

# 黄山马尾松林天牛及携带线虫种类初步调查

王立超<sup>1</sup>, 苏胜荣<sup>2△</sup>, 陈凤毛<sup>1\*</sup>, 董晓燕<sup>1</sup>, 田成连<sup>3</sup>, 王 洋<sup>1</sup>

(1.南京林业大学林学院,南方现代林业协同创新中心,江苏 南京 210037;2.黄山学院生命与环境科学学院,安徽 黄山 245041;3.黄山市林业局,安徽 黄山 245021)

**摘要:**【目的】松材线虫病是我国危害最大的森林病害,松树一旦感病便迅速死亡。调查黄山地区马尾松林内天牛种类以及天牛携带线虫的变化规律,为黄山市松材线虫病的防控工作提供理论支持。【方法】在安徽省黄山市博村林场通过野外和室内收集天牛,并对天牛进行整姿、鉴定,记录天牛种类和数量。为确定可以携带线虫的媒介天牛,使用贝尔曼漏斗法对可以危害松树且有活力的天牛进行单头天牛线虫分离实验,12 h后,用15 mL离心管接取漏斗下端的的天牛浸泡液,将浸泡液放在显微镜下观察是否含有线虫。根据携带线虫的天牛数量占天牛总数的比例计算天牛总体携带线虫比例;为鉴定天牛携带线虫种类,先通过室内真菌培养、观察线虫形态学特征对线虫进行初步鉴定,再使用松材线虫分子检测技术确定天牛携带的线虫是否为松材线虫,对于其他寄生线虫,通过28S rDNA基因进行扩增、测序、比对以及构建系统进化树进行分类鉴定。此外,统计不同时间携带线虫的天牛数量以及天牛携带线虫数量的变化。【结果】在黄山市博村林场共收集到4个亚科12个属的14种天牛,通过线虫分离实验确定可以携带线虫的天牛主要有2种:松墨天牛(*Monochamus alternatus*)和小灰长角天牛(*Acanthocinus griseus*),2种天牛整体线虫携带率分别为45.8%和13.6%,通过形态学观察松墨天牛和小灰长角天牛均可携带两种不同形态的扩散型线虫,一种是尖尾形线虫,另一种则是圆尾形线虫。尖尾形线虫通过形态学和松材线虫分子检测鉴定被确定为松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*),而圆尾形线虫则通过形态学和系统发育树结果被确定为*Contortylenchus* sp.类线虫。6月19日至7月23日每周线虫分离试验结果表明,松墨天牛雌成虫携带线虫的比例依次为76.5%、66.0%、52.9%、34.7%和10.0%;松墨天牛雄成虫携带线虫的比例依次为76.5%、60.0%、50.0%、30.8%和14.7%,松墨天牛雌成虫携带线虫的数量依次为1 018.0、530.1、202.5、200.4和80.0条/头,松墨天牛雄成虫携带线虫的数量依次为495.1、68.3、74.9、8.2和3.8条/头。【结论】黄山市博村林场马尾松林内共收集到14种天牛,其中松墨天牛和小灰长角天牛都可以携带松材线虫和*Contortylenchus* sp.类线虫,但以松墨天牛为主,松墨天牛携带线虫的数量和比例随携带时间推移逐渐减少。

**关键词:**松材线虫;媒介昆虫;松墨天牛;小灰长角天牛;马尾松

中图分类号:S763

文献标志码:A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

文章编号:1000-2006(2022)04-0029-07



## Preliminary investigations of vector beetle and nematode species in *Pinus massoniana* forest in Huangshan City

WANG Lichao<sup>1</sup>, SU Shengrong<sup>2△</sup>, CHEN Fengmao<sup>1\*</sup>, DONG Xiaoyan<sup>1</sup>, TIAN Chenglian<sup>3</sup>, WANG Yang<sup>1</sup>

(1. Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 2. College of Life and Environmental Sciences, Huangshan University, Huangshan 245041, China; 3. Huangshan City Forestry Bureau of Anhui Province, Huangshan 245021, China)

**Abstract:** 【Objective】The pine wilt disease is one of the serious forestry diseases in China, and causes rapid death in pine trees. To provide a theoretical support for the prevention and control of pine wood disease in Huangshan City, an investigation on the species of longicorn beetles and related nematodes was carried out in *Pinus massoniana* forest. 【Method】Longicorn beetles were collected indoors and outdoors from the Bocun forest farm. The beetles were fixed and

收稿日期 Received: 2021-06-29

修回日期 Accepted: 2021-10-10

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0600104); 黄山学院人才启动项目(2021xkj009)。

第一作者: 王立超(921023280@qq.com), 博士生, 负责实验开展与论文修改; 苏胜荣(532884745@qq.com), 副教授, 负责数据分析与论文修改。\* 通信作者: 陈凤毛(cfengmao@126.com), 教授。

引文格式: 王立超, 苏胜荣, 陈凤毛, 等. 黄山马尾松林天牛及携带线虫种类初步调查[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2022, 46(4): 29-35. WANG L C, SU S R, CHEN F M, et al. Preliminary investigations of vector beetle and nematode species in *Pinus massoniana* forest in Huangshan City[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2022, 46(4): 29-35. DOI: 10.12302/j.issn.1000-2006.202106041.

