

花生茎线虫 *Ditylenchus arachis* 在真菌上的培养条件研究

章淑玲¹, 林谷园², 肖 顺³

(1. 福建农业职业技术学院园艺园林系, 福州 350119; 2. 福建出入境检验检疫局, 福州 350001;
3. 福建农林大学植物保护学院, 福州 350002)

摘要 花生茎线虫 *Ditylenchus arachis* 是危害花生的重要病原线虫。本研究通过测试不同真菌和培养温度对花生茎线虫繁殖力的影响,以探讨该线虫在室内的培养条件。研究表明:花生茎线虫在长柄链格孢、茄镰孢、尖镰孢和灰葡萄孢上均能完成生活史并进行繁殖,但不同真菌上培养线虫的效果不同。其中长柄链格孢的培养效果最好,培养 30 d 后的总虫量和繁殖系数分别为 37 292 条和 1 243 倍;灰葡萄孢的培养效果最差,30 d 后的总虫量和繁殖系数仅为 1 514 条和 50 倍。25~30℃ 是花生茎线虫的适宜培养温度,30℃ 时为最佳温度;当温度低于 20℃ 或高于 35℃ 时线虫繁殖效果差。此方法繁殖的线虫可用于花生茎线虫生物学、遗传学等方面的研究。

关键词 花生茎线虫; 真菌; 温度; 繁殖力

中图分类号: S435.652 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2017288

Cultural conditions of *Ditylenchus arachis* on fungi

ZHANG Shuling¹, LIN Guyuan², XIAO Shun³

(1. Department of Horticulture and Garden, Fujian Vocational College of Agriculture, Fuzhou 350119, China;
2. Fujian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuzhou 350001, China; 3. College of Plant Protection, Fujian Agricultural and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract *Ditylenchus arachis* is one of the important damaging nematodes of peanut in China. In order to study the cultural conditions on fungi in the laboratory, the effects of different fungi and different cultural temperatures on the reproductive capability of *D. arachis* were evaluated. The results showed that *D. arachis* could complete its life cycle and reproduce on *Alternaria longipes*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum* and *Botrytis cinerea*, but the effects of different fungi varied. The reproductive capability of *D. arachis* was the highest on *A. longipes*, with a total number of nematodes and reproduction rate of 37 292 and 1 243, respectively. The total number of nematodes and reproduction rate were the lowest on *B. cinerea* (only 1 514 and 50, respectively). The optimum temperatures for *D. arachis* on fungi were from 25℃ to 30℃, and 30℃ was the best cultural temperature. *D. arachis* could not reproduce well at temperatures lower than 20℃ or greater than 35℃. *D. arachis* cultured by this method can be used for biological and genetic studies on this nematode.

Key words *Ditylenchus arachis*; fungus; temperature; reproduction capability

花生茎线虫病于 1987 年在南非的德兰士瓦省 (Transvaal) 的花生荚果上首次发现,其后在南非所有花生主产区普遍发生,受侵染的花生通常减产 20%~50%,是南非花生上最重要的线虫病害,病原经鉴定为非洲茎线虫 *Ditylenchus africanus*^[1-4]。2014 年本实验室在我国山东、河北两省的多个花生

主产区首次发现了花生茎线虫病害,病原经形态学、分子生物学及致病性测定,确定为一种茎线虫新种——花生茎线虫 *Ditylenchus arachis*^[5]。该线虫可侵染花生的根系、胚栓、果荚和种粒,致使受害后的花生根系减少、腐烂,结荚少,固氮根瘤菌减少,果荚外壳变黑、腐烂,种皮褐变、皱缩,严重降低了花生

的产量和品质^[5-6]。因此,花生茎线虫是继根结线虫 *Meloidogyne* spp. 后又一个对中国花生生产造成重要影响的病原线虫^[7]。为了进一步研究该线虫的生物学、致病机理、种群间的遗传特性及防治技术,需要快速获得大量的、具有较强生命力的病原线虫群体。目前常用于线虫培养的方法有寄主接种法、离体组织培养法和真菌培养法等^[8]。本研究采用真菌培养线虫的方法,分别测试不同真菌和培养温度对花生茎线虫繁殖力的影响,以探讨花生茎线虫人工培养的最适条件。

