doi: 10. 11689/j. issn. 2095 - 2961. 2013. 02. 002

2013年6月

文章编号: 2095-2961 (2013) 02-0071-06

# 土壤中昆虫病原线虫种群密度检测新方法

战丽莉<sup>12</sup>,王 义<sup>3</sup>,许艳丽<sup>1</sup>,裴希超<sup>4</sup>,刘振宇<sup>5</sup>

(1. 中国科学院 东北地理与农业生态研究所 中国科学院 黑土区农业生态院重点实验室,海伦农田生态系统国家野 外观测研究站,黑龙江 哈尔滨 150081; 2. 黑河学院物理化学系,黑龙江 黑河 164300; 3. Rutgers University, New Brunswick NJ 08901 - 8520, USA; 4. 黑河出入境检验检疫局, 黑龙江 黑河 164300;

5. 黑龙江省农业科学院 植物脱毒苗木研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘 要:采用室内模拟试验,对昆虫病原线虫检测器收集到昆虫病原线虫线虫数量和土壤中昆虫病原线虫密度相关性进行 研究,确定昆虫病原线虫检测器收集时间、检测器放置间距进行了试验研究。结果表明,收集时间和检测器放置间距对检 测器收集到线虫数量有显著影响,48 h 为最佳收集时间,检测器之间放置8 cm 为最佳间距。检测器中收集到昆虫病原线虫 的数和昆虫病原土壤中线虫密度显著相关,相关系数  $R^2$ 达到 0.9364。该技术为昆虫病原线虫定性及定量检测提供了一种 新方法。图4,参12。

关键词: 昆虫病原线虫; 种群密度; 检测; 新方法 中图分类号: S476 + .9 文献标识码: A

### New Method for Population Density Detection of EPN in Soil

ZHAN Li-li<sup>1,2</sup> ,WANG Yi<sup>3</sup> ,XU Yan-li<sup>1</sup> ,PEI Xi-chao<sup>4</sup> ,LIU Zhen-yu<sup>5</sup>

(1. Key Laboratory of Mollisols Agroecology National Observation Station of Hailun Agroecology System, Northeast Institute of Geography and Agroecology CAS Harbin 150081 China; 2. Physical Chemistry Department of Heihe University Heihe 164300 China; 3. Rutgers University New Brunswick NJ 08901 - 8520 USA; 4. Heihe Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau Heihe 164300 China; 5. Virus-free Seeding Research Instituet of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences Harbin 150086 China)

Abstract: laboratory simulation test was used for this research, the relation between population density of EPN in soil and the individual number in detection tube was studied. Collection time and the distance between detection tubes were studied by one way test. The results showed that collection time and the distance between detection tubes affected the individual number in detection tube significantly, 48 hours was the best Collection time and 8 cm was the best distance between detection tubes for the EPN collection. The result showed that the individual number in detection tube was related to the population density of EPN in soil the highest R<sup>2</sup> was 0. 9364. This research provide a new method for qualitative and quantitative of EPN detection.

Key words: EPN; population density; detection; new method

#### 0 引 言

昆虫病原线虫( $Entomapathgenic\ Nematoda$ )是一类专性寄生土壤害虫的微小动物,属动物界、线虫 门 (Nematoda)、侧尾腺口纲 (Secernentea)、圆线虫目 (Rhabditida),斯氏线虫科 (Steinernematidae) 和 异小杆线虫科 (Heterhabditidae)。昆虫病原线虫由于具备对害虫致死范围广、致死速度快、对人畜以及其 它有益生物包括害虫天敌等无不良影响、对环境无污染以及易于规模化生产等优点,成为害虫生物防治的 重要因子,被国内外广泛应用。昆虫病原线虫主要生活在土壤中,具有主动搜寻昆虫寄主的能力[1]。昆 虫病原线虫可有效地控制钻蛀性害虫,对花生田地下害虫蛴螬防效可达到95%以上,效果明显好于辛硫

收稿日期: 2013-05-13; 修回日期: 2013-06-09.

