



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2117—2008

伪哥伦比亚根结线虫检疫鉴定方法

Identification and quarantine of *Meloidogyne fallax*

2008-09-04 发布

2009-03-16 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

本标准的附录 A、附录 B、附录 C 和附录 D 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。

本标准负责起草单位：中华人民共和国云南出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：杜宇、丁元明、寸东义、梅华全、曹云华、段禄华、周剑、和捷、刘忠善。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

伪哥伦比亚根结线虫检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了伪哥伦比亚根结线虫的检疫鉴定方法。

本标准适用于进出境植物及植物产品、土壤等传带的伪哥伦比亚根结线虫。

2 符号

本标准使用的符号源于 De Man 公式,并作了少部分修改:

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;

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);

W ——最大卵宽;

St ——口针长度;

Sp ——交合刺长度;

h ——透明尾的长度;

T ——尾长;

BW ——最大体宽;

EP ——排泄孔至体最前端的距离;

VA ——阴门至肛门的距离;

VL ——阴门宽度。

3 原理

3.1 伪哥伦比亚根结线虫的学名为 *Meloidogyne fallax* Karssen,1996,异名为 *Meloidogyne chitwoodi* B-type Karssen,1995,英文名为 False columbia root-knot nematode;隶属于线虫门 Nematoda,侧尾腺纲 Secernentea,垫刃目 Tylenchida,胞囊科 Heteroderidae,根结线虫亚科 Meloidogyninae,根结线虫属 *Meloidogyne*。

3.2 伪哥伦比亚根结线虫属侵染寄主根部的固定内寄生线虫,2龄幼虫可在土壤中生存一段时间,是唯一可迁移的侵染期虫态,雌虫是固定在植物根部或块茎组织内的侵染期虫态。因此,伪哥伦比亚根结线虫可随着染虫植物组织和土壤传播扩散,其形态特征、地理分布、寄主范围、生物学特性、为害症状和传播途径等(参见附录 A)是检疫鉴定的依据。

4 仪器及用具

4.1 样品袋和标签。

4.2 贝尔曼漏斗分离器或浅盘、标准套筛(40目~500目)。

4.3 数字智能显微镜(含照相装置、电脑和测微数据分析系统软件)、体视显微镜。

4.4 恒温水浴锅。

4.5 凹面皿、培养皿、载玻片、盖玻片、三角瓶、试管。

4.6 酒精灯、线虫挑针。

4.7 控温电热平板、大容量离心机。

4.8 普通冰箱和低温冰箱($-4\text{ }^{\circ}\text{C}\sim-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}\sim-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下)。

5 试剂和材料

5.1 指甲油、石蜡。

5.2 线虫保存液(配方参见附录B中的第B.1章)。

5.3 线虫脱水液(配方参见附录B中的第B.2章)。

5.4 无水乙醇(纯度96%以上)、70%的酒精、碳酸钙、福尔马林(4%甲醛溶液)、甘油、硫酸镁、高岭土、次氯酸钠溶液或漂白粉精片。

6 现场检疫

6.1 核查和直观检验

检查受检植物及其产品是否带有根、块茎,以及土壤或介质土,是否是伪哥伦比亚根结线虫的寄主等。根上是否有根结,块茎上是否有疙瘩状变异,如果是来自疫区的马铃薯,应去皮检查是否有腐烂或棕黑色变异等症状。

6.2 抽样和取样

如果有为害症状的,抽取有为害症状的受检物。如果无为害症状的,或土壤、介质土等,则随机抽样。

7 实验室检验

7.1 获取线虫的方法

7.1.1 直接法

在体视显微镜下,将带有症状的植物组织浸泡于盛有自来水的培养皿中,用小刀或挑针刺破根结或小疙瘩,检查球状虫体或卵块是否存在,并轻轻从组织上剥离附着的雌虫虫体。将所获取的雌虫和卵块用吸管转移至0.9%的氯化钠水溶液中,将幼虫和雄虫移至蒸馏水中,待用。

7.1.2 分离法

从未见症状的植物根或块茎、土壤和介质土分离2龄幼虫或雄虫,可采用贝尔曼漏斗法或浅盘法。

7.2 标本制作

线虫鉴定前,对雌虫虫体需进行会阴花纹的切片处理,2龄幼虫、雄虫和会阴花纹的切片需制作临时玻片或永久玻片(参见附录C)。在显微镜下,对线虫进行形态鉴定、测计和描述。

