**1  主题内容及应检范围**

1.1  本办法规定了松材线虫Bursaphelenchus xylophilus (Steiner et Buhrer) Nickle的检疫检验及检疫处理操作办法。

1.2  本办法适用于林业植物检疫机构对松科植物中松属Pinus spp.、冷杉属Abies spp.、云杉属Picea spp.、雪松属Cedru spp.、落叶松属Larix spp.植物的树木、枝条、伐桩、木材（含原木、锯材、切片）及其制品（含包装材料、电缆盘等）的检疫检验和检疫处理。

**2  产地检疫**

2.1  踏查

2.1.1  在由松科植物构成的，或以松树为主的生态林、用材林，特别是有松树栽植的风景名胜地，疫情发生区及毗邻地区，曾调入染疫木材（含原木、锯材、切片）及其制品的城镇、工矿企业、交通干线附近、无线通讯台站、广播电视信号台站、电力线路、仓库、码头、车站、驻军营房、贮木场及加工场（点）、集贸市场，以自然界线、道路为单位进行线路（目测）调查。

2.1.2  调查松树的针叶是否有黄绿色、黄褐色、红褐色萎蔫，是否整株枯死或未全部变红仍有部分呈绿色；枯死树针叶在小枝上当年不脱落（如黑松、马尾松等）或脱落（如思茅松）；树脂分泌急剧减少，甚至停止；材质干枯，有蓝变现象。

2.1.3  调查松树是否有天牛危害的羽化孔、侵入孔、蛀道等痕迹。

2.1.4  需进一步确定疫情的，应取样进行分离鉴定。

2.1.4.1  在树干的下部（胸高处）、中部和上部（主侧枝交界处），用斧子、柴刀、木锯或木钻（钻头直径1 ~ 1.5 cm）在木质部采集样品。

2.1.4.2  取样时在取样部位剥净树皮和外围木质部，直接砍取100 ~ 200 g木片；或剥净树皮和外围木质部，用手摇钻从木质部至髓心钻取100 ~ 200 g木屑；或在取样部位分别截取2 cm厚的圆盘。样品标签须填写清楚（包括样品号、采集地点、树种、树龄、取样时间、采集人），与样品一起放入塑料袋内，用橡皮筋扎紧，带回室内检验。

2.2  贮木场及加工场（点）、集贸市场调查

2.2.1  木材（含原木、锯材、切片）及其制品采取楞垛表面或分层方式设点抽样调查。

2.2.2  调查数量每批次按总量（m3、垛）的5% ~ 10%抽取，疫情严重的应全部进行抽样调查。

2.3  疫情监测

2.3.1  定期普查

2.3.1.1  对辖区内由松科植物构成的，或以松树为主的生态林、用材林以及松木贮木场及加工场（点），或人为活动频繁的公路两旁松林，应进行定期普查。

2.3.1.2  每年3 ~ 5月和8 ~ 10月，应对上述地区的松林进行全面普查。

2.3.2  人工监测

2.3.2.1  在疫情发生区及毗邻地区，在当年秋季刚刚枯死的病树树干下部（胸高处）、中部和上部（主侧枝交界处），剥净树皮，选取靠近蛀道、蛹室部位，用手摇钻钻至树心，取松木木屑（100 ~ 200 g）进行分离鉴定。

2.3.2.2  对已确定发现松材线虫的林分，应对周围松林进行全面调查，以确定疫情发生范围。

2.3.3  打孔流胶法监测

2.3.3.1  对于松材线虫发生区或其边缘的松树，若外观正常，针叶无明显变色可以用打孔流胶法做初步诊断，要确定是否感染了松材线虫还需进行取样分离诊断法进行确认。

