

DOI:10.13718/j.cnki.zwyx.2025.03.003

一株对红棕象甲卵有生物活性的 病原细菌的分离和鉴定

蒲宇辰, 游文庆, 陈娟, 刘晓辰,
郑宗炜, 冯春玲

闽南师范大学 生物科学与技术学院, 福建 漳州 363000

摘要: 红棕象甲(*Rhynchophorus ferrugineus*)是近年来对我国南方园林棕榈科植物产业造成重大经济损失的入侵害虫。由于该虫繁殖力强、隐蔽性高以及入侵地缺乏有效天敌等原因,其种群防控面临较大挑战。目前,生物防治被认为是一种具有持续控制潜力的手段。本研究成功从室内饲养的红棕象甲虫卵中分离出一株致病细菌 LL-2。通过形态学观察、分子系统发育分析和生理生化特性分析,鉴定该菌株为粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)。室内生物活性测定结果显示,不同浓度的 LL-2 菌液对虫卵的致死率存在显著差异。在使用 1.0×10^9 CFU/mL 浓度的菌液处理虫卵 7 d 后,校正后的死亡率可达 95.83%。LL-2 菌株在红棕象甲的田间生物防控中具有良好的应用前景,为新型绿色杀虫剂的开发奠定了理论基础。

关键词: 红棕象甲; 昆虫病原体;

粘质沙雷氏菌; 致病力; 生物防治

中图分类号: S433.5

文献标识码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 2097-1354(2025)03-0022-12

Isolation and Identification of a Pathogenic Bacterial Strain with Biological Activity against Red Palm Weevil Eggs

PU Yuchen, YOU Wenqing, CHEN Juan,
LIU Xiaochen, ZHENG Zongwei, FENG Chunling

School of Biological Science and Biotechnology, Minnan Normal University, Zhangzhou Fujian 363000, China

收稿日期: 2024-10-31

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(32102203); 福建省自然科学基金面上项目(2021J01994); 闽南师范大学校长基金项目(KJ2020018)。

作者简介: 蒲宇辰, 博士, 副教授, 主要从事入侵害虫的免疫与病原互作研究。

Abstract: The red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus*) is an invasive pest that has caused significant economic losses to the landscape palm industry in southern China in recent years. Due to its high reproductive capacity, high concealment, and the lack of effective natural enemies in the invaded areas, the difficulty of controlling its population has been increased. Currently, biological control is regarded as the most promising methods with the potential for sustainable control. In this study, a pathogenic bacterium LL-2 strain was successfully isolated from the red palm weevil eggs reared in the laboratory. Based on morphological observation, molecular phylogenetic analysis, and physiological and biochemical characteristic test, the LL-2 strain was identified as *Serratia marcescens*. The bioassays in the laboratory showed that there were significant differences in the mortality rates of the eggs treated with different concentrations of the LL-2 bacterial suspension. After treating the eggs with the bacterial suspension at a concentration of 1.0×10^9 CFU/mL for 7 d, the corrected mortality rate could reach up to 95.83%. Therefore, the LL-2 strain has good application prospects in the field of biological control of red palm weevils. This study lays a theoretical foundation for the development of new green pesticides.

Key words: *Rhynchophorus ferrugineus*; entomopathogens; *Serratia marcescens*; pathogenicity; biological control

红棕象甲(*Rhynchophorus ferrugineus*)隶属于鞘翅目(Coleoptera)、象甲科(Curculionidae)、棕榈象亚科(Rhynchophorinae)和棕榈象属(*Rhynchophorus*),被列入19种林业检疫性有害生物名录^[1]。该虫寄主种类众多,主要包括加拿利海枣(*Phoenix canariensis*)、椰子(*Cocos nucifera*)、槟榔(*Areca catechu*)、大王棕(*Roystonea regia*)、霸王棕(*Bismarckia nobilis*)等30余种棕榈科植物^[2]。棕榈科植物是热带和亚热带地区广泛种植的一类经济林木和园林观赏树木,其中美洲和亚洲的热带地区为其主要分布中心^[3]。这些植物不仅在园林绿化中具有重要的经济和观赏价值,而且在城市景观设计中扮演着不可或缺的角色。然而,作为一种外来入侵物种,红棕象甲对棕榈科植物构成了严重威胁,导致了重大经济损失和生态灾难^[4]。根据覃伟权等^[5]的研究发现,红棕象甲的入侵风险评估指数高达2.29,被列为高度危险的外来入侵生物。自20世纪80年代中期以来,红棕象甲已在全球范围内广泛传播。数据预测,红棕象甲将危害全球至少15%的椰子种植国和约50%的海枣种植国,部分沿海国家每年因防治及根除严重受害棕榈树所带来的经济损失最高可达869万美元^[6]。红棕象甲的主要害虫态为幼虫,它能钻蛀寄主的茎干,取食生长点及附近的柔软组织,逐渐在树干内形成深深的隧道,影响养分运输,导致流胶、组织坏死腐烂,并使寄主活力下降,产生特殊气味。若危害严重,可引起树干中空,最终导致植株死亡。由于没有明显的感染症状,尤其在感染的早期阶段,很难识别棕榈种植园中受感染的植株^[7]。

目前,针对红棕象甲的防治措施面临诸多挑战。化学防治由于施药难度大、环境污染问题以及药剂难以直接接触虫体,效果并不理想。物理防治则受到环境因素的制约,例如,低湿度和强紫外线等都会影响诱杀效果^[8]。相比之下,利用自然天敌进行害虫控制的生物防治手段,显示出较好的应用前景^[8]。红棕象甲在个体生长发育过程中易受到细菌和真菌等病原体的感染。Gindin等^[9]的研究发现,金龟子绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)对红棕象甲的控制效果优于球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*),使用金龟子绿僵菌后,红棕象甲幼虫在6~7 d内的死亡率达到100%,卵的死亡率为80%~82%;淡紫色拟青霉(*Paecilomyces lilacinus*)能够从体

