

西藏自治区色季拉山高寒草甸牧草根腐线虫的鉴定

王宏洪^{1,2} 卓 侃² 薛会英³ 廖金铃^{1,2}

1. 广东生态工程职业学院植物有害生物防控与生物环境健康技术研究中心, 广州 510520;
2. 华南农业大学农学院, 广州 510642;
3. 西藏农牧学院资源与环境学院, 林芝 860000

摘要 在西藏自治区色季拉山高寒草甸土壤线虫群落调查期间,从高山嵩草(*Kobresia pygmaea*)根际土壤中分离得到一种根腐线虫。通过形态特征观察和分子序列比对,将其鉴定为刻痕短体线虫(*Pratylenchus crenatus*)。其主要特征:唇环 3 个,口针长 15.6~16.2 μm ,口针基部球前缘略凹,侧线 6 条,V 值为 82.5~83.2,尾圆柱形,末端环纹清晰。对该线虫 rDNA 的 3 个区段(18S 部分序列、28S D2D3 区和 ITS 区)进行特异性扩增和测序,分别得到 902、774 和 1 013 bp 的序列。将所获得的序列在 GenBank 数据库上进行 BLAST 比对,结果显示:此线虫群体与刻痕短体线虫群体的相似度分别为 97.4%~99.8%、97.4%~97.8%和 90.2%~99.8%。贝叶斯推断法构建的系统进化树显示:本研究的线虫群体与刻痕短体线虫聚为高度支持的分支,进一步确定此线虫群体为刻痕短体线虫。本研究获得刻痕短体线虫中国群体的分子数据。该刻痕短体线虫是西藏自治区的新纪录种。高山嵩草是刻痕短体线虫的新寄主。

关键词 刻痕短体线虫; 高山嵩草; 形态特征; 分子序列分析; 新纪录
中图分类号 S 432.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)01-0059-08

高山嵩草(*Kobresia pygmaea*)为莎草科(Cyperaceae)嵩草属(*Kobresia*)垫状草本植物,分布于西藏、新疆南部、青海、云南、四川、甘肃、山西、内蒙古和河北等地,生长于海拔 3 200~5 400 m 的高山草甸。高山嵩草是喜马拉雅山区和青藏高原草甸带的常见建群种,同时也是优良牧草^[1]。

短体线虫可以造成寄主植物根部腐烂,还能与土壤中其他植物病原物形成复合病害,加重病变部位腐烂程度,因此,又称短体线虫为根腐线虫^[2]。国内已有许多有关短体线虫的鉴定工作的报道^[3-6]。我们在西藏自治区林芝市色季拉山高寒草甸进行土壤线虫群落调查,从高山嵩草根围发现一种根腐线虫,综合分析后将其鉴定为刻痕短体线虫(*Pratylenchus crenatus* Loof, 1960)^[7]。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 种群来源

样品采自西藏自治区林芝市色季拉山高寒草甸东坡(29°48' N, 94°49' E),样地主要建群植被为高山嵩草,另有蕨麻委陵菜(*Potentilla anserina*)和野草莓(*Fragaria vesca*)等地被植物。用土壤采样器在高山嵩草根围 0~20 cm 土层深处采集根系及土壤约 500 mL。将混有根系的土壤样品装入自封袋,共采集样品 24 个,记录样品采集信息。

1.2 形态学鉴定

将全部根系取出,剪成约 0.5 cm 碎段,然后将土壤充分混匀,量取 200 mL,采用贝曼漏斗法分离线虫,时间为 24~48 h。所分离 24 个样品中,仅 1 个样品分离到少量根腐线虫。在体式显微镜下,将根腐线虫从混合线虫中挑出。经杀死(65 °C 水浴 3 min)、固定(4% 甲醛)和脱水(甘油乙醇法)等步骤后,将线虫制作成玻片标本^[8]。使用尼康 ECLIPSE 90i 显微镜观察玻片标本、拍照,并测量线虫形态数据^[9]。

1.3 分子生物学鉴定

线虫 DNA 抽提采用蛋白酶 K 裂解液法^[10],裂解液成分:16 μL ddH₂O, 2 μL 10×PCR 缓冲液和 2 μL 20 mg/mL 蛋白酶 K,裂解程序:65 °C 1 h,

收稿日期: 2018-09-29
基金项目: 广东省林业科技创新专项(2015KJ CX045)
王宏洪, 博士, 讲师, 研究方向: 植物线虫检测与防控. E-mail: angongong2003@163.com
通信作者: 廖金铃, 博士, 教授, 研究方向: 植物病原线虫学和分子植物病理. E-mail: jlliao@scau.edu.cn

