

根结线虫的研究现状

赵 鸿^{1,2*}, 彭德良^{1**}, 朱建兰²

(1. 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100094; 2. 甘肃农业大学植物保护系, 兰州 730070)

摘要: 概述了根结线虫的发生分布和传统分类鉴定, 以及分子生物学技术(同工酶电泳技术、DNA 重组技术、PCR 技术)在根结线虫种和生理小种鉴定中的运用及其防治, 并对生物防治及抗根结线虫育种、转基因工程在植物线虫学研究领域上的应用前景作了展望。

关键词: 植物病理学, 根结线虫, 分类鉴定; 防治

中图分类号: S 432 45 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-1542(2003)06-0006-04

Reviews on the root-knot nematodes ZHAO Hong^{1,2}, PENG De-liang^{1,*}, ZHU Jian-lan² (1 Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China; 2 Department of Plant Protection, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: The occurrence, distribution, classification and control of root-knot nematodes as well as applicotim of molecular biological techniques such as isoenzymic electrophoresis, DNA recombination, and polymerase chain reaction identification of nematode species and physiological races were reviewed. The prospect of biological control of root-knot nematodes, resistance breeding, and transgenic engineering were also discussed.

Key words: phytopathology; root-knot nematodes; classification and identification; pest control

根结线虫 (*Meloidogyne* spp.) 是危害农作物的重要病原生物之一, 它广泛分布于世界各地。1855 年 Berkeley 最先在英国黄瓜根际发现根结线虫^[1], 1879 年 Cornu 首次给根结线虫命名, 以后逐渐有新种不断被发现。目前国际上报道的根结线虫有 80 多种^[2], 主要寄生在蔬菜、粮食作物、经济作物、果树、观赏植物及杂草等 2 000 多种寄主上。温带、亚热带、热带地区的植物受害尤其严重, 病害发生后, 一般减产 10%~20%, 严重的达 75% 以上^[3]。

目前, 我国报道的根结线虫有 29 种, 其中 16 个种是在我国发现和报道的根结线虫新种, 如象耳豆根结线虫 (*M. enterolobi*)、中华根结线虫 (*M. sinensis*)、福建根结线虫 (*M. fujianensis*)、济南根

结线虫 (*M. jinanensis*)、孔氏根结线虫 (*M. kongi*)、林氏根结线虫 (*M. lini*)、简阳根结线虫 (*M. jianyangensis*)、卷尾根结线虫 (*M. cirricauda*)、柑桔根结线虫 (*M. citri*)、东海根结线虫 (*M. donghaiensis*)、繁峙根结线虫 (*M. fanzhuensis*)、猕猴桃根结线虫 (*M. actinidiae*)、闽南根结线虫 (*M. mingnanica*)、海南根结线虫 (*M. hainanensis*)、拟悬铃木根结线虫 (*M. paraplantani*)、龙眼根结线虫 (*M. dimocarpus*)。根据目前报道, 由根结线虫引起的农作物损失中 90% 以上是由南方根结线虫 (*M. incognita*)、花生根结线虫 (*M. arenaria*)、爪哇根结线虫 (*M. javanica*) 及北方根结线虫 (*M. hapla*) 4 个最常见种引起的。据研究, 根结线虫

收稿日期 2003-02-18, 修订日期 2003-08-22

基金项目 国家自然科学基金“根结线虫核糖体基因内转录间隔区的遗传和多态性研究(30170610)”, “十五”国家科技攻关“蔬菜和大豆病虫害可持续控制技术项目(2001BA509B06)”

* 现工作单位为中国气象局兰州干旱气象研究所

** 通讯作者

具有寄主小种分化现象,其中南方根结线虫有 4 个生理小种,花生根结线虫有 2 个生理小种,北方根结线虫由两个明显的细胞遗传学小种组成即 A 小种和 B 小种^[4]。由于线虫不同种或寄主小种对某些寄主种或品种具有寄主专化性,因此对于根结线虫的种和小种的准确鉴定及其发生分布的研究具有重要的意义。

1 分类和鉴定研究现状

用于鉴定根结线虫种和生理小种的方法很多,目前,主要是利用国际根结线虫协作组的综合鉴定方法:形态学特征、鉴别寄主反应、细胞遗传学特征、生物化学、生态学等,其中利用前两种方法就能够较准确地鉴定根结线虫。近几年发展起来的分子生物学技术和方法能快速、准确地检测出根结线虫种和生理小种。

