

· 植物保护 ·

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.20230115



主持人:廖卫国

检疫性害虫带木蠹象 *Pissodes castaneus* (DeGeer)的鉴定

蔡波¹, 温淑璇², 张坤², 裴佶¹, 万培弟¹, 刘福秀¹, 吴少英²

(1. 海口海关 热带植物隔离检疫中心, 海口 570311; 2. 海南大学 三亚南繁研究院, 海南三亚, 572025)

摘要: 带木蠹象 (*Pissodes castaneus*) 是一种重要的林木入侵害虫, 是我国进境植物检疫性有害生物。该虫原产欧洲各国, 现已传入非洲和南美洲。国内尚无该虫的分布记录, 2017年8月首次在海南洋浦口岸截获。带木蠹象主要为害松科植物的形成层和韧皮部, 并在树皮内形成蛹室, 可通过进境木材贸易进行远距离传播。笔者利用DNA条形码技术扩增目标样本线粒体CO I基因, 与GenBank数据库以及BOLD数据库对比分析, 并使用邻接法构建该类昆虫支序图, 结果表明试验样品与带木蠹象 *P. castaneus* 聚为一支且99%以上同源性。DNA条形码技术为口岸快速检疫通关和入侵林业害虫的检测提供了便捷可能。

关键词: 带木蠹象; 检疫性害虫; 形态特征; 分子鉴定

中图分类号: S40 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-7054 (2024) 03-0332-05

蔡波, 温淑璇, 张坤, 等. 检疫性害虫带木蠹象 *Pissodes castaneus* (DeGeer)的鉴定 [J]. 热带生物学报, 2024, 15(3): 332-336. doi:10.15886/j.cnki.rdsxb.20230115

带木蠹象 [*Pissodes castaneus* (DeGeer, 1775)], 又名松带木蠹象、条带木蠹象、多条木蠹象, 隶属于鞘翅目 Coleoptera, 象虫科 Curculionidae, 魔喙象亚科 Molytinae, 木蠹象属 *Pissodes*, 主要分布于亚洲、南美洲、非洲和欧洲, 我国尚无分布记录^[1]。据公开报道2017年8月1日在海南洋浦口岸截获该虫, 为全国口岸首次截获^[2]。欧洲部分地区为带木蠹象原产地, 故带木蠹象没有被欧洲和地中海植物保护组织 (EPPO) 列为检疫害虫。但其对世界其他国家还具有很高的入侵风险, 现已被厄尔瓜多、美国和土耳其等列为检疫性害虫^[3]。2007年木蠹象属 *Pissodes* 被列入《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》。带木蠹象 *Pissodes castaneus* 是木蠹象属中具有明确入侵历史的种类之一^[4-5]。

带木蠹象寄主范围很广, 包括欧洲冷杉 (*Abies alba*)、高加索冷杉 (*Abies nordmanniana*)、欧洲落叶松 (*Larix decidua*)、欧洲云杉 (*Picea abies*)、北美短叶松 (*Pinus banksiana*)、欧洲黑松 (*Pinus nigra*)、辐射松 (*Pinus radiata*)、意大利五针松 (*Pinus pinea*)、欧洲红豆杉 (*Taxus baccata*) 等^[1]。带木蠹象喜欢在幼年或受到生物或非生物胁迫的树木上取食^[6], 其主要取食部位在树木的树梢、顶部枝杈、树干、树皮及球果^[7]。带木蠹象危害途径有两种: ①成虫取食树脂, 主要在细枝和细茎的幼嫩树皮打洞, 到达树皮内部, 切断树脂管道, 造成树枝茎端发黄和死亡^[8]; ②幼虫啃食树枝、树干和树根韧皮部, 并会在树木内部建造蛹室, 阻碍了树木营养物质循环, 树木表现枯萎, 针叶泛黄和褐变, 严重时可能造成树皮脱落, 最终导致树木的死亡^[9]。

