

# 短颈剑线虫和喜马拉雅剑线虫的形态与 rDNA 分子特征

赵立荣<sup>1</sup>, 葛建军<sup>2</sup>, 王卫芳<sup>1</sup>, 古少常<sup>3</sup>, 张永瑜<sup>3</sup>, 胡学难<sup>1</sup>, 冯黎霞<sup>1</sup>, 吴海荣<sup>1</sup>

(1 广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 广东 广州 510623;

2 中国检验检疫科学研究院 动植物检验检疫研究所, 北京 100029;

3 高明出入境检验检疫局, 广东 高明 528500)

**摘要:**描述了日本进境罗汉松根际截获的2种美洲剑线虫:短颈剑线虫 *Xiphinema brevicollum* Lordello et Da Costa, 1961 和喜马拉雅剑线虫 *Xiphinema himalayense* Ahmad, Lamberti, Rawat, Agostinelli et Srivastava, 1998, 并对这2种线虫 rDNA-ITS 和 D2D3 序列进行了扩增、克隆、测序及系统进化分析. 短颈剑线虫和喜马拉雅剑线虫在国家质量监督检验检疫局内首次截获, 喜马拉雅剑线虫在日本首次报道, 在中国没有分布记载.

**关键词:**日本; 美洲剑线虫; 短颈剑线虫; 喜马拉雅剑线虫; 罗汉松; ITS; D2D3; 形态

中图分类号: Q959.17

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2012)04-0488-05

## Morphological and Molecular Characterization of *Xiphinema brevicollum* and *X. himalayense*

ZHAO Li-rong<sup>1</sup>, GE Jian-jun<sup>2</sup>, WANG Wei-fang<sup>1</sup>, GU Shao-chang<sup>3</sup>,

ZHANG Yong-yu<sup>3</sup>, HU Xue-nan<sup>1</sup>, FENG Li-xia<sup>1</sup>, WU Hai-rong<sup>1</sup>

(1 Inspection and Quarantine Technology Center, Guangzhou 510623, China;

2 Institute of Animal and Plant Quarantine, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100029, China;

3 Gaoming Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Gaoming 528500, China)

**Abstract:** Morphological and molecular characterization of two putative *Xiphinema americanum*-group species (*X. brevicollum* and *X. himalayense*) from Yaccatree imported from Japan were described. ITS and D2D3 segments of two species were amplified, cloned, sequenced and analysed by using ME polygenetic tree. They were first intercepted by the General Administration of Quality Supervision Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. *X. himalayense* was reported in Japan and has no distribution record in China.

**Key words:** Japan; *Xiphinema americanum* group; *Xiphinema brevicollum*; *Xiphinema himalayense*; Yaccatree; ITS; D2D3; morphometrics

剑线虫 *Xiphinema* Cobb, 1913 隶属于矛线目 Dorylaimida Pearse, 1942, 长针科 Longidoridae (Thorne, 1935) Meyl, 1961, 剑亚科 Xiphinematinae Dalmasso, 1969. 剑线虫是一类重要的植物外寄生线虫, 可寄生于植物根部, 影响根系长势, 甚至造成根部肿大或坏

死等症状. 2010年4月, 广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心接受高明出入境检验检疫局送检的来自日本罗汉松根际的2份土壤样品. 从样品中分离获得剑线虫, 经形态观察、测量, 以及 rDNA-ITS、D2D3 区扩增、测序及系统进化分析, 分别鉴定为短

收稿日期: 2011-09-06

作者简介: 赵立荣 (1974—), 女, 高级农艺师, E-mail: zhaolr@iqtc.cn

基金项目: 广东局科技项目 (2009GDK13, 2009GDK05, 2010GDK44)

颈剑线虫 *Xiphinema brevicollum* Lordello et Da Costa, 1961 和喜马拉雅剑线虫 *X. himalayense* Ahmad, Lamberti, Rawat, Agostinelli et Srivastava, 1998. 短颈剑线虫在 10 多个国家有发生<sup>[1]</sup>, Fritzsche 等<sup>[2]</sup>曾报道在实验室条件下短颈剑线虫传播番茄环斑病毒,但是 Trudgill 等<sup>[3]</sup>认为其传毒证据不充分;喜马拉雅剑线虫仅报道印度境内的加瓦尔喜马拉雅山上海拔 1 850 m 处野草根际<sup>[4]</sup>,其传毒能力有待进一步考证.

