

# 台灣甜菜夜蛾核多角體病毒形態與致病力之研究

段淑人、高穗生、鄭朵智 台灣省農業藥物毒物試驗所生物藥劑系 台中縣霧峰鄉光明路 11 號

## 摘 要

自台灣埔里滿天星上甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 病蟲體內分離之核多角體病毒，經穿透式電子顯微鏡觀察該病毒外形為不規則且大小不均一的多角體，平均直徑為  $1.05 \pm 0.21 \mu\text{m}$ ，在每一病毒粒子中含有一至六個長桿狀之核蛋白鞘，其中以包含 2-4 個為最常見。每個核蛋白鞘之大小平均約為  $285 \times 48 \text{ nm}$ ，兩端為平緩的圓弧形。由電子顯微鏡及組織病理切片之觀察可證實此病毒為甜菜夜蛾核多角體病毒 (SeNPV)。核多角體病毒對本省甜菜夜蛾幼蟲具有高度之致病力，以接種源飲入法測得一至五齡幼蟲之半致死濃度 ( $\text{LC}_{50}$ ) 依序為  $1.6 \times 10^5$ ， $6.9 \times 10^4$ ， $4.1 \times 10^4$ ， $3.7 \times 10^5$  及  $5.2 \times 10^6$  PIBs / ml，並推算其半致死劑量 ( $\text{LD}_{50}$ ) 分別為 4、23、57、1,219 及 47,025 PIBs / larva，顯示隨著幼蟲齡期之增長，其對病毒之感受性亦明顯下降。而罹病幼蟲經以組織切片觀察，發現中腸細胞、脂肪體細胞及表皮細胞等細胞核均有明顯的腫大病變現象，病毒大量複製後導致細胞及組織崩解。

**關鍵詞：**甜菜夜蛾、核多角體病毒、致病力、組織病理學。

## Histopathology and Pathogenicity of *Spodoptera exigua* Nuclear Polyhedrosis Virus Isolated in Taiwan

Shu-Jen Tuan, Suey-Sheng Kao, Dor-Jih Cheng Biopesticide Department, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Wufeng, Taichung Hsien, Taiwan 41301, R.O.C.

## ABSTRACT

A nuclear polyhedrosis virus (SeNPV) was isolated from a single larva of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hubner), in Taiwan. Electron micrographs showed that the polyhedra were irregular measuring ca.  $1.05 \pm 0.21 \mu\text{m}$  in diameter, and that the virion contained one to six nucleocapsids within the envelope. The virion is rodshaped, with parallel sides and round ends. The nucleocapsid is elongated with parallel sides and straight end, measuring  $48 \times 285 \text{ nm}$ . This SeNPV isolate is highly pathogenic to *S. exigua* larvae, its  $\text{LC}_{50}$  values are  $1.6 \times 10^5$ ,  $6.9 \times 10^4$ ,  $4.1 \times 10^4$ ,  $3.7 \times 10^5$ , and  $5.2 \times 10^6$  PIBs / ml for first to fifth instar, respectively, as assayed according to an inoculum-imbibing method. The  $\text{LD}_{50}$  values were estimated to be 4; 23; 57; 1,219; and 47,025 PIBs / larva for the respective instars, demonstrating that beet armyworm larvae become less susceptible to SeNPV with age. Histological sections showed that the nuclei of midgut, fat body, and epidermal cells were swollen after inoculation, followed by cell lysis and tissue disintegration.

**Key words:** *Spodoptera exigua*, nuclear polyhedrosis virus, SeNPV, pathogenicity, histopathology.

## 前 言

甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua* Hubner)是鱗翅目夜蛾科害蟲，廣佈於本省花卉、蔬菜及雜糧作物田，幼蟲嚴重為害菊花、滿天星、桔梗、向日葵、十字花科蔬菜、青葱、番茄、玉米、蘆筍、豆類、草莓及瓜果等四十餘種作物，屬重要之雜食性害蟲(Chen and Chang, 1989)。其對一般化學藥劑極易產生抗藥性，加上幼蟲喜愛藏匿於花苞或蔥管內，藥劑不易直接接觸蟲體，故造成防治上極大的困擾(Cobb and Bass, 1975; Trumble and Baker, 1984)。又因為化學藥劑經年累月的頻繁使用，容易造成自然生態平衡的破壞，與殘留農藥的虞慮，使得非化學藥劑防治方法的開發與利用益顯重要。而核多角體病毒(nuclear polyhedrosis virus, NPV)對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, 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, *Orgyia pseudotsugata* NPV, *Lymantria dispar* NPV, 及 *Neodiprion sertifer* NPV (Agathos, 1991)。核多角體病毒屬於桿狀病毒科(Baculoviridae)，其病毒粒子(virion)呈桿狀，粒子中包含一個或2-8個核酸蛋白鞘(nucleocapsid)，鞘內含有雙股環狀去氧核糖核酸(dsDNA) (Tinsley and Kelly, 1985)。病毒經口進入幼蟲中腸後，經鹼性腸液及酵素作用使得病毒粒子自包含體內釋出，並穿透腸壁至血腔中感染脂肪體細胞、表皮真皮層細胞、氣管鞘、神經鞘、腸壁細胞等等，由於病毒快速的增殖致使細胞核腫大進而崩解，造成幼蟲體液混濁，罹病

幼蟲死亡後，蟲體破裂潰爛而流出大量高致病力之包含體(Hunter and Hall, 1968; Whitlock, 1974; 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)。一般而言，不同種類的病毒通常只針對其特定的寄主昆蟲致病，專一性極高(Ignoffo, 1968)，而且即使同一種寄主昆蟲的病毒，但源自不同地方之分離株(geographic isolate)，對寄主昆蟲之致病力亦不相同(Caballero, *et al.*, 1992)。採自本省南投縣埔里鎮滿天星花埔中之罹病甜菜夜蛾，經分離純化得到之核多角體病毒，對甜菜夜蛾四齡幼蟲具有高致病力，且已建立大量生產流程(黃莉欣、高穗生，未發表)。本文就此病毒形態之鑑定、對甜菜夜蛾各齡期幼蟲之致病力，與組織病理學做進一步的了解，期能供開發本土微生物製劑。

