

译者：朱麟 博士

海南师范大学生命科学学院

海南省海口市龙昆南路99号，海南 海口 571158，中华人民共和国

线虫入门

E.C. McGawley¹, C. Overstreet², M.J. Pontif³ and A.M. Skantar⁴

⁽¹⁻³⁾Nematologists, LSU AgCenter, Baton Rouge, LA 70803 and ⁴Research
ular Biologist, USDA-ARS Nematology Laboratory, Beltsville, MD 20705

(2011年7月)

本文档包括幻灯片编号，必要时对内容的评论以及对一些缩写词的解释。幻灯片122中未加以感谢的材料也包括在其中。与本专题的所有组成部份均可作为植物线虫学，植物病理学，植物保护学及蠕虫学等相关学科的非赢利性教育材料。线虫学家协会(The Society of Nematologists)和热带美洲线虫学家协会(The Organization of Nematologists of Tropical America)将负责本专题的宣传和传播。建议本专题的使用者和浏览者访问这两个组织的网站(<http://www.nematologists.org>和<http://ontaweb.org>)，更多地了解它们对科学和农业的贡献，同时熟悉Cobb N. A.和热带美洲线虫学家协会(ONTA)基金会的慈善活动。

本专题中的材料主要集中在农业上重要的植物寄生线虫，但使用者应该记住向听众传达这样的信息，即这类独特的动物群(即线虫门Nematoda)中其它成员的巨大多样性和重要性，这一点在本专题中没有得到足够的强调。

鼓励使用者通过本文档末尾的电子邮件地址给作者反馈在使用过程中的信息。欢迎提供相关照片或格式化的数据，以改进本文档中各个部分的内容，或用以增加除植物寄生线虫以外的其它线虫内容。本专题绝非终结产品。对线虫感兴趣的同僚的贡献将使本专题有望发展成一个反映已有线虫生物学的、生态学的和科学的知识以及线虫在自然界中的作用的持续性项目。

1) 导言 这张引导性的幻灯片希望传达这样一个事实，即线虫几乎占据地球上每一个已知的生态位。线虫即使不是地球上最丰富的多细胞动物，也是其中之一。最早的无脊椎动物出现在大约6亿年前，黎巴嫩发现的琥珀化石标本表明，最早的线虫(昆虫索线虫)出现在1.35-1.20亿年前(Poinar, G.O. et al. 1994. *Fundam. Appl. Nematol.*, 17(5) : 475-477)。

2) 六界系统 这里的资料描述的是“生命树网络项目” (<http://tolweb.org/tree/>)提供的地球上生物的丰度和类群。注意，在迄今为止已描述的1500万种生物中，动物占了1000万种。

3) 蠕虫 确定蠕虫和蠕虫状生物在动物界中的相对位置。动物体制表现为辐射或两侧对称。两侧对称生物或者是后口动物或者是原口动物。第一张“内置图(build-in)”解释这些术语并提供便于理解三胚层生物中中胚层形成的胚胎学图解。蠕虫及蠕虫状动物均为原口动物，划分为两个“总门”(superphyla)：“具体外纤毛和/或滤梳”的类群(冠轮动物总门Lophotrochozoa)及“能够蜕皮及具有表皮层”的类群(蜕皮动物总门Ecdysozoa)。详情请访问http://www.wormbook.org/toc_nematodeevolecol.html，在Paul Deley写的第二章里面。在冠轮动物总门中有九个门(扁形动物门Platyhelminthes, 苔藓动物门Bryozoa, 星虫动物门Sipuncula, 软体动物门Mollusca, 纽形动物门Nemertea, 内肛动物门Entoprocta, 环节动物门Annelida, 帚形动物门Phoronida 和腕足动物门Brachiopoda), 在蜕皮动物总门中有八个门(节肢动物门Arthropoda, 有爪动物门Onychophora, 缓步动物门Tardigrada, 线形动物门Nematomorpha, 动吻动物门Kinorhyncha, 胸板动物门Loricifera, 鳃曳动物门Priapulida 和线虫动物门 Nematoda)。从这个角度看，内置图2展示的是绦虫*Taenia pisiformis*，其前端(头节)附着在兔子的肠壁上(www.thiagoodview.com)。

4) 线虫动物门(Nematoda) 这六张内置图介绍线虫动物的特征。内置图1解释术语真体腔、假体腔和无体腔。注：有的专家认为从演化发育上讲，假体腔动物是一个人为的并系类群。但是，假体腔仍然是线虫的一个特征，在这里展示

仅仅是概览，并不表明支持该类群动物系统发育的正确性。

5) **动物寄生线虫** 右侧顶端：由盘尾丝虫*Onchocerca volvulus*引起的河盲症 (river blindness)。该线虫由黑蝇*Simulium damnosum*传播；中部右侧：狗蛔虫*Toxocara canis*；底部右侧：家猫蛔虫*Toxocara cati*(修改自petcaregt.com/cat-worm.html)；底部左侧：犬恶丝虫*Dirofilaria immitis*；顶部左侧：十二指肠钩虫*Ancylostoma duodenale*；内置图：1.) 从眼中除去非洲眼线虫*Loa loa*；2.) 从脚上除去麦地那龙线虫*Dracunculus medinensis*；3.) 医学标志—蛇杖。据说是麦地那龙线虫的像征，并可作从人体内除去该线虫的工具(注：在美洲以外，许多专业和病人集中的机构都使用蛇杖，该杖因有一条巨蛇环绕一柱状物而得名)；4.) 一条被班氏丝虫*Wuchereria bancrofti*感染而肿大的腿；5.) 圣经中提到的麦地那龙线虫感染症状以及十二指肠钩虫和美洲钩虫*Necator americanus*在人类皮肤上的迁移幼虫；6.) 彩色的家禽蛔虫幼虫。

6) **自由生活种类** 顶部右侧：丽突线虫*Acrobeles sp.*前端的电镜照片；中部右侧：秀丽隐杆线虫*Caenorhabditis elegans*；底部右侧：单齿线虫*Mononchus sp.* 取食另一线虫；底部中：录像；左：如矛线虫*Dorylaimus sp.*；内置图：1. A.) 盔甲线虫*Thoracostoma sp.*；B.) *Acromoldavicus mojavicus*；C.) 类嘴刺线虫 *Enoploides sp.*；D.) *Pontonema cf. parpapilliferum*；E.) *Ceramonema sp.*；F.) *Latronema sp.*；G.) *Actinca irmae*；2.) 单齿线虫*Mononchus sp.* 取食另一线虫。

