

# 寄生加勒比松松材线虫的鉴定及其致病性测定<sup>\*</sup>

方天松<sup>1</sup> 余海滨<sup>1</sup> 卓侃<sup>2</sup> 罗梅<sup>2</sup>  
李迅东<sup>2</sup> 尹成江<sup>2</sup> 廖金铃<sup>2</sup>

(1. 广东省森林病虫害防治与检疫总站 广州 510173; 2. 华南农业大学植物线虫研究室)

**摘要** 运用线虫比较形态学和 rDNA-ITS-PCR-RFLP 方法对采自广东省广州市白云山加勒比松上的伞滑刃线虫进行鉴定,结果确定该线虫为松材线虫。致病性测定表明该松材线虫种群对加勒比松苗有较强的致病力,接种的松苗均出现不同程度的枯萎,而且从枯死木中可重新分离到该线虫。

**关键词** 松材线虫 分子鉴定 加勒比松 致病性

中图分类号: S763.1 文献标识码: A 文章编号: 1006-4427(2008)02-0037-05

## Identification of *Bursaphelenchus xylophilus* from *Pinus caribaea* and Pathogenicity Assay

Fang Tiansong<sup>1</sup> Yu Haibin<sup>1</sup> Zhuo Kan<sup>2</sup> Luo Mei<sup>2</sup>  
Li Xundong<sup>2</sup> Yin Chengjiang<sup>2</sup> Liao Jinling<sup>2</sup>

(1. Forest Disease and Pest Control Station of Guangdong Province, Guangzhou, 510173;  
2. Plant Nematology Lab, South China Agricultural University)

**Abstract** *Bursaphelenchus xylophilus*, collected from *Pinus caribaea* in Guangzhou city, Guangdong province, was confirmed by morphology and rDNA-ITS-PCR-RFLP. Host seedlings of *P. caribaea* were inoculated with the isolated nematodes. The nematodes displayed pathogenicity in the host seedlings. All seedlings inoculated with the nematodes wilted and *B. xylophilus* could be recovered from the seedlings.

**Key words** *Bursaphelenchus xylophilus*, molecular identification, *Pinus caribaea*, pathogenicity

2005年秋冬季,广东省广州市白云山风景名胜区一片40 hm<sup>2</sup>的10年生加勒比松林(*Pinus caribaea*)陆续有植株发生枯死,当年累计枯死56株。枯死植株外观症状近似松材线虫病,对枯死木进行分离,得到1种伞滑刃属(*Bursaphelenchus*)线虫。伞滑刃属中的松材线虫(*B. xylophilus*)引起的萎蔫病是国际公认的林业特大毁灭性病害。松材线虫的准确鉴定是防治该病的一个重要前提条件。传统的鉴定方法主要根据形态学,但近年来研究发现,松材线虫与伞滑刃属松材线虫组(*xylophilus*-group)中的多种伞滑刃线虫在形态上十分相似,例如拟松材线虫(*B. mucronatus*)、假伞滑刃线虫(*B. fraudulentus*)、锥尾伞滑刃线虫(*B. conicaudatus*)等<sup>[1-2]</sup>,无法仅根据形态特征对松材线虫进行鉴定,因此EPPO(European Plant Protection Organization)提出松材线虫的准确诊断应在形态鉴定的基础上结合分子生物学数据,并且制定了一套松材线虫诊断程序<sup>[2]</sup>。本文根据EPPO的松材线虫诊断标准,采用形态学和rDNA-ITS-PCR-RFLP方法对该线虫种群进行鉴定。同时,为了明确该种群与加勒比松萎蔫死亡的关系,本研究还测定了该松材线虫种群对加勒比松的致病性。

