

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2338—2009

草莓滑刃线虫检疫鉴定方法

Quarantine identification of *Aphelenchoides fragariae*
(Ritzema Bos) Christie

2009-07-07 发布

2010-01-16 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

本标准的附录 D 为规范性附录,附录 A、附录 B 和附录 C 为资料性附录。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位为中华人民共和国珠海出入境检验检疫局和珠海市质量计量监督检测所。

本标准主要起草人:陈其文、张卫东、廖力、蒋立琴、乐海洋、徐森锋、张建军、刘勇、彭仁。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

草莓滑刃线虫检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了草莓滑刃线虫检疫和鉴定方法。

本标准适用于进出境花卉、苗木、盆景及草莓、柑橘、番茄等经济作物中草莓滑刃线虫的检疫鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

SN/T 1157 进出境植物苗木检疫规程

SN/T 1158 进出境植物盆景检疫规程

3 符号和缩略语

L=体长；

a=体长/最大体宽；

b=体长/体前端至食道与肠连接处的距离；

c=体长/尾长；

St=口针长度；

V=体前端至阴门处距离 $\times 100$ /体长；

T=泄殖腔口至精巢末端的距离 $\times 100$ /体长；

tail=尾长；

spicule=交合刺长度。

4 原理

中文名称:草莓滑刃线虫

学名:*Aphelenchoides fragariae* (Ritzema Bos, 1890) Christie, 1932

分类地位:线形动物门(Nematoda)、侧尾腺纲(Secernentea)、滑刃目(Aphelenchida)、滑刃科(Aphelenchoididae)、滑刃属(*Aphelenchoides*)

草莓滑刃线虫是一种芽叶寄生线虫。主要危害植物地上部分的腋芽、嫩叶和花序,被侵染的植株表现为生长不良,发生矮化和畸形,导致枝弱叶稀,顶芽凋枯,开花减少,产量及品质降低。草莓滑刃线虫主要依靠带芽苗木、接穗等无性繁殖材料传播扩散。其雌雄虫的形态学特征是制定该检疫鉴定方法的主要依据,传播途径、寄主范围、地理分布(参见附录A)和生物学特征是鉴定的辅助依据。

5 仪器和用具

5.1 仪器

生物显微镜(100倍~1 000倍)、体视显微镜(10倍以上,具透射光源)、电热恒温箱、冰箱。

5.2 用具

钟面皿或培养皿、盖玻片、载玻片、凹玻片、玻璃纤维丝、试管、烧杯、小镊子、剪刀、挑针、浅盘、打孔器、指形管、酒精灯、干燥器、滤纸或纱布、漏斗、漏斗架、乳胶管、止水夹、加热板、分样筛(100目、500目)。

6 试剂

乙醇、指甲油、石蜡、FG 固定液(福尔马林:甘油:蒸馏水=10:1:89)、4%甲醛、乳酚油(苯酚 20 mL、乳酸 20 mL、甘油 40 mL 和蒸馏水 20 mL 混合而成)。

7 现场检疫

对草莓、柑橘、番茄、花卉、苗木、盆景等芽叶部分进行检查,重点选取矮化、矮缩和畸形等症状的苗木,如无可疑症状则按要求随机取样。取样后立即置密封塑料袋,标记后及时送实验室检测。

具体抽样比例按 SN/T 1157 和 SN/T 1158 执行。

8 实验室检验

8.1 线虫分离

用浅盘分离法或漏斗法分离线虫(参见附录 B)。

8.2 体视显微镜镜检

分离获得的水样在 10 倍以上体视显微镜检查,初步观察线虫的形态特征。

8.3 标本制作

挑出若干分离到的线虫虫体,置于载玻片上制作临时玻片或永久玻片(参见附录 C)。

8.4 生物显微镜观察、摄影和测量

应针对雌、雄虫主要鉴定特征仔细观察并显微摄影,重点包括整体形态、头区轮廓、口针、侧线、尾部形态、雌虫生殖系统及雄虫交合刺等,并在每张图片上加相应标尺,测量并计算 a、b、c 和 V 等值。

