

基于分子证据探讨松材线虫在中国的传播途径

孙捷^{1,2}, 杨寿运¹, 崔春亮¹, 张崇星^{1,2}, 林茂松², 张克云^{1,2*}

(1. 南京农业大学生命科学学院, 2. 南京农业大学植物保护学院/农业部
病虫监测与治理重点开放实验室, 江苏 南京 210095)

摘要: 采用 11 个随机引物对来自中国最早发病的 5 个省和日本疫区的松材线虫共 10 个居群进行遗传多样性分析和系统发育分析, 拟从分子水平探讨松材线虫病在中国蔓延的可能途径。结果表明: 中国松材线虫居群间存在明显的遗传差异, 遗传距离为 0.066 ~ 0.262; 除了安徽明光的居群自成一支外, 其他居群均与南京居群聚成一支, 其中安徽皖南和浙江岱山居群与南京中山陵居群遗传距离最近, 为 0.066; 安徽明光居群与南京居群的遗传距离最大, 为 0.262。表明发生在安徽皖南和浙江岱山等地的松材线虫病可能是由最早发病的南京地区扩散的; 而发生在毗邻南京的安徽明光的松材线虫病不是由南京地区扩散的。该结果揭示, 松木制品的调运等人为远距离传播是松材线虫在我国蔓延的主要途径之一。

关键词: 松材线虫病; 松材线虫; RAPD; 传播途径

中图分类号: S763 文献标识码: A 文章编号: 1000–2030 (2008) 02–0055–06

Possible transmission routes of *Bursaphelenchus xylophilus* in China based on molecular data

SUN Jie^{1,2}, YANG Shou-yun¹, CUI Chun-liang¹, ZHANG Chong-xing^{1,2},
LIN Mao-song², ZHANG Ke-yun^{1,2*}

(1. College of Life Sciences, 2. College of Plant Protection/Key Laboratory of Monitoring and Management of Plant Diseases
and Insects, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In order to reveal possible transmission routes of *Bursaphelenchus xylophilus* in China, genetic diversity and phylogenetic analysis of 9 *B. xylophilus* populations from 5 provinces in China and one population in Japan were conducted based on RAPD of 11 random primers. Genetic diversity analysis showed that there was significant genetic variation among different populations of *B. xylophilus* in China, genetic distances between these populations were from 0.066 to 0.262; the genetic distance between population of Nanjing and Mingguang, Anhui Province, was the largest (0.262), whereas the genetic distance between population of Nanjing and South Anhui and Daishan, Zhejiang Province was the smallest (0.066). Phylogenetic analysis revealed that populations of *B. xylophilus* in China were divided into two clades: *B. xylophilus* populations from Nanjing, Zhejiang, Guangdong, Shandong, and South Anhui formed one clade; another one was made up only by the population of *B. xylophilus* in Mingguang, which adjacent to Nanjing. It suggested that the origin of pine wood nematode disease in Mingguang was different from that of Nanjing, whereas occurrences of pine wood nematode disease in the other places in China were probably dispersed from Nanjing, where pine wood nematode disease happened firstly in China, which suggested that transmission by imported pine wood packing boards was one of the most important transmission way of *B. xylophilus* in China.

Key words: pine wood nematode disease; *Bursaphelenchus xylophilus*; RAPD; transmission route

中国的松材线虫病于 1982 年首先在江苏省南京市紫金山风景区被发现^[1]。此后, 疫情呈蔓延扩散之势, 范围和面积不断扩大, 现已对中国南方省份松林资源造成严重破坏, 并对全国 0.44 亿多公顷松林和一些世界风景名胜区、自然文化遗产及重点生态区的安全构成严重威胁^[2–4]。

松材线虫病在中国大陆还只分布在江苏、安徽、山东、浙江和广东等省的部分松林中, 与广大的适生区相比尚属局部^[5–7]。因此研究松材线虫在中国的发生与传播规律, 从而堵住其传播渠道, 是保护中

收稿日期: 2007–04–11

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (2001AA249021); 江苏省科技攻关项目 (BE99359); 中国博士后科学基金 (20060390292);
江苏省博士后科学基金 (0601030B)

