

# 三种化合物处理对南方根结线虫生长发育及致病能力的影响

韩冰洁 朱晓峰 王媛媛 陈立杰 段玉玺\*

(沈阳农业大学植物保护学院, 北方线虫研究所, 沈阳 110866)

**摘要:** 为明确不同浓度  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  对南方根结线虫 *Meloidogyne incognita* 2 龄幼虫活性的影响, 在盆栽条件下将化合物处理后的 2 龄幼虫接种番茄, 通过根染色和根系冰冻切片法观察 2 龄幼虫的发育状况和根系内巨细胞的形成, 并测定了番茄根系各生理指标的变化。结果表明, 50 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 、1.4 mmol/L  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  和 1.4 mmol/L  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  处理南方根结线虫后, 番茄根系内 2 龄、3 龄及 4 龄幼虫数量均显著小于对照; 根系内丙二醛、可溶性糖和游离氨基酸的含量均显著低于对照, 根系活力显著增强; 经  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  处理后, 根系内巨细胞形成缓慢, 14 d 时出现巨型细胞空洞现象。3 种化合物处理对南方根结线虫生长发育的抑制作用显著, 处理后的线虫对番茄植株致病力减弱, 表现为  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  抑制作用最强,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  次之,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  最弱。

**关键词:** 南方根结线虫; 生长发育; 番茄根系; 巨细胞

## Effects of three compounds on the growth, development and pathogenic ability of *Meloidogyne incognita*

Han Bingjie Zhu Xiaofeng Wang Yuanyuan Chen Lijie Duan Yuxi\*

(College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University; Nematological Institute of Northern China, Shenyang 110866, Liaoning Province, China)

**Abstract:** In order to determine the effects of different concentrations of  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  on the activity of *Meloidogyne incognita* second stage juvenile (J2), potted tomatoes infected with *M. incognita* J2 were treated with the compounds to measure the growth of J2, the formation of giant cells of tomatoes and changes of physiology of roots by using root staining and tomato root-knot frozen section methods. The results showed that, after *M. incognita* were treated with 50 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 1.4 mmol/L  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  and 1.4 mmol/L  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , the amounts of J2, J3 and J4 in roots were significantly decreased, malondialdehyde, soluble sugars and free amino acids of the roots were lower than that of the control, and root activity was also constantly enhanced. The treatment of  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  delayed giant cell formation in tomato roots, and giant cells appeared empty after 14 d. The three compounds could significantly inhibit the growth of J2, and decrease the pathogenic ability of the treated J2, with  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  having the strongest effect, followed by  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .

**Key words:** *Meloidogyne incognita*; growth and development; tomato root; giant cell

基金项目: 国家自然科学基金(31171823), 国家公益性行业(农业)科研专项(201103018)

\* 通讯作者(Author for correspondence), E-mail: duanyx6407@163.com

收稿日期: 2014-04-03

自从 Berkeley 于 1855 年在英国的感病黄瓜上首次发现根结线虫病以来,该病害迅速蔓延,每年对世界重要经济作物造成的损失高达数百亿美元 (Barker et al., 1976; 段玉玺, 2011)。番茄 *Solanum lycopersicum* 为茄科草本植物,是中国设施栽培的主要蔬菜之一,连年种植造成严重的连作障碍。根结线虫病是番茄生产区普遍发生的主要病害之一,危害呈逐年上升趋势,导致番茄根部形成串珠状根结,破坏根组织的分化和生理活动,抑制地上部正常生长,严重影响番茄的产量与品质 (彭德良, 1988)。根系是植物吸收水分和营养的主要器官,也是物质同化、转化和合成的器官,根系的发育和活力直接影响植物个体的生长发育、营养水平和产量品质 (李青青等, 2014)。根结线虫侵入后刺激根系形成巨细胞,破坏根细胞结构,严重影响根系活力,导致植株产生生理生化变化 (Bird et al., 2009)。

20 世纪 60 年代很多学者开始关注腐生性线虫及秀丽小杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 的研究,探讨化合物对其作用的影响 (Ward, 1973; Dusenbery, 1974),而对植物寄生线虫的研究却相对较少。Castro et al. (1990) 研究表明  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{Cs}^+$ 、 $\text{NO}_3^-$  和  $\text{Cl}^-$  对南方根结线虫 2 龄幼虫具有很强的抑制作用;吕和平等 (2012) 研究表明  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CsCl}$ 、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$  对南方根结线虫卵囊、卵孵化及其幼虫存活均有不同程度的影响;白春明等 (2011) 研究表明不同化合物不同浓度处理对南方根结线虫的影响差异显著,且随着化合物浓度的增加,2 龄幼虫死亡率上升,其中  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  这 3 种化合物在低浓度下就可使 2 龄幼虫致死。基于此,本试验选用上述 3 种化合物处理南方根结线虫 2 龄幼虫,12 h 后接种番茄,通过统计根内不同龄期线虫数量,测定植株根系活力、丙二醛、可溶性糖和游离氨基酸的动态变化并观察巨型细胞的发育过程,以明确化合物对根结线虫生长发育和致病能力的影响,为番茄根结线虫病的有效防治提供新思路,从而为开发安全高效的新型根结线虫防治药剂奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

