实验室条件下中国和北美松材线虫 (*Bursaphelenchus xylophilus*)(Tylenchida: Aphelenchoididae)分离株之间的发育差异

张帅^{1†}, 宁静^{1,3†}, 张伟¹, Christian Salcedo¹, 赵莉茜^{1*}

1. 中国科学院动物研究所, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100101;

2. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193;

3. 河北大学生命科学学院, 保定 071002

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: zhaoli@ioz.ac.cn

收稿日期: 2017-08-08; 接受日期: 2017-08-18; 网络版发表日期: 2017-09-04

林业公益性行业科研专项(批准号: 201204501)、国家重点基础研究发展计划(批准号: 2009CB119200, 2012CB114105)、国家自然科学基金(批准号: 31272323, 31221091)、中国科学院知识创新工程项目(批准号: KSCX2-EW-J-2)和欧盟科学委员会第7框架计划(批准号: REPHRAME)资助

松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner和Buhner, 1934)), 是松树萎蔫病的主要致病因子, 是一种起源于北美的入侵物种. 然而, 并未有在起源地大规模爆发的报道^[1]. 松材线虫于1900年左右传入日本, 1982年在我国首次发现, 近期扩散到葡萄牙和西班牙, 对亚洲和欧洲的松林造成了巨大的破坏. 浙江省舟山区是中国受灾最严重的地区之一(413 km²), 几乎所有易感松树均被松材线虫破坏^[2]. 松材线虫在北美本地的生存环境与入侵地与中国不同, 且松材线虫生活史较短, 从而更易产生发育特征方面的变化. 在面临不利条件时, 松材线虫可转型进入另一种生长阶段, 以适应环境变化. 在环境适宜的条件下, 松材线虫连续经过繁殖型1~4龄幼虫(命名为J_I~J_{IV})发育为成虫. 当种群密度过高、寄主松树衰弱或死亡时, 松材线虫就不会继续发育为成虫, 而是转型成为扩散型三龄幼虫(J_{III}). 松材线虫的扩散型幼虫阶段相当于某些自由生活线虫(如秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*))的dauer幼

虫等)在不利环境中存活时的滞育虫态. 秀丽隐杆线虫的dauer形成受DAF-9 (细胞色素P450)的调控, DAF-9可促进秀丽隐杆线虫的生长繁殖并抑制dauer形成^[3]. DAF-9特异性抑制剂dafadine, 可抑制DAF-9的表达, 从而导致秀丽隐杆线虫形成dauer^[4]. 此外, 在不同的培养条件下, 秀丽隐杆线虫对dauer诱导信息素的敏感度不同^[5]. 在松材线虫中, 也发现dafadine可促进J_{III}的形成(未发表数据).

线虫为应对自然环境的变化而对基本发育阶段调控的变化可影响其入侵的成功率. 例如, 若线虫可及时感知环境的有利变化, 则可在繁殖阶段快速繁育后代; 若可快速感知环境的不利变化, 则可迅速转型进入滞育虫态. 自松材线虫1980年引入中国以来, PWN在与原产地完全迥异的中国环境下繁殖了数千代. 在此, 本文比较研究了中国松材线虫与北美松材线虫扩散型三龄(J_{III})的种群增长、繁殖和形成之间的差异. 本文分析了中美松材线虫接种于培养基上的繁殖力

引用格式: 张帅, 宁静, 张伟, 等. 实验室条件下中国和北美松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*)(Tylenchida: Aphelenchoididae)分离株之间的发育差异. 中国科学: 生命科学, 2017, 47: 1007–1010, doi: 10.1360/N052017-00186

英文版见: Zhang S, Ning J, Zhang W, et al. Developmental differences between a Chinese and a North American isolate of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* (Tylenchida: Aphelenchoididae) under laboratory conditions. Sci China Life Sci, 2017, 60: 921–923, doi: 10.1007/s11427-017-9103-4

差异、接种于松苗的繁殖情况以及在dafadine诱导条件下转型为J_{III}的情况。

1 材料与方法

1.1 供试线虫

中国(CN)松材线虫和北美(US)松材线虫(分别为ZJZS-1和US7H),由成新跃教授提供(北京师范大学,北京)。ZJZS-1株来源于中国浙江舟山,US7H株来源于美国宾夕法尼亚州^[6]。线虫培养于接种了灰葡萄孢*Botrytis cinerea*的马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基上,25℃,无光照。这种条件经测试对于两株线虫均为最佳培养条件^[7,8]。

1.2 中美松材线虫繁殖力差异

将灰葡萄孢菌接种于35 mm PDA平板中,25℃无光照培养4天。取10头松材线虫(5头雄虫和5头未交配过的雌虫)接种到灰葡萄孢菌落上。使用解剖镜对线虫每天进行镜检,共7天。在第7天时用贝尔曼漏斗法分离线虫^[9]。在解剖镜下统计线虫雌雄性比,中美松材线虫各进行10次重复。

