

小麥凝集素及刀豆凝集素對甜菜夜蛾核多角體病毒之殺蟲增益效果之研究

靳子蓉¹ 吳誌銘¹ 李郁萱¹ 高穗生¹ 吳宗遠^{2*}

1.臺中縣 行政院農委會農業藥物毒物試驗所生物藥劑組

2.桃園縣 中原大學生物科技系

(接受日期：2007年3月31日)

摘要

靳子蓉、吳誌銘、李郁萱、高穗生、吳宗遠* 2007 小麥凝集素及刀豆凝集素對甜菜夜蛾核多角體病毒之殺蟲增益效果之研究 植保會刊 49 : 1 – 12

本研究探討小麥凝集素(wheat germ agglutinin; WGA) 和刀豆凝集素(Concanavalin A; Con A) 分別添加至甜菜夜蛾核多角體病毒 (*Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus; SeMNPV) 後，對甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua* Hubner) 幼蟲致病力之影響。結果顯示，以 1×10^8 PIBs/ml 的甜菜夜蛾核多角體病毒含 0.2、0.5、1.0% WGA 混合的病毒液，感染二齡甜菜夜蛾幼蟲四天後，死亡率分別較甜菜夜蛾核多角體病毒處理組增加了約 42、47、57%。另以 1×10^8 PIBs/ml 的甜菜夜蛾核多角體病毒含 0.2、0.5、1.0% Con A 混合之病毒液，感染二齡甜菜夜蛾三天後，死亡率即可顯著的比甜菜夜蛾核多角體病毒處理組分別增加約 30、35、57%。相同的處理組感染三齡甜菜夜蛾六天後，於 0.5 及 1% WGA 或 0.2、0.5 和 1% Con A 添加至甜菜夜蛾核多角體病毒的處理組，比甜菜夜蛾核多角體病毒處理組增加約 20% 的死亡率。此外，不同濃度 WGA 和 Con A 與甜菜夜蛾核多角體病毒混合，並未增強甜菜夜蛾核多角體病毒本身對四齡甜菜夜蛾的殺蟲效果。結果也顯示當 1% WGA 或 Con A 加入甜菜夜蛾核多角體病毒後，感染二齡甜菜夜蛾幼蟲，其半致死時間 (Half-lethal time; LT_{50}) 分別由 4.05 天縮短為 3.13 或 2.34 天，其半致死濃度 (Half-lethal concentration; LD_{50})，分別由 1.46×10^5 降低為 6.35×10^4 和 2.11×10^4 PIBs/ml。而以相同方式處理三齡甜菜夜蛾幼蟲時，其 LT_{50} 則是分別由 4.47 天縮短為 3.96 或 3.94 天，其 LD_{50} 分別由 5.48×10^5 降低為 2.35×10^5 和 2.23×10^5 PIBs/ml。因此，本研究證實 1% WGA 或 Con A 可有效的增強甜菜夜蛾核多角體病毒對甜菜夜蛾幼蟲的致死率、縮短 LT_{50} 及降低 LD_{50} ，達到增強甜菜夜蛾核多角體病毒殺蟲效率之目的。

(關鍵詞：生物農藥、甜菜夜蛾核多角體病毒、病毒協力劑、植物凝集素)

* 通訊作者。E-mail: tywu@cycu.edu.tw

緒 言

用於生物農藥的微生物主要為細菌 (bacteria)、真菌 (fungi) 及核多角體病毒 (baculovirus) 三類⁽¹⁸⁾，其中又以核多角體病毒導致害蟲產生抗藥性的機率最少見⁽¹⁷⁾，因此核多角體病毒在害蟲防治 (pest control) 的重要性，已漸受重視。但核多角體病毒於田間運用並不普及，主要是因核多角體病毒的寄主範圍太窄，無法以單一核多角體病毒有效防治多種害蟲，且病毒進入蟲體後，必須經過數天才會使蟲體發病死亡，導致害蟲於感染過程中仍會繼續取食作物，造成農作物的損失⁽²⁾。此外，由於在田間風險評估上的法規限制，目前尚無法將在實驗室具良好殺蟲效果的基因改造核多角體病毒 (genetic modified baculoviruses) 運用於田間。因此，尋找安全、有效的病毒協力劑 (synergists)，將是目前增進核多角體病毒作為生物農藥的重要研究課題之一。

在過去核多角體病毒協力劑相關的研究中，發現能增進核多角體病毒致病力的協力劑 (synergists)，大多數為化學藥劑，例如已知的醯胺類界面活性劑 (acrylamine cationic detergent)，可有效的增強栗夜盜蛾核多角體病毒 (*Pseudaletia unipuncta* NPV) 對栗夜盜蛾的毒性⁽³⁰⁾，硼酸及其鹽類則可降低舞蛾核多角體病毒 (*Lymantria dispar* NPV) 之 LD₅₀⁽²⁷⁾，其它的化學藥劑如卵磷脂 (lecithin)、螢光增白劑 (leucophor) 及螢光增亮劑 (fluorescent brightener) 和 Tinopal CBS 光學增亮劑 (optical brightener)，亦被證實能有效降低核多角體病毒的 LT₅₀ 及 LD₅₀^(10, 28)。然而上述採用的病毒協力劑皆為化學物質，故若能篩選出可增益桿狀病毒殺蟲效益的有機物將能避免過多的化學藥劑的使用，更能符合綠色農業的宗旨。

