

核桃枝枯病小新壳梭孢巢式 PCR 检测方法的建立

陈 杰, 朱天辉*

(四川农业大学林学院, 温江 611130)

摘要 近年来,小新壳梭孢 *Neofusicoccum parvum* 导致的核桃枝枯病屡有报道,该病防治困难,发病率高,是核桃的一种灾难性病害。为建立 *N. parvum* 的快速、灵敏的分子检测体系,根据 *N. parvum* 的几丁质合酶 1 基因 (*CHS1*)及其前后 100 bp 序列,分别设计了两对特异性引物 CT-WK3-S/CT-WK3-A 和 CT-N-S/CT-N-A,建立了 *N. parvum* 的巢式 PCR 检测方法。结果表明,建立的体系可以从不同来源的 5 个 *N. parvum* 菌株中特异性地扩增出 97 bp 的目的条带,灵敏度达 30 fg/ μ L,是常规 PCR 的 10 倍,而从其近缘种葡萄座腔菌属 *Botryosphaeria* sp. 的病原菌及其他供试菌株均未扩增出任何条带。以感染 *N. parvum* 的核桃组织总 DNA 为模板进行检测,可以在发病早期检测出 *N. parvum* 的存在。本研究建立的巢式 PCR 体系可以为核桃枝枯病的田间检测提供思路。

关键词 核桃枝枯病; 小新壳梭孢菌; 分子检测; 巢式 PCR

中图分类号: S 763.13 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2017262

Establishment of nested PCR method for detecting the branch dieback of walnut caused by *Neofusicoccum parvum*

CHEN Jie, ZHU Tianhui

(College of Forestry, Sichuan Agricultural University, Wenjiang 611130, China)

Abstract The branch dieback of walnut caused by *Neofusicoccum parvum* has repeatedly been reported in recent years. The disease is a catastrophic disease of walnut with high incidence and is difficult to control. In order to establish a rapid and sensitive molecular detection system for *N. parvum*, two pairs of specific primers, CT-WK3-S / CT-WK3-A and CT-N-S / CT-N-A, were designed according to the sequence of chitin synthase 1 (*CHS1*) of *N. parvum* and 100 bp flanking sequences, and a nested PCR detection assay was established for *N. parvum*. The results showed that the established assay was specific to five strains of *N. parvum* from different sources and could amplify a 97 bp target with a sensitivity of 30 fg/ μ L, which was 10 times more sensitive than conventional PCR. No products were amplified in the related pathogenic species, *Botryosphaeria* sp., as well as the other tested strains. Therefore, the total DNA of walnut infected by *N. parvum* can be used as a template to detect the presence of *N. parvum* early in the disease. The nested PCR system established in this study can provide ideas for field detection of walnut branch dieback.

Key words walnut blight; *Neofusicoccum parvum*; molecular detection technology; nested PCR

据统计,目前我国核桃栽培面积达 554.78 万 hm^2 , 占全国经济林总面积的 14.96%,比 2002 年增加 464.91 万 hm^2 ,有 10 个省(自治区)的种植面积在 10 万 hm^2 以上^[1]。与此同时,核桃的各类病虫害也日益频发,其中核桃枝枯病在全国各地均有发生。引起核桃枝枯病的病原菌已报道的有矩圆黑盘孢 *Melanconium oblongum*^[2-4]、胡桃黑盘孢 *M. juglandina*^[5-6]、胡

桃楸拟茎点霉 *Phomopsis juglandina*^[7]、茎生拟茎点霉 *P. truncicola*^[8] 和小新壳梭孢 *Neofusicoccum parvum*^[9-10]。目前国内外研究较多的是 *M. oblongum*,而对其他引起核桃枝枯病的病原菌则研究较少。2013 年, Cheon 等首次报道了 *N. parvum* 在韩国引起核桃枝枯病^[11],而后该病原菌引起的核桃枝枯病陆续又在我国山西和四川有过报道^[12-13]。

收稿日期: 2017-07-11 修订日期: 2017-09-12

基金项目: 中国博士后科学基金(2016M602705)

* 通信作者 E-mail: zhuth1227@126.com

小新壳梭孢 *Neofusicoccum parvum* 属于囊菌门 Ascomycota, 子囊菌纲 Ascomycetes, 假球壳目 Pleosporales, 葡萄座腔菌科 Botryosphaericeae, 新壳梭孢属 *Neofusicoccum*, 在田间主要借风、雨或昆虫传播, 并可通过自然孔口或机械损伤等侵染枝条^[14]。

近年来已发展了多种植物病原菌的分子检测技术, 其中巢式 PCR 扩增技术是由内外两对引物先后对靶序列进行扩增, 使其 DNA 拷贝数以双重指数级增加, 因而灵敏度也大幅度提高。该技术已被广泛应用于多种植物病原菌的分子检测, 如荔枝霜疫

