

DB35

福建省地方标准

DB35/T 1559—2016

柑橘半穿刺线虫检疫鉴定方法

Detection and identification of *Tylenchulus semipenetrans* Cobb.

地方标准信息服务平台

2016 - 04 - 06 发布

2016 - 07 - 06 实施

福建省质量技术监督局

发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》给出的规则编写。

本标准由中华人民共和国福建出入境检验检疫局提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国福建出入境检验检疫局、福建农业职业技术学院、福建农林大学。

本标准主要起草人：林星辉、林谷园、章淑玲、高小倩、李敏。

地方标准信息服务平台

柑橘半穿刺线虫检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了柑橘半穿刺线虫鉴定依据、仪器用具及药品、现场检疫和抽样、实验室检疫鉴定、形态鉴定特征、结果判定以及样本和样品保存与处理。

本标准适用于植物根系、土壤及生长介质中柑橘半穿刺线虫的检疫鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 15569 农业植物调运检疫规程

SN/T 2122-2008 进出境植物及植物产品检疫抽样

3 鉴定依据

3.1 柑橘半穿刺线虫基本信息

中文名：柑橘半穿刺线虫

学名：*Tylenchulus semipenetrans* Cobb, 1913

柑橘半穿刺线虫隶属于线虫门Nematoda (Rudolphi, 1808) Lankester, 1877、侧尾腺纲Secernentea von Linstow, 1905、垫刃目Tylenchida Thorne, 1949、环总科Criconematoidea Taylor, 1936、环科Criconematoidea (Taylor, 1936) Thorn, 1949、半穿刺亚科Tylenchulinae Skarbilovich, 1947、半穿刺线虫属*Tylenchulus* Cobb, 1913。

柑橘半穿刺线虫为营定居性寄生，以二龄幼虫作为侵染虫态，主要从寄主的营养根根尖侵入。其传播途径主要依靠土壤、生长介质土和带根苗木等寄主植物材料的调运。

柑橘半穿刺线虫的其他信息参见附录B。

3.2 方法原理

将现场检疫中采集的植物根系、土壤以及生长介质样本，送实验室经解剖检查、根系染色检查、贝

尔曼漏斗法分离获得线虫、制成临时或永久玻片，显微镜下对成熟的雌虫、雄虫、二龄幼虫主要鉴定特征仔细观察并测量数据，依据本标准描述的柑橘半穿刺线虫形态鉴定特征、测量数据和基本生物学信息，按系统分类方法，鉴定其生物学种类。

4 仪器、用具及药品

4.1 仪器及用具

体视显微镜、显微镜、倒置显微镜、电子天平、试管、漏斗、漏斗架、橡皮管、止水夹、分离浅盘、面巾纸、培养皿、剪刀、刀片、烧杯、载玻片、盖玻片、酒精灯、挑针、记号笔、加热板、打孔器等。

4.2 药品

40%甲醛、甘油、石蜡、氯酸钠、酸性品红、95%乙醇、三乙醇胺、蒸馏水等。

5 现场检验和抽样

5.1 现场检验

在田间或温室（大棚）种植地、销售场地对柑橘半穿刺线虫的寄主植物进行检查，查验植物体的生长状况（长势），叶片是否有黄化褪绿、变小变薄，枝梢变短，开花减少，座果稀疏，花、果、叶脱落，树势衰退等症状。采集上述可疑的植物根部和根际生长介质，送实验室作线虫分离。

5.2 抽样

当田间或温室（大棚）地栽的植物没有明显症状表现时，可采用对角线、棋盘式、平行跳跃式或拉链式的随机取样方法，确定取样点；当田间或温室（大棚）地栽的植物表现明显症状时，对发病点的病株根部及其周围的土壤进行取样。国内省际间调运的植株抽样数量应符合GB 15569的规定；进出境的植株抽样数量应符合SN/T 2122-2008的规定。

