



联合国
粮食及
农业组织

Food and Agriculture
Organization of the
United Nations

Organisation des Nations
Unies pour l'alimentation
et l'agriculture

Продовольственная и
сельскохозяйственная организация
Объединенных Наций

Organización de las
Naciones Unidas para la
Alimentación y la Agricultura

منظمة
الغذية والزراعة
للأمم المتحدة

C

植物检疫措施委员会

第十二届会议

2017 年 4 月 5–11 日，韩国仁川

注意植检委第十一届会议（2016 年）通过的 国际植物检疫措施标准的译文调整

议题 9.4

国际植保公约秘书处起草

I. 引言

1. 植检委第五届会议（2010 年）通过了语言审查小组程序，纠正所通过的国际植检措施标准各语言版本中的编辑错误。
2. 国际植保公约秘书处在国际植检门户网站上提供有关该语言审查小组的设立和 workflow 情况¹。

II. 语言审查小组的设立

3. 需要为俄文语言审查小组配备协调员。

¹ <https://www.ippc.int/core-activities/governance/standards-setting/ispm/language-review-groups>

为尽量减轻粮农组织工作过程对环境的影响，促进实现对气候变化零影响，本文件印数有限。敬请各位代表、观察员携带文件与会，勿再索取副本。粮农组织大多数会议文件可从互联网 www.fao.org 网站获取。

III. 对植检委第十一届会议（2016年）所通过标准的审查

4. 秘书处收到了阿拉伯文、中文和西班牙文语言审查小组提交的对植检委第十一届会议（2016年）所通过国际植检措施标准做出的修改建议。秘书处将修改建议提交粮农组织翻译服务部门，由其进行审核。拟议修改已纳入经修订的国际植检措施标准并以跟踪方式标示，提交植检委第十二届会议（2017年）。

5. 对于每一种语言，粮农组织翻译服务部门与语言审查小组就所有拟议修改都达成了一致意见。

6. 秘书处没有收到有关国际植检措施标准法文版本的修改意见。

7. 忆及由于是标准委员会代表植检委通过诊断规程，因此诊断规程是在一年中的不同时间得到通过，而且可能无法在植检委会议之后把各语言版本提交至语言审查小组常规程序。诊断规程的其他语言版本一旦完成，秘书处将提交给相应语言审查小组。

8. 植检委第十一届会议（2016年）通过的国际植检措施标准，包括植检处理方法和诊断规程，仅以具体的语言版本作为本文附件：

- 第5号国际植检措施标准《植物检疫术语表》修正案（参阅附件1）
- 第37号国际植检措施标准《水果实蝇（*Tephritidae*）寄主地位的确定》（参阅附件2）
- 作为第28号国际植检措施标准《限定性有害生物植检处理方法》附件的第20号植检处理方法《欧洲玉米螟（*Ostrinia nubilalis*）的辐照处理》（参阅附件3）
- 作为第28号国际植检措施标准附件的第21号植检处理方法《针对库克果实蝇（*Bactrocera melanotus*）和黄侧条果实蝇（*Bactrocera xanthodes*）的番木瓜（*Carica papaya*）蒸汽热处理》（参阅附件4）
- 作为第27号国际植检措施标准《限定性有害生物诊断规程》附件的第7号诊断规程《马铃薯纺锤形块茎类病毒（*spindle tuber viroid*）》（参阅附件5）
- 第8号诊断规程《马铃薯鳞球茎线虫与（*Ditylenchus dipsaci*）与腐烂茎线虫（*Ditylenchus destructor*）》（参阅附件6）
- 第9号诊断规程《按实蝇属（Genus *Anastrepha* Schiner）》（参阅附件7）

IV. 决定

9. 提请植检委：

- 1) 注意到阿拉伯文、中文和西班牙文语言审查小组及粮农组织翻译服务部门已审查下列内容：
 - 第 5 号国际植检措施标准《植物检疫术语表》修正案
 - 第 37 号国际植检措施标准《水果实蝇 (*Tephritidae*) 寄主地位的确定》
 - 作为第 28 号国际植检措施标准《限定性有害生物植检处理方法》附件的第 20 号植检处理方法《欧洲玉米螟 (*Ostrinia nubilalis*) 的辐照处理》
 - 作为第 28 号国际植检措施标准附件的第 21 号植检处理方法《针对库克果实蝇 (*Bactrocera melanotus*) 和黄侧条果实蝇 (*Bactrocera xanthodes*) 的番木瓜 (*Carica papaya*) 蒸汽热处理》
 - 作为第 27 号国际植检措施标准《限定性有害生物诊断规程》附件的第 7 号诊断规程《马铃薯纺锤形块茎类病毒 (*spindle tuber viroid*)》
 - 作为第 27 号国际植检措施标准附件的第 8 号诊断规程《马铃薯鳞球茎线虫与 (*Ditylenchus dipsaci*) 与腐烂茎线虫 (*Ditylenchus destructor*)》
 - 作为第 27 号国际植检措施标准附件的第 9 号诊断规程《按实蝇属 (*Genus Anastrepha* Schiner)》
- 2) 同意一旦秘书处采用附件 1 至附件 7 中（以相关语言版本作为本文附件）以跟踪方式标示的修改，则国际植检措施标准先前的版本废除，由新加注的版本取代。
- 3) 注意到俄文语言审查小组由于没有任命协调员而在目前无法运作。
- 4) 鼓励缔约方为俄文语言审查小组提名一位协调员。
- 5) 感谢参加语言审查小组工作的缔约方、区域植物保护组织以及粮农组织翻译服务部门，感谢他们为改进国际植检措施标准各语言版本付出的努力和辛勤劳动。

[1]

**第 5 号国际植检措施标准（2014 年）：
植物检疫术语表修正案草案（1994-001）**

[2]

文件日期	2015 年 11 月 25 日
文件类型	第 5 号《国际植检措施标准》（植物检疫术语表）的修正 2014 年（1994-001）
文件当前阶段	2015 年 11 月标准委提交植检委
主要阶段	<p>植物检疫措施专家委员会（1994 年）添加主题：1994-001， 第 5 号国际植检措施标准：植物检疫术语表的修正</p> <p>2006 年 5 月 标准委员会（标准委）批准技术小组 5 技术规格</p> <p>2012 年 10 月 植物检疫术语表技术小组修订技术规格</p> <p>2012 年 11 月 标准委修订并批准经过修订的技术规格，撤销 技术规格 1 号</p> <p>2014 年 2 年 术语表技术小组审议第 5 号国际植检措施标准 修正案草案（2014 年）</p> <p>2014 年 5 月 经标准委审查和批准提交成员磋商</p> <p>2014 年 7-11 月 成员磋商</p> <p>2014 年 12 月 术语表技术小组修订修正案并回复成员的评论 意见</p> <p>2015 年 5 月 7 人标准委批准进入实质性关切评议期</p> <p>2015 年 6-9 月 实质性关切评议期</p> <p>2015 年 10 月 术语表技术小组审查实质性关切评议期的评论 意见；修正案草案未做任何修改</p> <p>2015 年 11 月 标准委撤销“标记”（2013-007），批准将 第 5 号国际植检措施标准修正案 2014 年草案提交通过</p>
说明	2014 年 5 月 标准委撤销：标识（货物的）（2011-001）， 植物检疫安全（货物的）（2013-008），完整性（货物的）， 窑内烘干（2013-006），

	<p>2014年5月19日 秘书处编辑</p> <p>2015年5月7日 标准委撤销：树皮（2013-005）和直观检查（2013-010）</p> <p>2015年5月25日 管理员审查。</p> <p>2015年11月16日 秘书处更新修正案草案，反映植检委第十届会议（2015年）注意到对“商品类别”表达方式的文字修改</p> <p>说明：有关各项提案的解释仅在提交成员磋商和提交标准委的修正案草案版本中提供。仅向植检委提交提案本身。</p>
--	---

[4] 1. 修订

[5] 1.1 附加声明 (2010-006)

[10] 原有定义

[11]

附加声明	<p>输入国要求填入植物检疫证书上的、提供有关限定有害生物的货物的具体补充情况声明。[粮农组织，1990年；植检临委2005年修改]</p>
------	---

[12] 建议修订

[13]

附加声明	<p>输入国要求填入植物检疫证书上的、提供有关限定有害生物或限定物的货物的具体补充情况声明。[粮农组织，1990年；植检临委2005年修改]</p>
------	--

[14] 1.2 谷物 (2013-018) ， 籽实

[24] 原有定义

[25]

谷物（作为一个商品类别）	供加工或消费而非 种植用的籽实 （见种子）[粮农组织，1990；植检临委 2001 年修改；植检委 2015 年修改]
种子（作为一个商品类别）	供 种植 或打算用于种植而非消费或加工用的籽实（见 谷物 ）[粮农组织，1990 年；植检临委 2001 年修改；植检委 2015 年修改]

[26] 建议修订

[27]

谷物（作为一个商品类别）	供加工或消费但 而非种植用的 （植物学意义上的）籽实（见 种子 ）[粮农组织，1990 年；植检临委 2001 年修改；植检委 2015 年修改]
种子（作为一个商品类别）	供 种植 或打算用于种植而非消费或加工用的 [植物学意义上的] 籽实（见 谷物 ）[粮农组织，1990 年；植检临委 2001 年修改；植检委 2015 年修改]

[38] 1.3 木材 (2013-011)

[46] 原有定义

[47]

木材（作为一个商品类别）	带 树皮 或不带 树皮 的 圆木、锯木、木片或垫木 [粮农组织，1990 年；植检临委 2001 年修改；植检委 2015 年修改]
--------------	---

[48] 建议修订

[49]

木材（作为一个商品类别）	带 树皮 或不带 树皮 的 圆木、锯木、木片或垫木和木废料等商品 ， 不包括木质包装材料、加工木制品和竹制品 [粮农组织，1990 年；植检临委 2001 年修改；植检委 2015 年修改]
--------------	---

国际植物检疫措施标准

ISPM 第 37 号

判确定水果的实蝇 (Tephritidae) 寄主地位

国际植物保护公约秘书处
2016 年通过 ; 2016 年出台

粮农组织鼓励对本信息产品中的材料进行使用、复制和传播。除非另有说明，可拷贝、下载和打印材料，供个人学习、研究和教学所用，但必须恰当地说明粮农组织为信息来源及版权所有，且不得以任何方式暗示粮农组织认可使用者的观点、产品或服务。

复制本国际植物检疫措施标准时，应提及国际植物检疫措施标准当前批准的版本可从 www.ippc.int 网站下载。

所有关于翻译权、改编权及转售权和其他商业性使用权的申请，应通过 www.fao.org/contact-us/licence-request 提交，或发送至 copyright@fao.org。

粮农组织信息产品可在粮农组织网站 (www.fao.org/publications) 获得和通过 publications-sales@fao.org 购买。

本信息产品中使用的名称和介绍的材料并不意味着联合国粮食及农业组织（粮农组织）对任何国家、领地、城市或地区或其当局的法律或发展状态、或对其国界或边界的划分表示任何意见。提及具体的公司或厂商产品，无论是否含有专利，并不意味着它们得到粮农组织的认可或推荐，优于未提及的具有类似性质的其它公司或产品。本出版物中表达的观点是作者的观点，不一定反映粮农组织的观点或政策。

出台背景

这部分不属于本标准的正式内容

2006 年 11 月，标准委将“实蝇 *Tephritidae* 寄主易感性的确定”列为主题（2006-031）

2009 年 5 月，标准委批准将规格草案提交成员磋商

2010 年 2 月，成员磋商

2010 年 4 月，标准委批准了第 50 号标准规格

2010 年 10 月，实蝇非疫区和系统方法技术小组起草了 ISPM

2011 年 5 月，标准委审议了 ISPM 草案并返回给实蝇技术小组

2011 年 8 月，实蝇技术小组修改了 ISPM 草案

2012 年 4 月，标准委批准将 ISPM 草案提交成员磋商

2012 年 7 月，成员磋商

2013 年 5 月，标准委 7 人小组批准于 2013 年 7 月进入实质性关切评议阶段

2013 年 11 月，标准委批准将 ISPM 草案提交植检委第九届会议通过

2014 年 4 月，植检委第九届会议前 14 日收到正式反对意见

2014 年 4 月，管理员修改了 ISPM 草案，对正式反对意见做出回应

2014 年 5 月，标准委审议并请实蝇非疫区和系统方法技术小组审议

2014 年 5 月，实蝇非疫区和系统方法技术小组审议

2014 年 11 月，标准委批准将 ISPM 草案提交植检委第十届会议通过

2015 年 3 月，植检委第十届会议（2015 年）提出关切，草案退回标准委

2015 年 4 月，管理员修改了 ISPM 草案

2015 年 5 月，标准委批准进入实质性关切评议阶段

2015 年 10 月，实蝇非疫区和系统方法技术小组修改了 ISPM 草案

2015 年 11 月，标准委审议批准提交植检委第十一届会议通过

2016 年 4 月，植检委第十一届会议通过本标准

国际植检措施标准第 37 号，2016 年。确定水果的实蝇（*Tephritidae*）

寄主地位。罗马，国际植保公约，粮农组织。

出台背景最后更新于 2016 年 4 月。

目录

批准	4
引言	4
范围	4
参考资料	4
定义	4
要求概要	5
背景	5
一般要求	6
具体要求	98
1. 通过果实抽样进行监视来 <u>判定</u> 确定自然寄主地位	98
2. 在半自然条件下用田间实验 <u>判定</u> 确定寄主地位	109
2.1 果实抽样	109
2.2 实蝇	109
2.3 水果	110
2.4 对照	110
2.5 田间实验设计	110
3. 利于实蝇发育和羽化的果实处理措施	124
4. 数据分析	134
5. 记录的保存和发表	134
附录 1: 参考资料目录	143

批准

本标准由植物检疫措施委员会第十一届会议于 2016 年 4 月通过。

引言

范围

本标准为判确定水果的实蝇 (Tephritidae) 寄主地位提供准则，并描述了水果作为实蝇寄主地位的三种类别。

本标准所指的水果涵盖了植物学意义上的水果，包括那些有时被称为蔬菜的水果（例如番茄和瓜类）。

本标准包含用于在当寄主地位不确定的情况下时，为判确定未受损害水果的实蝇寄主地位而在自然条件下进行监视，和在半自然条件下进行田间实验的方法。本标准不涉及保护植物免于实蝇传入和扩散的要求。

参考资料

本标准参考了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>。

ISPM 26 (《建立实蝇 Tephritidae 非疫区》) 附录 1 和附录 2 也适用于本标准。

定义

本标准中采用的植物检疫术语定义可参见 ISPM-5 (《植物检疫术表》) 。除 ISPM-5 中的定义外，本标准使用了以下术语：

寄主地位 (水果对实蝇)	将某 <u>种植物种</u> 或 <u>某个品种</u> 归类为一种实蝇的自然寄主、条件寄主或非寄主。
自然寄主 (水果对实蝇)	科学研究发现在自然条件下可被一种目标实蝇侵染，且可支持其 <u>正常发育成成虫发育成可育个体</u> 的某 <u>种植物种</u> 或 <u>某个品种</u> 。
条件寄主 (水果对实蝇)	不是自然寄主的某 <u>种植物种</u> 或 <u>某个品种</u> ，但科学研究显示，在 <u>从本标准设定的田间半自然条件总结出的下</u> ，其可被一种目标实蝇侵染，且能支持目标实蝇 <u>正常发育成成虫发育成可育个体</u> 。
非寄主 (水果对实蝇)	某 <u>种植物种</u> 或 <u>某个品种</u> ，从未发现可被目标实蝇侵染，或在自然条件或本标准设定的田间半自然条件下不能支持目标实蝇 <u>正常发育成成虫发育成</u>

可育个体。

要求概要

本标准描述了判断一种特定水果是一种特定实蝇的寄主的要求，并阐明了三类寄主地位：自然寄主、条件寄主和非寄主。

判断寄主地位的要求包括：

- 准确鉴定实蝇种类、待测试水果以及对田间实验而言，中用作内参水果的来自己知自然寄主的对照水果。
- 明确实蝇成虫和幼虫的监视参数，以及田间半自然条件下的实验设计（即田间网笼、温室或挂果枝条套袋），以判断寄主地位并描述待评估的水果状态条件（包括生理学）。
- 观察每个发育阶段实蝇的存活情况。
- 建立水果寄主地位判定过程中的控制固定和处理程序用于确定寄主地位的水果的程序。
- 评估实验数据并解读实验结果。

背景

实蝇是具有经济重要性的有害生物，常要求采取植物检疫措施以允许其寄主果实贸易流通（ISPM 26；ISPM 30（建立实蝇 (Tephritidae) 低度流行区）；ISPM 35（实蝇 (Tephritidae) 有害生物风险管理系统方法））。水果的寄主地位是有害生物风险分析（PRA）的一个重要因素（ISPM 2（有害生物风险分析框架）；ISPM 11（检疫性有害生物风险分析））。因此，应统一确定寄主地位的类别和判定程序。

值得注意的是，因为生物学条件的改变，寄主地位可能随时间改变。

在寄主地位不确定时，特别需要为国家植物保护机构（NPPOs）提供判断水果的实蝇寄主地位的统一指导。历史证据、有害生物截获记录和科学文献一般可提供有关寄主地位的充分信息，而不需要更多的幼虫田间监视或田间实验。然而，历史记录和已发表报道有时候可能并不可靠，例如：

- 可能错误鉴定了实蝇种类和植物种类或品种，且没有参考标本可以验证。
- 采集记录可能错误或值得怀疑（例如寄主地位基于(1) 来自于安放在水果植株上的诱捕器的捕获物；(2) 被损坏的果实；(3) 只是在果实内部发现了幼虫；或(4) 样品的交叉污染）。
- 可能忽略了重要的细节（例如品种、成熟阶段、采集时果实的物理条件、果园的卫生条件）。
- 可能没有验证幼虫能否正常发育成成虫发育成可育个体。

科学文献记录了判断确定实蝇寄主地位的规程和综合实验。然而，术语和方法的不一致会导致在判断确定实蝇寄主地位时出现差异。统一判断用于确定实蝇寄主地位的术语、规程及评估标准可增进不同国家间和科学界的一致性。

通过果实抽样进行监视是判断确定自然寄主地位最可靠的方法。通过果实抽样监视自然侵染不会干扰实蝇的自然行为，同时考虑到了水果、实蝇行为以及活动时期的高度易变性。果实抽样包括果实的采集和在果实上饲养实蝇，以确定该水果是否是实蝇的一种寄主（即：如果水果能支持实蝇正常发育成可育个体成虫）。

半自然条件下的田间实验可使实蝇表现出自然的产卵行为，因为果实保留在植株上，它在实验过程中不会很快腐烂。然而，半自然条件下的田间实验可能需要很多资源，也可能受到环境因素的影响。

如果目标实蝇种类和果实的生理条件相似，在某一地区所做的田间实验的结果可类推到其他具有可比性的地区。因此，在一个地区已经确定的实蝇寄主地位不需要在另一个相似区域重复进行。

一般要求

可通过流程图（图 1）概述的以下步骤判断确定一种水果归于三类寄主地位（自然寄主、条件寄主和非寄主）中的哪一类：

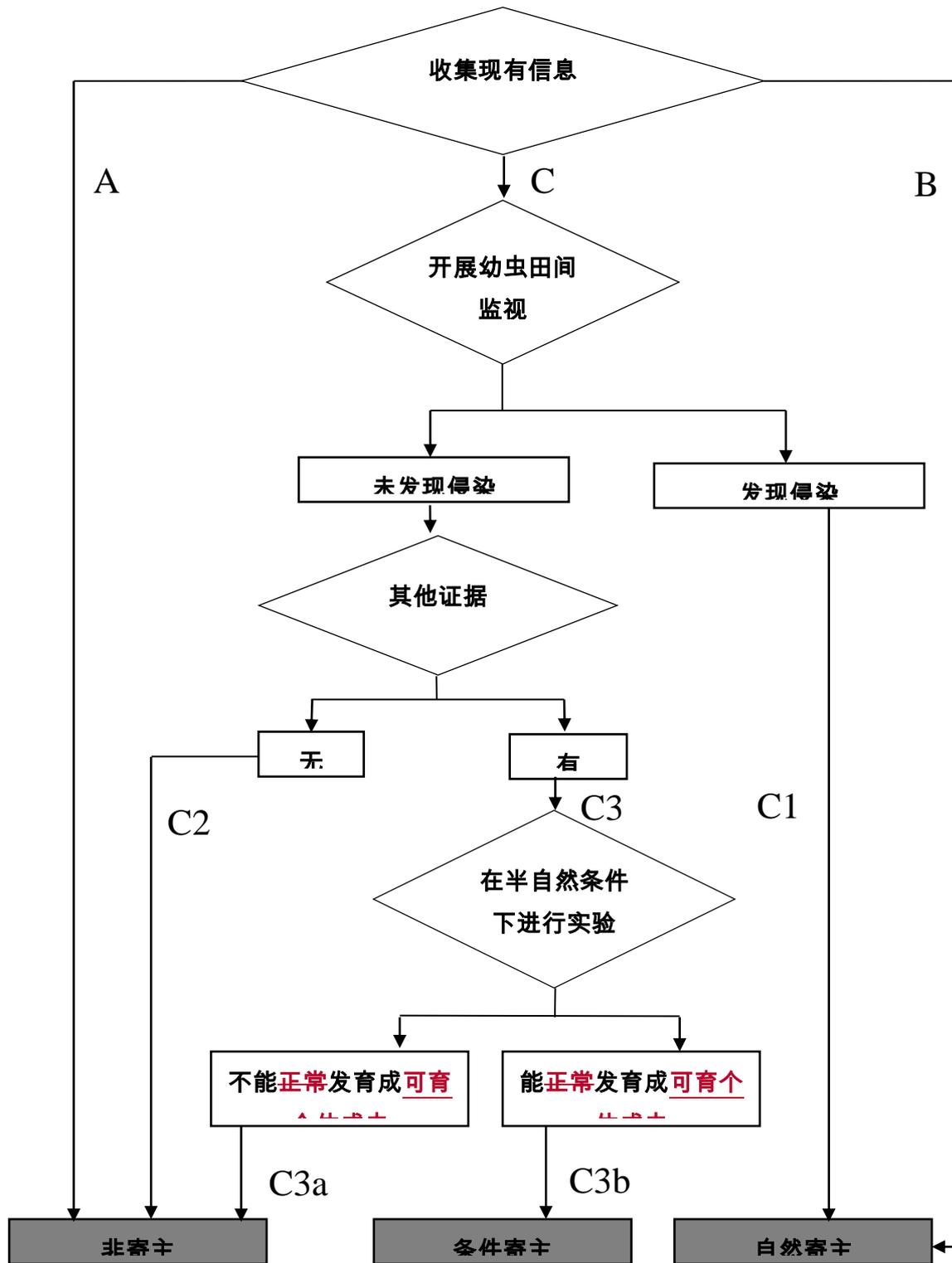
- A.** 在现有生物学或历史信息能充分证明一种水果不支持侵染¹和正常发育成成虫发育成可育个体时，不需要进一步的调查或田间实验，该植物应归类为非寄主。
- B.** 在现有生物学和历史信息能充分证明一种水果支持侵染和正常发育成成虫发育成可育个体时，不需要进一步的调查或田间实验，该植物应归类为自然寄主。
- C.** 在现有生物学和历史信息不能确定是非决定性时，应酌情通过果实抽样进行田间监视，以判断确定寄主地位。监视和实验可能产生以下结果之一：
 - C1.** 如果通过果实抽样进行田间监视后发现，侵染能正常发育成成虫发育成可育个体，则该植物应归类为自然寄主。
 - C2.** 如果通过果实抽样进行田间监视后未发现侵染，而且没有进一步信息显示该果实可能被侵染，同时考虑到商品进行交易的条件，如其生理条件、品种和成熟阶段，则该植物可被归类为非寄主。
 - C3.** 在通过果实抽样进行田间监视后未发现侵染，但有生物学和历史信息显示该果实可能被侵染时，可能需要在半自然条件下做更多的田间实验来评估目标实蝇能否在特定的水果种类或品种上正常发育成成虫发育成可育个体。
 - C3a.** 如果目标实蝇不能正常发育成成虫发育成可育个体，则该植物应归类为非寄主。

¹ 后文中“侵染”指一个果实被一种目标实蝇侵染。

主。

C3b. 如果目标实蝇~~正常发育成成虫~~发育成可育个体，则该植物应归类为条件寄主。

图 1. 判定水果实蝇寄主地位的步骤



具体要求

可通过显示有自然侵染的历史生产记录、贸易或截获资料来判确定寄主地位。在历史资料不能明确判确定寄主地位的情况下，应通过果实抽样开展监视，以收集自然侵染并正常发育成成虫发育成可育个体的证据，或者需要在田间半自然条件下开展实验。在通过监视未能科学判确定寄主地位的情况下，或者特别需要判确定一种水果是条件寄主还是非寄主时，可能要求在田间半自然条件下进行实验。

人工条件是实验室实验的固有特点，在此条件情况下为实蝇提供的是因生理变化很快，而因此可能更容易被侵染的采摘下的果实。因此，在判确定寄主状态的实验室实验中发现侵染可能产生误导。另外，已广泛报道在人工条件下，多食性实蝇的雌虫会将卵产在提供给它们的几乎任何一种水果上，而且在多数情况下，幼虫能正常发育成成虫发育成可育个体。因此，实验室检测可用于能足以说明非寄主地位的判定位，而不适于说明自然或条件寄主地位的判定。

在计划田间实验时要重点考虑以下因素：

- 植物种类（酌情包括品种）和目标实蝇种类的确定
- 产区内水果在产区的物理性状和生理性状的可变度差异
- 水果产区以往的农药使用情况
- 目标实蝇在整个生长季以及相关的收获与输出时期的发生情况
- 有关水果和实蝇种类的相关信息，包括文献与记录，以及对此类信息的严格审查
- 所使用的实蝇品系的来源与饲养情况
- 用作对照的已知的自然寄主种类和品种
- 酌情为需要判确定其寄主地位的每种实蝇安排单独的田间实验
- 如果据说品种差异是寄主受侵染差异性的来源，为每个水果品种安排单独的田间实验
- 田间实验在水果产区的布局
- 采用可靠的统计方法。

1. 通过果实抽样进行监视来判确定自然寄主地位

果实抽样是判确定自然寄主地位的最可靠的方法。以通过收获期果实抽样来确认自然侵染和能够正常发育成成虫发育成可育个体为依据，可判确定自然寄主地位。

水果样品应具代表性，要考虑到所有产区极及其和环境条件，以及水果的生理和物理阶段。

2. 在半自然条件下用田间实验判确定寄主地位

田间实验的目的是在一种已确定不是自然寄主的水果的特定条件下判确定其寄主地位。实验可包括田间网箱、温室（包括玻璃温室、塑料温室和网室），以及挂果枝条的套袋。

半自然条件下田间实验的任一重复中出现一只可育正常羽化的成虫即表明该水果是一种条件寄主。

以下各小节概述了设计田间实验时应考虑的一些因素：

2.1 果实抽样

以下要求适用于田间实验时的果实抽样：

- 可能的情况下，抽样应以怀疑受侵染的果实为目标。另外，抽样规程应基于随机和重复的原则，并适用于所作的任何统计分析。
- 抽样时期、每个生长期的实验次数，以及重复的次数应能满足目标实蝇和水果在不同时间和不同产区间的变异。它们还应能满足早收获和晚收获条件，并代表将有水果运出的拟议地区。应明确为决定有效性所需的果实数量和重量，每个实验的重复数量，以及适宜的置信水平。

2.2 实蝇

以下要求适用于与田间实验所用实蝇有关的操作程序：

- 应对用于田间实验的实蝇进行分类鉴定，并保存凭证标本。
- 应收集目标实蝇的基本信息，包括正常发育时期和特定地区内的已知寄主在內的与目标实蝇有关的基本信息。
- 田间实验最好使用野生种群。如果无法获取足够数量的野生实蝇，在可能的情况下，实验开始时尽量使用所使用的品系不得老手五代以內的实蝇。可使用培养基保持实蝇种群，但实验中使用的那代实蝇在田间实验前应用需在自然寄主上进行一次一段时间的饲养，以确保正常的产卵行为。各实验重复使用的实蝇应全部来源于同一种群和代次（即均一群体）。
- 只要有可能，实蝇品系应来自与目标水果相同的地区。
- 应在田间实验前确定产卵前期、产卵期和交配期，以便让已交尾的雌蝇在其产卵高峰期接触到果实。
- 应在交配日期和田间实验开始时记录雌、雄成蝇的虫年龄。
- 应根据果实大小、雌蝇繁殖力和田间实验条件确定每个果实所要求的交配过的雌蝇数量。应根据实蝇生物学、可用的果实数量和其他田间实验条件来确定每个实验重复使用的实蝇数量。

- 目标实蝇接触到果实的时间应以实蝇产卵行为为依据。
- 一头雌蝇只能使用一次。
- 应记录田间实验过程中死亡的成虫数量，并用来自同一种群和代次的成活成虫（即均一群体）替代。很高的成虫死亡率可能意味着不利的条件（例如过高的温度）或田间实验水果被污染（例如农药残留）。在此情况下，这些实验应在更为有利的条件下重做。

重做田间实验时，应使用具有相似生理年龄且在相同条件下饲养的实蝇。

2.3 水果

以下要求适用于田间实验所用的水果。水果应：

- 和将要流通的水果属于同一种类或品种
- 和将要流通的水果来自同一产区，或其代表性区域
- 基本没有对实蝇有害的农药，没有引诱剂、污垢、其他实蝇和有害生物
- 没有任何机械或自然损伤
- 在颜色、大小和生理条件方面属于特定的商品级别
- 处于一个适当的特定的成熟阶段（例如干重或糖分含量）。

2.4 对照

所有田间实验需要使用处于已知成熟阶段的已知自然寄主的果实作为对照。这些可与目标水果属于不同的种或属。果实以前未被侵染过（例如通过套袋或来自非疫区）。对照和实验重复（包括对照）使用的实蝇应来自同一种群和代次（即均一群体）。

对照用于：

- 确定雌蝇已性成熟、成功交配并具有正常的产卵行为
- 说明在自然寄主中可能发生的侵染水平
- 说明在田间实验条件下在自然寄主中发育至成虫阶段的时间框架
- 确认具有适宜侵染的环境条件。

2.5 田间实验设计

就本标准而言，田间实验使用的是田间网笼、温室或套袋的挂果枝条。实验应适于评估水果的物理和生理条件如何影响寄主地位。

将实蝇释放进套住整株挂果植物的大网笼或套住结有果实的部分植株的网袋。或者，将挂果植物放进温室，并在其中释放实蝇。用于实验的挂果植物可在封闭状态下种植，或盆栽后移入。值得注意的是，因为雌实蝇被人工封闭在特定的封闭物

内进行观察，它们可能被强制将卵产在条件寄主的果实上。

田间实验应在与实蝇行为，尤其是产卵行为相适应的条件下进行，具体如下：

- 田间网笼和温室应大小适度，其设计应确保封闭住成虫和实验植物，有充分的空气流通，同时具备有利于自然产卵行为的条件。
- 应为实蝇成虫提供其喜爱且充足的食物和水。
- 应有最适环境条件，并在田间实验期间加以记录。
- 如果有利于增加产卵，应将雄蝇和雌蝇一起放在网笼或温室中。
- 在实验开始前应清除网笼中目标实蝇的自然天敌，并防止天敌再次进入。
- 网笼应保护果实免受其他取食者（例如鸟类和猴子）的破坏远离果实的其他取食者（例如鸟类和猴子）。
- 作为对照，可将来自已知自然寄主的果实挂在植株枝条上（不是结有待测试果实的枝条）。必须使对照和待测试果实分开放置（在单独的田间网笼、温室或套袋的挂果枝条上），以确保该实验不是一种选择性实验。
- 待测试果实应自然保留在植株上，在田间网笼、网袋或温室中接触到实蝇。
- 植株的种植条件应尽可能排除对实蝇有害的化学农药的影响。
- 一个重复应是一个套袋或一个网笼，最好在实验单元的同一植株上。
- 应监控并记录实蝇死亡率，并立即用来自同一种群和代次（即均一群体）的成活实蝇替代死亡实蝇，以保持相同的实蝇密度。
- 水果应种植在商业条件下或封闭物大小能保证植株和果实正常发育的条件下。
- 在规定的产卵接触时期后，应从植株上摘下果实并称重，记录果实的数量和重量。

应使用科学参考文献提前确定用于获得所需置信水平的样本大小。

3. 利于实蝇发育和羽化的果实处理措施

自然条件（通过果实抽样进行监视）、半自然条件（田间实验）下采集到的果实和对照果实应保存至幼虫完成发育。这一时期的长短可能随温度和寄主地位而变。果实的处理和保存条件应尽可能有利于实蝇成活，并在抽样规程或田间实验的设计方案中予以明确。

应在能够确保虫蛹成活的条件下将果实保存在防虫的设施或容器内，具体包括：

- 适宜的温度和相对湿度
- 适宜的化蛹介质。

另外，条件应有利于准确收集幼虫和蛹，以及果实中正常羽化出的成虫。

应记录的数据包括：

- 果实保存设施中每天的物理条件（例如温度、相对湿度）
- 从待测试果实和对照果实中采集幼虫和蛹的日期及数量，注意：
 - 在保存期末可将介质过筛
 - 在保存期末，应在丢弃前将果实切开，以确定是否有成活或死亡的幼虫或蛹；取决于果实的腐烂程度，可能有必要将幼虫转移到足够的化蛹介质上
 - 应称量所有或部分虫蛹并记录不正常者
- 各种实蝇所有成虫的羽化日期和数量，包括不正常的成蝇。

4. 数据分析

可对幼虫监视和田间实验获取的数据进行定量分析以确定，例如：

- 特定置信水平下的侵染水平（如每个果实的幼虫数量、每公斤果实的幼虫数量、受侵染果实的百分比）
- 幼虫和蛹的发育时间，以及正常成虫的数量
- 成虫羽化的百分比。

5. 记录的保存和发表

国家植物保护组织应妥善保存判确定寄主地位的幼虫田间监视和田间实验记录，包括：

- 目标实蝇的学名
- 植物种类的学名或品种名
- 水果产区的位置（包括地理坐标）
- 目标实蝇凭证标本的位置（例如保存在正规收藏中）
- 田间实验使用的实蝇品系的来源与饲养情况
- 用于测试实蝇侵染情况的水果的物理和生理条件
- 实验设计、所作的实验、日期、地点
- 原始数据、统计计算和结果分析
- 使用的主要的科学参考文献
- 其他信息，包括该实蝇、水果或寄主地位的特定照片。

应要求应向输入国国家植物保护机构提供记录。

应尽可能邀请同行专家对研究工作进行审议，并在科学杂志上发表或通过其他渠道公开。

本附录仅供参考，不是本标准规定的一部分。

附录 1：参考资料目录

- Aluja, M., Diaz-Fleisher, F. & Arredondo, J.** 2004. Nonhost status of commercial *Persea americana* ‘Hass’ to *Anastrepha ludens*, *Anastrepha obliqua*, *Anastrepha serpentina*, and *Anastrepha striata* (Diptera: Tephritidae) in Mexico. *Journal of Economic Entomology*, 97: 293–309.
- Aluja, M. & Mangan, R.L.** 2008. Fruit fly (Diptera: Tephritidae) host status determination: Critical conceptual and methodological considerations. *Annual Review of Entomology*, 53: 473–502.
- Aluja, M., Pérez-Staples, D., Macías-Ordóñez, R., Piñero, J., McPherson, B. & Hernández-Ortiz, V.** 2003. Nonhost status of *Citrus sinensis* cultivar Valencia and *C. paradisi* cultivar Ruby Red to Mexican *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, 96: 1693–1703.
- APPPC RSPM 4.** 2005. *Guidelines for the confirmation of non-host status of fruit and vegetables to Tephritid fruit flies*. RAP Publication 2005/27. Bangkok, Asia and Pacific Plant Protection Commission.
- Baker, R.T., Cowley, J.M., Harte, D.S. & Frampton, E.R.** 1990. Development of a maximum pest limit for fruit flies (Diptera: Tephritidae) in produce imported into New Zealand. *Journal of Economic Entomology*, 83: 13–17.
- Cowley, J.M., Baker, R.T. & Harte, D.S.** 1992. Definition and determination of host status for multivoltine fruit fly (Diptera: Tephritidae) species. *Journal of Economic Entomology*, 85: 312–317.
- FAO/IAEA.** 2013. *Trapping manual for area-wide fruit fly programmes*. Vienna, Joint FAO/IAEA Division. 46 pp.
- FAO/IAEA/USDA.** 2014. *Product manual for product quality control for sterile mass-reared and released tephritid fruit flies*. Version 6.0. Vienna, IAEA. 164 pp.
- Fitt, G.P.** 1986. The influence of a shortage of hosts on the specificity of oviposition behaviour in species of *Dacus* (Diptera: Tephritidae). *Physiological Entomology*, 11: 133–143.
- Follett, P.A.** 2009. Puncture resistance in “Sharwil” avocado to Oriental fruit fly and Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) oviposition. *Journal of Economic Entomology*, 102: 921–926.
- Follett, P.A. & Hennessey, M.K.** 2007. Confidence limits and sample size for determining nonhost status of fruits and vegetables to tephritid fruit flies as a quarantine measure. *Journal of Economic Entomology*, 100: 251–257.
- Grové T., de Beer, M.S. & Joubert, P.H.** 2010. Developing a systems approach for *Thaumatotibia leucotreta* (Lepidoptera: Tortricidae) on ‘Hass’ avocado in South Africa. *Journal of Economic Entomology*, 103: 1112–1128.

- Hennessey, M.K.** 2007. *Guidelines for the determination and designation of host status of a commodity for fruit flies (Tephritidae)*. Orlando, FL, USDA-CPHST.
- NAPPO RSPM No. 30.** 2008. *Guidelines for the determination and designation of host status of a fruit or vegetable for fruit flies (Diptera: Tephritidae)*. Ottawa, North American Plant Protection Organization.
- NASS (National Agriculture Security Service).** 1991. *Specification for determination of fruit fly host status as a treatment*. Standard 155.02.01.08. Wellington, New Zealand Ministry of Agriculture and Fisheries.
- Rattanapun, W., Amornsak, W. & Clarke, A.R.** 2009. *Bactrocera dorsalis* preference for and performance on two mango varieties at three stages of ripeness. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 131: 243–253.
- Santiago, G., Enkerlin, W. Reyes, J. & Ortiz, V.** 1993. Ausencia de infestación natural de moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae) en aguacate “Hass” en Michoacán, México. *Agrociencia serie Protección Vegetal*, 4(3): 349–357.
- Singer, M.C.** 2004. Oviposition preference: Its definition, measurement and correlates, and its use in assessing risk of host shifts. In J.M. Cullen, D.T. Briese, W.M. Kriticos, L. Morin & J.K. Scott, eds. *Proceedings of the XI International Symposium on Biological Control of Weeds*, pp. 235–244. Canberra, CSIRO.
- Thomas, D.B.** 2004. Hot peppers as a host for the Mexican fruit fly *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*, 87: 603–608.
- van Klinken, R.D.** 2000. Host specificity testing: Why do we do it and how can we do it better. In R. Van Driesche, T. Heard, A. McClay & R. Reardon, eds. *Host-specificity testing of exotic arthropod biological control agents: The biological basis for improvement in safety*, pp. 54–68. Morgantown, WV, Forest Health Technology Enterprise Team, USDA Forest Service.
- Willard, H.F., Mason, A.C. & Fullaway, D.T.** 1929. Susceptibility of avocados of the Guatemala race to attack by the Mediterranean fruit fly in Hawaii. *Hawaiian Forester and Agriculturist*, 26: 171–176.

