

松材线虫和拟松材线虫的 PCR 快速检测

赵立荣¹, 廖金铃², 钟国强¹

(1 广州出入境检验检疫局 植检实验室, 广东 广州 510623;

2 华南农业大学 植物线虫研究室, 广东 广州 510642)

摘要: 利用 PCR 技术对松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 与拟松材线虫 *B. mucronatus* 的 rDNA 的 ITS1 区和 5.8S 区核苷酸序列扩增. 根据松材线虫与拟松材线虫的 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(φ 为 4% 的甲醛)固定的松材线虫和拟松材线虫的快速检测.

关键词: 单条; 松材线虫; 拟松材线虫; PCR

中图分类号: S126

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2005)02-0059-03

A rapid method to detect *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* by PCR

ZHAO Li-rong¹, LIAO Jin-ling², ZHONG Guo-qiang¹

(1 Guangzhou Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China

2 Lab of Plant Nematology, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: A polymerase chain reaction(PCR) was used to amplify ribosomal DNA containing 5.8S gene and internal transcribed spacer region 1(ITS1). According to the difference between the sequences of internal transcribed spacer region 1(ITS1) of *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus*, the species of specific primers were designed respectively for the two species nematodes. A single nematode, living or preserved in formalin, could be detected rapidly, and *B. xylophilus* and *B. mucronatus* were distinguished as well. This method would be useful for rapid detection of nematodes.

Key words: single nematode; *Bursaphelenchus xylophilus*; *Bursaphelenchus mucronatus*; PCR

由松材线虫引起的松材线虫病是松树的重要病害之一, 属我国和其他国家的检疫对象, 给全球林业生产造成重大的损失^[1]. 与松材线虫同属的拟松材线虫也会经常从松木中分离到, 该虫致病力微弱, 但与松材线虫形态极其相似, 甚至形态重叠, 给分类鉴定和病害诊断带来诸多不便. 并且松材线虫多以幼虫形态存在于松木中, 幼虫不具备种的形态鉴定特征, 培养成成虫需要几天的时间. 所以, 为了提高检验检疫速度、更好地防治松材线虫病, 需要寻找更为有效的方法鉴定这 2 种线虫. 近几年, 国内外不少学者用生化或分子生物学方法鉴定松材线虫. 如杨宝君等^[2]进行了酯酶电泳图谱研究, 其结果易受龄期和外部环境的影响. 郑经武等^[2]采用 RAPD 技术分析松材线虫与近似种的关系, 但结果重复性较差;

Webster 等^[3]用 DNA 标记技术, 虽能有效鉴定松材线虫, 但费用较高, 具有放射性; Iwahori 等^[4]用 RFLP 技术区分松材线虫和拟松材线虫, 内切酶价格昂贵、耗时. Liao 等^[5]用 SSCP 技术检测可靠、灵敏度高, 但操作较复杂. 本研究通过设计松材线虫和拟松材线虫的特异性引物, 应用 PCR 方法, 实现了单条松材线虫和拟松材线虫的快速鉴定.

1 材料与方法

1.1 供试线虫

本实验测试了近年来广东口岸截获的以及广东省内采集的来源不同的 9 个松材线虫种群、8 个拟松材线虫种群、1 个滑刃线虫种群和 1 个真滑刃线虫种群(表 1).

收稿日期: 2004-06-17

作者简介: 赵立荣(1974-), 女, 农艺师, 硕士. 通讯作者: 廖金铃(1962-), 男, 教授;

E-mail: jlliao@scau.edu.cn

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局项目(2002IK059)

