



美国多花黑麦草种子中致死粒线虫的检疫鉴定

俞禄珍 宋绍 李帅

Identification of *Anguina funesta* in *Lolium multiflorum* from the United States

YU Luzhen, SONG Shaoyi, LI Shuai

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2022-0217>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

多花黑麦草抗旱代谢通路挖掘

Mining metabolic pathways in drought tolerance of *Lolium multiflorum*

草业科学. 2020, 37(8): 1528 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.20190636>

甘肃省孢囊线虫新记录种：艾球孢囊线虫

Globodera artemisiae, a new cyst nematode record in Gansu, China

草业科学. 2020, 37(12): 2567 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2020-0163>

盐生草根际耐盐性木霉菌分离鉴定及其耐盐性评价

Isolation, identification, and evaluation of the saline-tolerant strain of *Trichoderma* spp. in the *Halogeton arachnoideus* rhizosphere

草业科学. 2021, 38(10): 1930 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2020-0574>

寄生醉马草的孢囊线虫种类鉴定

Identification of the cyst nematode parasited on *Achnatherum inebrians*

草业科学. 2019, 36(5): 1283 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2018-0275>

种子老化的分子生物学研究

Advances in the molecular biology study of seed aging

草业科学. 2017, 11(1): 129 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2016-0148>

3种生长抑制剂对多花黑麦草种子产量的影响

Effects of the application of three growth regulators on seed yield of *Lolium multiflorum*

草业科学. 2018, 35(8): 1959 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2017-0542>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

DOI: 10.11829/j.issn.1001-0629.2022-0217

俞禄珍, 宋绍祎, 李帅. 美国多花黑麦草种子中致死粒线虫的检疫鉴定. 草业科学, 2023, 40(11): 2832-2837.

YU L Z, SONG S Y, LI S. Identification of *Anguina funesta* in *Lolium multiflorum* from the United States. Pratacultural Science, 2023, 40(11): 2832-2837.

美国多花黑麦草种子中致死粒线虫的检疫鉴定

俞禄珍, 宋绍祎, 李 帅

(上海海关, 上海 200135)

摘要: 致死粒线虫 (*Anguina funesta*) 是具有重要经济意义的粒线虫, 被多国列入检疫性有害生物名录。2021 年, 上海口岸从来自美国的多花黑麦草 (*Lolium multiflorum*) 种子中截获一种粒线虫属线虫, 但在该样品中仅分离得到幼虫, 无法准确鉴定。本研究运用形态学与分子生物学相结合的方法对分离得到的幼虫进行鉴定。采用 28S 通用引物扩增该线虫序列, 测序获得 742 bp 的序列, 与 GenBank 中登录的致死粒线虫相似性达 100%; 采用 ITS 通用引物对 ITS 区扩增并测序, 获得 778 bp 的序列, 与 GenBank 中登录的致死粒线虫相似性达 99.86%~100%。基于 28S 及 ITS 区序列构建的系统进化树均显示, 该线虫与致死粒线虫位于同一进化枝上。综合形态学特征及分子鉴定结果, 将该群体鉴定为致死粒线虫。这是我国口岸首次报道截获该线虫, 本研究将为口岸检疫部门鉴定该线虫提供技术参考。

关键词: 致死粒线虫; 多花黑麦草; 形态学; 分子生物学; 鉴定; 粒线虫属

文献标识码: A 文章编号: 1001-0629(2023)11-2832-06

Identification of *Anguina funesta* in *Lolium multiflorum* from the United States

YU Luzhen, SONG Shaoyi, LI Shuai

(Shanghai Customs, Shanghai 200135)

Abstract: *Anguina funesta* is an important economic species of *Anguina* listed as a quarantine pest by several countries. In 2021, a population of *Anguina* sp. from the seeds of *Lolium multiflorum* from the United States was intercepted at the port of Shanghai. Only the larvae were isolated from the sample, and accurate identification could not be performed. A combination of morphological and molecular methods for detection was used. The nematode sequence was amplified by 28S universal primers and obtained a 742 bp sequence, which was 100% similar to *A. funesta* registered in GenBank. The internal transcribed spacer (ITS) region was amplified and sequenced to obtain a 778 bp sequence of 99.86%~100%, similar to *A. funesta* in GenBank. The phylogenetic tree based on 28S and ITS sequences was constructed. The results revealed that the sample clustered with *A. funesta* in GenBank. Based on morphological and molecular biology characteristics, the *Anguina* spp. was identified as *A. funesta*. The Shanghai port is the first in China to intercept *A. funesta*.

