



中华人民共和国国家标准

GB/T 28095—2011

木层孔褐根腐病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Phellinus noxius* (Corner) G. Cunn.

2011-12-30 发布

2012-06-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国植物检疫标准化技术委员会(SAC/TC 271)提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国宁波出入境检验检疫局检验检疫技术中心、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:张建成、陈先锋、丁国云、张慧丽、戴忠军、张培、王良华。

木层孔褐根腐病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了木层孔褐根腐病菌 *Phellinus noxius* 的检疫鉴定方法。
本标准适用于木材和苗木上的木层孔褐根腐病菌的检测和鉴定。

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。

GB/T 12728 食用菌术语

SN/T 1126 进出境木材检疫规程

SN/T 1157 进出境植物苗木检疫规程

3 术语和定义

GB/T 12728 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

平伏反卷 effused-reflexed

担子果在基物上的着生形态,其一部分贴附于基物上,边缘翘起反卷形成檐状、条状、半圆形或扇形菌盖,有时呈覆瓦状叠生。整个担子果贴附于基物上,不形成菌盖的形态称为平伏(effused)。

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

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。

4 木层孔褐根腐病菌基本信息

中文名:木层孔褐根腐病菌。

学名:*Phellinus noxius* (Corner) G. Cunn. 1965。

异名:*Fomes noxius* Corner 1932; *Phellinidium noxium* (Corner) Bondartseva & S. Herrera 1992。

病害英文名:brown root rot disease。

属真菌界 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*。

木层孔褐根腐病菌的其他信息参见附录 A。

5 方法原理

根据木层孔褐根腐病菌在寄主植物上的症状,抽取可疑样品进行病原菌分离培养,根据病原菌的形态特征、生物学特征和 PCR 特异性反应对病菌进行鉴定。

6 仪器和用具

6.1 仪器设备

体视显微镜、显微镜(具 100×油镜和测微尺)、超净工作台、生物培养箱、冰箱、高压灭菌器、干热灭菌器。

6.2 实验用具

载玻片、盖玻片、滴管、培养皿、镊子、解剖刀、酒精灯、医用手术剪。

7 试剂和材料

7.1 试剂

7.1.1 蒸馏水(H₂O)。

7.1.2 5%氢氧化钾(KOH)溶液(质量浓度)。

7.1.3 棉蓝试剂:棉蓝(苯胺蓝)0.5 g、乳酸 60 mL。

7.1.4 Melzer 试剂:碘(I₂)0.5 g、碘化钾(KI)1.5 g、水 20 g、水合氯醛 22.5 g。

7.2 培养基

7.2.1 大麦提取物琼脂(MEA)培养基

大麦提取物(Malt Extract)20 g,琼脂(Agar)20 g,加蒸馏水至 1 000 mL。121 ℃高压湿热灭菌 30 min,倒平板备用。

7.2.2 选择性培养基

MEA 培养基灭菌后,待冷却至 40 ℃~50 ℃,加入 100 mg 氨基青霉素,10 mg 氯硝胺,10 mg 苯菌灵,500 mg 没食子酸,混匀倒平板。

7.2.3 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基

自行配制或使用市售 PDA 培养基。

8 现场检测

取样和抽样按照 SN/T 1157 或 SN/T 1126 方法进行。

取样时应进行针对性检查,检查有无可疑症状,重点观察茎干基部 1 m 范围内区域及根系是否包裹褐色菌丝层;剥去树皮,观察树木组织是否白色腐朽,有无褐色网纹状菌丝束;腐烂树木表面是否有真菌子实体。直接挑出带有可疑症状的货物,将可疑部分切(锯)下,送实验室作进一步检验鉴定。

9 实验室检测

9.1 分离和培养

将带病材料用自来水冲洗干净,洗净吸水纸吸干。去除树皮,用消毒的解剖刀片将内部病组织切成约 3 mm×3 mm×6 mm 小块,置于选择性培养基平板上,每个培养皿放置 5 块,梅花状排列,30 ℃ 黑暗培养 5 d~10 d。选择性培养基上的褐色菌落转移到 MEA 培养基或 PDA 培养基 30 ℃ 黑暗培养。长满平板后,检查培养性状,在光学显微镜下观察菌丝形态特征。

