调 查 研 究
Investigations

陕西省首次发现象耳豆根结线虫危害洛南白菜

刘 晨[1], 陈志杰[1], 杨艺炜[1], 郑小慧[2], 王家哲[1], 张淑莲[1], 李英梅[1*]

(1. 陕西省生物农业研究所, 西安 710043; 2. 陕西省商洛市植保植检站, 商洛 726000)

摘要 采用形态学鉴定、特异性引物鉴定及 rDNA-ITS 序列分析方法,对采自陕西省洛南县白菜的根结线虫进行了种类鉴定,并结合构建系统发育树,确定了感染洛南县白菜的根结线虫为象耳豆根结线虫。切片观察发现,其会阴花纹整体呈圆形至卵圆形,线纹较密且平滑,背弓较高,为方形或近圆形,无明显侧线。利用象耳豆根结线虫特异性引物进行 PCR 扩增,得到大小约 236 bp 的目的条带,说明所鉴定线虫为象耳豆根结线虫。系统发育树结果显示,所鉴定根结线虫与已知的不同地区象耳豆根结线虫聚为同一进化分支,进一步确定陕西省洛南县采集的根结线虫为象耳豆根结线虫。本文首次发现并报道了陕西省有象耳豆根结线虫为害,为该线虫的扩散及防治研究奠定了基础。

关键词 陕西省; 白菜; 种类鉴定; 系统发育树; 象耳豆根结线虫

中图分类号: S 436.341 **文献标识码**: A **DOI**: 10.16688/j.zwbh.2019287

First report of *Meloidogyne enterolobii* infecting cabbage in Luonan county, Shaanxi province

LIU Chen[1], CHEN Zhijie[1], YANG Yiwei[1], ZHENG Xiaohui[2], WANG Jiazhe[1], ZHANG Shulian[1], LI Yingmei[1*]

(1. *Bio-Agriculture Institute of Shaanxi*, *Xian* 710043, *China*; 2. *Plant Protection and Inspection Station of Shangluo*, *Shaanxi Province*, *Shangluo* 726000, *China*)

Abstract The root-knot nematodes collected from Luonan county, Shaanxi province were identified to be *Meloidogyne enterolobii* by morphological observation, rDNA-ITS sequence analysis, specific primers identification and phylogenetic analysis. Perineal pattern of the root-knot nematode was round to oval, lines were dense and smooth, back bow was square or round and high, and no obvious lateral line. A 236 bp target band could be amplified by specific primers PCR amplification, indicating the root-knot nematode was *M. enterolobii*. Phylogenetic tree demonstrated that the root-knot nematode was clustered in the same evolutionary branch with those from different regions, thus we further confirmed that the root-knot nematode collected in Luonan county, Shaanxi province was *M. enterolobii*.

Key words Shaanxi province; Chinese cabbage; species identification; phylogenetic tree; *Meloidogyne enterolobii*

全世界线虫种类估计在 50 万种以上,其种类数量仅次于昆虫,位居第二,其中植物寄生线虫是为害作物的一大类重要生物灾害,仅根结线虫就达 90 多种,可为害 3 000 多种植物[1-2]。在我国广泛分布的根结线虫主要包括南方根结线虫 *Meloidogyne incognita*、北方根结线虫 *M. hapla*、花生根结线虫 *M. arenaria* 及爪哇根结线虫 *M. javanica* 等,陕西分布的主要种类和全国其他地区基本一致,优势种为南方根结线虫。近几年,另一种根结线虫逐渐受到人们重视,即象耳豆根结线虫 *M. enterolobii*。

象耳豆根结线虫最早在我国海南省儋州市的青皮象耳豆树根部发现[3],该线虫具有极强的致病力,危害性大,寄主范围也很广泛,能克服抗根结线虫的 *Mi* 基因,对农作物造成毁灭性的灾害[4],已被国际上公认为是最具危害性的植物病原线虫之一,被欧洲和地中海植物保护组织列为检疫性有害生物 A2 名录[5]。象耳豆根结线虫多分布于我国热带及亚热带地区,在海南省、广东省、福建省等多个省份均有报

收稿日期: 2019-06-11 **修订日期**: 2019-09-12
基金项目: 陕西省科技厅一般项目(2020NY-072);西安市农业科技创新工程(20193064YF052NS052);陕西省科学院一所一品项目(2019K-05);陕西省科学院科技计划(2019K-12)
* 通信作者 E-mail: liyingmei9@163.com

道[6-7]。设施大棚与日光温室内冬天土壤温度仍可保持在 0℃以上,使得象耳豆根结线虫的分布逐渐向北方蔓延,甚至可以越冬[8]。我们对采自陕西省洛南县白菜根部的根结线虫进行了分离鉴定及分子生物学分析,确定了在洛南县白菜上危害的根结线虫种类为象耳豆根结线虫,为准确防治白菜根结线虫病提供了依据。