霉^[15]、菜豆晕疫病菌^[16]、甘蔗黑穗病菌^[17]、琯溪蜜柚黑斑病菌^[18]、向日葵白锈病菌^[19]等。

目前, 国内外关于核桃枝枯病分子检测技术的研究鲜有报道。本研究根据 *N. parvum* 的 *CHS1* 基因及其前后 100 bp 序列设计特异性内、外引物, 拟建立一种快速、灵敏的巢式 PCR 检测体系, 为我国核桃枝枯病早期防治提供技术支持。

1 材料和方法

1.1 材料

菌株: 供试菌株详细信息见表 1。

表 1 供试菌株及其来源
Table 1 Tested strains and sources

编号 No.	代号 Code	菌株种类 Species	寄主 Host	来源 Source
1	BH01	小新壳梭孢 <i>Neofusicoccum parvum</i>	核桃	四川绵阳
2	BH02	小新壳梭孢 <i>N. parvum</i>	核桃	四川宜宾
3	BH03	小新壳梭孢 <i>N. parvum</i>	核桃	四川广元
4	88207	小新壳梭孢 <i>N. parvum</i>	核桃	四川广汉
5	00998	小新壳梭孢 <i>N. parvum</i>	桉树	广西南宁
6	86781	茶藨子葡萄座腔菌 <i>Botryosphaeria ribis</i>	苹果	山东泰安
7	HT-TJ	贝氏葡萄座腔菌 <i>Botryosphaeria berengeriana</i>	核桃	四川广元
8	88448	贝氏葡萄座腔菌 <i>Botryosphaeria berengeriana</i>	杨树	山东聊城
9	HT-03	甜椒拟茎点霉 <i>Phomopsis capsici</i>	核桃	四川广元
10	HT-Y2	茺菁状镰孢菌 <i>Fusarium napiforme</i>	核桃	四川广元
11	HT-411	芸薹链格孢 <i>Alternaria brassicae</i>	核桃	四川广元
12	HT-2F	尖镰孢菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	核桃	四川广元
13	HT-L1	拟茎点霉属 <i>Phomopsis</i> sp.	核桃	四川仁寿
14	HT-04	层出镰孢菌 <i>Fusarium proliferatum</i>	核桃	四川仁寿
15	HT-05	变红镰孢菌 <i>F. incarnatum</i>	核桃	四川仁寿
16	HT-06	链格孢属 <i>Alternaria</i> sp.	核桃	四川仁寿
17	HT-09	链格孢 <i>Alternaria alternata</i>	核桃	四川仁寿
18	HT-GB2	胶孢炭疽菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	核桃	四川仁寿
19	HT-08	赤霉菌属 <i>Gibberella</i> sp.	核桃	四川雅安
20	HT-B1	藤仓镰孢菌 <i>Fusarium fujikuroi</i>	核桃	四川雅安
21	87952	红球丛赤壳菌 <i>Nectria haematococca</i>	沙棘	黑龙江齐齐哈尔
22	88423	可可毛色二孢 <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	龙眼	福建福州
23	C5337	帚梗柱孢菌 <i>Cylindrocladium</i> sp.	桉树	四川攀枝花

引物: 采用 Primer Premier 5.0 和 Oligo 6.0, 根据 GenBank 中公布的 *N. parvum* 的 *CHS1* 和基因组序列, 设计两对特异性引物, 即: 外引物: CT-WK3-S(5'-GTGTCTATCAGGACGGCATTG-3')/CT-WK3-A (5'-CGAGGACGGTTCCAAAGG-3') 预计扩增片段大小为 271 bp 和内引物 CT-N-S(5'-GGACGGCATTGCCAAGCA-3')/CT-N-A(5'-TTAGCGTCTTTCCACGGGTCTT-3'), 预计扩增片段大小为 97 bp。引物由成都擎科梓熙生物技术有

限公司合成。

马铃薯葡萄糖培养基(PDB): 煮熟马铃薯滤液 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L; LB 培养基: 胰蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, 氯化钠 10 g/L。固体培养基为在对应液体培养基中加 15~20 g/L 琼脂粉。

试剂及仪器: 离心柱型植物基因组提取试剂盒 (Plant Genomic DNA Kit DP305)、DL2000 DNA Marker、6 × DNA Loading Buffer、2 × *Taq* PCR Master Mix (KT201) 及琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂

盒购自天根生化科技有限公司;大肠杆菌菌株 *Escherichia coli* DH5 α 购自北京全式金生物技术有限公司;pMD19-T 载体购自宝生物工程有限公司;50 $\times$ TAE Buffer 购自索莱宝科技有限公司;西班牙琼脂糖,BIOWEST 公司生产;Gold View I 核酸染色剂购自索莱宝科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 PCR 模板的制备

