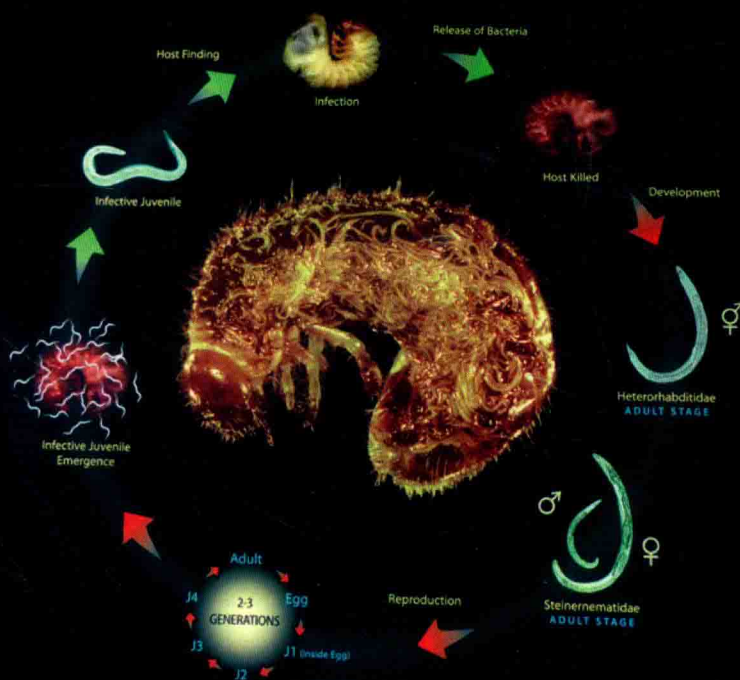


昆虫病原线虫学

—— Entomopathogenic Nematology ——

〔美〕 R. 高格勒 编著

许艳丽 赵奎军 王 义 译
樊 东 李春杰 潘凤娟



科学出版社

昆虫病原线虫学

Entomopathogenic Nematology

〔美〕R. 高格勒 编著

许艳丽 赵奎军 王 义 译
樊 东 李春杰 潘凤娟

谨以此书献给

中国科学院东北地理与农业生态研究所建所 60 周年

东北农业大学建校 70 周年

科学出版社

北 京

图字：01-2014-1647 号

内 容 简 介

昆虫病原线虫与其共生菌是昆虫致命的寄生物。在过去十年里，昆虫病原线虫学研究经历了突飞猛进的发展，现在这些“小虫”被广泛地用做园艺和农业害虫的生物防治制剂。这是一本关于昆虫病原线虫的综合性论著。本书首先主要阐述了昆虫病原线虫的基础生物学，以及与其细菌的分类基础，接下来的章节描述了昆虫病原线虫与共生细菌之间的关系，以及对寄主昆虫的侵染机制、线虫的逆境生理和行为生态学。后几章介绍了利用昆虫病原线虫进行害虫防治的方法和线虫生产技术进展。

本书适合作为相关专业本科生和研究生的参考教材，同时也将是我国昆虫病原线虫学研究工作者的一本重要参考书。

Entomopathogenic Nematology edited by Randy Gaugler was originally published in English by CAB International in 2002. This translation is published by arrangement with CAB International.

Copyright © CAB International 2002.

All rights reserved.

图书在版编目 (CIP) 数据

昆虫病原线虫学/ (美) R. 高格勒 (Randy Gaugler) 编著; 许艳丽等译. —北京: 科学出版社, 2018.10

书名原文: *Entomopathogenic Nematology*

ISBN 978-7-03-057227-1

I. ①昆… II. ①R… ②许… III. ①昆虫-线虫感染 IV. ①Q968.9

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2018) 第 083320 号

责任编辑: 王 静 陈 新 夏 梁 赵小林 / 责任校对: 王晓茜

责任印制: 张 伟 / 封面设计: 铭轩堂

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京虎彩文化传播有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2018 年 10 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

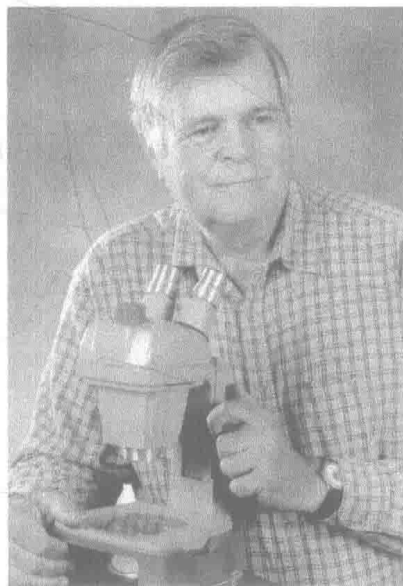
2019 年 1 月第二次印刷 印张: 21 1/4

字数: 504 000

定价: 150.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

献 词



谨以本书献给用毕生精力致力于线虫研究的 George O. Poinar Jr. 先生，他的早期工作阐述了昆虫病原线虫斯氏线虫属 (*Steinernema*) 和异小杆线虫属 (*Heterorhabditis*) 与它们共生细菌的关系，这为 Rudolf Glazer 的最初研究及其后来研究者的工作起到了非常重要的桥梁作用。Poinar 先生是建立生物系统学的一位非常重要的专家，他所建立的系统是昆虫病原线虫发展的重要里程碑。他编著或与人合著了共 5 部专著，发表了 400 多篇关于线虫系统学、结构、个体生态学、古生物学、天敌、动物流行病学和寄主-寄生物关系的文章。近来的研究热点主要是利用琥珀中的化石对线虫进化史进行研究。发表此类文章会对该领域的每位研究者产生非常重要的影响。

