

# 鸢尾种苗中截获的草莓滑刃线虫形态和分子鉴定

王 晨<sup>1</sup>, 俞禄珍<sup>2</sup>, 宋绍禧<sup>2\*</sup>, 李友军<sup>2</sup>, 田沂民<sup>2</sup>

(1. 上海东郁园林科技有限公司, 上海 200062; 2. 中华人民共和国上海海关, 上海 200135)

**摘要** 草莓滑刃线虫是一种重要的叶和芽寄生线虫,可侵染多种重要花卉、经济作物,被列入我国检疫性有害生物名录。目前,草莓滑刃线虫的鉴定以形态学鉴定为主,但一线口岸常分离不到雌虫,鉴定困难。本研究采用形态特征和分子特征相结合的方法对草莓滑刃线虫进行鉴定;对鸢尾种苗中截获的滑刃属线虫群体雌虫、雄虫进行形态观察和形态测计并与已报道文献进行比较;PCR 扩增该群体的 rDNA-ITS 区并测序,构建基于 ITS 序列的系统发育进化树;采用草莓滑刃线虫特异引物对该群体 DNA 样本进行扩增。结果表明:该群体与草莓滑刃线虫俄罗斯种群的测量值相接近;系统进化关系分析显示,该群体与 NCBI 公布的草莓滑刃线虫均处于同一进化支;采用草莓滑刃线虫特异引物 PCR 扩增可产生片段大小为 169 bp 的目的条带。

**关键词** 草莓滑刃线虫; 形态学特征; 系统发育分析; 鉴定

**中图分类号:** S 436.8 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2019039

## Morphological and molecular identification of *Aphelenchoides fragariae* intercepted in seedlings of iris bulbs

WANG Chen<sup>1</sup>, YU Luzhen<sup>2</sup>, SONG Shaoyi<sup>2\*</sup>, LI Youjun<sup>2</sup>, TIAN Yimin<sup>2</sup>

(1. Shanghai Orisis Landscape Science and Technology Company, Shanghai 200062, China;

2. Shanghai Customs District P.R.China, Shanghai 200135, China)

**Abstract** *Aphelenchoides fragariae* is a kind of important leaf and bud parasitic nematode, which can infect a variety of important flowers and cash crops. It was listed as a quarantine pest in China. At present, the identification of *A. fragariae* is mainly based on morphological characters, but the females are often unobtainable in the ports, which makes the morphological identification difficult. In this study, we identified *A. fragariae* through the combination of morphological and molecular features: the morphology of females and males were observed and morphometrics was conducted for *Aphelenchoides* spp. in iris bulbs; the ITS regions of ribosomal DNA were amplified and the PCR products were sequenced, and then a phylogenetic tree was constructed based on the ITS sequences. In addition, the species-specific primers were used to validate the identification. The results showed that the *Aphelenchoides* spp. were similar to those previously described based on morphological and morphometric comparisons. Phylogenetic analyses revealed that the *Aphelenchoides* spp. were grouped with *A. fragariae* from different origins. A single band of 169bp was amplified using species-specific primers.

**Key words** *Aphelenchoides fragariae*; morphological character; phylogenetic analysis; identification

草莓滑刃线虫 *Aphelenchoides fragariae* 是一种叶和芽寄生线虫,可侵染多种重要花卉、经济作物,造成叶片、幼芽、嫩枝严重损伤,是极具破坏性的、具有重要经济意义的线虫<sup>[1-2]</sup>。草莓是该线虫典型的寄主,感染该线虫后,植株结果量大大减少且果小、歪曲,严重影响草莓的品质及产量<sup>[3-5]</sup>。该线虫还可侵染蕨类、百合科、石蒜科、鸢尾科、毛茛科、菊