9.2 子实体观察

如发现病菌子实体,采用宏观形态观察和显微切片方法检测。

宏观形态观察使用体式显微镜,观察子实体的形态、色泽、菌盖、菌孔等特征。

显微切片检测方法,使用干标本制作成徒手切片,以蒸馏水、Melzer 试剂和 5% 氢氧化钾溶液分别做为浮载剂,在显微镜下观察菌丝及子实层中的担孢子、担子、菌髓等微观特征。显微测量和摄像均在棉蓝试剂包埋的切片中进行。孢子测量 30 个,其他结构如菌丝直径、担子大小等均测量 10 个,取极小值与极大值,宽度测量于其结构的最宽部位,长度测量于其顶端至基部分隔处。

9.3 PCR 检测方法

培养物菌丝或病组织中病菌 DNA 提取和 PCR 检测方法见附录 B。

引物 PN-1F/PN-2R 扩增病菌 DNA,得到 414 bp 或 422 bp 扩增产物,则为 PCR 检测阳性,反之,为阴性。所有真菌 DNA 均可与通用引物 ITS-1 和 ITS-2 结合扩增产生 300 bp 左右的 DNA 片段。

10 鉴定特征

10.1 寄主上症状

树木根和茎基部表面多形成一层厚厚的黑褐色到黑色菌丝壳,坚硬,油浸状表面,根部菌丝壳常与泥沙结合不明显。潮湿时,茎部菌丝壳的延伸边缘乳白色,约 2 cm 宽,带有澄清褐色的渗出液滴。(参见图 C. 1)树皮易剥落,病害引起软而脆的蜂窝状白色腐烂,受感染树皮内侧组织具不规则暗褐色菌丝束形成的网纹(参见图 C. 2)。

10.2 无性阶段特征

10.2.1 培养性状

在含有没食子酸 MEA 培养基上,能产生扩散性的暗褐色色素。菌落不规则,菌落前缘菌丝气生至平伏,初始白色至草黄色,渐渐转为黄褐色至褐色,有褐色网纹(参见图 D. 1)。

10.2.2 显微特征

菌丝透明到褐色,不产生锁状联合,一般能够产生节孢子和毛状菌丝。节孢子(参见图 D. 2)由菌丝断裂形成,与菌丝同色,球形到卵形。毛状菌丝(参见图 D. 3)鹿角状,菌丝分叉生长,表面有刺状突起。

10.3 子实体形态

10.3.1 整体特征

子实体单生,无柄,大小不一,平伏或平伏反卷形成窄的菌盖(参见图 C. 3 和图 C. 4),长可达 10 cm,

宽可达 6 cm,基部厚可达 2.5 cm;平伏时长可达 40 cm,宽可达 15 cm。新鲜时硬革质或软木栓质,无嗅无味,干后硬木质。菌盖表面暗褐色至黑色,具不规则的环带,光滑。孔口表面灰褐色至暗褐色,不育的边缘明显,孔口圆形,每毫米 7 个~8 个,孔口边缘薄而全缘。

10.3.2 微观结构

子实体切片分为 3 部分,最上层表皮为一明显的黑色薄皮壳,中间菌肉层,下层菌管层。菌肉黄褐色,具同心环带,菌肉和菌管之间有一条黑色细线相间。菌管褐色。微观结构参见图 D.4。具体结构如下:

- a) 菌丝结构:担子果内只存在生殖菌丝;菌肉中菌丝为菌肉菌丝,菌管为子实层体,其中的菌丝为菌髓菌丝,菌髓菌丝与菌肉菌丝相似;所有隔膜无锁状联合;在 5% KOH 试剂中菌丝组织颜色变黑,对 Melzer 试剂无变色反应,在棉蓝试剂中略变蓝色。担子果菌髓里的刚毛状菌丝顶端钝而菌肉里的刚毛状菌丝顶端锐,是子实体的最重要的鉴定特征。
- b) 菌肉:生殖菌丝无色,薄壁,偶尔分枝,常具隔膜,平直,规则排列,直径为 $4\ \mu\text{m}\sim 7\ \mu\text{m}$;刚毛状菌丝褐色至暗褐色,厚壁,内腔宽,通常末端尖,起源于黄色厚壁菌丝,长达数百微米,直径 $5\ \mu\text{m}\sim 10\ \mu\text{m}$ 。
- c) 菌管:生殖菌丝很少分枝,常具隔膜,略平行排列,相互紧密黏结,直径为 $3\ \mu\text{m}\sim 6\ \mu\text{m}$ 。刚毛状菌丝明显,厚壁并具一狭窄的内腔,顶端圆钝,长达数百微米,最宽处直径为 $7\ \mu\text{m}\sim 14.5\ \mu\text{m}$ 。子实层通常在后期消解;囊状体棍棒状,具长而尖锐的顶部,薄壁,大小为 $(16\ \mu\text{m}\sim 21\ \mu\text{m})\times(4\ \mu\text{m}\sim 5\ \mu\text{m})$;担子近棍棒状,大小为 $(12\ \mu\text{m}\sim 16\ \mu\text{m})\times(3.5\ \mu\text{m}\sim 4\ \mu\text{m})$;次生菌丝丰富,无色,薄壁,常分枝,直径为 $3\ \mu\text{m}\sim 5\ \mu\text{m}$ 。
- d) 孢子:担孢子椭圆形或倒卵形,无色,薄壁,大小为 $(4\ \mu\text{m}\sim 6\ \mu\text{m})\times(3\ \mu\text{m}\sim 5\ \mu\text{m})$ 。