收稿日期: 2023-09-30

修回日期: 2023-12-06

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2021YFC2600600); 海南省重大科技计划项目 (ZDKJ2021016)

第一作者: 蔡波 (1984-), 男, 海口海关热带植物隔离检疫中心. E-mail: caibohneiq@163.com

温淑璇 (1998-), 女, 海南大学热带农林学院 2022 级硕士研究生. E-mail: wsx2690607177@163.com

通信作者: 吴少英 (1980-), 女, 教授, 研究方向: 昆虫分子毒理及生理生化. E-mail: wswsy6000@hainanu.edu.cn;

刘福秀 (1973-), 男, 研究员, 研究方向: 进出境植物检疫. E-mail: fuxiuliu@126.com

带木蠹象世代周期长,成虫最多可以存活20个月^[10],通常为1年1代,在欧洲部分地区,为1年2代。该虫繁殖能力强,在恒定饲养条件下,雌虫的产卵周期可达20~60 d,其持续时间与温度有关^[11]。带木蠹象种群传播能力强、速度快,其卵、幼虫和蛹均可随寄主植物远距离调运扩散到其他国家和地区,形成对入侵地的威胁^[7]。2001年在南美洲的巴西发现其入侵,随后2003年在阿根廷、乌拉圭和智利也发现该害虫^[12]。带木蠹象易爆发成灾,易对松科植物造成毁灭性的破坏。2000—2017年在波兰的人工松树林和灌木丛中发现大量的带木蠹象,据统计其发生面积范围为3 000~10 000 hm²^[13]。带木蠹象适应能力强,主要以3~4龄幼虫或成虫形态越冬,幼虫在树皮下越冬,成虫在土壤中越冬^[14]。

木蠹象属的传统分类主要是依据其成虫形态特征,对成虫虫体完整性要求较高,对于虫体残缺及不同虫态的样本无法进行快速精准识别^[15]。DNA条形码技术不受物种个体影响,是生物基因组中普遍存在的、较短的、标准化的DNA序列,其中线粒体细胞色素氧化酶 I 基因 (cytochrome oxidase subunit I, CO I) 具有较高的突变率和引物扩增通用性,被认为是标准的动物 DNA 条形码序列,可用于物种的分子鉴定^[16]。综上所述,DNA条形码技术可以作为传统分类学辅助手段,弥补传统分类学的不足,缩短检测时间,提高口岸检出效率。

笔者通过形态特征和DNA条形码技术相结合的方法对洋浦口岸从乌拉圭的火炬松、湿地松原木上截获的带木蠹象进行分子鉴定复核,确认为带木蠹象(*Pissodes castaneus*),同时根据CO I基因序列对该属亲缘关系较近的种类进行系统发育分析,为DNA条形码技术在入侵生物快速鉴定中的应用提供了实践案例。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫 供试昆虫为2017年8月在洋浦口岸现场检疫时从来自乌拉圭的一批松木中截获的若干成虫、幼虫和蛹。

1.2 形态学鉴定 使用体视显微镜(型号为LEICA S8 APO)进行形态观察,参照文献[1, 17—20]对采集的标本进行形态特征鉴定。

1.3 分子鉴定

1.3.1 基因组DNA提取 提取截获昆虫总DNA,将单头幼虫置于离心管中研磨,使用DNeasy Blood & Tissue Kit血液/组DNA提取试剂盒提取总DNA,命名为unknown specimen, -20℃保存备用。

1.3.2 PCR扩增与测序 PCR扩增引物序列参照昆虫条形码通用引物 LCO1490:5'-GGTCAACAAA TCATAAAGATATTGG-3'和HCO2198:5'-TAAAC TTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'^[24],扩增CO I基因序列中549 bp的目的片段。按2×Taq Master Mix说明书配置反应体系,PCR反应体系:2×Master Mix 12.5 μL,引物各1 μL,模板1 μL, ddH₂O 将体积调整为25 μL。反应条件:94℃预变性1.5 min;94℃变性20 s,45℃退火20 s,72℃延伸1 min,35个循环;72℃终延伸10 min。用1%的琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,电泳缓冲液为1×TAE,135 v电泳25 min左右。琼脂糖凝胶电泳后在凝胶成像系统上观察,选取条带明亮单一条带,委托公司进行测序。

