

斜紋夜蛾核多角體病毒台灣分離株之致病力與體內增殖之研究

段淑人*、高穗生、劉員良、鄭朵智 台灣省農業藥物毒物試驗所 生物藥劑系

摘要

自本地之斜紋夜蛾 (*Spodoptera litura* (Fab.)) 罹病幼蟲體內分離之核多角體病毒，經電子顯微鏡觀察其外形為多角體，平均直徑大小約為 $1.90\mu\text{m}$ 。每個多角體所含之病毒粒子數量一般約數十個，而每個病毒粒子內又含有數個長桿狀之核蛋白鞘。病毒感染寄主之細胞核，在其內複製增殖使細胞核腫脹破裂，故名為斜紋夜蛾核多角體病毒 (*Spodoptera litura* multiple nuclear polyhedrosis virus, SIMNPV)。此病毒對斜紋夜蛾幼蟲具頗高之致病力，以接種源飲入法測得1至6齡幼蟲之半致死濃度 (LC_{50}) 依序為 5.47×10^5 、 4.47×10^4 、 6.16×10^5 、 3.12×10^6 、 1.43×10^7 、以及 7.28×10^8 PIBs / ml。隨供試齡期之增加，幼蟲對病毒的感受性有下降之趨勢，且其半致死時間亦隨之加長。病毒在寄主幼蟲體內增殖量與幼蟲體重及接種濃度間有正相關。5齡幼蟲之病毒產量遠高於4齡者。在 30°C 下，接種後2至3天幼蟲體內病毒含量急遽上升，至5天達到最高峰。若於 35°C 下，雖可提前達到高峰，但因高溫加速幼蟲之死亡，而使罹病幼蟲之體重及病毒之最終產量不如在 30°C 下為高。每隻幼蟲以接種源飲入法飼餵 10^5 PIBs，之後置於 30°C 生長箱中，至第5天即收取全部病蟲，平均每隻病蟲可回收病毒 2.47×10^9 PIBs，為接種劑量之25,000倍。病毒液經冷凍乾燥後每克粉末含有 3.07×10^{10} PIBs。

關鍵字：斜紋夜蛾、核多角體病毒、致病力、半致死濃度、半致死劑量。

前言

斜紋夜蛾 (*Spodoptera litura* (Fab.)) 屬鱗翅目、夜蛾科，為本省重要之經濟害蟲。年發生八至十一世代，幼蟲為雜食性，取食十字花科蔬菜、瓜類、番茄、玉米、高粱、豆類、花卉、甘藷、蘆筍、芋頭及茶等數十

種經濟作物。由於成蛾交尾能力強、雌蟲產卵量高 (Ou-Yang and Chu, 1990; 1991)、且幼蟲食量大，害蟲一旦大發生時，即會造成農作物嚴重的損害。目前一般化學藥劑防治效果均不甚佳，且過量施撒又容易造成農藥殘毒問題。加上環保與生態保育之意識日漸高張，因此開發專一性強、安全性高且殺蟲

* 拖印本索取及論文聯繫之負責人

力強之生物性藥劑，以作為抑制害蟲棲群之猖獗，乃為植保研究重點。桿狀病毒(Baculovirus)中之核多角體病毒(nuclear polyhedrosis virus, NPV)對其特定寄主害蟲具有極高的致病力與寄主專一性，對人、畜、天敵均無毒害，不失為一安全有效的防治因子(Ignoffo, 1968; 1973)。在田間實際應用上已證實核多角體病毒之防治效果甚至比化學藥劑來得高(Smits *et al.*, 1987)，且有數種病毒已經商品化，如*Heliothis zea* NPV, *Orygia pseudotsugata* NPV, *Lymantria dispar* NPV, 及*Neodiprion sertifer* NPV(Agathos, 1991)。核多角體病毒經口進入寄主幼蟲腸道後，穿透腸壁至血腔中迅速且全面感染脂肪體細胞、表皮真皮層細胞等標的細胞之細胞核。由於病毒快速的增殖，致使細胞核腫大進而崩解，在罹病幼蟲死亡後，蟲體表皮破裂、並流出高濃度之病毒包含體(Whitlock, 1974; Huber and Miltenburger, 1986; Su, 1990)。而病毒接種濃度愈高，則死亡率愈高，潛伏期也愈短(Allen and Ignoffo, 1969; Tuan, *et al.*, 1989)。幼蟲對病毒之感受性亦隨著齡期之增長而降低，齡期愈高死亡率愈低，且死亡時間也明顯延後(Boucias *et al.*, 1980; Smits and Vlak, 1988)。即使病毒劑量未能在幼蟲化蛹前使其罹病死亡，而已感病之幼蟲在進入化蛹期時可能會形成不正常蛹，如翅腹銜接不全；或羽化後雄蛾之繁殖力減弱，影響下一代卵之孵化率，或造成下一代初齡幼蟲罹病死亡(Santiago-Alvarez and Vargas Osuna, 1988; Smits and Vlak, 1988)。核多角體病毒在寄主體內之增殖速率、及產量之高低，與寄主之生理狀況、幼蟲體重、接種劑量、培育溫度，以及罹病幼蟲收穫之時間等均有著極密切的關係(Shapiro, 1982; Smits and Vlak, 1988; Huang and Kao, 1994)。因此了解病

毒之特性、致病力，與各影響因子對病毒增殖量與速率之關係，進而掌握適當之條件，使病毒在最短之時間內，以良好的增殖速率達到最高產量，乃是病毒開發利用及大量生產流程建立前之先修課題。故計畫就台灣分離株斜紋夜蛾核多角體病毒之形態、接種劑量對寄主各齡期幼蟲之致病力、以及病毒在寄主體內增殖之數量與速率做初步研究。

材料與方法

一、斜紋夜蛾之大量飼育

以人工飼料(Hung and Hwang, 1988)繼代飼育採自霧峰鄉芋頭田之斜紋夜蛾幼蟲，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。幼蟲化蛹後即依腹部末端形態分雌雄，待羽化後再配成對繁衍子代。生長箱條件為 25 ± 1 °C, 12L: 12D, 65 ± 5 % R.H.。試驗蟲均採用第三代以後之健康幼蟲。

二、核多角體病毒的純化與冷凍乾燥

自本省霧峰鄉芋頭田中之罹病斜紋夜蛾幼蟲蟲體分離到的核多角體病毒，以接種源飲入法(Klein, 1978)將病毒懸浮液點滴於飼育杯杯壁上，接種健康的4齡初或5齡初幼蟲，二小時後再給予新鮮人工飼料，置於25°C恆溫生長箱中俟其發病，並於蟲體死亡之前收集病蟲。蟲體經研磨粗濾後即可獲得大量活化之病毒。再參考Tuan *et al.* (1994)的方法，利用連續蔗糖梯度離心(42%–62%)，以 $80,000 \times g$ 離心60分鐘，之後再以無菌水洗二次，以純化蟲體中的核多角體病

