

# 低温驯化对海宾斯氏线虫生化物质含量及其生存活力的影响\*

张旭霞\*\* 韩岚岚\*\* 赵奎军\*\*\* 李东坡 高云雷 邓士群 刘凡卉 张玲

(东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030)

**摘要** 【目的】 本文为明确海宾斯氏线虫 *Steinernema litorale* 开发应用的潜能和价值, 研究了由本实验室从哈尔滨市香坊区原生态榆树根际土壤中分离到的海宾斯氏线虫的适低温特性。【方法】 采用 25 °C (6 d)、10 °C (6 d)、4 °C (6 d) 和 25 °C (2 d)-10 °C (2 d)-4 °C (2 d) 处理海宾斯氏线虫, 分析该线虫冷冻存活率、不同温度处理后的贮存稳定性以及体内生化物质—可溶性糖、糖原、海藻糖、脂肪与蛋白质含量的影响。【结果】 海宾斯氏线虫经过 25 °C (6 d)、10 °C (6 d)、4 °C (6 d) 和 25 °C (2 d)-10 °C (2 d)-4 °C (2 d) 低温驯化, 于 -20 °C 冷冻 36 h 后的存活率分别为 0.9%、23.6%、20.0% 和 49.2%, 经 25 °C (2 d)-10 °C (2 d)-4 °C (2 d) 处理的线虫冷冻存活率明显高于其它 3 组, 阶段性降温显著提高了线虫耐寒力; 将上述 4 组低温驯化后的海宾斯氏线虫置于 4 °C 贮存 7 个月, 其存活率差异不显著 ( $P < 0.05$ ), 均为 65% 以上; 25 °C (6 d) 驯化的线虫杀虫活性显著低于其他 3 个处理组线虫的杀虫活性。海宾斯氏线虫经 25 °C (2 d)-10 °C (2 d)-4 °C (2 d) 阶段降温驯化后体内可溶性糖、脂肪、海藻糖含量最高且显著高于 25 °C (6 d) 驯化的线虫体内可溶性糖、脂肪、海藻糖含量; 25 °C (6 d) 驯化的线虫体内蛋白质、糖原含量与其他 3 个处理组差异不显著。【结论】 阶段降温的低温驯化更有利于提高海宾斯氏线虫耐寒能力, 并能用于后期长期贮存。

**关键词** 海宾斯氏线虫, 低温驯化, 冷冻存活率, 贮存稳定性, 生化物质

## Effects of cold acclimation on the biochemical content and survival of *Steinernema litorale*

ZHANG Xu-Xia\*\* HAN Lan-Lan\*\* ZHAO Kui-Jun\*\*\* LI Dong-Po  
GAO Yun-Lei DENG Shi-Qun LIU Fan-Hui ZHANG Ling

(College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract** 【Objectives】 To clarify the potential value of *S. litorale* as a biological control agent, we studied the appropriate low temperature characteristics of this species in rhizosphere soil from under elms in the Xiangfang district, Harbin city. 【Methods】 *S. litorale* were exposed to several temperature treatments, including 25 °C (6 d), 10 °C (6 d), 4 °C (6 d) and 25 °C (2 d)-10 °C (2 d)-4 °C (2 d), and their freezing survival rate, low temperature dormancy, and biochemical (soluble sugar, glycogen, trehalose, lipid and protein) content, measured and compared. 【Results】 The freezing survival rates of *S. litorale* were 0.9%, 23.6%, 20.0% and 49.2% after cold acclimation at 25 °C (6 d), 10 °C (6 d), 4 °C (6 d) and 25 °C (2 d)-10 °C (2 d)-4 °C (2 d), respectively, followed by a 36 h -20 °C freezing treatment. The freezing survival rates of *S. litorale* after 25 °C (2 d)-10 °C (2 d)-4 °C (2 d) was significantly higher than those of the other three temperature treatments. Staged cooling significantly improved cold tolerance. The survival rates of nematodes in the four treatment groups were all above 65% and were not significantly different ( $P < 0.05$ ) after they had been kept at 4 °C for 7 months. Mortality in the 25 °C (6 d)

\*资助项目 Supported projects: 现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-04)

