

DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).202004016

云南省澜沧县林下三七根结线虫病害 调查与侵染来源分析*

王柱华¹, 王文鹏¹, 刘以斌¹, 蒋春和¹, 杨 宽¹,
朱有勇¹, 王 扬^{1**}, 何霞红^{1,2**}

(1. 云南农业大学, 云南生物资源保护与利用国家重点实验室, 云南 昆明 650201;

2. 西南林业大学, 云南 昆明 650224)

摘要:【目的】明确云南省澜沧县林下有机三七种植基地及育苗基地三七根结线虫病病原种类及来源, 为该地区三七根结线虫病的防治奠定基础。【方法】采用系统调查法对澜沧县林下三七种植基地、育苗基地的三七及其周边相同生境下的杂草进行根结线虫病害发生情况调查和病原线虫种类鉴定。【结果】3个基地中大塘子三七育苗基地的根结线虫危害最严重, 发病率高达66.82%; 其次是林下基地, 而哈果马育苗基地危害相对较轻。经收集鉴定, 危害林下和育苗基地三七和杂草的病原根结线虫为北方根结线虫(*Meloidogyne hapla*); 在思茅松林下分布杂草97种, 其中发生根结线虫病的杂草有紫茎泽兰和积雪草2种, 根据杂草的分布丰度和根结线虫寄生的程度可以判断紫茎泽兰是林下三七根结线虫病的主要中间寄主。两育苗基地的杂草类型基本一致, 分布杂草124种, 其中发生根结线虫病的杂草有溪黄草、紫茎泽兰、鬼针草、六棱菊、豆茶决明、野茼蒿、香薷、一点红、积雪草、草玉梅和豨莶等11种, 根据杂草的分布丰度和根结线虫寄生的程度可以判断鬼针草、野茼蒿和紫茎泽兰是三七育苗基地三七根结线虫病的主要中间寄主。【结论】云南省澜沧县林下及育苗基地危害三七及杂草的病原线虫均为北方根结线虫(*M. hapla*), 种苗带病是林下三七根结线虫病发生的主要原因, 而苗圃地土壤中的病原线虫来自易感病杂草的富集作用。因此, 三七育苗地的选择、育苗和移栽过程中杂草的清除是病害防控的关键。

关键词: 林下三七; 北方根结线虫; SCAR-PCR; 中间寄主

中图分类号: S 567.236.08

文献标志码: A

文章编号: 1004-390X (2021) 01-0060-09

Investigation and Infection Source Analysis of Root Knot Nematode Disease of *Panax notoginseng* in Lancang County, Yunnan Province

WANG Zhuhua¹, WANG Wenpeng¹, LIU Yibin¹, JIANG Chunhe¹, YANG Kuan¹,
ZHU Youyong¹, WANG Yang¹, HE Xiaohong^{1,2}

(1. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources in Yunnan, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

收稿日期: 2020-04-09

修回日期: 2020-09-15

网络首发时间: 2021-01-05 13:18:34

*基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0201100); 现代农业产业技术体系建设专项资金资助(CARS-21); 云南省科技厅重点研发(农业领域)项目(2018BB016); 云南省生物医药重大研究专项(A3008747)。

作者简介: 王柱华(1990—), 女, 云南昆明人, 在读博士研究生, 主要从事生物多样性与植物病害控制研究。E-mail: 1339593115@qq.com

**通信作者 Corresponding authors: 王扬(1970—), 男, 云南大理人, 博士, 教授, 主要从事植物线虫学研究。E-mail: wangyang626@sina; 何霞红(1975—), 女, 江西婺源人, 博士, 教授, 主要从事生物多样性与病害控制研究。E-mail: hexiaohong@hotmail.com

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20210104.0829.001.html>



Abstract: [Purpose] In order to provide reference for comprehensive prevention of root-knot nematodes disease, the present study investigated and identified the pathogen species and sources of root-knot nematodes in the understory plantation and nursery in Lancang County of Yunnan Province.

[Method] The systematic investigation method was used to investigate the occurrence of *Panax notoginseng* and weeds root-knot nematodes disease and identify the pathogenic nematodes of the *P. notoginseng* and the weeds which under the same habitats in the understory plantation and nursery in Lancang County. [Result] Among the three bases, the root-knot nematode of Datangzi nursery base was the most harmful, with an incidence rate as high as 66.82%; followed by the forest base, while the Haguoma nursery base was relatively light. After collection and identification, the pathogenic root-knot nematodes that endangered *P. notoginseng* and weeds in the forest base and nursery bases were *Meloidogyne hapla*. There are 97 species of weeds distributed under the *Pinus kesiya* var. *langbianensis* forest, among which two weeds with root-knot nematode disease include *Ageratina adenophora* and *Centella asiatica*. According to the distribution abundance of weeds and the parasitic degree of root knot nematode, *A. adenophora* is the main intermediate host of root knot nematode of *P. notoginseng*. The types of weeds in the two nursery bases are basically the same, with 124 species of weeds distributed, among which 11 weeds with root-knot nematode disease include *Rabdosia serra*, *A. adenophora*, *Bidens pilosa*, *Laggera alata*, *Cassia nomame*, *Crassocephalum crepidioides*, *Elsholtzia ciliata*, *Emilia sonchifolia*, *Anemone rivularis* and *Siegesbeckia orientalis*. According to the distribution abundance of weeds and the parasitic degree of root knot nematode, *B. pilosa*, *C. crepidioides* and *A. adenophora* are the main intermediate host of root knot nematode of *P. notoginseng*.