1.3.3 序列分析及支序图的构建 将拼接后的序列结果在GenBank和BLOD中进行BLAST序列比对,并下载带木蠹象相似种同源序列(表1)。利用MEGA 7.0对14条序列先进行比对,随后采用Bootstrap重复抽样1 000次进行遗传距离分析和构建支序图,验证形态鉴定的结果。

2 结果与分析

2.1 形态学特征 成虫的形态(图1)特征:体长5.0~11.0 mm,体型椭圆形,体壁红褐色至深褐色,被覆或稀或密、或窄或宽的鳞片,前胸两侧鳞片大而圆,白色。喙细长,弯,圆柱形,等于、短于或长于前

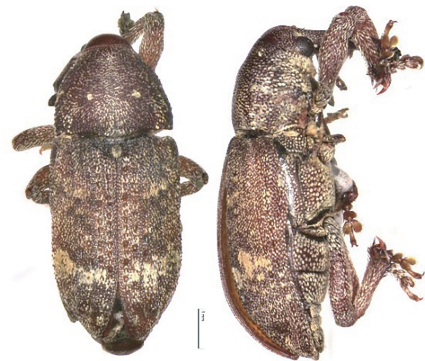


图1 带木蠹象侧面观和背面观

Fig. 1 Lateral view and dorsal view characteristics of *Pissodes castaneus*

表 1 木蠹象属同源序列信息

Tab. 1 Information of homologous sequence in *Pissodes*

序号 Serial number	物种 Species	碱基长度/bp Base length/bp	登录号 Accession number
1	带木蠹象 <i>Pissodes castaneus</i>	658	MK892386
2	樟子松木蠹象 <i>P. validirostris</i>	658	KU915362
3	白松木蠹象 <i>P. strobi</i>	625	MPCAN139
4	耐猛木蠹象 <i>P. nemorensis</i>	559	MH118709
5	松树木蠹象 <i>P. piniphilus</i>	658	KJ965145
6	条纹木蠹象 <i>P. striatulus</i>	559	MH118727
7	圆角木蠹象 <i>P. harcyniae</i>	658	KJ963137
8	粗刻点木蠹象 <i>P. punctatus</i>	658	HQ987002
9	施瓦兹木蠹象 <i>P. schwarzi</i>	539	INRMA2823
10	坚松木蠹象 <i>P. radiatae</i>	658	PFCCA212
11	松树木蠹象 <i>P. pini</i>	658	KU917614
12	同纹木蠹象 <i>P. similis</i>	661	KR124686
13	云杉木蠹象 <i>P. piceae</i>	534	KT799830
14	小松木蠹象 <i>P. affinis</i>	810	U77982

胸,有刻点、光滑或有稀疏的鳞片状刚毛,通常基部较窄,在触角附着点稍宽,端部最宽。触角附着在喙中部左右,触角沟起源于附着点之前,延伸到眼之前,并与喙的下缘平行,柄节短于索节,棒形,索节7节,被覆刚毛。头部在复眼的后面呈球形,宽约等于前胸,光滑,散布刻点,复眼之间有刻痕,略凹,眼内缘有长短不一的毛或成簇的鳞片。前胸中间以前缩窄,刻点之间扁或隆,后角成锐角。鞘翅基部等于或略宽于前胸,两侧接近平行,翅坡处略缩窄,之后强烈缩窄,翅坡斜,行间扁平,等宽或奇数行间较凸且宽,前胸背板上的点大部分相连,基部明显二波形,后面的鳞片外面宽,向内变窄。鞘翅具密集的整齐排列成行的方形的刻点,鞘翅上偶数行间明显比奇数行间窄,鞘翅有两条横带,前一条带中部断开,后一条中央为白色,两侧为黄色,行纹具有明显的刻点。腿节不具齿。

