



SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1105—2014
代替 SN/T 1105—2002

大家白蚁检疫鉴定方法

Detection and identification of *Coptotermes curvignathus* Holmgren

2014-11-19 发布

2015-05-01 实施



中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

中华人民共和国出入境检验检疫

行 业 标 准

大家白蚁检疫鉴定方法

SN/T 1105—2014

*

中国标准出版社出版

北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)

北京市西城区三里河北街16号(100045)

总编室:(010)68533533

网址 www.spc.net.cn

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 26 千字

2016年1月第一版 2016年1月第一次印刷

印数 1—1 100

*

书号: 155066·2-29348 定价 18.00 元

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 SN/T 1105—2002《大家白蚁检疫鉴定方法》。

本标准与 SN/T 1105—2002 相比,主要技术变化如下:

——增加大家白蚁分子生物学鉴定方法;

——增加大家白蚁寄主、分布、为害、与近似种的检索表(兵蚁)及特征图。

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:中华人民共和国厦门出入境检验检疫局、中华人民共和国珠海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:庞金、方元炜、许彩芸、林振基、黄蓬英、张卫东、廖力、董文广、乐海洋、曾琪、国伟、周昱。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

——SN/T 1105—2002。

大家白蚁检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了大家白蚁 *Coptotermes curvignathus* Holmgren 的形态学和分子生物学检疫鉴定方法。

本标准适用于大家白蚁的检疫和鉴定。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

囟 fontane

白蚁在头盖缝的汇合之处凹下或突起部分,是额线的开口处。

3.2

囟孔 fontanelle hole

前额中间的圆形开口。

4 大家白蚁基本信息

学名:*Coptotermes curvignathus* Holmgren。

异名:*Coptotermes gestroi* Oshima。

Coptotermes robustus Holmegren。

英文名:Rubber tree termites。

分类地位:等翅目 Isoptera,鼻白蚁科 Rhinotermitidae,乳白蚁属 *Coptotermes* Wasman。

大家白蚁常随原木、锯木和木包装传播,其寄主、分布及生物学参见附录 A。

乳白蚁属在全世界已知共 40 余种,属内形态与大家白蚁近似种有台湾乳白蚁 *C. formosanus* Shiraki、锡纳邦乳白蚁 *C. sinabangensi* Oshima、南亚乳白蚁 *C. travians* (Haviland)、卡肖乳白蚁 *C. kalshoveni* Kemner、塞庞乳白蚁 *C. sepangensis* Kirshna、印缅乳白蚁 *C. gestroi* (Wasmann)、菲岛乳白蚁 *C. vastator* Light 和婆罗乳白蚁 *C. borneensis* Oshima,大家白蚁与近似种的区别参见附录 B。

5 方法原理

根据大家白蚁的为害状,在检疫现场或发生疑似大家白蚁的地方,取得卵、兵蚁、工蚁或成虫等。现

场检疫如发现有白蚁的兵蚁,依据形态学特征进行鉴定。如未发现白蚁兵蚁,而有卵、工蚁或有翅成虫等时,利用大家白蚁 ITS 特异性扩增引物的常规 PCR 检测方法和实时荧光 PCR 检测方法,可准确、快速将大家白蚁与印缅乳白蚁、塞庞乳白蚁、台湾乳白蚁和婆罗乳白蚁 4 种乳白蚁区分开来。

6 器材和试剂

6.1 器材

6.1.1 形态学部分

显微镜、解剖镜、树皮铲、手锯、油锯、铁锥、螺丝刀、小斧头、解剖刀、解剖针、镊子、培养皿、毛笔、养虫管、指形管。

6.1.2 分子生物学部分

PCR 扩增仪、实时荧光 PCR 仪、电泳仪、凝胶成像系统、离心机、台式离心机、核酸蛋白分析仪、烘箱、高压灭菌锅、电子天平、研钵、摇床、水浴锅、旋涡振荡器、冰箱、微量加样器(0.5 μ L, 2 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1 000 μ L)、PCR 反应管(0.2 mL, 0.5 mL)。

