

南方根结线虫中国分离群体种内变异分析

冯 辉¹ 赵 敏¹ 周冬梅¹ 张金凤¹ 张爱华² 杨荣明³ 黄文坤⁴ 魏利辉^{1*}

(1. 江苏省农业科学院植物保护研究所, 南京 210014; 2. 泰兴市植物保护植物检疫站, 泰州 225400;

3. 江苏省植物保护植物检疫站, 南京 210036; 4. 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193)

摘要: 为调查我国不同地区和不同寄主上的根结线虫 *Meloidogyne* spp. 种类分布以及群体变异情况, 基于酯酶和苹果酸脱氢酶同工酶图谱及 SCAR 分子标记技术对 2017—2019 年从 6 省 19 种植物根部组织分离到的 40 个根结线虫群体进行鉴定, 针对南方根结线虫 *M. incognita* 群体分别通过寄主鉴别法进行生理小种鉴别, 利用携带 *Mi* 抗性基因的番茄进行毒力测试, 对 2 龄幼虫的口针长度和体长进行测量, 并对核糖体 ITS 和线粒体 *Nad5* 基因序列进行比较分析。结果显示: 根结线虫分离群体经鉴定包括 38 个南方根结线虫群体和 2 个象耳豆根结线虫 *M. erterolobii* 群体; 38 个南方根结线虫群体中有 35 个群体被鉴别为 1 号生理小种, 其余 3 个群体被鉴别为 2 号生理小种; 发现 1 个南方根结线虫群体 CN19 可在携带 *Mi* 抗性基因的番茄上侵染繁殖, 为毒性群体, 其余群体无法进行侵染和繁殖, 为无毒群体。南方根结线虫群体 2 龄幼虫的口针长度和体长均差异较大, 而不同寄主来源分离群体的 ITS 和 *Nad5* 基因序列也存在一定变异。基于 ITS 和 *Nad5* 基因序列构建的系统发育树将所有根结线虫群体归为南方根结线虫和象耳豆根结线虫组成的 2 个独立分支, 但不能确定南方根结线虫不同群体的分子进化与其寄主来源和地理分布之间的相关性。

关键词: 根结线虫; 南方根结线虫; 象耳豆根结线虫; 鉴定; 种内变异; 生理小种; 同工酶图谱

Intraspecific variability of the southern root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in China

Feng Hui¹ Zhao Min¹ Zhou Dongmei¹ Zhang Jinfeng¹ Zhang Aihua²
Yang Rongming³ Huang Wenkun⁴ Wei Lihui^{1*}

(1. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, Jiangsu Province, China;

2. Plant Protection and Quarantine Station of Taixing, Taizhou 225400, Jiangsu Province, China; 3. Plant Protection

and Quarantine Station of Jiangsu Province, Nanjing 210036, Jiangsu Province, China; 4. Institute of Plant

Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: To better understand the geographical distribution, and the pathogenic and genetic variability of the root-knot nematode, a survey was carried out in six provinces of China in 2017—2019. Forty root-knot nematode populations were recovered from 19 host plants and identified by using esterase (Est) and malate dehydrogenase (Mdh) phenotypes as well as the diagnostic SCAR marker. Races of *Meloidogyne incognita* populations were further characterized using pathogenic tests (host plant range and virulence) and morphometrics. The ITS and NADH dehydrogenase subunit 5 (*Nad5*) genes were PCR-amplified from them, and used to generate the phylogenetic trees for these root-knot nematode populations. The results showed that 38 root-knot nematode populations belonged to *M. incognita* with

基金项目: 国家自然科学基金(31871943), 国家现代农业(特色蔬菜)产业技术体系(CARS-24-C-01), 江苏省农业科技自主创新资金(CX(18)2005), 江苏省农业科学院“小而特”学科建设项目(ZX(19)6005)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: weilihui@jaas.ac.cn

收稿日期: 2020-07-07

35 in race 1 and three in race 2, while the other two populations were identified as *M. enterolobii*. Sample CN19, which could multiply in the resistant tomato carrying *Mi* gene, was identified as virulent, while other populations were avirulent. Comparative analysis revealed that morphologic traits (body and stylet lengths) of the second-stage juvenile varied remarkably among populations, while ITS and *Nad5* sequences also exhibited intraspecific variation to some extent. The phylogenetic trees based on ITS and *Nad5* suggested that these populations could be clustered into two main clades, *M. incognita* and *M. enterolobii*. However, the relationship between molecular evolution of different populations of *M. incognita* and the host origins or geographical distance could not be determined.

Key words: root-knot nematode; *Meloidogyne incognita*; *Meloidogyne enterolobii*; identification; intra-specific variation; race; isozyme profile

根结线虫 *Meloidogyne* spp. 是分布最广泛、寄主种类最多、为害严重的植物寄生线虫,能侵染3 000多种植物,每年造成经济损失逾千亿美元(Abad et al., 2003; Jones et al., 2013; 魏洪岩等, 2016)。目前已描述的根结线虫超过100种(Hunt & Handoo, 2009); 中国有记录的近40种,其中南方根结线虫 *M. incognita* 在北方温带地区和南方热带地区皆有分布,可为害蔬菜、水果、药材及园林树木,是中国最主要的根结线虫种类(Xu et al., 2004; 宋志强等, 2013)。象耳豆根结线虫 *M. enterolobii* 最早在我国海南省儋州市的象耳豆树上被发现,因该线虫能在抗性烟草、番茄和棉花上侵染繁殖,被认为是最具威胁性的根结线虫之一(Yang & Eisenback, 1983)。近年来,象耳豆根结线虫有逐渐向我国北方扩散的趋势,已在广东、广西、湖南和浙江等省区发生(吴文涛等, 2019; Zhang et al., 2020)。因此,对根结线虫群体进行有效鉴定、跟踪和监测,有助于制定高效且可持续的根结线虫病防控策略。

传统的根结线虫鉴定方法主要基于形态特征、雌虫会阴花纹和寄主差异等进行分析,但由于根结线虫种间形态特征相似度高而不易分辨、寄主植物筛选过程繁琐等原因导致传统鉴定方法的应用受限。生化鉴定技术如苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase, Mdh)和酯酶(esterase, Est)同工酶图谱分析技术也广泛应用于根结线虫种类鉴定(Esben-shade & Triantaphyllou, 1985; Carneiro et al., 2000); 然而该技术只能利用根结线虫雌虫进行鉴定,且无法区分种内变异(Blok & Powers, 2009)。目前,分子鉴定技术包括DNA多态性分析、特异引物扩增及测序比对等已经被广泛用于植物线虫种类的鉴定和变异研究,该方法灵敏度高、简便而准确(卓侃和廖金铃, 2015)。其中,核糖体内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)和线粒体NADH脱氢酶亚基

5(NADH dehydrogenase subunit 5, *Nad5*)是鉴定根结线虫常用的标记序列。

近20年,有学者对我国部分地区不同寄主来源的根结线虫进行了种类鉴定和变异分析(徐建华等, 1999; 赵洪海, 2000; Xu et al., 2004)。随着我国农业产业结构的调整和栽培模式的改变,根结线虫病发生呈逐年加重趋势,线虫的种群结构不可避免发生了变化,因此持续开展根结线虫种群动态监测和群体遗传分析十分必要。本研究自2017至2019年对我国6省19种不同寄主植物上的根结线虫群体进行调查,通过同工酶图谱和分子检测技术进行种类鉴定;同时对优势种群南方根结线虫生理小种分化、毒力水平、2龄幼虫形态特征以及ITS和*Nad5*基因序列差异及遗传关系进行分析,以期揭示我国根结线虫的地理分布和种间变异特征,为根结线虫病防控策略的制定提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试线虫:在2017—2019年,从我国山东、安徽、江苏、湖北、河南、海南6省采集根结线虫侵染的根组织样本,包括15种蔬菜(番茄、黄瓜、茄子、辣椒和生姜等)、3种水果(甜瓜、西瓜和猕猴桃)、2种经济作物(瓜蒌和向日葵)以及2种木本植物(猕猴桃和梓树)。各植物根组织样本用清水冲洗去除泥沙,浸于0.01%亮蓝染液15 min,用镊子挑取被染成蓝色的单个卵块至盆栽MoneyMaker番茄上进行培养扩繁,获得50个根结线虫分离群体,编号CN1~CN50,由于部分样品量过少或受到污染,最终保留40个根结线虫分离群体供试。爪哇根结线虫 *M. javanica* 由南京农业大学植物保护学院保存并提供。