科、报春花科等 250 多种植物,其中涉及多种经济价值较高的观叶、观花植物,已成为世界多个国家花卉产业的重要威胁之一<sup>[2-5]</sup>。该线虫被我国列入检疫性有害生物名录。2017 年—2018 年,上海口岸多次在进境铃兰 *Convallaria majalis*、酢浆草 *Oxalis corniculata*、落新妇 *Astilbe chinensis*、芍药 *Paeonia lactiflora* 等观赏花卉种苗中截获草莓滑刃线虫。

收稿日期: 2019-01-21

修订日期: 2019-04-03

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC1200600);上海出入境检验检疫科研项目(HK003-2017)

\* 通信作者 E-mail: songshhg@126.com

目前,草莓滑刃线虫的鉴定以传统的形态学鉴定为主,但草莓滑刃线虫及其近似种的形态特征极其相似,采用传统的形态学鉴定方法难以区分;且分离不到雌虫时,仅靠幼虫或雄虫无法进行准确鉴定,故该法的使用局限性较大。本实验室通过查阅国内外文献并开展试验摸索,建立了草莓滑刃线虫形态学与分子生物学相结合的鉴定技术,可供参考使用,现将上海口岸进境一批次鸢尾种苗中草莓滑刃线虫的检疫过程报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 线虫分离

口岸进境的鸢尾种苗为繁殖材料:地下部分根系稍修剪,地上部分修剪后高度仅 5 cm 左右(含基部茎、叶及芽)。剪取鸢尾种苗的地上部分,采用浅盘法进行线虫分离。次日,过 500 目网筛收集线虫,在体视显微镜下镜检。

### 1.2 形态学鉴定

挑取线虫制成临时玻片,在光学显微镜下进行形态观察、拍照及测量,并采用 de Man 公式对线虫进行测计。

### 1.3 分子生物学鉴定

#### 1.3.1 线虫 DNA 提取

用挑针挑取线虫若干条,放入去离子水中洗涤 3 次,备用。挑取单条经过洗涤的线虫,用挑针捅破或割成多段,采用 DNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen)试剂盒提取 DNA。

#### 1.3.2 通用引物 PCR 扩增

采用线虫 ITS 通用引物对线虫 DNA 进行 PCR 扩增:引物为 F194 (5'-CGTAACAAGGTAGCTG-TAG-3'), 5368r (5'-TTTCACTCGCCGTTACTA-AGG-3')<sup>[6-7]</sup>。

PCR 反应体系包括:10 × PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> free) 2.5 μL, 25 mmol/L Mg<sup>2+</sup> 2 μL, 2.5 mmol/L dNTP Mix 2 μL, 5 μmol/L 引物各 0.5 μL, 模板 DNA 2 μL, 5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.4 μL, ddH<sub>2</sub>O 15.1 μL,总体积 25 μL。扩增程序为:94℃ 3 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 90 s,40 个循环;72℃ 10 min。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶 1 × TAE 缓冲液中电泳,EB 染色后用凝胶成像系统分析。

将所得 PCR 产物送上海生工生物有限公司进

行测序,测得的序列用 Clustal X 程序比对后进行校对和拼接,并在 GenBank 中 BLAST,进行序列分析,利用 MEGA6.0 软件以最大似然法(Maximum Likelihood, ML)构建系统进化树。

#### 1.3.3 特异引物 PCR 扩增

采用草莓滑刃线虫的特异引物对线虫 DNA 进行 PCR 扩增:上游引物 AFragFl (5'-GCAAGT-GCTATGCGATCTTCT-3'), 下游引物 AFragRl (5'-GCCACATCGGGTCATTATTT-3')<sup>[2]</sup>。反应体系同 1.3.2,扩增程序参照 McCuiston 等<sup>[2]</sup>。预期扩增产物片段大小为 169 bp<sup>[2]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 形态学描述