[Conclusion] The pathogenic nematodes which infected *P. notoginseng* and weeds in the understory plantation and nursery in Lancang County were confirmed as *M. hapla*. The disease of seedlings is the main reason for the occurrence of root knot nematode of *P. notoginseng* in the forest, and the pathogenic nematode in the soil of nursery comes from the enrichment of susceptible weeds. Therefore, the selection of Sanqi nursery grounds, the removal of weeds during nursery and transplanting are the key to disease prevention and control.

Keywords: *Panax notoginseng* cultivation in forest; *Meloidogyne hapla*; SCAR-PCR; intermediate host

三七 [*Panax notoginseng* (Burk.) F.H.Chen] 又名田七, 为五加科人参属植物, 是中国极有经济和药用价值的名贵中药材^[1-3]。随着市场需求量的不断增加, 三七种植面积不断扩大^[4]。近年来, 三七的种植和加工已成为云南省地方经济发展的重要支柱产业^[5]。

目前, 三七的生产方式主要是传统农田种植模式。传统模式生产中, 三七的连作障碍发生严重^[6], 造成三七再植困难, 种植用地短缺^[7]。近年来, 朱有勇院士带领团队创新种植模式, 在云南省澜沧县利用丰富的林下资源开展林下三七有机种植, 让中药材回归山野林中^[8-9], 这不仅解决了连作障碍带来的无地可种的困境, 更为边疆贫困

山区脱贫致富做出了贡献^[9-10]。在林下种植三七病害发生很轻, 通过避雨的栽培方法, 不用农药就可以控制叶部病害和根腐病的发生, 但调查中发现林下三七有根结线虫病发生。三七根结线虫病主要危害其药用部位, 形成大量小米至绿豆大小、近似圆球形的根结, 同时线虫侵入造成的伤口又为其他病原物的侵入打开了通道, 可以与细菌、病毒和真菌等共同作用, 引发复合病害^[11], 对三七的产量和品质造成巨大影响。由于三七的种植年限较长, 再加上根结线虫病属于积年流行性病害, 其危害显得更加突出。

根结线虫 (*Meloidogyne* spp.) 是一种危害植物根系, 以侧根和须根发病严重, 并诱发植物根系

畸变形成根结的一类专性固着内寄生线虫^[11],具有寄主广、致病性强、繁殖快和易传播扩散等特性^[12],是园艺和大田作物中最具经济破坏力的植物寄生线虫之一^[13]。目前国际上报道的根结线虫有 100 多种,其寄主植物高达 3000 余种,遍及花卉、蔬菜、经济作物、药材、果树和粮食等^[14-15]。1997—1998 年,胡先奇等^[16-17]在云南省晋宁县首次发现并报道了北方根结线虫危害三七。随后杨佩文等^[12]、陈昱君等^[18-19]和马光泉等^[20]报道了云南文山、砚山、马关和蒙自等三七种植主产区根结线虫病发生情况和危害状况,经形态学、同工酶电泳和分子生物学 (SCAR-PCR) 等方法鉴定了这 4 个地区的三七病原根结线虫种群均为北方根结线虫 (*M. hapla*)。以上报道均是传统农地种植方式下发生的三七根结线虫病,根结线虫是农田中常见的土壤定居病原物,在自然林尤其是松林下的土壤环境中很少出现。2016 年在澜沧思茅松林下三七的病害调查中发现了根结线虫病,且有蔓延扩展的趋势,而迄今为止尚未发现思茅松感染根结线虫的迹象,松林土壤中的病原线虫从何而来成为未解之谜。三七根结线虫病目前缺乏有效的防治手段,传统的防治主要依赖施用杀线虫剂处理土壤,但带来的问题是农残超标而影响入药的安全性,这是林下种植三七过程需要杜绝的,而生物防治虽然安全但见效慢。因此,明确危害三七的病原线虫从哪里来,从源头上阻止病害的发生,可以为安全、有效、绿色的防控三七根结线虫病提供保障。

本研究采用形态学方法结合分子生物学 SCAR-PCR 技术对澜沧县林下有机三七种植基地和三七育苗基地的三七根结线虫病病原种类及中间寄主种类进行调查鉴定,以期明确澜沧县危害林下基地和育苗基地三七的病原根结线虫种类及其传播来源,为林下三七根结线虫病的研究和防治提供依据,保障云南林下三七种植产业的健康发展。

1 材料与方法

1.1 三七植株病情调查

2019 年 7 月,对云南省澜沧县竹塘乡大塘子林下有机三七种植基地、大塘子和哈果马三七育苗基地进行土壤采样和线虫病害调查。每个基地均采取五点取样法,每点取样不少于 30 株,根

际土壤样品不少于 100 g,借助小锄头将三七轻轻挖起,检查根部,按照国内同类研究马金慧等^[21]和王婷等^[22]的病情分级标准对调查的三七进行分级并记录。将采集的三七样品和土壤样品分别放于标记好的样品袋中,带回实验室保存于 4 ℃ 冰箱备用。统计分析并计算每个基地的发病率和病情指数。

