



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3433—2012

---

## 橡胶白根病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Rigidoporus lignosus* (Klotzsch) Imaz.

2012-12-12 发布

2013-07-01 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。

本标准负责起草单位：中华人民共和国海南出入境检验检疫局。

本标准参加起草单位：中华人民共和国宁波出入境检验检疫局、中华人民共和国广东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：韩玉春、刘福秀、李伟东、徐卫、林明光、赵立荣、闻伟刚。

## 橡胶白根病菌检疫鉴定方法

### 1 范围

本标准规定了出入境植物检疫中橡胶白根病菌 *Rigidoporus lignosus* (Klotzsch) Imaz. 的检疫鉴定方法。

本标准适用于橡胶属 *Hevea* 等植物种苗及其他繁殖材料上橡胶白根病菌的检疫鉴定。

### 2 原理

学名: *Rigidoporus lignosus* (Klotzsch) Imaz.

异名: *Fomes lignosus* (Klotzsch) Bres.

*Rigidoporus microporus* (Fr.) Overeem

*Polyporus lignosus* Klotzsch

橡胶白根病菌 *Rigidoporus lignosus* (Klotzsch) Imaz, 属于真菌界 Fungi, 担子菌门 Basidiomycota, 担子菌纲 Basidiomycetes, 无隔担子菌亚纲 Holobasidiomycetidae, 非褶菌目 Aphyllophorales, 薄孔菌科 Meripilaceae, 硬孔菌属 *Rigidoporus* 真菌。

橡胶白根病菌属根部专性寄居菌, 主要寄生橡胶属植物的根部, 离开寄主组织在土壤中不能存活。该病菌在侵染植物的过程中能产生粗细不一的根状菌索, 天气潮湿时在病变根部长出子实体。该病菌主要通过根系接触, 借根状菌索蔓延而传播, 也能借子实体产生的担孢子经过气传沉降到树桩切面或根系伤口形成新的侵染源, 再经过根系接触传播。该病菌的为害症状、形态特征、培养性状、致病性测定及分子生物学信息是鉴定橡胶白根病菌的依据。详细资料参见附录 A 和附录 B。

### 3 试剂与培养基

#### 3.1 试剂

燕麦片、琼脂粉、蔗糖。

三羟甲基氨基甲烷盐酸盐、十六烷基三甲基溴化铵、聚乙烯吡咯烷酮、乙二醇四乙酸、蛋白酶 K、冰醋酸、溴酚蓝、氯化钠、三氯甲烷、异戊醇、异丙醇、DNA 相对分子质量 Marker、溴化乙锭、次氯酸钠。

10×PCR 缓冲液、氯化镁、dNTP、*Taq* DNA 聚合酶、PCR 引物、琼脂糖。

#### 3.2 培养基

病菌分离和纯化采用燕麦琼脂培养基(见附录 C)。

燕麦琼脂平板: 将灭菌燕麦琼脂培养基熔化后倒入灭菌的培养皿中, 形成 2 mm~3 mm 厚的平板。

燕麦琼脂斜面: 将 2 mL~4 mL 燕麦琼脂培养基装入试管中, 灭菌后, 立即将试管摆放在一定斜度的坡面上, 凝固后制成斜面培养基。

### 4 仪器和用具

#### 4.1 仪器

PCR 仪、超净工作台、高压灭菌锅、制冰机、核酸蛋白分析仪、高速冷冻离心机、台式小型离心机、超

低温冰箱、常规冰箱、漩涡振荡器、电泳仪、凝胶成像系统、生物显微镜、生物培养箱、高压灭菌锅、电子天平等。

## 4.2 用具

酒精灯、三角瓶、培养皿、试管、载玻片、盖玻片、接种针、接种环、移液器、手术刀、剪刀、镊子、玻璃棒等。

## 5 检疫与鉴定

### 5.1 症状观察

仔细观察橡胶树种苗根部,看有无典型或可疑症状,症状描述参见附录 A。

### 5.2 样品抽取

发现可疑植株,切取感病部位组织,或将整株可疑植株带回实验室作进一步检测。

## 6 鉴定方法

### 6.1 病菌形态鉴定

#### 6.1.1 组织保湿观察

用塑料盒作为培养器皿,在盒内铺上保湿滤纸,将采集可疑病根组织样品置于滤纸上,无菌水喷雾保持病根组织高度湿润,置培养箱内在  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  黑暗或弱光下培养,3 d 后观察病根有无菌索产生。若有菌索产生,则进一步采用培养基法进行病菌分离纯化培养。