Keywords: *Anguina funesta*; *Lolium multiflorum*; morphology; molecular phylogeny; identification; *Anguina*

Corresponding author: SONG Shaoyi E-mail: songshhg@126.com

致死粒线虫 (*Anguina funesta*) 隶属于粒线虫属, 主要为害一年生硬直黑麦草 (*Lolium rigidum*) 和多花黑麦草 (*L. multiflorum*)^[1]。两种黑麦草均可作为

优质饲草, 特别是多花黑麦草在我国被广泛栽培^[2]。致死粒线虫可造成寄主饲草的产量下降, 而且还是产毒拉塞氏杆菌 (*Rathayibacter toxicus*) 的传播介

收稿日期: 2022-03-22 接受日期: 2023-02-08

基金项目: 上海市科学技术委员会科研计划项目 (19DZ1204104)

第一作者: 俞禄珍 (1987-), 女, 江苏南京人, 农艺师, 硕士, 主要从事植物线虫检测鉴定工作。E-mail: 478035072@qq.com

通信作者: 宋绍祎 (1971-), 女, 山东荣成人, 研究员, 本科, 主要从事植物线虫检测鉴定工作。E-mail: songshhg@126.com

体,被国内外广泛关注^[3-5]。产毒拉塞氏杆菌可侵染植物产生棒状毒素,棒状毒素是自然界产生的致命的毒素之一,该毒素热稳定性强、可不断富集,可引致牛、马、羊、猪、鸡等多种动物中毒致死^[6-7]。1978年,澳大利亚报道昆士兰州 5 591 头羊、232 头牛因取食了感染该细菌的黑麦草而中毒死亡^[1,6]。该细菌侵染寄主植物时,需要传播媒介线虫在寄主上先产生伤口,才能从伤口侵染植物,而致死粒线虫则是该细菌的重要媒介线虫^[1]。

鉴于致死粒线虫对草业、畜牧业危害极大,美国、智利、阿根廷、澳大利亚、纳米比亚、瑙鲁、南非已将其列入检疫性有害生物名录,严防该线虫扩散传播^[1]。致死粒线虫可侵染寄主花序形成虫瘿,受侵染的植物不能正常结籽,其籽粒变为虫瘿;收获植物种子时,虫瘿混入健康植物种子,随健康种子的调运而远距离传播扩散^[6-8]。目前,该线虫在美国(俄勒冈州)、澳大利亚均有分布,在我国尚未见分布^[7]。

我国是草原大国但却是草坪业弱国。2020年,我国草坪草种年需求量约 15 万 t,国产草坪草种生产能力不足,故羊茅属(*Festuca*)、草地早熟禾(*Poa pratensis*)和黑麦草属(*Lolium*)等生态草种、草坪草种 90% 以上依赖进口^[9]。致死粒线虫的寄主是黑麦草属草种,故其随进口草种传入我国的风险很高。同时,种子入境后直接播种用于绿化或生产青饲料,很少进行去除虫瘿的操作。加强来自疫区的进境草种的检疫工作,严防该线虫传入我国刻不容缓。

2021 年,上海口岸于全国首次在进境多花黑麦草种子中截获致死粒线虫。由于在进境多花黑麦草种子中仅截获幼虫,而仅根据幼虫形态很难准确鉴定。本研究采用形态学与分子生物学相结合的方法对所截获的粒线虫属幼虫进行鉴定,以期口岸检疫部门准确鉴定该线虫提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 线虫分离

进境草种子样品中粒线虫属线虫活动性不强,采用传统的浅盘法分离得到线虫较少。上海海关动植物与食品检验检疫技术中心植物检疫实验室参考 Meng 等^[4]的方法并进行了改良,具体如下:1) 称取黑麦草种子约 100 g 倒入 1 L 烧杯中(约至 300 mL 刻度线),加水至约 800 mL,用玻璃棒搅拌至草种子