\*\*共同第一作者 Co-first authors, E-mail: wzxyjl@163.com; hanll\_neau@aliyun.com

\*\*\*通讯作者 Corresponding author, E-mail: kjzhao@163.com

收稿日期 Received: 2018-04-12, 接受日期 Accepted: 2018-05-19

treatment group was significantly lower than that in the other three treatment groups. The soluble sugar, lipid and trehalose contents of the 25 °C (2 d)-10 °C (2 d)-4 °C (2 d) treatment groups were the highest; significantly higher than those of the 25 °C (6 d) treatment group. The protein and glycogen content of the 25 °C (6 d) treatment group were not significantly different from those of the other three treatment groups. **[Conclusion]** Cold acclimation by staged temperature reduction improves the cold tolerance of *S. litorale* and can be used to maintain these animals in a dormant state for prolonged periods.

**Key words** *Steinernema litorale*, cold acclimation, freezing survival rate, storage stability, biochemical materials

昆虫病原线虫 (Entomopathogenic nematodes) 是最具潜力的生防因子之一, 目前已成功用于防治多种地下害虫 (张安邦等, 2015)。但由于其贮存较困难, 货架期短, 阻碍了应用推广。如何延长其货架期及提高贮存后的活力是更好地应用昆虫病原线虫亟待解决的问题。研究报道, 低温驯化能够启动抗冻物质海藻糖与甘油的产生和积累 (Ash and Atkinson, 1986; Wharton *et al.*, 2000; Grewal and Jagdale, 2002, 2003), 进而增强线虫的耐寒能力, 而耐寒能力的增强程度受到低温驯化方式与线虫种类的限制 (Smith, 1987; Forge and Macguidwin, 1990; Brown and Gaugler, 1996; Wharton *et al.*, 2003; Ali and Wharton, 2009), 低温驯化方式主要有两种: 直接降温驯化和阶段降温驯化, 其中阶段降温能显著提高线虫冷冻存活率 (李春杰等, 2015)。因此, 筛选和开发适于低温贮存的材料和技术是更好地应用生防线虫的关键环节。

海宾斯氏线虫 *Steinernema litorale* 是 Mutsuhiro 首次诱集并通过形态和分子技术鉴定为新种 (Yoshida, 2004)。研究发现, 海宾斯氏线虫具有侵染力强和耐干燥力特性 (刘瑞和刘奇志, 2016)。吕洋等 (2014) 从哈尔滨香坊区原生态榆树根际土壤中分离到的海宾斯氏线虫在低温条件下对大蜡螟 *Galleria mellonella* L. 有较强侵染力, 在 10 °C 下对大蜡螟的侵染力明显高于对照线虫 *S. carpocapsa* 和 *H. bacteriophorae* 的侵染力。而有关海宾斯氏线虫低温驯化后耐寒能力与贮存货架期的系统研究未见报道。

故本文用低温驯化方法对本实验室分离、保存的哈尔滨当地海宾斯氏线虫进行适低温特性 (吕洋等, 2014) 的优化, 寻找提高冷冻存活率

以延长其货架期的方法, 并对该线虫经低温处理后其体内生物物质的变化及杀虫活性的影响进行进一步研究, 进而明确其开发利用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试昆虫和供试线虫

大蜡螟末龄幼虫 *G. mellonella* 购自天津玉米虫养殖场; 3 龄粘虫幼虫 *Mythimna separata* (Walker) 由东北农业大学农业昆虫与害虫防治实验室人工饲养。

供试海宾斯氏线虫采自哈尔滨市香坊区原生态榆树根际土壤中, 由东北农业大学农业昆虫与害虫防治实验室分离、鉴定并保存于 4 °C 冰箱。

### 1.2 试验仪器与设备

主要仪器: 恒温培养箱 (上海博讯实业有限公司, BSP-100)、控温冰箱 (青岛海尔股份有限公司, BCD-226STV)、酶标仪 (INFINITE-200 PRO, 瑞士 TECAN 公司)、高速离心机 (Sigma, 1-14)、电子天平 (ER-180, AND)。