identified, and their species and number were recorded. To confirm the presence of nematode vectors, Baermann funnel technique was used to extract the nematodes from beetles, which are harmful to the vitality of pine trees. After soaking the beetles for 12 h, a 15 mL centrifuge tube was used to place the soaking solution at the end of the funnel, which was then observed under a microscope to determine the presence or absence of nematodes. The ratio of beetles that carry nematodes was calculated by determining the ratio of nematode-containing beetles to the total number. To identify the species of nematodes carried by beetles, they were first cultured with fungi and preliminarily identified by observing their morphological characteristics. The molecular identification technique of *Bursaphelenchus xylophilus* was used to determine if the nematode was *B. xylophilus*. For the other parasitic nematodes, the 28S rDNA gene of nematodes was amplified, sequenced, blasted, and the phylogenetic tree was constructed for identification. Besides, the ratio and the number of nematodes carried by beetles at different times were counted. 【Result】Total 14 longicorn beetles belonging to 12 genera and four subfamilies were collected. Two species of beetles *Monochamus alternatus* and *Acanthocinus griseus* were associated with nematodes, and their overall nematode carrying rates were 45.8% and 13.6%, respectively. *M. alternatus* and *A. griseus* both carry two types of dispersal nematodes with different morphological characteristics, one with a pointed tail and the other with a rounded tail. Results of the morphological and molecular analysis revealed the nematode with the pointed tail as *B. xylophilus*, while the other as *Contortylenchus* sp. During the period from June 19 to July 23, the weekly nematode isolation test results showed that the nematodes carried by female adults of *M. alternatus* were 76.5%, 66.0%, 52.9%, 34.7% and 10.0%, respectively; the proportion of nematodes carried by male adults of *M. alternatus* was 76.5%, 60.0%, 50.0%, 30.8% and 14.7%. The average number of nematodes carried by per individual female adult of *M. alternatus* was 1 018.0, 530.1, 202.5, 200.4 and 80.0, and the average number of nematodes carried by per individual male adult was 495.1, 68.3, 74.9, 8.2 and 3.8. 【Conclusion】A total of 14 longicorn beetles were recorded in the masson pine forest in Bocun forest farm, Huangshan City. Among them, *M. alternatus* and *A. griseus* can carry *B. xylophilus* and *Contortylenchus* sp., the former being the main strain. The number and proportion of *M. alternatus* carrying nematodes gradually decreased with time.

**Keywords:** *Bursaphelenchus xylophilus*; vector insect; *Monochamus alternatus*; *Acanthocinus griseus*; *Pinus massoniana*

松材线虫是一种毁灭性的外来入侵生物,其起源于北美,后通过贸易活动相继传播到日本和中国<sup>[1]</sup>。我国于1982年在南京日本黑松(*Pinus thunbergii*)上首次分离到松材线虫<sup>[2]</sup>,至今已有近40年历史,为控制松材线虫病的发生发展,多种化学、物理和生物技术运用于松材线虫的治理工作<sup>[3-5]</sup>。由于松材线虫病防治工作涉及病原、寄主、媒介昆虫、人为活动以及地理环境等多重因素而成效不佳,导致该病在我国的发生面积和致死松树数量仍在不断增加,且呈现出由南向北不断扩散的趋势<sup>[6]</sup>,2016年,松材线虫突破10℃气温界限传播到辽宁省大连市<sup>[7]</sup>。我国现有至少16种松树可以在自然条件下发生松材线虫病<sup>[3]</sup>,感病植物也由原来的松属(*Pinus*)植物扩展到落叶松属(*Larix*)植物<sup>[3,8]</sup>。2019年,松材线虫被国家林业和草原局列为一级危害性林业有害生物<sup>[9]</sup>。根据2021年松材线虫病疫区公告,我国现有19个省(自治区、直辖市)728个县市级行政区发生松材线虫病<sup>[10]</sup>,不仅导致大量的经济损失和严重的生态破坏,还对我国著名生态旅游景区泰山、庐山和黄山等地松树以及生态安全构成严重威胁。黄山市作为我国著名生态旅游城市,其松林面积占整体森林

面积的20.7%<sup>[11]</sup>,松树种类主要包括马尾松(*P. massoniana*)和黄山松(*P. taiwanensis*),两种松树均为感病树种,其中马尾松作为荒山造林先锋树种,在黄山市分布广泛;黄山松则主要分布在黄山风景区,黄山风景区也因造型奇特的黄山松而闻名世界,文化和生态价值不可估量,但是黄山市黄山区于2018年被划定为松材线虫病疫区<sup>[12]</sup>,2019年黄山市除黄山风景区外,其辖区内的三区四县均被划定为松材线虫病疫区<sup>[13]</sup>。目前,黄山风景区四周均为松材线虫病疫区,松材线虫已对黄山风景区造成前所未有的生态威胁。

松材线虫寄生在松树体内,在自然界中需要借助媒介昆虫进行传播。现有报道可以携带松材线虫的媒介昆虫涉及天牛科(Cerambycidae)、小蠹科(Scolytidae)、吉丁科(Buprestidae)、叩甲科(Elaterridae)、白蚁科(Termitidae)和象甲科(Curculionidae)等<sup>[14-18]</sup>,其中天牛科是最主要的携带者和传播者。在我国已经报道可以携带线虫的媒介天牛包括松墨天牛(*Monochamus alternatus*)、云杉花墨天牛(*M. saltuarius*)、褐梗天牛(*Arhopalus rusticus*)、西藏墨天牛(*M. nigromaculatus*)、短角幽天牛(*Spondylis buprestoides*)、小灰长角天牛(*Acan-*

*thocinus griseus*)、台湾长角天牛(*Acanthocinus taiwannensis*)、粗鞘双条杉天牛(*Semanotus sinoauster*)、樟泥色天牛(*Uraecha angusta*)以及桃红颈天牛(*Aromia bungii*)<sup>[18-22]</sup>。黄山作为松材线虫病防控重点区域之一,除赵锦年等<sup>[22]</sup>对黄山风景区内媒介昆虫调查外,未见其他研究报告。为此,笔者以黄山市博村林场为实验点,通过室内和室外收集天牛,调查黄山地区松材线虫的媒介天牛以及天牛携带线虫的规律,为黄山市松材线虫病的科学防控提供理论支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样地概况

