

基于 rDNA-ITS 的中国外来香蕉穿孔线虫种群的系统发育分析

李云^{1,2} 秦萌³ 徐春玲¹ 李俊毅¹
刘淑婷¹ 吴文佳¹ 谢辉¹

1. 华南农业大学农学院/华南农业大学植物检疫线虫检测与防疫研究中心, 广州 510642;
2. 山东省东营市妇女联合会, 东营 257000; 3. 全国农业技术推广服务中心, 北京 100125;

摘要 为揭示传入中国的香蕉穿孔线虫群体间的遗传差异, 分析其亲缘和进化关系, 明确中国香蕉穿孔线虫的来源和传入途径, 分别扩增了多雌繁殖群体和相应种群的单雌繁殖群体后代 rDNA-ITS, 对扩增产物进行测序, 通过序列比对分析其遗传变异, 并构建系统发育树研究其亲缘和进化关系。结果表明: 供试香蕉穿孔线虫 20 个种群的 rDNA-ITS 序列大小为 705~713 bp, 序列同源性比较高, 相似性在 95% 以上, 序列变异率为 0~7.5%; 各群体 ITS1 和 ITS2 序列大小分别为 273~276 bp 和 151~152 bp, 各种群间的序列相似性分别达到 98.58% 和 98.35% 以上; 单雌繁殖群体与相应的多雌繁殖群体的序列相似性非常高, 有 8 个种群的 2 个繁殖群体序列相似性达到 100%, 其他种群的 2 个繁殖群体序列相似性达 97% 以上; 基于 ITS 序列构建穿孔属线虫的系统发育树说明, 所有香蕉穿孔线虫聚在一个大枝, 分成 4 小分枝, 其中寄主为红掌的 RsW 种群单独聚为一枝, 遗传距离较远, 寄主为绿宝石的 RsH 遗传距离相对其他种群也较远, 寄主分别为天鹅绒竹芋和孔雀竹芋的 RsP 和 RsS 种群的遗传距离则相对较近, 这说明传入中国的香蕉穿孔线虫种群可能直接来源是欧洲的竹芋科和天南星科观赏植物, 而前者的最初来源可能是苏丹的香蕉, 后者的最初地理来源较复杂。

关键词 香蕉穿孔线虫; 系统发育; ITS

中图分类号 S 432.45 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)06-0039-08

香蕉穿孔线虫 [*Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne, 1949] 是世界范围的检疫性有害生物, 已知寄主多达 250 多种^[1-3], 严重危害香蕉 (*Musa* spp.)、柑橘 (*Citrus* spp.) 和胡椒 (*Piper nigrum*) 等经济作物以及天南星科 (Araceae) 和竹芋科 (Marantaceae) 等观赏植物^[4-7], 目前已报道有该线虫分布的国家和地区超过 90 个^[8]。近些年, 随着我国花卉业迅速发展, 从国外引进花卉的种类和数量日益增加, 不同省份之间的花卉调运也日益频繁, 其中不少进口花卉是香蕉穿孔线虫的寄主植物且来自香蕉穿孔线虫发生的国家和地区, 加剧了香蕉穿孔线虫传入我国以及在国内扩散蔓延的风险。为了控制香蕉穿孔线虫进一步传入和扩散的风险, 有必要对传入我国的香蕉穿孔线虫不同种群之间的系统发育关系进行研究, 研究结果可以为掌握香蕉穿孔线虫不

同种群的地理和寄主来源、提高香蕉穿孔线虫检疫监测针对性, 提供重要依据。目前分子标记特征已被广泛应用于研究生物种类的起源和系统进化, 在植物寄生线虫分子诊断和系统进化研究上应用较多的一个手段是内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS) 的序列特征分析, 完整的 ITS 序列包括 ITS1、5.8S 基因和 ITS2 区^[9]。ITS 序列是一个多用途的遗传标记, 其在植物线虫的分类鉴定和多样性分析上被证明是很有用的区域, 应用越来越广泛^[9]。目前已经在垫刃类、滑刃类及长针类等多种经济重要性的植物寄生线虫上广泛应用^[10-14]。此外, 在香蕉穿孔线虫种类鉴定、快速检测和系统进化研究上的应用也非常广泛^[15-21]。近年来, 在我国温室种植的观赏植物上不断发现香蕉穿孔线虫, 且检疫部门也不断在进口的植物上发现该类线虫, 但关

收稿日期: 2016-11-27

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30471163; 30671366); 农作物病虫害疫情监测与防治项目 (10162130108235047)

