

文章编号: 1674-7054(2021)03-0375-05



香瓜根结线虫种类鉴定及杀线剂的室内毒力测定

李周容^{1,2}, 孙燕芳², 陈园², 裴月令², 冯推紫², 龙海波²

(1. 海南大学植物保护学院, 海口, 570228; 2. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 海口, 571101)

摘要: 利用形态学与分子生物学方法, 对采集于海南省文昌市乌鸡塘村香瓜根系上的根结线虫种群进行鉴定, 明确其为象耳豆根结线虫 (*Meloidogyne enterolobii*), 同时测定 3 种常用杀线剂对象耳豆根结线虫 2 龄幼虫的室内毒力。结果表明, 95% 阿维菌素原药对象耳豆根结线虫 2 龄幼虫的毒杀效果最好, LC_{50} 值为 $0.351 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 85% 噻唑膦原药和 95% 氟吡菌酰胺原药对象耳豆根结线虫 2 龄幼虫的 LC_{50} 值分别为 $0.82 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $7.783 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

关键词: 香瓜; 根结线虫; 鉴定; 室内药剂筛选

中图分类号: S 481⁺.9 **文献标志码:** A

引用格式: 李周容, 孙燕芳, 陈园, 等. 香瓜根结线虫种类鉴定及杀线剂的室内毒力测定 [J]. 热带生物学报, 2021, 12(3): 375-379. DOI: 10.15886/j.cnki.rds wxb.2021.03.015

西甜瓜(西瓜、哈密瓜、香瓜等)是海南热带特色高效农业的“王牌”产业, 2020 年海南种植面积近 $333\,333.33 \text{ hm}^2$, 年产值约 100 亿元^[1]。其中, 冬春季种植的薄皮甜瓜年均播种面积 $3\,000 \sim 4\,000 \text{ hm}^2$, 因栽培周期短、上市早、经济效益好, 已成为当地农民增收的主要产业之一^[2]。近年来, 随着种植年限的增加和重茬连作, 由根结线虫 (*Meloidogyne* spp.) 引起的根结线虫病已成为海南西甜瓜生产上的一种主要根部病害, 尤其在乐东、东方、三亚的设施大棚甜瓜种植上普遍发生, 一般可导致 20%~30% 产量损失, 严重时产量损失在 50% 以上甚至绝收^[3-4]。由于缺乏有效的抗病品种, 生产上主要依赖化学杀线剂防治西甜瓜根结线虫病害。目前, 市场上应用较普遍的有阿维菌素、噻唑膦和氟吡菌酰胺等少数非熏蒸性类杀线剂。西甜瓜根结线虫病病原发生种类较多, 孔祥义等^[5]报道大棚甜瓜根结线虫病病原有南方根结线虫 (*M. incognita*)、花生根结线虫 (*M. arenaria*) 和北方根结线虫 (*M. hapla*)。龙海波等^[6]鉴定危害海南哈密瓜上的甜瓜根结线虫病病原的主要种类有南方根结线虫 (*M. incognita*)、爪哇根结线虫 (*M. javanica*) 和象耳豆根结线虫 (*M. enterolobii*); 张国锋等^[7]报道了南方根结线虫 (*M. incognita*) 是危害西瓜根结线虫的优势种群。在对海南西甜瓜线虫病害的调查过程中, 笔者发现根结线虫侵染危害露地栽培香瓜 (*Cucumis melo* L. var. *makuwa* cv. ‘Silver Light’)。本研究采用形态和分子鉴定对采集的根结线虫进行种类鉴定, 同时筛选了几种常用的杀线剂品种, 分析测定其对采集的海南香瓜根结线虫种群的毒力, 旨在为高效防控田间根结线虫病害提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 供试病样 于 2019 年在海南省文昌市乌鸡塘村采集到具有明显“根结”症状的香瓜病根。从香瓜病根挑取饱满的单卵囊接种至长丰 3 号辣椒上进行保种、繁殖及纯化培养。

收稿日期: 2021-01-31

修回日期: 2021-04-02

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0201209); 中国热带农业科学院基本业务费专项(1630042017024); 农业农村部部门预算项目“粮经轮作模式关键技术优化提升与集成示范”