完全湿润,室温静置 1~2 d; 2) 用玻璃棒快速搅拌 30 s 使烧杯底部的草种子悬浮起来,静置片刻(等待大部分草种子沉底),将上悬液(水及浮于水中未沉底的草种子)一起倒入套筛(上筛孔径为 0.85 mm,下筛孔径为 0.0385 mm)中,并用水连续冲洗套筛后,将下筛网筛中的筛上物冲洗至培养皿中,待镜检; 3) 向烧杯中重新加水至约 800 mL 之后重复第 2 步骤,重复 1~3 次。将获得的所有分离液镜检。

1.2 形态学鉴定

将分离得到的 2 龄幼虫制片,在光学显微镜(ZEISS Imager. Z1)下进行形态观察、拍照测量(AxioVision Rel.4.8),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

用挑针挑取幼虫若干条,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) 试剂盒提取线虫 DNA。

1.3.2 通用引物 PCR 扩增

采用 28S 通用引物对线虫 DNA 进行 PCR 扩增:引物为 D2A (5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAA GTTG-3'), D3B (5'-TCGGAAGGAACCAGCTAC TA-3')^[10]。采用线虫 ITS 通用引物对线虫 DNA 进行 PCR 扩增:引物为 F194 (5'-CGTAACAAGGTA GCTGTAG-3'), 5368r (5'-TTTCACTCGCCGTTAC TAAGG-3')^[11-12]。

PCR 反应体系包括:10 × PCR Buffer (Mg²⁺ free) (TIANGEN) 2.5 μL, Mg²⁺ (25 mmol·L⁻¹) (TIANGEN) 2 μL, dNTP Mix (2.5 mmol·L⁻¹) (TIANGEN) 2 μL, 引物 (5 μmol·L⁻¹) (上海生物工程有公司合成) 各 0.5 μL, 模板 DNA 2 μL, Taq DNA 聚合酶 (5 U·μL⁻¹) (TIANGEN) 0.4 μL, ddH₂O 15.1 μL, 总体积 25 μL。扩增程序为:94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s, 40 个循环; 72 °C 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 产物送上海华大基因生物公司测序,测得的序列用 Seqman 软件比对后进行校对和拼接,并在 GenBank 中 BLAST,进行序列分析,进一步利用 MEGA 6.0 软件以最大似然法构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 形态描述与测计值

2.1.1 形态描述

幼虫：线虫热杀死后呈蠕虫形；唇区平，略缢缩，口针弱，口针基部球小；食道垫刃型，食道前体部圆柱体状，中食道球较小，纺锤形；后食道腺梨形，不覆盖或略覆盖肠。尾部尖削，肛门不明显(图 1)。

2.1.2 测计值

本研究致死粒线虫种群幼虫的形态测计值和美国种群比较显示：与 Meng 等^[4]描述的种群相比，a、b、c、口针长、尾长、中食道球长及宽、体宽等值基本吻合；体长、食道较长一些，但其数值范围部分重叠(表 1)。

2.2 28S 及 ITS 序列系统发育分析

2.2.1 28S 序列分析

多花黑麦草种子中截获的粒线虫幼虫，测序获

得 742 bp 的 DNA 序列(系统登录号 MH OM403184)，与 GenBank 中登录的 *A. funesta* 的序列相似性达 100.00% (登陆号 MG321209) (图 2)。基于 28S 区序列构建的系统进化树显示，截获的粒线虫与 GenBank 中登录的致死粒粒线虫 *A. funesta* 位于同一进化枝上(图 2)。

2.2.2 ITS 序列分析

多花黑麦草种子中截获的粒线虫属幼虫，经 ITS 测序获得长度为 778 bp 的序列(系统登录号 OM403183)，与 GenBank 中登录的 *A. funesta* 的相似性达 99.86% (登陆号 KM114435)~ 100.00% (登陆号 KM114438、KM114439、AF396347) (图 3)。基于 rDNA-ITS 区序列构建的系统进化树可见，测序获得序列与 *A. funesta* 位于同一进化枝上(图 3)。

