



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1723.2—2006

马铃薯金线虫检疫鉴定方法

Inspection and identification of golden potato cyst nematode

Globodera rostochiensis (Wollenweber) Behrens

2006-01-26 发布

2006-08-16 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

前 言

SN/T 1723 分为两部分：

——马铃薯白线虫检疫鉴定方法；

——马铃薯金线虫检疫鉴定方法。

本部分为 SN/T 1723 的第 2 部分。

本部分的附录 C 是规范性附录，附录 A 和附录 B 均为资料性附录。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分负责起草单位：中国检验检疫科学研究院。

本部分参加起草单位：中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局。

本部分起草人：葛建军、姜丽、沈培垠、周虹。

本部分系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

马铃薯金线虫检疫鉴定方法

1 范围

SN/T 1723 的本部分规定了进境植物检疫中马铃薯金线虫检疫的基本原则,以及检疫鉴定方法。

本部分适用于输华的马铃薯种薯、食用马铃薯、带根、土的茄属植物及其他带根、土的植物繁殖材料中马铃薯金线虫的检疫鉴定。

2 符号

下列符号适用于 SN/T 1723 的本部分。

n ——测计的线虫样本数目

L ——虫体体长(μm 或 mm)

S_i ——口针长度(μm)

S_p ——交合刺长度(μm)

3 原理

马铃薯金线虫 golden potato cyst nematode

学名: *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923) Behrens, 1975

异名: *Heterodera schachtii rostochiensis* Wollenweber, 1923

Heterodera schachtii solani Zimmermann, 1927

英文名: golden potato cyst nematode; yellow potato cyst nematode; golden nematode

分类地位: 线虫门(Nemata 或 Nematoda)、垫刃目(Tylenchida)、异皮线虫科(Heteroderidae)、球胞囊线虫属(*Globodera*)。

马铃薯金线虫的侵染循环、传播途径、寄主范围、生物学和形态学特征是其检疫鉴定方法的依据。马铃薯金线虫的寄主范围、分布、生活史和传播途径参见附录 A。

4 仪器、用具及药品

4.1 仪器、用具

光学显微镜、解剖镜、恒温箱、漂浮筒、20 目网筛、60 目网筛、100 目网筛、500 目网筛、酒精灯、烧杯、1 000 mL 三角瓶、毛笔、毛刷等。

4.2 药品

酒精、丁香油、过氧化氢、中性树胶、福尔马林(40%)、冰乙酸、甘油、三乙醇胺、乳酚油、硫酸镁、蒸馏水等。

5 现场检疫与抽样

5.1 现场检疫

检查马铃薯种薯、食用马铃薯薯块的带土情况,肉眼观察薯块基本不带土壤,则对进境的马铃薯薯块进行随机抽样,带回实验室检验;肉眼观察发现薯块带有土壤,应将带有土壤的所有薯块带回实验室进行检查。

查看带根、土的茄属植物及其他带根、土的植物繁殖材料的带土情况,收集上述植物繁殖材料和运输工具上可能携带的土壤,连同植物繁殖材料一并带回实验室检查。

5.2 抽样

5.2.1 抽样方式

棋盘式或五点式随机抽样。抽样时应注意上、中、下层的代表性。

5.2.2 抽样比例

以品种为单位,按总件数的10%抽样,每件按种薯总数的5%~10%抽样。

6 实验室检验

6.1 土壤的收集

使用毛刷将马铃薯等块茎和根上的土壤刷下来,尤其注意收集薯眼等内凹表面的土壤;若马铃薯种薯等繁殖材料的带土量极小,可使用少量水将块茎沾附的少量土洗刷下来。

6.2 线虫的分离与鉴定

6.2.1 Fenwick-Oostenbrink 漂浮法

此方法一般用于检验100 g以上的泥土。具体的分离步骤如下:

