

本诊断规程于 2016 年 1 月由标准委员会代表植物检疫措施委员会通过。

本附件为 ISPM 27 标准规定的一部分。

## ISPM 27

### 限定有害生物诊断规程

#### DP 10: 松材线虫 (*Bursaphelenchus xylophilus*)

2016 年通过；2018 年出台

#### 目录

1. 有害生物信息 .....	2
2. 分类信息 .....	3
3. 检测 .....	4
3.1 树木中的检测 .....	4
3.2 使用昆虫诱捕器、诱集原木，以及在取自锯木厂与木材堆放场的样品中检测 .....	5
3.3 在木材、木质产品与实木包装材料中直接检测 .....	5
3.4 从木材样品中分离线虫 .....	6
3.5 从媒介昆虫中分离线虫 .....	6
4. 鉴定 .....	7
4.1 形态学鉴定 .....	8
4.1.1 标本制备 .....	8
4.1.2 分种检索表 .....	9
4.1.3 松材线虫与相似种的比较 .....	13
4.2 分子鉴定 .....	14
4.2.1 ITS-PCR RFLP .....	15
4.2.2 常规 PCR .....	17
4.2.3 实时 PCR .....	19
4.2.4 基于 RNA 的检测活松材线虫的分子检测方法 .....	21
4.2.5 LAMP .....	23
4.2.6 分子检测的对照 .....	24
4.2.7 PCR 结果的解释 .....	25
4.2.8 测序 .....	25
5. 记录 .....	26
6. 获取进一步信息的联系点 .....	26
7. 致谢 .....	27
8. 参考文献 .....	28
9. 图 .....	33

## 1. 有害生物信息

松材线虫（*Bursaphelenchus xylophilus*（Steiner 和 Buhrer, 1934）Nickle, 1970）是松树萎蔫病的致病因子。松材线虫据信最早发生在北美洲，广泛分布于加拿大和美国（Ryss 等, 2005），在墨西哥分布极为有限（Dwinell, 1993）。北美洲的松树种类能够抵抗或者至少耐受松材线虫，但在北美洲，尤其是在较温暖的美国南部地区种植的外来松树种类被该线虫侵染后会引起死亡。

据推测松材线虫是在 20 世纪初通过输自北美洲的木材传入日本，成为该国最具危害的林业有害生物之一，今天仍然对松树（赤松（*Pinus densiflora*）、黑松（*P. thunbergii*）及琉球松（*P. luchuensis*））造成严重损失。松材线虫还传入了中国（包含台湾）和朝鲜；20 世纪 80 年代中后期在这些地区相继发生。1999 年，欧洲（葡萄牙）首次在海岸松（*P. pinaster*）上发现松材线虫，侵染后几个月内松树相继因该线虫导致死亡（Mota 等, 1999；Fonseca 等, 2012）。葡萄牙和西班牙的欧洲黑松（*P. nigra*）与辐射松（*P. radiata*）上也分别发现了松材线虫（Inácio 等, 2014；Zamora 等, 2015）。2008 年，西班牙首次发现松材线虫（Abelleira 等, 2011）。

松材线虫由木栖性墨天牛属（*Monochamus*（鞘翅目（Coleoptera）：天牛科（Cerambycidae）））甲虫在树与树之间传播（Linit, 1990；Evans 等, 1996）。线虫在天牛从蛹中羽化后不久，即将从寄主树木中蛀孔离开前进入其体内（Wingfield, 1987）。天牛飞至健康树木的冠层，取食幼枝和树叶（成虫补充营养）。它们随后交配，取决于墨天牛的种类，雌虫寻找树势衰弱或新近死亡的树木，或树干或大枝条（包含倒伏的残体），在树皮中产卵。天牛幼虫从卵中孵化，随后几个月取食树皮下的形成层组织。快成熟时，它们蛀入木材深处化蛹，进而完成其生活史。利用这一生活史，松材线虫可以传播给新的寄主树木（Wingfield, 1987）。它们可以在天牛产卵过程中传播给新树木（这可能是寄生死亡树木的几种伞滑刃属（*Bursaphelenchus*）线虫唯一的传播方式）（Edwards 和 Linit, 1992）。然而，松材线虫似乎在这些线虫种类中具有独特性，也可以在成虫补充营养的过程中传播给新的树木，通过嫩枝传播最终可以引起松树萎蔫病发生（Wingfield, 1987）。

当松材线虫在产卵过程中传播时，线虫停留在距离传入位置相对较近的地方。但是当通过幼枝传播，且树木死于松树萎蔫病时，线虫会分布于整株树木，毁坏轴向或放射状树脂道的上皮细胞和薄壁细胞、形成层和韧皮部等木材组织。松材线虫也可以在根部发现，即便树木的地上部分已经死亡、干枯或倒伏。树木是否会发展成松树萎蔫病取决于松树种类（一般而言，只有非美洲起源的各种松属树木会被侵染）、其健康状况和气候条件（特别是温度和水分供给）。这些因素也会影响线虫在树木内的分布：它们可以局部分布或不规则分布，抽样策略应考虑到这一点（Schröder 等, 2009）。

松材线虫也可以在冷杉属 (*Abies*)、扁柏属 (*Chamaecyparis*)、雪松属 (*Cedrus*)、落叶松属 (*Larix*)、云杉属 (*Picea*)、黄杉属 (*Pseudotsuga*) 和其他针叶类 (崖柏属 (*Thuja* spp.) 除外) 死树上发现, 但已知这些属都不会感染松树萎蔫病, 尽管在苗木上所做的致病性试验表现出明显的反应, 包含死亡 (Evans 等, 1996)。

松材线虫几乎只由各种墨天牛属天牛传播, 而且不同地理区域间的传播媒介种类不同; 例如中国和日本有松褐天牛 (*M. alternatus*)、日本有云杉花墨天牛 (*M. saltuarius*)、北美洲有卡罗来纳墨天牛 (*M. carolinensis*), 葡萄牙有樟子松墨天牛 (*M. galloprovincialis*)。偶尔会发现天牛科或鞘翅目其他甲虫身体上携带松材线虫的“休眠”幼虫, 但没有证据显示它们在该线虫的传播方面起着媒介作用 (Evans 等, 1996)。

已知人类活动是松材线虫远距离传播的主要途径, 很多情况下都在木材、木质产品国际贸易中, 特别是在针叶树加工成的实木包装材料中截获到松材线虫及其传播媒介。因此, 在国际上进一步扩散的风险很高。

尽管松材线虫及其媒介甲虫造成极高的传播风险, 但松材线虫从受侵染木材到未受侵染木材或树木的传播只有在特定情况下才会发生: 供体与受体木材直接接触、受体木材含水量很高或受体树木上有伤口 (Sousa 等, 2011; Hopf 和 Schroeder, 2013)。

有关松材线虫的生物学、其传播媒介、松树萎蔫病、地理分布、贸易和经济影响, 以及管理策略的更详细的信息可参阅以下综合性书籍: Kishi (1995); Mota 和 Vieira (2004); Mota 和 Vieira (2008); 以及 Zhao 等 (2008)。

## 2. 分类信息

**学名:** *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner 和 Buhrer, 1934) Nickle, 1970

**异名:** *Aphelenchoides xylophilus* Steiner 和 Buhrer, 1934  
*Paraphelenchoides xylophilus* (Steiner 和 Buhrer, 1934) Haque, 1967  
*Bursaphelenchus lignicolus* Mamiya 和 Kiyohara, 1972

**分类地位:** 线虫纲 (Nematoda), 小杆目 (Rhabditida), 垫刃亚目 (Tylenchina), 滑刃总科 (Aphelenchoidea), 滑刃科 (Aphelenchoididae), 寄生滑刃亚科 (Parasitaphelenchinae), 伞滑刃属 (*Bursaphelenchus*)

**通用名:** 松材线虫

### 3. 检测

松材线虫具有 6 个生活阶段：卵、4 个幼虫阶段及随后的成虫阶段。在卵中 1 龄幼虫（J<sub>I</sub>）蜕皮成为 2 龄幼虫（J<sub>2</sub>）。2 龄幼虫从卵中孵化，并在成虫阶段前再经历 2 个幼虫龄期（J<sub>3</sub> 与 J<sub>4</sub>）。不同类型的幼龄线虫出现在不同的条件下。在 25°C 的有利条件下，松材线虫从卵开始，经过 4 个繁殖阶段的幼虫龄期（J<sub>I</sub> 至 J<sub>4</sub>），在 4 天内到达成虫阶段（Hasegawa 和 Miwa, 2008）（图 1）。

在不利条件下，发育为分散型 3 龄幼虫 J<sub>III</sub> 而非繁殖阶段的 3 龄幼虫 J<sub>3</sub>。J<sub>III</sub> 可能是一个不取食的龄期。它在肠细胞中积累有脂肪（Kondo 和 Ishibashi, 1978），可在干旱、低温或缺少营养的不利条件下存活。通常该龄幼虫蜕皮成为分散型 4 龄幼虫 J<sub>IV</sub>（休眠幼虫），再由媒介甲虫传播给新的树木。然而，如果条件变得适于线虫发育，例如将分散型 3 龄幼虫 J<sub>III</sub> 接种到真菌培养皿中，线虫会发育成为繁殖阶段的 4 龄幼虫 J<sub>4</sub>（Wingfield 等, 1982）。

成活的松材线虫可在寄主不同类型的木材中发现，包含直立或倒伏的树木、圆木、锯木、针叶类木质包装材料等木质产品，以及锯屑、木片与木块、木质废弃物、未处理的家具和手工艺品等。以下几节提供了有关在树木、木材和木质产品，及其媒介甲虫中检测松材线虫的具体信息。尽管正确的取样方法对获取最有可能被松材线虫侵染的检测材料至关重要，但本规程不包含取样指导方面的内容。Schröder 等（2009）和 EPPO（2012）发表了针对欧洲各种墨天牛属（*Monochamus*）天牛媒介的一般性取样指导。

#### 3.1 树木中的检测

如果不知道某个地区是否有松材线虫发生，应重点针对高风险地点附近的树木取样；例如，卸载从已知有松材线虫发生的国家进口的货物的港口、机场、锯木厂、木材加工厂、存放木材的场所，以及发生过森林火灾的地区（墨天牛属天牛易被森林火灾吸引）等。

为了尽可能在一个地区检测到松材线虫，最好重点针对濒临死亡或最近死亡的松树取样（图 2 与 3），两类树木直立或倒伏均可。砍伐后被墨天牛属甲虫蛀食的树木和最近砍伐季（即 1 至 2 年内的伐木地点）砍落的废弃物也可作为取样材料。应寻找以下症状：针叶变色（例如发黄）、萎蔫、昆虫危害状（例如掉落在地面上或从树皮裂缝中露出的蛀屑、树皮下有墨天牛的平头幼虫、树皮下带有卵圆形侵入孔的沿树干纵向分布的表层蛀道、成虫的圆形羽化孔）、木材中有蓝变菌生长，以及伤口处没有树脂流出。在树木仍然为绿色的情况下，应去掉形成层外的一部分树皮来检查树脂流出的速度。在健康树木上树脂会在 1 个小时内覆盖住伤口表面，但在受侵染的树木上没有或很少有树脂流出。然而，这些症状在不同种类的松树间存在差异，而且由于它们可能会由其他病原物或物理因子引起，因而对松材线虫不具备特异性。目前还没有办法通过目视来识别由松树萎蔫病或其他因子致死的

树木。取样的树木最好带有成虫补充营养或产卵引起的墨天牛危害症状，至少应知道取样区域内有墨天牛发生。

线虫可能在树木中局部分布，它们由媒介甲虫通过产卵或成虫补充营养传入后短时间内尤其如此。在发生松树萎蔫病的情况下，线虫会快速扩散，在松针、松果和松子以外的树木各部位中大量繁殖。松材线虫还会侵入根部系统，并在树木已经死亡、干枯或被砍伐时仍然能够存活一定时期。然而，在不感病的树木中、在不利的天气条件或在树木特定的生理状态下，松材线虫危害可能仅限于树木的少数部位；例如，松材线虫可能在树冠或部分树冠中侵染定殖，而不会进一步扩散到树木的其他部位。

### 3.2 使用昆虫诱捕器、诱集原木，以及在取自锯木厂与木材堆放场的样品中检测

近年来开发的使用诱饵诱集墨天牛属天牛的昆虫诱捕器也可用于监测（Sanchez-Husillos 等，2015）。使用墨天牛属诱捕器捕捉甲虫来调查可能发生的松材线虫侵染时，应使捕捉到的甲虫保持成活状态，而不能使用液态致死剂。

在已知有墨天牛属甲虫种群的地区，在甲虫扬飞周期砍伐的木材可用作诱集原木。它们会吸引甲虫产卵，业已证明此类情况会引起线虫传播（Dwinell, 1997; Luzzi 等，1984）。可采集木材或羽化的甲虫样品，来监测松材线虫在有限区域内的发生情况。甲虫可在此类材料中完成其生活史。秋季将诱集原木带回实验室也可能会加快甲虫发育：甲虫会比在自然条件下早羽化几个星期。

从锯木厂和木材堆放场中采集木材样品、刨花或木片可能比从直立树木上取样更为有效。由于大型锯木厂可能从很远的地方收购木材，也可能同时加工国产与进口木材，此类样品可能来源于非常广泛的区域。但是这也是一个不利因素，因为有可能难以在一个阳性样品与其来源地区之间的建立联系。

### 3.3 在木材、木质产品与实木包装材料中直接检测

所有类型的针叶类木材，特别是来自有松材线虫发生的国家的针叶类实木包装材料可用低速钻头、打孔器、锯、斧、弯刀等取样。取样应重点针对带有圆形大虫眼（即甲虫的羽化孔）、卵圆形侵入孔与幼虫蛀道的木块，它们有时会被木屑堵塞。有树皮时去除树皮会有助于发现蛀道。就锯木而言，通常看不到羽化孔，但可以看见幼虫蛀道。由于会被刨花堵塞，蛀道有时候难以发现。有真菌，特别是蓝变真菌生长的木块应取样。尽管如此，一些截获案例显示在没有上述迹象的样品中也能检测到成活的松材线虫（EPPO, 2012）。

实木包装材料（例如托盘）在使用期间会接触到土壤。这会引起土壤与土栖线虫的表面污染，这些线虫在干燥环境下可以存活。为了避免采集到的木材样品被此类线虫污染，应先去掉木材的外表层，然后再对样品进行检查（Schröder 等，2009）。

### 3.4 从木材样品中分离线虫

可使用贝尔曼漏斗技术或改进的贝尔曼漏斗技术从受侵染的木材中分离出成活线虫（Penas 等，2002；EPPO，2013c）。在贝尔曼漏斗技术中，在一个底部细管被橡皮管或螺纹夹封闭的玻璃或塑料漏斗中装满水。将含有小块木材或刨花的样品放在漏斗内小筛上。为避免水受到木屑污染，在小筛上放置一张线虫可以穿透的滤纸。随后往漏斗中加水，直至覆盖住样品。样品在室温下或培养箱中（两者均为 25°C 左右）保持 24 至 28 h，在此期间线虫从木材中迁入水中，并沉积到漏斗底部，将少量水（大约 10 ml）放入一个小型培养皿中就可以收集到线虫。

