

山东聊城保护地蔬菜根结线虫种类鉴定

樊颖伦, 吕山花, 孙晓, 邢光耀

(聊城大学 农学院 山东 聊城 252059)

摘要:从山东西部聊城所属 8 个县区的蔬菜生产大棚中采集了 10 种蔬菜根结线虫样本 16 份, 采用 ITS-PCR 分子生物学鉴定方法对其进行了鉴定。结果表明: 聊城地区蔬菜大棚中蔬菜根结线虫均为南方根结线虫 (*Meloidogyne incognita*)。

关键词:蔬菜; 南方根结线虫; ITS 序列

中图分类号: S 436.421.2⁺9 文献标识码: B 文章编号: 1001-0009(2008)03-0214-03

根结线虫 (*Meloidogyne* spp.) 是危害最严重的植物病原线虫之一, 种类多、分布广、致病性强, 寄主范围超过 3 000 种, 尤以茄科、葫芦科、十字花科等植物受害严重^[1]。特别是近几年, 由于我国北方保护地蔬菜的大面积种植, 为根结线虫的越冬提供了更适宜的条件, 使保护地蔬菜的根结线虫病呈明显加重趋势, 已成为保护地蔬菜生产的严重障碍^[2]。聊城市位于山东省西部, 属黄河冲积平原, 地势平坦, 气候温和, 四季分明, 光照充足, 土地肥沃, 是全国重要的粮棉、蔬菜生产基地。目前, 蔬菜种植面积 23.3 万 hm² 多, 其中无公害蔬菜 10 万 hm²。由于近几年保护地蔬菜根结线虫发生日趋严重, 而目前防治根结线虫病的主要措施是采取杀线剂进行土壤处理, 但是多数杀线剂为毒性较高的化学药剂, 无公害蔬菜生产中不允许使用^[3]。蔬菜根结线虫病的发生制约了蔬菜生产, 降低了农民收入。

内转录间隔区 (ITS) 是位于线虫的遗传物质核糖体 DNA (rDNA) 上 18 S 和 28 S 之间的 DNA 片段, 它在生物种和亚种间变化较大, 用 PCR 技术扩增 ITS 区, 可根据 ITS 区的 DNA 序列来揭示线虫种间的差异, 从而进行植物病原线虫种的快速分子鉴定^[4]。为了进一步指导蔬菜根结线虫病害的防治, 该研究以来自不同地块的 16 个根结线虫为样本, 根据根结线虫 rDNA-ITS 区保守序列引物进行 PCR 扩增, 并对扩增产物进行 DNA 序列测定, 对聊城地区保护地主要受害蔬菜品种上的根结线虫种类进行了鉴定, 以便采取有针对性的防治措施。

1 材料与方法

1.1 线虫采集

第一作者简介:樊颖伦 (1977-), 男, 博士, 讲师, 从事植物病理/免疫学的教学、科研工作, 研究方向为植物抗线虫基因工程。E-mail: fanyinglun@lcu.edu.cn。

基金项目:聊城大学博士科研启动基金资助项目 (31805)。

收稿日期:2007-10-17

于 2007 年 3~7 月在聊城 8 个县区的 16 个具有代表性的蔬菜生产保护地大棚采集蔬菜病根及其根际土壤, 浅盘法分离 2 龄幼虫, 并接种于土壤经高温消毒灭菌的番茄 (中蔬四号) 根际。线虫采集地点、寄主及采集时间见表 1。

表 1 聊城地区保护地根结线虫的采集寄主、地点、时间

编号	寄主	采集地点	2007 年采集 月. 日
C1	彩椒	茌平博平镇	6. 5
C2	甜椒	茌平博平镇	6. 5
C3	茄子	茌平博平镇	6. 5
D1	黄瓜	东阿县姚寨乡	5. 15
F1	番茄	东昌府区侯营镇	3. 10
F2	苦瓜	东昌府区邓官屯	7. 10
G1	黄瓜	冠县斜店乡	4. 6
G2	甜椒	冠县斜店乡	4. 6
L1	茄子	临清市戴湾乡	3. 25
L2	芸豆	临清市戴湾乡	3. 25
S1	豇豆	莘县张鲁镇	4. 23
S2	芸豆	莘县张鲁镇	4. 23
T1	甜瓜	高唐县姜店乡	6. 15
T2	彩椒	高唐县姜店乡	6. 15
Y1	丝瓜	阳谷县石佛乡	4. 16
Y2	番茄	阳谷县石佛乡	4. 16

