

松材线虫和拟松材线虫的杂交遗传差异研究*

刘伟 杨宝君

摘要 运用杂交方法对来自南京、四川、日本、法国和加拿大等地的松材线虫和拟松材线虫共10个株系作遗传分析,结果表明中国的松材线虫和拟松材线虫能杂交成功,但后代数量少且大多不孕,两者间遗传差异较大,这两种线虫各株系间无明显差异。当中国线虫分别与日本、法国、加拿大株系杂交时,无论种间或种内均有差异,前者差异更显著。种间杂交中多数后代雌虫较难与父本回交产生子代幼虫。种间杂交在产生正常后代的同时也产生10%~60%的畸形后代。雄虫畸形主要表现在无交合刺或交合刺不发育,雌虫和幼虫的畸形则是身体的缢缩、弯折等。

关键词 松材线虫、拟松材线虫、遗传杂交

松材线虫病是松树的一种毁灭性病害。松材线虫[*Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Burher) Nickle]与致病性较弱的尖尾伞滑刃线虫(拟松材线虫)(*B. mucronatus* Mamiya & Enda)在形态上的主要区别是后者雌成虫有一个3.5 μm以上的尾尖突^[1]。由于两者形态极其相似,因此遗传杂交方法有利于准确区分这两种线虫。国外在这方面也有过一些研究^[3~5],但未见有关用中国这两种线虫作杂交的报道。而中国的松材线虫是否会同分布较广的拟松材线虫杂交来扩大疫区,这在国内曾一度引起争议。本文主要以南京松材线虫和四川拟松材线虫作杂交试验,同时与地理源相距较远的日本、加拿大、法国等地的松材线虫或拟松材线虫进行杂交以作比较,来研究它们之间的交配潜力,试图找出中国松材线虫和拟松材线虫之间以及与国外这两种线虫之间的遗传差异,以明确在中国,松材线虫是否会通过杂交来导致疫区的扩大。

1 材料和方法

1.1 线虫来源及未交配雌虫的培养

松材线虫(简作Bx)和拟松材线虫(简作Bm)各5个株系,株系号及来源如下:①Bx1,南京,寄主为黑松(*Pinus thunbergii* Parl.);②Bx2,山东,寄主为黑松;③Bx3,日本茨城,寄主为赤松(*P. densiflora* Sieb. & Zucc.);④Bx4,加拿大针叶树木削片;⑤Bx5,日本岛根,寄主为黑松;⑥Bm1,四川,寄主为马尾松(*P. massoniana* Lamb.);⑦Bm2,江西,寄主为马尾松;⑧Bm3,无锡,寄主为黑松;⑨Bm4,法国,寄主为海岸松(*P. pinaster* Ait.);⑩Bm5,日本东京,寄主为黑松。这些线虫分别用多毛孢(*Pestalotia* sp.)在25℃下培养繁殖供作虫源。

未交配雌虫的培养:用1/10 PDA培养基^[4]上的多毛孢分别培养各株系的大龄幼虫3~4 d后,留雌虫备用。所用线虫株系分别为Bx1、Bx3、Bx4、Bx5、Bm1、Bm4和Bm5。

1993-07-16收稿。

刘伟研究实习员,杨宝君(中国林业科学研究院森林保护研究所 北京 100091)。

* 本文为1989~1992年国家科委重点科技项目“松材线虫病的研究”部分内容,亦为第一作者的硕士研究生论文。

1.2 种间杂交

杂交方法是用前面培养的未交配雌虫1条与异种雄虫3条交配,同时作反交组合(见表1)。在25℃下培养6d后镜检杂交情况。

为确定杂交后代是否具有生殖能力,各杂交组合所产生的F1代幼虫经单独培养后再与父本作回交试验(方法同上)。培养6d后镜检回交情况。

1.3 种内交配

为了解Bx1与Bx2、Bx4、Bx5之间以及Bm1与Bm2、Bm3、Bm4、Bm5间是否存在地理源差异,也作了交配试验。采用的方法是用一个株系的大龄幼虫(用L表示)1条与另一株系的活跃雄虫3条交配,交配组合见表1。在25℃下培养13d后镜检交配情况。

整个杂交试验结果的数据差异显著性分析除特殊注明外均取α=0.05水平。

2 结果与分析

2.1 种间杂交

种间杂交结果见表2。中国的松材线虫和拟松材线虫(Bx1与Bm1)能杂交成功(参见图版1-1~2),正交率与反交率¹⁾无显著差异,但均明显低于对照组杂交率(α<0.01)。正交的子代中雌雄比例正常,但反交中子代雌虫高出雄虫7倍多。回交结果显示,正交产生的杂种雌虫有

表2 松树线虫(Bx)与拟松材线虫(Bm)的种间杂交结果 (在25℃下培养6d)

