

日本仙人掌中仙人掌孢囊线虫形态和分子鉴定

龙海^{1,2}, 李芳荣¹, 程颖慧¹, 谢泳桂¹, 李一农^{1*}

¹深圳出入境检验检疫局, 广东 深圳 518001; ²深圳市检验检疫科学研究院,
深圳市外来有害生物检测技术研发重点实验室, 广东 深圳 518045

摘要: 【背景】近年来, 种苗等植物通过邮寄包裹进入我国的数量越来越多, 有害生物随之入侵的风险与日俱增。深圳口岸曾多次从入境包裹中截获孢囊线虫、根结线虫等。【方法】2015年10月12日, 深圳口岸在对日本邮寄来的仙人掌进行检疫时, 从其根部发现了一种孢囊线虫。对该线虫进行分离, 结合形态学和28S rDNA序列扩增并测序的方法, 对截获的线虫进行鉴定。【结果】分离到了一种孢囊线虫, 其形态特征与仙人掌孢囊线虫基本吻合, 28S rDNA序列与GenBank数据库中登录号为DQ328702的德国群体的同源性高达99%。因此, 判定截获的线虫为仙人掌孢囊线虫。【结论与意义】入境包裹检疫需要引起口岸检疫部门的高度重视。采用形态学和分子生物学相结合的方法对植物寄生线虫进行鉴定, 可以得到更加准确的结果。

关键词: 仙人掌孢囊线虫; 邮检; 形态学; 分子鉴定

Morphological and molecular identification of the plant-parasitic nematode *Cactodera cacti*, intercepted in shipments of *Opuntia stricta* from Japan

Hai LONG^{1,2}, Fang-rong LI¹, Ying-hui CHENG¹, Yong-gui XIE¹, Yi-nong LI^{1*}

¹Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen, Guangdong 518001, China; ²Shenzhen Key Laboratory of Inspection Research & Development of Alien Pests, Shenzhen Academy of Inspection and Quarantine, Shenzhen, Guangdong 518045, China

Abstract: 【Background】In recent years, the number of seedlings imported by parcel post increased sharply, increasing the potential risk of entry of new pests. Shenzhen port has repeatedly intercepted cyst and root knot nematodes from such shipments. 【Method】In October 12, 2015, Shenzhen port found a kind of cyst nematode in the cactus shipments from Japan. Then the nematodes were identified with morphological methods and 28S rDNA sequence amplification and sequencing. 【Result】Extracted nematode life forms included females, cysts, juveniles and eggs. Morphological characteristics of the intercepted cyst nematode were basically consistent with *Cactodera cacti*, and the 28S rDNA of which matched well (99% similarity) with those of the *C. cacti* deposited in GenBank (accession number DQ328702). According to the morphological and molecular data, the intercepted cyst nematode was confirmed to be the cactus cyst nematode, *C. cacti*, so far not known to occur in China. 【Conclusion and significance】Inspection and quarantine departments need to pay more attention to the parcel post shipments containing plant material. Plant parasitic nematodes identified with the combination of morphological and molecular methods, will yield more accuracy.

Key words: *Cactodera cacti*; quarantine of imported parcel post; morphology; molecular identification

仙人掌孢囊属线虫 *Cactodera* 隶属线虫门 Nematoda 侧尾腺纲 Secernentea 垫刃目 Tylenchida 异皮科 Heteroderidae 异皮亚科 Heteroderinae, 是植物根系的一类固定性内寄生线虫(谢辉, 2000), 目前已报道 14 个种(罗诺德·佩里和莫里斯·莫恩斯, 2011), 可通过种苗进行远距离传播。仙人掌孢囊线虫最早在荷

兰的仙人掌中被发现, 并被描述为甜菜孢囊线虫 *Heterodera schachtii*, 1941 年 Filipjev 和 Schuurmans Stekhoven 把该种线虫命名为 *Heterodera cacti*, 1978 年又更名为 *Cactodera cacti* (Esser, 1992)。该线虫在五大洲都有分布, 我国曾在厦门(潘沧桑等, 1997)和辽宁 (Duan *et al.*, 2012) 发现该线虫。

收稿日期(Received): 2016-03-04 接受日期(Accepted): 2016-06-03

作者简介: 龙海, 男, 高级农艺师。研究方向: 植物线虫检疫。E-mail: longsi1979@163.com

* 通讯作者(Author for correspondence), E-mail: li_yinong@126.com

2015 年 10 月 12 日,深圳口岸在对日本邮寄来的仙人掌进行检疫时,从其根部发现了一种孢囊线虫,本试验对其形态学和分子生物学特征进行鉴定,以期为该线虫的检疫与防控提供依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集与线虫分离

