

Statens plantepatologiske Forsøg (H. Ingv. Petersen)

Zoologisk afdeling (K. Lindhardt)

Dyrkning af planteparasitiske nematoder af slægten *Pratylenchus* på lucernekallos

Culturing of Pratylenchus penetrans and Pratylenchus thornei on alfalfa callus-tissue

H. J. Andersen

Resumé

Ved dyrkningsforsøg med tre *Pratylenchus*-arter på lucernekallos uden tilstedeværelse af andre organismer er der opnået resultater, der viser metodens anvendelighed til opformering af artsrene populationer. Sådanne populationer uden associerede mikroorganismer har stor betydning for udførelse af mange undersøgelser over arternes biologi og skadevirkning.

I kulturer af *Pratylenchus penetrans* og *P. thornei* fandtes der med populationer af samme størrelsesorden en farveforskel i kallusen, de dyrkedes på. Efter dyrkning af *P. penetrans* konstateredes en mørkfarvning af kallusen, mens denne forblev uforandret lys efter dyrkning af *P. thornei*.

Beretningen er skrevet på grundlag af studier vedrørende planteparasitiske nematoder i forbindelse med specialopgave i zoologi ved Københavns universitet udført i 1970-71 på Statens plantepatologiske Forsøg's zoologiske afdeling.

Indledning

Til en lang række studier og eksperimenter vedrørende planteparasitiske nematoder vil det ofte være ønskeligt eller nødvendigt at kunne dyrke disse under sterile betingelser. For eksempel er det til patogenitetsundersøgelser ønskeligt at kunne massedyrke den pågældende nematodart uden tilstedeværelse af mikroorganismer.

Mens det er muligt at dyrke visse fritlevende nematoder axenisk (uden andre organismers tilstedeværelse), er dette endnu ikke lykkedes med nogen planteparasitisk nematodart. Derimod har monoxenisk (under tilstedeværelse af én anden organisme) dyrkning siden begyndelsen af 1960'erne efter Krusbergs studier (Krusberg, 1961 og 1964) over monoxenisk dyrkning af planteparasitiske nematoder på kallusvæv hyppigt været beskrevet i nematologisk litteratur.

Metoden har især været egnet for endoparasitiske, migrerende rodnematoder (d.v.s. ikke stationære) samt blad- og stængelnematoder, mens det for de ektoparasitiske rodnematoder kun er lykkedes med få af de arter, der har været forsøgt med. F.eks. er det lykkedes med *Tylenchorhynchus claytoni* på lucernekallos (Khera & Zuckerman, 1962).

I Sverige har Bingefors & Eriksson (1963) og Eriksson (1966) i forbindelse med resistensforsøg og racedifferentiering hos *Ditylenchus dipsaci* foretaget dyrkningsforsøg med denne art, og på lantbrukshögskolan i Uppsala findes nu en »nematodbank«, hvorfra forskellige racer er til rådighed for resistensforædling og andre formål.

Materiale og metoder

I forbindelse med en undersøgelse over migrerende rodnematoders forekomst hos bælgplanter

er der foretaget dyrkningsforsøg med den formodet vigtigste af de fundne arter, *Pratylenchus penetrans* (Cobb, 1917) Filipjev & Stekhoven, 1941, samt med *Pratylenchus thornei* Sher & Allen, 1953 og *Pratylenchus* Sher & Allen, 1953.

Til arbejdet under sterile betingelser er anvendt en box (50 × 50 × 35 cm) fremstillet af plexiglas og forsynet med en UV lampe, og ved brug af denne er det lykkedes at begrænse antallet af kulturer med infektion af mikroorganismer til nogle få procent.

Som kulturnæringsmedium anvendte Krusberg (1961) et medium udviklet af Hildebrandt et al. (1946), som bl.a. indeholder kokusmælk. Mediet, der her er anvendt, er en modifikation af ovennævnte, som er anvendt af Lownsberry et al. (1967) og indeholder ikke kokusmælk.

Efter fremstilling af mediet hældes dette i rørglas med 3 cm diameter (ca. 15 ml i hvert glas) og lukkes med en hætte af aluminiumsfolie lagt dobbelt, hvorefter det hele autoklaveres.

Lucernefrø overfladesteriliseres ved anbringelse i konc. svovlsyre i 20-30 minutter med efterfølgende mange gange skylning i destilleret, autoklaveret vand. Derefter bringes de til spiring i autoklaverede petriskåle med vådt filterpapir. Tre kimplanter overføres ca. 2 cm lange til hvert af kulturglassene, som derefter, inden nematoderne inokuleres, inkuberes i mørke i 14 dage ved stuetemperatur (21-24°C).

P. penetrans til inokulation er frasorteret en nematodsuspension fra lucerne ved Lyngby, mens *P. minyus* og *P. thornei* er fra rødkløver fra Rødby. Nematoderne overflade steriliseres ved overførsel til en 0,2 pct. hibitandiacetatopløsning i 10-15 min. og derefter enkeltvis gennem 4-5 bade med sterilt vand. Efter hibitanbehandlingen erfarede, at nematoderne var vanskeligere at overføre uden at skade dem end ellers, og dette er grunden til de uensartede tal, der podedes med i første forsøg. Overførslen til kallusen foretages ved en metode efter Eriksson (1966). Nematoderne overføres først enkeltvis til en dråbe vand ophængt på spidsen af en lang kanyle, hvorefter nematoderne samlet anbringes det ønskede sted på kallusen.

