

陈晶伟, 马居奎, 张成玲, 等. 徐淮地区 7 个甘薯茎线虫群体的形态学及分子生物学鉴定[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(6): 1409-1416.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2021.06.007

徐淮地区 7 个甘薯茎线虫群体的形态学及分子生物学鉴定

陈晶伟, 马居奎, 张成玲, 杨冬静, 唐 伟, 谢逸萍, 孙厚俊

(江苏徐淮地区徐州农业科学研究所/农业农村部甘薯生物学与遗传育种重点实验室, 江苏 徐州 221131)

摘要: 从江苏省徐淮地区 7 个采集地的甘薯块根中分离到 7 个甘薯茎线虫群体, 通过形态学鉴定, 其特征与已报道的腐烂茎线虫(*Ditylenchus destructor*)基本一致。利用 rDNA-内转录间隔区(ITS)通用引物、腐烂茎线虫特异性引物检测, 发现群体 JSXZ 为 B(L)型, 其余 6 个分离群体均为 A(S)型腐烂茎线虫。结合 ITS-5.8S-ITS2 区序列分析并构建系统发育树, 结果进一步表明, 所获序列与腐烂茎线虫相似性最高, 且各分离群体与徐淮地区已报道的相同基因型的腐烂茎线虫群体序列相似性均在 99%以上。群体 JSXZ 没有与腐烂茎线虫 A 型、B 型群体聚在一起, 而是与 C 型、D 型群体聚为 1 个分支, 且和 C 型亲缘关系更近, 所以群体 JSXZ 被鉴定为 C 型腐烂茎线虫; 群体 JSWJ、JSYJ、JSGS、JSHW、JSLQ 和 JSNG 与 A 型腐烂茎线虫群体聚为 1 个分支, 均为 A 型腐烂茎线虫, 且与其他基因型区分明显。危害徐淮地区甘薯的腐烂茎线虫亲缘关系近, 基因型种类多, 存在 A 型、B 型和 C 型, 其中 A 型腐烂茎线虫为优势群体。

关键词: 甘薯; 腐烂茎线虫; 鉴定; 系统发育树

中图分类号: S432.4⁺5

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2021)06-1409-08

Morphological and molecular biology identification of seven stem nematode populations of sweet potato in Xuhuai area

CHEN Jing-wei, MA Ju-kui, ZHANG Cheng-ling, YANG Dong-jing, TANG Wei, XIE Yi-ping, SUN Hou-jun

(Xuzhou Institute of Agricultural Sciences in Xuhuai Area of Jiangsu/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Sweet Potato of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Xuzhou 221131, China)

Abstract: Seven populations of sweet potato stem nematodes were isolated from storage roots of sweet potatoes from seven regions in Xuhuai area of Jiangsu province. Characteristics of the stem nematodes were basically identical to *Ditylenchus destructor* reported previously through morphological identification. By detections using universal primers of rDNA-internal transcribed spacer (ITS) region and specific primers of *D. destructor*, it was found that population JSXZ belonged to B(L) type of *D. destructor*, while the other six isolated populations all belonged to A(S) type of *D. destructor*. The results further suggested that, the sequences of the stem nematodes shared the highest similarity with *D. destructor* though sequences analysis of ITS-5.8S-ITS2 region and phylogenetic tree construction, and sequence similarity of the separated populations compared with the *D. destructor* populations carrying the same genotype reported in Xuhuai area were all above 99%. Results of phylogenetic tree analysis showed that population JSXZ did not cluster into one branch with type A and type B populations of *D. destructor*, but clustered into one branch with type C and type D populations of *D. destructor*, and had closer affinity with type

C. Therefore, JSXZ population from the sweet potato was confirmed as type C of *D. destructor*. Populations of JSWJ, JSYJ, JSGS, JSHW, JSLQ and JSNG were clustered into one branch with population of type A of *D. destructor*, which were all confirmed as type A of *D. destructor* and were clearly distinguished from other genotypes. It was indi-

收稿日期: 2021-04-07

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-10-B15); 徐州市农业科学院基金项目(RC2019002)

作者简介: 陈晶伟(1993-), 男, 陕西汉中, 硕士, 研究实习员, 从事甘薯病虫害防治研究。(Email) ibcjlw0825@126.com

通讯作者: 孙厚俊, (Email) sunhouj1980@163.com

cated that populations of *D. destructor* which harmed sweet potatoes in Xuhuai area were closely related and had various genotypes, such as type A, type B and type C, among which type A was the dominant population.

Key words: sweet potato; *Ditylenchus destructor*; identification; phylogenetic tree

茎线虫病害严重威胁中国甘薯产业的发展,其病原物为腐烂茎线虫(*Ditylenchus destructor*),最早在马铃薯(*Solanum tuberosum*)上被发现,故也称 Potato nematode^[1]。国内腐烂茎线虫首先发现于甘薯(*Ipomoea batatas*)中,主要侵染贮藏根并引起腐烂,造成糠心或糠皮等症状,危害严重时可导致减产 80% 以上,乃至绝收^[2-3]。随后,又在马铃薯及一些中药材上发现其危害^[4-5]。现已被亚太植物保护组织及许多国家和地区列为植物检疫性有害生物^[6]。

