

二化螟高毒力苏云金杆菌菌株的筛选

张鑫琳¹, 于洪春¹, 房丹丹¹, 项丹丹¹, 许振南¹, 许国庆²

(1. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 辽宁省农业科学院 植物保护研究所, 辽宁 沈阳 110161)

摘要:以高毒力苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)为供试菌株,以二化螟为试虫,初步研究了30个Bt菌株对1~2龄二化螟幼虫的毒力效果,进而以筛选出的5株较高青力Bt菌株进行2~3龄二化螟幼虫青力试验,以筛选出适合黑龙江省二化螟防治的Bt菌株。结果表明:Bt14菌株在饲喂菌液168 h后,二化螟的校正死亡率可达90%以上,毒力回归方程为 $y=0.6121x+0.8789$, $R^2=0.9989$, $LC_{50}=5.4\times10^6$ 芽孢/mL,致死剂量与其它菌株差异显著,表明该菌株对防治二化螟具有很好的应用前景。

关键词:二化螟;苏云金杆菌;菌株;生物测定;毒力;筛选

中图分类号:S 435.112⁺.1 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2014)16-0112-03

二化螟[*Chilo suppressalis* (Walker)]是我国稻区水稻上的重要害虫之一,原在我国长江流域及以南稻区发生严重^[1-2],但随着全球气候的变暖和耕作栽培技术的改变,近年我国北方地区二化螟发生日趋严重,目前已成为黑龙江省南部稻区水稻生产的最主要害虫,造成较严重的经济损失^[3]。其不但为害水稻,还可为害茭白、玉米、高粱、甘蔗、油菜等作物^[1,4]。目前对二化螟的防治主要采用有机磷类、拟除虫菊酯类、苯基吡唑类等化学杀虫剂为主^[5]。由于大量频繁地使用化学杀虫剂,导致二化螟对化学农药抗性上升^[2,6-7],同时易造成稻谷的农药残留超标和环境污染问题的发生。近年来随着害虫可持续治理的发展,生物防治越来越被人们所重视,有关稻田生物多样性和天敌的保护利用也成为研究热点之一。利用微生物防治、寄生性天敌防治、捕食性天敌防治等生物防治措施防治螟虫收到了较好的防治效果^[8-10]。

苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*)是一种分布广泛的革兰氏阳性土壤细菌,对鳞翅目、双翅目、鞘翅目等很多害虫具有较高杀虫活性。目前,生产上已经开始应用苏云金杆菌防治二化螟,表现出较好的防治效果^[9,11]。由于我国地大物博,各地苏云金杆菌存在很多变种和亚种,其对目标害虫的活性也不尽相同,甚至存在很大差异。该研究将黑龙江当地分离出的30株苏云金杆菌(Bt)菌株对二化螟幼虫进行室内生物测定,以期筛选出

对当地二化螟幼虫有较高毒力的Bt菌株,为研制和开发防治二化螟的Bt生物制剂提供试验依据,以满足黑龙江省绿色水稻生产和二化螟生物防治的需要。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试二化螟虫源采自哈尔滨市香坊区香坊农场水稻试验田,挑选出虫体大致相同的1~3龄幼虫作为试虫。

供试菌株有Bt2、Bt4、Bt42、Bt14、Bt20、Bt32、Bt21、Bt23、Bt34、Bt39、Bt10、Bt45、Bt47、Bt52、Bt53、Bt57、Bt106、Bt99、Bt25、Bt114、Bt108、Bt63、Bt61、Bt109、Bt110、Bt80、Bt56、Bt64、Bt78、以色列,由东北农业大学农学院植物保护系害虫生物防治研究室提供。

