病菌

英文名称:laminated root rot

A.2 寄主范围

北美地区已报道的松干基褐腐病的寄主:

花旗松型主要寄主:花旗松(*Pseudotsuga menziesii*) (主要寄主)、太平洋冷杉(*Abies amabilis*)、北美冷杉(*A. grandis*)、洛杉矶冷杉(*A. lasiocarpa*)、西部落叶松(*Larix occidentalis*)、阿拉斯加云杉(*Picea sitchensis*)、小干松(*Pinus contorta*)、西部白松(*P. monticola*)、黄松(*P. ponderosa*)、异叶铁杉(*Tsuga heterophylla*)、大果铁杉(*T. mertensiana*)。

雪松型主要寄主:红雪松(美国红侧柏、北美香柏)(*Thuja plicata*)。

除上述寄主外,在日本还发现松干基褐腐病菌可以侵染以下寄主:

马氏冷杉(*A. mariesii*)、库页冷杉(*A. sachalinensis*)、美国扁柏(*Chamaecyparis* sp.)、鱼鳞云杉(*Picea jezoensis*)、异叶铁杉(*T. diversifolia*)。

A.3 分布

北美洲:加拿大(BC省南部花旗松分布地区)、美国西北部(阿拉斯加州、加利福尼亚州、爱达荷州、蒙大拿州、俄勒冈州、华盛顿州、威斯康星州)。

亚洲:日本(本州、北海道中部)、中国(吉林)。

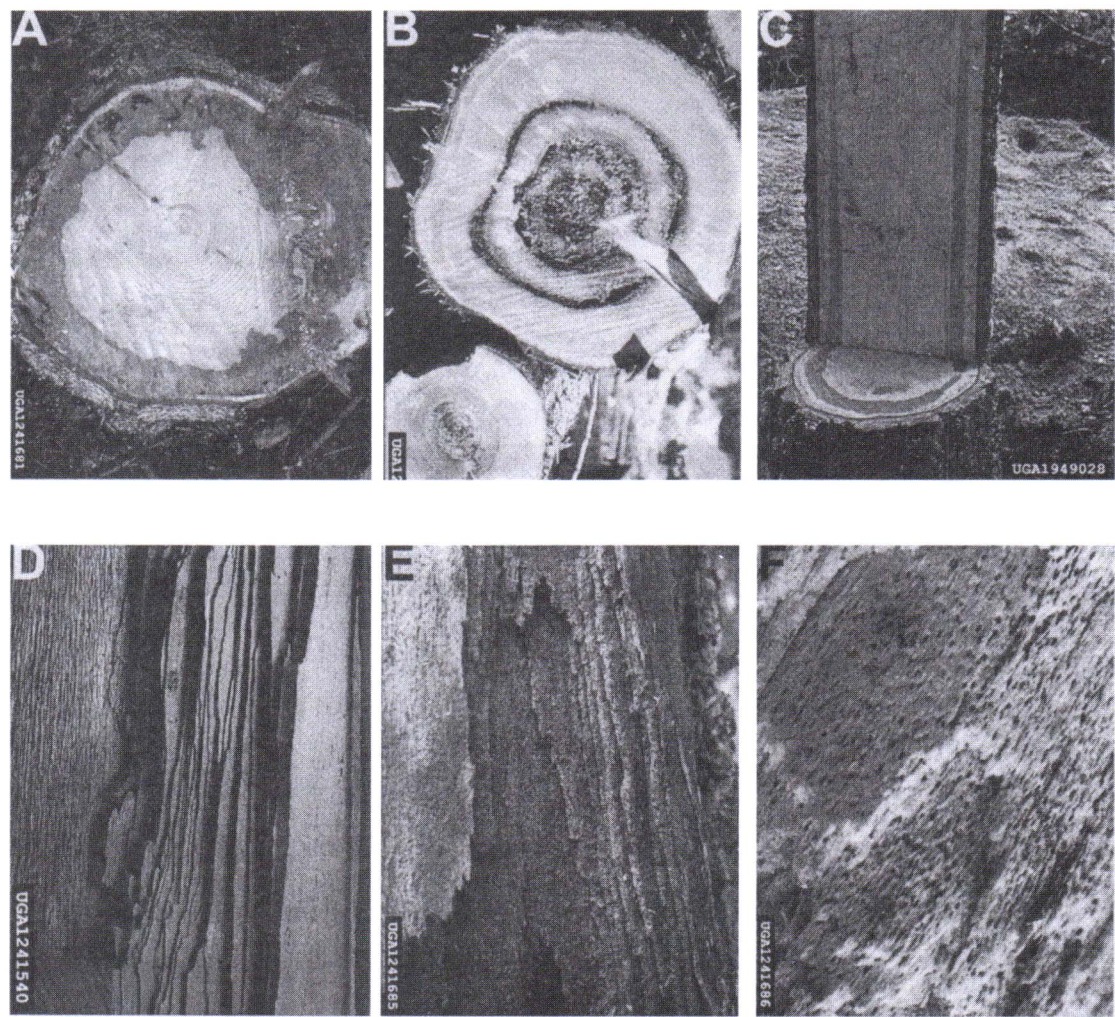
A.4 病原为害症状及形态特征

