

黎倩莹,金自学,倪春辉,等.海南温郁金根腐线虫病的病原鉴定[J].华中农业大学学报,2025,44(5):165-178.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2025.05.017

海南温郁金根腐线虫病的病原鉴定

黎倩莹¹,金自学²,倪春辉¹,杨帅¹,陆洋¹,蔡惠慧¹,徐春玲¹,谢辉¹

1. 华南农业大学植物保护学院,广州 510642; 2. 海南渊源农业科技有限公司,海口 570100

摘要 海南田间的温郁金发生植株枯萎和根腐症状,从这些温郁金根围土壤中发现一种短体线虫。为确定该短体线虫的种类及其是否是导致温郁金植株枯萎和根腐的病原物,采用形态学和分子生物学相结合的方法对温郁金根际的短体线虫进行鉴定,并在对田间发病情况进行系统调查的基础上,根据柯赫氏证病法则,通过室内盆栽接种的方法测定这种线虫对温郁金的致病性。结果显示,该线虫为咖啡短体线虫(*Pratylenchus coffeae*),它能侵染温郁金根组织,在根组织生长发育完成生活史,并进行大量繁殖,导致根和根茎变褐、坏死或腐烂,植株则黄矮、枯萎,根茎产量和品质显著降低。结果表明,咖啡短体线虫是温郁金根腐线虫病的病原物,该病害是一种新病害,在连作地块发病严重。

关键词 温郁金; 根腐线虫病; 咖啡短体线虫; 种类鉴定; 致病性

中图分类号 S432.4⁺5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2025)05-0165-14

温郁金(*Curcuma wenyujin*)为姜科(Zingiberaceae)植物,是浙江温州道地药材,被誉为“浙八味”之一,在中国已有1 500多年的种植和用药历史,被列为中国国家地理标志产品。目前,温郁金的野生种已罕见,以人工栽培为主。温郁金喜温暖湿润、阳光充足的气候,耐旱抗涝,怕霜冻。20世纪末,温郁金被引种到海南进行大规模种植。温郁金生长周期长,通常3—4月种植,12月中下旬开始收获,大规模商业化种植常采取连作的方式,加上作物种类单一,导致温郁金种植过程中的病害发生日趋严重,植株长势逐年减弱,出现黄化、萎蔫甚至枯死的情况,产量和质量也越来越低。目前,已报道的温郁金病害主要有由真菌引起的病害包括叶枯病^[1-3]、根腐病^[4]、枯萎病^[5]、白绢病^[6]、炭疽病^[7]、叶鞘腐烂病^[8],由多种植物病毒引起的病毒病^[9]以及由茄科劳尔氏菌(*Ralstonia solanaceae*)^[10]和桑肠杆菌(*Enterobacter mori*)^[11]等多种细菌引起的细菌病害。笔者所在课题组近几年在海南温郁金种植田间病害调查中发现一种由短体线虫(*Pratylenchus* sp.)侵染引起的新病害—温郁金根腐线虫病,在连作种植田块,温郁金植株发病严重,采取休耕、轮作,或用土壤杀线剂处理后的田块第1年种植的温郁金植株发病轻,但从第2年开始发病又明显加重。

短体线虫(*Pratylenchus*)也称为根腐线虫,隶属于线虫门(Nematoda)、色矛纲(Chromadorea)、小杆目(Rhabditida)、垫刃总科(Tylenchoidea)、短体科(Pratylenchidae)、短体亚科(Pratylenchinae)^[12],是一类重要的植物病原线虫,可造成多种作物的根腐线虫病,对作物的危害程度仅次于根结线虫(*Meloidogyne* spp.)和孢囊线虫(*Heterodera* spp.),被认为是全球10大植物病原线虫之一^[13]。短体线虫侵入寄主植物的根和其他地下组织,在其中以迁移性内寄生方式取食、繁殖,导致根部组织变褐、腐烂。短体线虫在全世界范围内均有发生,现有记载的有效种已超过100个^[14],其中有数十种严重危害多种作物,造成显著的经济损失。迄今尚未有短体线虫寄生为害温郁金的报道,因此有必要对温郁金根际的短体线虫种类及其致病性进行研究,以明确该线虫与温郁金发生的根腐枯萎病的关系。本研究采用形态学和分子生物学相结合的方法对温郁金植株根际的短体线虫进行鉴定,依据柯赫氏证病法则(Koch's postulates)采用室内盆栽接种的方法测定该线虫对温郁金的致病性,旨在确定该线虫的种类,并为验证其作为导致温郁金根腐枯萎病的病原体提供依据。

收稿日期:2025-02-07

基金项目:农作物病虫害疫情监测与防控项目(101821301082351011)

黎倩莹, E-mail: 13129562966@163.com

通信作者:谢辉, E-mail: xiehui@scau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 田间病害调查和线虫样品采集

2022—2023年,在海南温郁金种植基地对温郁金根腐线虫病的田间发生情况进行调查。采用5点取样法,在田间采集叶片发黄、植株矮小的温郁金植株的根和根际土壤于密封袋中。采集完成后,送至实验室进行线虫的分离鉴定。调查采样过程中,记录发病情况,拍照记录病害症状。

1.2 线虫的分离和形态鉴定

将采集的土壤样品和根组织充分混合后取100 mL,用改良的贝曼漏斗法分离其中的线虫。将分离到的线虫杀死、固定,在体视显微镜下统计线虫数量,然后将部分线虫脱水后制成标本,使用ZEISS Scope. A1光学显微镜对线虫的形态学特征进行观察、测量和拍照,线虫形态值的测计采用de Man公式^[15];参照Wang等^[16]的方法进行线虫电镜观察样品的制备,使用EVO MA 15钨丝灯扫描式电子显微镜(蔡司,德国)观察线虫的超微形态结构并拍照。

1.3 线虫的分子鉴定

单条线虫的DNA提取参照Wang等^[17]的方法,使用通用引物TW81(5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3')和AB28(5'-ATATGCTTAGTTCAGCGGGT-3')对ITS rDNA区片段进行扩增^[18];使用通用引物D2A(5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3')和D3B(5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3')对28S D2/D3区片段进行扩增^[19]。PCR扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序,测序得到的序列与NCBI上GenBank数据库中的序列进行BLAST相似性比对,使用MAFFT进行多序列比较分析^[20],用在线Gblocks对序列进行保守区的选择,使用MrModeltest3.7 Akaike Information Criterion(AIC)标准选择最优模型^[21],使用MrBayes3.1.1构建系统发育树^[22],并用Figtree v.1.4.3完善系统发育树^[23],最后综合形态学与分子特征对采集分离的短体线虫的种类进行鉴定。

1.4 线虫的纯化培养和扩繁

经鉴定的咖啡短体线虫用胡萝卜愈伤组织进行纯化培养和繁殖,胡萝卜愈伤组织的制备和线虫的培养与保存主要参照Moody等^[24]的方法,即挑取10条经形态鉴定的咖啡短体线虫雌虫,消毒后接种到

胡萝卜愈伤组织上,每个培养皿接种1条雌虫,共接种10皿,将培养皿置于25℃黑暗培养箱中培养6周后取出。挑取数条培养得到的短体线虫,依据本文“1.3线虫的分子鉴定”的方法确认培养扩繁的线虫类型并纯化。

挑取纯化培养得到的咖啡短体线虫雌虫于胡萝卜愈伤组织,每个培养皿接种60条线虫,将培养皿置于25℃黑暗培养箱中培养6周后取出,得到扩繁的大量咖啡短体线虫。用改良的贝曼漏斗法分离扩繁得到的线虫,并收集到烧杯中,配成500条/mL的线虫悬浮液用于接种处理。

1.5 线虫对温郁金致病性的测定

1)线虫接种。将生长一致的海南渊源农业科技有限公司提供的组培3~5叶期温郁金苗,自来水洗净根部,用改良贝曼漏斗法分离洗液和部分根组织,用体视显微镜检视确认分离液中没有植物寄生线虫后,将温郁金苗栽入盛有1 L灭菌基质(由大田土、炭土和沙土按4:2:1的比例混合,混匀后经过121℃,120 min灭菌处理)的盆钵中,盆钵为1.5 L塑料花盆。栽种温郁金苗30 d后,将咖啡短体线虫接种于温郁金根际,设1 000、2 000和3 000条/株3个接种虫量处理,每个处理5次重复,以接种清水为对照。接种线虫的前1 d给盆苗浇水以湿润盆中的基质,接虫时在距植物根部1.5 cm的半径范围内均匀插3个深约5 cm的小孔,将线虫悬浮液分别滴进3个小孔,然后覆盖上基质。为了保证线虫正常侵染,接种后3 d不浇水,然后进行常规的种植管理。试验时间为2023年4月17日至2023年7月26日。