线虫形态特征复杂且有相似的特点,仅依靠形态学鉴定,难以在种水平及基因型上进行区分,因此分子生物学检测已成为研究植物寄生线虫的常用手段^[7]。据相关文献报道,腐烂茎线虫存在种内分化的现象,如王金成等^[8]、黄健等^[9]、章淑玲等^[10]分析了国内不同腐烂茎线虫群体的 rDNA-内转录间隔区(ITS)序列后发现,中国的腐烂茎线虫明显存在 2 种基因型,即 A(S)型和 B(L)型。宛菲等^[11]根据腐烂茎线虫 rDNA-ITS 区分别设计了针对这 2 种基因型的特异性引物,并准确检测出国内 6 个省(市、区)的 21 个甘薯腐烂茎线虫群体的基因型。国外学者也深入研究了腐烂茎线虫群体分化的现象,如 Subbotin 等^[12]对世界范围内不同寄主植物的腐烂茎线虫群体的 rDNA-ITS 区序列进行分析比对后发现,不同线虫群体之间 ITS1-5.8S-ITS2 序列长度的变异源自 ITS1 区存在的重复序列,且该重复序列能在 RNA 二级结构中形成稳定的茎环,在保留 A(S)型的基础上,将 B(L)型进一步细分为 B~G 6 种不同的基因型。Jeszke 等^[13]结合 NCBI 已发表的腐烂茎线虫 rDNA-ITS 区序列构建系统发育树,鉴定出波兰 3 个不同地区腐烂茎线虫分离种群均为 C 基因型。现已发现危害甘薯的腐烂茎线虫基因型有 A 型、B 型、C 型、E 型和 F 型^[10,12,14]。

甘薯对于带动区域农业农村经济发展有着举足轻重的作用,且已成为国内许多省份及地区调整农业产业结构、促进农业农村发展的重要农作物之一^[15-16]。目前,甘薯茎线虫病害在中国北方薯区春作地发生严重^[2]。江苏省甘薯产业总体发展态势良好,但甘薯茎线虫病害严重制约甘薯单位面积产

量的提升,阻碍甘薯产业发展。本研究针对江苏省徐淮地区不同甘薯茎线虫分离群体进行形态学和分子生物学鉴定,并基于 rDNA-ITS 区构建系统发育树,以明确线虫危害种类及系统发育地位,为甘薯茎线虫病害的快速诊断和防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2019–2020 年,对江苏省徐淮地区 7 个线虫危害严重的薯田进行样品采集,并拍摄记录田间甘薯受害症状。采用随机采样法,将受害薯块装入聚乙烯薄膜自封袋内,并标记采集时间、地点、前茬作物及土壤类型等信息,带回实验室进一步分离与鉴定。DdSH、DdTS、DdXY、DEsg 为江苏徐淮地区已报道的甘薯上的腐烂茎线虫群体^[8,11](表 1)。

表 1 供试线虫品种及来源

Table 1 Varieties and origins of nematodes used in this study

群体代号	采集地	GenBank 登录号	rDNA-内转录间隔区(ITS) 序列长度(bp)
JSWJ	徐州市睢宁县魏集镇	MW648334	791
JSYJ	徐州市睢宁县姚集镇	MW648340	791
JSGS	徐州市邳州市港上镇	MW648337	791
JSHW	徐州市铜山区汉王镇	MW648338	791
JSLQ	徐州市铜山区柳泉镇	MW648339	791
JSXZ	徐州市铜山区徐庄镇	MW648335	980
JSNG	连云港市灌云县南岗镇	MW648336	791
DdSH	宿迁市泗洪县	EF208210	1 130
DdTS	徐州市铜山区	EF208211	1 130
DdXY	徐州市新沂市	EF210366	942
DEsg	连云港市赣榆县	AM232227	688

1.2 线虫的分离与纯化

将病薯切成碎屑,利用浅盘法分离线虫^[1]。获得线虫后,用 0.1% 青霉素+0.1% 链霉素浸泡,4℃ 下放置 12 h 消毒,用无菌水清洗 3 遍后保存备用。在体式显微镜下挑取已消毒的雌虫和雄虫各 50 头放入茄腐镰刀菌(*Fusarium solani*)培养皿中进行纯

化培养,保存备用。

1.3 线虫的形态观察和测量

线虫的杀死、TAF 固定、临时玻片制作均参照文献[17]。通过配备 Leica 相机 (DFC550) 的显微镜 (Leica DM4000B) 观察制作的线虫临时玻片。使用相机配套软件进行拍摄并记录各虫态形态特征图片;形态测量值利用配套软件,按照 De Man 公式^[17]进行测量计算,即 a = 体长/最大体宽; b = 体长/食道长度(从头到食道与肠结合处); c = 体长/尾长; V = 头至阴门距离/体长 $\times 100$ 。每个特征值,观察 20 个标本。

1.4 线虫分子生物学鉴定

1.4.1 DNA 提取方法 参考单条花生茎线虫 (*D. arachidis*) DNA 提取方法^[18],用 ddH₂O 把挑到的线虫清洗干净后,转移至装有 8 μ l ddH₂O、1 μ l 10 \times PCR buffer 的 PCR 管内,将 PCR 管在掌上离心机中快速离心后,放至液氮中浸泡约 30 s,然后加 1 μ l 蛋白酶 K (1.2 mg/ml) 到管内。最后,将 PCR 管放置于 PCR 仪中于 65 $^{\circ}$ C 温育 1.5 h,再于 95 $^{\circ}$ C 放置 10 min,取出放至室温即可用于 PCR 扩增或置于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

1.4.2 PCR 引物扩增 试验所用引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。反应体系为 25.0 μ l,其中模板 DNA 2.0 μ l,上游引物(10 μ mol/L) 1.0 μ l,下游引物(10 μ mol/L) 1.0 μ l,PCR Mix (Premix TaqTM, TaKaRa) 12.5 μ l, ddH₂O 8.5 μ l。

(1) rDNA-ITS 序列扩增。采用引物 ITSP1/ITSP2 (5'-CGTAACAAGCTAGCTGTAG-3', 5'-TTTCACTCGC-CGTTACTAAGG-3') 扩增^[8]。反应程序:94 $^{\circ}$ C, 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