毒。而後以冷凍乾燥機(KINGMECH, FD24, 100atm, -55℃) 將病毒液經隔夜處理後乾燥之。

三、病毒包含體與粒子形態之觀察

參考Tuan *et al.* (1994)之方法，將病毒經超音波均勻打散後，進行陰染法將病毒包含體及病毒粒子、核蛋白鞘染色，並以Hitachi H-300 穿透式電子顯微鏡觀察其外部形態。另自病發死亡的蟲體中挑取病變的脂肪體，將之與8% agarose充分混合後，切成1mm 的小塊，進行病毒之超薄切片，再以Hitachi H-300穿透式電子顯微鏡觀察其內部結構。

四、病毒對斜紋夜蛾之致病力

將純化後之病毒以無菌水進行三倍系列稀釋，再以接種源飲入法以不同濃度之病毒懸浮液接種1至6齡幼蟲，同時以無菌水做為對照組，以測試各齡期幼蟲對病毒之感病性。每濃度之各重覆以30隻幼蟲進行試驗，每處理組至少重覆四次。所有之供試蟲均於接種前、初蛻後經隔夜飢餓處理。1齡幼蟲接種方式及量參考Tuan *et al.* (1994)之方法，2至6齡供試蟲則以單隻接種方式分別餵予1、2、3、10及15 μl 之病毒液。病毒液之濃度自 1.2×10^8 PIBs / ml起以三倍系列稀釋至 1.2×10^4 PIBs / ml。接種後供試蟲置於25℃生長箱內，連續觀察十天，並記錄幼蟲罹病死亡率。再將死亡率以對機數換算，分析“劑量-死亡率”線性迴歸關係，並求得病毒對各齡期幼蟲之半致死濃度(LC₅₀)(Finney, 1971)。同時以低於半致死濃度之病毒液接種6齡幼蟲，觀察經病毒選汰存活之老熟幼蟲之成功化蛹率、羽化率、及產卵量。

五、病毒在體內增殖之產量與速率

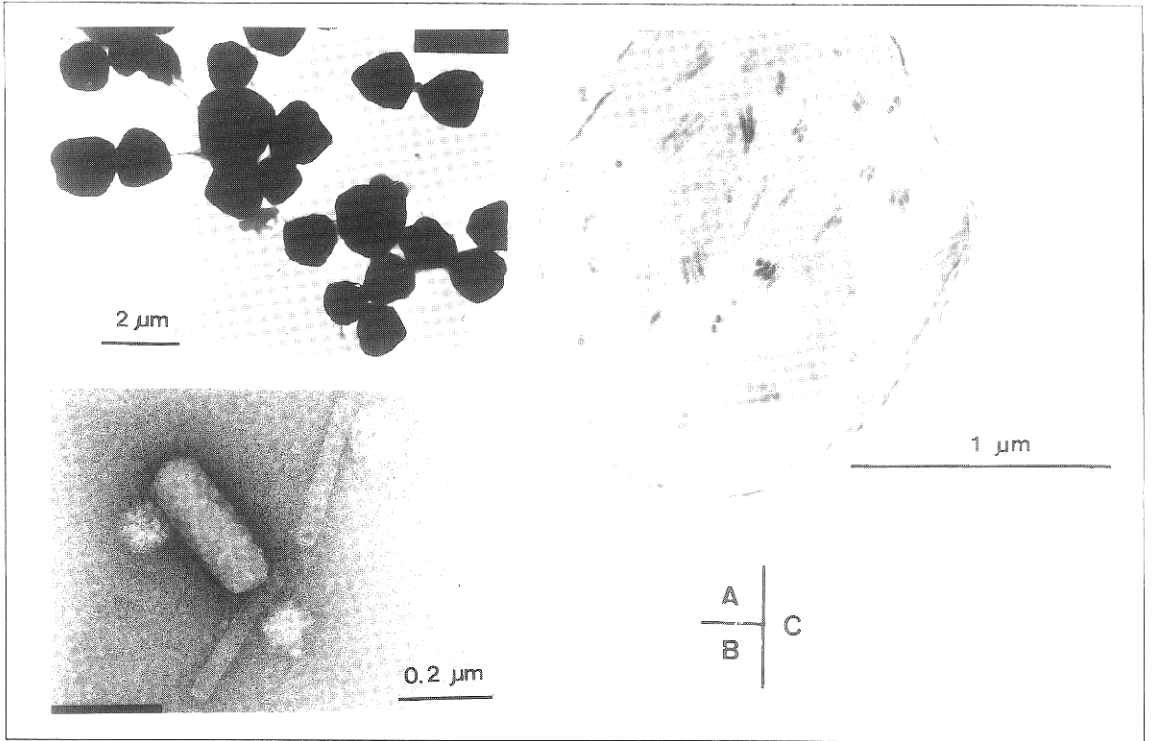
以體重均勻之4齡(10.4 ± 0.3 mg)及5齡(52.5 ± 3.8 mg)初蛻皮之健康幼蟲為供試蟲，幼蟲經16小時飢餓後，採用接種源飲入

法依幼蟲飲入接種液之能力，分別餵予3 μl 及10 μl 之病毒液，接種濃度有兩種： 10^6 及 10^7 PIBs / ml。接種後同時置於30及35℃恆溫生長箱中發病，並以無菌水餵予幼蟲做為對照組。每組處理40隻幼蟲，均重覆三次，採用單隻接種、培育及採樣。接種後逐日觀察記錄死亡率，並採用逢機取樣之方式，將蟲體秤重後再加入定體積之無菌水，以研磨器均質30分鐘後，以血球計數器於光學顯微鏡600倍下，計算每隻試驗蟲體內所含病毒包含體之量。此試驗連續進行十天，記錄幼蟲死亡率及體重，在逐日取樣期間，若幼蟲在被取樣前即先行罹病死亡者，則即刻收藏於-20℃，待取樣日到時再與其他蟲隻一併處理計算，以免蟲隻死亡後即崩解、病毒液流失被剩餘飼料及糞粒吸附、或乾涸於杯壁上，而影響計算病毒在蟲體內之確實增殖數量，同時為避免蟲隻逃逸而影響取樣蟲數，另準備一組同樣處理且逢機取樣設計之試驗組，以視需要替補。

結 果

一、斜紋夜蛾核多角體病毒之形態與構造

本省斜紋夜蛾病毒外形為多角體、不規則之球形或方形，包含體之大小差異頗大，平均直徑為 $1.90 \pm 0.27 \mu\text{m}$ (圖一A)。其中除了含有逢機排列、且大小不一的圓桿狀病毒粒子(virion)之外，其餘即為填充於病毒粒子間的多角體蛋白質(polyhedrin)。每個包含體所含之病毒粒子數量一般約數十個，而每個病毒粒子由一層包被(envelope)包裹住數個不等的核蛋白鞘(nucleocapsid)，其中又以含3-5個核蛋白鞘的病毒粒子最為普遍，多者可達8-9個(圖一B)，故名為multiple nuclear polyhedrosis virus，簡稱爲MNPV。核蛋白鞘則為細長桿狀，平均長度及寬度為



圖一 A.斜紋夜蛾核多角體病毒包含體外部形態。(6,000倍)。B.斜紋夜蛾核多角體病毒之病毒粒子及核蛋白鞘之外部形態。(72,000倍)。C.病毒包含體內含有數十個病毒粒子，每個病毒粒子中含有3-8個不等之核蛋白鞘。(40,600倍)。

Fig. 1. A. The morphology of a polyhedral inclusion body of SIMNPV. (6,000x); B. The morphology of virion and nucleocapsids of SIMNPV. (72,000x); C. Polyhedra occluding multiple enveloped virions. Usually 3-8 nucleocapsids are enveloped in each virion.(40,600x).

