

## 西班牙根结线虫 rDNA 特性及其检测方法

胡永坚, 王暄, 李红梅\*

(南京农业大学农业部病虫监测与治理重点开放实验室, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 通过对 rDNA 的 ITS 区和 IGS2 区进行 PCR 扩增并对产物测序, 比较分析了西班牙根结线虫与中国 4 种常见的南方根结线虫、爪哇根结线虫、花生根结线虫和北方根结线虫群体 rDNA 的 ITS 区和 IGS2 区的序列差异, 选择限制性内切酶 *Taq* I 对 IGS2 区的 PCR 扩增产物进行酶切, 获得了西班牙根结线虫的 554 bp 的特异性条带。表明用此方法可以明显将西班牙根结线虫与其他 4 种常见的根结线虫群体区分开, 其灵敏度可达到单条根结线虫二龄幼虫。

**关键词:** 西班牙根结线虫; rDNA; ITS; IGS2; RFLP

中图分类号: S432.4<sup>+</sup>5 文献标识码: A 文章编号: 1000-2030(2007)04-0062-04

## Characterization of rDNA and detection of *Meloidogyne hispanica*

HU Yong-jian, WANG Xuan, LI Hong-mei\*

(Key Laboratory of Monitoring and Management of Diseases and Insects,  
Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** The internal transcribed spacers (ITS) and intergenic spacer 2 (IGS2) of rDNA were amplified and the PCR products were sequenced from populations of *Meloidogyne hispanica*. Based on the differences between the sequences of *M. hispanica*, *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, and *M. hapla*, RFLP was carried out on the PCR products of IGS2 region by *Taq* I, and a specialized 554 bp fragment from *M. hispanica* can distinguish it from the other four *Meloidogyne* species. Reliability and sensitivity of IGS2-RFLP can be achieved from the single juvenile.

**Key words:** *Meloidogyne hispanica*; rDNA; ITS; IGS2; RFLP

根结线虫 (*Meloidogyne* spp.) 是世界上分布最广, 对农作物危害最严重的植物病原线虫之一。在中国目前已报道的根结线虫有效种为 39 种, 其中被记载和描述充分的有 20 种<sup>[1]</sup>。

早期的根结线虫鉴定方法主要以形态学特征和蛋白酶同工酶谱为主。形态学特征存在种内变异性, 而在种间的重叠性、准确性又较差; 虽然同工酶方法既快速又准确, 但该方法只适用于发育成熟的雌虫。近年来, 基于 PCR 技术的分子鉴定方法发展迅速, 与形态学和同工酶鉴定法比较, PCR 鉴定法的突出优势是结果可靠、检测灵敏 (可诊断单条幼虫) 和适用于线虫各虫态阶段。目前国际上针对根结线虫的 PCR 鉴定法建立的解决方案主要有基于 rDNA 的内转录间隔区 (ITS) 和基因间隔区 (IGS) 的 PCR-RFLP 法<sup>[2-5]</sup>, 基于 mtDNA 序列的 mtDNA-RFLP 法<sup>[6-7]</sup> 和基于序列特征扩增区域 (SCAR) 的 SCAR-PCR 法<sup>[8-9]</sup>。

本研究中, 我们分析了西班牙根结线虫 (*Meloidogyne hispanica*) 与我国 4 种主要根结线虫群体在 rDNA 中 ITS 区和 IGS2 区的序列差异性, 并以 IGS2 区 PCR 产物为酶切底物, 建立了西班牙根结线虫的快速分子检测方法。

### 1 材料与方法

#### 1.1 线虫群体

供试根结线虫群体的种类和来源见表 1。采集的根结线虫群体均先以单卵块接种法纯化, 然后挑取处于产卵盛期的雌虫进行苹果酸脱氢酶 (MDH) 和酯酶 (Est) 同工酶表型的鉴定确认, 然后接种在感

收稿日期: 2006-10-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30471141); 国家 863 计划项目 (2001AA249021)

作者简介: 胡永坚, 硕士研究生。\* 通讯作者: 李红梅, 副教授, 从事植物线虫学研究, E-mail: lihongmei70@hotmail.com。

病番茄品种苏红 2003 上, 20 ~ 28 °C 条件下 (温室中) 常年繁殖。

表 1 根结线虫群体的种类、来源和蛋白酶同工酶谱

Table 1 Species, origins and isozyme phenotypes of *Meloidogyne* populations used in the study

