

五种索科线虫 RAPD 亲缘关系分析

徐芬, 王国秀*, 查玉平, 刘朋, 曹文博, 刘绪生

(华中师范大学 生命科学学院, 湖北 武汉 430079)

摘要: 采用 RAPD 技术构建了索科线虫 4 属 5 种的指纹图谱。从 47 个引物中筛选出 12 个稳定性好、多态性高的引物, 共扩增出 161 条谱带, 其中 150 条谱带具遗传多态性, 占 93.17%。所获片段长度大小为 200 ~ 3 200 bp, 单个引物扩增的条带数在 11 ~ 16 之间, 平均为 13.42 条。采用 RAPDistance 软件及 MEGA 程序, 计算 Nei 氏相似系数和遗传距离, 建立 UPGMA 和 NJ 聚类图, 两个聚类图拓扑结构相同, 将 5 种索科线虫分为两大分支: 同属于蚊幼寄生罗索属线虫的食蚊罗索线虫 (*Romanomermis culicivorax*) 与武昌罗索线虫 (*R. wuchangensis*) 亲缘关系最近, 先聚在一起, 再与同翅目 (Homoptera) 寄生长沙多索线虫 (*Agamermis changshaensis*) 聚为一支; 鳞翅目 (Lepidoptera) 寄生中华卵索线虫 (*Ovomermis sinensis*) 和同翅目寄生两索属线虫 (*Amphimermis* sp.) 亲缘关系较近, 两者聚为一支。5 种索科线虫属内种间的遗传距离较小, 食蚊罗索线虫与武昌罗索线虫之间遗传距离仅为 0.1789; 而属间遗传距离较大, 在 0.4471 ~ 0.5488 之间。上述结果表明: RAPD 技术可以应用于索科线虫亲缘关系的分析, 能够反映出不同线虫间的遗传差距, 从而成功地进行属、种的分类及进化问题研究。

关键词: 昆虫病原线虫; 索科; RAPD; 亲缘关系

中图分类号: Q959.174; Q75 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-5853 (2005) 03-0294-06

Genetic Relationships Among Five Species of Mermithidae Based on RAPD

XU Fen, WANG Guo-xiu*, ZHA Yu-ping, LIU Peng, CAO Wen-bo, LIU Xu-sheng

(College of Life Science, Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

Abstract: In this study, the genetic relationships among five species belonging to four genera of Mermithidae were detected using RAPD. Twelve primers were screened from 47 random primers and amplified 161 bands (from 200 bp to 3 200 bp). 150 (93.17%) of these bands were polymorphic bands. The number of obtaining segments of individual primer was between 11 - 16, the average was 13.42. Nei's similarity coefficients and genetic distance were calculated using the RAPDistance and MEGA softwares. The phylogenetic trees were constructed with the methods of UPGMA and NJ. The results from two methods of cluster analysis were similar in general, and the relationship indicated the five species of Mermithidae could be distinguished with RAPD markers and were grouped into two distinct clusters. In the phylogenetic trees, *Romanomermis culicivorax* and *R. wuchangensis* (all parasite in larvae of mosquitoes) grouped together, then they grouped with *Agamermis changshaensis* (parasite in Homoptera) into one cluster. *Ovomermis sinensis* (parasite in Lepidoptera) grouped with *Amphimermis* sp. (parasite in Homoptera) into one cluster. The genetic distances of five Mermithidae species showed that the relationships of intra-genus were nearer than that of inter-genus, the genetic distance between *R. culicivorax* and *R. wuchangensis* was 0.1789, but the genetic distance between inter-genus were 0.4471 - 0.5488. All those results suggested that RAPD was suitable for analysis of phylogenetic relationship among species of Mermithidae.

