

菊花滑刃线虫快速分子检测

崔汝强^{1,2}, 赵立荣², 钟国强²

(1. 江西农业大学 农学院 江西 南昌 330045; 2. 广东检验检疫技术中心 广东 广州 510623)

摘要: 根据菊花滑刃线虫(*Aphelenchoides ritzemabosi*)和相近滑刃线虫种群的 rDNA-ITS 序列,设计出菊花滑刃线虫特异性引物,利用 PCR 技术对菊花滑刃线虫包含部分 5.8 S 基因和部分 rDNA-ITS2 核苷酸序列进行扩增,获得 208 bp 的特异性片段。实现了单条活的或 FG(4% 的甲醛)固定的菊花滑刃线虫的快速检测。

关键词: 菊花滑刃线虫; 检测; rDNA-ITS

中图分类号: S41-30 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2010)04-0714-04

A Rapid Method to Detect *Aphelenchoides ritzemabosi* by PCR

CUI Ru-qiang^{1,2}, ZHAO Li-rong², ZHONG Guo-qiang²

(1. College of Agronomy, JAU, Nanchang 330045, China; 2. Guangdong Exit-Entry Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China)

Abstract: A polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify partial ribosomal DNA containing 5.8S gene and partial internal transcribed spacer region 2 (ITS2). According to the difference between the sequences of internal transcribed spacer region (ITS) of *Aphelenchoides ritzemabosi*, *A. besseyi* and that of *A. fragariae*, specific primers were designed respectively for *A. ritzemabosi*. The primers amplified a fragment of about 208 bp. A single nematode, living or preserved in formalin, could be detected rapidly, and *A. ritzemabosi* was distinguished as well. This method would be useful for rapid detection of nematodes.

Key words: *Aphelenchoides ritzemabosi*; detection; rDNA-ITS

菊花滑刃线虫(*Aphelenchoides ritzemabosi*)通常又被称为菊花叶枯线虫或腋芽滑刃线虫。其寄主范围非常广,能寄生观赏植物、蔬菜、小果类植物和杂草等 200 多种植物,菊花(*Dendranthema morifolium*)是其典型寄主,其他重要的寄主有大丽花、福禄考、金丝桃、绣线菊、秋海棠、大岩桐、薄包花、秋海棠、黑树营、草莓、烟草、西瓜、莴苣、番茄、芹菜等^[1-2]。在全球广泛分布,在全世界已有 70 多个国家或地区发现此病害;是菊花的重要病害,病害发生导致经济价值降低,严重的导致死亡;为害草莓造成减产,严重时损失可达 65%^[3],在法国曾严重为害烟草,造成烟叶产量及品质严重下降^[4]。

许多国家和地区对菊花滑刃线虫有检疫要求,我国 2006 年也将其列入检疫名录中。目前滑刃属线虫除草莓滑刃线虫有快速检测方法以外^[5],其他种类依然靠传统的形态学检测,具有费时、幼虫无法鉴定等缺点。因此,应检疫工作的需要,发展快速准确鉴定、检测技术成为必然。本研究的主要目的是为菊花滑刃线虫鉴定提供一种快速、高效、灵敏的分子检测方法。

1 材料与方法

1.1 供试线虫

本实验测试了不同地区的 3 个菊花滑刃线虫种群及近年来广东口岸截获的星状尾组群的滑刃线

收稿日期: 2010-05-04 修回日期: 2010-06-23

基金项目: 科技部支撑项目(2006BAD08A16)和广东省科技计划项目(2007B020709006)

作者简介: 崔汝强(1978-)男,博士,主要从事植物病原线虫和细菌学研究,Email: cuiuruqiang@sohu.com。

虫: 水稻干尖线虫 (*A. besseyi*)、古德伊滑刃线虫 (*A. goodeyi*)、滑刃线虫种群 1 (*Aphelenchoides* sp US03)、滑刃线虫种群 2 (*Aphelenchoides* sp Be), 以及松材线虫 (*Bursaphelenchus xylophilus*)。

