

文章编号:1001-7380(2016)02-0005-03

不同培养方法对松材线虫鉴定的影响

杨 希¹, 陈 伟², 黄金水¹, 汤陈生¹, 何学友¹, 郭久江²

(1. 福建省林业科学研究院, 福建 福州 350012; 2. 福州市植物园, 福建 福州 350012)

摘要:开展了松萎蔫病疫木(枯死木、包装板)不同温度、时间保湿培养,以真菌为培养基培养松材线虫分散型3龄幼虫对松材线虫鉴定率影响的研究。结果表明:随着培养温度提高、时间的延长,松材线虫鉴定率随之升高。疫木保湿培养,48 h之前,鉴定率呈缓慢上升趋势,48 h之后鉴定率快速上升;疫木保湿30℃培养72 h或25℃培养96 h,真菌30℃培养72 h或20-25℃培养96 h,松材线虫分散型3龄幼虫样本的松材线虫鉴定率达100%,2种培养方法均适宜在松萎蔫病疫木松材线虫鉴定中应用。

关键词:松材线虫;分散型3龄幼虫;保湿;疫木;真菌(盘多毛孢);培养方法;鉴定

中图分类号:S763 **文献标志码:**A **doi:**10.3969/j.issn.1001-7380.2016.02.002

Effect of different culture method on the identification of *Bursaphlenchus xylophilus*

YANG Xi¹, CHEN Wei², HUANG Jin-shui¹, TANG Chen-sheng¹, HE Xue-you¹, GUO Jiu-jiang²

(1. Fujian Academy of Forestry Sciences, Fuzhou 350012 China; 2. The Fuzhou Botanical Garden, Fuzhou 350012 China)

Abstract: The effect of culturing dispersion-type three-instar-larvae of *Bursaphlenchus xylophilus* was studied on the identification rate, i.e. moisturizing culture of wood (dead standing tree or packing board) infected by pine wilt disease and on the medium containing fungi under different temperature and time duration. The results showed the identification rate of *B. xylophilus* increased with the temperature and time duration. As for the moisturizing culture of the infected wood, the identification rate increased gently before 48 hours and rapidly after 48 hours. For the moisturizing culture of the infected wood at 30℃ lasting 72 hours or 25℃ lasting 96 hours, or the fungus medium culture at 30℃ lasting 72 hours or 20-25℃ lasting 96 hours, the identification rate for the dispersion-type three-instar-larvae of *B. xylophilus* reached 100%. Such two methods are suitable for the identification of *B. xylophilus* from the wood infected by pine wilt disease.

Key words: *Bursaphlenchus xylophilus*; Dispersion-type three-instar-larvae; Moisturization; Infected wood; Fungus (*Pestalotia* sp.); Culture method; Identification

松材线虫病(*Bursaphlenchus xylophilus*)又名松材线虫萎蔫病、松树萎蔫病,由于其危害严重和防治困难受到世界各国的重视。我国于1982年在南京中山陵的黑松上首次发现该病,目前已蔓延至南方多个省^[1]。

松材线虫是松材线虫病的主要病原^[2,3],快速准确鉴定松材线虫是该病研究的关键。松材线虫的

鉴定主要是根据其成虫外部形态和内部结构的特征确定^[1,4],这种方法简单易行,无需复杂的设备,至今依然在松萎蔫病的研究中普遍使用。在研究过程中,会出现疫木中仅有少量松材线虫的分散型3龄幼虫^[5-7],没有成虫,缺乏鉴定松萎蔫病的主要组织结构特征,不能对病情做出正确的判断,需要将这些分散型3龄幼虫培养成成虫,才能进行准确

收稿日期:2016-03-17;修回日期:2016-04-03

基金项目:福建省林业厅(闽林科[2012]3号)和省属公益类科研专项(闽林研[2012]25号)“松材线虫病持续控制关键技术与示范”;国家林业局南方山地用材林培育重点实验室、福建省森林培育与林产品加工利用重点实验室资助

作者简介:杨 希(1963-),女,河南新乡人,教授级高级工程师,从事林木病虫害综合防控技术研究与推广工作。

的形态鉴定。为此,作者进行了疫木保湿直接培养与分离线虫用盘多毛孢(*Pestalotia* sp)培养分散型 3 龄幼虫的比较研究,以期为松萎蔫病的进一步研究提供借鉴。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