7.3 形态鉴定

7.3.1 测量值

7.3.1.1 雌虫($n=30$)

$L=404\text{ }\mu\text{m}\sim720\text{ }\mu\text{m}$; $BW=256\text{ }\mu\text{m}\sim464\text{ }\mu\text{m}$; $EP=12.6\text{ }\mu\text{m}\sim32.9\text{ }\mu\text{m}$; $VA=12.6\text{ }\mu\text{m}\sim19.0\text{ }\mu\text{m}$; $VL=20.2\text{ }\mu\text{m}\sim28.4\text{ }\mu\text{m}$; $St=13.9\text{ }\mu\text{m}\sim15.2\text{ }\mu\text{m}$ 。

7.3.1.2 雄虫($n=30$)

$L=736\text{ }\mu\text{m}\sim1\,520\text{ }\mu\text{m}$; $a=21.2\sim53.5$; $c=82.7\sim202$; $St=18.9\text{ }\mu\text{m}\sim20.9\text{ }\mu\text{m}$; $Sp=22.1\text{ }\mu\text{m}\sim29.7\text{ }\mu\text{m}$ 。

7.3.1.3 2龄幼虫($n=30$)

$L=381\text{ }\mu\text{m}\sim435\text{ }\mu\text{m}$; $BW=13.3\text{ }\mu\text{m}\sim16.4\text{ }\mu\text{m}$; $T=46.1\text{ }\mu\text{m}\sim55.6\text{ }\mu\text{m}$; $h=12.2\text{ }\mu\text{m}\sim15.8\text{ }\mu\text{m}$; $St=10.1\text{ }\mu\text{m}\sim11.4\text{ }\mu\text{m}$ 。

7.3.1.4 卵($n=30$)

$L=89.7\text{ }\mu\text{m}\sim104\text{ }\mu\text{m}$; $W=34.1\text{ }\mu\text{m}\sim44.2\text{ }\mu\text{m}$ 。

7.3.2 特征描述

7.3.2.1 雌虫

虫体珍珠白色,球形至梨形,具环纹,微向后突出的颈区明显与体中线成一定的角度,有时可达 90° ,体具有微突出的尾端。唇区高,具1至2个环纹。头帽明显,形态多样;唇盘微微隆起,头架骨化弱,前庭延伸明显。口针锥体部背弯,杆部圆柱形,基部球大,圆形至横向椭圆形,微向后倾斜。排泄孔位于头端至中食道球中间位置。食道腔两侧分布有1或2个大泡和多个小泡。食道腺的形状和大小变化多样。会阴花纹呈卵圆形或椭圆形,有时呈多边形,背弓低至中等高,具粗纹。尾端不明显,无刻点。侧尾腺孔小,不易看见。阴门周围无环纹。在光学显微镜下,未见侧线;在电子显微镜下,可见不明显的凹痕,延伸到尾端,凹痕中无纹。腹面环纹呈卵圆形至角状,纹路较粗(参见D.1.1)。

7.3.2.2 雄虫

体线形,前体部渐变细,尾钝圆。体环明显。侧区侧线4条,外侧两条呈不规则的网状。唇区微突出,具1条后唇区头环,通常被侧线分割。唇盘圆形、隆起或与中唇融合。头架骨化中等,前庭延伸明显。口针锥体部直,杆部圆柱形。基部球大而圆、突出。中食道球中等大小,卵圆形,瓣门发达。后食道腺长度在个体间变异较大,从腹面覆盖肠。半月体长 $2\mu\text{m}$ 或 $3\mu\text{m}$,在排泄孔前2个~4个体环处,精巢长,单个前伸,前端直或折叠。尾短而弯曲。交合刺细,腹弯。交合刺韧带月牙形。侧尾腺孔位于泄殖腔的前区(参见D.1.2)。

