ICS 62.020.20
CCS B 62

DB3211

镇 江 市 地 方 标 准

DB3211/T 1099—2024

多年生异担子菌检验技术规程

Code of practice for examination of Heterobasidion annosum

2024-12-30 发布 2025-02-01 实施

镇江市市场监督管理局 发 布

目　　次

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。

本文件由江苏农林职业技术学院提出。

本文件由镇江市农业农村局归口。

本文件起草单位：江苏农林职业技术学院、北京林业大学、镇江海关。

本文件主要起草人：陈佳佳、孙亚亚、员瑗、于健、戴玉成、崔宝凯、曹书培、郑香容、付丹阳、彭金凤、李松、黄晓潇、吴项乾、莫家兴、邱秀文、杨洪俊。

多年生异担子菌检验技术规程

1 范围

本标准确立了多年生异担子菌检验流程，规定了该病菌症状、采样、核酸制备、等温扩增反应、和结果判定等各阶段操作要求。

本标准适用于进出境松、柏属植物材料中携带多年生异担子菌的检验。

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。

SN/T 2589 植物病原真菌检测规范

3 术语和定义

3.1 多年生异担子菌（Heterobasidion annosum（Fr.）Bref.）属于担子菌门（Basidiomycota），伞菌纲（Agaricomycetes），红菇目（Russulales），刺孢多孔菌科（Bondarzewiaceae），异担子菌属（Heterobasidion）。

4 检验流程

多年生异担子菌具体检验流程见图1。

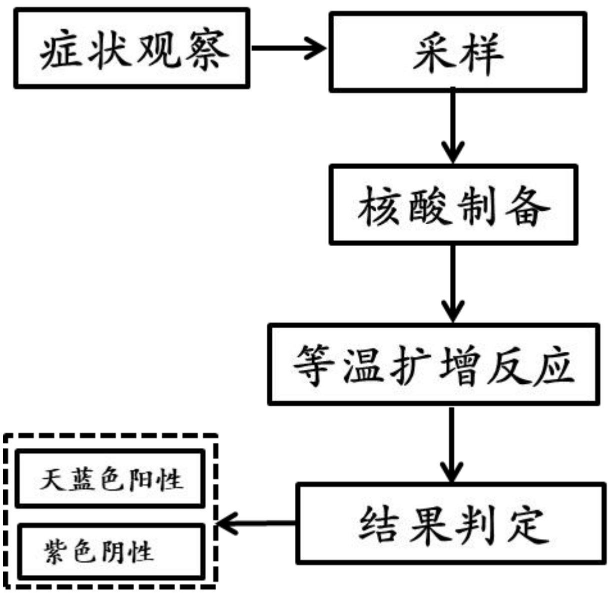

图 1 检验流程图

5 症状

该病菌主要寄生在植物的根部、茎干基部，尤其是边材。此病菌感染树木的形成层和外木质部，导致典型的白色层状腐朽。多年生异担子菌的相关资料见附录A。

6 仪器设备、试剂和培养基

6.1 仪器设备

超净工作台、恒温培养箱、超低温冰箱、常规冰箱、高压灭菌锅、恒温水浴锅、小型离心机、显微镜、PCR仪、电泳仪、水平电泳槽、凝胶成像系统、制冰机、电子天平、涡旋振荡器、微量进样器等。

6.2 试剂

除另有规定外，所有试剂均为分析纯或生化试剂。

10×ThermoPol Buffer，$MgSO_4$，dNTPs，甜菜碱，Bst DNA polymerase，羟基萘酚蓝。

6.3 培养基

马铃葡萄糖琼脂培养基（PDA）：将200 g去皮马铃薯切成小块，沸水煮 20 min后过滤，弃去滤渣在滤液中加入葡萄糖和琼脂粉各20 g，加蒸留水定容至1 L。配成溶液后121 ℃下灭菌20min。

