

拟双角斯氏线虫生物学特性的研究*

简 恒 杨秀芬 赵兴元 杨怀文

(中国农亚科学院生物防治研究所 北京 100081)

摘 要 本文对拟双角斯氏线虫 D-4-3 品系的生物学特性进行了研究。结果表明:该线虫在 10℃ 下不能侵染大蜡螟幼虫;25℃ 下在大蜡螟幼虫体内完成一个侵染周期需 232~240 小时;每克大蜡螟幼虫组织可繁殖 $8.183 \cdot 10^5$ 条侵染期幼虫;该线虫有较强的垂直扩散能力,3 天内 49.3% 的线虫可扩散到 5cm 处远,15~20cm 处有 6.0% 的线虫分布;该线虫比 *S. carpocapsae* A24 品系线虫更耐高温,经 37℃ 水浴处理 10 小时后,其死亡率仅为 24.7%,而 A24 线虫高达 89.4%;在沙壤土中的存活能力与 *S. carpocapsae* BJ 品系和 *S. bicornutum* 线虫没有显著差异;室内感染 48 小时后,对槐尺蠖、菜青虫和小麦红吸浆虫的致死率分别为 89.4%、81.4% 和 26.2%。

关键词 拟双角斯氏线虫 大蜡螟幼虫 生物学特性

昆虫病原线虫(Entomopathogenic nematodes)是一类专门寄生昆虫的天敌。其中斯氏线虫属(*Steinernema*)和异小杆线虫属(*Heterorhabditis*)是控制害虫因子中最具有潜力的类群。为拓宽防治害虫的范围和更有效的防治害虫,因此需要不断挖掘线虫资源,系统研究其生物学、生理生化等特性,为昆虫病原线虫的田间应用提供科学依据。本文以从我国辽宁省采集分离出的一种斯氏线虫——拟双角斯氏线虫(*Steinernema ceratophorum* Jian, et al., 1997)^[1]为供试材料,研究了该线虫的个体发育、在昆虫体内的繁殖能力;侵染期幼虫的耐高温能力、垂直运动能力、在土壤中的存活时间以及对等一些害虫的侵染力等生物学特性,期望为进一步利用该线虫来防治害虫提供理论依据。

1 材料方法

1.1 试验材料

供试昆虫:大蜡螟 *Galleria mellonella* 老龄幼虫,由生防所室内人工饲养;槐尺蠖(*Semiothisa (Macaria) cinerearia*)二龄幼虫,采自北京的国槐树;菜青虫(*Pieris rapae*)老龄幼虫,由河北农业大学植保系提供;小麦红吸浆虫(*Sitodiplosis mosellana*)幼虫,由河北农业大学植保系提供。

供试线虫:拟双角斯氏线虫(*Steinernema ceratophorum*)D-4-3 品系,采自中国辽宁省(简称 D-4-3 品系);*S. carpocapsae* Beijing 品系,采自北京地区(简称 BJ 品系);*S. carpocapsae* A24 品系,采自前苏联,从澳大利亚引进(简称 A24 品系);*S. bicornutum* 采自原南斯拉夫,从英国国际寄生虫研究所引进。

消毒细沙和沙壤土:沙壤土采自北京西郊苹果园,过筛并除去杂质。细沙和土壤在 120℃,干热灭菌 3 小时冷却后备用。

1.2 D-4-3 品系线虫的生物学特性研究

1.2.1 D-4-3 品系线虫的个体发育的测定

个体发育观察:采用 Dutky^[2](1964)的滤纸侵染法按 20 条/虫的线虫剂量在 25℃ 下感染大蜡螟幼虫,12 小时后取出试虫并用清水冲洗虫体表面后,仍将其置于 25℃ 下让侵入昆虫体内的线虫发育。每隔 8 小时,解剖 3 头大蜡螟幼虫,在 Olympus 显微镜下观察并记录昆虫体内线虫的发育状况。

1.2.2 三种线虫的繁殖力比较

* 本研究得到农业部农作物病虫害生物防治资源研究与利用重点实验室资助,项目编号 LBCR-97-011;

第一作者介绍:简 恒,男,36,副研究员,硕士;

收稿日期:1997-12-05,修回日期:1998-03-17

本实验比较了 D-4-3 品系与 BJ 品系和 *S. bicornutum* 三种线虫在大蜡螟幼虫体内的繁殖力。三种线虫均以 20 条/虫的剂量, 采用 Dutky 的滤纸法感染大蜡螟幼虫, 在 25℃ 下感染 24 小时后取出昆虫, 用电子天平逐一称量大蜡螟幼虫的重量, 待昆虫死亡后, 单头移入线虫收集盘中收集线虫。每种线虫感染 10 头大蜡螟幼虫。1~3 周后待线虫收获完毕, 用稀释法计数单头昆虫所繁线虫的产量, 比较三种线虫的产量差异。线虫的产量用条/克昆虫组织表示。