雌虫:虫体细长,热杀死后虫体直到弯;侧区窄,侧线 2 条。头部稍高、光滑,前端平,略缢缩;口针细,口针基部球小而明显。食道体部呈细长管状,中食道球明显,呈长卵圆形。食道腺长叶状,背覆盖肠。阴门位于体中后部,阴门唇稍突起,阴门横裂,阴道向前倾斜,阴道长约阴门处体宽的 1/2。单卵巢,前伸,卵母细胞单行排列。受精囊长卵圆形,通常有精子。后阴子宫囊长囊状,长度超过肛阴距的 1/2,常有精子。尾长圆锥形,末端尖细,中间有一钝的尾尖突。

雄虫:热杀死后虫体尾部向腹面弯曲,体前部与雌虫相似。单精巢,前伸,精母细胞单行排列。交合刺玫瑰刺形,有中等发达的基顶和基喙,交合刺背缘长 19.2~22.2 μm。尾部具 3 对尾乳突,分别位于肛门后、尾中部和近尾端处。尾圆锥形,末端有 1 个钝的尾尖突。

### 2.2 测量值

本研究种群草莓滑刃线虫雌虫的形态测量值和其他种群比较结果显示:与 Chizhov<sup>[9]</sup>描述的俄罗斯种群相比,*a*、*b*、*c*、*c'*、*V* 值基本吻合;其他测量值体长、口针长、尾长较长,但其数值范围部分重叠。与顾建锋描述的荷兰种群相比,*b*、*c*、*V* 值及口针长一致性较高;虽本种群体长较长,但在荷兰种群的范围内;*a* 值存在一定差异。与国内刘维志描述的种群相比,*b*、*c'*、*V* 值、口针长、尾长较一致;*L*、*a*、*c* 值较大,但测量值均有重叠范围。雄虫测量值体长、口针长较其他种群较长,*a*、*b*、*c* 值均与各种群测量值范围大部分重叠。

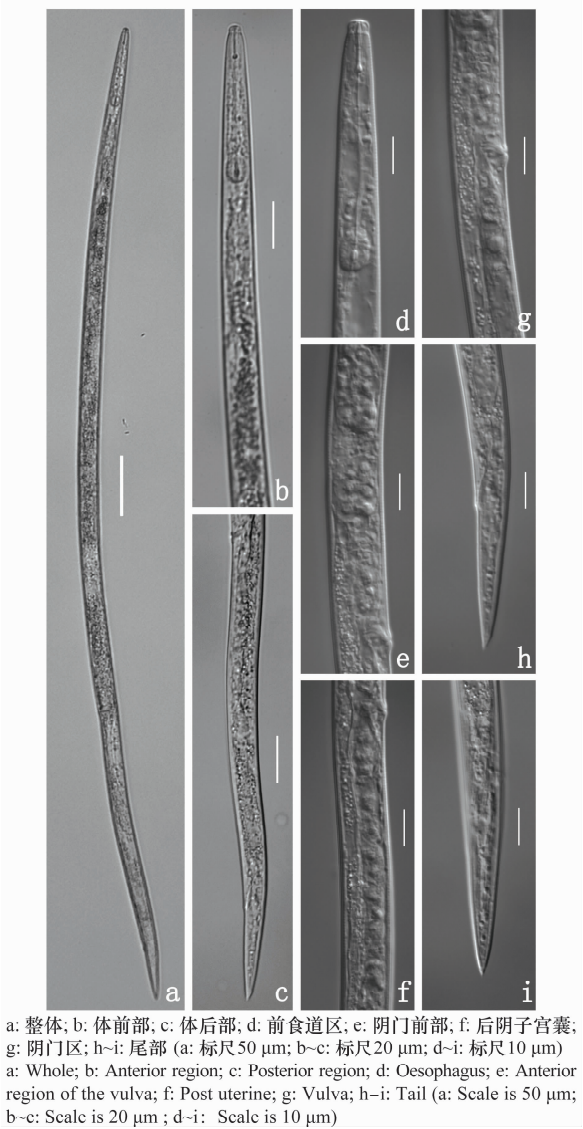


图 1 草莓滑刃线虫雌虫形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of female *Aphelenchoides fragariae*

