

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1141—2002

鳞球茎茎线虫检疫鉴定方法

Methods for quarantine and identification of
Ditylenchus dipsaci (Kühn) Filipjev

2002-08-02 发布

2003-01-01 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

本标准的附录 B 和附录 C 为规范性附录,附录 A 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:中华人民共和国上海出入境检验检疫局、南京农业大学。

本标准主要起草人:宋绍伟、戚龙君、林茂松。

本标准系首次发布的检验检疫行业标准。

鳞球茎线虫检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了对鳞球茎线虫检疫和鉴定方法。

本标准适用于花卉和蔬菜的块茎、鳞茎、球茎等根茎部分和其他寄主植物种子、花、茎、叶及残体中鳞球茎线虫的检疫和鉴定。

2 原理

鳞球茎线虫 Stem and bulb nematode, 学名: *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev, 属于线虫门(Nemata)、侧尾腺纲(Secernentea)、垫刃目(Tylenchida)、粒线虫科(Anguillidae)、茎线虫属(*Ditylenchus*)。是一种迁移性内寄生线虫,被侵染的球茎发生腐烂,切成片时有褐色环纹。受侵染的植株常矮化、肿胀、畸形,甚至最终死亡。在植物的种子、花、花序、芽、茎、匍匐茎、根状茎及土内可发现此虫。

该线虫是一种危害 450 多种植物(参见附录 A)的寄生性线虫,又称作起绒草茎线虫,它的地理分布、寄主范围、传播途径、生物学和形态学特征是该检疫鉴定方法的依据。

3 仪器、用具

- 3.1 生物显微镜(100 倍~1 000 倍,具有目镜测微尺或者绘图仪、监视器等)。
- 3.2 体视显微镜(10 倍~90 倍,具透射光源)。
- 3.3 冰箱。
- 3.4 加热板(80℃以下)。
- 3.5 打孔器。
- 3.6 载玻片。
- 3.7 盖玻片。
- 3.8 分样筛(100 目、500 目)。
- 3.9 烧杯(500 mL、1 000 mL)。
- 3.10 漏斗。
- 3.11 漏斗架。
- 3.12 乳胶管。
- 3.13 止水夹。
- 3.14 凹玻片。
- 3.15 指形管。
- 3.16 剪刀。
- 3.17 挑针。
- 3.18 浅盘(上盘、下盘)。
- 3.19 线虫滤纸。
- 3.20 酒精灯。
- 3.21 培养皿。
- 3.22 试管。

- 3.23 纱布。
- 3.24 干燥器。
- 3.25 记号笔。
- 3.26 玻璃纤维丝(3 mm~5 mm)。

4 药品

- 4.1 指甲油。
- 4.2 TAF 固定液(40%甲醛 7 mL、三乙醇胺 2 mL 和蒸馏水 91 mL 混合而成)。
- 4.3 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)。
- 4.4 石蜡。

5 现场检疫

5.1 抽样

5.1.1 抽样方法

棋盘式、五点式或随机抽样。

5.1.2 抽样数量

5.1.2.1 块茎、鳞茎、球茎

按总件数的 5%~20% 抽样,最低抽检 10 件且不少于 1 000 粒,取样的数量为:500 粒以下取一份;501 粒~2 000 粒取二份;2 001 粒~5 000 粒取三份;5 001 粒~10 000 粒取四份;10 001 粒以上每增加 10 000 粒增取一份样品,不足 10 000 粒的余量计取一份样品。每份样品为 20 粒。

5.1.2.2 整株植物或者插枝

按总件数的 5%~20% 抽样,最低抽检 10 件且不少于 500 株。取样的数量为:50 株以下抽取五株;51 株~200 株抽取 10 株;201 株~1 000 株抽取 15 株;1 001 株~5 000 株抽取 20 株;5 001 株以上每增加 5 000 株增取五株,不足 5 000 株的余量计取五株样品。

