对韭菜迟眼蕈蚊幼虫高毒力 Bt 资源筛选及效果评价*

宋 健** 曹伟平 冯书亮 杜立新***

（河北省农林科学院植物保护研究所/河北省农业有害生物综合防治工程技术研究中心/
农业部华北北部作物有害生物综合治理重点实验室，保定 071000）

摘 要 **【目的】** 为开发防治韭菜迟眼蕈蚊 *Bradysia odoriphaga* 的生物杀虫剂，本研究评价了 185 株苏云金芽胞杆菌 *Bacillus thuringiensis* 对韭菜迟眼蕈蚊幼虫的杀虫活性。**【方法】** 采用浸叶饲喂法对供试菌株进行室内生物学测定，用盆栽试验对筛选到的对韭菜迟眼蕈蚊高毒力的 FPT3 菌株进行防效验证，通过 SDS-PAGE 电泳技术对 FPT3 菌株的杀虫晶体蛋白进行分析，并采用 Biolog 微生物自动分析系统对 FPT3 菌株进行了生理生化测定。**【结果】** 在 1×10^8 cfu/mL 浓度下，对韭菜迟眼蕈蚊 2 龄幼虫 3 d 的校正死亡率在 80%以上的菌株有 12 株，其中 FPT3 菌株对韭菜迟眼蕈蚊 2 龄幼虫的杀虫活性最高；FPT3 菌株表达 70 ku 左右蛋白，具有典型的苏云金芽胞杆菌的生理生化特征；FPT3 菌株对韭菜迟眼蕈蚊 1 龄和 2 龄幼虫具有较高的杀虫活性，LC_{50} 分别为 1.206×10^6 cfu/mL 和 2.577×10^6 cfu/mL，室内盆栽试验明确了 FPT3 菌株对韭菜迟眼蕈蚊的防治效果达 77.76%。**【结论】** FPT3 菌株能有效地控制韭菜迟眼蕈蚊的发生，具有良好的应用前景。

关键词 韭菜迟眼蕈蚊，苏云金芽胞杆菌，毒力，生理生化

Effectiveness of high virulence Bt resources as a means of controlling *Bradysia odoriphaga* larvae

SONG Jian** CAO Wei-Ping FENG Shu-Liang DU Li-Xin***

(Institute of Plant Protection, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences/IPM Center of Hebei Province/Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Northern Region of North China, Ministry of Agriculture, Baoding 071000, China)

Abstract **[Objectives]** To develop biological insecticides against *Bradysia odoriphaga*. **[Methods]** The toxicity of one hundred and eighty five *Bacillus thuringiensis* strains to *B. odoriphaga* larvae was evaluated using the leaf immersion feeding method and pot trials. Insecticidal crystal protein of FPT3 was analyzed by SDS-PAGE. Physiological and biochemical characters of FPT3 were determined using the Biolog system. **[Results]** All 12 Bt strains caused > 80% mortality to *B. odoriphaga* larvae but FPT3 was the most toxic. The FPT3 strain had typical physiological and biochemical characteristics of Bt and expressed protein of 70 ku. The LC_{50} of the FPT3 strain against 1st and 2nd instar larvae was 1.206×10^6 cfu/mL and 2.577×10^6 cfu/mL, respectively. Pot trials demonstrated that the control effect of FPT3 on *B. odoriphaga* larvae was 77.76%. **[Conclusion]** FPT3 can effectively control *B. odoriphaga*, and has potential for application in the field.

Key words *Bradysia odoriphaga*, *Bacillus thuringiensis*, virulence, physiological and biochemical

*资助项目 Supported projects：国家公益性行业（农业）科研专项(201303027)

**第一作者 First author，E-mail：sj3250@163.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：lxdu2091@163.com

收稿日期 Received：2016-11-01，接受日期 Accepted：2016-11-10

苏云金芽胞杆菌 *Bacillus thuringiensis*（简称 Bt）是世界上产量最大、应用最广的微生物杀虫剂，其商品制剂已达 100 多种，占到整个微生物源杀虫剂农药市场的 90%以上（Kumar *et al.*，2008；Vasquez *et al.*，2009）。苏云金芽胞杆菌制剂的主要活性成分是杀虫晶体蛋白（Insecticidal crystal protein，简称 ICP），其对鳞翅目 Lepidoptera、鞘翅目 Coleoptera 和双翅目 Diptera 等多种害虫以及螨类、线虫等有害生物具有特异的杀虫作用。苏云金杆菌以色列亚种 *B.thuringrensis* var. *israelesis*（Bti）对埃及伊蚊 *Aedes aegypti*、淡色库蚊 *Culex pipienspallens*、中华按蚊 *Anopheles sinensis* 等蚊科幼虫高毒，因其高效、安全、无污染等特点，在世界范围内被广泛应用于蚊虫的防治，从而控制多种严重疾病，如疟疾、登革热、丝虫病及黄热病等的传播（Mario，2005）。