10.4 木层孔褐根腐病菌与其近似种的主要区别

木层孔褐根腐病菌与其近似种橡胶木层孔菌的主要区别参见附录 E。

11 结果判定

11.1 检出子实体,符合 10.3 的鉴定特征,可直接判为木层孔褐根腐病菌。

11.2 未检出子实体,为害症状、无性阶段培养特征符合 10.1~10.2 鉴定特征,判为木层孔褐根腐病菌。

11.3 未检出子实体,为害症状不明显,分离得到符合 10.2 鉴定特征的真菌,PCR 特异性反应阳性,可判为木层孔褐根腐病菌。

12 标本和样品保存

鉴定为木层孔褐根腐病菌的病木保存至少 12 个月。

选择适当的病原菌材料制成永久玻片,分离获得的木层孔褐根腐病菌分离物转移到 MEA 斜面培养基或 PDA 斜面培养基或灭菌蒸馏水室温黑暗保存,每 6 个月转接到新的培养基上保存,并严格防止扩散。妥善保存实验原始记录等材料,以备复验、谈判和仲裁。

样品和菌株保存期满后,经高温高压灭菌处理。

附 录 A
(资料性附录)

木层孔褐根腐病菌其他信息

A.1 分布

亚洲:巴基斯坦,菲律宾,马来西亚(西马来西亚、沙巴、沙撈越),缅甸,斯里兰卡,印度(喀拉拉邦、马德拉斯、迈索尔、东北地区、北方邦、安达曼群岛、尼科巴群岛),印度尼西亚(爪哇、苏门答腊),越南,中国(台湾)。