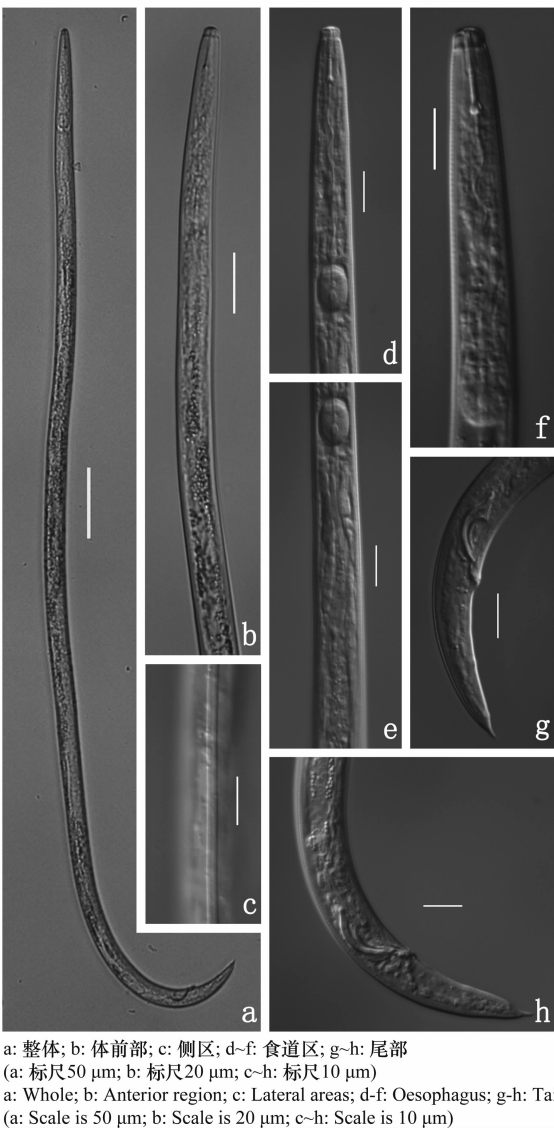


图 2 草莓滑刃线虫雄虫形态特征

Fig. 2 Morphological characteristics of male *Aphelenchoides fragariae*

表 1 鸢尾种苗中截获的草莓滑刃线虫雌虫与其他种群的测量值比较<sup>1)</sup>

Table 1 Comparison of measured values between different populations of female *Aphelenchoides fragariae*

| 形态指标<br>Morphological character | 本研究种群<br>Population in this study | 中国种群 <sup>[3]</sup><br>Population from China | 荷兰种群 <sup>[8]</sup><br>Population from Netherlands | 俄罗斯种群 <sup>[9]</sup><br>Population from Russia |
|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| <i>n</i>                        | 10                                | 20                                           | 20                                                 | 25                                             |
| <i>L</i>                        | 755.4±74.8(620.8~876.7)           | 624.2(528~777)                               | 685(470~960)                                       | 579±43(525~685)                                |
| <i>a</i>                        | 47.1±4.0(40.4~53.1)               | 42.8(37.6~52.8)                              | 30.4(24.3~35.4)                                    | 48.7±4.8(37.1~59.8)                            |
| <i>b</i>                        | 8.7±0.5(8.0~9.6)                  | 8.7(8.2~9.4)                                 | 9.3(7.8~12)                                        | 8.1±0.3(7.6~9.1)                               |
| <i>c</i>                        | 18.0±1.2(16.2~19.5)               | 15.4(14.6~17.3)                              | 18.7(15.7~20.6)                                    | 17.0±1.2(15.2~20.6)                            |
| <i>c'</i>                       | 4.4±0.4(3.8~5.4)                  | 4.9(4.4~5.8)                                 |                                                    | 4.7±0.3(3.6~5.7)                               |
| <i>V</i>                        | 69.3±0.5(68.5~69.9)               | 68.1(66.5~71.3)                              | 70.8(68~71)                                        | 69±2(65~74)                                    |
| 口针长 Stylet length               | 11.5±0.2(11.2~11.9)               | 10.7(10.1~11.8)                              | 10~12                                              | 9(8~11)                                        |
| 尾长 Tail length                  | 42.1±4.7(36.9~54.2)               | 40.5(36.3~46.3)                              |                                                    | 34(28~40)                                      |