本植物检疫处理由植物检疫措施委员会第十一届会议于 2016 年通过。

本附件是 ISPM 28 标准规定的一部分。

第 28 号国际植物检疫措施标准 限定性有害生物植物检疫处理

PT20 : 欧洲玉米螟 (*Ostrinia nubilalis*) 的辐射辐照辐射处理

处理范围

本处理适用于在 289 Gy 最低吸收剂量下对水果和蔬菜进行辐射辐照辐射，阻止欧洲玉米螟 (*Ostrinia nubilalis*) (~~欧洲玉米螟~~) F₁ 代发育至超过5 龄幼虫，或在 343 Gy 最低吸收剂量下阻止经过辐射辐照辐射的亲本蛹（最具耐受力的生命阶段）的 F₁ 代卵孵化¹。

处理说明

处理名称： 欧洲玉米螟 (*Ostrinia nubilalis*) 的辐射辐照辐射处理
有效成分： 不详
处理类型： 辐射辐照辐射
目标有害生物： 欧洲玉米螟 (*Ostrinia nubilalis* Hübner) (鳞翅目：草螟科)
目标限定物： 欧洲玉米螟的所有寄主水果和蔬菜

处理方案

289 Gy 的最低吸收剂量以阻止欧洲玉米螟末期蛹的 F₁ 代卵发育至超过5 龄幼虫。

在 95%置信水平下，采用本处理方案能阻止不少于 99.987%的欧洲玉米螟末期蛹的 F₁ 代发育至超过5 龄幼虫。

343 Gy 的最低吸收剂量以阻止欧洲玉米螟末期蛹的 F₁ 代卵孵化。

在 95%置信水平下，采用本处理方案能阻止不少于 99.9914%的欧洲玉米螟末期蛹的 F₁ 代卵孵化。

处理操作应符合 ISPM 18（辐射用作植物检疫措施的准则）的有关要求。

这些辐射辐照辐射处理方案不可应用于在气调条件下想储存的水果和蔬菜，否则处理效果会受到影响。

其他相关信息

辐射辐照辐射有可能不会导致害虫立即死亡，所以检疫员在检验过程中可能会发现存活、但不能正常发育的欧洲玉米螟（幼虫、蛹或成虫）。这种情况不意味处理失败。

¹ 植物检疫处理方法的范围不包括与农药登记或缔约方批准处理方法的其他国内要求相关的问题。植物检疫措施委员会批准的处理方法不提供对人类健康或食品安全具体影响的信息，此种影响应在处理方法获得缔约方批准之前通过国内程序解决。此外，应在国际采用之前审议处理方法对某些寄主商品产品质量的可能影响。然而，可能需要进行更多审议，以评价某些处理方法对商品质量的可能影响。缔约方没有义务在其境内批准、登记或采用这些处理方法。

在对本处理的评估过程中，植检处理技术小组考虑了与不育成虫可能存活有关的问题。如果从~~辐射辐照辐射~~后的寄主水果和蔬菜中逃离的不育成虫足够多，并且飞入了有害生物监测诱集装置，就有可能触发检疫应对措施，进而导致经济损失和贸易限制。基于 Hallman ~~和~~ Hellmich (2009), ~~和~~ Hallman 等人 (2010) 的研究工作，植检处理技术小组认为，健康存活的成虫数量会足够少，上述情况不可能发生。

参考文献

本附件引用了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>。

Hallman, C. I. & Hellmich, R.L. 2009. Ionizing radiation as a phytosanitary treatment MK256/Rev2/Ch. ~~ean~~ corn borer (Lepidoptera: Crambidae) in ambient, low oxygen, and cold conditions *Journal of Economic Entomology*, 102(1): 64–68.

Hallman, G.J., Levang-Brilz, N.M., Zettler, L. & Winborne, I.C. 2010. Factors affecting ionizing radiation phytosanitary treatments, and implications for research and generic treatments. *Journal of Economic Entomology* 103(6): 1950–1963.

出台背景

这部分不属于本标准的正式内容

2012 年，提交处理文本 (2012-009)

2012 年 12 月，植检处理技术小组 (TPPT) 审议处理文本，并要求提供更多信息

2013 年 2 月，植检处理技术小组通过秘书处与提交人信件沟通

2013 年 5 月，提交人做出回应

2013 年 7 月，植检处理技术小组向标准委建议进行成员磋商

2013 年 9 月，植检处理技术小组批准处理方案 (虚拟会议)

2013 年 9 月，植检处理技术小组着手起草关于辐射处理后成虫羽化的文稿

2014 年 2 月，植检处理技术小组批准关于辐射处理后成虫羽化的文稿，并提交至秘书处

2014 年 2 月，标准委通过电子决策批准提交成员磋商

2014 年 3 月，秘书处接受讨论会的修改建议，并公开征求意见

2014 年 3 月，标准委通过电子表决 (2014_eSC_May_06) 批准将处理草案提交成员磋商

2015 年 2 月，植检处理技术小组审议成员磋商意见

2015 年 5 月，植检处理技术小组 5 月份虚拟会议审议

2015 年 9 月，植检处理技术小组 9 月份会议审议

2015 年 10 月，标准委批准将处理草案提交植检委审议 (2015_eSC_Nov_06)

2016 年 4 月，植检委第十一届会议通过本植物检疫处理

国际植检措施标准第 28 号。附件 20。玉米螟 (*Ostrinia nubilalis*)

的辐射辐照辐射处理。罗马，国际植保公约，粮农组织。

出台背景最后更新于 2016 年 4 月。

本植物检疫处理由植物检疫措施委员会第十一届会议于 2016 年通过。

本附件是 ISPM 28 标准规定的一部分。

第 28 号国际植检标准 限定性有害生物植物检疫处理

PT21：针对库克果实蝇 (*Bactrocera melanotus*) 和 黄侧条果实蝇 (*Bactrocera xanthodes*) 的 番木瓜 (*Carica papaya*) 蒸汽热处理

处理范围

本处理适用于在[高温强制通风强制热空气处理](#)室内对番木瓜 (*Carica papaya*) 果实进行处理，按规定的效能导致库克果实蝇 (*Bactrocera melanotus*) 或黄侧条果实蝇 (*Bactrocera xanthodes*) ~~(太平洋果蝇)~~卵和幼虫死亡¹。

处理说明

- 处理名称：** 针对库克果实蝇 (*Bactrocera melanotus*) 和黄侧条果实蝇 (*Bactrocera xanthodes*) 的番木瓜 (*Carica papaya*) 蒸汽热处理 (2009-105)
- 有效成分：** 不详
- 处理类型：** 物理 (蒸汽热处理)
- 目标有害生物：** 库克果实蝇 (*Bactrocera melanotus* Coquillett) (双翅目：实蝇科) 或黄侧条果实蝇 (*Bactrocera xanthodes* Broun) (双翅目：实蝇科)
- 目标限定物：** 番木瓜 (*Carica papaya* L.) 果实

处理方案

暴露在强制[通风热空气处理](#)室内：

- 最小相对湿度为 60%
- 至少经过 3.5 小时使气温从室温升至 48.5°C 或更高
- 使气温在 48°C 或更高至少保持 3.5 小时
- [处理气室](#) ~~一箱~~中所有果实[中心体核](#)温度在 47.5°C 或更高至少保持 20 分钟。

一旦处理完成，果实[中心体核](#)温度需降至（例如通过水冷却）30°C，冷却时间不应少于 70 分钟。

在 95% 置信水平下，采用本处理方案能达到库克果实蝇 (*B. melanotus*) 和或黄侧条果实蝇 (*B. xanthodes*) 卵和幼虫致死率不低于 99.9914%。

其他相关信息

植检处理技术小组在评估本处理时，考虑了将最初提交的处理说明中包含的其他实蝇类有害生物（墨西哥按实蝇 (*Anastrepha ludens* Loew)、加勒比按实蝇

¹ 植物检疫处理方法的范围不包括与农药登记或缔约方批准处理方法的其他国内要求相关的问题。植物检疫措施委员会批准的处理方法不提供对人类健康或食品安全具体影响的信息，此种影响应在处理方法获得缔约方批准之前通过国内程序解决。此外，应在国际采用之前审议处理方法对某些寄主商品产品质量的可能影响。然而，可能需要进行更多审议，以评价某些处理方法对商品质量的可能影响。缔约方没有义务在其境内批准、登记或采用这些处理方法。

(*Anastrepha suspensa* Loew)、瓜实蝇 (*Bactrocera cucurbitae* Coquillett)、桔小实蝇 (*Bactrocera dorsalis* Hendel)、汤加果实蝇 (*Bactrocera facialis* Coquillett)、柯克氏果实蝇 (*Bactrocera kirki* Froggatt)、斐济实蝇 (*Bactrocera passiflorae* Froggatt)、新喀里多尼亚果实蝇 (*Bactrocera psidii* Froggatt)、昆士兰实蝇 (*Bactrocera tryoni* Froggatt) 和地中海实蝇 (*Ceratitis capitata* Wiedemann) 和其他水果类作物 (实蝇类的所有水果寄主) 纳入处理范围的技术合理性。但是, 植检处理技术小组基于 Waddell 等 (1993) 的研究, 建议仅包含库克果实蝇 (*B.melanotus*) 和黄侧条果实蝇 (*B. xanthodes*) 这两种实蝇类有害生物和番木瓜 (*C.papaya*) 这一种水果作物。

用于本处理方案研究的水果作物是番木瓜 *C.papaya* .Waimanalo Solo 品种。

参考文献

本附件参考了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>。

Waddell, B.C., Clare, G.K., Maindonald, J.H. & Petry, R.J. 1993. Postharvest disinfestations of *Bactroceramelanotus* and *B. xanthodes* in the Cook Islands. Report 3. Wellington, New Zealand Ministry of Agriculture and Fisheries – Regulatory Authority pp.44 PP.

出台背景

这部分不属于本标准的正式内容

2009 年, 提交“针对部分实蝇种类 (双翅目: 实蝇科) 的水果 **高温强制通风强制热空气处理**” (2009-105) 主题

2010 年 7 月, 植检处理技术小组评审议处理文本, 并要求提供更多信息。

2012 年 12 月, 植检处理技术小组要求增加评估时间

2013 年 7 月, 植检处理技术小组将名称变更为“针对库克果实蝇 (*Bactroceramelanotus*) 和黄侧条果实蝇 (*Bactroceraxanthodes*) 的番木瓜 (*Carica papaya*) **高温强制通风强制热空气处理** (2009-105)”, 并建议标准委提交成员磋商。

2013 年 9 月, 植检处理技术小组批准了处理方案 (虚拟会议)

2014 年 2 月, 标准委通过电子决策批准提交成员磋商

2014 年 3 月, 秘书处采用论坛修改建议, 并开放供表决。

2014 年 3 月, 标准委通过电子表决 (2014_eSC_May_02) 批准将处理草案提交成员磋商

2015 年 2 月, 植检处理技术小组审议成员磋商意见

2015 年 5 月, 植检处理技术小组 5 月份虚拟会议

2015 年 9 月, 植检处理技术小组 9 月份会议

2015 年 10 月, 标准委批准将处理草案提交植检委审议 (2015_eSC_Nov_07)

2016 年 4 月, 植检委第十一届会议通过本植物检疫处理

国际植检措施标准第 28 号。附件 21。 针对库克果实蝇 (*Bactrocera melanotus*) 和黄侧条果实蝇 (*Bactrocera xanthodes*) 的番木瓜 (*Carica papaya*) 蒸汽热处理

罗马，国际植保公约，粮农组织
出台背景最后更新于 2016 年 4 月。

本诊断规程于 2015 年 1 月由标准委代表植检委通过。

本附件是 ISPM 27 号标准规定的一部分。

ISPM 27 号标准

限定有害生物诊断规程

DP 7 : 马铃薯纺锤形块茎类病毒 (*spindle tuber viroid*)

2016 年通过 ; 2016 年出版

目录

1. 有害生物信息	32
2. 分类信息	43
3. 检测	43
3.1 抽样	76
3.2 生物学检测	76
3.3 分子检测	87
3.3.1 样品制备	87
3.3.2 核酸提取	98
3.3.3 马铃薯纺锤形块茎类病毒属的通用分子检测方法	1140
3.3.3.1 R-PAGE	1140
3.3.3.2 用 DIG 标记的 cRNA 探针杂交	1140
3.3.3.3 使用 Verhoeven 等 (2004) 引物的常规 RT-PCR	1244
3.3.3.4 使用 GenPospi 检测的实时 RT-PCR (Botermans 等, 2013)	1342
3.3.4 具有较高特异性的 PSTVd 分子检测方法	1544
3.3.4.1 使用 Shamloul 等 (1997) 引物的常规 RT-PCR	1544
3.3.4.2 使用 Boonham 等 (2004) 引物的实时 RT-PCR	1544
3.3.4.3 实时 RT-PCR (Plant Print Diagnostics kit)	1645
3.4 分子检测的对照	1746
3.5 常规和实时 RT-PCR 结果的解释	1948
3.5.1 常规 RT-PCR	1948
3.5.2 实时 RT-PCR	1948
4. 鉴定	1948
4.1 测序与序列分析	2049
5. 记录	2120
6. 获取进一步信息的联系点	2120
7. 致谢	2224

8. 参考文献 [2224](#)

1. 有害生物信息

类病毒是没有蛋白质外壳，共价闭合的单链环状 RNA 分子，长度为 239—401 个碱基对核苷酸，由寄主酶复制 (Hammond & Owens, 2006)。马铃薯纺锤形块茎类病毒 (PSTVd; 马铃薯纺锤形块茎类病毒属 (*Pospiviroid*)) 通常长 359 个碱基对核苷酸，但有报道称有的 PSTVd 分离物含有 341—364 个碱基对核苷酸 (Wassenegger 等, 1994; Shamloul 等, 1997; Jeffries, 1998)。根据易感病的番茄品种产生的症状，例如番茄 (*Solanum lycopersicum* L.) 的卢特格 (*Rutgers*) 品种 (Fernow, 1967)，人们对其弱株系和强株系进行了描述。

PSTVd 的自然寄主范围相对较窄。主要的自然寄主是产生匍匐茎和块茎的茄属植物；例如马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 和番茄 (*S. lycopersicum*)。PSTVd 在辣椒 (*Capsicum annuum*)、鳄梨 (*Persea americana*) 和南美香瓜茄 (*S. muricatum*) 中也有发现。PSTVd 主要在无性繁殖的茄科观赏植物种类中发现—即木曼陀罗属 (*Brugmansia* spp.)、夜香树属 (*Cestrum* spp.)、曼陀罗属 (*Datura* sp.)、蓝花茄 (*Lycianthes rantonetti*)、矮牵牛属 (*Petunia* spp.)、灯笼果 (*Physalis peruviana*)、茄属 (*Solanum* spp.) 和果酱木 (*Streptosolen jamesonii*)，也见于菊科 (Asteraceae) 的菊蒿属 (*Chrysanthemum* sp.) 和大丽花 (*Dahlia × hybrida*) (有关自然寄主的详细情况，见 CABI (n.d.))。PSTVd 的实验寄主范围很宽，包含茄科的各个种，以及至少其他 9 个科的部分种。多数寄主很少表现或不表现病害症状 (Singh, 1973; Singh 等, 2003)。

已发现 PSTVd 在非洲、亚洲、东欧、北美洲 (EPPO/CABI, 1997)、中美洲 (Badilla 等, 1999)、南美洲和中东 (Hadidi 等, 2003) 一些国家侵染马铃薯。然而，它在观赏植物和其他寄主植物上有更广泛的地理分布 (地理分布见 CABI (n.d.))。

在马铃薯中，PSTVd 的主要传播方式是无性繁殖。它也通过接触传播，主要是田间机械和种薯块茎切分 (Hammond & Owens, 2006)。PSTVd 可以通过真正的马铃薯种子传播—多达 100% 的种子可被侵染 (Fernow 等, 1970; Singh, 1970)—也可以通过花粉传播 (Grasmick & Slack, 1985; Singh 等, 1992)。De Bokx 和 Pirone (1981) 报道马铃薯长管蚜 (*Macrosiphum euphorbiae*) 低比率传播 PSTVd，但桃蚜 (*Myzus persicae*) 和茄沟无网蚜 (*Aulacorthum solani*) 不能传播。然而，有报道称，实验条件下桃蚜可从受 PSTVd 和马铃薯卷叶病毒 (*Potato leafroll virus* (PLRV)) 联合侵染的植株中获得并传播 PSTVd (Salazar 等, 1995; Singh & Kurz, 1997)。随后发现 PSTVd 被异源包被在马铃薯卷叶病毒颗粒体中 (Querci 等, 1997)，这一现象可能对田间条件下 PSTVd 的流行学和传播具有重要意义。

在番茄中，PSTVd 易于通过接触传播，且已证明可经花粉和种子传播（Kryczynski 等，1988；Singh，1970）。已证明通过番茄种子传播加速了 PSTVd 在国际上的扩散（van Brunschot 等，2014）。PSTVd 也可能随受侵染的辣椒种子传播（Lebas 等，2005）。

如果在处理受侵染的观赏植物后，又接触其他感病植物前对其进行过处理，受侵染的观赏植物则前者可以起到接种源的作用，已证明它们是 PSTVd 国际传播的一个路径（Navarro 等，2009；Verhoeven 等，2010）。尚未发现 PSTVd 随西方蜜蜂（*Apis mellifera*）、熊蜂（*Bombus terrestris*）、西花蓟马（*Frankliniella occidentalis*）或烟蓟马（*Thrips tabaci*）传播（Nielsen 等，2012）。

PSTVd 是唯一已知可自然侵染茄属栽培种的类病毒。然而，墨西哥心叶茄类病毒（*Mexican papita viroid* (MPVd)）侵染野生种马铃薯（*S. cardiophyllum*）（Martinez-Soriano 等，1996）。在实验条件下，马铃薯纺锤形块茎类病毒属中的其他类病毒可侵染马铃薯（Verhoeven 等，2004）。

除 PSTVd 外，已证明其他马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒可自然侵染番茄，包含柑橘裂皮病类病毒（*Citrus exocortis viroid* (CEVd)；Mishra 等，1991）、金鱼花潜隐类病毒（*Columnea latent viroid* (CLVd)；Verhoeven 等，2004）、墨西哥心叶茄类病毒（Ling & Bledsoe，2009）、辣椒小果类病毒（*Pepper chat fruit viroid* (PCFVd)；Reanwarakorn et al.，2011）、番茄顶缩类病毒（*Tomato apical stunt viroid* (TASVd)；Walter，1987）、番茄褪绿矮缩萎黄矮化类病毒（*Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd；Singh 等，1999)），以及番茄整株结节类病毒（*Tomato planta macho viroid* (TPMVd；Galindo 等，1982)）。

2. 分类信息

学名：*Potato spindle tuber viroid*（简称 PSTVd）

异名：potato spindle tuber virus, potato gothic virus, tomato bunchy top virus

分类地位：马铃薯纺锤形块茎类病毒科（Pospiviroidae），马铃薯纺锤形块茎类病毒属（*Pospiviroid*）

通用名：马铃薯纺锤块茎病

3. 检测

PSTVd 的症状表现和严重程度取决于其株系、栽培品种和环境。在马铃薯中，侵染可能不表现症状，或产生轻微到严重的症状（植株变小，从上部看叶片直立且叶序呈顺时针方向；叶片呈暗绿色且皱缩）。块茎可能变小、畸形，呈纺锤形或哑铃

形，带有均匀分布且明显突出的芽眼（EPPO，2004）。在番茄中，症状包括矮化、新叶有明显的偏上性、皱缩且边缘扭曲、叶片黄化、变红、变脆、坏死，果实变小且不能完全成熟（Mackie 等，2002；Hailstones 等，2003；Lebas 等，2005）。在辣椒上，症状轻微，植株近顶部叶片表现出波浪状边缘（Lebas 等，2005）。到目前为止，调查过的各种观赏植物均不表现症状（Verhoeven, 2010）。

因为 PSTVd 侵染可能不显症，需要通过检验来检测和鉴定该类病毒。可选用图 1 提供的生物学和分子检验方法来检测 PSTVd，但鉴定时必须对多聚酶链式反应（PCR）产物进行测序，这是由于这些检验方法对 PSTVd 不具特异性，可能检测出其他类病毒。测序还有助于防止报告假阳性。如果认为致病性很重要，可使用生物学指示法。如果 PSTVd 的鉴定代表的是在一个国家首次发现，鉴定实验室可请另一个实验室对其诊断结果予以确认。

所有检验均应包含适宜的对照，以尽可能减少出现假阳性或假阴性结果的风险。

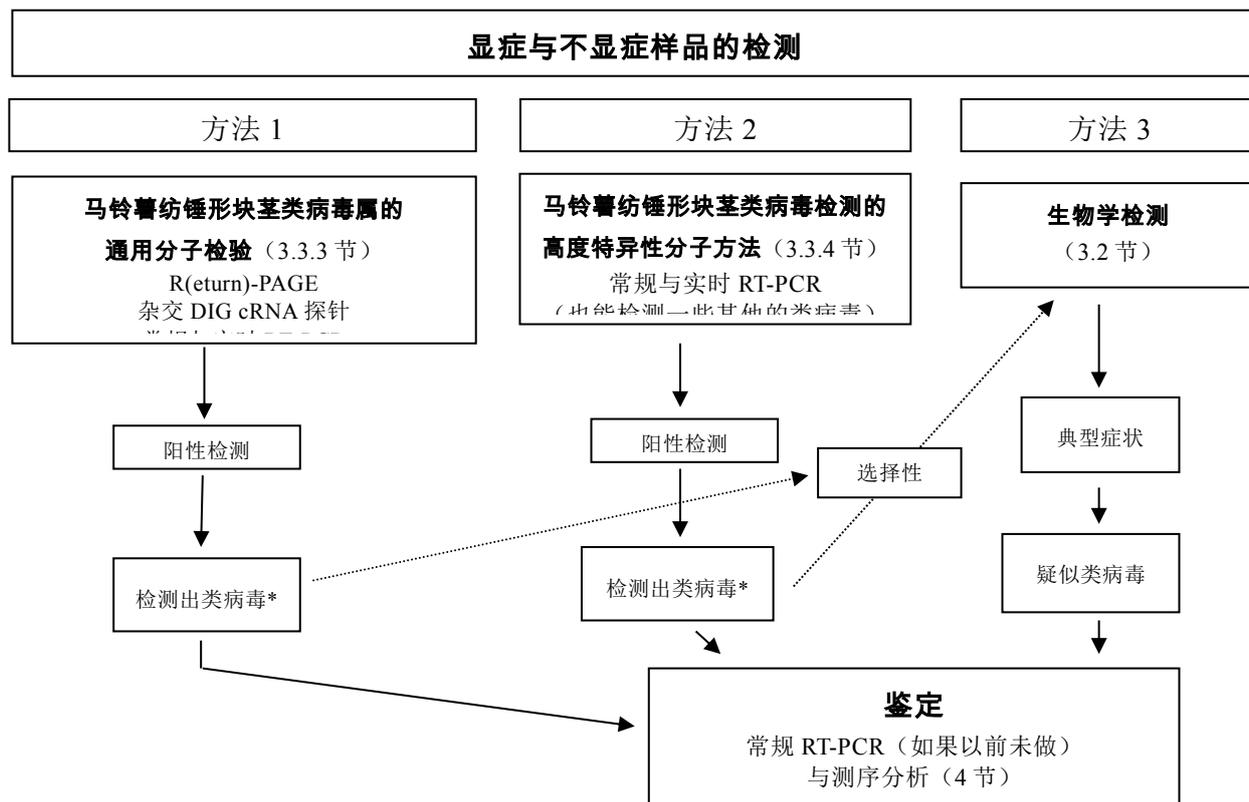


图 1. 马铃薯纺锤形块茎类病毒 (*PSTVd*) 检测和鉴定的最低要求

* 在某些情况下，鉴定对每一个类病毒阳性样品可能并非必须；例如，在应对 *PSTVd* 突发时。

注：如果怀疑一个样品中有一种类病毒（即存在典型症状），但检验给出了阴性结果，需进行另一种检测以验证该结果。

本附件用于检测 *PSTVd*；它的制定并非为了检测和鉴定马铃薯纺锤形块茎类病毒属其他种类的类病毒。然而，在选定检测和鉴定方法时，需要考虑可能存在其他类病毒。因此，本附件描述了能检测出所有已知类病毒的非特异性检测方法；其中包含马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒，例如 *PSTVd*。为了鉴定，PCR 产物需要测序。

本规程描述了叶片、块茎和植物学（真正的）种子组织中 *PSTVd* 的检测方法，然而对种子组织进行可靠的检测特别具有挑战性。

在本诊断规程整中，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规定了最初的灵敏度、特异性和/或再现性水平。本诊断规程对试剂、化学品或设备名称的使用，并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。有关植物诊断学方法验证的建议由 EPPO（2014）提供。

分子检验的效果由待检验的材料基质和选定的后续样品制备、核酸提取，以及检测与鉴定方法共同决定。表 1 概述了不同基质材料和方法组合可以使用的验证数据。这些方法在相应段落或引用的参考文献中有详细描述。

3.1 抽样

ISPM 31 号标准（货物抽样方法）提供了有关抽样方法的一般性指导。

马铃薯微型植株与温室栽培的马铃薯植株 对微型植株而言，整个植株全部取样应用作样品，或在无菌条件下对植株上部 2/3 的部位进行取样，以确保植株的其他部分可继续生长。微型植株应是 4 至 6 周大小，茎长约 5cm，有发育良好的叶片。对温室栽培的植株而言，每一植株应采集一片完全展开的嫩叶。类病毒浓度在低温和低光照水平下较低，因此植物应在最低为 18℃ 的温度和至少为 14h 的光周期下生长。微型植株或叶片可混合使用，但混合比例取决于所使用的检验方法，且必须经过验证。

大田栽培的马铃薯植株 应在每一植株顶部采集一片完全展开但未衰老的嫩叶。叶片可混合用于检测；混合比例取决于所使用的检测方法，且必须经过验证。

马铃薯块茎 PSTVd 在受侵染的马铃薯块茎中系统分布（Shamloul 等，1997）。在初次侵染和再次侵染块茎中，不同部位的发生数量都近乎相同（Roehorst 等，2006）。发现刚收获时浓度最高。块茎在 4℃ 下储藏时，浓度在长达 3 个月的时间内不会显著下降，但储藏 6 个月后，它可能下降 10^4 倍以上。块茎任何部位的一块中心组织都可以用作一个样品，也可以混合使用；混合比例取决于所使用的检测方法，且必须经过验证。

其他作物和观赏植物叶片 使用完全展开的嫩叶。叶片可混合用于检测；混合比例取决于所使用的检测方法，且必须经过验证。需注意的是，类病毒浓度会受植株年龄/成熟度影响，而且通常有季节性波动。另外，一些种类含有生化物质，可能抑制受检植物（例如木曼陀罗属）的接种或逆转录反转录 PCR（RT-PCR）（例如小花矮牵牛花属（*Calibrachoa* spp.）、素馨叶白英（*Solanum jasminoides*）和果酱木。

种子 类病毒浓度在种子间变化很大，侵染水平也可能在不足 1% 到 100% 之间变化。这导致很难建议样本大小和混合比例（EUPHRESCO，2010）。对番茄而言，单一检测曾用过 100—1 000 的混合比例。混合比例取决于所使用的检测方法，且必须经过验证。

马铃薯种子可种植在装有栽培介质（例如堆肥）的托盘中，而且可以采用针对温室栽培植株所描述的另一程序对幼苗/植株进行非毁灭性检测（EPPO，2006）。

3.2 生物学检测

对番茄（栽培品种 Rutgers 卢特格、Moneymaker 或 Sheyenne 栽培品种）植株进行接种，可以检测多种但非所有类病毒（例如番茄不是血苋类病毒 1 号（*Iresine*

viroid 1, rVd-1) 的寄主 (Spieker, 1996; Verhoeven 等, 2010)), 并产生可见的致病性症状。然而, 由于缺少症状, 一些分离物可能无法检测。另外, 症状可能不足以诊断 PSTVd。生物指示可能需要大量的温室空间, 要付出大量劳动, 而且在检测完成前可能需要几个星期甚至更多时间。尚未对本方法和本规程描述的其他方法的灵敏度做过比较研究。如果它的灵敏度比分子学方法低, 它可能就不太适合用于检测种子。然而, 类病毒可能在生物指示过程中得到扩增, 从而达到可以采用其他方法进行检测的水平。

将大约 200—500 mg 叶片、根或块茎组织放在含金刚砂 (400 目) 的少量 0.1 M 磷酸盐接种缓冲液 (1:1 稀释即可) 中研磨。磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 使用 80.2 ml 1 M K_2HPO_4 和 19.8 ml 1 M KH_2PO_4 混合制备, 并用蒸馏水调配至 1 升。

对有 1 或 2 片完全展开的叶片的番茄幼株进行接种。将带手套的手指、棉签或棉棒浸入接种液, 沾上接种液后轻轻擦拭叶片表面, 然后立即用清水冲洗叶片, 直至金刚砂被全部清除。植株在 24—39°C 昼夜周且温度变化和约 650 $\mu E/m^2/s$ 钠蒸汽照明补光的 14h 光周期条件下生长 (Grassmick & Slack, 1985)。较低温度和较少光照可能降低本检测方法的灵敏度。接种后每周调查植株症状, 持续 6 周。PSTVd 感染的症状包括矮化、新叶具偏上性、皱缩且边缘扭曲, 叶片黄化、变红、变脆、坏死。

番茄的生物检测可以检测出很多种马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒 (除 IrVd-1 外, 见上文); 因此应从显症的指示植物中提取核酸, 对其实施 RT-PCR, 并对 PCR 产物进行测序和鉴定。

3.3 分子检测

3.3.1 样品制备

微型植株、叶片材料和根 已成功使用研钵研杵或匀浆器 (例如 Homex 6 (Bioreba)) 和提取袋 (Bioreba) 对材料进行研磨。加入少量水或裂解缓冲液 (其成分取决于用于所采用的核酸提取方法), 或对样品进行冷冻 (例如在液氮中) 有助于匀浆。

以下程序已和使用磁珠提取法 2 进行核酸提取, 以及本附件描述的实时 RT-PCR GenPospi 检测一起经过了验证 (见表 1)。将约 1 g 组织和 3.5 ml (范围 1:2—1:5 (w/v)) GH plus 裂解缓冲液 (6 M 盐酸胍; 0.2 M 乙酸钠, pH 5.2; 25 mM 乙二胺四乙酸 (EDTA); 2.5% 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) -10) 一起放进提取袋中, 使用 Homex 6 或手持匀浆器 (Bioreba) 匀浆。核酸提取前, 将样品放在恒温混匀仪中, 65°C 下以 850 r.p.m. 培养 10 min (或通过摇晃 (倒置试管 3 次), 并以 16 000 g 离心 2 min)。

马铃薯块茎 块茎中心组织在水或裂解缓冲液 (其成分取决于所采用的核酸提取

方法；每 g 块茎中心组织用 1 ml) 中充分匀浆。Homex 6 等研磨器和提取袋已成功应用于此。在加水或裂解缓冲液之前，对中心组织进行冷冻（例如在 -20°C 下）有助于匀浆。

种子 少量种子 (<100) 可使用组织研磨仪（例如 RetschTissueLyse (Qiagen)）。大量种子可使用一种桨式搅拌器（例如 MiniMix (Interscience)）或匀浆器（例如 Homex 6），以及尽可能少的裂解缓冲液（其成分取决于所采用的核酸提取方法）。种子也可以用锤子（Bertolini 等，2014b）或研钵研杵粉碎。由于交叉污染可能难以控制，后者可能并不适于日常使用。另外，也可以使用液氮对样品进行冷冻，随后在细胞研磨器中研磨（此方法也可用于其它类型的植物组织）。

以下程序已和使用磁珠提取法 2 进行核酸提取，以及本附件描述的 Boonham 等（2004）的实时 RT-PCR 检测一起经过了验证（见表 1）。核酸提取前，将 3 个各含 1 000 粒种子的子样品分别放进一个 100 ml BagPage 均质袋（Interscience）中，室温下用 20 ml GH plus 裂解缓冲液浸泡 30—60 min，使用一个 BagMixer 均质器（Interscience）均质 90 s 并进行培养（或采用针对微型植株、叶片材料和根所描述的方法进行摇晃和离心）。

组织挤压 将叶柄或离体嫩芽挤压在尼龙膜上。根据 Bertolini 等（2008，2014a），在大约为 0.5 cm^2 的尼龙膜上可以挤压来自不同叶片和/或离体嫩芽的几个部分重叠的挤压物。切下附有固定样品的薄膜，装入微型管中。固定样品应使用干净的镊子处理。室温下组织挤压样品可以在黑暗和干燥的环境中至少保存 3 个月。为了从薄膜上提取目标 RNA，在每个装有一个固定样品的微型管中加入 100 μl 甘氨酸缓冲液，随后进行涡旋混合并放在冰块上，保存至 PCR 扩增。

3.3.2 核酸提取

有很多核酸提取方法可供使用，包括商业化试剂盒和科学期刊发表的一些方法。以下核酸提取试剂盒、缓冲液和程序已成功用于 PSTVd 检测。

商业化试剂盒 可按照生产商的说明使用 RNeasy (Qiagen)、MasterPure (Epicentre) 和 Sbeadex maxi plant kit (LGC Genomics) 等商业化试剂盒。作为欧洲植物检疫研究与协调网络 (EUPHRESKO) 马铃薯纺锤形块茎类病毒属检测与流行病学 (DEP) 项目的一个部分，已对 RNeasy 从不同基质中提取 PSTVd RNA 的情况进行了评估 (EUPHRESKO, 2010)。

Mackenzie 等 (1997) 描述的方法 植物组织在裂解缓冲液（使用前加入 4 M 异硫氰酸胍、0.2 M 乙酸钠、25 mM EDTA 和 2.5% PVP-40 (w/v)，和使用前加入 1% 2-巯基乙醇 (v/v)）中均质 (1:10 (w/v))。取 1 ml 均质物，与 100 μl 20% 十二烷基肌氨酸钠 (w/v) 混合，在恒温混匀仪中以 70°C 、1 200 r.p.m. 震荡培养 10 min。本

方法可用于从很多种植物中提取高质量 RNA。

使用 EDTA 缓冲液的方法 植物组织可以在一种简单的裂解缓冲液（50 mM NaOH、2.5 mM EDTA）中均质（1:4 (w/v)），随后进行培养（约 25°C 下 15 分钟）或离心（4°C 下 12 000 g 15 min）。取决于所要求的灵敏度，随后可将上清液直接用于 RT-PCR（较低灵敏度），或点到硝化纤维素膜上并用无菌蒸馏水洗脱（较高灵敏度）（Singh 等，2006）。尽管 EDTA 法提取到的类病毒浓度比描述的其他提取方法低，但当本方法和 RT-PCR 或异羟基洋地黄毒甙元（DIG）探针一起使用时，这不应成为一个限制因素。本方法已用于番茄、马铃薯和很多种观赏植物。

苯酚 - 氯仿和两步 PEG 提取法 按照 EPPO（2004）描述的方法对植物组织进行均质并提取核酸。本方法已和本诊断规程描述的双向往返聚丙烯酰胺凝胶电泳（R-PAGE）、DIG-RNA 探针及常规 RT-PCR 等方法一起用于多种植物和组织类型（例如叶片和马铃薯块茎）。

CTAB 提取法 按照 EPPO（2004）描述的方法对植物组织进行均质并提取核酸。十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）法已和实时 RT-PCR 一起用于多种植物和组织类型（例如叶片和番茄种子；EUPHRESCO，2010）。

磁珠提取法 1 以下自动化程序基于 KingFisher mL 磁珠提取仪（Thermo Scientific）。对容量进行适当调整后，也可使用 KingFisher 其他型号。

对每一样品而言，至少要浸软 200 mg 叶片或块茎组织，或 100 粒种子，随后按照 1 g 叶片或块茎组织对 10 ml 缓冲液和 1 g 种子对 20 ml 缓冲液的比例，立即加入提取缓冲液。持续浸软，直至获取尽可能没有完整组织碎屑的清澈细胞裂解物。提取缓冲液含 200 μ l 8.39% (w/v) 焦磷酸钠（TNaPP）溶液（pH 10.0–10.9）、100 μ l B 型消泡剂乳液（Sigma）和 9.8 ml 胍裂解缓冲液（GLB）。GLB 含：764.2 g 盐酸胍、7.4 g 脱水 EDTA 二钠、30.0 g PVP-10、5.25 g 一水柠檬酸、0.3 g 柠檬酸三钠、5 ml 聚乙二醇辛基苯基醚（Triton X-100）、250 ml 无水乙醇和 750 ml 水。

将大约 2ml 裂解物倒入一个新微量离心管中，约 5 000 g 离心 1 min。取 1 ml 上清液，加入 KingFisher mL 托架上第一个离心管（A）中，同时加入 50 μ l 涡旋震荡的 MAP 溶液 A 磁珠（Invitek）。离心管 B 加入 1 ml GLB；离心管 C 和 D 加入 1 ml 70%乙醇；离心管 E 加入 200 μ l 水或 1 \times Tris-EDTA 缓冲液。

将排管放入 KingFisher mL 磁珠提取仪并运行程序（见图 2）。20 分钟后，暂停提取仪运行，实施加热步骤。将排管移入烘箱，65–70°C 保持 5 min，然后放回 KingFisher mL 磁珠提取仪，恢复程序运行。其他型号可能有内置的加热或控制蒸发步骤。完成后，将洗脱的核酸移入一个新的微型离心管。

本方法已用于很多种植物，以及马铃薯块茎和番茄种子。本方法和本附件描述的

两种实时 RT-PCR 检测一起使用（见 3.3.3.4 和 3.3.4.2 节）。使用磁珠提取方法 1 时，循环阈值（Ct）可能比本附件描述的其他提取方法要多几个循环，但样品处理数量的增加使其成为一种有价值的提取方法（Roehorst 等，2005）。

```

Plate layout Default: Plate type = KingFisher tubestrip 1000 µl; Plate change message = Change Default
A: volume = 1000, name = Cell lysate or tissue homogenate; volume = 50, name = Magnetic particles;
B: volume = 1000, name = Washing buffer 1 (Various); C: volume = 1000, name = Washing buffer 2 (Various);
D: volume = 1000, name = Washing buffer 3 (Various); E: volume = 200, name = Elution buffer (Various)
STEPS COLLECT BEADS Step parameters: Name = Collect Beads; Well = A, Default; Beginning of step:
Premix = No; Collect parameters: Collect count = 1. BIND Step parameters: Name = Lysing, Well = A, Default;
Beginning of step: Release = Yes, time = 1min 0s, speed = Fast dual mix; Bind parameters: Bind time = 4min
0s, speed = Slow; End of step: Collect beads = No. BIND Step parameters: Name = Lysing, Well = A, Default;
Beginning of step: Release = Yes, time = 1min 0s, speed = Fast dual mix Bind; Bind parameters: Bind time =
4min 0s, speed = Slow; End of step: Collect beads = No. BIND Step parameters: Name = Lysing, Well = A,
Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 1min 0s, speed = Fast dual mix; Bind parameters: Bind time =
4min 0s, speed = Slow; End of step: Collect beads = Yes, count = 4. WASH Step parameters: Name =
Washing, Well = B, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 0s, speed = Fast; Wash parameters:
Wash time = 3min 0s, speed = Fast dual mix; End of step: Collect beads = Yes, count = 3. WASH Step
parameters: Name = Washing, Well = C, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 0s, speed = Fast;
Wash parameters: Wash time = 3min 0s, speed = Fast dual mix; End of step: Collect beads = Yes, count = 3.
WASH Step parameters; Name = Washing, Well = D, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 0s,
speed = Fast; Wash parameters: Wash time = 3min 0s, speed = Fast dual mix; End of step: Collect beads =
Yes, count = 3. ELUTION Step parameters; Name = Elution, Well = E, Default; Beginning of step: Release =
Yes, time = 10s, speed = Fast; Elution parameters: Elution time = 20s, speed = Bottom very fast; Pause
parameters: Pause for manual handling = Yes, message = Heating, Post mix time = 30s, speed = Bottom very
fast; Remove beads: Remove beads = Yes, collect count = 4, disposal well = D

```

图 2. KingFisher mL 磁珠提取仪（Thermo Scientific）程序

磁珠提取方法 2 本自动程序使用 Sbeadex maxi plant kit（LGC Genomics）和 KingFisher 96 系统（Thermo Scientific）。除使用 GH plus 裂解缓冲液代替试剂盒中的 PN 裂解缓冲液外，应按照生产商的说明进行操作。

3.3.3 马铃薯纺锤形块茎类病毒属的通用分子检测方法

3.3.3.1 R-PAGE

R-PAGE 被推荐作为侵染马铃薯叶片 PSTVd 的一种检测方法（EPPO，2004），但其在以 DIG 标记的 cRNA 探针、用 Shamloul 等（1997）引物的两步常规 RT-PCR 和 Boonham 等（2004）的实时方法所做的环形试验中，灵敏度（检测极限（LOD）87 893 pg PSTVd）比接受评估的其他分子方法（LOD 至少为 17 pg PSTVd）低（Jeffries & James，2005；同样见表 1）。

本方法已成功用于其他寄主植物；例如辣椒、马铃薯（块茎）和番茄。由于其灵敏度低，需要混合样品来进行验证。

R-PAGE 能检测出所有已知的马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒；因此，为了鉴定 PSTVd，必须对核酸进行 RT-PCR，并对 PCR 产物进行测序。

3.3.3.2 用 DIG 标记的 cRNA 探针杂交

本方法被推荐用于检测侵染马铃薯叶片的 PSTVd (EPPO, 2004)。对马铃薯叶片中 PSTVd 的检测灵敏度至少为 17 pg PSTVd (Jeffries & James, 2005)。还成功检测过其他寄主, 包含矮牵牛属、素馨叶白英、番茄和马铃薯 (块茎)。

该探针基于 Agdia, Inc.⁹ 生产的一个 PSTVd 全长度单体 (编号 DLP 08000/0001)。探针应按照生产商的说明使用, 或参考 EPPO (2004) 有关本方法的详细信息。除 Ames 缓冲液 (EPPO, 2004) 外, 聚乙二醇 (PEG) 和其他提取缓冲液也可用于核酸提取。

本 DIG 标记的 cRNA 探针法可检测所有已知的马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒, 因此, 为鉴定 PSTVd, 必须对核酸进行 RT-PCR, 并对 PCR 产物进行测序。

