

网络出版时间:2015-01-05 08:59

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2015.02.026

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20150105.0859.026.html

预处理方式对昆虫病原线虫冷冻存活的影响

李春杰,王丽芳,潘凤娟,许艳丽

(中国科学院 东北地理与农业生态研究所 黑土区农业生态院重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150081)

【摘 要】 【目的】探讨提高昆虫病原线虫冷冻存活能力的方法,以改进昆虫病原线虫储存技术。【方法】以我国高寒地区分离、筛选出的高致病力昆虫病原线虫 *Heterorhabditis bacteriophora*-HBN(HBN,45°45'N)和从美国引进的同种不同品系昆虫病原线虫 *H. bacteriophora*-NJ(NJ,40°13'N)为研究对象,在实验室条件下研究了不同预处理方式对 2 个品系线虫冷冻存活率的影响。【结果】HBN 经过 25 ℃ 7 d、10 ℃ 7 d、4 ℃ 7 d、25 ℃ 3 d 10 ℃ 3 d 和 25 ℃ 3 d 10 ℃ 3 d 4 ℃ 3 d 的预处理后,于-4 ℃ 冷冻 5 d 时的存活率为 86.1%~95.2%,显著高于直接冷冻法(25 ℃ 0 d)的存活率 17.7%,而 NJ 经 25 ℃ 3 d 10 ℃ 3 d 4 ℃ 3 d 的预处理后,于-4 ℃ 冷冻 5 d 时的存活率为 83.0%,显著高于其他预处理(2.2%~58.5%)。【结论】适当的预处理可提高 2 个品系线虫的冷冻存活率,但生活在不同地理纬度的同种线虫(HBN 和 NJ)适于不同的驯化方式。

【关键词】 昆虫病原线虫;预处理;低温驯化;冷冻储存;存活率

【中图分类号】 S432.4⁺5

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2015)02-0198-05

Effect of pretreatment method on freezing survival of entomopathogenic nematodes

LI Chun-jie, WANG Li-fang, PAN Feng-juan, XU Yan-li

(Key Laboratory of Mollisols Agroecology, Northeast Institute of Geography and Agroecology,
Chinese Academy of Sciences, Harbin, Heilongjiang 150081, China)

Abstract: 【Objective】 In order to improve storage technology of entomopathogenic nematodes (EPNs), the methods to increase freezing survival of EPNs were explored. 【Method】 Two strong virulence strains of EPNs, *Heterorhabditis bacteriophora*-HBN (HBN) with cold tolerance isolated from Harbin (China, 45°45'N) and *H. bacteriophora*-NJ (NJ) from New Jersey (USA, 40°13'N), were used in this study. The survival rates of HBN and NJ at -4 ℃ for 5 days after different pretreatment methods were compared. 【Result】 The freezing survival rates of HBN pretreated at 25 ℃ for 7 d, 10 ℃ for 7 d, 4 ℃ for 7 d, 25 ℃ for 3 d then 10 ℃ for 3 d, and 25 ℃ for 3 d and 10 ℃ for 3 d before 4 ℃ for 3 d were 86.1% to 95.2%, which were significantly higher than that of 25 ℃ for 0 d (17.7%). The highest freezing survival rate of 83.0%, was obtained for NJ when pretreated at 25 ℃ for 3 d and 10 ℃ for 3 d before 4 ℃ for 3 d, which was significantly higher than those of other pretreatment methods (2.2% to 58.5%). 【Conclusion】 Freezing survival rates of HBN and NJ could be increased by appropriate pretreatment methods. But the best pretreatment methods for the same species (HBN and NJ) isolated from different geographical latitudes were different.