324×48 nm，兩端為平緩的圓弧形，且一端有電子密度較深之處(圖一C)。當包含體成熟時，位於最外圍的病毒粒子逐漸開始剝離，且留下大小不等的凹洞，有時亦可觀察到正在剝離的病毒粒子(圖一B)。

二、斜紋夜蛾核多角體病毒對幼蟲之致病力

斜紋夜蛾1至6齡之幼蟲均以接種源飲入法接種病毒懸浮液，累記十天之罹病死亡率，推算其半致死濃度(LC₅₀)依序為5.47×10⁵、4.47×10⁴、6.16×10⁵、3.12×10⁶、1.4×10⁷、以及7.28×10⁸ PIBs/ml。其中以1、2齡幼蟲的半致死濃度最低，6齡幼蟲所需濃度最高，其間濃度相差數千至數萬倍。若以各齡

幼蟲飲入病毒液的量來推算，可測得2至6齡幼蟲之半致死劑量間相差數十萬倍，幼蟲隨著齡期的增加，對核多角體病毒的半致死劑量亦隨之大幅升高。從各齡期之劑量-死亡率直線迴歸方程式中之斜率看來，幼蟲個體間對病毒感受性之差異亦隨著齡期之增加而增加(表一)。而幼蟲之發病死亡的時間又依病毒接種濃度之升高而加速。若以同一病毒濃度接種2至5齡幼蟲時，其半致死時間(LT₅₀)分別為5.79、7.74、7.86、及7.94天，即隨著供試齡期之增加，幼蟲發病死亡的時間亦延長(表二)。而感染病毒卻未死之幼蟲，其化蛹時期雖然較健康幼蟲明顯延長，但仍能夠

表一 斜紋夜蛾核多角體病毒對斜紋夜蛾各齡期幼蟲之半致死濃度、半致死劑量及劑量-死亡率直線迴歸方程式

Table 1. Concentration- and dosage-mortality responses of *Spodoptera litura* larvae to SIMNPV

Instar	LC ₅₀	Imbibed volume(μ l)	LD ₅₀	Dosage-mortality regression line	Coefficient value
	PIBs / ml		PIBs / larva		
2nd	4.47x10 ⁴	1.0	45	y=1.787x-3.311	r=0.985
3rd	6.16x10 ⁵	2.0	1,232	y=1.015x-0.876	r=0.933
4th	3.12x10 ⁶	3.0	9,360	y=0.837x-0.436	r=0.978
5th	1.43x10 ⁷	10.0	142,870	y=0.710x-0.080	r=0.999
6th	7.28x10 ⁸	15.0	10,920,000	y=0.667x-0.907	r=0.973

1) Recorded mortality until 10th day after inoculation, and corrected with Abbott's formula.

2) y= mortality in probits, x= log dose (PIBs / larva).

表二 不同接種濃度下斜紋夜蛾各齡期幼蟲之半致死時間

Table 2. LT₅₀ of 2nd- to 5th-instar larvae of *Spodoptera litura* inoculated with different concentrations of SIMNPV

Virus Conc. (PIBs / ml)	LT ₅₀ (days)			
	2nd-instar	3rd-instar	4th-instar	5th-instar
3.8 x 10 ⁴	9.93	—	—	—
1.2 x 10 ⁵	7.94	—	—	—
3.8 x 10 ⁵	6.89	>>10.00	>>10.00	>>10.00
1.2 x 10 ⁶	6.83	8.45	>10.00	>10.00
3.8 x 10 ⁶	6.37	8.16	9.61	9.86
1.2 x 10 ⁷	5.79	7.74	7.86	7.94
3.8 x 10 ⁷	—	7.38	7.41	7.46
1.2 x 10 ⁸	—	7.09	7.23	7.43

1) Cumulative larval mortality was recorded until 10th day post-inoculation, and corrected with Abbott's formula.

2) Inoculated with inoculum-drinking method, and incubated at 25°C.

順利化蛹。且由本試驗之初步觀察結果顯示，以低於10⁸ PIB / ml之數種低濃度病毒液接種6齡幼蟲，經培養一週後，未罹病死亡而進入蛹期者，其中正常蛹與不正常蛹之比例、蛹之羽化率、以及成蛾雌雄性比例，與當初病毒接種濃度之高低間之相關性不顯著；而每對成蛾三天內之每日平均產卵量卻有因病毒接種濃度之升高而減少之趨勢(表三)。

三、病毒在幼蟲體內增殖的產量與速率

以接種源飲入法餵予5齡初蛻幼蟲每隻10

μ l之10⁷ PIBs / ml病毒液，於30°C及35°C生長箱中發病，經逐日取樣研磨鏡檢發現，自接種後之第一天起至第四天期間，蟲體內病毒增殖之速率與產量均呈直線上升，且因溫度的升高而加速，但至第五天起，35°C之病毒產量有下降之趨勢，而後均低於30°C之病毒產量(圖二A)。若以4齡幼蟲為病毒增殖之供試蟲時，因蟲體體重僅為5齡幼蟲之五分之一，而能飲入之病毒液亦僅有3 μ l，故接種劑量相對僅有5齡幼蟲之三分之一強。在相同培育溫度下，4齡幼蟲體內病毒之增殖平均產量

表三 斜紋夜蛾6齡幼蟲於接種病毒後，存活幼蟲之正常化蛹率、成功羽化率、成蟲性別及成蛾產卵量

Table 3. The pupation, emergence, sex ratio, fecundity of *Spodoptera litura* 6th-instar larvae post viral infection

Treatment (PIBs / ml)	Normal pupation(%)	Successful emergence(%)	Sex ratio female / total	Eggs / female / day
0.0	98.57	100	0.468	300-350
3.3x10 ⁵	97.37	100	0.375	300-350
1.0x10 ⁶	100	100	0.462	300-350
3.3x10 ⁶	100	100	0.574	200-250
1.0x10 ⁷	100	100	0.500	150-200
3.3x10 ⁷	100	100	0.565	—

