

吕亮,陈娇,郭志敏,等.苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒对草地贪夜蛾幼虫的杀虫活性及生防效果[J].华中农业大学学报,2021,40(5):46-53.DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2021.05.007

苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒对草地贪夜蛾 幼虫的杀虫活性及生防效果

吕亮¹,陈娇²,郭志敏³,吕为²,陶佩文²,
吕惠红²,潘哲群²,常向前¹,万鹏¹,张舒¹

1.农业农村部华中作物有害生物综合治理重点实验室/湖北省农业科学院植保土肥研究所,武汉 430064;
2.武汉武大绿洲生物技术有限公司,武汉 430072;3.华中农业大学植物科学技术学院,武汉 430070

摘要 为明确苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(*Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus, AcMNPV)对草地贪夜蛾幼虫的防治效果,采用室内生物活性测定、田间药效试验等方法,研究和分析 AcMNPV 对草地贪夜蛾幼虫的杀虫活性和生防效果,结果显示,AcMNPV 对草地贪夜蛾 2 龄幼虫的 $LC_{50} = 2.9 \times 10^7$ PIB/mL;在田间,AcMNPV + Bt 复配制剂 1 千万苜核·苏云菌悬浮剂(1 500 mL/hm²)药后第 10 天的平均虫口防效为 68.99%,而药后第 15 天的平均防效亦有 66.87%,均对草地贪夜蛾幼虫表现出较好的防治效果。应用 DNAMAN 6.0 软件对试验后死虫样进行 DNA 同源比对鉴定,结果显示 *polh*、*lef-8* 和 *lef-9* 基因序列同源性均达到 100%。以上结果表明 AcMNPV 对草地贪夜蛾幼虫有较好的控制作用。建议在草地贪夜蛾低龄幼虫发生高峰期施用 1 千万苜核·苏云菌悬浮剂,最好选择在晴天 16:00—17:00 使用,避开高温和光照等不利环境条件的影响,以使病毒制剂能更好地发挥作用,提高其防治效果。

关键词 苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒;草地贪夜蛾;鳞翅目害虫;幼虫;生物农药;苜核·苏云菌悬浮剂;杀虫活性;绿色防控

中图分类号 S 476.13 文献标识码 A 文章编号 1000-2421(2021)05-0046-08

草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)是 2019 年首次由缅甸迁入我国的杂食性迁飞害虫,并迅速扩散至我国 26 个省市区的 1 518 个县,已严重威胁我国的粮食安全^[1]。迄今在草地贪夜蛾的防治策略中,控制草地贪夜蛾的暴发为害仍依靠于化学农药的大量使用。而化学农药的过度施用,极易造成害虫抗药性、再猖獗以及环境残留和污染等一系列严重的问题,严重制约了现代农业的可持续发展。因此,采用生物防治方法或生物农药替代化学农药来控制草地贪夜蛾越来越重要,并日益受到重视^[2-3]。

苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(*Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus, AcMNPV)是从苜蓿银纹夜蛾幼虫中分离出的 1 株多粒包裹的核型多角体病毒^[4],它能交叉感染甜菜夜蛾、小菜蛾、银纹夜蛾、斜纹夜蛾等 30 多种鳞翅目害虫^[5],

以 Bt 等多种杀虫剂和非靶标害虫病毒作为增效剂的混配剂型对许多夜蛾科害虫具有明显的增效作用,并进一步拓宽了杀虫谱,提高了杀虫效果^[6-7]。苜核·苏云菌悬浮剂是武汉武大绿洲生物技术有限公司研发的昆虫病毒新型生物农药,由苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒加入 Bt 高效病毒增效剂复配而成,具有良好的杀虫活性,已在蔬菜、果树、水稻等大面积应用^[8]。

本研究通过室内活性测定、田间试验等方法检测和评价苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒对草地贪夜蛾的杀虫活性和生防效果,以期苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒在玉米草地贪夜蛾的生物防治中得到广泛应用提供数据支撑,最终为苜核·苏云菌悬浮剂在防治草地贪夜蛾上的登记应用提供理论依据。

收稿日期:2021-02-22

基金项目:湖北省重点研发计划项目(2020BBA051);湖北省农业科技创新行动项目(NYKJ2019011)

吕亮,E-mail:lvlianghbaas@126.com

通信作者:张舒,E-mail:ricezs6410@163.com

1 材料与方法

1.1 供试病毒、生物药剂

供试病毒为苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcMNPV)。2019年5月20日于湖北省仙桃市玉米田采集草地贪夜蛾,在武汉武大绿洲生物技术有限公司于室内进行病毒感染筛选试验(其中苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒对草地贪夜蛾幼虫具有较高的感染活性),并用饲养的草地贪夜蛾幼虫进行增殖扩繁。将感染病毒的幼虫尸体加水研磨,经3层纱布过滤,滤液经600 r/min和3 000 r/min差速离心,显微计数为每mL含有 1.8×10^{10} 个病毒多角体(polyhedral inclusion body, PIB),即得较纯的多角体病毒母液(记浓度为 1.8×10^{10} PIB/mL),于低温保存备用。