前文描述了贝尔曼漏斗技术的原理，但实际工作中可以做一些改进（EPPO，2013c）。例如，可以将木片直接浸入水中，或将它们放置在装于塑料盆中的一个棉纤维过滤器上来分离线虫。另外，EPPO（2013c）描述的每种方法都可以与一个雾化喷雾装置结合使用。

在体视显微镜下用移液管或解剖针将线虫从小型培养皿中转移至玻璃玻片上，以便在高倍显微镜下进行检验。

样品中线虫的数量可能很少，因此检测可能会比较困难。建议在分离前让线虫繁殖。为此将湿润的不带任何树皮的木材样品封闭在一个塑料袋中，在 25°C 左右培养 2 至 3 周。然后使用贝尔曼漏斗技术分离线虫。

贝尔曼漏斗技术依据的原理是，在线虫离开木材样品时检测到活线虫，但在推荐的 24 至 28 小时内一些线虫会死亡（Baermann, 1917）。尽管如此，检测人员可以确信开始分离时这些线虫仍然存活着。在分析进口木质材料时必须牢记这一点。其他几种分离方法 – 例如离心法（此处未做描述；比贝尔曼漏斗技术快很多）– 也能从木材中分离到已经死亡的线虫（Moens, 2000）。离心法可用于对有松材线虫发生的区域进行监测，而不能用于证明木材经过了成功的植物检疫处理（Moens, 2000）。

### 3.5 从媒介昆虫中分离线虫

可对诱捕器诱捕到的墨天牛属甲虫（Pajares 等，2004；Ibeas 等，2007）或诱集原木进行检测，以确认是否有松材线虫发生（3.2 节）。除非直接用于分子检测，否则应活捉甲虫，而不能将其置于液态致死剂中。

线虫通常以分散型 4 龄幼虫 J<sub>IV</sub>（休眠幼虫）存在于甲虫气管内和身体上。J<sub>IV</sub> 休眠幼虫没有口针。为了分离到线虫，要在适宜的培养皿中对甲虫进行解剖、挤压，并将其放入水中，在 25°C 左右保持 24 至 48 小时（Sousa 等，2001；EPPO，2013c）。休眠幼虫将离开甲虫。由于进一步的形态学鉴定只能在线虫成虫上进行，因此需要将 J<sub>IV</sub> 休眠幼虫转移到在麦芽汁琼脂培养基（4.1.1 节）上生长的富氏葡萄孢盘菌（*Botryotinia fuckeliana*（无性态：灰葡萄孢菌（*Botrytis cinerea*））

菌垫上，使其进入繁殖阶段。也可以用它们直接进行分子检测。贝尔曼漏斗技术也可用于从甲虫中分离线虫。

按照前文描述的方法从木材或媒介昆虫中分离到的线虫可用于形态学检验，或者用分子检测方法直接从分离物中检测松材线虫。EPPO（2013b）报道了一种以改进型贝尔曼分离方法为基础，继以实时聚合酶链式反应（PCR）检测的一种筛选程序（改编自 François 等，2007）。

还报道过几种分子检测方法，可用于繁殖前直接从木材中提取的松材线虫 DNA（Takeuchi 等，2005；François 等，2007；Kikuchi 等，2009；Hu 等，2011；Kanetani 等，2011；Cardoso 等，2012）。然而在这些报道中，用于提取 DNA 的木材数量介于 5 至 120 mg 之间，与常规检测所用的木材样品的数量相比非常小。另外，这种通过分子方法直接进行的检测可以检测到任何目标线虫，不论线虫死活。因此，出于分析的目的如有必要，该方法的使用者应建立明确的程序，确定样品中有成活线虫存在。

#### 4. 鉴定

至今已有 110 种伞滑刃属线虫被描述（Futai，2013）。最新的综述可参阅 Ryss 等（2005）、Hunt（2008）、Braasch 等（2009）和 Futai（2013）。松材线虫可使用两种方法之一进行阳性鉴定：基于形态学特征的方法与基于分子生物学技术的方法。尽管近年来描述过的伞滑刃属线虫种类的数量已有显著增加，而且其中有些种类具有相似的形态学特征，但是多数情况下仍有可能基于形态学进行鉴定。然而，可能难以基于形态学特征对 M 型（尾尖突型）松材线虫进行鉴定。

基于形态学特征进行的鉴定要求制备高质量的显微镜玻片、有高倍显微镜可供使用，而且在线虫分类方面要有丰富的经验，在鉴定与松材线虫密切相关的一小组线虫（拟松材线虫东亚亚种（*B. mucronatus mucronatus*）、拟松材线虫欧洲亚种（*B. mucronatus kolymensis*）、伪伞滑刃线虫（*B. fraudulentus*）及其他几种）时尤其如此。基于分子生物学的鉴定方法要求昂贵的设备与试剂，但其应用只要求较少的技术经验（以及很少的线虫学培训）。然而，需要有充分的经验来确保有限的线虫材料不会在鉴定过程中丢失。形态学鉴定要基于一些成虫标本，但即便只有幼龄阶段或只有 1 种性别的成虫可供使用，仍然可以进行分子鉴定，这是一个优势。尽管基于 DNA 的 PCR 方法不能区分死亡和成活的线虫，但是基于 mRNA 的新方法可以明确阳性检测结果是否来源于成活线虫（Leal 等，2013）。

如果同时有雌雄成虫而且保持着良好状态，松材线虫可由线虫学家或者具有线虫学背景的有经验的植物病理学家通过形态学特征加以鉴定。然而，可能在有些情况下会建议同时使用形态学特征与分子信息，以获得更为可靠的鉴定结果；例如，在一个新的地区发现松材线虫时、一个实验室首次检测到松材线虫且作为符合认证计划的质量控制措施时，以及进口检验在货物中检测到松材线虫，特别是输出国已经宣布没有松材线虫发生时。另外，松材线虫可能表现出形态学变异，

从而有必要使用分子生物学技术；例如雌虫的尾端圆形或有突起（图 4），或排泄孔的位置。只分离到少量线虫时，建议在鉴定前让其在富氏葡萄孢盘菌上繁殖，以获得可靠鉴定所需要的足够材料（4.1.1 节）。

## 4.1 形态学鉴定

针叶类木材的水溶性分离物中可能存在多种线虫，木材组织已经开始腐烂时尤其如此。其中一些是腐生种类，其成虫没有口针，有口针是垫刃目（*Tylenchida*）、滑刃目（*Aphelenchida*）和矛线目（*Dorylaimida*）线虫的典型特征。伞滑刃属属于滑刃目，其背食道腺开口于中食道球中，与垫刃目形成对比，后者背食道腺体开口于食道球与口针之间的食道管中（图 4）。如果分离物中只有幼虫，就不可能对松材线虫进行形态学鉴定。在此情况下，应分离出符合松材线虫大小范围（参阅例如：Penas 等，2008）的各种滑刃属线虫，或在培养皿中繁殖，或直接用于分子鉴定。

在光学显微镜下鉴定时，建议使用 400×至 1 000×（油镜）的放大倍数。微分干涉显微镜（DIC）可能有助于观察。

### 4.1.1 标本制备

可能需要繁殖分离到的线虫，以获取鉴定所需的足够材料。绝大多数种类的伞滑刃属线虫可以在富氏葡萄孢盘菌的产孢型上培养。一些种类，特别是属于十二齿小蠹伞滑刃线虫（*sexdentati*）组的那些种类要求在非产孢型上培养。两种真菌型都在 2% 麦芽汁琼脂（MEA）培养基（15g 琼脂、15g 麦芽汁、750ml 水；pH 7.0）上培养。在培养皿（直径 90mm）中加入 25 ml 无菌 MEA。在无菌操作台上将真菌孢子或有真菌生长的琼脂块移入培养皿。建议在室温（25°C 左右）下培养真菌平板。用移液管或其他方法将一小滴待培养的线虫转移至菌丝体上。建议在 25°C 左右（根据其生物学）培养线虫，这样可以得到足够高的繁殖速率，以获得足够数量的成虫和幼虫个体。

#### 4.1.1.1 临时玻片标本制备

按照以下方法进行临时玻片标本制备，用于快速鉴定或研究在非固定标本中最易观察的特征。将成活标本转移至玻璃玻片上的一个小水滴中。玻片在酒精灯上轻微加热，经常检查线虫移动情况。一旦标本停止颤动，立即停止加热。加盖盖玻片，玻片即可用于研究。不建议固定玻片，因为后续可能需要移动雄线虫的虫体，使其处于背腹位，以便观察交合伞。

#### 4.1.1.2 永久玻片标本制备

按照以下方法进行永久玻片标本制备，用于在光学显微镜下进行鉴定。用轻微加热杀死从植物材料中分离到的成活线虫或培养的线条，用 FAA 固定液（35% 蒸馏水、10% 的 40% 福尔马林、5% 的冰醋酸、50% 的 95% 乙醇）（Andrássy, 1984）或三乙醇胺与福尔马林（TAF）固定液（7 ml 福尔马林（40% 甲醛水溶液）、2 ml



三乙醇胺、91 ml 蒸馏水）固定，转移到无水甘油中（供长期保存）和按照 Seinhorst（1959）与 Goodey（1963）描述的方法用无水甘油封装玻片。Ryss（2003）描述了一种更为快捷的制备永久玻片的方法（1-1.5 h），该方法用 4% 甲醛热溶液杀死线虫。随后置于程序化热控制器中，在不同温度下进行固定，最后用甘油处理。包含固定液成分在内的有关制备线虫标本和永久玻片的更详细的信息可参阅 van Bezooijen（2006），该资料可从互联网上免费获取。

#### 4.1.2 分种检索表

以下部分源于 Bongers（1989）的检索表可用于鉴定雌性标本的亚科。在寄生滑刃亚科内鉴定伞滑刃属的检索表改编自 Hunt（2008）。伞滑刃属内鉴定松材线虫组的检索表引自 Braasch 等（2009）。另外 EPPO 松材线虫诊断规程（EPPO, 2013b）提供了一个简明检索表，它在欧洲与地中海植物保护组织（EPPO）区域内得到了一致认可和广泛应用。

以下各节所用的术语定义可参阅 EPPO 的限定有害生物诊断规程：线虫形态学术语图解（EPPO, 2013a）。

##### 4.1.2.1 科或亚科检索表

1. 线虫有口针 ..... 2
  - 线虫无口针 ..... NBS
2. 口腔有垫刃型口针，咽部有中食道球 ..... 3
  - 口腔有矛线型口针，咽部圆柱形或瓶形，无中食道球 ..... NBS
3. 中食道球有中食道球瓣 ..... 4
  - 中食道球无明显的中食道球瓣 ..... NBS
4. 前部食道与中食道球间有明显缢缩分界 ..... 5
  - 前部食道与中食道球间无缢缩分界，后食道球明显退化，角质层有明显环纹 ..... NBS
5. 单生殖腺（阴门开口于虫体后部） ..... 6
  - 双生殖腺 ..... NBS
6. 唇区无刚毛 ..... 7
  - 唇区有刚毛 ..... NBS
7. 中食道球肌肉发达且发育非常好，低倍放大镜下清晰可见，卵圆形至方形，背咽腺开口位于中食道球内食道管中 ..... 8
  - 中食道球正常，背咽腺开口位于紧靠口针后的食道管中 ..... NBS
8. 咽腺覆盖肠背侧 ..... 9
  - 咽腺在邻接的食道球内 ..... NBS
9. 雄虫尾端包裹一个小型交合伞状角质层膜（只在线虫处于背腹位时可见） ..... 10
  - 无交合伞状角质层膜 ..... NBS
10. 通常有口针基部球，雌虫有肛门 ..... 寄生滑刃亚科
  - 通常无口针基部球，雌虫无肛门 ..... NBS

#### 4.1.2.2 寄生滑刃亚科检索表

11. 在多数种类中, J<sub>III</sub> 或 J<sub>IV</sub> 休眠幼虫由昆虫携播; 阴门开口于虫体后部 (通常体长的 60-80% 处); 交合刺部分联合或分离; 雄虫尾部明显向腹面弯曲; 多数种类有交合伞 ..... *Bursaphelenchus*
- J<sub>IV</sub> 休眠幼虫; 阴门开口于虫体最后部 (体长的 80-90% 处); 交合刺部分联合; 雄虫尾部不明显向腹部弯曲; 有交合伞 ..... **NBS**

#### 4.1.2.3 伞滑刃属检索表

12. 阴门盖明显; 交合刺长, 较细, 呈半圆形, 后 1/3 有角状叶片, 冠状体扁平, 有小基顶和明显的喙, 通常有盘状突; 侧区有 4 条刻线 ..... **松材线虫组**
- 特征不同 ..... **非松材线虫组**

#### 4.1.2.4 松材线虫组检索表

在松材线虫组内, 以下检索表 (根据 EPPO (2013b、2014) 修订) 可用于区分从木材和树皮中分离的松材线虫与同组其他种类的伞滑刃属线虫。有关松材线虫组其他种类线虫更详细的信息可参阅 Braasch and Schönfeld (2015)。松材线虫组也包含一些并非来源于针叶类木材的种类 (例如杨伞滑刃线虫 (*B. populi*)); 这些种类可以很容易地通过确定木材种类来排除。在带有真菌的琼脂培养基上饲养线虫可能会增加线虫尾部的变异性。

13. 雌虫尾部基本接近圆柱形, 有或没有尾尖突 (图 4 与 5) ..... **14**
- 雌虫尾部圆锥形 (图 6) 或急剧渐变细, 有或没有尾尖突 ..... **非松材线虫**
14. 交合刺长度 < 30  $\mu\text{m}$  (从基顶到末端测量) ..... **15**
- 交合刺长度 > 30  $\mu\text{m}$  ..... **非松材线虫**
15. 交合刺有长且尖的喙, 交合刺臂有一个角状弯曲 (图 5 (C) 与 7) ..... **16**
- 交合刺有短且尖的喙, 交合刺臂有一个圆形弯曲 ..... **非松材线虫**
16. 雌虫阴门盖平直, 末端不深凹陷 (图 5 (G) 与 8) ..... **17**
- 雌虫阴门盖末端深凹陷 (图 9 (A)) ..... **非松材线虫**
17. 雌虫尾部有 > 3  $\mu\text{m}$  的尾尖突 (图 4 (c) 与 10 (d)) ..... **18**
- 雌虫尾部无尾尖突 (图 5 (H) 与 4 (a)), 有或没有 < 2  $\mu\text{m}$  的小突起\* (图 4 (b) 与 5 (I) - (J)) ..... **松材线虫 (圆形型)**
18. 排泄孔位于中食道球对应处或中食道球后 ..... **拟松材线虫 (非松材线虫 M 型)**
- 排泄孔位于中食道球前 ..... **非松材线虫**

**NBS, 非伞滑刃属种类。**

\* 在伪伞滑刃线虫 (*B. fraudulentus*) 的一些种群中, 可能发现有小突起, 甚至无尾尖突的雌虫 (图 9 (B))。如果发生线虫的木材种类不确定 (伪伞滑刃线虫在落叶类木材上发生, 在落叶松上也有发现, 但在松树中未曾发现), 建议进行分子检测。

\*\* 松材线虫 M 型主要发现在北美洲，建议用分子检测（Gu 等，2011）可靠地区分该型与“欧洲型”拟松材线虫，即拟松材线虫欧洲亚种（Braasch 等，2011）。