供试线虫:南方根结线虫的培养在沈阳农业大学北方线虫研究所日光温室中进行。挑取番茄根系上成熟新鲜的黄褐色卵囊,用 0.5%  $\text{NaClO}$  消毒 3 min,再用无菌水冲洗 3 次置于培养皿中,于 28 °C

恒温箱中孵化,每隔 24 h 换 1 次水,选取新鲜有活力的 2 龄幼虫备用。

供试番茄:番茄品种 L402 在人工光照培养箱内育苗,幼苗生长至四叶期备用。

试剂:硫酸铜 ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ),沈阳市试剂三厂;氯化铁 ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ),国药集团化学试剂有限公司;碳酸氢铵 ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ),天津市大茂化学试剂厂;其余试剂均为国产分析纯。

仪器:Olympus JM 体视显微镜、UV-2450 Nano-Drop1000 紫外可见分光光度计,岛津国际贸易(上海)有限公司;Satorius JD 200-3 型电子天平,赛多利斯科学仪器北京有限公司;Leica CM 1100 冰冻切片仪,北京中仪光科科技发展有限公司;LRH-150 生化培养箱,上海一恒科学仪器有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 化合物处理及线虫接种

吸取 1000 条新鲜的 2 龄幼虫放入 4 mL 无菌离心管中。每个离心管中分别加入无菌水配置的化合物溶液 1 mL,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  的浓度分别为 0.2、0.6、1.0 和 1.4 mmol/L,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  分别为 0.2、0.6、1.0 和 1.4 mmol/L,  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  分别为 5、20、35 和 50 mmol/L,每个处理 3 次重复,以无菌水作为对照 1 (CK1),置于 28 °C 培养箱中处理 12 h,注意打开离心管盖,保持通气。将上述经过处理的 2 龄幼虫分别与 250 mL 珍珠岩混匀,装入 300 mL 的塑料苗钵中,同时植入 4 叶期番茄幼苗,未接种 2 龄幼虫的正常番茄植株作为对照 2 (CK2),放入人工光照培养箱培养,每周浇 2 次 1/2 Hoagland 营养液。

#### 1.2.2 番茄根系内南方根结线虫的动态变化

采用上述接种方法对番茄进行接种,接种后 7、14、21 d 分别取样进行根染色,采用次氯酸钠-品红染色法 (刘维志, 1995),配制 5.25%  $\text{NaClO}$  溶液及酸性品红溶液;病根冲洗干净后,放入 150 mL 烧杯中,加入 50 mL 蒸馏水、10 mL 5.25%  $\text{NaClO}$ ,阳光下搅拌;4 min 后取出病根,流水冲洗 45 s,放入蒸馏水内浸泡 15 min;另取一个烧杯加入 30 ~ 50 mL 蒸馏水和 1 mL 酸性品红溶液;用微波炉将放有根系病组织的染液煮沸 30 s,之后冷却、漂洗;准备 20 ~ 30 mL 的酸性甘油液,将漂洗后的根组织放入其中煮沸,进行组织褪色;镜检并记录番茄根系内 2 龄、3 龄和 4 龄幼虫的数量。

#### 1.2.3 番茄根系生理指标测定

番茄接种后 7、14、21 d 分别取样进行生理指标的测定。根系活力测定采用氯化三苯基四氮唑 (tri-

phenyltetrazolium chloride, TTC) 法(葛体达等, 2008), 根系活力 ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) = TTC 还原量/(根重  $\times$  时间); 丙二醛含量测定采用硫代巴比妥酸 (thiobarbituric acid, TBA) 法(赵世杰等, 1994), 丙二醛浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ ) =  $6.45(A_{532} - A_{600}) - 0.56A_{450}$ , 丙二醛含量 ( $\text{nmol/g}$ ) = (丙二醛浓度  $\times$  样品提取液总体积  $\times$  样品提取液与 TBA 溶液总反应体积)/(与 TBA 反应的样品提取液体积  $\times$  鲜样质量); 可溶性糖测定采用蒽酮比色法(Mazumder et al., 2002; 件均祥等, 2004), 含糖量 ( $\mu\text{g/mg}$ ) = (标准曲线查得的含糖量  $\times$  样品总体积  $\times$  稀释倍数)/(样品重量  $\times$  测定时取样体积  $\times 10^3$ ); 游离氨基酸测定采用茚三酮显色法(杨远帆等, 2013), 氨基酸含量 ( $\mu\text{g/mg}$ ) = (标准曲线查得的氨基酸含量  $\times$  样品提取液总体积)/(样品重量  $\times$  测定时取用体积  $\times 10^3$ )。

#### 1.2.4 番茄根系细胞组织观察

番茄根系组织观察采用冰冻切片法(焦石等, 2009), 将新鲜材料切成 0.5 cm 左右的小段, 加入福尔马林-醋酸-酒精固定液, 充分浸泡; 清洗过后的根段放入装有甘油乳酸液的试管中, 室温下放置 3 h 以上; 在 1% 番红染液中染色 2 ~ 3 min, 双蒸水清洗后, 0.5% 固绿水溶液染色 1 min, 双蒸水清洗后放入液氮中速冻 8 ~ 10 s, 随即将根段转移到  $-25\text{ }^\circ\text{C}$  冷冻室内回温 1 h; 自制包埋剂采用胶水: 蒸馏水 = 1:1,