3 讨论与结论

由于国产草种供给不足，我国长期进口大量草种，特别是禾本科草种子^[1]。粒线虫属线虫是禾本

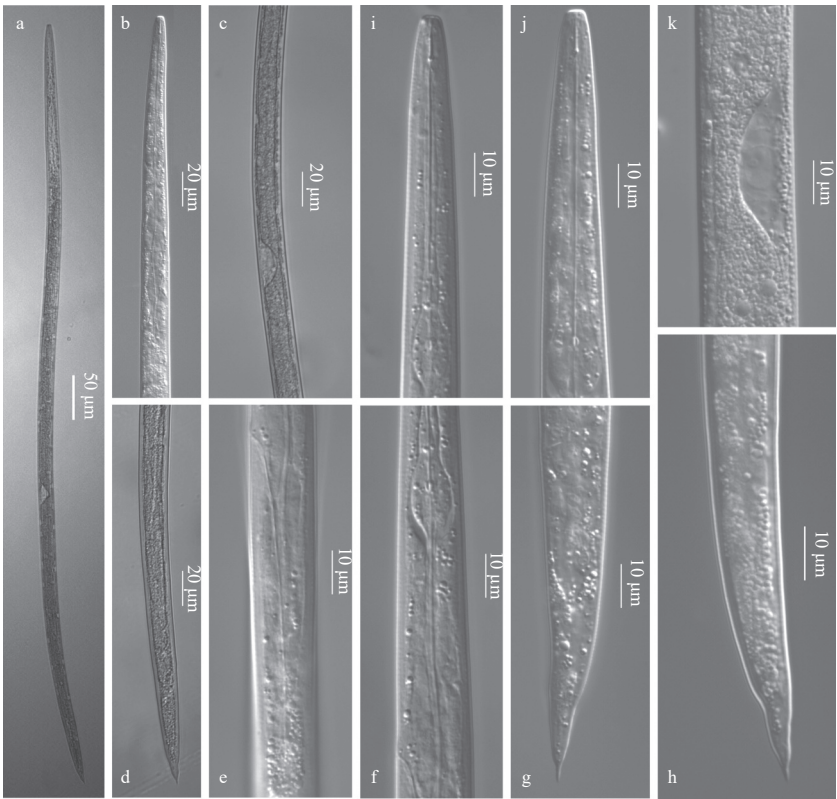


图 1 致死粒线虫幼虫形态特征

Figure 1 Morphological characteristics of juvenile *Anguina funesta*

a: 整体；b: 体前部；c: 体中部；d: 体后部；e-f: 食道区(中后部)；g-h: 尾部；i-j: 食道区(前部)；k: 生殖原基。
a: entire; b: anterior region; c: middle region; d: posterior region; e-f: esophagus (middle to posterior regions); g-h: tail; i-j: esophagus (anterior region); k: genital primordium.

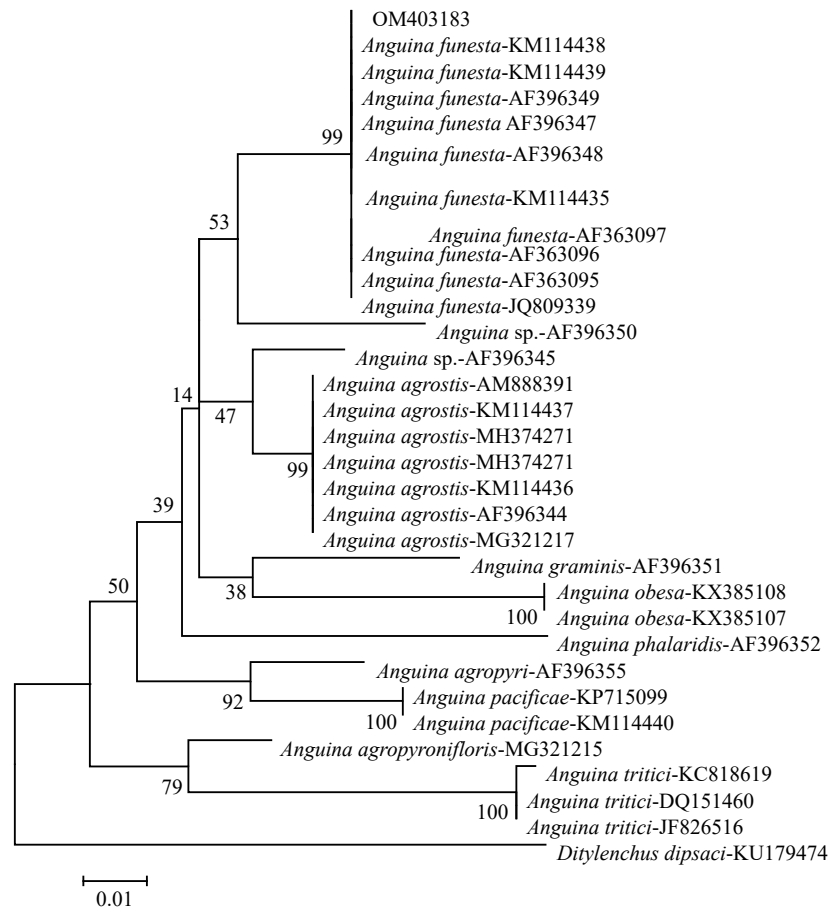


图 3 基于粒线虫属线虫 ITS 区序列构建的系统进化树

Figure 3 Phylogenetic tree of *Anguina* sp. based on ITS sequences (maximum likelihood, ML)