第一作者: 李周容(1995-), 女, 海南大学植物保护学院 2018 级硕士研究生. E-mail: wode591@qq.com

通信作者: 龙海波(1984-), 副研究员. 研究方向: 植物线虫学. E-mail: longhb@catas.cn

1.2 供试药剂及配制浓度 将供试原药用丙酮配制成母液,再用 0.1% 的吐温 80 水溶液配制成 5 个浓度(表 1)。

表 1 药剂及其浓度

Tab. 1 Nematicides and their concentrations

供试药剂 Nematicide	来源 Source	配制浓度 Concentration/(mg·L ⁻¹)
95%阿维菌素原药 Abamectin	武汉天惠生物工程有限公司	4, 2, 1, 0.5, 0.25
85%噻唑膦原药 Fosthiazate	河北三农农用化工有限公司	8, 4, 2, 1, 0.5
95%氟吡菌酰胺原药 Fluopyram	湖北正兴源精细化工有限公司	40, 20, 10, 5, 2.5

1.3 试验方法

1.3.1 根结线虫形态鉴定 直接挑取西瓜根系上的卵囊孵化得到 2 龄幼虫,用挑针从病根组织中分离获得雌虫。参照刘维志^[8]所描述的方法进行观察,测量并记录 2 龄幼虫体长,最大体宽,口针长度,尾长等形态指标。2 龄幼虫的观察样本数为 20 头。参照张绍升^[9]所描述的方法制作雌虫会阴花纹永久玻片,在显微镜下观察并拍照。

1.3.2 根结线虫 DNA 提取 根据 1.3 方法得到 2 龄幼虫悬浮液,参照龙海波等^[6]的方法,挑取单头 2 龄幼虫进行 DNA 提取并于-20 °C 保存备用。

1.3.3 rDNA-ITS 序列扩增 利用万新龙等^[10]设计的引物 V5367 (TTGATTACGTCCCTGCCCTTT) 和 26s (TTTCACTCGCCGTTACTAAGG) 扩增根结线虫 ITS 序列。PCR 反应使用 ExTaq 酶 PCR 扩增试剂盒 (TaKaRa), 扩增体系参照龙海波等^[6]的方法。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测观察,并对目的条带进行切胶回收、连接、转化,最后挑取阳性克隆送至广州华大基因科技有限公司测序,将获得的线虫 rDNA-ITS 区序列与 GenBank 数据库中根结线虫序列进行比对分析。

1.3.4 线虫 SCAR 标记特异性引物检测 利用 LONG 等^[11]设计的象耳豆根结线虫 SCAR 标记的特异引物 MeF (AACTTTTGTGAAAGTGCCGCTG) 和 MeR (TCAGTTCAGGCAGGATCAACC) 进行扩增。PCR 扩增、产物电泳检测方法同 1.5。

1.3.5 药剂毒力的测定 采用浸渍法,将 1.3 方法中得到的 2 龄幼虫悬浮液调制为 400 条·mL⁻¹ 备用。取 24 孔细胞培养板,每孔加入 1 mL 配制好的各浓度药剂,分别加入 1 mL 根结线虫 2 龄幼虫悬浮液,以 0.1% 的吐温 80 水溶液做空白对照,每个浓度重复 4 次。将药剂处理的 2 龄幼虫悬浮液于 28 °C 培养箱中放置 24 h 后,将每处理中的加药线虫悬浮液转移至生物计数板中,显微镜下观察,活的线虫虫体呈现有弧度的弯曲,而死亡的线虫身体僵直(图 1),10 min 内完成统计。

