

苏云金芽胞杆菌对云斑天牛杀虫活性的体外检测*

逯晋忠¹ 李菁菁¹ 张献芳¹ 祁高富¹ 陈京元² 赵秀云^{1* * *}

1. 华中农业大学生命科学技术学院/农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070;

2. 湖北省林业科学研究院, 武汉 430075

摘要 模拟自然界中云斑天牛 *Batocera horsfieldi* (Hope) 成虫的生活状态, 建立室内人工饲养及生测方法, 对苏云金芽胞杆菌(Bt)的杀虫活性进行测定。将苏云金芽胞杆菌菌悬剂涂抹在野蔷薇枝条表面, 饲喂云斑天牛成虫, 20 d 后统计死亡率、体质量变化及产卵数量。在室内测定了 80 株苏云金芽胞杆菌的活性, 通过 1 次初筛和 2 次复筛, 筛选到 1 株对云斑天牛成虫有较高致死率的菌株 ZQ-51。该菌株处理云斑天牛成虫后平均死亡率为 53.33%, 平均体质量减少率和平均产卵减少率分别是 5.67% 和 12.48%, 与对照差异均极显著。从感染死亡的成虫肠道中重新分离了该菌株, 并验证分离的菌株与 ZQ-51 具有相似的形态特征和杀虫活性, 表明苏云金芽胞杆菌可通过云斑天牛取食进入肠道而发挥杀虫作用。

关键词 苏云金芽胞杆菌; 云斑天牛; 杀虫活性

中图分类号 S 482.3⁺9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)06-0681-06

云斑天牛 *Batocera horsfieldi* (Hope) 又称云斑白条天牛、大钻心虫, 是重要的林业害虫, 其幼虫钻蛀树干, 并在蛀道和蛹室内越冬。由于其特殊的生活习性, 给常规的化学防治和物理防治增加了难度^[1-3]。苏云金芽胞杆菌 *Bacillus thuringiensis* (简称 Bt) 是应用最广泛且对人类安全无毒的高效微生物杀虫剂, 目前已用于多种农业和林业害虫的防治^[4-13], 但尚未见苏云金芽胞杆菌对云斑天牛杀虫活性的报道。笔者建立了室内测定苏云金芽胞杆菌对云斑天牛毒性的生测方法, 并对多株苏云金芽胞杆菌的杀虫活性进行了检测, 旨在为云斑天牛以及同类害虫的生物防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试苏云金芽胞杆菌 *Bacillus thuringiensis* 由笔者所在实验室保存。供试云斑天牛 *Batocera horsfieldi* (Hope) 成虫, 在 2009 年 5 月上旬至 6 月中旬采集于湖北省荆州市公安县金猫口桥河岸两侧的野蔷薇 *Rosa multiflora* Thunb. 丛中。

主要仪器和试剂: 电子显微镜(DXM1200F, 尼康公司), PCR 仪(PTC-100 TM, MJ Research 公

司), 凝胶成像系统(Logic 100 Image System, Gene 公司), 离心机(5415D 型, Eppendorf 公司), 恒温摇床型号(HQL150C, 中国科学院武汉科学仪器厂), 生化培养箱(LRH-250A, 广东省医疗器械厂), DNA 凝胶回收试剂盒为 Axygen 公司产品, DNA 分子质量标准为 TaKaRa 公司产品。

LB 培养基: 蛋白胨 10 g/L, 酵母浸粉 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 调至 7.4, 在 121 °C 下湿热灭菌 20 min。

ICPM 液体培养基: 胰蛋白胨 6 g/L, 葡萄糖 5 g/L, CaCO₃ 1 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 1 g/L, KH₂PO₄ 0.5 g/L, pH 7.2, 115 °C 湿热灭菌 30 min。

展着剂: 5 g/L 甲基纤维素, 在 121 °C 下湿热灭菌 20 min。

1.2 成虫的饲养

将野外采集的云斑天牛成虫带回室内, 置于用铁纱网制的笼子中, 每笼饲养成虫 10 头左右。在野外, 云斑天牛成虫主要通过咀嚼野蔷薇枝条的表皮取食, 室内喂养模仿其在自然界的取食方式, 即将采集的新鲜野蔷薇枝条, 裁剪成适当长度(40 cm), 放于笼内的广口瓶中, 并在瓶中盛放适量水以保水分。每笼中放入直径 8~10 cm、长度 35~40 cm 的新砍

