

松材线虫的快速检测

刘源岗, 龙瑞敏* (1. 华侨大学材料科学与工程学院, 福建泉州 362021; 2. 厦门大学生命科学学院寄生动物研究室, 福建厦门 361005)

摘要 从形态学检测、化学生化检测、分子生物学检测3个方面,对现行的松材线虫的快速检测技术进行了综述。

关键词 松材线虫; 形态学检测; 化学生化检测; 分子生物学检测

中图分类号 S431 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)28-08926-03

Fast Detection of Pine Wood Nematode

LIU Yuan-gang et al (College of Material Science and Engineering, Huaqiao University, Quanzhou, Fujian 362021)

Abstract The present fast detection techniques of pine wood nematode was summarized from 3 aspects of morphologic detection, chemical-biochemical detection and molecular biological detection.

Key words Pine wood nematode; Morphological detection; Chemical-biochemical detection; Molecular biological detection

由松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*)引起的松树萎蔫病,是一种松树毁灭性病害。该病害已在多个国家发生和流行,并呈扩展蔓延趋势。我国于1982年在江苏省南京市中山陵园梅花山风景区首次发现松材线虫病,此后,该病在我国境内迅速扩散蔓延,危害日趋严重,发生面积达8.7万 hm^2 ,累计致死松树3500多万株,因松材线虫病造成的直接经济损失已达25亿元,间接损失达250亿,使我国的松木资源、自然景观、生态环境遭受严重影响^[1-3]。该病的发生和发展涉及寄主、媒介、病原以及有关的微生物等多种生物因素,而病原即松材线虫为其主要因素。当前防止松材线虫病扩散蔓延的最有效措施是及时诊断由松材线虫病引起的松树枯死,并对可能携带松材线虫的松类植物及其产品进行准确的检疫检验。因此,松材线虫的快速检测技术已成为控制该病害扩散的重要手段之一。目前松材线虫的快速检测技术主要包括形态学检测法、化学生化检测法和分子生物学检测法三大类。

1 形态学检测法

相对于化学生化检测法与分子生物学检测法,从形态学上正确地鉴定松材线虫对一些非专业从事植物线虫检测的人员来说有一定的困难。但是,化学生化检测法与分子生物学检测法都为间接方法,都是通过对病树的化学和生理变化推测病原线虫存在与否,并区别松材线虫和拟松材线虫的差异。相对而言,形态学检测法更为可靠^[4-6]。通过简化常规的形态鉴定程序,取消样本水浸分离线虫这一耗时费工过程,能实现松材线虫病的早期快速鉴定的目的。来燕学开发了便携式显微镜和松枝解剖技术,用修枝剪采集松枝,用解剖刀进行松枝切片,再用便携式显微镜镜检,结果表明松枝内松材线虫检出率为70%,其中濒死松树内检出率为100%,局部枯枝内检出率为60%,健康枝内检出率为0^[7]。野外松林内鉴定一个样本平均用时2.5 min,表明该方法能对松材线虫病实施早期快速诊断。

蒋丽雅等通过林间设置松褐天牛(*Mnochaemus alternatus*)引诱剂,对引诱到的松褐天牛进行分离,通过镜检,10 min后就能判定有无病原线虫的存在,50 min后线虫全部游离到水

中^[8]。该方法具有在病害传入早期及时发现和检测时间短等优点。厦门大学植物线虫研究室潘沧桑教授发明的松材线虫检测管能在野外快捷及时地从松树上直接插管吸引松材线虫。这对于该疫病的检测、监控、治理起到关键作用^[9]。