节连接处的缝隙侵入虫体,导致虫体死亡,因此可以作为生物资源应用于红棕象甲的防控^[10]。苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)能够显著降低红棕象甲幼虫的钻蛀活性,并减少其进食活动;二龄幼虫死亡率随着苏云金芽孢杆菌浓度增加而提高^[11-12]。

然而,生物防治仍存在防治效果不稳定的问题,再加上幼虫和成虫活动范围较广,对一些天敌表现出负趋性,导致目前的生物防治效果并不显著。红棕象甲作为一种极具危害性的害虫,虽然其幼虫阶段为主要的危害时期,但针对虫卵开展防治工作的重要性同样不可忽视。在害虫生命周期的初始阶段,若能针对虫卵进行有效干预,便能从根源上遏制红棕象甲种群的繁殖。相较于幼虫等虫态,虫卵具有高度集中且尚未对寄主造成直接破坏的特性,此时采取防治措施,可避免后续因幼虫钻蛀树干导致的一系列严重后果(如植株生长受阻、树干内形成隧道甚至死亡等),从而减少棕榈科植物种植产业在经济和景观维护方面的巨大损失。此外,针对虫卵的防治可显著降低因大规模幼虫危害引发的化学防治强度,减少化学农药的使用量,这不仅有利于降低防治成本,还能最大程度减轻对生态环境的负面影响,保护生物多样性与生态平衡,为可持续的害虫管理策略构建关键的早期防御体系。

我国目前在害虫防控上仍主要采用化学防治手段,例如,将以氨基甲酸酯、苯基吡唑和新烟碱为主要活性成分的杀虫剂注入棕榈植物树干,以防治红棕象甲^[13];然而,持续使用大量的化学药剂势必会使害虫种群逐步产生抗药性。已有证据表明,红棕象甲的田间种群已对毒死蜱、高效氯氟菊酯和吡虫啉等多种常用药剂产生抗药性;该虫在经过吡虫啉的7代选择后,其抗性倍数已达1 883倍,说明在持续的选择压力下,红棕象甲对吡虫啉的抗药性将导致化学杀虫剂失效^[14]。这不仅大大削弱了害虫的防治效果,也在一定程度上降低了农林产品的质量安全水平,并污染了环境^[15]。因此,害虫防治模式正逐渐由单一的化学防治转向以生物防治为核心的综合治理^[16]。

本研究从室内饲养染菌的红棕象甲虫卵中成功分离并纯化得到1株病原细菌,发现该菌株对红棕象甲虫卵具有显著防治效果。通过形态学特征、16S rRNA序列分析以及生理生化特性对该菌株进行了鉴定,旨在为红棕象甲的生物防治提供新的菌株资源。此项发现有望为进一步开发高效环保的红棕象甲新型杀虫剂提供新的思路和途径。

1 材料与方法

1.1 虫源采集和饲养

红棕象甲成虫采集自福建省漳州市闽南师范大学(117.63°E, 24.51°N)及江滨公园(117.66°E, 24.51°N),使用安装在棕榈科植物上的漏斗形诱捕器进行采集,诱捕器距地面约1 m,诱芯每50~60 d更换1次。每隔48 h收集成虫并带回实验室进行饲养^[17]。在实验室中,成虫根据性别配对,安置于植物组织培养瓶中,并提供新鲜甘蔗作为食物^[18]。成虫产卵后,用毛笔挑取虫卵,随后转移至底部铺有湿润脱脂棉的培养皿中孵化^[19]。孵化出的幼虫被转移至60 mm培养皿中,提供适量甘蔗块,随着幼虫成长,转移至更大的培养皿。成虫羽化后继续繁殖下一代。实验室的培养条件为温度(27±1)℃,湿度(75%±5%),光照周期(12 L:12 D),其他虫态则在全黑暗条件下培养。实验所用的虫卵均来自室内饲养的成虫。

1.2 实验仪器与试剂

1.2.1 主要仪器设备

超净工作台、生化培养箱、人工气候箱、高压蒸汽灭菌锅、高速离心机、PCR仪、凝胶电泳

仪、凝胶成像仪、恒温摇床、微量分光光度计、光学显微镜等。

1.2.2 主要试剂配制

(1)营养琼脂(Nutrient Agar, NA)固体培养基:称取 18 g NA 培养基粉末,将其溶解于 1 000 mL 纯水中,121 ℃ 高压蒸汽灭菌 20 min 后,保存于 4 ℃ 冰箱中备用。

(2)营养肉汤(Nutrient Broth, NB)液体培养基:称取 33 g NB 培养基粉末,将其溶解在 1 000 mL 纯水中,121 ℃ 高压蒸汽灭菌 20 min 后,保存于 4 ℃ 冰箱中备用。

(3)1%琼脂糖凝胶:称取 0.2 g 琼脂糖与 20 mL 1×TAE 缓冲液,倒入 100 mL 锥形瓶中,使用微波炉加热 40 s,冷却后添加 1 μL 核酸染料。该溶液需现配现用。

(4)磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffer Saline, PBS):称取 7.9 g NaCl、1.8 g K₂HPO₄、0.24 g KH₂PO₄、0.2 g KCl,将其溶解在 800 mL 蒸馏水中,用 HCl 调节溶液的 pH 值至 7.4,补加蒸馏水至 1 L。将溶液保存于 4 ℃ 冰箱中备用。

1.3 虫卵病原细菌的培养与分离纯化

收集实验室中感染病原细菌的红棕象甲虫卵作为实验样本,在超净工作台上使用无菌接种环采集虫卵上的病原菌脓液,并通过平板划线法将其接种至 NA 固体培养基表面。接种后,将培养皿置于 25 ℃ 的恒温生化培养箱中初步培养 10 h^[20]。培养结束后,使用接种环从培养皿上挑取单个菌落进行连续 4 次分离纯化,最终获得纯培养的细菌分离株。对这些纯培养的分离株在 NA 培养基上形成的菌落进行形态学观察,记录菌落的大小、色泽、形状、边缘特征、隆起程度、质地和透明度等特征。使用甘油保藏法^[21],将菌株保存于-80 ℃ 温度条件下,并命名为 LL-2。

