



卡森斯氏和短尾异小杆单菌线虫的制备方法

李茜童 张文德 杨亚贤 钱秀娟

A method for culturing the entomopathogenic nematodes *Steinernema kraussei* and *Heterorhabditis brevicaudis* mononucleosis nematodes

LI Xitong, ZHANG Wende, YANG Yaxian, QIAN Xiujuan

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2021-0133>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

甘肃省5种昆虫病原线虫对草地贪夜蛾的致病力测定

Pathogenicity of five entomopathogenic nematodes from Gansu Province on *Spodoptera frugiperda*

草业科学. 2021, 38(10): 2069 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2020-0681>

甘露寡糖添加方式对哺乳期犊牛瘤胃细菌菌群结构的影响

Effect of oligosaccharide addition on rumen bacterial flora of lactating calves

草业科学. 2020, 37(5): 984 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2019-0502>

丹江口水源涵养区退耕还草对土壤微生物和线虫群落的影响

Effects of the conversion of cropland to grassland on soil microbial and nematode communities in the Danjiangkou water source conservation area

草业科学. 2019, 36(11): 2796 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2019-0073>

寄生醉马草的孢囊线虫种类鉴定

Identification of the cyst nematode parasited on *Achnatherum inebrians*

草业科学. 2019, 36(5): 1283 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2018-0275>

藏北高寒草甸土壤线虫群落结构对增温的响应

Soil nematode community response to warming in alpine meadows of northern Tibet

草业科学. 2018, 12(6): 1528 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2017-0346>

异迟眼蕈蚊生物生态学特征及防治策略

Bio-ecological characteristics and control strategies of *Bradysia impatiens*

草业科学. 2021, 38(4): 654 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2020-0436>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

DOI: 10.11829/j.issn.1001-0629.2021-0133

李茜童, 张文德, 杨亚贤, 钱秀娟. 卡森斯氏和短尾异小杆单菌线虫的制备方法. 草业科学, 2022, 39(3): 579-585.

LI X T, ZHANG W D, YANG Y X, QIAN X J. A method for culturing the entomopathogenic nematodes *Steinernema kraussei* and *Heterorhabditis brevicaudis* mononucleosis nematodes. Pratacultural Science, 2022, 39(3): 579-585.

卡森斯氏和短尾异小杆单菌线虫的制备方法

李茜童, 张文德, 杨亚贤, 钱秀娟

(甘肃农业大学植物保护学院 / 甘肃省农作物病虫害生物防治工程实验室, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 本研究旨在建立一种利用昆虫病原线虫共生细菌培养单菌线虫的方法, 可为检测线虫致病力和收集侵染期幼虫提供基础。首先分别分离了甘肃省抗低湿胁迫能力较强的卡森斯氏线虫 (*Steinernema kraussei*) 0657L 和非耐旱性短尾异小杆线虫 (*Heterorhabditis brevicaudis*) 0641TY 两个品系线虫的共生菌, 然后在 NBTB 培养基上对分离到的共生细菌进行纯化和培养, 随后将单菌落转移到 LB 培养基上。最后, 从被侵染的大蜡螟 (*Galleria mellonella*) 体内收集种子怀卵成虫至培养有共生菌的 LB 上孵育, 培养以收集侵染期线虫。研究表明, 本研究所述方法简便快速地分离出了两个品系昆虫病原线虫的共生菌, 并可通过培养共生菌收集侵染期线虫, 筛选到一种直接从大蜡螟体内分离怀卵成虫至纯化的共生菌上孵育线虫, 以快速准确获得整齐龄期的单菌线虫的简便方法。

关键词: 短尾异小杆属; 卡森斯氏属; 侵染期幼虫; 共生菌; 单菌线虫

文献标志码: A 文章编号: 1001-0629(2022)03-0579-07

A method for culturing the entomopathogenic nematodes *Steinernema kraussei* and *Heterorhabditis brevicaudis* mononucleosis nematodes

LI Xitong, ZHANG Wende, YANG Yaxian, QIAN Xiujuan

(College of Plant Protection, Biocontrol Engineering Laboratory of Crop Diseases and Pests of Gansu Province, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China)

Abstract: The present study aimed to develop a method for culturing mononucleosis nematodes (MONO- nematodes) using the symbiotic bacteria (SB) of these nematodes, providing a basis for examining nematode pathogenicity and collecting infective juveniles (IJs). SB were isolated from two EPN strains collected from the Gansu Province: *Steinernema kraussei*, which is highly resistant to low-humidity stress, and *Heterorhabditis brevicaudis*, which is sensitive to low-humidity stress. The isolated bacteria were purified and cultured on NBTB. Subsequently, single colonies of SB were transferred to LB medium. Thereafter, the SB were incubated on LB medium with a gravid nematode female, which was collected from the body of an infected wax worm, and cultured to collect IJs. Therefore, the SB of *S. kraussei* 0657L and *H. brevicaudis* 0641TY could be isolated using the method described here and IJs could be collected through culture with these SB. The proposed protocol can serve as a simple, rapid, and accurate method to collect IJs of MONO- nematodes directly isolating the gravid nematode females from infected wax worms and incubating them with purified SB.