1 材料与方法

1.1 材料来源

供试的花生茎线虫 6 个地理种群(编号 Dar01~Dar06)分别来自河北邢台、河北迁安、山东莱芜、山东费县、山东聊城和江苏宿州的花生茎线虫病果荚,病果荚中的茎线虫经改良贝尔曼漏斗法分离取得^[9]。

供试的长柄链格孢 *Alternaria longipes*、尖镰孢 *Fusarium oxysporum*、茄镰孢 *F. solani* 及灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 采用组织分离法从福建的烟草、香蕉、山药及番茄上分离获得^[10]。

1.2 线虫的消毒

分离出的线虫悬浮液经沉降后收集于 1.5 mL eppendorf 管中,3 000 r/min 离心 2 min,去上清液;加入 0.1% 硫酸链霉素溶液,进行表面消毒 10 min;再用无菌水清洗 2~3 次,备用。

1.3 真菌培养基的制备

PDA 试管斜面的制备:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL。

在超净工作台内将不同真菌分别接种于灭菌后的 PDA 斜面试管中,置于 28℃ 的恒温培养箱中培养 5~7 d,待用。

1.4 真菌培养花生茎线虫

1.4.1 不同真菌对花生茎线虫培养的影响

分别吸取已消毒并清洗的 30 条河北邢台花生茎线虫(Dar01)雌虫接种到长满真菌的 PDA 斜面试管中,每种菌设 20 个重复,置于 28℃ 的恒温培养箱中进行黑暗培养 30 d。30 d 后分离计数试管中培养的花生茎线虫数。

1.4.2 不同培养温度对花生茎线虫的影响

挑取已消毒并清洗的 30 条河北省邢台花生茎

线虫(Dar01)雌虫接种于长满长柄链格孢的 PDA 斜面试管中,分别置于 15、20、25、30℃ 和 35℃ 的恒温黑暗培养箱中培养 30 d,每处理设 20 个重复,测定不同培养温度下花生茎线虫的繁殖力。

1.4.3 不同地理种群间花生茎线虫的繁殖力测定

分别挑取已消毒并清洗的 30 条 6 个不同地理种群的花生茎线虫,按 1.4.1 的方法接种于长满长柄链格孢的 PDA 斜面试管中,每个地理种群设 20 个重复。培养 30 d 后分离计数其中的花生茎线虫数。

1.5 线虫的分离与统计

往培养到期的真菌斜面试管中加入无菌水进行反复冲洗,将试管壁及真菌中的花生茎线虫尽可能地洗出。洗出的线虫悬浮液经沉降后收集到 10 mL 的离心管中,3 000 r/min 离心 2 min,最后定容至 1 mL。用 100 μ L 移液管吸取 20 μ L 线虫悬浮液于载玻片上,在体视显微镜下分别统计卵、幼虫、雄虫、雌虫的数量,重复 3 次取平均值。最后根据定容的体积计算出每个接种重复的总虫数。线虫的繁殖系数(R_t)=最终线虫量(P_t)/起始线虫量(P_i)。