1.2 根结线虫分子鉴定

1.2.1 rDNA-ITS 区保守序列引物设计 内转录间隔区 (ITS) 是位于线虫的遗传物质核糖体 DNA (rDNA) 上 18S 和 28S 基因之间的 DNA 片段, 它在生物种和亚种间变化较大, 用 PCR 技术扩增 ITS 区, 可通过酶切、克隆、测序等来揭示线虫种间或群体间的差异, 从而进行植物病原线虫种的快速分子鉴定^[4,5]。现根据线虫 18 S 和 28 S 基因上的序列设计了一对通用引物 F195 (5'-TCCTC-CGCTA AATG ATATG -3') 和 V5367 (5'-TTGAT-TACG TCCCTG CCCTTT -3')^[5-9]。应用此对引物可以扩展线虫的 18 S 和 28 S 基因的部分序列、ITS1 序列、5.8 S 基因序列和 ITS2 序列。

1.2.2 根结线虫 DNA 的提取 参考廖金铃的微量提取法提取单条雌虫的 DNA^[7], 并做适当修改。具体方法

是: 在干净的载玻片上滴 10 μ L 预冷的蠕虫裂解缓冲液 (WLB), 挑入从根中分离出的健康的雌虫 1 头, 用手术刀切碎后迅速吸取尽量多的含线虫片段的裂解缓冲液 (约 8 μ L), 加入到含有 10 μ L 无菌水的 200 μ L 离心管中, 再加入 2 μ L 预冷的蛋白酶 K (1 mg/mL), 并使总体积为 20 μ L。然后迅速将离心管放入 -20 $^{\circ}$ C 的冰箱中冷冻至少 10 min, 将离心管置于 65 $^{\circ}$ C 下温育 1 h, 接着在 95 $^{\circ}$ C 下恒温 10 min, 使蛋白酶 K 变性, 离心 13 000 r/min, 取上清 DNA 悬浮液于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.3 PCR 扩增与扩增产物序列测定 取 1 μ L 离心后的上清液 DNA 作为模板, 根据设计的通用 PCR 引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体积 25 μ L, 反应液组成为: 1 PCR 缓冲液 (10 mmol/L Tris \cdot HCl, pH 8.3, 50 mmol/L KCl, 0.1% Triton-100), 2.5 mmol/L MgCl₂, dNTP 0.25 mmol/L, 每条引物 50 ng, 1U Taq 酶。PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 然后每个循环 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 60 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共循环 35 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 保温 10 min。PCR 反应时设置无 DNA 模板的空白对照。PCR 反应产物在 1.5% 琼脂糖凝胶 (含 EtBr) 中电泳分离, 紫外灯下扫描照相。

扩增产物序列测定: 切下琼脂糖凝胶上的 DNA 条带, 用凝胶纯化试剂盒进行 DNA 回收纯化, 进行 DNA 测序。

2 结果与分析

2.1 PCR 产物电泳检测结果

以单条雌虫 DNA 为模板, F195/V5367 为引物进行 PCR 扩增后, 用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳检测, 16 个线虫样本均扩增出约 760 bp 的相同电泳条带 (图 1)。

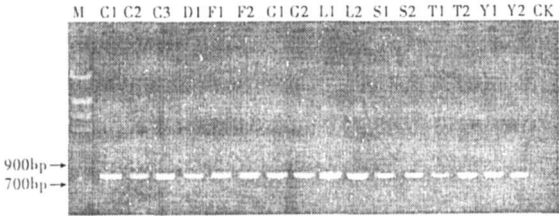


图 1 单条根结线虫 DNA 经 PCR 扩增的电泳图

2.2 BLAST 比对分析

扩增产物序列测定后, 剪辑 ITS 区域序列与 Gen-Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库进行 Nucleotide Blast 序列比对, 结果显示获得的扩增产物的 ITS 区域与南方根结线虫 ITS 区域序列完全同源, 这表明收集的根结线虫样本全部为南方根结线虫。

