

不同方法培养保存后相似穿孔线虫的单雌繁殖力的测定

武玉环^{1,2}, 徐春玲¹, 陈淳¹, 张超¹, 谢辉¹

(1 华南农业大学资源环境学院,植物检疫线虫检测与防疫研究中心,广东广州510642;

2 河北北方学院,河北张家口075000)

摘要:采用胡萝卜愈伤组织培养(25℃)的方法,测定传入中国温室的相似穿孔线虫6个种群单条雌虫的繁殖力,并比较这些种群经长期在胡萝卜愈伤组织上培养保存和在寄主红掌上接种复壮保存的单雌繁殖力.结果表明,在25℃条件下,供试相似穿孔线虫种群经长期在胡萝卜愈伤组织上培养保存和在寄主植物上复壮后的单条雌虫在胡萝卜愈伤组织上均能完成生活史并进行繁殖,同一种群经不同保存处理的后代单雌繁殖力以及不同种群经同种保存处理的后代单雌繁殖力均存在差异;在胡萝卜愈伤组织上长期培养保存和在寄主植物上接种复壮保存都会对相似穿孔线虫的单雌繁殖力产生影响,但不同种群单雌繁殖力所受影响的情况不同.

关键词:相似穿孔线虫;胡萝卜愈伤组织;红掌;繁殖力

中图分类号:S432.45

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2010)04-0036-04

Reproduction of *Radopholus similis* Cultured and Maintained in Different Methods After Inoculation of Carrot Callus with One Female

WU Yu-huan^{1,2}, XU Chun-ling¹, CHEN Chun¹, ZHANG Chao¹, XIE Hui¹

(1 Research Center of Nematodes of Plant Quarantine, College of Resources and Environment,

South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

Abstract: Six isolates of *Radopholus similis* from the greenhouse in China were tested for their reproductive fitness after inoculating carrot callus with one female at 25℃, and the reproduction of single female of *R. similis* isolates cultured long in carrot callus and rejuvenated of *Anthurium andraeanum* were compared. At 25℃, one female of all *R. similis* offspring could complete their life cycle and reproduce in carrot callus, and there were differences in reproduction inter- and intra-isolates. The reproduction of single female of *R. similis* isolates was affected by long culturing period in carrot callus and rejuvenation of *A. andraeanum*, while there were differences among the isolates.

Key words: *Radopholus similis*; carrot callus; *Anthurium andraeanum*; reproduction

相似穿孔线虫 *Radopholus similis* (Cobb, 1893) 植物寄生线虫,备受各国的关注和研究.相似穿孔线虫雌雄异体进行两性生殖,也可以进行孤雌生殖^[1]. Thorne, 1949 俗称香蕉穿孔线虫,是中国禁止进境的植物检疫性有害生物,也是国际公认的重大检疫性在适宜条件下完成1个生活史通常需要20~25 d,

收稿日期:2009-12-15

作者简介:武玉环(1981—),女,助教,硕士;通信作者:谢辉(1963—),男,教授,博士,E-mail: xiehui@scau.edu.cn

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(200903040);农业部农作物病虫害监测与防治项目【(农财发2009)71号】

在胡萝卜 *Daucus carota* 愈伤组织上的繁殖适宜温度为 25 °C^[2]。近几年,相似穿孔线虫随着观赏植物的引进传入中国的温室,对观赏植物造成严重危害和经济损失,引起中国对该线虫的重视。目前国内外对该线虫进行研究所需的虫源大多数是通过胡萝卜愈伤组织培养保存和扩繁的,有些研究为了获得纯化的虫源则利用单条雌虫在胡萝卜愈伤组织上培养扩繁。本研究测定了在中国温室的进口观赏植物上获得的相似穿孔线虫 6 个种群单条雌虫在胡萝卜愈伤组织上(25 °C)的繁殖力,并对这些种群经长期在胡萝卜愈伤组织上培养(6 代以上)后单条雌虫的繁殖力和在寄主上接种复壮后的单雌繁殖力进行比较研究,初步明确在胡萝卜愈伤组织上培养保存以及在寄主植物上复壮保存对单雌繁殖力的影响,为进一步研究和掌握传入中国的相似穿孔线虫生物学和病理学特性提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 供试线虫种群

