

生物杀虫剂——昆虫病原线虫的研究及其产业化*

韩日畴¹ 田彩娟² 张鹏波³ 陈镜华¹ 丘雪红¹ 曹莉¹ 王立婷²

(¹广东省昆虫研究所, 广州 510260; ²中国科学院华南植物园, 广州 510650;

³中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘要: 本文描述生物杀虫剂-昆虫病原线虫培养技术的发展过程, 培养程序和未来的展望。同时, 介绍中国昆虫病原线虫的产业化进展, 特别是广东省昆虫研究所的产业化之路。

关键词: 昆虫病原线虫; 生物杀虫剂; 离体培养; 产业化

在人类跨入 21 世纪之际, 可持续发展已成为国际社会关注的主题。应用自然控制方法管理病虫害, 消除化学农药对人类食品和环境的严重污染是实现可持续发展的主要途径。研制新型、高效生物农药已列为“中国二十一世纪议程”优先发展项目之一。

昆虫病原斯氏属 (*Steinernema*) 和异小杆属 (*Heterorhabditis*) 线虫作为新型生物杀虫剂在防治多种农林、草地、花卉以及卫生害虫方面发挥了独特的作用。在工业化国家的生物农药市场中, 此类线虫的市场销售额仅次于苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*), 占第二位。这类线虫具有独特的优点: 广泛的寄主范围; 对寄主具主动搜寻能力, 特别是对土栖性及钻蛀性害虫; 可规模化培养, 使用方便; 对人畜、环境安全, 特别是目前世界上大多数国家和政府豁免注册可以生产、施放。

昆虫病原线虫的产业化需要有效的培养方法。线虫的培养方法已从活体培养发展到离体培养; 离体培养又从无菌培养到单菌培养。昆虫病原线虫的单菌培养是在明确共生细菌的营养作用的基础上, 通过无菌操作技术于人工培养基中加入共生细菌和线虫而建立的, 即线虫的单菌体外培养系统。根据培养基的基质可分为固体 (solid phase) 和液体 (liquid phase) 培养。液体培养系统中, 控制共生细菌的菌体密度、菌型, 筛选合适的培养基, 线虫种的制备方式, 线虫发育的同步性, 发酵参数控制, 以及产品的后处理方法均影响产品的产量、质量和培养成本。

广东省昆虫研究所在昆虫病原线虫研究和产业化过程做出了努力, 也取得了一系列令国内外同行关注的进展。

1 昆虫病原线虫及其共生细菌种质资源库建设

生物杀虫剂对国家来说是战略资源, 不仅作为研究材料, 而且具有商业价值。因此我们从国内外收集了大量昆虫病原线虫, 构建了国内最大的生物杀虫剂-昆虫病原线虫和共生细菌的种质资源库。

* 作者简介: 韩日畴, 广东省昆虫研究所, 电话: 020-89103943, E-mail: richou-han@163.net

2 昆虫病原线虫的分类研究

描述了两个昆虫病原线虫新种 *S. serratum* 和 *H. brevicaudis*^[1]。利用 ITS-RFLP 分析进行昆虫病原线虫斯氏属和异小杆属的分类鉴定^[2]。

3 昆虫病原线虫共生细菌的研究

3.1 分离和测定了两型共生细菌（初生型和次生型）的形态、抗菌性、生理生化特征以及对昆虫病原线虫培养的影响^[3-5]。

3.2 测定了不同 *Xenorhabdus* 菌株培养物的游离氨基酸含量^[6]。

3.3 共生细菌菌株的噬菌体检测^[7]。

3.4 共生细菌菌株对小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 的趋避作用^[8-9]。

3.5 昆虫病原线虫与共生细菌的共生关系研究

4 共生细菌对非自然共生昆虫病原线虫的毒杀作用

4.1 测定了不同 *Photorhabdus luminescens* 菌株与异小杆线虫 (*Heterorhabditis*) 种系组合培养的特化性、繁殖性能、感染期线虫的携菌能力^[10-13]。

4.2 测定了无菌 *H. bacteriophora* H06 和 *S. carpocapsae* A24 线虫于无菌大蜡螟 (*Galleria mellonella*) 中的生长、繁殖和对无菌大蜡螟的毒性^[12]。