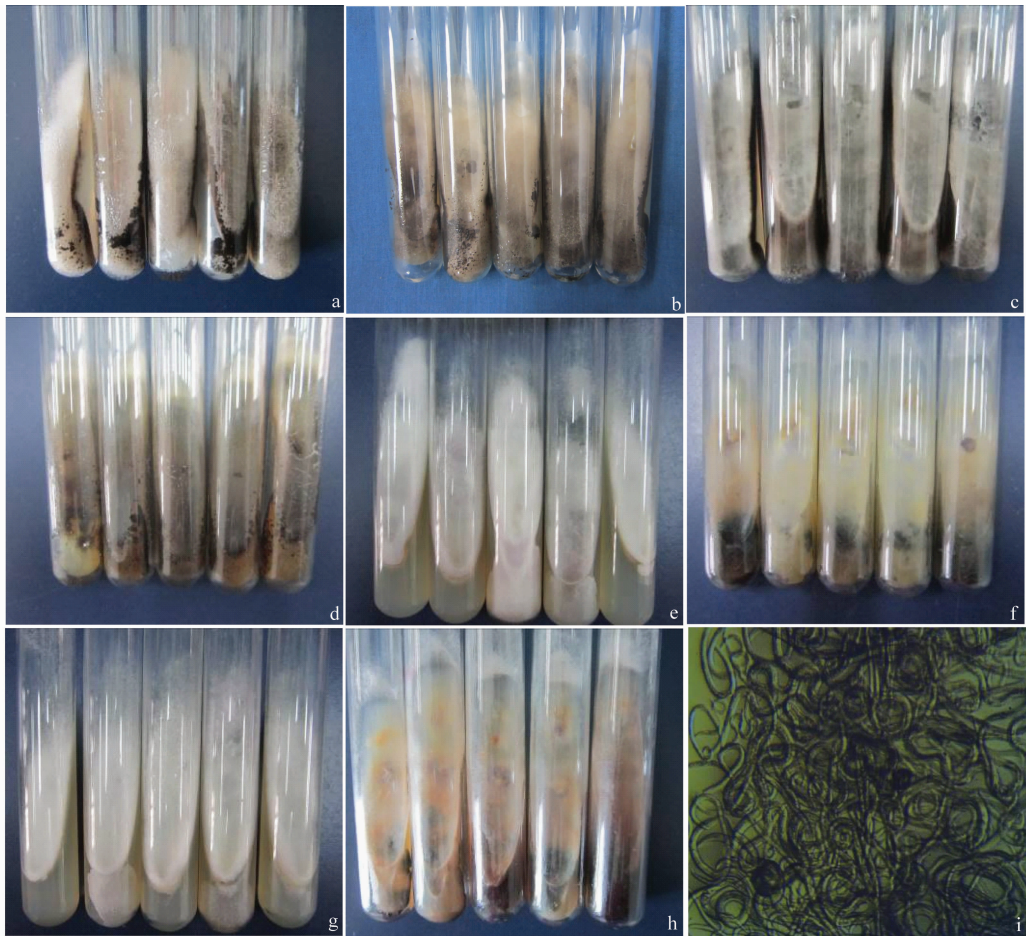
1.6 数据分析

采用 SPSS PASW Statistics v18.0 软件对获得的数据进行方差分析,并采用 Duncan 氏新复极差法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 不同种类的真菌对花生茎线虫繁殖力的影响

从图 1 可看出,花生茎线虫(Dar01)接种于 4 种不同真菌于 28℃ 黑暗培养 30 d 后,均可见斜面试管中的菌丝相比接种前(图 1a,c,e,g)已被线虫大量取食(图 1b,d,f,h),用体视显微镜观察可见试管壁上有大量的线虫团(图 1i),说明供试的 4 种真菌均可用于花生茎线虫的人工室内培养。但在不同种类真菌上花生茎线虫的繁殖力表现出显著的差异(表 1):花生茎线虫在长柄链格孢上培养的效果最好,30 d 后各虫态数量分别为卵 704 个、幼虫 34 592 条、雌虫 972 条、雄虫 1 024 条,虫口总数达 37 292 条,繁殖系数为 1 243 倍;其次是茄镰孢和尖镰孢,其繁殖系数分别为 541 倍和 429 倍;灰葡萄孢培养的效果最差,30 d 后花生茎线虫的总虫数仅 1 514 条,繁殖系数为 50 倍,与以上 3 种真菌的繁殖力存在显著差异。



