陕西省温室蔬菜根结线虫的种类鉴定

毛 琦,张 荣,张小艳,李乖绵
(西北农林科技大学 植保学院,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 为了明确陕西省温室蔬菜根结线虫的种类,为有效防治奠定基础。采用传统的会阴花纹形态鉴定结合线粒体 DNA 分子标记技术,对采自陕西省 7 个市县的 71 份根结线虫样本进行了鉴定。结果表明,危害陕西省温室蔬菜的根结线虫种类为南方根结线虫 *M. incognita*、爪哇根结线虫 *M. javanica*、花生根结线虫 *M. arenaria*,其中南方根结线虫是危害陕西大棚蔬菜的优势种群。同时,研究发现大多数地区为单一种群,但个别地区存在混合侵染现象。因此在防治时,应当以南文根线虫为对象,同时也应考虑到混合浸染的因素。

[关键词] 根结线虫;线虫鉴定;PCR-RFLP;温室蔬菜
[中图分类号] S432.4+5;S62 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2007)08-0135-04

Identification of root-knot nematodes on greenhouse's vegetable in Shaanxi Province

MAO Qi, ZHANG Rong, ZHANG Xiao-yan, LI Guan-mian
(*College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*)

Abstract: In order to distinguish the species of root-knot nematode occurring in greenhouse in Shaanxi Province, and provide effective prevention, seventy-one root-knot nematode samples were collected from Shaanxi Province. Based on morphology and mtDNA, *M. incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* were identified. Results showed *M. incognita* was the dominant specie in greenhouse in Shaanxi. So, *M. incognita* should be the main control object, at the same time, the mixed infection should be noticed, too.

Key words: root-knot nematode; nematode identification; PCR-RFLP; greenhouse vegetable

根结线虫(*Meloidogyne* spp.)在世界各国广泛发生,其危害大防治难,在世界范围内,受害作物年损失率约 10%,而其中由南方根结线虫(*M. incognita*)、爪哇根结线虫(*M. javanica*)、花生根结线虫(*M. arenaria*)和北方根结线虫(*Meloidogyne hapla*)等 4 种常见根结线虫造成的损失占 90%[1]。近几年,随着农业产业结构的调整,陕西省温室大棚发展迅速,但根结线虫的危害也日益严重,由于很多种植户对该病原缺乏了解,防治不力,致使根结线虫已对一些蔬菜大棚造成了毁灭性危害。

目前,生产上对根结线虫的防治主要是利用化学药剂和抗病品种,但效果并不理想,原因在于对所要防治的线虫种类尚未进行准确鉴定。根结线虫间存在显著的致病性差异,因此,对根结线虫种类进行准确的鉴定和检测成为防治该病的前提条件。本研究采用传统的会阴花纹形态与目前应用广泛的线粒体 DNA 分子标记技术相结合的方法,对发生在陕西省蔬菜大棚的根结线虫种类进行初步鉴定,以期为该病害的有效防治奠定基础。

*[收稿日期] 2007-02-01
[基金项目] 教育部"长江学者和创新团队发展计划"资助项目(200558);陕西省自然科学基金项目(2005C23);高等学校学科创新引智计划项目(B07049)
[作者简介] 毛琦(1980 -),男,陕西汉中人,在读硕士,主要从事植物病害综合治理研究。E-mail:maoqi7@hotmail.com
[通讯作者] 张荣(1964 -),女,陕西榆林人,副教授,主要从事植物病理学研究。E-mail:rongzh@nwsuaf.edu.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料与方法

1.1 样品的采集与保存

参照刘维志等[2]的方法,从陕西主要大棚蔬菜种植区西安(阎良北屯村)、咸阳(渭滨区李家村、兴平市农场、武功锣鼓村)、渭南(临渭区阳尹村)、宝鸡(扶风南台村)及杨凌(西魏店、殿背湾)等7个市县共采集8个根结线虫群体共71份样品。同一个地方的样品作为一个群体,同一个根及根围的病土作为一个样品。样品带回实验室后,先从每个病根挑取3～5头雌虫用于制作会阴花纹,再将病根(经过捣碎)、病土直接接种于3至4真叶期经消毒的盆栽感病番茄苗上,温室中繁殖40～50 d备用。培养过程中样品间相互严格隔离,防止交叉传播。