供试生物药剂为苜核·苏云菌悬浮剂(1.0×10^7 PIB/mL)。由武汉武大绿洲生物技术有限公司研制,并由其子公司武汉楚强生物科技有限公司生产。

1.2 供试昆虫

供试昆虫为草地贪夜蛾,在湖北省通山县大畈镇板桥村夏季玉米地,于2019年7月20日采收草地贪夜蛾高龄幼虫,带回湖北省农业科学院植保土肥研究所实验室,采用新鲜嫩玉米叶于一次性塑料培养皿(直径8 cm,高3 cm)中单头饲养。草地贪夜蛾的室内饲养条件为:(25 ± 1) °C,相对湿度60%~70%,光周期为16L:8D。繁殖多代后留取新鲜并经消毒处理的卵块备用。

1.3 苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒对草地贪夜蛾幼虫的室内活性测定

本试验设计了 1.0×10^9 、 1.0×10^8 、 1.0×10^7 、 1.0×10^6 、 1.0×10^5 、 1.0×10^4 等6个浓度梯度。即先将配制的苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒母液倍数稀释成 1.0×10^9 PIB/mL,然后经多次10倍稀释得到其他不同浓度的稀释液。试验设空白对照处理,共计7个处理,每处理重复3次。

试验方法采用叶段喂毒法,即事先用病毒悬浮液喷雾处理新鲜玉米嫩叶段(长2 cm × 宽2 cm),接入幼虫进行饲喂,并用培养皿进行单头饲养,饲养条件为:温度(25 ± 1) °C,相对湿度60%~70%,光周期为16L:8D。待含毒玉米叶段被取食完后,立即补充新鲜无毒玉米叶段。每重复处理48头草地

贪夜蛾2龄幼虫。参考文献[9-11],综合考虑该病毒在夜蛾科昆虫细胞与寄主上增殖的变化,确定于接虫后7、10 d调查因病毒死亡虫数和总死亡虫数,统计死亡率并计算 LC_{50} 等数据。

1.4 1千万苜核·苏云菌悬浮剂对草地贪夜蛾幼虫的田间防效试验

田间药效试验在湖北省通山县闯王镇小源村夏季玉米地进行。该试验地块总共1 500 m²,土质类型为石灰性泥土,pH值为6.8,有机质含量13.9%,肥力中等偏上。常年种植玉米,种植玉米品种为西玉三号,2020年7月13日施45%复合肥750 kg/hm²做底肥并播种。该田块自2019年以来,草地贪夜蛾发生为害严重。

试验共设计1千万苜核·苏云菌悬浮剂(1 500 mL/hm²)、常用杀虫剂15%甲维·茚虫威悬浮剂(300 mL/hm²)以及空白对照3个处理。每处理重复4次,共计12个试验小区,每小区面积为100 m²。

于2020年8月26日(草地贪夜蛾低龄幼虫多发期)近傍晚时一次喷雾施药。使用乐帮手牌3WBJ-16DZ多功能背负式电动喷雾器,工作压力0.40~0.60 MPa,喷孔口径1 mm,流量60~85 L/h。施药当日为晴天,气温23~32 °C。于施药后第1、3、5、7、10、15天调查。调查时,每小区取10个随机样点,每点连续调查10株,共计100株,记录每株玉米上活虫数、死亡数、中毒情况及天敌数量。相关计算公式如下:

$$\text{虫口减退率} = \frac{(\text{施药前活虫数} - \text{施药后活虫数})}{\text{施药前活虫数}} \times 100\%$$

防治效果 =

$$\frac{(\text{处理区虫口减退率} - \text{空白对照区虫口减退率})}{(100 - \text{空白对照区虫口减退率})} \times 100\%$$

1.5 苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcMNPV)的分子鉴定

1) 供试病毒样本。事先选取室内活性测定时的苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒母液(记样品1)、生物制剂1千万苜核·苏云菌悬浮剂(记样品2)、田间药效试验后病毒感染虫尸(记样品3)、样品3中采集的虫尸感染的草地贪夜蛾第2代幼虫虫尸(记样品4)作为供试病毒样本,以验证1千万苜核·苏云菌悬浮剂中AcMNPV对草地贪夜蛾幼虫是否具有杀灭活性。

2) DNA提取。取AcMNPV试样1.0 mL,加入

99.0 mL 蒸馏水,充分振荡 1 min;取振荡后的混悬液 300 μ L,加入 100 μ L 碱裂解液,于 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min;再加入 200 μ L Tris $\cdot$ HCl 缓冲液,10 000 r/min 离心 8 min,取上清液于离心管中;加入 5 μ L 蛋白酶 K 和 60 μ L SDS,于 65 $^{\circ}$ C 水浴 2 h,取出冷却至室温;再加入 650 μ L Tris 饱和苯酚混匀,10 000 r/min 离心 5 min,取上清液于新离心管中;于转入上清液的离心管中加入 650 μ L 苯酚:氯仿(体积比 1:1)混合液,10 000 r/min 离心 5 min,再取上清液于新离心管中;于上清液中加入 650 μ L 氯仿:异戊醇混合液(体积比 24:1),10 000 r/min 离心 5 min,最后取上清液保存于新离心管中,并用分光光度计测定 DNA 浓度。

