

# 菊花滑刃线虫的培养条件和繁殖特性

彭晓放 陈德强 王东伟 王珂 吴文佳 徐春玲 谢辉

华南农业大学植物病理学系/华南农业大学植物检疫线虫检测与防疫研究中心, 广州 510642

**摘要** 采用胡萝卜和甘薯愈伤组织培养的方法, 分别在4个不同培养温度和6个不同培养时间条件下, 观察菊花滑刃线虫(*Aphelenchoides ritzemabosi* (Schwartz, 1911) Steiner & Buhner, 1932)在2种植物愈伤组织上的繁殖特性。结果表明: 菊花滑刃线虫在2种植物愈伤组织上培养繁殖的适温为15~25℃, 温度达到30℃及以上均不能正常繁殖。在胡萝卜愈伤组织上培养, 20℃时第5周繁殖率最大, 为3 937.50倍; 在甘薯愈伤组织上培养, 20℃时第6周繁殖率最大为576.68倍; 在相同培养温度和时间条件下, 菊花滑刃线虫在胡萝卜愈伤组织上的繁殖率均大于在甘薯愈伤组织上的繁殖率。

**关键词** 菊花滑刃线虫; 愈伤组织; 人工培养; 繁殖特性

**中图分类号** S 432.4<sup>+</sup>5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)05-0048-04

菊花滑刃线虫(*Aphelenchoides ritzemabosi* (Schwartz, 1911) Steiner & Buhner, 1932)也称菊花叶枯线虫或里泽马博斯滑刃线虫, 与水稻干尖线虫(*A. besseyi*)和草莓滑刃线虫(*A. fragariae*)一起统称为腋芽滑刃线虫。菊花滑刃线虫是一种重要的植物寄生线虫, 能寄生观赏植物、蔬菜、果树和杂草等200多种植物<sup>[1-2]</sup>, 全世界已有70多个国家或地区均有分布<sup>[3]</sup>。菊花滑刃线虫引起的菊花叶枯病是菊花(*Dendranthe mamorifolium*)上最重要的病害, 该线虫也是危害草莓(*Fragaria ananassa*)的重要病原线虫, 可导致草莓产量损失高达65%<sup>[4-5]</sup>。中国花卉种植面积位居世界之首, 菊花滑刃线虫的寄主植物分布广泛, 多数地区的气候适宜菊花滑刃线虫的定殖和发生, 因此, 菊花滑刃线虫在中国具有很大的潜在威胁<sup>[6]</sup>。目前, 中国菊花滑刃线虫仅在个别地区零星发生<sup>[7-8]</sup>。为有效防止菊花滑刃线虫从国外传入和在国内传播扩散, 中国于2007年将其列入中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录, 2013年列入全国林业危险性有害生物名单。该线虫也是国际上公认的极为重要的检疫性植物寄生线虫, 故受到广泛关注。

菊花滑刃线虫繁殖适温的确定和快速、大量的人工培养, 是对其进行全面系统研究的基础。最早

有关菊花滑刃线虫培养的报道是Sanwal等<sup>[9]</sup>通过优化菊花植株种植装置, 在室温下利用盆栽菊花获得该线虫的纯培养; Dolliver等<sup>[10]</sup>通过White培养基培养离体植物组织的方法, 使用烟草(*Nicotiana tabacum*)、苜蓿(*Medicago sativa*)和胡萝卜(*Daucus carota*)愈伤组织培养繁殖该线虫, 并测定了该线虫在烟草愈伤组织上于不同温度下的繁殖量, 但对苜蓿和胡萝卜愈伤组织培养并未做具体繁殖量测定; Hooper等<sup>[11]</sup>研究了该线虫在灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)和丝核菌(*Rhizoctonia* spp.)上的繁殖力, 但由于灰葡萄孢不是该线虫的最适寄主, 因此, 不适合大量培养繁殖。为建立快速、高效和操作简单的菊花滑刃线虫人工培养方法, 本试验选用胡萝卜愈伤组织与甘薯愈伤组织培养繁殖菊花滑刃线虫的可行性和繁殖效果, 观察该线虫在这2种植物愈伤组织上的繁殖特性, 旨在为进一步明确菊花滑刃线虫繁殖周期、生活史和发生规律, 为系统研究菊花滑刃线虫提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试线虫

供试菊花滑刃线虫(*Aphelenchoides ritzemabosi*)来源于云南省昆明市西山区大观公园, 寄主为

收稿日期: 2014-12-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(31371920)

