维普资讯 http://www.cqvip.com

第13卷第4期 中国病毒学 Vol.13 No.4
1998年12月 VIROLOGICA SINICA Dec. 1998

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*

侯建文 赵烨烽 姚国强 蒋伟民 杨文勤

(南京农业专科学校,南京 210038)

摘 要 对防治蔬菜甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua* Hübner)和斜纹夜蛾(*Prodenia litura* Fabricius)为主并兼治菜螟、菜青虫、小菜蛾等鳞翅目害虫的单一型和复配型苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(*Autographa californica* nuclear polyhedrosis Virus, AcMNPV)生物杀虫剂进行筛选。毒力测定结果表明:选用单剂的 AcMNPV A 株(从甜菜夜蛾虫体增殖获得)的毒力(LD_{50} = 131.8 PIB/头)比 AcMNPV B 株(从草地贪夜蛾细胞株 Sf_9 中获得)的毒力(LD_{50} = 1949.4 PIB/头)高 14.79 倍。AcMNPV A 株加苏云金杆菌(Bt)加斜纹夜蛾核型多角体病毒(PlNPV)形成的复配型 AcMNPV A 株制剂对甜菜夜蛾二龄幼虫的 LD_{50} 值(21.82～21.4 PIB/头)与单剂 AcMNPV A 株的 LD_{50} 值(168.84～204.36 PIB/头)比值为 9.5～7.7 倍。同样复配型 AcMNPV A 株制剂对斜纹夜蛾二龄幼虫 LD_{50}(3.16～15.46 PIB/头)与单剂 PlNPV LD_{50} 值(16.02～53.53 PIB/头)比值为 5.1～3.5 倍。说明以 Bt 和非靶标害虫病毒作为增效剂的复配型 AcMNPV A 株制剂对两种夜蛾害虫有明显增效作用。以复配型 AcMNPV A 株制剂形成的蔬菜复合病毒杀虫剂(SNB-3)防治蔬菜重要鳞翅目五种抗性害虫取得良好效果。

关键词 苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒,苏云金杆菌,斜纹夜蛾核型多角体病毒,甜菜夜蛾,斜纹夜蛾,毒力测定

六十年代后期,Vail 等[1]自美国加利福尼亚洲一头苜蓿银纹夜蛾幼虫中分离出一株多粒包埋的核型多角体病毒(*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, AcMNPV),因它能交错感染 30 多种鳞翅目害虫而受到重视[2,3]。自我国引进 AcMNPV 后,期望对多种难以防治的害虫能有较好的毒杀作用[4,5]。作者以二龄甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)和斜纹夜蛾(*Prodenia litura*)为靶虫,将从甜菜夜蛾虫体培养获得的 AcMNPV A 株、斜纹夜蛾核型多角体病毒(*Prodenia litura* nuclear polyhedrosis virus, PlNPV)、苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)复配,并进行杀虫毒力增效作用的研究,以期选出能在蔬菜害虫防治中发挥主导作用的复配型生物农药,促进城市无公害蔬菜的发展。

