



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117187195 A

(43) 申请公布日 2023.12.08

(21) 申请号 202311156721.7

(22) 申请日 2023.09.07

(71) 申请人 湖南省林业科学院

地址 410005 湖南省长沙市韶山南路658号

(72) 发明人 赵正萍 颜学武 袁冬菊 张敏

夏永刚 钟武洪 颜果 邬颖

卢敏

(74) 专利代理机构 北京维正专利代理有限公司

11508

专利代理师 智业

(51) Int. Cl.

C12N 7/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书11页 附图2页

(54) 发明名称

一种提高马尾松毛虫质型多角体病毒产量的方法

(57) 摘要

本申请涉及马尾松毛虫质型多角体病毒增殖的技术领域,尤其是涉及一种提高马尾松毛虫质型多角体病毒产量的方法。该方法中替代寄主人工饲料为:麦胚8~12份、豆粉8~12份、酵母粉2~5份、抗坏血酸0.5~1份、复合维生素0.05~0.1份、防腐剂0.1~0.5份、卡拉胶粉2~4份、保幼激素类似物0~0.05份;替代寄主的培养温度为 $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,光周期为14 L:10D,相对湿度 $60 \pm 2\%$ ;多角体病毒的接种量为 $2 \sim 7 \mu\text{L}/\text{头}$ ,多角体病毒水溶液的浓度为 $1 \times 10^6 \text{ PIB}/\text{mL} \sim 5 \times 10^6 \text{ PIB}/\text{mL}$ ,通过以上技术方案病毒总产量提高98.3~239.2%。

1. 一种提高马尾松毛虫质型多角体病毒产量的方法,包括如下步骤:替代寄主培养、多角体病毒接种、接种后培养、收集替代寄主、制备纯的多角体病毒的步骤,其特征在于,所述替代宿主培养的人工饲料包括麦胚8~12份、豆粉8~12份、酵母粉2~5份、抗坏血酸0.5~1份、复合维生素0.05~0.1份、防腐剂0.1~0.5份、卡拉胶粉2~4份;;所述复合维生素每克含量:B1 86.86mg、B2 77.55mg、B6 91.32mg、B12 142.06 $\mu$ g、烟酸286.81mg、叶酸4.11 $\mu$ g、泛酸130.25mg。
2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述替代寄主为甜菜夜蛾、棉铃虫或银纹夜蛾。
3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,还包括保幼激素0~0.05份。
4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,所述保幼激素为ZR-512、ZR-515、ZR-619、ZR-717中的一种或多种,添加量为0.02份。
5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述多角体病毒接种步骤中的接种量为2~7 $\mu$ L/头,多角体病毒水溶液的浓度为 $1 \times 10^6$ PIB/mL~ $5 \times 10^6$ PIB/mL。
6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,多角病毒接种后的培养条件为温度18 $^{\circ}$ C至26 $^{\circ}$ C,光周期为16 L:8D,相对湿度60 $\pm$ 2%。
7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述多角病毒接种后的培养温度为18 $^{\circ}$ C~22 $^{\circ}$ C。
8. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述替代寄主培养中培养条件为温度26 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C,光周期为14 L:10D,相对湿度60 $\pm$ 2%。
9. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述多角体病毒接种后的培养条件为20 $^{\circ}$ C,光周期为16 L:8D,相对湿度60 $\pm$ 2%。
10. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述多角体病毒接种密度为100~200头/盒,所述盒的规格为40cm $\times$ 25 cm $\times$ 8 cm。

## 一种提高马尾松毛虫质型多角体病毒产量的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及马尾松毛虫质型多角体病毒增殖的技术领域,尤其是涉及一种提高马尾松毛虫质型多角体病毒产量的方法。

### 背景技术

[0002] 马尾松毛虫 *Dendrolimus punctatus* 属鳞翅目枯叶蛾科的一种昆虫,是我国历史性森林害虫,其防治仍以化学防治为主,全国每年防控面积达2500万亩以上,这不仅造成了环境的污染,同时也给林间物种多样性的保护带来的极大的挑战,在提倡绿色可持续发展理念中,生物防治的应用无疑是建立绿色生态林业模式的理想策略。其中,马尾松毛虫质型多角体病毒 (*Dendrolimus punctatus* Cytoplasmic polyhedrosis virus,简称DpCPV) 是防控马尾松毛虫主要生物防治手段之一,防治效果可达50%~80%,较易引起区域性的流行病,且具有持效作用,防治1次可控制5~6年不成灾,同时,该病毒的特异性高,昆虫对其抗性低,对人畜及天敌十分安全,在环境中没有残留,因此在林业生产上具有广阔的应用前景。

[0003] 应用昆虫病毒防治农林害虫,其前提条件是能否实现病毒工厂化生产。目前,DpCPV生产主要是利用天然寄主马尾松毛虫林间或围栏进行复制,不仅受季节性及虫源的限制,也严重影响病毒的产量与质量,导致DpCPV不能规模化生产与应用。采用人工饲料在室内大规模饲养宿主昆虫或替代寄主昆虫进行病毒增殖是获得大量病毒的重要途径,同时不受环境和寄主虫源等条件限制,能实现病毒周年性生产。研究发现,DpCPV具有相对广泛的宿主范围,可使鳞翅目10科31种昆虫感染发病,已证明甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*、棉铃虫 *Heliothis armigera*、粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 和银纹夜蛾 *Argyrogramma agnata* 等昆虫能够作为增殖DpCPV的优良替代寄主,但均以实验室小规模研究为主,尚未形成工厂化规模繁育技术体系,病毒产量远远没有达到防治所需。