## 材料與方法

### 一、蟲源的飼育

由桃園大園鄉附近青蔥田採回的甜菜夜蛾幼蟲，於試驗室內以半合成人工飼料(Hung and Hwang, 1988)，繼代飼育於控溫  $25 \pm 1$  °C， $70 \pm 5$  % 相對濕度，12 小時光照的定溫箱中，並於第三代以後選擇健康蟲體進行試驗。

### 二、核多角體病毒的來源及分離

自本省南投縣埔里鎮滿天星花圃中之罹病甜菜夜蛾幼蟲蟲體分離到的核多角體病毒，以飲入法將病毒懸浮液點滴於飼育杯杯壁上，餵飼健康的四齡初幼蟲，2 小時後再給予新鮮人工飼料(Klein, 1978)。於接種後第

六天起至第九天止，連續收集感染病毒的死蟲。並參考 Caballero, *et al.*(1992)的方法，利用不連續蔗糖梯度離心，以純化病蟲體中的核多角體病毒。並以 30% (w/v) 蔗糖液，以  $11,200 \times g$  離心 30 分鐘。收集沉澱物，以 0.1 M Tris-HCl pH7.2 緩衝液懸浮，再經 42-62% 蔗糖兩段式糖梯以  $80,000 \times g$  離心 60 分鐘。病毒包含體可自 42% 及 62% 兩層糖梯的界面中收集。再用無菌水懸浮經  $25,200 \times g$  離心 10 分鐘。如此重覆 2-3 次即可得到純度極高之病毒多角體。

### 三、病毒粒子的純化

將純化出來的病毒包含體經超音波打碎 1 分鐘後，加入三分之一體積的緩衝液(0.3 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.5 M NaCl, 0.03 M EDTA, pH 10.5) 於 37 °C 水浴中作用 16 小時，之後加入一倍體積的蒸餾水將未溶解的包含體以  $500 \times g$  低速離心 1 分鐘。上清液則以 36-56% 連續糖梯離心  $80,000 \times g$  離心 60 分鐘(5 °C)，收集白色環帶部分即為病毒粒子。再以蒸餾水懸浮，經  $80,000 \times g$  離心 60 分鐘。沈澱物以 10 mM Tris / HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5 buffer 懸浮，並貯於 4 °C，以備電子顯微鏡觀察用。

### 四、純化病毒之電子顯微鏡觀察法

1. 將純化出來的包含體經超音波均勻打散後，取 10 ul 的病毒液加入等量的 0.1% Bovine serum albumin，於蠟膜上充分混合，並將銅網覆蓋於其上作用 10 分鐘，之後將銅網上多餘的水分以濾紙吸乾。再將吸覆過的銅網覆蓋於 1% 磷鎢酸(PTA)上作用 10 分鐘，最後以蒸餾水滴洗 10 秒。病毒粒子則以 2.5% uranyl acetate 染 15 分鐘後，以蒸餾水稍加滴洗，即以 Hitachi H-300 穿透式電子顯微鏡觀察及照像。

#### 2. 細胞中病毒之觀察

1) 樣品的處理及固定：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 1 mm 的小塊，置於稱量瓶中，加入 2.5% glutaraldehyde (in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2, 4 °C) 的前固定液中，固定 2 小時。之後以含 0.25 M 的蔗糖—二甲次砷酸緩衝液 (0.25 M sucrose in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2) 浸洗三次，每次 15 分鐘。再以 2% 的四氧化錳 (osmium tetraxide in 0.1 M cacodylate buffer, 4 °C) 進行後固定 2 小時，然後用常溫之二甲次砷酸緩衝浸洗三次，每次 15 分鐘。

2) 脫水及包埋：以序列酒精進行脫水，每一種酒精濃度二次，每次 15 分鐘。最後換上環氧丙烷 (propylene oxide)，15 分鐘二次。置換時膠體與環氧丙烷以 1:2 的體積比漸次置換，每次 2 小時，直到純膠中，以低速振盪隔夜。再換一次純膠 2 小時後，進行包埋。

3) 切片、染色及觀察：將所得的樣品修成 0.2×0.3 mm 之梯形，經超薄切片 (Sorvall MT2-B) 處理，將所得的 ribbon 黏附於銅網上，經 2.5% uranyl acetate 水溶液染 20 分鐘，以蒸餾水滴洗 10 秒。再以 lead citrate 染 12 分鐘，蒸餾水滴洗 10 秒，並以濾紙將多餘的水分吸乾。將銅網置於 grid holder 中，保存於乾燥箱中備用。以 Hitachi H-300 穿透式電子顯微鏡觀察。

#### 五、核多角體病毒對甜菜夜蛾幼蟲的致病力

以接種源飲入法為接種方式，接種濃度及接種量則因蟲齡大小而有異。1) 初齡蟲的接種：初齡蟲體弱小，故以 24 孔培養盤為接種容器，每孔加入 5 ul 之病毒液，再接入 5 隻剛孵化的一齡幼蟲，2 小時後再將所有的幼蟲移入 50 孔培養盤 (每孔直徑 3 cm × 高 2.5 cm)，每孔 5 隻，再餵予人工飼料。三天後，待蟲體發育為二齡蟲時再予以單隻飼育，連續觀察七天並記錄死亡率。2) 其他各

