

## 涕灭威抑制松材线虫繁殖的研究\*

朱正昌 周性恒 李庆波

高景斌 朱洪兵 戢振华

(南京林业大学)

**摘要** 9 ppm 涕灭威对生长在灰葡萄孢霉上的松材线虫有很强的抑制繁殖作用。每株黑松注入 15% 涕灭威颗粒剂 40 g, 30 天后树干内的涕灭威含量为 20.013~51.796 ppm; 50 天内为 17.575~40.386 ppm。含不同剂量涕灭威的木屑对松材线虫的繁殖有不同程度的抑制作用。在松褐天牛羽化期, 黑松树干注射一次涕灭威, 当年保株率达 100%。

**关键词** 松材线虫; 松萎蔫病; 松褐天牛; 涕灭威

松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhner 1934) Nickle 1970) 是松萎蔫病的病原体, 以松褐天牛(*Monochamus alternatus* Hope) 为主要传播媒介, 并可随被侵染原木的调运而加快扩展蔓延。该病最早于 1905 年在日本九州长崎发现, 我国于 1982 年在南京中山陵发现病树。近几年病害迅速发展, 已波及南京市近郊六县及江苏镇江、安徽马鞍山等地, 为害面积 20 万亩以上, 累计病死树 70 万余株。除危害黑松(*Pinus thunbergii*) 外, 寄主范围已扩展到黄松(*P. thunbergii* × *massoniana*)、红松(*P. koraiensis*)、海岸松(*P. pinaster*)、赤松(*P. densiflora*)、白皮松(*P. strobus*) 以及抗病力较强的马尾松(*P. massoniana*) 等, 是松树的一种毁灭性病害。

松褐天牛成虫羽化时体内具不饱和脂肪酸, 对线虫聚集有刺激作用, 促使大量线虫转移到羽化后的成虫体上, 从气门进入气管内。因此, 从病树中羽化飞出的松褐天牛, 携带松材线虫均在千条以上, 最高达 28.9 万条之多<sup>[1,3]</sup>。新羽化飞出的松褐天牛在黑松上啃食嫩梢枝皮补充营养, 可使健康枝条 100% 受到侵染, 大多数受侵黑松一年内便可死亡。

松材线虫在灰葡萄孢霉(*Botrytis cinerea*) 上, 于 25℃ 时经 4 天培养即可完成生活史并开始大量繁殖。接种 95 条线虫经 8 天培养可繁殖 38 840 条, 在整个树干中形成巨大的群体, 加速树木死亡。有效地抑制线虫的大量繁殖, 是防治该病的关键措施之一。笔者于 1986~1989 年用涕灭威 (Temik) 进行了抑制松材线虫繁殖的一系列试验, 为防治该病提供了一条有效途径。

本文于 1989 年 11 月 23 日收到。

\* 参加本课题研究的还有卓为君、曾庆东、曾衍俊。

## 一、材料与方法

### (一) 药剂与试剂

99.6%涕灭威标准品(山东济宁化工研究所); 15%涕灭威颗粒剂(山东宁阳农药厂, 日本进口); 硅藻土(美国Witco产, 上海试剂采购供应站分装); 坚固蓝B盐(E. Merck产, 上海试剂分装); 醋酸- $\beta$ -萘酯(上海试剂一厂, 化学纯); 丙酮; 二氯甲烷; 无水硫酸钠; 磷酸; 石油醚等均为分析纯。大白鼠鼠肝酶液(自提)。

### (二) 内容与方法

1. 松材线虫的分离与培养 (1)分离: 取致病死亡的黑松木碎片, 经过滤、离心后收集, 使用时加等容0.2%硫酸链霉素, 经振荡、清洗、离心后待用。(2)培养: 取于25℃恒温箱中培养6~7天接种在PDA培养基上的灰葡萄孢霉, 于菌落上接种上述分离的线虫约100条, 放入25℃恒温箱培养。

