

美国白蛾核型多角体病毒增殖和保存的影响因素*

胡天义^{1**} 孙丽昕¹ 郭同斌² 王 新² 周晓宇²
赵正萍³ 耿蕙舒¹ 郝德君^{1***}

(1. 南京林业大学南方现代协同创新中心, 南京 210037; 2. 徐州市林业技术推广服务中心, 徐州 221009;
3. 湖南省林业科学院, 长沙 410004)

摘 要 【目的】明确美国白蛾核型多角体病毒 (*Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus, HcNPV) 的最佳增殖方法和最适保存条件, 为 HcNPV 标准化生产提供理论依据和技术支撑。【方法】利用活体增殖法, 探究不同饲毒虫龄-病毒浓度组合、持续饲毒时间、幼虫饲毒温度和密度对 HcNPV 增殖量的影响, 筛选最佳的 HcNPV 活体增殖方法; 并利用生物活性测定法, 研究不同病毒保存处理方式、保存时间、保存温度和保存剂对 HcNPV 活性的影响, 明确最佳的保存条件。采用喂食法处理美国白蛾幼虫, 利用血球计数板统计 HcNPV 增殖数量, 以半数致死时间 (LT_{50}) 为指标评价病毒的杀虫活性。【结果】当饲毒浓度为 1×10^6 OB·mL⁻¹、虫龄为 5 龄时病毒的增殖量为 1.16×10^{10} OB/头, 显著高于其他供试浓度和龄期; 以 3 龄幼虫作为供试虫龄, 饲毒浓度为 1×10^6 OB·mL⁻¹ 时, 研究发现最佳饲毒温度为 20 °C, 病毒增殖量达 5.06×10^9 OB/头; 随着持续饲毒时间的延长, 病毒增殖量显著降低, 从 3.42×10^9 OB/头降低至 0.97×10^9 OB/头; 幼虫饲毒密度为 100 头/箱 (0.05 头/cm²) 时, 病毒增殖量显著高于 200-500 头/箱, 增殖量为 4.94×10^9 OB/头。不同保存方法对 HcNPV 杀虫活性具有不同程度的影响。以病毒虫浆法和虫尸干燥粉碎法保存的病毒感染美国白蛾 3 龄幼虫的 LT_{50} 显著低于病毒液法和病毒干粉法; 当保存时间不超过 12 个月时, 病毒杀虫活性无显著变化; 保存温度范围为 -20-25 °C 时, 病毒的杀虫活性未出现显著变化; 筛选出最佳的保存剂为蔗糖 (50%) 和氯化钠 (5%), LT_{50} 分别为 4.94 d 和 4.97 d。【结论】在幼虫密度为 0.05 头/cm² 的养虫箱中, 使用浓度为 1×10^6 OB·mL⁻¹ 的 HcNPV 饲喂美国白蛾 5 龄幼虫一次, 20 °C 下可获得最高产量的病毒; 感病幼虫虫尸研磨成匀浆, 添加蔗糖 (50%) 或氯化钠 (5%) 作为辅助剂, 置于 -20 °C 的冰箱内保存, 可在 12 个月内保证 HcNPV 的最佳活性。

关键词 美国白蛾; 核型多角体病毒; 病毒增殖; 保存; 杀虫剂

Factors influencing the proliferation and preservation of the *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus

HU Tian-Yi^{1**} SUN Li-Xin¹ GUO Tong-Bin² WANG Xin² ZHOU Xiao-Yu²
ZHAO Zheng-Ping³ GENG Yi-Shu¹ HAO De-Jun^{1***}

(1. South Modern Collaborative Innovation Center of Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 2. Xuzhou Forestry Technology Extension Service Center, Xuzhou 221009, China; 3. Hunan Academy of Forestry, Changsha 410004, China)

Abstract 【Objectives】To determine the optimal reproduction and storage conditions for the *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus (HcNPV) in order to provide a theoretical basis and technological support for the commercial production of this virus. 【Methods】The effects of different larval instars, virus concentration, duration, temperature and population

*资助项目 Supported projects: 上海市绿化和市容管理局科研专项 (G221207); 徐州市科技计划项目 (KC18130)

**第一作者 First author, E-mail: 1450199496@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: dejunhao@163.com

收稿日期 Received: 2022-04-16; 接受日期 Accepted: 2022-09-24

density, were analyzed to identify the optimal condition for HcNPV reproduction *in vivo*. Effects of different formulations, times, temperatures and adjuvants on the stability of HcNPV storage were also investigated to determine the optimal HcNPV bioactivity assay method. In feeding bioassays, the number of proliferating occlusion bodies (OB) were recorded with a hemocytometer, and the lethal time (LT_{50}) was calculated to quantify the insecticidal activity of HcNPV. Third instar larvae fed a diet with a HcNPV concentration of 1×10^6 OB·mL⁻¹ were used for follow-up experiments. **[Results]** OB proliferation in 5th instar larvae reared on an artificial diet containing HcNPV at a concentration of 1×10^6 OB·mL⁻¹ was significantly higher (1.16×10^{10} OB per larva) than in other treatments. The optimal temperature for HcNPV reproduction was 20 °C, which resulted in 5.06×10^9 OB per larva. The abundance of HcNPV virions significantly decreased from 3.42×10^9 OB per larva after feeding for 1 day to 0.97×10^9 OB per larva after feeding for 5 days. Larvae kept at a density of 100 larvae/box (0.05 larvae/cm²) had 4.94×10^9 OB per larva, which was significantly higher than that of those kept at densities of 200, 300, 400, 500 larvae/box. The LT_{50} of 3rd instar larvae infected from insect pulp and freeze-dried insect pulp was significantly lower than that of those infected from virus suspension and freeze-dried virus suspension. There was no significant change in the insecticidal activity of HcNPV when stored for less than 12 months and insecticidal activity did not change significantly over a range of storage temperatures from - 20 to 25 °C. The best preservatives were sucrose (50%) and sodium chloride (5%), which had in LT_{50} values of 4.94 days and 4.97 days, respectively. **[Conclusion]** The highest yield of HcNPV was achieved by giving 5th instar *H. cunea* larvae a single feed of an artificial diet containing HcNPV inoculum at a concentration of 1×10^6 OB·mL⁻¹ and keeping larvae at a density of 0.05 larvae/cm² at a temperature of 20 °C. Grinding the bodies of diseased larvae into a slurry, adding sucrose (50%) or sodium chloride (5%) as adjuvants, and storing the resultant homogenate in a refrigerator at - 20 °C, allowed HcNPV to be stored for up to 12 months with no loss in insecticidal activity.