菌株培养:用打孔器从接菌 7 d 的 PDA 平板中取直径 5 mm 的菌饼接种于装有灭菌 PDB 的锥形瓶中,28 $^{\circ}$ C 恒温 140 r/min 振荡培养 5 d。

菌丝获取:菌丝的获取参照何月秋^[20]的方法,置于冰箱-20 $^{\circ}$ C 保存待用。

核桃发病组织获取:用针刺法在健康两年生核桃植株的枝条上接种 *N. parvum* 菌饼,用无菌水喷湿后覆盖保鲜膜置于室外通风处,随后观察发病情况。在核桃枝枯病发病时期分不同发病情况(表 2)用消毒后的刀片采集接种枝条的韧皮部,对样品进行表面消毒后置于冰箱-80 $^{\circ}$ C 保存待用。

表 2 发病情况分级

Table 2 Classification standards for branch diseases	
等级 Rank	分级标准 Classification standard
0 级	枝干未见任何症状
1 级	病斑初现
2 级	病斑扩展至直径 3 cm 左右
3 级	病斑环绕一周后枝条枯死
4 级	病株整株枯死

DNA 的提取:核桃样品组织 DNA 提取参照天根植物基因组 DNA 提取试剂盒(Plant Genomic DNA Extraction Kit)说明书;供试菌株 DNA 提取参照刘少华等^[21]的方法。用 Biomate 3S 紫外可见核酸蛋白分析仪测定吸光值,估算 DNA 的质量和浓度后置于-20 $^{\circ}$ C 保存待用。

1.2.2 PCR 扩增体系

常规 PCR 扩增体系(50 μ L):2 $\times$ Taq PCR Master Mix 25 μ L,10 mmol/L 外引物(或内引物)各 2.0 μ L,模板 DNA 2.0 μ L,用双重蒸馏水补足至 50 μ L。程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,55 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s,33 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。

巢式 PCR 扩增体系:以外引物进行第一轮 PCR,扩增体系同常规 PCR,扩增程序除退火温度改为 53 $^{\circ}$ C 和延伸时间改为 30 s 外其他同常规 PCR。

取第一轮产物稀释 10 倍后,以内引物进行第二轮扩增,体系和程序同常规 PCR。

电泳检测:4%的琼脂糖凝胶,110V 电压下电泳 40 min。

1.2.3 巢式 PCR 引物退火温度的筛选

以外引物和内引物分别扩增 *N. parvum* 基因组 DNA,退火温度梯度设置为 45~55 $^{\circ}$ C,其他程序及体系同 1.2.2 常规 PCR。

1.2.4 巢式 PCR 引物特异性验证

用引物对 CT-WK3-S/CT-WK3-A 和 CT-N-S/CT-N-A 对所有供试菌株基因组 DNA 进行巢式 PCR 扩增,体系及程序见 1.2.2 巢式 PCR。

1.2.5 PCR 产物的克隆及序列分析

用引物对 CT-WK3-S/CT-WK3-A 和 CT-N-S/CT-N-A 对 *N. parvum* 基因组 DNA 进行巢式 PCR 扩增,产物电泳后用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒纯化、克隆至 pMD19-T 载体中,并转化至 DH5 α 感受态细胞中,取 100 μ L 涂平板,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,随即挑取单菌落接种到 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养 4 h,用菌液 PCR 筛选阳性克隆,随机选择 3 个阳性克隆送成都擎科梓熙生物技术有限公司测序。将得到的产物序列经 NCBI 在线 BLAST 比对验证其来源,再用 DNAMAN 分析其与目的片段的一致性。

1.2.6 巢式 PCR 灵敏度试验

用特异性引物对 CT-N-S/CT-N-A 和 CT-WK3-S/CT-WK3-A 分别对浓度为 300 ng/ μ L、30 ng/ μ L、3 ng/ μ L、300 pg/ μ L、30 pg/ μ L、3 pg/ μ L、300 fg/ μ L、30 fg/ μ L、3 fg/ μ L 的 *N. parvum* 基因组 DNA 进行常规 PCR 扩增和巢式 PCR 扩增,设置无菌 ddH₂O 为阴性对照,扩增体系及程序同 1.2.2。

1.2.7 发病组织检测

以 1.2.1 中不同发病等级的核桃组织及健康核桃组织的 DNA 作为模板,分别进行 CT-WK3-S/CT-WK3-A 常规 PCR、CT-N-S/CT-N-A 常规 PCR 和巢式 PCR,扩增体系及程序同 1.2.2。

2 结果与分析

2.1 巢式 PCR 引物退火温度优化

以外引物 CT-WK3-S/CT-WK3-A 进行扩增时,不同退火温度下扩增 *N. parvum* 基因组 DNA 的结果见图 1,结果表明该对引物在退火温度 45~55 $^{\circ}$ C 时均能很好地扩增出目的条带,且无杂带产生。为了保证扩增产物的产量和引物的特异性,最终选