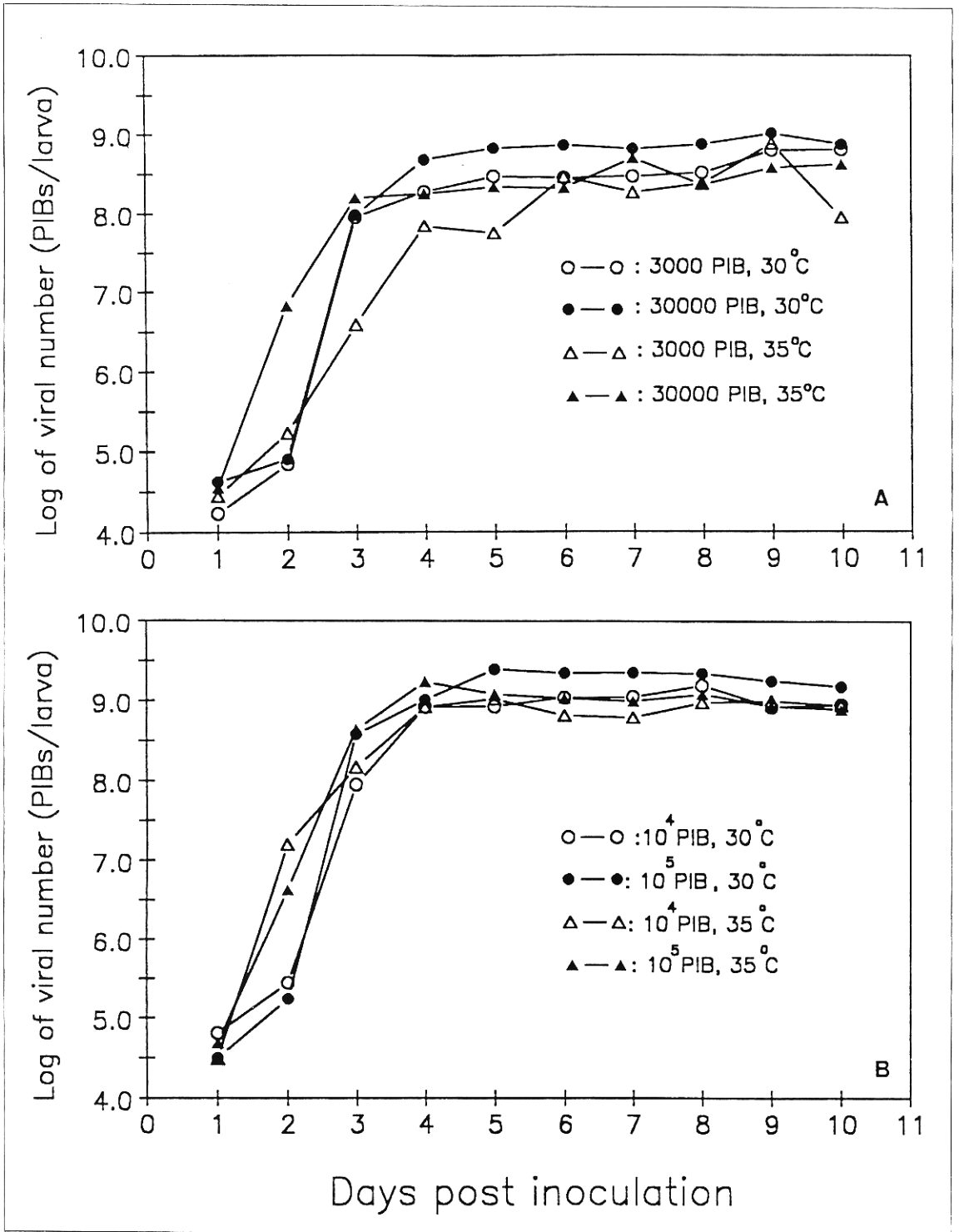
1) Inoculated with inoculum-drinking method, and incubated at 25°C.

較5齡幼蟲為低(圖二B)。就5齡幼蟲而言，接種後第五天達到病毒產量高峰，並在第六至第九天期間，因幼蟲罹病死亡而造成病毒的回收量稍減，經鄧肯氏分析無顯著差異。而4齡幼蟲在接種後第五天亦進入病毒產量之高峰期，並在第六至第十天期間病毒產量有上下波動之情形，雖在第九天之病毒量最高，但與第五天之病毒量間無顯著差異(表四)。在不同接種及培育條件下病毒增殖的產量亦有顯著的差異，得知病毒接種濃度之高低、培育溫度、與供試蟲齡期均對病毒的產量有所影響。其中以5齡幼蟲接種10 μl之10⁷ PIBs / ml病毒液，於30°C培養發病所得之病毒產量最高(表五)。隨感病幼蟲的生長，蟲體體重逐日增加，病毒的產量亦隨之大幅上升。感病幼蟲之體重較健康幼蟲為低，而35°C下幼蟲之體重雖提早到達高峰，但平均體重卻低於30°C(表六)。而4齡幼蟲的體重每日上升的差距雖較5齡幼蟲小許多，但仍可看出病毒之產量與感病幼蟲的體重之間存在著正相關關係(圖三)。在30°C下5齡幼蟲的體重呈直線成長至第五天達到體重的高峰，而病毒的產量亦隨之達到最高點，並自此時起因將進入化蛹期而體重開始銳減。若置於35°C下發病，則可提前達到體重與病毒產量之高峰，但卻均不及30°C來得高及穩定。在蟲體

逐漸化蛹後，病毒的產量不再上升，反而隨著體重的下降有稍減量的趨勢，並趨於平穩(圖四)。由於35°C之高溫會加速病毒在幼蟲體內增殖之速率，同時亦導致感病幼蟲提早死亡，並提高罹病幼蟲死亡率。在幼蟲罹病死亡率達到高峰期之前一天，即為病毒產量之高峰期，其後病毒產量亦不再增加(圖五)。因此高溫雖可促使病毒在幼蟲體內增殖之數量及早達到高峰，卻也阻礙了病毒在蟲體內持續增殖的發展空間，得知高溫的培育條件並不適合病毒的大量生產。病毒之最終產量與幼蟲之最高體重仍以30°C為佳。在供試蟲體健康情況良好、且飼料中加入適量之防腐劑之增殖條件下，經逐日鏡檢幼蟲體液，結果均未發現有雜菌污染或複合感染之情形。故綜合以上各因子看來，在人工大量繁殖核多角體病毒之初步策略上，擬以接種源飲入法餵予每隻5齡幼蟲10⁶ PIBs，置於30°C生長箱中培養至接種後第五天即收所有病蟲，研磨後以血球計數器測知每隻病蟲可回收(2.47±0.30)x10⁹ PIBs，經冷凍乾燥後每克粉末含有(3.07±0.24)x10¹⁰ PIBs。

討 論

斜紋夜蛾核多角體病毒對斜紋夜蛾幼蟲



圖二 核多角體病毒於30及35°C培育溫度下，在斜紋夜蛾4齡(A)及5齡(B)幼蟲體內之增殖速率。
 Fig. 2. The propagative rate of SIMNPV in 4th-(A) and 5th-instar(B) larvae of *Spodoptera litura* at 30 and 35°C.