6.2 试剂

6.2.1 形态学部分

75%乙醇。

6.2.2 分子生物学部分

实验用水、液氮、蛋白酶 K(20 mg/mL)、RNA 消化酶、Tris 饱和酚、Premix Ex Taq(2 \times)、三氯甲烷、异戊醇、异丙醇、75%乙醇、95%乙醇、10 \times PCR 缓冲液、脱氧核糖核苷三磷酸(dNTPs)、Taq 酶、DL2000 Marker、琼脂糖、溴化乙锭(EB)、引物探针、昆虫基因组 DNA 提取试剂盒。

提取液:1% SDS, 50 mmol/L Tris-Cl(pH8.0), 25 mmol/L NaCl, 25 mmol/L EDTA(pH8.0)。

7 现场检疫

7.1 检查空洞

用铁锥敲打木材,探明是否有空洞。若是发出异常声响,应撬开空洞,仔细检查是否有白蚁行踪。

7.2 检查白蚁外露的活动踪迹

检查木材是否有白蚁泥(即白蚁排泄物及泥土堆积的蚁路)、分飞孔(此孔是有翅成虫移植出飞的孔口,孔口常有泥土封住)和通气孔(即蚁巢外面直径约 1 mm 的针尖状小孔,通常有十几至几十个,孔口有时有细泥土,并常有兵蚁守卫)。

7.3 查寻巢穴

在现场对有白蚁外露的活动踪迹的可疑木材仔细查寻巢穴,如发现有白蚁活动,应及时收集标本,以备进行实验室鉴定。

8 实验室鉴定

8.1 形态学鉴定

8.1.1 乳白蚁属鉴定

8.1.1.1 兵蚁鉴定特征

头卵形,前段明显变狭,囟位于头前部,呈短管延出,囟孔大,朝向前方,上颚细而弯曲,除基部的锯齿形缺刻外,内缘光滑无齿,触角 13~17 节,上唇尖吞形。前胸背板平坦,狭于头部。

8.1.1.2 有翅成虫鉴定特征

头部宽卵形,后唇基极短而平,触角 18~25 节,囟位于头中部。前胸背板扁平,狭于头部,前翅鳞大于后翅鳞且覆盖后翅鳞之上,翅脉有极浅淡的网状纹,翅面具毛,前翅中脉由肩缝处独立伸出,后翅中脉由胫分脉基部分出,中脉距肘脉极近。

8.1.2 大家白蚁鉴定

8.1.2.1 工蚁鉴定特征

体长 4.10 mm~5.05 mm。头近圆形,淡褐色,头宽 1.30 mm~1.75 mm,头长 0.85 mm~1.05 mm,触角 14~15 节。前胸背板宽 0.60 mm~0.85 mm,前缘略翘起,中央有缺刻,前胸背板及腹部乳白色,疏生淡黄色短毛。

8.1.2.2 兵蚁鉴定特征

头壳深黄色,上颚深褐色,胸部腹部与足淡黄色。头壳稀布小毛,上唇端有 1 对端毛,囟孔两侧各具 1 枚刚毛,囟孔与触角间也有 1 枚粗刚毛,前胸背板中区具短毛约 20 枚。头壳卵圆形,最宽处在头的后半部,上颚瘦长,军刀状,颚端强烈弯曲,左上颚基部有 1 深凹处,其前具小齿刻,上唇为舌形,长稍大于宽,端部稍尖,唇端半透明,囟孔大、圆形,侧面观孔口倾斜,上部稍向后。触角 15~16 节,一般为 16 节,第 3、4 节短小,几乎相等,第 2 节稍长于第 3 节或相等。前胸背板元宝形,宽大于长,前后缘中央具浅凹,前侧角圆,两侧缘斜向后缘(参见附录 C、附录 D 和附录 E)。

8.1.2.3 有翅成虫鉴定特征

全长 16 mm~17 mm,翅长 13 mm~14 mm,体长(不含翅)7.5 mm,头近圆形,深褐色,头长 1.15 mm。触角黄褐色,21 节,第 2、3、4 节短于其他各节,其中第 3 节最短。复眼大,近圆形,单眼卵圆形。触角与复眼间距小于触角与单眼间距,单眼与复眼间距小于单眼的宽度。前胸背板前缘中央向后凹入,后缘中央向前凹入。前胸背板褐色,密生黄褐色长毛。前翅鳞大于后翅鳞,翅面密生细短的淡褐色毛,前翅中脉从肩缝处独立伸出,肘脉有 4~10 条分支。后翅中脉从胫分脉基部分出,肘脉有 8~10 条分支,在不同个体间翅脉变化较大。

