

无菌培养条件下不同碳素和 NH_4^+ 水平 对刺线虫生活史的影响

罗大民¹, 王 博², 方文珍¹, S. J. BECKER³, J. O. BECKER³

(1 厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005; 2 厦门市环保局, 福建 厦门 361006;

3 Department of Nematology, University of California, Riverside)

摘要:在 24 °C 无菌、无光照、不同碳素和氮素水平培养条件下, 观察了以玉米切根根尖为食的长尾刺线虫 *Belonolaimus longicaudatus* 的发育. 结果表明, 刺线虫完成生活史所需的最短时间没有明显受到不同碳素水平的影响. 碳素缺乏时, 刺线虫的存活率和成虫的比率明显下降. 在 5~10 倍于标准 B5 培养基中 NH_4^+ 水平的环境下, 没有观察到 NH_4^+ 对刺线虫的发育有不良影响.

关键词:刺线虫; 无菌培养; 蔗糖; NH_4^+

中图分类号: Q18

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2004)03-0048-03

Effect of different organic carbon and NH_4^+ levels on life cycle of *Belonolaimus longicaudatus* on excised corn root

LUO Da-min¹, WANG Bo², FANG Wen-zhen¹, S. J. BECKER³, J. O. BECKER³

(1 School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2 Environment Protection Bureau of Xiamen, Xiamen 361006, China;

3 Department of Nematology, University of California, Riverside)

Abstract: The effect of different sucrose and NH_4^+ levels on development of *Belonolaimus longicaudatus* was separately investigated on excised corn root in 24 °C. The results showed that the maximum development rate of the nematodes was not obviously affected by organic carbon levels tested as nematodes approaching in the stage of adult. Carbohydrate-poor nutritious sediment had an important impact on the survival rate and the percentage of adult of the sting nematode. Whereas, the ammonium-rich amendment didn't have any negative impact on the maximum rate of development, survival rate, and the percentage of juveniles and adults within the certain range tested.

Key words: *Belonolaimus longicaudatus*; gnotobiotic culture; sucrose; NH_4^+

应用无机肥和有机肥降低植物线虫种群数量的研究已有许多报道^[1], 并且肥料已经被视为一种非常规的线虫防治方法. 通过试验, 证实了 10 种氨盐和氨释放物对爪哇根结线虫 *Meloidogyne javanica* 有很好的杀灭活性^[2]. 尿素释放的 NH_3 对植物线虫种群的抑制是最有效的^[3]. 并且, 其防治植物线虫的效率常与所使用的量相关^[4]. 当土壤施用肥料后, 其中的氮素被矿化成 NH_4^+ 或 NO_3^- 的形式而有利于作物

根的吸收和摄取. 本实验以长尾刺线虫 *Belonolaimus longicaudatus* 为材料, 探讨了 NH_4^+ 性氮素和有机碳素对刺线虫发育的影响.

1 材料与方法

1.1 线虫卵的提取和表面消毒

长尾刺线虫在实验室种植的草皮上保种. 实验用刺线虫虫卵从种植草皮的沙中分离获得. 虫卵分

收稿日期: 2003-12-08

作者简介: 罗大民(1962-), 男, 副教授, 博士.

基金项目: 教育部留学回国人员基金; 厦门市环保局科技计划项目

离和表面消毒方法参见 Huang 等^[5]的方法。

1.2 玉米根和线虫培养

培养基的配制、玉米切根和刺线虫的无菌培养同样均依照 Huang 等^[5]的方法。 ρ (蔗糖)分别为 4、8、12、16 和 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; $c(\text{NH}_4^+)$ 分别为 0.001、0.005、0.010、0.015 和 0.020 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。对照为常规 B5 培养基, ρ (蔗糖)为 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $c(\text{NH}_4^+)$ 0.001 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 将无菌的玉米切根分别接种于含不同浓度碳素和氮素的培养皿中, 待切根生长 1 周后即可接种第 2 期幼虫(J2)。每个培养皿中分别接种 100 条 J2。用封口胶带将培养皿盖封口, 然后放置于无光照、24 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中培养。每个浓度处理设 6 个重复。

为了尽可能地使每个培养皿中玉米根尖的密度基本相似, 以避免培养皿中玉米次生根根尖的密度可能成为刺线虫发育的限制因子之一, 因此, 在 ρ (蔗糖)为 4 和 8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养皿中分别接种 8 和 6 条切根, 而在其他培养皿中分别接入 4 条切根。计数每个培养皿中的根系生物量(以次生根根尖的数量表示)。