如果排泄孔的位置难以辨别，则基于形态学特征的鉴定可能会发生错误。在此情况下，应进行分子检测。

松材线虫具有伞滑刃属的一般特征（Nickle, 1970; Hunt 2008）：约 1 mm 长，较细；头区高，与身体间有缢缩分界，有 6 片唇；口针发育良好，通常基部有小的膨大；中食道球发育良好（图 11 与 5（F））；雄虫尾端明显向腹部弯曲，圆锥形，有一小端部交合伞，背腹位可见（图 12）；交合刺大，玫瑰刺状，通常有明显的顶尖与喙；无副刺（图 7 与 10）；阴门开口于虫体的 70–80% 处，后阴子宫囊发育良好（图 5（A））。

松材线虫多数种群尾端圆形，可通过以下 3 个特征区分于其他种类的伞滑刃属线虫（图 10）。（1）松材线虫雄虫（图 7）交合刺相对较大，均匀弓形，喙尖锐突出，远端部有盘状突（盘状突起）。（2）雌虫尾部近圆柱形，尾端近圆形（图 4(a)），通常无尾尖突（小突起），但圆尾种群雌虫尾端偶尔有一个尾尖突，通常短于 2  $\mu\text{m}$ （图 4(b)）。（3）阴门前部有长阴门唇覆盖（图 8）。

然而，M 型种群雌虫的尾端一般有一个尾尖突（1.5–4.2  $\mu\text{m}$ ）（图 4(c)）。

扫描电子显微镜最易观察到的特征是侧区的 4 条刻线（图 13），以及雄虫尾乳突的数量与位置（图 14）：紧邻肛门前肛前乳突 1 对、交合伞起点前肛后乳突 2 对，以及肛门前中央乳突 1 个。这些特征有时候用光学显微镜无法观察到。图 13 与 14 为描述这两个特征的电子显微镜照片，它们在 4.1.3 节被引用来对松材线虫组内的伞滑刃属线虫进行分组。

表 1 提供了松材线虫形态学特征的测量值。

**表1.** 松材线虫特征测量值（平均值，括号内为变化范围）

雄 虫					
作者特征	Nickle 等 (1981) ( <i>n</i> = 5) (美国) †	Mamiya 和 Kiyohara (1972) ( <i>n</i> = 40) (日 本) †	Mota 等 (1999) ( <i>n</i> = 12) (葡 萄牙) †	Penas 等 (2008) ( <i>n</i> = 20) (葡萄牙) †	Penas 等 (2008) ( <i>n</i> = 20) (葡萄牙) ‡
长度 (L), mm	0.56 (0.52–0.60)	0.73 (0.59–0.82)	1.03 (0.80–1.30)	0.57 (0.45–0.69)	1.04 (0.87–1.17)
a (体长/最大体宽)	40.8 (35–45)	42.3 (36–47)	49.4 (44–56)	46.0 (40.2–58.5)	45.7 (41.3–48.9)
b (体长/头端到食道 和肠连接处距离)	9.4 (8.4–10.5)	9.4 (7.6–11.3)	13.3 (11.1–14.9)	9.6 (8.2–10.7)	13.7 (11.6–15.4)
c (体长/尾长)	24.4 (21–29)	26.4 (21–31)	28.0 (24–32)	21.6 (19.1–24.6)	26.8 (23.6–31.4)
口针, μm	13.3 (12.6–13.8)	14.9 (14–17)	12.6 (11–16)	11.0 (10–14)	14.0 (12–15)
交合刺, μm	21.2 (18.8–23.0)	27.0 (25–30)	24 (22–25)	19.3 (16.5–24.0)	30.4 (25.0–33.5)

雌 虫					
作者特征	Nickle 等 (1981) ( <i>n</i> = 5) (美国) †	Mamiya 和 Kiyohara (1972) ( <i>n</i> = 30) (日 本) †	Mota 等 (1999) ( <i>n</i> = 12) (葡 萄牙) †	Penas 等 (2008) ( <i>n</i> = 20) (葡 萄牙) †	Penas 等 (2008) ( <i>n</i> = 20) (葡萄牙) ‡
体长 (L), mm	0.52 (0.45–0.61)	0.81 (0.71–1.01)	1.05 (0.89–1.29)	0.58 (0.51–0.66)	1.13 (0.91–1.31)
a (体长/最大体宽)	42.6 (37–48)	40.0 (33–46)	50.0 (41–58)	41.9 (32.8–50.6)	45.6 (39.4–50.3)
b (体长/头端到食道 和肠连接处距离)	9.6 (8.3–10.5)	10.3 (9.4–12.8)	13.8 (12.7–16.4)	10.1 (9.1–11.2)	14.7 (11.6–16.8)
c (体长/尾长)	27.2 (23–31)	26.0 (23–32)	26.6 (22–32)	25.4 (20.2–29.0)	28.1 (21.9–34.4)
口针, μm	12.8 (12.6–13.0)	15.9 (14–18)	12.3 (11–15)	11.2 (10.0–12.5)	14.4 (12–16)
阴门开口位置 (V), 体长的%	74.7 (73–78)	72.7 (67–78)	73.3 (70–76)	71.5 (70.1–72.9)	72.6 (70.4–74.5)

† 从自然寄主基质中分离出的线虫

‡ 在真菌培养物上生长了1年的线虫

#### 4.1.3 松材线虫与相似种的比较

已有鉴定伞滑刃属线虫的种检索表可用（例如 Ryss 等，2005），但 Ryss 等（2005）中描述的两种方法都有不足之处，即关于各种伞滑刃属线虫的早期描述不够完整，或仅基于少数几头标本。有关 74 种伞滑刃属线虫的最初描述可参阅 Vieira 等（2003）。

松材线虫是广义的松材线虫组中的一种（Braasch，2001）。尽管目前分类学家对该组中线虫种类的数量存有争议，但根据侧线数量（图 9）、尾乳突的数量和位置、交合刺特征，以及长阴门盖，至少有 15 个种或亚种（截至 2015 年 4 月）可归类于松材线虫组（Gu 等，2005；Ryss 等，2005；Braasch 等，2009；Braasch 和 Schönfeld，2015）。最近至少有 2 种伞滑刃属线虫（*B. trypophloeae* Tomalak & Filipiak，2011 与 *B. masseyi* Tomalak, Worrall & Filipiak，2013）被建议补充进松材线虫组；然而本规程采用的是 Braasch 和 Schönfeld（2015）最新的分组方法，由于这两种线虫交合刺形态方面的原因，他们未将其列为该组的有效成员。因此，松材线虫组的成员为：

- 松材线虫（*B. xylophilus* (Steiner & Buhner, 1934) Nickle, 1970)
- 伪伞滑刃线虫（*B. fraudulentus* Rühm, 1956 (Goodey, 1960)）
- 拟松材线虫东亚亚种（*B. mucronatus mucronatus* (Mamiya & Enda, 1979) Braasch, Gu & Burgermeister, 2011）
- 拟松材线虫欧洲亚种（*B. mucronatus kolymensis*, Braasch, Gu & Burgermeister, 2011）
- 锥尾伞滑刃线虫（*B. conicaudatus* Kanzaki, Tsuda & Futai, 2000）
- 鲍嘉伞滑刃线虫（*B. baujardi* Walia, Negi, Bajaj & Kalia, 2003）
- 灰黄锦天牛伞滑刃线虫（*B. luxuriosae* Kanzaki & Futai, 2003）
- 豆伞滑刃线虫（*B. doui* Braasch, Gu, Burgermeister & Zhang, 2004）
- 新加坡伞滑刃线虫（*B. singaporensis* Gu, Zhang, Braasch & Burgermeister, 2005）
- 大尖尾伞滑刃线虫（*B. macromucronatus* Gu, Zheng, Braasch & Burgermeister, 2008）
- 杨伞滑刃线虫（*B. populi* Tomalak & Filipiak, 2010）
- 拟灰黄锦天牛伞滑刃线虫（*B. paraluxuriosae* Gu, Wang & Braasch, 2012）
- 日本冷杉伞滑刃线虫（*B. firmae* Kanzaki, Maehara, Aikawa & Matsumoto, 2012）
- 韩国伞滑刃线虫（*B. koreanus* Gu, Wang & Chen, 2013）
- 吉拉尼伞滑刃线虫（*B. gillanii* Schönfeld, Braasch, Riedel & Gu, 2013）

松材线虫可划分为两种类型或种群：圆尾型和 M 型（Gu 等，2011）（图 4）。M 型种群主要发现在北美洲，与拟松材线虫欧洲亚种非常相似。

可以通过雄虫交合刺的形状及雌虫具有特定形状的阴门盖来识别松材线虫组 15 个种或亚种与其他各种伞滑刃属线虫。可以用雌虫的尾部形状（近圆柱形至圆柱形，通常尾端钝圆，无尾尖突）将松材线虫与组内其他 14 种线虫区分开。有关松材线虫组内各种线虫的详细检索表，包含主要特征的图示可参阅 Braasch 和 Schönfeld（2015）。松材线虫组内其他各种线虫的雌虫尾部均呈圆锥形或有突起。然而，北美洲存在少数松材线虫 M 型种群，难以通过形态学与其他各种有尾尖突的线虫相区分（图 4）。另外，实验室饲养的松材线虫雌虫通常表现出典型的圆形尾端，然而从自然侵染或人工接种树木上获取的株系可能在圆尾型雌虫之外还含有具不同长度尾尖突的雌虫（图 4）。有关这一方面的详细内容可参阅 Gu 等（2011）。

松材线虫组中分布最广的种是拟松材线虫东亚亚种和欧洲亚种。它们遍布欧洲和亚洲，在加拿大也有发生（Ryss 等，2005）。因此，最常需要区分的很可能是松材线虫与拟松材线虫东亚亚种或欧洲亚种（图 6 与 10）。

位于德国不伦瑞克的国家与国际植物健康研究所栽培植物联邦研究中心 Julius Kühn-Institut 的伞滑刃属线虫培养保藏中心收藏有 50 种伞滑刃属线虫的参考培养物，包含来自世界不同地区的 41 个松材线虫株系。

## 4.2 分子鉴定

本节提供从分离到的线虫中鉴定出松材线虫的分子检测方法的有关信息。这些检测方法一般在形态学检验后使用，以确认其结果。如每小节开始时所描述的那样，以下各小节提供了针对特定问题的不同类型的检测方法。

有很多方法可用于松材线虫鉴定。下文描述的分子检测方法是在本规程起草时推荐的那些方法。也可以使用其他检测方法。分子鉴定可以采用常规 PCR（4.2.2 节）或实时 PCR（4.2.3 节）法。所有这些技术，特别是内转录间隔区（ITS）– 限制性片段长度多态性（RFLP）（4.2.1 节），已在世界各地的实验室内得到成功应用，但至今尚未通过环形试验进行评估。还建立了一种环介导等温扩增（LAMP）检测法（4.2.5 节），可用于直接检测和鉴定源自木材的目标线虫。

最新的分子鉴定方法依赖于测序与条形码分析（4.2.8 节）。该方法要求使用测序设备和可靠的序列（例如 Q-bank 中提供的那些，(<http://www.q-bank.eu/Nematodes/>)），并由高度熟练的操作人员进行序列分析，以免得到错误的结果。

出于检疫目的使用分子技术对木质产品中的松材线虫进行检测时，区分线虫的死活非常重要。有几种植物检疫处理方法可以杀死木材中的松材线虫，现有基于 DNA 的检测方法不能区分一个阳性结果是来自活线虫还是死线虫的残留 DNA。

基于 RNA 的可以区分木材中线虫死活的分子方法更适合用于解决检疫管理方面的问题（Leal 等，2013）（4.2.4 节）。这一问题在选择线虫分离方法（例如，贝尔曼漏斗技术依赖于活线虫；参看 3.4 与 3.5 节）和分子鉴定技术时应予考虑。只要有可能，一个阳性分子检测结果应通过形态学鉴定加以验证。

在本诊断规程中，各种方法（包含引用的商标名）的描述和发表时一样，因为它们决定了最初获得的灵敏度、特异性和/或再现性水平。此类诊断规程对试剂、化学品或设备名称的使用不意味对它们的认可，而排斥可能同样适用的其他品牌。只要经过充分验证，本规程提供的实验室程序可根据各个实验室的标准进行调整。

#### 4.2.1 ITS-PCR RFLP

Burgermeister 等（2005，2009）使用一种基于 PCR 的 ITS-RFLP 技术来鉴别松材线虫和另外 43 种伞滑刃属线虫。2009 年后发表的所有伞滑刃属新种的描述几乎都包含了依据 Burgermeister 等（2009）建立的方法所做的 ITS-PCR RFLP 图谱。在本规程所有的分子技术中，它是已被证明对最多种类伞滑刃属线虫有效的一种方法。

使用 QIAamp DNA Micro Kit（Qiagen<sup>1</sup>）试剂盒从混合龄期的线虫（雌雄成虫、各龄幼虫）中提取 DNA。将线虫样品（1 至 30 个标本）加入装在 Eppendorf<sup>1</sup> 离心管中的 5 µl 水中，在 -20°C 下冷冻待提取。提取前，将样品解冻，加入 10 µl ATL 缓冲液（Qiagen<sup>1</sup>），在 Eppendorf<sup>1</sup> 离心管中使用微型小杵（Eppendorf<sup>1</sup>）匀浆。然后按照生产商的建议（QIAamp DNA Micro Kit 使用手册，Qiagen：“从组织中分离基因组 DNA”<sup>1</sup>）进行 DNA 提取操作，但以下步骤除外。第 4 步，孵化持续 3 h。第 12 步（洗脱），在膜上添加 20 µl（适用于从单一线虫中提取）至 100 µl（适用于从多达 30 头线虫中提取）AE buffer 缓冲液（Qiagen<sup>1</sup>）。将含有 DNA 提取物的洗脱液保存在 -20°C 下备用。

通过对提取的 DNA 实施 PCR，随后对 PCR 产物实施 RFLP 来进行 ITS-PCR RFLP 分析。使用以下引物对含有 ITS 的 ITS1 与 ITS2 区域的线虫核糖体（r）DNA 片段进行扩增：

ITS1-正向（F）：5'-CGT AAC AAG GTA GCT GTA G-3'（Ferris *et al.*, 1993）

ITS2-方向（R）：5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3'（Vrain, 1993）

---

<sup>1</sup> 在本诊断规程中，各种方法（包含引用的商标名）的描述和发表时一样，因为它们决定了最初获得的灵敏度、特异性和/或再现性水平。此类诊断规程对试剂、化学品或设备名称的使用不意味对它们的认可，而排斥可能同样适用的其他品牌。只要经过充分验证，本规程提供的实验室程序可根据各个实验室的标准进行调整。

PCR 混合物 (50  $\mu$ l) 含两种引物各 0.6  $\mu$ M、2 U Taq DNA 聚合酶 (Stratagene<sup>1</sup> 或 Fermentas<sup>1</sup>)、10 mM Tris-HCl (pH 8.8)、50 mM KCl、2 mM MgCl<sub>2</sub>、0.2 mM 脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTPs) 与 2 ng DNA 模板。用一个热循环仪进行扩增, 采用以下循环参数: 94°C 变性 2.5 min, 40 个反应循环 (94°C 1 min、55°C 1 min 与 72°C 2 min), 以及最后延伸 72°C 5 min。PCR 完成后, 取 5  $\mu$ l PCR 产物用凝胶电泳进行分析。按照生产商的说明, 取适量等分的 DNA 扩增产物用 3 U 限制性内切酶 *AluI*、*HaeIII*、*HinfI*、*MspI* 与 *RsaI* 进行酶切。

