

DOI: 10.5846/stxb201306071396

张伟, 张帅, 孔祥波, 赵莉茵. 松材线虫近交系培育及繁殖力比较. 生态学报, 2014, 34(14): 3932-3936.

Zhang W, Zhang S, Kong X B, Zhao L L. Inbreeding and reproductive comparison of *Bursaphelenchus xylophilus*. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(14): 3932-3936.

松材线虫近交系培育及繁殖力比较

张 伟^{1, 2}, 张 帅², 孔祥波³, 赵莉茵^{2, *}

(1. 安徽大学生命科学学院, 合肥 230039;

2. 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;

3. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所国家林业局森林保护重点实验室, 北京 100091)

摘要: 近交系的培育是研究动物遗传学特性的基础。为了研究外来入侵种松材线虫的遗传学基础, 选择了中国浙江舟山松材线虫种群和美国宾夕法尼亚州松材线虫种群为研究对象, 培育了近交系, 并比较了近交系培育前后繁殖力的差异。结果表明: 美国宾夕法尼亚州松材线虫种群近交系培育得到 8 个株系, 中国浙江舟山松材线虫种群近交系培育得到 4 个株系, 连续近交对松材线虫的繁殖力未造成显著影响。其中, 在近交系培育前后, 中国浙江舟山松材线虫种群株系群体繁殖力均优于美国宾夕法尼亚州松材线虫种群。此近交系的培育为进一步研究松材线虫入侵的遗传机制奠定了基础。

关键词: 松材线虫; 近交; 繁殖力

Inbreeding and reproductive comparison of *Bursaphelenchus xylophilus*

ZHANG Wei^{1, 2}, ZHANG Shuai², KONG Xiangbo³, ZHAO Lilin^{2, *}

1 School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230039, China

2 State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 Key Laboratory of Forest Protection of State Forestry Administration, Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China

Abstract: The breeding of the inbred line is the basis of studying the characteristics of animal genetics. We studied the genetic basis of alien invasive species-*Bursaphelenchus xylophilus*, and established the inbred lines of two local populations of China (CN-ZJ) and the United States (US-7H), and compared the differences of fertility before and after the breeding of the inbred lines. Eight strains were established in the inbreeding of US-7H population and 4 strains were established in the inbreeding of CN-ZJ population. There was no effect of inbreeding on the fecundity of pine wood nematode. The population fecundity of CN-ZJ is better than that of the US-7H population. The breeding of the inbred lines paves the road for further research about genetic mechanism on the invasion of *Bursaphelenchus xylophilus*.

Key Words: *Bursaphelenchus xylophilus*; inbred line; reproduction

外来入侵种的影响十分巨大, 在入侵地已成为导致生物多样性丧失和物种濒危的重要因素, 但是在原产地往往危害不大^[1]。生境的变迁使入侵种呈

现出一定的适应性进化^[2], 例如形态^[3-4]、生活史、生态位^[5]、行为^[6-7]等发生改变。其中, 繁殖能力增强是比较普遍的入侵种表型^[8-9]。对入侵生物繁殖力

基金项目: 林业公益性行业科研专项 (201204501); 国家自然科学基金资助项目 (31221091, 31272323, 31370650); 中国科学院创新工程资助项目 (KSCX2-EW-J-2)

收稿日期: 2013-06-07; **修订日期:** 2014-05-13

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhaoll@ioz.ac.cn

改变的遗传学基础进行对生物入侵机制的阐明极为重要。近交系具有高度纯合的基因型和稳定的遗传性状,有益于实验结果的精确性和重复性^[10],因此,近交系的培育成为遗传学研究的基础^[11]。但是入侵地和原产地种群的近交系培育以及二者之间的比较极少报道。

松材线虫起源于北美,入侵中国后,已成为我国最危险的森林害虫之一,造成松树的大量死亡^[12],但是在原产地北美危害并不严重^[13],具有典型的入侵种表现特征。松树死亡率主要由松材线虫繁殖能力决定^[14],因此松材线虫近交系培育及繁殖能力比较成为阐明松材线虫遗传学基础的关键。谢丙炎等曾对比过中国和美国各种群的 microRNA、低温适应等特征^[15]。本实验选择这些研究中具有代表性的中国和美国两个松材线虫地方种群进行研究,包括对中国浙江舟山松材线虫种群和美国宾夕法尼亚州松材线虫种群进行近交系培育,并对其近交系培育前、后繁殖力的差异进行比较。