种 Species	群体代码 Population code	采集地 Origin	同工酶表型 Isozyme phenotypes	
			MDH	Est
南方根结线虫	MIFJ1	中国福建 Fujian, China	N1	I2
<i>M. incognita</i>	MIT1	意大利 Italy	N1	I2
瓜哇根结线虫	MJFJ1	中国福建 Fujian, China	N1	J3
<i>M. javanica</i>	MJBE1	比利时 Belgium	N1	J3
花生根结线虫	MAJS1	中国江苏 Jiangsu, China	N1	A2
<i>M. arenaria</i>	MAYN1	中国云南 Yunnan, China	N1	A1
北方根结线虫	MHSD1	中国山东 Shandong, China	H1	H1
<i>M. hapla</i>	MHHO1	荷兰 Netherlands	H1	H1
西班牙根结线虫	MSHN1	中国海南儋州 Danzhou, Hainan, China	N1	S2 - M1
<i>M. hispanica</i>	MSHN2	中国海南儋州 Danzhou, Hainan, China	N1	S2 - M1

## 1.2 线虫 DNA 的提取

单条根结线虫的 DNA 提取方法如下: 取 5  $\mu\text{L}$  裂解缓冲液 ( $1 \times \text{ExTaq}$  PCR Buffer,  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  蛋白酶 K, TaKaRa) 到洁净凹玻片上, 手工挑入单条二龄幼虫 (雌虫或雄虫) 用自制钢针将线虫压破; 然后将含破碎线虫的裂解缓冲液移入 PCR 管中, 置于  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中冷冻 30 min; 冷冻后的单条线虫样本在 PCR 扩增前, 先要进行  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  1 h、 $95 \text{ }^\circ\text{C}$  15 min 的预处理 (使蛋白酶 K 失活)。

## 1.3 rDNA-ITS 和 rDNA-IGS2 区域 PCR 扩增

采用 Blok 等<sup>[10]</sup> 设计的 IGS2 通用引物对 194 (5'-TTAACTTGCCAGATCGGACG-3') 和 195 (5'-TCTAATGAGCCGTACGC-3') 以及 Vrain 等<sup>[11]</sup> 设计的 ITS 通用引物对 18S (5'-TCATTACGTCCCTGCCCTTTG-3') 和 28S (5'-TTTCACTCGCCGTTACTAAG-3'), 分别对西班牙根结线虫的 2 个群体和 4 种常见根结线虫的代表性群体进行 rDNA-IGS2 和 rDNA-ITS 区域的扩增。

PCR 反应体系 ( $12.5 \mu\text{L}$ ): 5 ng 总基因组 DNA 或  $5 \mu\text{L}$  单条线虫 DNA 提取液, 引物各  $0.4 \mu\text{mol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , dNTPs  $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $1 \times \text{PCR}$  Buffer,  $\text{MgCl}_2$   $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $0.5 \text{ U}$  *ExTaq* DNA 聚合酶 (TaKaRa, Japan)。PCR 反应程序:  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  4 min;  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  30 s,  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  30 s,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  1 min, 40 个循环; 最后  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸 10 min。PCR 反应结束后, 将  $3 \mu\text{L}$  PCR 产物加至 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳, EB 染色, 凝胶成像系统上观察、拍照。

## 1.4 PCR 产物的回收、克隆和测序

为了获得西班牙根结线虫 rDNA-ITS 和 rDNA-IGS2 的 PCR 产物, 选取群体 MSHN1 和 MSHN2 的 ITS 和 IGS2 凝胶条带, 切胶后, 用 Agarose Gel DNA Fragment Recovery Kit (TaKaRa Biotechnology) 回收纯化。将纯化后的 PCR 扩增产物克隆至质粒载体 pGEM-T Easy (Promega, Madison, USA) 上, 交上海生物工程技术有限公司进行测序。测序反应在 ABI PRISM 377-96 测序仪上进行, 用 BigDye terminator 反应 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, USA)。

