

深圳市蔬菜基地根结线虫的种类和分布

赵传波^{1,2} 郑小玲³ 阮兆英³ 丁莎¹ 李东平³ 徐春玲¹ 谢辉¹

1. 华南农业大学资源环境学院/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. 中国种子集团有限公司生命科学技术中心, 武汉 430075; 3. 广东省深圳市农业科技促进中心, 深圳 518040

摘要 为明确深圳市威胁蔬菜生产的根结线虫种类和种群分布, 对其主要蔬菜基地的根结线虫进行调查, 并采用传统形态学与分子生物学结合的方法进行种类鉴定。结果表明: 在深圳市 13 个蔬菜基地的 121 个调查采样点中, 有 11 个蔬菜基地的 74 个采样点发现根结线虫 *Meloidogyne* spp., 蔬菜根结线虫发生率为 61.16%; 从采集的样本中纯化得到 76 个根结线虫种群, 并鉴定出 4 种根结线虫, 其中 69 个种群为南方根结线虫 *M. incognita*, 3 个种群为爪哇根结线虫 *M. javanica*, 1 个种群为花生根结线虫 *M. arenaria*, 3 个种群为象耳豆根结线虫 *M. enterolobii*; 同时发现 2 个采样点有南方根结线虫和象耳豆根结线虫的复合种群。

关键词 蔬菜; 根结线虫; 种类; 鉴定; 分布

中图分类号 S 432.4⁺5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)02-0041-08

根结线虫 *Meloidogyne* spp. 是分布广泛且寄主种类繁多的固着内寄生植物线虫, 是威胁蔬菜生产的主要病原物之一, 现已报道约 100 个有效种^[1]。全世界每年因根结线虫病引起的农业经济损失巨大。同时, 根结线虫的危害又加重了枯萎病、根腐病等土传性真菌病害和部分细菌病害的发生。近年来, 广东省深圳市建立了很多规模大、产业化水平高的商品蔬菜生产基地, 蔬菜连作重茬和连续多年种植的情况非常普遍, 从而导致该地区根结线虫病的发生日趋严重。因不同种类的根结线虫对寄生作物的种类或品种有专化性, 故准确鉴定根结线虫种类、明确田间根结线虫的优势种群, 对选育抗病作物品种和采用抗病作物轮作防治根结线虫具有重要意义。笔者对深圳市主要蔬菜生产基地根结线虫的发生情况进行了系统调查, 并对采集、纯化的根结线虫种群进行鉴定, 旨在明确该地区蔬菜根结线虫的优势类群, 为制定病害可持续防治措施提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

在 2010 年到 2011 年, 对广东省深圳市主要蔬菜生产基地种植的多种蔬菜根结线虫病发生情况进行调查。在 13 个蔬菜生产基地的 121 个采样点, 于

不同季节采集当季蔬菜根际土壤和有根结的病根。采样时, 以 GPS 定位点为中心在约 2 m×2 m 范围内 5 点取样, 每个点取蔬菜根际 5~15 cm 深处土壤和根组织混合物约 200 mL; 将 5 个点混为 1 个样品装入采样袋中, 记录寄主、采样时间、采样地点等信息并进行编号(表 1)。

1.2 样品纯化

将田间采集的病根和病土样品接种于盆栽的感病空心菜 (*Ipomoea aquatica*) 上, 当空心菜根部出现色泽淡黄或黄色的卵块时挑取单卵块, 接种到预先盆栽在消毒土壤且有 15 d 苗龄的空心菜根部, 每份样品用单卵块接种 10 盆, 在温室内培养 45 d 左右, 当空心菜根部出现色泽淡黄或黄色的卵块时, 取样备用。

1.3 线虫形态观察

在解剖镜下用解剖针、镊子分离根上的根结线虫雌虫、雄虫、卵囊, 并采用浅盘法^[2], 把卵囊置于 2 层面巾纸上, 在 25℃ 下光照培养箱内将卵囊孵化为 2 龄幼虫。将收集到的雄虫和 2 龄幼虫在 60~65℃ 的水浴锅内温热杀死, 然后将雄虫、2 龄幼虫和雌虫会阴花纹制成永久玻片, 将雌虫制成临时玻片, 使用 Nikon 90i 显微镜观察测量和拍照记录线虫的形态特征, 根据 De Man 公式对 20 条雌虫和 20 条

收稿日期: 2014-07-14

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(201103018)

赵传波, 硕士研究生, 研究方向: 植物线虫学。E-mail: zhaochuanbo1986@163.com

通信作者: 徐春玲, 博士, 副研究员, 研究方向: 植物线虫学。E-mail: xuchunling@scau.edu.cn

2 龄幼虫的形态特征值进行测量计算。将获得的形态特征及其测量值与已有的文献记载进行比较,并根据形态学特征鉴定根结线虫的种类^[3-6]。形态测计项目和缩写符号参见文献^[4]。

1.4 线虫同功酶分析

参考 Esbenshade 等^[7-8]的方法,对分离纯化的根结线虫雌虫苹果酸脱氢酶(MDH)和酯酶(EST)进行同功酶电泳。使用 BIO-RAO Mini-Protean 电泳仪,凝胶板大小为 8.3 cm×7.3 cm,凝胶厚度为 1 mm,每个泳道加入 4 个纯化培养的雌虫酶提取物,将已鉴定的爪哇根结线虫 *Meloidogyne javanica* 样本作为参照系进行电泳。参照 Esbenshade^[7-8]和赵洪海^[9]的标准,判读 2 种酶的谱带类型,再次确定根结线虫种类。