①林间松萎蔫病枯死木(直径 15-30 cm)、截获的松萎蔫病包装板,采用贝尔曼(Baermann)漏斗法^[1,4,8]获取松材线虫分散型 3 龄幼虫;②PDA 平板(直径 75 mm)、盘多毛孢;③冷藏箱、培养箱、显微镜、漏斗等。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基的制备 用直径 75 mm 培养皿制成平板 PDA,冷却后分别接种盘多毛孢,25 ℃恒温培养;待盘多毛孢铺满 PDA,移入 4 ℃冰箱冷藏待用。

1.2.2 样本的检测 在松萎蔫病枯死木的上、中、下各截取 1 段长约 30 cm 的木段,带回室内,去掉树皮及相连部分边材,各取厚 2 cm 左右圆盘,经过圆心按扇形取其中的一小部分(20 g 左右),剪碎,称重,用贝尔曼漏斗法浸泡 24 h 获取线虫,在显微镜下进行形态学观测鉴定(虫态、数量),剩余部分即刻放入 4 ℃冰箱,以保持样本中线虫虫态及密度。将包装板切割成长条形,取其中的 1 小块(20 g 左右),检测方法同上;对于只有松材线虫分散型 3 龄幼虫(无成虫)的圆盘及包装板,作为试验材料备用,计数其中的线虫密度,分别编号为 1, 2(见表 1)。

表 1 试验材料来源及基本情况

样本编号	样本来源	试验时虫态	备注
1	马尾松枯死木	松材线虫分散型 3 龄幼虫	检测后 4 ℃冷藏
2	松木包装板	松材线虫分散型 3 龄幼虫	检测后 4 ℃冷藏

1.2.3 疫木保湿培养松材线虫 将只有松材线虫分散型 3 龄幼虫的圆盘、包装板在水中浸湿一下,并在其上用脱脂棉保湿(保持水不流失),置密封袋中;分别放入 20,25,30 ℃恒温培养箱中培养 24, 48,72,96,120 h 后,分别从各圆盘、包装板上,按样本检测方法要求剪取不少于 20 g 的木块,测定其内松材线虫繁殖发育情况,比较在不同温度、时间下疫木保湿培养对促进松材线虫幼虫发育成成虫之间的差别。

1.2.4 真菌培养松材线虫 将上述分离到的松材线虫分散型 3 龄幼虫,按 20 条/皿的线虫量,滴入到盘多毛孢靠近中心的位置,分别放入 20,25,30 ℃恒温培养箱中培养 24,48,72,96,120 h 后,用贝尔曼漏斗法分离线虫,比较在不同温度、时间下真菌培养对促进幼虫发育成成虫之间的差别。

2 结果与分析

2.1 不同时间、温度条件下疫木保湿培养对松材线虫鉴定率的影响

不同时间、温度疫木直接保湿培养对分散型 3 龄幼虫生长发育的影响,结果见图 1-2。从图 1-2 中可知:随着培养时间的延长及培养温度的提高,松枯死木、包装板的松材线虫鉴定率(相同温度,时间下有松材线虫雌虫出现的样本数与总重复数的百分比)均呈上升趋势,分别为 0-100%,0-66.67%;48 h 之前,鉴定率呈缓慢上升趋势,48 h 之后鉴定率快速上升。

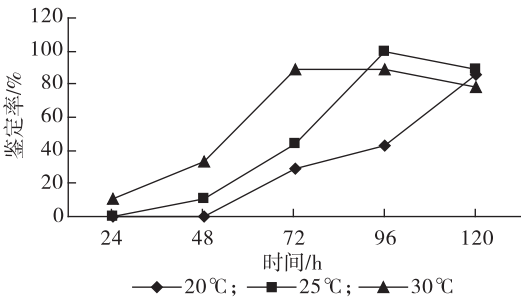


图 1 不同温度、时间马尾松枯死木保湿培养的松材线虫鉴定率

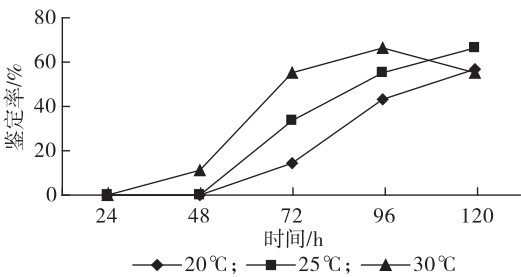


图 2 不同温度、时间松木包装板保湿培养的松材线虫鉴定率

枯死木在 30 ℃培养 72 h 后,松材线虫鉴定率高达 88.89%(其中 72,96 h 各有 1 个重复中无线虫,120 h 有 2 个重复中无线虫);在 25 ℃培养 96 h 后,松材线虫鉴定率可达 100%(25 ℃培养 120 h 的重复中有 1 个无线虫);20 ℃培养 120 h,松材线虫鉴定率高达 85.71%(1 个重复中无线虫)。包装板