#### 6.1.2 病菌分离培养

剪取可疑的病变植物组织,先用清水洗干净,用 0.5% 次氯酸钠溶液表面消毒 5 min,灭菌水洗 3 次,无菌滤纸吸干表面水分,将病组织移到燕麦琼脂平板培养基中,置室温  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 3 d。如发现可疑的菌落,及时将菌落移植另一新的燕麦琼脂平板上,进一步纯化培养,将纯化菌株移植到燕麦琼脂斜面培养基上,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

#### 6.1.3 病菌形态观测

将 6.1.1 或 6.1.2 分离纯化的病菌在显微镜下进行镜检,观察形态和测量数值。

### 6.2 分子生物学鉴定

#### 6.2.1 DNA 提取

将有疑似症状的植物组织或分离的菌丝,按 CTAB 法提取 DNA(见附录 D)。

#### 6.2.2 特异性引物 PCR 凝胶电泳检测

从植物病组织中抽提总 DNA,用橡胶白根病菌的标准菌株作阳性对照,用健康植株抽提总核酸作阴性对照,用超纯水作为空白对照,进行特异性引物 PCR 凝胶电泳检测(见附录 E)。

## 6.3 致病性测定

### 6.3.1 供试植物材料

致病性测定采用栽培较为广泛分布的感病品种巴西橡胶 *Hevea brasiliensis*。种子先用自来水冲洗干净,并用 0.5% 次氯酸钠表面消毒 5 min,无菌水冲洗 5 min,将处理好的种子放在人工气候箱 25℃ 进行催芽。取萌芽种子播在 30 cm×50 cm 的塑料盆中,种植介质为灭菌的细沙和有机土(比例为 1:2)。植株在室温下生长至平均株高 30 cm(约 2~3 个月)时用于接种实验。

### 6.3.2 菌丝块接种

接种前 10 d,将保存于 4℃ 下的菌种移植转到新鲜燕麦琼脂平板上,在 28℃±1℃ 下,12 h 光照/黑暗重新培养。7 d 后在菌落边缘切取直径约 2 mm 的圆块,作为接种菌丝。用手术刀在供试植株的主根基部切出一个约 5 mm<sup>2</sup> 的圆形切口,并用 0.5% 次氯酸钠溶液表面消毒,再将直径 2 mm 的菌丝块放入根部的切口中,用封口膜封好以防水分流失。同时接种无菌燕麦琼脂培养基块作为对照,实验重复 3 次,每个重复的菌株及对照接种至少 3 棵植株。

接种完后将植株移入温室中培养,控制环境温度在 25℃~28℃,相对湿度维持在 50%~90%。接种 7 d 后观察植株叶片是否有褪绿、变小卷缩等症状,根部是否有菌丝、菌索或子实体产生,每天观察一次,接种 45 d 后所有植株均不发病视为不致病。

### 6.3.3 病原菌再分离

检查植株是否有 7.1 描述的症状出现,并按 6.1.1 或 6.1.2 方法对 6.3.2 发病并表现典型症状的植株接种部位附近的组织进行病菌再分离,按 7.2 描述的病原特征对分离物进行观察。

## 7 鉴定特征

### 7.1 症状特征

#### 7.1.1 地上部分症状

叶片发病初期无明显症状,发病后期叶片开始褪绿变黄,失去闪亮的腊质而缺乏光泽,反卷呈舟状。这种现象最初只在一条或几条枝条上出现,很快整个树冠的叶片褪色、变黄,最后落叶,枝条回枯,导致整株死亡。

#### 7.1.2 地下部分症状

感染病菌的根部表面长满白色菌丝体,并粘附有白色网状菌索,严重时散发蘑菇味。菌索在侵入树皮部位之前有菌索的附着部分,这一部分有时能延伸 250 cm 之长。菌索的生长端白色、扁平。老菌索近圆形、淡黄色。菌索粗细不一,但粗度最多不过 0.6 cm,有时菌索能连结成连续的菌片。在暴露的根系上常常产生子实体,天气潮湿时尤易产生(参见附录 A)。