发病率 = 感病株数/调查总株数×100%;

病情指数 = $\sum$ (病级×同病级株数)/最高病级×调查总株数×100。

1.2 感病杂草种类调查

分别对大塘子林下有机三七种植基地、大塘子和哈果马三七育苗基地周围的杂草进行调查,每个基地均采用倒置“W”九点取样法,每个样方面积为 0.25 m² (50 cm×50 cm)^[23],调查并统计每个样方内杂草的种类和株数,采用形色软件初步鉴别杂草种类,然后拍照,对照《中国农田杂草原色图谱》^[24]进行进一步识别,并将有根结的杂草带回实验室进行镜检及鉴定病原。

采用杂草的相对丰度值 (RA) 来衡量杂草的重要程度。计算公式如下^[25]:

杂草频度 (PF)=某种杂草出现的样方数/调查样方的总数;

相对频率 (RF)=某种杂草 PF 值/该区域所有杂草种 PF 值之和;

相对密度 (RD)=某种杂草株数/区域内所有物种植株总数;

杂草相对丰度 (RA)=RF+RD。

1.3 线虫分离及会阴花纹形态鉴定

采用浅盘法分离根际土壤样品中的线虫,收集线虫并在体视显微镜下计数。从感病三七和杂草根结内分离雌成虫,参照刘维志^[26]和谢辉^[27]的方法制作病原根结线虫雌成虫会阴花纹,在显微镜下观察会阴花纹的形态特征。

1.4 分子生物学鉴定

1.4.1 根结线虫 DNA 提取

将感病三七和杂草的根部洗净,在解剖镜下挑取成熟的单头雌成虫,放于装有 5 μL 灭菌 ddH₂O 的灭菌 PCR 管中,参照 ADAM 等^[28]的方法提取病原线虫 DNA。将 DNA 提取液置于-20 ℃ 冰箱中备用。

1.4.2 病原根结线虫 SCAR-PCR 特异性鉴定

采用 DONG 等^[29]和冯光泉等^[20]设计的 2 对北

方根结线虫特异性引物, 分别编号为 Mh-F1/Mh-R1 和 Mh-F2/Mh-R2, 分别以侵染三七和杂草的病原线虫为模板进行 SCAR-PCR 扩增, 预期扩增片段长度为 1500 和 462 bp。PCR 反应体系 (50 μ L): 5 $\times$ Trans Start[®] Fastpfu Buffer 10 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 4 μ L, Trans Start[®]DNA polymerase 1 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 病原线虫 DNA 模板 2 μ L, 灭菌 ddH₂O 31 μ L。引物 Mh-F1/Mh-R1 的扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 进行 35 个循环; 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。引物 Mh-F2/Mh-R2 的扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 51 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 进行 35 个循环; 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测。

2 结果与分析

2.1 根结线虫危害情况

调查结果发现: 大塘子林下有机三七种植基地、大塘子和哈果马三七育苗基地的三七均受根结线虫危害, 其症状表现主要在根部, 即在三七的大、小枝根上, 形成大量大小不等的近似米粒状或圆球形的根结 (图 1), 枝根上新长出的须根被侵染后也形成稚嫩的新的根结 (图 1a)。经长时间反复多次侵染, 严重的三七根部已形成密密麻麻的根结或根瘤 (图 1b)。根结线虫侵染初期或三七受害较轻时, 植株的地上部分无症状表现; 三七受害较重时, 植株地上部生长缓慢, 叶片黄化或萎蔫, 长势衰弱, 呈缺水缺肥状。



图 1 云南澜沧三七根结线虫病症状

Fig. 1 Symptoms of *P. notoginseng* root knot nematode disease in Lancang County of Yunnan Province

大塘子思茅松林下有机三七种植基地 (N22 $^{\circ}$ 80'39", E99 $^{\circ}$ 78'16", 海拔 1481 m) 十余年前是农地, 退耕还林十多年, 基地内三七种植方式为生

态有机种植, 目前三年生三七地上部长势良好。经病害调查发现: 大塘子思茅松林下有机三七种植基地根结线虫病发病率为 19.66%, 病情指数为 10.43, 平均每 100 g 土壤含虫量为 11.3 条。由于思茅松的荫蔽和根系强烈的化感作用, 林下基地的杂草种类和数量都显然不足以引起这么严重的病害, 推测可能移栽进基地的种苗上有根结线虫病。

大塘子三七育苗基地 (N22 $^{\circ}$ 48'18", E99 $^{\circ}$ 46'56", 海拔 1460 m) 和哈果马三七育苗基 (N22 $^{\circ}$ 47'73", E99 $^{\circ}$ 47'58", 海拔 1560 m) 至今一直是农地, 前茬作物为玉米或早稻, 大塘子育苗基地于 2018 年 1 月采取种子播种的方式进行种植, 目前二年生种苗地上部长势良好; 哈果马育苗基地于 2019 年 1 月采取种子播种的方式进行种植, 目前一年生种苗地上部长势良好。调查结果表明: 两育苗基地的种苗均发生根结线虫病, 其中大塘子三七育苗基地的发病最严重, 发病率高达 66.82%, 病情指数达到 33.18, 平均每 100 g 土壤含虫量高达 33.2 条; 而哈果马育苗基地的发病相对较轻, 发病率为 15.25%, 病情指数为 7.62, 平均每 100 g 土壤含虫量为 10.6 条。经分析发现: 根结线虫病发生的严重程度同三七根结线虫病发生年限密切相关, 即三七根结线虫病属于积年流行性病害, 随着种植年限的增加, 病原线虫在土壤中的虫口密度越大, 危害越严重。