[0004] 现有技术对病毒增殖的影响因素研究可归纳为三方面,除了上述寄主因素如品系、虫龄、性比等之外,还受环境因素如饲养容器、人工饲料、温湿度、光照等和病毒因素如接种浓度、病毒株品种、收获病毒的时间及方法等的影响。并且以上研究只是实验室规模的摸索多角体病毒在宿主内稳定地生长繁殖条件,并不能稳定的提升病毒产量。

### 发明内容

[0005] 鉴于此,本发明提供了一种提高马尾松毛虫质型多角体病毒产量的方法,通过在人工饲料中添加微量保幼激素类似物以及调节饲养温度,延长替代寄主增殖DpCPV的时间,实现以低成本、高效率获得大量DpCPV,从而满足防治需求。

[0006] 为了实现以上目的,本发明主要采用如下技术方案:

一种提高马尾松毛虫质型多角体病毒产量的方法,包括如下步骤:

替代寄主培养、多角体病毒接种、接种后培养、收集替代寄主、制备纯的多角体病毒步骤,其中替代住宿培养的人工饲料为麦胚8~12份、豆粉8~12份、酵母粉2~5份、抗

坏血酸0.5~1份、复合维生素0.05~0.1份、防腐剂0.1~0.5份、卡拉胶粉2~4份；

优选的,所述替代寄主人工饲料,在正常饲养时,采用的配比为:麦胚10份、豆粉10份、酵母粉2.5份、抗坏血酸0.5份、复合维生素0.05份、防腐剂0.2份、卡拉胶粉2份;在病毒增殖时,采用的配比为:麦胚10份、豆粉12份、酵母粉5份、抗坏血酸0.5份、复合维生素0.1份、防腐剂0.2份、卡拉胶粉2份;

所述复合维生素的组成为每克含量:B1 86.86mg、B2 77.55mg、B6 91.32mg、B12 142.06 $\mu$ g、烟酸286.81mg、叶酸4.11 $\mu$ g、泛酸130.25mg;

所述防腐剂为山梨酸钾、无水柠檬酸、尼铂金甲酯的一种或多种混合物;

替代寄主的培养温度为 $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,光周期为14L:10D,相对湿度 $60\pm 2\%$ 。

[0007] 多角体病毒接种的步骤中,所述多角体病毒的接种量为 $2\sim 7\mu\text{L}/\text{头}$ ,多角体病毒水溶液的浓度为 $1\times 10^6\text{PIB}/\text{mL}\sim 5\times 10^6\text{PIB}/\text{mL}$ 。

[0008] 通过以上人工饲料饲养的甜菜夜蛾、棉铃虫以及银纹夜蛾能够稳定生长繁殖,生长繁殖周期和野生型不具有显著性差异,且它们对多角病毒敏感度依次为,甜菜夜蛾对DpCPV最敏感,感染死亡率显著高于其他两种,高达91.33%;棉铃虫次之,感染死亡率为87.33%,银纹夜蛾感染死亡率为14.00%。

[0009] 以上替代寄主培养增殖多角体病毒的方案中,棉铃虫平均单头病毒产量为 $(7.51\pm 0.29)\times 10^8\text{PIB}/\text{头}$ ,甜菜夜蛾平均单头病毒产量为 $(2.06\pm 0.20)\times 10^8\text{PIB}/\text{头}$ ,银纹夜蛾平均单头产量分别为 $(1.73\pm 0.16)\times 10^8\text{PIB}/\text{头}$ ,棉铃虫增殖DpCPV的产量显著高于甜菜夜蛾、银纹夜蛾增殖DpCPV的产量。

[0010] 以上替代寄主培养增殖多角体病毒的方案中,群体接种病毒产量检测结果表明,利用棉铃虫和甜菜夜蛾增殖的DpCPV的产量无显著差异,平均百头病毒产量分别为 $(224.87\pm 22.42)\times 10^8\text{PIB}/\text{头}$ 和 $(181.50\pm 5.12)\times 10^8\text{PIB}/\text{头}$ ,显著高于银纹夜蛾增殖DpCPV的产量 $(110.17\pm 2.49)\times 10^8\text{PIB}/\text{头}$ 。银纹夜蛾因感染率低,所以相较单头接种的,DpCPV产量显著下降;棉铃虫虽然病毒增殖量是最大,但由于棉铃虫3龄以上幼虫有自相残杀的习性,百头虫收虫率不足一半,不宜群体饲养,需单头饲养,因此规模繁育工作量大、成本高;甜菜夜蛾病毒感染率高、饲养容易且发育周期短。综上所述,小规模实验可选棉铃虫作为最佳替代寄主,大规模生产宜选甜菜夜蛾作为最佳替代寄主。

[0011] 更为优选的替代寄主饲料中还包括保幼激素类似物 $0\sim 0.05\%$ ,所述保幼类似物为ZR-512、ZR-515、ZR-619、ZR-717中的一种或多种;多角病毒接种后的培养温度为 $18^{\circ}\text{C}$ 至 $30^{\circ}\text{C}$ ,优选的多角病毒接种后的培养温度为 $18^{\circ}\text{C}$ 至 $22^{\circ}\text{C}$ 。

[0012] 通过以上技术方案,在人工饲料中添加保幼激素类似物以及调控温度,能够显著延长替代寄主增殖马尾松毛虫质型多角体病毒 $1.3\sim 3.3\text{d}$ ,平均单头病毒产量提高 $40.0\sim 70.6\%$ ,病毒总产量提高 $98.3\sim 239.2\%$ 。同时本发明通过调节温度,还能减少其他病菌滋生。

[0013] 综上本申请技术方案可以实现方便、快速、稳定地获得大量DpCPV,大大提高生产效率,降低生产成本。

## 附图说明

[0014] 附图1不同接种量和虫龄对DpCPV增殖的影响。

- [0015] 附图2不同接种频率对DpCPV增殖的影响。
- [0016] 附图3不同甜菜夜蛾饲养密度对DpCPV增殖的影响。
- [0017] 附图4不同接种温度对DpCPV增殖的影响。