\* 本文由省科技计划项目(2004B20501005)资助。通讯作者:余海滨,E-mail:yhb@gdf.gov.cn。

## 1 材料与方法

### 1.1 线虫来源

2007年分离自广东省广州市白云山加勒比松,经纯化后培养在盘多毛孢菌(*Pestalotia* sp.)上。

### 1.2 线虫的形态学鉴定

将线虫置于水浴锅中,60~65℃处理2~3 min,杀死线虫;杀死的线虫用TAF液固定保存。将已固定的线虫制成临时玻片或永久玻片,在OLYMPUS显微镜下对线虫进行观察、拍摄,并用De Man公式法进行形态特征测量计算。

### 1.3 DNA方法鉴定

**1.3.1 线虫DNA提取** 采用微量DNA提取法,主要参照Liao等<sup>[3]</sup>的方法,略加改动。在载玻片上滴16 μL预冷的WLB液(2.5 mmol/L DTT,1.125%吐温20,0.025%明胶,2.5倍PCR缓冲液),挑入3~5条松材线虫,用手术刀将线虫切成多段,迅速吸取含尽量多的线虫片段悬浮液8 μL,加到含10 μL无菌水的Eppendorf管中,再向管中加入2 μL预冷的1 mg/mL蛋白酶K,迅速放入-70℃冰箱10 min以上。接着将Eppendorf管置于65℃恒温60 min,95℃恒温10 min,12 000 g离心0.5 min。此时即得到DNA悬浮液,可直接用于PCR,也可保存于-20℃。

**1.3.2 PCR扩增** 对rDNA-ITS区进行扩增。试验采用引物为:

5'-CGTAACAAGGTAGCTGTAG-3'<sup>[4]</sup>和5'-TTTCACTCGCCGTTACTAAGG-3'<sup>[5]</sup>;

PCR反应体系为:DNA模板10~20 ng,Ex Taq(5 U/μL)0.125 μL,10×PCR缓冲液2.5 μL,dNTP(2.5 mmol/L)2 μL,引物(10 μmol/L)各1 μL,加无菌水至25 μL;

扩增条件为:94℃ 3 min;接着94℃ 1 min,50℃ 1 min,72℃ 2 min共35个循环;最后72℃ 10 min;

扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离。每100 mL琼脂糖凝胶加入5 μL EB替代物GoldView。电泳缓冲液为0.5×TBE,以5 v/cm电压电泳约30 min。用凝胶图象分析系统照相,并储存到电脑中。

**1.3.3 RFLP分析** 参照EPO程序<sup>[2]</sup>,用*Rsa* I、*Hae* III、*Msp* I、*Hinf* I和*Alu* I(大连宝生物)5种限制性内切酶对PCR扩增产物进行酶切,酶切程序按说明书进行。酶切产物在2%琼脂糖凝胶中电泳分离,每100 mL琼脂糖凝胶加入5 μL EB替代物GoldView。电泳缓冲液为0.5×TBE,以5 v/cm电压电泳约30 min。用凝胶图象分析系统照相,并储存到电脑中。

### 1.4 致病性测定

**1.4.1 线虫接种** 采用柴希民等<sup>[6]</sup>的“截枝套管法”,在封闭的温室内,对健康的3年生加勒比松进行线虫接种。接种时选择松树的任一侧枝,用枝剪剪下树枝,使伤口呈朝上的斜面,套上一粗细和侧枝直径相适的,长约5~8 cm的乳胶管,套叠部分用封口膜封好,用移液器将试验备好的松材线虫液注入乳胶管,然后用浸有无菌水的湿棉球封住管口,以保持乳胶管内的湿度。接虫量为每株10 000条,共接种5株,以清水作对照。连续观察并记录植株变化。