2 化学生化检测法

2.1 pH值检测法 王玉燕等研究了松材线虫病木和健康木的化学成分,发现松材线虫侵害松树后产生代谢酸,从而使木材的酸度增加^[10-11]。在树体的同一部位,与健康木相比病木pH值总是较低。对江苏南京黑松的病木和健康木进行pH值测定,发现它们的树干中部样品pH值差别最大。根据所测病木、健康木的pH值范围,选择了0.04%溴酚兰酒精溶液,其pH值变色域是3.0~4.6。该指示剂在健康木木质部上所显示的颜色为紫罗兰色,而在松材线虫病木上所显示的颜色为黄色,线虫危害越严重则黄色越明显。在不同类型疫区和有关非疫区进行测试,发现该方法的准确率可达85%以上。在此基础上,笔者对江苏、安徽2个疫区的黑松、赤松、马尾松、火炬松、湿地松等5个树种松材线虫病、健康木pH值差异性进行了分析^[12-14]。结果表明,不同松树品种松材线虫病的病木、健康木pH值的差异性也不同,对松材线虫越敏感和受害越严重的,其病木pH值降低得越多,与健康木pH值差异就越明显。该研究为利用pH值进行松材线虫病快速检测提供了依据。

2.2 纤维素酶扩散检测法 纤维素酶是松材线虫病发生、发展过程中产生的一种与致病性相关的重要物质之一。蒋丽雅等利用纤维素酶扩散法对松材线虫虫体提取液和分泌液进行了定性检测^[15]。该方法以羧甲基纤维素钠为酶底物,超薄层琼脂板为反应板,刚果红为染色剂,乙酸为中止反应剂,结果均呈阳性反应,说明松材线虫虫体含纤维素酶,且向体外分泌,而拟松材线虫几乎不含纤维素酶。该方法的灵敏度高,方法简单,结果稳定,反应易于观察,检测时间短。张奇等对松材线虫分泌的一种抗原性纤维素酶进行了初步纯化,并以该纤维素酶为指标建立了选择性抗体酶联免疫分析方法(SAELIA)^[16]。该方法可以简便、快捷地检测出疫木中存在的纤维素酶,为松材线虫的检测及松材线虫病的研究提供了一种新的手段。

2.3 显色剂检测法 为了获取准确、快速检测松材线虫的方法,王明旭等对利用纤维素酶活性、苯乙酸与苯甲酸含量和显色剂检测松材线虫的方法进行了比较研究^[17]。研究表

基金项目 国家自然科学基金面上项目(30470234)。

作者简介 刘源岗(1978-),男,湖南娄底人,博士,讲师,从事生物相关研究。* 通讯作者。

收稿日期 2007-04-14

明,在这3种方法中,显色法的检测结果具有较好的稳定性和准确性。显色剂测定病树和健康树内的显色差异明显。病树呈深红色至浅红色,而且线虫愈多色泽愈深;健康树呈无色,感染拟松材线虫的松材呈清白色或无色。该方法操作简便,稳定性好,准确性高,检测时间短,是有发展前景的检测方法。

2.4 免疫学检测法 利用免疫学原理,白钢等以直接从疫木上分离的松材线虫的粉碎虫体免疫家兔制备抗血清,通过免疫印迹考察抗血清的特异性,利用固相松材线虫抗原和游离线虫抗原同线虫抗体相竞争,建立竞争型 ELISA 法用于松材线虫的分析^[18]。该方法简便快速,灵敏度高,可直接检测出10 ng 木屑中0.1 μg 线虫蛋白,即约7条线虫的存在。在此基础上,他们利用抗松材线虫血清建立了在疫木切面上直接进行免疫组化染色检测松材线虫抗原的方法^[19]。曹宇等采用种子聚合法合成聚苯乙烯磁性微球,并以兔抗松材线虫 IgG 致敏,制备出能特异性地捕获松材线虫蛋白抗原的免疫磁性微球,以生物素标记抗体为示踪抗体,并结合酶标亲和素检测系统用于疫木样品的分析,其灵敏度可达到0.1 μg/ml 线虫抗原蛋白^[20]。该方法可直接捕获木屑中的微量线虫抗原,具有简便、快速、准确等优点,是一种实用的松材线虫的快速检测方法。

3 分子生物学检测法

植物线虫的分子生物学检测是通过分析线虫 DNA 特有的基因组区域而对其作出准确的鉴定。目前研究比较清楚的松材线虫 DNA 片断的序列主要有70A 热休克蛋白部分片断 rDNA 基因组序列,包括18S rRNA 序列、ITS1、5.8S rRNA、ITS2、28S rRNA 以及 DNA 探针、卫星 DNA 等^[21]。相关的分子生物学检测技术主要包括探针技术以及基于 PCR 的各种检测技术。

