

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2022.02.016

杨小舟蛾新病毒的鉴定及其生物活性研究

刘瑞霞^{1,2}, 谢丹洁², 刘锦山³, 王青华^{2*}, 张永安², 段立清^{1*}

(1. 内蒙古农业大学林学院, 内蒙古 呼和浩特 010019; 2. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所/国家林业和草原局森林保护学重点实验室, 北京 100091; 3. 扶沟县森林病虫害防治检疫站, 河南 周口 461300)

摘要: [目的] 杆状病毒在农林害虫的生物防治中起着重要的作用, 本研究鉴定 1 株具有高毒力的杨小舟蛾新病毒, 为害虫的生物防治提供新病毒资源。[方法] 通过研究该病毒的超微结构和生物活性确定其生防潜力。[结果] 超微结构表明, 该病毒包涵体多呈椭圆形, 平均大小为 $0.43 \times 0.21 \mu\text{m}$; 包涵体中包埋一个杆状病毒粒子, 具有颗粒体病毒结构特征, 命名为杨小舟蛾颗粒体病毒 (MisiGV)。生物活性显示, MisiGV 对杨小舟蛾幼虫有致死作用, 对 3 龄幼虫的半致死浓度 LC_{50} 为 $2.37 \times 10^5 \text{OBs} \cdot \text{mL}^{-1}$; 当浓度为 1.2×10^7 、 4.0×10^6 、 4.0×10^5 、 1.2×10^5 和 $4.0 \times 10^4 \text{OBs} \cdot \text{mL}^{-1}$, 对 3 龄幼虫的半致死时间 LT_{50} 随着病毒浓度的降低而增大, 分别为 7.55、11.61、14.69、16.06 和 17.62 d。不同龄期幼虫对 MisiGV 的敏感性表明, 虫龄较小越容易受到病毒的侵染, 而且幼虫的死亡速度依赖于虫龄和病毒浓度。当浓度为 $4.0 \times 10^6 \text{OBs} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 2 和 4 龄幼虫的最高累计死亡率分别为 90.00% 和 57.78%, 而在该浓度下, 杀死 50% 的 2 龄幼虫的所需时间 $\approx 6.81 \text{d}$, 4 龄 $\approx 12.89 \text{d}$; 当病毒浓度为 $4.0 \times 10^4 \text{OBs} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 2 和 4 龄幼虫的最高累计死亡率分别为 83.33% 和 36.67%, LT_{50} 值分别为 11.91 d 和 25.65 d。此外, MisiGV 对存活幼虫化蛹率和羽化率也有一定影响, 病毒液浓度越高, 化蛹率和羽化率越低。当 MisiGV 浓度为 $4.0 \times 10^4 \text{OBs} \cdot \text{mL}^{-1}$, MisiGV 对羽化率的影响不明显。[结论] 本文报道的 MisiGV 新病毒是具有开发潜力和应用前景的生防因子。

关键词: 杨小舟蛾; 颗粒体病毒; 生物活性; 敏感性

中图分类号: S763.306.4

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2022)02-0140-08

杨小舟蛾 (*Micromelalopa sieversi* (Staudinger)), 属鳞翅目 (Lepidoptera) 舟蛾科 (Notodontidae) 小舟蛾属 (*Micromelalopa*), 分布于中国、日本和朝鲜半岛。在我国, 杨小舟蛾分布范围广, 在吉林、黑龙江、河南、山东、安徽、浙江、上海、江苏、江西和四川等地发生^[1-3]。杨小舟蛾是杨、柳树的重要害虫, 由幼虫取食杨、柳树叶片, 严重时, 叶片常被取食殆尽, 形似火烧, 严重影响林木的正常生长发育。国家林业和草原局 (2019 年第 20 号文公告) 将杨小舟蛾列入三级危害性林业有害生物, 同时也列入我国发生面积

超过 100 万亩的林业有害生物名单中。2012 年统计, 杨小舟蛾在山东鲁西平原危害 7 市 48 县, 并在齐河、滕州、商河等 24 个县局部爆发成灾, 发生面积达 16.71 万 hm^2 , 占该地区杨树种植总面积的 28.58%^[4-5]。2018 年, 杨小舟蛾在河南省南阳市危害杨树纯林面积达 3.33 多万 hm^2 ^[6]。2021 年, 杨小舟蛾仅在河南省扶沟县一个村的危害面积达 6.80 万 hm^2 (扶沟县蕤园镇里村)。杨小舟蛾繁殖量大, 其发生世代主要取决于光照、温度和湿度。在河南漯河地区一年发生 6 代, 以 2、3、4 代为成灾世代; 在江苏徐州一年发生 5 代, 主要以 3、

收稿日期: 2021-09-06 修回日期: 2021-10-16

基金项目: 中国林科院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项基金 (CAFYBB2018QB005); 十三五国家重点研发计划 (2018YFD0600202)

* 通讯作者: 王青华, 博士, 副研究员, 主要研究方向: 昆虫病毒学, 电话: 13810489465, Email: wqh633@caf.ac.cn; 段立清, 博士, 教授, 主要研究方向: 生物防治, 电话: 18947196724, Email: duanlq2013@163.com