原书参编者

- Byron J. Adams**, Entomology and Nematology Department, University of Florida, PO Box 110620, Gainesville, Florida, USA (e-mail: bjadams@ufl.edu)
- Ray Akhurst**, CSIRO Entomology, Canberra ACT 2600, Australia (e-mail: ray.akhurst@ento.csiro.au)
- Noël Boemare**, Laboratoire de Pathologie Comparée, CC 101, INRA - Université Montpellier II, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France (e-mail: boemare@ensam.inra.fr)
- Ann Burnell**, Institute of Bioengineering and Agroecology, Department of Biology, National University of Ireland Maynooth, Maynooth, Co. Kildare, Ireland (e-mail: ann.burnell@may.ie)
- Genhui Chen**, Welichem Biotech Inc., Burnaby, British Columbia, V5G 3L1, Canada
- David Clarke**, Department of Biology and Biochemistry, University of Bath, Bath BA2 7AY, UK (e-mail: bssdj@bath.ac.uk)
- Barbara C.A. Dowds**, Department of Biology and Institute of Bioengineering and Agroecology, National University of Ireland, Maynooth, Co. Kildare, Ireland (e-mail: barbara.c.dowds@may.ie)
- Steven Forst**, Department of Biological Sciences, PO Box 413, University of Wisconsin, Milwaukee, Wisconsin 53201, USA (e-mail: sforst@uwm.edu)
- Randy Gaugler**, Department of Entomology, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey 08901-8524, USA (e-mail: gaugler@rci.rutgers.edu)
- Ramon Georgis**, EcoSmart Technologies, 318 Seaboard Lane, Suite 202, Franklin, Tennessee 37067, USA (e-mail: rgeorgis@ecosmart.com)
- Itamar Glazer**, Department of Nematology, ARO, The Volcani Center, Bet Dagan, Israel (e-mail: glazeri@netvision.net.il)
- Dawn H. Gouge**, Department of Entomology, University of Arizona, Maricopa, Arizona 85239, USA (e-mail: dhgouge@ag.arizona.edu)
- Parwinder S. Grewal**, Department of Entomology, Ohio State University, Wooster, Ohio 44691-4096, USA (e-mail: grewal.4@osu.edu)
- Richou Han**, Guangdong Entomological Institute, 105 Xingang Road W., Guangzhou 510260, China (e-mail: en@gdei.gis.sti.cd.cn)
- William M. Hominick**, CABI Bioscience UK Centre, Bakeham Lane, Egham, Surrey TW20 9TY, UK (e-mail: b.hominick@cabi.org)
- Kaiji Hu**, Welichem Biotech Inc., Burnaby, British Columbia, V5G 3L1, Canada
- Harry K. Kaya**, Department of Nematology, One Shields Avenue, University of California, Davis, California, USA (e-mail: hkkaya@ucdavis.edu)
- Albrecht M. Koppenhöfer**, Department of Entomology, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey 08901, USA (e-mail: koppenhof@aesop.rutgers.edu)
- Edwin E. Lewis**, Department of Entomology, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia 24061-0319, USA (e-mail: lewise@vt.edu)
- Jianxiong Li**, Welichem Biotech Inc., Burnaby, British Columbia, V5G 3L1, Canada
- Khuong B. Nguyen**, Entomology and Nematology Department, University of Florida, PO Box 110620, Gainesville, Florida, USA (e-mail:

kbn@gnv.ifas.ufl.edu)

Roland N. Perry, Plant Pathology Interactions Division, IACR-Rothamsted, Harpenden, Hertfordshire AL5 2JQ, UK (e-mail: roland.perry@bbsrc.ac.uk)

Arne Peters, E-Nema GmbH, Klausdorfer Strasse 28026, Ralsdorf, Germany (e-mail: a.peters@e-nema.de)

David I. Shapiro-Ilan, USDA-ARS, SE Fruit and Tree Nut Research Lab, Byron, Georgia 31008, USA (e-mail: dshapiro@saa.ars.usda.gov)

Kirk Smith, University of Arizona, Maricopa Agricultural Center, Maricopa, Arizona 85239-3010, USA (e-mail: cpt-kirk@ag.arizona.edu)

Donald R. Strong, Section of Evolution and Ecology and The Bodega Marine Laboratory, University of California, Davis, California 95616, USA (e-mail: drstrong@ucdavis.edu)

John M. Webster, Department of Biological Sciences, Simon Fraser University, Burnaby, Vancouver, British Columbia, V5A 1S6, Canada (e-mail: jwebster@sfu.ca)

Denis J. Wright, Department of Biology, Imperial College of Science, Technology and Medicine, Silwood Park, Ascot, Berkshire SL5 7PY, UK (e-mail: d.wright@ic.ac.uk)

译者序

该书是美国罗格斯大学的 Randy Gaugler 教授组织美国、中国、英国、加拿大、澳大利亚、爱尔兰、法国、德国和以色列 9 个国家 28 位昆虫病原线虫学专家共同编著，由 CABI 出版的书籍。

昆虫病原线虫是近几十年发展起来的一种很有潜力的生物因子，我国在该领域的研究和应用起步较晚。近年随着我国食品安全意识的提高，害虫生物防治愈发引起人们的重视，昆虫病原线虫学教学、科研和产品开发等急需专业书籍，但到目前为止我国还没有一部专门的昆虫病原线虫学论著，而该书既详尽、系统地介绍了昆虫病原线虫的理论知识，也全面介绍了昆虫病原线虫的繁殖、生产和应用技术，非常符合我们的需求。经与原著作者 Randy Gaugler 教授联系，并通过科学出版社向英国 CABI 申请，获得了将该书翻译为中文版的许可。