2. 药剂抑制松材线虫繁殖的试验 (1)药剂筛选及浓度设计: 秤定量15%涕灭威颗粒剂, 粉碎后溶于定量丙酮中, 用蒸馏水稀释成均含5%丙酮的水溶液, 且涕灭威的有效含量分别为4、6、9、13.5、20.25、30.37、45.56等7个浓度梯度(单位ppm)的药液备用。(2)定量喷药处理: 采用先喷药液后接线虫和先接线虫后喷药液两种方法。每处理将接有松材线虫的灰葡萄孢霉培养皿二套平放桌上, 四周均匀放置洁净载玻片四块, 用喷雾器分别喷洒上述7个浓度的涕灭威药液, 另设不作任何处理和5%丙酮水喷雾两种对照。置培养皿于25℃温箱中培养。据载玻片面积及两次称重, 求出实际含药量( $\text{g}/\text{cm}^2$ )。

3. 涕灭威在黑松树干内的残留输导测定<sup>[1]</sup> (1)涕灭威的树干注射: 选16~17年生、树高8~9 m、胸径16~17 cm的黑松, 在离地30 cm处打洞, 注入15%涕灭威颗粒剂。采用每株40 g(编号 $T_1$ )及每株40 g加丙酮20 ml(编号 $T_2$ )两种处理, 并设对照。(2)样品提取与定容: 注药后的第15、30、50天时, 在 $T_1$ 、 $T_2$ 树干上, 分别于离地面0.2 m、1.5 m及4.5 m处, 钻取木屑15 g, 置于250 ml锥形瓶中, 加磷酸3滴, 二氯甲烷70 ml, 摇匀后放冰箱, 次日放于室温, 振荡15~30 min, 溶液通过用漏斗装有5~10 g的无水硫酸钠(经160℃处理48 h)滤纸过滤脱水, 将滤液在40~45℃水浴上浓缩近干, 分别定容于刻度试管中备用。(3)酶液及显色剂配制: 取大白鼠新鲜纯肝1份, 切碎加3份冰蒸馏水(W/V), 在组织捣碎机中匀浆3 min, 用3层纱布过滤后, 以2500 r/min离心15~30 min, 取上清液于0℃以下冰箱中贮藏。用时以冰蒸馏水20倍稀释即可。另取醋酸- $\beta$ -萘酯100 mg, 溶于60 ml无水乙醇中, 秤取固蓝B盐200 mg, 溶于160 ml蒸馏水中, 使用时以此量相混合, 即为显色剂(基质液)。(4)样品测定: ①制板——薄层玻板20 cm×20 cm, 硅藻土1份加2.8~3倍的0.25%羧甲基纤维素钠水溶液, 调成糊状, 涂板(厚约0.3~0.5 mm)。在110~130℃下活化1 h, 取出置于干燥器内备用; ②标样——秤99.6%涕灭威标准品0.00567 g, 溶于10 ml丙酮中, 配成 $T_{\text{浓标}} = 567 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的标准溶液。另取 $T_{\text{浓标}}$ 少量稀释成4倍, 得 $T_{\text{稀标}} = 141.75 \mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液备用; ③点样——在薄层板基线略上方, 等距离设置8个点, 将同一处理株的上、中、下三部位的样品各在 $T_{\text{浓标}}$ 及 $T_{\text{稀标}}$ 设点, 分别点样5  $\mu\text{l}$ ; ④展开——点样后的薄层板放入密封层析缸中

(展开剂为石油醚:丙酮 = 17:1), 上行展开 10~16 cm; ⑤ 显色——原理  $Ax + E \xrightleftharpoons{K_1} Ax \cdot E \xrightleftharpoons{K_2}$

$AE \xrightarrow{K_3} A + E$ , 式中  $Ax$  为涕灭威,  $E$  为胆碱酯酶,  $K_1$  为解离常数,  $K_2$  为反应速率常数,  $K_3$  为酶致活常数,  $Ax \cdot E$  为复合物,  $x$  为胆碱,  $AE$  为氨基甲酰化酶, 在一定条件下, 最后水解, 酶复活。