凝集素 (lectin) 是一類可以專一性的與單醣或多醣體結合之蛋白質。凝集素最初是

在豆科植物的種子中被發現，是種子中含量最豐富的蛋白質⁽¹⁵⁾，但是它的功能仍未完全清楚地了解。目前的研究結果顯示凝集素可以作為儲存物質以供種子發芽之用，或扮演植物與固氮微生物的中間聯繫角色 (根瘤菌會辨識植物特有的凝集素)；此外，也有研究結果指出凝集素可能是植物抵抗昆蟲的防禦工具⁽⁷⁾。從過去的研究文獻中指出，凝集素不但會降低昆蟲的生存率，對昆蟲有毒殺的作用，同時也會影響昆蟲的正常生理代謝，影響昆蟲的生長及繁殖能力，故凝集素被認為具有綜合害蟲管理 (Integrated pest management; IPM) 的潛能⁽²⁵⁾。研究發現凝集素經口食入會對昆蟲產生毒殺效果；這些對昆蟲有毒性的凝集素蛋白在結構上可分成兩個 domains：lectin domain 與具有酵素活性的 non-lectin domain；如蓖麻毒素 (ricin 或 arcelin)，因為會將核醣體 60S 次單元進行 ADP-ribosylation，而使核醣體失活 (inactivated)，進而使細胞的轉譯終止，具有強烈的毒性^(16, 20)。但是，亦有報導指出只含有 lectin domain 的蛋白質同樣具有殺蟲效果⁽¹³⁾，例如小麥凝集素 (WGA, wheat germ agglutinin 或稱 *Triticum vulgare* lectin)，對鱗翅目與鞘翅類的昆蟲具有毒性^(5, 11, 19)；石蒜科雪花蓮 (*Galanthus nivalis*) 的凝集素 (*Galanthus nivalis* agglutinin, GNA) 則對同翅目、鞘翅類具有毒性^(8, 21, 23)。這些對昆蟲有毒性的凝集素已廣泛的應用於基因轉殖植物 (transgenic plants) 上，例如刀豆 (*Canavalia ensiformis* DC.)、豌豆 (*Pisium sativum* L.) 與刺楸 (*Robinia*) 樹皮的凝集素已成功的表現在菸草葉中，以降低昆蟲啃咬葉片比例，而使農業損失明顯減少^(3, 6, 29)。此外，選殖自石蒜科雪花蓮的凝集素也成功的轉殖進菸草與稻米中，並有效的防治數種病蟲害，如蛀蟲 (*Lacanobia oleracea*)、蚜蟲 (*Myzus persicae*) 或稻米棕蠟蟬 (*rice brown planthopper*)^(9, 24, 31)。

甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 幼蟲在台

灣是危害瓜類、豆類、蕃茄、甘藍及白菜等重要經濟作物之農業害蟲，因該幼蟲對化學農藥已普遍產生抗藥性，在防治上有相當高的難度。而目前在甜菜夜蛾的生物防治上，多採用病毒類生物農藥，但當以甜菜夜蛾核多角體病毒 (*Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedro- virus; SeMNPV) 防治時，其致死的時間很長，約需 6-10 天，於感染過程中該害蟲仍會繼續危害、取食作物，造成農作物的損失。因此，本研究將探討小麥凝集素及刀豆凝集素對甜菜夜蛾核多角體病毒之殺蟲效果的影響，探討以 WGA 及 Con A 做為甜菜夜蛾核多角體病毒協力劑的可行性。

材料與方法

SDS-聚丙烯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE)

WGA 及 Con A 均購自 Sigma 化學公司。取 20 μg Con A 和 75 μg WGA 加入 1/4 體積的 4 \times sample buffer (6.25 nM Tris-HCL, 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 0.004% Bromophenol Blue, 10% glycerol, pH 6.8) 混合，以 95 $^{\circ}\text{C}$ 處理 5 分鐘，以 12.5% SDS-PAGE 進行電泳分析 (Bio-Rad, 100V, 2 小時)，電泳膠片以二次水清洗 10 分鐘，三次，以 Quick stain (Biovan) 染色 1.5 小時，以二次水清洗膠片去除背景，最後以玻璃紙包膠保存。

甜菜夜蛾之大量飼育

台灣嘉南地區田間採集的甜菜夜蛾，以人工飼料繼代飼育⁽¹²⁾，並以 20% 蜂蜜水餵飼成蛾。每十對成蛾置於一產卵箱內進行交尾產卵，卵塊經 5% 福馬林溶液浸泡 15 分鐘後，以自來水淋洗 15 分鐘，進行卵表面之消毒。卵孵化後置於裝有人工飼料之布丁杯中集體飼育，至三齡即分別單隻飼養，以防止幼蟲自相殘食及因飼育密度高而引發蟲體罹病。生長箱條件為 25 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ ，12L：12D，65 \pm 5% R.H.。試驗蟲為二

齡及三齡健康之幼蟲。

增殖及純化甜菜夜蛾核多角體病毒包含體

將收集來的病蟲加入適量的 1 \times TE 緩衝劑 (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5)，研磨，經二層紗布過濾，濾液先以 1000 rpm，10 $^{\circ}\text{C}$ 離心 15 分鐘，除去細胞碎片，懸浮液再以 3000 rpm，10 $^{\circ}\text{C}$ 離心 20 分鐘，沉澱物，再以 1 \times TE 緩衝劑沖散，此即是含核多角體的懸浮液，再以 35-56% (W/W) 蔗糖密度梯度離心，74,000g，4 $^{\circ}\text{C}$ 離心 30 分鐘後，收集所有核多角體集中帶，並加入二次蒸餾水稀釋 3 倍，然後用 3500 rpm，30 分鐘將它沈澱下來，即得純化的甜菜夜蛾核多角體病毒之核多角體包含體 (PIBs)。

甜菜夜蛾核多角體病毒包含體 (PIBs) 計數

將由蟲體純化而來的甜菜夜蛾核多角體病毒包含體 (PIBs)，以 5000 rpm、5 min 離心，將 PIBs 沉降，最後以 1 \times PBS 回溶。取 10 μl 至血球計數器，放置於光學顯微鏡下，計數 PIBs 數目，進而推算出 PIBs 的濃度。

小麥凝集素與刀豆凝集素協同甜菜夜蛾核多角體病毒包含體之生物檢定

由甜菜夜蛾幼蟲，分離所取得之甜菜夜蛾核多角體病毒包含體 (Polyhedrin inclusion body; PIBs) 分別餵食感染三齡或四齡甜菜夜蛾的幼蟲。以飼料表面污染法接種，先將每個飼料塊 (直徑 7 mm \times 高 10 mm) 分別置於 30 孔培養盤中，以 15 μl 之病毒包含體溶液均勻滴於人工飼料塊上，待病毒液滲透完全並稍陰乾後，再單隻接入供試蟲。其處理組除甜菜夜蛾核多角體病毒包含體外，另添加 0.1、0.5 和 1% 等不同濃度的小麥凝集素或刀豆凝集素至甜菜夜蛾核多角體病毒包含體溶液，其甜菜夜蛾核多角體病毒包含體溶液的最終濃度均為 1 \times 10⁸ PIBs/ml。此外，每試驗組處理 30 隻健康幼蟲 (先經飢餓處理 6 小時)，同時，分別以 15 μl 的 0.1、0.5 和 1%

