

日本五针松感染松材线虫病的检验检疫及扩散风险

来燕学

(浙江省宁波市森林病虫害防治检疫站)

Quarantine inspection and proliferation risks of Japanese five-needle pine (*Pinus Parviflora* Sieb.et Zucc.) infected by pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhrer) Nikle) associated with other parasites and microbes .

Lai Yanxue

(Forest Pest Management Station of Ningbo City, Ningbo 315012, China)

Abstract: To reveal the characteristic and the spread risk of Japanese five-needle pine infected by pine wilt nematode, the xylem of dead Japanese five-needle pine were collected through the nursery sampling and the nematode associated with other parasites and microbes were isolated from chips of the xylem soaking in water; the isolates were inspected under microscope; and then the larvae (roundhead wood borer) in the xylem of dead Japanese five-needle Pine were further identified under dissected microscope. When the larvae metamorphose into the beetle of longhorn, the species of the longhorn beetle were further identified and then the beetle was cut into piece which was inspected under microscope to find whether or what nematode was carried by the beetle. The result showed that 33% of the samples were infected by *Bursaphelenchus xylophilus*; and 33% of the samples were infected by *B. mucronatus*; 66.7%, 83.3% and 100% of the samples were infested by other invasive protozoon, fungus and bacterium respectively. The larvae (roundhead wood borer) are the larvae of *Monochumus alternatus*, which are able to metamorphose into the beetle of *Monochumus alternatus* which carry the nematode that is dauerlarvae LIV of *Bursaphelenchus xylophilus*. The conclusion is that the Japanese five-needle pine can be infested by the nematode of *B.xylophilus* and the other invasive parasites and microbes; dead or dying Japanese five-needle pine can carry *B. xylophilus* and *M. alternatus*, and is a complete system of infection cycle of pine wilt disease caused by *B.xylophilus*; the transportation

of Japanese five-needle pine has a high proliferation risk of the pine wilt disease.

Keywords *Bursaphelenchus xylophilus*, *B. mucronatus*, *Monochamus alternatus*, *Pinus Parviflora*, Quarantine inspection, Proliferation risks

摘要: 为揭示日本五针松感染松材线虫病特性和扩散风险,通过在苗圃实地采样,对枯死和濒死日本五针松木质部分离镜检了松材线虫和侵入性伴生物;对天牛幼虫作了特征鉴定;对羽化的天牛成虫作了解剖检验。结果表明:在枯死日本五针松上能检测到松材线虫病原和其他侵入性伴生物。松材线虫检出率为 33%,拟松材线虫检出率为 33%,原虫、真菌和细菌检出率分别为 66.7%、83.3%和 100%;天牛幼虫为松褐天牛幼虫;松褐天牛成虫能顺利羽化,并携带 LIV 耐久型幼虫。由此结论:日本五针松能感染松材线虫病,能携带松材线虫和松褐天牛,是松材线虫病完整的侵染循环体系,极易通过人为调运,扩散传播松材线虫病。

关键词: 松材线虫;拟松材线虫;松褐天牛;日本五针松;检验检疫;扩散风险

日本五针松 (*Pinus parviflora* Sub.et.Zuu) 原产日本,枝杆曲折苍劲,叶色翠绿,是观赏价值较高的树种,在我国作为大型盆景材料,栽植广泛,历史悠久,具有很高的知名度。浙江宁波是日本五针松盆景和苗木繁育重要基地,是农区的重要的经济产业之一。1991 年松材线虫 (*Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhner) Nikle) 病侵入宁波^[1,2],此后流行危害,范围逐年扩大^[3],对松林资源造成严重破坏,对日本五针松产业发展带来了负面影响。由此,日本五针松是否感染松材线虫病,是否会成为松材线虫病传播扩散的载体,引起业主和各地森林植物检疫部门的高度关注。但是查阅相关资料,未见有关于日本五针松感染松材线虫病的专题报道。最近,我们在松材线虫病发生区,对栽种在圃地的枯死日本五针松进行调查和分离镜检,发现日本五针松也感染松材线虫病,现将结果报道,供经营业主和森林植物检疫人员参考。