1) *n* 代表样本数; *L* 为体长; *a* 为体长与最大体宽的比值; *b* 为体长与体前端至食道与肠连接处长度的比值; *c* 为体长与尾长的比值; *c'* 为尾长与肛门处体宽的比值; *V* 为体前端至阴门的距离×100/体长。(长度测量单位为 μm)。下同。  
*n*: Number of sample; *L*: Body length; *a*: Body length/maximum body width; *b*: Body length/oesophageal length; *c*: Body length/tail length; *c'*: Tail length/body width at anus; *V*: Distance from head end to vulva×100/body length. Unit of length is μm. The same below.

表 2 鸢尾种苗中截获的草莓滑刃线虫雄虫与其他种群的测量值比较

Table 2 Comparison of measured values between different populations of male *Aphelenchoides fragariae*

| 形态指标<br>Morphological character | 本研究种群<br>Population in this study | 中国种群 <sup>[3]</sup><br>Population from China | 荷兰种群 <sup>[8]</sup><br>Population from Netherlands | 俄罗斯种群 <sup>[9]</sup><br>Population from Russia |
|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| <i>n</i>                        | 10                                | 15                                           | 20                                                 | 24                                             |
| <i>L</i>                        | 688.7±53.7(624.3~812.8)           | 613.8(587~655)                               | 610(480~690)                                       | 493±37(435~562)                                |
| <i>a</i>                        | 49.4±4.9(44.5~63.0)               | 43.1(42.7~45.4)                              | 36.5(30.5~46.7)                                    | 46.8±3.1(41.2~54.8)                            |
| <i>b</i>                        | 8.1±0.4(7.1~8.6)                  | 9.0(8.6~9.5)                                 | 9.6(8.3~11.6)                                      | 7.2±0.4(6.5~8.1)                               |
| <i>c</i>                        | 17.5±1.4(15.7~20.1)               | 16.3(15.8~17.1)                              | 18.1(16.5~19.2)                                    | 18.5±1.8(15.9~24.1)                            |
| 口针长 Stylet length               | 12.3±0.1(12.0~12.5)               | 10(10~11.1)                                  |                                                    | 9(8~10)                                        |
| 交合刺长 Spicule length             | 20.2±1.1(19.2~22.2)               | 17.3(16.8~17.8)                              | 21~25                                              | 12(10~13)                                      |
| 尾长 Tail length                  | 39.5±2.2(36.2~42.8)               |                                              |                                                    | 27(21~33)                                      |