本书共分 17 章，内容包括昆虫病原线虫分类、昆虫病原线虫共生细菌生物学和次生代谢物及分类、昆虫病原线虫共生细菌与线虫的共生关系和致病机理、昆虫病原线虫生物学和生态学及遗传学等生物学特性、昆虫病原线虫繁殖和生产技术、线虫制剂应用技术、制剂管理和安全性等。该书涵盖了昆虫病原线虫研究的各个方面，也介绍了实际应用技术，将为我国昆虫病原线虫的教学和研究起到重要的推动作用。

参加该书翻译的大多数译者是有相关工作经历的昆虫病原线虫专家、研究骨干或国外留学人员。王义（美国罗格斯大学 Randy Gaugler 教授实验室）、许艳丽、赵奎军对全书进行了校对。尽管如此，限于时间和译校者水平，在译著中难免有疏漏或不足之处，在此，谨向原著作者和广大读者表示歉意，并真诚欢迎读者和同行批评指正。

译著的出版得到了“现代农业产业技术体系建设专项（CARS-04）”的资助。感谢所有参与翻译和校阅，以及为我们的工作提供方便的教师和研究生。在该书的翻译、校阅过程中，也使我们系统地学习到了昆虫病原线虫的理论和翻译技巧。

译者

2017 年 11 月

前 言

过去的 10 年里,昆虫病原线虫学经历了突飞猛进的发展,全世界有 60 多个国家、约 100 个实验室在从事这些线虫及其共生细菌的研究,研究范围从分子生物学领域到农业生态学领域,研究的共同目的是害虫生物防治。30 年前,一些研究者提出了用线虫防治害虫的初步设想,而今天,这种想法已不再只是实验室里的奇想,人们已经开始接受昆虫病原线虫作为一种对环境无副作用的杀虫剂以取代化学杀虫剂。美国佛罗里达州每年有 25 000hm² 柑橘类植物利用线虫防治害虫,还利用线虫防治酸果蔓类植物的害虫(葡萄黑象甲和蔓越橘环切虫),草坪害虫(蝼蛄、夜蛾、黏虫和象鼻虫等),洋蓟(野李蛾),蘑菇上的害虫(尖眼蕈蚊),苹果和桃树上的害虫[果柱蛾属(*Carposina*)],观赏植物上的害虫(象甲和食菌蝇)及园艺、农业、庭院和花园里的许多害虫。

昆虫病原线虫的实际应用把昆虫病原线虫学推到了科学研究的前沿。近年来,全世界的科研人员对新的遗传材料进行广泛收集并发现了数以千计的线虫新品系,推动了线虫分类鉴定方法的改进,使已描述种的数量迅速增加。已经用研究亲缘关系(同一总科)和秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)的分子技术研究昆虫病原线虫的其他种类,发现只有可作生防制剂的线虫研究能达到分子生物学研究水平。目前,在阐述昆虫病原线虫搜寻寄主策略、室温下制剂、生态作用、种群动态及昆虫病原线虫学的其他许多方面的研究都取得了很大的进步与突破。

本书主要讲述了昆虫病原线虫的一些基础知识与应用,来自 9 个国家的专家分别为本书各章提供了全面的、最新的研究与发现,并作以权威的概述,包括最近在基因工程、生物多样性、发酵、毒素、土壤生态、寄主-寄生物互作、共生、安全评价及防治方面取得的研究成果。本书首先阐述了线虫的基础生物学、分类和系统发育等方面的基础知识。然后根据已有的线虫分布数据库对记录的线虫种类进行分析,重点阐述线虫寄生和线虫生态方面的功能过程。本书从整体上介绍了昆虫病原线虫及一些研究得较为透彻的线虫种类,特别强调了线虫从原始的自由生存到寄生生存所进化的一些适应性。其余章节主要讲述线虫作为一种生防杀虫剂的技术优势。目前,线虫在防治应用中存在的一些问题在笔者以前的文章中也有所描述,主要是针对线虫应用、生产、质量和商业化的影响。昆虫病原线虫在研究与应用之间还存在一定差距,这也为我们提供了一些很有前景的研究方向,关键是制定一个研究计划,这样便可以把昆虫病原线虫的潜力充分地挖掘出来。

昆虫病原线虫是线虫与细菌的复合体,是建立在互利共生基础上的共生关系。与早期出版物(《生物防治中的昆虫病原线虫》,1990 年,CRC 出版社)内容的不同之处在于,本书把细菌共生体从不被关注的位置搬上了备受瞩目的舞台。强调细菌在保持共生关系和杀死寄主方面的作用,可能是细菌产生一系列不同的代谢物在起作用,但目前研

究得还不是很清楚，需要运用生物学技术来研究这些细菌产物。因此，商业开发除关注线虫外，细菌也成了一个新的焦点。

本书的编著得到了 George O. Poinar Jr. 的大力支持与帮助，Poinar 先生对我在昆虫病原线虫的研究方面帮助很大，尤其对我的研究生和博士后的学习和研究有深刻的影响，在此表示感谢。同时也要感谢所有的撰稿人，没有他们的支持本书无法完成。最后，感谢 Cheryl 为本书编著提供的大量帮助。

