

· 研究论文 ·

苏云金芽孢杆菌 HBF-1 菌株对铜绿丽金龟和 黄褐丽金龟幼虫生长发育及取食的影响

宋 健¹, 王金耀¹, 王容燕¹, 冯书亮^{1*}, 曹伟平¹,
杜立新¹, 张海剑¹, 张 杰², 宋福平²

(1. 河北省农林科学院 植物保护研究所, 河北 保定 071000;

2 中国农业科学院 植物保护研究所 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100094)

摘 要:研究了苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* HBF-1 菌株对 10 日龄铜绿丽金龟 *Anomala corpulenta* 和黄褐丽金龟 *A. exoleta* 幼虫存活率、拒食、抑制生长及取食选择性的影响。结果表明, 随着感染剂量的增大和感染时间的延长, 两种金龟子幼虫的存活率均下降, 对铜绿丽金龟幼虫的拒食作用和生长抑制作用增强, 使该幼虫对饲料的选择性增强。感染 7 d 时, 对黄褐丽金龟幼虫的 LC_{50} 值为 $64.16 \mu\text{g/g}$, 14 d 时下降到 $13.98 \mu\text{g/g}$, 对铜绿丽金龟幼虫的 LC_{50} 值则由 79.69 下降到 $19.14 \mu\text{g/g}$ 。当菌剂浓度为 $10 \mu\text{g/g}$, 感染 7 d 时, HBF-1 菌株对铜绿丽金龟幼虫的拒食率和生长抑制率分别为 4.74% 和 9.84%, 14 d 时分别为 30.75% 和 73.87%; 当菌剂浓度达到 $160 \mu\text{g/g}$, 感染 7 d 时, 对铜绿丽金龟幼虫的拒食率和生长抑制率分别为 39.01% 和 83.61%, 14 d 时分别为 86.10% 和 97.75%。可见高浓度菌剂对铜绿丽金龟幼虫有一定的拒食作用。

关键词:苏云金芽孢杆菌; 铜绿丽金龟; 黄褐丽金龟; 生长发育; 拒食作用

中图分类号: S476.11; S482.3

文献标识码: A

文章编号: 1008-7303(2006)02-0134-05

Effect of HBF-1 Strain of *Bacillus thuringiensis* on Growth and Development and Feeding of *Anomala corpulenta* and *A. exoleta* larvae

SONG Jian¹, WANG Jin-yao¹, WANG Rong-yan¹, FENG Shu-liang^{1*}, CAO Weiping¹,
DU Li-xin¹, ZHANG Hai-jian¹, ZHANG Jie², SONG Fu-ping²

(1. Institute of Plant Protection, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Baoding 071000, China;

2. Institute of Plant Protection, China Academy of Agricultural Sciences, State Key Lab
of Biology for Plant Diseases and Insects, Beijing 100094, China)

Abstract: The effect of HBF-1 strain on survival rate, antifeeding, inhibition of growth and feeding behavior on 10 days instar larvae of *Anomala corpulenta* and *A. exoleta* larvae were studied by biological tests. The results showed that the survival rate of *A. corpulenta* larvae and *A. exoleta* larvae was decreased, the antifeeding effect and growth inhibition of *A. corpulenta* larvae were increased, the feeding selectivity to feedstuff of *A. corpulenta* larvae enhanced as the concentration of HBF-1 strain was increased and the time of infected with HBF-1 strain was prolonged. The *A. exoleta* larvae LC_{50}

作者简介: 宋健 (1980-), 女, 河北涿州人, 实习研究员; *通讯作者: 冯书亮 (1957-), 男, 河北威县人, 研究员, 主要从事杀虫微生物研究。

联系电话: 0312-5915680; E-mail: sj3250@163.com

基金项目: 河北省自然科学基金项目资助 (C2005000642)。

was 64.16 $\mu\text{g/g}$ for 7 d and decreased 13.98 $\mu\text{g/g}$ for 14 d infected by HBF-1 strain. The *A. exoleta* larvae LC_{50} reduced from 79.69 $\mu\text{g/g}$ to 19.14 $\mu\text{g/g}$ treated with HBF-1 strain. When the *A. compulenta* larvae treated with HBF-1 strain at the concentration of 10 $\mu\text{g/g}$ soil for 7 d, the antifeeding rate and growth inhibition rate were 4.74% and 9.84%, 30.75% and 73.87% for 14 d. When the *A. compulenta* larvae treated with HBF-1 strain at the concentration of 160 $\mu\text{g/g}$ soil for 7 d, the antifeeding rate and growth inhibition rate were 39.01% and 83.61%, 86.10% and 97.75% for 14 d. *A. compulenta* larvae were somewhat repellent to the feedstuff containing HBF-1 strain of high concentration.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; *Anomala compulenta*; *Anomala exoleta*; growth; antifeeding