李云, 博士, 研究方向: 植物病原线虫, E-mail: 6710557@qq.com

通信作者: 谢辉, 博士, 教授, 研究方向: 植物病原线虫, E-mail: xiehui@scau.edu.cn

于这类线虫的起源尚不清楚。本研究拟对采自国内温室或口岸截获的来自观赏植物根际和生姜 (*Zingiber officinale* Roscoe) 的 20 个香蕉穿孔线虫种群的多雌繁殖群体和单雌繁殖群体的 rDNA-ITS 进行 PCR 扩增和产物测序, 对序列进行分析, 开展基于 rDNA-ITS 序列的多态性研究, 分析其遗传多样性和系统发育关系, 以揭示传入中国的香蕉穿孔线虫群体间的序列差异, 研究其遗传多态性和亲缘进化关系, 旨在为进一步的检疫防控奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试香蕉穿孔线虫种群(表 1)是从进口观赏植

物上截获或从国内温室和大棚内种植的观赏植物上采集分离, 由笔者所在研究室鉴定并培养保存在胡萝卜愈伤组织上^[22]。香蕉穿孔线虫 ITS 扩增使用的通用引物如下: P1: 5'-GTAACAAGGTAGCTGTAG-3', 5'-TTCCTCGCCGTACTAAGG-3'^[23-24]。

1.2 线虫的培养

胡萝卜愈伤组织的制备, 香蕉穿孔线虫不同种群 25 条雌虫和单条雌虫繁殖群体的接种培养参照文献^[25]进行。

1.3 线虫的收集

用无菌水浸泡冲洗培养繁殖线虫的胡萝卜片, 将线虫悬浮液收集到 1.5 mL 离心管内, 6 000 r/min 离心 2~3 min, 弃去上清液, 用无菌水同样条

表 1 香蕉穿孔线虫种群信息

Table 1 Origin of *Radopholus similis* populations used in this study

编号 Code	地点 Original locations	寄主 Hosts	序列号 GenBank accession
RsA/RsAs	荷兰(截获) Netherlands (intercepted)	天鹅绒竹芋 <i>Calathea zebrina</i>	JQ782227
RsB/RsBs	国内温室 China greenhouse	国王椰子 <i>Ravenea rivularis</i>	JQ782228
RsC/RsCs	荷兰(截获) Netherlands (intercepted)	肖竹芋 <i>Calathea</i> sp.	JQ782229
RsD/RsDs	国内温室 China greenhouse	富贵椰子 <i>Chamaedorea cataractarum</i>	JQ782230
RsE/RsEs	国内温室 China greenhouse	绿宝石 <i>Philodendron</i> sp.	JQ782231
RsG/RsGs	国内温室 China greenhouse	富贵椰子 <i>Chamaedorea cataractarum</i>	JQ782232
RsH/RsHs	国内温室 China greenhouse	绿宝石 <i>Philodendron</i> sp.	JQ782233
RsI/RsIs	国内温室 China greenhouse	红掌 <i>Anthurium andraeanum</i>	JQ782234
RsJ/RsJs	国内温室 China greenhouse	红掌 <i>Anthurium andraeanum</i>	JQ782235
RsK/RsKs	国内温室 China greenhouse	天鹅绒竹芋 <i>Calathea zebrina</i>	JQ782236
RsL/RsLs	国内温室 China greenhouse	绿萝 <i>Epipremnum aureum</i>	JQ782237
RsM/RsMs	马来西亚(截获) Malaysia (intercepted)	红果 <i>Stranvaesia</i> sp.	JQ782238
RsN/RsNs	国内温室 China greenhouse	散尾葵 <i>Chrysalidocarpus lutescens</i>	JQ782239
RsP/RsPs	国内温室 China greenhouse	天鹅绒竹芋 <i>Calathea zebrina</i>	JQ782240
RsS/RsSs	国内温室 China greenhouse	孔雀竹芋 <i>Calathea makoyana</i>	JQ782241
RsT/RsTs	国内温室 China greenhouse	雨淋竹芋 <i>Calathea</i> sp.	JQ782242
RsV/RsVs	中国香港(出入境截获) China, Hong Kong	红掌 <i>Anthurium andraeanum</i>	JQ782243
RsW/RsWs	国内温室 China greenhouse	红掌 <i>Anthurium andraeanum</i>	JQ782244
RsY/RsYs	国内温室 China greenhouse	红掌 <i>Anthurium andraeanum</i>	JQ782245
RsXj/RsXjs	新加坡(截获) Singapore (intercepted)	生姜 <i>Zingiber officinale</i> Roscoe	JQ782246

注: 编号中前者表示接种 25 条雌虫的繁殖群体, 后者表示接种相应种群的单条雌虫繁殖群体。Note: In the column of code, the former letters mean the progeny of 25 females, and the latter mean the progeny of single female from the same population.