2)接种测试结果检查。接种线虫100 d后,观察并拍照记录植株生长状况和表现的受害症状,测量记录株高、根茎鲜质量、根组织鲜质量、根茎发病严重度、根组织发病严重度。分离和统计植株根际线虫数量。参照Braun等^[25]的方法对植物根组织中的线虫进行染色观察。

根际线虫的分离统计采用以下步骤:洗净植株根部,洗液过100 μm孔径筛和500 μm孔径筛的组合筛网,收集500 μm孔径筛上截留的线虫于烧杯中,定容后用移液管吸取1 mL线虫悬浮液于培养皿中,在解剖镜下统计虫数,计算出定容溶液中的虫量(N1)。基质混合均匀后定量取100 mL,用改良贝曼漏斗法分离其中的线虫,统计虫数为n,则每盆基质中的线虫数量为10 n(N2)。根内线虫的分离主要参考Ka-

plan^[26]的方法,并加以改进:将待分离的全部根组织切碎放到密封袋中,加入500 mL水浸没,在25℃的培养箱中黑暗培养7 d孵化根部的线虫,7 d后将根组织打碎后连同线虫孵化液一起用改良贝曼漏斗分离其中的线虫,统计线虫数量(N3)。每个试验处理的线虫总数量为 $N=N1+N2+N3$ 。

参照山药短体线虫病^[27]及GB/T 17980.38《农药田间药效试验准则(一)》中杀线虫剂防治根部线虫病的病害分级方法,结合田间观察和致病性病症观察结果,将接种线虫后的温郁金根组织/根茎病情严重度分为0~5级:0级,根组织/根茎无病斑;1级,根组织/根茎发病面积<根组织/根茎总面积的5%;2级,根组织/根茎总面积的5%≤根组织/根茎发病面积<根组织/根茎总面积的25%;3级,根组织/根茎总面积的25%≤根组织/根茎发病面积<根组织/根茎总面积的50%;4级,根组织/根茎总面积的50%≤根组织/根茎发病面积<根组织/根茎总面积的75%;5级,根组织/根茎发病面积≥根组织/根茎总面积的75%。病情指数计算方法如式(1)所示:

$$D_1=\frac{\sum(n\times a)}{(N\times a_{\max})}\times 100\tag{1}$$

式(1)中, D_1 为病情指数; n 为各级病株数; a 为病

情级数; N 为调查总株数; a_{\max} 为最高病情级数。

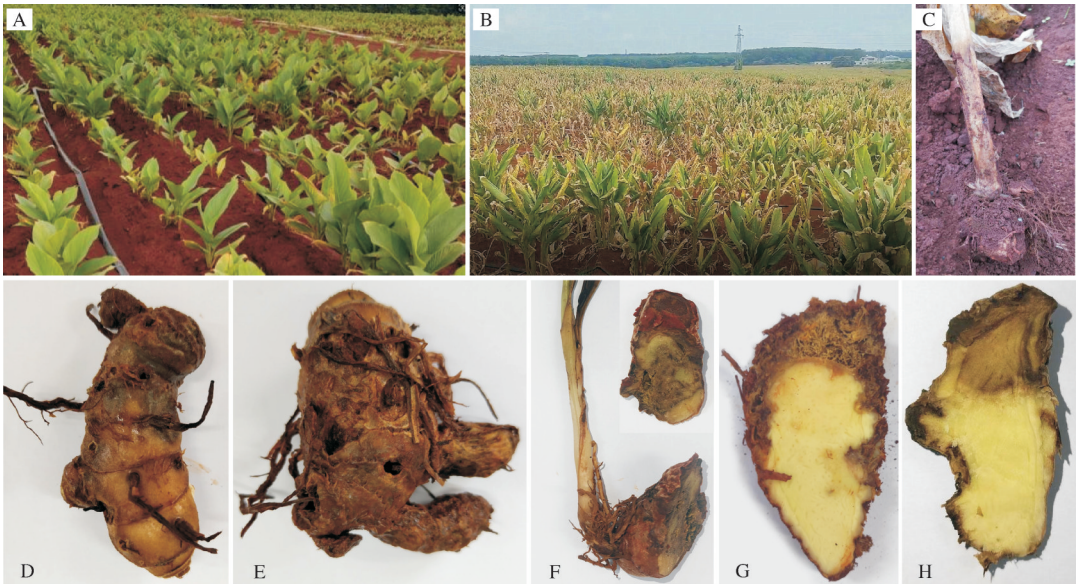
1.6 数据分析

使用SPSS 27.0和Excel 2021统计分析软件计算数据的平均值与标准误,用邓肯氏新复极差法进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 田间病害发生状况

在海南温郁金种植基地,根腐线虫病在温郁金整个生育期均可发病,且连作地块发病更重。温郁金发病植株的叶片发黄、矮小凋萎甚至枯死(图1),根组织局部变褐、坏死或腐烂,须根呈现深褐色,块根呈褐色,根茎上有黑褐色病斑。发病轻的温郁金根组织形成局部褐色病斑,发病重的根组织形成大面积的褐色病斑甚至根组织完全坏死(图1)。在发病温郁金的根组织及根际土壤中均存在大量短体线虫,连作种植田块中,温郁金植株发病率超过80%,根际土壤里的短体线虫数量超过75条/100 mL。采取休耕、轮作或用杀线剂处理后的田块,温郁金种植前土壤中的短体线虫少于3条/100 mL,第1年种植的温郁金发病很少,但从第2年开始发病明显加重。



A:田间温郁金苗期症状;B:田间温郁金生长后期症状;C:田间受害温郁金植株症状;D~E:受害温郁金根茎症状;F~H:受害温郁金根茎剖面。A:Field symptoms of *Curcuma wenyujin* infected by the root lesion nematode at the seedling stage;B:Field symptoms of *C. wenyujin* infected by the root lesion nematode at the late stage of growth;C:An infected *C. wenyujin* plant;D-E:Tubers of the infected *C. wenyujin*;F-H:Profiles of the infected *C. wenyujin* tubers.

图1 咖啡短体线虫危害温郁金的田间症状

Fig. 1 Damage caused to *Curcuma wenyujin* by the root lesion nematode *Pratylenchus coffeae* in the field

2.2 温郁金根际咖啡短体线虫的特征

1)形态特征。从温郁金根部和根际土样中分离到的短体线虫群体形态特征一致,线虫的形态特征测计值见表1,形态特征描述如下:

雌虫,热杀死后虫体后部稍向腹面弯曲或直伸(图2A);侧线4条(图2G、图3C),侧带非网状;唇区低,稍隘缩,唇环2个,偶尔在唇区一侧为2个环,另一侧为3个环(图3A、B);头架骨化,口针短粗、强壮,

