



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4873—2017

西班牙根结线虫检疫鉴定方法

Detection and identification of *Meloidogyne hispanica* Hirschmann 1986

2017-07-21 发布

2018-03-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

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：中华人民共和国珠海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：迟远丽、黄永辉、廖佳、权永兵、廖力、张卫东、徐森锋。

西班牙根结线虫检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了西班牙根结线虫的检疫鉴定方法。

本标准适用于进出境植物及其繁殖材料、土壤及栽培介质中西班牙根结线虫的检疫和鉴定。

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。

SN/T 1157—2014 进出境植物苗木检疫规程

SN/T 1158—2011 进出境植物盆景检疫规程

SN/T 2117—2008 伪哥伦比亚根结线虫检疫鉴定方法

3 符号和缩略语

下列符号和缩略语适用于本文件。

n ——测计的标本数。

L ——体长。

W ——虫体宽(雌虫、卵为虫体宽度,雄虫和二龄幼虫为最大体宽)。

HH ——头区高度。

HW ——头区宽度。

Wep ——排泄孔处的虫体宽度。

a ——体长/最大体宽。

c ——体长/尾长。

NL ——雌虫颈的长度。

NW ——雌虫颈的宽度。

$V-A$ ——阴门到肛门的距离。

ST ——口针长度。

$STKH$ ——口针基部球高度。

$STKW$ ——口针基部球宽度。

DGO ——背食道腺开口到口针基部球的距离。

EP ——排泄孔至体前端的距离。

MEL ——中食道球长度。

MEW ——中食道球宽度。

SPI ——交合刺长度。

$Testis$ ——精巢长度。

$Tail$ ——尾长。

TTL ——透明尾的长度。

4 基本信息

中文名称:西班牙根结线虫

中文别名:塞维利亚根结线虫

学名:*Meloidogyne hispanica* Hirschmann 1986

英文名:Seville root-knot nematode

分类地位:线虫门(Nematoda),无侧尾腺纲(Adenophorea),垫刃目(Tylenchida),异皮科(Heteroderidae),根结亚科(Meloidogyninae),根结属(*Meloidogyne* Goeldi, 1892)。

西班牙根结线虫是一类非常重要的植物内寄生线虫,危害寄主植物的根部,引起根部组织受损,皮层增厚,侧根增生,长势变弱,造成根系肿大或坏死。西班牙根结线虫主要通过苗木、土壤及栽培介质传播扩散,成熟雌、雄虫形态、会阴花纹特征等是该线虫检验鉴定的主要依据,寄主范围、地理分布等信息可供参考(参见附录 A)。

5 方法原理

将送检的样品进行线虫分离,得到的成熟雌、雄线虫及二龄幼虫悬浮液制成临时玻片或永久玻片,在生物显微镜下观察线虫形态并进行测量、摄影及描述等工作。根据形态特征和形态特征测计值进行线虫的检疫鉴定。

6 仪器、用具和试剂

6.1 仪器

生物显微镜(具测微尺和照相机)、体视显微镜(具透射光源)、恒温培养箱、冰箱、离心机。

6.2 用具

钟面皿或培养皿、盖玻片、载玻片、挑针、酒精灯、线虫滤纸或纱布、离心管、贝曼漏斗分离器、乳胶管、止水夹、加热板、水桶、标准套筛(40目~500目)、移液器、干燥器、记号笔。

6.3 试剂

4%甲醛、甘油、指甲油、石蜡、溶液 I (96%乙醇:甘油:蒸馏水=20:1:79)、溶液 II (甘油:96%乙醇=1:19)。

7 现场检疫

首先观察苗木的生长状况,有无长势变弱、萎蔫或坏死等症状,然后对植物或种苗的根、茎根、根状茎等地下部分进行检查,重点选取根部组织肿大,有粒状突起,侧根增生的苗木及根际介质或土壤,如无可疑症状按规定进行随机取样(具体操作见 SN/T 1157—2014 中 5.3 和 SN/T 1158—2011 中 5.2)。取样后立即置于密封塑料袋中,标记后及时送实验室检验。

8 实验室鉴定

8.1 线虫分离

在体视显微镜下,能看到球状虫体或卵块的植物组织可采用直接法将线虫剥离到培养皿中;未见到

任何症状的植物根剪成小段,块茎切碎后用贝曼漏斗法分离线虫,土壤和其他介质等采用过筛法或贝曼漏斗法进行线虫分离(具体操作见 SN/T 2117—2008 中 7.1)。

8.2 体视显微镜镜检

分离到的线虫、幼虫和雄虫直接做成临时玻片或永久玻片,成熟雌虫需制作会阴花纹的临时玻片或永久玻片,在显微镜下进行形态观察、测量和描述拍照(玻片制作见 SN/T 2117—2008 中的附录 C)。