基金项目: 宁夏农业综合开发项目(NTKJ2012-05-01).

第一作者简介: 战丽莉(1983-),女,黑龙江佳木斯人,在读博士,研究方向为土壤动物多样性研究.

通讯作者: 许艳丽 (1958-),女,辽宁本溪人,研究员,研究方向为植物线虫病害、作物病虫害生物生态控制.

磷的防治效果<sup>[2]</sup>,试验对大豆田地下害虫东北大黑鳃金龟(Holotrichia oblita)的幼虫进行防治,发现致死率同样达到95%以上<sup>[3]</sup>。但紫外光、部分病原微生物和捕食性天敌对昆虫病原线虫有抑制作用<sup>[4-6]</sup>,因此施用后昆虫病原线虫在土壤中的种群数量会随时间推移发生变化,进而影响昆虫病原线虫对害虫的防治效果。生产中线虫施用后在田间的密度、施用线虫地块存活数量等,对于评价线虫应用效果和线虫在土壤中定殖很重要,因此,对施入昆虫病原线虫的田块进行昆虫病原线虫密度检测是确保昆虫病原线虫防治害虫效果的重要手段,也是确定是否需要再次施入昆虫病原线虫的重要依据,同样也是研究过程中的追踪调查重要手段。而土壤中线虫种类繁多、数量巨大<sup>[7-8]</sup>,昆虫病原线虫仅为土壤线虫的一种类群<sup>[9]</sup>,前人对昆虫病原线虫定性和定量的监测方法有悬浮离心法<sup>[10]</sup>和诱集法<sup>[11]</sup>,悬浮离心法要将土壤样品带回实验室后进行相应的处理后进行一次离心和两次悬浮离心。诱集法同样要将土壤样品带回实验室进行诱集,诱集过程中需人工翻动诱集装置数次已达到最佳的诱集效果。这两种方法需进行田间取样,该过程会破坏农作物,另外在定量监测时采用大蜡螟诱集直至土样中没有线虫为止要花费很多时间,同时还要对被侵染的大蜡螟逐头解剖计数线虫,此过程费时费力。所以,准确、快速地确定检测土壤中昆虫病原线虫的密度是试验研究和线虫应用及技术指导中急需解决的问题,研究报道了土壤中昆虫病原线虫密度定量检测技术,该技术可方便、快捷、准确地检测土壤中昆虫病原线虫密度,并可有效地促进昆虫病原线虫试验研究和应用,为研究结果的实施提供科学依据。

### 1 材料与方法

### 1.1 材料

昆虫病原线虫( $Heterorhabditis\ bacteriophora$ ) 侵染期线虫( $Infective\ Juveniles$ ,IJ) 由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实验室保存,试验用的大蜡螟( $Galleria\ mellonella$ ) 属鳞翅目螟蛾科蜡螟亚科,其幼虫是昆虫病原线虫重要寄主之一,由于大蜡螟幼虫对昆虫病原线虫极为敏感的特点,人们常采用大蜡螟进行昆虫病原线虫分离、诱集、繁殖和对昆虫致病力测定 $^{[12]}$ 。研究用大蜡螟末龄幼虫( $Galleria\ mellonella$ ) 购于天津惠裕德生物科技有限公司,昆虫病原线虫种群密度检测器为自制,并获得授权专利(ZL201010205217.8)。试验用灭菌土取自本所试验田耕层黑土, $160\ ^{\circ}$  下烘干  $2\ h$  灭菌备用。生物显微镜( $Motic\ s633069$ )下昆虫病原线虫计数,试验用长方形塑料盒为  $32\ cm\ \times\ 23\ cm\ \times\ 15\ cm$ 。

### 1.2 方法

利用昆虫病原线虫依赖寄主昆虫繁殖并具有趋化性的特点,采用室内模拟试验方法,优化昆虫病原线虫对寄主昆虫大蜡螟的趋向时间,即昆虫病原线虫种群密度检测器的使用时间的确定,同时优化监测器之间的距离,确定最佳收集距离。利用昆虫病原线虫昆虫种群密度检测器检测土壤中昆虫病原线虫种群密度。

