

嗜菌异小杆线虫 H06 品系对红棕象甲各虫态的致病力及 感染行为

吕朝军, 赵建超, 钟宝珠*, 张楚毓, 陈拓, 李文莲

中国热带农业科学院椰子研究所, 海南文昌 571339

摘要: 为阐明昆虫病原线虫 (entomopathogenic nematodes, EPNs) 对红棕象甲 (*Rhynchophorus ferrugineus*) 的防控潜力, 采用室内生物测定法研究了嗜菌异小杆线虫 H06 品系对红棕象甲各虫态的致病力及其感染行为学特性。结果表明, 各虫态红棕象甲被 EPNs 感染后, 卵的死亡率最高, LC_{50} 为 104.85 IJs/mL, 其次为 1~2 龄幼虫、3~4 龄幼虫和 5~6 龄幼虫, 其 LC_{50} 分别为 165.34、215.31、292.26 IJs/mL; 7~10 龄幼虫和蛹对 EPNs 的敏感性无显著差异; 不同接种部位对不同龄期幼虫死亡率的影响中, 3 龄幼虫处理以气孔和肛门接种的死亡率较高, 分别为 91.11% 和 78.89%, 而 6 龄和 8 龄幼虫处理中均以口器接种致死率最高; 在肛门接种处理中, 各龄期的红棕象甲幼虫死亡率无显著差异。经 EPNs 感染后, 红棕象甲各虫态体色均变成红色或红褐色, 轻触虫体无自主反应, 同时幼虫伴随体壁皱缩; 线虫接近供试虫体表气孔后, 会在气孔周围停留片刻, 最后从气孔处进入虫体, 成功侵入的 EPNs 个体数量约占 33.33%。

关键词: 嗜菌异小杆线虫; 致病力; 红棕象甲; 形态学

中图分类号: S476 文献标识码: A

Pathogenicity and Infection Behavior of *Heterorhabditis bacteriophora* H06 Strain to Different States of *Rhynchophorus ferrugineus* Oliver

LYU Chaojun, ZHAO Jianchao, ZHONG Baozhu*, ZHANG Chuyu, CHEN Tuo, LI Wenlian

Coconut Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Wenchang, Hainan 571339, China

Abstract: In order to clarify the potential of entomopathogenic nematodes (EPNs) on the control of *Rhynchophorus ferrugineus*, the pathogenicity of *Heterorhabditis bacteriophora* H06 against all stages of *R. ferrugineus* and the behavior of the invading red palm weevil larvae was studied using laboratory bioassay methods. The results showed that the mortality of eggs was the highest in all stages after *R. ferrugineus* was infected by EPNs, and LC_{50} was 104.85 IJs/mL, followed by 1–2 instar larvae, 3–4 instar larvae and 5–6 instar larvae, LC_{50} was 165.34 IJs/mL, 215.31 IJs/mL and 292.26 IJs/mL respectively; No significant differences were observed in the sensitivity between 7–10 instar larvae and pupae to EPNs. Among the effects of inoculation site on the mortality of different instar larvae, the mortality of the 3rd instar larvae was the highest when inoculated with spiracle and anus, which was 91.11% and 78.89% respectively, while the lethal rate of inoculation with mouthparts was the highest in the treatment of the 6th and 8th instar larvae. No significant difference presented in the mortality of different instar *R. ferrugineus* larvae when treated with vent inoculation. The *R. ferrugineus* body color changed to red or reddish brown, no spontaneous response when touching, and the body wall of *R. ferrugineus* shrunk after treated by EPNs. When the nematode approached the spiracle of *R. ferrugineus* larval, it stayed around the spiracle for a moment, and finally entered the insect body, and the number of EPNs successfully invaded was about 33.33%.