## 1 材料与方法

### 1.1 样品的采集和线虫的分离

采集罗汉松根际土壤,将土壤样品浅盘浸泡 10~24 h,用线虫筛分离线虫.

### 1.2 线虫形态鉴定

分离获得的线虫 60~62 °C 水浴处理 2~3 min,将线虫杀死,用 FG 固定液[V(甲醛):V(甘油):V(蒸馏水) = 10:1:89]固定.在光学显微镜下进行形态观察与测量.形态测计采用 Deman 公式中的参数符号<sup>[5]</sup>.

### 1.3 线虫分子鉴定

**1.3.1 线虫 DNA 提取** 在 200  $\mu$ L Eppendorf 管中加入 8  $\mu$ L 预冷的 PCR Buffer. 在平玻片上滴 20  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O,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  $\mu$ L,加入含有 8  $\mu$ L PCR Buffer 液的 Eppendorf 管中,再向管中加入 2  $\mu$ L 预冷的 1 mg/mL 蛋白酶 K,使总体积为 20  $\mu$ L. 迅速将管放入 -70 °C 冰箱至少 10 min,而后将 Eppendorf 管置于 PCR 仪中 65 °C 恒温 60 min,以降解 DNase,接着 95 °C 恒温 10 min,以变性蛋白酶 K,此时即可取此 DNA 悬浮液 1~2  $\mu$ L 直接做 PCR 或 -20 °C 保存.

**1.3.2 分子检测** ①PCR 扩增. PCR 反应体系包括: 10 $\times$  PCR Buffer 5  $\mu$ L, dNTP(10 mmol/L) 1  $\mu$ L,引物(10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L,模板 DNA 4  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 39.75  $\mu$ L, TaqDNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ L) 0.25  $\mu$ L,总体积 50  $\mu$ L.

②ITS 区引物及扩增程序. 采用通用引物,上游引物为 5'-ttgattacgtccctgccctt-3', 下游引物为 5'-tttcaactcggcttactaagg-3'<sup>[6]</sup>. 扩增程序为 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 35 个循环; 72 °C 5 min; 4 °C 保温.

③D2D3 区引物及扩增程序. 采用通用引物,上游引物为 5'-acaagtaccgtgaggaaagt-3', 下游引物为 5'-tcggaaggaaccagctacta-3'<sup>[7]</sup>, 扩增程序为 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 35 个循环; 72 °C 5 min; 4 °C 保温.

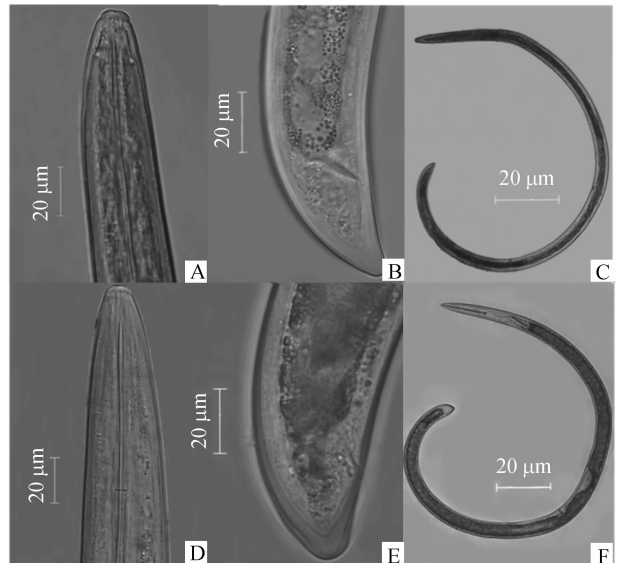
④PCR 产物的检测及克隆、测序、系统进化分

析. 使用 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳,电压 10 V/cm,取 PCR 产物 5  $\mu$ L 上样. 电泳 30 min 后,在紫外灯下观察. 将片段割胶纯化、回收,连接到 pMD-18T 载体后转入大肠埃希菌 *Escherichia coli* JM109 菌株中,筛选阳性菌落测序. 以钱氏剑线虫 *X. chambersi* 作为外群,将获得的序列数据与 GenBank 上相似性较高的美洲剑线虫序列进行 ME 系统进化分析.