依据种特异性 DNA 限制性片段图谱 (图 15) 对松材线虫进行鉴定。至少已描述过以下各种伞滑刃属线虫的 DNA 限制性片段数量与大小 (Gu, 2014): 冷杉伞滑刃线虫 (*B. abietinus*)、分裂伞滑刃线虫 (*B. abruptus*)、非洲伞滑刃线虫 (*B. africanus*)、安娜摩伞滑刃线虫 (*B. anamurius*)、*B. andrassyi*、安东尼伞滑刃线虫 (*B. antoniae*)、阿苏里伞滑刃线虫 (*B. arthuri*)、*B. arthuroides*、布拉希伞滑刃线虫 (*B. braaschae*)、伯氏伞滑刃线虫 (*B. burgermeisteri*)、程氏伞滑刃线虫 (*B. chengi*)、锥尾伞滑刃线虫 (*B. conicaudatus*)、小角伞滑刃线虫 (*B. corneolus*)、豆伞滑刃线虫 (*B. doui*)、艾格斯伞滑刃线虫 (*B. eggersi*)、荒漠伞滑刃线虫 (*B. eremus*)、伪伞滑刃线虫 (*B. fraudulentus*)、弗氏伞滑刃线虫 (*B. fuchsi*)、食菌伞滑刃线虫 (*B. fungivorus*)、悬臂伞滑刃线虫 (*B. gerberae*)、吉拉尼伞滑刃线虫 (*B. gillanii*)、赫列尼伞滑刃线虫 (*B. hellenicus*)、希尔德加德伞滑刃线虫 (*B. hildegardae*)、霍夫曼伞滑刃线虫 (*B. hofmanni*)、树皮象伞滑刃线虫 (*B. hylobianum*)、韩国伞滑刃线虫 (*B. koreanus*)、利昂伞滑刃线虫 (*B. leoni*)、灰黄锦天牛伞滑刃线虫 (*B. luxuriosae*)、大尖尾伞滑刃线虫 (*B. macromucronatus*)、*B. masseyi*、拟松材线虫东亚亚种 (*B. mucronatus mucronatus* (以前为拟松材线虫 (*B. mucronatus*) 东亚型))、拟松材线虫欧洲亚种 (*B. mucronatus kolymensis* (以前为拟松材线虫 (*B. mucronatus*) 欧洲型))、欧斐切伞滑刃线虫 (*B. obeche*)、拟伯氏伞滑刃线虫 (*B. paraburgeri*)、拟小角伞滑刃线虫 (*B. paracorneols*)、*B. paraluxoriosae*、拟小刺伞滑刃线虫 (*B. paraparvispicularis*)、拟泰国伞滑刃线虫 (*B. parathailandae*)、小刺伞滑刃线虫 (*B. parvispicularis*)、小松伞滑刃线虫 (*B. pinasteri*)、松居伞滑刃线虫 (*B. pinophilus*)、四眼小蠹伞滑刃线虫 (*B. poligraphi*)、杨伞滑刃线虫 (*B. populi*)、*B. posterovolvus*、莱奴尔夫伞滑刃线虫 (*B. rainulfi*)、肖恩伞滑刃线虫 (*B. seani*)、十二齿小蠹伞滑刃线虫 (*B. sexdentati*)、树木伞滑刃线虫 (*B. silvestris*)、中华伞滑刃线虫 (*B. sinensis*)、新加坡伞滑刃线虫 (*B. singaporensis*)、泰国伞滑刃线虫 (*B. thailandae*)、托斯卡纳伞滑刃线虫 (*B. tusciae*)、瓦里西伞滑刃线虫 (*B. vallesianus*)、威尔巴德伞滑刃线虫 (*B. willibaldi*)、松材线虫 (*B. xylophilus*)、甬伞滑刃线虫 (*B. yongensis*) 与余姚伞滑刃线虫 (*B. yuyaoensis*)。



有建议将湖南伞滑刃线虫（*B. hunanensis*）与林伞滑刃线虫（*B. lini*）重新分组，因此不再属于伞滑刃属。Burgermeister 等（2009）全面总结了 44 种伞滑刃属线虫的图谱与 ITS-RFLP DNA 片段大小。表 2 提供了通过 ITS-RFLP 限制性片段 图谱将松材线虫、拟松材线虫东亚亚种和拟松材线虫欧洲亚种分离物鉴别到种的 示例。

**表2.** 几种伞滑刃属线虫的限制性片段长度多态性（RFLP）图谱

种	PCR 产物 (碱基对)	限制性酶产生的限制性片段（碱基对）				
		<i>Rsa</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Msp</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Alu</i> I
拟松材线虫东亚型 = 拟松材线虫东亚亚种	920	486 412 12	621 299	355 302 263	408 232 121 86 49 24	674 246
拟松材线虫欧洲型 = 拟松材线虫欧洲亚种	925	413 263 227 22	625 195 105	356 303 266	412 232 121 87 49 24	678 247
松材线虫	925	483 420 22	728 197	562 363	263 232 142 139 125 24	433 256 142 96

来源：Burgermeister *et al.* ( 2009 )。

4.2.2 常规PCR

以下 PCR 检测方法可对松材线虫进行种特异性鉴定，但不能确定是否有其他 种类的伞滑刃属线虫存在。

4.2.2.1 以ITS rDNA 为靶标的常规PCR

Matsunaga 和 Togashi（2004）描述了一种以 rDNA 的 ITS1–ITS2 区域为靶标的 鉴定松材线虫的种特异性方法。本方法分别用 5 个松材线虫和 4 个拟松材线虫的 日本种群做过评估。试验规程如下：

将单条线虫放进装在 0.2 ml MicroAmp 反应管（Applied Biosystems<sup>1</sup>）中的

5  $\mu$ l 裂解缓冲液（50 mM KCl、10 mM Tris-HCl（pH 8.2）、2.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.45%（w/v）乙基苯基聚乙二醇（Nonidet P-40）、0.45%（w/v）Tween 20、0.01%（w/v）明胶与 0.06 mg/ml 蛋白酶-K）中，在-70°C 或更低温度下保存 10 min（DNA 提取方法改编自 Barstead 等，1991）。室温下解冻后，将 DNA 溶液在 60°C 加热 1 h，继以 95°C 加热 15 min。得到的 DNA 粗提液用作特异性 PCR 的模板。使用以下引物对进行 PCR：

X-正向：5'-ACG ATG ATG CGA TTG GTG AC-3' X-反向：5'-

TAT TGG TCG CGG AAC AAA CC-3'

用 Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600 热循环仪（Applied Biosystems<sup>1</sup>）在 10  $\mu$ l 反应混合液中进行 PCR，混合液含前面制备的 DNA 模板（5  $\mu$ l DNA 粗提物）、50 mM KCl、10 mM Tris（pH 8.3）、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.001% 明胶、每种脱氧核糖核苷三磷酸（dNTPs）各 200  $\mu$ M、每种引物各 5 pmol 与 0.25 U Taq DNA 聚合酶（AmpliTaq Gold, Applied Biosystems<sup>1</sup>）。94°C 变性 5 min 后，进行 35 个循环（94°C 30 s、55.9°C 30 s 与 72°C 1 min），以及最后延伸 72°C 6 min。

本反应从被检测的所有松材线虫提取物中产生一个含 557 个碱基对（bp）的 DNA 扩增子。

#### 4.2.2.2 以卫星DNA为靶标的常规PCR

Castagnone 等（2005）描述了一种使用基于卫星 DNA 的 PCR 技术来鉴定松材线虫的种特异性方法。其特异性用伞滑刃属非目标种（利昂伞滑刃线虫、拟松材线虫与托斯卡纳伞滑刃线虫），以及 1 个松材线虫日本种群和 2 个松材线虫加拿大种群做过评估。

对单条线虫进行扩增，按照改编自 Williams 等（1992）的一个 PCR 程序进行制备。简单来说，将单头线虫转移进一个 PCR 管中，加入 2.5  $\mu$ l 裂解缓冲液（50 mM KCl、10 mM Tris（pH 8.2）、2.5 mM MgCl<sub>2</sub>、60 mg/ml 蛋白酶-K、0.45% 乙基苯基聚乙二醇（Nonidet P-40）、0.45% Tween 20 与 0.01% 明胶）。将 PCR 管置于-80°C 下保持 45 min，立即转移进一个热循环仪中，在 60°C 下保持 60 min，随后在 95°C 下保持 15 min。得到的 DNA 粗提物用作特异性 PCR 的模板。

反应所用的 PCR 引物设计用于以前在松材线虫确定的卫星 DNA 家族中 160 bp 单体序列的近两端处（Tarès 等，1993；GenBank 序列号 L09652）： J10-1：5'-

GGT GTC TAG TAT AAT ATC AGA G-3'

J10-2Rc：5'-GTG AAT TAG TGA CGA CGG AGT G-3'

PCR 在 25  $\mu$ l 反应混合液中进行，含前面制备的 DNA 模板（5  $\mu$ l DNA 粗提物）、50 mM KCl、10 mM Tris（pH 8.2）、2.5 mM MgCl<sub>2</sub>、每种脱氧核糖核苷三磷酸（dNTPs）各 200  $\mu$ M、每种引物各 250 ng 与 1 U Taq DNA 聚合酶（QBiogene<sup>1</sup>）。

94°C 变性 5 min 后，进行 25 个循环（94°C 30 s、64°C 1 min 与 72°C 1 min），以及最后延伸 72°C 5 min。

因为已经证明卫星 DNA 家族是由串联的重复片段组成（Tarès 等，1993），使用松材线虫 DNA 模板进行 PCR 后，获得的是对 160 bp 单体的阶梯状多聚体的扩增条带。相反的，如果是其他种类的伞滑刃属线虫就观察不到扩增条带，从而提供了一个对松材线虫简单、可靠且明确的阳性或阴性结果（Castagnone 等，2005）。

#### 4.2.3 实时PCR

可采用实时 PCR 检测法对松材线虫进行特异性鉴定。这类检测方法一般比 4.2.1 和 4.2.2 节描述的常规 PCR 技术更为灵敏，也更节省时间。

##### 4.2.3.1 以卫星DNA 序列为靶标的实时PCR

François 等（2007）描述了一种使用卫星 DNA 序列鉴定松材线虫的种特异性方法。本方法高度灵敏，可检测松材线虫与其高度相似种拟松材线虫混合样品中至少 1 pg 的基因组 DNA 和单条线虫，极限分别为混合物的 0.01% 和 1%。本方法还可直接从 100 mg 木材中检测出松材线虫。

按照以前描述的方法（Castagnone 等，2005）并略做修改，使用简化程序从分离自纯培养物的线虫中提取 DNA：所用裂解缓冲液的容积不固定，而是根据线虫数量进行调整（即 1 至 4 条线虫为 3 µl，更多线虫为 20 µl）。

使用 ChargeSwitch genomic DNA Plant Kit（Invitrogen<sup>1</sup>）试剂盒从受松材线虫侵染的木材中提取 DNA。将大约 0.1 g 受侵染的木材切成小块，放入一个装有 5 ml 含 1% 聚乙烯吡咯烷酮和 20 mM 氯化钙的 CST 裂解缓冲液的塑料袋中。用小锤轻轻粉碎样品，取 1 ml 裂解物并按照生产商的说明进行处理。简言之，往裂解物中加入 100 µl 十二烷基硫酸钠，随后在室温下孵化 5 min，接着加入 400 µl 沉淀缓冲液，并以最大转速（约 18 000 g）离心 5 min。取 1 ml 上清液，往其中加入 100 µl CST 洗涤剂 and 40 µl CST 磁珠。使用 PickPen 8-M（Bio-Nobile<sup>1</sup>）通过两个洗涤步骤将 CST 磁珠和吸附的 DNA（每次用 1 ml CST 洗涤缓冲液）移入加在 2.2 ml 深孔板上的 150 µl CST 洗脱缓冲液中。随后取走磁珠。DNA 可直接用于检测，也可在 -20°C 下保存供将来分析。

本方法使用的引物和 TaqMan 探针为：

BsatF: 5'-TGA CGG AGT GAA TTG ACA AGA CA-3'

BSatRV: 5'-AAG CTG AAA CTT GCC ATG CTA AA-3'

Fluorogenic TaqMan 探针 BSatS: 5'-FAM-ACA CCA TTC GAA AGC TAA TCG CCT GAG A-TAMRA-3'

PCR 在含 1  $\mu$ l 基因组 DNA 的总容积为 25  $\mu$ l 的混合液中进行。单一反应含 2.5  $\mu$ l 10 $\times$ 反应缓冲液 (qPCR Core Kit, Eurogentec<sup>1</sup>)、5 mM MgCl<sub>2</sub>、每种脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTPs) 各 200  $\mu$ M、0.5 U Taq 聚合酶 (qPCR Core Kit<sup>1</sup>)，以及每种引物和探针各 200 nM。实时 PCR 检测在 DNA Engine Opticon 2 热循环仪 (MJ Research<sup>1</sup>) 中进行。循环参数为 95°C 10 min、随后进行 30 个循环 (95°C 15 s 和 59°C 30 s)。按照生产商的说明，使用 Opticon 2 Monitor software version 3.1<sup>1</sup> 对数据进行分析。提取物不经稀释和按 1:10 比例用不含核酸的水稀释后检测。

用 SmartCycler II (Cepheid<sup>1</sup>) 对木材提取物进行实时 PCR 检测。单一反应含 0.025 U/ $\mu$ l Hot Taq (Biogene<sup>1</sup>)、1 $\times$ PCR 缓冲液、每种脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTPs) 各 0.2 mM、5.5 mM MgCl<sub>2</sub>、5%海藻糖 (w/v)、每种引物各 300 nM，以及探针 100 nM。循环条件为 95°C 10 min，随后进行 40 个两步循环 (95°C 15 s 与 60°C 1 min)。使用 SmartCycler II software<sup>1</sup> 以默认的阈值设定(30 个荧光单位) 对数据进行分析。提取物不经稀释和按 1:10 比例用不含核酸的水稀释后检测。

#### 4.2.3.2 以hsp70 基因序列为靶标的实时PCR 检测法

Leal 等 (2007) 建立了一种基于一个热激蛋白基因(*hsp70*)的实时 PCR 方法。本方法显示出对松材线虫的特异性 (对 5 个松材线虫分离物进行过试验)，对 7 种非目标伞滑刃属线虫未观察到扩增条带。这种 *hsp70* PCR 足够灵敏，最少可以检测到 0.005 ng 松材线虫基因组 DNA，以及从条头线虫中提取的 DNA。