4代成灾^[7]。杨小舟蛾在每年的4—9月份都对杨树造成危害,该时期繁殖力强,取食量大,且危害时间长。研究表明,杨树的失叶率在60%、80%和100%时,材积损失率分别为11.9%、41.1%和56.5%^[8]。因此,杨小舟蛾的防治至关重要。

化学农药因其易于加工、高效杀死大量个体等特点在杨小舟蛾防治中发挥了重要作用。但化学防治的大量使用会带来负面影响,如环境污染、生态失衡、产品安全、人类健康等一系列的问题,这使林业害虫的生物防治显得尤为重要。昆虫杆状病毒是联合国粮农组织(FAO)和世界卫生组织(WHO)一致推荐用于农林害虫的生物防治安全药剂^[9]。其优点在于对寄主有很强的专化性,对人、植物和天敌均无危害,是有效和持续控制林业害虫的最佳生物药剂之一^[10]。

据文献资料记载,在杨小舟蛾体内只发现一种病毒,即为杨小舟蛾质型多角体病毒(*Micromelalopha sieversi cypovirus*, MisiCPV),该病毒于1984年10月在湖北省嘉鱼县林区的自然病死的杨小舟蛾虫尸中分离获得^[11]。但有关MitrCPV的形态特征、生物活性等未见详细报道。本研究从河北省秦皇岛市采集的杨小舟蛾病死虫中分离纯化出一株新病毒,经超微结构鉴定,其为颗粒体病毒,命名为杨小舟蛾颗粒体病毒(*Micromelalopha sieversi granulovirus*, MisiGV),生物活性测定了MisiGV对3龄幼虫的半致死浓度 LC_{50} 和半致死时间 LT_{50} 、对不同龄期幼虫毒力,以及对存活幼虫化蛹率和羽化率的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

杨小舟蛾病毒(秦皇岛株)由中国林业科学研究院昆虫病原微生物实验室提供,采用梯度离心的方法得到纯净的病毒并于本实验室4℃保存待用。杨小舟蛾各龄期幼虫采自河南省周口市扶沟县韭园镇的里村(114.18 E°, 34.6 N°),并于温度(25±1)℃,相对湿度(60±10)%,光周期16 L:8 D的昆虫饲养室中饲养。

1.2 方法

1.2.1 病毒的复制、分离与纯化 MisiGV的复制,将MisiGV(秦皇岛株)刷到新鲜杨树(欧美杨107)叶片上,接入健康的杨小舟蛾3龄幼虫,待5d后收集死虫并分离病毒。MisiGV的分离纯化方法参考王承锐等^[12]方法,并将过程进一步优

化。具体步骤如下:将感染杨小舟蛾病毒的虫尸放入研钵,加入2/3体积的无菌水研磨虫尸至匀浆,用两层纱布过滤除去大的组织块。滤液装入干净的离心管(1.5 mL),用差速离心法,分别为9 600 g,离心10 min,弃上清;20 g,离心5 min,弃沉淀;60 g,离心3 min,弃沉淀再将上清用9 600 g,离心10 min,弃上清后将沉淀悬浮,获得较纯病毒液。为了获得更纯的病毒液,利用蔗糖梯度法进一步纯化。将60%、55%、50%和40%蔗糖溶液依次加入50 mL离心管静置过夜,然后加入上述较纯病毒液,2 504 g,离心40 min。纯净病毒在50%~55%蔗糖梯度区,吸取纯净病毒用无菌水清洗3次。血球计数板计数后,4℃保存待用。纯净的病毒悬浮液用于后续超微结构观察和生物活性测定等试验。

1.2.2 超微结构观察 a. 扫描电镜样品制样:将300 μL的MisiGV(3.0×10^7 OBs·mL⁻¹)悬浮液加入1.5 mL离心管内,用无菌水洗涤2次,12 800 g,离心5 min,弃上清,尽量吸去多余的无菌水,在沉淀中加入2.5%戊二醛,悬浮沉淀,常温固定6 h以上。将固定好的病毒液用12 800 g,离心2 min,弃戊二醛上清液;用去离子水浸泡样品6 min,12 800 g,2 min离心后吸去去离子水,此步骤重复3次,每次浸泡时间比前一步延长1 min。然后分别用50%、70%和85%乙醇脱水14 min,再用95%和100%乙醇浸泡15 min,其中100%乙醇脱水3次,以上脱水过程从70%乙醇脱水开始,将病毒样品装入滤纸包进行的。将样品放入临界点干燥仪(LEICA EM CPD300)2 h后取出,并粘至金属台,用离子镀膜仪(E-1045 IDN SPUTTTER)喷金后,放入扫描电镜(HITACHI SU8010)观察并拍照。

b. 透射电镜样品制样:取纯净的MisiGV(3.0×10^7 OBs·mL⁻¹)悬浮液300 μL,用2.5%的戊二醛常温固定6 h以上。将固定好的病毒液12 800 g,离心2 min吸去多余的戊二醛,用去离子水清洗3次。沉淀中加入500 μL溶解的琼脂后离心,切取底部样品放入1.5 mL离心管中,用1倍的磷酸缓冲液(pH 7.0)充分清洗3~5次,每次3~5 min。沉淀中加入1%的饿酸固定1 h,并用1倍的磷酸缓冲液(pH 7.0)充分清洗3次以除去饿酸。用梯度丙酮(30%、50%、70%、85%和95%)

