

相似穿孔线虫消毒方法筛选及其 对线虫繁殖量的影响^①

丁 莎, 徐春玲, 谢 辉, 李 静,
俞 璐, 张建峰, 袁 月

华南农业大学 资源环境学院, 植物线虫研究室/植物检疫线虫检测与防疫研究中心, 广州 510642

摘要: 通过比较不同消毒方法对相似穿孔线虫的消毒效果和对其活力的影响, 筛选出 5 种消毒方法, 再通过接种胡萝卜愈伤组织繁殖线虫的方法, 测定了这些消毒方法对相似穿孔线虫繁殖量的影响. 结果表明: 供试的 5 个相似穿孔线虫种群, 用硫酸链霉素进行消毒后的雌虫平均繁殖量最大, 用次氯酸钠处理后的雌虫平均繁殖量最小, 而用氯化汞、洗必泰+氯化汞和硫酸链霉素+氯化汞进行处理后的雌虫平均繁殖量介于上述两者之间, 综合消毒效果和对繁殖量的影响 2 个因素, 其中洗必泰+氯化汞是最合适的消毒方法.

关 键 词: 相似穿孔线虫; 胡萝卜愈伤组织; 消毒; 繁殖

中图分类号: S763.16

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2014)9-0037-07

相似穿孔线虫 *Radopholus similis* 是一种危害极大的植物病原线虫, 是中国和其他许多国家的植物检疫性有害生物^[1-2]. 相似穿孔线虫寄主范围非常广泛, 已报道能在超过 250 种植物上寄生繁殖^[3], 能为害单子叶植物, 也能为害许多双子叶植物, 给种植业造成严重损失^[2], 因此世界上许多国家非常重视对该线虫的研究和防治.

植物寄生线虫的大量培养繁殖是开展相关研究的重要基础之一, 对线虫表面消毒则是进行各种接种培养繁殖的前提. 对植物寄生线虫人工接种培养时的表面消毒, 已报道有很多消毒剂, 如短体线虫 *Pratylenchus vulnus* 在接种培养前用甲氧乙氯汞和双氢硫酸链霉素进行消毒^[4]; 氯化汞和洗必泰用于对针线虫 *Paratylenchus projectus* 进行消毒处理以接种愈伤组织进行培养繁殖^[5]; 茎线虫 *Ditylenchus destructor* 的人工培养繁殖使用次氯酸钠和青霉素、氯霉素进行消毒^[6]; 松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 用双氧水和硫酸链霉素进行接种前的消毒^[7-8]. 在相似穿孔线虫人工培养繁殖中使用的消毒剂, 已报道的有氯化汞^[9-11]、洗必泰^[12]、甲氧乙氯汞^[10]以及庆大霉素^[12]、四环素^[12]和硫酸链霉素^[10, 13-15]. 目前接种胡萝卜片愈伤组织是相似穿孔线虫培养繁殖的最常用方法, 相似穿孔线虫的消毒通常使用 0.1%~0.5% 硫酸链霉素浸泡 2~18 h^[13-15], 但该方法杀菌不彻底, 经其消毒处理的相似穿孔线虫在胡萝卜愈伤组织培养过程中, 易引起胡萝卜愈伤组织腐烂, 影响繁殖量和培养保存期, 培养繁殖出的相似穿孔线虫也通常携带细菌, 不

① 收稿日期: 2013-03-18

基金项目: 国家青年科学基金资助项目(31000068); 教育部“高等学校博士点学科点专项科研基金”新教师类联合资助项目(20104404120023).

作者简介: 丁 莎(1988-), 女, 江西宜春人, 硕士研究生, 主要从事植物病原线虫研究.

通信作者: 徐春玲, 副研究员.

能用于与无菌化相关的研究. 而不同消毒方法对相似穿孔线虫的消毒效果及其对线虫活力和繁殖量的影响, 尚未有研究报道.

