



陕西不同地区马铃薯腐烂茎线虫的分离鉴定及同源性分析

刘 晨,杨艺炜,王家哲,常 青,洪 波,张 锋

(陕西省生物农业研究所,西安 710043)

摘 要 旨在鉴定陕西不同地区马铃薯腐烂茎线虫生物型,为其防治提供理论依据。对陕西不同地区马铃薯腐烂茎线虫进行分离,对其形态进行观察并测量特征值,通过茎线虫线粒体 CO I 通用引物、ITS 区通用引物及 A、B 生物型的特异性引物对不同地区采集马铃薯腐烂茎线虫进行 PCR 检测及序列分析,利用 MEGA6.0 进行系统发育树构建及种群同源性分析。结果表明,陕北地区腐烂茎线虫的生物型为 B 型,关中地区为 A 型。形态特征值数据显示雌成虫体长、体宽均大于雄成虫,A 型的体长、体宽均大于 B 型。系统发育树结果显示,陕北不同地区的 B 型马铃薯腐烂茎线虫聚为一支,合阳、兴平的 A 型马铃薯腐烂茎线虫聚为一支,与分子鉴定结果相一致。

关键词 马铃薯腐烂茎线虫;形态特征;生物型;系统发育树

中图分类号 S435.621

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2020)05-0793-08

马铃薯俗称土豆,作为全球第四大粮食作物在农业生产中具有举足轻重的地位^[1]。但中国马铃薯产业一直饱受病害困扰,马铃薯病害严重制约国内马铃薯单位面积产量的提升以及马铃薯产业的进一步发展,目前陕西省马铃薯产业面临着同样问题。甘薯已经成为中国许多省(区)调整农业产业结构,促进农村产业发展的重要作物,甘薯在陕西省也逐步成为重要经济作物,对于带动区域农业经济发展具有重要意义。马铃薯腐烂茎线虫(*Ditylenchus destructor*)也被称为 Potato nematode,最初发现于马铃薯上,是其贮藏期一种重要病害^[2],也是严重为害马铃薯的重要病原之一^[3]。在中国,马铃薯腐烂茎线虫首次在甘薯上被分离出来,发生严重时会造成 80% 以上的减产,甚至绝收^[4-5]。此外,腐烂茎线虫还可为害蚕豆、小麦、当归、三七等几十种农作物及中药材^[6]。

马铃薯腐烂茎线虫目前主要分为 2 类基因型,有文献^[7]报道这 2 个基因型在尾长、C 值、V 值等形态特征值上存在显著差异。2007 年,有学者^[8]对多个马铃薯腐烂茎线虫种群的核糖体 ITS 区序列进行比对,发现在中国不同地理种群明显分为 2 个生物型,即 A 型和 B 型这两种。此外,

还有多篇文献也证实马铃薯腐烂茎线虫种群中存在 2 类基因型这一结论^[9-11]。有国外学者将不同寄主作物上的马铃薯腐烂茎线虫群体分为 A 型、B 型、C 型、D 型、E 型、F 型和 G 型这 7 个不同生物型^[12-13]。A 型仅在中国发现,且只为害甘薯,B 型和 E 型主要为害甘薯和马铃薯,C 型寄主为马铃薯、甘薯及大蒜,D 型可侵染大蒜,F 型在甘薯和黄芪上有分离出来,G 型为害马铃薯。

1925 年,马铃薯腐烂茎线虫首次在美国甘薯上被发现^[14],传入中国后,在北京、山东、河北等甘薯生产区均造成严重为害^[15]。马铃薯腐烂茎线虫在国外主要为害马铃薯,在国内主要为害甘薯,但近几年,在甘肃等地也发现此线虫为害马铃薯^[16-18]。因此,明确该病原线虫的生物型及系统发育地位,可为其致病性研究奠定基础,同时为马铃薯及甘薯生产区腐烂茎线虫的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2018 年 3 月至 12 月期间,马铃薯腐烂茎线虫采自陕西省榆林市定边县、靖边县、神木县及榆阳区的马铃薯发病田,及陕西省渭南市合阳县及

收稿日期:2019-08-19 修回日期:2020-01-07

基金项目:陕西省科技厅重点项目(2017ZDXM-NY-008);西安市农业科技创新工程(20193064YF052NS052);陕西省科学院科技计划(2019K-12)。

第一作者:刘 晨,女,助理研究员,研究方向为农业昆虫与害虫防治。E-mail:liuc1204@126.com

通信作者:张 锋,男,研究员,研究方向为植物保护。E-mail:545141529@qq.com

兴平市的甘薯发病田。

1.2 试验方法

1.2.1 线虫的分离 将不同地区采集病薯的典型病块区切下,切成 1 cm×1 cm 小块,清水冲洗干净,取双层面巾纸将其包住,采用漏斗分离线虫。收集到的线虫用 0.5%次氯酸钠浸泡、消毒 5 min,无菌水冲洗 3 遍,保存,备用。

