

# 烟芽夜蛾囊泡病毒3h株对草地贪夜蛾幼虫的感染特性及其生长发育的影响

刘 航<sup>1</sup> 廖用信<sup>2</sup> 陈壮美<sup>1</sup> 赵琳超<sup>1</sup> 黄国华<sup>1\*</sup>

(1. 湖南农业大学植物保护学院, 植物病虫害生物学与防控湖南省重点实验室, 长沙 410128;

2. 武冈市农业农村局, 湖南 武冈 422400)

**摘要:** 为寻找有效防控外来入侵物种草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 的技术, 以烟芽夜蛾囊泡病毒3h株 (*Heliothis virescens ascovirus* 3h, HvAV-3h) 为研究对象, 通过测定不同龄期草地贪夜蛾幼虫口服或针刺感染 HvAV-3h 后的死亡率、存活时间、取食量及体重, 分析该毒株对草地贪夜蛾幼虫的感染特性及其生长发育的影响。结果显示, 草地贪夜蛾 1、2 龄幼虫口服 HvAV-3h 后的校正死亡率分别为 9.22% 和 0, 3~6 龄幼虫针刺感染 HvAV-3h 后的校正死亡率则高达 100.00%, 感染 HvAV-3h 的幼虫均在幼虫期或蛹期死亡。3~5 龄幼虫针刺感染 HvAV-3h 后的存活时间明显长于健康幼虫; 3~6 龄幼虫针刺感染 HvAV-3h 后其体重和取食量均受到不同程度的抑制作用, 体重抑制率分别为 67.79%、41.68%、16.31% 和 10.30%, 总取食量抑制率分别为 57.80%、33.90%、17.42% 和 41.82%; 其中 3 龄幼虫针刺感染 HvAV-3h 后的体重和取食量被显著抑制, 且蜕皮困难, 最终在幼虫期死亡; 部分 4~6 龄感染 HvAV-3h 幼虫能够完成化蛹, 但是均无法羽化。表明 HvAV-3h 感染能够有效控制草地贪夜蛾幼虫, 有望开发为草地贪夜蛾的生防制剂。

**关键词:** 草地贪夜蛾; 烟芽夜蛾囊泡病毒3h株 (HvAV-3h); 校正死亡率; 生防制剂

## Infection characteristics of *Heliothis virescens ascovirus* 3h (HvAV-3h) in *Spodoptera frugiperda* larvae and its effects on host growth and development

LIU Hang<sup>1</sup> LIAO Yongxin<sup>2</sup> CHEN Zhuangmei<sup>1</sup> ZHAO Linchao<sup>1</sup> HUANG Guohua<sup>1\*</sup>

(1. Hunan Provincial Key Laboratory for Biology and Control of Plant Diseases and Insect Pests, College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan Province, China; 2. Wugang Municipal Bureau of Agriculture and Rural Affairs, Wugang 422400, Hunan Province, China)

**Abstract:** In order to find an effective method for controlling the invasive alien species *Spodoptera frugiperda*, *Heliothis virescens ascovirus* 3h (HvAV-3h) was used to inoculate the larvae of different instars *per os* or by injection. The survival time, the mortality rate, food intake and body weight of the larvae after infection were recorded. Further, the infection characteristics of HvAV-3h in *S. frugiperda* larvae and its effects on host growth and development were analyzed. The results showed that the corrected mortality rates of the first to second instars inoculated *per os* were 9.22% and 0, respectively. The corrected morbidity rate of the third to sixth instars inoculated by injection was up to 100.00% with all the infected larvae dead during larval or pupal stages. The survival time of the third to fifth instars infected by HvAV-3h was significantly longer than that of the healthy larvae. The body weight and food intake of the third to sixth instars infected by injection were inhibited to varying degrees. The weight inhibition

基金项目: 长沙市科技计划项目(2019CSKJ1035)

\* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: ghhuang@hunan.edu.cn

收稿日期: 2019-07-24

rates of the third to sixth instars were 67.79%, 41.68%, 16.31% and 10.30%, respectively, and the total food intake inhibition rates were 57.80%, 33.90%, 17.42% and 41.82%, respectively. The body weight and food intake of the third instars infected by injection were significantly inhibited and all the infected larvae died due to the difficulty in molting during the larval stage. Some infected larvae in the fourth to sixth instars could pupate, but could not complete eclosion. In conclusion, HvAV-3h can effectively control *S. frugiperda* larvae and has the potential to be developed as a biocontrol agent for controlling *S. frugiperda*.

**Key words:** *Spodoptera frugiperda*; *Heliothis virescens* ascovirus 3h (HvAV-3h); corrected morbidity rate; biocontrol agent

草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 又称秋黏虫, 隶属于鳞翅目 Lepidoptera 夜蛾科 Noctuidae 贪夜蛾属 *Spodoptera*, 原产于美洲热带和亚热带地区 (Sparks, 1979), 广泛分布于美洲大陆, 是重要的杂食性农业害虫 (Todde & Poole, 1980)。草地贪夜蛾具有极强的迁飞能力, 自 2016 年 1 月首次侵入非洲尼日利亚和加纳以来 (Goergen et al., 2016), 仅用了 2 年时间就侵入到撒哈拉以南的大部分非洲国家。该虫于 2018 年 5 月侵入印度 (Sharanabasappa et al., 2018), 当年 12 月侵入缅甸 (吴秋琳等, 2019), 2019 年 1 月侵入我国云南省 (姜玉英等, 2019a), 截至当年 10 月已扩散至 26 个省 (自治区、直辖市) (姜玉英等, 2019b), 对我国乃至世界农业造成了极大的损失。

草地贪夜蛾可为害玉米、水稻、麦类等粮食作物和果树、蔬菜、花卉、烟草等经济作物共 353 种植物 (Goergen et al., 2016), 其在迁飞扩散期间受不同国家各种农药的选择压力, 已对多种常用杀虫剂产生了很高的抗性, 形成大区域无药可用的局面 (赵胜园等, 2019)。另外, 农药剂量的增加, 易引发农产品质量安全、环境污染等系列问题 (李晓强等, 2008; 陈印军等, 2014; 吴孔明, 2018)。针对新侵入害虫寻找并发现对其能有效控制的本地自然天敌, 是防控草地贪夜蛾的重要途径, 有利于构建防控草地贪夜蛾的环境友好型技术体系, 保障我国农业生产安全。