上述反应设计在薄层板上进行。底板部位由于酶的活性未被抑制, 与基质液起作用生成基质水解产物, 显色剂使底板呈紫红色; 药斑部位由于酶活性被抑制, 基质液不被水解, 显色剂不显色, 农药斑点为白色。展开后的薄层板, 待有机溶剂挥发后, 均匀喷洒酶液 (约 10 ml), 并将薄层板置于 37 °C 温箱中 30 min, 取出喷显色剂, 即可在紫红色背景上呈现清晰白色涕灭威斑点。

计算:  $\log W = \log W_s - \left( \frac{\sqrt{A_s} - \sqrt{A}}{\sqrt{A_d} - \sqrt{A_s}} \right) \log d$ , 式中:  $W$  为样品检出量;  $W_s$  为标准液

含量;  $A_s$ 、 $A$ 、 $A_d$  分别为标准样 ( $T_{浓标}$ )、样品和标准样稀释液 ( $T_{稀标}$ ) 的斑点面积 ( $T_{浓标} = 576 \mu\text{g/ml}$ ,  $T_{稀标} = 141.75 \mu\text{g/ml}$ );  $d$  为标准样稀释液倍数的倒数 ( $1/4 = 0.25$ )。

4. 提取树干内涕灭威对抑制松材线虫繁殖的测定 [涕灭威注入黑松树干后 30 天, 用 5% 丙酮水将提取的已知浓度的样品浓缩液配成 6 ppm、9 ppm 的药液, 以测定对线虫繁殖的抑制程度。

## 二、结果与分析

### (一) 涕灭威抑制松材线虫繁殖的测定

1. 定量喷药——先喷药剂后接线虫的抑制繁殖试验 不同浓度涕灭威分别喷雾在经培养的灰葡萄孢霉上, 喷后每皿立即准确接上松材线虫, 并在 25 °C 恒温箱中培养 8 天。单位面积实际含药量通过载玻片计测 ( $\text{ppm} \times \text{单位面积含药量} = \text{g/cm}^2$ )。试验表明, 9 ppm 涕灭威喷雾, 实际含药量为  $2.0709 \times 10^{-8} \text{ g/cm}^2$ , 可完全抑制松材线虫的繁殖 (表 1)。单位面积上的实际含药量因喷雾均匀度而略有差异, 但均是极微量的, 证明松材线虫对涕灭威十分敏感。浓度低到 4 ppm, 实际含量  $0.8931 \times 10^{-8} \text{ g/cm}^2$ , 就能影响线虫繁殖。5% 丙酮水 ( $CK_2$ ) 与不作任何处理的对照 ( $CK_1$ ) 相比, 对线虫的繁殖无影响, 可用来配制涕灭威药液。表 1 还可看出, 浓度的递增与抑制繁殖程度呈正相关。

2. 定量喷药——先接线虫后喷药剂的抑制繁殖试验 药剂处理方法对抑制线虫繁殖是否有影响? 为此又进行了先在灰葡萄孢霉上接种线虫, 后喷 9 ppm 涕灭威药液的试验, 经培养检查结果见表 2。由于先接虫后喷药试验迟于先喷药后接虫 15 天左右, 病树取样不同和线虫幼虫、成虫的老熟程度不一, 因此繁殖力有所影响, 但表 2 的线虫检出数 (9 ppm 和 5% 丙酮水处理) 恰好较表 1 的线虫检出数下降 6.5 倍。所处理的条件相同, 次序略有先后, 结果基本一致。

### (二) 黑松树干内涕灭威残留输导测定结果

1988~1989 年对黑松树干采用  $T_1$ 、 $T_2$  剂量试验。1989 年 4 月 18 日注入涕灭威后的测

表 1

不同浓度涕灭威抑制松材线虫繁殖的测定

(1989·4·21~4·29)