件离心洗涤 3 次, 弃去上清, 备用。

1.4 线虫 DNA 的提取

供试香蕉穿孔线虫各种群的多雌繁殖群体的后代采用申能博彩 3S Spin Genimic DNA Miniprep Kit V3.0 提取基因组 DNA, 试验方法同操作手册。供试

香蕉穿孔线虫各种群的单雌繁殖群体采用单条虫 DNA 提取的方法^[26]。将得到的 DNA 悬浮液 2 μ L 作为模板进行 ITS 扩增, 或放入 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.5 PCR 扩增及测序

反应体系: 模板 DNA 2 μ L, 10 \times PCR Buffer

(含 Mg^{2+}) (TaKaRa) 5 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 2 μ L, 上游引物 (10 μ mol/L) 3 μ L, 下游引物 (10 μ mol/L) 3 μ L, rTaq DNA 聚合酶 0.4 μ L, 加超纯水使反应体系为 50 μ L。

反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 40 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 保温 5 min, 使反应物充分延伸。扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 使用凝胶成像系统检查扩增结果并拍照。对扩增产物进行纯化、回收并连接到载体 pMD-18T 上, 转化至大肠杆菌 DH5 α 上, 然后进行培养并涂布 LB 平板, 使用蓝白斑和 PCR 鉴定的方法进行阳性克隆鉴定, 并把阳性克隆菌液送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.6 序列分析及系统发育树构建

在 NCBI 上使用 Blastn 进行同源性搜索比对分析。使用 DNA Star 软件生成相似性系数矩阵, 使

用 MEGA v6 分析 ITS1、5.8S 和 ITS2 的区间分布和序列组成, 计算各种群间的遗传距离及标准差, 最后提交序列到 GenBank 数据库中 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>), 序列号见表 1。在 GenBank 数据库中下载已发表的香蕉穿孔线虫和榴莲穿孔线虫 (*R. duriophilus*)、阿拉伯咖啡穿孔线虫 (*R. arabocoffeae*)、咖啡短体线虫 (*Pratylenchus coffeae*) 的 ITS 序列 (表 2), 去掉已扩增和下载的 ITS 两端的部分 18S 和 28S 序列, 使用 MEGA v6 中的 ClustalW 功能进行比对, 然后在在线服务器 Gblock 0.91b (http://www.phylogeny.fr/version2cgi/one_task.cgi?task_type=gblocks) 选择序列的保守区间, 用 DAMBE 软件测试碱基替换饱和度和, 使用 MrModeltest v2.3 软件选择最佳模型, 最后用 MrBayes v3.1.2 贝叶斯算法构建系统发育树。

表 2 序列分析引用的 GenBank 中相关序列信息

Table 2 Sequence information downloaded from GenBank

线虫种类 Nematode species	序列号 GenBank number	寄主 Host	地理来源 Geological location	文献 References
<i>Radopholus similis</i>	HM469456	<i>Anthurium</i> spp.	Macau	[21]
<i>R. similis</i>	FJ455831	<i>Musa</i> spp.	Malaysia	[17]
<i>R. similis</i>	AF375350	<i>Philodendron</i> spp.	Germany	[17]
<i>R. similis</i>	AF375351	<i>Musa</i> spp.	Cuba	[17]
<i>R. similis</i>	AF375352	<i>Musa</i> spp.	Guinea	[17]
<i>R. similis</i>	AF375353	<i>Musa</i> spp.	Uganda	[17]
<i>R. similis</i>	AF375355	<i>Musa</i> spp.	Panama	[17]
<i>R. similis</i>	AF375358	<i>Musa</i> spp.	Costa Rica	[17]
<i>R. similis</i>	AF375359	<i>Musa</i> spp.	South Africa	[17]
<i>R. similis</i>	AF375360	<i>Musa</i> spp.	Australia	[17]
<i>R. similis</i>	AF375361	<i>Anthurium andreaenum</i>	Belgium	[17]
<i>R. similis</i>	AF375374	<i>Musa</i> spp.	Sudan	[17]
<i>R. similis</i>	AF375385	<i>Calathea makoyana</i>	Belgium	[17]
<i>R. similis</i>	AF375387	<i>Musa</i> spp.	Sudan	[17]
<i>R. similis</i>	AF375395	<i>Musa</i> spp.	Sudan	[17]
<i>R. duriophilus</i>	AY257199	<i>Durio zibetinus</i> M.	Vietnam	[27]
<i>R. duriophilus</i>	HQ823571	<i>Coffeae canephora</i>	Vietnam	[28]
<i>R. arabocoffeae</i>	AY547297	<i>Coffeae arabica</i>	Vietnam	[29]
<i>Pratylenchus coffeae</i>	JN809833	<i>Colocasia esculenta</i>	Japan	直接提交 Submitted directly

