蜡蚧轮枝菌毒素Ⅷ对烟粉虱的忌避与拒食活性*

洪慧金 杨艺华 王联德**

(福建农林大学 生物农药与化学生物学教育部重点实验室 福州 350002)

摘 要 蜡蚧轮枝菌毒素Ⅷ和化学合成的吡啶-2,6-二羧酸(DPA)对烟粉虱成虫的忌避作用均表现出忌避与拒食活性。利用罩叶选择法测定了蜡蚧轮枝菌毒素Ⅷ和DPA对烟粉虱成虫的忌避与拒食活性。试验表明蜡蚧轮枝菌毒素Ⅷ和DPA对烟粉虱具忌避与拒食作用活性,100 mg·L^{-1}毒素Ⅷ的忌避率与拒食率分别为41%和23%。

关键词 蜡蚧轮枝菌毒素Ⅷ,吡啶-2,6-二羧酸,烟粉虱,忌避,拒食

Repellence and feeding deterrence of *Verticillium lecanii* toxic-Ⅷ against *Bemisia tabaci*

HONG Hui-Jin YANG Yi-Hua WANG Lian-De**

(Key Laboratory of Biopesticide and Chemical Biology, MOE, Fujian Agriculture & Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract Both the dipicollinoc acid, toxin Ⅷ, produced by the fungus *Verticillium lecanii* (Zimmermann) Viégas, and an artificially synthesized version of this compound, were effective in repelling *Bemisa tabaci* (Gennadius) adults. The effectiveness of these compounds was tested using a choice experiment. The results show that both natural and synthetic toxic-Ⅷ had similar deterrence values against *B. tabaci* of 41 % and 23% respectively.

Key words *Verticillium lecanii* toxic-Ⅷ, dipicollinoc acid, *Bemisa tabaci*, repellence, feeding deterrence

蜡蚧轮枝菌 *Verticillium lecanii* (Zimmermann) Viégas 是寄生粉虱的一种重要昆虫病原真菌。然而要诱发害虫真菌病流行达到控制种群,必需有较高的环境湿度,而高湿度往往造成植物病害的发生(范晓莉等,2003);这种高湿度的苛求和稳定性差的特性成为杀虫真菌成功开发的一个"瓶颈"(顾宝根和姜辉,2000)。克服这个"瓶颈"最有效的方法之一,是利用虫生真菌产生的具有杀虫活性的代谢产物——虫生真菌毒素。虫生真菌毒素是一类相对稳定性强、受环境影响相对较小的低分子量天然杀虫产物。然而由于受植物病原真菌毒素污染食物和饲料的传统影响,虫生真菌毒素长期以来没有得到很好的开发,至今仍未有产品的成功开发(Abendstein *et al.*, 2000)。Kanaoka 等(1978)从蜡蚧轮枝菌中分离出一种具有生物活性的环状多肽,我国学者也开展了利用该菌代谢粗提物对粉虱、蚜虫、菜青虫和小菜蛾毒杀作用的研究,证实了该菌毒素的田间杀虫效果(李国霞等,1995;王克勤等,2000;刘春来等,2003;张仙红等,2003;王联德和黄建,2006a;2006b;王联德等,2007)。迄今为止,分离到10种蜡蚧轮枝菌杀虫毒素(王联德等,2010)。作者分离并鉴定了蜡蚧轮枝菌杀虫毒素4化合物,其中,蜡蚧轮枝菌毒素Ⅷ对烟粉虱不仅表现出触杀作用,还表现出产卵和取食忌避活性(王联德和黄建,2006b)。研究蜡蚧轮枝菌毒素Ⅷ(吡啶二羧酸)对烟粉虱 *Bemisa tabaci* (Gennadius)杀虫活性以及取食、产卵忌避作用,以期为开发和利用蜡蚧轮枝菌毒素Ⅷ的进一步研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试毒素

生物测定所用毒素为用化学品98%的吡啶-2,6-二羧酸(dipicolinic acid, DPA)(国药集团化学

* 资助项目:公益性行业(农业)科研专项(200803005)、国家自然科学基金(30771452)、福建省科技计划重点项目(2007I0004)。

**通讯作者,E-mail: wangliande@yahoo.com

收稿日期:2010-12-23,接受日期:2011-01-07

试剂有限公司)和蜡蚧轮枝菌代谢液中提取的毒素Ⅷ,试验时按所需浓度用含 0.002% Tween 80 的蒸馏水溶解稀释配成。

在蜡蚧轮枝菌毒素Ⅷ对烟粉虱若虫的杀虫活性及对烟粉虱成虫的产卵、取食忌避作用测定中,所用蜡蚧轮枝菌毒素Ⅷ供试浓度为 500、400、200、100、50 mg·L^{-1}5 个浓度梯度,均用蒸馏水溶解稀释成。