非洲:安哥拉,贝宁,布基纳法索,多哥,刚果,加纳,加蓬,喀麦隆,科特迪瓦,肯尼亚,尼日利亚,塞拉利昂,坦桑尼亚,乌干达,中非。

美洲:巴西,波多黎各,法属圭亚那,哥斯达黎加,古巴。

大洋洲:澳大利亚(昆士兰),巴布亚新几内亚,北马里亚纳群岛(美属),斐济,美属萨摩亚,所罗门群岛,瓦努阿图,西萨摩亚,新西兰。

A.2 寄主

木层孔褐根腐病菌寄主范围很广,寄主包括 56 科近 200 种植物(见表 A.1)。

表 A.1 木层孔褐根腐病菌的寄主

学 名	中文名	学 名	中文名
<i>Acacia aulacocarpa</i>	纹荚相思	<i>Artemisia capillaris</i>	茵陈蒿
<i>Acacia confusa</i>	台湾相思	<i>Artemisia princeps</i>	魁蒿,艾草
<i>Acacia mangium</i>	马占相思	<i>Artocarpus heterophyllus</i>	木菠萝
<i>Actinodaphne pedicellata</i>	小梗木姜子	<i>Averrhoa carambola</i>	杨桃
<i>Agathis robusta</i>	昆士兰贝壳杉	<i>Barleria cristata</i>	假杜鹃
<i>Albizia lebeck</i>	大叶合欢	<i>Bauhinia purpurea</i>	红花羊蹄甲
<i>Albizia</i> sp.	合欢属	<i>Bauhinia</i> sp.	羊蹄甲属
<i>Aleurites fordii</i>	油桐	<i>Bauhinia variegata</i>	宫粉羊蹄甲
<i>Aleurites moluccana</i>	石栗	<i>Bauhinia hybrid</i>	艳紫荆
<i>Alstonia scholaris</i>	糖胶树	<i>Bischofia javanica</i>	茄苳
<i>Annona</i> × <i>squamosa-cherimola</i>	凤梨释迦	<i>Blepharocarya involucrigera</i>	漆树科一种
<i>Annona montana</i>	山刺番荔枝	<i>Boehmeria nivea</i>	苎麻
<i>Annona squamosa</i>	番荔枝	<i>Bombax ceiba</i>	木棉
<i>Annona squamosa</i> × <i>A. cherimola</i>	凤梨释迦	<i>Bougainvillea</i> sp.	九重葛属
<i>Araucaria cunninghamii</i>	南洋杉	<i>Breynia nivosa</i>	彩叶山漆茎
<i>Araucaria heterophylla</i>	异叶南洋杉	<i>Broussonetia kazinoki</i>	小构树
<i>Areca triandra</i>	三药槟榔	<i>Broussonetia papyrifera</i>	构树

表 A.1 (续)

学名	中文名	学名	中文名
<i>Cajanus cajan</i>	木豆	<i>Crotalaria micans</i>	黄猪屎豆
<i>Calocedrus formosana</i>	台湾肖楠	<i>Cycas taiwaniana</i>	台湾苏铁
<i>Calophyllum inophyllum</i>	琼崖海棠	<i>Dalbergia sissoo</i>	印度黄檀
<i>Camellia japonica</i>	山茶	<i>Delonix regia</i>	凤凰木
<i>Camellia japonica</i> var. <i>japonica</i>	凤凰山茶	<i>Dimocarpus longan</i>	龙眼
<i>Camellia sinensis</i>	茶	<i>Diospyros ferrea</i> var. <i>buxifolia</i>	象牙树
<i>Cassia fistula</i>	腊肠树	<i>Diospyros kaki</i>	柿树
<i>Cassia grandis</i>	红花铁刀木	<i>Diospyros oldhamii</i>	红柿
<i>Cassia</i> sp.	铁刀木属	<i>Duranta repens</i>	假连翘
<i>Casuarina equisetifolia</i>	木麻黄	<i>Elaeis guineensis</i>	油棕
<i>Cedrela mexicana</i>	墨西哥洋椿	<i>Elaeocarpus serratus</i>	锡兰橄榄
<i>Ceiba pentandra</i>	爪哇木棉	<i>Eriobotrya japonica</i>	枇杷
<i>Cerbera manghas</i>	海芒果	<i>Erythrina variegata</i>	刺桐
<i>Chamaecyparis formosensis</i>	红桧	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	赤桉
<i>Chlorophora excelsa</i>	绿柄桑	<i>Eucalyptus citriodora</i>	柠檬桉
<i>Chorisia speciosa</i>	美人树	<i>Eucalyptus drepanophylla</i>	纤脉桉
<i>Chrysalidocarpus lutescens</i>	散尾葵	<i>Eucalyptus grandis</i>	巨桉
<i>Cinnamomum camphora</i>	樟树	<i>Ficus elastica</i> var. <i>elastica</i>	印度橡胶树
<i>Cinnamomum kanehirai</i>	牛樟	<i>Ficus hanceana</i>	桑科一种
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	锡兰肉桂	<i>Ficus microcarpa</i>	榕
<i>Citrus aurantifolia</i>	莱檬	<i>Ficus pumila</i> var. <i>awkeotsang</i>	爱玉子
<i>Citrus limon</i>	柠檬	<i>Ficus religiosa</i>	菩提树
<i>Citrus reticulata</i>	柑橘	<i>Ficus stenophylla</i>	竹叶榕
<i>Cocos nucifera</i>	可可椰子	<i>Firmiana simplex</i>	梧桐
<i>Codiaeum variegatum</i>	变叶木	<i>Flemingia macrophylla</i>	大叶千金拔
<i>Coffea arabica</i>	小粒咖啡	<i>Flindersia brayleyana</i>	昆士兰巨盘木
<i>Coffea canephora</i>	中粒咖啡	<i>Fraxinus formosana</i>	白鸡油
<i>Coffea</i> sp.	咖啡属	<i>Gardenia jasminoides</i>	黄栀子
<i>Cola nitida</i>	可拉	<i>Grevillea robusta</i>	银桦
<i>Cordia dichotoma</i>	破布木	<i>Hedera australiana</i>	五加科一种
<i>Crataegus</i> sp.	山楂	<i>Hevea brasiliensis</i>	巴西橡胶树
<i>Crescentia cujete</i>	葫芦树	<i>Hevea</i> sp.	橡胶树
<i>Crotalaria anagyroides</i>	三尖叶猪屎豆	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	朱槿
<i>Cryptocarya concinna</i>	海南厚壳桂	<i>Hibiscus schizopetalus</i>	裂瓣朱槿
<i>Cupressus lusitanica</i>	墨西哥柏木	<i>Hibiscus tiliaceus</i>	黄槿