在冰上脱水各 5~7 min, 再用 100% 丙酮常温下脱水 3 次。然后用不同比例的丙酮和树脂渗透样品, 丙酮:树脂=3:1, 45 min; 1:1, 1.5 h 和 1:3, 2 h。以上渗透样品结束后, 吸出上清加入纯树脂包埋, 并放入干燥器 (AP 9925N) 内保存。使用 Leica uc7 型切片机超薄切片, 再用醋酸双氧铀染 30 min 和柠檬酸铅 15 min 双染色后, 放入透射电镜 (JEOL JEM-1400) 观察后拍照。

1.2.3 杨小舟蛾幼虫生物活性的测定 a. 毒力的测定 挑选健康的杨小舟蛾 3 龄幼虫放入圆柱型的养虫筒中 ($\Phi 10 \text{ cm} \times 14 \text{ cm}$), 饥饿 24 h 后, 放入含有病毒液的速生杨叶片。带毒的叶片是用毛笔均匀刷上不同浓度梯度的病毒液各 1 mL, 晾干后喂食幼虫。空白对照为刷有等量无菌水的新鲜叶片。实验设置 6 个处理, 1 个空白对照和 5 个浓度梯度杨小舟蛾病毒: 1.2×10^7 、 4.0×10^6 、 4.0×10^5 、 1.2×10^5 和 4.0×10^4 OBs·mL⁻¹。每个处理 30 头幼虫, 3 次重复。昆虫饲养室条件为温度 (25 ± 1) °C, 相对湿度 (60 ± 10) %, 光周期 16 L : 8 D。2 d 后叶片基本取食完全, 换无毒的新鲜叶片。每天观察记录各处理的幼虫死亡数和死亡症状。

b. 不同虫龄幼虫对 MisiGV 的敏感性测定 选用带有不同浓度梯度的 MisiGV 叶片分别喂食杨小舟蛾 2 龄、3 龄和 4 龄的健康幼虫, 每个处理 30 头幼虫, 3 次重复, 病毒浓度为 4.0×10^6 和 4.0×10^4 OBs·mL⁻¹, 给毒方法和幼虫饲养条件同上述 a, 每天观察记录各龄幼虫的死亡数^[13]。

c. MisiGV 对幼虫化蛹率和羽化率的影响 每个处理选用健康的杨小舟蛾 4 龄幼虫 30 头, 3 次重复。病毒浓度为 4.0×10^6 、 4.0×10^5 和 4.0×10^4 OBs·mL⁻¹, 给毒方法和饲养条件同上述 a, 每天观察幼虫状态并记录化蛹数和羽化数^[14]。

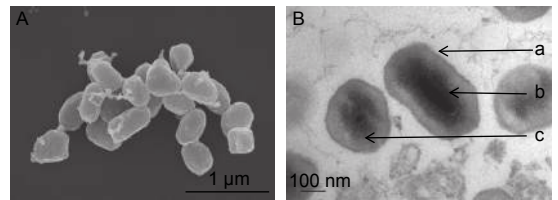
1.2.4 数据分析 运用 Excel 和 SPSS 22.0 软件的概率回归分析计算出致死中浓度 LC₅₀ 和半致死天数 LT₅₀^[15-17], 计算病毒液对不同龄期幼虫的累

计死亡率和 4 龄幼虫的化蛹率、羽化率^[18]。

2 结果与分析

2.1 超微结构

MisiGV 超微结构如图 1 所示。扫描电镜观察, 该病毒形态大多呈椭圆形, 也有的呈卵圆形或不规则形, 形似颗粒体, 其平均大小为 $0.43 \times 0.21 \mu\text{m}$, 但变化范围较大, 为 $(0.18 \sim 0.76) \times (0.20 \sim 0.23) \mu\text{m}$, (图 1A)。从透射电镜可观察到该病毒内部的详细结构, 颗粒体的周围颜色较深的一层为颗粒体膜, 膜内一层为颗粒体的蛋白质, 颗粒体中包埋着单个单粒的病毒粒子, 横切为颗粒状, 纵切为杆状, 病毒粒子位于颗粒体的中央, 其平均大小为 $0.03 \times 0.20 \mu\text{m}$ 。(图 1B)



注: A: 扫描电镜观察图 (40 000 ×)。B: 透射电镜观察图 (10 000 ×)。a: 颗粒体膜 b: 病毒粒子 c: 颗粒体蛋白。

Note: A: Scanning electron microscopy (40 000 ×). B: Transmission electron microscopy (10 000 ×). a: membrane b: virions c: granule protein.