作者简介: 孙捷, 硕士研究生。^{*}通讯作者: 张克云, 博士后, 从事植物线虫学及其生物防治研究, Tel: 025–84396849, E-mail:
keyunzhang@njau.edu.cn。

国广阔的森林资源的一项十分重要而迫切的任务。

本研究采用 RAPD-PCR 技术对来自中国较早发病的 5 个省区及日本疫区的松材线虫共 10 个居群进行了遗传多样性分析和系统发育分析, 为探讨松材线虫在中国的发生与传播途径提供分子依据。

1 材料与方法

1.1 供试松材线虫和拟松材线虫居群

供试松材线虫 10 个居群分别来自中国江苏、安徽、山东、浙江、广东等 5 省和日本, 其中日本 1 个居群。拟松材线虫 1 个居群来自日本。供试线虫的编号、来源见表 1。

表 1 供试线虫的来源及寄主

Table 1 Geographical origins and hosts of *Bursaphelenchus* populations used in this study

线虫居群 Population	来源 Origin	寄主 Host
<i>B. xylophilus</i>		
BxCNJ1	中国 (南京中山陵) China (Nanjing Sun-Yat-Sen Mausoleum)	<i>Pinus massoniana</i>
BxCNJ2	中国 (南京中山陵) China (Nanjing Sun-Yat-Sen Mausoleum)	<i>Pinus thunbergii</i>
BxCNJ3	中国 (南京江宁林场) China (Nanjing Jiangning Forest)	<i>Pinus thunbergii</i>
BxCNJ4	中国 (南京江宁林场) China (Nanjing Jiangning Forest)	<i>Pinus densiflora</i>
BxCAS	中国 (安徽皖南山区, 安徽农业大学杨荣铮教授惠赠) China (South Anhui Province, provided by Prof. Rongzheng Yang, Anhui Agricultural University)	<i>Pinus massoniana</i>
BxCAJ	中国 (安徽明光, 安徽农业大学杨荣铮教授惠赠) China (Mingguang, Anhui Province, provided by Prof. Rongzheng Yang, Anhui Agricultural University)	<i>Pinus massoniana</i>
BxCZD	中国 (浙江岱山) China (Daishan, Zhejiang Province)	<i>Pinus massoniana</i>
BxCSC	中国 (山东长岛, 中国林科院杨宝君教授惠赠) China (Changdao, Shandong Province, provided by Prof. Baojun Yang, Chinese Academy of Forestry)	<i>Pinus thunbergii</i>
BxCGD	中国 (广东东莞, 华南农业大学高学彪副教授惠赠) China (Dongguan, Guangdong Province, provided by Prof. Xuebiao Gao, South China Agricultural University)	<i>Pinus massoniana</i>
BxJ1	日本 (南京出入境检验检疫局沈培垠先生惠赠) Japan (Provided by Mr. Peiyin Shen, Nanjing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau)	<i>Pinus thunbergii</i>
<i>B. mucronatus</i>		
BmJ2	日本 (南京出入境检验检疫局沈培垠先生惠赠) Japan (Provided by Mr. Peiyin Shen, Nanjing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau)	<i>Pinus thunbergii</i>

1.2 松材线虫的分离、培养和收集

采用单异活体培养法, 将分离纯化并灭菌的松材线虫 (不少于 50 头) 接种于生长在 PSA 培养基上的灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) 中, 24 ℃培养 7~14 d。将培养好的松材线虫用无菌水洗出, 离心收集, -70 ℃保存待用。

1.3 松材线虫 DNA 的提取

参见 Harmey 等^[8]方法每个居群取 1 000 条松材线虫研磨, 采用 SDS/蛋白酶 K 消化, 酚 - 氯仿抽提和乙醇沉淀法提取松材线虫基因组总 DNA。

1.4 PCR 扩增

采用 100 个寡核苷酸引物 (上海生物工程有限公司合成), 分别扩增松材线虫基因组总 DNA, 从中筛选出扩增结果清晰、重复性高、多态性丰富的引物用于 PCR 扩增。筛选出的 11 个随机引物见表 2。

