

山东保护地蔬菜根结线虫种类鉴定

樊颖伦¹,张维国¹,吕山花¹,高信岩²,刘立科¹

(1.聊城大学 农学院,山东 聊城 252059;2.即墨市农业局,山东 即墨 266200)

摘要:近年来在北方由于蔬菜大棚的大力发展,为根结线虫的越冬提供了良好的生活环境,保护地蔬菜根结线虫的发生日趋严重,为了鉴定危害山东省保护地蔬菜根结线虫的种类,从山东蔬菜主产区7个地市的蔬菜生产大棚中采集了14种蔬菜根结线虫寄主样本,采用ITS-PCR分子生物学鉴定方法对其进行了鉴定,表明山东蔬菜主产区的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:S436.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2009)增刊-0262-03

Identification of the Root-knot Nematode from Vegetables in Greenhouses in Shandong

FAN Ying-lun¹, ZHANG Wei-guo¹, LU Shan-hua¹, GAO Xin-yan², LIU Li-ke¹

(1. College of Agronomy, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China;

2. Agricultural Bureau of Jimo, Jimo 266200, China)

Abstract: Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) are important endoparasitic pests of numerous crop species. Most vegetables are highly susceptible host of several species of root-knot nematodes and incurs yield losses from root-knot infection. The yield of vegetables in greenhouse is increasing, but nematodes in greenhouse and other controlled environment production systems propagate rapidly. To ascertain the species of the root-knot nematodes, fourteen samples of root-knot nematode were collected in the greenhouse planted with various vegetables from seven city of Shandong Province. The sequences of ITS region of nematode were amplified by PCR. The ITS sequence of nematode collected was compared with the data of NCBI by BLAST. The results showed that all samples of root-knot nematodes belong to *Meloidogyne incognita*.

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

根结线虫(*Meloidogyne* spp.)是一类在植物尤其是蔬菜作物上为害极大的植物病原线虫,不但种类多、分布广、致病性强,而且寄主范围广(3 000种以上),能侵染几乎所有蔬菜作物。在蔬菜中,茄科、葫芦科和十字花科等蔬菜受害最重^[1]。蔬菜一旦遭受根结线虫侵染后,会导致其减产、品质下降的同时,还可与其他病原物互作而造成复合侵染,带来更严重的经济损失。因此,根结线虫已成为国内外最为严重的植物病害之一,也是世界各国对外检疫的对象。近些年来,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,它能使受

侵染的蔬菜减产15%~25%,高达70%以上,严重地区使保护地蔬菜到了无法种植的地步。因此,根结线虫病已成为保护地蔬菜生产的严重障碍^[2]。目前,山东省种植1 200万亩大棚蔬菜,居全国第一位。由于近几年保护地蔬菜根结线虫发生日趋严重,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,而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其使用^[3]。因此,开展对山东省根结线虫种类的鉴定,可以为制定相应的防治措施提供指导依据。

万新龙等采用PCR扩增ITS(内转录间隔区)片段,通过对其进行测序和比对,对来自16个不同地

收稿日期:2009-01-17

基金项目:聊城大学博士科研启动基金(31805);聊城大学大学生科技文化创新项目(SRT07024NX2)

作者简介:樊颖伦(1977-),男,博士,讲师,主要从事植物免疫学的教学与科研工作。

区和不同作物的根结线虫进行了鉴定^[4]。赵洪海等^[5]采用形态特征观察和酯酶表型对山东省 10 个地市的 53 个种植物上的根结线虫进行了种类鉴定，但是二者并未采集山东省西部的聊城、德州等地的根结线虫，并进行种类鉴定。我们曾采用 PCR 技术扩增 ITS 片段对山东省聊城地区保护地蔬菜根结线虫的种类进行了鉴定^[6]。为了进一步扩大调查范围，本研究从山东的东部、中部和西部的 7 个地市共收集了 14 个根结线虫寄主样本，以根结线虫 rDNA - ITS 区保守序列设计引物，进行 PCR 扩增，然后对扩增产物进行测序，以鉴定其种类。