1.5 基因序列扩增和 PCR-RFLP 分析

参照 Powers 等^[10]方法提取纯化单条根结线虫 2 龄幼虫 DNA,利用上游引物[#] C2F3 和下游引物[#] 1108 对根结线虫 mtDNA 的 *COII/lrRNA* 间序列进行扩增。PCR 反应体系为:KOD FX 2×buffer 12.5 μL (TOYOBO),dNTPs (2 mmol/L each) 5 μL (TOYOBO),上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.75 μL,KOD FX (1 U/μL) 0.5 μL (TOYOBO),DNA 模板 5.5 μL。PCR 反应在 Bio-rad C 1000 上进行,程序:94℃预变性 4 min,94℃变性 50 s,51.5℃退火 40 s,68℃延伸 1 min 50 s,共 35 个循环;最后 72℃延伸 10 min,4℃保存。

扩增产物使用 1.0% 的琼脂糖凝胶进行电泳分离,在 Alpha Imager EP 凝胶成像仪上进行观察和拍照记录。采用 OMEGA 胶回收试剂盒对目的片段回收,回收产物用 TAKARA PMD18-T Vector 进行连接,转化到大肠杆菌 *Escherichiacoli coli* JM109 菌株中,经蓝白斑筛选和 PCR 鉴定后,送华大基因公司测序。对获得的测序序列,通过 NCBI (美国国立生物技术信息中心, National Center of Bionotechnology Informaton) 在线 Blast 功能进行同源序列信息检索比对,鉴定根结线虫的种类。

使用限制性内切酶 *Hinf* I (TOYOBO) 对上述 mtDNA 扩增产物进行酶切,酶切反应体系组分为 PCR 扩增产物 5 μL,10×酶切反应缓冲液 2 μL, *Hinf* I 内切酶 0.5 μL,ddH₂O 12.5 μL。上述酶切反应体系放入 37℃金属浴,酶切 2 h。酶切产物使用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳。

2 结果与分析

2.1 线虫形态鉴定

在采自深圳市 13 个蔬菜生产基地 121 个点的样品中,坪山新区绿基蔬菜农场和宝安区西乡农业公司蔬菜农场 2 个基地 9 个采样点的样品中均未发现根结线虫,但在其他 11 个蔬菜基地 74 个采样点的样品中均分离到根结线虫。根据其形态特征,鉴定出 4 种根结线虫:南方根结线虫 *M. incognita*、爪哇根结线虫 *M. javanica*、花生根结线虫 *M. arenaria* 和象耳豆根结线虫 *M. enterolobii*(表 1)。

1) 南方根结线虫。雌虫:体形膨大,呈球形或梨形,有明显突出的颈部;唇区稍突起,略呈帽状;口针针锥部明显向背面弯曲,杆部后部稍宽;口针基部球缢缩,扁圆形(种群 KZ1、JZT2、GH2 测量值见表 2)。会阴花纹变异较大,一般背躬高,明显呈圆形、椭圆形、梯形或方形,背弓顶部圆或平,背纹紧密,背面和侧面的花纹从波浪形至锯齿形,有时平滑,侧线不明显,侧纹常分叉(图 1-A~C)。雄虫:线形,头部高圆,唇区平至凹,不缢缩,常有 2~3 条不完整的环纹;口针粗壮,口针针锥部尖端钝圆,杆部常为圆柱形,靠近基部球位置变窄;基部球缢缩,圆形或扁圆形。2 龄幼虫:线形,头冠平;口针针锥部和杆部中等宽;口针基部球缢缩,圆形,向后倾斜;透明尾端尖圆或钝圆,有的有缢缩(种群 KZ1、JZT2、GH2 测量值见表 3)。

2) 爪哇根结线虫。雌虫:体形膨大,梨形或近球形,颈较长;口针针锥部明显向背面弯曲,杆部呈柱状,口针基部球缢缩,横向延伸(种群 JZT13 测量值见表 2)。会阴花纹通常为椭圆形至圆形,背躬较低,圆形,线纹平滑、细密、连续(图 1-D);有明显侧线,侧线把花纹分成背区和腹区,无线纹通过侧线。雄虫:线形,头冠高圆,头部缢缩,常有 2 条不完全环纹;口针粗壮,顶端尖,口针针锥部直,杆部柱形;口针基部球缢缩,扁圆形;尾端阔圆。2 龄幼虫:线形,头冠平;口针针锥部和杆部中等宽;口针基部球缢缩,圆形,向后倾斜,横向延伸;尾细长,有的有缢缩(种群 JZT13 测量值见表 3)。

3) 花生根结线虫。雌虫:体形膨大,呈梨形或近球形,颈部较长,唇区稍突起,略呈帽状;口针粗壮,针锥部稍向背面弯,杆部后部稍宽;口针基部球不缢缩,向后倾斜(种群 GH7 测量值见表 2)。会阴花纹变异较大,花纹明显呈梯形,一般背躬稍高,部分

表 1 深圳市蔬菜基地根结线虫调查鉴定结果

Table 1 Collection and identification results of *Meloidogyne* species in the vegetables in Shenzhen City