**1.4.2 发病后加勒比松树内线虫的分离、鉴定及无害化处理** 松苗(枝)刚枯死后,去掉针叶,剪成约1 cm长的片段,用改良的贝曼漏斗法室温分离线虫并鉴定。实验结束后将所有松苗(枝)残体及器具120℃消毒20 min。

## 2 结果与分析

### 2.1 形态鉴定

**2.1.1 形态描述** 雌虫:虫体细长,热杀死后向腹面弯;唇区高,缢缩显著;口针长,基部稍膨大;中食道球卵圆形,占体宽2/3以上,瓣膜清晰;排泄孔开口大致和食道与肠的交界处平行;食道腺细叶状,背覆盖肠。单卵巢,前伸;后阴子宫囊长,长度约为肛阴距的3/4;阴门具宽的阴门盖,尾部近圆筒形,末端宽圆。

雄虫:热杀死后虫体后部向腹面弯,虫体呈“J”形。虫体前部与雌虫相似;单精巢,前伸;交合刺大,弓形,基顶钝圆,基喙尖,顶端具1盘状的顶喙;尾部向腹面弯曲呈鸟爪状;有1个小的端生交合伞;有7个尾乳突,1个位于泄殖腔前,1对位于泄殖腔区,2对位于泄殖腔后近交合伞起始处。

2.1.2 形态测量值 由表1可见,主要形态特征及形态测量值与 EPPO<sup>[2]</sup>、Mamiya 等<sup>[7]</sup>对松材线虫的描述相符。

表1 寄生加勒比松供试线虫种群形态测量值

种群	类型	测量值	n	L(μm)	a	b	c	st(μm)	v	sp(μm)
寄生加勒比松 松材线虫种群	雌虫	平均值	30	1006.48	38.50	10.65	27.38	14.76	73.37	
		最小值		789.36	30.20	7.80	21.50	12.65	69.60	
		最大值		1194.16	47.00	12.90	33.00	16.45	75.90	
	雄虫	平均值	30	903.65	41.37	9.39	28.12	14.38		28.34
		最小值		721.00	35.00	7.80	22.50	12.65		25.30
		最大值		1122.70	46.00	11.80	31.70	15.18		30.36
Mamiya & Kiyohara 的松材线虫 副模标本 <sup>[7]</sup>	雌虫	平均值	40	810.00	40.00	10.30	26.00	15.90	72.70	
		最小值		710.00	33.00	9.40	23.00	14.00	67.00	
		最大值		1010.00	46.00	12.80	32.00	18.00	78.00	
	雄虫	平均值	30	730.00	42.30	9.40	26.40	14.90		27.00
		最小值		590.00	36.00	7.60	21.00	14.00		25.00
		最大值		820.00	47.00	11.30	31.00	17.00		30.00

注:n为测量虫数,L为体长,a为体长/最大体宽,b为体长/自头前端至食道与肠交界处,c为体长/尾长,st为口针长,v为头顶至阴门长度/体长×100,sp为交合刺长。

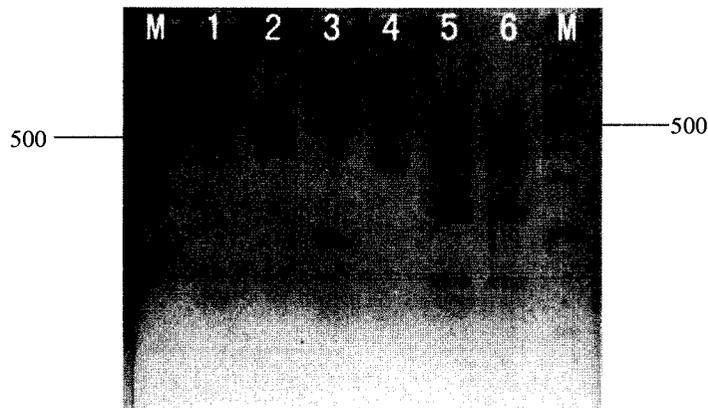
## 2.2 分子生物学特征

rDNA-ITS 区扩增获得一条约 950 bp 的亮带,5 种限制性内切酶对该 PCR 扩增产物的酶切结果见表 2, rDNA-ITS-PCR 图谱和酶切图谱见图 1。该结果与 EPPO<sup>[2]</sup> 报道的松材线虫结果一致。

