

## SeMNPV 两个分离株的生物活性比较及病毒杀虫剂的应用<sup>\*</sup>

张海元<sup>1,2</sup>, 梅春蕾<sup>1</sup>, 张忠信<sup>1\*\*</sup>

(1. 中国科学院武汉病毒研究所, 湖北武汉, 430071; 2. 长江大学医学院, 湖北荆州, 434000)

## Comparison of Bioactivity of Two Isolates of *Spodoptera exigua* Nucleopolyhedrovirus and Application for the Viral Pesticide

ZHANG Hai-yuan<sup>2,1</sup>, MEI Chun-lei<sup>1</sup>, ZHANG Zhong-xin<sup>1\*\*</sup>

(1. Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China; 2. Medical School, Yangtze University, Jingzhou 434000, China)

**Abstract:** The activity of two isolates of *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus, SeMNPV-M and SeMNPV-Z, was compared by bioassays. The LD<sub>50</sub> values of SeMNPV-M and SeMNPV-Z in 3rd instar host larvae were 195.8 PIBs/gram diet and 242.4 PIBs/gram diet, respectively. The LT<sub>50</sub> values infected with 6000PIBs/gram diet were 3.50 and 3.68 days, respectively. The viral suspension formulation pesticide with SeMNPV-Z was produced and in field trials, the SeMNPV pesticide proved to be an effective control agent.

**Key words:** *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus, SeNPV-M, SeNPV-Z, viral pesticide, biological

**摘要:** 本文对甜菜夜蛾核型多角体病毒的两个分离株(SeMNPV-M, SeMNPV-Z)的生物活性进行了比较,并对甜菜夜蛾核多角体病毒杀虫悬浮剂的田间应用效果进行了评估。病毒生物测定结果显示,SeNPV-M 和 SeNPV-Z 感染三龄幼虫的半致死剂量(LD<sub>50</sub>)分别为 195.8 PIBs/克饲料和 242.4 PIBs/克饲料。使用 6000PIB/克饲料的病毒制剂感染三龄幼虫,其半致死时间(LT<sub>50</sub>)分别为 3.50d 和 3.68d。甜菜夜蛾病毒杀虫悬浮剂已在工厂生产,田间实验结果表明,甜菜夜蛾病毒杀虫悬浮剂可有效控制目标害虫的危害。

**关键词:** 甜菜夜蛾核型多角体病毒; 分离株; 病毒杀虫悬浮剂; 应用效果

中图分类号:S43

文献标识码:A

文章编号:1003-5125(2005)06-0656-04

甜菜夜蛾是世界性害虫,对我国的蔬菜危害严重。近年来随着对化学农药的抗性迅速发展,甜菜夜蛾已成为蔬菜上最难防治的主要害虫。甜菜夜蛾核型多角体病毒 (*Spodoptera exigua* MNPV, SeMNPV) 杀虫剂具有杀虫效果好,不污染环境,不伤害天敌,无残留,不易导致害虫产生抗性等优点,是防治抗性甜菜夜蛾的良好生物制剂。

2001 年,中国科学院武汉病毒研究所分离出一株甜菜夜蛾核型多角体病毒,命名为甜菜夜蛾核多角体病毒中国株(SeMNPV-Z)<sup>[1]</sup>。近年来,我们先后对 SeMNPV-Z 编码的泛素基因(*ubi*)、过氧歧化

酶基因(*sod*)和组织蛋白酶基因(*v-cath*)进行了序列分析和表达。结果发现,SeMNPV-Z 的这些保守基因与甜菜夜蛾核型多角体病毒美国株(SeMNPV-M)的同类基因只有很小的差别<sup>[2~4]</sup>,SeMNPV-Z 可能是甜菜夜蛾核型多角体病毒的不同地理分离株。为了进一步研究 SeMNPV-Z 分离株的应用前景,我们对 SeMNPV-M 和 SeMNPV-Z 两个分离株的生物活性进行了比较,并对甜菜夜蛾核型多角体病毒(SeMNPV-Z)杀虫悬浮剂的应用效果进行了评估。

### 1 材料和方法

\* 收稿日期:2005-04-28,修回日期:2005-06-12

\* 基金项目:国家 863 项目(2001AA246014)

作者简介:张海元(1974—),男,湖北鄂州籍,硕士,主要从事病毒分子生物学研究。

\*\* 通迅作者:张忠信(1957—),男,山西运城籍,主要从事昆虫病毒学研究。

Corresponding author: E. mail: zhangzx@pentium. whiov. ac. cn

### 1.1 病毒分离株

甜菜夜蛾核型多角体病毒中国分离株(SeMNPV-Z)由我所分离<sup>[1]</sup>,甜菜夜蛾核型多角体病毒美国分离株(SeMNPV-M)由孙修炼博士馈赠。