1.2.2 形态学鉴定、线虫标本制作及特征值测量 将分离得到的腐烂茎线虫悬浮液,置于 65 ℃水浴处理 0.5 min 热力杀死^[19-21],并制成玻片以供观察。应用 EZcam 软件,在显微镜下对腐烂茎线虫的主要形态特征进行观察、测量及拍照。主要测量数据包括线虫的体长(*L*)、体宽(*W*)、口针长度(*S*)、头长(*H*)、尾长(*T*)等^[22],对比不同生物型的马铃薯腐烂茎线虫在形态上的差异。每组测量 20 条线虫,计算平均值。

扫描电镜观察:将线虫置于装有 5%戊二醛的离心管中于 4 ℃下固定 3 h,在 3 000 r/min 下离心 2 min,弃上清,留下层的线虫,用 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液进行冲洗之后,在 3 000 r/min 下

离心 2 min,弃上清,留下层的线虫,用超声波清洗仪将线虫于 30 ℃条件下清洗 30 min,经体积分数依次为 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100% 乙醇梯度脱水,每级脱 8 min,离心 2 min。再依次用乙酸异戊酯与无水乙醇体积比分别为 1:2、1:1、2:1、1:0 的乙酸异戊酯与无水乙醇混合液置换,每步置换 6 min,离心 2 min,EMITECH-K850 型临界点干燥仪干燥,MSP-1S 型离子溅射仪喷金镀膜,在 HITA-CHI-3400N 型扫描电子显微镜下观察并照相。

1.2.3 分子生物学鉴定提取线虫 DNA 向 1.5 mL 离心管内加入 16 μL×PCR Buffer (去 Mg²⁺)、4 μL 蛋白酶 K、40 μL ddH₂O,再将线虫放入混合液中;将离心管置于液氮中研磨,反复研磨 3 次;离心管水浴 65 ℃保温 90 min;再放置 85 ℃金属浴 10 min,取出放至室温即可用于 PCR 扩增。

PCR 扩增条件:反应选取腐烂茎线虫线粒体 COI 通用引物、核糖体 ITS 通用引物及 A 型生物型及 B 型生物型的特异性引物(表 1)。

表 1 用于鉴定马铃薯腐烂茎线虫的引物
Table 1 Primers of *Ditylenchus destructor*

引物名称 Primer	引物序列(5'→3') Sequence(5'→3')	目标片段大小/bp Fragment size
线粒体 COI 通用引物 Universal primer of mtDNA COI	TTTTTTGGGCATCTGAGGTTTAT TAAAGAAAAGAACATAATGAAAATG	480
核糖体 ITS 通用引物 Universal primer of rDNA ITS	CGTAACAAGGTAGCTGTAG TTTCACTCGCCGTTACTAAGG	760/950
A 型特异性引物 Specific primers of typeA	TCGTAGATCGATGAAGAACGC ATTATCTCGAGTGGGAGCGC	252
B 型特异性引物 Specific primers of type B	TTGTGTTTGCTGGTGCCTTGT GAGTGAGAGCGATGTCAACATTG	485

PCR 反应体系为 2×*Taq* Mix 25 μL(上海生工),20 μmol/L 上游引物 2 μL,20 μmol/L 下游引物 2 μL,DNA 模板 2 μL,H₂O 补充总体积至 50 μL。PCR 扩增反应为 95 ℃预变性 4 min,94 ℃变性 30 s,50 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 2 min,35 个循环;72 ℃最后延伸 7 min,PCR 产物 4 ℃保存。PCR 反应结束后,1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 系统发育树构建 将 PCR 产物送至上海生工生物工程有限公司,进行测序(Sanger 测序)。利用 MEGA 6.0 软件,采用邻接法(Neighbour-Joining, NJ)分别对线粒体 CO I 及核糖体

ITS 序列进行系统发育树的构建。

2 结果与分析

2.1 腐烂茎线虫形态学鉴定

在 40 倍显微镜下观察可见,雌性腐烂茎线虫温热死亡后虫体略向腹部弯曲,虫体表角质膜上有细环纹,环距 1 μm,唇区低且平滑,稍突出于体外,头区与体躯之间有一轻微的溢缩。虫体侧宽约占整体宽的 1/5,侧线 6 条(图 1)。食道属垫刃型,口针细小,长 10~13 μm,口针基球小而明显,呈圆形(图 2)。中食道球卵圆形,肌肉质,具瓣门。狭部窄,其上环绕神经环。后食道腺体