取仙人掌的根和根际土壤约 500 g,放入封口袋中,做好标签,送至实验室。取约 250 g 样品,用双层纱布包好,置于漏斗中,加入清水至刚好没过样品,25 ℃ 放置 12~24 h(毛小芳等,2004)。用凹面皿接取线虫悬浮液 10 mL,在体式显微镜下检查,发现 2 龄幼虫后,用直接过筛法分离其孢囊(Subbotin *et al.*,2010)。

1.2 形态学鉴定

挑取线虫制成临时玻片,在光学显微镜(Zeiss Zmager MI)下观察,用 Zeiss AxioCam HRC 数码相机对线虫进行拍照,并用 AxioVision 4.8.2 自带的测量软件和 de Man 公式法(de Man,1884)对雌虫进行测计。

1.3 分子生物学检测

提取单条 2 龄幼虫的 DNA,方法参见 Long *et al.*(2006),28S rDNA 基因 PCR 扩增参见顾建锋等

(2013)。PCR 扩增产物送深圳华大基因有限公司测序,用 BioEdit 7.0 (Hall,1999)对序列进行编辑,在 GenBank 数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov)中进行 BLAST 分析,用 MEGA 4.0(Tamura *et al.*,2007)构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 形态描述

2 龄幼虫:虫体蠕虫状,唇区轻微缢缩;口针基部球圆形,头架明显(图 1A);侧区有 4 条刻线,食道腺充满体腔(图 1B);尾呈细长圆锥形,末端钝圆,具明显的透明区(图 1C)。

雌虫:虫体呈柠檬形到近球形,珍珠白色、黄色或金色;颈部缢缩,阴门锥凸出。

孢囊:通常为柠檬形,有时圆形,颈和阴门凸出,浅褐色或中等褐色(图 1D)。阴门凸位于膜孔下面紧接膜孔的位置,有时不明显;阴门锥无囊泡和下桥,有阴门小齿和环膜孔。

卵:椭圆形,长度约为宽度的 2 倍,卵壳刻点明显(图 1D)。

雄虫:未见。

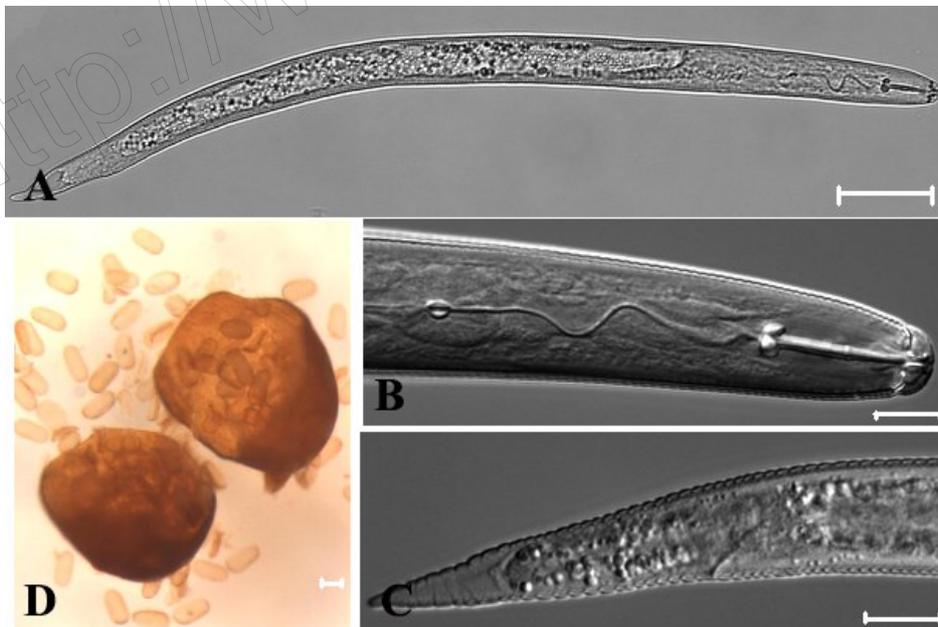


图 1 孢囊线虫形态

Fig.1 Light microscopic images of cyst nematode

A:2 龄幼虫虫体(标尺:50 μm);B:2 龄幼虫前体部(标尺:10 μm);C:2 龄幼虫尾部(标尺:10 μm);D:孢囊和卵(标尺:50 μm)。

A: Whole body of second stage juvenile (J2) (scale bar: 50 μm); B: Head regions of J2 (scale bar: 10 μm);

C: Tail regions of J2 (scale bar: 10 μm); D: Cyst and eggs (scale bar: 50 μm).

