

昆虫病原线虫对大豆地下害虫 东北大黑鳃金龟幼虫的致病力研究^{*}

钱秀娟^{1,2} 许艳丽^{1*} Wang Yi³ 刘长仲² 李春杰^{1,2} 赵风平⁴

(1. 中国科学院东北地理与农业生态研究所, 哈尔滨 150040; 2. 甘肃农业大学, 兰州 730070;
3. Rutgers University, New Brunswick, NJ 08901-8520, USA; 4. 东北农业大学, 哈尔滨 150030)

摘要 蛴螬是一种对大豆为害严重的地下害虫。本试验应用昆虫病原线虫(*Entomopathogenic nematode*, EPN)斯氏线虫 *Steinernema carpocapsae* 的4个品系和异小杆线虫 *Heterorhabditis bacteriophora* 的3个品系, 分别以滤纸和沙子为介质对东北大黑鳃金龟幼虫进行致病力测定, 筛选出异小杆线虫 *Heterorhabditis bacteriophora* -1品系为防治东北大黑鳃金龟幼虫的较理想线虫品系, 以沙子为介质时, 校正寄生死亡率达95.83%。

关键词 昆虫病原线虫; 东北大黑鳃金龟幼虫; 室内生测

中图分类号 S 433.8⁺3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2005)03-0224-05

0 引言

蛴螬是东北地区大豆主要害虫, 由于其长期栖息在土壤中取食萌发的种子, 咬断幼苗的根、茎, 轻则缺苗断垄, 重则毁种绝收^[2-4], 防治比较困难。一般采用将化学农药颗粒剂与肥料混合施入土壤中进行防治, 但效果不理想。而且使用的药剂一般为甲基异柳磷、辛硫磷、甲拌磷等高毒性、长残留, 对人、畜不安全的农药^[2-4], 长期使用造成环境和粮食的污染。昆虫病原线虫是上个世纪发展起来的一种非常有潜力的生物控制因子, 因其具有对昆虫专性寄生、寄生范围广、对寄主昆虫具有主动搜寻能力、能够从寄主昆虫的自然开口(如口器、气门和肛门)、伤口或节间膜进入寄主昆虫体内、并且能够迅速杀死寄主昆虫、能以人工培养基低成本大量培养、对人畜、植物及有益生物安全等优点, 引起了研究者的关注^[5,6]。此外, 昆虫病原线虫可以在虫尸内持续生存繁殖, 即其后代还可以继续杀死目标害虫, 有利于害虫的持续控制, 具有持效性, 这是目前任何化学杀虫剂都无法比拟的^[7]。国外学者研究表明, 昆虫病

原线虫对250种害虫有防治作用, 我国在昆虫病原线虫的实际应用方面也进行了大量研究, 利用线虫防治土栖性害虫, 如桃小食心虫、甘蔗实背黑蔗龟、暗黑鳃金龟及钻蛀性害虫如光肩星天牛、木蠹蛾、多纹貂蠹蛾等均取得了较好防治效果^[5-7,8-12]。目前世界上不少国家正在进行对这种新型生物杀虫剂的研究和应用^[8-12]。因此本试验旨在通过实验室生测, 筛选出对东北大黑鳃金龟幼虫侵染效果较好、致病力较高的线虫种类或品系, 以期对日后的田间实际应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试昆虫: 东北大黑鳃金龟幼虫 *Holotrichia oblita* Faldermann.

线虫扩繁寄主昆虫: 大蜡螟幼虫 *Galleria mellonella* (L.).

供试线虫: 斯氏线虫、异小杆线虫和格氏线虫的不同品系, 包括: *Steinernema carpocapsae* -1(04. 1. 10), *Steinernema carpocapsae* -2(03. 12. 27), S.