- **1.2.1** 昆虫病原线虫收集时间优化。将 4.5 kg 灭菌土装入长方形塑料盆中,加入 511 ml 无菌水和 102 ml 的线虫悬浮液,使土壤湿度保持在 12%。侵染期线虫(*Infective Juveniles*,IJ) 按 60 万 IJ s m  $^{-2}$ 接种线虫,将昆虫病原线虫种群密度检测器垂直插入塑料盒中。试验设接种线虫后 24 h、48 h、72 h、96 h 和 120 h 5 个时间调查密度检测器内诱集到的线虫数量。收集进入到昆虫病原线虫种群密度检测器中的线虫悬浮液,显微镜下计数,每处理重复 4 次,检测器间距为 8 cm。
- 1.2.2 昆虫病原线虫密度检测器放置间距优化。试验用塑料盒设置同上,检测器放置之间的距离(两相邻管管心连线距离)为  $2~cm~\sqrt{4}~cm~\sqrt{6}~cm~\sqrt{8}~cm~10~cm~$ , 48~h~ 收集,然后分别收集进入到昆虫病原线虫种群密度检测器中的线虫悬浮液,显微镜下计数,每处理重复 4~次。
- **1.2.3** 检测标准曲线的建立。优化收集时间及检测器间距后,在土壤中分别按  $10~ {\rm F~IJ~s}^{ullet}\,{\rm m}^{-2}$ ,

20 万 IJ  $s \cdot m^{-2}$  40 万 IJ  $s \cdot m^{-2}$  , 60 万 IJ  $s \cdot m^{-2}$  , 80 万 IJ  $s \cdot m^{-2}$  , 100 万 IJ  $s \cdot m^{-2}$  七个密度施入昆虫病原线虫的侵染期线虫,48 h 后收集检测器中管中收集到的昆虫病原线虫,并计数,依据管中昆虫病原线虫的数量和施入线虫的密度建立曲线,3 次重复。标准曲线的建立分别在 2010 年 1 月 7 日、3 月 18 日和 4 月 14 日进行试验重复,并依据 3 次试验结果进行最终标准曲线的建立。

**1.2.4** 数据统计分析。采用 Excel 进行数据基本处理,采用 DPS v3. 01 软件完成数据处理。利用 one – way ANOVA 单因素方差分析多重比较(LSD) 方法对不同处理数据进行差异显著性分析,差异显著水平为  $\alpha$  = 0. 05。

## 2 结果与分析

#### 2.1 昆虫病原线虫收集时间优化

利用昆虫病原线虫对寄主大蜡螟的趋向性进行线虫密度检测,检测过程中发现昆虫病原线虫种群密度检测器收集时间的长短显著影响检测器中收集到的昆虫病原线虫的数量。在 24~h 时昆虫病原线虫种群密度检测器就有线虫出现,线虫条数为 27~条,见图 1。在 24~h 到 120~h 区间线虫在密度检测器中的数量出现了两次高峰,即测定时间为 48~h 与 72~h 密度检测器中线虫条数分别为 126~条和 129~条,且 48~h 与 72~h 两测定时间之间检测器收集到昆虫病原线虫数量差异较小,但与其他测定时间之间差异显著(p>0.05),72~h 后密度检测器中线虫数量开始缓慢下降,直至 96~h 之后密度检测器中线虫数量基本处于平稳阶段。分析原因可能是昆虫病原线虫需要一定的活动空间,且在检测器中昆虫病原线虫的数量达到一定程度即昆虫病原线虫在收集管中的密度达到一定的临界值时,因空间、氧气等外界条件的限致使昆虫病原线虫爬出,导致检测器中昆虫病原线虫数量降低。48~h 和 72~h 两个收集时间之间昆虫病原线虫种群密度检测器中昆虫病原线虫数量差异不显著(p>0.05),从节省时间以及试验的准确度上考虑,48~h 为昆虫病原线虫密度检测器的最佳收集时间。

