

宁夏贺兰山农牧场黄瓜根结线虫种类鉴定

张 靠 稳¹, 贾 振 华²

(1. 北方民族大学 生命科学与工程学院, 宁夏 银川 750024; 2. 福州大学 生物科学与工程学院 福建 福州 350002)

摘 要: 利用传统的比较形态学及新兴的同工酶电泳方法, 对宁夏贺兰山农牧场 9 个样点, 共 45 个病根中的线虫进行了种类鉴定。结果表明: 引起贺兰山农牧场黄瓜根结线虫病的病原线虫主要是南方根结线虫 *Meloidogyne incognita*, 该种数量占样品总量的 97% 以上, 其它种类尚未发现。

关键词: 根结线虫; 种类鉴定; 酯酶谱

中图分类号: S 436.421.2⁺9(243) 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2008)02-0220-03

据报道, 宁夏贺兰山农牧场温棚黄瓜近年来发生了根结线虫病, 黄瓜受害程度逐年加重, 使当地的保护地黄瓜生产受到很大影响, 然而其病原根结线虫种类尚不明确^[2], 在一定程度上影响了针对性防治措施的实施。由于根结线虫的种类不同, 所采取的防治方法有所区别, 种类的明确对于有效地防治此病具有重要的指导作用。现主要从成、幼虫形态和成雌虫酯酶电泳方面对宁夏贺兰山农牧场黄瓜根结线虫种类进行研究, 目的在于查清该地区根结线虫的种类及优势种, 为今后的病害防治提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品的采集

2007 年 6 月, 于宁夏贺兰山农牧场采集温棚黄瓜根结线虫病病根。田块取样采取分区分棚、随机取样法, 即从当地 3 个区域, 3×3 座温棚样点, 获得 3×3×5=45 棵病根。样品采回后, 置于-4℃冰箱中保存待用。

1.2 根结线虫的获得

成虫: 从 45 棵病根上剪下 90 个根结(2 个根结/每棵)。在解剖镜下用解剖针从每个根结中挑出 3 个雌成虫, 共 270 个虫样, 分 3 组, 分别用于观察会阴花纹、测量虫体大小和主要形态特征、酯酶电泳。

2 龄幼虫: 从 45 棵病根上剪下 45 个根结(1 个根结/每棵)。在解剖镜下, 用解剖针从每个根结中挑出 1 块卵块, 放在少量清水中, 于 30℃下, 让其孵化, 24 h 后收集所孵化的 2 龄幼虫, 以备虫体大小和主要形态特征数据的测量。

1.3 形态观察

第一作者简介: 张靠稳(1962-), 男, 本科, 副教授, 主要研究温室蔬菜病害, 现从事植物生理学教学工作。E-mail: zkw620821@yahoo.com.cn.

基金项目: 宁夏自然科学基金资助项目(NZ0739)。

收稿日期: 2007-09-12

1.3.1 会阴花纹 在会阴花纹常规制作方法^[3]的基础上, 对第 1 组雌成虫样品进行会阴花纹染色, 即从盖玻片一边加上 1 滴 1% 的甲烯蓝染液, 稍微倾斜载玻片, 使染液慢慢扩散到盖玻片与载玻片之间, 染色 60 min(也可自然风干)后, 用手轻轻按住载玻片和盖玻片, 于自来水下, 从盖玻片一边轻轻冲洗染液, 使载玻片和盖玻片间的染液冲完为止, 于显微镜下观察。

1.3.2 雌成虫及幼虫主要形态测量 从另第 2 组雌成虫样品中, 选出 20 个完好的雌成虫。从卵块孵化出的幼虫中, 选出 20 条幼虫。对其成、幼虫进行虫体大小和主要形态特征测量。主要测量虫体体长(L)、最大体宽(W)、口针长(ST)、背食道腺开口至口针基部球的距离(DGO)。

1.4 酯酶电泳

1.4.1 主要试剂、仪器 分离胶浓度 7%, 浓缩胶浓度 3%。Tris-甘氨酸电极缓冲液 pH 8.3^[1]。使用北京六一仪表厂生产的 DYY-12 电泳仪。

1.4.2 样品的制备 把第 3 组雌成虫样品, 分单雌虫、多雌虫 2 个处理, 分别放入 1 mL 指型离心管中, 单雌虫是 1 虫 1 管, 60 个样品, 多雌虫是 3 虫 1 管, 10 个样品。每管加入 30 μ L 酯酶浸提液(质量浓度为 200 g/L 的蔗糖溶液, 2% TritonX-100, 定容至 100 mL), 研磨虫体, 于 12 000 r/min, 离心 10 min。离心后及时取样电泳。

1.4.3 电泳 先在 80V 电压下电泳 30 min, 之后调整电压至 120 V, 继续电泳 2 h, 待指示剂到分离胶底边前 0.5 cm 处, 断电停止。