韭菜迟眼蕈蚊 *Bradysia odoriphaga* 是韭菜上的主要害虫，属双翅目眼蕈蚊科，主要危害韭菜、大蒜、大葱和洋葱，其次还有菊科、藜科、十字花科、葫芦科和伞形科等 6 科 30 多种蔬菜，其中北方保护地韭菜受害最重（陈澄宇等，2014）。韭菜迟眼蕈蚊幼虫喜群居在土下 5～10 cm 处活动，咬食鳞茎或地下茎叶，使植株枯萎死亡，成虫飞行能力较弱，活动范围窄，喜欢在受为害的植株部位产卵（卢巧英等，2006；梅增霞和李建庆，2012；杨峰山等，2015），造成植株被害部位腐烂，地上植株成墩萎蔫，严重时，每墩虫量达千头，造成减产，甚至绝收等严重经济损失（薛明，2002）。目前对于韭菜迟眼蕈蚊的防治主要采用化学农药防治（李慧等，2015），而韭菜为多年生宿根类草本植物，长期大量使用化学农药不仅导致水源污染、有益生物死亡，还会在农产品中富集、残留，给生态环境、人类健康造成严重影响。因此，筛选安全、高效、特异的新型杀虫剂已成为韭菜生产的迫切需求。

为开发防治韭菜迟眼蕈蚊的生物杀虫剂，本研究评价了 185 株苏云金芽胞杆菌对韭菜迟眼蕈蚊幼虫的杀虫活性，结果发现 FPT3 菌株能有效地控制韭菜迟眼蕈蚊的发生，对韭菜迟眼蕈蚊高毒力 Bt 资源的筛选与应用研究，不仅扩大了 Bt 的杀虫应用范围，丰富了我国 Bt 资源，而且适应我国绿色防控、可持续发展要求，具有良好的应用前景。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

从河北省保定市郊区韭菜地中采集韭菜迟眼蕈蚊幼虫，带回试验室，采用周仙红等（2015）方法于人工气候室（宁波东南仪器厂）进行继代饲养，取适龄、健康的韭菜迟眼蕈蚊幼虫作为供试虫源。

1.2 供试菌株

供试菌株为本试验室自主分离筛选的苏云金芽胞杆菌菌株。

1.3 试验方法

1.3.1 菌株培养 首先将供试菌株在 LB 平板上 30℃进行活化培养，挑取单菌落于 5 mL 液体 LB 培养基中，30℃，220 r/min 条件下摇床培养过夜，按 1%体积比转接至 50 mL LB 液体摇瓶中培养至胞晶分离，计数后，4℃，8 000 r/min 离心 5 min，收集菌体，加无菌水重新悬浮菌体，至 20℃冷冻保藏备用。

1.3.2 生物测定 采用浸叶饲喂法（慕卫等，2002），取备用菌悬液稀释至一定浓度，取 2 mL 菌悬液于 10 mL 灭菌离心管中，将韭菜茎剪成 2 cm 小段放入菌悬液中浸泡 10 min，取出放入灭菌的上下均铺有水琼脂和双层滤纸的 90 mm 培养皿中晾干。设 dH_2O 为对照。每皿接入 20 头 2 龄健康、活泼的韭菜迟眼蕈蚊幼虫，于（24±1）℃、RH70%的生化培养箱中饲养，对照死亡率低于 5% 即为有效。复筛时，每皿 20 头，重复 3 次。药后 2 d、3 d 观察死亡虫数，计算死亡率和校正死亡率。

1.3.3 菌株形态 观察及杀虫晶体蛋白分析取少量胞晶混合物均匀涂抹于载玻片上，烘干固定后，石炭酸复红染液染色配制方法参见 Breed 等（1994），清水冲洗、控干，用 Olympus 显微