95 ℃ 15 min。裂解产物可立即用于 PCR 扩增或者放入 -20 ℃ 冰箱保存备用。18S 部分序列扩增引物为 G18SU (5'-GCTTGTCTCAAAGATTAAGCC-3') 和 R18Tyl1 (5'-GGTCCAAGAATTTACCTCTC-3')^[11], 扩增 28S rDNA D2D3 区的通用引物为 D2A (5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGT-3') 和 D3B (5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3')^[12], ITS 区全长扩增引物为 18S (5'-TTGATTACGTCCCTGC-CCTTT-3') 和 26S (5'-TTTCACTCGCCGTTACTA-AGG-3')^[13]。PCR 反应体系参照 Ex Taq 酶说明书(Ex Taq®, TAKARA, 日本)。PCR 扩增产物检测结果、纯化回收、克隆和测序, 以及序列分析参考王宏洪等^[14]方法。最终序列上传至 GenBank 数据库, 序列号分别为 MH973646、MH973647 和 MH973648。

1.4 系统发育关系分析

根据近年来发表的短体线虫系统进化方面的文献^[9,15-17], 下载 GenBank 数据库中短体线虫 18S rDNA、28S rDNA D2D3 和 rDNA-ITS 序列。使用 MEGA6.0 软件携带的 ClustalW 工具分别进行多重序列比对^[18]。结合 PAUP4.0 软件和 Modeltest3.7 软件分析多重比对后的文件, 并选择核酸替代模型^[19-20]。系统发育树的构建利用 MrBayes3.2 软件^[21]。系统发育树的打开和编辑应用 Tree-view1.6 软件^[22]。基于 18S rDNA 和 28S rDNA D2D3 区构建的系统进化树参考 Subbotin 等^[15]选择外类群, 基于 rDNA-ITS 区的系统进化树选择玻利维亚短体线虫 [*Pratylenchus bolivianus* (FR692328)] 作为外类群。

2 结果与分析

2.1 形态学鉴定

光学形态图片见图 1; 形态测量值见表 1。

雌虫(图 1): 虫体热杀死后向腹面弯曲(图 1A)。体环清晰, 宽 1.0~1.1 μm(图 1B)。体中部 6 条侧线(图 1G), 侧区约占相应体宽的三分之一。头部低平, 唇环 3 个(图 1B、1C 和 1E)。口针强壮, 基部球大, 前缘略凹陷(图 1B、1C 和 1E)。阴门相对较后, $V=82.5\sim83.2$ (图 1A)。卵母细胞单行排列, 受精囊圆形, 不含精子(图 1F)。后阴子宫囊略长于阴门处体宽(图 1D)。尾圆柱形, 尾环 21~24 个, 末端宽圆具粗糙的清晰环纹(图 1H 和 1I)。

侧尾腺开口孔状, 位于尾的前半部。

雄虫: 未发现。

寄主: 高山嵩草(*Kobresia pygmaea*)。

采集地: 西藏自治区林芝市色季拉山。

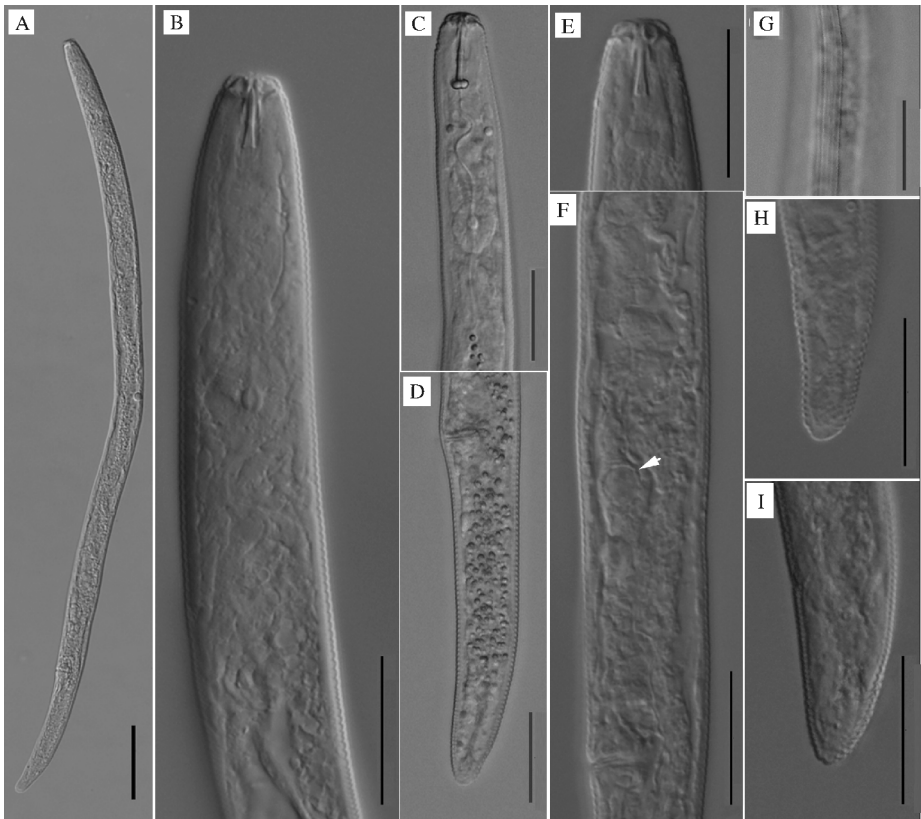
本研究中西藏种群其他的形态特征和测量数据与刻痕短体线虫原始报道^[8]基本一致, 故定为该种。与国内云南种群相比^[23], 本研究中西藏种群包括体长和口针长在内的多数形态测量值都略小些, b 值偏大。