### 1.2 昆虫

甜菜夜蛾幼虫由本所养虫室提供,人工饲料饲养。甜菜夜蛾室内人工饲养连续传代已超过 60 代。

### 1.3 病毒多角体的纯化

病毒多角体的纯化参照孙修炼等<sup>[5]</sup>的方法进行。使用不同病毒分离株分别感染甜菜夜蛾健康幼虫,收集典型病死虫匀浆,双层纱布过滤,差异离心三次后,取少量病毒悬液稀释,显微镜下血球计数板记数后,计算出病毒含量后于 4℃冰箱保存备用。

### 1.4 病毒生物活性测定

甜菜夜蛾核型多角体病毒生物测定方法参考张光裕等<sup>[6]</sup>的报道。两株甜菜夜蛾核多角体病毒分别稀释成  $1 \times 10^6$  PIBs/mL、 $2 \times 10^5$  PIBs/mL、 $4 \times 10^4$  PIBs/mL、 $8 \times 10^3$  PIBs/mL、 $1.6 \times 10^3$  PIBs/mL 和  $3.2 \times 10^2$  PIBs/mL 六种浓度,感染 3 龄初幼虫,幼虫在 10mL 玻璃瓶中单头饲养,每个处理 50 头幼虫,每瓶中加入 1g 饲料,滴加 30μL 病毒悬液,使感染幼虫的病毒数量分别为 30,000、6000、1,200、240、48 和 9.6 PIBs/克饲料。待病毒悬液渗入饲料后再加入幼虫。试验设三次重复。感染后逐日记录各处理的幼虫病毒致死数量,感染 6 天后结束试验,计算各处理的幼虫死亡率或校正死亡率。绘制感染病毒数量对数与幼虫死亡机率值的回归曲线,得出回归曲线方程,根据回归曲线方程求出病毒对三龄初幼虫的半致死剂量( $LD_{50}$ ),同时根据死亡率和死亡时间曲线求出病毒对三龄初幼虫的半致死时间( $LT_{50}$ )。

### 1.5 甜菜夜蛾病毒杀虫悬浮剂

甜菜夜蛾核型多角体病毒杀虫悬浮剂由株海市华夏生物农药有限公司提供,生产病毒株为 SeN-

PV-Z 病毒含量为 20 亿 PIBs/mL。病毒杀虫悬浮剂的配制参考张光裕等和张忠信等<sup>[7,8]</sup>的报道。甜菜夜蛾核多角体病毒杀虫悬浮剂已获国家发明专利<sup>[9]</sup>,专利号 ZL02115908.4。

### 1.6 田间试验

试验分别在湖北武汉、广东广州、福建福州和上海市郊区进行,防治对象为蔬菜上的甜菜夜蛾。病毒杀虫悬浮剂设 3 个处理,施用量分别为 750mL/ha、1250mL/ha 和 1500mL/ha,米螨施用量为 750g/ha,对照药剂为 20% 米螨悬浮剂,由美国罗门哈斯公司生产。设清水喷洒为空白对照。施药用背负式喷雾器喷洒,喷液量为 900L/ha。每个试验小区为 20~40m<sup>2</sup>,每个试验设四次重复。防治时间为 8 月 21~25 日,虫龄为 1~3 龄,施药前调查虫口基数,药后 3、7、10 或 14d 调查各处理的残留虫数,调查时 5 点取样,每个小区调查 20~40 株,根据调查结果计算校正防效,对甜菜夜蛾病毒杀虫悬浮剂的应用效果进行评价。

## 2 结果

### 2.1 SeMNPV 不同分离株对三龄幼虫的生物活性比较

两个甜菜夜蛾核型多角体病毒(SeMNPV)分离株分别对三龄宿主幼虫进行生物活性测定,三次重复试验结果的平均值列于 1。与其它杆状病毒一样,SeMNPV 不同分离株感染宿主幼虫后经历一个潜伏期,不但感染后 1d 和 2d,幼虫没有死亡。病毒感染后 3d,感染幼虫开始死亡,感染后第 4d 和第 5d,感染宿主幼虫的死亡率达到高峰,感染后第 6d,高剂量病毒感染幼虫的死亡率就达到或接近 100%,生试验于病毒感染后 6d 结束。