Keywords: *Heterorhabditis bacteriophora*; pathogenicity; *Rhynchophorus ferrugineus* Oliver; morphological

收稿日期 2022-08-01; 修回日期 2022-09-15

基金项目 海南省自然科学基金高层次人才项目 (No. 320RC740)。

作者简介 吕朝军 (1980—), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 热带有害生物预警监测与综合治理。*通信作者 (Corresponding author): 钟宝珠 (ZHONG Baozhu), E-mail: baozhz@163.com。

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.08.020

红棕象甲 (*Rhynchophorus ferrugineus* Oliver) 是我国重要的检疫性害虫, 分布于海南、广东、广西、重庆、台湾、云南、西藏、香港、澳门、江西、上海、四川、贵州、浙江、福建等地^[1-2], 也是世界上椰子 (*Cocos nucifera* L.)、油棕 (*Elaeis guineensis* Jacq.)、椰枣 (*Phoenix dactylifera* L.) 等棕榈科作物的重大害虫。该虫主要通过钻蛀植物的茎干和生长点危害, 由于其为害隐蔽, 在植株表现症状时多数已无法挽救。

目前生产上对于红棕象甲的防治方法包括茎干注射^[2]、药剂喷雾^[3]、信息素诱捕^[4]等。在该虫生物防治方面已取得了一些成就^[5-7], 其中昆虫病原线虫 (entomopathogenic nematodes, EPNs) 作为重要的生防因子之一^[7], 可与其他生物形成共生关系^[8], 截至 2015 年底, 已报道 95 种斯氏线虫和 16 种异小杆线虫^[9]。BARBARA 等^[10]研究了斯氏线虫 (*Steinernema carpocapsae*) 对红棕象甲的致死效果, 及其对红棕象甲生长发育及幼虫的免疫活性等影响, 当 EPNs 通过肛门、气孔和口腔进入宿主后, 会在宿主血腔中释放共生细菌引起细胞毒性, 并引起败血症导致宿主死亡^[11]; 田间试验结果表明, EPNs 对红棕象甲的预防效果达 98%, 治愈率达 80%^[12]。同时嗜菌异小杆线虫 (*Heterorhabditis bacteriophora*) 和昆虫病毒以 1:5 混合对红棕象甲的防治效果较好^[13]; 嗜菌异小杆线虫与白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 混用对于红棕象甲幼虫具有增效作用, 尤其对低龄幼虫的增效作用更显著^[14]。目前针对 EPNs 侵染红棕象甲的研究多集中在幼虫, 而较少报道对其他虫态是否有致病性的研究, 因此本文研究了嗜菌异小杆线虫 H06 (*Heterorhabditis bacteriophora* H06) 品系对红棕象甲各虫态的致病力, 并对其侵染途径及侵染过程等进行系统观察, 以期为红棕象甲生物防治策略的科学制定提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

红棕象甲和嗜菌异小杆线虫 H06 品系均由中国热带农业科学院椰子研究所生物防治实验室自繁自养。其中红棕象甲采用半人工饲料^[15]饲养; 嗜菌异小杆线虫 H06 品系以大蜡螟幼虫为寄主进行扩繁, 采用 White trap 法^[16]收集 3 龄侵染期线

虫 (infective juveniles, IJs), 用蒸馏水稀释成系列浓度, 备用。

试虫繁育及实验均在温度 (26±1)°C, 相对湿度 70%±5% 的昆虫繁育室开展。

1.2 方法

1.2.1 嗜菌异小杆线虫 H06 品系对红棕象甲的致病力测定 养虫杯 (直径 4 cm, 高 3 cm) 杯底覆盖滤纸, 杯顶置通气孔, 用移液枪滴加 1 mL 不同浓度线虫液至滤纸上, 将红棕象甲 5 个龄期段 (1~2 龄、3~4 龄、5~6 龄、7~8 龄、9~10 龄) 幼虫、卵、蛹、成虫分别置于养虫杯中。处理 5 d 后统计试虫死亡率, 并以对照组死亡率对处理死亡率进行校正。每处理 30 头, 重复 3 次, 以蒸馏水处理为对照。幼虫、蛹、成虫死亡标准: 以昆虫针轻触虫体, 完全不动者为死亡。卵死亡标准: 以变红色或黑色为死亡。