8.3 生物显微镜观察、摄影和测量

将制作的线虫玻片置于生物显微镜下,观察线虫的形态特征,并对会阴花纹形态、头部及尾部形态等进行摄影,测量相应的测计值。

9 形态鉴定特征及测计值

9.1 根结线虫属(*Meloidogyne* Goeldi, 1892)的主要鉴别特征

成熟雌虫虫体膨大呈梨形或球形,具突出的颈,头架弱,口针细,长度一般小于 25 μm ,排泄孔位于中食道球前水平处,双卵巢,阴门和肛门位于末端,无尾。会阴部有指纹状花纹。雄虫蠕虫形,体细长,头架和口针强壮,食道峡部粗短,尾短,无交合伞,交合刺粗壮。二龄幼虫蠕虫形,头架和口针细弱,具透明尾或不明显,后期膨大固着,3、4 龄幼虫在 2 龄幼虫脱落的角质层内形成,无口针。

9.2 西班牙根结线虫(*M. hispanica*)形态特征

9.2.1 西班牙根结线虫成熟雌虫形态特征(参见附录 B 图 B.1 和附录 C 图 C.1)

虫体乳白色,卵形至球形,颈细长,与虫体分界明显,头区无环纹,与虫体分界不明显。口针纤细,锥体部略向背面弯曲,基杆圆柱形或基部略粗,口针基部球宽阔,彼此分离明显,且前缘向后倾斜,与基杆分界明显。排泄孔位置变化较大,大多位于 DGO 处,有时靠近头端。会阴花纹卵圆形至长方形,背弓通常较低,少数较高。背纹线从纤细、波浪至粗糙,腹面线纹通常细弱平滑,并在腹面一侧形成翼,侧线明显多分叉。尾端和阴门区无线纹,阴门侧缘有少量线纹,阴门边缘具微钝齿形,侧尾腺管明显。

9.2.2 西班牙根结线虫成熟雄虫形态特征(参见附录 B 图 B.2 和附录 C 图 C.2)

虫体粗壮,前端略细,后端钝圆,体表环纹大而明显,头冠高,向后覆盖头区。唇盘与中唇融合结合处明显凹陷。唇盘较大,稍高于中唇,中唇新月形,外缘平滑。口针粗大,锥体直,尖,向后渐粗,基杆圆柱形,基部球状,与基杆略分离。侧线 4 条,偶尔在中间看到第 5 条断续的侧线。交合刺引带典型垫刃型,尾短。

9.2.3 二龄幼虫形态特征(参见附录 B 图 B.3 和附录 C 图 C.3)

虫体细长,体环纹明显。头区平截,与虫体明显分离。头冠低,狭于头区。口针尖细,基杆圆柱形向后微加粗,基部球大,明显分离,圆形向后倾斜。侧区具有 4 条侧线,不网格化,外侧的侧线呈锯齿状。直肠膨大明显。尾细长,稍向腹面弯,末端钝圆,尾部透明区末端不明显。

9.3 西班牙根结线虫测计值

西班牙根结线虫测计值见表 1。

表 1 西班牙根结线虫测计值

形态指标	测量值			
<i>n</i>	♀♀(30 条)	♂♂(30 条)	二龄幼虫(50 条)	卵(50 粒)
<i>L</i> /μm	830(570~1 180)	1 677.6 (1 340.6~1 990)	392.6 (356.4~441.4)	91.5(80~105)
<i>W</i> /μm	503(330~740)	41.1(32.4~47.4)	14.5(13.4~15.8)	42.4(37~52)
<i>HH</i> /μm	—	7.6(7.0~8.1)	2.7(2.4~3.1)	—
<i>HW</i> /μm	—	12.8(11.8~13.7)	5.4(4.8~5.7)	—
<i>NL</i> /μm	232.7(140~440)	—	—	—
<i>NW</i> /μm	129.8(60~200)	—	—	—
<i>V-A</i> /μm	19(17.2~22.6)	—	—	—
<i>a</i>	1.7(0.9~2.2)	41.2(31.4~61.4)	27.1(24.6~30.9)	—
<i>c</i>	—	128.1(98.2~172.6)	8.5(7.7~9.4)	—
<i>ST</i> /μm	14.1(13.6~14.6)	23.5(21.7~24.3)	11.1(10.4~11.9)	—
<i>STKH</i> /μm	2.5(2.1~2.8)	3.2(2.9~3.5)	1.4(1.2~1.6)	—
<i>STKW</i> /μm	4.6(4.1~5.1)	5.6(5.1~6.1)	2.6(2.3~3.4)	—
<i>DGO</i> /μm	3.2(2.8~4.0)	2.5(1.4~3.6)	2.8(2.2~3.4)	—
<i>EP</i> /μm	30.5(11.9~71.1)	181.5(148.6~254.1)	80.1(73.9~86.0)	—
<i>MEL</i> /μm	48.8(39.5~63.2)	—	—	—
<i>MEW</i> /μm	45.5(39.5~52.6)	—	—	—
<i>Tail</i> /μm	—	13.3(10.7~16.2)	46.4(41.1~53.4)	—
<i>Wep</i> /μm	—	33.6(28.8~38.6)	13.9(13.1~15.0)	—
<i>SPI</i> /μm	—	32.1(31.1~33.7)	—	—
<i>Testis</i> /μm	—	808.4(650~1 150)	—	—
<i>TTL</i> /μm	—	—	12.6(11.4~13.3)	—
注：♀♀，♂♂，卵的测量值参照 Hirschmann(1986)，二龄幼虫参照 Hirschmann(1986) 和 Karssen & Van Hoenselaar(1998)，—表示空白。				