8.2 分子生物学鉴定

8.2.1 大家白蚁基因组 DNA 提取

8.2.1.1 一般方法

取白蚁 1 头于双蒸水中漂洗,吸水纸吸干,解剖镜下剔除其体表的附着物及腹部内容物,以免原生

动物污染。置于 1.5 mL 离心管中,加入 40 μ L 提取液 A,放置于-70 $^{\circ}$ C 冰箱中,4 min 后取出,用牙签捣碎,匀浆,加入等体积的 3 mmol/L 醋酸钾(pH7.2),冰上放置 1 h,酚/三氯甲烷提取基因组 DNA,溶解在 TE 中,用微量分光光度仪测定 DNA 浓度和纯度后,将样品于-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

8.2.1.2 试剂盒法

将大家白蚁样本移入 1.5 mL 离心管或碾钵中,捣碎或加入液氮碾磨,实验步骤根据试剂盒的操作说明书操作。大家白蚁基因组 DNA 溶液置-20 $^{\circ}$ C 冷冻保存。

8.2.2 DNA 质量检查

用核酸蛋白分析仪测定 DNA 的纯度与浓度,分别取得 260 nm 和 280 nm 处的吸收值,计算核酸的纯度和浓度,计算公式见式(1)和式(2)

DNA 纯度 = OD_{260} / OD_{280} (1)

DNA 纯度 = $50 \times OD_{260} \mu\text{g/mL}$ (2)

PCR 级 DNA 溶液的 OD_{260} / OD_{280} 比值应为 1.7~1.9。

8.2.3 常规 PCR 检测

8.2.3.1 引物

大家白蚁常规 PCR 扩增引物序列见表 1。

表 1 引物序列

类型	引物名称	引物序列	扩增片段
正向引物	CC-1F	5'-AGCACGGACCTGTCCGATGCC-3'	254 bp
反向引物	CC-1R	5'-CCATCTTCGGGCCCCGCGGCCT-3'	

8.2.3.2 反应体系

常规 PCR 反应体系见表 2。

表 2 反应体系

试剂名称	加样量/ μ L
10 \times PCR 缓冲液(含 Mg^{2+})	2.5 μ L
dNTP 混合物(10 mmol/L)	2 μ L
正向引物和反向引物(10 μ mol/L)	各 1 μ L
<i>Taq</i> 酶(5 U/ μ L)	0.2 μ L
模板 DNA	5 μ L
ddH ₂ O	补充至总体积为 25 μ L

8.2.3.3 反应条件

预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min;变性 94 $^{\circ}$ C 1 min,退火延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min,30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

8.2.3.4 阴性对照、阳性对照和空白对照的设置

以乳白蚁属其他种类 DNA 模板为阴性对照,以大家白蚁的 DNA 作为阳性对照,以灭菌去离子水作空白对照,各做 2 个重复。

8.2.3.5 琼脂凝胶电泳检测

常规 PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳检查扩增目标片段的大小。取 PCR 产物 5 μ L,加入 10 \times PCR 缓冲液 1 μ L,并用 DL2000 Marker 作分子量标记,在含 DNA 染色剂的 1.5%琼脂糖凝胶上电泳 30 min (90 V),凝胶图像分析仪上检查是否扩增出预期大小的目标片段,拍摄并记录结果。

8.2.4 实时荧光 PCR 检测

8.2.4.1 引物及探针

大家白蚁实时荧光 PCR 引物及探针序列见表 3。

表 3 引物、探针序列

类型	引物名称	引物序列	扩增片段
正向引物	CC-2F	5'-AGGCCGCGGGCCCGAAGATGG-3'	155 bp
反向引物	CC-2R	5'-CCGAGATCTCTCTCGTATTTTC-3'	
探针	CC-TZ	5'-FAM-ACGACAGCACTGTCTTAATCTTCG-TAMRA-3'	

8.2.4.2 反应体系

大家白蚁实时荧光反应体系见表 4。

表 4 反应体系

试剂名称	加样量/ μ L
Premix Ex Taq (2 \times)	12.5
正向引物和反向引物(10 μ mol/L)	各 0.5
探针(10 μ mol/L)	0.25
模板 DNA	2
ddH ₂ O	补充至总体积为 25