供试植物:番茄对照品种MoneyMaker和含*Mi*抗性基因品种Motelle、棉花品种DP16及烟草品种

NC95由江苏省农业科学院植物保护研究所保存并提供。供试植物置于盛有灭菌砂壤土(稻田土、河沙和有机质等体积配制)的塑料盆钵中,于(25±3)℃温室中在自然条件下培养,生长至3~4叶期供试。

试剂和仪器:非变性蛋白预制胶,北京索莱宝科技有限公司;PCR扩增相关试剂,成都福际生物技术有限公司;Mdh染液和Est染液,参考Karssen et al.(1995)方法配制,所用试剂和其他试剂均为国产分析纯。Mini PROTEAN Tetra Cell蛋白电泳仪、C1000 Touch PCR仪,美国伯乐公司;DM2500光学显微镜,德国徕卡显微系统有限公司。

1.2 方法

1.2.1 根结线虫种类的鉴定方法

Est和Mdh同工酶鉴定:参考Karssen et al.(1995)方法,并略有修改。将分离获得的40个线虫群体和爪哇根结线虫,分别在显微镜下随机挑取4条雌虫至盛有30 μL预冷蛋白提取缓冲液(含35%甘油、2% Triton X-100和0.01%溴酚蓝)的离心管中,用无菌镊子挤破虫体使虫液释放,以12 000 r/min离心3 min,所得上清液即为供试线虫群体的蛋白提取液。分别取20 μL蛋白提取液上样至8%非变性蛋白预制胶,在150 V电压下进行聚丙烯酰胺凝胶电泳;另在每块凝胶上加入爪哇根结线虫蛋白提取液作为参照。电泳结束后,将凝胶依次置于Mdh染液和Est染液中染色5 min和30 min,再用含10%甘油和10%乙酸的固定液固定3 h。以待测根结线虫的Mdh和Est同工酶酶带与爪哇根结线虫参照酶带的相对迁移率和酶带条数,结合图谱表型查询表判断根结线虫种类(OEPP/EPPO, 2016)。

SCAR分子标记分析:单条线虫DNA提取参照冯辉等(2016)方法进行,并略有修改。在显微镜下,从植物病根组织中随机挑取单条雌虫至盛有10 μL 1×PCR缓冲液(不含Mg²⁺)的PCR管中,加入2 μL的1 mg/mL蛋白酶K并充分混匀,随即在液氮中冷冻20 min,置于PCR仪中于65℃孵育1 h,最后95℃反应10 min,即为单条根结线虫DNA粗提液。每个分离群体至少制备3个独立DNA样本。应用南方根结线虫特异性引物MiSCAR-F(5'-GTGAGGATTC-AGCTCCCCAG-3')和MiSCAR-R(5'-ACGAGGAA-CATACTTCTCCGTCC-3')进行PCR扩增(Meng et al., 2004),所用引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。25 μL PCR反应体系:PCR Hero™ Mix 12.5 μL、DNA粗提液5 μL、10 μmol/L正反向引物各1 μL, ddH₂O水补足至25 μL。PCR反应条件:

94℃预变性3 min;94℃变性10 s,56℃退火10 s,72℃延伸30 s,35个循环;最后72℃反应5 min。通过1.2%琼脂糖凝胶电泳评估产物大小,并判断根结线虫种类。

1.2.2 南方根结线虫生理小种鉴别和毒力测定

生理小种鉴别:依据寄主鉴别法鉴别南方根结线虫生理小种(Stanton & O'Donnell, 1998)。将3~4叶期DP16棉花和NC95烟草分别移栽至携带有南方根结线虫不同分离群体的土壤(含约1~2条2龄幼虫/cm³),以感病番茄品种Money maker作为对照,在温室自然条件下培养30 d后,调查各植株根结线虫病发生情况;每个群体重复3次。生理小种鉴别依据为:不能同时侵染DP16棉花和NC95烟草的线虫为1号生理小种;能侵染NC95烟草但不能侵染DP16棉花的线虫为2号生理小种;能侵染DP16棉花但不能侵染NC95烟草的线虫为3号生理小种;能同时侵染DP16棉花和NC95烟草的线虫为4号生理小种。

毒力测定:根结线虫抗Mi基因毒力测试参考Semblat et al.(2000)方法,并略有修改。挑取生理小种鉴别试验中具有明显根结的Money maker番茄根,约携带8~10个卵块,机械破碎后与250 cm³灭菌砂土混合;将携带Mi基因的抗性番茄品种Motelle幼苗移栽至含有根结组织和砂土混合物的盆钵中,在温室自然条件下培养30 d。以感病番茄品种Money maker作为对照,每个群体重复3次。线虫群体毒力水平根据番茄根结产生情况进行评估,根结数少于5个的群体为无毒群体,根结数大于等于5个的群体为毒性群体。

1.2.3 南方根结线虫2龄幼虫口针长度和体长的测定

采用线虫分离装置提取番茄根围土壤的根结线虫,即在2 mm孔径金属筛网上平铺一层无尘纸,加入约20 g携带有南方根结线虫不同分离群体的土样,然后将筛网置于灭菌培养皿上,沿筛网边缘向皿内加入去离子水并浸没土样,室温静置24~48 h,收集皿中根结线虫2龄幼虫。在光学显微镜下观察南方根结线虫各群体2龄幼虫虫体特征,利用ImageJ 1.51软件计算各群体南方根结线虫2龄幼虫的口针长度和体长,分析不同寄主和地理来源的南方根结线虫的形态特征差异。每个群体随机测量5个样本。

1.2.4 根结线虫DNA序列分析

利用1.2.1制备的40个根结线虫分离群体DNA,采用引物TW81(5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3')和AB28(5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3')

扩增其 ITS 基因序列 (Maafi et al., 2003), 利用引物 NADF2 (5'-TATTTTTTGTGAGATATATTAG-3') 和 NADR1 (5'-CGTGAATCTTGATTTTCCATTTT-3') 扩增其 *Nad5* 基因序列 (Janssen et al., 2016)。PCR 反应体系同 1.2.1, 反应条件: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 48℃ 退火 30 s, 70℃ 延伸 2 min, 38 个循环; 最后 72℃ 反应 5 min。PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将测序获得序列递交至 NCBI 进行 BLAST 比对, 根据最高得分和最小 E 值判断各分离群体线虫种类。采用 Phylogeny.fr 在线工具基于最大似然法构建系统进化树 (Dereeper et al., 2008), 默认预设参数, 设定 Bootstrap 为 500 次来计算自展率。

同时, 将获得的南方根结线虫各分离群体的 ITS 和 *Nad5* 基因序列用 MEGA 7 软件进行比对分析, 采用 Tamura-Nei 模型计算不同寄主来源的南方根结线虫群体的 ITS 和 *Nad5* 基因碱基替换率 (变异率), 分析各群体的碱基变异情况。

