

香蕉穿孔线虫培养技术及其种群繁殖力研究

陈 淳^{1,2}, 谢 辉¹, 蔚应俊¹, 韩玉春¹, 秦 丹¹, 黄春晓¹, 唐 炯¹

(1 华南农业大学 植物线虫研究室, 广东 广州 510642 2 华南农业大学 科技处, 广东 广州 510642)

摘要: 以 10 g/L 琼脂粉培养基为对照, 研究筛选了新的培养基. 新筛选的 100 g/L 马蹄粉培养基、100 g/L 玉米粉培养基和 100 g/L 菱角粉培养基可以培养用于繁殖香蕉穿孔线虫的胡萝卜愈伤组织. 其中 100 g/L 马蹄粉培养基和 100 g/L 玉米粉培养基培养的胡萝卜愈伤组织繁殖香蕉穿孔线虫的效果较好, 而 100 g/L 马蹄粉培养基培养周期短、速度快、成本低, 可以用于代替琼脂粉培养基培养胡萝卜愈伤组织来繁殖香蕉穿孔线虫. 香蕉穿孔线虫不同种群的繁殖力存在明显差异, 本研究的 10 个种群中, 来源于红掌的 RH1 种群的繁殖力最强.

关键词: 香蕉穿孔线虫; 培养基; 培养技术; 繁殖力

中图分类号: S432.45

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X (2006) 01-0061-04

Studies on Cultural Technique and Reproduction Fitness of *Radopholus similis*

CHEN Chun^{1,2}, XIE Hui¹, WEI Yingjun¹, HAN Yuchun¹,
QIN Dan¹, HUANG Chunxiao¹, TANG Jiong¹

(1 Lab of Plant Nematology South China Agric Univ Guangzhou 510642 China

2 Division of Science and Technology Management South China Agric Univ, Guangzhou 510642 China)

Abstract The culture media of 100 g/L chinese water chestnut powder, 100 g/L corn powder and 100 g/L water chestnut powder were screened to used to culture carrot callus culturing *Radopholus similis*. Among these culture media, the culture results of 100 g/L chinese water chestnut powder and 100 g/L corn powder were preferable. The medium of 100 g/L chinese water chestnut powder had a good characteristics with short culture period, fast speed growth and lower costs, and suitable to replace the medium of agar powder. The reproduction fitness of 10 populations of *R. similis* from different hosts and origins were compared in carrot disk cultures at 25 °C. The result indicated that all *R. similis* populations completed their life cycle and significantly differed in reproduction ability among these populations. The reproduction of the RH1 population from *Anthurium andraeanum* was significantly more than that of all other populations.

Key words *Radopholus similis*; culture media; cultural technique; reproduction fitness

香蕉穿孔线虫 *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thome, 1949 是一种危害极大的植物病原线虫, 是中国禁止进境的一类植物检疫性有害生物, 也是国际上公认的极为重要的检疫性植物寄生线虫, 因此受到广泛重视和研究. 对香蕉穿孔线虫进行快速、大量的人工培养, 是开展该线虫其他方面研究的重要基

础. 目前国际上对香蕉穿孔线虫的培养主要是采用 10 g/L 水琼脂培养基或 White 培养基培养离体植物组织^[1,2]. 为了缩短培养所需的时间、降低成本, 本研究以 10 g/L 水琼脂培养基为对照, 研究筛选了新的培养基. 并采用 10 g/L 水琼脂培养基培养胡萝卜愈伤组织方法, 对进口观赏植物上发现的香蕉穿孔

收稿日期: 2005-05-09

作者简介: 陈 淳 (1979), 女, 硕士; 通讯作者: 谢 辉 (1963), 男, 教授, E-mail: xiehui@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (30471163); 农业部重点项目 (农财发 2003-9 农财发 2004-27); 广东省科技计划项目 (2004B20501001); 广东省农业厅项目 (粤财农 2003-247 粤财农 2004-230)