1.2 形态学鉴定

在解剖镜下,用解剖针和镊子从根结组织上挑取雌虫,置于体积分数45%乳酸中制作会阴花纹,其余的用TAF固定液固定保存,备用。制作好的会阴花纹用纯甘油作浮载剂制片,用树脂封片[1-4],在显微镜下观察、摄像并保存图片,与文献[1,3-5]中的图片和文字描述相比较,以确定其种类。

1.3 线粒体DNA的提取和PCR扩增

由于会阴花纹等形态学特征在鉴定几类根结线虫,特别是南方根结线虫与花生根结线虫时有一定局限性[6],故对难以确定其具体种类的根结线虫群体进行分子生物学鉴定。而观察时发现同一个群体内根结线虫会阴花纹形态比较一致,故针对群体进行线粒体DNA分析。

根结线虫线粒体DNA的提取采用Cenis[7]和Xu等[8]的方法,从每个群体内各样品上挑取雌虫混合后提取DNA。引物采用Powers等[9]设计的引物#C2F3和#1108,序列分别为:5′-GGTC AATGT-CAGAAATT TGTGG-3′和5′-TACCTTTGAC-CAATCACGCT-3′。

PCR反应体系为25 μL,其中10 ×PCR缓冲液2.5 μL、Mg^{2+} 2.5 μL、2.5 mmol/L dNTPs 2.5 μL、引物0.5 μL、5U/μL *Taq*酶0.2 μL(MBI产)。扩增在Bio-RadPTC-200PCR仪上进行。反应条件为:94 ℃预变性4 min;94 ℃1 min,52 ℃1 min,70 ℃1 min,35个循环;72 ℃再延伸5 min。取2 μL扩增产物在10 g/L琼脂糖凝胶中电泳,最后在EB(0.5 μg/mL)中染色,在凝胶成像仪上观察拍照。

1.4 线粒体DNA的RFLP分析

用限制性内切酶*Hinf* Ⅰ(TaKaRa产)对扩增产物进行酶切。参照Xu等[8]的方法并略有改动。反应体系10 μL,包括4 μL PCR产物,4 μL 10 ×*Hinf* Ⅰ缓冲液,2 μL *Hinf* Ⅰ内切酶。在37 ℃温箱内反应6 h。取4 μL酶切产物在20 g/L琼脂糖凝胶中电泳,最后在EB(0.5 μg/mL)中染色,凝胶成像仪上观察拍照。

2 结果与分析

2.1 根结线虫的形态学鉴定结果

观察8个根结线虫雄性群体的会阴花纹,发现有以下3种会阴花纹类型(图1)。

类型Ⅰ:背弓高而且顶部呈梯形或方形,线纹平滑,比较稀疏,无侧线,阴门、肛门区无线纹(图1-A),鉴定其为南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*(Kofoid &White,1919) Chitwood,1949)。包括西安(阎良北屯村)、咸阳(渭滨区李家村、武功锣鼓村)、渭南(临渭区阳尹村)、宝鸡(扶风南台村)及杨凌(西魏店、殿背湾)等7个根结线虫群体。

