

昆虫病原线虫与 Bt 联用对黏虫的防治效果

李而涛¹, 曹雅忠¹, 张 帅¹, 李克斌¹, 李金桥¹,
李 晓峰¹, 张海茹², 尹 姣^{1*}

(1. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193;

2. 河北省承德市宽城满族自治县农牧局, 承德 067600)

摘要 为明确昆虫病原线虫与 Bt 联用后对黏虫致病力的协同增效作用, 本研究分别测定了自主分离获得的一种新嗜菌异小杆属线虫 *Heterorhabditis* sp. (LF) 和实验室保存的 *Heterorhabditis bacteriophora* (Hb) 线虫对黏虫的致病力; 比较了两种 Bt 菌株 (HD1 和 G03) 对黏虫的毒力差异, 开展了 G03 对黏虫的毒力测定试验; 明确了室内和田间试验条件下两种线虫 (LF 和 Hb) 与 G03 联用对黏虫的交互作用。结果表明, 黏虫的死亡率随两种线虫剂量的增加而增加, 在 100 IJs/mL 剂量下黏虫死亡率均达到了 90% 以上; Bt 菌株 G03 对黏虫的毒力显著高于 HD1, G03 对黏虫的 LC_{50} 为 3.55×10^{10} cfu/mL; 室内条件下 LF 25 IJs/mL + G03 (LC_{50}) 联用处理 6 d 对黏虫的防治具有显著的协同增效作用, 较单独 LF 线虫和 G03 处理死亡率分别提高了 50.72 和 50.0 百分点, Hb 25 IJs/mL + G03 (LC_{50}) 联用处理 6 d 对黏虫的防治也具有显著的协同增效作用, 较单独 Hb 线虫和 G03 处理死亡率分别提高了 76.67 和 50.0 百分点; 田间小区试验表明线虫与 Bt 联用对黏虫的防治具有协同的加成或增效作用, 其中 LF 线虫与 G03 联用具有显著的增效作用, 较单独 LF 线虫和 Bt 处理死亡率分别提高了 47.96 和 46.80 百分点。本研究为黏虫的防治提供了新的技术措施, 拓宽了黏虫生防研究的思路。

关键词 昆虫病原线虫; Bt; 黏虫; 协同增效

中图分类号: S 433.4; S 476 **文献标识码:** B **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018493

Control efficacy of the combined application of the entomopathogenic nematode and Bt against the oriental armyworm, *Mythimna separata* (Walker)

LI Ertao¹, CAO Yazhong¹, ZHANG Shuai¹, LI Kebin¹, LI Jinqiao¹, LI Xiaofeng¹, ZHANG Hairu², YIN Jiao¹

(1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Bureau of Agriculture and Animal Husbandry of Kuancheng Manzu Autonomous County, Chengde City, Hebei Province, Chengde 067600, China)

Abstract In this study, we examined possible synergistic effects resulted from a combined application of the entomopathogenic nematode and Bt based on their virulence against *Mythimna separata*. The virulence of a newly isolated nematode *Heterorhabditis* sp. (LF) and a laboratory-maintained nematode *Heterorhabditis bacteriophora* (Hb) against *Mythimna separata* was determined and the virulence of two Bt strains (HD1 and G03) against *M. separata* was compared. The interactive effect of two nematodes (LF and Hb) and G03 on *M. separata* was determined under both laboratory and field conditions. The results showed that the mortality of *M. separata* increased with the dose of two nematodes. The mortality of *M. separata* reached more than 90% when 100 IJs/mL was applied. The LC_{50} value of of Bt strain G03 was 3.55×10^{10} cfu/mL, significantly higher than that of HD1. Compared to single application of nematode or Bt, combined application exhibited a significant synergistic effect. The mortality of *M. separata* increased by 50.72% and 50.0% when LF 25 IJs/mL + G03 (LC_{50}) was applied for 6 days under indoor conditions, respectively. The application of Hb 25 IJs/mL + G03 (LC_{50}) exhibited a significant synergistic effect of 76.67% and 50.0% under indoor conditions after 6 days compared to the controls (Hb or G03

收稿日期: 2018-12-19

修订日期: 2018-12-28

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFE013040, 2018YFD0201000); 公益性行业(农业)科研专项(201403031)

* 通信作者 E-mail: jyin@ippcaas.cn

applied alone), respectively. Field trials showed that a combined application of nematodes and Bt had additive or synergistic effects on the mortality of *M. separata*. The combination of LF nematode and G03 showed a significant synergistic effect of 47.96% and 46.80%, respectively, higher than nematodes and Bt when applied alone. This study not only provides a new technical measure for the prevention and control of *M. separata* but also expands the research scope of biological control of *M. separata*.

Key words entomopathogenic nematode; Bt; *Mythimna separata*; synergism

黏虫 *Mythimna separata* (Walker) 是鳞翅目夜蛾科的一种典型的季节性远距离迁飞昆虫, 也是我国及其他亚洲和澳洲国家粮食作物上的重大害虫^[1]。其食性杂, 可取食 16 科 100 多种植物, 大发生时不仅能将植株叶片吃光, 还可取食禾本科作物的穗部, 给粮食生产带来严重威胁^[2]。近年来, 由于作物种植结构、气候条件和农田生境等因素的影响, 黏虫在我国作物间、地区间和代次间的发生已明显变化, 其发生为害呈日趋严重态势。2012 年—2013 年我国黏虫连续暴发, 发生面积合计 1 743.7 万 hm^2 , 粮食损失高达 178.4 万 t, 其发生面积之大、损失之重, 均属历史罕见^[3]。目前, 玉米成为了黏虫为害的第一大作物^[3]。长期以来, 防控黏虫一直以化学防治为主, 不仅导致田间种群抗药性、适应能力增强, 而且造成了环境污染、农产品质量安全隐患等严重后果^[4-5]。为实现黏虫的综合治理, 亟须开辟能够减少环境污染的绿色防控途径。