7.3.2.3 2龄幼虫

体细长,前、后渐变细,尾较前体部更细。体环细而明显。侧区侧线4条,不呈网状。头部平截,唇区微突出,唇盘低,比头架窄。头架骨化弱,前庭延伸明显。口针细,中等长度,锥体部直,杆部圆柱形。基部球显著、圆而突出。中食道球卵圆形,瓣门发达,后食道腺长度在个体间变异较大,从腹面覆盖肠。半月体明显,与排泄孔平齐。尾渐变细,直到透明尾的起始处。透明尾端宽圆形,可见微弱缢缩的体环。侧尾腺孔小,难以观察,位于肛门之后(参见D.1.3)。

7.4 近似种的区别

伪哥伦比亚根结线虫的形态特征与哥伦比亚根结线虫相似,它们的区别表现为:

- 前者雌虫和雄虫的口针长于后者,前者雄虫的口针基部球大而突出,后者的小而不规则;
- 前者雄虫头部电镜扫描形态表现为较后者有更高的唇盘;
- 前者雌虫的会阴花纹的背弓较后者更高,环纹更粗;
- 前者2龄幼虫的平均体长、尾长、透明尾的长度均比后者的长,前者的排泄孔位与半月体在同一位置上,后者的半月体在排泄孔之前;
- 这2种根结线虫与北方根结线虫在亲缘关系上较近似,3种根结线虫的形态区别参见附录D.2。

8 结果判定

主要依据雌、雄成虫、2龄幼虫的综合形态特征进行鉴别判定,其寄主、来源、为害症状及传播途径等可作为辅助的依据,符合伪哥伦比亚根结线虫上述特征的,可确定为伪哥伦比亚根结线虫。

附录 A

(资料性附录)

伪哥伦比亚根结线虫的生物学特性和生态学特征

A.1 生物学特性

A.1.1 虫口动态

伪哥伦比亚根结线虫与哥伦比亚根结线虫(*Meloidogyne chitwoodi*)非常相似,由于有关前者的资料较少,因此,将哥伦比亚根结线虫的有关信息资料简述如下,以供参考。哥伦比亚根结线虫相对于其他根结线虫种类来说,可在相对较低的温度下开始侵染活动;在适宜环境下,3周~4周可完成1代的发育,其发育积温第1代和第2代分别是600~800和500~600摄氏度日时,其发育阈值是5℃;伪哥伦比亚根结线虫的生活史相对哥伦比亚根结线虫的生活史要短,在荷兰,前者1年可完成2代至3代的发育;2种线虫均以卵或幼虫越冬。

A.1.2 发育史

A.1.2.1 成虫

在根结线虫中,雄虫的存在对于繁殖的作用尚不清楚。雌虫行孤雌生殖,在哥伦比亚根结线虫和伪哥伦比亚根结线虫同时存在的种群中,两者的发育是独立完成的,不存在种间交配现象。雌虫在寄主上取食,并产卵于几丁质包被中,卵块突出于根(或茎)表皮下,或在组织中,例如:在马铃薯块茎内10 mm深处可发现卵块的存在。

A.1.2.2 卵

卵的孵化并不依赖于寄主根分泌物的刺激,而是对环境湿度作出迅速的反应。在干燥环境下卵不能孵化,但是可在土壤或干枯的根中存在一段时期。当湿度适宜时,即孵化。

A.1.2.3 幼虫

根结线虫幼虫虫态共4龄,1龄幼虫在卵中完成发育,脱皮后,在土壤湿度适宜时,2龄幼虫从卵中孵化出来,如果土壤太干燥,幼虫处于休眠状态。根结线虫容易随着水流传播扩散,可在水中存活3周。2龄幼虫是惟一具有侵染力的活动期虫态,侵染寄主植物的根部,可单个取食,也可群体取食。一旦发现适宜的寄主,通常在根冠上或附近取食,并建立固定的取食点,受侵染植物组织的韧皮部或薄壁组织细胞畸形发育成多核巨大细胞,在根尖上表现为圆形肿大(称为根结),幼虫继续发育成膨大的雌虫。一旦受侵染的细胞不能发育成巨大细胞,幼虫或者离开该侵入点,寻找新的侵入点,或者因饥饿而死亡。根结通常在幼虫成功侵入后的1 d~2 d内形成。幼虫在取食过程中虫体逐步膨大成年轻雌虫,并完成发育,根结也随之增大。