5.3 样品制作及保存

选定取样植株，在树冠滴水线以内，刨除表土、杂草，采集分布于10 cm~45 cm土层的营养根及根系土壤。每株5点取样混合为一个样本，每株至少采集500 g的根与根际土壤。将样本装入自封袋中，扎紧保持湿润，并附上标签，记录寄主、地点、症状特点及采集时间。在实验室对样本进行线虫分离与观

察。未及时分离的样本，应放置在4℃冰箱保存，保存时间不宜超过1个月。

6 实验室检疫鉴定

6.1 线虫分离

6.1.1 解剖检查

选择植株营养根，清除表面土壤，将根剪成2 cm~3 cm长的小段，置于装有适量水的培养皿中，在显微镜下用解剖针撕开可疑的营养根，挑取其中的线虫，按附录 E 的规定制成临时玻片，用显微镜检查与鉴定。

6.1.2 染色检查

采用次氯酸钠-酸性品红染色法对根组织柑橘半穿刺线虫染色检查。按附录F进行染色，冷却后以酸性甘油为浮载剂于显微镜下进行镜检。

6.1.3 贝尔曼漏斗法分离

根际土壤中的柑橘半穿刺线虫各虫态分离采用改良贝尔曼漏斗法。用一小段皮管接于漏斗颈上，用止水夹夹紧皮管底部，分离线虫时在分离筛底部垫一张纱布或滤纸。将栽培介质和土壤铺在纱布或滤纸上，将筛置于漏斗上，加水至没过样本表面。24 h~48 h后，用培养皿收集漏斗底部的水样，在显微镜下检查，挑取线虫，按附录 E 规定的方法制成临时玻片。检查鉴定。

6.2 显微镜观察、拍照和测量

对雌虫、雄虫、二龄幼虫的整体形态、唇区形态、食道腺形态、尾部形态及雄虫交合刺等鉴定特征进行显微观察、拍照。每张照片应加相应标尺。需测量记录的项目和参数主要有：

- a) 体长；
- b) 最大体宽；
- c) 口针长；
- d) 尾长；
- e) 体前端至食道与肠连接处的距离；
- f) 泄殖腔至精巢最前端距离；
- g) 排泄孔至头端的距离。

7 形态鉴定特征

7.1 形态特征

7.1.1 未成熟雌虫形态特征描述

虫体蠕虫形，有清晰的环纹；头部锥圆、光滑、连续，无唇盘，头架中等硬化；口针具有圆形、发达的基部球，背食道腺开口位于基部球后，约 4 μm ；食道前体部长柱形，中食道球发达、卵圆形、有发达的瓣，峡部细长柱形，后食道腺囊状，略向腹面偏移且与肠交界清楚，有贲门瓣；排泄孔显著，紧位于阴门前，其到头端距离是体长在 80.2（76.9~84.2）%，排泄管清楚；阴门位于虫体近后端部，阴门唇厚，单卵巢、前伸、未发育成熟，有几个卵母细胞，无后阴子宫囊；直肠和肛门退化，尾端钝圆。

未成熟雌虫形态特征参见附录 A

7.1.2 成熟雌虫形态特征描述

成熟雌虫：虫体颈部呈不规则的弯曲，口针纤细，角质膜薄；虫体后部呈不规则明显膨大、最宽处约 68 μm ~100 μm 角质膜厚、无环纹，阴门以后的虫体呈指状并朝腹面弯曲，长为 36（32~43） μm ；排泄孔和阴门位于虫体后部，排泄孔位于阴门前 36（32~43） μm ，距头端的距离是体长的 82.5（79.4~85.0）%；卵巢盘卷，受精囊有精子，子宫内有单个的卵；无直肠和肛门。