【收稿日期】 2013-09-29

【基金项目】 国家科技计划农业成果转化项目(2007GB24910482);国家自然科学基金项目(31000205);黑龙江省青年科学基金项目(QC2010070);哈尔滨市科技创新人才项目(2009RFQYN092)

【作者简介】 李春杰(1976—),女,黑龙江依安人,副研究员,博士,主要从事作物病虫害生物生态控制及机理研究。
E-mail:lichunjie@neigae.hrb.ac.cn

【通信作者】 许艳丽(1958—),女,辽宁本溪人,研究员,博士,主要从事农田有害生物控制研究。

Key words: entomopathogenic nematode; preprocessing; cold acclimation; freezing storage; survival rate

昆虫病原线虫(Entomopathogenic nematode, EPN)是指体内携带具有病原性的共生细菌,并能引起昆虫致病的一类寄生性线虫,它是昆虫的重要天敌类群,已经成功用于防治200余种害虫^[1],且这种生物杀虫剂具有广阔的应用前景。但昆虫病原线虫常温储存货架期短,是其推广应用的主要障碍因素之一。线虫在低温下处于静止休眠状态,新陈代谢速度减慢,体能消耗减少,其存活率下降速度减慢,从而可延长线虫货架期。所以,线虫低温储存已成为当前研究热点,但适于低温储存的线虫材料和储存技术尚未解决。

低温驯化过程能使线虫产生保护性脱水,然后进行低湿休眠。Grewal^[2]认为,低湿休眠利于昆虫病原线虫的长期储存。经过低温驯化后,线虫的耐寒能力得到增强^[3-6],但耐寒能力的增强程度受不同低温驯化方式的影响。芜菁夜蛾斯氏线虫(*Steinernema feltiae*)经过直接降温驯化后,低温存活率显著提高;而嗜菌异小杆线虫(*Heterorhabditis bacteriophora*)经过阶段性降温驯化后,其低温存活率增加幅度比直接降温驯化后的增加幅度更大^[7]。Grewal^[2]研究表明,阶段性降温驯化方式使苾小卷夜蛾斯氏线虫(*S. carpocapsae*)和夜蛾斯氏线虫(*S. riobrave*)所获得的耐寒性较直接驯化更强。杨秀芬等^[8]试验结果证实,低温诱导有助于培育夜蛾斯氏线虫A54适应0℃以上的低温特性,但返回25℃培养2个侵染循环后这种特性有不同程度的丢失。

很多学者通过各种方法均提高了昆虫病原线虫暂时的耐寒性,而李春杰等^[9]从我国高寒地区分离、筛选获得的高致病力线虫本身具有很好的耐寒性。根据该线虫能在黑龙江省越冬的自然现象,其低温储存潜力及储存条件已得到初步探索^[10-13]。本研究以2个不同品系线虫为材料,采用不同预处理方式,研究线虫冷冻储存前的预处理方式对冷冻后线虫存活率的影响,进而改善昆虫病原线虫储存技术,以加快我国寒区高致病力线虫的开发应用速度。

1 材料与方法

1.1 材料

Heterorhabditis bacteriophora-HBN(HBN),从黑龙江省哈尔滨市(45°45'N)分离得到的昆虫病原线虫,低温致死中温度是-12.4℃,由加拿大线虫博物馆馆长郁庆教授鉴定为嗜菌异小杆线虫哈尔

滨品系。*H. bacteriophora*-NJ(NJ),从美国新泽西州(40°13'N)引进,也是市场上常用制剂中的线虫,低温致死中温度为-6.1℃,相对HBN视为非耐寒线虫。两线虫均保存于中国科学院东北地理与农业生态研究所农田有害生物控制学科组。

1.2 试验方法

所用线虫均采用White-Trap法繁殖^[14],对新繁殖出来的感染期线虫进行不同温度和时间预处理。预处理方式有:A为25℃放置0d(记为25℃0d,下同)、B为25℃放置3d(25℃3d)、C为25℃放置7d(25℃7d)、D为10℃放置7d(10℃7d)、E为4℃放置7d(4℃7d)、F为25℃放置3d然后10℃放置3d(25℃3d10℃3d)、G为25℃放置3d然后10℃放置3d然后再4℃放置3d(25℃3d10℃3d4℃3d)。分别取新繁殖出来的线虫200μL(10⁷/mL)置于慢速定量滤纸片(北京天宇祥瑞科技有限公司)上,真空抽滤(此时水分与滤纸质量比为10.7:8.0)后放于0.3mL离心管中进行不同预处理,然后再经历-4℃的低温冷冻,5d后升温至10℃保持24h,于室温放置1h后,再将带有线虫的滤纸片置于装有1mL水的直径为6cm的培养皿中振荡1min,解剖镜下调查线虫存活率^[15]。每种预处理10个离心管,试验重复3次。预处理过程中25℃采用恒温培养箱(天津泰斯特仪器有限公司,DH6000A)控制,10,4和-4℃采用置于控温冰箱(青岛海尔股份有限公司,BCD-226STV)内。