Key words: Entomogenous nematodes; Mermithidae; RAPD; Genetic relationship

索科线虫 (Mermithidae) 属于无尾感器纲 (Aphasmodia) 嘴刺目 (Enoplida) 索线虫总科

收稿日期: 2004-12-14; 接受日期: 2005-03-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30170129, 30470246)

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: wangguoxiu@yahoo.com.cn

第一作者简介: 徐芬 (1980-), 女, 硕士研究生, 研究方向为分子系统学。E-mail: xf3303@tom.com

(Mermithidea), 能主动侵染宿主, 其寄生率即等于害虫的死亡率, 可在自然界中再循环, 是一类宝贵的生防资源 (Poinar, 1975)。因此, 索科线虫的研究对于农林及卫生害虫的综合防治、环境保护以及实现农田生物多样性等, 都具有重要的学术和应用价值。在昆虫病原线虫的应用中, 线虫种类或品系的选择非常重要, 是获得防治成功的关键。所以, 分析不同种类线虫之间的亲缘关系, 正确鉴定线虫种类或品系, 对于大规模商业化生产、田间释放线虫质量的监控等都具有十分重要的意义。

迄今, 国际上已报道的索科线虫有 80 余属, 3 000 余种, 但有些属种描述依据不足, 故能被多数线虫学家接受的仅 60 余属。我国对索科线虫的研究起步于 20 世纪 50 年代, 现已报道的索科线虫有 10 属 30 余种, 其中 21 种为新种或新亚种 (Bao, 1996; Wang & Yan, 2001; Zhong & Wang, 2001; Zhou & Zhang, 2001)。长期以来, 索科线虫的分类鉴定主要以某些特定的形态特征为依据 (Poinar, 1979; Robzov, 1991), 如线虫的体长、头到神经环或泄殖孔的距离、雄虫交合刺和生殖乳突的特征等。实际上, 由于宿主营养、环境温度和感染强度等因素的不同, 即使同种的不同个体也可能在上述形态特征上产生较大差异, 从而造成分类上的一些混乱。此外, 索科线虫的种类繁多, 生态环境和地理分布差异大, 宿主范围广, 生活史复杂, 某些属级的分类到目前为止还存在一些争议, 其属间的亲缘关系也没有清晰地阐述。现已有一些学者尝试用其他方法对索科线虫分类进行探讨, 如 Cai & Peng (1993) 应用同工酶和蛋白质电泳技术对罗索属的两种线虫进行研究, 探讨其应用于索科线虫分类的可行性; Bao et al (1992b) 应用数值分类法对索科线虫进行了探讨, 通过将索科线虫属种间的性状差异所转换的属种间的离散增量做相似性比较, 反映属、种间的相似程度。近十几年来, 分子

生物学技术的发展和应用于线虫的分类学及系统亲缘关系研究提供了一种强有力的辅助手段和工具。

随机扩增多态性 DNA (RAPD) 是由 Williams et al (1990) 和 Welsh & MmClelland (1990) 两个研究组同时创建的一种新型的 DNA 分子水平上的检测技术。因其具有简便、快速、实验费用较低等诸多优点, 在自由生活线虫、植物寄生线虫和部分昆虫病原线虫的种属鉴定、亲缘关系、遗传多样性等方面的研究中, 得到了广泛应用 (Bendezu et al, 1998; Guirao et al, 1995; Hahn et al, 1996; Jie & Berry, 1995; Wang et al, 2001), 但目前国内外对于索科线虫分子水平的研究极少, 有关寄生于昆虫体内的索科线虫种和属间的分子系统学研究还未见报道。本文首次通过分子生物学方法对索科线虫的 4 属 5 种进行了系统演化研究, 初步探讨了它们之间的亲缘关系, 具有一定的科学意义。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试线虫标本来源及处理方法见表 1。其中, 中华卵索线虫和武昌罗索线虫分别在河南上蔡的麦田和湖北武汉的稻田采得, 经本实验室传代培养的雌雄成虫, 4 ℃冰箱内活体贮存备用。食蚊罗索线虫为美国 California 大学 Platzer 教授惠赠。多索线虫和两索线虫采自湖北枣阳的稻田。由于线虫个体较小, 每种供试线虫取 3~5 条提取基因组 DNA。

1.2 实验方法

1.2.1 线虫基因组 DNA 提取 取供试线虫雌雄成虫 3~5 条, 用灭菌双蒸水冲洗 3 次; 加适量消化液于 55 ℃水浴 5 h 左右; 然后用酚氯仿抽提, 加入适量灭菌 TE 溶解, -20 ℃冰箱保存备用。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DNA 的质量。