成熟雌虫形态特征参见附录 A

7.1.3 雄虫形态特征描述

虫体显蠕虫形，细小，热杀死后虫体前部直，尾部略弯，侧区不明显；头部光滑、锥圆，骨质化；口针和食道退化，口针基部球小，中食道球弱、纺锥形，后食道腺溢缩；排泄孔位于虫体中后部；单精巢、前伸，无交合伞，交合刺较细、弓状、长度为 14 μm ~18 μm ，引带长 3 μm ~4 μm ，尾长圆锥形、端圆。

雄虫形态特征参见附录 A

7.1.4 二龄幼虫形态特征描述

虫体直或弯，侧区不清楚，刻线 2 条；头部、口针和食道特征似未成熟雌虫，背食道腺开口位于口针基本球后，食道腺略覆盖肠；排泄孔位于体中后部；无直肠和肛门，尾长圆锥形、端尖到圆。

二龄幼虫的形态特征图见附录 A。

7.2 测计数据

柑橘半穿刺线虫测计数据（参考数值）见附录 C

8 结果判定

以雌成虫、雄成虫、二龄幼虫为主要观测对象，将观察、测量获得的各鉴定特征作为检疫鉴定的依据，形态特征符合本标准第 8 章形态鉴定特征和附录 C 虫体测计数据应判定为柑橘半穿刺线虫。其附录 B 柑橘半穿刺线虫的相关资料、附录 D 半穿刺线虫属种类鉴定检索表等信息可供参考。

