



靳雯怡, 佟岩, 孟茜, 陈新中, 方分分, 秦启联, 张继红, 舒锐豪, 张寰. 苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒在宿主草地贪夜蛾选择压力下的毒力和基因变异 [J]. 环境昆虫学报, 2021, 43 (5): 1129–1135.

苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒在宿主草地贪夜蛾选择压力下的毒力和基因变异

靳雯怡^{1,2}, 佟岩², 孟茜², 陈新中³, 方分分³,
秦启联², 张继红², 舒锐豪², 张寰^{2*}

(1. 河北大学生命科学学院, 河北保定 071002; 2. 中国科学院动物研究所农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100101;
3. 河南济源白云实业有限公司, 河南济源 454652)

摘要: 草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) 原产北美, 现已入侵中国许多地区, 造成了巨大的生态和经济损失。杆状病毒是多种昆虫的病原体, 对非目标生物无毒无害, 是很有应用前景的生物农药, 其施用可大大减缓草地贪夜蛾对化学农药抗性产生速度。以往的研究发现, 虽然苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (*Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*, AcMNPV) 可感染许多种鳞翅目昆虫, 但对草地贪夜蛾口服感染能力较差。选择毒力增强的变异体是提高 AcMNPV 作为病毒杀虫剂应用的一个新方向。在本研究中, 使用野生型 AcMNPV 在草地贪夜蛾 2 龄末幼虫中连续传代 20 次, 并对亲本和后代分离株的毒力进行了评价。与野生型 AcMNPV 相比, 后代分离株对草地贪夜蛾 2 龄末幼虫毒力显著提高。由于病毒的复制依赖于宿主细胞, 受到草地贪夜蛾选择压力的影响, AcMNPV 的基因发生变异。宿主适应性强的毒株在草地贪夜蛾体内的感染增殖能力较强, 容易获得生长优势并成为优势毒株。更进一步, 本研究通过二代测序分析了突变的关键基因。本研究可为生物农药生产提供高毒力毒株, 也可在草地贪夜蛾应急防控和持续防控中发挥重要作用。

关键词: 草地贪夜蛾; 杆状病毒; 宿主选择压力; 生物测定; 病毒适应性

中图分类号: Q963; S476

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2021) 05-1129-07

Virulence and genetic variation of *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* under selection pressure of *Spodoptera frugiperda*

JIN Wen-Yi^{1,2}, TONG Yan², MENG Qian², CHEN Xin-Zhong³, FANG Fen-Fen³, QIN Qi-Lian², ZHANG Ji-Hong², SHU Rui-Hao², ZHANG Huan^{2*} (1. College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, Hebei Province, China; 2. State Key Laboratory of Integrated Management of Pests and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 3. Henan Jiyuan Baiyun Industry Co. Ltd., Jiyuan 454652, Henan Province, China)

Abstract: *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), native to North America, has invaded many regions in China, causing enormous ecological and economic losses. Baculoviruses are pathogens of lots of insects, which are safe to non-target organisms with potential application as a biopesticide. Application of baculoviral insecticides can greatly slow down the resistance of *S. frugiperda* to chemical pesticides. Previous studies had found that although *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* infects many

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFD0200400); 中国科学院重点部署项目 (KJZD-SW-L07)

作者简介: 靳雯怡, 女, 1997 年生, 硕士研究生, 研究方向为昆虫病毒分子生物学, E-mail: jin.weniyi@foxmail.com

* 通讯作者 Author for correspondence: 张寰, 女, 博士, 副研究员, 研究方向为昆虫细胞与昆虫病毒学, E-mail: zhanghuan@ioz.ac.cn

收稿日期 Received: 2021-07-14; 接受日期 Accepted: 2021-08-04

lepidopteran species, it was less effective against *S. frugiperda* by oral infection. Screen of virulence-enhancing variants was an attractive option to improve the application of AcMNPV as a viral insecticide. In this study, wild-type AcMNPV was serially passaged 20 generations in the late 2nd instar larvae of *S. frugiperda*, and the virulence of parental and progeny isolates was evaluated. Compared with the wild-type AcMNPV, the virulence of the progeny was remarkably increased. Since viral replication depends on the host cells, the viral gene mutations of AcMNPV were affected by the selection pressure of *S. frugiperda*. The sub-strains with high survival fitness had strong infection and proliferation ability in *S. frugiperda*, and were easy to obtain growth advantages and become dominant sub-strains. Furthermore, the key genes for mutation were analyzed by genome-wide sequencing. This study can provide highly virulent strains for biological pesticide production, and also play an important role in emergency prevention and sustainable control of *S. frugiperda*.