主要试剂: 考马斯亮蓝 G-250、牛血清蛋白、缓冲液 (100 mmol/L K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1 mmol/L 二硫苏糖醇和 1 mmol/L 乙二胺四乙酸, pH 7.4)、20% 硫酸钠溶液、氯仿甲醇混合液 (体积分数, 1:2)、三油精、香草醛 (68% 磷酸配制, 浓度为 1.2 g/L)、浓硫酸、葱酮等, 以上试剂均为国产分析纯。

### 1.3 海宾斯氏线虫的低温驯化

所用海宾斯氏线虫均采用 White-Trap 法 (White, 1927; Dutky *et al.*, 1964) 繁殖, 参照李春杰等 (2015) 的方法稍做修改后对新繁殖出来的感染期线虫在无菌水中进行不同温度的

驯化, (1) 直接降温驯化: 10 (6 d)、4 (6 d); (2) 阶段降温驯化: 25 (2 d)-10 (2 d)-4 (2 d); 对照组: 25 (6 d), 共 4 个处理, 每个处理 3 个重复, 每种处理浓度均为 1 000 IJs (Infective juvenile) /mL。处理中 25 采用恒温培养箱, 10, 4, -20 采用控温冰箱。

#### 1.4 海宾斯氏线虫低温驯化后冷冻存活率测定

参照 Brown 和 Gaugler (1996) 的方法, 略做改进。吸取 1 mL 经上述 1.3 方式低温驯化后的海宾斯氏线虫于 1.5 mL 离心管中, 然后将装有线虫的离心管置于控温冰箱中 -20 低温冷冻, 分别在 1、3、9、21、36 h 时从各管中吸取 20  $\mu$ L 线虫悬浮液在显微镜下观察其存活情况。每个处理放 10 管, 浓度均为 1 000 IJs/mL, 重复 3 次。

#### 1.5 低温驯化后海宾斯氏线虫杀虫活性的测定

参照吕洋 (2014) 的方法, 在垫入灭菌滤纸的 90 mm 培养皿中, 分别放入大蜡螟老熟幼虫或 3 龄粘虫幼虫, 10 头/皿。将经 1.3 低温驯化后具活力的海宾斯氏线虫 (50 IJs/大蜡螟, 150 IJs/粘虫) 分别均匀喷洒于双层滤纸上, 对照组是在双层滤纸上均匀喷施无菌水, 每皿滴加水为 2 mL, 悬浮液不够时用无菌水补充, 盖上盖子, 放入 23 无光恒温培养箱中培养, 重复 4 次, 每隔 24 h 观察大蜡螟与粘虫的死亡情况, 记录死亡率。

#### 1.6 海宾斯氏线虫低温驯化后体内主要生物物质的测定

吸取经上述 1.3 方式低温驯化的具活力的海宾斯氏线虫约 3 000 IJs, 分别用于蛋白质、脂肪、可溶性糖、糖原、海藻糖生物物质的测定。每个处理重复 3 次。

蛋白质、脂肪、可溶性糖、糖原含量测定参照钱秀娟 (2014) 的测定方法, 海藻糖标准曲线的制定和试验方法参考 Jagdale 和 Grewa (2003) 的方法。

#### 1.7 海宾斯氏线虫低温驯化后贮存稳定性的测定

将经上述 1.3 方式低温驯化后具活力的海宾斯氏线虫分别转移到 30 mL 细胞培养瓶中, 4 冰箱中贮存 7 个月, 每隔 1 个月从各管中取出 20  $\mu$ L 线虫悬浮液于显微镜下观察其存活情况。每瓶悬浮液均为 10 mL, 浓度 1 000 IJs/mL, 重复 3 次。

#### 1.8 低温驯化贮存后对海宾斯氏线虫杀虫活性的影响

经 1.3 方式低温驯化后 4 贮存 7 个月的具活力的海宾斯氏线虫分别参照 1.5 方式侵染大蜡螟 (50 IJs/大蜡螟), 对照组同 1.5, 每隔 24 h 观察大蜡螟的死亡情况, 记录死亡率。

#### 1.9 数据统计与分析

本试验涉及的数据分析均使用 Excel 2003 和 SPSS 23.0 数据分析软件完成。利用 SPSS 23.0 数据分析软件进行组间均值数据的 Duncan's 多重比较法处理差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 低温驯化对海宾斯氏线虫冷冻存活率的影响

