九叶青花椒根结线虫病的病原鉴定

曹业凡1, 汪来发1*, 王曦茁1, 徐志伦2, 李 央2, 姚 玲3

(1. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所,国家林业局森林保护学重点实验室,北京 100091; 2. 四川省蓬溪县林业局,蓬溪 629100; 3. 四川省遂宁市林业局,遂宁 629000)

摘要 为确定四川省蓬溪县九叶青花椒种植区发病植株花椒根结线虫的种类,进而为九叶青花椒根结线虫病防治提供依据,本文根据根结线虫雌虫与 2 龄幼虫的形态特征及雌成虫的会阴花纹、雌虫酯酶同工酶图谱,并结合特异性扩增及 rDNA-ITS 扩增,根据 ITS 序列构建系统发育树,对该地区九叶青花椒根结线虫病的病原进行了种类鉴定。结果表明该病原为南方根结线虫 Meloidogyne incognita (Kofold & White) Chitwood。这是我国首次在九叶青花椒上发现南方根结线虫。

关键词 九叶青花椒; 南方根结线虫; rDNA-ITS

中图分类号: S 435.73, S 432.45 文献标识码: A **DOI**: 10.16688/j.zwbh.2018402

Identification of root-knot nematode on Zanthoxylum armatum var. novemfolius

CAO Yefan¹, WANG Laifa¹, WANG Xizhuo¹, XU Zhilun², LI Yang², YAO Ling³

(1. Key Laboratory of Forest Protection of State Forestry Administration, Research Institute of Forest Ecology,
Environment and Protection, CAF, Beijing 100091, China; 2. Forestry Bureau of Pengxi County, Sichuan Province,
Pengxi 629100, China; 3. Forestry Bureau of Suining, Sichuan Province, Suining 629000, China)

Abstract In order to confirm the species of root-knot nematode on Zanthoxylum armatum var. novemfolius in Pengxi County, Sichuan province and provide the reference for prevention and controlling with root-knot disease, the nematode was identified by morphological observation, biochemical observation, specific amplification and rDNA-ITS sequence analysis. The results showed that the root-knot nematode on Z. armatum var. novemfolius was Meloidogyne incognita (Kofold & White) Chitwood. This is the first report of M. incognita on Z. armatum var. novemfolius in China.

Key words Zanthoxylum armatum var. novemfolius; Meloidogyne incognita; rDNA-ITS

九叶青花椒 Zanthoxylum armatum DC. var. novem folius Hong Ping Deng 隶属芸香科 Rutaceae 花椒属 Zanthoxylum,为竹叶花椒 Z. armatum 一变种。九叶青花椒起源于重庆江津区,目前在重庆、四川及贵州等省市有广泛栽培[1]。九叶青花椒与其他花椒种类 Zanthoxylum spp. 相比,具有花序多、花期较早,果实产量大、品质好等优势[2],因此成为当地主要经济作物,并逐渐成为四川、重庆等省区退耕还林的首选树种[3]。随着九叶青花椒种植的集约化与树龄的增长,各大九叶青花椒产区的花椒病虫害开始暴发,如锈病、黑胫病、流胶病、煤污病

等[4-5]。近几年来,在四川省遂宁市蓬溪县及周边地区,发现九叶青花椒感染根结线虫,致使九叶青花椒生长不良,产量下降,感病严重的地块,20%~30%的九叶青花椒树死亡。为鉴定四川蓬溪县九叶青花椒根结线虫病害病原,2016年5月至8月间,对蓬溪县宝梵镇和新星乡等乡镇的九叶青花椒产地进行病害调查,并采集发病严重的九叶青花椒上的根结线虫样品带回室内进行纯化培养,结合形态学特征、生物化学特征与分子生物学特征进行分析和鉴定,以期为九叶青花椒根结线虫病害的综合防治奠定基础。

收稿日期: 2018-09-17 **修订日期:** 2018-10-23

基金项目: 林业科学技术推广项目([2016]09);国家微生物资源平台(NIMR-2018-7)