5.1.2.3 种子

按总件数的 5%~20% 抽样,最低抽检 10 件,小包装(指最小单位包装不大于 0.5 kg 的),只扦取室内检验样品。取样数量为:10 kg 以下取一份;11 kg~100 kg 取二份;101 kg~500 kg 取三份;501 kg~1 000 kg 取四份;1 001 kg~2 000 kg 取五份;2 001 kg~5 000 kg 取六份;5 001 kg~10 000 kg 取七份;10 001 kg~100 000 kg,每增加 5 000 kg 增取一份样品,不足 5 000 kg 的余量,计取一份样品;100 001 kg 以上每增加 50 000 kg 增取一份样品,不足 50 000 kg 的余量,计取一份样品。每份样品的重量为 1 kg~2 kg。

5.2 外观症状的检查

对花卉和蔬菜的块茎、鳞茎、球茎等根茎部分和其他寄主植物种子及花、茎、叶进行检查,注意检查有无矮化、肿胀、畸形和腐烂等症状,收集上述可疑植物材料及所夹带的土壤等,一并带回实验室检验。

6 实验室检验

对于抽取的样品,可用浅盘分离法或漏斗法分离线虫(见附录 B)。分离获得的水样在体视显微镜下检查,然后挑取线虫若干条制成临时玻片(制作方法见附录 C)在显微镜下镜检,观察线虫的形态结构。

7 形态鉴定特征

7.1 茎线虫属形态鉴定特征

雌虫一般不肥大,不弯成螺旋形,长 0.6 mm~1.5 mm,有的可达 2 mm;表皮有很细的环纹,侧区有四条至六条刻线;口针细小,多数长度为 7 μ m~11 μ m;中食道球有或无瓣,偶尔无明显的中食道球,峡

部与后食道腺之间无缢缩,后食道腺短或长,不覆盖、短覆盖或长覆盖肠;雌虫单生殖腺、前伸,卵巢短或长,有时伸达食道区或转折,卵母细胞一行至二行排列,子宫柱状部有四排细胞(每排四个细胞),后阴子宫囊有或无。雄虫精巢不转折,精细胞大(通常直径 $3\ \mu\text{m}\sim 5\ \mu\text{m}$),交合伞不伸到尾端,延伸至尾长的四分之一至四分之三处。交合刺窄细,基部宽大,其上具特殊的突起。两性尾形相似,呈长圆锥形到近柱形,偶尔丝状,多数 c' (尾长 $\div$ 肛门或泄殖腔处体宽)为 $4\sim 7$ 。寄主不形成虫瘿。

7.2 鳞球茎茎线虫形态鉴定特征

7.2.1 测计值

表 1 鳞球茎茎线虫测计值

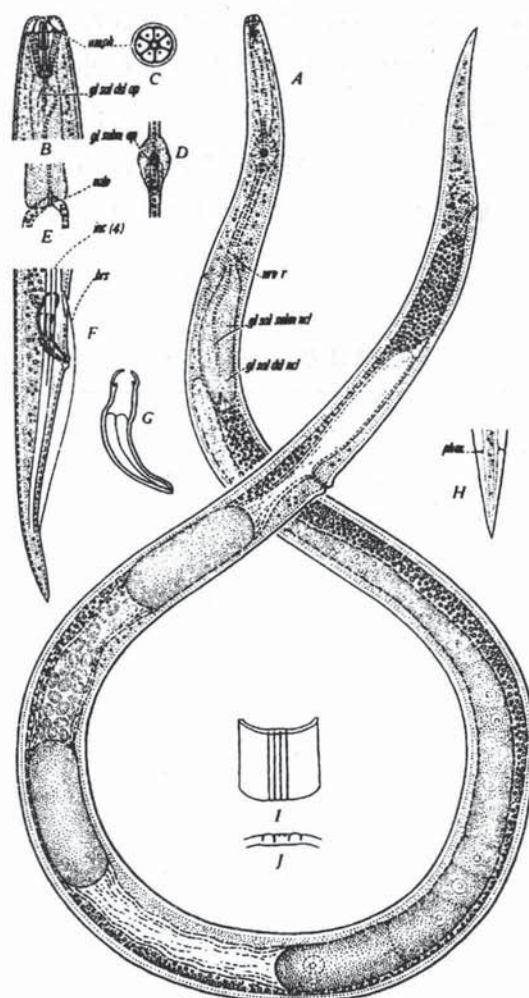
数据来源		L/mm	a	b	c	V	T	$n/\text{条}$
Thorne	雌虫	1.0~1.3	36~40	6.5~7.1	14~18	80		
	雄虫	1.0~1.3	37~41	6.5~7.3	12~15		65~72	
Blake	雌虫	1.3	62 ± 5.6	15 ± 1.4	14 ± 2.1	80 ± 1.5		48
	雄虫	1.3	63 ± 11.3	15 ± 1.7	14 ± 2.1		72	23
Goodey	雌虫	1.97 (1.73~2.23)	58.2 (50~64)	9 (7~12)	17.5 (15.8~20.0)	82 (76~84)		22
	雄虫	1.77 (1.51~1.93)	67 (58~74)	7 (6~8)	16.9 (14.6~19.1)			23

