



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2017—2007

拟松材线虫检疫鉴定方法

Identification of *Bursaphelenchus mucronatus* Mamiya & Enda

2007-12-24 发布

2008-07-01 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 A、附录 B、附录 C、附录 D、附录 E 和附录 F 均为资料性附录。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准由中华人民共和国云南出入境检验检疫局负责起草,中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中华人民共和国浙江出入境检验检疫局、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局、云南农业大学参加起草。

本标准主要起草人:杜宇、蒋小龙、宋绍祎、林小佳、吴蓉、林何燕、王扬、喻盛甫。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

拟松材线虫检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了拟松材线虫的检疫鉴定方法。

本标准适用于进出境木材(包括原木、板材、木包装和木屑等)传带的拟松材线虫的检疫鉴定。

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 1132—2002 松材线虫检疫鉴定方法

3 符号

线虫测计:本标准采用 De Man 公式,对线虫进行测计。

De Man 公式测计参数如下:

N ——标本数;

L ——体长(mm 或 μm , 头端至尾端的中线距离,不包括尾尖突);

a ——体长/最大体宽;

b ——体长/自头端至食道与肠连接处的长度;

c ——体长/尾长(尾长指肛门或泄殖腔口至尾端的长度,不包括尾尖突);

V ——自头端至阴门的长度 $\times 100$ /体长(%);

T ——雄虫前生殖腺(精巢)端至泄殖腔口的长度 $\times 100$ /体长(%);

St ——口针长度;

Sp ——交合刺长度;

M ——尾尖突的长度。

4 分类地位

拟松材线虫(*Bursaphelenchus mucronatus* Mamiya & Enda, 1979)隶属线虫门(Nematoda)、侧尾腺纲(Secernentea)、滑刃目(Aphelenchida)、滑刃科(Aphelenchoididae)、伞滑刃属(*Bursaphelenchus*)。

5 原理

拟松材线虫是系统侵染寄主茎干部分的内寄生线虫,松墨天牛(*Monochamus alternatus* Hope)为拟松材线虫的媒介昆虫,可随着染虫材料和传媒昆虫传播扩散,常在进境检疫中被截获。其侵染寄主特点、传播途径、寄主范围、生物学特性和形态特征等是检疫鉴定的依据(参见附录 A)。

6 仪器及用具

6.1 木工锯或木工电锯,空心电钻,砍刀。

6.2 样品袋和标签。

6.3 贝尔曼漏斗分离器或浅盘。

6.4 标准套筛(400 目以上)。

- 6.5 生物显微镜。
- 6.6 体视显微镜。
- 6.7 超净工作台。
- 6.8 可调式气候培养箱。
- 6.9 恒温培养箱。
- 6.10 恒温水浴锅。
- 6.11 凹面皿。
- 6.12 培养皿、载玻片和盖玻片。
- 6.13 酒精灯。
- 6.14 线虫挑针。
- 6.15 微量移液管、可调微量加样器($0.2\ \mu\text{L}\sim 1\ 000\ \mu\text{L}$)。
- 6.16 控温电热平板。
- 6.17 大容量离心机。
- 6.18 普通冰箱。

7 药品和材料

- 7.1 指甲油。
- 7.2 石蜡。
- 7.3 70%的酒精。
- 7.4 休眠线虫发育催化液(配方参见第 B.1 章)。
- 7.5 线虫保存液(配方参见第 B.2 章)。
- 7.6 线虫脱水液(配方参见第 B.3 章)。
- 7.7 PDA 培养基。
- 7.8 灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)。

8 现场检疫

8.1 核查和直观检验

- 8.1.1 核对品名、品种、产品、批号、数量、唛头及相关的检验检疫单证等是否与申报相符。
- 8.1.2 检查检疫物是否为针叶类木材、有无媒介昆虫侵染的痕迹,如:侵入孔、虫道和蛹室等。

8.2 抽样

选取有媒介昆虫侵染痕迹的松木或其加工制品;如无上述特征时,则随机抽样,抽样数量为每批总件数的 0.5%~5%,最低不得少于 3 件,不足 3 件时,全部抽取。

8.3 取样

木质包装或其他木材带有树皮时,取样前将树皮清除;有媒介昆虫侵染时,尽量在靠近有侵染痕迹的部位取样;在其他情况下,去除表层的木质部分后,将所抽取的样品劈成长 2 cm~5 cm 和宽 1 cm~2 cm 的小木段,或用木工空心钻多点钻取木屑(样品量至少为 50 g),贴上标签后,送样至实验室。