相似穿孔线虫 *Radopholus similis* 由华南农业大学植物线虫研究室采集、分离和鉴定,并在胡萝卜愈伤组织上培养保存 6 个月(约 9 代)以上。供试的 6 个种群 RSO1 ~ RSO6 均来源于进口的观赏植物(表 1)。将此 6 个种群分别接种到红掌 *Anthurium andraeanum* 根上进行复壮性繁殖得到的后代分别为 RSA1 ~ RSA6,然后将 RSA1 ~ RSA6 分别在胡萝卜愈伤组织上连续培养 6 代得到的后代分别为 RSB1 ~ RSB6,同时将 RSA1 ~ RSA6 分别接种到红掌根上进行第 2 次复壮性繁殖得到的后代分别为 RSC1 ~ RSC6。在胡萝卜愈伤组织上培养相似穿孔线虫见 Stoffelen 等^[3]的方法。

表 1 供试的相似穿孔线虫种群

Tab. 1 List of tested *Radopholus similis* isolates

序号	种群编号	寄主植物
1	RSO1	红掌 <i>Anthurium andraeanum</i>
2	RSO2	孔雀竹芋 <i>Calathea makoyana</i>
3	RSO3	散尾葵 <i>Chrysalidocarpus lutescens</i>
4	RSO4	孔雀竹芋 <i>Calathea makoyana</i>
5	RSO5	富贵椰子 <i>Collinia</i> sp.
6	RSO6	天鹅绒竹芋 <i>Calathea zebrina</i>

1.2 胡萝卜愈伤组织的制备

胡萝卜愈伤组织的制备主要参考 Moody 等^[4]和 Reise 等^[5]的方法,并加以改进,操作过程如下:从市

场上购买到新鲜的胡萝卜,用自来水冲洗干净,在通风阴凉处晾干,在工业酒精中浸泡 1 min 之后,在酒精灯上烧,直到胡萝卜表皮由桔红色变成暗红色,在超净工作台上放 1 张经过无菌处理的滤纸(直径 12.5 cm)作垫,用灭菌刀削去胡萝卜表皮,并将其切成直径为 3 ~ 4 cm,厚约 0.5 cm 的薄片,然后放入经过灭菌的直径为 6 cm 的玻璃培养皿中,并用封口膜封好,放入 25 °C 的培养箱中黑暗培养约 15 d 长出愈伤组织备用。

1.3 相似穿孔线虫的接种培养

在解剖镜下,从分离收集的供试相似穿孔线虫中分别挑取 20 条雌虫,放入盛有 2 g/L 硫酸链霉素溶液的 1.5 mL 离心管中,放置 3 h 进行表面消毒,然后在超净工作台上,用无菌水清洗 2 次,把已消毒的线虫接到胡萝卜愈伤组织上,每个胡萝卜愈伤组织只接 1 条雌虫,并用封口膜封好,放入 25 °C 的培养箱中黑暗培养 50 d。每个处理 5 次重复。

1.4 相似穿孔线虫的分离和统计

把接种相似穿孔线虫培养到期的胡萝卜愈伤组织取出,放入搅拌器中加入适量的自来水搅拌 10 s,间隔 5 s,重复 3 次。将搅拌后得到的悬浮液通过 100、500 目组合筛,用自来水反复冲洗后,用洗瓶冲洗收集 500 目筛上的线虫至烧杯中并定容,充分混匀后用移液管吸取 1 mL 线虫悬浮液放入培养皿中,在解剖镜下分别统计雌虫、雄虫、幼虫和卵的数量,重复 3 次取平均值,然后根据定容的体积计算出每个接种重复的总虫量。

1.5 数据分析

用 SPSS. V13.0 软件处理所得试验数据。

2 结果与分析

在 25 °C 条件下,相似穿孔线虫种群经长期组织培养保存和在寄主植物上复壮处理后得到的后代,其单条雌虫在胡萝卜愈伤组织上均能完成生活史并进行繁殖,同一种群经长期组织培养和复壮后的单雌繁殖力以及不同种群经同种培养保存处理后代之间的单雌繁殖力都存在差异(表 2)。1 ~ 3 号种群经 1 次复壮的后代(RSA1 ~ RSA3)单雌繁殖量大于或显著大于长期在胡萝卜愈伤组织上培养的相应后代(RSO1 ~ RSO3 和 RSB1 ~ RSB3),但是 RSA1 ~ RSA3 的单雌繁殖量也显著大于经连续 2 次复壮后的相应种群后代 RSC1 ~ RSC3,而 RSO1 ~ RSO3 的单雌繁殖量显著大于相应的 RSC1 ~ RSC3;4 号种群单雌繁殖