1.1 形态学特征分类鉴定

线虫雌成虫的会阴花纹是区分根结线虫种的唯一特征,由 Chitwood 于 1949 年首创,随后又有许多学者相继进行了这方面的研究。Vik, C P 和 Birchfred, W (1978)通过电镜观察了 3 种不同根结线虫的特征。我国学者杨宝君(1984)对来自全国不同地区的 15 种植物根结线虫、喻盛甫(1990)对云南省约 30 个县 60 种作物上采集的 150 种根结线虫种群、于秋菊(1999)对黑龙江省番茄根结线虫、赵洪海(2000)对烟台市危害剑麻的根结线虫、唐本安(2000)对危害秋芹的根结线虫、高乾魁(2000)对山东省菏泽地区危害薯蓣的根结线虫等的主要种类通过形态学特征进行一一鉴定。赵洪海根据形态学特征鉴定并报道了我国寄生于海南省三亚市葱上的一新纪录种——拟禾本科根结线虫(*M. graminicola*)^[5]。另外,线虫雄虫的头部形态、背食道腺开口至口针基部球底部的距离也是鉴定种的重要特征。

1.2 鉴别寄主反应鉴定

此方法是由北卡罗来那州 Sasser 和 Taylor 经多年试验筛选出的,用来鉴定根结线虫的种和生理小种。鉴别寄主有 6 个品种:烟草 NC95、棉花 Del-tapine16、辣椒 California Wonder、西瓜 Charleston Grey、花生 Florrunner、番茄 Rutgers,是目前国际上通用的鉴别寄主。利用这套鉴别寄主可以鉴定 4 种最常见根结线虫的种和生理小种,还可鉴定新地区或新寄主上发现的新的根结线虫群体。通常情况下,应用鉴别寄主结合形态学特征的观察可得到更准确的结果。

1.3 分子生物学技术在分类鉴定中的应用

20 世纪 80 年代,分子生物学技术在线虫学各研究领域得到广泛应用,分子诊断已经成为植物线虫学研究的新领域和热点之一。运用同工酶电泳、DNA 探针、PCR、RFLP、RAPD 等分子生物技术和方法,可以直接检测线虫的基因组,排除了基因表达产物中阶段性的特异性和随环境变化的多型性对种类鉴定的影响,从而快速、准确的鉴定出线虫的种类和生理小种。

1.3.1 同工酶电泳技术 同工酶电泳分析是 20 世纪 60 年代发展起来的一种鉴定根结线虫相对较快的方法。Esbenshade 等利用单个雌虫的酯酶(Est)和苹果酸脱氢酶(MDH)的同工酶电泳图谱区分了 4 种常见根结线虫:奇特伍德根结线虫(*M. chitwoodi*)、纳西根结线虫(*M. naasi*)、短小根结线虫(*M. exigua*)和禾草根结线虫(*M. graminicola*)^[6]。Tomaszewski 等(1994)用酯酶的同工酶电泳图谱鉴定出寄生在埃及花生上的爪哇根结线虫。另外,我国胡凯基(1988)利用酯酶电泳图谱也成功地区分了北方根结线虫、爪哇根结线虫、花生根结线虫和象耳豆根结线虫。陈永芳等(1998)用瑞典 Pharmacia Biotech 公司开发的 Phastsystem 电泳仪对云南省烟草和一串红上的根结线虫进行 Est 和 MDH 电泳图谱分析,得出 *M. hapla*, *M. arenaria*, *M. incognita* 的 Est 谱带类型分别为 H_1 、 A_1 、 I_1 , Rf 值分别为 0.5、0.54、0.47, MDH 谱带类型分别为 H_1 、 N_1 、 N_1 , Rf 值分别为 0.37、0.24、0.24。*M. javanica* 的 Est 谱带有两种类型:一种为 J_3 , Rf 值为 0.47、0.55、0.59;另一种为 J_2 , Rf 值为 0.47、0.59,其 MDH 谱带类型为 N_1 , Rf 值为 0.24。这样根据 MDH 谱带和 Est 谱带种特异性的稳定性很快将 4 种常见根结线虫区分开^[7]。但在应用同工酶分析时必须应用特定发育阶段的根结线虫雌虫,同时需要大量的线虫样品才能获得可靠的结果。同时,蛋白质的表达也可能受到未知环境因素的影响。

