

# 海南岛象耳豆根结线虫的种类鉴定 及其 rDNA-ITS 序列分析

符美英, 芮 凯, 肖彤斌, 黄伟明, 陈绵才

海南省农业科学院农业环境与植物保护研究所, 海南省植物病虫害防控重点实验室, 海南 海口 571100

**摘要:**【背景】植物根结线虫病是世界性分布的土传病害,常造成农作物的重大经济损失。目前分布于热带亚热带区域的象耳豆根结线虫,由于其致病性和分子特征以及与植物互作关系的独特性,被认为是一种对农作物具有潜在危害性的重要病原根结线虫,因而引起国内外植物寄生线虫学者的广泛关注。【方法】用形态学、同工酶技术和分子生物学技术相结合的方法,对从海南岛农作物上采集到的 10 个根结线虫纯化种群进行分类鉴定。【结果】象耳豆根结线虫在海南岛大面积栽培的 10 种农作物和南药植物,包括黄瓜、南瓜、苦瓜、丝瓜、葫芦瓜、辣椒、番石榴、海巴戟、沈香和丁香上均有寄生,其形态学、酯酶表型和 mtDNA-PCR 扩增产物均有别于常见的根结线虫种类;用引物 18S 和 28S 扩增象耳豆根结线虫种群的 rDNA-ITS 区序列,并对其进行克隆、测序和比对分析,结果表明,象耳豆根结线虫 4HBJ 种群分别与南方根结线虫、爪哇根结线虫和花生根结线虫的同源性均仅为 88% 左右。【结论与意义】本文准确鉴定了象耳豆根结线虫,首次阐述其对海南岛多种农作物的致害性;阐释了象耳豆根结线虫的形态和分子特征,并明确了其与 3 种常见根结线虫的系统发育关系。本研究对今后进一步开展象耳豆根结线虫的基础研究和防治工作具有重要参考价值。

**关键词:** 象耳豆根结线虫; 鉴定; rDNA-ITS

## Identification and analysis of rDNA-ITS of the nematode *Meloidogyne enterolobii* on Hainan Island, China

Mei-ying FU, Kai RUI, Tong-bin XIAO, Wei-ming HUANG, Mian-cai CHEN

Hainan Key Laboratory for Control of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Environment & Plant Protection,  
Hainan Academy of Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571100, China

**Abstract:** 【Background】The Plant root-knot nematode disease (*Meloidogyne* spp.) is a soil-borne pest and may cause great economic losses. As *M. enterolobii* is distributed widely in the tropical and subtropical regions, and is a potentially harmful pathogenic root-knot nematode for several cultivated crops, it is the subject of intensive study around the world, based on its peculiarity of pathogenicity, molecular characteristics and interaction with plants. 【Method】Ten purified populations of root-knot nematodes collected from Hainan Province, Southern China, were identified by using the morphological, isozyme and molecular biological methods. 【Result】The presence of *M. enterolobii* was confirmed on 10 cultivated crops and herbs, including as cucumber, pumpkin, balsam pear, loofah, bottle gourd, pepper, guava, clove and the herbs *Morinda citrifolia*, and *Excoecaria agallocha*. Its morphology, esterase phenotype and mtDNA-PCR amplification products were different from the common species of root knot nematodes. Primers 18S and 28S were used to amplify the rDNA-ITS region of *M. enterolobii* and population 4HBJ were cloned, sequenced and compared. We found about 88% homology between *M. enterolobii* and *M. incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*, respectively. 【Conclusion and significance】*M. enterolobii* was accurately identified, and its presence on crops in Hainan Island was firstly proven. The morphological and molecular characteristics of *M. enterolobii* were clarified, and the molecular phylogenetic relationship between *M. enterolobii* and three other common species of *Meloidogyne* was explained. The research results had important value for the future study of *M. enterolobii* and disease control.