1 材料与方法

1.1 松材线虫

中国浙江舟山松材线虫种群(CN-ZJ)采自于中国浙江舟山(1992年于该地首次发现松材线虫);美国宾夕法尼亚州松材线虫种群(US-7H)由北京师范大学成新跃教授提供,采于美国宾夕法尼亚州,使用前均培养在灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)上。

1.2 灰葡萄孢的培养

配制 PDA 培养基,PDA(BD 公司提供)39g,蒸馏水 1000mL,然后在 121℃ 下,灭菌 30min,倒入 90mm 直径培养皿中;将灰葡萄孢接种于培养基上,25℃,培养 1 周,待用。

1.3 CN-ZJ 和 US7H 近交系的培育

将两个松材线虫种群的第 4 龄幼虫用 10μL 移液器分别随机吸取 50 对(1 雌 1 雄),编号为 CN(1—50),US(1—50),每对各自接种于 35mm 培养皿中直径为 5mm 的灰葡萄孢菌块上,25℃ 培养 5d 后,向培养皿中注入 5mL 无菌蒸馏水,将菌块翻过来,静置 2h 后,取出菌块,对培养皿内松材线虫进行数量统计,然后取该世代 4 龄松材线虫幼虫成对培养,编号(图 1)。如此往复循环 12 个周期后,将形成的各株系松材线虫接入大麦培养基灰葡萄孢菌进

行培养,-80℃ 冷冻保存待用。

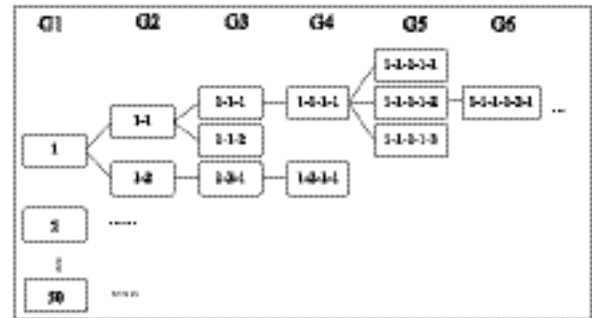


图 1 近交系培育过程示意图

Fig.1 Schematic diagram of inbred line's breeding process

G1—G6: 近交系第 1 代至第 6 代

1.4 CN-ZJ 和 US7H 近交系和野生型繁殖力的测定

向培养好的灰葡萄孢中分别接入 CN-ZJ 和 US-7H 自交系和野生型松材线虫 80 头,各 10 次重复,培养 10d,用贝尔曼漏斗法进行分离后,显微镜下进行观察和数量统计。

1.5 数据使用 SPSS18.0 进行统计分析,运用独立样本 t 检验对比处理间差异。

2 结果与分析

2.1 CN-ZJ 和 US7H 近交系培育结果

25℃ 培养松材线虫 5d 后,无菌水冲出,发现培养皿中的线虫有以下几种情况:1)没有活体线虫;2)只有活体雄虫;3)只有活体雌虫;4)除父母本外的幼虫子代。只可选取第 4 种情况可分辨性别的第 4 龄幼虫个体进行转接,经过 12 个世代的近交系转接,CN-ZJ 和 US7H 成功的有 4 株:

CN-ZJ G12

45-1-2-5-4-1-3-1-5-3-4-2(CN-ZJ G10-4-2)

45-1-2-5-4-1-3-1-5-3-4-4(CN-ZJ G10-4-4)

45-1-2-5-4-1-3-1-5-3-4-5(CN-ZJ G10-4-5)

45-1-2-5-4-1-3-1-5-3-4-7(CN-ZJ G10-4-7)

US7H 成功的有 8 株:

US7H G12

34-4-3-1-1-1-1-6-1-1-5-4(US7H G10-5-4)

34-4-3-1-1-1-1-6-1-1-5-5(US7H G10-5-5)

34-4-3-1-1-1-1-6-1-1-5-6(US7H G10-5-6)

34-4-3-1-1-1-1-6-1-1-5-7(US7H G10-5-7)

34-4-3-1-1-1-1-6-1-1-6-6(US7H G10-6-6)

34-4-3-1-1-1-1-6-1-1-6-8(US7H G10-6-8)

34-4-3-1-1-1-1-6-1-1-6-11(US7H G10-6-11)

34-4-3-1-1-1-1-6-1-1-9-3 (US7H G10-9-3)