^{*} 通信作者 E-mail:nema@caf. ac. cn

1 材料与方法

1.1 样本采集与病害调查

在四川省宝梵镇和新星乡九叶青花椒种植区采集感病花椒样品,使用随机取样法,对感病植株根部及其周围的病土进行采取,取样深度为表层土 10~30 cm,各样地随机设置 5 个采样点,完成采样后将样品混匀放入同一个采集袋内并标记样品。将采集的标样带回实验室,在显微镜下挑取单卵块。将易感病品种'918 粉红'种植于灭菌培养土中,待长出两片真叶时,将卵块接种于培养土中,培养 60 d 后进行病原鉴定^[6]。

1.2 花椒根结线虫的获得

雌虫的分离与收集:经单卵块接种后的番茄苗培养60 d后,取感染线虫的番茄根用清水洗净,在体视显微镜下用镊子或解剖针针尖将根结表皮轻轻挑开,剖面出现的乳白色的光滑梨形物即为根结线虫的雌虫,用解剖针轻轻拨出,放入水中待用。

2龄幼虫的收集:室内单卵块繁殖 60 d后,将番茄病根带回室内清洗并剪成 1~3 cm 的小段,将根段装入 500 mL 三角瓶中后倒入 300 mL 的 1%次氯酸钠溶液,封口后猛摇 3 min,立即用蒸馏水冲洗数次,先后过 200 目和 500 目筛,用蒸馏水反复冲洗留在 500 目筛子上的卵,最后用无菌水冲洗收集于无菌的小烧杯中。将上述卵放于 26℃ 无菌培养箱中孵化 3 d,得到根结线虫的 2龄幼虫^[5]。

1.3 形态学鉴定

观察头部特征、口针特征等。测量 20 条线虫体长、最大体宽、口针长和 DEGO(背食道腺开口至口针基部球的距离)等形态指标。

雌成虫会阴花纹的制作与观察:参照王曦茁等^[7]的方法,在体视显微镜下解剖根结线虫的成熟雌虫,将雌虫移入硬塑料板上的一滴体积分数 45%乳酸中,用解剖刀切取尾端(虫体后部约 1/4 处),将尾端的体内组织去掉,切除尾端表皮多余的部分,仅留下会阴花纹部分。将会阴花纹转移至一块载玻片上的纯甘油滴中,一个玻片上放 10 块会阴花纹,以AFG 液为浮载剂,用树脂封片,制成永久玻片。在显微镜下观察会阴花纹的形态特征并拍照。

1.4 同工酶鉴定

参照文献^[8-9],通过垂直板聚丙烯凝胶电泳做酯酶分析。首先配制浸提液(20%蔗糖+2%TritonX-100)、1 mol/L Tris-HCl pH 8.9 缓冲液、1 mol/L

Tris-HCl pH 8. 3 缓冲液、1 mol/L Tris-HCl pH 6. 8 缓冲液、1%过硫酸铵溶液、0. 2%溴酚蓝。用移液器吸取 5 μ L 浸提液至离心管中,将成熟雌虫转人管内,用研磨锥充分研磨,补加 10 μ L 浸提液浸提酯酶同工酶。聚丙烯酰胺浓度分别为 3%和 7%。板大小为 150 mm×120 mm,凝胶厚度 1. 5 mm,电极缓冲液为 1 mol/L pH 8. 3 Tris-HCl 缓冲液。每孔加样量为 20 μ L(含浓度为 1 mg/mL 溴酚蓝溶液),电泳前 30 min 电压设为 80 V,之后在 190 V 下电泳 2 h,直到溴酚蓝指示条带迁移距离达到 10 cm。电泳结束后进行染色,显色完全后用蒸馏水漂洗 3 次,之后在固定液(10%醋酸+10%甘油)中固定 3 h以上,酯酶表型的命名参照文献[9],以室内培育已鉴定的南方根结线虫 $Meloidogyne\ incognita\ 样本作为参照系判读酯酶谱型,初步确定根结线虫的种类。$