取少量滴加在冷台上, 迅速将植物组织垂直放入包埋剂液滴中; 取出包埋好的样品, 修整为楔形, 调整防卷板角度, 切片厚度设为  $10\text{ }\mu\text{m}$ ; 在载玻片上涂一层甘油液(甘油: 水 = 1:1), 作为组织的展片, 制成临时装片, 显微镜观察拍照。

#### 1.3 数据分析

采用 SPSS 17.0 和 Excel 2010 软件对试验数据进行统计分析, 应用 Duncan 氏新复极差法对各处理进行显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 三种化合物对南方根结线虫发育动态的影响

3 种化合物处理对南方根结线虫的生长和发育均表现出不同程度的抑制作用。接种 7 d 时,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  处理组每株根系内 2 龄和 3 龄幼虫数量均显著小于对照, 50 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  处理后根系内 2 龄幼虫数量每株仅为  $1.7 \pm 0.6$  条, 且未出现 3 龄幼虫分化; 接种 14 d 时, 对照组根内出现大量 3 龄幼虫, 部分分化为 4 龄幼虫, 处理组每株根内 3 龄幼虫数量明显少于对照, 线虫总数与 7 d 时相比明显减少, 说明处理后的南方根结线虫生长发育受到一定的抑制作用; 21 d 时, 1.4 mmol/L  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  和 50 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  处理组每株根系内发育的 4 龄幼虫分别为  $1.7 \pm 0.6$  和  $1.3 \pm 0.6$  条, 抑制作用明显(表 1)。

表 1 不同化合物处理南方根结线虫 2 龄幼虫后不同时间段根内各龄期线虫数量

Table 1 The numbers of nematodes at different ages after second-stage juveniles treated with different compounds

化合物处理 Compound	浓度 (mmol/L) Concentration	每株线虫数量 Number of nematode (条)					
		7 d		14 d		21 d	
		J2	J3	J3	J4	J3	J4
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.2	$51.7 \pm 1.2$ bc	$26.0 \pm 1.7$ d	$41.0 \pm 1.0$ d	$16.7 \pm 1.5$ c	$9.0 \pm 1.0$ c	$35.7 \pm 4.5$ d
	0.6	$33.3 \pm 3.2$ d	$10.0 \pm 2.0$ f	$21.3 \pm 3.5$ ef	$8.7 \pm 0.6$ d	$5.0 \pm 0.0$ g	$16.7 \pm 1.5$ f
	1.0	$17.0 \pm 1.0$ f	$2.0 \pm 1.0$ g	$13.0 \pm 1.0$ g	$2.7 \pm 0.6$ e	$2.0 \pm 2.0$ h	$8.0 \pm 0.0$ gh
	1.4	$3.3 \pm 0.6$ hi	$0.0 \pm 0.0$ g	$4.0 \pm 1.0$ hi	$0.3 \pm 0.6$ e	$0.3 \pm 0.6$ h	$1.7 \pm 0.6$ i
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.2	$90.7 \pm 5.8$ a	$43.0 \pm 4.6$ b	$84.7 \pm 8.1$ b	$40.0 \pm 2.0$ b	$20.0 \pm 2.0$ b	$71.3 \pm 4.2$ b
	0.6	$54.0 \pm 1.7$ b	$32.7 \pm 2.5$ c	$56.3 \pm 4.2$ c	$18.3 \pm 1.5$ c	$9.0 \pm 2.6$ c	$43.3 \pm 4.2$ c
	1.0	$32.3 \pm 1.2$ d	$13.0 \pm 1.7$ f	$26.3 \pm 2.1$ e	$8.3 \pm 1.5$ d	$6.3 \pm 2.1$ def	$22.0 \pm 5.3$ e
	1.4	$8.7 \pm 0.6$ g	$2.0 \pm 1.0$ g	$7.0 \pm 1.0$ hi	$2.0 \pm 1.0$ e	$2.0 \pm 1.0$ h	$6.7 \pm 1.5$ hi
$\text{NH}_4\text{HCO}_3$	5.0	$46.7 \pm 4.7$ c	$20.3 \pm 2.1$ e	$36.3 \pm 3.8$ d	$16.0 \pm 2.0$ c	$8.3 \pm 1.2$ de	$31.3 \pm 1.5$ d
	20.0	$23.0 \pm 2.0$ e	$8.7 \pm 0.6$ f	$19.7 \pm 0.6$ f	$6.3 \pm 0.6$ d	$6.0 \pm 1.7$ fg	$12.7 \pm 2.1$ fg
	35.0	$7.3 \pm 1.2$ gh	$0.3 \pm 0.6$ g	$7.7 \pm 1.2$ h	$1.0 \pm 0.0$ e	$1.3 \pm 1.2$ h	$5.0 \pm 1.0$ hi
	50.0	$1.7 \pm 0.6$ i	$0.0 \pm 0.0$ g	$1.7 \pm 0.6$ i	$0.0 \pm 0.0$ e	$0.0 \pm 0.0$ h	$1.3 \pm 0.6$ i
CK1	0.0	$92.0 \pm 6.1$ a	$82.3 \pm 6.1$ a	$113.0 \pm 2.0$ a	$50.3 \pm 4.2$ a	$40.3 \pm 2.5$ a	$112.3 \pm 5.5$ a

表中数据为平均数  $\pm$  标准差。同列数据后不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在  $P < 0.05$  水平差异显著。J2 ~ J4: 2 龄、3 龄、4 龄幼虫。Data in the table are mean  $\pm$  SD. Different letters in the same column indicate significant difference at  $P < 0.05$  level by Duncan's new multiple range test. J2 - J4: Second, third, and fourth stage juveniles.