表2 寄生加勒比松供试线虫 rDNA-ITS 扩增及酶切结果

单位:bp

PCR 产物大小	限制性片段大小				
	<i>Rsa</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Msp</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Alu</i> I
950	500	730	570	270	460
	420	200	380	260	250
				140	140
					100



M: Takara 100 bp ladder 1: ITS 2: *Rsa* I 3: *Hae* III 4: *Msp* I 5: *Hinf* I 6: *Alu* I

图1 寄生加勒比松供试线虫 rDNA-ITS 扩增及酶切图谱

### 2.3 线虫对松树的致病力

接种试验结果表明该松材线虫种群对加勒比松表现较强的致病力,接种1个月后,接种线虫的5株松苗均表现不同程度的枯萎,其中2株枯萎死亡,3株下部侧枝枯萎。将枯萎松枝进行漏斗分离线虫,均分离到松材线虫。清水对照的松苗均不感病。

## 3 讨论

本研究从广州市白云山加勒比松上分离到1种伞滑刃线虫,通过形态学和 rDNA-ITS-PCR-RFLP 方法确证该线虫为松材线虫,而且通过致病性实验证明该松材线虫对加勒比松具有较强的致病力。据统计,我国松材线虫主要感染马尾松(*P. massoniana*)、黑松(*P. thunbergii*)、赤松(*P. densiflora*)、海岸松(*P. pinaster*)、火炬松(*P. taeda*)、湿地松(*P. elliotii*)、白皮松(*P. bungeana*)、黄松(*P. thunbergii* × *P. massoniana* (F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>))、琉球松(*P. luchuensis*)、黄山松(*P. taiwanensis*)、台湾五针松(*P. morrisonicola*)、台湾果松(*P. armandi*)<sup>[1,6]</sup>,这是国内首次在加勒比松上发现松材线虫。一般认为加勒比松是松材线虫病的抗性品种,但笔者不仅在自然条件下从加勒比松枯死木中分离到大量松材线虫,而且致病性实验结果也表明该松材线虫对加勒比松具有较强的致病力。该现象说明不同的松材线虫种群的致病性可能不同,或者松属树种对松材线虫的抗性只是相对的,环境的变化可能影响寄主的抗感性。

加勒比松是继黑松和马尾松之后,广东省又一种在自然条件下感染松材线虫病的树种。由于加勒比松在我国有较大的分布范围,在广东省也有一定的分布面积,因此应进一步开展调查,了解松材线虫是否侵染其他地区的加勒比松及存在新的潜在寄主,同时防治上应予以重视,必须对马尾松林、黑松林及加勒比松林一并进行治理;采取有效的检疫措施防止该线虫继续传播蔓延,以减少松材线虫对林业造成的经济损失。

松材线虫的准确鉴定是防治该病的一个重要前提条件。松材线虫隶属于滑刃目(Aphelenchida)、寄生滑刃科(Parasitaphelenchidae)、伞滑刃属。由于松材线虫在林业生产上的重要性,近年来伞滑刃属的分类鉴定研究越来越受到人们的重视。传统的鉴定方法主要根据形态学,但近年来研究发现,松材线虫与伞滑刃属松材线虫组中的多种伞滑刃线虫在形态上十分相似。据统计,迄今报道的与松材线虫形态相似的松材组线虫达11种,这给伞滑刃松材组线虫的鉴定带来困难。目前,人们主要对线虫的 rDNA-ITS、SSU、LSU 和 mtDNA-COI 进行 PCR 扩增,然后采用 RFLP 或直接测序等方法进行分析鉴定<sup>[8-11]</sup>。其中, rDNA-ITS-PCR-RFLP 技术在伞滑刃线虫的鉴定中日趋成熟并发挥了重要的作用。Burgermeister 等<sup>[8]</sup>建立了26种伞滑刃线虫的 rDNA-ITS-PCR-RFLP 图谱,近年来所发表的伞滑刃线虫新种也基本上建立了该图谱。rDNA-ITS-PCR-RFLP 图谱已成为伞滑刃线虫鉴定的一个重要依据,越来越多的学者利用该方法对伞滑刃线虫进行了准确的鉴定<sup>[12-16]</sup>。本研究所获得的松材线虫 rDNA-ITS-PCR-RFLP 图谱与国内外的报道一致,这进一步证实了它在鉴定上的价值,该方法在松材线虫鉴定上的客观性和准确性已得到国际的公认,因此笔者认为我国在进行松材线虫病疫区确定时,应该建立以形态学为基础的,并结合分子生物学技术来鉴定的标准,以保证有关结果的权威性。