1.3 数据统计与分析

试验中所调查的原始数据经Excel处理和SPSS 11.5软件分析,计算所得存活率经反正弦平方根转换,然后采用单因素0.05水平方差分析(One-Way ANOVA)和LSD多重比较检验各处理组间的差异显著性。

2 结果与分析

由图1可以看出,在25℃下分别预处理0,3和7d,即随着预处理时间的延长,-4℃冷冻5d后HBN和NJ的存活率下降速度逐渐减慢,并且HBN的下降速度较NJ更慢。25℃预处理7d的HBN和NJ冷冻5d时的存活率分别为93.0%和53.2%,显著高于2个品系线虫预处理0d和3d时的存活率(17.7%和35.5%,1.6%和2.2%)。

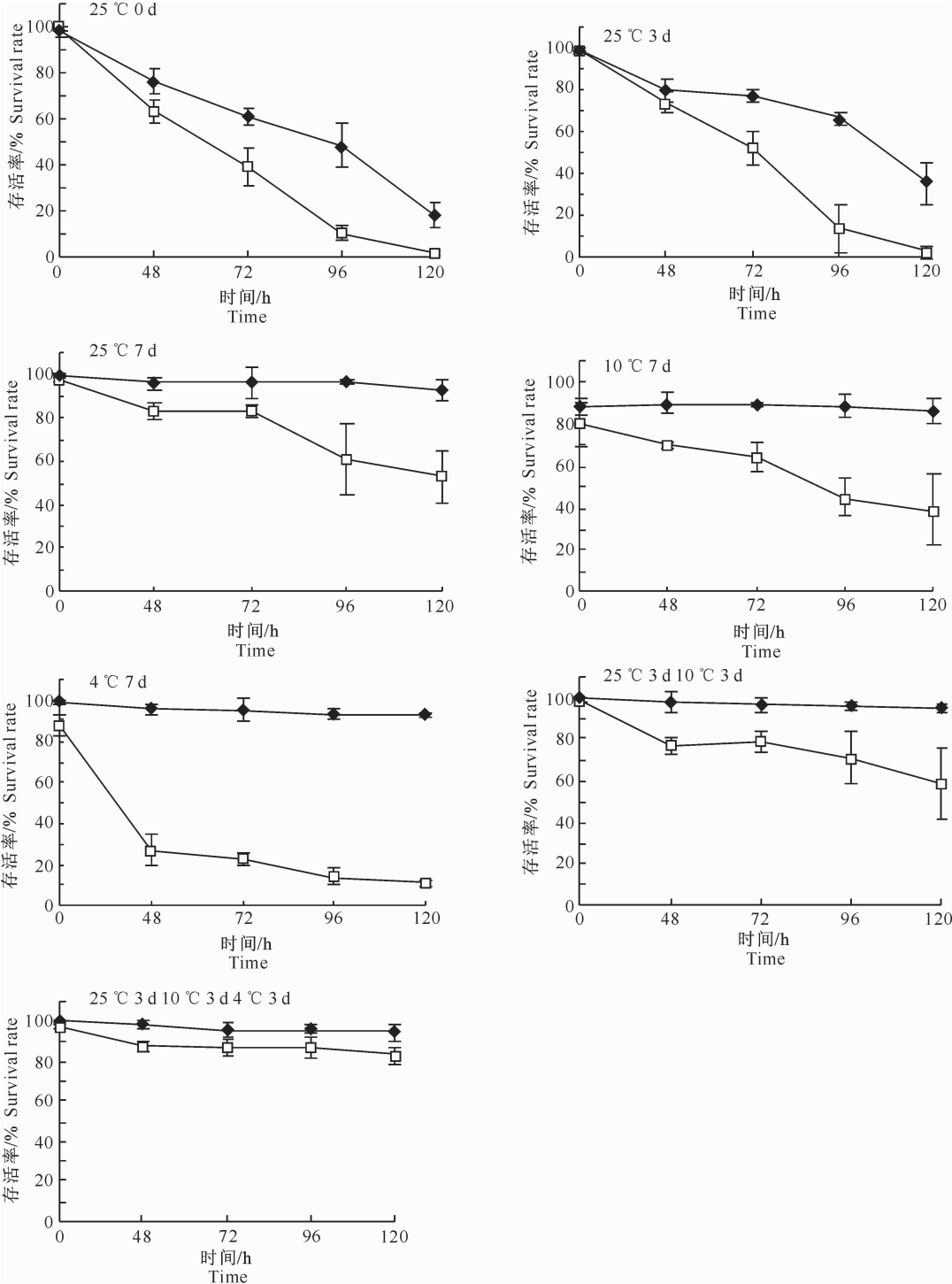


图 1 不同预处理方式对昆虫病原线虫冷冻存活率的影响

—◆—, HBN; —□—, NJ

Fig. 1 Effect of different pretreatment methods on freezing survival of EPN

在 25, 10 和 4 °C 下均预处理 7 d, 随着预处理温度的降低, NJ 冷冻 5 d 时的存活率逐渐下降, 分别为 53.2%, 39.1% 和 11.0%, 差异显著, 而 HBN 的存活率分别为 93.0%, 86.1% 和 94.1%, 差异不显著。

在 25 °C 3 d、25 °C 3 d 10 °C 3 d 和 25 °C 3 d 10 °C 3 d 4 °C 3 d 的预处理方式下, NJ 冷冻 5 d 时的存活率逐渐增加, 分别为 2.2%, 58.5% 和 83.0%, 而 HBN 经 25 °C 3 d 10 °C 3 d 和 25 °C 3 d 10 °C 3 d 4 °C 3 d 预处理的存活率分别为 95.2% 和