择 55℃作为该对引物的退火温度。以内引物 CT-N-S/CT-N-A 进行扩增时,不同退火温度下扩增 *N. parvum* 基因组 DNA 的结果见图 2,结果表明该对引物在退火温度 45~55℃均能扩增出目的条带,但均有非目的性条带产生。为了使引物的特异性最佳,最终选择 53℃作为该对引物的退火温度。

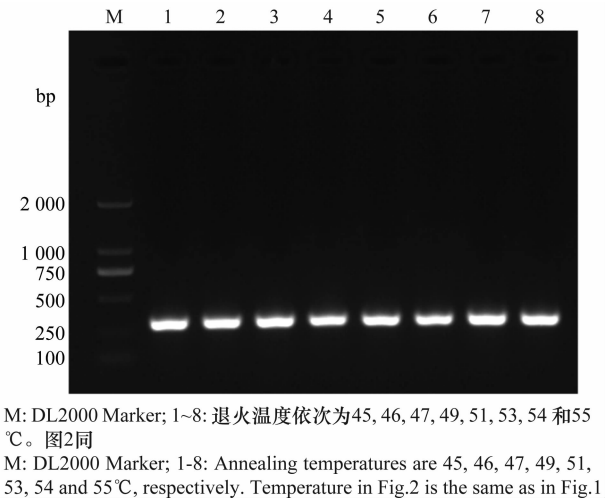


图 1 引物 CT-WK3-S/CT-WK3-A 退火温度筛选

Fig. 1 Optimization of the annealing temperature for the primers CT-WK3-S/CT-WK3-A

2.2 巢式 PCR 特异性检测

外引物对 CT-WK3-S/CT-WK3-A 常规 PCR

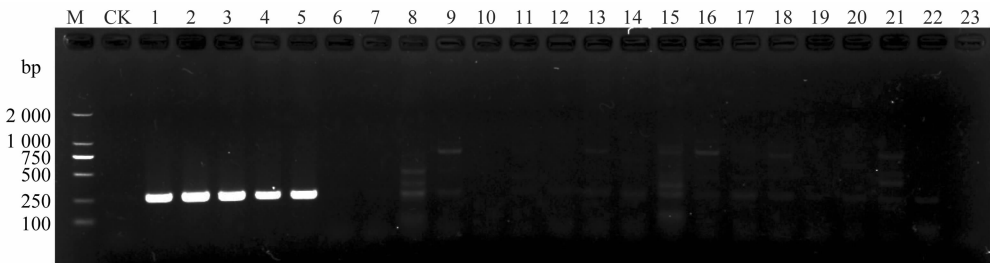


图 3 引物 CT-WK3-S/CT-WK3-A 特异性验证

Fig. 3 Specificity of the primers CT-WK3-S/CT-WK3-A

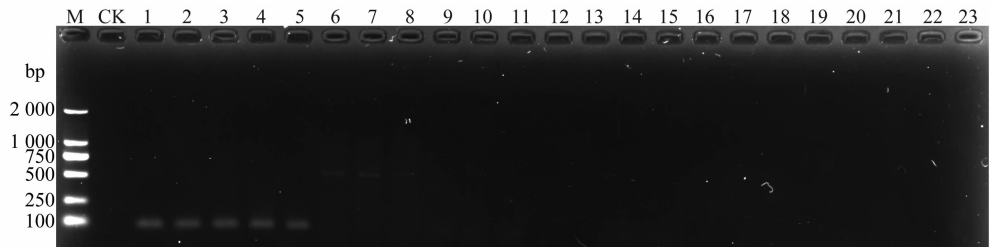


图 4 引物 CT-N-S/CT-N-A 特异性验证

Fig. 4 Specificity of the primers CT-N-S/CT-N-A

扩增结果见图 3,5 个不同来源的 *N. parvum* 均扩增出了非常明亮的 271 bp 的目的条带,但其他菌株也都有微弱非特异性目的条带出现。内引物对 CT-N-S/CT-N-A 常规 PCR 扩增结果见图 4,5 个不同来源的 *N. parvum* 均扩增出了不甚明亮的 97 bp的目的条带,但葡萄座腔菌属 *Botryosphaeria* 的 3 个菌株(图 4,泳道 6~8)可见一条约 500 bp 的微弱非特异性目的条带,其他 10 个菌株均无条带出现。巢式 PCR 检测结果见图 5,5 个不同来源的 *N. parvum* 均扩增出了 97 bp 的特异性目的条带,而其他 18 个菌株均无条带出现。