牛肉膏蛋白胨琼脂培养基,蛋白胨1%,牛肉膏0.5%,琼脂2%,pH 7.0~7.5。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株培养与芽孢计数 在无菌操作台中接种各Bt菌株于斜面培养基上,置于30℃的生化培养箱中培养3 d后,用无菌水将Bt各菌株制成悬浮液,用血球计数板计数芽孢数,放置在4℃冰箱里保存备用。各菌株原液芽孢浓度(芽孢/mL)=每小格内平均孢子数 $\times 4\times 10^6\times$ 稀释倍数。

1.2.2 菌株筛选试验 各Bt菌株用无菌水稀释成 5×10^7 芽孢/mL。将10 cm长新鲜的水稻茎秆浸于菌液中1 min后取出,放于铺有2层保湿滤纸的养虫盒中,每盒中接入1~2龄幼虫15~20头,并设无菌水对照。每处理设3次重复。然后将其放入25℃、L14:D10的光照培养箱内饲养。48 h后更换无菌的新鲜稻秆。以后每隔24 h更换1次稻秆并记录幼虫存活数,计算其死亡率

第一作者简介:张鑫琳(1986-),女,黑龙江人,硕士研究生,研究方向为害虫生物防治。E-mail:dnzhangxinlin@163.com。

责任作者:于洪春(1966-),男,博士,教授,硕士生导师,研究方向为农业昆虫与害虫防治。E-mail:hongcyu@yahoo.com.cn。

资助项目:国家公益性行业(农业)科研专项资助项目(201003025)。

收稿日期:2014-04-16

和校正死亡率。筛选出较高毒力 Bt 菌株。

1.2.3 室内毒力测定 将初筛出来的 5 株 Bt 菌株用无菌水稀释成 2×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 2.5×10^8 、 1.25×10^9 芽孢/mL 5 个浓度梯度,并设清水为对照,对 2~3 龄二化螟幼虫进行室内生物测定,处理方法同 1.2.2。计算 72、120、168 h 二化螟死亡率和校正死亡率,求出回归方程和致死中浓度,筛选出毒力最高的 Bt 菌株。

1.2.4 5 个 Bt 菌株致死剂量之间的差异显著性比较 采用致死剂量比率测定法比较 2 种药剂致死剂量之间的差异,当致死剂量比率的 95% 置信区间包含 1,则 2 种药剂的致死剂量之间的差异不显著。

