

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1140—2002

---

### 甜菜胞囊线虫检疫鉴定方法

Methods for quarantine and identification of  
*Heterodera schachtii schmidt*

2002-08-02 发布

2003-01-01 实施

---

中华人民共和国  
国家质量监督检验检疫总局 发布

## 前 言

本标准的附录 B、附录 C、附录 D 和附录 E 为规范性附录，附录 A 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。

本标准起草单位：中华人民共和国上海出入境检验检疫局、南京农业大学。

本标准主要起草人：戚龙君、宋绍祎、林茂松。

本标准系首次发布的检验检疫行业标准。

## 甜菜胞囊线虫检疫鉴定方法

### 1 范围

本标准规定了对甜菜胞囊线虫检疫和鉴定方法。

本标准适用于甜菜及其他藜科和十字花科等植物及植物繁殖材料的根和病土中甜菜胞囊线虫的检疫和鉴定。

### 2 原理

甜菜胞囊线虫 Sugarbeet cyst nematode, 学名: *Heterodera schachtii* Schmidt, 1871, 属于线虫门 (Nemata)、侧尾腺纲 (Secernentea)、垫刃目 (Tylenchida)、异皮科 (Heteroderidae)、异皮线虫属 (*Heterodera*)。该病原线虫一生中形态多样, 由蠕虫状二龄幼虫进入寄主植物根内发育, 变成豆荚状三龄幼虫, 此时出现性别分化, 三龄雌幼虫发育成近葫芦形四龄早幼虫, 四龄雄虫为蠕虫状, 四龄雌幼虫再蜕变为雌性成虫, 白色的成熟雌虫与雄虫交配后, 蠕虫状的雄虫便死亡, 雌虫完全成熟后就叫胞囊, 胞囊一般从根表面掉入土中。受害甜菜出现侧根增多, 整个根系呈簇须状, 严重缺少功能根, 在太阳照射下或干燥土壤中萎蔫。

甜菜胞囊线虫是危害甜菜及其他藜科和十字花科植物 (参见附录 A) 的一种植物寄生性线虫, 该病原线虫主要靠寄主植物和病土的移动进行传播。它的侵染循环、传播途径、寄主范围、生物学和形态学特征是检疫鉴定方法的依据。

### 3 仪器、用具

- 3.1 Fenwick 胞囊漂浮器。
- 3.2 生物显微镜 (100 倍~1 000 倍, 具有目镜测微尺或者绘图仪、监视器等)。
- 3.3 体视显微镜 (10 倍~90 倍, 具透射光源)。
- 3.4 加热板。
- 3.5 低速离心机 (1 000 r/min~4 000 r/min)。
- 3.6 离心管 (100 mL)。
- 3.7 载玻片。
- 3.8 盖玻片。
- 3.9 分样筛 (直径均为 20 cm, 孔径为 20 目、60 目、100 目、300 目、500 目)。
- 3.10 烧杯 (500 mL、1 000 mL)。
- 3.11 毛刷。
- 3.12 打孔器。
- 3.13 干燥器。
- 3.14 挑针。
- 3.15 冰箱。
- 3.16 滤纸。
- 3.17 酒精灯。
- 3.18 培养皿。

- 3.19 解剖刀。
- 3.20 搪瓷盘。
- 3.21 竹针。
- 3.22 试管。
- 3.23 记号笔。
- 3.24 指形管。
- 3.25 玻璃纤维丝(3 mm~5 mm)。

#### 4 药品

- 4.1 中性树脂。
- 4.2 TAF 固定液(40%甲醛 7 mL、三乙醇胺 2 mL 和蒸馏水 91 mL 混合而成)。
- 4.3 酒精(浓度为 70%、95%和 100%)。
- 4.4 双氧水(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)(浓度为 40%)。
- 4.5 丁香油。
- 4.6 蔗糖溶液(W/V 为 80%)。
- 4.7 指甲油。
- 4.8 石蜡。
- 4.9 乳酚油(苯酚 20 mL、乳酸 20 mL、甘油 40 mL 和蒸馏水 20 mL 混合而成)。

