

doi: 10.3969/j.issn.1674-0858.2016.03.22

昆虫病原线虫对腰果细蛾的致病力测定

张中润*, 王金辉, 黄海杰, 黄伟坚

(中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所/农业部华南作物基因资源与种质创制重点实验室, 海南儋州 571737)

摘要: 室内测定了 *Steinernema carpocapsae* All、*S. carpocapsae* Biosys、*S. glaseri* NC52、*S. longicaudum* X-7、*Heterorhabditis bacteriophora* H06 和 *H. indica* LN2 共 6 个昆虫病原线虫品系对腰果细蛾 *Acrocercops syngamma* Meyrick 幼虫的致病力。结果表明, 线虫 *S. carpocapsae* All、Biosys 品系与线虫 *S. glaseri* NC52 对腰果细蛾幼虫的致死效果显著高于其它线虫, 但供试的 6 个线虫品系均未能在腰果细蛾幼虫体内繁殖下一代, 说明供试线虫在腰果细蛾幼虫体内难以繁殖。选择小卷蛾斯氏线虫 *S. carpocapsae* All 进一步研究其对腰果细蛾的致病力, 结果发现, All 线虫对腰果细蛾 3 龄幼虫处理 24 h 后的致死中浓度 LC_{50} 为 19.88 IJs/虫。腰果细蛾各龄幼虫和蛹对小卷蛾斯氏线虫 *S. carpocapsae* All 均表现出高度的敏感性, 但不同幼虫龄期和处理时间敏感程度不同。小卷蛾斯氏线虫 *S. carpocapsae* All 对不同龄期腰果细蛾幼虫和蛹均表现出较强的致病力。

关键词: 昆虫病原线虫; 斯氏属线虫; 异小杆属线虫; 腰果细蛾; 致病力

中图分类号: Q965.9; S476.15

文献标志码: A

文章编号: 1674-0858 (2016) 03-0602-05

The efficacy of entomopathogenic nematodes against cashew leaf miners *Acrocercops syngamma* in the laboratory

ZHANG Zhong-Run*, WANG Jin-Hui, HUANG Hai-Jie, HUANG Wei-Jian (Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory of Tropical Crops Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Danzhou 571737, Hainan Province, China)

Abstract: The efficacy of entomopathogenic nematodes (EPNs) from the families of Steinernematidae and Heterorhabditidae against the larvae of *Acrocercops syngamma* was tested in the laboratory. Six nematode strains including *Steinernema carpocapsae* All, *S. carpocapsae* Biosys, *S. glaseri* NC52, *S. longicaudum* X-7, *Heterorhabditis bacteriophora* H06 and *H. indica* LN2 were used in the study. The results showed that, the mortality of cashew leaf miner larvae caused by All, Biosys and NC52 were significantly higher than that caused by other strains. No nematode juvenile of next generation was found in insect cadavers treated with EPNs, which indicated that EPNs have poor potential to reproduce within the body of *A. syngamma* larvae. *S. carpocapsae* All was further selected for the subsequent bioassay. In laboratory bioassay experiment, *S. carpocapsae* All showed high virulence on the 3rd instar larvae of *A. syngamma*, showing LC_{50} of 19.88 IJs per insect. The larvae from each stage and the pupae of *A. syngamma* were highly susceptible to *S. carpocapsae* All. However, the susceptibility differed according to the developmental stage of insects and the treated time. The findings indicated that *S. carpocapsae* All was highly virulent to the larvae of *A. syngamma* in the laboratory.

Key words: Entomopathogenic nematode; *Steinernema*; *Heterorhabditis*; *Acrocercops syngamma*; efficacy

基金项目: 海南省自然科学基金项目 (314126); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (1630032013019); 农业部热带作物种质资源保护项目 (16RZZY-101); 非营利性科研机构改革专项启动费项目 (pzs-201502); 农业部引进国际先进农业科学技术项目 (2011-G13 (5))