镜 100×油镜观察芽胞和晶体形态。

将 1 mL 菌悬液于 Eppendorf 离心管中，4℃，8 000 r/min 离心 5 min，收集菌体，用 1 mol/L NaCl 洗涤 2～3 次，再用去离子水洗 2～3 次，加入适量样品缓冲液备用。SDS-PAGE 方法参见 Sambrook 等（1989）。

1.3.4　Bt 菌株生理生化测定　应用 Biolog 微生物自动分析系统（GENIII 微孔板，美国 Biolog 公司）对病原菌进行 94 种表型测试。其中，包括 71 种碳源利用测试和 23 种化学敏感性测试。试验程序按 Biolog 公司 GEN III 鉴定操作指南进行，所测菌株均在 Biolog 推荐的 BUG 培养基上 33℃活化培养 24 h，而后在 B 接种液中制成菌悬液，用 Biolog 浊度仪将菌液浓度调至 95%~98% T（T 为所测得的透光率），将调好的菌悬液倒入 V 型加样水槽中，用 8 通道电动移液器按每孔 100 μL 的量将菌悬液按顺序加入 96 微孔板的所有孔中，33℃培养 24 h 后采用 OmniLog 读数仪读板、分析（汪汉成等，2012）。

1.3.5　盆栽试验　2014 年 3 月底对筛选到的苏云金芽胞杆菌分别进行室内盆栽试验，将菌液稀释至 1×10^{7} cfu/mL。采用淋灌的方式，将菌液浇灌到室内盆栽的韭菜根部，韭菜迟眼蕈蚊种群为自然发生种群，此时为成虫产卵和幼虫孵化盛期，韭菜割后施肥浇水第 3 天，土壤表面干燥。每盆韭菜用水量为 100 mL。设清水和 480 g/L 毒死蜱乳油（美国陶氏益农公司）1 000 倍液为对照。每处理 3 盆，重复 3 次。化学农药在整个试验用药一次，其它处理连续用药 3 次，每次间隔 7 d。最后一次药后 7 d 调查幼虫数量和作物受害情况，计算被害株率和防治效果。

1.4　数据分析

生物测定试验数据采用 DPS 软件（2000）进行分析。计算公式如下：

死亡率（%） = 死亡虫数 / 供试虫数 × 100；

校正死亡率（%）=（处理组死亡率 – 对照组死亡率）/（1 – 对照组死亡率）× 100；

被害株率（%） = 被害株数 / 调查总株数 × 100；

防治效果（%） =（对照区虫数 – 施药区虫数） / 对照区虫数 × 100。

2　结果与分析

2.1　对韭菜迟眼蕈蚊幼虫高毒力 Bt 菌株的筛选

本试验前期采用浸叶饲喂法对 185 株苏云金芽胞杆菌进行对韭菜迟眼蕈蚊 2 龄幼虫的初步生物活性筛选，结果发现，在 1×10^{8} cfu/mL 浓度下饲喂 3 d，有 3 株 Bt 菌株对韭菜迟眼蕈蚊 2 龄幼虫的校正死亡率达到 100%，有 3 株 Bt 菌株对韭菜迟眼蕈蚊 2 龄幼虫的校正死亡率达到 90%以上，有 6 株 Bt 菌株对韭菜迟眼蕈蚊 2 龄幼虫的校正死亡率达到 80%以上（表 1）。根据初筛结果，我们对初筛结果最好的 3 株 Bt 菌进行了复筛（表 2），结果发现 FPT3 菌株的杀虫活性最高，以 1×10^{7} cfu/mL 浓度饲喂韭菜迟眼蕈蚊幼虫时，3 d 的校正死亡率达到 94.84%。

表 1　苏云金芽胞杆菌菌株对韭菜迟眼蕈蚊幼虫毒力的部分初筛结果

Table 1　Toxicity of partial *Bacillus thuringiensis* strains to the larvae of *Bradysia odoriphaga*

菌株编号 No.	浓度 Concentration (cfu/mL)	3 d 校正死亡率 Corrected mortality (%)
BtionR60A	1×10^{8}	100
Pbt23	1×10^{8}	100
FPT3	1×10^{8}	100
Bt4Q2	1×10^{8}	95
EA40694	1×10^{8}	95
Bt4H5	1×10^{8}	90
HL51	1×10^{8}	85
Bt4m5	1×10^{8}	80
Bt4Q12	1×10^{8}	80
Bt4G6	1×10^{8}	80
Bm6A14	1×10^{8}	80
BW6A23	1×10^{8}	80