* 收稿日期: 2005-03-30

基金项目: 中国科学院知识创新工程重大项目(KZCX1-SW-19-4-03), 中国科学院学科前沿领域项目(KZCX3-SW-NA-09)

作者简介: 钱秀娟(1979-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 害虫生物防治, E-mail: xiujuan-602@163.com

** 通讯作者: E-mail: xuy12002@yahoo.com

carpocapsae — 3 (04.1.10), *S. glaseri* — 1(04.1.10), *Heterorhabditis bacteriophora* — 1 (03.12.27), *H. bacteriophora* — 2(03.12.27), *H. bacteriophora* — 3 (03.12.27), 括号内表示收集此种线虫并制成悬浮液的时间。

试验所用仪器设备:人工气候箱、智能冰箱、冷光源生物解剖镜、电热恒温培养箱、微量移液器、直径 60mm 培养皿、直径 90mm 培养皿、黑光灯、滤纸、小喷壶等。

1.2 试验方法

1.2.1 供试昆虫的获取

东北大黑鳃金龟幼虫在哈尔滨郊区大豆田直接挖取,四月下旬从田间挖取老熟幼虫,带回实验室用于室内防效生测。

大蜡螟幼虫由莱阳农学院和哈尔滨丰禾盛生物科技发展有限公司提供,并在本实验室扩繁。

1.2.2 供试线虫的获取

本试验所用 7 种昆虫病原线虫品系由中国科学院东北地理与农业生态研究所无公害农业学科植保组提供,并在本实验室通过活体培养获得大量侵染期线虫。

1.2.3 昆虫病原线虫不同种或品系对东北大黑鳃金龟幼虫的致病力测定(改进的 One on one 法)^[5]。

1.2.3.1 预备试验:生测用适宜线虫数量的筛选试验

在温度为 25℃、相对湿度为 80% 人工气候箱内,将东北大黑鳃金龟 *Holotrichia oblitata* Faldermann 老熟幼虫放在垫有滤纸的直径为 60mm 的培养皿中,每皿 1 头,经常用小喷壶喷水使滤纸保持湿润。7 个线虫品系为 7 个不同的处理,每个处理 50 头幼虫,每 10 头幼虫为一组,用相同的线虫数量,线虫数量分为 5 个梯度 5 条、10 条、20 条、40 条、60 条^[6]。按此数量将七个不同品系的线虫用微量移液器分别滴加到东北大黑鳃金龟幼虫上,同时以不加线虫滴加等量无菌水处理作对照,滴加时保证数量的准确性,并在解剖镜下检查。每隔 8h 检查东北大黑鳃金龟的死亡情况并记录。

1.2.3.2 以滤纸为介质的室内生测

本组试验在温度为 25℃、相对湿度为 80% 人工气候箱条件下进行。在直径为 60mm 的培养皿中垫一层滤纸,加入适量的水,使滤纸保持湿润。将东北大黑鳃金龟 *Holotrichia oblitata* Faldermann 老熟幼虫放在垫有滤纸的培养皿中,每皿 1 头,按通过预试验确定的数量将 7 个不同品系的线虫用微量移

液器分别滴加到东北大黑鳃金龟幼虫上,7 种不同品系的线虫每一种做为一个处理,同时以不加线虫滴加等量无菌水处理作对照,每处理 10 头供试幼虫,3 次重复^[10-12]。每隔 8h 检查东北大黑鳃金龟幼虫的死亡情况并作记录,比较各品系线虫对东北大黑鳃金龟幼虫的侵染效果。

1.2.3.3 以沙子为介质的室内生测

温度为 25℃、相对湿度为 80% 人工气候箱条件下,在直径为 60mm 的培养皿中加入 9g 灭菌细沙,再加入 1ml 无菌蒸馏水(使含水量为 10%),并酌量加入剪碎的灭菌大豆根,以模拟田间环境。每培养皿放入一头东北大黑鳃金龟幼虫,滴加 Hb-NJ60 条,同时以不加线虫滴加清水的处理作对照。每处理 10 头供试幼虫,3 次重复。每隔 8h 检查东北大黑鳃金龟幼虫的死亡情况并作记录。

1.2.4 数据处理

所有数据采用 SAS 统计软件进行统计分析,并作图。

2 结果与分析

2.1 生测适宜线虫数量的确定

昆虫病原线虫对东北大黑鳃金龟室内生测适合浓度的筛选,其主要依据为 ONE ON ONE 法,即用一条线虫侵染一头供试害虫,测定昆虫病原线虫对供试害虫的致病力,这样能最真实的反映昆虫病原线虫对供试害虫的致病力。但实际上因为供试害虫的自我防御反应,一条线虫对供试害虫几乎没有致病力,所以对浓度的选择要达到既能使东北大黑鳃金龟的死亡率达到一个较高的值,同时所选择的昆虫病原线虫剂量又是最小的。

