

云南昆明烟草主产区根结线虫种类及分布研究*

徐兴阳¹, 彭昌田², 顾进坤¹, 李凤丽³, 李浩昊¹, 李 顺¹, 胡先奇⁴

(1. 云南省烟草公司 昆明市公司, 云南 昆明 650051; 2. 红河佳裕农业科技有限公司, 云南 红河 654300;
3. 云南省烟草公司 文山州公司, 云南 文山 663000; 4. 云南农业大学 植物保护学院, 云南 昆明 650201)

[摘要] 近年来, 昆明市烟草种植区的烟草根结线虫病为害逐年加重, 严重损害了烟草的产量和质量, 对烟草产业发展带来较大的影响. 为确定昆明市所辖, 安宁市、石林县、富民县、晋宁区、禄劝县、嵩明县、寻甸县、宜良县烟草根结线虫病病原种类, 分析掌握根结线虫种类分布及优势种, 以期防治提供理论依据, 从该8县(市、区)采集烟草根结线虫病标本, 运用形态学和分子生物学鉴定方法, 鉴定根结线虫种类. 形态学鉴定指标主要包括: 雌成虫会阴花纹形态、2龄幼虫及雌成虫形态测量. 分子生物学鉴定主要通过 SCAR-PCR 检测技术完成. 结果表明: 采集自8县(市、区)的烟草根结线虫病标本109份中, 经鉴定应有不少于4种根结线虫, 且存在混合发生(复合侵染), 其分别是南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*)、花生根结线虫(*Meloidogyne arenaria*)、爪哇根结线虫(*Meloidogyne javanica*)和未知种(*Meloidogyne sp.*). 其中分离鉴定到南方根结线虫的标本97份, 占比89.0%; 花生根结线虫45份, 占比41.3%; 爪哇根结线虫58份, 占比53.2%; 未知种14份, 占比12.8%. 复合侵染组合为: 南方根结线虫与花生根结线虫, 南方根结线虫与爪哇根结线虫, 花生根结线虫与爪哇根结线虫, 南方根结线虫、花生根结线虫与爪哇根结线虫, 存在上述复合侵染组合的标本数分别占标本总数的12.8%, 49.5%, 17.4%和11.9%. 南方根结线虫为优势种, 其次是爪哇根结线虫和花生根结线虫. 此外, 还明确了上述根结线虫在8县(市、区)的具体分布.

[关键词] 烟草; 根结线虫; 形态鉴定; 分子生物技术鉴定

[中图分类号] S435.72 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5639(2023)06-0001-09

DOI: 10.14091/j.cnki.kmxyxb.2023.06.001

烟草具有重要经济价值, 其产业在我国具有重要地位. 烟叶生产可以帮助烟农增收, 巩固全面脱贫实现全面小康, 助力乡村振兴. 在烟叶生产中, 烟草病虫害可直接影响烟叶的品质与产量, 成为烟叶生产的重要制约因素. 当前, 我国较为流行的烟草病害主要包括烟草黑胫病、烟草花叶病、番茄斑萎病毒病、烟草根结线虫病和赤星病等, 其中烟草根结线虫病备受关注.

烟草根结线虫病属于世界性病害, 在我国各大烟区呈逐渐加重趋势, 造成重大经济损失, 已成为烟草生产的重要限制因子. 朱斌等^[1]研究表明陕南烟区烟草根结线虫病发病率最高可达100%. 云南烟草根结线虫病年发病面积超过 $3.3 \times 10^4 \text{ hm}^2$, 损失烟叶比例范围在20.0%~30.0%, 严重达50.0%以上^[2], 其中昆明烟草受根结线虫危害最严重的一次其局部连片受灾面积达到 400 hm^2 ^[3].

根结线虫(*Meloidogyne spp.*)属于垫刃目(Tylenchida), 异皮科(Heteroderidae), 根结线虫属(*Meloidogyne*), 其适应能力和繁殖能力强, 寄主植物超过3000种^[4]. 根结线虫幼虫有4个龄期, 从卵中孵化出的2龄幼虫具有侵染能力, 2龄幼虫主要从根冠伸长区侵入寄主, 通过口针的穿刺作用使食道腺分泌的酶入侵根部组织, 导致根结的形成^[5].

我国烟草根结线虫病主要有南方根结线虫(*M. incognita*)、爪哇根结线虫(*M. javanica*)、花生根结线虫

* [收稿日期] 2023-05-07

[作者简介] 徐兴阳, 男, 云南盐津人, 云南省烟草公司昆明市公司高级农艺师, 硕士, 研究方向为烟草新品种选育、栽培技术.

[基金项目] 中国烟草总公司云南省公司重点科技项目(2020530000241020); 云南省烟草公司昆明市公司一般科技项目(KMYC202302).

(*M. arenaria*) 和北方根结线虫 (*M. hapla*)^[6], 根据已有的调查结果, 在我国大部分地区, 南方根结线虫是主要的优势种. 对烟草根结线虫的鉴定主要采用形态特征和分子生物学特征分析. 形态特征主要包括: 雌成虫会阴花纹、雌成虫和2龄幼虫形态特征. 分子生物学鉴定常用方法主要有聚合酶链反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR)、序列特异性扩增区 (Sequence Characterized Amplified Region, SCAR) 等. Carolien 等^[7] 基于 SCAR-PCR 技术, 设计了3对特异性引物, 准确鉴定出南方根结线虫、爪哇根结线虫和花生根结线虫. 杜惠等^[8] 利用 rDNA-ITS-PCR 技术通过11个根结线虫种群进行分析, 确定甘肃当地蔬菜根结线虫种类为南方根结线虫.