Key words *Hyphantria cunea*; nucleopolyhedrovirus; virus proliferation; storage; insecticides

核型多角体病毒 (Nucleopolyhedrovirus, NPV), 属杆状病毒科 Baculoviridae, 核型多角体病毒属 *Nucleopolyhedrovirus*, 是一类重要的昆虫病原微生物 (Pringle, 1999)。由于其寄主感染率高、对环境无污染、不杀伤天敌及非靶标生物等优良特性, 在农林害虫的防治中表现出良好的效果和应用前景。目前世界上已有数十种杆状病毒成功商品化 (Haase *et al.*, 2015), 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* nucleopolyhedrovirus, SeMNPV)、斜纹夜蛾核型多角体病毒 (*Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus, SpltNPV) 等 (靳雯怡等, 2021)。

目前, 关于核型多角体病毒的增殖已有相关研究, 如利用人工培养的昆虫细胞增殖核型多角体病毒 (Isobe *et al.*, 2021), 但是这种方法存在成本高、产量较低等缺点 (秦启联等, 2012)。采用昆虫活体增殖方式是获取大量病毒的主要

途径, 具有效率高、成本相对较低等优点 (Subramanian *et al.*, 2006; Knox *et al.*, 2015)。研究发现, 病毒活体增殖过程中, 幼虫虫龄、病毒浓度、增殖温度和宿主幼虫密度及饲毒持续时间等因素均影响病毒增殖质量和数量 (Kalia *et al.*, 2001; Behle, 2018), 并以此为基础制定核型多角体病毒规模化生产技术和商品化核型多角体病毒制剂的企业标准 (司升云等, 2012; 唐美君等, 2012)。此外, 评估病毒大量增殖后的活性稳定性也是病毒制剂商业化开发不可或缺的步骤 (Lacey and Shapiro-Ilan, 2008)。Tamez-Guerra 等 (2002) 研究发现温度和保存剂会显著影响芹菜夜蛾核型多角体病毒 (*Anagrapha falcifera* nucleopolyhedrovirus, AfMNPV) 的长期保存活性。Behle 等 (2003) 将芹菜夜蛾核型多角体病毒 (AfMNPV) 的病毒液干燥处理后保质期显著延长, 在田间试验中也表现出更久的持续活性。

美国白蛾 *Hyphantria cunea* 是一种寄主范围广、繁殖力高、适生性强、危害严重、防治难度大的世界性检疫害虫, 自从 1979 年入侵以来,

对我国的林木资源及相关产业造成严重经济损失 (Yang *et al.*, 2015; 赫传杰等, 2022)。目前, 生产实践中对美国白蛾的防治主要依赖化学农药。然而, 长期使用化学杀虫剂导致的污染环境、产生抗药性和伤害非靶标生物等环境生态安全问题日益突出 (萧玉涛等, 2019)。因此, 利用天敌昆虫和病原微生物等绿色防控手段替代化学农药将成为美国白蛾防治的发展趋势。其中, 美国白蛾核型多角体病毒 (*Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus, HcNPV) 是防治美国白蛾的重要手段之一 (Yang and Zhang, 2007; 王承锐等, 2019), 已经在美国白蛾的防治中展现良好的前景 (刘岱岳等, 1986; 段彦丽等, 2009; 赵海燕等, 2012)。目前, 美国白蛾核型多角体病毒的大量生产是制约其应用的一个重要原因。已有利用人工培养的昆虫细胞增殖 HcNPV 的报道 (Lee *et al.*, 1991; 温发园, 2009), 但目前使用美国白蛾幼虫增殖仍然是获取大量 HcNPV 的主要途径。近年来, 虽然研究了病毒接种浓度和虫龄对 HcNPV 增殖量的影响 (艾德洪等, 1984; 郑桂玲等, 2011), 以及保存温度、时间和保存剂对 HcNPV 活性的影响 (杨唯一, 2009; 殷灿, 2014), 但是 HcNPV 的最佳增殖方法与保存条件缺乏系统性研究。因此, 本研究采用病毒活体增殖方法, 研究不同虫龄、病毒浓度、持续饲毒时间、温度和幼虫密度等对 HcNPV 增殖量的影响, 并利用生物活性测定方法, 探究保存方式、保存时间、温度和病毒保存剂对 HcNPV 活性的影响, 筛选最优的增殖方法和保存条件, 以期 HcNPV 规模化生产提供基础数据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫与病毒

美国白蛾卵块采自徐州市铜山区房村镇 (E 117°46'97", N 34°08'90"), 带回实验室后用 5% 的甲醛溶液消毒 15 min, 再用无菌水漂洗 3 次, 自然晾干后置于 25 °C, 相对湿度 70%, 光周期 14L:10D 的人工气候箱 (宁波东南仪器有限公

司, 型号 NDG-350B) 中, 每隔 8 h 检查卵的发育情况。待幼虫孵化后, 用细软毛笔将初孵幼虫转移到装有美国白蛾人工饲料 (由湖南省林业科学院提供) 的养虫盒中, 继续在气候箱中饲养, 每日饲喂新鲜、无病毒的人工饲料, 根据实验要求选取大小一致的健康幼虫, 备用。美国白蛾核型多角体病毒 HcNPV 由中国林业科学研究院森林环境与生态保护研究所提供。经美国白蛾 3 龄幼虫活体复壮后分离获得的 HcNPV 用于试验。

1.2 HcNPV 增殖影响因素研究

1.2.1 饲毒虫龄-病毒浓度组合对 HcNPV 增殖量的影响 根据预实验结果, 将 HcNPV 用无菌水分别稀释至 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 和 1×10^6 OB·mL⁻¹, 挑选刚刚脱皮、健康的美国白蛾 2、3、4、5 和 6 龄幼虫。共 20 个处理, 每个处理重复 3 次, 每个重复选择 30 头试虫。将 1.5 mL 病毒悬液滴加至面积为 1.0 cm × 2.5 cm × 0.3 cm 的人工饲料表面, 阴干后喂食饥饿处理 6 h 后的美国白蛾幼虫, 置于塑料养虫盒 (15 cm × 10 cm × 8 cm) 中饲养, 每盒 30 头, 接种剂量为 50 μL/头。放置温度 25 °C, 相对湿度 70%, 光周期 14 L:10 D 的人工气候室 (南京恒裕仪器设备制造有限公司, 型号 FYS-18) 内, 待滴加病毒的饲料被完全取食后更换为无毒饲料。每天检查并更换 1 次新鲜人工饲料, 定期清理食物残渣及粪便, 更换干净的养虫盒。同时收集不同处理中的病死虫, 并记录死虫数量, 直至幼虫化蛹为止。

1.2.2 持续饲毒时间对 HcNPV 增殖量的影响 设置持续饲毒时间 1、2、3、4 和 5 d 共 5 个处理, 分别在饲毒 1、2、3、4 和 5 d 后更换新鲜无菌人工饲料。每处理重复 3 次, 每个重复选择 30 头新脱皮的 3 龄试虫。饲毒浓度为 1×10^6 OB·mL⁻¹, 其他条件和方法同 1.2.1。

1.2.3 饲养温度对 HcNPV 增殖量的影响 设置 20、25 和 30 °C 共 3 个温度处理, 每个处理重复 3 次, 每个重复选择 30 头试虫。饲毒浓度为 1×10^6 OB·mL⁻¹, 饲毒虫龄为 3 龄, 饲毒后分别置于 20、25 和 30 °C, 相对湿度 70%, 光周期 14 L:

10 D 的人工气候箱里持续饲养。其他条件和方法同 1.2.1。

1.2.4 幼虫密度对 HcNPV 增殖量的影响 将人工饲料浸入 HcNPV 悬液 10 s, 自然晾干后, 置于周转箱 (55 cm×35 cm×8 cm) 中。设置每箱幼虫数量分别为 100、200、300、400 和 500 头共 5 个处理, 即每箱饲养密度为 0.05、0.10、0.16、0.21 和 0.26 头/cm², 每个处理重复 3 次。饲毒浓度为 1×10^6 OB·mL⁻¹, 饲毒虫龄为 3 龄, 其他条件和方法同 1.2.1。