1.2　供试昆虫

试验所用烟粉虱为福建农林大学植保学院温室饲养的种群,饲养寄主植物为甘薯,饲养温度 T 为 28 ℃左右,RH 为 70% ~90%。蜡蚧轮枝菌毒素Ⅷ对烟粉虱的杀虫活性的测定供试昆虫为烟粉虱的 3 龄若虫,获得方法是将甘薯枝条插入装有植物营养液的锥形瓶中培养甘薯苗,放在养虫室让成虫产卵 1 d,然后抖去成虫拿出养虫室并放入培养箱培养至 3 龄,其它虫龄的昆虫用昆虫针挑掉;蜡蚧轮枝菌毒素Ⅷ对烟粉虱的忌避作用的测定所用烟粉虱为刚羽化的成虫。

1.3　供试寄主植物

蜡蚧轮枝菌毒素Ⅷ对烟粉虱的杀虫活性的测定所用烟粉虱寄主植物为甘薯叶片,杀虫活性测定所用的为带有烟粉虱 3 龄若虫的甘薯叶片;毒素对烟粉虱成虫的忌避作用的测定用的是新鲜无虫卵的甘薯嫩叶。

1.4　溴甲酚绿试纸的制作

用量筒量取 100 mL 无水乙醇倒入干燥的 150 mL 烧杯中,然后用电子天平称取 0.2 g 的溴甲酚绿,倒入烧杯,用干燥的玻璃棒搅拌直至完全溶解,倒入大培养皿(d = 20 cm)中,然后将直径为 9 cm 滤纸放入其中浸泡,用干燥的镊子夹出,待乙醇挥发至滤纸干燥,用密封袋装好,待用。

1.5　蜡蚧轮枝菌毒素Ⅷ对烟粉虱成虫忌避和拒食活性的测定

蜡蚧轮枝菌毒素Ⅷ对烟粉虱成虫忌避活性的测定是用忌避率(*RI*)这一个指标来评价的。

$$RI(\%) = \frac{(\text{对照叶着虫数} - \text{处理叶着虫数})}{(\text{对照叶着虫数} + \text{处理叶着虫数})} \times 100 \quad (1)$$

将蜡蚧轮枝菌毒素Ⅷ用蒸馏水将蜡蚧轮枝菌毒素Ⅷ溶解稀释成 500、400、200、100 和 50 mg·L^{-1}5 个浓度,每个处理用面积相当的甘薯叶片 2 片,处理叶先放到药液里面浸湿,然后拿出晾干,对照叶用蒸馏水浸湿后晾干。晾干后,处理叶和对照叶均插入湿润的花泥中保湿,并放入培养皿中,再用圆柱形玻璃罩(h = 28 cm,Φ = 20 cm)围罩。每处理 3 个重复,每个重复接入烟粉虱成虫 50 头,24 h 后统计处理叶和对照叶的成虫的分布情况。以此计算出蜡蚧轮枝菌毒素Ⅷ对烟粉虱成虫的忌避作用。

烟粉虱在取食过程中分泌蜜露,因此蜜露斑的面积差异反映了取食量的差异。根据不同处理浓度处理过的甘薯叶片上烟粉虱取食后分泌的蜜露落到试纸上显色,可估算出蜜露斑的面积,与对照组蜜露斑的面积的差异,烟粉虱在取食寄主植物的过程中会分泌蜜露,且分泌的蜜露量的多少与取食量大小成正比(Hendrix and Wei, 1992; Davison *et al.*, 1996),因此,通过测量对照叶和处理叶的蜜露量来测量烟粉虱成虫的拒食率。根据蜜露与溴甲酚绿作用出现特殊颜色的显色原理来测量蜜露斑的面积,蜜露量用蜜露斑的面积表示,即用半定量法来测定蜜露量(Henneberry *et al.*, 1996),蜜露斑的面积计算用透明的九宫格坐标纸(边长 1 mm)覆盖在蜜露斑上大致估算蜜露斑的面积,通过处理组和对照组蜜露斑面积差异,根据公式(2)可以求出毒素的不同处理浓度对烟粉虱的拒食率。