表四 斜紋夜蛾4齡及5齡幼蟲經接種核多角體病毒後，在30°C下培養蟲體內病毒逐日增殖量之比較

Table 4. The comparison of daily virus yield by 4th- and 5th-instar larvae inoculated with 10^7 PIBs / ml at 30°C

Days post-inoculation	Virus yield ($\times 10^6$ PIBs / larva)	
	4th-instar	5th-instar
3	0.95 ± 0.92 bc A	3.80 ± 2.32 c A
4	4.77 ± 4.25 abc A	15.09 ± 8.63 b A
5	8.64 ± 4.00 a B	26.83 ± 4.25 a A
6	7.24 ± 2.68 ab A	19.30 ± 9.14 ab A
7	5.51 ± 2.04 abc A	17.39 ± 9.64 ab A
8	7.38 ± 6.60 ab A	17.18 ± 9.05 ab A
9	10.22 ± 2.07 a B	17.83 ± 1.21 ab A
10	7.36 ± 3.71 ab A	15.10 ± 1.75 b A

1) Means in each column followed by the same lower-case letter and in each row followed by the same capital letter are not significantly different ($p \geq 0.05$, DMRT).

表五 兩種濃度之核多角體病毒接種斜紋夜蛾4齡及5齡幼蟲，經30及35°C培育五天後，蟲體內病毒增殖量之比較

Table 5. The comparison of virus yield by 4th- and 5th-instar larvae treated with two viral concentrations and incubated at 30 and 35°C until 5th day post-inoculation.

Incubation temperature (°C)	Virus yield ($\times 10^6$ PIBs / larva)			
	4th-instar treated by		5th-instar treated by	
	10^6 PIBs / ml	10^7 PIBs / ml	10^6 PIBs / ml	10^7 PIBs / ml
30	3.9 ± 2.5 cd	8.6 ± 4.0 bc	8.6 ± 2.1 bc	26.8 ± 4.3 a
35	0.6 ± 0.1d	1.7 ± 1.3d	10.7 ± 0.7 b	10.7 ± 2.8 b

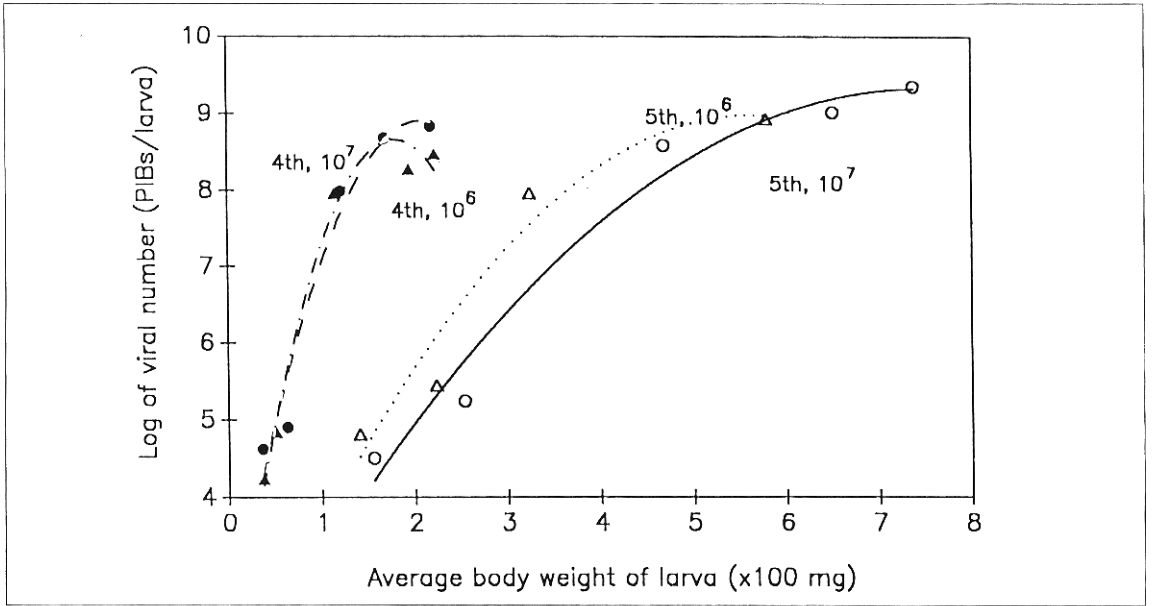
1) Means followed by the same letter are not significantly different ($p \geq 0.05$, DMRT).

表六 5齡感病幼蟲及健康幼蟲在30及35°C下發育之體重變化比較

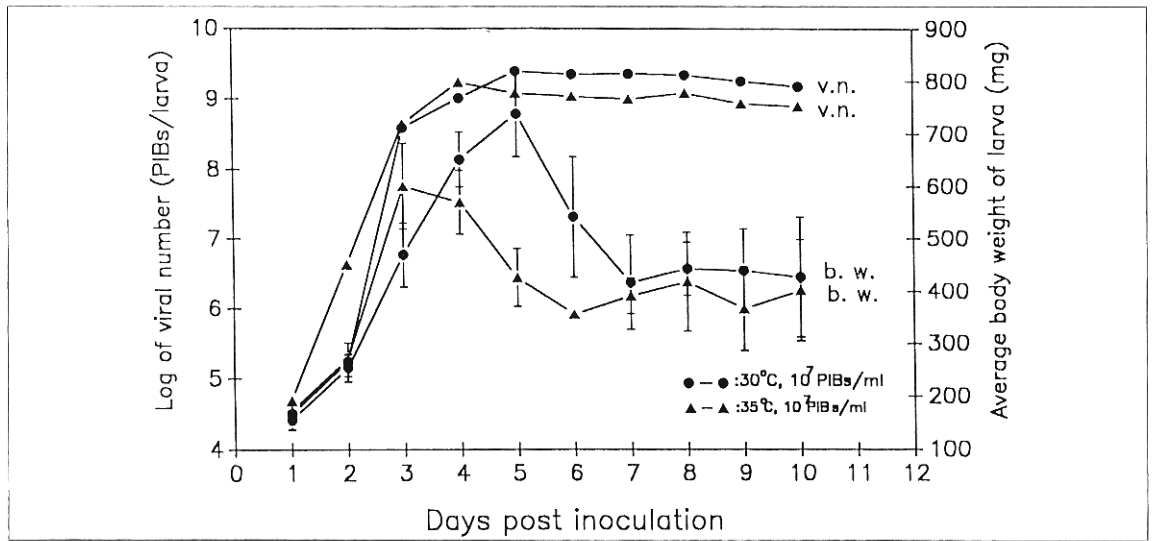
Table 6. The comparison of body weight of virus-infected and healthy 5th-instar larvae at 30°C and 35°C