3 结论与讨论

研究表明, 在山东聊城地区的保护地栽培中危害蔬菜的根结线虫均为南方根结线虫。到目前为止, 在山东省报道的根结线虫种类有 9 个^[8], 其中北方根结线虫和南方根结线虫分布最广, 前者是露地植物上的优势种, 而后者是大棚蔬菜上的优势种。赵洪海等对山东省 10 个地市的 53 种植物上的根结线虫进行了种类鉴定^[8], 但是没有对山东西部聊城地区的根结线虫, 尤其是保护地蔬菜根结线虫的种类进行鉴定的报道。在北方地区, 南方根结线虫只是在温室和大棚才能越冬, 在露地不能越冬, 这是由于保护地蔬菜的大量种植为南方根结线虫的繁殖提供了良好的生活环境。

蔬菜根结线虫病的传播途径很多, 可以通过病土、病残根、幼苗、肥料、水流、人畜活动、农具及农事操作等途径传播, 因此防治该病必须采取综合防治的措施, 提倡预防为主, 保护无病区控制轻病区, 综合治理重病区的防治策略^[9]。蔬菜一旦造成根结线虫为害, 参考国内外经济、有效的防治经验, 提倡采用以下办法进行操作: 对具有抗线虫品种的蔬菜, 优先考虑种植抗性品种; 但是多数蔬菜尚没有抗线虫品种, 种植此类蔬菜时最经济有效的办法是在每年 7 ~ 8 月份闲棚季节, 在保护地土壤上撒适量的作物秸秆, 灌溉后深翻土壤 30 cm 左右, 覆盖当年的棚膜 (不是地膜, 为节省成本一般不用新棚膜) 并封严裂缝, 压实棚膜, 这样高温闷土壤 5 周左右 (不能少于 4 周) 的时间可以高温杀死绝大多数的根结线虫。

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.
[2] 李宝聚. 我国蔬菜病害研究现状与展望 [J]. 中国蔬菜, 2006(1): 1-5.
[3] 张芸, 郑建秋, 师迎春, 等. 番茄抗根结线虫病品种筛选 [J]. 中国蔬菜, 2006(10): 23-24.
[4] 魏学军, 杨文香, 刘大群, 等. 植物根结线虫分子鉴定研究进展 [J]. 中国农学通报, 2006, 22(8): 401-404.
[5] Peng Deliang, Subbotin S A, Moens M. Molecular characterization of some species of the genus Meloidogyne from China [J]. Nematology, 2002, 4 (2): 175.
[6] 赵鸿. 甘肃省蔬菜根际寄生线虫的种类鉴定、发生分布以及根结线虫 rDNA-ITS-RFLP 及其防治的研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2003.
[7] 廖金铃. 根结线虫的鉴定及其 DNA 多态性研究 [D]. 广州: 华南农业大学, 2001.
[8] 赵洪海, 袁辉, 武侠, 等. 山东省根结线虫的种类与分布 [J]. 莱阳农学院学报, 2003, 20(4): 243-247.
[9] 彭德良. 蔬菜病害的综合治理 (十) 蔬菜线虫病害的发生和防治 [J]. 中国蔬菜, 1998(4): 57-58.