表 2 3 株苏云金芽胞杆菌菌株对韭菜迟眼蕈蚊幼虫的毒力复筛

Table 2 Toxicity of three *Bacillus thuringiensis* strainsto the larvae of *Bradysia odoriphaga*

菌株编号 No.	浓度 Concentration (cfu/mL)	校正死亡率 Corrected mortality rate (%)	
		2 d	3 d
BtionR60A	1×10^7	67.89	82.29
Pbt23	1×10^7	42.45	78.95
FPT3	1×10^7	71.05	94.84

2.2 FPT3 菌株对不同龄期韭菜迟眼蕈蚊幼虫的生物测定

采用浸叶饲喂法，测定了 FPT3 菌株对不同龄期韭菜迟眼蕈蚊幼虫的杀虫活性（表 3），结果显示，FPT3 菌株对韭菜迟眼蕈蚊 1 龄和 2 龄幼虫具有较高的杀虫活性，LC_{50} 分别为 1.206×10^6 cfu/mL 和 2.577×10^6 cfu/mL；对 3 龄和 4 龄幼虫的杀虫活性较弱，LC_{50} 分别为 36.910×10^6 cfu/mL 和 53.220×10^6 cfu/mL。

表 3 FPT3 菌株对韭菜迟眼蕈蚊不同龄期幼虫的活性

Table 3 Toxicity of FPT3 strain to the different instars of *Bradysia odoriphaga*

菌株 No.	龄期 Instar	毒力回归方程 Toxicity regression equation	相关系数 Correlation coefficient (r)	LC_{50} ($\times10^6$cfu/mL)	95%置信限 95% confidence interval ($\times10^6$cfu/mL)
FPT3	1 龄 1st instar	Y=4.9257+0.9132X	0.974	1.206	0.478—3.041
	2 龄 2nd instar	Y=4.7537+0.5992X	0.966	2.577	0.964—6.890
	3 龄 3rd instar	Y=3.3941+1.0247X	0.975	36.910	22.500—60.570
	4 龄 4th instar	Y=3.2997+0.9851X	0.949	53.220	31.610—89.620

2.3 菌体形态观察及伴胞晶体蛋白分析

通过 SDS-PAGE 分析，FPT3 菌株所表达杀虫晶体蛋白分子量主要为 70 ku 左右，如图 1 所示。对该菌株进行纯化培养至胞晶分离，经石炭酸复红染色，显微镜观察，伴胞晶体形状为圆形，如图 2 所示。

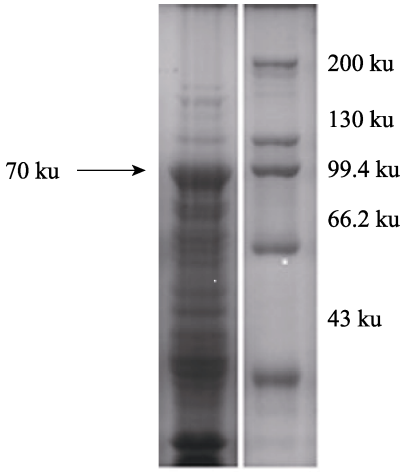

图 1 FPT3 菌株 SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 1 SDS-PAGE electrophoresis resultsof FPT3 strain

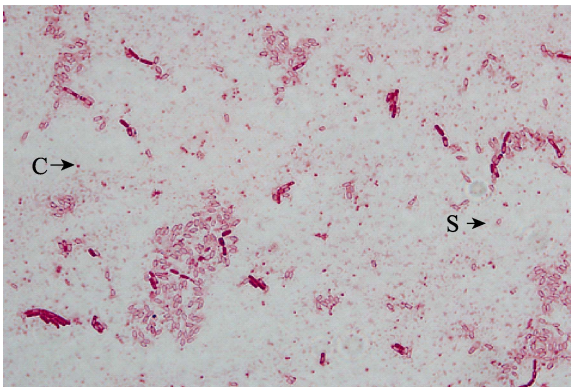

图 2 FPT3 菌株芽胞晶体形态观察

Fig. 2 Morphology of crystal and spore of FPT3 strain

C：晶体 Crystal；S：芽胞 Spore.