1. 材料与方法

1.1 圃地概况

日本五针松圃地位于浙江省宁波市北仑区大矸镇。北仑区大矸镇是松材线虫病流行重灾区,又是北仑区规模最大的日本五针松栽植基地。业主介绍表明,大矸镇日本五针松栽种面积达 135hm²,其中地径>10cm 五针松栽植密度 2250 株/hm²,共有 70 hm²;地径 6cm 之间,栽植密度 22000 株/hm²。历年来有五针松枯萎死亡现象,每年 8 月-10 月是日本五针松死亡高发期,2008 年径阶较大的五针松就死了 500 多株。

1.2 检验材料

2009年2月12日,在大研镇苗圃地选择6株枯死或濒死的日本五针松,其中3株已死亡,枝条上有补充营养伤口,树干上有天牛产卵痕;另3株濒死,枝条上有补充营养伤口,树干上找不到天牛产卵痕,每株五针松上剪取长10cm,直径2cm枝条1根,共6根,编号,带回室内供分离镜检用;在3株有天牛产卵痕的五针松上锯取长20cm,直径5cm松木段各1段,共3段,现场劈木检查和带回室内,供观察天牛幼虫和天牛成虫羽化用,确认天牛种类和解剖检测线虫携带情况。

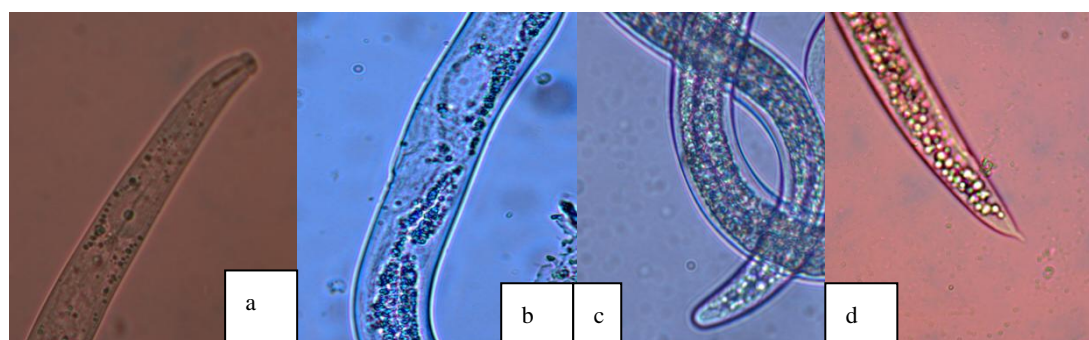
1.3 实验方法

1.3.1 线虫分离 用培养皿+细枝方法,分离松枝内的侵入性生物^[3, 4]。具体方法是:①定性描述供试枝条的含水量和木质部颜色及对应的松主干上是否有天牛危害痕迹;②把供试松枝条去皮、洗净,用剪枝刀把枝条切成薄圆片,称取10g,置培养皿加入30ml水,浸提24hr。

1.3.2 线虫鉴定 ①把培养皿,置体视镜下观察悬浮液内线虫存在情况并定性计数,同时在镜下挑出线虫到载玻片,置显微镜下观察线虫种类,摄制特征部位显微照片;②用滴管吸取悬浮液到载玻片上,置显微镜下观察,真菌、细菌及原虫存在情况^[4]。

1.3.3 天牛鉴定 ①现场劈开日本五针松枯死木,检查天牛幼虫蛀入主干情况;②镜检天牛幼虫,室内解剖带回的枯死松木段捕获天牛幼虫在体视镜下观察,摄取前胸背板、背步泡、腹步泡及胸腹面特征照片^[5];③培育天牛,把部分带回的松木段置养虫缸,观察木段内天牛幼虫羽化为成虫,进一步确认天牛成虫种类;④用虫体解剖法检测松褐天牛携带的线虫种类^[6]。