7 采样

样品的采集、分离、纯化和培养按照SN/T 2589植物病原真菌检疫鉴定方法进行。样品采集后，放入密封的容器内，送实验室。将取样结果进行记录，记录表格见附录B。样品应保存在-20 ℃下，避免反复冻融。

8 核酸制备和扩增反应

8.1 核酸的制备

采用基因组提取试剂盒制备DNA，-20 ℃保存备用。将提取的多年生异担子菌的DNA用分光光度计测定浓度，其质量浓度大于100 pg•μL^{-1}符合LAMP检测的要求。

8.2 引物序列

正向外部引物F3：GTCCTGCACGACCAACTG，

反向外部引物B3：GGAATGACCTTGCCGACG，

正向内部引物FIP：TAGCAGTGGTGGCGTGGATGGTCATCCACGACAAGTACGG，

反向内部引物BIP：GGACCTTCCATGAAGGACTGGCCAGCACCAGTGGACGAAG，

正向环引物LF：CTCATCAAGCCCTCAACGATG，

反向环引物LB：GTGGCGGTCGTGGTGTT。

8.3 扩增反应体系

检测多年生异担子菌的扩增反应体系为：2.5 μL 10×ThermoPol Buffer，8 mmol•$L^{-1}$$MgSO_4$，1.2 mmol•$L^{-1}$dNTPs，内引物FIP和BIP各1.6 μmol•L^{-1}，外引物F3和B3各0.4 μmol•L^{-1}，环引物LF和LB各 0.8

μmol·L^{-1}，0.8 μmol·L^{-1}甜菜碱，8 U·μL^{-1}Bst DNA polymerase，180 mmol·L^{-1} 羟基萘酚蓝，2 μL模板DNA，体系共计26 μL。以多年生异担子菌的DNA作阳性对照，不含多年生异担子菌的DNA作阴性对照，以无菌ddH_2O作空白对照，每个样品设置3个重复。

8.4 扩增反应条件

所述扩增反应的程序为：63 ℃反应扩增60 min。

9 结果判定

观察扩增产物的颜色变化：

——若呈天蓝色表示检测结果为阳性，存在多年生异担子菌；

——若呈紫色表示检测结果为阴性，不存在多年生异担子菌。

10 结果记录、资料保存与复核

10.1 植物源样品应置于 4 ℃冰箱妥善保存，对检出多年生异担子菌的样品应至少保存 6 个月。

10.2 分离到的多年生异担子菌应接种与 PDA 试管中妥善保存。

10.3 完整的实验记录包括:样品的种类、来源、寄主信息、接样（或采样）时间、实验的时间、地点、方法和结果。

10.4 保存 LAMP 检测阳性结果的照片，保存期限为（保存时间）1 年。

附　录　A
（资料性）
多年生异担子菌相关资料

A.1　子实体

担子果多为一年生，平伏反转或无柄或盖形，单身或几个覆瓦状叠生；菌盖形状多变，多为半圆形；菌盖长可达9 cm，宽可达15 cm，中部厚可达5 mm；菌盖表面褐色至暗褐色；边缘锐至钝，浅褐色；孔口浅黄色；孔口圆形至多角形，每毫米2～3个；菌肉木塞质，厚达7 mm，有包被；菌管与菌肉同色，长达7 mm。

图A.1 多年生异担子菌子实体

A.2　菌丝结构

菌丝系统二体系；生殖菌丝具简单分隔；骨架菌丝在Melzer试剂中呈拟糊精反应，CB+；菌丝组织在KOH试剂中无变化。

A.3　菌肉

生殖菌丝无色，薄壁，无分枝，直径为2 μm～4.5 μm；骨架菌丝占主导，无色，厚壁，具一窄的内腔至实心，无分枝，弯曲，交织排列，直径为3 μm～4 μm。

A.4　菌管

生殖菌丝无色，薄壁，极少分枝，直径1.5 μm～3 μm；骨架菌丝占主导，无色，厚壁，具一窄的内腔至实心，偶尔分枝，弯曲，交织排列，直径为3 μm～4 μm；子实层无囊状体和拟囊状体；担子棍棒形，具4个担子梗，基部具一简单分隔，大小为（16～22）μm ×（5～7） μm；拟担子形状与担子相似，但明显小一些。