昆虫病原线虫是昆虫的专性寄生性天敌, 具有杀虫能力强、杀虫谱广、主动搜索寄主、对人畜、环境安全等优点, 是国际上新型的绿色高效生物杀虫剂^[6]。昆虫病原线虫可以通过辨识昆虫排泄物中某些物质(如尿酸、尿囊素、黄嘌呤、氨和精氨酸等)、粪便散发出的气味、呼吸释放的 CO_2 等多种途径主动搜寻到寄主昆虫^[7], 然后侵染期幼虫通过昆虫的口、肛门、气门等自然孔口、节间膜或者伤口进入体内, 并穿透肠壁或气管壁进入血管, 随后释放其肠腔内携带的共生细菌并大量繁殖, 一方面线虫侵入时对昆虫造成机械损伤, 另一方面共生菌分泌杀虫毒素蛋白, 抑制免疫反应, 破坏昆虫生理防御机能, 同时共生菌产生胞外酶分解昆虫, 最终导致昆虫患败血症而死亡^[8-11]。对黏虫有效的昆虫病原线虫已有报道, 如室内应用夜蛾斯氏线虫 *Steinernema feltiae* Beijing 品系处理 3 龄黏虫后, 黏虫死亡率达 63.2%~78.9%^[12]; 但昆虫病原线虫在实际应用中的防效除易受温度、湿度、紫外等不良因素影响外, 其速效性、生产成本、储存技术等方面的缺陷也制约其普及

应用^[13-14]。为了突破这些限制因素的束缚, 更程度地发挥病原线虫的生防效果, 研究者对改善病原线虫作用效果的增效措施展开了一系列的研究, 已获得一些较好的结果。例如将小卷蛾斯氏线虫 *Steinernema carpocapsae* 与氯虫苯甲酰胺联用 72 h 可以使黏虫死亡率达 90% 以上^[15]; 类似研究中将昆虫病原线虫 *Heterorhabditis indica* 与虱螨脲联用可实现对草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 的理想控制^[16]。

作为 20 世纪应用最成功的微生物杀虫剂, 苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 对鳞翅目、双翅目、鞘翅目等多种害虫以及一些线虫、螨类和原生动物具有特异性的杀虫活性^[17-19]。Bt 的主要杀虫物质为芽胞期形成的具有不同形态的伴胞晶体, 即杀虫晶体蛋白, 这些杀虫晶体蛋白在昆虫中肠碱性环境中溶解并被酶活化, 活化后的毒素与中肠上皮细胞表面的特异性受体结合, 插入细胞膜形成孔洞, 引发上皮细胞裂解^[20-21], 这些特点为昆虫病原线虫及其共生菌快速进入昆虫的血腔提供了有利条件, 为两者联用提供了理论基础。因此本研究开展了嗜菌异小杆属线虫与 Bt 联用对黏虫防治效果的试验, 研究结果可为黏虫的生物防治研究拓宽思路, 同时有助于推动黏虫的绿色防控技术的发展。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试昆虫与饲养方法

试验所用黏虫均为本实验室室内饲养。虫源由中国农业科学院植物保护研究所迁飞害虫组提供, 幼虫用新鲜玉米叶片饲喂, 饲养温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光周期 16 L//8 D, 相对湿度 70%, 成虫用 10% 的蜂蜜水补充营养。

1.1.2 供试昆虫病原线虫

嗜菌异小杆线虫 *Heterorhabditis bacteriophora* 由南开大学线虫研究室提供(简称 Hb)。另一种线虫为本实验室在 2017 年 5 月初从中国农业科学院

廊坊中试基地花生试验田采集的土样中分离获得,其诱集及收集方法参考 White(1927)^[22],暂时将其命名为嗜菌异小杆线虫 *Heterorhabditis* sp. (简称 LF)。两种线虫在生测前均用大蜡螟进行活体扩繁,扩繁方法参考 Gaugler^[23]。将收集的侵染期线虫(infective juveniles,简称 IJs)转入小烧杯纯化后以浅水层法于(7±1)℃保存,时间不超过 15 d^[24]。

1.1.3 供试菌株

Bt 菌株 HD1 和 G03 均由中国农业科学院植物保护研究所生物技术组提供。

生测前将两种 Bt 菌株接种于 LB 固体培养基上划线过夜培养,纯化后大量接种于 1/2 LB 固体培养基,30℃培养至晶体产生,油镜检验,观察到芽胞释放量至 50%以上(约 45 h)即可;刮取培养好的菌株,用少量无菌水悬浮于 50 mL 灭菌离心管中,用菌落形成单位 colony-forming units(cfu)计数定量后备用。

1.2 试验方法

1.2.1 昆虫病原线虫 LF 与 Hb 对黏虫的致病力测定

在玻璃培养皿中($d = 13$ cm)加入 50 g 左右的灭菌土(湿度 18%左右、过 40 目筛),铺平。将两种线虫的侵染期幼虫分别用无菌水稀释成 25、50、75、100、125 IJs/mL 5 个浓度梯度,各浓度分别取 1 mL 摇匀的线虫悬浮液均匀滴到放有适量新鲜玉米叶为饲料的培养皿中,每皿分别接入 20 头健康、个体均匀的 3 龄黏虫幼虫,每个处理设 3 个重复同时以灭菌水作为对照。各处理置于人工气候箱中正常饲养。根据需要及时添加玉米叶,每隔 24 h 观察并记录黏虫死亡情况。