1.4 细菌分离菌株的分子生物学鉴定

1.4.1 细菌总 DNA 的提取

使用无菌接种环从 NA 固体培养基上挑取单个 LL-2 菌落,并将其接种至含有 NB 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中。随后,将锥形瓶置于 37 ℃ 的摇床中,以 200 r/min 的速度过夜培养 12 h。培养完成后,使用移液枪吸取 1 mL 菌液并转移至 1.5 mL 的离心管中。接着,使用高速离心机以 12 000 rpm 的速度离心 1 min,吸除上清液,留下细菌沉淀。按照北京索莱宝科技有限公司提供的细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行细菌基因组 DNA 的提取。

1.4.2 细菌 16S rRNA 序列的扩增

以菌株 DNA 为模板,采用由生工生物工程(上海)股份有限公司合成的细菌 16S rRNA 的通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGT-TACGACTT-3') 扩增 LL-2 的 16S rRNA 全长序列。每个 PCR 反应体系为 50 μL,其中 DNA 模板 4 μL,10 μM 的上游引物 27F 和下游引物 1492R 各 2 μL,2×Taq PCR MasterMix 25 μL 和 ddH₂O 17 μL。反应条件为:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,共 35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min^[22]。先取 5 μL 的 PCR 扩增产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳,检测目的片段的条带和大小,然后将其送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.4.3 16S rRNA 序列同源性比较

根据测序结果,将 LL-2 菌株的 16S rRNA 全长序列提交至 GenBank,并使用 NCBI 的 BLAST 工具进行比对,下载与目标序列具有高同源的序列。使用 MEGA5.22 软件的 Multiple Sequence Alignment 功能进行 16S rRNA 同源性分析,并采用最大似然法(Maximum Likelihood, ML)构建系统发育树。为评估系统发育树的稳定性,使用 MEGA 5.22 软件对发育树进

行 1 000 次的 Bootstrap 分析。

1.5 细菌分离菌株的生理、生化鉴定

分子生物学方法在细菌鉴定中存在一定局限性,因此参照《一般细菌常用鉴定方法》并结合菌株的生理生化反应,进一步对细菌进行分类鉴定^[23]。采用革兰氏染色法^[24],使用北京陆桥技术股份有限公司提供的革兰氏染色试剂盒对分离得到的 LL-2 菌株进行染色,并通过光学显微镜观察菌体细胞的形状、芽孢和大小等形态特征。LL-2 菌株的生化试验使用杭州微生物试剂有限公司提供的细菌微量生化鉴定管进行。接种时,使用接种针从 NA 平板上挑取已分离纯化的 LL-2 菌株单菌落,接种至相应的鉴定管中,随后将其放置于(36±1)℃的生化培养箱中进行培养。各检测项目的培养要求及结果判别见表 1。

表 1 细菌分离菌株的生化鉴定

检测项目	培养时间/h	结果判断		注意事项
		阳性	阴性	
硫化氢	18~24	黑色	不变色	穿刺接种
苯丙氨酸(脱氨酶)	18~24	蓝绿色	不变色	滴加 10%三氯化铁溶液 2~3 滴
葡萄糖酸盐	24~48	橙红色	不变色	培养后按体积比 1:1 加入班氏试剂,混匀煮沸 10 min,冷却后观察结果
蛋白胨水(靛基质)- 吲哚试验	24~48	红色	不变色	滴加 Kovacs 试剂 2~4 滴
葡萄糖(产气)	24~48	黄色产气	蓝色或绿色 不产气	穿刺接种
赖氨酸(脱羧酶)	18~24	紫色	黄色或不变色	每株被检菌应同时接种氨基酸对照管 1 支,并加灭菌液体石蜡覆盖培养基液面。试验管紫色,对照管黄色,为阳性;试验管与对照管均变黄色,为阴性
鸟氨酸(脱羧酶)	18~24	紫色	黄色或不变色	每株被检菌应同时接种氨基酸对照管 1 支,并加灭菌液体石蜡覆盖培养基液面。试验管紫色,对照管黄色,为阳性;试验管与对照管均变黄色,为阴性
棉子糖	18~24	黄色	紫色或不变色	—
山梨醇	18~24	黄色	紫色或不变色	—
侧金盏花醇	18~24	黄色	紫色或不变色	—
木糖	18~24	黄色	紫色或不变色	在 4℃下放置 30 min 后再观察结果

1.6 细菌分离株对红棕象甲虫卵的生物活性测定

从室内饲养的红棕象甲种群中选择无损伤的新鲜虫卵作为供试样品,用 PBS 将 LL-2 菌株分别配制成 1.0×10^5 、 1.0×10^6 、 1.0×10^7 、 1.0×10^8 、 1.0×10^9 CFU/mL 的细菌悬浮液。在实验前,将虫卵放置于铺有无菌水浸润的医用脱脂棉的 9 cm 玻璃培养皿中,每皿均匀分布 10 粒虫卵。采用微量点滴法,将 10 μ L 菌悬液均匀滴加至每粒虫卵表面,磷酸盐缓冲液(PBS)作为对照组。处理后,将虫卵置于(25±1)℃、湿度(75%±5%)、0 L:24 D 光照周期的温控环境中

培养。每组处理 10 粒虫卵,重复 3 次,共 30 粒虫卵用于生物活性测定^[25-26]。实验过程中,每日观察虫卵的感染情况,并记录染菌虫卵数,直至第 7 d。染菌虫卵及时移除,以防交叉感染。使用 Abbott(1925)公式计算校正死亡率,进一步进行毒力回归分析,得出致死中浓度(LC₅₀)。同时,根据科赫法则对染菌虫卵再次分离病原菌,以验证所接种菌株的致病性。

