

# 一种昆虫病原斯氏线虫杂交的新方法\*

沈长朋  
(莱阳农学院)

王国汉  
(华南农业大学)

**摘要** 将大蜡螟幼虫或蛹剪成 2—3 段,挑入配对种的感染期幼虫各一条, 24—26°C 保湿条件下,一周左右可获杂交结果。较常规的注射法和昆虫血液悬滴法操作方便,培养条件也要求不严,试用效果良好。做过的 1594 对线虫的交配试验,成功率在 95% 以上。

我国的昆虫病原斯氏线虫属 *Steinernema* (*Neoplectana*) 资源,自王国汉 1985 年 3 月首次在广东省海陵岛采到后<sup>[1]</sup>,不断被发现,因此,这些材料的分类鉴定也日益受到重视。由于只据形态特征及测量值等项来确定这些线虫在属内的分类地位尚有困难,因此,杂交就显得十分重要。另外,当保种的感染期线虫太少时,用类似杂交的方法进行种内自交,繁殖培养新的种群,比现在通用的感染大蜡螟 *Galleria mellonella* (Linnaeus) 幼虫的方法更妥当。

该属线虫的杂交方法 Poinar (1979) 曾介绍过用昆虫血液悬滴 (hanging drops of insect blood) 的方法<sup>[2]</sup>, Akhurst 和 Bedding (1978) 介绍了将感染期幼虫注射到大蜡螟幼虫体内的方法<sup>[3]</sup>, 已为目前通用的方法。我们在 1985—1988 年对采自我国的斯氏线虫进行研究时,除参照上述两种方法进行之外,又设计了新的大蜡螟体段培养法,获得较理想的效果。现将新方法简称为体段法,简介如下。

## 材料和方法

斯氏线虫 *Steinernema* sp. 8506、85011、8608、8701、8708 均采自我国, *Steinernema glaseri* KG 品系、NC—513 品系、*S. bibionis* T319 品系、*S. feltiae* DD—136 品系和 *S. affinis* 均由广东省昆虫研究所自澳大利亚引入后转赠。大蜡螟幼虫为人工饲养得到。

线虫自大蜡螟幼虫尸体上迁出 7—10 天后,用 0.2% 柳硫汞或 1:1000 的新结尔灭消毒 0.5—1 小时,也可反复冲洗干净不消毒。用无菌生理盐水冲洗三遍,取存活正常者用于杂交。选健康的大蜡螟老熟幼虫或蛹,用 75%—80% 酒精棉球擦洗其体表。以下均为无菌操作,所有用具均煮沸 30 分钟或高压灭菌。

1. 将大蜡螟幼虫剪成 2—3 段,或将其蛹剪成两段,各段分别放入直径和高均为 1—1.5cm 的白塑料的瓶盖内。

2. 将配对种线虫各一条挑入同一段大蜡螟组织里,再将挑针放入无菌水中,检查挑针上的线虫是否确已放入。

3. 将置有大蜡螟幼虫体段及线虫的塑料瓶盖放入培养皿内,在瓶盖周围加 0.5cm 深的无菌生理盐水,再扣上与放瓶盖的培养皿直径相等的另一培养皿。

4. 以相同的操作进行两个配对种的自交处理。

每次杂交试验,自交的以 10—20 对、杂交的以 30—50 对为宜。对杂交未产生子代,两个配对种线虫的形态又比较接近的,最好再试验两次。

无菌操作之后,用胶布或胶带把相扣着的

\* 华南农业大学寇雄飞教授给予指导。华南农业大学 84 级硕士研究生许再福同学和植保系 85 级本科生彭春桃同学参加部分试验,谨此致谢。

两个培养皿之间的缝隙从外边贴死,使塑料瓶盖处于一个密封的无菌空间之中。置24—26℃恒温箱内培养,48小时后开始逐个瓶盖在双管镜下检查。若有线虫后代产生时,可见大蜡螟组织里有很多蠕动的小线虫,几天后可迁出瓶盖落入水中。若见不到线虫后代产生时,应继续观察五天以上。对杂交后代还应进行重复感染大蜡螟幼虫的试验,以确定其是否能进行正常的发育和繁殖。

## 结果和讨论

在做过的296对自交配对试验中,雌雄配对的有123对,产生子代的有119对,成功率为96.75%,杂交的1471对,被污染的7对,成功率为99.59%。

另外,还对注射法和昆虫血液悬滴法进行过数百对试验,认为三类方法均可行,但又各具特色。

注射法的优点是,配对线虫的生存环境近乎自然侵入,产生出的子代可继续发育并具有产生第二代感染期幼虫的条件,从而减少一次验证杂交后代是否能正常发育和繁殖的试验,培养观察期间不易污染,也不必保湿。该方法的不足是,同样的试验,需用的大蜡螟材料较其它两种方法为多,操作和解剖检查时稍微麻烦些。容易出现的问题是,两条配对线虫不能同时注入,一是随涌出的血淋巴流出,二是仍然留

在注射器的针管中,可在冲洗针管时被检出。我们的经验是,将针管沿幼虫体壁多插进一些,使针头到达胸部时再注射,注射时不要缓缓推出,要稍猛一些。

悬滴法可在双管镜下随时观察到线虫的发育进度、性别、交配及繁殖情况,准确地进行异性配对,使用的大蜡螟材料较省。但操作时易污染,较麻烦,培养观察时对湿度要求较严格。

体段法操作方便,用材较省,也具备产生第二代感染期幼虫的条件,由于体段较血液悬滴耐干燥,故培养条件也容易满足,但不能象悬滴法那样直接观察到各时期线虫的发育进度和异性配对。

不论采用那种方法,进行线虫杂交试验时均应注意三点原则:第一,必须确保每个配对种线虫只被取用到一条存活正常的感染期幼虫;第二,必须确保配对的两条线虫都放入同一培养物内;第三,必须确保培养物在一周之内不干燥,不被污染。

## 参 考 文 献

- [1] 沈长朋等 1985 山东省一种昆虫病原斯氏线虫的初步研究 莱阳农学院学报(2): 40—42.
- [2] Akhurst, R.J. *et al.* 1978 A simple cross-breeding technique to facilitate species determination in the genus *Neosaplectana*. *Nematologica*. 24, 328—330.
- [3] Poinar, G. O., Jr. 1979 *Nematodes for biological control of insects*. C.R.C. Press. Boca: Raton, Florida. 146—147.