云南省是全国最主要的烟叶产区, 昆明市作为云南烟叶产区的重要组成部分, 其烟叶品质与产量一直深受行业高度关注. 然而, 当前昆明烟草根结线虫病已成为烟草种植过程中的主要病害, 局部区域已经成为决定性制约因子. 本文拟通过对昆明全市烟草主要种植区开展根结线虫病病害调查及病原鉴定, 以确定根结线虫种类及分布, 以期科学指导防控提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

1.1.1 主要仪器

显微镜 (Leica DM 2000); PCR 仪 (Applied Biosystems 2720 型); 电子天平 (先行者); 超低温冷冻储存箱 (DM-HL 398 S 型、DM-HL 528 S 型, 中科美菱生产); 标准检验筛; 移液枪; 凝胶成像仪 (LG 2020 型, 杭州朗基科学仪器有限公司生产); LX-100 手掌型离心机 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司).

1.1.2 主要试剂

10 × PCR Buffer (Mg^{2+} , free); 25 mmol/L $MgCl_2$ 、Tap 酶; dNTPs; 蛋白酶 K (20 mg/mL); DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒; DL 200 DNA MarKer; 6 × Loading Buffer.

1.2 根结线虫样本采集与保存

2021年9月8日至14日, 昆明市烟草技术中心集中采集109个根结线虫病样本. 采集地点主要是昆明市8县(市、区)的主要种植区, 以烟站为单位, 根据面积大小每个烟站取1~3个样本, 对样本进行编号, 取根部于自封袋中4℃保存(表1).

表1 烟草根结线虫病样本信息

项目	安宁	富民	晋宁	禄劝	石林	嵩明	寻甸	宜良	合计
烟站数/个	1	4	5	9	7	4	13	7	49
样本数/个	3	6	12	21	14	13	27	13	109
样本编号	A1 ~ A3	F1 ~ F6	J1 ~ J2	L1 ~ L21	Sh1 ~ Sh14	S1 ~ S13	X1 ~ X27	YI ~ Y13	-

1.3 根结线虫种类鉴定

1.3.1 根结线虫各虫态的收集

1) 雌成虫收集

将患根结线虫病烟株根部用水冲洗干净, 采用直接解剖法获取雌成虫^[9]. 在体视镜下, 用镊子固定好根, 再轻轻挑起根结外部组织, 直到雌虫外部植物组织处理干净为止, 然后在雌虫的一侧由底部慢慢挑起成熟饱满的雌虫, 一部分用于分子鉴定, 另一部分用于会阴花纹鉴定及测量.

2) 卵块及2龄幼虫的收集

在体视镜下, 直接从根结中挑取乳白色、透明、粘状物的卵块堆积物, 获得的卵块放入10 mL离心管中, 加入适量清水, 在室温或28℃恒温培养箱中孵化.

1.3.2 土壤中2龄幼虫的收集及计数

使用浅盘法分离土壤中2龄幼虫: 取干净盆筛, 在筛上铺面巾纸, 称取100 g土壤平铺于纸上, 向盆中注入适量清水, 水量以刚浸湿土壤为宜, 水平静置48 h后, 用上层100目、下层500目的套筛冲洗盆底的线虫悬浮液, 收集500目筛上的2龄幼虫至直径约为6 cm的培养皿中, 水平静置过夜后计数.

1.3.3 根结线虫形态学鉴定

雌成虫会阴花纹鉴定具体步骤参考徐兴阳等^[10]的方法, 具体步骤如下:

- 1) 在雌成虫收集选中选出成熟饱满的雌虫, 放入干净的并滴有 45% 乳酸的有机玻璃板上;
- 2) 在解剖镜下, 用解剖刀切取含有会阴花纹的角质膜, 并在乳酸中用柔软的纤维刷刷轻轻刷洗角质膜上黏附的组织, 清洗干净;
- 3) 取干净的载玻片, 以甘油作为浮载剂, 于显微镜下观察并拍照记录.

雌成虫形态测量方法: 把制作好拨片放入 LEICA 显微镜下于 LASAF 软件下进行测量, 每个种群至少测量 20 头雌成虫^[11]. 具体测量指标见表 2.

2 龄幼虫形态测量方法: 将 2 龄幼虫置于 63 ~ 65 °C 的水浴锅中水浴 2 ~ 3 min 杀死后, 用 4% 甲醛溶液固定保存^[12], 用于形态指标测量, 具体指标见表 2.

使用 Excel 2016 统计并计算各个测量指标, 最终以“平均值 ± 标准差 (最小值 - 最大值)”的形式表述.

1.3.4 根结线虫分子生物学鉴定

DNA 提取参照 Adam 等^[13]的方法, 略微改进, 具体步骤如下:

- 1) 完成灭菌的 PCR 管加入 5 μL ddH₂O;
- 2) 挑选其成熟的雌成虫放入 PCR 管中;
- 3) 用灭菌枪头将虫体刺破;
- 4) 加入 5 μL 的细胞裂解液 (1 μL 10 × PCR Buffer (Mg²⁺, free)、0.8 μL MgCl₂、0.05 μL 蛋白酶 K、3.15 μL ddH₂O, 放入液氮中冷冻 20 min, 加入 10 μL 液状石蜡, 短暂离心, 置于 PCR 仪中 56 °C 反应 80 min, 95 °C 反应 15 min, 得到根结线虫 DNA 提取液.

rDNA-ITS 区、mtDNA-COI 区序列进行扩增, 具体方法如下:

根据形态鉴定出本次实验主要种群, 由此采用特异引物进行扩增反应, 反应体系、引物和反应程序分别为表 3、表 4 和表 5. PCR 反应完成后, 用 5 μL 的扩增产物与 1 μL 6 × DNA Loading buffer 混合, 注入 1.2% 的琼脂糖凝胶孔中, 110 V、180 mA 条件下电泳 30 min, 使用凝胶成像系统观察拍照.