9 标本和样品保存与处理

9.1 保存方法

9.1.1 标本保存

将分离鉴定为柑橘半穿刺线虫按附录 E 的规定进行灭活、固定并制成永久玻片保存。标签上应注明样品编号、寄主、产地、制作人和制作时间。

9.1.2 寄主样品保存

对已鉴定出带有柑橘半穿刺线虫的植物材料，应登记、保存，并做好标识，标明样品基本情况，如：样品编号、截获人、截获日期、寄主名称、运输工具名称、产地等。

9.2 保存时间

含有柑橘半穿刺线虫的样品，保存至少 6 个月备用。

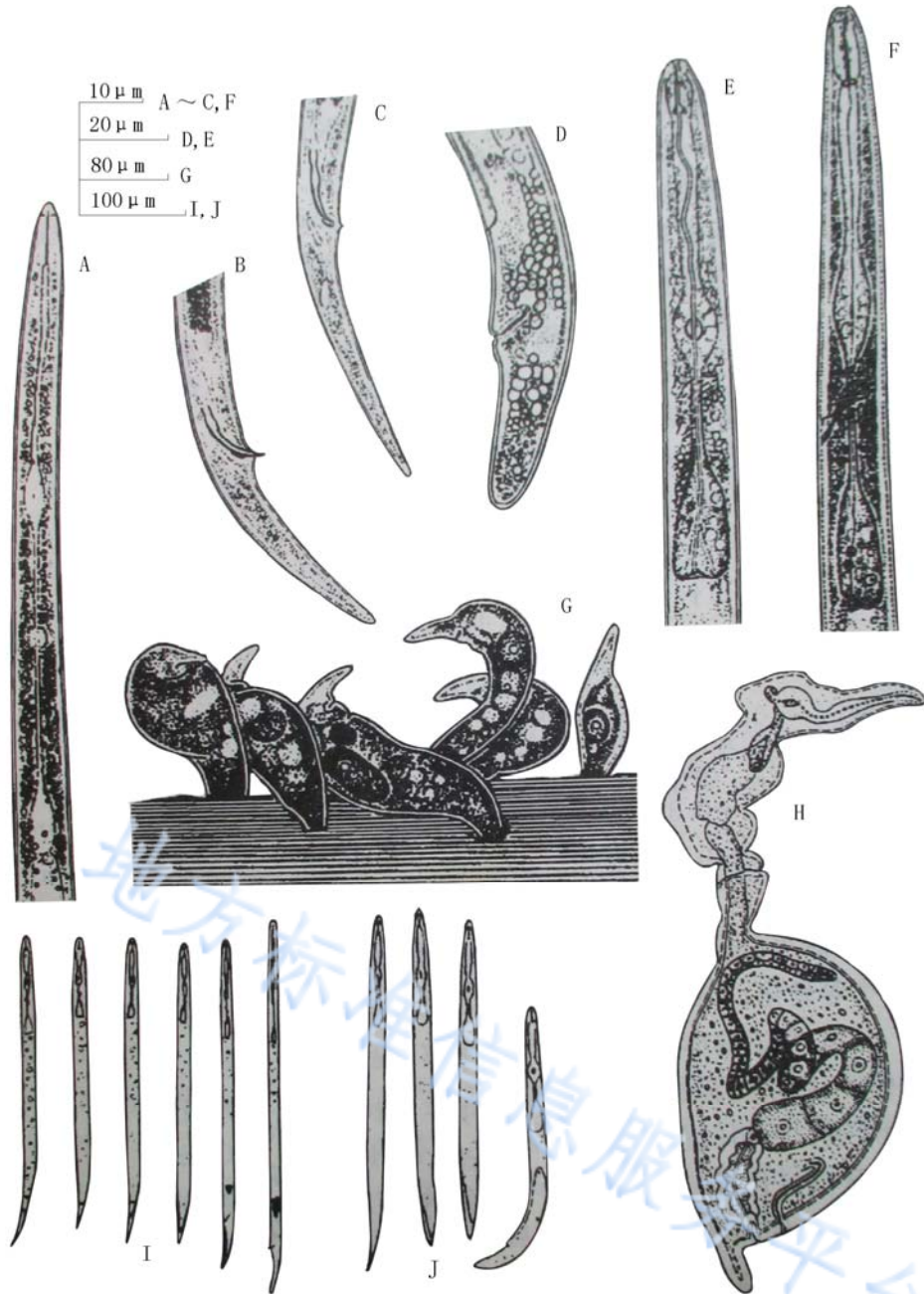
9.3 处理

保存期满后，含有柑橘半穿刺线虫的样品应作灭活处理。

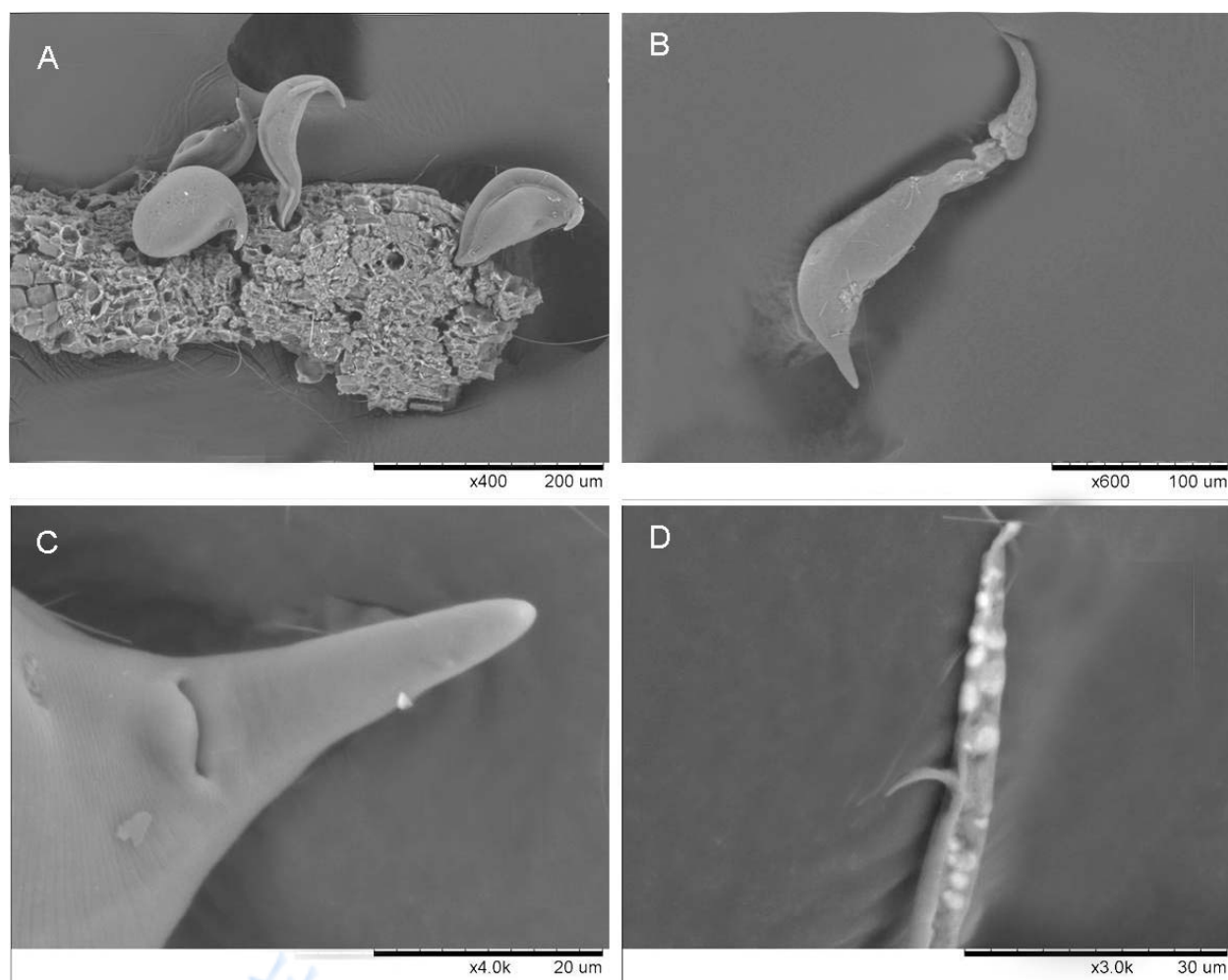
地方标准信息服务平台

附录 A
(资料性附录)

柑橘半穿刺线虫形态特征图



A.雄虫体前部；B,C.雄虫尾部；D,E.未成熟雌虫体后部和前部；F.2龄幼虫体前部