#### 5 现场检疫

##### 5.1 抽样

###### 5.1.1 抽样方法

棋盘式、五点式或随机抽样。

###### 5.1.2 抽样数量

按总件数的 5%~20%抽样,最低抽检数量不少于 10 件或 500 株。取样的数量为:50 株以下取五株;51 株~200 株取 10 株;201 株~1 000 株取 15 株;1 001 株~5 000 株取 20 株;5 001 株以上,每增加 5 000 株增取五株,不足 5 000 株的余量计取五株样品。

##### 5.2 外观症状检查

对植物,尤其是甜菜、藜科、十字花科及其他植物繁殖材料的带根和土的情况进行检查,注意检查侧根较多,整个根系呈簇须状,植株出现萎蔫状的材料,收集上述材料和所扦取的样品及运输工具上可能携带的土壤,一并带回实验室检验。

#### 6 实验室检验

##### 6.1 土壤的收集

用毛刷将收集的材料和所扦取的样品的根或其他组织表面附着的土刷下,收集到塑料袋中,作为检验的土样。

##### 6.2 线虫分离

###### 6.2.1 改进的浮力离心法

本法可以分离到土壤中的孢囊和幼虫,一般用于检验 100 g 以下的土壤。具体分离步骤如下:

- 6.2.1.1 搓碎土样,充分混匀。
- 6.2.1.2 100 mL 离心管加水 70 mL,再加土样,搅拌成悬浮状。
- 6.2.1.3 3 000 r/min 离心 5 min,去上清液。
- 6.2.1.4 加入 80%蔗糖液 60 mL,搅拌成悬浮状。

6.2.1.5 2 000 r/min 离心 2 min。

6.2.1.6 上清液倒入套筛中(20目+100目+500目),用清水尽快冲洗。

6.2.1.7 去除 20 目筛中的杂质;从 100 目筛中可以收集到胞囊(阴门锥制作方法见附录 B);将 500 目筛中剩余物全部洗入培养皿中,在体视显微镜下观察,用挑针挑取二龄幼虫制备临时玻片(线虫玻片制作见附录 C)镜检。

## 6.2.2 套筛法

本法可同时分离土壤中的胞囊和二龄幼虫,一般用于检验 100 g 以下的土壤。具体方法如下:

6.2.2.1 选用 20 目、60 目、100 目、300 目、500 目筛子各一个,从上到下依次放置在特制的架子上;

6.2.2.2 采回的土样放于烧杯中,加水充分搅拌成悬浮状;

6.2.2.3 将土壤悬浮液缓慢倒入套筛中,并用清水冲洗;

6.2.2.4 从 60 目和 100 目筛中收集胞囊,从 300 目和 500 目筛中收集二龄幼虫,制片镜检。

## 6.2.3 Fenwick 胞囊漂浮器分离法(见图 D.1)

仅用于分离土样中的胞囊,一般用于检验 100 g 以上的土壤。具体方法如下:

6.2.3.1 将收集到的附着土壤铺于干净的浅瓷盘内,将土样在室内风干,去除土壤中的植物组织和粗砂等杂物,称 100 g 土样备用。

6.2.3.2 先将漂浮器加满清水,再取 100 g 的风干土样放入漂浮器的上筛中,加水冲洗,使土样全部被淋洗至漂浮筒内。

6.2.3.3 再由上筛加水至漂浮筒内,用 100 目筛子(底筛)接收从漂浮器中漂浮出来的胞囊和杂物。

6.2.3.4 将 100 目筛子上的含胞囊的残留物冲洗到滤纸上,在体视显微镜下用毛刷挑取胞囊制片镜检。

## 7 形态鉴定特征

### 7.1 异皮线虫属形态鉴定特征

雌虫:有胞囊期;虫体球形或柠檬形,有短颈和末端锥;角质层厚,表面有网状花纹,D 层不明显;阴门位于末端,阴门层不突出,阴门区有双半膜孔或双膜孔,无肛区膜孔,一般有以下桥,泡囊有或无(胞囊线虫雌虫阴门锥见图 E.1)。卵存留在体内,有时也产生卵块,卵表面光滑。

