

1 种苕麻根腐病线虫的鉴定

余永廷¹, 薛召东¹, 曾粮斌¹, 张 岗², 陈 权¹, 朱爱国¹

(1 中国农业科学院 麻类研究所, 湖南 长沙 410205; 2 陕西中医学院 药学院, 陕西 咸阳 712046)

[摘 要] **【目的】**对分离的一种苕麻根腐病线虫进行形态和分子生物学鉴定, 为病原线虫分子生物学检测技术的研发及苕麻根腐病的防治奠定基础。**【方法】**从感染苕麻根腐病植株根中分离出一种植物病原线虫, 利用显微技术观察线虫的形态特征, 对其进行初步鉴定; 之后采用分子生物学技术, 提取单条线虫的 DNA, 利用通用保守性引物扩增了线虫核糖体 DNA 内部转录间隔区(rDNA-ITS)序列, 并用软件 DNASTAR 和 DNAMAN 进行序列分析, 对该植物病原线虫进行进一步鉴定。**【结果】**根据形态特征, 将获得的苕麻根腐病线虫初步鉴定为咖啡短体线虫。序列分析结果表明, 该线虫 rDNA-ITS 序列与咖啡短体线虫湖北种群、越南种群、台湾种群、日本种群及尼日利亚种群的同源性依次为 99.8%, 99.0%, 98.0%, 97.8% 和 94.6%。该线虫 rDNA-ITS 序列在 GenBank 注册号为 HQ403649。**【结论】**形态及分子生物学鉴定结果表明, 分离的苕麻根腐病线虫为咖啡短体线虫(*Pratylenchus coffeae*)。

[关键词] 苕麻; 根腐病; 形态特征; rDNA-ITS; 咖啡短体线虫

[中图分类号] S432.4⁺5; S435.63

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2011)07-0105-05

Identification of a nematode isolate from rot root of ramie

YU Yong-ting¹, XUE Shao-dong¹, ZENG Liang-bin¹,
ZHANG Gang², CHEN Quan¹, ZHU Ai-guo¹

(1 Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Changsha, Hunan 410205, China;

2 College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi 712046, China)

Abstract: **【Objective】**The study conducted morphological and molecular identification of a plant parasitic nematode isolated from rot root of ramie, which may lay a foundation for developing a molecular detection method of pathogen and integrated control. **【Method】**A plant pathogenic nematode was isolated from rot root of ramie in Yuanjiang. The nematode was investigated under the microscope for initial identification. rDNA-ITS region was amplified using DNA extracted from single nematode and sequenced. The sequence was analysed by DNASTAR and DNAMAN software for further identification. **【Result】**The nematode was preliminarily identified as *Pratylenchus coffeae* by morphological characters. Furthermore, the identity of rDNA-ITS sequence is 99.8%, 99.0%, 98.0%, 97.8% and 94.6% with populations from Hubei (China), Viet Nam, Taiwan, Japan and Nigeria, respectively. The GenBank accession number of this rDNA-ITS sequence is HQ403649. **【Conclusion】**The morphological and molecular character indicated that the nematode was *P. coffeae*.

Key words: ramie; root rot disease; morphological characters; rDNA-ITS; *Pratylenchus coffeae*

根腐线虫是引起苕麻败菟的重要原因之一,一旦发生将产生长期的危害,严重威胁着苕麻的高产

* [收稿日期] 2010-12-17

[基金项目] 现代农业产业技术体系建设专项(nycytx-19-S18), 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(0032011024)

[作者简介] 余永廷(1980—), 男, 安徽淮北人, 助理研究员, 博士, 主要从事植物-病原物互作的分子基础以及苕麻病虫害防治研究。
E-mail: yyting23@yahoo.com.cn

[通信作者] 朱爱国(1973—), 男, 湖南常德人, 副研究员, 博士, 主要从事苕麻栽培与遗传育种及生物信息学研究。
E-mail: ibfczag@hotmail.com