Randy Gaugler

2001 年 4 月

目 录

1 昆虫病原线虫的鉴定、命名及系统分类学	1
2 发光杆菌和致病杆菌的生物学与系统分类学	31
3 细菌-线虫之间的共生关系	52
4 昆虫病原线虫的致病机制	71
5 昆虫病原线虫共生细菌的次生代谢物	90
6 昆虫病原线虫生物地理学	104
7 昆虫病原线虫生理学和生物化学	130
8 昆虫病原线虫生存生物学	153
9 昆虫病原线虫的天敌和其他拮抗物	170
10 昆虫病原线虫行为生态学	183
11 食物网中的昆虫病原线虫种群	199
12 昆虫病原线虫的遗传学和遗传改良	213
13 昆虫病原线虫的剂型和应用技术	233
14 昆虫病原线虫的生产技术	253
15 昆虫病原线虫的管理与安全性	272
16 影响昆虫病原线虫商业化进程的因素：以在棉花、草坪和柑橘上的应用为例	291
17 Biosys 公司的经历：业内人士的观点	312

1 昆虫病原线虫的鉴定、命名及系统分类学

Byron J. Adams 和 Khuong B. Nguyen

*Entomology and Nematology Department, University of Florida,
PO Box 110620, Gainesville, Florida, USA*

1.1	引言	1
1.2	一般生物学	2
1.3	起源	3
1.4	分子系统分类学	3
1.4.1	种的鉴定	4
1.4.2	系统发育分析	5
1.5	斯氏线虫科系统分类学 (Chitwood and Chitwood, 1937)	7
1.5.1	形态观察	7
1.5.2	分类	8
1.5.3	系统发育关系	19
1.6	异小杆线虫科系统分类学 (Poinar, 1976)	20
1.6.1	形态观察	20
1.6.2	分类	21
1.6.3	系统发育关系	24
1.7	结论与展望	25
	致谢	25
	参考文献	26

1.1 引言

昆虫病原线虫的发现与害虫生物防治的历史需求息息相关。20 世纪初，发现了格氏斯氏线虫 (*Steinernema glaseri*)，随后开发利用该线虫控制害虫，但当时化学农药防治害虫成本低、药效高和相对未被限制，使利用线虫控制害虫经历了一段停滞状态。20 世纪 60 年代，人们认识到了化学药剂对环境的负面影响，又因其效率逐渐降低、代价大，使用逐渐受到限制。所以，寻找替代化学药剂的生物防治害虫的课题再次受到科学家的重视。20 世纪 80 年代，政府和企业投入了大量资金，昆虫病原线虫的研

究得到了迅速的发展，人们不断地寻找线虫新种以用于有效且持续性的害虫控制并进入商业化生产。

1.2 一般生物学

在斯氏线虫属 (*Steinernema*) 侵染期 (侵染期幼虫, IJ), 线虫肠道前部携带共生细菌致病杆菌 (*Xenorhabdus*), 当侵染期线虫进入寄主昆虫血腔后, 释放细菌。细菌在昆虫血液中迅速繁殖, 通常情况下在 24-48h 使昆虫患败血病而死亡。然后线虫变成取食的 3 龄幼虫, 取食细菌, 接着蜕皮发育成 4 龄, 变成雌雄成虫, 完成了第一代的增长发育。雌雄交配后, 雌虫产卵, 卵孵化成 1 龄幼虫, 然后蜕皮依次发育成 2 龄、3 龄和 4 龄。4 龄线虫发育成第二代的雌雄成虫。成虫再继续交配, 第二代雌虫产卵孵化为 1 龄, 蜕皮成为 2 龄, 线虫继续繁殖, 直到寄主尸体内部营养被耗尽才停止。通常情况下, 在昆虫体内线虫能繁殖 2-3 代 (图 1.1, 长生活史)。如果食物供应不足, 第一代雌虫产生的卵直接发育成侵染期线虫 (图 1.1, 短生活史)。寄主昆虫尸体内部营养耗尽时, 2 龄幼虫停止取食, 并将一些细菌存放于前端的细菌囊中, 然后它们蜕皮形成侵染前期和侵染期阶段幼虫, 并携带 2 龄期蜕下的皮作为保护壳。一般情况下, 侵染期线虫离开死虫体后继续寻找新的寄主。侵染期线虫在不取食的情况下可以在土壤中存活几个月。