材料和方法

1 供试病毒、Bt 株

1.1 AcMNPV A 株 由中国科学院武汉病毒研究所经甜菜夜蛾幼虫感染死亡后获得的纯化病毒悬浮液,含 3.6×10^7 PIB/mL,大量测定用病毒悬液为本室用人工饲料繁殖的甜菜夜蛾虫体增殖所获 AcMNPV A 株,含

收稿日期:1998-01-15,修回日期:1998-04-21
* 本研究获南京市科学技术委员会 96(208)项目资助

维普资讯 http://www.cqvip.com

$3.6 \cdot 10^9$ PIB/mL。

1.2 AcMNPV B株 由武汉大学病毒研究所经草地贪夜蛾细胞株(S9)繁殖50代左右的细胞培养而收集的纯化病毒悬浮液，含1.5×10^7PIB/mL。

1.3 PINPV 是中国科学院武汉病毒研究所提供的毒种，由本室感染斜纹夜蛾幼虫，收集虫尸，纯化病毒而配制成悬浮液含1.6×10^9 PIB/mL。

1.4 BtHD-1菌株 由中国科学院武汉病毒所提供，由本室摇瓶培养收集的细菌悬浮液，含芽孢数6×10^7个/mL。

2 供试幼虫及饲养

2.1 供试幼虫 为室内人工饲料饲养的F3代～F10代甜菜夜蛾二龄幼虫和F3代斜纹夜蛾二龄幼虫。

2.2 人工饲料 由作者自行研制的对多种蔬菜鳞翅目害虫均可饲养的通用人工饲料，及从田间取回新鲜包菜叶的自然饲料。

2.3 卵至二龄初孵幼虫 用3 cm直径的平底试管群集饲养，二龄受试幼虫用8 mm直径玻管单管饲养，管口用普通棉花塞，经干热灭菌。

3 AcMNPV A株和B株对二龄甜菜夜蛾幼虫的毒力测定

由于AcMNPV的毒力在替代的夜蛾科昆虫细胞和寄主增殖后毒力会发生变化[6]，因此筛选复配型AcMNPV中的AcMNPV单剂的毒株显得十分必要。

将供试AcMNPV A株、B株悬浮液用PBS分别稀释配制成$1.5 \times 10^3 \sim 10^7$ PIB/mL五种浓度，用微量进样器按每园片2 μL滴加人工饲料上，每处理40头二龄甜菜夜蛾幼虫，单管饲养，另用PBS作对照处理，置27℃±1℃、RH80%养虫室内饲养。因饥饿处理的幼虫，大多将园片取食尽后每12～24 h检查死、活虫数并记录，6 d后停止检查。

4 复配型AcMNPV A株制剂对二龄甜菜夜蛾幼虫的毒力测定

AcMNPV A株加Bt加PINPV复配型制剂和AcMNPV A株加Bt复配型制剂进行毒力测定，同时与AcMNPV A株单剂毒力作比较测定，并用人工饲料法及园菜叶片法两种方法重复测定。

4.1 园菜叶片法

4.1.1 AcMNPV A株单剂毒力测定

用PBS将AcMNPV A株悬液稀释配制成$2.42 \times 10^3 \sim 10^7$ PIB/mL五种浓度，用进口20 μL进样器按每园片3 μL滴加于园菜叶片上，每处理50头二龄甜菜夜蛾幼虫，其它方法同3，4 d后停止检查。

4.1.2 复配型AcMNPV A株制剂毒力测定

AcMNPV A株+Bt复配型悬液采用2.4×10^7 PIB/mL与7×10^6芽孢/mL浓度1:1配比，再依次稀释成五种浓度，AcMNPV A株+Bt+PINPV复配型悬液，采用以上两种浓度及PINPV 2.05×10^7 PIB/mL浓度，以1:1:1配比，再依次稀释成五种浓度，其它方法同4.1.1。

4.2 人工饲料法

4.2.1 AcMNPV A株单剂毒力测定

用PBS将AcMNPV A株悬液稀释成$1.6 \times 10^3 \sim 10^7$ PIB/mL五种浓度，每处理28头二龄甜菜夜蛾幼虫，其它方法同4.1.1。

4.2.2 复配型AcMNPV A株制剂毒力测定

AcMNPV 1.6×10^7 PIB/mL悬液与Bt 7×10^6芽孢/mL悬液1:1配比，再依次稀释成五种浓度，其它方法同3；AcMNPV A株+Bt+PINPV复配型悬液采用以上两种浓度及PINPV 1.6×10^7 PIB/mL浓度，以1:1:1配比，再依次稀释成五种浓度，其它方法同4.1.1。

5 复配型AcMNPV A株制剂对二龄斜纹夜蛾幼虫的毒力测定

将AcMNPV A株+Bt+PINPV复配型制剂进行毒力测定的同时，和PINPV+Bt复配型制剂及PINPV单剂毒力作比较测定，并用人工饲料法及园菜叶片法两种方法重复测定。

维普资讯 http://www.cqvip.com

5.1　PlNPV单剂毒力测定

用PBS将PlNPV株悬液稀释成$1.6\times10^3\sim10^7$ PIB/mL五种浓度,每处理28头二龄斜纹夜蛾幼虫,其它方法同3,8 d后停止检查。

