

大庆温室黄瓜根结线虫病原鉴定

姬妍茹, 肖湘*, 张正海, 李国巍, 董艳, 杨庆丽, 高宇, 聂迪, 石杰 (黑龙江省科学院大庆分院, 黑龙江大庆 163319)

摘要 [目的]明确大庆温室黄瓜根结线虫的种类,为黄瓜根结线虫病的防治提供理论依据。[方法]从大庆市让湖路温室采集感染根结线虫的黄瓜根部和根际土壤,分别采用直接剥离法和贝尔曼法分离获得线虫卵囊和雄虫,并由卵囊孵化培养得2龄幼虫,采用显微形态观察结合分子生物学方法对其进行鉴定。[结果]形态学观察表明采集的样本线虫与象耳豆根结线虫(*Meloidogyne enterolobii*)特征基本相符;rDNA-ITS序列分析表明,与GenBank中象耳豆根结线虫的序列相似度为98%~100%,采用邻接法构建系统发育树,大庆根结线虫M229、M230和M231与登录号为KF418368.1和JF309154.1等5个象耳豆根结线虫(*Meloidogyne enterolobii*)处于同一分类地位。[结论]从大庆让湖路温室采集的黄瓜根结线虫为象耳豆根结线虫。

关键词 象耳豆根结线虫;黄瓜;大庆;鉴定;PCR检测

中图分类号 S432.4 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2022)01-0144-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2022.01.038



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Pathogenic Identification of Cucumber Root-knot Nematodes in Daqing Greenhouse

JI Yan-ru, XIAO Xiang, ZHANG Zheng-hai et al (Daqing Branch of Heilongjiang Academy of Sciences, Daqing, Heilongjiang 163319)

Abstract [Objective] To identify the species of cucumber root-knot nematode in Daqing greenhouse and provide theoretical basis for the prophylaxis and treatment of cucumber root-knot nematodosis. [Method] The eggs and males of the nematodes were isolated from cucumber roots and rhizosphere soil infected with root-knot nematodes in the greenhouse of Ranghulu District, Daqing City. The eggs and males were isolated by direct stripping and Belman method, the second instar larvae were incubated by egg, and identified by micromorphological observation combined with molecular biological method. [Result] Morphological observation showed that the characteristics of the collected nematodes were basically consistent with that of *Meloidogyne enterolobii*. RDNA-ITS sequence analysis indicated that the sequence similarity with GenBank was 98%-100%. The phylogenetic tree was constructed by neighbor joining method and the Daqing root-knot nematode M229, M230 and M231 were in the same taxonomic position with 5 kinds of *Meloidogyne enterolobii* (accession No. KF418368.1, JF309154.1 et al). [Conclusion] The cucumber root knot nematode collected from the greenhouse of Ranghulu District in Daqing is elephant eared bean root knot nematode.

Key words *Meloidogyne enterolobii*; Cucumber; Daqing; Identification; PCR test

黄瓜(*Cucumis sativus* Linn.)是一年生草本植物,最初发现于喜马拉雅山脉的热带地区,后在很多国家种植。截至2003年,全世界黄瓜种植面积超过200万hm²,我国超过125万hm²,居世界黄瓜栽培之首^[1],设施黄瓜栽培面积占国内黄瓜总面积的近50%^[2]。设施栽培的优势在于既能为消费者提供反季蔬菜,还增加了菜农收入,已成为当前黄瓜的主要栽培方式。但由于设施栽培存在同类蔬菜连作和温室内湿度过高等问题,病害发生比大田更为严重,根结线虫病是设施蔬菜生产中的主要病害,一般可减产30%~50%^[3-5]。目前我国已发现根结线虫40多种^[6],为害蔬菜的主要有南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*)、花生根结线虫(*Meloidogyne arenaria*)、北方根结线虫(*Meloidogyne hapla*)、爪哇根结线虫(*Meloidogyne javanica*)和象耳豆根结线虫(*Meloidogyne enterolobii*)^[7-9]。