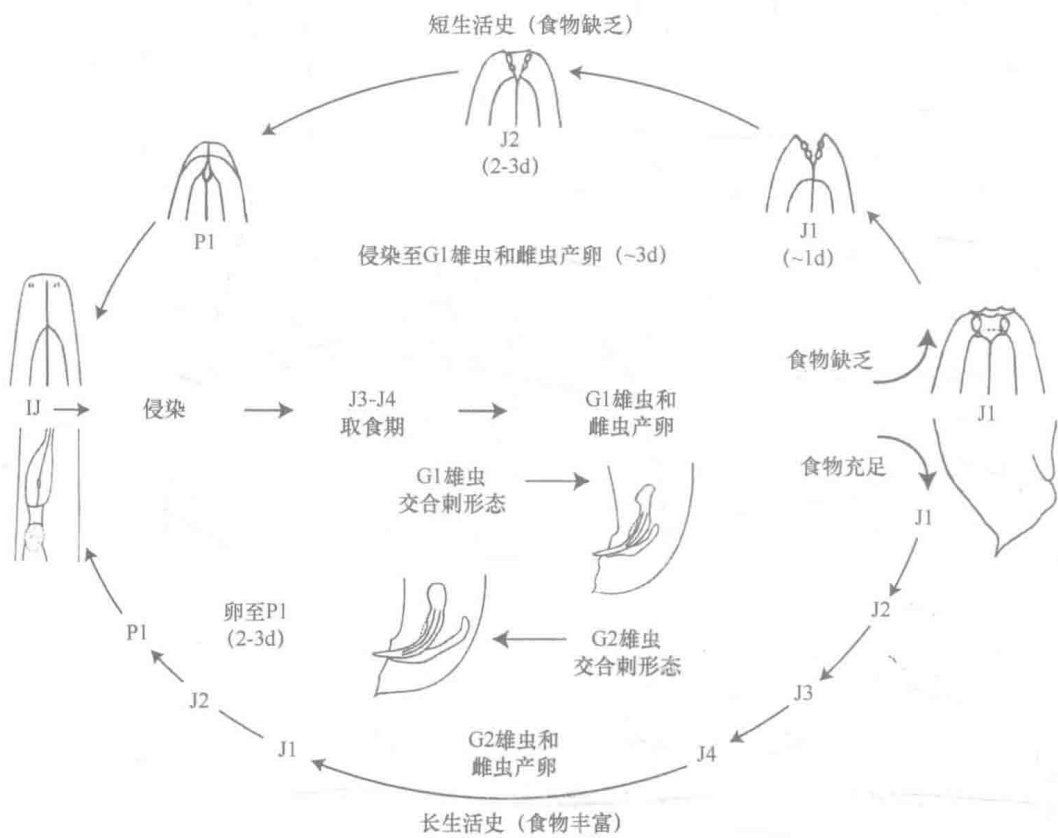


图 1.1 斯氏线虫属生活史图解

图中以矮蝼斯氏线虫 (*S. scapterisci*) 为例描述了斯氏线虫非常重要的不同发育阶段。G1. 第一代; G2. 第二代; J1. 1 龄幼虫; J2. 2 龄幼虫; J3. 3 龄非侵染期幼虫; P1. 侵染前期幼虫; IJ. 3 龄侵染期幼虫; J4. 4 龄幼虫。已经观察到了异小杆线虫属 (*Heterorhabditis*) 生活史长或短导致其形态的差异 (Wouts, 1979)。

新斯氏线虫属 (*Neosteinernema*) 的生活史与斯氏线虫属的生活史相似, 但新斯氏线虫属只能繁殖一代, 雌虫离开寄主进入环境后, 它的后代在雌虫体内形成侵染期线虫。新斯氏线虫属体内的共生细菌已被发现, 但它的特性还不明确, 该线虫除了分类上有所描述, 其他情况还不详。

异小杆线虫属 (*Heterorhabditis*) 的生活史与斯氏线虫属的生活史也很相似, 但异小杆线虫属的第一代是雌雄同体, 而斯氏线虫属是雌雄异体, 并且共生细菌是发光杆菌 (*Photorhabdus*), 而不是致病杆菌。

1.3 起 源

Poinar (1983, 1993) 认为斯氏线虫属和异小杆线虫属起源于古生代中期 (3.75 亿年前)。他还推断了既独立又相互共存的进化使得这两个属具有相似的形态和生活史特征。根据它们口腔和雄虫尾的结构相似性, Poinar 推断异小杆线虫属是从沙质的海洋环境中“类暗杆亚属” (*Pellioditis*-like) 的祖先演化而来的, 而斯氏线虫属是从陆地上“小杆线虫原型” (*proto-Rhabditonema*) 的祖先演化而来的。

关于异小杆线虫属和斯氏线虫属的起源, Poinar 的观点是基于 18S 核糖体 DNA (Blaxter et al., 1998) 建立线虫最初的进化树。依据该进化树的描述, 异小杆线虫属与脊椎动物的寄生虫——圆线虫目 (*Strongylida*) 关系非常近。异小杆线虫属与圆线虫目有着亲缘关系最近的、共同的祖先暗杆亚属 (*Pellioditis*) [小杆目 (*Rhabditida*), 小杆总科 (*Rhabditoidea*)]。该进化树也描述了斯氏线虫属与小杆目的两个总科——全凹总科 (*Panagrolaimoidea*) 和类圆线虫科 (*Strongyloidea*) 的进化关系最近, 并且是最大的进化枝的一个成员, 包括滑刃目 (*Aphelenchida*) 和垫刃目 (*Tylenchida*) 中的植物寄生虫、食真菌线虫和食细菌线虫, 还包括小杆目中的头叶科 (*Cephalobidae*)。因此, 最初的分子数据显示异小杆线虫属起源于自由生活的取食细菌线虫的祖先, 然而关于斯氏线虫属祖先营养习性的进化还不清楚。

Blaxter 等 (1998) 不赞同 Poinar 的观点, 即认为异小杆线虫属和斯氏线虫属起源于不同祖先的假说, 虽然这一假说与其他人的分析结果一致 (Sudhaus, 1993; Liu et al., 1997; Adams et al., 1998)。所有分析结果均表明异小杆线虫属和斯氏线虫属与细菌及昆虫间的演化关系是分别独立且不相关的。然而, Burnell 和 Stock (2000) 认为这些观点不成熟, 并且提出一个令人惊讶的说法, 即斯氏线虫属起源于并系类群 (*paraphyletic group*), 异小杆线虫属起源于斯氏线虫科 (*Steinernematidae*)。