polh 上游引物:AGGGTTTTCCCAGTCACGCGGCTGAGGATCCTTT
polh 下游引物:GAGCGGATAACAATTTTCACACTGGTGCAAACCTCCTT
lef-8 上游引物:AGGGTTTTCCCAGTCACGCACGGCGAAATGAC
lef-8 下游引物:GAGCGGATAACAATTTTCACACATGTACGGATCTTCGGC
lef-9 上游引物:AGGGTTTTCCCAGTCACGAAAAACGGGTACGCGG
lef-9 下游引物:GAGCGGATAACAATTTTCACACTTGTCACCGTCGCAGTC

最后应用 DNAMAN 6.0 软件对所测到的 *polh*、*lef-8*、*lef-9* 序列进行比对。

1.6 数据分析与处理

试验数据应用 IBM SPSS 22.0 数据统计分析软件进行处理。
病毒杀虫活性测定试验中统计各浓度处理死活虫数,计算死亡率、校正死亡率并转换成概率值,各处理浓度转换成 lg 值,通过工作概率值及权重等计算得毒力回归方程(slope $\pm$ SE),求出 LC₅₀ 值及其 95% 的置信限,最后进行卡方(χ^2)检验;田间防效试验中,统计各处理活虫数,计算虫口减退率,用 Microsoft Excel 编辑公式求出防治效果,并采用 Duncan's 法进行分析,用单因素方差分析比较处理间差异显著性。

文中图表均采用 Microsoft Excel 软件进行

3)PCR 扩增。采用 T3 super mix 标准体系:试样 DNA 2 μ L,前后引物各 0.5 μ L,T3 super mix 18 μ L 和 ddH₂O 7 μ L。PCR 扩增条件为 95 $^{\circ}$ C,3 min 预变性后,进行以下循环:98 $^{\circ}$ C 15 s,52 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C 20 s,最后再 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min;循环 42 次。

4)DNA 琼脂糖凝胶电泳。取 PCR 扩增产物 2 μ L 及 5 kb DNA Marker 点样于琼脂糖凝胶中,180 V 电压下电泳 20 min。电泳结束后在凝胶成像系统中观察 PCR 产物。

凝胶成像系统中观察到分子质量大小正确的 PCR 产物,用 *polh*、*lef-8*、*lef-9* 基因 PCR 扩增引物对 PCR 产物进行 DNA 测序。各基因引物如下:

2 结果与分析

2.1 苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒对草地贪夜蛾幼虫的杀虫活性

室内活性测定的结果(表 1)显示,处理 7 d 后,苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒对草地贪夜蛾 2 龄幼虫的 LC₅₀ 为 4.1 $\times$ 10⁷ PIB/mL,LC₉₀ 为 1.05 $\times$ 10⁸ PIB/mL;而处理 10 d 后,苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒对 2 龄幼虫的 LC₅₀ 为 2.9 $\times$ 10⁷ PIB/mL,LC₉₀ 为 7.8 $\times$ 10⁷ PIB/mL。可见苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒处理草地贪夜蛾 2 龄幼虫 7 d 后的 LC₅₀、LC₉₀ 均高于 10 d 后的 LC₅₀ 和 LC₉₀,即 7 d 时苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒对草地贪夜蛾幼虫表现出较好的杀虫活性。

表 1 苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒对草地贪夜蛾 2 龄幼虫的生物测定

Table 1 Bio-activity of AcMNPV acts on the 2nd instar larvae of *Spodoptera frugiperda* (Means $\pm$ SE)

处理时间/d Treatment time	毒力回归方程 Slope $\pm$ SE	LC ₅₀ /(PIB/mL) (95% CL)	LC ₉₀ /(PIB/mL) (95% CL)	卡方值 χ^2
7	3.135 $\pm$ 0.350	4.1 $\times$ 10 ⁷ (3.1 $\times$ 10 ⁷ ~5.9 $\times$ 10 ⁷)	1.05 $\times$ 10 ⁸ (7.0 $\times$ 10 ⁷ ~1.90 $\times$ 10 ⁸)	18.340
10	2.932 $\pm$ 0.371	2.9 $\times$ 10 ⁷ (2.1 $\times$ 10 ⁷ ~4.5 $\times$ 10 ⁷)	7.8 $\times$ 10 ⁷ (4.9 $\times$ 10 ⁷ ~1.83 $\times$ 10 ⁸)	22.283

2.2 苜核·苏云菌对草地贪夜蛾幼虫的田间防治效果

田间药效试验结果显示,1 千万苜核·苏云菌 SC(1 500 mL/hm²)对草地贪夜蛾幼虫起作用效果比较慢。在喷施用药后第 1、3、5 天的平均防效分别为 11.57%、16.23%、15.56%,用药后第 7 天的平均防效也只有 21.88%,但用药后第 10 天的虫口防效突然上升到 68.99%,且用药后第 15 天的平均防效亦有 66.87%。而对照化学药剂 15%甲维·茚虫威 SC(300 mL/hm²)对草地贪夜蛾幼虫有很好的杀灭效果,能迅速降低虫口数量,用药后第 1、3、5、7 天的平均防效分别为 91.39%、92.66%、90.71% 和 87.19%,但其药后第 10 天的平均防效开始下降,仅

