

文章编号: 1000-5692(2005)02-0188-05

用松枝解剖法快速检测松材线虫病原

来燕学

(浙江省宁波市森林病虫害防治检疫站, 浙江 宁波 315000)

摘要: 松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 早期诊断是防治松材线虫病的重要环节。为了在早期快速测定寄主(松树)体内的病原线虫, 开发了便携式显微镜和松枝解剖技术。用修枝剪采集松枝, 用解剖刀进行松枝切片, 再用便携式显微镜镜检, 结果显示松枝内松材线虫检出率为 70%, 其中濒死松树内检出率为 100%, 局部枯枝内检出率为 60%, 健康枝内检出率为 0。野外松林内鉴定一个样本平均用时 2.5 min。便携式显微镜加枝条解剖法能对松材线虫病实施早期快速诊断。表 3 参 25

关键词: 森林保护; 松材线虫; 解剖; 便携式显微镜; 早期诊断

中图分类号: S763.1 **文献标识码:** A

松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 病是松林毁灭性疫病。1982 年在我国发生和流行后^[1], 已在局部地区造成松林资源的重大损失^[2,3]。该病危害性大, 蔓延迅速, 防治困难, 加强监察预防, 快速及时检测病原是阻断松材线虫病传播和扩散的重要环节。有关专家学者已对松材线虫病早期诊断鉴别做了大量工作, 主要有流脂法^[4,5]、化学法^[6,7]、生物化学法^[8,9]和分子生物学法^[10~14]等, 取得很多成绩。但这些都为间接方法, 试图通过感病树的化学和生理变化来推测病原线虫存在与否, 并区别拟松材线虫 *B. mucronatus* 和松材线虫的形态差异, 始终存在可靠性问题。形态鉴定是最可靠的方法^[15~20], 简化常规的形态鉴定程序, 取消样本水浸分离线虫这一耗时费工过程, 能实现松材线虫病的早期快速鉴定目的。笔者在实践中找到一种以松枝解剖为手段的早期快速鉴定松材线虫形态方法, 较为方便。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料为马尾松 *Pinus massoniana* 和黑松 *P. thunbergii* 1~3 年生新鲜枝、枯死枝和萎蔫枝。实验设备为显微镜、解剖刀、载玻片、饮用矿泉水及自行改装的 L100 型袖珍显微镜(该显微镜原本用于纺织工业。笔者用锯在底部开槽, 制成能放载玻片的平台, 再在底部安装一个反光镜, 这样就制成能在野外鉴定松材线虫的显微镜)。

1.2 方 法

1.2.1 室内检验 用高枝剪在野外松材线虫病发病林地内采集不同类型松枝带回室内作鉴定材料。材料包括: ①健康树的嫩枝, 采黑松 1 年生和 2 年生样枝各 1 条, 马尾松 1 年生样枝 1 条作对照。②

收稿日期: 2004-06-11; 修回日期: 2004-09-30

作者简介: 来燕学, 高级工程师, 从事森林病虫害防治研究。E-mail: nbssfz@zjly.gov.cn

健康树局部感病松枝, 即树干树皮破损后有流脂, 树冠有少量的枯萎枝或带补充营养痕迹的枝条, 用于早期诊断。黑松样枝采集 10 条, 其中 1 年生 5 条, 2 年生 3 条, 3 年生 2 条; 马尾松样枝 6 条, 其中 1 年生 2 条, 2 年生 3 条, 3 年生 1 条。③濒死树的松枝, 即树干树皮破损后无流脂, 枝条上针叶有失绿、黄色和尚绿 3 种, 主干木质部已有大量蛀干害虫侵入。在不同部位取 5 条绿色枝条作为检验材料。

