

文章编号: 1001-1498(2009)05-0736-04

三种荧光增白剂对 HcNPV 增效作用研究

杨唯一^{1,2}, 张永安^{2*}, 唐明^{1*}, 王玉珠², 曲良建², 薛建杰^{1,2}

(1. 西北农林科技大学林学院, 陕西 杨凌 712100;

2. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 国家林业局森林保护学重点实验室, 北京 100091)

关键词: 美国白蛾核型多角体病毒; 荧光增白剂; 增效作用; 杀虫效果

中图分类号: S763.42

文献标识码: A

Study on a Synergistic Effect of Three Fluorescent Brighteners on *Hyphantria cunea* NPV

YANG Wei-yi^{1,2}, ZHANG Yong-an², TANG Ming¹, WANG Yu-zhu², QU Liang-jian², XUE Jian-jie^{1,2}

(1. College of Forestry, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, Shaanxi, China;

2. Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, CAF, Key Laboratory of Forest Protection,

State Forestry Administration, Beijing 100091, China)

Abstract: The combinations of *Hyphantria cunea* NPV (HcNPV) and three different fluorescent brighteners BA, VBL, CBS-X were added to the artificial diet and the influence of synergists in concentration 25 and 14L/10D (h). The results showed that the fluorescent brighteners BA and VBL had higher insecticidal activity, CBS-X had not significant synergistic effect.

Key words: *Hyphantria cunea* NPV; fluorescent brightener; synergistic effect; insecticidal activity

美国白蛾 (*Hyphantria cunea* Drury) 为鳞翅目 (Lepidoptera) 灯蛾科 (Acartiidae), 是一种重要的国际性检疫害虫, 具有食性杂、食量大、繁殖强、传播快、危害严重等特点。目前, 北京、天津、河北、辽宁、山东、陕西等 6 个省市均出现了美国白蛾疫情。采用美国白蛾核型多角体病毒 (*Hyphantria cunea* nuclear polyhedrosis virus, 简称 HcNPV) 防治美国白蛾危害是目前生物防治的主要手段之一, 但由于 HcNPV 产量及成本的限制, 制约了这一新型无公害防治手段的推广^[1-2]。荧光增白剂是一类能显著提高昆虫病毒毒力、快速缩短寄主昆虫死亡时间、提高昆虫病毒对紫外光保护作用的化学因子, 特别是对 NPV 具有很强增效作用^[3-5]。

1992年 Shapiro首次报道了 Tinonal LPW 等荧光增白剂能极大地提高 NPV 的毒力, 而且几乎对所有的 NPV 具有增效作用^[6]。为此, 本文研究了三种荧光增白剂对 HcNPV 的增效作用, 其中荧光增白剂 BA 对 HcNPV 的增效研究属于国内外首次开展, 以期扩大 HcNPV 的使用面积, 提高美国白蛾生物防治的水平。

1 材料和方法

1.1 材料

供试昆虫美国白蛾 (*Hyphantria cunea* Drury), 室内继代培养、体形大小一致的健康 3 龄幼虫。HcNPV 由本实验室通过室内感染的美国白蛾虫体经分

收稿日期: 2008-08-20

基金项目: 国家“十一五”科技支撑项目 (2006BAD08A1202); 教育部博士点基金 (2006071205)

作者简介: 杨唯一 (1983—), 男, 山东青岛人, 硕士, 主要从事生物防治研究。

*通讯作者: 唐明, 女, 教授, E-mail: tangn@mwsuaf.edu.cn; 张永安, 男, 研究员, E-mail: zhangyab@caf.ac.cn

离提纯所得。荧光增白剂 VBL、BA、CBS-X 购买于上海助剂厂。人工饲料为本实验室自主研发的配方。

1.2 HcNPV 对美国白蛾 3 龄幼虫的毒力测定

将供试的 HcNPV 提纯液稀释成 1.0×10^7 、 1.0×10^6 、 1.0×10^5 、 1.0×10^4 、 1.0×10^3 $\text{PBs} \cdot \text{mL}^{-1}$ 5 个浓度,用上述不同浓度 HcNPV 液浸泡定量的人工饲料,浸泡 30 s 后取出晾干,供幼虫取食,每处理虫数 20 头,重复 3 次,饲养温度 25°C ,光照 14L/10D (h)。以加无菌水为对照 (CK)。虫体饲养 3 天后,更换为无毒的人工饲料,每天观察记录虫体死亡情况,第 15 天结束。

