

# 松材线虫病研究进展 (综述)<sup>\*\*</sup>

秦复牛, 潘沧桑\*

(厦门大学生命科学院, 厦门 361005)

**摘要:** 主要就松材线虫 (*Bursaphelenchus xylophilus*) 的遗传学、分子生物学及松材线虫病的防治等方面进行综述。松材线虫与拟松材线虫 (*B. mucronatus*) 在试验条件下能够种间杂交, 但绝大多数杂交后代无繁殖能力, 有些松材线虫种下水平杂交后代的宿主特异性及侵袭力会发生改变。用分子生物学方法研究表明, 松材线虫可分为美国、日本和加拿大三种亚型, 日本亚型和美国亚型具有更近的亲缘关系。已筛选出一些具有鉴别特征的分子标记。对松材线虫病这一顽症, 目前还只能“以防为主”, 发展快速分离和早期诊断的检疫检验技术对预防该病具有一定的实用意义。

**关键词:** 松材线虫; 遗传学; 分子生物学; 防治

**中图分类号:** S763.3

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-2197 (2003) 04-0370-07

松材线虫 (*Bursaphelenchus xylophilus*) 病是松树一种毁灭性病害。由于它能使大量松树迅速死亡, 造成巨大经济损失, 所以引起了国内外的高度重视。目前该病在日本、美国、韩国、加拿大、墨西哥、希腊、葡萄牙和中国均有分布。我国于 1982 年发现该病, 目前该病已扩展到江苏、浙江、安徽、广东、山东、湖北、香港和台湾等地。基于经典生物学的研究已基本阐明了松材线虫的形态结构、生活史、传播媒介、寄生范围等问题, 本文不再详述。但到目前为止, 松材线虫病的致病机理尚未研究清楚, 该病的防治也没有取得突破性进展。分子生物学技术的发展, 使得从分子水平上研究松材线虫病成为可能。由于分子生物学在研究松材线虫的遗传多态性方面可以和遗传学的研究相互补充, 相互印证, 因此本文在概述分子生物学及防治的研究进展的同时, 对遗传学的研究也作了简要概述。至于松材线虫病致病机理方面的研究进展, 杨宝君已作了综述<sup>[1]</sup>, 本文不再赘述。

## 1 遗传学研究概述

由于松材线虫与拟松材线虫在形态特征上极为相似, 且两者都存在不同地理型的分化, 因此松材线虫与拟松材线虫是否会通过种间杂交及种下水平的交配而扩大疫区引起了人们的关注。许多学者对松材线虫与拟松材线虫种间杂交及种下水平的交配潜力及其后代的致病性、宿主特异性等方面进行了大量研究。

松材线虫与拟松材线虫在试验条件下种间杂交成功的例子很多<sup>[2~6]</sup>。一种西伯利亚拟松材线虫株系与一种北美有尾尖突型松材线虫株系、德国拟松材线虫株系与日本松材线虫株系、日本松材线虫株系与法国拟松材线虫株系具有很高的杂交潜力, 杂交后代数量大, 其中德国拟松材线虫株系与日本松材线虫株系杂交能产生有繁殖能力的后代<sup>[4,6]</sup>。我国刘伟等<sup>[3]</sup>用中国不同株系的松材线虫和拟松材线虫与其他国家的松材线虫和拟松材线虫进行种间杂交试验, 其杂交后代数量少, 有的畸形, 且均无繁殖能力。

无论是松材线虫还是拟松材线虫, 其不同株系间的交配均能产生有繁殖能力的后代<sup>[2,5~8]</sup>。日本松材线虫 S10 株系与美国松材线虫株系交配所产生的后代没有保持亲代的宿主特异性<sup>[6]</sup>, 而 M 型松材线虫与 R 型松材线虫的交配后代比亲代具有更广泛的侵袭力<sup>[8]</sup>。

以上研究表明, 种间杂交虽能产生后代, 但子代数量有限且多数不育, 所以通过种间杂交而扩大疫区的可能性不大, 虽然在有些试验中种间杂交能产生较多数量的后代, 甚至能产生具有繁殖能力的后代, 但后代是否保持了亲代的侵袭力和宿主特异性, 还有待进一步研究。目前尚没有有关在自然条件下通过种间杂交而扩大疫区的证据。但值得注意的是, 由于松材线虫其不同株系间交配后代的宿主特异性及侵袭力均有可能发生改变, 因此那些在某一地区对松材线虫具有抗性的针叶树种可能会因此而失去抗性, 成为感病树种。

收稿日期: 2002-11-06

作者简介: 秦复牛, 男, (1973-), 硕士研究生。

\*\* 通讯作者 (Corresponding author)