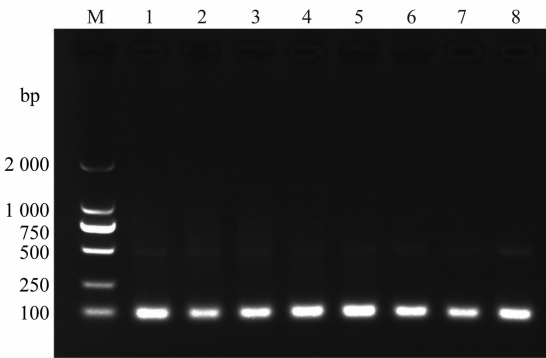


图 2 引物 CT-N-S/CT-N-A 退火温度筛选

Fig. 2 Optimization of the annealing temperature for the primers CT-N-S/CT-N-A

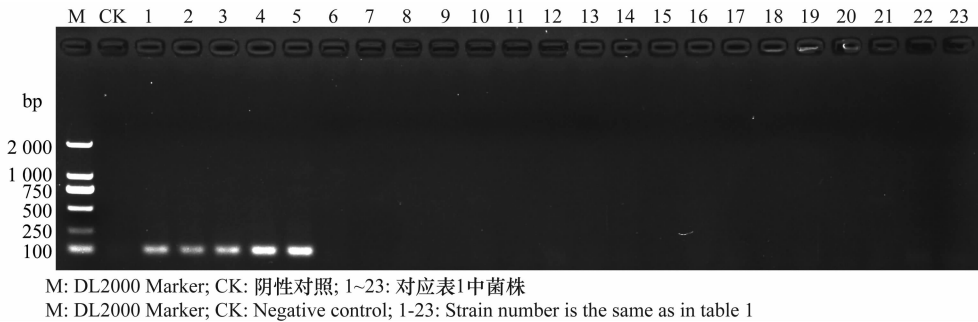


图 5 巢式 PCR 特异性验证
Fig. 5 Specificity of the primers CT-WK3-S/CT-WK3-A and CT-N-S/CT-N-A for nested PCR

2.3 巢式 PCR 灵敏度检测

用内侧特异性引物对 CT-N-S/CT-N-A 进行常规 PCR,能检测到 300 fg/ μ L 的 *N. parvum* 总 DNA (图 6),而用外侧引物对 CT-WK3-S/CT-WK3-A 的 PCR 产物稀释 10 倍作为模板,再用内引物对 CT-N-S/CT-N-A 进行巢式 PCR 能检测到 30 fg/ μ L 的 *N. parvum*总 DNA(图 7)。表明巢式 PCR 灵敏度是常规 PCR 的 10 倍。