1.3 三种荧光增白剂对美国白蛾 3 龄幼虫的毒力测定

将荧光增白剂 BA、VBL 和 CBS-X 分别稀释成 0.5%、1% 和 2% 3 个浓度共 9 个处理组,将上述稀释液浸泡定量的人工饲料,30 s 后取出晾干,供幼虫取食,每处理虫数 20 头,重复 3 次,饲养温度 25°C ,光照 14L/10D (h)。以加无菌水为 CK。每天观察记录虫体死亡情况,第 15 天结束。

1.4 HcNPV 与各荧光增白剂混配后对美国白蛾 3 龄幼虫的毒力测定

将 HcNPV 提纯液稀释成 2.1×10^5 $\text{PBs} \cdot \text{mL}^{-1}$,该浓度为 1.2 节中筛选出的 LC_{50} ,体积为 100 mL,配制 10 份。在上述病毒液中分别加入 VBL 0.5、1、2 g,BA 0.5、1、2 g,CBS-X 0.5、1、2 g 备用。将配好的混配液浸泡定量的人工饲料,30 s 后取出

晾干,供幼虫取食,每处理虫数 20 头,重复 3 次,饲养温度 25°C ,光照 14L/10D (h)。以加无菌水为 CK1,以只加 2×10^5 $\text{PBs} \cdot \text{mL}^{-1}$ HcNPV 为 CK2。虫体饲养 3 天后,更换为无毒的人工饲料,每天观察记录虫体死亡情况,第 15 天结束。

1.5 荧光增白剂与不同浓度的 HcNPV 复配后对美国白蛾 3 龄幼虫的毒力测定

根据各增效剂不同质量浓度对 HcNPV 增效作用的试验结果,选择作用效果最佳的增效剂浓度,配制不同浓度的 HcNPV 病毒液对美国白蛾 3 龄幼虫进行毒力测定,并与不加增效剂的 HcNPV 毒力进行比较,以加无菌水为 CK。

1.6 数据处理

当无菌水对照死亡率在 10% 以下时,试验有效。连续观察 15 天,记录各处理幼虫死亡数,计算出死亡率;利用 SPSS 软件计算出浓度与死亡率的回归方程、 LC_{50} 及 95% 置信区间,分析虫体死亡时间和死亡率关系。增效作用采用孙云沛的方法进行测定^[7]。

增效比值 $S_R = \text{HcNPV 的 } \text{LC}_{50} / (\text{HcNPV} + \text{荧光增白剂}) \text{ 的 } \text{LC}_{50}$

2 结果和分析

2.1 HcNPV 和荧光增白剂对美国白蛾 3 龄幼虫的毒力

HcNPV 对美国白蛾 3 龄幼虫的毒力测定的 LC_{50} 及其 95% 置信限、毒力回归方程见表 1。

表 1 HcNPV 对美国白蛾 3 龄幼虫的室内毒力

处理	浓度 / ($\text{PBs} \cdot \text{mL}^{-1}$)	死亡率 / %	$\text{LC}_{50} / (\text{PBs} \cdot \text{mL}^{-1})$ 95% 置信限	浓度对数 死亡率值回归方程 $Y = a + bx$	相关系数 R
HcNPV	1.0×10^3	15.00 ± 0.00	2.111×10^5 ($1.04 \times 10^5 \sim 4.53 \times 10^5$)	$Y = 2.324 + 0.504x$	0.988
	1.0×10^4	23.33 ± 2.89			
	1.0×10^5	36.67 ± 2.89			
	1.0×10^6	66.67 ± 2.89			
	1.0×10^7	81.67 ± 5.77			
CK	-	0.00			

HcNPV 的浓度与美国白蛾死亡率呈显著正相关。

三种荧光增白剂在 0.5%、1%、2% 浓度下对美国白蛾 3 龄幼虫的死亡率均小于 5.00%, 无法测定其 LC_{50} , 因此认为这三种荧光增白剂为无毒增效剂。

2.2 HcNPV 与荧光增白剂混配后对 3 龄幼虫的毒力

HcNPV 与荧光增白剂按不同配方混配后,各处理对美国白蛾 3 龄幼虫毒力测定的死亡率、虫体死亡时间与死亡率的回归方程及 LT_{50} 见表 2。

表 2 可见,在 LC_{50} 浓度下加入荧光增白剂其校正死亡率均超过了 50%, 表明三种荧光增白剂在

0.5%、1.0%和2.0%三个浓度下对 HcNPV 均有增效作用。其中加入 1.0% 的荧光增白剂 BA 效果最为显著,其次为加入 0.5% 的荧光增白剂 VBL,而加入荧光增白剂 CBS-X 虽有增效作用,但是效果不显著。从时间-死亡率的关系来看,达到 LT_{50} 的时间平