## 2 分子生物学研究进展

### 2.1 蛋白质、酶及免疫学的研究

Kiyohara 等<sup>[9]</sup>在对来自美国和日本的一些能感染针叶树的伞滑刃属线虫的分离物进行研究时发现, 根据对天冬氨酸转酰基酶谱的分析, 可区分松材线虫和拟松材线虫。Guiran 等<sup>[10]</sup>用酶解电泳图谱法将松材线虫与拟松材线虫鉴别开, 在对松材线虫病致病机理的研究中, 发现松材线虫能分泌多种酶, Kojima<sup>[11]</sup>在对松材线虫的分泌物进行电泳分析时发现, 松材线虫分泌的纤维素酶的谱带类型与拟松材线虫分泌的不同, 而松材线虫的弱毒株系和强毒株系, 其所分泌的纤维素酶的谱带类型十分一致, 但酶的活性不同。Higgins 等<sup>[12]</sup>用 PCR 扩增松材线虫和拟松材线虫的 *dDNA* 片段, 通过对扩增产物的分析发现存在一定数量的几丁质同工酶, 可能正是由于这些同工酶表达的差异而导致松材线虫与拟松材线虫之间致病性的差异。松材线虫其致病型和非致病型的碳水化合物经历不同的代谢途径, 而这正是因为乙醇脱氢酶基因的不同造成的<sup>[13, 14]</sup>。上述研究表明, 利用分子生物学手段, 通过对线虫蛋白质及酶的研究可将松材线虫与其他线虫鉴别开。这些研究将有助于进一步揭示松材线虫病的致病机理。

免疫学方法很早就被用来作为鉴别线虫种类的辅助手段之一。Lawler 等<sup>[15]</sup>用酶联免疫吸附 (ELISA) 法检测来自海关的已剥皮烘干的松树样品中的松材线虫和拟松材线虫, 可检测出木材表面 0.4 mg 线虫蛋白质量, 但未能将这两种线虫区分开。随后 Laler 等<sup>[16]</sup>又用 ELISA 和蛋白质印迹 (Western blot) 技术来检测分析松材线虫的多克隆抗体, 结果用 ELISA 法鉴别松材线虫与拟松材线虫的多克隆抗体效果不佳, 但用蛋白质印迹技术可鉴别松材线虫和拟松材线虫。由于血清的交叉反应, 用多克隆抗体来鉴别线虫种类效果并不理想, 因此人们又在积极探索利用杂交瘤技术来发展一种有效的血清学诊断方法<sup>[17]</sup>。

### 2.2 基于基因的研究

尽管蛋白质图谱、酶解电泳图谱及免疫学方法已被用来作为线虫种类鉴别的辅助手段, 但由于线虫基因在生活史的不同阶段表达有差异以及受诸如环境条件等外在因素的影响, 使得上述方法有很大局限性。基于基因技术提供了一个更有希望的选择, 这些技术应用于线虫的虫种鉴别和种系发生研究等方面已取得了一定的成功。

**2.2.1 松材线虫的鉴定及其与伞滑刃属其他线虫的鉴别** 要从分子水平上鉴别线虫, 就要筛选出具有鉴别特征的基因片段。Hamney 等<sup>[18, 19]</sup>筛选出引物 X14 作为虫种特异性探针, 能从种间及种下水平鉴别伞滑刃线虫及松材线虫的不同株系, X14 能和松材线虫的 DNA 杂交产生一个 4 kb 的特异性片段, 而在拟松材线虫和假伞滑刃线虫 (*B. f raudulentus*) 的 DNA 中却不能产生这种特异性片段, 但当 Hamney 等将这一方法用来检测接种于松树中的松材线虫、拟松材线虫和假伞滑刃线虫的 DNA 时, 没有得到预期结果。Braasch 等<sup>[20]</sup>筛选出 OPY-1、OPB-7 和 OPPZ-08 三种引物, 能有效地将松材线虫、拟松材线虫及假伞滑刃线虫相互区分开。我国郑经武等<sup>[21]</sup>筛选出的引物 P235 能在松材线虫与拟松材线虫间产生有鉴别特征的特异性 RAPD 扩增片段, 这种产物在不同株系的松材线虫分离物中均能产生约 700 bp 的特异性片段, 在拟松材线虫分离物中产生 1 300 bp 和 1 900 bp 的两种特异性片段, 但由于试验所用的拟松材线虫只有一个株系, 在其他株系的拟松材线虫分离物中是否能产生同样的具有鉴别特征的特异性片段, 有待进一步研究。Lao 等<sup>[22]</sup>设计了 2 种虫种特异性引物作为探针, 直接用 PCR 从 9 种不同株系的松材线虫 DNA 中扩增得到 220 bp 和 330 bp 的特异性片段, 而在 5 种拟松材线虫株系中均不能产生这些特异性片段, 同时他们通过对 PCR 扩增产物的 RFLP 分析, 认为 *HinfI* 和 *MspI* 基因片段可以用来区分松材线虫与拟松材线虫。Wahori 等<sup>[5]</sup>用 PCR 扩增 *dDNA* 的 5.8S、ITS1、ITS2 及 18S 和 28S 部分区域的基因片段, 经 RFLP 分析可明确地区分松材线虫与拟松材线虫, 在对松材线虫不同株系的 RFLP 分析中, 可以将日本致病型松材线虫、中国松材线虫及美国松材线虫相互区别开, 而日本非致病型松材线虫和加拿大松材线虫差别不明显。Hoyer 等<sup>[24]</sup>, Abad 等<sup>[25]</sup>用类似的方法将伞滑刃属更多的虫种区分开。