2 结果与分析

2.1 香蕉穿孔线虫的 ITS 扩增及序列分析

使用通用引物对供试 20 个香蕉穿孔线虫种群的多雌繁殖和单雌繁殖群体的 rDNA 进行扩增, 结果显示, 各试验群体 rDNA-ITS 的 PCR 产物大小约为 750 bp。测序结果表明, 各种群多雌繁殖和单雌

繁殖群体的 rDNA-ITS (包括 ITS1、ITS2、5.8S 基因和部分 18S 和 28S 基因) 序列大小为 705~713 bp。将 20 个种群的多雌繁殖群体 ITS 序列分别提交 GenBank (序列号见表 1) 并进行序列比对, 结果显示与 GenBank 中香蕉穿孔线虫的 ITS 序列相似性达到 94% 以上。将供试种群 ITS 区的测序结果去掉两端引物序列, 与 GenBank 中下载并进行同样序

列剪切处理后的香蕉穿孔线虫、穿孔属的其他种类 (*R. durophilus* 和 *R. arabocoffeae*) 以及作为外族的咖啡短体线虫的 ITS 序列(表 2) 进行比对和相似性分析(图 1), 结果显示供试 20 个香蕉穿孔线虫种群间的序列相似性在 95% 以上。20 个种群的 ITS 序列经 ClustalX 1.8 软件对比, 共有 589 个位点, 运用 MEGA 序列分析在 589 个位点中共检测到保守位点 544 个; 变异位点 41 个, 占总平均序列的 7.5%; 简约信息位点 19 个; A、T、C、G 的平均含量分别为 26.2%、27%、22.5%、24.3%, A + T 高于 G + C 的含量。各种群 ITS1 序列大小为 273~276 bp, ITS2 区为 151~152 bp, 经序列比对 ITS1 区的相似性为 98.58%, ITS2 区的相似性为 98.35%。

将单雌繁殖群体与同种群的多雌繁殖群体分别进行 ITS 序列比对, 其中有 8 个种群 (RsB、RsI、RsL、RsN、RsS、RsT、RsV、RsY) 的序列相似性为 100%, 除了 RsK、RsW 种群的相似性在 97% 左右外, 其他的相似性都在 99% 以上。

2.2 香蕉穿孔线虫种群系统发育分析

以咖啡短体线虫为外族基于 ITS 序列在

GTR+I+G 模型下构建穿孔属线虫的系统发育树(图 2), 由图 2 可知, 所有的穿孔属线虫聚在一起, 与咖啡短体线虫明显聚在不同的分枝; 所有香蕉穿孔线虫聚在一个大枝, 来自越南但寄主不同的 2 个榴莲穿孔线虫种群聚在一起, 与阿拉伯咖啡穿孔线虫亲缘关系最近, 聚在一个大枝。香蕉穿孔线虫进化分枝中, 寄主分别为天鹅绒竹芋、绿宝石和生姜的 RsA、RsH、RsXj 种群以及寄主均为红掌的 RsJ 和 RsY 种群与 GenBank 中来自苏丹寄主为香蕉的 AF375387 和 AF375395 聚为一枝, 但 RsH 遗传距离较远; 寄主分别为肖竹芋和天鹅绒竹芋的供试 RsC 和 RsK 种群与 GenBank 中来自非洲苏丹的香蕉 (AF375374) 和来自比利时的孔雀竹芋种群 (AF375385) 聚为一枝, 其中 RsK 遗传距离较短; 寄主为红掌的供试 RsW 种群单独聚为一枝, 遗传距离较远; 其他供试种群与 GenBank 中寄主为香蕉的马来西亚种群 FJ455831 种群聚为一大枝, 但马来西亚种群 FJ455831 遗传距离相对较远, 寄主分别为天鹅绒竹芋和孔雀竹芋的供试 RsP 和 RsS 种群与其他相比, 遗传距离较短; 其他种群基本一致。