最终 CN-ZJ 形成 4 个株系, US7H 形成 8 个株系。得到的 CN-ZJ 和 US7H 株系, 前 10 代编号相同, 可以初步推测 CN-ZJ 形成的这 4 株均来自于第 11 代亲本, 遗传学背景相同; US7H 形成的这 8 株均来自于第 10 代亲本, 遗传背景相同。可以看出, CN-ZJ 和 US7H 近交成功率均很低。

2.2 CN-ZJ 和 US7H 近交系培育过程中的变化与差异

2.2.1 CN-ZJ 和 US7H 近交系培育过程中亲本数量变化

由图 2 看出, US7H 亲本总数量 (4 龄幼虫数量), 由第 1 代到第 4 代先上升, 后下降, 第 4 到第 7 代之间趋于稳定, 第 9 代达到高峰; CN-ZJ 亲本总数量则是持续下降到第 5 代, 然后有所波动, 第 9 代到第 12 代呈连续下降趋势。CN-ZJ 和 US7H 在近交系培育的过程中, US7H 交配成功率要明显优于 CN-ZJ, 从第 2 代开始, 亲本数逐步高于 US7H, 虽然在第 6 代上, 数量上有所接近, 但是随后, US7H 亲本数又明显高于 CN-ZJ。

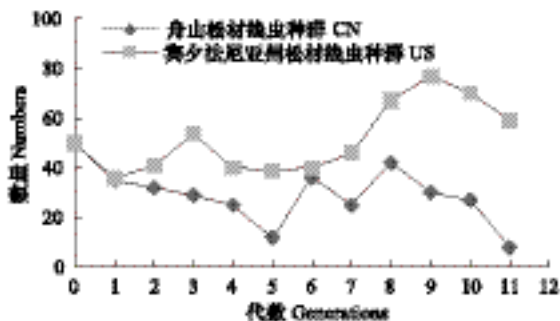


图 2 CN-ZJ 和 US7H 近交系过程每一世代亲本总数

Fig.2 The parents's total quantity of every generation during the CN-ZJ and US7H's inbreeding

2.2.2 CN-ZJ 和 US7H 单对亲本在近交系培育过程中平均子代数量变化

从图 3 中得知, CN-ZJ 和 US7H 在近交系培育过程中单对亲本培养 5 天后, 子代平均数量上下波动, 呈动态变化。US7H 子代数量从第 1 代到第 3 代有所下降, 但第 6 代上升达到峰值, 然后呈波动式下降; CN-ZJ 子代数量在前 5 代先下降, 在第 6 代达到最大数量, 第 11 代达到最小值, 第 12 代有所回升。CN-ZJ 和 US7H 近交系培育过程中第一代到第 12 代, 子代数量基本重叠在一起, 最大值也比较接近, 无显著差异。其中, 前 5 代是 CN-ZJ 和 US7H 共同的

繁殖急速下降期, 从第 6 代开始突破了近交繁殖死亡的影响, 开始有比较稳定的繁殖力, 偶尔出现繁殖力急速下降的时期, 比如 CN-ZJ 的第 11 代, US7H 的第 12 代。经过 SPSS 统计分析, CN-ZJ 和 US7H 在近交系培育的前、中、后期, 单对亲本的平均子代数量无显著性差异。

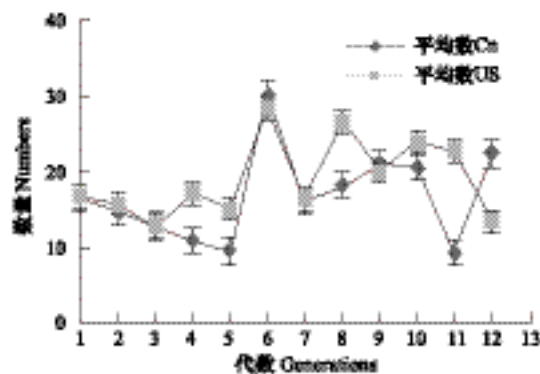


图 3 CN-ZJ 和 US7H 近交系培育过程中每一世代繁殖数量

Fig.3 Productive number of every generation during the CN-ZJ and US7H's inbreeding

