

线虫耐寒性研究进展

戴素明^{1,3}, 成新跃², 肖启明³, 谢丙炎^{1,*}

(1. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; 2. 北京师范大学生命科学学院, 北京 100875;

3. 湖南农业大学生物安全科技学院, 长沙 410128)

摘要:对于分布在温带和寒带的线虫,它们只有战胜冬季寒冷的挑战,才能有利于种群的存在与发展。因此,耐寒性是线虫生物学研究中不可忽视的内容。综述了关于线虫在低温胁迫下的耐寒性测定方法、耐寒对策及耐寒机制等方面的研究进展。线虫的耐寒性和昆虫一样,可通过过冷却点和低温存活率两种指标进行评价,但在具体的实验方法上,线虫耐寒性研究有其不同之处。线虫的耐寒对策和耐寒机制具有多样化。耐寒对策主要有耐冻和避冻,二者能共同渗透于线虫的耐寒过程中。耐寒机制包括特殊发育阶段的形成、低温驯化作用、低分子量抗冻物质的聚集、以及高分子量抗冻蛋白和热休克蛋白的产生,等等。此外,还强调应从多个角度研究线虫的耐寒性,如寒冷敏感型线虫的研究、寄生线虫的耐寒对策研究以及交叉胁迫的研究。

关键词:线虫;耐寒性;方法;耐寒对策;耐寒机制

文章编号:1000-0933(2006)11-3885-06 中图分类号:Q958.1,Q959.17 文献标识码:A

Research progress in Nematode cold tolerance

DAI Su-Ming^{1,3}, CHENG Xing-Yue², XIAO Qi-Ming³, XIE Bing-Yan^{1,*} (1. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 2. College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China; 3. College of Biosafety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China). Acta Ecologica Sinica, 2006, 26(11): 3885 ~ 3890.

Abstract: In order to have normal development and better existence, nematodes should overcome the challenges of winter cold in the temperate and frigid areas. Therefore, the research on nematode cold tolerance assumes greater significance. The present status of knowledge along with the methods to study nematode cold tolerance, its strategies and mechanisms are reviewed in this paper. Research methods for nematodes cold tolerance are similar to that of insects, including measurement of supercooling points and assessment of survival; but the detailed experimental technique for nematodes has its own characteristics. The F_{50} has been shown as a valid measure of the degree of supercooling. Cold tolerance strategies have been mainly divided into freezing tolerance and freeze avoidance. Freeze tolerance is widespread among nematodes but not all nematode species are freezing tolerant. As the sheath or eggshell can prevent inoculative freezing, some nematodes can survive by freeze avoidance. In nematodes, these two strategies are not mutually exclusive as in found in case of arthropods. Nematodes are also able to optimize their strategy in response to changes in the environment. Nematodes have adopted various cold tolerance mechanisms. In many parasitic nematodes, which spend part of their life cycle in a protected and favourable environment (i. e. the host), only particular developmental stage has adopted these mechanisms. Cold acclimation before cold stress significantly increases the cold hardiness of nematodes. In addition, other mechanisms of cold stress include the synthesis of cryoprotectants, antifreezing proteins and heat

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目(2002CB111401);国家自然科学基金资助项目(30270236,30571261);重大基础研究前期研究专项(2004CCA05300)

收稿日期:2006-01-27; **修订日期:**2006-09-20

作者简介:戴素明(1980~),女,湖南人,博士,事入侵生物学研究。

*通讯作者 Corresponding author. E-mail: xieby@mail.caas.net.cn

Foundation item: The project was financially supported by State Key Basic Research and Development Plan (No. 2002CB111401); National Nature Science Foundation of China (No. 30270236, 30571261) Important Basic Research Prophase Research (No. 2004CCA05300)

Received date: 2006-01-27; **Accepted date:** 2006-09-20

Biography: DAI Su-Ming, Ph. D., mainly engaged in exotic species invasion.

shock proteins. Further, it has been suggested that the nematode cold tolerance must also be investigated from other aspects, such as chill susceptibility, cold tolerance of parasitic stages and the effect of cross stresses.