1.4 分子系统分类学

由于对昆虫病原线虫新种描述的困难, 昆虫病原线虫分类学家正在迅速减少。对于非专业人员, 斯氏线虫属内不同种线虫, 特别是异小杆线虫属内线虫, 外表看上去很相似。尽管有形态分类检索表 (Hominick et al., 1997), 但是对田间采集的大量线虫样本进行分类整理合并, 并进行种水平的鉴定还是很令人头疼。近年来, 分子生物学和进化理论的发展为线虫学家提供了新的鉴定、定义和描述昆虫病原线虫种类的手段 (Liu et

al., 2000)。近几年来,有几个种的描述就是采用形态学和分子遗传学数据相结合的方法进行的(Gardner et al., 1994; Liu and Berry, 1996a; Stock et al., 1996; Stock, 1997, 1998; Van Luc et al., 2000)。

分子特征可以和形态特征一样进行线虫种的鉴定、诊断和定义。分子数据是它们的遗传基础,当不同的环境及寄主导致线虫形态不同时,分子分类法占有绝对优势。但是如果仔细地分子鉴定,敏感、客观和有力的分子生物学方法也有可能导致鉴定结果不准确。下面介绍一些鉴定和诊断昆虫病原线虫种通用的分子标记法的应用。

1.4.1 种的鉴定

从理论上讲,可以采用线虫的全基因组进行分子遗传标记来区分特殊种,然而,若对一个未鉴定的昆虫病原线虫进行分类地位的确定,利用基因库中最有代表性的标记进行比较是最方便的。因此,当标记的分子在基因库中没有或结果不一致时,则这种方法是不可行的。种群结构(亚种变异)提供的重要信息,在确定种界限上经常被忽视。

基于遗传数据库的描述,鉴定未知线虫最常用的标记法是测定 18S rDNA 或小核糖体亚单位 RNA 基因的序列(SSU)(Blaxter et al., 1998; Dorris et al., 1999)。对于非线虫学家或对昆虫病原线虫不熟悉的人来说,这种标记能够区分一个未知样品是否是线虫,并指出其是异小杆线虫科(Heterorhabditidae)还是斯氏线虫科。网站列出了线虫 18S rDNA 的 PCR 引物一览表:www.nema.cap.ed.ac.uk/biodiversity/sourhope/nemoprimer.html。

确定异小杆线虫属或斯氏线虫属的分子标记应选择核糖体内转录间隔区的核糖体基因序列(ITS rDNA),这种标记可区分异小杆线虫属或斯氏线虫属种间的异质性(Adams et al., 1998; Szalanski et al., 2000; Nguyen et al., 2001),这些在公开的 DNA 序列数据库已有很好的描述。一些昆虫病原线虫种群内部存在差异(B. Adams 和 T. Powers, 未发表数据),对这些差异需要谨慎地评价,尤其当这种标记被用在系统发育研究中更要谨慎。细胞色素氧化酵素(CO II)-16S(Szalanski et al., 2000)、ND4(Liu et al., 1999)、线粒体基因和 28S 核糖体亚单位间隔区分析等其他位点在区分线虫种水平上已证实是可行的(Stock et al., 2001)。

卫星 DNA 探针已经被认为是鉴定异小杆线虫属和斯氏线虫属的工具(Grenier et al., 1995, 1996, 1997; Abadon et al., 1998)。这些探针能迅速地确定线虫的特征是否属于已被描述的很少的分类群,但是,当所有探针都被构建时,这种标记可以用于鉴定。目前报道的这些探针在种水平鉴定上不如 rDNA ITS 或 IGS 方法敏感(Stach et al., 2000)。卫星 DNA 探针的一个缺点是只能揭示未知样品是否属于已有的种类(基本的,所有其他种)。另外,卫星 DNA 探针不能提供用于弥补系统发育关系的信息。

随机扩增多态性 DNA(RAPD)技术已经应用于昆虫病原线虫种间和品系间遗传多样性研究(Hashmi and Gaugler, 1998),以确定系统发育关系(Liu and Berry, 1996b),并进行新种的描述(Gardner et al., 1994; Liu and Berry, 1996a; Stock et al., 1996)。当 DNA 模板数量和质量及 PCR 循环参数稍有变化时,RAPD 分析法可以敏锐地捕捉到,但该方法重演性不好,因此,该方法很少被人们在系统分类研究中采用。然而,随着周

密的实验步骤和明确的规范化, RAPD 分析法在探索种以下的区别时成为一种有力的手段。例如, 它已被成功地用于检测异小杆线虫属不同种群间的同系繁殖后代 (Shapiro et al., 1997)。

与 RAPD 分析的信息内容相似的扩增片段长度多态性 (AFLP) 也是一种有力的分子分类手段。该技术可替代 RAPD 技术, 但 AFLP 要求更严格的扩增条件来提高可重复性结果, AFLP 标记法也被应用于昆虫病原线虫分类, 并且也证明了植物寄生线虫的根结线虫属 (*Meloidogyne*) 亚种关系的丰富性和近缘种间的遗传差异 (Semblatt, 1998)。AFLP 标记法对于系统研究的最大缺点是它只能分析显性遗传而不能分析共显性突变遗传的等位基因 (Mueller and Wolfenbarger, 1999), AFLP 很难通过基本特征来鉴定同源标记, 不支持亲缘关系较远的系统发育关系。对于昆虫病原线虫, AFLP 在探索种群结构的基因型分析和指纹图谱分析方面非常有效, 其在绘制有趣的特征轨迹分析时更有用 (Qin et al., 2000; Van der Voort et al., 2000)。