该病菌能够为害幼树和成年树,病原菌主要通过根部侵染。病原菌与根部接触后,菌丝首先在表皮外生长,伸入土壤内1 cm~5 cm。然后通过树皮到达木质部,在木质部内扩展,造成木质部腐烂。被侵染的树表现为顶枝生长减慢,球果会比正常的小,叶片发黄或发红,脱落,树逐渐死亡。多数腐烂的根折断,聚集在根颈部周围,形成独特的“球根”。

被侵染的外部心材在刚开始腐烂时为新月形至球形,红褐色,病斑可扩展到树干通常可达2 m~4 m。受害原木的基部横切面变色,病症常沿年轮呈环状、新月状或不规则状(图 A.1 中图片 A、B),纵切面呈条纹状分布(图 A.1 中图片 C)。发病较轻的寄主木质部为浅棕褐色或棕褐色(图 A.1 中图片 A、B),发病严重的寄主干基部的木质部横切面上沿年轮分离呈片层状(图 A.1 中图片 D、E)。变色部位常常出现蜂窝状小孔(图 A.1 中图片 F)。利用手持显微镜观察到在片状腐朽层之间常形成棕褐色的刚毛菌丝(长度一般为3 mm,直径5 μm~10 μm,细胞壁115 μm~215 μm)是该病菌最典型的症状(图 A.2 中图片 A、B)。该病菌的子实体,薄,新鲜时如皮革质,干后较脆;呈黄色至肉桂色,表面有小孔(图 A.2 中图片 B);但在受侵染的寄主上子实体并不容易被观察到。

SN/T 3754—2013

病原菌在培养基上一般很难产生子实体,也不形成刚毛状菌丝,营养菌丝体发达呈絮状(图 A.3)。病原菌有性阶段子实体仅在寄主上产生,其显微特征见图 A.4。



说明:

A、B —— 受害原木基部横切面;

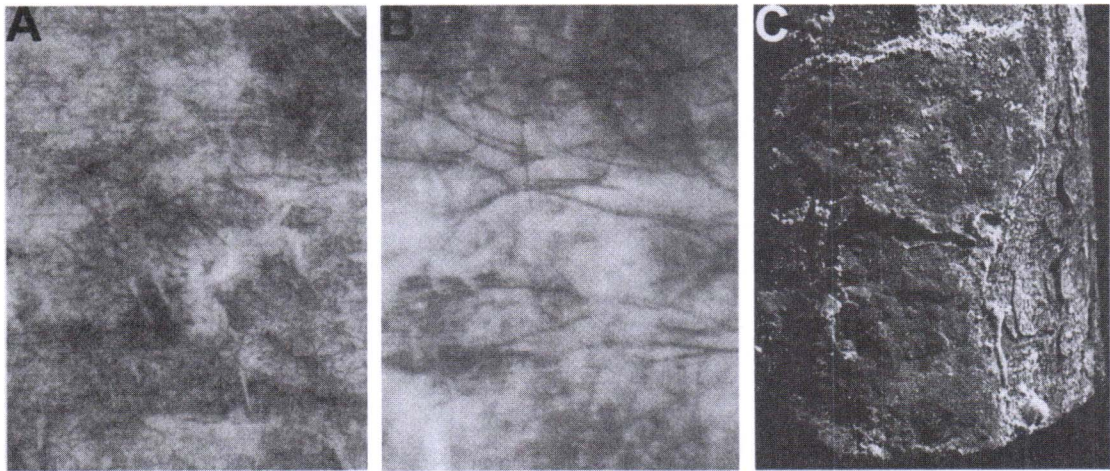
C —— 受害原木纵切面;