作者简介: 张中润, 男, 1979 年生, 副研究员, E-mail: zhrzhang@126.com

收稿日期 Received: 2015-08-26; 接受日期 Accepted: 2015-11-10

腰果 *Anacardium occidentale* Linnaeus 是海南省特色热带经济作物, 主要分布在海南省乐东县、昌江县、东方市和陵水县。腰果细蛾 *Acrocercops syngramma* Meyrick (Lepidoptera: Gracillariidae) 是腰果重要害虫之一, 其幼虫潜叶取食叶肉, 使被害嫩叶出现曲折弯曲的为害纹, 为害扩大后被害腰果叶片呈灰白色水泡状。一般每片叶有 2-8 个水泡状为害斑, 有多头幼虫为害。为害严重时腰果嫩叶被害率可达 90% 以上, 对腰果叶片造成了永久性破坏, 严重影响腰果植株的光合作用 (梁李宏和张中润, 2007; 张中润等, 2008)。

昆虫病原线虫主要包括斯氏线虫科 Steinernematidae 的斯氏线虫属 *Steinernema* 线虫和异小杆线虫科 Heterorhabditidae 的异小杆线虫属 *Heterorhabditis* 线虫。作为新型微生物杀虫剂, 昆虫病原线虫在防治多种农林和卫生害虫方面中发挥着重要的作用 (颜珣等, 2014), 对多种潜叶害虫均有很好的防治效果, 已成功应用于潜叶性害虫如非洲菊斑潜蝇 *Liriomyza trifolii* (Burgess)、南美斑潜蝇 *L. huidobrensis* (Blanchard) 的防治 (Hara et al., 1993; Head et al., 2000; Head et al., 2003)。目前, 腰果细蛾综合防治措施有化学农药防治、寄生蜂如羽角姬小蜂 *Sympiesis* sp. 和瑟姬小蜂 *Cirrospilus* sp. 防治以及抗性腰果品种筛选等 (梁李宏和张中润, 2007; 张中润等, 2008), 但关于应用昆虫病原线虫防治腰果细蛾的研究仍未见报道。

本文拟通过室内测定不同昆虫病原线虫品系对腰果细蛾的致病力, 筛选出高效昆虫病原线虫品系应用于防治腰果细蛾, 为探索昆虫病原线虫在腰果细蛾田间防治上的适用性提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验昆虫

腰果细蛾幼虫从腰果园采集后, 置于 $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 下饲养观察 24 h, 未发现异常的种群用于试验。参照 Athalye 和 Patil 法 (1998) 判定腰果细蛾幼虫龄期。蛹由采集的腰果细蛾幼虫在实验室以腰果嫩叶饲养而得。

1.2 试验线虫

参试线虫为小卷蛾斯氏线虫 *S. carpocapsae* (Weiser) 的 All、Biosys 品系, 格氏斯氏线虫 *S. glaseri* (Steiner) 的 NC52 品系, 长尾斯氏线虫 *S.*

longicaudum CP. Shen et GH. Wang 的 X-7 品系, 嗜菌异小杆线虫 *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar 的 H06 品系和印度异小杆线虫 *H. indica* Poinar, Karunakar et David 的 LN2 品系。

参试线虫的感染期幼虫 (IJs, infective juveniles) 由广东省昆虫研究所人工固体培养基培养获得后引进 (韩日畴, 1995)。引进的昆虫病原线虫以黄粉虫 *Tenebrio molitor* L. 幼虫进行活体培养, 获得的感染期幼虫以浅水层方法贮存于 $10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 15 d 内用于试验 (Woodring and Kaya, 1998)。

1.3 不同昆虫病原线虫对腰果细蛾幼虫的侵染力测定

于垫了 2 层中速定性滤纸、直径为 9 cm 的培养皿中均匀滴入约含 500 IJs 的线虫悬浮液 0.5 mL, 然后挑入 10 头 3 龄腰果细蛾幼虫, 置于 $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下培养。每个线虫品系重复 4 次, 同时设清水对照。24 h 后观察各个处理和对照中腰果细蛾幼虫的死亡情况。线虫处理死亡的腰果细蛾幼虫则取出放在垫了 2 层中速定性滤纸的培养皿中, 5 d 后显微镜下解剖, 观察死虫体内是否有下一代线虫或大母虫。