DNA 测序技术对某种昆虫病原线虫大量种群个体测定效果大都很理想, 该技术对具有特有特征的种鉴定很有效。通过 rDNA ITS (Adams et al., 1998) 和 mtDNA ND4 位点 (Blouin et al., 1999; Liu et al., 1999) 可以区分异小杆线虫属群体内一部分亚种间的变化。在相对水平上, 这样的差别也许存在于斯氏线虫属群体间和种内部 (Szalanski et al., 2000)。微卫星位点在其他生物种群水平研究中已成为普遍的标记 (Jarne and Lagoda, 1996; Goldstein and Pollock, 1997), 且已成功地应用于异小杆线虫属和斯氏线虫属的研究中。研究者试图用传统基因文库筛选的方法寻找异小杆线虫属和斯氏线虫属线虫微卫星标记, 但结果失败了, 并且这些改进的技术 (Casey and Burnell, 2001) 仅从 rDNA 区域得到了少量 ($n < 5$) 可重复图形 (Casey, Maynooth, 2001, 个人交流)。

虽然建立数据库比 DNA 测序要难, 并且准确度也低, 但是利用限制性内切核酸酶酶切 PCR 扩增产物 (PCR RFLP) 可以提高速度, 并可替代 DNA 测序。异小杆线虫属和斯氏线虫属中有几种线虫存在 ITS 区 (内部转录区间) 限制性片段 (Joyce et al., 1994; Nasmith et al., 1996; Reid et al., 1997; Pamjav et al., 1999; Stack et al., 2000), 并且更容易从如 GenBank 这样的公共数据库中得到 ITS 序列。Hominick 等 (1997) 提出采用清晰而有用的 PCR RFLP 操作程序来鉴定斯氏线虫属和异小杆线虫属。非专业人员或将来的分类专家采用该方法可以迅速地调查样品中得到新种以做进一步详细研究。例如, 用 PCR 扩增线虫样品, 设计几个特异酶, 产生的谱带模式与已知种类相比较, 如果谱带一致, 则认为种类相同 (还需进一步分析显示), 如果谱带显示新的模式, 可能是新种, 但要继续检测相近的基因和形态结构。

1.4.2 系统发育分析

对于种水平系统发育分析, 前面所提到的分子标记都被用过, 然而目前尚未发现一种较理想的分子标记能够解释异小杆线虫属和斯氏线虫属种类之间的关系 (Adams et al., 1998; Liu et al., 1999; Nguyen et al., 2001)。除了形态结构特征, DNA 序列数据在系统发育变化上是最经得起检验的分子标记。假设所鉴定的种有很少的分裂位点被覆盖, 当 RFLP 数据标记正确时 (如绘制分裂位点), 可能会产生正确的系统发育树。但是, 若用 RAPD 扩

增同源片段, 那么这种假设是很难被证实的, 并且对于评价昆虫病原线虫种间关系也不是最理想的 (Liu and Berry, 1996b)。

在 DNA 序列分析中, 18S 标记由于保守一直不能完全可靠地解决异小杆线虫属和斯氏线虫属种类之间的关系 (Liu et al., 1997)。另外, 使用 ITS、CO II-16S 和 ND4 标记的置换率太高, 结果导致没有太多 (或很少) 同源基因的描述 (只是大量序列罗列着) (Adams et al., 1998; Liu et al., 1999; Nguyen et al., 2001; Szalanski et al., 2000)。前面所提到这些分子应用研究的另一个问题是实验样品不充足 (丢失种)。由于实验材料所有权的原因, 一些分类单元经常要被排除。当发现新材料时, 保存样本或 DNA, 并提供给分类学家, 他们需要信息来产生最新的研究。经过这样的合作后, 申请生物防治应用专利便会很顺利, 而且这些资料还能充分地促进遗传改造 (Graybeal, 1998; Hillis, 1998; Poe, 1998)。

种命名注解: 1997 年, Stock 等和 Hominick 等建议改变几种昆虫病原线虫具体性质的描述, 因为《动物学术语国际代码》要求种名结尾的性别和通用名相一致 (第 4 版, 34.2 款)。1982 年以前, 大多数斯氏线虫属种类被归属于新斯氏线虫属, 新斯氏线虫属只有雌性。1982 年后, 新斯氏线虫属成为新的斯氏线虫属代名词 (Wouts et al., 1982)。斯氏线虫属性别是中性, 因此斯氏线虫属的命名也随之改变。

1998 年, Liu 等对命名的改变提出反对, 并声称: 对起始种描述, 原创作者是作为名词还是形容词不清, 使用证据不确定, 命名应仍用名词而不应改变 (第 4 版, 文章 34.2.1)。Liu 等 (1998) 还认为 *S. affinis*、*S. anomali*、短小尾斯氏线虫 (*S. neocurtillis*) 和锐比斯氏线虫 (*S. riobravis*) 的具体名称可以是名词或形容词。然而, 这并不完全正确。*anomali* 和 *neocurtillis* 可能是名词所有格, *affinis* 是形容词, 后来几乎没有人对最开始描述的原创作者命名的改变有疑义。在本章我们以 Hominick 等 (1997) 为准, 根据 ICZN (International Com Zoc: Nom) 建立的规定:

S. affinis 应该是 *S. affine*, 因为 *affinis* 是形容词。

中长斯氏线虫 (*S. intermedia*) 应该是 *S. intermedium*, 因为 *intermedia* 是形容词。

古巴斯氏线虫 (*S. cubana*) 应该是 *S. cubanum*, 因为有原创作者自己的意图 (Hominick et al., 1997)。

短小尾斯氏线虫 (*S. neocurtillis*) 应该是 *S. neocurtillae*, 因为有原创作者自己的意图 (Hominick et al., 1997)。