金龟子属鞘翅目金龟总科 (Scarabaeoidea), 其幼虫蛴螬是我国重要的农林业地下害虫。20世纪50年代, 我国以六六六为代表的一些药剂被大面积推广用于防治金龟子幼虫。1974年, 辛硫磷和甲基异柳磷作为主要药剂, 被用于防治华北、华南等地区花生、大豆及甘蔗上的金龟子幼虫^[1]。1984年, 甲基异柳磷被我国农业部列为取代六六六防治地下害虫的重点推广药剂^[2]。

苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* (简称 Bt) 是一种革兰氏阳性昆虫病原细菌, 它在形成芽孢的过程中能产生具有杀虫活性的蛋白晶体。Bt 制剂以其良好的杀虫效果及对环境安全、无污染、对天敌无毒害作用等优点, 已在世界范围内得到广泛应用。1992年, Ohba等^[3] 在世界上首次筛选出一株对日本丽金龟具有特异杀虫活性的 *B. t* subsp. *Japonensis* Buibui 菌株。我国河北省农林科学院植物保护研究所也于 1998年筛选到一株对华北地区主要地下害虫黄褐丽金龟 *Anomala exoleta* 和铜绿丽金龟 *A. compulenta* 幼虫具有较高杀虫活性的苏云金芽孢杆菌 HBF-1 菌株^[4]。与大多数化学杀虫剂不同, 苏云金芽孢杆菌的伴孢晶体蛋白作用于昆虫的肠道, 只有被昆虫取食后才能发挥杀虫作用^[5], 因而已有不少专家学者研究了 Bt 对靶标害虫的生长发育及取食行为等各种生理指标的影响, 其中尤以鳞翅目和膜翅目昆虫为主^[6-9], 而其对金龟子幼虫生长发育及取食行为影响的研究还未见报道。作者以铜绿丽金龟和黄褐丽金龟幼虫为研究对象, 在毒力测定的基础上, 进一步研究了 HBF-1 菌株对幼虫的拒食作用、生长抑制作用及取食选择作用。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

从河北保定郊区和定州等地采集铜绿丽金龟 *Anomala compulenta* 和黄褐丽金龟 *A. exoleta* 成虫,

分别放入 30 cm × 40 cm × 15 cm 的塑料盒、上罩 30 cm 高网纱的饲养笼中, 盒底放 6~8 cm 厚的细土 (含水量 18%), 饲喂新鲜榆树叶片, 在养虫室 (26 ± 1, 16L 8D, RH 50%~60%) 内饲养。待其产卵后, 将卵挑出, 放在潮湿的土中使其孵化。挑取 5 头初孵幼虫放入盛有湿土的塑料盒 (直径 8 cm, 高 5 cm) 中饲养, 饲喂新鲜的马铃薯块和刚发芽的玉米, 待幼虫长到一定日龄后供生测用。因铜绿丽金龟幼虫较黄褐丽金龟幼虫发生程度高, 虫源丰富, 因此选用铜绿丽金龟幼虫进行生长发育和取食影响的试验。

1.2 供试菌株

苏云金芽孢杆菌 HBF-1 菌株 (*Bacillus thuringiensis* serovar *Japonensis*) 由河北省农林科学院植物保护研究所杀虫微生物实验室提供。

1.3 菌剂的制备

将 HBF-1 菌株接种到装有普通细菌培养基 [牛肉膏 0.5% (质量分数, 余同), 蛋白胨 1.0%, 葡萄糖 0.3%, NaCl 0.2%, 琼脂 2%, pH 7.5] 的克氏瓶中, 培养至孢晶分离。将菌体用无菌水冲洗至三角瓶中, 搅匀, 过滤, 3 000 r/min 离心 30 min, 收集沉淀物, 冰冻干燥制成孢晶粉剂。

