

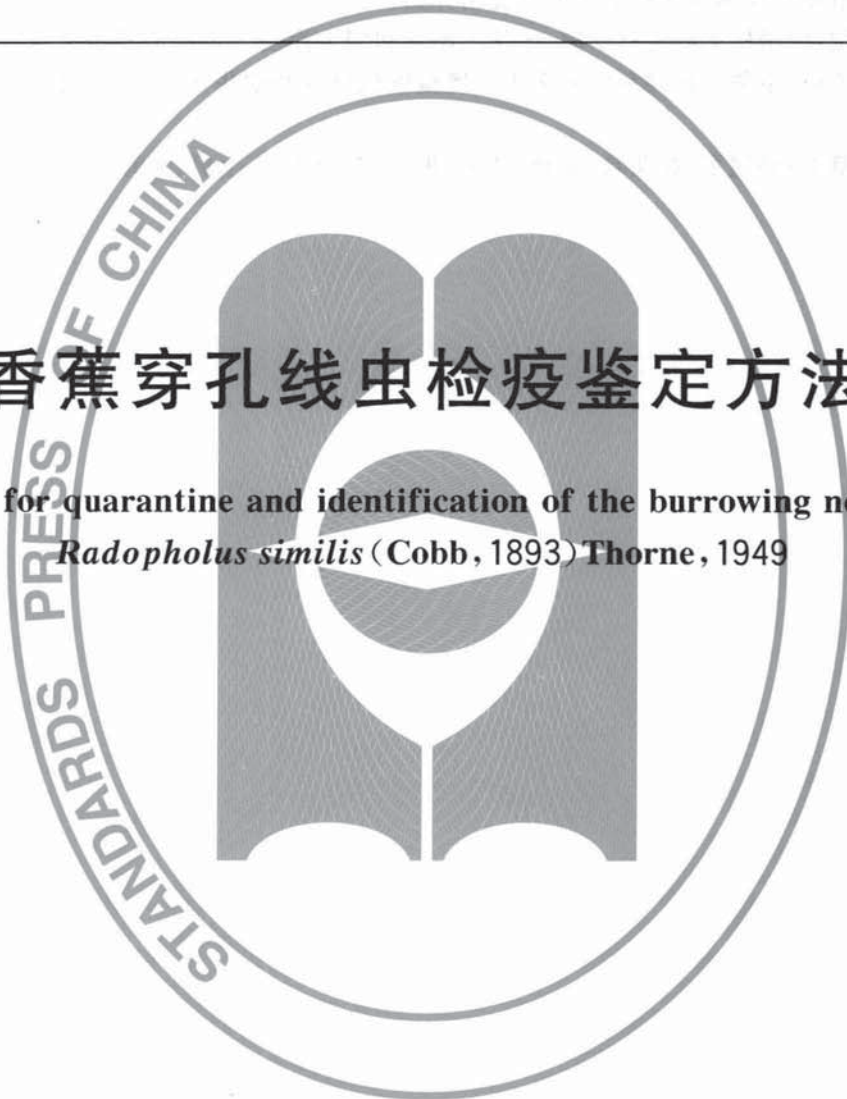


中华人民共和国国家标准

GB/T 24831—2009

香蕉穿孔线虫检疫鉴定方法

Methods for quarantine and identification of the burrowing nematode,
Radopholus similis (Cobb, 1893) Thorne, 1949



2009-12-15 发布

2010-06-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准的附录 B 为规范性附录,附录 A、附录 C 为资料性附录。

本标准由全国植物检疫标准化技术委员会提出并归口。

本标准起草单位:中国检验检疫科学院、中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局、中华人民共和国云南出入境检验检疫局和中华人民共和国深圳出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:葛建军、戚龙君、栗寒、杜宇、张明、李芳荣、李生贵、龙海。

香蕉穿孔线虫检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了香蕉穿孔线虫检疫鉴定方法。

本标准适用于观赏植物、蔬菜、果树等多种植物根部和土壤及栽培介质中的香蕉穿孔线虫检疫鉴定。

2 规范性引用

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 2122 进境植物及植物产品检疫抽样

3 鉴定依据

英文俗名: burrowing nematode、pepper yellows nematode、slow wilt nematode、citrus burrowing nematode、banana burrowing nematode。