齡蟲體的接種：挑取將蛻皮的蟲隻，並飢餓處理 16 小時之後再飼予病毒液，各齡蟲 (2、3、4 及 5 齡) 的飲入量分別為 1、2、3 及 4 ul，飲入二小時後，再分別給予飼料，並單隻飼育。觀察七天，並記錄每天的死亡蟲數。所得幼蟲罹病死亡率再以對數換算，分析劑量—死亡率線性迴歸關係 (Finney, 1971)。

#### 六、罹病幼蟲組織切片法

取四齡初蛻且經過飢餓 16 小時的健康幼蟲，單隻餵予高濃度 ( $10^8$  PIBs/ml) 之病毒懸浮液 (3 ul/larva)，再隔二小時後，給予新鮮無毒之人工飼料，置於 25 °C, 12L:12D 之生長箱內培養。取接種病毒後第三、四、五天的蟲體置於固定液中 (福馬林：醋酸：70% 酒精 = 1:1:20)，固定 12 小時後，將其頭及尾部切除，之後再固定 8 小時。以序列酒精進行脫水，再以酒精與二甲苯 1:1 的溶液置換一次，純二甲苯一次，再以二甲苯與石蠟成 1:1 之體積比於 45 °C 的烘箱中浸漬隔夜，最後換成純蠟並使二甲苯揮發，浸漬隔夜即可進行包埋及切片。厚度為 4 μm，以 Hamm (1966) 的方法，利用 Azocarmin G 及 counter-stain solution (1% phosphotungstic acid, 0.1% aniline blue, 0.5% orange G, 0.2% fast green FCF) 各染色 15 分鐘，即可針對含核多角體病毒的細胞核染成明顯的鮮紅顏色，可與正常細胞區別。

## 結 果

#### 一、甜菜夜蛾核多角體病毒電子顯微鏡之觀察

於穿透式電子顯微鏡下，利用陰染法觀察，發現病毒包含體為多邊且不規則的球形或方形。其形狀及大小均有明顯的差異，平

均直徑約為  $1.05 \pm 0.21 \mu\text{m}$ 。完整的包含體電子束無法穿透(Fig. 1A)。當包含體中的病毒粒子剝離後，可見空缺的痕跡部分(Fig. 1F)。病毒包含體經強鹼作用後，可將包含病毒粒子之多角蛋白溶解。經穿透式電子顯微鏡觀察的結果，可見大部分的病毒粒子亦被鹼溶開(Fig. 1B)，呈現出裸露的核蛋白鞘。而未被溶解的病毒粒子為粗桿狀；核蛋白鞘則為細長桿狀，平均長度及寬度為  $0.29 \mu\text{m} \times 0.05 \mu\text{m}$ (Fig. 1C)，兩端為平緩的圓弧形，且一端有電子密度較深之處。自罹病蟲體中取出病變之脂肪體細胞，由電子顯微鏡圖片可見病毒包含體為不規則的多角體，但其形狀及大小變異頗大。包含體中除了含有隨機排列且大小不一的圓桿狀病毒粒子之外，其餘即為填充於病毒粒子間的多角體蛋白，其以局部平行的走向整齊排列成格子狀，且其中分佈著許多顆粒狀物質，而呈現出不同的電子密度(Fig. 1D)。而病毒粒子是由一層包被(envelope)包裹住 1-6 個不等的核蛋白鞘所組成(Fig. 1E)，其中又以含 2-4 個核蛋白鞘的病毒粒子最為普遍，因此本省甜菜夜蛾核多角體病毒(SeNPV)乃為混合包被型(Mixed enveloped NPV)。在電子顯微鏡觀察下，病毒粒子的包衣是一層電子密度較淡的物質，而核蛋白鞘則是電子密度較深的部位，也是整個包含體中最易辨別的部位(Fig. 1D)。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(Fig. 1F)，有時亦可觀察到正在剝離的病毒粒子(Fig. 1G)。