A.2 生态学特征

A.2.1 地理分布

欧洲:比利时、法国、德国、荷兰;非洲:南非;大洋洲:澳大利亚、新西兰。

A.2.2 寄主范围

主要寄主有马铃薯(*Solanum tuberosum*),三叶草(*Medicago sativa*),胡萝卜(*Daucus carota*),甜菜(*Beta vulgaris*),花生(*Arachis hypogaea*)和番茄(*Solanum lycopersicum*)(以上寄主是与哥伦比亚共同的寄主)。其他寄主包括:萱草属(*Hemerocallis* sp.),荷包牡丹(*Dicentra spectabilis*),报春花(*Oenothera erythrosapala*),钟蕙花(*Phacelia tenaceti folia*),朝鲜蓟(*Cynara scolymus*),莴苣(*Lactuca sativa*),鸦葱(*Scorzonera hispanica*),芦笋(*Asparagus officinalis*),菊牛蒡(*Scorzonera hispanica*),荞麦(*Eriogonum* sp.),玉米(*Zea mays*),大丽花(*Dahlia* spp.),白藜(*Chenopodium album*),白芥

(*Sinapis alba*)、月见草(*Oenothera biennis*)、大青萝卜(*Raphanus sativus*)、草莓(*Fragaria* sp.)、小麦(*Triticum* sp.)、*T. aestivum*、*T. durum*、黑麦草(*Lolium* sp.)、*Lolium perenne* spp.、*Multi florum*、谷类和杂草等。

A.2.3 为害症状

根结线虫的为害直接影响到植物根部的生长、植物产量和品质。受害寄主地上部分在受害较轻时通常无症状表现,但是受害较重时,表现为:矮化、失活或缺水状萎蔫。地下部分的典型症状为根结。通常,伪哥伦比亚根结线虫侵染寄主上的根结相对于其他根结线虫侵染引起的根结要小,而且,根结上不再长出次生根。在马铃薯上,通常在其表面形成小疙瘩。但是,在有些种类的马铃薯表面上没有明显的症状,皮下组织却腐烂或变成棕黑色(参见图 A.1)。

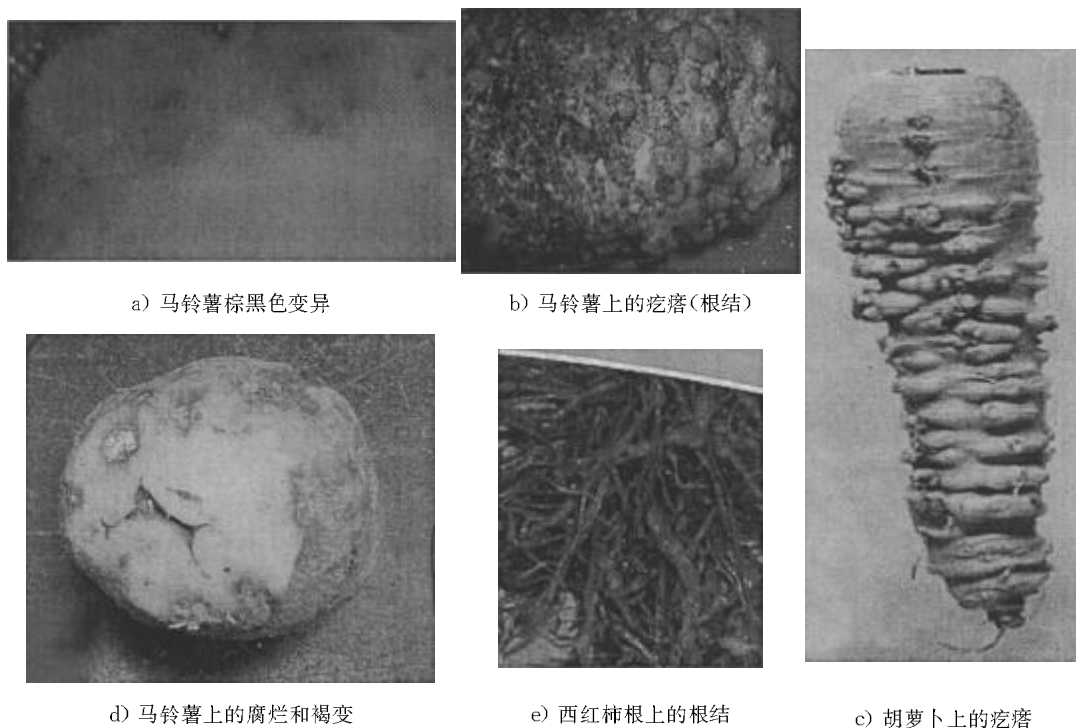


图 A.1 伪哥伦比亚根结线虫的为害症状

(引用自:<http://www.australasianplantpathologysociety.org.au/Regions/May07.pdf>)