3.3.3.3 使用 Verhoeven 等 (2004) 引物的常规 RT-PCR

本检测所用引物是 Verhoeven 等 (2004) 的 Posp1 和 Vid 引物。Posp1 引物可检测 CEVd、菊矮化类病毒 (*Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd))、IrVd-1、MPVd、PCFVd、PSTVd、TASVd、TCDVd 和 TPMVd。Vid 引物可检测 PSTVd、TCDVd, 以及 CLVd。在两个独立的反应中使用 Posp1 和 Vid 引物可检测出所有马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒。然而, 引物目标区关键位点的序列匹配错误可能会妨碍对一些马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒分离物的检测 (例如, 用这些引物未能检测出 [CLVd](#) 的一个 ~~CLVd~~ 分离物; Steyer 等, 2010), 因而要使用其他引物来检测这些分离物。计算机模拟研究显示, 因为关键位点的引物序列匹配错误, 可能无法检测以下 PSTVd 分离物: Posp1 引物: EU879925、EU273604、EF459697、AJ007489、AY372398、AY372394、FM998551、DQ308555、E00278; Vid 引物: EU273604²。Posp1 引物在检测 PSTVd 时要比 Vid 引物灵敏得多。

引物

Posp1-正向: 5'-GGG ATC CCC GGG GAA AC-3' (核苷酸 (nt) 86-102)

Posp1-反向: 5'-AGC TTC AGT TGT (T/A) TC CAC CGG GT-3' (nt 283-261)

Vid-正向: 5'-TTC CTC GGA ACT AAA CTC GTG-3' (nt 355-16)

Vid-反向: 5'-CCA ACT GCG GTT CCA AGG G-3' (nt 354-336)

反应条件

已证明 1 步法 RT-PCR 试剂盒 (Qiagen) 能可靠用于检测单个样品中的 PSTVd、CEVd、CLVd、CSVd、TASVd 和 TCDVd (EUPHRESCO, 2010), 以及本节起首部分列出的其他马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒。没有必要使用 EUPHRESCO (2010) 描述的 Q-溶液。尽管可以采用不同的 RT-PCR 试剂盒和反应条件, 还是应使用所有拟检测的相关马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒对其进行验证, 以确认它

们适用于预期目的。

取 2 ml 模板, 加入 23 μl 反应混合母液, 其中含正向和反向引物 (10 μM) 各 1.0 μl 、5 μl 5 \times 一步法 RT-PCR 缓冲液、1.0 μl 一步法 RT-PCR 酶混合液、1.0 μl 脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTPs) (每种 dNTP 各 10 mM), 以及 14 μl 水。热循环程序如下: 50 $^{\circ}\text{C}$ 30 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 60 s 和 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 35 个循环; 以及最后一步 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。

凝胶电泳

RT-PCR 后, PCR 产物 (Pospil 和 Vid 引物分别约为 197 bp 和 359 bp) 应用凝胶电泳 (2%琼脂糖凝胶) 进行分析, 并对大小正确的 PCR 扩增子进行测序, 以确定类病毒种类。在实际工作中, 对 197 bp 产物进行测序总会获得与类病毒全基因测序相同的鉴定结果。

3.3.3.4 使用 GenPospil 检测的实时 RT-PCR (Botermans 等 , 2013)

GenPospil 检测使用 TaqMan 实时 RT-PCR 来检测马铃薯纺锤形块茎类病毒属各种已知类病毒。它包含平行运行的两个反应: 第一个 (反应混合液 1) 以除 CLVd 之外的所有马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒为目标 (Botermans 等, 2013); 第二个 (反应混合液 2) 则专门以 CLVd 为目标 (Monger 等, 2010)。为了监测 RNA 提取, 引入了一个以 Menzel 等 (2002) 设计的引物为基础的 *nad5* 内对照, 来扩增植物线粒体 mRNA (线粒体 *NADH* 脱氢酶基因)。对番茄叶片的方法验证 (见表 1) 显示, GenPospil 检测能在相对侵染率仅为 0.13% 的情况下 (相当于 1: 770 的稀释比例) 检测出各种已知的马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒分离物。由于未观察到它与其他类病毒、病毒或寄主植物核酸间有交叉反应, 本分析具有特异性。在一项实验室间比较中, 重复性和再现性达 100%, 本分析表现得非常可靠。已证明 GenPospil 检测是对马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒进行大规模筛选的一个适宜工具。对番茄叶片以外的其他基质而言, 本分析仍然需要经过验证。

引物

TCR-正向 1-1: 5'-TTC CTG TGG TTC ACA CCT GAC C-3' (Botermans 等, 2013)

TCR-正向 1-3: 5'-CCT GTG GTG CTC ACC TGA CC-3' (Botermans 等, 2013)

TCR-正向 1-4: 5'-CCT GTG GTG CAC TCC TGA CC-3' (Botermans 等, 2013)

TCR-正向 PCFVd: 5'-TGG TGC CTC CCC CGA A-3' (Botermans 等, 2013)

TCR-正向 IrVd: 5'-AAT GGT TGC ACC CCT GAC C-3' (Botermans 等, 2013)

TR-反向 1: 5'-GGA AGG GTG AAA ACC CTG TTT-3' (Botermans 等, 2013)

TR-反向 CEVd: 5'-AGG AAG GAG ACG AGC TCC TGT T-3' (Botermans 等, 2013)

TR-反向 6: 5'-GAA AGG AAG GAT GAA AAT CCT GTT TC-3' (Botermans 等, 2013)

CLVd-正向: 5'-GGT TCA CAC CTG ACC CTG CAG-3' (Monger 等, 2010)

CLVd-正向 2: 5'-AAA CTC GTG GTT CCT GTG GTT-3' (Monger 等, 2010)

CLVd-反向: 5'-CGC TCG GTC TGA GTT GCC-3' (Monger 等, 2010)

nad5-正向: 5'-GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT-3' (Menzel 等, 2002)

nad5-反向: 5'-CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA-3' (Menzel 等, 2002)

探针

pUCCR: 6FAM-5'-CCG GGG AAA CCT GGA-3'-MGB (Botermans 等, 2013)

CLVd-P: 6FAM-5'-AGC GGT CTC AGG AGC CCC GG-3'-BHQ1 (Monger 等, 2010)

nad5-P: VICr-5'-AGG ATC CGC ATA GCC CTC GAT TTA TGT G-3'-BHQ1 (Botermans 等, 2013)

两种反应混合液均基于 TaqMan RNA to Ct 1 步法试剂盒 (Applied Biosystems)。

反应混合液 1 (除 CLVd 外所有马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒+ *nad5*)

反应混合液含 12.5 μ l 2 \times TaqMan RT-PCR 混合液、0.6 μ l 1 \times TaqMan RT 酶混合液、0.75 μ l (10 μ M) 正向引物 (TCR-正向 1-1、TCR-正向 1-3、TCR-正向 1-4、TCR-正向 IrVd、TCR-正向 PCFVd 和 *nad5*-正向) 与反向引物 (TR-反向 1、TR-反向 CEVd、TR-反向 6 和 *nad5*-反向) (最终浓度分别为 0.3 μ M), 0.25 μ l (10 μ M) TaqMan 探针 pUCCR (最终浓度为 0.1 μ M), 以及 0.5 μ l (10 μ M) TaqMan 探针 *nad5*-P (最终浓度为 0.2 μ M)。加入分子级水和 2 μ l RNA 模板, 形成最终容量 25 μ l。

反应混合液 2 (CLVd + *nad5*)

反应混合液含 12.5 μ l 2 \times TaqMan RT-PCR 混合液、0.6 μ l of 1 \times TaqMan RT 酶混合液、0.75 μ l (10 μ M) 正向引物 (CLVd-正向、CLVd-正向 2 和 *nad5*-正向) 与反向引物 (CLVd-反向和 *nad5*-反向) (最终浓度分别为 0.3 μ M)、0.25 μ l (10 μ M) TaqMan 探针 CLVd-P (最终浓度为 0.1 μ M), 以及 0.5 μ l (10 μ M) TaqMan 探针 *nad5*-P (最终浓度为 0.2 μ M)。加入分子级水和 2 μ l RNA 模板, 形成最终容量 25 μ l。

两种反应混合液的热循环条件均为 48 $^{\circ}$ C 15 min, 95 $^{\circ}$ C 10 min, 继以 40 个循环 (95 $^{\circ}$ C 15 s 和 60 $^{\circ}$ C 1 min)。

关于本方法, Botermans 等 (2013) 认为 Ct 值 <32 为阳性; 介于 32 和 37 之间为不确定, 需要进一步确认; \geq 37 为阴性。然而, 这些值可能检测不出一些组织中的低水平感染, 因而需要由各个实验室自行确定。

3.3.4 具有较高特异性的 PSTVd 分子检测方法

3.3.4.1 使用 Shamloul 等 (1997) 引物的常规 RT-PCR

本检测所用 RT-PCR 引物由 Shamloul 等 (1997) 设计, Weidemann 和 Buchta (1998) 也做过描述。这些引物可以检测 MPVd、PSTVd、TCDVd 和 TPMVd。计算机模拟研究显示, 因为关键位点的引物序列匹配错误, 可能无法检测以下 PSTVd 分离物: 反向引物时 AY372394、DQ308555、EF459698。如果 RNA 不是使用这些引物进行扩增, 则可使用 Vid 引物。

引物

3H1-正向: 5'-ATC CCC GGG GAA ACC TGG AGC GAA C-3' (nt 89-113)

2H1-反向: 5'-CCC TGA AGC GCT CCT CCG AG-3' (nt 88-69)

方法 1 (使用 *Platinum Taq (Invitrogen)* 的 *SuperScript* 一步法 RT-PCR)

每一反应, 取 1 μ l 模板 RNA 加入 24 μ l 反应混合母液, 其中含正向和反向引物 (15 μ M) 各 1.7 μ l、12.5 μ l 2 \times 反应缓冲液、0.5 μ l RT/Platinum Taq, 以及 7.6 μ l 水。热循环程序如下: 43 $^{\circ}$ C 30 min; 94 $^{\circ}$ C 2 min; 随后 94 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 90 s 和 72 $^{\circ}$ C 45 s, 10 个循环; 继以 94 $^{\circ}$ C 30 s, 64 $^{\circ}$ C 90 s 和 72 $^{\circ}$ C 45 s, 20 个循环; 以及最后 72 $^{\circ}$ C 10 min 和 20 $^{\circ}$ C 1 min 延伸。

方法 2 (二步法 RT-PCR)

使用二步法 RT-PCR, 对马铃薯中 PSTVd 的检测灵敏度至少为 17 pg PSTVd—可检测的最低浓度, 但不同实验室可达到的灵敏度并不相同, 大多数实验室至少可以检测出 89 pg PSTVd (Jeffries & James, 2005)。有关方法 2 的描述见 EPPO (2004)。

RT-PCR 后, 应按说明对 PCR 产物 (约 360 bp) 进行凝胶电泳分析, 并对大小正确的 PCR 扩增子进行测序, 以确定类病毒种类。

已在一个单一 (独立) 反应中和本方法配合使用过一种以 *nad5* 为引物的内对照分析 (Menzel 等, 2002)。所用引物的最终浓度为 0.2 μ M。扩增子为 181 bp。

nad5 正义链: 5'-GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGTT-3' (nt 968-987 和 1836-1838)

nad5 反义链: 5'-CTCCAGTCACCAACATTGGCATAA-3' (nt 1973-1995)

3.3.4.2 使用 Boonham 等 (2004) 引物的实时 RT-PCR

本检测所用引物和探针由 Boonham 等 (2004) 描述。然而, 本检测方法或其他任何已经发表的实时检测方法都不能对 PSTVd 进行特异性鉴定。如果实时 RT-PCR 获得阳性结果, 还需要通过常规 RT-PCR 和测序来确定类病毒种类。

本检测法可检测 PSTVd、MPVd、TCDVd 和 TPMVd。用 CTAB 提取法从马铃薯中提取时，对 PSTVd 的检测灵敏度最低为 17 pg PSTVd，即检测出的最低浓度 (Jeffries & James, 2005)。通过检测 PSTVd 变异株和合成寡核苷酸，已证明本检测方法可检测出所有已知的序列变异。这些变异由计算机模拟研究确定，其引物序列匹配错误可能导致检测失败 (Boonham 等, 2005)。然而，由于探针结合位点插入了 (一个) 多余的碱基，可能无法检测出 Owens 等 (2009) 最近描述的异常分离物 VIR-06/7L 和 VIR-06/10L (W. Monger, 个人通讯, 2011)¹。

引物

PSTV-231-正向: 5'-GCC CCC TTT GCGCTG T-3' (nt 232-247)

PSTV-296-反向: 5'-AAG CGG TTC TCG GGA GCT T-3' (nt 297-279)

PSTV-251T: FAM-5'-CAG TTG TTT CCA CCG GGT AGTAGC CGA-3' TAMRA
(nt 278-252)

内对照 COX 引物扩增植物线粒体细胞色素氧化酶 1 基因 (Weller 等, 2000)。

COX-正向: 5'-CGT CGC ATT CCA GAT TAT CCA-3'

COX-反向: 5'-CAA CTA CGG ATA TAT AAG RRC CRR ACC TG-3'

COXsol-1511T: VIC-5'-AGG GCA TTC CAT CCA GCG TAA GCA-3' TAMRA

反应混合液适用于 96 孔板，是对 EPP0 方法 (EPP0, 2004) 的一个修订，其中包含了可检测 PSTVd 和 COX 的一个复合反应，以及检测 PSTVd 的一个单一反应 (Roehorst 等, 2005)。

反应混合液含 13.75 μ l 水、25 μ l 2 \times 反应混合母液 (Applied Biosystems)、1.25 μ l 40 \times MultiScribe 逆转录反转录酶 (Applied Biosystems)、PSTV-231-F 和 PSTV-296-R 引物 (10 μ M) 各 1.5 μ l，以及 1.0 μ l PSTV-251T 探针 (5 μ M)。反应混合液均匀分为容量为 22 μ l 的两等份，即 A 和 B。A 中加入 2 μ l 水，B 中加入每种 COX 引物 (10 μ M) 各 0.75 μ l 和 0.5 μ l COXsol-1511T 探针 (5 μ M)。A 和 B 中各加入 1 μ l 目标 RNA，使反应板每个孔中的反应混合液最终均为 25 μ l。使用反应混合液 A 可以检测出 PSTVd，使用反应混合液 B 则可以在一个复合反应中同时检测出 PSTVd 和 COX。

热循环条件为 48 $^{\circ}$ C 30 min; 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s 和 60 $^{\circ}$ C 1 min，40 个循环。

3.3.4.3 实时 RT-PCR (Plant Print Diagnostics 试剂盒 kit)

本检测所用引物和探针由 Bertolini 等 (2010) 描述，它们作为一个试剂盒可从

¹ 截至 2010 年 3 月 1 日 (W. Monger, 个人通讯, 2011)

Plant Print Diagnostics 购得 (编号 PSTVd/100)。本检测可检测 CLVd、PSTVd 和 TCDVd。计算机模拟研究表明,所有引物序列匹配错误都发生在非关键位点,因此 GenBank 中保存的所有 327 份 PSTVd 分离物应该都可以进行检测 (N. Duran-Vila, 个人通讯, 2014)。

表 1 提供了验证数据。

引物

PSTVd-正向: 5'-CCT TGG AAC CGC AGT TGG T-3' (nt 339—357)

PSTVd-反向: 5'-TTT CCC CGG GGA TCC C-3' (nt 87—102)

PSTVdP: FAM-5'-TCCTGTGGTTCACACCTGACCTCCTGA-3' TAMRA (nt 19—45)

PCR组合包含冻干的引物和探针(试剂盒中提供),其中可加入任何商业化RT-PCR反应混合母液。每一反应,取 3 μl 模板 RNA,加入 9 μl PCR 混合物中,其中含 6 μl 商业化 2 \times RT-PCR 缓冲液、正向和反向引物 (10 μM) 各 0.6 μl 、0.36 μl TaqMan 探针 (5 μM)、0.5 μl 25 \times RT-PCR 酶混合液,以及 0.94 μl 水,形成最终反应容量 12 μl 。

热循环条件为 45 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s 和 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 40 个循环。

使用本方法产生的 Ct 值 <40 且阴性对照为阴性(无扩增)时,样品可视为阳性。产生的 Ct 值 ≥ 40 且阳性对照有扩增时,样品可视为阴性。

3.4 分子检测的对照

为了获得可靠的检测结果,取决于所使用的检测类型和所要求的确定性水平,应考虑为每一组核酸分离物、目标有害生物或目标核酸扩增物设置适宜的对照。对 RT-PCR 而言,最少应使用一个阳性核酸对照、一个内对照,以及一个阴性扩增对照(无模板对照)。

阳性核酸对照 本对照用于监测检测方法(不包括提取)的效率。可使用预先制备(储存)的类病毒核酸、全基因扩增 DNA,或使用与检测所用引物相同的引物对生成一个合成对照(例如克隆的 PCR 产物)。也可使用一个检测对照限量(非必须)。

内对照 对常规和实时 RT-PCR 而言,RT-PCR 规程应包含诸如 COX 或 NAD 的一个植物管家基因(HKG),以排除因核酸提取失败或降解,或存在 PCR 抑制剂而可能引起的假阴性。内对照引物最好应在一个复合反应中和马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒/PSTVd 引物一起使用。然而,由于可能难以在不降低类病毒检测灵敏度的情况下做到这一点,建议在可行的情况下运行马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒/PSTVd 引物和 HKG 引物的复合反应,以及只有马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒/PSTVd 引物的单一反应。

已证明 *nad5* 线粒体 *NADH* 脱氢酶 5 基因片段是判断提取程序和常规 RT-PCR 的

RT 步骤的效果的可靠指标 (Menzel 等, 2002)。这一点已经很多种植物测试, 包含马铃薯和其他多种茄属植物 (*S. bonariensis*、欧白英 (*S. dulcamara*)、素馨叶白英 (*S. jasminoides*)、龙葵 (*S. nigrum*)、珊瑚樱 (*S. pseudocapsicum*)、蓝花茄 (*S. rantonnetii*) 和拟刺茄 (*S. sisymbriifolium*)、巴西野烟 (*Acnistus arborescens*)、颠茄 (*Atropa belladonna*)、木曼陀罗属 (*Brugmansia spp.*)、辣椒属 (*Capsicum spp.*)、夜香树属 (*Cestrum spp.*)、*Lochroma cyanea*、烟草属 (*Nicotiana spp.*) 和酸浆属 (*Physalis spp.*) (Seigner 等, 2008)。nad5 引物含有一个内含子, 因此不能从 DNA 扩增。内含子切除后就可以扩增出 RNA。

尽管 COX 在本规程中被用作一个内对照, 但 COX 引物可以扩增 RNA 和 DNA。因此, 它只能作为可扩增的 DNA 而非仅仅是 RNA 的质量指标, 因此不能控制反转录 (RT) 步骤。

当一种 PCR 方法的说明未提及内对照 COX 或 nad5 时, 实验室应选择一种内对照并对其进行验证。

阴性扩增对照 (无模板对照) 常规和实时 RT-PCR 有必要设置本对照, 以排除反应混合液制备过程中污染引起的假阳性。在扩增阶段加入制备反应混合液所使用的 PCR 级水。

阳性提取对照 本对照用于确保所提取的目标类病毒核酸的数量和质量可以满足 RT-PCR 的需要, 从而能检测到目标类病毒。类病毒核酸提取自受侵染的寄主组织或用类病毒接种过的健康植物组织。

阳性对照应约为每株植物用于 RNA 提取的叶片组织数量的 1/10。如果对样品进行了混合, 应相应调整阳性对照的数量 (例如 10 批次 20 mg 的样品混合用于提取 RNA, 2 mg 受侵染叶片+ 198 mg 健康马铃薯组织)。如果这种情况下未能检测到, 应重新进行检测或降低混合比例, 直至获得可靠的检测。

对 RT-PCR 而言, 应注意避免由阳性对照或阳性样品的气溶胶雾引起的交叉污染。应对实验室所用的阳性对照进行测序, 以便对该序列和从大小正确的 PCR 扩增子获取的序列作出比较。或者, 可以合成已知序列的阳性对照, 该对照同样可以与大小正确的 PCR 扩增子进行比较。

阳性提取对照 本对照用于监测核酸提取过程中的污染和/或与寄主组织的交叉反应。本对照包含提取自未受侵染的寄主组织, 并随后进行扩增的核酸。预期有大量阳性样品时, 建议引入多重对照。

3.5 常规和实时 RT-PCR 结果的解释

3.5.1 常规 RT-PCR

类病毒特异性 PCR 可判为有效，如果：

- 阳性核酸对照产生该类病毒基因组大小正确的产物；且
- 阴性提取物对照和阴性扩增对照中未产生该类病毒基因组大小正确的扩增子。

如同时使用了 COX 和/或 *nad5* 内对照引物，则阴性（健康植物组织）对照（如有使用）、阳性核酸对照，以及每个检测样品都要产生一个 181 bp 的条带（*nad5*）。样品使用内对照引物不能扩增样品则说明，例如，核酸提取失败、反应混合液不含核酸、RT 步骤失败、核酸提取物中有抑制 PCR 的化合物存在，或核酸已经降解。

一个样品可判为阳性，如果它产生大小正确的扩增子。为鉴定类病毒种类，必须对 PCR 产物测序。

3.5.2 实时 RT-PCR

实时 RT-PCR 可判为有效，如果：

- 阳性核酸对照可使用类病毒特异性引物产生一条扩增曲线；且
- 阴性提取物对照和阴性扩增对照未见扩增曲线（即 Ct 值为 40 或实验室验证后确定的其他 Ct 值）。

如果同时使用了 COX 和 *nad5* 内对照引物，则阴性对照（如有使用）、阳性核酸对照，以及每个检测样品都要产生一条扩增曲线。样品使用内对照引物不能产生一条扩增曲线则说明，例如，核酸提取失败、反应混合液不含核酸、核酸提取物中有抑制 PCR 的化合物存在，或核酸已经降解。

一个样品可判为阳性，如果它产生一条典型的扩增曲线。3.3.3.4 和 3.3.4.3 节提供了有关两种方法 Ct 临界值的具体信息。

4. 鉴定

根据 3.3.4.1 和 3.3.3.3 节的描述，通过使用 Shamloul 或 Vid 引物的常规 RT-PCR 方法获得的产物应分别进行测序，并在公开的基因序列数据库中找到一个匹配序列来鉴定 PSTVd。可能需要由序列分析专家来协助鉴定。如果 PCR 产物扩增得很少，或者样品被一种以上马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒侵染，对 PCR 产物进行克隆可有效保证能够获得一个序列。

如需确认，一个由实时 RT-PCR 检测出的阳性样品应使用常规 RT-PCR 重新进行检测，以确保对产物进行测序和鉴定。实时 RT-PCR 产物直接测序产生的序列信息不能保证作出可靠的鉴定。它可将 PCR 产物鉴定为一种类病毒，但不能鉴定到种，

也不能与所用的阳性对照相区分。然而，由于实时 RT-PCR 的灵敏度越来越高，一种产物可能无需通过常规 RT-PCR 获得。在对样品进行混合的情况下，重新检测更小的子样品可能会提高常规 RT-PCR 扩增的可靠性。或者，可以将样品接种到番茄植株上，使叶片中类病毒的浓度提高到常规 RT-PCR 可以检测到的水平。然而，该方法尚未经过评估，如果结果不具确定性，则可能需要重新进行取样和检测。

4.1 测序与序列分析

序列分析只能由富有经验的人员来完成。如果没有进行内部测序的设备，应使用一个商业化公司。该公司会明确提出他们对 PCR 产物进行测序的要求。将纯化后的产物（以及必要的正向和反向引物）交由公司测序。如有要求，一些公司也可能对产物进行纯化。

如果测序在内部进行，则应建立并遵循测序方法。应使用 PCR 引物作为测序引物，对 PCR 产物的每一单链进行测序。两个独立测序的 DNA 单链（来自正向和反向引物）应组装成一个整体，以确认对每一个核苷酸位点的识别。最好使用基因组组装软件（例如 Geneious、CLC Genomics Workbench 或 Lasergene 软件）对电泳图谱（跟踪文件）进行分析。两条单链间不一致的部分应在序列编辑时标记为不确定的碱基对。编辑后的一致序列（通过比较两条单链来确定）随后可以与相关数据库中马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒的序列进行比对。在复合侵染的情况下，色谱可能无法读取，需对 PCR 产物进行克隆和测序。

在只有少数几个核苷酸差异对将类病毒鉴定为限定或非限定有害生物具有关键作用的情况下，需要对马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒进行认真的比较。对 PSTVd 进行最初鉴定时，可以保留一致序列中的引物序列（Shamloul 或 Vid 引物），这是由于这些引物位于类病毒基因组中最保守的区域，不太可能影响鉴定。如有发现，就必须切割掉延伸阶段通过聚合酶植入的 [A-悬垂片段尾](#)。为了鉴定，建议使用始于类病毒基因组位点 1 的编辑后的一致序列，与一个综合性核酸数据库进行比较。应使用基本的局部相似性比对搜索工具（BLAST），在国家生物技术信息中心（NCBI）网站的 GenBank 去冗余核苷酸数据库或欧洲分子生物学实验室（EMBL）的欧洲核苷酸档案中进行搜索。另外，鉴定应基于树状视图中特异性簇状 BLAST 相似性片段（邻接法）。

根据国际病毒分类委员会（ICTV）规则，种鉴定的主要标准是序列一致性要在 90% 以上（Owens 等，2011）。然而，如果所获得的序列表现出接近 90% 的一致性，则应考虑生物学特性等更多参数。ICTV 类病毒研究组目前正在讨论类病毒分类和界定种的标准。

当要求 100% 的序列准确度时，例如一个序列要提交到数据库或怀疑是一个类病毒新种时，有必要进行第二次 PCR。此 PCR 应涵盖首次 PCR 所用引物序列的区域，以及首次 PCR 中任何不确定的 [碱基对核苷酸](#)。为此目的，可能需要设计从最初序列开始的一对新引物，但使用 Shamloul 和 Vid 引物对也可能能够满足需要。

5. 记录

应按照 ISPM 27（限定有害生物诊断规程）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，特别是在违规或一个地区首次发现 PSTVd 时，应妥善保存以下其他材料，以保持完整的可追溯性：

- 最初的样品（如果仍然存在）应在 -80°C 下冷冻保存，或冻干后在室温下保存。
- 如有必要，RNA 提取物应在 -80°C 下保存
- 如有必要，RT-PCR 扩增产物应在 -20°C 至 -80°C 下保存
- 用于生成样品鉴定所用一致序列的 DNA 序列跟踪文件。

如果分离物表现出与此前已有记录的分离物不同的分子或生物学特性，应将其提交给一个公认的植物有害生物库/档案（例如 Q-bank (检疫性植物有害生物综合数据库 (Comprehensive Database on Quarantine Plant Pests and Diseases))、DSMZ (Leibniz 研究所—德国微生物与细胞培养物保藏中心 (Leibniz Institute-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)))。

如有证据表明任何所描述的检测方法不能检测出一种 PSTVd 分离物，应将该分离物的详细情况（最好有 GenBank 序列号）提交给国际植物保护公约秘书处。

6. 获取进一步信息的联系点

有关本诊断规程的进一步信息可获自：

苏格兰农业科学与咨询研究院（SASA），英国苏格兰爱丁堡 EH12 9FJ，Roddinglaw 路（C.J. Jeffries 博士，电子邮件：colin.jeffries@sasa.gsi.gov.uk）。

国家植物保护机构，荷兰瓦赫宁根 6700 HC，邮政信箱 9102（J.W. Roenhorst 博士，电子邮件：j.w.roenhorst@nvwa.nl；J.Th.J. Verhoeven 博士，电子邮件：j.th.j.verhoeven@nvwa.nl）。

环境与初级产业部生物科学研究处农业生物组，澳大利亚维多利亚州 3083，Bundoora 区 La Trobe 大学 5 Ring 路（B. Rodoni 博士，电子邮件：brendan.rodoni@depi.vic.gov.au）。

加拿大食品检验局（CFIA）夏洛特镇实验室，加拿大 C1A 5T1，爱德华王子岛夏洛特镇 Mt Edward 路 93 号（H. Xu 博士，电子邮件：huimin.xu@inspection.gc.ca）。

Conselleria de Agricultura de la Generalitat Valenciana, Centro de Proteccion Vegetal y Biotecnologia (IVIA), 46113 Moncada (Valencia), Spain (N. Duran-Vila 博士，电子邮件：duran_nur@gva.es)。

美国农业部动植物检疫局 (USDA-APHIS) 植物种质资源检疫项目 BARC-E, 美国马里兰州 20705, Beltsville 市 Powder Mill 路 580 号楼 (J.A. Abad 博士, 电子邮件: jorge.a.abad@aphis.usda.gov)。

Laboratorios Biológicos, Dirección General de Servicios Agrícolas, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Millán 4703, Montevideo, Uruguay (A. Etchevers 博士, 电子邮件: anitaetchevers@hotmail.com)。

国家植物保护机构 (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) 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

本规程第一稿由 C.J. Jeffries (英国苏格兰农业科学与咨询研究院)、J.W. Roenhorst (荷兰国家植物保护机构)、B. Rodoni (澳大利亚环境与初级产业部)、H. Xu (加拿大食品检验局)、N. Duran-Vila (西班牙 IVIA)、A. Etchevers (乌拉圭 Laboratorios Biológicos) 和 J.A. Abad (美国农业部动植物检疫局) 起草 (详细的联系信息见 6 节)。另外, J.Th.J. Verhoeven (荷兰国家植物保护机构) 深度参与了本规程的制订工作。

感谢 S.L. Nielsen (丹麦), L. Seigner、S. Winter 与 M. Wassenegger (德国), H. Koenraad (荷兰), 以及 A. Fox, T. James、W. Monger 和 V. Mulholland (英国) 在本规程制订过程中提出了建设性建议。

8. 参考文献

本标准同时引用了其他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/ispm>。

Badilla, R., Hammond, R. & Rivera, C. 1999. First report of Potato spindle tuber viroid in Costa Rica. *Plant Disease*, 83: 1072.

Bertolini, E., Cambra, M., Serra, P., López, M.M., Lopes, S., Durán-Vila, N., Ayres, J., Bové, J. 2010. Procedimiento directo de detección específica de los viroides *Potato spindle tuber viroid* y *Citrus exocortis viroid* mediante dianas inmovilizadas y RT-PCR a tiempo real y kit para su detección. Spanish Patent N° 2.387.172.

Bertolini, E., Felipe, R.T.A., Sauer, A.V., Lopes, S., Arilla, A., Vidal, E., Mourão-Filho, F.A.A., Nunes, W.M.C., Bové, J.M., López, M.M. & Cambra, M. 2014a. Tissue-print and squash real-time polymerase chain reaction for direct detection of 'Candidatus Liberibacter' species in citrus plants and psyllid vectors. *Plant Pathology*, doi:10.1111/ppa.12197.

Bertolini, E., Moreno, A., Capote, N., Olmos, A., De Luis, A., Vidal, E., Pérez-Panadés, J. & Cambra, M. 2008. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant tissues and single aphids by real-time PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 120: 177–188.

- Bertolini, E., Teresani, G.R., Loiseau, M., Tanaka, F.A.O., Barbé, S., Martínez, C., Gentit, P., López, M.M. & Cambra, M.** 2014b. Transmission of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ in carrot seeds. *Plant Pathology*, doi:10.1111/ppa.12245.
- Boonham, N., Fisher, T. & Mumford R.A.** 2005. Investigating the specificity of real-time PCR assays using synthetic oligonucleotides. *Journal of Virological Methods*, 130: 30–35.
- Boonham, N., González, L., Lilia Peralta, E., Blockley, A., Walsh, K., Barker, I. & Mumford, R.A.** 2004. Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd). *Journal of Virological Methods*, 116: 139–146.
- Botermans, M., van de Vossenbergh, B.T.L.H., Verhoeven, J.Th.J., Roenhorst, J.W., Hoofman, M., Dekter, R. & Meekes, E.T.M.** 2013. Development and validation of a real-time RT-PCR assay for generic detection of pospiviroids. *Journal of Virological Methods*, 187: 43–50.
- CABI.** n.d. Invasive species compendium. Datasheet for Potato spindle tuber viroid. Wallingford, UK, CABI. Available at <http://www.cabi.org/isc/datasheet/43659> (last accessed 18 August 2014).
- De Bokx, J.A. & Pirone, P.G.** 1981. Transmission of Potato spindle tuber viroid by aphids. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 87: 31–34.
- EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization).2004. Diagnostic protocols for regulated pests. PM 7/33. Potato spindle tuber viroid. *EPPO Bulletin*.
- EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2006. Phytosanitary procedures. PM 3/21 (2). Post-entry quarantine for potato. *EPPO Bulletin*, 34: 443-454.
- EPPO.** (European and Mediterranean Plant Protection Organization).2014. PM 7/98 (2) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. *EPPO Bulletin*, 44: 117-147.
- EPPO/CABI** (I.M. Smith, D.G. McNamara, P.R. Scott & M. Holderness, eds).1997. *Quarantine pests for Europe*, 2nd edn. Wallingford, UK, CABI. 1425 pp.
- EUPHRESKO.** 2010. *Detection and epidemiology of pospiviroids (DEP)*. EUPHRESKO Final Report. York, UK, EUPHRESKO. Available at <http://www.euphresco.org/downloadFile.cfm?id=536> (last accessed 15 May 2013).
- Fernow, K.H.** 1967. Tomato as a test plant for detecting mild strains of potato spindle tuber virus. *Phytopathology*, 57: 1347–1352.
- Fernow, K.H., Peterson, L.C. & Plaisted, R.L.** 1970. Spindle tuber virus in seeds and pollen of infected plants. *American Potato Journal*, 47: 75–80.
- Galindo, J., Smith, D.R. & Diener, T.O.** 1982. Etiology of planta macho, a viroid disease of tomato. *Phytopathology*, 72: 49–54.
- Grasmick, M.E. & Slack, S.A.** 1985. Symptom expression enhanced and low concentrations of potato spindle tuber viroid amplified in tomato with high light intensity and temperature. *Plant Disease*, 69: 49–51.
- Hadidi, A., Mazyad, H.M., Madkour, M.A. & Bar-Joseph, M.** 2003. Viroids in the Middle East. In A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles & J. Semancik, eds. *Viroids*, pp. 275–278. Melbourne, Australia, CSIRO Publishing. 392 pp.

- Hailstones, D.L., Tesoriero, L.A., Terras, M.A. & Dephoff, C.** 2003. Detection and eradication of *Potato spindle tuber viroid* in tomatoes in commercial production in New South Wales, Australia. *Australasian Plant Pathology*, 32: 317–318.
- Hammond, R.W. & Owens, R.A.** 2006. Viroids: New and continuing risks for horticultural and agricultural crops. APSnet. St Paul, MN, American Phytopathological Society (APS). Available at <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/Viroids.aspx> (last accessed 20 December 2012).
- Jeffries, C.** 1998. *Technical guidelines for the safe movement of germplasm*. No.19. Potato. Rome, FAO/IPGRI. 177 pp.
- Jeffries, C. & James, C.** 2005. Development of an EU protocol for the detection and diagnosis of *Potato spindle tuber pospiviroid*. *EPPO Bulletin*, 35:125–132.
- Kryczynski, S., Paduch-cichal, E. & Skrzeczkowski, L.J.** 1988. Transmission of three viroids by seed and pollen of tomato plants. *Journal of Phytopathology*, 121: 51–57.
- Lebas, B.S.M., Clover, G.R.G., Ochoa-Corona, F.M., Elliott, D.R., Tang, Z. & Alexander, B.J.R.** 2005. Distribution of *Potato spindle tuber viroid* in New Zealand glasshouse crops of capsicum and tomato. *Australian Plant Pathology*, 34: 129–133.
- Ling, K.S. & Bledsoe, M.E.** 2009. First report of Mexican papita viroid infecting greenhouse tomato in Canada. *Plant Disease*, 93: 839.
- Mackenzie, D.J., McLean, M.A., Mukerji, S. & Green, M.** 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 81: 222–226.
- Mackie, A.E., McKirdy, S.J., Rodoni, B. & Kumar, S.** 2002. Potato spindle tuber viroid eradicated in Western Australia. *Australasian Plant Pathology*, 31: 311–312.
- Martinez-Soriano, J.P., Galindo-Alonso, J., Maroon, C.J.M., Yucel, I., Smith, D.R. & Diener, T.O.** 1996. Mexican papita viroid: Putative ancestor of crop viroids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 9397–9401.
- Menzel, W., Jelkmann, W. & Maiss, E.** 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with co-amplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods*, 99: 81–92.
- Mishra, M.D., Hammond, R.W., Owens, R.A., Smith, D.R. & Diener, T.O.** 1991. Indian bunchy top disease of tomato plants is caused by a distinct strain of citrus exocortis viroid. *Journal of General Virology*, 72: 1781–1785.
- Monger, W., Tomlinson, J., Boonham, N., Virscek Marn, M., Mavric Plesko, I., Molinero-Demilly, V., Tassus, X., Meekes, E., Toonen, M. & Papayiannis, L.** 2010. Development and inter-laboratory evaluation of real-time PCR assays for the detection of pospiviroids. *Journal of Virological Methods*, 169: 207–210.
- Murcia, N., Serra, P., Olmos, A. & Duran-Vila, N.** 2009. A novel hybridization approach for detection of citrus viroids. *Molecular and Cellular Probes*, 23: 95–102.
- NAK (Dutch General Inspection Service).** 2011. *Pospiviroid: Detection of pospiviroid in potato leaves by real-time RT-PCR*. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (last accessed 18 August 2014).

- Naktuinbouw.** 2012a. *Pospiviroid: Real-time RT-PCR (TaqMan RT-PCR) for pospiviroids in leaves of horticultural crops.* European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (last accessed 18 August 2014).
- Naktuinbouw.** 2012b. *Potato spindle tuber viroid: Real-time RT-PCR (TaqMan RT-PCR) for Potato spindle tuber viroid(PSTVd) and/or Tomato chlorotic dwarf viroid(TCDVd) in leaf material of horticultural crops.* European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (last accessed 18 August 2014).
- Naktuinbouw.** 2012c. *Potato spindle tuber viroid: Detection of Potato spindle tuber viroid(PSTVd) and/or Tomato chlorotic dwarf viroid(TCDVd) in tomato seed with real-time RT-PCR (TaqMan RT-PCR).* European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (last accessed 18 August 2014).
- Navarro B, Silletti M.R, Trisciuzzi, V.N. & Di Serio, F.** 2009. Characterization of Potato spindle tuber viroid infecting tomato in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 91: 723–726.
- Nielsen, S.L., Enkegaard, A., Nicolaisen, M., Kryger, P., Marn, M.V., Pleško, I.M., Kahrer, A. & Gottsberger, R.A.** 2012. No transmission of Potato spindle tuber viroid shown in experiments with thrips (*Frankliniella occidentalis*, *Thrips tabaci*), honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus terrestris*). *European Journal of Plant Pathology*, 133: 505–509.
- NPPO-NL** (National Reference Centre, National Plant Protection Organization). 2013a. *Pospiviroid: Validation of a conventional RT-PCR assay for detection and preliminary identification of pospiviroids (expect [sic] CLVd) by Posp1-FW/Posp1-RE.* European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (last accessed 18 August 2014).
- NPPO-NL** (National Reference Centre, National Plant Protection Organization). 2013b. *Potato spindle tuber viroid: Validation of a conventional RT-PCR assay for detection and identification of CLVd, PSTVd and TCDVd using primers Vid-FW/RE (Verhoeven et al. 2004).* European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (last accessed 18 August 2014).
- NPPO-NL** (National Reference Centre, National Plant Protection Organization). 2013c. *Potato spindle tuber viroid: Validation of a conventional RT-PCR test for detection and identification of PSTVd, TCDVd, MPVd and TPMVd using primers 2H1/3H1 described by Shamoul et al. (1997).* European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (last accessed 18 August 2014).