将蜡蚧轮枝菌毒素Ⅷ按照 1.1 方法配好 5 个浓度的毒素溶液,每处理取面积相当的新鲜甘薯叶片 2 片,所有的处理叶均经不同浓度毒素Ⅷ的处理 30 s,然后用镊子夹出晾干;对照叶均用蒸馏水浸湿,夹出晾干。晾干后,处理叶和对照叶均插入湿润的花泥中保湿(图 1),并放入培养皿中(装花泥的培养皿要用保鲜膜密封以保持培养皿外部干燥),两片叶片下面均放置一张制好的溴甲酚绿试验滤纸(Φ = 9 cm)。每处理 3 个重复,每个重复接入烟粉虱成虫 50 头,24 h 后根据处理叶蜜露量和对照叶蜜露量统计烟粉虱成虫的拒食率(AFI)。

$$AFI = (C - T) \times 100 / C \quad (2)$$

C 对照叶蜜露量, T 处理叶蜜露量。

2　结果与分析

2.1　蜡蚧轮枝菌毒素Ⅷ对烟粉虱忌避作用的测定

提取毒素和化学品 DPA 对烟粉虱成虫表现出相似的忌避作用($F = 0.01$, $DF = 5$, $P = 0.92$),由

表 1 可知，忌避作用显著大于相对对照（含 0.002% Tween 80 的蒸馏水溶液）和绝对对照（蒸馏水溶液）（$F = 383.05$，$DF = 11$，$P > 0.001$），相对对照和绝对对照着虫率差异不显著（$F = 0.65$，$DF = 5$，$P = 0.45$），表明含 0.002% Tween 80 的蒸馏水溶液对烟粉虱成虫没有忌避作用。

通过对该毒素对烟粉虱成虫的忌避率的方差分析可知，在不同处理浓度下忌避率与对照组比较均达到显著水平（$F = 110.218$，$DF = 12$，$P < 0.01$）。其忌避率随着处理浓度的增大而增大。

在不同浓度之间，除了 500、400 mg·L^{-1}的处理浓度下的方差分析的差异不明显外，其余的处理浓度下，均表现出显著差异。且毒素对烟粉虱成虫的忌避作用较强，在高于200 mg·L^{-1}的处理浓度，忌避率均大于 49%，就是在最低浓度 50 mg·L^{-1}的处理下，平均取食忌避率为 30.84%，忌避率仍然较强（图 2）。