彭晓放, 硕士研究生, 研究方向: 植物线虫学. E-mail: pengxiaof2012@163.com

通信作者: 谢辉, 博士, 教授, 研究方向: 植物线虫学. E-mail: xiehui@scau.edu.cn

菊花 (*Dendranthe mamorifolium*), 由华南农业大学植物线虫室采集、分离、鉴定和培养保存。

## 1.2 供试愈伤组织

试验用新鲜胡萝卜 (*Daucus carota*) 和甘薯 (*Ipomoea batatas*) 购于华南农业大学菜市场, 参照 Moody 等<sup>[12]</sup> 和 Reise 等<sup>[13]</sup> 的方法, 将胡萝卜和甘薯切片、消毒, 置于无菌培养皿 (直径 5 cm) 中, 25 °C 黑暗培养 15 d 后生成愈伤组织备用。

## 1.3 线虫的接种

菊花滑刃线虫的接种主要参考裴艳艳等<sup>[14]</sup> 的方法。挑取 20 条菊花滑刃线虫雌虫, 放入装有 0.3% 硫酸链霉素的 1.5 mL 离心管中, 放置 8~12 h, 5 000 r/min 离心 2 min, 去除上清。用无菌水清洗 2 次, 在超净工作台上去除上清液, 最终剩余体积约 100  $\mu$ L。用无菌吸管吸取离心管中的线虫悬浮液, 接种于愈伤组织上, 用保鲜膜封好培养皿, 分别放入 15、20、25、30 °C 的培养箱中黑暗培养, 分别统计培养 1~6 周后的繁殖量, 每种愈伤组织在 1 个温度条件下培养 1 个时间段为 1 个处理, 每个处理设 5 个重复。

## 1.4 线虫的分离与收集

线虫的分离主要采用浸泡法<sup>[10,13]</sup>, 并作一定的改进。将培养供试线虫的愈伤组织和培养皿上的线虫用无菌水冲洗 3~5 次, 收集到 50 mL 离心管中, 于 4 °C 保存。然后将愈伤组织切碎放到 50 mL 离心管中, 加入适量的清水 25 °C 下浸泡 48 h 后过孔径 0.147 mm 和 0.026 mm 的组合筛, 将孔径 0.026 mm 筛网上的线虫冲洗到小烧杯中。将 2 次

分离的线虫悬浮液混合后定容到 50 mL, 混匀后取 1 mL 悬浮液于计数皿中, 在解剖镜下计数, 重复 5 次, 取平均值后再乘 50, 即为每个处理的线虫数量。

线虫在愈伤组织上的繁殖率  $R_f$  ( $R_f = \text{分离线虫总数} / \text{接种虫数}$ )<sup>[14]</sup>。

## 1.5 数据分析

试验结果数据的平均数和标准误 (SE) 的计算及分析采用 SPSS(13.0) 和 EXCEL2007 软件; 利用邓肯氏新复极差法 (DMRT), 在  $P = 0.05$  水平上进行差异显著性分析。

# 2 结果与分析

## 2.1 菊花滑刃线虫在胡萝卜愈伤组织上的繁殖

试验结果表明: 菊花滑刃线虫接种于胡萝卜愈伤组织上培养 1~6 周后, 在 15~25 °C 的繁殖率均大于 1; 在 30 °C 条件下, 仅在培养 6 周后的繁殖率大于 1, 但显著小于在 15~25 °C 培养 6 周的繁殖率 ( $P < 0.05$ ), 故菊花滑刃线虫在胡萝卜愈伤组织上培养繁殖的适合温度为 15~25 °C。

在 15 °C 条件下, 随着培养时间的延长, 繁殖率逐渐增加, 在第 6 周达到最大值 912.20 倍, 且显著高于前 5 周的繁殖率 ( $P < 0.05$ ); 在 20 °C 和 25 °C 条件下, 繁殖率在前 5 周随着时间延长逐渐增加, 在第 5 周达到最大值, 分别为 3 937.50 倍和 3 787.60 倍, 分别显著高于 1~4 周和第 6 周的繁殖率, 但它们之间差异不显著, 而第 6 周的繁殖率显著高于前 4 周 ( $P < 0.05$ ) (表 1)。

表 1 菊花滑刃线虫在胡萝卜愈伤组织上的繁殖率<sup>1)</sup>

Table 1 Reproduction rates of *Aphelenchoides ritzemabosi* on carrot callus

培养时间/周	Culture time	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C
1	1	6.25±0.41 Cd	15.81±0.55 Be	18.41±1.25 Ae	0.55±0.15 Db
2	2	13.99±0.60 Cd	30.92±2.50 Be	144.73±5.16 Ae	0.4±0.11 Dbc
3	3	49.40±3.54 Cc	222.06±12.07 Bd	693.80±45.14 Ad	0.60±0.05 Db
4	4	64.92±3.30 Cc	855.20±99.22 Bc	2 408.75±156.47 Ac	0.22±0.10 Cc
5	5	359.86±17.37 Bb	3 937.50±215.19 Aa	3 787.60±144.20 Aa	0.56±0.14 Cb
6	6	912.20±30.02 Ca	3 384.00±128.85 Ab	2 881.50±111.85 Bb	1.14±0.45 Da

1) 表中数据为 5 次重复的平均值 ± 标准误 (SE), 同行数据后大写字母相同者和同列数据后小写字母相同者表示不同培养条件下的繁殖率在 0.05 水平上差异不显著 ( $P > 0.05$ , 表 2 同)。The reproduction rate (mean ± SE,  $n = 5$ ) of *A. ritzemabosi* on carrot callus. The same upper case in the same row and the same lower case in the same column at different conditions is not significantly different ( $P > 0.05$ , the same as Table 2).