**Key words:** *Meloidogyne enterolobii*; identification; rDNA-ITS

收稿日期:2011-10-10 接受日期:2011-12-05

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(201103018)

作者简介:符美英(1982-),女,助理研究员,硕士。研究方向:植物线虫。E-mail:Fumeiyingzi2011@163.com

通讯作者(Author for correspondence):陈绵才,E-mail:mcchen@263.net

根结线虫 *Meloidogyne* spp. 是一类在经济上极为重要的植物专性寄生线虫,广泛分布于世界各地,在 35°S 与 35°N 之间的地区分布最多(汪来发等,2001)。目前已报道有 90 多个种,但 Karssen *et al.* (1999) 认为仅 81 个为有效种。根结线虫可寄生 2000 多种植物,是普遍且重要的农作物病原线虫,一般造成农作物减产 10% ~ 20%,严重的达 75% 以上。

海南岛是我国唯一的热带陆海海域省份,气候条件优越,一年四季均适合农作物的生长。随着热带现代农业的产业化发展,农作物复种指数不断提高,根结线虫病发生与危害日趋严重,给农作物的产量和品质造成较大影响,已成为制约热带特色现代农业可持续发展的主要障碍因子。

在根结线虫的形态学分类中,会阴花纹一直被认为最具有应用价值(赵洪海,1999)。但由于一些种类个体间会阴花纹变异较大,如果仅凭此特征作为鉴定依据,可能导致鉴定误差(卓侃等,2008)。基于根结线虫同工酶特别是酯酶和苹果酸脱氢酶谱型的稳定性,将其应用于根结线虫分类鉴定已越来越受到植物线虫学者的重视和关注。近年来,分子生物学技术作为一种辅助手段也广泛应用于根结线虫的分类鉴定中。Powers *et al.* (1993) 用 PCR 技术研究了南方根结线虫 *M. incongnita* Kofoid *et* White 等 8 种根结线虫的线粒体 DNA (mtDNA),得到了不同大小的扩增片段,一些不能区分的片段,则通过进一步酶切鉴定。ITS (intemal transcribed spacer region) 是一个通用的遗传标记,被广泛应用于构建系统发育树、预测种群结构、评估种群进化过程,以及确定分类地位等方面。廖金铃(2001)对根结线虫核糖体 DNA 的 ITS 区进行研究,通过分析荧光 AFLP 片段和对 18S DNA、ITS 区、26S DNA 进行扩增、克隆与测序,成功地鉴定出花生根结线虫 *M. arenaria* (Neal) Chitwood、南方根结线虫、瓜哇根结线虫 *M. javanica* Treub 和最近描述的一个新种番禺根结线虫 *M. panyuensis* Liao。

象耳豆根结线虫是一种重要的植物病原线虫,现已广泛分布于世界四大洲的热带亚热带地区,欧洲及地中海植物保护组织 (EPPO) 已将其列入检疫名单。我国当前仅在海南省和广东省发现该虫(卓侃等,2008),且国内关于象耳豆根结线虫的报道也较少。据此,笔者试图运用形态学、酯酶表型和分子生物学方法对海南岛象耳豆根结线虫进行全面

而准确的鉴定,并对其分子特征加以分析,旨在为今后开展进一步研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试虫源

供试病原根结线虫采集于海南岛各主要农作物主产区,分别将单卵块接种于预先用消毒土培植的感病品种番茄根上,进行活体保存,待用。

### 1.2 形态学鉴定

1.2.1 雌虫主要形态特征观察 观察头部、尾部特征等,每个种群共观测 20 头。主要测计指标为体长、最大体宽、口针长、DGO(背食道腺开口至口针基部球的距离)、口针基部球高、口针基部球宽、中食道球长、中食道球宽。

1.2.2 2 龄幼虫 (J2) 形态观察及测量 主要观察头部和尾部特征,每个种群共观测 20 头。测计指标除了 1.2.1 中涉及的指标外,还包括尾长、透明尾长和  $a$  值(体长/最大体宽)。

1.2.3 会阴花纹的制作与观察 用挑针在体视显微镜下解剖根结,每个种群挑取成熟雌虫 20 头移入硬塑料板上的清水滴中,修切后剔除杂物,并用清水清洗 3 次;然后将包含完整会阴花纹的角质膜转移到载玻片上,加盖玻片;干燥后在显微镜下观察会阴花纹的形态特征并拍照。

### 1.3 同工酶分析

运用常规聚丙烯酰胺凝胶电泳技术进行同工酶分析。电泳分析采用北京六一仪器厂生产的 DYY-6B 型电泳仪,7% 分离胶和 4% 浓缩胶,每孔加入 20 头纯化培养的年轻雌虫酶提取物。酯酶染色参照胡凯基(1988)的方法。以已鉴定的瓜哇根结线虫样本作为参照系。酯酶表型的命名按照 Esbenshade & Triantaphyllou(1985)的方法。