1　材料与方法

1.1　样品采集

线虫侵染的白菜采自陕西省洛南县,染病苗放入封口袋,做好标记带回实验室做进一步鉴定。

1.2　形态学鉴定

会阴花纹切片的制作与观察:将白菜根冲洗干净后,在体视镜下挑取 20 头雌成虫,单头雌成虫移至滴有 45%乳酸固定液的载玻片上,显微镜下用解剖刀从虫体后部约 1/4 处轻轻切下,制作会阴花纹切片。清水将杂质冲干净后,加上盖玻片[9-10],Olympus显微镜下观察会阴花纹形态并拍照保存。

1.3　分子生物学鉴定

1.3.1　线虫 DNA 提取

从根系挑出的卵及雌成虫先用 75%乙醇消毒,再用灭菌水清洗 3 遍后转移至 PCR 管中;每管加去 Mg^{2+} 的 PCR Buffer 16 μL,2 mg/mL 蛋白酶 K 4 μL,ddH_2O 40 μL,液氮冷冻研磨 3 遍;置于 PCR 仪,65℃ 90 min,85℃ 10 min,即得到线虫的 DNA,可直接用于下一步的 PCR 扩增或−20℃保存备用。

1.3.2　PCR 鉴定

采用象耳豆根结线虫特异性引物 Me-F/Me-R 进行 PCR 扩增,Me-F:5′-AACTTTTGTGAAAGTGCCGCTG-3′, Me-R: 5′-TCAGTTCAGGCAGGATCAACC-3′,PCR 反应条件为 94℃ 4 min;94℃ 30 s,62℃ 30 s,72℃ 60 s,35 个循环;72℃ 10 min[11]。

采用 ITS 区引物 V5367/26S 对根结线虫的 rDNA-ITS 进行扩增。V5367:5′-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT -3′, 26S: 5′-TTTCACTCGCCGTTACTAAGG -3′,PCR 反应条件为 94℃ 4 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 60 s,35 个循环;72℃ 10 min[5]。

1.4　系统发育树构建

将扩增的 rDNA-ITS 区 PCR 产物送至上海生工生物科技有限公司进行测序(双脱氧核苷酸终止法 Sanger 测序)。测序结果通过 BLAST 与 GenBank 中的序列进行同源性比较。下载世界不同地区象耳豆根结线虫种群基因序列,利用 MEGA 6.0 软件,采用邻接法(neighbour-joining, NJ)构建系统发育树。

2　结果与分析

2.1　白菜根结线虫病症状

感染根结线虫的白菜生长缓慢,植株矮小,叶片发黄甚至枯死。受害根系出现膨大的根结,根结呈近圆形。一条根上出现形状不定、大小不一、表面粗糙的念珠状根结。这一特征不同于其他根结线虫形成的根结。根结内有乳白色纺锤状雌成虫,根结外部附着有大量浅黄色卵囊(图 1)。



图 1　白菜根结线虫病症状

Fig. 1　Symptoms on Chinese cabbage root damaged by root-knot nematode

2.2　形态学特征

从白菜根结内分离的根结线虫中随机挑选 20 头雌成虫进行形态特征观测。如图 2 所示,其会阴花纹整体呈圆形至卵圆形,线纹较密且平滑,背弓较高,为方形或近圆形,无明显侧线。这些特征与我们从陕西不同作物上分离的南方根结线虫会阴花纹有差异[12-13],与象耳豆根结线虫会阴花纹特征较吻合,初步判断感染白菜的根结线虫种类为象耳豆根结线虫。

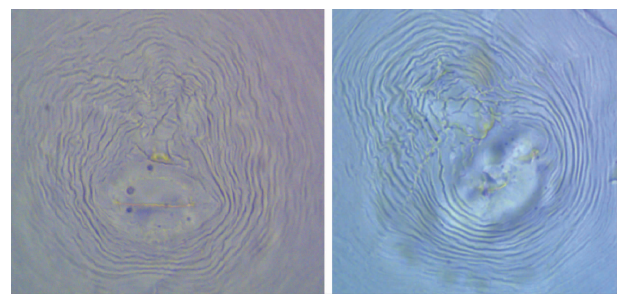


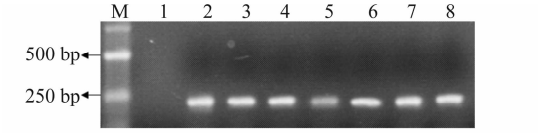
图 2　侵染白菜的根结线虫代表性雌成虫会阴花纹形态

Fig. 2　Typical female perineal patterns of root-knot nematode populations infecting Chinese cabbage