1.4 不同浓度的小卷蛾斯氏线虫 All 品系对 3 龄腰果细蛾幼虫的侵染力测定

于垫了 2 层中速定性滤纸、直径为 9 cm 培养皿中分别均匀滴入约含 100、200、300、400 和 500 IJs 的线虫悬浮液 0.5 mL, 然后挑入 10 头 3 龄腰果细蛾幼虫, 置于 $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下培养。每个浓度重复 4 次, 同时设清水对照。24 h 后观察各个处理的腰果细蛾幼虫。

1.5 小卷蛾斯氏线虫 All 品系对不同龄期腰果细蛾幼虫和蛹的侵染力测定

于垫了 2 层中速定性滤纸、直径为 9 cm 培养皿中均匀滴入含 500 IJs 的 0.5 mL 线虫悬浮液, 然后挑入 10 头各个龄期腰果细蛾幼虫或蛹, 置于 $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下培养。每龄期幼虫或蛹重复 4 次, 同时各龄期幼虫或蛹设清水对照。于线虫或清水处理 6 h、12 h、24 h、36 h 和 48 h 后观察各个处理或对照的幼虫或蛹的死亡情况。

1.6 数据分析

百分数值均经反正弦变换后, 以 SPSS 软件进行方差分析, 多重比较采用 LSD 法。

2 结果与分析

2.1 不同昆虫病原线虫对腰果细蛾幼虫侵染力

结果显示,小卷蛾斯氏线虫 All 与 Biosys 品系、格氏斯氏线虫对腰果细蛾的致死率均显著高于其他 3 种线虫 ($F = 14.166, P = 0.00001$) (表 1)。24 h 后,这 3 种斯氏线虫对腰果细蛾幼虫的致死率分别为 87.5%,87.5% 和 72.5%,而长尾斯氏线虫对腰果细蛾幼虫的致死率 45.0%,印度异小杆线虫为 47.5%,嗜菌异小杆线虫的致死

率最低,仅为 25.0%。结果表明,腰果细蛾幼虫对小卷蛾斯氏线虫、格氏斯氏线虫较为敏感,但对长尾斯氏线虫及其他 2 种异小杆属线虫敏感性较差。

腰果细蛾幼虫死亡 120 h 后进行解剖,所有参试线虫处理均发现有线虫大母虫,但均未发现有下一代线虫。嗜菌异小杆线虫致死的腰果细蛾中线虫大母虫出现率最低,为 8.3%,显著低于其他线虫 ($F = 8.331, P = 0.0003$)。其它 5 种线虫致死的腰果细蛾幼虫体内大母虫出现率差异不显著。

表 1 昆虫病原线虫对腰果细蛾 3 龄幼虫的致死率及其在昆虫体内的繁殖情况

Table 1 Corrected mortality and EPN presence of 3rd instar larvae of *Anacardium syngamma* after treated with different EPN strains

线虫品系 Strain	校正致死率 (%) Corrected mortality	大母虫出现率 (%) Female adult emergence	幼虫出现率 (%) Next generation emergence
<i>S. carpocapsae</i> All	87.5 ± 4.8 a	45.8 ± 6.6 a	0
<i>S. carpocapsae</i> Biosys	87.5 ± 4.8 a	45.5 ± 3.0 a	0
<i>S. glaseri</i> NC52	72.5 ± 4.8 a	37.4 ± 4.6 a	0
<i>S. longicaudum</i> X-7	45.0 ± 6.5 bc	32.9 ± 3.1 a	0
<i>H. indica</i> LN2	47.5 ± 4.8 b	41.3 ± 5.9 a	0
<i>H. bacteriophora</i> H06	25.0 ± 6.5 c	8.3 ± 8.3 b	0

注: 数据为平均数 ± 标准误 (n=4), 同列数据后不同字母表示经 LSD 方法检验在 0.05 水平差异显著。下同。Note: Data were mean ± SE (n=4), different letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level by LSD method. The same in the following tables.