### 1.4 DNA 的提取

参照万新龙等(2007)的方法稍做改进,用挑针将单头根结线虫雌虫从根结中挑出,放入 200  $\mu$ L 的 PCR 管中,加入 8  $\mu$ L 灭菌水,并用枪头将线虫虫体戳破,直至内含物溢出;再加入 2  $\mu$ L 5  $\times$  裂解 buffer (10  $\times$  PCR buffer 与 1000  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 蛋白酶 K,按等体积比混合);将 PCR 管转移到 -70  $^{\circ}$ C 冰箱中,冷冻 30 min;将冷冻后的 PCR 管置于 PCR 仪中,65  $^{\circ}$ C 1 h,95  $^{\circ}$ C 10 min;掌上离心机瞬时离心后,取上清液用于 PCR 扩增或置于 -20  $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

## 1.5 mtDNA PCR 扩增

采用引物#C2F3 (5'-GGTCAATGTCAGAAATTTGTGG-3')和#1108 (5'-TACCTTTGACCAATCAGCT-3')对根结线虫 mtDNA 的 COII 和 LRNA 基因间序列进行扩增(黄伟明等,2011)。反应总体体系为 25  $\mu\text{L}$ , 引物各 1.0  $\mu\text{L}$ , Perfectshot *Ex Taq* 12.5  $\mu\text{L}$  (大连宝生物), 模板 DNA 0.5  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 10  $\mu\text{L}$ 。反应参数:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min,55  $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1.5 min,共 35 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

取 10  $\mu\text{L}$  PCR 产物在浓度为 1.5% 的琼脂糖凝胶上检测所扩增片段的大小,用凝胶成像系统观察、拍照。

## 1.6 rDNA-ITS 序列扩增

采用 Vrain *et al.* (1992) 设计的 18S 和 28S 引物(由上海生工生物工程技术有限公司合成),其序列分别为:5'-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3' 和 5'-TTTCACTCGCCGTTACTAAGG-3',对根结线虫的 rDNA-ITS 进行扩增。反应总体体系为 25  $\mu\text{L}$ ,引物各 1.0  $\mu\text{L}$ , Perfectshot *Ex Taq* 12.5  $\mu\text{L}$  (大连宝生物工程技术有限公司),模板 DNA 0.5  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 10  $\mu\text{L}$ 。反应参数:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 45 s,55  $^{\circ}\text{C}$  退火 45 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,共 35 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。扩增片段大小的检测方法与 1.5 一致。

## 1.7 PCR 产物的克隆、测序与比对分析

对获得的 mtDNA 和 ITS 条带进行回收,将纯化后的 PCR 产物与 pGEM-T Easy Vector 载体 (Promega) 于 4  $^{\circ}\text{C}$  下连接 12 h 以上后,采用热击法转化到 *E. coli* DH5a 感受态细胞中。在含有氨苄 Ampicillin

(100 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>)、IPTG (24 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 和 X-gal (20 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 的 LB 筛选平板上挑取单个白色菌落于含有氨苄(100 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 的液体 LB 中摇菌过夜。采用质粒提取试剂盒 (OMEGA) 提取重组质粒 DNA,经 PCR 鉴定后,筛选出含有正确插入片段的重组克隆进行测序(上海生工生物工程技术有限公司)。采用 MEGA 软件包中的 Neighbor-Joining 聚类分析法对所测定的序列进行比对分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 形态学鉴定

2.1.1 观测值 通过显微镜观察,对采自海南岛的 10 个纯化种群进行初步的会阴花纹观察和形态学测量、比对。雌虫呈梨形或球形,无后端突;头区和颈区分界不明显,唇盘圆盘状;口针细,略向背面弯曲;基部球粗大。J2 线形,头区与虫体有明显的分界线。初步鉴定为象耳豆根结线虫。详细测量数据见表 1。

2.1.2 会阴花纹特征 10 个根结线虫种群会阴花纹的主要特征较一致,主要表现在整体呈卵圆形到椭圆形,背弓较高,线纹较细、由平滑到波浪状,尾尖区环纹不规则,侧线不明显(图 1)。与刘昊等(2005)描述的象耳豆根结线虫会阴花纹形态一致。

### 2.2 同工酶鉴定

对各种群年轻雌虫的酯酶进行电泳分析,并参照 Esbenshade & Triantaphyllou (1985) 的方法分类,发现 10 个种群(表 2)的酯酶谱型均为 VS1-S1 型,其中 1SG 和 4HBJ 种群的酯酶图谱见图 2。结合形态学结果,进一步确认 10 个根结线虫种群均为象耳豆根结线虫。