RAPD-PCR 反应体系 (10 μL): ddH₂O 5.6 μL, 10 × Buffer 1 μL, 25 mmol · L⁻¹ MgCl₂ 1.2 μL, 10 mmol · L⁻¹ dNTP 0.2 μL, 0.5 U *Taq* 酶 0.1 μL, 0.8 μL 引物, 10 ng 模板 DNA (0.1 μL)。反应程序为: 94 ℃ 2 min; 94 ℃ 30 s, 37 ℃ 1 min, 72 ℃ 2 min, 45 个循环; 72 ℃ 7 min。

1.5 数据分析

1.5.1 遗传相似度 (*S*) 与遗传距离 (*D*) 根据 Nei^[9]的公式计算任意 2 个体间的遗传相似度 (*S*): $S = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, 其中: N_{xy} 是个体 *X* 和 *Y* 共同拥有的带数; N_x 和 N_y 分别是个体 *X* 和个体 *Y* 所具有的总带数。遗传距离 (*D*) 由 MEGAlI 软件^[10]采用 p-distance 模型获得。

1.5.2 系统发育分析 经电泳获得 RAPD 图谱, 将每个 RAPD 扩增带看作 1 个位点, 将电泳图谱上清晰且可重复出现的谱带记为 “A”, 同一位置没有谱带记为 “C”, 生成 “A” 和 “C” 组成的原始矩阵。

用 MEGAI 软件进行数据分析，其中遗传距离用 p-distance 模型，选用 UPGMA 法（unweighted pair-group method arithmetic averages）生成系统树。

2 结果与分析

2.1 RAPD 扩增结果

根据原始 DNA-RAPD 图谱照片及在电泳中的观察记录，筛选出的 11 个引物共产生 122 个扩增片段，片段大小在 200~1 600 bp 之间。其中，引物 S360 获得的扩增产物在中国松材线虫居群间的多态性最为丰富，在 10 个扩增片段中有 7 个为多态性片段（表 2，图 1-A）；引物 S348 获得的扩增产物在中国松材线虫居群间的多态性最少，在 12 个扩增片段中只有 1 个为多态性片段（表 2，图 1-B）。松材线虫与拟松材线虫种间多态性片段 100 个，共有片段 22 个，遗传相似度 18.0%；松材线虫种内多态性片段 73 个，共有片段 49 个，遗传相似度 40.2%；中国松材线虫居群间多态性片段（多态性位点）共有 57 个，共享片段 65 个，遗传相似度 53.3%。

表 2 随机引物序列及其扩增结果

Table 2 Amplified results and primer sequences used in this study

引物编号 Primer	引物序列 (5'-3') Primer sequences	扩增片段数 Number of fragments	多态性片段 Polymorphism of amplification fragments		
			中国松材线虫居群间 Among population of <i>B. xylophilus</i> in China		松材线虫种内 Among inter-species of <i>B. xylophilus</i>
			6	7	9
S344	CCGAACACGG	12	6	7	9
S24	AATCGGGCTG	8	4	4	6
S356	CTGCTTAGGG	13	5	10	13
S351	ACTCCTGCAGA	9	3	3	6
S348	CATACCGTGG	12	1	6	12
S347	CCTCTCGACA	17	12	13	14
S350	AAGCCCGAGG	11	5	7	8
S23	AGTCAGGCCAC	10	4	5	8
S346	TCGTTCCGCA	8	5	6	8
S360	AAGCGGCCTT	10	7	7	7
S357	ACGCCAGTTC	12	5	5	9

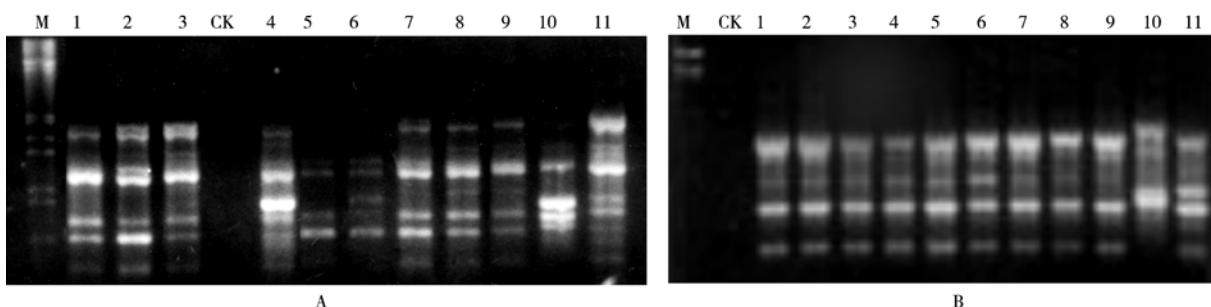


图 1 引物 S360 (A) 和 S348 (B) 对线虫基因组 DNA 的扩增产物电泳图

Fig. 1 RAPD amplified profiles of nematodes genetic DNA by primer S360 (A) and S348 (B)