1.2.5 病毒提取与计数方法 将感病死虫按每处理重复分别放入研磨器充分研磨, 三层纱布过滤, 滤渣用无菌水冲洗、过滤 3 次后弃除杂质。将滤液用高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司, 型号 Centrifuge 5804R) 6 000 r/min 离心 25 min, 去上清, 双蒸水悬浮沉淀, 重复 3 次后悬液 1 000 r/min 离心 5 min, 留上清, 沉淀悬浮, 重复 3 次, 将 3 次上清合并, 10 000 r/min 离心 30 min 后弃上清, 白色沉淀物即为粗提的 HcNPV 多角体。制备 45% 和 60% 的蔗糖溶液, 利用蔗糖密度梯度离心法进行 HcNPV 提纯 (曲良建, 2004)。将获得的多角体加无菌水稀释至 2 mL, 摇匀后加无菌水稀释一定倍数 (Wang *et al.*, 2021)。采用血球计数板计数, 每个处理重复计数 3 次, 按下列公式计算多角体数量: 多角体数量 = 每小格平均多角体数 × 400×10^3 × 稀释倍数 × 母液体积。再计算各处理平均单头幼虫的病毒增殖量。

1.3 HcNPV 保存影响因素的研究

1.3.1 保存方式对 HcNPV 毒力的影响 采用 4 种方法保存 HcNPV (Behle *et al.*, 2003)。1) 病毒虫浆法: 收集感染 HcNPV 死亡的幼虫尸体, 用研钵磨成匀浆后密封避光保存; 2) 虫尸干燥粉碎法: 收集感染 HcNPV 死亡的虫尸并磨成匀浆后, 真空冷冻干燥机 (上海力辰仪器科技有限公司, 型号 LC-10N-50A) 干燥处理, 密封避光保存; 3) 病毒液法: 收集感染 HcNPV 死亡的幼虫虫尸, 研钵磨成匀浆, 加适量无菌水稀释, 双层纱布过滤, 滤液于冷冻离心机中差速离心,

500 r/min 离心 30 min, 取上清液再 7 000 r/min 离心 30 min, 弃去上清, 用无菌水悬浮沉淀, 将上述步骤重复一次, 最终离心得到的沉淀物再经无菌水稀释, 即为病毒液, 密封避光保存; 4) 病毒干粉法: 将上述的浓缩病毒液置于真空冷冻干燥机中, 干燥处理, 密封避光保存。将不同保存状态的 HcNPV 放在 -20 °C 冰箱内, 保存 3 个月。之后将 4 种保存条件处理的病毒用无菌水稀释至浓度为 1×10^6 OB·mL⁻¹, 取 1.5 mL 滴加在人工饲料喂食美国白蛾 3 龄幼虫, 以滴加 1.5 mL 无菌水的人工饲料饲喂的幼虫作为对照。每个处理重复 3 次, 每个重复选择 30 头试虫, 饲毒和养虫方法同 1.2.1。每天检查并更换新鲜人工饲料, 同时记录不同处理病死虫数量, 直到幼虫全部死亡或化蛹为止。计算幼虫死亡率、校正死亡率和半致死时间 (LT₅₀)。

1.3.2 保存时间对 HcNPV 毒力的影响 分别将在 -20 °C 条件下保存 24、12 和 3 个月的 HcNPV 用无菌水稀释至浓度为 1×10^6 OB·mL⁻¹, 取 1.5 mL 滴加在人工饲料喂食美国白蛾 3 龄幼虫, 以滴加 1.5 mL 无菌水的人工饲料饲喂的幼虫作为对照。每个处理重复 3 次, 每个重复选择 30 头试虫。其他条件和方法同 1.3.1。

1.3.3 保存温度对 HcNPV 毒力的影响 分别将在 -20、4 和 25 °C 条件下保存 3 个月的 HcNPV 用无菌水稀释至浓度为 1×10^6 OB·mL⁻¹, 取 1.5 mL 滴加在人工饲料喂食美国白蛾 3 龄幼虫, 以滴加 1.5 mL 无菌水的人工饲料饲喂的幼虫作为对照。每个处理重复 3 次, 每个重复选择 30 头试虫。其他条件和方法同 1.3.1。

1.3.4 保存剂对 HcNPV 毒力的影响 分别将甘油、碳酸钙、蔗糖、5% 氯化钠与 HcNPV 配制成 HcNPV+50% 甘油、HcNPV+20% 碳酸钙、HcNPV+50% 蔗糖、HcNPV+5% 氯化钠的病毒液, 在 -20 °C 条件下保存 3 个月后将病毒液用无菌水稀释至浓度为 1×10^6 OB·mL⁻¹, 取 1.5 mL 滴加在人工饲料喂食美国白蛾 3 龄幼虫, 以滴加 1.5 mL 无菌水的人工饲料饲喂的幼虫作为对照。每个处理重复 3 次, 每个重复选择 30 头试虫。其他条件和方法同 1.3.1。

1.4 数据分析

使用 Microsoft Excel 2019 数据处理统计试虫死亡率,并以 Abbott 公式进行死亡率校正,即 校正死亡率 = (处理死亡率 - 对照死亡率) / (1 - 对照死亡率) × 100%。通过 SPSS 20 软件中单因素方差分析 (One-way ANOVA) 及后续 Tukey 法对 HcNPV 增殖影响因素实验测得数据进行统计显著性检验 ($P < 0.05$),使用 Probit 回归模型计算半数致死时间 (LT_{50}) 及 95% 的置信区间,采用对数秩 (Log-rank) 进行显著性检验 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 HcNPV 增殖影响因素研究

2.1.1 饲毒虫龄-病毒浓度组合对 HcNPV 增殖量的影响 以 2 龄、3 龄和 4 龄幼虫作为饲毒虫龄时,随着饲毒浓度的增加, HcNPV 增殖量出现先上升后下降的趋势,此时,最佳饲毒浓度为 1.0×10^5 OB·mL⁻¹; 以 5 龄和 6 龄幼虫作为饲毒虫龄时,随着饲毒浓度的增加,病毒增殖量均呈

上升趋势,当饲毒浓度为 1×10^6 OB·mL⁻¹,增殖量最高。相同饲毒浓度条件下,病毒增殖量与特定虫龄 (2-5 龄) 呈现正相关,然而,以 6 龄幼虫作为饲毒虫龄,增殖效果仅与 4 龄幼虫相当。总体而言,以 5 龄幼虫作为饲毒龄期,饲毒浓度为 1.0×10^6 OB·mL⁻¹ 时,增殖效果最好,达 1.16×10^{10} OB/头 (图 1)。

2.1.2 持续饲毒时间对 HcNPV 增殖量的影响 从图 2 可以看出,以病毒浓度为 1×10^6 OB·mL⁻¹ 饲喂美国白蛾 3 龄幼虫,持续饲喂时间的长短显著影响幼虫体内 HcNPV 的增殖量 ($P < 0.05$)。随着饲喂时间的延长,幼虫体内病毒增殖量整体呈下降趋势。具体表现为,持续饲毒 1 d 的病毒增殖量最高,为 3.42×10^9 OB/头,持续饲毒 2 d (3.10×10^9 OB/头) 和 3 d (1.24×10^9 OB/头) 病毒增殖量显著降低,4 d (1.12×10^9 OB/头) 和 5 d (0.97×10^9 OB/头) 保持较低水平。