## 2.2 菊花滑刃线虫在甘薯愈伤组织上的繁殖

试验结果表明: 菊花滑刃线虫接种于甘薯愈伤组织上培养 1~6 周后, 在 15~25 °C 条件下, 繁殖率均随着培养时间的延长逐渐增加, 在第 6 周达到最

大值, 分别为 90.82 倍、576.68 倍、203.58 倍, 并且与前 5 周的繁殖率差异显著 ( $P < 0.05$ )。在 20 °C 条件下培养 6 周的繁殖率显著高于其他所有处理 ( $P < 0.05$ ); 在 30 °C 条件下, 繁殖率均小于 1 (表 2), 说

表 2 菊花滑刃线虫在甘薯愈伤组织上的繁殖率

Table 2 Reproduction rates of *Aphelenchoides ritzemabosi* on sweet potato callus

培养时间/周	Culture time	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C
1		1.60±0.18 Be	3.11±0.40 Ae	1.91±0.60 Bd	0.28±0.07 Ca
2		2.78±0.33 Ce	6.81±0.90 Be	7.94±0.45 Ad	0.12±0.04 Db
3		11.57±0.81 Cd	85.49±2.68 Ad	50.48±5.01 Bc	0.00
4		24.97±0.48 Bc	332.65±87.67 Ac	56.70±3.03 Bc	0.00
5		65.66±2.69 Cb	392.60±8.40 Ab	184.00±7.18 Bb	0.00
6		90.82±2.69 Ca	576.68±27.18 Aa	203.58±16.97 Ba	0.00

明菊花滑刃线虫在此温度下不能在甘薯愈伤组织上繁殖。

### 3 讨 论

试验结果表明,菊花滑刃线虫在胡萝卜和甘薯愈伤组织上的培养适合温度为 15~25 °C,在胡萝卜愈伤组织培养繁殖的最适条件是 20~25 °C 培养 5 周,在甘薯愈伤组织上培养繁殖的最适条件为在 20 °C 下培养 6 周。在相同时间和相同温度条件下,该菊花滑刃线虫在胡萝卜愈伤组织上的繁殖率均大于在甘薯愈伤组织的繁殖率,且在胡萝卜愈伤组织上的最大繁殖率为甘薯愈伤组织上的最大繁殖率的 6.83 倍。相对于甘薯愈伤组织,胡萝卜愈伤组织更适合菊花滑刃线虫的快速大量繁殖,而该线虫在甘薯愈伤组织上繁殖率较低不易导致甘薯愈伤组织腐烂,因此,甘薯愈伤组织适合长期培养保存该线虫。

French 等<sup>[15]</sup>曾报道,利用栽培的菊花植株接种繁殖菊花滑刃线虫,在室温 17~23 °C 条件下,38 d 后的最大繁殖率为 3 500 倍; Dolliver 等<sup>[10]</sup>测定了菊花滑刃线虫在烟草愈伤组织上不同温度下的繁殖量,在 24 °C 培养 29 d 后的最大繁殖率为 3 880 倍,26 °C 下不能完成生活史; Hooper 等<sup>[11]</sup>曾报道,菊花滑刃线虫在(23±2) °C 于丝核菌上培养 28 d 后的最大繁殖率为 50 倍。在本试验中,菊花滑刃线虫在胡萝卜愈伤组织上 20 °C 培养 35 d 后的繁殖率为 3 937.50 倍,远远大于 Hooper 等<sup>[11]</sup>报道的繁殖率,与 French 等<sup>[15]</sup>和 Dolliver 等<sup>[10]</sup>报道的结果相近。但是,用菊花植株接种繁殖和烟草愈伤组织培养繁殖的方法,都存在过程和操作复杂、周期长,在培养期间易发生污染等问题。本试验所用胡萝卜愈伤组织的制备,操作简单、不易污染、周期短,更适合菊花滑刃线虫的快速纯化和大量繁殖。菊花滑刃线虫在甘薯愈伤组织上的繁殖量显著低于胡萝卜愈伤组织,也显著低于 Dolliver 等<sup>[10]</sup>报道的烟草愈伤组织。这可能与甘薯愈伤组织的湿度较小有关。甘薯

