

不同地理来源腐烂茎线虫种群杂交后代致病力测定

王宏宝^{1,3}, 毛佳², 李茹¹, 赵桂东¹, 林茂松³

(1. 江苏徐淮地区淮阴农业科学研究所, 江苏 淮安 223001; 2. 南京农业大学 园艺学院, 江苏 南京 210095; 3. 南京农业大学 植保学院, 江苏 南京 210095)

摘要:利用室内人工接种方法对腐烂茎线虫杂交后代进行致病力、繁殖力的测定,结果表明:同一基因型内各组合中均能杂交成功,比较发现各种群的后代数与对照亲本的数目有显著差异,各杂交组合中杂交率与 F_1 数量均低于对照组(对照组为亲本自交);各杂交群体在致病力、繁殖力表现方面与对照 DeSD 种群在 $P_{0.05}$ 水平上均存在差异;各种群正反交群体致病力、繁殖力与对照相比,对照 DeSD 种群所在的反交组合表现特征均高于其正交组合;相关性分析,腐烂茎线虫两类基因型各种群基因型内杂交群体致病力与繁殖力均存在正相关。本研究对模拟我国不同地理来源腐烂茎线虫种群扩散后所产生杂交代的致病力分化情况,腐烂茎线虫遗传多样性具有重要的应用价值,并为不同地理来源有害生物入侵分险评估提供理论依据。

关键词:生物学杂交; 腐烂茎线虫; 致病力; 繁殖力

中图分类号:S435 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2011)06-0212-05

The Pathogenicity Study of Hybrids Populations of *Ditylenchus destructor* from Different Geographical Origin

WANG Hong-bao^{1,3}, MAO Jia², LI Ru¹, ZHAO Gui-dong¹, LIN Mao-song³

(1. Institute of Agricultural Science of Huaiyin Xuhuai District of Jiangsu, Huaian 223001, China;

2. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

3. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Using artificial inoculation methods on offspring of *Ditylenchus destructor*, the pathogenicity, fecundity of that were determination, the results showed that: hybrids combinations within the same genotype can successfully. Compared of the number of descendants found in the various groups and control parents were significantly different, the hybridization rate and the number of F_1 hybrid were lower than the control group (the control group as the parents selfed); The hybrid groups and control DeSD population in pathogenicity, reproductive performance, there were differences at the $P_{0.05}$ level; Compared with groups of reciprocal groups and the control population in the pathogenicity, fecundity, performance characteristics of the anti-crosses was higher than the orthogonal on the control DeSD; Correlation analysis was showed that pathogenicity and fecundity of *Ditylenchus destructor* hybridization groups were positively correlated. This study has important applications on the genetic diversity of *Ditylenchus destructor* and the virulence differentiation of simulating proliferation of hybrids of *Ditylenchus destructor* populations in different geographical origin at the same time, This was provided a theoretical basis on the risk assessment of pest invasion from different geographical origin.

Key words: Biological hybrid; *Ditylenchus destructor*; Pathogenicity; Fecundity

腐烂茎线虫(*Ditylenchus destructor*)是一种迁移性的内寄生线虫,主要为害植物的地下部分(根瘤、匍匐茎、球茎、根茎和块根),很少为害地上部分,缺少高等植物时,可以取食土壤真菌存活。在我国主

收稿日期:2011-09-20

基金项目:江苏省农业自主创新项目资助(cx(10)454);江苏淮安市农业科学研究院院长基金

作者简介:王宏宝(1982-),男,山西大同人,硕士研究生,主要从事植物病原线虫分类学及生物防治工作。

通讯作者:林茂松(1948-),男,江苏徐州人,教授,主要从事植物病原线虫学研究。

要受害甘薯,是农业上的重要线虫病害,也是我国及其他国家和地区的检疫性危险线虫^[1-2]。近年来由于甘薯种植时引种不当,造成甘薯茎线虫病的传播蔓延。一般发病田块减产 20%~50%,重病田块甚至绝产的状况^[3]。