1.2.3 D-4-3 品系线虫的垂直扩散能力

采用杨怀文等^[3](1990)沙柱法, 测定侵染期线虫在 20cm 深沙柱中的垂直运动能力。将四个直径为 8.2cm、高为 5cm 的塑料筒, 构成 0~5、5~10、10~15 和 15~20cm 四个层次的圆柱, 柱内装满含水量为 7% 的消毒细砂, 每层之间垫一张塑料网。从沙柱表面(0cm 处)滴入 1ml 含侵染期线虫 1000 条的水悬液, 并用培养皿盖上, 以防水分蒸发。将沙柱放入 25℃ 恒温室中, 3 天后, 取出沙柱, 分别将各层沙柱中的沙倒入烧杯中, 加入 1000ml 清水, 充分搅动, 使线虫从沙中浮出, 收集上清液, 计数其中的线虫数, 按加入线虫的总数计算线虫运动到各层中的百分率, 由此确定线虫在沙层中的分布规律, 实验设 5 个重复。

1.2.4 D-4-3 品系线虫在低温下的侵染力

实验采用 Bedding 的沙埋法^[4]侵染大蜡螟幼虫, 试验设 10℃、15℃ 两温度处理。具体如下: 将一头大蜡螟幼虫放入高为 6cm、直径为 4.5cm 的塑料盒底部, 覆以 80g 含水量为 7% 的消毒细砂, 每处理各 25 盒, 分别放入处理温度预冷 24 小时, 然后每盒滴入 1ml 含 100 条侵染期线虫的水悬液。在设定温度侵染 3 天后取出大蜡螟幼虫, 用清水洗去附在虫体表面的沙及线虫, 再放入垫有滤纸的培养皿中, 置于 25℃ 的恒温室, 每隔 24 小时检查大蜡螟的死亡率, 5 天后解剖死虫, 计数进入虫体内的线虫数, 按 Yang and Jian(1993)^[5]描述的方法计算线虫的侵入率, 用大蜡螟幼虫死亡率和线虫侵

入率确定线虫在低温下的侵染力。

线虫侵入率 = 侵入大蜡螟体内线虫数 ÷ 试验所加线虫数 × 100%

1.2.5 D-4-3 品系线虫与 BJ 和 *S. bicornutum* 线虫在土壤中存活能力比较

本实验采用 Curran 和 Jian(1993)方法^[6], 比较 D-4-3、BJ 和 *S. bicornutum* 三种线虫在土壤中的存活能力。按每盒 400 条侵染期线虫的剂量将三种线虫分别滴入直径为 4.5cm、高为 6cm、装有 80g 含水量为 16.8% 的沙壤土的小塑料盒中, 每种线虫各处理 45 盒, 放于 25℃ 的恒温室中。从线虫滴入当天开始, 以后从第 2 天起每隔 5 天检查一次, 用大蜡螟幼虫回收土样中的线虫。检查方法是: 将同一土样连续用大蜡螟幼虫诱集两次, 即将昆虫与土样接触 24 小时后, 检出处理虫, 在同一土样中再放入健康新虫, 再进行 72 小时的诱集, 每次诱集每盒均放入三头大蜡螟幼虫。解剖计数同一土样中经两次诱集后所得线虫数, 按线虫回收的数量比较不同线虫在不同取样时间的存活差异, 每次回收过程每种线虫均取样 5 盒。

1.2.6 D-4-3 品系线虫与 A24 线虫耐高温能力的比较

本实验按 Glazer^[7](1993)方法进行, 试验开始前取样检查各线虫的存活率, 然后分别将两种线虫按 20ml 含 6250 条侵染期线虫的水悬液, 装入容量 100ml 的三角瓶中, 用封口膜封瓶口以防水分蒸发。然后把三角瓶置于水温为 37℃、转速为 40 转/分的水浴摇床内振荡。每种线虫各设 3 个重复。分别于 4、6、8、10 小时从三角瓶内各取出 5ml 线虫液放入培养皿中, 加入无菌水至 10ml, 置于 25℃ 恒温室内, 24 小时后检查线虫的死亡率, 按线虫校正死亡率高比较线虫的耐高温能力。

1.2.7 D-4-3 品系线虫对几种害虫的侵染力

实验采用滤纸法感染供试昆虫, 测定 D-4-3 线虫对槐尺蠖、菜青虫和小麦红吸浆虫三种幼虫的侵染能力。具体如下: 在垫有滤纸的培养皿(直径为 9cm)中, 滴入所需剂量的线虫水悬液, 线虫剂量分别如下: 槐尺蠖为 40 条/虫;