2. 结果与分析



照片1 示(拟)松材线虫特征

a 示唇区、口针及食道球; b 示阴门及阴门盖; c 示圆尾; d 示尾尖突

2.1 松材线虫检测

对 6 个样本分离镜检 (表 1), 1 个样本检测到松材线虫, 形态特征为口针发达、食道球膨大、雌成虫阴门具阴门盖、尾端圆无尖突 (照片 1, a, b, c), 为典型的松材线虫^[7-11]; 1 个样本检测到拟松材线虫, 与松材线虫区别是雌虫尾端有尾尖突 (照片 1, d), 是典型的拟松材线虫^[12-13]; 1 个样本检测到松材线虫和拟松材线虫混合物, 这混合的拟松材线虫实际上是松材线虫的复合种^[14-17]; 4 个样本检测到原虫, 5 个样本检测到真菌, 6 个样本全部检测到细菌^[4]。

由表 1 可见, 五针松枝条内生物群落与一般的松材线虫病感染的松树内生物群落一致。补充营养枝条内的生物群落发生规律是细菌>真菌>原虫>线虫。能检出线虫的枝条往往是木质部颜色已发生变化, 这是细菌和真菌引起的色变, 而且其主杆上也检测到天牛侵入危害。线虫检出率为 50%, 其中松材线虫检出率为 33%, 拟松材线虫检出率也为 33%; 66%样本没检测到松材线虫, 这与普通松材线虫病发生的松林地一样, 许多枯死松树检不出松材线虫病原^[18]。但检不到松材线虫却能检出往往与松材线虫伴生的细菌、真菌和原虫^[4]。

表 1 枯萎或濒死日本五针松枝条分离镜检结果表

样本号	样枝特性				样本重量 (g)	浸提水量 (ml)	镜检结果 ^a				
	样本部位	木质色泽	木质湿度	主杆天牛危害			Bx	Bm	原虫	真菌	细菌
1	枝条	棕红色	干燥	有蛀入孔	10	30	++	+	+++	+++	+++
2	枝条	浅黑色	干燥	有蛀入孔	10	30	++	-	+++	+++	+++
3	枝条	黑色	干燥	无蛀入孔	10	30	-	++	+++	+++	+++
4	枝条	灰白色	湿润	无蛀入孔	10	30	-	-	+++	++	++
5	枝条	棕色	湿润	无蛀入孔	10	30	-	-	-	++	++
6	枝条	嫩白色	湿润	无蛀入孔	10	30	-	-	-	-	++

a—“+”表示阳性, “++”表示中量, “+++”表示大量, “-”表示阴性

原虫在枯松枝条上检出率远高于线虫检出率, 但这种原虫起到何种病理作用有待研究^[4]。真菌也是引起松树枯萎的重要因子, 木质部“兰变”就是真菌感染所致^[4, 19-22]。细菌对松树的病理作用已有大量报道^[4, 23-28], 本次检查的 6 个样本能 100%检测到细菌, 16.7%样本只能检测到细菌, 也说明了细菌在松树枯萎所起的重要作用。

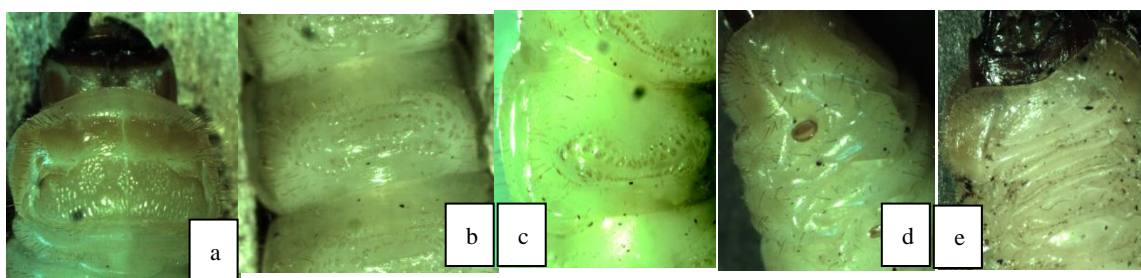
但按照目前的诊断方法与标准, 只要在枯死松木中检测到公认的病原—松材线虫, 即表明该片松树枯死是由松材线虫引起。由此可见, 该圃地日本五针松已感染了松材线虫病。反之, 这圃地有 2/3 枯死日本五针松只检测到拟松材线虫或其他伴生物, 这表明日本五针松枯死原因复杂, 松材线虫可能不是唯一的病原物, 需进一步研究。