## 2.2 番茄根系生理指标的变化

3种化合物处理的南方根结线虫2龄幼虫侵染番茄后,根系活力均表现出不同程度的促进作用,随着化合物浓度的增加,促进作用表现出逐渐升高的趋势(表2)。随着接种后时间的延长根系活力不断上升,14d时根系活力显著增强,21d时根系活力增强减缓,与14d时差异不显著。经 $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 处理的2龄幼虫接种后番茄根系活力最强, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 次之, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 最弱。丙二醛含量随着处理线虫的化合物浓度增加表现出逐渐降低的变化趋势,7d时0.2 mmol/L  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和0.2 mmol/L

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 处理与CK1差异不显著,当化合物浓度增加时处理组与CK1差异显著;随着时间的延长,14d和21d时处理组均与CK1差异显著。表明高浓度的化合物对2龄幼虫具有致死作用,降低了南方根结线虫2龄幼虫对番茄根系的侵染能力,导致丙二醛含量降低(表2)。

根结线虫侵染后CK1的可溶性糖含量明显高于CK2,而化合物处理后的2龄幼虫侵染的番茄根系中可溶性糖含量均表现为随处理浓度的增大而逐渐降低,21d时50 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 处理的线虫侵染番茄根系中可溶性糖含量为 $68.3 \pm 0.4 \mu\text{g}/\text{mg}$ ,

表2 不同化合物处理的南方根结线虫侵染番茄后根系各生理指标的变化

Table 2 Change of root physiological indexes after tomatoes were infected with *Meloidogyne incognita* treated by different compounds

化合物 Compound	浓度 (mmol/L) Concentration	根系活力 ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) Root activity			丙二醛含量 (nmol/g) Malondialdehyde content		
		7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d
		$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.2	396.0 ± 7.2 g	526.0 ± 15.1 h	561.0 ± 9.5 i	14.9 ± 0.6 abc
	0.6	433.3 ± 3.5 f	581.0 ± 9.5 g	600.0 ± 11.0 g	14.2 ± 0.4 cd	16.3 ± 0.1 e	16.2 ± 0.9 cd
	1.0	470.0 ± 7.0 d	642.0 ± 2.0 d	661.0 ± 18.5 e	13.1 ± 0.7 ef	14.5 ± 0.6 gh	15.1 ± 0.7 e
	1.4	515.7 ± 8.5 bc	706.0 ± 6.2 b	734.3 ± 4.0 c	12.0 ± 0.2 g	13.0 ± 0.4 ij	13.2 ± 0.1 fg
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.2	358.3 ± 17.6 h	501.7 ± 17.6 i	523.3 ± 7.1 j	15.3 ± 0.3 ab	19.3 ± 0.3 b	19.7 ± 0.4 b
	0.6	395.0 ± 4.6 g	529.7 ± 8.5 h	573.3 ± 5.9 hi	14.7 ± 0.3 bcd	18.5 ± 0.3 c	18.9 ± 0.3 b
	1.0	455.0 ± 2.0 e	591.7 ± 9.6 fg	633.7 ± 6.7 f	13.8 ± 0.2 de	16.6 ± 0.5 de	17.1 ± 0.7 c
	1.4	481.3 ± 6.1 d	614.0 ± 6.0 e	694.3 ± 9.6 d	12.2 ± 0.3 fg	15.2 ± 0.8 fg	16.1 ± 0.9 d
$\text{NH}_4\text{HCO}_3$	5.0	400.0 ± 10.0 g	533.3 ± 6.5 h	583.3 ± 11.7 gh	14.3 ± 0.3 cd	17.2 ± 1.1 d	17.1 ± 0.6 c
	20.0	437.7 ± 8.6 f	607.0 ± 4.6 ef	635.0 ± 12.5 f	13.0 ± 0.6 ef	16.0 ± 0.4 ef	16.0 ± 0.1 de
	35.0	503.0 ± 6.2 c	665.7 ± 10.0 c	693.3 ± 10.1 d	12.2 ± 0.9 fg	13.8 ± 0.3 hi	13.9 ± 0.2 f
	50.0	526.0 ± 5.7 b	715.7 ± 12.5 b	752.0 ± 9.5 b	10.6 ± 0.8 h	12.6 ± 0.1 j	12.5 ± 0.3 g
CK1	0.0	326.3 ± 9.6 i	498.0 ± 11.1 i	427.7 ± 8.6 k	15.8 ± 0.9 a	20.6 ± 0.5 a	22.5 ± 0.3 a
CK2	0.0	553.7 ± 13.9 a	767.3 ± 6.7 a	785.3 ± 9.5 a	9.4 ± 0.4 i	9.9 ± 0.2 k	12.3 ± 0.6 g