2.1.3 饲养温度对 HcNPV 增殖量的影响 由图 3 可知,以病毒浓度为 1×10^6 OB·mL⁻¹ 饲喂美国白蛾 3 龄幼虫,温度显著影响幼虫体内 HcNPV 的增殖量 ($P < 0.05$),随着饲养温度的升高,

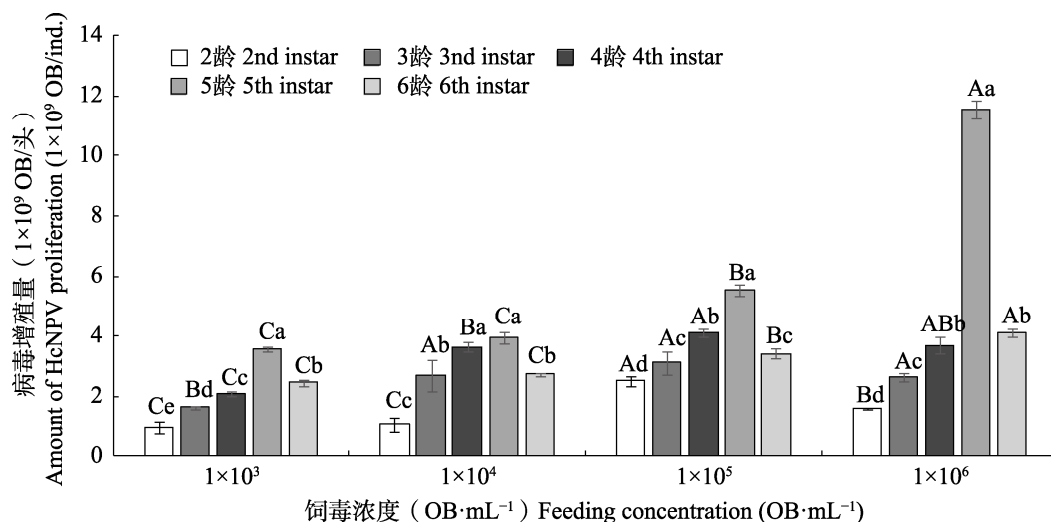


图 1 不同饲毒浓度-虫龄组合对 HcNPV 增殖量的影响

Fig. 1 Effects of different virus feeding concentration-larval instars combinations on the proliferation of HcNPV

柱上标有不同小写字母代表同一饲毒浓度不同饲毒虫龄的病毒增殖量差异显著 ($P < 0.05$, Tukey 法检验);

柱上标有不同大写字母代表同一饲毒龄期不同饲毒浓度的病毒增殖量差异显著 ($P < 0.05$, Tukey 法检验)。

Histograms with different lowercase letters indicate significant differences among the virus proliferation amount of the same virus feeding concentration and different virus feeding larval instars by Tukey test ($P < 0.05$), while with different uppercase letters indicate significant differences among the virus proliferation amount of different virus feeding concentrations of the same virus feeding larval instars by Tukey test ($P < 0.05$).

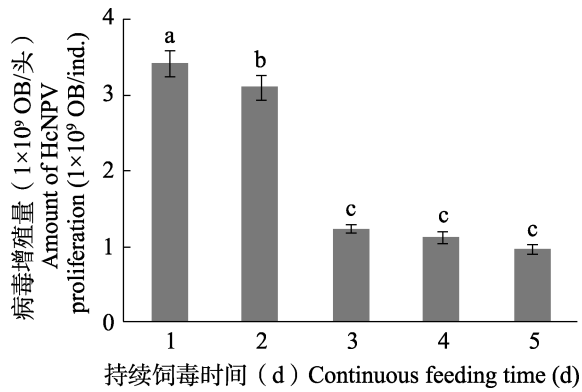


图2 持续饲毒时间对 HcNPV 增殖量的影响

Fig. 2 Effects of continuous feeding time on the proliferation of HcNPV

柱上标有不同字母表示经 Tukey 法检验差异显著 ($P < 0.05$)。下图同。

Histograms with different letters indicate significant differences at the 0.05 level by Tukey's test. The same below.

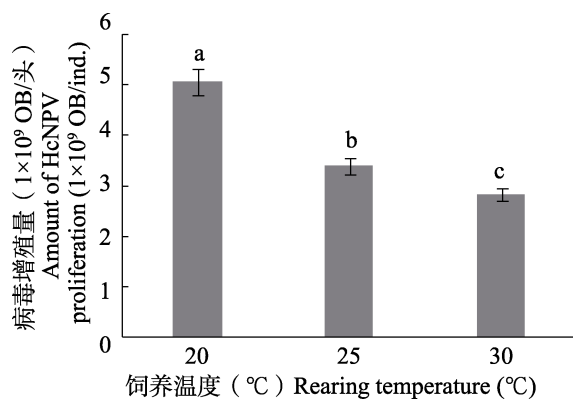


图3 不同饲养温度对 HcNPV 增殖量的影响

Fig. 3 Effects of different rearing temperatures on the proliferation of HcNPV

幼虫体内病毒增殖量呈下降趋势。在 20、25 和 30 °C 条件下的病毒增殖量分别为 5.06×10^9 、 3.40×10^9 和 2.83×10^9 OB/头, 各处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

2.1.4 幼虫饲毒密度对 HcNPV 增殖量影响 随着幼虫饲毒密度的增加, 幼虫体内 HcNPV 增殖量呈下降趋势 (图 4)。幼虫密度为 100 头/箱 (0.05 头/ cm^2) 时病毒增殖量最高, 为 4.94×10^9 OB/头, 其次为 200 头/箱 (0.10 头/ cm^2)、300 头/箱 (0.16 头/ cm^2) 和 400 头/箱 (0.21 头/ cm^2), 病毒增殖量分别为 1.63×10^9 、 1.06×10^9 和 0.86×10^9 OB/头, 4 个处理之间差异显著 ($P <$

0.05)。幼虫密度为 400 头/箱与 500 头/箱 (0.26 头/ cm^2) 之间差异不显著 ($P > 0.05$)。

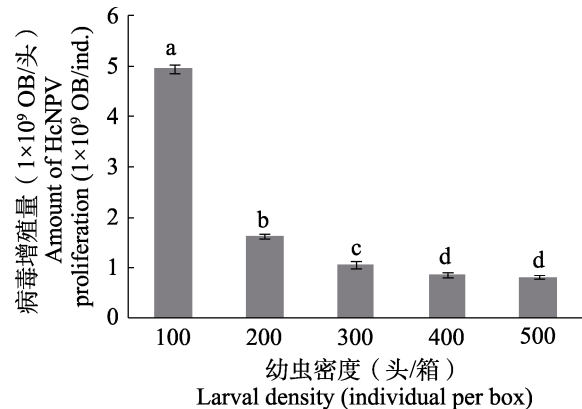


图4 不同幼虫密度对 HcNPV 增殖量的影响

Fig. 4 Effects of different larval densities on the proliferation of HcNPV

2.2 HcNPV 保存影响因素研究

2.2.1 不同保存方式对 HcNPV 活性的影响 不同保存方式对病毒活性具有明显影响 (表 1)。以虫浆法保存的病毒活性最高, 对 3 龄幼虫的 LT_{50} 为 4.87 d, 与冻干虫浆法 (5.30 d) 无显著差异 ($\chi^2 = 0.09$, $df = 1$, $P = 0.762$), 均显著高于病毒液法 (6.41 d) 和冻干病毒液法 (5.89 d) ($P < 0.05$); 病毒液法保存的病毒活性最低, 与冻干病毒液法差异显著 ($\chi^2 = 9.96$, $df = 1$, $P = 0.002$)。