1.5 分子生物学鉴定

1.5.1 DNA 提取

根结线虫的 DNA 提取方法参照磁珠法基因组提取试剂盒(天根)说明书并稍作优化。对花椒病根进行解剖,挑取根结线虫成熟雌虫,将根结线虫雌虫置于离心管并与研磨锥一同放入液氮中预冷后,用研磨锥研磨样品,加入 20 μL 蛋白酶 K,经水浴裂解 30 min 后,加入 350 μL 异丙醇,振荡混匀后加入 30 μL 磁珠悬浮液,振荡混匀后静置 3 min,反复 3 次;将离心管置于磁力架上,静置。待磁珠完全吸附后,吸弃液体;加入 700 μL 缓冲液,振荡混匀,吸弃液体;加入 700 μL 漂洗液,振荡混匀后置于磁力架上静置,吸弃液体后,将离心管置于室温晾干;将离心管取下并加入 200 μL洗脱缓冲液并振荡混匀,56℃水浴 10 min。之后将离心管置于磁力架上静置 2 min,待磁珠完全吸附后,吸取 DNA 溶液并置于新离心管内,之后将 DNA 产物保存至一20℃备用。

1.5.2 PCR 扩增

采用根结线虫 ITS 扩增通用引物^[10]以及南方根结线虫特异性引物^[11]进行 PCR 扩增。ITS 片段扩增引物名称分别为 F195:5'-TCC TCC GCT AAA TGA TAT G-3'和 V5367:5'-TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT-3',特异性扩增引物名称分别为: MiSF:5'-GGG CAA GTA AGG ATG CTC TG-3'和 MiSD:5'-GCA CCT CTT TCA TAG CCA CG-3'。 PCR 扩增采用 25 μL 反应体系:12.5 μL 2×FastLong Taq PCR MsaterMix, 1 μL 上游引物(10 μmol/L),

1 μ L下游引物(10 μ mol/L),1 μ L DNA,9. 5 μ L ddH₂O。PCR 反应条件为:95℃预变性 3 min;94℃ 变性 15 s,60℃退火 15 s,72℃延伸 20 s,反应共 35 个循环;最后 72℃延伸 10 min。4℃保存备用。PCR 产物采用 1.5%的琼脂糖凝胶 110 V 电泳 30 min 进行检测,用 1×TAE 作为电泳缓冲液,并在紫外灯下观测照相。

1.5.3 产物克降与测序

将纯化后的 ITS-PCR 产物克隆至质粒载体 pMD18-T(TaKaRa)上,选取每种群各 5 个阳性克隆由擎科公司测序。利用 NCBI 中的 BLAST 工具和 DNAMAN 9.0 软件,将获得的 rDNA-ITS 区序列与 GenBank 已登录的根结线虫序列进行比对分析。利用 MEGA 6.0 软件通过邻接法(neighbor-joining)构建系统发育树,采用 Maximum Composite Likelihood模型。同时对构建的系统树作自展检验(bootstrap test)以获得分支的支持率,自展检验中重复抽样次数为 1 000 次,以秀丽隐杆线虫 Caenorhabditis elegans (X03680)的 ITS 序列作为外群。

2 结果与分析

2.1 九叶青花椒根结线虫病症状

九叶青花椒感染根结线虫后,植株矮小,叶片发黄、失绿,生长缓慢,感病严重的地块,20%~30%的九叶青花椒树死亡。九叶青花椒感病后其主根及根尖处开始膨大,并慢慢形成白色米粒状根结,随后侧根根部也出现膨大现象,并形成不规则白色米粒状根结,随着病情加重,根结逐渐膨大,颜色由白色变为