1.2.2 Bt 菌株 HD1 和 G03 对黏虫的毒力比较

在玻璃培养皿中($d = 13$ cm)加入 50 g 左右的灭菌土(湿度 18%左右、过 40 目筛),铺平。将培养好的 Bt 菌株 HD1 和 G03 用无菌水稀释为 1.5×10^{12} cfu/mL,将新鲜玉米叶片在菌悬液中浸渍约 1 min,拿出后自然晾干,取适量放入培养皿中,每皿分别接入 20 头健康、个体均匀的 3 龄黏虫幼虫。每个处理设 3 个重复,同时以浸渍无菌水作为对照。各处理置于人工气候箱中正常饲养。根据需要及时添加浸渍菌液后并晾干的玉米叶,每隔 24 h 观察并记录黏虫死亡情况。

1.2.3 Bt 菌株 G03 对黏虫的毒力测定

毒力测定方法同 1.2.2,其中将培养好的 Bt 菌

株 G03 用无菌水稀释成 1.0×10^{10} 、 0.5×10^{11} 、 1.0×10^{11} 、 0.5×10^{12} 、 1.0×10^{12} cfu/mL 5 个浓度梯度,每隔 24 h 统计黏虫死亡情况并计算 LC_{50} 。

1.2.4 昆虫病原线虫 LF 和 Hb 分别与 Bt 联用对黏虫致病力的交互作用

将线虫 LF 和 Hb 的侵染期幼虫分别用无菌水稀释成 25 IJs/mL 和 50 IJs/mL 两个浓度梯度,Bt 菌株 G03 浓度设为 LC_{50} (3.55×10^{10} cfu/mL),将不同浓度的 LF、Hb 线虫与 G03 菌株两两组合后分别测定其对黏虫的致病力,各组合分别为 A: LF 25 IJs/mL+G03(LC_{50}); B: LF 50 IJs/mL+G03(LC_{50}); C: Hb 25 IJs/mL+G03(LC_{50}); D: Hb 50 IJs/mL+G03(LC_{50})。各组合处理方法如下:在玻璃培养皿中($d = 13$ cm)加入 50 g 左右的灭菌土,铺平。将新鲜玉米叶片在 G03 菌悬液中浸渍约 1 min,拿出后自然晾干,取适量放入培养皿中,每皿分别接入 20 头健康、个体均匀的 3 龄黏虫幼虫。待黏虫取食经 G03 菌悬液浸渍的玉米叶片 48 h 后^[25],取 1 mL 摇匀的线虫悬浮液均匀滴到培养皿中,每个组合处理设 3 个重复,同时以喂食未处理玉米叶片为对照。各处理置于人工气候箱中正常饲养。根据需要及时添加浸渍菌液后并晾干的玉米叶,每隔 24 h 观察并记录黏虫死亡情况。

1.2.5 昆虫病原线虫与 Bt 联用对黏虫致病力交互作用的田间试验

6 月中旬播种玉米,生长至喇叭口期时,选择天气连续为阴天或多云时开展田间试验。试验田共分为 18 个小区,每小区面积为 12 m^2 ($3 \text{ m} \times 4 \text{ m}$),并罩有高度为 2 m 的 40 目网纱。各小区之间间隔 2 m。试验共设 6 个处理,分别为单独 LF、Hb 线虫处理,单独 G03 处理,LF 与 G03 联用、Hb 与 G03 联用处理,清水对照处理,每处理设 3 个重复。LF、Hb 线虫浓度为 2.5×10^3 IJs/m²,Bt 菌株 G03 浓度为 1.11×10^{16} cfu/m²。傍晚接虫,在每个小区的每株玉米的卷芯中放入 3 头 2 龄黏虫幼虫,田间适应 2 d 后,观察并统计每株上幼虫数并保证在喷施线虫或 Bt 前每株上只有 2 头 3 龄幼虫。整个试验均采用喷雾的方式将线虫和 Bt 均匀喷施在每个小区的玉米叶片和地面上,对于联用小区在 Bt 处理 48 h 后喷施线虫(傍晚)。每隔 24 h 观察并记录黏虫死亡情况。

1.3 数据分析

试验结果中黏虫的死亡率均为校正死亡率(%)。百分数值均经反正弦转换后在 Excel 2003 与 SPSS 17.0 统计软件上完成分析。处理之间的差异采用方差分析,然后采用 Duncan 氏法测验不同处理之间的差异显著性,概率水平设 $P<0.05$ 。毒力回归方程及致死中浓度用 probit 模型分析。

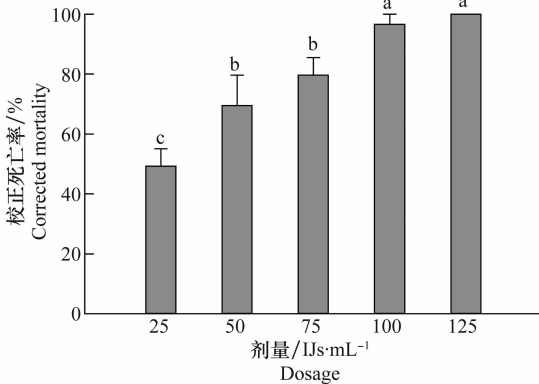
校正死亡率 = $\frac{\text{处理死亡率} - \text{对照死亡率}}{1 - \text{对照死亡率}} \times 100\%$ 。

由 χ^2 检验判断线虫与 Bt 联合作用类型^[26-28]。各处理昆虫的死亡率=死亡虫数除以处理总虫数,并且转换为校正死亡率。线虫与 Bt 联用对参试昆虫的期望致死数 M_E 由期望致死率 $M = M_N + M_B(1 - M_N)$,乘以参试昆虫总数计算而得,其中 M_N 和 M_B 分别为线虫和 Bt 单独处理时试虫的校正死亡率。 $\chi^2 = (M_{NB} - M_E)^2 / M_E$,其中 M_{NB} 为线虫与 Bt 联用时试虫的实际校正死亡数, M_E 为线虫与 Bt 联用时试虫的期望致死数。计算出的 χ^2 值与 χ^2 值表进行比较。当 $\chi^2 \geq 3.84(df=1 \text{ 和 } P=0.05)$ 及 $M_{NB} < M_E$ 时,显示两种杀虫因子联用表现为拮抗作用(antagonism,即两种杀虫因子联用后的毒力明显低于各因子毒力的总和);当 $\chi^2 < 3.84(df=1 \text{ 和 } P=0.05)$ 时,显示两种杀虫因子联用表现为加成作用(additivity,即两种杀虫因子联用后的毒力和各因子毒力的总和相似);当 $\chi^2 \geq 3.84(df=1 \text{ 和 } P=0.05)$ 及 $M_{NB} > M_E$ 时,显示两种杀虫因子联用表现为增效作用(synergism,即两种杀虫因子联用后的毒力明显超过各因子毒力的总和)。