- NPPO-NL** (National Reference Centre, National Plant Protection Organization). 2013d. *Pospiviroid: Development and validation of a real-time RT-PCR assay for generic detection of Pospiviroids*. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (last accessed 18 August 2014).
- Owens, R. A., Flores, R., Di Serio, F., Li, S.-F., Pallas, V., Randles, J. W., Sano, T. & Vidalakis, G.** 2011. Viroids. In A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens & E. J. Lefkowitz, eds. *Virus Taxonomy*. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, pp. 1221–1234. London, Elsevier Academic Press. 1259 pp.
- Owens, R.A., Girsova, N.V., Kromina, K.A., Lee, I.M., Mozhaeva, K.A. & Kastalyeva, T.B.** 2009. Russian isolates of *Potato spindle tuber viroid* exhibit low sequence diversity. *Plant Disease*, 93: 752–759.
- Querci, M., Owens, R.A., Bartolini, I., Lazarte, V. & Salazar, L.F.** 1997. Evidence for heterologous encapsidation of potato spindle tuber viroid in particles of potato leafroll virus. *Journal of General Virology*, 78: 1207–1211.
- Reanwarakorn, K., Klinkong, S. & Porsoongnurn, J.** 2011. First report of natural infection of *Pepper chat fruit viroid* in tomato plants in Thailand. *New Disease Reports*, 24: 6.
- Roenhorst, J.W., Jansen, C.C.C., Kox, L.F.F., De Haan, E.G. & Van den Bovenkamp, G.W.** 2006. Real-time RT-PCR voor grootschalige toetsing van aardappel op het aardappelspindelknolviroïde. *Gewasbescherming*, 37: 198–203 (in Dutch).
- Roenhorst, J.W., Jansen, C.C.C., Kox, L.F.F., de Haan, E.G., van den Bovenkamp, G.W., Boonham, N., Fisher, T. & Mumford, R.A.** 2005. Application of real-time RT-PCR for large-scale testing of potato for Potato spindle tuber pospiviroid. *EPPO Bulletin*, 35: 133–140.
- Salazar, L.F., Querci, M., Bartolini, I. & Lazarte, V.** 1995. Aphid transmission of potato spindle tuber viroid assisted by potato leafroll virus. *Fitopatologia*, 30: 56–58.
- Seigner, L., Kappen, M., Huber, C., Kistler, M. & Köhler, D.** 2008. First trials for transmission of Potato spindle tuber viroid from ornamental Solanaceae to tomato using RT-PCR and an mRNA based internal positive control for detection. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 115: 97–101.
- Shamloul, A.M., Hadidi, A., Zhu, S.F., Singh, R.P. & Sagredo, B.** 1997. Sensitive detection of potato spindle tuber viroid using RT-PCR and identification of a viroid variant naturally infecting pepino plants. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19: 89–96.
- Singh, R.P.** 1970. Seed transmission of potato spindle tuber virus in tomato and potato. *American Potato Journal*, 47: 225–227.
- Singh, R.P.** 1973. Experimental host range of the potato spindle tuber virus. *American Potato Journal*, 50: 111–123.
- Singh, R.P., Boucher, A. & Somerville, T.H.** 1992. Detection of potato spindle tuber viroid in the pollen and various parts of potato plant pollinated with viroid-infected pollen. *Plant Disease*, 76: 951–953.
- Singh, R.P., Dilworth, A.D., Singh, M. & Babcock, K.M.** 2006. An alkaline solution simplifies nucleic acid preparation for RT-PCR and infectivity assays of viroids from crude sap and spotted membrane. *Journal of Virological Methods*, 132: 204–211.

- Singh, R.P. & Kurz, J.** 1997. RT-PCR analysis of PSTVd aphid transmission in association with PLRV. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19: 418–424.
- Singh, R.P., Nie, X. & Singh, M.** 1999. Tomato chlorotic dwarf viroid: An evolutionary link in the origin of pospiviroids. *Journal of General Virology*, 80: 2823–2828.
- Singh, R.P., Ready, K.F.M. & Nie, X.** 2003. Viroids on solanaceous species. In A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles & J. Semancik, eds. *Viroids*, pp. 125–133. Melbourne, Australia, CSIRO Publishing. 392 pp.
- Spieker, R. L.** 1996. A viroid from *Brunfelsia undulata* closely related to the *Columnea* latent viroid. *Archives of Virology*, 141: 1823–1832.
- Steyer, S., Olivier, T., Skelton, A., Nixon, T. & Hobden, E.** 2010. *Columnea* latent viroid (CLVd): First report in tomato in France. *Plant Pathology*, 59: 794.
- van Brunschot, S.L., Verhoeven, J.Th.J., Persley, D.M., Geering, A.D.W., Drenth, A. & Thomas, J.E.** 2014. An outbreak of Potato spindle tuber viroid in tomato is linked to imported seed. *European Journal of Plant Pathology*, doi:10.1007/s10658-014-0379-8.
- Verhoeven, J.Th.J.** 2010. *Identification and epidemiology of pospiviroids*. Wageningen University, Wageningen, Netherlands. (Thesis) Available at <http://edepot.wur.nl/137571> (last accessed 20 December 2012).
- Verhoeven, J.Th.J., Hüner, L., Virscek Marn, M., Mavric Plesko, I. & Roenhorst, J.W.** 2010. Mechanical transmission of Potato spindle tuber viroid between plants of *Brugmansia suaveolens*, *Solanum jasminoides*, potatoes and tomatoes. *European Journal of Plant Pathology*, 128: 417–421.
- Verhoeven, J.Th.J., Jansen, C.C.C., Willemsen, T.M., Kox, L.F.F., Owens, R.A. & Roenhorst, J.W.** 2004. Natural infections of tomato by *Citrus exocortis* viroid, *Columnea* latent viroid, *Potato spindle tuber viroid* and *Tomato chlorotic dwarf viroid*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 823–831.
- Walter, B.** 1987. Tomato apical stunt. In T.O. Diener, ed. *The viroids*, pp. 321–328. New York, Plenum Press. 365 pp.
- Wassenegger, M., Heimes, S. & Sänger, H.L.** 1994. An infectious viroid RNA replicon evolved from an *in vitro*-generated non-infectious viroid deletion mutant via a complementary deletion *in vivo*. *EMBO Journal*, 13: 6172–6177.
- Weidemann, H.L. & Buchta, U.** 1998. A simple and rapid method for the detection of potato spindle tuber viroid (PSTVd) by RT-PCR. *Potato Research*, 41: 1–8.
- Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N.C., Boonham, N. & Stead, D.E.** 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2853–2858.

表 1. 用于检测不同类型寄主材料中马铃薯纺锤形块茎类病毒的规程的验证资料概述

基质	样品量	样品制备	核酸提取	检测方法	验证情况
番茄叶片	1 g	3.5 ml (1:2–1:5 (w/v)) GH plus 裂解缓冲液和 Homex 6 (Bioreba)	在 96 孔 KingFisher 系统 (Thermo Scientific) 上使用 RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) 或 Sbeadex maxi plant kit (LGC Genomics)	实时逆转录反转录多聚酶链式反应 (RT-PCR): GenPospi 检测, Botermans 等 (2013)	检测极限: 在99.7%的确定性下, 对用健康番茄稀释后的受感染番茄叶片中各种马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒的检测可达到 0.13%的相对侵染率 ¹ (等于 770 倍稀释) 分析特异性: 对各种马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒具有高度特异性 选择性: 番茄叶片无影响 重复性和再现性: 100% (Naktuinbouw, 2012a; Botermans 等, 2013; NPPO-NL, 2013d)
番茄叶片	1 g	3.5 ml (1:2–1:5 (w/v)) GH plus 裂解缓冲液和 Homex 6	RNeasy Plant Mini Kit	实时 RT-PCR: Boonham 等 (2004)	检测极限: 可检测用健康番茄稀释 10 000 倍的受感染番茄叶片 分析特异性: 可检测墨西哥心叶茄类病毒 (MPVd)、马铃薯纺锤形块茎类病毒 (PSTVd)、番茄萎黄矮化类病毒 (TCDVd)、番茄整株结节类病毒 (TPMVd) (部分分离物) 选择性: 番茄叶片无影响 重复性和再现性: 100% (Naktuinbouw, 2012b)
番茄叶片	1 g	3.5 ml (1:2–1:5 (w/v)) GH plus 裂解缓冲液和 Homex 6	RNeasy Plant Mini Kit	RT-PCR: Pospil—正向/Pospi1—反向引物, Verhoeven 等 (2004)	检测极限: 对用健康番茄稀释后的受感染番茄叶片中各种马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒 (金鱼花潜隐类病毒 (CLVd) 除外) 的检测最低可达到 2.5%的相对侵染率 分析特异性: 可检测啤酒花潜隐类病毒 (<i>Hop latent viroid</i> (HpLVd), 椰子死亡类病毒属 (<i>Cocadviroid</i>)) 和 PSTVd 选择性: 番茄叶片无影响 重复性和再现性: 100% (NPPO-NL, 2013a)
番茄叶片	1 g	3.5 ml (1:2–1:5 (w/v)) GH plus 裂解缓冲液和 Homex 6	RNeasy Plant Mini Kit	RT-PCR: Vid-正向/Vid-反向引物, Verhoeven 等 (2004)	检测极限: 对用健康番茄稀释后的受感染番茄叶片中 CLVd、PSTVd 和 TCDVd 的检测最低可达到 100%的相对侵染率 (CLVd*为 10%) * 引物最初设计用于和 Pospil—正向/Pospi1—反向 RT-PCR 配套用于检测 CLVd (Verhoeven 等, 2004) 分析特异性: 可检测 CLVd、PSTVd 和 TCDVd 选择性: 番茄叶片无影响 重复性和再现性: 100% (NPPO-NL, 2013b)

限定有害生物诊断规程

基质	样品量	样品制备	核酸提取	检测方法	验证情况
番茄叶片	1 g	3.5 ml (1:2–1:5(w/v)) GH plus 裂解缓冲液和 Homex 6	RNeasy Plant Mini Kit	RT-PCR: Shamloul 等 (1997)	检测极限: 对用健康番茄稀释后的受感染番茄叶片的检测最低可达到 10% 的相对感染率 分析特异性: 可检测 MPVd、PSTVd、TCDVd、TPMVd (部分分离物) 选择性: 番茄叶片无影响 重复性和再现性: 100% (NPPO-NL, 2013c)
番茄种子	3 000 粒种子 (1 000 粒检测 3 次)	20 ml (1:2–1:5 (w/v)) GH plus 裂解缓冲液和 BagMixer (Interscience)	在 96 孔 KingFisher 系统上使用 Sbeadex maxi plant kit	实时 RT-PCR: Boonham 等 (2004)	效果特性分析同番茄叶片 对各含 1 000 粒种子的 3 个子样品进行检测时, 在 1 个 1 000 粒种子的样品中检测出 1 粒受感染种子的概率>95%。由于在种子处理过程 (使用发酵和果胶酶处理) 中 PSTVd 可很快从受感染果实对健康种子产生交叉污染, 一个样品中很可能存在更多的受污染种子 (Naktuinbouw, 2012c)
马铃薯叶片 (生长室生长) 及马铃薯试管植株	200 mg	20 µL 10% 十二烷基硫酸钠 (SDS)、180 µL 氯化锂提取缓冲液、400 µL 苯酚-氯仿, 以及研钵研杵	苯酚-氯仿和两步法聚乙二醇 (PEG) 提取	双向往返 (R) 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) ²	检测极限: 2 465 pg PSTVd; 这是本分子方法在一项国际环形试验中的最低灵敏度 分析特异性: 可检测已知各种马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒 选择性: 马铃薯品种、马铃薯叶片或试管植株无影响 重复性和再现性: 再现性在 87 893 pg PSTVd (检测的最高 PSTVd 浓度) 时为 51%, 在检测极限时为 42%
马铃薯叶片 (生长室生长) 及马铃薯试管植株	200 mg	1:1.5 (w/v) Ames 缓冲液 (Eppo, 2004) 和研钵研杵	薄膜 (Agdia, Inc.) 固定苯酚-氯仿和两步法聚乙二醇 (PEG) 提取	Digoxigenin (DIG) 探针 ²	检测极限: 最少 17 pg PSTVd (检测的最低浓度) 分析特异性: 可检测各种已知的马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒 选择性: 马铃薯品种、马铃薯叶片或试管植株无影响 重复性和再现性: 再现性在 87 893 pg PSTVd 时为 100%, 在 17 pg PSTVd 时为 23%
马铃薯叶片 (生长室生长) 及马铃薯试管植株	50–500 mg	1:9 (w/v) RH 缓冲液 (Qiagen)、微型离心管, 以及微型小杵或 Homex 6	RNeasy Plant Mini Kit	使用 Shamloul 等 (1997) 引物的两步法 ² 常规 RT-PCR	检测极限: 最少 17 pg PSTVd 分析特异性: 可检测 MPVd、PSTVd、TCDVd 和 TPMVd 选择性: 马铃薯品种、马铃薯叶片或试管植株无影响 重复性和再现性: 再现性在 87 893 pg PSTVd (检测的最高 PSTVd 浓度) 时为 78%, 在 17 pg PSTVd 时为 44%
马铃薯叶片 (生长室生长) 及马铃薯试管植株	1 g	3.5 ml (1:2–1:5(w/v)) GH plus 裂解缓冲液和 Homex 6	在 96 孔 KingFisher 系统上使用 Sbeadex maxi plant kit	实时 RT-PCR: GenPospi 检测, Botermans 等 (2013)	效果特性分析同番茄叶片 分析特异性: 和马铃薯中常发生的病毒没有交叉反应 选择性: 马铃薯叶片和试管植株无影响 对高达 100 的混合比例进行过验证 (在 1 片受感染叶片和 99 片健康叶片构成的样品中检出率达 100%; NAK, 2011)

基质	样品量	样品制备	核酸提取	检测方法	验证情况
马铃薯叶片 (生长室生长) 及马铃薯试管 植株	1.5 g 叶片或 5 g 块茎	叶片使用约 600 μl 缓冲液, 块茎使用约 3 ml 缓冲液 (缓冲液的 选择取决于所使用的 提取方法)	RNeasy Plant Mini Kit, 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 提取, 或 Purescript RNA 分离试剂 盒 (Gentra Systems; 注 意本试剂盒不再有售)	实时 RT-PCR: Boonham 等 (2004)	检测极限: 可检测用健康组织稀释 10 000 倍的受感染组织 分析特异性: 可检测 MPVd、PSTVd、TCDVd、TPMVd (部分分离物); 和马铃薯 中常发生的病毒无交叉反应 选择性: 马铃薯叶片、试管植株或块茎无影响 重复性和再现性: 100% (四个实验室的环形试验) 对高达 100 的混合比例进行过验证 (在 1 片受感染叶片和 99 片健康叶片构成的样 品中检出率达 100%; Roenhorst 等, 2005, 2006)
各种观赏植物 (叶片)	1 g	3.5 ml (1:2–1:5 (w/v)) GH plus 裂解缓冲液和 Homex 6	在 96 孔 KingFisher 系统 上使用 RNeasy Plant Mini Kit 或 Sbeadex maxi plant kit	实时 RT-PCR: GenPospi 检测, Botermans 等 (2013)	效果特性分析同番茄叶片 分析灵敏度: 叶片汁液中马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒的浓度和选择性 (抑制 性化合物) 取决于植物种类 混合比例达 25 时对木曼陀罗属、小花矮牵牛花属、夜香树属、大丽花属 (<i>Dahlia</i>)、金鱼草属 (<i>Nematanthus</i>)、矮牵牛属、素馨叶白英和果酱木进行过验 证。值得注意的是, 对小花矮牵牛花属、素馨叶白英和果酱木而言, 稀释倍数 超过 100 时仍能观察到效果。对一些作物而言, 例如大丽花属, 似乎只有夏季适于 进行 (可靠) 检测 (Naktuinbouw, 2012a)。
各种观赏植物 (叶片)	1 g	3.5 ml (1:2–1:5 (w/v)) GH plus 裂解缓冲液和 Homex 6	在 96 孔 KingFisher 系统 上使用 RNeasy Plant Mini Kit 或 Sbeadex maxi plant kit	实时 RT-PCR: Boonham 等 (2004)	效果特性分析同番茄叶片 分析灵敏度: 叶片汁液中马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒的浓度和选择性 (抑制 性化合物) 取决于植物种类 混合比例达 25 时对木曼陀罗属、小花矮牵牛花属、大丽花属、矮牵牛属、素馨叶 白英和果酱木进行过验证。值得注意的是, 对小花矮牵牛花属、素馨叶白英和果 酱木而言, 稀释倍数超过 100 时仍能观察到效果。对一些作物而言, 例如大丽 花属, 似乎只有夏季适于进行 (可靠) 检测 (Naktuinbouw, 2012b)。

基质	样品量	样品制备	核酸提取	检测方法	验证情况
番茄叶片，马铃薯叶片、块茎和种子，以及各种观赏植物（叶片）	1 g 叶片，或尼龙薄膜上马铃薯块茎或叶片挤压物	10 ml (1:10 (w/v)) 磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 和 Homex 6	直接方法（组织挤压），RNeasy Plant Mini Kit 或 PowerPlant RNA 提取试剂盒 (Mo Bio)	实时 RT-PCR: Bertolini 等 (2010)	<p>检测极限: 可检测用素馨叶白英和番茄健康叶片稀释 10 000 倍的受感染素馨叶白英叶片</p> <p>分析特异性: 可检测 CLVd、PSTVd 和 TCDVd</p> <p>选择性: 马铃薯叶片、块茎或番茄种子无影响</p> <p>重复性和再现性: 100% (3 个实验室的环形试验)</p> <p>检测灵敏度为 100%，检测特异性为 100%，和一种分子杂交方法 (Murcia <i>et al.</i>, 2009) 相比的相对准确度为 100%。对 208 个素馨叶白英、木曼陀罗属、曼陀罗属、矮牵牛属、菊属 (<i>Dendrathera</i> spp.)、马铃薯和番茄的大田样品进行过检测验证。在 208 个样品中，两种技术均是 43 个真阳性，150 个真阴性。使用杂交方法时，有 15 个样品为假阳性，其中检测出番茄顶缩类病毒 (TASVd) 和柑橘裂皮病类病毒 (CEVd)。没有样品为假阴性。</p>

¹ 由于最初检测材料中类病毒浓度未知，一些检测方法的检测极限（灵敏度）以相对值表示。未稀释的叶片汁液视为 100 受感染（以 1 g 叶片材料：3 ml 缓冲液的比例）。通过检测健康叶片汁液对受感染叶片汁液的 8 个系列稀释比例的稀释物来确定相对检测极限。相对检测极限定义为可检测出的每个分离物的平均最低相对感染率（循环阈值 (Ct) <32），而且增加了 3 个标准差，以获得确定性达 99.7% 的保守测算 (Botermans 等, 2013)。

² R-PAGE、DIG 探针和使用 Shamloul 等 (1997) 引物的两步法常规 RT-PCR 等三种方法在一项国际环形试验中进行过比较 (Jeffries 和 James, 2005)。

出台背景

这部分不属于本标准的正式内容

2007 年 3 月，植检委第二届会议在工作计划中增列了主题（2006-002）

2012 年 11 月，诊断规程技术小组修改了规程草案

2013 年 3 月，标准委通过电子表决程序批准提交成员磋商
（2013_eSC_May_10）

2013 年 7 月，成员磋商

2014 年 7 月，诊断规程技术小组审查了规程草案

2014 年 9 月，诊断规程技术小组通过电子表决程序批准提交给标准委审议通过（2014_eTPDP_September_01）

2014 年 11 月，标准委通过电子表决程序批准进入诊断规程通报期（2014_eSC_Nov_13）

2014 年 12 月，通报期

2015 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. 2006: 附件 7. 马铃薯纺锤形块茎类病毒（2016）。罗马，

国际植物保护公约，粮农组织。

2015 年 7 月，植保公约秘书处整合纳入编辑性修订并依据植检委第十届会议（2015 年）的标准撤销程序重新调整了标准格式。

2016 年 5 月，依据所提供的文献参考（Weller 等，2000）（“3.3.4.2 使用 Boonham 等（2004）引物的实时 RT-PCR”章节），标准委通过了对本诊断规程 COX-F 引物序列内对照的技术修正

（2016_eSC_May_15）。诊断规程技术小组注意到，本诊断规程上一版本的序列以及依据 Weller 等（2000）的当前序列，均有效。

出台背景最后更新：2016 年 5 月。

本诊断规程于 2015 年 8 月由标准委代表植检委通过。
本附件是 ISPM 27 号标准 (限定有害生物诊断规程) 规定的一部分。

ISPM 27
附件 8

国际植物检疫措施标准

ISPM 27 诊断规程

DP 8 :

鳞球茎线虫 (*Ditylenchus dipsaci*) 与 腐烂茎线虫 (*Ditylenchus destructor*)

2015 年通过 ; 2015 年出台

目录

1. 有害生物信息	3
1.1 鳞球茎线虫 (<i>Ditylenchus dipsaci</i>)	3
1.2 腐烂茎线虫 (<i>Ditylenchus destructor</i>)	4
2. 分类信息.....	5
3. 检测.....	5
3.1 寄主与症状.....	6
3.1.1 鳞球茎线虫.....	6
3.1.2 腐烂茎线虫.....	10
3.2 线虫分离.....	11
3.2.1 从鳞茎和大蒜瓣中分离	11
3.2.2 从土壤和植物材料中分离	11
4. 鉴定.....	13
4.1 形态学鉴定.....	13
4.1.1 标本制备.....	13
4.1.2 形态学诊断特征.....	13
4.2 分子鉴定.....	17+6
4.2.1 鳞球茎线虫.....	17

4.2.2	腐烂茎线虫.....	17
4.2.3	DNA 提取	18
4.2.4	鳞球茎线虫和腐烂茎线虫的 ITS-rRNA PCR-RFLP 检测.....	18
4.2.5	鳞球茎线虫的 SCAR PCR 检测.....	19
4.2.6	鳞球茎线虫的 18S 和 ITS1 特异性 PCR 检测	19
4.2.7	鳞球茎线虫的 5.8S rDNA 特异性 PCR 检测	21 ²⁰
4.2.8	鳞球茎线虫的 5.8S rDNA 和 ITS 特异性 PCR 检测	21 ²⁰
4.2.9	鳞球茎线虫的 SCAR PCR 检测.....	21
4.2.10	分子检测的对照.....	23 ²²
4.2.11	常规 PCR 结果的解释	23 ²²
5.	记录.....	23 ²²
6.	获取进一步信息的联系点	23 ²²
7.	致谢.....	24 ²³
8.	参考文献.....	24 ²³
9.	图.....	30 ²⁹

1. 有害生物信息

茎线虫属 (*Ditylenchus* Filipjev, 1936) 很大, 其中各种线虫在全球广泛分布, 大多数种类取食菌类。然而, 该属有少数种类是高等植物的重要有害生物 (Sturhan 和 Brzeski, 1991)。应说明的是, 尽管有一些植物 (例如甜菜、紫花苜蓿、三叶草) 既可能被鳞球茎茎线虫 (*Ditylenchus dipsaci*) 又可被腐烂茎线虫 (*Ditylenchus destructor*) 侵染, 但两种线虫在同一植株上很少同时发生 (Andrássy 和 Farkas, 1988)。

1.1 鳞球茎茎线虫 (*Ditylenchus dipsaci*)

鳞球茎茎线虫 (广义) 为害 1 200 多种野生和栽培植物。很多杂草和草坪草是该线虫的寄主, 在缺少栽培植物的情况下对其存活起着重要作用。对鳞球茎茎线虫不同种群和小种的形态学、生物化学、分子学和细胞核研究表明, 它至少是 30 个寄主小种的复合体, 各具有有限的寄主范围。Jeszke 等 (2013) 将该复合体分成两组, 第一组包含双倍体种群, 以“正常”大小为典型特征, 被命名为鳞球茎茎线虫 (狭义)。该组包含了目前已记录的大多数种群。第二组是多倍体, 目前包含巨大茎线虫 (*Ditylenchus gigas* Vovlas 等, 2011) (寄生蚕豆 (*Vicia faba*) 的鳞球茎茎线虫的“巨大小种”)、维氏茎线虫 (*D. weischeri* Chizhov 等, 2010) (寄生丝路蓟 (*Cirsium arvense*)), 以及三种未描述的茎线虫属线虫, 称为 D、E 和 F, 它们分别和豆科 (Fabaceae)、菊科 (Asteraceae) 及车前草科 (Plantaginaceae) 有关 (Jeszke 等, 2013)。所有上述种类中, 只有鳞球茎茎线虫 (狭义) 及其体型较大的变种巨大茎线虫是具有经济重要性的植物有害生物。本规程包含了区分鳞球茎茎线虫 (狭义) 和巨大茎线虫的信息。

鳞球茎茎线虫在大多数情况下是植物地表以上部分 (茎、叶和花) 的内寄生线虫, 但也为害鳞茎、块茎和根茎。该线虫在蚕豆、紫花苜蓿 (*Medicago sativa*)、洋葱 (*Allium cepa*)、车轴草属 (*Trifolium* spp) (三叶草)、川续断属 (*Dipsacus* spp.) (起绒草) 和甜瓜 (*Cucumis melo*) 中由种子传播 (Sousa 等, 2003; Sikora 等, 2005)。很重要的是, 四龄幼虫可以长时间忍受干燥, 有时长达 20 年甚至更多 (Barker 和 Lucas, 1984)。在植物组织开始变干燥时, 这些线虫聚集在一起进入休眠状态, 形成“虫绒” (图 1)。在严重受侵染的豆荚内的种子上和干燥的植物碎屑 (例如收获后的田间残留物) 中常常可以观察到虫绒。种子和干燥植物材料中存在的具有侵染能力的四龄幼虫在该线虫长距离的被动传播中具有重要意义。在受侵染种子表面或内部的处于干燥状态的线虫在经历猪和牛取食消化后仍可存活 (Palmisano 等, 1971)。

尽管鳞球茎茎线虫被视为高等植物的一种有害生物, Viglierchio (1971) 报道, 从大蒜 (*Allium sativum*) 中分离到的一个鳞球茎茎线虫加利福尼亚种群, 实验室条

件下可以在土壤真菌（轮枝孢属 (*Verticilium*) 和枝孢属 (*Cladosporium*)）上繁殖。

已知鳞球茎线虫可在体表携带植物病原细菌（即苜蓿萎蔫病菌（*Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*（异名 *Clavibacter michiganensis* subsp. *Insidiosum*、*Corynebacterium insidiosum*）），引起苜蓿萎蔫病）。

根据 EPPO（2013a），鳞球茎线虫分布在以下区域（不包含截获）：欧洲、亚洲、非洲、北美洲、中美洲与加勒比地区、南美洲及大洋洲。

1.2 腐烂茎线虫 (*Ditylenchus destructor*)

腐烂茎线虫，或称马铃薯腐烂线虫，几乎专门受害植物的地下部分（例如块茎、根茎和茎状地下部分）。它是一个近乎全球分布的物种，在温带地区常见，在马铃薯和啤酒花生产中造成严重损失（EPPO，2013a）。该线虫的寄主范围广泛，包含 90 多种植物，涉及观赏植物、农作物和杂草。马铃薯（*Solanum tuberosum*）是主要寄主，储藏期间湿腐或干腐的块茎会将病害传播给其他块茎。在某些条件下，湿腐微生物会大量为害块茎，也会杀死线虫。腐烂茎线虫只有在干腐微生物感染块茎时才能存活。Rojankovski 和 Ciurea（1986）发现马铃薯块茎中有 55 种细菌和真菌与腐烂茎线虫相关，其中镰刀菌属最为常见。

其他常见寄主有由甘薯（*Ipomoea batatas*）、球根鸢尾（选自西班牙鸢尾（*Iris xiphium*）和英国鸢尾（*Iris xiphoides*）的杂交种）、西洋蒲公英（*Taraxacum officinale*）、啤酒花（*Humulus lupulus*）、郁金香属（*Tulipa* spp.）（郁金香）、流苏风信子（*Leopoldia comosa*）（葡萄风信子）、风信子（*Hyacinthus orientalis*）、唐菖蒲属（*Gladiolus* spp.）（唐菖蒲）、大丽花属（*Dahlia* spp.）（大丽花）、绣球小冠花（*Coronilla varia*）和绒毛花（*Anthyllis vulneraria*）、甜菜（*Beta vulgaris*，糖用甜菜、饲料甜菜和根甜菜）、金盏花（*Calendula officinalis*）、胡萝卜（*Daucus carota*）、欧芹（*Petroselinum crispum*）及车轴草属（红、白和杂三叶草）（Sturhan and Brzeski, 1991）。在没有高等植物时，腐烂茎线虫可以在近 70 种真菌的菌丝体上繁殖，据知也可以破坏栽培蘑菇的菌丝体（Sturhan and Brzeski, 1991）。该线虫能够在干燥和低温条件下存活，但不会象鳞球茎线虫一样形成“虫绒”。该线虫以卵越冬，这使它的卵比鳞球茎线虫的卵更为重要。种薯和花卉鳞茎中的腐烂茎线虫在很多国家是一种限定有害生物（Sturhan 和 Brzeski, 1991）。有报道称在南非花生（*Arachis hypogaea*）上发生腐烂茎线虫，但这些记录现在被认为是另一个种，非洲茎线虫（*Ditylenchus africanus* Wendt, Swart, Vrain 和 Webster, 1995），其形态和形态测量值与腐烂茎线虫相近。

根据 EPPO（2013a），腐烂茎线虫分布在以下区域（不包含截获）：欧洲、亚

洲、南部非洲、北美洲、南美洲和大洋洲。

2. 分类信息

学名：*Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev, 1936

异名：Siddiqi (2000) 列出了鳞球茎茎线虫模式种的异名

分类地位：线虫门 (Nematoda)，泄管纲 (侧尾腺纲) (Secernentea)，双胃亚纲 (Diplogasteria)，垫刃目 (Tylenchida)，垫刃亚目 (Tylenchina)，垫刃总科 (Tylenchoidea)，粒科 (Anguinidae)

通用名：茎线虫、茎与鳞茎线虫 (英文) (Sturhan 和 Brzeski, 1991)

注：鳞球茎茎线虫目前被认为是一个复合种，由主要在寄主选择方面存在差异的大量生理小种和种群构成。因此，共有 13 个定名种为鳞球茎茎线虫的异名，其中已区分出多达 30 个生理小种，它们的主要区别在于寄主范围，并且通常以其主要寄主植物命名。

学名：*Ditylenchus destructor* Thorne, 1945

异名：无

分类地位：线虫门 (Nematoda)，泄管纲 (侧尾腺纲) (Secernentea)，双胃亚纲 (Diplogasteria)，垫刃目 (Tylenchida)，垫刃亚目 (Tylenchina)，垫刃总科 (Tylenchoidea)，粒科 (Anguinidae)

通用名：块茎腐烂线虫、马铃薯腐烂线虫 (英文) (Sturhan 和 Brzeski, 1991)

De Ley 与 Blaxter (2003) 已结合形态学观察、分子学发现和分支分析建立了最新的分类系统。

3. 检测

鳞球茎茎线虫和腐烂茎线虫具有以下共同的识别症状：膨大、变形、变色、植株地上部分矮化，以及鳞茎和块茎坏死或腐烂 (Thorne, 1945)。

鳞球茎茎线虫

鳞球茎茎线虫在其侵入紧密的薄壁组织的能力方面表现出寄生适应性，先以酶降解相邻细胞壁间的果胶或中间薄层，使细胞变圆、四周分离。这引起典型的发亮症状或受侵染组织的粒状结节，让人想起过熟苹果的果肉 (Southey, 1993)。

根据 Vovlas 等 (2011)，巨大茎线虫 (巨大茎与鳞茎线虫) 侵染蚕豆引起茎部组织膨大和变形或病变，变成红褐色，最后黑色。严重侵染时，种子发黑、变形，

比未受侵染的种子小，表面有斑点状病斑。除蚕豆外，其他寄主还有紫花野芝麻（*Lamium purpureum*）、短柄野芝麻（*Lamium album*）、宝盖草（*Lamium amplexicaule*）、田野毛茛（*Ranunculus arvensis*）、田旋花（*Convolvulus arvensis*）和不实野燕麦（*Avena sterilis*）。~~ss~~

腐烂茎线虫

腐烂茎线虫通常侵染植株的地下部分（马铃薯的块茎和匍匐茎、薄荷的根茎，以及啤酒花和丁香的根），引起变色和植物组织腐烂。地上部分有时也受侵染，引起矮化、变厚、茎部分叉和矮化、叶片卷曲及变色（例如在马铃薯中）（Sturhan 和 Brzeski, 1991）。然而，多数情况下植株的地上部分看不到侵染症状。

3.1 寄主与症状

3.1.1 鳞球茎茎线虫

根据 Sturhan 和 Brzeski (1991)，鳞球茎茎线虫的主要寄主是禾本科（Gramineae）植物：燕麦（*Avena sativa*）、黑麦（*Secale cereale*）、玉米（*Zea mays*）、小麦（*Triticum aestivum*）；百合科（Liliaceae）植物：洋葱、大蒜、郁金香属；豆科（Leguminosae）植物：紫花苜蓿、野豌豆属（*Vicia* spp.）、豌豆（*Pisum sativum*）、车轴草属；茄科（Solanaceae）植物：马铃薯、烟草属（*Nicotiana* spp.）；十字花科（Cruciferae）植物：油菜（*Brassica campestris*），以及石蒜科（Amarillidaceae）：水仙属（*Narcissus* spp.）。其他寄主包含胡萝卜、草莓属（*Fragaria* spp.）（草莓）、甜菜、风信子、韭菜（*Allium ampeloprasum*）、小天蓝绣球（*Phlox drummondii*）、天蓝绣球（*Phlox paniculata*）、石竹属（*Dianthus* spp.）（康乃馨）、芹菜（*Apium graveolens*）、绣球属（*Hydrangea* spp.）、兵豆（*Lens culinaris*）、欧洲油菜（*Brassica napus*）、欧芹、向日葵 sss（*Helianthus annuus*）。

不同代次鳞球茎茎线虫可在一个生长季中存在于一株寄主植物中，代代相接。如果植物受侵染部分因有害生物为害引起死亡，线虫会在其彻底死亡之前离开寄主。在缺少寄主植物时，线虫可以进入非寄主植物，在其中取食一段时间，但它们不能在非寄主植物中繁殖（Andrássy 和 Farkas, 1988）。鳞球茎茎线虫侵染最常见的症状是植株矮化、黄化；茎、叶柄和花变厚、变短、含有虫瘿且变形；鳞茎和根茎上有坏死病斑和腐烂，鳞茎切开时常见环形褐变。鳞球茎茎线虫也可以侵染菜豆（*Phaseolus vulgaris*）（芸豆、青豆或四季豆）、蚕豆、葱属（*Allium* spp.）和紫花苜蓿等植物的种子。小种子一般不表现出明显的侵染症状，但大种子可能种皮皱瘪且带有变色病斑。

3.1.1.1 禾本科植物的特异性症状

燕麦和黑麦 (McDonald 和 Nicol, 2005)。叶片变形, 茎秆增厚, 产生分蘖数量不正常, 植株矮小、丛生。在黑麦栽培中, 鳞球茎茎线虫主要发生在腐殖质少的轻质土壤中和经常种植黑麦的区域。晚秋时节可以观察到最初的侵染迹象, 但它们在春季最为明显。黑麦田中生长迟缓的植株上出现一些病斑, 表明受到了该有害生物为害。由于受侵染的燕麦植株生长更为缓慢, 它们的绿色在黄熟的作物中尤为显眼。小麦受侵染后具有与其他禾谷类作物相似的症状, 而且只在中东欧受**鳞球茎腐烂**茎线虫为害 (Rivoal 和 Cook, 1993)。

玉米不是鳞球茎茎线虫喜欢的寄主, 但幼小植株茎秆组织受侵染后会产生坏死, 并导致玉米植株在收获前死亡或倒伏 (Rivoal 和 Cook, 1993)。受侵染植株的叶片变脆, 像开瓶器一样扭曲。较大植株剥开时, 节间变短, 茎秆基部中空。

3.1.1.2 百合科植物的特异性症状

洋葱、大蒜和分葱 (*Allium cepa* var. *aggregatum*)。在多数葱属植物中, 其受鳞球茎茎线虫侵染的特征是叶片和鳞茎变形 (图 2、3 和 4)。幼小植株基部膨大, 叶片变形。较老的受侵染鳞茎的鳞瓣膨胀, 鳞茎基部鳞茎盘常会开裂 (Potter 和 Olthof, 1993)。洋葱受鳞球茎茎线虫为害时, 因线虫取食导致细胞分离, 其表面呈霜粒状 (Ferris 和 Ferris, 1998)。受侵染鳞茎在储藏期间很容易腐烂 (Bridge 和 Hunt, 1986)。鳞茎内部鳞瓣通常比外部鳞瓣受害更重。随着时间推移, 鳞茎变软, 切开后鳞瓣上可见褐色同心圆。相反的是, 鳞球茎茎线虫不会引起大蒜叶片变形或膨大, 但会引起叶片黄化和死亡 (Netscher 和 Sikora, 1990)。Mollov 等 (2012) 首次报道在美国明尼苏达州大蒜上发现鳞球茎茎线虫。地上部分的症状为矮化和变色, 而鳞茎的症状则是坏死、发育不良和变形。葱属可能会有叶疱 (叶片上水泡状突起)。受侵染的葱属种子观察不到侵染症状。

郁金香属 (Southey, 1993)。鳞球茎茎线虫侵染郁金香的症状, 无论是在生长的植株还是鳞茎上, 都与水仙属的症状的有很大差别。田间花期最容易发现侵染。**最初第一个**症状是紧挨花下的茎部一侧有白色或淡紫色病斑, 并向病斑一侧弯曲。病斑变大, 表皮开裂—其下面显示出典型的组织松软—受害部向下扩展, 通常也会向上扩展至花瓣。在更为严重的侵染中, 相似病斑自叶片主脉向茎下方扩展, 生长可能变形。侵染自新鳞茎的底部开始, **被侵染部位**随后成长为从原来茎基部发出的侧补偿芽。去除外部褐色鳞瓣后, 就可以看见并摸到外层肉质鳞瓣上灰色或褐色松软的块状侵染。受侵染鳞茎没有和水仙或风信子一样的褐色环状斑。

3.1.1.3 豆科植物的特异性症状

紫花苜蓿。鳞球茎线虫是紫花苜蓿上最重要的线虫类有害生物。在比较黏重的土壤中且降雨多时，或在喷灌区域容易发生侵染。在水分胁迫的情况下，受侵染作物常表现出和叶绿素丧失有关的“叶尖白化”特征（Griffin, 1985）。受侵染田块常有不规则的稀疏生长区。线虫为害的典型症状包含基部膨大，茎秆和叶片矮化、扭曲，节间变短，并形成很多腋生芽，产生数量不正常的分裂，使植株表现出丛生状（McDonald 和 Nicol, 2005）。受侵染植株有时不能长高作为干草使用（Ferris 和 Ferris, 1998），它们通常不能产生花穗（McDonald 和 Nicol, 2005）。紫花苜蓿受鳞球茎线虫侵染后易于感染疫霉根腐病（*Phytophthora megasperma*）。在感病、破裂的植株上发生的其他腐生线虫（**各种小杆线虫属**（*Rhabditis*）、头叶属（*Cephalobus*）和盆咽属（*Panagrolaimus*）**的种类线虫**）会加重鳞球茎线虫的危害，也会加速植株的死亡（Andrássy 和 Farkas, 1988）。苜蓿种子未观察到侵染症状。

车轴草属（Cook 和 Yeates, 1993）。除红三叶草和白三叶草外，症状与紫花苜蓿的描述极为相似。该有害生物特别在冷凉、多雨天气下侵染红三叶草。田间出现大片圆形的病株区，**发病区中部区域朝中部方向**的植株发病更重，**中心部位**通常枯萎。植株基部通常有球茎状膨大，叶片变脆，皱缩且叶脉明显变厚。花苞膨大似虫瘿，一个花部虫瘿可以包含 5 000 头线虫（Courtney, 1962）。受鳞球茎线虫侵染后，白三叶草茎部变短并膨大，花蕾丛生，受侵染部位在夏季或秋季变成褐色。叶片较正常的变窄，然而叶柄变厚变短。花蕾基部膨大（Andrássy 和 Farkas, 1988）。

3.1.1.4 茄科植物的特异性症状

马铃薯。鳞球茎线虫**在块茎上**产生漏斗形腐烂，会向块茎内部进一步扩展，与腐烂茎线虫引起的表层腐烂不同。茎叶受该线虫侵染，由此引起植株的典型矮化，并伴有茎和叶柄的严重变形（Evans 和 Trudgill, 1992）。

烟草属（Johnson, 1998）。侵染性幼虫（4 龄）在湿润天气下侵入烟草种苗的叶片和茎中，形成小型黄色膨大物（虫瘿），可扩展至地面以上 40 cm 甚至更多。随着虫瘿数量的增加，植物组织在未成熟时就开始死亡。下部叶片可能脱落，上部叶片可能变黄。虫瘿最终腐烂，受侵染植株停止生长。最后，特别是在冷凉、湿润的天气下和黏重的土壤中，受侵染的茎会开裂，植株倒伏。

3.1.1.5 十字花科植物的特异性症状

受鳞球茎线虫侵染的成熟油菜可能产生严重的褐色腐烂。

3.1.1.6 石蒜科的特异性症状

水仙属 (Southey, 1993)。典型症状是叶片上有白黄色、疱状肿大(叶疱)，鳞茎横切时可以看到褐色的同心圆环(图 5 和 6)。鳞茎纵切时，可见坏死始于颈部，向下延伸。开花前，叶片快速生长时最容易看到肿大。在轻微侵染时，用食指和拇指捋过叶片可感觉到肿大，比目察更为明显。紧挨着颈部以下切开，在干燥鳞茎中可以观察到造成极小鳞茎**损毁**的鳞球茎茎线虫侵染。在侵染的早期阶段仔细观察，可以看到明亮的海绵状区域，此处细胞已经分离。随后很快会出现褐色坏死。

3.1.1.7 其他寄主的特异性症状

草莓属。鳞球茎茎线虫被认为是茎线虫属中唯一一种草莓病原物 (Brown 等, 1993)。为害后可见叶片畸小变形，叶柄短粗扭曲。

天门冬科 (Asparagaceae)、Sciloideae 亚科 (风信子) 及其他球茎植物 (Southey, 1993)。球茎症状和水仙属一样，但植株叶片上通常看不到清晰的肿大。叶子可能表现出白黄色条纹、变形，并常见轻微肿大。其他百合科球茎一般表现出和风信子一样的症状。石蒜科的侵染症状与水仙属的相似；例如雪花莲属 (*Galanthus* spp.) 和娜丽花属 (*Nerine* spp.) 均表现出叶片肿大，鳞茎中有褐色同心圆环。