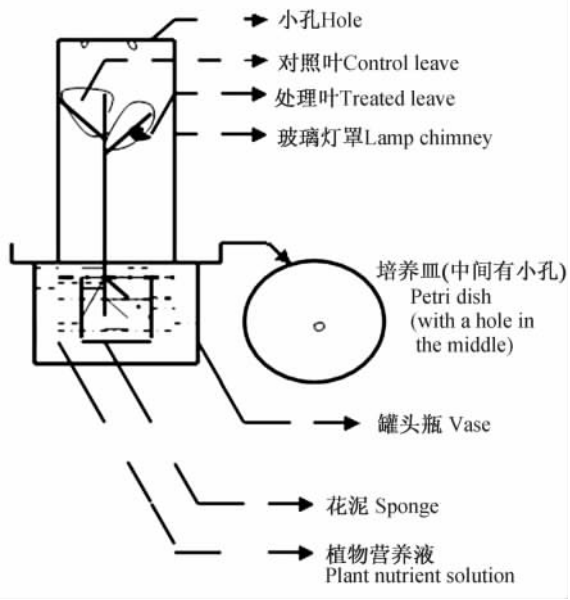


图 1 烟粉虱蜜露测定装置

Fig. 1 Apparatus for testing the honeydew excreted by *B. tabaci*

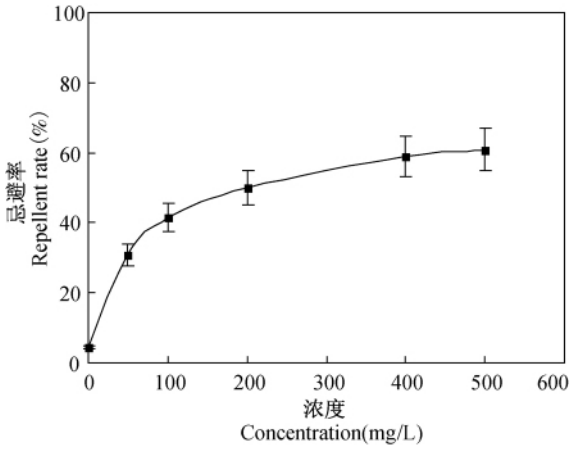


图 2 DPA 对烟粉虱成虫的忌避作用曲线

Fig. 2 Repellence dose-response curve for DPA on *B. tabaci* adult

表 1 蜡蚧轮枝菌毒素Ⅷ对烟粉虱忌避作用活性

Table 1 The repellence of toxic-Ⅷ to *B. tabaci* adult

处 理 Treatment	忌避率 Repellent rate (%)	Duncan DMRT $P_{0.05}$	Duncan DMRT $P_{0.01}$
绝对对照（蒸馏水溶液）Absolute control (Distillwater)	4.213 ± 0.18	a	A
相对对照（含 0.002% Tween 80 的蒸馏水溶液）Relative control (Distill water containing 0.002% Tween 80)	4.53 ± 0.65	a	A
提取毒素毒素Ⅷ（100 mg·L^{-1}）*Verticillium lecanii* toxic-Ⅷ	41.29 ± 2.53	b	B
化学品 DPA（100 mg·L^{-1}）Chemically synthesized compound DPA	41.51 ± 2.73	b	B

注：表中为平均值 ± 标准差，同一列中标有不同字母者，表示差异达 0.01 显著水平，下同。

Values are Mean ± SD, values in the same column with different letters are significantly different at 0.01 level according to DMRT of one-way ANOVA. The same below.

2.2 蜡蚧轮枝菌毒素Ⅷ不同浓度对烟粉虱成虫的拒食作用

蜡蚧轮枝菌毒素Ⅷ对烟粉虱成虫蜜露的分泌量有较明显的影响，图 3 为在不同浓度的毒素Ⅷ处理过的甘薯叶片上烟粉虱成虫取食叶片后分泌的蜜露落在溴甲酚绿试纸上显色的蜜露斑。经毒素处理过的甘薯叶片上，烟粉虱取食叶片分泌的蜜露明显受到影响。经毒素Ⅷ的 5 个不同浓度处理后，不同处理的蜜露斑面积与对照组有明显差异，蜜露斑面积随毒素浓度升高而减小，也与对照组的差异越显著。

提取毒素和化学品 DPA 对烟粉虱成虫表现出

相似的拒食作用活性($F = 0.001$, $DF = 5$, $P = 0.98$),由表 2 可知,拒食作用活性显著大于相对对照(含 0.002% Tween 80 的蒸馏水溶液)和绝对对照(蒸馏水溶液)($F = 74.86$, $DF = 11$, $P > 0.001$),相对对照和绝对对照蜜露量差异不显著($F = 0.001$, $DF = 5$, $P = 0.98$),表明含 0.002% Tween 80 的蒸馏水溶液对烟粉虱成虫没有拒食作用活性。

蜡蚧轮枝菌毒素Ⅷ对烟粉虱成虫的拒食率跟处理浓度相关,其拒食率随着处理浓度的增加而增大。由毒素对烟粉虱成虫的拒食率方差分析表明,在 50 mg·L^{-1}的低浓度处理下,处理组的拒食率与对照组差异不明显,基本不表现出拒食作用;在高于 100 mg·L^{-1}的处理浓度作用下,处理组拒食率与对照组的差异显著;在 200 mg·L^{-1}的浓度以上,毒素对烟粉虱成虫的拒食率均超过 40%;在不同处理浓度之间,除 400 mg·L^{-1}和 200 mg·L^{-1}处理浓度下拒食率的方差分析差异不明显外,其它组的方差分析均表现显著差异(图 4, $F = 36.433$, $DF = 12$, $P < 0.01$)。