Keywords: *Heterorhabditis*; *Steinernema*; infective juvenile; symbiotic bacteria; mononucleosis nematodes

Corresponding author: QIAN Xiujuan E-mail: qianxj@gsau.edu.cn

收稿日期: 2020-03-09 接受日期: 2020-07-18

基金项目: 国家自然科学基金 (31960559); 甘肃省科技计划项目 (21JR7RA819); 甘肃农业大学科技创新基金学科建设专项 (GAU-XKJS-2018-151); 甘肃农业大学科研训练项目 (202113017)

第一作者: 李茜童 (1998-), 女, 甘肃榆中人, 在读本科生, 主要从事有害生物防治研究。E-mail: 1316312549@qq.com

共同第一作者: 张文德 (1998-), 男, 甘肃安定人, 在读本科生, 主要从事有害生物防治研究。E-mail: 1722525647@qq.com

通信作者: 钱秀娟 (1980-), 女, 甘肃武威人, 副教授, 博士, 主要从事有害生物防治研究。E-mail: qianxj@gsau.edu.cn

线虫是一类种类庞大的物种,在自然界中仅次于昆虫。线虫与昆虫之间存在普遍而广泛的联系,其中少数线虫因对昆虫具有较强的侵染致死力被称为昆虫病原线虫(entomopathogenic nematodes, EPNs),通常与其携带的共生细菌一同引起寄主昆虫死亡^[1],是一类带有共生菌的专性寄生线虫^[2]。

共生细菌存在于侵染期线虫肠道内,该线虫进入寄主昆虫血腔并在其中繁殖时,寄主昆虫体内营养物质被分解,共生菌被释放,大量的共生菌繁殖产生毒素使寄主昆虫败血死亡。共生菌的大量繁殖在这一过程中起到两个作用,一是产生抑菌物质(如抗生素)以抑制其他微生物的生长,为线虫提供适宜的生长环境;二是降解其他物质为线虫提供营养^[3-4]。线虫与细菌共生关系的研究主要集中在携带共生菌的斯氏线虫属(*Steinernema*)与异小杆线虫属(*Heterorhabditis*)等昆虫病原线虫上^[2,5],其具有寄主范围广泛,致死速度快,寄生杀虫效果可观,对脊椎动物、植物、人类无害,且对环境安全、无有毒残留物,植物不易产生抗药性等特点^[6]。此外,线虫在土壤中的生存能力和扩散能力强,对害虫(尤其是对土栖性和钻蛀性害虫有替代化学药剂的潜能)具有主动搜寻能力^[7-10],其侵染期幼虫^[11]能存活1到几个月,可进行产业化培养^[1,12]生产和销售,并广泛应用于害虫的生物防治领域^[13]。

近年来,由于草原退化导致的草地病、虫、鼠害愈发猖獗,进而引起生态恶化、牧草产量和品质降低,以及生物多样性减少等问题^[14]。化学农药治理见效快却有很大毒性,且残留量高,虽然根据我国目前所提倡“预防为主,综合治理”的方针,已将昆虫病原线虫应用于防治多种农林、花卉以及卫生害虫,并且取得了令人鼓舞的成果^[1],但在草地害虫防治方面仍有巨大进步空间。单菌病原线虫在产业和科学研究中具有重要作用。研究表明,细菌和线虫的共生关系是具有一定程度专化性的,即一种线虫只能同一种细菌共生。因此,单菌线虫的培养获得尤为重要。研究制备只携带专化性共生菌的昆虫病原线虫的方法不仅能够明确昆虫病原线虫与其共生菌的关系,也有利于侵染期幼虫的产业化生产制备,并提高昆虫病原线虫对草地害虫的防治效果^[15]。

本研究以从甘肃省分离诱集得到的抗低湿胁迫能力较强的卡森斯氏线虫(*Steinernema kraussei*)和非耐旱性短尾异小杆线虫(*Heterorhabditis brevicaudis*)