1.3.2 DNA 重组技术 20 世纪 80 年代中后期, Powers 等对根结线虫的基因组 DNA 和线粒体 DNA(mtDNA)进行了 RFLP 分析,且在已经涉及的根结线虫群体间检测出明显的限制性片段长度多态性,也检测出一些种类甚至种间变异。对 mtDNA 和其基因序列进行 RFLP 分析能有效地区分几种根结线虫群体,但是这一技术敏感性较低,而且需要大量的线虫样品和从几千头线虫中提取微克级 DNA,

在一定程度上影响了 mtDNA 技术的推广和应用。RAPD 分析能够鉴定单头根结线虫幼虫,也能分析比较种间及种内群体。Cenis 用 RAPD 技术成功区分了花生根结线虫、南方根结线虫、爪哇根结线虫和北方根结线虫的差异^[8]。喻盛甫等(1998)用 120 个随机引物对 4 种常见根结线虫 10 个小种和类型进行了全基因组 DNA 的 RAPD 分析,筛选出 11 个适宜引物,扩增出 91 条 RAPD 谱带。其中 86 条为多态性谱带,并将其进行了聚类分析,得出种间水平上花生根结线虫和爪哇根结线虫的亲缘关系最近,北方根结线虫与另外 3 种根结线虫亲缘关系最远,在种下水平上同种的不同小种和类型间存在不同程度的遗传差异;南方根结线虫 4 个生理小种间、花生根结线虫 2 个生理小种间亲缘关系较近;爪哇根结线虫 2 个酯酶谱带类型间,北方根结线虫 2 个细胞生物学小种 A、B 间遗传差异较大^[9]。

1.3.3 PCR 技术 利用 PCR 技术能够从复杂的 DNA 分子群体中选择性地复制某一段特异的序列,使其得到扩增,从而解决了对于含少量生物量的样品中 DNA 量受限制的问题。Harris 等(1990)应用 PCR 技术对单个根结线虫幼虫的 mtDNA 进行鉴定。Power 等(1993)用 PCR 技术成功地区分了 4 种常见根结线虫和奇特伍德根结线虫。Blok, V C 等(1997)用引物 5S 和引物 18S 扩增爪哇根结线虫、花生根结线虫、南方根结线虫、马雅圭根结线虫(*M. mayaguensis*)和北方根结线虫的 rDNA 中 18S 和 5S 之间的 ITS 区域,从爪哇根结线虫、花生根结线虫和南方根结线虫中扩增出 715bp 的 ITS 产物;从玛雅圭根结线虫中扩增出 831bp 的 ITS 产物,从北方根结线虫中扩增出的 ITS 最小,仅为 564bp,从而有效地揭示了种内和种间变异^[10]。

2 根结线虫病抗病育种及抗线虫基因工程

番茄抗根结线虫育种研究始于 19 世纪 30 年代,1940 年 Bailey 筛选出 11 份抗根结线虫的材料。1956 年 Gilbert 指出对根结线虫的抗病基因是由一个显性基因 *M₁* 控制,并且与一些控制不良性状的基因紧密连锁。以后人们相继研究了 *M₁* 基因,并发现 *M₁* 基因是所有番茄栽培种的唯一抗源。秘鲁番茄、多毛番茄和多腺番茄等野生栽培种均含有该基因,而且该基因可抗除北方根结线虫以外其余 3 种根结线虫。Ammati(1985)报道,在野生番茄中可能存在着不同于 *M₁* 的新基因,这些基因可以抗南方根结线虫、北方根结线虫和根结线虫属其它线虫