死亡率=死亡虫口数/处理总虫口数×100%

校正死亡率=(处理死亡率-对照死亡率)/(1-对照死亡率)×100%

1.2.2 红棕象甲不同虫态被嗜菌异小杆线虫 H06 品系侵染后的形态学变化 使用线虫液 (500 IJs/mL) 分别对红棕象甲 6 龄幼虫、预蛹、初产 1 d 卵、新羽化成虫进行处理。其中幼虫和预蛹滴加 200 μL 于前胸背板处, 成虫滴加 200 μL 于前胸背板和中胸之间连接处, 卵直接在线虫液中浸渍 5 s 取出, 处理后将试虫单独放置于养虫盒中, 成虫和幼虫以甘蔗块为补充营养。处理 72 h 后用索尼摄像机 (FDR-AX700) 拍照记录红棕象甲各虫态被 EPNs 侵染后的典型形态学变化。

1.2.3 嗜菌异小杆线虫 H06 品系从红棕象甲幼虫不同部位的侵入效果 选取红棕象甲 3 龄、6 龄、8 龄幼虫, 以每克虫体重接种 100 IJs 剂量嗜菌异小杆线虫 H06 品系, 分别接种于红棕象甲口器、气孔和肛门周围, 处理 4 d 后统计死亡虫数。死亡标准为用昆虫针轻触虫体, 完全不动者为死亡。每处理接种 30 头, 重复 3 次, 以未接种处理为对照。

1.2.4 嗜菌异小杆线虫 H06 品系对红棕象甲幼虫腹侧气孔的侵入行为观测 以红棕象甲 8 龄幼虫为寄主, 接种 24 h 后观察虫体气孔周围嗜菌异小杆线虫 H06 品系的分布情况。为便于观察, 用防水蓝色记号笔在红棕象甲幼虫气孔处进行轻微涂抹, 利用解剖镜 (凤凰 XTL-165-LD500u) 持续

观察线虫从红棕象甲气孔侵入虫体的过程并记录。

1.3 数据处理

致病力测定结果中, 根据黄剑等^[17]的方法, 采用 Excel 统计软件求毒力回归方程及 LC_{50} 、 LC_{50} 的 95% 置信区间等。嗜菌异小杆线虫 H06 品系致病力数据采用试虫的校正死亡率进行分析, 采用邓肯氏新复极差检验法 (DMRT 法) 进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 嗜菌异小杆线虫 H06 品系对红棕象甲不同虫态的致病力

红棕象甲各虫态均可被嗜菌异小杆线虫 H06 品系侵染 (表 1)。从毒力测定结果可知, 嗜菌异小杆线虫 H06 品系对红棕象甲卵和 1~2 龄幼虫的

毒力水平最高, 二者无显著差异。随着幼虫龄期增加, 红棕象甲对嗜菌异小杆线虫 H06 品系的敏感性逐渐降低, 其 LC_{50} 值逐渐增大; 嗜菌异小杆线虫 H06 品系对红棕象甲蛹和成虫的致病力无差异, 但均低于卵和 1~6 龄幼虫。此外, 5~6 龄幼虫与 7~8 龄幼虫之间、7~10 龄幼虫与蛹之间、9~10 龄幼虫与成虫之间对嗜菌异小杆线虫 H06 品系的敏感性均无显著差异。

2.2 红棕象甲不同虫态被嗜菌异小杆线虫 H06 品系侵染后的形态学变化

经嗜菌异小杆线虫 H06 品系侵染后, 红棕象甲幼虫、预蛹、蛹和卵均死亡, 轻触虫体无自主反应, 体色变成红色或红褐色, 同时伴随虫体体壁皱缩僵硬。成虫经嗜菌异小杆线虫 H06 品系处理后体色加深, 体表斑纹逐渐消失 (图 1)。