两种昆虫病原线虫为研究材料,分离其携带的共生菌,并采用直接从大蜡螟(*Galleria mellonella*)体内分离种子怀卵成虫至纯化好的专化性共生菌上孵育单菌线虫的简易方法,以期快速准确获得高防效的侵染期幼虫,为昆虫病原异小杆属和斯氏属线虫的产业化生产奠定基础,为高效防除害虫提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 供试昆虫

大蜡螟3龄幼虫由甘肃农业大学植物保护/甘肃省农作物病虫害生物防治工程实验室保存。

1.2 供试线虫

抗低湿胁迫能力较强的卡森斯氏线虫0657L和非耐旱性短尾异小杆线虫0641TY均由甘肃农业大学植物保护学院昆虫生态实验室/甘肃省农作物病虫害生物防治工程实验室保存。

1.3 培养基的配制

NBTB培养基:琼脂15g, LB琼脂预混干粉40g, 溴百里酚蓝0.01g, 无菌水1000mL, 摇匀。配置好培养液,于121℃,1240Pa灭菌20min,倒平板培养基保存备用。

LB培养基:营养肉汤8g,琼脂15g,酵母粉5g,六水合氯化镁($MgCl_2 \cdot H_2O$)12g,蒸馏水900mL,摇匀。配置好培养液,于121℃,1240Pa灭菌20min。玉米糖浆7mL,玉米胚芽油4mL,蒸馏水89mL,混合均匀,加入已灭菌的培养液中,置于平板培养基保存备用。

1.4 共生菌的分离

在两个直径为9cm的培养皿内铺垫两层无菌滤纸,将经过75%酒精进行体表消毒的3龄大蜡螟(大小、生理活性基本一致)各5头置于其中,用移液枪分别吸取1.5mL密度为 $3.84 \text{头} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的卡森斯氏线虫和密度为 $2.82 \text{头} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的短尾异小杆线虫悬浮液滴至大蜡螟头部附近体壁上,在20~25℃培养箱中放置24h。

在超净工作台上,用75%酒精消毒的小剪刀将经过线虫侵染的大蜡螟第1对胸足剪破,用拇指和食指从虫体尾部向前按压,使大蜡螟的体液从第1对胸足伤口处流出,滴加在NBTB平板培养基

上。接菌环在酒精灯下灭菌,蘸取大蜡螟体液,划Z字型分离共生菌。用封口膜密封培养基,置于20~25℃培养箱中培养。侵染24、28、32、36、40h各分离一次,每次分离3皿,培养后比较菌落生长情况。

1.5 共生菌的纯化

卡森斯氏线虫和短尾异小杆菌线虫共生菌分别培养至出现易于挑取的单菌落,无菌条件下每8h挑取绿色单菌落一次,转移至新的NBTB平板培养基上,继续划线进行共生菌的二次纯化,以此重复,直到培养纯化出均匀的单菌落。挑取纯化的初生型单菌落转移至LB平板培养基,在20~25℃培养箱中培养72h后保存备用。

1.6 单菌线虫的制备

在两个直径为9cm的培养皿内铺垫两层无菌滤纸,将经过75%酒精消毒的3龄大蜡螟各5头置于其中,用移液枪分别吸取1.5mL密度为 $3.84 \text{ 头} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的卡森斯氏线虫和密度为 $2.82 \text{ 头} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的短尾异小杆菌线虫悬浮液侵染大蜡螟。侵染7d后,在显微镜下用酒精灯灭过菌的昆虫针解剖侵染至死的大蜡螟,观察并分别挑取大蜡螟体内的卡森斯氏线虫和短尾异小杆菌线虫怀卵成虫各1头,接到长好共生菌的LB平板培养基上,用封口膜密封培养基,并将培养基置于培养箱中继续培养,每24h观察一次幼虫发育情况,连续观察2周。