采样点编号 Codes of sample point	采样地点 Sample point	寄主 Hosts	线粒体扩增片段/bp Amplified frag- ments of mtDNA	同工酶图谱 Isoenzyme patterns		根结线虫种类 <i>Meloidogyne</i> species
				MDH	EST	
KZ1-4	农作物良种引进中心 Center for Quality Crop Seed	小番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	1 700	N1	I1	<i>M. incognita</i>
SF1-2	坪山新区顺发蔬菜农场 Vegetable Farm of Shunfa at Pingshan District	生菜 <i>Lactuca diversifolia</i>	1 700	N1	I1	<i>M. incognita</i>
TD3-4,7-8	坪山新区田地农业科技园 Agricultural Science and Technology Garden of Tiandi at Pingshan new District	木耳菜 <i>Basella alba</i>	1 700	N1	I1	<i>M. incognita</i>
JZT2-6, 8-9,12	光明新区甲子塘蔬菜农场 Vegetable Farm of Jiazitang at Guangming new District	苋菜 <i>Amaranthus mangostanus</i> L.	1 700	N1	I1	<i>M. incognita</i>
JZT10,13	光明新区甲子塘蔬菜农场 Vegetable Farm of Jiazitang at Guangming new District	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	1 700	N1	J3	<i>M. javanica</i>
TL1-10,12- 14,17-18,20	龙岗区同乐农科基地 Agricultural Science Base of Tongyue at Longgang District	辣椒 <i>Cap sicum annuum</i>	1 700	N1	I1	<i>M. incognita</i>
LD2a,3-4, 6a,7-10	龙岗区龙东蔬菜农场 Vegetable Farm of Longdong at Longgang District	空心菜 <i>Ipomoea aquatica</i>	1 700	N1	I1	<i>M. incognita</i>
LD2b,6b	龙岗区龙东蔬菜农场 Vegetable Farm of Longdong at Longgang District	空心菜 <i>I. aquatica</i>	700	N1a	VS1-S1	<i>M. enterolobii</i>
GH1-2, 4-5,9-13	宝安区桂花蔬菜农场 Vegetable Farm of Guihua at Baoan District	生菜 <i>L. diversifolia</i>	1 700	N1	I1	<i>M. incognita</i>
GH7	宝安区桂花蔬菜农场 Vegetable Farm of Guihua at Baoan District	小白菜 <i>Brassica pekinensis</i>	1 100	N1	A2	<i>M. arenaria</i>
FM2-3, 9-10	宝安区福民蔬菜农场 Vegetable Farm of Fumin at Baoan District	生菜 <i>L. diversifolia</i>	1 700	N1	I1	<i>M. incognita</i>
FM11	宝安区福民蔬菜农场 Vegetable Farm of Fumin at Baoan District	苋菜 <i>A. mangostanus</i> L.	700	N1a	VS1-S1	<i>M. enterolobii</i>
DSK1-4, 6,8-9	宝安区大水坑蔬菜农场 Vegetable Farm of Dashuikang at Baoan District	生菜 <i>L. diversifolia</i>	1 700	N1	I1	<i>M. incognita</i>
DSK7	宝安区大水坑蔬菜农场 Vegetable Farm of Dashuikang at Baoan District	苦瓜 Balsam pear	1 700	N1	J3	<i>M. javanica</i>
PC1-2, 4-6,8	龙岗区鹏城蔬菜农场 Vegetable Farm of Oupeng at Longgang District	空心菜 <i>I. aquatica</i>	1 700	N1	I1	<i>M. incognita</i>
FH1	宝安区福海蔬菜基地 Vegetable Base of Fuhai at Baoan District	胡萝卜 <i>Daucus carota</i>	1 700	N1	I1	<i>M. incognita</i>

个体有明显的侧线,有时线纹通过侧线,背面和侧面的花纹从波浪形至锯齿形(图 1-E~G)。雄虫:线形,唇区平至凹,不缢缩,常有 1~2 条不完整的环纹;口针端部钝圆,针锥部粗壮,杆部常为柱形,靠近基部球位置较宽,口针基球不缢缩,圆球形。2 龄幼虫:线形,头冠明显,前端平;口针纤细,口针基部球

不缢缩,圆形;尾细长,透明尾明显,末端钝圆(种群 GH7 测量值见表 3)。

4)象耳豆根结线虫。雌虫:体形膨大,呈球形,有突出的颈部;头区无花纹,头冠高,唇区稍突起,略呈帽状;口针稍纤细,针锥部稍向背面弯,口针基部球圆形、不缢缩(种群 LD2b 和 FM10 测量值见

表 2)。会阴花纹(图 1-H,I)呈卵圆形至椭圆形,线纹较平滑;背弓常较高,呈方形或近圆形;侧线不明显。雄虫:线形,头冠高圆,略有缢缩。口针粗壮,锥体部前端尖,杆部圆柱形;针锥部与杆部分界明显;口针基部球圆形;尾端阔圆。2 龄幼虫:线形,头冠明显,前端平;口针纤细,口针基部球圆形、缢缩;尾形棒状,透明尾明显,末端钝圆(种群 LD2b 和 FM10 测量值见表 3)。