1.3 中美松材线虫感染黑松幼苗*P. thunbergii*时的繁殖力差异

将同一时间播种的2~3年生黑松树苗(*P. thunbergii*)移栽到盆中,放置于25℃,40%相对湿度的温室中(光周期10L:14D)。中美松材线虫均接种10棵幼苗。根据Bolla等人^[10]的研究,本实验在每棵幼苗上接种约2000头混合虫态线虫(1986年)。对照组用无菌蒸馏水接种10棵幼苗。每周浇2次水。接种20天后,当PWD症状明显时(嫩枝末端萎蔫、针叶卷曲发脆、树干相对干燥),去除松针,劈开树干,使用贝尔曼漏斗法收集线虫,并记录每棵幼苗所携带线虫数。

1.4 自然条件下中美松材线虫扩散型J_{III}幼虫的形成差异

将混合虫态的中美松材线虫各约200头接种入长满灰葡萄孢菌丝的10 cm平板,25℃、无光照、10天。用蒸馏水将线虫冲出,所得的线虫悬浮液室温825×g离心3 min。去掉上清收集线虫,其中体内脂肪粒较

多、尾部较圆的是J_{III}^[11],统计每个样品中J_{III}的数量、线虫总数并计算出J_{III}的百分比。中美松材线虫各10个重复。

1.5 Dafadine诱导扩散型J_{III}幼虫的形成

DAF-9抑制剂dafadine 4-(1-((5-((2,6二甲苯氧基)甲基)-3-异恶唑基)羰基)-4-哌啶基)吡啶购买自Chem-Bridge公司(美国)。生测实验在改良的PDA培养基上进行,目的是减少营养使菌丝生长稀疏,便于将线虫从培养皿中冲出或在显微镜下观察。改良培养基制备方法:用2%水琼脂溶液将PDA培养基稀释10倍,高压灭菌处理。将改良的PDA培养基倒入35 mm培养皿中,待其凝固,再接种灰葡萄孢菌,培养3天。将dafadine溶于DMSO至终浓度25 μmol/L,长好菌丝的每个培养皿加50 μL dafadine溶液^[4]。将约100头同步化培养的繁殖型二龄幼虫(J₂)接种到琼脂平板上^[12]。培养两天后镜检计算J_{III}比例。对照组接种到无dafadine的平板上(仅DMSO)。中美松材线虫各10个重复。

1.6 数据分析

使用独立样本 t 检验进行统计显著性分析,所用分析软件为SPSS 19.0 (IBMS Statistics, 美国)。

2 结果与分析

2.1 中美松材线虫繁殖力差异

在培养基培养时,中国松材线虫繁殖数量显著高于美国松材线虫,表明中国松材线虫可能繁殖力更强或生命周期更短(网络版附图1)。在培养第7天,中国松材线虫数约为美国松材线虫的6倍;雌雄性比也显著高于美国松材线虫($F=0.113$, $t=2.514$, $df=16$)(图1A)。

2.2 中美松材线虫感染黑松幼苗*P. thunbergii*时的繁殖力差异

接种20天后,感染松材线虫的幼苗均表现出典型的枯萎症状(网络版附图2),而对照组幼苗未出现任何症状。感染中国松材线虫和美国松材线虫的松树幼苗其松树萎蔫病症状并无明显差异。然而,中国松材线虫的种群数目显著大于美国松材线虫($F=0.866$, $t=2.750$, $df=18$)(图1B)。中国松材线虫的线虫数目是接种量的5

图1 中国与美国松材线虫比较

A: PDA平板上的中(CN)美(US)松材线虫在培养第7天时的雌雄性比; B: 中美松材线虫感染松树幼苗(*P. thunbergii*)时的繁殖力差异; C: 自然条件下中美松材线虫 J_{111} 形成的变化; D: dafadine诱导条件下中美松材线虫形成 J_{111} 的变化。误差线为SEs, *和***分别代表 $P < 0.05$ 和 $P < 0.001$ 时的差异显著性

倍,美国松材线虫的线虫数目仅为接种量的1倍。

2.3 自然条件下中美松材线虫扩散型 J_{111} 幼虫的形成差异

尽管在正常培养条件下自然形成的 J_{111} 比例低于1%,在本实验中仍可看出,美国松材线虫比中国松材线虫繁殖出更多 J_{111} ($F=4.768$, $t=-12.826$, $df=8$) (图1C)。

2.4 Dafadine诱导扩散型 J_{111} 幼虫的形成

当用dafadine处理线虫时,繁殖型 J_2 线虫会转型为可贮存更多脂肪且体色更深的扩散型 J_{111} 幼虫。与自然条件培养出的 J_{111} 类似,美国松材线虫产生的 J_{111} 幼虫数显著高于中国松材线虫($F=0.372$, $t=-2.490$, $df=8$) (图1D)。然而,在对照组中并未分离出 J_{111} 幼虫(数据未显示)。