象耳豆根结线虫最早在我国海南儋州的象耳豆树上发现,于1983年被鉴定命名^[10]。该种的根结线虫致病力极强,可为害多种农作物,是热带及亚热带地区最具有威胁性的主要病原微生物^[11-13],我国南方的胡萝卜、生姜、辣椒和空心菜上曾有过象耳豆根结线虫的发生和为害^[14-17]。东北地区的黄瓜、番茄、茄子和辣椒的根结线虫病原以南方根结线虫为主,其次为北方根结线虫,在大庆大同区大棚的发病黄瓜、番

茄和茄子上鉴定出的致病病原都为南方根结线虫^[6],还未发现象耳豆根结线虫为害温室蔬菜的报道。笔者从大庆让湖路温室采集感染根结线虫的黄瓜植株和根际土壤,采用显微形态观察结合分子生物学方法对其进行鉴定,明确黄瓜根结线虫的种类,以期为黄瓜根结线虫病的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂 Ezup柱式真菌基因组DNA抽提试剂盒,上海生工SK8259; DreamTaq-TM DNA Polymerase MBI EP0702 dNTP,上海生工D0056; 琼脂糖 BBI AB0014; SanPrep柱式DNAJ胶回收试剂盒,上海生工SK8131; DNA Ladder Mix maker,上海生工SM0337; pMD 18-T Vector连接试剂盒 TaKaRa D101A; SanPrep柱式质粒DNA小量抽提试剂盒,上海生工SK8191;其他化学试剂均用分析纯。

1.2 仪器与设备 BBI HC-2518R型冷冻高速离心机(郑州南北仪器设备有限公司); JY04S-3C型凝胶成像系统,北京君意东方电泳设备有限公司; DYY-5型电泳仪,北京六一仪器厂; GENEPRO型基因扩增仪,上海京工实业有限公司; BK-5000型生物显微镜,重庆奥特光学仪器有限公司; PXS5-B体视解剖镜,北京测维光电仪器厂。

1.3 样本采集 发病黄瓜的根部及根部周围病土,于2020年5月采自大庆市让湖路宏伟二队温室。

1.4 形态鉴定 雌虫从发病黄瓜根组织上解剖获得;雄虫通过贝尔曼漏斗法从染病黄瓜根际土壤分离获得;2龄幼虫由黄瓜发病根部的卵囊孵化获得。线虫的处死和会阴花纹

基金项目 大庆市指导性科技计划项目(zd-2020-77)。

作者简介 姬妍茹(1971—),女,黑龙江大庆人,高级农艺师,硕士,从事生物技术研究。*通信作者,实验师,从事生物技术研究。

收稿日期 2021-04-17

的制作参照张绍升^[18]的方法。

1.5 分子生物学鉴定

1.5.1 DNA 提取。黄瓜根结线虫 DNA 提取参照万新龙等^[19]的研究方法,从发病的黄瓜根结挑取线虫卵囊 3 个,分别放入盛有 10 μL 灭菌重蒸水的 PCR 管中,并用解剖针将其刺破。加入 8 μL 预冷的 WLB (蠕虫裂解液)和 2 μL 蛋白酶 K (1 mg/mL),13 200 r/min 离心 0.5 min。迅速放入 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中至少 10 min。然后分别在 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下温育 1.5 h, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下灭活 10 min,13 200 r/min 下离心 1 min,吸取上层 DNA 清液于 PCR 管中, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.5.2 rDNA-ITS 序列分析。用线虫 ITS 扩增的通用引物 V5367:5'-TTGAT-TACGTCCCTGCCCTTT-3' 和 26S:5'-TTTCACTCGCCGTTACTAAGG-3' 进行 PCR 扩增,引物由上海生工合成。50 μL 反应体系:10 \times PCR Buffer (Mg²⁺ Plus) 5 μL ,dNTP Mixture 4 μL ,Taq 酶 (5 U/ μL) 0.4 μL ,引物 26S (20 $\mu\text{mol/L}$) 1.5 μL ,引物 V5367 (20 $\mu\text{mol/L}$) 1.5 μL ,模板