2.2 不同浓度的小卷蛾斯氏线虫 All 品系对腰果细蛾 3 龄幼虫的侵染力

根据上述试验结果,选择对腰果细蛾幼虫致死效果较好,同时生产成本较为经济的小卷蛾斯氏线虫 All 进一步测定其对腰果细蛾的致病力。

处理 24 h 后,小卷蛾斯氏线虫 All 品系在线虫浓度为 100–500 IJs/皿范围中,对腰果细蛾 3 龄幼虫的致死率随着线虫浓度的升高显著提高 (表 2),其对腰果细蛾 3 龄幼虫的致死中浓度 LC_{50} 为 19.88 IJs/虫 (表 3)。

2.3 小卷蛾斯氏线虫 All 品系对腰果细蛾的不同龄期幼虫和蛹的侵染力

小卷蛾斯氏线虫 All 品系对腰果细蛾的不同龄期幼虫和蛹的致死率见图 1。处理 6 h 后,腰果细蛾 1 龄、2 龄、3 龄幼虫和蛹的死亡率分别为 7.5%、7.5%、5.0% 和 5.0%,4 龄和 5 龄幼虫未发现死亡。处理 12 h 后,1 龄、2 龄、3 龄幼虫和

表 2 不同浓度小卷蛾斯氏线虫 *Steinernema carpocapsae* All 品系对腰果细蛾 3 龄幼虫的侵染力

Table 2 Infectivity of *Steinernema carpocapsae* All at different concentration against the 3rd instar larvae of *Anacardium syngamma*

线虫浓度 Dose (IJs/dish)	校正死亡率 (%) Corrected mortality
100	30.0 ± 4.1 c
200	52.5 ± 6.3 bc
300	62.5 ± 6.3 ab
400	62.5 ± 8.5 ab
500	80.0 ± 7.1 a

蛹的死亡率相似,分别为 45.0%、45.0%、40.0% 和 45.0%,4 龄幼虫死亡率为 20.0%,5 龄为 2.5%。处理 24 h 后,1 龄、2 龄、3 龄幼虫和

表 3 小卷蛾斯氏线虫 *Steinernema carpocapsae* All 品系对腰果细蛾 3 龄幼虫的致死中浓度和 95% 置信限
Table 3 LC₅₀ values and 95% confidence limits (CL) of *Steinernema carpocapsae* All against the 3rd instar larvae of *Anacardium syngramma*

线虫品系 Strain	处理时间 (h) Treated time	回归方程式 Equation	<i>r</i>	LC ₅₀ (IJs/insect)	95% CL of LC ₅₀	
					下限 Upper limit	上限 Lower limit
<i>S. carpocapsae</i> All	24	$y = 2.7499 + 1.7329x$	0.9646	19.88	15.21	25.98

蛹的死亡率均高于 90%，显著高于 4 龄（42.5%）和 5 龄（20.0%）幼虫（ $F = 30.376$ ， $P < 0.00001$ ）。处理 36 h 后，1 龄、2 龄、3 龄幼虫和蛹均全部死亡，而 4 龄和 5 龄幼虫的死亡率分别为 75.0% 和 55.0%。处理 48 h 后，4 龄和 5 龄幼虫的死亡率均高于 95%。

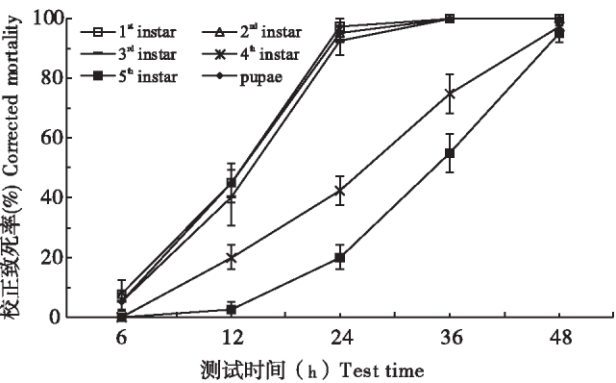


图 1 小卷蛾斯氏线虫 All 品系对腰果细蛾的不同龄期幼虫和蛹的侵染力

Fig. 1 Infectivity of *Steinernema carpocapsae* All against the larvae at different stage and the pupae of *Anacardium syngramma*