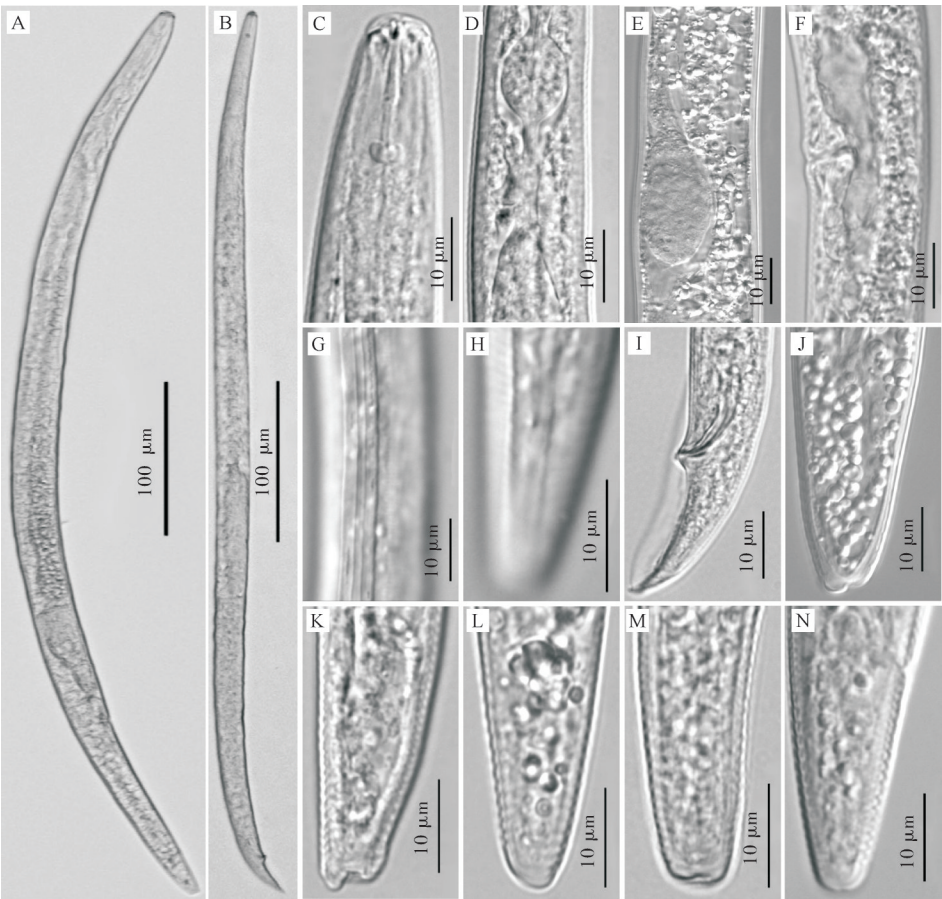
口针基部球发达、圆形或椭圆形(图2C);中食道球呈卵圆形,食道腺腹覆盖肠,排泄孔在食道腺前部(图2D);阴门横裂(图2F、图3D、图3E);单生殖管前伸,先端通常不达到食道腺叶,卵母细胞单行排列,少数在卵巢生殖区附近双列,受精囊大,卵圆形,有精子(图2E);尾为亚圆筒状至圆锥状,尾末端多数宽圆或平(斜)截,少数有凹痕(图2J~N,图3F~H);侧尾腺口小,位于尾中部(图2H)。

表 1 海南温郁金咖啡短体线虫种群和文献描述种群的形态测计值

Table 1 Morphometrics of *Pratylenchus coffeae* populations from *Curcuma wenyujin* in Hainan and literature-described populations

特征 Character	雌虫 Females			雄虫 Males		
	海南温郁金种群 <i>Curcuma wenyujin</i> population in Hainan	黄文华等 Huang et al. (1994)	Filipjev 等 Filipjev et al. (1941)	海南温郁金种群 <i>Curcuma wenyujin</i> population in Hainan	黄文华等 Huang et al. (1994)	Filipjev 等 Filipjev et al. (1941)
<i>n</i>	23	10	—	20	10	—
<i>L</i>	589±43.2(503~661)	704(655~735)	370~690	520±35.7(432~571)	585(525~658)	450~700
<i>a</i>	24.4±3.7(17.8~31.6)	21.5(16.4~26.0)	17.7~30.5	28.3±2.7(24.5~32.8)	24.3(20.5~31.3)	26.0~40.0
<i>b</i>	6.6±1.0(5.2~8.6)	7.8(7.3~8.1)	5.0~7.8	6.4±0.5(5.7~7.2)	6.6(5.8~7.9)	6.0~7.0
<i>b'</i>	4.4±0.4(3.9~5.7)	5.2(4.5~5.7)	—	4.6±0.6(3.8~5.7)	4.6(4.0~5.4)	—
<i>c</i>	20.4±1.9(17.1~23.0)	18.8(14.4~23.3)	13.7~23.9	20.1±1.7(17.0~23.7)	20.7(16.1~20.5)	17.0~24.0
<i>c'</i>	2.0±0.2(1.7~2.4)	—	—	2.4±0.3(1.9~2.9)	—	—
Lip H	2.4±0.4(1.9~3.6)	—	—	2.4±0.2(2.1~2.8)	—	—
Lip W	7.9±0.4(7.1~8.9)	—	—	6.7±0.2(6.3~7.2)	—	—
Stylet	16.5±0.8(15.0~17.7)	17.4(16.7~18.2)	—	15.2±0.5(14.1~15.9)	15.7(14.3~18.2)	—
Sk H	2.5±0.2(2.1~2.8)	—	—	1.9±0.2(1.6~2.4)	—	—
Sk W	3.9±0.3(3.3~4.6)	—	—	3.1±0.3(2.8~3.7)	—	—
DGO	3.4±0.7(2.2~4.4)	—	—	3.1±0.4(2.5~3.9)	—	—
MB L	12.8±0.9(11.4~14.1)	—	—	10.9±0.7(9.7~12.1)	—	—
MB W	10.6±0.8(9.4~11.7)	—	—	8.3±0.8(7.4~9.7)	—	—
Hemiw	2.4±0.6(1.6~3.8)	—	—	2.3±0.5(1.5~3.3)	—	—
Ep	90.1±8.9(61.4~104.2)	—	—	85.7±3.0(80.5~92.2)	—	—
V	80.2±1.4(77.0~82.5)	79.0(76.6~80.8)	75.8~84.2	—	—	—
PSL	36.0±8.9(19.1~44.7)	—	—	—	—	—
Sp	—	—	—	19.4±1.2(17.1~20.8)	19.4(18.2~20.8)	15.0~18.0

注:所有测量值单位为μm,格式为:平均值±标准误。表中*n*:样本量;*L*:体长;*a*:体长/最大体宽;*b*:体长/体前端至食道与肠连接处的距离;*b'*:体长/体前端至食道腺末端的距离;*c*:体长/尾长;*c'*:尾长/肛门处体宽;Lip H:唇区高;Lip W:唇区宽;Stylet:口针长;Sk H:口针基部高度;Sk W:口针基部球宽;DGO:口针到背食道腺开口距离;MB L:中食道球高;MB W:中食道球宽;Hemiw:半月体宽;Ep:体前端至排泄孔距离;V:(体前端到阴门的距离/体长)×100;PSL:后阴子宫囊长;Sp:交合刺长。Note: All morphometrics in μm and in the form: mean±standard deviation (range). Abbreviations in the table: *n*: Body length/maximum body width; *L*: Body length; *a*: Body length/maximum body width; *b*: Body length/distance from anteriorto esophageal-intestinal junction; *b'*: Body length/distance from anteriorto esophageal gland terminus; *c*: Body length/tail length; *c'*: Tail length/anal body width; Lip H: Lip region height; Lip W: Lip region width; Stylet: Stylet length; Sk H: Stylet knob height; Sk W: Stylet knob width; DGO: Distance from stylet base todorsal esophageal gland orifice; MB L: Median bulb length; MB W: Median bulb width; Hemiw: Hemilunar width; Ep: Distance from anterior end to excretory pore; V: (Distance from anterior to vulva/body length)×100; PSL: Post-uterine sac length; Sp: Spicule length.



A、C~H、J~N: 雌虫; A: 整体; C: 头部; D: 体前部; E: 受精囊; F: 阴门; G: 侧线; H: 侧尾腺; J~N: 尾部; B、I: 雄虫; B: 整体; I: 尾部。
A, C-H, J-N: Females; A: Entire body; C: Head part; D: Anterior body part; E: Spermatheca; F: Valve; G: Incisures; H: Phasmid; J-N: Tail; B, I: Males; B: Entire body; I: Tail.