Key words: *Spodoptera frugiperda*; baculovirus; host selection pressure; bioassay; viral fitness

草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 是联合国粮农组织 (FAO) 发布警告的世界性农业害虫, 主要取食危害玉米、小麦等 204 种植物 (<https://www.cabi.org/ISC/datasheet/29810>), 是一种繁殖力极强、危害巨大的害虫。自 2019 年入侵我国后, 快速入侵大部分省区, 并在南部省区定殖, 可能成为常发和暴发性兼具的农业害虫 (崔志斌等, 2020)。由于草地贪夜蛾在原产地美洲已经对多种化学农药产生很高的抗药性, 加之新近入侵, 我国缺乏生物和生态的自然控制因子, 其危害潜力巨大, 对我国农业生产可能造成极大的破坏。通过二代测序和相关抗性基因扫描检测, 发现入侵我国的草地贪夜蛾种群对有机磷类、有机氯类和拟除虫菊酯类等传统农药具有较高的抗性基因变异频率 (崔志斌等, 2020)。而生物农药包括核型多角体病毒 Nucleopolyhedrovirus (NPV) 等绿色防控措施, 不仅安全有效, 且能够显著减缓草地贪夜蛾抗药性的产生。

核型多角体病毒 (NPVs) 是杆状病毒 Baculovirus 中发现较早、应用最广泛的昆虫病毒, 主要用于防治鳞翅目害虫。世界上已有数十种杆状病毒成功用于防治农林害虫。我国已登记注册的病毒杀虫剂有 10 余种, 应用最广泛的有棉铃虫核型多角体病毒 (*Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus*, HearNPV)、甜菜夜蛾核型多角体病毒 (*Spodoptera exigua multiple nucleopolyhedrovirus*, SeMNPV)、斜纹夜蛾核型多角体病毒 (*Spodoptera litura nucleopolyhedrovirus*, SplitNPV) 等。

苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (*Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*, AcMNPV) 是一种宿主范围较广的 α -杆状病毒, 可感染 10 科 33 种鳞翅目幼虫 (王成燕, 2012)。研究表明, 草

地贪夜蛾幼虫对 AcMNPV 口服感染有较强的抗性 (Haas-Stapleton *et al.*, 2005), 但草地贪夜蛾细胞系 Sf 21 及其克隆株 Sf 9 对 AcMNPV 出芽型病毒 (Budded virus, BV) 非常敏感。究其原因可能是 AcMNPV 的包涵体缺乏与草地贪夜蛾中肠柱状细胞特异性结合或融合的能力。野生型 AcMNPV 存在显著的基因型变异 (Lee and Miller, 1978; Smith and Summers, 1978), 此外, AcMNPV 的基因型变异可能在包括毒力在内的表型特征上产生差异 (Kolodny-Hirsch and VanBeek, 1997)。

选择毒力增强的变异体是提高杆状病毒毒力, 并应用于生物农药的新方向。连续传代可以从一个异质性的野生型种群中挑选出更强毒力的同质分离株 (Kolodny-Hirsch *et al.*, 1997)。已有在同源或异源宿主连续传代后筛选得到毒力增强病毒的报道 (Kolodny-Hirsch *et al.*, 1997)。如果要将 AcMNPV 开发成商品用于防治草地贪夜蛾, 那么必须对其进行毒株筛选和优化, 提高 AcMNPV 对草地贪夜蛾的口服感染能力, 使其毒力达到实际应用的水平。毒力和传播力之间博弈一直都是病毒进化的重要驱动因子。从害虫防控的角度来看, 对病毒生物农药毒力的要求应高于对其传播力和产量的要求; 反过来, 从病毒生物农药生产的角度, 还要考虑病毒接种量和产量等因素。本研究报道了在宿主草地贪夜蛾中连续压力筛选前后 AcMNPV 的生物学活性和基因发生的变化。