雄虫:虫体蠕虫形、弯曲,侧线四条(偶尔三条);交合刺长于 30  $\mu\text{m}$ ,远末端尖或呈叉状,泄殖腔层不形成泄殖腔管;尾圆、非常短。

二龄幼虫:口针短于 30  $\mu\text{m}$ ,侧线四条(偶尔三条),食道腺充满体腔;尾圆锥形、端尖,尾的透明后部长度有变化,一般为尾长的二分之一;侧尾腺口呈刻点状。

### 7.2 甜菜胞囊线虫形态鉴定特征

#### 7.2.1 测计值(据 Raski,1950)

表 1 甜菜胞囊线虫测计值

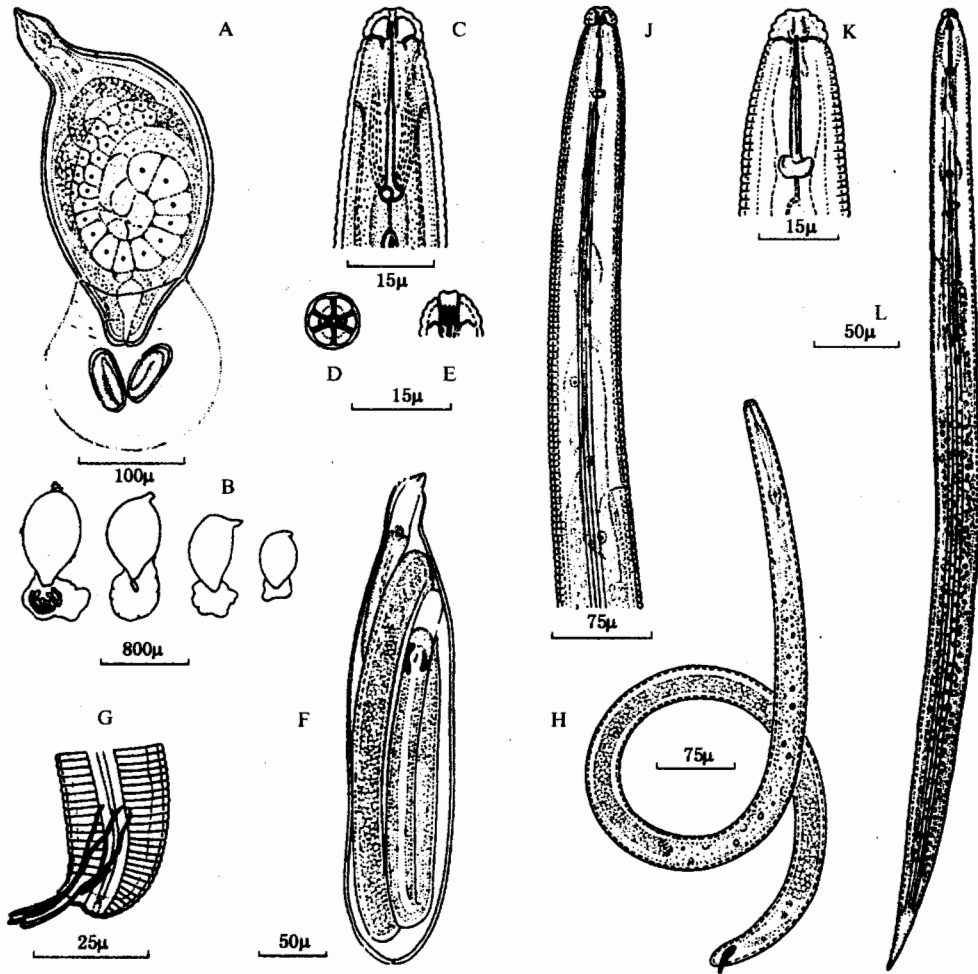
	体长/ $\mu\text{m}$	体宽/ $\mu\text{m}$	口针长/ $\mu\text{m}$	表皮厚/ $\mu\text{m}$	食道长/ $\mu\text{m}$	交合刺长/ $\mu\text{m}$	引带长/ $\mu\text{m}$	$a$	虫体环纹间距/ $\mu\text{m}$
雌虫	626~890	361~494	27	9~12	28~30				
雄虫	1 119~1 438	28~42	29			34~38	10~11	32~48	
二龄幼虫	435~492	21~22	25						1.4~1.7

