



中华人民共和国国家标准

GB/T 23476—2009

松材线虫病检疫技术规程

Technical regulation on quarantine for the pine wilt disease

2009-04-01 发布

2009-09-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准的附录 F 为规范性附录,附录 A、附录 B、附录 C、附录 D、附录 E、附录 G 为资料性附录。

本标准由国家林业局提出。

本标准由全国植物检疫标准化技术委员会归口。

本标准负责起草单位:国家林业局森林病虫害防治总站、江苏省森防站。

本标准主要起草人:熊惠龙、李海燕、徐克勤、赵宇翔。

松材线虫病检疫技术规程

1 范围

本标准规定了松材线虫病的检疫技术规程。

本标准适用于松材线虫寄主植物及其加工制品等检疫工作。

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。

GB/T 23478—2009 松材线虫普查监测技术规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

松材线虫病 *pine wilt disease caused by pine wood nematode*

由松材线虫寄生在松树体内引起松树迅速死亡的一种毁灭性林木病害。又称松树萎蔫病、松材线虫萎蔫病、松树枯萎病。

3.2

松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhner) Nickle

一种无脊椎动物,属于线虫门(Nematoda),侧尾腺纲(Secernentea),滑刃目(Aphelenchida),滑刃总科(Aphelenchoidoidea)、滑刃科(Aphelenchoididae)、伞滑刃亚科(Bursaphelenchinae)、伞滑刃属(*Bursaphelenchus*)。

3.3

检疫 *quarantine*

为了保护一个国家或一个地区人民的身体健康和农林牧业的生产安全,根据国家和地方政府颁布的检疫法规,由法定的专门机构,对那些主要通过人为活动而远距离传播的流行性疫病所采取的检疫检验和严格的检疫处理措施。

3.4

疫木 *the diseased wood*

感染松材线虫病的寄主植物及其制品。主要为松属(*Pinus*)植物及其制品,包括松木包装材料、电缆盘等。

3.5

检疫检验 *quarantine inspection*

对检疫法规所规定应施检疫的森林植物及其产品,通过一定的技术手段检查、检验是否带有有害生物。

3.6

媒介昆虫 *intermediary insect*

将松材线虫由罹病树中携带而出,通过补充营养或产卵时造成的创口又将其传染到其他寄主松树上的昆虫,是松材线虫病发生不可缺少的条件,是松材线虫病侵染循环的组成部分之一。松材线虫病媒

介昆虫必须具备以下三个条件：一是生活史与松材线虫的生活史相吻合；二是具有一定的种群密度；三是能够携带一定数量的松材线虫。

3.7

松木及制品 pine wood and woodenware

松属原木、锯材和用于承载、包装、铺垫、支撑、加固货物的木质材料，如木板箱、木条箱、木托盘、木框、木桶、木轴、木楔、垫木、枕木、衬木等。经人工合成或经加热、加压等深度加工的包装木质材料，如胶合板、纤维板等除外。

3.8

松墨天牛 *Monochamus alternatus* Hope

属节肢动物门(Arthropoda)，昆虫纲(Hexapoda)，鞘翅目(Coleoptera)，天牛科(Cerambycidae)，墨天牛属(*Monochamus*)，是松材线虫病的主要媒介昆虫。又名松褐天牛、松天牛。

3.9

木材蓝变 wood blue-stain

由于蓝变菌(或称青变菌)的存在而导致木材变为蓝灰色。它是松材线虫病木取样的一个辅助而非必要依据。

3.10

分散型 3 龄幼虫(L_{III}) dispersal third-stage larvae

夏末初秋，松材线虫病枯死木中出现与增殖期 3 龄幼虫不同的另一类型 3 龄幼虫，从形态上表现出内含物显著增加，它可以抵抗不良环境条件如冬季寒冷和木材失水，被称为分散型 3 龄幼虫。

3.11

持久型 4 龄幼虫(L_{IV}) dauer larvae

由分散型 3 龄幼虫蜕变而来，除虫体角质膜较厚外，它没有口针，食道退化，头圆丘形，尾端明显指状，体表覆盖保护性的胶粘物。易于附着在媒介昆虫的体上，以利于媒介昆虫的携带和传播。

3.12

批 batch

应检验对象的抽样单位。“批”是指同一地点、同一日期、同一品名和同一运输工具运载的应检验物品。

3.13

抽样 sampling

为确定应检验对象是否感染松材线虫，根据检疫技术规程要求而抽取一定数量样本的过程。

4 应施检疫的植物及其产品

来自国内外疫情发生区的松属、雪松属、冷杉属、云杉属和落叶松属等植物的苗木、接穗、插条、盆景等生长繁殖材料；来自国内外疫情发生区的上述植物的木材、枝桠、根桩、木片以及它们的制品；来自非发生区违规调运或不具备合法手续的松木及制品等；带有松材线虫及其传播媒介昆虫活体的货物、包装材料、铺垫材料及运输工具。自然界感染松材线虫病的寄主植物和通过人工接种感染此病的植物名录见附录 A。