94.1%,显著高于 25 ℃ 3 d 处理(35.4%)。

25 ℃ 0 d 即直接冷冻的 2 个品系线虫—4 ℃ 冷冻 5 d 时的存活率最低, HBN 为 17.7%, NJ 为 1.6%。对于 HBN 而言,除 25 ℃ 0 d 和 25 ℃ 3 d 的预处理外,经其他 5 种方式预处理后—4 ℃ 冷冻 5 d 时的存活率差异均不显著(86.1%~95.2%);而 NJ 线虫只有 25 ℃ 3 d 10 ℃ 3 d 4 ℃ 3 d 预处理(83.0%)显著高于其他所有预处理方式。

综上所述,预处理方式对 2 个品系线虫的冷冻存活率有很大影响,并且所有预处理方式均可提高 HBN 线虫于—4 ℃ 冷冻 5 d 后的存活率,预处理时间对 HBN 线虫冷冻存活的影响比预处理温度更明显,只要预处理时间达到足够长(6~7 d),其存活率较直接冷冻法(25 ℃ 0 d)显著提高;而 NJ 对预处理温度和预处理时间均很敏感。根据 2 个品系线虫在—4 ℃ 冷冻 5 d 时的存活率, HBN 选择 25 ℃ 7 d、10 ℃ 7 d、4 ℃ 7 d、25 ℃ 3 d 10 ℃ 3 d 和 25 ℃ 3 d 10 ℃ 3 d 4 ℃ 3 d 的预处理方式均有助于增强其冷冻存活能力,而对于 NJ 线虫选用 25 ℃ 3 d 10 ℃ 3 d 4 ℃ 3 d 的预处理方式最适于提高—4 ℃ 的冷冻存活能力。可以推测生活在不同纬度的同种线虫(HBN 和 NJ)对不同预处理温度适应能力表现出明显不同。