1.7 数据统计

观察侵染不同时间的大蜡螟体内初次分离的共生菌在NBTB上培养出单菌落的情况。

记录怀卵成虫在培养有共生菌的LB培养基上的存活情况,获得侵染期幼虫(即3龄幼虫)所需最短时间和全部幼虫形成侵染期幼虫的时间。

2 结果与分析

2.1 共生菌的分离及纯化

观察比较两个品系线虫悬浮液接种大蜡螟24、28、32、36以及40h后,从其体内分离出来的共生菌的生长情况。

2.1.1 卡森斯氏线虫专化性共生菌

卡森斯氏线虫侵染大蜡螟24h后分离获得的共生菌更易在NBTB培养基上培养出较为均匀生长的单菌落(图1),便于被二次纯化。

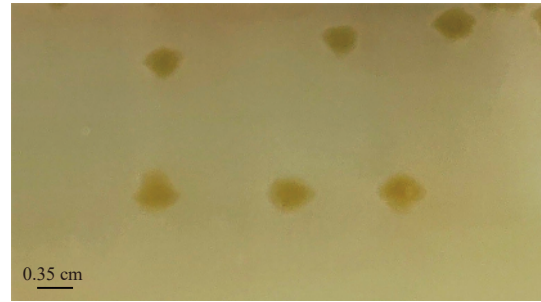


图1 卡森斯氏线虫侵染大蜡螟24h分离的共生菌
Figure 1 Symbiotic bacteria isolated from *Galleria mellonella* infected by *Steinernema kraussei* for 24 hours

在NBTB培养基上,经过纯化的卡森斯氏线虫共生菌呈墨绿色,菌株可以吸收培养基中的溴百里酚蓝,周围培养基也呈现出蓝色,菌株大,边缘整齐规则,表面凸起有光泽(图2);在LB培养基上,菌株呈现棕黄色。经在黑暗条件下观察有生物荧光,为发光杆菌属。



图2 卡森斯氏线虫共生菌在NBTB培养基上的菌株形态
Figure 2 Morph of the symbiotic bacteria of *Steinernema kraussei* on NBTB

2.1.2 短尾异小杆菌线虫专化性共生菌

从短尾异小杆菌线虫侵染大蜡螟28h分离获得的共生菌在NBTB培养基上生长最佳(图3),有较均匀单菌落,便于二次纯化。

在NBTB培养基上,经过纯化的短尾异小杆菌线虫共生菌也呈墨绿色,菌株吸收培养基中的溴百里酚蓝,但周围的培养基呈明显不规则黄色,菌株较小,边缘稍不规则,表面较为扁平,中心有小突起(图4);在LB培养基上,菌株也呈现棕黄色,经在黑暗条件下观察无生物荧光,为嗜线虫杆菌属。共生细菌种的鉴定,拟另文发表。

2.2 种子怀卵成虫的培养及在LB培养基上的培养

用线虫悬浮液侵染大蜡螟24h后,大蜡螟患败血症死亡,开始膨胀,褪色。侵染1周后,在解剖镜

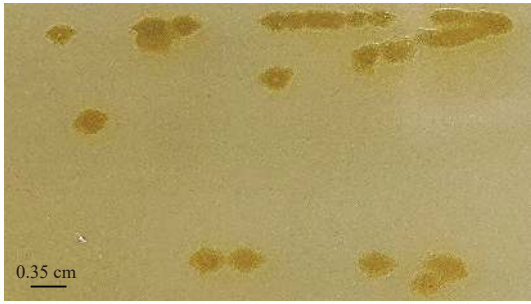


图3 短尾异小杆线虫侵染大蜡螟 28 h 分离的共生菌
Figure 3 Symbiotic bacteria isolated from *Galleria mellonella* infected by *Heterorhabditis brevicaudis* for 28 hours



图4 短尾异小杆线虫共生菌在 NBTB 培养基上的菌株形态
Figure 4 Morph of the symbiotic bacteria of *Heterorhabditis brevicaudis* on NBTB

下解剖大蜡螟, 两个品系线虫悬浮液侵染的大蜡螟体内均存在多数幼虫及少数怀卵成虫。分别将单头怀卵成虫挑取接种至 LB 培养基上恒温培养观察。

2.2.1 卡森斯氏线虫

斯氏属的种子怀卵成虫繁殖较慢, 在 LB 培养基存活时间约为 3 d, 接入前两天产出第二代, 虽在解剖镜下可明显看到怀卵成虫体内的卵粒(图 5), 也可看到卵在母体内孵化成幼虫(图 6), 但并未观察到体外有卵粒排出, 第二代均以幼虫形态钻出怀卵成虫

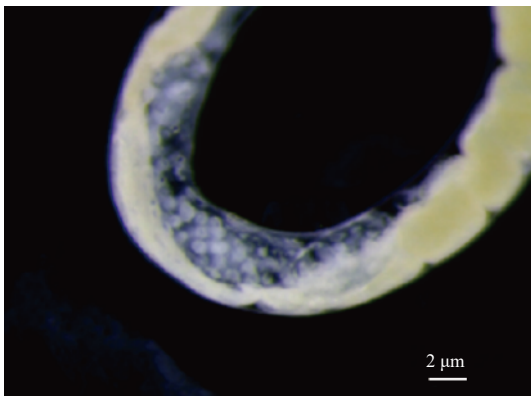


图5 卡森斯氏线虫怀卵成虫体内的卵粒
Figure 5 Eggs in adult *Steinernema kraussei*

体外。怀卵成虫最短仅存活 2 d, 最长存活 5 d 后死亡。

2.2.2 短尾异小杆线虫

异小杆属的种子怀卵成虫自接入 LB 培养基上的存活时间约为 3 d, 接入后 2~3 d 即产出下一代, 繁殖速度相对较快, 但下一代同样是以幼虫形态钻出母体(图 7)。怀卵成虫最短存活 3 d, 最长 5 d 即死亡。