1.7 数据处理与统计学分析

数据整理使用 Excel 2021,统计分析通过 SPSS 23.0 进行,显著性水平设为 $\alpha=0.05$ 。毒力回归采用 probit 模型,根据浓度和死亡率计算 LC₅₀。数据结果以“平均值±标准误(SE)”表示,不同浓度的死亡率和校正死亡率的差异用单因素方差分析(ANOVA)进行检验,多重比较采用 Duncan 法。

2 结果与分析

2.1 LL-2 菌株感染红棕象甲虫卵后的症状与菌落特征

实验室饲养的红棕象甲虫卵在感染 LL-2 菌株后,最初未表现出明显变化,随后颜色由乳白色逐渐转变为粉红色,最终腐烂并有明显的菌脓溢出(图 1)。将感染菌株的虫卵接种至 NA 固体培养基上培养,观察到菌株形成不透明的粘稠液滴,菌落光滑、凸起,边缘不规则,呈近圆形,颜色由无色变为淡红色,并在 25 ℃ 条件下培养 10 h 后显现出鲜红色(图 2)。

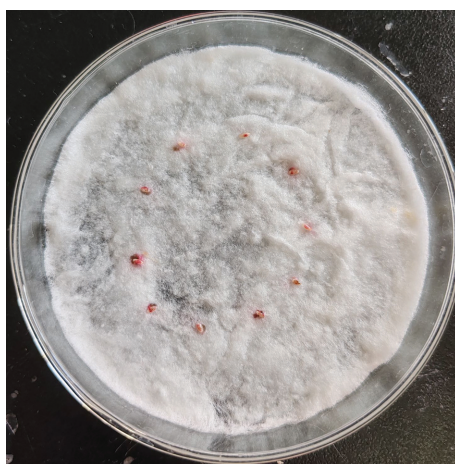
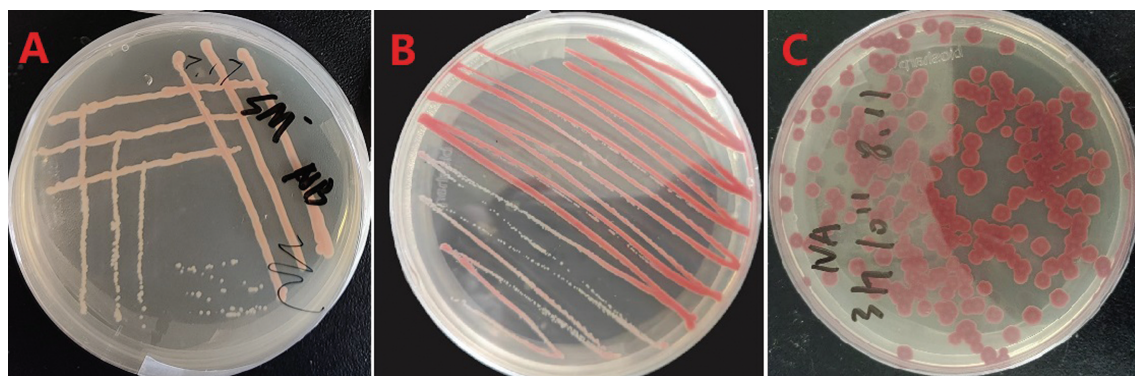