(2) 特异性引物扩增。A(S)型特异性引物为 DdS1/DdS2 (5'-TCGTAGATCGATGAAGAACGC-3', 5'-ATTATCTCGAGTGGGAGCGC-3'); B(L)型特异性引物为 DdL1/DdL2 (5'-TTGTGTTTGCTGCTGCGCTTGT-3', 5'-GAGTGAGAGCGATGTCAACATTG-3')^[11]。反应程序:94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。

用 1% 的琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳确定目的条带,扩增产物寄送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向测序。

1.4.3 序列提交、分析及系统发育树构建 依据序列提交步骤将本试验所得序列上传至 GenBank,获得序

列号(表 1)。采用 MEGA 6.0 和 DNAMAN 软件进行多序列比对分析。采用 jModelTest v.2.1.2 AIC 标准进行最佳匹配替代模型估算^[19],采用 DAMBE v.7.0.28 软件^[20]进行基因替代饱和度检测。在 CIPRES Science Gateway (www.phylo.org)^[21]平台上进行在线序列分析。分别使用 MrBayes 3.2.6 on XSEDE^[22] 和 RAxML-HPC2 on XSEDE^[23-24] 进行贝叶斯法与最大似然法分析。贝叶斯系统发育树分析采用 GTR+I+G 模式,运算 5 000 000 代,每运算 100 代对树形进行 Markov chains 采样,剔除初始 25% 采样;最大似然法分析采用 GTRCAT 模型,完成 1 000 次自展重复。采用 Figtree v1.4.3 和 Adobe Illustrator CC 在贝叶斯 50% 多数原则一致树上标注自展值和后验概率。

2 结果与分析

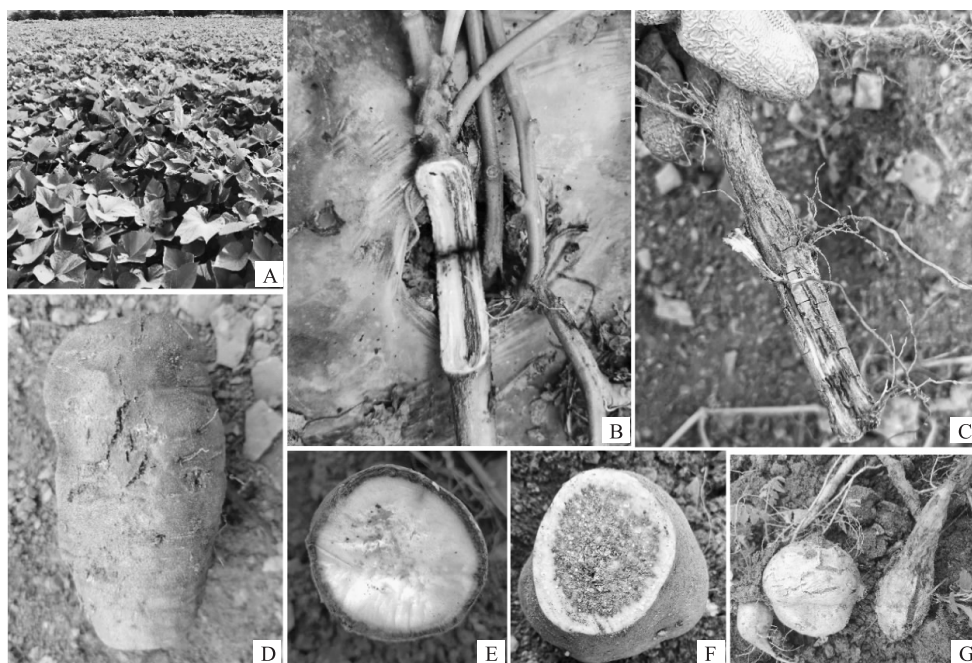
2.1 甘薯茎线虫病主要症状特点

受病原线虫危害的大田中,甘薯地上部分在生长前期症状不明显,症状在中后期显现,薯蔓近地面的主蔓基部纵切后可见髓部呈黑褐色干腐样,呈糠心状,而发病严重的植株糠心可达薯蔓顶部,叶片逐步发黄,直至主蔓枯死(图 1A、图 1B、图 1C)。薯块受害后大多表现为糠皮或糠心,丧失经济价值。糠皮型薯块表皮褪色泛青,有的还会出现凹陷或裂口,导致薯皮龟裂。纵切后可见皮下组织干腐变褐,呈圆环状(图 1D、图 1E)。糠心型薯块的皮层与健康薯块无差异,但是薯块质量显著下降,切开后可见薯块内呈褐白相间的干腐症状(图 1F)。甘薯受害后期,发病严重时,糠皮和糠心会混合发生,并常伴随真菌、细菌和螨类等二次侵染(图 1G)。

2.2 甘薯茎线虫形态学鉴定

雌虫温热杀死后可见整个虫体略向腹面弯曲(图 2A)。虫体侧区可见 6 条清晰侧线(图 2C)。唇区平滑,头区稍有缢缩,口针细直,口针基部球明显,中食道球似纺锤形,瓣膜可见,排泄孔位于食道肠道连接处略靠上方,后食道腺覆盖于肠道背面(图 2D)。阴门明显,侧面观可见向外突起,后阴子宫囊明显,长约占肛阴距的 2/3,尾略向腹面弯曲,末端圆滑(图 2F、图 2G)。