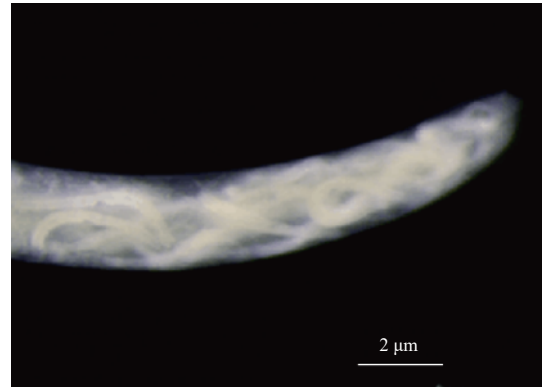


图6 卡森斯氏线虫怀卵成虫体内孵化的幼虫
Figure 6 Hatching juveniles in a gravid *Steinernema kraussei* female adult

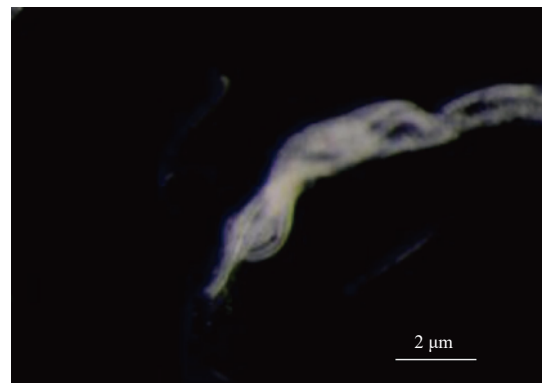


图7 短尾异小杆线虫幼虫钻出已死亡的母体
Figure 7 Juveniles of *Heterorhabditis brevicaudis* emerging from the body of the dead female adult

2.3 侵染期幼虫的形成

2.3.1 卡森斯氏线虫

卡森斯氏线虫侵染期幼虫在 LB 培养基中形成较快, 最快需要 2 d 时间即可观察到侵染期幼虫的形成。在观察的 2 周内, 可观察到其 2 龄幼虫均可全部转化成侵染期幼虫, 而且龄期整齐, 全部转化为侵染期幼虫所需时间约为 10 d(图 8)。

2.3.2 异小杆线虫

异小杆线虫侵染期幼虫在 LB 培养基中较慢形成, 最长需要 4 d 才可观察到侵染期幼虫的形成。在观察的 2 周内, 可观察到卡森斯氏线虫 2 龄幼虫

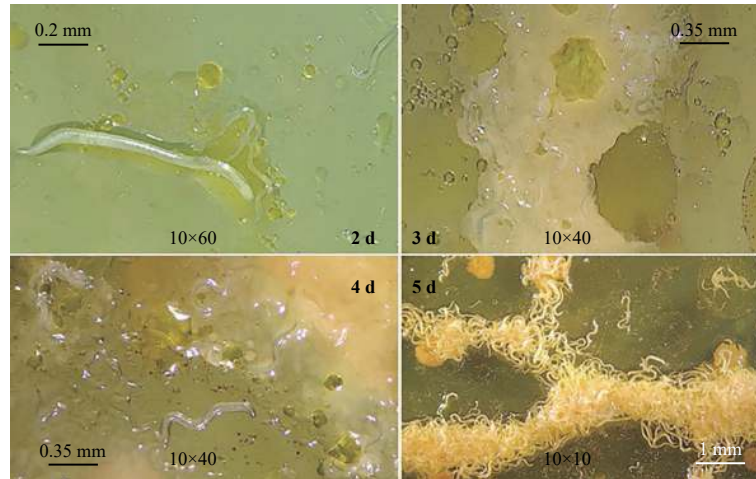


图 8 卡森斯氏线虫侵染期幼虫在 LB 培养基上的形成过程

Figure 8 *Steinerinema kraussei* infective juveniles cultured on LB medium

接种 2 d 侵染期幼虫开始形成, 接种 3、4 d 侵染期幼虫形成数量变多, 接种 5 d 出现龄期较为整齐的侵染期幼虫。

The larvae began to form at 2 d after inoculation infection stage, the number of larvae formed at 3 and 4 d after inoculation infection stage increased, and the larvae at 5 d after inoculation infection stage appeared with relatively neat instars.