1.2.2 引物筛选 本实验对 47 个随机引物进行筛

表 1 用于 RAPD 研究的索科线虫样品

Tab. 1 Mermithidae samples for the RAPD study

泳道序号 Lane number	种名 Species	代码 Code	来源 Locality	保存方式 Storage
1	食蚊罗索线虫 <i>R. culicivora</i>	RC	美国 USA	I
2	武昌罗索线虫 <i>R. wuchangensis</i>	RW	湖北武汉 Wuhan, Hubei	II
3	中华卵索线虫 <i>O. sinensis</i>	OS	河南上蔡 Shangcai, Henan	I
4	长沙多索线虫 <i>A. changshaensis</i>	AC	湖北枣阳 Zaoyang, Hubei	II
5	两索线虫未定种 <i>Amphimermis</i> sp.	AM	湖北枣阳 Zaoyang, Hubei	II

I: 4 ℃活体冷藏 (4 ℃ storage living); II: 95% 乙醇固定 (95% ethanol-fixed)。

选,引物均由上海生物工程公司合成。首先,以中华卵索线虫基因组 DNA 为模板,选取扩增稳定性好、带型丰富的 12 个引物,再将其用于所有供试线虫 RAPD 分析。引物号及序列见表 2。

1.2.3 RAPD 扩增 经事先优化后的 RAPD 反应总体积为 25 μL ,其中含模板 DNA 20 ~ 40 ng, 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μL , MgCl_2 2.0 mmol/L, dNTP 150 $\mu\text{mol/L}$, 引物 0.3 $\mu\text{mol/L}$, Taq 聚合酶 1 U (SABC)。扩增反应程序为: 94 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^\circ\text{C}$ 1 min, 36 $^\circ\text{C}$ 1 min, 72 $^\circ\text{C}$ 2 min, 共 45 个循环; 循环结束后,再 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。

表 2 随机引物的序列及扩增的谱带和多态谱带数

Tab. 2 Sequences of arbitrary primers and the number of the amplified bands and polymorphic bands of each primer

引物 Primer	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	扩增谱带 No. of amplified	多态谱带 No. of polymorphic
S306	ACGCCAGAGG	14	14
S313	ACGGGAGCAA	12	11
S319	TGGCAAGGCA	15	14
S320	CCCAGCTAGA	14	14
S353	CCACACTACC	13	10
S357	ACGCCAGTTC	11	11
S461	GTAGCACTCC	12	11
S467	GTCCATGCCA	14	12
S472	AAGGGCGAGT	13	13
S477	TGACCCGCCT	15	15
S503	ACACAGAGGG	12	12
S508	CCCCTTGCCCT	16	13

1.2.4 电泳检测 取扩增后的 PCR 产物 8 μL 上样于 1.5% 琼脂糖凝胶中, 0.5 \times TBE 电泳缓冲液, 2 V/cm 的恒压电泳 3 h 左右, 0.01% EB (溴化乙锭) 染色 30 min, 用 Gel-PRO ANALYZER 凝胶成像系统 (America) 照相。

1.2.5 数据处理 根据扩增结果, 使用 SynGene GeneTools 分析软件结合人工记录结果, 用“1”和“0”把 RAPD 图形资料转换成数据资料。采用 RAPDistance 1.04 软件计算 Nei-Li 相似系数和遗传距离。根据遗传距离利用 MEGA 3.0 程序进行聚类分析, 构建 UPGMA 和 NJ 聚类图。

2 结果

2.1 RAPD 扩增结果

按照优化的条件, 采用筛选出的 12 个引物对 5 种索科线虫基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 获得的 DNA 片段大小为 200 ~ 3 200 bp。12 种引物共获得 161 条谱带, 其中存在多态性的条带数为 150, 多态性比率为 93.17%。单个引物扩增的条带数在 11 ~ 16 之间, 平均为 13.42 条。每个引物检测到的 RAPD 多态性谱带为 10 ~ 15 条, 平均 12.5 条 (表 2)。部分引物的扩增结果见图 1。