黄色,当根部腐烂坏死时根结变成黑色,其根结主要分布在 10~30 cm 土层。剖开米粒状根结可见白色 梨形雌虫,说明九叶青花椒树已感染根结线虫。

2.2 根结线虫形态学鉴定结果

雌虫:体白色,梨形,颈短,头区有不完整的环纹,口针纤细,口针基球呈扁圆形,同杆部的界线明显;口针锥部向背部明显弯曲,杆部末端较宽。

2龄幼虫:虫体呈线形,蠕虫状;头冠前端平宽, 头部无突出与缢缩,有不完整环纹;口针纤细,锥部 与杆部中等宽,基部缢缩且向后倾斜;尾有透明区。

会阴花纹:背弓高,呈方形,由平滑到波浪形的 线纹组成。线纹在侧面分叉,侧线不明显,线纹弯向 阴门,尾端区无刻点(图1)。

雌虫与 2 龄幼虫部分体长测量值如表 1,参考 文献[12-14],初步确定九叶青花椒根结线虫为南 方根结线虫 *M. incognita*。

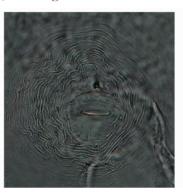


图 1 九叶青花椒根结线虫雌虫会阴花纹

Fig. 1 The perineal pattern of the root-knot nematode on Zanthoxylum armatum var. novem folius

表 1 九叶青花椒根结线虫雌虫和 2 龄幼虫部分形态特征测量值

Table 1 Measurement of females and second-stage juveniles of the root-knot nematode on Zanthoxylum armatum var. novemfolius

虫态	体长/µm	体宽/μm	口针长/µm	背食道腺口距	尾长/µm
Stage	Body length	Body width	Stylet length	DEGO	Tail length
雌虫	586. 7	345. 2	16.7	3. 1	_
Female (n=20)	(490. 8~708. 7)	(313. 5~410. 7)	(16.2~17.3)	(2. 9~3. 7)	
2 龄幼虫	407. 6	14. 3	10.7	2.8	52. 7 $(44.6 \sim 53.1)$
Second-stage juvenile (n=20)	(348. 7~461. 6)	(14. 5~16. 4)	(9.5~11.8)	(2.2~3.1)	

2.3 酯酶同工酶酶谱

将分离纯化的根结线虫种群进行同工酶分析, 电泳结果如图 2,该种群根结线虫雌成虫的酯酶同 工酶谱均出现一条酯酶带,酯酶谱带类型为 I1,相对 迁移率为 0.47,与南方根结线虫相同,因此确定该 根结线虫为南方根结线虫。

2.4 分子生物学特征

根据琼脂糖凝胶电泳检测 ITS-PCR 产物与特异性引物扩增产物的结果,表明九叶青花椒根结线虫样本的 rDNA-ITS 片段大小为 700 bp 左右(图 3),特异性扩增产物大小为 500 bp 左右(图 4),其 ITS 片段以及特异性扩增片段同南方根结线虫的产物片段

长度基本一致。将ITS-PCR产物所挑取的阳性克隆 送至公司测序,通过 DNAMAN 9.0 拼接得到 695 bp 的 ITS 序列。将该序列上传至 GenBank 上进行 BLAST,结果表明,获得的扩增产物 ITS 区域序列 与已知南方根结线虫 ITS 区域序列的相似性达到 99%。用 MEGA 6.0 软件构建系统发育树(图 5)。 从系统发育树来看,5个九叶青花椒根结线虫的 ITS 序列与南方根结线虫的遗传距离最近,支持率为 97%,而与其他根结线虫的遗传距离相对较远。结 合其 ITS 系统发育树以及特异性扩增产物,参照文 献[10-11]并进行条带比较,说明在四川省发生的九叶 青花椒根结线虫病的病原为南方根结线虫。

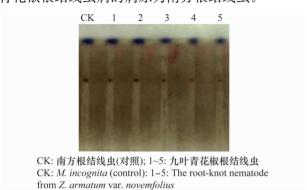
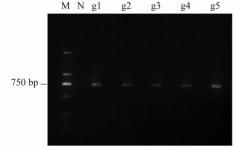


图 2 九叶青花椒根结线虫酯酶电泳谱型 Fig. 2 Phenotype of esterase isozyme (Est) from the root-knot nematode on Zanthoxylum armatum

var. novem folius



M: DNA Marker DL2000; g1~g5: 根结线虫样本编号; N: 阴性对照。下同M: DNA Marker DL 2000; g1~g5: No. of root-knot nematode; N: Negative control. The same below