M. LambdaDNA/Hind III + EcoR I ; 1. BxCSC; 2. BxCAJ; 3. BxCAS; CK. Negative control; 4. BxCNJ2; 5. BxCGD; 6. BxCZD; 7. BxCNJ1; 8. BxCNJ4; 9. BxCNJ3; 10. BmJ2; 11. BxJ1

2.2 遗传多样性与系统发育分析

按带的有（记为 A）、无（记为 C）记录松材线虫的 RAPD 带谱（图 2），输入计算机采用 MEGAI 软件计算它们之间的遗传距离（表 3），并采用 UPGMA 法生成系统树（图 3）。

由表 3 可见，松材线虫与拟松材线虫之间的遗传距离在 0.475~0.582 之间；中国松材线虫与日本松材线虫的遗传差异较为显著，遗传距离在 0.246~0.402 之间；安徽 BxCAJ 居群与日本居群间的遗传差异最大，遗传距离为 0.402；浙江 BxCZD 居群与日本居群间的遗传差异最小，遗传距离为 0.246。

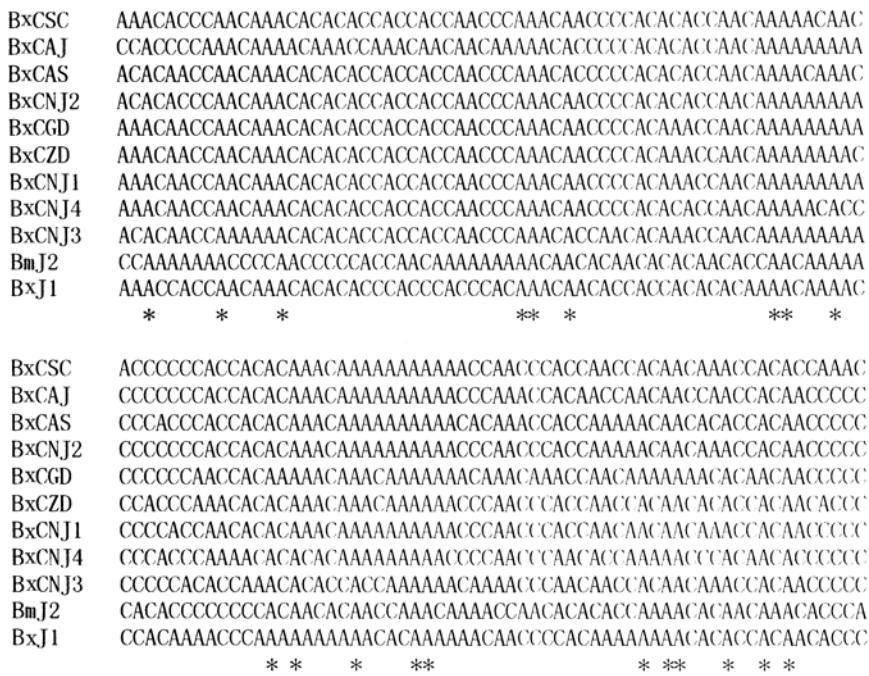


图2 松材线虫和拟松材线虫的 RAPD 带谱

Fig. 2 RAPD fragments of *B. xylophilus* and *B. mucronatus*

* 表示共有 RAPD 带 * Denote consistent fragment

中国松材线虫各居群间的遗传距离在 0.066 ~ 0.262 之间；安徽 BxCAJ 居群与南京的 BxNJ3 居群的遗传距离最大，为 0.262；其他居群均与南京中山陵居群具有较近的亲缘关系，其中安徽皖南 BxCAS 居群和浙江岱山的 BxCZD 与南京的 BxNJ2 和 BxNJ1 居群遗传差异最小（遗传距离仅为 0.066），其次是山东长岛的 BxCSC 与南京的 BxNJ2 居群（遗传距离为 0.098），再次是广东东莞 BxCGD 与南京的 BxNJ1 居群（遗传距离为 0.107）（表3）。