必要时,可将整件样品送交实验室。

9 实验室检验

9.1 分离

线虫分离可采用贝尔曼漏斗法或浅盘法。

9.2 镜检

初步形态观察:收集线虫于凹面皿中,在体视显微镜下观察,发现线虫后,用挑针挑取,或用微量移

液管吸取线虫,转到带小凹面的载玻片或普通载玻片上,制成临时水玻片,在显微镜下观察,重点观察鉴别性特征,识别该线虫是否属于伞滑刃属线虫,包括口针基部球和中食道球的形状、雌虫有无阴门盖、雄虫交合刺的形状和尾部是否有交合伞等特点,并做好笔记。

9.3 培养

分离所得的拟松材线虫雌、雄虫数量较少,或仅发现幼虫时,应通过线虫培养,获得足够的雌雄成虫(参见第 B.1 章和第 C.1 章)。

9.4 鉴定准备

线虫鉴定前,应制作临时玻片或永久玻片(参见第 B.2 章、第 B.3 章、第 C.2 章),在显微镜下,对线虫进行形态鉴定、测计和描述。

9.5 形态鉴定(参见附录 D)

9.5.1 测量值

雌虫($n=40$): $L=700\ \mu\text{m}\sim 1\ 197\ \mu\text{m}$; $a=34\sim 46$; $b=10\sim 16$; $c=20\sim 38$; $M=2.5\sim 5.0$; $V=72\sim 80$; $St=15\ \mu\text{m}\sim 20\ \mu\text{m}$ 。

雄虫($n=35$): $L=640\ \mu\text{m}\sim 970\ \mu\text{m}$; $a=27\sim 51$; $b=8.4\sim 15$; $c=20\sim 39$; $St=11\ \mu\text{m}\sim 20\ \mu\text{m}$; $Sp=23\ \mu\text{m}\sim 29\ \mu\text{m}$ 。

3 龄幼虫($n=30$): $L=500\ \mu\text{m}\sim 590\ \mu\text{m}$; $a=30\sim 37$; $b=8.4\sim 10$; $c=20\sim 25$; $St=11\ \mu\text{m}\sim 13\ \mu\text{m}$ 。

4 龄耐久性幼虫($n=30$): $L=500\ \mu\text{m}\sim 650\ \mu\text{m}$; $a=35\sim 46$; $b=10\sim 16$; $c=20\sim 24$ 。

9.5.2 特征描述

雌虫:经缓慢加热杀死后,虫体向腹部微弯,纤细,表面光滑,有浅环纹,侧区侧线 4 条;唇区高,缢缩。内唇和外唇各 6 片。口针细,基部略膨大,中食道球为典型的滑刃型,占体腔的三分之二以上,瓣门发达;神经环位于中食道球下方;背食道腺开口于中食道球内;后食道腺背侧长覆盖肠,其长大约等于 4 倍体宽;排泄孔的位置大约与神经环平齐,靠近食道和肠交界处。半月体明显,位于排泄孔后 1 个体宽处。阴门有前阴门盖;单卵巢前伸,卵母细胞单列;后阴子宫囊长,约为肛阴距的三分之二,常见精子。尾端指状,或圆锥形,有尾尖突,端部尖锐,长度在群体中有差异,通常大于 $2.5\ \mu\text{m}$ 。

雄虫:热杀死后,虫体近似“J”形。头部和食道部分与雌虫相似。精巢前伸,不折叠;精子圆形,较大,直径 $5\ \mu\text{m}\sim 7\ \mu\text{m}$;交合刺为典型的玫瑰刺形,近基部有明显的喙尖突;尾端有交合伞,交合伞的形状因地区等因素存在种群间差异。