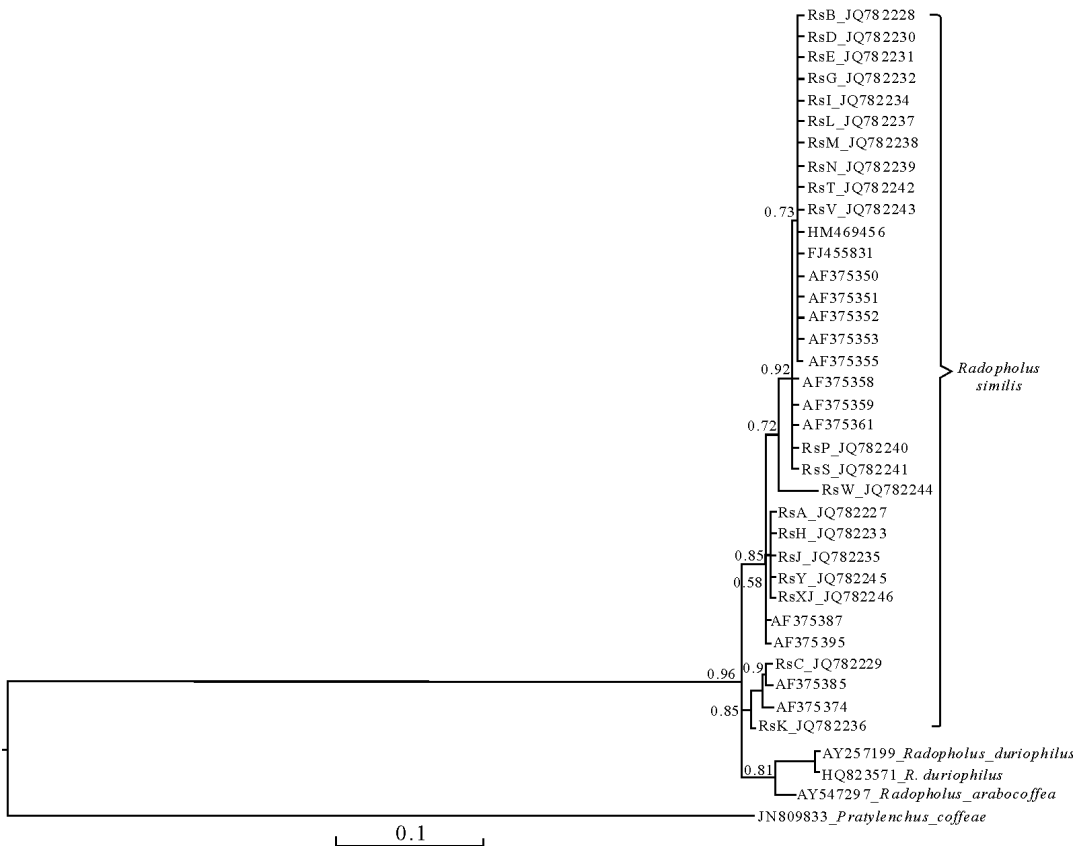


图 2 基于供试 20 个香蕉穿孔线虫种群 rDNA-ITS 序列构建的系统发育进化树

Fig.2 Phylogenetic relationships of 20 populations of *Radopholus similis* based on rDNA-ITS gene sequences

3 讨 论

供试 20 个香蕉穿孔线虫种群的多雌繁殖和单雌繁殖群体的 ITS 序列的测定和比较结果表明,供试香蕉穿孔线虫 ITS 区的同源性高,各多雌繁殖群体间的相似性在 95% 以上,但序列信息显示具有 7.5% 的变异位点,表现出一定异质性。同一种群的单雌繁殖群体与多雌繁殖群体的序列比对表现出很高的遗传稳定性,除 2 个种群外,其他相应种群之间的序列相似性都 $\geq 99\%$,同种群的单雌繁殖群体与多雌繁殖群体的序列变异率与种群之间序列变异率相比极低。香蕉穿孔线虫单雌繁殖种群的遗传稳定性为深入研究传入我国的香蕉穿孔线虫种群与国外种群之间的遗传变异提供了理论依据。