杂交组合	重复	产生后代皿数	杂交率(%)	平均后代数(条/皿)				成虫畸形率 ^① (%)			成虫比例 ^② (%)		
				雌虫	雄虫	幼虫	总计	雌虫	雄虫	总计	雌虫	雄虫	总计
Bx1 Bm1	27	16	59.3	0.75+0.13 ^③	0.56+0.19	3.75+0.06	5.44	14.8	25.3	40.1	16.2	13.8	30.0
Bm1 Bx1	20	10	50.0	1.00+0.40	0.20+0	1.90+0.90	4.40	28.6	0	28.6	31.8	4.5	36.3
Bx1 Bm4	30	23	76.7	0.83+0.13	0.52+0.13	10.91+0.70	13.22	13.5	20.0	33.5	7.3	4.9	12.2
Bm4 Bx1	28	23	82.1	4.52+0.78	0.17+0.13	12.91+1.96	20.47	14.7	43.3	58.0	25.9	1.5	27.4
Bx1 Bm5	20	17	85.0	0	0.18+0.12	15.35+0.12	15.77	—	40.0	40.0	0	1.9	1.9
Bm5 Bx1	14	10	71.4	1.10+0.30	0.20+0	5.80+0.50	7.90	21.4	0	21.4	17.7	2.5	20.2
Bm1 Bx3	18	0	0	0	0	0	0	—	—	—	—	—	—
Bx3 Bm1	18	2	11.1	0.50+0	0.50+0	2.00+0	3.00	0	0	0	16.7	16.7	33.4
Bm1 Bx4	20	15	75.0	4.60+0.67	0+0	9.00+4.07	18.34	12.7	—	12.7	28.7	0	28.7
Bx4 Bm1	36	6	16.7	0.83+0	0+0	1.00+0	1.83	0	—	0	45.4	0	45.4
Bm1 Bx5	20	15	75.0	0.60+0	0	1.47+1.67	3.74	0	—	0	16.1	0	16.1
Bx5 Bm1	26	8	30.8	1.13+0	0.50+0.25	1.25+0	3.13	0	50.0	50.0	36.1	24.0	60.1
Bx1 Bx1 ^④	28	27	96.4	5.00+0	4.44+0	17.11+0	26.55	0	0	0	18.8	16.7	35.5

①=畸形雌虫(雄虫)数/后代雌虫(雄虫)数×100%;②=后代雌虫(雄虫)数/后代总数×100%;③表示0.75条正常后代,0.13条畸形后代,其它同;④对照组。

1)杂交组合的第一组为正交,第二组为反交,以下同。

表1 Bx和Bm各株系种间、种内交配组合^①

亲本♀ 或L ^②	亲 本 ♂										
	Bx1	Bx2	Bx3	Bx4	Bx5	Bm1	Bm2	Bm3	Bm4	Bm5	
Bx1	⊙	⊙		⊙	⊙	×				×	×
Bx2	⊙										
Bx3						×					
Bx4	⊙					×					
Bx5	⊙					×					
Bm1	×		×	×	×	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	
Bm2						⊙					
Bm3						⊙					
Bm4	×					⊙					
Bm5	×					⊙					

①“×”示种间杂交组合,“⊙”示种内交配组合;

②L表示种内交配时一方亲本为大龄幼虫。

25.0%可孕,反交杂种均不孕。正交产生的子代继续培养 10 d 后却查不到线虫,说明杂交子代间不能自由繁殖。本杂交试验所用的亲本 Bx1 雌虫为圆尾形,Bm1 雌虫则有较长尾尖突,结果显示无论正交或反交,其杂种后代雌虫均有尾尖突。分别测量了杂种及亲本 Bm1 雌成虫尾尖突各 40 条,其长度分散情况见图 1。正交、反交后代雌成虫平均长分别为 3.43 μm 和 3.55 μm ,两者无明显差异,但它们都显著($\alpha < 0.01$)短于 Bm1 雌虫(4.61 μm)。从图 1 来看,Bm1 雌虫分散度较小(3.41~6.34),而两杂种雌虫的分散度较大(0.98~6.34),且分布不连续,说明杂交后代雌成虫尾尖突长度分布零散,不稳定。