均可全部转化成龄期整齐的侵染期幼虫, 全部转化为侵染期幼虫所需时间为 15 d (图 9)。

3 讨论与结论

本研究选用了卡森斯氏线虫和短尾异小杆线两个品系的线虫侵染大蜡螟, 分别于接种 24、28、32、36 以及 40 h 大蜡螟体内分离其共生菌, 并纯化成具有专化性的单菌, 观察菌株生长情况, 以及单菌下

侵染期幼虫诱导形成的情况。结果表明, 卡森斯氏线虫共生菌分离的最佳时间为接种 24 h, 而短尾异小杆线虫共生菌分离的最佳时间为接种 28 h。结合分析培养过程中菌株的形态特征和分离、纯化、培养所需时间的差异, 有力地证明了线虫与细菌的一一对应关系, 即不同品系的线虫其肠道内共生菌的种类也是不同的。加之单菌培养制备线虫通气性好、产量高、生产效率高^[15], 因而可以推断这种专化

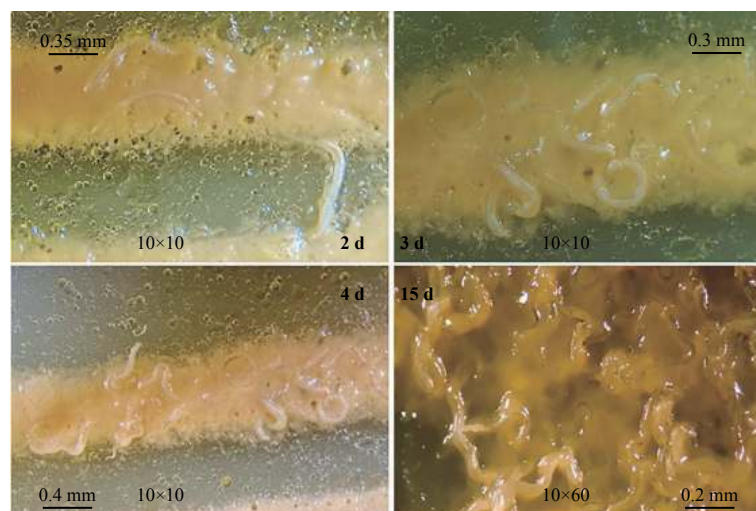


图 9 异小杆线虫侵染期幼虫在 LB 培养基上的形成过程

Figure 9 *Heterorhabditis brevicaudis* infective juveniles cultured on LB medium

接种 2 d 侵染期幼虫开始形成, 接种 3、4 d 侵染期幼虫形成数量变多, 接种 15 d 已全部转化为龄期整齐的侵染期幼虫。

The larvae began to hatch at the 2 d after inoculation infection stage; numerous larvae had hatched at the 3 d and 4 d after inoculation infection stages, and at the 15 d after inoculation infection stage, all eggs had transformed into small larvae.

性能够较好的保证昆虫病原斯氏属和异小杆属线虫的生活力、生殖力和致病力。

此外,斯氏线虫属和异小杆线虫属共生细菌均具有两型现象,通称共生细菌菌型的初生型与次生菌。在线虫大量培养中,培养基必须接入初生型共生菌。初生型能把培养基中的一系列物质转化为适宜于线虫生长繁殖的营养基质,而次生型则不能^[16],因此,线虫只吸收并保留初生型共生菌^[17]。

虽然在 LB 培养基中共生细菌不能大量生长^[1],但接入异小杆属和斯氏属两个不同品系的怀卵成虫均能存活,将怀卵成虫接入 LB 培养基后,均能在较短时间内产出下一代幼虫。同时,可以清楚地观察到怀卵成虫体内的卵,有些也可以观察到卵在母体内孵化成幼虫,但并未观察到卵被排出体外,而是以幼虫钻出母体,即卵可以在母体内孵化,这种现象叫噬母现象^[3],是指卵在种子怀卵成虫体内孵化,幼虫靠母体的营养物质存活,当母体营养物质被消耗完后钻出母体。这些幼虫大多为 2 龄幼虫,或者 2 龄幼虫至侵染期幼虫的过渡虫态,2 龄幼虫及过渡虫态在 LB 培养基上存活并发育形成侵染期