2 结果与分析

2.1 昆虫病原线虫 LF 与 Hb 对黏虫的致病力

LF 线虫处理 6 d 后对黏虫致病力结果如图 1 所示:黏虫的死亡率随线虫剂量的增加而增加,在 100 IJs/mL 和 125 IJs/mL 剂量下黏虫死亡率均达到了 95%以上,且两者差异不显著($P>0.05$),但均显著高于 75 IJs/mL 处理的死亡率($P<0.05$);75 IJs/mL 与 50 IJs/mL 处理间差异不显著($P>0.05$),但均显著高于 25 IJs/mL 的处理($P<0.05$),25 IJs/mL 剂量处理后黏虫死亡率为 49.28%。Hb 线虫对黏虫致病力趋势与 LF 线虫类似(图 2),但 75 IJs/mL 与 50 IJs/mL 处理间黏虫死亡率差异显著($P<0.05$),25 IJs/mL 剂量下黏虫死亡率仅为 23.33%。可见,LF 线虫对黏虫致病力略高于 Hb 线虫。



图中柱上标不同字母表示不同剂量处理下校正死亡率差异显著。下同
Different letters on the bar indicate significant difference between different treatment. The same below

图 1 LF 线虫对黏虫的致病力

Fig. 1 Pathogenicity of LF nematodes to *Mythimna separata*

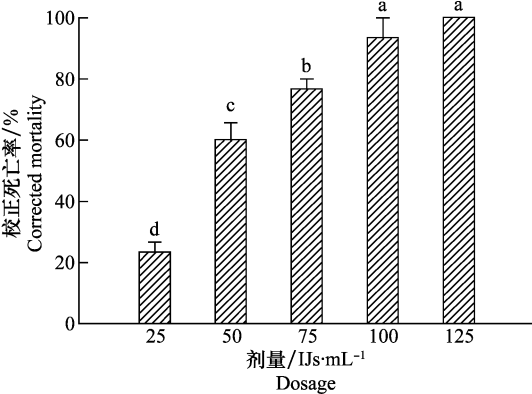
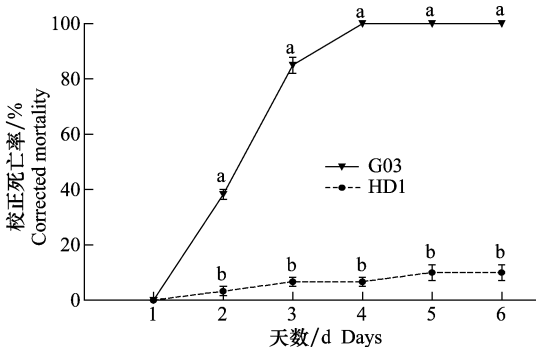


图 2 Hb 线虫对黏虫的致病力

Fig. 2 Pathogenicity of Hb nematodes to *Mythimna separata*



图中相同时间不同菌株处理间标不同字母表示差异显著($P<0.05$)
The different letters between different treatments at the same time indicate significant difference ($P<0.05$)

图 3 Bt 菌株 HD1 和 G03 对黏虫的毒力比较

Fig. 3 Comparison of the virulence between HD1 and G03 against *Mythimna separata*

2.2 Bt 菌株 HD1 和 G03 对黏虫的毒力比较

两种 Bt 菌株对黏虫毒力结果如图 3 所示:HD1 菌株对黏虫毒力较弱,处理 5 d 后黏虫死亡率仅为

10.0%，且以后不再增加；G03 菌株对黏虫毒力较强，4 d 后达到 100%；图中可以明显看出在处理 2 d 后的任何时间段 G03 对黏虫的毒力均显著高于 HD1 菌株($P<0.05$)，表明 G03 菌株具有更为广阔的应用前景。

2.3 Bt 菌株 G03 对黏虫的毒力测定

室内测定不同浓度下 G03 对黏虫的毒力，由动态图(图 4)可知：整体上黏虫死亡率随 Bt 浓度和处理时间的增加而增加；4 d 后死亡率增加趋势减缓，5 d 后基本上不再增加。用 1.0×10^{10} 、 0.5×10^{11} 、 1.0×10^{11} 、 0.5×10^{12} 、 1.0×10^{12} cfu/mL 的 Bt 浓度处理 6 d 后，黏虫死亡率分别达到了 28.33%、50.00%、70.00%、96.67%和 100.00%。由表 1 可知 G03 对

黏虫的致死中浓度 LC_{50} 为 3.55×10^{10} cfu/mL，相关系数为 0.956。

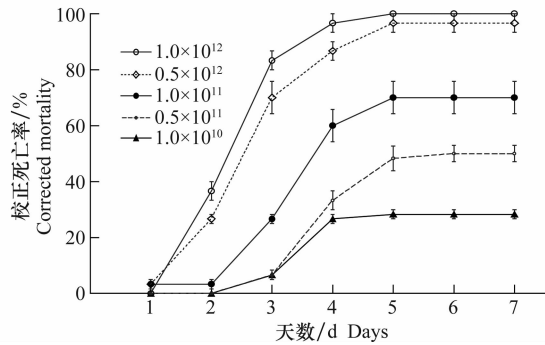


图 4 Bt 菌株 G03 不同浓度处理下黏虫的校正死亡率
Fig. 4 Corrected mortality of *Mythimna separata* treated by different concentrations of Bt strain G03