### 7.2 病原菌特征

菌丝一般只有少数分枝。在燕麦琼脂培养基中,菌丝呈白色,具轮纹,特别是先端更明显,菌丝宽度平均 3.05 μm(2.64 μm~4.29 μm)(参见附录 B)。菌丝沿病根部表面生长,并形成网状菌索。菌索先端扁平、白色,后端呈圆形,黄褐色,直径 0.6 cm。组成菌索的菌丝平均宽 2.31 μm(1.98 μm~3.96 μm)。

## SN/T 3433—2012

子实体檐生、无柄,通常单生,也有群生,堆积成层,长达数尺。新鲜子实体革质或木质,长径 8.2 cm~8.6 cm,短径 5.1 cm~5.3 cm,其上表面橙黄色,具轮纹,并有放射性沟纹,有明显的鲜黄色边缘,下表面橙色、红色或淡褐色。子实体纵切能区分出两层,上层菌肉白色,厚 2 cm~3 cm,下层管孔红褐色,厚 1 mm~2 mm。

担子棒状,无色,大小为  $4.04\ \mu\text{m}\times 17.66\ \mu\text{m}$  ( $3.96\ \mu\text{m}\sim 6.27\ \mu\text{m}$ )  $\times$  ( $9.9\ \mu\text{m}\sim 23.1\ \mu\text{m}$ ),顶端着生 4 支细小的担子梗,其上着生担孢子。在担子之间有棍棒状无色的薄壁隔胞。担子产生的担孢子透明光滑,无色,细胞壁薄,内含物少,近圆形或椭圆形,顶端较尖,有一油滴,担孢子大小为  $4.66\ \mu\text{m}\times 5.15\ \mu\text{m}$  ( $3.3\ \mu\text{m}\sim 7.26\ \mu\text{m}$ )。

### 7.3 PCR 特异性产物

PCR 扩增产物,经电泳后,只有一条 494 bp 的目的片段。

## 8 结果判定

以橡胶白根病菌在橡胶上侵染产生的症状、担子果、担子、担孢子的形态特征或分离菌的 PCR 产物作为鉴定依据,进行综合判定。若病原菌引起的症状特征、病原菌形态特征及特异 PCR 检测结果与 7.1、7.2 和 7.3 的鉴定指标符合,可鉴定为橡胶白根病菌,否则不视为橡胶白根病菌。必要时,按 6.3 进行致病性试验。

## 9 样品保存与复核

### 9.1 样品保存

病根样品经登记和签字后置于 4℃ 冰箱或阴凉干燥、防虫防鼠处妥善保存;样品中分离出的橡胶白根病菌,在燕麦琼脂斜面培养基 28℃ $\pm$ 1℃ 培养 7 d 后,置于 4℃ 冰箱保存;或将菌种用冷冻干燥机制成冻干粉置于 -20℃ 低温冰箱保存。

对鉴定为橡胶白根病菌的病根样品至少应保存 1 年,以备复检、谈判和仲裁,样品保存期满后,需经无害化处理。

### 9.2 结果记录与资料保存

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。

### 9.3 复核

由国家质量监督检验检疫总局指定的单位或人员负责。主要考察实验记录、照片等资料的完整性和真实性,必要时进行复核实验。

附 录 A  
(资料性附录)  
橡胶白根病菌相关信息

#### A.1 名称及分类地位

学名: *Rigidoporus lignosus* (Klotzsch) Imaz.

异名: *Fomes lignosus* (Klotzsch) Bres.

*Rigidoporus microporus* (Fr.) Overeem

*Polyporus lignosus* Klotzsch

英文名: White root disease of Hevea rubber

中文名: 橡胶白根病

橡胶白根病菌 *Rigidoporus lignosus* (Klotzsch) Imaz, 属于菌物界 Fungi, 担子菌门 Basidiomycota, 担子菌纲 Basidiomycetes, 无隔担子菌亚纲 Holobasidiomycetidae, 非褶菌目 Aphyllophorales, 薄孔菌科 Meripilaceae, 硬孔菌属 *Rigidoporus* 真菌。