D、E —— 受害严重的寄主木质部呈片层状腐烂;

F —— 变色部位蜂窝状小孔。

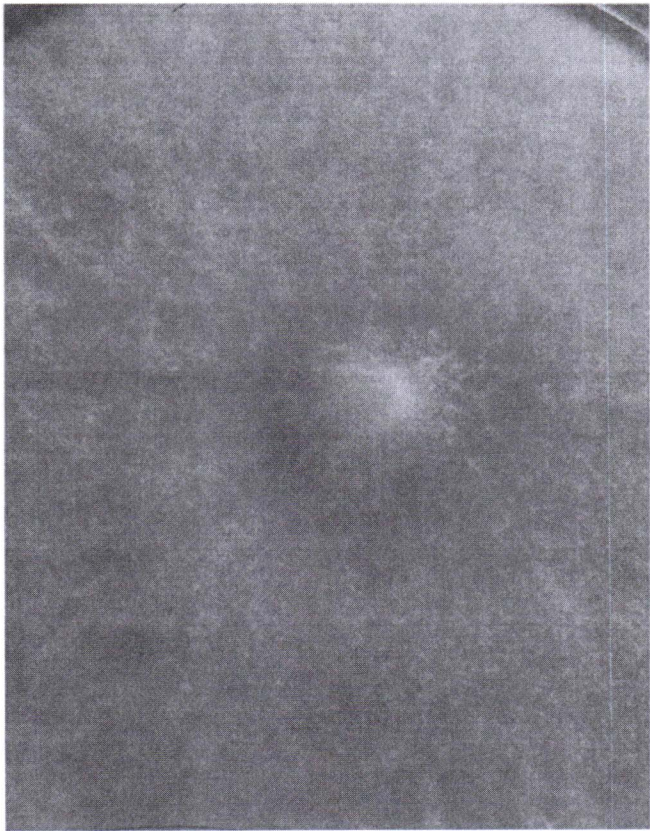
注: 图片来源:Thies and Sturrock,1995, <http://www.forestryimages.org/>。

图 A.1 松干基褐腐病菌(*Phellinus weirii*)侵染引起的典型症状



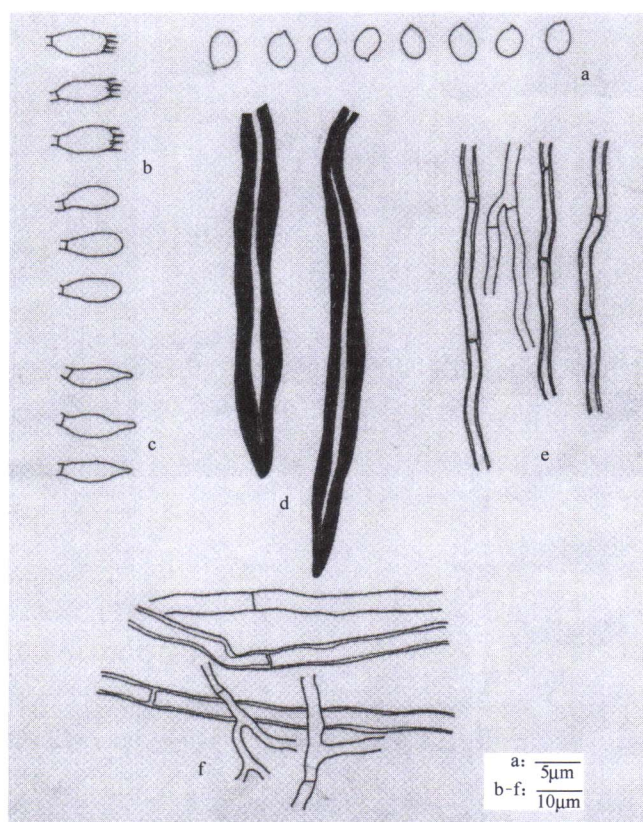
说明：
A —— 松干基褐腐病原菌(*Phellinus weirii*)刚毛菌丝；
B —— A 图的局部放大；
C —— 松干基褐腐病原菌(*Phellinus weirii*)子实体。
注：图片来源：Thies and Sturrock, 1995, <http://www.forestryimages.org/>。