幼虫。由于 LB 培养基上的菌落接种采用了 Z 字形划线法,线虫会顺着菌落层层扩散分布,使得培养获得的侵染期幼虫龄期整齐。

综上所述,本研究中单菌线虫的制备利用了昆虫病原线虫与细菌共生关系的专化性,通过使用两个不同品系线虫的怀卵成虫,筛选到一种直接从大蜡螟体内分离怀卵成虫至纯化好的共生菌上孵育线虫,以快速准确获得整齐龄期的侵染期幼虫的简便方法,弥补了颜珣和韩日畴^[1]研究的以不同的孵育液孵育小卷蛾斯氏线虫(*S. carpocapsae*)的怀卵成虫,找到可以简单快速从怀卵成虫直接获得整齐龄期的侵染期幼虫的方法中营养成分介于纯水和 Ringer's 液中的生理盐水及 PBS 中,无法诱导获得全部的侵染期幼虫的不足;明确了昆虫病原线虫与其共生菌的一一对应关系;为这两种品系线虫侵染期致病力的研究以及在草地害虫安全防治中的商业化生产提供技术支持;为产品的低成本生产、贮存技术、质量控制程序^[18-19],为更多植物病虫害寻找新的防治途径^[20]打下基础。为证实单菌线虫制备方法的意义,本研究也将在后续进行单菌线虫致病力测定。

参考文献 References:

- [1] 颜珣,韩日畴.一种从小卷蛾斯氏线虫怀卵成虫制备侵染期幼虫的简易方法.环境昆虫学报,2016,38(6):1288-1292.
YAN X, HAN R C. A simple method for induction of infective juveniles from gravid female adults of *Steinernema carpocapsae*. *Journal of Environmental Entomology*, 2016, 38(6): 1288-1292.
- [2] 李星月,李其勇,符慧娟,向运佳,杨雯婷,刘奇志,张鸿.新型生防因子:昆虫病原线虫的研究进展.四川农业科技,2019(1):37-39.
LI X Y, LI Q Y, FU H J, XIANG Y J, YANG W T, LIU Q Z, ZHANG H. Research progress of a new biocontrol factor: Entomopathogenic nematodes. *Sichuan Agricultural Science and Technology*, 2019(1): 37-39.
- [3] GREWAL P S, LEWIS E E, GAUGLER R. Response of infective stage parasites (Nematoda: Steinernematidae) to volatile cues from infected hosts. *Journal of Chemical Ecology*, 1997, 23(2): 503-515.
- [4] BOWEN D J, ENSIGN J C. Purification and characterization of a high-molecular-weight insecticidal protein complex produced by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(8): 3029-3035.
- [5] 谷黎娜,钱秀娟,刘长仲.甘肃省昆虫病原线虫 3 个优良品系的生物学特性研究.甘肃农业大学学报,2009,44(2):85-89,109.
GU L N, QIAN X J, LIU C Z. Study on the biological characteristics of three good strains of entomopathogenic nematodes in Gansu Province. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2009, 44(2): 85-89, 109.
- [6] 颜珣,韩日畴.生物杀虫剂:昆虫病原线虫的培养技术.环境昆虫学报,2016,38(5):1044-1051.
YAN X, HAN R C. Production technology of the bio-insecticides: Entomopathogenic nematodes. *Chinese Journal of Environmental Entomology*, 2016, 38(5): 1044-1051.
- [7] 颜珣,郭文秀,赵国玉,韩日畴.昆虫病原线虫防治地下害虫的研究进展.环境昆虫学报,2014,36(6):1018-1024.
YAN X, GUO W X, ZHAO G Y, HAN R C. Research advances in subterranean pest control by entomopathogenic nematodes. *Journal of Environmental Entomology*, 2014, 36(6): 1018-1024.
- [8] 夏颖伟,丘雪红,韩日畴.昆虫病原线虫发育相关基因的差异表达.中国生物防治,2008,24(1):22-29.