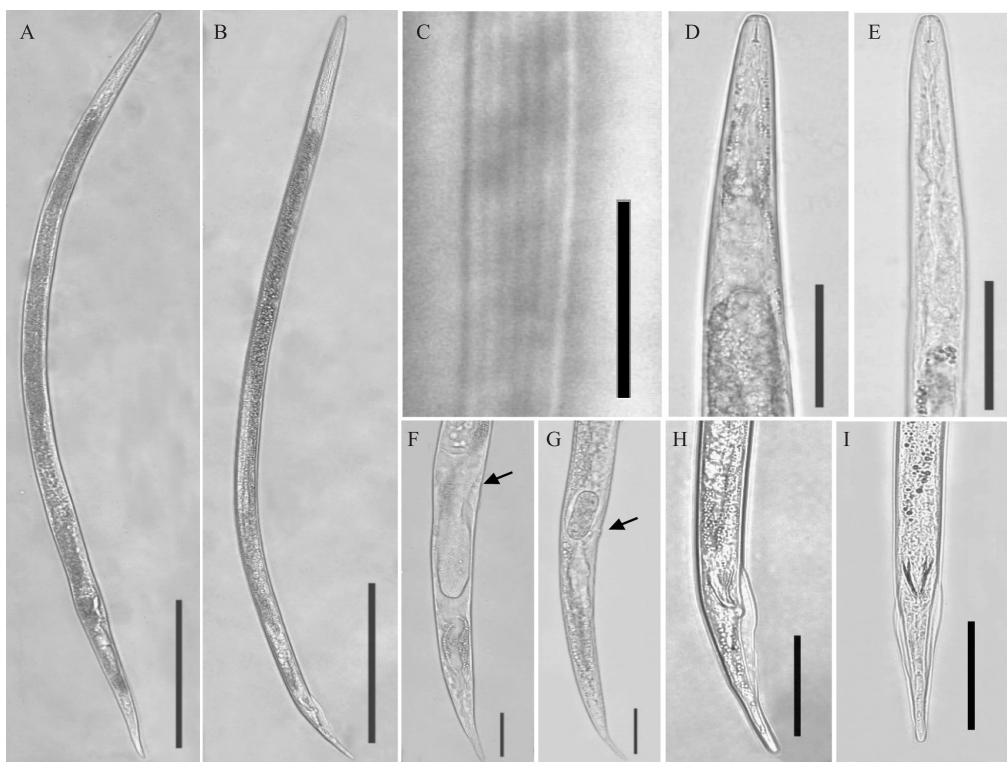
雄虫温热杀死后,虫体前端较为平直,尾端向腹面弯曲度大(图 2B)。交合刺发达,尾部侧面可见交合刺向腹面弯曲,交合伞由交合刺前端延伸至尾长约 3/4 处,尾端窄圆(图 2H、图 2I)。其余特征与雌虫类似。



A:受害大田;B,C:甘薯地上茎部症状;D,E:糠皮型薯块;F:糠心型薯块;G:线虫危害后期甘薯。

图 1 甘薯茎线虫危害甘薯的症状

Fig.1 Symptoms of sweet potatoes infected by stem nematodes



A:雌虫虫体;B:雄虫虫体;C:雌虫侧区;D:雌虫头部与食道;E:雄虫头部与食道;F:雌虫尾部腹面观(箭头示阴门位置);G:雌虫尾部侧面观;H:雄虫尾部侧面观;I:雄虫尾部腹面观;标尺,A~B:200 μm ,C:25 μm ,D~I:50 μm 。

图 2 甘薯茎线虫光学显微图片

Fig.2 Light microscopy photographs of stem nematodes in sweet potatoes

本研究中分离纯化的甘薯线虫群体的形态测量值见表 2。由表 2 可知,部分线虫分离群体与 Thorne^[25]记载的腐烂茎线虫形态测量值存在一定

差异,但与 Goodey^[26]的记载相符。根据主要虫态的形态学特征和主要形态测量值,初步推断各甘薯线虫群体均为腐烂茎线虫。

表 2 徐淮地区甘薯茎线虫各分离群体雌虫、雄虫的形态测量值

Table 2 Morphometric parameters of female and male *Ditylenchus destructor* populations of sweet potatoes in various regions of Xuhuai area

群体代号	虫态	体长 (μm)	体宽 (μm)	口针长 (μm)	尾长 (μm)	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>V</i>
JSNG	♀	985±126	23.8±4.7	10.6±1.0	63.6±9.2	42.2±6.2	8.2±1.4	15.8±3.0	78.0±2.0
	♂	900±90	22.1±3.6	9.9±0.8	74.2±6.7	41.2±4.4	8.3±2.0	12.1±0.7	—
JSHW	♀	922±106	26.4±3.7	9.3±0.8	70.7±4.5	35.4±5.4	8.1±1.4	13.1±1.6	78.5±3.6
	♂	860±61	22.5±2.8	9.0±1.6	64.3±6.0	38.6±3.8	8.0±1.6	13.1±0.9	—
JSGS	♀	869±97	25.8±3.9	8.9±1.2	70.2±8.3	34.5±5.3	6.7±0.7	12.5±1.8	77.3±3.6
	♂	851±100	20.8±1.8	9.8±0.8	68.8±7.6	41.1±4.6	6.5±0.7	12.5±2.0	—
JSLQ	♀	905±63	25.4±2.5	9.7±0.8	70.4±6.4	35.8±3.3	6.7±0.7	12.9±1.2	78.7±3.1
	♂	880±111	21.1±2.7	9.4±0.7	70.6±8.0	41.9±3.9	7.0±0.7	12.5±1.1	—
JSWJ	♀	1 060±147	30.0±5.6	9.5±0.9	71.4±6.3	35.9±4.8	7.9±1.4	14.9±1.9	78.3±4.4
	♂	992±80	24.9±2.4	9.6±1.1	72.0±6.8	40.0±2.9	7.3±0.7	13.8±1.1	—
JSYJ	♀	882±80	25.7±3.4	9.0±0.7	68.2±3.6	34.6±2.9	6.7±0.5	12.9±1.1	80.6±5.0
	♂	875±81	21.8±2.7	9.1±0.9	72.1±5.9	40.4±4.4	6.6±0.6	12.1±0.8	—
JSXZ	♀	1 044±102	30.0±3.0	10.0±0.6	70.0±4.9	35.0±2.8	7.3±0.7	14.9±1.4	79.5±1.4
	♂	880±111	21.1±2.7	9.4±0.7	70.6±8.0	41.9±3.9	6.3±0.4	12.5±1.1	—
Thorne ^[23]	♀	810~1 400	—	—	—	30.0~35.0	8.0~10.0	15.0~20.0	78.0~83.0
	♂	800~1 300	—	—	—	34.0~40.0	7.0~8.0	12.0~16.0	—
Goodey ^[24]	♀	690~1 890	—	—	—	18.0~49.0	4.0~12.0	9.0~30.0	73.0~90.0
	♂	760~1 350	—	—	—	24.0~50.0	4.0~11.0	11.0~21.0	—