使用经以下修改的 Burgermeister 等 (2005) 的方法提取 DNA：(1) 将样品匀浆在 56°C 下孵化过夜而非 3 h；(2) 只有在 DNA 提取自一条线虫时才使用 carrier RNA；(3) 将洗脱缓冲液 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0) 加到微型柱的膜上，在离心前孵化 5 min 来洗脱样品 DNA；(4) 将 DNA 提取物置于 55°C 下加热 5 min，除去残留乙醇，以免影响以后对 DNA 数量的测定和质量，以及 PCR 扩增；(5) 样品用 30  $\mu$ l (单条线虫) 和 50  $\mu$ l (样品含一条以上线虫) 洗脱。本方法使

用的引物和 TaqMan 探针为 (小写字母表示锁核酸)：

BxLNAF: 5'-TAA GAT GTc TTT tAc AGA TGc CAA G-3' BxLNAR: 5'-  
GCc TGG ACG AcC TTG AAT-3'

双标记 TaqMan 探针 BxLNAP: 5'-FAM-AtT GgC CGC AAA TtC GaT GAa  
CC-IAblkFQ-3'

PCR 在 20  $\mu$ l 反应混合物中进行，含 5  $\mu$ l 模板、50 mM Tris (pH 8.3)、0.25 mg/ml 非乙酰化牛血清白蛋白 (BSA) (Sigma<sup>1</sup>)、0.1  $\mu$ M 探针、0.7  $\mu$ M 正向引物、0.5  $\mu$ M 反向引物、每种脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTPs) 各 0.4 mM (Roche<sup>1</sup>)、5.0 mM MgCl<sub>2</sub> 与 1.0 U FastStart Taq DNA 聚合酶 (Roche<sup>1</sup>)。扩增在 LightCycler 1.5 热循环仪(Roche Diagnostics<sup>1</sup>)中进行，使用以下循环参数：95°C 10 min 预变性和 FastStart Taq DNA 聚合酶 (Roche Diagnostics<sup>1</sup>) 激活，随后进行 45 个

循环（94°C 5 s 变性、62°C 20 s 退火和 72°C 10 s 延伸）。数据用 LightCycler version 3.5 software<sup>1</sup> 分析。

为确认本检测所用的纯化线虫基因组 DNA 的质量，可用对照引物 ITS1-F 与 ITS2-R(4.2.1 节描述的引物)进行常规 PCR 扩增。25 µl PCR 反应混合液含 5 µl 模板、2.5 µl 10× 反应缓冲液（50 mM Tris-HCl、10 mM KCl、5 mM(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>；pH 8.3）、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、每种引物各 1 µM、1.6 µg BSA、每种脱氧核糖核苷三磷酸（dNTPs）各 0.2 mM 与 1 U FastStart Taq DNA 聚合酶（Roche<sup>1</sup>）。循环参数包含 94°C 5 min 预变性，随后进行 40 个循环（94°C 1 min，55°C 1 min 和 72°C 2 min），以及最后延伸 72°C 5 min。

#### 4.2.4 基于RNA的检测活松材线虫的分子检测方法

以下检测方法仅检测活线虫。可选择进行常规和实时逆转录（RT）-PCR。

##### 4.2.4.1 以hsp70 DNA 序列为目标的常规RT-PCR

Leal 等（2013）描述了一种用于检测活松材线虫的基于 *hsp70* 基因序列的常规 RT-PCR 方法。本检测方法将正向和反向引物置于 *hsp70* 内含子的两端，因而可以依据扩增子大小很容易地将基因组 DNA 与 cDNA 区分开来。本检测方法的特异性用 6 种非目标伞滑刃属线虫和 6 个松材线虫分离物做过评估。通过 3 次、每次 3 个重复的测量，本方法的检测极限是每反应 0.4 头线虫。

从至少 20 条线虫中提取 RNA 和基因组 DNA。可使用 AllPrep DNA/RNA Mini Kit（Qiagen<sup>1</sup>），按照生产商提供的规程并进行以下修改来同步提取 RNA 和基因组 DNA：用 Kontes Pellet Pestle（Kimble Chase Life Science and Research Products<sup>1</sup>）研磨此前储存在-80°C 下的线虫团，往每个线虫团上加 350 µl 裂解缓冲液 RLT（取自 Qiagen<sup>1</sup> extraction kit）。使用 QIAshredder Mini Spin Columns（Qiagen<sup>1</sup>）完成匀浆步骤。用 20 µl 不含核糖核酸酶的水从柱上洗脱 RNA，用 50 µl 预热过的 EB 缓冲液（取自 Qiagen<sup>1</sup> extraction kit）洗脱 DNA。让洗出液在柱膜上停留约 3 min，以便通过 1 次离心进行最大限度的洗脱。

本检测方法使用的松材线虫特异性引物如下，从 cDNA 模板产生的扩增子为 473 bp：

Hsp23F1: 5'-ACC CAA GTT TGA GTT GTA TTG TTT-3' Hsp19R2: 5'-  
ACG GTA ACA ACG GCA TCC T-3'

以下对照引物以肌动蛋白基因（actin gene）为目标，可在检测分离到的基因组 DNA 时加以应用，以确保检测按预期进行。它们产生一个 228 bp 的扩增子。

BxActF3: 5'-TCG TCA CCA ACT GGG ATG ATA-3' BxActR3:  
5'-CAC CAG TGG TAC GAC CG-3'

使用一种两步 RT-PCR 规程。按照 anchored-oligo (dT) 18 引物规程, 用 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics<sup>1</sup>) 试剂盒完成 RT 反应。为合成 cDNA, 用 12 µl RNA 作为起始物质。采用试剂盒生产商建议的选择性步骤, 在 65°C 10 min 条件下使 RNA 与引物变性, 随后立即在冰上冷却。完成 cDNA 合成后, 将样品保存在-20°C 下以备将来作为模板使用。

25 µl PCR 反应混合液包含 2 µl cDNA 作为模板、19 µl GoTaq Flexi PCR 缓冲液 (Promega<sup>1</sup>)、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、每种脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTPs) (Roche Diagnostics<sup>1</sup>) 各 0.20 mM、1.25 U GoTaq Flexi DNA 聚合酶 (Promega<sup>1</sup>) 与每种引物各 0.4 µM (Hsp23F1 与 Hsp19R2)。按照以下循环参数进行扩增: 95°C 5 min 预变性、随后进行 35 个扩增循环 (95°C 30 s 变性, 60°C 30 s 退火与 72°C 1 min 延伸), 以及最后延伸 72°C 5 min。对于用对照引物进行的扩增, 25 µl PCR 反应混合液与上述相同, 只是使用了 1 µl 基因组 DNA (40 ng/µl) 和每种引物各 1 µM (BxActF3 与 BxActR3)。采用以下循环参数进行扩增: 95°C 5 min 预变性, 随后进行 35 个循环 (95°C 30 s, 52°C 30 s 和 72°C 1 min), 以及最后延伸 72°C 5 min。

#### 4.2.4.2 以hsp70 cDNA 序列为靶标的实时RT-PCR

Leal 等 (2013) 描述了一种通过检测是否存在作为生活力标记的 *hsp70* mRNA 来专门鉴定活松材线虫的 SYBR Green 实时 RT-PCR 检测方法。由于反向引物结合处跨越一个外显子-内含子结合点, 从而排除了基因组 DNA 的扩增, 本检测方法可检测逆转录的松材线虫 *hsp70* cDNA 的特异性扩增。其特异性已用 6 种非目标伞滑刃属线虫和 6 个松材线虫分离物做过评估。通过 3 次、每次 3 个重复的测量, 本方法的检测极限是每反应 0.25 条线虫。

同步提取 RNA 和基因组 DNA 的规程的实施与常规 PCR 方法 (4.2.4.1 节) 相同。

本检测使用的引物为:

HspexF3: 5'-AGA ACC ACT CCC TCG TAT GTC-3' HspexR3:

5'-TCA AAC GCT TGG CAT CAA-3'

可采用以下内对照引物来确保检测按预期进行:

BxActF3: 5'-TCG TCA CCA ACT GGG ATG ATA-3' BxActR3:

5'-CAC CAG TGG TAC GAC CG-3'

使用一种两步 RT-PCR 规程, cDNA 的合成与常规 PCR 方法 (4.2.4.1 节) 相同, 只是要使用 anchored-oligo (dT) 18 引物或序列特异性引物 (HspexR3)。cDNA 合成完成后, 将样品保存在-20°C 下待以后作为模板使用。

20 µl PCR 反应混合液含 5 µl cDNA 模板 (按 1:10 的比例用 10 mM Tris 稀释, pH 8.0)、0.6 µM 正向引物 (HspexF3) 与 0.4 µM 反向引物 (HspexR3), 以及

4  $\mu$ l 5 $\times$ LightCycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green 1 Mix (Roche Diagnostics<sup>1</sup>)。实时扩增在 LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics<sup>1</sup>) 中进行, 使用 LightCycler version 4.1 software<sup>1</sup> 并采用以下参数: 95°C 10 min 预变性与激活, 随后进行 40 个循环 (95°C 15 s, 66°C 10 s 与 72°C 15 s)。对于用对照引物进行的扩增, 20  $\mu$ l PCR 反应混合液与上述相同, 只是每种引物 (BxActF3 和 BxActR3) 各用 0.5  $\mu$ M。采用以下循环参数进行扩增: 95°C 10 min 预变性与激活, 随后进行 45 个循环 (95°C 15 s, 52°C 10 s 与 72°C 15 s)。

#### 4.2.5 LAMP

Kikuchi 等 (2009) 描述了一种通过 LAMP 从木材样品中检测松材线虫的方法。这些作者建立的这种检测松材线虫的方法比他们建立另一种 TaqMan 探针实时 PCR 检测方法更快更灵敏。引物和 LAMP 检测方法的特异性已用来自非目标材料的 DNA 做过验证: 和松材线虫有关的 10 种线虫、6 个非目标线虫属、黑松、赤松与富氏葡萄孢盘菌。LAMP 检测方法的灵敏度确定为 10 个目标基因 (ITS) 拷贝和分离自纯培养物的一条线虫的  $2.5 \times 10^{-5}$ 。

将木材样品 (试验程序中大约 0.12 g 木材) 加入 800  $\mu$ l 提取缓冲液中, 在 55°C 下孵化 20 min, 随后在 95°C 下孵化 10 min。提取缓冲液含有与松材线虫检测试剂盒 (Nippon Gene<sup>1</sup>) 一起提供的蛋白酶-K 与二硫苏糖醇。

本方法使用以下 LAMP 引物:

ITS(ID19) F3: 5'-GCA GAA ACG CCG ACT TGT-3'

ITS(ID19) B3: 5'-TCA TCC GAA CGT CCC TGA C-3'

ITS(ID19) FIP: 5'-CGC GGA ACA AAC CGC GTA AAA C-CG TTG TGA CAG TCG TCT C G-3'

ITS(ID19) BIP: 5'-AGA GGG CTT CGT GCT CGA TTGGCC GTT GAA ACA ACA TCA CC-3'

ITS(ID19) LF: 5'-AGA TGG TGC CTA ACA TTG CG-3'

LAMP 反应按照 Notomi 等 (2000) 描述的方法, 用 Loopamp DNA Amplification Kit (Eiken Chemical<sup>1</sup>) 进行。25  $\mu$ l 反应混合液含 2  $\mu$ l 提取到的 DNA、F3 和 B3 引物各 5 pmol、FIP 和 BIP 引物各 40 pmol、LF 引物 20 pmol、12.5  $\mu$ l 2 $\times$  reaction mix、1  $\mu$ l Bst DNA 聚合酶, 以及 1  $\mu$ l 荧光检测试剂 (Eiken Chemical<sup>1</sup>)。反应混合物在 63°C 下孵化 60 至 120 min, 结束时在 80°C 下孵化 2 min。通过紫外光下反应溶液颜色的改变来检测 LAMP 扩增子。

也可选择使用一个基于探针的检测系统来评估扩增产物。可用 5'-biotinylated 型 FIP 引物来进行 LAMP 反应。LAMP 反应后, 往反应混合液中加入 10  $\mu$ l 设计用于和目标序列的一个内部区域杂交的以异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的探针

(10 pmol/μl; 5'-GGC GAG AGG GCT TCG TGC TCG ATT GTC GTG C-3')，在 95°C 下孵化 5 min，然后缓慢冷却至 25°C。反应混合液用 100 μl 电泳缓冲液稀释（含 3% Tween 的磷酸盐缓冲液）并按照生产商的说明直接用于 HybriDetect strips (Milenia Biotec<sup>1</sup>)。HybriDetect strips 可检测同时含特异性扩增所产生的生物素与 FITC 的片段。相反，有非特异性扩增发生时，在测试带线上就观察不到任何信号。

#### 4.2.6 分子检测的对照

为了保证获得可靠的检测结果，取决于所采用的检测类型和所要求的确定性水平，应考虑为每组核酸分离与目标有害生物核酸扩增设置适当的对照。对分子检测而言，至少应使用一个阳性核酸对照、一个阴性扩增对照（无模板对照），以及必要时（例如直接检测线虫）的一个内对照。对 RT-PCR（常规或实时）而言，应包含一个阳性 RT 对照。

**阳性核酸对照** 本对照用于监测在实验条件和参数下检测是否按预期完成。一个阳性对照可以是含有检测的目标序列的任何核酸；也就是以前检测为阳性的松材线虫核酸、一个含有克隆的目标序列的质粒、离体转录 RNA、以前扩增反应的产物，或合成的双链（ds）DNA 或一长段寡聚核苷酸。

**阴性扩增对照（无模板对照）**。PCR 必须设置本对照来排除制备反应混合液过程中污染或非特异性扩增引起的假阳性。可在扩增阶段加入制备反应混合液所用的 PCR 级水。

**内对照**。对常规 PCR、实时 PCR 和 LAMP 而言，可使用诸如 ITS 区域、18S rRNA、β-肌动蛋白或 COX 基因等内源性对照来排除可能因核酸提取失败或降解，或存在 PCR 抑制剂而引起的 PCR 假阴性。

对 RT-PCR 而言，应使用一个不含逆转录酶的对照来验证 RNA 样品未被基因组 DNA 污染。本对照含有除了逆转录酶以外所有的 RT-PCR 试剂。在没有基因组 DNA 污染的情况下，本对照在扩增后不会产生任何信号。

对 RT-PCR 而言，应使用一个阳性逆转录酶对照来验证逆转录酶能正常发挥作用。本对照含有所有的 RT-PCR 试剂，以及含有检测的目标序列的一份 RNA 提取物（例如一份实验室制备的以前已确认为阳性的 RNA 提取物）。本对照在扩增后应产生信号。

对 PCR 和 LAMP 而言，应注意避免由阳性对照或阳性样品的气雾引起的交叉污染。



#### 4.2.7 PCR 结果的解释

##### 4.2.7.1 常规PCR

病原特异性 PCR 可判为有效，如果：

- 阳性对照产生目标线虫预期大小的扩增产物
- 阴性提取物对照和阴性扩增对照不产生目标线虫预期大小的扩增产物。

如果使用了内对照引物，对单一反应而言，阳性对照和每个检测样品都应产生预期大小的扩增产物。对多重反应而言，所有阴性样品应产生预期大小的扩增产物。在一些情况下，使用内对照引物时线虫的阳性样品也可以产生预期大小的扩增产物。