表 2 形态测量指标及符号

测量指标名称	测量指标符号
体长	L
体宽	W
口针长	ST
口针基部球宽	STKW
口针基部球高	STKH
背食道腺开口到口针基部球距离	DGO
中食道球长	MEH
中食道球宽	MEW
中食道球瓣到头端距离	MEV-HE
尾长	TALL
透明尾长	TTL
肛门处虫体宽	Wa

表 3 PCR 扩增反应试剂及用量 μL

试剂	用量
10 × PCR Buffer (Mg ²⁺ , Plus)	2.50
dNTPs (Mixture)	2.00
前引物	1.00
后引物	1.00
DNA 模板 DNA-template	2.50
Tap 酶 Tap polymerase	0.25
ddH ₂ O	16.25

表 4 所用引物信息

根结线虫种类	引物	引物序列	产物大小
<i>M. incognita</i>	Finc	CTCTGCCCAATGAGCTGTCC	1 200 bp
	Rinc	CTCTGCCCTCACATTAAG	
<i>M. javanica</i>	Fjav	GGTGCGCGATTGAACTGAGC	670 bp
	Rjav	CAGGCCCTCAGTGGAACTATAC	
<i>M. arenaria</i>	Ma-F	TCCGCCGATAGAGGTAATGAC	420 bp
	Ma-R	TCCGCCGATAGACTACAACCT	

表 5 PCR 反应程序

引物	预变性	反应参数 (35 个循环)			后延伸
		变性	退火	延伸	
Finc/Rinc	94 °C; 4 min	94 °C; 30 s	55 °C; 30 s	72 °C; 1 min	72 °C; 10 min
Fjav/Rjav	94 °C; 4 min	94 °C; 30 s	64 °C; 30 s	72 °C; 1 min	72 °C; 10 min
Ma-F/Ma-R	94 °C; 4 min	94 °C; 30 s	60 °C; 30 s	72 °C; 1 min	72 °C; 10 min

2 结果与分析

2.1 昆明产区土壤中2龄幼虫数量统计

从表6可知,各地区土壤中根结线虫2龄幼虫数量按以下顺序依次降低:嵩明、寻甸、石林、禄劝、富民、晋宁、宜良、安宁.其中嵩明产区土壤中2龄幼虫数量最多,高达每100g土壤中585.90头.

表6 各县(市、区)土壤样本中2龄幼虫的平均数量 头/(100g土壤)

安宁	富民	晋宁	禄劝	石林	嵩明	寻甸	宜良
91.22	320.83	278.88	330.62	376.07	585.90	454.09	232.15

2.2 烟草根结线虫形态学鉴定

经形态学分析,昆明烟区发生根结线虫主要有南方根结线虫、花生根结线虫、爪哇根结线虫和未知根结线虫,其线虫种类间具有复合侵染特征.在109个样品中,检出存在南方根结线虫样本占89.0%,花生根结线虫占41.3%,爪哇根结线虫占53.2%,未知线虫占12.8%.可见昆明产区危害烟草根结线虫的种类以南方根结线虫为主,爪哇根结线虫和花生根结线虫次之.

2.2.1 烟草根结线虫形态特征及种类描述

根结线虫各个种之间存在着细微的差别,此差别可以成为重要的鉴定依据,3种根结线虫形态特征描述及比较列于表7.

表7 根结线虫形态特征描述及比较

虫态	南方根结线虫	花生根结线虫	爪哇根结线虫
雌虫	圆形或鸭梨形,虫体肿大,口针锥部向背面弯曲,口针基部球扁圆形,与基杆分界明显(图1(d)、图1(e))	虫体近球形,头区有一环纹.口针粗壮,向后逐渐变粗,口针基部球椭圆形,中食道球近圆形(图2(d)、图2(e))	虫体近梨形,有明显颈部,颈部与虫体分界明显,口针纤细,基杆柱状,基球与基杆界限明显(图3(d)、图3(e))
2龄幼虫	线形,热杀后体直或略有弯曲,中前部宽向两端变细,尾端最细.口针纤细,口针基部球较小,透明尾明显(图1(a)~图1(c))	线形,热杀死后体略向腹面弯曲,尾细长(图2(a)~图2(c))	热杀后虫体略向腹部弯曲,口针纤细,基球小,近圆形.中食道球明显,尾尖圆或尖(图3(a)~图3(c))