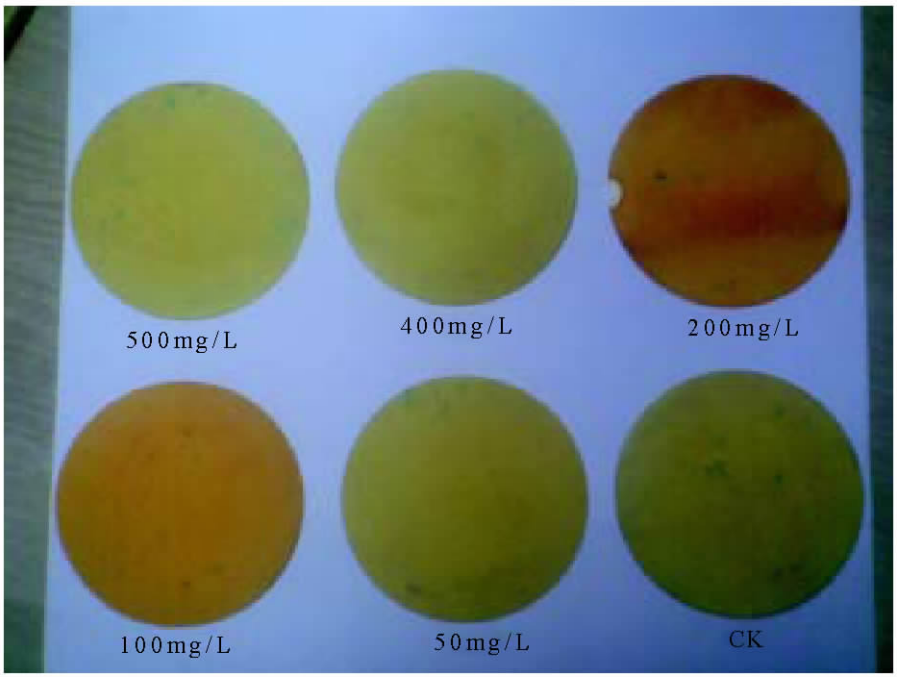


图 3　蜡蚧轮枝菌毒素Ⅷ不同浓度作用下烟粉虱成虫分泌的蜜露

Fig. 3　Honeydew of *B. tabaci* adult treated with different concentration of toxic-Ⅷ

表 2　蜡蚧轮枝菌毒素Ⅷ对烟粉虱拒食作用活性

Table 2　The feeding deterrence of toxic-Ⅷ to *B. tabaci* adult

处理 Treatment	拒食率 Feeding deterrent rate (%)	Duncan DMRT $P_{0.05}$	Duncan DMRT $P_{0.01}$
绝对对照(蒸馏水溶液) Absolute control (Distillwater)	3.71 ± 0.45	a	A
相对对照(含 0.002% Tween 80 的蒸馏水溶液) Relative control (Distill water containing 0.002% Tween 80)	3.70 ± 0.36	a	A
提取毒素Ⅷ (100 mg·L^{-1}) *Verticillium lecanii* toxic – Ⅷ	23.38 ± 3.08	b	B
化学品 DPA (100 mg·L^{-1}) Chemically synthesized compound DPA	23.32 ± 3.29	b	B

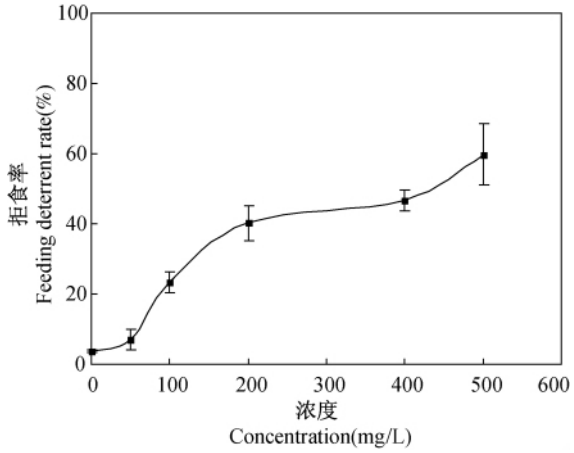


图 4 DPA 对烟粉虱成虫的拒食作用曲线

Fig. 4 Deterrence dose-response curve for DPA on *B. tabaci* adult

3 讨论

以往的研究都是关于蜡蚧轮枝菌毒素对昆虫的触杀或者胃毒作用的报道(Kanaoka *et al.*, 1978; Claydon and Grove, 1982; Gindin *et al.*, 1994; Mitina *et al.*, 1997)。本试验表明蜡蚧轮枝菌毒素Ⅷ不仅对烟粉虱 3 龄若虫具有毒杀作用,对其成虫还表现出取食忌避。烟粉虱成虫对被处理过的寄主植物具有拒食作用。在 500 mg·L^{-1} 的处理浓度下,取食忌避率达高 60.83%,拒食率也达 59.72%。

