

# 夜蛾颗粒体病毒宿主筛选及其增殖因子 主次研究

高小文<sup>1</sup>, 赵艳<sup>2\*</sup>, 王浩挺<sup>2</sup>, 陆骏<sup>1</sup>, 曹雅虹<sup>1</sup>, 陆畅<sup>2</sup>

<sup>1</sup>镇江市润宇生物科技开发有限公司, 江苏 镇江

<sup>2</sup>镇江应用生物科技开发研究所, 江苏 镇江

收稿日期: 2023年9月10日; 录用日期: 2023年10月9日; 发布日期: 2023年10月16日

## 摘要

夜蛾颗粒体病毒(GXW9-3 *Mamestra oleracea granulosis virus*)简称MOGV GXW9-3。该病毒2013年首次由高小文在江苏镇江发现, 保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏编号为CCTCCNO: V201340, 样品呈黑色粉末状, 保存于4℃冰箱。MOGV GXW9-3是寄生在鳞翅目夜蛾科昆虫真皮、脂肪组织及血细胞中的一种最重要的杆状病原病毒, 以蛋白质包涵体的形式存在, 蛋白质包含着一个病毒颗粒, 核酸为双链DNA。本文研究影响MOGV GXW9-3增殖宿主及增殖因子的主次, 筛选该病毒增殖最佳宿主及其增殖因子主次。研究表明, 影响MOGV GXW9-3产量的因子及互作因子主次顺序为: 宿主细胞 > 饲毒虫日龄与收毒时间互作 > 饲毒虫日龄与收毒时间互作 > 收毒时间 > 温度。明确饲毒宿主, 饲毒虫日龄因子对病毒产量有极显著影响, 饲毒虫日龄和饲毒虫日龄与收毒时间存在互作且对产量有显著影响。确定MOGV GXW9-3增殖宿主为斜纹夜蛾细胞, 最佳生产条件为26~28℃、分别按药剂浓度为:  $6 \times 10^6$  GV/mL、 $4 \times 10^6$  GV/mL、 $3 \times 10^6$  GV/mL、 $2.4 \times 10^6$  GV/mL、 $2 \times 10^6$  GV/mL的剂量饲毒斜纹夜蛾6龄幼虫, 14~16 d后提取病毒, 斜纹夜蛾6龄幼虫平均单虫个体重量约1.046 g, 冷冻干燥后每头虫体重量约为: 0.085~0.108 g, 平均单虫病毒产量约为0.069~0.28亿GV/g, 幼虫孵化到收集幼虫提取病毒的生产周期为24 d, 病毒增殖倍数为: 31.25~43.75倍。

## 关键词

夜蛾科, 夜蛾颗粒体病毒, 病毒宿主, 斜纹夜蛾, 增殖因子条件

# Host Screening and Proliferation Factors of MOGV GXW9-3 Primary and Secondary Research

Xiaowen Gao<sup>1</sup>, Yan Zhao<sup>2\*</sup>, Haoting Wang<sup>2</sup>, Jun Lu<sup>1</sup>, Yahong Cao<sup>1</sup>, Chang Lu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zhenjiang Runyu Biotechnology Development Co., LTD., Zhenjiang Jiangsu

\*通讯作者。

文章引用: 高小文, 赵艳, 王浩挺, 陆骏, 曹雅虹, 陆畅. 夜蛾颗粒体病毒宿主筛选及其增殖因子主次研究[J]. 农业科学, 2023, 13(10): 930-945. DOI: 10.12677/hjas.2023.1310128

<sup>2</sup>Zhenjiang Applied Biotechnology Development Institute, Zhenjiang Jiangsu

Received: Sep. 10<sup>th</sup>, 2023; accepted: Oct. 9<sup>th</sup>, 2023; published: Oct. 16<sup>th</sup>, 2023

## Abstract

**GXW9-3 *Mamestra oleracea granulosis virus* is abbreviated as MOGV GXW9-3. The virus was first discovered by Xiaowen Gao in Zhenjiang, Jiangsu Province in 2013 and was stored in the Chinese Typical Culture Preservation Center with the storage number CCTCCNO: V201340. The samples were in black powder form and stored in a refrigerator at 4°C. MOGV GXW9-3 is one of the most important rod pathogenic viruses in the dermis, adipose tissue and blood cells of lepidoptera. It exists in the form of protein inclusion body. The protein contains a virus particle and the nucleic acid is double-stranded DNA. In this paper, complex factors were used to study the primary and secondary order of MOGV GXW9-3 proliferation hosts and factors, and to screen the best host of the virus proliferation and its proliferation influence factors. The results showed that the main order of factors and interaction factors affecting the yield of MOGV GXW9-3 was as follows: host cell > interaction between day age of feeding insects and time of toxification > interaction between day age of feeding insects and time of toxification > time of toxification > temperature. Clearly defining the host of the virus, the virus yield was significantly influenced by the age factors of the feed worms. The age of the feed worms and the age of the feed worms interacted with the time of receiving the poison and had a significant effect on the yield. The proliferation host of MOGV GXW9-3 was determined to be moth cells, and the optimal production conditions were 26~28°C, according to the drug concentration: The 6th instar larvae were fed with  $6 \times 10^6$  GV/mL,  $4 \times 10^6$  GV/mL,  $3 \times 10^6$  GV/mL,  $2.4 \times 10^6$  GV/mL,  $2 \times 10^6$  GV/mL, and the virus was extracted 14~16 days later. The average body weight of the 6th instar larvae was about 1.046 g. After freeze-drying, the weight of each insect was about 0.085~0.108 g, the average virus production was about 0.069~0.28 million GV/g, the production cycle from larvae hatching to larvae collection and virus extraction was 24 d, and the multiplication of virus was 31.25~43.75 times.**