囊泡病毒是一类夜蛾科昆虫专性寄生的双链 DNA 昆虫病毒 (Federici, 1983), 具有急性致病、慢性致死的典型致病特征, 感染该病毒能够造成鳞翅目幼虫及蛹的死亡, 其中最常见的是夜蛾科幼虫, 包括粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni*、烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*、草地贪夜蛾等 (Carner & Hudson, 1983; Hamm et al., 1986; Cheng et al., 2005)。囊泡病毒在鳞翅目夜蛾科中有着最广泛的寄主范围, 但其口服感染活性低, 主要通过寄生蜂产卵行为在宿主幼虫个体间进行传播 (Govindara-

jan & Federici, 1990)。宿主幼虫感染囊泡病毒后生长发育迟缓、肌肉弹性降低、取食量减少、体色发黄且蜕皮困难 (Carner & Hudson, 1983; Hamm et al., 1985; Govindarajan & Federici, 1990)。囊泡病毒在虫体细胞内复制, 组织细胞完全裂解, 含病毒粒子的囊泡释放到血淋巴中 (Hamm et al., 1998), 使血淋巴呈奶白色 (Federici et al., 1990; Bideshi et al., 2006)。Huang et al. (2012) 在我国长沙市从野外采集到的甜菜夜蛾幼虫体内分离获得烟芽夜蛾囊泡病毒 3h 株 (*Heliothis virescens* ascovirus 3h, HvAV-3h), 并发现其对棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、甜菜夜蛾、斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 等具有强致病力和高致死率, 但其对新入侵我国的草地贪夜蛾是否也具有强感染性、高致病力尚不清楚。因此, 本研究拟系统检测 HvAV-3h 对草地贪夜蛾幼虫的感染特性, 以及草地贪夜蛾幼虫感染 HvAV-3h 之后的生长发育特性, 以期为草地贪夜蛾的生物防治及 HvAV-3h 生防制剂的开发利用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试虫源和寄主植物: 草地贪夜蛾幼虫于 2019 年 5 月采自湖南省武冈市玉米田, 采用玉米叶片和人工饲料在  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 、光周期 14 L: 10 D 条件下进行饲养。寄主植物为取自湖南农业大学植物保护学院东沙基地种植的拔节期京科糯 2000 玉米叶片; 人工饲料使用大豆粉、小麦胚芽、氯化胆碱、维生素混合物、胆固醇、韦氏盐、蔗糖、山梨酸、对羟基苯甲酸甲酯、琼脂、抗坏血酸、乙酸进行制作。

供试病毒: HvAV-3h 由本实验室按照 Li et al. (2013) 方法长期传代饲养的斜纹夜蛾种群进行扩繁。用左手大拇指和食指将幼虫固定在左手上进行接种, 使幼虫的腹部朝上, 露出所有腹足, 以便于将沾有 HvAV-3h 的微型针平行刺穿幼虫的腹足基部。

接种时微型针方向与虫体保持平行,防止斜扎时扎进幼虫体内,造成幼虫机械损伤最终死亡。当针头从进入幼虫体内约0.5 mm后拔出微针,然后用斜纹夜蛾人工饲料单头饲养,收集被HvAV-3h感染7 d后的幼虫血淋巴,即为含毒血淋巴,同时收集未被病毒感染幼虫血淋巴即无毒血淋巴作对照,收集到的血淋巴于 $-20\pm 1^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

**试剂和仪器:**本试验所用试剂均为国产分析纯。Shimadzu AUY120 万分之一天平,株式会社岛津制作所;GZX-150BSH-III光照培养箱,上海新苗医疗器械制造有限公司;Axi Vert A1 倒置荧光显微镜,德国蔡司公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 草地贪夜蛾幼虫口服感染HvAV-3h试验

口服试验采用Hu et al. (2016)龄期区分喂养法,基于HvAV-3h口服感染活性低,仅对低龄幼虫有一定效果的结论(Hu et al., 2016),本研究仅选用1、2龄草地贪夜蛾幼虫进行口服感染试验。分别取1、2龄幼虫各50头,以群体形式喂养在涂抹50  $\mu\text{L}$ 含毒血淋巴的京科糯2000玉米新鲜叶片表面,饲养条件为温度 $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、光周期14 L:10 D,取食48 h后为避免试虫长大后自相残杀,分开单头以新鲜玉米叶片饲养于底面直径3.0 cm、高2.8 cm的杯型养虫盒中;以分别喂食涂抹50  $\mu\text{L}$ 无毒血淋巴的玉米新鲜叶片的1、2龄幼虫作为对照,每天观察幼虫生长发育状况并记录幼虫存活时间、死亡数或化蛹数,计算校正死亡率;校正死亡率=(处理死亡率-对照死亡率)/(1-对照死亡率) $\times 100\%$ 。

### 1.2.2 草地贪夜蛾幼虫针刺接种感染HvAV-3h试验

由于1~2龄草地贪夜蛾幼虫体型小,针刺机械死亡率过高,因此针刺接种试验,即模拟寄生蜂产卵行为传播,仅针对草地贪夜蛾3~6龄幼虫开展。参照扩繁供试病毒的接种方法进行针刺接种,分别选取3、4、5、6龄幼虫各96头,其中48头接种含毒血淋巴,48头接种无毒血淋巴作对照,分别在 $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、光周期14 L:10 D条件下单头饲养于底面直径3.0 cm、高2.8 cm的杯型养虫盒中,每日更换新鲜人工饲料。每天记录幼虫存活时间、死亡数或化蛹数,并用万分之一电子天平于每天同一时间称取幼虫体重和饲料重,计算取食量,即幼虫取食前后饲料的减少量。同时每天将适宜大小的人工饲料放入同规格无草地贪夜蛾幼虫的养虫盒中,称取前后重量,测定饲料的水分蒸发率(Li et al., 2013)。日取食量=饲料初始重量 $\times (1 - \text{饲料日水分蒸发率}) - \text{被幼虫取食后饲料重}$

量;饲料日水分蒸发率=1-水分蒸发后饲料重量/初始饲料重量;单头幼虫总取食量即为单头幼虫日取食量之和。

## 1.3 数据分析

使用SPSS 16.0软件对试验数据进行统计分析,应用Kaplan-Meier法进行生存分析,计算半数存活时间 $ST_{50}$ 及95%置信区间,并通过Log-rank法对生存曲线的差异进行显著性检验,采用 $t$ 测验法对草地贪夜蛾幼虫的体重和取食量进行差异显著性检验。使用Prism 6.0绘制图表。