等濃度的小麥凝集素、刀豆凝集素及無菌二次水滴於人工飼料塊上作為對照組。處理後幼蟲置於 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、光照 12L:12D、溼度 $65 \pm 5\%$ R. H. 之恆溫生長箱中，並於接種後三天更換新鮮無病毒之飼料，每天紀錄供試蟲之幼蟲死亡率及病、死蟲之體重，死亡率依⁽¹⁾校正死亡率公式計算，以 JMP 5.01 統計軟體 (JMP, a business unit of SAS, 2002 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 計算 LT_{50} 、 LD_{50} 及 LSD test (以上不同之試驗，均於不同時間進行，至少重複三次)。

結 果

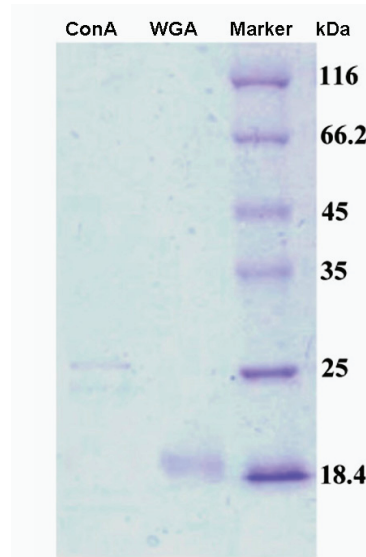
分析小麥凝集素 (WGA) 和刀豆凝集素 (Con A) 蛋白在水溶液中的穩定性

由於本研究乃是將 WGA 和 Con A 添加至含甜菜夜蛾核多角體病毒的水溶液中，探討對甜菜夜蛾幼蟲的殺蟲效果。因此先將 WGA 和 Con A 配製成 10% 的水溶液，並置於 4°C 冰箱保存。為了確定此二蛋白在水溶液中的穩定性，故於進行生物檢定測試前均

以 SDS-聚丙烯胺凝膠電泳分析 WGA 和 Con A 二蛋白，結果顯示 $75 \mu\text{g}$ WGA (於 0.5% 的濃度下) 和 $20 \mu\text{g}$ Con A (於 0.1% 的濃度下) 于 12.5% 的 SDS-PAGE 蛋白質電泳下，分子量分別為 18.7 和 25.6 kDa (圖一)，此結果說明此二蛋白於 10% 的水溶液濃度下， 4°C ，可保存其蛋白質肽鏈的完整性而不會降解。雖然先前的研究顯示 WGA 對鱗翅目與鞘翅類的昆蟲具有毒性^(5, 11, 19) 但當我們單獨以 0.2、0.5 和 1% 的 WGA 和 Con A 分別處理甜菜夜蛾幼蟲，均不會造成甜菜夜蛾幼蟲的死亡 (data not shown)，此結果顯示甜菜夜蛾幼蟲對此濃度作用下的 WGA 和 Con A 可能具有抗性，由於再提高 WGA 和 Con A 作用濃度的實用性不大，於是我們探討 WGA 和 Con A 的添加對甜菜夜蛾核多角體病毒之殺蟲效果的影響。

添加 WGA 和 Con A 對甜菜夜蛾核多角體病毒感染二齡甜菜夜蛾幼蟲致死率之影響

添加不同濃度之 WGA 至甜菜夜蛾核多角體病毒液 (使其最終濃度為 1×10^8



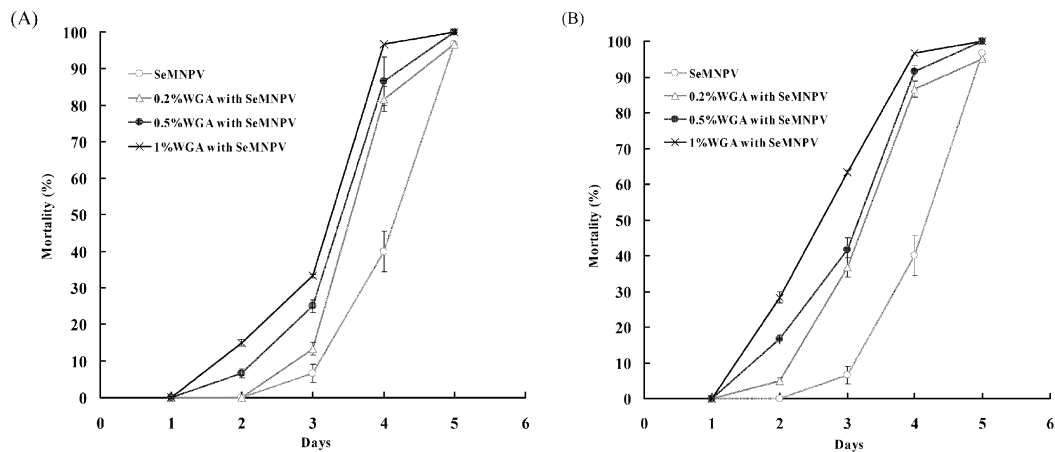
圖一、利用 12.5% SDS-PAGE 分析刀豆凝集素(Con A; $20 \mu\text{g}$)與小麥凝集素(WGA; $75 \mu\text{g}$)蛋白。
Fig. 1. The Con A ($20 \mu\text{g}$) and WGA ($75 \mu\text{g}$) proteins were resolved by SDS-PAGE using 12.5% acrylamide gel.