根据生物测定结果,以甜菜夜蛾病毒感染 3 龄幼虫的包涵体数量(PIBs/gram diet)的对数值为横

表 1 两株甜菜夜蛾核型多角体病毒对三龄宿主幼虫的生物活性比较

Table 1 Bioassay for two isolates of *Spodoptera exigua nucleopolyhedrovirus* against on the third instar host larvae

Dosage (PIBs/g diet)	Mortality after different treated days (%)											
	SeNPV-M						SeNPV-Z					
	1d	2d	3d	4d	5d	6d	1d	2d	3d	4d	5d	6d
30,000		33.8	90.2	96.2	100			20.6	78.8	92.5	96.9	
6,000		28.0	72.5	88.1	95.0			14.8	69.1	84.4	90.3	
1,200		18.2	51.6	76.0	85.2			6.5	51.0	72.7	80.3	
240		6.8	27.7	40.7	54.7			5.6	27.8	39.6	49.4	
48		5.6	15.8	27.5	36.3			5.6	17.9	22.5	28.8	
9.6		2.1	15.6	16.5	18.9			3.5	16.0	17.4	21.6	
CK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Note: The values in this table were the mean values for 3 repeat tests.

坐标,以幼虫病毒致死百分率的机率值为纵坐标,绘制两株病毒感染数量对数与幼虫死亡机率值的回归图曲线。根据两株病毒对三龄幼虫的回归曲线方程,分别求出 SeMNPV-M 和 SeMNPV-Z 的半致死

剂量( $LD_{50}$ ),以及它们的  $LD_{30}$ 、 $LD_{70}$  和  $LD_{90}$ ,结果列于表 2。从表 2 的结果看,SeMNPV-Z 感染三龄宿主幼虫的半致死剂量为 242.4 PIBs/g 饲料,比 SeMNPV-M 的半致死剂量(195.8 PIBs/g 饲料)略

表 2 甜菜夜蛾病毒感染 3 龄幼虫 LD 及其 95% 置信值的比较 (PIBs/g diet)

Table 2 Comparison of LD and their 95% fiducial limits of SeMNPV

Strains	$LD_{30}$	$LD_{50}$	$LD_{70}$	$LD_{90}$
SeMNPV-M	77.6(72.8~83.8)*	195.8(186.0~207.5)*	509.8(479.2~530.2)*	2026.7(1944.6~2148.3)*
SeMNPV-Z	62.8(59.7~68.5)*	242.4(227.8~261.8)*	583.5(554.3~618.5)*	3357.4(3156.0~3610.4)*

\* : 95% fiducial limits.

高,SeMNPV-Z 的 70% 致死剂量( $LD_{70}$ )和 90% 致死剂量( $LD_{90}$ )分别为 583.5/g 饲料和 3357.4/g 饲料,也比 SeMNPV-M 的  $LD_{70}$  和  $LD_{90}$  高。

## 2.2 SeMNPV 两个分离株感染三龄宿主幼虫的 $LT_{50}$ 比较

为了对甜菜夜蛾核多角体病毒两个分离株的杀虫速度进行比较,我们以病毒感染宿主幼虫后的时间(days)为横坐标,以感染剂量为 6000PIBs/g 饲料的病毒致死百分率(mortality)为纵坐标,分别绘制 SeNPV-M 和 SeNPV-Z 的感染时间与病毒致死百分率曲线,结果见图 1。根据图 1 的曲线推算,在感染病毒剂量为 6000 PIBs/g 饲料时,SeMNPV-M 感染三龄宿主幼虫的半致死时间( $LT_{50}$ )为 3.50d,而 SeMNPV-Z 感染幼虫的  $LD_{50}$  值为 3.68d。2001 年,Boning 等在重组病毒的研究中,以野生型甜菜夜蛾核型多角体病毒为对照,其半致死时间为 80 h 左右<sup>[10]</sup>。尽管我们的试验条件和方法与 Boning 的有很大的差别,但 SeMNPV 半致死时间的试验结果也与她们的结果相近。

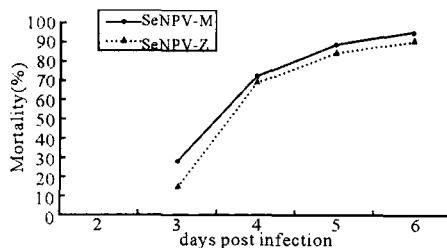


图 1 两株甜菜夜蛾病毒对三龄宿主幼虫致死时间的比较

Fig. 1 Comparison of the kill speed of two isolates of SeMNPV against on the 3rd instar host larvae