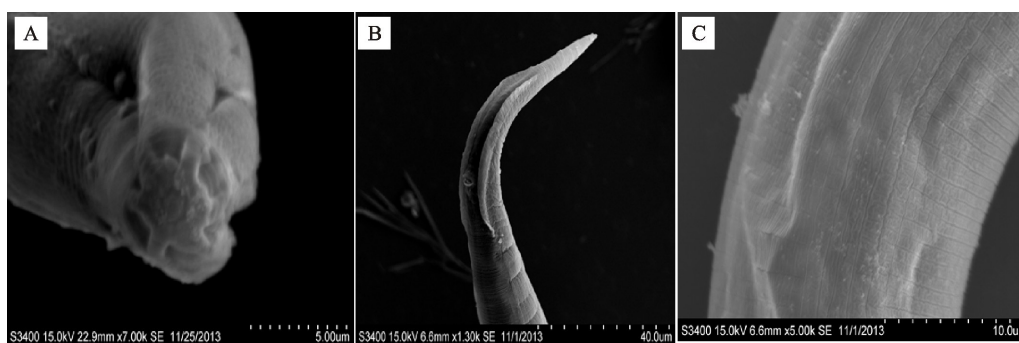
从背面或侧面交盖肠的前端,约交盖半个体宽至 1 个体宽。后阴子宫囊明显,其长度一般为阴门到肛门距离的 2/3。卵母细胞在近子宫处单行排列。后阴子宫囊长约达阴门至肛门距离的 3/4 位置处。尾圆锥形,略向腹部弯,尾端细圆(图 2)。

雄虫虫体前端形态与雌性虫形态相似,尾略窄,尾端细圆;交合刺略向腹部弯曲。交合伞始于

交合刺前端相对应的位置,向后伸约尾长的 75%,基部膨大,其宽处有 2 个指状突起;引带简单且短(图 2)。

2.2 不同生物型腐烂茎线虫特征值测量

对不同生物型的马铃薯腐烂茎线虫雌、雄成虫各测量 20 头,测量结果见表 2。

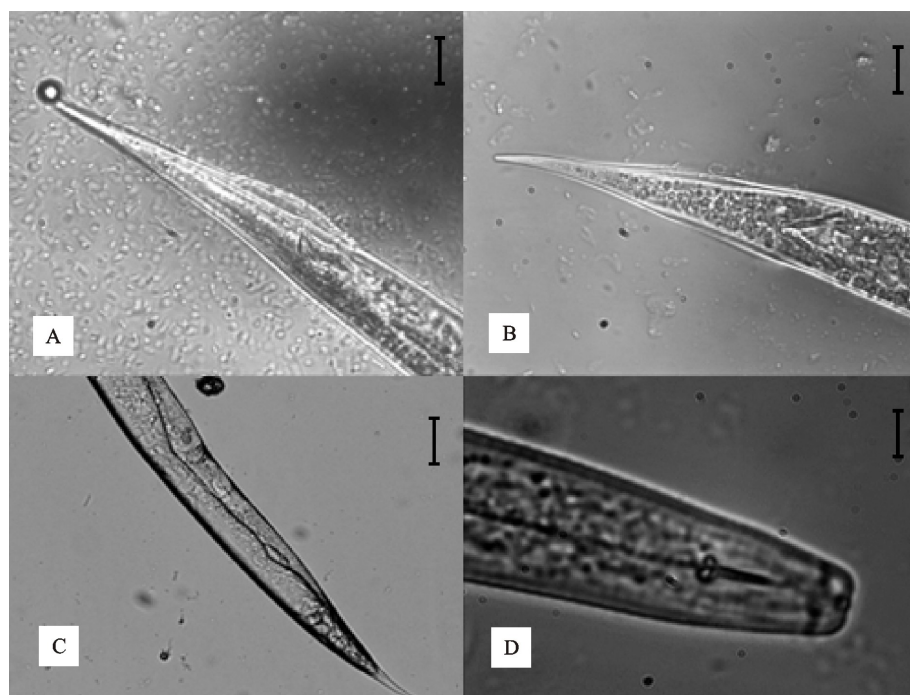


A. 6 面辐射状唇片;B. 交合伞始于交合刺前端;C. 体中侧区 6 条侧线

A. Six radial labrum; B. Copulatory bursa begins at the front of speculum; C. Six lateral lines of middle body side

图 1 马铃薯茎线虫扫描电镜照片

Fig. 1 Stereoscan photograph of *Ditylenchus destructor*



A. 雄虫交合刺侧面及交合伞;B. 交合刺腹面及指状;C. 雌虫阴门及尾部;D. 头部溢缩及口针;标尺:A/B/C=25 μm ,D=10 μm

A. Spiculum lateral surface and copulatory bursa of male; B. Segmental venter and finger of speculum; C. Cunnus and tail of female; D. Excessive shrinkage and lancet of head; scaleplate;A/B/C=25 μm ,D=10 μm