Key words: nematodes; cold tolerance; methods; cold tolerance strategies; cold tolerance mechanisms

线虫是一类低等的无脊椎动物,其分布极为广泛,即使在环境条件十分恶劣的极地,也有一定种类数量的线虫存在。对于分布在温带和寒带的线虫,它们不可避免地要接受冬季寒冷的挑战。因此,线虫需要具备一定的耐寒能力,才能有利于种群的存在与发展。大量的室内外研究表明:线虫能够经受在自然条件下可能遭受的低温。例如,动物寄生性蛇形毛圆线虫(*Trichostrongylus colubriformis*)的侵染幼虫,在土表温度低至 -10°C 的条件下仍能存活^[1]。植物寄生性北方根结线虫(*Meloidogyne hapla*)冬季存活的土壤温度可达到 -16°C ^[2]。对于自由生活的线虫,有一些种类可以从南极洲的冰冻海洋植物中分离获得^[3~5]。

有关线虫耐寒能力的研究,早期主要是针对在实验室超低温条件下($< -190^{\circ}\text{C}$)对线虫的影响来开展的^[6,7]。随着对其它生物耐寒性研究的深入,线虫的耐寒性研究近些年来也取得了突破性的进展。并且,有许多研究作者敢于创新,形成了线虫耐寒性研究独有的特色。有关这一领域的研究主要集中在国外,研究对象以一种南极线虫——大卫全凹线虫(*Panagrolaimus davidi*)为主。

1 耐寒性的测定

和昆虫一样,线虫的耐寒性是以过冷却点和低温存活率作为指标来进行评价的。由于线虫的生命活动离不开水,所以在具体的研究方法上有其不同之处。

1.1 过冷却点(SCP, supercooling point)的测定

线虫的过冷却点可以通过两种方法来测定。一种方法是类似于对昆虫过冷却点的测定。将线虫缚在热电偶上,然后以一定的速率开始降温,当线虫体液结冰时,由于潜热的释放,虫体的温度会有一个反弹,据此可得知线虫的过冷却点^[3~5,8]。该种方法是测定昆虫过冷却点的一种普遍方法,但是运用在线虫研究上,尚存在一些不足之处。由于线虫表面的水结冰能影响测定结果,所以在测定之前必须除去线虫体表的水分。为了避免线虫干燥发生脱水,通常用石蜡油覆盖在线虫的体表,这就造成该方法不能真实反映线虫在自然情况下对低温的反应。此外,这种方法尽管已对很小的线虫($0.1\mu\text{g}$ 干重)进行过测定^[3],但还是对线虫的体长有一定的要求。如果体长过短,会由于释放的潜热检测不到,而不能采用这种方法进行测定^[4]。

另一种方法则是在低温显微镜下直接观察线虫结冰来测定过冷却点^[9]。但是,由于介质、线虫的大小等一些因素的影响,该方法有时很难直接获得线虫的过冷却点。后来的研究发现,用导致50%个体发生结冰的温度(F_{50})能很好地衡量线虫的过冷却程度^[1]。在温度由低温开始回升的过程中,结冰线虫身体的透明度会更为显著地减弱。当温度上升到 -5°C 时,结冰线虫的透明度达到最弱。因此,在低温显微镜下很容易区分线虫是否结冰,再根据统计学方法就能够获得 F_{50} ,从而可用来确定线虫的平均过冷却点。有关线虫在这一过程中透明度发生减弱的原因,至今尚未清楚。推测可能是由于体内的冰晶使得透射光发散而造成的^[10]。相比前种方法,该方法能够测定更小的线虫^[1],并可直接观察线虫在水中的结冰过程^[11](图1)。

1.2 低温存活率的测定

虽然大多数研究都采用过冷却点作为线虫的耐寒性指标,但也有不少研究用低温存活率来衡量线虫耐寒性的强弱^[10,12]。低温存活率的测定,一般采用将线虫进行冷冻胁迫处理后,再放入生理溶液中(如蒸馏水^[10,12], M9 缓冲液^[13])恢复一段时间($>24\text{h}$),然后,通过统计

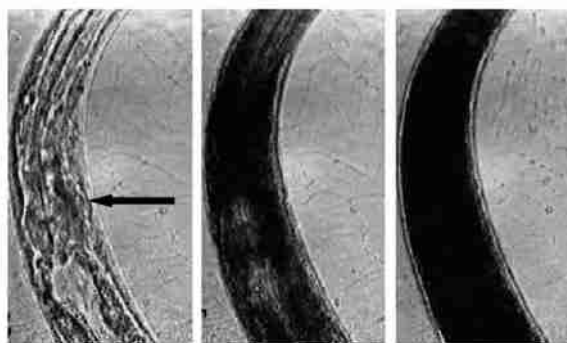


图1 线虫体内结冰示意图:结冰由后食道球附近(箭头表示)开始,逐渐在体内扩展直至整体结冰^[11]