为 67.63%,且药后第 15 天的平均防效已下降至 51.60%。详见表 2。

同时我们也发现,空白对照区的虫口减退率在处理后第 1、3、5 天均为负数,即说明虫口数量在增长,而在处理后第 7 天开始变为正数(虫口开始下降),其第 10 天和第 15 天的平均虫口减退率分别达到 38.25%、47.00%,极有可能与第 10~15 天后草地贪夜蛾的幼虫有部分开始入土化蛹以及世代重叠等原因有关。

综上所述,供试药剂 1 千万苜核·苏云菌 SC (1 500 mL/hm²)对草地贪夜蛾是有一定的防治效果的,但起作用较慢,发挥药效约在第 10~15 天。

表 2 1 千万苜核·苏云菌悬浮剂对草地贪夜蛾幼虫的田间试验结果

Table 2 Control effect of the compounds of 10 ⁷ PIB/mL AcMNPV + Bt suspension against the larvae of <i>Spodoptera frugiperda</i> %				
处理 Treatment		1 千万苜核·苏云菌 SC 10 ⁷ PIB/mL AcMNPV+ Bt Suspension (1 500 mL/hm ²)	15%甲维·茚虫威 SC Emamectin Benzoate+ Indoxair Conditioningarb 15% Suspension (300 mL/hm ²)	空白对照 Control
药后 1 d One day after treatment	虫口减退率 Decrease rate of insect	1.35±1.02	91.39±2.71	-11.56±1.60
	防效 Control effect	11.57±3.68B	92.28±3.52A	
药后 3 d 3 days after treatment	虫口减退率 Decrease rate of insect	8.85±2.14	92.66±4.65	-8.81±3.35
	防效 Control effect	16.23±3.80B	93.25±4.91A	
药后 5 d 5 days after treatment	虫口减退率 Decrease rate of insect	9.57±3.31	90.05±4.60	-7.10±2.57
	防效 Control effect	15.56±4.42B	90.71±4.55A	
药后 7 d 7 days after treatment	虫口减退率 Decrease rate of insect	32.98±5.69	89.01±6.34	14.21±3.61
	防效 Control effect	21.88±6.17B	87.19±7.25A	
药后 10 d 10 days after treatment	虫口减退率 Decrease rate of insect	80.85±3.79	80.01±4.31	38.25±4.37
	防效 Control effect	68.99±4.34Aa	67.63±5.48Aa	
药后 15 d 15 days after treatment	虫口减退率 Decrease rate of insect	82.44±4.12	74.35±5.07	47.00±3.81
	防效 Control effect	66.87±5.44Aa	51.60±5.73Ab	

注:此表中数据为平均值±标准误。同行中数据后的不同大写字母表示处理间差异达极显著水平(单因素方差分析, $P<0.01$),小写字母表示处理间差异达显著水平(单因素方差分析, $P<0.05$)。Note:Data in this table are mean±SE. The different block letters in the same line mean extremely significantly different (by one-way ANOVA, $P<0.01$),and those different lowercase letters mean significantly different (by one-way ANOVA, $P<0.05$) between the treatments.

2.3 苜核·苏云菌对天敌的影响

田间试验时,同时调查了 1 千万苜核·苏云菌悬浮剂对玉米上害虫天敌(蜘蛛、瓢虫、隐翅虫等)的影响,结果显示,1 千万苜核·苏云菌悬浮剂对蜘蛛、瓢虫和隐翅虫等天敌未见有明显的伤害作用,平均百株有各类天敌 13.4 头,而对照化学农药 15%甲

维·茚虫威悬浮剂药后对蜘蛛、瓢虫和隐翅虫等天敌则有明显的毒杀作用,其药后第 1 天调查时,平均百株玉米上仅为 3.1 头,药后第 3 天调查每百株玉米上亦只有各类天敌 5.2 头(图 1)。可见 1 千万苜核·苏云菌悬浮剂对害虫天敌有较好的保护作用,而 15%甲维·茚虫威悬浮剂对天敌的伤害相对较大。