2.2 形态测量值

2 龄幼虫形态测量值如表 1 所示。

表 1 孢囊线虫 2 龄幼虫日本群体形态测量值与仙人掌孢囊线虫文献记述的比较

Table 1 Morphometric comparison of J2 of cyst nematode Japanese population with *C. cacti* reported in the literature

种群 Population	体长 (L) Body length (μm)	体长/最大体宽 (s) Body length/Max. body width ratio	体长/体前端至食道与肠连接处的距离 (b) Body length/oesophagus length ratio	体长/肛门处体宽 (c') Tail length/width at anus ratio	口针长 Stylet length (μm)	DGO (μm)	n	
日本 Japan	508.4±23.4(469~563)	22.5±1.3(19.6~24.1)	2.5±0.2(2.3~3.0)	9.0±0.4(8.3~9.9)	24.5±0.7(22.8~25.8)	5.0±0.6(4.1~6.6)	20	
荷兰 Netherlands ^①	485.8(428~584)	22.0(19.2~29.4)	6.0(5.6~6.8)	9.4(8.4~10.5)			15	
意大利 Italy ^②	409.0(364~453)	18.0(15~20)	2.6(2.1~3.1)	8.9(7.8~10.1)	23.5(22.4~24.6)	3.8(3.4~4.6)	50	
墨西哥 Mexico ^②	418.0(376~451)	19.0(17~21)	2.7(2.5~3.7)	9.9(9.5~10.7)	23.4(22.4~24.0)	5.0(4.5~6.1)	25	
美国 America ^②	432.0(412~451)	19.4(18~21)	2.8	9.9(9.5~10.7)	22.9(22.4~24.0)	3.8(3.4~4.5)	23	
中国 China ^③	539.6±22.5(512.2~548.7)	23.8±2.8(20.2~26.8)	3.6±0.6(2.9~4.3)	10.2±0.5(9.6~10.3)	27.8±0.8(26.0~28.5)	4.8±0.6(4.4~5.5)	10	
种群 Population	头端至口针基部球 Anterior end to stylet knob base (μm)	头端至中食道球 Anterior end to center of median bulb (μm)	头端至排泄孔 Anterior end to excretory pore (μm)	唇高 Lip height (μm)	唇宽 Lip width (μm)	尾长 Tail (μm)	透明区长 Tail hyaline terminus (μm)	n
日本 Japan	27.2±0.5(26.3~28.4)	75.7±4.1(66.1~82.8)	115.2±10.1(96.9~144.8)	4.7±0.3(3.7~5.2)	10.4±0.08(8.2~12.4)	55.6±2.5(49.4~59.8)	19.0±1.9(16.3~23.3)	20
荷兰 Netherlands ^①	25.2(22.0~28.2)	80.0(64~92)	103.4(96~128)	5.2		51.4		15
意大利 Italy ^②		33.0(26~38)	(101~108)	3.5(2.8~4.5)	6.9(6.2~8.4)	46.0(36~52)	15.7(12~19)	50
墨西哥 Mexico ^②		39.0(35~42)		3.5(2.8~4.5)	7.0(6.2~8.4)	43.0(34~48)	19.0(14~21)	25
美国 America ^②		40.0(38~44)		2.6(2.2~3.4)	7.2(6.2~7.8)	44.0(39~48)	17.2(14.5~19.6)	23
中国 China ^③						54.0±3.2(49.4~58.3)	20.2±3.2(16.5~22.0)	10

① 参见 Adam (1932); ② 参见 Golden & Raski (1977); ③ 参见潘沅桑等(1997)。括号中的数据表示测量的最小值和最大值。DGO = 口针基部球末端至背食道腺开口的距离; n = 测计样本数。
 ① Refer to Adam (1932); ② Refer to Golden & Raski (1977); ③ Refer to Pan et al. (1997) (in Chinese). Data in bracket are the minimum value and the maximum value. DGO = Distance between the end of the stylet knobs and the dorsal esophageal gland opening; n = Number of measured samples.

