

DOI: 10.13376/j.cblls/20180601

文章编号: 1004-0374(2018)06-0659-08

松树抗松材线虫病机制研究进展

胡龙娇^{1,2}, 吴小芹^{1,2*}

(1 南京林业大学林学院南方现代林业协同创新中心, 南京 210037;

2 南京林业大学江苏省有害生物入侵预防与控制重点实验室, 南京 210037)

摘要: 松材线虫病 (pine wilt disease, PWD) 是一种重大的森林病害, 对我国乃至世界生态环境和森林资源造成了严重破坏和威胁。由于该病发生发展的复杂性, 病原的致病机理一直不清楚。面对松材线虫的侵染, 寄主松树势必要启动防御机制予以抵抗。现对寄主松树受松材线虫侵染后组织病理学、生理生化及分子病理学的变化进行综述, 并对今后从寄主角度研究松材线虫病提出思考和展望, 这将有助于进一步了解松树与松材线虫的互作过程, 并揭示寄主从防御到最后死亡的内在原因, 从而找到防治松材线虫病的有效策略。

关键词: 松材线虫病; 松树; 松材线虫; 防御响应机制

中图分类号: S763.16 文献标志码: A

Research progress on the mechanism of pine response to the infection of *Bursaphelenchus xylophilus*

HU Long-Jiao^{1,2}, WU Xiao-Qin^{1,2*}

(1 Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 2 Jiangsu Key Laboratory for Prevention and Management of Invasive Species, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: The pine wood nematode (PWN) *Bursaphelenchus xylophilus* is notorious for causing the pine wilt disease (PWD), which is one of the most serious coniferous forests diseases and has made a threat to ecological environment and forest resources worldwide. The mechanism of pathogenesis has remained unclear due to the complexity of the disease. To resist the infection of *B. xylophilus*, the host would launch a defense. In this paper, the changes of histopathology, physiology and biochemistry and molecular pathology in pine were summarized, when it was infected by *B. xylophilus*, and we put forward some thoughts and prospects about the PWD from the point of host, which will provide an insights to help us more deeply understand the interaction process and reveal the reason of defense and death in the host to search the control strategy.

Key words: pine wilt disease; pine; *Bursaphelenchus xylophilus*; defense response mechanism

松材线虫病 (pine wilt disease, PWD) 又称松树萎蔫病, 是由松材线虫 (*Bursaphelenchus xylophilus*) 引起的一种毁灭性的森林病害^[1]。该病可危害包括日本黑松 (*Pinus thunbergii*)、马尾松 (*Pinus massoniana*)、日本赤松 (*Pinus densiflora*)、黄山松 (*Pinus taiwanensis*)、云南松 (*Pinus yunnanensis*) 及湿地松 (*Pinus elliottii*) 等在内的 58 种松属植物, 也可危害 13 种非松属针叶树^[2]。1905 年首次在日本长崎县发现该病, 但当

时由于不知其病原而未引起足够重视, 直到 1969 年后才引起植病学者的深入研究^[3]。目前该病主要分布在日本、中国、韩国、美国、加拿大、墨西哥、

收稿日期: 2018-03-03; 修回日期: 2018-04-09

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFC1202100); 江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(16)1005); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

*通信作者: E-mail: xqw@njfu.edu.cn

葡萄牙和西班牙等国,其中日本、中国及韩国危害最为严重^[4]。1982年,该病在我国南京中山陵首次被发现,截至2018年2月,疫情已扩展到江苏、浙江、安徽、福建、江西、山东、湖北、湖南、广东、广西、重庆、四川、贵州、陕西和辽宁等16个省区。与2016年相比,疫区又新增77个县(国家林业局2018年第1号公告)。相关研究发现,该病的发生能显著改变我国三峡地区马尾松林的群落组成和土壤特性,严重影响了我国森林生态的平衡和林业产业的可持续发展^[5]。目前松材线虫病已造成巨大的经济损失和生态威胁,因此被列为国内头号森林植物检疫对象^[6]。在对该病研究的几十年中,国内外的研究主要偏向于对病原相关科学问题的探究,如病原种类、病原致病机理、病原线虫生态学特性、病原传播媒介、病害诊断及防治等,对寄主松树的抗病机制研究相对较少^[7-13]。

在自然界中,面对各种病原物的侵染,植物主要依靠自身固有的及诱导的两类防卫系统来抵抗病原物的入侵^[14]。研究发现,不同寄主松树乃至同一松树不同地理来源或同一松树不同树龄对松材线虫的抗性都存在较大差异,但松树具体明确的响应机制尚未研究清楚。同时,抗病育种是治理森林病害的有效途径之一,而植物的抗病机制研究可为抗病育种提供理论基础和指导。因此,在复杂的松材线虫病中,探究寄主松树抗线虫病的机制显得尤为重要,也成为目前松材线虫病研究的热点之一。各国学者围绕寄主松树从不同角度展开了深入研究,以期揭示其抗病机制。本文就该方面的研究现状进行总结概括。