图 3 ITS-PCR 片段扩增电泳图

Fig. 3 PCR amplification of ITS of root-knot nematodes on Zanthoxylum armatum var. novemfolius

3 结论与讨论

磁珠法提取 DNA 适用于微量材料 DNA 提取, 提取的 DNA 纯度高,浓度高,不含抑制剂,提取过 程中无需过柱与离心,可有效避免提取微量材料的 DNA 时出现 DNA 损失,目前主要用于植物与动物

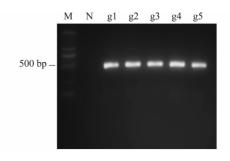
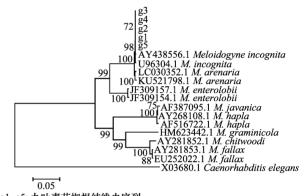


图 4 特异性引物扩增九叶青花椒根结线虫 DNA Fig. 4 PCR amplification with MiSF/MiSD from DNA of Zanthoxylum armatum var. novem folius



g1~g5: 九叶青花椒根结线虫序列 g1-g5: The sequence of the root-knot nematode on Zanthoxylum armatum var. novemfolius

图 5 不同种类根结线虫 ITS 区序列构建的系统进化树 Fig. 5 The phylogenetic tree of *Meloidogyne* spp. from GenBank based on their ITS sequences

DNA 提取,广泛应用于法医学、分子生物学等领 域[15-16]。目前国内尚未报道磁珠法用于提取线虫 DNA,常规根结线虫的 DNA 提取方法主要通过裂 解冻融法[17],本文首次利用磁珠法成功提取根结线 虫 DNA。通过对根结线虫 rDNA-ITS 区域序列进 行 PCR 扩增、克隆测序与比对,可有效鉴定根结线 虫种类[18-20]。从九叶青花椒根部分离的线虫经 rD-NA-ITS 片段比对以及特异性条带扩增鉴定为南方 根结线虫 M. incognita。本研究通过对九叶青花椒 根结线虫进行雌虫和2龄幼虫的形态学鉴定和成熟 雌虫的会阴花纹鉴定,以及雌虫酯酶同工酶分析和 rDNA-ITS 序列系统发育树的构建,结合特异性扩 增条带,结果表明侵染九叶青花椒的根结线虫为南 方根结线虫 M. incognita。本试验在鉴定病原过程 中,通过综合形态学、分子生物学、生物化学等鉴定 方法,有效避免因鉴定方法单一而产生误差,做到准 确、有效的分类[21]。这是我国首次报道由南方根结线 虫 M. incognita 引起九叶青花椒根结线虫病害。

九叶青花椒属于多年生树种,3~4年进入盛产期,挂果期可延续至15年以上,生长寿命长达20~30年,故与常规农作物的根结线虫病害防治工作相比,根结线虫病害的防治工作具有长期性与持续性的特点,因此需结合不同地理条件与九叶青花椒生长期采取相应措施。

在进行育苗工作时,最好在无病区育苗,如若在发病区,可在育苗时进行育苗土预处理,可用石灰粉与表层土、腐熟有机肥进行搅拌混均,通过曝晒减少初侵染源。移栽幼苗时,注意检查根部有无根结,选择无病苗造林,同时在选择造林地时最好不要选择有根结线虫的地块。一旦发现病株,立刻就地销毁,防止病情扩散。如若有根结线虫,可对种植穴施用噻唑膦等杀线虫剂进行土壤消毒。对已感染根结线虫病的九叶青花椒林地,可通过使用生防真菌与生防细菌进行生物防治,减少土壤中根结线虫数量[22-24],并施用土壤修复剂,如碳酸氧氨与生石灰等碱性肥料,改善土壤条件,增加根际土壤有益微生物的数量以及植物根系的活力,从而达到有效防治根结线虫病的目的。