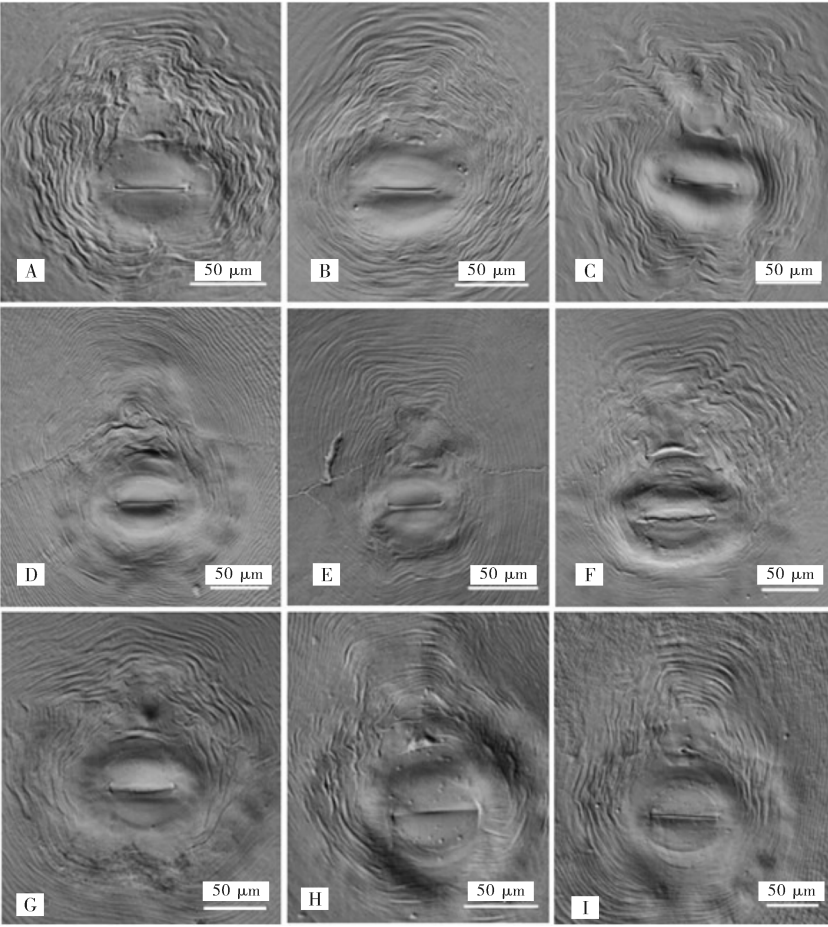
2.2 线虫同功酶鉴定

对经形态学鉴定确认的 4 种根结线虫共 76 个种群进行纯化繁殖,并对其苹果酸脱氢酶(MDH)和酯酶(EST)进行电泳图谱分析(图 2),结果表明:在 76 个纯化线虫种群中,有 69 个种群 MDH 谱型为 N1 型,EST 谱型为 I1 型,与已报道的南方根结线虫相同;有 3 个种群的 MDH 谱型为 N1 型,EST 谱型为 J3 型,与已报道的爪哇根结线虫相同;有

1 个种群的 MDH 谱型为 N1 型,EST 谱型为 A2 型,与已报道的花生根结线虫的 2 种谱型相同;有 3 个种群的 MDH 谱型为 N1a 型,EST 谱型为 VS1-S1 型,与已报道的象耳豆根结线虫相同^[11-12]。同功酶鉴定结果与形态学鉴定结果一致。

2.3 线虫序列扩增测序和酶切鉴定

对 76 个纯化的根结线虫种群的 PCR 扩增、测序和限制性酶切分析(图 3-A,B),结果显示:有 72 个种群的电泳扩增片段为 1.7 kb,其中有 69 个种群可被 *Hinf* I 酶切为 1.3 kb 和 0.4 kb 的片段,将 KZ1 种群扩增产物克隆测序,序列与 GenBank 中编号分别为 FJ159629.1、FJ159614.1 和 FJ159624.1 的南方根结线虫序列有 100% 的相似性,故鉴定为南方根结线虫;有 3 个种群不能被酶切,将 JZT13 种群的扩增产物克隆测序,序列与 GenBank 中编号为 AY635612.1 的爪哇根结线虫序列有 99% 的相



A~C:分别为南方根结线虫 KZ1、JZT2 和 GH2 种群 A-C:KZ1,JZT2 和 GH2 population of *M. incognita*, respectively; D:爪哇根结线虫 JZT13 种群 D:JZT13 population of *M. javanica*; E~G:均为花生根结线虫 GH7 种群 E-G:GH7 populations of *M. arenaria*; H,I:分别为象耳豆根结线虫 LD2b 和 FM10 种群 H,I:LD2b 和 FM10 population of *M. enterolobii*.

图 1 深圳市蔬菜根结线虫部分种群会阴花纹

Fig. 1 Perineal patterns of some *Meloidogyne* populations in the vegetables in Shenzhen City

表 2 深圳市蔬菜根结线虫部分种群雌虫测量值($n=20$)

Table 2 Measurements of females of some *Meloidogyne* populations in the vegetables in Shenzhen City