依据行业标准《仙人掌孢囊属线虫检疫鉴定方法》(国家质量监督检验检疫总局,2015),本试验分离到的孢囊线虫日本群体形态特征及 2 龄幼虫测量值与文献记述的仙人掌孢囊线虫基本一致。

2.3 分子生物学特征分析

用引物 D2A/D3Br 对单条 2 龄幼虫进行 PCR 扩增,结果见图 2,扩增产物长 750 bp 左右(GenBank 登录号分别为 KX230467 - KX230473)。BLAST 分析结果表明,孢囊线虫日本群体的 28S rDNA 基因序列与 GenBank 登录号为 DQ328702 的德国群体的同源性高达 99%。基于 28S rDNA 基因序列的系统发育树(图 3)表明,孢囊线虫日本群体和德国群体位于一个进化枝上,亲缘关系最近。

综合形态学比较和分子生物学分析得出,从日本邮寄的仙人掌中截获的孢囊线虫为仙人掌孢囊线虫 *Cactodera cacti*。

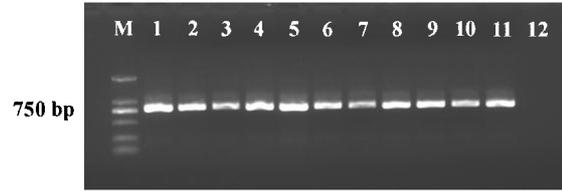


图 2 2 龄幼虫 PCR 扩增产物

Fig.2 PCR products amplified from second stage juveniles
M:DL2000 marker; 1~11:2 龄幼虫的扩增产物;12:阴性对照(水).
M: DL2000 molecular marker; lines 1~11: Second stage juvenile individuals; line 12: Negative control (H₂O).

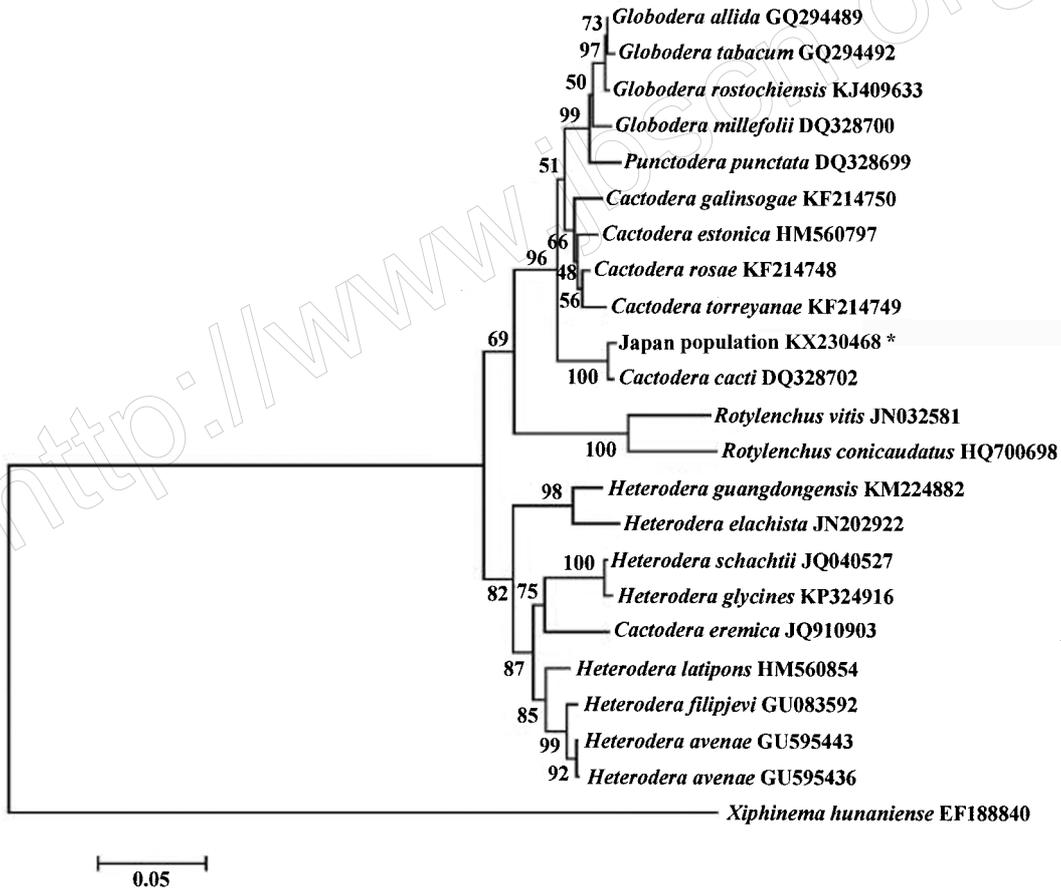


图 3 28S rDNA 序列构建的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree based upon sequences of D2/D3 expansion region of the 28S rRNA gene

* 表示本试验分离的孢囊线虫。

* indicates the cyst nematode in this paper.