量由大到小的处理后代是连续2次复壮的RSC4 > 1次复壮的RSA4 > 在胡萝卜愈伤组织上长期培养的RSO4 > 1次复壮后在胡萝卜愈伤组织上连续培养6代的RSB4; 5号种群单雌繁殖量由大到小的处理后代是在胡萝卜愈伤组织上长期保存的RSO5 > 连续2次复壮后的RSC5 > 1次复壮后在胡萝卜愈伤组织上连续培养6代的RSB5 > 1次复壮的RSA5; 6号种群单雌繁殖量由大到小的处理后代是连续2次复壮后的RSC6 > 1次复壮后在胡萝卜愈伤组织上连续培养6代的RSB6 > 在胡萝卜愈伤组织上长期保存的

RSO6 > 1次复壮的RSA6, 这些后代间的单雌繁殖量差异均显著.

在所有相似穿孔线虫种群的不同培养保存处理的后代中, 单雌平均繁殖量最大的是RSA3, 最小的是RSB1; 平均繁殖量低于1 000条的分别是RSB1、RSC1和RSB2. 单雌繁殖的后代中, 一般是卵占总虫量的比重最大, 其次是幼虫和雌虫, 雄虫的比例最小. 在雌虫和雄虫的比率方面, 各处理均不小于1, 其中有10个处理的雌雄比值大于5, 说明在单条雌虫繁殖的后代中, 雌虫数量远远多于雄虫.

表2 相似穿孔线虫单条雌虫在胡萝卜愈伤组织上培养50 d的虫量¹⁾

Tab. 2 Reproduction of *R. similis* after inoculation of carrot callus with one female after 50 days 25 °C