菜青虫为 80 条/虫;小麦红吸浆虫为 100 条/虫,每皿投入供试昆虫 10 头,每处理重复 6 皿,设清水处理为对照,在 25℃ 下进行感染,48 小时后检查供试昆虫的死亡率。

所有实验数据均采用 Statgrafic 软件分析其差异显著性。

2 结果与分析

2.1 D-4-3 品系线虫的个体发育

从表 1 可以看出 25℃ 下 D-4-3 在大蜡螟幼虫体内完成一个侵染循环需 216~240 小时,约为 9~10 天。完成一个侵染循环时, D-4-3 已经在蜡螟体内繁殖了二代;值得注意的是:当线虫发育至子一代三龄幼虫至子一代四龄幼虫时,会有部分侵染期线虫爬出寄主体外。

表 1 25℃ 下 D-4-3 线虫在不同时间的发育状态

Table 1 The development stages of *S. ceratophorum* in *Galleria larva* at 25℃

发育历期(h) Development periods	发育状况 Development stages
20	侵染期线虫脱鞘,虫体开始变大、变粗
28	部分发育至四龄初期幼虫
36	发育至四龄幼虫
44	大部分进入四龄后期,成虫初期,雌、雄虫体长差别不大
52	发育至成虫,并达性成熟。雌虫个体远比雄虫大,长。
60	雌成虫体内可见少量卵粒形成
68	雌成虫体内卵粒明显可见,已充满其子宫
76	部分卵从雌成虫体内产出
84	少量子一代一龄幼虫出现
100	发育至子一代二龄幼虫
128	发育至子一代三龄幼虫
136	有少量发育至四龄幼虫,并有少量三龄幼虫爬出寄主体外
144	少量四龄幼虫发育至子一代成虫初期
160	发育至子一代成虫。雌虫个体明显小于母代雌虫
168	子一代雌成虫体内可见卵粒形成
192	子二代一龄幼虫出现
200	少量子二代二龄幼虫出现
216	发育至子二代三龄幼虫
232~240	大量子二代三龄幼虫爬出寄主体外

2.2 D-4-3 品系、BJ 品系和 *S. bicornutum* 线虫的繁殖力

由图 1 看出, D-4-3、BJ 和 *S. bicornutum*

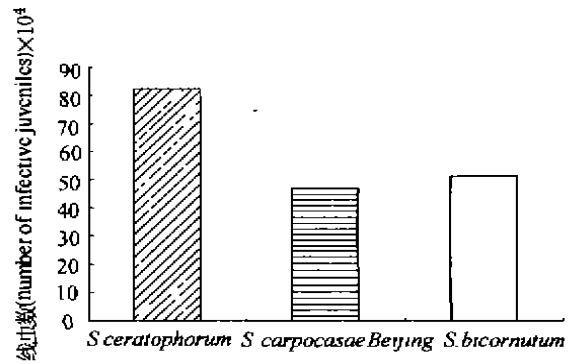


图 1 不同线虫种在大蜡螟幼虫中的繁殖量比较(条/克)

Fig.1 The yields of infective juvenile of three nematode species in *Galleria larvae*(Infective juveniles/Gram of insect tissue)

三种斯氏线虫在大蜡螟幼虫体内繁殖时,每克昆虫组织所繁线虫的产量分别为 8.183×10^5 、 4.650×10^5 和 5.093×10^5 条;D-4-3 线虫的产量分别是 BJ 线虫的 1.76 倍、*S. bicornutum* 线虫的 1.61 倍;方差分析表明三者产量差异显著 ($F = 11.5, df = 2, 15, P = 0.0009$),说明用同量的大蜡螟幼虫组织,可繁殖出比 BJ、*S. bicornutum* 线虫更高的产量,表明 D-4-3 线虫有较强的繁殖能力。

2.4 D-4-3 品系线虫的垂直扩散能力

由图 2 可以看出,经 3 天运动后,该线虫各

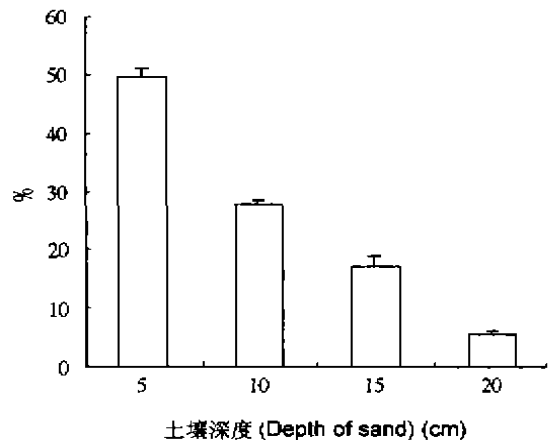


图 2 *S. ceratophorum* 线虫在不同沙层中的分布
Fig.2 The vertical distribution of *S. ceratophorum* in sand column