#### A.2 为害症状

橡胶根部由于受到病原菌侵染, 导致植株水分、养料吸收受到干扰而在地地上部分表现叶片变色、失绿、萎蔫和枝枯等症状, 最后整株死亡。染病树根表层紧贴有根状菌索, 沿根生长时分枝, 形成网状。典型的根状菌索先端白色、扁平, 老熟时圆形、黄色至暗黄褐色。刚被杀死的木质部褐色、白色或淡黄色, 坚硬, 仅在湿土中腐根可呈果酱状。白根病根状菌索与腐生菌产生的根状菌索有区别, 前者紧贴根表, 根皮有坏死, 后者菌索松散地附着在根上, 根部表皮完好。

#### A.3 寄主范围

橡胶白根病菌的寄主植物范围非常广泛。除橡胶属植物外, 还有番荔枝 *Annona squamosa*、印度麻 *Apocynum cannabinum*、菠萝蜜 *Artocarpus heterophyllus*、茶 *Camellia sinensis*、柑桔 *Citrus reticulata*、咖啡 *Coffea arabica*、椰子 *Cocos nucifera*、樟树 *Cinnamomum camphora*、龙脑树 *Dryobalanops aromatica*、油棕 *Elaeis guineensis*、细叶桉 *Eucalyptus tereticornis*、刺桐 *Erythrina variegata*、木棉树 *Gossampinus malabaricus*、银合欢 *Leucaena glauca*、芒果 *Mangifera indica*、人心果 *Manilkara zapota*、木薯 *Manihot esculenta*、胡椒 *Piper nigrum*、槟榔 *reca cathecu*、可可 *Theobroma cacao* 及豆科植物等。

#### A.4 发病规律

橡胶白根病菌属根部专性寄居菌。该病菌主要以丛林病树的残留树桩或各种灌木等野生寄主为侵染来源, 如带病胶树的不断生长, 根系纵横交替相互接触时借助病根上已形成的根状菌索的蔓延传播, 使其发病; 此外, 病菌的子实体产生的分生孢子也能通过气流、雨水传播到胶树伤口、树桩切面或根部, 在适当环境下, 孢子萌发产生侵入丝侵入胶树, 扩展致使其发病, 又形成新侵染源, 再由根系接触传给其他胶树造成根系感染而发病。如此而逐渐地蔓延到周围健康胶树形成病区。



SN/T 3433—2012

#### A.5 传播途径

主要依靠病株残体或带病种苗进行远距离传播。

#### A.6 地理分布

橡胶白根病最先于1904年在新加坡发现,之后在马来西亚、印尼(爪哇、苏门答腊)、泰国、印度、斯里兰卡、缅甸、尼日利亚、刚果、安哥拉、塞拉利昂、乌干达、中非、埃塞俄比亚、加蓬、菲律宾、越南、阿根廷、巴西、秘鲁、墨西哥、新赫布里底群岛等地陆续发现。热带胶区大多都是该菌为害的常发区。



## 附录 B

(资料性附录)

