

团 体 标 准

T/JSF XXXX—2XXX

松材线虫取样与分离操作指南

Guide for sampling and separation of pine wood nematode

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

目 次

前言	2
1 范围	3
2 规范性引用文件	3
3 术语和定义	3
4 基本要求	4
4.1 山场取样的作业环境	4
4.2 取样的样本类型	4
4.3 取样工具	4
4.4 山场取样的作业时间	4
4.5 山场作业安全要求	4
5 取样标准	4
5.1 山场取样	4
5.1.1 松树病害分级	4
5.1.2 松树样树选择	4
5.1.3 松树取样部位	4
5.1.4 松树取样数量	5
5.2 锯材取样	5
5.3 木制品取样	5
5.4 锯材与木制品取样数量	5
5.5 样本管理	5
6 档案管理	5
7 松材线虫的分离	5
7.1 不同类型样本的分离方法选择	5
7.2 分离流程	5
7.2.1 贝尔曼漏斗法	5
7.2.2 负压分离法	6
7.2.2.1 检材的预处理	6
7.2.2.2 线虫的分离	6
7.2.2.3 仪器的清洗	6
参考文献	7

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本标准的某些内容可能涉及专利。本标准的发布机构不承担识别专利的责任。

本标准由江苏省林学会提出并发布。

本标准由南京生兴有害生物防治技术股份有限公司；南京林业大学；江苏省林业科学研究院；吉安市森林病虫害防治检疫站；上饶市林业灾害防治服务中心；合肥市林业保护中心；泉州市林业有害生物防治检疫站；浏阳市林业有害生物防治检疫所；铜仁市森林病虫害防治检疫站；衡阳市林业服务中心起草。

本标准主要起草人：王晨；许嘉麟；柴寅初；柴忠心；徐福元；鲍友山；陈凤毛；谢实猛；贾玉娟；乔钰航；丁志鹏；田伟龙；张浩伟；秦正文；吉凯；王昭鑫；董晓燕；解春霞；刘清亮；邓晓峰；周文秀；邹丽红；王朝晖；钟景辉；苏文晶；黄金玲；周长富；寻标兵；刘乐荷；潘斌；童蓉；李思颖；安树海；陶胜；胡蔚；尹艳玲。

松材线虫取样与分离操作指南

1 范围

本标准规定了松材线虫取样与分离操作的术语和定义、基本要求、技术要求、档案管理、安全要求。本标准适用于松材线虫取样和分离。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本标准中必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本标准；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

GB/T 23478-2009 松材线虫普查监测技术规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准

3.1 松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus*(Steiner & Buhrer) Nickle

一种无脊椎动物，属于线虫门，侧尾腺口纲，滑刃目，滑刃总科，滑刃科，伞滑刃亚科，伞滑刃属。
[来源：GB/T 23478-2009, 3.1]

3.2 松材线虫病 pine wilt disease caused by pine wood nematode

由松材线虫寄生在松树体内引起松树迅速死亡的一种毁灭性林木病害。又称松树萎蔫病、松材线虫萎蔫病、松树枯萎病。

[来源：GB/T 23478-2009, 3.2]

3.3 松树取样 sample separation of the pine tree

用高枝剪、电钻、油锯等工具对不同感病时期的松树进行取样，样本类型包括枝条、圆盘、木屑等。

3.4 媒介昆虫 vector insect

将松材线虫由罹病树中携带出，通过补充营养或产卵时造成的创口又将其传染到其他寄主松树上的昆虫，是松材线虫病发生不可缺少的条件，也是松材线虫病侵染循环的组成部分之一。目前，在我国松材线虫病的媒介昆虫主要为松褐天牛 *Monochamus alternatus* Hope。

[来源：GB/T 23478-2009, 3.6, 有修改]

3.5 负压分离法 negative pressure separation method

利用压差与水流相配合的工作原理，通过负压分离器，使检材微管中的松材线虫随通过的水流被带出，得到待检溶液。

3.6 信息管理系统 information management system

一个方便作业人员管理，由计算机和相关技术支持的组织内部和外部业务活动的信息采集、处理、存储和传递的系统，应用大数据、智能分析及可视化等先进技术手段，对现场作业信息进行归档记录，对现场操作情况进行检查与规范。

4 基本要求

4.1 山场取样的作业环境

天气情况：应避免雨雪、雷电、大风、大雾天气。

4.2 取样的样本类型

样本类型为枝条、木条、圆盘、木屑、木片等。

4.3 取样工具

高枝剪、手工钻、油锯、柴刀、记号笔、塑料袋、安全帽、手套等。

4.4 山场取样的作业时间

病害发生 1-2 月内及时取样，优先考虑秋冬两季进行取样。

4.5 山场作业安全要求

- ① 提高作业人员安全意识，确保作业人员了解并掌握必要的安全知识与技能。
- ② 作业前向相关部门申请许可，严格按照许可内容进行操作。
- ③ 为作业人员配备必要的安全防护装备，如安全帽、防护服、防护鞋等。同时定期对装备进行检查与维护。对于高空、陡峭等危险作业环境，应设置安全网、防护栏等设施，防止作业人员跌落等意外事故发生。
- ④ 加强现场监管力度，安排专人对作业现场进行巡查，及时发现并排除安全隐患。
- ⑤ 根据山林作业的特点和可能发生的意外事故类型，指定相应的应急措施和救援方案。
- ⑥ 山林作业严禁烟火，必须采取严格的禁火措施，在作业现场设置明显的禁火标志，严禁携带易燃易爆物品进入作业区域。
- ⑦ 山林作业应注意环境保护，采取有效的环保措施。作业过程中，应减少对周围环境的破坏和污染，作业完成后，应及时清理现场，恢复环境原貌。