5 现场检疫

5.1 产地检疫

5.1.1 直观检验

产地检疫的直观检验主要通过现场踏查的方法进行。用目测方法查找有无死树或针叶褪色和黄化、枯萎变成红褐色并整齐地挂在松枝上，树脂分泌减少直至停止，近期死亡等典型症状的松树，选择抽

样对象。

5.1.2 抽样

5.1.2.1 抽样的对象

按照 GB/T 23478—2009 中 4.5.1.3 执行(参见附录 B)。

5.1.2.2 抽样时考虑的因素

按照 GB/T 23478—2009 中 4.5.1.4 执行(参见附录 B)。

5.1.2.3 抽样的数量

按照 GB/T 23478—2009 中 4.6.1 执行(参见附录 B)。

5.2 调运检疫

5.2.1 现场直观检验

5.2.1.1 直接观察和借助锯、斧等工具检查应施检疫的松木或其加工制品等是否干枯;重量是否明显减轻;木质部是否有蓝变;松脂味是否消失;有无媒介昆虫栖居的痕迹,如侵入孔、蛀道、蛹室等。

5.2.1.2 检查松树及其枝条是否有天牛危害、补充营养取食痕迹。

5.2.2 抽样

5.2.2.1 抽样比例

按照 GB/T 23478—2009 中 4.8.1 执行(参见附录 B)。

5.2.2.2 抽样方法

按照 GB/T 23478—2009 中 4.8.2 执行(参见附录 B)。

5.3 复检

按照 5.2 调运检疫执行。

6 取样方法

按照 GB/T 23478—2009 中 4.7 执行(参见附录 B)。

7 松材线虫的室内鉴定

7.1 松材线虫的分离

一般采取贝尔曼漏斗法、浅盘分离法、改进型线虫分离器分离(参见附录 C)。

7.2 松材线虫的镜检

7.2.1 当在解剖镜下观察培养皿中的线虫分离液,发现线虫时,挑出(挑取时可选用 500 μ L 移液枪挑取)做成临时水玻片(参见附录 D);或用尖头吸管吸取沉淀管底部分离液 1~3 滴,滴于载玻片上,在解剖镜下观察,发现有线虫时制成临时水玻片。

7.2.2 将临时水玻片置于显微镜下观察、测量。

7.3 松材线虫的培养

当只分离到幼虫或雌、雄成虫数量极少时,可以采用疫木保温保湿或真菌单异活体培养方法快速培养松材线虫(参见附录 D)。不具备松材线虫真菌培养基质制作的检疫单位可以委托有无菌培养条件的单位制作。真菌培养基质 4 $^{\circ}$ C 冰箱冷藏备用。

7.4 松材线虫的形态学鉴定

7.4.1 形态鉴定

根据松材线虫成虫的形态特征为鉴定依据对松材线虫进行鉴定。松材线虫成虫形态特征参见附录 E。松材线虫的繁殖型幼虫、分散型幼虫和持久型幼虫作为鉴定的辅助特征。

7.4.2 检验记录

有关检验情况和鉴定结果填入《松材线虫病检验记录表》(见附录 F)。

7.5 松材线虫的分子生物学鉴定

分子生物学鉴定不受松材线虫龄期的影响,无须培养即可对松材线虫幼虫进行鉴定。PCR 技术作为形态学鉴定的辅助手段,对于鉴定那些形态特征不够典型的松材线虫或拟松材线虫以及幼虫有很大的帮助。具体方法参见附录 G。

8 检疫结果

- 被检样品中未发现松材线虫的,作为签发“植物检疫证书”的依据。
- 被检样品中发现松材线虫的,作为签发“检疫处理通知单”的依据。

附录 A

(资料性附录)