3 龄幼虫:体前端和雌、雄虫的相似。因肠中充满营养物质,体色较深。尾端具明显的尾尖突。

4 龄耐久性幼虫:头部高,半球形,不缢缩。口针、食道和中食道球退化。体融物非常浓。尾端圆锥形或亚弓形,具明显的尾尖突。

9.5.3 松材线虫和拟松材线虫形态特征区别

在伞滑刃属线虫中,松材线虫 *B. xylophilus* (Steiner & Buhner) Nickle 和拟松材线虫 *B. mucronatus* 的形态极为相似,两者有细微的区别在于尾形和尾尖突的有无和长短(参见附录 E,表 E.1)。

不同地区拟松材线虫种群间测量值具有差异(参见附录 F)。

10 结果判定

主要依据雌、雄成虫的综合形态特征进行判定,符合拟松材线虫的特征的,可鉴定为拟松材线虫。

11 样品保存

对传带拟松材线虫的木质样品,应登记备案,并做好标识,标注:截获日期、截获人、输出国别/地区、运输工具、包装货物名称等基本信息。样品保存至少 1 个月,以备复查。保存期满后,做销毁处理。

附录 A

(资料性附录)

拟松材线虫的生物学和生态学特性

拟松材线虫与松材线虫的生物学特性相似,差别是前者的生活史略长些。拟松材线虫可在松树的组织或媒介昆虫松墨天牛体内繁殖,能随着染虫的树枝、树干和树根以及传媒昆虫传播扩散。深秋和冬天,从染虫木材中分离的侵染期 3 龄幼虫与其他虫态的比例较高。在 25℃ 时,拟松材线虫在灰葡萄孢菌培养基上完成一个生活史需 5 d。侵染型 3 龄幼虫在水中或灰葡萄孢菌培养基上蜕皮,发育成 4 龄幼虫,耐久型 4 龄幼虫蜕皮发育为成虫。拟松材线虫比松材线虫有更广泛的分布范围。接种拟松材线虫发生病害症状或死亡的松树,其症状表现与接种松材线虫的松树相似。相对松材线虫而言,拟松材线虫具有较弱的致病能力。

附录 B

(资料性附录)

标准中涉及的试剂配制方法

B.1 休眠线虫发育催化液

双氧水	$5 \times 10^{-3} \sim 3.3 \times 10^{-4}$
去氢枞酸	2.5×10^{-6}
长叶烯	2.5×10^{-6}

B.2 线虫保存液

FG 液的配方:福尔马林(40%甲醛)	10 份
甘油	1 份
蒸馏水	89 份

B.3 线虫脱水液

脱水液 1:酒精(96%)	95 份
甘油	5 份
脱水液 2:酒精(96%)	50 份
甘油	50 份

附录 C (规范性附录)

拟松材线虫培养、线虫标本制作方法

C.1 拟松材线虫的培养方法

C.1.1 病木保湿保温培养

将样品处理成小段,置于烧杯中,加少量清水,使木段下端浸在水中,木段上端用湿纸巾覆盖,在25℃下保湿保温培养3 d~4 d。

C.1.2 单异活体培养

在PDA培养基上,于25℃的培养箱中培养灰葡萄孢,直至其覆盖整个平板后,取出,在其上接种经0.1%的硫酸链霉素表面消毒的幼虫(2条以上),继续在同等温度的培养箱中保持5 d。

C.1.3 控温快速培养

将木质样品处理成小段,用纱布包好置于烧杯中,加入足量的线虫分离液(以淹没纱布为准),在36℃的气候培养箱中,湿度80%,培养4 h~6 h,将温度调到32℃左右,继续培养10 h以上,取烧杯中沉淀液,检查线虫。

C.2 标本制作方法

C.2.1 临时标本制作方法

C.2.1.1 线虫量大时,将离心浓缩的线虫水液转移入1.5 mL的PCR管中,置于65℃的水浴锅中热水中处理5 min左右,进入步骤3(见C.2.2.1)的操作。

C.2.1.2 线虫量小时,将线虫转移到带有小凹面的载玻片上,盖上盖玻片,在酒精灯火焰外焰上来回轻轻移动(15次左右),加热凹面里水液中的线虫,将线虫刚好杀死为止。

C.2.1.3 取少量线虫固定液(FG,约25 μ L)置于载玻片的中央,稍微加热后,在解剖镜下,用线虫挑针挑取线虫(约10条),转移到载玻片上的线虫固定液中央,待线虫沉底后,从水滴的正上方盖上盖玻片。