Til ekstraktion overføres kallusen til en petri-

skål med vand, og ekstraktionen er fortsat i 14 dage fra hver kultur.

Resultater

Resultaterne fra en del af kulturerne er angivet i nedenstående tabel:

	Start- pop.	Alder i uger	Slut- pop.
<i>Pratylenchus penetrans</i>	20	4½	348
	20	—	346
	20	—	395
	18	9	2804
	20	—	3201
	20	—	1811
	20	—	2161
	14	11	7269
	15	12½	3900
	17	—	3
	15	13	3502
	14	14	3929
	20	14½	5287
<i>Pratylenchus minyus</i>	20	—	3827
	5	12	58
<i>Pratylenchus thornei</i>	25	14½	210
	15	12	1709
	20	14½	967
	20	—	2457
	20	—	5906

Efter 4½ uges inkubation er *P. penetrans*-populationerne vokset med ca. en faktor 18 og efter 9 uger med yderligere en faktor 7. Derefter til 14½ uge synes populationerne at være stagnerende. Maximum for *P. penetrans*, inoculeret med et kendt antal nematoder, er 7269, der er opnået i en 11 uger gammel kultur med 14 individer som startpopulation (se tabel). Ved overførsel af kallusstykker fra etablerede kulturer til nye er efter 7½ uge opnået et maximum på godt 21.000 nematoder, men startpopulationen, der altså ikke kendes, kan have været betydelig.

Med *P. thornei* er der startet færre kulturer, men af resultaterne, 5906 som højeste tal efter 14½ uge synes tilvæksten stort set at være tilsvarende *P. penetrans*. For *P. minyus* foreligger 2 tal, men begge kulturer har haft ret ringe tilvækst.

Mellem kulturer af *P. penetrans* på den ene

side og *P. thornei* og *P. minyus* på den anden konstateredes, efter at kulturerne var godt etablerede (ca. 9 uger), en farveforskel i kallussen. Hos *P. penetrans* farvedes denne mørk, mens den forblev uforandret lys hos de øvrige. Det drejer sig formentlig om en nekrotisk effekt forårsaget af *P. penetrans*.

Diskussion og konklusion

Med udgangspunkt i resultaterne fra disse foreløbige dyrkningsforsøg vil der ved efterfølgende dyrkninger med forskellige metodemæssige forbedringer være grundlag for at opnå de samme store populationer af *Pratylenchus*arter, som angivet i flere afhandlinger. Lownsberry et al. (1967), hvis medium er anvendt her, refererer tal på omkring 150.000 pr. kultur for *Pratylenchus vulnus* efter 3 måneder ved 25°C startet med 800 nematoder på kallas etableret med 0,5 ccm lucernefrø, altså med væsentlig større startpopulation og større kallusmængde.

En væsentlig årsag til de tilsyneladende stagnationer i populationerne her antages at måtte søges i den begrænsede kallusmængde, og en forbedring af resultaterne kan muligvis opnås ved anvendelse af et andet medium, der giver bedre kallusvækst.

Summary

Pratylenchus penetrans and *P. thornei* cultured on alfalfa callus-tissue by the methods of Krusberg

(1961) and Lownsberry et. al. (1967) showed both good reproduction, but between the two species a marked difference was observed in the colour of the callus, on which they were reared. In cultures of *P. penetrans* the callus turned dark, while in cultures of *P. thornei* containing populations of the same order of size the colour could not be distinguished from that of uninfested callus.

Litteratur

Bingefors, S. & Eriksson, K. B. 1963: Rearing stem nematode inoculum on tissue culture. Preliminary report. Lantbrukshögsk. An. 29, 107-118.

Eriksson, K. B. 1966: Studier i vävnadskultur av resistens mot *Ditylenchus dipsaci* och av rasdifferentiering inom denna nematodart. Avhandling för avläggande av agronomie licentiatexamen i växtpatologi. Lantbrukshögsk. Uppsala 1966.

Khera, S. & Zuckerman, B. M. 1962: Studies on the culturing of certain ectoparasitic nematodes on plant-tissue. *Nematologica*, 8, 272-274.

Krusberg, L. R. 1961: Studies on the culturing and parasitism of plant parasitic nematodes in particular *Ditylenchus dipsaci* and *Aphelenchoides ritze-mabosi* on alfalfa tissues. *Nematologica*, 6, 180-200.

Krusberg, L. R. & Blickenstaff, 1964: Influence of plant growth regulating substances of *Ditylenchus dipsaci*, *Pratylenchus penetrans* and *Pratylenchus zeei* on alfalfa tissue cultures. *Nematologica*, 10, 145-150.

Lownsberry, B. F. et al. 1967: Tissue culture and maintenance of the root-lesion nematoda *Pratylenchus vulnus*. *Nematologica*, 13, 390-394.

Manuskriptet modtaget d. 24. februar 1972.