1.3 氮素和碳素对刺线虫生活史的影响

在双目解剖镜和倒置显微镜下观察并记录刺线虫从 J2 到下一个世代 J2 的发育情况, 记录线虫性别分化、第 4 次蜕皮(M4)和成虫期出现的时间, 统计每个培养皿中发育最快的 2~4 条线虫和每个培养皿中第 1 枚卵和 J2 孵出的时间。至每皿中第 1 条 J2 孵出时终止实验。线虫存活率为实验结束时每皿中存活的线虫数量占该皿中接种的 J2 数量的百分率。成虫比率为实验结束时每皿中性分化的第 4 期幼虫(J4)、成熟前期和成虫的数量占该皿接种的 J2 数量的百分率。

1.4 数据处理

不同氮素和碳素水平处理下, 玉米根尖密度和刺线虫发育速率间的差异均用 SPSS8.0 进行方差显著性分析。

2 实验结果

在碳素对玉米根尖生物量实验中, 除了 ρ 为 4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养皿生长状况稍差外(表 1), 玉米根尖的生物量在其他质量浓度处理组间的差异并不显著。当培养基中 ρ (蔗糖)低于 4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 玉米根不能正常生长。氮素实验中, 当 $c(\text{NH}_4^+) \geq 0.015 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 玉米切根不能正常生长。在 0.001~0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内, 玉米切根长势良好且根系的生物量之间没有显著的差异。

大约 30% 的 J2 在接种后不久死亡。从每个培养皿中发育速率最快的前 2~4 条线虫的比较结果看, 玉米切根组织中碳素含量对刺线虫从 J2 至成虫期这

表 1 在不同碳素和氮素水平的离体培养条件下玉米切根的生长结果¹⁾

Tab. 1 Result of excised corn roots grown at different concentrations of sucrose and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in gnotobiotic culture (条·皿⁻¹)

蔗糖 sucrose		$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	
$\rho/$ ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	次生根生物量 biomass of roots	$c/$ ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	次生根生物量 biomass of roots
4	24.6a ± 9.3	0.001	29.8a ± 10.2
8	28.6ab ± 11.6	0.005	33.4ab ± 8.5
12	30.7ab ± 13.2	0.010	36.3ab ± 6.1
16	32.8b ± 10.9	0.015	
20	33.3b ± 12.9	0.020	

1) 同列平均数后字母不同表示差异显著 ($P \leq 0.05$)

段的发育似乎没有明显的影响(图 1)。不同碳素水平培养条件下, 刺线虫生殖原基出现所需最短的时间仅相差 1~2 d, 但所需平均时间没有显著差异。当发育至成虫期时, 最低和最高碳素水平处理组所需最短时间的差异相差 2~3 d 或平均相差 4~5 d, 其他处理间无显著差异。当可利用的碳素水平降低时, 成虫个体的大小并无明显差异。在碳素水平相对较低时 [ρ (蔗糖) $\leq 8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$], 没有观察到雌虫产卵; 而碳素浓度在 12 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上时, 刺线虫在 36~39 d 内完成生活史。

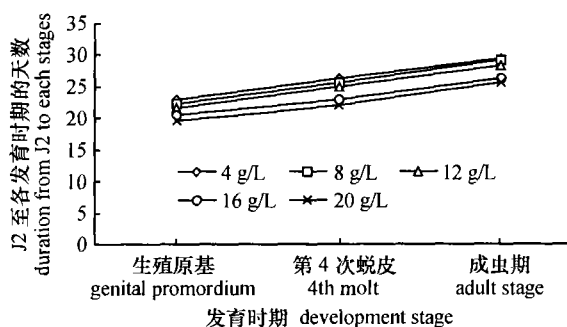


图 1 离体培养条件下不同蔗糖水平对刺线虫发育的影响
Fig. 1 Effect of different sucrose levels on development of *B. longicaudatus* in gnotobiotic culture

在碳素缺乏时, 许多线虫幼虫长时间不停地在寻找食物源, 似乎不能很快找到合适的根尖取食, 多数幼虫的发育缓慢。当实验结束时, 大多数线虫的发育阶段仍处于第 3 期幼虫(J3)。碳素的缺乏对刺线虫的存活率和成虫(包括性分化的 J4 和成熟前期成虫)所占存活线虫总数的比例有明显的影 响。实验结束时, 蔗糖浓度在 12~20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间的处理组中, 刺线虫的存活率几乎比 4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理下的高 2~3 倍, 同时, 成虫所占的比例也要比最低处理组的高 3 倍(表 2)。

表2 离体培养条件下不同蔗糖水平对刺线虫存活率和成虫比率的影响¹⁾

Tab. 2 Effect of different sucrose levels on survival rate and adult rate of *B. longicaudatus* in vitro

ρ (蔗糖 sucrose) /(g·L ⁻¹)	线虫存活率 survival rate/%	成虫比率/% percentage of adult /%	雌虫产卵 情况 female lay eggs
4	16.5a±7.4	6.3a±2.7	无
8	18.3a±5.7	10.3a±5.5	无
12	33.5b±9.9	19.5b±7.4	有
16	40.3bc±8.4	21.3b±7.1	有
20	44.2c±6.8	22.5b±8.5	有