Fig. 1 Freezing of nematode starts near the posterior bulb of the oesophagus (arrow) and spreads throughout the body until all compartment^[11]

活虫数来获得低温存活率。但由于一些活性线虫恢复后仍处于静止状态,所以在实验中还需要通过物理刺激来判断线虫的活性。和其他生物一样,线虫的低温存活率主要取决于温度和时间两个因素。随着温度的降低和时间的延长,其死亡率升高。在昆虫的低温存活率实验中,除温度和时间外,冷却速率也是实验的一个考虑因素,因为较慢的冷却能使昆虫有一个快速冷驯化的机会,可以提高昆虫的耐寒性^[14]。最近,线虫的低温存活率和冷却速率的相关性也已得到证实^[15]。在较快的结冰环境中,部分线虫由于不断增长的冰晶而受到机械损伤,造成体内物质会从皮层的伤口处流出。而较慢的冷却速率则可以抑制接种性结冰(inoculative freezing),从而有助于线虫低温存活率的提高。

2 线虫的耐寒对策

Asahina 首次报道菊花滑刃线虫(*Aphelenchoides ritzemabosi*)具有耐寒性^[16]。后来,随着节肢动物耐寒性分类方法的建立,Sayre 将这种分类方法应用于线虫的研究中,提出线虫可能也采取不同的耐寒对策应答低温胁迫^[17]。线虫的耐寒对策通常可分为两大类:耐冻(freezing tolerant):线虫能忍受胞外结冰,其死亡的最低温度低于结冰点。避冻(freeze avoiding):线虫通过降低过冷却点来避免体液结冰,然而,其一旦在过冷却点上发生结冰就会死亡。最近,线虫耐寒性研究又发现另一种耐寒对策,即通过保护性脱水来避免冰冻。由于在同一温度下过冷却水和冰的压力不同,使线虫身体发生显著性脱水。线虫通过这种保护性脱水的耐寒对策,保护虫体避免结冰,从而获得对低温的抵抗性^[18]。

线虫其实是一种水生动物,即使生活在土壤中的线虫,也需要土壤颗粒至少有一层水膜,才有利于线虫的运动、生长和繁殖。因此,线虫比完全陆地生活的节肢动物更有可能受到接种性结冰。最早研究认为,大多数耐寒线虫采用避冻对策^[19]。随着线虫耐寒性研究方法的完善,早期的认识发生了改变,耐冻才是线虫在低温下普遍采用的对策^[20,21]。当外界水结冰时,冰能够在整个样品中较快地扩散,通过线虫的孔口或者表皮进入体内,最终引起整个线虫结冰^[11](图1)。通常认为只有当结冰局限在细胞以外部分时,生物体才能够忍受结冰而存活下来。然而,研究发现,结冰也可能发生在细胞内的部分,线虫能够承受胞内结冰^[11,18]。*P. davidi*是目前已发现的唯一在经受广泛性胞内结冰后仍能存活下来的动物。它暴露在 -40°C ^[22]和 -80°C ^[20]的低温下,仍有很高的存活率。

当然,耐冻也并不被所有的线虫都采用。对于不同生活时期的线虫,通常幼虫和成虫采用耐冻对策,而一些具有外鞘(sheath)结构的线虫和卵,则采用避冻对策。外鞘是 *T. colubriformis* 三龄幼虫保持前一个龄期的角质层,具有保护作用。它使幼虫的过冷却程度达到 -25°C ,阻止了线虫在低温环境中被接种结冰。如果将外鞘进行部分移去或完全移去,则抗接种结冰的线虫数量比例会有所减少或显著减少,说明接触冰的表皮面积越大,线虫受到接种结冰的机会也就越多。在线虫的脱皮过程中,线虫的耐寒对策将会随之由避冻转变为耐冻^[1]。此外,西兰异小杆线虫(*Heterorhabditis zealandica*)的耐寒性研究发现,其采取避冻对策也是由于外鞘的保护性作用^[23]。同样,卵壳也具有和外鞘相同的作用。马铃薯金线虫(*Globodera rostochiensis*)的未孵化二龄幼虫由于卵壳的保护作用,能够避免结冰,从而比孵化的二龄幼虫更能耐受低温胁迫^[24]。因此,外鞘和卵壳的有无,在决定线虫采取何种耐寒对策时起着重要的作用。