2.2 分子序列特征分析

本研究中西藏种群 18S-rDNA、28S-rDNA D2D3 区和 ITS-rDNA 序列长度分别为 902、774 和 1 013 bp, PCR 扩增产物电泳结果如图 2。所获得序列在 NCBI 网站 GenBank 数据库上进行 BLAST 比对, 结果表明该西藏种群 18S rDNA 部分序列与数据库中刻痕短体线虫种群的相似性为 97.4%~99.8%; 而 28S rDNA D2D3 区序列与数据库中刻痕短体线虫种群相似性为 97.4%~97.8%; rDNA-ITS 序列与数据库中刻痕短体线虫种群相似性为 90.2%~99.8%。该结果进一步表明该西藏种群为刻痕短体线虫。

2.3 系统发育分析结果

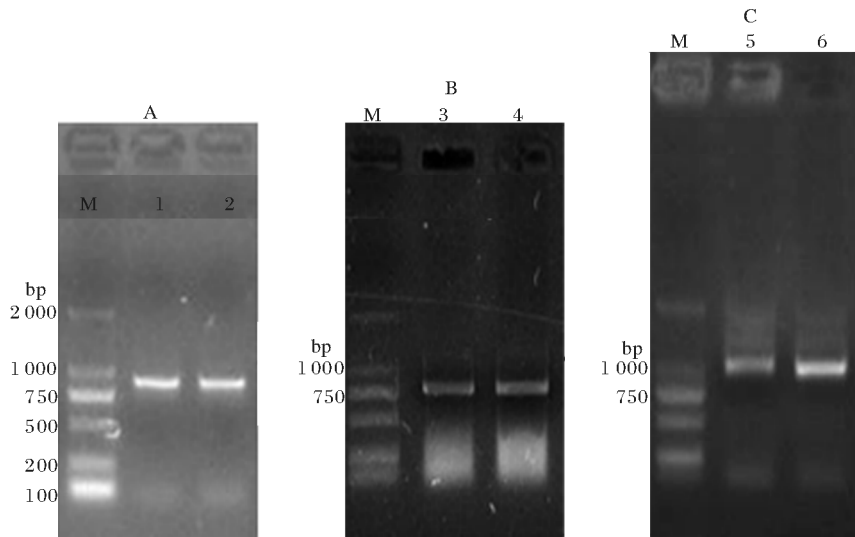
18S rDNA 部分序列比对数据集包含 30 条序列, 比对后的长度为 913 bp, 其中保守位点 618 个, 简约信息位点 195 个。图 3 为基于 18S rDNA 部分序列在 TrN+I+G 模型下的贝叶斯一致树。28S rDNA D2D3 区序列比对数据集包含 34 条序列, 比对后的长度为 822 bp, 其中保守位点 390 个, 简约信息位点 318 个。图 4 为基于 28S rDNA D2D3 区序列在 GTR+I+G 模型下的贝叶斯一致树。rDNA-ITS 区序列比对数据集包含 31 条序列, 比对后的长度为 1 105 bp, 其中保守位点 254 个, 简约信息位点 767 个。图 5 为基于 rDNA-ITS 序列在 TVM+I+G 模型下的贝叶斯一致树。后验概率(PP)超过 50% 的数值显示在合适的分支上, 3 个系统发育树都证明本研究获得的刻痕短体线虫序列与 NCBI 网站 GenBank 序列库中刻痕短体线虫其他种群的序列聚为一个高度支持的分支(PP=100)。进一步证明西藏嵩草根围分离到的短体线虫种类为刻痕短体线虫。



A:整体; B-C:体前部; D:后阴子宫囊; E:唇区; F:卵巢(箭头指示受精囊); G:体中部侧线; H-I:尾部侧面观。(标尺: A = 50 μm; B-I = 20 μm)。A:Entire body; B-C:Anterior region; D:Post-vulval region; E:Lip region; F:Ovaries (arrow shows spermatheca); G:Lateral lines near mid-body; H-I:Lateral view of tail. (Scale bar:A = 50 μm; B-I = 20 μm).

图 1 光学显微下的刻痕短体线虫西藏种群形态特征图片

Fig.1 Female of *P. crenatus* population in Tibet under light micrographs



A:18S rDNA; B:28S rDNA D2D3; C:rDNA-ITS; M:DL 2000 DNA 分子标记。A:18S rDNA; B:28S rDNA D2D3; C:rDNA-ITS; M:DL 2000 DNA marker.