PIBs/ml 中含 0.2、0.5 和 1% 的 WGA)，處理二齡初之甜菜夜蛾幼蟲，於感染後第 5 天，不論是單獨感染甜菜夜蛾核多角體病毒的處理組或含三種不同濃度 WGA 的甜菜夜蛾核多角體病毒液處理組，其死亡率均達到 96.6% 或 100%，但於感染後的第二天，以含 0.5 及 1% WGA 的甜菜夜蛾核多角體病毒液感染二齡初之甜菜夜蛾幼蟲，即可造成部分蟲體的死亡，其死亡率分別高出單獨處理甜菜夜蛾核多角體病毒液約 6.6 和 15%。於感染後的第三天，蟲體的死亡率於含 0.2、0.5 和 1% WGA 的甜菜夜蛾核多角體病毒液處理組中，死亡率分別是 13.3、24.9、33.3%。另，於感染後的第四天，處理組中含 0.2、0.5 和 1% WGA 的甜菜夜蛾核多角體病毒液，造成蟲體的大量死亡，其死亡率分別已高達 81.6、86.6 和 96.6%，相較單獨感染甜菜夜蛾核多角體病毒，死亡率明顯提高了約 41.7、46.7 和 56.7%。而單獨感染甜菜夜蛾核多角體病毒，於第三天則只有 6.6% 的死亡率（圖二 A），故添加 WGA 的甜菜夜蛾核多角體病

毒液會提高蟲體之死亡率且隨計量之增加效果更明顯。其相似的試驗結果亦發現於甜菜夜蛾核多角體病毒添加 Con A 的實驗中，分別添加 0.2、0.5 和 1% Con A 之甜菜夜蛾核多角體病毒液於感染後的第四天，也達到蟲體死亡的高峰期（圖二 B），其死亡率是 86.6、91.6 和 96.6%，其死亡率較僅感染甜菜夜蛾核多角體病毒的蟲體分別提高了約 46.7、51.7 和 57.7%。

添加 WGA 和 Con A 對甜菜夜蛾核多角體病毒感染三齡甜菜夜蛾幼蟲致死率及體重變化的影響

由於添加 WGA 和 Con A 對甜菜夜蛾核多角體病毒感染二齡甜菜夜蛾幼蟲之致死率有顯著的增益效果（圖二），因此我們分別將 0.2、0.5 和 1% 的 WGA 和 Con A 添加至甜菜夜蛾核多角體病毒液中，餵食三齡初之甜菜夜蛾幼蟲進行分析，其每日死亡率分別見圖三(A)和圖四(A)。結果顯示當三齡初甜菜夜蛾幼蟲感染添加 WGA 和 Con A 之甜菜夜蛾核多角體病毒液，其



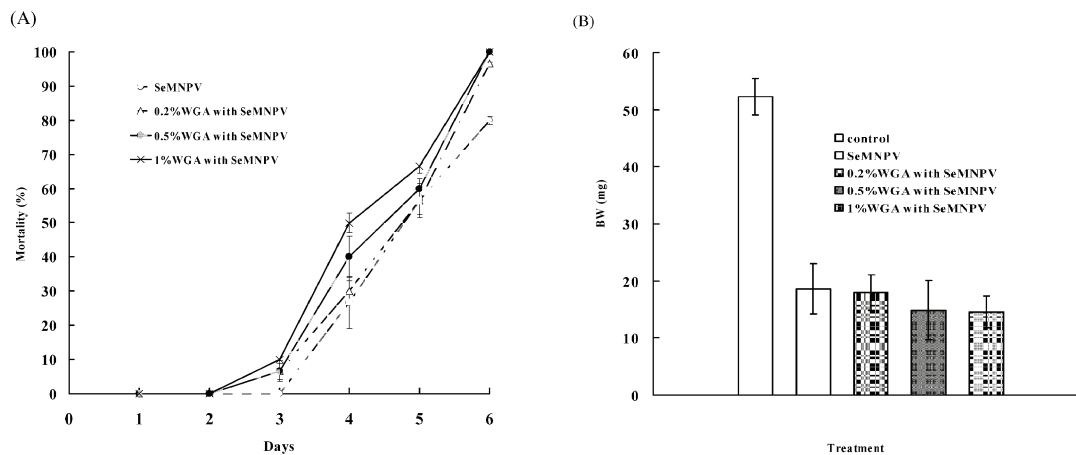
圖二、比較不同濃度的小麥凝集素(WGA) (A)及刀豆凝集素(Con A) (B)與甜菜夜蛾核多角體病毒(1×10^8 PIBs/ml)一同感染二齡甜菜夜蛾的每日致死率。

Fig. 2. The mortality of 2nd instar *Spodoptera exigua* larvae infected per os with 1×10^8 PIBs/ml of contaminated diet of SeMNPV and 1×10^8 PIBs/ml of SeMNPV combined with various concentrations of (A) WGA and (B) Con A from 1 to 5 days post inoculation (30 larvae per treatment, in triplicates).

死亡率並未似感染二齡初甜菜夜蛾幼蟲時明顯的提高，其中 0.2% 的 WGA 或 Con A 之甜菜夜蛾核多角體病毒液的殺蟲效果是與甜菜夜蛾核多角體病毒液處理組並無差異，而添加 0.5% 的 WGA 或 Con A 的處理組於感染後第五天也只提高了約 4~5% 的死亡率。另 1% 的 WGA 或 Con A 於感染後的第五天，則可提高約 10% 的死亡率。但於感染後的第六天，0.5 及 1% 的 WGA 或 0.2、0.5 和 1% Con A 的添加，則可顯著的提高了約 20% 的死亡率。