1.3 数据分析

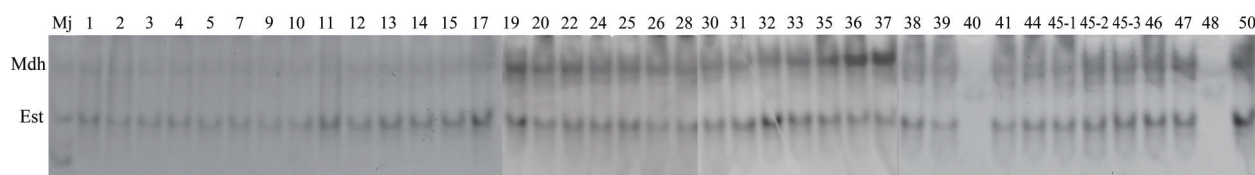
采用 SPSS 22.0 软件对南方根结线虫 2 龄幼虫的口针长度和体长进行统计分析, 应用 Tukey HSD 法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 根结线虫种类鉴定结果

同工酶电泳显示 40 个根结线虫分离群体共产生 2 种 Mdh 表型 (N1、N1a) 和 2 种 Est 表型 (I1、M2)。以爪哇根结线虫 Mdh-Est 图谱表型 (N1-J3) 为参照, 其中 CN1~CN39、CN41~CN47 及 CN50 共 38 个群体符合南方根结线虫图谱表型 (N1-I1), CN40 和 CN48 这 2 个群体符合象耳豆根结线虫图谱表型 (N1a-M2) (图 1)。

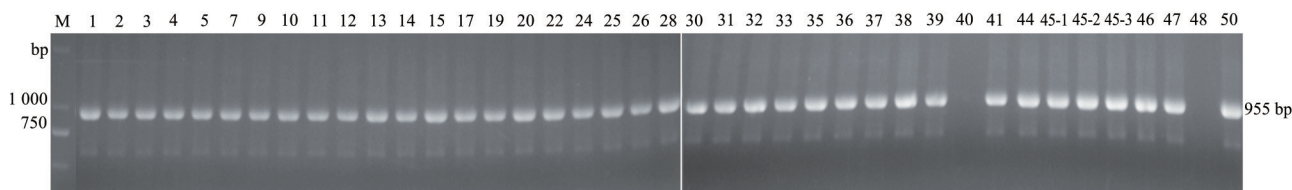
基于 MiSCARF/R 引物对供试 40 个根结线虫分离群体进行 PCR 扩增, 除群体 CN40 和 CN48 未扩增出目的条带外, 其余分离群体均扩增出约 955 bp 的特异性条带, 表明其为南方根结线虫 (图 2)。



Mj: 爪哇根结线虫苹果酸脱氢酶 (Mdh)-酯酶 (Est) 图谱表型 N1-J3; 1~50: 根结线虫分离群体 CN1~CN50。Mj: Mdh-Est isozyme profiles N1-J3 of *M. javanica*; 1~50: CN1~CN50 of *Meloidogyne* spp. populations used in this study.

图 1 根结线虫不同分离群体的同工酶图谱

Fig. 1 Isozyme profiles of *Meloidogyne* spp. populations



M: DNA 分子量标准 DL2000; 1~50: 根结线虫分离群体 CN1~CN50。

M: DNA marker DL2000; 1~50: CN1~CN50 of *Meloidogyne* spp. populations.

图 2 利用南方根结线虫 SCAR 分子标记检测各线虫分离群体

Fig. 2 Identification of *Meloidogyne* spp. populations with the SCAR probe

2.2 南方根结线虫的生理小种鉴别和毒力水平

利用寄主鉴别法将 38 个南方根结线虫分离群体鉴别为 2 个生理小种类群, 分别为 1 号生理小种和 2 号生理小种。其中 CN41、CN44 和 CN45-1 这 3 个群体不能侵染抗性棉花 DP16, 但能侵染烟草 NC95, 为 2 号生理小种, 其余群体既不能侵染抗性棉花 DP16, 也不能侵染烟草 NC95, 为 1 号生理小种 (表 1)。毒力测定结果显示, 除 CN19、CN20、CN32 和 CN35 外, 其余群体均无法在携带 *Mi* 抗性基因的

番茄上形成根结, 但只有 CN19 分离群体平均可产生 20 个根结, 为毒力群体。

2.3 南方根结线虫 2 龄幼虫的形态特征差异

南方根结线虫各分离群体 2 龄幼虫的口针长度和体长存在差异。根据口针长度的变异度可将南方根结线虫各分离群体分为 3 组, 第 1 组口针长度为 10.85~12.63 μm , 第 2 组口针长度为 11.54~13.26 μm , 第 3 组口针长度为 11.70~13.55 μm ; 其中 CN7 群体的口针长度最短, 平均为 10.85 μm , CN4 群体口针长

度最长,平均为 13.55 μm 。相比口针长度,南方根结线虫各分离群体 2 龄幼虫的体长变异更大,其中 CN50 群体的体长最短,平均为 379.01 μm , CN45-3 群体的体长最长,平均为 443.62 μm (表 2)。

表 1 根结线虫分离群体的同工酶图谱、生理小种鉴别和毒力水平

Table 1 Isozyme profiles, races and virulence of *Meloidogyne* spp. populations used in this study

线虫种类 Nematode species	群体 Popul- ation	原始寄主 Host plant	地理来源 Location	图谱表型 Isozyme profile		生理 小种 Race	毒力反应 Virulence
				Mdh	Est		
南方根结线虫 <i>M. incognita</i>	CN1	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	江苏省淮安市 Huai'an, Jiangsu	N1	I1	1	-
	CN2	梓树 <i>Catalpa ovata</i>	江苏省徐州市 Xuzhou, Jiangsu	N1	I1	1	-
	CN3	辣椒 <i>Capsicum annuum</i>	江苏省盐城市 Yancheng, Jiangsu	N1	I1	1	-
	CN4	茄子 <i>Solanum melongena</i>	江苏省南京市 Nanjing, Jiangsu	N1	I1	1	-
	CN5	苦瓜 <i>Momordica charantia</i>	江苏省南京市 Nanjing, Jiangsu	N1	I1	1	-
	CN7	番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	山东省济南市 Jinan, Shandong	N1	I1	1	-
	CN9	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	山东省枣庄市 Zaozhuang, Shandong	N1	I1	1	-
	CN10	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	山东省枣庄市 Zaozhuang, Shandong	N1	I1	1	-
	CN11	茄子 <i>Solanum lycopersicum</i>	山东省枣庄市 Zaozhuang, Shandong	N1	I1	1	-
	CN12	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	江苏省淮安市 Huai'an, Jiangsu	N1	I1	1	-
	CN13	甜瓜 <i>Cucumis melo</i>	江苏省宿迁市 Suqian, Jiangsu	N1	I1	1	-
	CN14	苋菜 <i>Amaranthus tricolor</i>	江苏省宿迁市 Suqian, Jiangsu	N1	I1	1	-
	CN15	西瓜 <i>Citrullus lanatus</i>	江苏省宿迁市 Suqian, Jiangsu	N1	I1	1	-
	CN17	甜瓜 <i>Cucumis melo</i>	江苏省徐州市 Xuzhou, Jiangsu	N1	I1	1	-
	CN19	番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	山东省潍坊市 Weifang, Shandong	N1	I1	1	+
	CN20	番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	山东省淄博市 Zibo, Shandong	N1	I1	1	-
	CN22	番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	江苏省南京市 Nanjing, Jiangsu	N1	I1	1	-
	CN24	瓜蒌 <i>Trichosanthes kirilowii</i>	安徽省安庆市 Anqing, Anhui	N1	I1	1	-
	CN25	瓜蒌 <i>Trichosanthes kirilowii</i>	安徽省安庆市 Anqing, Anhui	N1	I1	1	-
	CN26	瓜蒌 <i>Trichosanthes kirilowii</i>	安徽省安庆市 Anqing, Anhui	N1	I1	1	-
	CN28	瓜蒌 <i>Trichosanthes kirilowii</i>	安徽省安庆市 Anqing, Anhui	N1	I1	1	-
	CN30	芹菜 <i>Apium graveolens</i>	山东省泰安市 Tai'an, Shandong	N1	I1	1	-
	CN31	西兰花 <i>Brassica oleracea</i>	江苏省盐城市 Yancheng, Jiangsu	N1	I1	1	-
	CN32	山药 <i>Dioscorea oppositifolia</i>	江苏省徐州市 Xuzhou, Jiangsu	N1	I1	1	-
	CN33	生姜 <i>Zingiber officinale</i>	山东省莱芜市 Laiwu, Shandong	N1	I1	1	-
	CN35	苦瓜 <i>Momordica charantia</i>	湖北省十堰市 Shiyan, Hubei	N1	I1	1	-
	CN36	丝瓜 <i>Luffa aegyptiaca</i>	江苏省徐州市 Xuzhou, Jiangsu	N1	I1	1	-
	CN37	南瓜 <i>Cucurbita moschata</i>	江苏省徐州市 Xuzhou, Jiangsu	N1	I1	1	-
	CN38	猕猴桃 <i>Actinidia chinensis</i>	江苏省南京市 Nanjing, Jiangsu	N1	I1	1	-
	CN39	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>	海南省海口市 Haikou, Hainan	N1	I1	1	-
	CN41	芹菜 <i>Apium graveolens</i>	海南省海口市 Haikou, Hainan	N1	I1	2	-
	CN44	菜豆 <i>Phaseolus vulgaris</i>	江苏省连云港市 Lianyungang, Jiangsu	N1	I1	2	-
	CN45-1	番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	江苏省连云港市 Lianyungang, Jiangsu	N1	I1	2	-
	CN45-2	番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	江苏省连云港市 Lianyungang, Jiangsu	N1	I1	1	-
	CN45-3	番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	江苏省连云港市 Lianyungang, Jiangsu	N1	I1	1	-
	CN46	甜瓜 <i>Cucumis melo</i>	江苏省连云港市 Lianyungang, Jiangsu	N1	I1	1	-
	CN47	西瓜 <i>Citrullus lanatus</i>	海南省三亚市 Sanya, Hainan	N1	I1	1	-
	CN50	山药 <i>Dioscorea oppositifolia</i>	河南省焦作市 Jiaozuo, Henan	N1	I1	1	-
象耳豆根结线虫 <i>M. enterolobii</i>	CN40	黄秋葵 <i>Abelmoschus esculentus</i>	海南省海口市 Haikou, Hainan	N1a	M2	/	/
	CN48	辣椒 <i>Capsicum annuum</i>	海南省东方市 Dongfang, Hainan	N1a	M2	/	/