## 二、甜菜夜蛾核多角體病毒感染幼蟲之組織病理切片

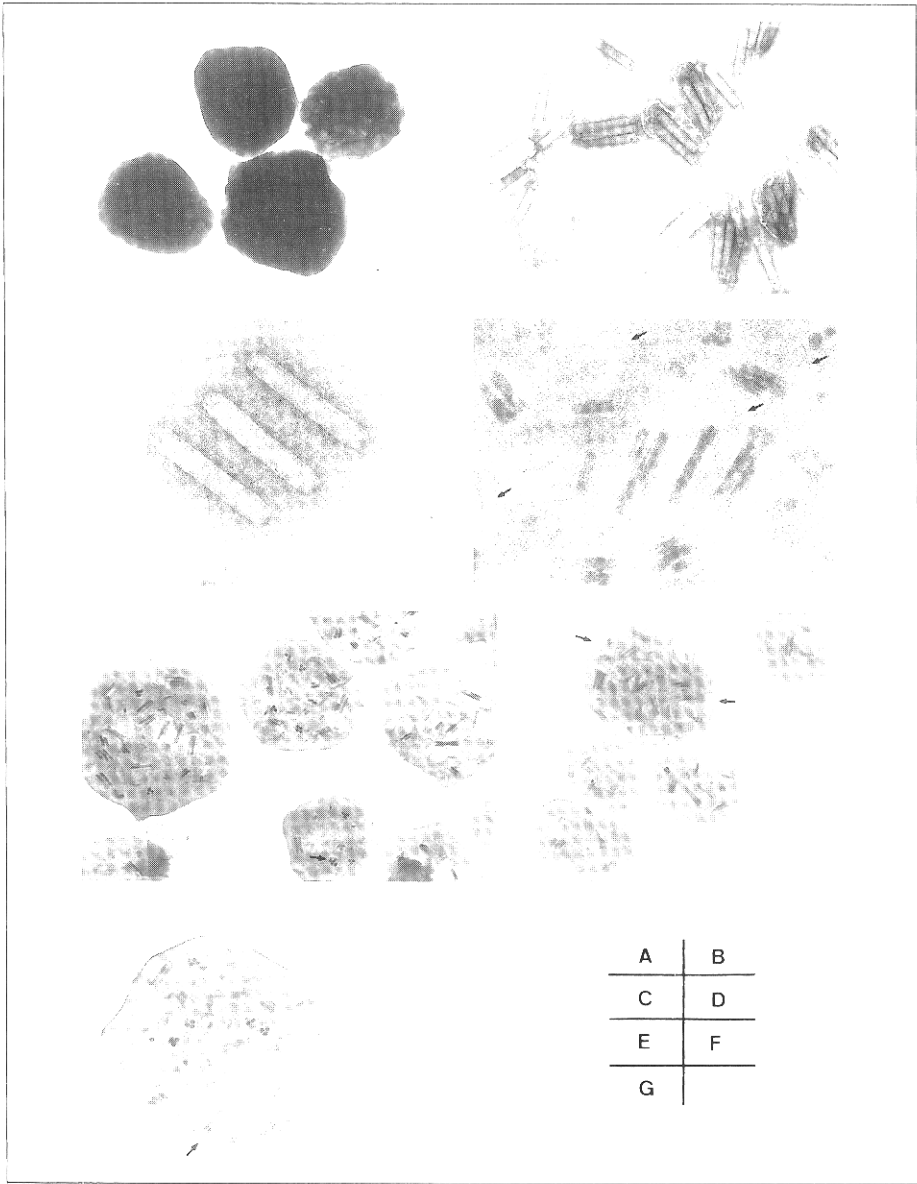
甜菜夜蛾三齡幼蟲飲入病毒懸浮液之後第四天起，蟲體之顏色變淡、體節稍腫脹、行動較正常蟲隻為緩、且有食慾降低的現象。第五天之後罹病蟲體表皮變薄且發亮，

體節嚴重腫脹，常趴在飼料塊上、頭部下垂，隨後會自口中流出體液，而蟲體亦開始死亡，隨即體壁潰爛破裂並流出膿汁。也有部分的罹病幼蟲爬到飼育杯的杯壁或杯蓋上，以腹部的偽足附著，頭、胸部下垂，呈倒吊狀死亡(Fig. 2G)。將飲入高濃度病毒懸浮液的四齡幼蟲，鏡檢發現接種後第三天之罹病幼蟲，其脂肪體細胞與表皮真皮層細胞已有病毒，由於病毒在寄主細胞核內複製，而導致細胞核腫大的明顯病徵(Fig. 2B)與正常細胞核(Fig. 2A)有顯著的差異。接種後四天的病蟲其管鞘及中腸細胞之細胞核亦有輕微腫脹的病變現象，中腸柱狀細胞與脂肪體細胞出現空胞，且大多數細胞膜之間隔已破壞(Fig. 2C, 2D)。至第五天後罹病幼蟲體內充滿大量的病毒粒子及包含體，此時所有細胞及組織均因病毒之感染而崩解，體腔僅由一層薄弱的表皮細胞包裹著，且其內並充滿病毒包含體(Fig. 2E, 2F)。

## 三、甜菜夜蛾核多角體病毒對各齡期幼蟲之致病力

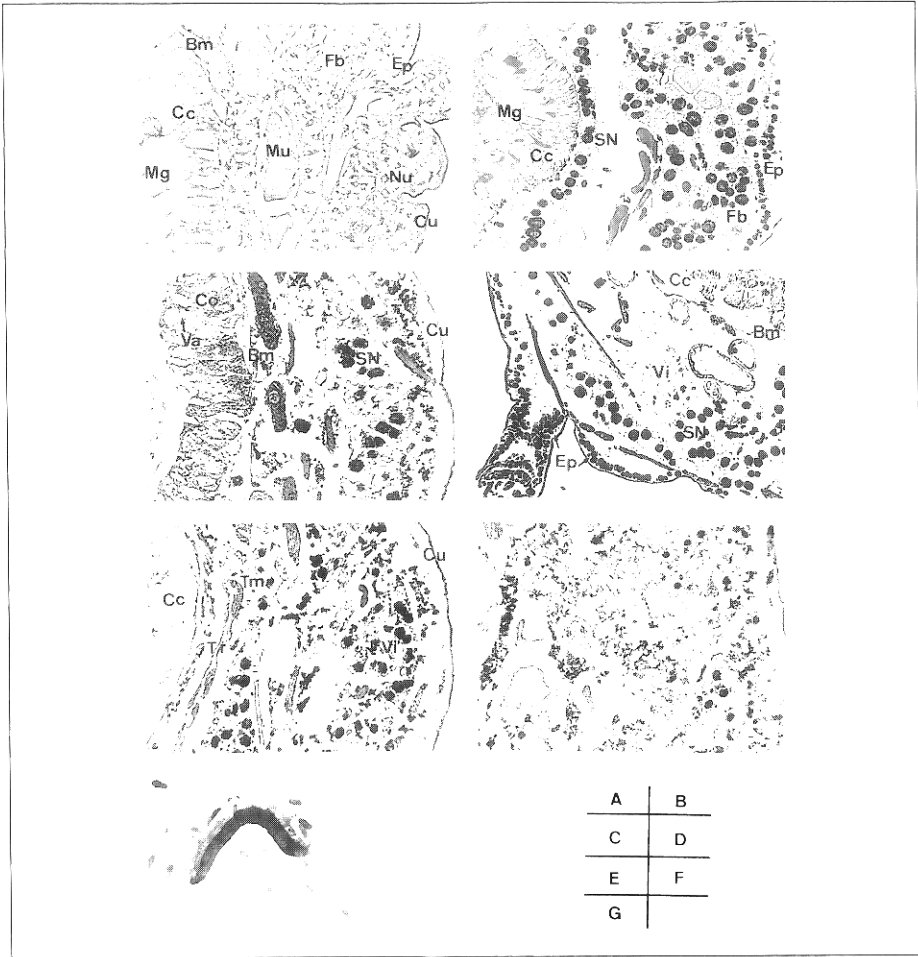
各齡期幼蟲均以飲入法接種病毒懸浮液，由於幼蟲蛻皮後經過足夠的饑餓處理，所以大多數供試蟲均能在數秒鐘至數分鐘內飲盡接種的病毒液。接種後之幼蟲，其發病死亡的時間依供試蟲齡期與病毒接種濃度而異，大多需要三至五天的潛伏期，一齡幼蟲在第五天出現死亡率高峰，二、三、四齡幼蟲在第六天出現死亡率高峰，而五齡幼蟲則需拖延至接種後第七天才出現死亡率高峰(表一、二)。而幼齡幼蟲接觸較高的濃度時，於第三天即有明顯的外部病徵，體節腫脹、體色淡化發亮，且在第四天亦有罹病死亡蟲體出現；而三齡幼蟲接觸較低的病毒濃度時亦有拖延至十天仍不發病，甚至順利化蛹的情形(表二)。