表 1 嗜菌异小杆线虫 H06 品系对红棕象甲不同虫态的致病力
Tab. 1 Pathogenicity of *H. bacteriophora* H06 against different stage of *R. ferrugineus*

发育虫态 Development stage	毒力回归方程 Toxicity regression equation	LC_{50} ($IJs \cdot mL^{-1}$)	相关系数 r	95% 置信区间 95% confidence interval/($IJs \cdot mL^{-1}$)	
卵	$y=3.1531+0.9141x$	104.85	0.9171	66.62~165.01	
幼虫	1~2 龄	$y=-0.6072+2.5276x$	165.34	0.9447	148.25~184.39
	3~4 龄	$y=-0.6455+2.4198x$	215.31	0.9583	191.71~241.81
	5~6 龄	$y=-0.8787+2.3841x$	292.26	0.9690	244.37~349.54
	7~8 龄	$y=-1.3768+2.4547x$	396.06	0.9701	301.65~520.01
	9~10 龄	$y=-3.8601+3.2023x$	584.45	0.9262	388.72~878.75
蛹	$y=0.1328+1.7654x$	571.54	0.9885	456.58~715.46	
成虫	$y=-0.2463+1.8261x$	746.22	0.9500	626.09~889.39	

注: 以 95% 置信区间是否重叠作为显著性差异的判断标准。

Note: Significant criteria is whether 95% confidence interval of LD_{50} overlaps or not.

2.3 嗜菌异小杆线虫 H06 品系对不同龄期红棕象甲幼虫不同部位的侵入效果

红棕象甲幼虫不同部位被嗜菌异小杆线虫 H06 品系侵染后, 红棕象甲死亡率如表 2 所示。红棕象甲 3 龄幼虫的接种处理中, 以气孔和肛门处接种的致死率较高, 且二者无显著差异, 分别为 91.11% 和 78.89%, 均显著高于口器接种处理; 而在 6 龄幼虫和 8 龄幼虫的接种处理中均以口器接种致死率最高, 分别为 95.56% 和 98.89%, 其次为肛门接种和气孔接种。

口器接种处理中, 6 龄和 8 龄红棕象甲幼虫死亡率无显著差异, 但均显著高于 3 龄幼虫死亡率; 在气孔接种处理中, 3 龄幼虫的死亡率显著高于 6 龄和 8 龄幼虫; 而在尾部肛门接种处理中, 供试 3 个龄期的红棕象甲幼虫死亡率无显著

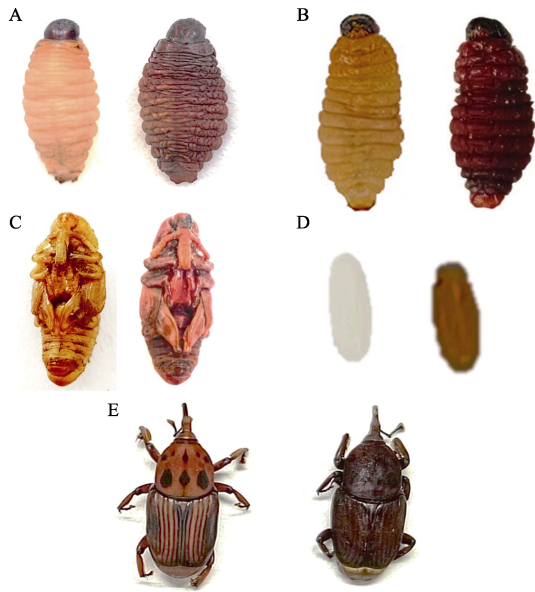
差异。

2.4 嗜菌异小杆线虫 H06 品系从红棕象甲幼虫气孔侵入的行为观测

研究表明, 嗜菌异小杆线虫 H06 品系接近红棕象甲气孔后, 在气孔周围停留一段时间, 之后从气孔进入虫体 (图 2), 从开始进入气孔至完全进入虫体整个过程持续 2~5 min; 部分线虫在进入气孔的过程中会退出, 亦有部分线虫直接从气孔上爬过而不侵入虫体, 接触到红棕象甲虫体气孔的线虫且成功进入虫体的比例为 33.33%。