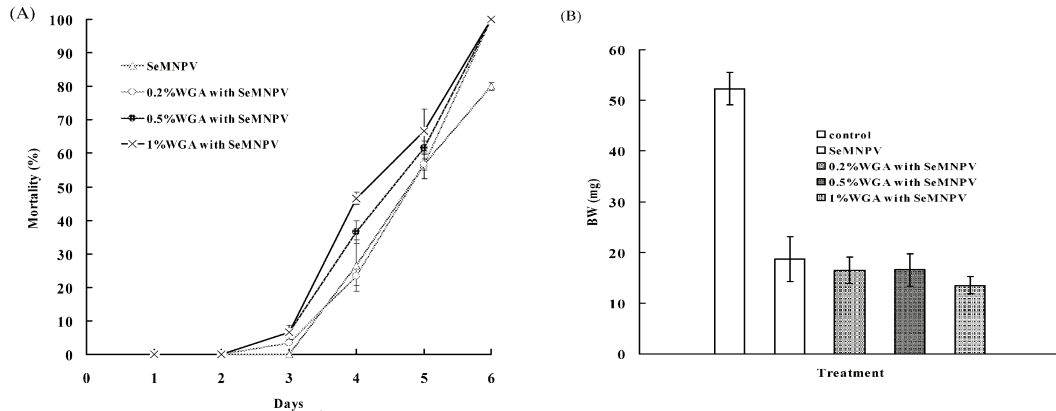
在觀察死亡率變化的同時，我們亦同時記錄各處理組之病蟲體重，當以添加 0.2、0.5 和 1% 的 WGA 之甜菜夜蛾核多角體病毒感染三齡初甜菜夜蛾，其 4 天後累積病蟲之平均體重分別是 17.95、14.84 和 14.56 mg，較

甜菜夜蛾核多角體病毒單獨處理降低了 0.71、3.82 和 4.1 mg (圖三 B)。同時，在添加 Con A 的甜菜夜蛾核多角體病毒處理組中亦觀察到相似的體重變化，但，較添加 WGA 的甜菜夜蛾核多角體病毒處理組有明顯的病蟲體重降低的現象，當以 0.2、0.5 和 1% Con A 添加至甜菜夜蛾核多角體病毒液，感染後四天，病蟲累積的平均體重分別為 16.47、16.53 和 13.49 mg (圖四 B)，較甜菜夜蛾核多角體病毒單獨感染降低了 2.19、2.13 和 5.17 mg。這些結果說明了不論 WGA 或 Con A 添加至的甜菜夜蛾核多角體病毒液，均可增強甜菜夜蛾核多角體病毒的毒性，且除了會提高甜菜夜蛾核多角體病毒殺蟲效率外，亦可同時降低病蟲之體重，此現象可能與 WGA 和 Con A 會影響蟲體的生長發育有關。



圖三、比較不同濃度的小麥凝集素(WGA)與甜菜夜蛾核多角體病毒(1×10^8 PIBs/ml)一同感染三齡甜菜夜蛾 (感染前三齡初之蟲體重約 7.25 ± 2.1 mg) 的每日致死率(A)及累積感染後 96 小時之病蟲平均體重(B)。

Fig. 3. (A) Efficacy of 3rd instar *Spodoptera exigua* larvae infected per os with 1×10^8 PIBs/ml of contaminated diet of SeMNPV and 1×10^8 PIBs/ml of SeMNPV combined with various concentrations of WGA from 1 to 5 days post inoculation (30 larvae per treatment, in triplicates). (B) Body weight change of 3rd instar *Spodoptera exigua* larvae infected per os with 1×10^8 PIBs/ml of contaminated diet of SeMNPV and 1×10^8 PIBs/ml of SeMNPV combined with various concentrations of WGA. The body weight mean value was calculated from the cumulative mortalities up to 96 hrs post inoculation. The average weight of 3rd instar *Spodoptera exigua* larvae was 7.25 ± 2.1 mg for the test (30 larvae per treatment, in triplicates).



圖四、比較不同濃度的刀豆凝集素(Con A)與甜菜夜蛾核多角體病毒(1×10^8 PIBs/ml)一同感染三齡甜菜夜蛾(感染前三齡初之蟲體重約 7.25 ± 2.1 mg)的每日致死率(A)及累積感染後 96 小時之病蟲平均體重(B)。

Fig. 4. (A) Efficacy of 3rd instar *Spodoptera exigua* larvae infected per os with 1×10^8 PIBs/ml of contaminated diet of SeMNPV and 1×10^8 PIBs/ml of SeMNPV combined with various concentrations of Con A from 1 to 5 days post inoculation (30 larvae per treatment, in triplicates). (B) Body weight change of 3rd instar *Spodoptera exigua* larvae infected per os with 1×10^8 PIBs/ml of contaminated diet of SeMNPV and 1×10^8 PIBs/ml of SeMNPV combined with various concentrations of Con A. The body weight mean value was calculated from the cumulative mortalities up to 96 hrs post inoculation. The average weight of 3rd instar *Spodoptera exigua* larvae was 7.25 ± 2.1 mg for the test (30 larvae per treatment, in triplicates).

WGA 和 Con A 對甜菜夜蛾核多角體病毒感染甜菜夜蛾幼蟲半致死時間 (LT_{50}) 及半致死濃度 (LD_{50}) 之影響

由圖二及圖三之結果顯示，雖然 WGA 和 Con A 的添加對甜菜夜蛾核多角體病毒感染甜菜夜蛾幼蟲之致死率有顯著的增益效果，但我們也發現其作用隨著甜菜夜蛾的齡期增加而降低，且當感染四齡(末齡)幼蟲時，WGA 和 Con A 的添加，並無法提高甜菜夜蛾核多角體病毒的致病力 (data not shown)。當以半致死時間 (LT_{50}) 及半致死濃度 (LD_{50}) 評估 WGA 和 Con A 對增進甜菜夜蛾核多角體病毒對二齡及三齡甜菜夜蛾幼蟲致死效率的影響，我們發現甜菜夜蛾核多角體病毒的致病力亦隨著 WGA 和 Con A 的添加濃度增加而提高，結果如表一及表二所示。以二齡甜菜夜蛾為例，當感染含

0.2、0.5、1% WGA 的甜菜夜蛾核多角體病毒 (1×10^8 PIBs/ml) 時，其 LT_{50} 可分別較甜菜夜蛾核多角體病毒單獨處理組縮短了 12、18 和 22 小時(表一)。另以 0.2、0.5、1% Con A 添加至甜菜夜蛾核多角體病毒時，其 LT_{50} 則可由 4.05 天降低為 3.3、3.1 和 2.34 天，並分別較甜菜夜蛾核多角體病毒單獨處理組縮短了約 18、23 和 41 小時。故 WGA 或 Con A 的添加確實可加速甜菜夜蛾核多角體病毒其對二齡和三齡甜菜夜蛾的致死時間，尤其是 1% Con A 的添加更可明顯降低其半致死時間，當以 1% Con A 的添加至甜菜夜蛾核多角體病毒於二齡幼蟲時，由原來的 4.05 天降低為 2.34 天，另，感染三齡幼蟲時，則由原來的 4.47 天降低為 3.94 天(表一)。我們也發現 1% WGA 或 Con A 的添加，當以甜菜夜蛾核多角體病毒感染二齡甜