节肢动物耐寒性研究的结果表明,耐冻和避冻二者独立存在^[25]。然而,线虫耐寒性研究发现两种对策能够相互渗透于同一线虫的耐寒过程中。当耐冻线虫 *P. davidi* 去除表面水后,在低温的空气介质中并不结冰,其耐寒对策转变为避冻,过冷却点至少能达到 -60°C ^[20]。*T. colubriformis* 的三龄幼虫,虽然具有保护性外鞘,但仍有一些个体受到接种性结冰。这种线虫能通过同时采用两种耐寒对策来抵御低温的胁迫^[1]。由此说明,线虫的耐寒性具有一定的表型可塑性,能够根据环境的变化,采取最优化的耐寒对策。

3 线虫的耐寒机制

有关线虫的耐寒机制,目前还不是十分清楚。但是可以预测,对于具有耐冻对策的线虫而言,耐寒机制是有助于线虫能够在较高的亚致死低温下建立一种保护性结冰,以及在温度回升的过程中起到抑制冰发生重结晶的作用。而对具有避冻对策的线虫而言,耐寒机制则是有助于线虫缺乏冰核剂,从而发生过冷却现象,并维

持机体的过冷却状态,降低过冷却点。将线虫的耐寒机制归类,大致有如下几种:

3.1 特殊发育阶段的形成

许多寄生线虫将在适宜的环境(寄主)中完成其生活史部分,仅在一些特定的发育阶段形成抗性机制来抵御不良的环境胁迫。为害甘薯的马铃薯腐烂线虫(*Ditylenchus destructor*),通常以幼虫或部分成虫在土壤中越冬^[26]。为害松树的松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*),在冬季不经历正常的三龄幼虫时期,生活史由繁殖型阶段转变为分散型阶段^[27],这个发育阶段的线虫在形态结构上有了一些适应性变化,如分散型的第三龄幼虫角质层显著增厚,肠内积聚脂小滴,能够抗低温和干燥等不良环境^[26,27]。

3.2 低温驯化作用

许多南极线虫冬季种群的过冷却点低于夏季种群的过冷却点,可能是高过冷却点线虫和低过冷却点线虫的数量比例发生变化而导致的结果,由此也反映线虫发生低温驯化反应^[3~5]。大多数研究发现:经过冷驯化后,线虫的耐寒能力得到增强^[8,28]。但耐寒能力的增强程度受到不同低温驯化方式的限制。夜蛾斯氏线虫(*Steinernema feltiae*)经过突然性降温锻炼后,耐寒力有了显著增强;而嗜菌异小杆线虫(*Heterorhabditis bacteriophora*)经过逐渐性降温锻炼后,其耐寒力增强程度比经过突然性降温锻炼后的耐寒力增强程度要更高^[10]。此外,研究发现,低温驯化能够启动一些抗冻物质(海藻糖、甘油)的产生和积累^[8,29,30]。

3.3 低分子量抗冻物质的聚集

线虫能够合成多种低分子量的糖或醇,已知这些物质在其它生物体中起到抗冻保护作用。海藻糖是最重要的抗冻物质。

海藻糖(Trehalose),是由两个葡萄糖分子以 $\alpha, \alpha_2(1 \rightarrow 1)$ 键结合而成的非还原性双糖。它在许多线虫的低温适应过程中出现聚集,并且能够促进线虫的耐寒性^[8,29,30]。巴特斯细颈线虫(*Nematodirus battus*)的卵经过5℃低温处理后,体内的海藻糖含量达到111.59 $\mu\text{g}/\text{ul}$ ^[31],足够引起0.5 μl 双蒸水的过冷却点显著下降^[8]。海藻糖在线虫体内主要通过两种机制提高线虫耐寒性^[32]。海藻糖的羟基能够与膜磷脂的极性头部的磷酸盐形成氢键,这样就可扩大磷脂单分子层,抑制因体内水分降低所引起的膜和凝胶的转相,从而在低温环境中有效地保护生物膜结构。海藻糖的羟基能与蛋白质的极性基团形成氢键,在蛋白质的外周形成一层水化膜。另外,海藻糖作为非还原性糖,不参与Maillard反应,并且还能够抑制这种生化反应,减少了蛋白质在脱水的过程中与糖的结合。通过这两种方式,海藻糖能够实现在低温环境下维持蛋白质结构的稳定。