甜菜和胡萝卜 (Cooke, 1993)。鳞球茎茎线虫取食引起种苗生长点死亡(导致形成多个冠部)；子叶和叶片可能扭曲、肿大和变形；稍老植株上的叶片或叶柄上可能产生虫瘿。生长后期取食冠部可引起腐烂，被称为冠溃疡、冠腐或颈腐。最初通常在叶片伤痕中可以看出隆起的浅灰色脓疱。腐烂随后向外、向下发展，扩展到植株整个肩部，使冠部在拔起时断裂。在胡萝卜上，其他症状可能包含叶片开叉和主根头部变色。症状主要发生在地面上下 2—4 cm 的根和茎上。严重侵染引起叶片死亡和褐腐，秋季尤其如此(图 7)。

天蓝绣球和其他观赏植物 (Southey, 1993)。在福禄考上，受侵染的嫩枝表现出典型的茎部变粗和易碎症状，节间变短，易于开裂。该寄主独特的症状是上部叶片卷曲变小，其中最上部叶片可能退化成细丝。具有畸形生长、肿大等症状，有记录的寄主植物的例子包含各种和各品种银莲花属 (*Anemone*)、蒲包花属 (*Calceolaria*)、桂竹香属 (*Cheiranthus*)、石头花属 (*Gypsophila*)、堆心菊属 (*Helenium*)、矾根属 (*Heuchera*)、剪秋罗属 (*Lychnis*)、珍珠菜属 (*Lysimachia*) 和钓钟柳属 (*Penstemon*) 植物 (Roberts, 1981)。Edwards (1937) 报道报春花属 (*Primula* spp) 矮化、叶片变形、腐烂和不能开花。木本植物一般不受为害，但绣球属可受鳞球茎茎线虫侵染，引起未木质化新枝畸形、叶柄和主脉肿大，以及叶

片明显的皱缩。叶片皱缩通常是侵染的最初表现。另一种木本植物，*Yucca smaliana*，则表现出叶片畸形和疱状肿大。

3.1.2 腐烂茎线虫

根据 Sturhan 与 Brzeski (1991)，腐烂茎线虫主要寄生块茎（例如马铃薯和大丽花）、鳞茎（例如球根鸢尾、郁金香和唐菖蒲），以及块根作物（例如甜菜和胡萝卜）。它可以为害圆生蘑菇（*Agaricus hortensis*）（栽培蘑菇）的菌丝体。其他寄主包括甘薯、大蒜、菜豆、当归（*Angelica sinensis*）（“女人参”）、人参（*Panax ginseng*）、西洋蒲公英、秋海棠属（*Begonia* spp.），以及欧洲狗牙堇（*Erytronium denscanis*）（狗牙紫罗兰）的鳞茎。

马铃薯和大丽花属。生长阶段无可见症状。线虫通常通过匍匐茎进入马铃薯块茎。多数线虫位于褐变和未受害部位交界处。如果从块茎的这一部位采集一个小样品，放入水中，即使只使用一个简单的放大镜也可以看到明显的小线虫团。腐烂茎线虫侵染的**初期最早**症状是很小的白色或浅色病斑，在块茎表皮下**即可看见**（Brodie, 1998）。这些病斑随后变大，颜色逐渐变深（从灰色、深褐色至黑色），并形成海绵状组织（图 8）。这主要是细菌、真菌和腐生线虫次生侵染的结果（Brodie, 1998）。在严重侵染的块茎上，一般有典型的略微凹陷区域，其表皮破裂、皱缩，呈纸状。表皮未受危害，但在其下受侵染组织干燥和皱缩的过程中会变薄并破碎（Brodie, 1998）。最后，整个块茎可能脱水变干。此类被彻底危害的块茎可浮于水面（图 9）。相对而言，受鳞球茎线虫侵染的马铃薯表皮通常不会破裂。收获后线虫继续在块茎内繁殖，并可能形成很大数量。储藏后症状可能更加明显。受侵染的块茎上一般会发生真菌、细菌和自由生活的线虫的次生侵染。

甜菜。侵染在根和根状茎上引起黑色坏死病斑。Dallimore 和 Thorne (1951) 报道其症状与褐腐相近。在甜菜中，除了引起产量损失外，糖分含量也会降低。

胡萝卜。侵染引起胡萝卜表皮横向破裂，皮层组织中形成白色斑块。真菌和细菌在这些部位的次生侵染也可能引起腐烂。此类为害在胡萝卜横切面上很容易看到。在冬**季天**储藏期，线虫继续其为害行为，使胡萝卜变得不宜食用。

鸢尾属 (Iris spp.) 和郁金香属 (Southey, 1993)。侵染引起浅灰色线性斑点，在外层肉质鳞瓣上从基部向上延伸。伴随侵染进程，受损部位遍布并深入鳞茎组织，引起次生干燥、纤维状腐烂，导致鳞茎崩解。对受侵染鳞茎进行横切时，可以看见明显的环状褐斑。叶片黄化和顶端枯死是鳞茎受害以及最终根部功能丧失引起的次生症状。

在南非低温储藏期间，观赏植物蛇鞭菊（*Liatris spicata*）的球茎受腐烂茎线虫侵染后表现出浅黑色腐烂，与腐烂部位相邻的组织中有不同龄期的成活线虫（Van der Vegte 和 Daiber, 1983）。

3.2 线虫分离

3.2.1 从鳞茎和大蒜瓣中分离

为了分离线虫，将受侵染的鳞茎瓣（主要是内层瓣）或蒜瓣切成小块，在室温下和自来水一起放入一个装有自来水的容器（例如培养皿）中。为了获得清澈的悬浮液，可将切块放在覆有滤纸的 200–250 μm 孔径的筛子上作为支撑（Oostenbrink 浅盘技术）。1 h 或更长一段时间后，可使用一台立体视显微镜（至少 40X 放大率）对线虫进行观察。

3.2.2 从土壤和植物材料中分离

贝尔曼漏斗法是从土壤和植物材料（鳞茎、根、马铃薯皮和种子）中分离线虫的参考技术。在漏斗颈部末端接一段橡皮管，用弹簧或螺纹夹夹紧。将漏斗放在支架上，基本加满自来水。将土壤或切成小片的植物组织放在经折叠可以装入这些材料的纱布或滤纸上，轻轻浸入漏斗里的水中。活动线虫穿过纱布并沉到漏斗颈部底端。经过几个小时后，或隔夜，放出含有线虫的少量自来水，在显微镜下进行观察（Flegg 和 Hooper, 1970）。

在该技术的一项改进中，用一个盘子替换漏斗。将一块土壤打碎，清理掉其中的石子和植物残体。将土壤（50 ml）均匀放在一张圆形的单层纸巾上，纸巾放在置于一个塑料容器中的粗孔塑料筛子上。在容器中加水，至土壤充分湿润但未浸没时止。用一个大培养皿盖盖住容器，以减少水分的蒸发。该装置至少保持 24 小时，然后倒掉土壤，并将线虫悬浮液从容器中倒进一个盘子中，在解剖镜下进行观察。可以使用切得很小的植物组织代替土壤（Kleynhans, 1997）。

用于鳞茎和根的 Seinhorst mistifier 技术与贝尔曼漏斗法的不同之处在于，前者冲洗掉了植物汁液和有毒分解物。对水仙属等植物而言，本方法比贝尔曼漏斗法更为合适。在本方法中，将一个贝尔曼漏斗或 Oostenbrink 浅盘放在水汽或水雾中，以避免氧气耗尽。用喷头将水喷洒在植物材料上，或用喷头往上喷水，使水滴轻轻掉落到植物材料上，从而产生水雾。活线虫离开植物组织，被冲进漏斗或盘子里，并沉淀其中。每隔 24 或 48 小时收集一次线虫，打开漏斗颈部的螺纹夹将其收集在一个玻璃烧杯中，或者在 20–25 μm 的筛子上收集标本。分离最多可持续 4 周时间。本技术由 Hooper（1986）描述。

从植物材料中分离茎线虫属线虫的另一种方法源自 Oliveira 等（2013）的描述

。将植物材料切成 1 cm 的小块，放进装满自来水的 500 ml 杯子中。在杯盖上打两个孔，一个用于穿过鱼缸泵软管，另一个用作通气孔。材料在鱼缸泵连续通风的过程中保持 72 h。最后的悬浮液倒在 1 000 μm 的筛子上去除植物残体，随后用 38 μm 的筛子从悬浮液中分离出线虫。这种对悬浮液进行通风的方法是为了防止植物材料腐烂，从而最大限度地减少细菌和真菌寄生物的增长，使很多线虫保持存活。通过通风搅动含有植物材料的悬浮液，可使更多线虫从根组织中分离出来，从而更准确地估算植物材料的侵染情况。

也可以采用 Coolen 和 D'Herde (1972) 的方法从植物材料中分离线虫。将植物材料清洗干净，切成约 0.5 cm 见方的小块，取 5 g 放入装有 50 ml 自来水的家用搅拌器中浸软，以最低速度搅拌 1 min。本方法的缺点是大线虫标本，例如鳞球茎茎线虫成虫会被搅拌器切成碎段。将线虫悬浮液和组织碎片倒入放在 45 μm 筛子上的 750 μm 筛子中。收集 45 μm 筛子上的残留物，倒进两个 50 ml 离心管中。每个管中加入约 1 ml 高岭土，混合物充分混匀，随后以 3 000 r.p.m.离心 5 min。倒掉上清液，往离心管中加入蔗糖溶液（浓度 1.13 g/cm³）。混合物充分混匀，以 1 750 r.p.m.离心 1 min。将上清液倒入 45 μm 筛子中，收集残留物，对线虫进行研究。

对于豆子以及其他豆类作物是否带有鳞球茎茎线虫的检测是一个两步程序，包括：(1) 将一定数量的种子放在通风的水中浸泡过夜，以及(2) 将一部分浸泡过的种子在水雾中分离 3 天。将两步中每一步的液体部分过筛，继以显微镜检测鉴定，以确定浸泡水和水雾分离物中是否有线虫。本方法耗时约 7 天，但可以通过省略步骤(2)（即水雾分离）将时间压缩至 3 天。改进后的程序包含：将豆子在通气的水中浸泡过夜，继以过筛和显微镜观察、鉴定。

可以采用以下方法（根据 Kleynhans, 1997）来分离土壤中的线虫。将土壤（250 ml）通过粗网筛（2 mm）冲洗进 5 升桶中。加自来水至 5 升。搅拌悬浮液，让其沉淀 30 s，随后倒入 45 μm 筛子中。用桶中的土壤重复上述步骤 2 次，但将沉淀时间缩短至 20 s 及随后的 10 s。将残留物从 45 μm 筛子上转移进 50 ml 离心管中。如果离心管中的溶液非常浑浊，加入 5 ml 高岭土（并充分混匀），以促进线虫沉淀。离心管以 1 750 r.p.m.离心 7 min。倒掉每个离心管中的上清液。往离心管中加入蔗糖溶液（450 g/l 水），充分搅拌蔗糖和土壤混合物，随后以 1 750 r.p.m.离心 3 min。将上清液倒入 45 μm 筛子中，将带有线虫的残留物收集在一个烧杯中，用于检测。这是一项基本技术，取决于技术人员的技能和土壤类型，可能会丢失多达 40% 的线虫。可用于从土壤中分离线虫的其他方法包含 Flegg—改进型 Cobb 技术和 Oostenbrink 淘析器方法（EPPO, 2013c）。Hooper 等（2005）描述了经过调整的，可充分利用线虫大小、密度和运动能力的不同的分离方法。

4. 鉴定

通过形态学方法鉴定茎线虫属线虫仅限于成虫标本，而且最好能使用高倍显微镜检验一种线虫的雄虫和雌虫。高质量的玻片制备应可保证只用形态学检验方法就能准确鉴定出鳞球茎线虫和腐烂茎线虫成虫。一个样品中茎线虫幼虫的形态学鉴定应只用于确认样品中存在该种线虫。由于食菌性茎线虫经常污染腐烂的植物材料，在对植物和土壤样品中的标本进行鉴定时应特别小心。

4.1 形态学鉴定

鳞球茎线虫和腐烂茎线虫的鉴定最好应基于形态学方法。为鉴定这些种类而建立起来的分子方法可用于低度侵染水平，或在仅有幼虫时使用。分子方法可用于不完整和非典型的成虫，以及各个虫龄，包括幼虫阶段，它们用形态学方法不可能鉴定到种。

4.1.1 标本制备

用于快速鉴定或研究未固定标本中最好观察的特征的临时制备方法如下（Kleynhans, 1997）：

- 将活标本转移到载玻璃玻片上的小水滴中。
- 在酒精灯上轻微加热玻片，经常检查是否有线虫移动。标本停止颤动时应立即停止加热。
- 盖上盖玻片，并用指甲油密封四周。指甲油干燥后，带有标本的玻片即可用于研究。

对光学显微镜而言，从土壤或植物材料中分离出活线虫，温和热（65—70℃）杀死，用 FAA（35%的蒸馏水、10%的 40%福尔马林、5%的冰醋酸、50%的 95%乙醇）固定（Andrássy, 1984），转移至甘油中（Hooper 等, 2005），按照 Seinhorst（1959）和 Goodey（1963）描述的方法用无水甘油将其封装在盖玻片和载玻片之间。

对光学显微镜鉴定工作而言，建议以 500x 至 1 000x（油镜）放大倍数与微分干涉相差显微镜结合使用。

4.1.2 形态学诊断特征

茎线虫属各种线虫的诊断检索表可参看 Viscardi 与 Brzeski（1993），以及 Brzeski（1998）。下列表 1 提供了区分茎线虫属与其他垫刃目和滑刃目其他各属的一个检索表。

表 1. 区分茎线虫属与其他垫刃目和滑刃目其他各属的检索表

1	背食道腺开口近口针基部；中食道球形、卵形或缺失	垫刃目-2
	背食道腺开口于中食道球中；中食道球特征突出，通常椭圆形	滑刃目
2	食道前部（ <u>前部</u> 食道 <u>前体部</u> ）和中食道球未结合成单一体；口针 <u>从不特别通常较短长</u>	3
	<u>前部</u> 食道 <u>前体部</u> 逐渐变宽，并且和中食道球融合；口针很长，基部常位于中食道球的前部	其他属
3	雌成虫蠕虫状	4
	雌成虫为根部固着的囊状或梨形寄生物	其他属
4	中食道球有瓣门	5
	中食道球无瓣门 ¹	其他属
5	食道腺位于后食道球内，不覆盖或略覆盖肠；鲜有明显的头骨架；口针弱至中等发达	6
	食道腺耳垂状，覆盖肠；头骨架发达；口针粗壮	其他属
6	单一前卵巢型卵巢；阴门位于虫体后部	7
	双卵巢， <u>前后伸展两卵巢型</u> ；阴门位于中部稍后	其他属
7	雌虫不膨大；雌虫子宫柱状部 4 排，每排 4 个细胞；雄虫交合伞包裹尾部 1/3 或更多	茎线虫属
	雌虫膨大；子宫柱状部有超过 20 个细胞	其他属

来源：改编自 Heyns (1971) 和 Siddiqi (2000)。

¹ 少数几种非植物寄生性茎线虫没有具瓣门的中食道球。

非洲茎线虫、腐烂茎线虫、鳞球茎茎线虫、巨大茎线虫和食菌茎线虫（*D. myceliophagus*）在形态学和形态测量学方面很相似，但只要同时有雄虫和雌虫标本供测量和研究，就可以通过以下方法（表 2）来区分彼此。

4.1.2.1 鳞球茎茎线虫的描述

参考 Sturhan 与 Brzeski (1991)、Wendt 等 (1995)，以及 Brzeski (1998)。详情和图示见图 10。

测量值（标准描述见 EPP0 (2013b)）。（除燕麦外，参考 Blake, 1962，收录于 Hooper, 1972）（ $n=48♀♀$ ）： $L=1.3\text{ mm} \pm 0.009$ ； $a=62 \pm 5.6$ ； $b=15 \pm 1.4$ ； $c=14 \pm 2.1$ ； $V=80 \pm 1.5$ 。（ $n=23♂♂$ ）： $L=1.3\text{ mm} \pm 0.017$ ； $a=63 \pm 11.3$ ； b

$=15 \pm 1.7$; $c=14 \pm 2.1$; $T=72$ 。

一般形态。静止松弛放松时虫体直或几乎直。侧区具侧线 4 条。头部和相邻虫体连续（图 10B）。雌虫口针长 10–13 μm ，雄虫口针长 10–12 μm 。口针锥体约为口针长度一半，基部球圆形，发育良好。中食道球肌肉发达，有 4–5 μm 的腔壁增厚（图 10A）。后食道球分叉缢缩，或覆盖肠几微米。排泄孔位于峡区后部或食道腺球的对面应部位。后阴子宫囊约占肛阴距的一半或略多（图 10D）。雄虫交合伞包裹尾部的 3/4。交合刺长 23–28 μm 。两性尾圆锥形尾，端尖。

形态学诊断特征。侧线数量（4 条）（图 10F），相对较长的口针，后阴子宫囊长度及尖状尾（图 10D）是本种的鉴别性特征（Andrássy, 2007）。鳞球茎茎线虫可通过雌虫较短的虫体型（1.0–1.7 对 1.6–2.2 mm）和较长的肛阴距（202–266 对 132–188 μm ）与巨大茎线虫加以区别（Vovlas 等, 2011）。从侧面观察，鳞球茎茎线虫的交合刺比腐烂茎线虫的更为弯曲（图 10C）。有关交合刺的更多信息及其在鳞球茎茎线虫和腐烂茎线虫鉴定方面的应用可参看 Karssen 与 Willemsen（2010）。必须注意的是，蚕豆种子主要包含 4 龄幼虫。

4.1.2.2 腐烂茎线虫的描述

参考 Sturhan 与 Brzeski（1991），以及 Brzeski（1998）。详情和图示见图 11。

测量值（参考 Goodey, 1952，采自多种高等植物寄主）（ $n=237$ ♀♀）： $L=1.07$ （0.69–1.89）mm； $a=32$ （18–49）； $b=7$ （4–12）； $c=17$ （9–30）； $V=80$ （73–90）。（ $n=231$ ♂♂）： $L=0.96$ （0.76–1.35）mm； $a=35$ （24–50）； $b=7$ （4–11）； $c=14$ （11–21）； $T=65$ （40–84）。

一般形态。腐烂茎线虫成虫为微小的蠕虫形生物，长 0.8–1.4 mm，宽 23–47 μm ，略向腹面弯曲。因寄主和虫龄不同，成虫具有显著的形态测量学差异。雄虫和雌虫总体上外表相似。侧区具侧线 6 条（图 11F），在颈部和尾部区域退化为 2 条。表皮和头部有很细的环纹，头部较相邻虫体常缢缩，通过扫描电子显微镜可以辨别出大约 4 个头部体环（Wendt 等, 1995）。口针长 10–12 μm ，偶见描述具 14 μm 长口针的标本。口针锥体为口针长度的 45–50%，基部球清晰、圆形，向后方倾斜。中食道球肌肉发达，有 3 μm 的腔壁（瓣门）增厚。后食道球在虫体背侧覆盖一小段肠，偶尔可见食道腺球缢缩分叉的标本（图 11A）。排泄孔位于食道腺对面应部位。后阴子宫囊延伸至肛阴距约 3/4 处（图 11E）。卵长度为宽度的 2 倍（Andrássy, 2007）。阴门唇厚，突起（图 11B）。前卵巢前延伸，有时伸至食道区域。后阴子宫囊占肛阴距 40–98%，不起受精囊的作用（图 11E）。雄虫交合伞包裹尾部长度的 50–90%。交合刺长 24–27 μm 。鳞球茎茎线虫的交合刺形态不同于腐烂茎线虫，区别在于后者宽大处有腹侧突起（图 12）（Karssen and Willemsen,

2010)。精巢延伸直达食道基部。两性尾圆锥形尾，尾长为肛门处体宽的 3—5 倍，通常向腹面弯曲，端圆。

形态学诊断特征。腐烂茎线虫和鳞球茎线虫相似，但与后者的区别在于侧区具侧线 6 条（图 11F）、后阴子宫囊更长，以及细浑圆的尾端部（图 11D）。形态学上腐烂茎线虫与非洲茎线虫主要区别于可能略有重叠的口针长度，以及交合刺长度，这意味着鉴定时种群中必须有雄虫存在。由于聚合酶链式反应（PCR）技术有足够的灵敏度来阐明密切相关的几个属之间的区别，Wendt 等（1995）使用限制性片段长度多态性（RFLPs）来区分腐烂茎线虫和非洲茎线虫。侧面观察时，鳞球茎线虫交合刺的弯曲度比腐烂茎线虫小（图 11C）。

注意。上述特征可能发生变化，几乎不可能将单个标本鉴定到种的水平。建议至少要检验 1 条雄虫和 1 条雌虫标本。例如，雄虫侧线偶尔会在尾部附近退化为 4 条，形成与鳞球茎线虫相近的模式。

表 2. 非洲茎线虫、腐烂茎线虫、鳞球茎线虫、巨大茎线虫和食菌茎线虫的诊断特征对比

特征	腐烂茎线虫 (参考 Hooper, 1973)	非洲茎线虫 (参考 Wendt 等, 1995)	食菌茎线虫 (参考 Hesling, 1974)	巨大茎线虫 (参考 Vovlas 等, 2011)	鳞球茎线虫 (参考 Hooper, 1972)
雌虫体长 (mm)	0.8–1.9	0.7–1.1	0.6–1.4	1.6–2.2	1.0–1.7
侧线数量	6	6–15	6	4	4
尾端形状	圆形	圆形	圆形	尖形至 <u>细浑圆</u> 形	尖形
雌虫 C 值 (体长/尾长)	14–20	8.8–16.9	8.2–17	15.7–27.6	11–20
后食道球	短, 背部覆盖	短, 背部覆盖	短, 背部覆盖	略覆盖	不覆盖
雌虫口针长度 (μm)	10–14	8–10	7–8	10.5–13.0	10–12
PUS/阴门—肛门长度 (%) ¹	53–90	37–85	30–69	约 50 ²	40–70
交合刺长度 (μm)	24–27	17–21	15–20	23.5–28	23–28
交合伞长度 (尾长%)	50–70	48–66	20–55	72–76	40–70
寄主选择性 ³	高等植物和真菌菌丝	花生和真菌	真菌菌丝	高等植物	高等植物和真菌 i

¹ PUS, 子宫囊后阴部分。

² 计算自种的描述。

³ 在形态学标准混淆时可用。

4.2 分子鉴定

必要时，可对鳞球茎线虫或腐烂茎线虫进行分子鉴定，可能有易于混淆的种类（例如食菌茎线虫、非洲茎线虫或巨大茎线虫）发生，以及不能通过形态确切地将其与目标种类区分开时尤其如此。

此情况下，在提取 DNA 前，最好将含有线虫个体的溶液放在低温条件下（即冷藏）少储存少数几天。

在本诊断规程程中，各种方法（包含引用的商标名）的描述和发表时一样，因为它们规决定了最初获得的灵敏度、特异性和/或再现性水平。本诊断规程对试剂、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 鳞球茎线虫

已建立用于鉴定鳞球茎线虫的多种分子方法。

Southern 杂交（Wendt 等，1993）和电泳（Tenente 和 Evans，1997；Palazova 和 Baicheva，2002）被用于研究鳞球茎线虫中的小种概念，以及茎线虫属的各种线虫间的遗传多样性。

用于特异性鉴定的分子方法也已得到充分研究，主要是通过 PCR 或 PCR-RFLP，以及通过序列分析检测种群变异（Leal-Bertioli 等，2000；Zouhar 等，2002）。

已有 6 种分子检测方法（PCR、PCR-RFLP）发表，可用于鉴定鳞球茎线虫；这些方法的描述见 4.2.4 至 4.2.9 节。描述包含了每种检测方法的特异性，即每种检测方法已对照评估过的线虫属和种类。

线粒体(r) DNA 序列的分子分析，包含不同区域（内转录间隔区（ITS）ITS1-5.8S-ITS2 区域、*s8S* 基因的 D2-D3 片段、18S 小亚基、细胞色素 c 氧化酶 I 的部分线粒体基因（线粒体 (mt) DNA），以及 *hsp90* 基因序列（核酸 (n) DNA）），可明确区分巨大茎线虫和鳞球茎线虫（狭义）（Vovlas 等，2011）。

4.2.2 腐烂茎线虫

腐烂茎线虫的分子诊断是基于 rRNA 基因 ITS 区域的 PCR-RFLP 或测序。

Wendt 等（1993）表明 ITS 区域的 PCR-RFLP 可将寄生马铃薯的腐烂茎线虫与鳞球茎线虫的两个小种，以及食菌茎线虫区分开。他们发表了这三个种的 RFLP 诊断概况。非洲茎线虫和腐烂茎线虫可通过以下组合特征加以区分：rDNA 的 ITS 区域上 7 个限制性酶产生的 RFLP。

Ji 等（2006）获得了采自甘薯的几个腐烂茎线虫种群的 RFLP 概况，并揭示了其 RFLP 概况中的一些区别。

Powers 等（2001）首先对鳞球茎线虫的 ITS1 区域进行了测序，GenBank 数据库目前可提供 50 多个从腐烂茎线虫中提取的 rRNA 片段的编号序列，这些腐烂茎线虫采自不同地点和寄主植物。

4.2.3 DNA 提取

将几头幼虫或成虫转移到一个微型管中，从其中提取 DNA。Webster 等（1990）描述了 DNA 提取方法。

4.2.4 鳞球茎线虫和腐烂茎线虫的 ITS-rRNA PCR-RFLP 检测

本检测方法由 Wendt 等（1993）建立。

方法

本检测使用的 ITS rRNA 通用引物（如 Vrain 等（1992）所描述）为：

18S: 5'-TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT-3'

26S: 5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3'

鳞球茎线虫和食菌茎线虫的扩增子扩增产物均为 900 个碱基对 (bp)，腐烂茎线虫为 1 200 个碱基对。

按照生产商对含 Taq DNA 聚合酶、核苷酸和反应缓冲液的 PCR 试剂盒的使用建议进行扩增。

PCR 循环参数¹包含：1.5 min 96°C、30 s 50°C 和 4 min 72°C，第 1 个循环；45 s 96°C、30 s 50°C 和 4 min 72°C，40 个循环；以及 45 s 96°C、30 s 50°C 和 10 min 72°C，最后一个循环。DNA 扩增后，取 2–5 μl 产物在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳。将剩余产物在 -20°C 下储存，用于 RFLP。有几个限制性酶可用于区分腐烂茎线虫、鳞球茎线虫和其他种类的茎线虫属线虫；例如 *HaeIII*、*HpaII*、*HinfI* 和 *RsaI*（Wendt 等，1993）。这些诊断酶产生的限制性片段长度见表 3。

表 3. 四种限制性酶产生的茎线虫属几种线虫 ITS-rRNA 的 RFLP 片段的大约长度 (bp)

酶	腐烂茎线虫	食菌茎线虫	鳞球茎线虫	巨大茎线虫 ¹	非洲茎线虫
非限制性 PCR 产物	1 200	900	900	900	1 000
<i>HaeIII</i>	450, 170	450, 200	900	800, 200	650, 540

¹ 这些 PCR 循环参数由最早的文献描述（Wendt 等，1993）。用于 PCR 的热循环仪和试剂的改进可能导致对这些循环参数进行修改。

<i>HpaII</i>	1 000	900	320, 200, 180	600, 200	950
<i>HinfI</i>	780, 180	630, 310	440, 350, 150	350, 150	450, 340, 150, 130, 100
<i>RsaI</i>	600, 250, 170	900	450, 250, 140	490, 450	690, 450

来源: Wendt 等 (1993, 1995)。

Bp, 碱基对; ITS, 内转录间隔区; PCR, 多聚酶链式反应; RFLP, 限制性片段长度多态性; rRNA, 核糖体 RNA。

¹ 在最初的文献中被称为鳞球茎茎线虫巨大小种。

4.2.5 鳞球茎茎线虫的 SCAR PCR 检测

本序列特异性扩增区 (SCAR) PCR 检测由 Esquibet 等 (2003) 建立, 是设计用于区分鳞球茎茎线虫正常和巨大小种的一种种特异性检测方法。该方法曾用食菌茎线虫 (1 个种群)、鳞球茎茎线虫正常小种 (采自不同寄主和地点的 11 个种群) 和鳞球茎茎线虫巨大小种, 即 Vovlas 等 (2011) 描述的巨大茎线虫 (从不同地点蚕豆上分离出的 11 个种群) 进行评估。

方法

所使用的鳞球茎茎线虫特异性引物为:

鳞球茎茎线虫 (正常小种):

H05: 5'-TCA AGG TAA TCT TTT TCC CCA CT-3'

H06: 5'-CAACTG CTA ATG CGT GCT CT-3'

鳞球茎茎线虫 (巨大小种, Vovlas 等 (2011) 描述为巨大茎线虫):

D09: 5'-CAA AGT GTT TGA TCG ACT GGA-3'

D10: 5'-CAT CCC AAA ACA AAG AAA GG-3'

鳞球茎茎线虫 (正常小种) 的 扩增子扩增产物 约为 242 个 bp, 鳞球茎茎线虫 (巨大小种) 则为 198 个 bp。就两个引物对而言, 对非目标种和非目标小种均未见扩增 (Esquibet 等, 2003)。

10 μl PCR 混合液包含: 1.5 mM MgCl₂、每种脱氧核糖核苷酸各 250 μM、对双重 PCR (H05-H06) 或 (D09-D10) 而言每种引物各 690 nM, 或对多重 PCR (H05-H06-D09-D10) 而言每种引物各 500 nM, 以及 Taq DNA 聚合酶 0.5 U。循环参数为: 3 min 94 °C 变性开始; 1 min 94 °C、1 min 59 °C 和 1 min 72 °C, 30 个循环; 以及 10 min 72 °C 最后延伸。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳分析。

4.2.6 鳞球茎茎线虫的 18S 和 ITS1 特异性 PCR 检测

本检测由 Subbotin 等 (2005) 建立, 是设计用于鳞球茎茎线虫 (狭义) (仅正常小种) 的一种种特异性检测方法。该方法曾用腐烂茎线虫 (1 个种群)、鳞球茎

茎线虫正常小种（来自不同寄主和地点的 18 个种群）和茎线虫属（来自不同寄主和地点的 12 个种群）进行评估。

方法

所使用的鳞球茎茎线虫特异性引物为：

rDNA2: 5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3' (Vrain 等, 1992)

DitNF1: 5'-TTA TGA CAA ATT CAT GGC GG-3'

鳞球茎茎线虫（狭义）（巨大小种，后来称为巨大茎线虫的未包含在内）的扩增子扩增产物约为 263 个 bp。非目标种未见扩增。

25 µl PCR 引物包含：1× 从 10× PCR 缓冲液包含 15 mM MgCl₂、每种脱氧核糖核苷酸各 0.2 mM、每种引物各 60 nM，以及 Taq DNA 聚合酶 1 U。PCR 在 96 孔 Peltier 型热循环仪（PTC100, MJ Research²）中进行，循环参数如下：4 min 94 °C 开始；15 s 94 °C、30 s 57 °C 和 30 s 72 °C，35 个循环；以及 10 min 72 °C 最后延伸。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳分析。

4.2.7 鳞球茎茎线虫的 5.8S rDNA 特异性 PCR 检测

本检测由 Marek 等（2005）建立，是设计用于鳞球茎茎线虫的一种特异性检测方法。该方法曾用鳞球茎茎线虫（来自不同寄主的 3 个欧洲种群）和非目标属种群（马铃薯白线虫（*Globodera pallida*）、松材线虫（*Bursaphelenchus xylophilus*）和小杆线虫属）进行评估。

方法

为鳞球茎茎线虫的鉴定设计了两对特异性引物，其中最灵敏的（可检测出 10 pg 目标 DNA）是：

PF1: 5'-AAC GGC TCT GTT GGC TTC TAT-3'

PR1: 5'-ATT TAC GAC CCT GAG CCA GAT-3'

用本对引物产生的鳞球茎茎线虫扩增子扩增产物约为 327 个 bp。

25 µl PCR 混合液包含：1× Taq 缓冲液、1.5 mM MgCl₂、每种脱氧核糖核苷酸各 200 µM、每种引物（PF1-PR1 引物对）各 10 pmol，以及 Taq DNA 聚合酶（Fermentas²）1.5 U。PCR 在 96 孔 Peltier 型热循环仪（PTC200, MJ Resarch²）上进行，循环参数如下：3 min 94 °C；2 min 94 °C、30 s 62 °C 和 2 min 72 °C，30 个循环；以及 10 min 72 °C 最后延伸。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳分析。

² 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。本诊断规程对试剂、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。

4.2.8 鳞球茎线虫的 5.8S rDNA 和 ITS 特异性 PCR 检测

本检测由 Kerkoud 等 (2007) 建立, 是设计用于鳞球茎线虫的一种种特异性检测方法。该方法曾用鳞球茎线虫 (来自不同寄主和地点的 10 个种群)、非洲茎线虫、腐烂茎线虫、食菌茎线虫、菊花滑刃线虫 (*Aphelenchoides ritzemabosi*) (每种 1 个种群), 以及茎线虫属 (根据文献, 目前描述为巨大茎线虫) (从不同地点蚕豆上分离到的 10 个种群) 进行评估。

方法

使用两对特异性引物, 其中一对只用于鉴定鳞球茎线虫, 另一对用于鉴定巨大茎线虫和鳞球茎线虫。同时使用两对引物可将巨大茎线虫和鳞球茎线虫区分开来。引物为:

第一对引物:

DdpS1: 5'-TGG CTG CGT TGA AGA GAA CT-3'

rDNA2: 5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3' (Vrain 等, 1992)

鳞球茎线虫的扩增子扩增产物约为 517 个 bp。非目标种未见扩增, 其中包含巨大茎线虫。

第二对引物:

DdpS2: 5'-CGA TCA ACC AAA ACA CTA GGA ATT-3'

rDNA2: 5'-TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG-3' (Vrain 等, 1992)

鳞球茎线虫和巨大茎线虫的扩增子扩增产物约为 707 个 bp。

20 μ l PCR 混合液包含: 含最终浓度为 5 mM 的 $MgCl_2$ 的 1.5 mM 扩增缓冲液、每种脱氧核糖核苷酸各 200 μ M、每种引物各 0.5 μ M (在单一 PCR 中使用 DdpS1-rDNA2 或 DdpS2-rDNA2; 在双重 PCR 中, DdpS1 引物的最终浓度为 0.5 μ M, DdpS2 和 rDNA21 则为 1 μ M), 以及 Taq DNA 聚合酶 (MP Biomedicals2) 1 U。PCR 在 96 孔 Peltier 型热循环仪 (GeneAmp 9600 PCR 系统, Perkin Elmer2) 上进行, 循环参数如下: 1 min 94 $^{\circ}C$; 30 s 94 $^{\circ}C$ 、30 s 60 $^{\circ}C$ 和 45 s 72 $^{\circ}C$, 40 个循环; 以及 10 min 72 $^{\circ}C$ 最后延伸。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳分析。

4.2.9 鳞球茎线虫的 SCAR PCR 检测

SCAR PCR 由 Zouhar 等 (2007) 建立, 是设计用于鳞球茎线虫的一种种特异性检测方法。该方法只用鳞球茎线虫 (来自不同寄主的 10 个欧洲种群) 进行过评估。

方法

为鳞球茎线虫的鉴定设计了两对特异性引物:

第一对引物:

DIT_2 正向: 5'-GCA ATG CAC AGG TGG ATA AAG-3'

DIT_2 反向: 5'-CTG TCT GTG ATT TCA CGG TAG AC-3'

使用本对引物的鳞球茎茎线虫扩增子扩增产物约为 35 个 bp。

第二对引物:

DIT_5 正向: 5'-GAA AAC CAA AGA GGC CGT AAC-3'

DIT_5 反向: 5'-ACC TGA TTC TGT ACG GTG CAA-3'

使用本对引物的鳞球茎茎线虫扩增子扩增产物约为 245 个 bp。

25 μ l PCR 混合液包含: 1 \times PCR 缓冲液 (Fermentas2)、1.5 mM MgCl₂、每种脱氧核糖核苷酸各 200 μ M、每种引物各 10 pmol (DIT_2 或 DIT_5 引物对)、Taq DNA 聚合酶 (Fermentas2) 1.5 U, 以及 50 ng DNA 作为模板。PCR 在 96 孔 Peltier 型热循环仪 (PTC200, MJ Research2) 上进行, 循环参数为: 3 min 94 $^{\circ}$ C; 1 min 94 $^{\circ}$ C、30 s 60 $^{\circ}$ C 和 1 min 72 $^{\circ}$ C, 30 个循环; 以及 10 min 72 $^{\circ}$ C 最后延伸。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳分析。

4.2.10 分子检测的对照

为确保获得可靠的检测结果, 应考虑为每个系列的核酸分离、目标有害生物核酸或目标核酸的扩增设置适宜的对照, 该对照取决于所采用的检测类型和所要求的确程度。至少应采用一个阳性核酸对照、一个阴性扩增对照和一个阴性提取对照。

阳性核酸对照。本对照用于监测扩增 (提取除外) 的效率。可使用提前制备 (储存) 的目标线虫的核酸。

阴性扩增对照 (无模板对照)。常规 PCR 必须采用本对照, 以排除制备反应混合液过程中污染引起的假阳性。在扩增阶段加入制备反应混合液时使用的 PCR 级水。

阴性提取对照。本对照用于监测核酸提取过程中的污染。本对照包含核酸提取和随后仅仅对提取缓冲液所做的扩增。预期会得到大量阳性样品时, 建议采用多重对照。

4.2.11 常规 PCR 结果的解释

只有在以下两项标准均得到满足时, 病原特异性 PCR 才可被视为有效:

- 阳性对照产生目标线虫种类的大小正确的扩增子扩增产物
- 阴性提取对照和阴性扩增对照不产生目标线虫种类的大小正确的扩增子扩增产物。

5. 记录

应按照 ISPM 27（限定有害生物诊断规程）的要求保存记录和证据。

在其他缔约方可能受到诊断结果负面影响的情况下，记录和证据（酌情，特别是保存或玻片封装的标本、具有明显形态特征的照片、DNA 提取物和凝胶照片）应至少保存 1 年。

6. 获取进一步信息的联系点

有关本诊断规程的进一步信息可获自：

ARC-PPRI 生物分类学处，南非共和国 0121，昆斯伍德市私人邮箱 X134（Antoinette Swart；电子邮件：SwartA@arc.agric.za）。

加利福尼亚食品与农业部植物有害生物诊断中心，美国加利福尼亚州 95832-1448，Sacramento 市 Meadowview 路 3294 号（Sergei Subbotin；电子邮件：subbotin@ucr.edu）。

加拿大食品检验局夏洛特镇实验室马铃薯病害组，加拿大 C1A 5T1，爱德华王子岛夏洛特镇 Mount Edward 路 93 号（Harvinder Bennypaul；电子邮件：bennypaulhs@inspection.gc.ca）。

国家植物保护机构（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）提出对诊断规程进行修订的申请，此类申请会转交给诊断规程技术小组（TPDP）。

7. 致谢

本规程由 Antoinette Swart（南非共和国 ARC-PPRI 生物分类学处线虫组）、Eliseo Jorge Chaves（阿根廷 INTA-Estación Experimental de Balcarce, Laboratorio de Nematología）和 Renata C.V. Tenente（巴西 EMBRAPA, Recursos Genéticos e Biotecnología）起草。

分子技术的描述由 Sergei Subbotin（加利福尼亚食品与农业部植物有害生物诊断中心，美国加利福尼亚州 95832-1448，Sacramento 市 Meadowview 路 3294 号）完成。

以下线虫专家对完善本规程提出了有价值的建议：

- Harvinder Bennypaul（加拿大食品检验局）
- Johannes Hallmann（德国 Julius Kühn-Institut）
- Mikhail Pridannikov（俄罗斯 A.N. Severtsov 生态与进化研究所寄生虫学中心）
- P. Castillo（西班牙 Instituto Agricultura Sostenible, Consejo Superior de Investigaciones Científicas）。

8. 参考文献

- 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.
- Andrássy, I.** 2007. Free-living nematodes of Hungary (Nematoda Errantia) II. In *Pedazoológica Hungarica No. 4*, pp. 145–154. Budapest, Hungarian Natural History Museum and Systematic Zoology Research Group of the Hungarian Academy of Sciences. 496 pp.
- Andrássy, I. & Farkas, K.** 1988. *Kertészeti növények fonálféreg kártevői*. Budapest, Mezőgazdasági Kiadó. pp. 181–198. 418 pp.
- Barker, J.R. & Lucas, G.B.** 1984. Nematode parasites of tobacco. In W.R. Nickle, ed. *Plant and insect nematodes*, pp. 213–242. New York, Marcel Dekker Inc. 925 pp.