1 寄主松树组织病理学变化与抗病性

寄主在受到病原物侵染时,其内部组织必定会因受到刺激而发生病理变化。组织病理的变化直接反映了病害的发生与发展进程;同时,也在一定程度上揭示了寄主为抵抗病原侵染所启动的自我保护措施。

1.1 寄主松树皮层树脂道对线虫迁移的影响

一些研究表明,松树皮层树脂道对阻碍线虫迁移具有重要作用。Kusumoto等^[15]研究发现,抗性黑松在接种10 d后,其皮层树脂道中形成胶质而发生堵塞,进而对松材线虫的垂直迁移起到了阻碍作用。该结论与国外一些认为皮层树脂道的干扰限制了线虫的迁移,并推测皮层树脂道干扰与抗性相关的观点一致^[16-19]。Zas等^[20]对海岸松(*Pinus pinaster*) 在松材线虫侵染后其解剖学和化学防御特性的种内

变异进行研究,结果显示,不同地理来源的马尾松皮层树脂道大小、木质部树脂道密度及化学防御物质(主要是多酚和不易挥发的树脂)的浓度均存在显著差异,并且松材线虫在皮层树脂道中迁移主要受树脂道大小影响,而在木质部树脂道中,树脂道密度为松材线虫迁移的决定因素。Kawaguchi等^[21]也得出了类似的结论,他们认为抗性黑松的皮层树脂道比易感病的黑松的直径小,因而限制了松材线虫在抗性黑松皮层树脂道内的迁移。还有研究表明,松树存活率与树体分枝数量及胸径呈正相关,与树高不相关,并推测松树分枝节点可能对线虫在树体中的迁移起到一定的限制作用^[22]。但Mori等^[23]和Nunes da Silva等^[24]的研究认为,松树抗性与抑制线虫繁殖有关,而不是限制其迁移。

1.2 寄主松树受松材线虫侵染后水分疏导与抗病性

松材线虫侵染松树时,树体内水分输导受到阻碍最终引起松树萎蔫死亡。Umabayashi等^[25]利用便携式磁共振成像技术对接种松材线虫的3年生日本黑松(*P. thunbergii*)木质部栓塞变化过程进行多点监测。观察发现,在病程发展过程中,水势发生明显下降之前,接种点周围的大量栓塞管胞沿着各个方向迅速扩展;当水势发生明显下降时,黑松接种点附近木质部功能紊乱率超过70%,最终木质部的几乎所有区域都发生栓塞。值得注意的是,这一现象仅仅在一个横截面上的水势发生堵塞之后就出现了,因此推测木质部导管簇的同时栓塞化导致了大规模栓塞的发生,并且认为受侵染的松树木质部功能的紊乱可能与树干中松材线虫的分布及数量紧密相关。2018年,Yazaki等^[26]用冷冻扫描显微镜观察到松树受干旱影响时,树体可以控制水流防止木质部的空洞;而受松材线虫侵染时,树脂道周围的管胞出现不可逆转的空洞化。因此认为,管胞空洞化导致了树体木质部管胞功能障碍,最终引起松树死亡。

1.3 不同抗性寄主松树感病后的组织病理学变化差异

不同抗性寄主松树感病后其组织病理学变化在出现时间和速度上存在明显差异。不同抗性松树在松材线虫侵染后表现出类似的早期组织病理学变化,但抗性松树出现的时间一般比感病松树要早^[14]。1993年,Yamada等^[27]用松材线虫分别接种抗病性不同的火炬松(*Pinus taeda*)、美国五针松(*Pinus strobus*)及日本黑松(*P. thunbergii*),接种2周后,抗性松树接种点附近的皮层、韧皮部组织和形成层

出现了明显坏死, 且被限制在有限的范围内, 而感病的日本黑松则至少在接种 3 周后才出现类似的组织病理反应, 并且这种细胞坏死有不断扩展的趋势。另外观察到火炬松与美国五针松的侵入点附近树脂道迅速发生堵塞, 其形成创伤周皮的速度也明显快于易感病的日本黑松。徐华潮等^[28]研究松材线虫自然侵染对马尾松 (*P. massoniana*) 和日本黑松 (*P. thunbergii*) 组织结构的影响。结果表明, 两种松树的组织在感病初期即表现出病变特征, 并随着病程的加剧, 马尾松的皮层薄壁细胞、周皮栓内层细胞、韧皮部薄壁细胞、形成层细胞依次发生木质化, 甚至在发病晚期, 木材以外所有部分完全木质化。黑松的病程变化与马尾松类似, 但症状表现稍晚于后者。