2.3.3.2  使用锤子和打孔器或铳子（直径10 ~ 15 mm）在松树主干上打一可见木质部的圆孔，位置和方向不限。

2.3.3.3  在春、夏、秋季，打孔后24 h即可进行观察；在冬季，打孔后48 ~ 72 h进行观察。

2.3.3.4  观察打孔后松树流脂情况，按下述标准确定流胶级别。

一级流胶：树脂从孔口流下，渗出量很多；

二级流胶：树脂从孔口流下，渗出量较多；

三级流胶：树脂沉积在孔口下缘；

四级流胶：树脂渗出到圆孔壁上，呈粒状；

五级流胶：孔壁上无树脂流出。

2.3.3.5  对于三至五级流胶的松树，按2.1.4进行取样分离鉴定。

2.3.4  天牛引诱剂监测

2.3.4.1  于松褐天牛羽化期，在通风良好便于观测的山顶或林道旁设置诱捕器。诱捕器距地面高度不得低于1.5 m，诱捕器间距50 ~ 100 m。

2.3.4.2  羽化高峰期1d检查1次，其余时间每隔3 ~ 5 d检查1次。将诱捕到的松褐天牛活体进行分离鉴定。

**3  调运检疫**

3.1  抽样比例

3.1.1  木材（含原木、锯材）及其制品按货物总量的1% ~ 20%抽样，样本数低于10个全检。

3.1.2  树木、枝条、伐桩按货物总量的1% ~ 5%抽样，样本数低于50个全检。

3.2  抽样方法

3.2.1  木材（含原木、锯材）及其制品、枝条、伐桩，采取表层或分层方式设点抽样检查。

3.2.2  抽取有密度明显减轻和（或）有蓝变特征或有天牛危害症状的树木、枝条、木材（含原木、锯材）及其制品。

3.3  现场检验

3.3.1  检查木材（含原木、锯材）及其制品的截面是否有松脂痕迹、密度明显减轻、木质部有蓝变现象及有天牛危害的蛀道、蛹室。

3.3.2  检查枝条、伐桩及其制品是否有天牛蛀道、蛹室、补充营养取食痕迹。

3.3.3  对有蓝变、天牛蛀道、蛹室的样本，每个样本取2份样品带回室内做进一步鉴定。取样品时注意选取靠近蛀道、蛹室的部位，所取样品不得带有树皮。

**4  检疫检验**

4.1  对产地检疫、调运检疫所取的样品（含诱集到的天牛成虫）经制备后，采用贝尔曼漏斗法或浅盘法进行分离、镜检。具体方法见附录1。

4.2  根据以下特征，鉴定是否属伞滑刃属：虫体通常细长，唇区高，缢缩明显。口针有小的基部膨大。排泄孔位置通常在中食道球后方。阴门有时突出，后阴子宫囊长。雌虫尾端钝圆或尖。交合刺大而狭，基部通常有明显的喙。雄虫尾部向腹面弯曲，尾端尖，有一短的尾端交合伞。在尾部通常有2对乳突，1对在肛门前，1对在肛门后。无导刺带（引带）。分属检索表见附录2。

4.3  对照松材线虫形态特征，鉴定是否为松材线虫Bursaphelenchus xylophilus (Steiner et Buhrer) Nickle。松材线虫与近似种拟松材线虫B. mucronatus在形态上的主要区别见附录3。

**5  除害处理**

5.1  发现携带松材线虫的木材（含原木、锯材）及其制品、枝条、伐桩等，可采取切片处理、热处理、熏蒸处理、销毁处理。

5.2  将病木切成厚度不超过1 cm的碎片后用作纤维板、纸浆等工业原料。或将病死木用旋切机切成厚度为3 mm以下薄片，经80 ℃烘房热烘6 h，制成刨花板、胶合板。

5.3  熏蒸处理方法见附录4。

5.4  将病树去皮锯板后置于热处理房，加热至木材中心温度达到65 ℃以上并保持2 ~ 3 h（或利用微波处理），取出检查松材线虫死亡率，若死亡率达不到100%，继续进行处理直至松材线虫全部死亡为止。

