

我国主要蛱蝶对乳状菌的敏感性*

张书芳 冯祥兴 刘玉滨

崔景岳 李广武 李锁芝

(中国科学院动物研究所)

(河北省沧州地区农业科学研究所)

摘要 我国主要蛱蝶种类对乳状菌(*Bacillus popilliae* Dutky) (以下简称 *B. p.*)敏感性的测定:已有 14 种蛱蝶能注射感染 *B. p.*。超出了 Dutky (1963)的记录。敏感寄主毛喙丽金龟(*Adoretus hirsutus* Ohaus)、四纹丽金龟(*Popillia quadriguttata* F.)、暗黑鳃金龟(*Holotrichia morosa* Waterh)、黑棕鳃金龟(*Apogonia cupreoviridis* Fairm.)的幼虫注射感病率达 91.6—100%。*B. p.* 拌种喂食四纹、阔胸犀金龟(*Pentodon patruelis* Friv.)的幼虫,感病率分别达到 68.9% 和 50%。*B. p.* 拌土喂食阔胸幼虫,感病率为 28.5%,田间小区试验,保苗效果达 49.5%,虫口减退率达 40.0%。定向转主驯化 *B. p.* 对华北黑鳃金龟(*Holotrichia obliqua* Fald.)幼虫,注射感病率已由不感病提高至感染率 34.6%。

利用病原微生物防治害虫是综合防治的一个重要环节,应用乳状菌防治金龟子幼虫是以菌治虫方面值得研究的课题之一。

早在本世纪三十年代已发现日本金龟子(*Popillia japonica* Newm.)幼虫罹患乳臭病的事实。1940 年 Dutky 首先对其病原菌(*B. popilliae*)和(*B. lentimorbus*)进行命名和描述,继之 White 1941, Beard 1945 等对其生理生化、致病机理等作了较多的研究。五十年代后,对这类菌的超显微结构、离体培养等研究更为广泛。它作为第一个商品化的细菌杀虫剂,美国最早用于防治草地下的日本金龟子幼虫,取得了显著的效果。

我国蛱蝶种类在千种以上,在华北、东北、西北的农田里为害十分严重,由于蛱蝶种类多,分布广,因而寄生于蛱蝶的乳状菌株也相当丰富。目前已从主要蛱蝶种类上陆续分离出一些菌株,将为我国开发利用乳状菌提供资源。近几年来,我们除对我国菌株进行研究外,也做了引进菌种 *Bacillus popilliae* Dutky 对我国主要蛱蝶敏感性的研究,本文主要报道这方面结果。

材料与方 法

虫种选用了北方地区危害农林作物严重而分布广泛的鳃金龟科(Melolonthidae)、丽金龟科(Rutelidae)、犀金龟科(Dynastidae)和危害南方甘蔗的蛱蝶共十余种,均系春、秋季从田间采集的二、三龄幼虫,经室内饲养后择其健壮者供试。

菌种是 1973 年由美国引进的 *B. p.* 血涂片**。

试验方法:

一、室内

寄主范围测定采用血腔注射法(张书芳等 1975),接种后分置于盛有湿润土壤的铝盒内,于 1, 7, 10, 14 天分别记载感染情况。

喂食试验有如下数种:

1. 菌液拌种: 用 0.1% 胰化胨洗涤血涂片后稀释成所需浓度的悬浮液;或用感染症状明显的幼虫放血,用一定菌量拌合在麦种上,晾干后取 10 粒带菌麦种放入盛有湿润土壤的铝盒内,每盒接入一头三龄幼虫。置 25℃ 条件下饲养,观察取食、感病情况。

本文于 1978 年 8 月收到。

* 张慧、高玉芬、张书凤等同志参加部分工作。蛱蝶照片为于延芬同志拍摄,一并致谢。

** 1973 年中国科学家代表团赴美期间承 Professor Tashiro 赠予邱式邦教授的。

2. 菌液拌土：一定浓度的芽孢悬浮液与烘干后的土壤搅拌均匀，土壤湿度要适于不同种类蛱蝶生长需要，控制每克土内约含芽孢量 1×10^9 ，在每只盒内装入菌土 40 克，加入鲜土豆片或麦粒为饲料，每盒接虫一头，饲养在 25℃ 条件下观察感病情况。