病害^[11]。

国外育种专家早在 1940 年就进行抗根结线虫的选育工作。1949 年 Frazier 等从加利福尼亚的杂交系中选育出多个由显性基因 *M₁* 控制的抗性番茄品种。Berham 及 Winstead(1957)在夏威夷和得克萨斯州的番茄选育中发现了抗多种根结线虫的品种,但对北方根结线虫感病。Gilbert(1958)、Aramov(1985,1991)等经过多年选育培育出十几种抗根结线虫的杂交种(*F₁*)。目前法国、荷兰、日本等园艺业发达国家都相继从秘鲁番茄中引入 *M₁* 基因,选育出抗根结线虫的栽培番茄。为了更多地野生番茄中的抗病基因导入栽培番茄中,育种者不断地采用各种高新技术手段,以克服远缘杂交的障碍。Ammati(1986)、Cop(1991)分别利用胚培养成功地将抗性基因转入杂种中,并获得抗性植株。目前克隆 *M₁* 基因技术亦日趋成熟,Messeguer *et al* (1991)构建了 *M₁* 基因侧翼的 9 个高分辨率的 RFLP 图谱。Aarts(1991)研究出与 *M₁* 紧密连锁的酸性磷酸酶-1(APS-1)座位的一个探针。Kaloshian 等(1998)和 Milligan 等(1998)用定位克隆的方法从野生番茄 *Lycopersicon peruvianum* 中分离到 *M₁* 基因,然后用 DNA 重组技术将 *M₁* 基因定位于番茄第 6 染色体上的一小段区域中,通过对连续 52Kb DNA 的序列分析,得出抗北方根结线虫外的其他 3 种根结线虫的番茄栽培种^[12]。

3 根结线虫病的防治

根结线虫的防治除了植物检疫工作外,还有农业防治(轮作、休闲、种植抗病品种、调节播种期、改良土壤、清洁田园等)、物理防治(汰洗、热处理、射线或超声波处理及灌溉等)、化学防治和生物防治。

化学防治在根结线虫综合防治中占很大比例。目前,我国常用的杀线虫剂有:力满库 10% 颗粒剂(fenamiphos)、万强(oxamyl)、涕灭威(aldicarb)、威百亩(metham-sodium)、胺线磷(diamidfos)、克线丹(rugby)等。10% 益舒宝(ethoprophos)颗粒剂和 3% 米乐尔(isazophos)颗粒剂是当前预防和控制蔬菜根结线虫病的有效药剂,噻唑磷(IKI-1145)目前在国外也很受重视。另外,溴甲烷土壤消毒是我国蔬菜保护地用以防治土传病害的主要措施之一,特别是对难以防治的蔬菜根结线虫病效果优异。但是溴甲烷对大气臭氧层具有破坏作用,1987 年《关于停止使用消耗臭氧层物质的蒙特利尔议定书》,各签约国相继制定了有关政策,美国等一些国家目前已禁用

溴甲烷。1.8%爱福丁(avermectin)乳油可作为溴甲烷的替代品防治蔬菜根结线虫病。国外报道以碘甲烷和氧硫化碳(COS)代替溴甲烷作为熏蒸剂,也很引人注目。

生物防治是近年来发展较迅速的一种防治方法。高等担子菌如侧耳属(*Pleurotus*)的粗皮侧耳(*P. ostreatus*)、肺状侧耳(*P. pulmonarius*)、漏斗状侧耳(*P. safor-caju*)、长柄侧耳(*P. spodoleucus*)、裂皮侧耳(*P. corticatus*)、阿魏侧耳(*P. ferulae*)和 *P. memberanzen* 等 23 个种的菌株产生的毒素具有杀线虫活性。子囊菌枪林盘属 *Lachnum papyraceum*、*Apiocrea chrysospermis* 的代谢产物杀线虫谱很广。半知菌淡紫拟青霉(*Paecilomyces lilacinus*)、寡孢节丛孢菌(*Arthrobotrys*)、灰绿曲霉(*Aspergillus glaucus*)等都具有不同程度的杀线虫活性。巴氏杆菌(*Pasteuria* spp.)是一种菌丝型和内生孢子型的植物线虫专性寄生细菌,在温室试验中已被证实可作为一种有效的植物线虫生防因子,寄生于根结线虫、根腐线虫、孢囊线虫、球孢囊线虫、柑橘半穿刺线虫等重要植物线虫,使农业有害线虫种群密度明显降低。如在美国佛罗里达,穿刺巴氏芽菌(*P. penetrans*)已有效地防治了花生根结线虫(*M. arenaria*)(Oostendorp, et al 1990, 1991)。这类细菌是非常有潜力的植物线虫生防因子,目前已成为国内外研究热点。另外,从番茄根上分离筛选到尖镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)非致病菌株(S162)可有效控制南方根结线虫的群体数量。最近,又发现多功能生防制剂圆褐固氮菌 YKT41 (*A. chroococcum* YKT-41),对南方根结线虫防效明显,并且能够固氮,起到明显的增产效果。有人从用胶原蛋白改良过的土壤中分离出假单胞杆菌(*Pseudomonas chitinolytica*)和蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*),对爪哇根结线虫具有明显的抑制作用。雅致小克银汉霉(*C. elegans*)可产生胶原蛋白酶、几丁质酶和其他蛋白酶,它在胶原蛋白培养基上的培养滤液可阻止爪哇根结线虫卵的孵化,影响幼虫的活动和侵入^[13]。植物源杀虫剂印楝素可有效降低番茄根部的南方根结线虫、爪哇根结线虫幼虫的侵染^[14]。