9.4 西班牙根结线虫与近似种的区别

西班牙根结线虫与南方根结线虫(*M. incognita*)形态上极为相似,主要区别见表 2。

表 2 西班牙根结线虫与南方根结线虫的主要形态区别

形态特征	西班牙根结线虫	南方根结线虫
雌虫口针	锥体部稍向背面弯曲	锥体部明显向背面弯曲
会阴花纹	侧线明显,通常具有褶皱纹;背弓通常低	侧线不明显,背弓高而方

表 2 (续)

形态特征	西班牙根结线虫	南方根结线虫
雄虫头部	头冠非常高、圆,向后延伸到明显缢缩的头区上	头冠平到凹陷,与头区分界明显,头部不缢缩
二龄幼虫口针	口针基部球大,明显向后倾斜,口针基部球宽 2.3 μm ~3.4 μm	口针基部球小,向后倾斜,口针基部球宽 1.2 μm ~2.3 μm
二龄幼虫透明尾	尾后部有不规则环纹,透明末端不明显	尾透明末端明显或不明显,有弯曲或缢缩

10 结果判定

主要以成熟雌、雄虫的形态特征及测计值作为西班牙根结线虫鉴定的依据,符合 9.2 形态鉴定特征及 9.3 形态测计值的线虫可判定为西班牙根结线虫,二龄幼虫形态特征及测计值、寄主和地理分布等信息供参考。

11 样品保存

若鉴定为西班牙根结线虫,则将剩余的线虫杀死、固定制成永久玻片保存;也可以用 4% 甲醛固定后长期保存。应保存的记录信息包括样品编号、为害症状、样品来源、有害生物的学名、测量数据、显微照片等信息。标本的标签上应注明标本鉴定人、鉴定时间、寄主、产地、制作人和制作时间等信息。

对已鉴定出带有西班牙根结线虫的剩余样品材料,经记录后妥善保存,保存期至少为 6 个月,以备复验、谈判和仲裁。保存期满后做销毁处理。

附 录 A
(资料性附录)

西班牙根结线虫基本信息

A.1 寄主范围

主要寄主有茄子(*Solanum melongena*)、番茄(*Lycopersicon esculentum*)、甜菜(*Beta vulgaris*)、葡萄(*Vitis vinifera*)、西兰花(*Brassica oleracea*)、康乃馨(*Dianthus caryophyllus*)、玉米(*Zea mays*)、黄瓜(*Cucumis sativus*)、大蒜(*Allium sativum*)、莴苣(*Lactuca sativa*)、甜瓜(*Cucumis sativus*)、南瓜(*Cucurbita moschata*)、洋葱(*Allium cepa*)、洋芹(*Apium graveolens*)、豌豆(*Phaseolus vulgaris*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*)、菠菜(*Spinacia oleracea*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)、甘蓝(*Brassica oleracea*)、无花果(*Ficus carica*)、香蕉(*Musa* sp.)、甘蔗(*Saccharum officinarum*)、金鱼草(*Antirrhinum majus*)、苋属(*Amaranthus* sp.)、玻璃海棠(*Begonia margaritae*)、番木瓜(*Carica papaya*)等。

A.2 地理分布

欧洲：法国、俄罗斯、西班牙、保加利亚、意大利、匈牙利、波兰、斯洛伐克、罗马尼亚、荷兰。
非洲：毛里求斯、南非、肯尼亚、马拉维、布基纳法索、佛得角群岛。
美洲：美国、巴西、委内瑞拉、秘鲁、洪都拉斯、马提尼克。
亚洲：乌兹别克斯坦、以色列、韩国、中国(海南省)。
大洋洲：澳大利亚、斐济群岛。

A.3 危害症状

西班牙根结线虫的危害主要是直接影响根部的生长发育,造成植物根部膨大形成肿瘤,进而使植物的营养及水分运输受阻,造成植物产量和品质下降,严重的甚至死亡。受害寄主地上部分危害较轻时症状不明显,较重时主要表现为黄化萎蔫、矮化、发育不良等症状。地下部的典型症状是形成根结,块茎、块根等表面形成疙瘩、疮痂等,严重时腐烂、变褐。