DNA 5 μL ,加 ddH₂O 至 50 μL 。反应条件: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 1.5 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,循环 35 次;最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。PCR 产物采用 1% 的琼脂糖凝胶 110 V 电泳 30 min 进行检测,用 0.5 \times TAE 作为电泳缓冲液,并在紫外灯下观测照相。PCR 产物回收纯化后送至上海生工进行测序。将获得的 rDNA-ITS 区序列与 GenBank 数据库中常见根结线虫序列进行 Blast 比对分析,并通过 MEGA 5 软件采用邻接法构建系统发育树,评估根结线虫样本的生物学地位。

2 结果与分析

2.1 黄瓜根结线虫病害症状 黄瓜感染根结线虫后,初时症状表现不明显,随着病程加重,表现为植株矮小,果实小而少,叶片褪绿发黄,萎蔫甚至枯死。受害根系出现膨大的根结,呈近圆形。一条根上出现形状不定、大小不一、表面粗糙的念珠状根结。根结初期为白色,表面光滑,后转为褐色至黑色(图 1),严重时腐烂。



图 1 黄瓜根结线虫发病症状

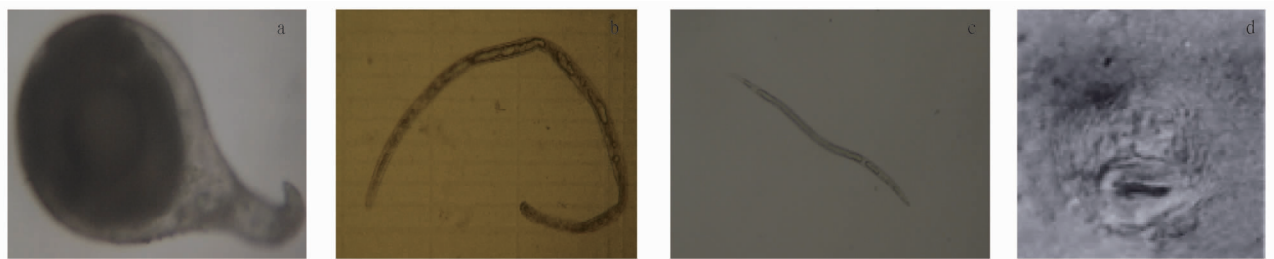
Fig.1 Symptoms of root-knot nematode disease on cucumber

2.2 形态学特征 雌虫:头尖,腹部膨大呈球形或梨形,乳白色。(0.45~1.60) mm \times (0.26~0.80) mm,口针长 12~15 μm ;会阴花纹圆形或椭圆形,线纹细且较为平滑,背弓高,呈近圆形或方形。

雄虫:蠕虫形,体较长,无色透明,(1.0~1.5) mm \times (0.03~0.04) mm,口针长 20~26 μm ,背食道腺开口在基部球后 2.2~2.8 μm 。

2 龄幼虫:蠕虫形,体细小,体长 0.36~0.39 mm。口针纤细,针锥与针杆等长,基部球小。

会阴花纹整体呈圆形至卵圆形,线纹较密且平滑,背弓较高,为方形或近圆形,无明显侧线(图 2)。与象耳豆根结线虫的会阴花纹描述基本吻合^[20],初步推断侵染黄瓜根结线虫种类为象耳豆根结线虫。



注:a,b,c,d 分别为雌虫、雄虫、2 龄幼虫和会阴花纹

Note:a,b,c and d are female,male,2nd instar larvae and perineal pattern,respectively

图 2 黄瓜根结线虫形态特征

Fig.2 Morphological characteristics of root-knot nematode on cucumber

2.3 黄瓜根结线虫 PCR 扩增及测序分析结果 利用通用引物 V5367/26S 对黄瓜根结线虫 3 个 DNA 样本的 rDNA-ITS 区片段进行扩增,得到的条带均为 859 bp(图 3),通过 GenBank 进行 BLAST 比对,结果表明黄瓜根结线虫与象耳豆根结线虫(*Meloidogyne enterolobii*)相似度为 98%~100%。利