如果产生正确大小的扩增产物，对样品的检测可判为阳性。

##### 4.2.7.2 实时PCR

实时 PCR 可判为有效，如果：

- 阳性对照使用目标线虫特异性引物产生一条扩增曲线
- 阴性对照不产生一条扩增曲线。 如果使用了内对照引物，阳性对照和每个检测样品都应产生一条扩增曲线。

#### 4.2.8 测序

为了对松材线虫进行种的鉴定和区分不同种类的伞滑刃属线虫，已对来自分离到的线虫（Wu 等（2013）使用单条或 Ye 等（2007）使用混合的真菌培养产物）的几个基因组区域进行过直接测序。这些区域包含 rDNA 的内转录间隔区（ITS-1、ITS-2、5.8S）（Abelleira 等，2011；Wu 等，2013）或 28S rRNA 基因的 D2-D3 区域（Ye 等，2007）。通过 PCR 对目标区域进行扩增，然后对扩增子直接或克隆后进行测序。随后可采用国家生物技术信息中心（NCBI）（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）提供的基本局部相似性比对搜索工具（BLAST）对测序数据进行分析，并与 NCBI 数据库中的伞滑刃属序列（例如适用于上述 ITS 区域的序列号 HQ646254 与 KC460340 和适用于 28S rRNA 区域的 AY508105 至 AY508109）。

就 ITS 基因而言，如果与已知的松材线虫序列相比，样品的配对序列差异小于 2%，但和其他所有种类相比均大于 2%，则它可鉴定为松材线虫。就 28S 基因而言，如果与已知的松材线虫序列相比，样品的配对序列差异小于 0.5%，但和其他所有种类相比均大于 0.5%，则它可鉴定为松材线虫。任何其他结果都应做进一步研究。

细胞色素氧化酶亚基 I COI 区域也可用于种鉴定。包括 BLAST 在内，所有的方法指导和一个从参考材料获取的参考序列（Q38 序列）都可以从 Q-bank 获取（<http://www.q-bank.eu/Nematodes/>）。

## 5. 记录

应按照 ISPM 27（限定有害生物诊断规程）2.5 节的要求保存记录和证据。在

其他缔约方可能受到诊断结果影响的情况下，特别是在出现违规（ISPM 13：违规和紧急行动通知准则）或一个地区首次发现松材线虫时，以下记录、证据和其他材料应至少妥善保存 1 年，以确保可追溯性：

- 封装为固定玻片或用 TAF 固定液或甘油溶液固定的线虫样品。在一个地区首次发现松材线虫的情况下，建立一个在富氏葡萄孢盘菌上繁殖的活松材线虫培养物有助于对传播途径做进一步调查。即使在形态学鉴定的情况下，保存好标本或 DNA 以备后续分子鉴定可能也会有所助益。
- 如果鉴定是基于分子技术，可在-20°C 下保存提取到的 DNA，在-80°C 下保存提取到的 RNA。
- 针对包含木质包装材料在内的木材或木质产品中发生松材线虫的情况，应保存有关来源、材料（例如圆木、木质包装材料）和输入条件（例如与媒介甲虫同时发生）的数据，而非有关取样的地理信息。要注意到木质包装材料未必和货物来自同一来源。根据 ISPM 15（国际贸易中木质包装材料的管理），国际贸易中的木质包装材料应带有一个标记，其中前两个字母代表木质包装材料生产国的 ISO 编码。

## 6. 获取进一步信息的联系点 有关本生物或本诊断规程的进一步信息可

获自： 国家与国际植物健康研究所联邦栽培植物研究中心 Julius

Kühn-Institut

（JKI），德国布伦瑞克市 D-38104, Messeweg 11-12 号

（Thomas Schröder；电子邮件：[thomas.schroeder@jki.bund.de](mailto:thomas.schroeder@jki.bund.de)）。 宁

波出入境检验检疫局技术中心，中国 315012，宁波市马园路 9 号

（Jianfeng Gu；电子邮件：[jeffgu00@qq.com](mailto:jeffgu00@qq.com)）。

ANSES 植物健康实验室，法国，49044 Angers Cedex 01, rue Jean Dixmèras 7 号

（Geraldine Anthoine；电子邮件：[geraldine.anthoine@anses.fr](mailto:geraldine.anthoine@anses.fr)）。 加拿大

林业局，加拿大，BC V8Z 1M5，维多利亚市 West Burnside 路 506 号

（Isabel Leal；电子邮件：[ileal@nrcan.gc.ca](mailto:ileal@nrcan.gc.ca)）。

加拿大食品检验局，加拿大，ON K2H 8P9，渥太华市 Fallowfield 路 3851 号

（Fencheng Sun；电子邮件：[sunfc@inspection.gc.ca](mailto:sunfc@inspection.gc.ca)）。 除

上述专家外，表 3 列出了和本线虫有关的区域专家。

**表3.** 有关松材线虫的区域与国家专家列表（非全部）

区域或国家	专家详细联系方式
非 洲	比勒陀利亚大学林业与农业生物技术研究所以（FABI），南非比勒陀利亚 0002（Michael J. Wingfield；电子邮件： <a href="mailto:mike.wingfield@fabi.up.ac.za">mike.wingfield@fabi.up.ac.za</a> ）
澳大利亚	CSIRO 生态系统科学黑山实验室，澳大利亚，ACT 2601，黑山 Clunies Ross 街（Mike Hodda；电子邮件： <a href="mailto:Mike.Hodda@csiro.au">Mike.Hodda@csiro.au</a> ）
中 国	南京林业大学林业保护系，中国 210037，南京市龙蟠路 159 号（Boguang Zhao；电子邮件： <a href="mailto:13505186675@126.com">13505186675@126.com</a> ）
欧 盟	NemaLab-ICAM, Departamento Biologia, Universidade de Évora, 7002-554 Évora, Portugal（Manuel Mota；电子邮件： <a href="mailto:mmota@uevora.pt">mmota@uevora.pt</a> ）
日 本	林业与林产品研究所林业病理实验室，日本，茨城县 305-8687，筑波市（Mitsuteru Akiba；电子邮件： <a href="mailto:akiban@ffpri.affrc.go.jp">akiban@ffpri.affrc.go.jp</a> ）
韩国（南朝鲜）	韩国林业研究所林业病虫害研究室，韩国（ROK），首尔 130-712，东大门区 Cheongnyangni 2-dong 207 号（Hyerim Han；电子邮件： <a href="mailto:hrhan@forest.go.kr">hrhan@forest.go.kr</a> ）

国家植物保护组织（NPPOs）、区域植物保护组织（RPPOs）或植物检疫措施委员会（CPM）附属机构可通过国际植物保护公约秘书处（[ippc@fao.org](mailto:ippc@fao.org)）提出对诊断规程进行修订的申请，此类申请会被转交给诊断规程技术小组（TPDP）。

## 7. 致谢

本规程由 Thomas Schröder（德国国家与国际植物健康研究所联邦栽培植物研究中心 JKI（参看前节））、Geraldine Anthoine（法国 ANSES 植物健康实验室（参看前节））、Isabel Leal（加拿大林业局（参看前节））、Jianfeng Gu（中国宁波出入境检验检疫局技术中心（参看前节））和 Fengcheng Sun（加拿大食品检验局（参看前节））起草。

Vladimir Gaar（捷克共和国国家植物检疫局诊断实验室）和 David McNamara（前 EPPO）在前期为本规程做出了贡献。

有关 ITS-RFLP 技术的描述最初由 Wolfgang Burgermeister（德国 JKI 的 Institut für Pflanzenvirologie, Mikrobiologie und Biologische Sicherheit）完成。以卫星 DNA 为目标的鉴定松材线虫的常规 PCR 方法的最初描述由 Philippe Castagnone-Sereno（UMR1064 INRA/UNSA/CNRS，Interactions Plantes-Microorganismes et Sante Vegetale，法国）提供。

本诊断规程的文本部分参考了 EPPO 松材线虫诊断规程（EPPO，2001，2013b）。

## 8. 参考文献

本附件可引自国际植物检疫措施标准（ISPMs）。ISPMs 可从国际植物检疫门户网站（IPP）获取：<https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/ispms>。

- Abelleira, A., Picoaga, A., Mansilla, J.P. & Aguin, O.** 2011. Detection of *Bursaphelenchus xylophilus*, causal agent of pine wilt disease on *Pinus pinaster* in northwestern Spain. *Plant Disease*, 95(6): 776–776.
- Andrássy, I.** 1984. Klasse Nematoda (Ordnungen Monhysterida, Desmoscolecida, Araeolaimida, Chromadorida, Rhabditida). In *Bestimmungsbücher zur Bodenfauna Europas*, pp. 24–25. Stuttgart, Germany, Gustav Fischer Verlag. 509 pp.
- Baermann, O.** 1917. [A simple method of discovering ankylostomo (nematode) larvae in faeces.] *Med. Geneesl. Lab. Weltevreden*, 1917: 41–47 (in German).
- Barstead, R.J., Kleiman, L. & Waterston, R.H.** 1991. Cloning, sequencing and mapping of an alpha-actinin gene from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 20: 69–78.
- van Bezooijen, J.** 2006. *Methods and techniques for nematology*. Wageningen, Netherlands, Department of Nematology, Wageningen University. 112 pp. Available at [https://www.wageningenur.nl/upload\\_mm/4/e/3/f9618ac5-ac20-41e6-9cf1-c556b15b9fa7\\_MethodsandTechniquesforNematology.pdf](https://www.wageningenur.nl/upload_mm/4/e/3/f9618ac5-ac20-41e6-9cf1-c556b15b9fa7_MethodsandTechniquesforNematology.pdf).
- Bongers, T.** 1989. [*The nematodes of the Netherlands*] (translated from the Dutch by J. van de Haar). Wageningen, Netherlands, Wageningen Agricultural University. 83 pp.
- Braasch, H.** 2001. *Bursaphelenchus* species in conifers in Europe: Distribution and morphological relationships. *EPPO Bulletin*, 31: 127–142.
- Braasch, H., Burgermeister, W. & Gu, J.** 2009. Revised intra-generic grouping of *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Nematoda: Aphelenchoididae). *Journal of Nematode Morphology and Systematics*, 12(1): 65–88.
- Braasch, H., Gu, J. & Burgermeister, W.** 2011. *Bursaphelenchus mucronatus kolymensis* comb. n.: New definition of the “European type” of *B. mucronatus*. *Journal of Nematode Morphology and Systematics*, 14(2): 77–90.
- Braasch, H. & Schönfeld, U.** 2015. Improved morphological key to the species of the *xylophilus* group of the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937. *EPPO Bulletin*, 45(1): 73–80.
- Burgermeister, W., Braasch, H., Metge, K., Gu, J., Schröder, T. & Woldt, E.** 2009. ITS-RFLP analysis, an efficient tool for identification of *Bursaphelenchus* species. *Nematology*, 11: 649–668.
- Burgermeister, W., Metge, K., Braasch, H. & Buchbach, E.** 2005. ITS-RFLP patterns for differentiation of 26 *Bursaphelenchus* species (Nematoda: Parasitaphelenchidae) and observations on their distribution. *Russian Journal of Nematology*, 13(1): 29–42.
- Cardoso, J., Fonseca, L. & Abrantes, I.** 2012. Direct detection of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, from pine wood, bark and insect vector. *European Journal of Plant Pathology*, 133: 419–425.
- Castagnone, C., Abad, P. & Castagnone-Sereno, P.** 2005. Satellite DNA-based species-specific identification of single individuals of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae). *European Journal of Plant Pathology*, 112: 191–193.
- Dwinell, L.D.** 1993. First report of pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) in Mexico. *Plant Disease*, 77: 846.
- Dwinell, L.D.** 1997. The pinewood nematode: Regulation and mitigation. *Annual Review of Phytopathology*, 35: 153–166.

- Edwards, O.R. & Linit, M.J. 1992. Transmission of *Bursaphelenchus xylophilus* through oviposition wounds of *Monochamus carolinensis* (Coleoptera: Cerambycidae). *Journal of Nematology*, 24(1): 133–139.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2001. *Bursaphelenchus xylophilus*. Diagnostics PM 7/4 (1). *EPPO Bulletin*, 31(1): 61–69.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2012. *Bursaphelenchus xylophilus* and its vectors: Procedure for official control. National regulatory control systems PM 9/1 (5). *EPPO Bulletin*, 42(3): 477–485.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2013a. *Diagnostic protocols for regulated pests: Pictorial glossary of morphological terms in nematology*. EPPO Technical Document No. 1056 (rev. 4). Paris, EPPO. 21 pp.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2013b. *Bursaphelenchus xylophilus*. Diagnostics PM 7/4 (3). *EPPO Bulletin*, 43(1): 105–118.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2013c. Nematode extraction. Diagnostics PM 7/119 (1). *EPPO Bulletin*, 43(3): 471–496.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2014. *Bursaphelenchus xylophilus*. Addendum to Diagnostics PM 7/4 (3). *EPPO Bulletin* 44(1): 105.
- EPPO/CABI. 1996. *Bursaphelenchus xylophilus*. In I.M. Smith, D.G. McNamara & P.R. Scott, eds. *Quarantine pests for Europe*, 2nd edn. Wallingford, UK, CABI. 1425 pp.
- Evans, H.F., McNamara, D.G., Braasch, H., Chadoeuf, J. & Magnusson, C. 1996. Pest risk analysis (PRA) for the territories of the European Union (as PRA area) on *Bursaphelenchus xylophilus* and its vectors in the genus *Monochamus*. *EPPO Bulletin*, 26: 199–249.
- Ferris, V.R., Ferris, J.M. & Faghihi, J. 1993. Variation in spacer ribosomal DNA in some cyst-forming species of plant parasitic nematodes. *Fundamental and Applied Nematology*, 16: 177–184.
- Fonseca, L., Cardoso, J.M.S., Lopes, A., Pestana, M., Abreu, F., Nunes, N., Mota, M. & Abrantes, I. 2012. The pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in Madeira Island. *Helminthologia*, 49(2): 96–103.
- François, C., Castagnone, C., Boonham, N., Tomlinson, J., Lawson, R., Hockland, S., Quill, J., Vieira, P., Mota, M. & Castagnone-Sereno, P. 2007. Satellite DNA as a target for TaqMan real-time PCR detection of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Molecular Plant Pathology*, 8: 803–809.
- Futai, K. 2013. Pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Annual Review of Phytopathology*, 51: 61–83.
- Goodey, J.B. 1963. *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*. Technical Bulletin No. 2 of the Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. London, HMSO. 72 pp.
- Gu, J., ed. 2014. [*Identification of Bursaphelenchus xylophilus and its closely related species.*] Xiamen, China, Xiamen University Press (in Chinese).
- Gu, J., Wang, J., Braasch, H., Burgermeister, W. & Schröder, T. 2011. Morphological and molecular characterisation of mucronate isolates (M form) of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae). *Russian Journal of Nematology*, 19(2): 103–120.
- Gu, J., Zhang, J., Braasch, H. & Burgermeister, W. 2005. *Bursaphelenchus singaporensis* sp. n. (Nematoda: Parasitaphelenchidae) in packaging wood from Singapore: A new species of the *B. xylophilus* group. *Zootaxa*, 988: 1–12.
- Hasegawa, K. & Miwa, J. 2008. Embryology and cytology of *Bursaphelenchus xylophilus*. In B.G. Zhao, K. Futai, J.R. Sutherland & Y. Takeuchi, eds. *Pine wilt disease*, pp. 81–104. Tokyo, Springer. 459 pp.