浓 度 (ppm)	重 复	单位面积实际含药量 (g/cm <sup>2</sup> )	接种线虫数(条)		检出线虫数(条)		繁殖情况
			重 复	平 均	重 复	平 均	
4	1	0.8931 × 10 <sup>-8</sup>	100	95	873	850	受到抑制
	2		91		827		
6	1	1.2609 × 10 <sup>-8</sup>	95	93	510	501	抑 制
	2		91		493		
9	1	2.0709 × 10 <sup>-8</sup>	94	97	53	62	完全抑制
	2		100		71		
13.5	1	3.2717 × 10 <sup>-8</sup>	96	97	39	35	完全抑制
	2		98		31		
20.25	1	6.2706 × 10 <sup>-8</sup>	108	104	25	22.5	完全抑制
	2		100		20		
30.37	1	7.5485 × 10 <sup>-8</sup>	104	100	2	4.5	完全抑制
	2		95		7		
45.56	1	1.2974 × 10 <sup>-8</sup>	97	98	2	2	完全抑制
	2		99		2		
CK <sub>1</sub> (不处理)				93		39522	大量繁殖
CK <sub>2</sub> (5%丙酮水喷雾)	1	1.4869 × 10 <sup>-4</sup>	93	94	38960	38840	大量繁殖
	2	(丙酮含量)	94		38720		

表 2

9 ppm 涕灭威抑制松材线虫繁殖的测定

(1989·5·10~5·18)

浓 度 (ppm)	重 复	单位面积实际含药量 (g/cm <sup>2</sup> )	接种线虫数(条)		检出线虫数(条)		繁殖情况
			重 复	平 均	重 复	平 均	
9	1	2.5599 × 10 <sup>-8</sup>	101	98	11	9.3	完全抑制
	2		97		9		
	3		96		8		
5%丙酮水	1	1.5054 × 10 <sup>-4</sup>	95	95	5640	5983	大量繁殖
	2		95		6326		

定结果见表 3、4。在相同时间内, T<sub>2</sub> 处理的残留含量要比 T<sub>1</sub> 处理高得多。涕灭威为内吸性杀虫剂及杀线虫剂, 水中的溶解度为 0.26% (30℃), 易溶于丙酮, 因此, 溶于丙酮的涕灭威颗粒剂注入后, 有效成分很快随树液流动而输导, 这是检出量高的主要原因。由于涕灭威为颗粒制剂, 其表面有保护物质, 加上丙酮量较少, 有一部分涕灭威并未完全溶解。残存的涕灭威在注孔中缓慢地溶解在树液和孔壁渗出的松脂中, 加上剩余涕灭威丙酮液随树液流动不断缓慢地输导, 虽然第 30、50 天的株平均检出量显著低于 15 天的检出量, 但仍明显高于表 3 中第 15、30 及 50 天的涕灭威检出量。

树干打孔后直接注入 40 g 涕灭威(T<sub>1</sub>), 孔壁不久便充满松脂, 并逐渐变稠、氧化。涕灭威逐步溶解于松脂和树液中, 但溶解及输导程度显然比用丙酮溶解的为低。第 50 天检查注孔

表 3 注入15%涕灭威颗粒剂40g后不同时间的采样分析 (1989年)

测定时间 部 位	注药后15 d (4.18~5.3)			注药后30 d (4.18~5.18)			注药后50 d (4.18~6.7)		
	上 部	中 部	下 部	上 部	中 部	下 部	上 部	中 部	下 部
样品定容(ml)	3.95	2.60	3.39	2.90	2.40	1.80	2.20	2.67	2.70
点样量(μl)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
二次重复平均展开面积(mm <sup>2</sup> )	130	160.5	178	142	144	169	88	139.5	102
平均检出量(μg)	0.525 2	1.069 5	1.315 4	0.650 7	0.652 8	0.763 0	0.436 5	0.633 3	0.484 9
平均样品总检出量(μg)	290.550	373.810	626.060	286.330	339.460	274.680	190.740	338.170	261.870
每克木屑含药量(ppm)	19.369	24.921	41.373	19.089	22.630	18.312	12.716	22.550	17.460
株平均检出量(ppm)	28.675 7			20.013 3			17.575 3		