5 取样标准

5.1 山场取样

5.1.1 松树病害分级

取样之前对感病松树进行病害分级。根据针叶褪绿、枯黄和变红的程度分为五级：0 级为正常，I 级为褪绿、部分针叶（1/4 以下）变黄，II 级为 2/4~3/4 针叶变黄、1/4 以下针叶变红，III 级为 3/4 左右针叶变红，IV 级为全变红、死亡^[1]。

5.1.2 松树样树选择

在一片小班或林分中，选取长势旺盛的林间感病优势木或生长势正常的感病林缘木、孤立木，且树干上通常无松脂溢出或较少的松脂溢出，枝条上有松褐天牛成虫补充营养痕迹的作为采样对象，尤其是出现在向阳山坡、林缘的病树，不宜选择生长势衰弱的松树或被压木。

5.1.3 松树取样部位

I ~ II 级感病松树：用高枝剪剪取高处感病树枝，尽量多采取侧枝。III 级感病松树：用柴刀砍去树皮后，再用手工钻或其他工具对主干胸高部位不同方向选取 3-5 个点钻取木屑共 50g 或砍取木片 100-200g，如果砍去树皮后，发现蓝变、天牛成虫产卵痕迹和幼虫蛀道等特征时，优先对该区域进行取

样。IV级感病松树：用油锯砍倒松树，锯得多个主干部位圆盘，厚度约5-10cm，优先锯取有蓝变、天牛成虫产卵痕迹和幼虫蛀道等特征的圆盘。

5.1.4 松树取样数量

以小班为单位取样，死亡松树数量小于100株的，先取样10株进行检测，如检测到松材线虫，可不再取样；如没有检测到松材线虫，则继续取样检测，直至死亡松树全部取样检测为止；死亡松树大于100株的，如取样100株仍未检测到松材线虫，对超出部分按5%的比例进行抽样检测。

5.2 锯材取样

①圆木桩类：(1)用手工钻或其他工具对截断面木质部区域选取3-5点钻取木屑共50g，如发现蓝变、产卵孔痕迹和蛀道等典型特征则优先钻取该区域木屑，同时应避免在髓心部位取样。(2)用油锯锯成多个5-10cm厚的圆盘。

②胶合板、木质电缆盘等形状规则的木制半成品类：(1)用手工钻或其他工具对截断面区域选取3-5点钻取木屑共50g，如发现蓝变、产卵孔痕迹和蛀道等典型特征则优先钻取该区域木屑。(2)用柴刀劈成多个长3cm直径5mm左右的木条约150g。

5.3 木制品取样

如已做成工艺品、家具、装饰品等形状不规则的木制品可考虑：(1)用手工钻或其他工具对不同部位钻取木屑共50g。(2)用柴刀劈成长3cm直径5mm左右的木条约150g。

5.4 锯材与木制品取样数量

须先全面检查其外表，对发现可疑症状的锯材与木制品全部取样，如未发现可疑症状则按照每批总数比例的0.5%~5.0%随机取样。

5.5 样本管理

将所取样本装入塑料袋中，并用记号笔做好标记，放入4℃条件下保湿保存。

6 档案管理

将样本信息输入信息管理系统中，其中至少要包括以下信息：

- ① 取样地点
- ② 取样树种
- ③ 取样时间
- ④ 固定标牌编号

7 松材线虫的分离

7.1 不同类型样本的分离方法选择

- ① 枝条/木条：贝尔曼漏斗法
- ② 木屑：贝尔曼漏斗法
- ③ 圆盘：负压分离法

7.2 分离流程

7.2.1 贝尔曼漏斗法

- ① 取灭菌后的玻璃漏斗，并在其下面接上乳胶管，在乳胶管上夹一个止水夹，再向漏斗中加入清

水（检查并确保不漏水），将漏斗置于架上。

② 取上述劈好的样木组织约50~100g，用300目纱布包好，轻放在漏斗中，再放入清水，清水以浸没分离材料为宜。

③ 室温20℃放置24h后，打开止水夹，慢放出底部约5mL水样于15mL的灭菌离心管中。用吸管吸一滴线虫悬液在载玻片上，在显微镜镜下检查，先确认有无线虫。如果线虫的数量少，可以离心（1500r/min，2-3min）沉降后再检查。

7.2.2 负压分离法

7.2.2.1 检材的预处理

① 取得无松脂残留且断面平整的圆盘，直径5.0~20.0cm，厚度10cm左右为宜。

② 将AB胶各挤出15克，按照1:1比例混匀，并将吸附罩与待检木材胶合。

③ 待胶水干后，将检材浸泡于水中5~10分钟。

7.2.2.2 线虫的分离

① 取一桶清水，将预处理好的检材浸泡在清水中（水面略低于检材的上沿）。

② 打开电源开关，负压分离器开始工作，适当调节负压吸力的大小，可见负压表的指针逆时针旋转，此时吸附罩内有水渗入，等水逐渐增多达到待检量时，关闭电源开关。

③ 将吸附罩上的胶管拔下，将吸附罩内的溶液倒入试管或烧杯中，待检。

④ 待检溶液静置十分钟左右，吸取底部带有沉淀的分离液少许，进行检验。

7.2.2.3 仪器的清洗

完成一件检材分离操作后，应清洗连接缓冲瓶和吸附罩的硅胶软管、缓冲管（如果没有待检溶液进入缓冲瓶，可以不清洗缓冲瓶）。

清洗方法：

① 缓冲瓶清洗：可用毛刷对其内壁、底部进行刷洗，用清水重复冲洗干净。

② 连接软管清洗：对着软管注入干净清水，反复冲洗干净即可。

参考文献

- [1] 不同龄级马尾松对松材线虫病抗性的探讨