图 2 马铃薯腐烂茎线虫显微镜下特征形态

Fig. 2 Characteristic morphology under microscope of *Ditylenchus destructor*

表 2 不同生物型马铃薯腐烂茎线虫种群与其他种群形态测量值比较

Table 2 Morphometric value comparison of different *Ditylenchus destructor*

地点 Location	生物型 Bio-type	性别 Gender	体长(L)/ μm Length	体宽(W)/ μm Width	口针(S)/ μm Lancet	尾长(T)/ μm Tail	a	b	c	V
陕北 Northern Shaanxi	B 型 Type B	雌 Female	972.78 $\pm$ 70.03 a	24.13 $\pm$ 9.85 a	11.05 $\pm$ 2.31 ab	64.02 $\pm$ 6.44 a	41.81 $\pm$ 11.12 a	8.73 $\pm$ 1.44 ab	15.20 $\pm$ 0.74 ab	80.11 $\pm$ 5.31 ab
		雄 Male	943.20 $\pm$ 129.38 a	24.03 $\pm$ 11.35 a	10.28 $\pm$ 3.89 a	69.25 $\pm$ 8.89 ab	40.25 $\pm$ 3.54 a	8.65 $\pm$ 2.67 ab	13.61 $\pm$ 0.57 a	/
合阳 Heyang	A 型 Type A	雌 Female	1 121.8 $\pm$ 192.63 ab	29.06 $\pm$ 7.57 a	11.13 $\pm$ 2.58 a	64.78 $\pm$ 6.85 a	35.42 $\pm$ 5.22 a	8.99 $\pm$ 2.91 a	15.56 $\pm$ 0.91 a	81.27 $\pm$ 3.63 ab
		雄 Male	1 053.94 $\pm$ 117.52 ab	32.53 $\pm$ 8.14 a	10.59 $\pm$ 2.39 a	71.71 $\pm$ 7.94 ab	30.24 $\pm$ 4.42 a	8.67 $\pm$ 1.93 a	13.60 $\pm$ 0.49 ab	/
兴平 Xingping	A 型 Type A	雌 Female	1 009.55 $\pm$ 155.72 ab	29.62 $\pm$ 9.78 a	11.09 $\pm$ 3.72 a	64.65 $\pm$ 7.72 ab	34.19 $\pm$ 5.13 a	8.71 $\pm$ 2.05 a	15.62 $\pm$ 1.15 a	80.58 $\pm$ 3.19 ab
		雄 Male	974.56 $\pm$ 108.29 a	28.93 $\pm$ 10.15 a	10.51 $\pm$ 3.28 a	69.83 $\pm$ 7.89 ab	33.69 $\pm$ 7.51 ab	8.64 $\pm$ 1.38 a	14.16 $\pm$ 0.55 a	/
辽宁等省 Liaoning Provinceect		雌 Female	1 011 $\pm$ 137	34.6 $\pm$ 8.2	/	65.31 $\pm$ 11	38.75 $\pm$ 9.2	8 $\pm$ 1.4	13 $\pm$ 1.5	80.2 $\pm$ 1.6
		雄 Male	1 020 $\pm$ 65	24.25 $\pm$ 4.25	/	75.5 $\pm$ 10.5	40.25 $\pm$ 7.75	7.8 $\pm$ 1.2	5.7 $\pm$ 1.5	/
张家口 Zhangjiakou		雌 Female	886 $\pm$ 96	/	/	/	32 $\pm$ 4	15 $\pm$ 2	14 $\pm$ 2	81 $\pm$ 18
		雄 Male	870 $\pm$ 92	/	/	/	38 $\pm$ 5	14 $\pm$ 2	14 $\pm$ 1	/

注:a=体长/体宽;b=体长/体前部至肠前端距离;c=体长/尾长;V=体前端至阴门距离 $\times$ 100/体长。
Note:a=Length/width;b=Length/distance from anterior body to anterior intestine; c=Length/Tail; V=Distance from anterior end of body to vulva $\times$ 100/length.