虽然抗性强的松树受侵染后组织病理学变化早于感病松树, 但随着病程发展, 感病松树在受侵染时组织反应和破坏扩展的速度要快于抗性松树。Kusumoto 等^[15]为研究 2 种抗病性不同的日本黑松的抗性机制, 比较了两者在受松材线虫侵染时的组织反应和破坏扩展情况。结果发现, 抗性黑松中皮层、形成层及木质部轴向树脂道的组织破坏扩展速度较易感病黑松迟钝, 并且其有效地抑制了松材线虫的繁殖, 因而推测松树体内组织破坏的推迟机制是松树抗性的关键。

1.4 寄主受不同毒力松材线虫侵染后组织病理学变化差异

松树在受到不同致病力的松材线虫侵染时其组织病理学变化也存在差异。金刚和叶仁建^[29]用不同致病力的线虫侵染 2 年生黑松苗, 接种强致病力的线虫后, 松树组织首先发生变化的是树脂道上皮细胞及邻近的薄壁细胞; 接种弱致病力线虫后, 松树组织皮层薄壁细胞首先出现异常症状; 接种无致病力的拟松材线虫后, 寄主组织只有外部零星的皮层薄壁细胞出现异常, 树脂道上皮细胞几乎无任何变化。另外, 厉艳和叶建仁^[30]发现, 在松材线虫侵染松树早期 (12 h), 寄主松树接种点附近皮层薄壁细胞开始发生程序性死亡。皮层薄壁细胞发生程序性死亡的数量和程度与侵染时间及线虫数量成正比, 与距接种点的距离成反比。

2 寄主松树抗松材线虫病的生理生化机制研究

植物在应对生物和非生物胁迫时, 体内会发生一系列的生理应答和生化响应, 以抵抗外界环境的

不利影响。

2.1 寄主松树信号分子参与早期防御反应

在众多寄主应对病原物的防卫反应中, 作为信号分子的活性氧 (包括 H_2O_2 、超氧自由基等) 会迅速产生并参与寄主植物对病原物的过敏性反应。何龙喜等^[31-32]的研究表明, 不同抗性松树体内 H_2O_2 、超氧自由基含量以及过氧化物酶 (peroxidase, POD)、抗坏血酸过氧化物酶 (ascorbate peroxidase, APX) 及超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性的变化差异均与其抗性密切相关; 刘劫等^[33]发现, 黑松中超氧自由基的突增时间早晚和强度与松材线虫和拟松材线虫的致病性呈一定的负相关性, 并且认为拟松材线虫对松树的无毒性与其更快速地激发了松树早期的防御反应有关。另外有研究表明, NO 也是植物应对病原物入侵的重要信号分子, 参与寄主抗病信号转导^[34-36]。钙离子 (Ca^{2+}) 也是植物中最普遍的信号分子之一, 并在植物防御反应信号转导中具有重要作用^[37]。在众多学者的研究中均发现在侵染早期, 松树体内细胞质 Ca^{2+} 流变化响应松材线虫侵染; 并且研究人员通过分析推测, 在马尾松苗与松材线虫互作早期存在 Ca^{2+} -CaM-CaMBP 信号转导途径, 进而对马尾松早期防御反应进行调控^[38-40]。

2.2 寄主松树激素在受松材线虫侵染时发挥信号转导作用

茉莉酸 (jasmonic acid, JA)、乙烯 (ethylene)、水杨酸 (salicylic acid, SA) 等植物激素不仅在调控植物生长发育过程中起作用, 还可在植物受到生物或非生物胁迫时发挥信号转导的作用^[41]。钱万强等^[42]研究松材线虫侵染对马尾松体内有机酸及酶的影响时发现, 水杨酸及苯甲酸在寄主马尾松发病过程中起到一定的作用。这一结论与谈家金等^[43]在黑松上的研究结果一致。但 Hirao 等^[44]在对黑松抗松材线虫机制的研究中发现, 茉莉酸、乙烯和水杨酸的一些响应基因在易感病黑松中的表达反而更高, 并认为通过这些植物激素调控的防卫反应对控制线虫侵染的效果不佳, 但具体这些激素和防卫反应的相互作用关系仍不明确。

2.3 寄主松树次生代谢产物是其防御反应的重要物质

针叶树的次生代谢物是其防卫反应的重要物质, 越来越多的次生代谢相关基因被发现并且在松材线虫侵染松树的过程中差异表达^[45-49]。国内外一些学者对松树感染松材线虫后产生的次生代谢物质