蜡蚧轮枝菌是一种重要的昆虫病原真菌,可用于许多害虫的生物防治,但由于其要求高湿度,易受环境影响,不易储藏,这在一定程度上妨碍了该菌的产业化进程,导致该菌在生防中仍未能得到推广应用(王联德等,2010),蜡蚧轮枝菌在侵染致死昆虫体内分泌多种毒素,而毒素的提取并生产可弥补这一系列的缺点。

参考文献(References)

Abendstein D, Pernfuss B, Strasser H, 2000. Evaluation of and its metabolite oosporein regarding phytotoxicity on seed potates. *Biocon. Sci. Technol.*, 10: 789—796.

Claydon N, Grove JF. 1982. Insecticidal secondary metabolic products from the netomologenous fungus *Verticillium lecanii*. *J. Invertebr. Palhol.*, 40: 413—418.

Davison EW, Patron BR, Lacey LA, Frutos R, VeyA, Hendrix DL, 1996. Activity of natural toxins against the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii* using a novel feeding bioassay system. *Entomol. Exp. Appl.*, 79: 25—32.

范晓莉,谢明,万方浩,邱卫亮,2003. 蜡蚧轮枝菌耐药菌株防治蔬菜烟粉虱的效果研究. 中国虫生真菌研究与应用,5: 153—156.

Gindin G, Barash I, Harari N, Raccah R, 1994. Effect of endotoxin compounds isolated from *Verticillium lecanii* on the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*. *Phytoparasitica*, 22(3): 189—196.

顾宝根,姜辉,2000. 我国生物农药的现状及问题//喻子牛等主编,微生物农药及其产业化. 北京:科学出版社. 13—20.

Hendrix DL, Wei Y, 1992. Detection and elimination of excretion by the sweetpotato whitefly feeding up cotton // Herberd J, Richer DA. Proceedings, 1992 Beltwide Cotton Research Conference. Memphis, TN: National Cotton Council Of America. 671—673.

Henneberry TJ, Hendrix DL, Perkins HH, 1996. *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) honeydew sugars and relationships to sticky cotton. *Environ. Entomol.*, 25(3): 551—558.

Kanaoka M, Isogal A, Murakoshi S, 1978. Bassianolide, a new insecticidal cyclodpsipeptide from *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*. *Agri. Biol. Chem.*, 42: 629—635.

李国霞,高希武,刘青春,严毓华,1995. 蜡蚧轮枝菌的发酵培养及其代谢产物对害虫毒杀作用的初步研究. 北京农业大学学报,21(4): 409—415.

刘春来,王克勤,李新民,刘新润,闫明宇,周英伟,2003. 蜡蚧轮枝菌素对五种蚜虫毒杀作用的初步研究. 中国农学通讯,19(2): 77—79.

Mitina GV, Sergeev GE, Pavlyushin VA, 1997. Effect of biochemical and morphocultural properties of *Verticillium leccmii* (Zimm.) Viégas natural isolates on the virulence for *Trialeurodes vaporaurorum*. *Mikol. Fitopatol.*, 31: 57.

王克勤,李新民,刘春来,许国庆,2000. 蜡蚧轮枝菌毒素防治温室白粉虱初步研究. 植物保护,26(4): 44—45.

王联德,黄建,2006a. 蜡蚧轮枝菌高产毒素菌株的筛选. 福建农林大学学报,35(2): 134—137.

王联德,黄建,2006b. 蜡蚧轮枝菌 *Lecanicillium lecanii* 次生代谢产物对烟粉虱 *Bemisia tabaci* 的忌避作用模型. 江西农大学报,28(2): 195—199.

王联德,黄建,王宗华,2007. 昆虫病原真菌的毒素种类及其结构与作用方式. 中国农学通报,(23): 268—274.

王联德,尤民生,黄建,周然,2010. 虫生真菌多样性及其在害虫生物防治中的作用. 江西农大学报,32(5): 920—927.

张仙红,李来保,成志芳, 2003. 蜡蚧轮枝菌代谢产物杀虫及植物生理活性的测定. 山西农业大学学报(自然科学版),(4): 316—318.