- Hopf, A. & Schroeder, T.** 2013. Non vector spread of *Bursaphelenchus xylophilus* via wood chips. In T. Schroeder, ed. Pine Wilt Disease Conference, 15–18 October 2013, Braunschweig, Germany. *Berichte aus dem Julius Kühn Institut*, 169: 46–47.
- Hu, Y.Q., Kong, X.C., Wang, X.R., Zhong, T.K., Zhu, X.W., Mota, M.M., Ren, L.L., Liu, S. & Ma, C.** 2011. Direct PCR-based method for detecting *Bursaphelenchus xylophilus*, the pine wood nematode in wood tissue of *Pinus massoniana*. *Forest Pathology*, 41: 165–168.
- Hunt, D.J.** 2008. A checklist of the Aphelenchoidea (Nematoda: Tylenchina). *Journal of Nematode Morphology and Systematics*, 10(2): 99–135.
- Ibeas, F., Gallego, D., Diez, J.J. & Pajares, J.A.** 2007. An operative kairomonal lure for managing pine sawyer beetle *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerymbycidae). *Journal of Applied Entomology*, 131(1): 13–20.
- Inácio, M.L., Nóbrega, F., Vieira, P., Bonifácio, L., Naves, P., Sousa, E. & Mota, M.** 2014. First detection of *Bursaphelenchus xylophilus* associated with *Pinus nigra* in Portugal and in Europe. *Forest Pathology*, 45(3): 235–238.
- Kanetani, S., Kikuchi, T., Akiba, M., Nakamura, K., Ikegame, H. & Tetsuka, K.** 2011. Detection of *Bursaphelenchus xylophilus* from old discs of dead *Pinus armandii* var *amamiana* trees using a new detection kit. *Forest Pathology*, 41: 387–391.
- Kikuchi, T., Aikawa, T., Oeda, Y., Karim, N. & Kanzaki, N.** 2009. A rapid and precise diagnostic method for detecting the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* by loop-mediated isothermal amplification. *Phytopathology*, 99: 1365–1369.
- Kishi, Y.** 1995. *The pine wood nematode and the Japanese pine sawyer*. Forest Pests in Japan No. 1. Tokyo, Thomas Company Limited. 302 pp.
- Kondo, E. & Ishibashi, N.** 1978. Ecological significance of dormancy in plant parasitic nematodes. 7. Ultrastructural differences between propagative and dispersal forms in pine wood nematode, *Bursaphelenchus lignicolus*, with reference to survival. *Applied Entomology and Zoology*, 13: 1–11.
- Leal, I., Foord, B., Allen, E., Champion, C., Rott, M. & Green, M.** 2013. Development of two reverse transcription-PCR methods to detect living pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in wood. *Forest Pathology*, 43: 104–114.
- Leal, I., Green, M., Allen, E., Humble, L. & Rott, M.** 2007. Application of a real-time PCR method for the detection of pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in wood samples from lodgepole pine. *Nematology*, 9: 351–362.
- Linit, M.J.** 1990. Transmission of pinewood nematode through feeding wounds of *Monochamus carolinensis* (Coleoptera: Cerambycidae). *Journal of Nematology*, 22(2): 231–236.
- Luzzi, M.A., Wilkinson, R.C. & Tarjan, A.C.** 1984. Transmission of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*, to slash pine trees and log bolts by a cerambycid beetle, *Monochamus tilliator*, in Florida. *Journal of Nematology*, 16(1): 37–40.
- Mamiya, Y. & Kiyohara, T.** 1972. Description of *Bursaphelenchus lignicolus* n.sp. from pine wood and histopathology of nematode-infested trees. *Nematologica*, 18: 120–124.
- Matsunaga, K. & Togashi, K.** 2004. Among-tree difference in the inhibition of systemic dispersal of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) by *Pinus densiflora*. *Applied Entomology and Zoology*, 39(2): 271–277.
- Moens, M.** 2000. The pinewood nematode: Development of a sampling, extraction and identification method. Final report FAIR1-CT95-0034 EU research project. 102 pp.
- Mota, M., Braasch, H., Bravo, M.A., Penas, A.C., Burgermeister, W., Metge, K. & Sousa, E.** 1999. First record of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology*, 1: 727–734.



- Mota, M. & Vieira, P., eds. 2004. The pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. Proceedings of an international workshop, University of Évora, Portugal, 20–22 August 2001. In *Nematological monographs and perspectives*, Vol. 1. Leiden, Netherlands, Brill. 291 pp.
- Mota, M. & Vieira, P., eds. 2008. *Pine wilt disease: A worldwide threat to forest ecosystems*. Berlin, Springer Verlag. 405 pp.
- Nickle, W.R. 1970. A Taxonomic review of the genera of the Aphelenchoidae (Fuchs, 1937) Thorne, 1949 (Nematoda: Tylenchida). *Journal of Nematology*, 2(4): 375–392.
- Nickle, W.R., Golden, A.M., Mamiya, Y. & Wergin, W.P. 1981. On the taxonomy and morphology of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhrer, 1934) Nickle (1970). *Journal of Nematology*, 13: 385–392.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. & Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28: e63.
- Pajares, J.A., Ibeas, F., Diez, J.J. & Gallego, D. 2004. Attractive responses by *Monochamus galloprovincialis* (Col., Cerambycidae) to host and bark beetle semiochemicals. *Journal of Applied Entomology*, 128(9/10): 633–638.
- Penas, A.C., Bravo, M.A., Valads, V. & Mota, M. 2008. Detailed morphometric studies of *Bursaphelenchus xylophilus* and characterisation of other *Bursaphelenchus* species (Nematoda: Parasitaphelenchidae) associated with *Pinus pinaster* in Portugal. *Journal of Nematode Morphology and Systematics*, 10(2): 137–163.
- Penas, A.C., Dias, L.S. & Mota, M.M. 2002. Precision and selection of extraction methods of aphelenchoid nematodes from maritime pine wood, *Pinus pinaster* L. *Journal of Nematology*, 24(1): 62–65.
- Ryss, A.Y. 2003. Express technique to prepare permanent collection slides of nematodes. *Zoosystematica Rossica*, 11: 257–260.
- Ryss, A., Viera, P., Mota, M. & Kulinich, O. 2005. A synopsis of the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Aphelenchida: Parasitaphelenchidae) with keys to species. *Nematology*, 7(3): 393–458.
- Sanchez-Husillos, E., Etxebeste, I. & Pajares, J. 2015. Effectiveness of mass trapping in the reduction of *Monochamus galloprovincialis* Olivier (Col.: Cerambycidae) populations. *Journal of Applied Entomology*, doi:10.1111/jen.12219.
- Schröder, T., McNamara, D.G. & Gaar, V. 2009. Guidance on sampling to detect pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* in trees, wood and insects. *EPPO Bulletin*, 39: 179–188.
- Seinhorst, J.W. 1959. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica*, 4: 67–69.
- Sousa, E., Bravo, M.A., Pires, J., Naves, P., Penas, A.C., Bonifácio, L. & Mota, M.M. 2001. *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) associated with *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera; Cerambycidae) in Portugal. *Nematology*, 3(1): 89–91.
- Sousa, E., Naves, P., Bonifácio, L., Henriques, J., Inácio, L. & Evans, H. 2011. Assessing risks of pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* transfer between wood packaging by simulating assembled pallets in service. *EPPO Bulletin*, 41: 423–431.
- Takeuchi, Y., Kanzaki, N. & Futai, K. 2005. A nested PCR-based method for detecting the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, from pine wood. *Nematology*, 7: 775–782.
- Tarès, S., Lemontey, J.M., de Guiran, G. & Abad, P. 1993. Cloning and characterization of a highly conserved satellite DNA sequence specific for the phytoparasitic nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Gene*, 129: 269–273.
- Tomalak, M. & Filipiak, A. 2011. *Bursaphelenchus tryphloeus* sp. n. (Nematoda: Parasitaphelenchinae): An associate of the bark beetle, *Tryphloeus asperatus* (Gyll.) (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae), in aspen, *Populus tremula* L. *Nematology*, 13: 619–636.

- Tomalak, M., Worall, J. & Filipiak, A.** 2013. *Bursaphelenchus masseyi* sp. n. (Nematoda: Parasitaphelenchinae): A nematode associate of the bark beetle, *Trypophloeus populi* Hopkins (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), in aspen, *Populus tremuloides* Michx. affected by sudden aspen decline in Colorado. *Nematology*, 15: 907–921.
- Vieira, P.R., Mota, M. & Eisenback, J.D.** 2003. Pinewood Nematode Taxonomic Database. CD-ROM. Blacksburg, VA, Mactode Publications.
- Vrain, T.C.** 1993. Restriction fragment length polymorphism separates species of the *Xiphinema americanum* group. *Journal of Nematology*, 25: 361–364.
- Williams, B.D., Schrank, B., Huynh, C., Shownkeen, R. & Waterston, R.H.** 1992. A genetic mapping system in *Caenorhabditis elegans* based on polymorphic sequence-tagged sites. *Genetics*, 131: 609–624.
- Wingfield, M.J.** 1987. A comparison of the mycophagous and the phytophagous phases of the pine wood nematode. In M.J. Wingfield, ed. *Pathogenicity of the pine wood nematode*. Symposium Series, pp. 81–90. St Paul, MN, APS Press. 122 pp.
- Wingfield, M.J., Blanchette, R.A., Nicholls, T.H. & Robbins, K.** 1982. The pine wood nematode: A comparison of the situation in the United States and Japan. *Canadian Journal of Forest Research*, 12: 71–75.
- Wu, H.Y., Tan, Q.Q. & Jiang, S.X.** 2013. First report of pine wilt disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus* on *Pinus thunbergii* in the inland city of Zibo, Shandong, China. *Plant Disease*, 97(8): 1126.
- Ye, W., Giblin-Davis, R.M., Braasch, H., Morris, K. & Thomas, W.K.** 2007. Phylogenetic relationships among *Bursaphelenchus* species (Nematoda: Parasitaphelenchidae) inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43: 1185–1197.
- Zamora, P., Rodriguez, V., Renedo, F., Sanz, A.V., Domínguez, J.C., Pérez-Escolar, G., Miranda, J., Álvarez, B., González-Casas, A., Mayor, E., Duenas, M., Miravalles, A., Naves, A., Robertson, L., Gutiérrez Abascal, C.J. & Martín, A.B.** 2015. First report of *Bursaphelenchus xylophilus* causing pine wilt disease on *Pinus radiata* in Spain. *Disease Notes*, <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-03-15-0252-PDN>.
- Zhao, B.G., Futai, K., Sutherland, J.R. & Takeuchi, Y.** 2008. *Pine wilt disease*. Berlin, Springer. 459 pp.



## 9. 图

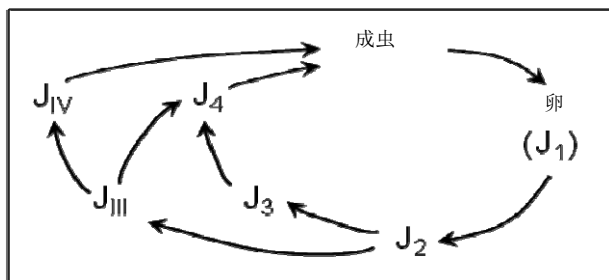


图1. 松材线虫从卵到成虫的生活史

JX, X 龄幼虫

来源：改编自 Wingfield 等 (1982)。



图2. 海岸松被松材线虫侵染后的症状演变，树木从健康到死亡

照片由德国 Julius Kühn-Institut 的 T. Schröder 提供。



图3. 松材线虫在海岸松上引起的松树萎蔫病症状  
照片由德国Julius Kühn-Institut 的T. Schröder 提供。

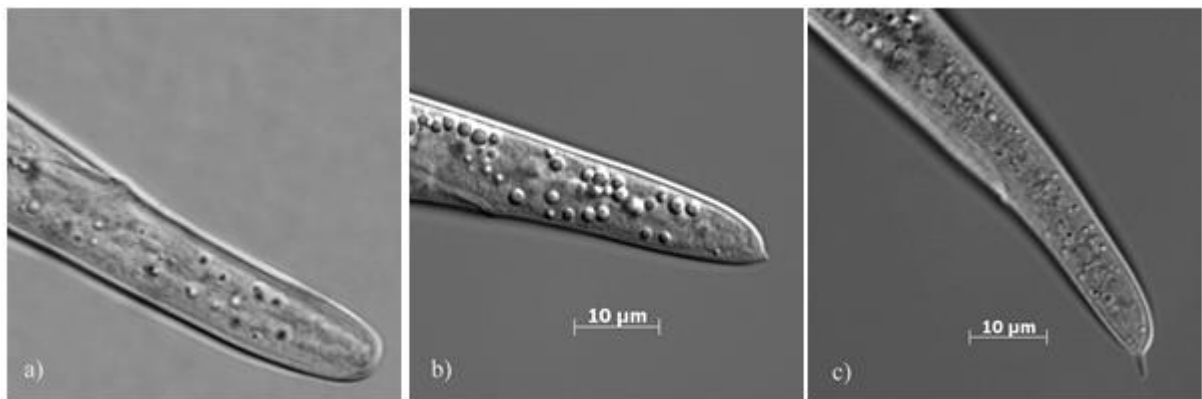


图4. 松材线虫雌虫尾部：（a）圆形（ $\times 1\,000$  放大）；（b）有小突起；以及（c）M型（尾尖突型）  
照片（a）由德国Julius Kühn-Institut 的T. Schröder 提供，（b、c）由中国宁波出入境检验检疫局 的J. Gu 提供。

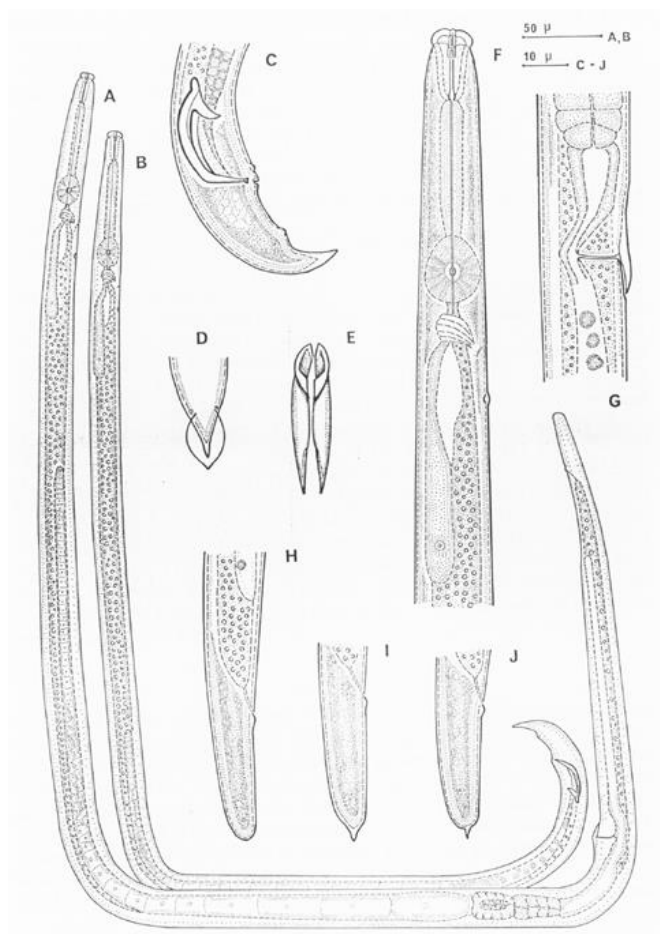


图 5. 松材线虫：（A）雌虫；（B）雄虫；（C）雄虫尾部；（D）雄虫尾部腹面观，尾端有交合伞；（E）交合刺腹面观；（F）雌虫，前部；（G）雌虫阴门；以及（H）、（I）与（J）雌虫尾部  
来源：Mamiya 和 Kiyohara ( 1972 )。