均比单用 HcNPV 要提前了 2 天左右,加 0.5% VBL 的处理组甚至提前了近 4 天,致死时间明显缩短。由此可见,在 HcNPV 中加入荧光增白剂可显著提高速效性。

表 2 HcNPV 与不同质量浓度的荧光增白剂复配后对美国白蛾 3 龄幼虫的毒力

处理	荧光增白剂浓度 / (g · mL ⁻¹)	死亡率 / %	LT ₅₀ / d 95% 置信限	时间-死亡率回归方程 Y = a + bx
HcNPV + VBL	0.5	78.33 ± 2.89	6.90 (6.34 ~ 7.77)	Y = -6.856 + 8.174x
	1.0	76.67 ± 5.77	10.05 (9.11 ~ 11.91)	Y = -5.793 + 5.780x
	2.0	73.33 ± 5.77	9.54 (8.47 ~ 12.04)	Y = -5.651 + 5.768x
HcNPV + BA	0.5	75.00 ± 2.89	8.48 (7.30 ~ 13.20)	Y = -5.602 + 6.034x
	1.0	76.67 ± 2.89	9.30 (8.32 ~ 11.46)	Y = -5.647 + 5.831x
	2.0	66.67 ± 2.89	7.84 (7.23 ~ 8.81)	Y = -6.875 + 7.689x
HcNPV + CBS-X	0.5	56.67 ± 0.00	8.58 (8.28 ~ 8.87)	Y = -7.941 + 8.509x
	1.0	55.00 ± 2.89	9.13 (8.81 ~ 9.45)	Y = -7.530 + 7.840x
	2.0	51.67 ± 0.00	10.94 (10.45 ~ 11.46)	Y = -9.170 + 8.824x
CK1	-	0.00	-	-
CK2	-	53.33 ± 2.89	10.62 (10.22 ~ 11.03)	Y = -10.363 + 10.099x

2.3 荧光增白剂与不同浓度的 HcNPV 复配后对美国白蛾 3 龄幼虫的毒力

不同浓度的 HcNPV 与 0.5% VBL 和 1% BA 两两复配后对美国白蛾幼虫的毒力测定的 LC₅₀ 及其 95% 置信限、毒力回归方程见表 3。

表 3 可见, HcNPV + 0.5% VBL 在 25 温度条件下对美国白蛾幼虫的 LC₅₀ 为 1.159 × 10³ PBs · mL⁻¹, HcNPV + 0.1% BA 在 25 温度条件下对美

国白蛾幼虫的 LC₅₀ 为 1.186 × 10³ PBs · mL⁻¹, 而单独使用 HcNPV 的 LC₅₀ 为 2.1 × 10⁵ PBs · mL⁻¹, 由此根据孙云沛的方法可以计算得出^[5], 添加 0.5% VBL 的增效比值 S_R 为 182.14, 添加 1% BA 的增效比值 S_R 为 178.00。可见, 在 HcNPV 中加入 0.5% 和 1% 的 BA 均对美国白蛾幼虫有很强增效作用。

表 3 增效剂与不同浓度的 HcNPV 复配对美国白蛾 3 龄幼虫的毒力

处理	HcNPV 浓度 / (PBs · mL ⁻¹)	死亡率 / %	LC ₅₀ / (PBs · mL ⁻¹) 95% 置信限	浓度对数-死亡率值 回归方程 Y = a + bx
HcNPV + 0.5% VBL	1.0 × 10 ³	46.7 ± 0.00	1.159 × 10 ³ (1.47 × 10 ² ~ 4.00 × 10 ³)	Y = 3.847 + 0.377x (R = 0.994)
	1.0 × 10 ⁴	66.7 ± 2.89		
	1.0 × 10 ⁵	78.3 ± 2.89		
	1.0 × 10 ⁶	85.0 ± 5.77		
	1.0 × 10 ⁷	93.3 ± 5.77		
HcNPV + 1% BA	1.0 × 10 ³	48.3 ± 0.00	1.186 × 10 ³ (1.32 × 10 ² ~ 4.31 × 10 ³)	Y = 3.868 + 0.366x (R = 0.993)
	1.0 × 10 ⁴	65.0 ± 2.89		
	1.0 × 10 ⁵	75.0 ± 5.77		
	1.0 × 10 ⁶	83.3 ± 5.77		
	1.0 × 10 ⁷	93.3 ± 5.77		
CK	-	0.0	-	-