化合物 Compound	浓度 (mmol/L) Concentration	可溶性糖含量 ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) Soluble sugar			氨基酸含量 ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) Amino acid content		
		7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d
		$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.2	82.8 ± 1.0 c	121.3 ± 0.9 c	134.7 ± 1.8 c	10.8 ± 0.9 c
	0.6	71.4 ± 0.3 e	100.7 ± 0.7 d	112.5 ± 1.0 e	7.3 ± 0.5 e	9.9 ± 0.1 f	11.3 ± 0.1 f
	1.0	64.6 ± 2.3 f	80.7 ± 0.1 h	89.5 ± 0.8 h	4.4 ± 0.5 g	6.5 ± 0.3 i	7.8 ± 0.1 j
	1.4	55.5 ± 1.4 h	63.5 ± 0.7 j	71.6 ± 1.3 j	2.1 ± 0.3 h	4.9 ± 0.1 k	5.2 ± 0.1 l
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.2	90.5 ± 2.8 b	130.6 ± 0.9 b	141.5 ± 1.1 b	12.3 ± 0.4 b	15.9 ± 0.1 b	17.8 ± 0.1 b
	0.6	79.5 ± 1.3 d	121.5 ± 1.3 c	130.0 ± 3.0 d	9.2 ± 0.2 d	10.9 ± 0.1 e	12.4 ± 0.1 e
	1.0	70.6 ± 1.2 e	97.5 ± 0.3 e	108.6 ± 0.3 f	6.7 ± 0.1 e	9.8 ± 0.0 f	10.1 ± 0.1 h
	1.4	63.8 ± 2.6 f	86.6 ± 1.7 g	88.5 ± 1.3 h	5.5 ± 0.3 f	7.9 ± 0.0 h	8.7 ± 0.0 i
$\text{NH}_4\text{HCO}_3$	5.0	80.8 ± 0.3 cd	120.7 ± 1.0 c	130.8 ± 1.6 d	9.6 ± 0.2 d	12.5 ± 0.1 d	13.7 ± 0.1 d
	20.0	65.7 ± 0.2 f	95.2 ± 0.2 f	101.9 ± 1.0 g	7.1 ± 0.1 e	9.4 ± 0.0 g	10.3 ± 0.0 g
	35.0	60.5 ± 1.8 g	70.9 ± 1.0 i	80.7 ± 1.9 i	4.0 ± 0.1 g	5.8 ± 0.1 j	6.6 ± 0.1 k
	50.0	51.4 ± 1.7 i	59.2 ± 0.9 k	68.3 ± 0.4 k	2.0 ± 0.0 h	3.4 ± 0.1 l	4.0 ± 0.0 m
CK1	0.0	98.2 ± 0.2 a	135.7 ± 2.1 a	182.7 ± 2.6 a	13.7 ± 0.2 a	21.1 ± 0.1 a	29.0 ± 0.1 a
CK2	0.0	45.6 ± 0.3 j	56.8 ± 1.0 l	66.7 ± 1.1 k	1.9 ± 0.1 h	3.0 ± 0.0 m	3.8 ± 0.2 n

表中数据为平均数 ± 标准差。同列数据后不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。Data in the table are mean ± SD. Different letters in the same column indicate significant difference at  $P < 0.05$  level by Duncan's new multiple range test.

与 21 d 时 CK1 差异显著,与 21 d 时 CK2 无明显差异。CK2 的根系中游离氨基酸含量较低,随着番茄的生长,21 d 时仅为  $3.8 \pm 0.2 \mu\text{g}/\text{mg}$ 。当受到南方根结线虫侵染后,根系内游离氨基酸含量迅速升高,21 d 时 CK1 的游离氨基酸含量比 CK2 增加了 763%。3 种化合物处理的 2 龄幼虫侵染番茄后,根系内游离氨基酸含量随着化合物浓度的增加而降低,随处理时间的延长而不断增加,表现为  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  抑制效果最强, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  抑制效果较弱(表 2)。

### 2.3 对番茄根系巨细胞发育的影响

根结线虫侵染 7 d 时, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  处理的番茄幼苗根系与无菌水对照组均出现 2

龄幼虫的侵染, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  处理组产生少量巨细胞; $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  处理组未观察到 2 龄幼虫的侵染和巨细胞的形成(图 1-A ~ D)。接种后 14 d 时,各化合物处理组的根系根结组织中巨型细胞与无菌水对照组有较大差别,主要表现在  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  和  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  处理的细胞质染色较浅,并能看到明显的巨型细胞空洞现象;对照组细胞质染色较深,细胞核较多,巨型细胞饱满(图 1-E ~ H)。接种后 21 d 时,观察发现 3 组化合物处理组均出现空洞或巨型细胞破碎、细胞质崩解现象;对照组巨型细胞仍然饱满,没有出现细胞质崩解和空洞的现象(图 1-I ~ L)。