松材线虫的寄主范围

A.1 自然发病的寄主植物

奄美岛松 *Pinus amamiana* Koidzumi、华山松 *P. armandii* Franch、台湾果松 *P. armandii* var. *mastersiana* (Hayata) Hayata、美国短针松 *P. banksiana* Lamb.、白皮松 *P. bungeana* Zucc. ex Endl.、加勒比松 *P. caribaea* Morelet、瑞士五针松 *P. cembra* Linn、沙松 *P. clausa* Aarg.、小干松 *P. contorta* Loud.、赤松 *P. densiflora* Sieb. et Zucc.、千头赤松 *P. densiflora* var. *umberacliflora*、短针松 *P. echinata* Mill.、湿地松 *P. elliotii* Engelm.、恩氏松 *P. engelmannii* Carr.、硬枝展松 *P. greggii* Engelm.、地中海松 *P. halepensis* Mill.、卡西亚松 *P. kesiya* Royle ex Gorden、华南五针松 *P. kwangtungensis* Chun ex Tsiang、光叶松 *P. leiophylla* Schkecht & Cham.、疏球松 *P. luchuensis* Mayr.、马尾松 *P. massoniana* Lamb.、米却肯松 *P. michoacana* Martinez、欧洲山松 *P. mugo* Turra.、粗糙松 *P. muricata* D. Don.、小干松变种 *P. murrayana* (Greville & JH Balfour) Critchfield、欧洲黑松 *P. nigra* Arnold.、卵果松 *P. oocarpa* Schiede.、日本五针松 *P. parviflora* Sieb. & Zucc.、长叶松 *P. palustris* Mill.、展叶松 *P. patula* Schlecht. et Cham.、海岸松 *P. pinaster* Ait.、西黄松 *P. ponderosa* Dougl. et Laws.、拟北美乔松 *P. pseudostrobus* Lindl.、辐射松 *P. radiata* D. Don.、美加红松 *P. resinosa* Ait.、刚松 *P. rigida* Mill.、野松 *P. rudis* Endl.、北美乔松 *P. strobus* Linn.、墨西哥白松 *P. strobus* var. *chiapensis* Martinez、欧洲赤松 *P. sylvestris* Linn.、火炬松 *P. taeda* Linn.、黄山松 *P. taiwanensis* Hayata.、黑松 *P. thunbergii* Parl.、黄松 *P. thunbergii* × *P. massoniana*、北美二针松 *P. virginiana* Mill.、胶枞 *Abies balsamea* (L.) Mill.、北非雪松 *Cedrus atlantica* Manetti.、雪松 *C. deodara* (Roxb.) Loud.、欧洲落叶松 *Larix decidua* Mill.、美洲落叶松 *L. laricina* K. Koch.、挪威云杉 *Picea abies* (L.) Karst.、加拿大云杉 *P. canadensis* (Mill) Britton, Sterns & Poggenb.、欧洲云杉 *P. excelsa* (Lam.) Link.、白云杉 *P. glauca* (Moench) Voss.、黑云杉 *P. mariana* B. S. P.、锐尖北美云杉 *P. pungens* Engelm.、红云杉 *P. rubens* Sarg.、花旗松 *Pseudotsuga menziesii* (Mirbel) Franco.

A.2 人工接种感病的植物

海南五针松 *Pinus fenzeliana* Hand.-Mzt.、柔松 *P. flexilis* James.、光松 *P. glabra* Walt.、乔松 *P. griffithii* McClelland.、约弗松 *P. jeffreyi* A. Murr.、红松 *P. koraiensis* Sieb. et Zucc.、华南五针松 *P. kwangtungensis* Chun et Tsiang.、糖松 *P. lambertiana* Dougl.、山白松 *P. monticola* Lamb.、台湾五针松 *P. morrisonicola* Hayata.、日本五须松 *P. pentaphylla* Mayr.、刺针松 *P. pungens* Lamb.、晚松 *P. serotina* Michx.、类球松 *P. strobiformis* Engelm.、章子松 *P. sylvestris* var. *mongolica* Litvin.、油松 *P. tabulaeformis* Carr.、云南松 *P. yunnanensis* Franch.、平泽银枞 *Abies amabilis* (Dougl.) Forb.、日本冷杉 *A. firma* Sieb. et Zucc.、巨冷杉 *A. grandis* Lindl.、日光冷杉 *A. homolepis* Sieb. et Zucc.、库叶冷杉 *A. sachalinensis* Mast.、日本落叶松 *Larix kaempferi* (Lamb.) Carr.、西方落叶松 *L. occidentalis* Nuttall.、恩格曼氏云杉 *Picea engelmannii* (Parry) Engelm.、北美云杉 *P. sitchensis* (Bong.) Carr.、西美山铁杉 *Tsuga mertensiana* (Bong.) Carr.、黄杉 *Pseudotsuga douglasii*.

附录 B

(资料性附录)

引用《松材线虫普查监测技术规程》的条款

B.1 松林抽样的对象(见 GB/T 23478—2009,4.5.1.3)

抽样对象为能够排除非疫病死亡因素(如人畜破坏、森林火灾、其他病虫害),并表现出松材线虫病典型外部症状的可疑松树。

B.2 松林抽样应考虑的因素(见 GB/T 23478—2009,4.5.1.4)