3. 口服：将菌液涂抹于虫口、菌液注入虫口、滴菌液入口等，剂量为 1×10^6 芽孢/头虫。

用上述方法，每个处理虫量为 30—50 头，三年的结果统一计算其敏感程度。

二、田间

每小区面积为一平方米，周围砌砖、底铺塑料网纱，防止虫子逸失。每处理重复三次，设清水拌种为对照区。菌种系 *B. p.* 血涂片，按常规操作，将菌液拌在麦种上，每克麦粒带菌量为 1×10^8 芽孢，每小区施菌量为 3×10^9 芽孢，播种时每小区接铜绿丽金龟 (*Anomala corpulenta* Mots.) 幼虫 20 头。9 月 15 日播种，15、30 天后分别检查死苗率，翌年 6 月 3 日收获后剖土查虫计算效果。

病原观察及拍照用 CARL ZEISS NFPK-1 型相差显微镜和 Hitachi HU-11 型电子显微镜。

试 验 结 果

1. 寄主范围

Durky (1963) 的名录中指出 *B. p.* 通过注射可使 48 种蛱蝶感病，但这些蛱蝶大多

表 1 注射法对蛱蝶的敏感程度 (1975—1977)

虫 种	学 名	剂量(芽孢/头)	感病率(%)
四 纹 丽 金 龟	<i>Popillia quadriguttata</i> Fabr.	5×10^6	92.8
毛 喙 丽 金 龟	<i>Adoretus hirsutus</i> Ohaus.	5×10^6	100.0
黄 褐 丽 金 龟	<i>Anomala exoleta</i> Fald.	5×10^6	61.5
铜 绿 丽 金 龟	<i>A. corpulenta</i> Mots.	5×10^6	52.4
阔 胸 犀 金 龟	<i>Pentodon patruelis</i> Friv.	$4.5 \times 10^6 - 1.9 \times 10^7$	28.5—40.0
暗 黑 鳃 金 龟	<i>Holotrichia morosa</i> Waterh.	5×10^6	92.8
棕 色 鳃 金 龟	<i>H. titanis</i> Reitter.	1×10^6	55.1
华北大黑鳃金龟	<i>H. obliata</i> Fald.	4×10^7	34.6*
桑 龟	<i>H. ovata</i> Chang.	1×10^6	22.4
黑 棕 鳃 金 龟	<i>Apogonia cupreoviridis</i> (Fairm.)	5×10^6	91.6
灰 粉 鳃 金 龟	<i>Melolontha incanus</i> Motsch.	3×10^7	62.7
阔 胫 鳃 金 龟	<i>Maladera verticollis</i> (Fairm.)	5×10^6	58.3
黄 色 蔗 龟	<i>Exolontha serrulata</i> (Gyllenhal)	1×10^6	65.8—72.4
黑 色 蔗 龟	<i>Alissonotum</i> sp.	1×10^6	10.2—12.1

* 驯化 7 代后菌种

属于北美和大洋洲的种类,对于亚洲虫种记载很少,而在我国普遍分布的鳃金龟、丽金龟中一些属基本上没有记录。本试验用注射法对 15 种蛱蝶进行接种,结果表明:除白星花金龟(*Potosia britarsis* Lews)幼虫不感染外,有 14 种蛱蝶均能感染,远远超出了 Dutky (1963)的记录,说明我国主要蛱蝶种类对引进的 *B. p.* 菌种是敏感的。

2. 对寄主的敏感程度

(1) 注射法

对常见蛱蝶做血腔注射,表现出不同程度的感染(表 1)。

一般来说丽金龟科较鳃金龟科感染率要高些,在丽金龟科中以四纹丽金龟、毛喙丽金龟幼虫感染率最高。四纹丽金龟与日本金龟子同属 *Popillia* 属,毛喙丽金龟与 Carter (1945)报道的敏感寄主中喙丽金龟(*Adoretus sinicus* Burm.)同属 *Adoretus* 属,亲缘关系较近,敏感性也相似。鳃金龟敏感性较差,特别是我国最大优势种华北大黑鳃金龟(*H. obliqua* Fald.)最初表现不感染,后经转主驯化,感染率才逐渐提高。

(2) 拌种法

根据我国拌种防治地下害虫的习惯,用分布较广,敏感性较强的四纹丽金龟幼虫作了初步试验,结果表明:用 2.6×10^6 芽孢/每粒,取得了 68.9% 的效果,对阔胸犀金龟、铜绿丽金龟(*A. corpulenta* Mots.)幼虫的试验也取得了不同程度的结果(表 2)。

表 2 拌种法对蛱蝶的敏感程度 (1975—1977)

虫 种	虫数(头)	剂量(芽孢/粒)	感病率(%)
铜绿丽金龟	50	$5 \times 10^6 - 2.6 \times 10^6$	3.3—13.3
四纹丽金龟	50	$7.5 \times 10^7 - 2.6 \times 10^6$	13.2—68.9
阔胸犀金龟	50	$7.5 \times 10^7 - 2.6 \times 10^6$	15.3—50.0