## 2 结果与分析

### 2.1 草地贪夜蛾幼虫口服HvAV-3h后的感染特性

草地贪夜蛾1、2龄幼虫口服HvAV-3h后的感染致死数极低,其校正死亡率分别为9.22%和0。所有处理中仅有2头1龄幼虫被HvAV-3h感染,表现为虫体淡绿色、肌肉弹性低、蜕皮困难等病症,龄期维持在2龄末至3龄初,其存活时间分别为12 d和14 d,其余处理组幼虫与健康幼虫的幼虫期无明显差异,并能顺利化蛹,羽化为成虫。

### 2.2 草地贪夜蛾幼虫针刺接种HvAV-3h后的感染特性

模拟寄生蜂产卵行为对3~6龄草地贪夜蛾幼虫进行针刺接种HvAV-3h后,所有幼虫均受到感染,且校正死亡率为100.00%,但不同龄期幼虫被HvAV-3h感染后的生长发育历程明显不同,3龄幼虫感染HvAV-3h后不能成功化蛹,均在幼虫期死亡,化蛹率为0;4龄幼虫感染后少部分能成功化蛹,而5、6龄幼虫感染后大部分能成功化蛹,4、5、6龄幼虫的化蛹率分别为14.29%、60.42%和96.30%,但幼虫化蛹后不能羽化,均在蛹期死亡。

Kaplan-Meier生存曲线分析结果显示,3、4和5龄幼虫感染HvAV-3h后的半数存活时间与健康幼虫相比差异显著,而6龄幼虫感染HvAV-3h后的半数存活时间与健康幼虫无显著差异(表1)。3、4、5和6龄健康幼虫半数存活时间分别为9、8、7和5 d,分别在接种后7~8、5~7、4~5和1~2 d即开始进入预蛹期,分别需要7~11、7~10、5~8和2~5 d完成化蛹;而3、4龄幼虫感染HvAV-3h后的半数存活时间较健康幼虫显著延长,均为13 d且在接种后陆续死亡;5、6龄幼虫感染HvAV-3h后的半数存活时间为8 d和4 d,分别在接种后4~5 d和1~2 d开始进入预蛹期,部分化蛹成功,但是均无法正常羽化。

针对草地贪夜蛾幼虫感染HvAV-3h后的生存曲线的整体累积效应(图1),经Log-rank法检验结

果表明,3、4、5龄幼虫感染HvAV-3h后的存活时间与健康幼虫差异显著(3龄: $\chi^2=58.367$ ,  $df=1$ ,  $P<0.001$ ; 4龄: $\chi^2=69.326$ ,  $df=1$ ,  $P<0.001$ ; 5龄: $\chi^2=18.115$ ,  $df=1$ ,  $P<0.001$ ), 6龄幼虫感染HvAV-3h后的存活时间与

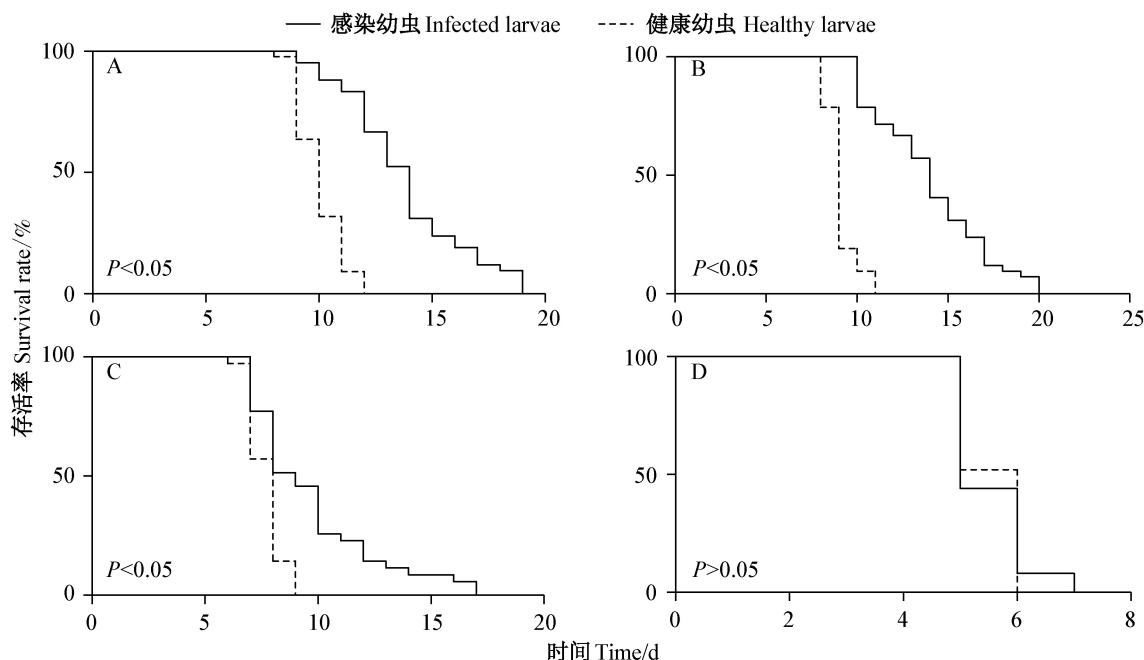
健康幼虫无显著差异( $\chi^2=0.002$ ,  $df=1$ ,  $P=0.965$ ), 表明除6龄幼虫因为即将化蛹其幼虫期太短表现不出明显差异外, 其它龄期幼虫被HvAV-3h感染后会显著延长其存活时间。

表1 草地贪夜蛾幼虫针刺感染HvAV-3h后的存活时间

Table 1 Survival time of *Spodoptera frugiperda* larvae after HvAV-3h inoculation by micro-pin injection d

处理 Treatment	3龄 Third instar		4龄 Fourth instar		5龄 Fifth instar		6龄 Sixth instar	
	半数存活 时间	95%置信区间 95% confidence interval	半数存活 时间	95%置信区间 95% confidence interval	半数存活 时间	95%置信区间 95% confidence interval	半数存活 时间	95%置信区间 95% confidence interval
	ST <sub>50</sub>		ST <sub>50</sub>		ST <sub>50</sub>		ST <sub>50</sub>	
被感染幼虫 Infected larva	13.0±0.4 a	12.2–13.8	13.0±0.5 a	12.1–13.9	8.0±0.5 a	7.0–9.0	4.0±0.0 a	4.0–4.0
健康幼虫 Healthy larva	9.0±0.2 b	8.6–9.4	8.0±0.1 b	7.8–8.2	7.0±0.1 b	6.7–7.3	5.0±0.0 a	5.0–5.0

表中半数存活时间数据为平均数±标准误。同列后不同字母表示经Log-rank法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data of ST<sub>50</sub> are mean±SE. Different letters in the same column indicate significant difference at  $P<0.05$  level by Log-rank test.