## Keywords

**Nocidae, MOGV GXW9-3, Virus Host, Spodoptera litura Fabricius, Proliferation Factor Conditions**

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

鳞翅目夜蛾科昆虫是一种种群庞大的重要食根、茎、叶、花、果、穗的暴食性强，寄主范围较广，严重为害十字花科蔬菜、禾谷类、棉花、烟草、林草等作物的害虫，对生产造成严重威胁。夜蛾颗粒体病毒 GXW9-3 *Mamestra oleracea granulosis virus* (简称 MOGV GXW9-3) 是寄生在鳞翅目幼虫真皮、脂肪组织及血细胞中的一种杆状病毒，以蛋白质包涵体的形式存在，蛋白质包含着一个病毒颗粒，核酸为双链 DNA。经第三方检测机构检测，测序结果总 Reads 数为 31,337,564，总碱基读长为 4,700,634,600 bp，平均 Read 读长为 147.76 Ibp，平均 GC 含量 56.4。该病毒对人畜安全，且杀虫谱较广，不但对夜蛾活性很高，且对斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* Fabricius、烟青虫 *Heliothis assulta* Guenée、银纹夜蛾 *Ctenoplia*

agnata、小菜蛾 *Plutella xylostella* (Linnaeus)、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (Hübner)、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner)、大地老虎 *Agrotis tokionis* Butler、稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis*、二化螟 *Chilosuppressalis* (Walker)等重要农业害虫幼虫均具有较高的杀虫活性，是一种非常有开发潜力的重要昆虫病原微生物。该病毒 2013 年首次由高小文在江苏镇江发现，保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCCNO: V201340)，为国内外首次发现高致病性 MOGV GXW9-3 毒株。2019 年初次对该病毒田间药效试验初报，其对斜纹夜蛾实际防治效果达到 80% 以上。并对多种鳞翅目夜蛾科害虫也获得良好的效果。因此，用 MOGV GXW9-3 田间防治夜蛾等重要农业害虫有广阔的应用前景[1]。目前 MOGV GXW9-3 生产仍以活体增殖方式生产。因此，研究 MOGV GXW9-3 筛选增殖宿主及其增殖影响因子，对工业化大量生产该病毒和利用该病毒防治鳞翅目夜蛾类等农林牧害虫，保障农、林、牧、草业类作物无公害绿色生产具有重要现实意义。以便为 MOGV GXW9-3 商品化大量生产提供试验依据和技术支撑。

## 2. 夜颗粒体病毒宿主筛选

### 2.1. 试验材料

#### 2.1.1. 宿主的选择

**供试虫体：**斜纹夜蛾、蚕幼虫(来自中国农科院蚕业研究所养虫室)；银纹夜蛾、小菜蛾(来源镇江市润宇生物科技开发有限公司饲养虫室)；

**供试病毒：**斜纹夜蛾颗粒体病毒 MOGV GXW9-3 (镇江市润宇生物科技开发有限公司菌种室保存的 2013 年 8 月分离株)。

#### 2.1.2. 人工饲料

1) **斜纹夜蛾、银纹夜蛾幼虫，人工饲料配方：**小麦胚芽 600 克，大豆粉 200 克，加 1200 ml 水混匀后高温灭菌(30 分钟)，灭菌快结束时，进行第二步。琼脂 40 克，加水 1100 ml，置于微波炉中高温微波 20 分钟。灭菌时可称药品，将所有药品放于一个烧杯中，用灭菌水溶解，用水量为 100 ml。小麦胚芽和豆粉灭菌完成后，将琼脂加入其中搅拌，直到不烫手为止，此时加入药品搅拌均匀，然后倒入盒中冷却定型后即可使用。药品包括：酵母粉：30 g；抗坏血酸：16 g；尼泊金甲酯：10 g；山梨酸：5 g；肌醇：1 g；复合维生素 B：2 片。为防止变质，可加入少量甲醛和头孢。

2) **小菜蛾人工饲料配方：**小麦胚芽 100 g、甘蓝粉 100 g、加 300 mL 水混匀后高温灭菌。灭菌快结束时，琼脂 12 g，加水 200 mL，加热溶解。灭菌时可称药品，将所有药品放于一个烧杯中，用灭菌水溶解，用水量为 50 mL。小麦胚芽和甘蓝粉灭菌完成后，将琼脂加入其中搅拌，直到不烫手为止，此时加入药品。搅拌均匀，然后倒入盒中冷却定型后即可使用。药品包括：酵母粉 10 g；维 C 1 片；维 B 少量；山梨酸 1 g；抗坏血酸 4 g。

3) **家蚕采用桑树叶饲养：**常规家蚕桑叶喂养法。

### 2.2. 试验步骤

#### 2.2.1. 人工饲养

将同一批孵出的幼虫用细软毛笔转移到放有人工饲料的养虫塑料盒中，并标记日期和时间，继续在气候箱中饲养，保持光周期 14L: 10D、RH 75%，视食料食用情况，每隔 2 d 更换 1 次人工饲料，3 龄幼虫开始每隔 1 d 更换 1 次人工饲料，视试验要求饲养 16~17 天后待用。

#### 2.2.2. 接毒与饲养

单皿饲养饲毒幼虫，每处理 3 次重复，斜纹夜蛾：100 虫/重复、银纹夜蛾：30 虫/重复、小菜蛾：20 虫

/重复、桑蚕：50 虫/重复。配制浓度为  $2.4 \times 10^6$  GV/mL (稀释 500 倍)的 MOGV GXW9-3 悬液待用。将 10  $\mu$ L 病毒悬液滴加到约 0.5 cm  $\times$  0.5 cm  $\times$  0.2 cm 人工饲料块上，幼虫饥饿 5~6 h 后每虫喂食 1 块，待感染饲料被完全取食后每天更换 1 次无毒饲料，于 28 $^{\circ}$ C、光周期 14L: 10D、RH 75%的人工气候生化培养箱中饲养。

### 2.2.3. 室内昆虫饲养 MOGV9-3 宿主细胞筛选试验与结果(见表 1~表 2、见图 1)

**结论：**从表 1、表 2 试验及数据统计看出，用 12.0 亿 GV/mL MOGV9-3，稀释 500 倍液浓度加入饲料中，48 h 内 5、6 龄斜纹夜蛾和银纹夜蛾罹病死亡率达 100%；而小菜蛾在同样的给毒试验下，4、5 龄 48 h 幼虫罹病死亡率 88.3%，72 h 幼虫罹病死亡率 100%；而 5 龄期斜纹夜蛾在同样的给毒试验下 48 h 幼虫罹病死亡率 100%。从试验统计虫体越大暴食越强罹病死亡越快，甚至 24 h 就体破流出白色浮状病毒，产毒量也越高[2]；而虫体较小的小菜蛾 48 h 罹病死亡率仅为 88.3%，相比虫体较大的 3 种幼虫，且繁殖率亦相应较少。见图 1 中以 24 h 罹病死亡率宿主筛选，故确定斜纹夜蛾为该病毒首选宿主[3] [4]。