用 MEGA 5 软件绘制系统发育树(图 4),由图 4 可知,3 个 DNA 样本与 5 个 *Meloidogyne enterolobii* 在同一支系上。由此可确定,该研究中所采集的样本为象耳豆根结线虫。

3 结论与讨论

该研究结合形态学和分子生物学方法,明确从大庆让湖

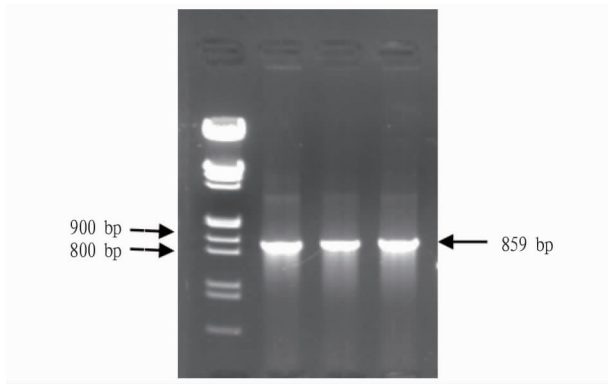


图3 18S rDNA PCR产物电泳图

Fig. 3 PCR electrophoresis results of 18S rDNA

路区温室采集的黄瓜根结线虫样本为象耳豆根结线虫,同时对其形态特征和为害黄瓜的症状进行了描述,为黄瓜根结线虫的防治提供理论依据。该研究是大庆黄瓜上发生象耳豆根结线虫的首次报道,该线虫致病力强,调查发现发病温室中85%以上的黄瓜植株矮小,叶片变黄,果实少而小,根系根结多,大多数黄瓜根部变黑腐烂,严重降低了黄瓜的产量和品质。以往大庆地区温室曾发现有南方根结线虫的为害^[6],没有发现象耳豆根结线虫的原因可能是样本采集分布区域覆盖面不够。该研究仅对大庆让湖区温室采集到的黄瓜根结线虫样本进行了初步鉴定,关于黄瓜根结线虫的发生规律、群体分布情况等还有待于深入研究,以期为大庆地区黄瓜根结线虫的防治提供更加充分的理论依据。

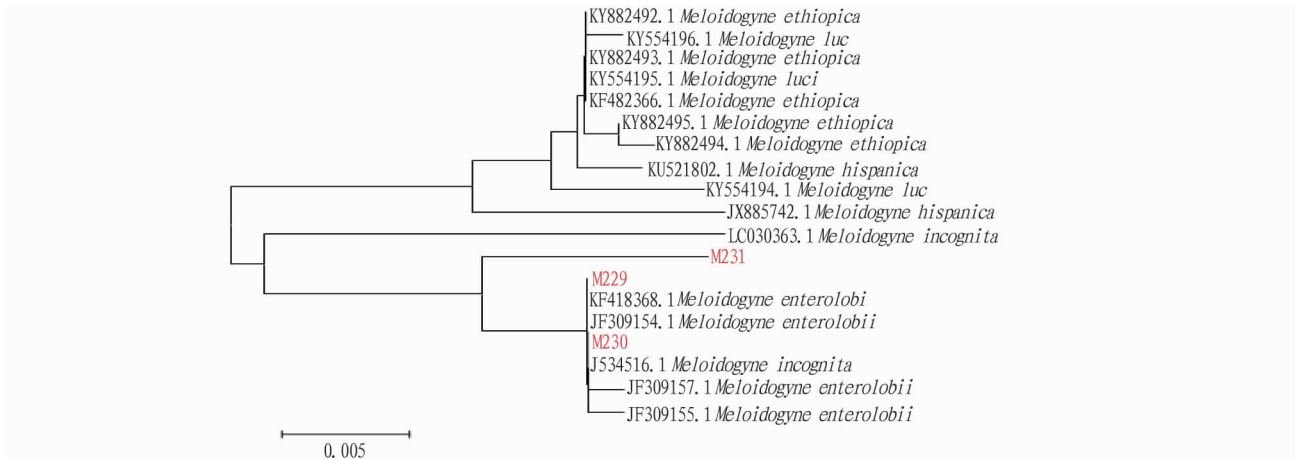


图4 ITS1-5.8S-ITS2 区序列系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of ITS1-5.8S-ITS2 region