测定结果(表 1)表明:侵染剂量为 60 条线虫/头幼虫时,7 个线虫品系处理寄生死亡率分别为 20%、20%、20%、40%、60%、40%、20%,与其他 4 个浓度和清水对照之间差异显著,显然当线虫侵染剂量为 60 条/头时,各品系昆虫病原线虫均对东北大黑鳃金龟幼虫表现一定的致病力。因此,选择每头东北大黑鳃金龟幼虫用 60 条昆虫病原线虫的剂量作为东北大黑鳃金龟致病力室内测试的使用剂量。

2.2 以滤纸为介质的室内致病力测定

测定结果表明:侵染剂量为 60 条/头时,7 种昆虫病原线虫对东北大黑鳃金龟幼虫都有致病能力,校正死亡率在 23.9% — 58.2% 之间,其中

Heterorhabditis bacteriophora —1 对东北大黑鳃金龟幼虫的累积寄生校正死亡率为 58.24%，与其他 6 种线虫品系差异达显著水平($p<0.05$),如图 1 所示。通过上表可以看出在同样的昆虫病原线虫侵染

表 1 对东北大黑鳃金龟幼虫生测适宜线虫数量的筛选

Table 1 The propriety number of EPN to *Holotrichia oblita* Faldermann

线虫品系 Nemadode strains	供试虫数(头) Number of pest	线虫侵染剂量(条/头) Number of EPN	寄生死亡率(%) (72h) Mortality
<i>Steinernema carpocapsae</i> — 1	50	5	0
		10	0
		20	0
		40	10.00
		60	20.00
		5	0
<i>Steinernema carpocapsae</i> — 2	50	10	0
		20	10.00
		40	10.00
		60	20.00
		5	0
		10	0
<i>Steinernema carpocapsae</i> — 3	50	20	0
		40	10.00
		60	20.00
		5	0
		10	0
		20	0
<i>Sternernema glaseri</i> — 1	50	40	10.00
		60	20.00
		5	0
		10	0
		20	10.00
		40	20.00
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> — 1	50	60	40.00
		5	0
		10	0
		20	20.00
		40	40.00
		60	60.00
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> — 2	50	5	0
		10	0
		20	20.00
		40	40.00
		60	40.00
		5	0
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> — 3	50	10	0
		20	10.00
		40	10.00
		60	20.00
		CK	50
		O(蒸馏水)	0

剂量下, *Heterorhabditis bacteriophora* —1 对东北大黑鳃金龟幼虫的半致死时间为 94.3h,其他 6 种线虫品系的致死率都较低,半致死时间较 *Heterorhabditis bacteriophora* —1 要长。

2.3 以沙子为介质的室内生测

试验结果表明,在被 *Heterorhabditis bacteriophora* —1 侵染 8h 后,东北大黑鳃金龟幼虫开始出现个体死亡,感染 16h 时校正死亡率达到

50%(LT50=16h),80h 时的累计校正死亡率为 95.83%,与以滤纸为介质时的致病力之间差异极显著($p<0.01$)(表 3)。可能是由于以沙子为介质更有利于昆虫病原线虫的移动,从而大大增加了侵染寄主的机率,因此在做室内生测时,选择以沙子为介质能更准确地反映昆虫病原线虫的致病性。95.83%的校正死亡率说明异小杆线虫 *Heterorhabditis bacteriophora* —1 对蛴螬有较强的致病力。