试验地选择在安徽省黄山市博村林场马尾松林内(118°17'30"E,29°41'51"N),属皖南山区变层岩系的低山、丘陵地区,海拔200~380 m,年平均气温为15.5~16.3℃,极端最高气温可达41℃,1月平均气温为3.5℃,7月平均气温为27.9℃,地表平均气温为17.9~19.3℃,平均无霜期达260 d,年降水量为1350~1650 mm,平均降水时间为152 d,4—6月份降雨量多,10月至翌年2月降雨量少,呈不均匀季节性分配,且垂直变化程度较大。松林内偶有枫香(*Liquidambar formosana*)、毛竹(*Phyllostachys edulis*)、青冈栎(*Quercus glauca*)、板栗(*Castanea mollissima*)、乌桕(*Triadica sebifera*)等乔木存在。

### 1.2 天牛种类调查

野外收集:2017年5月29日在博村林场马尾松林内悬挂110个诱捕器,诱芯为APF-I型松墨天牛高效诱剂(厦门三涌生物科技有限公司),每周收集1次诱捕器内天牛,用塑料瓶将天牛带回室内。室内收集:选择有天牛侵入孔的马尾松疫木放入养虫笼中,待其中天牛羽化后收集天牛。

对收集到的天牛进行整姿、鉴定,并记录种类和数量,使用型号为Discovery 28蔡司体视显微镜(德国卡尔蔡司股份有限公司)对天牛进行拍照。

### 1.3 线虫媒介天牛种类调查

分离实验使用的松墨天牛、短角幽天牛、赤梗天牛(*Arhopalus unicolor*)、桃红颈天牛和弧纹虎天牛(*Chlorophorus miwai*)用诱捕器获得,小灰长角天牛和齿角坡天牛(*Pterolophia serrata*)用养虫笼收集。每周实验选择有活力且可以危害马尾松的天牛装入50 mL离心管带回实验室,每个离心管装1头天牛。在实验室用剪刀将天牛剪碎,使用贝尔曼漏斗法对各种天牛进行单头天牛线虫分离实验,12 h后,用15 mL离心管接取漏斗下端天牛浸泡液,

做好标记,将离心管放在离心机中12 000 r/min离心3 min,用移液枪吸取离心管上部液体至废液缸,保留5 mL天牛浸泡液用于镜检实验,观察天牛浸泡液是否含有线虫以确定天牛是否携带线虫。

### 1.4 天牛携带线虫种类调查

线虫形态学观察。将保留的5 mL线虫分离液全部倒入直径30 mm的一次性培养皿中,在光学显微镜下使用10倍物镜对培养皿中所有线虫进行观察,依据尾部形态对扩散型线虫进行初步判断,再将不同形态特征的线虫分别挑取100条置于灰葡萄孢和炭疽菌上培养,待线虫取食真菌90%后,使用贝尔曼漏斗法分离线虫,在光学显微镜下,通过观察雌成虫和雄成虫头部、尾部、口针、食道腺以及生殖系统对线虫进行形态学鉴定。

松材线虫分子检测。由于天牛携带线虫为扩散型线虫,其形态特征不明显<sup>[23]</sup>,为确定天牛是否携带松材线虫,用移液枪吸取线虫液5 μL(含1~3条线虫)于1.5 mL离心管中,加入5 μL线虫DNA提取液A液和1 μL线虫DNA提取液B液(南京生兴有害生物防治技术股份有限公司),振荡混匀,将离心管放入金属浴(上海一恒科技有限公司)中;95℃加热45 min,65℃加热10 min;12 000 r/min离心3 min;取上清3.5 μL加入200 μL PCR管中,加入5 μL松材线虫检测试剂K液和1.5 μL松材线虫检测试剂P液(南京生兴有害生物防治技术股份有限公司),振荡混匀,短暂离心,将PCR管置于Bx-48松材线虫自动化分子检测仪(杭州博日科技有限公司)进行分子检测<sup>[24]</sup>。

对于松材线虫分子检测技术和形态学均无法确定的线虫,使用线虫28S rDNA引物对基因组DNA进行扩增,其中DNA提取参考陈凤毛等<sup>[25]</sup>方法,28S rDNA引物序列以及PCR扩增程序参见宋雅婷等<sup>[26]</sup>方法。扩增产物在1.0%(质量分数)的琼脂糖凝胶上电泳20 min,并在UVP-GelDoc-It2315成像仪(Ultra-Violet Products Ltd.,美国)观察拍摄。PCR产物由南京Genscript测序公司直接纯化并双向测序,在GenBank数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中对获得的序列进行BLAST同源比对分析。运用MEGA软件中的Clustal W程序进行序列拼接、比对,以邻接(NJ)法构建线虫28S rDNA的系统发育树,选择伞滑刃属(*Bursaphelenchus*)作为外群。

### 1.5 天牛携带线虫比率和数量的统计

试验收集到的小灰长角天牛中仅有3头可以携带线虫,且天牛携带线虫的数量均小于5条,因

此仅对松墨天牛在不同时间携带线虫的比例和数量进行统计。由于黄山地区5月和6月雨水多,从6月19日—6月25日作为第一个时间段(于6月25日)开始统计天牛携带线虫的比例和数量,以后每周统计1次(即6月25日、7月2日、7月9日、7月16日、7月23日),直至试验结束,共统计5次松墨天牛携带线虫的比例和数量,其中天牛携带线虫率的计算公式为:携带线虫的雌(雄)成虫数量/用于分离线虫的雌(雄)成虫总数×100%。