B.2.1 松材线虫病发病高峰期一般在 9~10 月,从表现出针叶变黄、树脂分泌减少甚至停止至死亡约 1 个月至 1 个半月。

B.2.2 在松林中一般是优势木先发病。

B.2.3 由于松材线虫具有潜伏侵染以及不同松树的抗性差异等原因,一些松树仅部分枝条表现感病外部症状。这种症状在混交林中表现尤其明显。

B.2.4 抽取样品要及时并重点抽取尚未完全枯死或刚枯死的优势木(针叶呈黄绿或黄褐色,尚未完全枯萎,树皮尚未脱落,材质尚未腐朽)。

B.2.5 死树的针叶在小枝上下垂倒挂,当年不脱落。

B.3 松林抽样数量(见 GB/T 23478—2009,4.6.1)

以林业小班为单位,表现典型症状的松树在 10 株以下全部取样;10 株以上先抽取 10 株,再选取其余数量的 1%~5%。

B.4 调运检疫的抽样比例(见 GB/T 23478—2009,4.8.1)

B.4.1 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。

B.4.2 松树、枝条、伐桩按货物的 1%~5%抽样,样本数低于 50 个全检。

B.5 调运检疫的抽样方法(见 GB/T 23478—2009,4.8.2)

B.5.1 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。

B.5.2 抽取密度明显减轻和(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。

B.6 取样方法(见 GB/T 23478—2009,4.7)

B.6.1 松林取样

B.6.1.1 一般情况下在树干下部(胸高处)、上部(主干与主侧枝交界处)、中部(上、下部之间)3 个部位取样。如仅部分枝条表现症状的,要在树干上部和死亡的枝条上取样。如外部表现症状明显的可在胸高处取样。在春季松褐天牛化蛹期,可在蛹室周围取样。

B.6.1.2 取样时在取样部位剥净树皮,直接砍取 100 g~200 g 木片;或剥净树皮,用手摇钻从木质部至髓心钻取 100 g~200 g 木屑;或在取样部位分别截取 2 cm 厚的圆盘。

B.6.1.3 所取的样品要及时贴上标签(记录样品号、采集地点、树种、树龄、取样时间和取样人等)。

B.6.2 松木及制品取样

B.6.2.1 选择截面无松脂痕迹、密度明显减轻和(或)木质部有蓝变现象及有天牛危害的蛀道、蛹室的

松木及制品进行取样。

B.6.2.2 原木取样时在取样部位剥净树皮,直接砍取 100 g~200 g 木片;或剥净树皮,用手摇钻从木质部至髓心钻取 100 g~200 g 木屑;或在取样部位分别截取 2 cm 厚的圆盘。

B.6.2.3 锯材和松木制品取样时直接砍取 100 g~200 g 木片;或用手摇钻从木质部取 100 g~200 g 木屑。

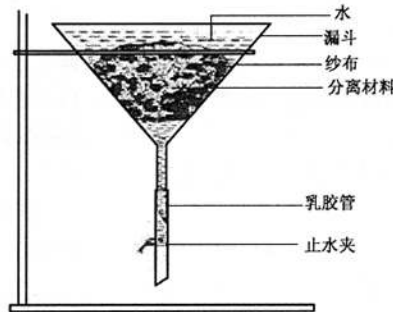
B.6.2.4 所取的样品要及时贴上标签(记录样品号、采集地点、材种、制品类型、取样时间和取样人等)。

附录 C
(资料性附录)
松材线虫的分离

C.1 贝尔曼漏斗法分离线虫

在直径 10 cm~15 cm 的漏斗末端接一段长约 10 cm 的乳胶管后置于漏斗架上,并在乳胶管上装一止水夹,然后在漏斗上铺大小适当的两层纱布;分离木屑时,两层纱布之间放 1 张纸巾。

将带回实验室的样木去皮后劈成长约 3 cm~4 cm,直径 2 mm~3 mm 的细条,约取 10 g(或木屑)置于漏斗中的纱布上,将纱布四角向中间盖上分离材料,然后向漏斗内注入清水至浸没,并挤捏。注入清水后要注意使水充满漏斗和下面的乳胶管,乳胶管内不得有气泡。见图 C.1。



C.1 贝尔曼漏斗法分离线虫装置图

分离时室温不低于 20 °C,先将分离用水的温度调至 20 °C~30 °C,具体水温可视分离时室温的高低而定,即室温较低时可将水温调得较高些,但不超过 30 °C。3 h~4 h 线虫游离出一定数量后即可镜检。一般需经 12 h 后镜检。轻轻打开止水夹,用直径 60 mm~70 mm 培养皿在乳胶管下接取分离液约 10 mL,于解剖镜下观察;或用 5 mL 离心沉淀管接取分离液 5 mL,自然沉淀 30 min 或 1 500 r/min 离心 2 min,收集线虫供镜检。