A.4 传播途径

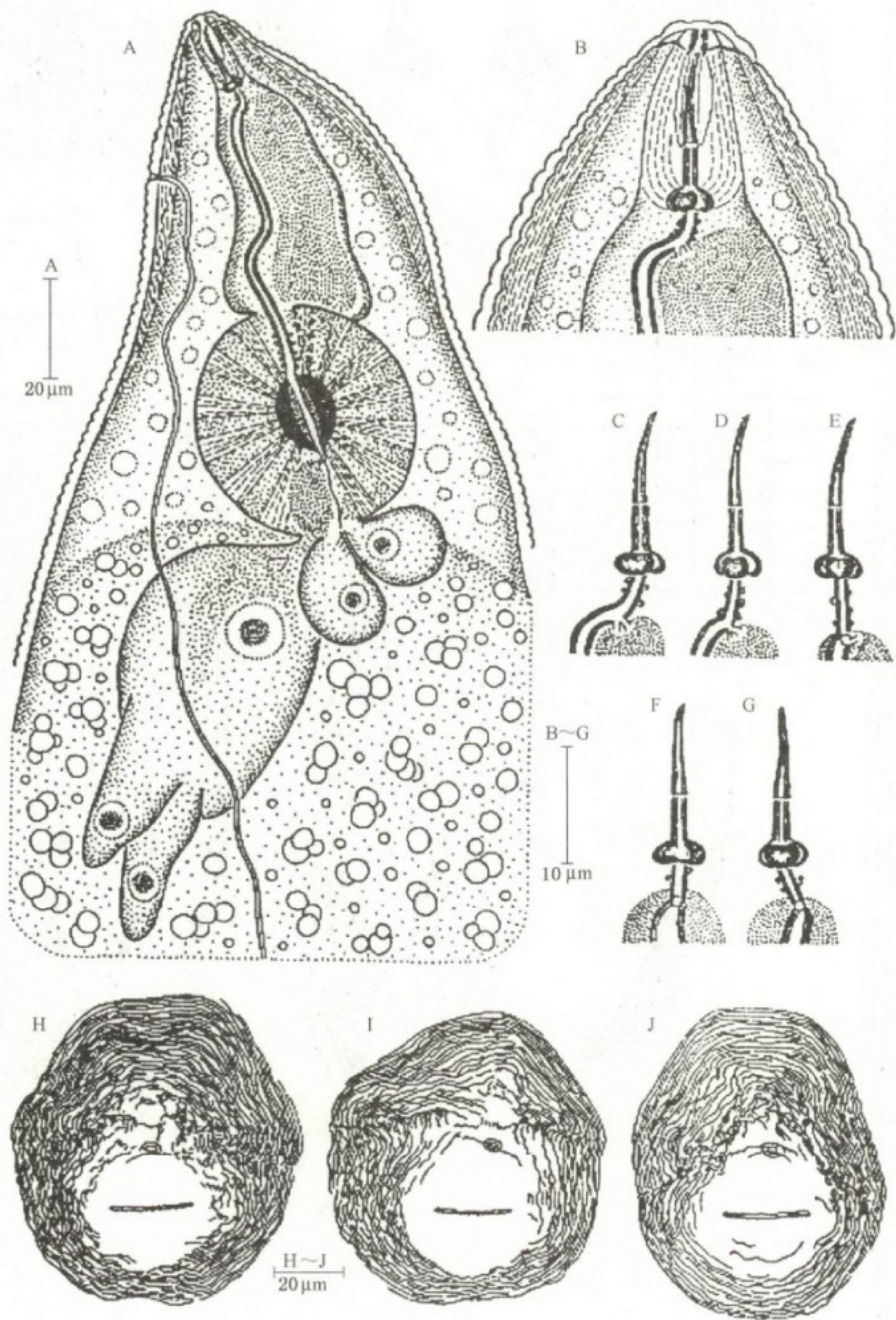
随被感染的植株、介质土壤和其他被感染的材料如块根、块茎、鳞球茎等进行远距离传播。

A.5 生物学特性

西班牙根结线虫是植物固着性内寄生线虫,主要以二龄幼虫侵染植物的地下部分,其还可以寄生含有 MI 抗性基因的番茄品种。该线虫进行专性有丝孤雌生殖,染色体数为 $2n=33\sim36$,温度在 $10\text{ }^{\circ}\text{C}\sim35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时该线虫可以进行繁殖发育, $25\text{ }^{\circ}\text{C}\sim30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时的胚胎发育速度是 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的两倍, $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的四倍,低于 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或高于 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 则停止发育。较强的温度适应范围使该线虫具有较强的适应性,能够从南到北进行传播危害。