从多次试验中看出:不同虫种对 *B. p.* 的敏感程度不同,同一虫种敏感程度也不够稳定,不稳定的原因为培养期间温度所致。以四纹丽金龟幼虫为例,在 25℃ 条件下,感染率达 60% 以上。如在低温(20℃ 以下)则降为 10% 左右。这与前人报道的结果一致。铜绿丽金龟幼虫亦有同样表现,按照注射感染情况分析,拌种法感染率也应较高,但由于试验期间未能及时控制温度,在 *B. p.* 侵染关键时刻,温度仅为 19.7℃,不利于病原发育增殖,未能表现出应有的效果。尽管如此,上述事实仍能说明拌种法是有希望的。

(3) 菌土法

根据 Sharpe (1970)的报道,我们试用 1×10^6 芽孢/克剂量来测定阔胸犀金龟等幼虫的敏感性(见表 3)。由于试验次数较少,尚需进一步明确。

3. 田间拌种试验

1974 年 9 月 15 日播种时,进行了菌液拌种,拌种后 15 天内 10 公分地温为 20.8℃,15 天后处理区死苗率开始有变化,三个重复平均死苗率低于对照区,30 天后这种差别更为明显,由于要观察全生育期效果,不可能随时挖土查虫检查蛱蝶感病率,但从死苗率的变化可以判断虫口数量已经有了改变。翌年 6 月麦收后,将小区土壤全部挖出,检查残余虫量,计算防治效果达到 40% (表 4)。

表 3 菌土法对蛱蟥的敏感程度 (1975)

虫 种	虫数(头)	剂量(芽孢/克土)	感病率(%)
阔胸犀金龟	10	1×10^9	14.2—28.5
铜绿丽金龟	10	1×10^9	0

表 4 田间拌种试验 (1977—1978)

处 理	死 苗 率 (%)			虫 口 减 退 率		
	前期	后期	保苗效果(%)	接虫(头)	残留(头)	校正防治效果(%)
<i>B. p.</i> 1.	10.7	9.5	49.5	20	13	40.0*
<i>B. p.</i> 2.	5.5	1.1		20	13	
<i>B. p.</i> 3.	7.9	1.7		20	10	
对 照	12.7	11.3		20	20	

* 处理区接虫总数减去残留虫数用接虫总数校正

在检查残虫中,处理区一头感病的铜绿丽金龟幼虫,外观具明显的症状[以健康幼虫做对比(图版 I-2)],镜检血淋巴及粪便均为发育成熟的孢囊(图版 I-1、3、4)。形状与接种菌 *B. p.* 一样(图版 I-5)。由于乳状菌能在土壤中较长期存留,故具有长效的可能。

4. 驯化 *B. p.* 提高对华北大黑鳃金龟的敏感性

华北大黑鳃金龟是我国分布最广,数量最多,为害最重的一种蛱蟥,但是 *B. p.* 对它的敏感性最差,因此定向驯化菌株提高对华北大黑鳃金龟的感染率的工作十分迫切。

Dutky (1963)报道, *B. p.* 经过新的寄主能提高致病力。我们认为 *B. p.* 有高度专化性,也必然有变异性,故采用转主接种定向驯化,动摇其遗传性,迫使其适应华北大黑鳃金龟幼虫的生理条件,从而使华北大黑鳃金龟幼虫开始感染。试验用幼虫每次 100 头(表 5)。在驯化过程中,始终掌握高剂量接种的原则。用引进的 *B. p.* 为出发菌种,剂量

表 5 驯化 *B. p.* 对“华北大黑”敏感性的变化 (1975—1977)

菌种代数	剂量(芽孢/头)	感病率(%)
f_0	1×10^7	0
f_2	4.38×10^7	0
f_3	5.3×10^7	19.4
f_6	3×10^7	26.7
f_7	4×10^7	34.6

为 1×10^6 — 1×10^7 芽孢/头接种“华北大黑”后检查,在血液中仅见营养体,以后又全部消失。个别感染虫的血淋巴中 *B. p.* 已形成饱满的孢囊,但浓度较低,经过一周后孢囊全部消失,虫体恢复正常。将 *B. p.* 改接在阔胸犀金龟幼虫上,繁殖二代后再接“华北大黑”,仍不感染。转接广东的蔗龟 *Exolontha serrulata* (Gyllenhal) 后再接“华北大黑”,华北大黑鳃金龟开始感染,感染率仅为 1.5%,前孢明显增大,继续接种又得到 14% 的感染率,提高得不快。将蔗龟菌血接“铜绿”幼虫后再接“华北大黑”获得 19.4% 的感染率,再传下去得到 34.6% 的感染率,提高的速度明显加快。我们认为转主驯化提高敏感性的可能