2.2 分子鉴定结果

2.2.1 COI 序列比对结果 通过 PCR 扩增获得目标样本的线粒体 COI 序列,长度是 549 bp,将序列与 GenBank 和 BOLD 数据库比对,结果(图 2)是目标样本与带木蠹象线粒体 COI 序列相似度在 99% 以上,为此可以判定该目标样本为带木蠹象。

2.2.2 支序图分析结果 将目标样本的 COI 序列在 BOLDSYSTEMS v4 数据库经行比对,发现与数

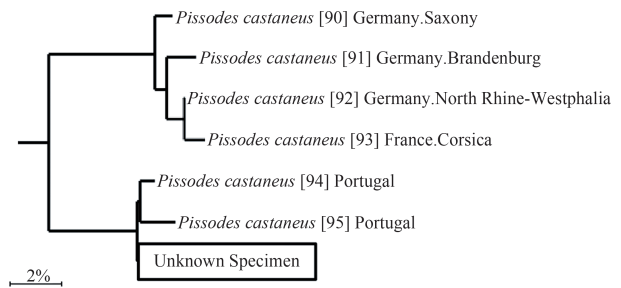


图 2 试验样品线粒体 COI 序列片段 BOLD 数据库检索所得支序图

Fig. 2 caldgram obtained by sample Mitochondrial COI sequence fragments in BOLD database

据库中葡萄牙地区的 2 条带木蠹象序列聚为 1 支,具有 99% 以上的同源性(图 2),为此可以判断该样本为带木蠹象。

The unknown specimen identified by the box in the figure is the target sample, marked The ruler is 2% genetic distance, and the serial number 90~95 is the *pissodes castaneus* included in the BOLD database

据库中葡萄牙地区的 2 条带木蠹象序列聚为 1 支,具有 99% 以上的同源性(图 2),为此可以判断该样本为带木蠹象。

基于 Clustal W 多序列联配比对分析结果,用 MEGA 7.0 软件采用邻接法(NJ)构建 14 个带木蠹象属害虫的支序图(图 3)。试验样本与带木蠹象单独聚为一支,与其他相似种明显分开。

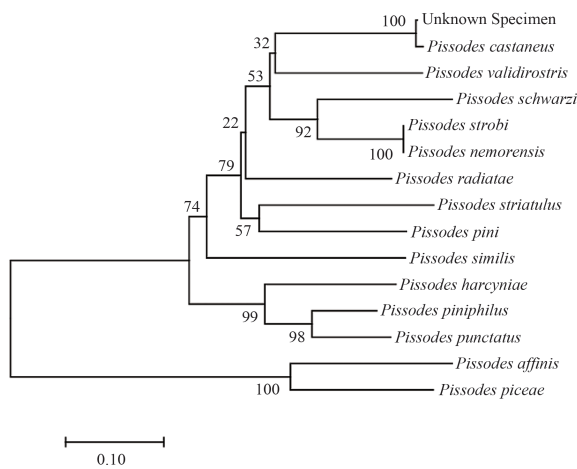


图3 基于NJ法构建的带木蠹象支序图

Fig. 3 *Pissodes castaneus* caldgram based on neighbor-joining method

3 讨论

木蠹象属 *Pissodes* 是以松树木蠹象为模式种建立的属, 隶属鞘翅目、象虫科、魔喙象亚科^[21]。该属目前已记录种类46种, 29种记录于美洲, 18种记录在欧洲和亚洲, 在中国记录8种^[22]。带木蠹象主要危害栽培松树, 在中国暂未分布, 据公开报道在海口洋浦口岸截获该虫^[2]。我国地域辽阔, 生态环境多样, 大部分地区气候适合该虫繁殖, 寄主植物广泛, 频繁的国际贸易往来更是加剧传入风险, 为防止其传入我国形成新的入侵物种, 加强海关检疫尤为重要。