7) **海洋生活种类(含海洋寄生种类)** 顶部右侧：小杆线虫*Rhabditis sp.*；底部右侧：寄生乌鳢*Channa argus*的胃瘤线虫*Eustrongyloides sp.*；底部中：三齿线虫*Trissonchulus sp.*；底部左侧：雄性*Glochinema bathyperuvensis*手绘图 (dpc.uba.uva.nl)；中部左侧：*Onyx sp.*；顶部左侧：未知海洋种类(www.arcodiv.org)；内置图：(顶部) 生活三十鱼肉中的鼠海豚线虫*Phocanema sp.*；(底部)：驼形线虫*Camallanus cotti*前端。

8) **植物寄生线虫** 顶部左侧：(红色的食道)，彩图来源于B.Y. Endo；内置图 1-6: 植物寄生线虫的主要特征；7.) 图示常见属的相对大小(修改自G. N. Agrios著 植物

病理学, 第五版, 2005, Elsevier 科学出版社); 8.) 植物线虫内部解剖初步。注: 有的专家认为90%的线虫生活于海洋, 比较起来, 植物与动物寄生线虫只占很小的比例。除此之外, 学生们应该认识到大多数植物寄生线虫不是农业害虫, 而纯粹是自然生态系统的一个部分。

9) **植物病害病原** 对每一病原组, 提供了发现的时间顺序, 第一个病害及其发现者。(细胞模型: 可从 Mactode 出版公司获得). 细胞图来自G. N. Agrios著《植物病理学》, 第五版, 2005, Elsevier 科学出版社。

10) 专业术语 C= 锥状体(cone), S= 杆状体(shaft) 和 K= 瘤状体(knob)。DEGO= 背食管腺孔口(dorsal esophageal gland orifice), EL=食管腔(esophageal lumen), A= 壶状体(ampulla). 外置图: 口针鞘。内置图: 1.) 口针的功能; 2.) 提示; 3.) 麦线虫, 毛刺线虫和如矛线虫口针图解 (毛刺线虫为*Paratrichodorus hispanus*, 自F. Roca & M. Arias [Nematol. Medit. 14:181-185]); 4.) 实时录像: 松材线虫*Bursaphelenchus xylophilus*取食绿粘帚霉*Gliocladium virens*的菌丝。

11) **生活史** 图示为卵(单卵, 卵块和包囊, 未分化或完全分化); 孵化的幼体(外寄生或内寄生); 待成熟个体; 和成体(雌性个体和雄性个体的尾端, 示交合刺)。内置图: 1.) 根结线虫幼虫从卵中孵出(400X 实时); 2.) 肾形线虫幼虫从卵中孵出(1000X实时); 3.)线虫生活史周期。注: 对大多数植物寄生线虫来说, 感染期在二龄幼虫(J2)。但并不是所有植物线虫都如此, 如肾形线虫*Rotylenchulus reniformis*的感染虫态是雌性预成虫。

12-14) **植物线虫学简史** 显著的背景组成为埃及亚伯斯古医籍(Ebers Papyrus) 以及一个蛲虫(*Enterobius vermicularis*) 标本(picturesofparasites.com) 内置图: 1.) 线虫在被害谷粒上的感染症状; 种子(黑色); 从谷粒中出来的二龄幼虫; 和脱水状态下的幼虫(底部)(自M. McClure); 2.) Needham 就这一主题所写文章的未修改原文。幻灯片 13 & 14 无需解释而自明。

15) **线虫表型分类** 内置图: 短尾盾线虫*Scutellonema brachyurum*, 最原始的线虫分类是依据质粒的有无(照片中染色的部分)。

16) **线虫的系统分类** 有腺纲Adenophorea和胞管肾纲Secernentea的特征。垫刃亚目Tylenchina和滑刃亚目Aphelenchina背食管腺孔口的位置。内置图: De Ley, P 提出的线虫分类系统。快捷浏览线虫多样性和线虫分类的主要内容可参阅2006年1月25日的《蠕虫丛书》(*WormBook*), 编者: The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.41.1, , doi/10.1895/wormbook.1.41.1, <http://www.wormbook.org>. 另一可供咨询的优秀网站<http://insects.tamu.edu/research/collection/hallan/Nematoda/Family/0NematodaIndex0.htm>。

17) **鉴定** 食道(有时指食道或简单的称咽)在线虫鉴定中的重要性; 内置图: 1.) 环线虫型食道(criconematoid esophagi); 2.) 体液(humor); 3.) 食道各部分; 4.) 垫刃形线虫食道球中部横切面, 示食道内腔(esophageal lumen); 5.) 中部球状窦的活动 (P. M. Sforza 和 J. D. Eisenback).

18) **形态** 这里对线虫雌雄的描述没有针对某一特定的属。这里的各种材料只是想给学生提供有关植物寄生线虫外部形态特征的基本知识。注: 在属种的鉴定中所采用的DeMan值来源于对线虫某些体区的测定值。内置图: 1.) 额外的DeMan值; 2.) 表皮及侧带; 2.) 头区(正面); 3.) 感觉器的类型。

19) **内部器官系统** 内置图: 1.) 植物寄生线虫的生殖方式; 2 & 3.) 单子宫与双子宫卵巢; 4.) 描述子宫组成的术语; 5.) 据秀丽隐杆线虫 *C. elegans* 的图修改, 示子宫(uterine)和瓣状肌(vulvular muscles)。

20.) **阴门的位置**. 植物雌性寄生线虫阴门的位置变化很大。

21.) **生殖系统** 顶部右侧: 雄性交合刺, 交合伞(bursa)类型(leptoderan-型交合伞不达尾部末端, peloderan-型交合伞包裹尾部); 内置图1: 雄性尾部(据秀丽隐杆线虫 *C. elegans* 的图修改), 示泄殖腔(cloaca)和引带(gubernaculum); 底部右侧: 录像(秀丽隐杆线虫 *C. elegans*), 示配偶寻找行为和交尾; 左: 秀丽隐杆线虫 *C. elegans* 和根结线虫的阴道口(vulva); 内置图2: 卵的发育 (秀丽隐杆线虫 *C. elegans*); 根组织中的卵(染为红色者) (病灶线虫); 正在孵化的卵 (桔黄色-未知线虫(David Spears), 绿色-甜菜胞囊线虫*Heterodera schachtii*).