1.6 数据处理

天牛携带线虫的比例和数量变化使用 Excel 2019 进行数据统计,天牛携带线虫的比例和数量变化则使用 GraphPad 8.0 进行作图。

2 结果与分析

2.1 天牛种类分析

经研究发现,实验共收集到14种天牛(表1),分属于4个亚科(沟胫天牛亚科、幽天牛亚科、锯天牛亚科和花天牛亚科)、12个属,其中有6种天牛的寄主植物为马尾松,包括松墨天牛、小灰长角天牛、短角幽天牛、赤梗天牛、齿角坡天牛和弧纹虎天牛,在6种天牛中,松墨天牛的数量最多,占有天牛数量的98%以上;其次为小灰长角天牛、弧纹虎天牛和斑角坡天牛,其余天牛诱捕到的数量较少。

表1 马尾松林诱捕天牛种类

Table 1 The longicorn beetle species captured by the panel trap in *Pinus massoniana* plantation

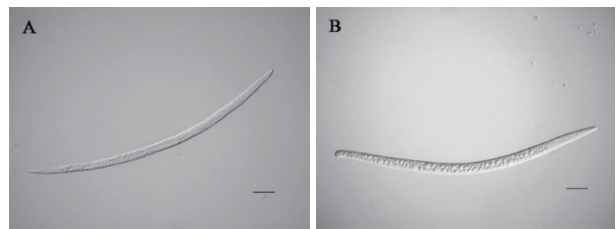
诱捕天牛种类 species of longicorn beetles	数量/头 number of longicorn beetle trapped
松墨天牛 <i>Monochamus alternatus</i>	5 910
小灰长角天牛 <i>Acanthocinus griseus</i>	22
短角幽天牛 <i>Spondylis buprestoides</i>	3
赤梗天牛 <i>Arhopalus unicolor</i>	3
桃红颈天牛 <i>Aromia bungii</i>	2
星天牛 <i>Anoplophora chinensis</i>	1
八星粉天牛 <i>Olenecamptus octopustulatus</i>	1
弧纹虎天牛 <i>Chlorophorus miwai</i>	18
黄荆重突天牛 <i>Tetraopthalmus episcopalis</i>	1
桔狭胸天牛 <i>Philus antennatus</i>	2
斜顶天牛 <i>Pseudoterinaea bicoloripes</i>	1
斑角坡天牛 <i>Pterolophia annulata</i>	14
瘤胸簇天牛 <i>Aristobia hispida</i>	1
齿角坡天牛 <i>Pterolophia serrata</i>	1

2.2 媒介天牛种类分析

通过对松墨天牛、短角幽天牛、赤梗天牛、桃红颈天牛、弧纹虎天牛、小灰长角天牛和齿角坡天牛的线虫分离液镜检,结果表明在短角幽天牛、赤梗

天牛、桃红颈天牛、弧纹虎天牛和齿角坡天牛的线虫分离液中并未发现任何线虫,仅在松墨天牛和小灰长角天牛的线虫分离液中发现一定数量的寄生线虫,其中松墨天牛携带线虫的比例为45.8%,小灰长角天牛携带线虫的比例为13.6%。

通过对天牛体内线虫形态学观察发现,黄山地区松墨天牛和小灰长角天牛可以携带两种扩散型寄生线虫,其中一种扩散型线虫尾形钝尖(下文称为尖尾线虫)(图1A),另一种扩散型线虫尾形指圆(下文称为圆尾线虫)(图1B)。

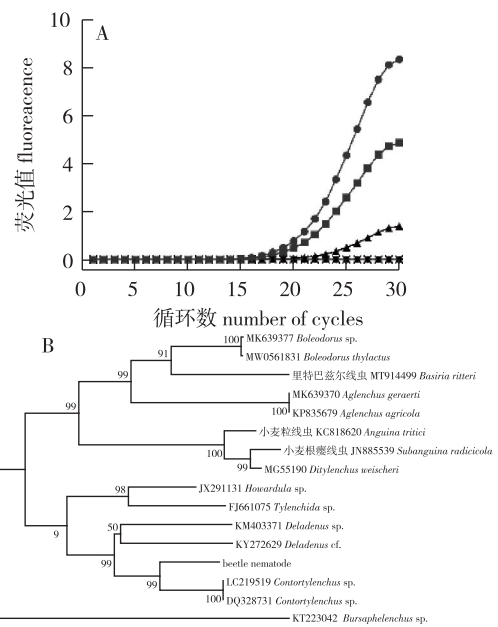


A. 松材线虫 *B. xylophilus*; B. *Contortylenchus* sp. 比例尺 scale bars = 50 μm。

图1 天牛携带线虫的种类

Fig.1 Species of nematodes carried by longicorn beetles

通过松材线虫分子检测鉴定尖尾线虫为松材线虫(图2A),通过真菌培养,其雌成虫和雄成虫

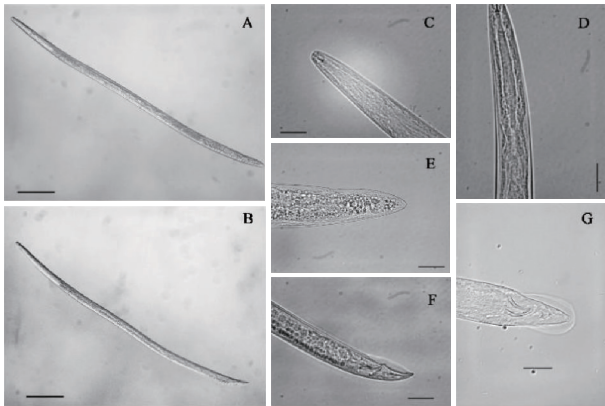


- 阳性对照 positive control; ✕ 阴性对照 negative control;
- 松墨天牛携带尖尾线虫 *Monochamus alternatus* carrying the nematode with pointed tail;
- ▲ 松墨天牛携带圆尾线虫 *Monochamus alternatus* carrying the nematode with round tail;
- ◆ 小灰长角天牛携带尖尾线虫 *Canthocinns griseus* carrying the nematode with pointed tail;
- ◆ 小灰长角天牛携带圆尾线虫 *Canthocinns griseus* carrying the nematode with round tail.