传统形态学鉴定是昆虫鉴定的经典方法^[23], 然而在海关实际检疫工作中, 截获的样本可能会出现无法满足形态学鉴定要求, 如虫体残缺、数量不足、或是幼虫、蛹期等。另有木蠹象属害虫不同种之间的差异较小, 不容易通过肉眼识别, 而DNA条形码技术能够实现快速准确鉴定种类。笔者对带木蠹象成虫进行形态鉴定后, 通过DNA条形码技术对带木蠹象幼虫进行分子鉴定复核, 形态和分子鉴定结合能够确保带木蠹象鉴定的准确性, 同时也验证分子鉴定的可行性。目前, DNA条形码技术已广泛应用于我国植物检疫工作中, 如张桂芳等^[24]鉴定玉米根萤叶甲, 马琳等^[25]鉴定番茄潜叶蛾幼虫, 吴福中等^[26]鉴定扶桑绵粉蚧和其他近似种。依目前技术条件, DNA条形码技术还不能完全取代传统分类学地位, 但随着DNA条形码

技术发展和数据库的完善, 该技术将是服务于我国植物检疫领域快速有效的工具。

参考文献:

- [1] 张润志, 任立. 中国检疫害虫图鉴 [M]. 北京: 科学出版社, 2020:16-19.
- [2] 赵刚, 张毅. 洋浦口岸全国首次截获带木蠹象 [J]. 中国检验检疫, 2017(9): 42.
- [3] CABL. *Pissodes castaneus* (small banded pine weevil) [EB/OL]. (2021-11-17) [2023-09-28]. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompilendium.41485>.
- [4] 中华人民共和国农业部公告第862号《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》[EB/OL]. (2007-06-04) [2023-09-28]. http://www.moa.gov.cn/gk/tzgg_1/gg/200706/t2007-0604_827310.htm.
- [5] BOHEMAN C H. Genera et species Cuculionidum cum synonymia hujus familiae[M]. Paris:Roret,1843:45-47.
- [6] PROKOCKA A, SKRZECZ I, SOWINSKA A, et al. Insecticidal activity of alpha-cypermethrin against small banded pine weevil *Pissodes castaneus* (Coleoptera: Curculionidae) in forest plantations and thickets [J]. Folia Forestalia Polonica. Series A. Forestry, 2016, 58(3):16-20.
- [7] 张新民. 木蠹象属 *Pissodes* 系统学研究综述 [J]. 西部林业科学, 2016, 45(2): 153-158.
- [8] WOLSKI R, SKRZECZ I. Insect assemblages associated with *Pissodes castaneus* (De Geer) on *Pinus sylvestris* L. trees[J]. sylwan, 2022, 166(2):91-100.
- [9] FRENCH G, ZALESKI S R M, SCHORR R R, et al. Attraction of *Pissodes castaneus* (Coleoptera, Curculionidae) to *Pinus taeda*: laboratory and field evaluation [J]. Chemoecology, 2023, 33(1): 45-54.
- [10] PANZAVOLTA T, TIBERI R. Observations on the life cycle of *Pissodes castaneus* in central Italy [J]. Bulletin of Insectology, 2010, 63: 45-50.
- [11] DAY K R, NORDLANDER G, KENIS M, et al. General biology and life cycles of bark weevils [M]//Lieutier F, Day KR, Battisti A, et al. Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, a Syn-thesis. Dordrecht: Springer, 2007: 331-349.
- [12] SKRZECZ I, POPOWSKA-NOWAK E, WOLSKI R, et al. The role of fungus *Beauveria bassiana* in reducing the number of *Pissodes castaneus* (Col., Curculionidae) in young forests [J]. Folia Forestalia Polonica, 2016, 58(4): 214-219.
- [13] SKRZECZ I, WOLSKI R, SOWINSKA A, et al. Evaluation of attractants and traps for monitoring small banded pine weevil *Pissodes castaneus* [J]. Journal of Applied Entomology, 2019, 143(4): 397-407.
- [14] ALAUZET C. Cycle biologique de *pissodes notatus* (Coleoptera, Curculionidae) dans la region toulousaine (france) [J]. The Canadian Entomologist, 1977, 109: 597-603.
- [15] 李春雷, 王溪桥, 张宇霞, 等. DNA条形码技术在口岸