线虫不同种群的繁殖力进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试香蕉穿孔线虫 采用 Feder^[3] 和 Viglierchio^[4-6] 的方法, 从观赏植物的根组织和栽培介质中分离获得供试的香蕉穿孔线虫种群 10 个, 代号为 RH1~RH10 其中 RH2、RH3、RH5、RH6、RH10 寄主分别为孔雀竹芋 *Calathea mackayana*、钻石椰子 *Microcœlum waddellianum*、雨淋花烛 *Anthurium 'Rain Forrest'*、天鹅绒竹芋 *Calathea zebrina* 和袖珍椰子 *Chamaedorea elegans* Mart 其他的寄主为红掌 *Anthurium andraeanum*。

1.1.2 胡萝卜愈伤组织的制备 选用新鲜的胡萝卜 *Daucus carota* var *sativa* DC., 冲洗干净后, 切去前端和末端, 再用蒸馏水冲洗, 喷 $\varphi=95\%$ 的酒精于胡萝卜表面, 置于酒精灯火焰上烧 (重复 3 次, 直到表皮变黑、变干), 用灭菌的削皮刀削去胡萝卜的表皮, 然后将胡萝卜切成 5 mm 左右的薄片, 置于 10 g/L 水琼脂培养基上培养 10~11 d (25℃) 生成愈伤组织备用^[7]。

1.1.3 培养基的制备 称取 10 g 琼脂粉、100 g 菱角粉 (产地: 广东)、100 g 玉米粉 (产地: 广东) 或 100 g 马蹄粉 (产地: 广东) 放入 1 000 mL 蒸馏水中, 煮沸, 分别制得 10 g/L 水琼脂培养基 (A)、100 g/L 菱角 (*Tiapa* sp.) 粉培养基 (B)、100 g/L 玉米 (*Zea mays* L.) 粉培养基 (C)、100 g/L 马蹄 (*Eleocharis dulcis*) 粉培养基 (D), 分装于培养瓶中 (每瓶约 30 mL), 封口, 放于高压蒸气锅中 (121℃, 20 min) 灭菌^[10-11], 备用。

1.2 方法

1.2.1 香蕉穿孔线虫的接种培养 将分离获得的香蕉穿孔线虫 10 个种群进行纯化培养。从各种群中分别挑选出活力较强的香蕉穿孔线虫 25 条置于有 2 mL 无菌水的 10 mL 无菌试管中, 加入 1 mL 6 mg/L 的硫酸链霉素, 3~6 h 后, 用无菌的吸管吸去上层的溶液, 加入 3 mL 无菌水, 轻轻震荡, 然后以 1 500 r/min 离心 5 min 吸去上清液, 再加无菌水, 离心, 重复 2 或 3 次^[8-9]。用无菌的吸管将灭菌的线虫悬浮液吸到胡萝卜愈伤组织上, 置于 25℃下, 黑暗培养 45 d 获大量纯化的香蕉穿孔线虫备用。

1.2.2 不同培养基对胡萝卜愈伤组织和香蕉穿孔线虫的培养比较 按 1.1.2 方法准备胡萝卜片, 然后分别置于 1.1.3 中的 4 种培养基上培养 (25℃), 观察愈伤组织生长情况。将纯化培养的香蕉穿孔线虫 RH8 种群接种于在 1.1.3 中的 4 种培养基上培养

的胡萝卜愈伤组织上, 重复 3 次, 其中 10 g/L 水琼脂培养基胡萝卜愈伤组织作为对照, 置于 25℃下, 黑暗培养 45 d 后, 分别放入搅拌器中, 搅拌 3 次, 每次约 10 s 每次间隔 5 s^[7-12], 将胡萝卜悬浮液通过 100、400、500 目的套筛, 再用洗瓶将 400 目筛网上的线虫和 500 目网筛上的卵分别冲洗到烧杯中, 将 400 目网筛收集到的线虫悬浮液上贝曼氏漏斗, 24 h 后收集漏斗底部的线虫^[13]。将分离收集到的线虫和卵悬浮液移到 500 mL 离心管中 (约占离心管的 1/2), 以 1 500 r/min 离心 5 min^[7], 然后定容到 100 mL, 统计成虫、幼虫和卵数。