将现场采集到的土样铺于干净的浅瓷盘内,置于通风无阳光处风干,用手(或用小的圆木棍)将泥土轻轻压碎,用孔径为3 mm的标准筛过筛,除去泥土中混杂的植物组织和粗砂等杂物后备用;将漂浮筒和下筛淋湿;漂浮筒内灌满清水;在上筛中放置风干的土壤样品100 g左右,用强水流冲洗,使土样全部被淋洗至漂浮筒内;进入筒内的土粒因较重而逐渐下沉,而较轻的胞囊和一些有机杂物则陆续向上漂浮,经1 min~2 min后漂浮于筒口水面之上;再由上筛加水至漂浮筒内,使漂浮于筒口的胞囊和杂物沿水槽流到下筛(100目)上面;将下筛内含胞囊的残留物冲洗至1 000 mL的三角瓶内,往瓶内加清水,直至瓶口处;静置片刻,待漂浮物浮于液面时,将漂浮物倒入装有滤纸的漏斗中过滤,待滤纸晾干后即可镜检。

6.2.2 简易漂浮法分离线虫

收集的土壤数量在100 g以下时可采用此方法分离胞囊。

将上述泥土倒入2 000 mL的三角瓶中,加少量水(可用10%的硫酸镁溶液代替水作漂浮液使用效果更佳)后至水深5 cm左右后充分摇晃使之呈悬浮液,然后边加水边搅动,加水直至接近瓶口处。静置片刻,待三角瓶颈部的水变清时,将三角瓶瓶口的漂浮物通过20目和100目的套筛。彻底冲洗20目筛网,使所有的胞囊被冲到100目的筛网上。将100目筛网上的收集物轻轻地倒入装有滤纸的漏斗中过滤,待滤纸晾干后即可在解剖镜下检查是否有胞囊。

6.2.3 直接过筛分离胞囊线虫

马铃薯薯块上马铃薯胞囊线虫的分离使用该方法。

将洗涤马铃薯薯块的泥水洗涤液倒入20目—100目—500目的三层套筛中,然后用水喷淋冲洗,使杂质留在20目的粗筛内,而胞囊则会被冲到100目的网筛中,500目的网筛用于收集胞囊线虫的2龄幼虫、雄虫和其他蠕虫形线虫。将100目筛网上的胞囊和残余物冲洗入三角瓶内,一并倒入装有滤纸的漏斗中过滤,待滤纸晾干后镜检。将500目网筛上的收集物冲洗到小培养皿中镜检。

6.3 镜检

晾干后的滤纸可在解剖镜下检查,寻找胞囊。若发现胞囊,则用竹针或眉笔或0号狼毛笔将其挑至凹玻片上或装有白色滤纸的小培养皿中。并在显微镜下对胞囊的肛阴板进行鉴定。胞囊的肛阴板制作方法参见附录B。

7 马铃薯金线虫的鉴定特征

7.1 形态特征

7.1.1 雌虫

近球形,具突出的颈,虫体球形部分的角质层具有网状脊,无侧线。口针锥部约为口针长度的

50%，有时略弯曲，口针基部球圆形，明显向后倾斜，口针套管向后延伸略占口针长度的75%。排泄孔明显，位于颈基部。阴门膜孔略凹陷，阴门横裂状。肛门位于阴门膜孔之外，肛门与阴门间角质层有20个平行脊(见图1)。