注:

$a$  = 体长  $\div$  最大体宽。

胞囊:阴门窗长 = 38.7  $\mu\text{m}$ ,阴门窗宽略小,阴门与肛门间距离为 65  $\mu\text{m}$ ~111  $\mu\text{m}$ (平均为 77  $\mu\text{m}$ )。

7.2.2 形态鉴定特征(见图 1)



- A——雌虫和卵；
- B——胞囊；
- C~E——雄虫头部；
- F——四龄雄幼虫；
- H、J——雄虫及其食道；
- G——雄虫尾部；
- K、L——二龄幼虫及其头部。

图 1 甜菜胞囊线虫形态(仿 Krankling 等)

**胞囊:**含有卵和幼虫的胞囊从植物根上脱落,留在土壤中。胞囊褐色,表皮为鞣革质,具有粗糙感觉的微小皱折。胞囊的阴门裂几乎等长于阴门桥,阴门裂位于胞囊表皮的二个肾形薄区的两侧,此区域在较老的胞囊中只剩下两个孔或者被阴门桥分成两个半膜孔。在阴门锥内,阴道连接着阴门下桥和许多不规则排列的位于阴门桥下的褐色泡状结构。

**雌虫:**虫体白色、呈柠檬形,有短颈插入寄主根内,膨大的虫体露在根外,体内充满卵和幼虫;阴门锥被胶质团所覆盖;头部小,颈部急剧膨大呈柱形;排泄孔位于“肩部”,从此处开始虫体膨大而成近球形,至阴门锥处变小;肛门位于近尾端的背部,无明显的尾;头骨架弱,口针细、有小的基部球,中食道球明显、呈球形,食道腺覆盖肠的腹侧面;双生殖腺、长、盘卷。少部分卵产在胶质团内,大部分卵存留在体内。表皮基本上分三层,外层覆盖着脊状网形结构。

**雄虫:**虫体蠕虫形,热杀死后虫体前部直,后四分之一部分呈螺旋形旋绕 90°~180°,虫体从中部向前渐变细;体表环纹明显,侧区有四条侧线,无网格。头部圆、缢缩明显,有三个至四个头环,头架对称;侧

器孔为小裂缝状,位于近口的侧部。口针发达,基部球前端凹陷;中食道球纺锤形,食道腺覆盖肠的侧腹面,背食道腺开口于口针基部球后 $2\mu\text{m}$ 处。排泄孔在中食道球后二倍至三倍体宽处,半月体在排泄孔前六个至十个体环处。交合刺腹面弯,基部略膨大,顶端凹陷;引带结构简单。尾部短于体宽的二分之一,尾端钝圆,侧尾腺口位于肛门附近。

二龄幼虫:头部半球形、缢缩,头环四个,头骨架粗壮,对称;体环较宽,口针处体环宽 $1.4\mu\text{m}$ ,体中部体环宽为 $1.7\mu\text{m}$ ,侧线四条;口针中度硬化、有小的基部球,基部球前端向前凸;中食道球比雄虫发达,背食道腺开口在基部球后 $3\mu\text{m}\sim 4\mu\text{m}$ 处;肛门不清楚,距尾端约四倍体宽处;尾部急剧变细呈圆锥形、末端圆,尾后部透明区明显,长度是口针长的1.25倍。