1.3.6 数据统计 使用 Excel、SPSS 对数据进行分析处理,计算各处理的死亡率和校正死亡率,并用机率值分析法计算出各个药剂的致死中浓度 LC₅₀ 值和 95% 置信区间。



a. 活的象耳豆根结线虫 b. 死亡的象耳豆根结线虫

图 1 显微镜下活的及死亡的象耳豆根结线虫 2 龄幼虫
Fig.1 The live and dead second instar larvae of *M. enterolobii* under microscope

$$\text{死亡率} = \frac{\text{死亡线虫数}}{\text{处理线虫数}} \times 100\%$$

$$\text{校正死亡率} = \frac{\text{处理死亡率} - \text{对照死亡率}}{1 - \text{对照死亡率}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 形态特征 2龄幼虫和雌虫会阴花纹的显微观察: 2龄幼虫呈线形, 体环小、头冠明显、侧唇大呈三角形; 口针纤细, 基部球大且圆, 与口针基杆分界明显; 中食道球呈椭圆形, 直肠膨大; 透明尾区界限明显, 尾尖钝圆(图 2-a, b)。具体测量值为($n=20$): 体长(L)为 383~475 μm , 体宽(W)为 14.3~17.7 μm , 口针长(ST)为 11.8~13.5 μm , 背食道腺开口到口针基球附近的距离(DGO)为 3.2~5.8 μm , 尾长(Tail)为 46.2~61.5 μm 。雌虫会阴花纹呈椭圆形, 背弓较高, 线纹紧密且细, 呈波浪形(图 2-c), 且大多数会阴花纹无侧线, 少数具 1 条或 2 条不明显的侧线。

2.2 分子鉴定 利用根结线虫通用引物 V5367 和 26s, 对该种群的 rDNA-ITS 区序列进行扩增, 均获得了大小约 750 bp 的电泳条带(图 3-a), BlastN 同源性搜索比对显示, 该种群与 NCBI 数据库中的象耳豆根结线虫(*M. enterolobii*)一致性为 99.9%。利用象耳豆根结线虫特异性引物 MeF/MeR 扩增该种群的 ITS2 序列, 均获得长度约 300 bp 的特异条带, 空白对照无扩增条带(图 3-b)。

2.3 3种杀线剂对象耳豆根结线虫2龄幼虫的毒力 由表 2 可知, 供试药剂处理 24 h 后, 3种杀线剂对象耳豆根结线虫 2 龄幼虫的毒力大小顺序为阿维菌素>噻唑膦>氟吡菌酰胺, LC_{50} 值分别为 0.351、0.820 和 7.783 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3 讨论

经形态学和分子生物学鉴定, 本实验采集的香瓜根结线虫种类确定为象耳豆根结线虫(*M. enterolobii*), 这是国内首次发现象耳豆根结线虫感染危害香瓜。国内外已报道象耳豆根结线虫可以

感染包括豆科、茄科、葫芦科中的多种蔬菜, 以及玉米、棉花、烟草等重要粮食和经济作物^[12-15]。研究发现, 象耳豆根结线虫比南方根结线虫、爪哇根结线虫等常见种类具有更强的致病力, 能够克服 *N*、*Mi-1*、

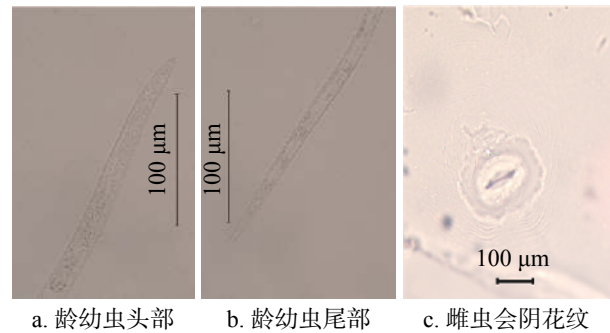


图 2 香瓜根结线虫形态特征

Fig. 2 Morphological characteristics of the muskmelon root-knot nematode

a: The head of the second instar larva; b: The tail of the second instar larvae; c: The perineal pattern of female larva