构建的系统发育树显示,来自天鹅绒竹芋的 RsK 种群与来自非洲苏丹香蕉的种群(AF375374)的亲缘关系最近,同时与来自荷兰肖竹芋的 RsC 种群和来自比利时孔雀竹芋的种群(AF375385)位于相同的进化枝,因此推测 RsK 种群与欧洲竹芋科观赏植物种群和苏丹的香蕉种群在地理来源上可能有着更密切的关系。另一进化分枝中荷兰天鹅绒竹芋种群 RsA、绿宝石种群 RsH、红掌种群 RsJ 和 RsY、新加坡生姜种群 RsXj 的亲缘关系较近,也和 2 个来自苏丹香蕉的种群(AF375387、AF375395)在同一进化枝上,因此 RsJ 和 RsY 种群与荷兰竹芋科观赏植物种群和新加坡生姜种群在地理来源上可能有着更密切的关系,其中 RsH 种群可能由荷兰传入并发生了变异;虽然 RsA 和 RsC 种群都是来自荷兰竹芋科观赏植物上的种群,但是由于两者分别与 2 个苏丹的香蕉种群位于相同的进化枝,这 2 个种群有可能是来自苏丹的不同地理种群。因此,可以推测中国的香蕉穿孔线虫观赏植物种群部分是直接随着从荷兰进口观赏植物传入,由于荷兰的自然生态条件不适合香蕉穿孔线虫的发生,荷兰的香蕉穿孔线虫也是外侵物种并在设施栽培植物上寄生,因此,这些种群的原始地理来源可能是非洲苏丹的不同地区。此外,相似性最高也是种群数最多的进化枝中包含了来自非洲、美洲和大洋洲的香蕉种群(AF375351、AF375352、AF375353、AF375355、AF375358、AF375359 和 FJ455831)、欧洲天南星科观赏植物种群(AF375350、AF375361)和马来西亚红果 RsM 种群,这一枝中,在国内采集到的种群有

RsB、RsD、RsE、RsG、RsI、RsL、RsN、RsT、RsV 和 RsY,由于这一枝中的种群之间没有明显分组,且各种群之间相似性达到 100%,因此这一组的种群可能有着相同的初始地理来源,同一地理位置的种群通过寄主植物的传播被带到了不同地方,而这一枝中的中国香蕉穿孔线虫观赏植物种群最直接的来源可能是欧洲天南星科观赏植物。国内获得的供试红掌种群 RsW 与其他种群的遗传距离最远,与 GenBank 中的种群没有明显聚类,而单独为一枝,因此可能来源于其他未知的区域,或已知区域里的其他群体。这一研究结果为进一步研究香蕉穿孔线虫检疫风险性以及在我国扩散为害的规律奠定了基础,为建立快速、准确、灵敏的香蕉穿孔线虫分子检测方法和准确分析我国香蕉穿孔线虫传入的可能途径提供了科学依据,对进一步制定更有针对性的检疫措施具有重要意义和应用价值。

周春娜等^[18]对口岸截获的 4 个香蕉穿孔线虫种群进行了 ITS 序列分析,聚类结果显示有 1 个种群可能来源于欧洲,另外 3 个种群可能来源于非洲。李佳等^[30]对口岸截获的 9 个香蕉穿孔线虫种群进行了 D2/D3 区序列分析,结果显示有 8 个种群的亲缘关系较近,可能来源于相同的地理种群,另外 1 个种群可能来源于不同的地理种群。本试验供试 20 个香蕉穿孔线虫种群有 5 个种群为口岸直接截获,有 15 个种群是来源于国内温室的观赏植物,本研究结果表明,这些种群可能的直接来源分别为欧洲的竹芋科和天南星科等观赏植物,而前者的最初来源可能是苏丹的香蕉,后者的最初地理来源较复杂。有关香蕉穿孔线虫单雌繁殖群体的研究比较少,Elbadri 等^[31]对 5 个香蕉穿孔线虫种群的单雌繁殖力进行了研究,结果显示各种群都能进行单雌繁殖但繁殖力有差异,且差异很小。而黄春晓^[32]对 18 个种群进行了单雌繁殖研究,结果表明不是所有雌虫都能进行单雌繁殖,且种群间单雌繁殖力差异很大。穆瑞林^[33]证明了单雌繁殖群体与同种群的多雌繁殖群体相比,其致病力有差异。本试验对单雌繁殖群体的 ITS 区研究结果表明,同一种群的单雌繁殖群体与多雌繁殖群体的序列相似性普遍高于各种群序列之间的相似性。