对尚未发生松材线虫病的地区, 发展一项有效、快捷、灵敏的检测方法尤为重要。利用卫星 DNA 作为虫种特异性探针, 可直接用来快速检测微量的线虫分离物。Tares<sup>[26]</sup>, Abad<sup>[27]</sup>曾先后用 *MspI* 卫星 DNA 作为虫种特异性探针, 成功地检测出压碎在滤纸上的单条松材线虫; 这种方法如果结合 PCR 扩增来检测松材线虫将更为有效。此外 Wahori 等<sup>[28]</sup>和 Liao 等<sup>[22]</sup>通过对 *dDNA* 特定基因片段的 PCR 扩增, 利用 RFLP 分析也能成功地检测出单条线虫, 并能将松材线虫与拟松材线虫区分开。

**2.2.2 种系发生** Webster 等<sup>[29]</sup>用来自松材线虫的 pBx6 基因片段和来自拟松材线虫的 pBm4 基因片段作为种特异性探针, 可检测出松材线虫和拟松材线虫, 经进一步分析后, Webster 等认为拟松材线虫至少存在 2 种亚型, 并将分离物分为 3 个种下群体: 北美群体、欧洲群体和亚洲群体。随后 Tares 等<sup>[30]</sup>用同源性 DNA 探针对松材线虫进行研究, 认为松材线虫至少可分为 3 个亚型, 即美国亚型、加拿大亚型和日本亚型, 而美国亚型和日本亚型有较近的亲缘关系, 这支持了传入日本的松材线虫起源于美国的假说。此后, Tares<sup>[31]</sup>, Irdani 等<sup>[32, 33]</sup>和 Wahori 等<sup>[34, 35]</sup>的试验结果也都支持了这一假说。Kanzaki 等<sup>[36]</sup>以松材线虫、拟松材线虫、假伞滑刃线虫、*B. conicaudatus* 和 *B. abruptus* 5 种伞滑刃线虫为对象来研究它们的种系发生, 通过对这 5 种线虫的 *dDNA* 的 18S、5.8S、ITS1 和 ITS2 基因片段的碱基序列和部分 *CoI* 基因的比较分析,

首先将后者从这一种团中剔除,认为前四者的共同祖先起源于一种自由生活线虫,这种自由生活线虫当时生活于欧亚大陆东部的阔叶树体内,*B. conicaudatus* 首先从这一祖先中分化出来,然后假伞滑刃线虫和拟松材线虫再分化出来,拟松材线虫重新选择了针叶树种作为其寄主并因此扩散到欧亚大陆和北美的针叶树林中,北美的拟松材线虫再次发生分化,其中的一支便分化为现今的松材线虫。

在对不同株系松材线虫的同源性研究中,由于松材线虫的来源不同,其试验结果也不尽相同,这正说明松材线虫存在不同的亚型。Kusano 等<sup>[37]</sup>, Zhang 等<sup>[39]</sup>用随机扩增多态性技术对不同株系的松材线虫分离物的基因组进行 DNA 随机扩增,其扩增片段的共享度为 60%~90%, 郑经武等<sup>[21]</sup>用同样的方法分析得出不同株系松材线虫分离物基因组扩增片段的共享度为 60%~84%, Zhang 等<sup>[39]</sup>用 SSCP 分析 4 个不同株系的松材线虫的核 rDNA 的 ITS1 扩增产物,它们之间仅存在 1 bp 的差别,这些试验说明不同株系的松材线虫既具有高度的同源性又存在着一定的分化。Iw ahori 等<sup>[34]</sup>的试验进一步说明了这一问题,他们用 RFLP 分析 rDNA 和 rDNA 的 ITS 基因片段的扩增产物,结果显示日本、中国和美国致病型松材线虫分离物的 DNA 序列高度同源,说明它们来源于共同的祖先,日本非致病型松材线虫和致病型松材线虫的 DNA 存在 5~9 bp 的差异,加拿大的 4 个不同株系的松材线虫分离物的 DNA 序列与其他国家的松材线虫分离物的 DNA 序列差别多达 15~19 bp,说明加拿大松材线虫与中国松材线虫、日本松材线虫及美国松材线虫的亲缘关系较远。

分子生物学技术在有关种系发生方面的研究表明:首先,松材线虫与拟松材线虫是两个独立的种,但两者具较近的亲缘关系,这一点在遗传学的研究中也得到证实;其次,松材线虫不同株系存在着分型,多数学者赞同将松材线虫分为美国亚型、加拿大亚型和日本亚型,其中美国亚型和日本亚型亲缘关系最近,而传入日本的松材线虫很可能起源于美国;第三,中国、日本和美国致病型松材线虫具有高度同源性,它们可能来源于共同的祖先。分子生物学在松材线虫鉴别检测等方面的研究表明,由于供试材料及所使用方法的的不同,结果也异彩纷呈,这些试验基本都处于实验室阶段,例如在筛选具有鉴别特征的基因片段作为分子标记以鉴别线虫时,各人所使用的供试线虫的株系数量有限,来源不同,所筛选的分子标记是否具有代表性还需进一步研究。