愈伤组织的湿度较小不易腐烂,在接种线虫后培养维持时间较长,特别是在 15 °C 的低温下。根据本试验的观察,将菊花滑刃线虫接种于甘薯愈伤组织,在 15 °C 下放置 50~80 d 后,甘薯愈伤组织才开始腐烂,因此,该方法适用于线虫的长期培养保存。在本试验中,菊花滑刃线虫在胡萝卜和甘薯愈伤组织上 25 °C 时仍可以大量繁殖,在 30 °C 下则不能完成生活史,这与 Dolliver 等<sup>[10]</sup>报道的试验结果有差别,其原因可能与培养基质不同或线虫种群间生物学特性差异有关。由此可见,在培养不同种群的线虫时,需要通过试验确定最合适的培养温度和时间。

### 参 考 文 献

- [1] SIDDIQI M R. *Aphelenchoides ritzemabosi* [J]. Descriptions of Plant Parasitic Nematodes, 1974, 32: 38-41.
- [2] HUNT D J. *Aphelenchida, Longidoridae and Trichodoridae, their systematic and blonomics* [M]. Wallingford (UK): CBA International, 1993.
- [3] 崔汝强, 赵立荣, 钟国强. 菊花滑刃线虫快速分子检测[J]. 江西农业大学学报, 2010, 32(4): 714-717.
- [4] EVANS K, TRUDGILL D L, WEBSTER J M. *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture* [M]. Wallingford (UK): CBA International, 1993.
- [5] SAMALIEV H Y, MOHAMEDOVA M. Plant-parasitic nematodes associated with strawberry (*Fragaria aianassa* Duch.) in Bulgaria[J]. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 2011, 17(6): 730-735.
- [6] 董燕, 赵宇翔, 陈小平. 菊花叶枯线虫风险管理对策研究[J]. 四川林业科技, 2013, 34(3): 57-60.
- [7] 谢辉. 菊花滑刃线虫及其检测和防疫方法[J]. 植物检疫, 2006, 21(3): 190-192.
- [8] 李建中. 六种潜在外来入侵线虫在中国的适生性风险分析[D]. 吉林: 吉林农业大学图书馆, 2008.
- [9] SANWAL K C. A simple method for rearing pure populations of the foliar nematode, *Aphelenchoides ritzemabosi*, in the laboratory [J]. Canadian Journal of Zoology, 1959, 37(5): 707-711.
- [10] DOLLIVER J S, HILDEBRANDT A C, RIKER A J. Studies of reproduction of *Aphelenchoides ritzemabosi* (Schwartz) on

- plant tissues in culture [J]. *Nematologica*, 1962, 7(4): 294-300.
- [11] HOOPER D J, COWLAND J A. Fungal hosts for the chrysanthemum nematode, *Aphelenchoides ritzemabosi* [J]. *Plant Pathology*, 1986, 35(1): 128-129.
- [12] MOODY E H, LOWNSEBURY 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.
- [13] 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.
- [14] 裴艳艳, 骆爱丽, 谢辉, 等. 中国不同地区水稻干尖线虫种群的繁殖特性研究[J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2012, 38(6): 165-170.
- [15] FRENCH N, BARRACLOUGH R M. Observations on the reproduction of *Aphelenchoides ritzemabosi* (Schwartz) [J]. *Nematologica*, 1962, 6(2): 89-94.

## Culture conditions and reproductive characteristics of *Aphelenchoides ritzemabosi* on callus

PENG Xiao-fang CHEN De-qiang WANG Dong-wei

WANG Ke WU Wen-jia XU Chun-ling XIE Hui

*Research Center of Nematodes of Plant Quarantine,*

*Department of Plant Pathology, South China Agricultural University,*  
*Guangzhou 510642, China*

**Abstract** The reproductive characteristics of *Aphelenchoides ritzemabosi* (Schwartz) Steiner & Buhner on carrot (*Daucus carota*) callus and sweet potato (*Ipomoea batatas*) callus were studied at 4 different temperatures and 6 different culture times. The results showed that the optimum temperatures of *A. ritzemabosi* on two calluses in culture were from 15 °C to 25 °C and it could not reproduce at temperatures greater than or equal to 30 °C. The maximum reproduction rates of *A. ritzemabosi* on the carrot callus and on the sweet potato callus were 3 937.50 at 20 °C for 5 weeks, 576.68 at 20 °C for 6 weeks, respectively. The reproduction rate of *A. ritzemabosi* on the carrot callus was higher than that on the sweet potato callus at same temperature and with the same culture time. This research provided the scientific basis for the confirmation of the reproductive cycle, life history and occurrence regularity of *A. ritzemabosi*, and it also provided a practical method for the systematical study of *A. ritzemabosi*.

**Key words** *Aphelenchoides ritzemabosi*; callus; artificial culture; reproductive characteristics

(责任编辑:陈红叶)