然而,并非所有线虫的耐寒性增强均与海藻糖的积累呈正相关,如斯氏线虫(*Steinernema riobrave*)经冷驯化后,其海藻糖增加水平虽然不高,但其耐寒能力却有了非常显著的提高,因而认为,线虫的耐寒能力还与其它一些抗冻保护剂的产生有关^[12]。已知线虫也能够合成甘油、肌糖、核糖醇和山梨醇等多元醇^[33]。低温驯化的*P. davidi*经气相色谱分析,体内合成的抗冻物质除了海藻糖外,还有甘油^[30]。只是甘油的含量太低,而不被认为在线虫的抗寒性中起重要作用^[34]。

3.4 高分子抗冻蛋白的产生

近年来在一些生物体内发现了各种与耐寒性相关的高分子蛋白,如冰核蛋白(INPs, ice-nucleating proteins)、脂蛋白(LPs, lipoproteins)、抗冻蛋白(AFPs, antifreeze proteins)或称热滞蛋白(THPs, thermal hysteresis proteins)。对于这些影响冰形成和稳定的蛋白,Wharton等人将其统称为冰活化蛋白(IAPs, ice-active proteins)^[35]。其中,冰核蛋白和耐冻蛋白也纳入到线虫耐寒性研究。预计冰核蛋白在耐冻线虫中存在,能够诱导虫体在较高的亚致死温度下形成冰,从而避免细胞内液的进一步结冰。然而,研究并没有发现最耐寒的*P. davidi*具有冰核蛋白^[36]。抗冻蛋白能够导致生物体产生热滞活性(在冰晶出现时熔点与冰点之间的差异)。Wharton等人根据线虫热滞活性很弱或者根本就没有的观察结果,认为抗冻蛋白在线虫体内缺乏^[37]。事实上,有研究表明*P. davidi*确实产生具有AFP特性的蛋白,能抑制冰核的进一步增长^[36,38,39]。

此外,研究发现在*P. davidi*体内还存在另一种冰活化蛋白^[40]。这种蛋白由于具有抑制冰晶重结晶的特性,被命名为抑制再结晶蛋白(RIPs, recrystallisation-inhibiting proteins)^[35]。在恒定或变化的零下低温情况下,冰

晶可以发生再结晶。再结晶将会使得小冰晶的尺寸增大,整个冰晶的分布以大冰晶为主,从而极有可能对结冰生物造成损伤^[41]。因此,抑制再结晶蛋白对于支持结冰生物存活下来具有重要作用。目前,该蛋白的理化特性^[35]和分子结构^[42]已有研究报道。今后,有关其在生物耐寒过程中的作用还有待进一步研究。

3.5 热休克蛋白的产生

所有生物当暴露在高温(亚致死温度)或其它一些胁迫的时候,机体能被诱导产生热休克蛋白(Hsps, heat shock proteins)。热休克蛋白在一些昆虫遭受低温或高温刺激时都能诱导合成,促使虫体的耐寒和耐热能力明显提高。热休克蛋白在自由生活和寄生生活的线虫中也都有发现^[43,44]。3种旋毛虫(*Trichinella nativa*, *T. spiralis*和*T. nelsoni*)受到冷刺激后,Hsp70的含量相比对照水平都有了显著增加^[44]。但目前有关热休克蛋白与线虫耐寒能力的关系尚无明确的研究证明。

4 结束语

线虫具有多种优势,如许多线虫可进行实验培养,且培养周期不长;身体结构透明,可在低温显微镜下直接观察体内结冰;线虫结构简单,容易进行突变体分离和遗传分析。因此,它是研究生命体如何耐受低温胁迫的重要模式生物,为低温生物学理论研究提供丰富的内容。此外,线虫的耐寒性对于解释种群动态,指导有益线虫的低温保存和有害线虫的防治而具有重大的应用价值。