μm

形态指标 Morphological options	南方根结线虫 <i>M. incognita</i>			爪哇根结线虫 <i>M. javanica</i> JZT13 黄瓜 种群 JZT13 population of <i>Cucumis</i> <i>sativus</i>	花生根结线虫 <i>M. arenaria</i> GH7 小白菜 种群 GH7 population of <i>Brassica</i> <i>pekinensis</i>	象耳豆根结线虫 <i>M. enterolobii</i>	
	KZ1 小番茄 种群 KZ1 population of <i>Lycopersicon</i> <i>esculentum</i>	JZT2 莙菜 种群 JZT2 population of <i>Amaranthus</i> <i>mangostanus</i>	GH2 生菜 种群 GH2 population of <i>Lactuca</i> <i>diversifolia</i>			LD2b 空心菜 种群 LD2b population of <i>I. aquatica</i>	FM10 生菜 种群 FM10 population of <i>L. diversifolia</i>
体长 Body length	849.2±6.1 (820.8~906)	855.6±18.7 (782.5~1031.3)	885.3±11.3 (823.2~959.4)	817.1±18.1 (703.4~909.6)	887.9±12.0 (807.0~978.7)	744.7±9.6 (689.3~790.2)	820.1±12.0 (758.5~939.3)
最大体宽 Body diameter	554.9±5.4 (517.9~592.3)	622.2±8.8 (581.3~672.8)	612.0±5.8 (581.8~653.5)	595.9±10.0 (512.5~648.5)	566.8±10.1 (504.8~626.6)	575.6±8.8 (525.3~619.2)	561.1±17.5 (423.0~686.1)
口针长 Stylet length	13.3±0.2 (12.2~14.5)	13.1±0.2 (11.8~14.6)	13.3±0.1 (12.3~14.2)	13.5±0.3 (10.9~15.3)	13.0±0.3 (10.1~15.0)	178.3±4.2 (150.2~210.7)	233.6±14.2 (173.1~367.5)
口针基部球至背 食道腺开口距离 Distance from stylet knob to dorsal gland orifice	2.6±0.1 (2.3~3.4)	2.7±0.1 (2.1~3.2)	2.8±0.1 (2.4~3.2)	3.3±0.1 (2.8~3.9)	3.79±0.12 (2.8~4.4)	11.3±0.2 (10.1~12.5)	12.0±0.2 (10.3~14.0)
颈长 Neck length	231.5±8.6 (173.1~282.7)	230.8±7.6 (198.0~307.3)	242.4±13.0 (164.5~299.2)	245.9±10.7 (167.1~304.0)	270.0±12.3 (164.8~334.1)	4.0±0.1 (3.6~4.3)	4.1±0.1 (3.3~5.2)
中食道球长 Length of median bulb	46.6±1.3 (36.3~55.2)	49.2±1.0 (42.5~56.3)	51.0±0.7 (46.3~57.6)	42.6±1.16 (34.2~53.5)	45.3±0.8 (39.9~52.0)	52.4±1.3 (45.0~62.7)	47.0±1.0 (40.0~55.7)
中食道球宽 Diameter of median bulb	42.9±0.92 (35.6~49.3)	42.1±0.6 (36.3~44.7)	47.5±0.6 (42.4~52.0)	37.1±0.9 (33.3~46.0)	40.4±1.1 (35.5~49.9)	46.5±0.9 (40.5~51.8)	40.6±1.0 (34.9~48.6)
中食道球处宽 Body diameter at median bulb	75.6±2.7 (49.3~88.3)	86.3±2.8 (72.9~100.7)	81.5±2.07 (69.7~96.3)	64.6±1.9 (53.8~80.4)	71.1±1.6 (60.8~79.0)	78.3±1.6 (66.1~88.3)	77.0±2.6 (62.0~108.7)
中食道球中间 至头端距离 Distance from anterior body to median bulb	71.9±2.7 (54.2~91.4)	80.8±3.4 (61.6~98.3)	86.1±1.7 (75.1~98.2)	84.4±1.3 (72.1~92.6)	79.7±1.8 (68.1~92.0)	76.8±1.5 (69.1~88.8)	76.3±2.3 (65.5~91.2)
排泄孔至 头端距离 Distance from anterior body to excretory pore	26.1±1.3 (18.1~36.8)	30.42±1.4 (22.99~41.7)	32.5±1.0 (24.6~40.2)	27.3±0.9 (20.3~33.1)	29.7±0.9 (22.9~37.4)	33.9±0.6 (30.3~38.5)	30.2±1.1 (20.7~35.3)
<i>a</i>	1.5±0.0 (1.4~1.6)	1.38±0.0 (1.3~1.7)	1.5±0.0 (1.3~1.6)	1.4±0.0 (1.2~1.5)	1.57±0.0 (1.3~1.9)	1.3±0.0 (1.3~1.3)	1.5±0.0 (1.2~1.9)

似性,故鉴定为爪哇根结线虫;有 1 个种群的扩增片段为 1.1 kb,编号为 GH7,扩增产物克隆测序,其序列与 GenBank 中编号为 EU364879.1 的花生根结线虫序列有 100% 的相似性,故鉴定为花生根结线虫;有 3 个种群的扩增片段为 0.7 kb,将 LD2b 和 FM10 的 2 个种群测序,序列与 GenBank 中编号为 GQ870255.1 的象耳豆根结线虫序列具有 100% 的相似性,故鉴定为象耳豆根结线虫。序列测序和酶切分析鉴定结果与形态学和同工酶鉴定结果一致。

2.4 线虫的发生和优势种群

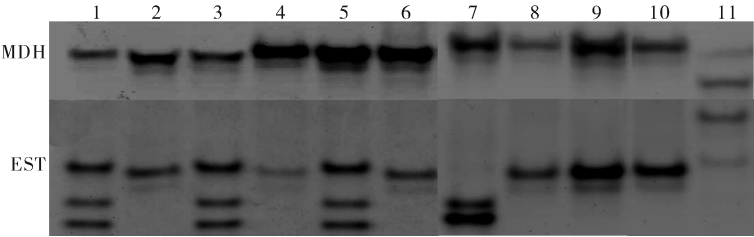
调查结果显示,深圳市蔬菜生产基地根结线虫

发生率达 61.16%。在纯化得到的 76 个种群中,共鉴定出 4 种根结线虫,其中 69 个种群为南方根结线虫,3 个种群为爪哇根结线虫,1 个种群为花生根结线虫,3 个种群为象耳豆根结线虫,分别占鉴定种群总数的 90.79%、3.95%、1.32% 和 3.95%,另有 2 个样品为南方根结线虫和象耳豆根结线虫的复合种群。在采集地点分布上,南方根结线虫在 11 个蔬菜基地都有发生,象耳豆根结线虫在龙岗区龙东蔬菜农场和宝安区福民蔬菜农场 2 个基地发生,而花生根结线虫和爪哇根结线虫分别在宝安区桂花蔬菜农场和光明新区甲子塘蔬菜农场发生。在寄主分