**Table 1.** Results of indoor MOGV9-3 host cell screening test

**表 1.** 室内 MOGV9-3 对宿主细胞筛选试验结果

试虫品种	重复	试虫数(头)	药料比	供药日期	罹病死亡头数(头)			罹病总数(头)
					24 h	48 h	72 h	
斜纹夜蛾	1	100	500	2019.8.16	86	100		2 天死亡 100
	2	100	500	2019.8.16	91	100		2 天死亡 100
	3	100	500	2019.8.16	89	100		2 天死亡 100
	合计	300	—	—	266	300		2 天死亡 300
银纹夜蛾	1	30	500	2019.8.16	19	30		2 天死亡 30
	2	30	500	2019.8.16	19	30		2 天死亡 30
	3	30	500	2019.8.16	18	30		2 天死亡 30
	合计	90	—	—	56	90		2 天死亡 90
小菜蛾	1	20	500	2019.8.16	12	18	20	3 天死亡 20
	2	20	500	2019.8.16	13	18	20	3 天死亡 20
	3	20	500	2019.8.16	11	17	20	3 天死亡 20
	合计	60	—	—	36	53	60	3 天死亡 60
桑蚕	1	50	500	2019.8.16	43	50		2 天死亡 50
	2	50	500	2019.8.16	44	50		2 天死亡 50
	3	50	500	2019.8.16	43	50		2 天死亡 50
	合计	150	—	—	130	150		2 天死亡 150

**Table 2.** Summary of indoor MOGV9-3 host cell screening test results

**表 2.** 室内 MOGV9-3 对宿主细胞筛选试验结果汇总表

试虫品种	不同时间段的死亡率(%)		
	24 小时	48 小时	72 小时
斜纹夜蛾	88.7	100	100
银纹夜蛾	62.2	100	100
小菜蛾	60	88.3	100
桑蚕	86.7	100	100

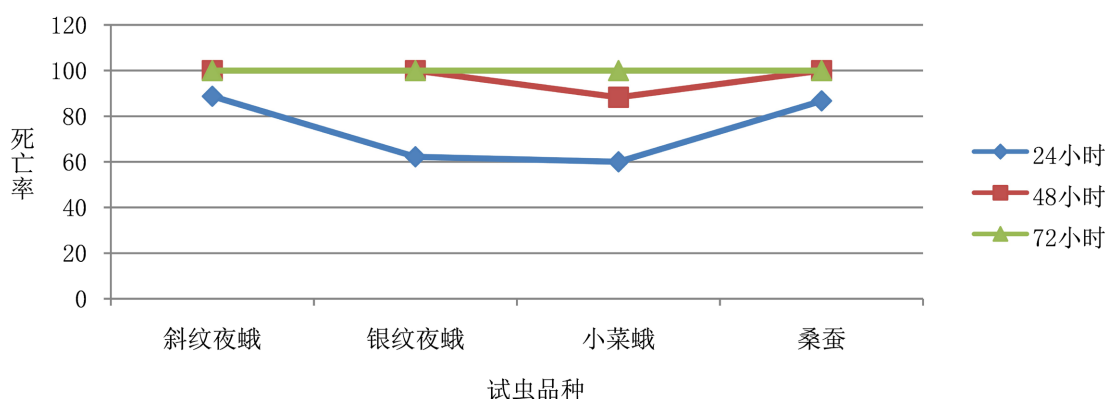


Figure 1. Trend of indoor MOGV9-3 screening test on host cells  
图 1. 室内 MOGV9-3 对宿主细胞筛选试验趋势图

### 3. 斜纹夜蛾细胞繁殖率试验

#### 3.1. 试验材料

- 1) 供试虫体: 斜纹夜蛾幼虫(来自镇江市润宇生物科技开发有限公司饲养虫室);
- 2) 供试病毒: 斜纹夜蛾颗粒体病毒 MOGV GXW9-3 (镇江市润宇生物科技开发有限公司菌种室保存)。

#### 3.2. 试验步骤

##### 3.2.1. 斜纹夜蛾的人工饲养

将同一批孵出的幼虫用细软毛笔转移到放有人工饲料的养虫塑料盒中, 并标记日期和时间, 继续在气候箱中饲养, 保持光周期 14L: 10D、RH 75%, 视食料食用情况, 每隔 2 d 更换 1 次人工饲料, 3 龄幼虫开始每隔 1 d 更换 1 次人工饲料, 视试验要求饲养 16~17 天后待用并记录各虫龄段生长情况, 见表 3。

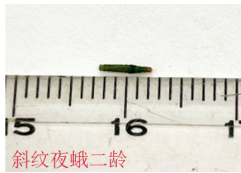


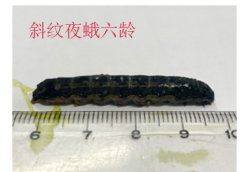
##### 3.2.2. 接毒与饲养

选取斜纹夜蛾不同虫龄幼虫单皿饲养饲毒, 每处理 3 次重复, 6 虫/重复。配制浓度分别为  $6 \times 10^6$  GV/mL、 $4 \times 10^6$  GV/mL、 $3 \times 10^6$  GV/mL、 $2.4 \times 10^6$  GV/mL、 $2 \times 10^6$  GV/mL 的 MOGV<sub>gxw9-3</sub> 悬液待用。将 10  $\mu$ L 病毒悬液滴加到约 0.5 cm  $\times$  0.5 cm  $\times$  0.2 cm 人工饲料块上, 幼虫饥饿 5~6 h 后每虫喂食 1 块, 待感染饲料被完全取食后每天更换 1 次无毒饲料, 于 28 $^{\circ}$ C、光周期 14L: 10D、RH75% 的人工气候生化培养箱中饲养[5]。