22.) 神经系统. 顶部右侧: 据秀丽隐杆线虫 *C. elegans* 雄性尾部的感觉器官图修改: B= 交合伞(bursa), R=交合伞射线神经元(bursal ray neurons), to NR= 联接到神经环; 底部右侧: 鲁道夫对垂线虫(*Contraecum rudolphii*): S=感觉器; 底部中: *Steinernema riobravis*; 底部左侧: 美洲剑线虫*Xiphinema americanum*: CS= 头部感觉器(黑色箭头指示化感器开口); 顶部左侧: NR= 神经环; 顶部中央: 秀丽隐杆线虫 *C. elegans* 雄虫尾部; 内置图: 1.) (顶部) *Laxus oneistus* 的前端 (A=化感器开口); (底部) 尾盾线虫*Scutellonema brachyurum* 质粒开口 (苏木精染色); 2.) 从右到左: 盘旋线虫*Rotylenchus* sp., 锥线虫*Dolichodorus* sp. 和*Neopsilenchus* sp. 的头部区域(自K. B. Nguyen); 3.) A= 化感器及其复杂结构图解。

23.) 消化系统. 右侧中央: 大豆“Lee”品种根部大豆异皮线虫*Heterodera glycines* 二龄幼虫的前端 (B.Y. Endo); 内置图: 1.) 示线虫前端的口针开口; 2.) 口针肌肉及其与食管腔的联结示意图 (绿色表示口针与食管腔联结); 3.) 帽状纽带线虫*Hoplolaimus galeatus* 有前端; 4.) 食管的延长部分(further along the esophagus) (*H. galeatus*); 5.) 前虫前端食管与肠的连接示意图; 6.) C=克来顿矮化线虫*Tylenchorhynchus claytoni* 的食道肠间瓣膜(cardium) (BBE = 食管基球, INT= 肠); 7.) DS= 消化系统, 点从消化系统的开始处分布到末端。

24.) 排泄系统. 顶部左侧: 绕线虫*Plectus* sp. 示意图(修改); 顶部右侧: 秀丽隐杆线虫 *C. elegans* 的排泄孔; 内置图: 示意图上排泄孔的位置和分泌腺

25.) 肌肉系统. 结虫身体中部(A)和端部(B)的肌肉组成。修改自秀丽隐杆线虫 *C. elegans* 形态解剖图集(The Atlas of *C. elegans* Anatomy (Altun, Z.F., R. Lints and D.H. Hall, 2002-2006).). 注: 对线虫研究有兴趣的任何浏览网址 www.wormatlas.org 可获得大量优秀的信息。内置图: 1.) 图A示弯曲的卵巢的横切面; 2.) 表皮的功能。

26.) 线虫的生境. 外寄生和内寄生线虫. 顶部左侧: 病灶和针刺(黑白图); 右侧: 根结线虫(RK)的幼虫 (红色), 雄虫(绿色) 和雌虫 (深蓝), CN=包囊线虫. 底部示意图修改自Hesling, J. J. and H.R. Wallace, 1961. Observations on the biology of

chrysanthemum eelworm *Aphelenchoides ritzemabosi* (Schwartz) Steiner in florists chrysanthemum. I. Spread of eelworm infestation. *Annals of Applied Biology*, 49: 195-209.

27.) 被寄生的根部. 顶部左侧: 大豆上白色的大豆包囊线虫雌虫(SCN) (www.entm.purdue.edu);顶部右侧: 包囊幼虫从卵中孵化(ucdnema.ucdavis.edu)和病灶雌虫; 底部右侧: 环线虫取食苜蓿的根; 底部中央: 非洲长针线虫*Longidorus africanus*取食根尖 (www.faculty.ucr.edu); 底部左侧: 有线虫和无线虫的甘蔗根系 (为强调起见, 线虫被放大); 放大的插图示肿大的根结和靠近根部蠕虫状螺旋形的雌虫。内置图: 1.) 大豆根组织中被染色的大豆包囊线虫雌虫幼虫 (www.extension.missouri.edu); 2.) 园艺作物表上部分被害状: A & B.) 分别为根结线虫危害的黄杨木苗圃及苗木 (Alexandria, LA); C.) 由于匕首线虫危害而致的衰弱桃树 (Clinton, LA); D.) 蓝斯和钱线虫危害破坏的高尔夫草坪 (Bastrop, LA); 3.) 农作物地上部分被害状: A-C.) (LA) A.) 被南方根结线虫*Meloidogyne incognita*危害的玉米地 (左边一行用二氯丙烯Telone处理, 右边一行未处理); B.) 被肾形线虫*Rotylenchulus reniformis* 危害的棉花地 (前面地块未处理, 后面地块用二氯丙烯Telone处理); C.) 南方根结线虫*M. incognita* 和肾形线虫*R. reniformis*危害的棉花地; D.) 大豆包囊线虫*Heterodera glycines* 危害的大豆田(www.entm.purdue.edu)。

28.) 叶部线虫危害: 水稻(Crowley, LA), 银莲花 (www.ppd1.purdue.edu), 草夹竹桃 (plant-disease.ippc.orst.edu), 小麦, 苜蓿(www.agf.gov.bc.ca), 椰子 (nematology.ifas.ufl.edu), 松树 (www.oznet.ksu.edu); 内置图: 1.)郁金香 (www.eppo.org); 2.)自明; 3.) 一点思考!