### 3 防治

由于松材线虫病传播快,一旦发生则很难控制,所以在防治上要贯彻“以防为主,防治并举,防重于治”的方针。

#### 3.1 松材线虫病的治疗

目前对松材线虫病的治疗主要是利用高效内吸性杀虫剂进行树干打孔注射或根部浇灌, Matsuura K<sup>[40]</sup>试验表明, 丰索磷 (fensulfotion)、治线磷 (thionazin)、噁啉-酒石酸 (morantel-tartrate)、mesulfenos、carbosulfan、cyanophos、methiodathion、dioxazenzofos 和 fenthion 作树干注射剂治疗松材线虫病均有不同程度的效果,其中,治线磷和丰索磷的疗效分别达 94.7% 和 92.5%。治线磷的疗效在 Matsuura T<sup>[41]</sup>的试验中得到证实,噁啉-酒石酸的疗效在 Oku 等<sup>[42]</sup>的试验中也得到证实。这种树干注射剂不仅能降低病害的发生率,而且还能延缓发病进程<sup>[43]</sup>。Amamectin benzoate 制成水溶性制剂后,以每立方米病木 20 g 的剂量注射病木,疗效明显<sup>[44,45]</sup>。另外,用苦豆碱来防治松材线虫也有一定效果<sup>[46,47]</sup>。如能将杀线剂和杀虫剂配合使用,既防治松材线虫也防治媒介天牛,则效果会更好。随着松树化学研究的深入,人们在树体内发现了大量与松材线虫病有关的化学物质,许多物质的含量与树龄及感病性存在着一定的关系<sup>[48]</sup>。这些物质的发现不仅为研究松材线虫病的致病机理、抗病树种的抗性机制等打下基础,同时也为进一步开发新的树干注射剂提供了丰富的研究材料,不过,距离高效实用还有很长的路要走。以上研究表明,有几种树干注射剂的疗效显著,且还会不断有新的药剂出现,但就目前情况看,如果大面积应用成本太高,所以只适用于小面积观赏树种和名贵树种。

在进行药物治疗的同时,人们对松材线虫病的生物防治也做了大量研究,试验表明许多真菌具有杀线虫活性,如总状共头霉 (*Syncephalastrum racemosum*)<sup>[49]</sup>、日本亮耳菌 (*Lamplerymyces japonicus*)<sup>[50,51]</sup>、纤小指孢霉 (*Dactylella leptospora*)<sup>[52]</sup>、节丛孢 (*A rthrobotrys* spp.)<sup>[53]</sup>等。这些真菌杀线虫的机制是不同的,另外周性恒等<sup>[54]</sup>还发现一种捕食松材线虫的矛线虫 (*Dorylaimus* sp.)。这些都为松材线虫的生物防治提供了丰富的研究材料。

作者认为,生物防治有诸多优点,是需要积极开展研究的,但是就松材线虫而言,由于该线虫发育速度太快,不可对其生物防治寄予过多希望,更不能夸大生物防治对松材线虫的作用。对于松材线虫这一顽症,目前还只能以防为主,发展快速分离和早期诊断技术对预防该病具有一定的实用意义。

#### 3.2 加强检疫

杜绝人为传播是防治松材线虫病最重要的一环,所以加强检疫必须摆在首位。首先要严禁将病树、病苗、受侵染的木质包装材料和木质铺垫材料等从疫区运到非疫区。其次,对检疫中发现的病木、病林应及时彻底地处理。

为了更好地执行各项检疫措施,发展一种高效、灵敏、快捷的检测方法是十分必要的。随着分子生物学技术在松材线虫研究中的应用,目前比较灵敏的检测方法已经初步建立,不过,这些技术只解决鉴定的准确性问题,而不解决检验的速度问题,然而,在检疫检验实务中,对检测速度的要求更为迫切,因此,潘沧桑教授发明了松木线虫快速分离装置,使先前需 20 小时以上的分离工作得以在半个小时内完成,大大加快了检疫通关的速度,也免除了劈木削片之苦,方便了检查

站和口岸的检疫工作。此外,作者还创造了松材线虫病早期诊断的方法,该方法利用培养的微生物将树体中的线虫诱入检测管中加以鉴定,以便在松树出现症状之前就能检出病原线虫,同时避免因削皮取样而破坏松林景观。此两项技术已经申请了专利。

### 3.3 媒介昆虫的防治

由于松材线虫的生活史与其媒介昆虫有密切的关系,因此,如能有效地控制媒介昆虫,便可达到遏制松材线虫病扩散蔓延的目的。松墨天牛是最重要的一种传播媒介,目前防治松墨天牛一般采用喷洒化学药剂、不育剂、熏蒸病死木,诱杀天牛,烘干、水浸病死木,生物防治等措施。用飞机喷撒化学药剂来杀死天牛,虽有一定效果,但污染环境,同时也伤害环境生物。熏蒸或焚烧病死木,再结合其他措施能使病情得到有效控制,这方面有不少成功的报道<sup>[55-57]</sup>。这种措施不单杀灭媒介昆虫,也杀灭各种线虫,在疫区不失为一种比较彻底的防治措施。但是,如果砍除不彻底或处理不严格,就得不到应有的防治效果。