5.5  如不具备上述条件，就地烧毁。

**附件1**

**线虫分离方法**

分离线虫可采用贝尔曼漏斗法和浅盘法。

贝尔曼漏斗法  将玻璃漏斗（直径为10 ~ 15 cm）置漏斗架上，下面接一段（10 cm左右）橡皮管，橡皮管上装一个止水夹。将劈成“火柴杆”状大小的分离材料，取湿重10 g，用两层纱布包好，放入漏斗中，然后放入清水，清水以浸没分离材料为度。经过4 ~ 24 h，由于趋水性和本身的重量，线虫离开植物组织，并在水中游动，最后沉降到漏斗底部的橡皮管中。打开止水夹，取底部约5 ~ 15 ml的水样，其中含有样本中大部分活动的线虫。在解剖镜下检查，如果线虫的数量少，可以离心（1500 r/min，2 ~ 3 min）沉降后再检查。

浅盘法  浅盘分离装置主要由两只不锈钢浅盘组成，其中口径略小的一只底部为粗网筛，放在另一只浅盘上面。将两层纱布打湿铺于筛盘上，把样品劈碎（或钻取的木屑）置于筛盘纱布上，慢慢注入清水，使水浸没样品。分离结束后，移去筛盘，把大盘内的分离液集中于小烧杯内。小烧杯内的线虫分离液可通过自然沉降或离心机（1500 r/min，2 ~ 3 min）浓缩至适宜的量，以便镜检。

改进型线虫分离器法  改进型线虫分离器分离线虫，兼顾漏斗法和浅盘法各自的优点。分离器由一只网筛、乳胶管、止水夹和一次压模成型的主体构成。在筛网上放两层纱布，再将木屑或劈好的小木条放在上面。从网筛外缘加水至样品水平的位置。在20℃~30 ℃下放置12 h后，打开止水夹，用离心管接取约5mL 分离液；静止自然沉淀30min或1500r/min，离心2min，吸去离心管内上清液，获得浓度较高的线虫悬浮液供镜检。

常规镜检  分别将各标号盛有线虫分离液的培养皿置于解剖镜下观察，先确认有无线虫。对有线虫的样品进行活体镜检，观察它的一般形态结构。然后选择几条成熟、特征易观察的线虫，用针或吸管移至载玻片上的水滴中。将此载玻片在酒精灯火焰上方往返几次（5 ~ 6 s）或放置于已盛满高温热水、打开盖子的保温瓶口上，蒸30 ~ 60 s至虫体死亡，加盖玻片后在显微镜下观察。根据形态特征予以初步鉴别，以确定是否需作进一步的鉴定。

快速镜检  （1）用显微镜直接观察线虫浓缩分离液。分离液经一定时间后，当漏斗下端和乳胶管内出现透明度降低甚至混浊现象、表明线虫的游离量较多时，即可用培养皿接取混浊状分离液3 ~ 5滴，直接置于解剖镜下观察；如有线虫，就将盛有分离液滴的培养皿，放置于已盛满高温热水、打开盖子的保温瓶口上，进行30 ~ 60 s的热杀处理，擦干培养皿底部凝结的小水珠，直接放置于显微镜下（先用低倍物镜，找到目标线虫，再转换到高倍物镜）观察形态特征予以鉴别。（2）用显微镜直接观察线虫分离液。用培养皿盛放贝尔曼漏斗放出的线虫悬液适量，直接移放在光学显微镜下观察，用低倍镜调整焦距，找到线虫，一手移动培养皿，不断变换所观察线虫的位置，一手不断调整焦距。在10倍的接物镜下松材线虫的基本形态鉴定特征如头部、中食道球、阴门、交合刺、尾形等都可以清晰地观察到。发现分离液中存有松材线虫时，挑取线虫并制成临时玻片标本进一步观察。