图2 线虫分子检测结果与系统发育树

Fig.2 The results of nematode identification and phylogenetic tree based on the 28S rDNA

的形态特征与松材线虫相同,进一步确定为松材线虫;而圆尾线虫通过炭疽菌培养,观察其繁殖型线虫特征为成虫头部无缢缩,口针基部明显,无中食道球,雌成虫无阴门盖,尾部指圆形,线虫热杀死后略向腹部弯曲,雄成虫交合刺无喙突,尾部尖,热杀死后线虫直伸,雄虫交合伞椭圆形(图3),其序列比对结果与 *Contortylenchus* sp. 相似度最高,系统发育树结果进一步显示与 *Contortylenchus* sp. 聚在一个分支上(图2B),综合以上结果,初步鉴定天牛携带圆尾线虫为 *Contortylenchus* sp. 线虫。



A. 雌虫整体 entire view of female; B. 雄虫整体 entire view of male; C. 体前部 anterior region; D. 食道 esophagi; E. 雌虫尾部和阴门 female tail and vulval region; F. 雄虫尾部 male tail; G. 交合刺和交合伞 spicule and caudal alae (比例尺 scale bars; A, B = 100  $\mu$ m; C, D, E, F, G = 20  $\mu$ m)

图3 *Contortylenchus* sp. 显微图

Fig.3 Light micrographs of *Contortylenchus* sp.

### 2.3 天牛携带线虫数量变化

研究发现,各统计日中6月25日时松墨天牛雌成虫和雄成虫线虫携带率均为76.5%,线虫平均携带量分别为1018.0条/头和495.1条/头(图4)。7月2日时松墨天牛雌成虫和雄成虫线虫携带率分别为66.0%和60.0%,线虫平均携带量分别为530.1条/头和68.3条/头。7月9日时松墨天牛雌成虫和雄成虫线虫携带率分别为52.9%和50.0%,线虫平均携带量分别为202.5条/头和74.9条/头。7月16日时松墨天牛雌成虫和雄成虫线虫携带率分别为34.7%和30.8%,线虫平均携带量分别为200.4条/头和8.2条/头。7月23日时松墨天牛雌成虫和雄成虫线虫携带率分别为10.0%和14.7%,线虫平均携带量分别为80.0条/头和3.8条/头。可见,松墨天牛雌成虫线虫携带率和携带量大于松墨天牛雄成虫线虫携带率和携带量,且松墨天牛携带率和携带量随时间的推移而减少。

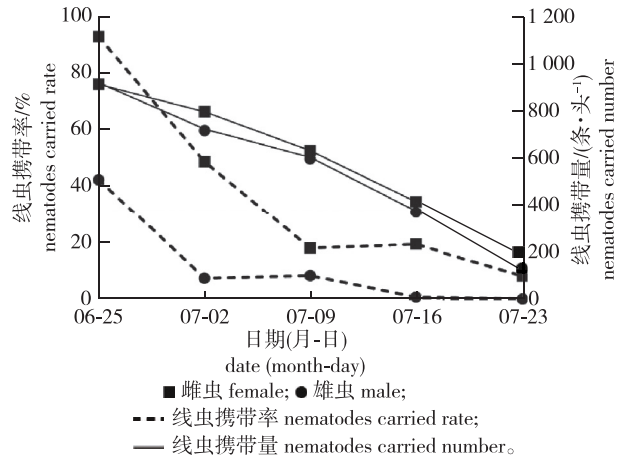


图4 不同时间天牛携带线虫比率和数量

Fig.4 The ratio and number of nematodes carried by longicorn beetles in different time

### 3 讨论

已有研究发现,松树体内寄生多种线虫<sup>[27-29]</sup>,同时也生存多种蛀干害虫。当松树内蛀干害虫的生活史和松树内的线虫生活史同步时,蛀干害虫在羽化时便有可能携带线虫<sup>[30]</sup>。本实验选择在黄山市博村林场对当地媒介昆虫进行调查,实验共收集到14种天牛,其中危害松树的天牛有6种,松墨天牛的种群数量占绝对优势,其他天牛种群数量远远小于松墨天牛种群数量。这可能与天牛诱捕器的诱芯相关,也可能与林地环境相关。天牛携带线虫种类和比例受到线虫种类和种群大小、天牛种类和种群的大小、疫木含水量以及疫木内微生物种类等多种因素影响<sup>[31-35]</sup>。在6种危害松树的天牛中,仅松墨天牛和小灰长角天牛携带线虫,且松墨天牛在黄山博村林场6月下旬天牛种群数量大,在7月下旬时天牛数量明显减少。松墨天牛作为亚洲地区松材线虫主要媒介昆虫,一直以来被当作媒介昆虫防治的重点对象。小灰长角天牛作为黄山博村林场马尾松主要蛀干天牛之一<sup>[21]</sup>,也曾被报道可以携带松材线虫,但是小灰长角天牛携带的线虫数量和比例远小于松墨天牛携带线虫的数量和比例<sup>[18]</sup>。短角幽天牛曾在日本被报道携带松材线虫<sup>[14]</sup>,在中国,至今未见短角幽天牛可以携带松材线虫的报道,但有研究发现短角幽天牛可以携带拟松材线虫<sup>[22]</sup>。桃红颈天牛作为蔷薇科李属植物上一种常见天牛,也曾被报道可以携带上百条松材线虫<sup>[36]</sup>,但在本实验中均未在短角幽天牛、桃红颈天牛、弧纹虎天牛和齿角坡天牛体内分离到松材线虫,这可能与本次收集到的天牛种群大小相关。