## 8 结果判定

符合第7章的形态鉴定特征可鉴定为甜菜胞囊线虫。

## 9 样品保存

9.1 对于分离获得的剩余二龄幼虫可以加热杀死、固定制成永久玻片保存;也可固定后放入含TAF液的指形管中,在 $4^{\circ}\text{C}$ 冰箱内长期保存,并标明样品登记号码、制作日期和制作人等。

9.2 对于剩余的胞囊,可以放入含TAF液的指形管中,在 $4^{\circ}\text{C}$ 冰箱内长期保存,并标明样品登记号码、制作日期和制作人等。

9.3 对于检出甜菜胞囊线虫的剩余样品,土样可风干,保存在低温干燥、防虫防鼠处;并标明基本情况,如样品登记号码、截获日期、截获人、寄主名称、运输工具名称和输出国名等。

9.4 所有保存样品,至少需保存六个月,以备复验、谈判和仲裁。

附 录 A  
(资料性附录)

甜菜胞囊线虫的寄主与分布

A.1 甜菜胞囊线虫的寄主

甜菜胞囊线虫的寄主范围极广,主要发生在十字花科、藜科植物上,还可侵染蓼科、石竹科、苋科、豆科、茄科等多种植物和杂草,包括:甜菜、菠菜、莖椰菜、抱子甘蓝、结球甘蓝、球茎甘蓝、羽衣甘蓝、大白菜、芸苔、芜菁甘蓝、萝卜、南芥、白芥、食用大黄、香石竹、番茄、大豆、鹰嘴豆、羽扇豆、黄荚种菜豆等植物,及芥菜类、藜、龙葵、滨藜、扁蓄、苋、马齿苋、荠菜、香杏、繁缕、野萝卜、反枝苋等多种杂草。

A.2 甜菜胞囊线虫的分布

亚洲:伊朗、伊拉克、约旦、韩国、巴基斯坦、阿塞拜疆、哈萨克斯坦、乌兹别克斯坦、吉尔吉斯斯坦、土耳其、以色列。

欧洲:奥地利、比利时、法国、捷克、斯洛伐克、丹麦、意大利、德国、芬兰、爱沙尼亚、英国、荷兰、卢森堡、葡萄牙、西班牙、爱尔兰、希腊、波兰、罗马尼亚、拉脱维亚、摩尔达维亚、乌克兰、俄罗斯、前南斯拉夫、保加利亚、瑞典、瑞士。

非洲:赞比亚、塞内加尔、南非、加那利群岛、佛得角共和国。

北美洲:加拿大、美国、墨西哥。

大洋洲:澳大利亚、新西兰。

南美洲:智利、乌拉圭。



附 录 B

(规范性附录)

胞囊线虫雌虫阴门锥的制作方法

- B.1 将用水浸泡 24 h 的胞囊移至有水滴的载玻片上,在体视显微镜下用解剖刀切下胞囊后部的阴门锥部分。
- B.2 用竹针仔细清除阴门锥内的附着物。
- B.3 用解剖刀适当修整阴门锥边缘,最好使阴门锥的高度不超过阴门窗区域宽度的 10 倍~15 倍。
- B.4 将切下的阴门锥用 40%双氧水处理数分钟,再依次移至玻片另一侧的 70%、95%、100%酒精液滴中脱水,再移至凹玻片的凹穴中的丁香油内透明。
- B.5 在凹玻片的凹穴内加一小滴中性树胶,稍涂平,将处理好的阴门锥埋于中性树胶内,阴门锥顶端向上。
- B.6 待中性树胶凝固后,再在阴门锥附近加入适量的中性树胶,并加盖玻片,贴好标签。

附 录 C

(规范性附录)

甜菜胞囊线虫二龄幼虫的玻璃片标本制作方法

C.1 线虫的杀死:在体视显微镜下用线虫挑针挑取少量线虫放至凹玻片上的水滴中,使线虫位于水滴中央,手持凹玻片在酒精灯火焰上来回 5 s~6 s,使线虫恰好被杀死为止;杀死大量的线虫,可将线虫悬浮液放在试管中加等量的沸水杀死线虫。