表 3 深圳市蔬菜根结线虫部分种群 2 龄幼虫形态测量值($n=20$)

Table 3 Measurements of the second juveniles of some *Meloidogyne* populations in the vegetables in Shenzhen City μm

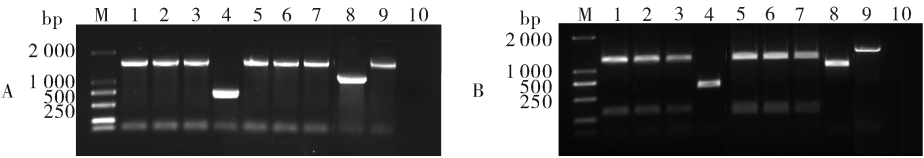
形态指标 Morphological options	南方根结线虫 <i>M. incognita</i>			爪哇根结线虫 <i>M. javanica</i>	花生根结线虫 <i>M. arenaria</i>	象耳豆根结线虫 <i>M. enterolobii</i>	
	KZ1 小番茄 种群	JZT2 莧菜 种群	GH2 生菜 种群	JZT13 黄瓜 种群	GH7 小白菜 种群	LD2b 空心菜 种群	FM10 生菜 种群
	KZ1 population of <i>Lycopersicon esculentum</i>	JZT2 population of <i>Amaranthus mangostanus</i>	GH2 population of <i>Lactuca diversifolia</i>	JZT13 population of <i>Cucumis sativus</i>	GH7 population of <i>Brassica pekinensis</i>	LD2b population of <i>I. aquatica</i>	FM10 population of <i>L. diversifolia</i>
体长 Body length	413.1±1.5 (400.8~424.7)	419.7±2.4 (404.4~430.4)	418.4±3.7 (392.3~445.6)	427.6±2.1 (410.1~440.1)	455.2±3.0 (434.7~473.3)	403.6±2.1 (373.8~417.1)	449.7±2.4 (446.5~463.8)
最大体宽 Body diameter	14.8±0.2 (13.3~16.5)	15.6±0.3 (13.7~19.0)	16.1±0.3 (14.1~18.9)	14.9±0.1 (14.4~15.5)	15.4±0.2 (14.1~16.9)	15.6±0.1 (14.5~16.5)	15.8±0.1 (15.6~16.6)
口针长 Stylet length	13.2±0.2 (11.7~15.0)	12.6±0.1 (12.0~13.3)	12.6±0.1 (12.2~13.3)	12.7±0.1 (12.1~13.5)	13.3±0.2 (12.4~15.0)	12.9±0.2 (11.5~14.5)	12.4±0.2 (12.2~13.5)
口针基部球至背 食道腺开口距离 Distance from stylet knob to dorsal gland orifice	3.2±0.1 (2.5~3.9)	3.1±0.1 (2.2~4.3)	2.6±0.1 (2.0~3.2)	3.5±0.1 (3.0~4.0)	3.3±0.1 (2.8~3.9)	3.1±0.1 (2.2~3.6)	3.1±0.1 (3.0~3.7)
排泄孔至 头端距离 Distance from anterior body to excretory pore	83.8±0.6 (79.8~89.9)	85.0±1.1 (79.7~93.7)	86.4±1.0 (81.2~92.5)	86.7±0.3 (85.1~89.0)	87.5±0.9 (78.4~93.6)	81.8±0.7 (75.1~85.7)	96.2±0.6 (95.2~99.5)
尾长 Tail length	49.0±0.6 (42.0~52.0)	50.7±1.2 (44.3~58.2)	52.9±1.0 (48.0~60.5)	50.9±0.3 (49.2~52.7)	56.1±0.7 (51.9~63.1)	48.8±1.1 (42.5~55.6)	51.3±1.1 (49.2~57.7)
透明尾长 Hyaline tail length	11.7±0.2 (10.6~12.9)	12.9±0.1 (11.5~14.0)	13.4±0.2 (12.4~14.5)	12.1±0.1 (11.1~12.9)	16.3±0.5 (9.4~19.3)	14.1±0.2 (13.1~15.9)	16.0±0.5 (15.7~19.6)
a	28.0±0.4 (24.7~31.1)	27.0±0.5 (22.5~31.4)	26.2±0.4 (22.3~29.2)	28.8±0.3 (26.6~30.5)	29.6±0.4 (26.7~32.6)	25.9±0.2 (24.4~28.3)	28.4±0.2 (28.4~29.6)
b'	2.9±0.0 (2.6~3.1)	3.0±0.0 (2.8~3.3)	3.0±0.0 (2.8~3.2)	2.9±0.1 (2.5~3.2)	3.1±0.0 (2.8~3.3)	2.3±0.0 (2.1~2.4)	2.3±0.0 (2.3~2.4)
c	8.5±0.1 (7.9~9.3)	8.3±0.1 (7.4~9.1)	8.5±0.1 (7.8~10.1)	8.4±0.0 (8.2~8.8)	8.1±0.1 (7.1~9.1)	8.3±0.2 (6.8~9.6)	8.8±0.2 (7.7~9.8)
MB	0.5±0.0 (0.4~0.5)	0.5±0.0 (0.5~0.5)	0.5±0.0 (0.4~0.5)	0.5±0.0 (0.4~0.5)	0.5±0.0 (0.4~0.5)	0.3±0.0 (0.3~0.4)	0.4±0.0 (0.4~0.4)