本研究参考已报道的不同消毒剂, 采用不同处理方式和时间对相似穿孔线虫进行消毒处理, 研究不同消毒处理方法的无菌消毒效果以及对相似穿孔线虫活力和繁殖力的影响, 以获得优化的相似穿孔线虫消毒条件, 为相似穿孔线虫的生物学、病理学以及与微生物互作等方面的研究, 提供相应的、更合适的相似穿孔线虫消毒方法.

1 材料和方法

1.1 材 料

1.1.1 供试相似穿孔线虫

供试相似穿孔线虫种群(表 1), 均由华南农业大学植物线虫研究室分离和鉴定, 并保存在胡萝卜愈伤组织上.

表 1 供试相似穿孔线虫种群

序号	种群编号	寄 主 植 物
1	bxj	巴西蕉 <i>Musa</i> AAA Giant Cavendish cv. Baxi.
2	hg	红果 <i>Stranvaesia</i> sp.
3	dbsr	大巴水榕 <i>Anubias barteri</i>
4	hz	红掌 <i>Anthurium andraeanum</i>
5	xinj	生姜 <i>Zingiber officinale</i>

1.1.2 试 剂

次氯酸钠 NaClO、氯化汞 HgCl₂、洗必泰和硫酸链霉素, 使用前配制相应体积质量分数(w/v).

1.2 方 法

1.2.1 胡萝卜愈伤组织的制备

胡萝卜愈伤组织制备参照文献[13]、[16]的方法进行.

1.2.2 相似穿孔线虫的接种培养

按照文献[9]的方法在胡萝卜愈伤组织上接种和培养供试的 5 个相似穿孔线虫种群.

1.2.3 相似穿孔线虫的消毒处理

用无菌水洗下在胡萝卜愈伤组织上培养繁殖的线虫, 转到 1.5 mL 无菌离心管中, 将获得的线虫悬浮液定容至 1 mL, 取 100 μ L 统计线虫的数量, 重复 3 次, 以 3 次的平均值 $\times 10$ 作为离心管中的总线虫量, 然后配成每个离心管含有约 1 000 条相似穿孔线虫的悬浮液. 在超净台内用无菌水洗涤每个离心管中的线虫 3 次, 5 000 r/min 离心 2 min 沉淀线虫, 吸去上清液, 分别进行如下处理: ① 用硫酸链霉素(百分比分别为 0.1%, 0.3%, 0.5%, 0.7%, 0.9%)浸泡处理 3 h, 6 h, 9 h, 12 h, 18 h; ② 用 NaClO(百分比分别为 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.75%, 1.0%)浸泡处理 2 min, 3 min, 4 min, 5 min, 10 min; ③ 用 0.01% HgCl₂ 浸泡处理 2 min; ④ 用 0.001% 洗必泰浸泡处理 1 h 后再用 0.001% HgCl₂ 浸泡处理 7 min; ⑤ 用 0.3% 硫酸链霉素浸泡处理 12 h 后再用 0.005% HgCl₂ 浸泡处理 2 min. 处理后的线虫 5 000 r/min 离心 2 min, 吸去上清液, 再用无菌水洗涤线虫 3 次. 每种消毒方法处理 1 个供试香蕉穿孔线虫种群为 1 个试验处理, 每个试验处理重复 3 次.

1.2.4 不同消毒处理对相似穿孔线虫的活力影响和抑菌效果测定

吸取处理后的线虫悬浮液滴至凹玻片上, 在体视镜下观察线虫活动情况. 若线虫处于僵直状态则放弃线虫细菌检测试验, 若线虫处于活动状态则吸取 100 μ L 处理后的线虫悬浮液至 NA(营养琼脂培养基: 牛肉粉 3.0 g, 氯化钠 5.0 g, 蛋白胨 10.0 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1 000 mL; pH=7.0 $\pm$ 0.1)平板, 重复 3 次, 并设置无菌水对照. 放入 25 $^{\circ}$ C 恒温箱中黑暗培养 72 h 后检查线虫表面是否携带细菌.