1.4 HBF-1 菌株对金龟子幼虫存活率及 LC_{50} 值的影响

分别将 40 g 马铃薯丝 (2 mm × 2 mm) 加入装有 40 mL 不同浓度 HBF-1 菌悬液的三角瓶中, 混合均匀, 连同菌悬液一起分别倒入经紫外线 (40 W, 5 h) 处理过的 200 g 干土中, 放置 2~3 h, 使土壤含水量为 20%。先将马铃薯丝平均放入 20 支灭菌的指形管 (10 cm × 1.2 cm) 底部, 再加入 8 cm 拌匀的菌土, 每管接 1 头 10 日龄健康且大小一致的铜绿丽金龟幼虫。每处理 20 头幼虫, 菌剂浓度分别为 20、40、80、160、240 $\mu\text{g/g}$ (每 g 土中含有 HBF-1 孢晶粉剂的 μg 数, 下同), 设清水为对照, 重复 3 次。黄褐丽金龟幼虫测定方法相同,

菌剂浓度分别为 10、30、60、90、120 $\mu\text{g/g}$ 。处理后试虫置于 30 的人工气候箱中饲养,分别在处理后 7 d 和 14 d 观察死、活虫数,并计算 LC_{50} 值。

1.5 HBF-1 菌株对铜绿丽金龟幼虫的拒食作用和生长抑制作用测定

参照 1.4 节的方法处理,所加入马铃薯条为 8 mm \times 8 mm \times 60 mm,菌剂浓度分别为 10、20、

40、80、160 $\mu\text{g/g}$ 。每管放入称重后的马铃薯条一根,再加入 8 cm 厚拌匀的菌土,然后接入 1 头 10 日龄称重过的铜绿丽金龟幼虫。每处理 20 头幼虫,另设不接虫的对照和清水对照,重复 3 次。分别在接虫前、感染 7 d 和 14 d 时对马铃薯条和幼虫进行称重,根据幼虫的取食量和体重增长量,按下式计算对幼虫的拒食率和生长抑制率。

$$\text{对照失水率}(\%) = \frac{\text{处理时马铃薯条重量} - \text{调查时马铃薯条重量}}{\text{处理时马铃薯条重量}} \times 100$$

$$\text{幼虫取食量}(\text{mg}) = \frac{\text{取食前马铃薯条重量} - \text{取食后马铃薯条重量}}{(1 - \text{对照失水率})}$$

$$\text{拒食率}(\%) = \frac{\text{对照平均取食量} - \text{处理平均取食量}}{\text{对照平均取食量}} \times 100$$

$$\text{生长抑制率}(\%) = \frac{\text{对照平均体重增长量} - \text{处理平均体重增长量}}{\text{对照平均体重增长量}} \times 100$$

1.6 HBF-1 菌株对铜绿丽金龟幼虫取食选择性的影响

配制浓度为 40、80、120、160、200 $\mu\text{g/g}$ 的 HBF-1 菌悬液,加入马铃薯丝(2 mm \times 2 mm)混匀,放在经紫外线照射过的白纸上,控干水分。在饲养盒(15 cm \times 10 cm)一侧放菌剂处理过的马铃薯丝,另一侧放无菌的马铃薯丝,上盖 5 cm 湿土,将 10 日龄的铜绿丽金龟幼虫接在两种饲料中间,每处理接 10 头,3 次重复。设两侧均为无菌马铃薯丝的处理作为对照。在 30 的人工气候箱中饲养,分别于 7、10 和 14 d 时统计死、活虫数,记录在对照马铃薯和处理马铃薯上的幼虫数,计算对照和处理马铃薯上的幼虫比例,并计算死亡率。

1.7 数据处理

数据用 Duncan 氏新复极差法进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 HBF-1 菌株对金龟子幼虫存活率及 LC_{50} 值的影响

结果如表 1 所示,随着 HBF-1 菌剂浓度的增加和处理天数的延长,铜绿丽金龟幼虫和黄褐丽金龟幼虫的死亡率均呈明显上升趋势, LC_{50} 值显著降低。感染 7 d 时对黄褐丽金龟幼虫的 LC_{50} 值为 64.16 $\mu\text{g/g}$,14 d 时下降到 13.98 $\mu\text{g/g}$,是 7 d 时的 0.22 倍;感染 7 d 时对铜绿丽金龟幼虫的 LC_{50} 值为 79.69 $\mu\text{g/g}$,14 d 时下降到 19.14 $\mu\text{g/g}$,

