农业环境科学学报
JOURNAL OF AGRO-ENVIRONMENT SCIENCE
中文核心期刊/CSCD
请通过网上投稿系统投稿
网址：http://www.aes.org.cn

荷兰进境百合种球中线虫的分离及分子鉴定

张寅寅, 黑多尔, 刘玥婷, 李鑫

引用本文:
张寅寅, 黑多尔, 刘玥婷, 李鑫. 荷兰进境百合种球中线虫的分离及分子鉴定[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(12): 2805-2809.

在线阅读 View online: https://doi.org/10.11654/jaes.2022-1141

张寅寅, 黑多尔, 刘玥婷, 等. 荷兰进境百合种球中线虫的分离及分子鉴定[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(12): 2805-2809.
ZHANG Y Y, HEI D E, LIU Y T, et al. Isolation and molecular identification of nematodes intercepted from imported Netherlands′ lily bulbs[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2022, 41(12): 2805-2809.

开放科学OSID

荷兰进境百合种球中线虫的分离及分子鉴定

张寅寅, 黑多尔, 刘玥婷, 李鑫*

(大连海关技术中心, 辽宁 大连 116001)

摘　要:随着荷兰百合种球的进口量逐年增加,其极易携带多种有害生物入境,线虫传入风险随之增大,危害国门生物安全,因此对其准确的检疫鉴定十分重要。本文采用形态学(改良贝曼漏斗法)结合分子生物学方法(DNA提取及PCR扩增)对百合种球中分离到的植物寄生线虫进行分离鉴定。最终鉴定出3个种类,分别为穿刺短体线虫(*Pratylenchus penetrans*)、毁芽滑刃线虫(*Aphelenchoides blastophthorus*)和燕麦真滑刃线虫(*Aphelenchus avenae*)。研究表明,在进境百合种球中分离到的线虫数量有限、幼虫较多,无法通过形态学准确鉴定,应结合分子生物学方法保证结果的准确性。

关键词:荷兰;百合种球;线虫;分子鉴定

中图分类号:S436.8　**文献标志码:**A　**文章编号:**1672-2043(2022)12-2805-05　doi:10.11654/jaes.2022-1141

Isolation and molecular identification of nematodes intercepted from imported Netherlands′ lily bulbs

ZHANG Yinyin, HEI Duoer, LIU Yueting, LI Xin*

(Technology Center of Dalian Customs, Dalian 116001, China)

Abstract: The increasing import of the Netherlands′ lily bulbs over the years has meant introduction of a variety of pests into the country; and one such nematode pest has turned into risk, endangering the national biosafety. Quarantine and identification of nematodes are thus imperative. This paper provides reference for the quarantine of imported seedlings and flowers to various ports and the supervision of planting sites. In this study, morphology (Beeman funnel method), combined with molecular biological methods (DNA extraction and PCR amplification), were used to quarantine and identify plant parasitic nematodes isolated from lily bulbs. The results showed that three species of plant parasitic nematodes were found: *Pratylenchus penetrans*, *Aphelenchoides blastophthorus*, and *Aphelenchus avenae*. The results also indicated that the quantity of nematodes isolated from the imported lily bulbs was limited, with most being larvae, as is it difficult to accurately identify nematodes based on their morphology, this process needed to be supplemented by molecular biological methods to ensure the accuracy of the results.