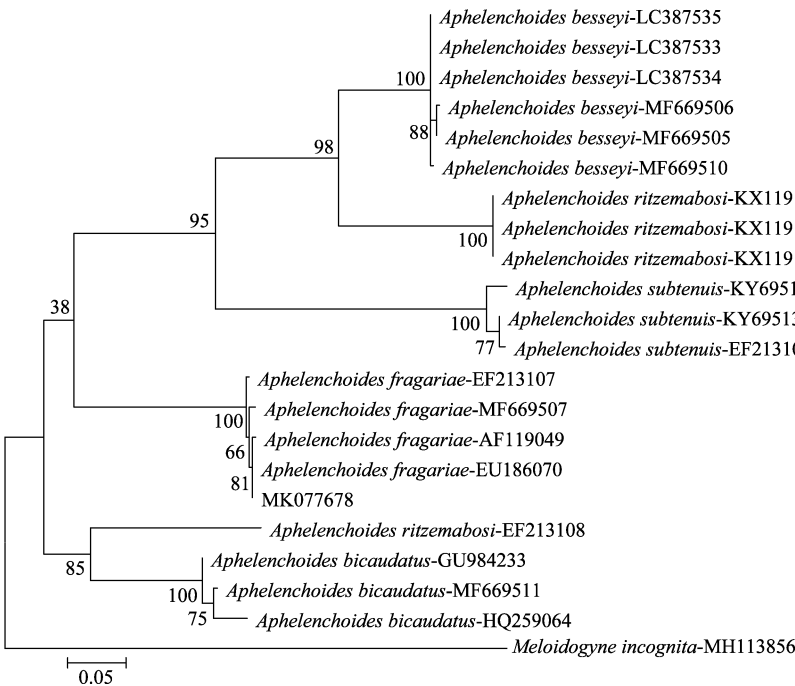


图 3 基于滑刃属线虫 ITS 区序列构建的系统进化树

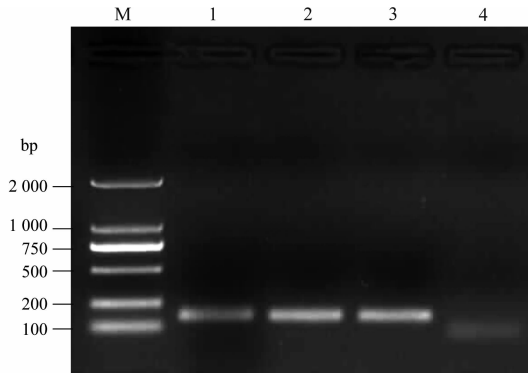
Fig. 3 Phylogenetic tree of *Aphelenchoides* spp. based on ITS sequences (maximum likelihood, ML)

2.3 ITS 区系统进化分析

采用引物 F194/5368r 对该种群线虫的 rDNA-ITS 区域进行扩增,得到约 700 bp 的片段,经双向测序及拼接得到 643 bp 序列。通过 BLAST 比对分析,发现该序列(NCBI 登录号为 MK077678)与草莓滑刃线虫(EU186070、AF119049)序列相差 2 bp,相似度达 99.67%~99.68%。系统发育树显示该线虫与草莓滑刃线虫位于同一分支,支持率为 100%。其中,本线虫群体与俄罗斯(EU186070)、日本(AF119049)的种群亲缘关系更近。

2.4 特异引物检测

采用草莓滑刃线虫特异引物扩增本研究种群雌虫、幼虫 DNA,样本及阳性对照均获得 169 bp 的特异性片段,空白对照未发生特异性扩增(图 4)。



M: Marker DL2000; 1: 幼虫DNA样本; 2: 雌虫DNA样本; 3: 阳性对照; 4: 空白对照  
M: Marker DL2000; 1: DNA sample of a juvenile; 2: DNA sample of a female; 3: Positive control; 4: Negative control

图 4 草莓滑刃线虫特异引物 PCR 扩增凝胶电泳图

Fig. 4 Electrophoresis of PCR products from *Aphelenchoides fragariae* with the primers AFragFl/AFragRl

综合形态学特征及分子鉴定结果,确认鸢尾种苗中截获的线虫为草莓滑刃线虫 *Aphelenchoides fragariae*。

### 3 讨论

近年来,我国花卉产业规模不断扩大,种球的进口需求量也大幅增加。据统计,我国已成为仅次于美国的荷兰花卉种球第二大进口国<sup>[10]</sup>。进口的种球品种繁多,主要有百合、风信子、郁金香、洋水仙等。球根类花卉是多年生草本花卉,可在地下存活多年,因此其根茎携带有害线虫的风险很高。近年来,我国口岸多次在进境种苗中截获鳞球茎茎线虫、腐烂茎线虫、草莓滑刃线虫、菊花滑刃线虫等检疫性线虫<sup>[11]</sup>。