C.2.2 永久玻片制作方法

C.2.2.1 线虫脱水(甘油-乙醇脱水法,De Griss,1996)

步骤1:将活体线虫离心,制成浓缩水液,转入小凹面皿中,将与浓缩线虫水液等体积的FG液加热至75℃左右,迅速加入装有线虫的小凹面皿中。

步骤2:将小凹面皿放在干燥器中,干燥器内加有其容量十分之一的乙醇(95%),将干燥器置于35℃~40℃的培养箱中12 h(注:应加盖)。从干燥器中取出小凹面皿,直接放在40℃的培养箱中,加入脱水液1(如果液面过满,在加脱水液前,应缓缓抽吸去掉上层液),加盖,半盖小凹面皿(防止皿内乙醇蒸发过快),每隔3 h,再加脱水液1至皿刚满为止,重复2次~3次,最后,加入脱水液2,过夜。

步骤3:将脱水后的线虫保存在装有氯化钙(CaCl_2)的干燥皿中,用凡士林封盖,常温保存。

C.2.2.2 玻片制作

步骤1:在酒精灯上加热直径为1.2 cm的空心小钢管,粘取封片石蜡,在干净的载玻片上印制蜡圈。

步骤2:取15 μ L纯净甘油,置于载玻片石蜡圈中央,挑针挑取10条线虫,按照头尾一致的顺序排列成两行于甘油中,取与线虫直径大小一致的玻璃丝3根~4根,紧靠石蜡圈周围放置(能包容在盖玻片下),小心盖上盖玻片。