图 1 感染 LL-2 菌株的红棕象甲虫卵

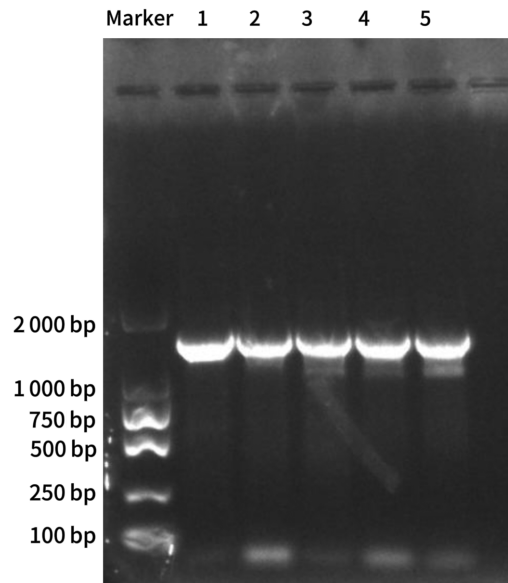


A 为采用平板划线法分离后的菌落初期生长状况, B 为采用平板划线法分离后的菌落后期生长状况, C 为采用稀释涂布法分离后的菌落生长状况。

图 2 染病红棕象甲虫卵分离的 LL-2 细菌菌落

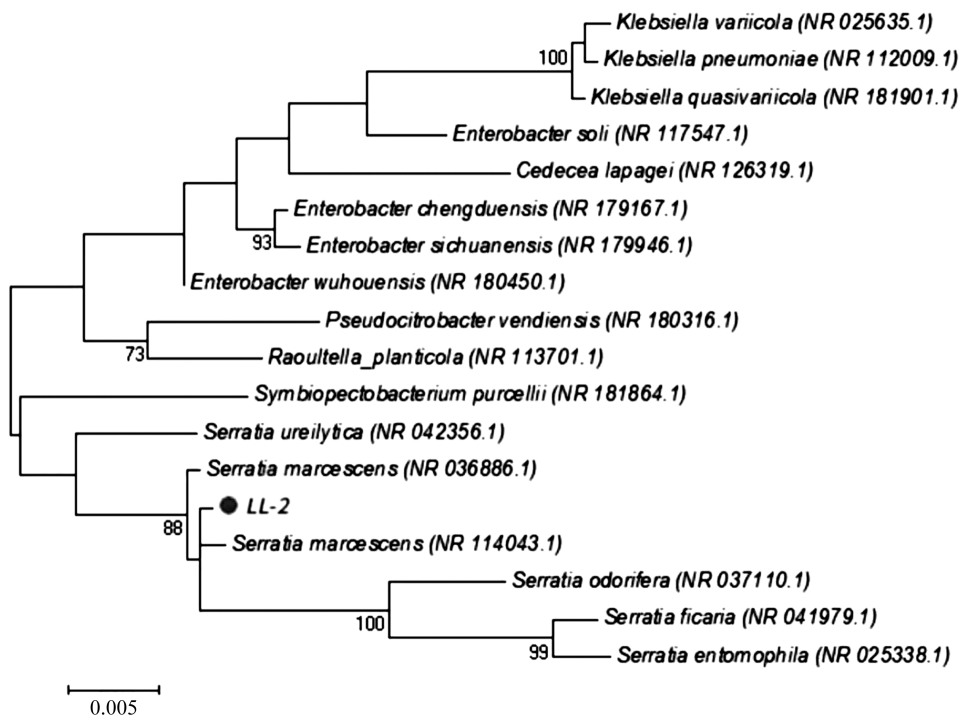
2.2 LL-2 菌株 16S rRNA 序列测定及系统发育分析

LL-2 菌株的 16S rRNA 序列测定结果显示,扩增的 DNA 序列全长为 1 447 bp,与预期目的片段大小一致(图 3)。将该序列通过 GenBank 的 BLAST 工具进行比对,选择与 LL-2 菌株同源性较高的若干模式菌进行系统进化分析。分析结果表明,LL-2 菌株与粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)在一个簇群内,同源性高达 99% 以上(图 4)。



1、2、3、4、5 为细菌菌株 LL-2 的 5 个 PCR 试验重复样本。

图 3 LL-2 菌株 16S rRNA PCR 扩增产物的电泳图

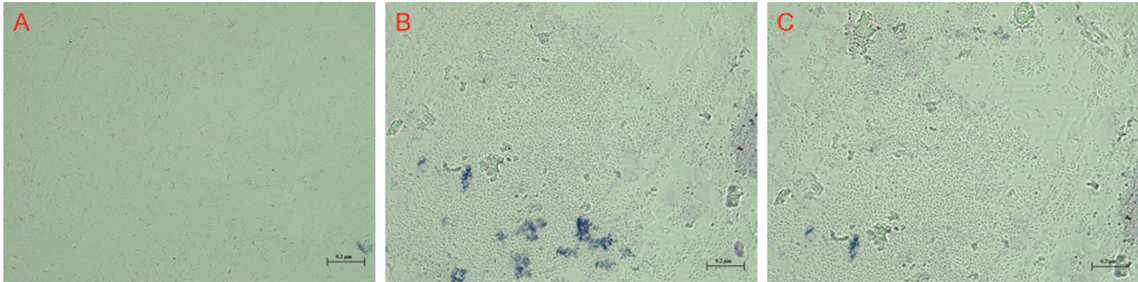


系统发育树采用最大似然法构建;节点上的数字表示自展后的支持率,即 Bootstrap 值;图形底部标尺的线段长度表示 0.5% 的序列差异。

图 4 LL-2 菌株 16S rRNA 序列的系统发育树

2.3 LL-2 菌株的形态特征和生理、生化特性

细菌分离株 LL-2 在培养基上的菌落呈红色、边缘不规则、形状近圆形且隆起、质地光滑且中心不透明。通过革兰氏染色后,在光学显微镜下观察菌体,发现该菌体呈红色、短杆状、无芽孢,大小为 $(1.2\sim 1.5)\mu\text{m}\times(0.7\sim 1.0)\mu\text{m}$,菌株为阴性菌,兼性好氧(图 5),其余生理、生化特性见表 2。参照《一般细菌常用鉴定方法》^[23],最终确定该红棕象甲虫卵的病原细菌分离菌株 LL-2 为粘质沙雷氏菌。



A: 光学显微镜 40×观察; B: 光学显微镜 100×观察; C: 光学显微镜 100×观察。

图 5 LL-2 菌株的细胞形态

表 2 LL-2 菌株的主要生理生化特性

检测项目	LL-2 菌株	粘质沙雷氏菌
革兰氏染色	—	—
氧化酶试验	—	—
硫化氢	—	—
苯丙氨酸	—	—
葡萄糖酸盐	+	+
蛋白胨水(靛基质)——吲哚试验	—	—
葡萄糖水(M.R.)——甲基红试验	—	—
枸橼酸盐	+	+
尿素	—	—
动力试验	+	+
葡萄糖产气试验	+	+
赖氨酸	+	+
鸟氨酸	+	+
棉子糖	—	—
山梨醇	+	+
侧金盏花醇	—	—
木糖	—	—

注: +表示阳性结果, —表示阴性结果。

2.4 LL-2 菌株对红棕象甲虫卵的致病力

红棕象甲虫卵的死亡率随着粘质沙雷氏菌 LL-2 菌株菌液浓度的增加而显著上升,不同浓度处理组之间的死亡率存在显著性差异(死亡率: $F_{4,10}=28.094$, $p<0.001$; 校正死亡率 $F_{4,10}=28.945$, $p<0.001$)。在自然状态下,红棕象甲虫卵的平均孵化率为 83.33%。当使用 1.0×10^5 CFU/mL 的菌液处理虫卵时,孵化率降至 60.00%;而使用 1.0×10^9 CFU/mL 的菌液浓度处理时,卵的平均校正死亡率可高达 95.83%(表 3)。此外,LL-2 菌株的毒力回归分析结果表明,菌液浓度的对数值与红棕象甲虫卵的死亡率呈现正相关关系。菌液浓度越高,红棕象甲虫

卵的死亡率也随之升高。根据毒力回归分析结果, LL-2 菌株 7 d 内对红棕象甲虫卵的 LC_{50} 值为 1.5×10^7 CFU/mL, 表明粘质沙雷氏菌对红棕象甲虫卵具有较高的毒力(表 4)。

表 3 LL-2 菌株对红棕象甲虫卵的致病力

%

处理方法	死亡率	校正死亡率
磷酸盐缓冲液(PBS)	16.67±3.33f	—
1.0×10^5 CFU/mL LL-2 菌株菌液	40.00±5.77e	28.24±4.70e
1.0×10^6 CFU/mL LL-2 菌株菌液	53.33±8.82d	43.98±10.83d
1.0×10^7 CFU/mL LL-2 菌株菌液	66.67±6.67c	59.26±9.26c
1.0×10^8 CFU/mL LL-2 菌株菌液	86.67±3.33b	83.80±4.42b
1.0×10^9 CFU/mL LL-2 菌株菌液	96.67±3.33a	95.83±4.17a