a: 未接线虫的灰葡萄孢; b: 接种线虫后的灰葡萄孢; c: 未接线虫的长柄链格孢; d: 接种线虫后的长柄链格孢; e: 未接线虫的尖镰孢; f: 接种线虫后的尖镰孢; g: 未接线虫的茄镰孢; h: 接种线虫后的茄镰孢; i: 真菌上培养的花生茎线虫
a: *Botrytis cinerea* without inoculation; b: *B. cinerea* inoculated with *D. arachis*; c: *Alternaria longipes* without inoculation; d: *A. longipes* inoculated with *D. arachis*; e: *Fusarium oxysporum* without inoculation; f: *F. oxysporum* inoculated with *D. arachis*; g: *F. solani* without inoculation; h: *F. solani* inoculated with *D. arachis*; i: *D. arachis* on the fungi

图 1 不同真菌培养的花生茎线虫

Fig. 1 *Ditylenchus arachis* on different fungi

表 1 花生茎线虫 (Dar01) 在不同真菌上的繁殖力¹⁾

Table 1 Reproductive capability of *Ditylenchus arachis* (Dar01) on different fungi

真菌种类 Fungal species	卵/个 Egg	幼虫/条 Larva	雌虫/条 Female	雄虫/条 Male	总虫数/条 Total	繁殖系数 R_t
灰葡萄孢 <i>B. cinerea</i>	(32±3. 0)c	(1 352±68. 3)d	(64±5. 17)c	(66±4. 56)d	(1 514±68. 8)d	(50±2. 2)d
尖镰孢 <i>F. oxysporum</i>	(84±5. 3)c	(12 320±482. 9)c	(228±25. 1)b	(244±39. 6)c	(12 876±500. 4)c	(429±16. 6)c
茄镰孢 <i>F. solani</i>	(216±9. 2)b	(15 216±563. 1)b	(344±36. 0)b	(480±40. 2)b	(16 256±566. 2)b	(541±18. 8)b
长柄链格孢 <i>A. longipes</i>	(704±44. 3)a	(34 592±461. 9)a	(972±78. 7)a	(1 024±42. 4)a	(37 292±404. 1)a	(1 243±13. 4)a

1) 表中数值为 20 个重复的平均值±标准误, 同列数据后的小写字母表示在 0. 05 水平上的差异显著性, 字母相同者表示差异不显著, 不同则显著。下同。
The data are mean ± SE and different lowercase letters within the same column indicate significant difference at 0. 05 level. The same below.

2. 2 不同培养温度对花生茎线虫繁殖力的影响

从表 2 可以看出, 温度对花生茎线虫在长柄链格孢上的繁殖有很大的影响。15℃下培养 30 d 后虽可见少数幼虫和雄虫, 但卵和雌虫的数量为 0, 说明当温度 ≤15℃时花生茎线虫不能顺利地完成生活史。在 25~30℃的培养温度之间, 随着温度的升高, 花生茎线虫的

幼虫、成虫数量在不断增加, 说明其繁殖力在不断地升高, 尤其当温度达到 30℃时花生茎线虫的总数达到了最高值 43 120 条, 繁殖系数也达到了 1 437 倍, 说明 30℃是花生茎线虫繁殖的最佳温度。温度高于 30℃后花生茎线虫的繁殖能力随之下降, 当温度升高到 35℃时, 花生茎线虫的繁殖力与 15℃和 20℃时差异不显著。

表 2 不同培养温度下花生茎线虫 (Dar01) 在长柄链格孢上的繁殖力

Table 2 Reproductive capability of *Ditylenchus arachis* (Dar01) on *Alternaria longipes* at different temperatures