图 1 杨小舟蛾病毒超微结构

Fig. 1 Ultrastructure of virus strain isolated from *M. troglodyta* larvae

2.2 室内毒力测定结果

2.2.1 LC₅₀ 与 LT₅₀ 当 MisiGV 浓度为 1.2×10^7 、 4.0×10^6 、 4.0×10^5 、 1.2×10^5 和 4.0×10^4 OBs·mL⁻¹ 时对 3 龄幼虫都有致死作用。MisiGV 对 3 龄幼虫的回归方程为: $y = -3.945 + 0.734x$, LC₅₀ 为 2.37×10^5 OBs·mL⁻¹ (95% 置信区间为 $1.13 \times 10^5 \sim 4.34 \times 10^5$) (表 1)。表 1 中皮尔逊拟合优度显著性值 (P) 大于 0.05, 则模型能较好的拟合数据。

不同浓度的 MisiGV 对幼虫致死速度有一定差

表 1 不同浓度的 MisiGV 对杨小舟蛾 3 龄幼虫的毒力 (17 d)

Table 1 Different concentrations of MisiGV to the 3rd instar larvae of *M. sieversi* (17 d)

虫龄 Instar	Probit 回归方程 Probit structural equation regression $y = a + bx$	皮尔逊拟合优度显著性值 Pearson goodness of fit significance values (P)	LC ₅₀ / (OBs·mL ⁻¹)	95%置信区间 95% CL	
				上限 Upper limit	下限 Lower limit
3龄	$y = -3.945 + 0.734x$	0.240	2.37×10^5	1.13×10^5	4.34×10^5

异 (表 2)。LT₅₀ 数据表明, 当病毒浓度为 1.2×10^7 和 4.0×10^6 OBs·mL⁻¹ 时, 半致死时间 LT₅₀ 分别为 7.55 d 和 11.61 d, LT₅₀ 相比缩短了 4.06 d。当病毒浓度为 4.0×10^5 、 1.2×10^5 和 4.0×10^4 OBs·mL⁻¹, LT₅₀ 分别为 14.69、16.06

和 17.62 d, 该病毒浓度间相比分别相差 10 倍和 3 倍时, LT₅₀ 分别缩短了 2.93 d 和 1.56 d。即随着 MisiGV 浓度的提高, LT₅₀ 值缩短。表 2 中皮尔逊拟合优度显著性值 (*P*) 均大于 0.05, 则模型能较好的拟合数据。

表 2 不同浓度的 MisiGV 对杨小舟蛾 3 龄幼虫时间-死亡率的影响 (17 d)

Table 2 Different concentrations of MisiGV on time-mortality of the 3rd instar larvae of *M. sieversii* (17 d)

浓度 Treatment / (OBs·mL ⁻¹)	Probit 回归方程 Probit structural equation regression $y=a+bx$	皮尔逊拟合优度显著性值 Pearson goodness of fit significance values (<i>P</i>)	LT ₅₀ / d	95% 置信区间 95% CL	
				上限 Upper limit	下限 Lower limit
1.2×10^7	$y=-5.036 + 5.735x$	0.115	7.55	7.067	8.030
4.0×10^6	$y=-3.221 + 3.025x$	0.374	11.61	10.803	12.531
4.0×10^5	$y=-4.772 + 4.089x$	0.138	14.69	13.558	16.366
1.2×10^5	$y=-4.235 + 4.224x$	0.089	16.06	15.475	16.790
4.0×10^4	$y=-3.832 + 3.075x$	0.441	17.62	16.040	19.930

2.2.2 不同虫龄幼虫对 MisiGV 的敏感性 图 2 显示, 在 MisiGV 浓度为 4.0×10^6 和 4.0×10^4 OBs·mL⁻¹ 时, 其对 2~4 龄幼虫都表现出一定的毒力。在这

2 个浓度下, 2 龄幼虫的最高累计死亡率分别为 90.00% 和 83.33% (图 2A), 3 龄幼虫的最高累计死亡率分别为 85.56% 和 50.58% (图 2B), 4 龄幼虫的最高累计死亡率分别为 57.78% 和 36.67% (图 2C)。也就是说, 在同一龄期不同病毒浓度下, 病毒液浓度越高, 幼虫的死亡率随之增加。

当浓度为 4.0×10^6 OBs·mL⁻¹ 时, 2 龄幼虫的累计死亡率在 2~10 d 呈显著上升趋势, 且在第 11 d 达最高累积死亡率, 11 d 之后呈稳定趋势; 3 龄幼虫在 5~8 d 内累计死亡率缓慢增大, 而在 8~13 d 内累计死亡率呈显著上升趋势, 且在 13 d 时累计死亡率达最高值, 之后几天趋于稳定; 而 4 龄幼虫的累计死亡率在 9 d 之内没有显著性的变化, 第 15 d 累计死亡率达到最大, 而往后天数里死亡率几乎维持不变。当浓度为 4.0×10^4 OBs·mL⁻¹ 时, 2 龄幼虫在 3~15 d 内累计死亡率呈显著上升, 第 15 d 时达最高累计死亡率并往后几天内趋于稳定; 3 龄幼虫在 6~10 d 的累计死亡率缓慢增大, 11~14 d 内呈缓慢增长, 无明显变化, 16~19 d 时累积死亡率达最高值并趋于稳定; 4 龄幼虫在第 10~13 d 时增长缓慢, 累计死亡率在 15~18 d 内随之上升, 且 18 d 时达最高累计死亡率。

同一剂量病毒, 杀死相同比例的杨小舟蛾幼虫, 高龄比低龄幼虫的所需的时间长。在浓度为 4.0×10^6 OBs·mL⁻¹ 时, 2 和 3 龄幼虫 LT₅₀ 值分别为 ≈ 6.81 d 和 ≈ 11.61 d, 而杀死 50% 的 4 龄幼虫