5.2　复配型PlNPV制剂毒力测定

PlNPV+Bt复配型悬液采用1.6×10^7 PIB/mL与7×10^6芽孢/mL浓度的1:1配比,再依次稀释成五种浓度。其它方法同5.1。

5.3　复配型AcMNPV A株制剂毒力测定

AcMNPV A株+PlNPV+Bt复配型悬液采用方法5.2的两种浓度及AcMNPV 2.4×10^7 PIB/mL浓度,以1:1:1配比,再依次稀释成五种浓度。其它方法同5.1。

6　增效作用的测定

6.1　计算公式

按孙云沛[7]法,单一型病毒制剂为a制剂,当复配型b制剂的混合为无毒增效剂时,其增效比值(S_R)可用以下公式:

$$增效比值(S_R)=\frac{a制剂的\ LD_{50}}{(a+b)制剂混合的\ LD_{50}}$$

6.2　b制剂无毒性的证实

Bt单剂及两种非靶病毒单剂对两种夜蛾的毒性很低[8,9],可作为无毒增效性看待。本研究为进一步证实其无毒性,在进行复配型AcMNPV A株制剂对两种夜蛾毒力测定的同时,又进行Bt单剂及非靶病毒单剂对两种夜蛾的感染试验。将a+b复配制剂中Bt单剂的最高浓度(6×10^7芽孢/mL)分别感染甜菜夜蛾、斜纹夜蛾,校正死亡率分别为15.3%和18.1%(6 d的结果)。说明Bt单剂在相同条件下无法测定LD_{50}值,因此可作为无毒增效剂看待。

同样将a+b复配制剂中b单剂——非靶标病毒单剂的最高浓度(AcMNPV A株1.6×10^7 PIB/mL或PlNPV 2.4×10^7 PIB/mL)分别感染斜纹夜蛾及甜菜夜蛾,校正死亡率分别为11.4%和13.4%(6 d的结果),说明相同条件下非靶标病毒单剂无法测定LD_{50},可作为无毒增效剂看待。

7　数据处理及生物统计

统计各处理死活虫数,计算死亡率,校正死亡率并转换成机率值,各处理浓度转换成lg值,用函数计算器计算出a、b值,得临时回归方程,通过工作机率值及权重等计算得毒力回归方程,求出LD_{50}值及其95%的置信限,最后进行卡方(X^2)检验。

结　果

1　AcMNPV A株和B株对甜菜夜蛾的毒力

AcMNPV A株和B株对二龄甜菜夜蛾的LD_{50}值及其95%置信限、毒力回归方程式如下:

A株　$LD_{50}=131.8$ PIB/头　(66.7～259.2 PIB/头)　$y=3.5257+0.6955x$

B株　$LD_{50}=1949.4$ PIB/头　(1092.53～3478.3 PIB/头)　$y=2.4648+0.7706x$

2　复配型AcMNPV A株制剂对甜菜夜蛾的毒力

AcMNPV A株,AcMNPV A株+Bt,AcMNPV A株+Bt+PlNPV(复配型AcMNPV A株制剂)对二龄甜菜夜蛾幼虫的LD_{50}值及其95%的置信限,回归方程见表1。

3　复配型AcMNPV A株制剂对斜纹夜蛾的毒力

PlNPV、PlNPV+Bt、PlNPV+Bt+AcMNPV A株(复配型AcMNPV A株制剂)对二龄斜纹夜蛾的LD_{50}值及其95%置信限和回归方程式如表2。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 复配型 AcMNPV A 株制剂对甜菜夜蛾的毒力