梨卷叶瘿蚊严重危害珍珠绣线菊

张巍¹, 付军臣¹, 魏国先², 赵海峰²

(1. 吉林市绿化管理处, 吉林 吉林 132013; 2. 吉林市农业科学技术学院, 吉林 吉林 132101)

中图分类号: S 436.8 文献标识码: B 文章编号: 1001-0009(2008)03-0216-01

梨卷叶瘿蚊 *Contarinia pyrivora* (Riley) 属双翅目, 瘿蚊科昆虫。文献记载该虫主要分布贵州省, 为害栎树。最近湖南省也有过该虫危害梨树的报道。目前还没见到该虫危害其他树种的报道。吉林市对该虫的发生危害也从未有记载。2003 年在进行园林病虫害普查时, 发现杜梨生长点有被瘿蚊危害的现象, 同时受害的树种还有珍珠绣线菊, 多季玫瑰, 加拿大杨树。近年来为害珍珠绣线菊日趋严重、影响观赏, 降低了该树种的绿化美化效果。苗期被害, 延续了树冠的早期成形。为查明该虫的发生规律, 找出防治措施, 2006 年对该虫进行了初步研究, 现将结果整理如下。

2006 年对吉林市燃料乙醇、吉林市农业科学院、吉林省农业科技大学的绿化材料中珍珠绣线菊、多季玫瑰、杜梨、加拿大杨树进行了现场调查, 发现其新梢被害率依次为 96%、32%、30% 和 5%。该虫对珍珠绣线菊已构成严重威胁。

1 危害状

梨卷叶瘿蚊以幼虫为害生长点幼嫩叶片。珍珠绣线菊被害是由叶缘向叶面纵卷, 生长点的 6~12 片叶均可受害。被害叶变厚、变脆。受害叶先为黄色, 渐变红色, 后变为黑色, 严重影响树体形成, 降低了观赏价。梨树受害, 由叶缘向叶面纵向卷曲, 被害叶畸形, 肿胀, 质

地变硬。叶面被害部粗糙变黑。被害叶卷先褪绿, 后变黑, 干枯脱落, 常造成枝条光秃, 削弱树势。多季玫瑰受害, 多在主脉基部或叶缘一侧, 受害叶局部变硬增厚, 形成勺状卷曲。被害处先为黄色, 后为紫红色, 在田间清楚可见。加拿大杨树受害, 多在叶缘为害, 使叶缘向叶面纵卷, 变硬畸形。

2 形态特征

成虫: 雌成虫体长 1.3~1.6 mm, 腹部末节和产卵管黄色。雄成虫体长 1.0~1.2 mm, 复眼黑色肾形。触角 8 节, 中胸发达, 黑色。小盾片桔黄色。前翅椭圆形膜质, 翅脉简单, 只有 2 根纵向翅脉。卵: 长椭圆形, 长 0.2 mm, 乳白色透明。幼虫: 初孵幼虫乳白色, 渐变为桔黄色, 老熟时红色。幼虫无足由 11 节组成。中胸腹面有 1 块褐色“Y”状骨片。蛹: 体长 1.3~1.8 mm, 桔红色, 羽化前为黑褐色。茧: 茧灰白色, 椭圆形。

3 发生规律

以老熟幼虫在被害树下土中越冬。5 月中旬始见成虫, 成虫将卵产在叶面叶缘处, 每处产卵 3~15 粒, 幼虫孵出后取食为害嫩叶。造成叶片纵卷, 该虫 6~7 月为发生为害盛期。7 月中、下旬幼虫老熟脱叶入土。

4 防治

可在幼虫脱叶前, 及时剪除被害叶, 集中处理。可有效控制虫口密度。幼虫入土前或成虫羽化出土前向树冠下土表喷施 50% 辛硫磷乳油 1 000 倍液, 也有较好的防效。防治该虫要几种树种同时进行, 才能奏效。

第一作者简介: 张巍(1968-), 女, 工程师, 现从事城市园林绿化与植物保护工作。

收稿日期: 2007-09-24

Identification of the Root-knot Nematode on Vegetables in Greenhouses in Liaocheng, Shandong Province

FAN Ying-lun, LV Shan-hua, SUN Xiao, XING Guang-yao

(College of Agronomy, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

Abstract: Sixteen samples of root-knot nematode were collected in the greenhouse planted with various vegetables from eight counties of liaocheng, Shandong province. The sequences of ITS region of nematode were employed to identify the samples of root-knot nematodes. The results showed that all samples of root-knot nematode belongs to *Meloidogyne incognita*.

Key words: Vegetable; *Meloidogyne incognita*; ITS sequence