生物学的兴起与应用,为线虫的分类鉴定提供了新的手段。关于粒线虫属线虫的分子鉴定, Powers 等^[16]于 2001 年最早开展研究,其基于 ITS1 的 PCR-RFLP 图谱显示,曾经同物异名的剪股颖粒线虫、维氏粒线虫 (*Anguina wevelli*) 和致死粒线虫酶切图谱均不同,系统进化树也显示上述 3 种线虫聚于不同进化枝,故认为分子特征支持上述 3 种线虫为独立有效种,并认为 ITS1 区可用于粒线虫属线虫鉴定。近年来,多位学者基于该属线虫的 ITS 区序列开发了分子检测方法^[15, 17], 特异引物 PCR 法^[18]、实时荧光 PCR 法^[19]。由于在检测种子或植物组织样品时,分离得

到的粒线虫属线虫常为幼虫^[20],难以进行鉴定,采用分子生物学手段进行辅助鉴定可一定程度上弥补形态学鉴定方法的不足。2012 年, Meng 等^[4]首次报道美国发生致死粒线虫,但在田间调查样本中未发现成虫,其针对分离得到的幼虫采用了形态学与分子生物学 (PCR-RFLP) 相结合的方法进行鉴定。

本研究综合形态学和分子生物学特征,确认从美国多花黑麦草种子中截获的粒线虫属线虫为致死粒线虫,这是我国口岸首次报道截获鉴定该线虫,为口岸检疫部门准确鉴定提供技术支持和决策参考。

参考文献 References:

- [1] 俞禄珍, 徐飞, 李帅, 杨轶, 马丁, 王寅鹏, 宋绍祯. 致死粒线虫. 植物检疫, 2022, 36(2): 55-58.
YU L Z, XU F, LI S, YANG Y, MA D, WANG Y P, SONG S Y. *Anguina funesta*. Plant Quarantine, 2022, 36(2): 55-58.
- [2] 张文洁, 马冉冉, 袁洁, 许能祥, 丁成龙, 李青丰. 有机无机肥配施对多花黑麦草产量、饲用和青贮发酵品质的影响. 中国草地学报, 2022, 44(4): 76-84.