是 7 d 时的 0.24 倍。

金龟子幼虫接到菌土上后很快入土觅食,48 h 观察无死亡现象。随时间延长,幼虫活动变得迟缓,体壁弹性降低,身体变软,取食量下降,对外界刺激反应迟钝,死亡率升高;死亡幼虫身体柔软,变褐,轻轻挤压即破,时间稍长,虫尸就会腐烂。

2.2 HBF-1 菌株对铜绿丽金龟幼虫的拒食和生长抑制作用

由表 2 可以看出,不同浓度 HBF-1 菌剂对铜绿丽金龟幼虫取食量的影响不同。当菌剂浓度为 10 和 20 $\mu\text{g/g}$ 时,幼虫取食量与对照无明显差异,但随着处理时间的延长,菌剂浓度越高幼虫的取食量越少,与对照相比差异显著。处理后 7 d,幼虫对 HBF-1 菌株的拒食率均低于 40%,当处理时间达到 14 d,幼虫的拒食率明显升高,且随着菌剂浓度的增加而升高,160 $\mu\text{g/g}$ 处理时幼虫的拒食率高达 86.10%。

由表 2 还可看出,HBF-1 菌株对幼虫的生长抑制率也随着菌剂浓度的增加和处理时间的延长而升高。10 $\mu\text{g/g}$ 处理 7 d 时,对幼虫的生长抑制率为 9.84%;160 $\mu\text{g/g}$ 7 d 时则高达 83.61%。处理 14 d 时,各浓度菌剂对幼虫的生长抑制率均在 70% 以上,而以两个浓度最高者抑制率最高,分别为 91.25% 和 97.75%。随着处理时间的延长,低浓度菌剂对幼虫的生长抑制率变化明显,而浓度高者变化微弱。

Table 1 Effect of HBF-1 strain on survival rate and LC₅₀ of *A. corpulenta* and *A. exoleta* larvae

Concentration /($\mu\text{g/g}$)	<i>A. corpulenta</i> larvae		Concentration /($\mu\text{g/g}$)	<i>A. exoleta</i> larvae	
	Mortality (%)			Mortality (%)	
	7 d	14 d		7 d	14 d
20	34.67 Aa	55.33 Aa	10	5.33 Aa	34.67 Aa
40	35.33 Aa	59.67 Aa	30	24.67 Bb	79.67 Bb
80	45.33 Bb	69.67 Bb	60	49.67 Cc	89.67 Cc
160	60.67 Cc	80.33 Cc	90	55.33 Cc	95.33 Cc
240	69.67 Dd	89.33 Dd	120	74.67 Dd	95.67 Cc
CK	0	0	CK	0	0
LC ₅₀ (95% CL)	79.69	19.14	LC ₅₀ (95% CL)	64.16	13.98
/($\mu\text{g/g}$)	(38.21 ~ 121.17)	(9.02 ~ 29.26)	/($\mu\text{g/g}$)	(36.09 ~ 90.33)	(6.92 ~ 21.04)

Note: Data in line followed by the same letter are not significantly different Capital indicates that the difference is significant under 0.05 level, lowercase indicates that the difference is significant under 0.01 level The same as below.

Table 2 Effect of HBF-1 strain on antifeeding and growth inhibition of *A. corpulenta* larvae

Concentration /($\mu\text{g/g}$)	Average of food consumption/mg		Antifeeding rate (%)		Average amount of growth/mg		Growth inhibition rate (%)	
	7 d	14 d	7 d	14 d	7 d	14 d	7 d	14 d
	10	14.65 Ee	12.16 Ee	4.74 Aa	30.75 Aa	2.85 Dd	1.97 Cc	9.84 Aa
20	14.04 Ee	11.87 Ee	8.71 Aa	32.34 Aa	2.02 Cc	1.44 Cc	33.77 Bb	80.90 Bb
40	12.66 Cc	9.18 Cc	17.89 Bb	47.72 Bb	1.68 Bb	0.84 Bb	44.92 Cc	88.86 Cc
80	11.46 Bb	3.54 Bb	25.42 Bb	79.84 Cc	1.02 Bb	0.66 Bb	66.56 Dd	91.25 Cc
160	9.38 Aa	2.44 Aa	39.01 Cc	86.10 Cc	0.50 Aa	0.17 Aa	83.61 Ee	97.75 Dd
CK	15.38 Ee	17.56 Ff	0	0	3.05 Dd	7.54 Dd	0	0