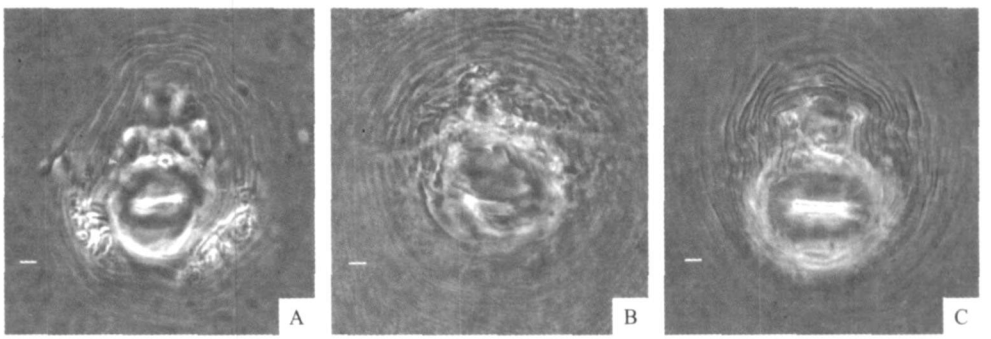

图1 根结线虫会阴花纹形态(标尺:10 μm)

A.南方根结线虫;B.花生根结线虫;C.爪哇根结线虫

Fig.1 Perineal pattern of root-knot nematodes (Bar:10 μm)

A. *Meloidogyne incognita*;B. *Meloidogyne arenaria*;C. *Meloidogyne javanica*

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

类型 Ⅱ:背弓低平或略方,背纹与腹纹在侧区相遇而显出侧区的位置,背弓纹在侧区处向肛门弯曲,无侧线,背纹粗而疏,腹纹连续细密,侧区线纹不连续(图 1-B)。鉴定其为花生根结线虫(*Meloidogyne arenaria* (Neal,1889) Chitwood, 1949)。发现于武功锣鼓村的根结线虫群体中,该群体可能为混合侵染群体。

类型 Ⅲ:背弓低圆或较高略方,有两条明显的侧线从尾区向外延伸,尾部有一涡状纹。整体线纹平滑或波纹状,较密,侧区线纹波纹状(图 1-C)。鉴定为爪哇根结线虫(*Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood,1949)。发现于兴平农场根结线虫群体。

在上述 8 个群体中,扶风南台村和兴平农场两个群体具有各自典型的会阴花纹特征,可以确定其种类。但是其余 6 个群体(杨凌殿背湾、西魏店,咸阳渭滨区,渭南临渭区,西安阎良区,武功锣鼓村)会阴花纹变化较大,初步鉴定为以上结果,但需采用 mtDNA-PCR-RFLP 技术进行进一步鉴定。

2.2　根结线虫的分子生物学鉴定

2.2.1　根结线虫种群线粒体 DNA 的 PCR 扩增

对杨凌殿背湾、西魏店,咸阳渭滨区李家村,渭南临渭区阳尹村,西安阎良区北屯村,咸阳武功锣鼓村 6 个根结线虫群体线粒体 DNA 的 *CO* Ⅱ和 *Lr*RNA 基因间序列进行扩增。结果表明,5 个群体的扩增片段大小约为 1.7 kb,为南方根结线虫的特异性条带;另外 1 个类群为混合侵染群体,扩增片段出现两个大小不同的条带,分别约为 1.7 和 1.1 kb,其中 1.1 kb 条带为花生根结线虫的特异性条带(图 2-A),以上结果与孙龙华等[10]的报道一致。故可确定其中 5 个群体为南方根结线虫,1 个混合侵染群体则为南方根结线虫与花生根结线虫的混合侵染群体。

2.2.2　RFLP 结果分析

为了进一步确定上述扩增结果,利用限制性内切酶 *Hinf* Ⅰ对 PCR 扩增产物进行酶切。结果表明(图 2-B),6 个根结线虫群体都可以被 *Hinf* Ⅰ酶切,产生约 1.3 和 0.4 kb 2 个限制性片段。其中混合侵染群体扩增出的约 1.1 kb 的片段不能被酶切,这也与孙龙华等[10]的报道结果一致。表明 5 个群体确为南方根结线虫,另 1 个则是南方根结线虫与花生根结线虫的混合群体。这说明陕西省大多数地区的根结线虫为单一种群,个别地方存在混合侵染现象。