- XIA Y W, QIU X H, HAN R C. The differential expression of development-related genes of entomopathogenic nematode. Chinese Journal of Biological Control, 2008, 24(1): 22-29.
- [9] 王立霞, 杨秀芬, 简恒, 杨怀文, 黄大昉. 昆虫病原线虫共生细菌的代谢产物. 微生物学报, 2001, 41(6): 753-756.
WANG L X, YANG X F, JIAN H, YANG H W, HUANG D F. Metabolites produced by bacteria of xenorhabdus and photorhabdus. Acta Microbiologica Sinica, 2001, 41(6): 753-756.
- [10] 钱秀娟, 刘长仲, 阮艳娥. 昆虫病原线虫对甘肃省草地蛴螬的致病力研究. 草地学报, 2015, 23(2): 414-421.
QIAN X J, LIU C Z, RUAN Y E. Pathogenicity of entomopathogenic nematodes to grass grubs (Coleoptera: Scarabaeidae). Acta Agrestia Sinica, 2015, 23(2): 414-421.
- [11] 陈建华. 崇明拟异小杆线虫二种单菌线虫差异表达新 *microRNAs* 靶基因的鉴定. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2017.
CHEN J H. Identifying target genes of differentially expressed novel microRNAs in two monoxenic nematode complexes of *Heterorhabditoides chongmingensis*. Master Thesis. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017.
- [12] 唐璞, 王知知, 吴琼, 刘银泉, 时敏, 黄健华, 陈学新. 草地贪夜蛾的天敌资源及其生物防治中的应用. 应用昆虫学报, 2019, 56(3): 370-381.
TANG P, WANG Z Z, WU Q, LIU Y Q, SHI M, HUANG J H, CHEN X X. Biological characteristics, trend of fall armyworm *Spodoptera frugiperda*, and the strategy for management of the pest. Chinese Journal of Applied Entomology, 2019, 56(3): 370-381.
- [13] 陈向荣, 徐彩霞, 韩杜斌, 赵明, 周福才. 小卷蛾斯氏线虫对辣椒烟粉虱的控制作用. 中国生物防治学报, 2021, 37(1): 110-116.
CHEN X R, XU C X, HAN D B, ZHAO M, ZHOU F C. Control of *Bemisia tabaci* in pepper by *Steinernema carpocapsae*. Chinese Journal of Biological Control, 2021, 37(1): 110-116.
- [14] 岳方正, 段廷玉, 才玉石, 柴守权. 简述我国草原有害生物发生与防治. 中国森林病虫, 2019, 38(6): 27-31.
YUE F Z, DUAN T Y, CAI Y S, CHAI S Q. Occurrence and prevention of grassland pests in China. Forest Pest and Disease, 2019, 38(6): 27-31.
- [15] 张军鸽, 漆永红, 马娟, 刘长仲, 陈书龙. 三种斯氏线虫与其共生细菌之间的专化性. 中国生物防治学报, 2008, 24(2): 128-132.
ZHANG J G, QI Y H, MA J, LIU C Z, CHEN S L. Specialization of entomopathogenic nematode *Steinernema* spp. and their mutualistic *Xenorhabdus* spp. Chinese Journal of Biological Control, 2008, 24(2): 128-132.
- [16] 付俊瑞, 刘奇志, 李星月. 昆虫病原线虫异小杆属新种 *Heterorhabditis beicherriana* 共生菌的分离及致病性. 中国生物防治学报, 2018, 34(1): 133-140.
FU J R, LIU Q Z, LI X Y. Isolation and pathogenicity of symbiotic bacteria associated with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis beicherriana*. Chinese Journal of Biological Control, 2018, 34(1): 133-140.
- [17] 钱秀娟, 许艳丽, 刘长仲. 昆虫病原线虫研究的历史现状及其发展应用动力. 甘肃农业大学学报, 2005, 40(5): 117-121.
QIAN X J, XU Y L, LIU C Z. Phylogeny and developing force of entomopathogenic nematodes. Journal of Gansu Agricultural University, 2005, 40(5): 117-121.
- [18] 李朋娅, 黄金, 张克云. 崇明拟异小杆线虫 *lin-41* 基因功能的鉴定. 农业生物技术学报, 2019, 27(12): 2216-2226.
LI P Y, HUANG J, ZHANG K Y. Functional identification of *lin-41* gene in *Heterorhabditoides chongmingensis*. Journal of Agricultural Biotechnology, 2019, 27(12): 2216-2226.
- [19] 韩日畴, 田彩娟, 陈镜华, 丘雪红, 曹莉, 王立婷. 生物杀虫剂-昆虫病原线虫的研究及其产业化. // 植物保护科技创新与发展. 重庆: 中国植物保护学会, 2008: 250-255.
HAN R C, TIAN C J, CHEN J H, QIU X H, CAO L, WANG L T. Research and industrialization of biocides-entomopathogenic nematodes. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States. Chongqing: Chinese Plant Protection Society, 2008: 250-255.
- [20] 刘玉涛. 松材线虫携带的细菌对其繁殖发育的影响. 南京: 南京林业大学硕士学位论文, 2003.
LIU Y T. The effect of the bacteria carried by pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* on its reproduction and development. Master Thesis. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2003.

(责任编辑 王芳)