图 2 温郁金咖啡短体线虫光学显微镜观察

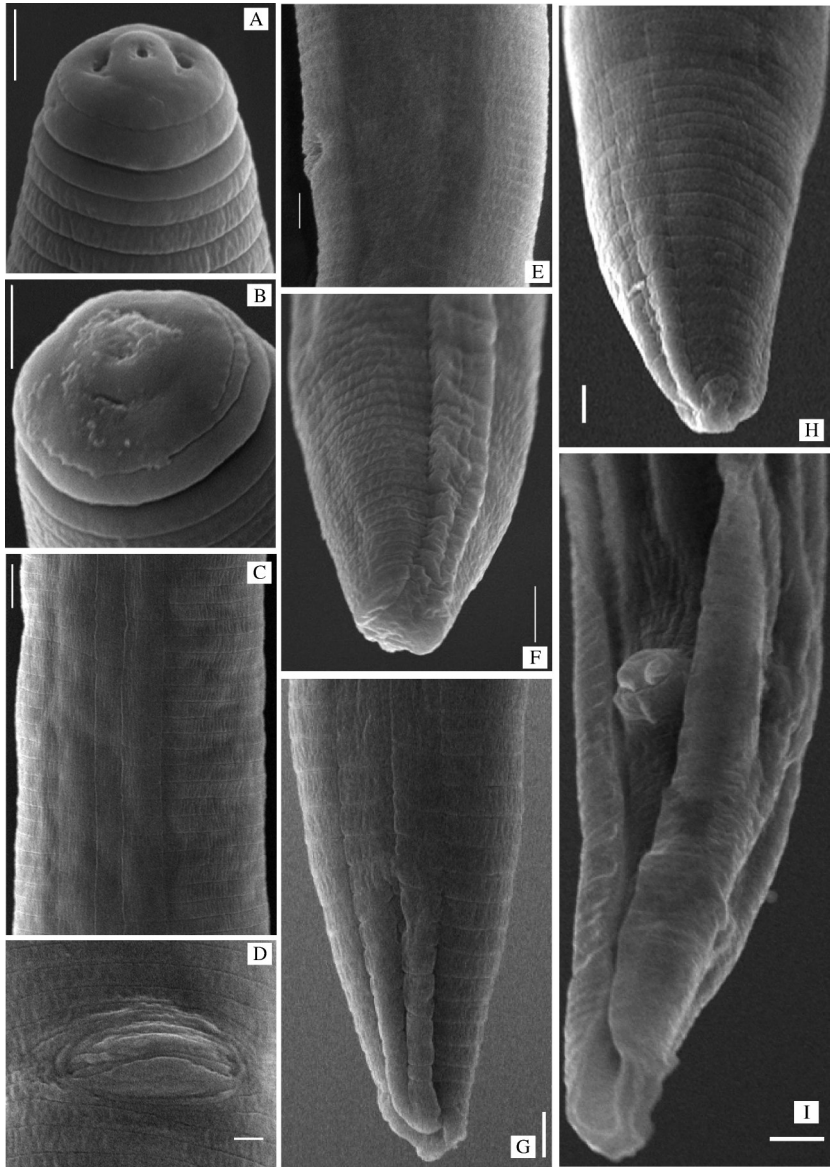
Fig. 2 Microphotographs of *Pratylenchus coffeae* on *Curcuma wenyujin*

雄虫普遍存在,虫体前部与雌虫相似,整体较雌虫细小(图2B);交合刺较细长,末端尖(图2I)。交合伞发达,伸到尾部末端;尾端尖(图3I)。本研究描述的短体线虫种群的形态特征和测量值与黄文华等^[28]在中国的山药上发现的咖啡短体线虫种群和Filipjev等^[29]描述的该种类原始种群相符。

2)分子生物学特征分析。本研究获得4条ITS rDNA 序列(序列号:PQ461361、PQ461362、PQ461363和PQ461364),序列长度分别为980、922、924和989 bp。比对发现,在海南温郁金上的咖啡短体线虫种群的样本序列(PQ461361、PQ461362)与在西非芭蕉上发现的*P. coffeae*(JN809840)相似性最高,相似度分别为98.66%、99.03%,差异碱基分别为13 bp和10 bp;咖啡短体线虫海南温郁金种群另外2条序列(PQ461363、PQ461364)与在广州发现的*P. coffeae*(KY424204)相似性最高,相似度分别为99.57%、99.60%,差异碱基均为2 bp。采用AIC标

准下的最优模型GTR+G,基于ITS序列构建的贝叶斯发育树如图4所示,获得温郁金上的咖啡短体线虫的4条序列与咖啡短体线虫西非芭蕉种群(JN809840)、广州种群(KY424204、KY424209)和江西薯蓣种群(KR106218)的序列聚成一支(PP=100)。

获得的咖啡短体线虫海南温郁金群体4条28S rDNA D2/D3 区序列(序列号:PQ461372、PQ461373、PQ461374和PQ461375)的长度分别为782、781、782和781 bp。比对分析显示,海南温郁金种群的2条序列(PQ461372、PQ461373)与在河南玉米上发现的咖啡短体线虫种群(MT586754)相似性最高,相似度分别为99.62%、99.87%,差异碱基分别为3 bp和1 bp;海南温郁金种群样本序列(PQ461374)与在坦桑尼亚香蕉上发现的咖啡短体线虫种群(MK346211)相似性最高,相似度为100%,碱基差异为4 bp;海南温郁金种群样本序列



A~B:雌虫唇区;C:雌虫侧线;D~E:阴门;F~H:雌虫尾部;I:雄虫交合刺和交合伞(标尺:2 μm)。A-B:En face view of female; C:Incisures of female; D-E: Valves; F-H:Female tail; I:Male spicule and bursa (scale bar: 2 μm).

图3 温郁金咖啡短体线虫电子显微观察

Fig. 3 Scanning electron micrographs of *Pratylenchus coffeae* on *Curcuma wenyujin*

(PQ461372)与在河南烟草上发现的咖啡短体线虫种群(OQ449390)相似性最高,相似度为99.74%,差异碱基为2 bp。采用AIC标准下的最优模型GTR+G,基于28S rDNA序列构建的贝叶斯发育树如图5所示,海南温郁金种群与咖啡短体线虫的河南玉米种群(OP071592、MT586754)、河南烟草种群(MK829009、MN750755、OQ449390)、河南小麦种群(OR417393)、福建柑橘种群(MT160082)、广州海关截获种群(HQ668112)、坦桑尼亚香蕉种群(MK346211)和越南胡萝卜种群(MH359161)序列聚类在一个分支(PP=100)。

上述结果显示,海南温郁金短体线虫种群和已知咖啡短体线虫种群聚类在一个高支持度(PP=100)的分支里,且与其他线虫种类明显区分开。因此,根据形态学特征和分子生物学特征,将来自植株枯萎和根系腐烂的温郁金根际的短体线虫鉴定为咖啡短体线虫。

2.3 咖啡短体线虫的致病性测定

1)咖啡短体线虫侵染寄生导致的温郁金受害症状。温郁金接种供试线虫100 d后,从接种的温郁金植株根部和根际基质中分离到大量咖啡短体线虫,接种1 000、2 000、3 000条咖啡短体线虫的植株每盆