收稿日期: 2010-04-06; 修回日期: 2010-10-21

* 国家“863”计划项目(2006AA10A210)资助

* * 通讯作者。E-mail: xiuyunzh@mail.hzau.edu.cn

逯晋忠, 男, 1984 年生, 硕士研究生。研究方向: 微生物生物防治。E-mail: lujinzhong1984@webmail.hzau.edu.cn

伐杨树木段,以供成虫产卵,同时在培养皿内加入 20 mL 水以供成虫饮用并保持笼内湿度。当成虫取食完野蔷薇枝条后,应及时更换新鲜野蔷薇枝条。

1.3 毒力的测定

1) 苏云金芽胞杆菌菌悬剂的制备。将实验室保存的 80 个 Bt 菌株分别用 LB 液体培养基培养过夜,然后取 200 μL 菌液于 LB 固体平板上,涂布均匀,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养约 48~72 h,镜检其芽胞和伴胞晶体是否完全分离。待芽胞和伴胞晶体完全分离后,在每个平板中加入 3.6 mL 展着剂,洗下含有芽胞和伴胞晶体的培养物,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

2) 初筛。挑选日龄一致的云斑天牛成虫,每笼放入 10 头(5 雄和 5 雌)作为 1 个处理;每处理同时测定 8 个 Bt 菌株,即将制备的 8 个菌株的菌悬液各吸取 0.6 mL 于小烧杯中,混匀后在菌液中放入无菌脱脂棉,用镊子夹取棉花均匀地将菌悬液涂抹于野蔷薇枝条表皮上,然后放入笼中供虫取食;每隔 1 d 更换野蔷薇枝条,将涂有菌悬液的新鲜蔷薇枝条放入笼中,感染喂养共 4 次。为保证涂有菌悬液的野蔷薇枝条能被成虫充分取食,感染喂养间隔期不喂养成虫,达到饥饿目的。在 4 次感染喂养结束后,用未涂菌液的野蔷薇继续喂养云斑成虫,共饲喂 20 d,并记录云斑天牛的死亡率和每头成虫的体质量。80 个菌株共设 10 组处理(编号 1~10),每个处理 3 个重复,对照组用未添加菌液的展着剂涂抹野蔷薇枝条喂养。

3) 复筛。第 1 次复筛:对初筛生测结果进行分析,选取致死率最高的 2 组处理中的 16 个菌株进行第 1 次复筛,每个菌株 3 个重复,每次取 4.8 mL 菌悬液涂抹野蔷薇枝条,隔天涂抹,共涂抹 4 次,饲喂云斑天牛 20 d。在感染喂养云斑天牛后每天进行观察,并在第 20 d 记录死亡率和死亡成虫的体质量和产卵数;对照组用未添加菌液的展着剂涂抹野蔷薇枝条喂饲。第 2 次复筛:对第 1 次复筛的生测结果进行分析,选取致死率较高的 5 个菌株进行第 2 次复筛,每个菌株 3 个重复,复筛方法同前。

4) 从成虫体内重新分离苏云金芽胞杆菌。为检测苏云金芽胞杆菌是否通过云斑天牛的取食进入肠道,从感染死亡的成虫肠道中重新分离 Bt 菌株。在感染后饲喂观察期内,将白天死亡的成虫收集后编号放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱,当天晚上即进行解剖,每个处理解剖 3 头。具体方法:剪去死亡成虫的腿、触角和翅,