2.4 FPT3 菌株的生理生化测定

通过对 FPT3 菌株的生理生化测定，发现该菌株在对碳源的利用率上，可以有效利用 17 种碳源，其中包括糊精（A2），D-麦芽糖（A3），D-海藻糖（A4），N-乙酰-D-葡糖胺（B6），α-D-葡糖（C1），D-果糖（C3），D-葡糖-6-磷酸（D6），D-果糖-6-磷酸（D7），明胶（E1），L-丝氨酸（E9）

和丙酮酸甲酯（G2）等，在化学敏感性测试中，对 10 种化学物质敏感，包括二甲胺四环素（D12），林肯霉素（E10），十四烷硫酸钠（E12）等，对利福霉素（D11），盐酸胍（E11）等不敏感（表 4）。

表 4　FPT3 菌株生理生化特征测定

Table 4　Characters of physiology and biochemistry of FPT3

测试项目 Tested item	反应 Reaction	测试项目 Tested item	反应 Reaction	测试项目 Tested item	反应 Reaction
阴性对照 Negative control	−	糊精 Dextrin	+	D-麦芽糖 D-maltose	+
D-海藻糖 D-trehalose	+	D-纤维二糖 D-cellobiose	B	龙胆二糖 Gentiobiose	−
蔗糖 Sucrose	−	D-松二糖 D-turanose	B	水苏糖 Stachyose	−
阳性对照 Positive control	+	pH6	+	pH5	+
棉籽糖 D-raffinose	−	α-D-乳糖 α-D-lactose	−	蜜二糖 D-melibiose	−
β-甲基-D-半乳糖苷 β-methyl-D-glucoside	B	D-水杨苷 D-salicin	−	N-乙酰-D-葡糖胺 N-acetyl-D-glucosamine	+
N-乙酰-β-D-甘露糖胺 N-acetyl-β-D-mannosamine	B	N-乙酰-D-半乳糖胺 N-Acetyl-D-galactosamine	−	N-乙酰神经氨酸 N-acetyl neuraminic acid	−
1% NaCl	+	4% NaCl	+	8% NaCl	B
α-D-葡糖 α-D-glucose	+	D-鼠李唐 D-mannose	B	D-果糖 D-fructose	+
D-半乳糖 D-galactose	−	3-甲-D-葡糖 3-methyl glucose	−	L-岩藻糖 L-foucose	B
D-岩藻糖 D-foucose	B	L-鼠李糖 L-rhamnose	−	肌苷 Inosin	B
1%乳酸钠 1% Sodium lactate	+	夫西地酸 FusidicaAcid	−	D-丝氨酸 D-serine	+
D-山梨酸 D-sorbitol	−	D-甘露醇 D-mannitol	−	D-阿糖醇 D-arabitol	−
m-肌醇 Myo-inositol	−	甘油 Glycerol	B	D-葡糖-6-磷酸 D-glucose-6-PO4	+
D-果糖-6-磷酸 D-fructose-6-PO4	+	D-天冬氨酸 D-aspartic acid	−	D-丝氨酸 D-serine	B
醋竹桃霉素 Troleandomycin	−	利福霉素 Rifamycin SV	+	二甲胺四环素 Minocycline	−
明胶 Gelatin	+	甘氨酸- L-脯氨酸 Glycyl-L-proline	−	D-丙氨酸 D-alanine	B
L-精氨酸 L-arginine	B	L-天冬氨酸 L-aspartic acid	B	L-谷氨酸 L-glutamic acid	B
L-组氨酸 L-histidine	B	L-焦谷氨酸 L-pyroglutamic acid	B	L-丝氨酸 L-serine	+
林肯霉素 Lincomycin	−	盐酸胍 Guanidine HCi	+	十四烷硫酸钠 Niaproof 4	−
果胶 Pectin	−	D-半乳糖醛酸 D-galacturonic acid	+	L-半乳糖醛酸内酯 L-galactonic acid lactone	+
D-葡糖酸 D-gluconic acid	B	D-葡糖醛酸 D-glucuronic acid	+	葡糖醛酰胺 Glucuronamide	+
半乳糖二酸 Mucic acid	−	奎宁酸 Quinic acid	−	D-葡糖二酸 D-saccharic acid	B

续表 4 (Table 4 continued)