Table 1 Toxicity of AcMNPV A strain of the multiple type on *Spodoptera exigua*

处 理 Treatment	LD_{50} (PIB/larva)	y = a + bx
AcMNPV A strain ($7.8\times10^{3}\sim10^{4}$ PIB/larva)*	240.36(85.86～486.4)	y = 2.6270 + 1.0271x
AcMNPV A strain + Bt ($3.6\times10^{3}\sim10^{4}$PIB/larva)*	128.93(54.69～303.88)	y = 4.0183 + 0.4652x
AcMNPV A strain + Bt + PLNPV Preparation of AcMNPV A of the multiple type ($2.4\times10^{3}\sim10^{4}$ PIB/larva)*	21.47(5.56～82.89)	y = 4.6292 + 0.2784x
AcMNPV A strain ($3.2\times10^{3}\sim10^{4}$ PIB/larva)**	168.84(76.93～370.60)	y = 3.2982 + 0.7640x
AcMNPV A strain + Bt ($1.6\times10^{3}\sim10^{4}$ PIB/larva)**	1.43(0.21～9.61)	y = 4.9576 + 0.2716x
AcMNPV + Bt + PlNPV Preparation of AcMNPV A of the multiple type ($1.07\times10^{3}\sim10^{4}$ PIB/larva)**	21.82(3.99～110.30)	y = 4.6089 + 0.2921x

表2 复配型 AcMNPV A 株制剂对斜纹夜蛾的毒力

Table 2 Toxicity of AcMNPV A strain of the multiple type on *Prodenia litura*

处 理 Treatment	LD_{50} (PIB/larva)	y = a + bx
PlNPV ($3.2\times10^{3}\sim10^{4}$ PIB/larva)*	16.018(6.25～41.36)	y = 4.4448 + 0.4609x
PlNPV + Bt ($1.6\times10^{3}\sim10^{4}$ PIB/larva)*	2.900(1.07～7.88)	y = 4.8303 + 0.3670x
AcMNPV + PlNPV + Bt Preparation of AcMNPV A of the multiple type ($1.07\times10^{3}\sim10^{4}$ PIB/larva)*	3.156(1.08～9.22)	y = 4.8063 + 0.3881x
PlNPV ($3.2\times10^{3}\sim10^{4}$ PIB/larva)**	53.530(23.87～120.01)	y = 4.2354 + 0.4423x
PlNPV + Bt ($1.6\times10^{3}\sim10^{4}$ PIB/larva)**	7.760(2.00～30.09)	y = 4.7579 + 0.2699x
AcMNPV + PlNPV + Bt Preparation of AcMNPV A of the multiple type ($1.07\times10^{3}\sim10^{4}$ PIB/larva)**	15.460(6.36～37.58)	y = 4.4928 + 0.4269x

* 园菜叶片法 ** 人工饲料法

4 增效作用

以甜菜夜蛾为测试对象，复配型 AcMNPV A 株制剂及 AcMNPV A 株 + Bt 制剂对单剂 AcMNPV A 株的毒力增效作用和以斜纹夜蛾为测试对象，复配型 AcMNPV A 株制剂及 PlNPV + Bt 对单剂 PlNPV 的毒力增效作用见表3。

表3 复配型 AcMNPV A 株制剂对甜菜夜蛾和斜纹夜蛾的毒力增效作用

Table 3 Synergistic action of the multiple type AcMNPV A strain preparation on *Spodoptera exigua* and *Prodenia litura*

混合制剂 Mixed preparation (a+b)	单 剂 Single (a)	虫 种 Insect	增效比值 Synergistic ratio (S_R)	
AcMNPV + Bt(1:1)	AcMNPV	甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*	1.5*	118.0**
AcMNPV + PlNPV + Bt(1:1:1)	AcMNPV	甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*	9.5*	7.7**
PlNPV + Bt(1:1)	PlNPV	斜纹夜蛾 *Prodenia litura*	5.5*	6.9**
AcMNPV + PlNPV + Bt(1:1:1)	PlNPV	斜纹夜蛾 *Prodenia litura*	5.1*	3.5**

* 园菜叶片法 ** 人工饲料法

维普资讯 http://www.cqvip.com

讨　论

Vail 等[8]报道,以 AcMNPV 接种粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)细胞株中快速繁殖复制,收集这些多角体与虫体培养增殖的多角体感染粉纹夜蛾五龄幼虫,10 d 的 LD_{50}分别为 0.31 PIB/mm^2 和 0.25 PIB/mm^2,毒力相差 1.2 倍。Tompkins 等[6]研究表明,AcMNPV 的毒力在替代的夜蛾科昆虫细胞和寄主增殖后毒力会发生明显变化,如用 *T. ni* 细胞增殖与用 Se368 细胞增殖对甜菜夜蛾的 LC_{50}分别为 121.27×10^2 PIB/g 饲料和 3.92×10^2 PIB/g 饲料,两者相差 29 倍,用甜菜夜蛾(Se)幼虫增殖和用粉纹夜蛾幼虫增殖的 LC_{50}分别为 2.93×10^2 PIB/g 饲料和 18.87×10^2 PIB/g 饲料,两者相差 6 倍。