图 2 刻痕短体线虫西藏种群不同 rDNA 区段 PCR 扩增产物的电泳结果

Fig.2 Agrose gel electrophoresis of PCR products of *P. crenatus* in Tibet

表 1 刻痕短体线虫西藏种群雌虫的形态测量值

Table 1 Morphometrics of females of *P. crenatus* in Tibet

形态特征 Characteristics	刻痕短体线虫西藏种群 Tibet population of <i>P. crenatus</i>	刻痕短体线虫原始描述 Original description of <i>P. crenatus</i> ^[8]	刻痕短体线虫云南种群 Yunnan population of <i>P. crenatus</i> ^[23]
数量 Number of specimens	2	131	20
体长/ μm Body length	472.2~525.1	323.0~596.0	580.6~631.5
体长比最大体宽 a^*	22.5~25.7	19.7~29.9	27.0~30.9
体长比体前端至食道腺与肠瓣距离 b^*	7.0~7.5	4.9~7.9	4.8~6.4
体长比尾长 c^*	19.4~23.3	16.4~26.8	17.7~24.7
尾长比肛门处体宽 c'^*	1.8~1.9	—	1.7~2.6
阴门至体前端距离占体长比例 V^*	82.5~83.2	78.2~86.3	78.5~87.0
口针长/ μm Stylet length	15.6~16.2	14.0~18.0	17.5~18.2
口针基部球宽/ μm Stylet knob width	4.1~4.3	—	3.3~3.6
口针基部球高/ μm Stylet knob height	2.0~2.1	—	1.8~2.9
背食道腺开口至口针基部距离/ μm DGO [*]	3.2~3.3	—	4.0~4.4
体前端至:Anterior end to:			
中食道球中心/ μm Centre of metacarpus	44.2~45.5	—	60.1~65.5
食道与肠瓣膜/ μm Cardia	67.6~70.4	—	91.0~120.1
排泄孔/ μm Excretory pore	77.0~79.7	—	87.4~98.3
最大体宽/ μm Max. body diam.	20.4~21.0	—	—
阴门处体宽/ μm Vulval body diam.	17.6~18.8	—	18.9~21.8
肛门处体宽/ μm Anal body diam.	11.7~13.5	—	12.7~14.6
生殖腺长度/ μm Genital tract length	114.5~168.4	—	—
生殖腺长度占体长比例/% G^*	21.8~35.7	26.0~48.0	—
尾长/ μm Tail length	22.5~24.3	—	23.7~32.8
尾环数 No. of tail annuli	21~24	—	—
肛阴距/ μm Vulva to anus distance	56.9~66.1	39.0~84.0	—
后子宫囊长度/ μm Post-uterine sac	19.5~22.2	—	18.2~25.5
侧区宽/ μm Lateral field width	6.6~7.4	—	—
侧尾腺孔至尾末端距离/ μm Phasmids from tail terminus	13.2~14.9	—	—
排泄孔至体前端距离占体长比例/% E.P. [*]	15.2~16.3	—	—
唇区宽/ μm Lip width	7.8~8.0	—	7.3~7.6
唇区高/ μm Lip height	2.0~2.2	—	1.8~3.6

* 注 Note: a :Overall body length/Greatest body width; b :Overall body length/Esophagus length from the lips to the esophageal intestinal valve; c :Overall body Length/Length of Tail; c' :Tail length/Tail diameter at anus; V :(Distance of vulva from the lips $\times$ 100)/Overall body length; DGO:Distance of dorsal esophageal gland opening from stylet knobs; G :(Overall length of ovary from vulva $\times$ 100)/Overall body length; E.P.:(Excretory pore distance from anterior end $\times$ 100)/Overall body length.

3 讨 论

嵩草线虫病害鲜有报道,李惠霞等^[24]在甘肃省高寒草原矮嵩草的根部发现燕麦孢囊线虫。本研究在西藏自治区色季拉山高山嵩草根围发现刻痕短体线虫。刻痕短体线虫是西藏自治区线虫新纪录种,高山嵩草是刻痕短体线虫的寄主新纪录。

西藏自治区土壤线虫群落结构特征研究已有一些报道,但都是鉴定到属的水平^[25-28]。西藏植物线虫调查仅有少量报道^[29-30]。赵文霞等^[29]在《中国植物线虫名录》中仅收录了 4 种。金惺惺^[30]在硕士论文《西藏主要耕作区植物线虫的调查与鉴定》中记录了 24 种。2012 年李惠霞等^[31]报道了禾谷孢囊线虫在西藏的分布。加上本研究发现的刻痕短体线虫,西藏自治区一共记录了仅 30 种植物线虫。这一结

果与西藏自治区辽阔的地域和丰富的植被很不相符。因此,西藏自治区植物线虫种类的调查还很不充分,有待进一步研究。

刻痕短体线虫广泛分布于北温带,主要寄生轻砂质土壤上的谷物和禾草,另外,此线虫对胡萝卜和豆科牧草有一定程度的危害^[2]。在我国,段玉玺^[32]1994 年从山东莱阳和河南开封的番茄和玉米上分离到刻痕短体线虫。周银丽等^[23]1999 年报道了云南蒙自石榴根际的刻痕短体线虫。另外,在湖北烟草^[33]和黑龙江哈尔滨大豆^[34]上也有发现此线虫。此线虫对高山嵩草的危害程度有待进一步研究。至此,西藏自治区共记录了 4 种短体线虫,另外 3 种短体线虫分别是落选短体线虫[*P. neglectus* (Rensch, 1924) Filipjev and Schuurmans Stekhoven, 1941]、卢斯短体线虫(*P. loosi* Loof, 1960)和斯克里布纳短

