

斯克里布纳短体线虫的单异活体培养

高学彪* 程瑚瑞 方中达
(线虫研究室) (南京农业大学植保教研组)

摘要 采用链霉素含量 1 000 单位/ml、青霉素含量 800 单位/ml 和放线菌酮含量 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的混合液作线虫的表面消毒剂,用无菌条件下生长在 White 培养基上的玉米、大豆、小麦和高粱 4 种植物的离体根均成功地培养了斯克里布纳短体线虫 *Pratylenchus scribneri*。在 28℃ 和 33℃ 下,培养效果均好。在 28℃ 培养 9 周,*P. scribneri* 在玉米离体根上繁殖了 8.4 倍。通过根和培养基块移置都获得继代培养。培养的线虫具有正常的侵染能力。

关键词 斯克里布纳短体线虫; 单异活体培养; 离体根

植物线虫的人工培养是一项重要的研究手段。单异活体培养 (monoxenic culture) 常用来繁殖短体线虫。由于用植株培养线虫具有不仅需要维持光照,而且要用大的容器维持茎叶的生长等不足^[1],因而常常采用植物离体根和愈伤组织培养短体线虫。Mountain (1955)^[4]首次用植物离体根培养了一种短体线虫 *P. minyus* (= *P. neglectus*)。迄今,短体属线虫培养成功的种类不多,仅加拿大、美国和英国等少数几个国家先后报道培养了 7 种短体线虫^[1~3]。因为对我国玉米根腐线虫病病原 *P. scribneri* 研究的需要,作者对 *P. scribneri* 的单异活体培养进行了研究。

1 材料与方法

1.1 离体根的培养和接种

采用单异活体培养技术繁殖无菌 *P. scribneri*。供试植物为玉米、大豆、小麦和高粱。先在 White 培养基^[9]上培养植物离体根,以作为 *P. scribneri* 的营养来源。供试 White 培养基的配方如下(以 1 000 ml 培养基计): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 360 mg, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 16.5 mg, KNO_3 80 mg, Na_2SO_4 200 mg, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 200 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 4.5 mg, KI 0.75 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 mg, H_3BO_3 1.5 mg, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 2.5 mg, 甘氨酸 3 mg, 维生素 B_1 0.1 mg, 维生素 B_6 0.1 mg, 烟酸 0.5 mg, 蔗糖 20 g, 琼脂 10 g。培养基 pH 值调至 6。

以浓度为 0.1% 的升汞溶液作种子消毒剂。消毒时,种子在 70% 的酒精中浸泡 10 s 后,在升汞溶液中处理 10~15 min,再用灭菌水浸洗 10 次。消毒后的种子移于 0.75% 的琼脂培养基上,置于 28℃ 培养室中萌发。待主根伸长 3~4 cm 后,剪下移于灭菌的 White 培养基平板上。每皿移入离体根 1~5 条备用。

以链霉素含量 1 000 单位/ml、青霉素含量 800 单位/ml 和放线菌酮含量 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的混合液作线虫的表面消毒剂。供试 *P. scribneri* 分离于河北省正定县的玉米根和根际土壤中。从分离液中挑取 100 条 *P. scribneri* 雌虫移于蒸馏水中,在“800 型”离心沉淀器(上海产)上用 1

* 本文系在南京农业大学完成的博士论文的一部分,第二、三作者为导师。
1991-07-11 收稿

500 r/min 速度离心5 min, 轻轻吸去上层液, 将线虫悬浮液移于表面消毒剂中处理20 min, 然后按上述离心方法用灭菌水浸洗5次。最后, 用灭菌的吸管将表面消毒后的线虫悬浮液移于培养基上的离体根旁。培养皿用 parafilm 膜封口后, 置于28℃或33℃下暗培养。上述操作均在无菌条件下进行。

定期在带底座光源的双目解剖镜下观察培养情况, 并在温室(约25℃)接种玉米苗, 测定培养的 *P. scribneri* 对玉米根的侵染能力。

1.2 培养效率测定

培养9皿玉米离体根, 每皿置入5条根。分别在各皿中接种表面消毒过的450条 *P. scribneri*, 置于28℃培养室中暗培养。在接种后第6, 9, 12周分别分离、计数3皿中线虫繁殖量, 计算平均虫量。分离采用浅盘法, 计数在双目解剖镜下进行。

2 结果

2.1 *P. scribneri* 的培养观察

在28℃和33℃条件下, 利用生长在 White 培养基上的玉米、大豆、小麦和高粱的离体根均成功地培养了 *P. scribneri*。经表面消毒后的 *P. scribneri* 雌虫接入培养基后, 向离体根移动, 取食根并产卵繁殖。一般在培养约30天后, 根外培养基上才观察到较多的线虫(图版1)。

在供试的4种植物离体根上的繁殖均好。玉米具有种子消毒最简易、根萌发生长快的特点, 因而最适于培养 *P. scribneri*。

系统检查表明, *P. scribneri* 的继代培养以2~3个月进行1次为宜。剪取一小段含有线虫的根或一小块带有线虫的培养基均可得到继代培养。培养的线虫随皿装入塑料袋中, 置冰箱在5~10℃下保存40天以上, 大部分供试线虫仍具良好活性。温室接种试验表明, 培养的 *P. scribneri* 对玉米根具有正常的侵染能力。