甜菜夜蛾核型多角体病毒两个分离株的生物活性比较显示,我们获得的 SeMNPV-Z 分离株与 SeNPV-M 存在一些差别。SeNPV-Z 分离株感染三龄宿主幼虫的半致死时间( $LT_{50}$ )比 SeNPV-M 分离株长 0.18d,SeMNPV-Z 株的回归曲线斜率也比 SeMNPV-M 分离株小,但 SeMNPV-Z 分离株感染三龄宿主

幼虫的半致死剂量( $LD_{50}$ )为 242.4 PIB/克饲料,与 SeMNPV-M 分离株的 195.8 PIBs/g 饲料差异不明显;SeNPV-Z 分离株感染三龄宿主幼虫的  $LD_{70}$  值为 583.5 PIBs/g 饲料,与 SeNPV-M 株的  $LD_{70}$  值差别也不大。与其它昆虫杆状病毒 5-7d 的半致死时间相比较,SeMNPV-Z 分离株的半致死时间仅为 3.68 d,基本可满足生物控制害虫的需要。SeMNPV-Z 分离株对目标害虫杀虫活性高,杀虫速度较快,病毒感染三龄幼虫后第 4d,幼虫病毒致死率接近 70% (69.1%)。SeMNPV-Z 分离株用于防治蔬菜和其它农田上的抗性甜菜夜蛾,可能具有很好的开发前景。

## 2.3 甜菜夜蛾病毒杀虫悬浮剂的应用效果评估

我们使用甜菜夜蛾病毒杀虫悬浮剂,分别在湖北、广东、福建和上海等地的蔬菜上进行了田间小区试验,对甜菜夜蛾病毒杀虫悬浮剂的防治效果进行评估。田间防治对象为蔬菜上的甜菜夜蛾,虫龄期以 2~3 龄为主,有世代重叠。病毒杀虫悬浮剂施用量分别为 750mL/ha、1250mL/ha 和 1500mL/ha,以美国进口米螨为对比农药,其施用量为 750g/ha,并设空白对照。田间试验结果见图 2。田间试验结果显示,施药后第三天,甜菜夜蛾病毒杀虫悬浮剂就对田间害虫有一定的控制作用。施药后第七天,施用量为 750mL/ha 病毒悬浮剂的小区,校正防治效果为 59.13%~76.71%;施用量为 1125mL/ha 病毒悬浮剂的小区,校正防治效果为 66.63%~88.97%;施用量为 1500mL/ha 病毒悬浮剂的小区,校正防治效果为 76.43%~90.92%;施用 1250mL/ha 和 1500mL/ha 病毒杀虫悬浮剂防治害虫的校正防治效果与米螨化学农药接近;施药后米螨七天以后,病毒杀虫悬浮剂的防治效果优于化学农药或与之相当。田间小区试验的结果表明,甜菜夜蛾病毒杀虫悬浮剂不仅保持了昆虫杆状病毒杀虫剂不伤害天敌、不污染环境,不易导致害虫产生抗性等特性,而且杀虫速度较快,施药后 3d 就可有效地控制害虫,并具有较长的持效性。甜菜夜蛾病毒杀虫悬浮

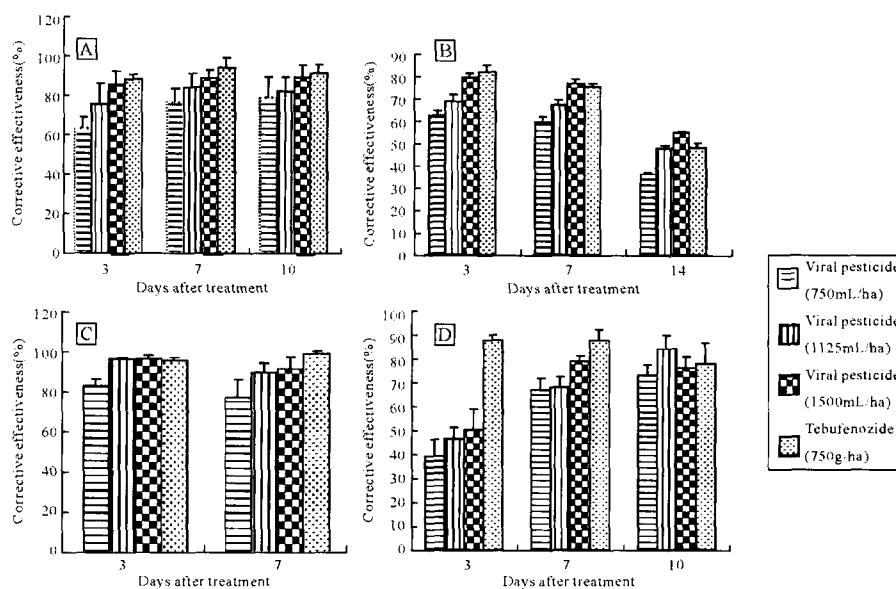


图2 甜菜夜蛾核型多角体病毒悬浮剂在不同地区防治效果

Fig. 2 The efficacy of SeMNPV suspension formulation pesticide in field trial

A, Hubei; B, Guangdong; C, Fujian; D, Shanghai.