在 30 ℃ 培养 72 h 后,松材线虫鉴定率最高为 55.56%–66.67%(72,96,120 h 的重复中各有 3,4,3 个没有线虫);25 ℃ 培养 96 h 后,松材线虫鉴定率最高为 55.56%–66.67%(96,120 h 的重复中各有 3,2 个无线虫);20 ℃ 培养 120 h 后,松材线虫鉴定率最高为 57.14%(7 个重复中有 3 个无线虫)。

以上结果表明,有松材线虫分散型 3 龄线虫的样本,在 3 种情况下(30 ℃ 培养 72 h、25 ℃ 培养 96 h、20 ℃ 培养 120 h)保湿培养,样本中均会有雌成虫出现,鉴定率达 100%。3 种情况均适宜松萎蔫病疫木保湿培养鉴定松材线虫。

2.2 不同时间、温度条件下真菌培养对松材线虫鉴定率的影响

不同时间、温度用真菌作为培养基培养对松材线虫分散型 3 龄幼虫生长发育的影响,结果见表 2。从表 2 中可知:在每皿滴入 20 条松材线虫分散型 3 龄幼虫,30 ℃ 培养 72 h、20–25 ℃ 培养 96 h,松材线虫鉴定率达均为 100%。

表 2 不同时间、温度下真菌培养中松材线虫的鉴定率

编号	重复数	接种量/条	培养时间/h	鉴定率/%		
				20 ℃	25 ℃	30 ℃
I	7	20	24	0	14.29	28.57
II	7	20	48	28.57	42.86	57.14
III	7	20	72	57.14	71.43	100
IV	7	20	96	100	100	100
V	7	20	120	100	100	100

3 结果与讨论

(1)在松材线虫检疫过程中,当疫木中仅有松材线虫分散型 3 龄幼虫时,可直接进行保湿培养,30 ℃ 培养 72 h、25 ℃ 培养 96 h、20 ℃ 培养 120 h,3

种情况均适宜疫木保湿培养鉴定松材线虫;培养结果受疫木中松材线虫分散型 3 龄幼虫分布的影响,因为样本中不同部位松材线虫的分布也不同,同一块样本,有的部位有松材线虫,有的部位没有松材线虫。

(2)用真菌培养疫木中分离出的松材线虫 3 龄分散性幼虫,30 ℃ 培养 72 h 及 20–25 ℃ 培养 96 h,均有成虫出现,且获得大量纯的松材线虫,可用于松萎蔫病的进一步研究。

(3)在有松材线虫幼虫存在的情况下,疫木保湿与真菌培养对松材线虫鉴定率影响不大;疫木保湿培养省去了制备培养基、培养真菌、分离线虫、接种线虫等程序,该方法适宜在松萎蔫病疫木松材线虫鉴定中应用。

参考文献:

[1] 杨宝君,潘宏阳,汤 坚.等.松材线虫病[M].北京:中国林业出版社,2003:10-27.

[2] 赵博光,郭道森.松材线虫携带的一株细菌分离及其致病性[J].北京林业大学学报,2004,26(1):57-61.

[3] 贾爱玲,戚建光,张宏娟,等.松材线虫体表物质与其携带细菌的关系[J].南京林业大学学报(自然科学版),2011,35(5):35-39.

[4] 方中达.植病研究法[M].北京:农业出版社,1979:46,308.

[5] 杨 希,黄金水,曾丽琼,等.松萎蔫病枯立木中松材线虫的动态研究[J].中南林业科技大学学报,2014,34(12):24-26.

[6] 钟国强,赵立荣,司徒保禄,等.促进松材线虫幼虫发育为成虫的培养方法试验简报[J].莱阳农学院学报,2004,21(2):177-179.

[7] 李海燕,黄北英,熊惠龙,等.快速检疫中培养松材线虫的冷藏真菌菌种筛选[J].林业科学,2008,44(12):157-162.

[8] 杨 希.福建省松枯死木检测鉴定方法与结果分析[J].武夷科学,2010(26):38-46.