3 讨 论

3.1 低温胁迫对不同线虫品种(系)存活的影响

昆虫病原线虫对低温的抵御能力,在不同种属间,同一种的不同地理种群间,甚至同一个体的不同发育阶段都存在差异。不同种属的昆虫病原线虫对低温胁迫表现出不同的耐受能力,这首先取决于其遗传特性^[16]。Brown 和 Gaugler^[7]对异小杆科(Heterorhabditidae)和斯氏科(Steinernematidae)线虫的冷冻耐受力研究发现,经过相同条件的冷冻处理后,嗜菌异小杆线虫(*H. bacteriophora*)、*S. anomali* 和芜菁夜蛾斯氏线虫(*S. feltiae*)的存活率分别为 55.3%、73.6% 和 92.8%,差异明显。本研究中经不同预处理后—4 ℃ 冷冻 HBN 和 NJ 2 个品系线虫 5 d 时的存活率差异明显,说明同种不同品系的昆虫病原线虫对冷冻的耐受能力明显不同。这可能与其自然生长的环境有关^[17]。Smith 等^[18]比较了自由生活线虫南极大卫全凹线虫(*Panagrolaimus davidi*)、全齿复活线虫(*Panagrellus redivivus*)、植物寄生线虫鳞球茎线虫(*Ditylenchus dipsaci*)和昆虫病原线虫苹小卷夜蛾斯氏线虫

(*S. carpocapsae*)于—15 ℃ 的冷冻存活率,发现生活在南极的自由生活线虫 *P. davidi* 的存活率最高。金永玲等^[19]认为,线虫的地理起源对线虫的生存温度需求是非常重要的。本研究中,从黑龙江省哈尔滨市分离的线虫 *H. bacteriophora*-HBN(HBN)经不同预处理后于—4 ℃ 冷冻 5 d 的存活率均高于从美国引进的 *H. bacteriophora*-NJ(NJ)线虫,主要可能是由于 2 个品系线虫的自然栖息地不同,使得其生态适应性不同,也可能是长期进化的结果,导致 HBN 对低温胁迫的耐受能力强于 NJ。

3.2 低温驯化对线虫冷冻存活的影响

Burman 等^[20]认为,通过长期的某种环境驯化可能会使线虫适应不同的温度范围。研究发现经过低温驯化后,线虫的耐寒能力得到增强,但耐寒能力的增强程度受到不同低温驯化方式的影响^[2]。从本研究 2 个品系线虫冷冻前的预处理结果可以看出, HBN 和 NJ 的冷冻存活率对不同预处理时间和温度的反映不同,但适当的低温驯化利于这 2 个品系线虫的冷冻存活。原因可能是未冷冻前的预处理过程使线虫体内积累了相关抗冻物质,如海藻糖和抗冻蛋白等^[21],以应对即将到来的低温。

线虫在低温驯化过程中,利用其特定的发育阶段来抵御不良的环境胁迫。Wharton 等^[21-22]指出, *H. zealandica* 的壳能预防无害的结冰,能允许最大限度的温度达—32 ℃,该线虫有过冷却现象,即在冰点以下保持体液流动的能力。昆虫病原线虫的感染期线虫是 3 龄幼虫包在 2 龄幼虫脱下的体鞘内,其体鞘起着重要的保护作用。关于线虫 HBN 和 NJ 对低温驯化过程中的生理生化反应及分子水平研究,还有待于下一步的深入挖掘。

志谢:感谢美国 Rutgers 大学王义老师在试验过程中的帮助!

【参考文献】

- [1] Gaugler R. Entomopathogenic nematology [M]. Wallingford: CABI Publishing, 2002.
- [2] Grewal P S. Enhanced ambient storage stability of an entomopathogenic nematode through anhydrobiosis [J]. Pest Management Science, 2000, 56(5): 401-406.
- [3] Ash C P J, Atkinson H J. Nematodirus battus: Development of cold hardiness in dormant eggs [J]. Experiment Parasitology, 1986, 62: 24-28.
- [4] Forge D J, Macguidwin A E. Cold hardening of *Meloidogyne hapla* second stage juveniles [J]. Journal of Nematology, 1990, 22: 101-105.

[5] Smith H J. Preconditioning of *Trichinella spiralis* nativa juveniles in musculature to low temperatures [J]. Veterinary Parasitology,1984,17:85-90.

[6] Smith H J. Factors affecting preconditioning of *Trichinella spiralis* nativa juveniles in musculature to low temperatures [J]. Canadian Journal of Veterinary Research,1987,51:169-173.

[7] Brown I M,Gaugler R. Cold tolerance of Steinernematid and Heterorhabditid nematodes [J]. Journal of Thermal Biology, 1996,21(2):115-121.