层次中的分布较为分散,其中表层(0~5cm)的线虫占总量的 49.6%; 5~10cm 沙层占 27.6%、10~15cm 沙层中占 17.2%; 15~20cm 沙层仍有 5.6% 线虫分布,表明 D-4-3 线虫有较强的垂直运动能力,这一特性与 *S. longicaudum* CB-2Y 品系线虫有相似之处(杨怀文等,1990)。

2.5 D-4-3 品系线虫在低温下的侵染力

从表 2 可知,D-4-3 线虫在 10℃ 下不能侵染大蜡螟幼虫,但在 15℃ 下,5 天后大蜡螟幼虫的累计死亡率可达 97%,线虫侵入率为 8.43%。

表 2 10℃ 和 15℃ 下 D-4-3 品系线虫对大蜡螟的侵染能力

Table 2 The performance of *S. ceratophorum* to *Galleria* larvae at 10 and 15℃

温度(℃) Temperatures	侵染时间(d) Exposure time	大蜡螟累计死亡率(%) Accumulative mortality		线虫侵入率(%) Penetrative rate of nematode
		第 4 天 4th d	第 5 天 5th d	
10	3	0	0	0
15	3	76.5	97.0	8.43

2.6 D-4-3 线虫与 A24 线虫耐高温能力比较

从表 3 结果可知,经 37℃ 水浴处理 10 小时后其校正死亡率仅为 24.7%,而 A24 线虫的校正死亡率高达 89.4%,说明 D-4-3 线虫对高温具有较强的忍耐性。

表 3 D-4-3 与 A24 两线虫对高温的忍耐性比较

Table 3 Comparison of tolerance to high temperatures between *S. ceratophorum* and *S. carpocapsae* A24

线虫 Nematode species	线虫累计校正死亡率(%) Accumulative mortality of nematode			
	4h	6h	8h	10h
D-4-3	6.52	8.54	16.18	24.71
A24	30.73	50	69.58	89.39

2.7 D-4-3 品系、BJ 品系和 *S. bicornutum* 线虫在土壤中的存活能力比较

由图 3 可以看出,D-4-3、BJ、*S. bicornutum* 三种线虫在土壤中的存活随时间延长而下降的趋势基本一致,在第 15 天时回收的线虫数已很少,三种线虫仅回收到 1% 左右,表明该线虫与 BJ 品系和 *S. bicornutum* 线虫在土壤中的存活

能力无显著差异。

2.8 D-4-3 线虫对几种害虫的侵染能力

从表 4 结果可知,D-4-3 线虫对槐尺蠖、菜青虫幼虫有较高的毒力,侵染 48 小时后槐尺蠖幼虫的校正死亡率为 89.4%、菜青虫幼虫为 81.4%。而对小麦红吸浆虫幼虫的致死能力较差,仅 26.2%。表明 D-4-3 线虫对鳞翅目昆虫有较高的毒力,而对双翅目昆虫的毒力较低。

表 4 D-4-3 线虫对几种害虫的致死能力

Table 4 Infectivity of *S. ceratophorum* to insect pests

供试虫 Insect species	线虫剂量 (条/头) Nematode doses (I ₃ /insect)	供试虫数 (头) Number of insect larvae	校正死亡率 (%) Corrected mortality
槐尺蠖 <i>Semiothisa (Macarua) cinerearia</i>	40	60	89.4
菜青虫 <i>Pieris rapae</i> L.	80	60	81.4
小麦红吸浆虫 <i>Sitodiplosis mosellana</i>	100	60	26.2

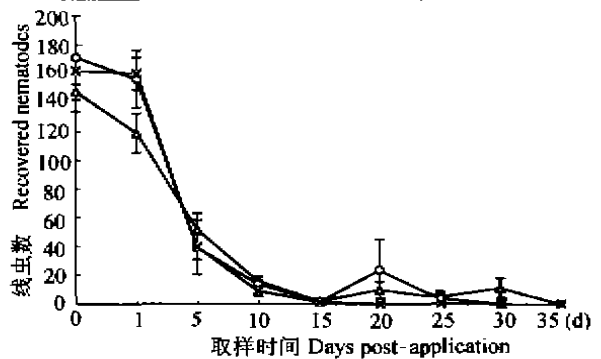


图 3 三种线虫在土壤中存在动态的比较
Fig.3 Comparison of persistence of three nematode species in soil

—△— *S. ceratophorum* —○— Beijing 品系
—×— *S. bicornutum*

3 讨论

在 D-4-3 线虫的个体发育中,在 4.5 天左右即有部分三龄幼虫爬出寄主体外,这种现象在其它线虫上未见报道,比杨怀文等^[3]报道的 *S. longicaudum* CB-2y 品系线虫个体发育要短得多。分析其原因可能是 D-4-3 线虫的侵染周