Copyright © 2006 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

表 1 供试线虫样本的种类及来源

Tab. 1 Isldates and origins of nematodes used in this study

编号	样本名称	供试线虫种类	来源地
code	isolate	species	origin
1	BxUs10	松材线虫	美国 Minnesota 州
2	BsUs12	松材线虫	美国 Harrisville 州
3	BxUs9	松材线虫	美国 Arizona 州
4	BxUs11	松材线虫	美国 Pennsylvania 州
5	BxKo	松材线虫	韩国
6	BxJa	松材线虫	日本
7	BxHk	松材线虫	香港
8	BxTw	松材线虫	中国台湾
9	BxCh	松材线虫	中国广东
10	BmUs	拟松材线虫	美国
11	BmIt	拟松材线虫	意大利
12	BmHo	拟松材线虫	荷兰
13	BmGe	拟松材线虫	德国
14	BmRu	拟松材线虫	俄罗斯
15	BmJa	拟松材线虫	日本
16	BxTw	拟松材线虫	台湾
17	BmCh	拟松材线虫	中国广东
18	<i>Aphelenchoides</i>	滑刃线虫	中国广东
19	<i>Aphelenchus</i>	真滑刃线虫	中国广东

1.2 线虫 DNA 的提取

1.2.1 单条活虫 DNA 的提取 在 200 μL Eppendorf 管中加入 8 μL 预冷的 WLB [含 2.5 mmol/L DTT, ϕ 为 1.125% Tween20, 0.25 g/L Gelatin, 2.5×PCRBuffer (125 mmol/L KCl, 25 mmol/L Tris-Cl (pH 8.3), 3.75 mmol/L MgCl₂)]。在平玻片上滴 20 μL ddH₂O, 挑入 1 条线虫, 用手术刀将线虫切成 2 至多段, 然后迅速吸取含尽量多的这些线虫片段的悬浮液 10 μL, 加入含有 8 μL WLB 液的 Eppendorf 管中, 再向管中加入 2 μL 预冷的 1 mg/mL 蛋白酶 K, 使总体积为 20 μL。迅速将管放入 -70℃ 冰箱至少 10 min, 而后将 Eppendorf 管置于 PCR 仪中 65℃ 恒温 60 min, 以降解 DNase, 接着 95℃ 恒温 10 min, 以变性蛋白酶 K, 此时即可取此 DNA 悬浮液 1~2 μL 直接做 PCR 或 -20℃ 保存^{3,4}。

1.2.2 活的线虫混合样 DNA 提取 方法基本同单条活虫, 只是挑入的是 2 条不同的线虫。

1.2.3 FG(ϕ 为 4% 甲醛) 固定的线虫 DNA 提取 先将线虫挑入清水中浸泡 2~3 h, 以下操作与活虫相同。

1.3 PCR 扩增

1.3.1 PCR 引物 该 PCR 反应体系运用了 3 种引物: 引物 1 (5'-GATGATGCGATGTGGTACT-3'), 引物 2 (5'-TGGCGTGGTTGAGTCGA-3') 和 引物 3 (5'-CAATTCACGTGCGTTCTTC-3')。其中引物 1 来自 Iwahori (1998), 引物 3 来自张立海(2000), 引物 2 利用 Primer Designer 软件 (Version 1.01, Copyright 1990, Scientific & Educational Software) 对 Genbank 的 U92464 (gi

4249371) 序列自行设计。

选择松材线虫的 rDNA 基因作为 PCR 鉴定的目标序列, 在 ITS1 区设计松材线虫的特异性引物 1 和拟松材线虫的特异性引物 2, 在 5.8S 区设计松材线虫和拟松材线虫的通用引物 3, 各引物的相对位置见图 1。引物 1 与引物 3 配对扩增松材线虫 ITS1 区, 引物 2 和引物 3 配对扩增拟松材线虫的 ITS1 区。

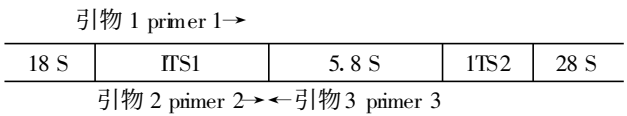


图 1 引物在 rDNA 区域的相对位置

Fig. 1 The relative position of primers located in rDNA

1.3.2 PCR 反应参数 PCR 反应体系包括: 10×PCR Buffer 2.5 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 2 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 2.5 μL, 引物 1、引物 2 各 1 μL, 引物 3 2 μL, 模板 DNA (10 ng/μL) 1 μL, ddH₂O 12.9 μL, TaqDNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.1 μL, 总体积 25 μL。