表 1 象耳豆根结线虫的形态学测量数据  
Table 1 Measure data for morphology of *M. enterolobii*

指标 Index	雌虫 Female	2 龄幼虫 J2
体长 Body length/ $\mu\text{m}$	730.0(555~990)	422.5(397~433)
最大体宽 Max body width/ $\mu\text{m}$	648.5(405~716)	15.8(14.5~16.5)
口针长 Stylet length/ $\mu\text{m}$	15.0(9.3~13.4)	11.8(10.7~13.4)
DGO	5.0(4.1~5.6)	3.7(2.9~4.8)
基部球高 Basal knob height/ $\mu\text{m}$	2.4(1.6~2.9)	1.6(1.4~1.8)
基部球宽 Basal knob width/ $\mu\text{m}$	4.8(3.9~5.6)	2.8(2.2~3.5)
中食道球长 Median bulb length/ $\mu\text{m}$	41.7(33.8~52.3)	13.0(12.2~13.7)
中食道球宽 Median bulb width/ $\mu\text{m}$	39.3(27.0~49.5)	8.8(8.4~9.4)
尾长 Tail length/ $\mu\text{m}$		53.1(43.5~59.5)
透明尾长 Clear tail length/ $\mu\text{m}$		16.0(13.5~21.2)
2 龄幼虫 <i>a</i> 值 J2 <i>a</i>		26.8(24.6~29.7)

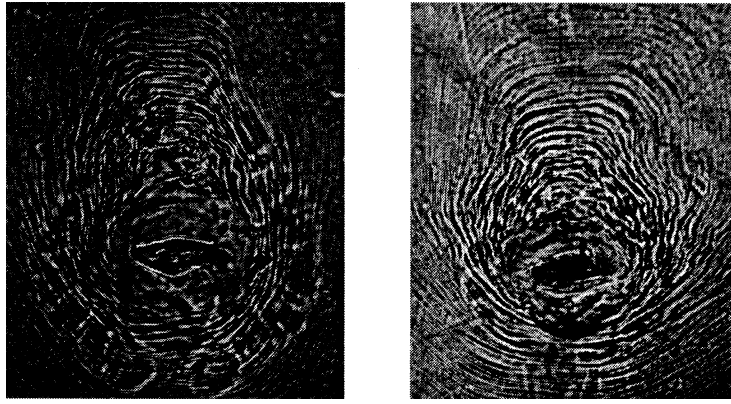


图 1 象耳豆根结线虫会阴花纹

Fig. 1 Perineal patterns of *M. enterolobii*

表 2 象耳豆根结线虫 10 个种群的酯酶谱型

Table 2 Phenotypes of esterases for 10 different populations of *M. enterolobii*

种群编号 Population	寄主 Host	采集地 Collection site	酯酶谱型 Esterase phenotype
1SG	丝瓜 <i>Luffa cylindrica</i>	定安定城 Dingcheng, Ding'an	VS1-S1
2LJ	辣椒 <i>Capsicum annuum</i>	海口永发 Yongfa, Haikou	VS1-S1
3PSL	番石榴 <i>Psidium guajava</i>	琼海塔洋 Tayang, Qionghai	VS1-S1
4HBJ	海巴戟 <i>Morinda officinalis</i>	儋州铺仔 Puzai, Danzhou	VS1-S1
5CX	沉香 <i>Aquilaria agallocha</i>	文昌冯坡 Fengpo, Wenchang	VS1-S1
6DX	丁香 <i>Syzygium aromaticum</i>	陵水南林 Nanlin, Lingshui	VS1-S1
7HLG	葫芦瓜 <i>Lagenaria sieeraria</i>	陵水岭门 Lingmen, Lingshui	VS1-S1
8KG	苦瓜 <i>Momordica charantia</i>	东方新龙 Xinlong, Dongfang	VS1-S1
9NG	南瓜 <i>Cucurbita pepo</i>	文昌龙马 Longma, Wenchang	VS1-S1
10HG	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	保亭新政 Xinzheng, Baoting	VS1-S1



图 2 象耳豆根结线虫酯酶电泳图

Fig. 2 Phenotypes of esterases for *M. enterolobii* in comparison with *M. javanica*.

1: 1SG; 2: 4HBJ; 3, 4: 对照、爪哇根结线虫。  
1: 1SG; 2: 4HBJ; 3, 4: Comparison, *M. javanica*.