3 讨论

EPNs 作为一种生防因子, 已经在部分害虫的防治上得到了应用。如小卷蛾斯氏线虫 (*Steinernema carpocapsae*) All 品系与草地贪夜蛾数量比为



A: 幼虫; B: 预蛹; C: 蛹; D: 卵;
E: 成虫。左为处理前, 右为处理后。
A: Larvae; B: Pre pupa; C: Pupa; D: Egg;
E: Adults. Left is before treated, right is after treated.

图 1 红棕象甲被嗜菌异小杆线虫 H06 品系侵染 72 h 后的形态变化

Fig. 1 Morphological changes of *R. ferrugineus* after treated by *H. bacteriophora* H06 strain 72 h

50 : 1 时, 侵染 36 h 后草地贪夜蛾 2 龄幼虫的死亡率为 92%^[18]; EPNs 配合人工诱食剂和增效助

剂, 可长期较好地抑制小地老虎对烟草幼苗的危害^[19]; 600 IJs/mL 线虫液处理 24 h 后, Wn01 线虫对红脉穗螟的校正死亡率达到 86.67%^[20]。SHAHINA 等^[21]研究发现, 供试的 7 种 EPNs 对红棕象甲各虫态均具有较好的致病效果; 在阿联酋椰枣园红棕象甲的防控实验结果显示, 一种本土分离的 *Heterorhabditis indicus* 线虫能在短时间内灭杀红棕象甲幼虫、成虫和蛹^[22]。由于 EPNs 对昆虫宿主的高致病性^[23], 小卷蛾斯氏线虫 (*Steinernema carpocapsae* Weiser) 和嗜菌异小杆线虫 (*H. bacteriophora* Poinar)^[24] 已制作成生防制剂并用于有害生物综合治理 (IPM) 中。前期研究显示, 嗜菌异小杆线虫 H06 品系对红棕象甲幼虫具有一定的致死作用, 且虫体呈现出僵硬皱缩、体色变褐、身体肿胀直至虫体腐烂、线虫游离而出的现象^[7]。本研究进一步证明, 嗜菌异小杆线虫 H06 品系不仅可侵染红棕象甲幼虫, 同时对红棕象甲蛹、成虫、卵等也具有侵染活性。其中对红棕象甲卵和 1~2 龄幼虫的毒力水平最高, 这可能与不同虫态对 EPNs 的耐受力差异有关, 也说明在红棕象甲卵期和低龄幼虫期利用嗜菌异小杆线虫 H06 品系进行可取得较好的防效。

EPNs 侵染寄主的方式分为 3 种: 潜伏型、攻

表 2 嗜菌异小杆线虫 H06 品系对不同龄期红棕象甲幼虫不同接种部位的致死效果

Tab. 2 Lethal effect of *H. bacteriophora* H06 strain on *R. ferrugineus* larvae through different inoculation site

接种部位 Inoculation site	校正死亡率 Corrected mortality/%		
	3 龄幼虫 3rd instar larvae	6 龄幼虫 6th instar larvae	8 龄幼虫 8th instar larvae
口器	32.22±2.22 ^{Bb}	95.56±2.94 ^{Aa}	98.89±1.11 ^{Aa}
气孔	91.11±4.01 ^{Aa}	55.56±2.94 ^{Bc}	63.33±1.92 ^{Bc}
肛门	78.89±2.22 ^{Aa}	76.67±5.09 ^{Ab}	78.89±4.84 ^{Ab}

注: 同行不同大写字母表示同一部位不同龄期间差异显著 ($P<0.05$); 同列不同小写字母表示同一龄期不同部位间差异显著 ($P<0.05$)。

Note: Different capital letters in the same line indicate significant difference between different ages in the same site ($P<0.05$); Different lowercase letters in the same column indicate significant difference between different sites in the same age ($P<0.05$).