Days post-inoculation	30°C		35°C	
	infected	control	infected	control
1	155.5 ± 17.8d	154.3 ± 16.0e	172.3 ± 16.0d	187.7 ± 5.2e
2	253.5 ± 26.1d	248.7 ± 17.6d	269.7 ± 31.8cd	297.3 ± 24.0d
3	469.4 ± 60.9c	539.3 ± 19.6c	600.8 ± 81.8a	796.0 ± 90.5a
4	651.5 ± 52.0ab	822.5 ± 30.9a	570.0 ± 61.0a	673.0 ± 99.5b
5	737.7 ± 80.4a	729.7 ± 99.1b	430.8 ± 54.8b	471.7 ± 67.3c
6	542.1 ± 115.0bc	451.3 ± 118.2c	355.7 ± 15.0bc	283.0 ± 24.8de
7	417.0 ± 90.3c	343.5 ± 16.6d	391.1 ± 34.3b	318.0 ± 29.8d
8	443.1 ± 50.2c	318.7 ± 6.0d	418.3 ± 82.6b	293.5 ± 46.7d
9	439.4 ± 79.7c	329.7 ± 33.1d	364.2 ± 80.1bc	279.3 ± 21.2de
10	427.4 ± 114.4c	345.7 ± 13.7d	401.8 ± 97.1b	318.3 ± 37.1d

1) Means in each column followed by the same letter are not significantly different ($p \geq 0.05$, DMRT).



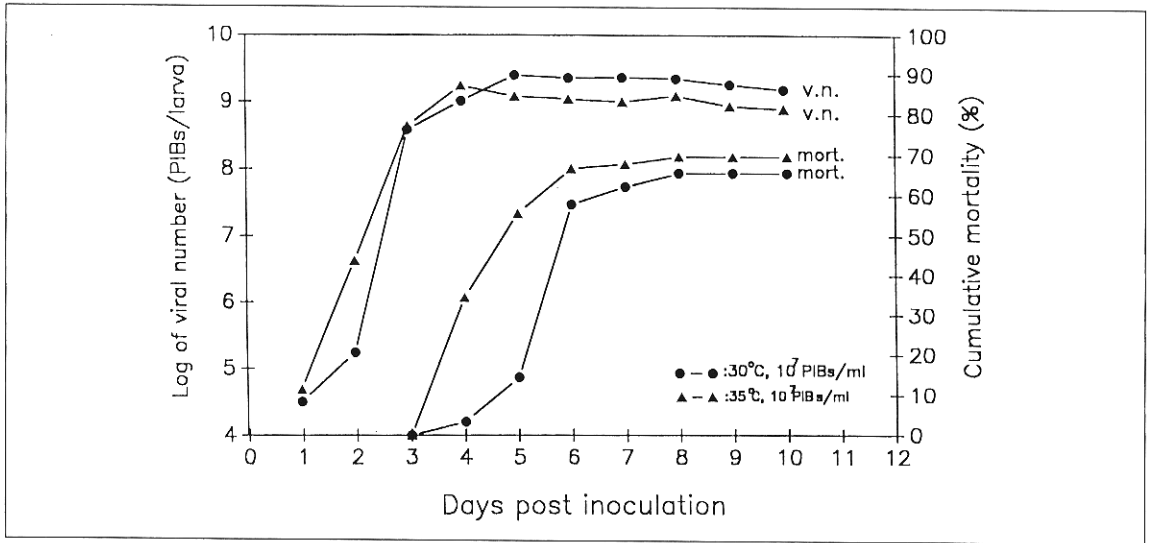
圖三 核多角體病毒於30°C培育溫度下，在斜紋夜蛾4齡及5齡幼體內之增殖速率與幼蟲體重成正相關。
 Fig. 3. The relationship between propagative rate of SIMNPV and average body weight in 4th- and 5th-instar larvae of *Spodoptera litura* at 30°C.



圖四 斜紋夜蛾5齡幼蟲經核多角體病毒兩種濃度之接種後，於30及35°C下之幼蟲平均體重與病毒產量之增減情形。
 Fig. 4. The average body weight and viral production by 5th-instar larvae of *Spodoptera litura* after inoculation with SIMNPV incubating at 30 and 35°C.

之致病力，乃隨著齡期之增加而銳減，此結果與玉米穗蟲(*Heliothis armigera*)、加州

苜蓿尺蠖蛾(*Autographa californica*)、甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)、及*Anticarsia*



圖五 斜紋夜蛾5齡幼蟲於接種核多角體病毒後，在30及35°C培養箱內，幼蟲之累積死亡率與病毒增殖量增減之情形。
 Fig. 5. The cumulative mortality and viral production by 5th-instar larvae of *Spodoptera litura* after inoculation with SIMNPV incubating at 30 and 35°C.

*gemmatalis*之幼蟲對病毒之感受性，亦隨著齡期之增長，有明顯下降之趨勢相同，且發病期也顯著延長。此現象或許與老齡幼蟲體重較重、體積較大之生物稀釋作用(Biomass dilution action)，及成熟免疫性(Mature immunity)有關(Boucias *et al.*, 1980; Salama *et al.*, 1986; Smits and Vlak, 1988; Tuan *et al.*, 1989; Tuan *et al.*, 1994)。由此可見，在以核多角體病毒為防治鱗翅日害蟲之幼蟲為害時，應以幼齡幼蟲期或卵期為較適當之防治對象。在田間應用之綜合防治策略上，由於感染核多角體病毒之雄蛾與正常雌蛾交尾後，其平均產卵量雖不受影響，但感病雄蛾之後代卵胚胎發育能力及孵化率則會顯著降低，而感病雄蛾之交尾次數亦較健康者為少(Santiago-Alvarez and Osuna, 1988)。本試驗中感病成蛾所產之卵量亦有因病毒接種濃度之升高而減少之趨勢，此等結果有助於提昇病毒的重要性與防治效益。而經LC₅₀及LC₇₅之病毒接種濃度選汰存活下來之

*Spodoptera frugiperda*幼蟲，其化蛹時之性比例、蛹重、成蟲羽化率均與對照組健康幼蟲間無顯著差異，且各指數之增減均亦與病毒接種劑量無關(Perelle and Harper, 1986)。此結果與本文相似，推測可能是幼蟲族群中有不同之基因庫，產生不同免疫系統，而經病毒選汰後所存活者均可克服病毒之侵害感染，而減輕不正常化之病癥，故與對照組之健康幼蟲間無顯著差異。Subrahmanyam and Ramakrishnan (1981)以高濃度(5.57×10^8 PIBs/ml)之核多角體病毒接種5齡幼蟲，經過二至三天之延長化蛹期後終究化蛹失敗，至於6齡幼蟲在化蛹時亦因高濃度之病毒而嚴重干擾了神經分泌細胞之活性，而使幼蟲蛻成爲中間型之不正常蛹。且因感病幼蟲延長了幼蟲期，而較健康幼蟲之取食量明顯增加，但因病蟲之發育不正常，其消化率及利用率指數均顯著降低，因此體重無顯著增加。