表 1 Bt 菌株 G03 对黏虫的室内毒力

Table 1 The virulence of G03 to <i>Mythimna separata</i>				
菌株 Strain	回归方程 Regression equation	LC_{50} /cfu · mL ⁻¹	95%置信限/cfu · mL ⁻¹ 95% confidence limit	相关系数 Correlation coefficient
G03	$y=-2.208+1.425x$	3.55×10^{10}	$1.44\times10^{10}\sim6.62\times10^{10}$	0.956

2.4 病原线虫 LF 和 Hb 分别与 Bt(G03)联用后对黏虫的致病作用

由表 2 可知，无论是病原线虫 LF 还是 Hb 与 Bt 菌株 G03 联用后都具有一定的协同作用。LF 25 IJs/mL 与 G03 联用(A)处理不同时间黏虫的死亡率均显著高于单独线虫处理($P<0.05$)，联用处理 6 d 黏虫的死亡率显著高于 LF 线虫或 Bt 单独处理($P<0.05$)，分别提高了 50.72 和 50.0 百分点，表现为增效作用($M_E=44.78$ ， $M_{NB}=60$ ， $\chi^2=5.17$)；LF 50 IJs/mL 与 G03 联用

处理不同时间的防治效果好于线虫或 Bt 单独处理($P<0.05$)，均表现为加成作用。Hb 25 IJs/mL 与 G03 联用处理不同时间差异显著($P<0.05$)，联用处理下黏虫的死亡率显著高于单独 Bt 处理($P<0.05$)，联用处理 6 d 黏虫的死亡率显著大于 Hb 线虫或 Bt 单独处理($P<0.05$)，分别提高了 76.67 和 50.0 百分点，表现为增效作用($M_E=37.00$ ， $M_{NB}=60.0$ ， $\chi^2=14.30$)；Hb 50 IJs/mL 与 G03 联用处理不同时间的防治效果均好于单独 Bt 处理($P<0.05$)，表现为加成作用。

表 2 LF、Hb 线虫分别与 G03 联用后对黏虫致病的交互作用¹⁾

Table 2 Interactive effects between LF and Hb nematodes with G03 against <i>Mythimna separata</i>								
组合 Combination	处理时间/d Treatment time	校正死亡率/% Corrected mortality			M_E	M_{NB}	χ^2	作用类型 Effect type
		D_N	D_B	D_{NB}				
A	2	(18.84±5.86)b	(33.33±3.33)a	(36.67±3.33)aC	27.53	22.00	1.11	加成
	4	(39.13±5.86)b	(50.00±2.89)a	(56.67±3.33)aB	41.74	34.00	0.04	加成
	6	(49.28±5.86)b	(50.00±2.89)b	(100.00±0.00)aA	44.78	60.00	5.17	增效
B	2	(22.22±8.95)b	(33.33±3.33)b	(43.33±3.33)aC	28.89	26.00	0.29	加成
	4	(42.51±3.38)b	(50.00±2.89)b	(83.33±3.33)aB	42.75	50.00	1.23	加成
	6	(69.57±10.14)b	(50.00±2.89)b	(100.00±0.00)aA	50.87	60.00	1.64	加成
C	2	(6.67±6.67)a	(33.33±3.33)b	(23.33±3.33)aC	22.67	14.00	3.31	加成
	4	(16.67±3.33)ab	(50.00±2.89)b	(56.67±6.67)aB	35.00	34.00	0.03	加成
	6	(23.33±3.33)c	(50.00±2.89)b	(100.00±0.00)aA	37.00	60.00	14.30	增效
D	2	(16.67±3.33)a	(33.33±3.33)b	(30.00±5.77)aC	26.67	18.00	2.82	加成
	4	(53.33±3.33)a	(50.00±2.89)b	(76.67±6.67)aB	46.00	46.00	0.00	加成
	6	(60.00±5.77)b	(50.00±2.89)b	(100.00±0.00)aA	48.00	60.00	3.00	加成

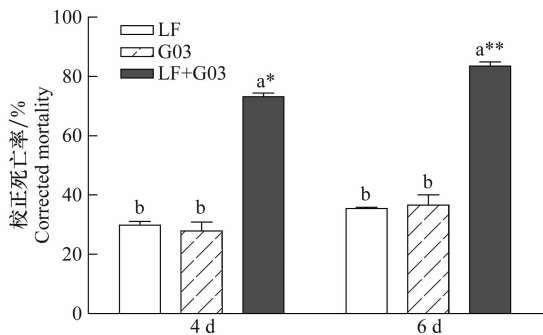
1) 同行数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)；各组合中同列数据后的不同大写字母表示差异显著($P<0.05$)；组合 A 为 LF 25 IJs/mL+G03(LC_{50})；组合 B 为 LF 50 IJs/mL+G03(LC_{50})；组合 C 为 Hb 25 IJs/mL+G03(LC_{50})；组合 D 为 Hb 50 IJs/mL+G03(LC_{50})； LC_{50} 为 3.55×10^{10} cfu/mL； D_N 、 D_B 、 D_{NB} 分别表示线虫处理、Bt 处理、线虫与 Bt 联用处理下黏虫的校正死亡率。Different lowercase letters in the same row and different uppercase letters in the same column indicate significant difference ($P<0.05$). The combination A is LF 25 IJs/mL+G03(LC_{50})；the combination B is LF 50 IJs/mL+G03(LC_{50})；the combination C is Hb 25 IJs/mL+G03(LC_{50})，and the combination D is Hb 50 IJs/mL+G03(LC_{50})。 LC_{50} is 3.55×10^{10} cfu/mL； D_N 、 D_B and D_{NB} are corrected mortality rates of *Mythimna separata* treated by nematodes, Bt, combined use of nematodes and Bt, respectively.