- Bridge, J. & Hunt, D.** 1986. Nematodes. *In Pest control in tropical onions*, pp. 65–77. London, Tropical Development and Research Institute and Office of Overseas Development Administration, Tropical Development and Research Institute. 109 pp.
- Brodie, B.B.** 1998. Potato. *In* K.R. Barker, G.A. Pederson & G.L. Windham, eds. *Plant and nematode interactions*, pp. 567–594. Madison, WI, American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc. and Soil Science Society of America, Inc. 772 pp.
- Brown, D.J.F., Dalmasso, A. & Trudgill, D.L.** 1993. Nematode pests of soft fruits and vines. *In* K. Evans, D.L. Trudgill & J.M. Webster, eds. *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*, pp. 427–462. Wallingford, UK, CABI. 656 pp.
- Brzeski, M.W.** 1998. *Nematodes of Tylenchina in Poland and temperate Europe*. Warsaw, Museum and Institute of Zoology, Polish Academy of Sciences. 397 pp.
- Chizhov, V.N., Borisov, B.A. & Subbotin, S.A.** 2010. A new stem nematode, *Ditylenchus weischeri* sp.n. (Nematoda: Tylenchida), a parasite of *Cirsium arvense* (L) Scop. in the Central Region of the Non-Chernozem Zone of Russia. *Russian Journal of Nematology*, 18: 95–102.
- Cook, R. & Yeates, G.W.** 1993. Nematode pests of grassland and forage crops. *In* K. Evans, D.L. Trudgill and J.M. Webster, eds. *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*, pp. 305–350. Wallingford, UK, CABI. 656 pp.
- Cooke, D.** 1993. Nematode parasites of sugarbeet. *In* K. Evans, D.L. Trudgill and J.M. Webster, eds. *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*, pp. 133–169. Wallingford, UK, CABI. 656 pp.
- Coolen, W.A. & D’Herde, C.J.** 1972. *A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue*. Ghent, Belgium, Ministry of Agriculture, State Agricultural Research Centre. 77 pp.
- Courtney, W.D.** 1962. Stem nematode of red clover in the Pacific Northwest. *Bulletin of the Washington State Agricultural Experiment Station*, 640: 1–17.
- Dallimore, C.E. & Thorne, G.** 1951. Infection of sugar beets by *Ditylenchus destructor* Thorne, the potato rot nematode. *Phytopathology*, 41: 872–874.
- De Ley, P. & Blaxter, M.** 2003. A new system for Nematoda: Combining morphological characters with molecular trees, and translating clades into ranks and taxa. *Nematological Monographs and Perspectives*, 2: 1–21.
- Edwards, E.E.** 1937. On the eelworm disease of primulas caused by *Anguillula dipsaci*, Kühn. *Journal of Helminthology*, 15: 221–232.
- EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2013a. PQR: EPPO Plant Quarantine Data Retrieval System. Available at <http://www.eppo.org/DATABASES/pqr/pqr.htm>
- EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2013b. *Diagnostic protocols for regulated pests: Pictorial glossary of morphological terms in nematology*. EPPO Technical Document No. 1056 (Rev. 4). Available at http://www.eppo.int/QUARANTINE/diag_activities/EPPO_TD_1056_Glossary.pdf.
- EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2013c. Nematode extraction. EPPO Standard PM 7/119(1). *EPPO Bulletin*, 43: 471–485.

- Esquibet, M., Grenier, E., Plantard, O., Andaloussi, F.A. & Caubel, G.** 2003. DNA polymorphism in the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*: Development of diagnostic markers for normal and giant races. *Genome*, 46: 1077–1083.
- Evans, K. & Trudgill, D.L.** 1992. Pest aspects of potato production Part 1. The nematode pests of potato. In P.M. Harris, ed. *The potato crop*, 2nd edn, pp. 438–475. London, Chapman and Hall. 909 pp.
- Ferris, J.M. & Ferris, V.R.** 1998. Biology of plant parasitic nematodes. In K.R. Barker, G.A. Pederson & G.L. Windham, eds. *Plant and nematode interactions*, pp. 21–36. Madison, WI, American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc. and Soil Science Society of America, Inc. 772 pp.
- Filipjev, I.N.** 1936. On the classification of the Tylenchinae. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 3: 80–82.
- Flegg, J.J.M. & Hooper, D.J.** 1970. Extraction of free-living stages from soil. In J.F. Southey, ed. *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*, Technical Bulletin 2, pp. 5–22. London, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. 148 pp.
- Goodey, J.B.** 1952. The influence of the host on the dimensions of the plant parasitic nematode, *Ditylenchus destructor*. *Annals of Applied Biology*, 30: 468–474.
- Goodey, J.B.** 1963. *Soil and freshwater nematodes*. Harpenden, UK, Nematology Department, Rothamsted Experimental Station, and London, Methuen & Co. Ltd. 544 pp.
- Griffin, G.D.** 1985. Nematode parasites of alfalfa, cereals and grasses. In W.R. Nickle, ed. *Plant and insect nematodes*, pp. 243–322. New York, Marcel Dekker Inc. 925 pp.
- Hesling, J.J.** 1974. *Ditylenchus myceliophagus*. CIH descriptions of plant-parasitic nematodes, Set 3, No. 36. St Albans, UK, Commonwealth Institute of Helminthology (CIH). 4 pp.
- Heyns, J.** 1971. A guide to the plant and soil nematodes of South Africa. Cape Town, A.A. Balkema. 233 pp.
- Hooper, D.J.** 1972. *Ditylenchus dipsaci*. CIH descriptions of plant-parasitic nematodes, Set 1, No. 14. St Albans, UK, Commonwealth Institute of Helminthology (CIH) 4 pp.
- Hooper, D.J.** 1973. *Ditylenchus destructor*. CIH descriptions of plant-parasitic nematodes, Set 2, No. 21. St Albans, UK, Commonwealth Institute of Helminthology (CIH) 4 pp.
- Hooper, D.J.** 1986. Extraction of nematodes from plant tissue. In J.F. Southey, ed. *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*, Reference Book 402, 6th edn, pp. 51–58. London, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. 202 pp.
- Hooper, D.J., Hallmann, J. & Subbotin, S.A.** 2005. Methods for extraction, processing and detection of plant and soil nematodes. In M. Luc, R.A. Sikora & J. Bridge, eds. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*, 2nd edn, pp. 53–86. Wallingford, UK, CABI. 871 pp.
- Jeszke, A., Budziszewska, M., Dobosz, R., Stachowiak, A., Protasewicz, D., Wieczorek, P. & Obrepalska-Stęplowska, A.** 2013. A comparative and phylogenetic study of the *Ditylenchus dipsaci*, *Ditylenchus destructor* and *Ditylenchus gigas* populations occurring in Poland. (Short Communication.) *Journal of Phytopathology*, 162: 61–67.

- Ji, L., Wang, J.C., Yang, X.L., Huang, G.M. & Lin, M.S.** 2006. [PCR-RFLP patterns for differentiation of three *Ditylenchus* species.] *Journal of Nanjing Agricultural University*, 29: 39–43 (in Chinese).
- Johnson, C.S.** 1998. Tobacco. In K.R. Barker, G.A. Pederson & G.L. Windham, eds. *Plant and nematode interactions*, pp. 487–522. Madison, WI, American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc. and Soil Science Society of America, Inc. 772 pp.
- Karssen, G. & Willemsen, N.M.** 2010. The spiculum: An additional useful character for the identification of *Ditylenchus dipsaci* and *D. destructor* (Nematoda: Anguinidae). *EPPO Bulletin*, 40: 211–212.
- Kerkoud, M., Esquibet, M. & Plantard, O.** 2007. Identification of *Ditylenchus* species associated with Fabaceae seeds based on a specific polymerase chain reaction of ribosomal DNA-ITS regions. *European Journal of Plant Pathology*, 118: 323–332.
- Kleynhans, K.P.N.** 1997. *Collecting and preserving nematodes*. A manual for a practical course in nematology by SAFRINET, the southern African (SADC) LOOP of BioNET-INTERNATIONAL, ARC. Pretoria, Plant Protection Research Institute. 52 pp.
- Kühn, J.** 1857. Über das Vorkommen von Anguillulen in erkrankten Blütenköpfen von *Dipsacus fullonum* L. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, 9: 129–137.
- Leal-Bertioli, S.C.M., Tenente, R.C.V. & Bertioli, D.J.** 2000. ITS sequence of populations of the plant-parasitic nematode *Ditylenchus dipsaci*. *Nematologia Brasileira*, 24: 83–85.
- Marek, M., Zouhar, M., Rysanek, P. & Havranek, P.** 2005. Analysis of ITS sequences of nuclear rDNA and development of a PCR-based assay for the rapid identification of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* (Nematoda: Anguinidae) in plant tissues. *Helminthologia*, 42: 49–56.
- McDonald, A.H. & Nicol, J.M.** 2005. Nematode parasites of cereals. In M. Luc, R.A. Sikora & J. Bridge, eds. *Plant parasitic nematodes on subtropical and tropical agriculture*, 2nd edn, pp. 131–192. Wallingford, UK, CABI. 896 pp.
- Mollov, D.S., Subbotin, S.A. & Rosen, C.** 2012. First report of *Ditylenchus dipsaci* on garlic in Minnesota. *Plant Disease*, 96: 1707.
- Nemapix.** 1999. J.D. Eisenback & U. Zunke, eds. *A journal of nematological images*, Vol. 2. Blacksburg, VA, Mactode Publications.
- Nemapix.** 2000. J.D. Eisenback & U. Zunke, eds. *A journal of nematological images*, Vol. 1, 2nd edn. Blacksburg, VA, Mactode Publications.
- Nemapix.** 2002. J.D. Eisenback & U. Zunke, eds. *A journal of nematological images*, Vol. 3. Blacksburg, VA, Mactode Publications.
- Netscher, C. & Sikora, J.W.** 1990. Nematodes in vegetables. In M. Luc, R.A. Sikora & J. Bridge, eds. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*, 2nd edn, pp. 237–283, Wallingford, UK, CABI. 896 pp.
- Oliveira, R.D.L., Santin, Â.M., Seni, D.J., Dietrich, A., Salazar, L.A., Subbotin, S.A., Mundo-Ocampo, M., Goldenberg, R. & Barreto, R.W.** 2013. *Ditylenchus gallaeformans* sp.n. (Tylenchida: Anguinidae): A neotropical nematode with biocontrol potential against weedy Melastomataceae. *Nematology*, 15: 179–196.

- Palazova, G. & Baicheva, O.** 2002. Electrophoretic studies of *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn, 1857) Filipjev, 1936 from two hosts: *Allium sativum* and *Allium cepa*. *Experimental Pathology and Parasitology*, 5: 39–40.
- Palmisano, A.M., Tacconi, R. & Trotti, G.C.** 1971. Sopravvivenza di *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev Nematoda: tylenchidae) al processo digestive nei suini, equini e bovini. *Redia*, 52: 725–737.
- Potter, J.W. & Olthof, T.H.A.** 1993. Nematode pests of vegetable crops. In K. Evans, D.L. Trudgill & J.M. Webster, eds. *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*, pp. 171–208. Wallingford, UK, CABI. 656 pp.
- Powers, T.O., Szalanski, A.L., Mullin, P.G., Harris, T.S., Bertozzi, T. & Griesbach, J.A.** 2001. Identification of seed gall nematodes of agronomic and regulatory concern with PCR-RFLP of ITS1. *Journal of Nematology*, 33: 191–194.
- Rivoal, R. & Cook, R.** 1993. Nematode pests of cereals. In K. Evans, D.L. Trudgill & J.M. Webster, eds. *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*, pp. 259–304. Wallingford, UK, CABI. 656 pp.
- Roberts, H.** 1981. New or unusual host-plant records for plant-parasitic nematodes, 1977–80. *Plant Pathology*, 30: 182.
- Rojankovski, E. & Ciurea, A.** 1986. Contributions to the study of interactions between the potato rot nematode, *Ditylenchus destructor* Thorne, and fungi in the potato disease complex. *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz*, 22: 101–106.
- Seinhorst, J.W.** 1959. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica*, 4: 67–69.
- Siddiqi, M.R.** 2000. *Tylenchida parasites of plants and insects*, 2nd edn. Wallingford, UK, CABI. 864 pp.
- Sikora, R.A., Greco, N. & Silva, J.F.V.** 2005. Nematode parasites of food legumes. In M. Luc, R.A. Sikora & J. Bridge, eds. *Plant parasitic nematodes on subtropical and tropical agriculture*, 2nd edn, pp. 259–318. Wallingford, UK, CABI. 896 pp.
- Sousa, A.I., Gomes, V.F. & Tenente, R.C.V.** 2003. Tratamento físico aplicado as sementes de melao (*Cucumis melo* L.), importadas da Holanda, na erradicação de *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn, 1857) Filipjev, 1936. *Nematologia Brasileira*, 27: 223–225.
- Southey, J.F.** 1993. Nematodes of ornamental and bulb crops. In K. Evans, D.L. Trudgill & J.M. Webster, eds. *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*, pp. 463–500. Wallingford, UK, CABI. 656 pp.
- Sturhan, D. & Brzeski, M.W.** 1991. Stem and bulb nematodes, *Ditylenchus* spp. In W.R. Nickle, ed. *Manual of Agricultural Nematology*, pp. 423–464. New York, Marcel Decker Inc. 1064 pp.
- Subbotin, S.A., Madani, M., Krall, E., Sturhan, D. & Moens, M.** 2005. Molecular diagnostics, taxonomy and phylogeny of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* species complex based on the sequences of the ITS-rDNA. *Phytopathology*, 95: 1308–1315.
- Tenente, R.C.V. & Evans, A.A.F.** 1997. Electrophoresis of proteins from several races of *Ditylenchus dipsaci* recovered from dried infested courgette tissue. *Nematologia Brasileira*, 21: 84–91.

- Thorne, G.** 1945. *Ditylenchus destructor*, n. sp., the potato rot nematode, and *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn, 1857) Filipjev, 1936, the teasel nematode (Nematoda: Tylenchidae). *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 12: 27–33.
- Van der Vegte, F.A. & Daiber, K.C.** 1983. A preliminary report on the occurrence of *Ditylenchus destructor* on the ornamental *Liatris spicata* and efforts to eradicate the former. *Proceedings of the 6th Symposium and General Meeting of the Nematological Society of Southern Africa*.
- Viglierchio, D.R.** 1971. Race genesis in *Ditylenchus dipsaci*. *Nematologica*, 17: 386–392.
- Viscardi, T. & Brzeski, M.W.** 1993. DITYL: Computerized key for species identification of *Ditylenchus* (Nematoda: Anguinidae). *Fundamental and Applied Nematology*, 16: 389–392.
- Vovlas, N., Troccoli, A., Palomares-Rius, J.E., De Luca, F., Liébanas, G., Landa, B.B., Subbotin, S.A. & Castillo, P.** 2011. *Ditylenchus gigas* n.sp. parasitizing broad bean: A new stem nematode singled out from the *Ditylenchus dipsaci* species complex using a polyphasic approach with molecular phylogeny. *Plant Pathology*, 60: 762–775.
- Vrain, T.C., Wakarchuk, A.C., Levesque, A.C. & Hamilton, R.I.** 1992. Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. *Fundamental and Applied Nematology*, 15: 563–573.
- Webster, J.M., Anderson, R.V., Baillie, D.L., Beckenbach, K., Curran, J. & Rutherford, T.** 1990. DNA probes for differentiating isolates of the pinewood nematode species complex. *Revue de Nématologie*, 13: 255–263.
- Wendt, K.R., Swart, A., Vrain, T.C. & Webster, J.M.** 1995. *Ditylenchus africanus* sp.n. from South Africa: A morphological and molecular characterization. *Fundamental and Applied Nematology*, 18: 241–250.
- Wendt, K.R., Vrain, T.C. & Webster, J.M.** 1993. Separation of three species of *Ditylenchus* and some host races of *D. dipsaci* by restriction fragment length polymorphism. *Journal of Nematology*, 25: 555–563.
- Zouhar, M., Marek, M., Douda, O., Mazáková, J. & Ryšánek, P.** 2007. Conversion of sequence-characterized amplified region (SCAR) bands into high-throughput DNA markers based on RAPD technique for detection of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* in crucial plant hosts. *Plant Soil and Environment*, 53: 97–104.
- Zouhar, M., Marek, M., Licinio, J. & Ryšánek, P.** 2002. Using point mutations in rDNA for differentiation of bioraces of *Ditylenchus dipsaci* from the Czech Republic. *Plant Protection Science*, 38 (Special 2): 358–360.

9. 图



图 1. 受鳞球茎线虫侵染的蚕豆种子 (显示虫绒)

照片由 G. Caubel , Nemapix (1999) 提供。



图 2. 受鳞球茎线虫侵染的大蒜

照片由 G. Caubel , Nemapix (1999) 提供。



图 3. 受鳞球茎线虫侵染的洋葱幼苗

照片由位于波兰托伦的国家植物检疫与种子检验局的 E. Hennig 提供。



图 4. 受鳞球茎线虫侵染的大蒜鳞茎

照片由 G. Caubel , Nemapix (2002) 提供。



图 5. 受鳞球茎线虫侵染的水仙属

照片由 G. Caubel , Nemapix (1999) 提供。



图 6. 受鳞球茎线虫侵染的水仙属鳞茎横切面
照片由 C.W. Laughlin , Nemapix (2002) 提供。



图 7. 受鳞球茎线虫侵染的甜菜横切面
照片由 C. Hogger , Nemapix (1999) 提供。



图 8. 受腐烂茎线虫侵染马铃薯和未受侵染的马铃薯横切面对比
照片由 S. Ayoub , Nemapix (2000) 提供。

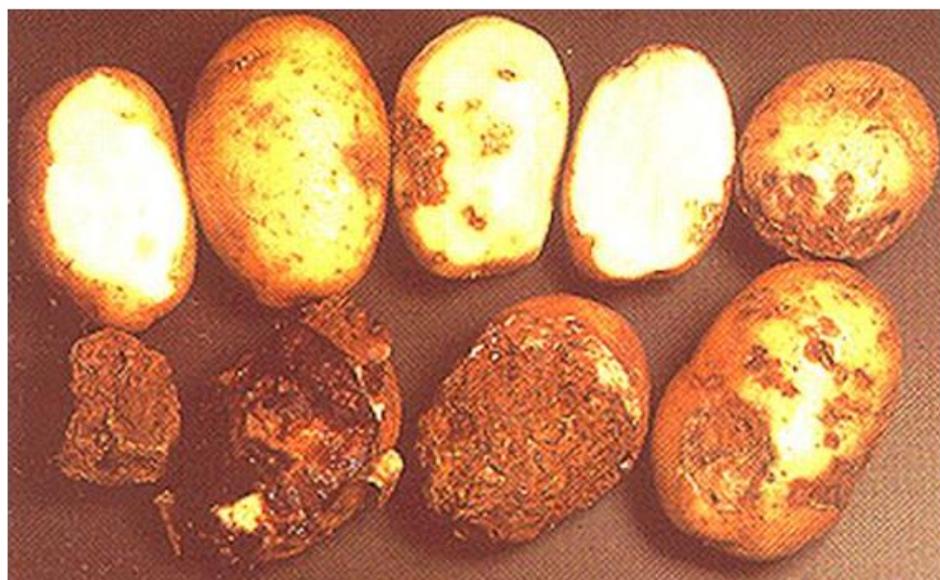


图 9. 受腐烂茎线虫不同程度侵染的马铃薯
照片由 H. Andersen 提供。

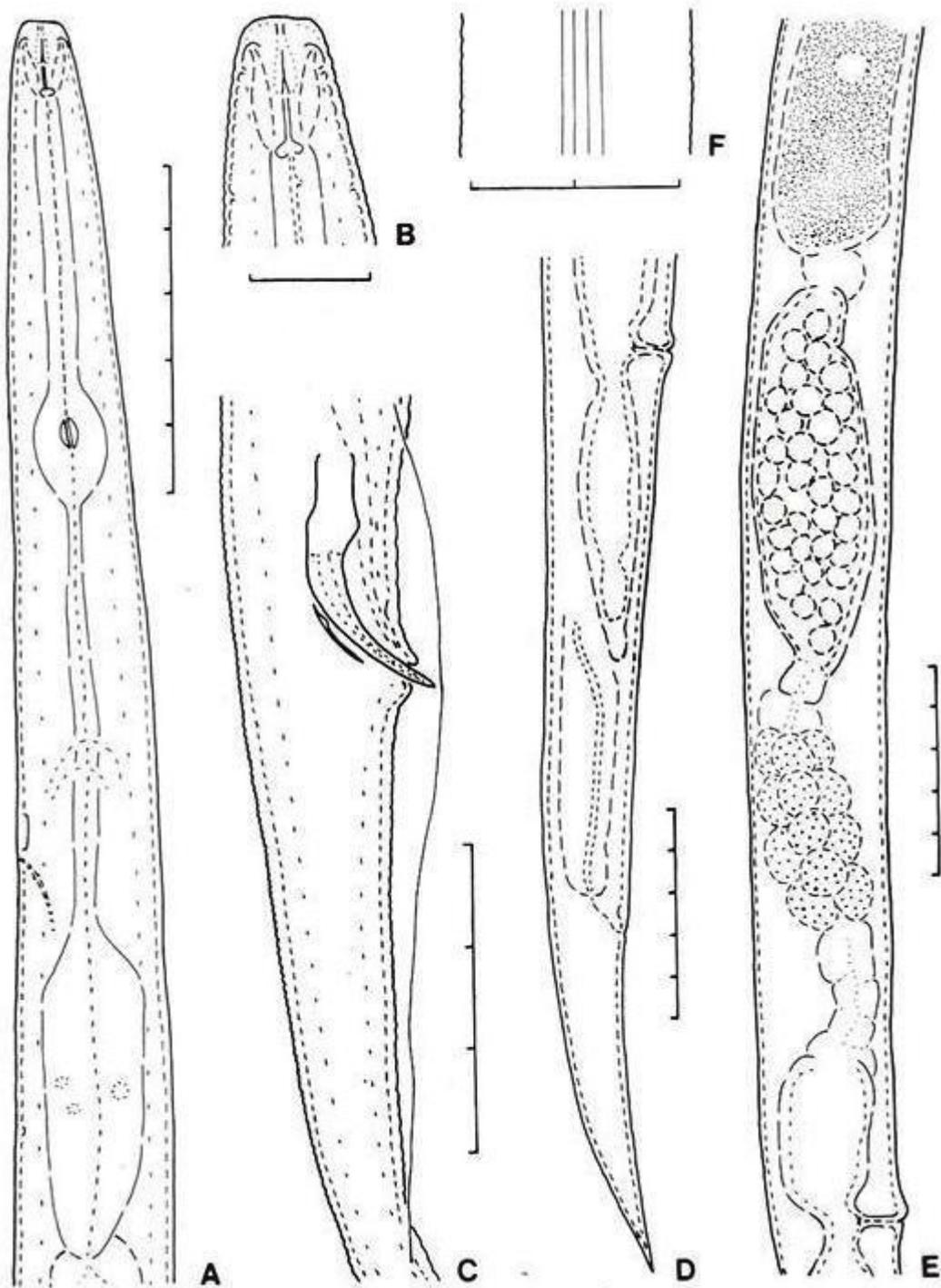


图 10. 鳞球茎线虫 (Kühn, 1857) Filipjev, 1936 (参考 Sturhan 和 Brzeski, 1991)。(A) 雌虫, 食道区域; (B) 雌虫头部; (C) 雄虫, 交合刺区域; (D) 雌虫, 后部区域; (E) 雌虫部分生殖系统; 以及 (F) 虫体中部侧区。比例尺上每一单位 = 10 μm 。

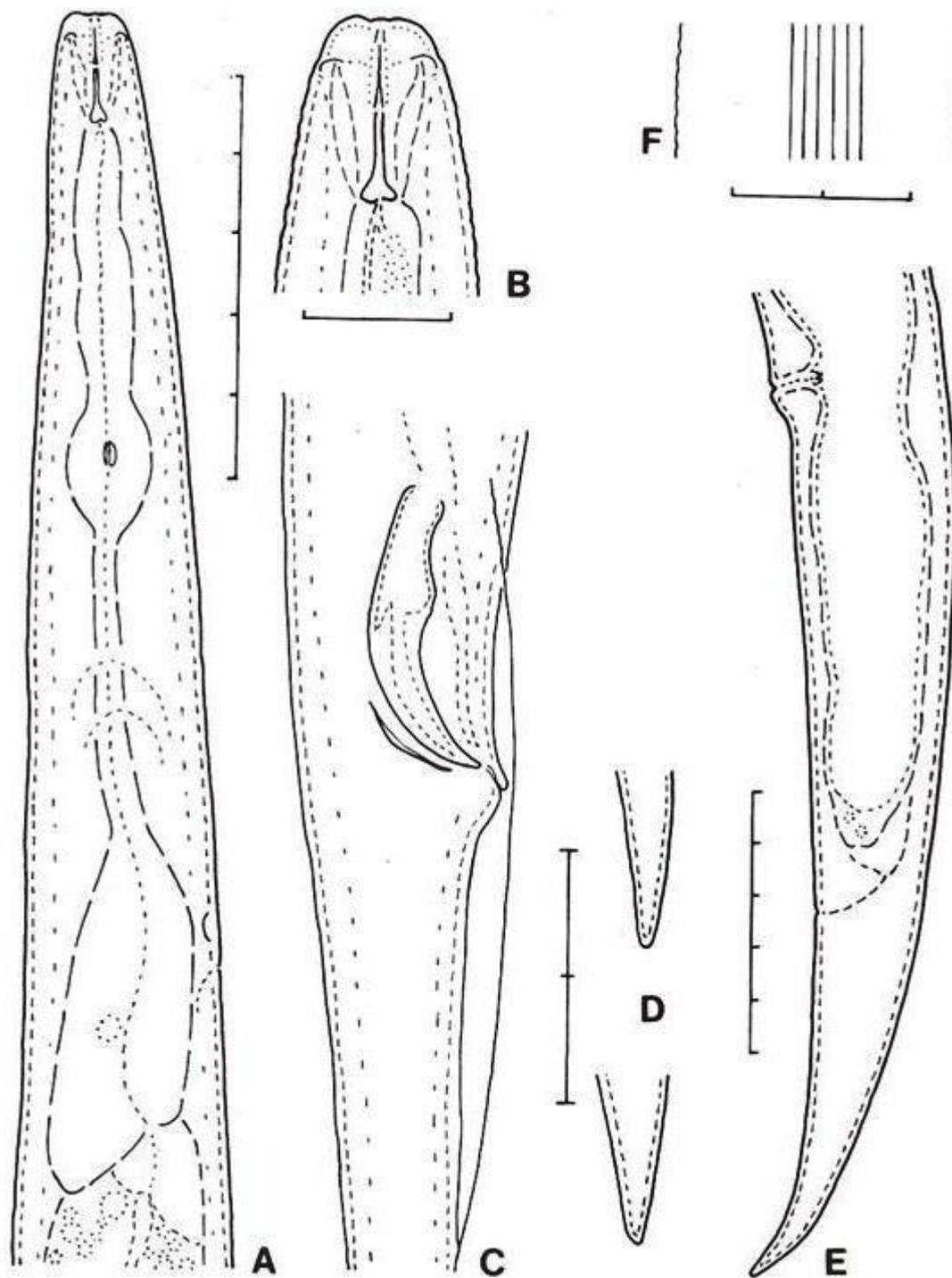


图 11. 腐烂茎线虫 Thorne, 1945 (参考 Sturhan 和 Brzeski , 1991) 。(A) 雌虫, 食道区域 ;(B) 雌虫, 头部 ;(C) 雄虫, 交合刺区域 ;(D) 两只雌虫的尾端 ;(E) 雌虫, 后部区域 ; 以及(F) 虫体中部侧区。比例尺上每一单位 = 10 μm 。

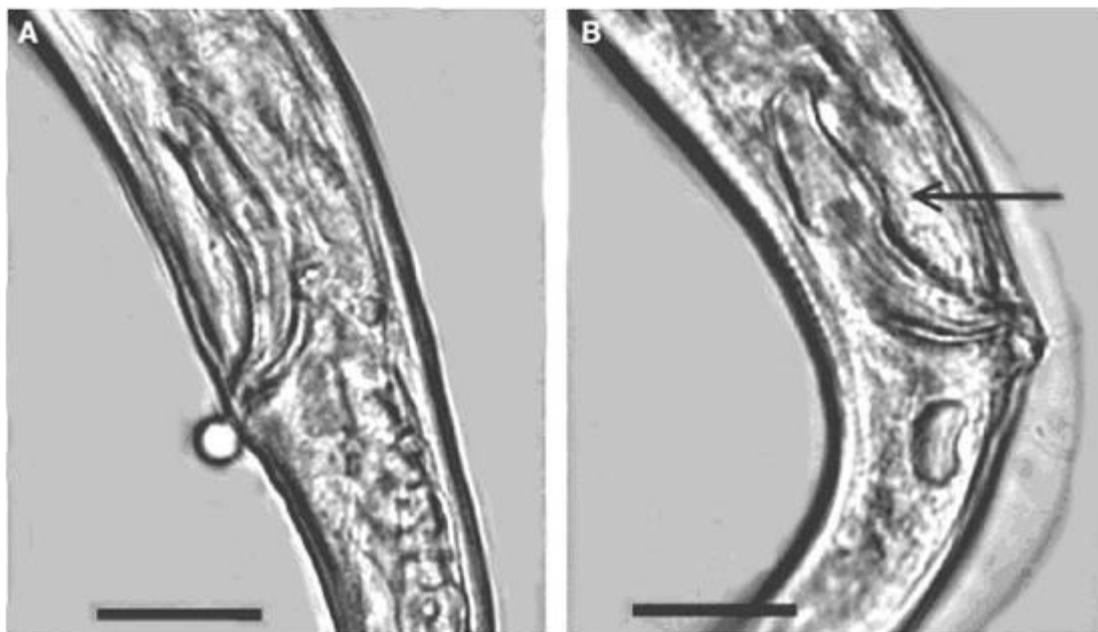


图 12. 茎线虫交合刺：(A) 鳞球茎线虫和(B) 腐烂茎线虫。箭头 = 突起。比例尺 = 12 μm
照片由 Karssen 与 Willemsen (2010) 提供。

出台背景

这部分不属于本标准的正式内容

2006年4月，植检委第一届会议（2006）在工作计划中增列了主题（线虫，2006-008）

2004年11月，标准委增列专题：腐烂茎线虫/鳞球茎线虫（2004-017）

2010年7月，草案提交给诊断规程技术小组会议

2013年4月，专家磋商

2013年6月，草案提交给诊断规程技术小组会议

2014年5月，标准委批准提交成员磋商（2014_eSC_May_11）

2014年7月，成员磋商

2015年4月，诊断规程技术小组批准草案提交标准委（2015_eTPDP_Apr_03）

2015年6月，标准委批准进入诊断规程通报期（2015_eSC_Nov_02）

2015年8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 8. 鳞球茎线虫与腐烂茎线虫 (2015)。

罗马，国际植物保护公约，粮农组织。

出台背景最后更新：2015年9月

本诊断规程于 2015 年 8 月由标准委代表植检委通过。

本附件是 ISPM 27 号标准 (限定有害生物诊断规程) 规定的一部分。

ISPM 27

附件 9

国际植物检疫措施标准

ISPM 27 诊断规程

DP 9 :

按实蝇属 (*Anastrepha* Schiner)

2015 年通过 ; ~~2015~~年出台-2016 年出版

目录

1. 有害生物信息	2
2. 分类信息.....	3
3. 检测.....	4
3.1 水果的检验.....	5
3.2 诱集装置的检验.....	5
4. 鉴定.....	5
4.1 准备用于鉴定的成虫.....	6
4.1.1 饲养幼虫以获得成虫.....	6
4.1.2 准备用于镜检的成虫.....	6
4.2 准备用于鉴定的幼虫.....	7
4.2.1 生物学样品的处理.....	7
4.2.2 准备用于镜检的幼虫.....	7
4.3 成虫的形态学鉴定.....	8
4.3.1 按实蝇属的鉴定.....	8
4.3.2 几种具有重大经济重要性的按实蝇的成虫检索表.....	9
4.4 三龄幼虫的形态学鉴定	10
4.4.1 美洲实蝇科具有重大经济重要性的属的三龄幼虫检索表.....	10
4.4.2 几种具有重大经济重要性的按实蝇的三龄幼虫检索表.....	11
5. 记录.....	17

6. 获取进一步信息的联系点	17
7. 致谢.....	17
8. 参考文献.....	18
9. 图.....	23

1. 有害生物信息

实蝇科 (Tephritidae) 包含约 500 个属 4 450 个种 (Norrbon 等, 1999a, 1999b; Norrbom, 2004b) (2014 年该数字是大约 4 700 个种 (A.L. Norrbom, 个人通讯, 2014))。实蝇科在世界范围内广泛分布于温带、热带和亚热带地区。按实蝇属 (*Anastrepha* Schiner) (实蝇科: 长尾实蝇族 (Toxotrypanini)) 是美洲实蝇科中最大的一个属, 代表性的种超过 250 个, 从美国南部 (德克萨斯和佛罗里达) 到阿根廷北部之间都有发生 (Hernández-Ortiz, 1992; Foote 等, 1993; Hernández-Ortiz 和 Aluja, 1993; Norrbom, 2004b; Norrbom 等, 2012)。因对受其危害的栽培水果 (例如芒果和柑橘) 高度重要且其寄主范围广泛, 至少有 7 种按实蝇被认为是重大的经济害虫。这 7 种是南美按实蝇 (*A. fraterculus* (Wiedemann))、**南美瓜按实蝇** (*A. grandis* (Macquart))、墨西哥按实蝇 (*A. ludens* (Loew))、西印度按实蝇 (*A. obliqua* (Macquart))、**山榄暗色按实蝇** (*A. serpentina* (Wiedemann))、**中美美洲番石榴按实蝇** (*A. striata* Schiner), 以及加勒比按实蝇 (*A. suspensa* (Loew))。南美按实蝇被认为是一个隐存复合种 (Hernández-Ortiz 等, 2004, 2012; Selivon 等, 2004, 2005; Vera 等, 2006; Cáceres 等, 2009)。本按实蝇诊断规程涵盖了该属及其中具有重大经济重要性的种的形态学鉴定。有关实蝇科各种实蝇更详细的一般信息, 参看 Norrbom (2010)。

取决于每个种及其所处的环境和气候条件, 实蝇科实蝇的生命周期长短不同 (Basso, 2003)。雌性按实蝇将卵产在果实中。每个果实中所产卵的数量不相同, 主要取决于寄主果实的特征, 诸如大小和成熟度等 (Malavasi 等, 1983), 但**每种按实蝇的对产卵数量也似乎也有其内在的限制** (Aluja 等, 1999)。几天内, 所产的卵就会孵化出幼虫。幼虫通常取食果肉, 但有时也取食, 甚至专门取食种子。成熟幼虫通常脱离果实, 在地上化蛹, 但在某些情况下化蛹也可能在果实内进行。成虫通常经 16—25 天的蛹期后羽化, 羽化后需要 5—20 天的性成熟时间。在此期间, 实蝇从同翅目昆虫分泌物、鸟粪和成熟果实产生的汁液中获取食物 (Prokopy 和 Roitberg, 1984)。

很少了解各种对按实蝇种类和其寄主之间的关系了解得很少。共有 48 个科 330 多种寄主植物, 据报道其中很多是少数几种广适按实蝇的寄主 (Norrbon 和 Kim, 1988; Norrbom, 2004a), 然而很多其他种类按实蝇的食源植物仍然不为人知。不

仅如此，现有资料还包含很多存疑记录，以及只是在实验室条件下诱导侵染的报道。如果将寄主清单限制在自然侵染范围内，只有约 39.8%的按实蝇种类已知其寄主（Hernández-Ortiz 和 Aluja, 1993）。

芒果（*Mangifera indica*）和柑橘属（*Citrus spp.*）等外来栽培物种的引进，已经使按实蝇属中一些有害生物种类拓展了其最初的分布范围，并增强了其繁殖能力。然而，它们对某些当地寄主仍然有明显偏好，这可能说明了其最初的寄主关系。在此方面，加勒比按实蝇、南美按实蝇和美洲番石榴中美按实蝇主要取食桃金娘科（Myrtaceae）寄主，墨西哥按实蝇主要取食芸香科（Rutaceae），西印度按实蝇主要取食漆树科（Anacardiaceae），暗色山榄按实蝇主要取食山榄科（Sapotaceae），南美瓜按实蝇则主要取食葫芦科（Cucurbitaceae）（Norrbon, 2004a）。

在美洲热带地区的当地寄主中，似乎与能产生乳汁的植物，特别是山榄科植物有遗传性联系。山榄科果实是箭齿按实蝇（*A. dentata*）、山榄按实蝇（*A. leptozona*）、暗色实蝇山榄按实蝇（*A. serpentina*）、异型按实蝇（*A. daciformis*）、*A. robusta* 和 *A. cryptostrepha* 等按实蝇种类经常取食的寄主。桃金娘科果实也是非常重要的寄主。已报道大约有 26 种按实蝇取食该科植物，其中多数属于南美按实蝇复合种（Norrbon 和 Kim, 1988; Norrbom 等, 1999c）。

2. 分类信息

学名：*Anastrepha* Schiner, 1868

异名：*Acrotoxa* Loew, 1873; *Pseudodacus* Hendel, 1914; *Phobema* Aldrich, 1925; *Lucumaphila* Stone, 1939

分类地位：昆虫纲（Insecta），双翅目（Diptera），实蝇科（Tephritidae），实蝇亚科（Trypetinae），长尾实蝇族（Toxotrypanini）

通用名：见表 1

表 1. 几种具有重大经济重要性的按实蝇的通用名和异名

通用名	按实蝇种类	异名
南美按实蝇	<i>Anastrepha fraterculus</i> (Wiedemann, 1830) 复合种	<i>Tephritis mellea</i> Walker, 1837
		<i>Trypeta unicolor</i> Loew, 1862
		<i>Anthomyia frutalis</i> Weyenbergh, 1874
		<i>Anastrepha fraterculus</i> var. <i>soluta</i> Bezzi, 1909
		<i>Anastrepha peruviana</i> Townsend, 1913
		<i>Anastrepha braziliensis</i> Greene, 1934
		<i>Anastrepha costarukmanii</i> Capoor, 1954
		<i>Anastrepha scholae</i> Capoor, 1955
		<i>Anastrepha pseudofraterculus</i> Capoor, 1955
		<i>Anastrepha lambayecae</i> Korytkowski and Ojeda, 1968
瓜按实蝇	<i>Anastrepha grandis</i> (Macquart, 1846)	<i>Anastrepha schineri</i> Hendel, 1914
		<i>Anastrepha latifasciata</i> Hering, 1935
墨西哥按实蝇	<i>Anastrepha ludens</i> (Loew, 1873)	<i>Anastrepha lathana</i> Stone, 1942
西印度按实蝇	<i>Anastrepha obliqua</i> (Macquart, 1835)	<i>Anastrepha fraterculus</i> var. <i>mombinpraeoptans</i> Sein, 1933
		<i>Anastrepha fraterculus</i> var. <i>ligata</i> Lima, 1934
		<i>Anastrepha trinidadensis</i> Greene, 1934
山榄按暗色实蝇	<i>Anastrepha serpentina</i> (Wiedemann, 1830)	<i>Urophora vittithorax</i> Macquart, 1851
番石榴按实蝇	<i>Anastrepha striata</i> Schiner, 1868	<i>Dictya cancellaria</i> Fabricius, 1805 (见 Norrbom 等, 1999b)
加勒比按实蝇	<i>Anastrepha suspensa</i> (Loew, 1862)	<i>Anastrepha unipuncta</i> Sein, 1933
		<i>Anastrepha longimacula</i> Greene, 1934

3. 检测

实蝇可通过检验水果中幼虫，以及检验运输对水果运输所用包装物中的蛹来进行检测，也可以通过诱集系统在室外诱集成虫。

3.1 水果的检验

可以在输入或输出货物、包裹，甚至是飞机或陆上运输工具中找到受侵染的水果。带有雌虫产卵或幼虫取食引起的发软部位、暗色斑点、腐烂、孔眼或伤痕的水果是检验的目标物。为了检测到雌性实蝇的产卵孔，应由专业人员在显微镜下进行目检。如果观察到幼虫脱果孔，应在水果包装物中检查蛹。水果未成熟时即被采摘和包装，不太可能发生 2、3 龄幼虫和蛹；然而，此类水果可能携带卵和 1 龄幼虫，它们更加难以检出。对可能受侵染的带有雌性实蝇典型产卵孔的水果，应切开寻找其中的卵或幼虫。检测的成功取决于对水果的认真取样和检查。

3.2 诱集装置的检验

ISPM 26（建立果蝇（实蝇科）非疫区）附录 1 提供了有关按实蝇诱集的指导。一般而言，为调查果树中实蝇成虫而设置的监测系统，无论是在水果种植区还是在国家之间的边境区域，都需要使用以食物饵料或合成引诱物为诱剂的 McPhail 诱捕器。通常含有大量铵化合物的诱剂应在国际上得到认可和批准（例如 ISPM 26）。诱集装置设置的独特方法及其维护时间应与各个国家的植物检疫法规保持一致。

4. 鉴定

按实蝇属的分类以成虫外部形态和雌虫尾器特征为依据（Stone, 1942; Hernández-Ortiz, 1992; Zucchi, 2000; Norrbom 等, 2012）。因为多数种类按实蝇未成熟阶段的形态特征未曾得到很好的记录，和成虫形态相比，这些特征在种类识别方面作用有限（White 和 Elson-Harris, 1992）。然而，科学文献中能查到有关卵结构和 3 龄幼虫的一些信息，它们对某些种类有诊断价值（Steck 和 Wharton, 1988; Steck 等, 1990; Frías 等, 2006, 2008, 2009; Dutra 等, 2011a, 2011b, 2012, 2013; Figueiredo 等, 2011）。已有具有重大经济重要性的 7 种按实蝇（1 节；列于表 1）的幼虫鉴定检索表（Steck 等, 1990; Carroll 等, 2004），但使用时应考虑其局限性。