剂是防治蔬菜和其它农田上抗性甜菜夜蛾的良好生物制剂,具有广泛的应用推广价值。

### 3 讨论

本文对甜菜夜蛾核型多角体病毒两个分离株的生物活性进行了研究和比较。两株甜菜夜蛾核型多角体病毒的生物活性比较结果表明,我们分离的SeMNPV-Z 病毒株与SeMNPV-M 存在一些差异,SeMNPV-Z 分离株的 $LT_{50}$ 比美国分离株稍长,回归曲线的斜率也较小,但SeMNPV-Z 病毒株感染三龄宿主幼虫的 $LT_{50}$ 值 242.4 PIBs/g 饲料,与美国分离株相近, $LD_{70}$ 值为 583.5 PIBs/g 饲料,与美国分离株差别不大。SeMNPV-Z 分离株株的 $LT_{50}$ 为 3.68d,与其它赶状病毒相比,它的杀虫速度较快,具有很好的应用前景。两株病毒的内切酶图谱分析发现,SeNPV-Z 病毒株的内切酶图谱上出现多个亚克分子带,以至使图谱不太清楚,因此本文没有列出内切酶比较图。SeMNPV-Z 病毒株内切酶图谱上出现多个亚克分子带及病毒生测回归曲线的斜率较小,这种现象预示,由于SeMNPV-Z 病毒株从野外分离,它可能存在混杂现象,进一步的工作需要进行细胞克隆或虫体克隆,以获取不同的病毒克隆株进行分析。

以SeMNPV-Z 分离株为生产毒株,生产出甜菜夜蛾病毒杀虫悬浮剂,田间试验表明,病毒杀虫悬浮剂在施用后3d 就开始控制害虫危害,并有较长的持续期。在室内试验时,由于甜菜夜蛾病毒杀虫毒力

强,容易出现病毒的接触传播。在田间,甜菜夜蛾成虫产卵是成块产卵,每个卵块含有几十粒乃至上百粒卵。若在甜菜夜蛾的盛卵初孵期施用病毒杀虫剂,病毒很容易在害虫种群中传播流行,这对病毒防治抗性甜菜夜蛾具有更重要的意义。甜菜夜蛾病毒流行病学及病毒生防的生态后效有待于今后的进一步研究。

### 参考文献

- [1] 张俊杰,张友清. 甜菜夜蛾核型多角体病毒中国株的分离鉴定及毒力测定[J]. 中国病毒学, 2001, 16: 361-363.
- [2] 牛国栋,张小霞,张忠信. 甜菜夜蛾核型多角体病毒泛素基因的克隆和原核表达[J]. 中国病毒学, 2003, 18: 44-48.
- [3] 张海元,牛国栋,洪靖君,张忠信. 甜菜夜蛾核型多角体病毒sod 基因的克隆和原核表达[J]. 中国病毒学, 2003, 18: 576-580.
- [4] 张海元,梅春蕾,张忠信. 甜菜夜蛾核型多角体病毒v-cath基因的克隆表达和功能研究[J]. 中国病毒学, 2005, 20:
- [5] 孙修炼,张光裕. 棉铃虫核型多角体病毒四个分离株的比较研究[J]. 中国病毒学, 1994, 9: 309-318.
- [6] 张光裕,周春莲,张友清. 棉铃虫核型多角体病毒的生物活性测定[J]. 植物保护学报, 1982, 9: 193-197.
- [7] 张忠信,张海元,牛国栋等. 含生物型增效剂棉铃虫病毒悬浮剂的应用效果研究[J]. 中国病毒学, 2003, 18: 571-575.
- [8] 张光裕,孙修炼,张忠信等. 棉铃虫病毒杀虫乳悬剂的生产及其药效试验[J]. 中国病毒学, 1995, 10: 242-247.
- [9] 发明专利:甜菜夜蛾核型多角体病毒杀虫悬浮剂. 授权专利号: ZL 02115908.4 .
- [10] Harrison R I, and Boning B C. Use of proteases to improve the insecticidal activity of baculovirus [J]. Biological control, 2001, 20: 199-209.