2.2 5 种索科线虫间聚类分析

5 种索科线虫的 Nei-Li 相似系数和遗传距离见表 3。从 5 种索科线虫之间的遗传距离来看, 属内种间的距离较小, 食蚊罗索线虫与武昌罗索线虫之间

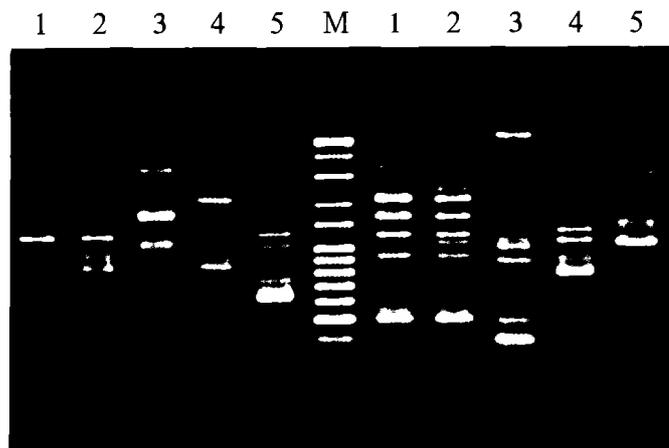


图 1 5 种索科线虫基因组 DNA 用 S313 (左) 和 S306 (右) 引物扩增的产物电泳图

Fig. 1 RAPD amplified profiles of five Mermithidae generated by primers S313 (left) and S306 (right)

材料编号 1—5 同表 1。M: 分子量标准。

The materials listed from the left to right are described in Tab. 1. M: DNA marker.

排泄器官不明显。以前曾将之划分子六索属 (*Hexanermis*), 后根据 Rubzov (1991) 的分类系统将之确定为卵索属 (*Ovomermis sinensis*)。其宿主为粘虫 (*Leucania separata*)、甜菜夜蛾 (*Laphygma exigua*) 等多种鳞翅目昆虫幼虫。长沙多索线虫是 1992 年鲍学纯 (Bao et al, 1992a) 发表的新种, 虫体细长, 口端位, 有颈乳突, 皮下索 6 条, 模式宿主为褐飞虱 (*Nilaparvata lugens*)。多索属的寄生前期幼虫体内有一“结”, 当幼虫进入宿主时, 虫体从“结”处断裂。两索属线虫虫体大小中等, 6 条纵索, 侧器孔在侧乳突后面。根据 Rubzov (1991) 的描述, 多索属线虫与卵索属线虫比较接近, 在交配器官、纵索、阴道的一般特征等方面相似。但 RAPD 分析结果表明, 在 4 属的线虫中, 多索属线虫与罗索属线虫的遗传距离分别为 0.4471 和 0.4659, 亲缘关系较为接近, 卵索属线虫与两索属线虫的遗传距离为 0.4522, 亲缘关系较为接近。

本研究的 RAPD 分析结果与传统的形态学分析存在一定的分歧, 可能由以下几方面因素所致: 首先, 索科线虫是一类低等动物, 在漫长的演化过程中, 其形态结构会随着地理环境和生态条件的变化

发生相应的变化, 而且同种索科线虫不同个体会表现出一定的变异性 (Bao, 1996; Curran, 1982), 因此完全根据形态特征的差异并不能充分说明其分化的程度和亲缘关系。其次, 索科线虫的属级划分存在一些争议, Rubzov 分类系统中的分类性状特征与以 Poinar 为代表的分类系统中的相关描述存在许多不同。因此, 在索科线虫的分类及系统演化研究中, 如何选择依据充分、区别明显、遗传稳定的生物学特征具有十分重要的意义。本实验首次通过分子生物学方法对目前已采集或收集到的 4 属 5 种索科线虫的系统演化进行了研究, 初步探讨了它们之间的亲缘关系。分析结果显示, 应用 RAPD 技术对索科线虫亲缘关系进行分析, 能够反映出不同线虫间的遗传差距, 从而成功地进行属、种间的分子分类及系统演化等问题研究。由于索科线虫在动物系统分类及生物防治等方面的重要地位, 其属种间的亲缘关系是个值得深入研究的课题, 本研究方法的建立不仅有助于从分子水平上对索科线虫种类鉴定、遗传变异、系统演化及与相关类群亲缘关系的进一步研究, 而且是传统形态分类学的重要补充和完善。

