

## DCPV 替代寄主筛选及利用技术研究

吴华青<sup>1</sup>, 赵志平<sup>2</sup>, 刘卫宏<sup>1</sup>, 冯美芳<sup>1</sup>, 刘付月清<sup>1\*</sup>

(1. 茂名市林业科学研究所, 广东茂名 525000; 2. 江华县林业局森保站, 湖南江华 425500)

**摘要** [目的] 筛选增殖 DCPV 的替代寄主。[方法] 利用 DCPV 感染斜纹夜蛾筛选增殖 DCPV 的替代寄主, 并用人工饲料开展规模饲养。[结果] 斜纹夜蛾对 DCPV 敏感且 PI-DCPV 产量高, DCPV 对斜纹夜蛾的  $LC_{50}$  为  $3.39 \times 10^5$  PIB/mL, 利用斜纹夜蛾增殖的 PI-DCPV 平均增殖量为  $2.01 \times 10^8$  PIB/头, PI-DCPV 对松毛虫的  $LC_{50}$  为  $1.45 \times 10^6$  PIB/mL, 略低于 DCPV 对松毛虫的  $LC_{50}$  ( $3.86 \times 10^5$  PIB/mL)。[结论] 综合分析, 斜纹夜蛾可作为增殖 DCPV 的合适寄主。

**关键词** DCPV; 斜纹夜蛾; 替代寄主; 筛选

中图分类号 S767.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)21-0143-03

## Study on Screening on Alternate Hosts of DCPV and Utilization Technology

WU Hua-qing<sup>1</sup>, ZHAO Zhi-ping<sup>2</sup>, LIU Wei-hong<sup>1</sup>, LIU Fu-yueqing<sup>1\*</sup> et al (1. Maoming Institute of Forestry Science, Maoming, Guangdong 525000; 2. Forestry Protection Station of Jianghua Forestry Bureau, Jianghua, Hunan 425500)

**Abstract** [Objective] The aim was to screen alternate hosts for DCPV proliferation. [Method] We infected *Prodenia litur* by DCPV to screen alternate hosts for DCPV proliferation, and carried out scale breeding by using artificial feed. [Result] *Prodenia litur* was sensitive to DCPV, and had high yield of PI-DCPV. The  $LC_{50}$  of DCPV to *Prodenia litur* was  $3.39 \times 10^5$  PIB/mL, and the average proliferation yield of PI-DCPV by using *Prodenia litur* was  $2.01 \times 10^8$  PIB per insect. The  $LC_{50}$  of PI-DCPV to *Dendrolimus* was  $1.45 \times 10^6$  PIB/mL, which was slightly lower than that of DCPV to *Dendrolimus* ( $3.86 \times 10^5$  PIB/mL). [Conclusion] Comprehensive analysis, *Prodenia litur* could be used as suitable alternate hosts for DCPV proliferation.

**Key words** DCPV; *Prodenia litur*; Alternate hosts; Screening

利用马尾松毛虫生产、增殖松毛虫质型多角体病毒 (*Dendrolimus cytoplasmic polyhedrosis virus*, 以下简称 DCPV) 易受季节及虫源的限制, 林间复制出来的 DCPV, 杂质偏多, 影响质量和产量<sup>[1]</sup>, 而采用人工饲料在室内饲养马尾松毛虫鲜见成功报道。可以认为, 利用替代寄主昆虫来生产 DCPV 是目前获得大量 DCPV 的主要途径。1990 年陈昌洁等<sup>[2]</sup>、1993 年周小毛等<sup>[3]</sup>、1996 年曾陈湘等<sup>[4]</sup> 做了很多这方面的研究, 但都未能应用于生产。笔者利用 DCPV 可以感染原宿主以外昆虫的特点, 筛选了对 DCPV 敏感、虫体适中、易饲养、周期短、病毒增殖量高的斜纹夜蛾作为目前合适的替代寄主, 并用人工饲料开展了规模饲养, 旨在为实现 DCPV 的工厂化生产提供理论依据。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

**1.1.1 病毒材料。**病毒材料 DCPV 50% 甘油悬浮剂, 含量为  $3 \times 10^9$  PIB/mL (PIB 是多角体 Po-lyhedral inclusion body 的简写), 由茂名市林业科学研究所林间采集后, 经室内分离提纯获得, 在  $-40$  °C 低温冰箱中保存。

**1.1.2 供试虫源。**樟蚕 (*Eriogyna pyretorus*)、绿翅绢野螟 (*Diaphania angustalis*)、凤凰木夜蛾 (*Pericyma crulgeni*) 采自茂名市林业科学研究所科研基地; 斜纹夜蛾 (*Prodenia litur*)、菜粉蝶 (*Pieris rapae*)、粘虫 (*Mythimna separata* Walker) 采自菜地; 银纹夜蛾 (*Argyrogramma agnata*)、甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua* Hiibner) 外购。