形态鉴定  依据雌雄成虫的形态，主要是雌成虫的形态进行鉴定。但分离到的线虫没有成虫或极少时，需进行培养，以获得大量雌雄成虫供鉴定。

常见的松材线虫培养方法是利用真菌培养线虫。

100 ml烧瓶中加入约30 g浸泡2 ~ 4 d的玉米粒，棉塞封口；或按5:1的比例将玉米粒与来自健康黑松或马尾松的木屑混合后装入100 ml烧瓶中，棉塞封口。经121 ℃，10.34×104Pa条件下灭菌40 min，冷却后接种灰葡萄孢Botrytis cinerea或球壳孢Sphaeropsis sapinea等线虫喜食真菌，待真菌长好后，接种松材线虫，并置于25 ℃下培养。

松材线虫表面消毒  松材线虫分离纯化后，为了避免受到污染，在培养之前，需对线虫体表进行消毒。消毒方法和消毒液根据工作需要进行选择，一般松材线虫的表面消毒液为0.002 %放线菌酮和0.1 %硫酸链霉素的抗菌素混合液。

（1）供试样品松材线虫个体较多时，在离心管内进行消毒。具体做法是：通过离心浓缩线虫至离心管底部，用无菌滴管将底部线虫液约2 ml移入另一支无菌离心管中。加入2 ml双倍浓度的消毒液，轻轻振荡混匀，处理5 min后，在1500 r/min下离心5 min，吸去上清液。按上述步骤重复消毒1次，用无菌水换洗2次。最后用无菌滴管将线虫吸入真菌培养基上。

（2）供试样品松材线虫个体较少时，在载玻片上进行消毒。具体做法是：将载玻片在70%酒精中浸泡1 min，经过火焰灭菌，冷却后置于双目解剖镜镜台上。将消毒液或无菌水分开滴在载玻片表面的3个点上，每点1滴，其中2个点为消毒液。挑线虫至消毒液中，约1 min后再依次转入另一消毒液滴和无菌水中。最后用无菌细头滴管将经过消毒的线虫转至真菌培养基上。

样木保温保湿培养  将发现幼虫的样品切成长约10 cm，横截面长、宽各1 cm的小木棍多根，使其一端浸在水中至1/3处，放入25 ℃保温保湿培养箱中培养线虫，2 ~ 3 d后能够获得所需的成虫。同样将样本适量喷水后，外套牛皮纸并扎紧，放入培养箱中3 ~ 5 d后也能获得松材线虫成虫。

**松材线虫临时玻片标本的制作**

在载玻片上滴一滴水，用挑针或吸管将线虫移入水滴中。或用吸管吸一滴线虫悬液在载玻片上。然后在酒精灯上将线虫杀死。用解剖镜检查线虫是否死亡，并用挑针将线虫轻轻按到水滴底部，以免盖盖玻片时线虫会随水流到盖玻片边缘，影响观察。在盖盖玻片时要从侧面慢慢放下，尽量不产生气泡。如果有条件的话，最好在制片前在载玻片上用指甲油画一小的圆圈，画得很薄。一方面它可起支撑作用，避免盖玻片压迫线虫虫体，另外也可阻止线虫随水流到盖玻片边缘。如果线虫已经杀死并固定，就可直接用固定液做浮载剂制片。制片后立即观察，可不用封片。如果观察时间较长，可用封片剂将盖玻片边缘封固。蜡、指甲油、中性树胶、阿拉伯树胶等均可用来封片。

这种玻片制作简单，不需要特殊的仪器。而且线虫未经透明，各种器官均非常清晰，易于辨认。

**附件2**

**滑刃目线虫分属检索表**1.侧区通常至少有6条侧线，神经环环绕食道腺；雄虫交合刺较细，有明显的基柄，似垫刃类交合刺，引带显著、细长……………………………………………………………………2

侧区侧线不超过4条，神经环环绕肠前端；雄虫交合刺粗，玫瑰刺形或不规则形，通常无引带或引带短、不明显…………………………………………………………………………3

2.食道腺叶状从背面长覆盖肠；雌虫尾圆筒形或近圆筒形，端宽圆；雄虫交合伞显著，伸对尾端………………………………………………………………………真滑刃属 Aphelenchus

