

植物保护

河南省烟草根结线虫种类的 PCR 鉴定与种群分析

焦永吉¹, 王闷灵², 赵云波³, 赵世民², 张涵⁴, 蒋士君¹

1 河南农业大学植物保护学院, 郑州市文化路 95 号 450002;

2 河南省烟草公司洛阳市公司, 洛阳市开元大道 246 号 471000;

3 河南省洛阳市烟草公司宜阳分公司, 洛阳市宜阳县红旗中路 32 号 471600;

4 河南省洛阳市烟草公司汝阳分公司, 洛阳市汝阳县人民路 41 号 471200

摘要: 为明确河南省烟田根结线虫种群分布及比例, 采集了 12 份烟草根结线虫样本。通过对线虫样本的 PCR 分子检测和雌成虫会阴花纹的形态鉴定, 结果表明, 检出烟草根结线虫 4 种, 其中南方根结线虫 (*Meloidogyne incognita*) 检出率为 55.83%, 花生根结线虫 (*Meloidogyne arenaria*) 23.33%, 北方根结线虫 (*Meloidogyne hapla*) 17.50%; 爪哇根结线虫 (*Meloidogyne javanica*) 3.33%。种群分析表明河南地区仍以南方根结线虫为主, 同时其他种类根结线虫的发生危害比例在上升。所有样本均为混合侵染, 南方根结线虫、花生根结线虫和北方根结线虫在河南广泛分布, 具有普遍性; 爪哇根结线虫在河南分布没有规律性。

关键词: 根结线虫; PCR 分子检测; 会阴花纹鉴定

doi:10.3969/j.issn.1004-5708.2014.03.013

中图分类号: S435.72; Q78

文献标志码: A

文章编号: 1004-5708 (2014) 03-0079-05

PCR-based identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.)
in tobacco in Henan provinceJIAO Yongji¹, WANG Menling², ZHAO Yunbo³, ZHAO Shimin², ZHANG Han⁴, JIANG Shijun¹

1 College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2 Henan Luoyang Tobacco Company, Luoyang 471000, China;

3 Yiyang Branch, Henan Luoyang Tobacco Company, Yiyang 471600, China;

4 Ruyang Branch, Henan Luoyang Tobacco Company, Ruyang 471200, China

Abstract: Root-knot nematode is one of the most important diseases in tobacco in Henan province. 12 samples were collected from 8 counties from main tobacco planting areas. Perineal pattern-based morphological and PCR-based molecular identification revealed that 4 species of *Meloidogyne* were detected. of which *M. incognita* accounted for 55.83%, *M. arenaria* 23.33%, *M. hapla* 17.50% and *M. javanica* 3.33%. *Meloidogyne incognita* was dominant although other species in the pathogen population of tobacco root-knot nematode were increasing. All samples showed mixed infection. *M. incognita*, *M. arenaria* and *M. hapla* were very common and widely distributed in Henan while *M. javanica* distributed unevenly.

Keywords: root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.); PCR molecular detection; perineal pattern identification

世界范围内为害烟草的线虫主要有根结线虫 (*Meloidogyne* spp.)、胞囊线虫 (*Heterodra* sp.)

和根腐线虫 (*Paratylenchus* spp.) 三大类^[1], 引起温带和亚热带烟草较严重的经济损失。其中根结线虫 (root-knot nematode) 是烟草上最重要、最常见的有害线虫之一^[2], 是世界各国烟草生产中重要病害之一, 也是当前在我国烟草发生范围最广、为害最重、防治难度大的线虫。根结线虫相比其他植物病原——真菌、细菌、病毒等, 具有主动侵袭寄生和自行转移为害的特点, 此外, 还能与有些病原真菌、细菌、病毒互作,

基金项目: 中国烟草总公司项目“全国烟草有害生物调查研究”
(110200902065)

作者简介: 焦永吉 (1988—), 硕士研究生, 从事线虫病害研究,
Email: jiaoyongji@126.com

通讯作者: 蒋士君 (1964—), 副教授, 主要从事烟草病理学研究,
Email: jiangsj001@163.com

收稿日期: 2013-05-14

共同致病造成复合病害,或以刺激、诱导、传带等协同方式促进这三种病害的加重,可以说,线虫具有双重性病原的特点^[3]。据 2002 年的我国烟草业统计,全国根结线虫发生面积为 10.83 万公顷,直接为害所造成的烟叶经济损失 7917.84 万元,占侵染性病害所致损失的 5.7%^[4]。