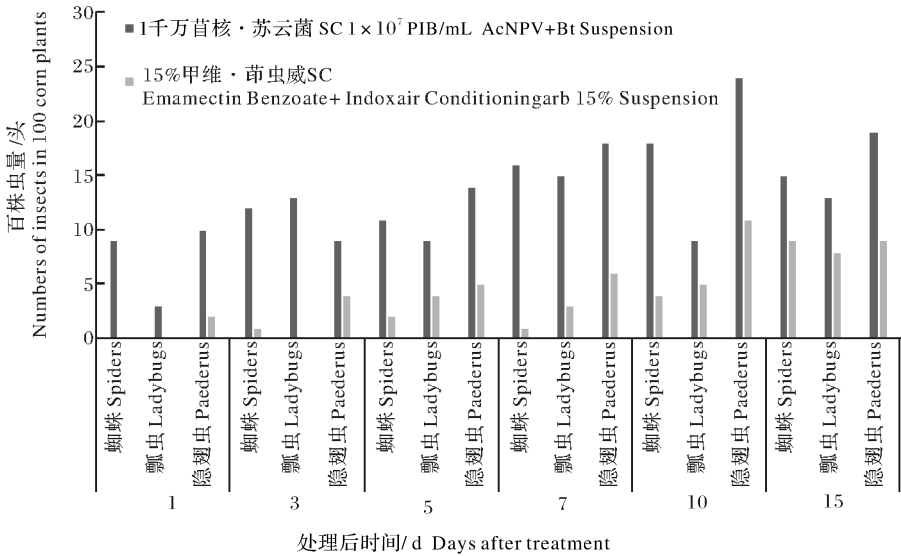
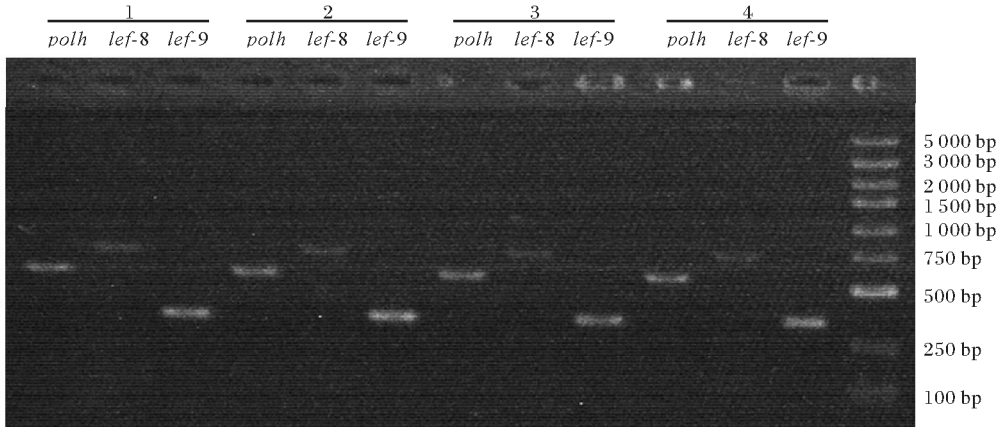


图 1 1 千万苜核苏云菌 SC、15% 甲维茚虫威 SC 对天敌的影响
Fig.1 The effect of 10^7 PIB/mL AcMNPV + Bt Suspension and Emamectin Benzoate+Indoxair Conditioningarb 15% Suspension on nature enemies of *Spodoptera frugiperda*

2.4 苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒的分子鉴定 正确, *polh*、*lef-8*、*lef-9* 基因 PCR 产物的大小分
不同供试病毒样品的 PCR 扩增结果显示,样品 别为 0.540、0.716 和 0.290 kb (图 2),即可证明 Ac-
1、2、3、4 的 *polh*、*lef-8*、*lef-9* 扩增片段大小一致且 MNPV 对草地贪夜蛾幼虫有杀虫活性。



1:样品 1 Sample 1; 2:样品 2 Sample 2; 3:样品 3 Sample 3; 4:样品 4 Sample 4; M:DL 5 000 标准 DL 5 000 marker.

图 2 AcMNPV 不同试验样品的 PCR 扩增结果
Fig.2 PCR amplification results of different AcMNPV test samples

应用 DNAMAN 6.0 软件对样品 1、2、3、4 中的 *polh*、*lef-8*、*lef-9* 扩增片段进行序列比对,结果(图 3)表明,样品 1、2、3、4 的 *polh*、*lef-8*、*lef-9* 扩增序列间相似度均为 100%,说明样品 1、2、3、4 均来自于同一种病毒 AcMNPV。

3 讨 论

苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcMNPV)是一种昆虫杆状病毒,害虫通过取食感染病毒后,病毒

会在昆虫体内增殖扩繁,会陆续感染全身,最终导致死亡。本研究结果表明,苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒对草地贪夜蛾幼虫有较好的生物活性,其第 7 天和第 10 天的 LC_{50} 分别 4.1×10^7 、 2.9×10^7 PIB/mL,且在田间表现出较好的防治效果,其混配的 1 千万苜核·苏云菌悬浮剂($1\ 500\ \text{mL/hm}^2$)药后第 10 天、15 天的平均防效较好,分别达到 68.99%和 66.87%,且对天敌安全。因此应加快研发速度,以便 AcMNPV 在草地贪夜蛾的生物防治

