

练冬梅,赖正锋,姚运法,等. 不同地区黄秋葵根结线虫的 SCAR 鉴定及其防治[J]. 江苏农业科学,2021,49(3):95-98.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.03.016

不同地区黄秋葵根结线虫的 SCAR 鉴定及其防治

练冬梅,赖正锋,姚运法,林碧珍,洪建基

(福建省农业科学院亚热带农业研究所,福建漳州 363005)

摘要:根结线虫病是黄秋葵生产中的重要地下病害,危害黄秋葵植株的生长,降低其产量。采用序列特异性扩增区聚合酶链反应(SCAR-PCR)技术鉴定不同地区黄秋葵上根结线虫的种类,并通过4种不同措施防治黄秋葵根结线虫。结果表明,在福建省漳州市龙文区、福建省三明市永安市和福建省莆田市秀屿区,黄秋葵根结线虫的种类为南方根结线虫,10.2%阿维噻唑膦颗粒剂的防治效果最好,为今后黄秋葵根结线虫病的防治研究提供了理论参考。

关键词:黄秋葵;根结线虫;SCAR;防治

中图分类号:S436.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)03-0095-04

黄秋葵(*Abelmoschus esculentus* L.)属锦葵科(Malvaceae)秋葵属(*Abelmoschus*)^[1],别称秋葵(okra)、补肾草、咖啡葵等,为一年或多年生草本植物,原产于非洲,20世纪20年代初从印度引入我国,现在国内各地均有栽培。黄秋葵作为一种特色的保健型蔬菜,在广东、福建、山东等地区均有大规模种植^[2],在福建省不同地区,每年的黄秋葵种植

面积累计达到2 000 hm²,在福建建宁、泰宁和将乐等地区,黄秋葵品种洋辣、痴椒的种植历史已有百年之久^[3]。由于黄秋葵生产的规模化、设施化和连作化且绝大部分黄秋葵易受根结线虫侵染^[4],根结线虫病已经成为世界上黄秋葵分布最广、危害最大的植物寄生线虫之一,严重影响了黄秋葵的生长和产量^[5]。因此,黄秋葵根结线虫病防控技术的研究受到越来越多的关注,研究内容包括黄秋葵嫁接玫瑰茄砧木^[6]、筛选抗病品种^[4-5,7-8]等手段。本研究采用序列特异性扩增区聚合酶链反应(SCAR-PCR)快速检测技术鉴定黄秋葵根结线虫种类,并研究不同技术措施对黄秋葵根结线虫的防治效果,以期今后黄秋葵根结线虫病的防治研究提供理论参考。

收稿日期:2020-04-27

基金项目:福建省农业科学院对外合作项目(编号:DEC201902)。

作者简介:练冬梅(1987—),女,福建永安市,硕士,助理研究员,主要从事特色作物育种及综合利用研究。E-mail: woshildm1987@163.com。

通信作者:洪建基,研究员,主要从事特色作物育种及综合利用研究。E-mail: 76227508@qq.com。

早+晚双机播技术集成模式单位产量碳足迹为 $201.26 \times 10^{-3} \text{ kg}(\text{CO}_2 - \text{eq})/\text{kg}$;早+晚双抛技术集成模式单位产量碳足迹为 $211.90 \times 10^{-3} \text{ kg}(\text{CO}_2 - \text{eq})/\text{kg}$;早直播+晚抛轻简化模式单位产量碳足迹为 $317.22 \times 10^{-3} \text{ kg}(\text{CO}_2 - \text{eq})/\text{kg}$ 。

参考文献:

- [1] 薛建福,李慧,高志强,等. 基于生命周期法评价山西省2004—2013年小麦碳足迹动态及其构成解析[J]. 中国农业大学学报,2017,22(10):15-25.
- [2] Wiedmann T, Minx J. A definition of 'Carbon Footprint' [J]. Journal of the Royal Society of Medicine, 2009, 92(4): 193-195.
- [3] 陈儒,姜志德. 中国低碳农业发展绩效与政策评价[J]. 华南农业大学学报(社会科学版), 2017, 16(5): 28-40.