- 昆虫监测中的应用研究 [J]. 中国口岸科学技术, 2022, 4(7): 59-64.
- [16] 杨倩倩, 刘苏汶, 俞晓平. DNA 条形码分析方法研究进展 [J]. 应用生态学报, 2018, 29(3): 1006-1014.
- [17] 林阳武, 郭琼霞. 木蠹象属三种主要木蠹象的识别与检疫 [J]. 武夷科学, 2006, 22: 172-175. doi:10.15914/j.cnki.wyxx.2006.00.0325.
- [18] 安榆林. 外来森林有害生物检疫 [M]. 北京: 科学出版社, 2012:12-16.
- [19] 赵养昌, 陈元清. 中国经济昆虫志:第二十册:鞘翅目:象虫科 [M]. 北京: 科学出版社, 1980:20-23.
- [20] 国家质量监督检验检疫总局. SN/T 3169-2012 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准 木蠹象属检疫鉴定方法[S].2012.
- [21] 张新民, 韩秀, 刘霞, 等. 中国木蠹象属的种类及区系分析 [J]. 生物学杂志, 2022, 39(1): 80-83.
- [22] 吕秀霞, 张润志. 木蠹象属(鞘翅目: 象虫科)的种类、分布、寄主植物及潜在入侵威胁 [J]. 林业科学, 2007, 43(9): 38-43.
- [23] 张桂芬, 王玉生, 郭建洋, 等. 重大检疫性害虫玉米根萤叶甲的种特异性 SS-CO I 快速检测技术研究 [J]. 植物保护, 2019, 45(1): 109-115.
- [24] 王心丽. 试论昆虫种类鉴定的准确性 [J]. 昆虫知识, 1999, 36(3): 171-173.
- [25] 马琳, 李晓维, 郭文超, 等. 基于 CO I 基因的新入侵害虫番茄潜叶蛾遗传多样性分析 [J]. 应用昆虫学报, 2021, 58(6): 1356-1364.
- [26] 吴福中, 王徐玫, 李惠萍, 等. 扶桑绵粉蚧及其近似种的 DNA 条形码鉴定 [J]. 植物检疫, 2020, 34(2): 42-47.

Identification of *Pissodes castaneus* (DeGeer), a quarantine pest

CAI Bo¹, WEN Shuxuan², ZHANG Kun², PEI Ji¹, WAN Peidi¹,
LIU Fuxiu¹, WU Shaoying²

(1. Post-Entry Quarantine Station for Tropical Plants, China Haikou Customs, Haikou, Hainan 570311, China; 2. Sanya Nanfan Research Institute, Hainan University, Sanya, Hainan 572025, China)

Abstract: *Pissodes castaneus* is an important invasive forest pest and a phytosanitary pest in China. The insect pest is native to European countries and has been introduced into Africa and South America. There is no record of the distribution of the insect pest in China, and it was first intercepted at Yangpu Port in Hainan, China in August 2017. *P. castaneus* mainly infests the cambium and phloem of Pinaceae plants and form pupa chambers under the bark, and it can be spread over long distances through imported timber trade. The adults, larva and pupa of an insect were collected at Yangput Port in August 2017, and their mitochondrial COI genes were amplified by using DNA barcoding and compared with those in GenBank database and BOLD database. The phylogenetic tree of this insect was constructed by using the neighbor-joining algorithm. The results showed that the insect sample and *P. castaneus* were clustered into the same family and had more than 99% homology. This DNA barcoding method provides a scientific basis for rapid quarantine clearance and detection of invasive forest pests.

Keywords: *Pissodes castaneus*(DeGeer); quarantine pest; morphological characteristics; molecular identification

(责任编辑:叶 静)