

冰核细菌对光肩星天牛幼虫 促冻杀虫的初步研究*

孙福在 邢炜 张永祥 高瑞桐

关键词 冰核细菌 光肩星天牛 过冷却点

在我国林业生产上,特别是杨树(*Populus* spp.)栽培中,受到天牛的严重危害^[1,2],至今尚无经济有效、简单易行的防治方法。为此在系统研究冰核细菌的基础上,探索利用冰核细菌作为促冻杀虫剂,为控制天牛危害提出一项新的措施。

研究表明^[3],多数害虫是不耐结冰的,一旦体内水分结冰,细胞组织就会受到破坏而导致死亡;一些耐寒昆虫的耐寒性也只是在一定时间内具有,当体内结冰持续时间较长,也会使之死亡。但是一般昆虫都能忍受-10~-15℃的低温而不结冰,这是因为昆虫具有过冷却能力,所以经过寒冬之后仍能存活^[4]。以往研究指出^[5]:水分保持过冷却的能力与其中存在的冰核有关,当只存在“同源冰核”时,可以保持到-39℃才发生冻结,但是当存在“异源冰核”时,冰核物质的活性越高,保持过冷却的能力就越低,也就越容易在接近0℃的负温度下结冰,一些越冬害虫之所以能够在很低的温度下保持过冷却状态,与其体内缺乏异源冰核有关。

自Maki^[6]等人从赤杨(*Alnus japonica* (Thunb.) Steud.)叶中分离出能在-2~-5℃诱发植物霜冻的冻核细菌(INA细菌)以来,对冰核细菌的研究,在世界上广泛而深入地进行着。我国已鉴定出冰核细菌的种类有3个属17个种^[7]。Stong Gunderson^[8]等人通过用冰核细菌饲养昆虫,发现冰核细菌能够提高昆虫的结冰温度。Lee^[4]等人提出:INA细菌有可能用于控制冬季不耐结冰昆虫的一种有效手段。1992年他又报道,用冰核细菌饲养谷蠹(*Rhyzopertha dominica* (Fabricius))等7种仓库害虫,能分别提高它们的结冰温度4.7~11.9℃,并可降低其在零度以下低温的忍耐力^[9]。依此,将冰核细菌作为一种促冻杀虫剂,用于降低害虫的数量,压低越冬虫口积数,来控制 and 降低害虫的危害,是一条值得探索的防虫新途径。

1 材料与方 法

1.1 供试虫源

以我国北方严重危害杨树的光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis* (Motschulsky)幼虫为对象,供试虫源由中国林业科学研究院提供。

1.2 饲养与保存

1.2.1 饲养 人工饲料配方见表1。

1994-06-27 收稿,1996-11-12 收修改稿。

孙福在研究员,张永祥(中国农业科学研究院植物保护研究所 北京 100094);邢炜(西北农业大学);高瑞桐(中国林业科学研究院森林保护研究所)。

* 本文为1994~1996年国家自然科学基金资助课题“生物冰核降低害虫抗寒性的机理及应用基础研究”的部分内容。

按配方称取各种组分,先加入锯末、豆粉、玉米粉、韦氏盐、糖、胆固醇、山梨酸、对-羧基苯甲酸和水,边加热边搅拌,使其充分混匀。当温度升至 60~70 °C 时加入琼脂,继续加热 10~15 min,待温度下降后,再加入抗坏血酸、核黄素、金霉素,搅匀后,装入灭菌试管(1.6 cm×15 cm)内。饲养时,将幼虫放入试管内即可。

1.2.2 保存 光肩星天牛在我国北方 1 a 一代或 2 a 一代,均以幼虫越冬。新采集的供试幼虫可存放在 4 °C 冰箱中,就会立即停止取食,处于休眠状态。

1.3 接种方法

1.3.1 冰核细菌的准备 用从大豆(*Glycine max* (Linn.) Merr.)上分离的冰核细菌 IS₂₄菌株(*Pseudomonas syringae*),接种在 NAG 培养基上,于 20 °C 培养 4 d 后,用无菌水冲洗菌苔,配制成 8×10⁸ 个/mL 细菌的菌悬液。由于冰核细菌活性物质为其产生的冰蛋白,并在实验中考虑到细菌浓度会因增殖而发生变化,以及防止对环境的污染等问题,所以在菌悬液中加入 4 000 mg/kg 剂量的防污杀菌剂 906,该药只能杀灭冰核细菌,但不会破坏冰蛋白活性。将配好的菌悬液放入 4 °C 的冰箱中备用。

1.3.2 喷雾接种 在低于 20 °C 的室内,将光肩星天牛幼虫置于干燥的滤纸上,再用配好的 8×10⁸ 个/mL 菌悬液,均匀喷布于幼虫体表,再用风扇吹干后,放回试管内,于 4 °C 条件下保存待测。