1 材料与方法

1.1 实验昆虫、细胞和病毒来源

甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*、棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、草地贪夜蛾云南种群, 购买自河南济源

白云实业有限公司, 后在室内 25℃ ±1℃ 条件下使用人工饲料饲养。

Sf 9 细胞系在 27℃ ±1℃ 条件下使用含有 10% 胎牛血清的 Insect-XPRESS™ 昆虫细胞培养液加入双抗 (青霉素和链霉素) 培养。

AcMNPV 野生毒株由本实验室保藏。

1.2 AcMNPV 毒株在草地贪夜蛾中连续传代

将用粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 幼虫扩增的 AcMNPV, 经甜菜夜蛾、棉铃虫交替感染扩增后, 再次感染甜菜夜蛾, 收取 BVs 接种 Sf 9 细胞, 收获的多角体命名为 P0; 挑取空斑单克隆, 将此 BVs 注射入草地贪夜蛾 3 龄幼虫, 获得死亡幼虫, 命名为 P1; 提取 OBs, 继续接种草地贪夜蛾, 收获最早死亡的虫尸, 连续接种收获 20 代, 分别命名为 P2 ~ P20。连续传代采用 50% 致死浓度 (LC₅₀) 接种。

1.3 病毒 DNA 的提取

取适量差速离心法纯化后的多角体, 加入 350 μL 碱裂解液后混合均匀, 37℃ 裂解 30 min。然后加入约 350 μL HCl (0.1 mol/L), 调节溶液 pH 至 7.0。加入 10 μL 蛋白酶 K (20 mg/mL) 和 40 μL SDS (10%), 混匀后置入 65℃ 水浴中保持 2 h 后, 分别使用适量 Tris 饱和苯酚, 等量的饱和苯酚:氯仿 (1:1) 混合液, 等量的氯仿:异戊醇 (24:1) 混合液, 各提取一次, 取出上层水相加入 2 倍体积无水乙醇混匀获得 DNA 沉淀, 再用 70% 乙醇洗涤沉淀, 后在室温下干燥; 加入 TE 缓冲液 100 μL 溶解 DNA, 用分光光度法测定试样 DNA 浓度, 保存于 -20℃。

1.4 全基因组测序

选取 P3 与 P10 代 AcMNPV 进行 illumina Hi-seq X PE 150 测序 (北京奥维森科技有限公司)。

1.5 PCR 和电泳

采用 PCR 及 Sanger 测序对二代测序的结果进行进一步验证。使用 TIANSeq 高保真 PCR 反应预混液 (天根生化科技有限公司, 货号: NG219) 进行 PCR 扩增, 扩增条件见表 1, 引物序列见表 2。反应产物使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 将电泳呈阳性的 PCR 产物送至华大基因公司测序。

1.6 生物测定

选取 P3, P6, P10, P15, P20 代 AcMNPV 进行生物测定, 将病毒进行浓度梯度稀释, 稀释浓度为 2 × 10⁵、4 × 10⁵、8 × 10⁵、1.6 × 10⁶、3.2 × 10⁶、6.4 × 10⁶ OBs/mL。添加等量无菌去离子水作为空白对照。

表 1 PCR 反应条件
Table 1 PCR reaction condition

温度 (℃) Temperature	时间 (s) Time	循环数 Cycle-index
94	120	1
98	10	
60	30	35
68	120	
68	300	1
4	Hold	1

表 2 PCR 实验引物序列
Table 2 Primers of PCR

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primers sequences (5'-3')
ac 34 -F	AGCCGCAATTTTGTTCTTTT
ac 34 -R	CGTTTCGGCGGTAATGGTTTTG
fpf -F	GTCATATTTTGCACACGGCTCTAA
fgf -R	TAATGCGCAATACCCTAAAAAGTT
lef 2 -F	GATGACATGACCCCGTAGTGAC
lef 2 -R	TGTTGCGTTTGTTTGATCGTTA
lef 12 -F	GCGTGGTTTGCGTCATGTCTGTAA
lef 12 -R	TCGTTGTCGGGCGCTTGGTCA