本研究用草地贪夜蛾细胞株(Sf_9)增值 AcMNPV B 株对二龄甜菜夜蛾 6 d 的 LD_{50}是甜菜夜蛾虫体增殖的 AcMNPV A 株的 14.79 倍。说明虫体增殖的 AcMNPV 感染相同寄主的毒力比用不同寄主细胞增殖的 B 株毒力要大得多,这与国外的研究结果相一致。因此以重点防治甜菜夜蛾为目的的复配型 AcMNPV 制剂选用 AcMNPV A 株是恰当的。

从表 1 可看出,AcMNPV A 株 + Bt 的复配型制剂用两种方法测定的 LD_{50}值差异很大,这可能与甜菜夜蛾对单位面积上 Bt 浓度产生拒食作用有关,人工饲料处理采用 2 μL/头,加之有渗透性,单位表面积上 Bt 浓度降低,取食量、取食速度加大毒力变高,而园菜叶经处理时采用 3 μL/头,单位表面积 Bt 浓度加大,因而幼虫取食量、取食速度减小,毒性反而变低。这与 Merrylleather 等[11]观察到的将 Bt δ 内毒素全长基因克隆到 AcMNPV 中引起 *T. ni* 幼虫饲食发生阻抗现象是一致的。

由于本研究重点是对 AcMNPV A 株 + Bt + PlNPV 的复配型制剂的增效测定,从表 3 中看出,两种方法测得的复配型 AcMNPV A 株制剂,比靶标害虫病毒单剂对两种夜蛾毒力有明显的增效作用。复配型 AcMNPV A 株制剂对甜菜夜蛾毒力测定时,以添加 Bt 及 PlNPV 作为无毒增效剂,增效比值为 9.5～7.7 倍,而复配型 AcMNPV A 株制剂对斜纹夜蛾毒力测定时 Bt 及 AcMNPV 作为无毒增效剂增效比值为 5.1～3.5 倍。

Bt 是一种广谱性微生物杀虫剂,尤其对蔬菜中的叶菜类重要害虫菜粉蝶、小菜蛾有较好的杀虫毒效。当 Bt 分别与两种病毒复配后,其毒力对两种夜蛾比单一型制剂明显提高,这与 Stelger 等[12]研究结果相一致。将三种制剂混配成复合制剂可以克服三者各自的不足,不仅扩大了微生物农药的杀虫范围,而且提高了微生物农药的毒力,达到一种制剂防治多种蔬菜害虫的目的。用复配型 AcMNPV 研制的蔬菜病毒复合杀虫剂产品(SBN-3)进行了 2 ha 次的田间试验,获得理想的防治效果(将另文发表)。

致谢　中国科学院武汉病毒研究所张友清、陈新文、陈涛先生,武汉大学齐义鹏先生提供昆虫病毒毒株和苏云金杆菌菌株,陈涛、陈新文先生还对本论文提出宝贵意见,在此一并致谢。

参 考 文 献

1　Vail P V, Jay D L, Hunter D K. Cross infeetivity of a nuclear polyhedrosis virus isolated from the alfalfa looper, *Autographa californica*. Proc. IV Int. Colloquium on Insect Pathology, College Park, MD. 1970. 297

2　Adams J R, Clutock J T, Mc. Couch J A. Bacaloviridae nuclear polyhedrosis viruses. Part I. Nuclear polyhedrosis viruses of in-

维普资讯 http://www.cqvip.com

sects, In: Adams J R *et al*. ed. Atlas of invete Brate viruses, CRC Inc. Press. 1991. 87 - 204