综合多年的研究结果,表明线虫在低温下采用多种耐寒对策和机制。因此,我们需要从多个角度更深层次地探讨线虫的耐寒性:对寒冷敏感型线虫的研究。在节肢动物的耐寒性研究中,耐寒性并不局限在耐冻和避冻两种类型内,还包括耐受寒冷型(chill tolerance)、寒冷敏感型(chill susceptible)以及机会主义型(opportunistic survival)^[45]。爪哇根结线虫(*Meloidogyne javanica*)和秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)已被证实属于寒冷敏感型线虫^[46]。目前,有关这一类型线虫受寒冷伤害(chilling injury)开展的研究非常少。对线虫寄生阶段的耐寒对策研究。线虫将近有一半的种类是植物或动物的寄生线虫。然而,线虫耐寒性研究主要限定在自由生活的线虫,或者处于自由生活状态的寄生线虫范围内。只有少量研究表明,线虫能够在冰冻寄主残体中存活下来,如旋毛虫(*T. spiralis*)和伪旋毛形线虫(*T. pseudospiralis*)两种幼虫,能够在羊的肌肉组织中经受一个月的低温仍能存活^[47]。有关线虫在寄主体内采取何种耐寒对策还不清楚,推测可能与寄主的耐寒对策有关。如果寄主采取耐冻对策,寄生线虫可能也采取相同的对策,或者通过某种途径阻止来自寄主冰核引发的结冰。如果寄主采取避冻对策,那么寄生线虫的过冷却点预计至少和其寄主一样的低^[48]。对交叉胁迫的研究。大多数研究都把胁迫因素简单化,分开讨论线虫在单个胁迫情况下的反应。其实,线虫受到低温胁迫的同时,还伴随着其它胁迫。例如,当溶液开始结冰时,由于盐离子不断地从逐渐增大的冰晶中排出,而造成未结冰的部分的渗透浓度升高。线虫将会受到高渗透压力的胁迫而脱水,最终可导致机体避免接种性结冰,提高自身的耐寒性^[49]。此外,随着分子生物学在各个研究领域的渗透,加上一些线虫的基因组信息获得破译,线虫耐寒性研究有望在分子水平上获得更大的突破。

References:

- [1] Wharton D A, Allan G S. Cold tolerance mechanisms of the free-living stages of *Trichostrongylus colubriformis* (Nematoda). *J. Exp. Biol.*, 1989, 145: 353 ~ 370.
- [2] Belair G. Winter survival of the northern root-knot nematode *Meloidogyne hapla* in organic soil. *Can. J. Plant. Sci.*, 1985, 65: 435 ~ 439.
- [3] Pickup J. Seasonal variation in the cold hardiness of a free-living predatory nematode, *Coomansus gertachei* (Mononchidae). *Polar. Biol.*, 1990, 10: 307 ~ 315.
- [4] Pickup J. Seasonal variation in the cold hardiness of three species of free-living antarctic nematode. *Funct. Ecol.*, 1990, 4: 257 ~ 264.
- [5] Pickup J. Strategies of cold-hardiness of three species of Antarctic dorylaimid nematodes. *J. Comp. Physiol. [B]*, 1990, 160: 167 ~ 173.
- [6] Luyet B J, Hartung M C. Factors in the revival of *Anguilla aceti* after its solidification in liquid air. *Am. J. Physiol.*, 1941, 133: 368 ~ 369.
- [7] DeConinck L A P. On the resistance of the free-living nematode *Anguilla silusiae* to low temperatures. *Biodynamica*, 1951, 7: 77 ~ 84.
- [8] Ash C P J, Atkinson H J. *Nematodirus battus*: development of cold hardiness in dormant eggs. *Exp. Parasitol.*, 1986, 62: 24 ~ 28.
- [9] Wharton D A, Rowland J J. A thermoelectric microscope stage for the measurement of the supercooling points of microscopic organisms. *J. Microsc.*, 1984, 134: 299 ~ 305.
- [10] Brown I M, Gaugler R. Cold tolerance of steinernematid and heterorhabditid nematodes. *J. Therm. Biol.*, 1996, 21: 115 ~ 121.
- [11] Wharton D A, Ferns D J. Survival of intracellular freezing by the Antarctic nematode *Panagrolaimus davidi*. *J. Exp. Biol.*, 1995, 198: 1381 ~ 1387.