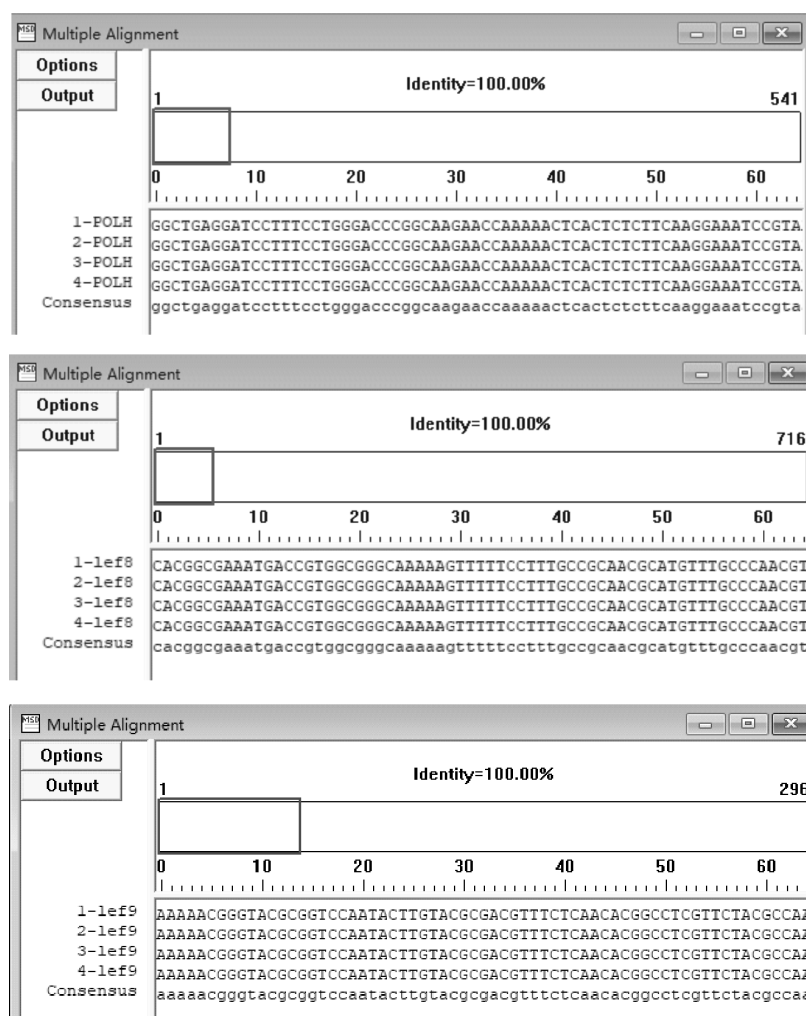


图3 应用 DNAMAN 6.0 软件对 *polh*、*lef-8*、*lef-9* 基因进行序列比对结果

Fig.3 Results of sequence alignment of *polh*, *lef-8* and *lef-9* genes were analyzed by DNAMAN 6.0 software

中发挥更大的作用。武汉楚强生物科技有限公司生产的1千万苜蓿·苏云菌悬浮剂是由AcMNPV与生物农药苏云金杆菌(Bt)复配而成的,可以显著提高病毒的杀虫活性。因为Bt是一种广谱性杀虫剂,具有较好的微生物杀虫活性,当AcMNPV与Bt复配后,其毒力比单一型制剂应该有明显提高,不仅扩大了Bt的杀虫范围,而且提高了其毒力,达到一种制剂防治多种害虫的目的^[12],这也是1千万苜蓿·苏云菌悬浮剂在蔬菜、果树和水稻上能够大面积推广的原因所在。因此,1千万苜蓿·苏云菌悬浮剂应可作为草地贪夜蛾绿色防控的防治药剂在玉米上推广。

进行田间药效试验时,在空白对照区虫口减退很快的情况下(第15天的虫口减退率达到47.00%),1千万苜蓿·苏云菌悬浮剂(1500 mL/hm²)在药后第15天的平均防效达到66.87%,呈快速上升态势,

而化学农药15%甲维·茚虫威SC(300 mL/hm²)药后第15天的平均防效却下降至51.60%。虽然从“一升一降”中可看出供试药剂1千万苜蓿·苏云菌悬浮剂(1500 mL/hm²)对草地贪夜蛾在第10~15天时具有一定的防治效果,但考虑到生物农药起效慢以及草地贪夜蛾幼虫历期短、世代重叠等原因,建议在进行生物农药(特别是病毒制剂)田间药效试验时应酌情增加调查次数,延长调查时间,可能会取得更理想的试验结果。这一点也是本研究的不足之处。总之,化学药剂与生物药剂相比,杀灭害虫效果相对较高,起效快,应当作为害虫暴发时的一种应急防治措施。而对于害虫发生相对较轻时,生物农药可代替化学农药作为绿色防控技术措施之一,从而减轻环境污染,达到保护农业生态的效果。