草莓滑刃线虫是重要的检疫性病原线虫。该线虫世界分布范围广,欧洲、原苏联各成员国、日本、美国、加拿大、新西兰、澳大利亚等国均有报道,我国局部地区(辽宁、广东、云南等)有报道发生<sup>[1,3-4]</sup>。该线虫的远距离传播主要依靠种苗的调运,因此口岸应加强对进境种苗的线虫检疫工作,谨防检疫性线虫随种苗在国内种植时扩散,对我国农林业、花卉业生产造成严重威胁。

目前对草莓滑刃线虫的鉴定主要依靠传统的形态学鉴定。但草莓滑刃线虫及其近似种的形态特征极其相似,传统的形态学鉴定方法很难区分。如 *A. besseyi*、*A. pseudolesistus*、*A. oryzae*、*A. olesistus* 等都曾在一段时间内被认为是草莓滑刃线虫的同物异名<sup>[12]</sup>。本实验室采用形态学与分子生物学相结合的鉴定方法,可实现对样品中的幼虫进行鉴定,且对鉴定人员的专业性要求不高,适合一线口岸进行推广。

本次鸢尾种苗中截获的草莓滑刃线虫种群,其形态测量值与俄罗斯种群最接近;基于 ITS 区

构建的系统发育树显示,该种群与俄罗斯种群亲缘关系更近。这可能与该批鸢尾种苗来自于荷兰相关。

### 参考文献

- [1] 国家质量监督检验检疫总局. SN/T 2338—2009 草莓滑刃线虫检疫鉴定方法[S]. 北京:中国标准出版社,2009.
- [2] MCCUISTON J L, HUDSON L C, SUBBOTIN S A, et al. Conventional and PCR detection of *Aphelenchoides fragariae* in diverse ornamental host plant species [J]. Journal of Nematology, 2007, 39(4): 343–355.
- [3] 刘维志. 植物线虫志[M]. 北京:中国农业出版社,2004:580–582.
- [4] 张绍升. 植物线虫病害诊断和治理[M]. 福州:福建科学技术出版社,1999:195.
- [5] 刘维志. 草莓叶芽线虫病[J]. 新农业,1999(9): 24–25.
- [6] FERRIS V R, FERRIS J M, FAGHIHI J. Variation in spacer ribosomal DNA in some cyst-forming species of plant parasitic nematodes [J]. Fundamental and Applied Nematology, 1993, 16(2):177–184.
- [7] VRAIN T C. Restriction fragment length polymorphism separates species of the *Xiphinema americanum* group [J]. Journal of Nematology, 1993, 25:361–364.
- [8] 顾建锋, 杨兰英, 徐瑛. 进口百合种球中截获草莓滑刃线虫 [J]. 植物检疫, 2003, 17(2): 86–87.
- [9] CHIZHOV V N, CHUMAKOVA O A, SUBBOTIN S A, et al. Morphological and molecular characterization of foliar nematodes of the genus *Aphelenchoides*: *A. fragariae* and *A. ritzenabosi* (Nematoda: Aphelenchoididae) from the main botanical garden of the Russian Academy of Sciences, Moscow [J]. Russian Journal of Nematology, 2006, 14(2):179–184.
- [10] 李艳梅. 百合:市场仍需突破[J]. 中国花卉园艺,2013(23):26–27.
- [11] 动植物检验检疫信息资源共享服务平台[DB/OL]. <http://info.apqchina.org/>.
- [12] ALLEN M W. Taxonomic status of the bud and leaf nematodes related to *Aphelenchoides fragariae* (Ritzema Bos 1891) [J]. Proceedings of The Helminthological Society of Washington, 1952; 19(2):108–120.

(责任编辑:田 喆)

### 更 正

本刊 2020 年第 1 期的“南方根结线虫侵染下罗汉果 WRKY 转录因子的鉴定分析”(作者李惠敏,李佳慧,程颖,韦文琼,李璐璐,陈玉梅), 171 页表 2 中的 SgWRKY19 的表达模式 up 应无上标 a; SgWRKY13 表达模式 down 则有上标 a,特此更正,并向作者和读者致歉!

《植物保护》编辑部 2020 年 3 月 10 日