饲料平板的制备: 取草地贪夜蛾饲料与适量蒸馏水放于锅中加热融化, 趁热倒入 15 孔板养虫盒内, 每孔加入量以刚好铺满孔板底部为准, 冷却凝固备用。

处理方法: 饲料平板加入 100 μL 稀释好的病毒液, 空白对照加等量蒸馏水, 涂布均匀, 再用已消毒的毛笔或镊子将草地贪夜蛾 2 龄幼虫转移至已加入病毒的饲料平板内。每个浓度 30 头。然后转移至温度 25℃ ±1℃ 下继续培养。观察并记录饲料及幼虫感染死亡情况。

1.7 毒力计算

根据生物测定的结果, 用 SPSS 22.0 对死亡率与浓度基于 Probit 回归模型进行回归分析, 计算 LC₅₀, 并以此为指标进行毒力分级。

2 结果与分析

2.1 生物测定以及毒力分析

将收集的虫尸纯化后得到 OBs, 计数后将病毒分别稀释至不同浓度, 喂食 30 头草地贪夜蛾 2 龄幼虫, 另以喂食等量去离子水作为空白对照组。统计 10 d 内幼虫死亡率 (图 1)。第 3 代死亡率为 0。第 6 代, 随着接种浓度增加, 死亡率增加, 但死亡率仍然很低, 使用 $1.6 \sim 6.4 \times 10^6$ OBs/mL, 仅有 1 头死亡。但是, 随着 P10 代以上, 矫正死亡率显著提升。通过生物测定数据计算半致死浓度 (LC_{50}), 经计算得 P10、P15、P20 代的 LC_{50} 分别为 4.845×10^7 , 2.665×10^7 , 2.925×10^7 OBs/mL, 由于感染 P3 和 P6 代 AcMNPV 的幼虫死亡率过低, 故无法计算二者的 LC_{50} 。该结果表明不同毒株毒力从高到低依次为 P15, P10, P20, P6, P3。

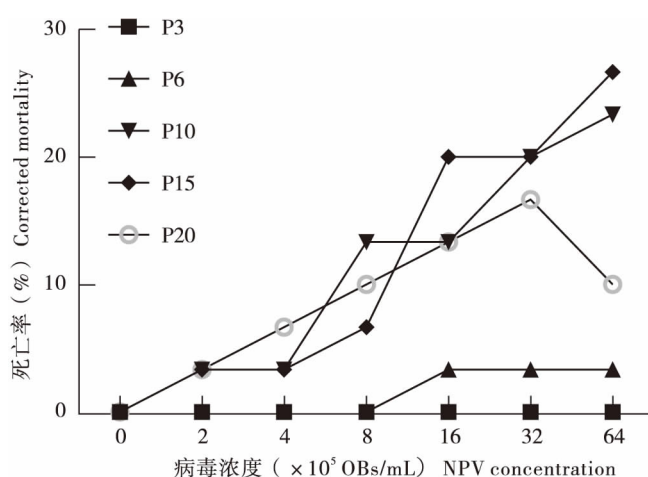


图 1 不同浓度病毒对草地贪夜蛾 2 龄幼虫致死率

Fig. 1 Mortality rate of virus at different concentrations to the 2nd instar larvae of *Spodoptera frugiperda*

2.2 测序结果及分析

选取 P3 和 P10 代 AcMNPV 进行二代测序, 将测序结果拼接获得全基因组序列, 与 NCBI 中序列 (Accession number: NC_001623) 进行比对, 发现部分基因存在核苷酸突变和氨基酸突变。该结果表明 7 个编码基因 *ac34*、*fgf*、*lef12*、*lef2*、*lef9*、*arif1* 以及 *ac112* 基因发生了核苷酸突变, 其中 4 个基因 *ac34*、*fgf*、*lef12* 和 *lef2* 发生了氨基酸突变。经进一步 PCR 验证, 发现 *fgf* 基因为测序错误 (结果未展示)。将这 3 个基因的测序结果翻译后进行 BLAST 比对 (图 2)。