## 1.5 酶切 rDNA-IGS2 区 RFLP

根据序列同源性的关系, 选择 rDNA-IGS2 扩增产物进行酶切分析。将测定的西班牙根结线虫 rDNA-IGS2 区序列与 GenBank 中已报道的南方根结线虫、花生根结线虫、瓜哇根结线虫和北方根结线虫序列进行 BLAST 比对, 找出西班牙根结线虫特异性酶切位点。分别以单条南方根结线虫、花生根结线虫、瓜哇根结线虫、北方根结线虫和西班牙根结线虫的 rDNA-IGS2 区 PCR 产物为酶切底物, 用 *Taq* I 限制性内切酶  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  下酶切 1 h。反应体系 ( $20 \mu\text{L}$ ): PCR 产物  $10 \mu\text{L}$ , *Taq* I  $1 \mu\text{L}$ ,  $10 \times \text{Taq}$  I Basal Buffer  $2 \mu\text{L}$ , 0.1% BSA  $2 \mu\text{L}$ , 灭菌水  $5 \mu\text{L}$ 。取  $3 \mu\text{L}$  酶切产物加至 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳, EB 染色, 凝胶成像系统上观察、拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 rDNA-ITS 和 rDNA-IGS2 序列比较

2.1.1 rDNA-ITS 图 1-A 显示, 2 个西班牙根结线虫群体的扩增产物与我国 4 个常见线虫群体的大小

相似，均为 760 bp 左右。序列比较表明，西班牙根结线虫与南方根结线虫、爪哇根结线虫和花生根结线虫同源性较高，分别为 99.69%、99.38% 和 99.85%，与北方根结线虫同源性相对较低，为 82.03%。

2.1.2 rDNA-IGS2 如图 1-B 所示，2 个西班牙根结线虫群体的扩增产物与南方根结线虫、爪哇根结线虫和花生根结线虫群体的大小相似，为 710 bp 左右，北方根结线虫的扩增产物大小为 668 bp 左右。序列同源性比较表明，西班牙根结线虫与南方根结线虫、爪哇根结线虫和花生根结线虫有较高的同源性，分别为 93.31%、93.75% 和 94.32%，与北方根结线虫同源性相对较低，为 57.01%。

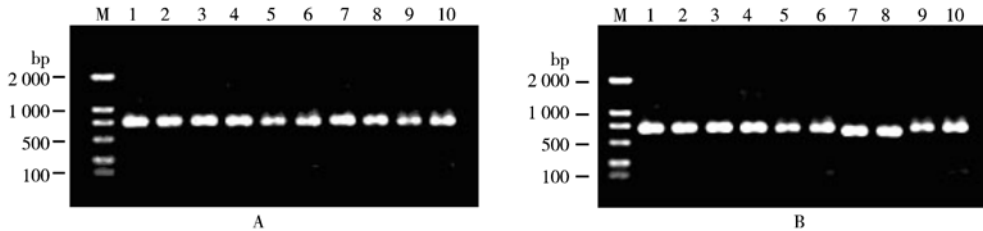


图 1 南方根结线虫、爪哇根结线虫、花生根结线虫、北方根结线虫和西班牙根结线虫代表性群体 rDNA-ITS 区 (A) 和 rDNA-IGS2 区 (B) 的 PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR product amplified from the ITS region (A) and the IGS2 region (B) from representative populations of *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. hapla* and *M. hispanica*

1. MIFJ1; 2. MITI1; 3. MJFJ1; 4. MJBE1; 5. MAYN1; 6. MAJS1; 7. MHSD1; 8. MHHO1; 9. MSHN1; 10. MSHN2; M. DL2000 DNA marker (TaKaRa). The same as follows.

### 2.2 PCR-RFLP 酶切图谱

由于西班牙根结线虫与南方根结线虫、爪哇根结线虫和花生根结线虫 ITS 序列的同源性达到 99% 以上，因此选择同源性相对较低的 IGS2 作为酶切检测对象。根据 *Taq* I 酶的酶切位点，南方根结线虫 IGS2 的 PCR 产物被酶切为 26、118、191 和 378 bp 4 个片段；花生根结线虫为 26、119、191 和 378 bp 4 个片段；爪哇根结线虫为 26、119、191 和 378 bp 4 个片段；北方根结线虫为 33、188、200 和 247 bp 4 个片段；西班牙根结线虫为 17、26、119 和 554 bp 4 个片段。利用 *Taq* I 酶对表 1 中 5 种根结线虫的各群体进行 IGS2 区的 PCR-RFLP 酶切检测，检测结果与预期结果一致 (图 2)。

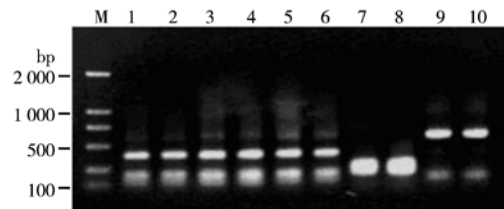


图 2 南方根结线虫、爪哇根结线虫、花生根结线虫、北方根结线虫和西班牙根结线虫代表性群体 IGS2 区 *Taq* I 酶切产物

Fig. 2 *Taq* I restriction products of the IGS2 region from representative populations of *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. hapla* and *M. hispanica*