3 结论与讨论

室内试验表明，不同昆虫病原线虫对腰果细蛾的致死效果不同。斯氏属线虫对腰果细蛾幼虫的致死效果显著高于异小杆属线虫。小卷蛾斯氏线虫 All 和 Biosys 是 6 个参试线虫中对腰果细蛾控制效果最好的线虫，进一步室内试验也表明小卷蛾斯氏线虫 All 对不同龄期腰果细蛾幼虫和蛹有较高的致病力。在应用线虫防治潜叶害虫的研究中，Hara 等（1993）发现室内试验时小卷蛾斯氏线虫 All 对非洲菊斑潜蝇也有较高的致死率，达 79.3%，但温室试验时，小卷蛾斯氏线虫对非洲菊斑潜蝇的控制效果较差，其致死率随着湿度的变化而在 24% - 43% 中变动。Harris 等（1990）研究发现，室内测定小卷蛾斯氏线虫对非洲菊斑

潜蝇的致死率达 64.2%，温室内应用线虫防治非洲菊斑潜蝇的效果与阿维菌素相似。Lebeck 等（1993）研究发现，潜叶害虫非洲菊斑潜蝇的各龄幼虫、预蛹和初蛹（开始化蛹后 1 h 内）对小卷蛾斯氏线虫均有较高的敏感性，其中线虫对 2 龄幼虫的致死率最高，达 93.3%。本研究结果也表明，小卷蛾斯氏线虫 All 品系对腰果潜叶害虫腰果细蛾具有较高的控制潜力。

由于腰果细蛾老熟幼虫一般在土壤中化蛹，田间应用昆虫病原线虫防治腰果叶片上的腰果细蛾幼虫时，会有许多昆虫病原线虫进入到土壤中，从而可以侵染土壤中的腰果细蛾蛹，降低下一代腰果细蛾的种群数量，因此本文测定了昆虫病原线虫对腰果细蛾蛹的敏感性。研究结果表明腰果细蛾蛹对昆虫病原线虫极为敏感，但是由于其化蛹时在体外分泌了一种膜状保护壳，致使昆虫病原线虫难以与其接触，从而极大降低了昆虫病原线虫对其的控制效果（梁李宏和张中润，2007）。

昆虫病原线虫在害虫体内循环繁殖出下一代，并对害虫进行持续性控制是昆虫病原线虫应用于防治害虫的重要特性（Harlan *et al.*，1971；Glazer *et al.*，2001；Yadav and Lalramliana，2012），但本试验中腰果细蛾幼虫被致死 5 d 后，仍未发现昆虫病原线虫的下一代可以在腰果细蛾幼虫体内繁殖。虽然线虫有可能需要更多的时间才能在腰果细蛾幼虫体内繁殖下一代，但在田间应用时，线虫致死的腰果细蛾幼虫尸体在 5 d 后甚至更早已经干燥硬化，即使再有线虫下一代繁殖出来也将无法存活，这也降低了昆虫病原线虫应用于防治腰果细蛾的控制效果。

在田间试验中，当昆虫病原线虫施用于腰果叶面后，可通过腰果细蛾成虫的产卵孔或叶片的裂缝进入腰果叶片并成功侵染腰果细蛾幼虫。但与室内试验人为去除了各种行为和生态障碍的条件相比，田间试验时线虫需要克服更多障碍如紫外线、高温和干燥等才能接触到腰果细蛾幼虫

(Gaugler and Boush, 1978; Gaugler *et al.*, 1992; Grewal *et al.*, 1994)。因此,在今后的田间应用研究中,有必要改善昆虫病原线虫在腰果园中应用于防治腰果细蛾的技术方法,如加入叶面辅助剂等(Baur *et al.*, 1997; 金永玲等, 2013),延长线虫在腰果叶面的有效侵染时间,提高昆虫病原线虫在叶面上对腰果细蛾的作用效果,进一步挖掘昆虫病原线虫对腰果细蛾的控制潜力。

参考文献 (References)