+/-: 分别表示在携带 *Mi* 抗性基因番茄 Motelle 上形成根结(卵块)数大于等于或小于 5 的根结线虫分离群体; /: 未测定; Mdh: 苹果酸脱氢酶; Est: 酯酶。+/-: to denote whether *Meloidogyne* populations had the ability to induce more than five root knots/egg mass in *Mi*-resistant tomato Motelle (+) or not (-); /: untested; Mdh: malate dehydrogenase; Est: esterase.

表 2 南方根结线虫不同分离群体 2 龄幼虫的形态学特征

Table 2 Morphometric measurements of the second-stage juveniles <i>Meloidogyne incognita</i> populations μm				
群体 Population	口针长度 Stylet length		体长 Body length	
	范围 Range	平均数 $\pm$ 标准误 Mean $\pm$ SE	范围 Range	平均数 $\pm$ 标准误 Mean $\pm$ SE
CN1	10.49–13.31	12.28 $\pm$ 0.9 abc	280.47–426.35	400.80 $\pm$ 13.50 bcddef
CN2	11.70–12.49	12.03 $\pm$ 0.24 abc	391.28–413.30	401.53 $\pm$ 6.40 bcddef
CN3	11.35–13.24	12.29 $\pm$ 0.32 abc	399.49–439.82	416.55 $\pm$ 7.17 bcddef
CN4	13.40–13.76	13.55 $\pm$ 0.11 c	396.93–425.06	411.30 $\pm$ 8.13 bcddef
CN5	10.65–12.47	11.91 $\pm$ 0.23 bc	403.52–422.15	412.89 $\pm$ 4.06 bcddef
CN7	10.33–11.63	10.85 $\pm$ 0.40 a	395.84–450.44	423.98 $\pm$ 15.78 dcddef
CN9	10.28–14.83	12.58 $\pm$ 0.51 abc	382.23–424.28	398.38 $\pm$ 6.46 abcde
CN10	11.51–13.65	12.90 $\pm$ 0.29 bc	376.29–409.06	387.06 $\pm$ 6.30 abc
CN11	11.79–13.52	12.74 $\pm$ 0.39 bc	382.98–404.73	394.07 $\pm$ 6.28 abcde
CN12	10.92–12.22	11.54 $\pm$ 0.30 ab	373.16–393.41	384.40 $\pm$ 5.06 ab
CN13	11.44–13.27	12.28 $\pm$ 0.53 abc	391.10–441.43	410.84 $\pm$ 15.51 bcddef
CN14	11.60–12.91	12.31 $\pm$ 0.21 abc	394.31–432.65	413.26 $\pm$ 7.89 bcddef
CN15	11.14–13.41	12.46 $\pm$ 0.24 abc	393.60–435.29	406.40 $\pm$ 5.26 bcddef
CN17	11.09–13.59	12.76 $\pm$ 0.36 bc	383.67–425.48	404.21 $\pm$ 6.99 bcddef
CN19	12.06–12.85	12.32 $\pm$ 0.18 abc	372.80–415.07	396.87 $\pm$ 8.85 abcde
CN20	10.86–12.50	11.70 $\pm$ 0.35 abc	385.38–396.86	390.32 $\pm$ 3.41 abcd
CN22	11.51–13.59	12.56 $\pm$ 0.35 abc	403.94–428.36	413.15 $\pm$ 4.23 bcddef
CN24	11.63–12.68	12.22 $\pm$ 0.22 abc	382.75–405.86	394.71 $\pm$ 6.68 abcde
CN25	12.22–13.38	12.70 $\pm$ 0.35 bc	381.71–428.98	403.56 $\pm$ 13.76 bcddef
CN26	12.29–13.58	12.94 $\pm$ 0.31 bc	378.18–437.48	411.45 $\pm$ 13.92 bcddef
CN28	11.71–12.95	12.48 $\pm$ 0.13 abc	416.84–448.96	431.53 $\pm$ 3.98 cdef
CN30	10.27–13.88	12.19 $\pm$ 0.52 abc	383.31–437.65	414.68 $\pm$ 12.53 bcddef
CN31	12.44–13.11	12.74 $\pm$ 0.12 bc	398.38–451.79	425.37 $\pm$ 8.14 dcddef
CN32	12.17–13.34	12.78 $\pm$ 0.20 bc	369.66–425.21	403.86 $\pm$ 6.63 bcddef
CN33	11.67–12.91	12.29 $\pm$ 0.17 abc	395.29–417.31	404.16 $\pm$ 3.24 bcddef
CN35	12.08–14.09	12.89 $\pm$ 0.28 bc	397.74–431.95	411.34 $\pm$ 6.05 bcddef
CN36	13.19–13.78	13.47 $\pm$ 0.13 c	389.31–423.62	402.76 $\pm$ 7.37 bcddef
CN37	12.11–12.98	12.47 $\pm$ 0.21 abc	382.77–410.92	401.31 $\pm$ 3.16 bcddef
CN38	12.12–12.58	12.34 $\pm$ 0.07 abc	378.06–425.52	409.35 $\pm$ 8.39 bcddef
CN39	12.66–13.93	13.26 $\pm$ 0.24 bc	364.56–428.33	401.02 $\pm$ 15.97 bcddef
CN41	11.43–13.19	12.33 $\pm$ 0.44 abc	404.30–450.75	429.77 $\pm$ 9.59 cdef
CN44	11.90–13.36	12.83 $\pm$ 0.23 bc	414.94–450.68	435.02 $\pm$ 4.91 def
CN45-1	12.69–13.47	13.07 $\pm$ 0.23 bc	425.44–450.25	438.32 $\pm$ 4.20 ef
CN45-2	12.58–13.36	13.05 $\pm$ 0.09 bc	428.47–438.55	434.85 $\pm$ 3.20 def
CN45-3	11.24–13.18	12.23 $\pm$ 0.33 abc	418.57–467.38	443.62 $\pm$ 10.46 f
CN46	11.46–12.55	12.02 $\pm$ 0.29 abc	386.27–422.05	409.07 $\pm$ 6.68 bcddef
CN47	11.88–14.03	12.63 $\pm$ 0.24 abc	401.32–454.20	426.73 $\pm$ 8.06 dcddef
CN50	11.28–14.07	12.02 $\pm$ 0.32 abc	369.44–392.69	379.01 $\pm$ 3.73 a