8.2.4.3 反应条件

预变性 94 $^{\circ}$ C 1 min;变性 94 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火延伸 1 min,40 个循环。

8.2.4.4 阴性对照、阳性对照和空白对照的设置

同 8.2.3.4。

9 结果判定

9.1 形态学方法

以兵蚁的形态特征为依据,有翅成虫的鉴定特征可作参考,符合 8.1.2 可判定为大家白蚁。

9.2 分子生物学方法

9.2.1 常规 PCR 检测

电泳成像结果,如果阳性对照样品和待测样品均出现大约 254 bp 的特异性 DNA 产物条带,而阴性对照样品无 DNA 产物带。上述实验做 2 个或 2 个以上重复,结果一致则可判定样品的种类为大家白蚁。

9.2.2 实时荧光 PCR 检测

在阳性对照、阴性对照和空白对照结果均正常的情况下,则:

- 检测 Ct 值小于或等于 36,检测结果呈阳性判定样品种类为大家白蚁;
- 检测 Ct 值大于或等于 40,检测结果呈阴性判定样品种类不是大家白蚁;
- 检测 Ct 值在 36~40 之间,应重做实时荧光 PCR。

10 标本保存

用于形态学鉴定所采集的标本应保存在内盛 75%乙醇的广口瓶中,同时应注明货物来源,白蚁寄主,采集时间、地点及采集者,保存期为 6 个月至 12 个月;用于分子生物学鉴定的标本用 100%乙醇浸泡,保存于-70℃冰箱中备用。

附录 A

(资料性附录)

大家白蚁寄主、分布与为害

A.1 寄主

合欢属、黄豆树、腰果属、南洋杉、菠萝蜜属、木棉、橄榄属、吉贝、咖啡桉属、三叶橡胶、李叶豆、芒果、木蝴蝶、松属、加勒比松、苏门答腊松、柳属、红柳桉属、安息香属、桃花心木、柚木等。

A.2 分布

亚洲：新加坡、马来西亚、泰国、缅甸、越南、印度尼西亚、柬埔寨、文莱、印度、韩国。
欧洲：德国。

A.3 为害

大家白蚁属于社会性多形态昆虫，同一个巢群有不同品级的分化，有蚁王、蚁后、工蚁、兵蚁和繁殖蚁之分，并各有职责分工。其中兵蚁变化奇特，在分类学上有明显的鉴别价值。该虫属土木栖白蚁，可筑巢于木材内，也可以筑巢于土壤中，营隐蔽生活方式，各个品级的发生和整个巢群的发展都在巢穴内，在木材内筑巢者多在木材中央空洞处。受害木材外表有时可见小孔、通气孔或工蚁出入的洞口，并常见有排泄物或泥路泥被。

大家白蚁从地下根部侵入，蛀食茎干。该蚁能对多种经济林木造成严重为害，能为害活树，蛀蚀埋地电缆、森林中的仪器装置，入屋为害及各类木包装。

附录 B

(资料性附录)

大家白蚁及其近似种检索表(兵蚁)

1. 头形感觉宽圆,头长头宽指数大于 0.85 2
 头形感觉长圆或椭圆形,头长头宽指数小于 0.80 6
2. 囱孔与触角窝之间有 2 根毛,前胸背板中区毛较短,成横列状 ... 锡纳邦乳白蚁 *C.sinabangensi*
 囱孔与触角窝之间毛不到 2 根,前胸背板中区毛不如上述 3
3. 前胸背板中区具一横列刚毛 南亚乳白蚁 *C.travians*
 前胸背板中区毛散乱 4
4. 前胸背板中区毛粗、长硬,为 20~40 根,非常明显 大家白蚁 *C.curvignathus*
 前胸背板中区毛较少,不易看清 5
5. 头极扁圆,上颚内缘较直 卡肖乳白蚁 *C.kalshoveni*
 头稍长,上颚从中部起向内弯 塞庞乳白蚁 *C.sepangensis*
6. 前胸背板中区光亮,几乎无毛,且较短 印緬乳白蚁 *C.gestroi*
 前胸背板中区毛不如上述 7
7. 头后缘中央凸出,两侧圆缩,头从上颚关节延伸处开始往前狭缩 菲岛乳白蚁 *C.vastator*
 头后缘平直,头从后部往前整体狭缩 8
8. 头最似梨形,最宽处在后中部 婆罗乳白蚁 *C.borneensis*
 头不太似梨形,最宽处在基部 台湾乳白蚁 *C.formosanus*