G.在柑橘根部的雌虫；H.成熟雌虫；I.雄虫发育各阶段虫态；J.雌虫发育各阶段虫态
图 A.1 柑橘半穿刺线虫主要形态特征图 (A~G,I,J 仿 Siddiqi,1974;H 仿 Luc et al.,1990)



A. 寄生根部组织的雌虫； B. 成熟雌虫； C.雌虫尾部； D. 雄虫尾部；
图 A.2 柑橘半穿刺线虫主要形态扫描电镜照片

地方标准信息服务平台

附录 B
(资料性附录)
柑橘半穿刺线虫相关资料

B.1 柑橘半穿刺线虫的主要寄主

柑橘半穿刺线虫(*Tylenchulus semipenetrans* Cobb.)最早于1912年在美国加利福尼亚州的黄化柑橘植株根部发现,目前在全世界柑橘产区广泛分布。该线虫是一种寄生专化性比较强的线虫,其主要寄主为柑橘属及其杂种,如柠檬、葡萄柚、金桔、四季桔、柚、柑、橙、黄皮等。此外为害较为严重的植物还有葡萄、柿、油橄榄。其他寄主还有枇杷、草莓、梨、桃、龙眼、荔枝、芒果、苹果、板栗、九里香、日本鹿蹄、杉木。