当前河南省大多数烟田为旱坡地轻砂质土或砂壤土,且多年连续种烟,难以实行水旱轮作、冬灌以及与其他作物的轮作倒茬,加之高抗线虫病烟草品种的缺乏、全球性气候变暖以及我国冬季的多样性种植,作物线虫病的发生已呈持续加重之势,并造成了许多复合病害或继发感染,已成为制约烟草生产的严重障碍。

本研究采用 PCR 分子检测法,结合根结线虫会阴花纹形态观察法对采自河南省主产烟区 8 个县 12 份烟草根结线虫样品进行了鉴定,旨在明确当前河南烟区根结线虫的种群分布,为科学制定河南烟草根结线虫的防治规划和抗线虫病育种工作提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品的采集

2012 年,根据烟叶生产中根结线虫的发生情况,在河南省烟区选择了具有代表性的 8 个烟叶生产重点县进行了根结线虫病调查。每地块或 0.0667 ~ 0.333 hm² 小区内取 1 个混合样,包括 5 个小样。这 5 个小样分别采自五点法选定的 5 株烟草。样品信息见表 1。

表 1 本研究中的烟草根结线虫样本来源信息

Tab. 1 Source information of sample tobacco root-knot nematode

代码 /code	样品来源 /sample source	代码 /code	样品来源 /sample source
MC1	澠池果园乡李家村	RY2	汝阳三屯镇东堡村
MC2	澠池天池镇西天池村	RY3	汝阳刘店镇沙坪村
LN	洛宁东宋乡下河堤村	XC	许昌椹涧乡西辛庄村
YY1	宜阳盐镇河上沟村	XX	襄城县汾陈乡庚河村
YY2	宜阳高村乡宋屋村	JX	郟县堂街镇堂街东村
RY1	汝阳柏树乡水磨村	QS	确山竹沟镇后李河村

1.2 根结线虫基因组 DNA 的提取

采用 CTAB 法略做改进。将清洗过的根结剪碎混匀,取 1 g 置于玻璃匀浆器中,加入 2 mL 的预热 65 °C 的 2 % CTAB 抽提缓冲液,充分研磨匀浆,将匀浆液分倒入 1.5 mL 的灭菌离心管中,匀浆液的高度约占管的三分之二,将离心管置于 65 °C 的金属浴中,每隔 10 min 轻轻摇动,40 min 后取出,冷却后,加入氯仿-异戊醇(24:1)至满管,上下颠倒振荡 2~3 min,使两者混合均匀,10,000 rpm×10 min,与此同时,将 600 μL 的异丙醇加入另一新的灭菌离心管中,移液器轻轻地吸取上清液,转入含有异丙醇的离心管内,将离心管慢慢上下摇动 30 s,使异丙醇与水层充分混合至能见到 DNA 絮状物,10,000 rpm×1 min 后,立即倒掉上清液,再加入 800 μL 75% 的乙醇,将 DNA

洗涤 30 min, 10,000 rpm×30 s 后,立即倒掉液体,将离心管放在 75 °C 的水浴中使酒精挥发,当没有酒精气味时取出加入 80 μL TE 溶解,-20 °C 保存备用。

1.3 PCR 扩增

研究采用的 25 μL PCR 反应体系如下:线虫模板 DNA 1 μL,上下游引物(20 μM)各 1 μL,2×TaqMasterMix 12.5 μL,ddH₂O 9.5 μL。试验所用引物有 4 组,基本信息见表 2。

PCR 扩增条件为 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 61 °C 30 s, 72 °C 60 s (DjF/DjR 为 90 s), 40 个循环, 72 °C 10 min, 设置无任何 DNA 的模板为阴性对照。PCR 扩增后,取 8 μL 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,用 1×TAE 缓冲液在 100 V 下电泳 40 min, EB 染色 15 min,紫外灯下观察并照相。

表 2 本研究中的 PCR 引物序列信息
Tab. 2 Sequence information of primers

Species	Sequence of Primer pairs (5' -3')	Amplicon length	Reference sources
M. incognita	MiSF: GGGCAAGTAAGGATGCTCTG MiSD: GCACCTCTTTTCATAGCCACG	502 bp	B.TESAŘOVÁ et al.,2003
M. arenaria	Far: TCGGCGATAGAGGTAAATGAC Rar: TCGGCGATAGACACTACAAC	420 bp	Zijlstra et al., 2000
M. hapla	Mh-F: CGAATAGTCTCAACGTTTATC Mh-R: ATGTGACAGCGAAAAGAATT	462 bp	Feng et al.,2008
M.javanica	DjF: CCTTAATGTCAACACTAGAGCC DjR: GGCCTTAACCGACAATTAGA	1650 bp	Dong et al.,2001