1.3.3 饲喂接种 由于高温会导致冰核细菌成冰活性下降,无法在人工饲料装管的同时,混入冰核细菌,因此采用注入的方法。将饲料定量装入管内后,再用直径 3 mm 的细玻璃管在饲料管中心插一垂直孔道,然后放于 56 °C 烘烤 36 h 后,塞上棉塞,待温度降低至 20 °C 以下时,用移液管吸取 8×10⁸ 个/mL 冰核细菌悬浮液(事先用 906 灭菌),往每管孔道中注入 1 mL,使菌液充分渗入饲料中,等 24 h 后,可将试虫放入饲料管内,于 20 °C 培养 72 h 后,置于 4 °C 条件下保存,待测。

1.4 结冰温度的测定

由于昆虫在温度达到过冷却点时,虫体发生冻结,释放出凝结热,致使温度骤然升高。这个变化可以通过仪器测得。

将热敏电阻测温探头固定在经低温适应的虫体上,然后置于人工模拟霜冻箱内(用于测定植物的霜冻温度试验),以 0.1 °C/min 的速度使箱内温度下降,温度的变化导致探头电阻值发生改变,而使电压发生变化,产生电压差值,经数据采集器将数据输入计算机中,计算机中有相应软件可对数据进行自动记录、分析,并绘制出温度变化曲线。这样,当虫体结冰释放出热量时,在计算机上所显示的温度变化曲线,会出现一个明显的峰值跳跃,该峰的起点即昆虫的冰点。该霜冻箱每次可测 32 个样品。

本实验分做喷雾接种、饲喂接种和对照(不接冰核菌)3 个处理,每处理 1 次测 8 头幼虫

表 1 饲养光肩星天牛幼虫人工饲料配方

原 料	用 量 (g)
寄主锯末粉(杨树或柳树)	160
琼 脂	12
黄 豆 粉	20
玉 米 粉	20
蔗 糖	20
葡 萄 糖	20
韦 氏 盐	20
胆 固 醇	0.5
山 梨 酸	1.2
对-羧基苯甲酸	1.2
抗坏血酸(V _C)	1.2
核黄素(V _B)	0.8
金 霉 素	0.5
水(mL)	600

(老龄4头,幼龄4头),从喷雾和饲喂接种停止24 h后,开始首次测定冰点,接着每间隔48 h测定1次,共测定5次。

2 结果与分析

接种和对照的光肩星天牛幼虫的平均结冰温度见表2。

由表2看出:

(1)用喷雾和饲喂方法接种冰核细菌的虫体,其结冰温度都明显比对照高。喷雾接种的虫体结冰温度比对照高3.38~9.24 C,平均提高7.04 C;饲喂接种比对照高3.27~10.68 C,平均提高5.62 C。每隔2 d测定1次,共测5次,其两种接种处理的结冰温度随测定时间的推移有所降低。这就表明冰核细菌能在光肩星天牛幼虫的虫体上起到异源冰核的作用,降低虫体的过冷却能力,使其抗寒性下降,从而提高虫体的结冰温度。

(2)两种处理间存在差异。喷雾接种的平均结冰温度为-5.56 C,饲喂接种的平均结冰温度为-6.98 C,两者相差近1.5 C,前者高于后者。尽管饲喂接种时,虫体表面难免沾着一定数量的冰核细菌,但本结果仍以食入体内的冰核细菌起主要促冻作用。

(3)处理比对照过冷却点变化范围窄。喷雾接种虫体结冰温度波动在-3.5~8.9 C,相差5.40 C;饲喂接种虫体的结冰温度波动在-2.0~-9.1 C,相差7.10 C,对照虫体结冰温度-7.6~-22.8 C,相差15.1 C。由此可见,用喷雾和饲喂接种冰核细菌处理的过冷却点变化范围要比对照大幅度变窄。

3 讨 论

我国北方,由于冬季的低温能杀死一部分越冬害虫。越冬虫体死亡率高是翌年害虫危害轻重的重要因素。本实验证明冰核细菌能在昆虫体上起到异源冰核作用,从而提高虫体的结冰温度,这与国外的报道相符^[8,9]。由此,可设想利用冰核细菌研制一种促冻杀虫剂,喷布于害虫体表或食入体内,降低越冬害虫的过冷却能力,诱发它在稍低于0 C的低温结冰,延长结冰时间,破坏细胞组织,造成虫体死亡,以期提高害虫越冬死亡率,减轻来年危害。这就为害虫防治提出一条新途径。至于对天牛来说,如何将冰核细菌与虫体接触,还存在许多问题有待进一步

表2 光肩星天牛幼虫的结冰温度

(单位: C)