2.2 松褐天牛检测

在现场劈检枯死日本五针松，当场劈检到天牛幼虫（照片 5），经目检幼虫瘦长，扁圆筒状，长约 35mm，前胸背板宽 5mm，不具胸足，初定为松褐天牛幼虫。



照片 2 示日本五针松主杆内的天牛幼虫

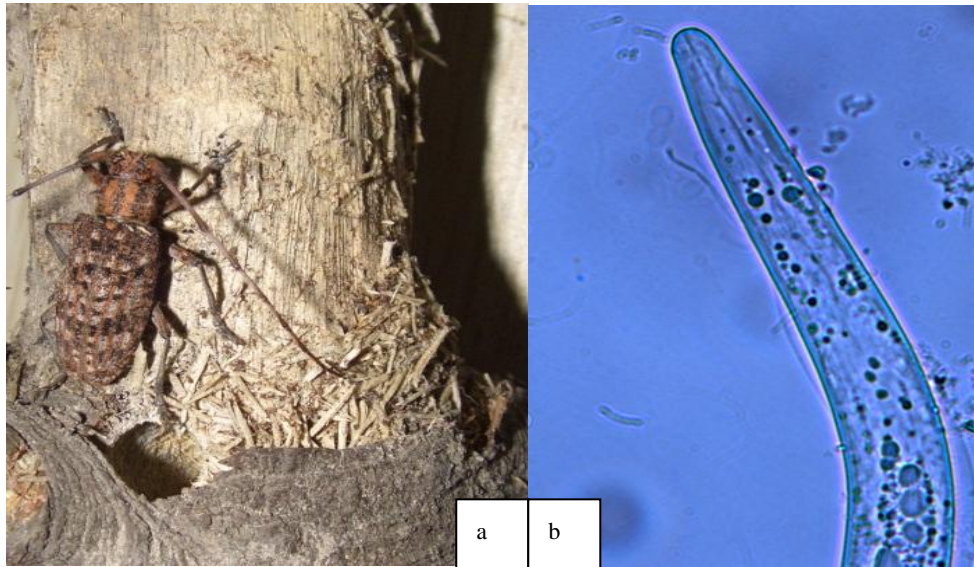


照片 3，示松褐天牛幼虫特征图

a 示前胸背板；b 示腹部背步泡；c 示腹部腹步泡；d 示前胸腹板；e 示气门

2.2.1 天牛幼虫镜检

前胸背板侧沟细，亚侧陷横向，有不规则的“凸”字斑，斑内密布竖细线和刻点（照片 3, a）；腹部背步泡的盾片板、前横沟、后横沟明显把步泡分成 4 行，中间 2 行步泡瘤突把盾片板围成“口”形，口角有“梅花”状步泡突，梅花状步泡突外有侧沟，侧沟外侧有 2 列“括号状”步泡突分布（照片 3, b）；腹部腹步泡具明显中横沟和侧沟、步泡排列月牙形（照片 3, c）；胸腹面不具胸足，前胸腹板半圆形，基部两侧带淡黄色的内密集细刻点构成斑（照片 3, d）。气门椭圆竖立，无气门缘室（照片 3, e）。这些特征表明，危害日本五针松的天牛幼虫为松褐天牛幼虫^[5]。



照片 4 示松褐天牛成虫和携带线虫
a 示刚羽化的松褐天牛成虫;b 示天牛携带线虫头部

2.2.2 松褐天牛成虫镜检

2009 年 5 月 10 日, 1 头成虫从日本五针松段木中羽化, 为典型的松褐天牛 (*Monochamus alternatus* Hope) (照片), 表明日本五针松受松褐天牛危害。对松褐天牛成虫进行解剖镜检, 能检测到 LIV 型耐久型幼虫 (照片 11, 12), 这种线虫头部圆, 无唇区, 无食道球, 带尾尖突^[6]。