#### 3.3. 试验结果与分析(见表 3~表 9、见图 2~图 6)

**结论:** 从试验及数据统计看出通过本次试验结果可以看出, 从斜纹夜蛾 4 龄期开始接毒, 致死率比较显著。根据表 3~表 7 的调查结果分别得出图 2~图 5 线性图和相应的线性回归方程见表 8, 根据方程式分别得出斜纹夜蛾颗粒体病毒对斜纹夜蛾不同虫龄毒性的 Lc 50 值, 分别为 3 龄虫约  $4.46 \times 10^6$  GV/ml、4 龄虫约  $3 \times 10^6$  GV/ml、5 龄虫约  $2.49 \times 10^6$  GV/ml、6 龄虫约  $2.88 \times 10^6$  GV/ml, 其中 5 龄虫 Lc 50 值最低, 其次时 6 龄, 两者均可作为病毒繁殖的活体载体。从表 9 和图 6 中可以看出, 当浓度为  $3 \times 10^6$  GV/ml 时, 斜纹夜蛾 4、5、6 龄 72 h 的死亡率均超过 50%; 当浓度为  $6 \times 10^6$  GV/ml 时, 72 h 的死亡率也均超过 85%, 其中 6 龄虫死亡率超过 90%。根据本次试验结果可以得出斜纹夜蛾病毒活体繁殖需从斜纹夜蛾 4 龄期开始, 其中 6 龄最佳, 其次时 5 龄, 综上所述, 得出选取斜纹夜蛾 5、6 龄幼虫作为病毒繁殖的活体载体[6]。

**Table 3.** Collection of individual growth data for 2nd to 6th instars of *Spodoptera litura* larvae  
**表 3.** 斜纹夜蛾幼虫 2~6 龄中期个体生长量数据采集

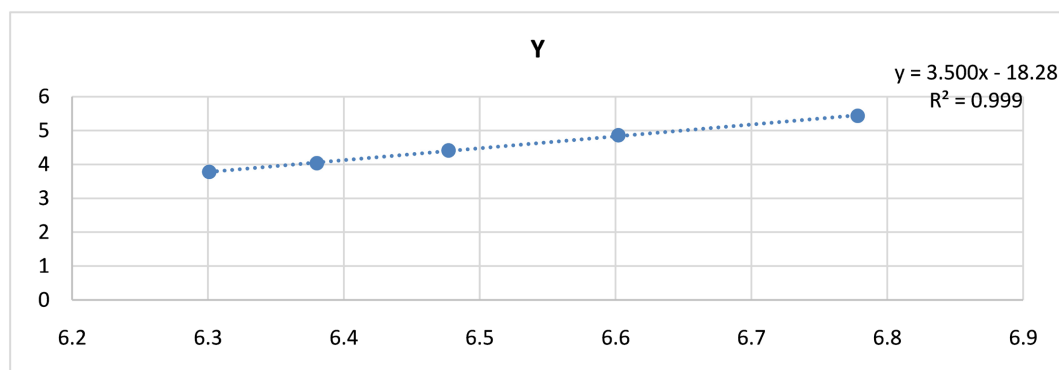
虫龄	虫体形态	虫体长度(mm)	单虫体重量约(g)
2	 斜纹夜蛾二龄	5~6	0.044
3	 斜纹夜蛾三龄	13~16	0.382
4	 斜纹夜蛾四龄	28~33	0.653
5	 斜纹夜蛾五龄	33~37	0.876
6	 斜纹夜蛾六龄	42~46	1.046

**Table 4.** Toxicity test results of *Spodoptera litura* granulosis virus on 3rd instar *Spodoptera litura*  
**表 4.** 斜纹夜蛾颗粒体病毒对 3 龄斜纹夜蛾毒性试验结果

稀释 倍数	浓度 (GV/ml)	重复	24 h		48 h		72 h	
			死/总(头)	死亡率(%)	死/总(头)	死亡率(%)	死/总(头)	死亡率(%)
200	$6 \times 10^6$	1	0/6		1/6		3/6	
		2	0/6	0	0/6		5/6	66.7
		3	0/6		0/6	5.6	4/6	
		合计	0/18		1/18		12/18	
300	$4 \times 10^6$	1	0/6		0/6		4/6	
		2	0/6	0	0/6		3/6	44.4
		3	0/6		1/6	5.6	2/6	
		合计	0/18		1/18		8/18	

Continued

400	$3 \times 10^6$	1	0/6		0/6		1/6	27.8
		2	0/6	0	0/6	0	2/6	
		3	0/6		0/6		2/6	
		合计	0/18		0/18		5/18	
500	$2.4 \times 10^6$	1	0/6		0/6		2/6	16.7
		2	0/6	0	0/6	0	0/6	
		3	0/6		0/6		1/6	
		合计	0/18		0/18		3/18	
600	$2 \times 10^6$	1	0/6		0/6		0/6	11.1
		2	0/6	0	0/6	0	1/6	
		3	0/6		0/6		0/6	
		合计	0/18		0/18		2/18	



注：根据表 4 中的实验数据以百分率的几率值为纵坐标，以浓度的对数值为横坐标，绘制线性回归线及线性回归方程。

Figure 2. Linear plot of toxicity test of *Spodoptera litura granulosis virus* on 3rd instar *Spodoptera litura* (72 h)

图 2. 斜纹夜蛾颗粒体病毒对 3 龄斜纹夜蛾毒性试验线性图(72 h)

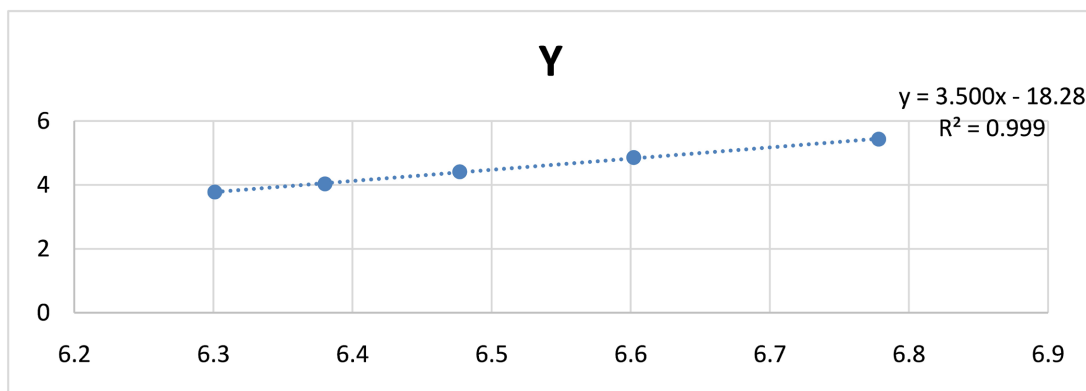
Table 5. Toxicity test results of *Spodoptera litura granulosis virus* on 4th instar *Spodoptera litura*