29.) 植物寄生线虫导致的产量损失估计. 损失范围在大麦为6.3% (左, 生命维持作物), 最高在番茄为20.6% (右, 重要经济作物). 全球范围内, 造成的损失的估计超过770亿美元。

30.) 线虫的运动与传播. 外置图: 1.) 爬行的 秀丽隐杆线虫 *C.elegans* (www.abac.edu); 2.) 运动方式, 改自Brusca, R.C. & J.G. Brusca. 1990. *Invertebrates*;

3.) 体液, 另上优秀的参考文献为: Robinson, A.F., et al. 2005. Vertical distribution of *Rotylenchulus reniformis* in cotton fields. *Journal of Nematology* 37 (3): 265-271. 相片: 繁殖群体(blog.agriculture.ph), 轮胎橡胶 (www.istockphoto.com), 种子残骸. 内置图: 说明线虫传播的动画, 如土豆包囊线虫 *Globodera rostochiensis* 通过鸟粪传播。参照幻灯片94中总结的Poinar 和 Yanoviak 的工作。

31.) 线虫取样方法. 改自Zuckerman, Mai & Rhode. 内置图: 对生产来说, 一个简单, 有效信息。(左图改自一幅G. L. Tylka的图)。

32.) 线虫分离技术. 已说明的技术包括(左上到左下): 贝尔曼方法(the Baermann method) (土壤样品外面用漏斗, 根系样品里面用雾室, 或用改进的贝尔曼方法, 即在通常直径15-20cm的PVC管之间夹上细钢丝网, 这种方法通常用于分离大量土壤中的线虫; 还有一种方法是应用半自动的淘析器(右侧顶部和底部)。 内置图: 技术人员在使用糖浮选离心分离技术。

33-36.) 线虫种群动态. 幻灯片36上的信息改自: Norton, D.C., 1978. Pp. 59-79. In, *Ecology of Plant-Parasitic Nematodes*. John Wiley & Sons, New York. 注: 在农业环境中, 组成群落的属通常最多6-8个。但在自然群落中, 属的数量常常达到30-60个。

37.) 线虫的活动, 危害与经济阈值. 相片: (从左到右) 大豆包囊线虫 *Heterodera glycines* 的包囊阶段, 矮小植株(大豆)上的互环形斑是典型的危害特征, 根结线虫在番茄根部形成的虫瘿以及肾形线虫在棉花根部的雌虫。内置图: 来自其它州的线虫阈值信息。术语: ET- 已在幻灯片37上定义; DT (危害阈值)-可观察到明显危害损失的线虫水平(相对于无线虫而言); AT (行动阈值)- 必须采取防治措施时的线虫水平。底部的表是表中所列州推荐的现行的阈值值(ET, DT, 或 AT), 已被 AR (T. Kirkpatrick), DE (R. Mulrooney), GA (R. Kemeraite), IL (G. Noel & J. Bond), IA (G.L. Tylka), MS (G. Lawrence), SC (J. Mueller), TN (P. Donald & M. Newman) 和VA (P. Phipps)使用。

38.) 线虫管理策略. 顶部右侧: 免耕农作系统(www.prebleswcd.com)。

39.) 杀线虫剂. 溴甲烷(Methyl bromide) (entwew.clemson.edu), 涕灭威(Temik) (www.bayercropscience.cl), 呋喃丹(Furadan) (www.sonti.cn). 内置图: 1.) 南极上空由于人类释放大量氯和溴而形成的臭氧洞(www.NASA.gov); 2.) 有关非熏蒸性杀线虫剂的信息。注: 自11/2009起, 禁止使用的熏蒸剂有: Meth-O-Gas, Brom-O-Gas, Terr-O-Gas 和 Vorlex. 禁止使用的非熏蒸剂有Dasnit和克线磷Nemacur。同样应注意, 作为种子处理剂的杀线虫剂有Avicta Complete Cotton 和Avicta Complete Corn (均由Syngenta公司生产) 和AERIS种子处理杀虫剂、杀线虫剂(种子处理杀虫剂、杀线虫剂) (Bayer Cropscience公司生产)。

40.) 线虫管理的新技术。相片: (从左到右) 通过移栽时沟内喷雾使用低剂量杀线虫剂; 农业中的卫星(www.fcc.gov) GPS 技术, 杀线虫真菌 (节丛孢*Arthrobotrys* sp.)。

41.) 减少杀线虫剂使用的一个例子. (路易斯安那农业中心(LSU AgCenter)线虫学项目最用一种胶体化合物所做的实验)。内置图: 1.) 在路易斯安那供试的12种作物图解; 2.) 棉花的产量最大, 而且变化不大(3-英亩试验区); 3.) 自明; 4.) 用该产品进行评估的各种使用方法(在所有试验中, 每英亩均使用10加仑1%的溶液, 采用“移栽浸渍法”“处理, 移栽苗在1%的溶液中浸泡8秒钟)。

42.) 定点农业的一个例子。用GPS准备定位一特定农地的位置(从Google Earth上定位)。内置图: 路易斯安那北部的一块100英亩棉花地, 该地同时用根结线虫(*Meloidogyne incognita*)和肾形线虫(*Rotylenchulus reniformis*) 感染。

43.) 定点农业2. 顶部左侧: 相片和录相, 内置图 1.) Veris 3100 土壤电导作图系统; 底部左侧: Veris 3100设备图解与使用说明(右), 即如何测定电导(EC). 其它内置图: 2.)对电导值作图并加以说明后获得的实验地地图; 3.) 建立验证行; 4.)第一年实验地用杀线虫剂二氯丙烯(Telone)处理后有效和无效的面积指标。