### 具体实施方式

[0018] 为了清楚、简要的说明本申请的实施方案,本申请以某一类具有相似结果的一到两个实施例作为代表,例如:本申请替代寄主为甜菜夜蛾、棉铃虫以及银纹夜蛾等的培养、接种病毒、接种后培养、病毒收集等步骤相同或相似,只以其中之一进行举例说明或阐述性或概括性叙述,因此本申请实施例仅是为了阐明技术方案,并不代表本申请的全部工作。

[0019] 本申请所述养虫室为单纯的替代寄主培养室。

[0020] 本申请中所述病毒接种室或病毒培养室是指替代寄主接种多角体病毒后的培养室。

[0021] 本申请所用仪器设备以及饲料中的成份均为市售产品。

[0022] 本申请所用养虫盒也叫做替代寄主培养盒为圆形塑料盒,规格为 $\phi = 11\text{cm}$ , $H = 7.5\text{cm}$ 。

[0023] 本申请所用病毒接种盒即接种病毒后的替代寄主幼虫期培养盒为方形塑料盒,规格为 $40\text{cm} \times 25\text{cm} \times 8\text{cm}$ 。

[0024] 本申请所有实施例或实施例中病毒的收集与计数方法相同,具体为从感染病毒后第7天开始收集病死虫至预蛹前期,收集的病死虫放入 $-20^{\circ}\text{C}$ 的冷藏箱内;

将收集的病死虫经粉碎、匀浆,加无菌水稀释,二层100目纱布过滤后,经500r/min和6000r/min差速离心法进行病毒纯化,得到纯DpCPV;用适量无菌水悬浮DpCPV,血球计数板计数。

[0025] 实施例1人工饲料和天然饲料的效果对比

#### 替代寄主培养方法

(1) 将替代寄主卵经5~8%甲醛溶液浸泡消毒15min,然后取无菌水漂洗2次,自然凉干后移入经消毒的养虫盒中,于养虫室中用人工饲料饲养至3龄;

(2) 所述替代寄主为甜菜夜蛾、银纹夜蛾或棉铃虫;

(3) 所述养虫盒为圆形塑料盒,规格为 $\phi = 11\text{cm}$ , $H = 7.5\text{cm}$ ;

(4) 所述养虫室温度为 $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,光周期为14L:10D,相对湿度 $60 \pm 2\%$ ;

(5) 所述替代寄主人工饲料为:麦胚8~12g、豆粉8~12g、酵母粉2~5g、抗坏血酸0.5~1g、复合维生素0.05~0.1g、防腐剂0.1~0.5g、卡拉胶粉2~4g;具体见表1。

[0026] (6) 将替代寄主3龄幼虫转移到病毒接种盒中,替代寄主接种密度为100~200头/盒;(7) 每天观察饲料取食情况,饲料取食完毕,添加新鲜的人工饲料,定期清理食物残渣和粪便,更换养虫盒。

[0027] 表1人工饲料筛选

试验组	麦胚	大豆粉	酵母粉	抗坏血酸	复合维生素	山梨酸	卡拉胶
1.1	8	8	2	0.5	0.05	0.1	2
1.2	10	10	4	1	0.08	0.2	3
1.3	12	12	5	0.8	0.1	0.5	4

注:1、用量单位为g;

2、表1中三种配方为实验筛选出的能够显著提高甜菜夜蛾、棉铃虫以及银纹夜蛾的化蛹率以及产卵量的优选配方,并且1.1-1.3组间不具有显著性差异。

[0028] 3、表1中优选配方同天然饲料玉米苞叶的效果对比见表2。

表2人工饲料和天然饲料对甜菜夜蛾生长发育的影响

饲养材料	存活率/%	化蛹率/%	蛹重/mg		羽化率/%	产卵量/粒	子代孵化率/%
			雌	雄			
人工饲料	94.25±0.63	95.31±1.32	140.26±2.35	120.32±1.55	94.32±0.75	527.20±41.43	98.40±0.80 a
玉米苞叶	92.33±0.94	86.44±0.97	132.69±2.35	117.94±1.40	95.63±0.45	413.30±33.31	96.51±1.24 a

[0029] 注:同列标注不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

[0030] 由表2可知,利用人工饲料喂食甜菜夜蛾,其化蛹率、雌蛹重和产卵量等生理指标均显著优于喂食天然食料玉米苞叶( $P < 0.05$ ,下同),因此,用人工饲料饲养甜菜夜蛾,表现出了较好的饲养效果,特别是平均产卵量高达(527.20±41.43)粒,显著高于天然饲料的(413.30±33.31)粒,这无疑可以增加单位时间内幼虫的产率,从而可以间接提高多角体病毒的总产量。

[0031] 本实验研究表明,研制的人工饲料可以满足甜菜夜蛾生长发育需要,能够完成整个生活世代。

[0032] 本实验研究还表明上述优选人工饲料配方对甜菜夜蛾、棉铃虫以及银纹夜蛾的影响相似,同其他诸如小菜蛾、米蛾、棉虫等昆虫间具有显著性差异。

[0033] 实施例2替代寄主的培养温度影响

采用同实施例1的优选饲料配方以及培养方法,不同是设置了几个不同的培养温度,具体温度设置以及结果见表3:

表3不同温度条件下饲喂人工饲料的甜菜夜蛾生长发育情况

温 度 /°C	发育历期/d				孵化率 /%	存活率/%	化蛹率 /%	羽化率/%
	卵期	幼虫期	蛹期	成虫期				
24	3.39±	14.62±	9.79±	7.36±	95.33±	90.19±	93.51±	92.54±
	0.32	0.07	0.10	0.08	2.40a	2.01	1.47a	2.18
	a	a	a	a		ab		a
26	2.63±	11.25±	7.22±	7.40±	98.33±	94.25±	95.31±	94.32±
	0.32	0.10	0.11	0.16	1.20a	0.63	1.32a	0.75
	ab	b	b	a		a		a
28	2.27±	10.81±	7.01±	6.54±	99.00±	96.97±	90.25±	89.64±
	0.25	0.05	0.08	0.04	0.58a	0.02	2.17a	1.21
	b	c	b	b		a		ab
30	2.08±	10.12±	6.07±	4.26±	94.00±	85.95±	80.64±	83.71±
	0.05	0.33	0.13	0.14	1.73a	3.73	1.65b	3.29
	b	d	c	c		b		b

注：同列标注不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

[0034] 由表3可知,温度对优势替代寄主发育历期、幼虫存活率、化蛹率以及成虫等生理指标具有较大影响,而对卵孵化率无显著影响。其发育历期随着温度升高而显著缩短。26°C和28°C两种饲养温度条件下,卵孵化率分别为98.33%和99.00%,高于24°C和30°C温度条件下的95.33%和94.00%,但差异不显著;但前两个温度条件下幼虫存活率(分别为94.25%和96.97%)显著高于后两者(分别为90.19%和85.95%)。饲养温度为24、26和28°C时,甜菜夜蛾化蛹率分别为93.51%、95.31%和90.25%,显著高于30°C(80.64%);成虫羽化率分别为92.54%、94.32和89.64%,显著高于30°C(83.71%)。因此,室内用人工饲料饲养甜菜夜蛾的最适温度为:卵期和幼虫期26~28°C,蛹期和成虫期24~26°C。

[0035] 并且通过表3我们可以看出,在24~26°C之间蛹期和幼虫期出现了显著性差异,并且24°C显著高于26°C,并且病毒接种在幼虫期,因此在保证存活率和产卵率不变的情况下,低温有助于延长(24°C)幼虫期,从而进一步提高病毒总产量。但是孵化率和存活率在24°C至28°C之间,具有随温度的升高而升高的趋势,而孵化率和存活率能够提升替代寄主的数量,从而间接提高病毒产量的优势,因此替代寄主最佳培养温度为26±2°C。

[0036] 实施例2中棉铃虫和银纹夜蛾的考察结果与甜菜夜蛾类似,最佳培养温度为26±2°C。

[0037] 实施例3多角体病毒接种步骤条件考察

实验方法:

替代寄主培养:

将替代寄主卵经5~8%甲醛溶液浸泡消毒15min,然后取无菌水漂洗2次,自然凉干后移入经消毒的养虫盒中,于养虫室中用人工饲料饲养至所需虫龄;

所述替代寄主为甜菜夜蛾、银纹夜蛾或棉铃虫;所述养虫盒为圆形塑料盒,规格为 $\phi = 11\text{cm}$ , $H = 7.5\text{cm}$ ;

所述养虫室温度为按照所需调整,光周期为14L:10D,相对湿度 $60 \pm 2\%$ ;

所述替代寄主人工饲料为:麦胚8~12g、豆粉8~12g、酵母粉2~5g、抗坏血酸0.5~1g、复合维生素0.05~0.1g、防腐剂0.1~0.5g、卡拉胶粉2~4g、保幼激素类似物0~0.05g;

所述防腐剂为山梨酸钾、无水柠檬酸、尼铂金甲酯的一种或几种混合物。

[0038] 多角体病毒接种:

将替代寄主3龄幼虫转移到病毒接种盒中,替代寄主接种密度为根据所需调整;所述病毒接种盒为方形塑料盒,规格为 $40\text{cm} \times 25\text{cm} \times 8\text{cm}$ 。

[0039] 用适量无菌水悬浮DpCPV,血球计数板计数,将DpCPV稀释至所需浓度;

将DpCPV滴加到制备好的人工饲料上,饲喂替代寄主幼虫龄按需选择;

DpCPV接种量为 $2 \sim 7\mu\text{L}/\text{头}$ ;

接种后培养:

将病毒接种盒置于病毒接种室中,调整病毒接种室温度为 $20^\circ\text{C}$ ,光周期为16L:8D,相对湿度 $60 \pm 2\%$ 。

[0040] 实施例3.1接种量和虫龄

以甜菜夜蛾作为替代寄主接种DpCPV悬浮液,虫龄分别为2、3、4、5龄,DpCPV接种浓度分别为 $1 \times 10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ PIB/mL。接种量为 $50\mu\text{L}/\text{头}$ 。放在温度 $20^\circ\text{C}$ ,相对湿度 $60 \pm 2\%$ ,光暗比14:10的人工气候箱里饲养。