一般而言，會影響感病幼蟲生長發育之

任何因子均會影響病毒產量，例如寄主幼蟲之健康狀況、齡期、性別，病毒活性與接種之純度、劑量，飼育環境、飼料成份、飼育溫度、濕度、光照，接種方法、培育及收穫時間等(Shapiro, 1982)。本試驗乃以接種源飲入法接種幼蟲，與將病毒混入飼料中或污染飼料表面者不同，幼蟲取食病毒的時間僅需數秒至數分鐘，考慮之因子以接種濃度、接種齡期及培育溫度為主。因核多角體病毒在30°C時之感染率及增殖速率高於25°C，故以稍低於4齡及5齡幼蟲在25°C下之 LC_{50} 的病毒濃度，進行病毒在幼蟲體內增殖之研究，此濃度最終可造成60-70%之幼蟲死亡率。在感病幼蟲進入死亡高峰之前乃是收穫病蟲的最佳時機，因為病毒產量此時已達高峰，且因蟲體多半尚未潰爛、病毒不會流失，收穫病蟲之工作亦較為容易。供試蟲體愈健康、體重愈重、所產生之病毒產量愈高且愈純。在繁殖Gypsy moth核多角體病毒時，病毒之產量與飼料中含病毒之濃度、接種時幼蟲之體重無明顯之正相關，而隨著取食含病毒飼料時間與收穫時感病幼蟲體重之增加，病毒的產量亦明顯增加(Hedlund and Yendol, 1974)。本試驗亦證實收穫時之感病幼蟲體重與病毒產量間存在正相關關係。

甜菜夜蛾核多角體病毒在4齡幼蟲體內增殖之產量與接種濃度間無明顯之相關，而與培養溫度有正相關趨勢，在25至32°C間又以30°C下所得之病毒產量最高。同時在接種後第五天達到高峰之後產量即有稍降並持穩之現象。幼蟲最後體重與病毒增殖的數量呈正相關。感病幼蟲食物供給之足夠與否為病毒生產過程中重要影響因子(Huang and Kao, 1994)。在飼料中添加適量之防腐劑(抗真菌劑及抗細菌劑)有助於防止病毒在幼蟲體內增殖過程中之雜菌污染情形之發生。本試驗中以光學顯微鏡檢視病毒產量時，均未發現

有雜菌污染之情形。玉米穗蟲核多角體病毒在15°C至30°C間，隨著培育溫度之上升而病毒感染速率及增殖速率加速，導致潛伏期縮短、幼蟲罹病死亡率增加，但在35°C時半致死時延長，而幼蟲死亡率亦下降，可見病毒增殖之最適高溫為30°C(Tuan *et al*, 1989)。

*Pseudaletia unipuncta*核多角體病毒在37°C高溫時，雖在部份的寄主細胞內仍可見病毒核酸在進行合成，但多角體蛋白質之合成卻受到抑制，而阻礙病毒進行感染與增殖，即高溫可防止幼蟲罹病死亡。而在35°C的培育條件下雖然不會防礙病毒之感染與增殖，且可加速感染而造成幼蟲提早死亡，但仍會對幼蟲之正常生長有所傷害，而導致其他非病毒之幼蟲死因(Watanabe and Tanada, 1972)。本試驗中感病幼蟲培育於35°C時，幼蟲加速死亡且罹病死亡率增加，因此病毒缺少足夠的活細胞及時間進行增殖作用，故病毒產量反而不如30°C。高溫時病毒產量不理想之另一個原因可能是高溫會加速幼蟲生長發育，促使其提早化蛹，而在生理上逃避病毒之感染，同時體重亦因化蛹而減輕許多，使病毒增殖之空間與時間受限制。在35°C高溫下接種濃度對病毒產量無顯著影響，但在30°C下病毒產量受接種濃度之影響極大，其最高產量相差二至三倍。本試驗中亦發現在相同生長條件下同日之感病幼蟲的體重較健康幼蟲為輕，而在35°C高溫培育下，幼蟲生長加速、體重快速增加且提前化蛹，但總體重及病毒產量卻低於30°C培養下之重量。由此可見過高的溫度不僅不適合病毒複製增殖，亦不適合寄主幼蟲生長發育。

本試驗中以4齡蟲為接種病毒之供試蟲時，病毒增殖產量之高峰延至第九天，且病毒產量亦遠不如5齡幼蟲來得高。4齡幼蟲較5齡幼蟲蟲體小許多，因此收集病蟲之工作便更耗費人力，相對地人工成本提高。而接種

濃度不宜過高，以免蟲體提早罹病死亡，導致病毒產量受到負面影響。然而偏低的劑量除了會影響病毒的總產量，同時亦會延長病毒產量到達高峰所需之培育時間，在大量生產病原菌作為防治害蟲之利器時，人工、材料與時間成本應以經濟為原則。因為病毒增殖的數量乃與幼蟲之體重有密切的關係，蟲體肥胖之幼蟲相對地體內之病毒產量亦較瘦小者為多，其間存在一種正相關關係。在良好的生長環境下斜紋夜蛾幼蟲1至4齡之自殘行為很輕微，故當孵化為一齡幼蟲時即可集體飼育於布丁杯中，直到幼蟲長至4齡末將蛻為5齡時，才挑起單隻飼育、並進行病毒接種增殖試驗。如此可節省養蟲人力及飼育空間，又可在接種後短時間內回收大量且純度高之病毒。綜觀以上各因子看來，在人工大量繁殖核多角體病毒之初步策略上，擬以接種源飲入法餵予每隻5齡幼蟲 10^7 PIBs/ml核多角體病毒液，置於30℃生長箱中培養至接種後第五天即回收所有病蟲，每隻幼蟲增殖病毒之產量相當高，為接種時之25,000倍。本文已證實斜紋夜蛾核多角體病毒台灣分離株對斜紋夜蛾幼蟲具有相當高的致病力，且可利用室內長期飼育之幼蟲，順利進行該病毒大量生產之工作；故開發該病毒做為防治斜紋夜蛾之微生物殺蟲劑應為可行之途徑。

誌 謝

本試驗承蒙行政院農業委員會83-科技-1.3-糧-24(39)經費補助，國立中興大學昆蟲學系侯豐男教授及郭美華老師之協助，本所林秀昭、林姿瑩小姐提供試驗蟲隻，以及劉雅慧小姐幫忙計算蟲體內病毒含量，使得試驗順利完成，在此一併誌謝。

參考文獻

- Agathos, S. N.** 1991. Mass production of viral insecticides. pp.217-235. in: K. Maramorosch, ed. Biotechnology for Biological Control of Pests and Vectors. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Allen, G. E., and C. M. Ignoffo.** 1969. The nucleopolyhedrosis virus of *Heliothis* quantitative in vivo estimates of virulence. J. Invertebr. Pathol. 13: 378-381.
- Boucias, D. G., D. W. Johnson, and G. E. Allen.** 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.
- Finney, D. J.** 1971. Probit Analysis. 3rd ed. Cambridge Univ. Press. London. pp.333.
- Hedlund, R. C. and W. G. Yendol.** 1974. Gypsy moth nuclear polyhedrosis virus production as related to inoculating time, dosage, and larval weight. J. Econ. Entomol. 67: 61-63.
- Huang, L. H., and S. S. Kao.** 1994. Production of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus in larvae. Chinese J. Entomol. (in press) (In Chinese)
- Huber, J., and H. G. Miltenburger.** 1986. Production of pathogens. pp. 167-181. in: J. M. Franz, ed. Biological Plant and Health Protection. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart, New York.