近年来,随着研究的深入发展,国内相关报道证实腐烂茎线虫在许多方面表现出特殊的遗传变异性:来自不同寄主植物线虫群体在致病力上存在差异,但不象 *D. dipsacii* 那样可划分出生理小种^[4-5];不同来源的腐烂茎线虫群体的抗药性不同^[6];其核糖体 DNA 的 D2/D3 区的序列约为 780 bp,但不同种群间有十几个碱基的差异,可划分为两类类群^[7];该类线虫存在多个近似种,如起绒草茎线虫、食菌茎线虫和仙女茎线虫等,从形态上很难快速、准确地鉴定^[8];其核糖体 DNA 的 ITS 区存在很大差异,可明显区分为 A/B 两类类型;另笔者研究发现,来自不同地理来源的腐烂茎线虫在致病力、性比及同工酶谱上同样存在明显差异^[9]。

鉴于我国国内各病薯区虫源存在的差异性,为评估和鉴定不同来源的腐烂茎线虫在传播和扩散中分险性及我国腐烂茎线虫的分化现象,对不同来源的腐烂茎线虫杂交所产生后代的致病力强弱等生物学特性进行探索和试验,本试验对我国腐烂茎线虫遗传分化现象提供理论支持,并为明确腐烂茎线虫的分类地位提供依据。

1 材料和方法

1.1 腐烂茎线虫群体纯化培养

对来自山东、江苏、安徽、天津、山西等地甘薯病区的腐烂茎线虫进行培养。腐烂线虫群体分别来自河北、河南、江苏、山东等省区的病区(表 1)。从病薯中分离得到线虫后,先在解剖镜下挑出生活力较强的线虫 100 条,用 3% H₂O₂ 消毒 3 min,接种到经

表 1 供试马铃薯腐烂茎线虫编号和来源

Tab.1 Number and origin of the tested <i>Ditylenchus destructor</i>			
序号 No.	编号 Code	种名 Species	来源 Origin
1	DeLJ	<i>Ditylenchus destructor</i>	山东莒县
2	DeLY	<i>D. destructor</i>	山东沂水
3	DeLL	<i>D. destructor</i>	山东临沂
4	DeSD	<i>D. destructor</i>	江苏东海
5	DeJL	<i>D. destructor</i>	山西临汾
6	DeHB	<i>D. destructor</i>	河北廊坊
7	DeYL	<i>D. destructor</i>	河南洛阳
8	DeSG	<i>D. destructor</i>	江苏赣榆
9	DeWY	<i>D. destructor</i>	安徽颍上
10	DeJJ	<i>D. destructor</i>	天津静海

乙醇(75%)消毒 5 min 的健康薯块上,蜡封。25℃培养 30 d 后,转移到 4℃冰箱备用^[10]。

1.2 生物学杂交试验

将某线虫种群的 1 条大龄幼虫与另一种群的 2 条雄虫用线虫针挑入打好孔的薯块中,孔间距约 3 cm,接入线虫后用石蜡封口,同时做反交组合,25℃培养 30 d 后,观察结果。杂交的每个组合重复 20 个孔。将每个孔的薯条用打孔器打下置于计数皿中分离。

腐烂茎线虫基因型 A 群体间的杂交: DeSD × DeLJ, DeLJ × DeSD, DeSD × DeLY, DeLY × DeSD, DeSD × DeLL, DeLL × DeSD。

腐烂茎线虫基因型 B 群体间的杂交: DeHB × DeJL, DeJL × DeHB, DeHB × DeYL, DeYL × DeHB, DeHB × DeSG, DeSG × DeHB, DeHB, DeHB × DeWY, DeWY × DeHB, DeHB × DeJJ, DeJJ × DeHB。

1.3 致病性测定

线虫接种方法同 1.1,以无菌水接到甘薯上作为对照。接种对象:苏薯 9 号,由江苏省农业科学研究院甘薯研究中心提供。每个处理设 8 个重复;48 d 后切开薯块统计并计算病情指数。病情指数分级标准^[11]:0 级:薯块不发病;1 级:薯块横切发病面积低于 25%;2 级:薯块横切发病面积在 25%~50%之间;3 级:薯块横切发病面积在 50%~75%之间;4 级:薯块横切发病面积高于 75%。