柑橘半穿刺线虫不同种群存在不同的寄主选择,存在致病力分化,根据对柑橘(*Citrus spp.*)、枳(*Poncirus trifoliata*)、油橄榄(*Olea europaea*)上的侵染与繁殖能力差异,全世界柑橘半穿刺线虫目前分为3个生理小种,分别为柑橘小种(citrus biotype)、枳小种(*Poncirus biotype*)、地中海小种(mediterranean biotype),柑橘小种在枳上繁殖很差,但在柑橘、枳橙、油橄榄、葡萄和柿上繁殖很好;枳小种能在大多数柑橘、枳和葡萄上繁殖,但不能在油橄榄上繁殖;地中海小种除了不能在油橄榄上繁殖外,其他与柑橘小种相似。福建省及我国柑橘半穿刺线虫生理小种尚不明确。

B.2 柑橘半穿刺线虫的生物学特征

柑橘穿刺线虫为营定居性寄生,其生活史受寄主、土壤质地、气候等条件影响。该线虫在24℃~26℃条件下,42d~56d可完成一次生活史。其生活史包括卵,幼虫、成虫。其一龄幼虫在卵内孵化,孵化出来的幼虫即为第二龄幼虫,并以二龄幼虫为侵染虫态,侵染寄主营养根,在7d~10d中完成三次脱皮发育成雌成虫,雌虫后端露在根外;成熟雌虫进行孤雌生殖,产卵75个~100个,将卵产于由雌虫后部排泄孔分泌的胶质混合物中。

柑橘半穿刺线虫种群的发展与树势、温度、土壤等因素有密切关系。雌成虫集中分布于5cm~30cm的须根上,二龄幼虫则多分布于0cm~45cm土层中,最深可达90cm。虫体密度会随着季节变化而波动。在一年季节中,该线虫种群密度及雌虫产卵高峰期在春季和秋季,与这两个季节柑橘营养根萌发高峰密切相关。最适宜繁殖的土壤温度在28℃~31℃,土壤pH为5.6~7.6时有利线虫的繁殖,并适应各种土壤

类型，在干燥、通气情况下种群繁殖好。该线虫远距离传播主要通过带土苗木传播的。近距离传播主要通过农具、土壤搬移、水流、人畜活动等传播。

地方标准信息服务平台

附录 C
(资料性附录)
柑橘半穿刺线虫测计数据资料

| 测计项目 | 测计值 (Van Gundy, 1958) | | | | |
|---|-----------------------|---------------------|------------------|---------------------|---------------------|
| | 未成熟雌虫 | 成熟雌虫 | 雄虫 | 二龄雌幼虫 | 二龄雄幼虫 |
| L (mm) | 0.29 (0.25~0.36) | 0.375 (0.349~0.406) | 0.37 (0.33~0.41) | 0.323 (0.295~0.364) | 0.307 (0.284~0.344) |
| a | 17.5 (15~20) | 4.5 (3.75~5.07) | 33.9 (29~39) | — | — |
| b | 2.52 (2.15~3.00) | 2.97 (2.80~3.12) | 3.57 (3.28~4.23) | — | — |
| c | — | — | 7.89~10.1 | — | — |
| T | — | — | ≈36 | — | — |
| St (μm) | 13.5 (12~15) | 11 (10~12) | 11 (10~12) | 13 (12~14) | 12 (11~13) |
| EP%L | 80.2 (76.9~84.2) | 82.5 (79.4~85.0) | 53.1~58.4 | — | — |
| 注：L—体长； a—体长/最大体宽； b—体长/体前端至食道与肠连接处的距离； c—体长/尾长； St—口针长； T—泄殖腔至精巢最前端距离×100/体长； EP%L—排泄孔至头端的距离×100/体长。 | | | | | |

附录 D
(资料性附录)

半穿刺线虫属 *Tylenchulus* 种类鉴定检索表 (Inserra et al., 1988)