9 形态鉴定特征

9.1 滑刃线虫属形态鉴定特征

虫体长度中等到长,热杀死后,雌虫虫体直到腹弯,雄虫通常尾部向腹面弯成沟状整个虫体呈“J”形;侧线通常 4 条,偶尔 2 或 3 条;头部略缢缩,头架骨化弱;口针较细,有基部球或基部膨大,口针长度通常为 $10\ \mu\text{m}\sim 12\ \mu\text{m}$,一般不超过 $20\ \mu\text{m}$;食道前体部圆柱形,中食道球发达、卵圆形或方形,中食道球瓣发达,后食道腺叶发达、覆盖肠的背面;排泄孔位于中食道球后水平处。雌虫阴门位于虫体中后部,一般位于体长的 60%~70%;单生殖腺、前伸,后阴子宫囊通常存在并常含有精子,偶尔后阴子宫囊缺;尾呈圆锥形,尾端形态多样:钝圆或细圆,指状或分叉或有 1 个腹突,有或无尾尖突,尾尖突形态多样。雄虫尾呈圆锥形、向腹面弯成钩状;交合刺呈玫瑰刺形,基顶和基喙通常发达,有时缺;3 对尾乳突,其中 1 对位于泄殖腔区,1 对位于近末端,1 对位于这两者之间;无交合伞。

9.2 草莓滑刃线虫形态鉴定特征

9.2.1 草莓滑刃线虫测计值

草莓滑刃线虫测计值见表 1。

表 1 草莓滑刃线虫测计值

类别	$L/\mu\text{m}$	A	b	c	$St/\mu\text{m}$	尾长/ μm	V/%	T/%	交合刺长度/ μm
雌虫	450~800	45~60	8~15	12~20	10~11	38~42	64~71	—	—
雄虫	480~650	46~63	9~11	16~19	10~12	38~42	—	44~61	21~25

注:以上测量数据来自 Shahina,1996。

9.2.2 草莓滑刃线虫形态鉴定特征

草莓滑刃线虫形态鉴定特征见附录 D,虫体长度中等到长($450\ \mu\text{m}\sim 800\ \mu\text{m}$),雌虫体形较细,热杀死后虫体直到弯;头部高、光滑,前端平,连续或略缢缩;口针细,长 $10\ \mu\text{m}\sim 11\ \mu\text{m}$,有小而明显的基部

球；侧区是一条窄带，侧线 2 条；排泄孔位于神经环或紧靠其后水平处；阴门横裂，阴门唇略突起，卵母细胞单行排列，受精囊长卵圆形，后阴子宫囊超过肛阴距的二分之一，后阴子宫囊常有精子；尾长圆锥形，末端钝尖，无尾尖突。雄虫普遍，体形基本类似雌虫；热杀死后，尾部弯成 $45^{\circ} \sim 90^{\circ}$ ；单精巢、前伸，精母细胞单行排列；尾端有 1 个钝刺，有 3 对腹亚中尾乳突；无交合伞，交合刺玫瑰刺形，有中等发达的基顶和基喙，背边长 $14 \mu\text{m} \sim 17 \mu\text{m}$ 。

9.2.3 草莓滑刃线虫与近似种的区别

草莓滑刃线虫与滑刃属的其他三种芽叶线虫毁芽滑刃线虫(*A. blastophthorus*)、水稻干尖线虫(*A. besseyi*)和菊花滑刃线虫(*A. ritzemabosi*)形态极为相似，主要区别见表 2。

表 2 草莓滑刃线虫与近似种线虫主要形态区别

形态特征	草莓滑刃线虫	毁芽滑刃线虫	水稻干尖线虫	菊花滑刃线虫
侧线数	2 条	4 条	4 条	4 条
尾尖突	单刺	单刺	星状 3 个~4 个刺突	刷状 2 个~4 个微刺
后阴子宫囊长度	大于肛阴距的二分之一	肛阴距的二分之一	小于肛阴距的二分之一	大于肛阴距的二分之一
交合刺顶尖	有,中等	有,发达	无	无
交合刺缘突	有,中等	有,发达	有,中等	无

10 结果判定

符合 9.2.1 测计值以及 9.2.2 形态鉴定特征的,可判定为草莓滑刃线虫。

11 样品保存

若判定为草莓滑刃线虫,则将剩余的线虫杀死、固定制成永久玻片保存,并标上样品编号、制作时间和制作人等。

对已鉴定出带有草莓滑刃线虫的植物材料,保存在 $5^{\circ}\text{C} \sim 10^{\circ}\text{C}$ 及干燥、防鼠防虫处,样品需至少保存 3 个月,以备复验、谈判和仲裁。

附 录 A

(资料性附录)

草莓滑刃线虫的寄主与分布

A.1 寄主

草莓滑刃线虫的寄主范围极广,已有 47 个科 250 多种植物,蕨类植物 100 余种。草莓是其典型寄主。涉及经济价值较高的科有:百合科、报春花科、毛茛科、菊科、石蒜科、禾本科、鸢尾科、榆科、豆科、水龙骨科、花荵科、木犀科、莽科和蔷薇科等。