2.2 中间寄主杂草种类调查结果

调查结果表明: 大塘子思茅松林下有机三七种植基地分布杂草 97 种, 其中发生根结线虫病的杂草有隶属菊科、伞形科的紫茎泽兰和积雪草 2 种 (表 1、图 2)。根据杂草的分布丰度和根结线虫寄生的程度可以判断紫茎泽兰和积雪草是林下三七根结线虫病的中间寄主, 其中紫茎泽兰为林下基地的草本优势种, 相对丰度较高, 线虫危害较严重, 平均根结百分率高达 92.45% (表 1), 因此可初步推测紫茎泽兰可能为主要中间寄主。

大塘子和哈果马三七育苗基地的杂草类型基本一致, 分布杂草 124 种, 其中有隶属菊科、唇形科、伞形科、豆科和毛茛科等 5 科, 有 12 种相同的杂草发生根结线虫病 (表 1、图 2)。其中, 溪黄草、紫茎泽兰、六棱菊、豆茶决明、香薷、积雪草、草玉梅和艾等 8 种杂草为多年生草本植物; 鬼针草、野茼蒿、一点红和豨薟为一年

表 1 澜沧县三七根结线虫病发病地块杂草种类调查
Tab. 1 Investigation of weed species in *P. notoginseng* root knot nematode affected areas

调查地点 survey location	优势杂草/% dominant species	相对丰度/% relative abundance	有根结杂草种类 rooted weeds	平均根结百分率/% average root knot percentage
大塘子林下有机三七 种植基地 organic <i>P. notoginseng</i> planting base in forest Datangzi	紫茎泽兰 <i>Ageratina adenophora</i> (Spreng.) R.M. King et H.Rob	90.51	紫茎泽兰 <i>A. adenophora</i> (Spreng.) R.M. King et H.Rob	92.45
	菵草 <i>Arthraxon hispidus</i> (Thunb.) Makino	38.12	积雪草 <i>C. asiatica</i> (L.) Urban	15.78
	艾 <i>Artemisia argyi</i>	25.85		
	牡蒿 <i>Artemisia japonica</i> Thunb.	11.63		
	糯米团 <i>Gonostegia hirta</i> (Bl.) Miq.	5.86		
大塘子育苗基地 Datangzi nursery base	阔叶丰花草 <i>Borreria latifolia</i> (Aubl.) K. Schum.	91.05	溪黄草 <i>Rabdosia serra</i> (Maxim.) Hara	94.45
	鬼针草 <i>Bidens pilosa</i> L.	51.09	紫茎泽兰 <i>A. adenophora</i> (Spreng.) R.M. King et H.Rob	87.13
	野苘蒿 <i>Crassocephalum crepidioides</i> (Benth.) S. Moore	45.24	鬼针草 <i>B. pilosa</i> L.	61.45
	紫茎泽兰 <i>Ageratina adenophora</i> (Spreng.) R.M. King et H.Rob	12.45	六棱菊 <i>L. alata</i> (D. Don) Sch.-Bip. ex Oliv	56.18
	地毯草 <i>Axonopus compressus</i> (Sw.) Beauv.	6.21	豆茶决明 <i>Cassia nomame</i> (Sieb.) Kitagawa	45.66
			野苘蒿 <i>C. crepidioides</i> (Benth.) S. Moore	41.25
			香薷 <i>Elsholtzia ciliate</i> (Thunb.) Hyland	32.61
哈果马育苗基地 Hagoma nursery base	阔叶丰花草 <i>Borreria latifolia</i> (Aubl.) K. Schum.	90.14	一点红 <i>Emilia sonchifolia</i> (L.) DC	24.75
	野苘蒿 <i>Crassocephalum crepidioides</i> (Benth.) S. Moore	52.07	积雪草 <i>C. asiatica</i> (L.) Urban	16.28
	鬼针草 <i>Bidens pilosa</i> L.	47.92	草玉梅 <i>Anemone rivularis</i> Buch.-Ham	10.52
	紫茎泽兰 <i>Ageratina adenophora</i> (Spreng.) R.M. King et H.Rob	13.8	豨莶 <i>Siegesbeckia orientalis</i> L.	5.13
	糯米团 <i>Gonostegia hirta</i> (Bl.) Miq.	4.73	艾 <i>A. argyi</i>	3.63

生草本；其中鬼针草、野苘蒿和紫茎泽兰同为两基地的优势杂草，且这 3 种优势杂草线虫危害严重，平均根结百分率高达 41.25% 以上 (表 1)。可初步推测溪黄草、紫茎泽兰、鬼针草、六棱菊、豆茶决明、野苘蒿、香薷、一点红、积雪草、草玉梅、豨莶和艾等 12 种杂草可能为三七育苗基地病原线虫的中间寄主，其中鬼针草、野苘蒿和紫茎泽兰可能为主要中间寄主。