## 1.2 方法

**1.2.1 DCPV 替代寄主筛选。**挑选试验的鳞翅目幼虫均用所取食寄主作饲料喂养, 在室内喂养至 4 龄。将 DCPV 稀释为  $1 \times 10^6$  PIB/mL 浸润天然饲料表面, 晾干后喂饲幼虫, 喂饲病毒后, 前 3 d 清除死伤的幼虫, 第 4 天开始至第 19 天, 每天检查 1 次, 并逐条解剖死虫的中肠, 第 20 天全部解剖死、活虫的中肠, 统计感染病毒死亡率。

**1.2.2 DCPV 对斜纹夜蛾的感染试验。**挑选 4 龄斜纹夜蛾 200 头, 将 DCPV 按梯度稀释成不同浓度, 使 DCPV 含量分别为  $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$  PIB/mL, 浸润块状人工饲料后, 饲养至第 4 天开始检查, 至第 20 天结束, 逐条解剖死虫中肠, 并最后解剖残存活虫中肠进行检查, 确定是否有感染病毒。

**1.2.3 斜纹夜蛾人工饲养及 PI-DCPV 产量测定。**斜纹夜蛾人工饲料配方由中山大学生命科学学院工程中心提供, 室内继代扩繁技术参照涂叶荷等<sup>[5]</sup> 的方法, 感染 DCPV 后, 提纯、测定 PI-DCPV (从感染 DCPV 的斜纹夜蛾中肠分离提取出来) 的平均产量。

**1.2.4 PI-DCPV 感染试验。**

**1.2.4.1 PI-DCPV 对斜纹夜蛾的回接感染试验。**用  $2 \times 10^6$  PIB/mL PI-DCPV 对 4 龄斜纹夜蛾进行感染, 每天保持清理虫粪, 第 4 天开始检查、解剖死虫中肠, 至第 20 天全部解剖残存活虫中肠进行检查, 确定是否感染病毒并计算感染率, 安排 3 批次试验。

**1.2.4.2 PI-DCPV 对松毛虫的感染试验。**在林间挑选个体均匀的 4 龄期健康松毛虫 200 头, 放到健康、浓密的松枝上, 用 80 目尼龙网袋套紧, 每笼 20 头, 共 10 笼, 待用。将稀释好的  $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$  PIB/mL 溶液 PI-

基金项目 广东省林业科技创新项目 (2016KJCX040)。

作者简介 吴华青 (1969—), 女, 广东茂名, 工程师, 从事林业研究及技术推广工作。\* 通讯作者, 高级工程师, 从事林业研究及技术推广工作。

收稿日期 2017-04-30

DCPV,分别喷洒2笼(2个重复),要求均匀喷洒到笼内松针,保证松针湿透滴水,另外设置2笼喷洒清水作对照。每天保持清理虫粪,第4天开始检查、解剖死虫中肠,至第20天全部解剖残存活虫中肠进行检查,确定是否感染病毒并计算感染死亡率。

## 2 结果与分析

### 2.1 DCPV感染8种鳞翅目幼虫的结果 DCPV对这8种

表1 DCPV对8种鳞翅目幼虫的感染结果

Table 1 The infection results for DCPV to eight kinds of Lepidoptera larvae

供试虫 Tested insect	供试虫数 The number of tested insect//头	感染虫数 The number of infected insect//头	感染率 Infection rate//%	病毒致死虫数 The number of dead insect killed by virus//头	病毒致死虫数占比 The proportion of dead insect killed by virus//%
菜粉蝶 <i>Pieris rapae</i>	59	0	0		
绿翅绢野螟 <i>Diaphania angustalis</i>	50	0	0		
凤凰木夜蛾 <i>Pericyma crulgeni</i>	50	0	0		
粘虫 <i>Mythimna separata</i> Walker	50	0	0		
银纹夜蛾 <i>Argyrogramma agnata</i>	80	21	26.2	17	21.2
樟蚕 <i>Eriogyna pyretorus</i>	50	0	0		
甜菜夜蛾 <i>Spodoptera exigua</i> Hiibner	60	15	25.0	13	21.6
斜纹夜蛾 <i>Prodenia litur</i>	67	52	77.6	47	70.1

### 2.2 DCPV对斜纹夜蛾的感染情况

2.2.1 DCPV不同浓度对斜纹夜蛾的感染死亡率。用不同浓度的DCPV感染4龄斜纹夜蛾,显示不同程度的致病感染,感染死亡率随浓度的增大而提高(表2)。由表2可知,DCPV对斜纹夜蛾的感染死亡率最低为44.0%,最高为82.0%,说明DCPV对斜纹夜蛾感染致死毒力较强。