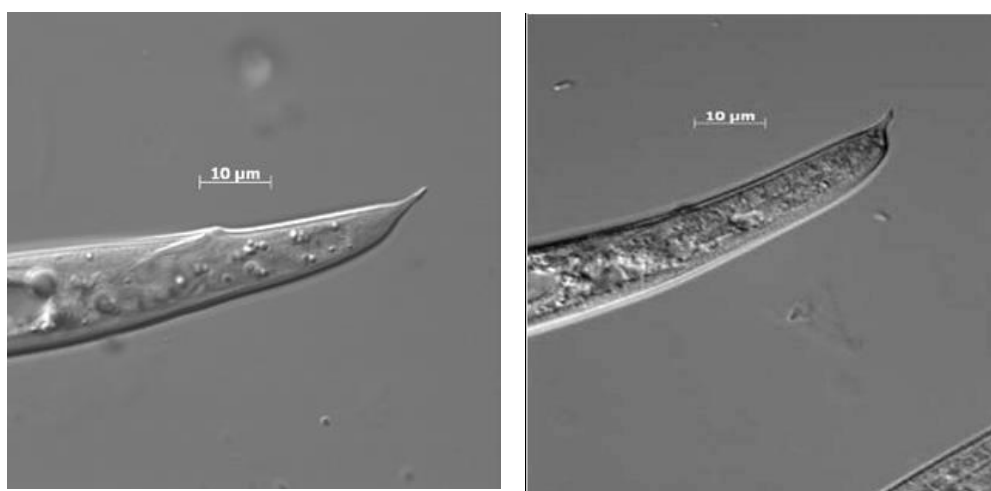


图 6. 拟松材线虫东亚亚种（左）与拟松材线虫欧洲亚种（右）的雌虫尾部  
照片由中国宁波出入境检验检疫局的 J. Gu 提供。

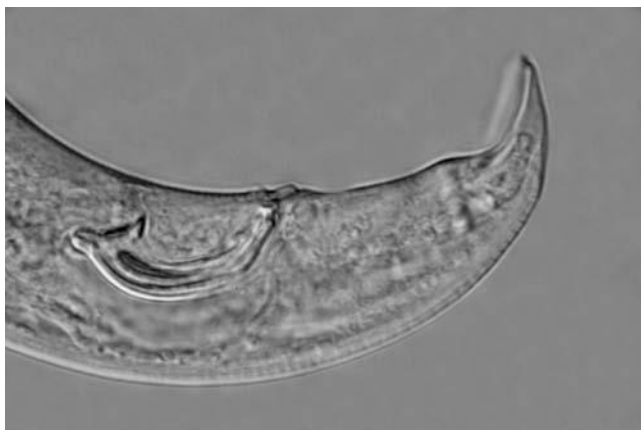


图7. 有交合刺的松材线虫雄虫尾部（ $\times 1\,000$  放大）  
照片由德国Julius Kühn-Institut 的T. Schröder 提供。

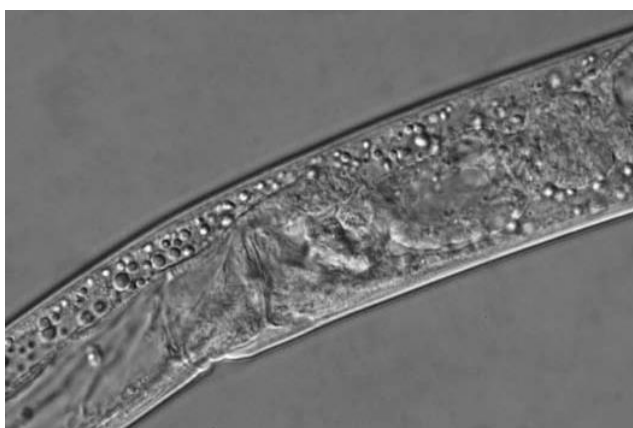


图8. 有阴门盖的松材线虫雌虫（ $\times 640$  放大）  
照片由德国Julius Kühn-Institut 的T. Schröder 提供。

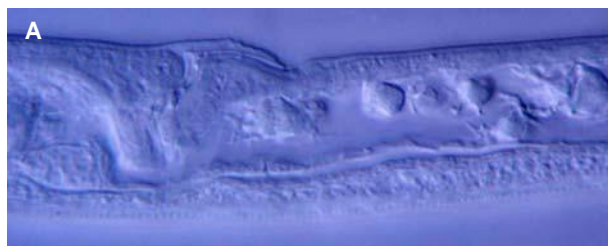


图 9. 松材线虫组的非松材线虫种：（A）雌虫阴门盖，弧形且末端深凹陷（B）伪伞滑刃线虫雌虫尾部有小突起（左）与无突起（右）（ $\times 1\,000$  放大）

照片由波兰国家研究院植物保护研究所的M. Tomalak 提供。

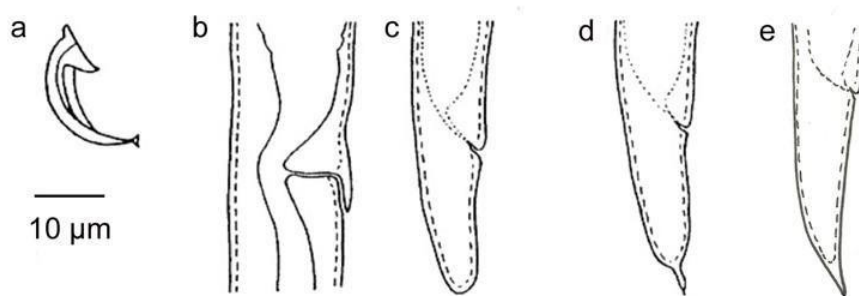


图 10. 松材线虫、拟松材线虫东亚亚种与拟松材线虫欧洲亚种的诊断特征：（a）三个种的交合刺；（b）三个种的阴门盖；（c）松材线虫雌虫的尾端，圆型；（d）拟松材线虫欧洲亚种的雌虫尾端；以及（e）拟松材线虫东亚亚种的雌虫尾端

来源：改编自EPPO/CABI ( 1996 )。

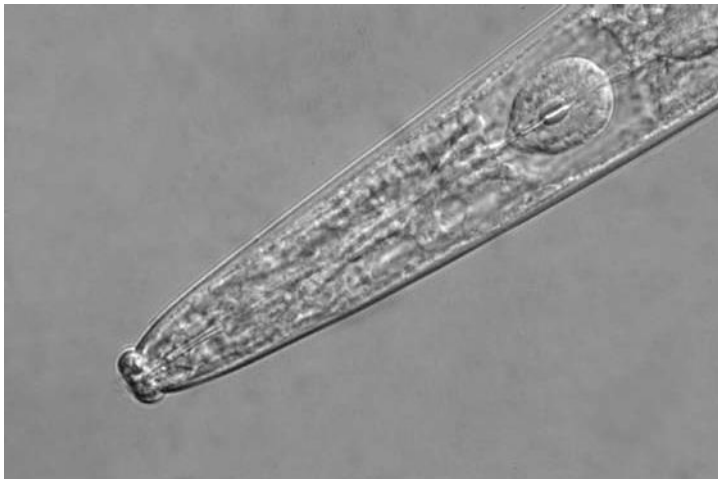


图11. 松材线虫前部有口针与中食道球 (×640 放大)  
照片由德国Julius Kühn-Institut 的T. Schröder 提供。



图12. 松材线虫有交合伞的雄虫尾部背腹位观 (×1 000 放大)  
照片由德国Julius Kühn-Institut 的T. Schröder 提供。

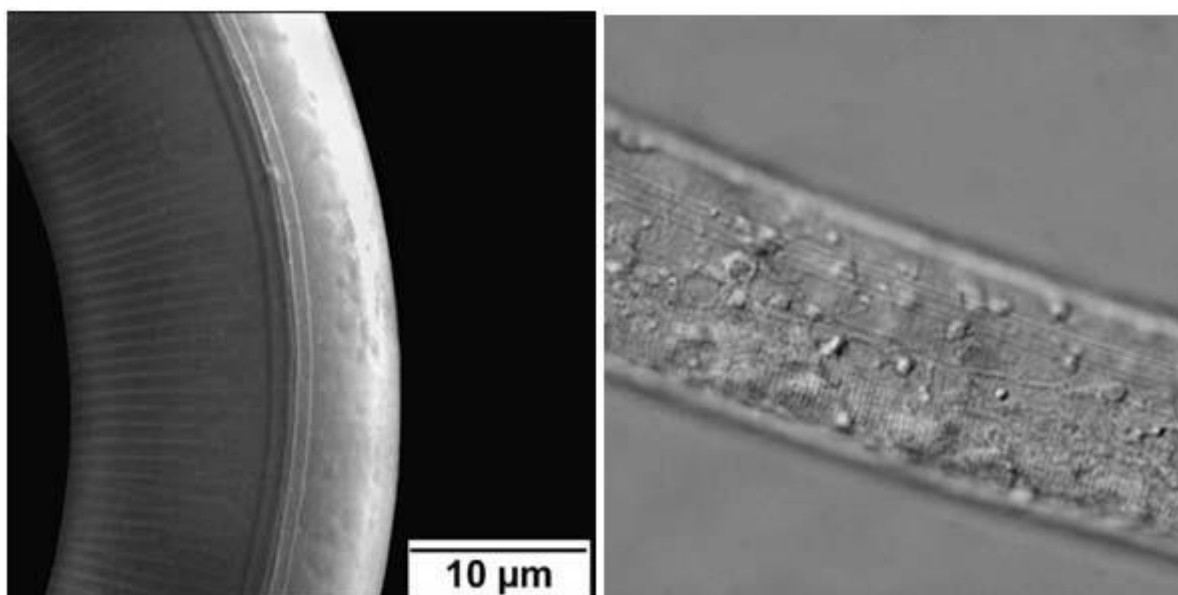


图13. 扫描电子显微镜（左）与光学显微镜（右（ $\times 1\,600$  放大））下的松材线虫侧区照片（左）由澳大利亚林业研究中心的 M. Brandstetter 提供，（右）由德国 Julius Kühn-Institut 的 T. Schröder 提供。

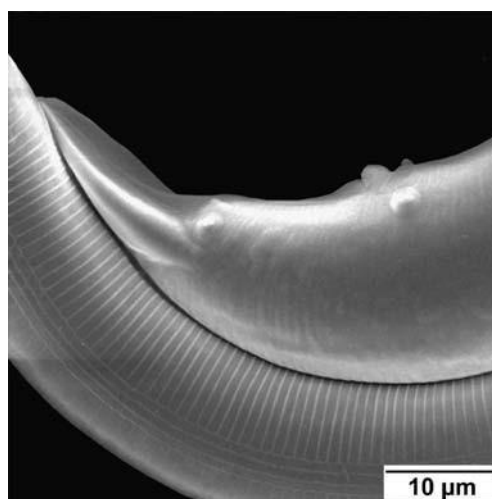


图14. 松材线虫尾乳突的扫描电子显微照片  
照片由澳大利亚林业研究中心的 M. Brandstetter 提供。



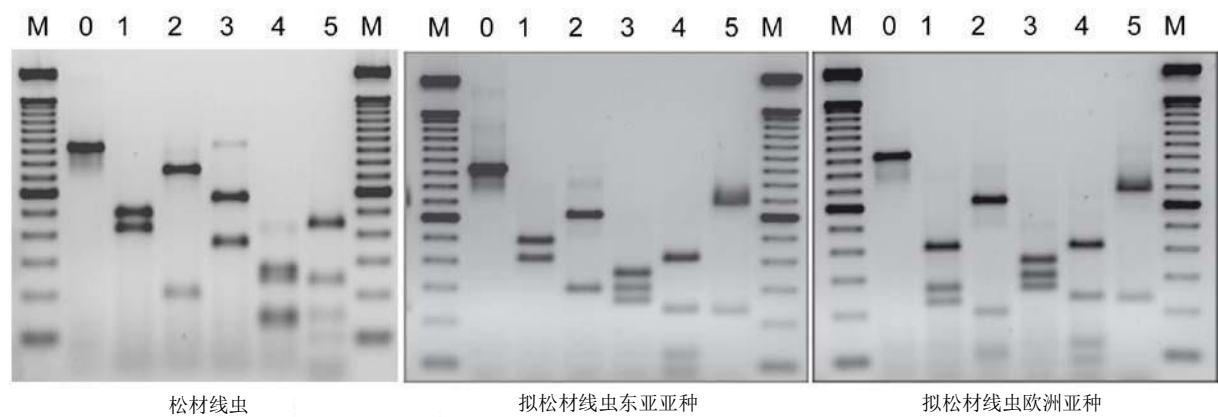


图 15. 松材线虫（左）、拟松材线虫东亚亚种（中）与拟松材线虫欧洲亚种（右）的内转录间隔区（ITS）- 限制性片段长度多态性（RFLP）图谱。限制性片段用 *Rsa*I（1）、*Hae*III（2）、*Msp*I（3）、*Hinf*I（4）和 *Alu*I（5）对扩增的核糖体（r）DNA 片段（0）进行酶切获得 M，DNA 标记（100 个碱基对梯度）  
照片由德国 Julius Kühn-Institut 的 W. Burgermeister 提供。

出台背景

这部分不属于本标准的正式内容

- 2004 年 11 月，标准委增列主题：松材线虫（2004-016）
- 2006 年 4 月，植检委第一届会议（2006）增列工作计划主题：线虫（2006-008）
- 2007 年 9 月，诊断规程技术小组讨论草案
- 2008 年 6 月，诊断规程技术小组和牵头作者一起讨论草案
- 2013 年 9 月，新的诊断规程起草小组成立
- 2014 年 3 月，专家磋商
- 2014 年 10 月，标准委批准提交成员磋商（2014\_eSC\_Nov\_11）
- 2015 年 2 月，成员磋商
- 2015 年 10 月，诊断规程技术小组批准提交标准委供电子决策论坛审议（eTPDP\_Oct\_02）
- 2015 年 11 月，标准委批准进入诊断规程通报期（2015\_eSC\_Nov\_08）
- 2016 年 1 月，标准委代表植检委批准诊断规程（未收到正式反对意见）

**ISPM 27. 附件10.** 松材线虫（*Bursaphelenchus xylophilus*）（2016）。罗马， 国际植物保护公约，粮农组织。

2018 年 1 月，中文语言审核小组和联合国粮农组织翻译服务审议了这项 DP，国际植物保护公约秘书处合并了相应的修改。

2018 年 4 月，植物检疫措施委员会第 13 届会议（2018）指出中文语言审查小组已经审查了此附件。

发布背景最后更新：2018 年 10 月