同列数据不同字母表示经 Tukey HSD 法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Different letters indicate significant difference at $P<0.05$ level by Tukey HSD test.

2.4 根结线虫的 ITS 和 *Nad5* 基因序列变异

对 40 个南方根结线虫分离群体的 PCR 扩增分别获得长度为 553~557 bp 的 ITS 序列片段,长度为 608~611 bp 的 *Nad5* 基因序列片段,编码 201~205 个氨基酸,在 NCBI 中的登录号为 MT490886~MT490917、

MT490919~MT490926。通过 BLAST 比对,除了 CN40 和 CN48 群体外,其余群体与南方根结线虫匹配度最高,其 ITS 序列一致性为 98.56%~99.82%,E 值为 0;其 *Nad5* 基因序列一致性为 95.96%~99.81%,E 值为 0。CN40 和 CN48 群体则与象耳豆根结线虫

匹配度最高,其ITS序列一致性为81.50%~99.82%, E 值为 $5e^{-83}$ ~0;其 *Nad5* 基因序列一致性为91.35%~99.79%, E 值为 0。结合同工酶蛋白电泳图谱和 MiSCAR 分子标记 PCR 检测结果,进一步确定 CN40 和 CN48 群体为象耳豆根结线虫,其余群体为南方根结线虫。

基于 19 种寄主来源分析 38 个南方根结线虫分离群体的序列变异,发现苋菜分离群体(CN14)与西兰花(CN31)、黄瓜(CN1、CN9、CN10、CN12)、向日葵(CN39)、丝瓜(CN36)、苦瓜(CN5、CN35)及菜豆(CN44)分离群体,西兰花分离群体(CN31)与黄瓜(CN1、CN9、CN10、CN12)、向日葵(CN39)、丝瓜(CN36)、苦瓜(CN5、CN35)及菜豆(CN44)分离群体,黄瓜分离群体(CN1、CN9、CN10、CN12)与向日

葵(CN39)、丝瓜(CN36)、苦瓜(CN5、CN35)及菜豆(CN44)分离群体,向日葵分离群体(CN39)与丝瓜(CN36)、苦瓜(CN5、CN35)及菜豆(CN44)分离群体,丝瓜分离群体(CN36)与苦瓜(CN5、CN35)及菜豆(CN44)分离群体,苦瓜分离群体(CN5、CN35)与菜豆(CN44)分离群体之间的 ITS 序列变异率均最低,为 0,而梓树分离群体(CN2)与南瓜分离群体(CN37)的 ITS 序列变异率最高,为 0.035。对 *Nad5* 基因序列进行比较,发现不同寄主分离群体间的 *Nad5* 基因序列变异率比 ITS 序列的小,最大变异率仅为 0.004,其中甜瓜分离群体(CN13、CN17、CN46)与除辣椒(CN3)、南瓜(CN37)和丝瓜(CN36)之外其余 15 个寄主上分离群体之间的变异率最大(表 3)。

表 3 不同植物寄主来源的南方根结线虫分离群体 ITS 和 *Nad5* 基因序列差异性比较
Table 3 Comparison of ITS and *Nad5* gene sequences of *Meloidogyne incognita* from different hosts

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1		0.000	0.001	0.000	0.002	0.000	0.003	0.004	0.001	0.002	0.001	0.002	0.002	0.000	0.002	0.001	0.000	0.001	0.000
2	0.002		0.001	0.000	0.002	0.000	0.003	0.004	0.001	0.002	0.001	0.002	0.002	0.000	0.002	0.001	0.000	0.001	0.000
3	0.001	0.001		0.001	0.001	0.001	0.002	0.004	0.001	0.001	0.001	0.002	0.001	0.001	0.002	0.001	0.001	0.001	0.001
4	0.002	0.000	0.001		0.002	0.000	0.003	0.004	0.001	0.002	0.001	0.002	0.002	0.000	0.002	0.001	0.000	0.001	0.000
5	0.009	0.007	0.008	0.007		0.002	0.002	0.003	0.000	0.000	0.001	0.002	0.000	0.002	0.002	0.001	0.002	0.000	0.002
6	0.015	0.013	0.014	0.013	0.017		0.003	0.004	0.001	0.002	0.001	0.002	0.002	0.000	0.002	0.001	0.000	0.001	0.000
7	0.003	0.001	0.002	0.001	0.008	0.014		0.004	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	0.003	0.002	0.003	0.002	0.003
8	0.003	0.001	0.002	0.001	0.009	0.014	0.002		0.004	0.003	0.004	0.004	0.003	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
9	0.002	0.000	0.001	0.000	0.008	0.014	0.001	0.001		0.000	0.001	0.002	0.000	0.001	0.002	0.001	0.001	0.001	0.001
10	0.019	0.021	0.020	0.021	0.029	0.035	0.022	0.022	0.021		0.001	0.002	0.000	0.002	0.002	0.001	0.002	0.000	0.002
11	0.002	0.002	0.002	0.002	0.009	0.015	0.003	0.003	0.002	0.019		0.002	0.001	0.001	0.002	0.001	0.001	0.001	0.001
12	0.002	0.000	0.001	0.000	0.007	0.013	0.001	0.001	0.000	0.021	0.002		0.002	0.002	0.001	0.002	0.000	0.002	0.002
13	0.002	0.000	0.001	0.000	0.007	0.013	0.001	0.001	0.000	0.021	0.002	0.000		0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
14	0.002	0.000	0.001	0.000	0.007	0.013	0.001	0.001	0.000	0.021	0.002	0.000	0.000		0.002	0.001	0.000	0.001	0.000
15	0.002	0.000	0.001	0.000	0.007	0.013	0.001	0.001	0.000	0.021	0.002	0.000	0.000	0.000		0.002	0.002	0.002	0.002
16	0.013	0.011	0.012	0.011	0.019	0.025	0.012	0.012	0.012	0.028	0.012	0.011	0.011	0.011	0.011		0.001	0.001	0.001
17	0.004	0.006	0.005	0.006	0.013	0.019	0.006	0.006	0.005	0.023	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.016		0.001	0.000
18	0.003	0.001	0.002	0.001	0.009	0.015	0.002	0.002	0.001	0.022	0.003	0.001	0.001	0.001	0.001	0.012	0.004		0.001
19	0.006	0.004	0.005	0.004	0.011	0.017	0.005	0.005	0.004	0.017	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.013	0.009	0.005	