西班牙根结线虫 rDNA-IGS2 区域的 PCR 扩增产物经酶切产生的 554 bp 的特异性条带，明显大于其他 4 种根结线虫经酶切所产生的条带，表明用 *Taq* I 酶对 rDNA-IGS2 区域的 PCR 扩增产物进行酶切的方法可以将西班牙根结线虫与其他 4 种常见的根结线虫群体区分开。

### 3 讨论

西班牙根结线虫最初报道自西班牙塞维利亚地区，原始寄主为桃树，并可寄生番茄、大豆等多种植物。为控制这种病原线虫的扩散和传播，迫切需要建立一种可靠、灵敏的分子诊断方法。

针对 *M. incognita*、*M. javanica* 和 *M. arenaria* 的 SCAR-PCR 分子诊断方法已经得到成功的应用<sup>[12]</sup>，本研究在比较西班牙根结线虫与我国 4 种主要根结线虫群体南方根结线虫、爪哇根结线虫、花生根结线虫和北方根结线虫在 rDNA 中 ITS 区和 IGS2 区序列差异的基础上，选取同源性相对较低的 IGS2 作为酶切检测对象，并发现除了限制性内切酶 *Taq* I 外并无其他限制性内切酶能将西班牙根结线虫与我国 4 种常见的根结线虫群体有效区分开。用限制性内切酶 *Taq* I 对 IGS2 区 PCR 扩增产物进行酶切，可获得西班牙根结线虫的 554 bp 的特异性条带。这是国内外首次利用 IGS2-RFLP 的方法鉴定西班牙根结线虫，此方法灵敏度可达到单条根结线虫二龄幼虫。运用该方法快速准确地鉴定西班牙根结线虫对于当前控制该病原线虫的扩散和传播具有重要意义。

## 参考文献:

- [1] 刘维志. 植物线虫志 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 313-314
- [2] Zijlstra C, Lever A E M, Uenk B J, et al. Difference between ITS region of isolates of the root-knot nematodes *M. hapla* and *M. chitwoodi* [J]. *Phytopathology*, 1995, 85: 1231-1237
- [3] Zijlstra C, Uenk B J, van Silfhout C H. A reliable, precise method to differentiate species of root-knot nematode in mixtures on the basis of ITS-RFLP [J]. *Fundam Appl Nematol*, 1997, 20(1): 59-63
- [4] Pertersen D J, Vrain T C. Rapid identification of *M. chitwoodi*, *M. hapla*, and *M. fallax* using PCR primers to amplify their ribosomal intergenic spacer [J]. *Fundam Appl Nematol*, 1996, 19(6): 601-605
- [5] Wishart J, Phillips M S, Blok V C. Ribosomal intergenic spacer: a polymerase chain reaction diagnostic for *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla* [J]. *Phytopathology*, 2002, 92: 884-892
- [6] Stanton J, Hugall A, Moritz C. Nucleotide polymorphisms and an improved PCR-based mtDNA diagnostic for parthenogenetic root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) [J]. *Fundam Appl Nematol*, 1997, 20(3): 261-268
- [7] Xu J H, Liu P L, Meng Q P, et al. Characterisation of *Meloidogyne* species from China using isozyme phenotypes and amplified mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2004, 110: 309-315
- [8] Zijlstra C. Identification of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla* based on SCAR-PCR: a powerful way of enabling reliable identification of populations or individuals that share common traits [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2000, 106: 283-290
- [9] Fourie H, Zijlstra C, McDonald A H. Identification of root-knot nematode species occurring in South Africa using the SCAR-PCR technique [J]. *Nematology*, 2001, 3(7): 675-680
- [10] Blok V C, Phillips M S, Fargette M. Comparison of sequences from the ribosomal DNA intergenic region of *Meloidogyne mayaguensis* and other major tropical root-knot nematodes [J]. *Journal of Nematology*, 1997, 29(1): 16-22
- [11] Vrain T C, Wakarchuk D A, Levesque A C, et al. Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group [J]. *Fundam Appl Nematol*, 1992, 15(6): 563-573
- [12] 孟庆鹏, 龙海, 徐建华. 南方、爪哇和花生根结线虫的快速灵敏的 PCR 鉴定方法 [J]. *植物病理学报*, 2004, 34(3): 204-210

责任编辑: 夏爱红