参 考 文 献

[1] O'BANNON J H. Worldwide dissemination of *Radopholus si-*

- nilis* and its importance in crop production[J]. Journal of nematology, 1977, 9(1): 16-25.
- [2] HOLDEMAN Q L. The burrowing nematode *Radopholus similis*, sensu lat [M]. Sacramento: Nematology Publication, 1986: 52.
- [3] TSANG M M C, HARA A H, SIPES B S. Efficacy of hot water drenches of *Anthurium andraeanum* plants against the burrowing nematode *Radopholus similis* and plant thermotolerance[J]. Annals of applied biology, 2004, 145: 309-316.
- [4] WILLIAMS K J O, SIDDIQI M R. *Radopholus similis* [J]. CIH description of plant-parasitic nematodes, 1973, 2(27): 1-4.
- [5] DUNCAN L W, COHN E. Nematode parasites of citrus [M]// LUC M, SIKORA R A, BRIDGE J, et al. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. UK: CAB International, 1990: 321-346.
- [6] NICKLE W R. Manual of agriculture nematology [M]. New York: Marcel Dekker, Inc., 1991: 363-422.
- [7] OEPP/EPPO. *Radopholus similis* [J]. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 2008, 38: 374-378.
- [8] 谢辉. 香蕉穿孔线虫及其检测和防疫控制[J]. 植物检疫, 2006, 20(5): 321-324.
- [9] POWERS T. Nematode molecular diagnostics: from bands to barcodes[J]. Annual review of phytopathology, 2004, 42: 67-83.
- [10] ABIDOU H, VALETTE S, GAUTHIER J P, et al. Molecular polymorphism and morphometrics of species of the *Heterodera avenae* group in Syria and Turkey[J]. Journal of nematology, 2005, 37(2): 146-154.
- [11] LAZAROVA S, PENEVA V, KUMARI S. Morphological and molecular characterisation, and phylogenetic position of *X. browni* sp. n., *X. penevi* sp. n. and two known species of *Xiphinema americanum*-group (Nematoda, Longidoridae) [J]. Zookeys, 2016(574): 1-42.
- [12] QIAO Y, YU Q, BADISS A, et al. Paraphyletic genus *Ditylenchus* Filipjev (Nematoda, Tylenchida), corresponding to the *D. trifomis*-group and the *D. dipsaci*-group scheme[J]. Zookeys, 2016(568): 1-12.
- [13] CARTA L K, LI S, SKANTAR A M, et al. Morphological and molecular characterization of two *Aphelenchoides* endophytic in poplar leaves[J]. Journal of nematology, 2016, 48(1): 28-33.
- [14] QUIST C W, SMANT G, HELDER J. Evolution of plant parasitism in the phylum Nematoda[J]. Annual review of phytopathology, 2015, 53: 289-310.
- [15] FALLAS G A, HAHAN M L, FARGETTE M, et al. Molecular and biochemical diversity among isolates of *Radopholus* spp. from different areas of the world[J]. Journal of nematology, 1996, 28(4): 422-430.
- [16] KAPLAN D T, THOMAS W K, FRISSE L M, et al. Phylogenetic analysis of geographically diverse *Radopholus similis* via rDNA sequence reveals a monomorphic motif[J]. Journal of nematology, 2000, 32(2): 134-142.
- [17] ELBADRI G A A, DE LEY P, WAEYENBERGE L, et al. Intraspecific variation in *Radopholus similis* isolates assessed with restriction fragment length polymorphic and DNA sequencing of the internal transcribed spacer region of the ribosomal RNA cistron[J]. International journal for parasitology, 2002, 32: 199-205.
- [18] 周春娜, 谢辉, 马以桂, 等. 相似穿孔线虫 PCR 检测鉴定技术与方法[J]. 华中农业大学学报, 2006, 25(1): 40-42.
- [19] 葛建军, 曹爱新, 周国梁, 等. 香蕉穿孔线虫双重 PCR 快速检测技术研究[J]. 植物病理学报, 2007, 37(5): 472-478.
- [20] TAN M, COBON J, AITKEN E, et al. Support of the "out-of-Southeast Asia" hypothesis for the origin of Australian populations of *Radopholus similis* (Cobb, 1893) (Nematoda: Pratylenchidae)[J]. Systematic parasitology, 2010, 77: 175-183.
- [21] 王琼. 罹病植物组织中香蕉穿孔线虫分子检测方法研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010.
- [22] MOODY E H, LOWNSBERY B F, AHMED J M. Culture of the root-lesion nematode *Pratylenchus vulnus* on carrot disks [J]. Journal of nematology, 1973, 5(3): 225-226.
- [23] VRAIN T C, WARKARCHUK D A, LeVESQUE A C, et al. Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group[J]. Fundamental and applied nematology, 1992, 15: 563-573.
- [24] FERRIS V R, FERRIS M, FAGHIHI J. Variation in spacer ribosomal DNA in some cyst-forming species of plant parasitic nematodes[J]. Fundamental and applied nematology, 1993, 16: 177-184.
- [25] XU C, LI Y, XIE H, et al. Morphological and karyotypic differences within and among populations of *Radopholus similis*[J]. Zookeys, 2014(444): 69-93.
- [26] 王金成, 马以桂, 周春娜, 等. 剪股颖粒线虫幼虫形态与分子检测方法[J]. 植物检疫, 2005, 19(2): 84-86.
- [27] NGUYEN C N, SUBBOTIN S A, MADANI M, et al. *Radopholus duriophilus* sp. n. (Nematoda: Pratylenchidae) from Western Highland of Vietnam[J]. Nematology, 2003, 5(4): 549-558.
- [28] TRINH P Q, WAEYENBERGE L, NGUYEN C N, et al. Morphological and molecular diversity of *Radopholus* on coffee in Vietnam and description of *R. daklakensis* sp. n. from Robusta coffee[J]. Nematology, 2012, 14(1): 65-83.
- [29] TRINH P Q, WAEYENBERGE L, SUBBOTIN S A, et al. *Radopholus arabocoffeae* sp. n. (Nematoda: Pratylenchidae), a nematode pathogenic to *Coffea arabica* in Vietnam, and additional data on *R. duriophilus* [J]. Nematology, 2004, 6: 681-693.
- [30] 李佳, 彭德良, 黄文坤. 香蕉穿孔线虫 28SrRNA 基因的 D2/D3 区序列分析[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(5): 585-589.
- [31] ELBADRI G A A, WAELE D D, MOENS M. Reproduction of *Radopholus similis* isolates after inoculation of carrot disks