3 Hink W F. Production of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in cell from large-scale suspension cultures In: Kurstak E ed, Microbial and viral pesticides. Marcel Dekker Inc. Press, 1982. 493 - 506

4 Yearian W C, Young S Y. Contral of insect pests of agricultural importance by viral insecticides In: Kurstak E ed, Microbial and viral pesticides. Marcel Dekker Inc. Press, 1982. 287 - 423

5 谢天恩. 昆虫病毒的分类及其意义. 病毒学杂志, 1986, 1(4)13 - 16

6 Tompkins G J, Dougherty E M, Adams J R *et al*. Changes in the virulence of nuclear polyhedrosis viruses when propagated in alteruate noctuid (Lepidoptera: *Noctuidae*) cell lines and hosts. J Econ Entomol, 1988, 81: 1027

7 Sun Y P, Johnson E R. Analysis of joint action of insecticides against houseflies. J Econ Entomol, 1960, 53: 887 - 892

8 Vail P X, Jay D L, Hink W F. Replication and infectivity of the nuclear polyhedrosis virus of the alfalfa looper, *Autographa californica*, produced in cells grown *in vitro*. J Invert Path, 1973, 22: 231 - 237

9 刘颖文, 庞义, 蒲蛰龙. 杆状病毒异源重组引起 DNA 片段缺失. 全国生物防治学术讨论会论文摘要. 北京: 中国农科院生防研究所. 1995

10 罗绍彬. 苏云金杆菌防治害虫. 见: 陈涛主编. 有害生物的微生物防治原理和技术. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1995. 11 - 59

11 Merryweather A T, Weger U, Harris M P G *et al*. Construction of gen etically engineered baculovirus insecticides containing the *Bacillus thuringiensis* subsp. Kurstaki HD-73 cleita endotoxin. Gen Virol, 1990, 71: 1535 - 1549

12 Stelger M J, Neisses J, Thompsom C G. Aerial applications of nucleopolyhedrosis virus and *Bacillus thuringiensis* against the Douglas fir tussock moth. J Econ Entomol 1975, 69: 269 - 272

Bioassay of the Multiple *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) Pesticides

Hou Jianwen Zhao Yefeng Yao Guoqiang Jiang Weimin Yang Wenqin

(*Nanjing Agricultural College*, *Nanjing* 210038)

Abstract The multiple with other biological agent *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) pesticide, which is widely used to control *Spodoptera exigua* and *Prodenia litura* as well as *Artogeia rapat*, *Hellula untalis*, *Plutella xylostella*, was selected. Tested with 2nd instar *S. exigua* larvae, the virulence of AcMNPV-A strain amplified in *S. exigua* larvae is higher than that of AcMNPV-B strain in Sf9 cells. LD_{50} of AcMNPV-B (1949.4 PIB/Larva) is 14.79 times more than AcMNPV-A (131.8 PIB/Larva). The ratio of LD_{50} between AcMNPV-A (LD_{50} = 168.84 - 240.36 PIB/Larva) and AcMNPV-A + Bt (LD_{50} = 1.4329 - 128.91 PIB/Larva) is 118 - 1.5 while the ratio between AcMNPV-A and AcMNPV-A + Bt + PlNPV (LD_{50} = 21.82 - 21.4 PIB/Larva) is 7.7 - 9.5. Tested with 2nd instar *P. litura* larvae, the ratio of LD_{50} between PlNPV (LD_{50} = 16.02 - 53.53 PIB/Larva) and PlNP V + Bt (LD_{50} = 2.9 - 7.76 PIB/Larva) is 5.5 - 6.9 while the ratio between PlNPV and PlNPV + Bt + AcMNPV-A (LD_{50} = 3.16 - 15.469 PIB/Larva) is 3.5 - 5.1. It shows that the virulence of the multiple AcMNPV-A significantly increases. The multiple pesticide of AcMNPV-A + Bt + PlNPV named SNB-3 has been successfully used in controlling 5 major leaf pests in vegetable.

Key words *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcMNPV), *Bacillus thuringiensis* (Bt), *Prodenia litura* nucleopolyhedrovirus (PlNPV), *Spodoptera exigua*, *Prodenia litura*, Bioassay