S. oregonensis 应该是 *S. oregonense*, 因为 *oregonensis* 是形容词。

波多黎各斯氏线虫 (*S. puertoricensis*) 应该是 *S. puertoricense*, 因为 *puertoricensis* 是形容词。

稀少斯氏线虫 (*S. rara*) 应该是 *S. rarum*, 因为 *rara* 是形容词。它在其他地方也都被替换了, 如新杆状线虫 (*Caenorhabditis rara*)、*Stegellesta rara* 和稀有茎线虫 (*Ditylenchus rarus*)。

锐比斯氏线虫 (*S. riobravis*) 应该变成 *S. riobrave*, 因为 *riobravis* 会产生歧义, 除非不管它是名词还是形容词。

H. indicus 应该是印度异小杆线虫 (*H. indica*), 因为 *indicus* 是形容词 (在属命名中 *indica*、*indicus* 和 *indicum* 经常被用作形容词)。

所有其他种的名称应该用原创作者命的名。

1.5 斯氏线虫科系统分类学 (Chitwood and Chitwood, 1937)

1.5.1 形态观察

雄虫: 在斯氏线虫科分类中, 雄虫形态特征是最重要的。**头:** 膨大或不膨大(图 1.2A、B), 头上的 4 个乳突通常要比唇部的 6 个乳突大, 前部有的带骨膜片。**后躯:** 生殖器官也很重要, 如图 1.2C 所示, 雄虫排泄道前有 10 对生殖乳突(正常是 6 个或 7 个)。**尾部:** 通常有 1 个乳突状物, 肛前的腹面有两对乳突状物(图 1.2D a、b)、左侧两对脊(subdorsal)、右侧一对脊。**尾端:** 有的有尾尖突(mucron)。**交合刺:** 在新斯氏线虫属中线虫交合刺比较大, 呈足状(图 1.2E)。交合刺的头部有的长大于宽, 有的长宽一样, 有的宽大于长(图 1.2F-H); 叶身几乎都是直的或弯的; 有的有软顎和喙状突起, 有的没有(图 1.2G、H)。**交配引带结构:** 腹部急剧或逐渐地变细(图 1.2I-K); 楔片呈 V 形、Y 形和箭头形。

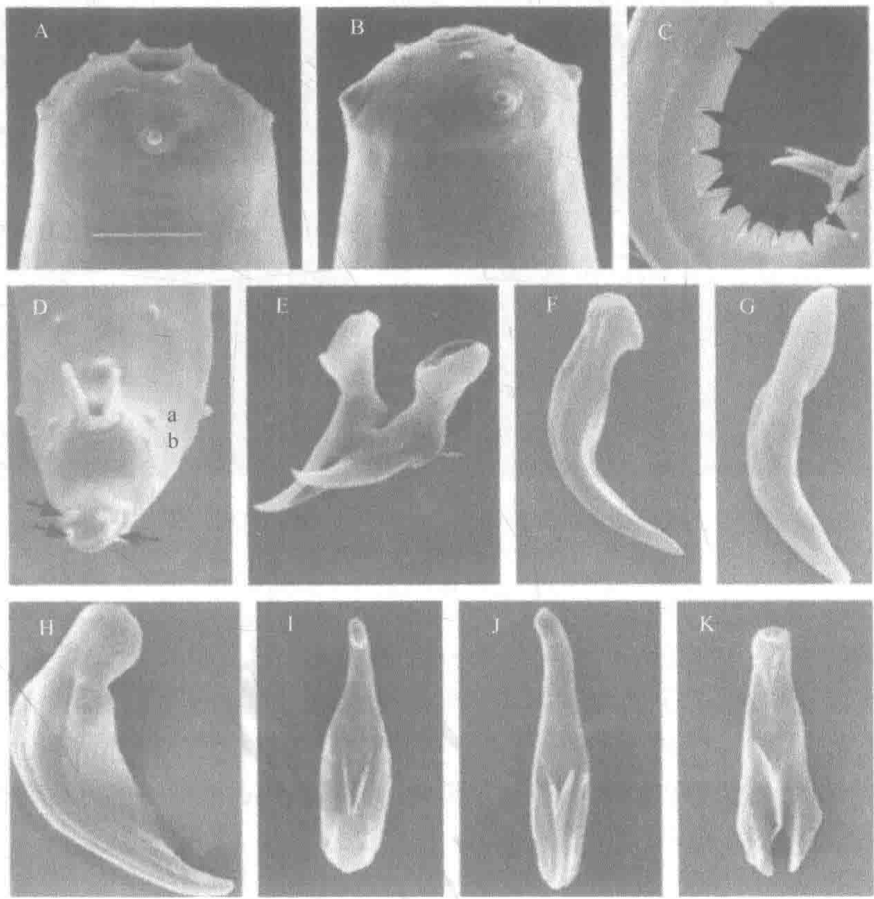


图 1.2 斯氏线虫科雄虫形态结构扫描电镜 (SEM) 显微图片

A、B. 头部口唇张开, 唇部和头部乳突; C. 雄虫尾部交合刺和肛门前生殖乳突(箭头指示); D. 从前面看, 雄虫尾部只有一个肛门前生殖乳突, 一对下乳突, 一对侧乳突, 两对傍臀乳突(a和b), 两对近尾部乳突(两个左箭头)和一对近尾部背乳突; E. 新斯氏线虫属的交合刺; F-H. 斯氏线虫属的交合刺(F. 交合刺头宽大于长; G. 交合刺头长大于宽; H. 交合刺有很大的膜和显著的喙状突起); I-K. 斯氏线虫属的交配引带结构(I. 楔片呈 V 形; J. 楔片呈 Y 形; K. 楔片呈箭头形)。

标尺: A、B=10 μ m, C=50 μ m, D-K=22 μ m