经 25、10、4 和 25 -10 -4 低温驯化的海宾斯氏线虫耐低温能力存在较大差异。-20 环境中冷冻 1、3、9 h, 海宾斯氏线虫的存活率没有显著变化 ( $P > 0.05$ ), 均保持在 90% 以上; 21 h 后, 4 个处理海宾斯氏线虫冷冻存活率 (21.3%, 58.9%, 52.4%, 80.7%) 差异显著 ( $P < 0.05$ ); 36 h 后, 其冷冻存活率分别为 0.85%、23.59%、19.98% 和 49.17% ( $P < 0.05$ ) (图 1)。结果表明, 与 25 驯化相比, 10、4 和 25 -10 -4 3 种低温驯化方式均可提高海宾斯氏线虫的冷冻存活率。阶段降温法能显著提高海宾斯氏线虫的冷冻存活率 ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 低温驯化对海宾斯氏线虫杀虫活性的影响

经 25、10、4 和 25 -10 -4 低温驯化后海宾斯氏线虫分别对大蜡螟老熟幼

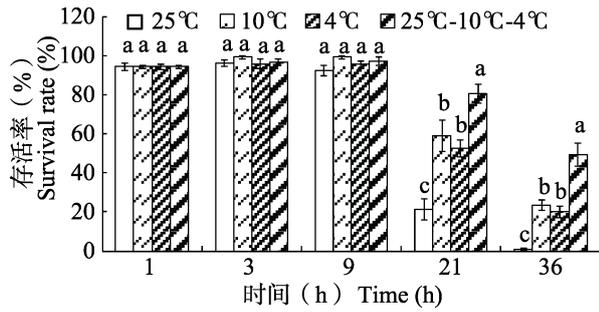


图 1 不同低温驯化方式海滨斯氏线虫冷冻存活率  
Fig. 1 The freezing survival rate of *Steinerema litoral* in different cold acclimation methods

柱上标有不同小写字母表示同一时间不同处理差异达显著水平 ( $P < 0.05$ )。图 2, 图 3, 图 5, 图 6 同。

Histograms with the different lowercase letters in the figure indicate that the difference in treatment are significant at the same time at 0.05 level.

The same as Fig. 2, Fig. 3, Fig. 5, Fig. 6.

虫、3 龄粘虫幼虫侵染率差异不显著 ( $P > 0.05$ )。侵染 24 h 后大蜡螟校正死亡率均为 0, 粘虫校正死亡率分别为 0、10%、7.5%、15%; 48 h 后, 大蜡螟的校正死亡率为 90%、93.33%、100%、100%, 粘虫幼虫的校正死亡率为 67.5%、67.5%、67.5%、65%, 二者均无显著差异 ( $P > 0.05$ ); 72 h 后, 大蜡螟与粘虫的校正死亡率分别无显著差异 ( $P > 0.05$ )。说明低温驯化对海滨斯氏线虫侵染力无显著影响 (图 2、3)。

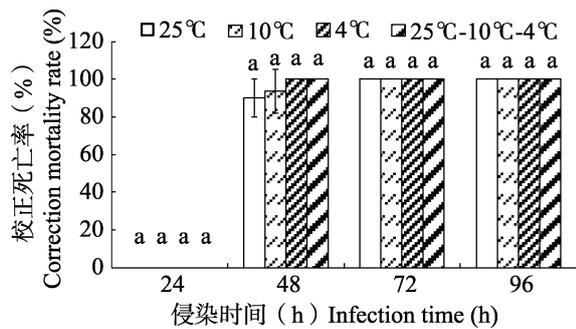


图 2 低温驯化海滨斯氏线虫侵染大蜡螟幼虫的校正死亡率

Fig. 2 Corrected mortality of *Galleria mellonella* larvae infected with cold acclimation of *Steinerema litoral*