培养温度/℃ Temperature	卵/个 Egg	幼虫/条 Larva	雌虫/条 Female	雄虫/条 Male	总虫数/条 Total	繁殖系数 R_r
15	(0±0)d	(12±0.5)c	(0±0)c	(0.4±0.2)c	(12±0.6)c	(0.41±0.02)c
20	(54±1.8)c	(81±1.4)c	(13±0.8)c	(19±0.6)c	(170±1.9)c	(5.67±0.06)c
25	(1 728±22.9)a	(23 448±427.7)b	(384±14.8)b	(816±18.9)b	(26 376±437.2)b	(879.20±14.57)b
30	(1 104±55.8)b	(39 712±883.5)a	(1 080±60.5)a	(1 224±51.3)a	(43 120±887.6)a	(1 437.33±29.58)a
35	(20±0.5)cd	(146±5.7)c	(18±1.8)c	(27±2.6)c	(212±6.2)c	(7.09±0.20)c

2.3 不同地理种群间花生茎线虫的繁殖力测定

将 6 个不同地理种群的花生茎线虫各 30 条接种于长柄链格孢上,于 28℃ 的恒温培养箱中黑暗培养,从表 3 可以看出,30 d 后各个地理种群

都能成功繁殖并顺利完成生活史,6 个地理种群的花生茎线虫在各个不同虫态上发育数量虽存在一定差异,但其总虫数及其繁殖系数不存在显著差异。

表 3 花生茎线虫不同地理种群在长柄链格孢上的繁殖力

Table 3 Reproductive capability of different populations of *Ditylenchus arachis* on *Alternaria longipes*

种群 Population	卵/个 Egg	幼虫/条 Larva	雌虫/条 Female	雄虫/条 Male	总虫数/条 Total	繁殖系数 R_r
Dar01	(840±28.4)cd	(38 120±531.4)a	(928±61.7)b	(840±69.6)c	(40 738±579.4)a	(1 357±17.5)a
Dar02	(2 640±50.9)a	(37 040±416.6)a	(1 536±133.0)a	(1 200±130.3)b	(42 416±377.1)a	(1 413±12.4)a
Dar03	(686±27.8)d	(36 040±693.9)a	(960±48.4)b	(2 280±174.3)a	(39 966±794.5)a	(1 332±26.5)a
Dar04	(1 236±97.7)b	(38 080±719.3)a	(1 080±84.5)b	(1 080±106.7)bc	(41 476±880.6)a	(1 382±42.9)a
Dar05	(796±39.5)cd	(38 280±492.3)a	(1 020±60.4)b	(840±48.4)c	(40 934±532.3)a	(1 364±17.7)a
Dar06	(878±46.3)c	(37 760±602.1)a	(974±44.9)b	(912±57.0)bc	(40 532±520.0)a	(1 351±36.7)a

3 结论与讨论

茎线虫属线虫是一类十分重要的植物寄生线虫,其中的多个种已被证实对作物造成了重大的危害,如腐烂茎线虫 *D. destructor*、鳞球茎茎线虫 *D. dipsaci*、巨大茎线虫 *D. gigas*、水稻茎线虫 *D. angustus* 和非洲茎线虫 *D. africanus*^[3-4, 11-13]。花生茎线虫 *D. arachis* 是在我国花生生产上发现的重要新病原。本试验首次探讨花生茎线虫在真菌上的培养条件,以此快速获取大量线虫样本,为后续开展花生茎线虫的相关特征研究提供基础保障。

本研究结果表明,花生茎线虫在长柄链格孢、茄镰孢、尖镰孢和灰葡萄孢这 4 种真菌上均能完成各自的生活史并进行有效的繁殖。但在不同种类真菌上的培养效果有较大的差异,其中在长柄链格孢上繁殖的效果最好,最适合用于花生茎线虫的大量快速培养,同时该菌也可用于腐烂茎线虫 *D. destructor* 和水稻干尖线虫 *Aphelenchoides besseyi* 的大量培养^[14-15];其次是茄镰孢和尖镰孢;灰葡萄孢作为常用的线虫培养菌^[16-18] 在本研究中的培养效果最差,其原因是否为该分离菌株存在分化变异还有待进一步研究。不同的培养温度对花生茎线虫的繁殖同样

有较大的影响,30℃ 是真菌培养花生茎线虫的最佳温度,温度低于 20℃ 或高于 35℃ 都不利于该线虫的繁殖。不同地理种群的花生茎线虫在繁殖力上不存在显著差异,这可能也说明我国花生茎线虫在种群间比较保守而不存在明显的地理变异,这一研究结果对今后进一步研究花生茎线虫的种群遗传多样性有一定的参考价值。

参考文献

[1] JONES B L, DE WAELE D. First report of *Ditylenchus destructor* in pods and seeds of peanut [J]. Plant Disease, 1988, 72(5): 453.