1. 2 龄幼虫和雌成虫有明显的直肠和肛门, 成熟雌成虫虫体后部膨大部不小体长的 60%.....2
- 2 龄幼虫和雌成虫无明显的直肠和肛门, 成熟雌成虫虫体后部膨大部不超过体长的 58%.....3
2. 2 龄幼虫尾端呈叉形.....*T.furcus*
- 2 龄幼虫尾渐变细或呈窄圆锥形, 不分叉.....*T.graminis*
3. 成熟雌成虫阴门后体部呈锥形, 该锥形基部宽; 雄虫的口针基部球宽 $\geq 1.6 \mu\text{m}$, 食道基球宽 $8.1 \geq \mu\text{m}$, 尾圆柱形、末端钝圆.....*T.palustris*
- 成熟雌成虫阴门后体部呈指状、端圆; 雄虫的口针基部球宽 $\leq 1.2 \mu\text{m}$, 食道基球宽 $\leq 8.0 \mu\text{m}$ 尾渐变细.....*T.semipenetrans*

地方标准信息服务平台

附录 E
(规范性附录)
柑橘半穿刺线虫玻片标准制作方法

E.1 线虫的杀死

杀死少量线虫，可在解剖镜下进行，用线虫挑针挑取若干线虫，放至凹玻片上的水滴中央，手持凹玻片在酒精灯火焰上来回移动 5 s~6 s，至线虫被杀死；杀死大量线虫，可将线虫悬浮液移入试管中，并加入与悬浮液等量的沸水。

E.2 线虫的固定

E.2.1 TAF 固定液：40%甲醛 7 mL，三乙醇胺 2 mL，蒸馏水 91 mL，三者混配。

E.2.2 双倍浓度的 TAF 固定液：40%甲醛 7 mL，三乙醇胺 2 mL，蒸馏水 44.5 mL，三者混配。

E.2.3 用挑针直接将杀死后的线虫移至 TAF 固定液（E.2.1）中固定；或直接在线虫悬浮液中加入等量的双倍浓度的 TAF 固定液（E.2.2）

E.3 临时玻片标本的制作

取适量 TAF 固定液（E.2.1）作为浮载剂，滴于载玻片上；用挑针将固定好的数条线虫移入浮载剂中，使其完全沉入；取 3 根长 3 mm~5 mm、直径与线虫体宽相近的玻璃纤维丝，均匀置于浮载剂边缘，加盖玻片，用滤纸吸去溢出的浮载剂；用中性树脂或指甲油封片，干固后再加封一次。

E.4 永久玻片标本的制作

E.4.1 脱水

采用快速脱水法（Seinhorst, 1959）。

脱水剂 I：95%酒精 20 mL，甘油 1 mL，蒸馏水 79 mL。

脱水剂 II：95%酒精 95 mL，甘油 5 mL。

脱水步骤：经过固定的线虫标本转移到含 0.5 mL 脱水剂 I 的小表面皿内，含线虫的小表面皿放入有饱和酒精气体的密闭干燥器内搁板上（95%的容积占干燥器 1/10）。干燥器放入恒温箱中保持 40 ℃，12 h 或 12 h 以上，这时线虫体内水分大部分被酒精和少量甘油取代。经规定时间后，将小表面皿从干燥器中移出，加满脱水剂 II，放入部分盖住的培养皿内于温箱中保持 40 ℃，直到酒精完全蒸发为止，这一过程至少需要 3 h。线虫体内水分完全被纯甘油取代后制片。

E.4.2 制片

取直径 1.5 cm 的打孔器在酒精灯火焰上加热后，插入蜡盘中蘸取少量石蜡，并迅速轻按于载玻片中央；待冷却并形成蜡圈后，在蜡圈内滴一小滴甘油（用量以盖上盖玻片后不外溢为宜）作为浮载剂，挑入已脱水的数条线虫，使其整齐排列并完全沉入浮载剂中，将 3 根与线虫体宽相近（约 3 mm~5 mm 长）的玻璃纤维丝均匀置于浮载剂边缘，加盖玻片，移至 65 °C~70 °C 的加热板上融化蜡，熔后自然冷却，指甲油封片，指甲油干后再封一次；两边加贴标签，左标签写上样品号、寄主、截获口岸、产地、制作日期，右标签写上线虫种名、线虫虫态及其数量。