### 2.3 海滨斯氏线虫对不同低温驯化方式的生理生化响应

不同低温驯化方式对海滨斯氏线虫体内蛋白质、脂肪、可溶性糖、糖原和海藻糖含量的影

响如图 4 所示。从图 4 可以看出, 25 °C 低温驯化后海滨斯氏线虫体内总蛋白含量为 ( $1\ 060.87 \pm 39.66$ )  $\mu\text{g/g}$ , 经 25 °C -10 °C -4 °C 驯化后其体内总蛋白含量为 ( $1\ 129.03 \pm 18.19$ )  $\mu\text{g/g}$ , 二者无显著差异 ( $P > 0.05$ )。线虫经 25 °C、10 °C、4 °C 和 25 °C -10 °C -4 °C 驯化后体内总脂肪含量依次升高, 25 °C 驯化后线虫体内总脂肪含量最低, 为 ( $146.59 \pm 11.23$ )  $\mu\text{g/g}$ , 25 °C -10 °C -4 °C 阶段降温驯化的线虫体内总脂肪含量最高, 为 ( $293.57 \pm 11.52$ )  $\mu\text{g/g}$ , 二者差异显著 ( $P < 0.05$ )。经 25 °C、10 °C、4 °C 和 25 °C -10 °C -4 °C

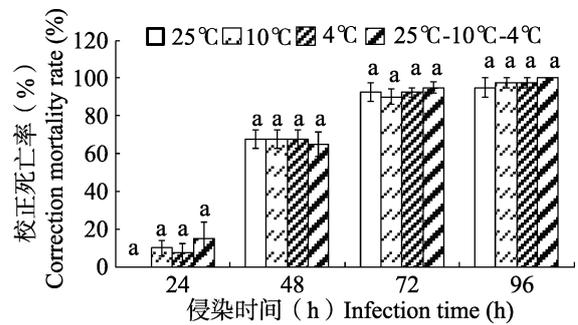


图 3 低温驯化海滨斯氏线虫侵染粘虫幼虫的校正死亡率

Fig. 3 Corrected mortality rate of *Mythimna separata* larvae infected with cold acclimation of *Steinerema litoral*

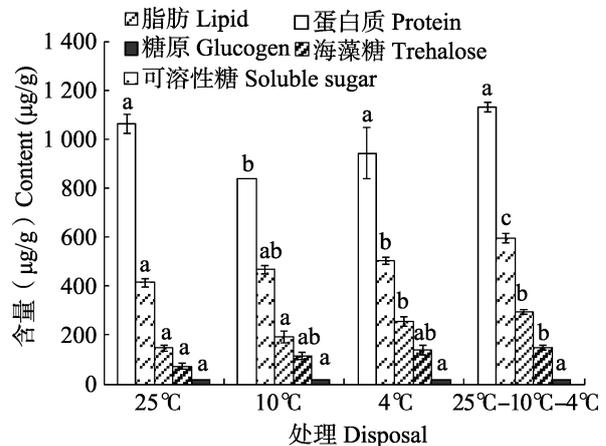


图 4 海滨斯氏线虫低温驯化后体内主要生物物质的含量

Fig. 4 The contents of major biochemical substances in the body of *Steinerema litoral* after cold acclimation

柱上标有不同小写字母表示同一处理的不同处理时间差异达显著水平 ( $P < 0.05$ )。

Histograms with the different lowercase letters in the figure indicate significant difference in processing time of the same treatment at 0.05 level.

驯化后线虫体内可溶性糖含量呈现出依次升高的变化,即 25 ℃ 驯化后线虫体内可溶性糖含量最低,为 (415.00 ± 16.83) μg/g,经 25 ℃ -10 ℃ -4 ℃ 驯化后其体内可溶性糖含量最高,为(594.57 ± 19.88) μg/g,低温驯化对线虫体内可溶性糖含量有显著的影响 ( $P < 0.05$ ),并且直接降温驯化后线虫体内可溶性糖含量均显著低于阶段降温驯化后线虫体内可溶性糖含量 ( $P < 0.05$ )。经 25 ℃、10 ℃、4 ℃ 和 25 ℃ -10 ℃ -4 ℃ 驯化后线虫体内糖原含量在(17.07 ± 0.53)-(18.34 ± 0.57) μg/g 之间,直接降温驯化后线虫体内糖原含量均低于阶段降温驯化的线虫体内糖原含量,4 个处理差异不显著 ( $P > 0.05$ )。线虫经 25 ℃、10 ℃、4 ℃ 和 25 ℃ -10 ℃ -4 ℃ 低温驯