1.2.5 不同消毒处理后相似穿孔线虫种群繁殖力和胡萝卜愈伤组织培养状况检测

根据 1.2.4 试验结果, 选择对相似穿孔线虫的活力影响小和抑菌效果好的消毒处理方法, 并以相似穿孔线虫消毒最常用的方法 0.3%硫酸链霉素处理 12 h 作为对照处理, 测定经不同消毒方法处理后相似穿孔线虫繁殖量. 在超净台内, 将供试的相似穿孔线虫用选定的消毒方法处理后, 挑取 15 条雌虫接种到胡萝卜愈伤组织上, 1 个线虫种群经 1 种消毒方法处理后接种到胡萝卜愈伤组织上为 1 个试验处理, 每个处理设置 7 个重复, 并置于 25 ℃培养箱中黑暗培养 50 d 后, 观察接种线虫的胡萝卜片是否出现软腐, 然后参照 Kaplan 等^[12]的方法分离在胡萝卜愈伤组织上培养繁殖的线虫和卵. 将分离得到的线虫悬浮液定容至 45 mL, 每次取 1 mL 分别对虫和卵进行计数, 重复 3 次, 以 3 次的平均值乘以 45 作为从每个胡萝卜愈伤组织中分离获得的虫量和卵量.

1.2.6 数据分析

采用 SAS 软件(The SAS System for Windows 9.0)对所得试验数据进行方差分析, 用 DMRT 法在显著水平 $p=0.05$ 上进行多重比较, 计算标准误.

2 结 果

2.1 相似穿孔线虫经消毒处理后的活力和带菌情况

对经不同的方法消毒处理后的相似穿孔线虫活动力和带菌情况进行观察和检测的结果表明(表 2), 用 0.1%, 0.3%, 0.5%, 0.7%, 0.9%的硫酸链霉素分别处理线虫 3 h, 6 h, 9 h, 12 h, 18 h 后, 线虫能保持很好的活动能力, 但线虫表面仍带菌, 因此这些处理都达不到有效消毒目的; 供试的各百分比 NaClO 处理不同时间后, 仅 0.5%的 NaClO 浸泡线虫 5 min 的处理能在保证线虫活动的情况下达到有效的消毒效果; 用 0.01% HgCl₂ 处理 2 min、0.001%洗必泰处理 1 h 再用 0.001% HgCl₂ 处理 7 min、0.3%硫酸链霉素浸泡处理 12 h 后再用 0.005% HgCl₂ 浸泡处理 2 min 后, 线虫均能保持很好的活动能力并且在 NA 平板上无菌长出.

表 2 不同消毒处理后香蕉穿孔线虫的活动和染菌情况

处理	处理时间	线虫活动情况	细菌检验结果
0.1%硫酸链霉素	3 h	+	+
	6 h	+	+
	9 h	+	+
	12 h	+	+
	18 h	+	+
0.3%硫酸链霉素	3 h	+	+
	6 h	+	+
	9 h	+	+
	12 h	+	+
	18 h	+	+
0.5%硫酸链霉素	3 h	+	+
	6 h	+	+
	9 h	+	+
	12 h	+	+
	18 h	+	+
0.7%硫酸链霉素	3 h	+	+
	6 h	+	+
	9 h	+	+
	12 h	+	+
	18 h	+	+