食道腺长瓶形或梨形，不覆盖肠；雌虫尾圆锥形，端圆并且有1个尾尖突；雄虫无交合伞……………………………………………………………………拟滑刃属 Paraphelenchus

3.雌虫有阴门盖；雄虫尾端包有交合伞…………………………………………………………4

雌虫通常无阴门盖，若有则尾端有4个端缘呈穗状的梗节；雄虫无交合伞…………………………………………………………………………………………………5

4.虫体细（a值约为100）；雌虫尾呈长圆筒形、端圆…………细杆滑刃属Rhadinaphelenchus

虫体粗（a值小于60）；雌虫尾短，呈圆筒形到圆锥形，端圆到锐尖，有时有1个尾尖突……………………………………………………………………伞滑刃属 Bursaphelenchus

5.雌雄虫尾端有4个端缘呈穗状的梗节，雌虫有和无阴门盖……咽滑刃属Laimaphelenchus

雌雄虫尾端出上述特征，雌虫无阴门盖………………………………………………………6

6.头部高，显著缢缩成球状，前端呈盘状；口针长35μm，无基部球………猪头属 Anomyctus

头部低，微缢缩到显著缢缩，但不呈球形，前端也不呈盘状；口针短于20μm……………7

7.角质层环粗（宽1.7μm），头部显著缢缩；口针粗，长约17μm，基部球大、圆；食道前体部的前部宽，后部呈细柱形，整个前体部呈倒瓶形………………………大针属 Megadorus

角质层环细，头部微缢缩；口针细，长度通常为10-12μm（一般不超过20μm），有小的基部球或基部膨大；食道前体部柱形……………………………………滑刃属Aphelenchoides

**附件3**

**松材线虫与近似种拟松材线虫B. mucronatus在形态上的主要区别**

    拟松材线虫雌虫尾部和幼虫尾部都呈圆锥形，尾端指状，有明显的尾尖突。雌成虫尾尖突长度为3.18 ~ 5.72μm，幼虫为2.54 ~ 3.81μm。松材线虫雌虫亚圆锥状，尾端宽圆，无尾尖突或尾端指状，如有尾尖突，幼虫为0.63 ~ 1.25μm，成虫为0.63 ~ 1.88μm（图1-4）。拟松材线虫交合伞平截形，交合伞末端边缘有2个小的突起，松材线虫交合伞卵圆形。



**图1-2  松材线虫形态特征**

A 雌成虫    B雄成虫  C 雄虫尾端   D 交合伞    E 交合刺   F雌虫前部（口针、中部食道球神经环、肠道）

G雌虫阴门  H ~ J 雌虫尾端变化



**图1-3  拟松材线虫形态特征**

1.雌成虫   2.雄成虫   3.雌虫前部   4、5 雌虫尾部   F.雄虫尾端   7.交合伞

8.三龄幼虫尾节   9.四龄耐久型幼虫尾部   10.四龄耐久型幼虫前端



**图1-4  松材线虫和拟松材线虫雌成虫的尾端形状**

**附件4**

**熏蒸处理**

目前应用的熏蒸剂有溴甲烷（含量不低于98%）、硫酰氟（含量不低于95%）和磷化铝（含量不低于56%）。

**熏蒸用具**

熏蒸帐幕材料：厚度0.15 mm以上的聚乙烯帐幕或厚度0.19 mm以上的聚氯乙烯帐幕或双面挂胶苫布。

施药管（溴甲烷和硫酰氟）：采用不易腐蚀的高压氧气管。

盛药盘或盛药罐（磷化铝）。

磅秤：称量范围0 ~ 150 kg，感量0.1 kg。

测温装置：水银温度计（测温范围0 ~ 100 ℃，精度0.5 ℃）或数字测温计（测温范围-10 ~ 100 ℃，精度0.1 ℃）或远红外测温计（测温范围-20 ~ 300 ℃，精度0.1 ℃）。