2.3 雌成虫会阴花纹形态学鉴定结果

通过观察澜沧各基地感病三七和感病杂草上的病原线虫雌成虫的形态特征，发现雌成虫均为乳白色梨形状 (图 3a)，且雌成虫会阴花纹特征相同 (图 3c、d)：花纹多为卵圆形，背弓稍扁平，

背腹线纹相遇处有一定的角度，有的形成“翼”，侧线不明显，线纹从波浪形到平滑形变化，肛门至 2 个侧尾线之间有一片刻点区，与杨佩文等^[12]报道的危害云南三七主产区的北方根结线虫的描述相符。因此，初步判断澜沧县感病三七和感病杂草上的病原线虫相同，均为北方根结线虫 (*M. hapla*)。

2.4 感病三七病原线虫 SCAR-PCR 鉴定结果

从林下基地及育苗基地的三七上分离出来的雌成虫 DNA 作为模板，分别用北方根结线虫的 2 对特异性引物 Mh-F1/Mh-R1 和 Mh-F2/Mh-R2 进行单引物 SCAR-PCR 鉴定。结果表明 (图 4)：林下及 2 个育苗基地三七上的所有供试线虫均扩

增得到 1500 bp (图 4a) 和 462 bp (图 4b) 大小的特异性条带, 分别与 2 对北方根结线虫特异性引物设计相符, 与阳性对照 (实验室保存的北方根结线虫标准种) 一致, 且以 ddH₂O 为阴性对照的扩增中未出现特异性条带, 表明感染澜沧县大塘子林下基地和 2 个育苗基地的三七的病原线虫相同, 均为北方根结线虫 (*M. hapla*)。

2.5 感病杂草病原线虫 SCAR-PCR 鉴定结果

将杂草上分离到的根结线虫通过北方根结线虫特异性引物 Mh-F1/Mh-R1 和 Mh-F2/Mh-R2 进

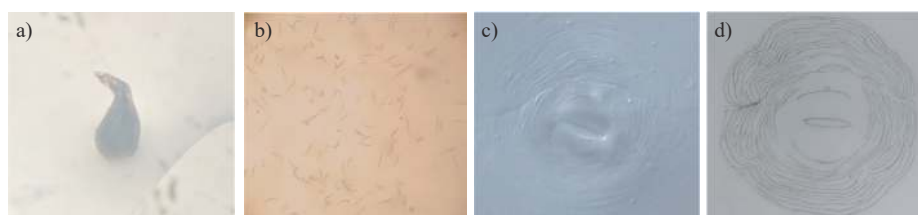
行 SCAR-PCR 鉴定病原种类。结果表明 (图 5): 有 11 种杂草的雌成虫与阳性对照 (三七上分离鉴定的北方根结线虫) 均分别扩增得到 1500 bp (图 5a) 和 464 bp (图 5b) 大小的特异性条带, 与 2 对特异性引物设计相符, 而杂草艾 (图 5a-12、5b-12) 的雌成虫和阴性对照 ddH₂O 扩增中未出现特异性条带, 表明侵染 11 种杂草的根结线虫为北方根结线虫 (*M. hapla*), 与侵染三七的根结线虫相同, 因此可以进一步明确以上 11 种杂草为三七病原根结线虫的中间寄主。



注: a) 豆茶决明; b) 溪黄草; c) 紫茎泽兰; d) 鬼针草; e) 六棱菊; f) 野苘蒿; g) 香薷; h) 一点红; i) 积雪草; j) 草玉梅; k) 豨莶; l) 艾。
Note: a) *C. nomame* (Sieb.) Kitagawa; b) *R. serra* (Maxim.) Hara; c) *A. adenophora* (Spreng.) R.M. King et H. Rob; d) *B. pilosa* L.; e) *L. alata* (D. Don) Sch.-Bip. ex Oliv; f) *C. crepidioides* (Benth.) S. Moore; g) *E. ciliate* (Thunb.) Hyland; h) *E. sonchifolia* (L.) DC; i) *C. asiatica* (L.) Urban; j) *A. rivularis* Buch.-Ham; k) *S. orientalis* L.; l) *A. argyi* Levl. et Van.

图 2 澜沧县三七根结线虫中间寄主杂草感病症状图

Fig. 2 Symptoms of the weeds in the intermediate host of the root knot nematode of *P. notoginseng* in Lancang County

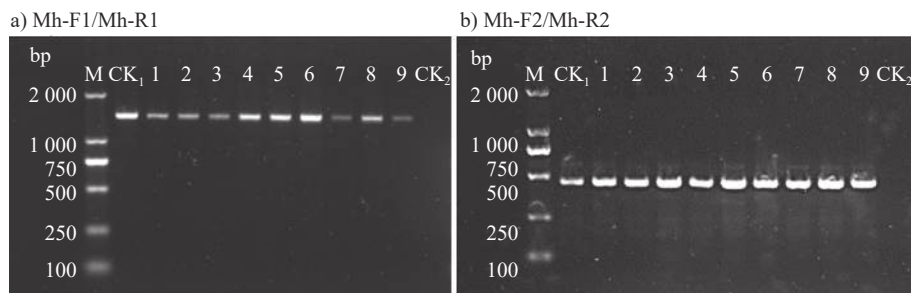


注: a) 雌成虫; b) 二龄幼虫; c) 和 d) 雌成虫会阴花纹。

Note: a) female adult; b) second-stage juveniles; c) and d) perineal pattern.