化后体内海藻糖含量表现出依次升高的变化,并且阶段性降温驯化后线虫体内海藻糖含量比直接降温驯化后线虫体内海藻糖含量高。

### 2.4 海滨斯氏线虫低温驯化后贮存稳定性的测定

经上述 4 种方式低温驯化后海滨斯氏线虫在 4 ℃ 下的贮存情况如图 5 所示。海滨斯氏线虫存活率随着贮存时间的延长而下降,前 3 个月,25 ℃、10 ℃、4 ℃ 和 25 ℃ -10 ℃ -4 ℃ 驯化后的线虫存活率差异不显著 ( $P > 0.05$ ),第 7 个月后,25 ℃、10 ℃、4 ℃ 和 25 ℃ -10 ℃ -4 ℃ 驯化后的线虫存活率高达 65%以上,其中第 4 个月后 10℃处理的线虫存活率高于其他 3 组驯化后的线虫存活率 ( $P < 0.05$ )。

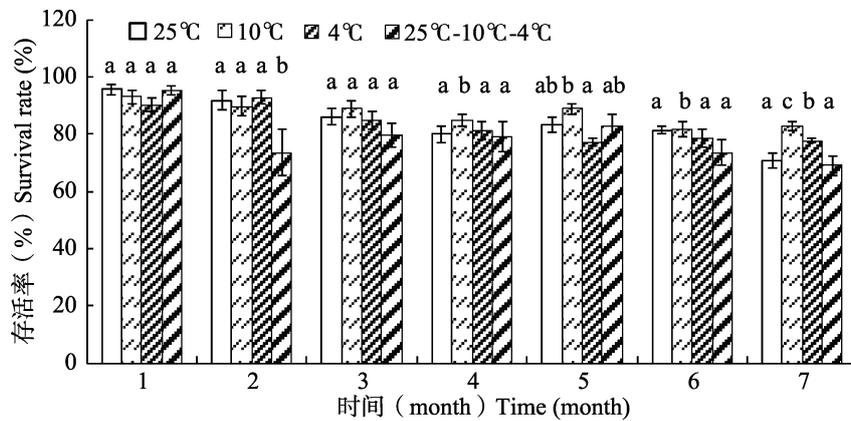


图 5 海滨斯氏线虫低温驯化后在 4 ℃ 贮存时的存活率

Fig. 5 The survival rate of *Steinerema litoral* at 4 ℃ storage after cold acclimation

### 2.5 低温驯化贮存后对海滨斯氏线虫的杀虫活性影响

经低温驯化的海滨斯氏线虫在 4 ℃ 下低温贮存 7 个月后的杀虫活性如图 6 所示。经 10 ℃、4 ℃ 和 25 ℃ -10 ℃ -4 ℃ 低温驯化的线虫在贮存 7 个月后,对大蜡螟幼虫的致死率达 70%以上,显著高于 25 ℃ 驯化的线虫贮存 7 个月对大蜡螟幼虫的致死率 ( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

本研究中,海滨斯氏线虫经 25 ℃ (6 d)、10 ℃ (6 d)、4 ℃ (6 d)和 25 ℃ (2 d)-10 ℃ (2 d)-4 ℃ (2 d)低温驯化后,(1)线虫耐

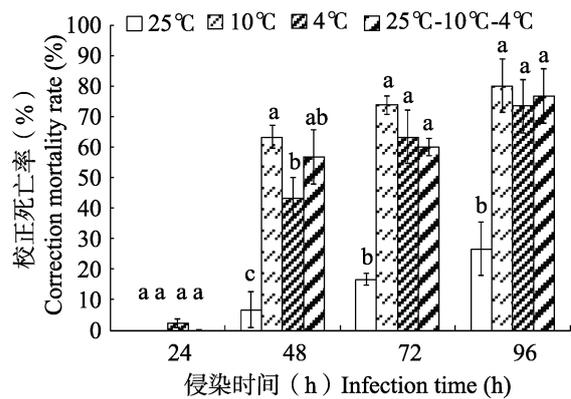


图 6 低温驯化贮存后对海滨斯氏线虫侵染大蜡螟幼虫的校正死亡率

Fig. 6 Correctional mortality of *Steinerema litoral* infestation with *Galleria mellonella* larvae after cold acclimation and storage