乙醇消毒后放入盛有无菌水的平皿中;剪去背部两侧背腹线,揭去背板,取出肠道;用无菌水洗涤肠道 3 次后,放入加有 500 μL 无菌水和少量无菌石英砂的离心管中,用灭菌研磨棒充分研磨,2 000 r/min 离心 5 min;取 100 μL 上清液进行梯度稀释后,取 200 μL 涂布于 LB 平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,观察统计菌落生长情况。Bt 菌落形态特征:乳白色,表面为蜡状,边缘为锯齿状,略成放射状皱纹^[11]。根据此特征挑取疑似菌落进行鉴定,首先进行革兰氏染色,选取阳性菌株用 ICPM 液体培养 72 h 左右后镜检,观察是否出现芽胞和伴胞晶体。

5) 成虫肠道分离菌株的生测验证和 16S rDNA 鉴定。在第 1 次复筛后,选取致死率较高的处理组,从感染死亡的成虫肠道中分离获得 Bt 菌株。用分离的 Bt 菌株饲喂成虫,并以原 Bt 菌株为对照,通过生测验证其杀虫活性,检测是否具有与原 Bt 菌株相似的毒力。同时,对分离的菌株进行 16S rDNA 分子鉴定,以原 Bt 菌株为对照。具体方法:取 1 mL 培养过夜的细菌菌液,12 000 r/min 离心 2 min,收集菌液,加 50 μL ddH₂O 煮沸 10 min,12 000 r/min 离心 2 min,取上清作为模板。

正向引物 16S(+):5'-AGA GTTTGATCCT-GGCTCAG-3';反向引物 16S(-):5'-ACGGC-TACCTTGTTACGACT-3',2 个引物在 16S rDNA 上的间距为 1 500 bp。PCR 反应体系:10 $\times$ Buffer 含 Mg²⁺ 5.0 μL ,F 引物 2.0 μL ,R 引物 2.0 μL ,dNTPs 2.0 μL ,菌裂解液 2.0 μL ,Taq 酶 0.5 μL ,ddH₂O 补至 50 μL 。反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,30 个循环反应为 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,54 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 30 s,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。电泳检测 PCR 产物,用 Axygen 公司凝胶回收试剂盒对目的条带进行切胶回收,并送南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。

6) 生测结果统计。成虫生长量的测定:称量感染饲喂前每头成虫的体质量,求出每个处理组成虫的平均体质量即处理前平均体质量;在感染后饲喂观察期内,每出现死亡成虫即进行称量和记录,在 20 d 生测结束之时对每个处理组未死亡的成虫逐头进行称量和记录,将未死亡成虫和观察期所记录死亡成虫进行相加并求出该处理组成虫的平均体质量即处理后平均体质量。对照组体质量测定方法同处理组。根据公式计算出处理组和对照组的平均体质量减少率。产卵量的测定:在生测结束后,剥去笼子中

杨树段的树皮,观察产于树皮与木质部之间的卵并进行计数,同时解剖未死雌性成虫,记录其体内的卵数目,饲喂观察期内死亡的成虫当天即进行解剖记录体内卵数,三者相加求出每头成虫产卵平均数;对照组产卵量的测定同处理组,产卵减少率以对照组产卵量为参照基数,根据公式求出平均产卵减少率。

$$\text{平均死亡率} = \frac{\text{总虫数} - \text{活虫数}}{\text{总虫数}} \times 100\%$$
$$\text{体质量减少率} = \frac{\text{处理前体质量} - \text{处理后体质量}}{\text{处理前体质量}} \times 100\%$$
$$\text{产卵减少率} = \frac{\text{处理产卵数} - \text{对照产卵数}}{\text{对照产卵数}} \times 100\%$$

7)数据处理。试验结果用 SPSS 16.0 数据处理软件进行方差分析,用 LSD 和 Duncan’s 法对死亡率、体质量减少率和产卵减少率进行均值多重比较。

2 结果与分析

2.1 Bt 菌株的初筛

初筛中共测定了 80 株苏云金芽胞杆菌菌株对云斑天牛的毒力,将其随机分为 10 个处理,每处理组 8 个菌株。从表 1 可看出,10 个处理中成虫平均死亡率为 3.33%~53.33%,其中第 3 组和第 7 组处理的平均死亡率比较高,分别达到了 40.00%和 53.33%,与对照组存在极显著差异;第 5 组、第 2 组和第 8 组处理的死亡率较低,为 3.33%,6.67%和 6.67%,与对照组差异不显著。各处理组成虫体质量均有不同程度的下降,平均体质量减少率为 3.16%~5.78%,其中第 7 组和第 3 组 Bt 菌株对云斑天牛成虫生长发育的影响较明显,平均体质量减