参考文献:

- Bao XC. 1996. Insect Nematology [M]. Wuhan: Wuhan University Press. [鲍学纯. 1996. 昆虫线虫学. 武汉: 武汉大学出版社.]
- Bao XC, Wang YW, Wu HS. 1985. A new species of the genus *Romanomermis* (Nematoda: Mermithidae), sp. nov [J]. *J. Central China Normal Univ. (Nat. Sci.)*, 3 (3): 73-75. [鲍学纯, 汪义慰, 伍惠生. 1985. 寄生于蚊类的罗索线虫属一新种: 武昌罗索线虫 (线虫纲: 索科). 华中师范大学学报 (自然科学版), 3 (3): 73-75.]
- Bao XC, Luo QG, Luo DM. 1992a. A new species of the genus *Agamer-mis* from China (Nematoda: Mermithidae) [J]. *Acta Zootax. Sin.*, 17 (1): 20-25. [鲍学纯, 骆启桂, 罗大民. 1992a. 中国多索属线虫一新种 (线虫纲: 索科) [J]. 动物分类学报, 17 (1): 20-25.]
- Bao XC, Luo QG, Zhong Y. 1992b. A numerical taxonomic preliminary study of the genus *Romanomermis* (Nematoda: Mermithidae) in China [J]. *J. Central China Normal Univ. (Nat. Sci.)*, 26 (2): 204-208. [鲍学纯, 骆启桂, 钟杨. 1992b. 中国罗索属线虫属值分类的初步研究 (线虫纲: 索科). 华中师范大学学报 (自然科学版), 26 (2): 204-208.]
- Bendezu IF, Evans K, Burrow PR, De Pomerai D, Canto-Saenz M. 1998. Inter and intra-specific genomic variability of the potato cyst Nematodes *Golobodera pallida* and *G. rostochiensis* from Europe and South America using RAPD-PCR [J]. *Nematologica*, 44 (1): 49-61.
- Cai Q, Peng YF. 1993. Patterns of *Romanomermis yunnanensis* and *R. culicivora* (Nematoda: Mermithidae) [J]. *J. West China Univ. Med. Sci.*, 24 (2): 147-151. [蔡庆, 彭玉芳. 1993. 豫南罗索线虫和食蚊罗索线虫同工酶和蛋白质电泳分析 (线虫纲: 索科). 华西医科大学学报, 24 (2): 147-151.]
- Chen G, Jian H, Ren HF, Pan CS. 1991. A new species of parasitic nematode of army worm: *Ovomermis sinensis* sp. nov [J]. *Acta Zootax. Sin.*, 16 (3): 270-277. [陈果, 简恒, 任惠芳, 潘沧桑. 1991. 寄生于粘虫的中华卵索线虫属一新种——中华卵索线虫. 动物分类学报, 16 (3): 270-277.]
- Curran J. 1982. Morphological variation in *Romanomermis culicivora* Ross and Smith, 1976 (Nematoda: Mermithidae) [J]. *Can. J. Zool.*, 60: 1007-1011.
- Dong GW, Liu XJ, Yu XY, Dong J. 2001. General situation of the research on entomopathogenic Nematodes [J]. *Ent. Knowl.*, 38 (2): 107-111. [董国伟, 刘贤进, 余向阳, 董健. 2001. 昆虫病原线虫研究概况. 昆虫知识, 38 (2): 107-111.]
- Guirao P, Moya A, Cenis JL. 1995. Optimal use of random amplified polymorphic DNA in estimating the genetic relationship of four major *Meloidogyne* spp [J]. *Phytopathology*, 42: 547-551.
- Hahn ML, Burrows PR, Wright DJ. 1996. Genomic diversity between *Radopholus similis* populations from around the world detected by RAPD-PCR analysis [J]. *Nematologica*, 42: 537-545.
- Jie L, Berry RE. 1995. Determination of PCR condition for RAPD analysis in entomopathogenic Nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) [J]. *J. Invertebr. Pathol.*, 65 (1): 79-81.
- Nickle WR. 1984. Plant and Insect Nematodes [M]. New York: Marcel Dekker Inc.
- Poinar Jr GO. 1975. Entomogenous Nematodes [M]. Leiden: E J Brill.
- Poinar Jr GO. 1979. Nematodes for Biological Control of Insects [M]. Florida: CRC Press, Boca Raton.