2.5 病原线虫 LF 和 Hb 分别与 Bt(G03)联用对黏虫致病力的田间试验

LF 线虫与 G03 联用田间效果如图 5 所示:线虫与 Bt 联用 4 d 表现为加成作用,较单独的线虫与 Bt 处理下黏虫死亡率分别提高了 43.29 和 45.23 百分点,联用 6 d 后表现为显著的协同增效作用($M_E = 35.47, M_{NB} = 50.06, \chi^2 = 6.00 > 3.84$),较单独线虫和 Bt 处理的死亡率分别提高了 47.96 和 46.80 百分点。

Hb 线虫与 G03 联用对黏虫的田间效果如图 6 所示:线虫与 Bt 联用 4 d 较单独线虫和 Bt 处理的黏虫死亡率分别提高了 35.95 和 35.61 百分点,联用 6 d 较单独线虫和 Bt 处理死亡率分别提高了 43.99 和 36.78 百分点,均表现为加成作用。

田间试验结果表明病原线虫 LF、Hb 与 Bt 菌株 G03 联用对黏虫的控制具有协同增效或加成作用,可显著提高对黏虫的致病力,缩短防控所需时间,其中病原线虫 LF 与 G03 联用效果较佳。



“*”表示线虫与Bt联用具有协同加成作用;“**”表示线虫与Bt联用具有协同增效作用。下同
The additive effect between nematodes and Bt is indicated by “*”. The synergistic effect between nematodes and Bt is indicated by “**”. The same below

图5 LF 线虫与 G03 联用对黏虫的致病力

Fig. 5 Pathogenicity of LF nematodes in combination with G03 against *Mythimna separata*

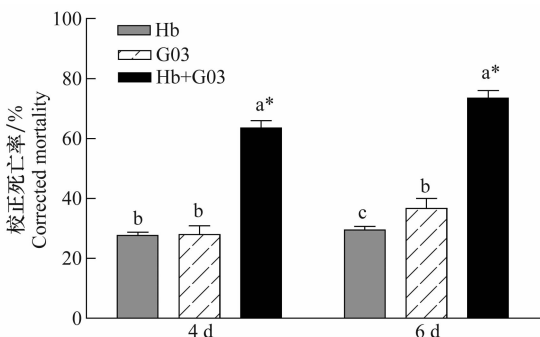


图6 Hb 线虫与 G03 联用对黏虫的致病力

Fig. 6 Pathogenicity of Hb nematodes in combination with G03 against *Mythimna separata*

3 讨论

黏虫是我国重要的暴发性害虫,目前对其防控方法比较单一,以化学防治为主,存在破坏自然环境、黏虫抗药性增强等潜在风险。而生物防治具有绿色、无污染、对人畜安全等优点颇受关注。为此本研究从黏虫的绿色防控角度出发,利用昆虫病原线虫和 Bt 两种生防因子对黏虫的致病力展开了研究,同时探讨了两者的协同增效作用,以期达到防虫、减药、增收的目的。尤为重要的是,随着转 Bt 玉米的大面积种植和推广,此研究结果可以为经典的生物控制策略与转基因 Bt 作物相结合的技术集成提供借鉴,开辟对重大害虫协调管理的新途径。

目前,我国利用昆虫病原线虫防治黏虫的研究报道中多数防治效果不佳。例如施用 DD-136 线虫(1 800 IJs/mL)对黏虫仅有 40% 的防效^[29],田间应用中华卵索线虫 *Ovomermis sinensis* (4 500 IJs/m²) 防治黏虫时其校正寄生率也仅为 52%^[30]。为充分利用我国线虫资源,深入挖掘对黏虫有效的生防线虫,实验室通过大蜡螟诱集获得了一种对黏虫较为有效的嗜菌异小杆属线虫 LF,该线虫在 100 IJs/mL 剂量下处理 6 d 黏虫的死亡率达到 95% 以上;另外一种嗜菌异小杆属线虫 Hb 在相同浓度下黏虫的死亡率达到 90% 以上;而赵奎军等室内应用斯氏线虫 *S. feltiae* Beijing 品系在 800 IJs/mL 剂量下处理 6 d 后黏虫的死亡率仅为 78.9%^[12],说明嗜菌异小杆属的这两种线虫在黏虫的控制上具有巨大的生防潜力。但相比于化学农药,其速效性较差。

蒋善军等研究表明 Bt 对黏虫也有较好的防治效果^[31]。试验中比较了两种 Bt 菌株对黏虫的毒力差异,结果显示在相同剂量下 G03 处理后黏虫死亡率高达 100%,而 HD1 菌株仅有 10%。该生测结果与姚萌等比较 G03 和 HD1 基因组分析结果相吻合,其研究结果显示,G03 菌株含有 HD1 不具有的 *Cry1Ca*、*Cry1Da* 基因,使其在虫害控制方面更具优势;与 HD1 相比,G03 含有较少的噬菌体、转座子相关基因,G03 可能有更好的遗传稳定性,使其在发酵中更稳定^[32]。尽管 G03 表现出了较为优秀的杀虫活性,但其需要较高的浓度(0.5×10^{12} cfu/mL 及以上)才可高效杀死黏虫,而较高的浓度将增加黏虫产生抗性的风险。已有研究表明长期使用高浓度 Bt 会使目标害虫产生抗药性,如美国棉铃虫 *Helicov-*

erpa armigera 在田间对 Bt 棉产生了抗性,印度田间的红铃虫 *Pectinophora gossypiella* 对 Cry1Ac 产生了抗性等^[33-34]。而将两种昆虫病原线虫分别与 Bt 菌株 G03 联用后,室内和田间结果均表明对黏虫具有显著的加成或增效作用。在田间试验中,LF 线虫与 G03 联用后较单独线虫和 Bt 处理黏虫的死亡率分别提高了 47.96 和 46.80 百分点。因此,线虫和 Bt 联用一方面可以减少线虫和 Bt 的使用剂量、提高速效性、节约防治成本,另一方面可以降低黏虫对线虫或 Bt 产生抗性的风险。