2.2.2 不同保存时间对 HcNPV 活性的影响 由表 2 可知, 不同保存时间对病毒活性具有明显影响, 随着保存时间的增加, 病毒活性逐渐下降。保存时间为 3 个月的病毒活性最高, 对 3 龄幼虫的 LT_{50} 为 5.31 d, 其次是保存时间为 12 个月 (5.35 d), 两者之间无显著差异 ($\chi^2 = 1.00$, $df = 1$, $P = 0.317$); 保存时间为 24 个月的病毒活性显著降低 ($P < 0.05$), LT_{50} 为 6.41 d。

2.2.3 不同保存温度对 HcNPV 活性的影响 不同保存温度对病毒活性的影响无显著差异 ($P > 0.05$) (表 3)。保存温度为 25 °C 条件下的病毒活性最高, 对 3 龄幼虫的 LT_{50} 为 5.15 d, 其次是 -20 °C (5.21 d) 和 4 °C (5.71 d)。

2.2.4 不同保存剂对 HcNPV 活性的影响 从表 4

可以看出,不同保存剂对病毒活性具有明显影响。以蔗糖处理保存的病毒活性最高,对3龄幼虫的 LT_{50} 为4.97 d,与氯化钠处理(4.97 d)无显著差异($\chi^2 = 0.25$, $df = 1$, $P = 0.619$),均显著高于甘油(7.79 d)和碳酸钙处理(7.80 d)($P < 0.05$)。

表 1 不同保存方式的 HcNPV 感染美国白蛾幼虫的 LT_{50}
Table 1 LT_{50} of *Hyphantria cunea* larvae infected by HcNPV of different storage treatments

处理方法 Treatments	致死中时间 (d) LT ₅₀ (d)	95%置信限 (d) 95% confidence limit (d)		回归方程 Regression equation	决定系数 R ²
		下限 Lower limit	上限 Upper limit		
虫浆 Insect pulp	4.87 a	3.65	5.63	y=0.468x - 2.278	0.986
冻干虫浆 Freeze-dried insect pulp	5.30 a	4.96	5.56	y=0.831x - 4.405	0.988
病毒液 Virus suspension	6.41 c	6.11	6.67	y=0.574x - 3.678	0.988
冻干病毒液 Freeze-dried virus suspension	5.89 b	5.15	6.35	y=0.731x - 4.303	0.954

表中致死中时间列数据后标有不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$, 对数秩法检验)。下表同。

Data of LT_{50} in the table by difference letters indicate significant differences at the 0.05 level by Log-rank test. The same below.

表 2 不同保存时间的 HcNPV 感染美国白蛾幼虫的 LT_{50}
Table 2 LT_{50} of *Hyphantria cunea* larvae infected by HcNPV of different storage time

保存时间（月） Storage time (month)	致死中时间（d） LT ₅₀ (d)	95%置信限（d） 95% confidence limit (d)		回归方程 Regression equation	决定系数 R ²
		下限 Lower limit	上限 Upper limit		
24	6.41 b	6.09	6.68	y=0.575x - 3.686	0.989
12	5.35 a	4.50	5.92	y=0.686x - 3.669	0.963
3	5.31 a	4.94	5.58	y=0.830x - 4.410	0.987

表 3 不同保存温度的 HcNPV 感染美国白蛾幼虫的 LT_{50}
Table 3 LT_{50} of *Hyphantria cunea* larvae infected by HcNPV of different storage temperatures

温度 Temperature (°C)	致死中时间 (d) LT ₅₀ (d)	95%置信限 (d) 95% confidence limit (d)		回归方程 Regression equation	决定系数 R ²
		下限 Lower limit	上限 Upper limit		
- 20	5.21 a	4.35	5.77	y=0.535x - 2.784	0.997
4	5.71 a	4.71	6.32	y=0.519x - 2.959	0.983
25	5.15 a	4.65	5.52	y=0.630x - 3.240	0.994

表 4 不同保存剂保存的 HcNPV 感染美国白蛾幼虫的 LT_{50}
Table 4 LT_{50} of *Hyphantria cunea* larvae infected by HcNPV of different storage preservatives

保存剂 Adjuvant	致死中时间（d） LT ₅₀ （d）	95%置信限（d）95% confidence limit (d)		回归方程 Regression equation	决定系数 R ²
		下限 Lower limit	上限 Upper limit		
蔗糖 C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	4.94 a	3.50	5.79	y=0.462x - 2.283	0.983
碳酸钙 CaCO ₃	7.80 b	7.46	8.09	y=0.453x - 3.531	0.988
甘油 C ₃ H ₈ O ₃	7.79 b	7.13	8.28	y=0.315x - 2.096	0.972
氯化钠 NaCl	4.97 a	3.46	5.81	y=0.526x - 2.613	0.969

3 结论与讨论

随着美国白蛾幼虫人工饲料的成功研发, 为 HcNPV 病毒大量增殖提供了丰富宿主, 也为 HcNPV 的工业化生产提供了前提 (曹利军等, 2014; 赵正萍等, 2020)。在病毒活体增殖生产方法中, 增殖方法的优化有利于提高生产效率和降低成本 (Elvira *et al.*, 2010)。本研究筛选出最佳饲毒虫龄为 5 龄幼虫, 病毒接种浓度为 $1 \times 10^6 \text{ OB} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。综合前人 (Kalia *et al.*, 2001; 梁洪柱, 2013) 研究结果, 发现以中高龄幼虫作为接种虫龄, 病毒增殖效果最佳。幼虫体重是其体内营养含量、生长效果的直接反映, 病毒复制依赖于宿主体内的营养物质 (Chen *et al.*, 2020)。此外, 本研究也发现, 美国白蛾 6 龄幼虫体内的病毒增殖总量低于 5 龄。类似研究表明, 接种 10 日龄的小地老虎 *Agrotis ipsilon* 体内核型多角体病毒增殖量低于 8-9 日龄 (Behle, 2018)。其原因除了可能是高龄幼虫抗病性较强, 感染病毒后死亡率较低, 也可能是其在面对不良环境胁迫时, 为维持自身存活和种群发展而提前化蛹 (曾智等, 2022), 导致病毒增殖量减少。尽管中高龄幼虫有助于病毒增殖, 但在工业化商品生产过程中还应综合考虑幼虫饲养成本和病毒生产周期, 选取适宜的饲毒虫龄进行 HcNPV 大规模增殖。本研究发现低龄幼虫随着饲毒浓度的增加, 病毒增殖量呈现先增后降的变化 (图 1), 可能是低龄幼虫抗病性弱, 随着感染病毒浓度的增加, 存活时间变短, 进而影响病毒增殖量。

持续饲毒时间、温度、幼虫密度是影响 HcNPV 增殖的关键因子 (郑桂玲等, 2011)。本研究结果表明, 随着持续饲毒时间的增加病毒增殖量显著降低。唐美君等 (2012) 使用 IrfaNVP 饲喂茶刺蛾幼虫, 持续饲毒 3 d 的病毒增殖量最高, 与本研究结果有所不同, 可能是由于不同昆虫对核型多角体病毒的抗性差异所致 (秦启联等, 2012), 导致幼虫感染病毒后死亡时间不同, 影响体内病毒增殖量。温度不仅影响昆虫生长发育、存活、繁殖等生命活动, 同时也会影响病毒在宿主细胞内增殖 (Monobrullah and Nagata,