由于昆虫生物防治的优越性明显,国内外均对松墨天牛的生物防治做了大量研究。通过释放寄生性天敌管氏肿腿蜂(*S clevodema guani*)结合诱杀天牛成虫等措施,可有效地防治松墨天牛<sup>[58,59]</sup>。此外,松墨天牛的寄生性天敌还有花绒坚甲(*D astarcus longulus*)<sup>[60-62]</sup>、黑色枝附瘦蜂(*Ibalia leucospoides*)<sup>[63]</sup>、姬蜂(*Icheum onidae* sp.)等<sup>[60]</sup>和一些寄生性线虫<sup>[60,64]</sup>。

周性恒等<sup>[65]</sup>、Shimazu等<sup>[66]</sup>从死亡的松墨天牛体内分离出对天牛幼虫具有毒性的球孢白僵菌(*B eauveria bassiana*)、布氏白僵菌(*B. brongniartii*)、金龟子绿僵菌(*M etarhizium anisopliae*)和枝顶孢菌(*A cremorium* sp.)。其中毒力最强的是球孢白僵菌,其对松墨天牛幼虫的防治效果优于成虫<sup>[66]</sup>,如果将白僵菌与轮枝霉混用<sup>[60]</sup>或与粉质雷氏杆菌联合感染<sup>[64]</sup>,则杀虫效果更明显。为了使菌剂能感染到树皮下面的天牛幼虫,Shimazu等<sup>[66]</sup>和Nobuchi<sup>[67]</sup>将白僵菌的分生孢子粘附在黄色梢小蠹虫体上后,再将小蠹虫释放到林间,让其寻找病死木,从而感染天牛幼虫。此外松墨天牛的致病微生物还有黄僵菌(*Isaria farinosa*)、黄曲霉(*A spergillus flavus*)、粘质沙雷氏杆菌(*S erratia marcescens*)等。

松墨天牛的捕食性天敌种类更多,如大斑啄木鸟(*D endrocopos major*)、日本大谷盗(*T ennochila japonica*)、蚊态郭公虫(*T hanasimus leivisi*)<sup>[61]</sup>等。

### 3.4 培育抗病树种

既然松材线虫存在着强毒株系和弱毒株系,那么能否通过接种弱毒株系的松材线虫来诱导寄主产生抗性呢?Kiyohara等<sup>[68]</sup>对此做了研究,其试验结果表明接种弱毒株系松材线虫的日本红松确实能产生抗性。

既然松树对松材线虫病的抗性有差异,那么培育抗病树种是有可能的,通过接种松材线虫来观察寄主的抗病性,初步筛选出一些抗病树种,但在人工接种条件下,树种抗病性会因供试树的树龄、接种体来源、接种条件、地理条件等的不同而发生变化。用常规的遗传学方法育种时间长,且幼苗的抗性不稳定,因此在实践中有一定局限性。如果能结合分子生物学技术,筛选出松树的抗性基因,利用转基因技术可大大缩短育种年限。由于致使松树萎蔫的病原不止松材线虫本身,因此在筛选抗性基因时,不仅可筛选那些抗松材线虫的基因,也可筛选那些抑制其他病原的基因,比如抑制某些细菌的基因。这有赖于松材线虫病致病机理的研究。

虽然自发现松材线虫病起,国内外投入了大量的人力、物力和财力来防治该病,但该病到目前为止还没有得到有效控制,且仍有继续蔓延的趋势。树干注射治疗成本高,不宜大面积推广使用。用飞机喷撒化学药剂防治天牛效果也不太理想,且具有负面效应,只有在迫不得已(紧急扑灭)的情况下才考虑使用。生物防治虽具有明显的生态效益,也进行了许多有益的探索,但目前的研究多处于试验阶段,大面积推广应用还要克服诸多难关,另外还有其它一些尚处于构想或试验阶段的防治方法,短期内也不可能有很大的进展。看来,人们只能寄希望于致病机理研究上的突破或许有助于防治上的推进。因此,就目前情况而言,任何单一的防治措施都是难以奏效的。松材线虫病的防治是一项复杂的系统工程,在继续加强科研的同时,还要运用行政、法律等多种手段,调动各方积极性,各有关部门密切配合,将每一项措施都落到实处,这样就可以将松材线虫控制在一定范围内,使病害造成的损失降低到最低限度。

致谢: 承B raasch、杨宝君教授和王宏毅、吴慧平副教授惠赠资料,谨致谢忱。

### 参考文献:

- [1] 杨宝君. 松材线虫病致病机理的研究进展 [J]. 中国森林病虫, 2002, 21 (1): 27~ 31, 14
- [2] Riga E, Beckenbach K, Webster J M. Taxonomic relationships of *B ursaphelenchus xylophilus* and *B ursaphelenchus mucronatus* based on interspecific and intraspecific crosshybridization and DNA analysis [J]. Fundamental and Applied Nematology, 1992, 15 (2): 391~ 395
- [3] 刘伟, 杨宝君. 松材线虫和拟松材线虫的杂交遗传差异研究 [J]. 林业科学研究, 1994, 7 (5): 469~ 474
- [4] Braasch H. Intra- and interspecific crossing experiments with a German and a Siberian isolate of *B ursaphelenchus mucronatus* (Nematoda: Aphelenchoididae) and related *B ursaphelenchus* species [J]. Nachrichtenblatt des Deutschen