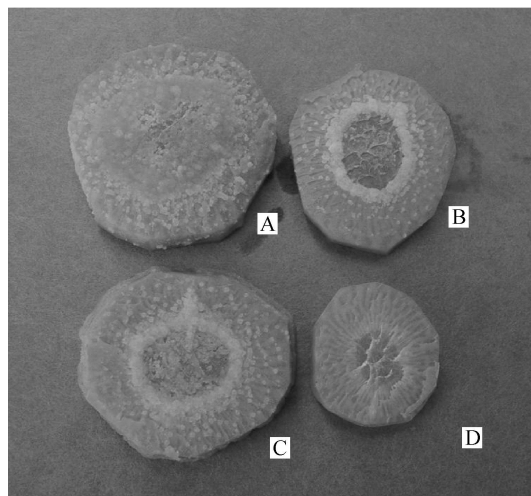
1.2.3 香蕉穿孔线虫种群繁殖力测定 将纯化培养的来源不同的香蕉穿孔线虫 10 个种群各 25 条接种于 10 g/L 水琼脂培养基胡萝卜愈伤组织上, 每个种群接种 3 瓶, 置于 25℃下黑暗培养 45 d 然后, 采用 1.2.2 方法进行线虫的分离和计数。

1.2.4 数据分析 采用 SAS 软件 (6.12 版) 进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对胡萝卜愈伤组织和香蕉穿孔线虫的培养比较

在 25℃下, 胡萝卜愈伤组织在供试的 4 种培养基上生长速度不同, 在 100 g/L 马蹄粉培养基上培养的胡萝卜片, 8 d 后就长出明显的愈伤组织, 可以接种培养香蕉穿孔线虫; 在 100 g/L 玉米粉培养基、10 g/L 水琼脂培养基和 100 g/L 菱角粉培养基上培养的胡萝卜片, 分别需要培养 14、15、22 d 才能长出可以接种培养线虫的愈伤组织 (图 1)。



A: 100 g/L 马蹄粉培养基 chinese water chestnut powder B: 10 g/L 水琼脂培养基 agar powder C: 100 g/L 玉米粉培养基 corn powder D: 100 g/L 菱角粉培养基 water chestnut powder

图 1 胡萝卜愈伤组织在不同培养基上培养 14 d 后的生长情况
Fig 1 The culture of carrot callus on different media (14 days after culture)

RH8种群的线虫接种于上述 4种培养基上长出的胡萝卜愈伤组织中, 25℃黑暗培养 45 d 结果(表 1)表明, 3种新的培养基培养的胡萝卜愈伤组织都能够用于培养香蕉穿孔线虫, 但培养效率不同.

100 g/L玉米粉培养基、100 g/L马蹄粉培养基培养的胡萝卜愈伤组织繁殖的虫数略低于对照 10 g/L水琼脂培养基, 100 g/L菱角粉培养基培养的胡萝卜愈伤组织繁殖的虫数则较少、培养效率低.

表 1 香蕉穿孔线虫在不同培养基上的培养效果¹⁾

Tah 1 Culture effect of *R. similis* on different media

培养基 ²⁾ media powder	卵 egg	幼虫 larva	雌虫数 female	雄虫数 male	虫数总计 add up
A	7 410±49 10a	7 927±68 74a	2 747±24 00b	854±7 63a	18 938±43 71a
B	1 833±21. 53d	958±6 51d	425±5. 92d	196±7. 61d	3 412±24 06c
C	4 913±54 20b	5 863±28 64b	2 188±57. 00c	569±4 41c	13 533±94 46b
D	4 100±21 72c	5 425±34 6c	3 093±21. 71a	640±5. 60b	13 258±125 90b