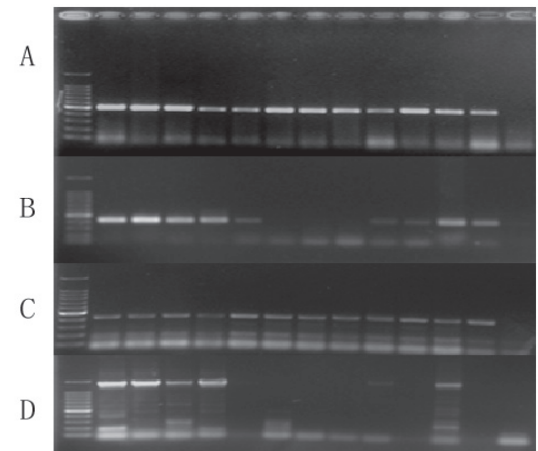
1.4 会阴花纹的制作及观察

用挑针在体视显微镜下解剖根结，随机挑取不同侧根上的成熟雌成虫，每个种群挑取 20 条移入硬塑料板上清水滴中，用单面刀片或解剖刀切下线虫尾部，用解剖针慢慢移走其它虫体和碎片，修剪尾部表皮成方块状，使会阴花纹处于方块中央，清水中清洗 3 次，把会阴部移到滴有一滴清水的载玻片上，加盖玻片。在显微镜下观察会阴花纹的形态特征并拍照，参照文献^[9-11]进行分类鉴定，统计各个种所占比例。

2 结果与分析

2.1 基于 PCR 的鉴定结果

MMC1 MC2 LNYY1 YY2 RY1 RY2 RY3 XCXX JX QSN



注：M 为 100 bp ladder DNA marker；N 为 negative control（阴性对照）。

图 1 南方根结线虫引物对 (A)、花生根结线虫引物对 (B)、北方根结线虫引物对 (C)、爪哇根结线虫引物对 (D) 扩增结果

Fig. 1 PCR amplifications with primer sets MiSF / MiSD(A), Far / Rar(B),Mh-F/Mh-R(C) and DjF/DjR(D)

根据南方根结线虫特异性引物 MiSF / MiSD 对供试线虫种群的 PCR 扩增结果（图 1A）表明，所有 12 份检样均扩增出了 502 bp 长的目标 DNA 片段，说明所有检样中均有南方根结线虫（*M. incognita*）存在。

花生根结线虫特异性引物 Far / Rar 对供试线虫种群的 PCR 扩增结果（图 1B）表明，来自浍池、洛宁、宜阳、许昌、襄城县、郏县、确山等 7 县的 9 份检样中均扩增出 420 bp 长的目标 DNA 片段，表明了检样中存在花生根结线虫（*M. arenaria*）。

北方根结线虫特异性引物 Mh-F/Mh-R 对供试线虫种群的 PCR 扩增（图 1C）表明，所有检样均扩增出 462 bp 长的目标 DNA 片段，说明所有 12 份检样中均有北方根结线虫（*M. hapla*）存在。

利用爪哇根结线虫特异性引物 DjF/DjR 进行的 PCR 扩增（图 1D）表明，仅有来自浍池、洛宁、宜阳、许昌、郏县等 5 县的 6 份检样扩增出了爪哇根结线虫（*M.javanica*）的 1650 bp 目标片段。

2.2 基于会阴花纹的形态鉴定结果

基于雌成虫会阴花纹特征的鉴定结果列于表 3。可以清晰看到，来自豫西烟区的浍池、洛宁、宜阳和来自豫中烟区的许昌、郏县的检样中四种根结线虫都存在；来自豫南确山的检样中存在三种根结线虫（*M. incognita*、*M. arenaria*、*M. hapla*）；但同样来自豫西烟区的汝阳 3 份检样中仅存在两种根结线虫（*M. incognita*、*M. hapla*）。所检样本均为混合侵染。

比较 PCR 鉴定结果与会阴花纹形态鉴定结果（表 3），可以看出两种方法的鉴定结果一致，说明基于 PCR 的根结线虫种类鉴定比较可靠，且省工省时。但我们认为 PCR 法比较适于种类的定性检测与鉴定，会阴花纹法比较适于种群构成的定量分析。