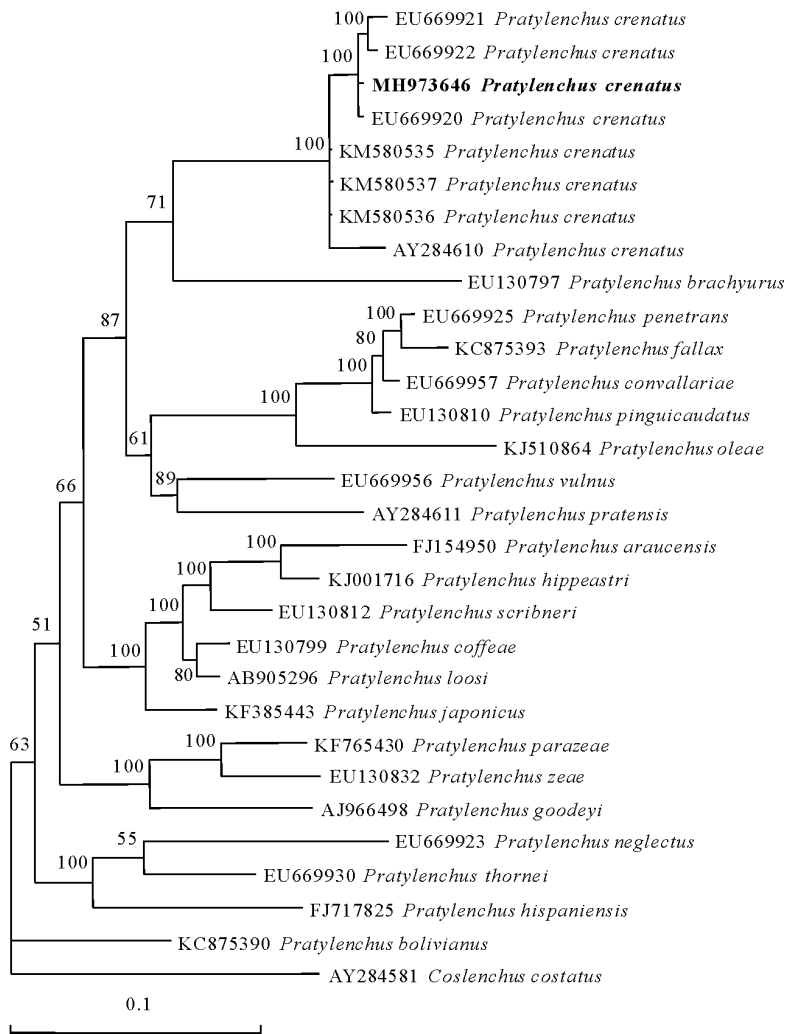


图 3 基于 18S rDNA 序列在 TrN+I+G 模型下的贝叶斯一致树(新获得的序列标记为黑体)
Fig.3 Bayesian consensus tree inferred from 18S rDNA sequence under GTR+I+G model
(Newly obtained sequences are indicated in bold)

体线虫(*P. scribneri* Steiner,1943)^[35]。

短体线虫非中国种被列入《进境植物检疫性有害生物名录》，非中国种被定义为“中国未有发生的种”^[36]。我国已报道的短体线虫种类超过 30 种，其中一些种类缺乏详细的形态学数据和图片，大多数种类缺乏分子序列信息^[36]。如何确定短体线虫非中国种一直困扰着检疫部门^[36]。刻痕短体线虫有两个近似种，分别为草地短体线虫[*P. pratensis* (de Man, 1880) Filipjev, 1936]和铃兰短体线虫(*P. convallariae* Seinhorst, 1959)^[2]。与后两者相比，刻痕短体线虫受精囊不含精子(*vs* 存在充满精子的受精囊)，侧线 6 条(*vs* 侧线 4 条)，阴门相对靠后[V=82.5~83.2 *vs* V=76~80(草地短体线虫)；V=78~81(铃兰短体线虫)]，尾末端宽圆[*vs* 尾末端不对称圆锥形或稍微呈尖突状(草地短体线虫)；

尾末端平截(铃兰短体线虫)]^[2]。本研究首次获得刻痕短体线虫中国群体的分子数据，进一步确认了刻痕短体线虫的中国种地位。

刻痕短体线虫原始报道中，后阴子宫囊短，不分化，且受精囊缺失^[4]。而后来的报道认为刻痕短体线虫后阴子宫囊长，约为体宽的 2 倍，存在小且不含精子的受精囊^[2]。本研究中的刻痕短体线虫种群后阴子宫囊长度不及体宽的 2 倍，也存在空的受精囊。说明刻痕短体线虫的后阴子宫囊长度是一个可变特征，容易受发育程度和固定脱水方法的影响，不可作为刻痕短体线虫的鉴别依据。