少率分别达到了 5.78%和 5.54%,与对照组存在显著差异;各处理组在取食涂抹有 Bt 菌株的野蔷薇枝条后,不仅在生长发育方面有明显抑制,而且能影响成虫的繁殖能力,产卵率也出现了不同程度的减少,各处理组平均产卵减少率为 2.89%~12.23%,第 7 组和第 3 组处理的抑制最为明显,达到 12.23%和 9.67%。表明这 2 组 Bt 菌株对成虫生存率、生长发育和繁殖能力都较其他处理组有明显抑制作用,因此选其中 16 株苏云金芽胞杆菌进行复筛。

2.2 Bt 菌株的复筛

1)第 1 次复筛。对初筛后的 16 株苏云金芽胞杆菌分别进行生物测定。由表 2 可知,菌株 ZQ-50 对云斑天牛没有毒性,平均死亡率为 0。ZQ-51、ZQ-54、ZQ-24、ZQ-21 和 ZQ-52 5 株苏云金芽胞杆菌对云斑天牛成虫的毒性较高,其平均死亡率分别达到 46.67%、43.33%、36.67%、33.33% 和 30.00%,与对照组存在极显著差异,并且可看出这 5 个菌株对成虫的生长发育和产卵率的影响都比较高,平均体质量减少率分别达到 5.88%、5.73%、5.56%、5.43%和 5.33%,与对照组存在显著差异,平均产卵减少率分别达到 12.76%、11.68%、9.98%、8.7%和 6.97%,与其他处理组差异显著。选取 ZQ-51、ZQ-54、ZQ-24、ZQ-21 和 ZQ-52 进行进一步的重复验证和筛选。本次筛选中 ZQ-50 菌株虽然对成虫没有杀虫活性,但却能影响成虫的生长发育和繁殖能力,平均体质量减少率为 3.43%,与对照组存在显著差异,平均产卵减少率为 2.99%。

表 2 第 1 次复筛苏云金芽胞杆菌对云斑天牛成虫的毒力

表 1 初筛中各处理对云斑天牛成虫的毒力¹⁾

Table 1 Toxicity of treatments on *B. horsfieldi* adults

in primary screening				%
处理 Treatments	死亡率 Mortality	体质量减少率 Reduction in mass rate	产卵减少率 Reduction in hatching eggs rate	
CK	0.00 d	2.45±0.16 g	—	
1	23.33±5.77 c	4.6±0.24 c	4.86±0.22 e	
2	6.67±5.77 d	3.25±0.21 f	3.48±0.17 gh	
3	40.00±10.00 b	5.54±0.15 b	9.67±0.72 b	
4	23.33±5.77 c	4.7±0.13 c	5.69±0.12 d	
5	3.33±5.77 d	3.54±0.09 e	3.67±0.09 fg	
6	20±10.00 c	3.62±0.10 de	3.86±0.12 fg	
7	53.33±5.77 a	5.78±0.11 a	12.23±0.74 a	
8	6.67±5.77 d	3.16±0.07 f	2.89±0.24 h	
9	23.33±5.77 c	4.82±0.08 c	6.74±0.56 c	
10	20±10.00 c	3.86±0.12 d	4.33±0.19 ef	