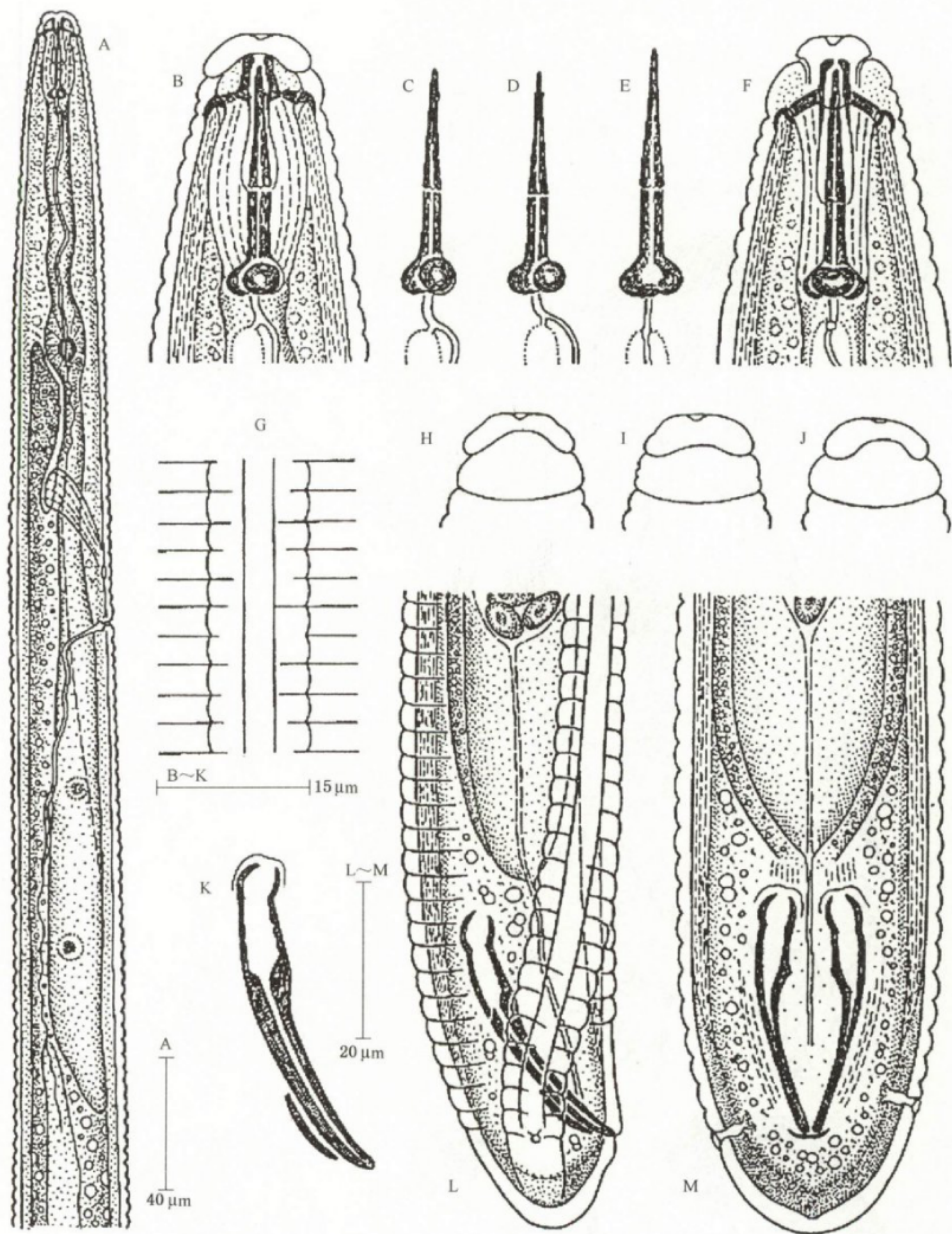
附录 B
(资料性附录)
西班牙根结线虫墨线图

西班牙根结线虫墨线图见图 B.1～图 B.3。



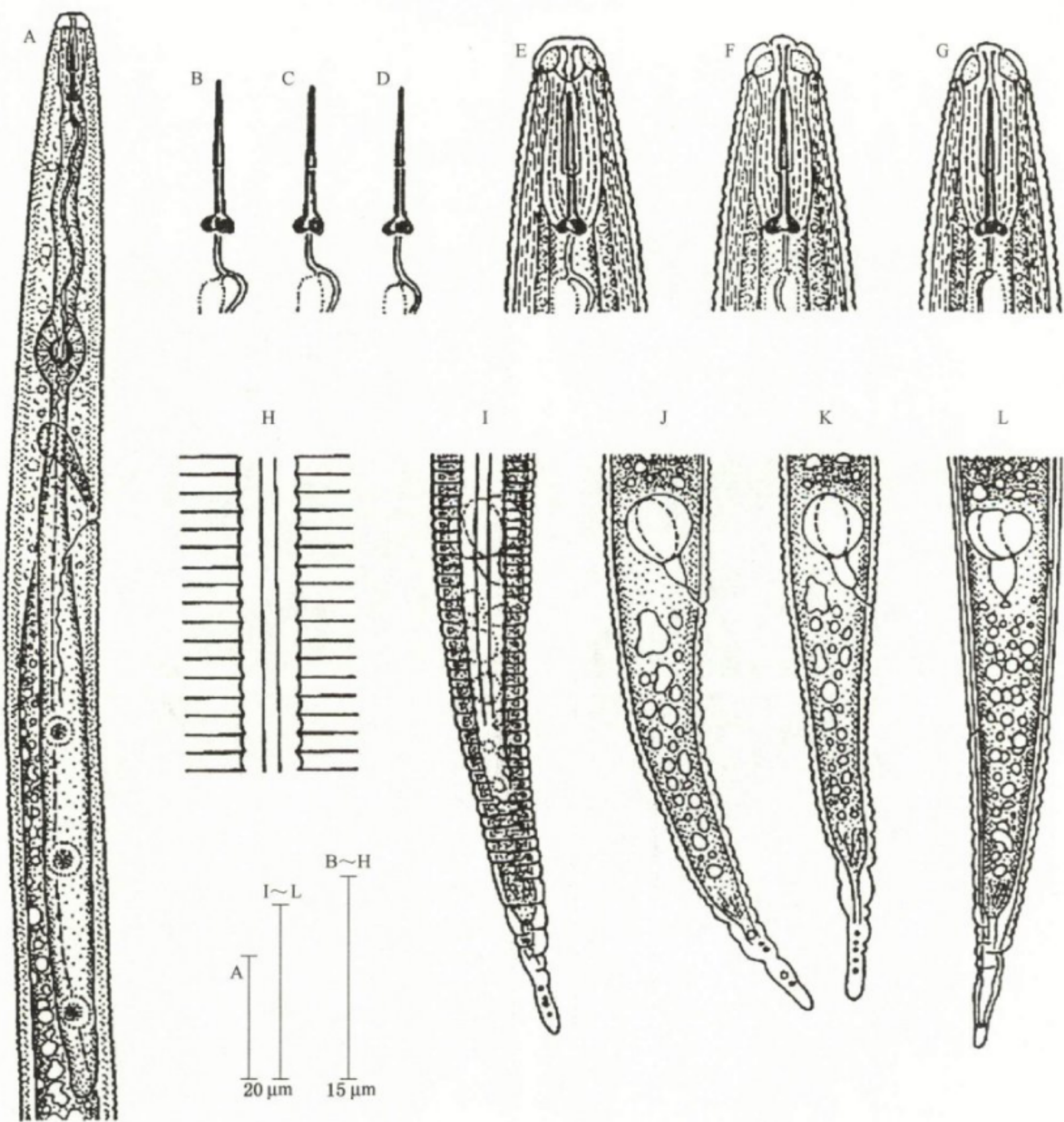
说明：
A——食道；B——头部；C～G——口针；H～J——会阴花纹。
注：引自 Hirschmann, 1986。