供试线虫均为单条线虫纯化后扩繁。菊花滑刃线虫在胡萝卜愈伤组织中于 20 °C 条件下培养; 其他滑刃线虫在长满灰霉菌菌丝 (*Botrytis cinerea*) 的马铃薯蔗糖培养基平板上, 25 °C 培养。

1.2 线虫 DNA 的提取

1.2.1 大量线虫 DNA 提取^[6] 将大量培养的线虫收集 100 μL 于 1.5 mL 离心管中, 投入液氮 30 s 后将线虫研磨成粉末; 加入 700 μL DNA 抽提取缓冲液 (50 mmol/L Tris - HCl, pH7.5; 50 mmol/L NaCl; 5 mmol/L EDTA, pH8.0; ρ(SDS) = 0.5%) 加入 5 μL 的 20 mg/mL 蛋白酶 K 混匀; 55 °C 温浴 4 ~ 5 h 后; 加入等体积的 V(酚) : V(氯仿) : V(异戊醇) = 25:24:1 混匀, 12 000 g 4 °C 下离心 15 min 取上清液转入另一灭菌的 1.5 mL 离心管中; 加入 2.5 倍体积经预冷的无水乙醇 混匀, 放入 -20 °C 冰箱中放置 30 min 以上; 7 000 g 4 °C 下离心 5 min 沉淀 DNA; 沉淀物用 φ = 75% 的乙醇洗涤 2 次 待乙醇挥发完全后 将沉淀的 DNA 溶解于 20 μL TE 中; -20 °C 贮存备用。

1.2.2 单条活虫 DNA 的提取 在解剖镜下将分离出的单条线虫加入含有 8 μL WLB 溶液 [含 2.5 mmol/L DTT ρ(Tween20) = 1.125% ρ. 25 g/L Gelatin, 125 mmol/L KCl 3.75 mmol/L MgCl 25 mmol/L Tris - HCl (pH 8.3)] 的 PCR 管中, 于 -70 °C 放置 30 min 后; 95 °C 处理 15 min; 随后 65 °C 温浴 2 min; 再加入 20 mg/mL 的蛋白酶 K 1 μL 65 °C 温浴 30 min; 95 °C 处理 15 min 后作为单条线虫 DNA 模板可直接用于 PCR 扩增^[7]。

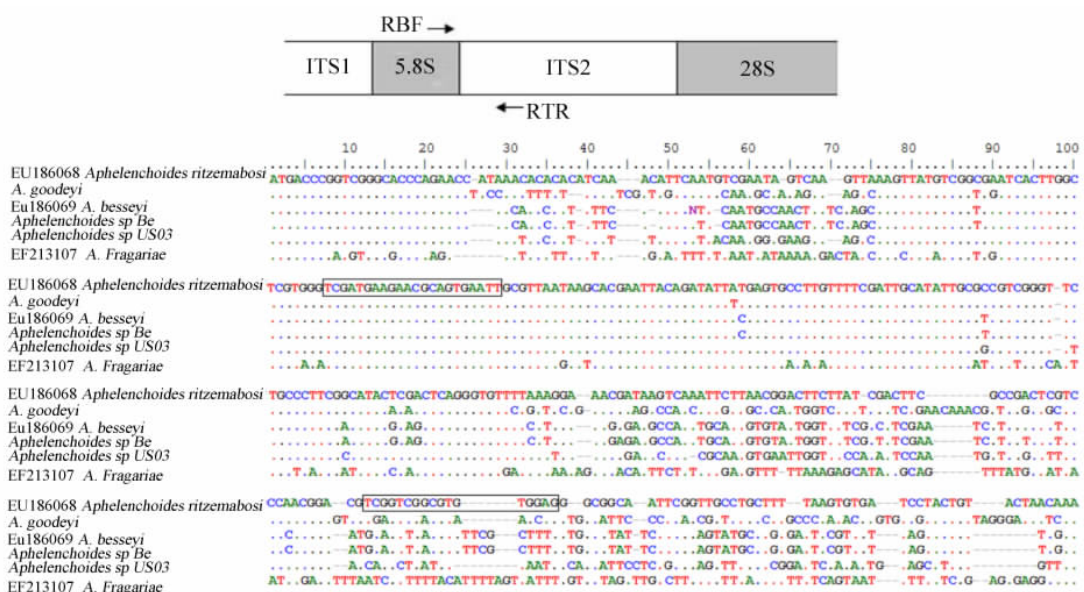
1.2.3 FGφ(甲醛) = 4% 固定的线虫 DNA 提取 先将线虫挑入清水中浸泡 2 ~ 3 h 以下操作同 1.2.2。