Table 2 Toxicity of Bt strains on *B. horsfieldi* adults

in the first rescreening				%
处理 Treatments	死亡率 Mortality	体质量减少率 Reduction in mass rate	产卵减少率 Reduction in hatching eggs rate	
CK	0.00 k	2.67±0.15 l	—	
ZQ-17	23.33±5.77 defg	4.8±0.17 f	5.34±0.21 fg	
ZQ-18	16.67±5.77 fgghi	4.53±0.87 gh	5.06±0.15 gh	
ZQ-19	10±10.00 hijk	4.34±0.07 h	4.47±0.16 i	
ZQ-20	20±10.00 efghi	4.66±0.13 fg	5.22±0.19 fg	
ZQ-21	33.33±5.77 bed	5.43±0.11 cd	8.7±0.20 d	
ZQ-22	26.67±5.77 cdef	5.09±0.12 e	5.57±0.30 f	
ZQ-23	13.33±5.77 ghj	4.48±0.09 gh	4.86±0.14 h	
ZQ-24	36.67±5.77 abc	5.56±0.12 bc	9.98±0.17 c	
ZQ-49	13.33±5.77 ghij	4.43±0.06 h	4.84±0.16 h	
ZQ-50	0.00 k	3.43±0.16 k	2.99±0.37 k	
ZQ-51	46.67±5.77 a	5.88±0.09 a	12.76±0.22 a	
ZQ-52	30.00±10.00 cde	5.33±0.05 d	6.97±0.17 e	
ZQ-53	6.67±5.77 ijk	3.68±0.14 j	3.69±0.16 j	
ZQ-54	43.33±5.77 ab	5.73±0.07 ab	11.68±0.24 b	
ZQ-55	13.33±5.77 ghij	4.05±0.10 i	4.37±0.11 i	
ZQ-56	13.33±5.77 ghij	3.57±0.04 jk	3.59±0.18 j	

1)同列数值后相同字母表示在 0.05 水平差异不显著(下表同)。
Data within a column followed by the same letter are not significantly different at 0.05 level (the same as following tables).

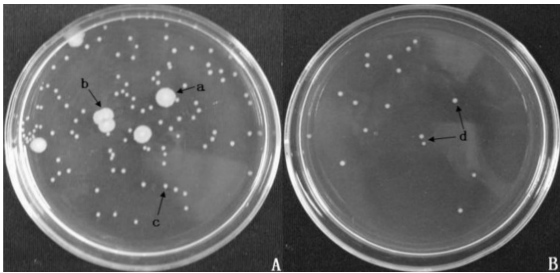
2)第2次复筛。由表3可知,5株苏云金芽胞杆菌对云斑天牛的平均死亡率为23.33%~53.33%,其中ZQ-51菌株对成虫的毒性最强,平均死亡率达53.33%,与对照组存在极显著差异;同时,ZQ-51菌株抑制云斑天牛成虫生长发育和繁殖能力的程度均较其他菌株高,平均体质量减少率和平均产卵减少率分别达到5.67%和12.48%,与其他菌株和对照组存在显著差异。ZQ-54、ZQ-24、ZQ-21和ZQ-52菌株对成虫的生存、生长发育和繁殖能力的影响也比较大,且均与对照存在显著差异。

表 3 第 2 次复筛苏云金芽胞杆菌对云斑天牛成虫的毒力

Table 3 Toxicity of Bt strains on <i>B. horsfieldi</i> adults in the second rescreening				%
处理 Treatments	死亡率 Mortality	体质量减少率 Reduction in mass rate	产卵减少率 Reduction in hatching eggs rate	
CK	3.33±5.77 d	2.68±0.17 e	—	
ZQ-21	26.67±5.77 bc	4.29±0.12 c	6.3±0.39 d	
ZQ-24	36.67±5.77 b	4.47±0.13 c	8.41±0.63 c	
ZQ-51	53.33±5.77 a	5.67±0.16 a	12.48±0.81 a	
ZQ-52	23.33±5.77 c	3.67±0.19 d	4.97±0.36 e	
ZQ-54	36.67±5.77 b	5.14±0.14 b	10.61±0.49 b	