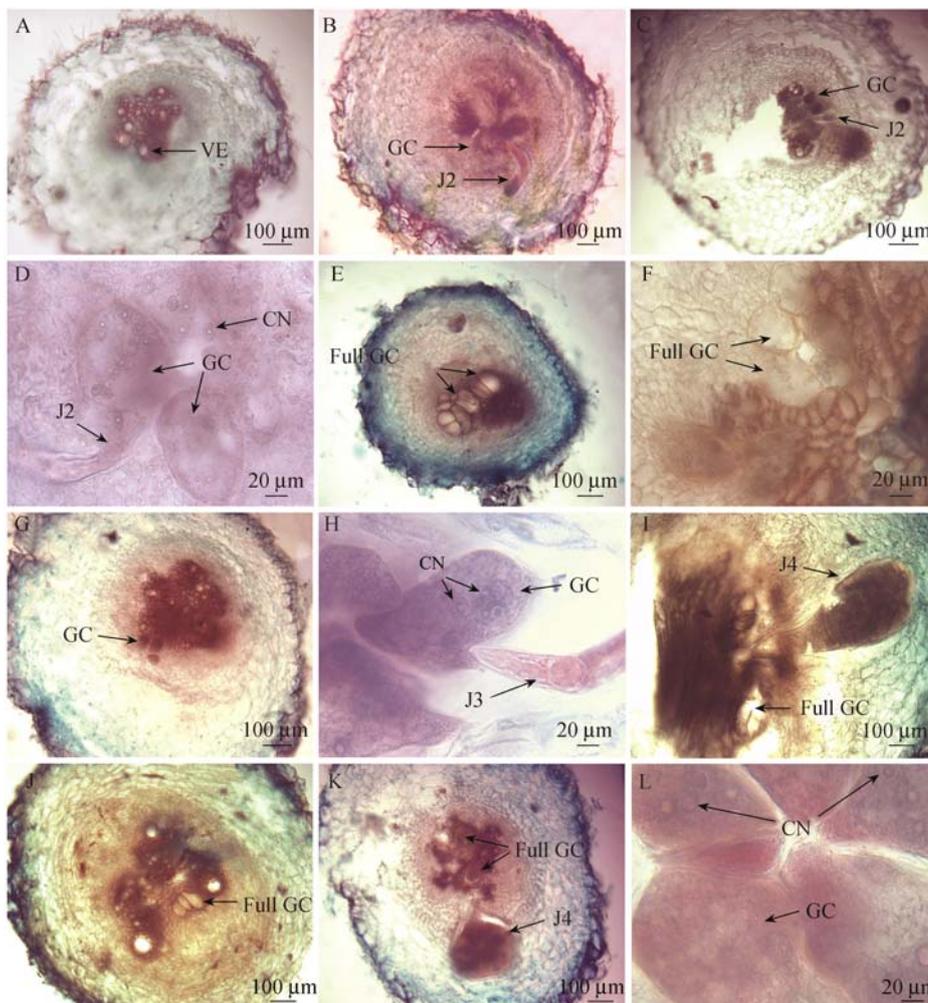


图 1 不同化合物处理的南方根结线虫接种 7、14、21 d 时番茄根系根结冰冻切片照片

Fig. 1 Photos of tomato root knot frozen section, inoculated by *Meloidogyne incognita* treated by different compounds (7, 14, and 21 d)

A ~ D: 50 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 、1.4 mmol/L  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、1.4 mmol/L  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  和无菌水 4 个处理的线虫接种 7 d 时; E ~ H: 上述 4 个处理的线虫接种 14 d 时; I ~ L: 上述 4 个处理的线虫接种 21 d 时; VE: 维管束细胞; GC: 巨细胞; Full GC: 空洞的巨细胞; CN: 细胞核; J2、J3、J4: 2 龄、3 龄、4 龄幼虫。A ~ D: Inoculation 7 d by *M. incognita* treated with 50 mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 、1.4 mmol/L  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、1.4 mmol/L  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  and sterile water; E ~ H: inoculation 14 d by *M. incognita*; I ~ L: inoculation 21 d by *M. incognita*; VE: vascular elements; GC: giant cell; Full GC: full giant cell; CN: cell nucleus; J2, J3, J4: second-, third-, and fourth-stage juveniles.

### 3 讨论

Vovlas et al. (2004) 发现巨型细胞空洞现象的产生是寄主植物的一种抗性机制,根结线虫的生长、发育、繁殖过程中,巨型细胞为其提供了充足的营养代谢库,如果巨型细胞死亡,根结线虫将失去养料来源而死亡。本研究结果表明,不同浓度的3种化合物处理南方根结线虫2龄幼虫,对根结线虫的个体生长发育均有显著的抑制作用,且随化合物处理浓度的增大,抑制作用增强,侵入根系内部的线虫数量逐渐减少。说明3种化合物都具有抑制线虫侵染、影响线虫个体分化发育的作用。

根系活力代表了根系新陈代谢活动的强弱,也是反应根系发育吸收功能的一项综合指标(杨瑞吉,2003)。丙二醛是细胞膜质中不饱和脂肪酸发生过氧化作用的最终产物之一,其含量的多少在一定程度上代表了细胞膜的损伤程度和植物对逆境反应的强弱(李建勇等,2003;毛培利等,2004)。本试验结果表明,3种化合物对南方根结线虫2龄幼虫的处理,降低了番茄根系丙二醛含量,表现为随处理浓度增大,根系活力增强,其中 $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 处理效果最显著。可溶性糖和游离氨基酸是重要的渗透调节物质,在植物抗逆过程中可以保持原生质体与环境的渗透平衡。Davies et al. (1994) 研究表明在正常条件下脯氨酸含量很低,植物受到胁迫后其含量升高,以提高细胞渗透势;Owens & Specht(1966)分析了番茄根结和正常根的化学成分,结果表明根结内可溶性糖和自由氨基酸含量分别比正常根提高了36%和304%。本试验通过不同化合物对南方根结线虫2龄幼虫的处理,有效减少了其对番茄根系的侵染,从而减少了根结形成的数量及大小,降低了根系内可溶性糖和游离氨基酸含量。番茄根系内各生理指标的变化,体现出化合物处理后的南方根结线虫对番茄的致病力减弱,番茄植株发病减轻的特征,同时各指标均显示 $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 处理后的效果最显著。因此,利用 $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 作为农用化学品的添加剂,可能对南方根结线虫的防治起到更好的效果。