3.1 探针检测法 在早期的研究中,Teres 等用同源 DNA 分别开发了松材线虫和拟松材线虫的特异性探针^[22];Harney 等利用克隆的线虫重复 DNA 设计出 X14 探针,进行 DNA 扩增指纹分析,找出了一条松材线虫的4kb DNA 特异性片段^[23]。最近,南京林业大学与安徽省森林病虫害防治总站合作,成功标记了一个可用于检测松材线虫的非放射性探针,在此基础上制备出检测试剂盒,可在较短时间(约3 h)对线虫进行鉴定^[24]。此外,王明旭等制备了松材线虫 Rdna-ITS2 的 TaqMan 探针^[25],葛建军等制备出 TaqMan-MGB 探针,均可实现对松材线虫的实时荧光定量检测^[26]。

3.2 RAPD PCR 检测法 RAPD 称为随机扩增多态性 DNA,是20世纪90年代初在 PCR 基础上发展起来的一项技术^[27]。它以10 bp 左右的随机引物用来扩增,可简便、快捷地检测基因组 DNA 的多态性。最近,陈凤毛等采用 RAPD 技术对松材线虫和拟松材线虫进行了检测,从140个随机引物中筛选出引物 OPK09 与引物组合 OPC18 + OPN18^[28]。引物 OPK09 对12个松材线虫株系扩增出一条约2 400 bp 左右的特异片段,引物组合 OPC18 + OPN18 对10个拟松材线虫株系扩增出一条970 bp 左右的特异片段。研究表明,引物 OPK09 与引物组合 OPC18 + OPN18 具有特异性强、灵敏度高的优点。这2组引物可以用于鉴定松材线虫和拟松材线虫。

3.3 PCR-RFLP 检测法 即 PCR-限制性片断长度多态性,利用特定的限制性内切酶在 DNA 分子上有其特异性的识别顺序和固定切点,经内切酶消化目的 DNA 片断,形成不同长度的片断,产生的 DNA 片段的数目和各个片段的长度又反映了限制性内切酶的切点在 DNA 上的分布。对于每一个 DNA/限制性内切酶组合而言,所产生的片段是特异性的,能作为某一 DNA 或含这种 DNA 生物所特有的“指纹”。如,Iwahori 等用12种限制性内切酶分析了15个松材线虫和拟松材线虫样本的 rDNA(包括 ITS1-5.8S-ITS2),并对松材线虫和拟松材线虫的样本进行测序,发现在松材线虫的样本中,中国、日本和美国的遗传距离很近,但它们与加拿大样本的遗传距离较远^[29]。

3.4 PCR-SSCP 检测法 即 PCR-单链构型多态性,利用 PCR 扩增的片断在变性剂或低离子浓度下经高温处理变性为单链,形成亚稳定构象。由于碱基组成差异而形成构象的不同,在非变性聚丙烯酰胺凝胶中表现出电泳迁移率不同。张立海等对14个松材线虫和拟松材线虫样本进行了单链构象多态性分析,发现 PCR-SSCP 分析技术可明确区分这2种线虫^[30]。该技术可为单条松材线虫的鉴定提供一套灵敏而可靠的方法。

3.5 荧光 PCR 检测法 在常规 PCR 的基础上,增加1条双荧光标记的核酸杂交探针,即 TaqMan 探针。在 PCR 循环中, TaqMan 探针可与 PCR 产物杂交,由于 Taq 酶有5到3的外切酶活性,在引物延伸阶段可将 TaqMan 探针切断,破坏探针的能量传递结构,增强报告基团荧光信号。随着 PCR 产物的增加,荧光信号随之增强。根据荧光信号是否增强可判断模板是否扩增^[31]。张卫东等利用荧光 PCR 从美国进境的木质包装材料中成功检出松材线虫^[32]。研究表明,探针检测松材线虫样品时,可产生明显的荧光信号,但空白对照、小杆线虫、拟松材线虫无荧光信号,说明探针有较强的特异性,且具有简单、灵敏、快速等特点。