学名: *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne, 1949

异名: *Radopholus similis citrophilus* Huettel, Dickson & Kaplan, 1984

Anguillulina granulosa (Cobb, 1893) Goodey, 1932

Tetylenchus granulosus (Cobb, 1893) Filipjev, 1936

Radopholus granulosus (Cobb, 1893) Siddiqi, 1986

Anguillulina acutocaudatus (Zimmermann, 1898) Goodey, 1932

Tylenchorhynchus acutocaudatus (Zimmermann, 1898) Filipjev, 1934

Radopholus acutocaudatus (Zimmermann, 1898) Siddiqi, 1986

Tylenchus biformis Cobb, 1909

Anguillulina biformis (Cobb, 1909) Goodey, 1932

Radopholus biformis (Cobb, 1909) Siddiqi, 1986

Radopholus citrophilus Huettel, Dickson & Kaplan, 1984

分类地位: 线虫门(Nematoda)、侧尾腺纲(Secernentea)、垫刃目(Tylenchida)、短体线虫科(Pratylenchidae)、穿孔线虫属(*Radopholus*)

香蕉穿孔线虫是一种根部迁移性内寄生线虫，危害寄主植物呈现如下症状：

——线虫一般穿刺根表皮进入皮层，在根的外部形成多个暗黑色的斑痕，接着邻近的斑痕融合，根

的皮层组织萎缩，变黑；严重危害时，斑痕可环割根；对于整个根系而言，表现为根系明显减少。

——生姜(大姜)等根茎受侵害可造成组织萎缩，表现为根茎小、干缩。

——地上部分表现为生长不良，叶片褪绿、黄化、叶片较少等症状，植株矮化、衰退，甚至凋萎、死亡。

香蕉穿孔线虫的寄主非常广泛，达数百种之多，主要侵染单子叶植物的芭蕉科 Musaceae(芭蕉属 *Musa* 和鹤望兰属 *Strelitzia*)、天南星科 Araceae(喜林芋属 *Philodendron* 和花烛属 *Anthurium*)、竹芋科 Marantaceae(肖竹芋属 *Calathea*)和凤梨科(果子蔓属 *Guzmania* 和丽穗凤梨属 *Vriesea* 等)，但也危害双子叶植物。香蕉穿孔线虫的主要农作物和经济作物寄主包括香蕉、胡椒、芭蕉、椰子、槟榔、可可、芒果、柑橘、咖啡、茶树、美洲柿、鸭梨、油柿、生姜、花生、大豆、高粱、甘蔗、茄子、番茄、马铃薯、甘薯、薯蓣、

酸豆、姜黄、小豆蔻、肉豆蔻、蚕豆、油棕、山葵、王棕等。

香蕉穿孔线虫的形态学特征、传播途径、寄主范围和地理分布是制定该标准的主要依据。

4 符号和缩略语

- n——测量的线虫标本数目；
- L——虫体体长(mm或 μm)；
- a——体长/最大体宽；
- b——体长/虫体前端至食道与肠连接处的距离；
- b'——体长/虫体前端至食道腺末端的距离；
- c——体长/尾长；
- c'——尾长/肛门处体宽；
- St.——口针长度(μm)；
- Sp.——交合刺长度(μm)；
- Gub.——引带长度(μm)；
- V——虫体前端至阴门的距离 $\times 100$ /体长。

5 仪器、用具

- 5.1 生物显微镜(100 \times 以上)。
- 5.2 生物体视显微镜(10 \times 以上,具透射光源)。
- 5.3 电热恒温箱。
- 5.4 载玻片和凹玻片。
- 5.5 盖玻片。
- 5.6 网筛(20目、100目、500目)。
- 5.7 烧杯(500 mL、1000 mL)。
- 5.8 漏斗。
- 5.9 漏斗架。
- 5.10 乳胶管或硅胶管。
- 5.11 止水夹。
- 5.12 小镊子。
- 5.13 剪刀。
- 5.14 挑针。
- 5.15 浅盘。
- 5.16 线虫滤纸或卫生纸。
- 5.17 酒精灯。
- 5.18 钟面皿或培养皿。
- 5.19 加热板。
- 5.20 干燥器。
- 5.21 试管。
- 5.22 水浴锅。