短体线虫的 ITS-rDNA 区序列存在较大变异，通常为 1%~3%，而且不同种类变异程度不同^[16-17]。文献中报道刻痕短体线虫的 ITS 变异最大可达 7%，玉米短体线虫 ITS 变异最大可达 9.5%^[8,16-17]。

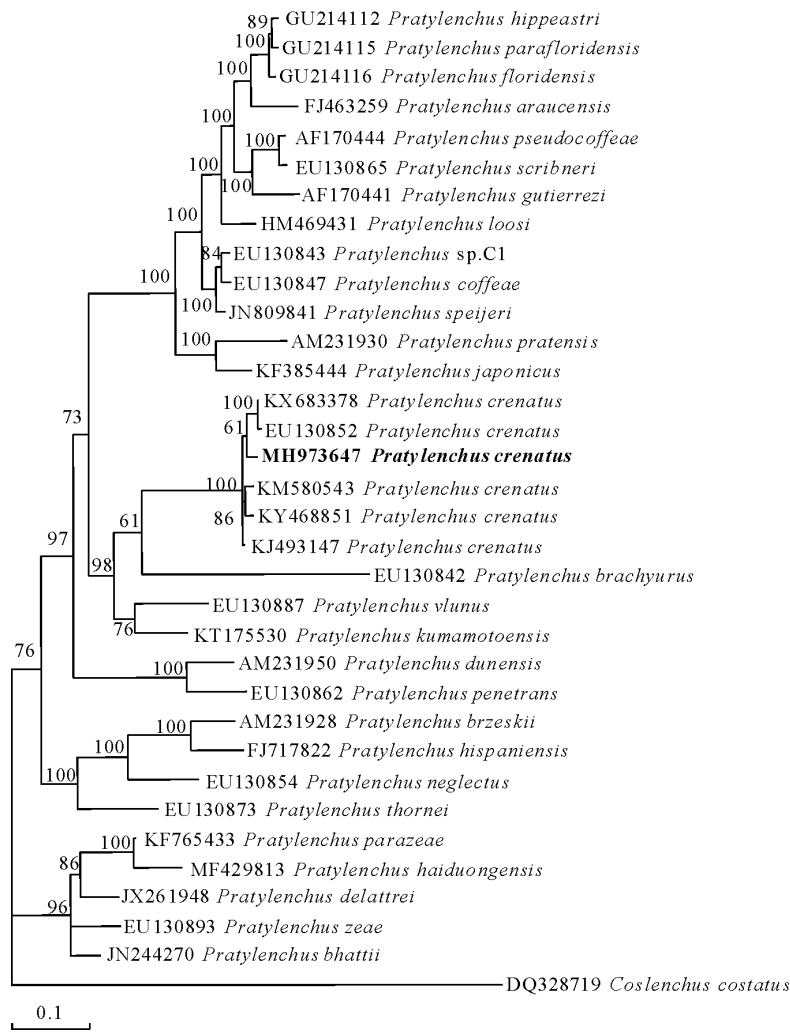


图 4 基于 28S rDNA D2D3 区序列在 GTR+I+G 模型下的贝叶斯一致树(新获得的序列标记为黑体)

Fig.4 Bayesian consensus tree inferred from 28S rDNA D2D3 fragment under GTR+I+G model

(Newly obtained sequences are indicated in bold)

本研究中获得 ITS-rDNA 序列与数据库中刻痕短体线虫种群相似性为 90.2%~99.8%,ITS 变异范围为 0.2%~9.8%。如此大的 ITS 变异可能与地理环境的差异有关。

参 考 文 献

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第十二卷) [M]. 北京:科学出版社,2000:47.
[2] CASTILLO P,VOVLAS N. *Pratylenchus* (Nematoda:Pratylenchidae): diagnosis, biology, pathogenicity and management [M]. Leiden:Brill,2007.
[3] 杨意伯,张绍升. 番石榴根部短尾短体线虫的鉴定[J]. 热带作物学报,2013,34(8):1557-1563.
[4] 章淑玲,王宏毅,金亮,等. 寄生台湾春兰的短体线虫种类鉴定[J]. 热带作物学报,2013,34(12):2463-2466.
[5] 刘星彤,林柏荣,廖金铃,等. 环介导等温扩增法(LAMP)检测最短尾短体线虫[J]. 华中农业大学学报,2018,37(6):17-24.

[6] 王宏洪,黄少彬,杨晓朱,等. 地稔根际根腐线虫的形态和分子鉴定[J]. 热带作物学报,2018,39(9):1820-1826.
[7] 冯志新. 植物线虫学[M]. 北京:中国农业出版社,2001.
[8] LOOF P A A. Taxonomic studies on the genus *Pratylenchus* (Nematoda) [J]. Tijdschrift over plantenziekten,1960,66(2): 29-90.
[9] WANG H H,ZHUO K,YE W M,et al. Morphological and molecular charaterisation of *Pratylenchus parazeae* n. sp. (Nematoda: Pratylenchidae) parasitizing sugarcane in China[J]. European journal of plant pathology,2015,143(1):173-191.
[10] MUNDO-OCAMPO M,TROCCOLI A,SUBBOTIN S A,et al. Synonymy of *Afenestrata* with *Heterodera* supported by phylogenetics with molecular and morphological characterisation of *H. koreana* comb. n. and *H. orientalis* comb. n. (Tylenchida: Heteroderidae) [J]. Nematology,2008,10(5):611-632.
[11] CHIZHOV V N,CHUMAKOVA O A,SUBBOTIN S A,et al.