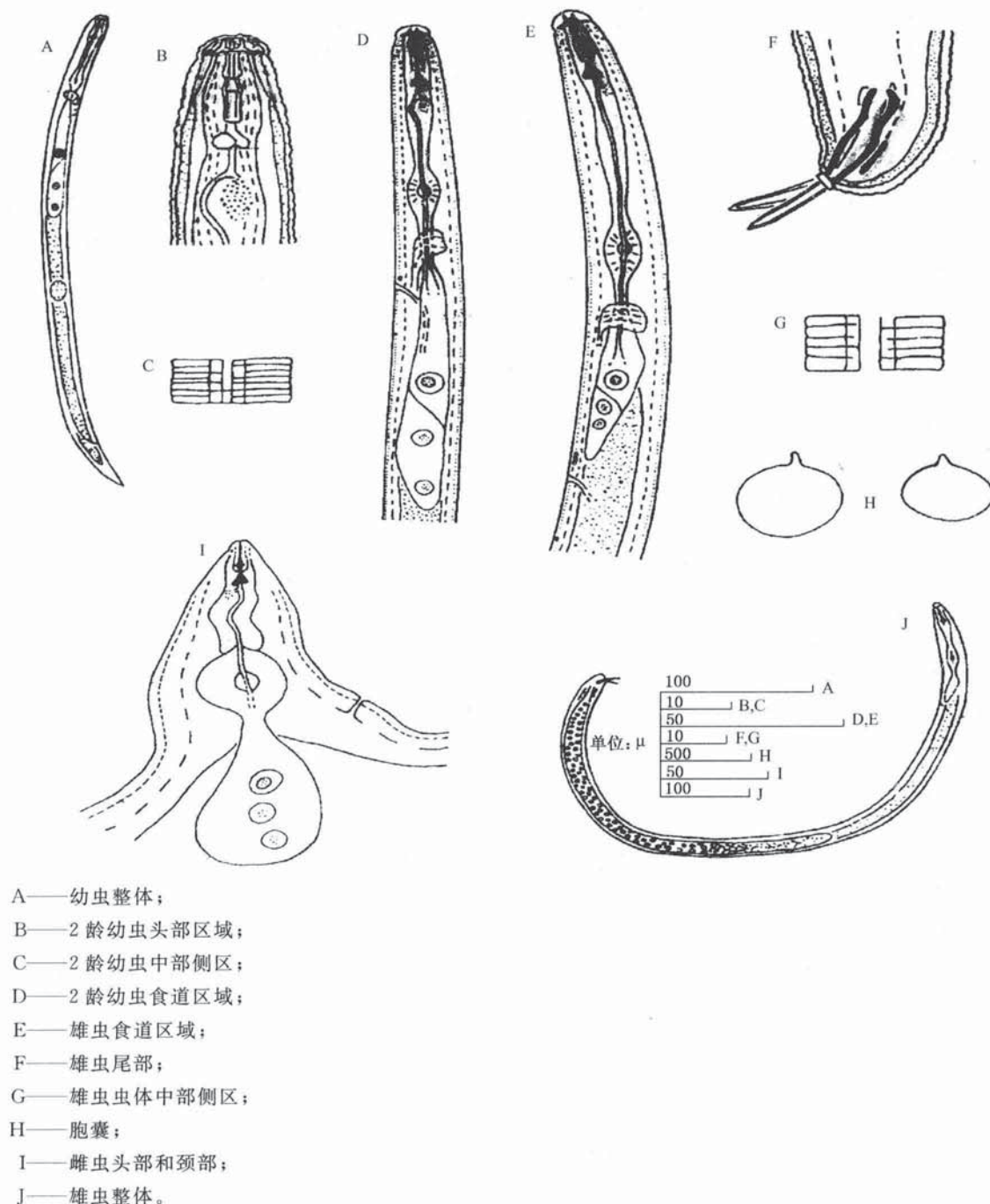


图1 马铃薯金线虫(*Globodera rostochiensis*) [仿 Stone, 1973]

7.1.2 胞囊

近球形具突出的颈,无突出的阴门椎;新胞囊的阴门区可能是完整的,但较老的胞囊标本的部分或全部阴门膜孔丢失,形成1个单环膜孔型(single circular fenestra)阴门膜孔。无阴门桥、下桥及其他残存的虫体腺体结构;无泡状突,但阴门区域可能有一些小而不规则黑色素沉积物。无亚晶层,角质膜与雌虫相似。