前人研究报道指出松墨天牛可以携带3种寄

生线虫,即松材线虫、拟松材线虫(*B. mucronatus*)和卵巢线虫(*Contortylenchus genitalicola*)<sup>[37]</sup>,本实验收集到的松墨天牛携带的线虫有两种,一种为松材线虫,另外一种为 *Contortylenchus* sp.线虫,并未发现拟松材线虫,这可能与当地松树体内寄生线虫种类有关。卵巢线虫是一种在松墨天牛卵巢内发现的一种寄生线虫<sup>[38]</sup>,也具有扩散型和繁殖型两个阶段。当卵巢线虫处在扩散型阶段,其生活史与腊肠线虫科线虫生活史相似,当其处在繁殖阶段,卵巢线虫生活史与新垫切线虫科显腺属线虫生活史相似<sup>[39]</sup>,虽然有学者对卵巢线虫形态进行研究报道,但不同地理种群的线虫会适应环境形态发生变化,因此对天牛通过分子生物学<sup>[40]</sup>以及形态学鉴定观察最终将天牛携带的圆尾线虫确定为 *Contortylenchus* sp.线虫。松墨天牛携带松材线虫的比例和数量受多种因素影响。经统计不同时间松墨天牛携带松材线虫的数量和比例发现马尾松林内松墨天牛携带线虫的比例和数量随时间推移逐渐减少,这与赵锦年等<sup>[41]</sup>和柴希民等<sup>[42]</sup>研究结果不同,赵锦年和柴希民等研究发现不同时间羽化的松墨天牛携带线虫具有明显的单峰或者双峰现象,本研究中天牛在6月19日—6月25日期间携带线虫的比例最高,携带线虫量最多,后面逐渐减少这可能是由于黄山地区5月和6月雨水天气多,试验未对该时期内羽化出的松墨天牛携带线虫的比例和数量进行统计的结果。天牛携带线虫数量和比例逐渐减少的原因可能是由于枯死松树内大量线虫在天牛早期羽化借助天牛传播,或者天气持续高温,枯死木内水分含量下降,导致天牛携带线虫的比例和数量逐渐减少。

#### 参考文献(reference):

- [1] FUTAI K. Pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 2013, 51: 61-83. DOI: 10.1146/annurev-phyto-081211-172910.
- [2] 程瑚瑞,林茂松,黎伟强,等.南京黑松上发生的萎蔫线虫病[J]. *森林病虫通讯*, 1983, 2(4): 1-5. CHENG H R, LIN M S, LI W Q, et al. Pine wilt disease on *Pinus thunbergia* in Nanjing [J]. *For Pest Dis*, 1983, 2(4): 1-5.
- [3] 叶建仁.松材线虫病在中国的流行现状、防治技术与对策分析[J]. *林业科学*, 2019, 55(9): 1-10. YE J R. Epidemic status of pine wilt disease in China and its prevention and control techniques and counter measures [J]. *Sci Silvae Sin*, 2019, 55(9): 1-10. DOI: 10.11707/j.1001-7488.20190901.
- [4] 陈婷婷,叶建仁,吴小芹,等.抗松材线虫病马尾松体胚发生与植株再生条件的优化[J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2019, 43(3): 1-8. CHEN T T, YE J R, WU X Q, et al. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration of disease-resistant *Pinus massoniana* Lamb [J]. *J Nanjing For Univ (Nat Sci Ed)*, 2019, 43(3): 1-8. DOI: 10.3969/j.issn.1000-2006.201806005.
- [5] 尹艳楠,谈家金,李梦伟,等.蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 菌株防治松材线虫病研究[J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2021, 45(3): 152-158. YIN Y N, TAN J J, LI M W, et al. A study on the biocontrol of pine wilt disease by *Bacillus cereus* NJSZ-13 [J]. *J Nanjing For Univ (Nat Sci Ed)*, 2021, 45(3): 152-158. DOI: 10.12302/j.issn.1000-2006.201910013.
- [6] 潘佳亮,姚翰文,董瀛谦,等.2019年全国松材线虫病疫情分析[J]. *中国森林病虫*, 2021, 40(1): 32-37. PAN J L, YAO H W, DONG Y Q, et al. Analysis of the epidemic situation of pine wilt disease in China in 2019 [J]. *For Pest Dis*, 2021, 40(1): 32-37. DOI: 10.19688/j.cnki.issn1671-0886.20200042.
- [7] 国家林业局. 国家林业局 2017 年第 4 号公告 [EB/OL]. (2017-01-11) [2021-06-30]. <http://www.forestry.gov.cn/sites/main/main/gov/content.jsp?TID=2344>.
- [8] 于海英,吴昊,张旭东,等.落叶松自然条件下感染松材线虫初报[J]. *中国森林病虫*, 2019, 38(4): 7-10. YU H Y, WU H, ZHANG X D, et al. Preliminary study on *Larix* spp. infected by *Bursaphelenchus xylophilus* in natural environment [J]. *For Pest Dis*, 2019, 38(4): 7-10. DOI: 10.19688/j.cnki.issn1671-0886.20180024.
- [9] 国家林业和草原局. 国家林业和草原局 2019 年第 20 号公告 [EB/OL]. (2019-12-12) [2021-06-30]. [http://www.gov.cn/xinwen/2019-12/18/content\\_5462013.htm](http://www.gov.cn/xinwen/2019-12/18/content_5462013.htm).
- [10] 丁晓磊,张悦,林司曦,等.基于高通量测序技术的松材线虫研究进展[J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2022, 46(4): 1-7. DING X L, ZHANG Y, LIN S X, et al. An overview of high-throughput sequencing techniques applied on *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. *J Nanjing For Univ (Nat Sci Ed)*: 2022, 46(4): 1-7. DOI: 10.12302/j.issn.1000-2006.202204039.
- [11] 郑凡.黄山市森林资源现状及变化分析[J]. *安徽林业科技*, 2015, 41(3): 54-57. ZHENG F. Analysis on forest resource actualities and changes of Huangshan City [J]. *Anhui For Sci Technol*, 2015, 41(3): 54-57. DOI: 10.3969/j.issn.2095-0152.2015.03.016.
- [12] 国家林业和草原局. 国家林业局 2018 年第 1 号公告 [EB/OL]. (2018-02-02) [2021-06-30]. <http://www.forestry.gov.cn/sites/main/main/gov/content.jsp?TID=2465>.
- [13] 国家林业和草原局. 国家林草局 2019 年第 4 号公告 [EB/OL]. (2019-01-23) [2021-06-30]. <http://www.forestry.gov.cn/zlszz/5356/20190517/054027583884147.html>.
- [14] MAMIYA Y, ENDA N. Transmission of *Bursaphelenchus lignicolus* (Nematoda: Aphelenchoididae) by *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) [J]. *Nematologica*, 1972, 18(2): 159-162. DOI: 10.1163/187529272x00395.
- [15] WINGFIELD M J, BLANCHETTE R A. The pine-wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in Minnesota and Wisconsin: insect associates and transmission studies [J]. *Can J For Res*, 1983, 13(6): 1068-1076. DOI: 10.1139/x83-143.
- [16] LINIT M J, KONDO E, SMITH M T. Insects associated with the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae), in Missouri [J]. *Environ Entomol*, 1983, 12(2): 467-470. DOI: 10.1093/ee/12.2.467.
- [17] SOUSA E, NAVES P, BONIFÁCIO L, et al. Preliminary survey for insects associated with *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal [J]. *EPPO Bull*, 2002, 32(3): 499-502. DOI: 10.1046/j.1365-2338.2002.00597.x.
- [18] 徐福元,杨宝君,葛明宏.松材线虫病媒介昆虫的调查[J]. *森林病虫通讯*, 1993, 12(2): 20-21. XU F Y, YANG B J, GE M H. Investigation on insects associated with *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. *For Pest Dis*, 1993, 12(2): 20-21.
- [19] WANG Y, CHEN F M, WANG L C, et al. Investigation of beetle species that carry the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylo-*