记录枝龄 (1, 2, 3 年生), 针叶颜色 (分绿色、灰绿色、黄红色 3 级), 韧皮部颜色 (分绿色、棕色、黑色 3 级), 松墨天牛成虫补充营养痕迹 (分“—, +, ++”3 级表示) 等。解剖镜检前, 先去除枝条上的针叶, 清洗枝条, 再用解剖刀对枝条做横切和纵切片, 把切片置于载玻片上, 每次 3 片, 滴水加盖玻片后直接置于显微镜下观察线虫并计数。如无线虫, 需重复切 3 次, 共 9 片定论; 有线虫, 但每片数量 ≤ 1 条, 则只切 1 次定论; 如每片数量 > 1 条, 需重复切 2 次计数。

1.2.2 野外检验 采用简化程序, 只采剪健康树局部枯萎枝或带补充营养痕迹的枝条作检验。采枝去叶后即可用解剖刀直接对样枝切片, 用自制的 L100 袖珍型显微镜对切片进行检测。镜检程序与室内相同。

2 结果与分析

2.1 健康树嫩枝解剖检测

由表 1 可知, 在健康树的嫩枝中均未能检出松材线虫, 这说明健康松树的健康嫩枝内未受松材线虫侵染。

2.2 健康树感病松枝解剖检测

表 1 健康树嫩枝解剖检测松材线虫结果

Table 1 The results of dissecting and microscope-examining healthy twigs of healthy pine trees

树种	枝龄/a	针叶色	补痕	韧皮色	直径/mm	切片数/片	线虫数/条
黑松	1	绿	—	绿	4.5	横 9	0
						纵 9	
黑松	2	绿	—	绿	7.0	横 9	0
						纵 9	
马尾松	1	绿	—	绿	4.5	横 9	0
						纵 9	

说明: 2000 年 8 月 3 日检测

由表 2 可见, 16 条样枝中共有 9 条检测到线虫, 检出率为 56.25%, 表明用解剖法能直接在镜下检到松材线虫。检到的松材线虫有的已游离在木质部以外, 有的在韧皮部活动, 有的在木质部活动, 有的在髓部活动, 最多的是在木质部与韧皮部界面, 有时能看到成束的线虫在活动。检出量最高为 2000 年 8 月 3 日检到的 8 号样本, 黑松 1 年生枝 12 个切片共得 38 条线虫, 平均每片 3.17 条。从感病松枝解剖镜检结果发现, 松材线虫的检出率和量主要与下列 3 个因素有关: 其一, 与补充营养痕迹有关。经松墨天牛 *Monochamus alternatus* 补充营养的枝条必定有伤口, 即“补痕”, 是松材线虫侵染松树的通道。有补痕的黑松枝条, 松材线虫检出率为 100%; 无补痕的黑松枝条, 只在 1 号样本 3 年生枝条上检测到松材线虫, 检出率为 20%, 这不能排除从其 1, 2 年生枝上补充营养侵入松材线虫转移到 3 年生枝条上的可能性。有补痕的马尾松枝条占 83.3%, 松材线虫检出率为 60%; 无补痕的马尾松枝条占 16.4%, 松材线虫检出率为 0。这个结果表明补痕与松材线虫检出关系密切, 没有补痕的马尾松枝条检测不到松材线虫。其二, 与病变程度有关。在解剖时可以发现枝条随着病变加重, 韧皮部或木质部颜色明显有绿色—棕色—黑色的变化规律。检测 2 条韧皮部为黑色的样枝, 线虫检出率为 100%; 检测 8 条韧皮部为棕色的样枝, 线虫检出率 62.50%; 检测 6 条韧皮部为绿色的样枝, 线虫检出率为 16.67%。这表明松材线虫侵入枝条组织后, 随着病变加重, 松材线虫数量增加。其三, 与树种有关。松材线虫检出率黑松为 60%, 马尾松为 50%。黑松共检到 85 条线虫, 分布于 57 个切片, 平均 1.49 条·片⁻¹; 马尾松共检到 5 条线虫, 分布于 18 个切片, 平均 0.28 条·片⁻¹, 只及黑松 18.64%。这表明松材线虫在黑松体内比在马尾松体内更易繁殖, 这是马尾松对松材线虫病具有一定抗性的表现。所以在黑松和马尾松混交林内采集黑松病枝更易检测到松材线虫病原。此外, 松材线虫检出率与切片方式也有一定关系。如样枝横切能检到线虫, 则纵切也能检到线虫; 但样枝纵切能检