菜夜蛾時，其 LD_{50} 可由 1.46×10^5 PIBs/ml 降低為 6.35×10^4 和 2.11×10^4 PIBs/ml，其中以 1% Con A 添加後，可降低約 10 倍的甜菜夜蛾核多角體病毒使用劑量（表二）。於三齡幼蟲感染時，其 LD_{50} 的降低並未如處理二齡幼蟲明顯，但以含 1% WGA 或 Con A 處理時，亦可降低約 5 倍的甜菜夜蛾核多角體病毒使用劑量（表二）。

討 論

核多角體病毒是當前和未來生物農藥發展的重要生物製劑。但由於核多角體病毒的寄主範圍較為專一，其殺蟲範圍較窄而且致死時間長，使得田間防治害蟲的效率差，因此如何適當提高核多角體病毒殺蟲劑之殺蟲效率，是讓核多角體病毒落實田間運用的重要關鍵。

表一、比較不同濃度的小麥凝集素(WGA)及刀豆凝集素(Con A)與甜菜夜蛾核多角體病毒(1×10^8 PIBs/ml)一同感染二齡、三齡甜菜夜蛾的半致死時間

Table 1. Time-efficacy response of 2nd and 3rd instar *Spodoptera exigua* larvae infected by SeMNPV and SeMNPV combined with various concentrations of WGA and Con A (30 larvae per treatment, in triplicates)

Treatment	Mean $LT_{50}^{1)}$ (days) \pm SD	
	2 nd instar	3 rd instar
SeMNPV ²⁾	4.05 \pm 0.53 a ³⁾	4.47 \pm 0.28 a
SeMNPV with 0.2% WGA	3.56 \pm 0.44 b	4.18 \pm 0.42 ab
SeMNPV with 0.5% WGA	3.29 \pm 0.42 b	4.20 \pm 0.08 ab
SeMNPV with 1% WGA	3.13 \pm 0.37 b	3.96 \pm 0.26 ab
SeMNPV with 0.2% Con A	3.30 \pm 0.40 ab	4.23 \pm 0.49 ab
SeMNPV with 0.5% Con A	3.10 \pm 0.30 b	4.26 \pm 0.36 ab
SeMNPV with 1% Con A	2.34 \pm 0.26 c	3.94 \pm 0.16 ab

¹⁾ The ET_{50} values were calculated from the cumulative mortalities up to 5 days post inoculation.

²⁾ Second and third instars *Spodoptera exigua* larvae infected through per os with 1×10^8 PIBs/ml of SeMNPV of each treatment.

³⁾ Means within the same column without same superscript are significantly different (Alpha = 0.05).

表二、比較 1% 的小麥凝集素(WGA)及刀豆凝集素(Con A)與甜菜夜蛾核多角體病毒(1×10^8 PIBs/ml)一同感染二齡、三齡甜菜夜蛾的半致死劑量

Table 2. Dose-efficacy response of 2nd and 3rd instar *Spodoptera exigua* larvae infected by SeMNPV and SeMNPV combined with various concentrations of WGA and Con A (30 larvae per treatment, in triplicates)

Treatment	Mean $LD_{50}^{1)}$ (PIBs/ml) \pm SD	
	2 nd instar	3 rd instar
SeMNPV ²⁾	1.46 \pm 0.63 $\times 10^5$ a ³⁾	5.48 \pm 1.66 $\times 10^5$ a
SeMNPV with 1% WGA	6.35 \pm 0.68 $\times 10^4$ b	2.35 \pm 0.55 $\times 10^5$ b
SeMNPV with 1% Con A	2.11 \pm 0.21 $\times 10^4$ b	2.23 \pm 1.38 $\times 10^5$ b

¹⁾ The LD_{50} values were calculated from the cumulative mortalities up to 5 days post inoculation.

²⁾ Second and third instars *Spodoptera exigua* larvae infected through per os with 1×10^8 PIBs/ml of SeMNPV of each treatment.

³⁾ Means within the same column without same superscript are significantly different (Alpha = 0.05).

由於，甜菜夜蛾是台灣農業上危害較嚴重之害蟲，而目前以甜菜夜蛾核多角體病毒製成的生物農藥 Spodox[®]，已在美國上市，因此本研究擬篩選植物凝集素做為病毒協同劑(Synergist)，以加強甜菜夜蛾核多角體病毒的殺蟲效率。

凝集素已廣為應用在轉基因作物上，作為害蟲防治，可以對大多數鞘翅目 (Coleoptera)、同翅目 (Homoptera)、雙翅目 (Diptera) 和鱗翅目 (Lepidoptera) 的昆蟲產生殺蟲活性，例如轉殖碗豆凝集素的菸草可以防治蚜夜蛾，而轉殖小麥凝集素 (WGA) 的玉米，則可以防治歐洲玉米螟與玉米根蛀蟲。而且只要凝集素蛋白含量佔可溶性蛋白的 0.1~0.2%，即可產生防治效果^(4, 8, 26)。研究證據同時指出 lectin 具有作為天然的殺蟲劑的潛力，可以增加農作物的收成。雖然 lectin 精確的殺蟲機制並不完全地被瞭解，但目前證據顯示其可能的機制是 lectin 經由與昆蟲的中腸結構或消化酶結合，進而導致干擾了昆蟲的消化道防護及腸內的分泌作用和蛋白質分解作用⁽²²⁾。