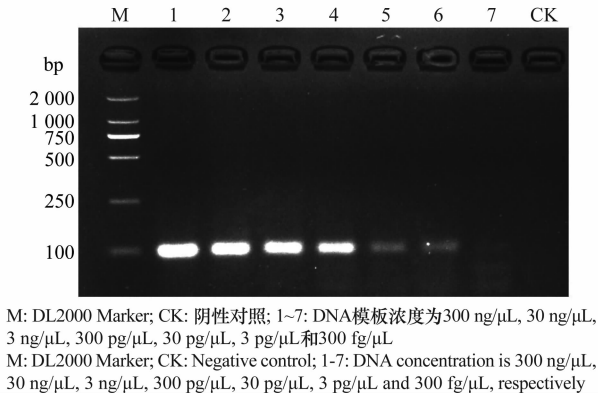


图 6 常规 PCR 灵敏度验证

Fig. 6 Sensitivity of universal PCR for detection of *Neofusicoccum parvum*

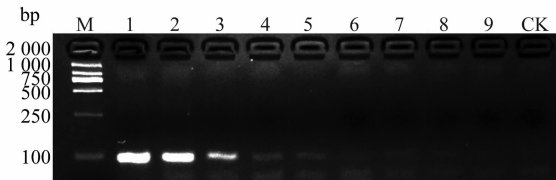


图 7 巢式 PCR 灵敏度验证

Fig. 7 Sensitivity of nested PCR for detection of *Neofusicoccum parvum*

2.4 测序结果

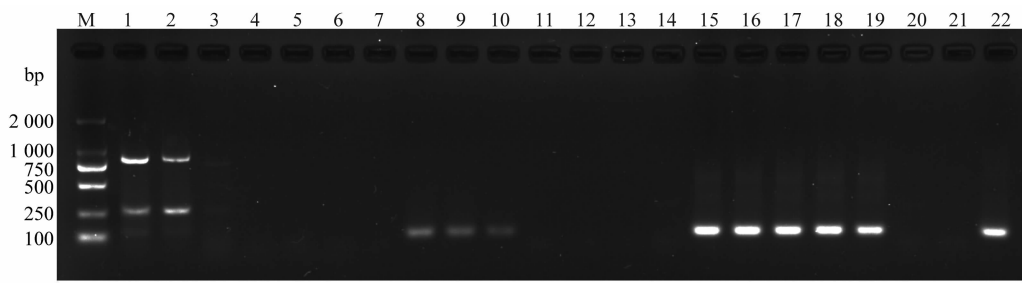
阳性产物克隆测序后在 NCBI 数据库进行在线 BLAST 对比分析,结果表明,本试验选取的 3 个阳性克隆的序列与 *N. parvum* CMW9071 菌株(GenBank 登录号为 EU339498. 1)、MUCC211 菌株(GenBank 登录号为 EU339500. 1)和 CMW7772 菌株(GenBank 登录号为 EU339495. 1)的序列一致性达 100%,100% 和 99%,用 DNAMAN 软件包分析比对表明,序列与巢式 PCR 预测产物一致。

2.5 核桃发病组织检测

不同发病情况的组织及健康组织 DNA 分别以 CT-WK3-S/CT-WK3-A 和 CT-N-S/CT-N-A 进行常规 PCR 检测和巢式 PCR 检测,结果见图 8。两对引物的常规 PCR 均只能检测出 3 级、2 级和 1 级发病组织内病原菌,其中 CT-WK3-S/CT-WK3-A 还扩增出了约 850 bp 的明显杂带,而巢式 PCR 可以检测出 4 级、3 级、2 级、1 级和 0 级发病组织,且呈单一条带,表明其灵敏度和特异性都明显高于常规 PCR。

3 讨论

一种高特异性、高灵敏度的分子检测方法能否成功建立,关键在于靶序列的选择。目前,已报道的分子检测技术常用靶序列主要有核糖体 RNA 基因的内转录间隔区(ITS)^[22]、细胞骨架蛋白(beta-tubulin)基因^[23]、肌动蛋白(actin)^[24]基因、水稻抗稻瘟病基因(*Pi*)^[25]、转录延伸因子(factor 1-alpha)^[26]、热激蛋白(heat shock protein)基因^[27]、线粒体 NADH 脱氢酶基因(*NADH 1*)^[28]、RNA 聚合酶 II 第 2 大亚基基因(*RPB2*)^[29]等。众所周知,不同物种的基因保守序列不同,同一物种的同一基因变异程度也不同,而植物病原菌作为典型的 R 策略者,其种群增长率大,种内遗传多样性丰富,所以寻找一个合适的分子检测靶基因并不是一件轻而易举的事。



M: DL2000 Marker; 1~7: CT-WK3-S/CT-WK3-A常规PCR; 8~14: CT-N-S/CT-N-A常规PCR; 15~21: 巢式PCR; 22: 阳性对照; 其中1, 8, 15为3级发病组织; 2, 9, 16为2级发病组织; 3, 10, 17为1级发病组织; 4, 11, 18为0级发病组织; 5, 12, 19为4级发病组织; 6, 13, 20为健康组织; 7, 14, 21为阴性对照
M: DL2000 Marker; 1~7: PCR results by CT-WK3-S/CT-WK3-A; 8~14: PCR results by CT-N-S/CT-N-A; 15~21: Nest-PCR results by CT-WK3-S/CT-WK3-A and CT-N-S/CT-N-A; 22: Positive control (*Neofusicoccum parvum*); Lane 1, 8, 15: New dead tissues; Lane 2, 9, 16: Diseased tissues with symptoms; Lane 3, 10, 17: Latent infected tissues; Lane 4, 11, 18: Infected tissues without symptom; Lane 5, 12, 19: Residues of dead plant; Lane 6, 13, 20: Healthy tissue; Lane 7, 14, 21: Negative control

图 8 利用巢式 PCR 检测感病样品

Fig. 8 Detection of diseased plants infected by *Neofusicoccum parvum* using nested PCR

几丁质合酶是促成几丁质分子延长的酶,而 *CHS1* 的主要作用则是在细胞分裂中合成几丁质。该基因在植物病原检测中还未见报道,但曾在动物皮肤病原分子检测中有作为靶基因的报道,如李晓红等^[30]基于申克孢子丝菌的 *CHS1* 基因建立了孢子丝菌病 PCR 分子检测方法。

N. parvum 导致的核桃枝枯病在韩国以及我国山西和四川有发生^[11-13]。本试验虽选择了 5 个不同来源的 *N. parvum* 菌株进行了巢式 PCR 分子检测技术的研究,但由于病原菌种群内遗传多样性较丰富,所以该技术是否能够成功检测其他更多来源的病原菌还有待下一步验证。