从表 2 可以看出,无论 B 型还是 A 型腐烂茎线虫的雌成虫均比雄成虫体长长,体宽也略宽,合阳与兴平的 A 型马铃薯腐烂茎线虫雌成虫与雄成虫在体长、a 值、b 值、c 值及 V 值之间差异不显著,B 型腐烂茎线虫雌成虫与雄成虫的体长均比 A 型的显著减小,雌成虫的 V 值 B 型比 A 型小,但 a 值 B 型高于 A 型,b 值、c 值差异不显著。测量结果与郭全新等^[19]、刘维志等^[20]的测量结果基本一致。

2.3 腐烂茎线虫分子鉴定

2.3.1 不同地区茎线虫线粒体 COI 及核糖体 ITS 通用引物检测结果 通过马铃薯腐烂茎线虫的线粒体通用引物扩增陕北及关中合阳、兴平的线虫群体,从凝胶成像结果来看,所有样品都扩增

出 480 bp 条带(图 3)。用马铃薯腐烂茎线虫 ITS 通用引物进行 PCR 扩增,结果显示,为害陕北马铃薯的茎线虫均有约 950 bp 的条带,关中合阳、兴平甘薯上茎线虫均扩增出约 760 bp 的条带(图 4)。因此可以确定所有这些线虫样品均为马铃薯腐烂茎线虫。

2.3.2 不同地区腐烂茎线虫生物型鉴定结果 为确定不同地区马铃薯腐烂茎线虫的生物型是否相同,选取 A 型与 B 型的特异性引物扩增陕北、合阳及兴平的马铃薯种群。从图 5 可以看出,榆林地区靖边县、定边县、神木县及榆阳区为 B 型马铃薯腐烂茎线虫,合阳县及兴平市采集的为 A 型马铃薯腐烂茎线虫。

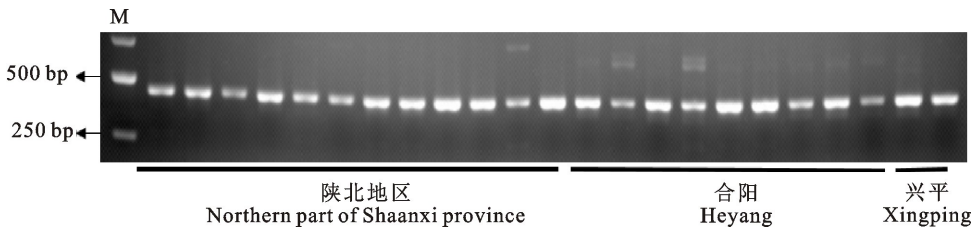


图 3 ITS 区通用引物扩增结果

Fig.3 Universal primer amplification of rDNA-ITS

2.4 rDNA-ITS 序列分析及系统发育树构建

对马铃薯腐烂茎线虫核糖体 ITS 通用引物扩增产物测序结果在 NCBI 上 BLAST 比对后发现,陕北 B 型种群与登录号为 JZ133363、

JZ133338 的 B 型马铃薯腐烂茎线虫群体同源性高达 99.5%,关中 A 型种群与 A 型的 MH992393 的同源性高达 99.1%。

使用腐烂茎线虫核糖体 ITS 通用引物对陕

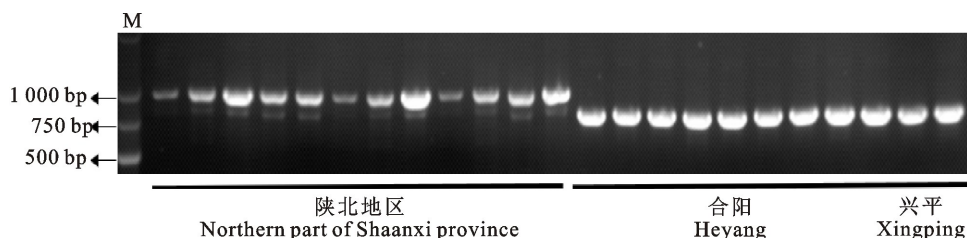


图 4 线粒体通用引物扩增结果

Fig. 4 Universal primer amplification of mtDNA

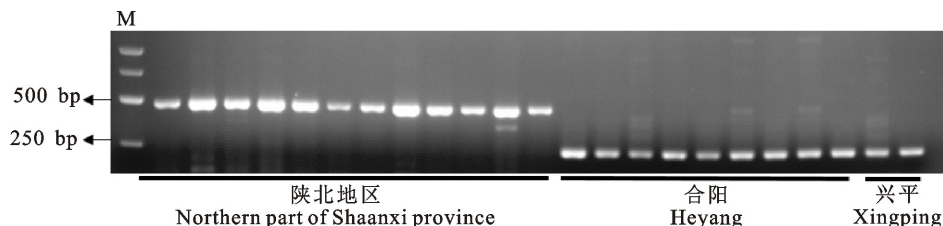


图 5 A 型、B 型特异性引物扩增结果

Fig. 5 Specific primer amplification of type A and B

北不同地区、合阳及兴平的种群进行扩增及测序,利用 MEGA6.0 软件,将这 7 个序列及 NCBI 上已知的 5 个序列号为 JZ133363、JZ133338 的 B 型及 MH992393 的 A 型马铃薯腐烂茎线虫种群分别构建系统发育树(图 6)。从结果来看,种群 DingB、JingB、ShenM 及 YuY 的 rDNA-ITS 序列与已知序列 MK979365、JZ133411 聚为一支。XingP、HeY 和 HeY2 聚在一支。合阳的两个不