2.2 *P. scribneri* 的培养效率测定

培养效率测定结果表明, *P. scribneri* 在玉米离体根上繁殖很好。供试线虫培养6周后, 虫量增长3.1倍; 培养9周, 虫量增长最多, 达8.4倍。详细结果见表1。



图版1 玉米离体根上培养的
Pratylenchus scribneri

表1 *Pratylenchus scribneri* 群体繁殖量与培养时间的关系

培养时间	接种虫量(条)	繁殖虫量(条)	增长倍数
6周	450	1 405	3.1
9周	450	3 769	8.4
12周	450	3 493	7.8

3 讨论和结论

单异活体培养通常被认为是一项相当难于掌握而又花时间的技术^[6], 但一旦获得线虫的无菌纯培养, 就只需继代培养, 从而获得大量的纯群体, 利于进行线虫的生理生化特性以及生物学等方面的研究, 尤其是对研究线虫与植物及线虫与其它微生物的相互关系具有重要意义。我国尚未见培养短体线虫的报道。世界上仅报道了7种短体线虫^[1-8], 且多限于用植物的愈伤组织培养^[2,3,6,7]。*P. scribneri* 仅在胡萝卜愈伤组织上培养过^[6], 在离体根上尚无研究。本研究用生长在 White 培养基上的玉米、大豆、小麦和高粱等4种植物的离体根, 都成功地培养了 *P. scribneri*, 其中小麦和高粱都是新用于培养短体线虫的植物。在28℃和33℃条件下, *P. scribneri* 在玉米、大豆、小麦和高粱等4种植物的离体根上的繁殖效果良好, 且能保持对玉米寄主的侵染能力。与用胡萝卜愈伤组织培养 *P. scribneri* 比较, 这种用植物离体根培养 *P. scribneri* 的方法具有不需向培养基加激素和不需要光照的特点。此外, 值得一提的是, 培养皿用 parafilm 膜封口, 利于防止培养基水份蒸发, 使培养时间延续3个月以上。

链霉素是常用的线虫表面消毒剂^[1,4]。据报道^[4], 用0.1%硫酸链霉素处理, 结合在紫外光照下人工挑虫消毒短体线虫, 消毒效率低。本研究根据链霉素和青霉素共同使用对革兰氏阴性细菌和革兰氏阳性细菌的广谱抗菌作用以及放线菌酮对真菌有良好抑制作用的原理, 采用链霉素1 000单位/ml, 青霉素800单位/ml, 放线菌酮15 µg/ml 的混合液作为表面消毒剂, 处理20 min, 结合离心沉淀法浸洗, 相对快速有效。

参 考 文 献

- 1 Chitambar J J. & Raski D J. Life history of *Pratylenchus vulvulus* on carrot discs. *Journal of Nematology* 1985, 17 (2): 235~236
- 2 Koenning S R. & Schmitt D P. Reproduction of *Pratylenchus brachyurus* on soybean callus tissue effects of culture age and observations on anhydrobiosis. *Journal of Nematology* 1986, 18 (4): 581~582
- 3 Krusberg L R. Studies on the culturing and parasitism of plantparasitic nematodes, in particular *Ditylenchus dipsaci* and *Aphelenchoides ritzemabosi* on alfalfa tissue. *Nematologica* 1961, 6: 181~200
- 4 Mountain W B. A method of culturing plant parasitic nematodes under sterile conditions. *Proc. Helm. Soc. Wash. D. C.* 1955, 22 (1): 49~52
- 5 Plays J M. & Meredith C P. Dual cultures of grape (*Vitis spp.*) and the lesion nematode (*Pratylenchus vulvulus*) for studies of nematode tolerance. *Plant Disease* 1984, 68: 1058~1060
- 6 Riese R W., Huettel R M. Carrot callus tissue for culture of endoparasitic nematodes. *Journal of Nematology* 1987, 19 (3): 387~389
- 7 Riedel R M., Foster J G. & Mai W F. Monoxenic culture of *Pratylenchus penetrans* on a simplified medium. *Journal of Nematology* 1972, 4 (4): 232
- 8 Tiner J D. Cultures of the plant parasitic nematode genus *Pratylenchus* on sterile excised roots. I. their establishment and maintenance. *Experiment Parasitology* 1960, 9: 121~126
- 9 White P R. A handbook of Plant Tissue culture. Jaques Cattell Press. Lancaster, Penn. 1943, 277

MONOXENIC CULTURE OF *Pratylenchus scribneri*
ON EXCISED ROOTS OF FOUR CROPS

Gao Xuebiao* Cheng Hurui Fang Zhongda
(Plant Pathology Division, Nanjing Agricultural University)

Abstract *Pratylenchus scribneri* was monoxenically cultured in petri dishes under aseptic conditions both at 28°C and 33°C, using respectively excised roots of the corn, soybean, wheat and sorghum grown on White's medium. A 8-fold increase in number of nematodes was observed from *P. scribneri* cultured on excised corn roots at 28°C for 9 weeks. For surface sterilization, females of *P. scribneri* were incubated in a solution containing streptomycin sulfate (1 000 units/ml), penicillin (800 units/ml) and actidione (15 µg/ml) for 20 minutes, followed by five rinses in sterile distilled water.

Key words *Pratylenchus scribneri*, Monoxenic culture, Excised roots

* Presently address: Laboratory of Plant Nematology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642