A: 线虫接近体表气孔; B: 线虫开始进入气孔; C: 线虫已进入虫体。圆圈处为线虫。
A: Nematodes approach the surface stomata of the body; B: Nematodes begin to enter the stomata;
C: The nematode has entered the body. The circle indicates the nematodes.

图 2 嗜菌异小杆线虫 H06 品系从红棕象幼虫气孔进入虫体过程

Fig. 2 Process of *H. bacteriophora* H06 entering *R. ferrugineus* larvae body through spiracle

击型和中间型^[25]。其中斯氏线虫的垂直扩散能力较强, 搜索策略为潜伏型, 而异小杆线虫对寄主的感应强烈且主动搜索力较强, 适于侵染隐蔽性害虫^[26-27]。本研究发现, 嗜菌异小杆线虫 H06 品系在有水为介质的情况下会游离至红棕象甲幼虫气孔附近, 并通过气孔进入虫体, 但观察发现其进入虫体气孔无目的性, 即并不是所有抵达气孔的线虫均会侵入至虫体, 因此嗜菌异小杆线虫 H06 品系从红棕象甲气孔侵入虫体, 是由气孔散发的气味吸引其向气孔定向移动? 还是偶然经过气孔附近进而侵入? 还需进一步深入研究。

EPNs 侵入虫体后会释放共生细菌, 通过细菌毒素和线虫消耗寄主营养致寄主死亡^[28], 虫尸棕色表示该虫是由斯氏线虫侵染所致, 而红色则为异小杆线虫侵染所致, 颜色差异是由于尸体中共生细菌释放的色素不同^[10], 本研究结果也表明, 经嗜菌异小杆线虫 H06 品系侵染后, 红棕象甲的卵、幼虫、预蛹、蛹及成虫等各虫态体色均变成红色或红褐色, 此结果与王国汉等^[28]发现的异小杆线虫侵染虫体后导致寄主尸体初为桔红色、后期为红褐色一致。

EPNs 从红棕象甲幼虫不同部位接种后, 死亡率存在显著差异, 其中 3 龄幼虫处理中, 以气孔和肛门处接种的致死率较高, 而 6 龄和 8 龄幼虫处理均以口器接种致死率最高。在气孔接种处理中, 3 龄幼虫的死亡率较高; 而在尾部肛门接种处理中, 供试 3 个龄期的红棕象甲幼虫死亡率无显著差异, 究其原因可能与红棕象甲幼虫的气孔、口器及肛门的发育特征有关, 其致病机理还需进一步深入研究。