## 2 结果与分析

### 2.1 短颈剑线虫形态鉴定

雌虫:热杀死后虫体向腹面弯曲呈“C”形,两端渐细.唇区圆,缢缩明显.齿尖针细长、针状、高度硬化,齿尖针基部呈叉状,齿托基部呈显著的凸缘状;齿针导环为双环,后环高度骨化,导环位于齿尖针后部靠近齿尖针与齿托相连接处.阴门位于虫体中部,横裂,占阴门处体宽的 1/3 左右,子宫内无特殊分化.生殖腺对生、均发育完全,生殖腺较短、卵巢回折.尾短圆锥形,有轻微指状突起,尾长等于或略长于肛门处体宽(图 1A~1C).



A, D: 头部; B, E: 尾部; C, F: 雌虫整体.

图 1 短颈剑线虫(A~C)和喜马拉雅剑线虫(D~F)形态特征图

Fig. 1 Photomicrographs of *Xiphinema brevicollum* (A-C) and *X. himalayense* (D-F)

雄虫:未见.

幼虫:虫体热杀死后呈“C”形,弯曲程度小于成虫.尾锥形,尾端尖圆,有轻微指状突起.分离到 1 条幼虫(估计 2 龄或 3 龄):体长 988.1  $\mu$ m,齿尖针长 60.3  $\mu$ m,齿托长 38.9  $\mu$ m,替代齿尖针长 71.2  $\mu$ m,尾长 30.6  $\mu$ m,  $a=35$ ,  $b=4.6$ ,  $c=32.0$ ,  $c'=1.7$ .

短颈剑线虫形态测量值见表 1. 根据 Lamberti

等<sup>[10]</sup>检索表,从日本罗汉松根际截获的剑线虫特征代码为 A3、B1、C2、D2/1、E2、F1、G2、H2、I2. 除了 C 值和 I 值偏大外,其他特征代码都符合 *Xiphinema diffusum* Lamberti & Bleve-Zacheo, 1979. 该线虫的鉴定特征及测量值与 Lamberti 等<sup>[8]</sup>对 *X. diffusum* 的描述基本相符,只是尾偏长,但差异不大.

另外,鉴于弥散剑线虫 *X. diffusum* 和短颈剑线虫 *X. brevicollum* 的多个鉴定特征及测量值(表 1)交叉重叠,根据 Luc 等<sup>[9]</sup>观点,将 *X. diffusum* 作为 *X. brevicollum* 的同物异名. 因此该虫初步判断为短颈剑线虫 *X. brevicollum* Lordello et Da Costa, 1961.

表 1 短颈剑线虫日本种群与模式标本的形态测量值

Tab. 1 Morphometrics of *Xiphinema brevicollum* populations from Japan and paratypes

形态指标	日本种群	弥散剑线虫 <sup>[8]</sup>	短颈剑线虫 <sup>[9]</sup>
	测量值	副模	副模
<i>n</i>	3 ♀♀	10 ♀♀	25 ♀♀
<i>L/mm</i>	1.9±0.1(1.8~2.0)	1.7(1.6~1.8)	1.9±0.1(1.7~2.2)
<i>a</i>	41.0±3.2(37.8~44.1)	47(46~51)	46.1±1.7(44~51)
<i>b</i>	6.6±0.7(6.1~7.4)	6.9(5.3~8.9)	5.9±0.4(5.1~6.7)
<i>c</i>	60.9±5.8(55.3~66.9)	72(63~84)	76.9±5.6(67.6~89.9)
<i>c'</i>	1.2±0.1(1.0~1.3)	0.9(0.8~1.1)	1.0±0.1(0.9~1.1)
<i>V</i>	50.4±0.2(50.3~50.6)	50(47~52)	53.0±0.9(50~55)
Total stylet/ $\mu\text{m}$	142.0±2.7(141.3~146)	-	159.0±8.1(144~173)
Odontostyle/ $\mu\text{m}$	89.2±2.2(86.7~90.6)	87(84~89)	101.0±6.1(89~110)
Odontophore/ $\mu\text{m}$	53.9±2.7(50.8~56.7)	50(48~51)	59.0±3.4(50~64)
Tail/ $\mu\text{m}$	30.6±1.7(29.6~32.6)	24(21~28)	26.0±1.7(23~28)