2.3 感染云斑天牛肠道中 Bt 菌株的检测

解剖 ZQ-51 菌株感染死亡的云斑天牛成虫,将肠道研磨液涂布于 LB 平板上进行培养,对菌落进行形态观察和计数(图1)。



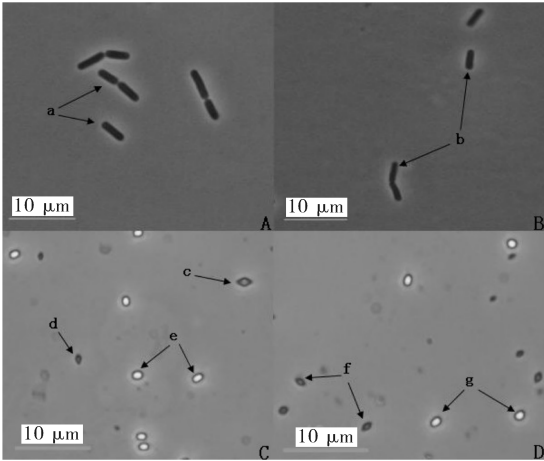
A. 感染苏云金芽胞杆菌死亡的云斑天牛肠道菌 Bacteria isolated from dead *B. horsfieldi*s infected Bt; B. 对照组云斑天牛肠道菌 Bacteria isolated from control group; a, b. 苏云金芽胞杆菌 *B. thuringiensis*; c, d. 肠道微生物 Intestinal bacteria.

图 1 云斑天牛肠道菌的分离

Fig. 1 Isolating bacteria from intestinal tract of *B. horsfieldi*s

观察结果显示,平板中共出现6种形态不同的菌落,部分菌落与肠杆菌比较相似。500 μL 肠道研磨液中总菌含量是 $5.9\times10^5\sim8.3\times10^5$ cfu/mL,其中 Bt 菌含量是 $0.3\times10^5\sim0.6\times10^5$ cfu/mL,其他肠道菌含量是 $3.1\times10^5\sim7.4\times10^5$ cfu/mL。挑取与 Bt 形态相似的菌落,进行菌体形态观察和革兰氏

染色,其中1株菌为革兰氏阳性杆菌,编号为FZQ-51。将FZQ-51和ZQ-51分别接种于ICPM培养基中,培养72 h后用相差显微镜进行芽胞和伴孢晶体的观测,结果发现2个菌株伴孢晶体的形状都是菱形(图2),因此可初步判断FZQ-51菌株是苏云金芽胞杆菌。



A, C. ZQ-51 菌株 ZQ-51 strain; B, D. FZQ-51 菌株 FZQ-51 strain; a, b. 营养体 Vegetative cells; c, d, f. 伴孢晶体 Parasporal crystals; e, g. 芽胞 Spores.

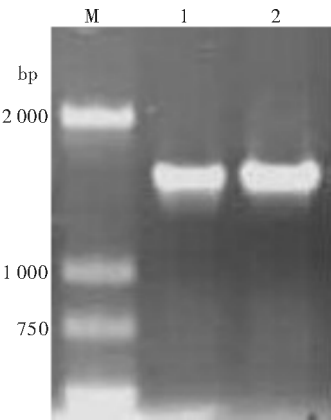
图 2 ZQ-51 和 FZQ-51 相差显微镜形态观察

Fig. 2 Characterization of ZQ-51 and FZQ-51 by phase contrast microscope

2.4 FZQ-51 菌株的生测验证和 16S rDNA 鉴定

第2次复筛时,将FZQ-51菌株与其余5株苏云金芽胞杆菌进行平行处理,以此对其进行生测验证。从验证结果发现,FZQ-51对云斑天牛有较高的杀虫活性,成虫平均死亡率达到46.67%,接近ZQ-51菌株对云斑天牛的杀虫活性(成虫平均死亡率为53.33%);FZQ-51菌株对成虫生长发育的影响,使成虫平均体质量减少率为5.89%,略高于ZQ-51菌株(平均体质量减少率为5.67%);同样,FZQ-51菌株能较明显地抑制成虫的繁殖能力,使成虫产卵减少率为11.79%。

由ZQ-51菌株和FZQ-51菌株的16S rDNA PCR扩增结果可知,2个菌株的16S rDNA大小相似,均为1500 bp(图3)。采用NCBI Blast软件进行分析和比较其16S rDNA序列,发现它们均与*Bacillus thuringiensis* IBL 200菌株(序列号AC-NK01000211)的16S rDNA相似性达到100%,因此可初步判断ZQ-51菌株被云斑天牛成虫取食后进入肠道,在肠道内发挥其杀虫作用。



M, DL 2 000 marker; 1, ZQ-51 菌株 16S rDNA PCR 扩增产物 16S rDNA PCR product of ZQ-51 strain; 2, FZQ-51 菌株 16S rDNA PCR 扩增产物 16S rDNA PCR product of FZQ-51 strain.