JSNG、JSHW、JSGS、JSLQ、JSWJ、JSYJ、JSXZ 见表 1。*a* 为体长与最大体宽的比值;*b* 为体长与食道长度的比值;*c* 为体长与尾长的比值;*V* 为头至阴门距离与体长的比值×100;本研究所有测量值为平均值±标准差;参考文献测量值为最小值~最大值。

2.3 分子生物学鉴定

2.3.1 甘薯茎线虫不同分离群体 rDNA-ITS 通用引物检测结果 分别以江苏徐淮地区 7 个不同的甘薯茎线虫总 DNA 为模板,采用通用引物 ITSP1/ITSP2 扩增 rDNA-ITS 区序列,电泳结果表明,7 个分离群体样本中,除 JSXZ 群体扩增出约 1 000 bp 条带外,其余皆扩增出约 780 bp 条带(图 3),结合形态鉴定结果,推断 JSXZ 群体可能为 B(L)型腐烂茎线虫,其余均为 A(S)型腐烂茎线虫。

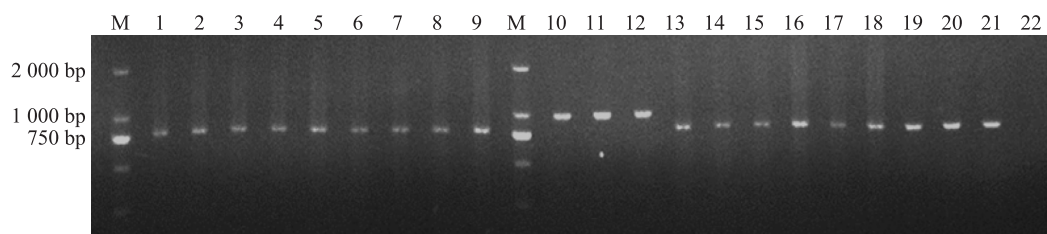
2.3.2 A(S)型和 B(L)型特异性引物扩增结果 为进一步确认各分离群体基因型,针对江苏徐淮地区不同甘薯茎线虫分离群体,分别随机挑取单头成虫提取 DNA,使用特异性引物 DdS1/DdS2 与 DdL1/DdL2 进行 PCR 扩增,除 JSXZ 群体扩增出 485 bp 条带外,其余皆为 252 bp,对照组没有条带(图 4),确定 JSXZ 群体为 B(L)型腐烂茎线虫,其余群体均为 A(S)型腐烂茎线虫。

2.3.3 基于 rDNA-ITS 的系统发育树构建及序列分析

对采自江苏徐淮地区甘薯茎线虫的不同分离群体进行靶标基因的测定,通过 NCBI 中 BLAST 进行比对,发现本研究所有群体与 GenBank 中江苏省内腐烂茎线虫群体序列相似性在 99%~100%,获取序列后上传至 GenBank,获得序列登录号,详细信息见表 1。依据比对结果筛选数据库中 17 条不同基因型的腐烂茎线虫序列,2 条起绒草茎线虫(*D. dipsaci*)序列,加上本试验获得的 7 条序列,共 26 条序列,基于 ITS1-5.8S-ITS2 基因,采用贝叶斯和最大似然法构建系统发育树。结果(图 5)表明所有 *D. destructor* 群体聚为一支,与 2 条 *D. dipsaci* 序列区分明显。JSYJ (MW648334)、JSWJ (MW648340)、JSGS (MW648337)、JSHW (MW648338)、JSLQ (MW648339)和 JSNG 群体 (MW648336)与已知 A 型腐烂茎线虫群体聚为一支,表明该 6 个群体均为 A 型腐烂茎线虫,与分子鉴定结果一致。其中,JSYJ 群体与 DdXY 群体聚为一支,表明两者遗传距离较近。

JSXZ 群体(MW648335)与 A 型、B 型群体未聚在一起,而是与已知的 C 型群体(EF208210、EF062574、KX181650)和 D 型群体(EF208213)聚为一支。通过 DNAMAN 软件进行序列比对分析,JSXZ 群体与已知的 C 型群体(EF208210、EF062574、KX181650)相似性均达 99% 以上,其中与宿迁市 C 型甘薯群体 EF208210 的序列在 ITS1 区第 193 bp 处有 1 个碱基替换。与 C 型马铃薯群体