应用 Bt 预处理后,Bt 菌株产生的毒素可能会引起黏虫中肠组织病变导致其中肠肠壁细胞排列疏松,细胞明显出现空洞化^[35],这不仅便于病原线虫侵入,同时导致黏虫自身免疫力降低,对线虫的抵御能力下降,有利于其共生菌在黏虫体内繁殖;线虫会对寄主体内的 CO₂ 浓度、分泌物等做出敏感反应^[36],而经 Bt 处理后势必会引起寄主体内代谢活动的变化^[37],间接提高了线虫的侵入几率,以上因素都可能是两者联用产生加成或增效效果的原因。

本试验在田间进行期间,气候条件比较适宜线虫的存活和侵染。实际应用时建议与一些线虫保湿剂配合使用,尽量避开晴天或多雨天气。本研究只是初步明确了线虫与 Bt 联用对黏虫的防控具有协同作用,后续试验还需要评估 Bt 菌株是否会对线虫受精卵、各龄期幼虫的活力存在副作用,取食 Bt 后的黏虫对线虫寄生情况的影响以及线虫和 Bt 施用后持效期的长短等;另外还需从组织病理学及体内相关酶活性变化的角度对联用机理展开深入研究,为推动此防治策略在黏虫上的推广应用奠定基础。

参考文献

- [1] 江幸福,张蕾,程云霞,等.我国粘虫研究现状及发展趋势[J].应用昆虫学报,2014,51(4):881-889.
- [2] 中国农业科学院植物保护研究所,中国植物保护学会.中国农作物病虫害[M].第3版.北京:中国农业出版社,2014:1430-1440.
- [3] 姜玉英,李春广,曾娟,等.我国粘虫发生概况:60年回顾[J].应用昆虫学报,2014,51(4):890-898.
- [4] 刘洪娟.黑龙江省粘虫生物防治的重要性及主要生防类群[J].农村实用科技信息,2013(12):20.
- [5] 董杰,刘小侠,岳瑾,等.北京地区粘虫对5种杀虫剂的抗性[J].农药学报,2014,16(6):687-692.
- [6] GEORGIS R, KOPPENHÖFER A M, LACEY L A, et al. Successes and failures in the use of parasitic nematodes for pest control [J]. Biological Control, 2006, 38(1):103-123.
- [7] 杨秀芬,杨怀文.昆虫病原线虫的致病机理[J].中国生物防治,1998(4):38-42.
- [8] POINAR G O. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae [M]//GAUGLER R, KAYA H K. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Boca Raton, FL. 1990: 23-61.
- [9] BOEMARE N E, AHKURST R J, MOURANT R G. DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1993, 43(2):244-255.
- [10] 李慧萍,韩日畴.昆虫病原线虫感染寄主行为研究进展[J].昆虫知识,2007,44(5):637-642.
- [11] 吴文丹,孙吴雨,席景会,等.嗜菌异小杆线虫侵染后暗黑鳃金龟和大黑鳃金龟幼虫脂肪体和中肠组织超微结构观察[J].昆虫学报,2015,58(8):836-845.
- [12] 赵奎军,张丽坤,宋捷,等.应用斯氏线虫防治8种鳞翅目、鞘翅目昆虫的研究[J].植物保护学报,1996(1):20-24.
- [13] SHAPIRO-ILAN D I, GOUGE D H, PIGGOTT S J, et al. Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control [J]. Biological Control, 2006, 38(1):124-133.
- [14] SHAPIRO-ILAN D I, GOUGE D H, KOPPENHÖFER A M. Factor affecting commercial success; case studies in cotton turf and citrus [J]. Entomopathogenic Nematology, 2002, 16:333-356.
- [15] VITERI D M, LINARES A M, FLORES L. Use of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* in combination with low-toxicity insecticides to control fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae [J]. Florida Entomologist, 2018, 101(2):327-329.
- [16] NEGRISOIL A S, GARCIA M S, BARBOSA N, et al. Efficacy of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) and insecticide mixtures to control *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) in corn crops [J]. Crop Protection, 2010, 29(7):677-683.
- [17] BRAVO A, LIKITVIVATANAVONG S, GILL S S, et al. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2011, 41(7):423-431.
- [18] JOUZANI G S, VALIJANIAN E, SHARAFI R. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(7):2691-2711.
- [19] SCHNEPL E, CRICKMORE N, VAN RIE J, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998, 62(3):775-806.
- [20] KIROUAC M, VACHON V, NOËL J F, et al. Amino acid and divalent ion permeability of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac in insect midgut brush border membrane vesicles [J]. Biochemical et Biophysical Acta, 2002, 1561(2):171-179.
- [21] VACHON V, LAPRADE R, SCHWARTZ J L. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review [J]. Journal of Invertebrate