A~D: 3、4、5、6龄幼虫。A~D: 3rd, 4th, 5th, 6th instar larvae.

图1 草地贪夜蛾幼虫针刺感染HvAV-3h后的生存曲线

Fig. 1 Survival curves of *Spodoptera frugiperda* larvae inoculated with HvAV-3h by micro-pin injection

$P<0.05$ 表示经Log-rank法检验感染HvAV-3h幼虫和健康幼虫之间差异显著,  $P>0.05$ 表示两者间无显著差异。When  $P<0.05$ , there is significant difference between infected and healthy larvae by Log-rank test; when  $P>0.05$ , there is no significant difference between infected and healthy larvae.

## 2.3 针刺感染HvAV-3h对幼虫生长发育的影响

### 2.3.1 针刺感染HvAV-3h对幼虫体重的影响

草地贪夜蛾幼虫感染HvAV-3h后,各龄期幼虫体重受到了不同程度的抑制,龄期越低抑制效果越明显,3、4、5和6龄幼虫的体重抑制率分别为67.79%、41.68%、16.31%和10.30%。3龄幼虫感染HvAV-3h后的体重与健康幼虫在接种后1~10 d差异显著(第

1天: $t=-2.480$ ,  $df=73.909$ ,  $P=0.015$ ;第2天: $t=-4.272$ ,  $df=79.383$ ,  $P<0.001$ ;第3天: $t=-3.050$ ,  $df=84$ ,  $P<0.003$ ;第4天: $t=-10.837$ ,  $df=50.036$ ,  $P<0.001$ ;第5天: $t=-12.112$ ,  $df=51.184$ ,  $P<0.001$ ;第6天: $t=-14.468$ ,  $df=55.018$ ,  $P<0.001$ ;第7天: $t=-11.145$ ,  $df=51.741$ ,  $P<0.001$ ;第8天: $t=-6.412$ ,  $df=30.930$ ,  $P<0.001$ ;第9天: $t=-9.935$ ,  $df=48$ ,  $P<0.001$ ;第10天: $t=-7.080$ ,

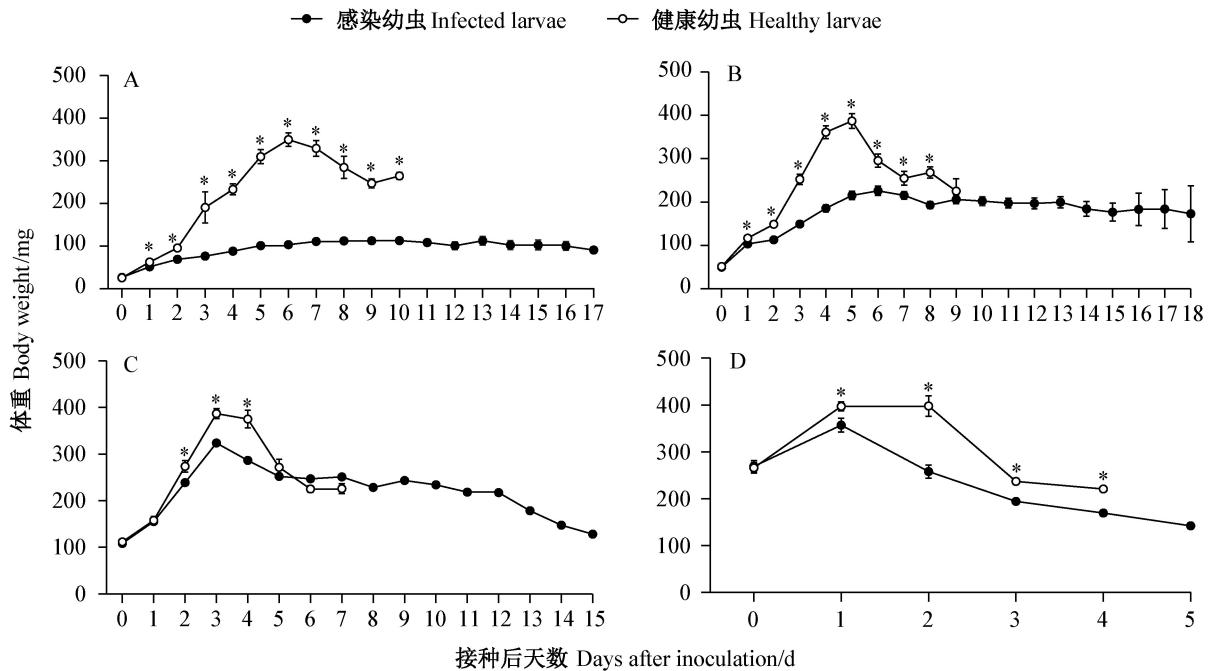
$df=37, P<0.001$ ; 图2-A)。3龄健康幼虫在接种无毒血淋巴后0~6 d体重急剧上升,从25.27 mg增长到349.30 mg,第7天开始进入预蛹期,体重逐渐下降;而感染HvAV-3h幼虫在接种后0~17 d的体重变化较小,在26.24~112.54 mg之间,且无法进入预蛹期。

4龄幼虫感染HvAV-3h后的体重与健康幼虫在接种后1~8 d差异显著(第1天: $t=-2.524, df=82, P=0.014$ ;第2天: $t=-6.229, df=82, P<0.001$ ;第3天: $t=-7.729, df=65.411, P<0.001$ ;第4天: $t=-10.243, df=64.441, P<0.001$ ;第5天: $t=-8.711, df=65.199, P<0.001$ ;第6天: $t=-3.759, df=82, P<0.001$ ;第7天: $t=-2.293, df=73, P=0.025$ ;第8天: $t=-3.784, df=48, P<0.001$ ),在接种后第9天无显著差异(第9天: $t=-0.631, df=35, P=0.532$ ;图2-B)。4龄健康幼虫在接种无毒血淋巴后0~5 d体重明显增长,从50.94 mg增长到387.08 mg,第5天开始进入预蛹期;而感染HvAV-3h幼虫在接种后0~6 d体重也有一定增长,从49.34 mg增长到225.75 mg,从第7天开始体重逐渐缓慢下降。