另外,本研究使用的*polh*(polyhedrin)基因是一类多角体蛋白启动子,和*p10*是杆状病毒表达

载体系统(BEVS)中最常用启动子,均在病毒感染晚期大量表达^[13]。但 *p10* 启动子的活性次于 *polh* 启动子,因此, *polh* 启动子常被用于外源蛋白的表达。而基因 *lef-8* 能编码病毒自身 RNA 聚合酶的最大亚基,是一类晚期表达因子^[14]。 *lef-9* 是在杆状病毒中与 *lef-4*、*lef-8* 和 *p47* 一起共同编码蛋白联合体亚基的一类晚期表达因子,研究发现,缺失 *lef-9* 基因病毒是不能生成具有感染活性的病毒粒子的,而补回 *lef-9* 基因病毒则可恢复病毒的感染活性,因此, *lef-9* 基因是杆状病毒形成具有感染活性 BV(budded virus)的必需基因^[15]。可见, *lef-8* 和 *lef-9* 基因在不同种类的核型多角体病毒中具有较高的保守性,故而 *lef-8* 和 *lef-9* 基因可作为鉴定病毒种类的依据。因此,本研究以 *polh*、*lef-8* 和 *lef-9* 为检测对象,通过基因序列比对,同源性均达到 100%,以分子快速检测方式再次验证了 AcMN-PV 对草地贪夜蛾具有较好的杀虫活性,适合在草地贪夜蛾防控中进一步推广应用。

草地贪夜蛾自 2019 年入侵我国,已成为玉米重要害虫,并在华南、西南部分地区形成定殖种群,给我国玉米产业造成巨大损失,严重威胁着我国的粮食安全^[16]。面对当前草地贪夜蛾国内严峻的防控形势,加快筛选和研发草地贪夜蛾防控的高效药剂是当务之急^[17]。虽然病毒杀虫剂由于其作用速度慢、杀虫谱窄等问题影响了其广泛应用,但在日益重视生态、环境保护的背景下,杆状病毒杀虫剂由于其相对传统农药的显著优势,在农业生产上定会得到越来越广泛的应用。而由于昆虫病毒制剂极易受高温、阳光、雨淋、害虫虫龄等外界条件影响^[18],故建议选择在害虫低龄幼虫发生高峰期施药,最好选择在晴天 16:00—17:00 使用,避开高温和光照等不利环境条件的影响,以使病毒制剂能更好地发挥作用,提高对害虫的防治效果。

参考文献 References

- [1] 姜玉英,刘杰,谢茂昌,等.2019 年我国草地贪夜蛾扩散为害规律观测[J].植物保护,2019,45(6):10-19. JIANG Y Y, LIU J, XIE M C, et al. Observation on law of diffusion damage of *Spodoptera frugiperda* in China in 2019 [J]. Plant protection, 2019, 45(6):10-19(in Chinese with English abstract).
- [2] ANDRADE R, RODRIGUEZ C, OEHLISCHLAGER A C. Optimization of a pheromone lure for *Spodoptera frugiperda* (Smith) in Central America[J]. Journal of the Brazilian chemical society, 2000, 11(6):609-613.
- [3] 刘华梅,胡斌,王应龙,等.对草地贪夜蛾高毒力的苏云金杆菌菌株筛选[J].中国生物防治学报,2019,35(5):721-728. LIU H M, HU X, WANG Y L, et al. Screening for *Bacillus thuringiensis* strains with high toxicity against *Spodoptera frugiperda* [J]. Chinese journal of biological control, 2019, 35(5):721-728(in Chinese with English abstract).
- [4] VAIL P V, SUTTER G, JAY D L, et al. Reciprocal infectivity of nuclear polyhedrosis viruses of the cabbage looper and alfalfa looper[J]. Journal of invertebrate pathology, 1971, 17(3):383-388.
- [5] 郭慧芳,韩召军,方继朝,等.虫酰肼对苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒的增效作用[J].植物保护学报,2005,32(4):411-415. GUO H F, HAN Z J, FANG J C, et al. Synergistic effect of tebufenozide combined with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus against *Spodoptera exigua* [J]. Journal of plant protection, 2005, 32(4):411-415(in Chinese with English abstract).
- [6] 喻子牛.微生物农药及其产业化[M].北京:科学出版社,2000. YU Z N. Microbial pesticide and its industrialization [M]. Beijing: Science Press, 2000(in Chinese).
- [7] 万成松,孙修炼,张光裕.棉铃虫核型多角体病毒与化学杀虫剂和卵磷脂混用的增效作用[J].昆虫学报,2000,43(4):346-355. WAN C S, SUN X L, ZHANG G Y. Synergism of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus in combinations with chemical insecticides and lecithin [J]. Acta entomologica sinica, 2000, 43(4):346-355(in Chinese with English abstract).
- [8] 刘方义,闵跃中,苜蓿·苏云菌 SC 防治水薹菜鳞翅目害虫田间药效试验[J].江西植保,2010,33(1):23-24. LIU F Y, MIN Y Z. Field efficacy of AcNPV + Bt SC to lepidopterans of water spinach [J]. Jiangxi plant protection, 2010, 33(1):23-24(in Chinese).
- [9] 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. GUO H F, FANG J C, HAN Z J. Advances in insect virus synergists [J]. Acta entomologica sinica, 2003, 46(6):766-772(in Chinese with English abstract).
- [10] GOTO C. Enhancement of a nuclear polyhedrosis virus (NPV) infection by a granulosis virus (GV) isolated from the spotted cutworm, *Xestia c-nigrum* L.: Lepidoptera: Noctuidae [J]. Applied entomology and zoology, 1990, 25(1):135-137.
- [11] SHAPIRO M, ARGAUER R. Relative effectiveness of selected stilbene optical brighteners as enhancers of the beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus [J]. Journal of economic entomology, 2001, 94(2):339-343.
- [12] 侯建文,赵焯烽,姚国强,等.复配型苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒制剂对两种夜蛾的毒力测定[J].中国病毒学,1998,13(4):345-350. HOU J W, ZHAO Y F, YAO G Q, et al. Bioassay of the multiple *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) pesticides [J]. Virologica sinica, 1998, 13(4):345-350(in Chinese with English abstract).
- [13] 曹翠平,兰丽盼,姚慧鹏,等.家蚕 *polh*⁺ bac-to-bac 杆状病毒表达系统的构建[J].蚕业科学,2008,34(2):237-243. CAO C P, LAN L P, YAO H P, et al. Construction of a BmNPV polyhedrin-plus BAC-to-BAC system for the silkworm, *Bombyx*