病情指数 = Σ (薯块级别 × 该级薯块数) × 100 / (调查总薯块 × 最高级别)。

致病力 = 病情指数 × 100%。

1.4 线虫繁殖力计算

将 1.3 中统计病情指数的薯块用贝尔曼漏斗法分离线虫,并收集在 10 mL 试管中,先定下体积,然后充分混匀后,用移液枪吸取 50 μL 滴在玻片上并置于体视显微镜下计数,吸取 5 次取平均数并换算出线虫的总数。繁殖力 = 繁殖总数 / 接种数。以上试验均设 8 个重复。

1.5 结果统计与数据处理

应用 SPSS16.0 软件进行差异显著性、单因素方差分析与相关性分析,其中差异显著性、单因素方差分析是为了揭示腐烂茎线虫各杂交群体间在生物学特性上的变异现象。

2 结果与分析

2.1 腐烂茎线虫基因型内杂交结果

同一基因型内杂交结果见表 2,不论是基因型 A 还是基因型 B 各线虫种群杂交,同一基因型内各

组合中均能杂交成功,且后代培养 3~4 代均能延续下去,也未发现有变形的虫体,比较发现各群体的后代数目与对照亲本的数目有显著差异,各杂交组合

中杂交率与 F_1 数量均低于对照组(对照组为亲本自交)。

表 2 腐烂茎线虫各种群杂交结果

Tab.2 Biological hybrids of *D. destructor*

杂交方案 Hybrids solution	杂交组合 ♂ ♀ Hybrids groups	重复皿数 Repeat No.	产生后代皿数 Offspring No.	杂交率/% Hybridization rate	平均后代数 Average
基因型 A 群体	DeSD × DeSD*	20	8	40	99.25a
	DeLL × DeSD	20	5	25	64.2b
	DeSD × DeLL	20	5	25	62b
	DeSD × DeLJ	20	7	35	60.57b
	DeLJ × DeSD	20	8	40	53.38b
	DeSD × DeLY	20	6	30	16.5c
	DeLY × DeSD	20	7	35	15c
基因型 B 群体内杂交	DeHB × DeHB*	20	9	45	96.11a
	DeYL × DeHB	20	9	45	78 b
	DeHB × DeYL	20	8	40	77b
	DeHB × DeSG	20	7	35	62c
	DeSG × DeHB	20	9	45	53.89c
	DeHB × DeJL	20	7	35	38d
	DeJJ × DeHB	20	7	35	36.14de
	DeJL × DeHB	20	8	40	33.88de
	DeHB × DeJJ	20	6	30	26.67de
	DeHB × DeWY	20	7	35	25.43de
	DeWY × DeHB	20	7	35	24.43e

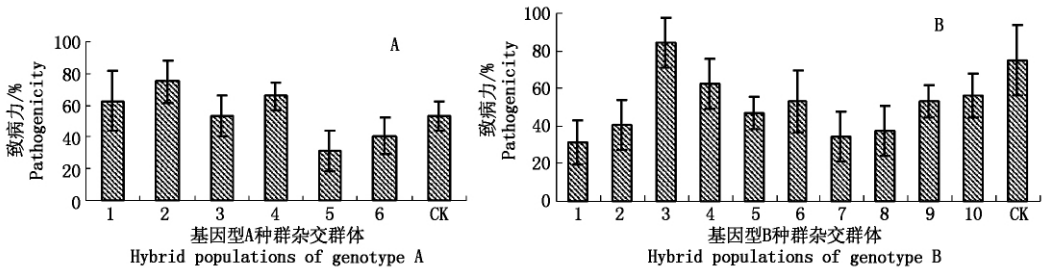
注 “♂”、“♀”分别代表父本和母本,杂交组合中带“*”的为对照组,同列数据具不同字母者经方差分析分析在 $P_{0.05}$ 水平上差异显著。
Noté “♂”represent male parent, “♀”represent female parent; with “*” for the control group. Data of the same set with different letters had been a significant difference in $P_{0.05}$ level.