附 录 C
(资料性附录)
大家白蚁兵蚁量度表

表 C.1 大家白蚁兵蚁量度

单位为毫米

项 目	Holgren(1913) 原记载	Ahanad(1965) 根据泰国标本	平正明(1992) 根据马来西亚标本
头至上颚	1.48~1.56	1.65~1.76(1.69)	1.45~1.65(1.55)
头宽(颚基)	0.78~0.83	0.86~0.90(0.87)	0.72~0.83(0.78)
头最宽	1.35~1.43	1.40~1.63(1.53)	1.25~1.37(1.33)
头高	0.93~0.98	0.97~1.11(1.06)	0.85~0.93(0.99)
左上颚长	—	1.08~1.22(1.14)	0.90~1.10(0.99)
囟孔长径	—	0.15~0.21(0.18)	0.21~0.25
囟孔短径	—	0.15~0.18(0.16)	—
后颞长	—	0.97~1.11(1.08)	0.90~1.00(0.94)
后颞宽	0.39~0.44	0.43~0.46(0.44)	0.37~0.45(0.41)
后颞狭	—	0.23~0.30(0.26)	0.22~0.25(0.24)
前胸背板长	0.48	0.54~0.63(0.57)	0.47~0.52(0.51)
前胸背板宽	0.93~1.01	1.04~1.18(1.12)	0.87~0.98(0.93)
注：括号内各项的数值为该项目的平均值。			