到线虫，横切不一定能检测到线虫，故采用纵切法更为有效。表2中除共有、共无的和只做1种切片方式的外，9、15、16号样枝均从纵切片上检测到线虫，而横切并未检测到，这可能与线虫活动多与主轴平行有关。另外检出率与枝龄关系不密切。

表2 健康树感病松枝解剖检测松材线虫结果

Table 2 The results of dissecting and microscope-examining infecting branches of healthy pine trees

日期	编号	树种	枝龄	针叶色	补痕	韧皮色	直径/mm	切片数/片	线虫数/条
2000-08-03	1	黑松	3	—	—	棕	14.5	横 3	2
								纵 6	10
2000-08-03	2	黑松	3	—	+	棕	11.0	横 3	2
								纵 6	18
2000-08-03	3	黑松	2	灰绿	—	绿	10.0	横 9	0
								纵 9	0
2000-08-03	4	黑松	1	灰绿	—	绿	5.0	横 9	0
								纵 9	0
2000-08-03	5	黑松	1	黄红	—	棕	4.5	纵 9	0
2000-08-03	6	黑松	2	黄红	—	棕	8.0	纵 9	0
2000-08-03	7	黑松	1	灰绿	+	棕	4.6	横 6	4
								纵 6	7
2000-08-03	8	黑松	1	黄红	++	黑	5.1	横 6	16
								纵 6	22
2000-09-01	9	黑松	2	绿	+	绿	12.0	横 9	0
								纵 3	1
2000-09-01	10	黑松	1	绿	+	棕	7.0	横 3	3
								横 3	1
2000-09-30	11	马尾松	1	针黄	++	黑	5.0	纵 9	0
2000-09-30	12	马尾松	2	针黄	—	绿	9.0	纵 9	0
2000-09-30	13	马尾松	3	—	++	绿	13.0	纵 9	0
								横 9	0
2001-07-11	14	马尾松	2	针绿	++	绿	7.5	纵 9	0
								横 9	0
2001-07-11	15	马尾松	1	针绿	+	棕	4.8	纵 9	2
								横 9	0
2001-07-11	16	马尾松	2	针绿	+	棕	6.5	横 9	0
								纵 6	2

2.3 濒死树松枝解剖检测

由表3可见，濒死树检验结果与健康树不同。表现为检出率高，达100%；检出血量大，共检测到松材线虫286条，平均5.29条·片⁻¹；韧皮部棕色部位线虫量最大，韧皮部绿色部位，没有补痕部位也能检测到大量线虫，表明松材线虫在树体内转移，侵染范围扩大，程度加深，故在任何部位都能检测到松材线虫。

2.4 野外解剖检测

野外解剖检测结果与室

表3 濒死黑松枝条解剖检测结果

Table 3 The results of dissecting and microscope-examining of branches of dying *Pinus thunbergii*

树种	枝龄	针叶色	补痕	韧皮色	直径/mm	切片数/片	线虫数/条
黑松	1	针绿	—	棕	7.5	横 6	20
						纵 6	31
黑松	2	针绿	+	棕	10.0	横 6	62
						纵 6	112
黑松	1	针绿	+	绿	7.5	横 6	8
						纵 6	12
黑松	2	针绿	—	绿	10.0	横 3	2
						纵 3	3
黑松	2	针绿	—	黑	9.0	横 6	14
						纵 6	22