3 讨论

通过形态描述和测量值比较,初步判断从日本邮寄的仙人掌中截获的线虫为仙人掌孢囊线虫。与其他地区群体(潘沧桑等,1997; Adam, 1932;

Golden & Raski, 1977)相比,日本群体 2 龄幼虫的 b 值、口针长和 DGO 的变化较大,其余测量值的变化相对较小。为了对形态学鉴定结果进行验证,本试验分析了 2 龄幼虫的 28S-D2/D3 区的序列和系统发

育关系,结果表明该日本群体与仙人掌孢囊线虫的亲缘关系最近,因此将其鉴定为仙人掌孢囊线虫。

寄主植物被仙人掌孢囊线虫侵染后,地上部分表现出生长缓慢、矮化、萎蔫、叶片褪绿等症状,地下根组织出现短小、稀疏、分叉等症状,但不会形成根瘤。仙人掌孢囊线虫的寄主包括仙人掌科 Cactaceae、伞形科 Umbelliferae、大戟科 Euphorbiaceae、景天科 Crassulaceae、桑科 Moraceae、夹竹桃科 Apocynaceae、萝藦科 Asclepiadaceae、菊科 Asteraceae 和木犀科 Oleaceae 的部分种、属(国家质量监督检验检疫总局,2015)。目前,有关该线虫对寄主植物的危害程度还不清楚,暂未被列入我国进境植物检疫性有害生物名录。

随着我国生态文明建设的推进,大量的种苗和观赏植物通过货物进口、旅客携带和包裹邮寄等途径进入我国。2014年,我国进境邮检截获检疫性线虫4种7批次(张静秋等,2015),也多次从德国和意大利的邮件中截获仙人掌孢囊线虫。植物线虫通过邮寄渠道入侵我国的风险日益严峻。因此,口岸除了做好进境种苗货检和旅客携带物的检疫外,还需加强对邮寄包裹的检疫。

参考文献

顾建锋,王江岭,邵芳,高菲菲,葛建军,2013. 日本鸡爪槭中苹果根结线虫的鉴定. 植物检疫, 27(1): 43-49.

国家质量监督检验检疫总局,2015. 仙人掌孢囊属线虫检疫鉴定方法: SN/T 4079—2014. 北京: 中国标准出版社.

罗诺德·佩里,莫里斯·莫恩斯,2011. 植物线虫学. 简恒,译. 北京: 中国农业大学出版社.

毛小芳,李辉信,陈小云,胡锋,2004. 土壤线虫三种分离方法效率比较. 生态学杂志, 23(3): 149-151.

潘沧桑,林竞,薛茹,1997. 仙人掌仙人掌皮线虫(*Cactodera cacti*)记述及其扫描电镜观察. 寄生虫与医学昆虫

学报, 4(4): 214-217.

- 谢辉,2000. 植物线虫分类学. 合肥: 安徽科学技术出版社.
- 张静秋,陈克,严进,郑明慧,黄英,潘绪斌,朱水芳,2015. 2010-2014年中国进境邮检截获数据分析. 植物检疫, 29(5): 53-56.
- Adam W, 1932. Note sur *Heterodera schachtii* Schm., parasite des cactus. *Bulletin du Muséum d'Histoire Naturelle de Belgique*, 8: 1-10.
- de Man J G, 1884. *Difrei in der reinen Erde und im süssen Wasser lebenden Nematoden der Niederländischen Fauna*. Leiden, the Netherlands: Brill.
- Duan Y X, Wang D and Chen L J, 2012. First report of the cactus cyst nematode, *Cactodera cacti*, on cactus in Northern China. *Plant Disease*, 96(9): 1385.
- Esser R P, 1992. *Cactuscyst Nematode, Cactodera cacti* (*Nematology Circular*, no. 197). Florida: Florida Department of Agriculture and Consumer Service.
- Golden A M and Raski D J, 1977. *Heterodera thornei* n. sp. (Nematoda: Heteroderidae) and a review of related species. *Journal of Nematology*, 9(2): 93-112.
- Hall T A, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- Long H, Liu H and Xu J H, 2006. Development of a PCR diagnostic for the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 36(2): 109-115.
- Subbotin S A, Mundo-Ocampo M and Baldwin J G, 2010. *Systematics of Cyst Nematodes (Nematoda: Heteroderinae)*. Leiden, the Netherlands: Brill.
- Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S, 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8): 1596-1599.

(责任编辑:杨郁霞)