1 材料和方法

1.1 线虫采集

于 2007 年 4 月至 2008 年 8 月在山东 7 个地市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，由中国农业科学院蔬菜花卉研究所提供)根际。线虫采集地点、寄主及采集时间见表 1。

表 1 山东保护地蔬菜根结线虫的采集寄主、地点、时间

Tab.1 The hosts, locations and time of collecting knot - nematode of vegetables planted in greenhouse in Shandong

编号 No.	寄主 Hosts	采集地点 Collecting locations	采集时间 Collecting time
D1	番茄	德州市陵县丁庄乡薛庄村	2008 - 07 - 13
D2	豇豆	德州市陵县丁庄乡薛庄村	2008 - 07 - 13
H1	番茄	菏泽市巨野县巨野镇李楼村	2008 - 08 - 25
H2	茄子	菏泽市巨野县巨野镇李楼村	2008 - 08 - 25
J1	番茄	山东六一农场(济南齐河县)	2008 - 06 - 13
J2	甜椒	山东六一农场(济南齐河县)	2008 - 06 - 13
L1	番茄	聊城市莘县张鲁镇周元疃	2007 - 05 - 23
L2	豇豆	聊城市莘县张鲁镇周元疃	2007 - 05 - 23
Q1	番茄	青岛即墨市移风店镇后古村	2008 - 04 - 10
Q2	甜椒	青岛即墨市移风店镇后古村	2008 - 04 - 10
S1	番茄	潍坊市寿光市古城街道办事处	2008 - 07 - 19
S2	彩椒	潍坊市寿光市古城街道办事处	2008 - 07 - 19
Z1	番茄	淄博市沂源县三岔镇流水村	2008 - 08 - 06
Z2	甜椒	淄博市沂源县三岔镇流水村	2008 - 08 - 06

1.2 根结线虫分子鉴定

1.2.1 根结线虫 DNA 的提取 参考廖金铃的微量提取法提取单条线虫的 DNA^[7]，并做适当修改。具体方法是：在干净的载玻片上滴 10 μL 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 μL)，加入到含有 10 μL 无菌水的 1.5 mL 离心管中，再加入 2 μL 预冷的蛋白酶 K (1 mg/ mL)，并使总体积为 20 μL。然后迅速将离心管放入 - 20 ℃的冰箱中冷冻至少 10 min，将离

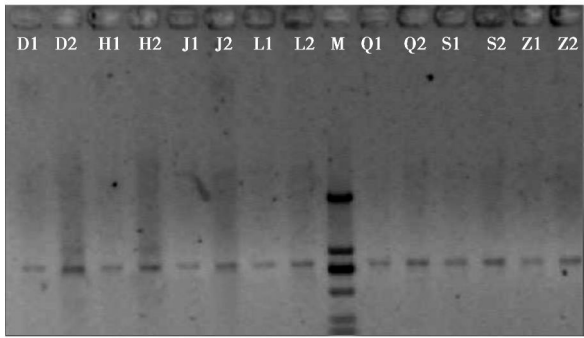
心管置于 65 ℃下温育 1 h，接着在 95 ℃下恒温 10 min，使蛋白酶 K 变性，13 000 g 下离心 1 min，取上清 DNA 悬浮液于 - 20 ℃保存备用。

1.2.2 引物设计、PCR 扩增及扩增产物序列测定 根据线虫 18S 和 28S 上的序列合成一对通用引物 F195(5' - TCCTCCGCTAAATGATATG - 3') 和 V5367(5' - TTGATTACGTCCTGCCCTTT - 3')^[8,9]，然后用此对引物，以线虫基因组 DNA 为模板，进行 PCR 扩增。PCR 扩增按如下体系进行，取 1 μL 离心后的上清液 DNA 作为模板，PCR 反应体积 25 μL，反应液组成为：1 μPCR 缓冲液(10 mmol/L Tris · HCl, pH8.3, 50 mmol/L KCl, 0.1 % Triton - 100)，2.5 mmol/L MgCl₂，dNTP 0.25 mmol/L，每条引物 50 ng，1 U Taq 酶。PCR 反应程序为：95 ℃预变性 5 min；然后每个循环 94 ℃变性 1 min，60 ℃复性 1 min，72 ℃延伸 1 min，共循环 35 次，最后 72 ℃保温 10 min。PCR 反应时设置无 DNA 模板做空白对照。PCR 反应产物在 1.5 % 琼脂糖凝胶(含 EBr)中电泳分离完毕后，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