以及代谢过程中的关键酶进行了研究。滕涛等^[50]研究了湿地松、黑松在病原线虫侵染后体内苯丙氨酸解氨酶(phenylalanineammonialyase, PAL)活性及其代谢产物总酚及类黄酮与病害发展的关系。结果显示,在松树受到侵染后 PAL 活性及其相关酚类物质含量均有提高,且在湿地松上的变化速度及增幅均大于黑松,推测该现象可能与两者对松材线虫的抗性差异相关。另外,陈玉惠和黄忠宏^[14]发现,在松材线虫侵染马尾松早期,马尾松的 PAL 活性水平也明显高于未接种的马尾松。Zhang 等^[4]对不同抗性日本黑松家系在接种松材线虫后产生的代谢物进行了比较,发现抗性黑松体内的亚油酸是易感病黑松的 2 倍,而苯甲酸只在抗性黑松上检测到;但当线虫数量增加时,其可在易感病黑松上累积,因此认为亚油酸参与抑制松材线虫增殖的抗性反应,苯甲酸可作为良好的松材线虫生物标记。同时,首次比较了不同抗性黑松中杀线虫物质的含量。结果显示,在线虫增殖阶段,易感病黑松中含有更多的杀线虫物质——银松素和银松素甲醚。早前有研究者对松材线虫侵染后的不同抗性马尾松种源化学成分的研究表明,烯萜类化合物的组成及含量与其抗病性密切相关^[51-52]。Rodrigues 等^[53]的研究也发现,接种线虫后,地中海松(*Pinus halepensis*)和意大利伞松(*Pinus pinea*)中倍半萜和二萜含量显著增加。海岸松受松材线虫侵染时,(E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate (HMB-PP) 还原酶以及类硫解酶蛋白的编码基因被证明参与了松树萜烯次生代谢途径^[54]。

另外,谈家金等^[55]发现,松材线虫接种 3~4 年生黑松后,松苗的可溶性糖、可溶性蛋白、游离氨基酸及抗坏血酸含量在侵染阶段降低,且认为松苗茎部的可溶性蛋白质含量可用于病害的早期诊断。

3 寄主松树抗松材线虫病的分子机制研究

分子生物学、生物信息学等学科迅速发展,极大地推动了分子植物病理学的研究进程。从基因水平上分析寄主植物应对各种逆境作出的反应,是深入了解植物抗性的根本途径。

王猛^[39]、张锴^[40]通过构建松材线虫诱导马尾松抑制消减杂交文库(suppression subtractive hybridization, SSH),均获得了涉及抗病反应[如:苯丙氨酸解氨酶基因(PAL)、4-香豆酸:CoA 连接酶基因(4CL)、类似于核苷酸结合位点和 C 端富含亮氨酸重复序列

的抗性基因(NBS-LRR 类抗病基因)]、信号转导(如:钙结合蛋白、G 蛋白、NPG1 等)、转录调控、编码胁迫耐受蛋白(如:热激蛋白、金属硫蛋白等)等功能的基因。另外,前者还发现了脱落酸(ABA)激素响应基因;后者则发现一些基因参与结构和功能代谢合成途径(如:ATP 结合蛋白)、次生代谢途径(肉桂酸脱氢酶)及能量代谢(糖类代谢),并认为寄主马尾松通过加强呼吸作用的糖酵解过程增强了细胞的抗逆性。国内外学者对寄主松树受松材线虫诱导表达的差异基因研究发现,多种病程相关蛋白(如:PR-1b、PR-2、PR-3、PR-4、PR-5、PR-6、PR-14 等)及细胞壁扩展蛋白、富含羟脯氨酸糖蛋白(HRGPs)等^[38,44,56]在侵染阶段表达量显著增强。而且 Hirao 等^[44]发现,它们在易感病的黑松中的诱导速度与表达量均高于抗性黑松,因此认为,这些高表达的病程相关基因可能导致松树的过度免疫,反而加速了树体细胞的死亡,这一结论与早前学者的研究结果一致^[57-59];而扩展蛋白、HRGPs 等细胞壁相关基因在抗性黑松中的表达更多,推测松树固有的组织结构抗性有效地抵抗了松材线虫的侵染。Sofia 等^[59]利用 SSH 对 2 种松树在松材线虫侵染早期的表达序列标签(express sequenced tags, EST)进行鉴定,结果发现病程早期松树在分子水平上的抗性反应被激活,主要涉及氧化胁迫、木质素、乙烯的产生及核酸转录后的调控。Shin 等^[60]利用 SSH 研究接种后日本赤松上调表达的基因(其中包括一些转录因子基因),也发现这些基因涉及防卫反应、次生代谢、转录调控及编码病程相关蛋白、银松素合成酶及金属硫蛋白等功能。谢婉凤等^[61]利用荧光定量 PCR 初步揭示了松材线虫侵染马尾松过程中马尾松中与病原识别、抗逆调节、次生代谢、解毒作用及生长素响应等相关的基因的动态表达模式,发现受侵染 48 h 的马尾松其分子响应最为强烈,受害马尾松中与病原识别、抗逆调节、次生代谢及生长发育相关基因的表达丰度变化最为明显,说明在侵染早期,寄主松树就已启动了相关防卫反应。另外,Gaspar 等^[62]利用转录组测序鉴定了参与海岸松抵抗松材线虫侵染的基因,结果表明,松材线虫的侵染激发了海岸松中参与响应生物胁迫、苯丙烷类和萜类代谢、激素调节及松树细胞壁组成相关基因的转录表达,并且发现海岸松受松材线虫侵染早期(6 h、24 h 和 48 h)和后期(7 d)表达的基因有显著差异,推测由于其抗侵染早期表现的防卫反应效果不佳,因此其响应侵染后期的反应是为了进一步加强防御。