和稳产。20 世纪 80 年代,陈洪福等^[1-2]根据苎麻根腐线虫的形态特征将其鉴定为咖啡短体线虫(*Pratylenchus coffeae*)和穿刺短体线虫(*P. penetrans*)。然而,这 2 种线虫常常发生种内变异,给形态区分鉴定带来很多困难。随着现代分子生物技术的发展,分子鉴定技术在植物病原线虫区分及鉴定中已得到广泛应用^[3-5]。在短体线虫方面,Waeyenberge 等^[6]利用 PCR-RFLP 技术,分析了 18 种短体线虫的核糖体 DNA 内部转录间隔区(rDNA-ITS)序列特征,并将这些线虫成功区分。在分析桑尼短体线虫(*P. thornei*)随机扩增产物的基础上,Carrasco-Balasteros 等^[7]开发出特异性 SCAR 引物,可以扩增不同生长阶段的 *P. thornei* 线虫 DNA,为进一步建立线虫诊断体系奠定了基础。Troccoli 等^[8]利用 PCR 技术分析了来自西西里岛的一种短体线虫的 ITS 序列特征,并结合线虫的形态特征将其鉴定为 *P. lentis* n. sp.。利用种群特异性引物,Yan 等^[9]利用 PCR 技术成功检测并区分了土壤中分离的落选短体线虫(*P. neglectus*)和 *P. thornei*,且可以检测到 1 g 土壤中的单条线虫。然而在过去的近 20 年中,关于苎麻根腐病的病原物研究报道还较少,对病原线虫的识别仍然停留在形态鉴定阶段,关于病原物有无变异、优势种如何等问题,目前还未见相关研究报道,给全面认识病原物及对其进行防治带来了很大的困难。本研究首先自沅江苎麻感染根腐病植株根中分离出一种植物病原线虫,然后利用形态学以及分子生物学方法对其进行鉴定,旨在为病原物分子检测方法的建立及苎麻根腐病的防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集 2009-09,从中国农业科学院麻类研究所沅江试验站农场试验田,选择生长矮小、分株少、地下茎及根变成黑褐色、内部呈海绵状腐朽,为典型根腐线虫危害症状的苎麻根腐病重症病株,采集病根,带回实验室,放置在 4 ℃ 冰箱保存。

1.1.2 载体与试剂 大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 、pGM-T Vector、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒小提试剂盒,均购自天根生物技术有限公司;2 $\times$ Power Taq PCR MasterMix,购自百泰克生物技术有限公司;DNA 分子量标准品(DGL 2000 DNA Marker),购自北京鼎国生物技术有限公司;其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 线虫分离 采用改进的贝曼漏斗法^[10]从苎麻根腐病植株根中分离线虫,室温静置 24 h 后取出线虫悬浮液,在 10 倍光学显微镜下观察,选择植物病原线虫,收集到含有少量 ddH₂O 离心管中,并命名为 YJ-1100。

1.2.2 形态观察 将收集的线虫温热杀死,制成临时玻片,用光学显微镜(Olympus)观察、拍照,并记录虫体状态、头冠、口针、食道腺与肠的位置关系、交合伞(刺)特征、尾部特征等。观察雌雄虫各 10~15 条,按照 de Man 公式^[10]测量虫体相关部位位置数据。

1.2.3 分子生物学鉴定 (1)DNA 提取。挑取分离的线虫若干条,用体积分数 70%乙醇表面消毒 2 min,再用无菌水洗涤 2 次。挑取灭菌的单条线虫放入灭菌的 200 μ L PCR 管中(约含 10 μ L 灭菌水),-70 ℃ 放置 1 h,解冻后依次加入 10 $\times$ PCR 缓冲液 3 μ L、蛋白酶 K (2 mg/mL) 5 μ L、灭菌水 12 μ L,65 ℃ 放置 1 h,95 ℃ 20 min,14 000 r/min 离心 2 min,取上清液备用^[11-12]。设置 10 个重复。

(2)PCR 扩增。参考文献[13]的方法,用通用保守性引物 Pc1(5'-CGTAACAAGGTAGCTGTAG-3')和 Pc2(5'-TCCTCCGCTAAATGATATG-3')扩增线虫 ITS 序列,引物由上海生工合成。PCR 反应体系为:DNA 模板(40 ng) 2 μ L, Pc1 (10 μ mol/L) 1 μ L, Pc2 (10 μ mol/L) 1 μ L, 2 $\times$ Power Taq PCR MasterMix (Taq 酶活性 5 U/ μ L) 12.5 μ L,加无菌去离子水至 25 μ L。反应程序:94 ℃ 4 min;94 ℃ 45 s,54 ℃ 45 s,72 ℃ 60 s,32 个循环;72 ℃ 10 min。设置 3 个重复。