### 橡胶白根病菌侵染症状及形态示意图



图 B.1 橡胶白根病菌侵染橡胶症状

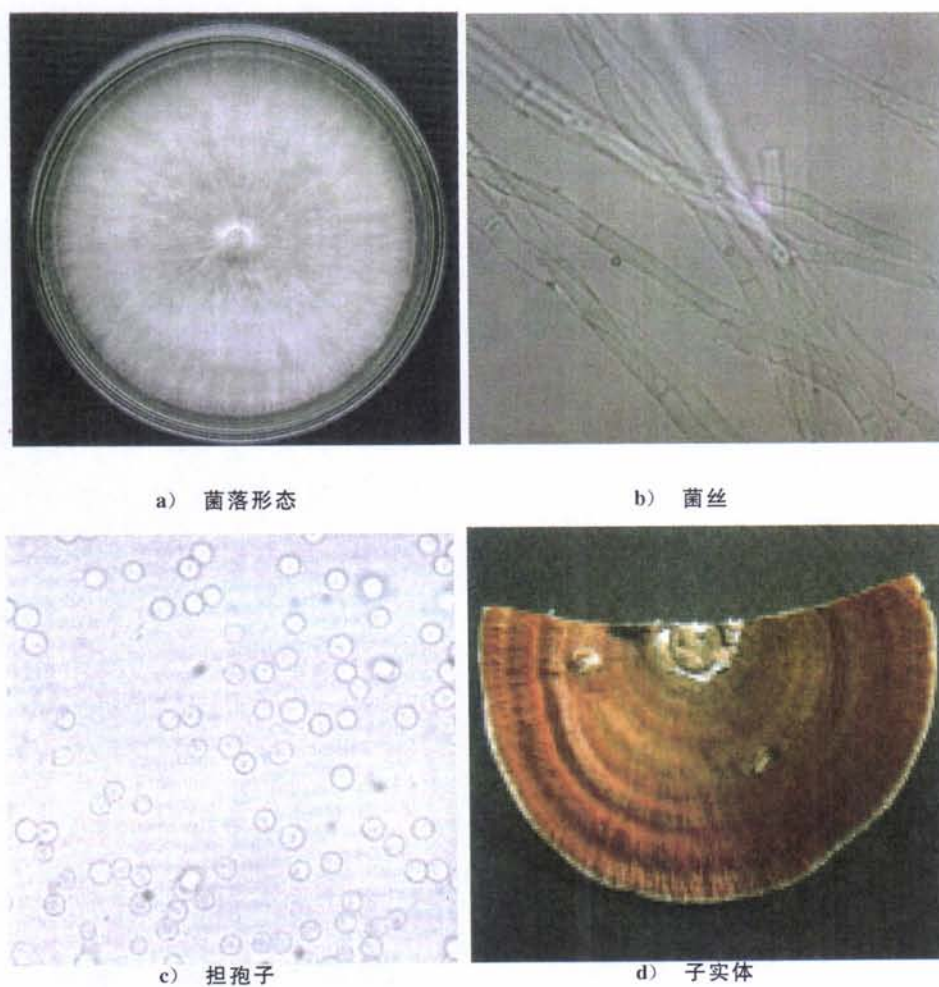


图 B.2 橡胶白根病菌形态示意图

附 录 C  
(规范性附录)  
燕麦琼脂培养基的配制

C.1 配方

见表 C.1。

表 C.1 配方

成分	比例
燕麦片	30.0 g
琼脂	20.0 g
蒸馏水	1 000 mL

C.2 配制方法

将燕麦片加 600 mL 水,制成匀浆,在沸水浴上加热 1 h,纱布过滤后加入琼脂熔化,加水补至 1 000 mL,分装灭菌待用(121 ℃,20 min)。

## 附 录 D

### (规范性附录)

### DNA 提取方法

#### D.1 试剂制备

##### D.1.1 总核酸抽提缓冲液

3%十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、100 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)pH 8.0、20 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)pH 8.0、1.4 mol/L 氯化钠、1%聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、2%β-巯基乙醇。

##### D.1.2 TE 缓冲液(pH 8.0)

1 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0

0.1 mmol/L EDTA。

##### D.1.3 50×TAE 电泳缓冲液(pH 8.0)

242 g Tris

57.1 mL 冰醋酸

100 mL 0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)

##### D.1.4 6×上样缓冲液

0.25%溴酚蓝、40%蔗糖。

#### D.2 总 DNA 提取

样品为橡胶属根部组织时,取 1 g 植物组织洗净消毒后切成小块,冷冻加液氮研磨,放入 1.5 mL 离心管中待用;样品为病原菌时,收集菌丝放入 1.5 mL 浸在液氮里的离心管中,用塑料杵碾碎待用。

样品管中加入 1 000 μL CTAB 缓冲液(缓冲液中加 0.1 g 蛋白酶 K)混匀,65 °C 水浴 1 h;13 000g 离心 15 min,保留上清液;加 500 μL Tris 饱和酚:三氯甲烷:异戊醇(体积为 25:24:1)混匀,13 000g 离心 15 min,保留上清液;再加 500 μL 三氯甲烷:异戊醇(体积为 24:1)混匀,13 000g 离心 15 min,取上清液;加入 1 mL 异丙醇混匀,13 000g 离心 30 min,可见 DNA 沉淀;70%乙醇洗 DNA 沉淀两次,无水乙醇洗涤两次,并倒置离心管 1 min;加入 100 μL TE 缓冲液悬浮总核酸,用 260 nm 紫外线检测 DNA 纯度,置于-20 °C 下保存备用。