Keywords: Netherlands; lily bulb; nematode; molecular identification

随着国内鲜花消费需求的逐步提升,优质百合花的需求量逐年增加,荷兰是世界上最大的百合种球等花卉生产国[1],我国每年从荷兰进口大量百合种球,其已成为我国主要的鲜切花品种。百合种球极易携带线虫随贸易进入我国[2],近年来,在我国口岸检疫工作中多次截获重要线虫[3-4]。线虫是一种最难鉴定的动物之一,目前随着分子生物学的不断发展,基于DNA的分子生物学鉴定方法已广泛应用于线虫的检

收稿日期:2022-11-10　**录用日期:**2022-12-06
作者简介:张寅寅(1987—),女,辽宁大连人,硕士,从事植物检疫工作。E-mail:2035425610@qq.com
黑多尔与张寅寅同等贡献
***通信作者:**李鑫　E-mail:14826155@qq.com
基金项目:"十四五"国家重点研发计划课题(2021YFD1400100)
Project supported: The National Key Research and Development Project During the 14th Five-Year Plan of China(2021YFD1400100)

疫鉴定中。国内外的研究人员主要采用线虫18S、28S核糖体基因、ITS区和线粒体基因的核苷酸序列，作为识别线虫的“条形码”，以建立线虫的DNA分类学[5]。近年来以上述序列作为分子标记在线虫鉴定中得到广泛应用[6-7]，尤其在口岸截获线虫为幼虫、近似种难以区分时，常采用形态学方法与分子生物学技术相结合的综合鉴定方法[8-9]，以保证鉴定结果的准确性。本文针对进境的荷兰百合种球进行线虫分离，采用形态学初步判断结合分子生物学技术进行检疫鉴定，最终获得植物寄生线虫3种。本研究为进境种苗花卉中线虫的检疫鉴定及后续监管防治提供了参考依据。

1 材料与方法

1.1 线虫分离

将百合种球的鳞球茎、根（重点选取有根腐症状的）及介质一并搜集，采用改良贝曼漏斗法（Beeman funnel method）分离线虫，室温保持在20~28 ℃，24 h后用凹面皿接取水样约5 mL，置于ZEISS Stemi 508体视显微镜下观察。

1.2 形态学鉴定

经体视显微镜观察后，挑取待检线虫，采用SEINHORST[10]发明的丙三醇-乙醇脱水法制作永久玻片，在Leica DM3000显微镜下进行形态观察，根据形态特征进行初步判断，并搜集该线虫以备分子生物学鉴定。

1.3 分子生物学鉴定

由于线虫的形态特征变异较大，进境百合种球中分离到的线虫数量有限、幼虫较多，很难仅依靠形态特征对线虫进行准确鉴定[11]。因此，在形态学初步判断的基础上，结合分子生物学鉴定方法对线虫种属进一步确认。

1.3.1 线虫DNA提取

在200 μL PCR管中加入8 μL ddH$_2$O和1 μL 10× PCR Buffer（Mg^{2+} free），挑取待检的单条线虫放入ddH$_2$O清洗后加入上述PCR管，将PCR管置于液氮中1 min，取出后置于85 ℃水浴加热2 min，再向PCR管中加入1 μL 1 mg·mL^{-1}蛋白酶K，56 ℃水浴加热15 min，95 ℃水浴加热10 min，得到待检线虫的DNA提取液，可直接用于PCR扩增。

1.3.2 引物合成、PCR扩增及产物测序

选择核糖体DNA的28 S D2/D3区引物对进行扩增，引物为D2A（5′-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3′）和D3B（5′-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3′）[12]，以提取的待测线虫DNA为模板，按反应体系（表1）及条件（表2）进行PCR扩增，将PCR产物送至生物公司测序，将测序结果BLAST比对分析。引物合成、试剂、测序服务均购于大连宝生物公司。

表1 PCR反应体系

Table 1 PCR reaction system

试剂 Reagent	使用量 Usage	最终浓度 Final concentration
TaKaRa LA Taq（5U·μL^{-1}）	0.5 μL	
10×LA Taq Buffer Ⅱ（Mg^{2+} plus）	5 μL	
dNTP Mixture（2.5 mmol·L^{-1} each）	8 μL	
引物D2A	1 μL	0.4 μmol·L^{-1}
引物D3B	1 μL	0.4 μmol·L^{-1}
Template DNA	< 1 μg	
dH$_2$O	<50 μL	