注: n =样本数;
 L =体长;
 a =体长 $\div$ 最大体宽;
 b =体长 $\div$ 自头顶至食道与肠连接处的长度;
 c =体长 $\div$ 尾长;
 V =头顶至阴门处长度 $\times 100\div$ 体长;
 T =精巢长度 $\times 100\div$ 体长。

7.2.2 形态描述(见图 1)

7.2.2.1 雌虫 热杀死时虫体近直线形,角质层有明显环纹,环距约 $1\ \mu\text{m}$;侧区有四条侧线,占虫体的六分之一到八分之一;唇区低平,无环纹,几乎不缢缩;头架中等发达,口针长约 $10\ \mu\text{m}\sim 12\ \mu\text{m}$,有明显的基部球;食道前体部圆桶状,食道峡部窄,后食道腺与肠平截或略有覆盖;排泄孔正对后食道腺体基部;尾锥形,尾长是肛门处体宽的四倍至五倍,末端锐尖;阴门清晰,前卵巢向前延伸,卵母细胞单列,偶尔双列;后阴子宫囊向肛门处伸展,约是阴肛距的一半。

7.2.2.2 雄虫 虫体前部与雌虫相似;热力杀死时虫体直线形;尾部与雌虫相似,末端锐尖;交合伞开始于交合刺的前部末端部位,交合伞长度约是尾长的四分之三;交合刺向腹部弯曲,并向前延伸,引带短,简单。



- A——雌虫；
 B——雌虫头端；
 C——唇区顶面观；
 D——中食道球背面观；
 E——肠与食道瓣膜交接处；
 F——雄虫尾；
 G——交合刺；
 H——尾；
 I——体中部角质膜；
 J——体中部侧区横切面

amph=侧器；gl sal dsl ap=背食道腺孔；gl subm ap=亚腹食道腺孔；valv=肠前端肌肉瓣器；inc=侧线；brs=交合伞；nrv r=神经环；gl sal subm ncl=亚腹食道腺核；gl sal dsl ncl=背食道腺核；phas=侧尾腺口

图 1 鳞球茎茎线虫形态特征(仿 Thorne, 1945)

8 结果判定

符合第7章形态鉴定特征的可鉴定为鳞球茎茎线虫。鉴定过程中应注意与马铃薯腐烂线虫的区别，二者的区别见表2。

表2 茎线虫属二种茎线虫的主要形态区别对照表

种 别	区 分 特 征						
	侧区 侧线数	食道与肠 覆盖程度	后阴子宫 囊与肛阴 距比	交合刺上 有无指状 突起	尾部末 端形状	卵的 平均长度	卵原细 胞排列
马铃薯腐烂线虫 (<i>Ditylenchus destructor</i>)	六条	覆盖	三分之二	有	钝尖	与虫体体宽 相近	双列
鳞球茎茎线虫 (<i>Ditylenchus dipsaci</i>)	四条	不覆盖	二分之一	无	锐尖	为虫体体宽 的二倍至三倍	单列

9 样品保存

9.1 若鉴定为鳞球茎茎线虫，则将剩余的线虫杀死、固定制成永久玻片保存；也可以固定后放入含TAF液的指形管内，在4℃冰箱内长期保存，并标上样品编号、制作时间和制作人等。

9.2 对已检出带有鳞球茎茎线虫的植物材料、种子，经登记后，要保存在低温干燥、防鼠防虫处，并标明相应基本情况，如样品编号、截获日期、截获人、寄主名称、运输工具名称、输出国名等，样品需至少保存六个月，以备复验、谈判和仲裁。