- [4] 邹晓霞,张巧,张晓军,等. 玉米花生宽幅间作碳足迹初探[J]. 花生学报, 2017, 46(2): 11-17.
- [5] 曹黎明,李茂柏,王新其,等. 基于生命周期评价的上海市水稻生产的碳足迹[J]. 生态学报, 2014, 34(2): 491-499.
- [6] 岳伟,阮新民,陈金华,等. 近50年安徽省双季稻安全生产期变化特征[J]. 长江流域资源与环境, 2019, 28(9): 2230-2238.
- [7] 陈中督,徐春春,纪龙,等. 2004—2014年南方稻区双季稻生产碳足迹动态及其构成[J]. 应用生态学报, 2018, 29(11): 3669-3676.
- [8] 黄晓敏,陈长青,陈铭洲,等. 2004—2013年东北三省主要粮食作物生产碳足迹[J]. 应用生态学报, 2016, 27(10): 3307-3315.
- [9] 姜振辉,杨旭,刘益珍,等. 春玉米—晚稻与早稻—晚稻种植模式碳足迹比较[J]. 生态学报, 2019, 39(21): 8091-8099.
- [10] 张林,冉光和,蓝震森. 碳排放约束与农业全要素生产率增长及分解[J]. 华南农业大学学报(社会科学版), 2015, 14(3): 22-32.

1 材料与方法

1.1 SCAR-PCR 鉴定

1.1.1 样品采集 于 2019 年 7 月分别采集福建省漳州市龙文区、三明市永安市、莆田市秀屿区黄秋葵生长后期的根样。采样方法以 5 点式为主,剪去植株地上部后将 5~10 株黄秋葵的根系放在 1 个塑料袋中作为根样。

1.1.2 线虫的分离 在解剖镜下直接用挑针挑出发病根样中的雌虫,用液氮处理后于-70℃冰箱中保存。

1.1.3 单条线虫 DNA 的提取 线虫 DNA 提取参考王江岭等的方法^[9]。将单条根结线虫雌虫放入含有 8 μL ddH₂O、1 μL 10×Ex Taq buffer (Mg²⁺ free) 的 200 μL PCR 管中,在液氮中冷冻 1 min 后,于 95℃处理 2 min,重复 3 次,向 PCR 管中加入

1 μL 1 mg/mL 蛋白酶 K,于 65℃温育 1 h 后,于 95℃静置 10 min。用掌上离心机瞬时离心,上清液即可用于 PCR 扩增或置于-20℃冰箱中备用。

1.1.4 PCR 引物 本研究采用的 SCAR 标记引物见表 1。

1.1.5 PCR 扩增与电泳 PCR 扩增反应采用 25 μL 体系,包括 5 μLDNA 模板,1 μL F 引物,1 μL R 引物,12.5 μL 2×Taq MasterMix (含染料),4.5 μL ddH₂O。PCR 扩增程序:94℃预变性 4 min;94℃变性 30 s,退火 30 s(温度参照表 1),72℃延伸 1 min,40 个循环;72℃延伸 10 min,4℃保存。取 5 μL PCR 扩增产物在浓度为 1.2% 的琼脂糖凝胶上检测扩增片段的大小,以 DNA marker DL 2000 作为分子量对照。电泳完毕后在溴化乙锭(EB)染液中染色 10 min,用凝胶成像仪观察并拍照。

表 1 根结线虫特异性 PCR 引物

根结线虫种类	引物	序列(5'→3')	退火温度(℃)	产物长度(bp)
南方根结线虫	MI-F	GTGAGGATTCAGCTCCCCAG	62	955 ^[10]
(<i>Meloidogyne incognita</i>)	MI-R	ACGAGGAACATACTTCTCCGTCC		
爪哇根结线虫	MJ-F	GGTGCGCGATTGAAGTACGAC	64	670 ^[11]
(<i>Meloidogyne javanica</i>)	MJ-R	CAGGCCCTTCAGTGGAAGTATAC		
象耳豆根结线虫	ME-F	AACCTTTTGTGAAAGTGCCGCTG	62	236 ^[12]
(<i>Meloidogyne enterolobii</i>)	ME-R	TCAGTTCAGGCAGGATCAACC		
花生根结线虫	MA-F	TCGGCGATAGAGGTAAATGAC	61	420 ^[11]
(<i>Meloidogyne arenaria</i>)	MA-R	TCGGCGATAGACACTACAAC		
北方根结线虫	MH-F	TGACGGCGGTGAGTGCCA	60	610 ^[13]
(<i>Meloidogyne hapla</i>)	MH-R	TGACGGCGGTACCTCATAG		