4 讨论与展望

关于寄主松树抗松材线虫病机制, 国内外学者通过几十年的研究取得了重要的成果。松树结合内部组织变化、生理应答以及基因表达调控来共同抵抗松材线虫的侵染, 其具体抗性机制大体概括为以下几点。(1) 组织结构方面: 松树受松材线虫侵染时, 皮层树脂道形成胶质、皮层树脂道大小、木质部树脂道密度及树体分枝节点都一定程度上影响了线虫在树体内的迁移; 树体内管胞空洞化导致了树体内水分输导受阻, 树体进而萎蔫死亡; 抗性强的松树在受松材线虫侵染时早期组织病理学变化早于抗病较弱的松树, 但前者体内组织被破坏速度慢于后者; 松树应对不同毒力松材线虫侵染时, 体内首先出现异常的细胞类型不同。(2) 生理响应方面: 松树体内信号分子、激素及次生代谢产物均参与应对松材线虫的侵染。(3) 分子机制方面: 树体中某些涉及抗性反应的基因及病程相关蛋白在松材线虫侵染阶段被显著诱导表达, 暗示它们参与了松树的抗病过程。

尽管目前对寄主松树应对松材线虫侵染的抗性机制有了一定的了解, 但对寄主的防御机制以及作用机理仍然缺乏深入研究。主要表现在: (1) 由于该病的复杂性, 在对寄主抗性与线虫迁移和繁殖的关系上, 不同研究方法和材料得出了不同的观点, 对此还需进一步研究; (2) 虽然当前研究表明不同抗性松树对松材线虫侵染的早期组织病理学变化时间和速度不同, 松树应对不同毒力松材线虫侵染时体内发生异常的细胞类型不同, 但具体什么因素导致了这些差异仍不清楚; (3) 对于病程相关生理生化代谢途径仍缺乏全面了解。目前的研究只是推测了几种代谢途径参与了病害的发生发展, 但这些代谢途径如何被激发并发挥抵抗作用仍知之甚少; (4) 在松材线虫侵染阶段寄主松树显著上调表达的基因是否真正具有抗病相关功能以及如何发挥功能仍有待探究。因此, 对于今后在松树抗松材线虫病的机制研究方面, 提出以下展望。

4.1 火炬松基因组数据的挖掘与利用

由于松树基因组庞大, 因而其基因测序工作十分困难。可喜的是, 火炬松 (*Pinus taeda*) 基因组项目研究组利用改进的“鸟枪法”于2014年成功完成了其基因组测序, 并且对其抗病、应激反应相关基因进行了说明^[63]。火炬松基因组数据的公布将为后续松树方面的研究提供极大的便利。(1) 由于同属物种的相关基因同源性较高, 可利用同源克隆,

在其他松树上寻找同源抗性基因。这将对松树抗松材线虫病的机制研究具有极大的推动作用。(2) 松树抗性相关 microRNA 研究。目前越来越多的研究证实, 植物 miRNA 参与植物的生长发育及抗逆过程^[64-67]。目前, 运用生物信息学方法, Quinn 等^[68-69]对火炬松上部分保守 miRNA 进行了预测, 但并未与松材线虫病研究相联系。因此, 在松树抗松材线虫机制研究中, 可利用火炬松基因组数据并借鉴其他植物中 miRNA 的研究方法, 寻找与抗松材线虫相关的 miRNA 及其靶基因并进行相关功能分析具有重要意义, 也将成为今后寄主松树的研究热点之一。

4.2 分子生物学和生物信息学研究方法和手段的进一步应用

学者们利用转录组测序 (RNA sequencing, RNA-Seq)、抑制消减杂交 (SSH)、长基因系列表达分析 (long serial analysis of gene expression, LongSAGE) 等分子生物学技术获得了众多差异表达的基因, 并结合生物信息学分析了这些基因可能的功能, 但这些仍需要具体的实验来研究基因的确切作用。随着分子生物学和生物信息学的快速发展, 转录组学、蛋白质组学、代谢组学等新技术的出现, 为进一步研究松树响应松材线虫侵染的分子机理提供了有利的技术平台; 今后的发展方向已不仅仅是研究某个基因的功能, 而更多的是研究某个信号通路上多个基因的作用以及不同通路上多个基因功能的互作和交叉, 这样才能更好地去揭示松材线虫与松树复杂的互作机制。