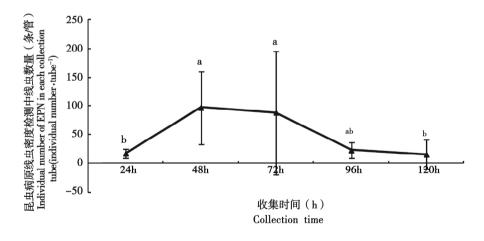


图 1 不同收集时间 EPN 对大蜡螟趋性影响

Fig. 1 Effects of different collection time on the trend from EPN to Galleria mellonella

### 2.2 昆虫病原线虫密度检测器间距优化

预试验中发现,病原线虫种群密度检测器对昆虫病原线虫的检测效率受检测器之间距离影响,因此,研究对昆虫病原线虫种群密度检测器施用间距进行了优化。在检测器间距为 8~cm 时昆虫病原线虫种群密度检测器的收集数目达到最大,达 18~ 条/管,显著高于间距为 2~ cm、4~ cm、6~ cm 和 10~ cm 时昆虫病原线虫种群密度检测器的收集数目,与其他 4~ 个距离差异显著,见图 2~ 当收集管之间的距离过近时昆虫病原线虫在一定范围内土壤中的数量有限,因此昆虫在每个检测器中收集到的数量较低。当检测器之间的距离

过大时,寄主释放的信息物质浓度低于检测器间距小的情况。综合土壤中昆虫病原线虫的数量和寄主昆虫 释放出的信息物质的浓度两种因素,认为昆虫病原线虫种群密度检测器的最佳使用间距为 8 cm。

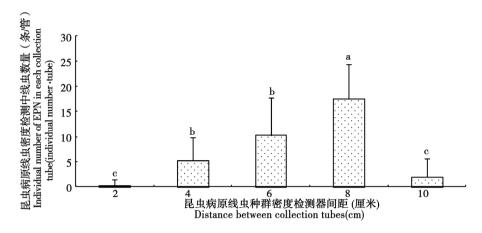


图 2 不同距离 EPN 对大蜡螟趋性

Fig. 2 Effect of distance between collection tubes on the trend from EPN to Galleria mellonella

### 2.3 检测标准曲线的建立

- **2. 3. 2** 最终标准曲线建立。综合 3 次试验结果,建立最终大蜡螟对昆虫病原线虫趋性标准曲线,见图 4 。 昆虫病原线虫检测器中收集到的昆虫病原线虫与土壤中昆虫病原线虫的密度显著相关,相关系数  $R^2$ 达到 0.929~5。

### 4 讨论

在利用昆虫病原线虫控制害虫时,研究者或植物保护工作者将昆虫病原线虫释放到田间进行害虫防治后,需要跟踪监测线虫在土壤中的存活情况以便决定下一次应用的必要性、应用时间及用量。研究方法在进行定性及定量试验时无需将土壤取回且不破坏田间作物,较前人研究的方法更快速简便。昆虫病原线虫的活动能力和侵染能力受到很多外界的影响,在外界环境因素出现变化的时候标准曲线也要重新建立,是否可以建立一个具有普遍适用性的标准曲线以减少实际操作时的步骤,是此方法有待改进之处。目前为止该技术在田间应用时应根据不同条件对标准曲线进行适当校正和调整后再进行田间应用。研究收集时间是在节省时间的前提下选定的,而在实际应用中应根据实验要求的不同对收集时间进行相应的调整,若以收集昆虫病原线虫为目的则应重新确定收集到昆虫病原线虫数量最多的时间,已达到收集量最大的目的。此方法只针对一种昆虫病原线虫进行试验,是否对其他品系的昆虫病原线虫有效还需要进一步实验确定。