- ZHANG W J, MA R R, YUAN J, XU N X, DING C L, LI Q F. Effects of combined application of organic and inorganic fertilizers on yield, and feeding and silage qualities of Italian ryegrass. *Chinese Journal of Grassland*, 2022, 44(4): 76-84.
- [3] FLEMING T R, MAULE A G, MARTIN T, HAINON-MCDOWELL M, ENTWISTLE K, MCCLURE M A, FLEMING C C. A first report of *Anguina pacificae* in Ireland. *Journal of Nematology*, 2015, 47(2): 97-104.
- [4] MENG S, ALDERMAN S, FRALEY C, LUDY R, SUN F J, OSTERBAUER N. Identification of *Anguina funesta* from annual ryegrass seed lots in Oregon. *Plant Health Progress*, 2012, 13(1): 10.1094/PHP-2012-1024-01-RS.
- [5] PRICE P C. Investigation of a nematode-bacterium disease complex affecting Wimmera ryegrass. PhD Thesis. Adelaide: University of Adelaide, 1973.
- [6] PUTNAM M L. *Rathayibacter toxicus*, select agent.[2021-03-06][2022-01-12]. <http://download.ceris.purdue.edu/file/3441>.
- [7] AGARKOVA I, ALDERMAN S, BULLUCK R, DIVAN C, CARLSON M, SCHAAD N W, TUO W B, VIDAVER A. Recovery plan for rathayibacter poisoning caused by *Rathayibacter toxicus* (syn. *Clavibacter toxicus*). (2010-02-10)[2021-03-06]. <https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/00000000/opmp/RathayibacterPoisoningFeb2010.pdf>.
- [8] CDFA. California pest rating for *Anguina funesta*. (2017-06-05)[2021-03-07]. <https://blogs.cdfa.ca.gov/Section3162/?p=3728>.
- [9] 赵金龙, 唐芳林, 刘永杰. 生态文明建设背景下我国草坪业发展的思考. *草业科学*, 2021, 38(10): 2077-2086.
- ZHAO J L, TANG F L, LIU Y J. Thoughts on development of China's turf industry in the context of ecological civilization construction. *Pratacultural Science*, 2021, 38(10): 2077-2086.
- [10] DE LEY P, FELIX M A, FRISSE L M, NADLER S A, STERNBERG P W, THOMAS W K. Molecular and morphological characterization of two reproductively isolated species with mirror-image anatomy (Nematoda: Cephalobidae). *Nematology*, 1999, 1(6): 591-612.
- [11] FERRIS V R, FERRIS J M, FAGHIHI J. Variation in spacer ribosomal DNA in some cyst-forming species of plant parasitic nematodes. *Fundamental and Applied Nematology*, 1993, 16(2): 177-184.
- [12] VRAIN T C. Restriction fragment length polymorphism separates species of the *Xiphinema americanum* group. *Journal of Nematology*, 1993, 25: 361-364.
- [13] 宋绍祯, 俞禄珍, 张博文, 戚龙君, 田沂民, 李友军. 美国剪股颖种子中剪股颖粒线虫的检疫鉴定. *植物检疫*, 2019, 33(1): 39-43.
- SONG S Y, YU L Z, ZHANG B W, QI L J, TIAN Y M, LI Y J. Identification of *Anguina Agrostis* in *Agrostis tenuis* from USA. *Plant Quarantine*, 2019, 33(1): 39-43.
- [14] 宋绍祯, 俞禄珍, 戚龙君, 杨娟, 易建平. 美国画眉草种子中维氏粒线虫的鉴定. *植物检疫*, 2015, 29(6): 39-43.
- SONG S Y, YU L Z, QI L J, YANG J, YI J P. Identification of *Anguina wevelli* in *Eragrostis curvula* from USA. *Plant Quarantine*, 2015, 29(6): 39-43.
- [15] MOBASSERI M, PEDRAM M, POURJAM E, BERTOZZI T. Description of a new species of seed-gall nematode, *Anguina obesa* n. sp. (Nematoda: Anguinidae) from northern Iran, and its phylogenetic relations with other species and genera. *European Journal of Plant Pathology*, 2017, 148: 423-434.
- [16] POWERS T O, SZALANKI A L, MULLIN P G, HARRIS T S, BERTOZZI T, GRIESBACH J A. Identification of seed gall nematodes of agronomic and regulatory concern with PCR-RFLP of ITS1. *Journal of Nematology*, 2001, 33(4): 191-194.
- [17] 王金成, 马以桂, 周春娜, 杜宇, 黄国明, 丁元明, 谢辉. 剪股颖粒线虫幼虫形态与分子检测方法. *植物检疫*, 2005, 19(2): 84-86.
- WANG J C, MA Y G, ZHOU C N, DU Y, HUANG G M, DING Y M, XIE H. Molecular identification bentgrass nematode, bying he single juvenile. *Pant Quarantine*, 2005, 19(2): 84-86.
- [18] 马以桂, 王金成, 谢辉, 周春娜, 杜宇, 黄国明, 李芳荣. 3种粒线虫多重PCR检测方法. *植物病理学报*, 2006, 36(6): 508-511.
- MA Y G, WANG J C, XIE H, ZHOU C N, DU Y, HUANG G M, LI F R. Multiple-PCR detection on three species of *Anguina* genus. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2006, 36(6): 508-511.
- [19] LI W B, YAN Z H, NAKHLA M K, SKANTAR A M. Real-Time PCR for Detection and Identification of *Anguina funesta*, *A. agrostis*, *A. tritici*, and *A. pacificae*. *Plant Disease*, 2015, 99(11): 1584-1589.
- [20] GRIESBACH J A, CHITAMBAR J J, HAMERLYNCK M J, DUARTE E O. A comparative analysis of extraction methods for the recovery of *Anguina* sp. from grass seed samples. *Journal of Nematology*, 1999, 33(4S): 635-640.

(责任编辑 王芳)