根结线虫引起寄主植物形成根结的发展过程分为诱导、发展、成熟和衰败4个阶段。从根结线虫2龄幼虫侵染寄主植物开始,首先在寄主植物根尖的伸长区内细胞间移动,在根中柱的维管束附近找到合适的位点后,诱导寄主植物的细胞发生变化,在最初的1~6d内形成巨型细胞(王新荣等,2010)。巨型细胞内的核数目不断增加,后期巨型细胞内数目

稳定,到根结线虫雌虫产卵后,巨型细胞内出现空洞,根结开始腐烂(Starr,1993;刘奇志等,2008)。本研究中经过 $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 处理后的2龄幼虫形成巨型细胞减慢,14d时出现巨型细胞空洞现象; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 处理分别在14d和21d时出现巨型细胞空洞现象;无菌水对照产生的巨型细胞饱满,细胞核多,没有出现细胞质崩解和空洞的现象。这进一步解释了3种化合物 $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 抑制南方根结线虫2龄幼虫侵染、减少根结形成的原因。

不同化合物处理对南方根结线虫的侵染能力和生长发育均具有不同程度的影响,这些化合物与杀线剂混用可能具有提高杀线剂的效果。本试验通过测定植株根系生理指标以及研究根结内巨型细胞的发育过程,明确了3种化合物处理能够导致南方根结线虫致病能力下降,降低番茄根结线虫病发生,可为杀线剂与农业化合物的合理搭配使用提供一定的理论依据,但其分子机制还有待进一步研究。

### 参考文献 (References)

- Bai CM, Duan YX, Chen LJ, Liu YF, Yu XF. 2011. The modes of action of inorganic compounds to *Meloidogyne incognita*. *Plant Protection*, 37(1): 74-78 (in Chinese) [白春明, 段玉玺, 陈立杰, 刘轶飞, 于晓飞. 2011. 无机化合物对南方根结线虫作用方式的研究. *植物保护*, 37(1): 74-78]
- Barker KR, Shoemaker PB, Nelson LA. 1976. Relationships of initial population densities of *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* to yield of tomato. *Journal of Nematology*, 8(3): 232-239
- Bird DM, Opperman CH, Williamson WM. 2009. Plant infection by root-knot nematode. *Plant Cell Monographs*, 15: 1-13
- Castro CE, Belser NO, McKinney HE, Thomason IJ. 1990. Strong repellency of the root knot nematode, *Meloidogyne incognita* by specific inorganic ions. *Journal of Chemical Ecology*, 16(4): 1199-1205
- Davies WJ, Tardieu F, Trejo CL. 1994. How do chemical signals work in plants that grow in drying soil? *Plant Physiology*, 104(2): 309-314
- Duan YX. 2011. *Plant nematology*. Beijing: Science Press, pp. 3 (in Chinese) [段玉玺. 2011. *植物线虫学*. 北京: 科学出版社, pp. 3]
- Dusenbery DB. 1974. Analysis of chemotaxis in the nematode *Caenorhabditis elegans* by countercurrent separation. *Journal of Experimental Zoology*, 188(1): 41-47
- Ge TD, Huang DF, Song SW, Lu B, Yang DD. 2008. Effects of nitrogen forms on carbon and nitrogen accumulation in tomato seedling. *Scientia Agricultura Sinica*, 41(10): 3168-3176 (in Chinese) [葛体达, 黄丹枫, 宋世威, 芦波, 杨冬冬.