其他的 DNA 提取方法也可以借鉴,也可以选择使用商业 DNA 提取试剂盒,提取的 DNA 在-80 °C 的条件下可以冻存 1 年。

## 附录 E

(规范性附录)

## 特异性引物 PCR 凝胶电泳检测

## E.1 特异性引物序列

见表 E.1。

表 E.1 PCR 检测的特异性引物序列及扩增产物

特异性引物	引物序列	扩增产物
1	5'-GAG CCT CTC TTG GCC TCT CC-3'	496 bp
2	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'	

## E.2 PCR 反应体系及参数

## E.2.1 PCR 反应体系

见表 E.2。

表 E.2 PCR 反应体系 (25  $\mu\text{L}$  体系)

试剂名称	终浓度	体积
10 $\times$ PCR 反应缓冲液	10 $\times$	2.5 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mmol/L	2.5 $\mu\text{L}$
dNTPs	0.15 mmol/L	2.0 $\mu\text{L}$
正向引物	20 $\mu\text{mol/L}$	1.0 $\mu\text{L}$
反向引物	20 $\mu\text{mol/L}$	1.0 $\mu\text{L}$
Taq DNA 聚合酶	2.5 U/ $\mu\text{L}$	0.2 $\mu\text{L}$
DNA 模板	2.0 $\mu\text{g/L}$	1 $\mu\text{L}$
超纯 H <sub>2</sub> O		14.8 $\mu\text{L}$

## E.2.2 反应条件

94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 然后进行 30 个循环: 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 62  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min。最后一个循环结束后 72  $^{\circ}\text{C}$  继续延伸 6 min。

## E.3 琼脂糖凝胶电泳

PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。每个样品取 5  $\mu\text{L}$  的 PCR 产物与 1  $\mu\text{L}$  的 6 $\times$  上样缓冲液

混匀,并加到置于  $1\times$ TAE 缓冲液的 1.5%琼脂糖凝胶孔中,然后在 120 V 下电泳。电泳结束后,放入装有  $0.5\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$  的溴化乙锭溶液的容器中染色,然后在清水中清洗后,在凝胶成像系统中观察,拍照,并保存照片。

#### E.4 结果判定

琼脂糖凝胶电泳出现一条 496 bp 片段,可以判定所测样品携带橡胶白根病菌。

### 参 考 文 献

- [1] 张运强,余卓桐,周世强,等. 橡胶树白根病病原菌的鉴定[J]. 热带作物学报,1992,13(2): 63-70.
- [2] 魏铭丽,崔昌华,郑肖兰,等. 橡胶树白根病研究概述[J]. 广西热带农业,2008,4:17-19.
- [3] 张开明. 橡胶树白根病[J]. 热带农业科技报,2006,29(4):33-34.
- [4] 张欣,陈勇,谢艺贤,等. 橡胶白根病鉴别与防治[J]. 植物检疫,2007,21(2):122-124.
- [5] Bose S. R. ,Bakshi B. K. *Polyporus lignosus* Klotzsch and its identity[J]. Transactions of the British Mycological Society,1957,40:45-61.
- [6] Fox R. A. White root disease of *Hevea brasiliensis* [C]. The identity of National Rubber Conference,1960,473-482.
- [7] Gohet E. ,Canh T. V. ,Louandri M. ,et al. New developments in chemical control of white root disease of *Hevea brasiliensis* in Africa [J]. Crop Protection,1991,10:234-238.
- [8] M. Nicole. ,Nandris J. ,P. Geiger and B. Rio. Variability among African populations of *Rigidoporus lignosus* and *Phellinus noxius*. Sonderdruck. aus European Journal of Forest Pathology,Band 15(1985),Heft 5-6,S. 293-300.
- [9] Stalpers J. A. Identification of wood-inhabiting Aphyllophorales in pure culture[J]. Studies in Mycology,1978,16:1-248.
- [10] Guyot J. ,Flori A. Comparative study for detecting *Rigidoporus lignosus* on rubber trees[J]. Crop Protection,2002,21:461-466.
- [11] Kaewchai, S. ,Soytong, K. Application of biofungicides against *Rigidoporus microporus* causing white root disease of rubber trees[J]. Journal of Agricultural Technology,2010,6(2):349-363.
-