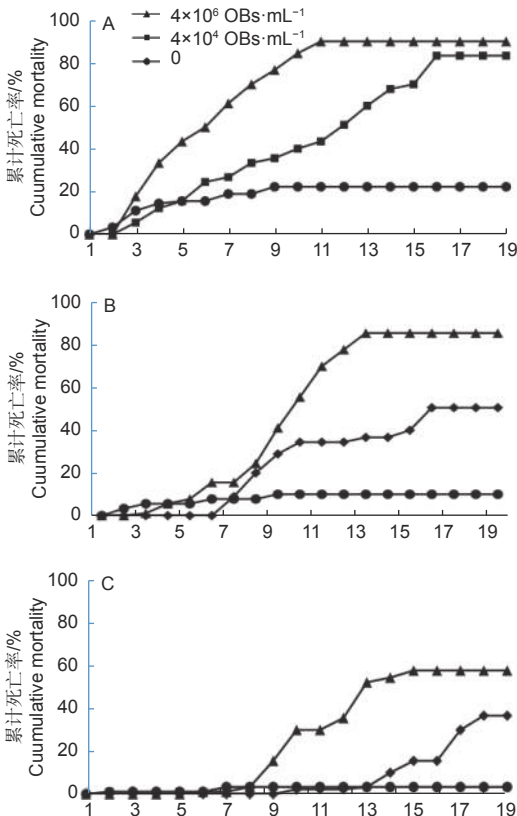


图 2 不同浓度的 MisiGV 对不同虫龄幼虫的累计死亡率

Fig. 2 Different concentrations of MisiGV to cumulative mortality of larvae at different instars

所需时间为 ≈ 12.89 d (表 3)。当病毒浓度为 4.0×10^4 OBs \cdot mL $^{-1}$ 时, 杀死 50% 的 2 龄幼虫的所需时间 ≈ 11.91 d、3 龄 ≈ 17.62 d, 4 龄 ≈ 25.65 d (表 3)。采用时间-剂量-死亡率模型进行模拟分

析发现, 在这两个病毒浓度下, 皮尔逊拟合优度显著性值 (P) 均大于 0.05, 拟合线性回归方程, 则模型能较好的拟合数据。

表 3 不同浓度 MisiGV 对不同虫龄杨小舟蛾的致死时间

Table 3 Different concentrations of MisiGV on time-mortality of larvae at different instars

浓度 Treatment / (OBs \cdot mL $^{-1}$)	虫龄 Instar	Probit 回归方程 Probit structural equation regression $y=a+bx$	皮尔逊拟合优度显著性值 Pearson goodness of fit significance values (P)	LT ₅₀ /d	95%置信区间 95% CL	
					上限 Upper limit	下限 Lower limit
4.0×10^6	2	$y=-3.273 + 3.927x$	0.230	6.81	6.476	7.145
	3	$y=-3.221 + 3.025x$	0.374	11.61	10.803	12.531
	4	$y=-3.848 + 3.466x$	0.460	12.89	11.923	14.059
4.0×10^4	2	$y=-3.741 + 3.477x$	0.395	11.91	11.474	12.500
	3	$y=-3.832 + 3.075x$	0.441	17.62	16.040	19.930
	4	$y=-3.451 + 2.890x$	0.487	25.65	24.672	26.864

在测试 3 个龄期的幼虫中, 两个剂量的病毒的 LT₅₀ 显著不同。对于 2 和 3 龄幼虫而言, 在浓度 4.0×10^4 OBs \cdot mL $^{-1}$ 和 4.0×10^6 OBs \cdot mL $^{-1}$ 时, 两者的 LT₅₀ 分别相差 ≈ 5.10 d 和 ≈ 6.01 d。而对于 4 龄幼虫而言, 低浓度比高浓度病毒的 LT₅₀ 增加 ≈ 12.76 d。可见, 对于虫龄小的幼虫而言, 浓度之间的差异, 导致其 LT₅₀ 变化不大, 而对于虫龄大幼虫而言, 病毒浓度的变化, 导致 LT₅₀ 差异显著。尽管 4.0×10^4 OBs \cdot mL $^{-1}$ 较 4.0×10^6 OBs \cdot mL $^{-1}$ 稀释了 100 倍, 但对于 2 龄幼虫而言, 其浓度还

是很高, 以至于他们的死亡率都在 80% 以上。

2.2.3 不同浓度的 MisiGV 对存活幼虫化蛹率和羽化率的影响 不同浓度的 MisiGV 喂食 4 龄幼虫后, 存活幼虫化蛹率和羽化率如表 4 所示。当病毒液浓度为 4.0×10^6 、 4.0×10^5 和 4.0×10^4 OBs \cdot mL $^{-1}$ 时, 幼虫的化蛹率分别为 $30.00\% \pm 2.65\%$ 、 $51.11\% \pm 0.33\%$ 和 $62.22\% \pm 1.20\%$, 较对照组相比, 化蛹率分别减少 52.27%、31.16%和 20.05%。因此, 不同浓度的 MisiGV 对化蛹率有影响, 化蛹率随着病毒液浓度的提高而减弱。