A.2.4 传播途径和扩散方式

随着被感染的植株、土壤残渣和其他被感染的仓储繁殖材料如:鳞球茎、块茎等传播。

附 录 B
(资料性附录)
线虫保存液和脱水液

B.1 线虫保存液

TAF 液的配方:福尔马林(40%甲醛)	7 份
三乙醇胺	2 份
蒸馏水	91 份

B.2 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
(资料性附录)
线虫标本制作方法

C.1 根结线虫会阴花纹的切片方法和步骤(参见图 C.1)

C.1.1 选取带有成熟雌虫的植物组织,置于培养皿中,用手术刀和镊子撕开植物组织,将雌虫虫体从组织中释放出来。

C.1.2 切除雌虫的颈部,并轻轻地挤压虫体,去除虫体内的体液和内脏部分,剩下表皮。

C.1.3 切除会阴花纹周围多余的表皮层,呈四方形,将会阴花纹置于 1 滴 45% 的乳酸水溶液中,清除其他杂质部分。

C.1.4 制作玻片(参见 C.2.2.2)。

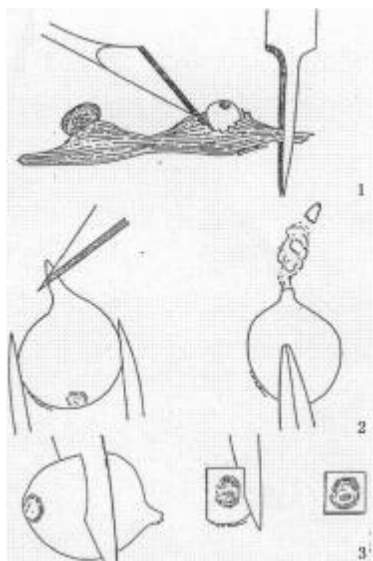


图 C.1 会阴花纹的制作方法

C.2 标本制作方法

C.2.1 临时玻片制作方法

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 °C 的水浴锅中处理 5 min 左右,进入 C.2.1.3 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水溶液中,盖上盖玻片,在酒精灯火焰外焰上来回轻轻移动(15 次左右),将线虫刚好杀死为止。

C.2.1.3 取少量线虫固定液(TAF,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:将活体线虫的幼虫和雄虫离心,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 TAF 液加热至 80 ℃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 μL 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、产地、制作日期;右标签上标注线虫学名、虫态和数量。

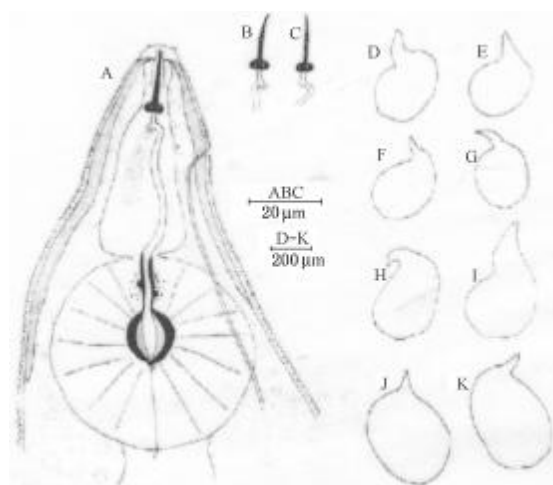
附录 D

(资料性附录)