1.4.4 染色 取出凝胶, 放入染液中, 37℃下染色 40 min。染色液的配制: 将 EDTA 30 mg、坚牢蓝 RR 60 mg 溶于 100 mL、pH 7.2 的磷酸缓冲液中, 再将 40 mg α -醋酸-萘酯溶于 2 mL 丙酮中, 逐滴加入到缓冲液中, 同时搅拌, 然后将染液过滤, 除去不溶物。染液在用前 0.5 h 配制。染色结束后于 10% 的醋酸溶液中固定 3 h。

2 结果与分析

2.1 形态观察

会阴花纹: 对 90 个根结线虫雌成虫的会阴花纹进行染色观察, 88 个会阴花纹特征基本与图 1 相同, 有明显高而方的背弓, 由平滑到波浪状的线纹组成, 无明显的侧沟, 经常有些弯向阴门的线纹。有 2 个样品线纹组成不明显, 归属难于判断。比照国内报道^[4], 从会阴花纹类型来看, 宁夏贺兰山农牧场地区的根结线虫种类主要是南方根结线虫 *M. incognita*, 该种数量占样品总量的 97% 以上, 其它种类尚未发现。

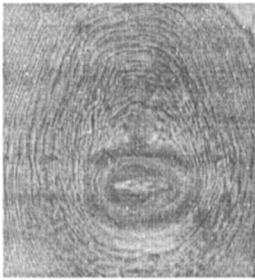


图 1 样品雌成虫会阴花纹

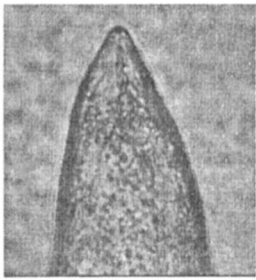


图 2 样品雌成虫头部



图 3 样品 2 龄幼虫头部

雌成虫及 2 龄幼虫主要形态测量结果: 雌成虫、2 龄幼虫样品的头部如图 2、3。雌虫: ($n=20$), $L=580$ ($483.5 \sim 698.5$) μm , $W=401.5$ ($316.5 \sim 538$) μm , $ST=13.5$ ($12.8 \sim 15.6$) μm , $DGO=3.2$ ($2.5 \sim 4.5$) μm 。2 龄幼虫: ($n=20$), $L=390$ ($352 \sim 478$) μm , $W=15.3$ ($13.5 \sim 17$) μm , $ST=10.5$ ($9.5 \sim 12$) μm , $DGO=2.5$ ($2.0 \sim 3.0$) μm 。依据样品雌成虫、2 龄幼虫的主要形态特征测量值, 比照国内报道^[3] 的该种同类形态特征数据、虫体大小及主要形态特征数据基本符合南方根结线虫 *M. incognita*。

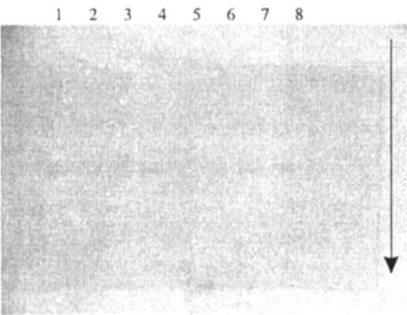


图 4 雌虫样品酯酶图谱

注: 单数泳道为多雌样, 多数泳道为单雌样, 箭头为电泳方向。

2.2 酯酶电泳图谱

比较同一群体单个雌虫样品和多个雌虫混合样品电泳后其酶带的异同, 基本能断定它是单种群体还是混合群体。如果 2 种样品电泳所得酶带, 在数量和位置上完全相同, 则初步断定为单种群体, 如果单雌样出现的酶带比多雌样的酶带少, 则初步断定为混合群体^[6]。

图 4 是雌成虫样品酯酶电泳图谱的其中一张。90 个样品分成单雌虫(60 个)和多雌虫(10 个)2 组, 经过凝胶电泳, 所有单雌虫和多雌虫样品的酯酶数量和位置基本一样, 迁移率(R_f 值)均在 0.47 左右, 比照报道^[7], 基本符合南方根结线虫酯酶图谱, 且种类单一, 与上述结果完全相同。

3 结论与讨论

3.1 通过对样品雌成虫会阴花纹观察、雌成虫和 2 龄幼

虫的主要形态特征测量和雌成虫凝胶电泳的酯酶图谱研究, 其几个方面的结果都与国内报道的南方根结线虫 *M. incognita* 相同, 因此认为: 贺兰山农牧场黄瓜根结线虫病的病原线虫种类, 主要是南方根结线虫 *M. incognita*, 研究中没有发现根结线虫其它种类。

3.2 研究中几个方面都未发现根结线虫的其它种类可能与当地该病的发生时间和范围有关, 是否该地就只有南方根结线虫需要进一步探索。不管是否还有其它种类, 但南方根结线虫是该地的优势种这点值得肯定, 此情况与国内北方省份的报道基本一致^[5]。

3.3 虽然根结线虫的雄虫对雌虫的繁殖意义不大, 但雄虫的存在与环境条件的变化关系密切^[3], 然而, 在进行当地土壤根结线虫分离时, 很少发现雄虫, 是什么原因引起如此现象的发生, 有待进一步研究。