7.1.3 雄虫

蠕虫形,尾短、钝圆,热力杀死固定时,虫体弯曲,后部卷曲 $90^{\circ}\sim 180^{\circ}$,呈“C”形或“S”形,角质膜具规则环纹,侧区4条刻线延伸至尾末端,两条外刻线具网纹但内刻线无。头部圆、缢缩,具6个~7个环纹,头骨架严重骨化。口针发育好,基部球向后倾斜,口针锥部占整个口针长的45%,口针套管向后延伸到70%口针长处。中食道球椭圆形,中间有明显的新月形瓣门,无明显的食道肠瓣状结构。半月体2个环纹长,位于排泄孔前2个~3个环纹处,半月小体1个环纹长,位于排泄孔后9个~12个体环处。单精巢,泄殖腔开口小,具升起的唇。交合刺强壮,弓形,末端单指尖状。引带小。

7.1.4 2龄幼虫

蠕虫形,但在卵内折叠成4折,角质层环纹清晰,侧区刻线4条,偶尔有网格化。头圆,稍微缢缩,4个~6个环纹。头骨架严重骨化,前、后头状体分别位于第2或第3个和第6个~8个体环处。口针发育好,口针锥部小于口针长的50%,口针基部球略向后倾斜,食道腺体在腹面延伸至排泄孔后35%体长处,排泄孔位于20%体长处,半月体2个体环长,位于排泄孔前1个环纹处,半月小体小于1个体环长,位于排泄孔后5个~6个环纹处。尾部逐渐变细,直至尾端,后部的一半到三分之二为透明尾(见图1)。

7.2 测计值

7.2.1 雌虫

($n=25$): L (不包括颈) $=520(420\sim 640)\mu\text{m}$, $S_1=22.9\mu\text{m}\pm 1.2\mu\text{m}$,口针基部至背食道腺开口的距离为 $5.7\mu\text{m}\pm 0.9\mu\text{m}$,头基部宽 $5.2\mu\text{m}\pm 0.7\mu\text{m}$,头端至中食道球瓣门的距离为 $73.2\mu\text{m}\pm 14.6\mu\text{m}$,中食道球瓣门至排泄孔的距离为 $65.2\mu\text{m}\pm 20.2\mu\text{m}$,头端至排泄孔的距离为 $145.3\mu\text{m}\pm 17.4\mu\text{m}$,中食道球平均直径 $30\mu\text{m}\pm 2.8\mu\text{m}$,阴门膜孔直径 $22.4\mu\text{m}\pm 2.8\mu\text{m}$,阴门裂长 $9.7\mu\text{m}\pm 1.9\mu\text{m}$,肛门至阴门膜孔距离 $60\mu\text{m}\pm 10.1\mu\text{m}$,肛门至阴门间角质层脊数为 $21.6\text{个}\pm 3.5\text{个}$ 。

7.2.2 胞囊

($n=25$): L (不包括颈) $=445\mu\text{m}\pm 50\mu\text{m}$,体宽 $382\mu\text{m}\pm 61\mu\text{m}$,颈长 $104\mu\text{m}\pm 19\mu\text{m}$,阴门椎直径 $18.8\mu\text{m}\pm 2.2\mu\text{m}$,肛门至阴门盆距离 $66.5\mu\text{m}\pm 10.3\mu\text{m}$,格氏比值(肛门至阴门盆近缘的距离/阴门盆直径) 3.6 ± 0.8 。

7.2.3 雄虫

($n=50$): $L=1\,197\mu\text{m}\pm 100\mu\text{m}$,排泄孔处体宽 $28.1\mu\text{m}\pm 1.7\mu\text{m}$,头基部宽 $11.8\mu\text{m}\pm 0.6\mu\text{m}$,头高 $6.8\mu\text{m}\pm 0.3\mu\text{m}$, $S_1=25.8\mu\text{m}\pm 0.9\mu\text{m}$,口针基部到背食道腺开口的距离为 $5.3\mu\text{m}\pm 0.9\mu\text{m}$,头端到中食道球瓣门距离 $98.5\mu\text{m}\pm 7.4\mu\text{m}$,中食道球瓣门至排泄孔的距离为 $73.8\mu\text{m}\pm 9.0\mu\text{m}$,头端到排泄孔距离 $172.3\mu\text{m}\pm 12.1\mu\text{m}$,尾长 $5.4\mu\text{m}\pm 1.1\mu\text{m}$,泄殖腔处体宽 $13.5\mu\text{m}\pm 0.4\mu\text{m}$, $S_p=35.5\mu\text{m}\pm 2.8\mu\text{m}$,引带长 $10.3\mu\text{m}\pm 1.5\mu\text{m}$ 。