1.2 防治技术研究

1.2.1 材料与药剂 供试黄秋葵品种闽秋葵 3 号由福建省农业科学院亚热带农业研究所选育^[14]。淡紫拟青霉颗粒剂(含 5 亿活孢子/g,处理 1)、1.0% 阿维菌素颗粒剂(处理 2)、10.2% 阿维噻唑膦颗粒剂(处理 3)、生菜(处理 4)种子均为市售。

1.2.2 试验方法 2019 年 8 月,选择根结线虫发生较重的福建省漳州市龙文区朝阳镇登科村福建省农业科学院亚热带农业研究所蔬菜种植基地进行试验,设 3 次重复,每个重复设 1 个小区,每个小区面积为 24 m²。处理 1~3 的施药方法严格按照说明进行,处理 4 为黄秋葵幼苗定植前 20 d,在栽培垄两侧条播诱集根结线虫的生菜种子,黄秋葵定植 35 d 后,将生菜连根拔除。黄秋葵移栽 60 d 后,采用 5 点随机取样法,每个点取 3 株,每个小区共取样

15 株,取样后记录发病级数。CK 为清水处理。

1.2.3 根结线虫病分级标准 0 级,无根结;1 级,仅有少量根结,1%≤根结百分率<10%;2 级,根结明显,10%≤根结百分率<25%;3 级,25%≤根结百分率<50%;4 级,50%≤根结百分率<75%;5 级,根结百分率≥75%。

根结线虫病病情指数=[(病级数×该级病株数)/(调查总株数×最高病级数)]×100;

防治效果=(对照病情指数-处理病情指数)/对照病情指数×100%。

1.2.4 根结线虫口密度调查 采用 5 点取样法,每点取 0~40 cm 土层的病土,将 5 点取到的土样混匀后从中称取 100 g,用贝尔曼漏斗法分离土壤中的二龄幼虫,将二龄幼虫悬浮液充分混匀后,取 2 mL 液体定容,从中吸取 100 μL 于皿底打格的培养皿

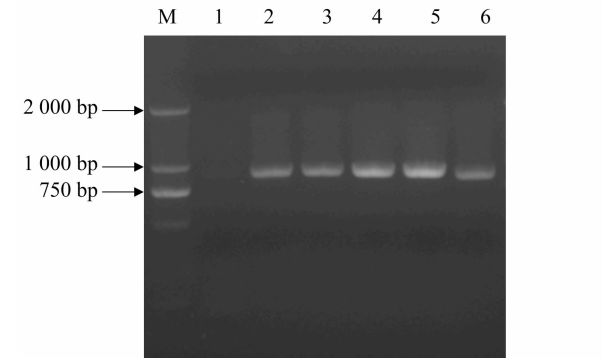
中,在解剖镜下对二龄幼虫进行计数,重复 3 次,取平均值。每个处理小区的二龄幼虫总量统一换算成 1 kg 土样中的幼虫总量。

1.2.5 数据分析 用 DPS 进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 SCAR 分子鉴定结果

利用 5 种常见根结线虫的特异性引物(表 1)对福建省漳州市龙文区、福建省三明市永安市、福建省莆田市秀屿区所采集样本中分离得到的根结线虫进行扩增与电泳观察,得到的片段均为 1 000 bp 左右(图 1),与前人所得扩增产物大小一致^[10],确定根结线虫的种类为南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*),但未检出其他根结线虫种类。



M—DNA Marker DL2000; 1—无菌水; 2~3—漳州市龙文区; 4~5—三明市永安市; 6—莆田市秀屿区
图1 黄秋葵南方根结线虫 SCAR 扩增产物

2.2 防治效果分析

2.2.1 病情指数和防治效果统计 试验结果表明,4 种不同措施对黄秋葵根结线虫病均有一定的防治效果(表 2),其中淡紫拟青霉(含 5 亿活孢子/g)颗粒剂、1.0% 阿维菌素颗粒剂、10.2% 阿维噻唑膦颗粒剂、种植诱集根结线虫的生菜的防治效果分别为 36.4%、33.1%、67.5%、39.5%,其中 10.2% 阿维噻唑膦颗粒剂的防治效果最好。

表 2 4 种不同措施对黄秋葵根结线虫病的防治效果			
编号	处理	病情指数	防治效果 (%)
1	淡紫拟青霉(含 5 亿活孢子/g)颗粒剂	48.6ab	36.4
2	1.0% 阿维菌素颗粒剂	51.1ab	33.1
3	10.2% 阿维噻唑膦颗粒剂	24.8b	67.5
4	种植诱集根结线虫的生菜	46.2ab	39.5
CK	清水处理	76.4a	—