- mori*[J]. Science of sericulture, 2008, 34(2): 237-243 (in Chinese with English abstract).
- [14] 罗辑, 周国英, 朱积余. 油桐尺蛾核型多角体病毒 *lef-8* 基因结构及系统进化分析[J]. 林业科学研究, 2015, 28(2): 230-235. LUO J, ZHOU G Y, ZHU J Y. The structural and phylogenetic analysis of late expression factor 8 (*lef-8*) gene in *Buzura suppressaria* nuclear polyhedrosis virus[J]. Forest research, 2015, 28(2): 230-235 (in Chinese with English abstract).
- [15] 石扬辉. 家蚕杆状病毒晚期表达因子 LEF-9 的功能研究[D]. 杭州: 浙江理工大学, 2014. SHI Y H. Functional studies on *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus late expression factor LEF-9 [D]. Hangzhou: Zhejiang Sci-Tech University, 2014 (in Chinese with English abstract).
- [16] 杨普云, 朱晓明, 郭井非, 等. 我国草地贪夜蛾的防控对策与建议[J]. 植物保护, 2019, 45(4): 1-6. YANG P Y, ZHU X M, GUO J F, et al. Strategy and advice for managing the fall armyworm in China [J]. Plant protection, 2019, 45(4): 1-6 (in Chinese with English abstract).
- [17] 崔丽, 芮昌辉, 李永平, 等. 国外草地贪夜蛾化学防治技术的研究与应用[J]. 植物保护, 2019, 45(4): 7-13. CUI L, RUI C H, LI Y P, et al. Research and application of chemical control technology against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in foreign countries[J]. Plant protection, 2019, 45(4): 7-13 (in Chinese with English abstract).
- [18] 单绪南, 杨普云. 核型多角体病毒的杀虫作用及其田间应用方法[J]. 中国植保导刊, 2009, 29(11): 39-42. SHAN X N, YANG P Y. The insecticidal functions of NPV and its field application methods [J]. China plant protection, 2009, 29(11): 39-42 (in Chinese).

Insecticidal activity and bio-control effect of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus on larvae of *Spodoptera frugiperda*

LÜ Liang¹, CHEN Jiao², GUO Zhiming³, LÜ Wei², TAO Peiwen², LÜ Huihong²,
PAN Zhequn², CHANG Xiangqian¹, WAN Peng¹, ZHANG Shu¹

1. Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Central China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Institute for Plant Protection and Soil Fertilizer, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China;

2. Wuhan Unioasis Biological Technology Co. Ltd, Wuhan 430072, China;

3. College of Plant Science and Technology, Huzhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, is one of the most important pests on maize, which invaded into China newly. In order to determine the control effect of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) on larvae of *S. frugiperda*, the insecticidal activity and biocontrol effect of AcMNPV on *S. frugiperda* were studied and analyzed by the methods of bioassay and field efficacy test. The results showed that the median lethal concentration (LC_{50}) of AcMNPV acting on the 2nd instar larvae of *S. frugiperda* was 2.9×10^7 PIB/mL. The average control efficacy of 10^7 PIB/mL AcMNPV + Bt Suspension ($1\ 500$ mL/hm²) on *S. frugiperda* was 68.99% on the 10th day and 66.87% on the 15th day after administration. Finally, DNAMAN 6.0 software was used to identify the DNA homology of the dead insects, and the results showed that the *polh*, *lef-8* and *lef-9* gene sequences of the dead insect and the *S. frugiperda* were 100% identical. All the above results could further verify that AcMNPV may play a key role on controlling *S. frugiperda*. It is suggested that 10^7 PIB/mL AcMNPV + Bt Suspension ($1\ 500$ mL/hm²) should be applied at the peak of the occurrence of the young larvae of *S. frugiperda*, and 4:00-5:00 pm on sunny day to avoid the influence of high temperature and light, so that the virus preparation can play a better role and improve its control effect on *S. frugiperda*.

Keywords AcMNPV; *Spodoptera frugiperda*; Lepidopteran pest; larval; bio-pesticide; AcMNPV + Bt Suspension; insecticidal activity; green prevention and control

(责任编辑:边书京)