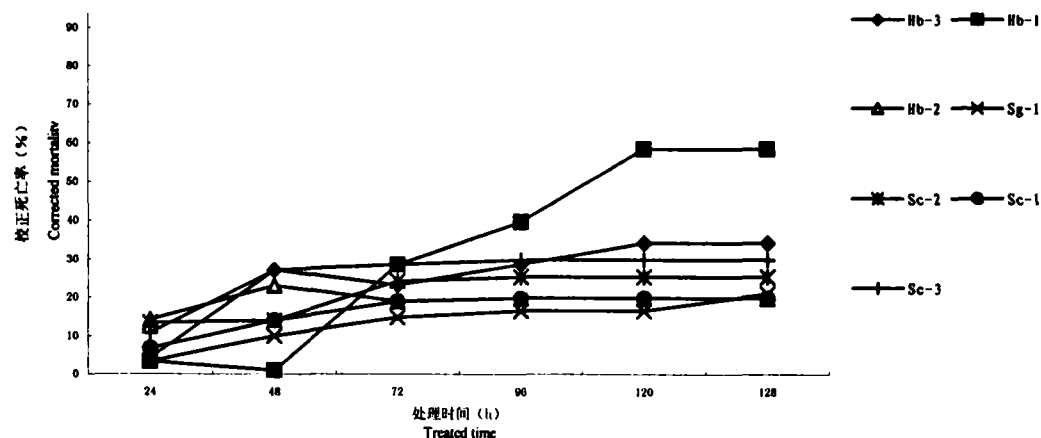


图 1 不同昆虫病原线虫种和品系对东北大黑鳃金龟幼虫的致病力
Fig. 1 The virulence of different strains to *Holotrichia oblita* Faldermann

表 2 7 种病原线虫对东北大黑鳃金龟幼虫致病力的室内生测
Table 2 Virulence of seven EPN strains to *Holotrichia oblita* Faldermann

线虫品系 Nemadode strains	供试虫数(头) Number of pest	线虫侵染剂量(条/头) Number of EPN	寄生死亡率(%) (128h) Mortality	校正死亡率(%) (128h) Corrected mortality	LT ₅₀ (h)
<i>S. carpocapsae</i> -1	30	60	44.0	25.3±21.1b	145.5
<i>S. carpocapsae</i> -2	30	60	42.9	23.9±21.0b	149.2
<i>S. carpocapsae</i> -3	30	60	53.6	38.1±7.6b	119.4
<i>S. glaseri</i> -1	30	60	39.3	19.1±13.2b	162.8
<i>H. bacteriophora</i> -1	30	60	67.9	58.2±10.5a	94.3
<i>H. bacteriophora</i> -2	30	60	42.9	23.9±13.3b	149.2
<i>H. bacteriophora</i> -3	30	60	50.0	33.3±4.8b	128
CK	30	0(蒸馏水)	25.0	0±0c	

表 3 Hb-1 对东北大黑鳃金龟幼虫防效的室内生测
Table 3 Virulence of *Heterorhabditis bacteriophora* -1 to *Holotrichia oblita* Faldermann

处理 Treatments	供试虫数(头) Number of pest	线虫侵染剂量(条/头) Number of EPN	寄生死亡率(%) (56h) Mortality	校正寄生死亡率(%) Corrected mortality
处理 Treatments	I	10	60	100
	II	10	60	90
	III	10	60	100
	平均值	10	60	96.7
对照 CK	I	10	0(蒸馏水)	30
	II	10	0(蒸馏水)	10
	III	10	0(蒸馏水)	20
	平均值	10	0	20

3 结论与讨论

本试验研究表明,7 个不同昆虫病原线虫种和品系均对东北大黑鳃金龟幼虫有一定的致病力,其中以异小杆线虫 *Heterorhabditis bacteriophora* -1 的致病力最高,以滤纸为介质 128h 时,东北大黑鳃金

龟幼虫的累计校正死亡率为 57.20%,且半致死时间明显地小于其他昆虫病原线虫品系,而以沙子为介质测定,56h 时累计校正死亡率达到 95.83%,说明 *Heterorhabditis bacteriophora* -1 是对东北大黑鳃金龟幼虫最敏感的昆虫病原线虫品系。
虽然同为一种昆虫病原线虫品系,但分别以滤纸和沙子为介质时, *Heterorhabditis bacteriophora*

—1对东北大黑鳃金龟幼虫的累计校正死亡率和半致死时间之间的差异极显著,说明以沙子为介质更有利于昆虫病原线虫对东北大黑鳃金龟幼虫的侵染。可能是因为沙粒之间有空隙,线虫可以在其中自由移动,从而大大增加了侵染寄主的机率。因此建议在昆虫病原线虫对地下害虫的室内生测试验中以沙子为介质。