2008. 不同氮素形态对番茄幼苗碳、氮积累的影响. 中国农业科学, 41(10): 3168 - 3176]
- Jiao S, Duan YX, Sun H, Chen LJ. 2009. The best method of soybean-root cryo-section technique. Hubei Agricultural Sciences, 48(4): 806 - 808 (in Chinese) [焦石, 段玉玺, 孙华, 陈立杰. 2009. 大豆根部冰冻切片最佳方法试验. 湖北农业科学, 48(4): 806 - 808]
- Li JY, Zhang ZX, Ge JQ, Wang L, Shi XZ. 2003. Effect of freezing stress on the membrane system of the open-field winter cabbage. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 11(3): 58 - 60 (in Chinese) [李建勇, 张振贤, 葛均青, 王磊, 史修柱. 2003. 冬季田间冻害胁迫对露地越冬甘蓝膜系统的影响. 中国生态农业学报, 11(3): 58 - 60]
- Li QQ, Qi YH, Cao SF, Li MQ, Du H, Li JP. 2014. Effect of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) infection on some physiological and biochemical reactions of cowpea seedling leaves and roots. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 23(2): 49 - 54 (in Chinese) [李青青, 漆永红, 曹素芳, 李敏权, 杜蕙, 李继平. 2014. 南方根结线虫侵染对豇豆叶部和根系部分生理生化指标的影响. 西北农业学报, 23(2): 49 - 54]
- Liu QZ, Li N, Wang L, Xie DY. 2008. Histopathological structure of cucumber radicle infected by root-knot nematode. Journal of China Agricultural University, 13(4): 51 - 56 (in Chinese) [刘奇志, 李娜, 王丽, 谢德燕. 2008. 南方根结线虫侵染黄瓜幼根组织的病理学观察. 中国农业大学学报, 13(4): 51 - 56]
- Liu WZ. 1995. Research technology of plant nematology. Shenyang: Liaoning Science and Technology Press, pp. 71 - 72 (in Chinese) [刘维志. 1995. 植物线虫学研究技术. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, pp. 71 - 72]
- Lü HP, Qi YH, Cao SF, Du H, Li MQ, Shen HM. 2012. Effects of inorganic salts on eggs, egg masses hatching and 2nd instar larval survival of *Meloidogyne incognita*. Journal of Plant Protection, 39(5): 449 - 455 (in Chinese) [吕和平, 漆永红, 曹素芳, 杜蕙, 李敏权, 沈慧敏. 2012. 四种无机盐对南方根结线虫卵囊、卵孵化及其幼虫存活的影响. 植物保护学报, 39(5): 449 - 455]
- Mao PL, Cao BH, He M. 2004. Effect of drought stress on activity of cell defects enzymes of four robinia pseudoacacia clones. Forestry Science & Technology, 29(4): 10 - 12 (in Chinese) [毛培利, 曹帮华, 何明. 2004. 干旱胁迫下刺槐无性系保护酶活性差异的研究. 林业科学, 29(4): 10 - 12]
- Mazumder S, Ghosal PK, Pujol CA, Carlucci MJ, Damonte EB, Ray B. 2003. Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Phodophyta). International Journal of Biological Macromolecules, 31(1/3): 87 - 95
- Owens RG, Specht HN. 1966. Biochemical alterations induced in host tissues by root-knot nematodes. //Contributions from Boyce Thompson Institute. Boyce Thompson Institute for Plant Research, 23: 181 - 189
- Peng DL. 1998. Integrated control of vegetable diseases and insect pests (XI): occurrence and control of vegetable nematodes. China Vegetables, (4): 57 - 58 (in Chinese) [彭德良. 1998. 蔬菜病虫害的综合治理(十): 蔬菜线虫病害的发生和防治. 中国蔬菜, (4): 57 - 58]
- Starr JL. 1993. Dynamics of the nuclear complement of giant cells induced by *Meloidogyne incognita*. Journal of Nematology, 25(3): 416 - 421
- Vovlas N, Simões NJ, Sasanelli N, Santos MCVD, Abrantes IMDO. 2004. Host-parasite relationships in tobacco plants infected with a root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) population from the Azores. Phytoparasitica, 32(2): 167 - 173
- Wang XR, Ma C, Ren LL, Wang L. 2010. Review on the morphology and formation mechanism of plant root-knot caused by *Meloidogyne* spp. Journal of Huazhong Agricultural University, 29(2): 251 - 256 (in Chinese) [王新荣, 马超, 任路路, 王磊. 2010. 根结线虫引起的植物根结形态与形成机理研究进展. 华中农业大学学报, 29(2): 251 - 256]
- Ward S. 1973. Chemotaxis by the nematode *Caenorhabditis elegans*: identification of attractants and analysis of the response by use of mutants. Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America, 70(3): 817 - 821
- Wu JX, Yuan F, Su L. 2004. Change of carbohydrate contents in larvae of the wheat midge, *Sitodiplosis mosellana* (Gehin) during mature and diapause stage. Acta Entomologica Sinica, 47(2): 178 - 183 (in Chinese) [作均祥, 袁锋, 苏丽. 2004. 麦红吸浆虫幼虫滞育期间糖类物质变化. 昆虫学报, 47(2): 178 - 183]
- Yang RJ. 2006. Allelopathic effects of rape root exudates on growth of seedlings of different crops. Ecology and Environment, 15(5): 1062 - 1066 (in Chinese) [杨瑞吉. 2006. 油菜根系分泌物对不同作物幼苗生长的化感效应. 生态环境, 15(5): 1062 - 1066]
- Yang YF, Ni H, Wu LM. 2013. Determination of amino acid in honey and high fructose corn syrup (HFCS) by the method of ninhydrin colorization. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 13(2): 171 - 176 (in Chinese) [杨远帆, 倪辉, 吴黎明. 2013. 茚三酮法测定蜂蜜及果葡糖浆中的氨基酸含量. 中国食品学报, 13(2): 171 - 176]
- Zhao SJ, Xu CC, Zou Q, Meng QW. 1994. Improvements of method for measurement of malondialdehyde in plant tissues. Plant Physiology Communications, 30(3): 207 - 210 (in Chinese) [赵世杰, 许长成, 邹琦, 孟庆伟. 1994. 植物组织中丙二醛测定方法的改进. 植物生理学通讯, 30(3): 207 - 210]

(责任编辑:李美娟)