C.2 浅盘法

浅盘法分离装置包括两个盘子,可由铝合金、不锈钢、塑料等材料制成。上面盘子底部是筛网,比下面的盘子稍小、稍浅。分离线虫时,在筛网上放两层纱布,再将木屑或劈好的小木条放上面。下面的盘子加水,筛网盘放入水中,水要没过样品。在 20 °C~30 °C 条件下放置 12 h~24 h,将下面盘子的水收集到烧杯中,通过沉淀或离心收集线虫,供镜检。见图 C.2。

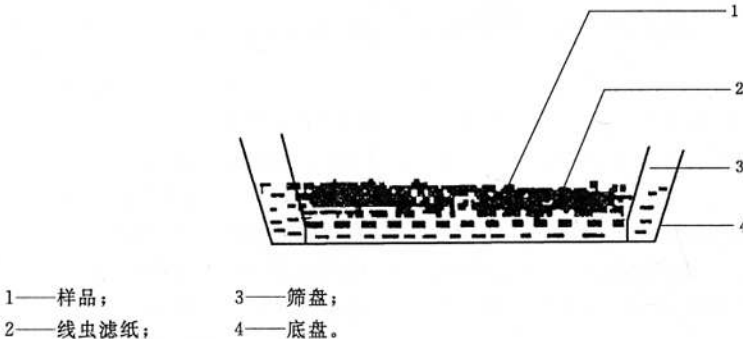


图 C.2 贝尔曼浅盘法分离线虫装置图

C.3 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(图 C.3)。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 5 mL 分离液;静止自然沉淀 30 min 或 1 500 r/min 离心 2 min,吸去离心管内上清液,获得浓度较高的线虫悬浮液供镜检。

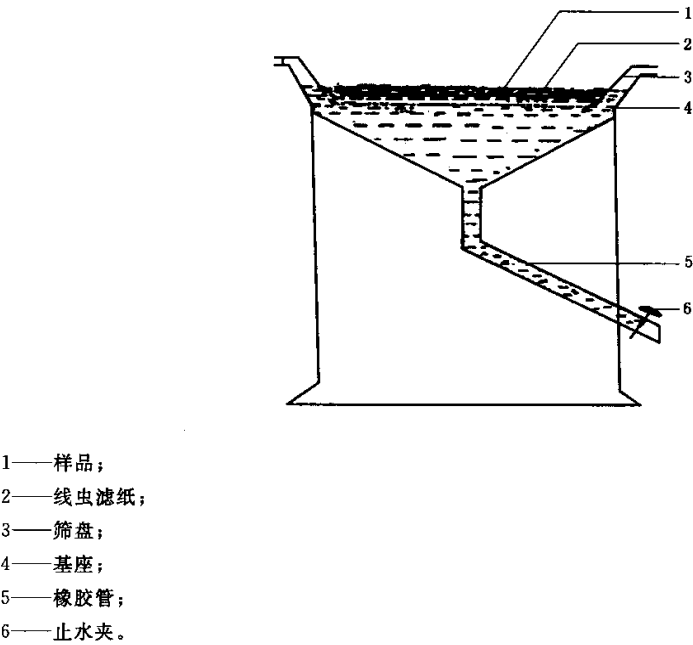


图 C.3 改进型漏斗分离松材线虫装置示意图

附录 D

(资料性附录)

松材线虫的快速培养和临时玻片的制作

D.1 疫木保温保湿培养

将样品锯成小段,置于烧杯中加少量清水,木段下端浸在水中,木段上端用湿纱布覆盖,在 30 ℃ 条件下保温保湿培养 3 d,倒取杯中水液,可获得较多雌雄成虫;或将样品木段适当浸湿,放于塑料袋里,扎紧袋口,置于 30 ℃ 培养箱中 3 d 取出重新分离,可获得较多雌雄成虫。或从干净的松木板材锯出一些木屑,装进盘尼西林瓶里,然后将幼虫移至木屑里,放在培养箱 30 ℃ 培养 3 d~5 d,将木屑中的线虫分离出来。

D.2 单异活体培养

制备马铃薯-葡萄糖-琼脂(PDA)培养基平板。用盘多毛孢(*Pestalotia* spp.)或镰刀孢(*Fusarium* spp.)或灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)培养线虫。无菌条件下将多毛孢或镰刀孢或灰葡萄孢接种在 PDA 平板上。多毛孢或镰刀孢 28 ℃ 恒温培养 4 d~5 d,待培养完成后可长期置 4 ℃ 冰箱冷藏备用;而灰葡萄孢 25 ℃ 恒温培养 4 d~5 d,菌丝长满平板备用。发现可疑幼虫时,取适量菌丝块放小培养皿中,恢复至室温接种线虫。多毛孢或镰刀孢在 30 ℃ 恒温条件下保湿培养线虫;接种 20 条幼虫,48 h 即可分离鉴定;线虫量少时可相应延长培养时间。而灰葡萄孢在 25 ℃ 恒温培养线虫,培养时间要加长 1 d~3 d。