步骤3:在加热板上缓慢加热石蜡圈,直到其完全融化,置室温自然冷却,指甲油封片。

步骤4:加贴标签。在左标签上写上样品号、寄主、截获口岸、产品、制作日期;右标签上标注线虫学名、虫态和数量。

附录 D
(资料性附录)
拟松材线虫的形态特征

D.1 拟松材线虫的形态特征图

拟松材线虫的形态特征见图 D.1。

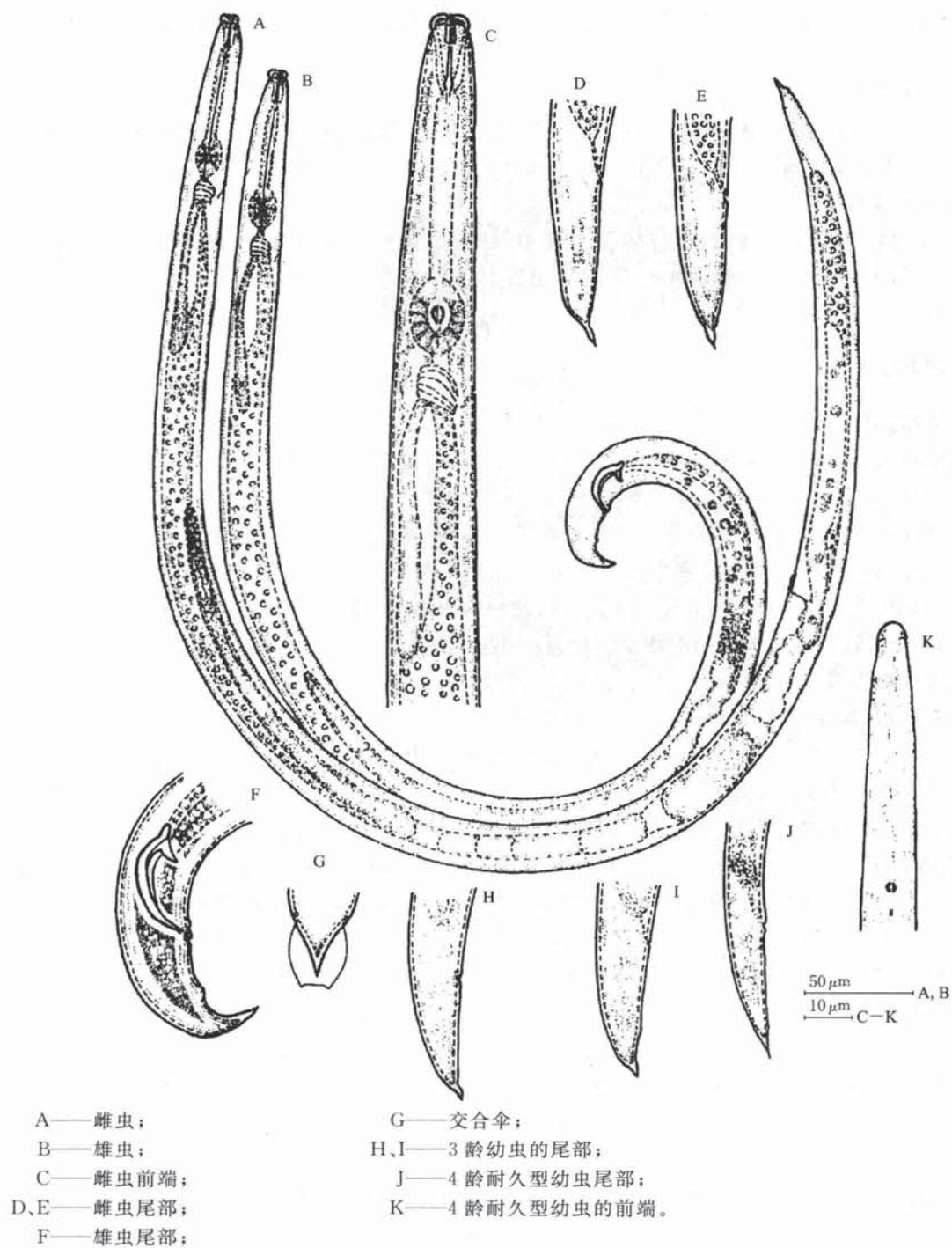
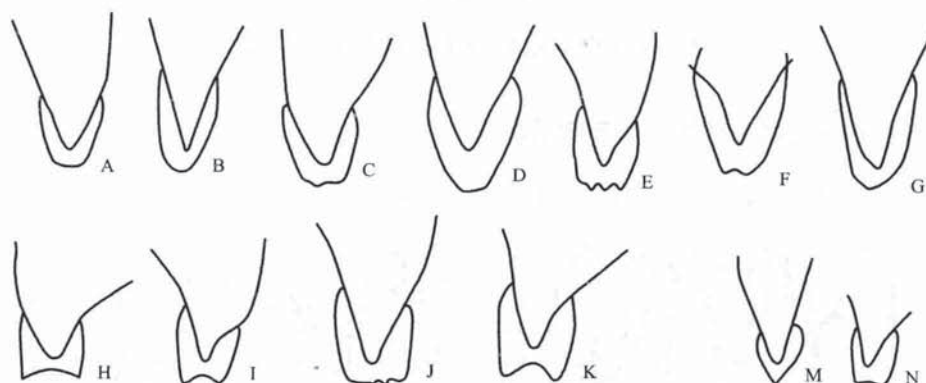


图 D.1 拟松材线虫(*Bursaphelenchus mucronatus*)的形态特征图(仿 Mamiya & Enda 1979)