处理	接种天数(d)					平均冻结温度	
	1	3	5	7	9		
CK	-10.7	-11.5	-10.4	-10.1	-10.3		
	-9.2	-9.1	-11.4	-11.8	-9.8		
	-9.3	-11.9	-14.7	-14.2	-9.9		
	-17.2	-10.5	-7.6	-11.9	-13.1		
	-15.0	-18.2	-8.0	-8.2	-8.8		
	-17.9	-10.9	-12.3	-13.3	-20.9		
	-9.9	-15.0	-22.8	-18.2	-20.6		
	-5.8	-14.3	-14.6	-9.6	-8.8		
	-12.74	-12.68	-12.65	-12.17	-12.77	-12.60	
	平均	-3.5	-5.9	-4.8	-4.8	-4.6	
喷雾	-6.3	-9.3	-4.5	-4.5	-4.8		
	-4.8	-8.9	-5.4	-5.1	-5.0		
	-4.2	-4.1	-5.6	-5.1	-6.6		
	-3.9	-4.9	-5.1	-6.6	-6.3		
	-4.1	-4.5	-8.5	-6.5	-6.1		
	-7.6	-3.6	-4.6	-7.6	-6.4		
	-4.0	-4.1	-6.1	-6.7	-7.5		
	-4.80	-5.66	-5.58	-5.86	-5.92	-5.56	
	平均	7.94	7.02	7.07	6.31	6.85	7.04
	与CK差	-4.5	-4.8	-7.9	-8.1	-5.0	
饲喂	-8.0	-8.4	-4.5	-5.4	-8.4		
	-7.9	-2.0	-6.3	-7.3	-6.5		
	-7.8	-7.7	-9.1	-7.2	-7.3		
	-6.8	-8.1	-8.3	-8.1	-8.3		
	-5.1	-7.7	-6.9	-8.9	-6.6		
	-5.0	-6.1	-5.0	-6.8	-8.4		
	-8.0	-8.3	-8.9	-7.4	-6.6		
	-6.63	-6.64	-7.11	-7.40	-7.14	-6.89	
	平均	6.11	6.04	5.54	4.77	5.63	5.62
	与CK差						

研究解决。

参 考 文 献

- 1 高瑞桐,郑世镛. 蛀虫蔓延宁夏杨树树毁欲尽岂能让长江中下游杨树重蹈复辙. 国土绿化, 1993, 2: 65.
- 2 庄电一. 人与天牛之战. 光明日报, 1993年8月24日(第5版).
- 3 Bale J S. Implication of cold hardiness for pest management (Insect at Low Temperature edited by R. E. Lee). 1991. 461~498.
- 4 Lee R E. Principles of insect low temperature tolerance. Insect at Low Temperature edited by R. E. Lee. 1991. 17~46.
- 5 Lindow S E. The role of bacteria ice nucleating in frost injury to plants. Ann. Rev. Phytopathol. .1983, 21: 362~384.
- 6 Maki I. R. Galyon E L. Chang-Chien M. et al. Ice-nucleating induced by *Pseudomonas syringae*. Appl. Microbiol. . 1974, 28: 456~460.
- 7 孙福在, 朱红, 何礼远. 我国植物上冰核细菌种类鉴定. 自然科学进展, 1994, 4(3): 123~135.
- 8 Strong-Gunderson J M. Lee R E. Lee M R. et al. Ingestion of ice-nucleating active bacteria increases the supercooling point of the lady beetle *Hippodamia convergens*. J. Insect Physiol. . 1990, 35: 153~157.
- 9 Lee R E. Strong-Gunderson J M. Lee M R. et al. Ice-nucleating active bacteria decrease the cold hardiness of stored grain insects. J. Econ. Entomol. . 1992, 85: 371~374.

Preliminary study on Effect of INA Bacteria to Kill Larva of *Anoplophora glabripennis* through Freezing-induction

Sun Fuzai Xing Wei Zhang Yongxiang Gao Ruitong

Abstract The influence of INA bacteria to the freezing temperature of larva of *Anoplophora glabripennis*, which caused serious damage in forest production in recent years, inoculated by spraying or feeding was tested. It was showed that the supercooling point of the larva could be raised by the INA bacteria inoculated by two methods, the mean freezing temperature of insects sprayed by INA bacteria was 7.04 °C higher than that of the control, and the mean freezing temperature of insects fed by INA bacteria was 5.62 °C higher than that of the control, the temperature of the former was higher than the later. All these freezing temperature reduced later on. The results proved that INA bacteria could be used as a freezing-induced insecticide which reduces the cold-hardiness of the insect, prolongs the duration of freezing of the insect, destroys the cell tissue of the insects. It also provided the evidence of using the INA bacteria in pest control in way of reducing the population of overwintering larvae.

Key words INA (Ice Nucleation Activity) bacteria *Anoplophora glabripennis* super-cooling point

Sun Fuzai, Professor, Zhang Yongxiang (Institute of Plant Protection of Chinese Academy of Agricultural Sciences, State Key Laboratory for Biology of Plant Disease and Insect Pests Beijing 100094); Xing Wei (Northern West Agricultural University); Gao Ruitong (The Research Institute of Forest Protection, CAF).