续表 2

处理	处理时间	线虫活动情况	细菌检验结果
0.9%硫酸链霉素	3 h	+	+
	6 h	+	+
	9 h	+	+
	12 h	+	+
	18 h	+	+
0.2% NaClO	2 min	+	+
	3 min	+	+
	4 min	+	+
	5 min	+	+
	10 min	—	\
0.3% NaClO	2 min	+	+
	3 min	+	+
	4 min	+	+
	5 min	+	+
	10 min	—	\
0.4% NaClO	2 min	+	+
	3 min	+	+
	4 min	+	+
	5 min	+	+
	10 min	—	\
0.5% NaClO	2 min	+	+
	3 min	+	+
	4 min	+	+
	5 min	+	—
	10 min	—	\
0.75% NaClO	2 min	—	\
	3 min	—	\
	4 min	—	\
	5 min	—	\
	10 min	—	\
1.0% NaClO	2 min	—	\
	3 min	—	\
	4 min	—	\
	5 min	—	\
	10 min	—	\
0.01% HgCl ₂	2 min	+	—
0.001% 洗必泰+0.001% HgCl ₂	1 h+7 min	+	—
0.3% 硫酸链霉素+0.005% HgCl ₂	12 h+2 min	+	—

注：表 2 中“+”表示消毒处理后线虫仍活动或 NA 平板有细菌生长，“—”则表示线虫僵直或无细菌生长，“\”表示无该处理。每个处理重复 3 次。

2.2 消毒处理后相似穿孔线虫的繁殖量和接种线虫的胡萝卜愈伤组织培养状况

用上述试验选定的能达到消毒效果的 4 种方法及作为对照的方法(用 0.3%硫酸链霉素处理 12 h)，处理供试的相似穿孔线虫 5 个种群的雌虫，然后将这些雌虫接种在胡萝卜愈伤组织上置于 25 ℃ 黑暗条件下培养 50 d 后的检测结果表明，对照处理的胡萝卜愈伤组织，多数重复有不同程度的软腐状况，有 2 个重复严重腐烂，次氯酸钠和洗必泰+氯化汞处理的胡萝卜愈伤组织未出现软腐，氯化汞和硫酸链霉素+氯化汞

处理的胡萝卜愈伤组织, 有个别重复出现轻微腐烂的情况; 线虫数量检测结果表明, 所有被处理的线虫均能进行繁殖, 但是每一种处理对不同种群后代虫量、卵量和总虫量的影响有差异(表 3).

对于所有供试种群, 用对照方法处理后的线虫, 培养繁殖总虫量都是最大, 卵量和虫量也是最大; 用 0.5%次氯酸钠处理 5 min 后的线虫, 培养繁殖的总虫量、虫量和卵量均最小. 而用氯化汞、洗必泰+氯化汞和硫酸链霉素+氯化汞进行处理后的线虫, 培养繁殖总虫量、虫量和卵量介于上述两者之间, 并且三者差异多数不显著, 仅其中的巴西蕉种群经 0.3%硫酸链霉素浸泡处理 12 h 后再用 0.005% HgCl₂ 浸泡处理 2 min, 虫量显著大于其他 2 种处理, 而大巴水榕种群经该方法处理后的总虫量和虫量均显著小于其他 2 种处理.

表 3 相似穿孔线虫经过不同方法消毒处理后, 15 条雌虫在胡萝卜愈伤组织上于 25 ℃下培养 50 d 后的繁殖量

种群	消毒方法	虫 量	卵 量	总 虫 量
bxj	I	33 893±71.30a	28 074±123.19a	61 971±167.17a
	II	1 686±55.56c	369±13.53b	2 055±68.58b
	III	7 110±75.16c	2 085±61.81b	9 195±93.99b
	IV	1 605±20.89c	2 805±3.82b	4 410±22.04b
	V	17 145±138.40b	2 040±76.16b	19 185±168.46b
hg	I	32 835±162.20a	11 640±253.35a	44 475±387.79a
	II	4 117±61.18c	2 664±45.31b	6 781±88.91c
	III	20 040±273.94b	9 120±131.03a	29 160±163.12b
	IV	15 927±150.21b	8 094±126.14a	24 021±207.45b
	V	19 140±281.64b	8 475±65.76a	27 615±307.95b
hz	I	40 035±581.09a	28 230±255.98a	68 265±741.89a
	II	3 915±12.11c	1 290±8.08b	5 205±20.12c
	III	19 650±487.84b	3 975±58.62b	30 105±246.16b
	IV	27 420±489.59b	5 205±193.57b	32 625±387.50b
	V	19 245±183.10b	5 595±87.03b	24 840±211.85b
dbsr	I	23 790±245.03a	20 220±102.46a	44 010±261.64a
	II	335±10.09c	155±5.25c	489±14.40d
	III	21 315±474.99a	6 998±176.87b	28 313±453.80b
	IV	25 385±100.96a	7 387±213.29b	32 771±258.33b
	V	9 405±84.40b	7 470±19.20b	16 875±88.55c
xinj	I	29 520±419.97a	12 075±256.68a	41 595±182.70a
	II	517±10.04c	156±4.74b	672±13.65c
	III	16 620±236.57b	6 585±176.77a	23 205±387.53b
	IV	11 700±362.84b	6 270±107.97a	17 970±404.28b
	V	10 942±206.28b	7 632±190.65a	18 573±58.41b