参考文献

- [1] 屈倩倩. 陕西黄瓜主栽品种性状比较[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2020.
- [2] 余冰, 郑志华, 孔令云, 等. 加工黄瓜的标准化与质量控制[J]. 中国农学通报, 2007, 23(3): 109-112.
- [3] 曾立, 程万里, 余豪, 等. 多粘类芽孢杆菌 KM2501-1 发酵液对番茄根结线虫的防治效果[J]. 应用与环境生物学报, 2020, 26(5): 1046-1050.
- [4] 李瑞, 李惠霞, 谢丙炎, 等. 长枝木霉菌株 TL16 防治南方根结线虫的作用机理[J]. 植物保护学报, 2020, 47(2): 384-393.
- [5] 迟元凯, 叶梦迪, 赵伟, 等. 氟吡菌酰胺对南方根结线虫的作用效果[J]. 植物保护学报, 2019, 46(6): 1364-1370.
- [6] 官远福. 东北地区根结线虫的种类分布及南方根结线虫氯离子通道基因分析[D]. 沈阳:沈阳农业大学, 2020.
- [7] 张锋, 杨苗苗, 孙娟, 等. 陕西设施蔬菜根结线虫特异性分子检测[J]. 中国农学通报, 2014, 30(31): 136-140.
- [8] 赵传波, 郑小玲, 阮兆英, 等. 深圳市蔬菜基地根结线虫的种类和分布[J]. 华中农业大学学报, 2015, 34(2): 41-48.
- [9] 李克梅, 董艳秋, 曹雪松, 等. 新疆设施蔬菜根结线虫病发生调查及病原鉴定[J]. 植物保护, 2015, 41(6): 191-194, 204.
- [10] YANG B J, EISENBACK J D. *Meloidogyne enterolobii* n. sp. (Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing pacara ear-pod tree in China [J]. Journal of nematology, 1983, 15(3): 381-391.
- [11] AHMED M, VAN DE VOSSENBERG B T L H, CORNELISSE C, et al. On the species status of the root-knot nematode *Meloidogyne ulmi* Palmisano & Ambrogioni, 2000 (Nematoda, Meloidogynidae) [J]. ZooKeys, 2013, 362: 1-27.
- [12] 卓侃, 胡茂秀, 廖金铃, 等. 广东省和海南省象耳豆根结线虫的鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(2): 193-197.
- [13] 符美英, 芮凯, 肖彤斌, 等. 海南岛象耳豆根结线虫的种类鉴定及其 rDNA-ITS 序列分析[J]. 生物安全学报, 2012, 21(1): 79-84.
- [14] WANG Y F, XIAO S, HUANG Y K, et al. First report of *Meloidogyne enterolobii* on carrot in China [J]. Plant disease, 2014, 98(7): 1019-1019.
- [15] ZHOU X, CHENG X, XIAO S, et al. First report of *Meloidogyne enterolobii* on banana in China [J]. Plant disease, 2016, 100(4): 863-864.
- [16] XIAO S, HOU X Y, CHENG M, et al. First report of *Meloidogyne enterolobii* on ginger (*Zingiber officinale*) in China [J]. Plant disease, 2018, 102(3): 684.
- [17] 陈淑君, 肖顺, 程敏, 等. 福建省象耳豆根结线虫的鉴定及分子检测[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2017, 46(2): 141-146.
- [18] 张绍升. 植物线虫病诊断与治理[M]. 福州:福建科学技术出版社, 1999.
- [19] 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.
- [20] 刘晨, 陈志杰, 杨艺炜, 等. 陕西省首次发现象耳豆根结线虫危害洛南白菜[J]. 植物保护, 2020, 46(5): 156-159.