表 5. 斜纹夜蛾颗粒体病毒对 4 龄斜纹夜蛾毒性试验结果

稀释 倍数	浓度(GV/ml)	重复	24 h		48 h		72 h	
			死/总(头)	死亡率(%)	死/总(头)	死亡率(%)	死/总(头)	死亡率(%)
200	$6 \times 10^6$	1	3/6		4/6		6/6	
		2	1/6	38.9	2/6	50	5/6	88.9
		3	3/6		3/6		5/6	
		合计	7/18		9/18		16/18	
300	$4 \times 10^6$	1	1/6		2/6		5/6	
		2	1/6	22.2	2/6	33.3	4/6	72.2
		3	2/6		2/6		4/6	
		合计	4/18		6/18		13/18	

Continued

400	$3 \times 10^6$	1	0/6	11.1	1/6	22.2	3/6	50
		2	1/6		2/6		3/6	
		3	1/6		1/6		4/6	
		合计	2/18		4/18		9/18	
500	$2.4 \times 10^6$	1	0/6	5.6	0/6	11.1	2/6	27.8
		2	1/6		1/6		1/6	
		3	0/6		1/6		2/6	
		合计	1/18		2/18		5/18	
600	$2 \times 10^6$	1	0/6	5.6	1/6	5.6	1/6	16.7
		2	0/6		0/6		1/6	
		3	1/6		0/6		1/6	
		合计	1/18		1/18		3/18	



注：根据表 5 中的实验数据以百分率的几率值为纵坐标，以浓度的对数值为横坐标，绘制线性回归线及线性回归方程。

**Figure 3.** Linear plot of toxicity test on 4th instar *Spodoptera litura* using *Spodoptera litura* granulosis virus (72 h)

**图 3.** 斜纹夜蛾颗粒体病毒对 4 龄斜纹夜蛾毒性试验线性图(72 h)

**Table 6.** Toxicity test results of *Spodoptera litura* granulosis virus on 5th instar *Spodoptera litura*

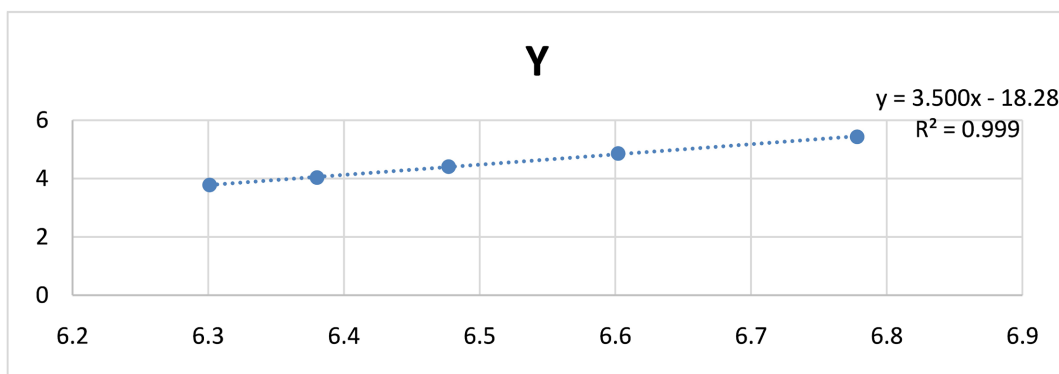
**表 6.** 斜纹夜蛾颗粒体病毒对 5 龄斜纹夜蛾毒性试验结果

稀释 倍数	浓度 (GV/ml)	重复	24 h		48 h		72 h	
			死/总(头)	死亡率(%)	死/总(头)	死亡率(%)	死/总(头)	死亡率(%)
200	$6 \times 10^6$	1	2/6	38.9	3/6	55.6	5/6	88.9
		2	2/6		4/6		6/6	
		3	3/6		3/6		5/6	
		合计	7/18		10/18		16/18	



Continued

300	4 × 10 <sup>6</sup>	1	2/6	22.2	2/6	44.4	4/6	77.8
		2	1/6		3/6		5/6	
		3	1/6		3/6		5/6	
		合计	4/18		8/18		14/18	
400	3 × 10 <sup>6</sup>	1	0/6	16.7	2/6	33.3	4/6	66.7
		2	1/6		2/6		4/6	
		3	2/6		2/6		4/6	
		合计	3/18		6/18		11/18	
500	2.4 × 10 <sup>6</sup>	1	1/6	16.7	2/6	22.2	2/6	44.4
		2	1/6		1/6		3/6	
		3	1/6		1/6		3/6	
		合计	3/18		4/18		8/18	
600	2 × 10 <sup>6</sup>	1	0/6	11.1	2/6	16.7	3/6	38.9
		2	0/6		1/6		2/6	
		3	2/6		0/6		2/6	
		合计	2/18		3/18		7/18	



注：根据表 6 中的实验数据以百分率的几率值为纵坐标，以浓度的对数值为横坐标，绘制线性回归线及线性回归方程。

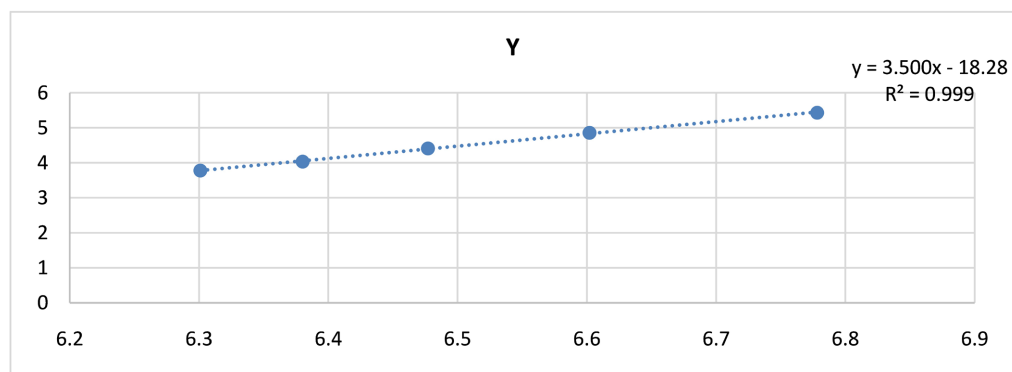
**Figure 4.** Linear plot of toxicity test on 5th instar *Spodoptera litura* using *Spodoptera litura* granulosis virus (72 h)  
**图 4.** 斜纹夜蛾颗粒体病毒对 5 龄斜纹夜蛾毒性试验线性图(72 h)