照片 5 示日本五针松感染松材线虫病症状
a 示苗圃地枯死五针松; b 示越年枯死五针松症状; c 示植宾馆假山上枯死五针松

2.3 扩散风险

日本五针松感染松材线虫病具有非常大的扩散风险。一是枯死日本五针松中含有松材线虫病原和最具效率的传播媒介松褐天牛, 是个完整的侵染循环系统。这个侵染循环系统能随着日本五针松调运而扩散; 二是日本五针松感染松材线虫病具有“健康带疫”特性 (照片 5, b), 隔年枯死现象较为常见, 使日本五针松能在“健康保护色”下调运, 更具扩散性风险; 三是日本五针松调运遍布全国, 广泛用作宾馆酒店和旅游区的景观树种 (照片 5, c), 近几

年我国松材线虫病往往在景区松林首先发生,可能与日本五针松的引进,特别是上世纪八十年代大坂松(日本五针松的变种)大量引进及广泛培育、调运有一定关系。

3. 结论与讨论

3.1 在日本五针松圃地的枯死日本五针松上能检到松材线虫和松褐天牛表明日本五针松是松材线虫病的感病树种而且具有侵染循环特性。尤其是松褐天牛既是松材线虫最有效的媒介昆虫又是致死松树的蛀干害虫,在松材线虫病发生区,日本五针松圃地和周边松林就能通过松褐天牛羽化飞行实行互动、侵染循环,加倍促使松材线虫病发生发展^[29-31],必须引起森林保护和植物检疫工作者高度关注。

3.2 日本五针松栽培历史悠久,种植面广量大,是农区重要经济产业。鉴于松材线虫病发生的严重性,各地日本五针松栽培区要高度重视松材线虫病防治工作,按国家《植物检疫条例》和《森林病虫害防治条例》要求,及时清理销毁病株,扑灭检疫对象,逐步建立无检疫对象苗圃;同时要严格执行报检制度,对需调运出县境的日本五针松实行每株“补充营养痕”检查^[32],杜绝健康带疫植株调运流通,保护全国松林资源和景观安全。

3.3 日本五针松被广泛调运,作为观赏植物扩散到全国各地及风景区是不争的事实。因此,调入单位要“亡羊补牢”,加强复查检疫,及时发现检疫对象并及时扑杀。一要对属地内调入日本五针松单位实行监管,全面掌握日本五针松调入情况;二发现调入单位日本五针松死亡现象,不要以为是栽培不当枯死,就随手一扔了之,要立即对枯死日本五针松作取样和分离镜检,排除一切隐患。

参考文献:

- [1]来燕学. 宁波萎蔫松树木质部内线虫类型镜检初报[J].浙江林业科技, 1993,13(1):40-44.
- [2]来燕学.用松枝解剖法快速检测松材线虫病原[J].浙江林学院学报, 2005, 22(2):188-192.
- [3]来燕学,王亚红,顾炎可.松细枝+培养皿法分离镜检松材线虫试验[J].江苏林业科技, 2003, 27(2):13-15.
- [4]来燕学.松树枯萎病枝条内的寄生虫和微生物群落[J].南京农业大学学报, 2006, 29(1):49-53.
- [5]钱庭玉.我国墨天牛属幼虫记述[J].昆虫学报,1984,27(1):87-90.
- [6]来燕学.松墨天牛成虫解剖与松材线虫分布研究[J].华东昆虫学报,2004,13(2):21-26.
- [7]程瑚瑞,林茂松,黎伟强,等.南京黑松上发现萎蔫线虫病[J].森林病虫通讯,1983,(4):1-5.
- [8]杨宝君.松树上线虫的鉴定[J].林业科学, 1985,21(3):305-309.
- [9] Mamiya Y. Pine wood nematode, *Bursaphelenchus lignicolus* Mamiya & Kyohara, as a causal agent of pine wilting disease[J]. Rev. Plant Prot., Rese, 1972,5:46-60.
- [10]Mamiya Y, Kiyohara T. Discription of *Bursaphelenchus lignicolus*,n.sp.(Nematode:Aphelenchoididae)from pine wood and histopathology of nematode-infested trees[J]. Nematologica,1972,18:120-124.
- [11]Nickle W R, Gdden A M, Mamiya Y, et al. On the taxonomy and morphology of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner&Buhrer 1934) Nickle 1970[J]. J Nematol, 1981, 13(3): 385-392.
- [12] Mamiya Y, Enda N. *Bursaphelenchus mucronatus* n. sp. (Nematode:Aphelenchoididae)from pine wood and its biology and pathogenicity to pine tree[J]. Nematologica, 1979, 25: 353-361.
- [13]程瑚瑞,林茂松,钱汝驹.拟松材线虫的形态诊断和致病性研究[J].南京林业大学学报, 1986,(2):55-61.