注: 表 3 中数据为 5 次重复的平均值, 同一种群不同消毒处理的同列数据后小写字母相同者表示在 $p\geqslant 0.05$ 水平上差异不显著(DMRT 法). “I”: 0.3%硫酸链霉素浸泡处理 12 h; “II”: 0.5% NaClO 浸泡处理 2 min; “III”: 0.01% HgCl₂ 浸泡处理 2 min; “IV”: 0.001%洗必泰浸泡处理 1 h 后再用 0.001% HgCl₂ 浸泡处理 7 min; “V”: 0.3%硫酸链霉素浸泡处理 12 h 后再用 0.005% HgCl₂ 浸泡处理 2 min.

3 讨 论

本研究使用 0.5%次氯酸钠(方法 II)、0.01%氯化汞(方法 III)、0.001%洗必泰+0.001%氯化汞

(方法Ⅳ)和 0.3%硫酸链霉素+0.005%氯化汞(方法Ⅴ)处理相似穿孔线虫均具有较好的表面杀菌效果。而培养繁殖的过程显示,消毒效果最好的是次氯酸钠和洗必泰+氯化汞。用这些方法消毒处理的线虫仍保持活动能力,但是与使用 0.3%硫酸链霉素消毒方法(方法Ⅰ)相比,这些消毒方法对线虫繁殖力均有明显的不良影响,不过除了 0.5%次氯酸钠处理后线虫繁殖量很低外,其他几种方法处理的线虫仍保持较高繁殖量。因此在对相似穿孔线虫进行生长、发育和繁殖等生物学特性以及致病力研究时,用传统的 0.3%硫酸链霉素进行消毒,可能更有利于获得准确的研究结果,而方法Ⅲ、方法Ⅳ和方法Ⅴ适用于需要进行无菌培养繁殖相似穿孔线虫的相关研究。