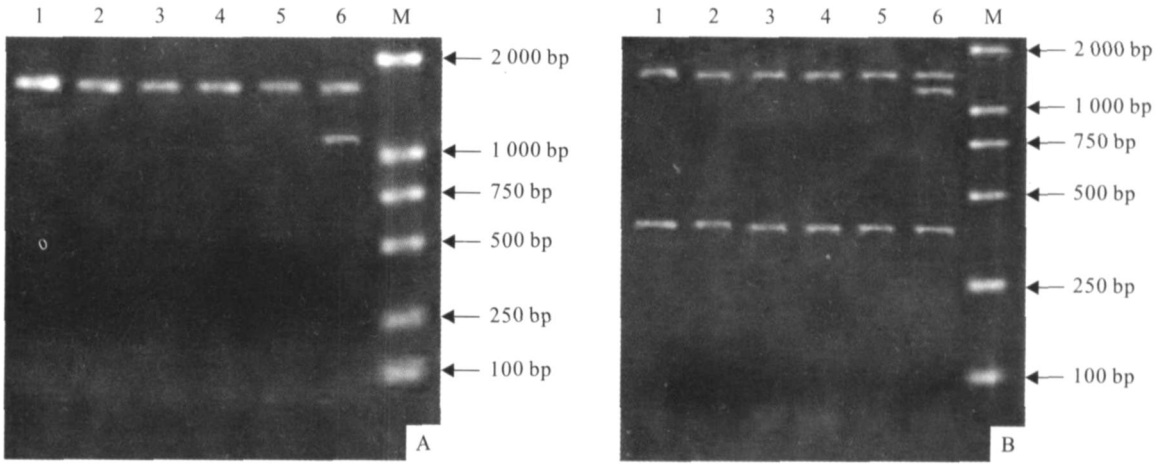

图 2　根结线虫线粒体 DNA 的 PCR 扩增产物(A)及其限制性内切酶 *Hinf* Ⅰ酶切(B)电泳图谱

1. 杨凌殿背湾;2. 杨凌西魏店;3. 咸阳渭滨区;4. 渭南临渭区;5. 西安阎良区;6. 武功锣鼓村;M. DL 2000 DNA 标准分子量

Fig. 2　Electrophoretogram of mtDNA PCR products(A) and *Hinf* Ⅰrestriction digested fragment(B) of root-knot nematodes

1. Dianbeiwan, Yangling; 2. Xiweidian, Yangling; 3. Weibin, Xianyang; 4. Linwei, Weinan; 5. Yanliang, Xi'an; 6. Luogu, Wugong; M. DL 2000 DNA Marker

3　结论与讨论

本研究结果表明,陕西地区主要大棚蔬菜产地的根结线虫病害几乎都由南方根结线虫 *M. incognita* 引起,只有兴平一处发现爪哇根结线虫 *M. javanica* 危害,而在武功县锣鼓村则发现了南方根结线虫与花生根结线虫 *M. arenaria* 的混合侵染群体。由此可见,南方根结线虫是温室根结线虫中的优势种,这与泰勒等[3]和廖金铃等[11]的报道结果一致。在本研究中尚未发现其他种类根结线虫的危害。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

本研究样本主要采集于大棚温室中,其气候条件特殊,常年都有作物生长,温度湿度都较大,温度成为影响根结线虫发生的最主要因素。这样的环境非常适合需要较高温度的南方根结线虫,因而南方根结线虫成为危害大棚蔬菜的最主要的根结线虫种类。因此,在大棚温室根结线虫的防治中可以将其作为主要防治对象。本研究还发现了一个混合侵染群体,其由两种不同种类的根结线虫侵染所引起,周银丽等[12]曾报道过该种侵染类型。这表明本地区还有花生根结线虫危害,因此,在防治和选择种植品种的过程中也要考虑这一因素。

在形态学鉴定中,会阴花纹是最主要的特征。但该方法需要研究者具备较高的技巧,而且由于同一种群个体间因寄主和环境条件等方面的差异,形态上相应也会有一些变化,必要时还应结合其他方法来确认。而采用mtDNA-PCR-RFLP技术可以快速准确地鉴定其具体种类,弥补了形态学鉴定的不足,但其设备要求较高,应用受到一定限制。因此,采取二者相结合的鉴定方法,还是目前比较适用的研究手段。

在调查中发现,根结线虫的初侵染源大多来自粪肥、苗木。在目前大多数地区为单一种群,个别地方存在混合侵染现象的情况下,应加大植物检疫力度,大力做好根结线虫发生、防治知识的宣传和指导工作。同时,对其种类和发生动态还需作进一步的了解,以期为防治奠定基础。

[参考文献]

[1] 刘维志. 植物病原线虫学[M]. 北京:中国农业出版社,2000:1-438.