图 3 根结线虫雌成虫及会阴花纹

Fig. 3 Female adult of root knot nematode and perineal pattern

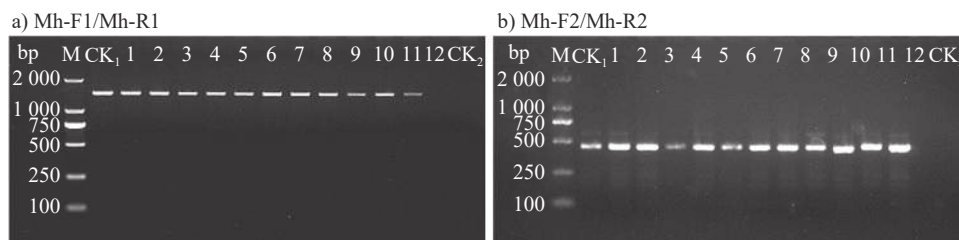


注: M. DNA 标准分子量; CK₁. 北方根结线虫 (云木香)(阳性对照); 1~3、4~6 和 7~9. 分别对林下、大塘子和哈果马育苗地病原线虫的扩增结果; CK₂. ddH₂O (阴性对照)。

Note: M. DNA Marker; CK₁. *M. hapla* was from *Saussurea costus* (positive control); 1-3, 4-6, 7-9. the amplification results for pathogenic nematodes from understory plantation, Datangzi nursery and Haguoma nursery; CK₂. ddH₂O (negative control).

图 4 感病三七病原线虫特异性引物 PCR 扩增电泳检测结果

Fig. 4 Detection results of specific primers PCR amplification and electrophoresis for the pathogenic nematodes of *P. notoginseng*



注: M. DNA 标准分子量; CK₁. 北方根结线虫 (三七)(阳性对照); 1. 溪黄草; 2. 紫茎泽兰; 3. 鬼针草; 4. 六棱菊; 5. 豆茶决明; 6. 野茼蒿; 7. 香薷; 8. 一点红; 9. 积雪草; 10. 草玉梅; 11. 豨薟; 12. 艾草; CK₂. ddH₂O (阴性对照)。

Note: M. DNA Marker; CK₁. *M. hapla* (*P. notoginseng*) (positive control); 1. *R. serra* (Maxim.) Hara; 2. *A. adenophora* (Spreng.) R.M. King et H. Rob; 3. *B. pilosa* L.; 4. *L. alata* (D. Don) Sch.-Bip. ex Oliv; 5. *C. nomame* (Sieb.) Kitagawa; 6. *C. crepidioides* (Benth.) S. Moore; 7. *E. ciliata* (Thunb.) Hyland; 8. *E. sonchifolia* (L.) DC.; 9. *C. asiatica* (L.) Urban; 10. *A. rivularis* Buch.-Ham; 11. *S. orientalis* L.; 12. *A. argyi* Levl. et Van.; CK₂. ddH₂O (negative control).

图 5 澜沧县杂草根结线虫特异性引物 PCR 鉴定电泳图

Fig. 5 Detection results of specific primers PCR amplification and electrophoresis for weeds root knot nematodes in Lancang County

3 讨论

调查发现大塘子思茅松林下有机三七种植基地根结线虫发病率为 19.66%，病情指数为 10.43。思茅松林生境下分布杂草 97 种，其中发生根结线虫病的杂草 2 种，根据杂草的分布丰度和根结线虫寄生的程度可以判断紫茎泽兰和积雪草是林下三七根结线虫病的主要中间寄主。土根结线虫为土壤习居的专性寄生生物，以土传的方式进行传播。大塘子思茅松林下有机三七种植基地十余年前是农地，退耕还林十多年，农地中根结线虫残留至今的可能性微乎其微。大塘子思茅松林下有机三七种植基地采用当地种苗，即种苗来源于大塘子和哈果马三七育苗基地，这 2 个育苗基地均采取种子播种的方式进行种植，未从外地调运种苗，因此可以判断病原线虫来自本地土壤。根

据云南农业大学线虫研究室的前期调查，澜沧地区农田作物的根结线虫优势种类为爪哇根结线虫 (*M. javanica*)，而林下三七上发生的根结线虫病原与紫茎泽兰和积雪草 2 种杂草上的同为北方根结线虫，其中紫茎泽兰为思茅松林下的草本优势种，可以推测林间杂草紫茎泽兰是三七根结线虫病的主要侵染来源，土壤中根结线虫种类的演化过程可能是在退耕还林后。由于思茅松的荫蔽和根系强烈的化感作用，当地大部分原有的农地植物因不能适应而退出生态系统，而抗逆性很强的入侵植物紫茎泽兰则继续生长蔓延，目前已知自然条件下仅发现北方根结线虫可以侵染紫茎泽兰^[30]，通过多年的筛选和富集，思茅松林下土壤中原本微量的北方根结线虫逐渐上升为土壤优势病原线虫种群，当林下种植三七后转而侵染三七，引起了林下三七根结线虫病的发生。但是由