尽管已能非常清楚地识别一些按实蝇种类按实蝇的 3 龄幼虫（Berg, 1979; Steck 和 Wharton, 1988; Carroll 和 Wharton, 1989; Steck 等, 1990; White 和 Elson-Harris, 1992; Carroll 等, 2004; Frías 等, 2006; Hernández-Ortiz 等, 2010），但对所描述的大多数种类而言，现有资料依据的只是非常有限的取样。对尚未描述特征的其他高度相关的种类进行研究，可能也会降低本方法的可靠性。正因为如此，专家应进行诊断，并评估所有能够获得的信息。最可靠的鉴定方法是将幼虫饲养至成虫阶段。

几种按实蝇类有害生物被认为包含多个形态上无法区分，或需要借助形态测量

学分析才能识别的隐存种（尚未描述）（Hernández-Ortiz 等，2004，2012）。

为进一步研究这一观点，国际原子能机构（IAEA）已协调了一个国际研究项目，描述南美按实蝇复合种中的隐存种。作为该项目的一部分，已研究了一些分子方法对该属的诊断作用。基于现有资料，使用细胞色素氧化酶 I 基因的 DNA 条形码等方法还不能可靠地鉴定一些双翅目种类，包含几种重要的有害生物（Will 等，2005；Meier 等，2006；Virgilio 等，2010；Lopes 等，2013）。通过内转录间隔区 ~~-(ITS)-1~~ 分析已取得一些进展（例如 Sonvico 等，2004，基因库序列号 AY686689）。此类信息与标本的形态特征和核型分析，以及杂交交配研究有关（Basso，2003）。

因此，本诊断规程所包含的鉴定方法以形态特征为依据。

4.1 准备用于鉴定的成虫

4.1.1 饲养幼虫以获得成虫

将水果放置在盖有布或细纱网的笼子中，底部放上消过毒的化蛹介质（例如湿蛭石、沙子或锯末）。一旦幼虫离开从水果中羽化出来，它们就会进入底层介质中化蛹。建议每个水果单独培育。必须每天观察每个样品，并收集虫蛹。将虫蛹放入装有化蛹介质的容器中，容器盖有严密的盖子，但要有适当的通风。一旦成虫羽化，它们应保持存活 48—72 h，以确保其体壁和翅具有硬度和该种类特有的颜色。随后杀死成虫，放入 70% 乙醇（96% 乙醇用于分子研究（DNA））中保存，或者用乙酸乙酯或其他药剂杀死成虫，并将其固定在大头针上。对雌实蝇而言，杀死后（在其变硬之前）立即用镊子轻轻挤压其前腹部末端部分非常有用，随后挤压产卵管基节的基部和端部，以露出其产卵管刺针突端梢部（因此以后不需要另行解剖）。

4.1.2 准备用于镜检的成虫

为了能将成虫阶段识别到种，完整的标本应干燥保存（大头针固定）或保存在 70% 乙醇中。翅膀和产卵管刺针突的检验尤其重要。产卵管刺针突的检验必须在大约 400× 的放大倍数下进行。每头标本的翅膀和产卵管刺针突可封固在同一载玻片的两个不同的盖玻片下。解剖和封固应由有经验的人员完成。解剖按实蝇雌虫尾器非常困难，很容易损坏有用部位。

4.1.2.1 产卵管刺针突

最好切下一头雌虫的整个腹部，以解剖其产卵管基节（合并背腹片 7）、翻转膜和产卵管刺针突。对保存的干燥（大头针固定）标本而言，建议使用精巧的解剖剪分离腹部。腹部需要清洗。为此目的，将腹部放进 10% 氢氧化钠（NaOH）或

10%氢氧化钾（KOH）溶液中，沸水浴加热 10—15 min，用蒸馏水冲洗腹部结构，随后在立体显微镜下用解剖镊清除内部物质。应露出产卵管**刺针突**和翻转膜。在此步骤，可以将产卵管**刺针突**放入 1 到 2 滴甘油中，在显微镜下直接检验。随后，可以将腹部结构移入一个装有甘油的微量瓶中，并固定在干标本下方。至于永久玻片，要按照 4.1.2 节描述的方法制作。以腹向位置永久封固产卵管**刺针突**。会妨碍对侧面观时更易看到的一些特征的观察。正因为如此，用甘油保存在微量瓶中通常更为可取。

4.1.2.2 翅

翅部特征常常不需封固即可观察，因此不建议将封固作为一种常规操作。形态测量学研究时可能必须如此，但在观察 4.3.2 节检索表中使用的特征时并非必须。如果制作永久封固标本，建议从基部切下双翅之一（最好是右翅，因为这样便于和文献及本诊断规程提供的图片进行比较）。

4.2 准备用于鉴定的幼虫

4.2.1 生物学样品的处理

正如 4 节所强调，确定无误的鉴定可能必须要观察成虫特征。如果找到的是未成熟**虫态龄期**，建议**取保存**少量幼虫**用于形态学检验**，用热水处理（4.2.2 节），随后放置在 70%乙醇中**用于形态学检验**。饲养**剩余的**其他幼虫和蛹，以获取鉴定用的成虫标本（4.1.1 节）。

对幼虫进行形态学检验（4.2.2 节）时，针对未封固幼虫可使用立体显微镜，玻片封固的幼虫可使用复式显微镜，而**经临界点关键部位干燥的**幼虫则使用扫描电子显微镜（SEM）。对幼虫进行玻片封固可能会妨碍以后对形态特征的分析。对玻片封固的幼虫，使用配备 20×、40×或更高倍数的光学显微镜，有可能检验其外部形态（例如前气门和后气门、口脊），以及头咽骨等内部结构（图 21—44）。使用扫描电子显微镜时，才有可能对幼虫外部形态进行详细和高分辨率的观察（图 45—61）。因此不建议用玻片封固代表一个样品的所有标本或可用于诊断的唯一幼虫；应保存未封固的幼虫，用于将来的分析。

4.2.2 准备用于镜检的幼虫

为制作用于检验的标本，必须用热水处理幼虫，具体可将成活幼虫在大约 65℃ 的水中放置 2—4 分钟。幼虫冷却至室温，随后在 50%酒精中浸泡 15—30 分钟。将标本移入装有 70%酒精的密封玻璃瓶（15—25 ml）中。建议在玻璃瓶上加贴含有所有取样信息的标签。这些样品可当即用于立体显微镜检验，或者以后用于制作封固玻片或扫描电子显微镜检验。

为了制备用于玻片封固的标本，必须清除（清理干净）所有内部物质，以便观察表皮、口腔口、头咽骨和前气门，以及后气门板和臀叶。为此可以在幼虫上横向切开两个口子，一个在头部和前气门之间，另一个在尾节前。随后需要将切开后的幼虫浸入一个装有 10% NaOH 或 10% KOH 溶液的试管中，并在沸水浴中加热 10—15 min。最后可以在立体显微镜下（45×或更大的放大率）用镊子和蒸馏水小心地清除掉标本的内部物质。

可以用加拿大树胶或优巴拉尔（Euparal）对玻片进行永久封固。在此之前，必须将清理干净的虫体结构放入 50%、75% 和 100% 乙醇中，各脱水 25 min。用加拿大树胶封固时，应将标本移入薰衣草精油中并保持 15 min，对其进行清洗，随后立即用 1—2 滴加拿大树胶封固在载玻片上。使用优巴拉尔作为封固剂时，应将虫体构造从 100% 乙醇中移入丁香油中，保持约 30 min，以在封固前对其进行清洗。在两种情况下，玻片都必须干燥数天（使用烘箱可以缩短时间），但它们封固后也可以直接在低倍显微镜下进行检验。玻片应加贴标签。

使用扫描电子显微镜观察时，必须首先在小玻璃瓶中用蒸馏水把标本（保存在酒精中）清洗干净，清洗前加 1 滴肥皂液作为表面活性剂。随后应用蒸馏水充分冲洗，并按以下顺序通过一系列乙醇浴脱水：70%、80% 和 95% 和 100%（该浓度需 3 次），并且更换 3 次纯乙醇（每次浸泡 15 min）。随后使标本的关键部位进行临界点干燥，并用金钼离子溅射镀膜（Carroll 和 Wharton, 1989）。在其他文献中也可以看到类似的技术（例如 Frías 等，2006，2008，2009）。

4.3 成虫的形态学鉴定

4.3.1 按实蝇属的鉴定

成虫（图 1）。头部（图 2-A）：通常黄色，具 2—8 根额鬃和 1—2 根上眶鬃，有时后上眶鬃缺如；单眼鬃通常非常纤细或不明显；具单眼后鬃、中及侧顶鬃。胸部（图 2-B、3）：胸部大刚毛通常黑色、红褐色或橘色，少金黄色；盾片通常黄色至橘色，偶尔以深褐色为主，或有时具深褐色或者黑色条纹或斑点，通常具 2—5 条黄色条纹；中胸背板具以下刚毛：1 根肩鬃、2 根背侧片鬃、1 根沟前翅上鬃、1 根沟后翅上鬃、1 根翅后鬃、1 根翅内鬃、1 根背中鬃、1 根中鬃（很少缺如），以及 2 根小盾鬃。

翅（图 4）：具亚前缘脉缺刻；*R-M* 横脉位于中室（*dm*）末端至中部之间；基肘室（*bcu*）具发育良好的后尖部扩展；翅脉 *M* 末端通常明显向前弯曲（所有有害种类尤其如此），不以 90° 角与前缘脉相交。翅纹带有橘色至褐色条带，形成以下典型模式：基前缘区前缘（*C*）带包含整条 *R₁* 脉、亚前缘室和翅痣；*S* 带从基肘室

端部开始延伸，穿过中室和 R-M 横脉，到达前缘，并继续延伸至翅尖；V 带形成一个倒 V 字形，包含沿 DM-Cu 脉的近臂（**端前横亚端带**）和发自 m 室的端臂（**后端横带**），两者相汇于 r_{4+5} 室；端臂通常不完整或缺如。在一些具有经济重要性的种类中，典型翅纹会有所改变（见 4.3.2 节的种检索表）。

雄虫尾器（图 5）：侧面观第九背板宽，侧背针突短或延长；中背针突较侧背针突短，端部具 2 个粗壮的黑色前叶；载肛突膜状，侧面和腹面轻微骨化；阳具长，常长于雌虫产卵管基节。阳茎头轻微骨化，端部具 T 形骨片，非有害种类有时阳茎头缺如。

雌虫尾器（图 6）：产卵**管器**基节管状，长度不确定。翻转膜（常翻入产卵**管器**基节）顶端背侧具一组钩状骨片（亦称锉器）；产卵管**刺针突**（常翻入翻转膜和产卵**管器**基节内）充分骨化，末端边缘有时呈锯齿状。

4.3.2 几种具有重大经济重要性的按实蝇的成虫检索表

检索表改编自 Hernández-Ortiz 等（2010）。有关形态结构和其他按实蝇种类的更多信息参看 Norrbom 等（2012）。有关按实蝇属的诊断形态特征见表 2 和 4。

1. 翅具 C 带，在 R_1 脉末端 r_1 室中一个边界清晰的透明斑点处中断；具前、后上眶鬃；V 带端臂通常存在，至少部分存在，如缺如，翅纹深褐色至黑色 **2**
 – 翅具 C 带，翅基至翅尖间不中断，有时消失于 r_1 室；后上眶鬃常缺如；V 带端臂缺如。必须具有以下全部特征：S 带基半部连续，始于 bcu 室端部，穿过 R-M 横脉并连结 C 带。 r_{2+3} 室全长有颜色； R_{2+3} 脉全长近平直； br 室在 BM-Cu 和 R-M 脉间近乎透明（图 7）；腹部背片黄色；盾片具深褐色背中条纹；雌虫产卵管**刺针突**特别长（5.3–6.2 mm），宽度通常大于 0.10 mm，端梢部具 V 形脊，边缘不呈锯齿状（图 14）；雄虫具阳茎头（幼虫侵染瓜类） **南美瓜按实蝇**
2. 盾片主要为深褐色，具褐色至黑色条纹 **3**
 – 盾片黄色或橙色，除偶沿盾间缝外无深褐色斑纹 **4**
3. 翅纹主要为深褐色；V 带端臂完全缺如（图 8）；腹部背片主要为深褐色，具 T 形中白斑；胸部侧板主要为褐色，与黄色斑纹形成强烈对比；雌虫产卵管**刺针突**长 2.6–3.8 mm，端梢部长 0.37–0.46 mm，宽 0.14–0.17 mm，末端 0.5–0.7 边缘呈小锯齿状（图 15）。（幼虫侵染山榄科水果） **山榄按暗色实蝇**
 – 翅纹主要为橙色和中褐色；常具 V 带端臂（图 9）；腹部背片和侧板黄色或橙色；盾片具两条宽背中条纹，在后缘连结形成 U 型斑纹，沿横缝的小区域内无小刚毛，但具密集的白色微毛型感受器，与黑色小刚毛形成对比；雌虫产卵管**刺针突**长 1.95–2.30 mm，端梢部宽，长 0.24–0.31 mm，宽 0.17–0.20 mm（图 16）。（幼

- 虫侵染番石榴) **中美美洲番石榴按实蝇**
4. 翅前端带 (=S 带端臂) 窄至中等宽度, 从不伸至 M 脉端; V 带具前端分离的两臂, 如连结, 则其与 M 脉间具大型透明斑纹; 盾间缝中部具或不具褐色斑点; 产卵管**刺针突**不确定 **5**
- 翅前端带 (=S 带端臂) 特别宽, 伸至 M 脉端; V 带宽且完整, 具前端宽广连结的双臂, 其与 M 脉间透明斑纹小或缺如 (图 10); 盾间缝中部常具大型圆褐斑; 雌虫产卵管**刺针突**长 1.4–1.6 mm, 端梢部长 0.19–0.23 mm, 宽 0.10–0.13 mm, 末端 0.50–0.65 边缘呈锯齿状 (图 17) **加勒比按实蝇**
5. 雌虫产卵管**刺针突**长度不足 2.0 mm (通常 1.4–1.9 mm), 端梢部短且宽, 边缘具大锯齿; 其他特征不确定 **6**
- 雌虫产卵管**刺针突**长度超过 2.5 mm (通常 3.3–5.8 mm); 产卵管**刺针突**端梢部长 0.28–0.42 mm, 近中部中等缢缩; 末端边缘不呈锯齿状, 或 0.55 或更短边缘具小锯齿 (图 18); 后小盾片边缘褐色斑纹明显, 有时伸至中背片 (图 3B); 翅纹如图 11 所示。(幼虫通常侵染柑橘和芒果) **墨西哥按实蝇**
6. 后小盾片全部黄色, 只有中背片边缘具褐色斑纹 (图 3C); 盾间缝无褐色斑点; 产卵管**刺针突**端梢部长 0.16–0.20 mm, 末端 2/3 或 3/4 部位边缘具锯齿 (图 19); 翅纹如图 12 所示。(幼虫通常取食芒果或槟榔青属 (*Spondias*) 果实) **西印度按实蝇**
- 中背片和后小盾片边缘均具深褐色至黑色宽斑纹 (图 3A); 盾间缝常具褐色斑点; 产卵管**刺针突**长 1.4–1.9 mm, 端梢部长 0.20–0.28 mm, 末端 2/5–3/5 部位边缘具齿 8–14 个 (图 20); 翅纹不确定 (图 13) **南美按实蝇复合种**

4.4 三龄幼虫的形态学鉴定

4.4.1 美洲实蝇科具有重大经济重要性的属的三龄幼虫检索表

- 检索表改编自 Frías 等 (2006)。有关本属和相关种类幼虫形态的更多信息, 参看 White 与 Elson-Harris (1992)、Carroll 等 (2004) 及 Frías 等 (2006, 2008)。
1. 上颚长度超过 0.3 mm。上颚腹内突宽且顶端圆形 (图 26)。气门毛短于中气门裂的宽度 (图 49) **驮长尾实蝇属 (*Toxotrypana* Gerstaecker)**
- 上颚长度不足 0.3 mm。上颚腹内突顶端尖 (图 22–24)。气门毛长于中气门裂的宽度 (如图 50 所示) **2**
2. 下咽桥狭窄, 位于舌悬骨近端部区域 (图 21)。具口前齿和口齿 (图 47)。口脊通常不呈齿状 (图 45、47)。背外侧感受器群距触角和下颚须等距。..... **绕实蝇属 (*Rhagoletis* Loew)**
- 下咽桥狭窄, 位于舌悬骨中间部位 (如图 27–32 所示)。口前齿和口齿缺如; 口

- 脊通常具齿状边缘（图 48）。背外侧感受器群距下颚须比触角近 3
3. 上颚后部无明显颈部（图 23）。尾脊缺如（图 59） **按实蝇属**
 – 上颚后部具明显颈部（图 22、24）。具尾脊（图 60） 4
4. 口脊具较短圆齿（图 48） **蜡小条实蝇属** (*Ceratitis McLeay*)
 – 口脊具尖锐长齿（与上不同） **果实蝇属** (*Bactrocera Macquart*)

4.4.2 几种具有重大经济重要性的按实蝇的三龄幼虫检索表

检索表改编自 Steck 等（1990）。几种按实蝇三龄幼虫的诊断形态特征见表 3。

地理分布和寄主仅引用作为有关种类同一起来源的补充信息。

1. 后气门显著突出于身体表面；或多数体节具明显的刚毛或突丛；或后气门裂弯曲。
 **非实蝇科**
 – 后气门与体表几乎等平；指状突若有，仅见于尾节；后气门裂长或椭圆形（图 49
 –50）（实蝇科） 2
2. 突出的几丁化口前齿（=气门板）邻近口腔口，或齿片明显（图 45、47）；以及/
 或尾部指状突充分发育；或采自番木瓜的幼虫尾脊缺如，且尾部感受器显著退化.....
 **实蝇科其他属**（非按实蝇属）
 – 口前齿（=气门板）缺如，齿片缺如或不明显（图 48）；尾部指状突最多中等程
 度发育..... (**按实蝇属**) 3
3. 至少 2 个或多个腹节具背刺，分散，圆锥形，在 T2 和 T3 胸节上少于 5–6 行
 （图 61）；后气门突丛 SP-I 和 SP-IV（图 46）平均有枝 6 条或更多，枝长为气门
 裂长度的 1/3 或更多（图 40、44） 4
 – 所有腹节背刺缺如，如有，仅见于 A1 腹节（墨西哥按实蝇的一些标本） 5
4. 前气门具指状突 28–37 个（图 43）；头咽骨如图 32 所示（主要寄主：幼虫取食
 葫芦科果实；分布：巴拿马至阿根廷） **南美瓜按实蝇**
 – 前气门具指状突 12–23 个（图 39）；头咽骨如图 31 所示。（主要寄主：幼虫取
 食桃金娘科果实；分布：美洲热带地区） **美洲番石榴中美按实蝇**
5. T3 胸节具背刺（图 61） 6
 – T3 胸节无背刺（与上不同） 7
6. 口脊 11–17 条，常具完整边缘；前气门具指状突 12–20 个（图 33、51）；后气
 门裂长度比宽度大 3.1–4.6 倍（图 34）。头咽骨如图 27 所示。（主要寄主：幼虫
 取食柑橘属（芸香科）果实；分布：美国南德克萨斯至巴拿马） **墨西哥按实蝇**
 – 口脊 8–11 条，具粗壮、钝圆、稀疏齿；前气门具指状突 9–15 个（图 41）；后

气门裂长度比宽度大 2.5—3.5 倍（图 42）。头咽骨如图 29 所示。（主要寄主：幼虫取食桃金娘科果实；分布：美国佛罗里达和安的列斯） **加勒比按实蝇**

7. 后气门突从 SP-I 和 SP-IV 有短主枝 5—11 条（平均 8 条）（图 36）；口脊通常 12—14 条；前气门具单行指状突 13—19 个（图 35）；肛叶通常为二裂片状（如图 57 所示）。头咽骨如图 30 所示。（主要寄主：幼虫取食山榄科果实；分布：美洲热带地区）……………**暗色山榄按实蝇**
 – 后气门突从 SP-I 和 SP-IV 有长主枝 8—18 条（平均 13 条）；口脊 7—10 条；前气门具单行指状突 9—18 个（如图 34 所示）；肛叶完整或二裂片状（图 57、58）……**8**
8. 后气门突从 SP-II 通常有主枝 3—6 条；后气门裂长度比宽度大 3.0—4.9 倍（图 38）。头咽骨如图 28 所示。（主要寄主：幼虫取食漆树科果实；分布：美洲热带地区，包括安的列斯）……………**西印度按实蝇**
 – 后气门突从 SP-II 通常有主枝 4—9 条；后气门裂长度比宽度大 2.5—4.0 倍（图 46）。（分布：美洲热带地区）……………**南美按实蝇复合种**

表 2. 本规程检索表所使用的按实蝇属诊断形态特征

生物阶段	结构	描述
幼虫	上颚	长度不足 0.3 mm；后部无明显颈部；端前齿缺如
	前气门	气门毛长于中气门裂的宽度
	下咽桥	狭窄，位于舌悬骨的中间部位
	口前齿和口齿	缺如
	口脊	常呈齿状
	气门感觉器官	变大
成虫	头部毛序	2—8 根额鬃和 1—2 根上眶鬃；单眼鬃非常纤细或不明显；单眼后鬃颜色单一
	中胸背板毛序	1 根肩鬃、2 根背侧片鬃、1 根沟前翅上鬃、1 根沟后翅上鬃，1 根翅后鬃、1 根翅内鬃、1 根背中鬃、1 根中鬃（很少缺如）及 2 根小盾鬃
	翅	翅脉： <i>M</i> 脉末端通常明显向前弯曲（所有有害种类尤其如此），不以 90° 角与前缘脉相交； <i>r-m</i> 横脉位于中室（ <i>dm</i> ）末端至中部之间；基肘室（ <i>bcu</i> ）具发育良好的后尖部扩展
		翅纹：基前缘区具 C 带；S 带（从基肘室端部穿过中室和 <i>r-m</i> 横脉）；V 带形成一个倒 V 形，包含沿 <i>dm-cu</i> 脉的近臂（ 端前横亚端带 ）和发自 <i>m</i> 室的端臂（ 后端横带 ），两者相汇于 <i>R</i> ₄₊₅ 室
	雄虫外生殖器	侧背针突短或延长；中背针突较侧背针突短，端部具 2 前叶；载肛突侧面和腹面轻微骨化；阳茎头轻微骨化，端部具 T 形骨片，非有害种类有时阳茎头缺如
雌虫外生殖器	产卵管基节管状，长度不确定；翻转膜顶端背侧具钩状骨片（亦称锉器）；产卵管 刺针突 充分骨化，长度不确定，末端边缘有时呈锯齿状	

表 3. 几种按实蝇三龄幼虫的诊断形态特征

种	结构	描述
南美按实蝇复合种	口脊	7—10 条
	前气门	单行指状突 9—18 个
	背刺	腹节无
		T3 胸节无
	后气门	SP-I 和 SP-IV 有长枝 10—17 条；SP-II 通常有枝 6—9 条，气门裂长度比宽度大 2.5—3.5 倍
肛叶	一些种群完整，其他二裂片状	
南美瓜按实蝇	口脊	8—13 条
	前气门	指状突 28—37 个
	背刺	2 或多个腹节有
		T2 和 T3 胸节有
	后气门	SP-I 和 SP-IV 有枝 6 或更多条，枝长为气门裂长度的 1/3
肛叶	二裂片状	
墨西哥按实蝇	口脊	11—17 条，边缘完整
	前气门	指状突 12—20 个
	背刺	A1 腹节有
		T3 胸节有
	后气门	气门裂长度比宽度大 3.1—4.6 倍
肛叶	二裂片状	
西印度按实蝇	口脊	7—10 条
	前气门	单行指状突 9—18 个
	背刺	腹节无
		T3 胸节无
	后气门	SP-I 和 SP-IV 有长枝 10—17 条，SP-II 通常有枝 3—6 条；气门裂长度比宽度大 3—4.5 倍
肛叶	完整	
山榄按暗色实蝇	口脊	12—18 条
	前气门	单行指状突 13—19 个
	背刺	腹节无
		T3 胸节无
	后气门	SP-I 和 SP-IV 有短枝 6—9 条
肛叶	通常二裂片状（很少完整）	

种	结构	描述
中美美洲番 石榴按实蝇	口脊	5—8 条
	前气门	指状突 12—23 个
	背刺	2 或多个腹节有； T2 和 T3 胸节有
	后气门	SP-I 和 SP-IV 有枝 6 条以上， 枝长为气门裂长度的 1/3 或更多
	肛叶	完整或部分二裂片状
加勒比 按实蝇	口脊	8—11 条； 边缘具粗壮、 钝圆、 稀疏齿
	前气门	指状突 9—15 个
	背刺	腹节无
		T3 胸节有
	后气门	气门裂长度比宽度大 2.5—3.5 倍
肛叶	—	

表 4. 几种按实蝇成虫的诊断形态特征

种	结构	描述
南美 按实蝇 复合种	头部毛序	具后上眶鬃
	胸部	中背片和后小盾片边缘具褐色宽斑纹；盾间缝中间部位常具褐色斑点
	翅	S 带端臂正常发育，从不伸至 M 脉端；V 带与 S 带前端连结或不连结
	雌虫 外生殖器	产卵管刺针突长 1.4—1.9 mm；产卵管刺针突端梢部长 0.20—0.28 mm；边缘具齿 8—14 个，占末端 2/5—3/5
南美 瓜按实蝇	头部毛序	后上眶鬃常缺如
	胸部	盾片具深褐色背中条纹
	翅	C 带沿前缘脉不中断；S 带基半部（中室上）连续，从基肘室（bcu）端部穿过 R-M 横脉，连结上部 C 带； r_{2+3} 室全长有颜色； R_{2+3} 脉近平直；br 室在 bm-cu 和 r-m 脉间近乎透明
	雌虫 外生殖器	产卵管刺针突特别长（5.3—6.2 mm），宽度通常大于 0.10 mm；产卵管刺针突端梢部具 V 形脊，边缘不呈锯齿状
墨西哥 按实蝇	头部毛序	具后上眶鬃
	胸部	后小盾片边缘总有褐色斑纹，有时伸至中背片
	翅	V 带通常不与 S 带连结，前端两臂分离
	雌虫 外生殖器	产卵管刺针突通常长 3.3—5.8 mm；产卵管刺针突端梢部长 0.28—0.42 mm，宽 0.12—0.14 mm，近中部中等缢缩；边缘不呈锯齿状，或 0.55 或更短边缘具小锯齿
西印度 按实蝇	头部毛序	具后上眶鬃
	胸部	后小盾片全部黄色，只有中背片边缘具褐色斑纹，盾间缝中间部位无褐色斑点
	翅	S 带端臂正常发育，从不伸至 M 脉端部；V 带通常在前端与 S 带连结
	雌虫 外生殖器	产卵管刺针突不足 2.0 mm 长；产卵管刺针突端梢部 0.16—0.20 mm 长，末端 2/3—4/5 边缘有锯齿
山榄按暗色 实蝇	头部毛序	具后上眶鬃
	胸	胸部主要为褐色或红棕色，与黄色斑纹形成对比；盾片主要为褐色，具 3 条黄色条带
	翅	翅纹主要为深褐色；V 带端臂完全缺如
	雌虫 外生殖器	产卵管刺针突长 2.6—3.8 mm；产卵管刺针突端梢部长 0.37—0.46 mm，宽 0.14—0.17 mm，末端 0.5—0.7 边缘呈小锯齿状
中美洲番仔 榴按实蝇	头部毛序	具后上眶鬃
	胸	盾片具两条宽背中条纹，在后缘连结形成 U 形斑纹，沿横缝的小区域内无小刚毛
	翅	翅纹主要为橙色和褐色；V 带端臂有或缺如
	雌虫 外生殖器	产卵管刺针突长 1.95—2.30 mm；产卵管刺针突端梢部宽，长 0.24—0.31 mm，宽 0.17—0.20 mm
加勒比 按实蝇	头部毛序	具后上眶鬃
	胸	盾间缝中部具圆形褐色斑点；中背片全部黄色或边缘具褐色斑纹
	翅	端前带（=S 带端部）特别宽，伸至 M 脉端；V 带宽且完整，具前端宽广连结的双臂
	雌虫 外生殖器	产卵管刺针突长 1.4—1.6 mm；产卵管刺针突端梢部长 0.19—0.23 mm，宽 0.10—0.13 mm，末端 0.50—0.65 边缘呈锯齿状

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负面影响的情况下，记录和证据（特别是酌情保存或玻片封装的标本，以及特异性分类结构的照片）应保存在一家博物馆或其他永久收藏库中。

6. 获取进一步信息的联系点

有关本诊断规程的进一步信息可获自：

Instituto de Ecología A.C., Red de Interacciones Multitróficas, Xalapa, Veracruz, México（Vicente Hernández-Ortiz; 电子邮件：vicente.hernandez@inecol.mx）。

美国农业部（USDA）系统昆虫学实验室，美国华盛顿 DC（Allen L. Norrbom; 电子邮件：anorrbom@sel.barc.usda.gov）。

Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz（ESALQ）/Universidade de São Paulo（USP）– Departmaneto de Entomologia, Piracicaba, Brazil（Roberto A. Zucchi; 电子邮件：razucchi@usp.br）。

Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación, Instituto de Entomología, Santiago, Chile（Daniel Frías; 电子邮件：daniel.frias@umce.cl）。

佛罗里达农业与消费者服务部植物产业处，美国佛罗里达州 Gainesville（Gary Steck; 电子邮件：gary.steck@freshfromflorida.com）。

Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía, Buenos Aires, Argentina（Alicia Basso; 电子邮件：bassoalicia@yahoo.com）。

美国农业部动植物检疫局（APHIS）Mission 实验室，美国德克萨斯州，（Norman B. Barr; 电子邮件：Norman.B.Barr@aphis.usda.gov）。

Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Dirección General de Servicios Agrícolas, Departamento Laboratorios Biológicos, Montevideo, Uruguay（Andrea Listre; 电子邮件：allbme@gmail.com）。

国家植物保护机构（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）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 V. Hernández-Ortiz（墨西哥 Instituto de Ecología A.C., Red de Interacciones Multitróficas（见前节））和 N. Vaccaro（阿根廷 Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Concordia），以及 A. Basso（阿根廷 Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía（见前节））共同起草。

另外，以下专家深度参与了本规程的制订：

- A.L. Norrbom (美国农业部 (USDA) 系统昆虫学实验室, Smithsonian Institution (见前节))
- R.A. Zucchi (巴西 Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de Sao Paulo (见前节))
- D. Frías (智利 Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación (见前节))
- N.B. Barr (美国农业部动植物检疫局 (APHIS) (见前节))
- G. Steck (美国佛罗里达农业与消费者服务部植物产业处 (见前节))
- A.L. Terra (乌拉圭 Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Dirección General de Servicios Agrícolas)
- A. Listre (乌拉圭 Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Dirección General de Servicios Agrícolas)
- O. Volonterio (乌拉圭 Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Dirección General de Servicios Agrícolas)
- M. Malipatil (澳大利亚环境与初级产业部生物科学研究处生物保护组 (维多利亚), La Trobe 大学)
- V. Balmès (法国 Anses, Laboratoire de la santé des végétaux, Unité entomologie et plantes invasives)。

8. 参考文献

本标准同时引用了其他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>。

- Aluja, M., Piñero, J., Jácome, I., Díaz-Fleischer, F. & Sivinski, J.** 1999. Behavior of flies in the genus *Anastrepha* (Trypetinae: Toxotrypanini). In M. Aluja & A.L. Norrbom, eds. *Fruit flies (Tephritidae): Phylogeny and evolution of behavior*, pp. 375–406. Boca Raton, FL, CRC Press.
- Basso, A.L.** 2003. Caracterización genética de los componentes del “complejo *Anastrepha fraterculus*” (*Anastrepha* spp. Diptera: Tephritidae, Trypetinae) (Wiedemann) mediante análisis de la variabilidad cromosómica. University of Buenos Aires, Buenos Aires. (PhD Dissertation)
- Berg, G.H.** 1979. *Clave ilustrada de larvas de moscas de la fruta de la familia Tephritidae*. El Salvador, Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria. 36 pp.

- Cáceres, C., Segura, D.F., Vera, M.T., Wornoyaporn, V., Cladera, J.L., Teal, P., Sapountzis, P., Bourtzis, P., Zacharopoulou, A. & Robinson, A.S.** 2009. Incipient speciation revealed in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) by studies on mating compatibility, sex pheromones, hybridization, and cytology. *Biological Journal of the Linnean Society*, 97: 152–165.
- Carroll, L.E., Norrbom, A.L., Dallwitz, M.J. & Thompson, F.C.** 2004. *Pest fruit flies of the world: Larvae*. Version: 8 December 2006. Available at <http://delta-intkey.com/ffl/> (last accessed 18 March 2015).
- Carroll, L.E. & Wharton, R.A.** 1989. Morphology of the immature stages of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 82: 201–214.
- Dutra, V.S., Ronchi-Teles, B., Steck, G.J. & Gomes Silva, J.** 2011a. Description of eggs of *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in the *spatulata* group using scanning electron microscopy. *Annals of the Entomological Society of America*, 104(5): 857–862.
- Dutra, V.S., Ronchi-Teles, B., Steck, G.J. & Gomes Silva, J.** 2011b. Egg morphology of *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in the *fraterculus* group using scanning electron microscopy. *Annals of the Entomological Society of America*, 104(1): 16–24.
- Dutra, V.S., Ronchi-Teles, B., Steck, G.J. & Gomes Silva, J.** 2012. Description of larvae of *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in the *fraterculus* group. *Annals of the Entomological Society of America*, 105(4): 529–538.
- Dutra, V.S., Ronchi-Teles, B., Steck, G.J. & Gomes Silva, J.** 2013. Description of eggs of *Anastrepha curitis* and *Anastrepha leptozona* (Diptera: Tephritidae) using SEM. *Annals of the Entomological Society of America*, 106(1): 13–17.
- Figueiredo, J.V.A., Perondini, A.L.P., Ruggiro, E.M., Prezotto, L.F. & Selivon, D.** 2011. External egg-shell morphology of *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Acta Zoologica (Stockholm)*, doi: 10.1111/j.1463-6395.2011.00533.x.
- Foote, R.H., Blanc, F.L. & Norrbom, A.L.** 1993. *Handbook of the fruit flies (Diptera: Tephritidae) of America North of Mexico*. Ithaca, NY, Comstock Publishing Associates, Cornell University Press. 571 pp.
- Frías, D., Hernández-Ortiz, V. & López Muñoz, L.** 2009. Description of the third-instar of *Anastrepha leptozona* Hendel (Diptera: Tephritidae). *Neotropical Entomology*, 38(4): 491–496.
- Frías, D., Hernández-Ortiz, V., Vaccaro, N., Bartolucci, A. & Salles, L.** 2006. Comparative morphology of immature stages in some frugivorous species of fruit flies (Diptera: Tephritidae). In A. Freidberg, ed. *Biotaxonomy of the Tephritoidea*, *Israel Journal of Entomology*, 35–36: 423–457.

- Frias, D., Selivon, D. & Hernández-Ortiz, V.** 2008. Taxonomy of immature stages: New morphological characters for Tephritidae larvae identification. In A. Malavasi, R. Sugayama, R. Zucchi & J. Sivinski, eds. *Fruit flies of economic importance: From basic to applied knowledge*. Proceedings of the International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, Salvador, Brazil, 10–15 September 2006, pp. 29–44.
- Hernández-Ortiz, V.** 1992. *El género Anastrepha Schiner en México*. Taxonomía, distribución y sus plantas huéspedes. Publicación #33. Xalapa, México, Instituto de Ecología. 167 pp.
- Hernández-Ortiz, V. & Aluja, M.** 1993. Listado de especies del género neotropical *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) con notas sobre su distribución y plantas hospederas. *Folia Entomológica Mexicana*, 88: 89–105.
- Hernández-Ortiz, V., Bartolucci A.F., Morales-Valles, P., Frías, D. & Selivon, D.** 2012. Cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex: A multivariate approach for the recognition of South American morphotypes. *Annals of the Entomological Society of America*, 105(2): 305–318.
- Hernández-Ortiz, V., Gómez-Anaya, J.A., Sánchez, A., McPheron, B.A. & Aluja, M.** 2004. Morphometric analysis of Mexican and South American populations of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae) and recognition of a distinct Mexican morphotype. *Bulletin of Entomological Research*, 94: 487–499.
- Hernández-Ortiz, V., Guillén-Aguilar, J. & López, L.** 2010. Taxonomía e identificación de moscas de la fruta de Importancia Económica en América. In P. Montoya, J. Toledo & E. Hernández, eds. *Moscas de la Fruta: Fundamentos y Procedimientos para su Manejo*, pp. 49–80. México, D.F., S y G Editores.
- Lopes, G.N., Arias, O.R., Cônsoli, F.L. & Zucchi, R.A.** 2013. The identity of specimens of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae) with atypical aculeus tip. *Neotropical Entomology*, 42(6): 618–627.
- Malavasi, A., Morgante, J.S. & Prokopy, R.J.** 1983. Distribution and activities of *Anastrepha fraterculus* (Diptera:Tephritidae) flies on host and non-host trees. *Annals of the Entomological Society of America*, 76: 286–292.
- Meier, R., Shiyang, K., Vaidya, G., & Ng, P.K.** 2006. DNA barcoding and taxonomy in Diptera: A tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology*, 55(5): 715–728.
- Norrbom, A.L.** 2004a. Host plant database for *Anastrepha* and *Toxotrypana* (Diptera: Tephritidae: Toxotrypanini). *Diptera Data Dissemination Disk* (CD-ROM) 2.
- Norrbom, A.L.** 2004b. Updates to biosystematic database of world Diptera for Tephritidae through 1999. *Diptera Data Dissemination Disk* (CD-ROM) 2.
- Norrbom, A.L.** 2010. Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) Taxonomy Pages. Beltsville, MD, Systematic Entomology Laboratory, Agricultural Research Service (ARS), United States Department of Agriculture (USDA). Available at <http://www.sel.barc.usda.gov/diptera/tephriti/tephriti.htm> (last accessed 18 October 2010).

- Norrbom, A.L., Carroll, L.E. & Freidberg, A.** 1999a. Status of knowledge. In F.C. Thompson, ed. *Fruit fly expert identification system and systematic information database*, pp. 9–47. *Myia* (1998) 9, vii + 524 pp. and *Diptera Data Dissemination Disk* (CD-ROM) (1998) 1.
- Norrbom, A.L., Carroll, L.E., Thompson, F.C., White, I.M. & Freidberg, A.** 1999b. Systematic database of names. In F.C. Thompson, ed. *Fruit fly expert identification system and systematic information database*, pp. 65–251. *Myia* (1998) 9, vii + 524 pp. and *Diptera Data Dissemination Disk* (CD-ROM) (1998) 1.
- Norrbom, A.L. & Kim, K.C.** 1988. A list of the reported host plants of the species of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). *United States Department of Agriculture, APHIS* 81–52, 114 pp.
- Norrbom, A.L., Korytkowski, C.A., Zucchi, R.A., Uramoto, K., Venable, G.L., McCormick, J. & Dallwitz, M.J.** 2012. *Anastrepha* and *Toxotrypana*: Descriptions, illustrations, and interactive keys. Version: 31 August 2012. Available at <http://delta-intkey.com> (last accessed 18 March 2015).
- Norrbom, A.L., Zucchi, R.A. & Hernández-Ortiz, V.** 1999c. Phylogeny of the genera *Anastrepha* and *Toxotrypana* (Trypetinae: Toxotrypanini) based on morphology. In M. Aluja & A.L. Norrbom, eds. *Fruit flies (Tephritidae): Phylogeny and evolution of behavior*, pp. 299–342. Boca Raton, FL, CRC Press.
- Prokopy, R.J. & Roitberg, B.D.** 1984. Foraging behavior of true fruit flies. *American Scientist*, 72: 41–49.
- Selivon, D., Perondini, A.L.P., Morgante, J.S.** 2005. A genetic-morphological characterization of two cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 98: 367–381.
- Selivon, D., Vretos, C., Fontes, L. & Perondini, A.L.P.** 2004. New variant forms in the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae). In B.N. Barnes, ed. *Proceedings of the 6th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance*, Stellenbosch, South Africa, 2004, pp. 253–258. Stellenbosch, South Africa, Istege Scientific Publications.
- Sonvico, A., Benseñor, L., Basso, A. & Quesada-Allué, L.A.** 2004. *Anastrepha fraterculus* internal transcribed spacer 1, complete sequence. GenBank accession number AY686689.
- Steck, G.J., Carroll, L.E., Celedonio-Hurtado, H. & Guillén-Aguilar, J.** 1990. Methods for identification of *Anastrepha* larvae (Diptera: Tephritidae), and key to 13 species. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 92: 333–346.
- Steck, G.J. & Wharton, R.A.** 1988. Description of immature stages of *Anastrepha interrupta*, *A. limae*, and *A. grandis* (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 81: 994–1003.