2.3 分子生物学鉴定

2.3.1 特异性引物扩增结果

从白菜根部随机分离根结线虫的雌成虫，提取其DNA，利用特异性引物进行扩增，均得到大小约236 bp的条带(图3)，与文献[4]报道的大小一致，确定侵染白菜的根结线虫为象耳豆根结线虫。



1: 阴性对照; 2~7: 单头根结线虫; 8: 多头根结线虫混合样品
1: Negative control; 2-7: Single nematode; 8: Mixture of nematodes

图3 根结线虫特异性引物扩增结果

Fig. 3 Amplification with the specific primers for root-knot nematode populations

2.3.2 ITS区扩增与系统发育树构建

对本试验分离的根结线虫DNA采用ITS区引物扩增，得到大小约770 bp的目的条带，将PCR扩增产物测序，序列简称为ME-SHX，在NCBI上进行BLAST比对，结果显示，与GenBank登录号为KX823380(福建象耳豆根结线虫)、KP411227(台湾象耳豆根结线虫)等序列同源性高达99.9%，因此可以确认陕西洛南白菜上分离的根结线虫为象耳豆根结线虫。

下载国内外不同地区象耳豆根结线虫序列(表1)进行聚类分析，以南方根结线虫为外群，构建系统发育树。

表1 象耳豆根结线虫种群系统进化分析中引用的其他序列信息

Table 1 Other sequence information in the phylogenetic analysis of *Meloidogyne enterolobii* population

登录号 Accession no.	中文名及拉丁学名 Chinese name and Latin name	采集地 Location	寄主植物 Host plant
MK894021	象耳豆根结线虫 *Meloidogyne enterolobii*	印度	番石榴
KU666394	象耳豆根结线虫 *M. enterolobii*	墨西哥	仙人掌
MK396844	象耳豆根结线虫 *M. enterolobii*	墨西哥	咖啡树
KP411227	象耳豆根结线虫 *M. enterolobii*	中国台湾	番石榴
MF467278	象耳豆根结线虫 *M. enterolobii*	中国福建	生姜
MG520184	象耳豆根结线虫 *M. enterolobii*	中国安徽	栀子花
KX823397	象耳豆根结线虫 *M. enterolobii*	中国福建	番石榴
KT354570	象耳豆根结线虫 *M. enterolobii*	中国福建	香蕉
KX823380	象耳豆根结线虫 *M. enterolobii*	中国福建	辣椒
GQ870255	象耳豆根结线虫 *M. enterolobii*	中国广东	花叶竹芋
KY386299	象耳豆根结线虫 *M. enterolobii*	中国海南	番茄
CK233978	南方根结线虫 *M. incognita*	美国	番茄

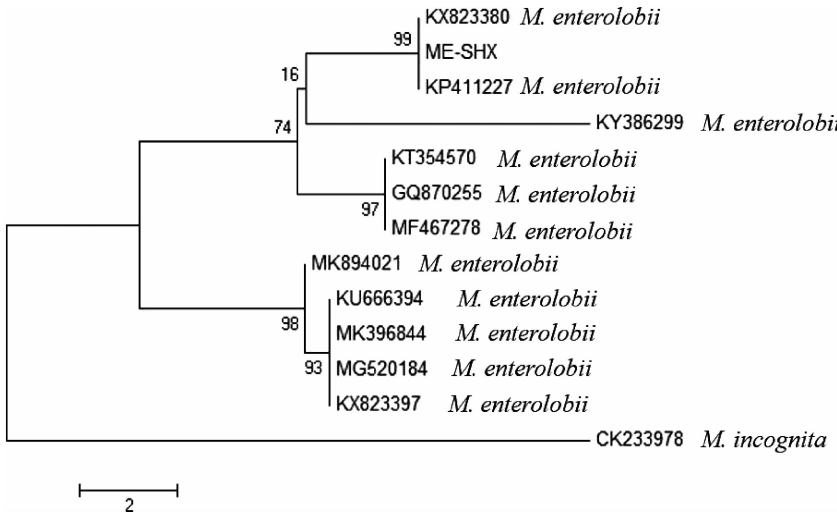


图4 基于ITS序列构建的象耳豆根结线虫种群系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic relationships among *Meloidogyne enterolobii* populations based on the sequence of ITS

从图 4 可以看出,本试验分离的 ME-SHX 根结线虫与南方根结线虫的遗传距离较大,分为两支,可将两者区分。ME-SHX 根结线虫与已知的不同地区象耳豆根结线虫聚为同一进化分支,由此可以确定,从陕西洛南采集的根结线虫为象耳豆根结线虫。