- Pathology, 2012, 111(1):1-12.
- [22] WHITE G F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures [J]. Science, 1927, 66(1709):302-303.
- [23] GAUGLER R. Entomopathogenic nematodes[M]. Wallingford, UK: CBAI. Parasitology, 2002: 115-144.
- [24] MALAN A P, KONETAE R, MOORE S D. Isolation and identification of entomopathogenic nematodes from citrus orchards in South Africa and their biocontrol potential against false codling moth [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2011, 108(2):115-125.
- [25] KOPPENHÖFER A M, GREWAL P S, KAYA H K. Synergism of imidacloprid and entomopathogenic nematodes against white grubs; the mechanism [J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 2000, 94(3):283-293.
- [26] KOPPENHÖFER A M, KAYA H K. Additive and synergistic interaction between entomopathogenic nematodes and *Bacillus thuringiensis* for scarab grub control [J]. Biological Control, 1997, 8(2):131-137.
- [27] KOPPENHÖFER A M, COWLES R S, COWLES E A, et al. Comparison of neonicotinoid insecticides as synergists for entomopathogenic nematodes [J]. Biological Control, 2002, 24(1):90-97.
- [28] MCVAY J R, GUDAUSKAS R T, HARPER J D. Effects of *Bacillus thuringiensis* nuclear-polyhedrosis virus mixtures on *Trichoplusia ni* larvae [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1997, 29(3):367-372.
- [29] 秦久刚, 周意滨. 新线虫 DD-136 防治粘虫研究初报 [J]. 湖北农业科学, 1984(6):21-22.
- [30] 张自亮, 雷书芳, 王合松, 等. 1990 年人工释放中华卵杀线虫防治麦田一代粘虫试验 [J]. 生物防治通报, 1992(4):148-150.
- [31] 蒋善军, 罗礼智, 胡毅, 等. Cry1Ac 毒蛋白对粘虫生长发育、繁殖及飞行能力的影响 [J]. 昆虫学报, 2010, 53(12):1360-1366.
- [32] 姚萌, 王奎, 束长龙, 等. 苏云金芽胞杆菌 G03 菌株的比较基因组分析 [J]. 生物技术通报, 2018(10):187-193.
- [33] ALI M L, LULLTTRELL R G, YOUNG S Y. Susceptibilities of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) population to Cry1Ac insecticidal protein [J]. Journal of Economic Entomology, 2006, 99(1):164-175.
- [34] TABASHNIK B E. Communal benefits of transgenic corn [J]. Science, 2010, 330(6001):189-190.
- [35] 王小奇, 束长龙, 蒋健, 等. 对大黑鳃金龟幼虫高效的苏云金芽胞杆菌筛选及 Cry 基因鉴定 [J]. 植物保护学报, 2016, 43(3):483-492.
- [36] 杨秀芬, 杨怀文. 昆虫病原线虫的致病机理 [J]. 中国生物防治, 1998(4):38-42.
- [37] 谭树乾. Cry8Ga1 和 Cry8Ea1 蛋白毒杀蛴螬的生理生化机制研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 272 页)

- [2] 高步衢, 耿海冬, 杨静莉, 等. 国内检疫性林木种害虫记述 [J]. 植物检疫, 1990(S1):1-11.
- [3] 姚国君, 陈申宽. 扎兰屯锦鸡儿广肩小蜂发生危害调查 [J]. 内蒙古草业, 1996(S2):28-31.
- [4] 罗于洋. 柠条种子害虫对柠条种子生产的影响及其综合治理研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2005.
- [5] 常朝阳. 中国锦鸡儿属植物分类研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2008.
- [6] 宋素杰, 鄂晓勤. 柠条种子小蜂初步研究 [J]. 森林病虫通讯, 1985(1):7-8.
- [7] 杨美良. 柠条种子小蜂及其防治 [J]. 内蒙古林业科技, 1998(1):40.
- [8] 苏日娜, 金花. 柠条种子主要害虫及其防除途径 [J]. 内蒙古草业, 2011, 23(3):61-64.
- [9] 罗于洋, 金花, 王树森. 内蒙古西部干旱区柠条种子害虫田间种群消长规律及其幼虫种群发育进程研究 [J]. 西北林学院学报, 2009, 24(3):112-117.
- [10] 卢妮妮, 王新杰, 张鹏, 等. 不同林龄杉木胸径树高与冠幅的通径分析 [J]. 东北林业大学学报, 2015, 43(4):12-16.
- [11] 陈应武, 李新荣, 张景光, 等. 昆虫寄生对柠条种子命运的影响 [J]. 中国沙漠, 2006, 26(6):1015-1019.
- [12] 萧刚柔主编. 中国森林昆虫 [M]. 第 2 版. 北京: 中国林业出版社, 1992:1231-1232.
- [13] 牛西午主编. 柠条研究 [M]. 北京: 科学出版社, 2003:166-168.
- [14] 齐晓英, 刘宏波. 柠条种子小蜂特性及防治技术 [J]. 内蒙古林业科技, 1993(4):33-35.
- [15] 中国植物保护学会植物检疫学分会主编. 植物检疫害虫彩色图谱 [M]. 北京: 科学出版社, 1993:182-183.
- [16] 《林木果树病虫害防治》编写小组. 林木果树病虫害防治 [M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 1974:16-17.
- [17] 朱春云, 赵越, 刘霞, 等. 锦鸡儿等旱生树种抗旱生理的研究 [J]. 植物研究, 1996, 13(1):59-63.
- [18] 李进, 张秀伏. 梯度分析技术用于植物抗旱性的研究 [J]. 西北植物学报, 1996(3):284-292.
- [19] 富象乾. 锦鸡儿属. 内蒙古植物志 [M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 1977:215-238.
- [20] 张建华, 马成仓, 高玉葆. 干旱荒漠区荒漠锦鸡儿种群繁殖对策研究 [J]. 草地学报, 2012, 20(3):434-437.
- [21] 赵一之. 树锦鸡儿的分布式样及其生态适应 [J]. 植物研究, 2006, 26(4):402-404.
- [22] 于倩玉, 于树成. 树锦鸡儿在园林绿化中的应用 [J]. 林业勘查设计, 2011(4):65-66.
- [23] BERNARD J, EWING C, MESSING R. The structure and phenology of non-native scolytine beetle communities in coffee plantations on Kaua'i [J]. Insects, 2018, 9(4):123.
- [24] GU Shimin, HAN Peng, YE Zhengpei, et al. Climate change favours a destructive agricultural pest in temperate regions: late spring cold matters [J]. Journal of Pest Science, 2018, 91(4):1191-1198.
- [25] 刘向东. 昆虫生态及预测预报 [M]. 第 4 版. 北京: 中国农业出版社, 2016.

(责任编辑: 杨明丽)