A.5　孢子

担孢子宽椭圆形至近球形，无色，厚壁，粗糙，IKI－，CB+，大小为3.6～4.8 × 2.8～3.6 μm，L = 4.1 μm，W = 3.1 μm，Q = 1.2～1.5 (n = 60/2)。

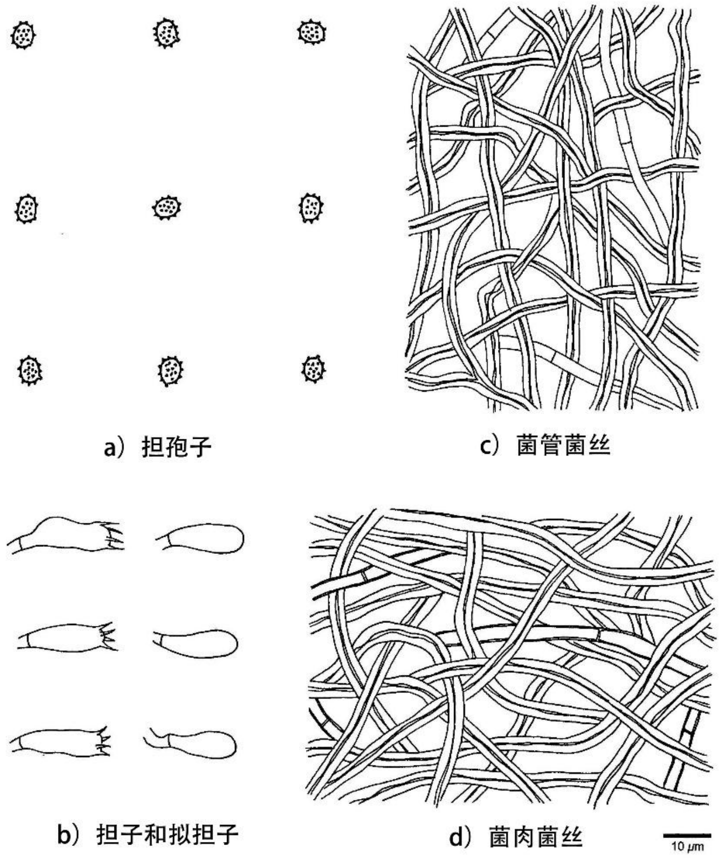

图 A.2 多年生异担子菌的显微结构图

A.6 分布及主要特征

分布在欧洲，此种的特征是红棕色的菌盖表面，窄的菌管生殖菌丝，具拟糊精反应的骨架菌丝和小孢子。

附 录 B
（资料性）
多年生异担子菌样本鉴定报告

下面给出了多年生异担子菌样本鉴定报告格式和内容。

<table>
<tr><td>样品种类</td><td colspan="3"></td><td>采样时间</td><td></td></tr>
<tr><td>采样地点</td><td></td><td>样品数量</td><td></td><td>采样部位</td><td></td></tr>
<tr><td>样品来源</td><td></td><td>送检时间</td><td></td><td>送检人</td><td></td></tr>
<tr><td>送检单位</td><td colspan="3"></td><td>联系电话</td><td></td></tr>
<tr><td colspan="6">检测鉴定方法及步骤：</td></tr>
<tr><td colspan="6">检测鉴定结果：</td></tr>
<tr><td colspan="6">备注：</td></tr>
<tr><td colspan="6">鉴定意见：

鉴定人（签名）：鉴定时间：</td></tr>
<tr><td colspan="6">审核意见：

审核人（签名）： 审核时间：</td></tr>
</table>

注：本单一式肆份，检测单位和受检单位各两份。本检测结果只对送检样品负责。