3　结论与讨论

根结线虫不同种类之间形态十分相似,鉴定难度较大。在分子生物学鉴定方法出现之前,根结线虫种类鉴定主要通过雌成虫会阴花纹的特征来进行。根结线虫的会阴花纹不会发生明显变化,是一种较为可靠的鉴别方法。但长时间的进化及生活环境的变化,会阴花纹也可能会发生一定的变异,使得鉴定结果不准确,因此就需要利用分子生物学方法进一步确认。本文利用象耳豆根结线虫特异性引物对白菜上根结线虫 DNA 进行了 PCR 扩增,结果得到大小约 236 bp 的目的条带,对 rDNA-ITS 序列与 GenBank 里已知象耳豆根结线虫的序列及南方根结线虫序列做了系统发育树分析,可以看出陕西象耳豆根结线虫与其他地区象耳豆根结线虫聚为一支,而与南方根结线虫分为两支,进一步确定了侵染白菜的根结线虫为象耳豆根结线虫。

象耳豆根结线虫多发生于我国广东、福建及海南等地区,主要寄主作物为番石榴。2008 年首次在广东省的南瓜上发现了该线虫[8],2013 年首次报道了福建省番石榴上该线虫的发生与危害[14],2015 年云南省首次发现该线虫为害辣椒根系[15],2015 年湖南省辣椒上首次发现象耳豆根结线虫[16],可见象耳豆根结线虫由热带地区向亚热带地区蔓延的速度在不断加快。本研究在陕西省发现了象耳豆根结线虫,这是首次在我国亚热带及热带地区之外的省份发现该线虫,并且十字花科 Brassicaceae 的白菜是该线虫的寄主新记录。象耳豆根结线虫对寄主植物具有极强的毒性,寄主范围广,相关检疫检验部门及农业部门应给予高度重视,加强该线虫的预警与监控工作。在此基础上,了解该线虫的分布区域及潜在寄主,为采取有效的防治措施提供理论依据。

参考文献

[1] 廖金玲. 根结线虫的鉴定及其 DNA 多态性研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2001: 4 - 12.

[2] 张绍升. 植物线虫病害诊断与治理[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1999: 300 - 302.

[3] YANG Baojun, EISENBACK J. *Meloidogyne enterolobii* n. sp. (Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing pacara earpod tree in China [J]. Journal of Nematology, 1983, 15(3): 381 - 391.

[4] KIEWNICK S, DESSIMOZ M, FRANCK L. Effects of the *Mi*-1 and the *N* root-knot nematode resistance gene on infection and reproduction of *Meloidogyne enterolobii* on tomato and pepper cultivars [J]. Journal of Nematology, 2009, 41(2): 134 - 139.

[5] EPPO A2 lists of pest recommended for regulation as quarantine pests [R]. Version 2012 - 09, Available online at http://www.eppo.int/QUARANTINE/list A2.htm, 2012.

[6] 陈淑君, 肖顺, 程敏, 等. 福建省象耳豆根结线虫的鉴定及分子检测[J]. 福建农林大学学报, 2017, 46(2): 141 - 147.

[7] 卓侃, 胡茂秀, 廖金玲, 等. 广东省和海南省象耳豆根结线虫的鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(2): 193 - 197.

[8] 陈慧, 王会芳, 陈绵才. 象耳豆根结线虫的研究进展[J]. 贵州农业科学, 2016, 44(5): 51 - 55.

[9] 冯志新. 植物线虫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.

[10] 张靠稳, 贾振华. 根结线虫会阴花纹的染色方法[J]. 北方园艺, 2008(3): 207 - 208.

[11] 龙海,刘昊,徐建华. 象耳豆根结线虫的 PCR 鉴定和检测方法[J]. 植物病理学报, 2006, 36(2): 109 - 115.

[12] 刘晨, 张锋, 陈志杰, 等. 渭南地区生姜根结线虫的种类鉴定研究[J]. 现代农业科技, 2019(2): 73.

[13] 刘晨, 王晨光, 张锋, 等. 周至县猕猴桃根结线虫种类的鉴定[J]. 现代农业科技, 2018(2):117 - 118.

[14] 杨意伯. 福建龙眼、荔枝、番石榴线虫病害调查及寄主线虫种类鉴定[D]. 福州: 福建农林大学, 2013.

[15] WANG Y, WANG X Q, XIE Y, et al. First report of *Meloidogyne enterolobii* on hot pepper in China [J]. Plant Disease, 2015, 99(4): 557.

[16] 王剑, 宋志强, 成飞雪, 等. 湖南省辣椒上首次发现象耳豆根结线虫[J]. 植物保护, 2015, 41(4):180 - 183.

(责任编辑: 杨明丽)