- [12] Jagdale G B, Grewal P S. Acclimation of entomopathogenic nematodes to novel temperatures: trehalose accumulation and the acquisition of thermotolerance. *Int. J. Parasitol.*, 2003, 33: 145 ~ 152.
- [13] Sulston J, Hodgkin J. Methods. In the nematode *Caenorhabditis elegans*. In: WB Wood. Cold Spring Harbour Laboratory, 1988. 587 ~ 606.
- [14] Jing X H, Kang L. Overview and evaluation of research methodology for insect cold hardiness. *Entomological Knowledge*, 2004, 41: 7 ~ 10.
- [15] Wharton D A, Goodall G, Marshall C J. Freezing rate affects the survival of a short-term freezing stress in *Panagrolaimus davidi*, an Antarctic nematode that survives intracellular freezing. *Cryo-lett.*, 2002, 23: 5 ~ 10.
- [16] Asahina E. Frost resistance in a nematode *Aphelenchoides rhizembosi*. *Low. Temp. Sci.*, 1959, B17: 51 ~ 62.
- [17] Sayer R M. Cold-hardiness of nematodes. Effects of rapid freezing on the eggs and larvae of *Meloidogyne incognita* and *M. hapla*. *Nematologica*, 1964, 10: 168 ~ 179.
- [18] Wharton D A, Goodall G, Marshall C J. Freezing survival and cryoprotective dehydration as cold tolerance mechanisms in the Antarctic nematode *Panagrolaimus davidi*. *J. Exp. Biol.*, 2003, 206: 215 ~ 221.
- [19] Wharton D A. A functional biology of nematodes. London: Croom Helm, 1986.
- [20] Wharton D A, Brown I M. Cold tolerance mechanisms of the Antarctic nematode *Panagrolaimus davidi*. *J. Exp. Biol.*, 1991, 155: 629 ~ 641.
- [21] Wharton D A, Block W. Freezing tolerance of some Antarctic nematodes. *Funct. Ecol.*, 1993, 7: 578 ~ 584.
- [22] Wharton D A, Block W. Differential scanning calorimetry studies on an Antarctic nematode (*Panagrolaimus davidi*) which survives intracellular freezing. *Cryobiology*, 1997, 34: 114 ~ 121.
- [23] Wharton D A, Surry M R. Cold tolerance mechanisms of the infective larvae of the insect parasitic nematode *Heterorhabditis zealanditis* Poinar. *Cryo-lett.*, 1994, 15: 353 ~ 360.
- [24] Wharton D A, Perry R N, Beane J. The role of the eggshell in the cold tolerance mechanisms of the unhatched juveniles of *Globodera rostochiensis*. *Fundam. Appl. Nematol.*, 1993, 16: 425 ~ 431.
- [25] Zachariassen K E. Physiology of cold tolerance in insects. *Physiol Rev*, 1985, 65: 799 ~ 832.
- [26] Lin M S, Liu X Y, Wen L, Fang Z H D. Observations on the overwintering of *Ditylenchus destructor* in sweet potato and its tolerance against pH and salt concentration. *Jiangsu J. of Agr. Sci.*, 1997, 13: 36 ~ 39.
- [27] Yang B J, Tang J, Wang Y Y, et al. *Bursaphelenchus xylophilus*. Beijing: Chinese Forests Press, 2003.
- [28] Forge D J, Macquidwin A E. Cold hardening of *Meloidogyne hapla* second-stage juveniles. *J. Nematol.*, 1990, 22: 101 ~ 105.
- [29] Grewal P S, Jagdale G B. Enhanced trehalose accumulation and desiccation survival of entomopathogenic nematodes through cold preacclimation. *Biocontr. Sci. Technol.*, 2002, 12: 533 ~ 545.
- [30] Wharton D A, Judge K F, Worland M R. Cold acclimation and cryoprotectants in a freeze tolerant Antarctic nematode, *Panagrolaimus davidi*. *J. Comp. Physiol. [B]*, 2000, 170: 321 ~ 327.
- [31] Ash C P J, Atkinson H J. Evidence for a temperature-dependent conversion of lipid reserves to carbohydrate in quiescent eggs of the nematode, *Nematodirus battus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1983, B76: 603 ~ 610.