Elsen 等^[11]使用 0.01% HgCl_2 浸泡处理相似穿孔线虫 2 min 后,接种无菌的苜蓿愈伤组织获得了无菌线虫。但本研究显示该方法(方法Ⅲ)处理相似穿孔线虫后,接种胡萝卜愈伤组织仍会出现少量污染情况,消毒效果不如方法Ⅱ和方法Ⅳ,但是与方法Ⅰ处理后的相似穿孔线虫繁殖量相比,方法Ⅱ处理后的相似穿孔线虫繁殖量显著降低,而用方法Ⅳ处理后的相似穿孔线虫繁殖量无显著差异。另外,本研究使用方法Ⅱ和方法Ⅴ消毒,对相似穿孔线虫不同种群后代孵化的虫量、卵量和总虫量的影响存在一些差异,这是否与相似穿孔线虫不同种群对消毒剂的耐受力有关,尚有待研究。而方法Ⅲ和方法Ⅳ这两种消毒方法对所有供试种群的繁殖量影响较相似。因此,在供试的消毒方法中,方法Ⅳ(即 0.001%洗必泰浸泡 1 h+0.001%氯化汞浸泡 7 min)最适合应用于对相似穿孔线虫消毒处理进行无菌培养,此种对线虫进行消毒的方法尚未见报道。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录 [R]. 北京: 中华人民共和国农业部公告第 862 号, 2007.
- [2] EUROPEAN and MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. EPPO Standards PM 7/88 *Radopholus similis* [J]. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 2008(38): 374–378.
- [3] O'BANNON J H. Worldwide Dissemination of *Radopholus similis* and Its Importance in Crop Production [J]. Journal of Nematology, 1977, 9(1): 16–25.
- [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] TOWNSHEND J L. Monoxenic Culture of *Paratylenchus projectus* [J]. Nematologica, 1974, 20(2): 264–266.
- [6] 徐进军, 李世东, 杨为之. 马铃薯茎线虫的培养 [J]. 西北农业学报, 2004, 13(4): 77–80.
- [7] 刘 劼, 吴小芹, 应晨希, 等. 松材线虫和拟松材线虫的繁殖力及其超氧自由基差异 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2009, 33(3): 5–8.
- [8] 贲爱玲, 韩正敏, 韩 旭, 等. 无菌松材线虫的获得及培养方法研究 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2008, 32(3): 99–102.
- [9] FALLAS G A, SARAH J L. Effect of Storage Temperature on the in Vitro Reproduction of *Radopholus similis* [J]. Nematropica, 1994, 24(2): 175–177.
- [10] BROWN S M, VESSEY J C. Rearing of *Radopholus similis* on Banana Fruit Callus [J]. Revue de Ne'matologie, 1985, 8: 79–190.
- [11] ELSEN A, LENS K, NGUYET D T M, et al. Aseptic Culture Systems of *Radopholus similis* for in Vitro Assays on *Musa* spp. and *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Nematology, 2001, 33(2–3): 147–151.
- [12] KAPLAN D T, DAVIS E L. Improved Nematode Extraction from Carrot Disk Culture [J]. Journal of Nematology, 1990, 23(3): 399–406.
- [13] 武玉环, 徐春玲, 陈 淳, 等. 不同方法培养保存后相似穿孔线虫的单雌繁殖力的测定 [J]. 华南农业大学学报: 自然科学版, 2010, 31(4): 36–39.
- [14] 王 琼, 耿丽凤, 张东升, 等. 香蕉穿孔线虫(*Radopholus similis*)特异性分子检测技术研究 [J]. 植物病理学报, 2011, 41(2): 171–177.

- [15] MATELLE T. Monoxenic Culture of Banana-Parasitic Nematodes on *Musa acuminata* cv. Poyo Shoots [J]. Journal of Nematology, 1990, 22(4): 608—611.
- [16] 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.

Screening of Surface-Sterilizing Methods for *Radopholus similis* and Their Influences on Its Reproduction

DING Sha, XU Chun-ling, XIE Hui,
LI Jing, YU Lu, ZHANG Jian-feng, YUAN Yue

Laboratory of Plant Nematology / Research Center of Nematodes of Plant Quarantine,

College of Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract: By comparing the sterilizing effects of different surface-sterilizing methods and their impacts on the vitality of *Radopholus similis*, five were chosen to study their influences on the reproduction of *R. similis* cultured on carrot disks. The results showed that of the 5 similar nematode populations used for surface sterilization, the one sterilized with streptomycin sulfate had the greatest average reproduction amount per female and that sterilized with sodium hypochlorite had the smallest, and the average reproduction amount per female in the populations sterilized with mercuric chloride, hibitane plus with mercuric chloride or streptomycin sulfate plus mercuric chloride appeared in between. Thus considering the two factors of sterilizing effects and influences on the reproduction amount, hibitane plus with mercuric chloride is the most appropriate sterilizing method on *R. similis*.

Key words: *Radopholus similis*; carrot callus; surface sterilization; reproduction

责任编辑 夏 娟