本研究於篩選植物凝集素 (lectin) 做為病毒協力劑 (synergist) 時，分別篩選了石蒜科雪花蓮 (*Galanthus nivalis*) 的凝集素 (galanthus nivalis agglutinin; GNA)、小麥凝集素及刀豆凝集素等三種植物凝集素對甜菜夜蛾核多角體病毒之殺蟲效果的影響。實驗結果顯示石蒜科雪花蓮 (*Galanthus nivalis*) 的凝集素 (GNA) 對甜菜夜蛾核多角體病毒的殺蟲效率並無影響 (data not shown)。另二植物凝集素 WGA 和 Con A 則具有增強甜菜夜蛾核多角體病毒殺蟲效率的潛能。由圖二及圖三之結果顯示，隨著 WGA 和 Con A 的濃度增加，甜菜夜蛾核多角體病毒對甜菜夜蛾幼蟲的致死率亦隨著增加，當以 1% WGA 和 Con A 添加至 1×10^8 PIBs/ml 甜菜夜蛾核多角體病毒感染二齡和三齡幼蟲，於感染後第四天，均可達分別約 96.6 和 47% 的致死率。但 1% Con A 的添

加至 1×10^8 PIBs/ml 甜菜夜蛾核多角體病毒感染二齡幼蟲，於感染後的第三天，即可較單獨感染 1×10^8 PIBs/ml 甜菜夜蛾核多角體病毒增加了 56.7% 的死亡率，而 1% WGA 的添加，卻只增加約 36.7% 的死亡率。相較之下，以 1% Con A 的添加至甜菜夜蛾核多角體病毒更可顯著增強其對二齡甜菜夜蛾幼蟲的致死率。經分析其 LT_{50} ，當以 1% WGA 或 Con A 的添加至甜菜夜蛾核多角體病毒，感染二齡幼蟲時，其 LT_{50} 可分別減少約 0.92 及 1.7 天，另，感染三齡幼蟲時，則是減少約 0.51 及 0.53 天 (表一)，此結果證實，的確以 1% Con A 的添加至甜菜夜蛾核多角體病毒更可顯著增強其對二齡甜菜夜蛾幼蟲的致死率。

已知甜菜夜蛾末齡幼蟲本身對外的防禦力強，不論是採用化學藥劑或生物農藥通常都需用較高的劑量來進行防治，因此，當以硼酸協同甜菜夜蛾核多角體病毒感染甜菜夜蛾幼蟲時，只有對幼齡 (1-2 齡) 的甜菜夜蛾才具有顯著殺蟲效果⁽¹⁴⁾，與本研究的結果類似。當以 WGA 或 Con A 協同甜菜夜蛾核多角體病毒感染甜菜夜蛾幼蟲時，亦只對 2-3 齡的甜菜夜蛾才具有提高殺蟲效果，對 4 齡 (末齡) 的甜菜夜蛾幼蟲則是沒有任何影響。由本研究結果亦證實了 1% WGA 或 Con A 可有效的增強甜菜夜蛾核多角體病毒對 2-3 齡甜菜夜蛾幼蟲的每日致死率，並縮短 LT_{50} 的時間及降低 LD_{50} ，因此利用 1% WGA 或 Con A 作為甜菜夜蛾核多角體病毒的協同劑，將可降低甜菜夜蛾核多角體病毒應用於田間時的使用量與成本，進而增強甜菜夜蛾核多角體病毒在生物農藥上的經濟效益。

謝 辭

本研究承行政院農委會委託計畫 94 農科 -5.1.5- 檢 -B1 (94AS-5.1.5-BQ-B1) 之補助，使得本研究可順利完成，謹致謝忱。

引用文獻

1. Abott, W. S. A. 1925. Method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265 - 267.
2. Boucias, D. G., Johnson, D. W., and Allen, G. E. 1980. Effects of host age, virus dosage, and temperature on the infectivity of a nucleopolyhedrosis virus against velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, larvae. *Environ. Entomol.* 9: 59-61.
3. Boulter, D., Edwards, G. A., Gatehouse, A. M. R., Gatehouse, J. A., and Hilder, V. A. 1990. Additive protective effects of different plant-derived resistance genes in transgenic tobacco plants. *Crop Prot.* 9: 351-354.
4. Carlini, C. R., and Grossi-de-Sá, M. F. 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 20: 1515-1539.
5. Czaplá, T. H., and Lang, B. A. 1990. Effect of plant lectins on the larval development of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 83: 2480-2485.
6. de Pater, S., Pham, K., Klitsie, I., and Kijne, J. 1996. The 22-bp W1 element in the pea lectin promoter is necessary and, as a multimer, sufficient for high gene expression in tobacco seeds. *Plant Mol. Biol.* 32: 515-523.
7. Etzler, M. E. 1985. Plant lectins: molecular and biological aspects. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36: 209-234.
8. Gatehouse, A. M. R., Powel, K. S., Peumans, W. J., Van Damme, E. J. M., and Gatehouse, J. A. 1995. Insecticidal properties of lectins: their potential in plant protection, pp. 35-57. *In: A. J. Pusztai, and S. Bardocz [ed.], Lectins: biomedical perspectives.* Taylor and Francis., Hants, UK.
9. Gatehouse, A. M. R., Davison, G. M., Newell, C. A., Merryweather, A., Hamilton, W. D. O., Burgess, E. P. J., Gilbert, R. J. C., and Gatehouse, J. A. 1997. Transgenic potato plants with enhanced resistance to the tomato moth, *Lacanobia oleracea*: growth room trials. *Mol. Breed* 3: 49-63.
10. Goulson, D., Williams, T., Hughes, W. O. H., and Martinez, A. M. 2000. Effects of optical brighteners used in biopesticide formulations on the behavior of pollinators. *Biol. Control* 19:232-236.
11. Huesing, J. E., Murdock, L. L., and Shade, R. E. 1991. Effect of wheat germ isolectins on development of cowpea weevil. *Phytochemistry* 30: 785-788.
12. Hung, C. C., and Hwang, J. S., 1988. The mass rearing method of major insect pests: Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*, guava mealy bug, *Planococcus minor* and beet armyworm, *Spodoptera exigua*. Annual report of TACTRI, Taiwan. pp.50-52. (in Chinese)
13. Janzen, D. H., Juster, H. B., and Liener, I. R. 1976. Insecticidal action of the phytohemagglutinin in black beans on a bruchid beetle. *Science* 192: 795-796.
14. Jinn, T. R., Kao, S. S., and Wu, T. Y. 2004. Boric acid as a synergist of *Spodoptera exigua* and *Autographa californica* nuclear polyhedrosis viruses. *Formosan Entomol.* 24: 173-184. (in Chinese)
15. Liener, I. E. 1976. Phytohemagglutinins (phytolectins). *Annu. Rev. Plant Physiol.* 27: 291-319.