表 4 不同浓度的 MisiGV 对幼虫化蛹率和羽化率的影响

Table 4 Effects of different concentrations of MisiGV on the pupation rate and emergence rate of larvae

浓度 Treatment / (OBs \cdot mL $^{-1}$)	死亡率 \pm 标准误差 Mortality rate \pm SE /%	化蛹率 \pm 标准误差 Pupation rate \pm SE /%	羽化率 \pm 标准误差 Emergence rate \pm SE /%
4.0×10^6	57.58 ± 2.85 b	30.00 ± 2.65 a	73.97 ± 2.06 a
4.0×10^5	50.00 ± 0.58 b	51.11 ± 0.33 b	82.64 ± 2.05 b
4.0×10^4	47.78 ± 0.33 b	62.22 ± 1.20 b	92.20 ± 0.47 c
0	12.22 ± 0.88 a	82.27 ± 1.33 c	93.54 ± 1.41 c

注: 表中的数据为平均数 \pm 标准误, 不同小写字母表示在不同浓度的病毒条件下 $p < 0.05$ 水平差异显著。

Note: The data is average \pm standard error in the table, different small letters indicate that the $p < 0.05$ level is significantly different under different concentrations of virus conditions.

当病毒液浓度为 4.0×10^6 和 4.0×10^5 OBs \cdot mL $^{-1}$ 时, 幼虫的羽化率分别为 $73.97\% \pm 2.06\%$ 和 $82.64\% \pm 2.05\%$, 较对照组相比, 羽化率分别减少了 19.57%和 10.90%。不同浓度的 MisiGV 对其羽化率有影响, 病毒液浓度越高, 羽化率越低。而当 4.0×10^4 OBs \cdot mL $^{-1}$ 时, 幼虫的羽化率为

$92.20\% \pm 0.47\%$, 较对照组相比, 羽化率减少了 1.34%。因此, 在较低浓度下, 对幼虫羽化率的影响不明显。

3 讨论

本研究分离的新病毒株为杨小舟蛾颗粒体病

毒 MisiGV, 其在主要形态特征方面与 GV 一致。杨小舟蛾 (*Micromelalopha sieversi* (Staudinger)) 和杨扇舟蛾 (*Clostera anachoreta* (Fabricius)) 同为舟蛾科, 且两者常混合发生, 是危害杨树的重大害虫。1966 年蔡秀玉等^[19]首次发现杨扇舟蛾颗粒体病毒 (*Clostera anachoreta granulovirus*, ClanGV), 1981 年, 报道了与杨扇舟蛾同属的分月扇舟蛾颗粒体病毒 (*Clostera anastomosis* L. *granulovirus*, CaLGV)^[20]。通过 MisiGV 与 ClanGV、CaLGV 相比较发现, 三者在超微结构和生物活性方面有一些不同。首先, 在颗粒体直径方面, ClanGV 平均直径大小为 $0.44 \times 0.22 \mu\text{m}$, CaLGV 为 $0.43 \times 0.24 \mu\text{m}$ ^[21-22], MisiGV 为 $0.43 \times 0.21 \mu\text{m}$ 。其次, 病毒粒子存在差异, ClanGV 病毒粒子平均大小约为 $0.15 \sim 0.04 \mu\text{m}$, CaLGV 为 $0.22 \times 0.06 \mu\text{m}$, 而 MisiGV 的大小约为 $0.20 \times 0.03 \mu\text{m}$ 。最后, 3 者在毒力方面存在差异。ClanGV 感染杨扇舟蛾 4 龄幼虫后, 其 LC_{50} 为 $1.25 \times 10^6 \text{ OBs} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[23]; 李海霞等^[24]发现 CaLGV 感染分月扇舟蛾 2 龄幼虫, LC_{50} 为 $2.97 \times 10^5 \text{ OBs} \cdot \text{mL}^{-1}$; MisiGV 对杨小舟蛾 3 龄幼虫的 LC_{50} 为 $2.37 \times 10^5 \text{ OBs} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。因测试虫和虫龄的不同三者的 LC_{50} 值的无法比较毒力大小。当 CaLGV 浓度为 $1.0 \times 10^7 \text{ OBs} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 感染分月扇舟蛾 3 龄幼虫后, LT_{50} 值为 7.74 d^[21]; 而当 MisiGV 浓度为 $1.2 \times 10^7 \text{ OBs} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 感染杨小舟蛾 3 龄幼虫的 LT_{50} 为 7.55 d (表 2)。可见, 在 CaLGV 和 MisiGV 浓度相差不大时, MisiGV 在杀死 50% 的 3 龄幼虫所需的时间与 CaLGV 的时间无明显差异。另外, MisiGV 与 ClanGV 在 LT_{50} 值的比较上, 当 ClanGV 浓度为 $3.0 \times 10^5 \text{ OBs} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 对 3~4 龄杨扇舟蛾幼虫 LT_{50} 值为 12.20 d^[24-25]; 而 MisiGV 浓度为 $1.2 \times 10^5 \text{ OBs} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对 3 龄杨小舟蛾幼虫 LT_{50} 值为 16.06 d。此外, CaLGV 对杨扇舟蛾和分月扇舟蛾的幼虫都具有致病性^[24]。MisiGV 是否能够感染杨扇舟蛾和分月扇舟蛾幼虫, 其 LC_{50} 与 LT_{50} 的结果是否与感染原寄主存在差异性, 还有待开展后续试验进一步验证。