D.3 临时水玻片的制作

D.3.1 在洁净的载玻片中央滴一水滴,水滴的量以加盖玻片后恰好充满盖玻片下的空间为好。

D.3.2 用细针挑取或用毛细滴管吸取线虫,置于载玻片的水滴中,并使之沉底。

D.3.3 将有线虫的载玻片在酒精灯的火焰上往返通过 5 s~6 s,杀死线虫。

D.3.4 用细针摆好水滴中的死线虫,然后用镊子夹盖玻片从一侧轻轻盖下。

D.4 半永久玻片的制作

将分离所得的线虫液,转移至离心管中,2 000 r/min 离心 3 min。吸去上部清水并保留底部 3 mL~4 mL 线虫液,置于 53 ℃ 热水中 15 min 杀死线虫,待冷却后,加入等体积的 TAF 液固定 48 h 以上。再用上述方法再离心,用 5 μ L 微量移液器吸取离心管底部线虫液,滴加进装有 2 mL 棉蓝-乳酚油的钟面皿中,置恒温烘箱中 45 ℃ 脱水 24 h。

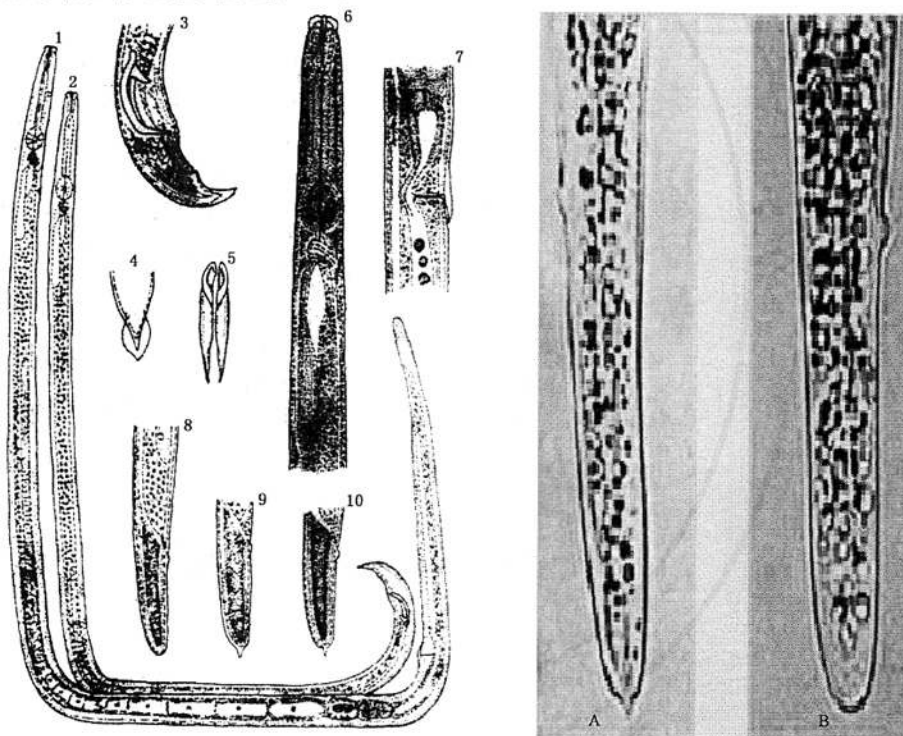
在载玻片上加上封片蜡圈,用挑针加一小滴甘油于蜡圈中心位置。解剖镜下挑取脱水后的目标线虫于甘油中,使其沉底并位于甘油滴中心位置。在封片蜡圈上放置盖玻片后,转移至控温电热平板上,保持 75 ℃ 使蜡完全融化,取下并自然冷却后用透明指甲油加封一次。在显微镜下鉴定并确认为松材线虫后贴上标签,注明松材线虫的虫龄、数量、寄主、寄主产地、截获口岸及鉴定人。

附录 E
(资料性附录)
松材线虫的形态特征

E.1 成虫特征

雌雄成虫均呈蠕虫形，虫体细长，约 1 mm。头部唇区高，缢缩明显，口针细长，基部略微增厚。中食道球卵圆形，占体宽的 2/3 以上，食道腺细长叶状，覆盖于肠背面。排泄孔的开口大致与食道和肠交接处平行，半月体在排泄孔后约 2/3 体宽处。雌虫尾部亚圆锥形，末端钝圆，少数有微小的尾尖突。卵巢前伸，卵呈单行排列，阴门开口于虫体的中后部 73% 处，上覆以宽的阴门盖。雄虫交合刺大，弓状，喙突显著，远端膨大如盘状。雄虫尾部似鸟爪，向腹面弯曲，尾端为小的卵形交合伞所包裹。