伪哥伦比亚根结线虫的形态特征

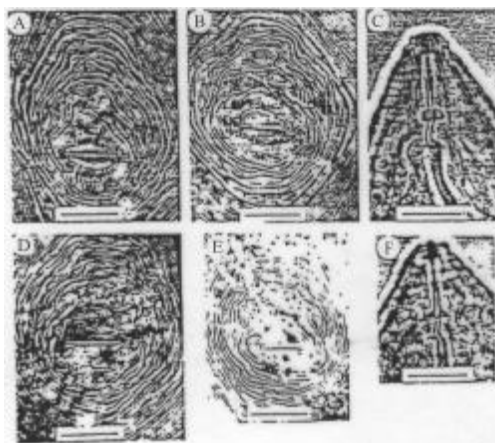
D.1 伪哥伦比亚根结线虫的形态特征图

D.1.1 伪哥伦比亚根结线虫雌虫的形态特征图(见图 D.1)。



A——雌虫前体部；
B、C——口针；
D~K——雌虫整体。

a)

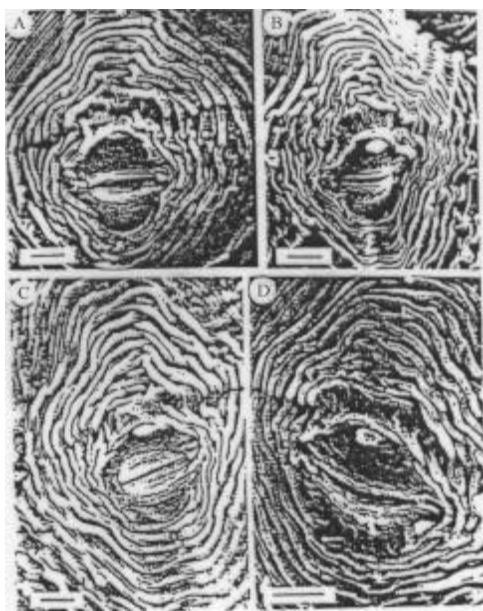


A、B、D、E——会阴花纹；
C、F——雌虫头部侧面观。

注：A~D为伪哥伦比亚根结线虫，E、F为哥伦比亚根结线虫；短横线=20 μm，显微摄影图片。

b)

图 D.1 伪哥伦比亚根结线虫(*Meloidogyne fallax*)雌虫的形态特征图(引用自 Karssen, 1996)

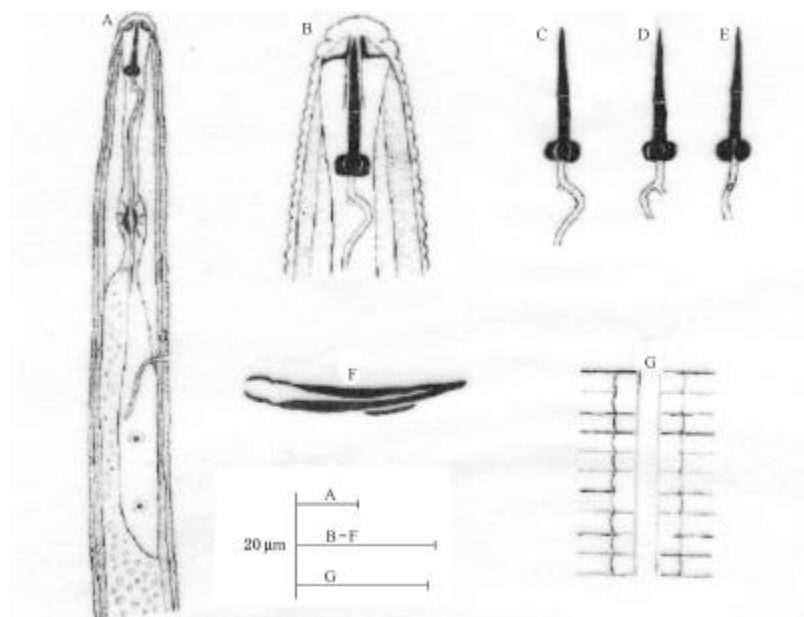


A~D——会阴花纹。
注：短横线=10 μm,电镜图片。

c)

图 D. 1 (续)

D. 1.2 伪哥伦比亚根结线虫雄虫的形态特征图(见图 D. 2)。



A,B——雄虫前体部；
C~E——口针(E 为背面观)；
F——交合刺和交合刺韧带；
G——侧区。

图 D. 2 伪哥伦比亚根结线虫(*Meloidogyne chitwoodi*)雄虫的形态特征图(引用自 Karssen, 1996)