- Robzov IA. 1991. Mermithidae: Taxonomy, Function, Application [M]. Translated by Pan CS. Beijing: Science Press. [鲁布佐夫. 1991. 索科线虫——分类·作用·应用. 潘沧桑译. 北京: 科学出版社.]
- Ross JF, Smith SM. 1976. A review of the mermithid parasites (Nematoda: Mermithidae) described from North American mosquitoes (Diptera: Culicidae) with descriptions of three new species [J]. *Can. J. Zool.*, **54**: 1084–1102.
- Wang GX, Yan S. 2001. Research advances on Mermithidae in China [J]. *Plant Prot. Tech. & Ext.*, **21** (7): 38–41. [王国秀, 阎 慷. 2001. 我国昆虫寄生索科线虫研究进展. 植保技术与推广, **21** (7): 38–41.]
- Wang LF, Wang Y, Yang BJ, Hu XQ, Yu SF. 2001. Studies on relationships of *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* by RAPD [J]. *Acta Phytopathol. Sin.*, **31** (3): 225–229. [汪来发, 王 扬, 杨宝君, 胡先奇, 喻盛甫. 2001. 利用 RAPD 研究松材线虫和拟松材线虫亲缘关系. 植物病理学报, **31** (3): 225–229.]
- Welsh J, McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. *Nucl. Acids Res.*, **18** (24): 7213–7218.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucl. Acids Res.*, **18** (22): 6531–6535.
- Zhong YL, Wang GX. 2001. Advances in the studies on Mermithidae in China [J]. *Chin. J. Biol. Control*, **17** (1): 35–39. [钟玉林, 王国秀. 2001. 我国昆虫寄生索科线虫研究近况. 中国生物防治, **17** (1): 35–39.]
- Zhou KF, Zhang BZ. 2001. A new species of parasitic nematode of locust: *Hexameris xiamenensis* sp. nov (Nematoda: Mermithidae) [J]. *J. Xiamen Univ. (Nat. Sci.)*, **41** (1): 128–134. [周克夫, 张宝忠. 2001. 寄生于蝗虫六索属一新种: 厦门六索线虫 (线虫纲: 索科). 厦门大学学报 (自然科学版), **41** (1): 128–134.]

核仁进化研究取得进展

核仁 (nucleolus) 是普遍存在于真核细胞间期核中的最显著结构。它是 rDNA 转录和核糖体亚基组装的场所。如果说核糖体是合成蛋白质的“分子机器”，那么核仁便是制造这一机器的“母机”。中国科学院昆明动物研究所文建凡研究员领导的研究小组先是在一类低等的单细胞真核生物——贾第虫 (*Giardia*) 上证实了“不具核仁结构”的现象，那么这类生物是如何进行 rDNA 转录和核糖体亚基组装呢？他们继而在贾第虫上克隆出了典型真核细胞核仁的一个参与 pre-rRNA 加工基因 *krr1* 的同源基因，经分析和实验证明该基因确为贾第虫的一个有转录活性的核仁功能蛋白基因。这意味着在一个没有核仁结构的真核细胞中分离到了一个典型真核细胞中参与核仁 (pre-rRNA 加工) 功能的基因。随后他们对贾第虫整个基因组有关核仁功能基因的搜索表明，该生物具有典型真核细胞参与核糖体合成的主要基因。因此他们推测贾第虫虽然没有核仁结构，但其 pre-rRNA 加工机制却与具核仁结构的典型真核细胞一致。这可能意味着真核细胞核仁的核糖体合成功能的起源形成是在核仁结构形成之前，那么核仁结构的形成可能是在此功能之外另有“新意”或“深意”，这与近来在核仁上发现的一系列的新功能相一致；另外也可能是由于贾第虫这类寄生原虫适应寄生生活而导致核仁“退化”之故，若是这样，也是生物适应性进化中的一个重要现象，值得深入研究。相关研究论文发表在 2005 年 *Molecular Biology and Evolution* 第 22 卷第 3 期上。