松材线虫成虫形态特征图见图 E.1。



- 1——雌虫；
2——雄虫；
3——雄虫尾部；
4——雄虫尾部腹面观(尾端有交合伞)；
5——交合刺腹面观；
6——雌虫前部；
7——雌虫阴门；
8~10——雌虫尾部；
11——松材线虫尾部两种形状(A——微小尾尖突，B——尾钝圆)。

图 E.1 松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhner) Nickle

E.2 幼虫特征

分散型 3 龄幼虫(L_{III})体内内含物增加导致体色较深。尾部呈半圆形,与其他龄期幼虫相比更宽、钝。

2 龄至 4 龄幼虫在形态上以体长和生殖腺长度进行区别。

E.3 松材线虫与近缘种拟松材线虫形态特征的主要区别

拟松材线虫 *B. mucronatus*(Mamiya et Enda)在形态学和生物学方面均与松材线虫相似,但分布较松材线虫广泛,在松材线虫病的检验中常常可见,二者在形态上的主要区别在于:

- a) 雌虫尾部,松材线虫为亚圆锥形,末端钝圆,少数可见微小的尾尖突,不超过 2 μm ,一般为 1 μm ;拟松材线虫为圆锥形,末端有明显的尾尖突,长度在 3.5 μm 以上,一般为 5 μm 。
- b) 雄虫尾部,松材线虫交合刺远端有盘状突,交合伞为卵形;拟松材线虫交合刺远端无盘状突,交合伞为近方形。

拟松材线虫形态特征图见图 E.2。

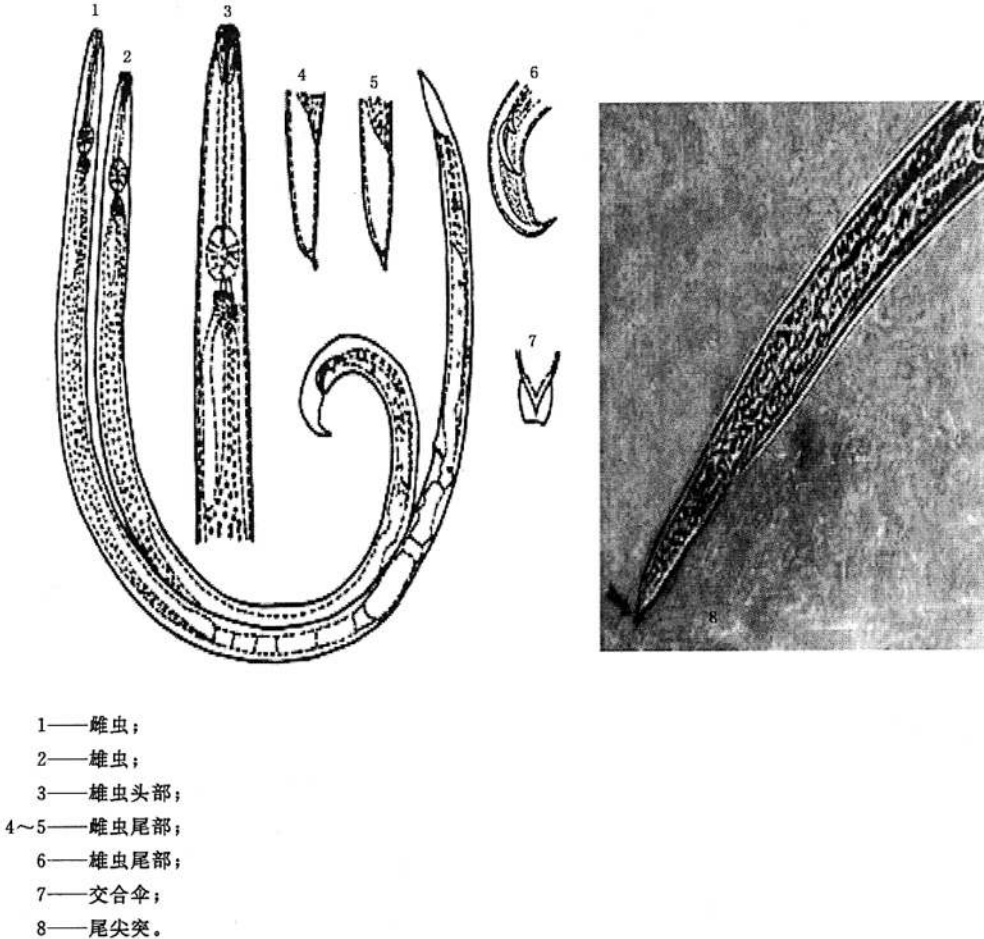


图 E.2 拟松材线虫 *B. mucronatus*(Mamiya et Enda)