性是存在的。

讨 论

我国蛴螬种类虽多,但严重为害的优势虫种不过一、二十种,对 *B. p.* 大多数表现了一定程度的敏感性,说明 *B. p.* 在我国应用是有前途的。但是单纯依靠 *B. p.* 解决我国最大优势虫种还有很多问题,特别是对“华北大黑”感染率极低,我们认为应努力开发利用我国自己的乳状菌资源,有针对性地解决“华北大黑”的问题。几年来在河北、山东陆续发现一些菌株,有的田间自然寄生率达 11%,室内感染率也很高。同时,也不应放弃对引进菌种 *B. p.* 的研究,我们采用转主驯化办法,逐步提高了它对“华北大黑”的敏感性,目前已传至 7 代,感染率已达 30% 以上,尚待进一步研究探索。

拌种防治蛴螬是我国常用方法,具有用药量少,操作简便的特点。我们的试验指出,拌种后第一年可获得保苗效果 40% 以上,今后应当对拌种效果进行系统观察,研究了解乳状菌在土壤中的分布、存活时间和长期效果,使乳状菌的田间应用技术进一步完善。

参 考 文 献

- 张书芳等 1975 昆虫知识 12 (2): 43.
- Beard, R. L. 1945 Studies on the milky disease of Japanese beetle larvae. *Gonn. Agr. Exp. Sta. Bull.*, New Haven, 491: 505—83.
- Dutky, S. R. 1936 The milky disease In “Insect pathology” (E. A. Steinhaus, ed) Vol. 2pp. 75—115 Academic Press New York.
- Dutky, S. R. 1940 Two new spore-forming bacteria causing milky diseases of Japanese beetle larvae. *J. Agr. Res.* 61: 57—68.
- Gould, G. W., Jones A and Wrighton 1968 Limitation to the initiation of germination of bacterial spores as a spore control procedure. *J. Appl. Bacteriol.*, 31: 357—66.
- Gordon, R. E., W. C. Haynes and C. H. N. Pang 1973 The genus *Bacillus*. U. S. Department of Agriculture Handbook No. 427.
- Grant, st. J. et al., 1972 Milky disease development in field infected Japanese beetle larvae *J. Invert.* 20: 109—13.
- Grant, st. J. and Hall, H. H. 1968 Infection of *popillia japonica* larvae with heat-activated spores of *Bacillus popilliae* *J. Invert. Pathol.* 10: 48—53.
- Sharpe, E. S., st. Julian et al., 1970 Characteristics of a new strain of *Bacillus popilliae* sporogenic in vitor. *Appl. Microb.* 19: 681—8.
- Tashiro, H. 1957 Susceptibility of European chafer and Japanese beetle larvae to different strains of milky disease organisms. *J. Econ. Ent.* 50: 350—2.
- White, R. T. 1941 Development of milky disease on Japanese beetle larvae field conditions. *J. Econ. Ent.* 34: 213—5.