图 3 ZQ-51 和 FZQ-51 菌株 16Sr DNA PCR 扩增结果
Fig.3 16S rDNA PCR products of ZQ-51 and FZQ-51 strain

3 讨 论

本试验建立了在室内用苏云金芽胞杆菌对云斑天牛毒杀作用的测定体系和方法。该方法简单易行,所需设备简单,可重复性和可操作性较高。在筛选菌株时采用初筛和复筛相结合的方法,初筛时以 8 个菌株为 1 组,再通过复筛对初筛中毒力较高的处理组中每个菌株的杀虫活性进行检测,最终筛选出具有较高杀虫活性的菌株。该筛选体系可大大减少筛选的工作量,适合于个体较大、虫源有限昆虫的生测。

本试验通过初筛和复筛,发现苏云金芽胞杆菌 ZQ-51 菌株对云斑天牛成虫的毒力最高,成虫平均死亡率达到 53.33%,平均体质量减少率和平均产卵减少率分别是 5.67%和 12.48%。苏云金芽胞杆菌对云斑天牛成虫的死亡率比苏云金芽胞杆菌对其他害虫的死亡率偏低。如苏云金芽胞杆菌对鳞翅目菜青虫作用 72 h 后死亡率达到 96.30%^[12],对鞘翅目黄褐丽金龟 1~2 龄幼虫的死亡率达 100%^[13],但 Bt 对鞘翅目谷蠹成虫的死亡率也比较低,为 29.55%^[14]。分析其原因,主要有 2 个:一是昆虫生活阶段的差异。本试验生测对象为云斑天牛的成虫,毒力检测是在其成虫时期,而多数研究中采用的是昆虫的幼虫,成虫在体型和体质量上均比幼虫大,其食量也较幼虫大,因此,相对于幼虫而言,Bt 菌株作用于成虫时,发挥同等药效所需菌体浓度较高、药剂剂量需求较大、作用时间也较长;二是研究对象

自身的特点。本试验中的云斑天牛个体相对比较大,成虫体长 35~75 mm,体宽 6~16 mm,体质量 2.0~7.6 g。昆虫对体外有害物质刺激抵抗能力与个体大小有一定关系,同等条件下,毒性物质作用于个体较大的昆虫,其发挥药效的过程较个体小的昆虫缓慢,药效也比较低,而达到同等药效所需毒性物质的剂量也比较大^[15],因此在实际应用中要引起重视。在使用 Bt 菌株防治个体相对较大的害虫时,应使用较高菌体浓度、较高伴胞晶体含量的菌剂进行生物防治,才能达到较好的防治效果。

值得关注的是,苏云金芽胞杆菌 ZQ-51 菌株除了能有效降低云斑天牛成虫存活率,还能使成虫体质量下降,产卵率减少,反映出高毒力 Bt 菌株对云斑天牛的发育和繁殖力均有一定影响。在自然界中则表现为 Bt 菌株能抑制云斑天牛个体的发育,降低成虫的繁殖力,从而控制其群体数量,最终减少云斑天牛对林木的危害。今后应对苏云金芽胞杆菌 ZQ-51 菌株进行深入研究,探讨其对云斑天牛的杀虫活性机理,克隆其杀虫基因及构建高效表达的工程菌,同时将杀虫基因转化到杨树,获得具有较高杀虫活性的转基因杨树,从而更经济有效地控制云斑天牛的危害。