参考文献

[1] 邓金龙. 我国核桃生产现状及发展策略[J]. 林产工业, 2016 (10):56 - 58.
[2] 雷琼,康克功,林伟锋. 商洛地区核桃主要病害发生特点及防治策略[J]. 价值工程,2012(1):281 - 282.
[3] 李会钦,刘会峰,杨利娟. 河南偃师核桃枝枯病的防治技术[J]. 果树实用技术与信息,2012(10):27 - 28.
[4] 张改香. 豫西地区核桃病害发生及相关因子分析[J]. 山西果树,2011(6):6 - 7.
[5] 张承胤,唐欣甫,张文忠,等. 北京地区核桃主要病害的发生规律与防治措施[J]. 山西果树,2012(2):25 - 26.
[6] 徐彧,马朝阳,陈建华,等. 成县核桃主要病虫害及其防治措施[J]. 经济林研究,2007(4):70 - 73.
[7] 孙俊. 辽宁新病害核桃枝枯病原鉴定[J]. 果树学报,2013 (4):669 - 671.
[8] 张榆英,伍建榕,熊智,等. 泸水县核桃衰退原因分析[J]. 中国森林病虫,2013(3):28 - 30.
[9] LATORRE B A, TORRES R, EL FAR K. Wound protectants

to prevent the stem canker (*Neofusicoccum parvum*) of blueberry [C]// Abstracts of ICPP 2013 10th International Congress of Plant Pathology, 2013.
[10] CHEON W, KIM Y S, LEE S G, et al. Branch dieback caused by *Neofusicoccum parvum* on walnut in Korea [C]// Abstracts of ICPP 2013 10th International Congress of Plant Pathology, 2013.
[11] CHEON W. First report of branch dieback of walnut caused by *Neofusicoccum parvum* in Korea [J]. Plant Disease, 2013, 97 (8): 1114.
[12] 尹万瑞,朱天辉. 核桃枝枯病原菌生物学特性及药剂防治[J]. 东北林业大学学报,2016(7):98 - 101.
[13] YU Zhongdong, TANG Guanghui, PENG Shaobin, et al. *Neofusicoccum parvum* causing canker of seedlings of *Juglans regia* in China [J]. 林业研究(英文版), 2015, 26(4):1019 - 1024.
[14] 金晓明. 核桃树主要病害发生规律及防治方法[J]. 果农之友, 2016(3):26 - 27.
[15] 李本金,刘裴清,刘小丽,等. 荔枝霜疫霉巢式 PCR 和 LAMP 检测方法的建立[J]. 农业生物技术学报,2016(6):919 - 927.
[16] 杨万凤,刘艳,刘翔,等. 进口大豆中菜豆晕疫病菌巢式 PCR 检测方法的建立[J]. 中国油料作物学报,2015(1):113 - 118.
[17] 沈万宽,杨湛端,刘睿,等. 基于 PCR 和巢式 PCR 技术的甘蔗黑穗病早期检测[J]. 热带作物学报,2013(9):1756 - 1760.
[18] 张凡,侯敏,余传信,等. 巢式 PCR 法在日本血吸虫易感水域哨鼠监测中的应用[J]. 中国病原生物学杂志,2015(4):325 - 328.
[19] 刘彬,张祥林,王肿,等. 向日葵白锈病菌巢式 PCR 检测方法的研究[J]. 新疆农业科学,2011(5):859 - 863.
[20] 何月秋. 真菌菌丝体培养和提取 DNA 方法的改进[J]. 菌物系统,2000,19(3):434.
[21] 刘少华,陆金萍,朱瑞良,等. 一种快速简便的植物病原真菌基因组 DNA 提取方法[J]. 植物病理学报,2005,35(4):362 - 365.
[22] 刘秀徽,王峰,刘雪峰. 落叶松枯梢病分子检测初步研究[J]. 植物检疫,2009(2):1 - 4.

虫。此外,保护和利用自然天敌是茶园害虫绿色防控的关键手段之一,我们在调查中发现茶扁叶蝉卵寄生蜂 1 种,初步鉴定属缨小蜂科 Mymaridae 柄翅缨小蜂属 *Gonatocerus* Nees,其田间寄生率在 5% 左右。寄生于茶扁叶蝉若虫体内的寄生蝇 1 种,初步鉴定属于双翅目 Diptera 头蝇科 Pipunculidae 佗头蝇属 *Tomosvaryella* Aczél,其一般在寄主若虫达 5 龄时羽化,寄主随即死亡。因此,有必要在今后对这两种天敌的控害潜能开展研究,确定其利用价值,增强茶扁叶蝉的防控效果。

春茶是全年茶叶生产的基础,更是绿茶茶区一年中主要茶季,病虫害发生程度对全年的收入影响极大。相对于小绿叶蝉、绿盲蝽等刺吸类害虫,人们对茶扁叶蝉的认知尚少,今后仍需系统地对其生物学、生态学开展研究,加强对该害虫发生和分布情况的普查,建立危害评价体系和开展相应的防控技术研究。

