

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 ; 2017 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	16
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	20
4.2.8	鳞球茎线虫的 5.8S rDNA 和 ITS 特异性 PCR 检测	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	22
4.2.11	常规 PCR 结果的解释	22
5.	记录	22
6.	获取进一步信息的联系点	22
7.	致谢	24
8.	参考文献	24
9.	图	30

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 (*Verticillium*) 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, 几乎专门有害植物的地下部分 (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侵染块茎时才能存活。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。

其他常见寄主有甘薯 (*Ipomoea batatas*)、球根鸢尾 (选自西班牙鸢尾 (*Iris xiphium*) 和英国鸢尾 (*Iris xiphioides*) 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)。

鳞球茎线虫

鳞球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*）。

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 鳞球茎线虫

根据 Sturhan 和 Brzeski (1991)，鳞球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（*Helianthus annuus*）。

不同代次鳞球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，相似的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（小杆属（*Rhabditis*）、头叶属（*Cephalobus*）和盆咽属（*Panagrolaimus*）的种类）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，发病区中部的植株发病更重，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害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见隆起的浅灰色脓疱。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症状是很小的白色或浅色病斑，在块茎表皮下可见（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 或更长时间后，可使用一台体视显微镜（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。在容器中加入水，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术和土壤类型，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垫刃目和滑刃目其他属的一个检索表。

表 1. 区分茎线虫属与垫刃目和滑刃目其他属的检索表

1	背食道腺开口近口针基部；中食道球圆形、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（食道前体部）和中食道球未结合成单一体；口针通常较短	3
	食道前体部逐渐变宽，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，前后伸展；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 EPPO (2013b) ）。（除燕麦外，参考 Blake, 1962，收录于 Hooper, 1972）（ $n=48\text{♀♀}$ ）： $L=1.3\text{ mm} \pm 0.009$ ； $a=62 \pm 5.6$ ； $b=15 \pm 1.4$ ； $c=14 \pm 2.1$ ； $V=80 \pm 1.5$ 。（ $n=23\text{♂♂}$ ）： $L=1.3\text{ mm} \pm 0.017$ ； $a=63 \pm 11.3$ ； $b=15 \pm 1.7$ ； $c=14 \pm 2.1$ ； $T=72$ 。

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~~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。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，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（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）（ $n=237\text{♀♀}$ ）：L=1.07（0.69—1.89）mm；a=32（18—49）；b=7（4—12）；c=17（9—30）；V=80（73—90）。（ $n=231\text{♂♂}$ ）：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~~的标本（图 11A）。排泄孔位于食道腺对面。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）。卵巢前伸，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	尖形至细圆形	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）储存少数几天。

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。

4.2.1 鳞球茎茎线虫

已建立用于鉴定鳞球茎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）被用于研究鳞球茎茎线虫中的小种概念，以及茎线虫属的种间遗传多样性。

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）1-5.8S-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）首先对鳞球茎茎线虫的 ITS1 区域进行了测序，GenBank 数

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℃、30 s 50℃和 4 min 72℃，第 1 个循环；45 s 96℃、30 s 50℃和 4 min 72℃，40 个循环；以及 45 s 96℃、30 s 50℃和 10 min 72℃，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℃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
<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

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。

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 μ l PCR 混合液包含：1.5 mM $MgCl_2$ 、每种脱氧核糖核苷酸各 250 μ M、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 $^{\circ}C$ 变性开始；1 min 94 $^{\circ}C$ 、1 min 59 $^{\circ}C$ 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。

4.2.6 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线虫扩增产物约为 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 Research²）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。

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*）（

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。

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茎线虫，另一对用于鉴定巨大茎线虫和鳞球茎茎线虫。同时使用两对引物可将巨大茎线虫和鳞球茎茎线虫区分开来。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）

鳞球茎茎线虫的扩增产物约为 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）

鳞球茎茎线虫和巨大茎线虫的扩增产物约为 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℃；30 s 94℃、30 s 60℃和 45 s 72℃，40 个循环；以及 10 min 72℃最后延伸。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳分析。

4.2.9 鳞球茎茎线虫的 SCAR PCR 检测

SCAR PCR 由 Zouhar 等（2007）建立，是设计用于鳞球茎茎线虫的一种种特异性检测方法。该方法只用鳞球茎茎线虫（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产物约为 245 个 bp。