1~19 为来自不同寄主的南方根结线虫分离群体。1: 猕猴桃; 2: 苋菜; 3: 芹菜; 4: 西兰花; 5: 辣椒; 6: 梓树; 7: 西瓜; 8: 甜瓜; 9: 黄瓜; 10: 南瓜; 11: 山药; 12: 向日葵; 13: 丝瓜; 14: 苦瓜; 15: 菜豆; 16: 番茄; 17: 茄子; 18 瓜蒌; 19: 生姜。表中数值表示 Tamura-Nei 模型推导出的不同寄主来源线虫每个位点的碱基序列变异率; 左下数据为不同群体 ITS 序列变异率, 右上数据为 *Nad5* 基因序列变异率。1-19 stands for the populations of *M. incognita* used in this study. 1: *Actinidia chinensis*; 2: *Amaranthus tricolor*; 3: *Apium graveolens*; 4: *Apium graveolens*; 5: *Capsicum annuum*; 6: *Catalpa ovata*; 7: *Citrullus lanatus*; 8: *Cucumis melo*; 9: *Cucumis sativus*; 10: *Cucurbita moschata*; 11: *Dioscorea oppositifolia*; 12: *Helianthus annuus*; 13: *Luffa aegyptiaca*; 14: *Momordica charantia*; 15: *Phaseolus vulgaris*; 16: *Solanum lycopersicum*; 17: *Solanum lycopersicum*; 18: *Trichosanthes kirilowii*; 19: *Zingiber officinale*. The number of base substitutions per site from averaging over all sequence pairs between groups is shown. Analyses were conducted using the Tamura-Nei model, divergence of ITS and *Nad5* were separately shown in the lower left and the upper right.

2.5 根结线虫分离群体的系统发育分析

基于 ITS 和 *Nad5* 基因序列构建的系统发育树

显示, 40 个根结线虫分离群体归为 2 个明显的大分支, 一个分支包括全部的南方根结线虫分离群体, 另

一个分支为象耳豆根结线虫分离群体;其中,南方根结线虫组成的分支上还包括多个较短的次级分支(图3~4)。

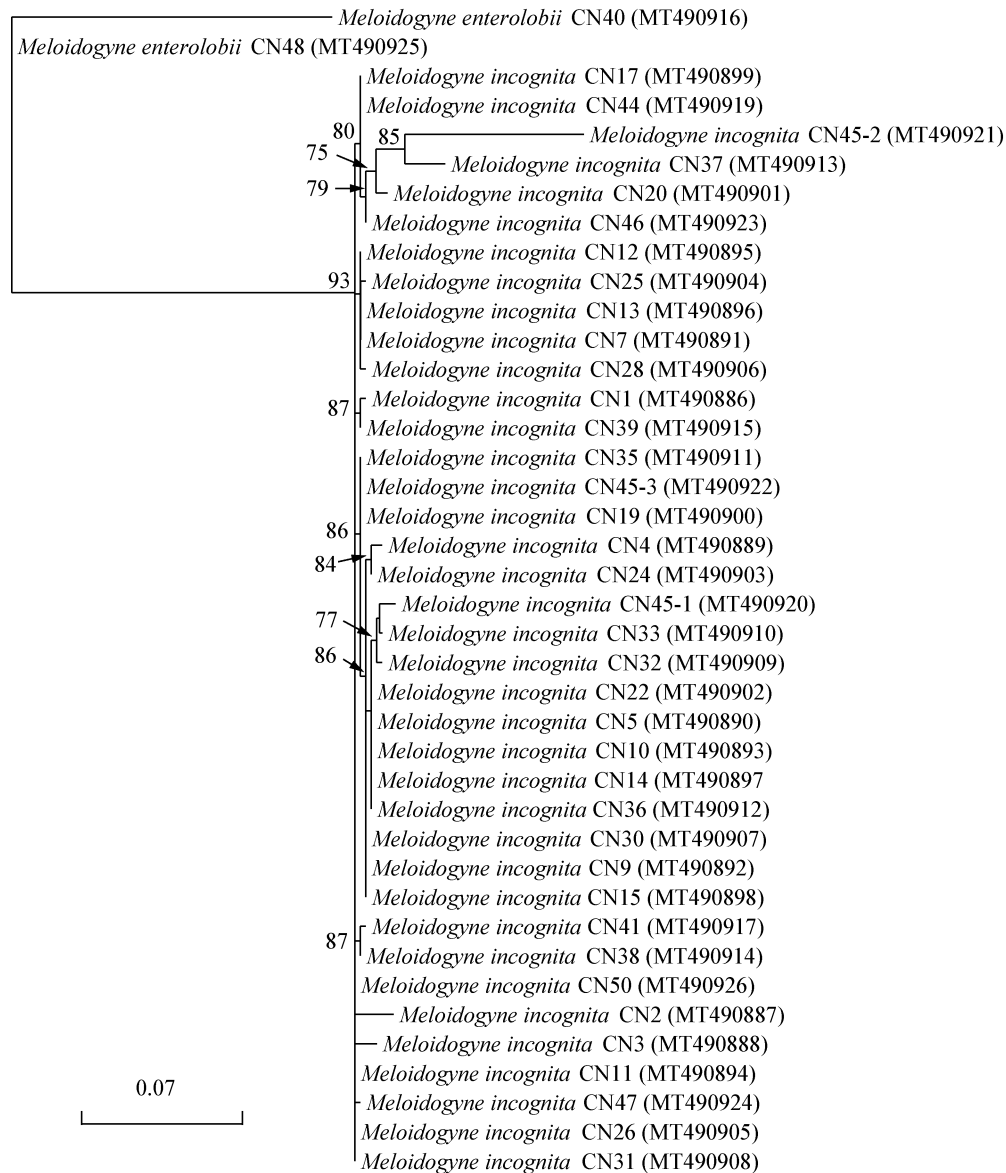


图3 利用最大似然法基于ITS序列构建根结线虫分离群体的系统发育树

Fig. 3 The phylogenetic tree of *Meloidogyne* spp. populations based on ITS sequences using maximum likelihood method

图中所列为大于70%的自展率;标尺表示每个核酸位点发生0.07个碱基替换。Branches with bootstrap support>70% are indicated. The scale bar denotes 0.07 substitutions per nucleotide position.

3 讨论

本研究供试根结线虫群体按纬度划分,最北来自我国山东省济南市,最南来自海南省三亚市,横跨温带和热带地区。按寄主划分,供试群体源自19个寄主,包括园艺、经济和药用植物。基于同工酶图谱和分子鉴定,确定供试群体存在2种根结线虫,分别为南方根结线虫和象耳豆根结线虫。其中南方根结线虫为优势种群(占比95%),分布范围和寄主广泛,涉及6省18个寄主,而象耳豆根结线虫仅在海南省

的黄秋葵和辣椒上分离到。象耳豆根结线虫最早就在海南省发现,因寄主广泛、侵染力强,近年来逐渐扩展,最北可至我国辽宁省(Niu et al., 2012)。由于样本数量限制,本研究于2017—2019年随机采集的根结线虫样本中仅在海南省样本中分离到象耳豆根结线虫,表明象耳豆根结线虫在海南省之外其他省份的发生仍处于较低水平。尽管如此,象耳豆根结线虫在我国的蔓延速度不断加快,应该严密跟踪其发展动向(陈慧等, 2016)。由于南方根结线虫仍是