- Athalye SS, Patil RS. Bionomics, seasonal incidence and chemical control of cashew leaf miner [J]. *Journal of Maharashtra Agricultural Universities*, 1998, 23: 29–31.
- Baur ME, Kaya HK, Gaugler R, *et al.* Effects of adjuvants on entomopathogenic nematode persistence and efficacy against *Plutella xylostella* [J]. *Biocontrol Science Technology*, 1997, 7: 513–525.
- Gaugler R, Bednarek A, Compbell JF. Ultraviolet inactivation of heterorhabditids and steinernematids [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1992, 59: 155–160.
- Gaugler R, Boush GM. Effects of ultraviolet radiation and sunlight on the entomogenous nematode, *Neoplectana carpocapsae* [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1978, 32: 291–296.
- Glazer I, Alekseev E, Samish M. Factors affecting the virulence of entomopathogenic nematodes to engorged female *Boophilus annulatus* ticks [J]. *Journal of Parasitology*, 2001, 87: 808–812.
- Grewal PS, Selvan S, Gaugler R. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: Niche breadth for infection, establishment, and reproduction [J]. *Journal of Thermal Biology*, 1994, 19: 245–253.
- Han RC. Optimum Management of Mass Production System of Entomopathogenic *Steinernema* and *Heterorhabditis* nematodes [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 1995. [韩日畴. 昆虫病原线虫大量培养系统的优化管理 [D]. 广州: 华南农业大学, 1995]
- Hara AH, Kaya HK, Gaugler R, *et al.* Entomopathogenic nematode for biological control of the leafminer, *Liriomyza trifolii* (Dipt.: Agromyzidae) [J]. *Entomophaga*, 1993, 38 (3): 359–369.
- Harlan DP, Dutky SR, Padgett GR, *et al.* Parasitism of *Neoplectana dutkyi* in white-fringed beetle larvae [J]. *Journal of Nematology*, 1971, 3: 280–283.
- Harris MA, Begley JW, Warkentin DL. *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) suppression with foliar applications of *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) and abamectin [J]. *Journal of Economic Entomology*, 1990, 83 (6): 2380–2384.
- Head J, Walters KFA, Langton S. The compatibility of the entomopathogenic nematode, *Steinernema feltiae*, and chemical insecticides for the control of the South American leafminer, *Liriomyza huidobrensis* [J]. *BioControl*, 2000, 45: 345–353.
- Head J, Palmer LF, Walters KFA. The compatibility of control agents used for the control of the South American leafminer, *Liriomyza huidobrensis* [J]. *Biocontrol Science and Technology*, 2003, 13 (1): 77–86.
- Jin YL, Han RC, Cong B. Screening of adjuvants for entomopathogenic nematodes of *Steinernema carpocapsae* All strain in foliar application [J]. *Plant Protection*, 2013, 39 (5): 194–200. [金永玲, 韩日畴, 丛斌. 昆虫病原线虫 *Steinernema carpocapsae* All 品系叶面应用辅助剂的筛选 [J]. 植物保护, 2013, 39 (5): 194–200]
- Lebeck LMR, Gaugler HK, Kaya AH, *et al.* Host stage suitability of the leafminer *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) to the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1993, 62: 58–63.
- Liang LH, Zhang ZR. Diseases and Insect Pests of Cashew [M]. Beijing: China Agriculture Press. 2007, 100. [梁李宏, 张中润. 腰果病虫害 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2007, 100]
- Woodring JL, Kaya HK. Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes: A Handbook of Techniques [M]. Southern Cooperative Series, Bulletin, 1998, 331: 1–30
- Yadav AK, Lalramliana. Evaluation of the efficacy of three indigenous strains of entomopathogenic nematodes from Meghalaya, India against mustard sawfly, *Athalia lugens proxima* Klug (Hymenoptera: Tenthredinidae) [J]. *Journal of Parasitic Disease*, 2012, 36 (2): 175–180.
- Yan X, Guo WX, Zhao GY, *et al.* Research advances in subterranean pest control by entomopathogenic nematodes [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2014, 36 (6): 1018–1024. [颜珣, 郭文秀, 赵国玉, 等. 昆虫病原线虫防治地下害虫的研究进展 [J]. 环境昆虫学报, 2014, 36 (6): 1018–1024]
- Zhang ZR, Liang LH, Huang WJ, *et al.* Evaluation of the resistance of five cashew germplasms to the cashew miner [J]. *Plant Protection*, 2008, 34 (5): 113–115. [张中润, 梁李宏, 黄伟坚, 等. 5个不同腰果品系对腰果细蛾抗性研究 [J]. 植物保护, 2008, 34 (5): 113–115]