44.) 定点农业3. 管理区域图, 示第二年内应该或不应该用杀线虫剂处理的实验地面积。内置图: 熏蒸工具。

45.) 定点农业 4. 底线。

- 46.) 定点农业 5. 农产品生产都可用的软件和硬件。
- 47.) 线虫寄生物: 巴斯德芽孢杆菌*Pasteuria penetrans*. Build out: 巴斯德芽孢杆菌*P. penetrans*的信息。生活史 (改自www.pasteuriabio.com), 电镜照片(分别来自B. Kerry & K. Davies 发一在www.rothamsted.ac.uk上的黑白和彩色电镜照片), 巴斯德芽孢杆菌*P. penetrans*的内生孢子; 内置图: 1.) (左) 雌性钱线虫的低倍相片, (右) 雌性针线虫的前端; 2.) 有色的针线虫和附着的巴斯德芽孢杆菌*P. penetrans*内生孢子(橙色); 3.) 巴斯德芽孢杆菌属*Pasteuria* 其它种及其寄主线虫的信息。
- 48.) 线虫寄生物: 真菌. 顶部左侧: 被*Arthrobotrys* sp.捕获的线虫电镜照片; 顶部右侧: *Dactylaria brochopaga* 产生的捕获环 (www.iwf.de); 底部: (左和右) 被真菌寄生的根结线虫卵; 中部: 被ARF真菌寄生大豆包囊线虫四龄幼虫(J4)。
- 49.) 扩展的线虫目表型分类。(Mai & Lyon, 1975). DEGO (背食管腺开口). 顶部右侧: (中) 马丁矮化线虫*Tylenchorhynchus martini*雄虫, (左) 细小线虫*Gracilacus* sp.雌虫, (右) 针线虫*Paratylenchus* sp. 雌虫; 底部右侧: 半轮线虫*Hemicriconemoides* sp. 雌虫; 左: (从上往下分别为) 螺旋线虫*Helicotylenchus* sp., 纽带线虫*Hoplolaimus* sp.和短体线虫*Pratylenchus* sp. 的雌虫。
- 50.) 垫刃目Tylenchida 重要属。自明。
- 51.) 侧尾腺口纲Secernentea寄生性的演化。早期鉴定的相片及致谢(除顶部左侧 [*H. galeatus* 侵染的草根外])。
- 52.) 寄生方式图解. 修改自R. P. Esser的图集。自明。
- 53-67.) 植物寄生线虫属检索表. 这一部分的一些图最初是从Pictorial Key to Genera of Plant Parasitic Nematodes by W. F. Mai and H. H. Lyon进行高精度扫描下来的(见致谢)。一旦出现问题(主要是第一作者发现), 即查阅原始文献, 扫描图形, 并用Photoshop CS3 “片层”和“图像调节”功能对图像进行修改, 并用于本讲义。注: 弹出的图像要嘛是对特征的描述, 要嘛是对一个属的说明(联接相片或属名的红线)。
- 68.) 线虫常见属的比较。同属内物种间如有重要的差异, 如*Heterodera*属各种间

包囊的生活阶段不同，此时需对包囊的“平均”大小进行说明。同样，除植物寄生线虫外，在圆圈的左下方还列出了自由生活的线虫(*Rhabditis* spp.)。

69.) 具有巨大经济重要性或潜在重要性线虫属。自明。相片：顶部右侧：脱水生活的肾形线虫*Rotylenchulus reniformis*幼虫；中：针线虫正在蜕皮的幼虫，*R. reniformis* 的卵；底部右侧：松材线虫*Bursaphelenchus xylophilus*雄虫尾部；底部中：兰斯线虫和病灶线虫的前端；底部左侧：*Hoplolaimus galeatus*雌虫前端；顶部左侧：根结线虫幼虫。

70.) 肾形线虫。相片：顶部：脱水休眠幼虫(anhydrobiotic juvenile)，幼虫的食道；中间行：(从左到右) 在根上的雌虫(LM= 光学照片)，在根上的雌虫(EM= 电镜照片)，在根上的感染性四龄幼和雄虫；底行：(从左到右) 根上的雌虫，用*R. reniformis* 感染后的大豆和棉花地，卵块；内置图：1.)染色与未染色的卵块；2.) 寄主范围；3.) 录相。

71.) 大豆包囊线虫。相片：A.) 用包囊线虫感染后的大豆地；B.) 大豆根上的“黄色雌虫”；C.) 内部可见卵的包囊；D.) 包囊发育过程(从白色到褐色)中的“肿胀”阶段；E.) 带有染色幼虫的大豆根组织；F.)幼虫；G.)雄虫的单个精子细胞；H.) 二龄幼虫从卵中孵出。内置图：1.) 示成虫和包囊发育的动画(已修改来源不明)；2.) (左)雌虫和雄虫，(右) 充满卵的包囊；3.)大豆根瘤与线虫雌虫大小比较；4.) 录相(同样是比较包囊雌虫与根瘤大小的比较，自G. L. Tylka)；5.) 大豆包囊线虫*Heterodera glycines* 充满卵的包囊(100X)。

72.) 根结线虫。相片：A.)在成瘿根部内寄生的肿胀雌虫和外面的卵块(均染色)；B.) 含有被染色幼虫的根组织；C.) (从左到右)从低到高的生活阶段(卵除外)；D.) 具瘿的番茄根；E.) 用于寄主鉴别试验的植物(用于鉴别“常规”的种和品种...见幻灯片73)；F.) 具瘿的胡萝卜根。 内置图：1.) (左) 从新鲜的黄瓜组织解剖出来的雌虫，(右)蓼属*Chenopodium*植物上的雌虫和卵块(E. C. Bernard)；2.) 靠近路易斯安那亚历山大(Alexandria)被根结线虫(*M. incognita*)感染的大豆地和具瘿的根系；3.) 录相。

73.) 要结线虫寄主鉴别试验. J. N. Sasser 1954 建立, 一直以来为线虫学领域具有重要的价值。加号(+)表示敏感寄主, 减号(-)表示抗性寄主。内置图: 除寄主鉴别试验外, 根结线虫雌虫(顶部中间)的会阴模式形态(perineal pattern morphology)也用于区别 *Meloidogyne hapla* (Mh), *M. javanica* (Mj), *M. incognita* (Mi) 和 *M. arenaria* (Ma)。近些年来, 酯酶表型(底部中间)也用于作为种类确证的另一种方法。

74.) 病灶线虫。外置图: 线虫取食根组织;左侧上部: 线虫模型 (从Mactode出版公司可获得); 右侧下部: 雌虫; 内置图: 自明。

75.) 刺线虫。自明。左侧下部: 刺线虫危害草莓; 内置图: 自明。

76.) 松树枯萎病 1. 外置图s: 单株松树枯萎症状: 1- 路易斯安那, 1981; 2- 葡萄牙, 1995, 标本采集自Setubal附近, PT (E.C. McGawley 的观察和收集, E.C. McGawley 在葡萄牙的富布莱特(Fulbright)休假时, 首次向当地的农业和林业工作者介绍了该病, 使这些人认识到在葡萄牙也可能存在松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus*); 3- 日本, 2008; 4- 日本松林中的松树枯萎症状; 相片: 顶行: 左- 松针的松褐天牛 *M. alternatus* (L.D. Dwinell), 具变色真菌感染征兆的松木(www.forestryimages.org) 以及天牛 *M. caroliniensis* 气管的横切面, 里面堆积着松材线虫 *B. xylophilus* 的幼虫; 中- 日本黑松对松材线虫 *B. xylophilus* 非常敏感; 右- 松板可能是线虫传播的有效方式; 底行: 左- 松材变色表示被blue-stain真菌侵染; 中-松材线虫 *B. xylophilus* 雄虫尾部, 具有玫瑰刺状的交合刺(L. D. Dwinell); 右-松材线虫 *B. xylophilus* 雌虫 (www.metla.fi). 框中间的松树枯萎病循环修改自 www.forestresearch.gov.uk。