寒力显著提高,阶段降温驯化比直接降温驯化效果更好,36 h 冷冻存活率达到 49.17%,侵染力无显著变化。与 Brown 和 Gaugler (1996) 报道的嗜菌异小杆线虫 *Heterorhabditis bacteriophora* 经过阶段降温驯化后,耐低温存活率显著高于直接降温驯化后的存活率的研究结果一致;(2) 低温驯化后海宾斯氏线虫体内可溶性糖、海藻糖与脂肪含量随着耐寒能力的增加而增加。低温驯化使线虫逐渐累积可溶性糖、海藻糖和脂肪,以渡过不良环境 (Jagdale *et al.*, 2005; Murray *et al.*, 2007; 王丽芳, 2011; 钱秀娟, 2014); (3) 25 (2 d) -10 (2 d) -4 (2 d) 低温驯化后海宾斯氏线虫体内蛋白质、糖原含量与 25 (6 d) 驯化后线虫体内蛋白质、糖原含量差异不显著 ( $P < 0.05$ ), 说明蛋白质、糖原在低温下是能源储备物质, 而不是最先消耗物质;(4) 经低温驯化后海宾斯氏线虫在 4 贮存 7 个月存活率均在 65% 以上, 本结果显著高于 Grewal (2015) 报道的 *S. carpocapsae* 在水中 25 条件下贮存的存活率, 这可能与本研究 4 贮存环境导致其低温休眠, 从而减少耗氧量和脂肪消耗量有关 (Watanabe, 2006)。其中, 海宾斯氏线虫经 10 (6 d) 驯化后贮存 7 个月的存活率显著高于经 4 (6 d)、25 (2 d) -10 (2 d) -4 (2 d) 低温驯化后线虫贮存 7 个月的存活率, 这可能是受到解冻速度的影响 (李春杰, 2014); (5) 经 25 (6 d) 驯化的海宾斯氏线虫在 4 贮存 7 个月后的杀虫活性显著低于其他 3 组低温驯化后线虫的杀虫活性。这是由于其它 3 组海宾斯氏线虫体内能量储备因子脂肪含量明显高于 25 (6 d) 驯化后线虫体内的脂肪含量, 从而影响其对寄主的侵染力和致病力 (钱秀娟, 2014)。

本研究表明, 哈尔滨当地海宾斯氏线虫经低温驯化能显著提高其适低温特性, 并能用于后期长期贮存, 显示出了海宾斯氏线虫在低温贮存和寒冷地区害虫防治上很好的开发利用潜力。本研究从冷冻存活率、体内生化物质变化以及贮存稳定性的角度初步探讨了其耐寒机理, 而海宾斯氏线虫其他内含生化物质在低温驯化过程中的变

化、作用, 以及其耐寒性机制与遗传基因的关系等问题, 有待进一步研究, 以期为海宾斯氏线虫的开发利用和生物防治提供科学依据。

## 参考文献 (References)

- Ali F, Wharton DA, 2009. Cold tolerance of entomopathogenic nematodes. *New Zealand Plant Protection*, 62(1): 396.
- Ash C, Atkinson HJ, 1986. Nematodirus battus: development of cold hardiness in dormant eggs. *Experimental Parasitology*, 62(1): 24-28.
- Brown IM, Gaugler R, 1996. Cold tolerance of Steinernematid and Heterorhabditid nematodes. *Journal of Thermal Biology*, 21(2): 115-121.
- Dutky SR, Thompson JV, Cantwell GE, 1964. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. *Journal of Insect Physiology*, 6: 417-422.
- Forge TA, Macguidwin AE, 1990. Cold hardening of *Meloidogyne hapla* second-stage juveniles. *Journal of Nematology*, 22(1): 101-105.
- Grewal PS, Jagdale GB, 2002. Enhanced trehalose accumulation and desiccation survival of entomopathogenic nematodes through cold preacclimation. *Biocontrol Science & Technology*, 12(5): 533-545.
- Grewal PS, 2015. Enhanced ambient storage stability of an entomopathogenic nematode through anhydrobiosis. *Pest Management Science*, 56(5): 401-406.
- Jagdale GB, Grewal PS, 2003. Acclimation of entomopathogenic nematodes to novel temperatures: trehalose accumulation and the acquisition of thermotolerance. *International Journal for Parasitology*, 33(2): 145-152.
- Jagdale GB, Grewal PS, Salminen SO, 2005. Both heat-shock and cold-shock influence trehalose metabolism in an entomopathogenic nematode. *Journal of Parasitology*, 91(5): 988-994.
- Li CJ, Tan GZ, Wang Y, Xu YL, 2014. Optimizing freezing storage conditions for the entomopathogenic nematode isolated from the cold region in China. *Plant Protection*, 40(5): 49-54. [李春杰, 谭国忠, 王义, 许艳丽, 2014. 寒区昆虫病原线虫冷冻储存条件优化. 植物保护, 40(5): 49-54.]
- Li CJ, Wang LF, Pan FJ, Xu YL, 2015. Effect of pretreatment method on freezing survival of entomopathogenic nematodes. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 43(2): 198-202. [李春杰, 王丽芳, 潘凤娟, 许艳丽, 2015. 预处理方式对昆虫病原线虫冷冻存活的影响. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 43(2): 198-202.]