累記接種後七天的死亡率，求出一至五



圖一 A、甜菜夜蛾核多角體病毒包含體外部形態。(20,000倍)；B、甜菜夜蛾核多角體病毒之病毒粒子。(40,000倍)；C、甜菜夜蛾核多角體病毒核蛋白鞘之外部形態。(100,000倍)；D、核多角體內之晶格以平行走向排列。(89,000倍)；E、病毒包含體內含有數十個病毒粒子，每個病毒粒子中含有1-6個不等之核蛋白鞘。(14,000倍)；F、病毒粒子剝離包含體後，在其表面留下空缺凹痕。(20,000倍)；G、正自包含體表面剝離之病毒粒子。(29,000倍)。

Fig. 1. A, Morphology of polyhedral inclusion body of SeNPV. (20,000 $\times$ ); B, Virions of SeNPV. (40,000 $\times$ ); C, Morphology of nucleocapsids of SeNPV. (100,000 $\times$ ); D, Crystalline lattice arrayed parallelly in SeNPV polyhedra. (89,000 $\times$ ); E, Polyhedra occluding multiply enveloped virions. Typically 1-6 nucleocapsids were enveloped in each virion. (14,000 $\times$ ); F, Virion dissociated from polyhedra, empty space appeared on polyhedron surface. (20,000 $\times$ ); G, Polyhedron showing embedded virions and liberating nucleocapsids dissociated from its surface. (29,000 $\times$ ).



圖二 A, 甜菜夜蛾幼蟲健康蟲體橫切面, 所有組織結構緊密、細胞完整且細胞核大小正常。(290倍); B, 接種三天後核多角體病毒感染甜菜夜蛾幼蟲大部份之組織細胞, 引起表皮真皮層及脂肪體細胞病變, 細胞核腫大。(210倍); C, 接種四天後核多角體病毒感染甜菜夜蛾幼蟲之情況更為嚴重, 中腸柱狀細胞有明顯之空胞化現象, 且與基底膜有剝離現象。(260倍); D, 接種四天後, 罹病之甜菜夜蛾幼蟲蟲體內充滿了大量複製之核多角體病毒, 已無正常之細胞, 中腸亦有分離現象。(210倍); E, 接種五天後, 罹病之甜菜夜蛾幼蟲蟲體內所有組織都嚴重受病毒感染, 且大多數細胞已崩解, 氣管鞘腫脹。(220倍); F, 罹病末期, 幼蟲所有組織細胞均崩解破壞, 體腔中充滿了組織碎片、細胞碎片及病毒。(220倍); G, 感染核多角體病毒之甜菜夜蛾幼蟲, 體節腫脹, 體色較淡且喜攀爬於高處, 呈倒吊姿勢。(3倍)。Bm: 基底膜; Cc: 柱狀細胞; Cu: 表皮; Ep: 真皮層; Fb: 脂肪體; Mg: 中腸; Nu: 細胞核; SN: 膨大細胞核; Tm: 氣管被膜; Tr: 氣管; Va: 空胞; Vi: 病毒。

Fig. 2. A, Cross section of a healthy larva of *Spodoptera exigua*, showing normal cell size and structure. (290×); B, Epidermal and fat body cells of *Spodoptera exigua* larva showing swollen nuclei three days after inoculation. (210×); C, The columnar cells of midgut showing vacuolization and detachment from basement membrane four days after inoculation. (260×); D, Larval tissues full of SeNPV polyhedra, and the midgut showing disassociation four days after inoculation. (210×); E, Serious infection of larval tissues, most cells lysing, and the tracheal matrix cells swelling five days after inoculation. (220×); F, Tissues and cell lyses occurring during the late infection period and the body cavity full of lysed tissues, cell debris and viruses. (220×); G, Symptom of a dead larva with light body color, swollen segments and hanging upside-down. (3×). Bm: Basement membrane; Cc: Columnar cell; Cu: Cuticle; Ep: Epidermis; Fb: Fat body; Mg: Midgut; Nu: Nucleus; SN: Swollen nucleus; Tm: Trachea membrane; Tr: Trachea; Va: Vacuole; Vi: Virus.