[2] DE WAELE D, JONES B L, BOLTON C, et al. *Ditylenchus destructor* in hulls and seeds of peanut [J]. Journal of Nematology, 1989, 21(1): 10-15.

[3] WENDT K R, SWART A, VRAIN T C, et al. *Ditylenchus africanus* sp. n. from South Africa: a morphological and molecular characterization[J]. Fundamental and Applied Nematology, 1995, 18(3):241-250.

[4] DICKSON D W, DE WAELE D. Nematode parasites of peanut [M]//LUC M, SIKORA R A, BRIDGE J, eds. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture (2nd edition). Wallingford, UK: CABI Publishing, 2005: 393-436.

参考文献

[1] 李冰祥,陈永林,蔡惠罗. 过冷却和昆虫的耐寒性[J]. 昆虫知识,1998, 35(6):361-364.

[2] BALE J S. Insect cold hardiness; A matter of life and death [J]. European Journal of Entomology, 1996, 93(3):369-382.

[3] 景晓红,康乐. 昆虫耐寒性的测定与评价力法[J]. 昆虫知识, 2004, 41(1):7-10.

[4] 鹿金秋,王振营,何康来,等. 桃蛀螟越冬老熟幼虫过冷却点测定[J]. 植物保护,2009, 35(2): 44-47.

[5] 陈豪,梁草梅,邹朗云,等. 昆虫抗寒性的研究进展[J]. 植物保护,2010, 36(2):18-24.

[6] 张瑞,马纪. 昆虫过冷却点的影响因素概述[J]. 天津农业科学,2013, 19(11):76-84.

[7] MACDONALD J R, BALE J S, WALTERS K F A. Temperature, development and establishment potential of *Thrips palmi* (Thysanoptera: Thripidae)[J]. European Journal of Entomology, 1999, 96(2):169-173.

[8] SAGE R B, FELL D, TUCKER K, et al. Post hibernation dispersal of three leaf-eating beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) colonizing cultivated willows and poplars [J]. Agriculture and Forest Entomology, 1999, 1(1):61-70.

[9] MACDONALD J R, HEAD J, BALE J S, et al. Cold tolerance, overwintering and establishment potential of *Thrips palmi* [J]. Physiological Entomology, 2000, 25(2):159-166.

[10] 朱弘复,王林瑶. 长沙马王堆一号汉墓中出土的昆虫尸体[J]. 考古,1973(1):62-64.

(上接 103 页)

[5] ZHANG S L, LIU G K, JANSSEN T, et al. A new stem nematode associated with peanut pod rot in China: morphological and molecular characterization of *Ditylenchus arachis* n. sp. (Nematoda: Anguinidae)[J]. Plant Pathology, 2014, 63(5): 1193-1206.

[6] 章淑玲. 花生茎线虫(*Ditylenchus arachis* n. sp.)新种鉴定、生物学及快速检测技术[D]. 福州:福建农林大学,2016.

[7] 中国农业百科全书编辑部. 中国农业百科全书·植物病理学卷[M]. 北京:农业出版社,1996:212.

[8] 彭晓放,陈德强,王东伟,等. 菊花滑刃线虫的培养条件和繁殖特性[J]. 华中农业大学学报,2015, 34(5):48-51.

[9] 张绍升. 植物线虫病诊断与治理[M]. 福州:福建科学技术出版社,1999:71-89.

[10] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京:中国农业出版社,1998:123-124.