图 B.1 西班牙根结线虫雌虫墨线图



说明：
A —— 前体部；
B、F —— 头部；
C~E —— 口针；
G —— 侧线；
H~J —— 头区形状；
L~M —— 尾部；
K —— 交合刺。
注：引自 Hirschmann, 1986。

图 B.2 西班牙根结线虫雄虫墨线图

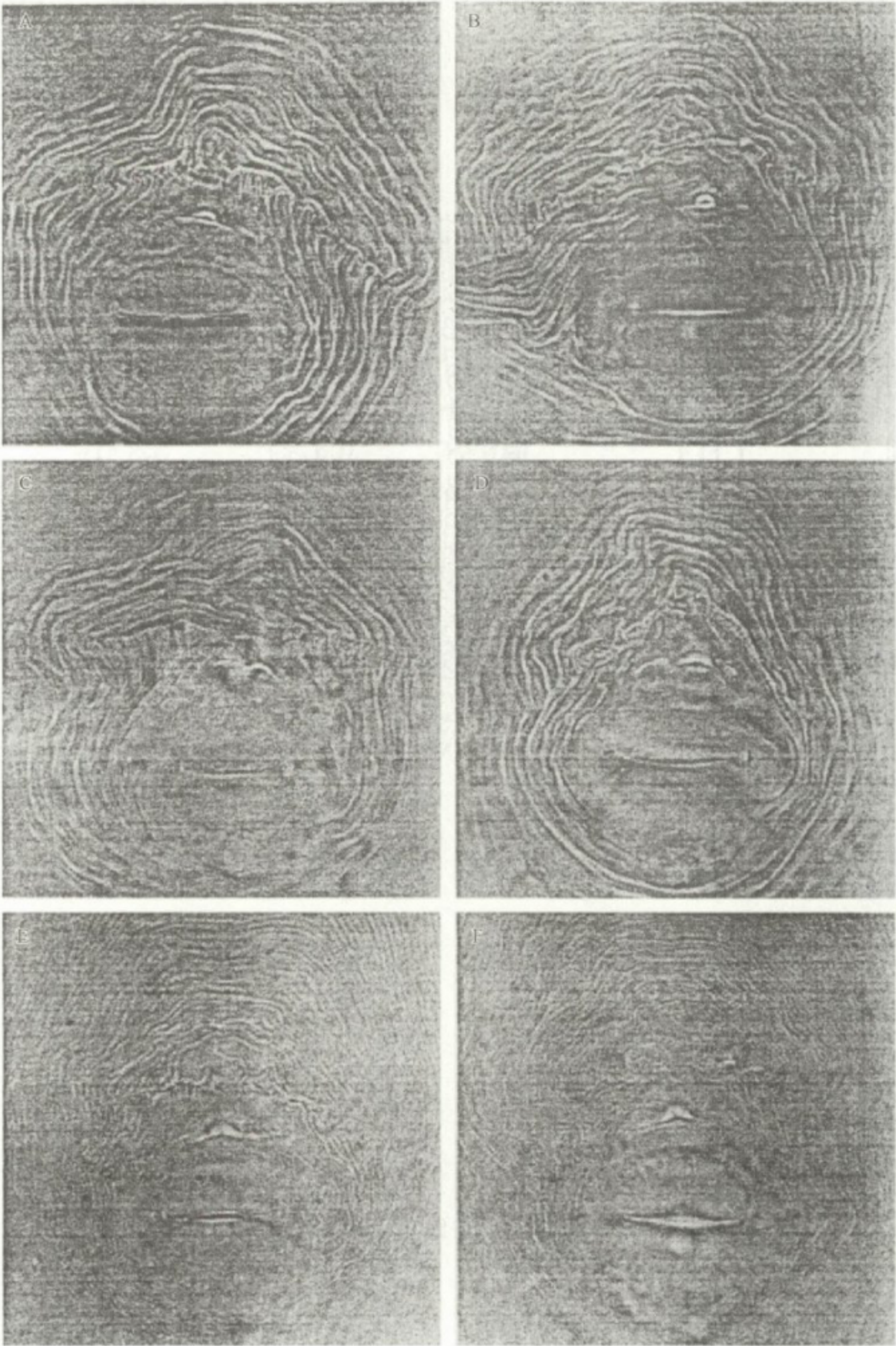


说明：
A ——前体部；
B~D ——口针；
E~G ——头部；
H ——侧线；
I~L ——尾部。
注：引自 Hirschmann,1986。

图 B.3 西班牙根结线虫二龄幼虫墨线图

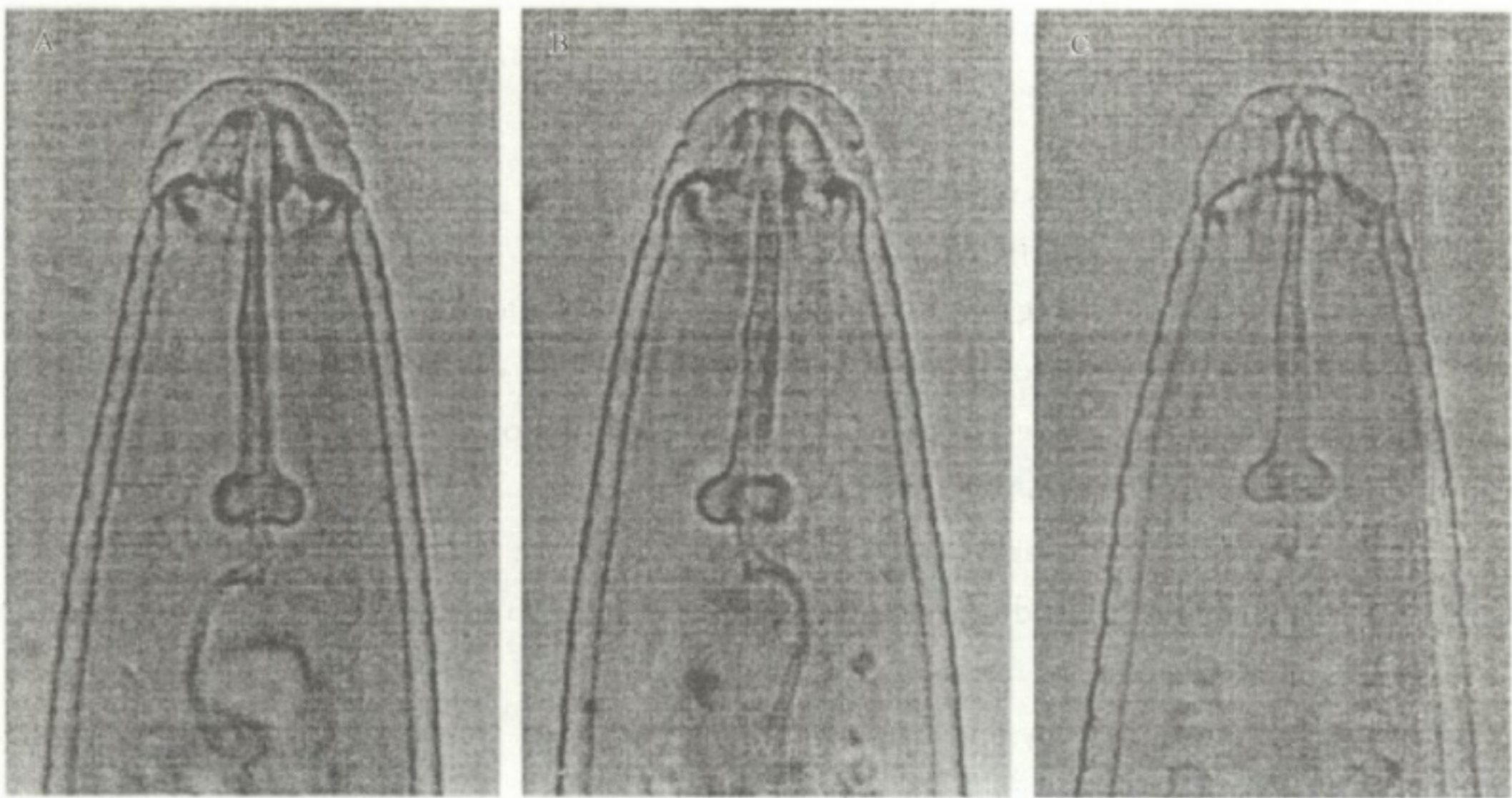
附录 C
(资料性附录)
西班牙根结线虫显微图

西班牙根结线虫显微图见图 C.1～图 C.3。



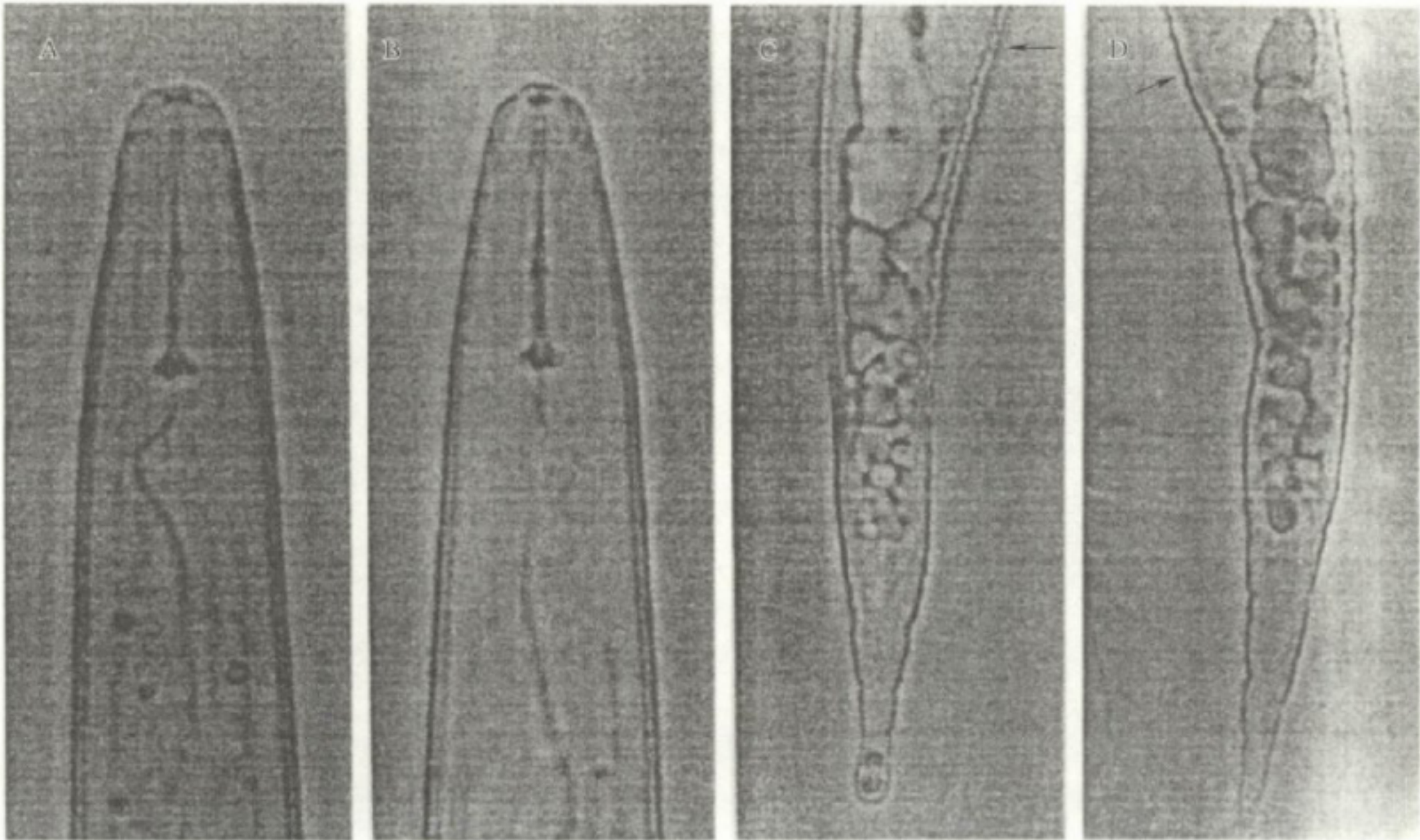
说明：
A～F——会阴花纹。
注：引自 Hirschmann, 1986。