参考文献

- [1] LI Y Z, ZHU Z R, JU R T. The red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae), newly reported from Zhejiang, China and update of geographical distribution[J]. Florida Entomologist, 2009, 92(2): 386-387.
- [2] 覃伟权, 阎伟. 红棕象甲监测与防治[M]. 北京: 中国农业出版社, 2013.
QIN W Q, YAN W. Monitoring and control of red palm weevil[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2013. (in Chinese)
- [3] 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.
YANG G L. Analysis on the harm and control measures of red palm weevil of Canary sea date in Kunming[J]. Low Carbon World, 2020, 10(7): 231-232. (in Chinese).
- [4] HAMADTTU A F E S, JOSE R F, 余武秀. 化学信息素及其在害虫防治中的潜在应用[J]. 世界农药, 2020, 42(1): 25-31, 42.
HAMADTTU A F E S, JOSE R F, YU W X. Chemical pheromones and their potential applications in pest control[J]. World Pesticides, 2020, 42(1): 25-31, 42. (in Chinese).
- [5] 郭雅洁, 韩红, 廖启料, 林倩男, 牟亚妮, 翁小倩, 邹双全, 张飞萍, 吴松青. 嗜虫耶尔森氏菌 Ye1-8 的分离鉴定及其对红棕象甲的杀虫活性[J]. 农业生物技术学报, 2018, 26(12): 2121-2131.
GUO Y J, HAN H, LIAO Q L, LIN Q N, MOU Y N, WENG X Q, ZOU S F, ZHANG F P, WU S Q. Isolation and identification of *Yersinia entomophaga* strain Ye1-8 and its toxicity to the red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus*)[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2018, 26(12): 2121-2131. (in Chinese).
- [6] 魏敏, 刘丽, 朱辉, 孙晓东. 一株对红棕象甲幼虫具高致病力新型金龟子绿僵菌的鉴定[J]. 中国南方果树, 2014, 43(6): 68-70, 73.
WEI M, LIU L, ZHU H, SUN X D. Identification of a new *Metarhizium anisopliae* strain with high pathogenicity to red palm weevil larvae[J]. South China Fruits, 2014, 43(6): 68-70, 73. (in Chinese).
- [7] 钟宝珠, 吕朝军, 李朝绪, 阎伟, 黄山春, 覃伟权. 嗜菌异小杆线虫 H06 品系对红棕象甲幼虫的室内致死能力测定[J]. 热带作物学报, 2020, 41(11): 2292-2296.
ZHONG B Z, LYU C J, LI C X, YAN W, HUANG S C, QIN W Q. Determination of lethal ability of *Heterorhabditis bacteriophora* H06 strain against the larvae of red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* in laboratory[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2020, 41(11): 2292-2296. (in Chinese).
- [8] YE W, ROBBINS R T, KIRKPATRICK T. Molecular characterization of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) from Arkansas, USA[J]. Science Report, 2019, 9: 15680.
- [9] WAN N K, SITI N A A H, MOHAMMAD S M, IZWAN B, ZULKEFLEY O, JOHARI J. A review of entomopathogenic nematodes as a biological control agent for red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae)[J]. Insects, 2022, 13: 245.
- [10] BARBARA M, DOMENICO S, VINCENZO A. Biological responses of *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) to *Steinernema carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae)[J]. Journal of Economic Entomology, 2013, 106(4): 1582-1589.
- [11] KAYA H K, GAUGLER R. Nematodes[J]. Annual Review