参考文献

- [1] 苗进,韩宝瑜. MeSA 诱导茶树抗叶蝉取食效应的 DC-EPG 分析[J]. 植物保护学报, 2008, 35(2): 143–147.
- [2] 朱海涵. 陕西渭北地区苹果园蝉类害虫多样性与危害研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
- [3] 张汉鹄,谭济才. 中国茶树害虫及其无公害治理[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2004: 389.
- [4] 彭萍,王晓庆,李品武. 茶树病虫害测报与防治技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2013: 117.
- [5] QIN D Z, ZHANG L, XIAO Q, et al. Clarification of the identity of the tea green leafhopper based on morphological comparison between Chinese and Japanese specimens [J]. PLoS ONE, 2015, 10(9): e139202.
- [23] 廖芳,赵磊,罗加风,等. 雀麦上雀麦腥黑粉菌 *Tilletia bromi* 的分子检测[J]. 菌物学报, 2009, 28(6): 776–782.
- [24] 张伟宏,廖芳,罗加风,等. 检疫性真菌病害向日葵黑茎病菌和茎溃疡病菌的三重 PCR 分子检测[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2013(1): 10–15.
- [25] 程芳艳,李春光,刘永巍,等. 水稻抗瘟基因 Pi-b 与 Pi-5 的分子检测及外引抗源的利用评价[J]. 核农学报, 2016, 30(1): 11–18.
- [26] 魏巍,赵冬梅,张岱,等. 马铃薯干腐病优势病原菌 *Fusarium sambucinum* 分子检测技术的建立[J]. 植物保护, 2017, 43(4):

- [6] 于晓飞,孟泽洪,杨茂发,等. 贵州及南方其他部分省区茶树小绿叶蝉种类调查与考订[J]. 应用昆虫学报, 2015, 52(5): 1277–1287.
- [7] 戴轩. 贵州茶树害虫种类及地理分布的研究[J]. 贵州茶叶, 2010(2): 21–35.
- [8] 周宁宁,刘卫平,韩宝瑜. 金华地区茶园病虫及其天敌考查[J]. 茶叶科学技术, 2011(2): 24–29.
- [9] 赵丰华,任红楼,蒋双丰,等. 信阳茶树病虫害种类调查及防控探讨[J]. 中国茶叶, 2012(10): 15–19.
- [10] MATSUMURA S. Die Cicadinen Japans II [J]. Annotationes Zoologicae Japonenses, 1912, 8(1): 15–51.
- [11] HAYASHI M, MACHIDA K. A revision of the Japanese species of the Penthimiinae (Homoptera, Cicadellidae) [J]. Japanese Journal of Systematic Entomology, 1996, 2(1): 55–73.
- [12] 王俊. 河南省叶蝉分类与区系研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2004.
- [13] 陈宗懋,杨亚军. 中国茶叶词典[M]. 上海: 上海文化出版社, 2013: 171.
- [14] 葛钟麟. 茶树叶蝉一新种(同翅目: 叶蝉总科) [J]. 昆虫学报, 1991, 34(2): 206–207.
- [15] 孙强. 中国乌叶蝉亚科系统分类研究(半翅目: 叶蝉科) [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2004.
- [16] FU X, ZHANG Y L. Description of two new species and a new combination for the leafhopper genus *Reticuluma* (Hemiptera: Cicadellidae: Deltocephalinae: Penthimiini) from China [J]. Zootaxa, 2015, 3931(2): 253–260.
- [17] 乔利,张丽,秦道正,等. 小贯小绿叶蝉成虫触角感器及网粒体的超微形态[J]. 西北农业学报, 2016, 25(3): 471–476.
- [18] RAKITOV R A. What are brochosomes for? An enigma of leafhoppers (Hemiptera, Cicadellidae) [J]. Denisia, 2002(4): 411–432.
- [19] 吕召云,杨茂发,孟泽洪. 叶蝉刺体的研究进展[J]. 贵州农业科学, 2011, 39(1): 142–147.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 129 页)

- 115–119.
- [27] 高利利,孙国珍,王勇,等. 天津地区番茄褪绿病毒的分子检测和鉴定[J]. 华北农学报, 2015, 30(3): 211–215.
- [28] 杨洪一,张志宏,杜国栋,等. 利用内标为基础的 RT-PCR 技术检测草莓斑驳病毒[J]. 植物病理学报, 2005, 35(2): 116–122.
- [29] 程云方,余知和. 基于曲霉属同源性分析的烟曲霉分子标记筛选[C]//2012 年中国菌物学会学术年会, 2012.
- [30] 李晓红,陈世义,付爱华,等. 聚合酶链反应技术检测申克孢子丝菌的实验研究[J]. 中国皮肤性病杂志, 2006(4): 209–210.

(责任编辑: 杨明丽)