当前我国最重要的农作物病原线虫之一,因此深入 于制定有效、可持续的线虫病害防控措施。
揭示南方根结线虫的生理小种分化和群体变异有助

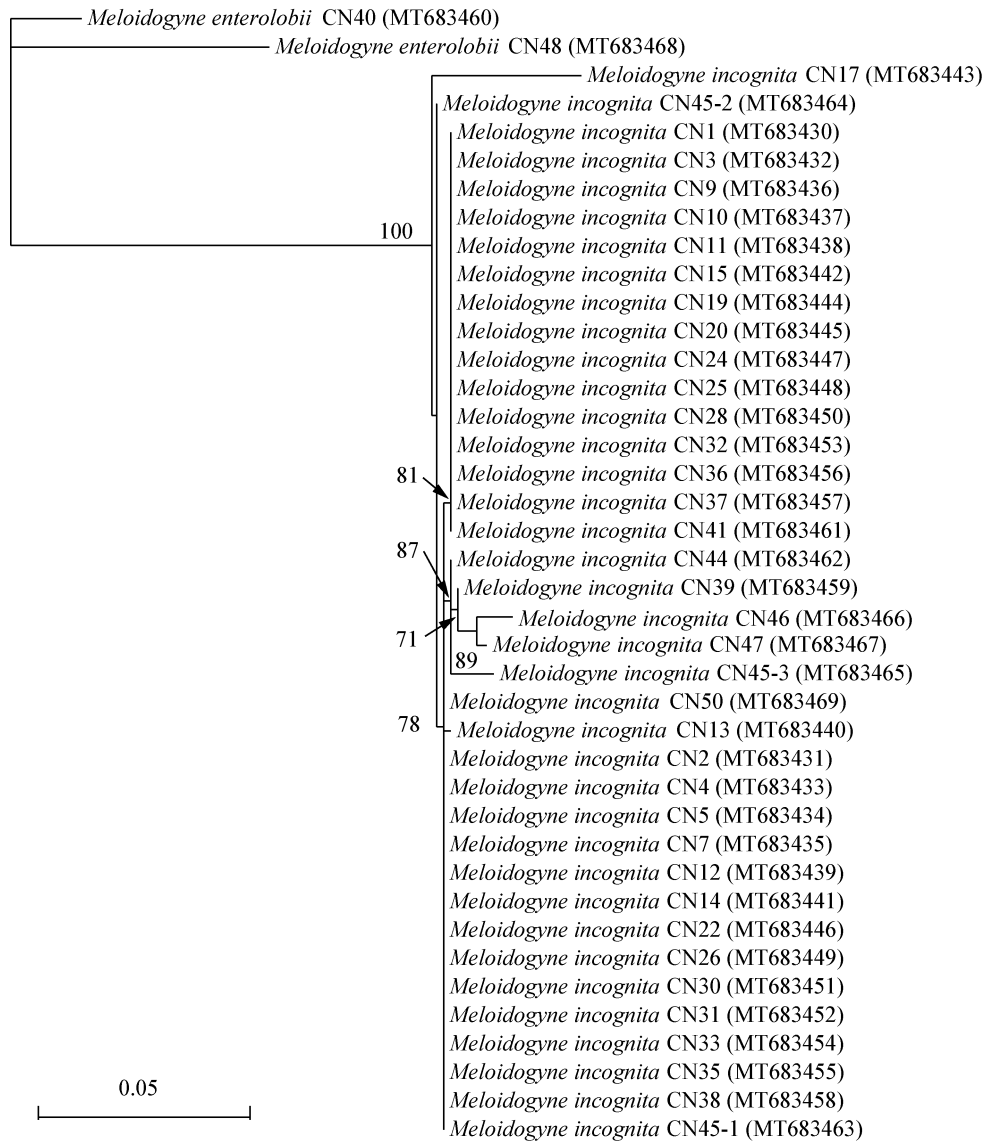


图4 基于 *Nad5* 基因利用最大似然法构建根结线虫分离群体的系统发育树

Fig. 4 The phylogenetic tree of *Meloidogyne* spp. populations based on *Nad5* gene using maximum likelihood method

图中所列大于70%的自展率;标尺表示每个核苷点发生0.05个碱基替换。Branches with bootstrap support >70% are indicated. The scale bar denotes 0.05 substitutions per nucleotide position.

南方根结线虫具有不同的生理小种。寄主选择性测试是鉴别生理小种的普遍方法。本研究涉及的38个南方根结线虫群体,大部分被鉴别为1号生理小种,少数为2号生理小种;这与徐建华等(1999)的研究结果相似。由于小种鉴别法只涉及2个不同种的鉴别寄主烟草和棉花,无法充分揭示南方根结线虫的种内遗传多样性,在生产中应用性较低。因此,本研究采用多组技术手段对南方根结线虫各分离群体的特征进行分析,毒力测试发现个别群体如CN19能感染携带 *Mi* 抗性基因的番茄,表现出较强

的毒力。*Mi* 抗性基因是防治根结线虫最普遍的抗性基因,能抵抗南方根结线虫、花生根结线虫 *M. hapla* 和爪哇根结线虫,然而能克服 *Mi* 抗性基因的生理小种或分离群体陆续被发现(Jacquet et al., 2005)。徐建华等(1999)从我国广东省白菜上分离到1个南方根结线虫毒性群体 MIGD1-1,可在抗性番茄上大量繁殖和发育。本研究中CN19群体来自山东省潍坊市的蔬菜基地,由于评估方法不同,其在抗性番茄上产生的根结数比 MIGD1-1 群体的低,但仍表现出一定的毒力水平。上述毒力群体的发现表

明在长期寄主选择压力下,南方根结线虫可能已经进化出克服 *Mi* 基因的抗性群体。

一些量化的参数例如体长、口针长度和尾部特征可作为鉴定一些根结线虫种类的参考依据(Jepson, 1983)。本研究比较了38个南方根结线虫分离群体的口针长度和体长,发现各分离群体间存在差异,特别是体长的差异更大,表现出不同地理群体或寄主来源的根结线虫存在种间变异性,这与前人的研究结果(Kaur & Attri, 2013; Nyaku et al., 2018)一致。Bellaïfior et al. (2015)研究发现,拟禾本科根结线虫 *M. graminicola* 越南群体经温室培养后其2龄幼虫口针长度和体长发生一定变化,从而认为土壤、气候和寄主等是影响根结线虫形态变异的潜在因素。然而,本研究统计结果显示不同地理和寄主来源的南方根结线虫分离群体之间无相关性(未发表结果)。核糖体ITS序列是根结线虫鉴定最常用的分子标记之一,而线粒体DNA因具有亲代遗传和高变异率的特点,在区分线虫近缘种上具有一定优势(Janssen et al., 2016)。本研究发现,南方根结线虫各分离群体ITS和 *Nad5* 基因序列碱基序列变异率与寄主并无明显关联;Shao et al. (2020)比较了我国不同地区桑树上的象耳豆根结线虫线粒体 *COI* 基因变异和地理分布的关系,结果证明供试根结线虫的遗传距离与地理距离无相关性。这些结果均表明我国种质资源的广泛流通可能导致根结线虫群体地理和寄主隔离变得不明确。

近年来,随着耕作模式的改变、种质资源的跨区域流通以及杀线虫剂的不规范使用,根结线虫病的发生和为害愈趋严重,而根结线虫新的生物学特征也被发现。如Huang et al. (2016)从我国大棚番茄中获得了杀线虫剂噻唑膦具有抗性的南方根结线虫分离群体,并明确了抗性产生机制为根结线虫乙酰胆碱脂酶基因2发生了突变。今后应从多个方面对根结线虫不同群体的生物学和遗传特征进行描述,深入分析根结线虫的种群结构和种内变异,以期对根结线虫病的预警和防控提供理论依据。

参 考 文 献 (References)