地方标准信息服务平台

附 录 F
(规范性附录)

柑橘营养根次氯酸钠-酸性品红染色法

- F.1 将柑橘营养根放入小三角瓶中，倒入 5.5%次氯酸钠溶液，直到浸没样品为止，处理 15 min (漂白)。
- F.2 将次氯酸钠去除，用清水冲洗病组织后加入蒸馏水浸没样品 5 min。
- F.3 将蒸馏水去除，再加入约 30 mL 蒸馏水，并加 1 mL 酸性品红，瓶口用保鲜膜封好，用解剖针扎 5 至 6 个小孔，用酒精灯加热 3 min，放置自然冷却。
- F.4 将品红去除，用清水冲洗病组织数次，加入 20 mL~30 mL 酸性甘油 (纯甘油:5 mol/L 盐酸=500:1)，放入沸水中加热 7 min~8 min。

地方标准信息服务平台

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国进出境动植物检疫法.北京:农业出版社.1992.
- [2] 国家质量监督检验检疫总局.检验检疫工作手册植物检验检疫分册.2003.
- [3] 蔡秋锦.杉木半穿刺线虫病的研究[J].林业科学,1990,26(6):506-514.
- [4] 蔡社锦.杉木半穿刺线虫寄主及混交林敬效应研究[J].福建林学院学报,1998,18(1):8-11
- [5] 蔡秋锦.杉木半穿刺线虫病的发现与研究[J].福建林学院学报. 1990.10(2):89-95
- [6] 邓大林.柑桔半穿刺线虫生物学特性观察[J].西南农业学报,1993,(A00):79-82.
- [7] 胡起宇译, 经济线虫学, 韦伯斯特(Webster; J. M.) [M]. 农业出版社, 1988, 143-162
- [8] 刘国坤,杨再福,叶明珍等.柑橘慢衰病诊断及其病原鉴定[J].福建农林大学学报: 自然科学,2004,33(4):431-433.
- [9] 刘国坤,陈娟,肖顺等.寄生柑橘和杉木的柑橘半穿刺线虫种内群体变异[J].中国农业科学,2011,44(9):1830-1836.
- [10] 张绍升.植物线虫病害诊断与治理[M].福州:福建科学技术出版社, 1999.71-89.
- [11] 谢辉.植物线虫分类学(第二版)[M]. 高等教育出版社.106 -110.
- [12] 刘维志.植物线虫学研究技术[M].辽宁科学技术出版社, 1995.
- [13] C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes[M].London:C.A.B International Institute of Parasitology,1977.Set3 No 34.
- [14] Duncan L W & Cohn E. Nematode parasites of citrus[M]. Plant parasite nematodes in subtropical and tropical agriculture(Luc M , Sikora R A & Bridge(eds). CAB International. 1990,321-343
- [15] Inserra R N., Vovlas N, O'Bannon J H, and Esser R P, *Tylenchulus graminis* n. sp. and *T. palustris* n. sp. (Tylenchulidae), from Native Flora of Florida, with Notes on *T. semipenetrans* and *T.furcus*[J]. Nematol. 1988; 20(2): 266-287.
- [16] Siddiqi M. R. *Tylenchulus semipenetrans*, C.I.H. descriptions of plant-parasitic nematodes[M]. London:CAB International Institute of Parasitology. 1974, set3, No.34.
- [17] Van Gundy, S D. The life history of the citrus nematode. *Tylenchulus semipenetrans* Cobb[J]. Nematologica .1958.3: 283-294.
- [18] Verdejo-Lucas S & McKenry M V. Management of the citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans*[J]. Journal of Nematology. 2004.36(4): 424-432

福建省地方标准
柑橘半穿刺线虫检疫鉴定方法
DB35/T 1559—2016

*

2016年9月第一版 2016年9月第一次印刷