威宝(VitaBio)土壤改良剂/植物营养增长液是有机酵素(酶)和复合菌种的浓缩混合液,是天然的根结线虫驱逐剂,它既能改善原先土壤内的生态结构,又有预防与抑制根结线虫的功效。除此之外,还有一些天敌如捕食线虫的螨、弹尾目昆虫等也能有

效地防治根结线虫。

4 讨论与展望

根结线虫是世界上危害农作物最严重的线虫之一,因此准确的鉴定其种类显得非常重要。一般情况下,通过形态学特征就可鉴定到种,如再结合分子生物学技术就可快速、准确地进行分类鉴定。只有在明确其具体种以及生理小种后,才能进一步深入开展其它方面的研究,如种群密度、群体动态消长规律、线虫与寄主间的分子互作、抗线虫基因的筛选和利用以及有效的防治方法。

参考文献:

- [1] Sasser J N Plant parasitic nematodes the famer's hidden enemy [M] Raleigh Carolina Carolina State University 1989, 13 - 15
- [2] Schmitz V B, Burgermeister W, Braasch H Molecular genetic classification of central European *Meloidogyne chitwoodi* and *M. jallax* populations nachrichtenbl [J] Deut Pflanzenschutzd 1998, 50(12) 310 - 317
- [3] Sasser J N The international *Meloidogyne* project - its goals and accomplishments [J] Annual Review Phytopathology, 1983, (21) 271 - 288
- [4] Eisenback J D, Hirschmann H, Sasser J N, et al 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
- [5] 赵洪海 根结线虫在中国的一新记录种——拟禾本科根结线虫 *Meloidogyne graminicola* [J] 植物病理学报, 2001, 31(2) 184 ~ 188
- [6] Esbenshade P R, Triantaphyllou A C Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species [J] Journal of Nematology, 1985, 17(1) 6 - 20
- [7] 陈永芳, 吴建宇, 胡先奇, 等 用 Phastsystem 电泳仪快速鉴定根结线虫种类 [J] 植物病理学报, 1998, 28(1) 73 ~ 77
- [8] Cenis J L Identification of major *Meloidogyne* spp by random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) [J] Phytopathology, 1993, 83(1) 76 - 78
- [9] 喻盛甫, 王 扬, 胡先奇, 等 四种常见根结线虫基因组 DNA 的 RAPD 分析 [J] 植物病理学报, 1998, 28(4) 359 ~ 365
- [10] Blok V C, Phillips M S, Fargette M Comparison of sequence from the ribosomal DNA intergenic region of *Meloidogyne mayaguensis* and other major tropical root-knot nematodes [J] Journal of Nematology, 1997, 29(1) 16 - 22
- [11] 彭德良, 唐文华 番茄抗根结线虫 *Mt* 基因研究进展 [J] 沈阳农业大学学报, 2001, 32(3) 220 ~ 223
- [12] Kaloshian I, Yaghoobi J The root-knot nematode resistance locus *Mt* in tomato [J] Mol Gen Genet, 1998, (57) 376 - 385
- [13] 杨新玲, 张利兰 植物寄生线虫防治的新策略 [J] 世界农业, 2001, 23(5) 26 ~ 29
- [14] 安玉兴, 徐汉虹 植物寄生线虫防治的新策略 [J] 世界农业, 2001, 23(5) 30 ~ 33