- [32] Behm C A. The role of trehalose in the physiology of nematodes. *Int. J. Parasitol.*, 1997, 27: 215 ~ 229.
- [33] Womersley C. Biochemical and physiological aspects of anhydrobiosis. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1981, B70: 669 ~ 678.
- [34] Wharton D A, Young S R, Barrett J. Cold tolerance in nematodes. *J. Comp. Physiol. [B]*, 1984, 154: 73 ~ 77.
- [35] Wharton D A, Barrett J, Goodall G, Marshall C J, Ramlov H. Ice-active proteins from the Antarctic nematode *Panagrolaimus davidi*. *Cryobiology*, 2005, 51: 198 ~ 207.
- [36] Wharton D A, Worland M R. Ice nucleation activity in the freezing-tolerant Antarctic nematode *Panagrolaimus davidi*. *Cryobiology*, 1998, 36: 279 ~ 286.
- [37] Wharton D A. The environmental physiology of Antarctic terrestrial nematodes: a review. *J. Comp. Physiol. [B]*, 2003, 173: 621 ~ 628.
- [38] Olsen T M, Duman J G. Maintenance of the supercooled state in overwintering pyrochroid beetle larvae, *Dendroides canadensis*: role of hemolymph ice nucleators and antifreeze proteins. *J. Comp. Physiol. [B]*, 1997, 167: 105 ~ 113.
- [39] Olsen T M, Duman J G. Maintenance of the supercooled state in the gut of overwintering pyrochroid beetle larvae, *Dendroides canadensis*: role of gut ice nucleators and antifreeze proteins. *J. Comp. Physiol. [B]*, 1997, 167: 114 ~ 122.
- [40] Ramlov H, Wharton D A, Wilson P W. Recrystallization in a freezing-tolerant Antarctic nematode, *Panagrolaimus davidi*, and an alpine weta, *Hemideina maori* (Orthoptera, Stenopelmidae). *Cryobiology*, 1996, 33: 607 ~ 613.
- [41] Knight C A, Duman J G. Inhibition of recrystallization of ice by insect thermal hysteresis proteins: a possible cryoprotective role. *Cryobiology*, 1986, 23: 256 ~ 262.
- [42] Marshall C J. Ice active proteins from an Antarctic nematode, *Panagrolaimus davidi*. *Cryo-lett.*, 2003, 24: 404.
- [43] Heschl M F, Baillie D L. The Hsp70 multigene family of *Caenorhabditis elegans*. *Comp. Biochem. Physiol. [B]*, 1990, 96(4): 633 ~ 637.
- [44] Martinez J, Perez-Serrano J, Bernadina W E, Rodriguez-Cabeiro F. Stress response to cold in *Trichinella* species. *Cryobiology*, 2001, 43(4): 293 ~ 302.
- [45] Bale J S. Classes of insect cold hardiness. *Funct. Ecol.*, 1993, 7: 751 ~ 753.
- [46] Lyons J M, Keith A D, Thomason I J. Temperature-induced phase transitions in nematode lipids and their influence on respiration. *J. Nematol.*, 1975, 7: 98 ~ 104.
- [47] Theodoropoulos G, Kapel C M O, Webster P, Saravanas L, Zaki J, Koutsotolis K. Infectivity, predilection sites, and freeze tolerance of *Trichinella* spp. in experimentally infected sheep. *Parasitol. Res.*, 2000, 86: 401 ~ 405.
- [48] Wharton D A. Cold tolerance strategies in nematodes. *Biol. Rev.*, 1995, 70: 161 ~ 185.
- [49] Forge T A, MacQuidwin A E. Effects of water potential and temperature on survival of the nematode *Meloidogyne hapla* in frozen soil. *Can. J. Zool.*, 1992, 70: 1553 ~ 1560.

参考文献:

- [14] 景晓红, 康乐. 昆虫耐寒性的测定与评价方法. *昆虫知识*, 2004, 41: 7 ~ 10.
- [26] 林茂松, 刘新宇, 文玲, 方中达. 甘薯茎线虫越冬虫态的类脂体和线虫对 pH、盐浓度适应性的研究. *江苏农业学报*, 1997, 13: 36 ~ 39.
- [27] 杨宝君, 汤坚, 王玉燃, 等. 松材线虫病. 北京: 中国林业出版社, 2003.