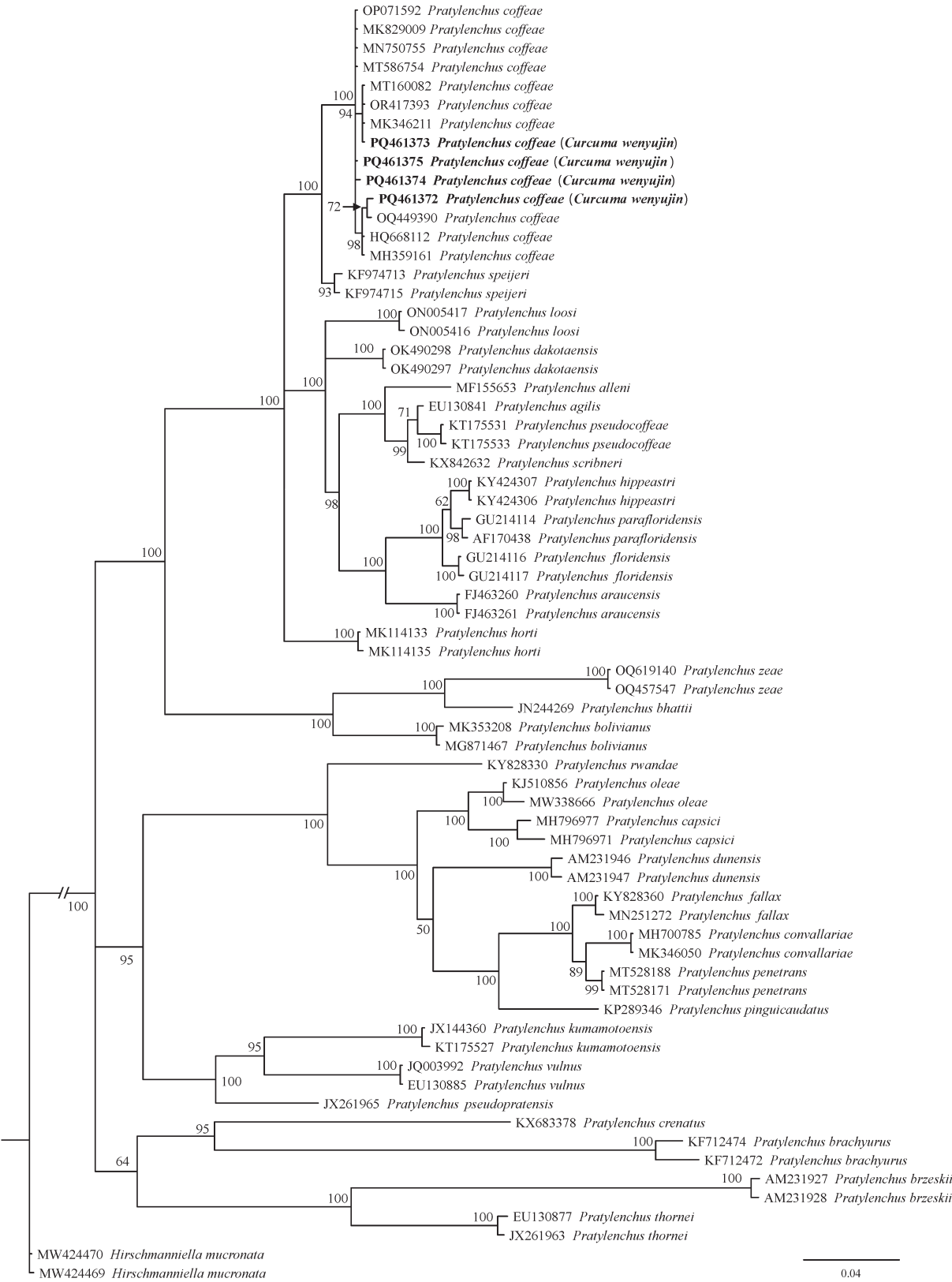


超过 50% 的后验概率标示在相应的分支上,新获得的咖啡短体线虫温郁金种群序列用粗体表示。Posterior probabilities more than 50% are given to appropriate clades. Newly obtained sequences are shown in bold font.

图 4 基于 ITS-rDNA 序列构建的短体线虫属种类的系统发育关系贝叶斯分析

Fig. 4 Phylogenetic relationships of *Pratylenchus* species inferred from Bayesian analyses of ITS-rDNA sequences

基质平均虫量分别为 799、2 498、2 948 条,根组织内平均虫量分别为 690、973、1 842 条,根际平均总虫量分别为 1 489、3 470、4 790 条,繁殖率分别为 1.49、1.74、1.60(表 2),因此,咖啡短体线虫能侵染、寄生温郁金,依据 Goo 等^[30]的植物线虫寄主植物判定标准,可确定温郁金是咖啡短体线虫的适合寄主植物。与未接种线虫的对照健康温郁金植株相比,接种线虫的温郁金,植株矮小、叶片发黄枯萎,发病严重的植



超过 50% 的后验概率标示在相应的分支上,新获得的咖啡短体线虫温郁金种群序列用粗体表示。Posterior probabilities greater than 50% are given to appropriate clades. Newly obtained sequences are shown in bold font.

图 5 基于 28S rDNA 序列构建的短体线虫属种类的系统发育关系贝叶斯分析

Fig. 5 Phylogenetic relationships of *Pratylenchus* species inferred from Bayesian analyses of 28S rDNA sequences

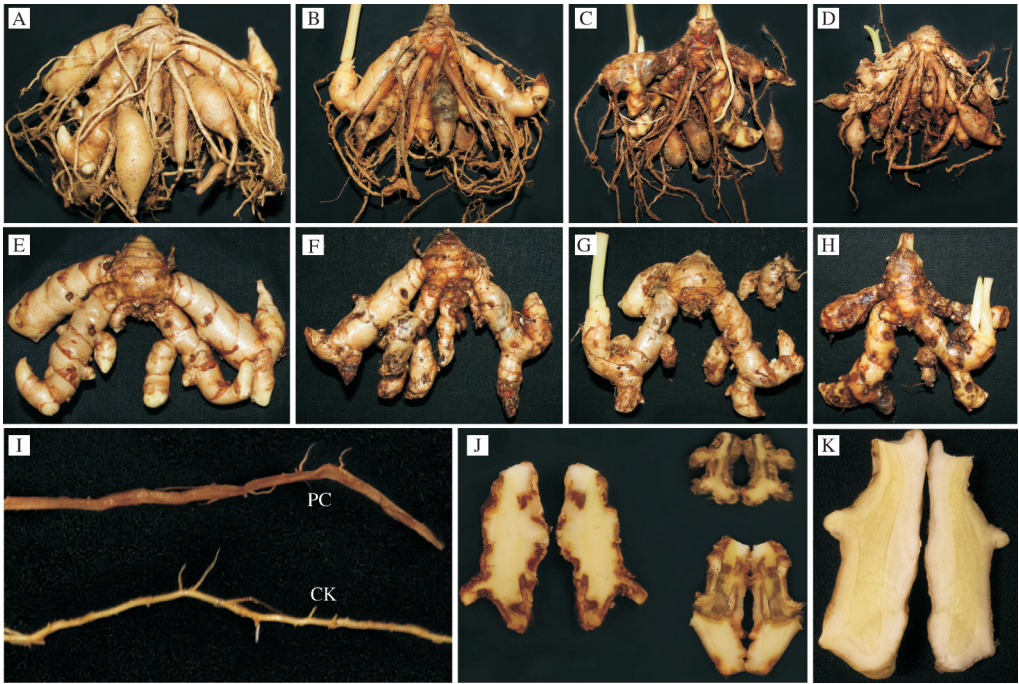
株枯死(图6);地下部分根组织生长缓慢、质量显著减少($P<0.05$)(表2),受害须根和根茎呈深褐色,受害根茎表面有褐色至黑色病斑,切开受害根茎可见被线虫侵染的呈褐色或灰色坏死组织(图7)。发病轻的温郁金根组织形成局部褐色病斑,发病重的温郁金根组织形成大面积褐色病斑直至完全坏死腐烂



A~C:分别为接种1 000条(PC1K)、2 000条(PC2K)和3 000条(PC3K)咖啡短体线虫的温郁金植株与健康植株(CK)的比较。A~C: The uninoculated plants (CK) of *Curcuma wenyujin* compared with that of the plants inoculated with 1 000(PC1K), 2 000 (PC2K) and 3 000 (PC3K) nematodes respectively.

图6 温郁金根组织被咖啡短体线虫侵染后的地上部症状

Fig. 6 Aboveground symptoms of *Curcuma wenyujin* infected by the root lesion nematode *Pratylenchus coffeae*

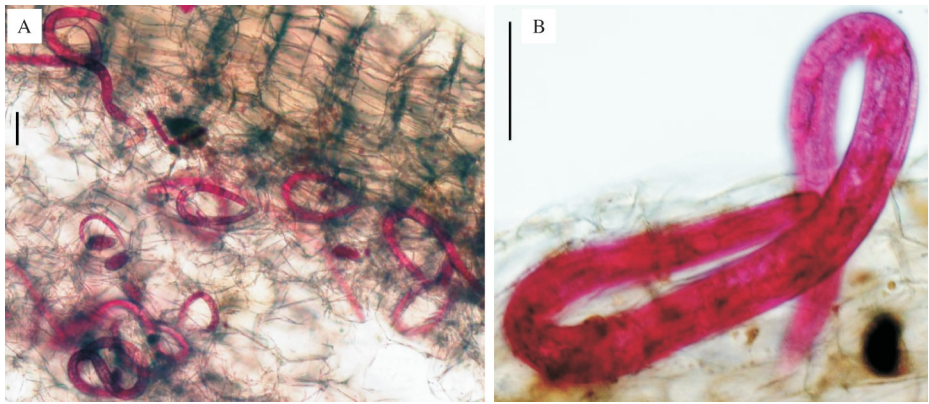


A:健康温郁金根组织;B~D:分别为接种1 000条、2 000条和3 000条咖啡短体线虫的温郁金根组织;E:健康温郁金根茎;F~H:分别为接种1 000条、2 000条和3 000条咖啡短体线虫的温郁金根茎;I:温郁金被侵染须根(PC)与健康须根(CK)的比较;J:受害温郁金根茎内部症状;K:健康温郁金根茎内部。A:Healthy roots of the uninoculated *Curcuma wenyujin*; B-D: *C. wenyujin* roots inoculated with 1 000, 2 000, and 3 000 nematodes respectively; E: Healthy tubers of the uninoculated *C. wenyujin*; F-H: *C. wenyujin* tubers inoculated with 1 000, 2 000, and 3 000 nematodes respectively; I: root of an infected *C. wenyujin* (PC) compared with that of an uninoculated plant (CK); J: Profiles of tubers infected with *Pratylenchus coffeae*; K: Profiles of a healthy tuber uninoculated with *P. coffeae*.