[0041] 实验结果如附图1所示。

[0042] 由附图1可知,当DpCPV接种浓度分别为 $1 \times 10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 和 $10^6$ PIB/mL,接种2龄幼虫DpCPV增殖量分别为0.67、0.83、0.59和 $0.32 \times 10^8$ PIB/头,3龄幼虫DpCPV增殖量分别为0.73、1.04、1.48和 $1.82 \times 10^8$ PIB/头,4龄幼虫分别为0.69、0.91、1.25和 $1.68 \times 10^8$ PIB/头,5龄幼虫分别为0.47、0.67、0.86和 $1.09 \times 10^8$ PIB/头。总体而言,2龄幼虫对DpCPV的增殖量随着DpCPV接种浓度的增大,呈先上升再下降的趋势,3~5龄幼虫对DpCPV的增殖量随着DpCPV接种浓度的增大而增大。这可能是由于低龄幼虫对DpCPV比较敏感,当接种的DpCPV在一定浓度内,其体内DpCPV增殖量与浓度正相关,但当DpCPV浓度高于 $1 \times 10^5$ PIB/mL时,幼虫死亡率大大增加,死亡时间也提前,影响了DpCPV的增殖量;而3龄幼虫以上对DpCPV敏感度下降,死亡率低,因而DpCPV增殖量与DpCPV接种浓度正相关。当接种浓度为 $1 \times 10^6$ PIB/mL,3龄幼虫DpCPV增殖量最大,平均增殖量高达 $1.82 \times 10^8$ PIB/头,显著高于其他3个接种浓度;而5龄幼虫因即将化蛹,DpCPV增殖时间短,因而增殖量低于3~4龄幼虫。综上所述,采用3龄虫且DpCPV最佳接种浓度为 $1 \sim 5 \times 10^6$ PIB/mL。

[0043] 实施例3.2接种频率

DpCPV接种频率分别为1、2、3、4、5次,DpCPV接种浓度为 $1 \times 10^6$ PIB/mL,接种量为 $50\mu\text{L}/\text{头}$ 。放在温度 $20^\circ\text{C}$ ,相对湿度 $60 \pm 2\%$ ,光暗比14:10的人工气候箱里饲养。

[0044] 实验结果如附图2所示。



[0045] 由附图2可知,在接种总量不变的情况下,当接种频率为1~2次时,DpCPV增殖量最高,平均增殖量分别为为 $1.80$ 、 $1.81 \times 10^8$  PIB/头,显著高于接种频率为3次及以上的DpCPV增殖量,其中接种频率为3~4次时,DpCPV增殖量为 $1.36$ 、 $1.20 \times 10^8$  PIB/头,显著高于接种频率为5次的增殖量 $0.92 \times 10^8$  PIB/头。因此,接种频率对DpCPV增殖有一定影响,接种次数越多,DpCPV增殖量越少。这可能与甜菜夜蛾取食含DpCPV的人工饲料后,DpCPV在体内不断积累,导致甜菜夜蛾取食量渐渐下降,后期投喂的含DpCPV的人工饲料未能完全取食,因而影响DpCPV的增殖量。综上所述,当DpCPV接种总量一致时,DpCPV最佳接种频率以1~2次为宜。

#### [0046] 实验3.3替代寄主饲养密度

饲养密度分别为100、200、300、400、500头/盒。以塑料周转箱(长×宽×高为55cm×35cm×8cm)作为饲养容器,DpCPV接种浓度为 $1 \times 10^6$  PIB/mL,接种量为50 $\mu$ L/头。放在温度20 $^{\circ}$ C,相对湿度 $60 \pm 2\%$ ,光暗比14:10的人工气候室里饲养。

[0047] 每处理挑选3龄健康活跃的甜菜夜蛾幼虫50头,饥饿6h。将人工饲料切成2.5cm×2.5cm×0.3cm大小,滴加DpCPV悬浮液,自然晾干后置于塑料养虫盒中。待滴加DpCPV的人工饲料取食殆尽,添加新鲜人工饲料,定期清理食物残渣及粪便,更换养虫盒。每组重复3次。接种DpCPV 3天后收集病死虫直至预蛹前期,统计DpCPV增殖量。

[0048] 实验结果如附图3所示。

[0049] 由附图3可知,当甜菜夜蛾饲养密度为100头/盒时,DpCPV增殖量最高,DpCPV平均增殖量达 $1.77 \times 10^8$  PIB/头,显著高于200、300、400、500头/盒的平均增殖量(分别为 $1.56 \times 10^8$ 、 $1.06 \times 10^8$ 、 $0.86 \times 10^8$ 和 $0.80 \times 10^8$  PIB/头)。因此,甜菜夜蛾幼虫饲养密度对DpCPV增殖有很大影响,饲养密度越高,DpCPV增殖量越小。这可能是,饲养密度越高,单头幼虫取食到的DpCPV量越少,体内病毒积累量也越少。综上所述,甜菜夜蛾最佳饲养密度为100头/盒至200头/盒。

#### [0050] 实施例3.4接种室温度对病毒增殖的影响

##### 实施例3.4.1温度对单头替代寄主增值病毒的影响

接种温度分别为20、25、30 $^{\circ}$ C,DpCPV接种浓度为 $1 \times 10^6$  PIB/mL,接种量为50 $\mu$ L/头。分别放在相对湿度 $60 \pm 2\%$ ,光暗比14:10的人工气候箱里饲养。

[0051] 实验结果如附图4所示。

[0052] 由附图4可知,当接种温度为20 $^{\circ}$ C时,DpCPV平均增殖量最高,可达 $1.80 \times 10^8$  PIB/头,高于25 $^{\circ}$ C条件下DpCPV的增殖量 $1.65 \times 10^8$  PIB/头,两者间差异不显著。但均显著显著高于30 $^{\circ}$ C时的增殖量 $1.33 \times 10^8$  PIB/头。由此可知,接种温度越高,DpCPV增殖量越小,这可能是温度越低,甜菜夜蛾幼虫发育周期越长,DpCPV在体内积累时间也变长,因而DpCPV增殖量越大。综上所述,DpCPV接种温度为20~25 $^{\circ}$ C,以20 $^{\circ}$ C左右最佳。

##### [0053] 实施例3.4.2温度对单头替代寄主增值病毒的影响

在实施例3.4.1的基础上,考察接种室温度对单头或多头的影响是否一致,具体温度设置以及结果如表4所示:

饲养温度	18℃	20℃	22℃	24℃	26℃	30℃
DpCPV 增殖量 $10^9$ PIB/头	1.78 $\pm 0.77b$	1.91 $\pm 0.14a$	1.67 $\pm 0.77c$	1.56 $\pm 0.07d$	1.46 $\pm 0.08e$	1.35 $\pm 0.06f$
DpCPV 增殖量 $10^{10}$ PIB/百头	179.40 $\pm 2.31b$	189.35 $\pm 3.97a$	166.80 $\pm 3.22c$	156.90 $\pm 2.80d$	145.17 $\pm 3.07e$	136.29 $\pm 2.44f$

由表4可知,接种室温度对单头或群体接种病毒影响一致,DpCPV增殖量均随着温度的升高,呈现先上升再下降的趋势,20℃时,DpCPV增殖量最大。说明饲养温度低时,虫体发育缓慢,病毒不能充分增殖,而温度过高,加快寄主昆虫发病速率、死亡速率,并且抑制病毒的增殖。因此,通过温度的调控,可以实现病毒在寄主体内的充分增殖,从而提高病毒的产量。

[0054] 通过以上实施例确定了人工替代寄主培养的基本方法,其中人工饲料包括麦胚8~12份、豆粉8~12份、酵母粉2~5份、抗坏血酸0.5~1份、复合维生素0.05~0.1份、防腐剂0.1~0.5份、卡拉胶粉2~4份;所述复合维生素每克含量:B1 86.86mg、B2 77.55mg、B6 91.32mg、B12 142.06 $\mu$ g、烟酸286.81mg、叶酸4.11 $\mu$ g、泛酸130.25mg;多角体病毒接种步骤中的接种量为2~7 $\mu$ L/头,多角体病毒水溶液的浓度为 $1 \times 10^6$  PIB/mL ~  $5 \times 10^6$  PIB/mL;多角病毒接种后的培养条件为温度18℃至26℃(优选18℃至22℃),光周期为16L:8D,相对湿度 $60 \pm 2\%$ ,并且以上培养方案具有在棉铃虫、银纹夜蛾和甜菜夜蛾间的广适性。

[0055] 通过以上方法,可以实现稳定的多角体病毒的规模化生产,同天然培养方法相比,通过提高替代寄主的孵化率、存活率、化蛹率从而间接提高病毒的总产量,通过调整温度实现幼虫期长,从而提高单头或群体病毒的产量。

[0056] 实施例4不同保幼激素类似物用量对单头寄主病毒增值时间的影响

实验方法:

替代寄主培养:

将替代寄主卵经5~8%甲醛溶液浸泡消毒15min,然后取无菌水漂洗2次,自然凉干后移入经消毒的养虫盒中,于养虫室中用人工饲料饲养至3龄;

所述替代寄主为甜菜夜蛾或棉铃虫;

所述养虫盒为圆形塑料盒,规格为 $\phi = 11\text{cm}$ , $H = 7.5\text{cm}$ ;

所述养虫室温度为26℃,光周期为14L:10D,相对湿度 $60 \pm 2\%$ ;

所述替代寄主人工饲料,在正常饲养时,采用的配比为:麦胚10g、豆粉10g、酵母粉2.5g、抗坏血酸0.5g、复合维生素0.05g、防腐剂0.2g、卡拉胶粉2g;

所述防腐剂为山梨酸钾、无水柠檬酸、尼铂金甲酯的一种或几种混合物;

多角体病毒接种:

将替代寄主3龄幼虫转移到病毒接种盒中,替代寄主接种密度为100头/盒;所述病毒接种盒为方形塑料盒,规格为 $40\text{cm} \times 25\text{cm} \times 8\text{cm}$ ;

用适量无菌水悬浮DpCPV,血球计数板计数,将DpCPV稀释至 $1 \times 10^6$  ~  $5 \times 10^6$  PIB/

mL;将DpCPV滴加到制备好的人工饲料上,饲喂替代寄主3龄幼虫;DpCPV接种量为5 $\mu$ L/头;在病毒增殖时,采用的配比为:麦胚10g、豆粉12g、酵母粉5g、抗坏血酸0.5g、复合维生素0.1g、防腐剂0.2g、卡拉胶粉2g、保幼激素类似物用量分别设置2 $\mu$ g、5 $\mu$ g、7 $\mu$ g;所述保幼激素类似物为ZR-512、或ZR-515,或ZR-619,或ZR-717;

接种后培养:

将病毒接种盒置于病毒接种室中;

调整病毒接种室温度为20 $^{\circ}$ C,光周期为16L:8D,相对湿度60 $\pm$ 2%;

每天观察饲料取食情况,饲料取食完毕,添加新鲜的人工饲料,定期清理食物残渣和粪便,更换养虫盒;

收集替代寄主:

从感染后第7天开始收集病死虫至预蛹前期,收集的病死虫放入-20 $^{\circ}$ C的冷藏箱内;

制备多角体病毒

将收集的病死虫经粉碎、匀浆,加无菌水稀释,二层100目纱布过滤后,经500r/min和6000r/min差速离心法进行病毒纯化,得到纯DpCPV。

[0057] 不同保幼激素用量对不同单头替代寄主病毒增值时间的影响见表5

保幼激素类 似物种类	延长病毒增殖时间/d (用量为 2 $\mu$ g/头)		
	甜菜夜蛾	银纹夜蛾	棉铃虫
0	0	0	0
ZR-512	3.3	2.2	3.1
ZR-515	2.5	2.1	2.2
ZR-619	1.6	1.8	2.0
ZR-717	1.5	1.3	1.8
延长病毒增殖时间/d (用量为 5 $\mu$ g/头)			
ZR-512	3.2	2.1	3.2
ZR-515	2.6	2.1	2.1
ZR-619	1.7	1.7	2.0
ZR-717	1.6	1.4	1.7
延长病毒增殖时间/d (用量为 7 $\mu$ g/头)			
ZR-512	1.8	1.0	1.6
ZR-515	1.2	0.9	1.0
ZR-619	0.7	0.7	0.8
ZR-717	0.5	0.4	0.6