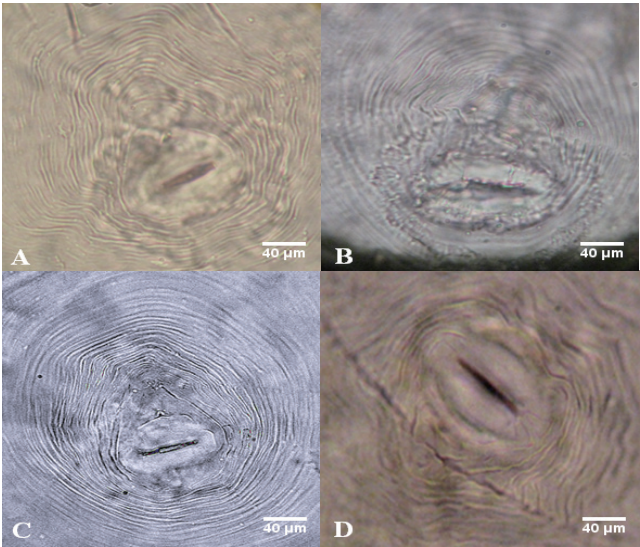


图 2 光学显微镜下南方根结线虫 (A)、花生根结线虫 (B)、北方根结线虫 (C)、爪哇根结线虫 (D) 的会阴花纹形态

Fig. 2 Photographs of perineal patterns of *M. incognita* (A), *M. arenaria* (B), *M. hapla* (C), *M. javanica* (D) LM

研究结果还表明，南方根结线虫和北方根结线虫普遍存在于河南省烟田土壤中，花生根结线虫存在于汝阳烟区之外的所有烟田，而爪哇根结线虫仅局部分布，但看不出其分布的规律性。种群构成上，南方根结线虫是河南省烟草根结线虫的优势种群，平均检出率达 55.83 %，其次为花生根结线虫和北方根结线虫，分别占 23.33 % 和 17.50 %，而爪哇根结线虫比例最小，仅占 3.33 %。尽管来自不同地区的根结线虫种群数量存在着差异，如汝阳烟田仅检出南方根结线虫和北方根结线虫等两种根结线虫，但看不出种群分布与地理来源之间的相关性，且同一地区的各种根结线虫所占比例也存在着差异。

表 3 根结线虫样本的 PCR 鉴定和会阴花纹鉴定结果比较

Tab. 3 Identification of tobacco RKN samples by PCR-based method and perineal pattern-based method

Code	M. incognita		M. arenaria		M. hapla		M. javanica	
	PCR -based	Perineal pattern -based /%	PCR -based	Perineal pattern -based /%	PCR -based	Perineal pattern -based /%	PCR -based	Perineal pattern -based /%
MC1	+	50	+	30	+	15	+	5
MC2	+	45	+	35	+	10	+	10
LN	+	50	+	35	+	10	+	5
YY1	+	55	+	30	+	10	+	5
YY2	+	50	+	35	+	15	-	0
RY1	+	65	-	0	+	35	-	0
RY2	+	75	-	0	+	25	-	0
RY3	+	70	-	0	+	30	-	0
XC	+	50	+	25	+	20	+	5
XX	+	60	+	25	+	15	-	0
JX	+	50	+	30	+	10	+	10
QS	+	50	+	35	+	15	-	0
Average		55.83		23.33		17.50		3.33

注：PCR 检测结果 “+” 表示有检出，“-” 表示无检出；会阴花纹鉴定结果的数值表示种群比例 %。

3 结论与讨论

了解根结线虫病病原种类是培育和选用抗病品种的基础。手段多元化是根结线虫分类上的一个显著特点^[12]。用于根结线虫的分类手段常见的有传统方法（包括形态学鉴定方法、鉴别寄主辅助鉴别实验、细胞遗传学方法和同工酶电泳技术）和现代分子生物技术（RFLP、AFLP、RAPD、SCAR 等）。本研究采用 PCR 技术与形态学鉴定相结合的方法，对河南烟区的根结线虫种类进行了定性分析和流行病学调查。

朱贤朝等^[1]曾对河南省烟草根结线虫病进行了报道，认为河南省烟草上存在南方根结线虫、花生根结线虫、北方根结线虫、爪哇根结线虫 4 种根结线虫，其中南方根结线虫占 83.3%。李淑君等^[13]曾对河南省烟草根结线虫病进行了初步研究，认为河南省烟草上存在南方根结线虫、花生根结线虫、北方根结线虫、爪哇根结线虫、高弓根结线虫 5 种根结线虫；南方根结线虫和花生根结线虫是河南的优势种。海飞^[14]曾对河南省的经济作物根结线虫种类作了初步鉴定，认为南方根结线虫是河南地区最大的优势种群，在鉴定标本中出现频率为 47.22%，花生根结线虫是次优势种群，在鉴定标本中出现频率为 36.11%，南方根结线虫和花生根结线虫混合侵染的比例为 11.11%，北方根结线虫的出现频率为 5.5%，未发现爪哇根结线虫。