表一 不同齡期甜菜夜蛾幼蟲接種核多角體病毒幼蟲累記死亡率<sup>1)</sup>

Table 1. Mortality of first- to fifth- instar larvae of *Spodoptera exigua* inoculated with SeNPV<sup>1)</sup>

Instar	Cumulative mortality (%) <sup>2)</sup>						
	Days post-inoculation						
	1	2	3	4	5	6	7
1st	0.0	0.0	0.0	0.0	6.4	47.1	69.4
2nd	0.0	0.0	0.0	1.7	3.0	79.9	86.9
3rd	0.0	0.0	0.0	1.4	6.2	68.9	74.3
4th	0.0	0.0	0.0	0.0	5.6	40.3	66.2
5th	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.7	34.8

1) Inoculated conc.:  $10^6$  PIBs / ml

2) Cumulative mortality of larvae was corrected according to Abbott's formula.

表二 三齡甜菜夜蛾幼蟲接種不同濃度核多角體病毒造成之幼蟲累記死亡率

Table 2. Mortality of third instar larvae of *Spodoptera exigua* fed on solutions containing varied concentrations of SeNPV

Virus Conc. (PIBs / ml)	Cumulative mortality (%) <sup>1)</sup>							
	Days post-inoculation							
	3	4	5	6	7	8	9	10
Control (DW) <sup>2)</sup>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	L+PP	PP+P	P
$10^2$	0.0	0.0	0.0	15.1	16.4	16.4	17.8	L+P
$10^3$	0.0	0.0	5.6	19.4	23.6	23.6	25.0	L+P
$10^4$	0.0	0.0	12.2	36.5	39.2	39.2	39.2	L+P
$10^5$	0.0	0.0	7.2	47.7	60.6	64.9	66.4	L
$10^6$	0.0	1.4	16.2	68.9	74.3	77.0	81.1	L
$10^7$	0.0	1.4	37.5	91.7	94.4	95.8	97.2	L
$10^8$	0.0	12.5	41.7	91.7	100.0	—	—	—

1) Cumulative mortality of larvae was corrected according to Abbott's formula.

2) Treatment with deionized sterile water. L: larva; PP: pre-pupae; P: pupae.

齡各齡期的半致死濃度(LC<sub>50</sub>)，依序分別為：  
 $1.62 \times 10^5$ 、 $6.89 \times 10^4$ 、 $4.10 \times 10^4$ 、 $3.70 \times 10^5$   
 $5.23 \times 10^6$  PIBs / ml(表三)。其中以三齡及  
 二齡蟲的半致死濃度最低，五齡蟲所需濃度  
 最高，其間濃度相差 100 倍。假若參考 Smits  
 and Vlask(1988)報告中所證實，各齡期甜菜  
 夜蛾幼蟲飲入病毒液的量，所推算出各齡幼  
 蟲的半致死劑量(LD<sub>50</sub>)分別為：4、23、  
 57、1,219、47,025 PIBs / larva(表三)。顯  
 示甜菜夜蛾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。從幼  
 蟲的體重看來，一齡至五齡初蛻皮幼蟲之平

均體重分別為：0.021、0.210、1.456、  
 8.052、40.960 mg，而各齡期末齡(即將蛻皮)  
 幼蟲之體重分別為0.364、2.795、12.530、46.  
 619、136.059 mg(表四)。得知在各齡期內體  
 重增加的倍數以一至三齡幼蟲為最高，可見  
 在較幼齡時期之幼蟲其生理代謝的速率較老  
 熟幼蟲快。而二、三齡幼蟲對核多角體病毒  
 的感受性也最高(LC<sub>50</sub>最低)，即使有生物稀  
 釋效應，但由於代謝快之幼蟲，對病原菌之  
 侵染也較敏感，所以 LD<sub>50</sub> 增加的倍數反而不  
 及體重。反之五齡幼蟲的體重為四齡之五  
 倍，LD<sub>50</sub> 卻已增加了三十八倍之多(表五)；

表三 甜菜夜蛾核多角體病毒對甜菜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 3. Concentration—and dosage—mortality responses of *Spodoptera exigua* larvae to SeNPV

Instar	LC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> PIBs / ml	Imbided volume(ul)	LD <sub>50</sub> <sup>2)</sup> PIBs / larva	Dosage—mortality <sup>3)</sup> regression line	Coefficient value
1st	1.62 × 10 <sup>5</sup>	0.023	3.7	y = 1.254x + 4.284	r = 0.9933
2nd	6.89 × 10 <sup>4</sup>	0.330	22.4	y = 1.134x + 3.462	r = 0.9995
3rd	4.10 × 10 <sup>4</sup>	1.400	57.4	y = 0.795x - 3.601	r = 0.9896
4th	3.69 × 10 <sup>5</sup>	3.000	1,219.0	y = 0.792x + 2.557	r = 0.9886
5th	5.23 × 10 <sup>6</sup>	4.000	47,025.0	y = 0.557x + 2.398	r = 0.9963

1) Recorded seven days after inoculation.

2) Estimated based on Smits and Vlask (J. Invertebr. Pathol., 51:107-114).

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

表四 甜菜夜蛾各齡期內幼蟲體重增加比例

Table 4. Increased ratio of body weight of *Spodoptera exigua* larvae

Instar	Average body <sup>1)</sup> weight (mg) (newly molted)	Average body <sup>1)</sup> weight (mg) pre-molting	Increased ratio (body weight)
1st	0.021 ± 0.003	0.364 ± 0.028	17.3
2nd	0.210 ± 0.017	2.795 ± 0.101	13.3
3rd	1.456 ± 0.065	12.530 ± 0.623	8.6
4th	8.052 ± 0.859	46.619 ± 1.034	5.8
5th	40.960 ± 3.640	136.059 ± 12.473	3.3

1) Average of 50 larvae for each instar.