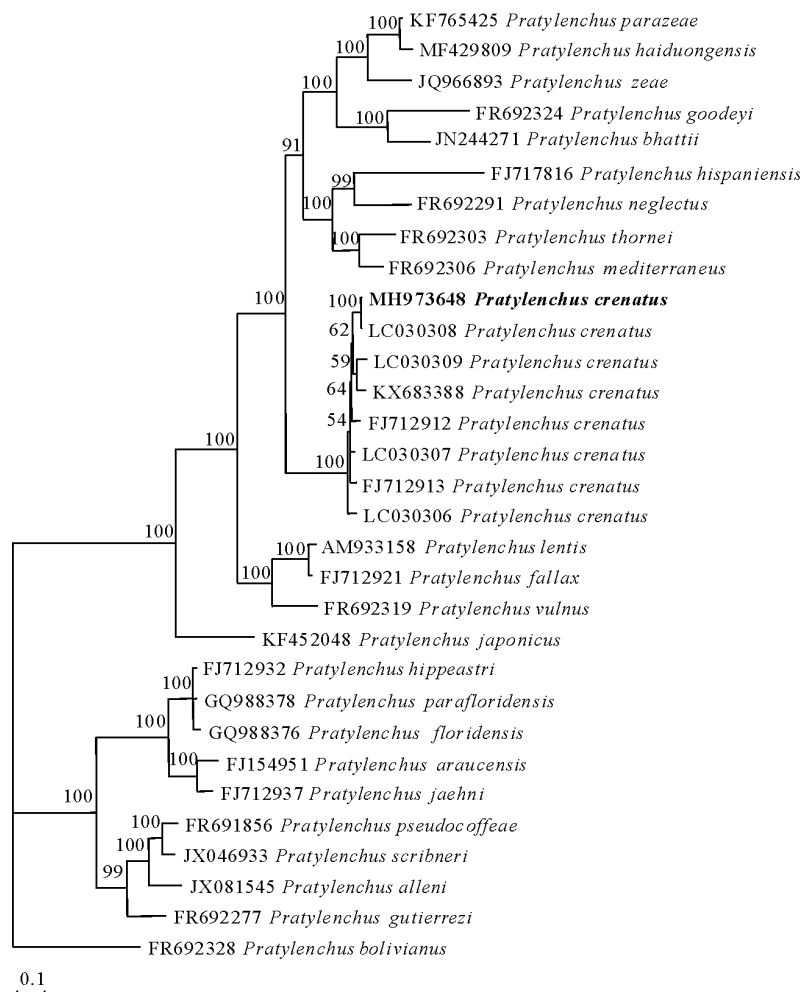


图 5 基于 rDNA-ITS 序列在 TVM+I+G 模型下的贝叶斯一致树 (新获得的序列标记为黑体)

Fig.5 Bayesian consensus tree inferred from rDNA-ITS region under TVM+I+G model
(Newly obtained sequences are indicated in bold)

Morphological and molecular characterization of foliar nematodes of the genus *Aphelenchoides*: *A. fragariae* and *A. ritzeabosi* (Nematoda: Aphelenchoididae) from the main botanical garden of the Russian Academy of Sciences[J]. Russian journal of nematology, 2006, 14(2): 179-184.

[12] SUBBOTIN S A, STURHAN D, CHIZHOV V N, et al. Phylogenetic analysis of Tylenchida Thorne, 1949 as inferred from D2 and D3 expansion fragments of the 28S rRNA gene sequences[J]. Nematology, 2006, 8(3): 455-474.

[13] VRAIN T C, WAKARCHUK D A, LEVESQUE A C, et al. Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group[J]. Fundamental and applied nematology, 1992, 15(6): 563-573.

[14] 王宏洪, 申东, 黄少彬, 等. 竹子根际螺旋线虫中国新记录种——尖尾螺旋线虫 *Helicotylenchus cuspidatus*[J]. 植物保护, 2018, 44(2): 75-80.

[15] SUBBOTIN S A, RAGSDALE E J, MULLENS T, et al. A phylogenetic framework for root lesion nematodes of the genus *Pratylenchus* (Nematoda): evidence from 18S and D2-D3 expansion segments of 28S ribosomal RNA genes and morphological characters[J]. Molecular phylogenetics and evolution, 2008, 48(2): 491-505.

[16] WAEYENBERGE L, VIAENE N, MOENS M. Species-specific duplex PCR for the detection of *Pratylenchus penetrans*[J]. Nematology, 2009, 11(6): 847-857.