致死时间的长短是判断病毒能否作为一种有潜力的生物防治制剂的一个关键因素^[26]。如果病毒能够提高杀虫速度, 缩短寄主致死时间, 就能够在一定程度上提高病毒水平传播速度^[25]。文中数据显

示, 致死时间随着虫龄和病毒浓度的增加而减少 (表 2, 3)。对于杀死 50% 的 2~3 龄幼虫而言, 当浓度为 $4.0 \times 10^6 \text{ OBs} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 3 龄的致死时间 $\approx 11.61 \text{ d}$, 而 4 龄 LT_{50} 为 12.89 d。在致死时间保持不变的条件下, 在幼虫发生的早期进行野外喷洒病毒, 这样在很大程度上会增加病毒在幼虫之间的水平传播。考虑到防治成本和防治效果, 应在幼虫 1 龄至 3 龄期间, 最好在孵化始期施用, 此时幼虫对病毒较敏感, 对杨树的为害尚轻, 喜群聚取食, 易于疾病的流行, 施用病毒制剂时也较节省劳力, 防治效果好。

昆虫杆状病毒因专一性强、可持续控制的优点, 越来越受到人们的重视并应用于防治农林害虫^[27]。本研究获得的 MisiGV 新病毒株对杨小舟蛾幼虫有极强的致病性, 在高剂量病毒下, 幼虫可在相对较短时间死亡。即使在低剂量浓度下, 存活幼虫的化蛹率降低, 可见, MisiGV 可作为防控杨小舟蛾的一理想生物因子。

4 结论

本文报道的 MisiGV 新病毒对杨小舟蛾幼虫有很强致病性, 为该害虫的生物防治提供新病毒资源。

参考文献:

- [1] 高悦, 解春霞. 杨小舟蛾对4个杨树品种叶片取食的选择性[J]. 西南林业大学学报, 2012, 32(1): 61-63.
- [2] 郭同斌, 杜伟, 刘忠刚. 杨小舟蛾的发生规律[J]. 南京林业大学学报, 2006, 30(5): 115-118.
- [3] Wu C S, Fang C L, Wang R Z. A taxonomic study of the genus *Micromelalopha* Nagano in China[J]. Acta Entomologica Sinica, 2003, 46(2): 222-227.
- [4] 范立鹏, 张真. 杨小舟蛾生殖行为及寄主选择机制研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2014.
- [5] 郭同斌, 王振营, 梁波, 等. 杨小舟蛾的生物学特性[J]. 南京林业大学学报, 2000, 24(5): 56-60.
- [6] 张莹, 孙新杰, 徐红彦, 等. 豫西南南阳市杨小舟蛾世代变化规律分析研究[J]. 现代园艺, 2018, 26(7): 157.
- [7] 张雨, 丰凯, 汤方, 等. 杨小舟蛾 MtroOBP1 基因的克隆、序列分析及表达[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2020, 44(5): 215-217.
- [8] 赵海燕. 信阳市杨小舟蛾的风险评估及其防控对策[J]. 河南林业科技, 2017, 37(2): 10-12.
- [9] Wang Q H, Wang Y Z, Wang R Z, et al. Identification and characterization of a new nucleopolyhedrovirus strain of *Neodiprion*