本研究采样的 8 个县分布在豫西、豫中、豫南，所得结果有较好的代表性。由鉴定结果看，在河南省南方根结线虫约占 55.83%，花生根结线虫约占 23.33%，北方根结线虫约占 17.50%，爪哇根结线虫约占 3.33%。河南省仍以南方根结线虫占优势，花生根结线虫和北方根结线虫的危害也较为严重，形态鉴定和分子鉴定均鉴定到爪哇根结线虫的存在，所有样本均为混合侵染，南方根结线虫、花生根结线虫和北方根结线虫在河南省的分布具有普遍性，而爪哇根结线虫在河南省分布没有规律性。调查结果与朱贤朝报道的结果相比，南方根结线虫的比例有很大的下降，这可能与单抗南方根结线虫烟草品种的长期种植有关。调查结果与海飞^[14]的调查结果相比，南方根结线虫有所上升，花生根结线虫有所下降，这可能与海飞的样品中烟草根样所占比例（≤10%）有关；同时也与烟草的轮作制度有关——不同的轮作作物对线虫的抗感性不同，如在调查中发现汝阳大面积种植花生，由鉴别寄主试验可知只有花生根结线虫和北方根结线虫侵染花生，而当地只存在南方根结线虫和北方根结线虫，当地烟草与花生轮作必然会引起北方根结线虫比例上升，导致

汝阳地区北方根结线虫所占比例明显高于其他地方。调查结果与海飞^[14]的调查结果相比所有样品均为混合侵染，这可能与样品的采集地点有关。本研究采用大田取样，环境相对开放，利于线虫种群交流，因此线虫病害多为混发；而海飞^[12]调查的瓜果蔬菜等经济作物多为设施地栽培，环境相对孤立、封闭，不利于线虫种群交流，因此多为单一物种危害。

本研究反映了河南一些烟草生产地区根结线虫的种群分布情况，有利于进一步了解根结线虫的动态变化，对于线虫病的防治工作和烟草抗线虫病育种工作的开展起到了一定的促进作用。由于我国烟区分布广泛、生态条件复杂，为害烟草的线虫情况不尽相同，仍需做大量基础的调查研究工作。由于时间的局限性本实验未进行鉴别寄主试验以明确到生理小种，同时扩增片段 DNA 的测序及种群亲缘关系分析等后续工作也有待进行。

参考文献

- [1] 朱贤朝, 王彦亭, 王智发. 中国烟草病害 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [2] Webster J M. 经济线虫学 [M]. 胡起宇, 译. 北京: 农业出版社, 1988.
- [3] 冯志新. 植物线虫学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [4] 中国烟叶生产购销公司. 中国烟叶生产使用技术指南 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- [5] B.TESAŘOVÁ, et al. Development of PCR for specific determination of root-knot nematode *meloidogyne incognita* [J]. *Plant Protect Sci*, 2003, 39(1): 23-28.
- [6] Zijlstra, et al. Identification of *meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterised amplified region (SCAR) based PCR assays [J]. *Nematology*, 2000, 2(8): 847-853.
- [7] 冯光泉, 董丽英, 陈昱君, 等. 三七病原根结线虫的分子鉴定 [J]. *西南农业学报*, 2008, 21(1): 100-102.
- [8] Dong K, Dean R A, Fortnum B A, et al. Development of pcr primers to identify species of root-knot nematodes: *meloidogyne arenaria*, *m. hapla*, *m. incognita* and *m. javanica* [J]. *Nematropica*, 2001, 31(2): 271-280.
- [9] 刘维志. 植物线虫志 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [10] Roland N Perry, Maurice Moens, James L. Starr. Root knot nematodes [M]. CABI, 2009.
- [11] Eisenback J D. 四种最常见根结线虫分类指南 [M]. 杨宝君, 译. 昆明: 云南人民出版社, 1986.
- [12] 武扬. 根结线虫分类和鉴定途径及进展 [J]. *浙江农业学报*, 2005, 17(2): 106-110.
- [13] 李淑君. 河南省烟草根结线虫病初步研究 [J]. *河南农业大学学报*, 1991(5): 16-18.
- [14] 海飞. 河南经济作物根结线虫病的为害调查与种类鉴定 [J]. *长江蔬菜*, 2011(24): 65-67.