**Table 7.** Toxicity test results of *Spodoptera litura* granulosis virus on 6-year-old *Spodoptera litura*  
**表 7.** 斜纹夜蛾颗粒体病毒对 6 龄斜纹夜蛾毒性试验结果

稀释 倍数	浓度 (GV/ml)	重复	24 h		48 h		72 h	
			死/总(头)	死亡率(%)	死/总(头)	死亡率(%)	死/总(头)	死亡率(%)
200	6 × 10 <sup>6</sup>	1	4/6	44.4	4/6	66.7	5/6	94.4
		2	2/6		3/6		6/6	
		3	2/6		5/6		6/6	
		合计	8/18		12/18		17/18	

Continued

300	$4 \times 10^6$	1	2/6	22.2	4/6	55.6	5/2	83.3
		2	3/6		4/6		6/6	
		3	1/6		2/6		4/3	
		合计	6/18		10/18		15/18	
400	$3 \times 10^6$	1	0/6	11.1	1/6	33.3	4/6	55.6
		2	2/6		3/6		3/6	
		3	0/6		2/6		3/6	
		合计	2/18		6/18		10/18	
500	$2.4 \times 10^6$	1	1/6	5.6	1/6	22.2	2/6	33.3
		2	0/6		2/6		3/6	
		3	0/6		1/6		1/6	
		合计	1/18		4/18		6/18	
600	$2 \times 10^6$	1	0/6	0	0/6	5.6	0/6	16.7
		2	0/6		0/6		2/6	
		3	0/6		1/6		1/6	
		合计	0/18		1/18		3/18	



注：根据表7中的实验数据以百分率的几率值为纵坐标，以浓度的对数值为横坐标，绘制线性回归线及线性回归方程。

**Figure 5.** Linear plot of toxicity test of *Spodoptera litura granulosis virus* to 6-year-old *Spodoptera litura* (72 h)

**图 5.** 斜纹夜蛾颗粒体病毒对 6 龄斜纹夜蛾毒性试验线性图(72 h)

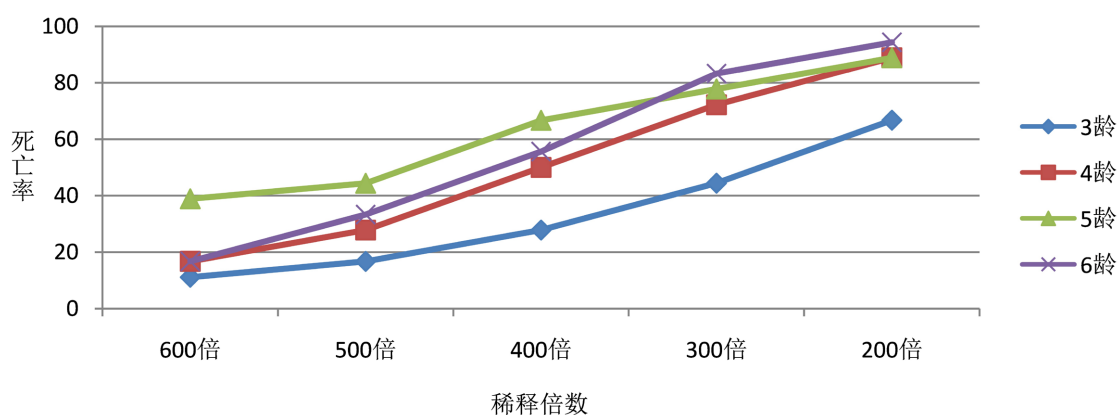
**Table 8.** Summary of linear relationship between the toxicity test results of *Spodoptera litura granulosis virus* on *Spodoptera litura* at different instars

**表 8.** 斜纹夜蛾颗粒体病毒对斜纹夜蛾不同虫龄毒性试验结果线性关系汇总表

虫龄	线性方程式	r 值	Lc 50 值(GV/ml)
3	$Y = 3.5009X - 18.28$	0.999	约 $4.46 \times 10^6$
4	$Y = 4.6527X - 25.227$	0.995	$3 \times 10^6$
5	$Y = 3.3092X - 16.165$	0.994	约 $2.49 \times 10^6$
6	$Y = 5.4331X - 30.097$	0.992	约 $2.88 \times 10^6$

**Table 9.** Summary of toxicity test results of *Spodoptera litura* granulosomal virus on *Spodoptera litura* at different ages (72 hours)**表 9.** 斜纹夜蛾颗粒体病毒对斜纹夜蛾不同虫龄毒性试验结果汇总(72 h)

浓度(GV/ml)	稀释倍数	斜纹夜蛾不同虫龄死亡率(%)			
		3 龄	4 龄	5 龄	6 龄
$6 \times 10^6$	200	66.7	88.9	88.9	94.4
$4 \times 10^6$	300	44.4	72.2	77.8	83.3
$3 \times 10^6$	400	27.8	50	66.7	55.6
$2.4 \times 10^6$	500	16.7	27.8	44.4	33.3
$2 \times 10^6$	600	11.1	16.7	38.9	16.7

**Figure 6.** Mortality line chart of the toxicity test of *Spodoptera litura* granulosis virus to different instars of *Spodoptera litura* (72 h)**图 6.** 斜纹夜蛾颗粒体病毒对斜纹夜蛾不同虫龄毒性试验死亡率折线图(72 h)