## 2.2 喜马拉雅剑线虫形态鉴定

雌虫:热杀死后虫体呈“C”形. 头部连续,侧器囊倒马鐮形. 齿尖针细长、针状、高度硬化,齿尖针基部呈叉状,齿托基部呈显著的凸缘状;齿针导环为双环,后环高度骨化,导环位于齿尖针后部靠近齿尖针与齿托相连接处. 阴门位于虫体中部稍后,阴门横裂. 双生殖腺、对生、等长;卵巢回折覆盖整个输卵管部分,内部充满细菌. 尾短圆锥形,背面弯曲、腹面直或略弯,尾端圆,尾长等于或略短于肛门处体宽(图 1D~1F).

雄虫:未见.

幼虫:热杀死后虫体成“J”形. 根据虫体长度、齿针长度及替代齿针长度,划分 4 个龄期,随着龄期增长身体弯曲程度加大,尾变短,*c'*变小.

喜马拉雅剑线虫形态测量值见表 2. 根据 Lamberti 等<sup>[10]</sup>检索表,从日本罗汉松根际截获的剑线虫测量特征代码为 A5、B2、C1、D2/3、E3、F1、G1、H2、I2. 除了 D 值偏小外,其他特征代码都符合 *Xiphinema*

*himalayense* Ahmad, Lamberti, Rawat, Agostinelli et Srivastava, 1998 代码.

表 2 喜马拉雅剑线虫日本种群与 *Xiphinema himalayense* 模式标本的形态测量值

Tab. 2 Morphometrics of *Xiphinema himalayense* populations from Japan and paratype from India

形态指标	日本种群	<i>X. himalayense</i> <sup>[4]</sup>
	测量值	副模
<i>n</i>	11 ♀♀	7 ♀♀
<i>L/mm</i>	2.3±0.1(2.1~2.4)	2.6±0.09(2.5~2.7)
<i>a</i>	37.8±2.8(34.8~43.5)	54.8±3.2(49.2~59.9)
<i>b</i>	7.0±1.0(6.0~8.7)	6.8±0.4(6.0~7.2)
<i>c</i>	75.8±7.0(67.2~88.7)	85.5±4.3(79.0~93.4)
<i>c'</i>	0.9±0.1(0.8~1.0)	1.0±0.1(0.9~1.1)
<i>V</i>	53.5±0.8(52.0~54.6)	52.0±0.0(52~52)
Total stylet/ $\mu\text{m}$	170.2±2.6(165.0~173.8)	-
Odontostyle/ $\mu\text{m}$	109.3±2.1(106.3~112.2)	112.5±1.9(110.0~114.5)
Odontophore/ $\mu\text{m}$	60.9±1.3(58.5~63.3)	64.4±2.2(60.7~67.5)
Tail/ $\mu\text{m}$	30.1±2.4(28.0~35.0)	30.6±1.7(28.9~32.9)

该线虫的鉴定特征及测量值与 Ahmad 等<sup>[4]</sup>对 *X. himalayense* 的描述基本相符,只是虫体偏短,但差异不大. 因此初步判断该虫为喜马拉雅剑线虫 *X. himalayense* Ahmad, Lamberti, Rawat, Agostinelli et Srivastava, 1998.