说明：2000年9月11日检测

内一致, 只是操作更简化。在切片时只需用“削铅笔”方法, 把木片直接削到载玻片上, 数量一般 5~6 片, 加上饮用矿泉水, 即移到 L100 型便携式显微镜下观察, 如木片内有松材线虫, 遇水立即会游离出薄片, 在镜下就能被发现。形态鉴定可用打火机加温杀死线虫再仔细观察。如线虫在木质部内, 则把放大倍数调至 100 倍, 仔细寻找, 特别是在木质部较为新鲜的样本内, 线虫颜色与木质部相近, 难以区分, 但线虫往往蠕动, 仔细观察仍能鉴别。笔者用这种方法在北仑小港金鸡山检测了 20 个切片, 不区分 1, 2 年生枝, 其中濒死树木 1 株 5 个切片, 检出率为 100%; 健康松树局部枯枝树 15 个切片 (均选韧皮部黑变样枝), 检出率为 60.0%。平均镜检耗时为每个切片 2.5 min, 实现了松材线虫病的快速、早期和现场诊断。

3 结论和讨论

利用松树 1, 2 年生枝解剖技术和便携式显微镜能对松材线虫病实现快速早期和现场诊断。这种诊断建立在形态学基础上, 具有稳定性和可靠性。应用这种方法的关键是如何选择检测的松树和枝条。野外鉴定要选取健康而有补充营养痕迹枝条或局部枯枝的树进行检查, 剪取针叶褪色的枝条, 可以用手剥枝皮, 如韧皮部呈棕色, 最好是黑色, 则用松枝解剖法极易检测。

对松枝的解剖镜检可看出, 松材线虫侵染松枝不一定导致全树快速枯死。马尾松多表现为局部枯死, 整株健康; 黑松有表现为整株枯死的, 但局部枯死也很常见。这表明松材线虫侵染松枝后, 导致全树快速枯萎死亡需有一段很长时间和复杂的病理过程, 有必要对这段时间的松材线虫致病过程探讨研究, 并利用这段时间开发新的防治方法^[2~25]。

参考文献:

- [1] 程瑚瑞. 松材线虫萎蔫病的发生和研究进展[J]. 植物检疫, 1988, 2(1): 11-16.
- [2] 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.
- [3] 来燕学, 周永平, 俞林祥, 等. 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.
- [4] 刘伟, 杨宝君, 徐福元, 等. 松材线虫病树早期诊断的研究 (I) 马尾松、黑松松材线虫病树的早期诊断[J]. 林业科学研究, 1998, 11(5): 455-460.
- [5] 杨宝君, 刘伟, 徐福元, 等. 松材线虫病树早期诊断的研究 (II) 松树品种、接种量及线虫来源对流胶法的影响[J]. 林业科学研究, 1999, 12(3): 251-255.
- [6] 王玉嫵, 宋玉双, 藏秀强, 等. 两种指示剂对松材线虫病木测试[J]. 植物病理学报, 1996, 26(4): 371-376.
- [7] 李海燕. 含水率对几种松树松材线虫病木和健木 pH 值的影响[J]. 林业科学研究, 2000, 13(专刊): 58-62.
- [8] 沈伯葵, 胡兹苓, 包宏. 松材中两种重要线虫比较的研究[J]. 林业科学, 1993, 29(4): 345-349.
- [9] Lawler C, Hamney M A. Immunological differentiation between *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* [J]. *Nematologica*, 1993, 39(4): 536-546.
- [10] Degurian G, Lee M J, Dalmaso A. Preliminary attempt to differentiate pine wood nematode (*Bursaphelenchus* spp.) by enzyme electrophoresis [J]. *Revista Nematol*, 1985, 8(1): 88-91.
- [11] Bolla R I. Genomic differences among pathotypes of *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. *J Nematol*, 1988, 20(2): 309-316.
- [12] 郑经武. 松材线虫和拟松材线虫间及种下群体的 RAPD 指纹分析[J]. 浙江农业大学学报, 1998, 24(2): 597-601.
- [13] 许建平, 郑经武, 王建伟, 等. 松材线虫的 PCR 快速诊断研究[J]. 浙江农业大学学报, 1998, 24(2): 133-134.
- [14] Iwahori H, Kanzaki N, Futai K. A simple polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism-aided diagnosis method for pine wilt disease [J]. *For Pathol*, 2000, 30(3): 157-164.
- [15] 杨宝君. 松树上线虫的鉴定[J]. 林业科学, 1985, 21(3): 305-309.
- [16] 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.
- [17] Mamiya Y, Kiyohara T. Description of *Bursaphelenchus lignicolus* from pine wood and histopathology of nematode-infected trees [J]. *Nematologica*, 1972, 18: 120-124.
- [18] Nickle W R, Gdden A M, Mamiya Y, et al. On the taxonomy and morphology of pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. *J Nematol*, 1981, 13(3): 385-392.
- [19] Mamiya Y, Enda N. *Bursaphelenchus mucronatus* from pine wood and its biology and pathogenicity to pine trees [J]. *Nematologica*, 1979, 25: 353-361.
- [20] 程瑚瑞, 林茂松, 钱汝驹. 拟松材线虫的形态和致病性研究[J]. 南京林业大学学报, 1986, 10(2): 55-61.