D.1.3 伪哥伦比亚根结线虫 2 龄幼虫的形态特征图(见图 D.3)。

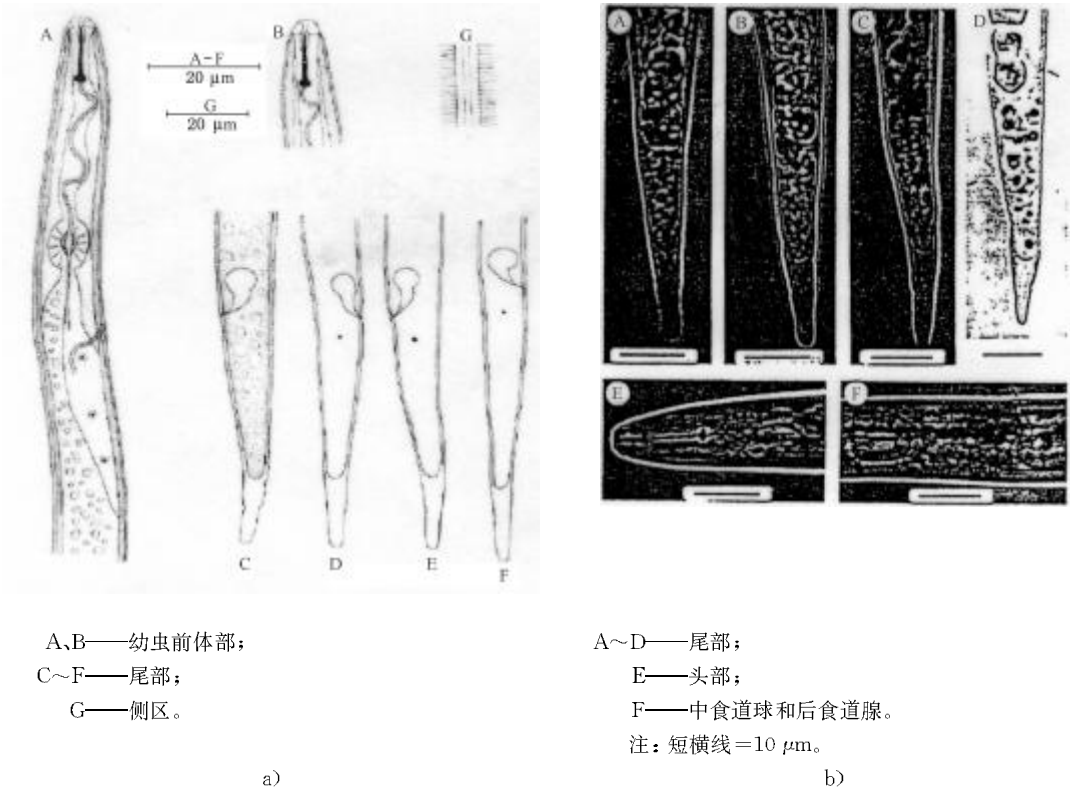


图 D.3 伪哥伦比亚根结线虫(*Meloidogyne fallax*)2 龄幼虫的形态特征图(引用自 Karssen, 1996)

D.2 伪哥伦比亚根结线虫、哥伦比亚根结线虫和北方根结线虫的形态特征比较见表 D.1。

表 D.1 伪哥伦比亚根结线虫、哥伦比亚根结线虫和北方根结线虫的形态特征区别

项 目	伪哥伦比亚根结线虫 <i>M. fallax</i> /μm	哥伦比亚根结线虫 <i>M. chitwoodi</i> /μm	北方根结线虫 <i>M. hapla</i> /μm
雌虫口针长度/μm	14~15	11~13	10~13
雄虫口针长度/μm	19~21	16~18	17~23
雄虫口针基部球形状	突出(宽 3.8~5.1)	圆形后倒,或不规则	不突出(宽 2.5×5.0)
2 龄幼虫的长度/μm	381~435	336~385	312~355
2 龄幼虫的尾长/μm	46~56	39~45	33~48
2 龄幼虫透明尾的长度/μm	12~16	8~13	12~19
会阴花纹	背弓高,线条粗,肛门与 尾端之间无刻点	背弓中到低,线条较细, 肛门与尾端之间无刻点	背弓圆,低,侧线圆滑, 肛门与尾端之间具小刻点