1.3 数据分析

试验数据采用 DPS v 7.05 软件进行方差分析并做差异显著性比较分析。

2 结果与分析

2.1 高毒力 Bt 菌株的初步筛选

表 1 结果表明,不同菌株的苏云金杆菌对二化螟幼虫的毒力存在很大的差异,其 72 h 累计校正死亡率为

表 1 30 株 Bt 菌株对二化螟 1~2 龄幼虫的毒力初步测定

菌株	浓度 /芽孢·mL ⁻¹	试虫 /头	累计死亡率/%			累计校正死亡率/%		
			72 h	120 h	168 h	72 h	120 h	168 h
Bt14	5×10^7	60	53.3	63.3	93.3	52.5	62.1	93.0 a A
Bt4	5×10^7	60	50.0	63.3	91.7	49.2	62.1	91.2 a AB
Bt20	5×10^7	60	38.3	55.0	76.7	37.3	53.4	75.4 ab ABC
Bt2	5×10^7	60	38.3	48.3	76.7	37.3	46.6	75.4 ab ABC
Bt42	5×10^7	60	41.7	46.7	71.7	40.7	44.8	70.2 ab ABCD
Bt64	5×10^7	60	8.3	45.0	65.0	6.8	43.1	63.2 bc ABCDE
Bt57	5×10^7	60	25.0	45.0	63.3	23.7	43.1	61.4 bc ABCDEF
Bt52	5×10^7	45	28.9	51.1	62.2	27.7	49.4	60.2 bc ABCDEF
Bt23	5×10^7	45	28.9	44.4	62.2	27.7	42.5	60.2 bc ABCDEF
Bt10	5×10^7	45	28.9	40.0	62.2	27.7	37.9	60.2 bc ABCDEF
Bt114	5×10^7	60	23.3	43.3	61.7	22.0	41.4	59.6 bcd ABCDEF
Bt80	5×10^7	60	23.3	38.3	60.0	22.0	36.2	57.9 bcd ABCDEF
Bt47	5×10^7	45	37.8	55.6	60.0	36.7	54.0	57.9 bcd ABCDEF
Bt32	5×10^7	60	28.3	45.0	58.3	27.1	43.1	56.1 bcde BCDEF
Bt63	5×10^7	60	28.3	40.0	56.7	27.1	37.9	54.4 bcdef CDEF
Bt53	5×10^7	45	26.7	37.8	51.1	25.4	35.6	48.5 bcdefg CDEF
Bt39	5×10^7	45	33.3	46.7	51.1	32.2	44.8	48.5 bcdefg CDEF
Bt61	5×10^7	60	26.7	41.7	50.0	25.4	39.7	47.4 cdefg CDEF
Bt108	5×10^7	60	15.0	40.0	50.0	13.6	37.9	47.4 bcdef CDEF
Bt56	5×10^7	60	21.7	33.3	43.3	20.3	31.0	40.4 cdefg CDEF
Bt21	5×10^7	60	21.7	25.0	43.3	20.3	22.4	40.4 cdefg CDEF
Bt110	5×10^7	60	30.0	40.0	43.3	28.8	37.9	40.4 cdefg CDEF
Bt99	5×10^7	60	23.3	28.3	40.0	22.0	25.9	36.8 cdefg DEF
Bt78	5×10^7	60	18.3	26.7	40.0	16.9	24.1	36.8 cdefg DEF
Bt45	5×10^7	45	8.9	28.9	40.0	7.3	26.4	36.8 cdefg DEF
Bt106	5×10^7	60	20.0	28.3	35.0	18.6	25.9	31.6 defg EF
以色列	5×10^7	60	11.7	21.7	31.7	10.2	19.0	28.1 efg EF
Bt109	5×10^7	60	20.0	26.7	31.7	18.6	24.1	28.1 efg EF
Bt25	5×10^7	60	16.7	23.3	30.0	15.3	20.7	26.3 fg EF
Bt34	5×10^7	45	20.0	24.4	28.9	18.6	21.8	25.1 g F
对照	无菌水	60	1.7	3.3	5.0	—	—	—

6.8%~52.5%,120 h 累计校正死亡率为 19.0%~62.1%,168 h 累计校正死亡率为 25.1%~93.0%。差异显著性分析表明,在 5% 水平上菌株 Bt14 和 Bt4 处理的二化螟的 168 h 累计校正死亡率除与 Bt20、Bt2 和 Bt42 差异不显著外,均显著高于其它菌株。因此,初步筛选出对二化螟幼虫具有较高毒力的菌株是 Bt14、Bt4、Bt20、Bt2 和 Bt42。

2.2 高毒力 Bt 菌株的进一步筛选

由表 2 可知,随着 5 株 Bt 菌株浓度的增加,其对二化螟的杀虫活性呈逐渐增高的趋势。菌株间毒力大小表现出差异,其中 Bt14 在 168 h 时 1.25×10^9 芽孢/mL 的浓度下对二化螟的累计校正死亡率高达 93.0%,Bt4 在 168 h 该浓度下的累计校正死亡率仅为 69.6%。