[2] 刘维志,刘 晔,周国梁,等. 植物线虫学研究技术[M]. 沈阳:辽宁科学技术出版社,1995:1-242.

[3] 泰勒 A L,萨塞 J N. 植物根结线虫(生物学、分类鉴定和防治)[M]. 杨宝君,曾大鹏,译. 北京:科学出版社,1983:1-171.

[4] 冯志新. 植物线虫学[M]. 北京:中国农业出版社,2001:135-154.

[5] 刘维志. 植物线虫志[M]. 北京:中国农业出版社,2004:313-459.

[6] 刘 昊,龙 海,鄢小宁,等. 海南省番石榴根结线虫病病原的种类鉴定及其寄主范围的测试[J]. 南京农业大学学报,2005,28(4):55-59.

[7] Cenis J L. Identification of four major *Meloidogyne* spp. by random amplified polymorphic DNA(RAPD - PCR)[J]. Phytopathology,1993,83:76-78.

[8] Xu Jianhua,Liu Peilei,Meng Qingpeng,et al. Characterization of *Meloidogyne* species from China using isozyme phenotypes and amplified mitochondrial DNA restriction fragment length polymerphism[J]. European Journal of Plant Pathology,2004,110:309-315.

[9] Powers T O,Harris T S. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species[J]. Journal of Nematology,1993,25(1):1-6.

[10] 孙龙华,廖金铃,李迅东,等. 根结线虫种群的线粒体DNA分析[J]. 植物病理学报,2005(2):134-140.

[11] 廖金铃,蒋 寒,孙龙华,等. 中国南方地区作物根结线虫种和小种的鉴定[J]. 华中农业大学学报,2003,22(6):544-548.

[12] 周银丽,杨 伟,余光海,等. 中国云南省石榴根结线虫的种类初报[J]. 华中农业大学学报,2005,24(4):351-354.

(上接第134页)

[5] 肖琳琳,董明盛. 西藏干酪乳杆菌降胆固醇特性研究[J]. 食品科学,2003,24(10):142-145.

[6] 刘宇峰,夏海华,孙建华,等. 藏灵菇奶对肿瘤的抑制作用[J]. 畜牧兽医科技信息,2005(6):56-58.

[7] 王春敏,李丽秋,杨春佳,等. 西藏灵菇酸奶对寻常性痤疮的治疗作用观察[J]. 中国微生物学杂志,2005,17(2):151.

[8] Diniz R O,Garla L K,Schneedorf J M,et al. Study of anti-inflammatory activity of Tibetan mushroom,a symbiotic culture of bacteria and fungi encapsulated into a polysaccharide matrix[J]. Pharmacological Research,2003,47:49-52.

[9] 周传云,聂 明,万佳蓉. 古老而新型的发酵奶——开菲尔[J]. 食品与机械,2003(5):46-47.

[10] 殷文政,刘立一,马玉玲,等. 马奶酒抑菌活性的研究[J]. 中国乳品工业,2005,33(7):15-17.

[11] 程丽娟,薛泉宏. 微生物学实验技术[M]. 西安:世界图书出版社,2000:383.

[12] 德赖森 F,普汉 M. 发酵乳科学与技术[M]. 顾瑞霞译. 南京:东南大学出版社,1991.

[13] Gurr M R. Milk products,contribution to nutrition and health[J]. J of the Socity of Dairy Tech,1992,45(3):61-72.

[14] 郭本恒. 益生菌[M]. 北京:化学工业出版社,2003:11.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net