2.3 mtDNA-PCR 扩增结果

用引物#C2F3 和#1108 对表 1 中 10 个根结线虫种群 mtDNA 的 COII 和 LRNA 基因间序列进行扩

增,均可获得 700 bp 的条带(图 3)。这与有关文献报道的象耳豆根结线虫一致。

2.4 rDNA-ITS-PCR 扩增结果

用引物 18S 和 28S 扩增 rDNA 的 ITS 区序列, 10 个根结线虫种群的 ITS 片段均为 750 bp 左右(图 4)。

2.5 序列测定与分析

对 4HBJ 种群的 mtDNA 的 COII 和 LRNA 基因间序列和 rDNA-ITS 区序列分别进行克隆与测序,得到大小为 705 和 765 bp 的片段,将测序结果与 GenBank 中已有的 DNA 序列进行同源性比较。发现与 4HBJ 种群 mtDNA 的 COII 和 LRNA 基因间序列同源性最高的是象耳豆根结线虫(GQ870255.1),达 100%。比对结果进一步证明 4HBJ 种群为象耳豆根结线虫。与 4HBJ 种群的 rDNA-ITS 区序列同源性最高的也是象耳豆根结线虫(JF309153.1),为 98%;而与南方根结线虫、爪哇根结线虫、花生根结线虫的同源性仅为 88% 左右(图 5)。

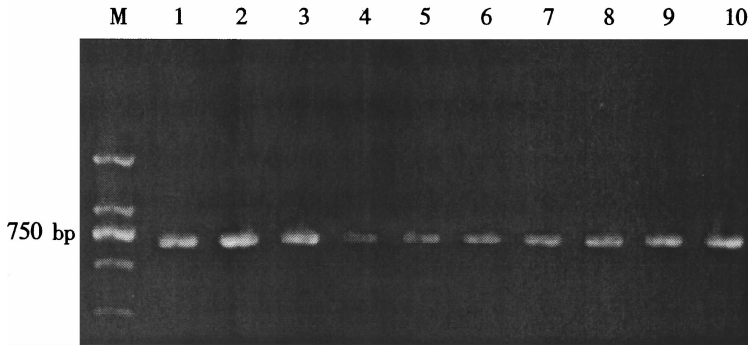


图 3 10 个根结线虫种群 mtDNA 的 COII 和 LRNA 基因间序列 PCR 扩增结果  
 Fig.3 PCR amplified mtDNA between COII and LRNA for 10 populations of root-knot nematodes

M: 标准 DNA 分子质量; 1~10: 10 个根结线虫种群。  
 M; DNA Marker; 1~10: 10 populations of root-knot nematodes.

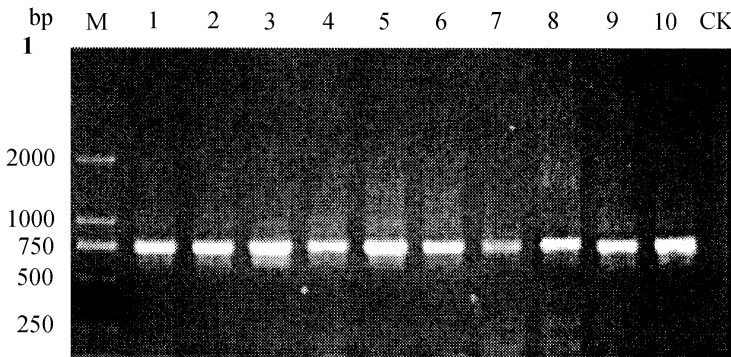


图 4 10 个根结线虫种群 rDNA-ITS 区序列 PCR 扩增结果  
 Fig.4 PCR amplified results of rDNA-ITS for 10 populations of root-knot nematodes

M: 标准 DNA 分子质量; CK: 空白对照; 1~10: 10 个根结线虫种群。  
 M: DNA Marker; CK: Comparison; 1~10: 10 populations of root-knot nematodes.