7.2.4 2龄幼虫

($n=25$): $L=468\mu\text{m}\pm 20\mu\text{m}$,排泄孔处体宽 $18.3\mu\text{m}\pm 0.5\mu\text{m}$,基部头宽 $9.9\mu\text{m}\pm 0.4\mu\text{m}$,头高 $4.6\mu\text{m}\pm 0.6\mu\text{m}$,头端到中食道球瓣门距离 $69.2\mu\text{m}\pm 1.9\mu\text{m}$, $S_1=21.8\mu\text{m}\pm 0.7\mu\text{m}$,口针基部到食道腺开口的长度为 $2.6\mu\text{m}\pm 0.6\mu\text{m}$,中食道球瓣门至排泄孔距离 $31.3\mu\text{m}\pm 2.3\mu\text{m}$,头端至排泄孔 $100.5\mu\text{m}\pm 2.4\mu\text{m}$,尾长 $43.9\mu\text{m}\pm 11.6\mu\text{m}$,肛门处体宽 $11.4\mu\text{m}\pm 0.6\mu\text{m}$,透明尾长 $26.5\mu\text{m}\pm 1.8\mu\text{m}$ 。

7.3 与相似种的区别

马铃薯金线虫与马铃薯白线虫在形态上极为相似,两个种的主要区别见附录C。

8 结果判定

以胞囊或雌虫的形态学作为该线虫鉴定的主要依据,2龄幼虫和雄成虫作为鉴定的辅助依据。符合上述形态特征和测计值的可鉴定为马铃薯金线虫。

9 样品的保存

9.1 样品保存

样品经登记,经手人签字,妥善保存2个月。如发现马铃薯金线虫,该样品至少需保存6个月,以备复验、谈判和仲裁。保存期满后,发现马铃薯金线虫的,需作销毁处理。

9.2 线虫标本的保存

截获的马铃薯金线虫的胞囊、雌虫、雄虫和幼虫可制作成标本,永久保存。



附录 A (资料性附录)

马铃薯金线虫的寄主范围、分布、生活史和传播途径

A.1 马铃薯金线虫的寄主

马铃薯金线虫的寄主范围较窄,最主要的农业寄主作物有马铃薯、茄子和番茄。此外,茄属的 90 种植物均是其寄主,其中许多是南部非洲的野生种,包括与马铃薯近缘的植物及具有不同抗性水平的 *Solanum tuberosum* *andigena*、*S. vernei* 和 *S. sucrense*,在欧洲,某些野生杂草如 *S. sarachoides*、*S. dulcamara*、*Datura stramonium* 可延续马铃薯金线虫的种群。

A.2 马铃薯金线虫的分布

欧洲:阿尔巴尼亚、阿尔及利亚、奥地利、白俄罗斯、比利时、保加利亚、捷克、丹麦、爱沙尼亚、法罗群岛、芬兰、法国、德国、希腊(包括克里特岛)、匈牙利(仅一个地方发生)、冰岛、爱尔兰、意大利、拉脱维亚、立陶宛、卢森堡、马耳他、荷兰、挪威、波兰、葡萄牙(包括马德里,亚速尔群岛未证实)、西班牙(包括加那利群岛)、俄罗斯(俄罗斯中部、西伯利亚东部、远东地区、俄罗斯北部和南部)、斯洛伐克、英国(苏格兰和海峡群岛)、瑞典、瑞士、乌克兰和前南斯拉夫。

亚洲:亚美尼亚、塞浦路斯、埃及、印度(喀拉拉邦、泰米尔纳德邦)、以色列(仅在 1954 和 1965 年偶然在 Sharon region 的小面积发现,现已成功地铲除)、日本(北海道)、黎巴嫩、巴基斯坦、菲律宾、斯里兰卡、塔吉克斯坦。