5龄幼虫感染HvAV-3h后的体重与健康幼虫在接种后0~1 d无显著差异(第0天: $t=-0.747, df=68,$

$P=0.457$ ;第1天: $t=-0.223, df=68, P=0.824$ ),在接种后2~4 d出现显著差异(第2天: $t=-2.157, df=68, P=0.035$ ;第3天: $t=-3.590, df=68, P=0.001$ ;第4天: $t=-4.147, df=52.110, P<0.001$ ),在接种第5天无显著差异(第5天: $t=-0.954, df=67, P=0.344$ ;图2-C)。5龄健康幼虫在接种无毒血淋巴后0~3 d体重明显增长,从111.62 mg增长到386.75 mg,在第4天开始进入预蛹期,体重下降;而感染HvAV-3h幼虫在接种后0~3 d体重也出现明显增长,从108.28 mg增长到323.67 mg,在第4天开始进入预蛹期,体重逐渐下降。

6龄幼虫感染HvAV-3h后的体重与健康幼虫在接种第1~4天差异显著(第1天: $t=-2.334, df=48, P=0.024$ ;第2天: $t=-5.364, df=40.533, P<0.001$ ;第3天: $t=-4.917, df=48, P<0.001$ ;第4天: $t=-6.051, df=22, P<0.001$ ;图2-D)。6龄健康幼虫在接种无毒血淋巴后0~2 d体重出现明显增长,从265.76 mg增长到397.83 mg,在第3天开始进入预蛹期,体重下降;而感染HvAV-3h幼虫在接种后0~1 d体重出现明显增长,从268.91 mg增长到356.88 mg,在第2天开始进入预蛹期,体重逐渐下降。



A~D: 3、4、5、6龄幼虫。A~D: 3rd, 4th, 5th, 6th instar larvae.

图2 草地贪夜蛾幼虫针刺感染HvAV-3h后的体重

Fig. 2 Body weights of *Spodoptera frugiperda* larvae inoculated with HvAV-3h by micro-pin injection

图中数据为平均数 $\pm$ 标准误。\*表示感染HvAV-3h幼虫与健康幼虫之间经 $t$ 测验法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean $\pm$ SE. \* indicates significant difference between HvAV-3h-inoculated and healthy larvae at  $P<0.05$  level by  $t$  test.

### 2.3.2 针刺感染HvAV-3h对幼虫日取食量的影响

3龄幼虫感染HvAV-3h后的日取食量与健康幼

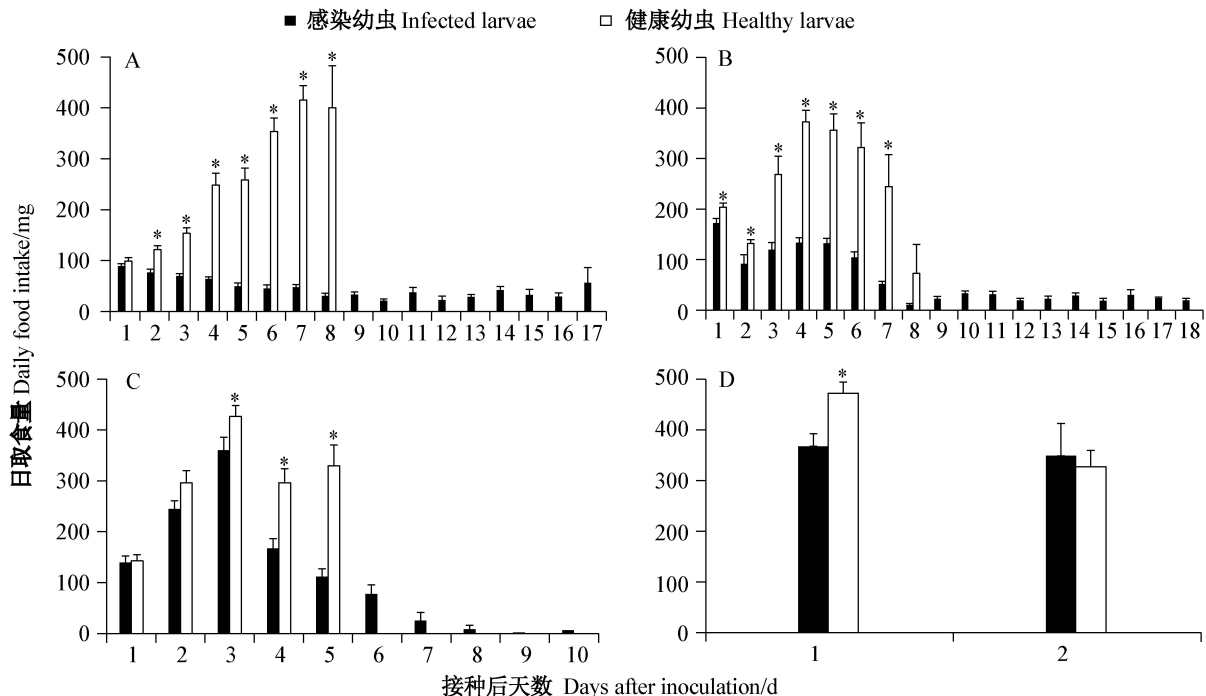
虫在接种后第1天无显著差异(第1天: $t=-1.259, df=84, P=0.211$ ),在接种后2~8 d出现显著差异(第

2天:  $t=-4.395$ ,  $df=84$ ,  $P<0.001$ ; 第3天:  $t=-6.919$ ,  $df=58.495$ ,  $P<0.001$ ; 第4天:  $t=-7.772$ ,  $df=46.165$ ,  $P<0.001$ ; 第5天:  $t=-8.628$ ,  $df=50.281$ ,  $P<0.001$ ; 第6天:  $t=-11.257$ ,  $df=41.122$ ,  $P<0.001$ ; 第7天:  $t=-12.708$ ,  $df=16.995$ ,  $P<0.001$ ; 第8天:  $t=-4.457$ ,  $df=5.042$ ,  $P=0.007$ ; 图3-A)。健康幼虫在接种无毒血淋巴后的1~7 d日取食量增长明显,从99.25 mg增长到415.16 mg,从第7天开始进入预蛹期,取食量逐渐下降;而感染HvAV-3h幼虫在接种后的1~8 d日取食量逐渐降低,从89.18 mg降至30.23 mg,从第9天开始取食量始终维持在较低水平,无法进入预蛹期,最终全部死亡。