表 4 注入15%涕灭威颗粒剂40g(加丙酮溶解)后不同时间的采样分析 (1989年)

测定时间 部 位	注药后15 d (4.18~5.3)			注药后30 d (4.18~5.18)			注药后50 d (5.18~6.7)		
	上 部	中 部	下 部	上 部	中 部	下 部	上 部	中 部	下 部
样品定容(ml)	2.60	2.80	2.80	1.79	2.10	2.58	1.45	2.45	2.30
点样量(μl)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
二次重复平均展开面积(mm <sup>2</sup> )	246	423	369	337	253.5	178.5	132.5	250	127
平均检出量(μg)	2.083 7	8.691 3	6.059 9	2.564 9	1.816 0	1.241 9	0.943 2	1.623 3	0.909 5
平均样品总检出量(μg)	758.448	3406.969	2375.462	918.252	762.720	640.846	603.616	795.393	418.370
每克木屑含药量(ppm)	50.563	227.131	158.564	61.220	50.484	42.720	40.241	55.026	27.891
株平均检出量(ppm)	145.352 9			51.796 0			40.386 0		

时发现, 未用丙酮溶解的注入孔中, 尤其是中心部分, 还存有较多量的保持原状的涕灭威颗粒剂, 这就说明表 3 中株平均检出量低的原因。但无论加丙酮溶解与否, 可以预测, 在50~70天内或更长时间, 株平均检出量可保持在 10 ppm 以上。南京地区松褐天牛的羽化期为 5 月中旬至 7 月中下旬, 因此在上述黑松中, 于 5 月 10 日前后每株注入 15% 涕灭威 20~40 g, 即可在天牛羽化期有效地抑制树干内松材线虫的繁殖。

在薄层板上, 用微量注射器点滴已知浓度的涕灭威标准液, 采用上述薄层层析——酶抑制技术进行测定, 最小检出量为 1 ng, 最小检出浓度为 0.005 ppm。各样品点样展开后, 在薄层板上移动的距离, 通常用比移值  $R_f$  表示。所测定的平均  $R_f$  值为 0.973。

### (三) 样品中涕灭威抑制松材线虫繁殖的测定

根据黑松注药后 30 天提取的样品所测定的涕灭威含量, 用 5% 丙酮水配制成 6 ppm 和 9 ppm 药液对生长在灰葡萄孢霉上的线虫进行室内抑制繁殖的试验(方法同上), 测定结果见表 5。

由于喷药不均匀, 检出线虫数重复之间有一定的差异。但试验表明, 树干注药后提取液中涕灭威配成某一浓度对抑制线虫的繁殖试验与室内将 15% 涕灭威颗粒剂用 5% 丙酮水配制的 6 ppm 及 9 ppm 所测定的抑制繁殖试验结果基本一致。

表 5

样品中涕灭威抑制松材线虫繁殖的测定

(1989·5·22~5·30)

药剂浓度 (ppm)	重 复	单位面积实际含 药量(g/cm <sup>2</sup> )	接种线虫数(条)		检出线虫数(条)		繁 殖 情 况
			重 复	平 均	重 复	平 均	
6	1	0.965 8 × 10 <sup>-5</sup>	103	104	961	464	符合表 1 试验结果
	2		104		214		
	3		107		278		
9	1	2.045 5 × 10 <sup>-5</sup>	101	101	73	149	基本符合表 1 试验结果
	2		100		219		
CK(5%丙酮水)	1	0.737 3 × 10 <sup>-4</sup>	101	102	15 060	18 760	大 量 繁 殖
	2		103		22 460		

#### (四) 回收率测定

将涕灭威标准品用丙酮配成253 μg/ml、63.25 μg/ml两种浓度,取未注药的黑松木屑15 g加入253 μg/ml标准溶液0.2 ml,测定方法同上,并设重复。结果(表6)表明采用薄层测定技术是可行的。