表 2 5 株较高毒力 Bt 菌株对二化螟 2~3 龄幼虫的生物测定

菌株	浓度 /×10 ⁶ 芽孢·mL ⁻¹	试虫 /头	累计校正死亡率/%		
			72 h	120 h	168 h
Bt14	2	45	16.4	26.4	39.2
	10	45	20.9	35.6	57.9
	50	45	23.2	44.8	71.9
	250	45	25.4	56.3	83.6
	1 250	45	29.9	67.8	93.0
Bt42	2	45	9.6	12.6	20.5
	10	45	14.1	28.7	41.5
	50	45	18.6	42.5	57.9
	250	45	29.9	54.0	69.6
	1 250	45	16.4	63.2	81.3
Bt2	2	45	5.1	14.9	27.5
	10	45	16.4	31.0	41.5
	50	45	23.2	40.2	53.2
	250	45	23.2	49.4	74.3
	1 250	45	16.4	44.8	83.6
Bt20	2	45	11.9	19.5	27.5
	10	45	18.6	31.0	43.9
	50	45	16.4	31.0	46.2
	250	45	20.9	42.5	67.3
	1 250	45	20.9	44.8	74.3
Bt4	2	45	9.6	21.8	25.1
	10	45	23.2	37.9	41.5
	50	45	34.5	54.0	53.2
	250	45	36.7	56.3	64.9
	1 250	45	45.8	65.5	69.6

利用 DPS v7.05 软件中生物测定的计数型分析,得出各个菌株的 LC_{50} 以及其回归方程。由表 3 可以看出,5 株 Bt 菌株浓度与校正死亡率间存在明显线性关系,其中菌株 Bt14 的毒力回归方程为 $y=0.6121x+0.8789$,其 LC_{50} 为 5.4×10^6 芽孢/mL,在 5 株菌株中 LC_{50} 最小,表明其毒力最高。

从表 4 可以看出,在两两菌株比较时,菌株 Bt14 对二化螟幼虫的致死剂量与其它 4 株菌株均有显著性差异,表明 Bt14 对二化螟幼虫的生物活性最强,毒力最高,因此,Bt14 菌株为筛选到的防治二化螟幼虫的最佳生防 Bt 菌株。

表3 5个Bt菌株168h的 LC_{50} 以及回归方程

菌株	$LC_{50}/\times 10^6$ 芽孢 $\cdot mL^{-1}$	回归方程	R^2
Bt14	5.4	$y=0.6121x+0.8789$	0.9989
Bt42	32.3	$y=0.5942x+0.5377$	0.9915
Bt2	24.3	$y=0.5750x+0.7526$	0.9952
Bt20	38.4	$y=0.4439x+1.6335$	0.9792
Bt4	45.4	$y=0.4243x+1.7513$	0.9826

表4 5个Bt菌株致死剂量之间的差异显著性比较

比较组别	LC	比率	95%置信区间	显著性
Bt14 : Bt42	50	0.1669	0.1138~0.2449 *	显著
Bt14 : Bt2	50	0.2217	0.1617~0.3039 *	显著
Bt14 : Bt20	50	0.1405	0.0800~0.2468 *	显著
Bt14 : Bt4	50	0.1190	0.0710~0.1994 *	显著
Bt42 : Bt2	50	1.3279	0.8596~2.0513	不显著
Bt42 : Bt20	50	0.8417	0.4448~1.5928	不显著
Bt42 : Bt4	50	0.7128	0.3924~1.2945	不显著
Bt2 : Bt20	50	0.6338	0.3480~1.1545	不显著
Bt2 : Bt4	50	0.5368	0.3079~0.9357 *	显著
Bt20 : Bt4	50	0.8468	0.4099~1.7497	不显著

3 讨论与结论

苏云金杆菌是目前害虫生物防治中应用最为广泛的昆虫病原微生物,已知对鳞翅目、鞘翅目等10目的522种昆虫具有不同程度的致病力^[12]。但不同Bt变种由于含有血清型或杀虫基因不同,其对昆虫的毒力差异很大,其寄主范围也表现出较大差异;甚至即使是苏云金杆菌类群中的同一个变种,不同的菌株对昆虫的毒力差异也可以很大;一个优良的Bt菌株只对1种或几种害虫具有高毒力,不会对所有害虫都有高毒力^[12]。因此,对目标农业害虫高毒力Bt菌株的筛选是应用Bt有效防治该目标害虫的前提条件和基础工作。Bt防治二化螟已有应用报道^[9,11],证实用Bt生物防治二化螟是可行性措施。该研究筛选出了1株适合黑龙江省二化螟