参考文献

- [1] 徐洁. 竹叶花椒起源及遗传多样性研究[D]. 重庆: 西南大学,2007.
- [2] 罗太海. 九叶青花椒发展前景及其高效种植技术[J]. 安徽农学通报,2014,20(14);46.
- [3] 凌波. 自贡市大安区九叶青花椒产业发展研究[D]. 雅安:四川 农业大学,2011.
- [4] 周庆椿,薛有锋. 九叶青花椒栽培技术和病虫害防治[J]. 植物 医生,2009(4);26-27.
- [5] 孙林. 九叶青花椒的主要病虫害及防治措施[J]. 农民致富之 友,2017(17):171.
- [6] 毛琦. 陕西省温室蔬菜根结线虫的种类鉴定[D]. 杨凌: 西北农 林科技大学, 2007.
- [7] 王曦茁,汪来发,杨佐忠,等.四川省茂县花椒根结线虫病病原 鉴定[J].植物保护,2014,40(4):84-88.
- [8] 胡凯基. 酯酶在根结线虫分类上应用的研究[J]. 林业科学研究,1988(6):650-656.
- [9] ESBENSHADE P R, TRIANTAPHYLLOU A C. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species [J].

- Journal of Nematology, 1985, 17(1):6-20.
- [10] HARRIS T S,SANDALL L J,POWERS T O. Identification of single *Meloidogyne* juveniles by polymerase chain reaction amplification of mitochondrial DNA[J]. Journal of Nematology, 1990,22(4):518 - 524.
- [11] TESAŘOVÁ B, ZOUHAR M, RYŠÁNEK P, et al. Development of PCR for specific determination of root-knot nematode Meloidogyne incognita [J]. Plant Protect Science, 2003, 39 (1):23-28.
- [12] 艾森拜克 J D,赫什曼 H,萨塞 J N,等. 四种最常见根结线虫分类指南[M]. 昆明:云南人民出版社,1986:17-28.
- [13] 谢辉. 植物线虫分类学[M]. 第 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2005; 243 247.
- [14] 泰勒 A L, 萨塞 J N. 植物根结线虫[M]. 北京: 科学出版社, 1983; 67-121,
- [15] CALDARELLI S R, VAGO L, BONETTO S, et al. Use of magnetic bead for tissue DNA extraction and IS6110 Mycobacterium tuberculosis PCR[J]. Journal of Clinical Pathology, 1999, 52;158 163.
- [16] MONTPETIT S A, FITCH I T, O'DONNELL P T. A simple automated instrument for DNA extraction in forensic casework [J]. Journal of Forensic Sciences, 2005, 50(3):555 563.
- [17] ADAM M A M, PHILLIPS M S, BLOK V C. Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidog yne spp.*) [J]. Plant Pathology, 2007, 56(1):190 197.
- [18] 苏圣淞,周国英,李河. 土沉香根结线虫病的病原鉴定[J]. 植物保护,2017,43(4):185-189.
- [19] 杜蕙,溱永红,吕和平,等. 甘肃省保护地蔬菜根结线虫种类鉴定及其 rDNA-ITS 序列分析[J]. 植物保护,2013,39(1):93-96.
- [20] WANG Xizhuo, WANG Laifa, PIAO Chungen, et al. First report of root-knot nematodes (*Meloidogyne arenaria*) on Angelica dahurica, in China [J]. Journal of Phytopathology, 2013,161(6):426-429.
- [21] 赵鸿,彭德良,朱建兰. rDNA-ITS-PCR 技术在植物寄生线虫分子诊断中的应用「J]. 植物检疫,2004,18(2):100-105.
- [22] 王曦茁,汪来发,孟繁丽,等.淡紫拟青霉航天诱变菌株对南方根结线虫的致病力[J].林业科学研究,2016,29(2);216-220.
- [23] 董炜博,石延茂,迟玉成,等. 穿刺巴氏杆菌防治植物根结线虫病的研究现状及其应用前景[J]. 中国生物防治,1999,15(2): 89-93.
- [24] 刘志明,余玉冰,秦碧霞,等. 根结线虫幼虫致病细菌的筛选 [J]. 中国生物防治,2000,16(3):142.

(责任编辑:杨明丽)