- [21] 来燕学. 松黑天牛的飞行特性与防治松材线虫病的指导思想[J]. 浙江林学院学报, 1998, 15(3): 320-323.
- [22] 来燕学. 松材线虫病自然扩散特征及防治策略[J]. 浙江林学院学报, 2000, 17(2): 170-175.
- [23] 来燕学, 俞林祥, 周永平, 等. 松材线虫病濒死树急救技术与救活机理[J]. 浙江林学院学报, 2000, 17(4): 404-409.
- [24] 来燕学, 俞林祥, 周永平, 等. 用双环法诱杀松黑天牛成虫控制松材线虫病[J]. 浙江林学院学报, 2001, 18(1): 60-61.
- [25] 来燕学, 周永平, 张义丰, 等. 飞机超低量喷洒保松灵防治松材线虫病[J]. 浙江林学院学报, 2002, 19(3): 282-287.

Quick detection of *Bursaphelenchus xylophilus* by the method of dissecting pine twigs

LAI Yan-xue

(Forest Pest Control and Quarantine Station of Ningbo City, Ningbo 315000, Zhejiang, China)

Abstract: Early diagnosis of pine wood nematode (PWN) is a key measure to prevent and control pine wood nematode. To detect PWN in the pine trees early and quickly, the technology of twig dissection with the aid of portable microscope was invented, which could diagnose pine wood nematode quickly. The method was as follows: cutting pine twigs with pruning shears, slicing the twigs up with scalpel, then examining them with the portable microscope. The results showed that the detection rate of nematode was 70% in the infected twigs, 100% in the dying twigs, 60% in partial dead twigs and naught in healthy twigs. The average time for detecting a sample in pine forests was 2.5 minutes. Therefore, the technology of twig dissection with the aid of portable microscope could diagnose pine wood nematode quickly. [Ch, 3 tab. 25 ref.]

Key words: forest protection; pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*); dissection; portable microscope; early diagnosis

集学术性、原创性与实用性于一体的专著

——《山核桃病虫害防治彩色图谱》出版

2005年3月, 中国农业出版社出版了一本彩色图书——《山核桃病虫害防治彩色图谱》。这部书是从从事山核桃病虫害防治研究多年的浙江林学院生命科学学院俞彩珠老师和浙江省临安市森防站胡国良先生等12位专家学者共同编著的。该书以一页文字一页实物彩照图文并茂的形式介绍了50多种山核桃病虫害的危害情况、形态特征、发生规律和防治方法。书中的实物彩照均为首次发表。该书集学术性、原创性与实用性于一体, 语言简明, 印装精良, 非常适合农林科技工作者、大专院校师生和山核桃产区专业户阅读参考。

《山核桃病虫害防治彩色图谱》一书32开本, 铜版纸印刷, 每本定价20.00元。如有需要该书的读者请与临安山核桃产业区域创新服务中心张秋月小姐联系。电话: 0571-63741127。