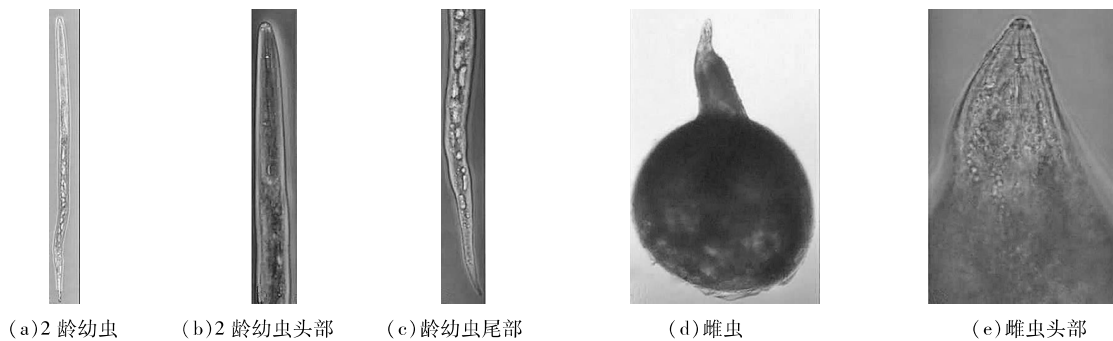


图1 南方根结线虫雌成虫和2龄幼虫

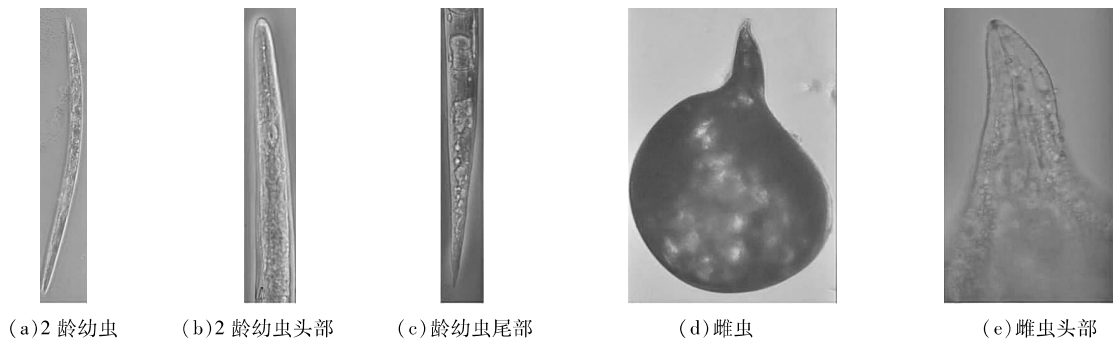


图2 花生根结线虫雌成虫和2龄幼虫

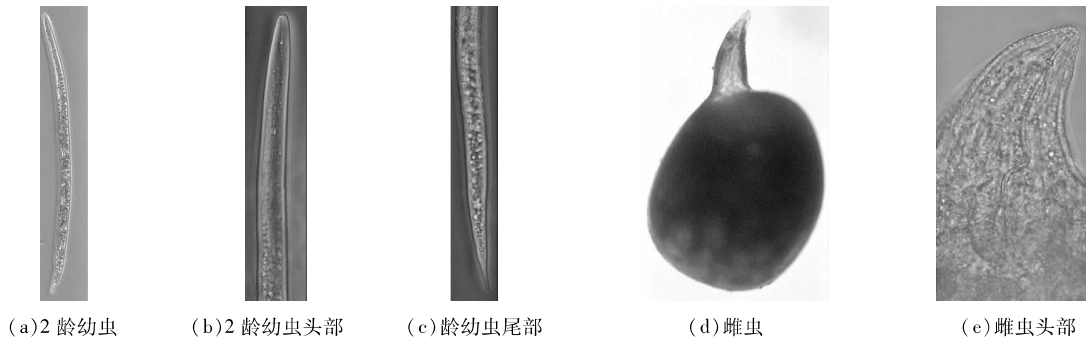


图3 爪哇根结线虫雌成虫和2龄幼虫

2.2.2 会阴花纹形态特征

会阴花纹是品种鉴别的一个重要指标, 3种不同的根结线虫进行了描述和对比列于表8.

表8 会阴花纹特征描述及比较

南方根结线虫	花生根结线虫	爪哇根结线虫
背弓高、大且明显, 近方形, 线纹波浪状; 侧线不明显, 有一些弯向阴门的线纹 (图4 (b))	背弓较低圆, 侧线附近有由稍呈锯齿状的背线形成的肩状突起, 侧线不明显, 一些线纹交叉并且不规则 (图4 (a))	背弓中等, 具有稍波浪状线纹把花纹分成背区和腹区的明显的沟形侧线 (图4 (c))

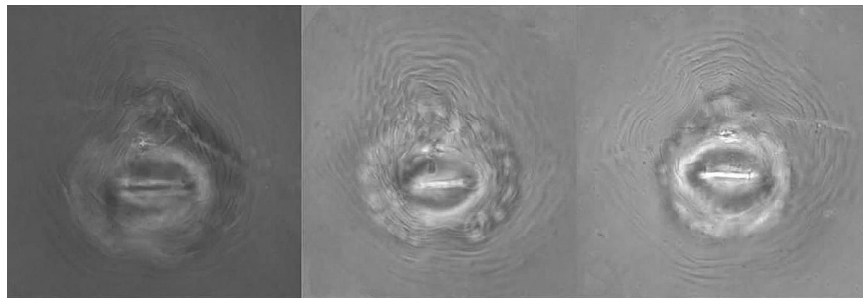


图4 根结线虫雌成虫会阴花纹

对2龄幼虫及雌成虫进行测量后统计2龄幼虫测量值 (表9), 及雌成虫的测量值 (表10), 并进行比较. 结果表明其测量数据与赵洪海等^[11]描述基本相符.