- Liu R, Liu QZ, 2016. Study on the biological characteristics of *Steinernema litorale*. *Chinese Journal of Biological Control*, 32(1): 101–105. [刘瑞, 刘奇志, 2016. 海滨斯氏线虫生物学特性研究. *中国生物防治学报*, 32(1): 101–105.]
- Ly Y, Han LL, Zhao KJ, Song J, Zhu MH, 2014. Isolation and identification of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from Harbin (Northeast China) and infectivity of entomopathogenic nematodes in low temperature. *Chinese Journal of Biological Control*, 30 (4): 558–563. [吕洋, 韩岚岚, 赵奎军, 宋捷, 朱明贺, 2014. 哈尔滨两种斯氏线虫及其共生菌的分离鉴定和低温侵染力分析. *中国生物防治学报*, 30 (4): 558–563.]
- Patricia M, Scott AIH, Gregor G, Andrew YG, Andrew R, 2007. An explicit test of the phospholipid saturation hypothesis of acquired cold tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(13): 5489–5494.
- Qian XJ, 2014. Entomological nematodes resources of Gansu province and its adaptation to abiotic stress. Doctoral dissertation. Gansu: Gansu Agricultural University. [钱秀娟, 2014. 甘肃省昆虫病原线虫资源及其对非生物胁迫的适应性研究. 博士学位论文. 甘肃: 甘肃农业大学.]
- Smith HJ, 1987. Factors affecting preconditioning of *Trichinella spiralis nativa* larvae in musculature to low temperatures. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 51(2): 169–173.
- Wang LF, Xu YL, Li CJ, 2011. The research of entomopathogenic nematodes cold tolerance. *System Sciences and Comprehensive Studies in Agriculture*, 27(4): 490–494. [王丽芳, 许艳丽, 李春杰, 2011. 昆虫病原线虫耐寒性研究进展. *农业系统科学与综合研究*, 27(4): 490–494.]
- Watanabe M, 2006. Anhydrobiosis in invertebrates. *Applied Entomology & Zoology*, 41(1): 15–31.
- Wharton DA, Judge KF, Worland MR, 2000. Cold acclimation and cryoprotectants in a freeze-tolerant Antarctic nematode, *Panagrolaimus davidi*. *Journal of Comparative Physiology B*, 170(4): 321–327.
- Wharton DA, Goodall G, Marshall CJ, 2003. Freezing survival and cryoprotective dehydration as cold tolerance mechanisms in the Antarctic nematode *Panagrolaimus davidi*. *Journal of Experimental Biology*, 206(2): 215–221.
- White GF, 1927. A Method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science*, 66(1709): 302–303.
- Yoshida M, 2004. *Steinernema litorale* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Japan. *Nematology*, 6(6): 819–838.
- Zhang AB, Nan Gong ZY, Song P, Wang QY, 2015. Efficacy of entomopathogenic nematodes against *Agrotis segetum* larvae. *Journal of Environmental Entomology*, 37(3): 591–597. [张安邦, 南宫自艳, 宋萍, 王勤英, 2015. 昆虫病原线虫对黄地老虎致病力的研究. *环境昆虫学报*, 37(3): 591–597.]