图中可以看出 Ac34 的 3 个氨基酸突变均发生在第 10 代, LEF12 的 3 个氨基酸突变发生在第 3 代和第 10 代, LEF2 的 4 个氨基酸突变只发生在第 3 代, 而第 10 代与 NCBI 序列相同, 依据氨基酸结果以及核苷酸测序结果发现第 10 代出现了突变回复现象 (图 3)。生物测定结果表明, 第 10 代病毒的毒力远远高于第 3 代。这可能是由于连续传代中宿主的选择性压力导致相同基因位点多次突变, 将适宜宿主的突变保留, 而与宿主适应性无关的突变被淘汰。

3 结论与讨论

草地贪夜蛾入侵我国并将长期定殖, 对其防控将成为长久的战役。病毒等微生物农药, 可使害虫种群在田间形成流行病, 是抑制其常在性危害的重要措施之一。体内连续传代过程中病毒活性增强的现象已有很多报道, 并认为连续传代是从异质性的野生型群体中选择毒力更强的病毒全体 (Kolodny-Hirsch and van Beek, 1997)。AcMNPV 在小菜蛾 *Plutella xylostella* (Linnaeus) 幼虫中连续传代后病毒毒力增强是由于基因型发生了变异 (KolodnyHirsch and VanBeek, 1997)。病毒跨宿主连续传代, NPV 往往对传代宿主毒力显著升高, 并且与传代次数有关 (王成燕, 2012)。

毒力和传播力的博弈一直都是病毒进化的驱动因素之一。病毒毒力和传播能力之间往往存在进化上的权衡。病毒在宿主体内的复制是促进病毒在各个宿主间传播的必要条件。根据传播毒力权衡假说, 高毒力病毒具有较高的传播率 (病毒复制与毒力呈正相关) 和较快的传播速度 (更快地杀死宿主)。较快的杀虫速度可能会增加病毒的适应度, 导致感染昆虫体内的 OBs 能迅速释放到宿主血液中, 使传播周期和病毒扩增增加。一项对舞毒蛾核型多角体病毒 (*Lymantria dispar nucleopolyhedrovirus*, LdNPV) 的研究表明, 短期感染的毒力高于长期感染的毒力, 这是因为宿主死亡率大的代价是病毒传播的减少 (Cooper et al., 2002)。昆虫中肠是病毒入侵过程中基因型选择的主要场所。目前的研究表明, 该过程也是病毒的遗传瓶颈, 可能严重影响宿主初始基因型的多样性。该过程有助于基因型选择, 只有复制最有效的基因型才能建立有效的感染。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

本研究使用的 AcMNPV 野生株宿主为棉铃虫或甜菜夜蛾, 经交叉世代感染获得, 对两种宿主均有较高的毒力。然而, 该毒株对草地贪夜蛾毒力较低, 与 Haas-Stapleton (2005) 报道的结果一致 (Haas-Stapleton *et al.*, 2005)。本研究的压力筛选方法是选择将最先死亡的虫尸中收获的病毒多角体用于下一代接种, 从而逐代缩短杀虫速度。虽然传代过程中 LC_{50} 有所波动, 但通过连续传代获得的 AcMNPV 毒株对宿主草地贪夜蛾的毒力有所增强。测定了几个世代 AcMNPV 毒力, 毒力从高到底依次为 P15、P10、P20、P6、P3。在前几代中, 病毒的毒力与传代数呈正相关, 该结果表明, 随着传代次数增加, 病毒对草地贪夜蛾幼虫的敏感性增强, 对草地贪夜蛾的宿主适应性增强。在 P20 代, AcMNPV 毒力下降, 这可能是由于病毒中存在不同的突变亚株所致。在收集子代病毒时, 优先选择致死时间较短的毒株, 而不是致死效果最强的毒株, 这可能导致了致死时间短的亚株成为子代的优势种, 导致幼虫死亡率降低。