77.) 松树枯萎病2. 相片: 左侧顶部: 松材线虫 *B. xylophilus* 感染的真菌 *G. virens* 培养物, 生长受阻, 孢子不能形成(左), 相同年龄的培养物在无线虫有情况下能产生孢子(右); 相片后的方框示12天内线虫感染的培养物发育情况; 顶部右侧: *G. virens* 培养物具典型的”保龄球瓶”瓶颈; 底部左侧: 分别为松材线虫 *B. xylophilus* 雄虫尾部(分别为低倍和高倍放大), 取食 *G. virens* 菌丝的线虫幼虫, 雌

虫食道和阴门, 以及线虫成虫的线条图; 底部右侧: 在路易斯安那大学(LSU)进行的用于接种研究的湿地松和火炬松苗。

78.) 兰斯线虫。自明。

79-80.) 线虫病害复合体。关于这一问题的一篇好的参考文献: Sikora, R.A. and W.W. Carter, 1987. Nematode Interactions with Fungal and Bacterial Pathogens – Fact or Fantasy. Pp. 307-312 In: Vistas on Nematology, J.A. Veech and D.W. Dickson, Eds., E.O. Painter Printing Co.

81.) 线虫-真菌复合体。相片: 左: (从上到下)齐整小核菌*Sclerotium rolfsii* (www.bspp.org.uk), 尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum*的培养物及被丝核菌 *Rhizoctonia solani*感染的大豆根; 顶部: (从左到右分别为)甜菜包囊线虫 *Heterodera schachtii* 的幼虫和*H. glycines*的雌虫(www.rennes.inra.fr), 根结线虫的雌虫和卵块, 染了色的*H. glycines*幼虫, 从植物组织上生长起来的真菌菌丝; 内置图: 1.) 一个加合的例子: 1989-1991年间草莓产量的累计数字。要获取其它详细细节, 请参阅标明的《线虫学杂志》中的文献引用; 2.) 一个增效作用的例子。要获取其它详细细节, 请参阅标明的《线虫学杂志》中的文献引用; 3.) 一个拮抗作用的例子。要获取其它详细细节, 请参阅标明的《热带线虫》中的文献引用。

82.) 线虫-细菌复合体。相片: 顶部: 青枯病菌*Ralstonia solanacearum*的培养物 (www.cals.ncsu.edu); 底部: 菊花滑刃线虫*Aphelenchoides ritzemabosi* 雌虫(修改); 内置图: 1.) 线虫寄生和健康大豆根瘤的切片 (www.micro.biol.ethz.ch); 2.) 香豌豆束茎病菌*Rhodococcus fascians*的彩色电镜照片 (www.mikrobenscout.de)。

83.) 一年生黑麦草毒性。外置图: ARG1影响的绵羊。相片: 黑麦草植株 (members.iinet.net.au), 黑麦草种子, 脱水休眠线虫(anhydrobiotic nematodes) (www.invasive.org)。

84.) 线虫病毒关系。相片: 叶部症状 (www.agf.gov.bc.ca); 电镜照片 (www.ncbi.nlm.nih.gov)。图(修改)中线虫食道上的箭头表示最大的病毒滞留区。

85.) 线虫-线虫关系。1. 外置图: 有关线虫-线虫关系研究的一般情况。介绍和引

用DeWit 取代系列方法。

86.) 线虫-线虫关系2. 用DeWit取代系列(replacement series)评价根结线虫和肾形线虫相互关系。要获取其它详细细节, 请参阅标明的《线虫学杂志》中的文献引用。

87.) 线虫杂草关系。一个例子: 该工作表明, 牵牛花(MG), 大果田菁(HS)和约翰逊草(JG)根部浸出液能阻碍棉花(C)上肾形线虫*Rotylenchulus reniformis*的生殖。顶部的相片示试验装置, 通过该装置收集每一种杂草的浸出液。(悬挂的蓝子作为对照(前), 蓝子里只有灭菌的珍珠岩)。右边的表是肾形线虫种群数据, 是两个试验的平均及分析结果。底部的相片示根浸出物的滤液及其以对肾形线虫卵孵化影响的评价。内置图: 1.) 数据显示未分化的8-16细胞期的细胞数以及在十天的周期内(X-轴)完全发育的卵和孵化的幼虫数(Y-轴)。实验时将卵放在细胞培养孔内, 内含各杂草的根浸出液和对照悬浮液。从所有三种杂草所获得的浸出液均能降低卵发育的速率。要获取其它详细细节, 请参阅标明的《热带线虫》中的文献引用; 2.) 农业中更为常见的线虫杂草关系; 3.) 农业中有关线虫杂草关系的关键问题; 4.) 长满杂草的大豆地 (top-www.extension.iastate.edu)和 小野芝麻上大豆包囊线虫雌虫(SCN)的雌虫相片(E. Creech, Purdue University)。最近的参考文献: Johnson, W. G., Creech, J. E., and Mock, V. A. 2008. Role of winter annual weeds as alternative hosts for soybean cyst nematode. Online. Crop Management doi: 10.1094/CM-2008-0701-01-RV.

88.) 线虫-昆虫-真菌关系. 在本研究中, 茎溃疡病真菌(DPC)降低大豆根组织中包囊线虫(SCN)幼虫的数量。相反, 大豆夜蛾(*Pseudoplusia includens*)取食会明显增加根中包囊线虫幼虫的数量。总的来说, 这三种病原对植物生长的影响及彼此间的相互影响是累加的。要获取其它详细细节, 请参阅标明的《线虫学杂志》中的文献引用。

89.) 虫生线虫 1. 外置图: 1.) 大多数虫生线虫的分类地位; 2.) 小杆目Rhabditida线虫的食管; 内置图: 1.)嗜菌异小杆线虫*Heterorhabditis bacteriophora* (www.bio-

control.nl) 和小卷蛾斯氏线虫 *Steinernema carpocapsae* 的相片 (www.db.uac.pt); 2.) 小卷蛾斯氏线虫 *S. carpocapsae* 的肠, 示其中的嗜线虫致病杆菌 *Xenorhabdus nematophilus* (www.uconn.edu)。