- philus* (Steiner and Buhner) Nickle, in China[J]. J For Res, 2021, 32(4): 1745-1751. DOI: 10.1007/s11676-020-01146-2.
- [20] LI M, LI H, SHENG R C, et al. The first record of *Monochamus saltuarius* (Coleoptera; Cerambycidae) as vector of *Bursaphelenchus xylophilus* and its new potential hosts in China [J]. Insects, 2020, 11(9): 636. DOI: 10.3390/insects11090636.
- [21] 王玉嫵, 石运琳, 周新胜, 等. 南京地区黑松萎蔫线虫病发病规律的初步观察[J]. 森林病虫害通讯, 1985, 4(2): 15-17. WANG Y Y, SHI Y L, ZHOU X S, et al. Preliminary observation on the pathogenesis of pine wilt disease of *Pinus thunbergii* in Nanjing [J]. For Pest Dis, 1985, 4(2): 15-17.
- [22] 赵锦年, 余盛明, 王浩杰, 等. 黄山风景区松蛀虫及携带线虫潜能的研究[J]. 中国森林病虫害, 2004, 23(4): 15-18. ZHAO J N, YU S M, WANG H J, et al. Pine borers in Huangshan Scenic Area and the potential for carrying nematodes by them [J]. For Pest Dis, 2004, 23(4): 15-18. DOI: 10.3969/j.issn.1671-0886.2004.04.005.
- [23] KANZAKI N, MAEHARA N, AKIBA M, et al. Morphological characters of dauer juveniles of three species of *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 [J]. Nematology, 2016, 18(2): 209-220. DOI: 10.1163/15685411-00002954.
- [24] 陈凤毛, 叶建仁, 吴小芹. 松材线虫实时 PCR 检测技术[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2007, 31(4): 121-124. CHEN F M, YE J R, WU X Q. Detection technique of *Bursaphelenchus xylophilus* using real time PCR [J]. J Nanjing For Univ (Nat Sci Ed), 2007, 31(4): 121-124. DOI: 10.3969/j.issn.1000-2006.2007.04.027.
- [25] 陈凤毛, 叶建仁, 吴小芹, 等. 松材线虫两种实用分子检测技术[J]. 北京林业大学学报, 2011, 33(4): 149-152. CHEN F M, YE J R, WU X Q, et al. Two kinds of applied molecular skills to detect *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. J Beijing For Univ, 2011, 33(4): 149-152. DOI: 10.13332/j.1000-1522.2011.04.012.
- [26] 宋雅婷, 王立超, 孙守慧, 等. 滑刃属线虫 1 个中国新记录种[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2020, 44(3): 105-110. SONG Y T, WANG L C, SUN S H, et al. First report of *Aphelenchoides rotundicaudatus* in China [J]. J Nanjing For Univ (Nat Sci Ed), 2020, 44(3): 105-110. DOI: 10.3969/j.issn.1000-2006.201909046.
- [27] 黄任娥, 叶建仁, 潘宏阳, 等. 感染松材线虫病松树滑刃目线虫调查[J]. 植物病理学报, 2008, 38(2): 136-146. HUANG R E, YE J R, PAN H Y, et al. Investigation on Aphelenchida (Nematoda) from pine wood infected with *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. Acta Phytopathol Sin, 2008, 38(2): 136-146. DOI: 10.13926/j.cnki.apps.2008.02.018.
- [28] 史延梅, 陈凤毛, 叶建仁, 等. 我国松树寄生线虫分类检索[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2012, 36(1): 137-141. SHI Y M, CHEN F M, YE J R, et al. Classification of parasitic Nematodes in pine trees in China [J]. J Nanjing For Univ (Nat Sci Ed), 2012, 36(1): 137-141. DOI: 10.3969/j.issn.1000-2006.2012.01.028.
- [29] 汤坚, 叶建仁, 陈凤毛, 等. 松树体内寄生线虫种类及其致病性[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2008, 32(3): 112-116. TANG J, YE J R, CHEN F M, et al. Species of parasitic nematode in pine host and pathogenicity [J]. J Nanjing For Univ (Nat Sci Ed), 2008, 32(3): 112-116. DOI: 10.3969/j.issn.1000-2006.2008.03.027.
- [30] 谢立群, 巨云为, 赵博光. 松材线虫传播机理的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(19): 5798-5800, 5867. XIE L Q, JU Y W, ZHAO B G. Review on transmission mechanism of *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. J Anhui Agric Sci, 2007, 35(19): 5798-5800, 5867. DOI: 10.13989/j.cnki.0517-6611.2007.19.075.