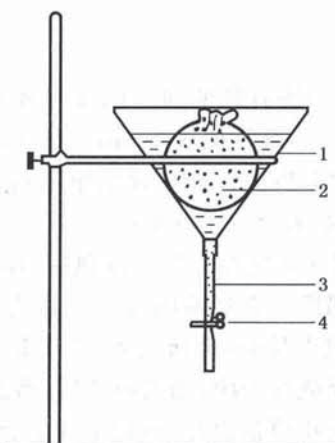
A.2 分布

德国、奥地利、英国、法国、西班牙、葡萄牙、意大利、捷克、保加利亚、阿塞拜疆、比利时、立陶宛、白俄罗斯、丹麦、匈牙利、拉脱维亚、瑞典、罗马尼亚、挪威、爱尔兰、希腊、澳大利亚、新西兰、俄罗斯、日本、加拿大和美国等。

附录 B
(资料性附录)
草莓滑刃线虫的分离法

B.1 漏斗法

将 10 cm~15 cm 直径的漏斗固定在支架上(图 B.1),柄端接一段乳胶管,管的近末端用止水夹夹紧。将分离的样品先剪成小块,用纱布包好,放入漏斗,加水淹没。在线虫自身的趋水性和重量作用下,线虫不断脱离植物组织,穿过纱布迁移到水中,最后沉降到漏斗末端的乳胶管下端水中。24 h 后,小心地打开乳胶管末的止水夹,用小器皿接取约 5 mL 的含有线虫的水样,放在体视显微镜下进行观察。用此法分离线虫时,室内温度最好要保持在 20℃~28℃,温度太高或太低均会影响草莓滑刃线虫的分离效果。



- 1——漏斗;
- 2——用纱布包裹的样品;
- 3——乳胶管;
- 4——止水夹。

图 B.1 Baermann 漏斗装置

B.2 浅盘分离法

浅盘分离法装置(图 B.2)由两只不锈钢浅盘、线虫滤纸或纱布组成,两只浅盘可套放,上盘底面为大于 10 目的粗筛网,下盘为正常浅盘。

分离线虫时,将线虫滤纸平放在上盘的筛网上,用水淋湿,将供分离的已剪成小块的样品撒铺在其上,套进下盘内;从两只浅盘的夹缝中注水,以淹没供分离的样品为宜;在 20℃~28℃下放置 24 h 后,线虫渐渐集中到下盘的水中;用烧杯收集浅盘中水,并将烧杯中的水连续通过 100 目和 500 目的筛网,将 500 目标准筛上的含线虫的残留物冲洗到培养皿中镜检。



- 1——上盘;
- 2——下盘。

图 B.2 浅盘分离装置

附 录 C

(资料性附录)

线虫玻片标本制作方法

C.1 线虫杀死:在体视显微镜下用线虫挑针挑取少量线虫放至凹玻片上的水滴中,使线虫位于水滴中央,手持凹玻片在酒精灯火焰上来回 5 s~6 s,使线虫恰好被杀死为止;杀死大量的线虫,可将线虫悬浮液放在试管中加等量的沸水杀死线虫。

C.2 线虫固定:少量线虫被杀死后,可用线虫挑针将线虫移至 FG 固定液中固定。大量的线虫被杀死后,在线虫悬浮液中加等量浓度双倍的固定液即可。

C.3 临时玻片标本的制作:以 FG 液作为浮载剂,滴适量于载玻片上,用挑针将固定好的线虫移数条于浮载剂中,并使其完全沉下,浮载剂边缘均匀放置 3 mm~5 mm 长、直径与线虫体宽相近的玻璃纤维丝 3 根,加盖玻片,用滤纸吸去溢出的浮载剂,用指甲油封片,待指甲油干后再加封一次,可保存几天至数周。

C.4 永久玻片标本的制作

C.4.1 脱水:采用乳酚油快速脱水法,把滴有乳酚油的凹玻片放在加热板上,加热至 65℃~70℃,将已固定 1 d 以上的线虫挑入热的乳酚油中,继续加热 2 min~3 min 后,在体视显微镜下观察标本是否清晰,若不够清晰,继续在 65℃~70℃的加热板上加热片刻至清晰(注意避免加热过度而损坏标本),然后放在干燥器中 12 h~24 h,进一步去除水分后即可制片。