由表5可知,人工饲料中添加ZR-512、ZR-515、ZR-619和ZR-717四种保幼激素类似

物均能显著延长替代寄主甜菜夜蛾、银纹夜蛾和棉铃虫对DpCPV的增殖时间,并且在0 $\mu$ g/头-7 $\mu$ g/头浓度之间,随保幼激素类似物浓度的增加先增加再减少,不同的是这几种保幼激素类似物在种属选择性上具有显著性差异:ZR-512对甜菜夜蛾、棉铃虫以及银纹夜蛾的影响依次减弱;ZR-515对甜菜夜蛾的增值影响显著优于棉铃虫和银纹夜蛾,对棉铃虫和银纹夜蛾的增值影响相当;ZR-619在2 $\mu$ g/头时对甜菜夜蛾、银纹夜蛾以及棉铃虫的增值效果依次增强,但是在5 $\mu$ g/头对甜菜夜蛾以及银纹夜蛾的效果相当,显著劣于棉铃虫,但是在7 $\mu$ g/头时对三者的效果效果相当;而ZR-717对在浓度2-7 $\mu$ g/头范围内,对棉铃虫、甜菜夜蛾以及银纹夜蛾的作用依次递减。总之,四种保幼激素类似物尽管均能增加替代寄主对病毒的增值时间,最短的增值时间为1.3天,最长的增值时间可达3.3天,但是具有显著的种属差异性和浓度差异性。

[0058] 实施例5不同保幼激素类似物对病毒增殖的影响

方法与实施例4相同,接种DpCPV浓度为 $2 \times 10^6$  PIB/mL,接种体积为5 $\mu$ L/头,每盒虫数为100头。

[0059] 经过考察,不同保幼激素类似物ZR-512、ZR-515、ZR-619、ZR717,其浓度含量均为0.02%的人工饲料饲喂替代寄主甜菜夜蛾、银纹夜蛾和棉铃虫,其平均单头病毒产量及病毒总产量见表6、7、8。

[0060] 表6添加不同保幼激素类似物对甜菜夜蛾增殖病毒的影响

保幼激素类似物	单头		每盒	
	平均单头病毒产量/ $\times 10^9$ PIB/头	增效/%	病毒总产量/ $\times 10^{10}$ PIB/盒	增效/%
对照	1.70	0	101.5	0
ZR-512	2.9	70.59	282.1	177.9
ZR-515	2.61	53.52	235.28	131.8
ZR-619	2.24	31.76	199.65	96.7
ZR-717	2.13	25.29	184.53	81.8

表7添加不同保幼激素类似物对银纹夜蛾增殖病毒的影响

保幼激素类似物	单头		每盒	
	平均单头病毒产量/ $\times 10^9$ PIB/头	增效/%	病毒总产量/ $\times 10^{10}$ PIB/盒	增效/%
对照	1.5	0	92.4	0
ZR-512	2.1	40	183.23	98.3
ZR-515	2.06	37.33	167.89	81.7
ZR-619	1.93	28.67	161.52	74.8
ZR-717	1.8	20	141.56	53.2

表8添加不同保幼激素类似物对棉铃虫增殖病毒量的影响

保幼激素类似物	单头		每盒	
	平均单头病毒产量/ $\times 10^9$ PIB/头	增效/%	病毒总产量/ $\times 10^{10}$ PIB/盒	增效/%
对照	4.5	0	224.8	0
ZR-512	7.3	62.22	562.67	150.3
ZR-515	6.26	39.11	475.9	111.7
ZR-619	5.89	30.89	434.09	93.1
ZR-717	5.55	23.33	393.4	75

由表6、7、8可知,人工饲料中添加一定浓度的保幼激素类似物ZR-512、ZR-515、ZR-619和ZR-717均能显著增加替代寄主甜菜夜蛾、银纹夜蛾和棉铃虫对DpCPV的增殖量,使得几种替代寄主平均单头病毒产量比对照组提高了20%-70.59%,病毒总产量比对照组提高了53.2%-177.9%。

[0061] 本具体实施例仅仅是对本申请的解释,其并不是对本申请的限制,本领域技术人员在阅读完本说明书后可以根据需要对本实施例做出没有创造性贡献的修改,但只要在本申请的权利要求范围内都受到专利法的保护。