(3)PCR 产物的回收、克隆及测序。将 PCR 产物用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离,回收目的 DNA 片段。将纯化的 PCR 产物与 pGM-T 载体连接,连接产物转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α ,经蓝白斑筛选、菌落 PCR 鉴定后获得阳性克隆,将阳性克隆培养并提取重组质粒进行序列测定(上海生工)。测序结果采用序列分析软件 DNASTar (Version 5.0) 和 DNAMAN (Version 6.0) 分析。

2 结果与分析

2.1 苎麻根腐病线虫的形态特征

苎麻根腐病线虫分离结果显示,每克受害病根组织中植物病原线虫数量达 110 条。该病原线虫经温热杀死后呈“J”型。雌虫虫体圆筒形,阴门至头端

体宽几乎相等,肛门后变窄;侧线 4 条;唇环数 2 个,唇区低平,不缢缩,口针强壮,基部球圆形;中食道球圆形,食道腺呈长叶状,覆盖于肠腹、侧面,其长度是体宽的 2~3 倍;排泄孔在神经环附近;单卵巢,卵母细胞单行排列,受精囊卵圆形;尾端宽圆或平截,有

缺刻。雄虫与雌虫形态相似,交合刺弓状,纤细。交合伞包裹尾端。其形态特征(图 1)、测量数据(表 1)与 Roman 等^[14]以及 Siddiqi^[15]报道的咖啡短体线虫的形态特征相似。故将苧麻根腐病根中分离的线虫初步鉴定为咖啡短体线虫。

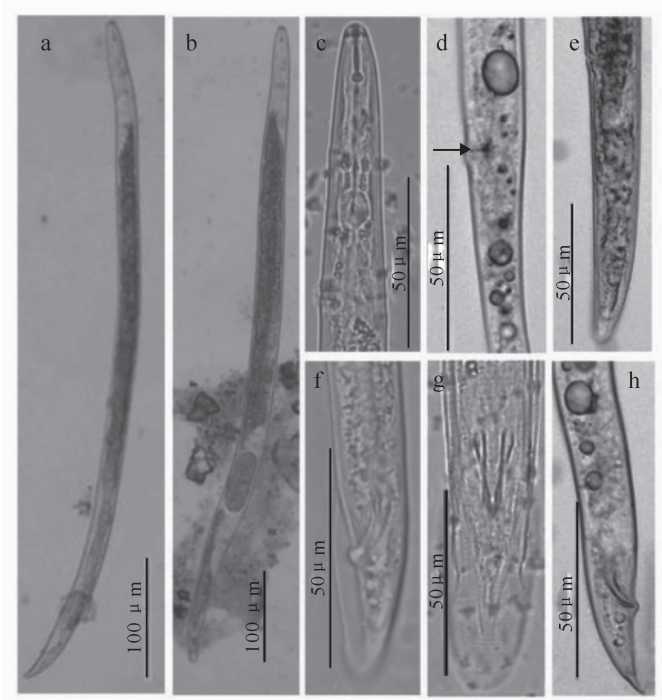


图 1 苧麻根腐病线虫的形态特征
a. 雄虫;b. 雌虫;c. 雌虫前端;d. 阴门(箭头处);e. 雌虫尾端;f~h. 雄虫尾端。放大率:a~b. 100×; c~h. 400×

Fig. 1 Morphology of nematode isolates from rot root of ramie
a. Male;b. Female;c. Anterior of female;d. Vulva region (arrow);e. Tail end of female;f-h. Tail end of male.
Magnification:a-b. 100×, c-h. 400×

表 1 苧麻根腐病线虫形态指标测量值与文献记载线虫的比较

Table 1 Comparison of morphological measurements of a nematode population from ramie rot root with the description of *P. coffeae* in literatures