表五 甜菜夜蛾各齡期幼蟲平均體重與對病毒半致死劑量之關係

Table 5. The relationship between LD<sub>50</sub> of *Spodoptera exigua* larvae instars infected with SeNPV and larval body weights

Instar	Average body <sup>1)</sup> weight (mg)	Relative ratio <sup>2)</sup> (body weight)	LD <sub>50</sub> (PIBs / larva)	Relative ratio <sup>3)</sup> (LD <sub>50</sub> )
1st	0.0214 ± 0.0027	1.0	4	1.0
2nd	0.2096 ± 0.0169	9.8	23	5.8
3rd	1.4560 ± 0.0650	7.0	57	2.5
4th	8.0520 ± 0.8594	5.5	1,219	21.4
5th	40.9600 ± 3.6400	5.1	47,025	38.6

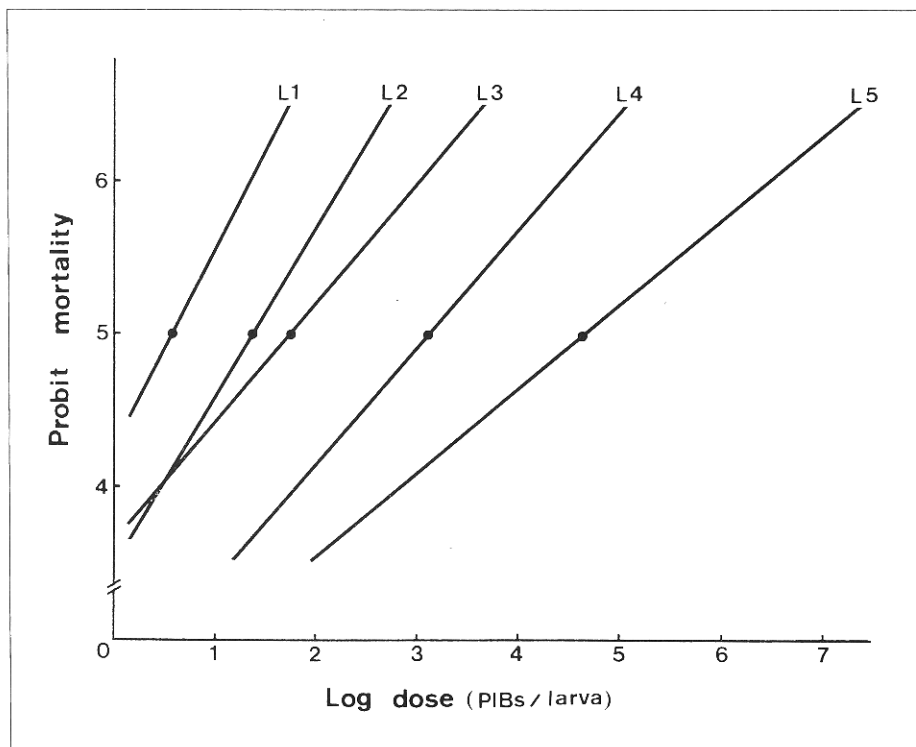
1) Average of 50 larvae for each instar.

2) Based on weight of instar (n+1) / weight of instar (n).

3) Based on LD<sub>50</sub> of instar (n+1) / LD<sub>50</sub> of instar (n).

若與一齡幼蟲相比，五齡幼蟲體重增加不到二千倍，而致死劑量卻為一齡幼蟲的一萬倍之多。相形之下，體重增加所產生之生物稀釋效應並無法完全涵蓋住老熟幼蟲敏感性降

低的倍數，顯現老熟幼蟲對病原菌之染感具有成熟免疫性。且依據劑量對死亡率迴歸直線方程式看來，其斜率隨著齡期之增長而有下降的趨勢(圖三)，顯示老齡幼蟲對病毒的



圖三 病毒接種劑量與甜菜夜蛾各齡期幼蟲死亡率之關係。

Fig. 3. Relationship between dose and mortality between SeNPV and five larval instars (L1-L5) of *Spodoptera exigua*.

感受性，於個體間較幼齡幼蟲具有更大的變異性。

## 討 論

核多角體病毒之特色即為含有桿狀之病毒粒子，其核蛋白鞘大小一般在 $250-400 \times 40-70$  nm 之間，其內含有雙股之環狀去氧核糖核酸(Tinsley and Kelley, 1985)。一般而言，核多角體病毒包含體之直徑大小介於 $0.5-15$   $\mu\text{m}$  間，其內含有數十至數百個病毒粒子(Bilimoria, 1986)。本省甜菜夜蛾核多角體病毒包含體之平均直徑為 $1.048 \pm 0.208$   $\mu\text{m}$ ，以多角體蛋白質包含著數十至百餘個大小不等之病毒粒子，而其中又包含1-6個不

等數的核蛋白鞘。每個核蛋白鞘的平均長度及寬度相當一致，平均為 $285 \times 48$  nm。而美國加州品系之甜菜夜蛾核多角體病毒(Se-MNPV-608)之包含體直徑平均為 $1.52 \pm 0.11$   $\mu\text{m}$ ，且每個病毒粒子所包含核蛋白鞘之數目變異很小均約2-4個(Gelernter and Federici, 1986)。相較之下，本省品系之病毒包含體較美國品系小且其間之大小變異度又較美國品系大；而病毒粒子含核蛋白鞘之數量也因有單一的及多數的，所以可稱為混合型的病毒粒子，有異於 *Heliothis zea* SNPV、*Autographa californica* MNPV、或美國品系之 SeMNPV 等結構均一(Ignoffo, 1973; Chung, *et al.*, 1980; Gelernter and Federici, 1986)。