2.2 腐烂茎线虫不同杂交群体致病力比较

分析基因型 A 各种群杂交结果显示:各杂交群体在致病力表现方面与对照 DeSD 种群存在差异(图 1-A)除杂交群体 DeSD × DeLY 致病力 53.13 与对照无差异外,其余几个组合在 $P_{0.05}$ 水平上均存在差异,杂交群体 DeLJ × DeSD,DeSD × DeLJ,DeLY × DeSD 致病力显著高于对照 DeSD 种群的 53.13;而 DeLL × DeSD,DeSD × DeLL 杂交群体则显著低于对照种群。从各种群正反交群体致病力与对照相比,对照 DeSD 种群所在的反交组合表现的致病力

均高于其正交组合。

分析基因型 B 各种群杂交结果显示:各杂交群体在致病力表现方面与对照 DeHB 种群在 $P_{0.05}$ 水平上均存在差异(图 1-B),在所有杂交群体中 DeHB × DeYL 杂交群体致病力 84.38 显著高于对照 DeHB 种群 75.00;其余各杂交群体致病力则显著低于对照种群。从各种群正反交群体致病力与对照相比,对照 DeHB 种群所在的反交组合除 DeYL × DeHB 致病力 62.50 低于正交组合外,其余组合表现的致病力均高于其正交组合。



A: 1-6. DeSD × DeLJ, DeLJ × DeSD, DeSD × DeLY, DeLY × DeSD, DeSD × DeLL, DeLL × DeSD, CK. DeSD × DeSD; B: 1-10. DeHB × DeJL, DeJL × DeHB, DeHB × DeYL, DeYL × DeHB, DeHB × DeSG, DeSG × DeHB, DeHB × DeWY, DeWY × DeHB, DeHB × DeJJ, DeJJ × DeHB, CK. DeHB × DeHB.

图 1 腐烂茎线虫各种群杂交群体致病力表现

Fig. 1 The fecundity phenotype of each hybrid population group

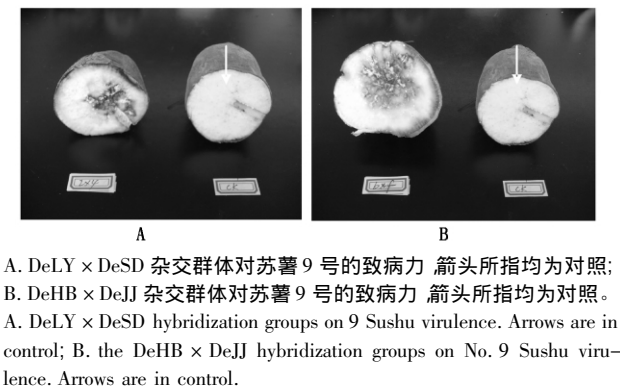


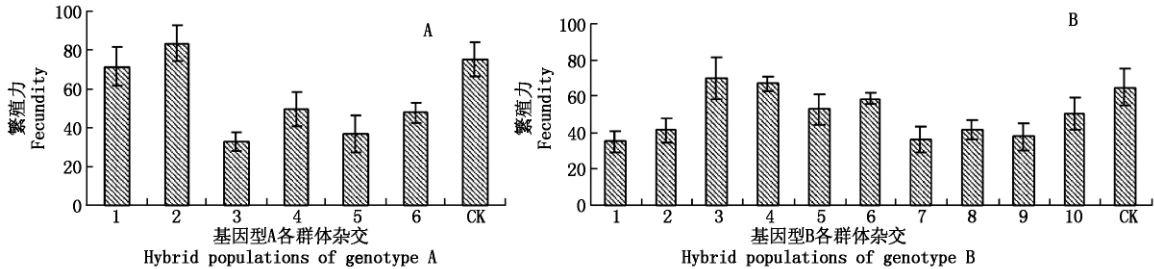
图 2 腐烂茎线虫杂交群体侵染甘薯表型
Fig.2 Infection degree of sweet potato infected
by *D. destructor*