测试项目 Tested item	反应 Reaction	测试项目 Tested item	反应 Reaction	测试项目 Tested item	反应 Reaction
万古霉素 Vancomycin	−	四唑紫 Tetrazolium violet	B	四唑蓝 Tetrazolium blue	−
p-羟基-苯乙酸 p-hydroxy-phenylacetic acid	−	丙酮酸甲酯 Methyl pyruvate	+	D-乳酸甲酯 D-lactic acid methyl ester	−
L-乳酸 L-lactic acid	B	柠檬酸 Citric acid	B	α-酮-戊二酸 α-keto-glutaric acid	B
D-苹果酸 D-malic acid	−	L-苹果酸 L-malic acid	+	溴-丁二酸 Bromo-succinic acid	B
萘啶酸 Nalidixic acid	B	氯化锂 Lithium chloride	+	亚碲酸钾 Potassium tellurite	+
吐温-40 Tween-40	−	γ-氨基-丁酸 γ-amino-butryric acid	−	α-羟基-丁酸 α-hydroxy-butyric acid	−
β-羟基-D,L-丁酸 β-hydroxy-D,L-butyric acid	B	α-丁酮酸 α-keto-butyric acid	B	乙酰乙酸 Acetoacetic acid	B
丙酸 Propionic acid	−	乙酸 Acetic acid	B	甲酸 Formic acid	+
氨曲南 Aztreonam	+	丁酸钠 Sodium butyrate	+	溴酸钠 Sodium bromate	+

表中括号内的−为阴性反应；+为阳性反应；B 表示结果不确定。

−: Negative; +: Positive; B: Indeterminacy.

2.5 室内盆栽试验结果

通过室内盆栽试验，发现 FPT3 菌株表现出良好的防治效果。在 1×10^7 cfu/mL 浓度下，连续用药 3 次，间隔 7 d，防治效果分别达到 77.76%，能够有效降低韭菜迟眼蕈蚊为害。

表 5 FPT3 菌株对韭菜迟眼蕈蚊的盆栽试验结果

Table 5 The control efficiency of FPT3 strains to *Bradysia odoriphaga* in pot test

处理 Treatment	浓度 Concentration	被害株率 Damage rate (%)	防治效果 Control efficiency (%)
FPT3	1×10^7 cfu/mL	39.08±9.75b	77.76±5.75a
480 g/L 毒死蜱乳油	480 mg/L	11.95±5.22a	94.27±5.09b
CK	—	55.94±8.38c	—

表中数据为平均值±标准误，同列数据后标有不同字母表示经 Duncan's 新复极差法检测在 5%水平上差异显著。

Data are mean±SE, and followed by the different lowercase letters in the same column indicate significantly different at 0.05 level by Duncan's multiple range test.

3 讨论

生物防治具有高效、安全、环境友好、专一性强、对人畜无害等特点，可有效改善传统农药带来的环境危害，具有广阔的发展前景。在韭菜迟眼蕈蚊的生物防治研究方面，主要是利用昆虫病原线虫、球孢白僵菌 *Beauveria bassiana*、苏云金芽胞杆菌等。如：利用斯氏线虫（Steinernematidae）和异小杆线虫（Heterorhabditidae），在一定环境条件下对韭菜迟眼蕈蚊有较好的防治效果（孙瑞红等，2004；孙瑞红和李爱华，2007；安连菊等，2012）；利用球孢白僵菌产品防治韭菜迟眼蕈蚊的室内和田间药效测定（周仙红等，2014）；关于苏云金芽胞杆菌防治韭菜迟眼蕈蚊的研究主要停留在室内活性测定阶段（解维星，2007），田间效果方面研究较少（宋健等，2016）。

当前防治双翅目蚊科幼虫的生物农药主要为 Bti 制剂，并已在巴西、印度、法国、中国和非洲等国家和地区被成功施用于蚊幼虫的治理，在疾病媒介蚊虫和传染性疾病的控制中发挥了重要的作用。但本项目组前期试验证明了 Bti 杀虫剂对韭菜迟眼蕈蚊没有杀虫效果（未发表数据）。Cloyd 和 Dickinson（2006）也曾报道 Bti 杀虫剂对 *Bradysia* sp. nr. *coprophila* 2 龄、3 龄幼

虫均无杀虫活性。

韭菜迟眼蕈蚊发生为害的部位在韭菜的鳞茎部，属于地下害虫，苏云金芽胞杆菌是一种土壤微生物，与韭菜迟眼蕈蚊幼虫发生部位相同，处于同一生态位，因此苏云金芽胞杆菌非常适用于韭菜迟眼蕈蚊的防治。本试验筛选获得 1 株对韭菜迟眼蕈蚊幼虫具有高杀虫活性的苏云金芽胞杆菌——FPT3 菌株，经室内盆栽试验，明确了该菌株对韭菜迟眼蕈蚊的防治效果达到 77.76%，能够有效降低韭菜迟眼蕈蚊为害。为更好的将该菌株用于韭菜的安全生产，还有待于对该菌株的发酵工艺和剂型等方面做进一步研究。