4龄幼虫感染HvAV-3h后的日取食量在接种后1~7 d较健康幼虫显著降低(第1天:  $t=-2.554$ ,  $df=82$ ,  $P=0.012$ ; 第2天:  $t=-2.053$ ,  $df=56.416$ ,  $P=0.045$ ; 第3天:  $t=-3.855$ ,  $df=54.336$ ,  $P<0.001$ ; 第4天:  $t=-9.650$ ,  $df=56.235$ ,  $P<0.001$ ; 第5天:  $t=-6.576$ ,  $df=40.401$ ,  $P<0.001$ ; 第6天:  $t=-4.324$ ,  $df=10.017$ ,  $P=0.001$ ; 第7天:

$t=-3.040$ ,  $df=5.082$ ,  $P=0.028$ ; 图3-B)。健康幼虫在接种无毒血淋巴后4 d内日取食量呈上升趋势,从203.77 mg增长到372.46 mg,从第5天开始进入预蛹期,取食量逐渐下降;而感染HvAV-3h幼虫在接种后1~7 d内日取食量呈下降趋势,从172.25 mg降至51.47 mg,随后其日取食量一直维持在较低水平。

5龄幼虫感染HvAV-3h后的日取食量与健康幼虫在接种后1~2 d无显著差异(第1天:  $t=-0.191$ ,  $df=68$ ,  $P=0.849$ ; 第2天:  $t=-1.757$ ,  $df=59.703$ ,  $P=0.084$ ),在接种后3~5 d存在显著差异(第3天:  $t=-2.016$ ,  $df=68$ ,  $P=0.048$ ; 第4天:  $t=-3.856$ ,  $df=59.839$ ,  $P<0.001$ ; 第5天:  $t=-6.107$ ,  $df=20$ ,  $P<0.001$  图3-C)。健康幼虫在接种无毒血淋巴后1~3 d内的日取食量呈增长趋势,从142.68 mg增长到426.81 mg,第4天开始进入预蛹期,日取食量下降;而感染HvAV-3h幼虫在接种后1~3 d日取食量也出现明显增长,从139.29 mg增长到360.42 mg,第4天开始进入预蛹期,日取食量下降。



A~D: 3、4、5、6龄幼虫。A~D: 3rd, 4th, 5th, 6th instar larvae.

图3 草地贪夜蛾幼虫针刺感染HvAV-3h后的日取食量

Fig. 3 Daily food intakes of *Spodoptera frugiperda* larvae inoculated with HvAV-3h by micro-pin injection

图中数据为平均数±标准误。\*表示感染HvAV-3h幼虫与健康幼虫之间经 $t$ 测验法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. \* indicates significant difference between HvAV-3h-inoculated and healthy larvae at  $P<0.05$  level by  $t$  test.

由于接种后6龄幼虫存活时间短,健康幼虫和感染HvAV-3h幼虫均在接种后第2天即开始进入预蛹期,其体重及日取食量与3、4、5龄幼虫存在明显

差别。根据6龄幼虫进入预蛹期前的数据分析,接种后第1天健康幼虫和感染HvAV-3h幼虫的日取食量存在显著差异(第1天:  $t=-3.156$ ,  $df=48$ ,  $P=0.003$ ),

第2天无显著差异( $t=0.312, df=30, P=0.757$ ;图3-D)。观察发现6龄健康幼虫和感染HvAV-3h幼虫均在接种后2~5 d完成化蛹,而感染HvAV-3h幼虫化蛹后都无法正常羽化,取血淋巴在显微镜下检验,确认为感染病毒致死。

### 2.3.3 针刺感染HvAV-3h对幼虫总取食量的影响

草地贪夜蛾幼虫在感染HvAV-3h后其生长发育历期虽有一定延长,但其总取食量均较健康幼虫显著降低(表2),表明病毒感染显著抑制3~6龄幼虫的总取食量,抑制率分别57.80%、33.90%、17.42%和41.82%。

表2 草地贪夜蛾针刺感染HvAV-3h幼虫和健康幼虫的单头总取食量

Table 2 Total food intake per *Spodoptera frugiperda* larva inoculated with HvAV-3h by micro-pin injection and healthy larvae mg

	3龄 Third instar	4龄 Fourth instar	5龄 Fifth instar	6龄 Sixth instar
被感染幼虫 Infected larva	586.90±37.09 b	917.45±39.43 b	998.36±31.77 b	465.31±35.99 b
健康幼虫 Healthy larva	1 392.95±32.53 a	1 387.89±52.38 a	1 208.89±27.54 a	799.71±42.35 a

表中数据为平均数±标准误。同列不同字母表示经 $t$ 测验法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. Different letters in the same column indicate significant difference at  $P<0.05$  level by  $t$  test.

## 3 讨论

本研究结果表明,草地贪夜蛾仅1龄初孵幼虫能通过口服途径被HvAV-3h感染,且感染数量很低,校正死亡率仅为9.22%。Hu et al.(2016)研究结果同样说明HvAV-3h几乎不能通过口服途径感染甜菜夜蛾的中高龄幼虫,仅对1~2龄幼虫具有较低的感染性,接种HvAV-3h的1、2龄甜菜夜蛾幼虫的校正死亡率分别为21.88%和22.22%。尽管这些结果表明HvAV-3h通过口服途径感染甜菜夜蛾幼虫的能力较感染草地贪夜蛾幼虫更强,但总体而言,宿主幼虫通过口服感染HvAV-3h的效率极低。

在野外,囊泡病毒主要通过昆虫幼虫寄生蜂的产卵行为,由产卵器携带病毒粒子传播给健康的宿主幼虫个体(Govindarajan & Federici, 1990; Li et al., 2016),例如其能依赖黑头折脉茧蜂 *Cardiochiles nigriceps*、黑唇姬蜂 *Campoletis sonorensis* 和红足侧沟茧蜂 *Microplitis croceipes* 等实现高效传播(Tillman et al., 2004)。囊泡病毒作为一种依赖于寄生蜂产卵行为而流行传播的昆虫病毒(Hamm et al., 1985),在实验室内通过针刺模拟接种感染其宿主幼虫,均表现出极高的感染率和极强的致病力,如针刺感染HvAV-3h的3、4和5龄甜菜夜蛾幼虫的校正死亡率分别为96.58%、98.83%和97.78%(Hu et al., 2016);本研究结果则表明针刺感染HvAV-3h的3~6龄草地贪夜蛾幼虫的校正死亡率均高达100.00%,均在幼虫期或蛹期死亡。