表 A.1 (续)

学名	中文名	学名	中文名
<i>Hydrangea chinensis</i>	中国绣球	<i>Ochroma lagopus</i>	轻木
<i>Ipomoea pescaprae</i>	马鞍藤	<i>Osmanthus fragrans</i>	桂花
<i>Keteleeria davidiana</i> var. <i>formosana</i>	台湾油杉	<i>Pachira macrocarpa</i>	马拉巴栗
<i>Kigelia pinnata</i>	腊肠树	<i>Palaquium formosanum</i>	大叶山榄
<i>Kissodendron australianum</i>	五加科一种	<i>Peltophorum inerme</i>	盾柱木
<i>Koelreuteria henryi</i>	台湾栾树	<i>Persea americana</i>	鳄梨
<i>Lactuca indica</i>	山莴苣	<i>Persea gratissima</i>	鳄梨
<i>Lagerstroemia speciosa</i>	大花紫薇	<i>Pinus elliotii</i>	湿地松
<i>Lagerstroemia turbinata</i>	梭萼紫薇	<i>Pinus elliotii</i> var. <i>elliotii</i>	湿地松
<i>Lantana camara</i>	马缨丹	<i>Pinus thunbergii</i>	黑松
<i>Leucaena</i> × <i>glabrata-leucocephala</i>	银合欢	<i>Piper nigrum</i>	胡椒
<i>Leucaena leucocephala</i>	银合欢	<i>Pistacia chinensis</i>	黄连木
<i>Liquidambar formosana</i>	枫香	<i>Podocarpus macrophyllus</i>	罗汉松
<i>Litchi chinensis</i>	荔枝	<i>Podocarpus macrophyllus</i> var. <i>macrophyllus</i>	罗汉松
<i>Litsea glutinosa</i>	潺高树	<i>Pongamia pinnata</i>	水黄皮
<i>Litsea hypophaea</i>	小梗木姜子	<i>Populus</i> sp.	杨树属
<i>Macaranga tanarius</i>	血桐	<i>Prunus campanulata</i>	山樱花
<i>Machilus zuihoensis</i>	香楠	<i>Prunus mume</i>	梅
<i>Maesa tenera</i>	台湾山桂花	<i>Prunus persica</i>	桃
<i>Mallotus paniculatus</i>	白楸	<i>Pterocarpus indicus</i>	印度紫檀
<i>Mangifera indica</i>	芒果	<i>Pyrus pyrifolia</i>	沙梨
<i>Manihot utilissima</i>	木薯	<i>Rhododendron obtusum</i>	杜鹃
<i>Melaleuca leucadendron</i>	白千层	<i>Rosa</i> sp.	蔷薇属
<i>Melia azedarach</i>	楝	<i>Roystonea regia</i>	大王椰子
<i>Melicope merrilli</i>	山刈菜	<i>Salix babylonica</i>	垂柳
<i>Melodinus angustifolius</i>	台湾山橙	<i>Saurauia oldhamii</i>	水冬瓜
<i>Michelia compressa</i>	乌心石	<i>Schefflera octophylla</i>	鹅掌柴
<i>Michelia compressa</i> var. <i>formosana</i>	台湾乌心石	<i>Schinus terebinthifolius</i>	巴西乳香
<i>Michelia figo</i>	含笑花	<i>Stenocarpus sinuatus</i>	火轮树
<i>Muntingia calabura</i>	西印度樱桃	<i>Sterculia foetida</i>	掌叶辛婆
<i>Murraya paniculata</i>	千里香	<i>Sterculia nobilis</i>	辛婆
<i>Murraya paniculata</i> var. <i>paniculata</i>	月橘	<i>Swietenia macrophylla</i>	大叶桃花心木
<i>Neolitsea parvigemma</i>	小芽新木姜子	<i>Swietenia mahagoni</i>	桃花心木
<i>Nephelium lappaceum</i>	红毛丹	<i>Syzygium samarangense</i>	莲雾
<i>Nerium oleander</i>	洋夹竹桃		