表3 松材线虫和拟松材线虫居群内和居群间的遗传距离

Table 3 Genetic distances among *B. xylophilus* and *B. mucronatus* groups

	BxCSC	BxCAJ	BxCAS	BxNJ2	BxCGD	BxCZD	BxNJ1	BxNJ4	BxNJ3	BmJ2	BxJ1
BxCSC	27	16	10	19	12	12	18	23	67	38	
BxCAJ	0.221		23	19	32	29	23	31	32	58	49
BxCAS	0.131	0.189		8	19	14	12	18	19	61	36
BxNJ2	0.082	0.156	0.066		15	12	6	18	17	65	36
BxCGD	0.156	0.262	0.156	0.123		13	13	21	22	62	33
BxCZD	0.098	0.238	0.115	0.098	0.107		8	18	19	65	30
BxNJ1	0.098	0.189	0.098	0.049	0.107	0.066		16	17	65	34
BxNJ4	0.148	0.254	0.148	0.148	0.172	0.148	0.131		27	71	42
BxNJ3	0.189	0.262	0.156	0.139	0.180	0.156	0.139	0.221		62	37
BmJ2	0.549	0.475	0.500	0.533	0.508	0.533	0.533	0.582	0.508		65
BxJ1	0.311	0.402	0.295	0.295	0.270	0.246	0.279	0.344	0.303	0.533	

注：右上角数据表示差异位点数，左下角数据表示遗传距离。Above diagonal shows the number of different sites, and below diagonal shows genetic distances.

系统发育分析结果（图3-A）表明，中国松材线虫为一单系群，日本松材线虫是中国松材线虫的姐妹群；其中中国松材线虫分成2个支系：来自安徽明光的BxCAJ居群自成一支，其余8个松材线虫居群聚成一支系。在该支系中，来自南京地区的2个居群BxNJ2、BxNJ1是浙江BxCZD居群的姐妹群；这两分支又组成山东BxCSC居群的姐妹群；广东东莞BxCGD居群是BxNJ2、BxCSC、BxNJ1、BxCZD和BxCAS组成的分支的姐妹群，它们共同聚成的分支是南京BxNJ4居群的姐妹群；南京BxNJ3居群是该支系中最基部的类群。

将图3-A中的松材线虫居群编号分别代之于产地，即得到松材线虫在我国各地的传播方向和发生规律（图3-B）。图3-B表明，发生在山东长岛、浙江岱山、安徽皖南、广东东莞的松材线虫病均由最早发病的南京地区扩散的，而发生在毗邻南京地区的安徽明光的松材线虫病不是由南京地区扩散的。