2.3 CN-ZJ 和 US7H 近交系与野生型的繁殖数量变化

通过对 CN-ZJ 和 US7H 近交系与野生型各 80 头进行培养, 发现近交系与野生型之间没有显著性差异, 但是 CN-ZJ 繁殖力显著高于 US7H。

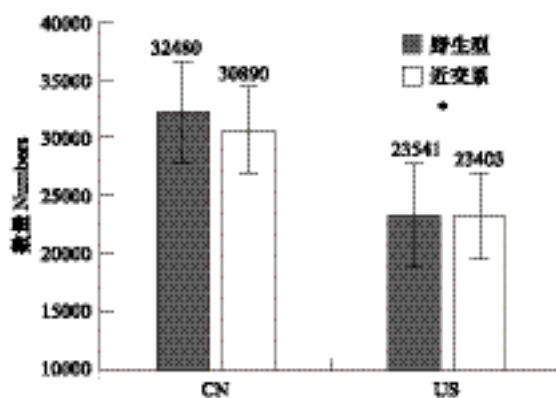


图 4 CN-ZJ 和 US7H 繁殖力比较

Fig.4 Comparison of fecundity between the CN-ZJ and US7H

3 讨论

研究表明, 多数物种近交系的培育会造成等位基因丢失、杂合度逐渐降低、适合度下降以及近交衰退的现象^[16]。但是越来越多的研究表明近交系的培育并不一定能造成近交衰退现象。首先, 本研究表明, 在松材线虫近交系培育前后, 单对亲本 5d 后

代数量以及接种 80 头群体培养 10d 后的种群数量均未表现出显著差异。另外,朱丽华等研究表明,松材线虫近交系培育过程中,致病力未产生显著变化^[17]。因此,推测松材线虫无近交衰退现象。此外,秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)是雌雄同体,其近交系培育相对容易,寿命^[18-19]、卵大小^[20]、及其它生活史指标也没有表现出近交衰退现象,反而会表现出远交衰退,其近交系表现出比远交系较高的后代数目和适合度;无独有偶,雌雄异体的粉蠹虫(*Lyctus brunneus*)近交系后代数量和适合度也没有下降,而远交系却表现出孵化率下降的特点^[21]。

入侵地和原产地繁殖能力常常会有所提高^[8-9]。Shoubridge E A 等研究表明,美洲西鲱(*Alosa sapidissima*)作为北美入侵物种,在原产地,雌性个体一个生命周内繁殖数量约为 30000 左右,但是到入侵地后,其繁殖数量则变为 321000—50000^[9],CN-ZJ 和 US7H 之间,虽然单对亲本后代数量(培养 5d)在近交系培育前后并没有显著性差异,但是,群体培养(接种量为 80 头/皿,培养 10d)繁殖数量上却有显著差异,CN-ZJ 繁殖力更高。此现象的产生,可能与 US7H 含有更多的 4 龄幼虫,而 CN-ZJ 含有更多的低龄幼虫有关(图 2)。CN-ZJ 年龄结构更趋向于正三角形,更为年轻化,后继发展较好。这种在入侵地繁殖力的提高是否具有普遍性,是否与交配策略发生改变,产生适应性进化等有关需要进一步深入研究。目前正在采集原产地北美,和入侵地日本、中国、欧盟各国等地多个种群,准备进行遗传学分析和比较,阐明松材线虫入侵过程中繁殖力提高的遗传学基础。

US7H 和 CN-ZJ 近交系培育成功率较低,其中,US7H 形成了 8 个株系,CN-ZJ 形成了 4 个株系。CN-ZJ 和 US7H 在近交系培育过程的前期繁殖力出现急速下降的情况,可能是因为近交系培育初期致死基因影响很大,而培育后期松材线虫突破了近交的遗传瓶颈。从第 6 代后,US7H 每代亲本数量高于 CN-ZJ,尤其第 12 代接种数量达到 60,而 CN-ZJ 不足 10,由此推测 US7H 近交系培育过程中具有更强的突破致死基因影响的能力。由此推测,当少量松材线虫入侵到一片松林时,由于其快速繁殖和生长的特点(5—6d 1 代),虽然小种群侵染寄主松树具有近交遗传瓶颈,但是,入侵当年 2 到 3 个月的繁殖时间

(10—15 代)足以使其突破致死基因影响,突破小种群瓶颈效应,最终获得较大的种群数量,加大了其继续传播到更多健康松树的机率,促进了自身的入侵成功。另外,成飞雪等发现中国和美国松材线虫间存在着一些遗传多样性差异^[22],不同种群突破近交遗传瓶颈出现难易差异现象,是否与其遗传多样性差异有关,有待进一步分析。

References:

- [1] Kikuchi T, Cotton J A, Dalzell J J, Hasegawa K, Kanzaki N, McVeigh P, Takanashi T, Tsai I J, Assefa S A, Cock P J A, Otto T D, Hunt M, Reid A J, Sanchez-Flores A, Tsuchihara K, Yokoi T, Larsson M C, Miwa J, Maule A G, Sahashi N, Jones J T, Berriman M, Tyler B. Genomic insights into the origin of parasitism in the emerging plant pathogen *Bursaphelenchus xylophilus*. *PLoS Pathog*, 2011, 7(9): e1002219.
- [2] Johnson T E, Hutchinson E W. Absence of strong heterosis for life span and other life history traits in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 1993, 134(2): 465-474.
- [3] Johnson T E, Wood W B. Genetic analysis of life-span in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1982, 79(21): 6603-6607.
- [4] Chasnov J R, Chow K L. Why are there males in the hermaphroditic species *Caenorhabditis elegans*? *Genetics*, 2002, 160(3): 983-994.
- [5] Lach L, Britton D K, Rundell R J, Cowie R H. Food preference and reproductive plasticity in an invasive freshwater snail. *Biological Invasion*, 2000, 2(4): 279-288.
- [6] Holway D A, Suarez A V. Animal behavior: an essential component of invasion biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 1999, 14(8): 328-330.
- [7] Moczek A P, Nijhout H F. Rapid evolution of a polyphonic threshold. *Evolution & Development*, 2003, 5(3): 259-268.
- [8] Hänfling B, Kollmann J. An evolutionary perspective of biological invasions. *Trends in Ecology and Evolution*, 2002, 17(12): 545-546.
- [9] Shoubridge E A. Reproductive strategies in local populations of the American shad (*Alosa sapidissima*). Montreal: McGill University, 1977.
- [10] Bai C, Shapiro-Ilan D I, Gaugler R, Hopper K R. Stabilization of beneficial traits in *Heterorhabditis bacteriophora* through creation of inbred lines. *Biological Control*, 2005, 32(2): 220-227.
- [11] Bailey D W. How pure are inbred strains of mice? *Immunology Today*, 1982, 3(8): 210-214.
- [12] Cheng H R. The occurrence of pine wilt disease and research progress. *Plant Quarantine*, 1988, 2(1): 28-30.

- [13] Dwinell L D, Nickle W R. An overview of the pine wood nematode ban in North America. U S Forest Service General Technical Report SE, 1990, NO. 55: 1-13.
- [14] Mamiya Y, Shoji T. Pathogenicity of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, to Japanese larch, *Larix kaempferi*, seedlings. *Journal of Nematology*, 2009, 41(2): 157-162.
- [15] Huang Q X, Cheng X Y, Mao Z C, Wang Y S, Zhao L L, Yan X, Ferris V R, Xu R M, Xie B Y. MicroRNA discovery and analysis of pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* by deep sequencing. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13271.
- [16] Frankel O, Soule M. Conservation and Evolution. Cambridge: Cambridge University. Press, , 1981.
- [17] Zhu L H, Ying C X, Ye J R. Inbreeding of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Scientia Silvae Sinicae*, 2005, 47(12): 92-96.
- [18] Vermeij G J. An agenda for invasion biology. *Biological Conservation*, 1996, 78(1/2): 3-9.
- [19] Blossey B, Notzold R. Evolution of increased competitive ability in invasive nonindigenous plants: a hypothesis. *Journal of Ecology*, 1995, 83(5): 887-889.
- [20] Gray A A J, Crawley M J, Edwards P J. Colonization, Succession and Stability. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1987: 429-453.
- [21] Peer K, Taborsky M. Outbreeding depression, but no inbreeding depression in haplodiploid *Ambrosia* beetles with regular sibling mating. *Evolution*, 2005, 59(2): 317-323.
- [22] Cheng F X, Cheng X Y, Xie B Y, Li Y N, Xie P Z, Chen X S, Xu R M. Use of the amplified fragment length polymorphism technique for genetic diversity analysis of the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Acta Phytopathologica Sinica*, 2005, 35(5): 410-419.

参考文献:

- [12] 程瑚瑞. 松材线虫萎蔫病的发生和研究进展. *植物检疫*, 1988, 2(1): 28-30.
- [17] 朱丽华, 应晨希, 叶建仁. 松材线虫近交系的培育. *林业科学*, 2011, 47(12): 92-96.
- [22] 成飞雪, 成新跃, 谢丙炎, 李一农, 谢培振, 陈祥盛, 徐汝梅. 松材线虫种群遗传多样性 AFLP 标记的建立及其应用. *植物病理学报*, 2005, 35(5): 410-419.