C.4.2 制片:将直径 1.5 cm 的打孔器在酒精灯火焰上加热后,插到蜡盘中蘸取少量石蜡,并迅速轻按于载玻片中央。待冷却后即形成一个蜡圈。在蜡圈内滴一小滴乳酚油(用量以盖上盖玻片后不外溢为宜)作为浮载剂,将已脱水的线虫数条挑入其中,排列整齐,并使其完全沉下,将与线虫体宽相近的 3 根 3 mm~5 mm 的玻璃纤维丝均匀置于浮载剂边缘,加盖玻片后,将载玻片移至 65℃~70℃的加热板上熔蜡,待蜡熔化后移至实验台上冷却,用指甲油封片,待指甲油干后再封一次。最后贴上标签,左边的标签写明样品号、寄主、截获口岸、产地、制作日期;右边的标签写线虫种名、线虫虫态及其数量。

附录 D
(规范性附录)
草莓滑刃线虫形态特征图

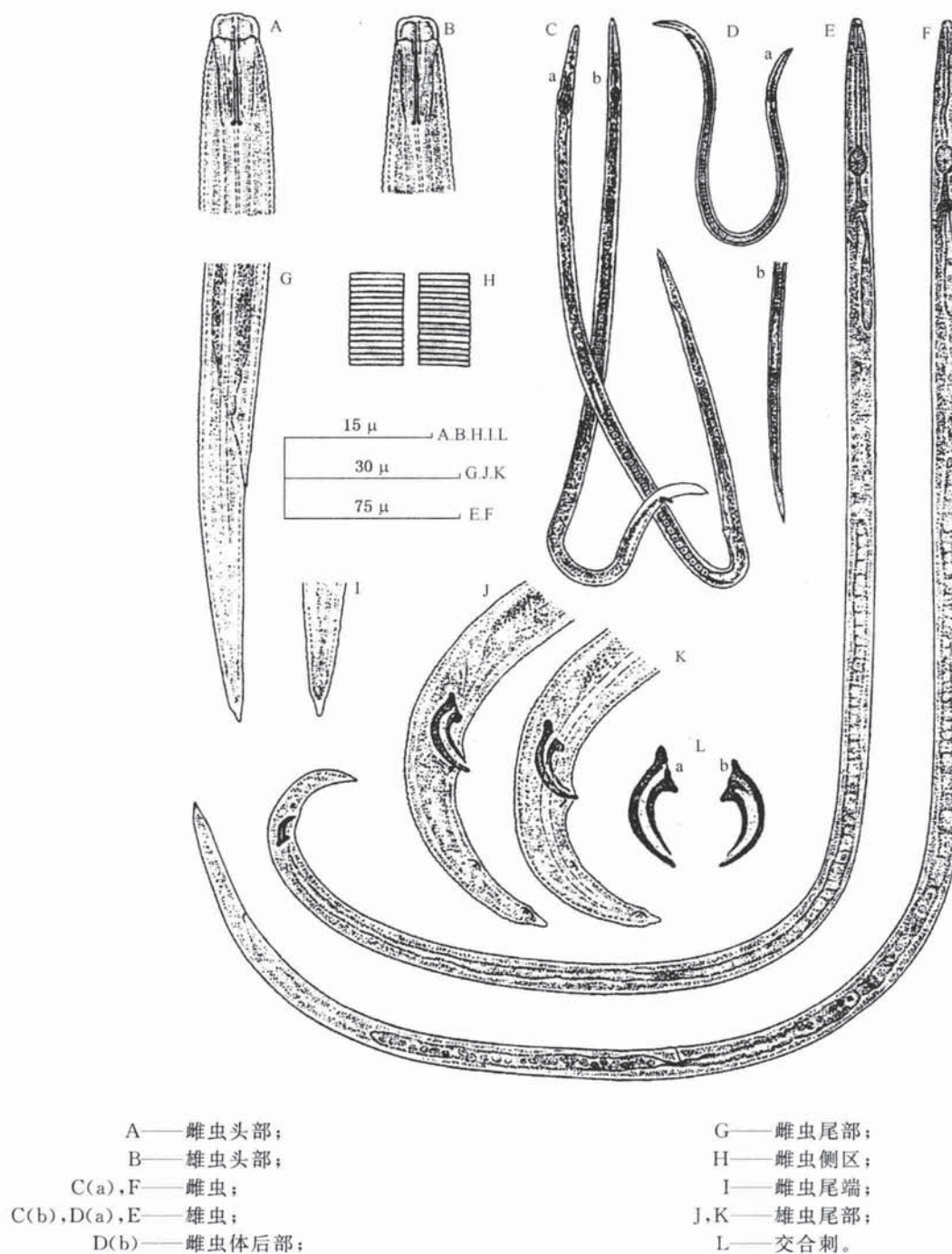


图 D.1 草莓滑刃线虫(*A. fragariae*)特征图
(A, B, E-L, 仿 Siddiqi, 1975; C, D, 仿 Ritzema Bos, 1893, 1891)