非洲:阿尔及利亚、埃及、利比亚、摩洛哥(仅被截获)、塞拉利昂、南非、突尼斯和加那利群岛。

大洋洲:澳大利亚(两次暴发,1986 年在西澳大利亚,1991 在维多利亚;两次都采取了官方铲除计划)、新西兰、诺福克岛。

北美洲:美国(纽约州;特拉华已铲除)、加拿大(纽芬兰、温歌华)和墨西哥。

中南美洲:哥斯达黎加、巴拿马、阿根廷、玻利维亚、巴西、秘鲁、智利、哥伦比亚、委内瑞拉和厄瓜多尔。

A.3 马铃薯金线虫的侵染循环和生活史

在寄主根分泌物的刺激下,从土壤中线虫胞囊内孵化出的马铃薯金线虫的 2 龄幼虫侵入到寄主根内,在根的中柱鞘、皮层或内皮层的一组细胞中取食,将其转变成大的合胞体转移细胞,此后线虫在此营固定性内寄生生活,并完成其余的发育过程;经蜕皮,2 龄幼虫变为 3 龄幼虫、4 龄幼虫,而从 3 龄幼虫开始出现性别的分化,雄性幼虫仍为蠕虫状,而雌性幼虫的身体开始膨大;4 龄雌性幼虫再蜕皮变为雌性成虫,虫体的后部不断膨大,撑破根表皮露出根外,仅头和颈部固着于根内;蠕虫状活泼运动的雄虫与雌虫交配后死亡,而雌虫继续留在根上,卵在其中发育。雌虫穿出根表层时呈白色,后经 4~6 周的金黄色阶段,在雌虫完全成熟时,其表皮变硬、变褐色从而成为保护壳,这就是胞囊,内含大量的卵;至此,胞囊一般从根表面脱落掉入土中,其内的卵可以立即孵化,侵害作物或保持休眠成为未来作物的初侵染源;鞣革质的胞囊可抵抗化学物和干旱,使得该线虫在土壤内越冬、滞育及度过不良环境,在无寄主茄属植物存在的情况下,胞囊可在土壤中存活多年并仍有侵染能力。

A.4 马铃薯金线虫的传播途径

马铃薯金线虫以 2 龄幼虫在土壤内作短距离的移动,农事操作、农具和交通工具可将农田中的土壤

带走,从而传播马铃薯金线虫;马铃薯种薯、苗木、花卉鳞球茎、消费或加工用马铃薯块茎上沾附的土壤可将马铃薯金线虫的胞囊传播到新的马铃薯生产地区,因此,胞囊是马铃薯金线虫远距离传播的主要途径。

附 录 B

(资料性附录)