2000; 贾志怡等, 2020)。大量研究表明, 高温条件导致病毒的增殖量降低 (Shapiro and Bell, 1981; Subramanian *et al.*, 2006; Kreitman *et al.*, 2021), 主要原因有两点: 一是不利于病毒复制; 二是加快幼虫的发育进程。本研究结果表明, 在一定范围内随着温度升高病毒增殖量出现显著下降。同时观察发现高温条件下部分供试幼虫出现提前化蛹的现象, 直接影响病毒增殖量。本研究结果表明, 随着幼虫密度增加病毒的增殖量显著降低。饲养过程中发现, 美国白蛾幼虫会沿着饲养箱壁爬行, 在一定程度上提高了单头幼虫的生存空间。已有研究发现, 感染核型多角体病毒死亡后的幼虫, 其虫尸对健康的幼虫具有诱食作用 (Caballero *et al.*, 1992)。孔海龙等 (2012) 研究幼虫密度对斜纹夜蛾抗病能力的结果显示, 随着幼虫密度的增加, 接种核型多角体病毒后幼虫的存活率降低, 存活时间缩短。因此, 使用活体增殖方式在密闭的环境中增殖核型多角体病毒时, 应尽量避免接种病毒后的幼虫取食感染死亡的虫尸, 导致体内病毒量增高提前死亡。本研究仅就饲毒虫龄、浓度、持续时间、温度和幼虫密度 5 个单独因子对 HcNPV 增殖量的影响。而有研究表明, 不同因子间的互作对病毒的增殖量有显著影响 (于洪春等, 2015), 不同因子间互作对 HcNPV 增殖量的影响有待进一步研究。

探索 HcNPV 最佳保存条件, 能够为其运输、保存和使用提供基础数据。本研究发现蔗糖和氯化钠对 HcNPV 活性表现出较好的保护效果。相关研究表明, 蔗糖分子内的羟基能代替水分子与蛋白质表面部分结合, 对病毒的核衣壳结构蛋白形成保护 (贾丽丽等, 2000), 从而使病毒具有更好的稳定性。如在 AnfaMNPV 中添加含糖的保存剂显著提高了其杀虫活性 (Tamez-Guerra *et al.*, 2002)。杨唯一 (2009) 认为钠盐对 HcNPV 具有增效作用, 与本研究结果相符。针对这两种保存剂具体添加量及比例对 HcNPV 保护效果的影响有待进一步探究。在几种 HcNPV 保存方式中, 虫浆保存法优于病毒液保存法。由于幼虫体内含有大量的碳水化合物、脂质及蛋白质 (丁金凤等, 2017), 因此推测虫浆中可能存在大量的

含糖化合物充当保存剂,从而提高保存效果。此外,以病毒液法保存 HcNPV 时采用冷冻干燥处理可显著提高其保存效果。Tamez-Guerra 等 (2002) 及 Cunningham (1970) 研究表明冷冻干燥处理可以相对保持昆虫核型多角体病毒液的活性稳定,这与本研究结果一致。

值得注意的是,本研究还发现在 HcNPV 的短期 (3 个月) 保存中,不同保存温度条件下 HcNPV 的活性无显著差异。与本研究结果类似的是,4 °C 与 -20 °C 保存 6 个月的 AfMNPV 活性无显著差异 (Behle *et al.*, 2003)。表明对于短期内频繁使用 HcNPV 病毒液,可适当提高保存温度,避免反复冻融,导致病毒粒子失活、毒力下降 (陈柯君等, 2018)。已有研究显示,随着病毒保存时间的增长,病毒液的活性会出现不同程度的下降 (Lewis and Rollinson, 1978),且低温保存能够有效延缓病毒液的失活 (殷灿, 2014)。本研究仅设置了 -20 °C 低温条件,探究 HcNPV 杀虫活性在长期保存过程中的稳定性。结果发现保存时间超过 12 个月后, HcNPV 的杀虫活性出现显著下降。彭辉银等 (1993) 研究表明油桐尺蠖核型多角体病毒 (*Buzura suppressaria* nucleopolyhedrovirus, BsNPV) 保存 2-7 年后,病毒活性丧失 7%-22%; Kaupp 和 Ebling (1993) 研究显示白斑毒蛾核型多角体病毒 (*Hemerocampa leucostigma* nucleopolyhedrovirus, HINPV) 保存两年后,杀虫活性显著降低。综合上述研究结果,说明不同昆虫种类的核型多角体病毒活力稳定性存在差异。因此,针对不同核型多角体病毒,明确其有效保存时间可避免保存时间过长引起的病毒活性下降。

本文通过比较不同因素对 HcNPV 增殖量和保存活性的差异,筛选出了最优的增殖方法和保存条件:在幼虫密度为 0.05 头/cm² 的养虫箱中,使用浓度为 1×10^6 OB·mL⁻¹ 的 HcNPV 饲喂美国白蛾 5 龄幼虫一次,20 °C 下可获得最高产量的病毒;感病幼虫虫尸研磨成匀浆,添加蔗糖 (50%) 或氯化钠 (5%) 作为辅助剂,置于 -20 °C 的冰箱内保存,可在 12 个月内保证 HcNPV 的最佳活性。该方法对于工业化大量生产该病毒,绿

色、高效防控美国白蛾具有重要意义。

参考文献 (References)

- Ai DH, Yu QW, Li YP, Yie WQ, 1984. Study on the application of *Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera: Arctiidae) nucleopolyhedrovirus. *Journal of Plant Protection*, 11(2): 127-132. [艾德洪, 于启文, 李玉璠, 叶维青, 1984. 美国白蛾核型多角体病毒的应用研究. 植物保护学报, 11(2): 127-132.]
- Behle RW, 2018. In vivo production of *Agrotis ipsilon* nucleopolyhedrovirus for quantity and quality. *Journal of Economic Entomology*, 111(1): 101-107.
- Behle RW, Tamez-Guerra P, McGuire MR, 2003. Field activity and storage stability of *Anagrapha falcifera* nucleopolyhedrovirus (AfMNPV) in spray-dried lignin-based formulations. *Journal of Economic Entomology*, 96(4): 1066-1075.
- Caballero P, Zuidema D, Santiago-Alvarez C, Vlak JM, 1992. Biochemical and biological characterization of four isolates of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *Biocontrol Science and Technology*, 2(2): 145-157.
- Cao LJ, Yang Fan, Tang SY, Chen M, 2014. Development of an artificial diet for three lepidopteran insects. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 51(5): 1376-1386. [曹利军, 杨帆, 唐思莹, 陈敏, 2014. 适合三种鳞翅目昆虫的一种人工饲料配方. 应用昆虫学报, 51(5): 1376-1386.]
- Chen KJ, Li J, Deng LJ, Chen ZM, Zhao Y, Jiang L, Zhang JH, Li WD, Li RB, Li J, 2018. Effects of repeated freezing and thawing times and different storage temperatures on virus titers. *Progress in Veterinary Medicine*, 39(2): 61-65. [陈柯君, 李佳, 邓乐君, 陈灶妹, 赵月, 江丽, 张俊辉, 李伟达, 李茹冰, 李健, 2018. 反复冻融次数和不同保存温度对病毒滴度的影响. 动物医学进展, 39(2): 61-65.]
- Chen YJ, Guo L, Wan NF, Ji XY, Zhang H, Jiang JX, 2020. Transcriptomic analysis of the interactions between the *Spodoptera exigua* midgut and nucleopolyhedrovirus. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 163(1): 241-253.
- Cunningham JC, 1970. The effect of storage on the nuclear polyhedrosis virus of the eastern hemlock looper, *Lambdina fiscellaria fiscellaria* (Lepidoptera: Geometridae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 16(3): 352-356.
- Ding JF, Xu CM, Zhang ZQ, Zhao YH, Liu F, Mu W, 2017. Effects of cyantraniliprole on development, fecundity and nutritional utilization of *Athetis dissimilis*. *Scientia Agricultura Sinica*, 50(22): 4307-4315. [丁金凤, 徐春梅, 张正群, 赵云贺, 刘峰, 慕卫, 2017. 溴氰虫酰胺对双委夜蛾生长发育、繁殖和营养利用的影响. 中国农业科学, 50(22): 4307-4315.]
- Duan YL, Qu LJ, Wang YZ, Zhang YA, Tao WQ, Guan L, Yang ZQ, 2009. Sustainable effects for *Hyphantria cunea* nuclear polyhedrosis virus on the host insects and the diffusion approach of the virus. *Scientia Silvae Sinicae*, 45(6): 83-86. [段彦丽, 曲良建, 王玉珠, 张永安, 陶万强, 关玲, 杨忠岐, 2009. 美国白