浓度检测器材：溴甲烷、硫酰氟气体浓度检测采用热导式熏蒸气体浓度检测仪，灵敏度1g/m3。磷化氢气体浓度检测管，1 ~ 50 ml/ m3和100 ~ 2 000 ml/ m3；溴甲烷气体浓度检测管，5 ~ 50 ml/ m3和10 ~ 100 g/ m3。上述检测设备也可用于渗漏检测。

防漏检测仪器：使用卤化物渗透检测器、测溴灯等各种类型的检测器进行检漏。使用卤化物渗漏检测器时先用火柴从燃烧的开口处将其点燃，然后再向左慢慢转动调节阀，待反应板或锥形体发热变红时，把火焰调至能够维持这种颜色的最小范围。将探测管末端开口处放在被检处，然后观察火焰的颜色是否发生变化，如火焰颜色变绿，则说明有溴甲烷外漏，外漏程度越严重，火焰的绿色越深，以致变为蓝绿色、蓝色。

**溴甲烷帐幕熏蒸方法**

熏蒸场地：就地选择一块地势平坦、土壤紧密、阳光较充足、通风良好、交通方便、远离居民区的地块作为熏蒸场地。

熏蒸布置：将须熏蒸处理的松木或其加工制品等在选择好的熏蒸场地上堆垛。成一个长立方形。一般垛高为1.5 ~ 2.0 m。

挖沟：在堆垛四周挖一圈宽20 cm以上，深30 cm以上的沟，挖出的土堆放在沟外侧，用作覆盖帐幕后回填。

覆盖帐幕：将准备好的帐幕覆盖在堆垛上，帐幕四周边埋在沟内，用沟外侧的土回填，适当加水，踩紧踏实。

投药量和熏蒸时间：投药量和熏蒸时间的选择参照下表，其中温度为熏蒸当日最高气温；投药量指帐幕内容积每立方米的投药量。当日最高气温低于4 ℃时则停止熏蒸。

在熏蒸密闭空间内的温度低于15 ℃或投药量大于3 kg时，溴甲烷熏蒸应采用药剂汽化装置投药，汽化器出口气体温度不低于20 ℃。

**表1-1　投药量和熏蒸时间**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 温度（℃） | 投药量（g/m3） | 熏蒸时间（h） |
| 4 ~ 10 | 104 ~ 125 | 48 |
|   | 69 ~ 83 | 72 |
| 10 ~ 20 | 63 ~ 83 | 48 |
|   | 42 ~ 56 | 72 |
| 20以上 | 42 ~ 63 | 48 |
|   | 28 ~ 42 | 72 |

投药：投药前先检查帐幕有否破损，确认封闭严密后开始投药。操作人员站在上风处，缓缓打开置于磅秤上的钢瓶阀门，使溴甲烷通过投药管进入堆垛，直至磅秤上显示已放完所需的总投药量时即关闭阀门，取出投药管，封好进药口，保持密闭至所选择的熏蒸时间。

散毒：熏蒸完毕，先将帐幕下风方向一边打开，0.5 h后再揭幕充分散毒。

效果检查：效果检查需在揭幕1 h后进行。在堆垛上部抽取3段长约50 cm的样段，将3个样段分别劈开检查松褐天牛幼虫死活。松褐天牛的死活可参照表1-2鉴定。

  **表1-2　松褐天牛存活与死亡特征**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 检查项目 | 活 | 死 |
| 体表色泽 | 有光泽 | 无光泽 |
| 虫体软硬程度 | 有弹性 | 无弹性 |
| 对外界刺激反应 | 动 | 不  动 |
| 头部位置 | 向腹面弯曲 | 前  伸 |
| 虫体截面形状 | 圆  形 | 扁圆形 |

另外，在使用硫酰氟熏蒸时，常用量为30 g/m3，温度17 ~ 30 ℃，密闭48 h，松褐天牛成虫和幼虫死亡率100 %。溴甲烷和硫酰氟在熏蒸时加入适量CO2，有显著增效作用，加入量为熏蒸剂的10% ~ 40 %。