同样品遗传距离最近,与兴平种群亲缘性高,这 3 个种群均为 A 型马铃薯腐烂茎线虫,陕北的定边县及靖边县的种群遗传距离最近,与神木县及榆阳区的茎线虫种群亲缘性较高,这 4 个种群均为 B 型马铃薯腐烂茎线虫。同时,此系统发育树成功将 A 型、B 型两个种群的马铃薯腐烂茎线虫成功区分开。此结果与分子鉴定结果较为一致。

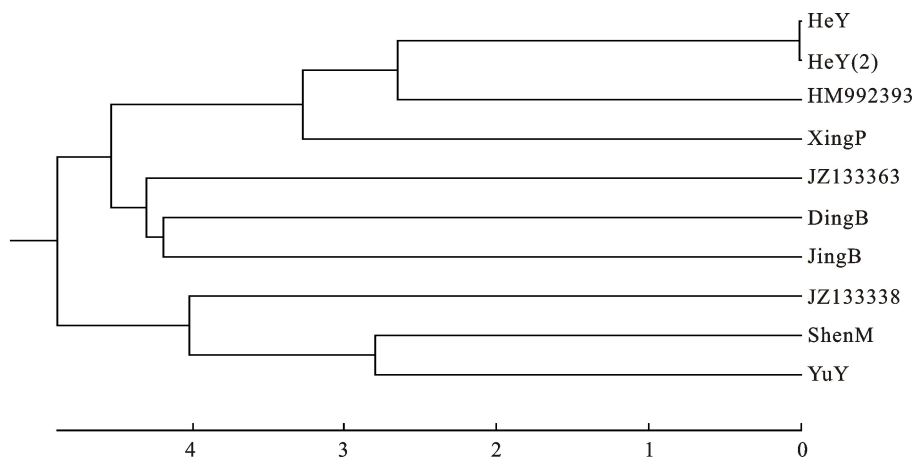


图 6 马铃薯腐烂茎线虫 rDNA-ITS 系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree of *Ditylenchus destructor* rDNA-ITS

3 结论与讨论

通过对中国马铃薯腐烂茎线虫 rDNA-ITS 序列对比可以看出,其种群主要分为 A 型和 B 型 2 个基因生物型^[8,23],但关于这 2 个生物型群体

在形态特征、寄主范围、病理学上等方面差异的研究较少^[18]。本研究首次在陕西省发现该线虫为害马铃薯及甘薯,并首次对陕西不同地区、不同寄主上该线虫的生物型进行了形态学与分子生物学鉴定。结果显示,侵染陕西省榆林马铃薯的为 B

型马铃薯腐烂茎线虫,侵染陕西省合阳及兴平甘薯的为 A 型。形态特征值的测量结果显示,A 型马铃薯腐烂茎线虫比 B 型的体长长,体宽略宽,雌成虫的 V 值较大,但 a 值 B 型马铃薯腐烂茎线虫高于 A 型,b 值、c 值差异不显著。不同地区相同生物型的茎线虫,在形态特征值上差异并不显著。构建系统发育树,成功将 A 型、B 型 2 个种群的马铃薯腐烂茎线虫区分开。

有研究^[18,23-24]表明:中国山东、河北及江苏等地甘薯上马铃薯腐烂茎线虫可分为 A 型、B 型 2 个生物型;有学者^[12]在此基础上将马铃薯腐烂茎线虫种群分为 A-G 型 7 个单元型,A-F 单元型均在中国有发生,而 G 型并未发现。关于陕西省是否还存在马铃薯腐烂茎线虫的其他生物型,及不同生物型发生区域、侵染作物种类、生物特性及其他分子生物学方面是否存在差异,还需进一步调查研究,这将对有效预防及控制马铃薯腐烂茎线虫的扩散提供理论依据。

参考文献 Reference:

- [1] 谢从华. 马铃薯产业的现状与发展[J]. 华中农业大学学报(社会科学版),2012,97(1):1-4.
XIE C H. Current situation and development of potato industry [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University (Social Sciences Edition)*, 2012, 97(1):1-4.
- [2] HOOPER D J. *Ditylenchus Destructor* [M]. CIH Description of Plant-parasitic Nematodes No. 21. CAB International Wallingford, UK, 1973.
- [3] 洪波,张锋,李英梅,等. 马铃薯腐烂茎线虫在陕西的适生性分析[C]//中国植物保护学会. 中国植物保护学会会议论文集. 北京:中国农业科学技术出版社,2017:52-58.
HONG B, ZHANG F, LI Y M, et al. The suitability analysis of potato rotten stem nematode in Shaanxi province [C]//China Society of Plant Protection. Proceedings of the Conference of the Chinese Society for Plant Protection. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2017:52-58.
- [4] 周忠,马代夫. 甘薯茎线虫病的研究现状和展望[J]. 杂粮作物,2003,23(5):288-290.
ZHOU ZH, MA D F. Research status and prospect of sweet potato stem nematode disease[J]. *Rain Fed Crops*, 2003, 23(5):288-290.
- [5] 朱秀珍,田希武,王随保,等. 甘薯茎线虫病发病规律及综合防治[J]. 山西农业科学,2004,32(3):54-57.
ZHU X ZH, TIAN X W, WANG S B, et al. The infection law and IPM of *Ditylenchus destructor* thorne [J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2004, 32(3):54-57.
- [6] 王宏宝,李茹,付佑胜,等. 不同基因型腐烂茎线虫侵染不同甘薯品种后生物学特性研究[J]. 西南农业学报,2017,30(1):93-99.
WANG H B, LI R, FU Y SH, et al. Study on biological characteristics of different genotypes *Ditylenchus destructor* infected on different sweet potato varieties [J]. *South-west China Journal of Agricultural Sciences*, 2017, 30(1):93-99.
- [7] 黄健,戚龙君,王金成. 腐烂茎线虫种内不同种群形态及遗传分析[J]. 植物病理学报,2009,39(3):39-43.
HUANG J, QI L J, WANG J CH. Morphological and genetic analysis on different populations of *Ditylenchus destructor* [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2009, 39(3):39-43.
- [8] 王金成,季镭,黄国明. 腐烂茎线虫不同地理种群 ITS 区序列比对及系统发育[J]. 河北农业大学学报,2007,30(5):79-83.
WANG J CH, JI L, HUANG G M. Alignments of rDNA-ITS sequences and phylogeny of different geo-populations of *Ditylenchus destructor* in China [J]. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 2007, 30(5):79-83.
- [9] 刘斌,梅圆圆,郑经武. 腐烂茎线虫种内群体特异性检测研究[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版),2007,33(5):490-496.
LIU B, MEI Y Y, ZHENG J W. Species-specific detection of inter-populations of *Ditylenchus destructor* [J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences)*, 2007, 33(5):490-496.
- [10] 刘先宝,葛建军,谭志琼. 马铃薯腐烂茎线虫在国内危害马铃薯的首次报道[J]. 植物保护,2006,32(6):157-158.
LIU X B, GE J J, TAN ZH Q. The first report of potato rotting stem nematode har ming potato in China [J]. *Plant Protection*, 2006, 32(6):157-158.
- [11] 郭全新,简恒. 危害马铃薯的茎线虫分离鉴定[J]. 植物保护,2010,36(3):117-120.
GUO Q X, JIAN H. Identification of *Ditylenchus destructor* from potatoes in Zhangjiakou, Hebei [J]. *Plant Protection*, 2010, 36(3):117-120.
- [12] SUBBOTIN S A, MOHAMMAD D A, ZHENG J, et al. Length variation and repetitive sequences of internal transcribed spacer of ribosomal RNA gene, diagnostics and relationships of populations of potato rot nematode *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945 (Tylenchida: Anguinidae) [J]. *Nematology*, 2011, 13(7):773-785.
- [13] JESZKE A, BUDZISZEWSKA M, DOBOSZ R, et al. A comparative and phylogenetic study of the *Ditylenchus dipsaci*, *Ditylenchus destructor*, and *Ditylenchus gigas* population occurring in Poland [J]. *Journal of Phytopathology*, 2014, 162:61-67.
- [14] STEINER G. The problem of host selection and host specialization of certain plant-infesting nemas and its application in the study of nematode pest [J]. *Phytopathology*, 1925, 15:499-534.
- [15] STEVENSON W R, LORIA R, FRANC G D, et al. Compendium of potato diseases (2nd edition) [M]. St. Paul,