表9 昆明产区烟草根结线虫2龄幼虫形态指标

形态指标	花生根结线虫		南方根结线虫		爪哇根结线虫	
	本文测量值	文献 [11] 测量值	本文测量值	文献 [11] 测量值	本文测量值	文献 [11] 测量值
L	458.22 ± 106.69 (55.64 ~ 556.15)	451.1 (410.0 ~ 485.0)	467.08 ± 34.36 (407.04 ~ 531.04)	427.4 (390.0 ~ 481.0)	423.63 ± 55.77 (323.76 ~ 617.49)	434.8 (380.0 ~ 470.0)
W	19.19 ± 2.80 (13.22 ~ 25.30)	16.5 (15.0 ~ 17.5)	19.03 ± 3.12 (13.92 ~ 28.42)	15.6 (15.0 ~ 16.5)	16.50 ± 2.14 (13.67 ~ 21.09)	14.3 (12.8 ~ 15.8)
TAIL	50.92 ± 8.82 (38.07 ~ 64.22)	50.6 (42.5 ~ 61.3)	46.29 ± 10.74 (19.35 ~ 63.51)	60.0 (50.0 ~ 62.5)	41.61 ± 8.28 (25.62 ~ 52.66)	54.2 (46.3 ~ 61.3)
TTL	19.13 ± 4.11 (14.01 ~ 26.81)	17.0 (12.5 ~ 21.9)	20.61 ± 5.00 (7.82 ~ 29.15)	14.9 (12.2 ~ 17.8)	5.88 ± 2.66 (9.40 ~ 20.05)	14.3 (12.3 ~ 17.5)
ST	12.84 ± 3.07 (3.11 ~ 15.74)	12.3 (11.6 ~ 13.1)	14.63 ± 1.02 (11.35 ~ 17.11)	12.0 (11.2 ~ 12.5)	13.88 ± 0.86 (1.25 ~ 3.63)	12.4 (11.2 ~ 13.3)
STKH	4.51 ± 5.16 (1.24 ~ 15.79)	1.1 (1.0 ~ 1.3)	2.00 ± 0.42 (1.42 ~ 2.84)	0.9 (0.8 ~ 1.1)	2.05 ± 0.66 (1.25 ~ 3.63)	1.1 (1.1 ~ 1.3)
STKW	80.14 ± 339.73 (1.41 ~ 3.65)	1.5 (1.3 ~ 1.8)	2.36 ± 0.45 (1.69 ~ 3.30)	1.5 (1.2 ~ 1.8)	2.45 ± 0.75 (1.36 ~ 4.45)	1.9 (1.6 ~ 2.3)

续表 9

μm

形态指标	花生根结线虫		南方根结线虫		爪哇根结线虫	
	本文测量值	文献 [11] 测量值	本文测量值	文献 [11] 测量值	本文测量值	文献 [11] 测量值
MEL	8.86 ± 3.89 (1.90 ~ 13.73)	12.7 (11.3 ~ 13.8)	12.03 ± 1.98 (7.94 ~ 15.06)	12.5 (11.2 ~ 13.8)	10.53 ± 1.65 (7.42 ~ 12.96)	7.9 (7.5 ~ 8.8)
MEW	7.81 ± 2.59 (2.77 ~ 12.01)	8.0 (7.5 ~ 8.8)	8.71 ± 1.40 (6.17 ~ 11.31)	8.2 (7.5 ~ 9.2)	6.89 ± 1.03 (4.91 ~ 8.57)	12.9 (12.3 ~ 13.8)
DGO	6.30 ± 3.36 (2.91 ~ 13.28)	3.6 (3.0 ~ 4.1)	4.34 ± 1.03 (2.37 ~ 6.71)	2.9 (2.5 ~ 3.5)	4.06 ± 1.11 (2.17 ~ 6.52)	3.6 (3.1 ~ 4.0)
MEV-HE	47.19 ± 22.56 (9.42 ~ 70.25)	61.9 (58.8 ~ 68)	61.59 ± 4.10 (51.20 ~ 70.41)	58.5 (54.0 ~ 62.5)	52.28 ± 10.23 (27.10 ~ 69.34)	601.2 (55.0 ~ 65.0)
Wa	21.17 ± 21.87 (7.25 ~ 72.09)	10.3 (9.8 ~ 11.4)	9.29 ± 1.36 (7.00 ~ 11.47)	11.4 (10.2 ~ 12.8)	9.40 ± 1.12 (7.50 ~ 11.93)	9.1 (7.8 ~ 10.9)