群体编号	雌虫	雄虫	幼虫	卵	总虫量	雌/雄
RSO1	493 ± 11.66Be	111 ± 3.79Bde	612 ± 6.04Ad	340 ± 9.92Be	1 556 ± 12.20Bf	4.46 ± 0.06Bc
RSA1	653 ± 26.58Ac	125 ± 5.27Ab	434 ± 24.33Bc	1 621 ± 59.21Ac	2 832 ± 66.77Ac	5.26 ± 0.28Acd
RSB1	45 ± 1.83De	26 ± 1.39De	60 ± 2.54Df	71 ± 2.75Df	202 ± 5.84Df	1.72 ± 0.12Dd
RSC1	209 ± 4.51Cf	78 ± 4.22Cd	226 ± 4.10Ce	175 ± 5.67Ce	687 ± 14.33Ce	2.71 ± 0.11Cc
RSO2	514 ± 11.12Bde	188 ± 6.24Ab	994 ± 24.39Ab	1 109 ± 19.34Cb	2 805 ± 34.76Ab	2.75 ± 0.14BCe
RSA2	553 ± 14.75Ad	96 ± 6.98Cc	756 ± 16.79Bb	1 492 ± 46.90Ac	2 897 ± 69.96Ac	5.85 ± 0.39Ac
RSB2	168 ± 6.95Dd	58 ± 0.66Dd	355 ± 10.55Dd	277 ± 7.51De	857 ± 9.33Ce	2.91 ± 0.11Bc
RSC2	271 ± 4.62Ce	124 ± 4.72Bc	439 ± 10.28Cd	1 295 ± 24.03Bd	2 128 ± 27.43Bd	2.20 ± 0.11Cd
RSO3	769 ± 18.53Cc	129 ± 5.50Ccd	755 ± 13.02Cc	742 ± 8.56Dd	2 394 ± 17.58Dd	6.00 ± 0.12Bb
RSA3	1 305 ± 40.44Aa	182 ± 8.42Ba	824 ± 27.80Ba	4 964 ± 74.79Aa	7 274 ± 70.13Aa	7.24 ± 0.36Ab
RSB3	1 123 ± 30.01Ba	515 ± 12.38Aa	1 717 ± 28.12Aa	3 425 ± 22.17Ba	6 780 ± 54.74Ba	2.18 ± 0.05Ccd
RSC3	1 173 ± 10.05Ba	199 ± 5.23Bb	728 ± 11.21Cc	1 371 ± 33.23Cc	3 471 ± 36.15Cb	5.92 ± 0.17Ba
RSO4	887 ± 13.06Bb	97 ± 2.09Be	748 ± 7.38Bc	283 ± 8.52Df	2 014 ± 4.89Ce	9.18 ± 0.09Ba
RSA4	1 010 ± 5.74Ab	81 ± 0.86Cc	788 ± 12.18Bab	1 956 ± 17.09Ab	3 835 ± 26.93Bb	12.44 ± 0.15Aa
RSB4	551 ± 14.29Cb	84 ± 4.80Cc	275 ± 23.22Ce	618 ± 15.21Cd	1 527 ± 36.17Dd	6.71 ± 0.55Cb
RSC4	988 ± 13.56Ab	278 ± 6.14Aa	1 362 ± 35.43Aa	1 665 ± 29.79Bb	4 293 ± 46.66Aa	3.56 ± 0.10Db
RSO5	1 795 ± 22.73Aa	659 ± 15.98Aa	2 711 ± 18.03Aa	1 523 ± 23.81Ba	6 687 ± 36.34Aa	2.73 ± 0.09Be
RSA5	442 ± 42.65Be	60 ± 4.04Cd	225 ± 14.47Dd	913 ± 23.67Ce	1 640 ± 29.40Dd	7.57 ± 0.87Ab
RSB5	454 ± 12.68Bc	189 ± 5.50Bb	555 ± 10.07Bc	720 ± 5.66Dc	1 918 ± 10.26Cc	2.41 ± 0.11Bcd
RSC5	338 ± 8.08Cd	214 ± 8.48Bb	437 ± 5.27Cd	1 788 ± 7.33Aa	2 776 ± 12.25Bc	1.59 ± 0.09Be
RSO6	551 ± 16.39Bd	136 ± 5.07Bc	1 018 ± 18.47Cb	973 ± 27.66Dc	2 677 ± 30.63Cc	4.08 ± 0.22Bd
RSA6	243 ± 13.46Df	57 ± 2.35Cd	98 ± 6.35De	1 074 ± 32.87Cd	1 472 ± 43.73De	4.29 ± 0.32Bd
RSB6	456 ± 9.36Cc	42 ± 2.66Dde	1 369 ± 13.16Ab	1 246 ± 12.99Bb	3 113 ± 22.23Bb	11.01 ± 0.62Aa
RSC6	702 ± 7.13Ac	203 ± 4.39Ab	1 137 ± 16.36Bb	1 347 ± 8.16Acd	3 389 ± 25.43Ab	3.47 ± 0.09Bb

1)表中数据为平均值 ± 标准误, 其中同列数据后凡是有一个大、小写字母相同者, 分别表示同一种群不同培养处理、同种培养处理不同种群在0.05水平上差异不显著(DMRT法).

3 讨论与结论

本研究结果表明, 相似穿孔线虫单条雌虫在胡萝卜愈伤组织上(25 °C)能进行繁殖, 后代的雌雄比均大于1, 但是不同种群的单雌繁殖力存在明显差异, 后代的雌雄比率与繁殖量无明确的相关性. El-badri等^[2]对群体繁殖力差异显著的、来自不同地区

的5个相似穿孔线虫种群进行了单条雌虫繁殖力试验, 结果显示, 这些种群单雌繁殖力差异不显著, 种群的繁殖量与雌雄比率有一定相关性, 雌雄比高的种群繁殖量大. 这与本研究结果不同.