THE SUSCEPTIBILITIES OF THE MAIN WHITE GRUB SPECIES TO *BACILLUS POPILLIAE* DUTKY

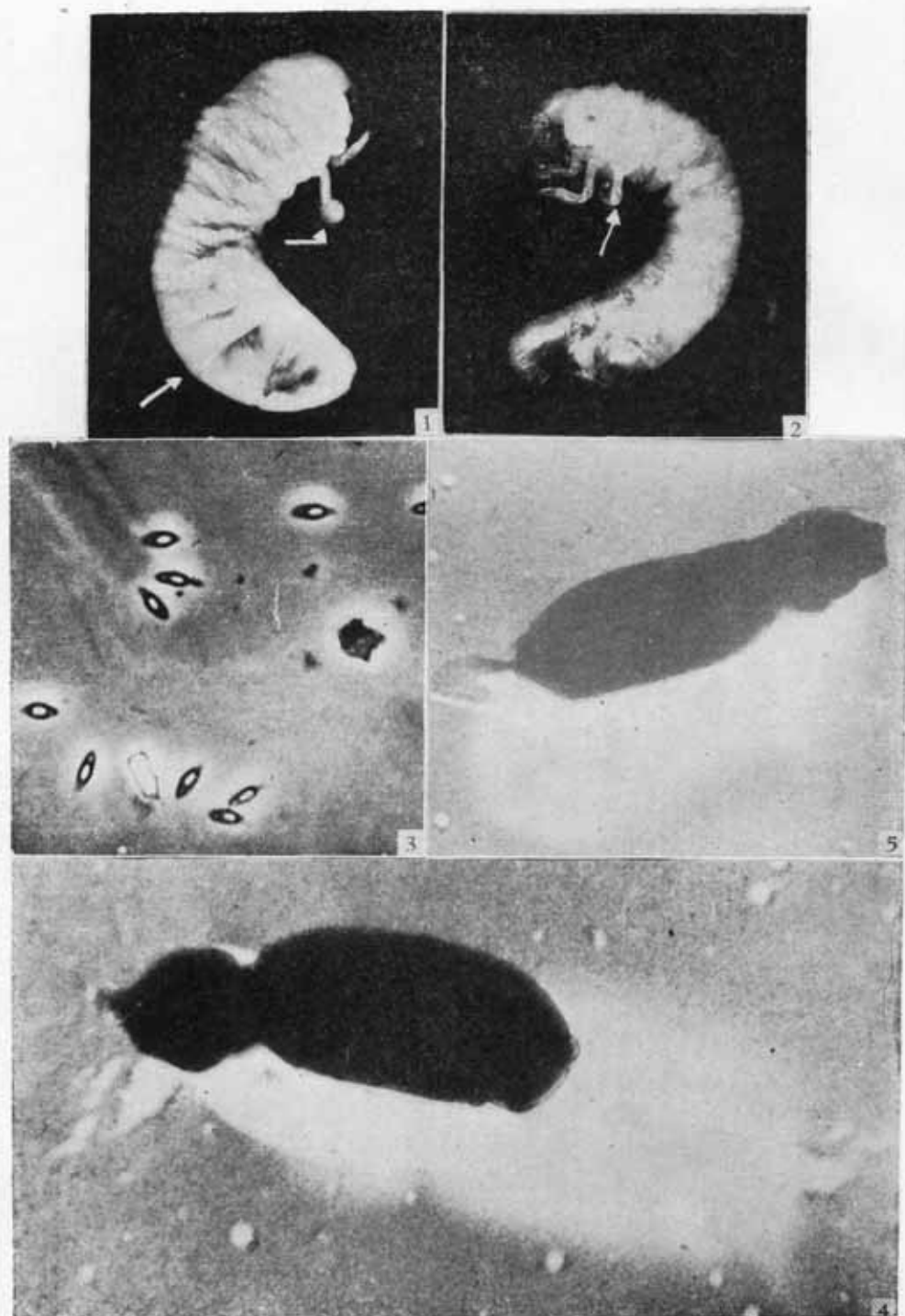
CHANG SHU-FANG FENG XIANG-XING LIU YU-BIN

(Institute of Zoology, Academia Sinica)

CUI JING-YUE LI KWANG-WU LI SUO-ZHI

(Institute of Agriculture, Cang-chou District, Hopei province)

We have studied the susceptibilities to *B. popilliae* of the main white grub species of our country, and found that fourteen species were susceptible through different routes of infection. The percentags of infection of the susceptible hosts (*Adoretus hirsutus*ohaus, *Popillia quadriguttata* Fabr., *Holotrichia morosa* Waterh. and *Apogonia cupreoviridis* (Fairm.)) would reach 91.6—100% by inoculation; those of *P. quadriguttata* Fabr. and *Pentodon patruelis* Friv. were 68.9% and 50% respectively by mixing the microbes with wheat grains fed to the larvae; and that of *P. patruelis* Friv. was 28.5% by mixing the microbes with the soil. In the field plots test, it was shown that the protective effect on wheat sprouts manifested a reduction of infestation rate to 49.5% and the population of the insects decreased to 40.0% as compared with the control. Selection experiments on the effective strain of the microbe to the nonsusceptible *Holotrichia oblita* Fald. by repeated inoculations to the larvae showed that the infection rate may be raised to 34.6%.



1. 感病的铜绿丽金龟幼虫, ↑ 示血淋巴混浊状, 放大 $\times 2$
2. 正常的铜绿丽金龟幼虫, ↑ 示血淋巴透明状, 放大 $\times 2$
3. 病感的铜绿丽金龟幼虫血液内的 *B. P.* 相差 $\times 1250$
4. 感病的铜绿丽金龟幼虫血液内的 *B. P.* 电镜放大 $\times 30000$
5. 引进的 *B. P.* 电镜放大 $\times 20000$