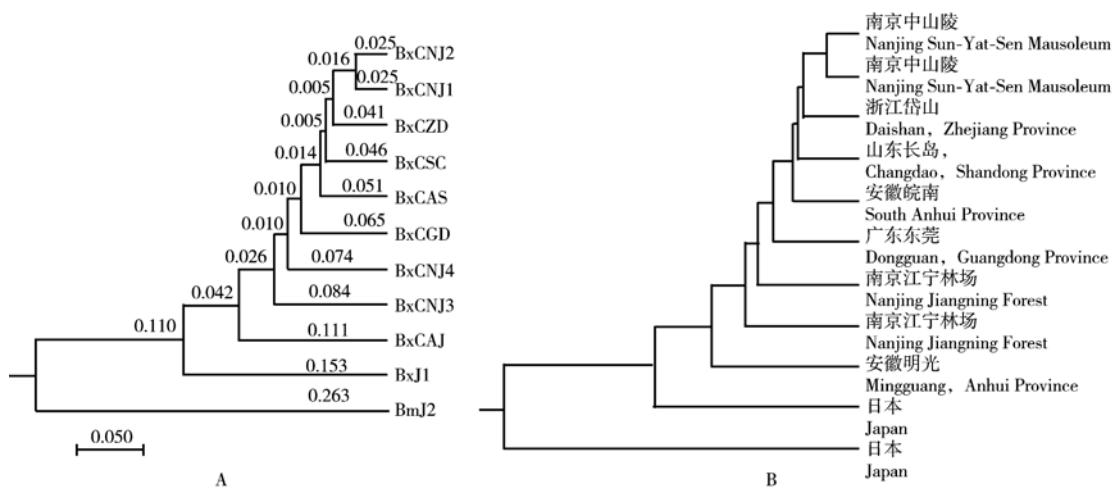


图3 根据 p-distance 用 UPGMA 法构建的松材线虫系统树 (A) 和松材线虫产地分支图 (B)

Fig. 3 Phylogenetic tree of *Bursaphelenchus* based on p-distance (A), and cladistic tree of occurrence places of *B. xylophilus* populations (B)

3 讨论与结论

3.1 RAPD 在研究松材线虫种下类群间亲缘关系中的应用

在研究线虫种间和种下类群间的亲缘关系时，常用的分子标记为核基因组 rDNA 的内部转录间隔区 (ITS) DNA 序列信息和 RAPD。ITS 序列在伞滑刃线虫属 (*Bursaphelenchus*) 种间差异比较大，因此在种间关系研究中发挥了非常重要的作用，目前开发出的许多松材线虫快速检测鉴定方法，多是基于 ITS 序列设计的^[11~14]。但是，ITS 序列在研究松材线虫种下类群间关系中的应用却难以开展，因为松材线虫种下类群间 ITS 序列差异极小^[11~13]。本实验室测定了本研究所用松材线虫居群的 ITS 序列 (GenBank 登录号分别为 EF446943 ~ 45、EF44694347 ~ 48、EF446950 和 EF446952)，结果表明中国各居群的 ITS 序列完全一致，与日本居群的 ITS 仅有 1 个碱基差异。而 RAPD 作为一种快速、灵敏的分子标记，在线虫种间和种下类群亲缘关系的研究中均发挥着重要作用^[15~17]。但是 RAPD 常因其扩增结果的重复性较差，而使其可靠性受到质疑。为克服 RAPD 重复性差的弱点，本研究利用所建立的最佳反应体系和最佳反应条件^[17]对 100 个随机引物进行了严格的筛选，100 个引物中有 11 个引物能获得清晰、重复性高、多态性丰富的扩增结果。

3.2 我国松材线虫的来源及传播途径

松材线虫的跨国远距离传播，主要是通过松类植物及其产品如木质包装箱等的人为传播。我国口岸检疫的主要目标一直是国外松材线虫疫区，自从 1992 年松材线虫被列为我国二类检疫动物以来^[1]，我国海关不断报道从来自日本、美国、加拿大等疫区木质包装箱上截获松材线虫^[18~20]。那么，除了最早发病的南京外，是否其他地方的松材线虫病均来自国外呢？本研究利用 RAPD-PCR 技术分析来自较早发病的 5 个省的 9 个松材线虫居群和日本居群间的亲缘关系，结果发现，发生在山东长岛、浙江岱山、安徽皖南、广东东莞的松材线虫病均由最早发病的南京地区扩散的，而发生在毗邻南京地区的安徽明光的松材线虫病不是由南京地区扩散的。杨再福等^[21]的研究也表明，国内省际流通的松木包装材料能携带松材线虫。松材线虫新疫点有人为传播、火灾诱发、原发生未防治和自然传播四大成因机制^[22]。本研究结果提示，在松材线虫的各种传播途径中，国内松木制品的调运等人为的远距离传播可能是松材线虫在我国蔓延的主要途径。所以在松材线虫的防治上，除了综合考虑杜绝各种可能的传播途径外，仍应加强检疫力度，尤其是在加强外检的同时注意严守内检关。

(致谢：感谢中国林业科学研究院杨宝君研究员、安徽农业大学杨荣铮教授、华南农业大学高学彪副教授和南京检疫检验局沈培垠高级工程师惠赠样品。感谢南京农业大学王金生教授、宋从凤副教授和李红梅副教授在试验设计等方面给予的指导和帮助。)