1.2.4 PCR 引物设计 利用 Primer Premier 软件 (Version 5.00, PREMIER Biosoft International) 根据实验室培养的星状尾滑刃线虫: 水稻干尖线虫、古德伊滑刃线虫、滑刃线虫种群 US03 和滑刃线虫种群 Be 的 ITS 序列以及 GenBank 中菊花滑刃线虫 EU186068、水稻干尖线虫 EU186069 和草莓滑刃线虫 (*A. fragariae*) EF213107 的 ITS 序列设计特异性引物 BSF 和 ArtR, 扩增产物为 208 bp。引物序列如下:

BSF: 5' - TCGATGAAGAACGCAGTGAATT - 3' ;

ArtR: 5' - CTCCACACGCCGACCGA - 3' ;

1.3 PCR 扩增及检测



框内为引物位置; (.) 表示同源的核苷酸; (-) 表示核苷酸缺失。

The priming sites of the primers are boxed. (.) Shows the identical nucleotide; (-) shows the gap of a nucleotide.

图 1 PCR 引物在 rDNA 上的位置

Fig. 1 Location of primers for polymerase chain reaction on rDNA

PCR 反应体系 25 μL: 包括 5 ng 线虫 DNA (单条线虫裂解 DNA 5 μL), 10 μmol/L 引物 RBF 和 ArtR 各 0.5 μL, 10 mmol/L each dNTPs 0.5 μL, 10 × *Taq* PCR 缓冲液 (包括 2 mmol/L MgCl₂) 2.5 μL, 5 U/μL

Taq DNA 聚合酶 0.2 μL 加 ddH₂O 至 25 μL。PCR 条件为: 94 °C 3 min; 35 个循环的 94 °C 30 s 58 °C 30 s 72 °C 40 s; 72 °C 5 min 延伸; 16 °C 保存; 将 5 μL PCR 产物用 φ = 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 根据扩增产物的大小判定结果 ,PCR 产物克隆测序。

2 结果分析

2.1 不同滑刃线虫特异性引物扩增结果

利用 BSF 和 ArtR 对菊花滑刃线虫、水稻干尖线虫、古德伊滑刃线虫、滑刃线虫种群 1、滑刃线虫种群 2、松材线虫进行特异性扩增,从图 2 可以看出,该对引物在菊花滑刃线虫中可以特异性地扩增出约 200 bp 的产物,对该序列的测序结果进行分析发现,该扩增产物为菊花滑刃线虫 208 bp 的特异性片段。

2.2 不同菊花滑刃线虫种群的扩增结果

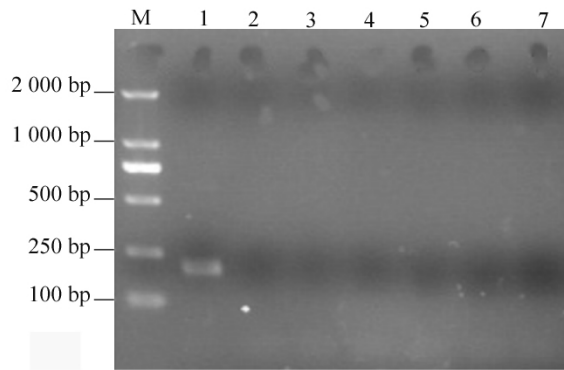
利用 BSF 和 ArtR 对来自美国、云南、重庆的不同地理种群的菊花滑刃线虫进行扩增的结果来看(图 3),该对引物可以稳定的扩增出目的片段。说明该对引物可以稳定地用于菊花滑刃线虫的特异性扩增。