6 药品

- 6.1 4%甲醛。
- 6.2 指甲油。

- 6.3 甘油。
6.4 95%酒精。
6.5 石蜡。

7 现场检疫

7.1 抽样

具体抽样方法见 SN/T 2122。

7.2 外观症状的检查

- 7.2.1 对花卉、观赏植物、果树、蔬菜等根及根基部分进行检查,注意检查是否有变褐和坏死等症状。
7.2.2 收集上述可疑植物材料及所夹带的土壤或栽培介质等,和采集的样品一并送实验室进行香蕉穿孔线虫的检验。

8 实验室检验

8.1 样品分离

对于抽取的样品,仔细检查根部,尽量选取有变褐和坏死等症状的根及根围介质作为分离样品。

8.2 线虫分离

用浅盘分离法或漏斗法分离线虫,具体分离方法见附录 A。

8.3 体视显微镜检查

分离获得的线虫样在生物体视显微镜下检查。

8.4 显微镜检查

挑取线虫若干条制成临时玻片在生物显微镜下镜检,观察线虫的形态。

9 形态鉴定特征

9.1 穿孔线虫属形态鉴定特征

9.1.1 雌虫

- 虫体长 0.4 mm~0.9 mm, a 值在 20~30 之间;
- 头部低,不缢缩或稍缢缩,头架骨化显著;
- 口针粗短,14 μm ~23 μm ,基部球发达;
- 中食道球发达,后食道腺叶较长叶状从背部覆盖肠;
- 侧区刻线 3 条~7 条,非网格化;
- 无颈乳突,侧尾腺孔常位于尾的前部;
- 双生殖腺、对伸,或后生殖腺退化,授精囊园至卵圆形,内多有杆状精子;
- 尾长圆锥形至亚圆柱形,长为肛门处体宽的 2 倍~4 倍,末端窄圆至稍尖。

9.1.2 雄虫

- 头部高,显著缢缩呈球状;
- 口针和食道明显退化;
- 交合伞延伸到近尾端,极少延伸到尾端;
- 引带大,伸出泄殖腔。

9.2 香蕉穿孔线虫形态鉴定特征

9.2.1 测计值

香蕉穿孔线虫的测量数据见表 1。

表 1 香蕉穿孔线虫测计值一览表

测量项目	来自香蕉(Sher,1968)		来自柑橘(Huettel等,1984)		来自可可(Koshy等,1991)	
	♀(n=12)	♂(n=5)	♀(n=30)	♂(n=30)	♀(n=20)	♂(n=20)
L./mm	0.52~0.88(0.69)	0.54~0.67(0.63)	0.60~0.76	0.59~0.70	0.624~0.748	0.559~0.711
a	22~30(27)	31~44(35)	21.4~31.7(28)	—	23.3~32.2	28.9~38.1
b	4.7~7.4(6.5)	6.1~6.6(6.4)	—	—	7.0~8.1	—
b'	3.5~5.2(4.5)	4.1~4.9(4.8)	—	—	3.8~4.6	—
c	8~13(10.6)	8~10(9)	8.7~12.2(10)	—	8~13	7.8~9.0
c'	2.9~4.0(3.4)	5.1~6.7(5.7)	—	—	2.99~4.41	4.66~6.53
V	55~61(56)	—	46~58	—	53.8~61.9	—
St./μm	17~20(19)	12~17(14)	18~20(19.1)	11.6~16(14.8)	16.8~18.7	11.2~14.9
Sp./μm	—	18~22(20)	—	17.6~25.6(20.9)	—	16.8~18.7
Gub./μm	—	8~12(9)	—	—	—	9.3~12.1