[17] DE LUCA F, REYES A, TROCCOLI A, et al. Molecular variability and phylogenetic relationships among different species and populations of *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae) as inferred from the analysis of the ITS rDNA[J]. European journal of plant pathology, 2011, 130(3): 415-426.

[18] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Molecular biology and evolution, 2013, 30(12): 2725-2729.

[19] SWOFFORD D L. PAUP*: Phylogenetic analyses using parsimony (and other methods). Version 4 b10[M]. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.

[20] POSADA D, CRANDALL K A. Modeltest: testing the model of DNA substitution[J]. Bioinformatics, 1998, 14: 817-818.

[21] RONQUIST F, TESLENKO M, MARK P V D, et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice

across a large model space[J]. Systematic biology, 2012, 61 (3):539-542.

[22] PAGE R D. TreeView:an application to display phylogenetic trees on personal computers[J]. Computer applications in the biosciences cabios, 1996, 12(4):357-358.

[23] 周银丽,胡先奇,林丽飞,等. 云南石榴根际刻痕短体线虫的鉴定[J]. 中国农学通报, 2008, 24(11):403-405.

[24] 李惠霞,彭焕,彭德良,等. 甘肃省高寒草原牧草孢囊线虫的鉴定[J]. 草业学报, 2015, 24(8):174-180.

[25] 薛会英,罗大庆,于宝政. 西藏色季拉山急尖长苞冷杉林土壤线虫群落特征[J]. 应用生态学报, 2012, 23(12):3402-3408.

[26] 薛会英,罗大庆. 藏东南冷杉林采伐迹地土壤线虫群落特征[J]. 林业科学, 2013, 49(6):107-114.

[27] 陈德来,普布,巴桑,等. 西藏拉鲁湿地夏季土壤线虫群落特征[J]. 动物学杂志, 2014, 49(5):744-753.

[28] 薛会英. 西藏北部高寒草甸土壤线虫群落特征研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.

[29] 赵文霞,杨宝君. 中国植物线虫名录[M]. 北京:中国林业出版社, 2006.

[30] 金惺惺. 西藏主要耕作区植物线虫的调查与鉴定[D]. 广州:华南农业大学, 2008.

[31] 李惠霞,柳永娥,魏庄,等. 新疆和西藏发现不谷孢囊线虫[J]. 中国线虫学研究, 2012(4):164-165.

[32] 段玉玺. 中国短体科线虫分类的研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学, 1994.

[33] 李建立,赵洪海,李锡宏,等. 湖北省烟草上植物线虫种类鉴定[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(21):4795-4798.

[34] 朱艳. 大豆根围线虫生物多样性研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学, 2007.

[35] 于焦,金惺惺,秦萌,等. 西藏农作物短体线虫种类的鉴定和描述[J]. 华中农业大学学报, 2017, 36(5):20-24.

[36] 江丽辉,边勇,汪万春. 短体线虫 *Pratylenchus* spp.非中国种问题探讨[J]. 中国线虫学研究, 2010(3):116-122.

Identification of lesion nematode in alpine cold meadow of Color Gerahs Mountain, Tibet

WANG Honghong^{1,2} ZHUO Kan² XUE Huiying³ LIAO Jinling^{1,2}

1. Research Center of Plant Pest Management and Bioenvironmental Health Technology, Eco-Engineering Polytechnic, Guangzhou 510520, China ;
2. College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China ;
3. College of Resources and Environment, Tibet Agriculture & Animal Husbandry University, Linzhi 860000, China

Abstract During the survey of soil nematodes in an alpine cold meadow of Color Gerahs Mountain, Tibet, a species of root lesion nematode was obtained from *Kobresia pygmaea* rhizosphere soil. Based on morphological characterization and molecular analysis, the species was identified as *Pratylenchus crenatus*. The nematode was characterized by a flatten lip with 3 annuli, stylet length of 15.6-16.2 μm , stylet knobs with concave anterior face, lateral fields with 6 lines, vulva position at 82.5%-83.2% of body length, and a cylindrical tail with distinct striated terminus. Amplification of 3 rDNA segments (partial 18S, 28S D2D3 and ITS sequences) generated PCR fragments with sizes of 902 bp, 774 bp and 1 013 bp, respectively. The similarities between the 3 rDNA segments in this study and those deposited in the GenBank database were 97.4%-99.8%, 97.4%-97.8% and 90.2%-99.8%, respectively. Bayesian inference method was used to construct the phylogenetic relationship of *P. crenatus* in China and other regions, as well as other associated species. All sequences of *P. crenatus* including that of this study formed a highly supported clade, which further confirmed that this population was *P. crenatus*. Molecular information of Chinese *P. crenatus* population was obtained in this study. *P. crenatus* was a new record in Tibet, south-west China, and *K. pygmaea* was founded to be a new host plant of *P. crenatus*.

Keywords *Pratylenchus crenatus*; *Kobresia pygmaea*; morphological characterization; molecular analysis; new record

(责任编辑:边书京)