[8] 杨秀芬,杨怀文,简恒,等. 低温诱导培养对夜蛾斯氏线虫 A54 品系适低温特性的影响 [J]. 植物保护,1999,25(3):8-10.

Yang X F,Yang H W,Jian H,et al. Influence of the induced culture of *Steinernema feltiae* A54 strain in cold condition on its low temperature adaptability [J]. Plant Protection,1999,25(3):8-10. (in Chinese)

[9] 李春杰,谭国忠,王义,等. 黑龙江省昆虫病原线虫资源和越冬情况调查初报 [J]. 植物保护,2011,37(2):120-123.

Li C J,Tan G Z,Wang Y,et al. Occurrence of entomopathogenic nematodes resources and overwintering conditions in Heilongjiang Province [J]. Plant Protection,2011,37(2):120-123. (in Chinese)

[10] 谭国忠. 北方寒区昆虫病原线虫越冬条件研究 [D]. 哈尔滨:东北农业大学,2008.

Tan G Z. Study on entomopathogenic nematode overwinter in cold zone of northern [D]. Harbin:Northeast Agricultural University,2008. (in Chinese)

[11] 王丽芳. 寒区昆虫病原线虫耐寒性和生存策略 [D]. 哈尔滨:中国科学院东北地理与农业生态研究所,2010.

Wang L F. Cold tolerance and survival strategy of entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*-ZT in Heilongjiang Province [D]. Harbin: Northeast Institute of Geography and Agroecology of Chinese Academy of Sciences, 2010. (in Chinese)

[12] 李春杰. 寒区昆虫病原线虫低温储存条件及耐寒机制研究 [D]. 哈尔滨:东北农业大学,2011.

Li C J. Cryogenic storage conditions and cold tolerance mechanism of the entomopathogenic nematode in cold regions [D]. Harbin:Northeast Agricultural University,2011. (in Chinese)

[13] 李春杰,许艳丽. 一种用于寒区嗜菌异小杆昆虫病原线虫冷冻储存方法:中国,ZL 200910071751. 1 [P]. 2009-04-09.

Li C J,Xu Y L. The method of refrigerated storage of *Heterorhabditis bacteriophora* from the cold region, Heilongjiang Province, China, ZL200910071751. 1 [P]. 2009-04-09. (in Chinese)

[14] White G F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures [J]. Science,1927,66:302-303.

[15] Jagdale G B,Grewal P S. Acclimation of entomopathogenic nematodes to novel temperatures:Trehalose accumulation and the acquisition of thermotolerance [J]. International Journal for Parasitology,2003,33:145-152.

[16] 曹翠玲,刘倩,简恒,等. 昆虫病原线虫对非生物胁迫的响应机制 [J]. 昆虫学报,2009,52(3):312-318.

Cao C L,Liu Q,Jian H,et al. Response mechanisms of entomopathogenic nematode to abiotic stress [J]. Acta Entomologica Sinica,2009,52(3):312-318. (in Chinese)

[17] Strauch O,Niemann I,Neumann A,et al. Storage and formulation of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis indica* and *H. bacteriophora* [J]. Biocontrol,2000,45(4):483-500.

[18] Smith T,Wharton D A,Marshall C J. Cold tolerance of an Antarctic nematode that survives intracellular freezing:Comparisons with other nematode species [J]. Journal of Comparative Physiolog Biochemical,2008,178:93-100.

[19] 金永玲,韩日晔,丛斌. 昆虫病原线虫应用研究概况 [J]. 昆虫天敌,2003,25(4):176-183.

Jin Y L,Han R C,Cong B. General situation of the application research on entomopathogenic nematodes [J]. Natural Enemies of Insects,2003,25(4):176-183. (in Chinese)

[20] Burman M,Pye A E. *Neoplectana carpocapsae*;Respiration of infective juveniles [J]. Nematology,1980,26:214-218.

[21] Wharton D A,Block W. Freezing tolerance in some Antarctic nematodes [J]. Functional Ecology,1993,7:578-584.

[22] Wharton D A,Surrey M R. Cold tolerance mechanisms of the infective larvae of the insect parasitic nematode,*Heterorhabditis zealandica* Poinar [J]. Cryo-Letters,1994,15(6):353-360.