2.3 单条菊花滑刃线虫种群的扩增结果

从菊花滑刃线虫的单条线虫 PCR 结果(图 4)来看该对引物可以稳定扩增出目的片段,说明该对引物具有较高的灵敏度,可以较好地应用到实际检测中。

3 讨论

菊花滑刃线虫主要在植物叶片,叶芽、花芽和生长点等组织营外寄生生活。主要随着植物繁殖材料和鲜切花进行远距离传播;在田间可通过风、雨、枝叶接触和农事操作等途径传播。一旦侵入植株就难以用药剂防治,只能及时拔除,集中烧毁,检疫措施为主要的防治手段^[8]。目前的菊花滑刃线虫主要是依据形态特征进行检测。这种方法存在一定的弊端,菊花滑刃线虫所属的滑刃目线虫种类繁多,且常见种类形态相似,这要求鉴定者具有丰富的经验;通常在滑刃线虫的形态学鉴定只适用于成虫,而对于幼虫不适合。因此,研究出菊花滑刃线虫快速、准确地检测方法至关重要。

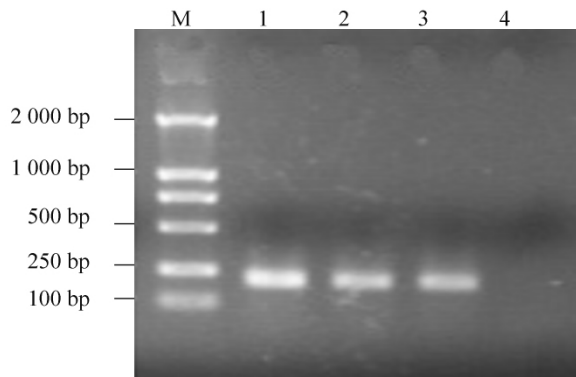


M: DNA 标记 DL2000; 1. 菊花滑刃线虫; 2. 水稻干尖线虫; 3. 古德伊滑刃线虫; 4. 滑刃线虫种群 US03; 5. 滑刃线虫种群 Be; 6. 松材线虫; 7. 清水对照。

Lane M: DL 2000 DNA Marker; lane 1: *Aphelenchoides ritzemabosi*; lane 2: *A. besseyi*; lane 3: *A. goodeyi*; lane 4: *Aphelenchoides* sp US03; lane 5: *Aphelenchoides* sp Be; lane 6: *B. xylophilus*; lane 7: ddH₂O.

图 2 引物 BSF 和 ArtR 对不同滑刃线虫的基因组 DNA 的 PCR 扩增电泳结果

Fig. 2 Gel photo of polymerase chain reaction products of *Aphelenchoides* spp and *Bursaphelenchus xylophilus* using primers BSF and ArtR