C.2 线虫的固定:少量线虫被杀死后,可用线虫挑针将线虫移至 TAF 固定液中固定。大量的线虫被杀死后,在线虫悬浮液中加入等量浓度双倍的固定液即可。

C.3 临时玻片标本的制作:以 TAF 作为浮载剂,滴适量于载玻片上,用挑针将固定好的线虫移数条于浮载剂中,并使其完全沉下,浮载剂边缘均匀放置 3 mm~5 mm 长、直径与线虫体宽相近的玻璃纤维丝三根,加盖玻片,用滤纸吸去溢出的浮载剂,用指甲油封片,待指甲油干后再加封一次,可保存几天至数周。

C.4 永久玻片标本的制作

C.4.1 脱水:采用乳酚油快速脱水法(Franklin & Goodey, 1949),把滴有乳酚油的凹玻片放在加热板上,加热至 65℃~70℃,将已固定一天以上的线虫挑入热的乳酚油中,继续加热 2 min~3 min 后,在解剖镜下观察标本是否清晰,若不够清晰,继续在 65℃~70℃的加热板上加热片刻至清晰(注意避免加热过度而损坏标本),然后放在干燥器中 12 h~24 h,进一步去除水分后即可制片。

C.4.2 制片:将直径 1.5 cm 的打孔器在酒精灯火焰上加热后,插到蜡盘中蘸取少量石蜡,并迅速轻按于载玻片中央。待冷却后即形成一个蜡圈。在蜡圈内滴一小滴乳酚油(用量以盖上盖玻片后不外溢为宜)作为浮载剂,将已脱水的线虫数条挑入其中,排列整齐,并使其完全沉下,将与线虫体宽相近的三根 3 mm~5 mm 的玻璃纤维丝均匀置于浮载剂边缘,加盖玻片后,将载玻片移至 65℃~70℃的加热板上熔蜡,待蜡熔化后移至实验台上冷却,用指甲油封片,待指甲油干后再封一次。最后贴上标签,左边的标签写明样品号、寄主、截获口岸、产地、制作日期;右边的标签写线虫种名、线虫虫态及其数量。

附录 D  
(规范性附录)

Ferwick 胞囊漂浮器分离法

Ferwick 胞囊漂浮器(见图 D.1)分离法主要用于分离土壤中的胞囊。分离时先堵好排污水孔,在漂浮筒内灌满水,把风干的土样放在上筛中(16 目筛),并用水淋湿 100 目的底筛。再用强水流淋洗全部土样到漂浮筒内,并从环颈水槽流到底筛中,静止 2 min 后,待筒内胞囊充分漂浮后,再注入适量的水,清洗筛子和仪器。最后将底筛中含胞囊的杂物洗到滤纸上,滤去水后晾干,收集胞囊检查。