25 µl PCR 混合液包含：1× PCR 缓冲液（Fermentas2）、1.5 mM MgCl₂、每种脱氧核糖核苷酸各 200 µM、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℃；1 min 94℃、30 s 60℃ 和 1 min 72℃，30 个循环；以及 10 min 72℃ 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定程度。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 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.
- Jeske, A., Budziszewska, M., Dobosz, R., Stachowiak, A., Protasewicz, D., Wieczorek, P. & Obrepańska-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. 受鳞球茎根线虫侵染的蚕豆种子（显示虫绒）

照片由 G. Caubel , Nemapix (1999) 提供。



图 2. 受鳞球茎根线虫侵染的大蒜

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。

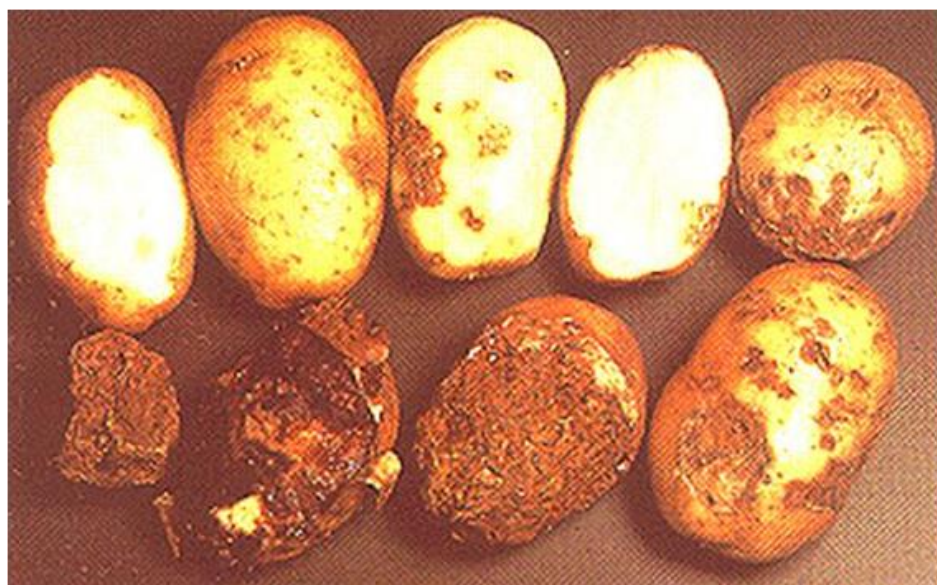


图 9. 受腐烂茎线虫不同程度侵染的马铃薯

照片由 H. Andersen 提供。

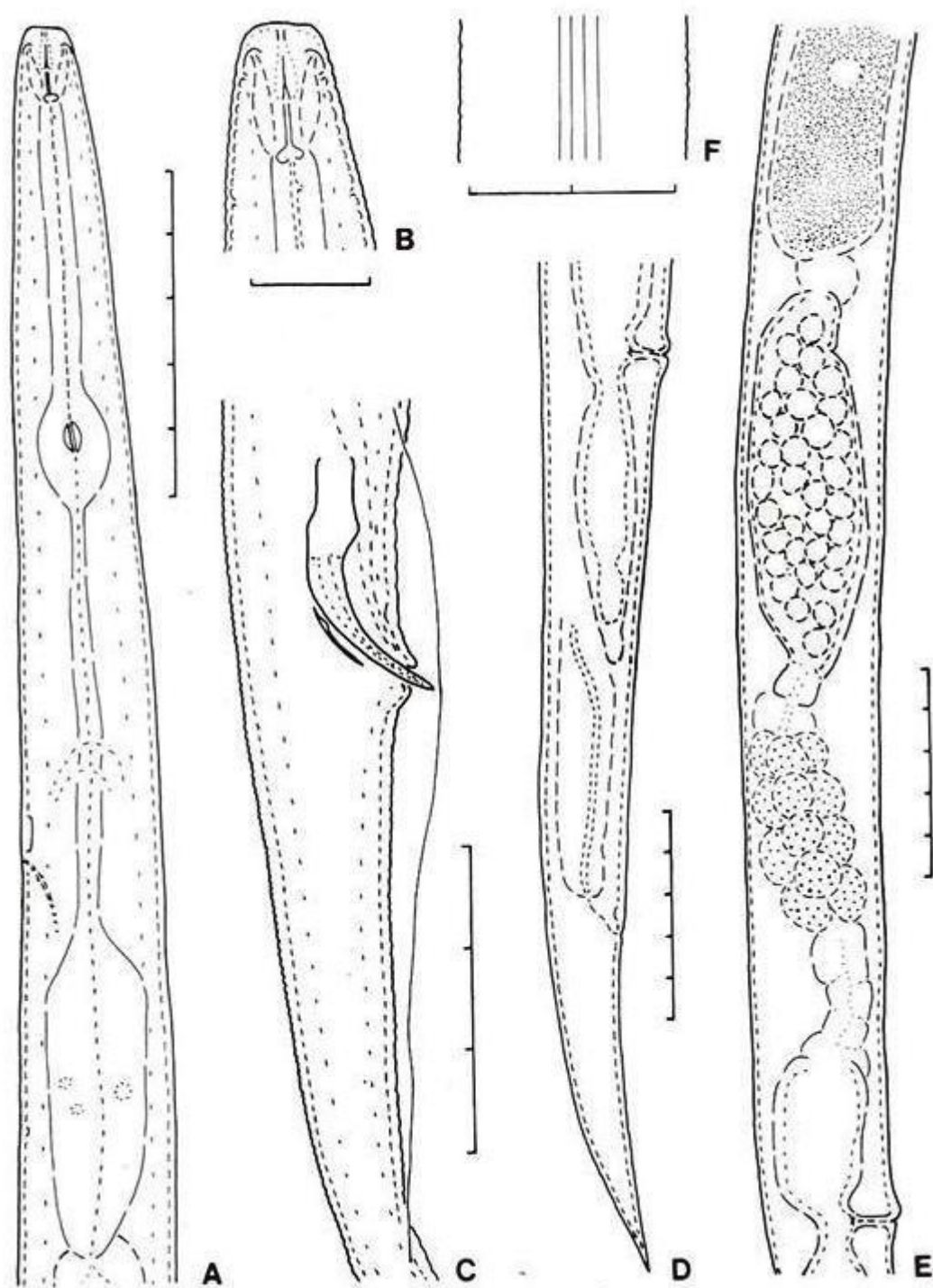


图 10. 鳞球茎线虫 (Kühn, 1857) Filipjev, 1936 (参考 Sturhan 和 Brzeski, 1991)。(A) 雌虫, 食道区域; (B) 雌虫头部; (C) 雄虫, 交合刺区域; (D) 雌虫, 后部区域; (E) 雌虫部分生殖系统; 以及 (F) 虫体中部侧区。比例尺上每一单位 = 10 μm 。