- zhejiangensis* Zhou & Xiao (Hymenoptera: Diprionidae)[J]. Journal of Pure and Applied Microbiology, 2016, 10(1): 103-108.
- [10] Wen F Y, Zhang Y A, Qu L J, *et al.* Two new cell lines originated from the embryos of *Clostera anachoreta* (Lepidoptera: Notodontidae) Characterization and susceptibility to bacuoviruses[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 2009, 45(8): 409-413.
- [11] 谭业平, 赵克斌, 陆志宇. 杨小舟蛾质型多角体病毒(CPV)的分离[J]. 武汉大学学报, 1984 (4): 94.
- [12] 王承锐, 李恩杰, 王少博, 等. 春尺蠖新病毒株的鉴定及其对春尺蠖核型多角体病毒的增效作用[J]. 中国生物防治学报, 2020, 36 (2): 196-202.
- [13] 刘劲军, 蒋杰贤, 游兰韶. 不同虫龄甜菜夜蛾幼虫实验种群对核型多角体病毒的敏感性[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 2004, 30 (1): 41-42.
- [14] 陈琳, 王广利, 魏洪义, 等. 杨小舟蛾的羽化和生殖行为节律[J]. 应用生态学报, 2014, 25 (8): 2425-243.
- [15] Zhang M L, Wang L Q, Qi Y, *et al.* Comparative genomic analysis of three geographical isolates from China reveals high genetic stability of *Plutella xylostella* granulovirus[J]. PLoS One, 2021, 16(1): e0243143.
- [16] 张永安, 仲国立, 侯玉霞, 等. 茶尺蠖核型多角体病毒(EoNPV)的PCR检测方法及其生物活性研究[J]. 林业科学研究, 2008, 21 (4): 451-455.
- [17] 甘恩宇, 李晓峰, 于欢, 等. 3株苹果蠹蛾颗粒体病毒本土株的毒力测定与田间防效[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2011, 39 (10): 119-122.
- [18] 周卓, 段景攀, 韩丽, 等. 温度对不同发育时期落叶松尺蠖的影响[J]. 生态学杂志, 2021, 40 (7): 2194-2200.
- [19] 蔡秀玉, 丁翠. 在我国发现的一些昆虫病毒[J]. 昆虫学报, 1982, 25 (4): 413-415.
- [20] 李亚平, 毕庶春. 分月扇舟蛾颗粒体病毒观察简报[J]. 林业科技通讯, 1981 (5): 23-24.
- [21] 李海霞, 郭树平, 王志英. 分月扇舟蛾颗粒体病毒病理、毒力及蛋白基因的研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2006.
- [22] 汤显春, 彭辉银, 张小霞, 等. 分月扇舟蛾颗粒体病毒的初步研究[C]. 第三届全国绿色环保农药新技术、新产品交流会暨第二届全国生物农药研讨会论文集, 2004, 205-211.
- [23] 陶万强, 潘彦平, 王金利, 等. 杨扇舟蛾颗粒体病毒室内增殖的研究[J]. 中国森林病虫, 2008, 28 (3): 9-14.
- [24] Li H X, Wang Z Y, Guo X P, *et al.* Bioassay of *Clostera anastomosis* Granulosis virus[J]. Journal of Forestry Research, 2006, 17(1): 50-52.
- [25] 李军, 杨秋珍, 黄敬峰, 等. 杨扇舟蛾和杨小舟蛾危害对意大利214高光谱特征的影响[J]. 北京林业大学学报, 2007, 29 (6): 148-154.
- [26] Li S Y. Virulence of a nucleopolyhedrovirus to *Neodiprion abietis* (Hymenoptera: Diprionidae)[J]. Journal of Economic Entomology, 2005, 98(6): 1870-1875.
- [27] 黄博, 朱梦瑶, 丘霏珊, 等. 核型多角体病毒侵染及其与宿主免疫系统互作的研究进展[J]. 环境昆虫学报, 2021, 43 (2): 329-339.

Identification and Biological Activity of a New Virus of *Micromelalopa sieversi* (Staudinger) (Lepidoptera: Notodontidae)

LIU Rui-xia^{1,2}, XIE Dan-jie², LIU Jin-shan³, WANG Qing-hua², ZHANG Yong-an², DUAN Li-qing¹

(1. Forestry College, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010019, Inner Mongolia, China; 2. Research Institute of Forest Ecology Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry/Key Laboratory of Forest Protection, National Forestry and Grassland Administration, Beijing 100091, China; 3. Forest Pest Control and Quarantine Station of Fugou Country, Zhoukou 461300, He'nan, China)

Abstract: [Objective] To identify a new viral strain of baculovirus which have high virulence against *Micromelalopa sieversi* (Staudinger). [Method] The ultrastructure and biological activity of this virus were study to determine its biological control potential. [Result] The ultrastructure showed that the occlusion bodies of the virus mainly consisted of ellipse, with an average size of $0.43 \times 0.21 \mu\text{m}$ and the inclusion bodies embedded a single rod-shaped virion. It had the structural features of a granulovirus named as *Micromelalopa sieversi* granulovirus (MisiGV). Biologic activity assays showed that MisiGV is highly virulent in the 3rd instar larvae of *M. troglodyta*, with an LC_{50} of $2.37 \times 10^5 \text{ OBs} \cdot \text{mL}^{-1}$. The LT_{50} of the virus increased with the decreasing of virus concentration. When the virus concentration were 1.2×10^7 , 4.0×10^6 , 4.0×10^5 , 1.2×10^5 and $4.0 \times 10^4 \text{ OBs} \cdot \text{mL}^{-1}$, the LT_{50} values were 7.55, 11.61, 14.69, 16.06 and 17.62 days, respectively. The susceptibility of larvae at different instar to different MisiGV concentrations indicated that the younger larvae of *M. troglodyta* were more susceptible to virus than the older larvae, and the speed of larval death depended on the age and virus concentration. Generally, at $4.0 \times 10^6 \text{ OBs} \cdot \text{mL}^{-1}$, the highest cumulative mortality of 2nd and 4th instar larvae were 90.00% and 50.58%, respectively, whereas the times required to kill 50% of the 2nd and 4th instars were approximately 6.81 days and 12.89 days. At $4.0 \times 10^4 \text{ OBs} \cdot \text{mL}^{-1}$, the highest cumulative mortality of 2nd and 4th instar larvae were 83.33% and 36.67%, the LT_{50} values were approximately 11.91 days and 25.65 days. In addition, after different concentration of MisiGV inoculation, the pupation and emergence rate of surviving larvae were significantly lower than that of the control. However, no significant difference on the emergence rate was observed at $4.0 \times 10^4 \text{ OBs} \cdot \text{mL}^{-1}$ MisiGV concentration. [Conclusion] A new virus-MisiGV is reported. This virus-MisiGV is a biological control factor with development potential and application prospects.

Keywords: *Micromelalopa sieversi* (Staudinger); granulovirus; biological activity; susceptibility

(责任编辑: 崔 贝)