4.3 结合松树抗病的各个方面综合研究其抗病机理

目前广泛认为, 植物抗病性的机制体现在病原体侵染的各个环节, 它是植物自身形态结构和生理生化代谢等方面在时间和空间上综合表现的结果, 是在一系列物质代谢的基础上, 依赖相关基因的表达、抗病物质的产生而实现的^[70]。而目前关于松树抗松材线虫病的机制大多仅从单一的角度去分析, 因此还需将松树的组织病理学、生理生化变化及分子病理学的研究联系起来, 揭示其内部联系, 从而全面揭示其抗病机制。

4.4 结合松材线虫的致病机制研究寄主的抗病机理

病原与寄主互作是一个十分复杂的过程。由于松材线虫病的发生发展涉及环境、传播媒介、寄主松树、病原松材线虫及其体内细菌等一系列因素, 因而了解该病的发生发展需要综合考虑各个因素在病程中的作用。研究寄主抗病机理, 可与松材线虫

的致病机理研究相结合, 探究其具体互作过程, 从中揭示寄主松树从防御到最后死亡的内在原因, 从而找到防治松材线虫病的有效策略。

[参 考 文 献]

- [1] Kiyohara T, Tokushige Y. Inoculation experiments of a nematode, *Bursaphelenchus* sp. onto pine trees. *J Jpn For Soc*, 1971, 53: 210-8
- [2] 刘博文, 柴雪芹, 张真真. 松材线虫入侵危害对森林系统的影响. *现代农业科技*, 2013, 9: 180-2
- [3] 李兰英, 高岚, 温亚利, 等. 松材线虫病研究进展. *浙江林业科技*, 2006, 26: 74-9
- [4] Zhang FJ, Kajiwara J, Mori Y, et al. Metabolites from resistant and susceptible *Pinus thunbergii* after inoculation with pine wood nematode. *Am J Plant Sci*, 2013, 4: 512-8
- [5] Gao RH, Shi J, Huang RF, et al. Effects of pine wilt disease invasion on soil properties and Masson pine forest communities in the Three Gorges reservoir region, China. *Ecol Evol*, 2015, 5: 1702-16
- [6] 叶建仁, 黄麟. 松材线虫病病原学研究的几个问题. *中国森林病虫*, 2012, 31: 13-21
- [7] Yu A, Oleg AR, Kulinich JR, et al. Pine wilt disease: a short review of worldwide research. *For Stud Chn*, 2011, 13: 132-8
- [8] Cardoso JMS, Anjo S, Fonseca L, et al. *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* secretomes: a comparative proteomic analysis. *Sci Rep*, 2016, 6: 39007-18
- [9] He LX, Wu XQ, Xue Q, et al. Effects of Endobacterium (*Stenotrophomonas maltophilia*) on pathogenesis-related gene expression of pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) and pine wilt disease. *Int J Mol Sci*, 2016, 17: 778-92
- [10] Espada M, Silva AC, Eves-van den Akker S, et al. Identification and characterization of parasitism genes from the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* reveals a multilayered detoxification strategy. *Mol Plant Pathol*, 2016, 17: 286-95
- [11] Togashi K, Miyauchi O, Kusumoto D, et al. Commensal relation between *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) and *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) within pine trees. *Appl Entomol Zool*, 2016, 51: 53-62
- [12] Rajasekharan, SK, Lee JH, Ravichandran V, et al. Assessments of iodoindoles and abamectin as inducers of methuosis in pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Sci Rep*, 2017, 7: 6803-16
- [13] Kim J, Lee SM, Park CG. *Bursaphelenchus xylophilus* is killed by homologues of 2-(1-undecyloxy)-1-ethanol. *Sci Rep*, 2016, 6: 29300-5
- [14] 陈玉惠, 黄忠宏. 松树抗松材线虫病机理的研究进展. *四川林业科技*, 2002, 23: 42-5
- [15] Kusumoto D, Yonemichi T, Inoue H, et al. Comparison of histological responses and tissue damage expansion between resistant and susceptible *Pinus thunbergii* infected with pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *J For Res*, 2014, 19: 285-94