图7 温郁金根组织感染咖啡短体线虫后的症状

Fig. 7 Symptoms on the roots of *Curcuma wenyujin* infested by *Pratylenchus coffeae*

2)咖啡短体线虫侵染对温郁金植株生长的影响。接种1 000、2 000、3 000条咖啡短体线虫的植株平均株高分别为健康对照植株的80.07%、50.80%、26.25%,除了接种1 000条线虫的处理外,其他2个



A:温郁金根茎中大量的线虫和卵;B:温郁金须根中线虫(标尺:50 μm)。A: A large number of nematodes and eggs in tuber of an infected *Curcuma wenyujin*; B: A nematode in the root of an infected *C. wenyujin* (scale bars:50 μm).

图 8 温郁金根中的咖啡短体线虫

Fig. 8 *Pratylenchus coffeae* in the roots of *Curcuma wenyujin*

表 2 咖啡短体线虫接种温郁金植株根际 100 d 后的总虫量和根组织发病等级及生长量

Table 2 Nematode population density, root disease severity, and plant growth in *Curcuma wenyujin* 100 d after inoculation with *Pratylenchus coffeae* growth

接种量 Inoculation quantity	基质线虫数/条 Number of soil matrix nematodes	根组织线虫 数/条 Number of root tissue nematodes	线虫总 数/条 Number of nematodes	繁殖率 Reproductive factors	根茎病情 指数 Rhizome disease severity index	根组织病 情指数 Root tissue disease severity index	株高/cm Plant height	根茎鲜 质量/g Fresh tuber weight	根组织 鲜质量/g Fresh root weight
1 000	799.40±	690.20±	1 489.60±	1.49±	3.00±	3.20±	33.82±	31.38±	52.72±
	275.49 a	248.46 b	517.73 b	0.52 a	0.32 a	0.37 b	3.49 ab	7.33 b	7.57 b
2 000	2 497.80±	973.00±	3 470.80±	1.74±	3.20±	4.00±	21.46±	24.06±	66.96±
	1 678.80 a	114.56 b	1657.41 ab	0.83 a	0.58 a	0.00 a	5.61 bc	6.34 b	12.81 b
3 000	2 948.40±	1 842.20±	4 790.60±	1.60±	3.80±	4.00±	11.09±	30.56±	63.06±
	2 037.69 a	229.73 a	2 170.52 a	0.72 a	0.73 a	0.32 a	3.33 c	5.36 b	3.99 b
CK	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	42.44±	59.24±	101.52±
	0.00 b	0.00 c	0.00 c	0.00 b	0.00 b	0.00 c	4.79 a	6.24 a	11.03 a

注:表中数据为 5 次重复的平均值;表中同列数据后字母相同者表示在 0.05 水平上差异不显著。Note: Each number is the average of five replicates. Different letters in columns indicate significant differences ($P<0.05$) according to Duncan's multiple range test.

接虫处理的株高均显著小于对照($P<0.05$)。所有接虫处理植株的根茎鲜质量和根组织鲜质量均显著小于健康对照($P<0.05$),接虫后的根茎鲜质量比对照减少 47% 以上,根组织鲜质量比对照减少 34% 以上。各接虫处理之间的根茎病情指数、根茎鲜质量和根组织鲜质量没有显著差异($P<0.05$);接种 2 000 条处理和 3 000 条处理的温郁金根组织病情指数差异不显著($P>0.05$),但均显著大于接种 1 000 条的处理($P<0.05$);在接种线虫的温郁金株高方面,接种 1 000 条处理显著高于接种 3 000 条处理($P<0.05$),接种 1 000 处理和接种 2 000 条处理之间以及接种 2 000 条处理和接种 3 000 条处理之间差异不显著($P<0.05$)。因此,咖啡短体线虫的侵染显著抑制了温郁金的生长,当根际基质中初侵染线虫数量达

100 条/100 mL 时,严重危害温郁金的生长,使温郁金的产量和质量明显降低。试验结果与田间发生情况一致。

3 讨 论

本研究通过对海南省温郁金种植区发生根组织腐烂、植株枯萎症状的温郁金根组织和根际土壤进行采集分离和检测,发现了一种短体线虫,经形态学和分子生物学鉴定确认该短体线虫为咖啡短体线虫。随后遵循柯赫式法则验证了温郁金根际的咖啡短体线虫是导致温郁金发生这种病害的病原物,将这种病害命名为“温郁金根腐线虫病”。这是首次发现和证实咖啡短体线虫侵染危害中药材植物温郁金,导致其发生根腐线虫病,这也是第一种被发现和

证实严重危害温郁金的植物线虫病害。

由咖啡短体线虫引起的温郁金根腐线虫病与由桑肠杆菌^[10]或茄科劳尔氏菌^[11]引起的根茎腐烂和枯萎病在植株地上部的症状上相似,桑肠杆菌侵染温郁金,导致植株叶片从边缘开始黄化萎蔫,茎基部失绿干瘪,主根茎软腐、出水发臭;茄科劳尔氏菌侵染温郁金导致植株萎蔫,叶片从叶缘和叶脉开始发黄萎蔫,严重时自下而上黄化枯死,发病叶片呈水浸状,茎基部和根茎腐烂。在田间分辨温郁金枯萎病害时,需整株拔出,观察其地下部分。地上植株枯萎,根茎表现软腐发臭或病叶呈水浸状通常是细菌引起的温郁金枯萎病。由咖啡短体线虫引起的温郁金根腐线虫病,地下根茎呈现褐色病斑,发病严重时腐烂,但组织不变软无异味。在田间根据症状初步判断后,需进一步取病组织在实验室进行病原物检测:线虫病害可用贝尔曼漏斗法分离病根组织中的线虫,鉴定其形态特征和分子生物学特征,确认其是否为植物寄生线虫;真菌病害通过PDA培养基培养观察菌落特征并鉴定形态和分子特征;细菌病害则需进行革兰氏染色和分子特征鉴定。

随着新技术的发展,以形态学鉴定和分子鉴定相结合的综合分类学方法使线虫的种类鉴定更加客观、可靠^[31]。短体属线虫种类间的形态特征接近^[29],分子生物学鉴定方法重要性更为突出。核糖体DNA(rDNA)中ITS区的特异性扩增常用来比较分析种间、种内群体间的遗传差异^[32]。LSU(large subunit)rDNA中的D区序列常用于区分属或属上的分类阶元,目前28S rDNA D2/D3区测序鉴定方法应用较为广泛^[33]。线粒体DNA(mtDNA)COI区序列近年来常被选择作为DNA靶标序列用来鉴定不同的植物寄生线虫^[34],研究显示,mtDNA COI区在玉米短体线虫鉴定中,种内保守、种间变异大,是理想的DNA靶标序列^[35]。Hsp90作为一个新的标志基因能鉴定短体线虫的不同种类、区分不同的种群^[36],但目前NCBI数据库中积累的植物寄生线虫Hsp90序列信息较少,应用受到限制。本研究中使用ITS rDNA序列和28S rDNA D2/D3区序列,利用单条短体线虫DNA样本对咖啡短体线虫进行种类鉴定。通过进一步分析其种间序列可看出,前者在咖啡短体线虫的种内遗传变异较后者更小,物种的辨识度更高。

咖啡短体线虫作为引起植物根腐病的主要病原线虫在中国大多数省(自治区)都有发现,其寄主广

泛,严重危害植物生长发育,直接导致作物减产,给我国农林生产造成严重损失。在我国,由于咖啡短体线虫侵染导致根腐病发生的作物有苎麻(*Boehmeria nivea*)^[37]、山药(*Dioscoreaceae*)^[28]、芋(*Colocasia esculenta*)^[38]、烟草(*Nicotiana tabacum*)^[39]、大豆(*Glycine max*)^[40]和玉米(*Zea mays*)^[41]等。迄今尚未有咖啡短体线虫侵染危害中药材的研究报道。咖啡短体线虫的侵染可导致芋的块茎腐烂,产量减少2/3^[38]。在山药中发现的咖啡短体线虫,当线虫数达到600条/株时,可导致明显的块茎损害,达到1000条/株时,会导致块茎质量严重降低^[27];在田间,山药短体线虫病的发病率可达30%~100%,产量损失可达30%~50%,部分发病的山药块茎产量并不会显著减少,但会导致块茎质量恶化,可食用部分减少,失去经济价值^[13]。本研究结果显示,在温郁金根际土壤内的咖啡短体线虫达到100条/100 mL时就严重危害温郁金的生长,使温郁金的产量降低47%以上,随着初侵染虫量的增加,温郁金的产量没有明显的降低,但会导致根茎的质量变差,经济价值进一步降低,在连作种植田块,温郁金发病率超过80%。