附 录 G
(资料性附录)
松材线虫 PCR 检测

G.1 线虫基因组 DNA 的提取

G.1.1 少量线虫(含单条线虫)DNA 提取

按照每条线虫,加入 10 μL 预冷的线虫裂解液比例,将线虫与裂解液置于 Eppendorf 管中。在 PCR 仪上,于 70 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保温处理 35 min。在 95 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保温处理 10 min。12 000 r/min 离心 2 min,上清液用于扩增。

G.1.2 大量线虫 DNA 提取

取线虫群体 200 μL 于 Eppendorf 管中,加入 300 μL 线虫裂解液(200 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L NaCl, 100 mmol/L EDTA, 2% SDS, 2% β -mercaptoethanol, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛋白酶 K),混匀;在 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中处理 1 h,每隔 10 min 振荡一次;用等体积(500 μL)的酚、酚-三氯甲烷-异戊醇(25+24+1)、三氯甲烷-异戊醇(24+1)抽提,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,12 000 r/min 离心 20 min,取上清液;在上清液中加入 1/10 体积的 3 mol/L 的乙酸钠(pH=4.6)和两倍体积的无水乙醇(-20°C),在 -70°C 条件下 30 min;12 000 r/min 离心 20 min,沉淀用 70% 的乙醇(-20°C 预冷)洗涤两次,沉淀气干 1.5 h,加入 100 μL TE 重新悬浮沉淀;取 10 μL 稀释 250 倍,用紫外分光光度计测定 DNA 的浓度($[\text{DsDNA}] = 50 \times (\text{OD}_{260} - \text{OD}_{310}) \times \text{稀释倍数} (\mu\text{g}/\text{mL})$);用灭菌蒸馏水将各 DNA 提取液稀释到 20 ng/ μL ,作为 PCR 扩增的模板 DNA, -20°C 备用。

G.2 PCR 扩增

G.2.1 PCR 引物

松材线虫特异引物组合 B。

G.2.2 反应体系

G.2.2.1 普通 Taq 酶

每反应的混合液总体积为 20 μL ,其中:

- a) 2.0 μL 10 $\times$ PCR 缓冲液;0.5 mol/L 的 KCl;100 mmol/L Tris-HCl, pH=9.0;1% Triton X-100;
- b) 2 μL 2.5 mmol/L 的 dNTP;
- c) 1.8 μL 25 mmol/L 的 MgCl_2 ;
- d) 0.2 μL 5 U/ μL Taq 酶;
- e) 1.5 μL 10 mmol 的引物组合 B;
- f) 2.0 μL 20 ng/mL 的模板 DNA;
- g) 补充高压灭菌重蒸水至 20 μL 。

G.2.2.2 快速扩增 Taq 酶

每反应的混合液总体积为 20 μL ,其中:

- a) 2.0 μL 10 $\times$ 快速 Taq PCR 缓冲液;
- b) 2 μL 2.5 mmol/L 的 dNTP;
- c) 0.3 μL 快速扩增 Taq 酶;
- d) 1.5 μL 10 mmol/L 的引物组合 B;
- e) 2.0 μL 的模板 DNA;

f) 补充高压灭菌重蒸水至 20 μL 。

G.2.3 反应程序

G.2.3.1 普通 Taq 酶

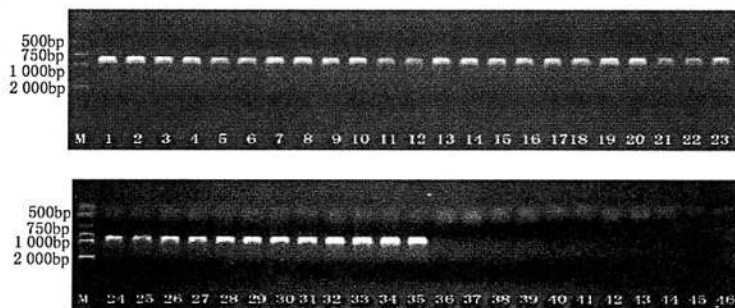
反应混合液在 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 进入循环 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 50 s, 共 40 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。

G.2.3.2 快速扩增 Taq 酶

反应混合液在 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 s, 进入循环 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 3 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s, 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min。

G.3 结果检测

PCR 扩增产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶上电泳, 电泳缓冲液为 1 $\times$ TAE 或 1 $\times$ TBE, 电压为 5 V/cm, 电泳时间为 30 min。置凝胶于 302 nm 透射紫外灯上观察、拍照。结果参见图 G.1、图 G.2。



泳道 M——标准 DNA;

1~35——松材线虫;

36~43——拟松材线虫;

44~46——线虫未定种。

图 G.1 松材线虫特异引物组合 B 对大量线虫检测图谱



泳道 M——标准 DNA;

47~49——松材线虫;

50~52——拟松材线虫。

图 G.2 松材线虫特异引物组合 B 对少量线虫检测图谱