3 讨论

以前有研究表明,松材线虫的不同分离株在诸如

致病力等性状方面具有可变异性[13,14]。这些变化可能导致不同松材线虫入侵地会产生不同程度的损伤。

本研究发现中国和北美松材线虫有不同的发育特征。此结论不仅适用于中国北美各分离一株线虫时;在两地得到更多分离株后,也发现了类似的趋势(Zhang等人的个人讨论)。一般来说,美国松材线虫的繁殖速度比中国松材线虫慢。使用两种初始分离株进行后续研究,包括幼苗实验、自然条件 J_{111} 转型实验和dafadine诱导 J_{111} 形成实验。

中国松材线虫的雌雄比高于美国松材线虫,这是中国松材线虫可成功定殖的重要因素之一。当一个种群在适宜条件下生存时,雌性个体数越多,此群体生殖力越强、种群增长越快[15]。通过松苗接种实验进一步验证了中国松材线虫的这种繁殖力变异。与美国松材线虫相比,中国松材线虫接种到松苗上可产生更多的后代,表明中国松材线虫具有更高的繁殖潜力和定殖成功率,这种变异可能导致中国松材线虫感染正确的宿主后会更有效地引起松树萎蔫病。

在无dafadine诱导条件下的实验中发现美国松材线虫比中国松材线虫形成更多J_{III}幼虫。这些结果表明, 美国松材线虫天生对J_{III}诱导信息素或dafadine更敏感, 可能由于美国松材线虫的受体对这些分子更敏感, 或这些分子穿透美国松材线虫的能力更强等因素引起的。中国松材线虫具有更高的繁殖力从而可以形成更大的种群数目, 这可让处于高密度或低温等不利条件下的松材线虫转型为更多的J_{III}。从而使得中国松材线

虫更易被载体昆虫松墨天牛携带, 转型为J_{IV}后入侵到新宿主。松材线虫在自然条件下对环境敏感度差异的机制还有待于进一步研究。

本研究探讨了中美松材线虫分离株对环境的敏感性、生殖力和发育趋势的自然差异。这些特征是否能提高松材线虫入侵成功率还有待商榷; 只能通过研究几个入侵地的分离株, 并对影响入侵成功率的相关生态因素进行全面分析来回答这一问题。

致谢 感谢北京师范大学成新跃教授提供松材线虫分离株。

参考文献

- 1 Wingfield M J, Blanchette R A, Nicholls T H. Is the pine wood nematode an important pathogen in the United States? *J Forestry*, 1984, 82: 232–235
- 2 王国明, 赵颖, 陈斌, 等. 浙江舟山岛松材线虫入侵后松林群落的自然演替和特征. *林业科学*, 2011, 47: 124–132
- 3 Jia K, Albert P S, Riddle D L. DAF-9, a cytochrome P450 regulating *C. elegans* larval development and adult longevity. *Development*, 2002, 129: 221–231
- 4 Luciani G M, Magomedova L, Puckrin R, et al. Dafadine inhibits DAF-9 to promote dauer formation and longevity of *Caenorhabditis elegans*. *Nat Chem Biol*, 2011, 7: 891–893
- 5 McGrath P T, Xu Y, Ailion M, et al. Parallel evolution of domesticated *Caenorhabditis* species targets pheromone receptor genes. *Nature*, 2011, 477: 321–325
- 6 Cheng X Y, Cheng F X, Xu R M, et al. Genetic variation in the invasive process of *Bursaphelenchus xylophilus* (Aphelenchida: Aphelenchoididae) and its possible spread routes in China. *Heredity*, 2007, 100: 356–365
- 7 Kobayashi T, Sasaki K, Mamiya Y. Fungi associated with *Bursaphelenchus lignicolus*, the pine wood nematode, 1. *J Jap Forestry Society*, 1974, 56: 136–145
- 8 Mamiya Y. Pathology of the pine wilt disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus*. *Annu Rev Phytopathol*, 1983, 21: 201–220
- 9 Baermann G. Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden) Larven in Erdproben. *Geneeskundig Tijdschrift voor Nederlandsch-Indie Batavia*, 1917, 57: 131–137
- 10 Bolla R I, Winter R E K, Fitzsimmons K, et al. Pathotypes of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *J Nematol*, 1986, 18: 230–238
- 11 Aikawa T. Transmission biology of *Bursaphelenchus xylophilus* in relation to its insect vector. In: Zhao B G, ed. *Pine Wilt Disease*. Berlin: Springer, 2008. 123–138
- 12 Shinya R, Takeuchi Y, Futai K. A technique for separating the developmental stages of the propagative form of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Nematology*, 2009, 11: 305–307
- 13 Aikawa T, Togashi K, Kosaka H. Different developmental responses of virulent and avirulent isolates of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae), to the insect vector, *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Environ Entomol*, 2003, 32: 96–102
- 14 Mota M M, Takemoto S, Takeuchi Y, et al. Comparative studies between Portuguese and Japanese isolates of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *J Nematol*, 2006, 38: 429–433
- 15 Triantaphyllou A C. Environmental sex differentiation of nematodes in relation to pest management. *Annu Rev Phytopathol*, 1973, 11: 441–462