## 4. 斜纹夜蛾不同虫龄不同浓度病毒含量测定

### 4.1. 材料与方法

#### 4.1.1. 供试虫体

斜纹夜蛾幼虫(来自镇江市润宇生物科技开发有限公司饲养虫室)。

#### 4.1.2. 供试毒株

斜纹夜蛾颗粒体病毒毒株 GXW9-3 *Mamestra oleracea granulosis virus*, 12 亿 GV/ml, 镇江市润宇生物科技开发有限公司菌种室保存)。

#### 4.1.3. 试验仪器

冷冻干燥机、电子显微镜、血球计数板。

#### 4.1.4. 试验方法

1) 分别挑选出人工喂养的斜纹夜蛾 3 龄、4 龄、5 龄、6 龄幼虫, 6 虫/重复, 3 次重复, 并按照药剂浓度  $6 \times 10^6$ 、 $4 \times 10^6$ 、 $3 \times 10^6$ 、 $2.4 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^6$  GV/mL 分别进行试验。过程中分别收集不同虫龄不同浓度的死虫体, 作无菌处理并低温保存。

2) 将试验收集的死虫体低温保存 15~20 天, 分别直接进行冷冻干燥, 2~3 天, 干燥结束再分别进行

粉碎处理，制成粉剂，待测。

3) 含量测定：将每个处理的粉剂进行一定倍数的稀释，分别滴入血球计数板中，在显微镜下观察并计数，每处理计3板，得平均数。

计算公式：含量(亿 GV/g) =  $5N \times 10^4 \times$  稀释倍数；式中：N - 为血球计数板上5格内的病毒数。

#### 4.2. 试验结果(见表 10~表 11、见图 7~图 A4)

MOGV9-3 经口主要感染鳞翅目昆虫的真皮、脂肪组织及血细胞等，由内向外感染的过程。MOGV 颗粒体病毒包含体呈圆形(见附件图 A2、图 A3)。包含体内只含有单个病毒颗粒，偶有两个。颗粒体长约 185~300 nm，宽 180~290 nm。幼虫被感染后，会出现食欲减退、体弱无力、行动迟缓、痉挛反应、腹部肿胀变色，当 MOGV 感染受试昆虫约 24 小时左右引起病原性后，罹病尸体易一触及发生表皮破裂、流出腥臭、浑浊、乳白色脓液(见附件图 A1~图 A2)等症状。

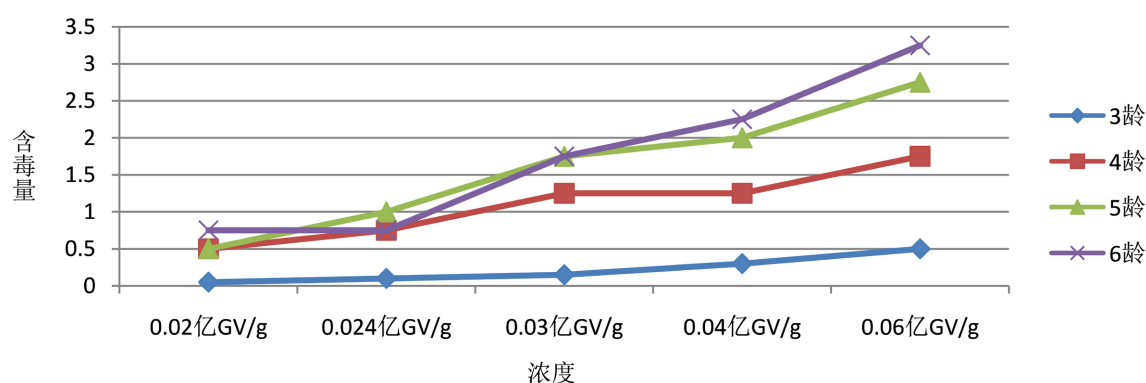
Table 10. Determination of granulosis virus content of *Spodoptera litura* at different ages and concentrations

表 10. 斜纹夜蛾不同虫龄不同浓度颗粒体病毒含量测定表

虫龄	稀释浓度(GV/mL)	稀释倍数	含量约(亿 GV/g)	每头虫产毒量(GV/g)
3	$6 \times 10^6$	100	0.5	$1.85 \times 10^5$
	$4 \times 10^6$	100	0.3	$1.17 \times 10^5$
	$3 \times 10^6$	100	0.15	$6 \times 10^4$
	$2.4 \times 10^6$	100	0.1	$4.1 \times 10^4$
	$2 \times 10^6$	100	0.05	$2.2 \times 10^4$
4	$6 \times 10^6$	500	1.75	$5.4 \times 10^6$
	$4 \times 10^6$	500	1.25	$4.1 \times 10^6$
	$3 \times 10^6$	500	1.25	$4.2 \times 10^6$
	$2.4 \times 10^6$	500	0.75	$2.7 \times 10^6$
	$2 \times 10^6$	500	0.5	$1.8 \times 10^6$
5	$6 \times 10^6$	500	2.75	$2.0 \times 10^7$
	$4 \times 10^6$	500	2	$1.4 \times 10^7$
	$3 \times 10^6$	500	1.75	$1.3 \times 10^7$
	$2.4 \times 10^6$	500	1	$7.7 \times 10^6$
	$2 \times 10^6$	500	0.5	$3.9 \times 10^6$
6	$6 \times 10^6$	500	3.25	$2.8 \times 10^7$
	$4 \times 10^6$	500	2.25	$2.0 \times 10^7$
	$3 \times 10^6$	500	1.75	$1.6 \times 10^7$
	$2.4 \times 10^6$	500	0.75	$6.9 \times 10^6$
	$2 \times 10^6$	500	0.75	$8.1 \times 10^6$

**Table 11.** Summary table of granulosis virus content of *Spodoptera litura* at different ages and concentrations  
**表 11.** 斜纹夜蛾不同虫龄不同浓度颗粒体病毒含量汇总表

浓度 (GV/mL)	斜纹夜蛾不同虫龄颗粒体病毒含量约(亿 GV/g)及增长倍数							
	3 龄		4 龄		5 龄		6 龄	
	病毒含量	增长倍数	病毒含量	增长倍数	病毒含量	增长倍数	病毒含量	增长倍数
$6 \times 10^6$	0.5	13.33	1.75	29.17	2.75	45.83	3.25	54.17
$4 \times 10^6$	0.3	7.5	1.25	31.25	2	50	2.25	56.25
$3 \times 10^6$	0.15	5	1.25	41.67	1.75	58.33	1.75	58.33
$2.4 \times 10^6$	0.1	4.17	0.75	31.25	1	41.67	0.75	31.25
$2 \times 10^6$	0.05	2.5	0.5	25	0.5	25	0.75	37.5