附录 D
(资料性附录)
大家白蚁兵蚁特征图

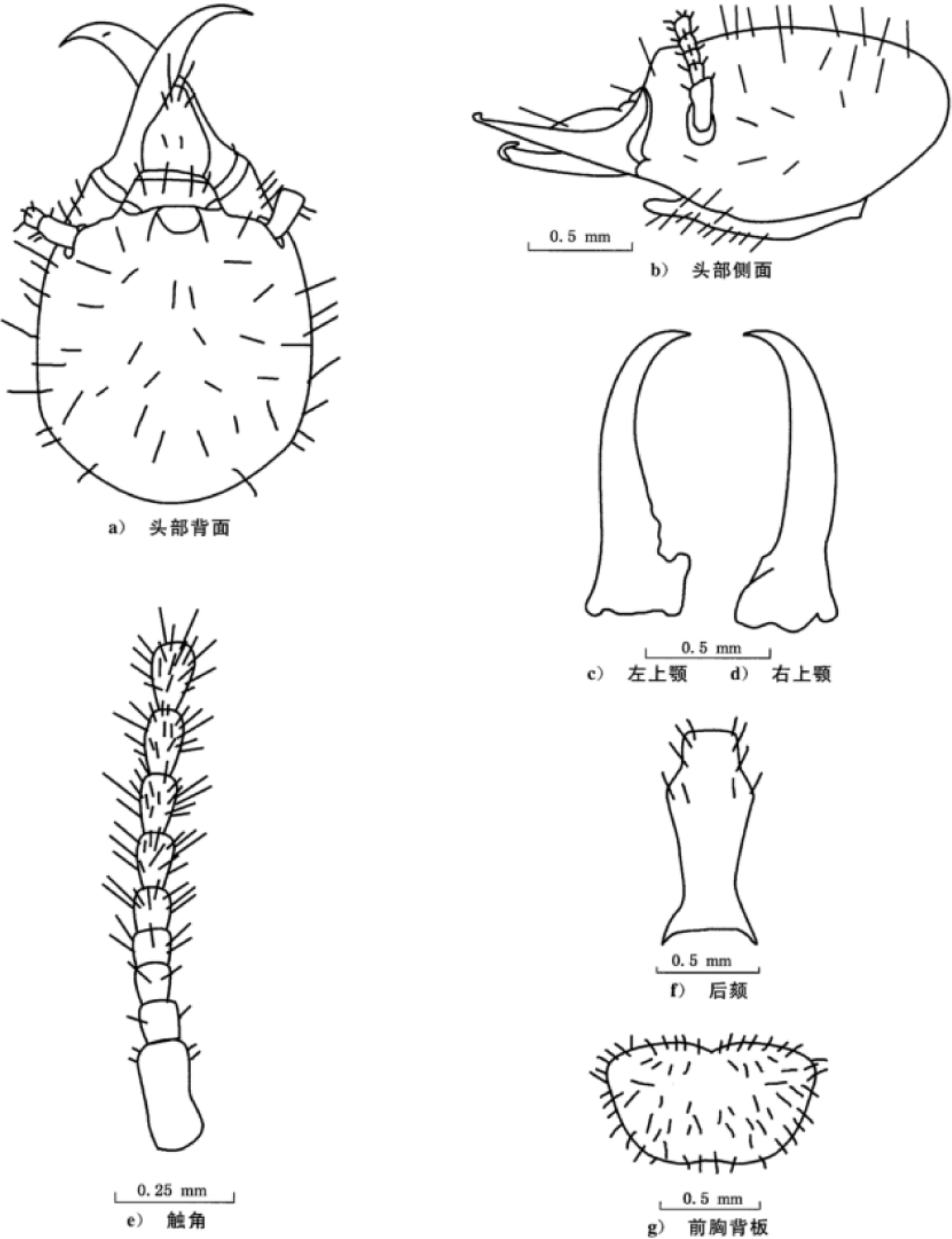


图 D.1 大家白蚁兵蚁特征图(仿 R.S.Thapa)

附 录 E
(资料性附录)
大家白蚁兵蚁及危害状



图 E.1 大家白蚁兵蚁图

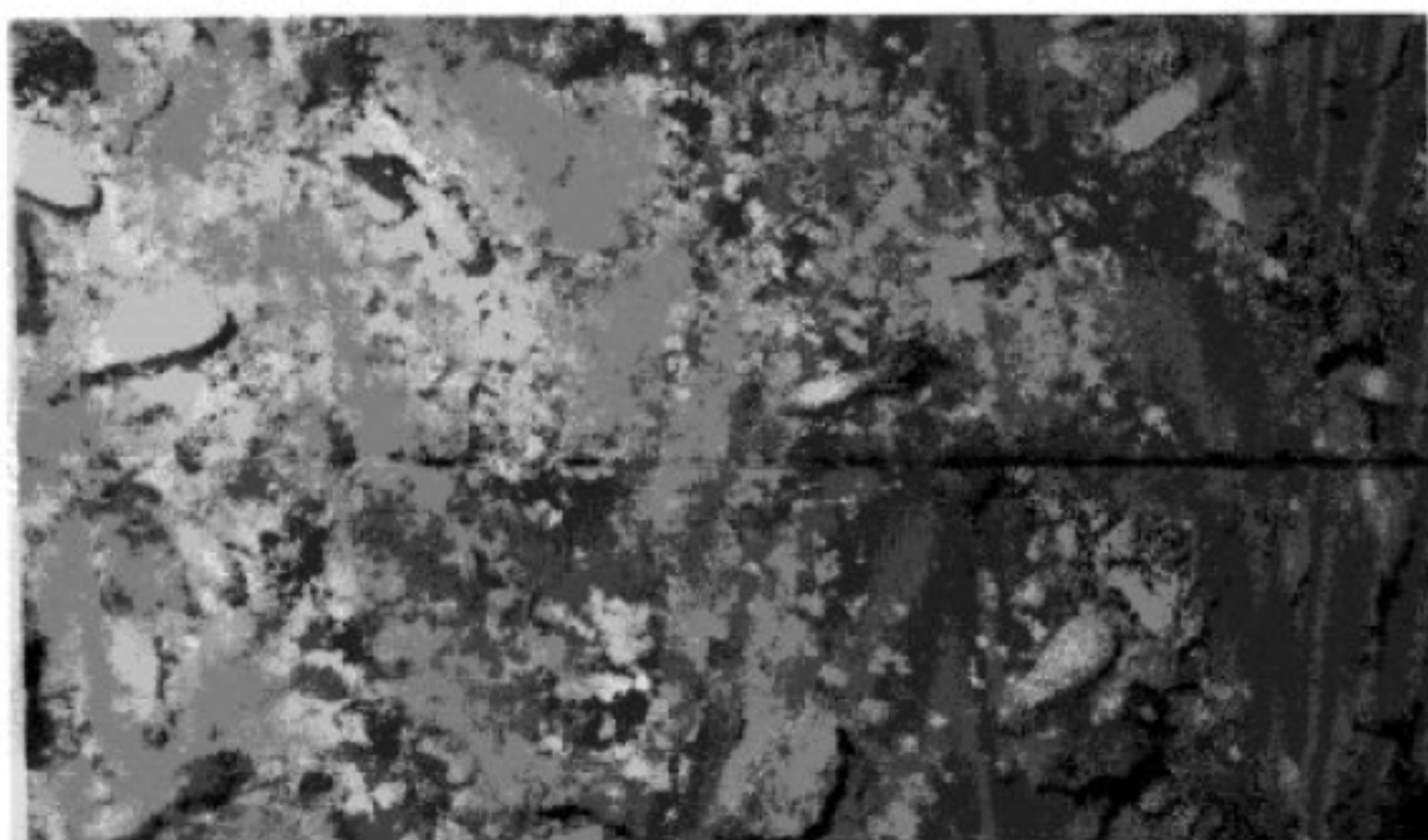
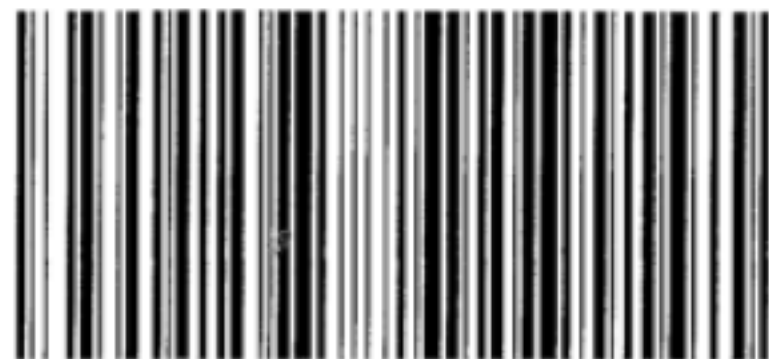