形态指标 Morphological index	沅江种群 Yuanjiang population		<i>Pratylenchus coffeae</i>			
	♂	♀	♂ ^[14]	♀ ^[14]	♂ ^[15]	♀ ^[15]
n	10	13	25	25		
L/ μ m						
平均值 Average	624.6 $\pm$ 44.8	582.3 $\pm$ 106.5	516.8 $\pm$ 7.9	592.7 $\pm$ 10.5		
观测值 Observation value	584.6~692.3	430.8~715.4	430.7~600.0	516.4~721.2	450~700	450~700
a	28.9 $\pm$ 3.0 (24.9~35.8)	25.3 $\pm$ 4.6 (18.6~32.4)	27.8 $\pm$ 0.5(23.5~32.2)	26.3 $\pm$ 0.6(20.1~33.7)	24~26	25~35
b	6.4 $\pm$ 0.6 (5.7~7.3)	6.4 $\pm$ 1.0 (5.1~8.8)	6.4 $\pm$ 0.1(5.1~7.0)	6.7 $\pm$ 0.1(5.2~7.5)	6~7	5~7
c	22.0 $\pm$ 2.6 (17.4~27.3)	17.1 $\pm$ 3.8 (10.2~23.2)	19.5 $\pm$ 0.3(17.1~23.0)	18.2 $\pm$ 0.3 (14.9~20.8)	17~24	17~22
V		81.0 $\pm$ 1.4 (79.3~82.3)		78.6 $\pm$ 0.3(74.0~79.0)		76~83
St/ μ m	13.3 $\pm$ 1.7 (13.5~16.3)	15.1 $\pm$ 1.2 (13.5~16.3)	14.4 $\pm$ 0.1(13.8~15.6)	15.5 $\pm$ 0.1(14.4~16.8)	15~17	15~18
Sp/ μ m	15.4 $\pm$ 1.1(9.6~15.4)		16.2 $\pm$ 0.3(15.0~18.0)		16~20	

注:n. 样品数;L. 体长;a. 体长/最大体宽;b. 体长/体前端至食道与肠连接处的距离;c. 体长/尾长;V. 体前端至阴门的距离/尾长;St. 口针长;Sp. 交合刺长。

Note;n. Number of sample;L. Body length;a. Ratio of body length and maximal body width;b. Ratio of body length and distance from anterior to joint of gullet and intestine;c. Ratio of body length and tail length;V. Ratio of distance from anterior end to vulva and tail length;St. Stylet length;Sp. Spicule length.

2.2 苕麻根腐病线虫 rDNA-ITS 序列的 PCR 扩增

根据苕麻根腐线虫形态特征,在将其初步鉴定为咖啡短体线虫的基础上,进一步采用分子生物学方法对其进行鉴定。首先提取线虫的 DNA,以提取的线虫 DNA 为模板,用引物 Pc1 和 Pc2 进行 PCR 扩增,得到大小为 1 100 bp 左右的片段(图 2)。将扩增片段回收纯化后,克隆到 pGM-T 载体上,连接转化后,通过菌落 PCR 检测可知,重组质粒中含有目的片段。

2.3 苕麻根腐病线虫的 rDNA-ITS 序列分析

利用 NCBI 网站的 BLASTN 程序,将本试验测序所得序列进行相似性搜索,结果显示,该序列与编号为 HM469441~45(1 029~1 248 bp,湖北种群)、FJ799119(1 249 bp,台湾种群)、FJ827744~47(1 249 bp,台湾种群)、AB053485(959 bp,日本种群)、FJ712902~FJ712906(1 022~1 026 bp,越南种群)、AY561436(1 215 bp,尼日利亚种群)的序列具

有较高的相似度(均在 90%以上),这些均是咖啡短体线虫(*P. coffeae*) rDNA 18S-ITS1-5. 8S-ITS2-28S 的部分序列。将本试验获得 ITS 序列提交至 GenBank,获得登录号 HQ403649。

利用 DNASTar 软件对本试验得到的序列与以上 6 个种群(其中湖北种群、台湾种群 FJ827744~47、越南种群,分别选取序列最长的序列)进行比对,结果表明,其与 AY561436 种群的碱基差异相对较多(51 个碱基),与其他 5 个种群基本无碱基差异。

利用序列分析软件 DNAMAN 对以上序列进行同源性分析,结果(图 3)发现,本试验中苕麻根腐线虫种群与咖啡短体线虫(*P. coffeae*)中国湖北种群(HM469441)的同源性最高(99.8%),其后依次为越南种群(FJ712905,同源性 99.0%)、台湾种群(FJ827747 和 FJ799119,同源性均为 98.0%)、日本种群(AB053485,同源性 97.8%),与尼日利亚种群(AY561436)同源性相对最低(94.6%)。