泳道 1 和 5 为对照爪哇种群 Line 1 and 5 was control population of *M. javanica*; 泳道 2 为南方根结线虫 KZ1 种群 Line 2 was KZ1 population of *M. incognita*; 泳道 3 为爪哇根结线虫 JZT13 种群 Line 3 was JZT13 population of *M. javanica*; 泳道 4 为南方根结线虫 JZT2 种群 Line 4 was JZT2 population of *M. incognita*; 泳道 6 为南方根结线虫 GH2 种群 Line 6 was GH2 population of *M. incognita*; 泳道 7 为花生根结线虫 GH7 种群 Line 7 was GH7 population of *M. arenaria*; 泳道 8~10 分别为南方根结线虫 TD3、SF1 和 TL1 种群 Line 8-10 was TD3, SF1 and TL1 population of *M. incognita*, respectively; 泳道 11 为象耳豆根结线虫 LD2b 种群 Line 11 was LD2b population of *M. enterolobii*.

图 2 深圳市蔬菜根结线虫部分种群同工酶电泳图谱

Fig. 2 Electrophoresis patterns of isoenzyme of *Meloidogynes* species in the vegetables in Shenzhen City



A:mtDNA-PCR 扩增片段电泳图 Electrophoresis pattern of mtDNA-PCR; B:mtDNA-PCR 扩增片段酶切电泳图 Electrophoresis pattern of mtDNA-RFLP; 泳道 1~3 分别为南方根结线虫 KZ1、SF1 和 TD3 种群 Line 1-3 was KZ1, SF1 and TD3 of *M. incognita*, respectively; 泳道 4 为象耳豆根结线虫 LD2b 种群 Line 4 was LD2b population of *M. enterolobii*; 泳道 5~7 分别为南方根结线虫 JZT2、TL1 和 GH1 种群 Line 5-7 was JZT2, TL1 and GH1 populations of *M. incognita*, respectively; 泳道 8 为花生根结线虫 GH7 种群 Line 8 was GH7 population of *M. arenaria*; 泳道 9 为爪哇根结线虫 JZT13 种群 Line 9 was JZT13 population of *M. javanica*; 泳道 10 为清水对照 Line 10 was water control; M:Marker DL 2 000.

图 3 深圳市蔬菜根结线虫部分种群 mtDNA COII/IRNA 序列扩增和 mtDNA-RFLP 酶切鉴定电泳图

Fig. 3 Electrophoresis patterns of fragments of mtDNA COII/IRNA sequences amplification and mtDNA-RFLP of *Meloidogyne* species in the vegetables in Shenzhen City

布上,南方根结线虫在 8 种蔬菜上都有发生,象耳豆根结线虫仅在空心菜和苋菜上发生,而花生根结线虫仅在小白菜上发生,爪哇根结线虫仅在黄瓜上发生。这说明在深圳市蔬菜生产基地根结线虫发生普遍且种类多样,其中南方根结线虫为优势种类,并存在少量 2 个种在同一蔬菜农场混合发生的情况。

3 讨 论

在根结线虫的形态分类中,会阴花纹的特征一直被认为是最重要的。本试验结果表明,在同一种群的花生根结线虫中,发现会阴花纹特征存在较大差异,多数个体具有典型的该种类会阴花纹特征;侧线不明显;少数个体的会阴花纹侧线明显,容易与爪哇根结线虫会阴花纹混淆。胡凯基^[11]和 Nickl^[12]也报道花生根结线虫会阴花纹有这一变异特征。目前已明确根结线虫的会阴花纹在种内和种间均有变异,寄主与营养的差异、地域的不同、发育阶段的不同、选取研究材料和样本制作技术的人为差异等都是导致变异的重要因素^[13],因此,完全依靠会阴花纹特征鉴定根结线虫是困难的。

同功酶特别是酯酶和苹果酸脱氢酶作为根结线虫分类鉴定的重要手段,已经愈来愈受到重视^[14]。本试验采用苹果酸脱氢酶(MDH)和酯酶(EST)成功地区分了南方根结线虫、爪哇根结线虫、花生根结线虫和象耳豆根结线虫,鉴定结果与形态鉴定一致。所鉴定的根结线虫深圳种群的苹果酸脱氢酶和酯酶带型均与报道的结果一致^[7-8],因而也证实了同功酶特征在根结线虫分类鉴定上具有重要意义。同功酶方法是根结线虫分类鉴定重要手段之一,是常见根结线虫种类鉴定的一个准确、稳定和实用的方法,可以用于根结线虫的检测及其诊断^[9,15]。