表2 DCPV对4龄斜纹夜蛾感染死亡率统计

Table 2 The mortality of fourth-instar larvae of *Prodenia litur* infected by DCPV

浓度 Concentration PIB/mL	供试虫数 The number of tested insect//头	感染死亡虫数 The dead number of infected insect//头	感染死亡率 The dead rate of infected insect//%
$1 \times 10^4$	50	22	44
$1 \times 10^5$	50	28	56
$1 \times 10^6$	50	35	70
$1 \times 10^7$	50	41	82

2.2.2 浓度与感染死亡率的直线回归方程及相关系数。依据表2的数据,将浓度转化为Log值,表述为 $x$ ;将感染死亡率转化为机率值,表述为 $y$ ,直线回归方程为 $y = 3.3468 + 0.3649x$ ,浓度对数与感染死亡率机率值相关系数 $r_{xy} = 0.999$ ,大于 $r_{0.05} = 0.950$ ,表明相关程度达到显著水平,根据直线回归方程求得 $LC_{50} = 3.39 \times 10^5$  PIB/mL。

2.3 斜纹夜蛾人工饲养及PI-DCPV产量测定结果 利用人工饲料对斜纹夜蛾连续饲养了2年,每年饲养9~10代,每代平均历期32~38d。PI-DCPV的产量最低为 $1.57 \times 10^8$  PIB/头,最高为 $3.16 \times 10^8$  PIB/头,平均为 $2.01 \times 10^8$  PIB/头(表3)。按DCPV防治马尾松毛虫用量 $7.5 \times$

鳞翅目昆虫的感染可分为2类:一类是不受感染,如菜粉蝶、绿翅绢野螟、凤凰木夜蛾、粘虫和樟蚕;另一类是受感染,如银纹夜蛾、甜菜夜蛾和斜纹夜蛾。由表1可知,斜纹夜蛾对DCPV最敏感,感染达到77.6%,感染病毒致死的死亡率高达70.1%。斜纹夜蛾感染后虫体变色,解剖病虫观察,中肠发病明显,呈皱褶状,黄白色。

$10^{10}$  PIB/hm<sup>2</sup>计算,约375头斜纹夜蛾幼虫增殖产生的多角体就可防治1hm<sup>2</sup>林地的松毛虫。

表3 PI-DCPV产量测定

Table 3 The detection of yield of PI-DCPV

批次 Batch	供试虫数 The number of tested insect 头	多角体数量 The number of polygonal body $\times 10^8$ PIB	多角体平均含量 The average content of polygonal body $\times 10^8$ PIB/头
1	21	33.00	1.57
2	25	79.12	3.16
3	57	94.62	1.66
合计 Total	103	206.74	2.01

### 2.4 PI-DCPV的感染试验结果

2.4.1 PI-DCPV对斜纹夜蛾的回接感染试验结果。PI-DCPV对4龄斜纹夜蛾的回接感染率最低为14.5%,最高为30.6%,平均为25.1%,其中因感染PI-DCPV而致死的分别有3、8和8头,感染死亡率分别为6.3%、16.3%和8.5%,平均9.9%(表4)。

2.4.2 PI-DCPV对马尾松毛虫的感染测定结果。感染试验结果表明,PI-DCPV对马尾松毛虫的毒力能够维持在较高水平(表5)。依据表5的数据,将浓度转化为Log值,表述为 $x$ ;将感染死亡率转化为机率值,表述为 $y$ ,直线回归方程为 $y = 3.4509 + 0.3001x$ ,浓度对数与感染死亡率机率值相关系数 $r_{xy} = 0.992$ ,大于 $r_{0.05} = 0.950$ ,表明相关程度达到显著水平。根据直线回归方程求得 $LC_{50} = 1.45 \times 10^6$  PIB/mL,略低于刘清浪等<sup>[6]</sup>研究得出的DCPV对松毛虫的毒力( $LC_{50} = 3.86 \times 10^5$  PIB/mL)。

表 4 PI-DCPV 对斜纹夜蛾的回接感染试验结果

Table 4 Results for back infection test on PI-DCPV to *Prodenia litur*

试验批次 Batch	供试虫数 The number of tested insect 头	感染 PI- DCPV 虫数 The number of infecting PI-DCPV//头	感染 PI-DCPV 虫数占比 The proportion of infecting PI-DCPV//%	感染致死虫数 The dead number of infected insect 头	感染致死虫数占比 The proportion of dead infected insect//%
1	48	7	14.5	3	6.3
2	49	15	30.6	8	16.3
3	94	16	17.0	8	8.5
平均 Average			25.1		9.9