防治的Bt14菌株,室内生物测定对低龄二化螟防治效果达90%以上,其毒力回归方程为 $y=0.6121x+0.8789$, $R^2=0.9989$, $LC_{50}=5.4\times 10^6$ 芽孢/mL;室外盆栽防治效果达80%以上,表明该菌株在黑龙江地区对二化螟的生物防治具有极好的应用前景和开发价值。有关该菌株的血清型或基因型有待进一步研究。

参考文献

- [1] 徐艳博,王孟伦,韩兰芝,等.人工饲料、转Bt水稻及其亲本稻苗饲养下二化螟种群适合度的比较研究[J].应用昆虫学报,2012,49(6):1535-1540.
- [2] 姚英娟,徐雪亮,徐荣仔,等.不同药剂混配组合对二化螟的防治效果[J].华中农业大学学报,2013,32(4):43-47.
- [3] 耿欢欢,李红霞,于洪春,等.黑龙江省二化螟虫口密度与梗稻产量损失关系及经济阈值的研究[J].东北农业大学学报,2012,43(1):43-47.
- [4] 彭丽年,张伟,蒋凡,等.氯虫苯甲酰胺对二化螟的防效简报[J].中国植保导刊,2011,31(6):42-43.
- [5] 吕锐玲,周强,涂军明,等.水稻二化螟的发生与防治[J].现代农业科技,2011(14):188-192.
- [6] 张帅,李永平,邵振润,等.水稻二化螟抗性监测及防控对策[J].植物保护,2011,37(2):141-144.
- [7] 姚英娟,徐雪亮,曾水根,等.二化螟对不同药剂的敏感度研究[J].植物保护,2013,39(6):95-99.
- [8] 朱红军,徐庚鸿,赵德明,等.水稻病虫害绿色防控技术研究集成示范[J].安徽农业科学,2013,41(7):2924-2925.
- [9] 郭荣,韩梅,束放.减少稻田用药的病虫草害绿色防控策略与措施[J].中国植保导刊,2013,33(10):38-41.
- [10] 郑和斌.水稻病虫害绿色防控技术的应用及效益[J].中国植保导刊,2012,32(7):58-60.
- [11] 彭丽年,蒋凡,徐翔,等.甜核·苏云菌对水稻二化螟的防效[J].植物保护,2011,37(3):170-172.
- [12] 韩新才.提高苏云金杆菌防治效果技术的研究[J].安徽农业科学,2006,34(8):1614-1616.

The Screening of High Virulence *Bacillus thuringiensis* Strains to *Chilo suppressalis* (Walker)

ZHANG Xin-lin¹, YU Hong-chun¹, FANG Dan-dan¹, XIANG Dan-dan¹, XU Zhen-nan¹, XU Guo-qing²

(1. School of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030; 2. Plant Protection Institute, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang, Liaoning 110161)

Abstract: Taking *Chilo suppressalis* as material, using high virulence Bt strains, the effect of 30 Bt strains on the virulence test of 1~2 instar *Chilo suppressalis* larvae were studied, then the effect of 5 high virulence Bt strains that screened out on virulence of 2~3 instar *Chilo suppressalis* larvae were studied, to screen out suitable high virulence Bt strain to prevention *Chilo suppressalis* in Heilongjiang province. The results showed that the corrected mortality of *Chilo suppressalis* was 90% treated by Bt14 bacteria liquid after 168 h. And then its toxicity regression equations were: $y=0.6121x+0.8789$, $R^2=0.9989$. Its LC_{50} was 5.4×10^6 spores/mL, which was significant difference from other Bt stains. The results suggested that Bt14 could have a good prospect for controlling *Chilo suppressalis*.

Key words: *Chilo suppressalis* (Walker); *Bacillus thuringiensis*; strains; bioassay; virulence; screening