表2 PCR反应条件

Table 2 PCR reaction conditions

温度 Temperature/℃	时间 Time	循环数 Cycle
94	1 min	
98	10 s	30
68	15 min	
72	10 min	

2 结果与分析

2.1 穿刺短体线虫（*Pratylenchus penetrans*）

分类地位：根据van den Berg & Esther最新分类系统，该线虫属于动物界（Animalia），线虫门（Nematoda），有腺纲（Adenophorea），双胃亚纲（Diplogasteria），垫刃线虫目（Tylenchida），垫刃总科（Tylenchoidea），短体科（Pratylenchidae），短体亚科（Pratylenchuinae），短体线虫属（*Pratylenchus*）。

2.1.1 形态特征描述

雌虫：虫体粗短，唇区较低平且无缢缩（图1）。口针强壮，基部球发达，中食道球卵圆形，约占该处体宽的1/2~2/3，阴门位于虫体约4/5处，尾部圆柱形，末端宽圆。

雄虫：形态与雌虫相近，交合刺细，交合伞边缘呈不规则锯齿状，包裹至尾端。

2.1.2 分子生物学结果分析

将搜集到的雌虫、雄虫分别提取其DNA，采用D2A/D3B引物对分别进行PCR扩增，获得长度均为750 bp左右的片段，测序后BLAST比对，结果表明雌

a.雌虫整体;b.雄虫整体;c.头部;d.雌虫尾部;e.雄虫尾部
a. entire female body;b. entire male body;c. anterior region;d. female posterior region;e. male posterior region

图1 穿刺短体线虫形态特征

Figure 1 Morphology of *Pratylenchus penetrans*

虫的序列与GenBank中已登录的穿刺短体线虫KP161612.1序列相似性为97%,雄虫序列与JX046990.1序列相似性为98%,因此鉴定该线虫为穿刺短体线虫(*P. penetrans*)。

2.2 毁芽滑刃线虫(*Aphelenchoides blastophthorus*)

分类地位:动物界(Animalia),线虫门(Nematoda),色矛纲(Chromadorea),色矛亚纲(Chromadoria),小杆目(Rhabditida),真滑刃总科(Aphelenchoidea),滑刃科(Aphelenchoididae),滑刃亚科(Aphelenchoidinae),滑刃属(*Aphelenchoides*)。

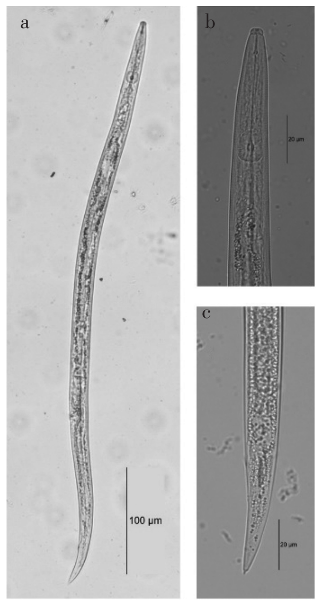
2.2.1 形态特征描述

雌虫:整个虫体细长,热杀死后虫体略向腹面弯,头部半球形,口针细,唇区缢缩不明显,中食道球卵圆形,食道球发达,尾部近圆柱形,尾端有尾尖突(图2)。

雄虫:未见。

2.2.2 分子生物学结果分析

提取搜集到的雌虫的DNA,采用D2A/D3B引物对扩增,获得长度为750 bp左右的产物片段,测序并BLAST比对,结果表明该雌虫序列与GenBank中已登录的毁芽滑刃线虫MK981894.1序列相似性为99%,因此鉴定其为毁芽滑刃线虫(*A. blastophthorus*)。



a.雌虫整体;b.头部;c.雌虫尾部
a. entire female body;b. anterior region;c. female posterior region

图2 毁芽滑刃线虫形态特征

Figure 2 Morphology of *Aphelenchoides blastophthorus*

2.3 燕麦真滑刃线虫(Aphelenchus avenae)