- Minnesota, USA; The American Phytopathological Society, 2009; 50-51.
- [16] 町再福, 林茂松. 甘薯、马铃薯和薄荷上的茎线虫的鉴定[J]. 植物保护学报, 1982, 9(3): 169-172.
- DING Z F, LIN M S. Identification of stem nematode from sweet potato, potato and mint [J]. *Journal of Plant Protection*, 1982, 9(3): 169-172.
- [17] 李惠霞, 徐鹏刚, 李建荣, 等. 甘肃定西地区马铃薯线虫病病原的分离鉴定[J]. 植物保护学报, 2016, 43(4): 580-587.
- LI H X, XU P G, LI J R, *et al.* Identification of the pathogenic nematodes from potatoes in Dingxi of Gansu province [J]. *Journal of Plant Protection*, 2016, 43(4): 580-587.
- [18] 张淑玲, 李惠霞, 徐鹏刚, 等. 黑龙江腐烂茎线虫群体的分离和鉴定[J]. 植物病理学报, 2019, 3(8): 1-10.
- ZHANG SH L, LI H X, XU P G, *et al.* Isolation and identification of *Ditylenchus destructor* from Heilongjiang [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2019, 3(8): 1-10.
- [19] 郭全新, 简 恒. 危害马铃薯的茎线虫分离鉴定[J]. 植物保护, 2010, 36(3): 117-120.
- GUO Q X, JIAN H. Identification of *Ditylenchus destructor* from potatoes in Zhangjiakou, Hebei [J]. *Plant Protection*, 2010, 36(3): 117-120.
- [20] 刘维志, 刘清利, 尼秀媚. 马铃薯茎线虫 *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945 的描述[J]. 莱阳农学院学报, 2003, 20(1): 1-3.
- LIU W ZH, LIU Q L, NI X M. Description of *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945 [J]. *Journal of Laiyang Agricultural College*, 2003, 20(1): 1-3.
- [21] 周志强, 程瑚瑞. 热力杀死制片线虫标本的初步研究[J]. 植物检疫, 1993, 7(2): 81-84.
- ZHOU ZH Q, CHENG H R. Preliminary study on thermal killing of nematode specimens [J]. *Plant Quarantine*, 1993, 7(2): 81-84.
- [22] 段玉玺, 陈立杰. 植物寄生线虫标本制作方法简介[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2006, 12(24): 65-69.
- DUAN Y X, CHEN L J. Introduction to preparation of plant parasitic nematode specimen [J]. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 2006, 12(24): 65-69.
- [23] 宛 菲, 彭德良, 杨玉文, 等. 马铃薯腐烂茎线虫特异性分子检测技术研究[J]. 植物病理学报, 2008, 38(3): 263-270.
- WAN F, PENG D L, YANG Y W, *et al.* Species specific molecular diagnosis of *Ditylenchus destructor* populations occurring in China [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2008, 38(3): 263-270.
- [24] 于海英, 彭德良, 胡先奇, 等. 马铃薯腐烂茎线虫 28S rDNA-D2/D3 区序列分析[J]. 植物病理学报, 2009, 39(3): 254-261.
- YU H Y, PENG D L, HU X Q, *et al.* Molecular cloning and sequences analysis of 28S rDNA -D2 /D3 regions of *Ditylenchus destructor* on sweet potato in China [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2009, 39(3): 254-261.

Homology Analysis and Identification of *Ditylenchus destructor* from Different Areas of Shaanxi Province

LIU Chen, YANG Yiwei, WANG Jiazhe, CHANG Qing,
HONG Bo and ZHANG Feng

(Bio-Agriculture Institute of Shaanxi, Xi'an 710043, China)

Abstract In order to provide theoretical basis for controlling *Ditylenchus destructor*, we identified biotypes of *D. destructor* from different areas of Shaanxi. In this study, the *D. destructors* from different areas of Shaanxi were isolated, and their morphological characteristics were observed and measured. Then the universal primers of *D. destructor* mitochondrial CO I and ribosomes ITS were used for PCR detection and sequence analysis of all the *D. destructor* samples from different areas of Shaanxi. In addition, the specific primers of biotype A and B were also used for PCR detection and sequence analysis of all the samples. MEGA 6.0 was used for phylogenetic tree construction and population homology analysis. The results showed that, the biotype of *D. destructors* from Northern Shaanxi was type B, and the biotype of *D. destructors* from Guanzhong area was type A. Morphological characteristic value data showed that female adults were longer and wider than male adults, and type A were longer and wider than type B in both female and male adults. Phylogenetic tree showed that type B *D. destructors* from Northern Shaanxi clustered in one clade, and type A *D. destructors* from Heyang and Xingping clustered in one clade, so it was consistent with the results of molecular identification.

Key words *Ditylenchus destructor*; Morphological characteristics; Biotype; Phylogenetic tree

Received 2019-08-19

Returned 2020-01-07

Foundation item Shaanxi Provincial Department of Science and Technology (No. 2017ZDXM-NY-008); Agricultural Science and Technology Innovation of Xi'an (No. 20193064YF052NS052); Science and Technology Program of Shaanxi Academy of Sciences (No. 2019K-12).

First author LIU Chen, female, assistant research fellow. Research area: agricultural entomology and pest control. E-mail: liuc1204@126.com

Corresponding author ZHANG Feng, male, research fellow. Research area: plant protection. E-mail: 545141529@qq.com

(责任编辑: 郭柏寿 Responsible editor: GUO Baishou)