本研究中草地贪夜蛾4~6龄幼虫感染HvAV-3h后,部分个体的日取食量未受到明显影响,且能够成功化蛹。而在HvAV-3h感染3~5龄甜菜夜蛾幼虫的

研究中,被感染幼虫会经历漫长的化蛹过程最后化蛹失败(Hu et al., 2016),这与本研究结果存在一定差异。造成此差异的原因可能是草地贪夜蛾高龄幼虫对HvAV-3h的抵抗能力较甜菜夜蛾幼虫略强,具体原因有待进一步研究确认。鉴于HvAV-3h的急致病性和强致病力的特性,当其感染中低龄幼虫时,可完全抑制宿主幼虫的暴食期,从而有效抑制当代害虫的为害,作为生防病原微生物表现出独特的优势。本研究结果显示,感染HvAV-3h的草地贪夜蛾幼虫总体表现出肌肉弹性降低、总取食量减少、生长阻滞以及蜕皮困难等病理反应,最终在幼虫期或蛹期死亡,无法完成整个生活史。感染HvAV-3h的3龄甜菜夜蛾、棉铃虫、斜纹夜蛾幼虫的取食量在接种后第2~3天即显著减少(Li et al., 2013),4龄甜菜夜蛾幼虫从第2天起取食量也受到显著抑制(Hu et al., 2016),本研究结果与上述研究结论一致,表明HvAV-3h在草地贪夜蛾生物防治领域同样具有较好的开发潜力。

最新研究表明,吡虫啉、高效氯氟菊酯等传统农药已经对草地贪夜蛾失去良好的防控效果(赵胜园等, 2019),同时农药大量使用会显著加大环境和生态的承受负荷,对害虫天敌寄生蜂的生存乃至人类自身安全造成严重威胁(张俊杰等, 2014)。近年来,转Bt抗虫作物发展迅速,由于其它国家对转Bt作物的监管力度不够,造成了草地贪夜蛾对转Bt作物的抗性显著增强(Fatoretto et al., 2017),使得草地贪夜蛾的防治相当困难,在入侵我国后迅速暴发,且无法得到有效控制。在草地贪夜蛾的防治中仅使用单一的防治方法其效果有限,可以通过农业防治、生物防

治、化学防治及物理防治等多种方法综合使用(吴超等, 2019), 利用杀虫灯和引诱剂能够有效捕杀草地贪夜蛾成虫, 同时喷施少量新型农药配合使用生物防治方法能够更加有效地杀灭草地贪夜蛾幼虫, 在不降低防治效果的前提下, 尽量降低农药对环境造成的污染, 更多的利用生物资源对草地贪夜蛾进行协同防治, 寻找并发现对其能有效控制的本地自然天敌, 充分利用生物之间的协同增效作用, 有利于研发出防控草地贪夜蛾的环境友好型技术体系, 保障我国农业生产安全。斯氏侧沟茧蜂 *Microplitis similis* 作为草地贪夜蛾的一种本土天敌, 能通过其产卵行为传播 HvAV-3h, 致使 HvAV-3h 在斜纹夜蛾和甜菜夜蛾幼虫个体间流行 (Li et al., 2016; Chen et al., 2017; 陈壮美等, 2019)。因此, 利用斯氏侧沟茧蜂传播 HvAV-3h 来防治草地贪夜蛾具有良好的生物防治应用前景。HvAV-3h 作为一种鳞翅目夜蛾科昆虫专性寄生性病毒, 对人畜、环境安全, 能有效抑制草地贪夜蛾幼虫的体重和日取食量, 从而阻止其暴食期的出现、中断其生命周期的完成, 通过“HvAV-3h-斯氏侧沟茧蜂-草地贪夜蛾幼虫”三者之间的互作关系, 研发生态调控技术体系, 以期应用于草地贪夜蛾防控。

### 参 考 文 献 (References)

- BIDESHI DK, DEMATTEI MV, ROULEUX-BONNIN F, KARINE S, TAN YP, BIGOT S, BIGOT Y, FEDERICI BA. 2006. Genomic sequence of *Spodoptera frugiperda* Ascovirus 1a, an enveloped, double-stranded DNA insect virus that manipulates apoptosis for viral reproduction. *Journal of Virology*, 80(23): 11791-11805
- CARNER GR, HUDSON JS. 1983. Histopathology of virus-like particles in *Heliothis* spp. *Journal of Invertebrate Pathology*, 41(2): 238-249
- CHEN XY, HOPKINS RJ, ZHAO YP, HUANG GH. 2017. A place to grow? Host choice and larval performance of *Microplitis similis* (Hymenoptera: Braconidae) in the host *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology*, 46(3): 642-648
- CHEN YJ, FANG LN, YANG JY. 2014. The cropland pollution in China: status and countermeasures. *Chinese Journal of Agricultural Resources and Regional Planning*, 35(4): 1-5, 19 (in Chinese) [陈印军, 方琳娜, 杨俊彦. 2014. 我国农田土壤污染状况及防治对策. *中国农业资源与区划*, 35(4): 1-5, 19]
- CHEN ZM, ZHAO LC, LIU H, LIAO YX, WANG X. 2019. Parasitic behavior and effect of *Microplitis similis* on *Spodoptera frugiperda* larvae. *Plant Protection*, 45(5): 65-70 (in Chinese) [陈壮美, 赵琳超, 刘航, 廖用信, 王星. 2019. 斯氏侧沟茧蜂对草地贪夜蛾幼虫的寄生行为及寄生效应. *植物保护*, 45(5): 65-70]
- CHENG XW, WANG LH, CARNER GR, ARIF BM. 2005. Characterization of three ascovirus isolates from cotton insects. *Journal of Invertebrate Pathology*, 89(3): 193-202
- FATORETTO JC, MICHEL AP, SILVA FIHO MC, SILVA N. 2017. Adaptive potential of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) limits Bt trait durability in Brazil. *Journal of Integrated Pest Management*, 8(1): 17
- FEDERICI BA. 1983. Enveloped double-stranded DNA insect virus with novel structure and cytopathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(24): 7664-7668
- FEDERICI BA, VLAK JM, HAMM JJ. 1990. Comparative study of virion structure, protein composition and genomic DNA of three ascovirus isolates. *Journal of General Virology*, 71(8): 1661-1668
- GOERGEN G, KUMAR PL, SANKUNG SB, TOGOLA A, TAMÒ M. 2016. First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in west and central Africa. *PLoS ONE*, 11(10): e0165632
- GOVINDARAJAN R, FEDERICI BA. 1990. Ascovirus infectivity and effects of infection on the growth and development of noctuid larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 56(3): 291-299
- HAMM JJ, NORLUNG DA, MARTI OG. 1985. Effects of a nonoccluded virus of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on the development of a parasitoid, *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae). *Environmental Entomology*, 14(3): 258-261
- HAMM JJ, PAIR SD, MARTI OGJ. 1986. Incidence and host range of a new ascovirus isolated from fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist*, 69(3): 524-541
- HAMM JJ, STYER EL, FEDERICI BA. 1998. Comparison of field-collected ascovirus isolates by DNA hybridization, host range, and histopathology. *Journal of Invertebrate Pathology*, 72(2): 138-146
- HU J, WANG X, ZHANG Y, ZHENG Y, ZHOU S, HUANG GH. 2016. Characterization and growing development of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae infected by *Heliothis virescens* ascovirus 3h (HvAV-3h). *Journal of Economic Entomology*, 109(5): 2020-2026
- HUANG GH, GARRETSON TA, CHENG XH, HOLZTRAGER MS, LI SJ, WANG X, CHENG XW. 2012. Phylogenetic position and replication kinetics of *Heliothis virescens* ascovirus 3h (HvAV-3h) isolated from *Spodoptera exigua*. *PLoS ONE*, 7(7): e40225
- JIANG YY, LIU J, XIE MC, LI YH, YANG JJ, ZHANG ML, QIU K. 2019b. Observation on law of diffusion damage of *Spodoptera frugiperda* in China in 2019. *Plant Protection*, 45(6): 10-19 (in Chinese) [姜玉英, 刘杰, 谢茂昌, 李亚红, 杨俊杰, 张曼丽, 邱坤. 2019b. 2019年我国草地贪夜蛾扩散为害规律观测. *植物保护*, 45(6): 10-19]