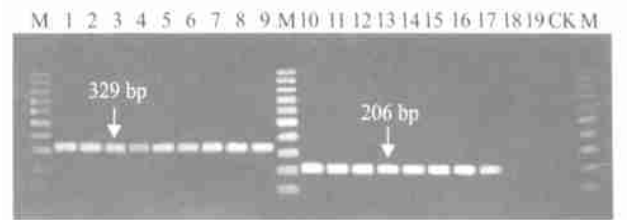
PCR 反应条件如下: 94℃ 预变性 1 min, 依 94℃ 变性 45 s, 49℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 进行 40 轮循环, 最后 72℃ 保温 10 min。

1.3.3 PCR 结果检测 PCR 反应结束后, 12000 r/min 离心 10 s, 然后取 10 μL 扩增产物进行 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶成像系统上观察并记录结果。

2 结果及分析

2.1 单条活虫的 PCR 扩增结果

图 2 的结果表明: 引物 1 与引物 3 配对, 松材线虫扩增的片段长度 329 bp; 引物 2 与引物 3 配对, 拟松材线虫扩增的片段长度 206 bp。引物 1 和引物 2 分别是松材线虫和拟松材线虫的特异性引物, 因此松材线虫和拟松材线虫能够扩增, 而滑刃线虫与真滑刃线虫不能扩增。



1: BxUs10, 2: BsUs12, 3: BxUs9, 4: BxUs11, 5: BxKo, 6: BxJa, 7: BxHk, 8: BxTw, 9: BxCh, 10: BmUs, 11: BmIt, 12: BmHo, 13: BmGe, 14: BmRu, 15: BmJa, 16: BxTw, 17: BmCh, 18: *Aphelenchoides*, 19: *Aphelenchus*, M: 100 bp mark, CK: 空白对照 control without template DNA

图 2 单条活松材线虫和拟松材线虫的 PCR 产物扩增电泳图
Fig. 2 PCR patterns of single living *Bursaphelenchus* nematode isolates

2.2 活的混合线虫样的 PCR 扩增结果

图 3 的结果表明: 不同来源松材线虫与拟松材

线虫的混合样分别扩增出自己的特异带 329 bp 和 206 bp, 松材线虫与滑刃线虫、松材线虫与真滑刃线虫的混合样只扩增松材线虫的特异带 329 bp, 拟松材线虫与滑刃线虫、拟松材线虫与真滑刃线虫的混合样只扩增拟松材线虫的特异带 206 bp, 小杆线虫样本不能扩增。

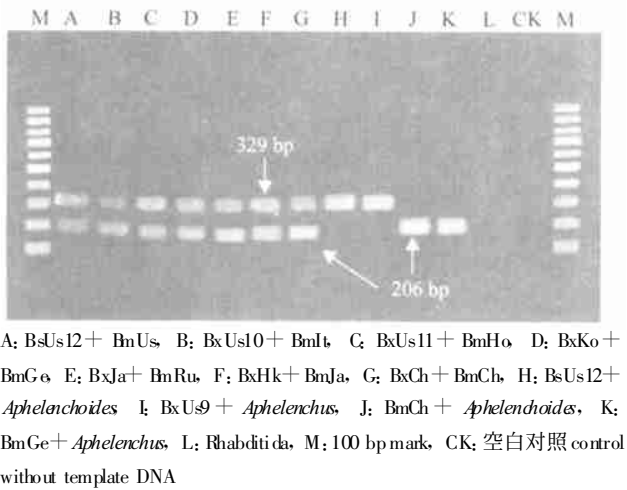


图 3 活松材线虫与拟松材线虫、滑刃线虫、真滑刃线虫混合样 PCR 产物电泳图

Fig. 3 PCR patterns of living *Bursaphelenchus*, *Aphelenchoides* and *Aphelenchus* nematode isolates

2.3 FG 固定单条线虫 PCR 扩增结果

图 4 的结果表明: 松材线虫扩增片段长度 329 bp, 拟松材线虫扩增片段长度 206 bp. FG 固定的线虫与活虫扩增结果相同, 只是扩增带的亮度稍弱。

2.4 在实践中的应用

在实际检验检疫工作中, 曾有 1 批来自德国木包装分离出的线虫, 其中的伞滑刃线虫大部分尾尖突长 5 μm, 极个别长 2 μm, 将尾尖突长 5 和 2 μm 各挑 1 条作 PCR 扩增、电泳, 结果都与拟松材线虫对照平齐。