## 2.3 分子生物学特征

2.3.1 ITS 区分分子生物学特征 ①短颈剑线虫 ITS 区分分子生物学特征:短颈剑线虫的 ITS 区扩增 1 448 bp 的片段(GenBank 登录序列号:HQ184474). 通过 Clustal W 进行 BLAST 比对, HQ184474 与 GenBank 上注册的序列 AY359858 (*X. diffusum*)、AY430181 (*X. brevicollum*)、AY580057 (*X. brevicollum*)、AY430190 (*X. brevicollum*) 相似性 99.2% 以上. 在系统进化树(图 2)中 HQ184474 与 AY359858、AY430181、AY580057、AY430190 位于同一分支,亲缘关系很近. 比对和系统进化分析证实 Luc 等<sup>[9]</sup>的观点,即 *X. diffusum* 为 *X. brevicollum* 的同物异名,同时进一步确认该虫为短颈剑线虫 *X. brevicollum*.

②喜马拉雅剑线虫 ITS 区分分子生物学特征:喜马拉雅剑线虫的 ITS 区扩增 1 390 bp 的片段(GenBank 登录序列号:JN091971),通过 Clustal W 进行 BLAST 比对, JN091971 与 *X. brevicollum* 相似性较低,低于 97.3%. 在系统进化树(图 2)中, JN091971 与 *X. brevicollum*、*X. incognitum* 亲缘关系较近,与 Ahmad 等<sup>[4]</sup>描述的近似种吻合.

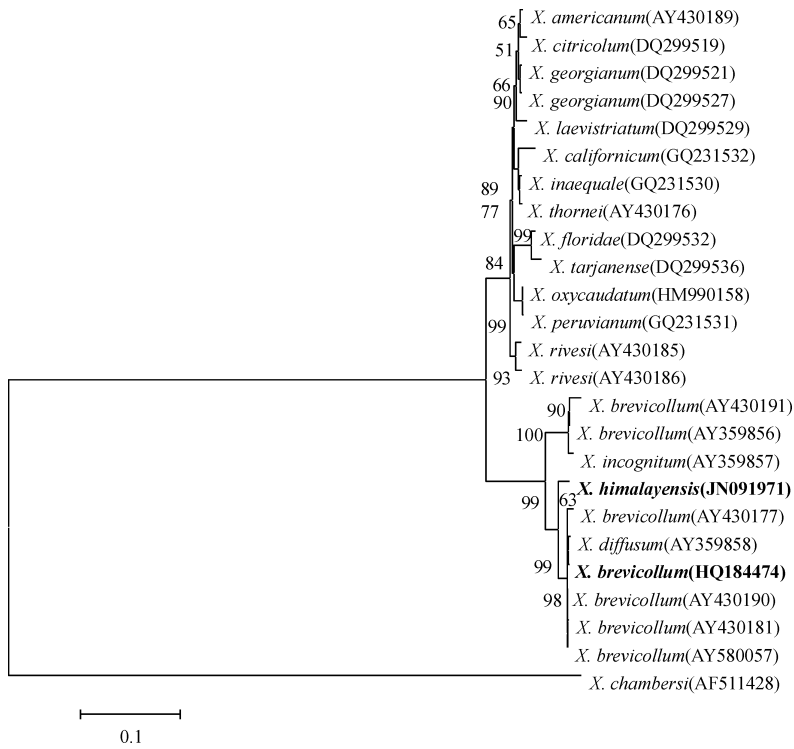


图 2 基于 ITS 序列的美洲剑线虫 ME 系统进化树

Fig. 2 Phylogeny of the *Xiphinema americanum* group inferred from ME analysis of ITS expansion regions

2.3.2 D2D3 区分子生物学特征 ①短颈剑线虫 D2D3 区分子生物学特征:短颈剑线虫 D2D3 区扩增 833 bp 的片段 (GenBank 登录序列号:HQ184473). 在 NCBI

上进行 BLAST 比对,与 AY601604 (*X. brevicollum*)、HMI63209 (*X. brevicollum*) 相似性 99.9% 以上. 在系统进化树(图 3)中 HQ184473 与 AY601604(*X. brevicollum*)