表 10 昆明产区烟草根结线虫雌成虫形态指标

μm

形态指标	花生根结线虫		南方根结线虫		爪哇根结线虫	
	本文测量值	文献 [11] 测量值	本文测量值	文献 [11] 测量值	本文测量值	文献 [11] 测量值
L	768.87 ± 185.05 (527.01 ~ 1356.43)	774.5 (630.0 ~ 1025.0)	863.60 ± 270.00 (83.47 ~ 1218.89)	654.2 (504.0 ~ 870.0)	875.21 ± 217.58 (217.63 ~ 1236.74)	739.5 (585.0 ~ 860.0)
W	503.59 ± 106.80 (389.87 ~ 668.43)	545.5 (430.0 ~ 670.0)	520.45 ± 169.66 (62.14 ~ 784.36)	426.0 (312.0 ~ 570.0)	534.53 ± 113.40 (138.89 ~ 685.49)	449.7 (325.0 ~ 600.0)
ST	15.74 ± 4.20 (4.18 ~ 22.65)	16.1 (13.8 ~ 18.8)	17.37 ± 3.83 (10.33 ~ 5.13)	15.8 (14.0 ~ 17.9)	16.66 ± 5.59 (6.84 ~ 35.52)	16.1 (14.8 ~ 17.5)
STKW	1.73 ± 0.41 (2.25 ~ 3.11)	3.8 (3.5 ~ 4.1)	3.23 ± 0.75 (1.99 ~ 5.13)	3.8 (2.8 ~ 4.8)	3.24 ± 0.98 (1.67 ~ 5.66)	3.7 (2.8 ~ 4.8)
STKH	3.08 ± 0.82 (3.11 ~ 5.69)	2.1 (1.5 ~ 2.5)	4.46 ± 1.32 (2.83 ~ 9.15)	1.9 (1.5 ~ 2.4)	4.36 ± 1.14 (2.50 ~ 7.64)	2.0 (1.5 ~ 2.5)
DGO	3.39 ± 1.41 (2.91 ~ 7.56)	4.9 (4.3 ~ 6.0)	4.67 ± 0.89 (3.30 ~ 7.25)	4.2 (3.0 ~ 5.5)	4.45 ± 1.48 (2.86 ~ 9.39)	4.5 (3.5 ~ 5.6)
MEL	39.19 ± 6.82 (13.00 ~ 39.19)	54.9 (50.0 ~ 58.8)	29.86 ± 8.06 (18.37 ~ 43.96)	50.7 (37.5 ~ 65.3)	32.10 ± 8.90 (14.81 ~ 47.95)	48.5 (40.0 ~ 60.0)
MEW	31.14 ± 7.43 (9.21 ~ 37.41)	44.9 (37.5 ~ 50.0)	31.06 ± 16.49 (12.68 ~ 93.98)	42.8 (35.0 ~ 48.8)	30.33 ± 7.49 (15.99 ~ 41.48)	43.6 (35.0 ~ 52.5)
MEV-HE	65 ± 18.06 (25.47 ~ 101.59)	73.3 (67.5 ~ 78.8)	79.00 ± 17.33 (41.62 ~ 107.06)	72.7 (57.5 ~ 81.3)	76.10 ± 24.48 (33.25 ~ 135.41)	77.5 (67.5 ~ 95.0)

2.3 昆明产区烟草根结线虫混合侵染结果及分析

由表 11 可知, 昆明产区主要的根结线虫有 3 个种, 组成的混合侵染有 4 种类型, 混合侵染样品占样本总数比例分别是 12.8%、49.5%、17.4% 和 11.9%, 合计达到 91.6%。可见在 4 种混合侵染中南方根结线虫/爪哇根结线虫混合侵染比重最大, 其余种类复合侵染比重相对较少。

表 11 昆明产区烟草根结线虫混合侵染形态鉴定结果

鉴定 (n = 109)	N/H	N/Z	H/Z	N/H/Z
混合侵染样品数/个	14	54	19	13
占比/%	12.8	49.5	17.4	11.9

2.4 分子生物学鉴定分析

应用 SCAR 技术进行根结线虫 DNA 的 PCR 扩增。南方根结线虫、花生根结线虫和爪哇根结线虫目的条带分别约为 1 200, 420, 700 bp (图 5、图 6、图 7)。

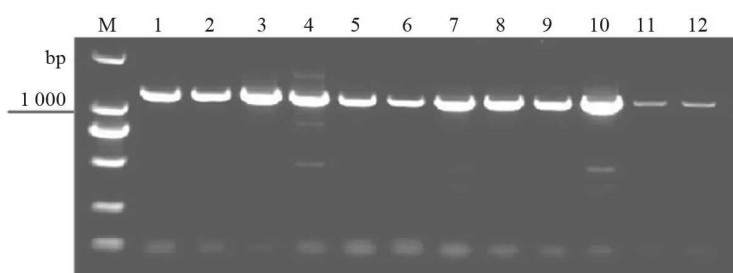


图5 南方根结线虫 PCR 扩增片段电泳图

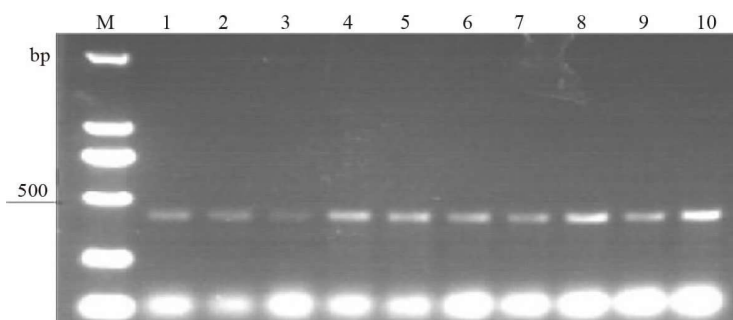


图6 花生根结线虫 PCR 扩增片段电泳图

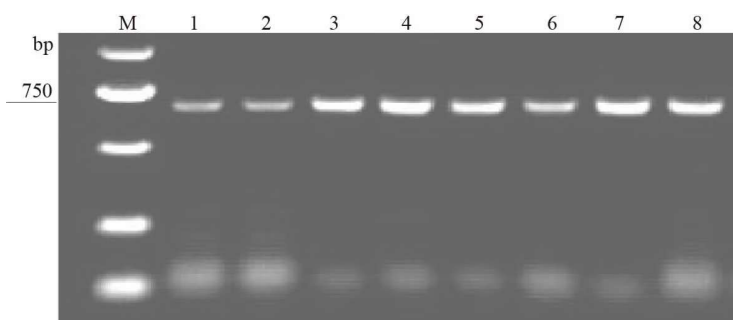


图7 爪哇根结线虫 PCR 扩增片段电泳图

2.5 昆明产区烟草根结线虫主要种类分布

通过形态学和分子生物学技术结合, 本次在昆明8县(市、区)采集的109个标本中鉴定出3种根结线虫, 分别是南方根结线虫、花生根结线虫和爪哇根结线虫, 它们在所调查的县(市、区)均有发现, 具体分布及混合种群的情况详见表12、表13.