1) 同列数据后字母相同者, 表示 0.01水平上差异不显著 (Duncan's法); 2) A: 10 g/L水琼脂培养基, B: 100 g/L菱角粉培养基, C: 100 g/L玉米粉培养基, D: 100 g/L马蹄粉培养基

2.2 香蕉穿孔线虫不同种群的繁殖力

将来源不同的香蕉穿孔线虫 10个种群各 25条分别接种于胡萝卜愈伤组织上, 于 25℃下黑暗培养 45 d 各个种群都能完成它们的生活史并进行繁殖,

但不同种群的繁殖力存在差异(表 2). RH1种群繁殖能力比其他种群的繁殖力强, 共 36 037条, 是繁殖力最低的 RH9种群(3761)的 9.6倍; 其次为 RH8种群, 共有 18 938条.

表 2 香蕉穿孔线虫不同种群在 25℃下培养 45 d后的繁殖结果

Tah 2 Reproduction of the different populations of *R. similis* on carrot disks 45days after inoculation at 25℃

种群 population	卵 egg	幼虫 larva	雌虫 female	雄虫 male	总计 add up
RH1	15 670±57. 20a	13 607±175. 81a	5 198±32 00a	1 553±47. 50b	36 037±367. 63a
RH2	2 235±20. 00g	1 592±12. 83h	350±3. 14f	1 549±21. 36b	5 726±33. 79h
RH3	2 101±15. 05g	992±58 00i	221±5. 22f	1 641±21. 13b	4 955±86 43i
RH4	2 650±43 54f	2 150±8 91g	350±14 53f	3 950±42 50a	9 100±87. 82g
RH5	1 713±65 00h	5 650±51. 32d	2 850±22 51c	525±25. 01de	10 738±118 42f
RH6	6 950±20 52c	3 550±32 23e	1 400±13 61e	500±2 50de	12 400±46 46d
RH7	3 675±63 90e	2 938±10 83f	4 650±24 17b	363±10 10e	11 626±66 78e
RH8	7 410±55 00b	7 927±48 84b	2 747±66 21c	854±2 53c	18 938±103 22b
RH9	2 200±60 47g	1 029±58 00i	407±7. 00f	125±7. 02f	3 761±67. 61j
RH10	4 138±57 83d	6 888±100 10c	2 475±57. 52d	675±14 15cd	14 176±78 75c

1)同列数据后字母相同者, 表示 0.01水平上差异不显著 (Duncan's法)

3 结论

在 25℃下, 新筛选的 100 g/L马蹄粉培养基、100 g/L玉米粉培养基和 100 g/L菱角粉培养基都能够用于培养香蕉穿孔线虫. 100 g/L马蹄粉培养基培养的胡萝卜愈伤组织生长最快, 并且明显快于目前广泛使用的 10 g/L水琼脂培养基; 100 g/L玉米粉培养基培养的胡萝卜愈伤组织生长速度相近于 10 g/L水琼脂培养基; 100 g/L菱角粉培养基培养的胡萝卜愈伤组织生长速度较慢. 香蕉穿孔线虫在 3种新的培养基培养的胡萝卜愈伤组织上繁殖数量不同, 香蕉穿孔线虫在 100 g/L玉米粉培养基和 100 g/L马蹄粉培养基培养的胡萝卜愈伤组织上的繁殖力接近

于 10 g/L水琼脂培养基, 而在 100 g/L菱角粉培养基培养的胡萝卜愈伤组织上繁殖数远低于 10 g/L水琼脂培养基. 虽然在 100 g/L马蹄粉培养基培养的胡萝卜愈伤组织上的繁殖数稍低于 10 g/L水琼脂培养基, 但在 100 g/L马蹄粉培养基培养培养的胡萝卜愈伤组织上香蕉穿孔线虫数量增殖到最大所需的时间最短, 比用 10 g/L水琼脂培养基培养周期缩短一星期左右. 另外, 马蹄粉培养基的成本低, 1 000g的马蹄粉只需要 10元人民币, 而 100 g琼脂粉需要 80元人民币. 因此从培养成本和速度上看, 100 g/L马蹄粉培养基比 10 g/L水琼脂培养基更为经济和快速. 100 g/L玉米粉培养基培养周期与 10 g/L水琼脂培养基相似, 繁殖力略低于 10 g/L水琼脂培养基, 但