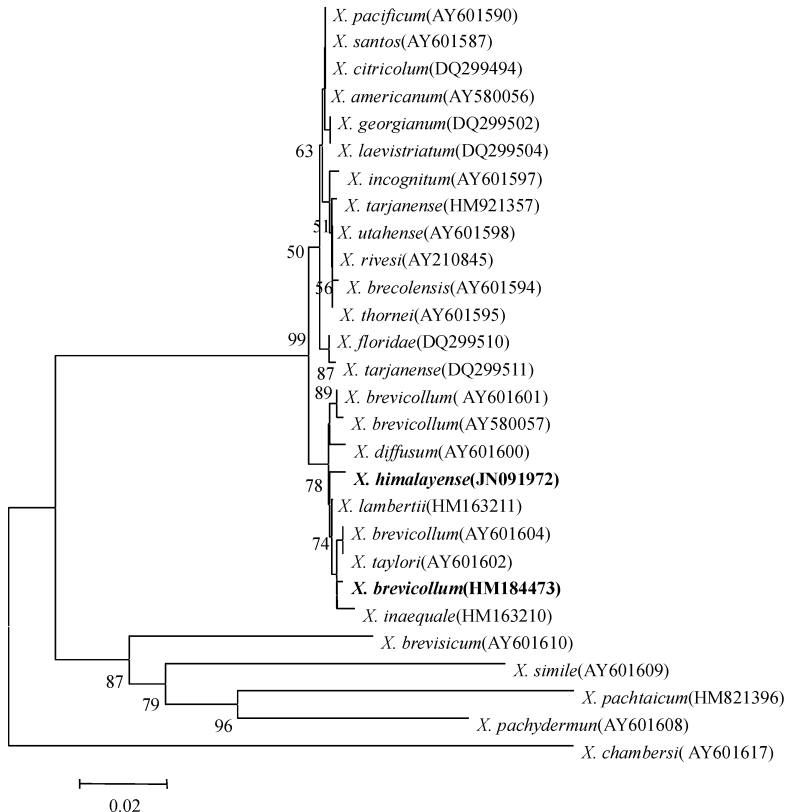


图 3 基于 D2D3 序列的美洲剑线虫 ME 系统进化树

Fig. 3 Phylogeny of the *Xiphinema americanum* group inferred from ME analysis of D2D3 expansion regions

位于同一分支,亲缘关系很近.从比对和进化分析结果进一步确认该虫为短颈剑线虫 *X. brevicollum*.

②喜马拉雅剑线虫 D2D3 区分子生物学特征:喜马拉雅剑线虫 D2D3 区扩增 831 bp 的片段(GenBank 登录序列号:JN091972).在系统进化树(图3)中,与 *X. brevicollum*、*X. taylori* 亲缘关系较近,与 Ahmad 等<sup>[4]</sup>描述的近似种吻合.

### 3 讨论

短颈剑线虫和喜马拉雅剑线虫都属于美洲剑线虫组 *Xiphinema americanum* group,由于美洲剑线虫组内部分种间的差异非常小,甚至交叉重叠,rDNA 序列的相似性很高,美洲剑线虫组的有效种数量存在争议,如 Lamberti 等<sup>[10]</sup>认为有 49 个有效种, Luc 等<sup>[9]</sup>认为有 34 个有效种.本文对 *X. diffusum* 和 *X. brevicollum* 线虫进行形态比较及 rDNA 序列分析,两者形态特征及测量值重叠,在 ITS 系统发育树中两者处于同一分支,说明这 2 种线虫属于同一种线虫,与 Luc 等<sup>[9]</sup>认为 *X. diffusum* 是 *X. brevicollum* 的同物异名结论吻合.

基于 rDNA-ITS、D2D3 序列构建的系统发育树,与 Lazarova 等<sup>[11]</sup>基于 rDNA-18S 和 mtDNA 序列、Lamberti 等<sup>[12]</sup>基于形态特征建立的系统发育树的拓扑结构基本类似.基于 rDNA 序列构建的系统发育树不仅从一定水平上揭示了剑线虫属内种群间的亲缘关系,也从另外一个角度支持了目前的形态分类观点,rDNA 序列可以作为剑线虫种类鉴定和进化分析的良好指标.