参考文献 (References)

An LJ, Jia LP, Ruan WB, Wang X, Chen LF, Song DM, Xu YB, Cui XY, Zheng LB, 2012. Effect of entomopathogenic nematodes on controlling *Bradysia odoriphage* Yang et Zhang and Soil nematode community. *Journal of Agro-Environment Science*, 31(5): 898–903. [安连菊, 贾令鹏, 阮维斌, 王欣, 陈龙飞, 宋东民, 许远蓓, 崔希洋, 郑连斌, 2012. 昆虫病原线虫对韭蛆和土壤线虫群落的影响. 农业环境科学学报, 31(5): 898–903.]

Breed EG, Murray D, Smith NR, 1994. Berger's Manual of Determinative Bacteriology, 9th. Baltimore (USA): The Williams and Wilkins co. 288–291.

Chen CY, Zhao YH, Li H, Zhang P, Mu W, Liu F, 2014. Biological activity of benzothiazole against *Bradysia odoriphaga* (Diptera: Sciaridae) at different developmental stages. *Acta Entomologica Sinica*, 57(1): 45–51. [陈澄宇, 赵云贺, 李慧, 张鹏, 慕卫, 刘峰, 2014. 苯并噻唑对不同虫态韭菜迟眼蕈蚊的生物活性. 昆虫学报, 57(1): 45–51.]

Cloyd R, Dickinson A, 2006. Effect of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and neonicotinoid insecticides on the fungus gnat *Bradysia* sp nr.*coprophila* (Lintner) (Diptera: Sciaridae). *Pest Management Science*, 62(2): 171–177.

Kumar S, Chandra A, Pandey KC, 2008. *Bacillus thuringiensis* (Bt) transgenie crop: an environment friendly insect-pest management strategy. *Journal of Environmental Biology*, 29(5): 641–653.

Lu QY, Zhang WX, Guo WL, Zhang Y, 2006. A preliminary study on distributing phase and sampling methods of *Braidysia olaiphage larva* in Chinese chive field. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 15(2): 75–77. [卢巧英, 张文学, 郭卫龙, 张毅, 2006. 韭菜迟眼蕈蚊幼虫田间分布型及抽样技术研究初报. 西北农业学报, 15(2): 75–77.]

Li H, Zhao YH, Wang QH, Han JK, Liu F, Mu W, 2015. Comparison of systemic activity of neonicotioid insecticides in leeks and its toxicity to larvae of *Bradysia odoriphaga* (Sciaridae: Diptera). *Chinese Journal of Pesticide Science*, 17(2): 156–162. [李慧, 赵云贺, 王秋红, 韩京坤, 刘峰, 慕卫, 2015. 新烟碱类杀虫剂在韭菜中的内吸性及其对韭菜迟眼蕈蚊幼虫的毒力比较. 农药学学报, 17(2): 156–162.]

Mario B, 2005. Utilization of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti-based formulations for the biological control of mosquitoes in Canada.6th Pacific Rim Conference on the Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and it Environmental Impact. Victoria BC. 87–94.

Mei ZX，Li JQ, 2012. Spatial distribution pattern and sampling technique of *Bradysia odoriphaga* larva. *Hubei Agricultural Sciences*, 51(6): 1128–1130. [梅增霞, 李建庆, 2012. 韭菜迟眼蕈蚊幼虫的空间格局及抽样技术. 湖北农业科学, 51(6): 1128–1130.]

Mu W, Ding Z, He MH, Zhang J, 2002. Bioassay technique of *Bradysia odoriphaga* and control to larcae and adults by insecticides. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 17(S1): 12–16. [慕卫, 丁中, 何茂华, 张晶, 2002. 韭菜迟眼蕈蚊的生测方法及防治药剂研究. 华北农学报, 17(S1): 12–16.]

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1713–1720.