注: 小写字母不同表示组间数据比较差异具有统计学意义($p < 0.05$)。

表 4 LL-2 菌株处理红棕象甲虫卵 7 d 后的毒力回归分析

虫态	毒力回归方程	$LC_{50}/(CFU \cdot mL^{-1})$	χ^2 值
虫卵	$p = -3.770 + 0.239x$	$1.5 \times 10^7 (1.3 \times 10^7 \sim 2.1 \times 10^7)$	16.274

3 结论与讨论

近年来, 红棕象甲虫的入侵对我国本土棕榈产业造成了严重威胁。为应对这一挑战, 我国采取了检疫、物理、化学及生物等多种防治手段。然而, 化学药剂的过度使用使得害虫种群的抗药性逐渐增强, 进而对环境和生态系统造成了显著破坏。作为一种具有可持续控制潜力的防控手段, 生物防治在减少药物残留和抑制害虫抗药性等方面展现出了优势。国内外研究主要集中于金龟子绿僵菌^[9]、球孢白僵菌^[9]、淡紫拟青霉^[10]及苏云金芽孢杆菌^[11]等生物防治资源的应用。本研究从室内饲养的染菌红棕象甲虫卵中分离得到 1 株粘质沙雷氏菌 LL-2, 研究结果表明, 该菌株能够使虫卵的平均致死率达到 95.83%。

国内外学者对真菌、细菌、病毒、线虫等昆虫病原体对害虫的毒力作用及其防控应用进行了广泛研究。目前, 全球范围内关于红棕象甲生物防治的研究主要集中在病原菌对其幼虫的作用, 而关于侵染红棕象甲虫卵的病原菌的研究相对较少。研究表明, 粘质沙雷氏菌对红棕象甲四龄幼虫也具有较高的毒力, 其 LC_{50} 为 1.2×10^7 CFU/mL^[27]。本研究从室内饲养的自然染菌红棕象甲虫卵中分离得到 LL-2 细菌株。通过形态特征、生理生化特性以及 16S rRNA 序列比对分析, 该菌株被鉴定为粘质沙雷氏菌。研究结果进一步证实了该菌株对红棕象甲虫卵具有较强的侵染能力, 其 LC_{50} 为 1.5×10^7 CFU/mL, 这表明粘质沙雷氏菌对红棕象甲幼虫和卵的毒力差异不显著。然而, 关于该菌在这两个虫态中的致病机制及其在全变态发育过程中的保守性仍需进一步研究。

粘质沙雷氏菌是一种自然界中广泛分布的微生物, 能够侵染多种昆虫, 包括棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)、小地老虎(*Agrotis ipsilon*)、粘虫(*Mythimna separata*)、菜青虫(*Pieris rapae* Linne)、马铃薯块茎蛾(*Phthorimaea operculella*)和草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)等^[28]。粘质沙雷氏菌对多种害虫的幼虫具有较强的致病力。例如, 该菌对草地贪夜蛾 3 龄幼虫在 72 h 后的 LC_{50} 为 3.58×10^5 CFU/mL^[29]; 对马铃薯块茎蛾处理后第 3 d 的 LC_{50} 为 9.784×10^{10} CFU/mL^[30]; 其发酵液对桃小食心虫(*Carposina sasakii*)和梨小食心虫(*Grapholitha molesta*)的 LC_{50} 分别为 1.70×10^8 CFU/mL 和 4.00×10^8 CFU/mL^[31]。根据袁梓涵等^[32]的

研究发现,粘质沙雷氏菌能够侵染亚洲玉米螟(*Ostrinia furnacalis*),对3龄幼虫具有强致病性,显著影响其生存和繁殖,其 LC_{50} 为 2.45×10^8 CFU/mL。此外,粘质沙雷氏菌对红棕象甲4龄幼虫也具有较高毒力,其 LC_{50} 为 1.2×10^7 CFU/mL^[27]。然而,现有证据尚未表明粘质沙雷氏菌对害虫虫卵阶段的致病性。本研究首次发现,粘质沙雷氏菌对红棕象甲虫卵具有较高的侵染能力,其 LC_{50} 为 1.5×10^7 CFU/mL,这一发现为将该菌应用于田间生物防治提供了理论依据。

本研究发现,粘质沙雷氏菌对红棕象甲虫卵表现出较强的毒力,且其毒力随菌液浓度的增加而增强。粘质沙雷氏菌通过其分泌的各种代谢产物对寄主昆虫进行侵染,会导致昆虫出现败血症。沙雷氏菌的分泌物中包含蛋白酶和几丁质酶,这些酶类能够有效防治害虫;其中,几丁质酶通过破坏昆虫肠道的围食膜,导致肠上皮细胞结构畸形,从而产生毒害效果^[33]。本研究分离获得的粘质沙雷氏菌 LL-2 菌株不仅对新的虫态具有较强的致病力,还突破了传统生物防治手段的局限,尤其是在白僵菌和绿僵菌等常用生防资源的基础上,提供了新的生物防治方案。此外,如果这些病原体能够成功侵染成虫,并与聚集信息素协同使用,将有助于抑制红棕象甲的种群在田间的发生和发展,为害虫的绿色防控提供新的思路^[34]。然而,粘质沙雷氏菌对成虫的致病作用仍需进一步研究和验证。