9.2.2 形态描述

9.2.2.1 香蕉穿孔线虫的形态特征描述图见附录 B。

9.2.2.2 雌虫

- 唇区低,半球形,无缢缩或稍缢缩,唇环 3 个~6 个,唇盘不明显;
- 口针发达,长约 17 μm~21 μm,口针基部球大,前端微凸,偶见圆形;
- 排泄孔位于中食道球后约 1 个~2 个中食道球长度处,即食道与肠接合处;
- 侧带区占体宽的三分之一,非网格化,刻线 4 条,其中内侧的两条在尾中部愈合 1 条;
- 双生殖管发育相当,偶见后生殖管退化,受精囊卵圆形至圆形,内充满杆状精子;
- 尾指形,偶见亚圆锥形,尾端常为不规则的缨枪头状;部分有尾环,尾部透明区长约 9 μm~17 μm;
- 侧尾腺孔明显,位于尾部的前三分之一处,一般为肛门后 7 个~17 个尾环处。

9.2.2.3 雄虫

- 雄虫细长,较雌虫短;
- 唇区高,半球型突起,明显缢缩,头环 3 个~5 个;
- 排泄孔位于中食道球后约 2 个中食道球长度处;
- 刻线 4 条;
- 交合伞包裹尾端的 2/3~3/4,交合刺健壮,末端尖,长 18 μm~20 μm;
- 引带伸出泄殖腔外,尖端有一明显的指状突;
- 尾部圆至圆锥形,末端尖。

10 样品保存

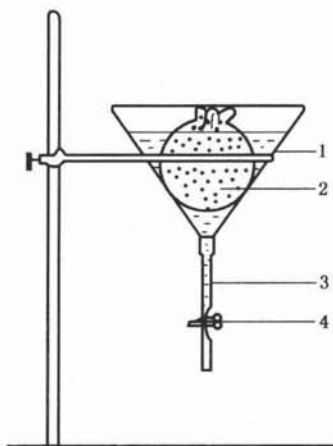
若鉴定为香蕉穿孔线虫,则将剩余的线虫杀死、固定制成永久玻片保存,制作方法详见附录 C;也可以固定后放入含 4%甲醛液的指形管内长期保存。

对已鉴定出带有香蕉穿孔线虫的植物材料,经登记后,要保存在 5℃~10℃及干燥、防鼠防虫处,并标明样品编号、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 3 个月,以备复验、谈判和仲裁。

附 录 A
(资料性附录)
香蕉穿孔线虫的分离方法

A.1 漏斗法

首先将 10 cm~15 cm 直径的漏斗固定在支架上(见图 A.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,再放入样品。在线虫自身的趋水性和重力作用下,线虫不断脱离植物组织和土壤等,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。12 h~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 的含有线虫的分离水样,放在生物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 21 °C~24 °C,温度太高或太低均会影响香蕉穿孔线虫的分离效果。



- 1——漏斗;
2——用纱布包裹的样品;
3——乳胶管;
4——止水夹。

图 A.1 Baermann 漏斗装置

A.2 浅盘分离法

浅盘分离法装置(见图 A.2)由两只不锈钢浅盘、线虫滤纸或卫生纸组成,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。