以单条线虫 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，14 个线虫样本均扩增出约 760 bp 的相同电泳条带(图 1)。



M. DNA 分子量标记 DL2000；其余泳道为表 1 所列寄主线虫的 PCR 扩增产物

图 1 单条根结线虫 DNA 经 ITS - PCR 扩增的电泳图

Fig.1 ITS - PCR patterns of single knot - nematode genome DNA

2.2 BLAST 比对分析

扩增产物序列测定后，剪辑 ITS 区域序列与 GenBank (<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 区域核苷酸序列同源性在 98.5 %~100 %，因此我们认为收集的根结线虫样本全部为南方根结线虫。

3 结论与讨论

对根结线虫的种类鉴定工作是开展对根结线虫研究和防治的基础。在北方地区,由于保护地蔬菜的大面积种植为南方根结线虫的繁殖提供了良好的生活环境,尤其是保护地蔬菜的复种指数增加使得根结线虫的发生危害有逐年加重的趋势。目前,由于蔬菜种苗的集约化供应,使根结线虫的传播十分迅速。对根结线虫进行分类时,常规方法进行分类鉴定是基于形态特征来进行的,但由于在分类鉴定描述中所用的性状特征较多,虫龄要求严格,各种群之间变异较大,而使得常规形态学鉴定和诊断变得越来越困难。这就需要其他的方法来对根结线虫进行分类鉴定。

随着分子生物学技术的发展,采用 PCR 方法从线虫特异序列 DNA 水平上进行序列分析,为根结线虫的鉴定和分类提供了行之有效的方法。基于分子水平检测,常采用 PCR 技术扩增 ITS 区,它是位于遗传物质核糖体 DNA (rDNA) 上 18S 和 28S 之间的 DNA 片段,该区段在寄生虫进化过程中保留了种的特异特征,在种内具有高度保守性,在不同种间又有不同程度的变异,因此可根据 ITS 区的 DNA 序列来揭示线虫种间的差异,而达到对植物病原线虫种进行快速的分子鉴定、而且鉴定结果可靠^[10]。万新龙等^[4]通过 rDNA - ITS 片段的扩增及序列分析,对寄生在山东胶州等地的花生、其他 7 省市的蔬菜花卉上的根结线虫进行了分子鉴定,成功地鉴定出危害其植物的根结线虫分别是北方根结线虫、爪哇根结线虫、花生根结线虫、南方根结线虫和番禺根结线虫。

本研究对山东的东部、中部和西部的 7 个地市共收集了 14 个根结线虫寄主样本,以根结线虫 rDNA - ITS 区保守序列设计引物,进行 PCR 扩增,然后对扩增产物进行测序及序列比对,表明在山东蔬菜主产区的保护地栽培中为害蔬菜的根结线虫均为南方根结线虫,说明南方根结线虫已经成为北方保护地蔬菜根结线虫的绝对优势种群。

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] 万新龙, 李建洪, 彭德良. 根结线虫 rDNA - ITS 片段的克隆与序列分析[J]. 华中农业大学学报, 2007, 26(5): 624 - 628.
- [5] 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.
- [6] 樊颖伦, 吕山花, 孙晓, 等. 山东聊城保护地蔬菜根结线虫种类鉴定[J]. 北方园艺, 2008, 3: 214 - 215.
- [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] Peng Deliang, Subbotin S A, Moens M. Molecular characterization of some species of the genus *Meloidogyne* from China [J]. *Nematology*, 2002, 4(2): 175.
- [9] 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.
- [10] 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.