本研究的数据表明, AcMNPV 在跨物种复制增殖过程中基因型发生了变异。本研究对 AcMNPV 第 3 代与第 10 代毒株进行了二代测序和序列比对, 发现了多处 SNP 突变, 包括一些编码氨基酸的基因突变。发现该病毒的 7 个编码基因存在单核苷酸多态性, 这 7 个编码基因参与病毒入核、多角体产量、加速中肠初始感染、抑制凋亡等功能。其中 4 个编码基因发生同义突变可能是由于不同宿主的密码子偏好不同, 对产生蛋白的影响不大; 错义突变的基因由于氨基酸组成的改变对蛋白质的影响较大。编码错译突变的基因分别为 *ac34*、*lef12* 和 *lef2*。

Ac34 是一种促进晚期基因表达的激活蛋白, 对病毒的致病性至关重要 (Cai *et al.*, 2012)。Ac34 序列高度保守, 其 C 端保守性更强, 序列中存在非保守的核定位信号, 也存在潜在的转录后修饰位点 (Qiu *et al.*, 2017)。Ac34 存在于细胞核和细胞质中, 由于杆状病毒在细胞核内复制, Ac34 的核定位可能对其促进病毒复制的功能至关重要 (Zhang *et al.*, 2019)。Ac34 刺激病毒晚期基因转录, 从而促进 BVs 的产生, 缺失 *ac34* 后产生无传染性 BVs, 但细胞核内可观察到包被的核衣壳 (Qiu *et al.*, 2017)。缺失 *ac34* 不影响 DNA 复制以及病毒组装, 而延迟晚期基因表达。进一步研究表明, 晚期转录不需要 Ac34, 但晚期基因表达的

扩增需要 Ac34 (Qiu *et al.*, 2017)。

lef12 是一种晚期表达基因, 与病毒复制无关 (Yuan *et al.*, 2014), 但在晚期转录中起直接作用。然而 *lef12* 缺失的重组病毒产量下降了 5 倍 (Qiu *et al.*, 2017)。*lef12* 不是病毒基因组复制所必需的基因, 但其缺失将导致宿主细胞的感病时间延迟, 也显著降低病毒晚期和极晚期基因的转录水平, 导致晚期和极晚期蛋白水平减少 (Guarino *et al.*, 2002)。

LEF1 为引物酶, 而 LEF2 作为引物酶辅助因子, 将 LEF1 纳入病毒 DNA 上组装的复制复合物中, LEF1 与 LEF2 结合, 同时与单链 DNA 形成稳定的复合物, 并可能与其它 DNA 复制相关的蛋白质结合, 实现 DNA 复制 (Mikhailov and Rohrmann, 2002)。最近的研究表明, LEF2 不是影响 DNA 复制的必要因素, 而只是提高 DNA 复制效率的影响因子 (Wu *et al.*, 2010)。*lef2* 的启动子序列包含两个晚期启动子共识基序 (TAAG), 因此 *lef2* 可能在感染晚期转录 (Passarelli and Miller, 1993)。由于 LEF2 作为 DNA 复制的重要影响因素, DNA 复制又是晚期和极晚期基因表达的必要因素, 故 *lef2* 突变会抑制晚期和极晚期基因表达 (Merrington *et al.*, 1996)。综上所述, LEF2 影响病毒的方式有两种: 直接作用于晚期和极晚期基因表达, 或作用于病毒 DNA 复制, 间接影响病毒增殖 (Sriram and Gopinathan, 1998)。

上述 3 种基因以不同的方式影响病毒产生以及病毒毒力。在本研究中, *lef12* 的基因突变在第 3 代和第 10 代均有发生, *lef2* 的基因突变仅在第 3 代发生, *ac34* 的基因突变仅出现在第 10 代毒株中, 提示 Ac34 在提高 AcMNPV 对草地贪夜蛾致病性中的重要性。这 3 个编码基因特别是 *ac34* 的突变, 可能是促进 AcMNPV 在草地贪夜蛾幼虫中连续传代毒力增强的原因, 具体的机理有待进一步研究。

参考文献 (References)

- Cai Y, Long Z, Qiu J, *et al.* An *ac34* deletion mutant of *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* exhibits delayed late gene expression and a lack of virulence *in vivo* [J]. *Journal of Virology*, 2012, 86 (19): 10432 - 10443.
- Cooper VS, Reiskind MH, Miller JA, *et al.* Timing of transmission and the evolution of virulence of an insect virus [J]. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 2002, 269 (1496): 1161 - 1165.