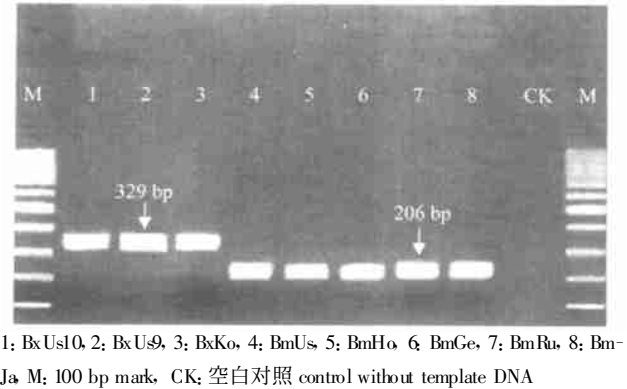


图 4 FG 固定的松材线虫与拟松材线虫 PCR 产物电泳图

Fig. 4 PCR patterns of fixed *Bursaphelenchus* nematode isolates

3 讨论与结论

该方法作为形态鉴定的辅助手段, 对于鉴定那些特征不够典型或者介于松材线虫和拟松材线虫之间的线虫, 以及幼虫, 是一个很好的帮助, 对于提高线虫鉴定的准确性、缩短鉴定的时间具有重要的作用。

本实验不仅能够检测活虫, 而且还能够检测 FG 固定的线虫. 因此, 可以节约因长期养虫而耗费的大量精力, 也可以对以前鉴定的结果进行复核. 到目前为止, 检测单条固定的松材线虫在国内还鲜见报道。

本研究选择松材线虫 rDNA 的部分核苷酸序列作为目标序列, 在 ITS1 区设计了松材线虫和拟松材线虫的特异性引物, 又在 5.8 s 区设计了松材线虫和拟松材线虫的通用引物. 松材线虫和拟松材线虫分别有自己的特异性带; 而滑刃线虫与真滑刃线虫没有带扩增. 该方法不仅检测单条线虫是否是松材线虫或拟松材线虫, 而且还能够检测混合线虫样本是否含有松材线虫或拟松材线虫. 通过对不同国家地区的松材线虫、拟松材线虫的检测研究, 以及在检验检疫工作中的应用, 结果表明该方法特异性和稳定性都非常好。

本实验巧妙运用通用引物和特异性引物, 3 种引物完成 2 种线虫的特异性扩增, 不用酶切, 节约了成本和时间. 原理和操作简单, 不需特殊仪器, 适合检验检疫部门运用和推广。

参考文献:

[1] 胡凯基, 杨宝君. 松材线虫和拟松材线虫不同株系酶电泳的研究[A]. 杨宝君, 朱克恭, 周元生, 等. 中国松材线虫病的流行与治理[C]. 北京: 中国林业出版社, 1995. 55—59.

[2] 郑经武, 徐建平, 吴玉良, 等. 松材线虫和拟松材线虫种间及种下群体的 RAPD 指纹分析[J]. 浙江农业大学学报, 1998, 24(6): 597—601.

[3] 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: 84—89.

[4] 张立海. 松材线虫 rDNA 的 PCR 研究[D]. 广州: 华南农业大学资源环境学院, 2000.

[5] JOHN M W, ROGER V A, DAVE L B. DNA probes for differentiating isolates of the pinewood nematode species complex[J]. Revue Nematol, 1990, 13(3): 255—263.

[6] IWAHORI H, TSUDA K, KANZAKI N, et al. PCR-RFLP and sequencing analysis of ribosomal DNA of *Bursaphelenchus* nematode related to pine wilt disease[J]. Fundamental and Applied Nematology, 1998, 21(6): 655—666.

[7] LIAO J L, ZHANG L H, FENG Z X. Reliable identification of *Bursaphelenchus xylophilus* by rDNA amplification[J]. Nematol Medit, 2001, 9: 131—135.

【责任编辑 周志红】