附录 A

(资料性附录)

鳞球茎线虫的寄主与分布

A.1 鳞球茎线虫的寄主

鳞球茎线虫的寄主范围极广,已有 40 科 450 种植物。涉及到经济价值较高的科有:洋葱科、石蒜科、藜科、起绒草科、禾本科、豆科、百合科、花荵科、蓼科、蔷薇科、玄参科、茄科、伞形花科。包括:起绒草、黄水仙、水仙、郁金香、风信子、百合、唐菖蒲、鸢尾、马铃薯、甘薯、小麦、大麦、玉米、黑麦、荞麦、燕麦、大蒜、洋葱、葱、冬葱、韭葱、青葱、火葱、黄瓜、甘蓝、草莓、胡萝卜、萝卜、甜菜、芜菁、芥菜、菠菜、白菜、大豆、蚕豆、菜豆、豌豆、红花三叶草、白花三叶草、紫苜蓿、车轴草、宽叶兰、茶、绣球、烟草、芸薹、福禄考、川续断、防风、草麻竹桃、大黄、亚麻、葱布、花生、人参等粮食作物、经济作物、蔬菜、中草药、花卉及观赏植物。

A.2 鳞球茎线虫的分布

欧洲:比利时、希腊、俄罗斯、保加利亚、阿尔及利亚、白俄罗斯、亚速尔群岛、捷克、斯洛伐克、丹麦、爱尔兰、德国、爱沙尼亚、亚美尼亚、芬兰、冰岛、马耳他、英国、摩尔达维亚、意大利、匈牙利、荷兰、挪威、奥地利、瑞士、瑞典、法国、葡萄牙、西班牙、罗马尼亚、波兰、立陶宛、拉脱维亚、克罗地亚、前南斯拉夫、塞尔维亚、乌克兰。

亚洲:伊朗、伊拉克、以色列、叙利亚、土耳其、巴基斯坦、印度、日本、韩国、孟加拉国、阿塞拜疆、约旦、阿曼、也门、乌兹别克斯坦、亚美尼亚、哈萨克斯坦、塞浦路斯。

非洲:南非、突尼斯、摩洛哥、阿尔及利亚、尼日利亚、乌干达、肯尼亚、留尼汪岛。

大洋洲:澳大利亚、新西兰。

北美洲:美国、加拿大、墨西哥。

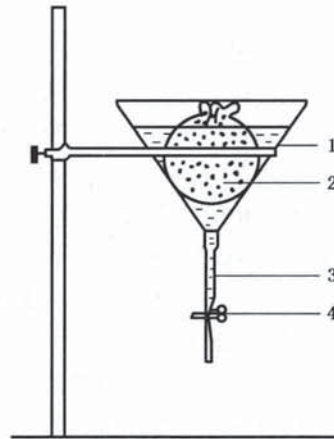
中南美洲:巴西、秘鲁、智利、阿根廷、巴拉圭、乌拉圭、海地、多米尼各共和国、委内瑞拉、厄瓜多尔、哥伦比亚、哥斯达黎加。

附 录 B
(规范性附录)
鳞球茎线虫的分离法

B.1 漏斗法

首先将 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。分离土壤中的线虫,在漏斗内加一只不锈钢或塑料的网,将纱布铺在筛网上,再放土样。由于线虫有趋水性和自身的重量,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,用小培养皿接取约 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 25℃ 左右,温度太高或太低均会影响鳞球茎线虫的分离效果。



- 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、线虫滤纸组成,两只浅盘可套放,上盘底面为 10 目粗筛网,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 25℃ 左右下放置 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

(规范性附录)

鳞球茎线虫玻片标本制作方法

C.1 线虫的杀死: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 线虫的固定:少量线虫被杀死后,可用线虫挑针将线虫移至 TAF 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 TAF 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三根,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(Franklin & Goodey, 1949),把滴有乳酚油的凹玻片放在加热板上,加热至 65℃~70℃,将已固定一天以上的线虫挑入热的乳酚油中,继续加热 2 min~3 min 后,在解剖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三根 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。