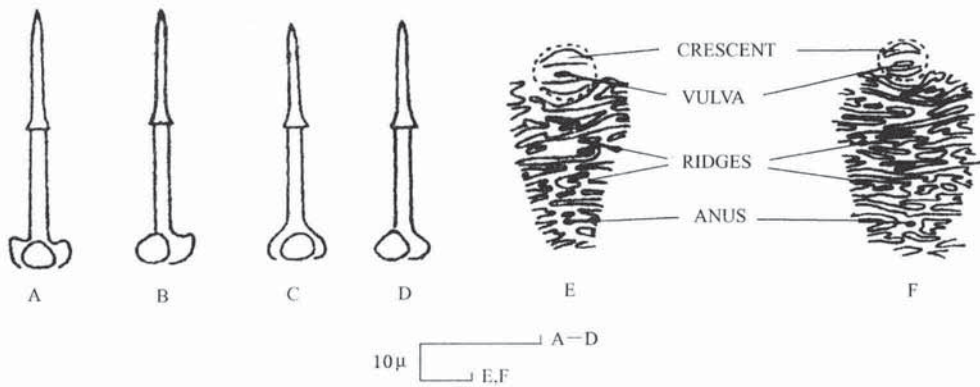
胞囊线虫肛阴板标本的制作

将分离到的胞囊在乳酚油或清水中浸泡 24 h;在塑料载玻片一侧的水滴中放置已浸泡过的胞囊,于双目解剖镜下用解剖刀切下胞囊的后端(肛阴板及其边缘)部分;用竹针或眉笔或 0 号狼毛笔轻轻剔除肛阴板的沾附物和卵;用 90 倍的过氧化氢漂白几分钟(不能漂白过度)后,用解剖刀适当修整肛阴板的边缘;将修整后的肛阴板移至塑料载玻片的另一侧,先用无菌水冲洗已净化了的肛阴板,然后再通过 70%、95% 和 100% 的酒精和丁香油处理,使之脱水和透明;在凹穴载玻片的凹穴内加一滴中性树胶,稍为涂平后将处理好的肛阴板(3 枚~4 枚)埋入该薄层树胶内(注意用竹针将肛阴板扶直,使其外表面向上);待凹穴载玻片中的树胶干固后,再在其四周加适量的中性树胶,盖上盖玻片(加进去树胶的量以在加盖玻片后树胶正好铺满盖玻片下表所占的空间为宜)。

附录 C
(规范性附录)

马铃薯金线虫和马铃薯白线虫的主要区别

马铃薯白线虫与马铃薯金线虫在形态上极为相似,两个种的主要区别在于马铃薯白线虫的幼虫通常比马铃薯金线虫的大;白线虫的幼虫口针较长为 21~26(23.6) μm ,而金线虫的幼虫口针较短为 21~23(21.8) μm ;白线虫的幼虫体长较长为 440~525(484) μm ,而金线虫的幼虫体长较短为 425~505(468) μm ;白线虫的幼虫尾长较长为 46~52(51.9) μm ,而金线虫幼虫尾长为 40~50(43.9) μm ;白线虫幼虫口针基部球前表面向前突起,而金线虫的幼虫口针基部球圆形,向后倾斜。白线虫的雌虫为白色或奶油色至亮褐色,金线虫雌虫为金黄色;白线虫雌虫口针较长,为 23~29(26.7) μm ,而金线虫雌虫口针较短为 21~25(22.9) μm ;白线虫雌虫阴门与肛门间角质层的脊数为 8~20(12.2),而金线虫雌虫阴门与肛门间角质层的脊数为 16~31(21.6)。白线虫胞囊阴门与肛门间距离较短,为 32~35 μm ,而金线虫胞囊阴门与肛门间距离较长,为 88~102 μm (见图 C.1 和表 C.1)。



- A~B——马铃薯白线虫 2 龄幼虫口针;
C~D——马铃薯金线虫 2 龄幼虫口针;
E——马铃薯白线虫雌虫肛门-阴门区,示角质层脊数;
F——马铃薯金线虫雌虫肛门-阴门区,示角质层脊数。

图 C.1 马铃薯金线虫和马铃薯白线虫的区别[仿 Stone, 1973]

表 C.1 马铃薯金线虫和马铃薯白线虫的主要区别及测计值范围 单位为微米

类别	2 龄幼虫				雌虫口针	胞囊			
	口针	体长	尾长	口针基球		阴门盆直径	脊数 ^{a)}	肛阴距 ^{b)}	格氏比值
马铃薯金线虫	21~23 (22)	425~505 (468)	40~50 (43.9)	前表面圆, 向后倾斜	21~25 (22.9)	8~20 (<19)	12~31 (>14)	37~77 (>55)	1.3~9.5 (>3)
马铃薯白线虫	21~26 (>23)	440~525 (484)	46~52 (51.9)	前表面向 前突起	23~29 (26.7)	18~21 (>19)	8~20 (<14)	22~67 (<50)	1.2~3.5 (<3)
a) 肛阴脊数是指雌虫肛门和阴门之间的角质层的脊数。 b) 指肛门至阴门盆边缘的距离。									