3.6 Duplex PCR 检测法 Duplex PCR 检测法在其他植物病害检测中(如大豆孢囊线虫)已得到一些研究与应用^[33]。赵立荣等利用 Duplex PCR 技术对松材线虫、拟松材线虫的 rDNA 部分核苷酸序列扩增^[34]。根据松材线虫、拟松材线虫的 ITS1 序列区别,设计出特异性引物,检测松材线虫的存在与否。Duplex PCR 技术只需单条线虫,不用酶切,节约了成本和时间。该方法原理和操作简单,不需特殊的仪器和设备,适合在检验检疫单位运用和推广。

3.7 其他 PCR 检测法 贺水山等选择常用的松材线虫 rDNA 基因的部分序列作为目标序列,在设计特异性引物时,故意在引物的3'端造成单个碱基的错配,由此增大引物与拟松材线虫基因之间的差异,再结合优化 PCR 扩增条件,最终实现对松材线虫的快速检测^[35]。李一农等利用2对松材线虫特异性引物分别对来自日本、美国和葡萄牙的松材线虫虫样进行 PCR 检测,成功扩增出330和220 bp rDNA-ITS1 区基因片断^[36]。该方法对松材线虫成虫和幼虫均能作出准确鉴定。赵立荣等利用 PCR 技术对松材线虫、拟松材线虫的 rDNA 的 ITS1 区和 5.8 S 区核苷酸序列扩增^[37]。根据松材线虫、拟松材线虫的 ITS1 序列区别,分别设计出松材线虫和拟

松材线虫的特异性引物, 实现了单条活的或FG(为4% 甲醛) 固定的松材线虫和拟松材线虫的快速检测。

4 结语

为了有效防止松材线虫病的扩散蔓延, 松材线虫的快速检测技术已成为控制病害扩散的重要手段之一。通过从形态学检测、化学生化检测、分子生物学检测3 个角度, 较为系统全面地对现行的松材线虫快速检测技术进行综述, 有利于不同机构根据实际情况选取合适的快速检测方法, 从而有效地防治由松材线虫引起的各种自然危害。