本试验采用 Powers 等^[10]设计的引物扩增 mtDNA 的 CO II 和 *LrRNA* 基因的目的 DNA 片段,南方根结线虫和爪哇根结线虫的扩增片段均为 1.7 kb,需要进一步使用限制性内切酶 *Hinf* I 对这 2 种根结线虫的扩增产物进行酶切才能鉴别。南方根结线虫可产生约 1.3 kb 和 0.4 kb 的 2 个片段,爪哇根结线虫的扩增产物不能被酶切,此结果与 Orui^[16]的报道一致,但 Powers 等^[10]的研究结果表明,南方根结线虫扩增产物 *Hinf* I 酶切可产生约 1.0 kb、0.4 kb 和 0.3 kb 的 3 个片段,而爪哇根结线虫扩增片段 *Hinf* I 酶切产生约 1.1 kb 和 0.7 kb 的 2 个限制性片段;花生根结线虫扩增片段约为 1.1 kb,这与 Xu 等^[17]的报道一致,但 Orui^[16]在扩增酯酶带型为 A1 和 A2 的花生根结线虫的 mtDNA 目的片段时,均得到约 1.7 kb 的目的片段;象耳豆根结线虫的扩增片段约为 0.7 kb,这与卓侃等^[18]的报道一致。虽然 mtDNA-PCR-RLFP 技术国内外学者研究结果有所不同,但通过 mtDNA-PCR-RLFP 技术仍可以将南方根结线虫、爪哇根结线虫、花生根结线虫和象耳豆根结线虫区分开来,因此,在根结线虫种类鉴定中,在运用形态学和同功酶鉴定的基础上,mtDNA-PCR-RLFP 技术的应用是一个有效补充。

深圳市蔬菜基地根结线虫发生普遍且种类多样,其中南方根结线虫是明显的优势种类,是蔬菜根结线虫病的最主要病原线虫,因此,在采用品种与轮作方法防治蔬菜根结线虫病时,重点要选择以抗南方根结线虫为主的蔬菜品种和作物种类。

参 考 文 献

[1] OKA Y,KOLTAI H,BAREYAL M,et al. New strategies for the control of plant-parasitic nematodes [J]. Pest Management

Science,2000,56(11):983-988.

[2] 谢辉.植物线虫分类学[M].2版.北京:高等教育出版社,2005:38-44.

[3] GOLDEN A M, BIRCHFIELD W. *Meloidogyne incognita* wartellei n. subsp. (Meloidogynidae), a root-knot nematode on resistant soybeans in Louisiana [J]. Journal of Nematology, 1978,10(3):269-277.

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

[5] CLIFF G M, HIRSCHMANN H. Evaluation of morphological variability in *Meloidogyne arenaria* [J]. Journal of Nematology, 1985,17(4):445.

[6] RAMMAH A, HIRSCHMANN H. Morphological comparison of three host races of *Meloidogyne javanica* [J]. Journal of Nematology, 1990,22(1):56-68.

[7] ESBENSHADE P R, TRIANTAPHYLLOU A C. Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species [J]. Journal of Nematology, 1990,22(1):10-15.

[8] ESBENSHADE P R, TRIANTAPHYLLOU A C. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species [J]. Journal of Nematology, 1985,17(1):6-20.

[9] 赵洪海. 中国部分地区根结线虫的种类鉴定和四种最常见种的种内形态变异研究[J]. 植物病理学报, 2000,30(3):288.

[10] POWERS T O, HARRIS T S. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species [J]. Journal of Nematology, 1993,25(1):1-6.

[11] 胡凯基. 酯酶在根结线虫分类上应用的研究[J]. 林业科学研究, 1988,6:650-656.

[12] NICKL W R. Manual of agricultural nematology [M]. New York:Marcel Dekker,1991:832-835

[13] KARSSSEN G, VAN AELST A C. Root-knot nematode perineal pattern development: a reconsideration [J]. Nematology, 2001,3(2):95-111.

[14] MOLINARI S, LAMBERTI F, CROZZOLI R, et al. Isozyme patterns of exotic *Meloidogyne* spp. populations [J]. Nematologia Mediterranea, 2005,33(1):61-65.

[15] BRITO J A, KAUR R, CENTITAS R, et al. Isozyme phenotypes and identification of *Meloidogyne* spp. infecting horticultural and agronomic crops, and weed plants in Florida [J]. Nematology, 2008,10(5):757-766.

[16] ORUI Y. Identification of Japanese species of the genus *Meloidogyne* (Nematoda: Meloidogynidae) by PCR-RFLP analysis [J]. Applied Entomology and Zoology, 1998,33(1):43-51.

[17] XU C L, ZHAO C B, DING S, et al. First report of the root-knot nematode *Meloidogyn arenaria* on *Anubias barteri* in China [J]. Plant Disease, 2012,96:773.

[18] 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.

Identification and population distribution of *Meloidogyne* species from the vegetable base in Shenzhen City

ZHAO Chuan-bo^{1,2} ZHENG Xiao-ling³ RUAN Zhao-ying³ DING Sha¹
LI Dong-ping³ XU Chun-ling¹ XIE Hui¹

1. College of Natural Resources and Environment/Plant Quarantine Nematodes Detection and Prevention Research Center, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
2. Life Science and Technology Center, China National Seed Group Co., ltd, Wuhan 430075, China;
3. Shenzhen Agricultural Technology Promotion Center, Shenzhen 518040, China

Abstract In this study, a survey was carried out to identify *Meloidogyne* species from rhizosphere of vegetables in Shenzhen City by means of morphology, isozymes and molecular analysis. The results showed that among 121 samples of roots and rhizosphere soil from 13 different vegetable bases in Shenzhen City, *Meloidogyne* were found in 74 samples from 11 different fields, and the incidence rate of *Meloidogyne* was 61.16%. Seventy six populations of *Meloidogyne* were purified, and 4 species were detected and identified, including 69 populations of *M. incognita*, 3 populations of *M. javanica*, 1 population of *M. arenaria* and 3 populations of *M. enterolobii*. At the same time, mixed populations of *M. incognita* and *M. enterolobii* existed in 2 samples. In conclusion, *Meloidogyne* distribute widely in vegetable fields in Shenzhen City, and *M. incognita* is the dominated species.

Key words vegetable; *Meloidogyne* spp. ; species; identification; distribution

(责任编辑:陈红叶)