- Pflanzenschutzdienstes, 1994, 46 (12): 276~ 281
- [ 5 ] Mamiya Y. Interspecific hybridization between *Bursaphelenchus xylophilus* and *Bursaphelenchus mucronatus* (Aphelenchida: Aphelenchoididae) [J]. Applied Entomology and Zoology, 1986, 21 (1): 159~ 163
- [ 6 ] Hajaukiewicz P T, Myers R T. Experimental crossing of selected isolates of *Bursaphelenchus xylophilus* and *Bursaphelenchus mucronatus* [J]. Phytopathology, 1988, 78 (11): 1507~ 1508
- [ 7 ] Bolla R I, Tamura H. Mating potential and chromosome number of some Japanese and US populations of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. Japanese Journal of Nematology, 1989, 19 (12): 7~ 11
- [ 8 ] Bolla R I, Boschert M. Pine wood nematode species complex: Interbreeding potential and chromosome number [J]. Journal of Nematology, 1993, 25 (2): 227~ 238
- [ 9 ] Kiyohara T, Bolla R I. Pathogenic variability among populations of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. Forest Science, 1990, 36 (4): 1061~ 1076
- [ 10 ] Guiran G De, Lee M J, Damasso A, et al. Preliminary attempt to differentiate pinewood nematodes (*Bursaphelenchus* spp.) by enzyme electrophoresis [J]. Revue de Nematologie, 1985, 8 (1): 88~ 90
- [ 11 ] Kojima K, Kamijyo A, Masmori M, et al. Cellulase activities of pine wood nematode isolates with different virulences [J]. Journal of Japanese Forest Society, 1994, 76: 258~ 262
- [ 12 ] Higgins D F, Briarty D M, Hamey M A. Detection of a chitinase gene fragment in *Bursaphelenchus* species by polymerase chain reaction amplification [A]. Proceedings of International Symposium [C]. Tokyo, Japan, 27~ 28 October, 1998, Shokado Shoten, 1999. 29~ 34
- [ 13 ] Bolla R I. A nonpathogenic isolate of *Bursaphelenchus xylophilus* produces ethanol as a metabolic product [J]. Journal of Nematology, 1986, 18 (4): 601
- [ 14 ] Bolla R I. Carbohydrate concentration in pines as affected by inoculation with *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. Journal of Nematology, 1987, 19 (1): 51~ 57
- [ 15 ] Lawler C, Hamey M A. Immunological detection of nematode antigens on the surface of a wood section: fundamental and applied [J]. Nematology, 1993, 6 (6): 521~ 523
- [ 16 ] Lawler C, Joyce P, Hamey M A. Immunological differentiation between *Bursaphelenchus xylophilus* and *Bursaphelenchus mucronatus* [J]. Nematologica, 1994, 39 (4): 536~ 546
- [ 17 ] Schots A, Gommers F J, Bakker J, et al. Serological differentiation of plant parasitic nematode species with polyclonal and monoclonal antibodies [J]. Journal of Nematology, 1990, 22: 16~ 23
- [ 18 ] Hamey J M, Hamey A M. Detection and identification of *Bursaphelenchus* species with DNA fingerprinting and polymerase chain reaction [J]. Journal of Nematology, 1993, 25 (3): 406~ 415
- [ 19 ] Hamey J H, Hamey M A. DNA profiling of *Bursaphelenchus* species [J]. Gene, 1994, 145 (2): 227~ 230
- [ 20 ] Braasch H, Burgemeister W, Pastrik K H. Differentiation of three *Bursaphelenchus* species by means of RAPD-PCR [J]. Deutschen Pflanzenschutzdienstes, 1995, 47 (12): 310~ 314
- [ 21 ] 郑经武, 许建平, 吴玉良等. 松材线虫和拟松材线虫种间及种下群体的 RAPD 指纹分析 [J]. 浙江农业大学学报, 1998, 24 (6): 597~ 601
- [ 22 ] Liao J L, Zhang L H, Feng Z X. Reliable identification of *Bursaphelenchus xylophilus* by rDNA amplification [J]. Nematologia Mediterranea, 2001, 29 (2): 131~ 135
- [ 23 ] Iwatori H, Tsuda K, Kanzaki N, et al. PCR-RFLP and sequencing analysis of ribosomal DNA of *Bursaphelenchus* nematodes related to pine wilt disease [J]. Fundamental and Applied Nematology, 1998, 21 (6): 655~ 666
- [ 24 ] Hoyer U, Burgemeister W, Braasch H. Identification of *Bursaphelenchus* species (Nematoda, Aphelenchoididae) on the basis of amplified ribosomal DNA (ITS-RFLP) [J]. Nachrichtenblatt des Deutschen, 1998, 50 (11): 273~ 277
- [ 25 ] Abad P, Taves S, Brugier N, et al. Characterization of the relationships in the pine wood nematode species complex (PWNC) (*Bursaphelenchus* spp.) using a heterologous unc-22 DNA probe from *Caenorhabditis elegans* [J]. Parasitology, 1991, 102 (2): 303~ 308
- [ 26 ] Taves S, Lemontery J M, Guiran G De, et al. Use of species-specific satellite DNA from *Bursaphelenchus xylophilus* as a diagnostic probe [J]. Phytopathology, 1994, 84 (3): 294~ 298
- [ 27 ] Abad P. Satellite DNA used as a species-specific probe for identification of *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. Bulletin OEPP, 2000, 30 (3/4): 571~ 574
- [ 28 ] Iwatori H, Kanzaki N, Jutai K. A simple, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism-aided