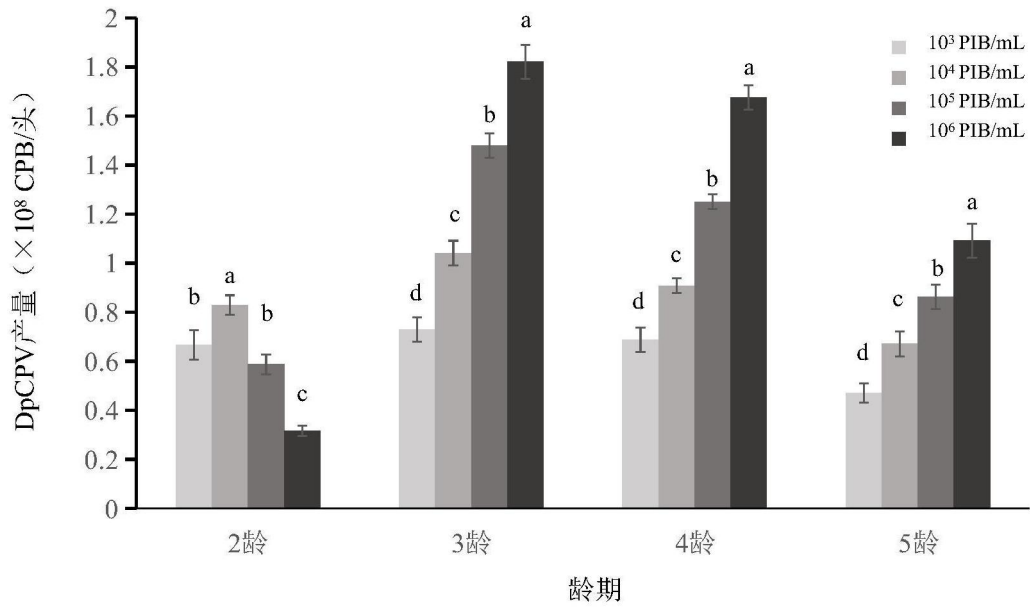


图1

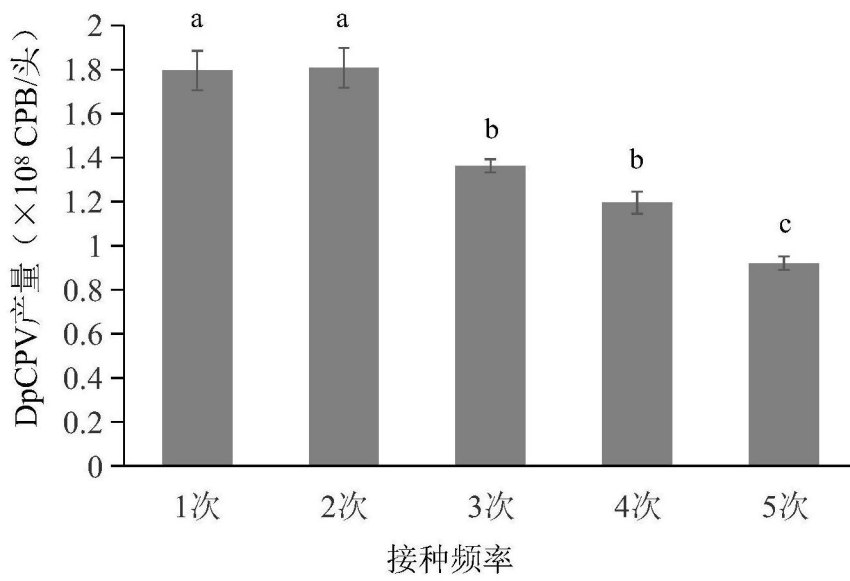


图2

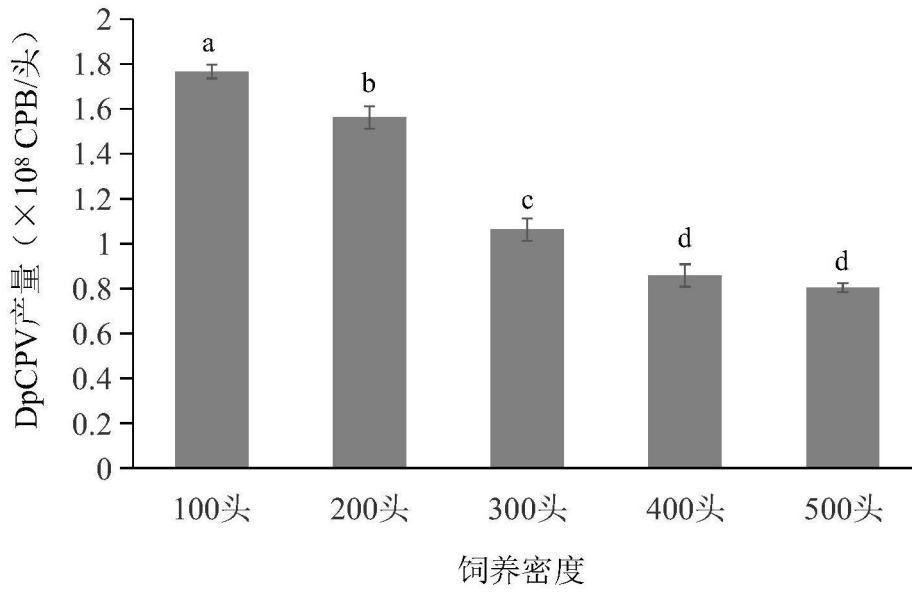


图3

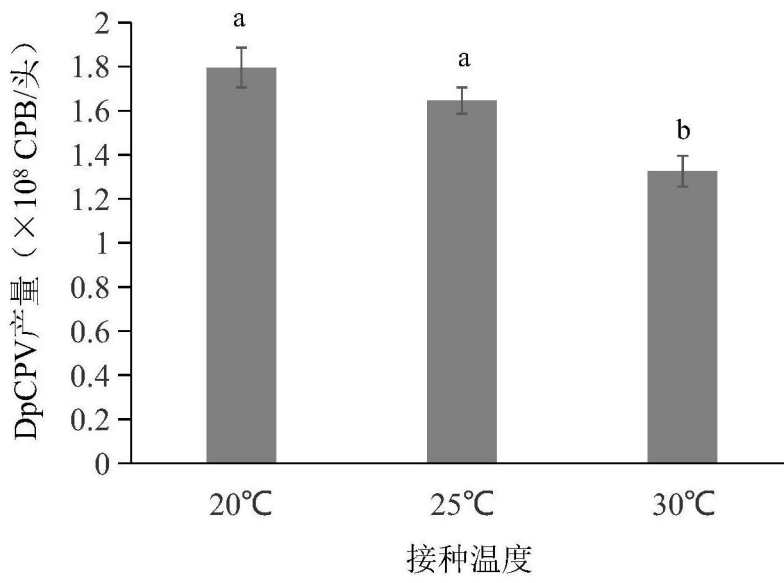


图4