90.) 虫生线虫 2. 发光杆菌 *Photorhabdus luminescens* 的生活史 (curiosidadesdelamicrobiologia.blogspot.com); 相片: 左: 从虫尸上爬出来的线虫; 右: 感染发光杆菌 *P. luminescens* 的烟草天蛾 (*Manduca sexta*) 幼虫及其光泽 (www.nature.com); 内置图: 发光杆菌 *Photorhabdus luminescens* (www.sci.muni.cz). “Photorhabdus” 意味着具发光的杆状体; 它们是唯一已知的陆生发光细菌。

91.) 虫生线虫 3. 相片: A.) 从火蚁上出来的索线虫 (S. Porter); B.) 从大蜡螟 (*Galleria mellonella*) 上出来的线虫; C.) 被线虫感染的藻虾 (mygrassshrimp.googlepages.com); D.) 从 *Prenolepis* 属的有翅雄蚁上出来的 Heydenius 属线虫幼虫。该标本保存在大约 4 亿年前的波罗的海琥珀中 (G. Poinoir, 2002); E.) 寄生白蚁的线虫 (bexar-tx.tamu.edu); F.) 从蚊子幼虫中出来的食蚊罗索线虫 *Romanomermis culicivorax* 幼虫 (University of Nebraska, Lincoln Dept. of Entomology)。

92.) 虫生线虫 4. 相片: A.) 被夜蛾斯氏线虫 *Steinernema feltiae* 感染的蕈蚊幼虫 (www.omafra.gov.on.ca); B.) 被嗜菌异小杆线虫 *Heterorhabditis bacteriophora* 感的蛆 (www.yardscaping.org); C.) 被索线虫 *Mermis nigrescens* 感染的蝗虫; D.) 被食蚊罗索线虫 *R. culicivorax* 感染的蚊子幼虫; 内置图: 1.) *Psammomermis* sp. (M. Hodda & www.csiro.gov.au); 2.) 用 Skeeter Doom 包装可确保每克培养基中同时含有食蚊线虫 *Reesimermis nielsenii* 的 500 种不同的生活阶段。

93.) 虫生线虫 5. 商业虫生线虫产品. 自明。 .

94.) 虫生线虫 6. *Myrmeconema neotropicum* 和 *Cephalotes atratus* 之间的关系。 自明。

95.) 分子诊断: 标题幻灯

96.) 为什么要用分子方法?

- 97.) 分子诊断包括生化方法, 基于DNA的方法, 和基因组方法。
- 98.) 生化方法: 最常用于线虫诊断的生化方法是电泳分离和同功酶类型的分析。包括酯酶, 苹果酸脱氢酶, 还有其它酶。通常使用PHAST 凝胶系统(Pharmacia, Inc. 可能已不再生产)。局限-必须用早期雌虫; 种内可见变异; 对热带根结线虫(RKN)鉴定是较好的方法。
- 99.) DESS: 广泛用于线虫PCR的保存液 (在Yoder et al., Nematology, 2006, Vol. 8 (3), 367-376.有详尽说明。). DESS= DMSO, EDTA, 饱和盐), 0.25M EDTA二钠盐 pH 8.0; 20% 二甲亚砜(Dimethyl sulphoxide); 饱和NaCl 保持线虫形态; 钝化降解DNA的核酸酶, 左图 = ; 右图 = ; 承Paul DeLey提供。
- 100.) vCinema 电影剪接, 承Paul De Ley, Luis Mundo 和Manuel Mundo提供。示穿刺短体线虫*Pratylenchus penetrans* 腺球区和卵巢端部区域。
- 101.) 基于DNA的方法: 所有的样品类型均可用于分子分析; 但包囊和卵需要破碎也释放DNA。很多常规的诊断情况下, 只有少量的幼虫样品可用, 在这种情况下, 发展单一线虫的DNA提取和分子分析方法就显得十分重要。
- 102.) 准备用于分子分析的线虫; 线虫表皮可能较坚韧, 通常需要物理破碎; 单独用化学试剂常常不能完全破碎表皮, 而且具有腐蚀性(如NaOH, 在模板在PCR中使用之前, 必须中性化)。虽然单个样本获得粗提物可进行PCR反应, 但当应用DNA制备的商业试剂盒时, 大量的线虫通常能获得更为满意的DNA量, 其纯度也较高。
- 103.) 下游分子分析: 多聚酶链反应利用热稳定的DNA多聚酶(Taq 多聚酶)合成目标DNA副本, 使DNA的数量呈指数增加。
- 104.) PCR方法详解: 下面的幻灯片示典型PCR反应的要素, 强调避免污染和其它隐蔽问题的方法。相片示在PCR工作场所使用的无菌罩, 以及用于反应装置的设备及试剂的放置。
- 105.) PCR反应中的卫生: 对PCR来说, 洁净是至关重要的, 可采用几个步骤减少污染或试剂的失效。从“线虫碎片”中提取DNA并不困难, 但最终的DNA并不

纯，而且线虫中的细胞核在常温下很活跃。将DNA提取物和PCR试剂盒置于低温下可防止DNA降解。气溶胶障碍技巧(Aerosol barrier tips)有助于防止移液管被DNA污染，这种污染可从一个实验传到另一个实验。与其化几周苦思问题的症结所在，还不如把一些过期的试剂扔掉。把热稳定缓冲液(Taq buffer)，核苷酸等分成许多份可防止在冻融过程中对试剂反应的降解。PCR分析前后将所需物品分放有助降低交叉感染。

106.) 后-PCR: 外置图中相片: 1)中, 称量琼脂糖; 左, 在微波炉中加热琼脂糖凝胶溶液至沸腾; 右, 将冷却的琼脂糖倒进制胶盘内。2) 左, 跑电泳的缓冲液在搅拌盘中混合; 右, 混合后的缓冲液被倒入凝胶盒。3) 左, 在每个样品中加入1% 的染液; 右, 将样品装入小孔中。4) 左, 电流通过凝胶; 右, 用染料跟踪电泳过程。5) 左, 凝胶浸入溴化乙锭(ethidium bormide)染液中; 右, 用Alpha成像系统获取电泳后凝胶的数字图像。尽管每个实验室均有自己的设备和工作习惯, 但这些均是进行PCR分析的典型的步骤。称量琼脂糖时最好用抹刀; 多余的琼脂糖一定要按照适当的废物处理规则处理掉 (不要再放回瓶里)。准备琼脂糖溶液时应避免灰尘(这些灰尘会吸收紫外光, 使凝胶看起来杂乱无章)。在倒入制胶盘前, 让融化的凝胶冷却一会儿, 以免制胶盘弯曲变形。尽管现化图像设备使归档凝胶图像非常容易, 但适合安装紫外光盒的暗罩成像系统(dark hood camera adapters)既便宜又好用。