分类地位:动物界(Animalia),线虫门(Nematoda),尾感器纲(Secernentea),垫刃目(Tylenchida),真滑刃总科(Aphelenchoidea),真滑刃科(Aphelenchidae),真滑刃亚科(Aphelenchinae),真滑刃属(*Aphelenchus*)。

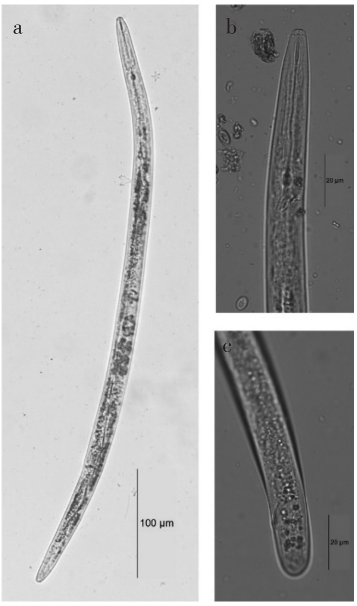
2.3.1 形态特征描述

雌虫:头部低平,口针较细,无基部球;中食道球大,直径近体宽,阴门横裂、位置较后,阴门唇略突起,肛门前唇略突起;尾短,稍向腹面弯曲,末端钝圆(图3)。

雄虫:未见。

2.3.2 分子生物学结果分析

提取搜集到的雌虫DNA,采用D2A/D3B引物对



a.雌虫整体;b.头部;c.雌虫尾部
a. entire female body;b. anterior region;c. female posterior region

图3 燕麦真滑刃线虫形态特征

Figure 3 Morphology of *Aphelenchus avenae*

扩增,获得长度为750 bp左右的产物片段,测序并BLAST比对,结果表明该雌虫序列与GenBank中已登录的燕麦真滑刃线虫KP313838.1序列相似性为99.43%,因此鉴定其为燕麦真滑刃线虫(*A. avenae*)。

3 讨论

近年来,我国每年大量从荷兰等国家引进优良的百合种球在国内种植,真菌、病毒、线虫等植物病害极易由百合种球携带入境,危害国门生物安全。各入境口岸在加大查验力度的同时,口岸实验室也逐步提高了线虫的检疫鉴定水平,在重点关注检疫性线虫的同时,一些非检疫性、限定性的线虫也逐步成为检疫工作的重点关注对象。

(1)本文在进境百合种球中检出3种寄生线虫,其中穿刺短体线虫是短体线虫属线虫,在《荷兰花卉种球进境植物检疫要求》中规定,其感染率不得超过2%。穿刺短体线虫的寄主众多,主要危害大麦、小麦、玉米、马铃薯、烟草、百合、郁金香等多种经济作物和花卉[6],可在寄主的组织、根部或土壤中生存,不仅危害寄主的根系、造成根腐症状甚至植株死亡,还可传播一些致病的植物寄生细菌、真菌。该线虫耐低温及干旱的环境,可随进境种球远距离传播,口岸检疫时应重点关注其感染率。目前,短体属线虫在我国口岸检疫时一般重点关注除了穿刺短体线虫、伤残短体线虫(*P. vulnus*)、咖啡短体线虫(*P. coffeae*)、艾短体线虫(*P. artemisiae*)和玉米短体线虫(*P. zeae*)以外的非中国种类,由于短体线虫种类众多,其属内形态近似度较高,传统形态学方法要通过雌虫、雄虫、2龄幼虫的特征及测量值鉴定,但口岸检疫时获得的线虫数量有限,无法保证获得大量的成虫[13],因此仅依靠形态学鉴定无法保证结果的准确性,需要结合分子生物学方法的测序结果进一步确认[14]。