图 A.2 松干基褐腐病原菌(*Phellinus weirii*)形态



注：PDA 上黑暗培养 7 d。

图 A.3 松干基褐腐病原菌(*Phellinus weirii*)的培养性状



说明：

- a——担孢子；
- b——担子；
- c——囊状体；
- d——刚毛状菌丝；
- e——次生菌丝；
- f——生殖菌丝。

注：仿 Dai YC, 2010。

图 A.4 松干基褐腐病菌(*Phellinus weirii*)子实体显微结构

附录 B
(规范性附录)
PCR 检测

B.1 DNA 提取

子实体及菌丝 DNA 提取可选择商业 DNA 提取试剂盒,提取的 DNA 在-80 ℃的条件下保存。

B.2 通用引物扩增

B.2.1 通用引物序列

LR0R:5'-ACCCGCTGAACTTAAGC-3'
LR3:5'-CCGTGTTTCAAGACGGG-3'

B.2.2 PCR 反应体系及参数

B.2.2.1 PCR 反应体系

PCR 反应体系见表 B.1。

表 B.1 PCR 反应体系

试剂名称	终浓度
10×PCR 缓冲液	1×
MgCl ₂	2.5 mmol/L
dNTP	0.1 mmol/L
上游引物	0.5 μmmol/L~1.0 μmmol/L
下游引物	0.5 μmmol/L~1.0 μmmol/L
Taq DNA 聚合酶(Takara)	1.25 U~2.5 U
DNA 模板	1.0 μg~3.0 μg
补 ddH ₂ O 至 25 μL	

B.2.2.2 阴性对照、阳性对照和空白对照的设置

阴性对照:健康的木块的 DNA 模板。
阳性对照:松干基褐腐病菌菌丝的 DNA 模板。
PCR 反应的空白对照:ddH₂O。

B.2.3 PCR 反应参数

94 ℃/2 min;94 ℃/1 min,60 ℃/30 s,72 ℃/3 min,35 个循环;72 ℃/4 min。
注:不同仪器可根据仪器要求将反应参数作适当调整。

B.2.4 琼脂凝胶电泳

用 1.2%琼脂糖凝胶进行电泳,EB 染色,凝胶成像系统观察、拍照。

B.3 RFLP 分析

B.3.1 反应体系

RFLP 酶切反应体系见表 B.2。

表 B.2 RFLP 酶切反应体系

试剂名称	终浓度
10×PCR 缓冲液	1×
限制性内切酶(<i>Age</i> I、 <i>Nci</i> I)	2 U
PCR 产物	10 μL
补 ddH ₂ O 至 20 μL	

B.3.2 反应参数

37℃温育,至少 2 h 或过夜。

B.3.3 琼脂凝胶电泳

电泳同 B.2.4,琼脂糖凝胶浓度改为 2%。

B.4 特异性引物扩增

B.4.1 特异性引物序列

PW164:5'-GCTTCCATTTTCTTAGG-3'

PW659:5'-TCAAAAGGGCGTATTAATG-3'

B.4.2 PCR 反应体系及参数

同 B.2.2。

B.4.3 琼脂凝胶电泳

同 B.2.4。

B.5 结果判断

B.5.1 在 B.3.3 的检测中,若 PCR 产物凝胶电泳检测结果为阳性,大小为 661 bp;*Age* I 酶切 PCR 产物后的片段为 175 bp 和 468 bp;*Nci* I 酶切 PCR 产物后的片段为 71 bp、218 bp、372 bp,可初步判定该样品携带雪松型松干基褐腐病菌。并且样品经 B.4 扩增后 PCR 产物凝胶电泳检测结果为阳性,大小为 495 bp,则可以确定该样品携带雪松型松干基褐腐病菌。