- [16] Ishida K, Hogetsu T, Fukuda K, et al. Cortical responses in Japanese black pine to attack by the pine-wood nematode. *Can J Bot*, 1993, 71: 1399-405
- [17] Ichihara Y, Fukuda K, Suzuki K. The effect of periderm formation in the cortex of *Pinus thunbergii* on early invasion by the pine wood nematode. *For Pathol*, 2000, 30: 141-8
- [18] Kuroda K. Inhibiting factors of symptom development in several Japanese red pine (*Pinus densiflora*) families selected as resistant to pine wilt. *J For Res*, 2004, 9: 217-24
- [19] Son JA, Komatsu M, Natsushita N, et al. Migration of pine wood nematodes in the tissues of *Pinus thunbergii*. *J For Res*, 2010, 15: 186-93
- [20] Zas R, Moreira X, Ramos M, et al. Intraspecific variation of anatomical and chemical defensive traits in Maritime pine (*Pinus pinaster*) as factors in susceptibility to the pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Trees*, 2015, 29: 663-73
- [21] Kawaguchi E. Relationship between the anatomical characteristics of cortical resin canals and migration of *Bursaphelenchus xylophilus* in stem cuttings of *Pinus thunbergii* seedlings (in Japanese with English summary). *J Jap For Soc*, 2006, 88: 240-4
- [22] Yamanobe T. Relationships between morphological traits and resistance to pine wood nematode in two Japanese pines. *Eur J Plant Pathol*, 2009, 124: 543-52
- [23] Mori Y, Miyahara F, Tsutsumi Y, et al. Relationship between resistance to pine wilt disease and the migration or proliferation of pine wood nematodes. *Eur J Plant Pathol*, 2008, 122: 529-38
- [24] Nunes da Silva M, Solla A, Sampedro L, et al. Susceptibility to the pine wood nematode (PWN) of four pine species involved in potential range expansion across Europe. *Tree Physiol*, 2015, 35: 987-99
- [25] Umebayashi T, Fukuda K, Haishi T, et al. The Developmental process of xylem embolisms in pine wilt disease monitored by multipoint imaging using compact magnetic resonance imaging. *Plant Physiol*, 2011, 156: 943-51
- [26] Yazaki K, Takanashi T, Kanzaki N, et al. Pine wilt disease causes cavitation around the resin canals and irrecoverable xylem conduit dysfunction. *J Exp Bot*, 2018, 69: 589-602
- [27] Yamada T. Histological observation on the responses of pine species, *Pinus strobus* and *P. taeda*, resistant to *Bursaphelenchus xylophilus* infection. *Ann Phytopathol Soc Jpn*, 1993, 59: 659-65
- [28] 徐华潮, 骆有庆, 邹力骏, 等. 松材线虫自然侵染后对不同松树组织结构的影响. *植物病理学报*, 2013, 43: 35-41
- [29] 金刚, 叶建仁. 不同致病力线虫接种黑松后寄主体内组织病理学变化. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 2007, 31: 115-20
- [30] 厉艳, 叶建仁. 松材线虫病早期寄主薄壁细胞的死亡方式. *林业科学*, 2008, 4: 95-8
- [31] 何龙喜, 吴小芹, 俞禄珍, 等. 不同抗性松树与松材线虫互作中H₂O₂及其氧化酶活性的差异. *南京林业大学学报*