一些病原生物能与短体线虫相互作用,降低其对作物的危害,据报道,某些假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)能显著减少草莓根系上穿刺短体线虫(*Pratylenchus penetrans*)的数量,减少草莓产量损失^[42];某些镰刀菌(*Fusarium* sp.)能够显著减少叶瓣上伤残短体线虫(*Pratylenchus vulnus*)的数量,减少幼苗死亡率^[43]。但更多的病原生物会和线虫造成复合侵染,加重对作物的为害程度或造成其他病害,如最尾短体线虫(*Pratylenchus brachyurus*)能侵染花生引发其他病原生物二次侵染^[44];在和烟草黑胫病菌(*Phytophthora parasitica*)同时接种时可加重黑胫病的严重性和蔓延程度^[45]。穿刺短体线虫能为假单胞菌入侵苜蓿提供侵染通道^[46];使草莓丝核菌(*Rhizoctonia fagariae*)引起草莓黑根病病情加重^[47];在单独引起马铃薯根腐病的同时和尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)^[48]或立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)^[49]共同侵染加重根腐病危害。根腐线虫能加重尖孢镰孢菌对农作物的危害,并与尖孢镰孢菌复合侵染引起作物枯萎病,造成作物地上部枯萎,根部腐烂^[50]。由于咖啡短体线虫、桑肠杆菌和茄科劳尔氏菌均能引起温郁金发生枯萎,因此,在田间发生的温郁金枯萎病是否存在2种或多种引起枯

萎病的病原物复合侵染的情况,以及这些混合发生的病原物之间的关系及其防控技术有待进一步研究。

参考文献 References

- [1] ZHANG L X, SONG J H, TAN G J, et al. First report of leaf blight caused by *Nigrospora sphaerica* on *Curcuma* in China [J/OL]. Plant disease, 2011, 95 (9) : 1190 [2025-02-07]. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-11-0284>.
- [2] CHEN X Y, FENG J D, SU Z, et al. First report of *Curvularia* leaf blight on *Curcuma wenyujin* caused by *Curvularia clavata* in China [J/OL]. Plant disease, 2013, 97 (1) : 138 [2025-02-07]. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-12-0392-PDN>.
- [3] ZHENG F, MA R, XU G, et al. Leaf blight on *Curcuma wenyujin* caused by *Phoma matteucciicola* in China [J/OL]. Plant disease, 2018; PDIS03180407PDN [2025-02-07]. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-18-0407-PDN>.
- [4] 陈旭玉, 钟锦玲, 黄炯, 等. 温郁金根腐病生物药剂的筛选 [J]. 安徽农业科学, 2016, 44 (2) : 192-193. CHEN X Y, ZHONG J L, HUANG X, et al. Screening for biological pesticides against root rot disease on *Curcuma wenyujin* [J]. Journal of Anhui agricultural sciences, 2016, 44 (2) : 192-193 (in Chinese with English abstract).
- [5] LI Q, MO J, GUO T, HSIANG T, et al. First report of leaf spot of *Curcuma wenyujin* caused by *Colletotrichum curcuma* in China [J/OL]. Plant disease, 2016, 100 (2) : 150901095013007 [2025-02-07]. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-15-0699-PDN>.
- [6] MA R, LI G M, XIE C P, et al. First report of southern blight on *Curcuma wenyujin* caused by *Sclerotium rolfsii* in China [J/OL]. Plant disease, 2017, 101 (4) : 633 [2025-02-07]. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-16-1342-PDN>.
- [7] 马瑞, 徐刚, 郑樊, 等. 海南省温郁金炭疽病的病原鉴定 [J]. 植物保护, 2018, 44 (4) : 81-86. MA R, XU G, ZHENG F, et al. Identification of the pathogen causing anthracnose on *Curcuma wenyujin* in Hainan, China [J]. Plant protection, 2018, 44 (4) : 81-86 (in Chinese with English abstract).
- [8] 李晶, 仇芳, 谢昌平, 等. 温郁金叶鞘腐烂病原菌的鉴定 [J]. 植物病理学报, 2023, 53 (2) : 326-329. LI J, QIU F, XIE C P, et al. Identification of the pathogen causing leaf sheath rot on *Curcuma wenyujin* [J]. Acta phytopathologica sinica, 2023, 53 (2) : 326-329 (in Chinese with English abstract).
- [9] 钱华, 王衍彬. 温郁金甘薯病毒感病病原血清学鉴定 [J]. 中国现代中药, 2007, 9 (7) : 8-9. QIAN H, WANG Y B. Identification of pathogenic serology in *Curcuma wenyujin* infected by sweet potato virus [J]. Modern Chinese medicine, 2007, 9 (7) : 8-9 (in Chinese with English abstract).
- [10] 方丽, 王连平, 王汉荣. 一种为害温郁金的新病害温郁金枯萎病 [J]. 浙江农业科学, 2016, 57 (7) : 985-986. FANG L, WANG L P, WANG H R. A new disease of *Curcuma wenyujin*, *Curcuma wenyujin* Fusarium wilt [J]. Journal of Zhejiang agricultural sciences, 2016, 57 (7) : 985-986 (in Chinese).
- [11] 李亚妮, 陈卫良, 毛碧增. 温郁金根茎腐烂病的病原鉴定 [J]. 浙江农业学报, 2024, 36 (5) : 1086-1093. LI Y N, CHEN W L, MAO B Z. Pathogen identification of root rot of *Curcuma wenyujin* [J]. Acta agriculturae Zhejiangensis, 2024, 36 (5) : 1086-1093 (in Chinese with English abstract).
- [12] DECRAEMER W, HUNT D J. Plant nematology [M]. 2nd ed. Wallingford: CAB International, 2013.
- [13] JONES J T, HAEGEMAN A, DANCHIN E G J, et al. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology [J]. Molecular plant pathology, 2013, 14 (9) : 946-961.
- [14] JANSSEN T, KARSSSEN G, ORLANDO V, et al. Molecular characterization and species delimiting of plant-parasitic nematodes of the genus *Pratylenchus* from the penetrans group (Nematoda: Pratylenchidae) [J]. Molecular phylogenetics and evolution, 2017, 117 : 30-48.
- [15] 谢辉. 植物线虫分类学 [M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 2005: 246-247. XIE H. Taxonomy of plant nematodes [M]. 2nd ed. Beijing: Higher Education Press, 2005: 246-247 (in Chinese).
- [16] WANG K, XIE H, LI Y, et al. *Paratylenchus shenzhenensis* n. sp. (Nematoda: Paratylenchinae) from the rhizosphere soil of *Anthurium andraeanum* in China [J]. Zootaxa, 2013, 3750 : 167-175.
- [17] WANG K, LI Y, XIE H, et al. Morphology and molecular analysis of *Paratylenchus guangzhouensis* n. sp. (Nematoda: Paratylenchinae) from the soil associated with *Bambusa multiplex* in China [J]. European journal of plant pathology, 2016, 145 (2) : 255-264.
- [18] JOYCE S A, REID A, DRIVER F, et al. Application of polymerase chain reaction (PCR) methods to the identification of entomopathogenic nematode bacterium complexes. Proceedings and National Reports 1990-1993, St Patrick's College, Maynooth, Co Kildare, Ireland. Co Kildare: [s.n.], 1994: 178-187.
- [19] DE LEY P, FELIX M A, FRISSE L, et al. Molecular and morphological characterisation of two reproductively isolated species with mirror-image anatomy (Nematoda: Cephalobidae) [J]. Nematology, 1999, 1 (6) : 591-612.
- [20] KATO H K, STANDLEY D M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability [J]. Molecular biology and evolution, 2013, 30 (4) : 772-780.
- [21] NYLANDER J A A. MrModeltest v2.3 [CP/OL]. (2018-09-12) [2025-02-07]. <https://www.softpedia.com/get/Science-CAD/MrModeltest.shtml>.
- [22] HUELSENBECK J P, RONQUIST F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees [J]. Bioinformatics, 2001, 17 (8) : 754-755.