表 5 PI-DCPV 对马尾松毛虫的感染试验结果

Table 5 Infection test on PI-DCPV to *Dendrolimus punctatus* Walker

试验浓度 Concen- tration PIB/mL	供试虫数 The number of tested insect 头	感染 PI- DCPV 虫数 The number of infecting PI-DCPV//头	感染 PI-DCPV 虫数占比 The proportion of infecting PI-DCPV//%	感染致死虫数 The dead number of infected insect 头	感染致死 虫数占比 The proportion of dead infected insect//%
$1 \times 10^4$	40	18	45.0	15	37.5
$1 \times 10^5$	40	25	62.5	19	47.5
$1 \times 10^6$	40	25	62.5	23	57.5
$1 \times 10^7$	40	31	77.5	29	72.5
清水 Clear water	40	0	0	0	0

### 3 结论与讨论

从 DCPV 对斜纹夜蛾的感染死亡率、浓度与感染死亡率的相关性、回归方程及致死中浓度来看,斜纹夜蛾对 DCPV 比较敏感;且斜纹夜蛾虫体适中,病毒增殖量大,可作为生产、增殖松毛虫质型多角体病毒的寄主。

PI-DCPV 平均产量为  $2.01 \times 10^8$  PIB/头,与林间宿主马尾松毛虫增殖的多角体病毒回收量接近。PI-DCPV 对 4 龄松毛虫的  $LC_{50}$  为  $1.45 \times 10^6$  PIB/mL,毒力稍低于 DCPV 对松毛虫的毒力,但感染死亡率高。同时发现 PI-DCPV 对斜纹夜蛾的回接感染效果差,说明 DCPV 经过斜纹夜蛾体内增殖后,对斜纹夜蛾的致病性已发生改变,具体致病机理需继

续研究。

### 参考文献

- [1] 曾陈湘,吴若光,何雪香. 马尾松毛虫质型多角体病毒替代寄主筛选的研究[J]. 广东林业科技,1996,12(2):22-27.
- [2] 陈昌洁,王志贤,陶粮,等. 利用棉铃虫为宿主增殖松毛虫质型多角体病毒[J]. 林业科学研究,1990,3(3):263-265.
- [3] 周小毛,戴冠群. 马尾松毛虫质型多角体病毒替代宿主的研究[J]. 华南农业大学学报,1993,14(1):114-121.
- [4] 曾陈湘,吴若光,何雪香. 用棉铃虫生产的马尾松毛虫质型多角体病毒对马尾松毛虫的毒力[J]. 广东林业科技,1996,12(1):27-29.
- [5] 涂业苟,曾吉华. 斜纹夜蛾的人工饲养技术[J]. 江西农业学报,2010,22(1):87-88.
- [6] 刘清浪,吴若光,曾陈湘. 应用马尾松毛虫质型多角体病毒防治松毛虫的研究[J]. 病毒学杂志,1986,1(4):65-72.

(上接第 137 页)

苗,用根尖观察鉴定,进一步确定形成的多倍体铁皮石斛数量。

培育形成的多倍体铁皮石斛具有较好的抗逆性、较高的适应性,将培育好的铁皮石斛圆球茎培育成幼苗,成长成植株,可以通过气孔观察、叶片厚实程度、有效成分含量来进一步验证多倍体铁皮石斛在原有基础上的优势。

### 参考文献

- [1] 张青华,李枝林,唐敏,等. 秋水仙碱诱导铁皮石斛多倍体研究初报[J]. 云南农业大学学报,2011,26(5):678-682.
- [2] 郭孟璧,封良燕,田茂军,等. 人工培养铁皮石斛营养成分分析研究[J]. 云南化工,2006,33(2):15-16.

- [3] 吕圭源,颜美秋,陈素红. 铁皮石斛功效相关药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志,2013,38(4):489-493.
- [4] 鹿伟,陈玉满,徐彩菊,等. 铁皮石斛抗疲劳作用研究[J]. 中国卫生检验杂志,2010,20(10):2488-2490.
- [5] 章晓玲,张玲菊,朱玉球,等. 铁皮石斛无性系繁育培养基专用性的研究[J]. 中国中药杂志,2013,38(4):494-497.
- [6] 唐娅梅,张臣良,苏兵,等. 铁皮石斛多倍体诱导与鉴定研究[J]. 北方园艺,2010(17):147-149.
- [7] 詹忠根,徐程. 秋水仙素诱导铁皮石斛多倍体研究[J]. 浙江大学学报(理学版),2011,38(3):321-325.
- [8] 江金兰,叶炜,李永清,等. 同源四倍体铁皮石斛的生长及多糖积累[J]. 植物生理学报,2014,50(4):519-526.
- [9] 张妍,刘宗欢,杨超,等. 铁皮石斛组培苗快速繁殖的研究[J]. 安徽农业科学,2015,43(28):77-78.
- [10] 李和平. 植物显微技术[M]. 2 版. 北京:科学出版社,2009:57-58.