2.3 腐烂茎线虫不同杂交群体繁殖力比较

分析基因型 A 各种群杂交结果显示：各杂交群体在繁殖力表现方面与对照 DeSD 种群在 $P_{0.05}$ 水平上均存在差异(图 3-A)，杂交群体 DeLJ × DeSD 繁殖力 83.34 显著高于对照 DeSD 种群 75.20；而 DeSD

× DeLJ ,DeLL × DeSD ,DeSD × DeLL ,DeLY × DeSD ,
DeSD × DeLY 杂交群体则显著低于对照种群。从各种群正反交群体繁殖力与对照相比 ,对照 DeSD 种群所在的反交组合表现的繁殖力均高于其正交组合。

分析基因型 B 各种群杂交结果显示：各杂交群体在繁殖力表现方面与对照 DeHB 种群在 $P_{0.05}$ 水平上均存在差异(图 3-B)，在所有杂交群体中 DeHB × DeYL 杂交群体繁殖力 69.99 显著高于对照 DeHB 种群 64.71；除 DeYL × DeHB 杂交群体的繁殖力 66.82 与对照在 $P_{0.01}$ 水平上无显著差异外 ,其余各杂交群体繁殖力在 $P_{0.05}$ 水平上显著低于对照种群。从各种群正反交群体繁殖力与对照比较来看 ,对照 DeHB 种群所在的反交组合除 DeYL × DeHB 繁殖力低于正交组合外 ,其余组合表现的繁殖力均高于其正交组合。



A. 1 -6. DeSD × DeLJ ,DeLJ × DeSD ,DeSD × DeLY ,DeLY × DeSD ,DeSD × DeLL ,DeLL × DeSD ,CK. DeSD × DeSD; B. 1 -10. DeHB × DeJL ,DeJL × DeHB ,DeHB × DeYL ,DeYL × DeHB ,DeHB × DeSG ,DeSG × DeHB ,DeHB × DeWY ,DeWY × DeHB ,DeHB × DeJJ ,DeJJ × DeHB ,CK. DeHB × DeHB.

图 3 各种群杂交群体繁殖力表型

Fig.3 The fecundity of each population group phenotype of hybrid

2.4 腐烂茎线虫生物学指标值相关性分析

从表 3 相关性指数分析 ,腐烂茎线虫两类基因型各种群基因型内杂交群体致病力与繁殖力均存在正相关 ,基因型 A 各种群内线虫杂交组合的致病力与繁殖力相关性 0.665；基因型 B 各种群内线虫杂交组合的致病力与繁殖力相关性 0.880 ,在 $P_{0.01}$ 水平上极显著。这与各基因型亲本间在致病力与繁殖力的相关性方面趋于一致^[9]。

表 3 腐烂茎线虫生物学指标值相关性分析
Tab.3 Partial correlation analysis of biological
index of *D. destructor*

线虫类型 Type	指标 Index	繁殖力 Fecundity
基因型 A 各杂交群体	致病力	0.665
基因型 B 各杂交群体		0.880 **

注：** . 在 0.01 水平(双侧) 上显著相关。
Note: ** . The 0.01 level(bilateral) is significantly related.

3 结论与讨论

利用室内接种方法对腐烂茎线虫杂交后代进行

致病力、繁殖力的测定 ,结果表明：同一基因型内各组合中均能杂交成功 ,比较发现各群体的后代数目与对照亲本的数目有显著差异 ,各杂交组合中杂交率与 F_1 数量均低于对照组(对照组为亲本自交)；从各种群正反交群体致病力、繁殖力与对照相比 ,具有基因型 A 的 DeSD 种群所在的反交组合表现特征均高于其正交组合 ,而具有基因型 B 的 DeHB 种群所在的反交组合除 DeYL × DeHB 致病力低于正交组合外 ,其余组合表现的致病力均高于其正交组合 ,从表型上分析 ,腐烂茎线虫的致病力遗传伴有一定的母系遗传特征 ,即细胞质遗传 ,至于腐烂茎线虫的致病相关基因属于细胞质遗传 ,还是细胞质与细胞核共有遗传有待进一步研究。