with one or more females[J]. *Nematology*, 2001, 3(8): 767-771.

州:华南农业大学,2006.

[32] 黄春晓.传入中国的香蕉穿孔线虫繁殖和适生能力研究[D]. 广

[33] 穆瑞林.香蕉穿孔线虫观赏植物种群的致病性研究[D]. 广州:华南农业大学,2008.

Phylogenetic analysis of exotic *Radopholus similis* in China based on rDNA-ITS sequences

LI Yun^{1,2} QIN Meng³ XU Chunling¹ LI Junyi¹
LIU Shuting¹ WU Wenjia¹ XIE Hui¹

1.College of Agriculture/Research Center of Nematodes of Plant Quarantine ,
South China Agricultural University,Guangzhou 510642,China ;

2.Dongying Women's Federation ,Dongying 257000,China

3.National Agro-Technical Extension and Service Centre ,Beijing 100125,China ;

Abstract To demonstrate genetic divergence of different populations of exotic *Radopholus similis* in China, analyze their phylogenetic relationship, and provide scientific proof for the origin of these populations, the published universal primers were used to amplify the rDNA-ITS sequences of progeny of single and 25 females, respectively, from 20 populations of *R. similis*. The amplified products were sequenced, blasted and aligned with public submitted sequences and phylogenetic tree was then constructed. The rDNA-ITS sequenced was 705-713 bp in length, and showed high similarity ($\geq 95\%$) among different populations, with a divergence of 0-7.5%. The rDNA-ITS1 and ITS2 were 273-276 bp and 151-152 bp in length, with sequences similarity $\geq 98.58\%$ and $\geq 98.35\%$, respectively. The sequences alignment results showed that the ITS sequences had a very high similarity between the progeny of single female and multiple females in the same population, showing 100% sequence identity in 8 populations and $\geq 97\%$ similarity in the other populations. In addition, the phylogenetic tree with *Pratylenchus coffeae* as outgroup showed that all *R. similis* populations were clustered together, but with 4 small branches. Among them, *Anthurium andraeanum* population RsW was clustered in a single branch, *Philodendron* sp. population RsH had a longer genetic distance with other members in the same branch, but *Calathea zebrine* population RsP and *C. makoyana* RsS had a shorter genetic distance. The results indicated that the *R. similis* populations in China mainly came from the European Marantaceae and Araceae ornamentals, and the primary origin for the former was banana in Sudan and was complicated for the latter.

Keywords *Radopholus similis*; phylogenetic analysis; ITS

(责任编辑:边书京)