昆虫能够通过体外免疫防御和体内免疫响应来抵抗病原微生物^[35-38]。Wang 等^[39]和 Luo 等^[40]的研究分别指出,美国白蛾(*Hyphantria cunea*)和黑胸散白蚁(*Reticulitermes chinensis*)在抵抗粘质沙雷氏菌时,细胞免疫和体液免疫均发挥重要作用。此外,昆虫与其肠道共生微生物之间的相互作用也对病原体的抵抗起到了关键作用。Steele 等^[41]的研究发现,粘质沙雷氏菌能够分泌一种具有拮抗作用的效应蛋白 T6SS,这种蛋白对蜜蜂具有高度毒性,导致蜜蜂死亡率上升。然而,蜜蜂肠道中的共生微生物能够产生抑制沙雷氏菌生长的代谢物,显示出昆虫共生微生物在宿主免疫防御中的潜在作用。

虽然生物防治被认为是一种具备持续控制潜力的防治手段,但由于昆虫自身免疫系统的运转,病原防治效果不甚理想。本研究发现粘质沙雷氏菌在室内条件下对红棕象甲虫卵具有较强的侵染性,但其在田间的防治效果可能不稳定。单一病原菌在田间常面临见效慢、周期长、防治效果差的问题。为提高昆虫病原菌的杀虫效率,可以考虑将不同作用机制的病原菌进行复配,探讨病原菌联合杀虫效果。

一些研究已证明,沙雷氏菌与绿僵菌混配能够明显提高单一菌株对德国小蠊(*Blattella germanica*)的致病力;例如,当 1.0×10^9 CFU/mL的粘质沙雷氏菌与绿僵菌复配时,9 d内可以使德国小蠊的致死率达到100%,而单独的粘质沙雷氏菌处理时,9 d内死亡率仅为5%^[42];有机硅与生物农药球孢白僵菌与绿僵菌按1:5混合使用也能显著提高对小云斑鳃金龟(*Polyphylla laticolla laticollis*)的防治效果^[43]。然而,当前针对病原菌混配防治的研究较少,探索病原菌混配以提高单一菌株毒力的策略,在未来的害虫综合治理中具有重要应用前景。

此外,病原菌与化学农药的混合使用在田间也取得了一定的控制效果。例如,博落回生物碱与苏云金芽孢杆菌按照一定质量分数进行混配时,当混配比例为73:1可提高对小菜蛾(*Plutella xylostella*)的毒杀能力^[44]。

粘质沙雷氏菌不仅在病虫害防治中具有潜力,还能促进植物生长并降解土壤中的农药残留^[45]。由此可见,粘质沙雷氏菌在生物防治、农业生产以及土壤修复等方面具有广泛的应用前景,值得进一步研究与开发。然而,本研究中,粘质沙雷氏菌 LL-2 分离株的生物活性是在严格控制的实验室条件下进行的,田间环境中固有的影响因子及其对该菌株侵染活性的作用尚未明确。因此,未来需要将该菌株引入田间试验,调查其在实际田间环境中的杀虫谱、毒力及应用技术,同时评估其对非靶标生物的安全性,为该菌株作为绿色害虫抑制剂的进一步开发和应用提供理论支持。

参考文献:

- [1] 杨国玲. 分析昆明地区加拿利海枣红棕象甲的危害及防治措施 [J]. 低碳世界, 2020, 10(7): 231-232.
- [2] 薛锐, 陈杰, 付玉飞, 等. 一株侵染棕榈象甲幼虫的白僵菌的分离鉴定及其毒力 [J]. 植物保护, 2023, 49(4): 131-139.
- [3] BAKER W J, NORUP M V, CLARKSON J J, et al. Phylogenetic Relationships among Arecoid Palms (Arecaceae: Arecoideae) [J]. Annals of Botany, 2011, 108(8): 1417-1432.
- [4] 李岩. 福建厦门红棕象甲虫情分析及防治对策探究 [J]. 亚热带植物科学, 2021, 50(2): 147-154.
- [5] 覃伟权, 李朝绪, 黄山春. 红棕象甲在中国的风险性分析 [J]. 江西农业学报, 2009, 21(9): 79-82, 85.
- [6] EL-SABEA A M R, FALEIRO J R, ABO-EL-SAAD M M. The Threat of Red Palm Weevil *Rhynchophorus ferrugineus* to Date Plantations of the Gulf Region in the Middle-East: an Economic Perspective [J]. Outlooks on Pest Management, 2009, 20(3): 131-134.
- [7] MURPHY S T, BRISCOE B R. The Red Palm Weevil as An Alien Invasive: Biology and the Prospects for Biological Control as a Component of IPM [J]. Biocontrol News and Information, 1999, 20(1): 35-45.
- [8] 韩宙, 周靖, 钟锋, 等. 红棕象甲危害及其防治研究进展 [J]. 广东农业科学, 2013, 40(1): 68-71.
- [9] GINDIN G, LEVSKI S, GLAZER I, et al. Evaluation of the Entomopathogenic Fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* Against the Red Palm Weevil *Rhynchophorus ferrugineus* [J]. Phytoparasitica, 2006, 34(4): 370-379.
- [10] 钟宝珠, 吕朝军, 覃伟权, 等. 淡紫色拟青霉对红棕象甲成虫室内毒力初步研究 [J]. 热带林业, 2019, 47(3): 69-71.
- [11] LIU Q X, SU Z P, LIU H H, et al. The Effect of Gut Bacteria on the Physiology of Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier and Their Potential for the Control of this Pest [J]. Insects, 2021, 12(7): 594.
- [12] PU Y C, MA T L, HOU Y M, et al. An Entomopathogenic Bacterium Strain, *Bacillus thuringiensis*, as a Biological Control Agent Against the Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) [J]. Pest Management Science, 2017, 73(7): 1494-1502.
- [13] 马兵. 基于多组学的红棕象甲抵御不同病原菌侵染的免疫应答机理解析 [D]. 福州: 福建农林大学, 2023.
- [14] AHMED R, FREED S. Biochemical Resistance Mechanisms Against Chlorpyrifos, Imidacloprid and Lambda-Cyhalothrin in *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) [J]. Crop Protection, 2021, 143: 105568.
- [15] 崔哲雨, 黄念庭, 何鹏, 等. 苏云金芽孢杆菌在害虫防治领域的应用进展 [J]. 现代面粉工业, 2023, 37(1): 13-18.
- [16] 刘超, 徐翔, 伍兴隆, 等. 2种生物防治方法对瓜蚜的防治效果 [J]. 中国植保导刊, 2021, 41(9): 59-61.
- [17] 黄山春, 覃伟权, 阎伟, 等. 红棕象甲人工饲养技术研究 [J]. 安徽农业科学, 2020, 48(3): 139-142.
- [18] 王凤, 鞠瑞亭, 李跃忠, 等. 利用甘蔗饲养红棕象甲的技术 [J]. 昆虫知识, 2009, 46(6): 967-969.
- [19] 蒲宇辰. 红棕象甲体外免疫效能及其与体内免疫权衡的生理调控 [D]. 福州: 福建农林大学, 2020.
- [20] 张晶, 覃伟权, 阎伟, 等. 一株对红棕象甲幼虫和卵有致病力的病原菌的分离鉴定 [J]. 热带作物学报, 2011, 32(12): 2331-2335.
- [21] 孙藏. 浅谈微生物菌种保藏方法 [J]. 轻工标准与质量, 2021(1): 95-96.
- [22] 肖勇. 16S rRNA/rDNA 序列分析技术应用于环境微生物群落的初步研究 [D]. 长沙: 湖南大学, 2007.
- [23] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法 [M]. 北京: 科学出版社, 1978.
- [24] 谭啸, 章熙东. 革兰氏染色法观察与区分细菌 [J]. 生物学教学, 2019, 44(7): 71-72.
- [25] 张晶, 覃伟权, 阎伟, 等. 金龟子绿僵菌对红棕象甲的室内致病力测定 [J]. 热带作物学报, 2012, 33(5): 899-905.
- [26] 徐利, 蓝江林, 侯有明, 等. 感染水椰八角铁甲的绿僵菌的分子鉴定及致病力测定 [J]. 应用昆虫学报, 2011, 48(4): 922-927.