- [23] RAMBAUT A. Fig Tree-version 1.4.3, a graphical viewer of phylogenetic trees [CP/OL]. (2018-11-25) [2025-02-07]. <https://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- [24] MOODY E H, LOWNSBERY B F, AHMED J M. Culture of the root-lesion nematode *Pratylenchus vulnus* on carrot disks [J]. Journal of nematology, 1973, 5(3): 225-226.
- [25] BRAUN A L, LOWNSBERY B F. The pin nematode, *Pratylenchus neoamblycephalus*, on Myrobalan plum and other hosts [J]. Journal of nematology, 1975, 7(4): 336-343.
- [26] KAPLAN D T. An assay to estimate citrus rootstock resistance to burrowing nematodes [J]. Proceedings of the Florida State Horticultural Society, 1994, 107: 85-89.
- [27] 董文芳. 山药短体线虫病病原种类鉴定、田间发生动态及其化学防治研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2015. DONG W F. Study on pathogen identification, field occurrence dynamics, and chemical control of short-body nematode disease on *Dioscorea opposita* Thunb. [D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2015 (in Chinese with English abstract).
- [28] 黄文华, 高学彪, 吕继宏. 山药根腐线虫病的病原鉴定和致病性研究[J]. 华南农业大学学报, 1994, 15(3): 35-38. HUANG W H, GAO X B, LÜ J H. Pathogen identification and pathogenicity of the Chinese yam root rot disease caused by lesion nematodes [J]. Journal of South China Agricultural University, 1994, 15(3): 35-38 (in Chinese with English abstract).
- [29] FILIPJEV I N, SCHUURMANS S. A manual of agricultural helminthology [J]. Anzeiger für schädlingkunde, 1941, 17: 96.
- [30] GOO M Y C, SIPES B S. Host preference of *Radopholus citrophilus* from Hawaiian *Anthurium* among selected tropical ornamentals [J]. HortScience, 1997, 32(7): 1237-1238.
- [31] LEMARCHAND K, MASSON L, BROUSSEAU R. Molecular biology and DNA microarray technology for microbial quality monitoring of water [J]. Critical reviews in microbiology, 2004, 30(3): 145-172.
- [32] BLOK V C, PHILLIPS M S, HARROWER B E. Comparison of British populations of potato cyst nematodes with populations from continental Europe and South America using RAPDs [J]. Genome, 1997, 40(3): 286-293.
- [33] 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.
- [34] DERYCKE S, VANAVERBEKE J, RIGAUX A, et al. Exploring the use of cytochrome oxidase c subunit 1 (COI) for DNA barcoding of free-living marine nematodes [J/OL]. PLoS One, 2010, 5(10): e13716 [2025-02-07]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013716>.
- [35] LIU X T, WANG H H, LIN B R, et al. Loop-mediated isothermal amplification based on the mitochondrial COI region to detect *Pratylenchus zeae* [J]. European journal of plant pathology, 2017, 148(2): 435-446.
- [36] TROCCOLI A, FANELLI E, CASTILLO P, et al. *Pratylenchus vovlasi* sp. nov. (Nematoda: Pratylenchidae) on raspberries in north Italy with a morphometrical and molecular characterization [J/OL]. Plants, 2021, 10(6): 1068 [2025-02-07]. <https://doi.org/10.3390/plants10061068>.
- [37] 陈洪福, 张怀芳, 陈绵才. 苎麻根腐线虫病及其防治方法研究简报[J]. 中国麻作, 1982, 4(4): 9-10. CHEN H F, ZHANG H F, CHEN M C. Brief report on the study of ramie root rot nematode disease and its control methods [J]. Plant fiber sciences in China, 1982, 4(4): 9-10 (in Chinese).
- [38] 姜鼎煌. 泉州地区芋根腐线虫病诊断与病原鉴定[J]. 中国植保导刊, 2015, 35(10): 63-64. JIANG D H. Diagnosis and pathogen identification of taro root rot nematode disease in Quanzhou area [J]. China plant protection, 2015, 35(10): 63-64 (in Chinese).
- [39] 王硕, 刘焱琨, 夏艳辉, 等. 河南烟草根际短体线虫鉴定及其致病性分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2021, 49(1): 85-93. WANG S, LIU Y K, XIA Y H, et al. Identification and pathogenicity of a root-lesion nematode species on tobacco in Henan [J]. Journal of Northwest A & F University (natural science edition), 2021, 49(1): 85-93 (in Chinese with English abstract).
- [40] WANG K, LIU Y K, HAO P H, et al. Occurrence of *Pratylenchus coffeae* causing root rot of soybean in Shandong Province of China [J]. Plant disease, 2020.1227 [2025-02-07]. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-20-1740-PDN>.
- [41] 夏艳辉, 刘焱琨, 郝鹏辉, 等. 河南省玉米田根腐线虫三个病样品的病原种类鉴定[J]. 植物病理学报, 2021, 51(4): 536-548. XIA Y H, LIU Y K, HAO P H, et al. Identification of pathogenic species of three root-lesion nematodes samples from corn fields in Henan Province [J]. Acta phytopathologica sinica, 2021, 51(4): 536-548 (in Chinese with English abstract).
- [42] HACKENBERG C, MUEHLKCHEN A, FORGE T, et al. *Pseudomonas chlororaphis* strain Sm3, bacterial antagonist of *Pratylenchus penetrans* [J]. Journal of nematology, 2000, 32(2): 183-189.
- [43] KHEIRI A, BORHANI A, OKHOVAT M, et al. Interaction between root lesion nematode *Pratylenchus vulnus* and two species of *Fusarium* on growth and development of maple seedlings [J]. Mededelingen, 2002, 67(3): 703-706.
- [44] PERRY R N, MOENS M. Plant nematology [M]. 2nd ed. Wallingford: CAB International, 2013.
- [45] INAGAKI H, POWELL N T. Influence of the root-lesion nematode on black shank symptom development in flue-cured tobacco [J]. Phytopathology, 1969, 59(10): 1350-1355.
- [46] BOOKBINDER M G, BLOOM J R, LUKEZIC F L. Interactions among selected endoparasitic nematodes and three pseudomonads on alfalfa [J]. Journal of nematology, 1982, 14(1): 105-109.

- [47] LAMONDIA J A. Interaction of *Pratylenchus penetrans* and *Rhizoctonia fragariae* in strawberry black root rot[J]. Journal of nematology, 2003, 35(1): 17-22.
- [48] UPADHAYA A, YANG P, SECOR G, et al. Effects of co-inoculation with *Pratylenchus penetrans* and *Fusarium oxysporum* on growth and yield of potato cultivar red norland [J]. American journal of potato research, 2020, 97(3): 246-255.
- [49] VIKETOFT M, FLÖHR A, ENGLUND J E, et al. Additive effect of the root-lesion nematode *Pratylenchus penetrans* and the fungus *Rhizoctonia solani* on potato yield and damage[J]. Journal of plant diseases and protection, 2020, 127 (6) : 821-829.
- [50] SUMNER D R. Interaction of *Fusarium* wilt and nematodes in Cobb soybean[J]. Plant disease, 1987, 71: 20-23.

Identification of pathogen causing root rot nematode disease in *Curcuma wenyujin* plants grown in Hainan

LI Qianying¹, JIN Zixue², NI Chunhui¹, YANG Shuai¹, LU Yang¹, CAI Huihui¹, XU Chunling¹, XIE Hui¹

1.College of Plant Protection, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2.Hainan Yuanyuan Agricultural Science and Technology Co., Ltd., Haikou 570100, China

Abstract Symptoms of wilting and root rot were observed in *Curcuma wenyujin* plants grown in Hainan fields. A root-lesion nematode, *Pratylenchus* sp., was detected in the rhizosphere soil of diseased plants. A combined method of morphological and molecular biology was used to identify root-lesion nematodes in the rhizosphere of *C. wenyujin* to determine the type of nematodes and whether it is the pathogen causing wilting and root rot of *C. wenyujin* plants. Based on a systematic investigation of the incidence of diseases in the field, the pathogenicity of this nematode to *C. wenyujin* was confirmed with greenhouse potted inoculation according to Koch's postulates. The results showed that the nematode was *Pratylenchus coffeae*. It infected the root tissue of *C. wenyujin*, completed its life cycle and reproduced extensively during the growth and development of root tissue, causing the browning, necrosis, or rotting of roots and rhizomes, accompanied by the stunting, yellowing, and wilting of plants, leading to the significant decrease in the yield and quality of root and stem. It is indicated that *Pratylenchus coffeae* is the pathogen of root rot nematode disease in *C. wenyujin*. This disease is a new disease that can occur throughout the entire growth period of *C. wenyujin*, and is severe in fields with continuous cropping.

Keywords *Curcuma wenyujin*; root rot nematode disease; *Pratylenchus coffeae*; identification of type; pathogenicity

(责任编辑:葛晓霞)