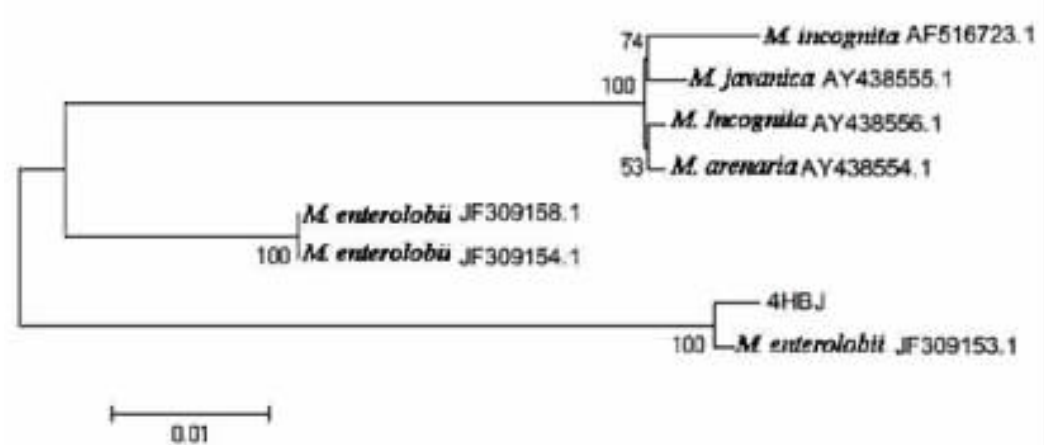


图 5 4HBJ 种群 rDNA-ITS 区序列的聚类分析  
 Fig.5 The clustering analysis of rDNA-ITS of 4HBJ population

### 3 讨论

本研究运用形态学、同工酶电泳和 mtDNA-PCR 技术相结合的方法,准确鉴定出海南岛农作物上的象耳豆根结线虫。杨宝君(1983)于海南省儋

州市野生象耳豆树上发现象耳豆根结线虫并鉴定为新种。本研究首次于海南岛栽培的葫芦科蔬菜(苦瓜、丝瓜、南瓜、黄瓜、葫芦瓜)、辣椒和南药植物(海巴戟、沉香、丁香)上发现该线虫。

4HBJ 种群 mtDNA 的 COII 和 LRNA 基因间序列与 Genbank 上公布的象耳豆根结线虫 (GQ870255.1) 的同源性高达 100%, 可以确定该种群为象耳豆根结线虫。

常见根结线虫种类如南方根结线虫、爪哇根结线虫和花生根结线虫的 rDNA-ITS 区差异很小, 有报道认为这一分子特征不能用于常见根结线虫的种类鉴定。本研究发现, 4HBJ 种群的 rDNA-ITS 区序列与象耳豆根结线虫 (JF309153.1) 的同源性高达 98%, 而与南方根结线虫、爪哇根结线虫和花生根结线虫的同源性仅为 88% 左右。这表明象耳豆根结线虫 rDNA-ITS 区序列测定比对可作为其鉴定的 1 种方法, 也阐明了象耳豆根结线虫与其他常见根结线虫种类的遗传距离相对较远, 对于进一步开展象耳豆根结线虫研究具有重要参考价值。

### 参考文献

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

黄伟明, 陈绵才, 肖彤斌, 王会芳, 徐建华. 2011. 海南岛葫芦科蔬菜根结线虫种类鉴定. *植物保护*, 37(1): 70 - 73.

廖金铃. 2001. 根结线虫的鉴定及其 DNA 多态性研究. 广州: 华南农业大学.

刘昊, 龙海, 鄢小宁, 崔汝强, 李迅东, 王彬, 周健勇. 2005. 海南岛番石榴根结线虫病病原的种类鉴定及其寄

主范围的测试. *南京农业大学学报*, 28(4): 55 - 59.

万新龙, 李建洪, 彭德良. 2007. 根结线虫 rDNA-ITS 片段的克隆与序列分析. *华中农业大学学报*, 26(5): 624 - 628.

汪来发, 杨宝君, 李传道. 2001. 华东地区根结线虫的调查. *林业科学研究*, 14(5): 484 - 489.

杨宝君. 1984. 十五种根结线虫病害的病原鉴定. *植物病理学报*, 14(2): 107 - 112.

赵洪海. 1999. 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. 沈阳: 沈阳农业大学.

卓侃, 胡茂秀, 廖金铃, 崔汝强, 李迅东, 王彬, 周健勇. 2008. 广东省和海南省象耳根结线虫的鉴定. *华中农业大学学报*, 27(2): 193 - 197.

Esbenshade P R and Triantaphyllou A C. 1985. Use of enzyme phenotype for identification of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology*, 17: 6 - 20.

Karssen G. 1999. *The Plant-parasitic Nematode Genus Meloidogyne Göldi, 1892 (Tylenchida) in Europe*. The Netherlands, Gent Belgium: Gent University.

Power T O and Harris T S. 1993. A polymerase chain reaction method for five major *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology*, 25(1): 1 - 6.

Vrain T C, Wakarchuk D A, Levesque A C and Hamilton R I. 1992. Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. *Fundamental and Applied Nematology*, 15(6): 563 - 573.

(责任编辑: 彭露)