4.3 昆虫病原线虫与共生细菌和非共生细菌的食物信息专化性^[12,14]。

当昆虫病原线虫与不同的共生细菌菌株组合培养时，有些共生细菌菌株对非自然共生的线虫产生致死作用。无菌的 *H. bacteriophora* H06 线虫与分离自 *H. indica* 线虫的 *P. luminescens* LN2 共生细菌组合培养时，LN2 共生细菌产生的对热敏感的毒素可致死 H06 线虫^[5]。

5 证明共生细菌晶体蛋白的营养功能

构建了两株携带胞内晶体蛋白编码基因 *cipA*、*cipB* 的重组大肠杆菌，并建立了重组细菌-线虫液体及固体共培养体系，对线虫的生长发育及繁殖状态进行了研究。结果显示：共生细菌的胞内晶体蛋白对昆虫病原线虫具有营养功能，并证明这种蛋白与感染期线虫的形成直接相关；采用构建重组酿酒酵母的方法研究胞内晶体蛋白的生物学功能时发现了胞内晶体蛋白对 *Panagrellus redivivus* 线虫的特定的生物学作用^[15]。

6 共生细菌口服毒素基因的表达和应用

将 *P. luminescens* 菌株的 *tcdA1B1* 基因整合到阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) 的染色体 DNA 中，构建了可持续控制台湾省乳白蚁的工程菌。然后利用转基因的阴沟肠杆菌喂食台湾省乳白蚁 (*Coptotermes formosanus*) 和红火蚁 (*Solenopsis invicta*)，工程菌中表达的目的蛋白对目标昆虫具有明显的杀虫活性^[16]。

7 昆虫病原线虫的产业化培养

针对新型生物农药-昆虫病原线虫产业化过程中需要解决的发酵系统的设计、液体发

酵技术平台、产品贮存、质量监控、产品标准、市场准入、试验示范和市场推广等系列问题,进行了全方位的研究^[17-18]。

建设了昆虫病原线虫大规模液体发酵场地和中试生产线,瞄准同类研究的国际进展,攻克了昆虫病原线虫产业化生产关键技术和优化工艺流程;进行了异小杆线虫(*H. bacteriophora*)的液体培养(2 000L发酵罐),获得每毫升228 000条感染期线虫的产量;确立了产品的贮存技术、质量控制程序;从产品的外观、有效数量比例、生物测定方法、分子生物学纯种鉴定等方面建立生物杀虫剂-昆虫病原线虫的2个产品标准,且经质量技术监督局备案。产品获得广东省高新技术产品认证和美国农业部进口许可证。

8 昆虫病原线虫的商业化应用

广东省昆虫研究所还致力于昆虫病原线虫的商业化应用。除了测定这类线虫对各种农林、草坪、花卉和卫生害虫外,最主要的是筛选可商业化应用的理想目标昆虫。下列害虫被认为是昆虫病原线虫的目标昆虫:

8.1 桃小食心虫(*Carpocapsa nipponensis*)

在我国主要为害苹果,造成重大经济损失。根据该虫在果园土壤中化蛹、虫源地比较集中以及昆虫病原线虫在土壤中比较活跃、能主动找寻寄主的特点,将斯氏线虫(*S. carpocapsa*)悬浮液喷施于果园土表,当每亩用1亿~2亿感染期线虫时,虫蛹被寄生死亡率达90%以上。经连续5年多点试验证明,其效果相当于常规施用农药,累计示范面积约达1万亩次。此外,广东省昆虫所和山东省果树所还从当地果园分离得到的一种异小杆线虫*H. bacteriophora* H06(泰山一号)作为防治桃小食心虫的试验,效果与斯氏线虫相似,每亩1亿~2亿条感染期线虫时,害虫死亡率可达92%,桃小食心虫卵果率降到1%以下^[29]。

8.2 突背黑蔗龟

应用格氏线虫(*S. glaseri*)防治为害甘蔗的突背黑蔗龟,在宿根蔗头喷雾、淋施线虫和散放已吸附线虫的海绵碎片均可有防效治。试验区幼虫寄生死亡率达52.2%~71.1%^[30]。李素春等用异小杆线虫*H. bacteriophora* H06防治两种金龟子(大黑鳃角龟及暗黑鳃角龟),采用表土喷施方法,防效显著。施线虫区花生产量较辛硫磷农药区增产75kg/亩。