**Figure 7.** Trend of granulosis virus content in different ages and concentrations of *Spodoptera litura*  
**图 7.** 斜纹夜蛾不同虫龄不同浓度颗粒体病毒含量趋势图

## 5. 结论

从试验结果可以看出, 从斜纹夜蛾 4 龄幼虫开始饲毒, 毒株在活体内繁殖系数增长倍数较高, 且根据表 10 看出同龄虫体含病毒量基本随浓度递增而递增。表 11 中同一浓度时, 斜纹夜蛾幼虫 5 龄和 6 龄之间含毒量相差不是很大, 当浓度为  $6 \times 10^6$  GV/mL 时, 斜纹夜蛾 6 龄幼虫含毒量最高为 3.25 亿 GV/g, 且单虫体繁殖量最高为  $2.8 \times 10^7$  GV/g, 其次是 5 龄幼虫含毒量为 2.75 亿 GV/g, 单虫体繁殖量为  $2.0 \times 10^7$  GV/g; 当浓度为  $3 \times 10^6$  GV/mL 时, 斜纹夜蛾幼虫 5 龄和 6 龄含毒量均为 1.75 亿 GV/g 时, 毒量增长倍数最高, 为 58.33 倍。由此可见, 虫体越大, 病毒繁殖越快, 含量越高(见附件图 A3~图 A4)。

## 基金项目

镇江市现代农业科技项目(编号为 NY2019008)。

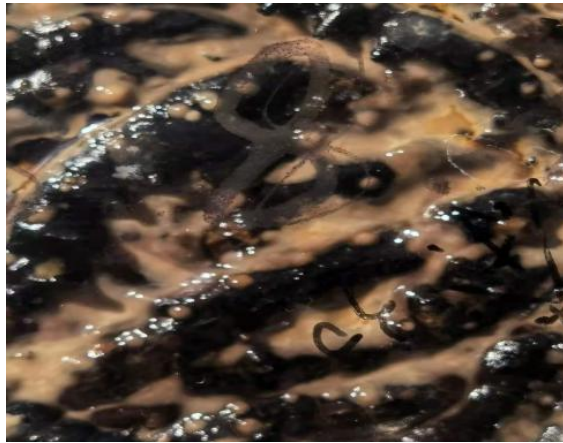
## 参考文献

- [1] 梁东瑞, 张起麟. 两种提取菜粉蝶颗粒体病毒方法的比较[J]. 微生物学报, 1983(3): 138-140.
- [2] 孙剑华, 高小文, 关成宏, 等. 110 亿 OB/mL 夜蛾颗粒体病毒悬浮剂对斜纹夜蛾的田间药效试验[J]. 生物灾害科学, 2019, 42(2): 120-125.
- [3] 孟昭金. 黄地老虎颗粒体病毒增殖与温度的关系[J]. 新疆农业科学, 1980(4): 28.
- [4] 陶万强, 潘彦平, 等. 杨扇舟蛾颗粒体病毒室内增殖的研究[J]. 中国森林病虫, 2009, 28(3): 9-10.
- [5] 尹宜农. 菜粉蝶颗粒体病毒规模生产技术研究简报[C]//第七届全国杀虫微生物学术讨论会. 武汉大学学报(自然

科学版第 44 卷).

- [6] 刘强, 丁翠, 等. 粘虫颗粒体病毒及其增效因子对粘虫核型多角体病毒的增效作用[J]. 应用与环境生物学报, 1999, 5(3): 300-304.

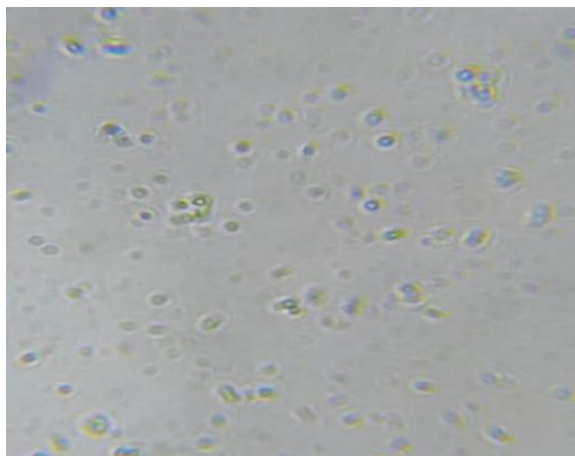
附件



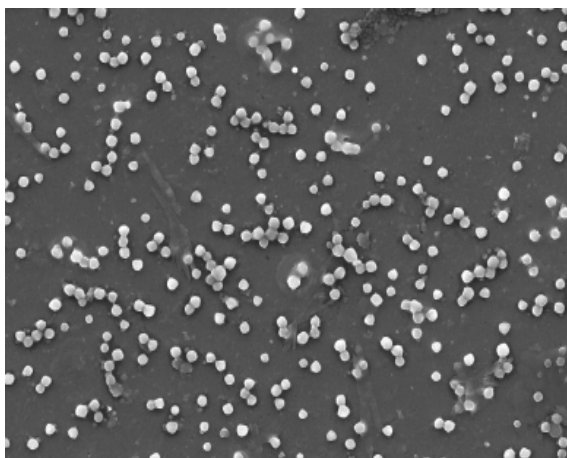
**Figure A1.** Rupture of MOGVgxw9-3 stained corpse  
**图 A1.** 染 MOGVgxw9-3 毒引起病原性霍乱尸体



**Figure A2.** MOGV9-3 proliferation in adipose tissue  
**图 A2.** MOGV9-3 脂肪组织内增殖



**Figure A3.** MOGV9-3 proliferation in Microscope  
**图 A3.** MOGV9-3 于脂肪组织内增殖(电镜)



**Figure A4.** MOGV9-3 Particle Body (Phase Spectrum Electron adipose tissue (electron microscopy))

**图 A4.** MOGV9-3 颗粒体(相谱电镜)