16. Lord, J. M., Roberts, L. M., and Robertus, J. D. 1994. Ricin: structure, mode of action, and some current applications. *FASEB J.* 8: 201-208.
17. Maeda, S., 1995. Further development of recombinant baculovirus insecticides. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6: 313-319.
18. Miller, L. K., Ling, A. J., Bulla, L. A. 1983. Bacterial, viral and fungal insecticides. *Science* 219: 715 -721.
19. Murdock, L. L., Huesing, J. E., Nielsen, S. S., Pratt, R. C., and Shade, R. E. 1990. Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil. *Phytochemistry* 29: 85-89.
20. Osborn, T. C., Alexander, D. C., Sun, S. S. M., Cardona, C., and Bliss, F. A. 1988. Insecticidal activity and lectin homology of arcelin seed protein. *Science* 240: 207-210.
21. Powell, K. S., Gatehouse, A. M. R., Hilder, V. A., and Gatehouse, J. A. 1993. Antimetabolic effects of plant lectins and plant and fungal enzymes on the nymphal stages of two important rice pests, *Nilaparvata lugens* and *Nephotettix cinctipes*. *Entomol. Exp. Appl.* 66: 119-126.
22. Pusztai, A. 1991. General effects on animal cells. pp. 105-205. *In: Pusztai, A., [ed.], Plant Lectins, Cambridge University Press, Cambridge.*
23. Rahbé, Y., Sauvion, N., Febvay, G., Peumans, W. J., and Gatehouse, A. M. R. 1995. Toxicity of lectins and processing of injected proteins in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Entomol. Exp. Appl.* 76: 143-155.
24. Rao, K. V., Rathore, K. S., Hodges, T. K., Fu, X., Stoger, E., Sudhakar, D., Williams, S., Christou, P., Bharathi, M., Bown, D. P., Powell, K. S., Spence, J., Gatehouse, A. M. R., and Gatehouse, J. A. 1998. Expression of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. *Plant. J.* 15: 469-477.
25. Roy, A., Banerjee, S., Majumder, P., and Das, S. 2002. Efficiency of mannose-binding plant lectins in controlling a homopteran insect, the red cotton bug. *J. Agric. Food Chem.* 50: 6775-6779.
26. Schuler, T. H., Poppy, G. M., Kerry, B. R., and Denholm, I. 1998. Insect resistant transgenic plants. *Trend Biotech.* 16: 168-175.
27. Shapiro, M., and Bell, M. R. 1982. Enhanced effectiveness of *Lymantria dispar* NPV formulated with boric acid. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 75: 345-349.
28. Shapiro, M. 1992. Use of optical brighteners as radiation protectants for gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus. *J. Econ. Entomol.* 85: 1682-1686.
29. Tazaki, K., Yoshida, K., Shinohara, K., Koshihara, T., and Yamamoto, N. 1995. Expression of cDNA for a bark lectin of Robinia in transgenic tobacco plants. *FEBS Lett.* 377: 54-58.
30. Yamamoto, T., and Tanada, Y. 1980. Physicochemical properties and location of capsule components in particular the synergistic factor in the occlusion body of a granulosis virus of the armyworm *Pseudaletia unipuncta*. *Virology* 107: 434-440.
31. Zhou, Y., Tian, Y., Wu, B., and Mang, K. 1998. Inhibition effect of transgenic tobacco plants expressing snowdrop lectin on the population development of *Myzus persicae*. *Chin. J. Biotechnol.* 14: 9-16.

ABSTRACT

Jinn, T. R.¹, Wu, C. M.¹, Lee, Y. H.¹, Kao, S. S.¹, and Wu, T. Y.^{2*} 2007. Effects of wheat germ agglutinin and concanavalin A lectin on the insecticidal efficacy of *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus. Plant Prot. Bull. 49: 1-12. (¹Biopesticides Division, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Taichung 413, Taiwan (ROC); ²Department of Bioscience Technology, ChungYuan Christian University, Chungli 320, Taiwan (ROC))

The insecticidal activity of *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (SeMNPV) in combination with wheat germ agglutinin (WGA) and concanavalin A (Con A) was investigated on *S. exigua*. Results showed that the combination of SeMNPV with 0.2, 0.5 and 1% WGA increased the mortality of 2nd instar *S. exigua*, 42, 47 and 57%, respectively, 4 days after inoculation. The combination of SeMNPV with 0.2, 0.5 and 1% Con A also increased mortality of 2nd instar *S. exigua* 30, 35 and 57%, respectively, 3 days after inoculation. Furthermore, the combination of SeMNPV with 0.5, 1% WGA or 0.2, 0.5, 1% Con A also caused a 20% increase in mortality of 3rd instar *S. exigua* 6 days after inoculation.. However, combination of SeMNPV with either WGA or Con A did not significantly enhance mortality of 4th instar *S. exigua*. The combination of SeMNPV with 1% WGA or Con A also significantly increased the insecticidal potency on 2nd instar *S. exigua*. The LT₅₀ value was reduced from 4.05 days to 3.13 and 2.34 days, respectively, and the LD₅₀ value was also reduced from 1.46 x 10⁵ PIBs/ml to 6.35 x 10⁴ and 2.11 x 10⁴ PIBs/ml, respectively. Similar results were also observed on 3rd instar *S. exigua*. The LT₅₀ value was reduced from 4.47 days to 3.96 days by WGA and to 3.94 days by Con A and the LD₅₀ value was reduced from 5.48 x 10⁵ PIBs/ml to 2.35 x 10⁵ PIBs/ml by WGA and to 2.23 x 10⁵ PIBs/ml by Con A. Our results have demonstrated the feasibility of using WGA and Con A in insect control with SeMNPV in the future.

(Key words: bioinsecticide, concanavalin A, *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (SeMNPV), viral synergist, wheat germ agglutinin)

*Corresponding author. E-mail: tywu@cycu.edu.tw