- diagnosis method for pine wilt disease [J]. *Forest Pathology*, 2000, 30 (3): 157~ 164
- [29] Webster J M, Anderson R V, Baillie D L, et al DNA probes for differentiating isolates of the pine wood nematode species complex [J]. *Revue de Nematologie*, 1990, 13 (3): 255~ 263
- [30] Tares S, Abad P, Bruguier N, et al Identification and evidence for relationships among geographical isolates of *Bursaphelenchus* spp. (pine wood nematode) using homologous DNA probes [J]. *Heredity*, 1992, 68 (2): 157~ 164
- [31] Tares S, Lemontey J M, Guiran G De, et al Use of species-specific satellite DNA from *Bursaphelenchus xylophilus* as a diagnostic probe [J]. *Phytopathology*, 1994, 84 (3): 294~ 298
- [32] Irdani T, Caroppo S, Ambrogioni L. Molecular diversity among pine wood *Bursaphelenchus* populations detected by RAPD analysis [J]. *Redia*, 1995, 78 (1): 149~ 161
- [33] Irdani T, Caroppo S, Ambrogioni L. Molecular identification of pine wood *Bursaphelenchus* species [J]. *Nematologia Mediterranea*, 1995, 23 (suppl): 99~ 106
- [34] Iwahori H, Kanzaki N, Futai K. Phylogenetic relationship among several isolates of *Bursaphelenchus xylophilus* and *Bursaphelenchus mucronatus* based on their ribosomal DNA sequences [A]. *Proceedings of International Symposium [C]*. Tokyo, Japan, 27~ 28 October, 1998, Shokado Shoten, 1999. 35~ 38
- [35] Iwahori H, Kanzaki N, Futai K. *Bursaphelenchus xylophilus* and *Bursaphelenchus mucronatus* in Japan: where are they from? [A]. *Fourth International Congress of Nematology Programme and Abstracts [C]*. 8~ 13 June 2002, Japan, 2002
- [36] Kanzaki N, Futai K. A PCR primer set for determination of phylogenetic relationships of *Bursaphelenchus* species within the *xylophilus* group [J]. *Nematology*, 2002, 4 (1): 35~ 41
- [37] Kusano T, Nakamura K, Fujii T, et al RAPD-PCR fingerprinting patterns of six *Bursaphelenchus xylophilus* isolates and a *Bursaphelenchus mucronatus* isolate [A]. *Proceedings of International Symposium [C]*. Tokyo, Japan, 27~ 28 October, 1998, Shokado Shoten, 1999. 175~ 177
- [38] Zhang K, Lin M, Wen L, et al Genetic variation of *Bursaphelenchus xylophilus* and *Bursaphelenchus mucronatus* geographical isolates of China as shown by RAPDs [A]. *Proceedings of International Symposium [C]*. Tokyo, Japan, 27~ 28 October, 1998, Shokado Shoten, 1999. 171~ 174
- [39] Zhang L H, Liao J L, Feng Z X. Sequencing and PCR-SSCP analysis of ribosomal DNA of *Bursaphelenchus* nematodes [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2001, 31 (1): 84~ 89
- [40] Matsuura K. Analysis of prevention effects of systemic nematodes against pine wilt diseases [A]. *Proceedings of International Symposium [C]*. Tokyo, Japan, 27~ 28 October, 1998, Shokado Shoten, 1999. 189~ 192
- [41] Matsuura T. Recovery of pine from the lethal process of pine wilt disease with systemic nematocide, thionazin [A]. *Proceedings of International Symposium [C]*. Tokyo, Japan, 27~ 28 October, 1998, Shokado Shoten, 1999. 184~ 188
- [42] Oku H, Morimoto T, Ando T, et al Simple method for evaluation of durability of anthelmintic compounds within pine stands [A]. *Proceedings of International Symposium [C]*. Tokyo, Japan, 27~ 28 October, 1998, Shokado Shoten, 1999. 196~ 199
- [43] Chang R J, Tzean S S, Enda N, et al Evaluation of morantel-tartrate for controlling pine wilt caused by *Bursaphelenchus xylophilus* in Taiwan [A]. *Proceedings of International Symposium [C]*. Tokyo, Japan, 27~ 28 October, 1998, Shokado Shoten, 1999. 165~ 169
- [44] Takai K, Soejima T, Suzuki T, et al Emamectin benzoate as a candidate for trunk-injection agent against the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. *Pest Management Science*, 2000, 56 (10): 937~ 941
- [45] Takai K, Soejima T, Suzuki T, et al Development of a water-soluble preparation for emamectin benzoate and its preventative effect against the wilting of pot-grown pine trees inoculated with the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. *Pest Management Science*, 2001, 57 (5): 463~ 466
- [46] 赵博光, 吴如其, 李小平. 苦豆碱防治松材线虫病的林间试验 [J]. *林业科学*, 1998, 34 (6): 113~ 117
- [47] 赵博光, 吴如其, 李小平. 苦豆碱对松材线虫的杀线活性 [J]. *林业科学*, 1996, 32 (3): 243~ 247
- [48] 徐福元, 席客, 徐刚等. 不同龄级马尾松对松材线虫病抗性的探讨 [J]. *南京林业大学学报*, 1994, 18 (3): 36~ 42
- [49] 孙建华. 土壤真菌培养物对松材线虫生长和繁殖抑制作用的研究 [J]. *南开大学学报*, 1997, 30 (3): 82~ 88
- [50] 董锦艳, 莫明和, 陈江虹等. 亮耳菌杀线虫活性的稳定性 [J]. *云南大学学报*, 2000, 22 (5): 365~ 368
- [51] 莫明和, 李国红, 董锦艳等. 日本亮耳菌-一种新的杀线虫真菌 [J]. *菌物系统*, 2000, 19 (4): 529~ 533
- [52] Maniwa Y. A kind of nematode-trapping fungus, *Dactylella leptospora*, found in wood around pupal chambers of