表 A.1 (续)

学 名	中文名	学 名	中文名
<i>Tabebuia chrysantha</i>	黄钟木	<i>Theobroma cacao</i>	可可
<i>Taiwania cryptomerioides</i>	台湾杉	<i>Thevetia peruviana</i>	黄花夹竹桃
<i>Tectona grandis</i>	柚木	<i>Ulmus parvifolia</i>	榔榆
<i>Tephrosia</i> sp.	灰毛豆属	<i>Urena lobata</i>	中华地桃花
<i>Tephrosia vogelii</i>	非洲山毛豆	<i>Vitis vinifera</i>	葡萄
<i>Terminalia boivinii</i>	小叶榄仁	<i>Zelkova serrata</i> var. <i>serrata</i>	榉
<i>Terminalia catappa</i>	榄仁		

附录 B
(规范性附录)
PCR 检测方法

B.1 仪器和用具**B.1.1 仪器设备**

普通天平(感量为 0.01 g)、高速冷冻离心机、冰箱、PCR 仪、电泳仪、凝胶成像系统。

B.1.2 实验用具

可调微量加样器(2 μ L、10 μ L、100 μ L、1 000 μ L)、离心管(1.5 mL)。

B.2 试剂

B.2.1 无菌双蒸水(ddH₂O)、液氮(N₂)、2-巯基乙醇、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、无水乙醇、氯化镁(MgCl₂)、Taq DNA 聚合酶、10×PCR 缓冲液、琼脂糖、DNA 相对分子质量标记(100 bp~1 000 bp)、10×上样缓冲液。

B.2.2 2%CTAB 提取缓冲液:2%十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)(质量浓度)、0.01 mol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)(pH8.0)、0.02 mol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)、1.4 mol/L 氯化钠(NaCl)。

B.2.3 三氯甲烷/异戊醇:体积比 24:1。

B.2.4 TE 缓冲液(pH8.0):10 mmol/L Tris-HCl(pH8.0)、1 mmol/L EDTA(pH8.0)。

B.2.5 dNTP 混合物:包括 dATP、dTTP、dCTP、dGTP,每种浓度各 2.5 mmol/L。

B.2.6 引物:根据表 B.1 和表 B.2 中序列合成引物,加无菌双蒸水配制成 10 μ mol/L。

表 B.1 特异性引物

引 物	序列 5'-3'
PN-1F	AGT TTG CGC TCA TCC ATC TC
PN-2R	AGC CGA CTT ACG CCA GCA G

表 B.2 真菌通用引物

引 物	序列 5'-3'
ITS-1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G
ITS-2	GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC

B.2.7 EB 储存液:溴化乙锭(EB)加无菌双蒸水配制成 10 mg/mL。

B.2.8 5×TBE 电泳缓冲液:Tris-HCl 54 g、硼酸(H₃BO₃)27.5 g、0.5 mol/L EDTA(pH8.0)20 mL,加蒸馏水至 1 000 mL,使用时 10 倍稀释。

B.3 病菌 DNA 提取

不同组织 DNA 提取方法如下,也可使用市售 DNA 提取试剂盒提取。

B.3.1 菌丝体 DNA 提取

制备用菌丝体约 0.2 g 于研钵中用液氮冷却,研成细粉,迅速将其放入 1.5 mL 离心管中加入少量的 PVP,500 μ L 的 2%CTAB 提取缓冲液,20 μ L 2-巯基乙醇,轻轻混匀,置 65 $^{\circ}$ C 水浴锅中温浴 1 h。取出加入等体积的三氯甲烷/异戊醇混匀,抽提,4 $^{\circ}$ C 下离心 10 min(12 000 r/min),吸取上清液,移入另一支 1.5 mL 离心管中。重复用三氯甲烷/异戊醇抽提,使蛋白质层沉淀完全。吸取上清液,置于一新的离心管中。加入 2 倍体积-20 $^{\circ}$ C 预冷的无水乙醇,混匀后,离心 10 min(12 000 r/min)。将所得 DNA 沉淀用 70%乙醇洗 2 次。自然干燥,溶于 100 μ L~150 μ L TE 中,贮存于-20 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