- [14] 来燕学.(拟)松材线虫耐久型四龄幼虫(L_(IV))的形态及其分化变异[J].林业科学研究,2009,22(2),294-298.
- [15] 马承铸,宋继荣,陈品山,等.上海佘山发现黑松松材线虫M型株系[J].上海农业学报,1996,12(1):56-60.
- [16] Bolla R I, Boschert M. Pine wood nematode species complex: interbreeding and chromosome number[J]. J Nematol, 1993,25(2):227-238.
- [17] 赵文霞,杨宝君.松材线虫雌虫尾部形态和寄主的关系[J].林业科学研究,2005,18(3):362-363.
- [18] 来燕学,张世渊,黄华正,等.松墨天牛在松树枯萎中的作用[J].浙江林学院学报,1996,13(1):75-81
- [19] 廖周瑜,叶辉.纵坑切梢小蠹伴生菌危害机理的研究[J].中国森林病虫,2002,21(3):3-5.
- [20] Basham H.G. Wilt of loblolly pine inoculated wilt blue-stain fungi of the Genus Ceratocystis[J]. Phytopathology, 1970,60:750-754.
- [21] 孙美清,等.松树枝枯病的研究进展[J].中国森林病虫,2001,(4):27-31.
- [22] 叶辉, Lieutier Francois.伴生菌(L. winggfieldii)对苏格兰松病害作用研究[J].森林病虫通讯,1997,(4):23-25.
- [23] Oku H, et al. Pine wilt toxin, the metabolite of a bacterium associated with anematode[J]. Naturwissenschafter, 1980,67:198.
- [24] Tada M, A Omizu, M shiroishi. Effect of phosphate on the growth and toxin-producing ability of a bacterium isolated from pine wood nematode Bursaphelenchus lignicolus[J]. Sci. Rep Fac. Agric. Okayama Univ. Jpn., 1981,57:35-40.
- [25] Kawazu K, et al. Relationship of the pathogens from wilted red pine seedlings inoculated with the bacterium-carrying nematode, and the cause of difference in pathogenicity among pine wood nematode isolates[J]. Sci. Rep Fac. Agric. Okayama Univ. Jpn., 1999,88:1-5.
- [26] 赵博光,等.细菌分离物B619与松材线虫病关系的初步研究[J].南京林业大学学报,2000,24(4):72-74.
- [27] 赵博光,等.抗生素对松材线虫病的影响[J].南京林业大学学报,2000,24(4):75-77.
- [28] 谈家金,冯志新.松材线虫与伴生细菌在寄主内的种群[J].林业科学,2004,40(6):110-114.
- [29] Linit M J. Nematode vector relationships in the pine wilt disease system[J]. J Nematol, 1988, 20(2):227-235.
- [30] 来燕学.皮下接种松墨天牛卵及幼虫致死松树的研究[J].昆虫知识,2005,42(2):193-195.
- [31] 来燕学,周永平,俞林祥,沈炳顺,蔡道尧.松材线虫病新疫点成因机制初探[J].浙江林学院学报,1999,16(4):425-429.
- [32] 张世渊,来燕学,周成枚,陆高,肖灵亚,蔡道尧.松褐天牛(Monochamus alternatus)成虫补充营养取食研究[J].浙江林业科技,1998,18(2):44-48.