8.3 蛴螬

在20世纪90年代末将昆虫病原线虫引入中国的高尔夫球场。目前绿草宝(昆虫病原线虫制剂)是国内唯一用于高尔夫球场的线虫产品,在球场全面使用已经有7年时间。其对目标害虫的感染率为75%~100%,杀虫速度和防治效果均等于甚至优于常用的化学杀虫剂。它不仅解决了草坪的病虫害问题,更重要的是解决了目前社会各界对高尔夫球场环保概念的疑虑,获得了真正的绿色高尔夫^[31-34]。

8.4 蔗扁蛾

是我国园林新害虫,它食性十分广泛,威胁香蕉、甘蔗、玉米、马铃薯等农作物及温室栽培植物,特别是一些名贵花卉等。巴西木是其重要寄主植物,感染轻则局部受损,重则整段干部的皮层全部蛀空,造成大的经济损失。由于巴西木等观赏植物多放置于宾馆、酒店等家居环境及其他娱乐场所,应尽量避免使用化学农药防治害虫。为了探讨利用昆虫

病原线虫防治蔗扁蛾, 中山大学昆虫研究所和广东省昆虫研究所合作进行了昆虫病原线虫对蔗扁蛾幼虫的敏感性试验。试验结果表明: *S. carpocapsae* A24 线虫是一个十分敏感的种类, 经接触 48 小时之后害虫的寄生死亡率为 77% ~ 100%, 入侵线虫可在虫尸内繁殖后代^[35~36]。

参考文献

- [1] 刘杰. 昆虫病原线虫: 斯氏线虫属 *Steinernema* Travassos 和异小杆线虫属 *Heterorhabditis* Poinar 的新种描述和分类研究. 华南农业大学博士学位论文, 1990
- [2] 丘雪红, 韩日畴. 昆虫病原线虫资源概况和分类技术进展. 昆虫学报, 2007, 50 (3): 286 ~ 296
- [3] 曹莉, 韩日畴. *Xenorhabdus* spp. 菌珠的菌落、菌体多样现象及抗菌特性. 昆虫天敌, 1990, 12 (4): 174 ~ 179
- [4] 韩日畴, 李丽英, 等. 菌株菌落功能二型性的特殊性. 昆虫天敌, 1990, 12 (1): 25 ~ 32
- [5] Han R C, Ehlers R U. Effect of *Photorhabdus luminescens* phase variants on the *in vivo* and *in vitro* development and reproduction of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae*. FEMS Microbiology Ecology, 2001, 35: 239 ~ 247
- [6] 韩日畴, 林琼芳, 张珊珊, 等. 昆虫天敌, 1993, 15 (3): 129 ~ 134
- [7] 游娟, 韩日畴, 吴振强. 昆虫病原线虫和共生细菌培养系统中噬菌体的检测. 昆虫天敌, 2003, 25 (2): 49 ~ 54
- [8] 金永玲. 昆虫病原线虫及其共生细菌叶面喷施技术的研究. 沈阳农业大学硕士学位论文, 2004
- [9] 韩日畴. 专利号: CN, ZL01130078. 7. 2001
- [10] Han R C, Wouts, W M, Li L Y. Development of *Heterorhabditis* spp. strains as characteristics of possible *Xenorhabdus luminescens* subspecies. Revue de Nematologie, 1990, 13: 411 ~ 415
- [11] Han R C, Wouts W M, Li L Y. Development and virulence of *Heterorhabditis* spp. strains associated with different *Xenorhabdus luminescens* isolates. Journal of Invertebrate Pathology, 1991, 58: 27 ~ 32
- [12] Han R C, Ehlers R U. Pathogenicity, development and reproduction of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* under axenic *in vivo* conditions. Journal of Invertebrate Pathology, 2000, 1: 55 ~ 58
- [13] 丘雪红, 韩日畴, 许再福. 不同昆虫病原线虫-共生细菌组合的生化特性研究. 昆虫天敌, 2004, 26 (2): 49 ~ 59
- [14] Han R C, Ehlers R U. Cultivation of axenic *Heterorhabditis* Dauer juveniles and their response to non-specific *Photorhabdus luminescens* food signals. Nematologica, 1998, 44: 425 ~ 435
- [15] You J, Liang S Z, Han R C. Nutritive Significance of Crystalline Inclusion proteins of *Photorhabdus luminescens* in *Steinernema* nematodes. FEMS Microbiology Ecology, 2006, 55: 178 ~ 185
- [16] Zhao R H, Han R C, Qiu X H, et al. Cloning and *Heterologous* Expression of Insecticidal Genes from *Photorhabdus luminescens* TT01 in *Enterobacter cloacae* for *Termite* Control. Applied and Environmental Microbiology (In Review)
- [17] 韩日畴. 昆虫病原线虫大量培养系统的优化管理. 华南农业大学博士学位论文, 1995
- [18] Han R C, Cao L, Liu X L. Relationship between medium composition, inoculum size, temperature and culture time in the yields of *Steinernema* and *Heterorhabditis* nematodes. Fundamental and Applied Nematology, 1992, 15 (3): 223 ~ 229
- [19] Han R C, Cao L, Liu X L. Effects of inoculum size, temperature and time on *in vitro* production of *Steinernema Carpocapsae* Agriotes. Nematologica, 1993, 39: 366 ~ 375