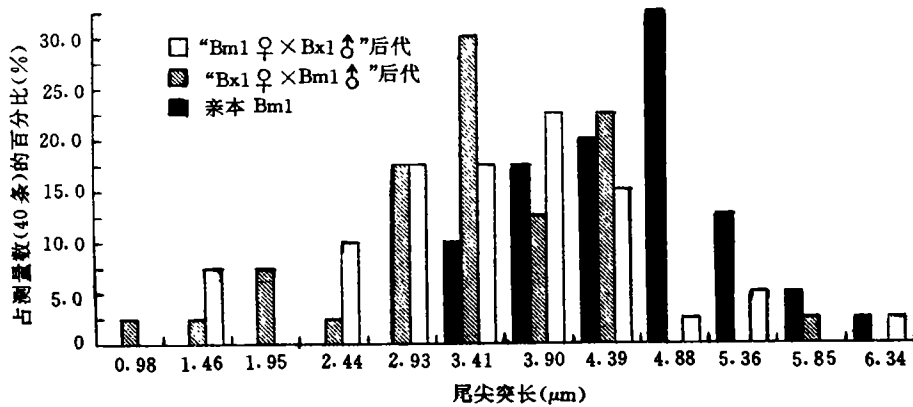


图 1 亲本 Bm1 雌虫及“Bx1×Bm1”正、反交后代雌虫尾尖突长度分散情况

Bx1 和 Bm4 的正交率与反交率无显著差异,但均高于 Bx1 和 Bm1 的杂交组合。其反交的后代平均数在所有杂交组合中达最高,其后代成虫畸形率也达最高;从后代性比看,正交雌雄比例正常,而反交中雌虫高于雄虫 17 倍。回交结果显示,正交、反交产生的后代雌虫均有较大比例(分别为 75.0%、44.8%)能与亲本雄虫回交产生下一代幼虫,且下一代性比正常。把“F2”代雌虫再次与 Bm4 或 Bx1 的雄虫回交时仍能产生“F3”及“F4”代。但发现一对亲本杂交却不能连续繁殖下去,这可能与杂交后代雄虫的生殖力有关,或许是子代间存在“不亲和”的现象。另外在试验中观察到,有的后代畸形雌虫(如身体弯折)也能与亲本雄虫回交产生正常子代。可见,尽管杂种雌虫形态异常,但生殖力并未丧失。

Bx1 和 Bm5 的正交后代数明显高于反交,但正交中却未产生 1 条雌虫,雄虫也只占 1.9%,绝大多数为幼虫,可能在这一组合中存在某种内在因素使得其后代发育较慢。正、反交的后代回交率分别为 14.3%、4.3%,回交后代数分别为 6.0、1.0 条/皿。

Bm1 和 Bm3 难杂交成功,由于杂交率低、后代数少,所以无法测定后代雌虫的回交能力。

Bm1 和 Bx4 的正交与反交存在很大不同,但后代均不产生雄虫。正交的杂交率及后代数显著高于反交($\alpha < 0.01$),而且反交产生的后代幼虫全部死亡。把正交产生的后代幼虫 100 余条放在一起再培养,6 d 后只查到 44 条雌成虫。回交结果显示正交的后代雌虫有 5% 可与 Bm1 雄虫回交,而且产生了 2 条雄虫,但与 Bx4 雄虫回交则不成功。

Bm1 和 Bx5 杂交试验中,正交后代多为幼虫(成虫只占 16.1%),且死亡率很高(66.5%),但反交的后代成虫率却在所有组合中达最高。正、反交的后代雌虫均无回交能力。

在整个杂交试验过程中发现,多数组合的杂种后代均出现 10%~50% 的畸形个体,其形态异常主要有如下类型(参见图版 I-3~12):(1)雄虫无交合刺或交合刺不发育;(2)雄虫交合

伞较短或弯曲;(3)雄虫身体后部缢缩、肿大或弯折;(4)雌虫或幼虫身体后部缢缩并弯折;(5)幼虫身体后半部分渐粗,呈“棒状”。

2.2 种内交配

结果显示(表3),国内 Bx 的 2 个株系(Bx1 和 Bx2)、Bm 的 3 个株系(Bm1、Bm2 和 Bm3)种内能自由交配,后代形态正常并能继续繁殖;从交配率和后代数两项指标看均与对照组没什么差异。Bx1 和 Bx4 的正、反交后代数均显著低于对照组,尤其是反交平均只有 19 条后代。Bm1 和 Bm4 能交配成功,交配率不低于对照($\alpha=0.01$),但后代数却明显低于对照;与“Bx1×Bm4”杂交相比较,Bm4 似乎处于 Bx1 与 Bm1 之间,也有人^[2~3]认为 Bm4 应独立为一种。Bm1 和 Bm5 的交配结果与其它种内交配有所不同,正交率明显低于反交率,但正交后代数却显著高于反交($\alpha < 0.01$),且反交的后代幼虫死亡率较高(49.1%);无论正交或反交其后代幼虫经再培养后均能自由繁殖下去。

表3 Bx 和 Bm 种内交配结果

(在 25℃ 下培养 13 d)