- Cui ZB, Li ZQ, Wang Y, *et al.* Research progress and control strategies of *Spodoptera frugiperda* [J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2020: 38–42. [崔志斌, 李智群, 王勇 等. 草地贪夜蛾研究现状及防控策略 [J]. 湖南农业科学, 2020: 38–42]
- Guarino LA, Mistretta TA, Dong W. Baculovirus *lef-12* is not required for viral replication [J]. *Journal of Virology*, 2002, 76 (23): 12032–12043.
- Haas–Stapleton EJ, Washburn JO, Volkman LE. *Spodoptera frugiperda* resistance to oral infection by *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* linked to aberrant occlusion-derived virus binding in the midgut [J]. *Journal of General Virology*, 2005, 86: 1349–1355.
- Kolodny-Hirsch DM, Sitchawat T, Jansiri T, *et al.* Field evaluation of a commercial formulation of the *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) *nuclear polyhedrosis virus* for control of beet armyworm on vegetable crops in Thailand [J]. *Biocontrol Science and Technology*, 1997, 7 (4): 475–488.
- Kolodny-Hirsch DM, van Beek NAM. Selection of a morphological variant of *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* with increased virulence following serial passage in *Plutella xylostella* [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1997, 69 (3): 205–211.
- Lee HH, Miller LK. Isolation of genotypic variants of *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* [J]. *Journal of Virology*, 1978, 27 (3): 754–767.
- Merrington CL, Kitts PA, King LA, *et al.* An *Autographa californica nucleopolyhedrovirus lef-2* mutant: Consequences for DNA replication and very late gene expression [J]. *Virology*, 1996, 217 (1): 338–348.
- Mikhailov VS, Rohrmann GF. Baculovirus replication factor LEF-4 is a DNA primase [J]. *Journal of Virology*, 2002, 76 (5): 2287–2297.
- Passarelli AL, Miller LK. Three baculovirus genes involved in late and very late gene expression: *le-1*, *ie-n*, and *lef-2* [J]. *Journal of Virology*, 1993, 67 (4): 2149–2158.
- Qiu J, Tang Z, Yuan M, *et al.* The 91–205 amino acid region of AcMNPV ORF34 (Ac34), which comprises a potential C3H zinc finger, is required for its nuclear localization and optimal virus multiplication [J]. *Virus Research*, 2017, 228: 79–89.
- Smith GE, Summers MD. Analysis of baculovirus genomes with restriction endonucleases [J]. *Virology*, 1978, 89 (2): 517–527.
- Sriram S, Gopinathan KP. The potential role of a late gene expression factor, *lef2*, from *Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus* in very late gene transcription and DNA replication [J]. *Virology*, 1998, 251 (1): 108–122.
- Wang CY. Effect of Co-Infection and Alternate Passages on Host Range and Infectivity of *Spodoptera Litura Nucleopolyhedrovirus* and Its Mechanism [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University Master Thesis, 2012. [王成燕. 混合侵染和交替传代对斜纹夜蛾核型多角体病毒宿主域和毒力 [D]. 南京: 南京农业大学硕士论文, 2012]
- Wu CP, Huang YJ, Wang JY, *et al.* *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* LEF-2 is a capsid protein required for amplification but not initiation of viral DNA replication [J]. *Journal of Virology*, 2010, 84 (10): 5015–5024.
- Yuan J, Xie C, Wang F, *et al.* The Effect of *lef-12* deletion on virus replication and gene transcription of *Bombyx mori Nucleopolyhedrovirus* [J]. *Acta Sericologica Sinica*, 2014, 40 (3): 468–474.
- Zhang B, Liang A, Fu Y. Ac34 protein of AcMNPV promoted progeny virus production and induced the apoptosis in host Sf 9 cells [J]. *Biotechnol Letters*, 2019, 41 (1): 147–158.