参考文献

[1] 芮凯. 海南岛番石榴病原根结线虫种类鉴定研究[D]. 华南热带农业大学硕士学位论文, 2005: 5-9.
[2] 张靠稳, 李建设, 马军. 宁夏贺兰山农牧场温棚黄瓜根结线虫病发生初报[J]. 农业科学研究, 2006(4): 23-26.
[3] 刘维志. 植物病原线虫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 398-399.
[4] 陈永芳, 喻盛甫, 陈海如, 等. 云南省烟草根结线虫比较鉴定及种类分布研究[J]. 中国烟草学报, 1997, 3(4): 33-40.
[5] 陈书龙, 李秀花, 马娟. 河北省根结线虫发生种类与分布[J]. 华北农学报, 2006, 21(4): 91-94.
[6] 赵洪海, 刘维志. 中国的根结线虫部分群体的同工酶表型及其对分类研究的意义[J]. 莱阳农学院学报, 2003(1): 4-9.
[7] 陈永芳, 吴建宇. 用 PhastSystem 电泳仪快速鉴定根结线虫种类[J]. 植物病理学报, 1998(1): 73-76.

四种中药提取物对蔬菜病原真菌的抑制作用

侯东耀, 田平芳, 谭天伟

(北京化工大学 生命科学与技术学院 北京 100029)

摘要: 采用生长速率法测定了黄连、雷公藤、青蒿和川楝子乙醇提取物对番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)和辣椒炭疽病菌(*Vermicularia capsici*)的抑菌活性。结果表明,在质量浓度为 1 g/mL 时,4 种中药乙醇提取物对 3 种真菌生长均具有一定程度的抑制作用,其中黄连提取物对番茄灰霉病菌的抑菌率为 65%~68%;青蒿和川楝子提取物对辣椒炭疽病菌的抑菌率分别为 63%~85%和 59%~77%;黄连、川楝子和雷公藤提取物对番茄早疫病菌的抑制率分别为 70%~80%、48%~57%和 59%~77%。此外还测定了黄连、川楝子提取物对几种真菌的毒力。该研究为跟踪抗菌活性物质奠定了基础。

关键词: 中草药; 提取液; 蔬菜病原真菌; 抗菌活性

中图分类号: S 481⁺.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)02-0222-03

番茄灰霉(*Botrytis cinerea*)、番茄早疫(*Alternaria solani*)和辣椒炭疽(*Colletotrium ccapsici*)是蔬菜重要病害,目前主要依靠化学防治。由于化学农药残留严重危害人体健康,寻求天然无毒或低毒生物源杀菌剂,一直是农药研发孜孜以求的目标。从药用植物中筛选抑菌活性物质是当前杀菌剂研发的重要思路^[1]。研究测定了黄连等 4 种廉价中草药乙醇提取物对 3 种北京郊区主要蔬菜病原真菌的抑菌活性,并确定了黄连和川楝提取物对 3 种霉菌的毒力,为杀菌剂的筛选和复配提供了依据。

第一作者简介: 侯东耀(1983),男,北京化工大学生命科学与技术学院硕士。

通讯作者: 田平芳. E-mail: tianpf@mail.buct.edu.cn.

收稿日期: 2007-08-07

1 材料

材料为黄连(*Coptis chinensis* Franch)、雷公藤(*Tripterygium wilfordii* Hook)、青蒿(*Artemisia apia- cea* Hance)、川楝子(*Melia toosendan* Sieb. et Zucc)购自安国市药材市场。供试真菌番茄灰霉(*Botrytis cine- rea*)、番茄早疫(*Alternaria solani*)和辣椒炭疽(*Vermicu- laria capsici*)由北京市农业科学院李兴红老师惠赠。

2 方法

2.1 中药提取物的制备

将 4 种中草药洗净,50℃干燥后粉碎至 30 目,称取粉末 200 g 与 70%乙醇 2 000 mL 一起置入微波提取仪中提取 7 min、离心、抽滤,滤液减压蒸馏至流浸膏。置流浸膏于 200 mL 容量瓶中,无菌水定容(相当于干样 1 g/mL),放入 4℃冰箱待用。

The Species Identification of the Cucumber Root-Knot Nematodes in Helan Mountain Farm of Ningxia

ZHANG Kao-wen¹, JIA Zhen-hua²

(1. College of Life Science and Engineering, the North University for Nationalities, Yinchuan, Ningxia 750021, China; 2. College of Biological Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: Based on the morphological characters such as Perineal- striae, juvenile and female adult body length and maximum width, stylet, and DGO, and isoenzyme profiles, 45 populations collected from 9 areas in Helan Mountain region, Ningxia, were identified. There was only one species of root-knot nematode *Meloidogyne. incognita* in those areas. *M. incognita* accounted for the total species of more than 97%, other species was not found yet.

Key words: Root-knot nematodes; Species identification; Esterase phenotype