B.5.2 在 B.3.3 的检测中,若 PCR 产物凝胶电泳检测结果为 661 bp;*Age* I 不能对 PCR 产物进行剪切;*Nci* I 酶切 PCR 产物后的片段为 71 bp 和 590 bp。可初步判定该样品携带花旗松型松干基褐腐病。进一步肯定需通过对大小约为 661 bp 的 PCR 产物进行测序比对,若得到的序列与 Genbank 中 *Phellinus weirii* 的花旗松型基因组序列一致,则可以确定为该样品携带花旗松型松干基褐腐病菌。

参 考 文 献

- [1] Allen, E. A.; Morrison, D. J.; Wallis, G. W., Common tree diseases of British Columbia. Natural Resources Canada, Canadian Forest Service, Pacific Forestry Centre, 1996.
- [2] Aoshima, K., Wood-rotting *Poria* from Japan II. Govt. For. Exp. Sta. Bul 1953, 59, 57-64.
- [3] Banik, M. T.; Paul, J. A.; Burdsall Jr, H. H.; Cook, M. E., Serological differentiation of two forms of *Phellinus weirii*. Mycologia 1993, 605-611.
- [4] Buckland, D.; Molnar, A.; Wallis, G., Yellow laminated root rot of Douglas fir. Canadian Journal of Botany 1954, 32 (1), 69-81.
- [5] Dai, Y., First report of laminated root rot on *Sabina przewalskii* caused by *Phellinus weirii* sensu stricto in China. Plant Disease 2004, 88 (5), 573-573.
- [6] Larsen, M. J.; Cobb-Pouille, L. A., *Phellinus* (Hymenochaetaceae). A survey of the world taxa. Synopsis Fungorum 1990, 3, 1-206.
- [7] Larsen, M. J.; Lombard, F. F.; Clark, J. W., *Phellinus sulphurascens* and the closely related *P. weirii* in North America. Mycologia 1994, 121-130.
- [8] Li, C. Y., Light and temperature induced sporocarp formation of *Phellinus weirii*. For. Res 9, 535-538.
- [9] Lim, Y.; Yeung, Y.; Sturrock, R.; Leal, I.; Breuil, C., Differentiating the two closely related species, *Phellinus weirii* and *P. sulphurascens*. Forest Pathology 2005, 35 (4), 305-314.
- [10] Murrill, W. A., An enemy of the western red cedar. Mycologia 1914, 6 (2), 93-94.
- [11] Parmasto, E.; Parmasto, I., The xanthochroic reaction in Aphyllophorales. Mycotaxon 1979, 8, 201-232.
- [12] Thies, W. G.; Sturrock, R. N., Laminated root rot in western North America. Portland, USDA Forest Service 1995, 32.
- [13] Dai YC, 2010. Hymenochaetaceae (Basidiomycota) in China. Fungal Diversity 45: 131-343
Dai YC, 2010.
- [14] *Phellinus weirii*, Data Sheet on Quarantine Pests, EPPO quarantine pest, Prepared by CABI and EPPO for the EU under Contract 90/399003.
- [15] Forest Image; Symptoms on Laminated butt rot in western redcedar log forms concentric rings of decay. Center for Invasive Species and Ecosystem Health, USDA Forest Service and International Society of Arboriculture. The University of Georgia-Warnell School of Forestry and Natural Resources and College of Agricultural and Environmental Sciences, May 04, 2010. [http://www.forestry-images.org/browse/detail.cfm?imgnum=1241681\(1241539\1949028\1241540\1241685\1241686\2250063\)](http://www.forestry-images.org/browse/detail.cfm?imgnum=1241681(1241539\1949028\1241540\1241685\1241686\2250063)).
- [16] *Phellinus weirii*, http://en.wikipedia.org/wiki/Phellinus_weirii.
- [17] Don Goheen, U.S. Department of Agriculture, Pacific Northwest Region, Forest Pest Management, Medford, OR., <http://www.fs.fed.us/pnw/pubs/gtr349/gtr349b.pdf>.
- [18] Natural Resources Canada. Laminated root rot. http://www.pfc.cfs.nrcan.gc.ca/pathology/rootd/laminated_e.html. Retrieved 2008-10-04.
- [19] Forest Pathology; Laminated Root Rot". Canadian Forest Service. Archived from the original on 2007-04-15.