2.3 HBF-1菌株对铜绿丽金龟幼虫取食选择性的影响

从总体上看,随着菌剂浓度的增加和处理时间的延长,幼虫死亡率逐渐升高,含菌饲料上的幼虫数逐渐减少,对照饲料上的幼虫数逐渐增多。同一浓度下,随着处理时间的延长,幼虫死亡率明显增加,尤其是在低浓度条件下死亡率变化更为明显:40 $\mu\text{g/g}$ 处理4 d时幼虫死亡率为10%,第7 d增加到26.7%,到第10 d增加到了53.3%,呈等比增长;而高浓度处理的幼虫死亡率虽高,但随着时间的延长死亡率变化不如前者明显。

由图1可以看出,在第4 d和第7 d,40和80 $\mu\text{g/g}$ 处理的幼虫取食选择性不明显;但第4 d时120、160和200 $\mu\text{g/g}$ 处理含菌饲料上的幼虫比率分别为33%、28%和25%,对照饲料上分别为67%、72%和75%,对照饲料上的幼虫数几乎为含菌饲料上的3倍;并且随着时间的延长,对照饲料上幼虫数与含菌饲料上幼虫数的比值有明显上升趋势,尤以160和200 $\mu\text{g/g}$ 处理表现明显,含菌饲料上的幼虫数分别从第4 d的28%和25%下降到第10 d的13%和7.7%。

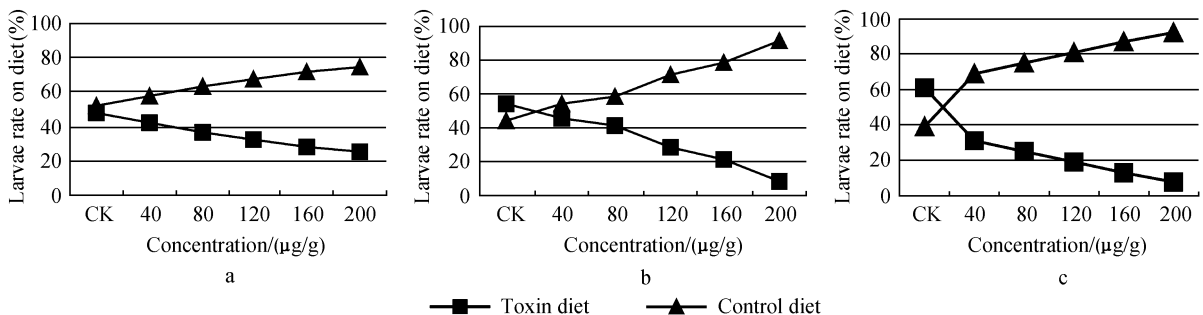


Fig. 1 The numbers of the *Anomala corpulenta* larvae fed on the diet containing Bt and control
a: 4 d after infected by Bt b: 7 d after infected by Bt c: 10 d after infected by Bt

3 讨论

本研究证明了苏云金芽孢杆菌 HB F-1 菌株对铜绿丽金龟和黄褐丽金龟幼虫均具有较高的杀虫活性,尤其黄褐丽金龟幼虫对其的敏感性较高。HB F-1 菌株对铜绿丽金龟幼虫有拒食和抑制生长作用,同时铜绿丽金龟幼虫对含菌饲料有一定的取食选择性,且这 3 种作用的强弱与饲料的含菌量有关,含菌量高时作用强,反之则弱。这与前人对 Bt 在鳞翅目和膜翅目幼虫上的相关实验结果一致。王冬妍等^[10]曾报道,表达 Cry1Ab 杀虫蛋白的 Bt 玉米 MON810 和 Bt11 对亚洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis* 初孵幼虫的取食有明显的抑制作用,对虫害有很好的控制效果。曾晓慧等^[11]也报道过苏云金芽孢杆菌 Cry1C 毒素对甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* Hübner 幼虫生长发育、存活及取食行为的影响,证明甜菜夜蛾幼虫对苏云金芽孢杆菌 Cry1C 毒素具有探测和拒食能力,该能力的强弱与饲料中所含毒素浓度呈正相关。左广胜^[12]报道过苏云金素对棉铃虫初孵幼虫和 5 日龄幼虫的体重和体长有明显的抑制作用,随着毒素浓度的增加,对幼虫的取食量也有明显的抑制作用。