1) 同列中平均数后具相同字母者表示差异不显著($P>0.05$)

表3 24℃无菌培养条件下不同NH₄⁺水平对刺线虫发育的影响¹⁾

Tab. 3 Effect of different NH₄⁺ level on development of *B. longicaudatus* in gnotobiotic culture at 24℃

$c[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ /(mol·L ⁻¹)	生殖原基 genital promordium/d	第4次蜕皮 fourth molt/d	成虫期 stage of adult/d	生活史 life cycle /d	存活率 survival rate /%	成虫百分率 percentage of adult /%
0.001	19.4a±2.8	21.5a±2.9	25.3a±3.02	36~40	40.0a±8.8	20.2a±7.8
0.005	19.3a±2.6	21.5a±2.8	23.8a±2.9	35~39	49.3a±7.1	25.2a±7.6
0.010	19.3a±2.3	21.6a±2.8	23.9a±2.7	36~39	45.8a±9.3	22.8a±9.2

1) 同列平均数后具相同字母者表示差异不显著($P>0.05$)

3 讨论

植物线虫的数量和群落结构与植物组织中的营养物水平有密切的关系^[5,6]。当玉米根尖缺乏碳素时,多数线虫幼虫死于营养不良或不适口,刺线虫需花更多时间去寻找一个较为适口的根尖进行取食,并且会延长取食时间来满足发育所需碳水化合物的量,最终导致存活率和成虫比例较低。但是,刺线虫极长的口针又使其在一旦找到合适的根尖后,可以在同一点上取食较长时间,在一定程度上弥补了碳素含量和根尖密度较低的不足,因此,在发育最快的刺线虫个体大小之间似乎未受玉米根尖中碳素水平的影响。基于在碳素水平低时,刺线虫的整体发育速率下降、存活率低、成虫所占比例小和雌虫未产卵等,推测刺线虫的种群数量亦会受到影响。碳素的这种作用同样在柑橘半穿刺线虫 *Tylenchulus semipenetrans* 种群数量变化中存在^[8]。

在5~10倍于标准B5的NH₄⁺浓度下,多数接种的J2能很快找到玉米根尖并取食,没有发现根尖组织中有导致J2不适口的物质存在的现象。同样,在较高NH₄⁺环境中生长的玉米根尖周围,也没有观察到有排斥线虫取食的活性分泌物存在的迹象。可见,复合肥中含氮化合物的矿质化产物之一的NH₄⁺并不直接作用于刺线虫的卵、J2和成虫。

参考文献:

[1] SHARMA G C. Impact of different soil components on the in-

festation potential of *Meloidogyne incognita* in french bean (*Phaseolus vulgaris*) [J]. Indian Journal of Agricultural Sciences, 2001, 71 (4): 535-537.

从表3中可见,在5、10倍于对照NH₄⁺浓度下,刺线虫生活史中的几个主要发育阶段均没有受到影响,即在玉米切根能正常生长的氮素水平下,刺线虫均能正常发育生长和繁殖。此外,雌虫和雄虫的发育速率之间没有显著差异。从接种J2至各个特定发育阶段所需时间之间也没有显著的差异。在相对高NH₄⁺浓度条件下,刺线虫在35~39d内完成生活史,这与对照组中的结果基本相似。线虫的存活率、性分化以上线虫的数量占全部存活线虫比例的统计结果(表3)表明,各处理组间无显著差异。

- [2] OKA J, PIVONIA S. Use of ammonia-releasing compounds for control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* [J]. Nematology, 2002, 4 (1): 65-71.
- [3] AKHTAR M, MALIK A. Roles of organic soil amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematodes: a review [J]. Bioresource Technology, 2000, 74 (1): 35-47.
- [4] AKHTAR M. Effects of two compositae plant species and two types of fertilizer on nematodes in an alluvial soil, India [J]. Appl Soil Ecol, 1998, 10 (1): 21-25.
- [5] HUANG X, BECKER J O. In vitro culture and feeding behavior of *Belonolaimus longicaudatus* on excised *Zea mays* roots [J]. J of Nematology, 1997, 29 (4): 411-415.
- [6] VERSCHOOR B C, R G M de GOEDE, F W de VRIES, et al. Changes in the composition of the plant-feeding nematode community in grasslands after cessation of fertiliser application [J]. Appl Soil Ecol, 2001, 17 (1): 1-17.
- [7] TODD T C. Effects of management practices on nematode community structure in tallgrass prairie [J]. Appl Soil Ecol, 1996, 3 (3): 235-246.
- [8] LARRY W D, DAVID M E. Responses of *Tylenchulus semipenetrans* to citrus fruit removal: implications for carbohydrate competition [J]. J of Nematology, 1993, 25 (1): 7-14.

【责任编辑 周志红】