于松林的荫蔽作用林下基地里的杂草种类和数量都显然不足以引起这么严重的病害, 推测可能移栽进基地的种苗上有根结线虫病。

通过 2 个育苗基地的病害调查和种类鉴定结果表明: 三七种苗发生严重的根结线虫病, 尤其是大塘子三七育苗基地的根结线虫危害最严重, 发病率高达 66.82%, 病情指数达到 33.18。大塘子和哈果马育苗基地未种三七前一直是农用地, 上茬作物为玉米或旱稻。经调查发现: 大塘子和哈果马三七育苗基地的田间杂草种类丰富, 杂草类型基本一致, 在相同的生境下分布杂草 124 种, 有隶属菊科、唇形科、伞形科、豆科和毛茛科等 5 科 11 种杂草发生根结线虫病, 其中紫茎泽兰为多年生优势草本, 鬼针草和野苘蒿为一年生优势草本, 可以推测溪黄草、紫茎泽兰、鬼针草、六棱菊、豆茶决明、野苘蒿、香薷、一点红、积雪草、草玉梅和豨莶等 11 种杂草为三七育苗基地病原线虫的寄主, 其中鬼针草、野苘蒿和紫茎泽兰可能为主要寄主。由此可见, 2 个育苗基地未种三七之前不仅通过紫茎泽兰等多年生杂草累年富集, 同时借助一年生杂草尤其是优势杂草鬼针草和野苘蒿快速大量繁殖北方根结线虫, 使其逐渐上升为土壤中优势病原线虫种群, 当三七种子发芽长根后, 病原线虫转而侵染三七, 引起了育苗地的三七种苗发生严重的根结线虫病。

病原根结线虫种类的准确鉴定是进一步研究病原线虫致病性、与寄主植物的互作关系、生物学及防治技术措施的基础^[31]。当前国内外研究者通常采用将形态学和分子生物学相结合的方法来鉴定根结线虫种类^[32]。本研究主要通过观察三七病原根结线虫雌成虫的会阴花纹形态特征, 同时结合 SCAR-PCR 方法进行特异性鉴定, 明确了危害澜沧县林下及育苗基地三七的病原线虫为北方根结线虫 (*M. hapla*), 与胡先奇等^[16-17]、陈昱君等^[18-19]、杨佩文等^[12]和冯光泉等^[20]相继报道的云南文山、砚山、马关和蒙自等三七种植主产区的三七根结线虫病病原相同。三七根结线虫病在云南首次报道至今已经有 20 余年, 令人惊奇的是尽管北方根结线虫并不是云南农田中的常见种, 但至今从云南各地采集的三七根结线虫病样本中鉴定出的病原只有北方根结线虫 1 种。因此, 三七是否对南方根结线虫、爪哇根结线虫和花生根结线虫等农田常见种具有抗性、抗病机制如何值

得深入研究。目前对三七根结线虫病的研究仅停留在对其病原线虫种类的鉴定及其分布, 今后仍需进一步深入研究三七与北方根结线虫的互作机制并解析其机制, 将有助于合理利用三七植株本身的抗性, 设计完善经济、高效、安全的三七根结线虫病防病栽培技术体系, 为云南三七种植产业的健康发展提供有力的支持。

4 结论

本研究首次明确了澜沧县思茅松林下有机三七基地及三七育苗基地的三七根结线虫病病原的种类及来源, 研究结果可为防治三七根结线虫提供理论依据, 为建立三七根结线虫综合防治技术体系提供借鉴, 为保证三七产业的良好发展提供保障。

[参考文献]

- [1] 蒋妮, 覃柳燕, 叶云峰. 三七病害研究进展[J]. 南方农业学报, 2011, 42(9): 1070. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1191.2011.09.010.
- [2] 王莹, 褚扬, 李伟, 等. 三七中皂苷成分及其药理作用的研究进展[J]. 中草药, 2015, 46(9): 1381. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.09.023.
- [3] YANG M, YUAN Y, HUANG H C, et al. Steaming combined with biochar application eliminates negative plant-soil feedback for sanqi cultivation[J]. Soil & Tillage Research, 2019, 189: 189. DOI: 10.1016/j.still.2019.02.006.
- [4] 王玉玺. 林下和传统种植三七的两类土壤中可培养微生物多样性比较研究[C]//中国植物病理学会2019年学术年会论文集. 北京: 中国植物病理学会, 2019.
- [5] 郭旭初. 新兴绿色产业——文山三七的现状与未来[J]. 生态经济, 2007(1): 114. DOI: 10.3969/j.issn.1671-4407.2007.01.031.
- [6] YANG M, CHUAN Y C, GUO C W, et al. *Panax notoginseng* root cell death caused by the autotoxic ginsenoside Rg1 is due to overaccumulation of ROS, as revealed by transcriptomic and cellular approaches[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 264. DOI: 10.3389/fpls.2018.00264.
- [7] 孙雪婷, 李磊, 龙光强, 等. 三七连作障碍研究进展[J]. 生态学杂志, 2015, 34(3): 885. DOI: 10.13292/j.1000-4890.2015.0119.
- [8] 余志飞, 张瑞君. 普洱市林下有机三七产业发展优势及关键问题研究[J]. 林业调查规划, 2019, 44(6): 177. DOI: 10.3969/j.issn.1671-3168.2019.06.034.
- [9] 任泽玉, 王挺, 沈梅. 云南省澜沧拉祜族自治县科技创新扶贫的路径研究——以朱有勇院士团队科技扶贫为例[J]. 云南农业大学学报(社会科学), 2019, 13(6): 14. DOI: 10.3969/j.issn.1004-390X(s).2019.06.003.
- [10] YE C, FANG H Y, LIU H J, et al. Current status of soil sickness research on *Panax notoginseng* in Yunnan,