### 参考文献

- [1] Ryss A, Vieira P, Mota M, et al. A synopsis of the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Aphelenchida: Parasitaphelenchidae) with keys to species [J]. *Nematology*, 2005, 7: 393-458.
- [2] OEPP/EPPO. EPPO standards PM 7/4(1) diagnostic protocols for regulated pests *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 2001, 31: 61-69.
- [3] Liao J L, Zhang L H, Feng Z X. Reliable identification of *Bursaphelenchus xylophilus* by rDNA amplification [J]. *Nematologia Mediterranea*, 2001, 29: 131-135.
- [4] Ferris V R, Ferris J M, Faghihi J. Variation in spacer ribosomal DNA in some cyst-forming species of plant parasitic nematodes [J]. *Fundamental and Applied Nematology*, 1993, 16: 177-184.

- [5] Vrain T C. Restriction fragment length polymorphism separates species of the *Xiphinema americanus* group [J]. *Journal of Nematology*, 1993, 25: 361-364.
- [6] 柴希民, 蒋平. 松材线虫病的发生和防治[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- [7] Mamiya Y, Kiyohara T. Description of *Bursaphelenchus lignicolus* n. sp. from pine wood and histopathology of nematode - infested trees [J]. *Nematologica*, 1972, 18: 120-124.
- [8] Burgermeister W, Metge K, Braasch H, et al. ITS-RFLP patterns for differentiation of 26 *Bursaphelenchus* species (Nematoda: Parasitaphelenchidae) and observations on their distribution [J]. *Russian Journal of Nematology*, 2005, 13 (1): 29-42.
- [9] Ye W M, Giblin - Davis R M, Braasch H, et al. Phylogenetic relationships among *Bursaphelenchus* species (Nematoda: Parasitaphelenchidae) inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequence data [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2007, 43: 1185-1197.
- [10] Zheng J W, Subbotin S A, He S S, et al. Molecular characterisation of some Asian isolates of *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* using PCR-RFLPs and sequences of ribosomal DNA [J]. *Russian Journal of Nematology*, 2002, 11 (2): 17-22.
- [11] 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.
- [12] 王立红, 顾建锋, 张慧丽, 等. 比利时橡木中伪伞滑刃线虫的鉴定 [J]. *浙江农业科学*, 2007(6): 698-701.
- [13] 顾建锋, 张慧丽, 郑炜, 等. 德国入境松木中锥尾伞滑刃线虫新记录 [J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2007, 46(5): 715-719.
- [14] Braasch H, Gu J F, Burgermeister W, et al. *Bursaphelenchus doui* sp. n. (Nematoda: Parasitaphelenchidae) in packaging wood from Taiwan and South Korea - a new species of the *xylophilus* group [J]. *Russian Journal of Nematology*, 2004, 12(2): 19-27.
- [15] Gu J, Zhang J, Braasch H, et al. *Bursaphelenchus singaporensis* sp. n. (Nematoda: Parasitaphelenchidae) in packaging wood from Singapore - a new species of the *B. xylophilus* group [J]. *Zootaxa*, 2005, 988: 1-12.
- [16] Mota M M, Braasch H, Bravo M A, et al. First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe [J]. *Nematology*, 1999, 1 (7-8): 727-734.