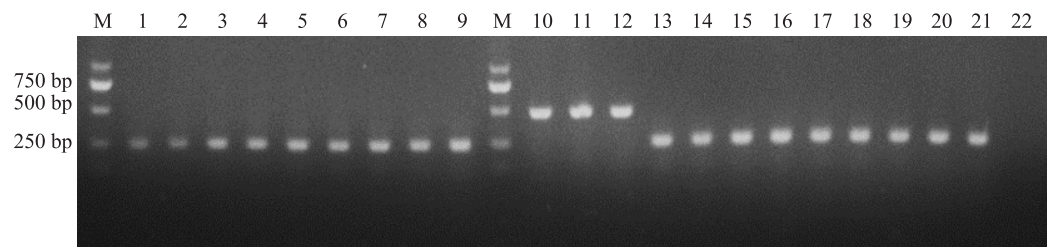
EF062574 在 ITS1 区 41 bp 和 363 bp 处各有 1 个碱基替换,与 C 型马铃薯群体 KX181650 在 ITS1 区 96 bp、126 bp、203 bp、215 bp 和 227 bp 处各存在 1 个碱基替换。而与 D 型群体(EF208213)同源性仅为 96%,在 ITS 区共存在 29 个碱基差异,分别在 ITS1 区存在 2 个碱基缺失、2 个碱基插入以及 25 个碱基的替换。因此,JSXZ 群体与 3 个 C 型群体亲缘性更近,确定其为 C 型腐烂茎线虫。



M: DL2000 DNA Marker; 1~3: JSWJ 群体; 4~6: JSLQ 群体; 7~9: JSYJ 群体; 10~12: JSXZ 群体; 13~15: JSNG 群体; 16~18: JSGS 群体; 19~21: JSHW 群体; 22: 清水对照。JSNG、JSHW、JSGS、JSLQ、JSWJ、JSYJ、JSXZ 见表 1。

图 3 内转录间隔区(ITS)通用引物扩增结果

Fig.3 Results of universal primer amplification of rDNA internal transcribed spacer(ITS)



M: DL2000 DNA Marker; 1~3: JSWJ 群体; 4~6: JSLQ 群体; 7~9: JSYJ 群体; 10~12: JSXZ 群体; 13~15: JSNG 群体; 16~18: JSGS 群体; 19~21: JSHW 群体; 22: 清水对照。JSNG、JSHW、JSGS、JSLQ、JSWJ、JSYJ、JSXZ 见表 1。

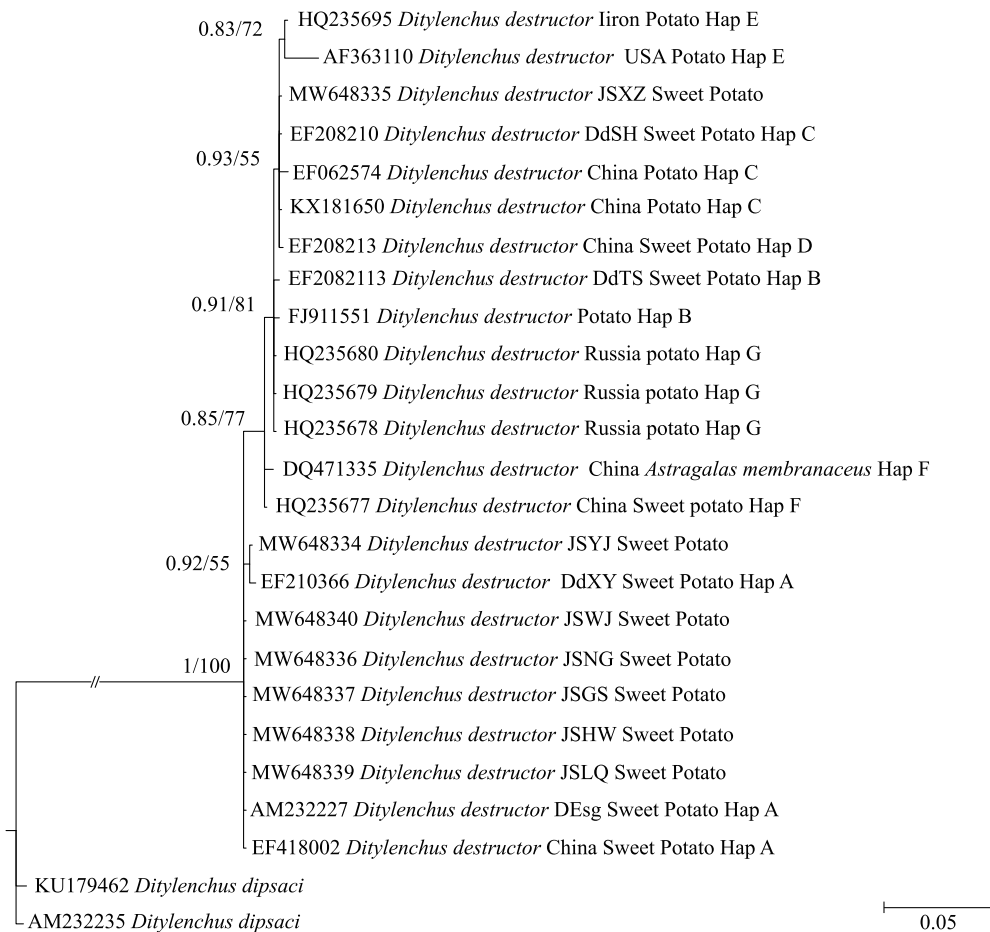
图 4 A 型(S)、B(L)型特异性引物扩增结果

Fig.4 Amplification results of type A(S) and B(L) specific primers

3 讨论

本研究应用形态学结合分子生物学手段对江苏徐淮地区主要甘薯产区的病原线虫进行了鉴定,对采集的 7 个甘薯线虫群体进行形态学观测,其形态特征均与张绍升等^[27]对腐烂茎线虫的描述一致。部分群体测量值与 Thorne^[25]的原定种(正模)的参考值存在一定差异。对此,Goodey^[26]、Wu 等^[28]认为这可能是由于寄主的变化,使得线虫的各测量值发生一定程度的变化,并定出比原定种(正模)测量数据范围更广的变异范围,本研究所有测量数据均在此变异范围内。鉴于寄主或不同地理因素差异会导致线虫形态数据的变异,应注意每个测量值的观测线虫数目不应过少。