B.3.2 病组织 DNA 提取

将病组织切成小块,以液氮冷冻后研磨成粉,取 0.2 g 粉末,DNA 提取方法与 B.3.1 菌丝体 DNA 提取方法相同。

B.4 PCR 扩增

扩增引物两对,其中 PN-1F 和 PN-2R 为木层孔褐根腐病菌 DNA 的特异性引物(见表 B.1),ITS-1 和 ITS-2 为真菌 ITS 区通用引物(见表 B.2)。

PCR 扩增反应体系见表 B.3。PCR 扩增反应程序为:94 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。使用通用引物 ITS-1 和 ITS-2 扩增,退火温度改为 52 $^{\circ}$ C,其他条件不变。扩增后产物置于-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

表 B.3 木层孔褐根腐病菌特异性 PCR 反应体系

试剂名称	储备液浓度	25 μ L 反应体系 加样体积 μ L
10 \times PCR 缓冲液	—	2.5
MgCl ₂	25 mmol/L	1.5
dNTP 混合物	2.5 mmol/L	2
TaqDNA 聚合酶	5 U/ μ L	0.2
引物	10 μ mol/L	各 0.5
DNA 模板	50 ng/ μ L~100 ng/ μ L	1~2
ddH ₂ O	—	补至 25 μ L

B.5 琼脂糖凝胶电泳

琼脂糖加入 0.5 \times TBE 电泳缓冲液,加热溶解,加入 EB 储存液至终浓度为 1 μ L/mL,制成 1.5%浓度琼脂糖凝胶。将 5 μ L~10 μ L 的 DNA Marker 和 PCR 扩增产物分别与适量的上样缓冲液混合,点样。5 V/cm 恒压,电泳 20 min~30 min。紫外凝胶成像系统下观察电泳结果,拍照并记录结果。