(2)毁芽滑刃线虫是滑刃线虫属线虫,最早于1952年在英国的高加索蓝盆花中发现该线虫[15],在2021年4月更新的《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》中滑刃属的检疫性线虫有菊花滑刃线虫(*A. ritzemabosi*)和草莓滑刃线虫(*A. fragariae*)2种,滑刃属线虫种类目前已知的有180多种,广泛分布于土壤、种球、苗木中。本研究中分离到的毁芽滑刃线虫在已知的报道中十分有限,仅我国2020年4月首次从荷兰进境的毛蕊银莲花中检出毁芽滑刃线虫[16]。经查阅文献,该线虫能危害蔷薇科,如草莓等经济作物,造成减产[17]。目前在荷兰等欧洲国家有发生,我国每年从荷兰大量进口百合等花卉种球,该线虫随种球贸易传入风险极大,由于我国尚未有该线虫的危害及分布情况报道,各口岸应重点关注并加强检疫,进行风险评估。

(3)燕麦真滑刃线虫是真滑刃属线虫,是一种取食真菌的线虫[18]。在世界各地广泛分布,寄主广泛,有柑桔属、咖啡属、枇杷属、草莓、烟草、马铃薯、豌豆和小麦等经济作物[19],目前尚未有该线虫对植物造成严重危害的报道,有待进一步研究。

4 结论

本研究在进境的荷兰百合种球中分离并鉴定出3种寄生线虫,分别是穿刺短体线虫、毁芽滑刃线虫、燕麦真滑刃线虫,其中穿刺短体线虫分离到少量的雌虫和雄虫,且部分鉴定特征不明显,而毁芽滑刃线虫和燕麦真滑刃线虫仅分离到雌虫成虫,均需依靠形态学初步判断结合分子生物学方法,才能准确鉴定到种。

参考文献:

[1] 赵良平, 黄正秋. 荷兰花卉业发展的成功经验及其借鉴[J]. 林业经济, 2001(7):39-44. ZHAO L P, HUANG Z Q. The successful experience of Netherland flower industry and its reference[J]. *Forestry Economics*, 2001(7):39-44.

[2] 边勇, 刘奇志, 赵纪文, 等. 进口百合种球携入植物线虫数量风险初探[J]. 植物保护, 2007, 33(3):93-96. BIAN Y, LIU Q Z, ZHAO J

W, et al. Pilot study on quantity risk of phytoparasitic nematodes brought in by imported lily corm[J]. *Plant Protection*, 2007, 33(3):93-96.

[3] 刘奇志, 边勇, 赵纪文, 等. 进口球根花卉携入线虫营养类群及数量检测[J]. 中国农业大学学报, 2007, 12(3):27-31. LIU Q Z, BIAN Y, ZHAO J W, et al. Inspection on trophic groups and quantity of nematodes carried in by imported corm flowers[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2007, 12(3):27-31.

[4] 邓艳凤, 高渊, 陈云芳. 江苏口岸进境种苗截获植物线虫疫情分析[J]. 植物检疫, 2020, 34(6):56-60. DENG Y F, GAO Y, CHEN Y F. Analysis on the nematode interception from imported seedlings at Jiangsu ports[J]. *Plant Quarantine*, 2020, 34(6):56-60.

[5] POWERS T. Nematode molecular diagnostics: From bands to barcodes [J]. *Annual Review of Phytopathology,* 2004, 42:367-383.

[6] SUBBOTIN S A, RAGSDALE E J, MULLENS T, et al. A phylogeneticframework of root lesion nematodes of the genus *Pratylenchus*(Nematoda): Evidence from the 18S and D2/D3 expansion segmentsof 28S ribosomal RNA genes and morphological characters[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2008, 48:491-505.

[7] DE L F, REYES A, TROCCOLI A, et al. Molecular variability and phylogenetic relationships among different species and populations of *Pratylenchus*(Nematoda: *Pratylenchidae*) as inferred from the analysis of the ITS rDNA[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2011, 130: 415-426.