3 讨论

Shapiro 等^[6] 1992 年报道了荧光增白剂对舞毒蛾核型多角体病毒 (LdNPV) 毒力的增强作用, 而且

不同浓度的 Tinopal LPW 荧光增白剂对舞毒蛾核型多角体病毒的毒力差异较大, 1% 浓度为最佳浓度。在大部分荧光增白剂当中, Tinopal LPW 对所有试验核型多角体病毒具有增效作用, 近年来, 我国也有应

用 Tinopal LPW 对蜀柏毒蛾核型多角体病毒 (Po NPV) 增效作用的研究, 实验结果表明增效作用明显^[8]。本研究采用的荧光增白剂 BA 与 Tinopal LPW 化学结构相同, 实验结果表明增效作用同样明显。

荧光增白剂 0.5% VBL 和 1% BA 对 HcNPV 的增效作用在低剂量效果显著, 室内生测结果显示, HcNPV 在 1.0×10^3 PBs \cdot mL⁻¹ 浓度下, 美国白蛾幼虫的死亡率从 15.0% 分别增加到 46.7% 和 48.3%, 这对于降低 HcNPV 的林间使用浓度, 从而降低防治成本具有重大意义。

三种荧光增白剂质量浓度在 1% 以下变化时, 增效作用的差别并不明显, 当质量浓度为 2% 时, 增效作用反而减弱。可能的原因为过高的荧光增白剂浓度对昆虫的取食有明显的抑制作用^[9]。也可能是高浓度的荧光增白剂对 HcNPV 的活性产生影响。

不同种类的荧光增白剂对 HcNPV 的增效作用差别显著, VBL 和 BA 同属荧光增白剂的 DSD 酸三嗪类型, 而 CBS-X 属于 4,4'-二苯乙烯基联苯类, 从实验结果来看, DSD 酸三嗪类型的荧光增白剂对 HcNPV 的增效效果较 4,4'-二苯乙烯基联苯类显著。

初步分析荧光增白剂增效机理可能与昆虫中肠的 pH 值下降有关。pH 值的下降是因为荧光增白剂阻止了被病毒感染的中肠上皮细胞的脱落, 这可能是其增效的主要原因^[10]。

从本研究的结果分析来看, 0.5% 的 VBL 和 1% 的 BA 对 HcNPV 的增效作用明显, 可作为 HcNPV 的

增效剂加入到制剂中。但是由于荧光增白剂水溶液 pH 呈碱性, 长期存放可能对 HcNPV 的毒力会产生影响, 因此在生产中可以尝试采用伴侣的方式配制, 即一定浓度的 HcNPV 病毒液外加一定质量的荧光增白剂, 两者单独包装存放, 使用时按比例现配现用。

参考文献:

- [1] 杨忠岐, 张永安. 重大外来入侵害虫——美国白蛾生物防治技术研究 [J]. 昆虫知识, 2007, 1(4): 1 - 4
- [2] 杨忠岐, 王小艺, 王传珍, 等. 白蛾周氏啮小蜂可持续控制美国白蛾的研究 [J]. 林业科学, 2005, 41(5): 72 - 80
- [3] 彭建新, 杨红, 洪华珠. 促进杆状病毒感染增效因子 [J]. 中国生物防治, 2000, 16(2): 87 - 91
- [4] 严东辉, 陈昌洁, Shapiro M. 提高昆虫病毒杀虫效果的荧光增白剂的研究 [J]. 林业科学, 2003, 39(1): 153 - 159
- [5] NicHe W R, Shapiro M. Use stilbene brightener tinopal LPW as a radiation protectant for *Steinana capocapsae* [J]. J Nematol, 1992, 24(3): 371 - 373
- [6] Shapiro M. Use of optical brighteners as radiation protectants for gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus [J]. J Econ Entomol, 1992, 85(5): 1682 - 1686
- [7] Sun Y P, Johnson E R. Analysis of joint action of insecticides against houseflies [J]. J Econ Entomol, 1960, 53: 887 - 892
- [8] 周建华, 胡应之, 肖育贵, 等. 荧光增白剂 Tinopal LPW 对蜀柏毒蛾核型多角体病毒增效作用研究 [J]. 中国病毒学, 2006, 21(3): 273 - 276
- [9] 戈建华, 程德文. 荧光增白剂在昆虫病毒领域的新用途 [J]. 精细与专用化学品, 2006, 14(7): 1 - 6
- [10] 郭慧芳, 方继朝, 韩召军. 昆虫病毒增效剂研究进展 [J]. 昆虫学报, 2003, 46(6): 766 - 772