- Abad P, Favery B, Rosso MN, Castagnone-Sereno P. 2003. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. *Molecular Plant Pathology*, 4(4): 217–224
- Bellaïfior S, Jougla C, Chapuis E, Besnard G, Suong M, Vu PN, de Waele D, Gantet P, Thi XN. 2015. Intraspecific variability of the facultative meiotic parthenogenetic root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*) from rice fields in Vietnam. *Comptes Rendus Biologies*, 338(7): 471–483
- Blok VC, Powers TO. 2009. Biochemical and molecular identification.// Perry RN, Moens, M, Starr JL. Root-knot nematodes. Wallingford, UK: CABI Publishing, pp. 98–112
- Carneiro RMDG, Almeida MRA, Quénéhervé P. 2000. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. populations. *Nematology*, 2(6): 645–654
- Chen H, Wang HF, Chen MC. 2016. Research progress of *Meloidogyne enterolobii*. *Guizhou Agricultural Sciences*, 44(5): 51–55 (in Chinese) [陈慧, 王会芳, 陈绵才. 2016. 象耳豆根结线虫的研究进展. 贵州农业科学, 44(5): 51–55]
- Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, et al. 2008. Phylogeny. fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research*, 36: 465–469
- Esbenshade PR, Triantaphyllou AC. 1985. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology*, 17(1): 6–20
- Feng H, Wei LH, Chen HG, Zhou YJ. 2016. Morphological and molecular characterization of the rice root nematode, *Hirschmanniella mucronata*, from Jiangsu, China. *Acta Phytopathologica Sinica*, 46(4): 474–484 (in Chinese) [冯辉, 魏利辉, 陈怀谷, 周益军. 2016. 细尖潜根线虫(*Hirschmanniella mucronata*)江苏分离群体形态学和分子特征描述. 植物病理学报, 46(4): 474–484]
- Huang WK, Wu QS, Peng H, Kong LA, Liu SM, Yin HQ, Cui YQ, Zhan LP, Cui JK, Peng DL. 2016. Mutations in acetylcholinesterase2 (*ace2*) increase the insensitivity of acetylcholinesterase to fosthiazate in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Scientific Reports*, 6: 38102
- Hunt DJ, Handoo ZA. 2009. Taxonomy, identification and principal species.//Perry M, Starr JL. Root-knot nematodes. Wallingford, UK: CABI Publishing, pp. 55–97
- Jacquet M, Bongiovanni M, Martinez M, Verschave P, Wajnberg E, Castagnone-Sereno P. 2005. Variation in resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in tomato genotypes bearing the *Mi* gene. *Plant Pathology*, 54(2): 93–99
- Janssen T, Karssen G, Verhaeven M, Coyne D, Bert W. 2016. Mitochondrial coding genome analysis of tropical root-knot nematodes (*Meloidogyne*) supports haplotype based diagnostics and reveals evidence of recent reticulate evolution. *Scientific Reports*, 6: 22591
- Jepson SB. 1983. Identification of *Meloidogyne*: a general assessment and a comparison of male morphology using light microscopy, with a key to 24 species. *Revue de Nematologie*, 6(2): 291–309
- Jones JT, Haegeman A, Danchin EGJ, Gaur HS, Helder J, Jones MGK, Kikuchi T, Manzanilla-Lopez R, Palomares-Rius JE, Wesemael WML, et al. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 14(9): 946–961
- Karssen G, van Hoenselaar T, Verkerk-Bakker B, Janssen R. 1995. Species identification of cyst and root-knot nematodes from potato

- by electrophoresis of individual females. Electrophoresis, 16: 105–109
- Kaur H, Attri R. 2013. Morphological and morphometrical characterization of *Meloidogyne incognita* from different host plants in four districts of Punjab, India. Journal of Nematology, 45(2): 122–127
- Maafi ZT, Subbotin SA, Moens M. 2003. Molecular identification of cyst-forming nematodes (Heteroderidae) from Iran and a phylogeny based on ITS-rDNA sequences. Nematology, 5(1): 99–111
- Meng Q, Long H, Xu JH. 2004. PCR assays for rapid and sensitive identification of three major root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*. Acta Phytopathologica Sinica, 34(3): 204–210
- Niu JH, Jian H, Guo QX, Chen CL, Wang XY, Liu Q, Guo YD. 2012. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays based on 5S rDNA-IGS2 regions for detecting *Meloidogyne enterolobii*. Plant Pathology, 61(4): 809–819
- Nyaku ST, Lutuf H, Cornelius E. 2018. Morphometric characterisation of root-knot nematode populations from three regions in Ghana. Plant Pathology Journal, 34(6): 544–554
- OEPP/EPPO. 2016. PM 7/103 (2) *Meloidogyne enterolobii*. Bulletin OEPP, 46(2): 190–201
- Semblat JP, Bongiovanni M, Wajnberg E, Dalmasso A, Abad P, Castagnone-Sereno P. 2000. Virulence and molecular diversity of parthenogenetic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. Heredity, 84: 81–89
- Shao HD, Zhang P, You CP, Li CR, Feng Y, Xie ZW. 2020. Genetic diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* in mulberry based on the mitochondrial COI gene. Ecology and Evolution, 10(12): 5391–5401
- Song ZQ, Wang X, Lin Y, Chi YK, Ju YL, Li HM. 2013. Detection and quantification of *Meloidogyne incognita* in soil sample using real-time PCR. Journal of Plant Protection, 40(3): 255–260 (in Chinese) [宋志强, 王暄, 林宇, 迟元凯, 鞠玉亮, 李红梅. 2013. 土壤中南方根结线虫的实时荧光PCR检测和定量. 植物保护学报, 40(3): 255–260]
- Stanton JM, O'Donnell WE. 1998. Assessment of the North Carolina differential host test for identification of Australian populations of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Australasian Plant Pathology, 27(2): 104–111
- Wei HY, Wang X, Li HM, Sun WR, Gu JF. 2016. Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid diagnosis of *Meloidogyne mali*. Journal of Plant Protection, 43(2): 260–266 (in Chinese) [魏洪岩, 王暄, 李红梅, 孙文荣, 顾建锋. 2016. 采用环介导等温扩增法(LAMP)快速检测苹果根结线虫. 植物保护学报, 43(2): 260–266]
- Wu WT, Zhang J, Xue MJ, Wei HY, Dong Y, Deng RK, Wang Y. 2019. Transcriptome analysis of tomato root system infected by *Meloidogyne enterolobii*. Molecular Plant Breeding, 17(11): 3477–3783 (in Chinese) [吴文涛, 张靖, 薛美静, 魏环宇, 董莹, 邓人可, 王扬. 2019. 象耳豆根结线虫侵染番茄根系的转录组分析. 分子植物育种, 17(11): 3477–3783]
- Xu JH, Li HM, Shen PY, Fu P. 1999. Biological test of pathogenic variation among populations of *Meloidogyne incognita* from China. Journal of Nanjing Agricultural University, 22(3): 33–36 (in Chinese) [徐建华, 李红梅, 沈培垠, 付鹏. 1999. 南方根结线虫群体间致病性变异的生物测定. 南京农业大学学报, 22(3): 33–36]
- Xu JH, Liu PL, Meng QP, Long H. 2004. Characterisation of *Meloidogyne* species from China using isozyme phenotypes and amplified mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism. European Journal of Plant Pathology, 110: 309–315
- Yang BJ, Eisenback JD. 1983. *Meloidogyne enterolobii* n. sp. (Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing pacara ear-pot tree in China. Journal of Nematology, 15(3): 381–391
- Zhang P, Shao HD, You CP, Feng Y, Xie ZW. 2020. Characterization of root-knot nematodes infecting mulberry in southern China. Journal of Nematology, 52: e2020-04
- Zhao HH. 2000. Identification and morphological comparison of the four common species of *Meloidogyne* from China. Acta Phytopathologica Sinica, 30(3): 288 (in Chinese) [赵洪海. 2000. 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. 植物病理学报, 30(3): 288]
- Zhuo K, Liao JL. 2015. Advances in molecular identification of plant nematodes. Plant Protection, 41(6): 1–8 (in Chinese) [卓侃, 廖金铃. 2015. 植物线虫分子鉴定研究进展. 植物保护, 41(6): 1–8]

(责任编辑:李美娟)