图 E.2 大家白蚁危害状

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国农业部植物检疫实验所.中国进出境植物检疫有害生物选编[M].北京:中国农业出版社,1997.
- [2] 安榆林.外来森林有害生物检疫[M].北京:科学出版社,2012.
- [3] 周明华,杜国兴,冉俊祥,等.乳白蚁的生物学特征与口岸植物检疫[J].植物检疫,2002,16(4):215-219.
- [4] 耿秉晋主编.中国植物检疫性害虫图册[M].北京:中国农业出版社,1999,2-3.
- [5] 陈乃中.中国进境植物检疫性有害生物——昆虫卷[M].北京:中国农业出版社,2009.
- [6] 平正明,齐桂臣.曲颚乳白蚁[J].植物检疫,1992,6(4):267.
- [7] 陈兰芬,赖学文.天津口岸截获到曲颚乳白蚁[J].植物检疫,1992,6(4):269-270.
- [8] 黄复生,李桂祥,朱世模.中国白蚁学论文选[M].武汉:天则出版社,1989,33-109.
- [9] 黄远达.中国白蚁学概论[M].武汉:湖北科学技术出版社,2001,149-153.
- [10] 郑建中,叶军,金翕.我国口岸从东南亚进口货物中截获的白蚁[J].植物检疫,1999,13(4):224-231.
- [11] 余道坚,陈志舜,康林.进口原木中截获的邻白蚁[J].植物检疫,2001,15(1):34-35.
- [12] 余道坚,陈志舜.进口印尼原木中截获的两种白蚁[J].植物检疫,2001,15(4):227-228.
- [13] 王建国.分子系统学方法在白蚁分类中的应用[D]广州:华南农业大学,2004.
- [14] Tracie M.Jenkins,Susan C.Jones,Chow-Yang Lee,et al.Phylogeography illuminates maternal origins of exotic *Coptotermes gestroi*(Isoptera:Rhinotermitidae)[J].Molecular Phylogenetics and Evolution,2007,42:612-621.



SN/T 1105-2014

书号:155066·2-29348

定价: 18.00 元