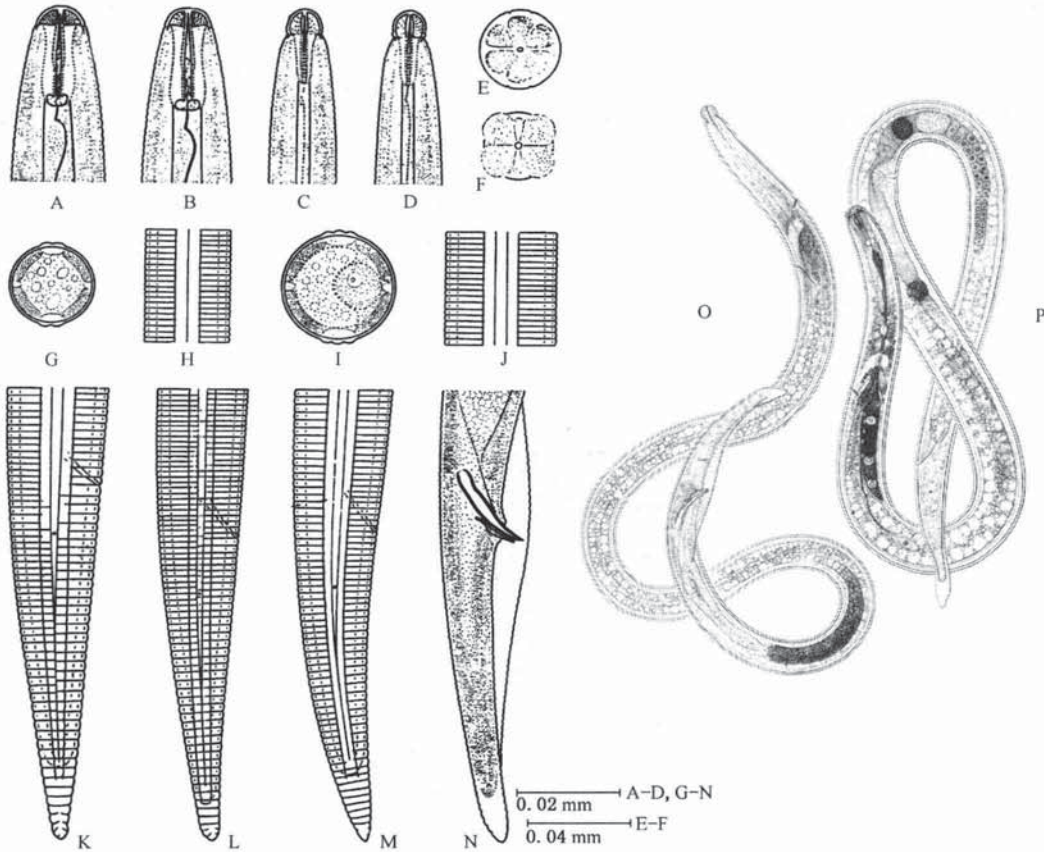
分离线虫时,将线虫滤纸平放在上盘的筛网上,用水淋湿,将供分离的已剪成小块的样品撒铺在其上,套进下盘内;从两只浅盘的夹缝中注水,以淹没供分离的样品为宜;在 21 °C~24 °C 下放置 24 h 后,线虫渐渐集中到下盘的水中;用烧杯收集浅盘中水,并将烧杯中的水连续通过 100 目和 500 目的筛网,将 500 目标准筛上的含线虫的残留物冲洗到培养皿中镜检。



- 1——上盘;
2——下盘。

图 A.2 浅盘分离装置

附录 B
(规范性附录)
香蕉穿孔线虫的形态特征图



- A——雌虫前部；
- B——雌虫前部；
- C——雄虫前部；
- D——雄虫前部；
- E——顶面观；
- F——虫顶面观；
- G——幼虫接近虫体中部的切面图；
- H——幼虫接近虫体中部的侧面图；
- I——雌虫接近虫体中部的切面图；
- J——雌虫接近虫体中部的侧面图；
- K——雌虫尾部；
- L——雌虫尾部；
- M——雌虫尾部；
- N——雄虫尾部；
- O——雄虫；
- P——雌虫。

图 B.1 香蕉穿孔线虫形态特征(A~N 仿 Sher, 1968; O~P 仿 Cobb, 1915)

附录 C

(资料性附录)

香蕉穿孔线虫玻片标本制作方法

C.1 线虫杀死

在生物体视显微镜下,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于 65 ℃ 的水浴锅中放置 5 min 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 4% 甲醛液中固定。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 4% 甲醛液作为浮载剂,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

采用甘油酒精快速脱水法(Seinhorst, 1959)脱水,具体方法如下。

- 将固定好的线虫移入含 FA(4:1) 固定液(95% 酒精 20 mL, 甘油 1 mL, 蒸馏水 79 mL)的贝氏小皿中;
- 将其放入充满饱和酒精蒸汽(1/10 体积的 95% 乙醇)的干燥器内,密封后置于 35 ℃~40 ℃ 恒温箱中,保持至少 12 h;
- 取出小皿,在解剖镜或放大镜下小心吸去上层液体后(由于酒精的沉积,小皿中的液体会增加),加入少量甘油酒精混合液(甘油 5 mL, 95% 乙醇 95 mL);
- 将小皿放置于培养皿中,盖上部分皿盖,再转移到 40 ℃ 恒温箱中脱水 3 h 以上,待酒精完全蒸发后,将线虫移至纯甘油液中。

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。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、数量等数据。