表 6

回 收 率 测 定

回 收 样	加入标准样量 (μg)	提取液定容 (ml)	点 样 量 (μl)	展开面积 (mm <sup>2</sup> )	检 出 量 (μg)	平均检出 总量(μg)	回 收 率 (%)
重 复	1	0.2 ml × 253 μg/ml = 50.6 μg	0.6	15	236	1.113	45.84
	2			15	243	1.179	

#### (五) 林间防治试验

1989年5月15日,在南京伊邨饭店后山黑松林疫区(树高7~8 m,胸径12~16 cm,14~16年生)中,用15%涕灭威颗粒剂以20 g/株、40 g/株分别打洞注药处理(均不加丙酮溶解)50株,并设对照100株。10月17日检查,对照有15株因松材线虫萎蔫病致死,而两种剂量的处理株均无病死树,保株率为100%。

### 三、结论与建议

1. 从配制的涕灭威系列浓度或树干注药后提取涕灭威用5%丙酮水稀释成某一浓度,对松材线虫进行抑制繁殖的试验表明,线虫对药剂有极大的敏感性,9 ppm以上就能完全抑制松材线虫的繁殖。

2. 林间防治试验表明,南京地区5月10日前后,根据树的大小,每株注药量控制在20~40 g,可在松褐天牛羽化期(南京5月中旬~7月中下旬)于黑松上传播线虫时完全抑制其繁殖,当年保株率达100%。目前我国山东宁阳农药厂正在合成生产涕灭威,这是防治和抑制松萎蔫病极有希望的农药。

3. 南京地区松褐天牛羽化期正值江南霉雨季节,每年5~6月,习惯用3%杀螟松飞机喷洒防治松褐天牛,这是极不经济的,应选用触杀性强的农药和研究耐雨水的长效农药剂

型<sup>[4,6]</sup>。为保护松萎蔫病重灾区的黑松，尤其是风景林及名胜迹地的古黑松，注射涕灭威是十分有效的措施。但施药方法的科学化，松褐天牛羽化期的预测，天牛、线虫的综合治理，严格检疫、控制疫区等尚需进行认真的研究。

### 参 考 文 献

- [1] Kobayash, F. et al., 1984, The Japanese Pine Sawyer beetle as the vector of pine wilt disease, *Ann. Rev. Entomol.*, 29, 115~135.
- [2] 戴秀莲等, 1985, 作物中涕灭威残留量的测定, *农药*, (1):32~33.
- [3] 孙永春, 1985, 浅谈松材线虫的防治, *江苏林业科技*, (1):50~52.
- [4] 朱正昌等, 1989, 杀螟松在中山陵林区中残留动态的研究, *南京林业大学学报*, 13(1):89~95.
- [5] 朱正昌等, 1989, 农药微胶囊剂研究, *南京林业大学学报*, 13(2):19~25.

## STUDY ON THE TEMIK CONTROL OF REPRODUCTION IN *BURSAPHELENCHUS XYLOPHILUS*

Zhu Zhengchang    Zhou Xingheng    Li Qingbo  
Gao Jingbin        Zhu Hongbing     Ji Zhenghua

(Nanjing Forestry University)

**Abstract** Temik 9 ppm can successfully control the reproduction of *Bursaphelenchus xylophilus* growing on the *Botrytis cinerea*. If 40 grams of 15% temik granule are injected into each *Pinus thunbergii* Parl, the contents of temik in the trunks will be 20.013~51.796 ppm in 30 days and 17.575~40.386 ppm in 50 days. Sawdusts mixed with different contents of temik will influences the growth of *Bursaphelenchus xylophilus* at different extent. During the emergence of *Monochamus alternatus* Hope, 100 % of the boles of *Pinus thunbergii* are protected by injecting temik into the trunks only once a year. A new way is provided to control *Bursaphelenchus xylophilus*.

**Key words** *Bursaphelenchus xylophilus*; pine wilt disease; *Monochamus alternatus* Hope; temik