107.) PCR扩增产生的典型凝胶: 相片: PCR反应产物的凝胶电泳。要考虑能产生最好PCR产物分离结果的凝胶大小和琼脂糖比例(通常, 产物长度(bp)越短, 所用的琼脂糖比例(%)就越高)。用足够大的凝胶刷以适应样品的体积, 倾倒凝胶要足够深, 同时不要忘了设置对照和DNA大小标记。凝胶带可用灭菌刀片切下, 从凝胶上纯化, 以用于下游的一些程序, 如直接测序, 限制性消化, 或克隆。在紫外光源下工作时不要忘了保护你的眼睛!

108.) 常用于线虫鉴定的分子标记-1: 线虫鉴定PCR中, 核糖体基因是最常用的目标基因。核糖体基因组的多拷贝排列提供了众多的目标, 即使从单条线虫上

也能做到这一点。由于协同进化中的均一化过程，个体内rDNA arrays间的变异率常较低，因此单个rDNA拷贝彼此前不可能独立进化。结果，在单个条线虫或线虫种群中几乎观察不到rDNA基因的任何变异。当然也有例外，因此当观察到多个序列变异结构时，均一化的过程可能是不完全的。

109.) 常用于线虫鉴定的分子标记-2: ITS rDNA由18S和5.8S间的转录间隔区(ITS1)以及5.8S和28S rDNA之间的转录间隔区(ITS2)组成。由于位于ITS侧面的转录区的高度序列保守性，单一的通用引物(如TW81和AB28)可对大多数植物寄生线虫和自由生活的线虫的该区域进行扩增。尽管ITS rDNA的扩增存在不同的意见，但对植物寄生线虫来说，它确实是最常使用而且最有用的诊断标记。

110.) 常用于线虫鉴定的分子标记-3: 18S rDNA也叫小亚基核糖体RNA(SSU)。该标记物通常用于系统发育分析，现也用于研究不清的属内物种的鉴定，如用于陆生和海洋环境中的样品调查。

111.) 常用于线虫鉴定的分子标记-4: 28S rDNA也叫大亚基核糖体RNA(LSU)。28S结构域D2和D3最常用于线虫序列分析和鉴定。基于环和发卡域的次级结构预测可用于揭示重要的或保守DNA序列。这些结构在系统发育分析中有助于序列的排列。图A和B来自Subbotin, S.A., Ragsdale, E.J., Mullens, T., Roberts, P.A., Mundo-Ocampo, M., Baldwin, J.G., A phylogenetic framework for root lesion nematodes of the genus *Pratylenchus* (Nematoda): evidence from 18S and D2-D3 expansion segments of 28S ribosomal RNA genes and morphological characters, *Molecular Phylogenetics and Evolution* (2008), doi: 10.1016/j.ympev.2008.04.028

112.) 常用于线虫鉴定的分子标记-5: IGS rDNA表示28S基因和5S核糖体亚基(IGS1)间的间隔区域以及5S和18S(IGS2)间的间隔。这一标记已表明可用于区分根结线虫的种类，特别是番茄抗根结线虫*Meloidogyne mayaguensis*。

113.) 常用于线虫鉴定的分子标记-6: 线粒体DNA标记。包括细胞色素氧化酶II基因, 内源tRNA组氨酸(His)基因, 16S基因的末端之间的间隔。通常用于区别根结线虫的种类。PCR产物的大小或限制性片断长度多态性也用于鉴别某些物种。

114.)限制性长度片段多态性: PCR产物用限制性酶消化, 产生各种片段类型, 并可用电泳分析。这一方法已用于大一植物寄生线虫, 且价格便宜, 简单而易于操作。

115.) 比较未知物种与参照物种: 成功应用RFLP于线虫鉴定的关键问题是要有可靠的参照物种以与未知样本比较。

116.) 实时PCR: 实时PCR 的一个主要优点是其多功能性; 但是, 正如PCR测试一样, 显示专一性和敏感性是至关重要的。实时PCR相对于传统的PCR来说需要专门的设备, 试剂的价格和设的维护可能受到限制。在实验设计和数据解释上进行适当的培训是非常重要的。

117.) 多重PCR: 这一方法通常包括特定种类的引物, 与线虫种类的同时检测与鉴定一起使用。应用这一方法的著名例子是基于ITS rDNA 的多重PCR用于检测土豆包囊线虫*Globodera pallida* 和 *G. rostochiensis*。这一方法最近被改进后用于 *G. tabacum*的检测。在选择标记中有可能存在种内变异的情况下, 多重PCR方法应该小心使用。对广大地理范围的种群和对照种进行新的验证性测试总是值得的。

118.) 各部分致谢: 自明。

119.) 缓冲和非缓冲生态系统. 缓冲生态系统-一群相互依赖的动植物生活在同一地区或区域, 相互间通过食物而相互作用, 其它正在发生影响的关系均被其它关系抵消, 从而形一个稳定的, 平衡的或不变的系统, 在该系统中没有任何一个物种占优势。

120.) 学生: 最重要的产物. 顶行 (左到右) C. Overstreet, K. L. Winchell, K.C. Hadden, J. P. Bond and I. Wenefrieda; 中行 (左到右) E. Wosula, A. Sankaralingam and M.J. Pontif; 底行 (左到右) F. Garces, S. R. Stetina and J. Bruce. 内置图: L - M. Parish; R - A. Staszkiwicz.

121.) 结尾. 自明。

122.)致谢。 我们真诚地希望这里以及在幻灯片98中的致谢能表达我们对那些提

供本讲义中所用材料的个人和网站的谢意。本讲义作者所提供的材料在这里未加以感到谢。 如果浏览者和使用者发现任何未加感谢的材料，鼓励与作者联系，以便增加在合适的地方加以感谢。

123.) 其它说明. 自明。

Author email contacts are: emcgawley@agctr.lsu.edu,
coverstreet@agcenter.lsu.edu, mpontif@agcenter.lsu.edu, and
andrea.skantar@ars.usda.gov