- Stone, A.** 1942. *The fruit flies of the genus Anastrepha*. United States Department of Agriculture (USDA) Miscellaneous Publication 439. Washington DC, USDA. pp. 1–112. 2012. Available at <http://www.sel.barc.usda.gov/diptera/tephriti/tephriti.htm>.
- Vera, M.T., Cáceres, C., Wornoyaporn, V., Islam, A., Robinson, A.S., De La Vega, M.H., Hendrichs, J. & Cayol, J.P.** 2006. Mating incompatibility among populations of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 99: 387–397.
- Virgilio, M., Backeljau, T., Nevado, B., & De Meyer, M.** 2010. Comparative performances of DNA barcoding across insect orders. *BMC Bioinformatics*, 11(1): 206.
- White, I.M. & Elson-Harris, M.M.** 1992. *Fruit flies of economic significance: Their identification and bionomics*. Wallingford, UK, CABI. 601 pp.
- Will, K.W., Mishler, B.D. & Wheeler, Q.D.** 2005. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology*, 54: 844–851.
- Zucchi, R.A.** 2000. Taxonomia. In A. Malavasi & R.A. Zucchi, eds. *Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil. Conhecimento básico e aplicado*, pp. 13–24. Riberão Preto, Brasil, Holos Editora.

9. 图



图 1. 墨西哥按实蝇 (*Anastrepha ludens*) 雌成虫一般体型背面观。
照片由 V. Hernández-Ortiz 提供。

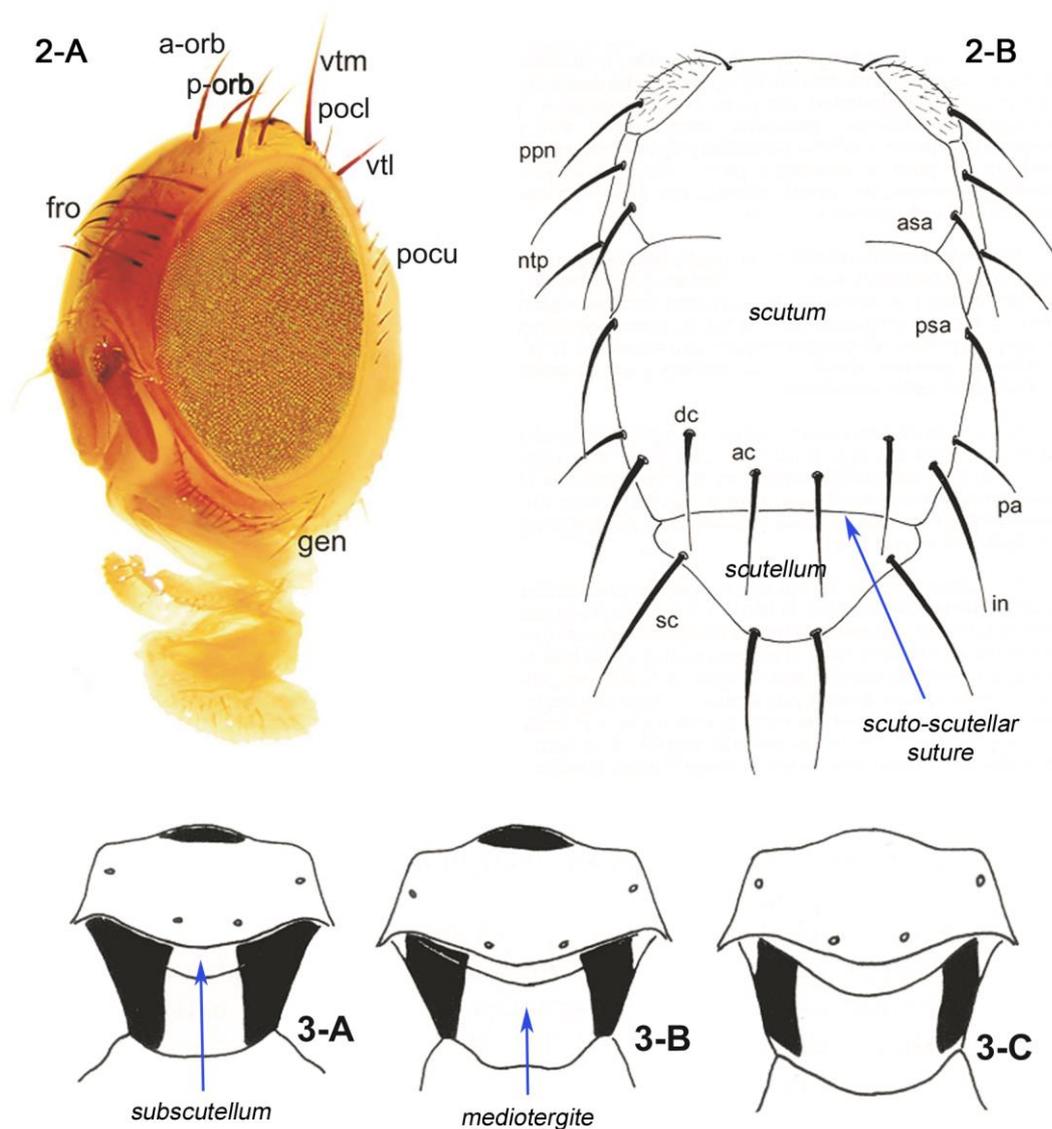


图 2 - 3. (2-A) 按实蝇头部形态，前侧面观：a-orb，前上眶鬃；fro，额鬃；gen，颊；pocl，单眼后鬃；pocu，眼后鬃；p-orb，后上眶鬃；vtl，侧顶鬃；vtm，中顶鬃。(2-B) 胸部背面观与毛序：Ac，中鬃；asa，沟前翅上鬃；dc，背中鬃；in，翅内鬃；ntp，背侧片鬃；pa，翅后鬃；ppn，肩鬃；psa，沟后翅上鬃；sc，小盾鬃。(3) 中背片与后小盾片，后背面观：(3-A) 南美按实蝇；(3-B) 墨西哥按实蝇及(3-C) 西印度按实蝇
来源：图 1 (A) 仿自 *Hernández-Ortiz* 等 (2010)；图 2 和 3 仿自 *Hernández-Ortiz* (1992)。

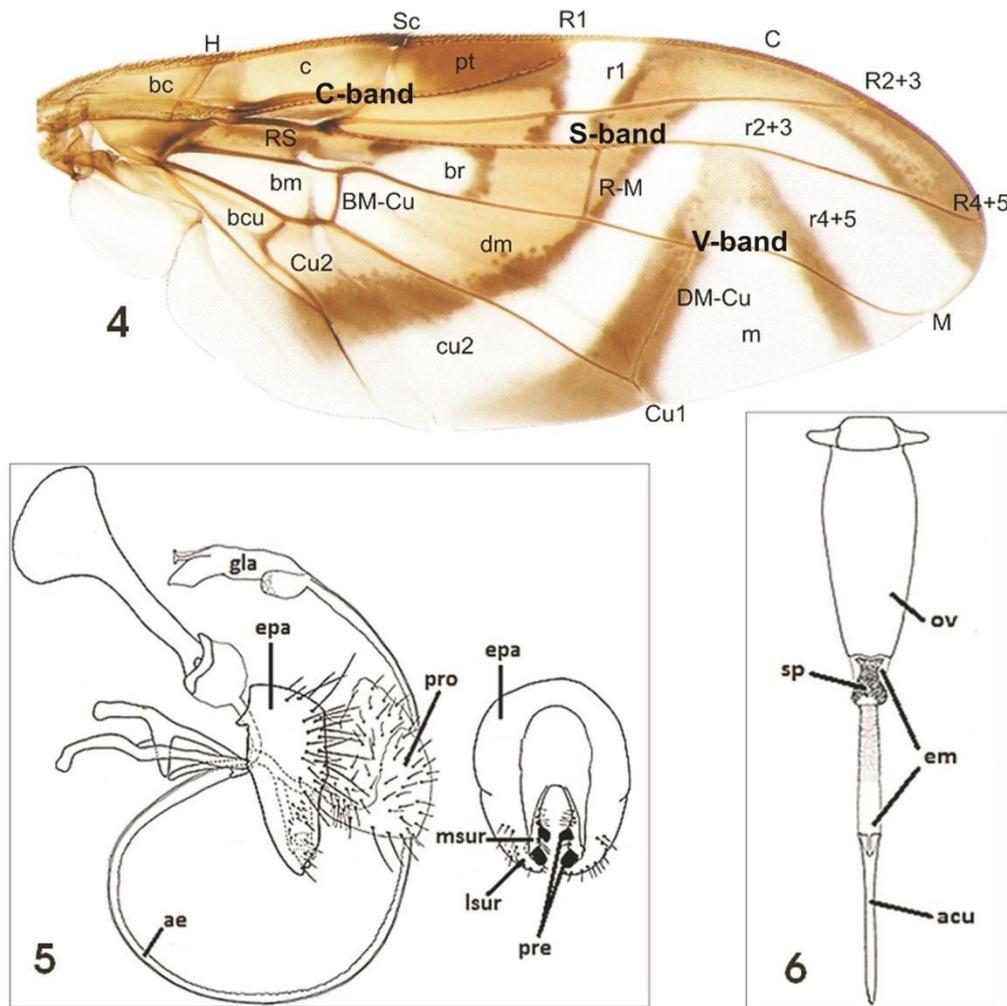


图 4 - 6. (4) 按实蝇翅纹及其翅脉与翅室命名 (背面观)。(5) 按实蝇雄虫尾器: *ae*, 阳茎; *epa*, 第九背板; *gla*, 阳茎头; *lsur*, 侧背针突; *msur*, 中背针突; *pre*, 前叶; *pro*, 载肛突。(6) 按实蝇雌虫尾器: *acu*, 产卵管刺针突; *em*, 翻转膜; *ov*, 产卵管基节; *sp*, 骨片 (锉器)

来源: 图 4 仿自 *Hernández-Ortiz* 等 (2010); 图 5 和 6 仿自 *Norrbom* 等 (2012)。

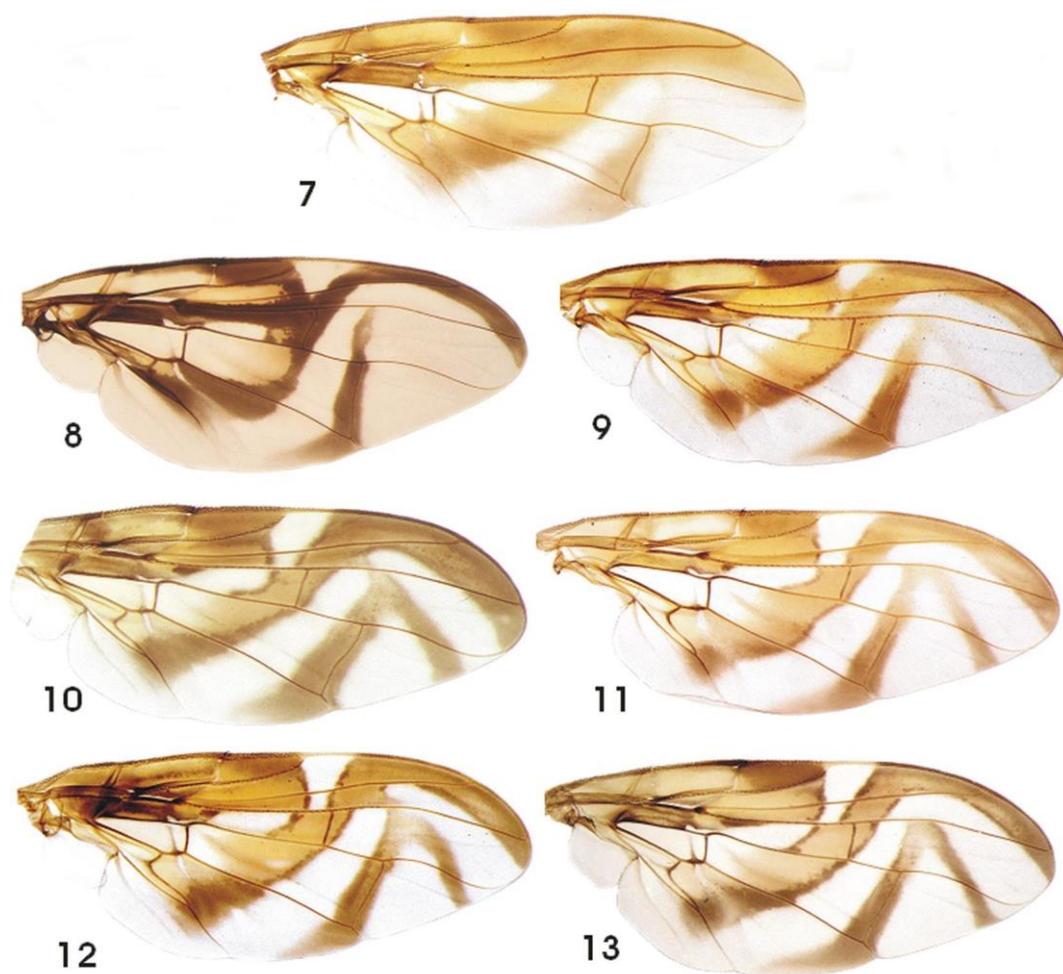


图 7 - 13. 按实蝇翅纹：(7) 南美瓜按实蝇；(8) 暗色山榄按实蝇；(9) 美洲番石榴中美按实蝇；(10) 加勒比按实蝇；(11) 墨西哥按实蝇；(12) 西印度按实蝇及(13) 南美按实蝇（巴西）
来源：所有图仿自 *Hernández-Ortiz* 等 (2010)。

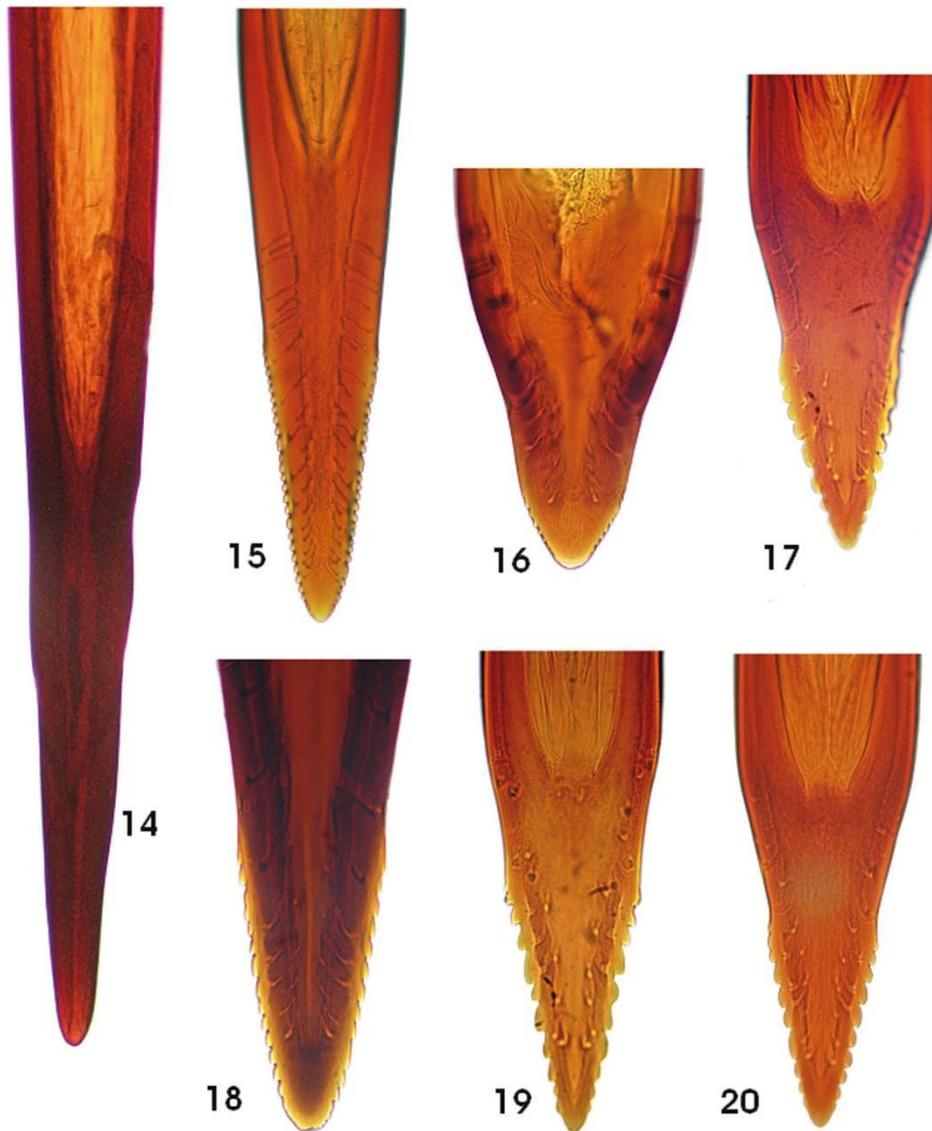


图 14 - 20. 几种具有重大经济重要性的按实蝇的产卵管刺针突端梢部形态：(14) 南美瓜按实蝇；(15) 暗色山榄按实蝇；(16) 美洲番石榴中美按实蝇；(17) 加勒比按实蝇；(18) 墨西哥按实蝇；(19) 西印度按实蝇及(20) 南美按实蝇（巴西）

来源：所有图仿自 *Hernández-Ortiz* 等（2010）。

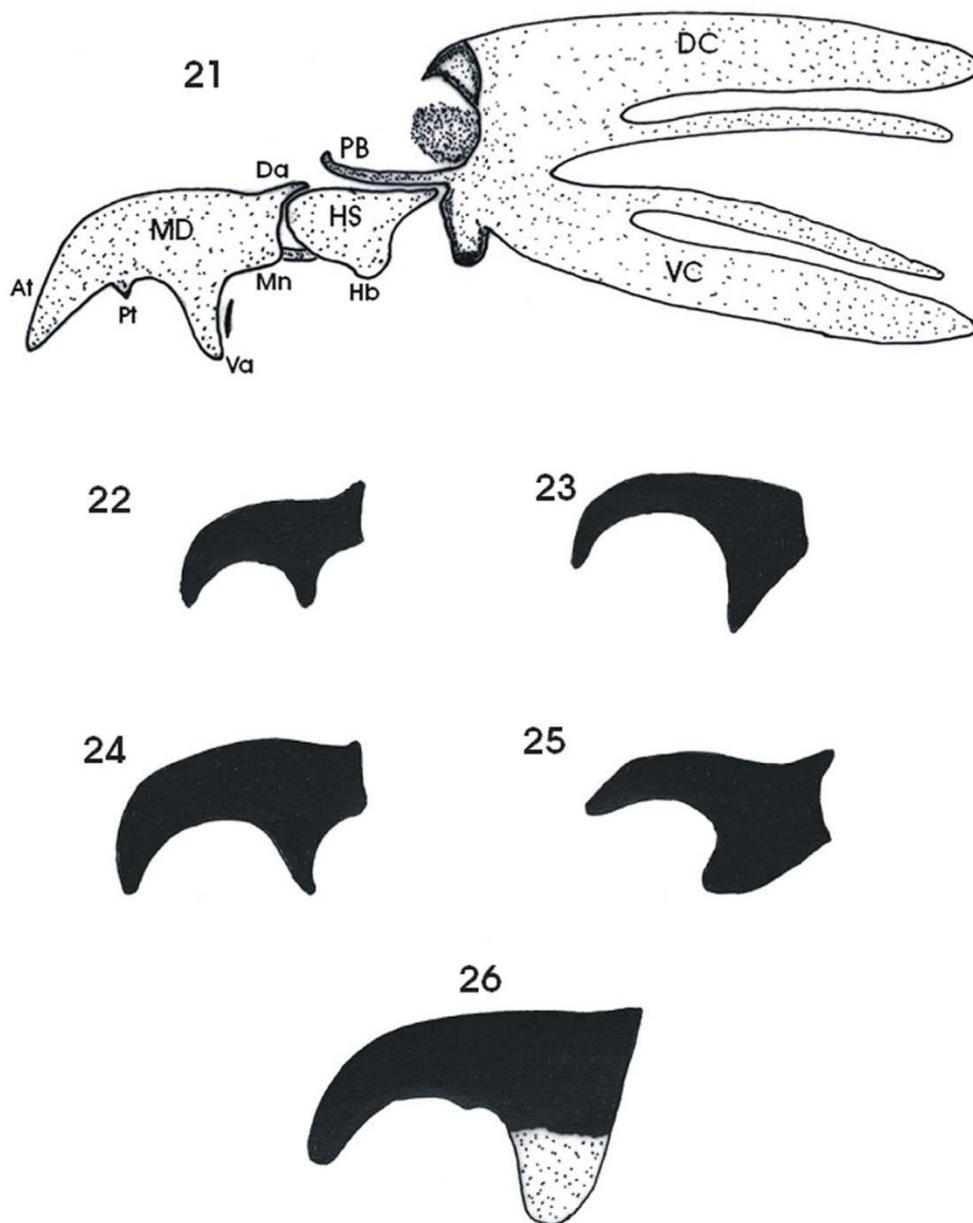


图 21 - 26. (21) 三龄幼虫头咽骨形态。三龄幼虫上颚口钩，侧面观：(22) 地中海实蝇 (*Ceratitidis capitata*)；(23) 西印度按实蝇；(24) 橘小实蝇 (*Bactrocera dorsalis*)；(25) 番茄绕实蝇 (*Rhagoletis tomatidis*) 及(26) 驿长尾实蝇属。At, 端齿；DC, 背角；DS, 齿片；Hb, 下咽桥；HS, 舌悬骨；MD, 上颚；Mn, 颚颈；PB, 侧口骨；Pt, 端前齿；Va, 腹内突；VC, 腹角

来源：所有图仿自 Frías 等 (2006)。

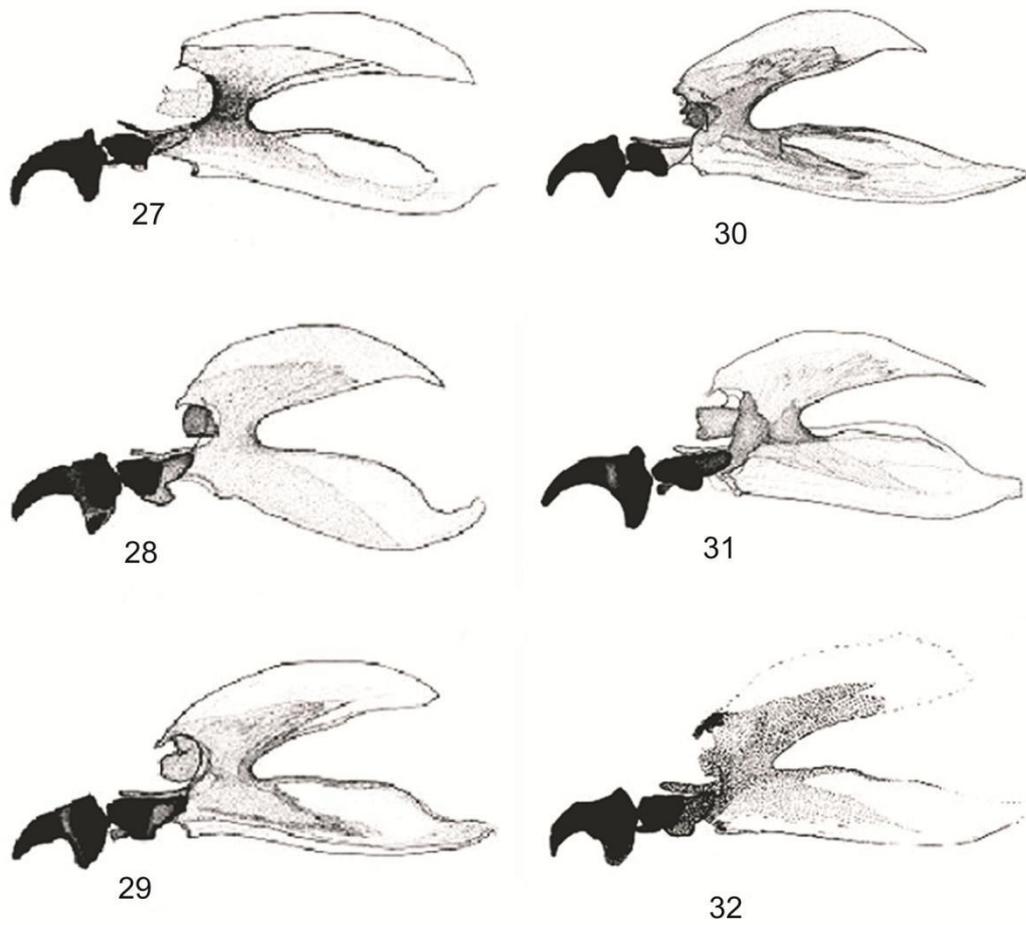


图 27 - 32. 几种按实蝇三龄幼虫头咽骨：(27) 墨西哥按实蝇；(28) 西印度按实蝇；(29) 加勒比按实蝇；(30) **暗色山榄按实蝇**；(31) **美洲番石榴中美按实蝇**及(32) **南美瓜按实蝇**
来源：所有图仿自 Carrol 等 (2004)。

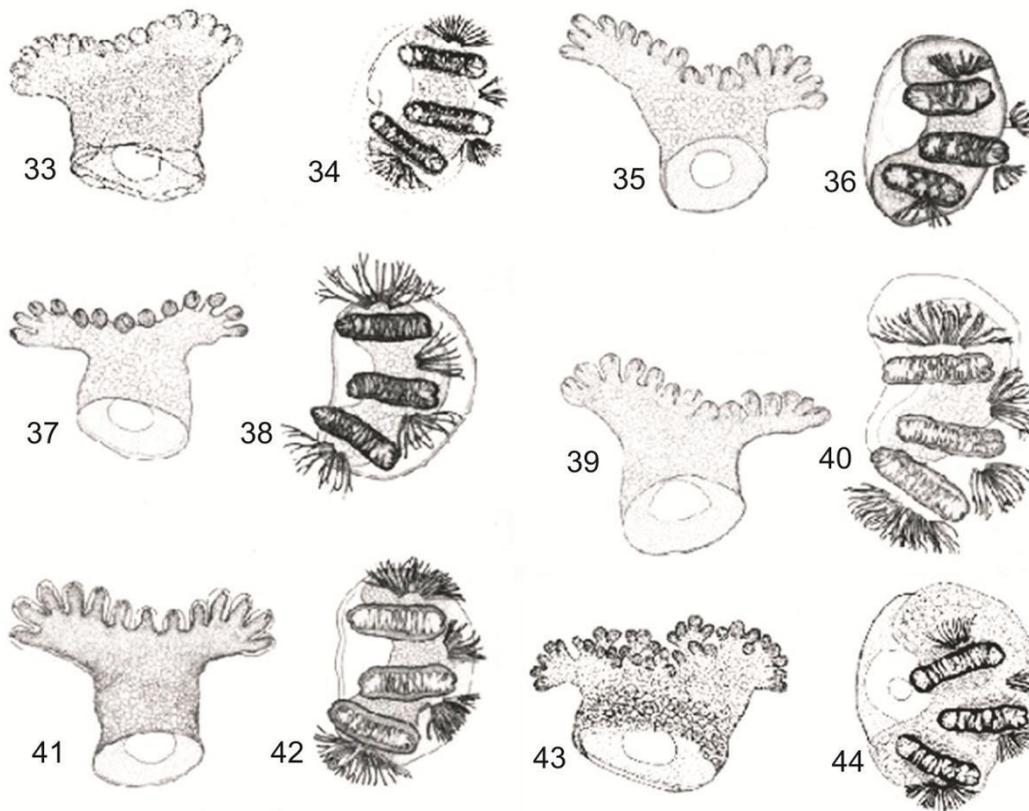


图 33 - 34. 几种按实蝇三龄幼虫前、后气门：(33、34) 墨西哥按实蝇；(35、36) **暗色山榄按实蝇**；(37、38) 西印度

按实蝇；(39、40) **美洲番石榴中美按实蝇**；(41、42) 加勒比按实蝇及(43、44) **南美瓜按实蝇**

来源：所有图仿自 Carroll 等 (2004)。

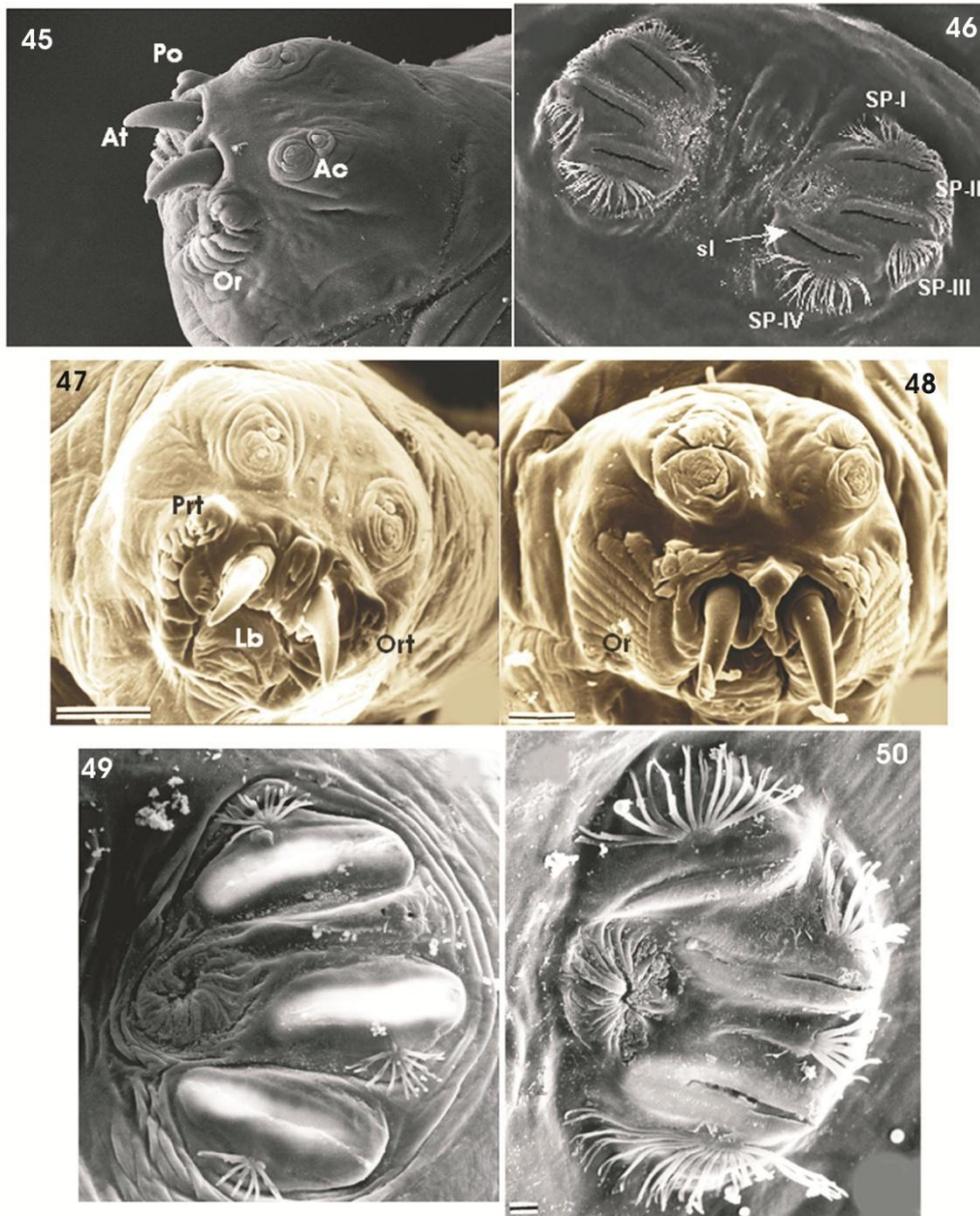


图 45 - 50. (45、47、48) 三龄幼虫头节；(46, 49, 50) 尾节气门板；(45) 绕实蝇属；(46) 南美按实蝇；(47) *Rhagoletis brncici*；(48) 地中海实蝇；(49) 驮长尾实蝇属；(50) 西印度按实蝇。Ac, 触角下颚复合体；At, 端齿；Lb, 下唇；Or, 口脊；Ort, 口齿；Prt, 口前齿；Po, 口前器官；Prt, 口前齿；sl, 气门裂。气门突丛 (=气门毛)：背 SP-I, 中 SP-II 和 SP-III, 后 SP-IV

来源：图 45 和 47 - 50 仿自 Frías 等 (2006)；图 46 仿自 Hernández-Ortiz 等 (2010)。

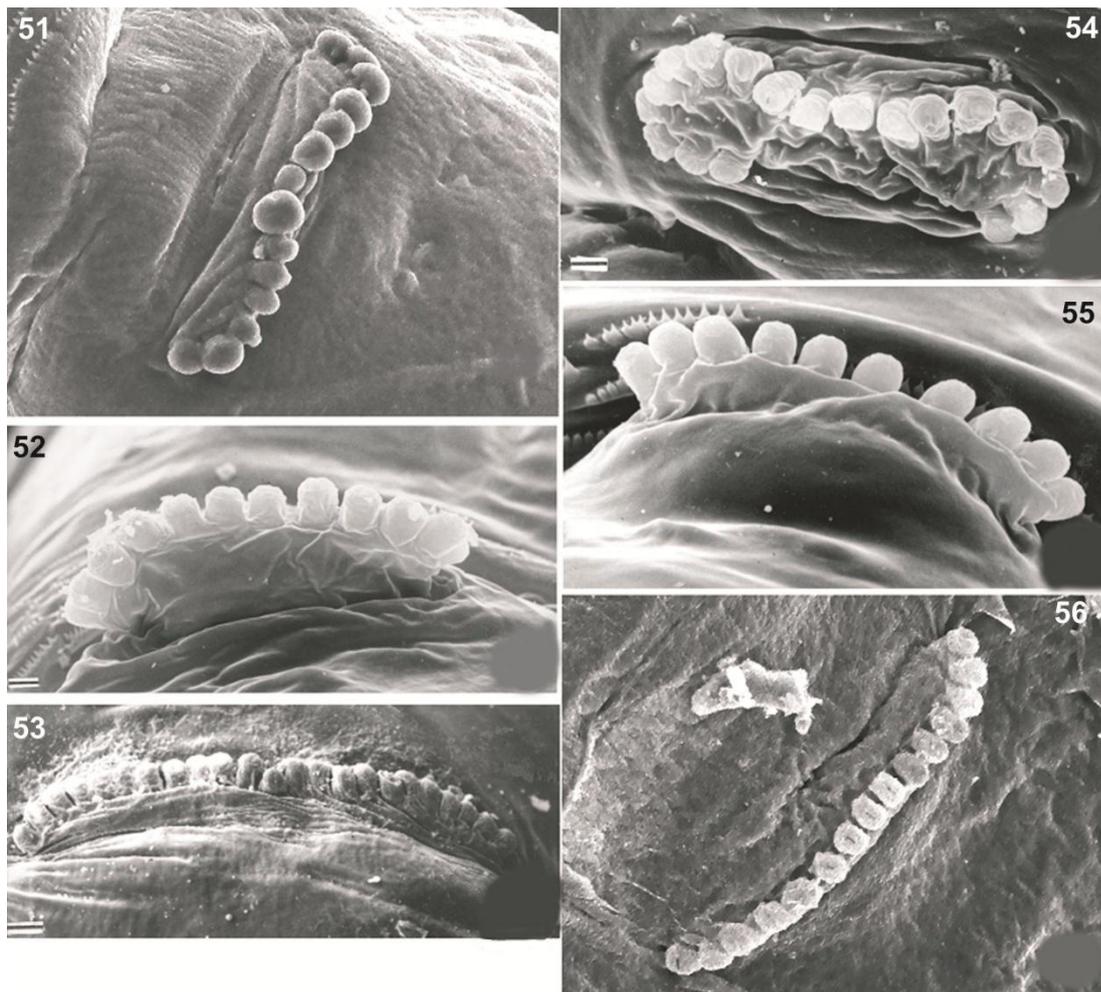


图 51 - 56. 第 1 胸节前气门，三龄幼虫：(51) 墨西哥按实蝇；(52) 南美按实蝇；(53) 番木瓜长尾实蝇 (*Toxotrypana curvicauda*)；(54) 茄绕实蝇 (*Rhagoletis conversa*)；(55) 地中海实蝇及 (56) 瓜实蝇 (*Bactrocera cucurbitae*)

来源：图 52 - 55 仿自 Frías 等 (2006)；图 51 和 56 仿自 Hernández-Ortiz 等 (2010)。

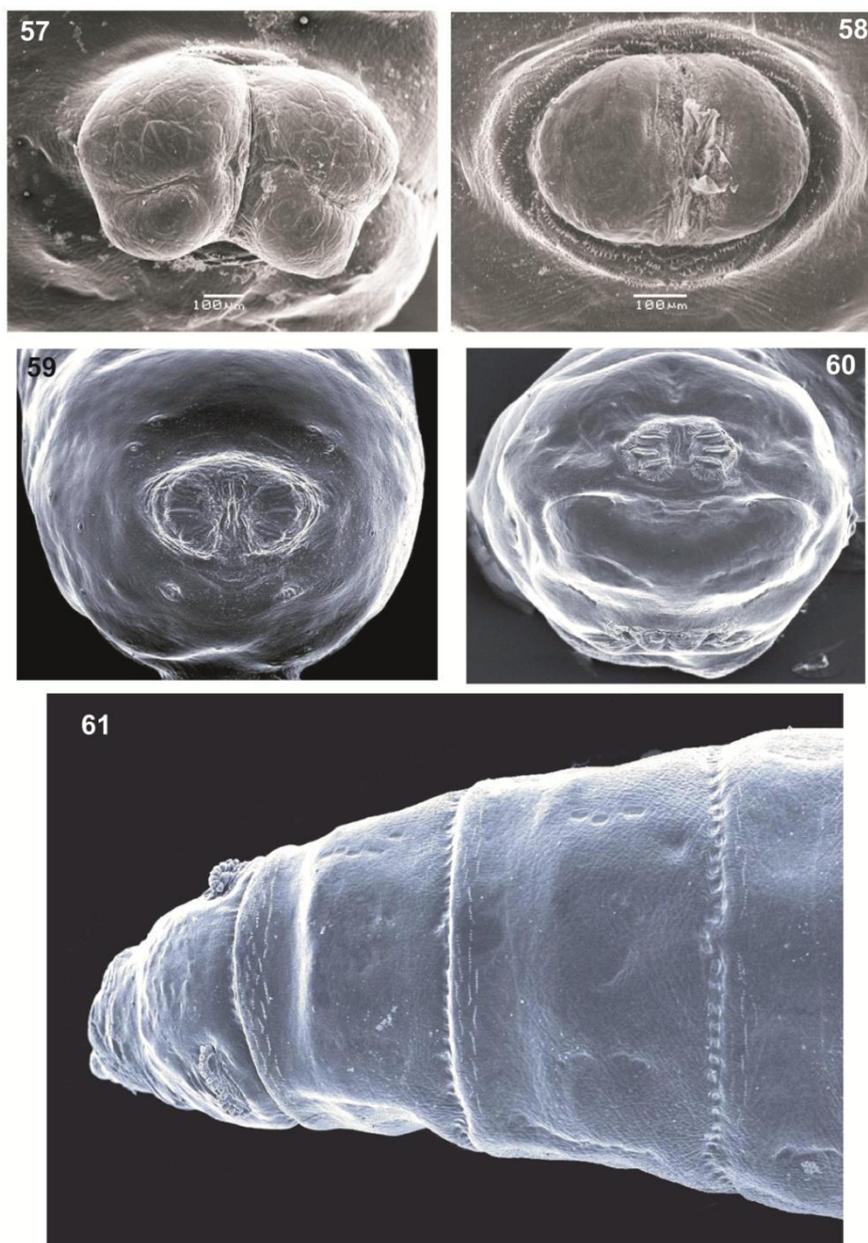


图 57 - 61. (57) 肛叶，二裂片状，美洲番石榴按实蝇；(58) 肛叶完整，西印度按实蝇；(59) 尾脊缺如，加勒比按实蝇；(60) 具尾脊，杨桃实蝇 (*Bactrocera carambolae*)；(61) 美洲番石榴中美按实蝇，三龄幼虫背面观，显示数行背刺

显微照片由 G. Steck 提供。

出台背景

这部分不属于本标准的正式内容

2004 年 3 月，植检委第一届会议（2006）在工作计划中增列了主题（按实蝇属，2004-015）

2008 年 6 月，初稿提交诊断规程技术小组（会议）

2013 年 4 月，专家咨询

2013 年 6 月，草案提交诊断规程技术小组（会议）

2014 年 5 月，标准委批准提交成员磋商
(2014_eSC_May_12)

2014 年 7 月，成员磋商

2015 年 3 月，诊断规程技术小组批准提交标准委审议通过（2015_eTPDP_Apr_02）
2015 年 6 月，标准委批准进入诊断规程通报期（2015_eSC_Nov_05）

2015 年 8 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 9. 按实蝇属（2015）。罗马，国际植物保护公约，粮农组织。

出台背景最后更新：2015 年 9 月