昆虫病原线虫不同种和品系对同一种害虫的侵染能力和致死能力之间有很大的差别,而且同一种或同一品系昆虫病原线虫对不同害虫的侵染能力和致病力之间也有显著差异,因此筛选致病力强的昆虫病原线虫是能否用昆虫病原线虫有效控制某一种害虫的关键^[5,6]。同时看出,昆虫病原线虫搜寻和接近寄主的能力是影响其致病力的重要因素之一,因此在试验时尽力模仿自然环境,对正确筛选昆虫病原线虫有决定性意义^[5,6]。综上所述,本试验采用细沙作为昆虫病原线虫对东北大黑鳃金龟幼虫致病力测定试验的介质,模拟供试昆虫和病原线虫生活环境,极大的减小了系统误差,生测结果具有较强的代表性。

随着无公害农业和绿色农业的发展,害虫的生物防治在本世纪将具有长远和广阔的发展空间,而昆虫病原线虫作为继Bt、昆虫病毒、白僵菌之后兴起的又一种有效的生物防治因子,在害虫生物防治中将有更大的发展余地,尤其是地下害虫的生物防治

方面,可以预计昆虫病原线虫在未来的农业害虫生物生态控制系统中将会发挥重要的作用。

参 考 文 献

- 1 马明义. 蛭蟥的发生及防治对策[J]. 植物医生, 2002, 15(5): 16—17.
- 2 仵均祥. 农业昆虫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002, 62—63.
- 3 岳静慧, 殷花娥. 蛭蟥的发生为害与综合防治技术[J]. 北京: 农药与植保, 2004, 6, 25.
- 4 肖永新, 邵君霞. 蛭蟥的发生及防治措施[J]. 植保技术, 2002, 9, 14.
- 5 Adams, B. J., Akhurst, R. J., Glaser, R. W., et al. Entomopathogenic nematology[M]. CABI Publishing, 2002.
- 6 Smart, G. C., Jr. Entomopathogenic nematodes for the biological control of insects. Supplement to the journal of nematology[J]. 1995. 27(4s): 529—534.
- 7 金永玲, 韩日晔, 丛斌. 昆虫病原线虫应用研究概况[J]. 昆虫天敌, 2003, 25(4): 175—183.
- 8 郝德军, 张海林. 几种昆虫病原线虫对苗圃地下害虫的毒力测定[J]. 林业科技, 2001, 26(2): 22—23.
- 9 杨平, 刘南欣. 应用昆虫病原线虫防止小菜蛾的研究[J]. 天敌昆虫, 1999, 21(3): 107—112.
- 10 王忠文, 廖咏梅, 张桂英, 等. 昆虫病原线虫的培养及其对两种天牛的致病性测定[J]. 广西农业生物科学, 1999, 18(2): 109—103.
- 11 王进贤, 邱礼涛, 练健生, 等. 昆虫病原线虫对突背黑色蔗龟幼虫致死效果的研究[J]. 昆虫天敌, 1986, 8(4): 220—224.
- 12 罗启治, 谭常, 陈志凌, 等. 昆虫病原线虫防治拟木蠹蛾和天牛幼虫的研究[J]. 华南农业大学学报, 1997, 18(1): 25—30.

INFECTIVITY OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODE TO SOYBEAN SOIL

PEST *Holotrichia Oblita* FALDERMANN

Qian Xiujuan^{1,2} Xu yanli² Wang Yi³ Liu changzhong¹
Li chunjie^{1,2} Zhao fengping⁴

(1. Northeast Institute of Geography and Agricultural Ecology, CAS, Harbin 150040; 2. Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070; 3. Rutgers University, New Brunswick, NJ 08901—8520, USA; 4. Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract *Holotrichia oblita* Faldermann is a kind of soil insect pest that can cause serious damage. The four strains of *Steinernema carpocapsae* and three strains of *Heterorhabditis bacteriophora* were used assay on Entomopathogenic nematode to *Holotrichia oblita* Faldermann, with filter paper and sand as medium. The result showed *Heterorhabditis bacteriophora* —1 was a efficiency strain to control *Holotrichia oblita* Faldermann. When used sand as medium, the correct dead rate of *Holotrichia oblita* Faldermann was 95.83%.

Key words Entomopathogenic nematode; *Holotrichia oblita* Faldermann; Assay