- 蛾核型多角体病毒传播途径及对寄主的持续作用. 林业科学, 45(6): 83–86.]
- Elvira S, Gorriá N, Muñoz D, Caballero P, 2010. A simplified low-cost diet for rearing *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) and its effect on *S.exigua* nucleopolyhedrovirus production. *Journal of Economic Entomology*, 103(1): 17–24.
- Haase S, Sciocco-Cap A, Romanowski V, 2015. Baculovirus insecticides in Latin America: Historical overview, current status and future perspectives. *Viruses*, 7(5): 2230–2267.
- He CJ, Li JZ, Wang Y, Liu F, 2022. Occurrence and trend forecast of *Hyphantria cunea* (Drury) in 2022. *Forest Pest and Disease*, 41(1): 46–48. [赫传杰, 李加正, 王越, 刘枫, 2022. 美国白蛾发生情况及 2022 年趋势预测. 中国森林病虫, 41(1): 46–48.]
- Isobe S, Ota A, Takata S, Hamajima H, Makino S, Kobayashi J, Kobayashi M, Ikeda M, 2021. NISES-AnPe-428 cell line derived from the Chinese oak silkworm *Antheraea pernyi* is permissive for multiple nucleopolyhedrovirus species from insects of four different families. *Cytotechnology*, 73(4): 643–655.
- Jia LL, Zhang W, Yue GZ, He JZ, Chen XY, Yu YX, 2000. Screening of protective agent of freeze-dried live attenuated JE vaccine. *Chinese Journal of Biologicals*, 13(3): 176–177. [贾丽丽, 张微, 岳广智, 何建中, 陈晓艺, 俞永新, 2000. 冻干乙脑减毒活疫苗保护剂的筛选. 中国生物制品学杂志, 13(3): 176–177.]
- Jia ZY, Chen C, Ma YX, Li SY, Fan BQ, Wang Y, Hao DJ, 2020. Effects of temperature on growth and development of *Pagiophloeus tsushimanus* Morimoto. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)*, 44(4): 131–136. [贾志怡, 陈聪, 马宇萱, 李寿银, 樊斌琦, 王焱, 郝德君, 2020. 温度对香樟齿喙象生长发育的影响. 南京林业大学学报(自然科学版), 44(4): 131–136.]
- Jin WY, Dong Y, Meng X, Fang FF, Qin QL, Zhang JH, Shu YH, Zhang H, 2021. Virulence and genetic variation of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus under selection pressure of *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Environmental Entomology*, 43(5): 1129–1135. [靳雯怡, 佟岩, 孟茜, 方分分, 秦启联, 张继红, 舒锐豪, 张寰, 2021. 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. 环境昆虫学报, 43(5): 1129–1135.]
- Kalia V, Chaudhari S, Gujar GT, 2001. Optimization of production of nucleopolyhedrovirus of *Helicoverpa armigera* throughout larval stages. *Phytoparasitica*, 29(1): 23–28.
- Kaupp WJ, Ebling PM, 1993. Effect of mechanical processing and long-term storage on biological activity of *Virtuss*. *The Canadian Entomologist*, 125(5): 975–977.
- Knox C, Moore SD, Luke GA, Hill MP, 2015. Baculovirus-based strategies for the management of insect pests: A focus on development and application in south Africa. *Biocontrol Science and Technology*, 25(1): 1–20.
- Kreitman D, Keena MA, Nielsen AL, Hamilton G, 2021. Effects of temperature on development and survival of nymphal *Lycorma delicatula* (Hemiptera: Fulgoridae). *Environmental Entomology*, 50(1): 183–191.
- Kong HL, Lv M, Zhu SD, 2012. Effects of larval density on disease resistance in the common cutworm *Spodoptera litura*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(6): 1572–1576. [孔海龙, 吕敏, 祝树德, 2012. 幼虫密度对斜纹夜蛾抗病能力的影响. 应用昆虫学报, 49(6): 1572–1576.]
- Lacey LA, Shapiro-Ilan DI, 2008. Microbial control of insect pests in temperate orchard systems: Potential for incorporation into IPM. *Annual Review of Entomology*, 53: 121–144.
- Lee HH, Lee MK, Cho IH, Yoo KH, 1991. Location and cloning of the polyhedrin gene of *Hyphantria cunea* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Bacteriology and Virology*, 21(1): 25–34.
- Lewis FB, Rollinson WD, 1978. Effect of storage on the virulence of gypsy moth nucleopolyhedrosis inclusion bodies. *Journal of Economic Entomology*, 71(5): 719–722.
- Liang HZ, Chen Q, Tian HP, Liang XM, 2013. Study on the mass propagation of *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus (LdNPV) and its application. *Forest Research*, 26(5): 593–597. [梁洪柱, 陈倩, 田会鹏, 梁晓梅, 2013. 舞毒蛾核型多角体病毒室内增殖的研究. 林业科学研究, 26(5): 593–597.]
- Liu DY, Ju SS, Zhang HD, Xu WX, Wang SJ, Peng WZ, 1986. Rearing of *Hyphantria cunea* and its control with NPV aerial applications. *Chinese Journal of Biological Control*, 2(2): 74. [刘岱岳, 居蜀生, 张恒德, 许文贤, 王胜金, 彭文忠, 1986. 美国白蛾病毒的繁殖与飞机喷施. 生物防治通报, 2(2): 74.]
- Monobullah M, Nagata M, 2000. Effects of larval age on susceptibility of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Spodoptera litura* multiple nuclear polyhedrosis virus. *The Canadian Entomologist*, 132(3): 337–340.
- Peng HY, Chen XW, Jin F, Xie TE, 1993. The effect of storage time on the toxicity of the *Buzura suppressaria* nucleopolyhedrovirus. *Chinese Journal of Biological Control*, 9(3): 119–121. [彭辉银, 陈新文, 金锋, 谢天恩, 1993. 保存时间对油桐尺蠖核型多角体病毒杀虫剂毒力的影响. 生物防治通报, 9(3): 119–121.]
- Pringle CR, 1999. The universal system of virus taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the international committee on taxonomy of viruses during. *Archives of Virology*, 144(2): 421–429.
- Qin QL, Cheng QQ, Zhang JH, Wang HT, Miao L, Li X, Zhang H, 2012. Industrialization, commercialization and the perspective of the viral insecticides. *Chinese Journal of Biological Control*, 28(2): 157–164. [秦启联, 程清泉, 张继红, 王红托, 苗麟, 李瑄, 张寰, 2012. 昆虫病毒生物杀虫剂产业化及其展望. 中国生物防治学报, 28(2): 157–164.]
- Qu LJ, 2004. Study on vertical transmission and PCR detection of insect NPV. Master dissertation. Urumqi: Xinjiang Agricultural University. [曲良建, 2004. 昆虫 NPV 垂直传递和 PCR 检测的研究. 硕士学位论文. 乌鲁木齐: 新疆农业大学.]