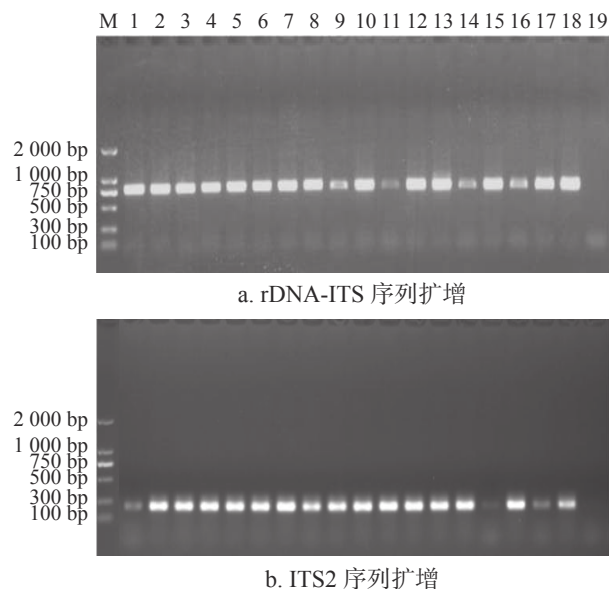


图 3 香瓜根结线虫 rDNA-ITS (a) 及 ITS2 (b) 序列扩增

M: DNA marker D2000; 泳道 1-18: 香瓜根结线虫种群; 泳道 19: 空白对照

Fig. 3 Amplification of rDNA-ITS (a) and ITS2 (b) sequence of the muskmelon root-knot nematode

M: DNA marker D2000; Lane 1-18: Muskmelon root-knot nematode population; Lane 19: Blank control

表 2 3种杀线虫剂对象耳豆根结线虫的室内毒力

Tab. 2 The toxicity of 3 nematocides to *M. enterolobii* in laboratory

杀线剂 Nematicide	毒力回归方程 Regression equation	决定系数 R^2	致死中浓度 $LC_{50}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	95%置信区间 95% confidence interval
阿维菌素 Avermectin	$y=1.45x+0.67$	0.930	0.351	0.173-0.580
噻唑膦 Fosthiazate	$y=1.58x+0.15$	0.959	0.820	0.679-0.981
氟吡菌酰胺 Fluopyram	$y=1.59x+1.42$	0.977	7.783	6.495-9.559

Mh、*Rk* 等多个抗病基因,被认为是最具危害性的植物病原根结线虫之一^[16]。值得高度警惕的是,近年来象耳豆根结线虫在海南全省快速扩散蔓延,已取代南方根结线虫成为冬季瓜菜上的优势种类,对瓜菜产业生产安全构成了严重现实威胁。

选用高效低毒化学杀线剂是现阶段防治根结线虫病害的主要手段。本研究选用几种主流的杀线剂原药进行室内毒力测定发现,阿维菌素对象耳豆根结线虫幼虫具有最高的杀虫活性($LC_{50}=0.351\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$),噻唑膦($LC_{50}=0.82\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)和氟吡菌酰胺对象耳豆根结线虫幼虫的杀虫活性(LC_{50})分别为 $0.82\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $7.783\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。FASKE 等^[17]和 YUE 等^[18]测定阿维菌素对南方根结线虫幼虫的 LC_{50} 值分别为 $0.42\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.68\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,与本研究测定的对象耳豆根结线虫的毒力大小相近,表明阿维菌素是一种较稳定且高效的药剂。另外,YUE 等^[18]测定氟吡菌酰胺对南方根结线虫 LC_{50} 值为 $0.13\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,与本研究测定的对象耳豆根结线虫的毒力差异较大,原因很可能是由于采集的香瓜象耳豆根结线虫种群对氟吡菌酰胺已产生了一定的抗药性。本研究测定的不同类型杀线剂的室内毒力结果是指导田间用药的一个理论依据,但由于实际防治效果还受到剂型、助剂、线虫抗药性水平等多种因素的影响,下一步还需对含有阿维菌素、噻唑膦和氟吡菌酰胺等有效成分的商品制剂进行田间测试验证。

参考文献:

- [1] 严婉荣, 谢圣华, 肖敏, 等. 海南省西瓜种植现状及病虫害发生情况调查[J]. 现代农业科技, 2020(21): 113 - 116.
- [2] 黄文枫, 胡艳平, 朱白婢. 海南薄皮甜瓜枯萎病原菌鉴定及抗病砧木的筛选[J]. 热带生物学报, 2020, 11(3): 310 - 313.
- [3] 王志伟, 李焕秀, 孙德玺, 等. 西瓜甜瓜根结线虫病研究进展[J]. 中国瓜菜, 2010(20): 31 - 33.
- [4] 李劲松, 韩晓燕, 柳唐镜, 等. 海南省西瓜甜瓜产业发展现状及展望[J]. 中国瓜菜, 2009, 22(5): 72 - 74.
- [5] 孔祥义, 李劲松, 许如意, 等. 海南大棚甜瓜根结线虫病研究[J]. 农技服务, 2007, 24(9): 54 - 55.
- [6] 龙海波, 孙艳芳, 白成, 等. 海南省象耳豆根结线虫的鉴定研究[J]. 热带作物学报, 2015, 36(2): 371 - 376.
- [7] 张国锋, 冯龙, 暴连群, 等. 几种杀线剂对西瓜根结线虫的田间药效试验[J]. 现代农村科技, 2016(20): 48 - 49.
- [8] 刘维志. 植物线虫学研究技术[M]. 辽宁: 辽宁科学技术出版社, 1995: 50 - 51.
- [9] 张绍升. 植物线虫病诊断与治理[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1999: 300 - 302.
- [10] 万新龙, 李建洪, 彭德良. 根结线虫 rDNA-ITS 片段的克隆与序列分析[J]. 华中农业大学学报, 2007(5): 624 - 628.
- [11] LONG H, LIU H, XU J H. Development of a PCR diagnostic for the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2006, 36: 109 - 115.
- [12] BRITO J A, STANLEY J, MENDES M, et al. Host status of selected cultivated plants to *Meloidogyne mayaguensis* in Florida [J]. Nematropica, 2007, 37: 65 - 71.
- [13] RAMMAH A, HIRSCHMANN H. *Meloidogyne mayaguensis* sp. (*Meloidogynidae*), a root-knot nematode from Puerto Rico [J]. Journal of Nematology, 1988, 20: 58 - 69.
- [14] 贾本凯, 王会芳, 陈绵才. 海南岛茄果类蔬菜根结线虫种类鉴定[J]. 广东农业科学, 2012, 7: 104 - 106.
- [15] 刘晨, 陈志杰, 杨艺炜, 等. 陕西省首次发现象耳豆根结线虫危害洛南白菜[J]. 植物保护, 2020, 46(5): 156 - 159.
- [16] CASTAGNONE-SERENO P. *Meloidogyne enterolobii* (= *M. mayaguensis*): profile of an emerging highly pathogenic, root-knot nematode species [J]. Nematology, 2012, 14(2): 133 - 138.
- [17] FASKE TR, STARR J L. Sensitivity of *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis* to abamectin [J]. Journal of Nematology, 2006, 38 (2): 240 - 244.
- [18] YUE X, Li F, WANG B. Acticity of four nematicides against *Meloidogyne incognita* race 2 on tomato plants [J]. Journal of phytopathology, 2020, 168: 399 - 404.

Identification and Laboratory Screening of Muskmelon Root-knot Nematodes

LI Zhouong^{1,2}, SUN Yanfang², CHEN Yuan², PEI Yueling², FENG Tuizi², LONG Haibo²

(1. College of Plant Protection, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Institute of Environment and Plant Protection, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China)

Abstract: A root-knot nematode population collected from Wujitang Village, Wenchang City, Hainan Province was identified by using morphological and molecular biological methods. The result showed that the root-knot nematode infesting the muskmelon was *Meloidogyne enterolobii*. Three commonly used nematicides were further tested to determine their toxicity to the second-instar larvae of *M. enterolobii* under laboratory conditions. The tests showed 95% avermectin had the best toxic effect on the 2nd instar larvae, with an LC₅₀ value of 0.351 mg·L⁻¹, followed by 85% fosthiazate and 95% fluopyram, with the LC₅₀ values of 0.82 mg·L⁻¹ and 7.783 mg·L⁻¹, respectively. These results will provide reference for the precise control and prevention of *M. enterolobii* in the muskmelon field in Hainan.

Keywords: muskmelon; root-knot nematode; identification; laboratory screening of nematicides

(责任编辑: 骆焱平 责任编辑: 叶 静)