附录 C
(资料性附录)
木层孔褐根腐病菌为害状

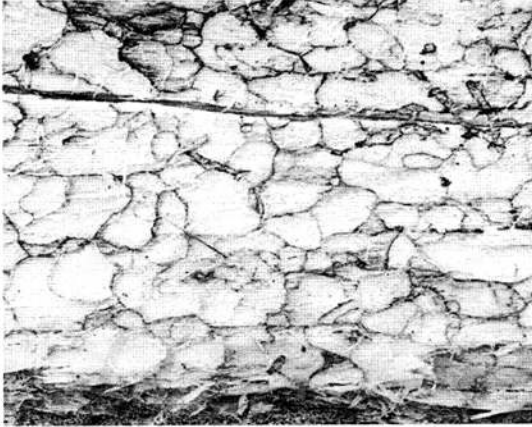


图 C.1 树皮内侧不规则暗褐色菌丝束形成网纹



图 C.2 *Phellinus noxius* 为害症状

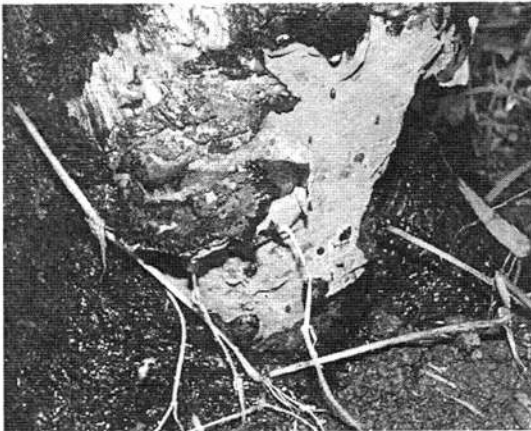


图 C.3 *Phellinus noxius* 平伏担子果



图 C.4 *Phellinus noxius* 平伏反卷担子果

附录 D
(资料性附录)
木层孔褐根腐病菌形态特征图

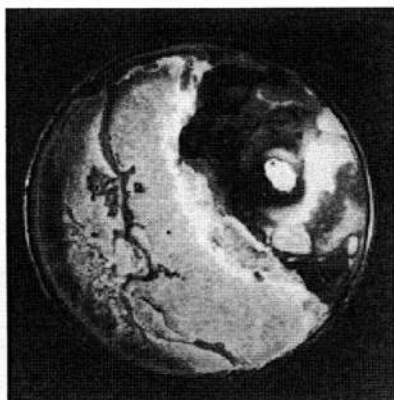


图 D.1 *Phellinus noxius* 培养性状

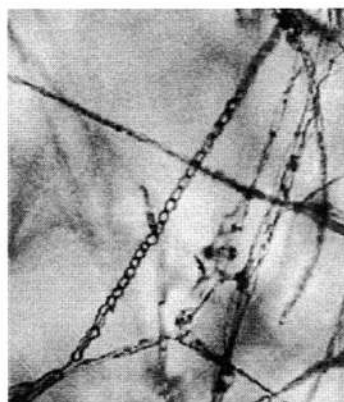


图 D.2 *Phellinus noxius* 节孢子

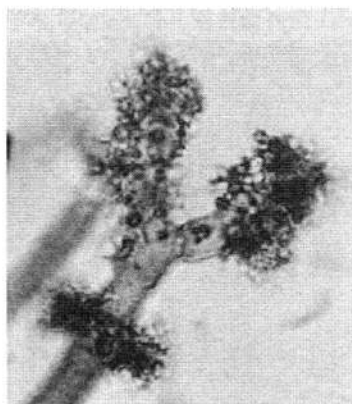
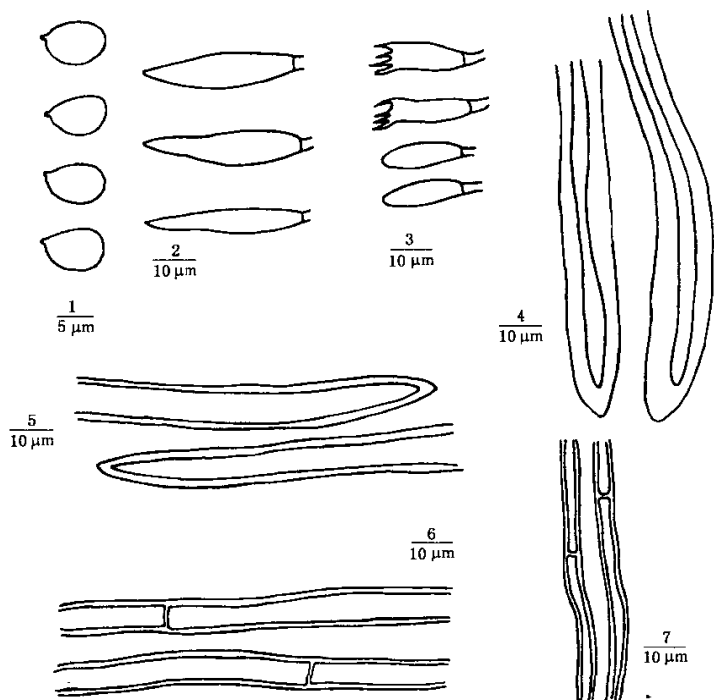


图 D.3 *Phellinus noxius* 毛状菌丝



- 1——担孢子；
- 2——囊状体；
- 3——担子；
- 4——菌髓中的刚毛状菌丝；
- 5——菌肉中的刚毛状菌丝；
- 6——菌髓菌丝；
- 7——菌肉菌丝。

图 D.4 *Phellinus noxius* 子实体显微结构

附 录 E
(资料性附录)

木层孔褐根腐病菌与其近似种的主要区别

表 E.1 木层孔褐根腐病菌与其近似种的主要区别

主要区别	种 类	
	木层孔褐根腐病菌	橡胶木层孔菌
学名	<i>Phellinidium noxium</i>	<i>Phellinus lamaënsis</i>
菌髓中刚毛状菌丝直径	7 μm~14.5 μm	4 μm~7 μm
刚毛状菌丝占菌髓比重	少数	多数
菌髓中刚毛状菌丝相对于生殖菌丝细胞壁厚	明显厚	稍厚
菌髓中刚毛状菌丝形态	埋生在菌髓中,顶端圆钝	伸出子实层,顶端尖锐
菌管腔有无子实层刚毛	无	有,红色、短而尖锐
围绕根茎形成菌丝壳	形成	不形成
致病性及生境	寄生,阔叶树活立木基部及腐朽根部	腐生,阔叶树腐木、倒木