目前,诸多研究结果已表明腐烂茎线虫具有明显的种内分化现象,如 Jones 等^[29]认为腐烂茎线虫存在寄主专化小种;王金成等^[8]对 8 个腐烂茎线虫种群 ITS 区序列进行分析,发现中国腐烂茎线虫的 7 个地理种群可明显分为 A、B 2 个分支,A 分支种群在 ITS1 区有 188 bp 片段的缺失,并推测腐烂茎线虫在中国很可能是 1 个至少由 2 种线虫组成的复合种。章淑玲等^[10]设计引物对甘薯腐烂茎线虫 rDNA-ITS 区进行分析比对,发现中国的腐烂茎线虫群体的 ITS1 区序列分化为短型(S)和长型(L)2 种基因型。宛菲等^[11]设计并筛选出 A(S)型、B(L)型腐烂茎线虫的 2 对特异性引物 DdS1/DdS2 和 DdL1/DdL2,对甘薯腐烂茎线虫 rDNA-ITS 区进行分析比对,将宿迁市甘薯



JSNG、JSHW、JSGS、JSLQ、JSWJ、JSYJ、JSXZ 见表 1。分支支持率;BI 的后验概率估值/ML 分析的自展值;拓扑结构不支持的自展值未标出。

图 5 腐烂茎线虫群体基于 rDNA-ITS 序列的系统发育树

Fig.5 Phylogenetic trees of *Ditylenchus destructor* populations based on rDNA internal transcribed spacer (ITS) sequence

茎线虫群体 (DdSH) 和徐州市铜山区甘薯茎线虫群体 (DdTS) 鉴定为 B(L) 型腐烂茎线虫。Subbotin 等^[12] 基于腐烂茎线虫 ITS1 区中重复序列在 RNA 二级结构的差异,并结合 rDNA-ITS 系统发育关系,在前人研究基础上将腐烂茎线虫划分为 A~G 7 个基因型,并发现腐烂茎线虫 A(S) 型特异性引物只能检测出 A 基因型,B(L) 型特异性引物可检测出除 A 基因型之外的所有基因型,并将群体 DdSH 鉴定为腐烂茎线虫 C 型群体,群体 DdTS 鉴定为腐烂茎线虫 B 型群体。在本研究中,利用 ITS 通用引物和特异性引物对徐淮地区 7 个不同的分离种群进行分子鉴定,结果表明 JSXZ 群体为 B(L) 型腐烂茎线虫群体,其余 6 个均为 A(S) 型腐烂茎线虫群体,且各分离群体与徐淮地区已报道的相同基因型甘薯腐烂茎线虫序列相似性均在 99% 以上。JSXZ 群体与 C 型 DdSH 群体序列 EF208210 几乎一致,仅在 ITS1 区有 1 个碱基替换。

系统发育树分析结果进一步表明,6 个 A 型腐烂茎线虫群体与已知 A 型群体单独聚为一支,JSXZ 群体与 DdSH 群体及其他 2 个 C 型群体 (EF062574、KX181650) 聚为一支,最终将群体 JSXZ 鉴定为 C 型腐烂茎线虫。现已发现危害甘薯的腐烂茎线虫基因型有 A 型、B 型、C 型、E 型和 F 型^[10,12,14],本研究结果及文献报道表明危害徐淮地区甘薯的腐烂茎线虫基因型种类较丰富,存在 A~C 3 种基因型,A 型为优势种群。这与于海英等^[30] 调查发现国内危害甘薯的腐烂茎线虫中 A 型群体占大多数且分布广泛的结果一致。而就目前的发现来看,A 型腐烂茎线虫仅在中国出现,且只危害甘薯,这表明中国腐烂茎线虫可能存在寄主专化性。

腐烂茎线虫不同地区群体的差异明显,说明其正处于快速进化过程中,且不同地理来源的线虫种群在形态特征^[9]、致病力^[31]、对乙酰胆碱酯酶抑制

剂的敏感性^[32]和抗药性^[33]等方面存在一定差异。徐振等^[34]的研究结果表明甘薯腐烂茎线虫在南方薯区存在较大的定殖风险。江苏省内甘薯腐烂茎线虫群体是否还存在其他不同基因型,各基因型腐烂茎线虫生态适应性、寄主范围、生物学特性等是否有差异,还需进一步调查研究。

参考文献:

- [1] 刘维志. 植物病原线虫学 [M]. 1版. 北京: 中国农业出版社, 1999.
- [2] 周忠, 马代夫. 甘薯茎线虫病的研究现状和展望[J]. 园艺与种苗, 2003, 23(5): 288-290.
- [3] 朱秀珍, 田希武, 王随保, 等. 甘薯茎线虫病发病规律及综合防治[J]. 山西农业科学, 2004, 32(3): 54-57.
- [4] 丁再福, 林茂松. 甘薯、马铃薯和薄荷上的茎线虫的鉴定[J]. 植物保护学报, 1982, 9(3): 169-172.
- [5] 陈品三, 郑经武. 当归麻口病中致病茎线虫的鉴定研究[J]. 植物保护, 1988, 14(6): 12-14.
- [6] HOOPER D J. *Ditylenchus destructor* CIH description of plant parasitic nematodes No. 21 [M]. UK: CAB International Wallingford, 1973.
- [7] YAGHOUBI A, POURJAM E, YE W, et al. Description and molecular phylogeny of *Ditylenchus gilanicus* n. sp. (Nematoda: Anguinidae) from northern forests of Iran[J]. European Journal of Plant Pathology, 2018, 152(3): 735-746.
- [8] 王金成, 季 镭, 黄国明, 等. 腐烂茎线虫不同地理群体 ITS 区序列比对及系统发育[J]. 河北农业大学学报, 2007, 30(5): 79-83.
- [9] 黄 健, 戚龙君, 王金成, 等. 腐烂茎线虫种内不同群体形态及遗传分析[J]. 植物病理学报, 2009, 39(2): 125-131.
- [10] 章淑玲, 张绍升. 甘薯茎线虫 rDNA-ITS1 区的 PCR 扩增与序列分析[J]. 植物病理学报, 2008, 38(2): 132-135.
- [11] 宛 菲, 彭德良, 杨玉文, 等. 马铃薯腐烂茎线虫特异性分子检测技术研究[J]. 植物病理学报, 2008, 38(3): 263-270.
- [12] SUBBOTIN S A, MOHAMMAD D A, ZHENG J Z, et al. Length variation and repetitive sequences of internal transcribed spacer of ribosomal RNA gene, diagnostics and relationships of populations of potato rot nematode, *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945 (Tylenchida: Anguinidae) [J]. Nematology, 2011, 13(7): 773-785.
- [13] JESZKE A, BUDZISZEWSKA M, DOBOSZ R, et al. A comparative and phylogenetic study of the *Ditylenchus dipsaci*, *Ditylenchus destructor* and *Ditylenchus gigas* populations occurring in Poland [J]. Journal of Phytopathology, 2014, 162(1): 61-67.
- [14] 刘 晨, 杨艺伟, 王家哲, 等. 陕西不同地区马铃薯腐烂茎线虫的分离鉴定及同源性分析[J]. 西北农业学报, 2020, 29(5): 793-800.
- [15] 刘中华, 林志坚, 李华伟, 等. 甘薯种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 南方农业学报, 2019, 50(11): 2392-2400.
- [16] 赵冬兰, 周志林, 唐 君, 等. 不同基因型甘薯的耐瘠性研究 [J]. 江苏农业科学, 2019, 47(3): 74-78.
- [17] 张绍升. 植物线虫病诊断与治疗 [M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1999.
- [18] ZHANG S L, LIU G K, JANSSEN T, et al. A new stem nematode associated with peanut pod rot in China: morphological and molecular characterization of *Ditylenchus arachidis* n. sp. (Nematoda: Anguinidae) [J]. Plant Pathology, 2014, 63(7): 1197-1206.
- [19] DARRIBA D, TABOADA G L, DOALLO R, et al. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing [J]. Nature Methods, 2012, 9(8): 772.
- [20] XIA X, XIE Z. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution [J]. Journal of Heredity, 2001, 30(7): 1720-1728.
- [21] QIAO K, BAI M, HE Y, et al. Description of *Labrys fuzhouensis* sp. n. and first record of *Coslenchus rafiqi* (Nematoda: Tylenchidae) from China [J]. Nematology, 2019, 21(7): 693-708.
- [22] RONQUIST F, HUELSENBECK J P. MrBayes 3: bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. Bioinformatics, 2003, 19(12): 1572-1574.
- [23] FELSENSTEIN J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach [J]. Journal of Molecular Evolution, 1981, 17(6): 368-376.
- [24] STAMATAKIS A, HOOVER P, ROUGEMONT J. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers [J]. Systematic Biology, 2017, 57(5): 758-771.
- [25] THORNE G. *Ditylenchus destructor* n. sp. the potato rot nematode, and *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev, 1936, the teasel nematode (Nematoda: Tylenchidae). [J]. Proceedings of the Helminthological Society of Washington, 1945, 12(2): 27-33.
- [26] GOODEY J B. Investigations into the host ranges of *Ditylenchus destructor* and *D. dipsaci* [J]. Annals of Applied Biology, 1952, 39(2): 221-228.
- [27] 张绍升, 章淑玲, 王宏毅, 等. 甘薯茎线虫的形态特征 [J]. 植物病理学报, 2006, 36(1): 22-27.
- [28] WU L Y. Comparative study of *Ditylenchus destructor* thorne, 1945 (Nematoda: Tylenchidae), from potato, bulbous iris, and dahlia, with a discussion of de Man's ratios [J]. Canadian Journal of Zoology, 1960, 38(6): 1175-1187.
- [29] JONES B L. First report of *Ditylenchus destructor* in pods and seeds of peanut [J]. Plant Disease, 1988, 72(5): 453-453.
- [30] 于海英, 彭德良, 胡先奇, 等. 马铃薯腐烂茎线虫 28S rDNA-D2/D3 区序列分析 [J]. 植物病理学报, 2009, 39(3): 254-261.
- [31] 王宏宝, 毛 佳, 李 茹, 等. 不同地理来源腐烂茎线虫种群杂交后代致病力测定 [J]. 华北农学报, 2011, 26(6): 212-216.
- [32] 丁 中, 彭德良, 高必达. 不同地理种群甘薯茎线虫乙酰胆碱酯酶对抑制剂的敏感性 [J]. 植物保护学报, 2007, 34(4): 410-414.
- [33] 丁 中, 彭德良, 何旭峰, 等. 不同地理种群甘薯茎线虫对不同类型杀线剂的敏感性 [J]. 农药, 2007, 46(12): 63-65.
- [34] 徐 振, 孙厚俊, 杨冬静, 等. 甘薯茎线虫在南方薯区的发生风险及影响因素研究 [J]. 广西农学报, 2017, 32(3): 26-29.

(责任编辑: 陈海霞)