- 341pp.
- Hung, C. C., and J. S. Hwang.** 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. pp. 50-52. (In Chinese).
- Ignoffo, C. M.** 1968. Specificity of insect viruses. Bull. Entomol. Soc. Am. 14: 265-276.
- Ignoffo, C. M.** 1973. Development of a viral insecticide: Concept to commercialization. Exp. Parasitol. 33: 380-406.
- Klein, M.** 1978. An improved peroral administration technique for bioassay of nucleopolyhedrosis viruses against Egyptian cotton worm, *Spodoptera littoralis*. J. Invertebr. Pathol. 31: 134-136.
- Ou-Yang, S. C., and Y. I. Chu.** 1990. Biology of the tobacco cutworm (*Spodoptera litura* (F.))—II. Longevity and mating ability of adult. Chinese J. Entomol. 10: 27-36. (In Chinese).
- Ou-Yang, S. C., and Y. I. Chu.** 1991. Biology of the tobacco cutworm (*Spodoptera litura* (F.))—IV. Copulation and oviposition of female paired for three days. Chinese J. Entomol. 11: 39-47. (In Chinese).
- Perelle, A. H., and J. D. Harper.** 1986. An evaluation of the impact of sublethal dosages of nuclear polyhedrosis virus in larvae on pupae, adults, adult progeny of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. J. Invertebr. Pathol. 47: 42-47.
- Salama, H. S., S. M. Moawed, and M. I. Megahed.** 1986. Effect of nuclear polyhedrosis virus on the cotton bollworm, *Heliothis armigera* (Hubner). J. Appl. Entomol. 102: 123-130.
- Santiago-Alvarez, C., and Vargas Osuna, E.** 1988. Reduction of reproductive capacity of *Spodoptera littoralis* males by a nuclear polyhedrosis virus (NPV). J. Invertebr. Pathol. 52: 142-146.
- Shapiro, M.** 1982. In vivo mass production of insect virus for use as pesticides. pp. 463-492. in: E. Kustak, ed. Microbial and Viral Pesticides. Marcel Dekker Inc. New York. 720pp.
- Smits, P. H., and J. M. Vlák.** 1988. Biological activity of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus against *S. exigua* larvae. J. Invertebr. Pathol. 51: 107-114.
- Smits, P. H., M. van de Vrie, and J. M. Vlák.** 1987. Nuclear polyhedrosis virus for control of *Spodoptera exigua* larvae on glasshouse crops. Entomol. Exp. Appl. 43: 73-80.
- Su, C. Y.** 1990. Histopathological studies of *Spodoptera litura* infected by nuclear polyhedrosis virus. Chinese J. Entomol. 10: 61-67. (In Chinese)
- Subrahmanyam, B., and N. Ramakrishnan.** 1981. Influence of a baculovirus infection on molting and food consumption by *Spodoptera litura*. J. Invertebr. Pathol. 38: 161-168.

- Tuan, S. J., L. C. Tang, and R. F. Hou.** 1989. Factors affecting pathogenicity of NPV preparations to the corn earworm, *Heliothis armigera*. *Entomophaga* 34: 541-549.
- Tuan, S. J., S. S. Kao., and D. J. Cheng.** 1994. Histopathology and pathogenicity of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus isolated in Taiwan. *Chinese J. Entomol.* 14: 33-45. (In Chinese).
- Watanabe, H., and Y. Tanada.** 1972. Infection of a nuclear-polyhedrosis virus in armyworm, *Pseudaletia unipuncta* Haworth (Lepidoptera: Noctuidae), reared at a high temperature. *Appl. Entomol. Zool.* 7: 43-51.
- Whitlock, V. H.** 1974. Symptomatology of two viruses infection *Heliothis armigera*. *J. Invertebr. Pathol.* 31: 48-56.

收件日期：1994年9月21日

接受日期：1994年11月29日

Pathogenicity and propagation of *Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus isolated in Taiwan

Tuan, S. J.*, Kao, S. S., Leu, U. L., and Cheng, D. J. Biopesticide Department, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Wufeng, Taichung Hsien, Taiwan 41301, R.O.C.

ABSTRACT

A nuclear polyhedrosis virus (SIMNPV) was isolated from a single larva of the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Fab.), in Wufeng, Taiwan. Electron micrographs showed that the polyhedra were irregularly measuring ca. 1.90 μm in diameter, and that the virion contained several nucleocapsids within the envelope. The virion is rod-shaped, with parallel sides and round ends. The nucleocapsid is elongated with parallel sides and straight ends, measuring 324 x 48 nm. This SIMNPV isolate was highly pathogenic to *S. litura* larvae, with LC_{50} values being 5.47×10^5 , 4.47×10^6 , 6.16×10^5 , 3.12×10^5 , 1.4×10^7 , and 7.28×10^6 PIBs/ml for the 1st to 6th instar, respectively, as assayed by inoculum-imbibing method. The LT_{50} values of inoculated larvae were also delayed as the larvae were getting older. Thus *S. litura* larvae became less susceptible to SIMNPV with age. Polyhedra of SIMNPV were propagated in 4th- and 5th-instar larvae by the inoculum-imbibing method. The viral yield was compared, by producing at various inoculum dosages, incubated at 30 and 35°C. The number of polyhedra produced was positively correlated with larval weight and inoculum dosage. Higher incubation temperature resulted in higher larval mortality. The larvae were killed before reaching maximum body weight, resulting in lower yields of the virus when incubated at higher temperatures. The polyhedra could be detected one day to post-inoculation (pi), and increased rapidly on day 2-3 (pi), reaching the highest level production on day 5. The maximum number of polyhedra was 2.47×10^9 PIBs per larva, and 3.07×10^{10} PIBs per gram after lyophilization.

Key words: *Spodoptera litura*, nuclear polyhedrosis virus, SIMNPV LC_{50} , LD_{50} , LT_{50}

*Correspondence / reprint request address