图 C.1 西班牙根结线虫雌虫会阴花纹显微图



说明：
A~C——雄虫头部。
注：引自 Hirschmann,1986。

图 C.2 西班牙根结线虫雄虫头部显微图



说明：
A~B——二龄幼虫头部；
C~D——二龄幼虫尾部。
注：引自 Hirschmann,1986。

图 C.3 西班牙根结线虫二龄幼虫头部和尾部显微图

参 考 文 献

- [1] 刘维志.植物线虫志.北京:中国农业出版社,2004.
 - [2] 简恒.植物线虫学.北京:中国农业出版社,2011.
 - [3] Hirschmann H.*Meloidogyne hispanica*.sp.(nematoda;*Meloidogynidae*), the“seville Root-Knot nematode”.*Journal of Nematology*(1986)18,520-532.
 - [4] Carla M.N.Maleita,Rosane H.C.Curtis,et al.Host status of cultivated plants to *Meloidogyne hispanica*.*Eur J Plant Pathol*(2012)133,449-460.
 - [5] Carla M.N.Maleita,Rosane H.C.Curtis,et al.Inoculum levels of *Meloidogyne hispanica* and *M.javanica* affect nematode reproduction,and growth of tomato genotypes *Phytopathologia Mediteranea*(2012)51,3,566-576.
 - [6] Carla M.N.Maleita.Biology and Ecology of the Root-Knot Nematode *Meloidogyne hispanica*.Universidade de Coimbra faculdade de ciencias e tecnologia,2011.
-