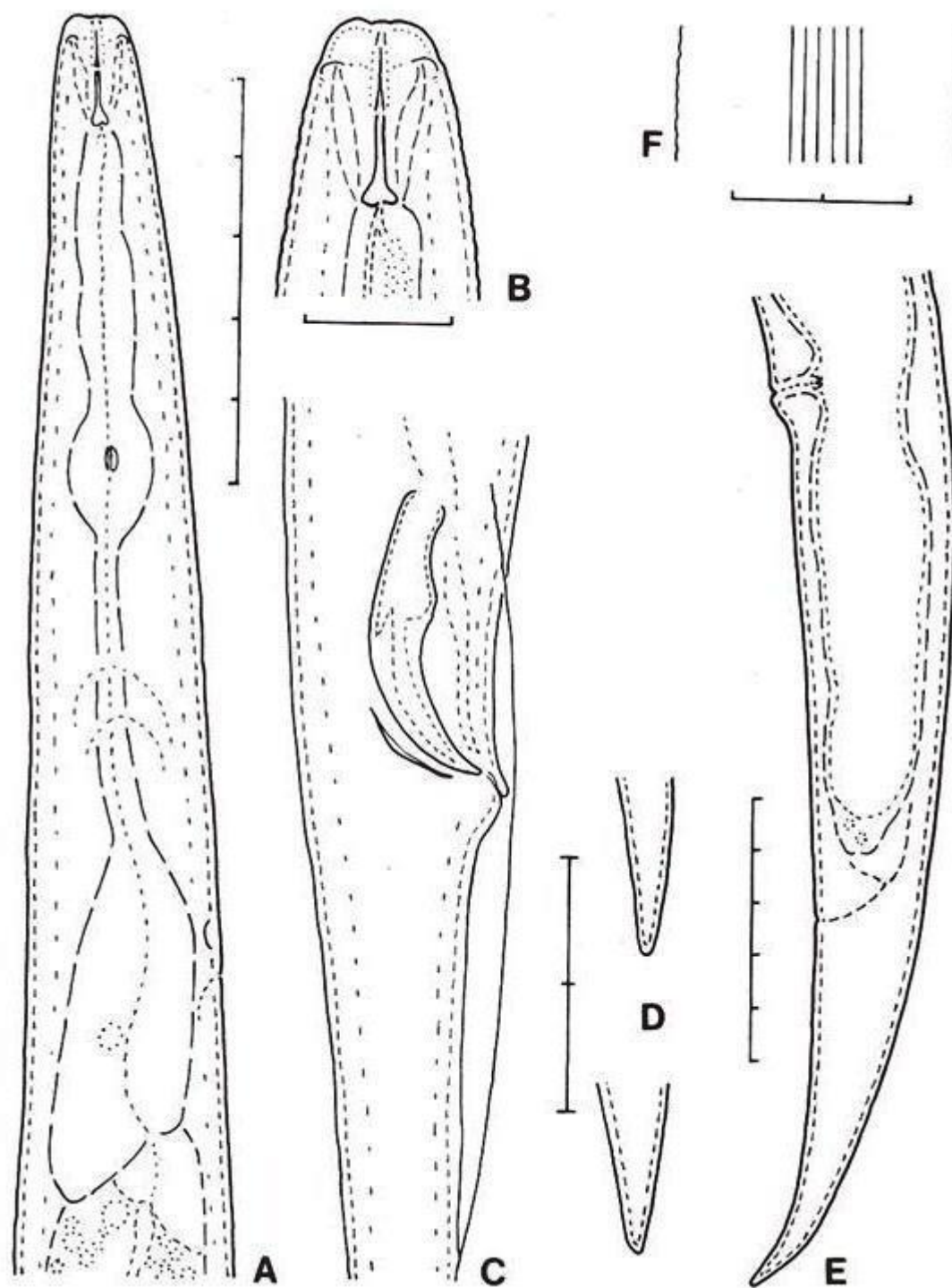


图 11. 腐烂茎线虫 Thorne, 1945 (参考 Sturhan 和 Brzeski , 1991) 。 (A) 雌虫，食道区域；(B) 雌虫，头部；(C) 雄虫，交合刺区域；(D) 两只雌虫的尾端；(E) 雌虫，后部区域；以及(F) 虫体中部侧区。比例尺上每一单位 = 10 μm 。

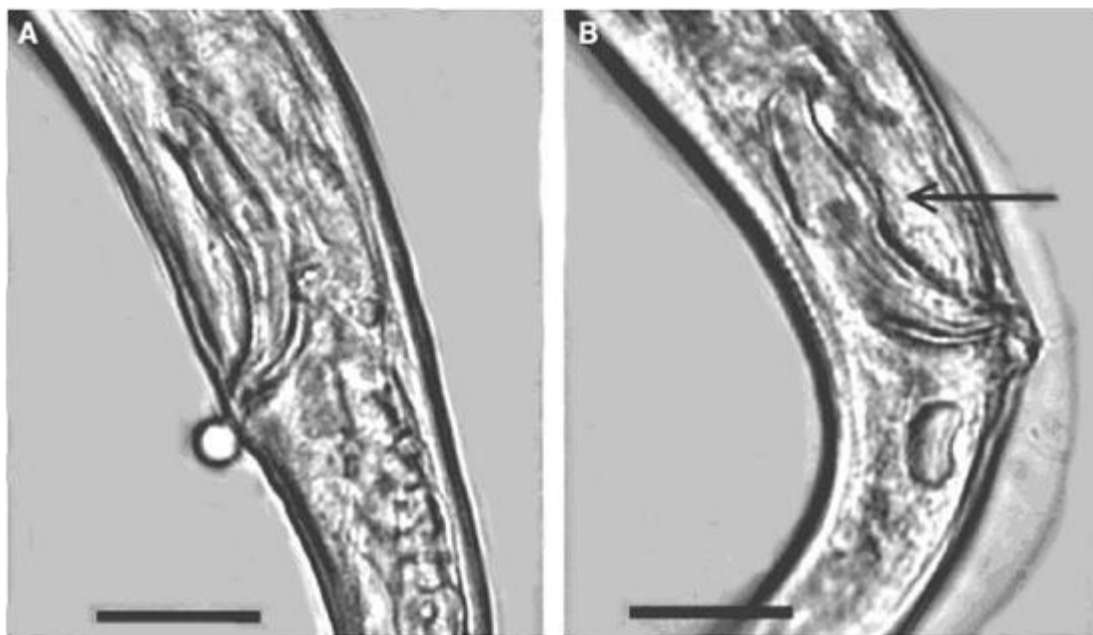


图 12. 茎线虫交合刺：(A) 鳞球茎线虫和(B) 腐烂茎线虫。箭头 = 突起。比例尺 = 12 μm
照片由 Karssen 与 Willemsen (2010) 提供。

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。

2017 年 04 月，植检委第 12 届会议注意到中文语言审查小组提出的编辑修改建议。

出台背景最后更新：2017 年 4 月