[8] 王金成, 林宇, 郭京泽, 等. 日本盆景中截获的短体线虫与根结线虫的鉴定[J]. 植物检疫, 2015, 29(4):38-42. WANG J C, LIN Y, GUO J Z, et al. Indentification of *Pratylenchus* and *Meloidogyne* nematodes intercepted in Bonsai from Japan[J]. *Plant Quarantine*, 2015, 29(4):38-42.

[9] 陈先锋, 边勇, 何洁, 等. 进境新西兰麻中玻利维亚短体线虫的鉴定[J]. 植物检疫, 2015, 29(5):13-16. CHEN X F, BIAN Y, HE J, et al. Indentification of *Pratylenchus* bolivianus from imported linen seedlings from New Zealand[J]. *Plant Quarantine*, 2015, 29(5):13-16.

[10] SEINHORST J W. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin[J]. *Nematologica*, 1959, 4(1):67-69.

[11] HANDOO Z A, CARTA L K, SKANTAR A M. Taxonomy, morphology and phylogenetics of coffee-associated root-lesion nematodes, *Pratylenchus* spp.[M]//Souza R M. Plant-Parasitic Nematodes of Coffee, New York: Springer-Verlag New York Inc, 2008:42-45.

[12] NUNN G B. Nematode molecular evolution: An investigation of evolutionary patterns among nematodes based upon DNA sequences[D]. Nottingham: University of Nottingham, UK, 1992:35.

[13] 何洁, 王江岭, 陈先锋, 等. 6种根结线虫的形态和分子检测技术研究[J]. 植物检疫, 2014, 28(2):39-42. HE J, WANG J L, CHEN X F, et al. Morphological and molecular detection methods for six *Meloidogyne* species[J]. *Plant Quarantine*, 2014, 28(2):39-42.

[14] 顾建锋, 王江岭, 何洁, 等. 4种常见短体线虫形态特征比较鉴别[J]. 植物检疫, 2013, 27(6):69-71. GU J F, WANG J L, HE J, et al. Morphological characters of four common *Pratylenchus* species[J]. *Plant Quarantine*, 2013, 27(6):69-71.

[15] FRANKLIN M T. A disease of *Scabiosa caucasica* caused by the nematode *Aphelenchoides blastophthorus n.* sp.[J]. *Annals of Applied Biology*, 1952, 39:54-60.

[16]吕晓玲, 方亦午, 马欣欣, 等. 荷兰进境毛蕊银莲花中毁芽滑刃线虫的形态和分子鉴定[J]. 植物检疫, 2021, 35(4):23-28. LÜ X L, FANG Y W, MA X X, et al. Morphological and molecular identification of *Aphelenchoides blastophthorus* intercepted in *Anemone cathayensis* Kitag. var. *Hispida* Tamura from Netherland[J]. *Plant Quarantine*, 2021, 35(4):23-28.

[17] CONSOLI E, RUTHES A C, REINHARD E, et al. First morphological and molecular report of *Aphelenchoides blastophthorus* on strawberry plants in Switzerland[J]. *Plant Disease*, 2019, 103(11):2851-2856.

[18] TAYYROV A, SCHMIEDER S S, BLEULER-MARTINEZ S, et al. Toxicity of potential fungal defense proteins towards the fungivorous nematodes *Aphelenchus avenae* and *Bursaphelenchus okinawaensis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(23):e02051-18.

[19] 陈娴婷. 厦门地区草莓寄生线虫种类调查及燕麦真滑刃线虫(*Aphelenchus avenae* Bastian, 1865)培养和发育的研究[D]. 厦门:厦门大学, 2008. CHEN X T. Investigation on the parasitic nematode species of strawberry in Xiamen and studies on the cultivation and development of *Aphelenchus avenae* Bastian, 1865[D]. Xiamen: Xiamen University, 2008.

(责任编辑:叶飞)