Song J, Cao WP, Zhang HJ, Wang JY, Feng SL, Du LX, 2016. The phenotype determination of *Bacillus thuringiensis* JQ23 and its control efficiency against *Bradysia odoriphaga*. *Chinese Journal of Biological Control*, 32(3): 326–331. [宋健, 曹伟平, 张海剑, 王金耀, 冯书亮, 杜立新, 2016. 苏云金芽胞杆菌 JQ23 的表型鉴定及对韭菜迟眼蕈蚊的防治效果. 中国生物防治学报, 32(3): 326–331.]

Sun RH, Li AH, Han RC, C L, Liu XL, 2004. Factors affecting the *Bradysia odoriphaga* with entomopathogenic nematode *Heterorhabditis indica* LN2. *Natural Enemies of Insects*, 26(4): 150–155. [孙瑞红, 李爱华, 韩日畴, 曹莉, 刘秀玲, 2004. 昆虫病原线虫 *Heterorhabditis indica* LN2 品系防治韭菜迟眼蕈蚊的影响因素研究. 昆虫天敌, 26(4): 150–155.]

Sun RH, Li AH, 2007. Studies on combination effect of *Etomolopathogenic nematode* H06 and insecticide against

Bradysina odoriphaga. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 9(1): 66–70. [孙瑞红, 李爱华, 2007. 昆虫病原线虫 H06 与化学杀虫剂对韭菜迟眼蕈蚊的联合作用. 农药学学报, 9(1): 66–70.]

Vasquez MI, Violaris M, Hadijivassilis A, Wirth MC, 2009. Susceptibility of *Culex pipines* (Diptera:Culicidae) field populations in cyprus to conventional organic insecticides, *Bacillus thuringlensis* subsp. *israelensis*, and *methoprene*. *Journal of Medical Entomology*, 46(4): 881–887.

Wang HC, Li WH, Huang YF, Li K, Li XL, Zhang H, Cao Y, Lu N, Shi JX, Hu XD, 2012. The application of Biolog GEN III Microplate in identifying antagonistic bacteria against tobacco bacterial wilt and tobacco black shank. *Acta Tabacaria Sinica*, 18(5): 51–55. [汪汉成, 李文红, 黄艳飞, 李凯, 李兴龙, 张恒, 曹毅, 陆宁, 石俊雄, 胡向丹, 2012. Biolog GEN III微孔板在烟草青枯病、黑胫病生防细菌鉴定中的应用. 中国烟草学报, 18(5): 51–55.]

Xie WX, 2007. Study on isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* against *Bradysia odoriphaga*. Master dissertation. Wuhan: Huazhong Agricultural University. [解维星, 2007 对韭蛆具生物活性的 Bt 的筛选及其特性研究. 硕士学位论文. 武汉: 华中农业大学.]

Xue M, 2002. Study on the insecticides of controlling *Bradysia odoriphaga* and unpolluting vegetable. *Pesticide*, 41(5): 29–31. [薛明, 2002. 韭菜迟眼蕈蚊无公害治理药剂的研究. 农药, 41(5): 29–31.]

Yang FS, Xu ZH, Lu HG, Li C, Liu CG, 2015. Studies on *Bradysia odoriphaga* laying eggs in different hosts and its phototaxis to LED. *China Vegetables*, (7): 45–48. [杨峰山, 徐振华, 鲁红刚, 李超, 刘春光, 2015. 韭菜迟眼蕈蚊在不同寄主上产卵及对 LED 光趋性的研究. 中国蔬菜, (7): 45–48.]

Zhou XH, Ma T, Zhuang QY, Zhang AS, Zhang SC, Yu Y, 2014. Indoor bioassay of *Beauveria bassiana* against *Bradysia odoriphaga* and evaluation on control effect in field. *Shandong Agricultural Sciences*, 46(7): 117–120. [周仙红, 马韬, 庄乾营, 张安盛, 张思聪, 于毅, 2014. 球孢白僵菌对韭蛆的室内生物测定和田间效果评价. 山东农业科学, 46(7): 117–120.]

Zhou XH, Zhang SC, Zhuang QY, Zhang AS, Li LL, Men XY, Zhai YF, Yu Y, 2015. Screening and evaluation of the artificial diets of *Bradysia odoriphaga* Yang *et* Zhang (Diptera: Sciaridae). *Acta Entomologica Sinica*, 58(11): 1245–1252. [周仙红, 张思聪, 庄乾营, 张安盛, 李丽莉, 门兴元, 翟一凡, 于毅, 2015. 韭蛆人工饲料配方筛选及饲养效果比较. 昆虫学报, 58(11): 1245–1252.]