参 考 文 献

[1] 夏剑萍,戴均华,刘立德,等. 云斑天牛研究进展[J]. 湖北林业科技,2005,132:42-44.
[2] 喻锦秀,张玉荣,钟武洪. 云斑天牛在杨树上的发生及无公害防治[J]. 湖南林业科技,2007,34(5):30-31.
[3] 李娟,王满因,张志春,等. 云斑天牛成虫对植物气味的行为反应[J]. 林业科学,2008,44(6):168-170.
[4] FRANKENHUYZEN K V. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins[J]. Journal of Invertebrate Pathology,2009,101:1-16.
[5] 曹正明. 苏云金芽胞杆菌与现代生物农药[J]. 现代农业科技,2008(20):141-142.
[6] 游红,周兴苗,徐家文,等. 抗紫外线降解苏云金芽胞杆菌微胶囊剂的制备工艺[J]. 华中农业大学学报,2009,28(3):281-285.
[7] 李建洪,伍建宏,喻子牛,等. 小菜蛾对苏云金芽胞杆菌的抗性研究[J]. 华中农业大学学报,1998,17(3):214-217.
[8] SATOSHI T, YOSHIHIRO K, HARUYASU, et al. Assessment of the efficacy of Japanese *Bacillus thuringiensis* isolates against the cigarette beetle, *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae)[J]. Journal of Invertebrate Pathology,2002,81:122-126.

[9] TAKUYA Y, KEN S, HISANORI B, et al. Discovery of a novel *Bacillus thuringiensis* Cry8D protein and the unique toxicity of the Cry8D-class proteins against scarab beetles[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2008, 99: 257-262.

[10] CHANGLONG S, GUIXIN Y, RONGYAN W, et al. Characterization of a novel *cry8* gene specific to Melolonthidae pests; *Holotrichia oblita* and *Holotrichia parallela* [J]. Appl Microbiol Biotechno, 2009, 84: 701-704.

[11] 喻子牛. 苏云金芽胞杆菌制剂的生产和应用[M]. 北京: 农业出版社, 1993.

[12] 谭芙蓉, 郑爱萍, 周华强, 等. 一株对鳞翅目高毒力的苏云金芽胞杆菌亚种的分离与鉴定[J]. 四川农业大学学报, 2006, 24(2): 152-155.

[13] 冯书亮, 王容燕, 范秀华, 等. 一株对金龟子类幼虫具有杀虫活性的苏云金杆菌新分离菌株[J]. 中国生物防治, 2000, 16(2): 74-77.

[14] 张宏宇, 喻子牛, 邓望喜. 苏云金杆菌制剂生物测定标准鞘翅目昆虫的筛选[J]. 湖北农业科学, 1998, 40: 40-42.

[15] 陈万义. 新农药研究与开发[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001.

Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* to *Batocera horsfieldi* (Hope) *in vitro* Detection

LU Jin-zhong¹ LI Jing-jing¹ ZHANG Xian-fang¹
QI Gao-fu¹ CHEN Jing-yuan² ZHAO Xiu-yun¹

1. College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University/State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Wuhan 430070, China;
2. Hubei Academy of Forestry, Wuhan 430075, China

Abstract Artificial feeding and bioassay methods of *Batocera horsfieldi* (Hope) adults had been applied in laboratory, and the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* (Bt) to *B. horsfieldi* had been determined. The result indicated that Bt had obvious poison effect against *B. horsfieldi*. The *B. horsfieldi* adults were fed with *Rosa multiflora* Thunb. branches whose surfaces were smeared with Bt liquid. The death rates, body mass changes and eggs quantities of *B. horsfieldi* adults were regularly analyzed. Through one primary screening and twice rescreenings, the insecticidal activity of 80 Bt strains to *B. horsfieldi* adults was determined in laboratory, and the best strain was ZQ-51 which had the most powerful toxicity to adults. In the treatment of strain ZQ-51, the mean mortality was 53.33%, the mean reduction in mass rate was 5.67%, and the mean reduction in hatching eggs rate was 12.48%. These were remarkably different from those of the control group. This strain had been isolated from intestinal tract of infected dead *B. horsfieldi* again, and was similar with strain ZQ-51 in morphologic characteristics and insecticidal activity, which proved that the toxicity to *B. horsfieldi* could develop after their intestinal tracts infected with Bt strains.

Key words *Bacillus thuringiensis*; *Batocera horsfieldi* (Hope); insecticidal activity

(责任编辑: 陈红叶)