本研究对腐烂茎线虫进行杂交后代培养及致病力测定研究在我国尚属首次 ,这对模拟我国不同地理来源腐烂茎线虫种群扩散后所产生杂交后代的致病力分化情况 ,腐烂茎线虫遗传多样性具有重要的应用价值 ,并为不同地理来源有害生物入侵分险评

估提供理论依据。本试验的研究对我国不同地理来源腐烂茎线虫杂交后代致病力变异现象进行深入的研究,并对我国腐烂茎线虫遗传分化现象提供理论支持,为明确腐烂茎线虫的分类提供依据。

参考文献:

- [1] Hooper D J. *Ditylenchus destructor*. CIH description of plant-parasitic nematodes No. 21. CAB international [M]. Wallingford, UK, 1973.
- [2] 姚文国, 崔茂森. 马铃薯有害生物及其检疫 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 300-307.
- [3] 周 忠, 马代夫. 甘薯茎线虫病的研究现状和展望 [J]. 杂粮作物, 2003, 23(5): 288-290.
- [4] De Waele D, Jones B L, Bolton C, et al. *Ditylenchus destructor* in hulls and seeds of peanut [J]. Journal of Nematology, 1989, 21(1): 10-15.
- [5] 丁再福, 林茂松. 甘薯、马铃薯和薄荷上的茎线虫的鉴定 [J]. 植物保护学报, 1982, 9(3): 169-172, 219.
- [6] 丁 中, 彭德良, 高必达, 等. 甘薯茎线虫乙酰胆碱酯酶 *ace-3* 基因全长 cDNA 的克隆和序列分析 [J]. 农业生物技术学报, 2008, 16(2): 326-331.
- [7] 于海英, 彭德良, 胡先奇, 等. 马铃薯腐烂茎线虫 28S rDNA-D2/D3 区序列分析 [J]. 植物病理学报, 2009, 3: 254-261.
- [8] Goodey J B. *Ditylenchus myceliophagus* n. spp. (nematode, tylenchidae). Nematologica III, 1958: 91-96.
- [9] 王宏宝, 戚龙君, 王金成, 等. 马铃薯腐烂线虫不同群体同工酶表型与致病力研究 [J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2009, 35(4): 425-432.
- [10] 林茂松. 室内人工接种测定甘薯品种对马铃薯腐烂线虫的抗性 [J]. 南京农业大学学报, 1989, 12(3): 44-47.
- [11] 李杏山, 郭石山. 甘薯茎线虫病检疫程序及方法 [J]. 植物检疫, 1992, 6(1): 21-22.

《蔬菜》杂志征稿启事

《蔬菜》杂志是一册面向全国公开发行的蔬菜专业类杂志,由北京市农林科学院主办。杂志创办于 1982 年,为月刊,是“中国期刊全文数据库(CJDF)全文收录期刊”、“中国核心期刊(遴选)数据库来源期刊”、“中国学术期刊综合评价数据库(CAJCFD)统计源期刊”。杂志先后荣获了“全国优秀农业期刊”、“北方优秀期刊”、“北京市优秀期刊”等称号。

《蔬菜》杂志主要面向蔬菜业界的科研人员、技术推广人员、管理人员,以推广普及蔬菜产业发展先进理念、先进技术,传播业界发展动态信息,推动蔬菜产业发展为宗旨。主要栏目有:业界观察、栽培技术、植物保护、新优品种、土壤肥料、保鲜加工、文献综述、试验研究、经营管理、菜业资讯等。

近年来,各地蔬菜科研、推广单位承担完成了大量科研项目,成功选育出大批蔬菜新品种,提出了系列实用栽培模式和栽培技术。为了促进发展、扩大交流,特向社会各界征集稿件,欢迎国内外蔬菜科研领域的基础研究和应用研究的论文投稿。

投稿及联系方式:

投稿邮箱:sc5634@sohu.com

编辑部电话:010-51503567

编辑部地址:海淀区曙光花园中路9号 北京市农林科学院信息所《蔬菜》杂志社 100097