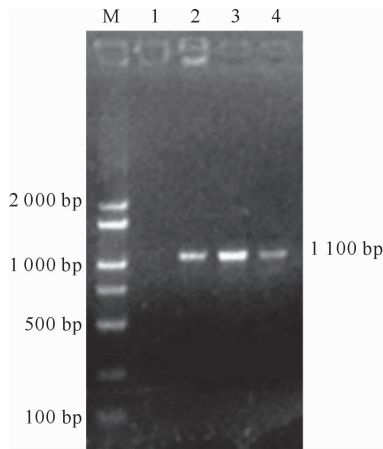


图 2 苕麻根腐病线虫 rDNA-ITS 的 PCR 扩增产物检测
M. DGL2000;1. 阴性对照;2~4. 扩增产物(3 条单个线虫)
Fig. 2 PCR amplification results of the rDNA-ITS region of the nematode of ramie rot root
M. DGL2000;1. Negative control;2-4. Amplification products (three single nematodes)

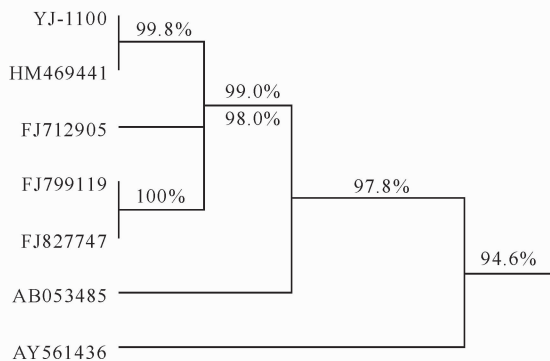


图 3 基于 rDNA-ITS 序列苕麻根腐病线虫种群与其他 6 个线虫种群的同源树
Fig. 3 Construction of homology tree by analysis of rDNA-ITS region sequences of nematode population from rot root of ramie and of other six nematode populations

3 结论与讨论

根据形态特征以及 rDNA-ITS 序列特征,本研究将引起沅江苕麻根腐病的病原线虫鉴定为咖啡短体线虫(*P. coffeae*)。咖啡短体线虫是一种能够危害多种作物的病原线虫,它与穿刺短体线虫均能危害苕麻,二者形态特征比较接近,传统的鉴定及区别方法是利用头部、消化道、尾部及性器官形态特征的不同加以区分。这不仅要求观察几十头甚至上百头线虫,并且要求有较丰富的实践经验。此外,线虫的

种内变异,加大了利用形态特征辨别某些线虫的难度。研究线虫的分子生物学特征就可以解决这一问题。rDNA 在生物体内大量存在,其 ITS 非编码区在个体间差异较小。rDNA-ITS 序列特征常用于种及种下水平的分子鉴定。研究线虫 rDNA 的序列特征,有的利用单条线虫 DNA 作为 PCR 反应的模板^[8,16];有的在挑选线虫后进行纯培养,再以多条线虫的 DNA 作为模板^[6,9]。无论是单条线虫还是多条线虫,所用的线虫(群体)分子生物学背景需一致,试验结果才会可靠。由于单条线虫 DNA 提取方法

已经成熟,本研究采用单条线虫 DNA 作为模板,减少了线虫培养的步骤;此外,单条线虫不仅适合线虫样本量较少的操作,而且适合进行检验与检疫。

本研究分离的苧麻根腐病线虫种群与咖啡短体线虫中国湖北种群同源性最高,与咖啡短体线虫越南种群、中国台湾种群、日本种群、尼日利亚种群的同源性依次降低,同时 2 个咖啡短体线虫台湾种群之间的同源性也最高。这可能是区域差异(比如海洋的阻隔),也可能是由于咖啡短体线虫的种内变异所致。

在本研究的基础上,笔者下一步的工作重点是,将在国内多个苧麻栽培地区采集根腐线虫样品,对其进行 rDNA-ITS 序列特征分析,以期开发出快速检测苧麻根腐线虫的分子生物学技术。

[参考文献]

[1] 陈洪福,张怀方,陈绵才. 苧麻根腐线虫病及其防治方法研究简报 [J]. 中国麻作,1982(4):8-10.
Chen H F,Zhang H F,Chen M C. Research note of root-lesion nematode of ramie and integrated control method [J]. China Fiber Crops,1982(4):8-10. (in Chinese)