参考文献

- [1] YANG B J, TANG J, WANG Y Y, et al. *Bursaphelenchus xylophilus* [M]. Beijing: Chinese Forest Press, 2003.
- [2] WUR, PANG H, HUGL. Occurrence, harm and control measure of *Bursaphelenchus xylophilus* [M] // XU R M. *Bionvasion theory and practice*. Beijing: Chinese Science Press, 2003.
- [3] 蔡卫兵, 徐六一, 席启俊, 等. 马尾松松材线虫抗性育种技术的开发——一次接种测定结果及其成果的早期利用[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(2): 248-249.
- [4] 杨宝君. 松树上线虫的鉴定[J]. 林业科学, 1985, 21(3): 305-309.
- [5] MAMIYA Y, KYOHARA T. Description of *Bursaphelenchus lignicidus* from pine wood and histopathology of nematode-infected trees[J]. *Nematologica*, 1972, 18: 120-124.
- [6] NICKLE W R, GDDEN A M, MAMIYA Y, et al. On the taxonomy and morphology of pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. *J Nematol*, 1981, 13: 385-392.
- [7] 来燕学. 用松枝解剖法快速检测松材线虫病原[J]. 浙江林学院学报, 2005, 22(2): 188-192.
- [8] 蒋丽雅, 周健生. 引诱松褐天牛检测松材线虫病的方法[J]. 森林病虫通讯, 1997(3): 41-43.
- [9] 潘沧桑. 松材线虫的快速分离装置及其检测方法: 中国, CN03103072.6 [P]. 2003-01-21.
- [10] 王玉燕, 宋玉双, 臧秀强, 等. 两种指示剂对松材线虫病病木的测试[J]. 植物病理学报, 1996, 26(4): 371-376.
- [11] 尤纪雪, 王玉燕, 宋祯, 等. 区分松材线虫病材与健康材的研究[J]. 林业科学, 1994, 30(2): 89-94.
- [12] 李海燕, 王玉燕, 舒朝然, 等. 含水率对几种松材线虫病木和健康木pH 值的影响[J]. 林业科学研究, 2000, 13(D): 58-62.
- [13] 王玉燕, 舒朝然, 李海燕, 等. 松材线虫病木快速检测技术的研究[J]. 林业科学, 2000, 36(5): 59-62.
- [14] 李海燕, 王玉燕, 舒朝然, 等. 几种松树松材线虫病木和健康木pH 值差异的研究[J]. 植物病理学报, 2001, 31(4): 342-348.
- [15] 蒋丽雅, 王晓芸. 松材线虫提取液和分泌液中纤维素酶定性检测[J]. 森林病虫通讯, 1995(3): 9-11.
- [16] 张奇, 马洪周, 杨文博, 等. 松材线虫纤维素酶的分离纯化及免疫学检测方法的研究[J]. 南开大学学报: 自然科学版, 2006, 39(1): 95-99.
- [17] 王明旭, 张志飞, 罗宽, 等. 松材线虫快速检测技术方法的比较研究[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2004, 30(3): 239-242.
- [18] 白钢, 王玉燕, 马洪周, 等. 疫木中松材线虫的免疫学检测方法的研究[J]. 林业科学, 2005, 41(2): 91-95.
- [19] 白钢, 李海燕, 马洪周, 等. 疫木切面上松材线虫抗原的免疫学检测方法[J]. 林业科学, 2005, 41(6): 101-104.
- [20] 曹宇, 李海燕, 马洪周, 等. 免疫磁性捕获ELISA 技术在松材线虫检测中的应用[J]. 林业科学研究, 2005, 18(5): 585-589.
- [21] 王明旭. 松材线虫分子生物学检测技术研究进展[J]. 湖南林业科技, 2004, 31(2): 1-3.
- [22] TARES S, ABADP, BRUGUER N, et al. Identification and evidence for relationship among geographical isdates of *Bursaphelenchus* spp. (pine wood nematode) using homologous DNA[J]. *Heredity*, 1992, 68(2): 157-164.
- [23] HARMEY J H, HARMEY M A. DNA profiling of *Bursaphelenchus* species [J]. *Gene*, 1994, 145(2): 227-230.
- [24] 陈凤毛, 叶建仁, 吴小芹. 应用特异引物组合检测松材线虫[J]. 林业科技开发, 2006, 20(3): 14-16.
- [25] 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.
- [26] 葛建军, 曹爱新, 刘先宝, 等. 应用TaqMan-MGB 探针进行松材线虫的实时荧光定量检测技术研究[J]. 植物病理学报, 2005, 35(6): 52-58.
- [27] BRAASCH H, BURGER W, PASIRIK K H. Differentiation of three *Bursaphelenchus* species by means of RAPD-PCR[J]. *Nachrichtenblatt Des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*, 1995, 47(12): 310-314.
- [28] 陈凤毛, 叶建仁, 汤坚, 等. 松材线虫与拟松材线虫RAPD 检测技术[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2005, 29(4): 25-28.
- [29] IVAHOR 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.
- [30] 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.
- [31] 王娜, 马雅军, 王吉之, 等. PCR 相关技术方法在植物病害检测中的应用[J]. 上海农业学报, 2004, 20(4): 112-115.
- [32] 张卫东, 廖力, 谭群英, 等. 利用荧光PCR 快速检测松材线虫[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2005, 18(4): 32-35.
- [33] SUBBOJINS A, PENG D, MOENS M. A rapid method for the identification of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* using duplex PCR[J]. *Nematology*, 2001, 3(4): 365-371.
- [34] 赵立荣, 钟国强, 廖金铃. Duplex PCR 快速检测松材线虫[J]. 植物检疫, 2004, 18(6): 324-326.
- [35] 贺水山, 闻伟刚, 杨兰英, 等. 松材线虫PCR 快速检测方法研究[J]. 植物免疫, 2002, 16(6): 321-324.
- [36] 李一农, 余道坚, 李芳荣, 等. 松材线虫rDNA-ITS1 区分子检测与鉴定[J]. 植物保护, 2004, 30(3): 61-63.
- [37] 赵立荣, 廖金铃, 钟国强. 松材线虫和拟松材线虫的PCR 快速检测[J]. 华南农业大学学报, 2005, 26(2): 59-61.