D.2 拟松材线虫雄虫交合伞类型图

拟松材线虫雄虫交合伞类型见图 D.2。



A,B,C,D,E,F,G,H,I——拟松材线虫雄虫交合伞形状；

A,B,E,F,G,I,J,K——松材线虫雄虫交合伞形状；

M,N——分别为 Mamiya 报道的松材线虫和拟松材线虫雄虫交合伞形状。

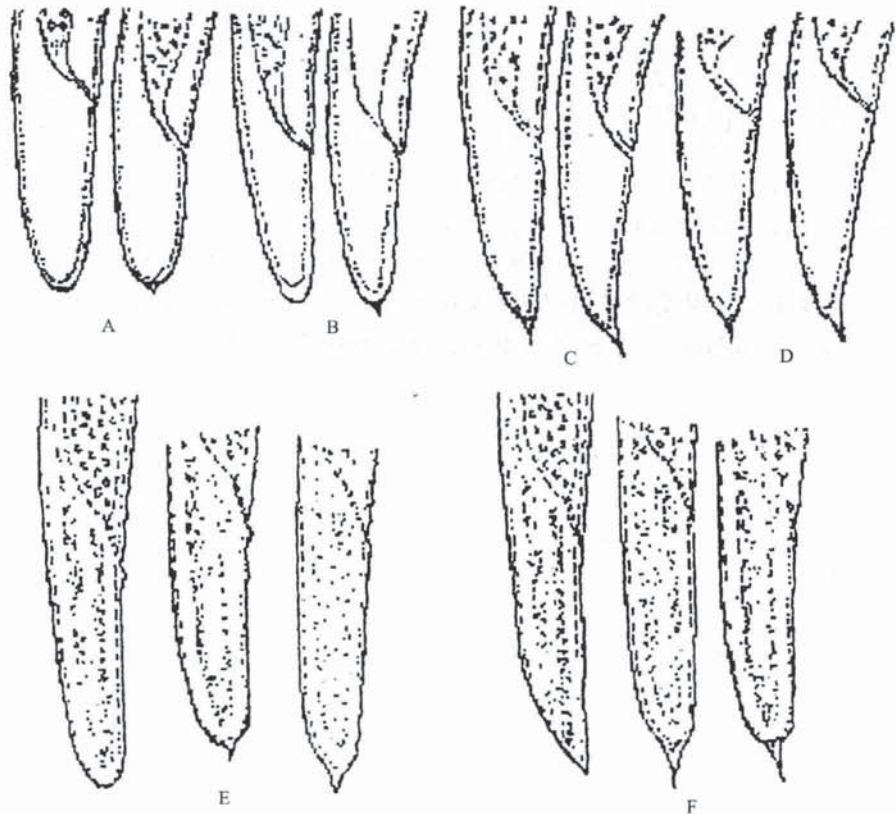
图 D.2 拟松材线虫(*Bursaphelenchus mucronatus*)和松材线虫(*B. xylophilus*)6 个株系的雄虫交合伞形状图(引用自刘伟、杨宝君)

附 录 E
(资料性附录)

拟松材线虫和松材线虫的形态特征比较图

E. 1 拟松材线虫和松材线虫的尾部形态特征比较

拟松材线虫和松材线虫的尾部形态特征比较见图 E. 1。



- A——3 龄松材线虫的尾部；
B——4 龄松材线虫的尾部；
C——3 龄拟松材线虫的尾部；
D——4 龄拟松材线虫的尾部；
E——松材线虫雌虫尾部；
F——拟松材线虫雌虫尾部。

图 E. 1 拟松材线虫(*Bursaphelenchus mucronatus*)和松材线虫(*B. xylophilus*)的主要形态区别
(引用自 SN/T 1132—2002)

E. 2 松材线虫和拟松材线虫形态特征区别

松材线虫和拟松材线虫形态特征区别见表 E. 1。

表 E. 1 松材线虫和拟松材线虫形态特征区别

种 类	雌 虫 尾 部
松材线虫(<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>)	无尾尖突、或有短的尾尖突(小于 2 μm)，尾圆柱形
拟松材线虫(<i>Bursaphelenchus mucronatus</i>)	有尾尖突(大于 2.5 μm)，通常偏向腹侧，尾圆锥形或指状

附录 F
(资料性附录)

不同地区(国家)拟松材线虫种群测量值比较

不同地区(国家)拟松材线虫种群测量值比较见表 F. 1。

表 F. 1 不同地区拟松材线虫 *Bursaphelenchus mucronatus* 种群测量值对照表^a

(引用自丹阳、喻盛甫)

参 数	云南江川		日本	南京	日本	南京
	雌 虫	雄 虫	雌 虫		雄 虫	
	平均值	平均值	平均值		平均值	
N	15	15	40	20	35	20
L/ μm	1 058	844	870	1 007	790	845
A	39	35	42	39	44	40
B	12	9.2	13	13	11	11
C	29	28	26	33	29	34
V/%	75	—	75	75	—	—
St/ μm	17	15	16	15	15	15
M/ μm	4.2	—	5.0	5.0	—	—
Sp/ μm	—	25	—	—	26	28
^a 当测量值低于 1 时,精确到小数点后两位;当测量值间于 1~9,精确到小数点后 1 位;当测量值大于 10,精确到个位,百分比率分子精确到个位。						