- JIANG YY, LIU J, ZHU XM. 2019a. Occurrence and trend of *Spodoptera frugiperda* invasion in China. *China Plant Protection*, 39(2): 33–35 (in Chinese) [姜玉英, 刘杰, 朱晓明. 2019a. 草地贪夜蛾侵入我国的发生动态和未来趋势分析. *中国植保导刊*, 39(2): 33–35]
- LI SJ, HOPKINS RJ, ZHAO YP, ZHANG YX, HU J, CHEN XY, XU Z, HUANG GH. 2016. Imperfection works: survival, transmission and persistence in the system of *Heliothis virescens* ascovirus 3h (HvAV-3h), *Microplitis similis* and *Spodoptera exigua*. *Scientific Reports*, 6: 21296
- LI SJ, WANG X, ZHOU ZS, ZHU J, HU J, ZHAO YP, ZHOU GW, HUANG GH. 2013. A comparison of growth and development of three major agricultural insect pests infected with *Heliothis virescens* ascovirus 3h (HvAV-3h). *PLoS ONE*, 8(12): e85704
- LI XQ, SUN YX, YE GY, LI ZY. 2008. Effect of using chemical pesticide on agribiodiversity. *Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition)*, 30(S2): 365–369 (in Chinese) [李晓强, 孙跃先, 叶光祯, 李正跃. 2008. 使用化学农药对农业生物多样性的影响. *云南大学学报(自然科学版)*, 30(S2): 365–369]
- SHARANABASAPPA D, KALLESWARASWAMY CM, ASOKAN R, MAHADEVA SWAMY HM, MARUTHI MS, PAVITHRA HB, HEGDE K, NAVI S, PRABHU ST, GOERGEN G. 2018. First report of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), an alien invasive pest on maize in India. *Pest Management in Horticultural Ecosystems*, 24(1): 23–29
- SPARKS AN. 1979. A review of the biology of fall armyworm. *Florida Entomologist*, 62(2): 82–87
- TILLMAN GP, STYER EL, HAMM JJ. 2004. Transmission of ascovirus from *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) by three parasitoids and effects of virus on survival of parasitoid *Cardiochiles nigriceps* (Hymenoptera: Braconidae). *Environmental Entomology*, 33(3): 633–643
- TODDE EL, POOLE RW. 1980. Keys and illustrations for the armyworm moths of the noctuid genus *Spodoptera* Guenée from the western hemisphere. *Annals of the Entomological Society of America*, 73(6): 722–738
- WU C, ZHANG L, LIAO CY, WU KM, XIAO YT. 2019. Research progress of resistance mechanism and management techniques of fall armyworm *Spodoptera frugiperda* to insecticides and Bt crops. *Journal of Plant Protection*, 46(3): 503–513 (in Chinese) [吴超, 张磊, 廖重宇, 吴孔明, 萧玉涛. 2019. 草地贪夜蛾对化学农药和Bt作物的抗性机制及其治理技术研究进展. *植物保护学报*, 46(3): 503–513]
- WU KM. 2018. Development direction of crop pest control science and technology in China. *Journal of Agriculture*, 8(1): 35–38 (in Chinese) [吴孔明. 2018. 中国农作物病虫害防控科技的发展方向. *农学学报*, 8(1): 35–38]
- WU QL, JIANG YY, WU KM. 2019. Analysis of migration routes of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) from Myanmar to China. *Plant Protection*, 45(2): 1–6, 18 (in Chinese) [吴秋琳, 姜玉英, 吴孔明. 2019. 草地贪夜蛾缅甸虫源迁入中国的路径分析. *植物保护*, 45(2): 1–6, 18]
- ZHANG JJ, DU WM, JIN XF, RUAN CC, ZANG LS. 2014. Susceptibility of the egg parasitoid *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) to three kinds of insecticides commonly used in fields. *Journal of Plant Protection*, 41(5): 555–561 (in Chinese) [张俊杰, 杜文梅, 金雪菲, 阮长春, 臧连生. 2014. 松毛虫赤眼蜂对三种农田常用杀虫剂的敏感性. *植物保护学报*, 41(5): 555–561]
- ZHAO SY, SUN XX, ZHANG HW, YANG XM, WU KM. 2019. Laboratory test on the control efficacy of common chemical insecticides against *Spodoptera frugiperda*. *Plant Protection*, 45(3): 10–14, 20 (in Chinese) [赵胜园, 孙小旭, 张浩文, 杨现明, 吴孔明. 2019. 常用化学杀虫剂对草地贪夜蛾防效的室内测定. *植物保护*, 45(3): 10–14, 20]

(责任编辑: 李美娟)