其成本更低, 1 000g的玉米粉才需要 2元人民币, 所以, 长期大量的培养繁殖香蕉穿孔线虫用该方法更经济.

在 25℃下, 供试的香蕉穿孔线虫各种群在胡萝卜愈伤组织上都能完成它们的生活史并进行繁殖, 但是, 种群的繁殖力表现出明显的差异, 这种差异存在于寄主不同的种群之间, 也存在于寄主相同的种群之间, 例如 RH1(红掌)种群、RH2(孔雀竹芋)种群、RH3(孔雀竹芋)种群、RH4(钻石椰子)种群、RH5(丛林王花烛)种群、RH6(天鹅绒竹芋)种群和 RH10(袖珍椰子)种群之间的繁殖能力都存在很大差异; 而在 5个红掌种群之间的繁殖力也明显不同. 这表明香蕉穿孔线虫种群的繁殖力与寄主无关, 而是取决于种群内部的特征(有待于进一步研究), 也反映了香蕉穿孔线虫具有丰富的生物多样性.

参考文献:

[1] NSERRA R N, OBANNON J H. Rearing migratory endoparasitic nematodes in citrus callus and roots produced from citrus leaves[J]. Journal of Nematology 1975 7 (3): 261-263

[2] REISE R W, HUTETTEL R N, SAYRE R M. Carrot callus tissue for culture of endoparasitic nematodes[J]. Journal of Nematology 1987, 19: 387-389.

[3] FEDER W A. Aseptic culture of the burrowing nematode *Radopholus similis* (Cobb) Thorne on excised okra root tissue[J]. Phytopathology 1958 48: 392-393.

[4] V GLIERCH D D R, SCHM ITT V. On the methodology of nematode extraction from field samples Comparison of methods for soil extraction[J]. Journal of Nematology 1983, 15: 450-454.

[5] V GLIERCH D D R, SCHM ITT V. On the methodology

of nematode extraction from field samples Baermann funnel modifications[J]. Journal of Nematology 1983 15: 438-444.

[6] V GLIERCH D D R, SCHM ITT V. On the methodology of nematode extraction from field samples Density flotation techniques[J]. Journal of Nematology 1983 15: 444-449.

[7] WAELE D, ELSSEN A. Migratory endoparasites *Pratylenchus* and *Radopholus* species[M] //STARR J L, BRIDGE J, COOK R. Plant Resistance to Parasitic Nematodes Wallingford CAB International 2002: 175-206.

[8] FALLAS G A, SARAH J L. Effect of storage temperature on the in vitro reproduction of *Radopholus similis*[J]. Nematopica 1994 24(2): 175-177.

[9] JAN J A, PETER M M S, LOES H M S. Population dynamics and damage potential of the burrowing nematode *Radopholus similis* on *Anthurium andreanum* grown in soil less medium[J]. Nematology 2002 4(3): 424-427.

[10] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 154-187.

[11] GUISAR B J, SOSAMMA V K. Tapioca pearl as a substitute for agar in culturing *Radopholus similis* on carrot discs[J]. Indian Journal of Nematology 1999 29(1): 78-111.

[12] KAPLAN D T, DAVIS E L. Improved nematode extraction from carrot disk culture[J]. Journal of Nematology 1990 22: 399-406.

[13] GAMAL A E, ETIENNE G, MOENS M. Morphological differences among *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne 1949 populations[J]. Russian Journal of Nematology 1999 7(2): 139-153.

【责任编辑 周志红】