线虫种	交配组合		重复皿数	产生后代皿数	交配率 (%)	平均后代数 (条/皿)	性比 (♀:♂)
	1L	3♂					
Bx	Bx1	Bx2	20	7	35.0	167	0.8:1
	Bx2	Bx1	23	8	34.8	228	1.7:1
	Bx1	Bx4	24	5	20.8	39	1.0:1
	Bx4	Bx1	24	2	8.3	19	0.4:1
	Bx1	Bx5	24	3	12.5	39	2.0:1
	Bx5	Bx1	24	8	33.3	106	1.7:1
	Bx1	Bx1 ^①	25	8	32.0	176	2.0:1
	Bm	Bm1	Bm2	30	11	36.7	192
Bm2		Bm1	28	11	39.3	181	1.3:1
Bm1		Bm3	20	7	35.0	121	1.5:1
Bm3		Bm1	20	8	40.0	198	0.8:1
Bm1		Bm4	25	9	36.0	98	0.7:1
Bm4		Bm1	25	10	40.0	79	1.3:1
Bm1		Bm5	24	2	8.3	52	0.5:1
Bm5		Bm1	24	8	33.3	12	0.5:1
Bm1		Bm1 ^②	20	8	33.3	167	2.1:1

①和②为对照组合。

3 结论与讨论

比较松材线虫和拟松材线虫的种间、种内交配结果,发现它们之间存在以下不同点:(1)种间杂交中绝大多数组合都产生或多或少的畸形后代,种内交配中则无异形个体;(2)种间杂交除“南京×法国”组合外,一般后代数较少,虽然“四川×加拿大”组合的正交后代高达 18.34 条,但反交后代只有 1.83 条,也说明这两个株系间存在明显内在差异;种内交配的后代数一般比较高,尤其是“南京×山东”、“四川×江西”、“四川×无锡”组合,它们已与对照无明显差异,说明中国这两种线虫种内各株系间不存在地理源差异,虽然“南京×加拿大”、“四川×日本”的后代数较少,但幼虫死亡率低,可看作是来源差异之故;(3)有些种间杂交组合的后代雌雄比例异常,如“四川♀×南京♂”、“日本♀×南京♂”组合雌虫高出雄虫 7 倍,“法国♀×南京♂”高出 17 倍,而有些组合则不产雄虫,如“四川♀×加拿大♂”;但在种内交配中雌雄比例一般正常;(4)除法国株系外,种间杂交后代雌虫较难与亲本雄虫回交,有的即使能回交但子代数少,子代间也不能连续繁殖,而种内交配的后代能连续繁殖。从上述分析看,松材线虫和拟松材线虫间确实存在较强生殖隔离,应看作是两种种,至于种内各株系间的差异则可看作是地理来源不同造成的。

松材线虫和拟松材线虫虽然在人工试验条件下能杂交成功,但由于种间杂交后代数量少且不能连续繁殖下去等因素的存在,所以认为在自然条件下中国的松材线虫不会通过与拟松

材线虫的杂交而导致疫区扩展。

参 考 文 献

- 1 程瑚瑞,林茂松,钱汝驹.拟松材线虫(*Bursaphelenchus mucronatus*)的形态诊断和致病性的研究。南京农业大学学报,1986,9(2):55~61.
- 2 Baujard P. Three new species of *Bursaphelenchus* (Nematoda: Tylenchida) and observations on the genus. *Revue De Nematologie*, 1980, 3(2): 167~177.
- 3 De Guiran G, Bruguier N. Hybridization and phylogeny of the pine wood nematode (*Bursaphelenchus* spp.). *Nematologica*, 1989, 35: 321~330.
- 4 Mamiya Y. Interspecific hybridization between *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* (Aphelenchida: Aphelenchoididae). *Appl. Ent. Zool.*, 1986, 21(1): 159~163.
- 5 Terashita T. Experimental crossing between *Bursaphelenchus lignicolus* and *B. mucronatus*. *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, 1981, 17: 103~116.

Hybridization between *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus*

Liu Wei Yang Baojun

Abstract The genetic analysis was conducted by crossing experiments to use 5 strains of *B. xylophilus* from China, Japan, Canada and 5 strains of *B. mucronatus* from China, Japan, France. The results indicated that the two species of China might cross successfully, but the number of hybrids were limited and hardly fertile, so the two species were different in genetics. There was no difference in the strains of conspecifics from China. When the two Chinese species were crossed with the strains of Japan, France, and Canada respectively, there was obvious difference in interspecific crossing and some difference in intraspecific crossing. The F1 generation females of interspecific hybridization had mucronate tails similar to *B. mucronatus* in reciprocal crossing. Back crossing of F1 hybrid females to their parent males were more difficult to produce progeny. The rate of deformations in hybrid adults ranged 10%~60%. Major deformations were no spicules in males and crooking of bodies in females and larvae.

Key words *Bursaphelenchus xylophilus*, *B. mucronatus*, crossing



1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100.