- Shapiro M, Bell RA, 1981. Biological activity of *Lymantria dispar* nucleopolyhedrosis virus from living and virus-killed larvae. *Annals of the Entomological Society of America*, 74(1): 27–28.
- Si SY, Zhou LL, Wang SL, Jiang XF, Xu ZF, Mu W, Wang DS, Wang XP, Chen JT, Yang YH, Ji XC, 2012. Progress in research on prevention and control of beet armyworm, *Spodoptera exigua* in China. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(6): 1432–1438. [司升云, 周利琳, 王少丽, 江幸福, 许再福, 慕卫, 王冬生, 王小平, 陈浩涛, 杨亦桦, 吉训聪, 2012. 甜菜夜蛾防控技术研究及示范—公益性行业(农业)科研专项“甜菜夜蛾防控技术研究及示范”研究进展. 应用昆虫学报, 49(6): 1432–1438.]
- Subramanian S, Santharam G, Sathiah N, Kennedy JS, Rabindra RJ, 2006. Influence of incubation temperature on productivity and quality of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus. *Biological Control*, 37(3): 367–374.
- Tamez-Guerra P, McGuire MR, Behle RW, Shasha BS, Pingel RL, 2002. Storage stability of *Anagrapha falcifera* nucleopolyhedrovirus in spray-dried formulations. *Journal of Invertebrate Pathology*, 79(1): 7–16.
- Tang MJ, Yin KS, Guo HW, Xiao Q, 2012. The optimal conditions of mass production of *Iragoides fasciata* nucleopolyhedrovirus. *Journal of Plant Protection*, 39(5): 2. [唐美君, 殷坤山, 郭华伟, 肖强, 2012. 茶刺蛾核型多角体病毒大量增殖的最优条件. 植物保护学报, 39(5): 2.]
- Wang CR, Li N, Li EJ, Duan LQ, Zhang YA, Wang QH, 2019. Development of the TaqMan fluorescent quantitative PCR for detection of *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus. *Journal of Environmental Entomology*, 41(4): 922–928. [王承锐, 李娜, 李恩杰, 段立清, 张永安, 王青华, 2019. TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测美国白蛾核型多角体病毒方法的建立. 环境昆虫学报, 41(4): 922–928.]
- Wang JY, Zhang H, Siemann E, Fan NN, Ji XY, Chen YJ, Jiang JX, Wan NF, 2021. Plants impact cellular immunity of caterpillars to an entomovirus. *Pest Management Science*, 77(5): 2415–2424.
- Wen FY, 2009. Studies on establishment of cell lines from *Clostera anachoreta* and several important forest insects and replication of *C. anachoreta* granulovirus in vitro. Doctoral dissertation. Beijing: Chinese Academy of Forestry Sciences. [温发园, 2009. 杨扇舟蛾等几种重要林业昆虫细胞系的建立及颗粒体病毒体外增殖研究. 博士学位论文. 北京: 中国林业科学研究院.]
- Xiao YT, Wu C, Wu KM, 2019. Agricultural pest control in China over the past 70 years: Achievements and future prospects. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 56(6): 1115–1124. [萧玉涛, 吴超, 吴孔明, 中国农业害虫防治科技 70 年的成就与展望. 应用昆虫学报, 56(6): 1115–1124.]
- Yang WY, 2009. Study on auxiliary agent of *Hyphantria cunea* nuclear polyhedrosis virus. Master dissertation. Xianyang: Northwest A and F University. [杨唯一, 2009. 美国白蛾核型多角体病毒辅助剂研究. 硕士学位论文. 咸阳: 西北农林科技大学.]
- Yang ZQ, Cao LM, Wang CZ, Wang XY, Song LW, 2015. *Trichospilus albiflagellatus* (Hymenoptera: Eulophidae), a new species parasitizing pupa of *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae) in China. *Annals of the Entomological Society of America*, 108(4): 641–647.
- Yang ZQ, Zhang YA, 2007. Researches on techniques for biocontrol of the fall webworm, *Hyphantria cunea*, a severe invasive insect pest to China. *Chinese Bulletin of Entomology*, 44(4): 465–471.
- Yin C, 2014. Study on the stability of *Hyphantria cunea* nuclear polyhedrosis virus (HcNPV). Master dissertation. Tai'an: Shandong Agricultural University. [殷灿, 2014. 美国白蛾核型多角体病毒的稳定性研究. 硕士学位论文. 泰安: 山东农业大学.]
- Yu HC, Fang DD, Deng JJ, Zhao KJ, 2015. Influencing factor and optimal conditions for in vivo production of MabNPV. *Chinese Journal of Biological Control*, 31(1): 78–84. [于洪春, 房丹丹, 邓佳佳, 赵奎军, 2015. 甘蓝夜蛾核多角体病毒活体增殖因子及最佳增殖条件的研究. 中国生物防治学报, 31(1): 78–84.]
- Zeng Z, He HL, Qiu L, Li YZ, Ding WB, 2022. Starvation tolerance and effects of starvation on growth, development and reproduction of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Environmental Entomology*, 44(1): 11–17. [曾智, 贺华良, 邱林, 李有志, 丁文兵, 2022. 草地贪夜蛾幼虫耐饥力及饥饿对其生长发育和繁殖的影响. 环境昆虫学报, 44(1): 11–17.]
- Zhao HY, Wang YS, Xiu YY, Chen SL, Li CY, 2012. Field efficacy test of *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus against larvae of *Hyphantria cunea*. *Forest Pest and Disease*, 31(1): 38–39. [赵海燕, 王艳士, 修玉义, 陈树林, 李长友, 2012. 美国白蛾核型多角体病毒林间药效试验. 中国森林病虫, 31(1): 38–39.]
- Zhao ZP, Yan XW, Wang X, Guo TB, Zhou XY, Yuan DJ, 2020. Research on the influencing factors of rearing *Hyphantria cunea* (Drury). *Hunan Forestry Science and Technology*, 47(3): 65–68. [赵正萍, 颜学武, 王新, 郭同斌, 周晓宇, 袁冬菊, 2020. 人工饲养美国白蛾影响因素研究. 湖南林业科技, 47(3): 65–68.]
- Zheng GL, Zhou HX, Geng YL, Du FL, Wang WM, 2011. Mass production of *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus isolated in Qingdao. *Forest Pest and Disease*, 30(5): 36–38. [郑桂玲, 周洪旭, 耿以龙, 杜方岭, 王未名, 李长友, 2011. 美国白蛾核型多角体病毒室内大量增殖的研究. 中国森林病虫, 30(5): 36–38.]