早在 1982 年, Mohd-Salleh 等^[13]就报道过鳞翅目幼虫在低剂量苏云金素处理后第 7 d 死亡率随剂量的增加而增加,此后随剂量的增加,死亡率反而下降; 7 d 后,最高剂量处理仅有 5% 的死亡率,然而至处理后第 14 d,幼虫死亡率又高达 90% 以上。处理 7 d 后,高剂量苏云金素明显抑制幼虫取食,存活幼虫在高剂量含菌饲料上几乎不取食,幼虫虫体较小,颜色也比低剂量处理者浅。本研究所采用的苏云金芽孢杆菌 HB F-1 菌株中起主要杀虫作用的是伴孢晶体蛋白^[4],但也发现在低浓度下随着菌剂浓度的增加和感染时间的延长,幼虫死亡率增高,这种反应比高浓度处理者明显,由此也充分表明金龟子幼虫对高浓度 HB F-1 菌剂存在拒食和取食选择性。

参考文献:

[1] Institute of Zoology, Academia Sinica (中国科学院动物研究所). Integrated Control of Primary Insect Pests in China (中国主要害虫综合防治) [M]. Beijing (北京): Science Press (科学出版社), 1979.

[2] WEI Hong-jun (魏鸿均), HUANG Wen-qin (黄文琴). 中国地下害虫研究概述 [J]. Entomological Knowledge (昆虫知

识), 1992, 29(2): 168-170.

- [3] Ohba M, Iwahana H, Asano S, et al A unique isolate of *Bacillus thuringiensis* serovar japonensis with a high larvicidal activity specific for scarabaeid beetles [J]. Letters in Applied Microbiology, 1992, 14: 54-57.
- [4] FENG Shu-liang (冯书亮), WANG Rong-yan (王容燕), FAN Xiu-hua (范秀华), et al 一株对金龟子类幼虫具有杀虫活性的苏云金芽孢杆菌新分离株 [J]. Chin J Biological Control (中国生物防治), 2000, 16(2): 74-78
- [5] Gould F, Anderson A. Effects of *Bacillus thuringiensis* and HD-73 delta-endotoxin on growth, behavior, and fitness of susceptible and toxin-adapted strains of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. Environ. Entomol, 1991, 20: 30-38.
- [6] Eborá V R, Eborá M M, Sticklen M B, et al Transgenic potato expressino of *Bacillus thuringiensis* Cry1A gene effects on the survival and food consumption of *Phthorimea perculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) [J]. J Economic Entomology, 1994, 87: 1122-1127.
- [7] Farrar R G, Ridgway R L. Feeding behavior of gypsy moth (Lepidoptera: Lymanthriidae) larvae on artificial diet containing *Bacillus thuringiensis* [J]. Environmental Entomology, 1995, 24: 755-761.
- [8] Moar W J, Carey M P, van Faassen H, et al Development of *Bacillus thuringiensis* Cry1C resistance by *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61: 2086-2092
- [9] Mariano B, Trumble J T, Moar W J. Effect of Cry1C toxin from *Bacillus thuringiensis* on larvae feeding behavior of *Spodoptera exigua* [J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 1996, 80: 389-401.
- [10] WANG Dong-yan (王冬妍), WANG Zhen-ying (王振营), HE Kang-lai (何康来), et al 转 Bt 基因抗虫玉米对亚洲玉米螟幼虫取食行为的影响 [J]. Entomological Knowledge (昆虫知识), 2005, 42(3): 270-274.
- [11] ZENG Xiao-hui (曾晓慧), YU Zi-niu (喻子牛), HU Cui (胡萃). 苏云金芽孢杆菌 Cry1C 毒素对甜菜夜蛾幼虫生长发育、存活及取食行为的影响 [J]. J Zhejiang Agric Univ (Agric & Life Sci) [浙江农业大学学报 (农业与生命科学版)], 1999, 25(1): 62-66
- [12] ZUO Guang-sheng (左广胜), GUO Yu-jie (郭玉杰), WANG Nian-ying (王念英), et al 苏云金素对棉铃虫幼虫生长发育和取食行为的影响研究 [J]. Acta Gossypii Sinica (棉花学报), 1994, 6(2): 126-128.
- [13] Mohd-Salleh M B, Lew ia L C. Feeding deterrent response of com insects to exotoxin of *Bacillus thuringiensis* [J]. Invertebr Pathol, 1982, 39: 323-328

(Ed. TANG J)