- [31] FUKUSHIGE H. The number of *Bursaphelenchus xylophilus* carried by *Monochamus alternatus* and some possible factors regulating the number [J]. Jpn J Nematol, 1990, 20: 18-24.
- [32] MAEHARA N, FUTAI K. Factors affecting the number of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) carried by several species of beetles [J]. Nematology, 2002, 4(5): 653-658. DOI: 10.1163/15685410260438944.
- [33] TOGASHI K. Factors affecting the number of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) carried by newly emerged adults of *Monochamus alternatus* (Coleoptera; Cerambycidae) [J]. Appl Entomol Zool, 1989, 24(4): 379-386. DOI: 10.1303/aez.24.379.
- [34] JIKUMARU S, TOGASHI K. Inhibitory effect of *Bursaphelenchus mucronatus* (nematoda: Aphelenchoididae) on *B. xylophilus* boarding adult *Monochamus alternatus* (coleoptera: Cerambycidae) [J]. J Nematol, 2004, 36(1): 95-99.
- [35] MAEHARA N, TSUDA K, YAMASAKI M, et al. Effect of fungus inoculation on the number of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) carried by *Monochamus alternatus* (Coleoptera; Cerambycidae) [J]. Nematology, 2006, 8(1): 59-67. DOI: 10.1163/156854106776179944.
- [36] 田成连. 黄山市松墨天牛及小灰长角天牛羽化规律研究[J]. 安徽林业科技, 2018, 44(5): 8-9, 13. TIAN C L. Study on the eclosion regularities of *Monochamus alternatus* and *Acanthocinus griseus* in Huangshan City [J]. Anhui For Sci Technol, 2018, 44(5): 8-9, 13. DOI: 10.3969/j.issn.2095-0152.2018.05.003.
- [37] 来燕学, 杨忠岐, 王小艺, 等. 卵巢线虫 (*Contortylenchus genitalicola*) 在中国松褐天牛上的分布与作用研究[J]. 林业科学研究, 2018, 31(1): 51-59. LAI Y X, YANG Z Q, WANG X Y, et al. Distribution and function of the ovarian nematode *Contortylenchus genitalicola* (Tylenchida: Allantonematidae) on *Monochamus alternatus* (Coleoptera; Cerambycidae) in China [J]. For Res, 2018, 31(1): 51-59. DOI: 10.13275/j.cnki.lykxyj.2018.01.006.
- [38] KOSAKA H, OGURA N. Biology of a tylenchid nematode parasitic on the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus* [J]. Nematologica, 1991, 37(1/2/3/4): 455-469. DOI: 10.1163/187529291x00448.
- [39] KOSAKA H, OGURA N. *Contortylenchus genitalicola* n. sp. (Tylenchida: Allantonematidae) from the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus* (Coleoptera; Cerambycidae) [J]. Appl Entomol Zool, 1993, 28(4): 423-432. DOI: 10.1303/aez.28.423.
- [40] 陈敬祥, 程杰, 林同. 松墨天牛 dynamin-1-like protein 基因的鉴定及表达分析[J]. 江苏农业学报, 2017(3): 524-532. CHEN J X, CHENG J, LIN T. Identification and expression of dynamin-1-like protein gene from *Monochamus alternatus* [J]. Jiangsu J Agric Sci, 2017(3): 524-532. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.03.007.
- [41] 赵锦年, 张常青, 戴建昌, 等. 松墨天牛成虫羽化逸出及其携带松材线虫能力的研究[J]. 林业科学研究, 1999, 12(6): 572-576. ZHAO J N, ZHANG C Q, DAI J C, et al. Studies of emerge emigration of *Monochamus alternatus* and its ability of carrying nematode [J]. For Res, 1999, 12(6): 572-576. DOI: 10.3321/j.issn.1001-1498.1999.06.002.
- [42] 柴希民, 张都海, 张国贤, 等. 松褐天牛成虫携带松材线虫的数量[J]. 东北林业大学学报, 2000, 28(5): 99-101. CHAI X M, ZHANG D H, ZHANG G X, et al. The number of *Bursaphelenchus xylophilus* carried by *Monochamus alternatus* adults [J]. J Northeast For Univ, 2000, 28(5): 99-101. DOI: 10.13759/j.cnki.dlx.2000.05.023.

(责任编辑 王国栋)