短颈剑线虫于 2011 年在日本报道<sup>[13]</sup>.本文首次报道了喜马拉雅剑线虫在日本分布,并公布了这 2 种线虫 ITS、D2D3 序列.

短颈剑线虫和喜马拉雅剑线虫为国家质量监督检验检疫总局首次截获.目前短颈剑线虫只在我国的江苏、浙江、湖南、广西等省区局部分布<sup>[14]</sup>.喜马拉雅剑线虫在我国没有分布记载.所以,应加强进境植物的审批和监管,以保护我国农林业生产的安全.

**致谢:**短颈剑线虫标本经浙江大学郑经武教授的复核,在此深表谢意!

#### 参考文献:

[1] KRUGER J C, HEYNS J. A study of *Xiphinema brevicolle* sensu Heyns, 1974 (Nematoda) [J]. *Phytophylactic*,

1986,18:209-215.

- [2] FRITZSCHE R, KEGLER H. Nematoden als vektoren von virus-krankheiten der obstgewachse [J]. *TagBer dt Akad Lander Wiss Berl*,1968,97:289-295.
- [3] TRUDGILL D L, BROWN D J F, MCNAMARA D G. Methods and criteria for assessing the transmission of plant viruses by Longidorid nematodes [J]. *Revue Nematol*, 1983,6:133-144.
- [4] AHMAD M, LAMBERTI F, RAWAT V S, et al. Two new species within the *Xiphinema americanum* group (Nematoda, Dorylaimida) from Garhwal Himalayas, India [J]. *Nematol Medit*, 1998, 26: 131-138.
- [5] BRODIE B B. Potato [M] // BARKER K R, PEDERSON G A, WINDHAM G L. *Plant and nematode interactions. Wisconsin: American of Agronomy*,1998:567-594.
- [6] VAIN T C. Restriction fragment length polymorphism separates species of the *Xiphinema americanum* group [J]. *Journal of Nematology*, 1993,25(3):361-364.
- [7] SUBBOTIN S A, STURHAN D, CHIZHOV V N, et al. Phylogenetic analysis of Tylenchida Thorne, 1949 as inferred from D2 and D3 expansion fragments of the 28S rRNA gene sequences [J]. *Nematology*, 2006,8:455-474.
- [8] LAMBERTI F, BLEVE-ZACHEO T. Studies on *Xiphinema americanum* sensu lato with description of fifteen new species (Nematoda, Longidoridae) [J]. *Nematol Medit*, 1979,7:51-106.
- [9] LUC M, COOMANS A, LOOF P A A. The *Xiphinema americanum* group (Nematoda: Longidoridae): II: Observation on *Xiphinema brevicollum* Lorfello da Costa, 1961 and comments on the group [J]. *Fundam Appl Nematol*, 1998,21:475-490.
- [10] LAMBERTI F, HOCKLAND S, AGOSTINELLI A, et al. The *Xiphinema americanum* group: III: Keys to species identification [J]. *Nematol Medit*, 2004,32:53-56.
- [11] LAZAROVA S S, MALLOCH G, OLIVEIRA C M G, et al. Ribosomal and mitochondrial DNA analyses of *Xiphinema americanum* group populations [J]. *Journal of Nematology*, 2006, 38(4):404-410.
- [12] LAMBERTI F, MOLINARI S, MOEN M, et al. The *Xiphinema americanum* group: II: Morphometric relationships [J]. *Russian Journal of Nematology*,2002,10(2):99-112.
- [13] SAKAI H, TAKEDA A, MIZUKUBO T. First report of *Xiphinema brevicolle* Lordello et Costa, 1961 (Nematoda, Longidoridae) in Japan [J]. *Zookeys*, 2011,135: 21-40.
- [14] 徐建华,傅鹏,程瑚瑞.中国七省(区)剑属线虫的分类学研究 [J]. *南京农业大学学报*,1995,18(1):37-42.

【责任编辑 周志红】