- of Entomology, 1993, 38: 181-206.
- [12] LLACER E, MARTINEZ D E A M M, JACAS J A. Evaluation of the efficacy of *Steinernema carpocapsae* in a chitosan formulation against the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*, in *Phoenix canariensis*[J]. BioControl, 2009, 54: 559-565.
- [13] SALAMA H S, ABD-ELGAWAD M. Activity of heterorhabditid nematodes at high temperature and in combination with cytoplasmic polyhedrosis virus[J]. Journal of Pest Science, 2002, 75: 78-80.
- [14] WAQAS W, MUHAMMAD Y, DAVID S I. Effects of single and combined applications of entomopathogenic fungi and nematodes against *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier)[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 5971.
- [15] 马子龙, 覃伟权, 李磊, 黄山春, 魏娟, 阎伟. 红棕象甲幼虫的半人工饲料: CN101703172B[P]. 2012-05-23.
MA Z L, QIN W Q, LI L, HUANG S C, WEI J, YAN W. Semi artificial feed for red palm weevil larvae: CN101703172B[P]. 2012-05-23. (in Chinese).
- [16] WHITE G F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures[J]. Science, 1927, 66: 302-303.
- [17] 黄剑, 吴文君. 利用 EXCEL 快速进行毒力测定中的致死中量计算和卡方检验[J]. 昆虫知识, 2004, 41(6): 594-598.
HUANG J, WU W J. Calculate the median lethal dose and Chi square test with EXCEL in toxicological tests[J]. Entomological Knowledge, 2004, 41(6): 594-598. (in Chinese).
- [18] 梁铭荣, 李子园, 戴钊萱, 陆永跃, 陈科伟, 王磊. 4 种昆虫病原线虫对草地贪夜蛾的致死作用[J]. 生物安全学报, 2020, 29(2): 82-89.
LIANG M R, LI Z Y, DAI Q X, LU Y Y, CHEN K W, WANG L. Virulence of four entomopathogenic nematodes on fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)[J]. Journal of Biosafety, 2020, 29(2): 82-89. (in Chinese).
- [19] 谷星慧, 王杰, 曹莉, 崔永和, 方明, 孙洁, 李江舟, 徐成体, 韩日畴, 唐睿. 昆虫病原线虫防治烟草小地老虎技术优化研究[J]. 环境昆虫学报, 2021, 43(6): 1529-1535.
GU X H, WANG J, CAO L, CUI Y H, FANG M, SUN J, LI J Z, XU C T, HAN R C, TANG R. Optimisation of entomopathogenic nematode technology for the control of *Agrotis ipsilon* in tobacco[J]. Journal of Environmental Entomology, 2021, 43(6): 1529-1535. (in Chinese).
- [20] 钟宝珠, 吕朝军, 李朝绪, 覃伟权. 海南槟榔园昆虫病原线虫对红脉穗螟的致病力[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(3): 431-435.
ZHONG B Z, LYU C J, LI C X, QIN W Q. Isolation and virulence of entomogenic nematodes against *Tirathaba rufivena* in *Areca* plantation of hainan[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2021, 37(3): 431-435. (in Chinese).
- [21] SHAHINA F, GULSHER M, JAVED S, KHANUM T A, BHATTI M I. Susceptibility of different life stages of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*, to entomopathogenic nematodes[J]. International Journal of Hematology, 2009, 19: 232-239.
- [22] ELAWAD S A, MOUSA S A, SHAHDAD A S, ALAWAASH S A, ALAMIRI A M A. Efficacy of entomopathogenic nematodes against red palm weevil in UAE[J]. Acta Horticulturae, 2007, 736: 415-420.
- [23] GOZEL U, GOZEL C, YURT C, INCI D. Efficacy of entomopathogenic nematodes on the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera: Curculionidae) larvae[J]. International Journal of Bioassay, 2015, 4: 4436-4439.
- [24] GRIFFIN C T. Perspectives on the behavior of entomopathogenic nematodes from dispersal to reproduction: traits contributing to nematode fitness and biocontrol efficacy[J]. Journal of Entomological Science, 2012, 44: 177-184.
- [25] 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.
LI H P, HAN R C. Advances in the researches on the infective behaviors of entomopathogenic nematodes[J]. Chinese Bulletin of Entomology, 2007, 44(5): 637-642. (in Chinese).
- [26] 杨怀文, 周瑗月, 张善稿. 昆虫病原线虫 *Steinernema* sp.(CB-2Y)的生物学特性研究[J]. 生物防治通报, 1990, 6(1): 13-17.
YANG H W, ZHOU Y Y, ZHANG S G. Biological studies on an indigenous entomopathogenic nematode, *Steinernema* sp. found in Hebei, China[J]. Chinese Journal of Biological Control, 1990, 6(1): 13-17. (in Chinese).
- [27] BAKONYI G, NAGY P. Temperature and moisture induced changes in the structure of the nematode fauna of a semiarid grassland-patterns and mechanisms[J]. Global Change Biology, 2000(6): 697-699.
- [28] 王国汉, 李小峰, 刘南欣, 张振英, 刘秀玲. 一种昆虫病原异小杆线虫的初步研究[J]. 昆虫天敌, 1986(4): 244-245.
WANG H G, LI X F, LIU N X, ZHANG Z Y, LIU X L. A preliminary study on a heterorhabditis nematode[J]. Natural Enemies of Insects, 1986(4): 244-245. (in Chinese).