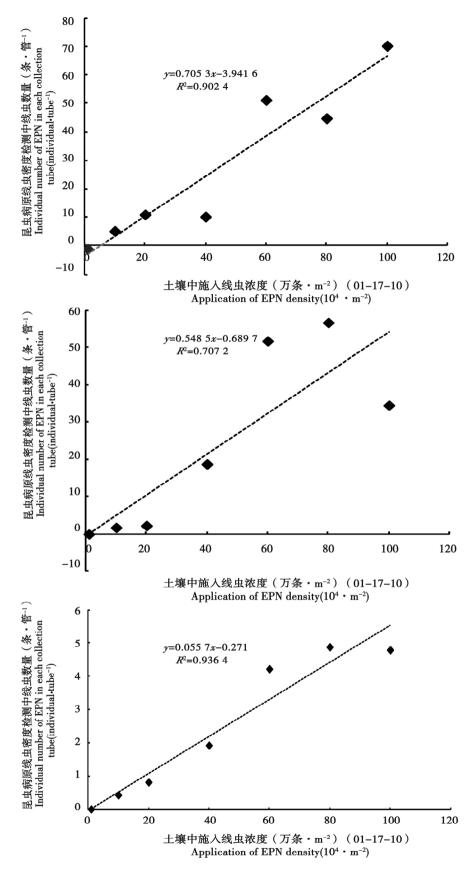


图 3 EPN 对大蜡螟趋性标准曲线

Fig. 3 Standard curve of the trend from EPN to Galleria mellonella

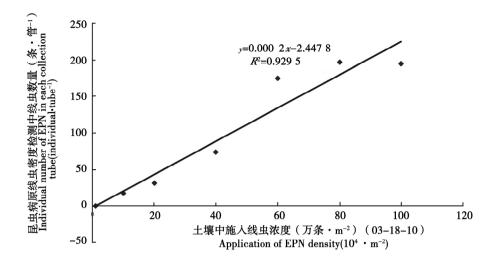


图 4 EPN 对大蜡螟趋性标准曲线(最终)

Fig. 4 Standard curve of the trend from EPN to Galleria mellonella (Final)

### 参考文献:

- [1] 董国伟,刘贤进,余向阳,等.昆虫病原线虫研究概况[J].昆虫知识,2001,38(2):107-111.
- [2] 李俊秀,孙春梅,康宇静,等.昆虫病原线虫对花生田蛴螬的防治效果[J].农药,2007,46(1):62-63.
- [3] 钱秀娟,许艳丽,Wang Yi,等.昆虫病原线虫对大豆地下害虫东北大黑鳃金龟幼虫的致病力研究 [J].大豆科学,2005,24 (3): 224-228.
- [4] Gaugler R , Campbell J F , Selvan S , et al. Large scale inoculative releases of the entomopathogenic nematode Steinernema glaseri. assessment 50 years later [J] . Biological Control , 1992 , 2 (3): 181 187.
- [5] Poinar Jr G O. Nematodes for Biological Control of Insects [M] . Boca Raton: CRC Press , 1979.
- [6] Walter D E. Life history, trophic behavior and description of Gamasellodes vermivorax n. sp. (Mesostigmata: Ascidae) a predator of nematodes and arthropods in semiarid grasslands [J]. Canadian Journal of Zoology, 1987, 65: 1689 1695.
- [7] Bernard E C. Soil Nematode Biodiversity [J] . Biology and Fertility of Soils , 1992 , 14 (2): 99 103.
- [8] Yeates G W, Bongers T. Nematode diversity in agroecosystems [J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 1999, 74 (1-3): 113-135.
- [9] 陈式斌,黄文玲,陈清林.中国昆虫病原线虫研究进展 [J].西南林学院学报,2002,22 (4):63-66.
- [10] Bedding R A, Akhurst R J. A simple technique for the seterminition of insect parasitic rhabditid nematodes in soil [J]. Nematologia, 1975 (21): 109-110.
- [11] 张刚应,杨怀文.经低温贮存的大蜡螟幼虫对线虫侵染率及侵染强度的影响[J].生物防治通报,1994(3):143-144.
- [12] 简 恒,杨怀文,张乃鑫.对悬浮离心法回收昆虫病原线虫方法的改进 [J].中国生物防治,1995,11 (1): 13-16.