表12 根结线虫侵染样品数(包括混合侵染)分布

县(市、区)	南方根结线虫	花生根结线虫	爪哇根结线虫	未知种
安宁	3	0	3	0
富民	5	1	4	0
晋宁	10	4	7	0
禄劝	20	3	11	5
石林	14	1	8	5
嵩明	13	12	8	1
寻甸	27	17	11	3
宜良	5	7	6	0

表13 根结线虫混合侵染检测样品数分布

县(市)	N/H	N/Z	H/Z	N/H/Z
安宁	0	3	0	0
富民	1	3	1	1
晋宁	2	6	4	3
禄劝	3	11	1	2
石林	1	11	0	0
嵩明	2	8	3	2
寻甸	2	10	4	2
宜良	3	2	6	3

3 讨论

通过形态学、分子生物学鉴定方法对昆明8县(市、区)烟草根结线虫种类进行鉴定,109个病害样品共鉴定出:南方根结线虫97份占比89.0%,花生根结线虫45份占比41.3%,爪哇根结线虫58份占比53.2%,未知种14份占12.8%,混合侵染南方根结线虫与花生根结线虫样本占比12.8%,南方根结线虫与爪哇根结线虫混合侵染样品占比49.5%,花生与爪哇根结线虫混合侵染样品占比17.4%,南方根结线虫、花生根结线虫和爪哇根结线虫混合侵染样品占比11.9%。通过以上数据可以看出南方根结线虫为优势种,其次是爪哇根结线虫和花生根结线虫。

4种主要根结线虫^[6]在我国均有发现,但北方根结线虫只在较为寒冷地区,如在贵州、河南等地有所发现^[14,15]。2016年在临沧、玉溪、曲靖、文山及云南省1997年分别检出了南方根结线虫、花生根结线虫、爪哇根结线虫,以花生根结线虫为主要病原,并对其进行了研究^[9]。1998年喻盛甫等研究发现,在云南省烟草根结线虫的优势种群由南方根结线虫转变为花生根结线虫^[16]。1998年在河南、湖北和四川^[17]和2013年在昆明主要县(区、市)^[3],同时检测出南方根结线虫、花生根结线虫和爪哇根结线虫,其中南方根结线虫为优势种群。

喻盛甫等1998年研究发现云南省烟草根结线虫主要群体从南方根结线虫向花生根结线虫转移^[16]。徐兴阳等2013年研究发现昆明主要县区烟草根结线虫优势种群为南方根结线虫^[3],1998年—2013年15年时间中,昆明产区烟草根结线虫优势种群为南方根结线虫,预示着品种布局的变化可能是改变昆明烟草主产区根结线虫优势种群的重要因子。本次实验得出南方根结线虫占比高达89.0%,根据南方根结线虫的为害特性,根结线虫病可能将对昆明烟草的产量、质量及生态环境、经济收益造成重大影响。

1991年张绍升发现同一株由多种根结线虫共同侵染的烟草病株^[18];2017年徐兴阳等对昆明市主要烟区进行根结线虫初步鉴定中发现混合侵染占11.54%,主要为花生根结线虫和爪哇根结线虫混合侵染^[19];杨艳梅等^[20]在昆明、曲靖和玉溪的主要烟区调查发现调查样本中混合侵染达到40.75%。本次调查也发现混合侵染存在,总和达到了91.6%。这和以往的研究报到总体相符,但混合侵染占比有了明显增加。这一结果或许预示着,烟草下一步的育种目标中应考虑抗多种根结线虫烟草品种的培育,在现阶段的生产实践中应加强对混合侵染的预防和关注。

4 结论

通过形态学及分子生物学鉴定,明确了危害昆明8县(市、区)烟草的根结线虫有:南方根结线虫、花生根结线虫和爪哇根结线虫,占比分别是89.0%、41.3%和53.2%,未知种占12.8%。混合侵染种类为:南方根结线虫与花生根结线虫,南方根结线虫与爪哇根结线虫,花生根结线虫与爪哇根结线虫,南方根结线虫、花生根结线虫与爪哇根结线虫,占比分别是12.8%、49.5%、17.4%和11.9%。

[参考文献]

- [1] 朱斌,王军,乔永信. 陕南烟草根结线虫病发病规律研究初报 [J]. 陕西农业科学, 2005, 51 (1): 6-8.
- [2] 秦西云,段玉琪,杨铭. 云南烟草根结线虫病病原鉴定初报 [J]. 云南农业科技, 1991 (4): 22-23.
- [3] 徐兴阳,罗华元,饶智,等. 昆明植烟土壤根结线虫种群动态研究 [J]. 昆明学院学报, 2013, 35 (6): 11-14.
- [4] 刘维志. 植物病原线虫学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 243.
- [5] ABAD P, FAVERY B, ROSSO M N, et al. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction [J]. Molecular Plant Pathology, 2003, 4 (4): 217-224.
- [6] 施河丽,彭五星,左梅,等. 湖北恩施烟区长期连作烟田影响南方根结线虫密度的土壤理化特性分析 [J]. 烟草科技, 2020, 53 (12): 9-15.
- [7] DONKERS-VENNE D T H M, FARGETTE M, ZIJLSTRA C. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterized amplified region (SCAR) based PCR assays [J]. Nematology, 2000, 2 (8): 847-853.
- [8] 杜蕙,漆永红,吕和平,等. 甘肃省保护地蔬菜根结线虫种类鉴定及其 rDNA-ITS 序列分析 [J]. 植物保护, 2013, 39 (1): 93-96.