- [27] PU Y C, HOU Y M. Isolation and Identification of Bacterial Strains with Insecticidal Activities from *Rhynchophorus ferrugineus* Oliver (Coleoptera: Curculionidae) [J]. Journal of Applied Entomology, 2016, 140(8): 617-626.
- [28] 丁秀琼. 一株蝗虫病原菌的分离鉴定及其毒力研究 [D]. 成都: 四川大学, 2007.
- [29] 孙明凯. 生防菌 FCA-1 分离鉴定及其对草地贪夜蛾致病力和肠道酶活及微生物的影响 [D]. 海口: 海南大学, 2021.
- [30] 苏造堂, 张凌英, 徐天梅, 等. 马铃薯块茎蛾幼虫致病黏质沙雷氏菌的分离鉴定及杀虫活性 [J]. 中国生物防治学报, 2020, 36(3): 361-370.
- [31] 张伟康. 粘质沙雷氏菌 *Serratia marcescens* XC-1 对两种果树食心虫致病力的研究 [D]. 保定: 河北农业大学, 2021.
- [32] 袁梓涵, 王小武, 丁新华, 等. 亚洲玉米螟越冬后幼虫致病细菌——黏质沙雷氏菌的分离鉴定及杀虫活性评价 [J]. 中国生物防治学报, 2024, 40(2): 310-318.
- [33] ZHAO L N, MA Y, YANG X B, et al. Identification of *Serratia marcescens* Isolated from *Antheraea pernyi* Eggs and Determination of Bacterial Pathogenicity and Transmission Pathway [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2020, 169: 107297.
- [34] 朱宇锟, 时增增, 刘云飞, 等. 粘质沙雷氏菌的生防作用 [J]. 四川农业科技, 2023(2): 53-57.
- [35] 曾令瑜, 李志红, 柳丽君. 昆虫免疫及五种重要入侵昆虫免疫机制研究进展 [J]. 植物保护学报, 2019, 46(1): 6-16.
- [36] 张明明, 初源, 赵章武, 等. 昆虫天然免疫反应分子机制研究进展 [J]. 昆虫学报, 2012, 55(10): 1221-1229.
- [37] PU Y C, XIANG H J, LIANG X Y, et al. External Immune Inhibitory Efficiency of External Secretions and Their Metabolic Profiling in Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) [J]. Frontiers in Physiology, 2020, 10: 1624.
- [38] PU Y C, WANG R, LIU H H, et al. Immunosenescence along with Direct Physiological Allocation Trade-Offs between Life History and Immunity in the Red Palm Weevil *Rhynchophorus ferrugineus* [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2021, 123: 104143.
- [39] WANG Z Q, FENG K, TANG F, et al. Activation of the Host Immune Response in *Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera: Noctuidae) Induced by *Serratia marcescens* Bizio [J]. Insects, 2021, 12(11): 983.
- [40] LUO J, WANG Z Q, TANG F, et al. Immune Defense Mechanism of *Reticulitermes chinensis* Snyder (Blattodea: Isoptera) Against *Serratia marcescens* Bizio [J]. Insects, 2022, 13(3): 226.
- [41] STEELE M I, MOTTA E V S, GATTU T, et al. The Gut Microbiota Protects Bees from Invasion by a Bacterial Pathogen [J]. Microbiology Spectrum, 2021, 9(2): e0039421.
- [42] 赵海政. 沙雷氏菌与绿僵菌复配对德国小蠊生物防治的研究 [D]. 济南: 山东师范大学, 2023.
- [43] 孟秀鹏, 梁巧兰, 魏列新, 等. 有机硅与生物农药混配对小云斑鳃金龟的毒杀增效作用 [J]. 中国植保导刊, 2021, 41(12): 54-56, 90.
- [44] 谷清义, 聂淑君, 马润红, 申君. 博落回生物碱与 Bt 复配对小菜蛾的毒力增效作用 [J]. 长江蔬菜, 2023(2): 25-29.
- [45] 马海燕. 粘质沙雷氏菌对花生连作土壤的修复及其高产灵菌红素的研究 [D]. 南京: 南京师范大学, 2015.