参考文献：

- [1] 程瑚瑞, 林茂松, 黎伟强, 等. 南京黑松上发生的萎蔫线虫病 [J]. 森林病虫通讯, 1983(4): 1~5

- [2] 赵锦年, 余盛明, 姚剑飞, 等. 黄山风景区松材线虫病危险性评估. II. 松天牛携带线虫状况的监测 [J]. 林业科学研究, 2004, 17(1): 72-76
- [3] 蒋丽雅, 江顺利, 汪振宇, 等. 黄山松自然状态下感染松材线虫病的初步调查 [J]. 安徽农业大学学报, 2006, 33(1): 5-8
- [4] 王峰, 王志英, 喻盛甫. 基于 ArcView GIS 的松材线虫传入云南风险评估 [J]. 云南农业大学学报, 2007, 22(5): 639-644
- [5] 屠新红, 裴海潮, 黄维正, 等. 松材线虫危害河南的潜在性风险分析 [J]. 河南林业科技, 2003, 23(1): 37-43
- [6] 蒋小龙, 沐咏民, 陈建涛, 等. 松材线虫传入云南的可能性及检疫对策 [J]. 植物检疫, 2004, 18(6): 346-348
- [7] 王峰, 王志英, 刘雪峰. 8种检疫线虫传入黑龙江的风险评估 [J]. 中国农学通报, 2007, 23(1): 351-353
- [8] Harmey J H, Harmey M A. Detection and identification of *Bursaphelenchus* species with DNA fingerprinting and polymerase chain reaction [J]. Journal of Nematology, 1993, 25(3): 406-415
- [9] Nei M. Analysis distance between populations [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1973, 70: 3321-3323
- [10] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I, et al. MEGA: molecular evolutionary genetic analysis, ver 2.0 [J]. Bioinformatics, 2001, 17: 1244-1245
- [11] 张立海, 廖金铃, 冯志新. 松材线虫 rDNA 的测序和 PCR-SSCP 分析 [J]. 植物病理学报, 2001, 31(1): 84-89
- [12] 王明旭, 朱水芳, 罗宽, 等. 松材线虫 rDNA-ITS2 的 TaqMan 探针实时荧光 PCR 检测 [J]. 林业科学, 2005, 41(2): 82-85
- [13] Matsunaga K, Togashi K. A simple method for discriminating *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* by species-specific polymerase chain reaction primer pairs [J]. Nematology, 2004, 6(2): 273-277
- [14] Kanzaki N, Futai K. A PCR primer for determination of phylogenetic relationships of *Bursaphelenchus* species within the xylophilus group [J]. Nematology, 2002, 4(1): 35-41
- [15] Da Conceição I L P M, Dos Santos M C V, De Oliveira Abrantes I M, et al. Using RAPD markers to analyse genetic diversity in Portuguese potato cyst nematode populations [J]. Nematology, 2003, 5(1): 137-143
- [16] 吴小芹, 熊大斌, 安榆林. 松材线虫和拟松材线虫种间及种内遗传相关性的 RAPD 分析 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2005, 29(1): 1-4
- [17] 张克云, 张崇星, 吕毅, 等. 松材线虫 RAPD-PCR 反应体系的优化与分子鉴定标记的筛选 [J]. 南京农业大学学报, 2006, 29(2): 61-65
- [18] 陈雪娇, 冯仑, 谢少强, 等. 深圳、广州、上海口岸截获松材线虫 [J]. 植物检疫, 1999, 13(4): 223
- [19] 王继蓬. 湖州局从美国木包装中截获松材线虫 [J]. 植物检疫, 2004, 18(4): 220
- [20] 李一农, 李芳荣, 金显忠, 等. 深圳口岸进境木质包装松材线虫检疫及对策 [J]. 莱阳农学院学报, 2004, 21(2): 154-157
- [21] 杨再福, 王宏毅, 张绍升. 松木包装板材的伞滑刃线虫种类鉴定 [J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2004, 33(1): 38-41
- [22] 来燕学, 周永平, 俞林祥, 等. 松材线虫病新疫点成因机制初探 [J]. 浙江林学院学报, 1999, 16(4): 425-429

责任编辑: 夏爱红