- [20] 韩日畴, 庞雄飞, 李丽英. 昆虫病原线虫固体培养系统干粉培养基的优化. 昆虫天敌, 1995, 17 (4): 153 ~ 164
- [21] Han R C. The effects of inoculum size on yield of *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora* in liquid culture. Nematologica, 1996, 42: 546 ~ 553
- [22] 韩日畴, 李丽英, 庞雄飞. 昆虫病原线虫固体培养系统中主要培养参数的优化. 昆虫天敌, 1997, 19 (2): 75 ~ 83
- [23] 韩日畴, 李丽英, 曹莉, 等. 昆虫病原线虫固体培养系统中主要培养参数的优化. 昆虫天敌, 1997, 19 (2): 75 ~ 83
- [24] 韩日畴, 何向阳, 曹莉, 等. 利用吸附性物质贮存昆虫病原线虫. 昆虫天敌, 2000, 22 (2): 49 ~ 53
- [25] 韩日畴, 李秋剑, 曹莉, 刘秀玲, 何向阳. 生物杀虫剂昆虫病原嗜菌异小杆线虫的生物反应器培养. 中国生物防治, 2002, 18: 16 ~ 19
- [26] Feng S P, Han R C, Qiu X H, et al. Storage of osmotically stressed entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. Insect Science, 2006, 13: 263 ~ 269
- [27] 丘雪红, 韩日畴, 许再福. 昆虫病原线虫 rDNA 多态性分析. 昆虫天敌, 2003, 25 (3): 130 ~ 144
- [28] Jin Y L, Han R C, Cong B. Effects of application parameters and adjuvants on the foliar survival and persistence of entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* All strain on cabbages. Entomologia Sinica, 2004, 11: 99 ~ 112
- [29] 杨平, 刘南欣, 韩日畴等. 应用斯氏线虫大面积防治桃小食心虫. 昆虫天敌, 2000, 22 (2): 79 ~ 82
- [30] 李素春, 梁梅芳, 王小江等. 利用新线虫防治突背蔗龟的研究. 昆虫天敌, 1983, 5 (3): 171 ~ 176
- [31] 张中润, 韩日畴, 许再福. 草坪地下害虫蛴螬的生物防治研究进展. 昆虫知识, 2004, 41 (5): 387 ~ 392
- [32] 张中润, 韩日畴, 许再福. 草坪常用化学药剂对昆虫病原线虫存活和侵染率的影响. 中国生物防治, 2005, 21 (3): 172 ~ 177
- [33] 张中润, 曹莉, 刘秀玲等. 昆虫病原线虫 *Steinernema longicaudum* X-7 增效药剂的筛选. 昆虫知识, 2006, 46 (1): 68 ~ 73
- [34] 张中润, 王果红, 曹莉等. 不同种昆虫病原线虫对同一寄主个体的竞争及对线虫繁殖的影响. 中国生物防治, 2007, 23 (3): 223 ~ 227
- [35] 王果红, 陈镜华, 韩日畴. 褐纹甘蔗象生物学特性及其防治研究进展. 昆虫天敌, 2005, 27 (3): 127 ~ 133
- [36] 王果红, 陈镜华, 韩日畴等. 利用昆虫病原线虫与化学农药混用防治褐纹甘蔗象. 中国生物防治, 2007, 23 (3): 218 ~ 222