注:表中数据为 3 次重复的平均值。同列数据后标有不同小写字母代表在 0.05 水平上差异显著。下表同。

2.2.2 根结线虫虫口密度统计 由表 3 可以看出,4 种不同措施对黄秋葵根结线虫虫口密度均有一定的降低作用,淡紫拟青霉(含 5 亿活孢子/g)颗粒剂、1.0% 阿维菌素颗粒剂、10.2% 阿维噻唑膦颗粒剂、种植诱集根结线虫的生菜的二龄幼虫虫口下降效果分别为 37.4%、36.0%、60.7%、40.6%,其中 10.2% 阿维噻唑膦颗粒剂对根结线虫虫口密度的下降效果最佳。

表 3 根结线虫虫口密度			
编号	处理	土样中的虫口密度 (头/kg)	虫口下降效果 (%)
1	淡紫拟青霉(含 5 亿活孢子/g)颗粒剂	5672b	37.4
2	1.0% 阿维菌素颗粒剂	5797b	36.0
3	10.2% 阿维噻唑膦颗粒剂	3559c	60.7
4	种植诱集根结线虫的生菜	5382b	40.6
CK	清水处理	9054a	—

3 讨论

我国已报道的根结线虫种类为 57 种,其中能引起蔬菜发生根结线虫病的主要为南方根结线虫(*M. incognita*)^[15]、象耳豆根结线虫(*M. enterolobii*)^[16]、爪哇根结线虫(*M. javanica*)^[17]、北方根结线虫(*M. hapla*)^[18]、花生根结线虫(*M. arenaria*)^[19]。常规的根结线虫种类鉴定方法主要有形态学鉴定法、寄主及生化鉴定法。近十几年来,分子生物学技术的发展,为根结线虫的准确鉴定提供了重要手段。其中,序列特异性扩增区(sequence characterized amplified region,简称 SCAR)是一种新型分子标记,结果稳定性好、可重复性强,已被广泛应用于植物根结线虫的种类鉴定中^[20-22]。本研究通过 SCAR-PCR 方法,从分子水平对不同地区根结线虫的种类进行了准确检测和鉴定。世界范围内发现的危害黄秋葵的根结线虫主要是南方根结线虫(*M. incognita*)和象耳豆根结线虫(*M. enterolobii*)^[6,23-25]。我国黄秋葵以南方根结线虫为主要种群,黄英凯鉴定得出,福建漳平地区黄秋葵的根结线虫病原为南方根结线虫^[24];姚玉荣等鉴定得出,天津地区黄秋葵的根结线虫病原为南方根结线虫^[25]。本研究结果显示,危害福建省漳州市龙文区、福建省三明市永安市、福建省莆田市秀屿区黄秋葵的根结线虫种类与我国黄秋葵上主要根结线虫种类相符,研究暂未发现

其他根结线虫。

目前,防治根结线虫的方法有轮作、药剂防治、生物防治、抗病品种等。本试验发现,采用田间不同措施对黄秋葵根结线虫病均有一定防治效果,能够减轻根结线虫的危害,降低病情指数和虫口密度,其中 10.2% 阿维噻唑膦颗粒剂的防效最好,具有速效性好、残留毒性低、对环境友好等优点,可作为当前黄秋葵根结线虫防治的最佳药剂选择,但防治成本偏高,而 1.0% 阿维菌素颗粒剂、淡紫拟青霉(含 5 亿活孢子/g)颗粒剂和种植诱集根结线虫生菜的防效一般,但防治成本低,其中诱集根结线虫的生菜连根拔除后可出售,从而增加生产效益。淡紫拟青霉颗粒剂在可持续农业发展中的作用仍然十分重要,其高效防治技术还需不断提升。

参考文献:

- [1] Nipaporn S, Leonard M C S, Renko D V, et al. Physicochemical properties of pectins from okra[J]. Food Hydrocolloids, 2009, 24(1): 35–41.
- [2] 吴剑夫,程安玮,孙金月,等. 超声波辅助提取秋葵果胶工艺优化及理化性质分析[J]. 核农学报, 2018, 32(10): 2002–2011.
- [3] 刘东祥,叶花兰,刘国道. 黄秋葵的应用价值及栽培技术研究进展[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(15): 3718–3720, 3725.
- [4] 练冬梅,赖正锋,姚运法,等. 黄秋葵抗根结线虫病种质资源筛选[J]. 中国植保导刊, 2019, 39(7): 45–49.
- [5] Mukhta T, Hussain M A, Kayani M Z. Yield responses of 12 okra cultivars to southern root – knot nematode (*Meloidogyne incognita*) [J]. Bragantia, 2017, 76(1): 108–112.
- [6] Marin M V, Santos L S, Gaion L A, et al. Selection of resistant rootstocks to *Meloidogyne enterolobii* and *M. incognita* for okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) [J]. Chilean Journal of Agricultural Research, 2017, 77(1): 58–64.
- [7] Hussain M, Kamran M, Singh K, et al. Response of selected okra cultivars to *Meloidogyne incognita* [J]. Crop Protection, 2016, 82: 1–6.
- [8] Tariq M, Muhammad A H, Muhammad Z K, et al. Evaluation of resistance to root – knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in okra cultivars[J]. Crop Protection, 2014, 56: 25–30.
- [9] 王江岭,张建成,顾建锋. 单条线虫 DNA 提取方法[J]. 植物检疫, 2011, 25(2): 32–35.
- [10] Meng Q P, Long H, Xu J H. PCR assays for rapid and sensitive identification of three major root – knot nematodes, *Meloidogyne*

- incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* [J]. Acta Phytopathol Sin, 2004, 34: 204–210.
- [11] Zijlstra C, Donkers – Venne D T H M, Fargette M. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, and *M. arenaria* using sequence characterized amplified region (SCAR) based PCR assays [J]. Nematology, 2000, 2(8): 847–853.
- [12] Long H, Liu H, Xu J H. Development of a PCR diagnostic for the root – knot nematode *Meloidogyne enterolobii* [J]. Acta Phytopathol Sin, 2006, 36: 109–115.
- [13] Zijlstra C. Identification of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla* based on SCAR – PCR: a powerful way of enabling reliable identification of populations or individuals that share common traits [J]. European Journal of Plant Pathology, 2000, 106: 283–290.
- [14] 赖正锋,练冬梅,姚运法,等. 黄秋葵新品种“闽秋葵 3 号” [J]. 园艺学报, 2019, 46(6): 1217–1218.
- [15] Abad P, Gouzy J, Aury J M, et al. Genome sequence of the metazoan plant – parasitic nematode *Meloidogyne incognita* [J]. Nature Biotechnology, 2008, 26(8): 909–915.
- [16] Yang B J, Eisenback J D. *Meloidogyne enterolobii* n. sp. (*Meloidogyne* *nidae*), a root – knot nematode parasitizing pacara earpod tree in China [J]. Journal of Nematology, 1983, 15(3): 381–391.
- [17] 何元,潘沧桑. 南方根结线虫和爪哇根结线虫的发育[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2000, 39(4): 537–546.
- [18] Opperman C H, Bird D M, Williamson V M, et al. Sequence and genetic map of *Meloidogyne hapla*: a compact nematode genome for plant parasitism [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(39): 14802–14807.
- [19] 宾淑英,姚圣梅,林进添,等. 花生根结线虫对花生植株主要生理指标的影响[J]. 华中农业大学学报, 1999, 18(2): 121–124.
- [20] 杨艳梅,梁艳,袁绍杰,等. 云南省部分烟区根结线虫形态和分子鉴定[J]. 南方农业学报, 2017, 48(2): 284–291.
- [21] 亓竹冉,刘天鸿,王宁,等. 出口蔬菜花卉种苗基地的植物线虫种类调查和鉴定[J]. 南京农业大学学报, 2014, 37(5): 93–100.
- [22] 宋莉,周培培,李阳,等. 云南玉溪地区烟田根结线虫的 SCAR 鉴定、分布及其生物防治研究[J]. 农业资源与环境学报, 2019, 36(4): 546–552.
- [23] 练冬梅,赖正锋,姚运法,等. 黄秋葵根结线虫病的病原鉴定[J]. 福建农业科技, 2019(3): 40–42.
- [24] 黄英凯. 福建省蔬菜基地根结线虫病原鉴定及发病规律研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2014.
- [25] 姚玉荣,霍建飞,郝永娟,等. 天津地区温室蔬菜根结线虫种类的多重 PCR 快速鉴定[J]. 北方园艺, 2018(7): 49–52.