- Monochamus alternatus [J]. Forest Pests, 1976, 25: 147~ 149
- [53] Mori T, Morikawa C, Noda T, et al. Effects of chelators (EGTA, EDTA) and Calcium ions on nematode capture by the nematode-trapping fungus *A rthrobotrys ellipso spora* [J]. Mycoscience, 2000, 41 (5): 455~ 460
- [54] 周性恒, 林巧娥. 松材线虫天敌——矛线虫的发现 [A]. 见: 杨宝君, 朱克恭, 周元生等. 中国松材线虫病的流行与防治 [C]. 北京: 中国林业出版社, 1995. 185~ 187
- [55] Muramoto M. Ending of pine wilt disease in okinoerabu island, kagoshima prefecture [A]. Proceedings of International Symposium [C]. Tokyo, Japan, 27~ 28 October, 1998, Shokado Shoten, 1999. 193~ 195
- [56] Lai Y. The different effect of practicing two strategic ways to control the pine wilt disease [A]. Proceedings of International Symposium [C]. Tokyo, Japan, 27~ 28 October, 1998, Shokado Shoten, 1999. 181~ 183
- [57] Lai Y X, Zhou Y P, Yu L X, et al. Study on instantly burning dead pines at cutting spots in pine forests to control pine wilt disease [J]. Journal of Japanese Forestry Science & Technology, 2000, 27 (6): 28~ 32
- [58] 张连芹. 利用引诱剂和肿腿蜂防治松墨天牛的研究 [J]. 林业科学研究, 1991, 3: 285~ 290
- [59] 宋世涵, 张连芹, 陈沐荣. 利用管氏肿腿蜂防治松材线虫病的研究 [J]. 广东林业科技, 1998, 14 (3): 38~ 42
- [60] Kobayashi F, Yamane A, Ikeda T. The Japanese pine sawyer beetle as the vector of pine wilt disease [J]. Annual Review of Entomology, 1984, 29: 115~ 135
- [61] 汪永俊. 松褐天牛的初步研究 [J]. 江苏林业科技, 1998 (2): 31~ 33
- [62] 烟台松材线虫防治技术研究组. 松墨天牛发生规律的调查研究 [A]. 见: 杨宝君, 朱克恭, 周元生等. 中国松材线虫病的流行与防治 [C]. 北京: 中国林业出版社, 1995. 113~ 114
- [63] 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 (2): 20~ 21
- [64] Ikeda T. Integrated pest management of Japanese pine wilt disease [J]. Europe Journal of Forest Pathology, 1980, 14: 398~ 414
- [65] 周性恒, 朱洪兵, 肖文忠. 南京地区墨天牛病原真菌的调查研究 [A]. 见: 杨宝君, 朱克恭, 周元生等. 中国松材线虫病的流行与防治 [C]. 北京: 中国林业出版社, 1995. 188~ 191
- [66] Shimazu. Microbial control of the pine sawyer, *Monochamus alternatus* by *Beauveria bassiana* [A]. International Symposium of Pine Wilt disease Caused by Pine Wood Nematode [C]. Beijing, 1995. 128~ 135
- [67] Nobuchi A. An automatic releasing equipment of *Beauveria* contaminated bark beetle for microbial control of *Monochamus alternatus* [J]. Forest Pests, 1993, 42: 213~ 217
- [68] Kiyohara T, Kosaka H, Aikawa T, et al. Experiments of induced resistance to pine wilt disease in pine forest [A]. Proceedings of International Symposium [C]. Tokyo, Japan, 27~ 28 October, 1998, Shokado Shoten, 1999. 103~ 104