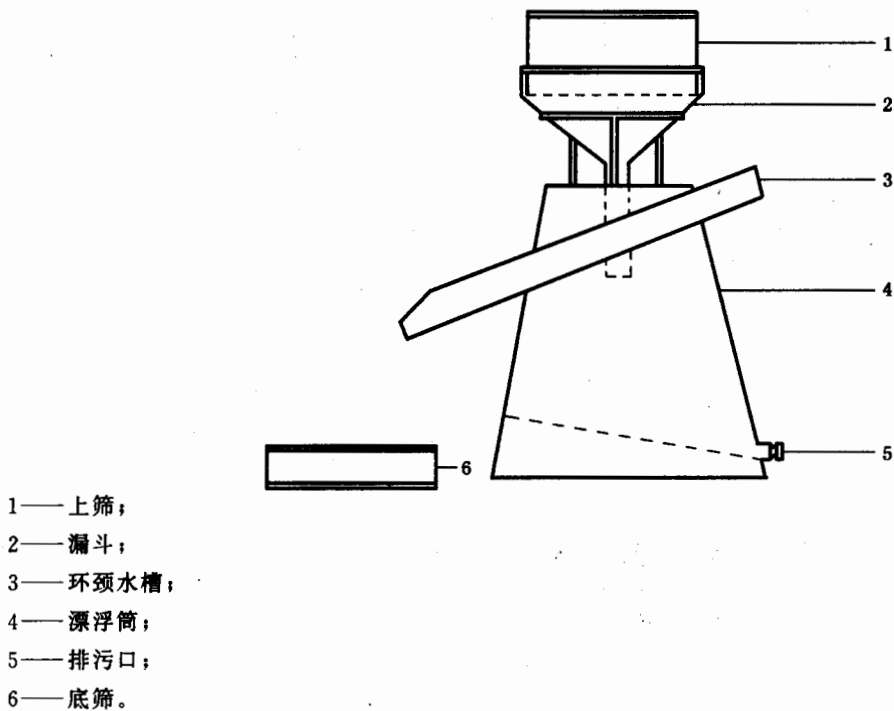
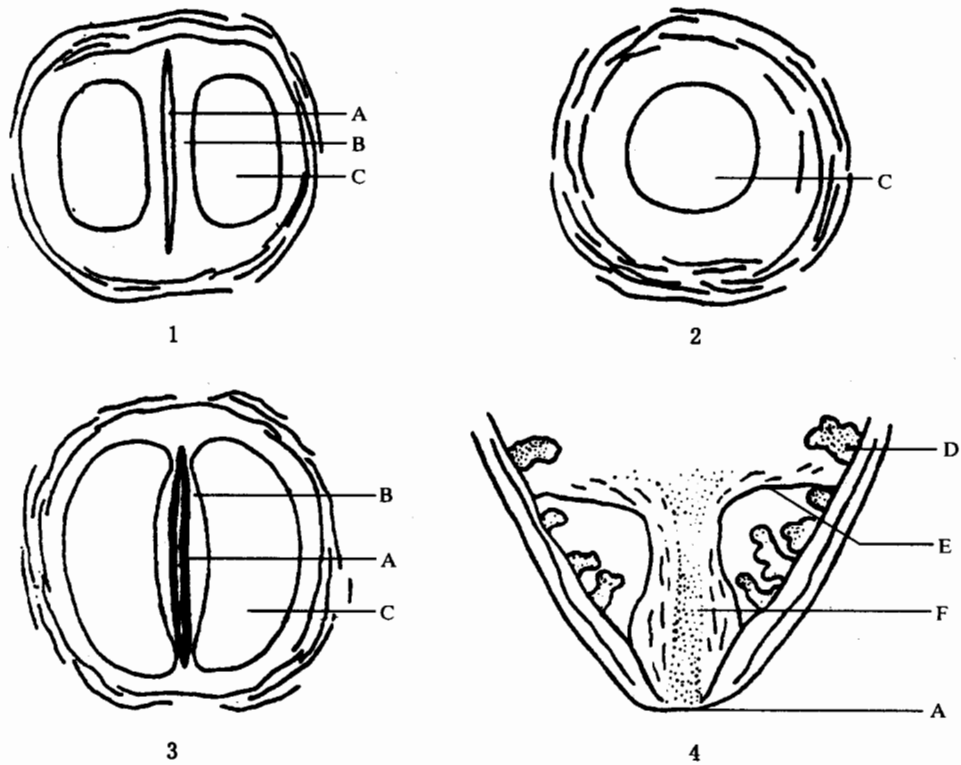


图 D.1 Fenwick-Oostenbrik 胞囊漂浮器

附录 E  
 (规范性附录)  
 胞囊线虫雌虫阴门锥图



- 1—双膜孔；
- 2—周膜孔；
- 3—双半膜孔；
- 4—阴门锥；
- A—阴门；
- B—阴门桥；
- C—膜孔；
- D—泡囊；
- E—下桥；
- F—阴道。

图 E.1 胞囊线虫雌虫阴门锥图