[2] 陈洪福,张怀方,陈绵才. 苧麻根腐线虫病及其防治研究 [J]. 中国麻作,1985(1):16,41-45.
Chen H F,Zhang H F,Chen M C. Research of root-lesion nematode of ramie and its integrated control method [J]. China Fiber Crops,1985(1):16,41-45. (in Chinese)

[3] 魏学军,杨文香,刘大群,等. 植物根结线虫分子鉴定研究进展 [J]. 中国农学通报,2006,22(8):401-404.
Wei X J,Yang W X,Liu D Q,et al. Recent advances of studies on molecular identification of plant root-knot nematodes [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin,2006,22(8):401-404. (in Chinese)

[4] 欧师琪,彭德良,李 玉. 禾谷孢囊线虫(*Heterodera avenae*)的分子鉴定及抗性基因研究进展 [J]. 植物保护,2008,34(6):7-11.
Ou S Q,Peng D L,Li Y. Research progress on molecular diagnosis and resistance genes of the cereal cyst nematode, *Heterodera avenae* [J]. Plant Protection,2008,34(6):7-11. (in Chinese)

[5] 赵 鸿,彭德良,朱建兰. rDNA-ITS-PCR 技术在植物寄生线虫分子诊断中的应用 [J]. 植物检疫,2004,18(2):100-105.
Zhao H,Peng D L,Zhu J L. Application of rDNA-ITS-PCR technique in molecular diagnosis of plant parasitic nematodes [J]. Plant Quarantine,2004,18(2):100-105. (in Chinese)

[6] Waeyenberge L,Ryss A,Moenis M,et al. Molecular characterization of 18 *Pratylenchus species* using rDNA restriction fragment length polymorphism [J]. Nematology,2000,2(2):135-142.

[7] Carrasco-Ballesteros S,Castillo P,Adams B J,et al. Identification of *Pratylenchus thornei*, the cereal and legume root-lesion nematode, based on SCAR-PCR and satellite DNA [J]. European Journal of Plant Pathology,2007,118(2):115-125.

[8] Troccoli A,De Luca F,Handoo Z A,et al. Morphological and molecular characterization of *Pratylenchus lentis* n. sp. (Nematoda;Pratylenchidae) from Sicily [J]. Journal of Nematology,2008,40(3):190-196.

[9] Yan G P,Smiley R W,Okubara P A,et al. Detection and discrimination of *Pratylenchus neglectus* and *P. thornei* in DNA extracts from Soil [J]. Plant Disease,2008,92:1480-1487.

[10] 谢 辉. 植物线虫分类学 [M]. 2 版. 北京:高等教育出版社,2005.
Xie H. Taxolomy of plant nematodes [M]. 2nd ed. Beijing: Higher Education Press,2005. (in Chinese)

[11] 沈锡权,杨官品,廖梅杰. 单条固定线虫基因组 DNA 提取及 18S rRNA 基因 PCR 扩增 [J]. 海洋科学,2005,29(5):33-36.
Shen X Q,Yang G P,Liao M J. Isolation of fixed nematode individual genomic DNA and amplification of 18S ribosomal RNA gene fragments [J]. Marine Sciences,2005,29(5):33-36. (in Chinese)

[12] 陈晓玲,陈永红,张红玲,等. 咖啡短体线虫的分子鉴定 [J]. 植物检疫,2009,23(2):7-9.
Chen X L,Chen Y H,Zhang H L,et al. Molecular identification for *Pratylenchus coffea* [J]. Plant Quarantine,2009,23(2):7-9. (in Chinese)

[13] Ferris V,Ferris J,Faghihi J. Variation in spacer ribosomal DNA in some cyst-forming species of plant parasitic nematodes [J]. Fundamental and Applied Nematology,1993,16:177-120.

[14] Roman J,Hirschmann H. Morphology and morphometrics of six species of *Pratylenchus* [J]. Journal of Nematology,1969,1(4):363-386.

[15] Siddiqi M R. *Pratylenchus coffea* [M]//CIH. Descriptions of plant-parasitic nematodes. St Albans:Commonwealth Institute of Helminthology,1972.

[16] 杨佩文,王 峰,王 洋,等. 马尾松萎蔫病树一种线虫分离物的鉴定 [J]. 植物病理学报,2004,34(6):495-500.
Yang P W,Wang F,Wang Y,et al. Identification of a nematode isolate from wilt *Pinus massoniana* [J]. Acta Phytopathologica Sinica,2004,34(6):495-500. (in Chinese)