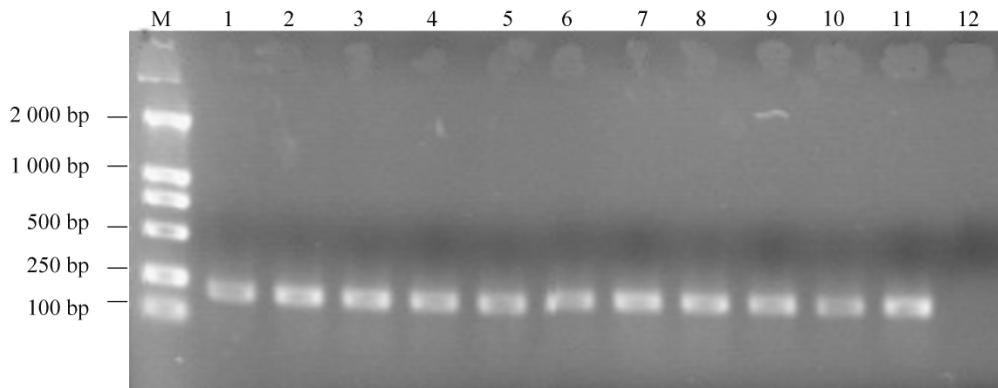


M: DNA 标记 DL2000; 1. 美国菊花滑刃线虫; 2. 云南菊花滑刃线虫; 3. 重庆菊花滑刃线虫; 4. 清水对照。

Lane M: DL 2000 DNA Marker; lane 1: *Aphelenchoides ritzemabosi* from USA; lane 2: *A. ritzemabosi* from Yunnan province; lane 3: *A. ritzemabosi* from Chongqing city; lane 4: ddH₂O.

图 3 引物 BSF 和 ArtR 对 3 个菊花滑刃线虫地理种群基因组 DNA 的 PCR 扩增电泳结果

Fig. 3 Gel photo of polymerase chain reaction products of three *Aphelenchoides ritzemabosi* geographic populations using primers BSF and ArtR



M: DNA 标记 DL2000; 1-6: 为单条活菊花滑刃线虫裂解 DNA 扩增; 7-11: 为单条固定后菊花滑刃线虫裂解 DNA 扩增; 12: 清水对照。

Lane M , DL 2000 DNA Marker; lanes 1-6: single living *Aphelenchoides ritzemabosi*; lanes 7-11: fixed *A. ritzemabosi*; lane 12: ddH₂O.

图 4 引物 BSF 和 ArtR 对菊花滑刃线虫的单条线虫基因组 DNA 的 PCR 扩增电泳结果

Fig. 4 Gel photo of polymerase chain reaction products of single living and fixed *Aphelenchoides ritzemabosi* using primers BSF and ArtR

本研究选择菊花滑刃线虫 rDNA 的部分核苷酸序列作为目标序列,通过对星状尾族群的不同种的序列进行比较,设计菊花滑刃线虫的特异性引物。对不同星状尾滑刃线虫种群,不同地理种群进行检测研究;并对单条线虫的灵敏度进行了研究。结果表明该方法具有较好的特异性和稳定性,并具有较高的灵敏度。该方法节约了成本和时间,操作简单,不需特殊仪器,适合在检验检疫部门推广和运用。

参考文献:

- [1] Decker H. Leaf - parasitic nematodes [M]//Plant nematodes and their control (phytonematology) (Sveshnikova N M, Ed.). New York: Publication Brill USA, 1989: 354 - 368.
- [2] Knight K W L, Hill C F, Sturhan, D. Further records of *Aphelenchoides fragariae* and *A. ritzemabosi* (Nematoda: Aphelenchida) from New Zealand [J]. Australasian Plant Pathology, 2002, 31(1): 93 - 94.
- [3] Siddiqi M R. *Aphelenchoides ritzemabosi* [J]. Descriptions of Plant - Parasitic Nematodes, 1974, 32: 38 - 41
- [4] Shepherd J A, Barker K R. Nematode parasites of tobacco [M]//Lue M, Sikora R A, Bridge J. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. UK: CAB International, 1993: 493 - 518.
- [5] Jamie L, McCuiston, Laura C, et al. Conventional and PCR detection of *Aphelenchoides fragariae* in diverse ornamental host plant species [J]. Journal of Nematology, 2007, 39(4): 343 - 355.
- [6] Williamson V M, Caswell - chen E P, Wu F, et al. PCR for nematode identification [A]//Lamberti F, Giorgi C D, Birs D M. Advance in molecular plant nematology. New York: Plnum Press, 1994: 119 - 127.
- [7] 张立海, 廖金铃, 冯志新. 松材线虫 rDNA 的测序和 PCR - SSCP 分析 [J]. 植物病理学报, 2001, 31(1): 84 - 89.
- [8] 谢辉. 菊花滑刃线虫及其检测和防疫方法 [J]. 植物检疫, 2007, 21(3): 190 - 192.