- 报: 自然科学版, 2010, 34: 13-7
- [32] 何龙喜, 吴小芹, 俞禄珍. 不同松树与松材线虫互作中超氧自由基差异与病变的关系. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2011, 35: 25-30
- [33] 刘劫, 吴小芹, 何龙喜, 等. 黑松与松材线虫和拟松材线虫互作早期超氧自由基研究. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2008, 32: 24-8
- [34] Wendehenne D, Durner J, Klessig DF, et al. Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Curr Opin Plant Biol*, 2004, 7: 449-55
- [35] 何龙喜, 吴小芹, 吉静, 等. 不同松树感染松材线虫后NO和核酸酶变与抗病性的关系. 林业科学, 2012, 48: 109-14
- [36] 俞禄珍, 吴小芹, 叶建仁, 等. 黑松与松材线虫互作早期NO应答信号与外在因子的关系. 应用生态学报, 2013, 24: 646-52
- [37] 吴兴泉, 李萌萌, 陈士华. 马铃薯Y病毒属病毒与寄主互作的分子机制研究进展. 云南农业大学学报, 2015, 30: 317-23
- [38] 徐亮. 马尾松响应松材线虫侵染的CaM和CaMBP钙信号转导特征[D]. 北京: 北京林业大学, 2013: 1-88
- [39] 王猛. 马尾松抑制消滅文库的构建及抗病性相关基因的克隆[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2010: 29-38
- [40] 张锴. 受松材线虫侵染的马尾松抑制消滅文库构建与表达谱分析[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2010: 55-64
- [41] 贾飞飞. 植物抗性信号物质缓解番茄根结线虫的效应及其机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2013: 21-54
- [42] 钱万强, 曹福祥, 王猛, 等. 松材线虫侵染对马尾松体内有机酸及酶的影响. 湖南林业科技, 2009, 36: 8-10
- [43] 谈家金, 叶建仁, 郝德君. 黑松感染松材线虫后几种有机酸含量的变化. 植物病理学报, 2008, 38: 649-51
- [44] Hirao T, Fukatsu E, Watanabe A, et al. Characterization of resistance to pine wood nematode infection in *Pinus thunbergii* using suppression subtractive hybridization. *Plant Biol*, 2012, 12: 13-27
- [45] Kusumoto D, Yonemichi T, Murata M, et al. Histological observations on host responses and nematode distribution in resistant pine trees infected with pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (in Japanese). *Tree For Health*, 2010, 14: 98-100
- [46] Keeling CJ, Bohlmann J. Diterpene resin acids in conifers. *Phytochemistry*, 2006, 67: 2415-23
- [47] Ro DK, Bohlmann J. Diterpene resin acid biosynthesis in loblolly pine (*Pinus taeda*): functional characterization of abietadiene/levopimaradiene synthase (PtTPS-LAS) cDNA and subcellular targeting of PtTPS-LAS and abietadienol/abietadienal oxidase (PtAO, CYP720B1). *Phytochemistry*, 2006, 67: 1572-8
- [48] Futai K. The changes in tannin amount in relation to the population dynamics of *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus*. *Trans Jpn For Soc*, 1984, 95: 473-4
- [49] Futai K. Abnormal metabolites in pine wood nematode-inoculated Japanese black pine. *Jpn J Nematol*, 2003, 33: 45-56
- [50] 滕涛, 曹福祥, 王猛, 等. 松材线虫侵染对松树苯丙氨酸解氨酶及酚类物质的影响. 中南林业科技大学学报, 2007, 27: 124-7
- [51] 赵振东, 李冬梅, 胡耀萼, 等. 抗松材线虫病马尾松种源化学成分与抗性机理研究(第II报)——马尾松种源抗性与中性萜类化合物组成差异关系研究. 林产化学与工业, 2001, 21: 56-60
- [52] 徐福元. 马尾松地理种源对松材线虫病的抗性研究[D]. 南京: 南京林业大学, 1998: 1-68
- [53] Rodrigues AM, Mendes MD, Lima AS, et al. *Pinus halepensis*, *Pinus pinaster*, *Pinus pinea* and *Pinus sylvestris* essential oils chemotypes and monoterpene hydrocarbon enantiomers, before and after inoculation with the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Chem Biodivers*, 2017, 14: 153-69
- [54] Santos CS, Pinheiro M, Silva AI, et al. Searching for resistance genes to *Bursaphelenchus xylophilus* using high throughput screening. *BMC Genomics*, 2012, 13: 599-613
- [55] 谈家金, 叶建仁, 郝德君, 等. 松材线虫对黑松一些生理生化指标的影响. 植物病理学报, 2011, 41: 44-8
- [56] Nose M, Shiraishi S. Comparison of the gene expression profiles of resistant and non-resistant Japanese black pine inoculated with pine wood nematode using a modified LongSAGE technique. *For Pathol*, 2011, 41: 143-55
- [57] Myers RF. Pathogenesis in pine wilt caused by pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *J Nematol*, 1988, 20: 236-44
- [58] Futai K. Pine wilt is an epidemic disease in forests: notes on the interrelationship of forest microbes [M]. Tokyo: Bun-ichi sogo shyuppan, 2003
- [59] Sofia C, Dos Santos S, Wilton M, et al. Identification of genes differentially expressed in *Pinus pinaster* and *Pinus pinea* after infection with the pine wood nematode. *Eur J Plant Pathol*, 2012, 132: 407-18
- [60] Shin H, Hyoshin L, Kwansoo W, et al. Identification of genes upregulated by pine wood nematode inoculation in Japanese red pine. *Tree Physiol*, 2009, 29: 411-21
- [61] 谢婉凤, 李慧敏, 黄爱珍, 等. 马尾松响应松材线虫侵染的基因动态表达变化. 福建农业学报, 2017, 32: 403-9
- [62] Gaspar D, Trindade C, Usié A, et al. Expression profiling in *Pinus pinaster* in response to infection with the Pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Forests*, 2017, 8: 279-90
- [63] Zimin A, Stevens KA, Crepeau MW, et al. Sequencing and assembly of the 22-Gb loblolly pine genome. *Genetics*, 2014, 196: 875-90
- [64] 许振华, 谢传晓. 植物miRNA与逆境响应研究进展. 遗传, 2010, 32: 1018-30
- [65] 刘萍. 番茄保守miRNA的鉴定及抗逆功能分析[D]. 大连: 大连理工大学, 2013: 30-7
- [66] 李博生. miRNA调节胡杨抗逆性状的分子机制研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2013: 12-74
- [67] 李子龙. miR319a对番茄生长发育的影响及在番茄抗根结线虫中作用的初探[D]. 北京: 北京农学院, 2015: 15-24
- [68] Quinn CR, Iriyama R, Fernando DD, et al. Expression patterns of conserved microRNAs in the gametophyte of loblolly pine (*Pinus taeda*). *Plant Reprod*, 2014, 27: 69-78
- [69] Quinn CR, Iriyama R, Fernando DD. Computational predictions and expression patterns of conserved microRNAs

- in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Tree Genet Genomes*, 2015, 11: 805-15
- [70] 李唯, 毕玉蓉, 刘伟, 等. 植物生理学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2012: 1-411