[11] HUANG W K, PENG D L, ZHANG D S, et al. Assessment of genetic variability in population of *Ditylenchus destructor* (Thorne 1945) (Tylenchida: Anguinidae) from China [J]. Russian Journal of Nematology, 2010, 18(1): 19-30.

[12] JESZKE A, DOBOSZ R, OBREPALSKA-STEPLOWSKA A.

[11] 黄敏,陈志麟,方晋治. 进境动物干产品带虫规律初探[J]. 深圳特区科技,1995(3): 22-23.

[12] 何美长,洪树毅,瞿俊杰. 皇岗口岸进境植检截害虫概况[J]. 广东农业科学,1997(2):42.

[13] 陆凤良,卢中建,顾建飞,等. 蚕茧仓库害虫种类调查及其熏蒸剂筛选和处理试验[J]. 植物检疫,1995, 9(3):148-151.

[14] 张生芳,刘永平,武增强. 中国储藏物甲虫[M]. 北京:中国农业科技出版社,1998:126-127.

[15] 叶澄宇. 皮蠹科蛀虫对蚕茧的危害及防治方法的调研报告[J]. 中国纤检,2007(12): 45-47.

[16] 李俊,卓秋虹,黄令富,等. 钩纹皮蠹的形态特征及耐受最高温度的研究[J]. 广西农学报,2015, 30(2):22-24, 29.

[17] CHOWDHARY S K,叶静. 大批量蚕茧内钩纹皮蠹的杀灭方法[J]. 国外农学-蚕业,1990(1): 63-64.

[18] 中元直吉,高德三. 皮蠹对蚕卵、蛹、茧、生丝及丝织品的为害[J]. 国外农学-蚕业,1989(1):49-51, 57.

[19] 段云,巩中军,李慧玲,等. 黏虫幼虫和蛹过冷却点及结冰点的测定[J]. 植物保护,2016, 42(4):147-150.

[20] 丁吉同,阿地力·沙塔尔,程晓甜,等. 枣实蝇不同发育阶段过冷却点及结冰点的测定[J]. 西北农业学报,2014, 23(11):163-167.

[21] 韩兰芝,翟保平,张孝羲. 甜菜夜蛾的抗寒力研究[J]. 植物保护学报,2005, 32(2):169-173.

[22] 郭俊杰,季清娥,王波,等. 阿里山潜蝇茧蜂不同发育阶段过冷却点和结冰点[J]. 环境昆虫学报,2014, 36(1):22-27.

[23] 赵琦,张云慧,韩二宾,等. 旋幽夜蛾各虫态的过冷却点测定[J]. 植物保护,2011, 37(2):63-66.

(责任编辑:田 喆)

A fast and sensitive method for the simultaneous identification of three important nematode species of the genus *Ditylenchus* [J]. Pest Management Science, 2014, 71(2): 243-249.

[13] VOVLAS N, TROCCOLI A, PALOMARES-RIUS J E, et al. *Ditylenchus gigas* n. sp. parasitizing broad bean; a new stem nematode singled out from the *Ditylenchus dipsaci* species complex using a polyphasic approach with molecular phylogeny [J]. Plant Pathology, 2011, 60(4): 762-775.

[14] 李世通,肖顺,章淑玲,等. 腐烂茎线虫的培养[J]. 福建农林大学学报:自然科学版,2014, 23(1): 11-13.

[15] 王盛君,段玉玺,靳莹莹,等. 水稻干尖线虫(*Aphelenchoides besseyi*)人工培养研究[J]. 植物保护,2008, 34(3): 46-48.

[16] 刘斌,郑经武. 腐烂茎线虫单异活体繁殖方法研究[J]. 浙江农业学报,2006, 18(6): 445-447.

[17] 谢春芹,陈啸寅,潘以楼,等. 水稻干尖线虫室内人工培养条件研究[J]. 植物保护,2008, 34(5): 140-142.

[18] 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.

(责任编辑:田 喆)