在供试相似穿孔线虫种群中, 有的在胡萝卜愈伤组织上长期培养保存后的单雌繁殖力明显小于在寄主植物上复壮后的单雌繁殖力, 并且经连续2次

复壮后的单雌繁殖力大于经1次复壮后的单雌繁殖力,这表明在胡萝卜愈伤组织上长期培养保存降低了该种群的单雌繁殖力,但通过接种寄主植物复壮可以恢复或增强其单雌繁殖力;有的种群在胡萝卜愈伤组织上长期培养保存的单雌繁殖力高于在寄主植物上复壮1次的单雌繁殖力,但低于在寄主植物上复壮2次的单雌繁殖力,这可能是在胡萝卜愈伤组织上长期培养保存后,降低了这些种群的单雌繁殖力,需经多次复壮才能恢复;5号种群复壮后单雌繁殖力低于在胡萝卜愈伤组织上长期培养保存的单雌繁殖力,这可能与该种群的来源寄主有关,该种群的来源寄主是富贵椰子,其被接种在非来源寄主植物红掌上后,可能由于不适应新的寄主繁殖力受到影响,而在胡萝卜愈伤组织上长期培养后适应了此环境或者胡萝卜本身就是该种群的优良寄主,因此在胡萝卜愈伤组织上长期培养后表现出较高的繁殖力;有的种群经第1次复壮后单雌繁殖力增强,但第2次复壮后单雌繁殖量低于第1次复壮后和长期在胡萝卜愈伤组织培养保存的单雌繁殖量,这可能是这些种群与复壮的寄主植物达到互作平衡后而保持的一种稳定繁殖量.以上这些问题和推论尚有待进一步研究.但是根据本研究结果可以明确,在胡萝卜愈伤组织上长期培养保存和寄主植物复壮保存都会

对相似穿孔线虫的单雌繁殖力产生影响,但不同种群单雌繁殖力所受影响的情况不同,这可能与相似穿孔线虫种群本身的繁殖特性、寄生特性以及寄主和地理来源等多种因素有关.

参考文献:

- [1] HUETTEL R N, DICKSON D W. Parthenogenesis in the two races of *Radopholus similis* from Florida[J]. *Journal of Nematology*, 1981, 13(1):13-15.
- [2] ELBADRI G A A, WAELE D D, MOENS M. Reproduction of *Radopholus similis* isolates after inoculation of carrot disks with one or more females[J]. *Nematology*, 2001, 3(8):767-771.
- [3] STOFFELEN R, JIMENEZ M I, DIERCKXSENS C, et al. Effect of time and inoculum density on the reproductive fitness of *Pratylenchus coffeae* and *Radopholus similis* populations on carrot disks[J]. *Nematology*, 1999, 1(3):243-250.
- [4] MOODY E H, LOWNSBERY B F, AHMED J M. Culture of the root-lesion nematode *pratylenchus vulnus* on carrot disks[J]. *Journal of Nematology*, 1973, 5(3):225-226.
- [5] REISE R W, HUETTEL R N, SAYRE R M. Carrot callus tissue for culture of endoparasitic nematodes[J]. *Journal of Nematology*, 1987, 19(3):387-389

【责任编辑 周志红】

(上接第31页)

- [30] GASKIN T, PETER F, TRACEY C. Increased density and male-male interactions reduce male longevity in the medfly, *Ceratitis capitata*[J]. *Animal Behaviour*, 2002, 63:121-129.
- [31] LEVINS R. Thermal acclimation and heat resistance in *Drosophila* species[J]. *American Naturalist*, 1969, 103:483-499.
- [32] SCHEIRING J F, DAVIS D G, RANASINGHE A, et al. Effects of larval crowding on life history parameters in *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae)[J]. *Experimental Gerontology*, 1984, 77:329-332.
- [33] LOESCHCKE V, KREBS R A, BARKER J S F. Genetic variation for resistance and acclimation to high temperature stress in *Drosophila buzzatii*[J]. *Biological Journal of the Linnean Society*, 1994, 52:83-92.
- [34] JOSHI A S J, MUELLER L D. Phenotypic enhancement of

longevity by environmental urea in *Drosophila melanogaster*[J]. *Experimental Gerontology*, 1996, 31:533-544.

- [35] MILLER R S, THOMAS J L. The effects of larval crowding and body size on the longevity of adult *Drosophila melanogaster*[J]. *Ecology*, 1958, 39:118-125.
- [36] LINTS F A, LINTS C V. Influence of preimaginal environment on fecundity and ageing in *Drosophila melanogaster* hybrids[J]. *Experimental Gerontology*, 1969, 4:231-244.
- [37] ZWAAN B J, BIJLSMA R, HOEKSTRA R F. On the development theory of ageing: I: Starvation resistance and longevity in *Drosophila melanogaster* in relation to pre-adult breeding condition[J]. *Heredity*, 1991, 66:29-39.
- [38] MIQUEL J. An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of ageing: Genetic and evolutionary implications[J]. *Experimental Gerontology*, 1998, 33:113-126.

【责任编辑 周志红】