- [9] 陈永芳, 喻盛甫, 陈海如, 等. 云南省烟草根结线虫的比较鉴定及种类分布研究 [J]. 中国烟草学报, 1997, 3 (2): 33-40.
- [10] 徐兴阳, 杨艳梅, 李杰, 等. 昆明烟区根结线虫种类及生防制剂防效评价 [J]. 昆明学院学报, 2017, 39 (6): 1-6.
- [11] 刘维志. 植物线虫志 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 317-405.
- [12] 杨艳梅, 刘沛, 董涵, 等. 云南省紫茎泽兰根结线虫病病原种类鉴定 [J]. 植物保护学报, 2020, 47 (3): 657-665.
- [13] ADAM M A M, PHILIPS M S, BLOK V C. Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) [J]. Plant Pathology, 2007, 56 (1): 190-197.
- [14] 莫明和, 桑维均, 张克勤, 等. 分布于南方的北方根结线虫初报 [J]. 西南农业学报, 1997, 10 (增刊 1): 101-104.
- [15] 焦永吉, 王闷灵, 赵云波, 等. 河南省烟草根结线虫种类的 PCR 鉴定与种群分析 [J]. 中国烟草学报, 2014, 20 (3): 79-83.
- [16] 喻盛甫, 胡先奇, 王扬. 云南烟草根结线虫优势种群动态规律研究 [J]. 云南农业大学学报, 1998, 13 (1): 52-58.
- [17] 王年, 石金开, 孔凡玉, 等. 我国烟草根结线虫鉴定与种类分布 [C]//中国植物保护学会青年工作委员会. “植物保护 21 世纪展望”: 植物保护 21 世纪展望暨第三届全国青年植物保护科技工作者学术研讨会文集. 北京: 中国科学技术出版社, 1998: 422-425.
- [18] 张绍升. 烟草根结线虫病的病原鉴定初报 [J]. 中国烟草, 1991, 12 (3): 20-21.
- [19] 徐兴阳, 杨艳梅, 端永明, 等. 昆明烤烟种植区根结线虫种类的初步鉴定 [J]. 云南农业大学学报 (自然科学), 2017, 32 (5): 947-951.
- [20] 杨艳梅, 梁艳, 袁绍杰, 等. 云南省部分烟区根结线虫形态和分子鉴定 [J]. 南方农业学报, 2017, 48 (2): 284-291.

Study on Species and Distribution of Root Knot Nematodes in Main Tobacco Producing Areas of Kunming

XU Xingyang¹, PENG Changtian², GU Jinkun¹, LI Fengli³, LI Haohao¹, LI Shun¹, HU Xianqi⁴

(1. Yunnan Tobacco Company Kunming Branch, Kunming, Yunnan, China 650051;

2. Honghe Jiayu Agricultural Technology Co., Ltd, Honghe, Yunnan, China 654300;

3. Yunnan Provincial Tobacco Company Wenshan Branch, Wenshan, Yunnan, China 663000;

4. School of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan, China 650201)

Abstract: In recent years, the harm of tobacco root knot nematode disease has increased year by year in Kunming tobacco planting area, which has seriously damaged the yield and quality of tobacco and had a great impact on the development of tobacco industry. To determine the pathogen species of tobacco root knot nematode in Anning City, Shilin County, Fuming County, Jinning County, Luquan County, Songming County, Xundian County and Yiliang County, and in order to analyze and master the species distribution and dominant species of root knot nematode, to provide theoretical basis for control, tobacco root knot nematode disease samples were collected from 8 cities (counties), and the species of root knot nematode were identified by means of morphological and molecular biological methods. Morphological indicators mainly include the perineal pattern morphology of female and the morphological measurement data of the second-stage juveniles and female. Molecular biological identification is mainly completed by SCAR-PCR detection technology. The results are as follows: among 109 samples of tobacco root knot nematode disease collected from 8 cities (counties), it is identified that there should be no less than 4 species of root knot nematodes, and with mixed occurrence (complex infection), namely *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* and unknown species (*Meloidogyne* sp.). Among them, *M. incognita* were isolated and identified from 97 specimens accounting for 89.0%, *M. arenaria* 45 specimens 41.3%, *M. javanica* 58 samples 53.2% and 14 unknown species 21 accounting for 12.8% respectively. The compound infection combinations were: *M. incognita* and *M. arenaria*, *M. incognita* and *M. javanica*, *M. arenaria* and *M. javanica*, *M. incognita* and *M. arenaria* and *M. javanica*, accounting for 12.8%, 49.5%, 17.4% and 11.9% respectively. *M. incognita* is the dominant species, followed by *M. javanica*. To sum up, the specific distribution in 8 cities and counties is clarified.

Key words: tobacco; *Meloidogyne* sp.; morphological character; molecular biological methods

(责任编辑: 陈伟超)