- China[J]. Allelopathy Journal, 2019, 47(1): 1. DOI: 10.26651/allelo.j/2019-47-1-1216.
- [11] 董莹. 象耳豆根结线虫诱导的根结特异启动子的克隆与功能验证[D]. 昆明: 云南农业大学, 2018.
- [12] 杨佩文, 崔秀明, 董丽英, 等. 云南三七主产区根结线虫病病原线虫种类鉴定及分布[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2008, 23(4): 479. DOI: 10.3969/j.issn.1004-390X.2008.04.010.
- [13] PENG H, LONG H B, HUANG W K, et al. Rapid, simple and direct detection of *Meloidogyne hapla* from infected root galls using loop-mediated isothermal amplification combined with FTA technology[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 44853. DOI: 10.1038/srep44853.
- [14] ALI N, TAVOILLOT J, CHAPUIS E, et al. Trend to explain the distribution of root-knot nematodes *Meloidogyne* spp. associated with olive trees in Morocco[J]. Agriculture Ecosystems & Environment, 2016, 225(1): 22. DOI: 10.1016/j.agee.2016.03.042.
- [15] HUNT D J, HANDOO Z A. Taxonomy, identification and principal species[M]//PERRY R N, MOENS M, STARR J L. Root-knot nematodes. [S.l.]: CAB International, 2009.
- [16] 胡先奇, 杨艳丽, 喻盛甫. 三七根结线虫病在云南发现[J]. 植物病理学报, 1997, 27(4): 360. DOI: 10.3321/j.0412-0914.1997.04.017.
- [17] 胡先奇, 喻盛甫, 杨艳丽. 三七根结线虫病病原研究[J]. 云南农业大学学报, 1998, 13(4): 36. DOI: 10.16211/j.issn.1004-390x(n).1998.04.008.
- [18] 陈昱君, 喻盛甫, 余敏, 等. 在文山地区发现三七根结线虫病[J]. 云南农业大学学报, 2000, 15(3): 298. DOI: 10.3969/j.issn.1004-390X.2000.03.046.
- [19] 陈昱君, 王勇, 柯金虎, 等. 三七根结线虫病调查初报[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(5): 63. DOI: 10.3321/j.issn:1001-5302.2002.05.023.
- [20] 冯光泉, 董丽英, 陈昱君, 等. 三七病原根结线虫的分子鉴定[J]. 西南农业学报, 2008, 21(1): 100. DOI: 10.3969/j.issn.1001-4829.2008.01.023.
- [21] 马金慧, 茆振川, 李惠霞, 等. 刺角瓜对南方根结线虫的抗性特征分析[J]. 园艺学报, 2014, 41(1): 73. DOI: 10.16420/j.issn.0513-353x.2014.01.011.
- [22] 王婷, 宋克光, 史倩倩, 等. 不同马铃薯品种对南方根结线虫的抗性测定[J]. 山东农业科学, 2019, 51(10): 125. DOI: 10.14083/j.issn.1001-4942.2019.10.023.
- [23] 古巧珍, 杨学云, 孙本华, 等. 不同施肥条件下黄土麦地杂草生物多样性[J]. 应用生态学报, 2007, 18(5): 1038. DOI: 10.13287/j.1001-9332.2007.0173.
- [24] 《中国农田杂草原色图谱》编委会. 中国农田杂草原色图谱[M]. 北京: 农业出版社, 1990.
- [25] 尼玛曲珍, 方江平, 郑维列, 等. 西藏林芝地区油菜田杂草群落动态及生态位[J]. 生态学杂志, 2015, 34(5): 1320. DOI: 10.13292/j.1000-4890.20150311.053.
- [26] 刘维志. 植物病原线虫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [27] 谢辉. 植物线虫分类学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2005.
- [28] ADAM M A M, PHILIPS M S, BLOK V C. Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.)[J]. Plant Pathology, 2007, 56(1): 190. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2006.01455.x.
- [29] DONG K, DEAN R A, FORTNUM B A, et al. Development of PCR primers to identify species of root-knot nematodes: *Meloidogyne arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita* and *M. javanica*[J]. Nematropica, 2001, 31(2): 271.
- [30] DONG Y, WANG Y, YAO R Y, et al. First report of *Meloidogyne hapla* infecting Crofton weed (*Eupatorium adenophorum*) in China[J]. Plant Disease, 2015, 99(11): 1654. DOI: 10.1094/PDIS-03-15-0315-PDN.
- [31] 丁玲, 林谷园, 池银花, 等. 寄生台湾长果桑的根结线虫种类鉴定[J]. 亚热带农业研究, 2018, 14(1): 40. DOI: 10.13321/j.cnki.subtrop.agric.res.2018.01.008.
- [32] 杨艳梅, 梁艳, 袁绍杰, 等. 云南省部分烟区根结线虫形态和分子鉴定[J]. 南方农业学报, 2017, 48(2): 284. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1191.2017.02.284.

责任编辑: 何承刚