Tuan *et al.* (1989)以浸漬法、飼料表面污染法及接種源飲入法進行玉米穗蟲核多角體病毒致病力之測定，得知接種源飲入法為一個簡便、快速、直接、敏感又精確的生物檢定法。同時此法之接種劑量非常節省，尤其供試蟲經過飢餓處理，促使幼蟲於數秒至數分鐘內能完全將接種劑量飲入，可避免供試蟲接受劑量多寡及時間先後之誤差。本試驗中以此法進行甜菜夜蛾核多角體病毒對甜菜夜蛾幼蟲致病力之測定，得知五齡幼蟲之感受性最低，且與幼齡幼蟲之半致死劑量相差甚遠。就以同一濃度而言，幼蟲之罹病死亡率乃隨著齡期之增加而銳減，此與玉米穗蟲核多角體病毒、加州苜蓿尺蠖蛾核多角體病毒對其寄主昆蟲致死率之結果相符(Vail, *et al.*, 1973; Salama, *et al.*, 1986)。而美國加州甜菜夜蛾、亞洲玉米穗蟲及 *Anticarsia gemmatalis* 對病毒之感受性亦隨著齡期之增長，有明顯下降之趨勢；且發病期也顯著延長(Boucias, *et al.*, 1980; Smits and Vlak, 1988; Tuan *et al.*, 1989)。由此可見，老齡幼蟲對病毒之感受性較低，防治時機以幼齡幼蟲期為佳。

核多角體病毒可感染寄主昆蟲之真皮層、脂肪體、氣管被膜，亦可感染腸道、絲腺、馬氏管、神經鞘、血球及其他器官或組織(Heimpel and Adams, 1966; Vail and Hall, 1969; Su, 1990)。斜紋夜蛾感染核多角體病毒，真皮層及氣管被膜於接種後一天後即開始發生變化，而脂肪體細胞依然正常，第二天後細胞核腫大並有許多空胞，接種第三天後核腫及空胞化現象嚴重，四天後已有部分細胞開始破裂釋出大量成熟病毒(Su, 1990)。而家蠶病毒感染的過程較緩慢，需六至七天細胞才會破裂(Watanabe, 1967)。本試驗中甜菜夜蛾四齡幼蟲接種核多角體病毒後第三天，真皮層及脂肪體細胞有嚴重的核

腫大現象，四天後細胞核開始破裂、釋出病毒，亦可見部分氣管被膜及腸壁細胞有些許核腫現象，五天後幾乎所有細胞均破裂，且腸道、體腔內組織及體壁均完全瓦解。在感染的過程中，發現真皮層細胞病變的情形頗為一致，而脂肪體細胞則不太一致，有些細胞核病變相當嚴重。經由石蠟切片組織病理之觀察，配合電子顯微鏡觀察的結果，證實自罹病的本省甜菜夜蛾幼蟲蟲體所分離及純化之病毒確為核多角體病毒，簡稱為“Se-NPV”。

## 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研究所侯豐男教授之協助及指導，本所劉員良、林秀昭及簡秀華小姐協助供試蟲之飼育工作，使得試驗順利完成，在此一併誌謝。

## 參考文獻

- 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. p. 50-52.
- Agathos, S. N. 1991. Mass production of viral insecticides. In "Biotechnology for Biological Control of Pests and Vectors", Maramorosch, K. Ed., CRC Press, Boca Raton, FL. 278 pp.
- 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.
- Bilimoria, S. L.** 1986. Taxonomy and identification of baculoviruses. in "The Biology of Baculoviruses. Vol. 1. Biological Properties and Molecular Biology." Granados, R. R. and B. A. Federici. Eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 275pp.
- 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.
- Caballero, P., D. Zuidema, C. Santiago-Alvarez, and J. M. Vlak.** 1992. Biochemical and biological characterization of four isolates of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *Biocont. Sci. Tech.* 2: 145-157.
- Chen, W. S., and F. I. Chang.** 1989. The ecology of beet armyworm and its control. *Chinese J. Entomol.*, Special Publ. No. 4: 161-198. (In Chinese with English summary)
- Chung, K. L., M. Brown, and P. Faulkner.** 1980. Studies on the morphogenesis of polyhedral inclusion bodies of a baculovirus *Autographa californica* NPV. *J. Gen. Virol.* 46: 335-347.
- Cobb, P. P., and M. H. Bass.** 1975. Beet armyworm: Dosage-mortality studies on California and Florida strains. *J. Econ. Entomol.* 68: 813-814.
- Finney, D. J.** 1971. Probit analysis. Cambridge Univ. Press, Cambridge. 7 pp.
- Gelernter, W. D., and B. A. Federici.** 1986. Isolation, identification, and determination of virulence of a nuclear polyhedrosis virus from the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Entomol.* 15: 240-245.
- Hamm, J. J.** 1966. A modified azan staining technique for inclusion body viruses. *J. Invertebr. Pathol.* 8: 125-126.
- Heimpel, A. M., and J. R. Adams.** 1966. A new nuclear polyhedrosis virus of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *J. Invertebr. Pathol.* 8: 340-346.
- Hunter, D. K., and I. M. Hall.** 1968. Cytopathology of a nuclear polyhedrosis virus of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *J. Invertebr. Pathol.* 12: 93-97.
- Ignoffo, C. M.** 1968. Specificity of insect viruses. *Bull. Entomol. Soc. Amer.* 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.

- 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.
- Smits, P. H., and J. M. Vlask.** 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. Vlask.** 1987. Nuclear polyhedrosis virus for control of *Spodoptera exigua* larvae on glass-house crops. *Entomol. Exp. Appl.* 43: 73-80.
- Su, C. Y.** 1986. Studies on histopathology of *Orgyia posticus* infected with a nuclear polyhedrosis virus of *O. pseudotsugata* (OpMNPV). *Chinese J. Entomol.* 6: 153-158. (In Chinese with English summary)
- Su, C. Y.** 1990. Histopathological studies of *Spodoptera litura* infected by nuclear polyhedrosis virus. *Chinese J. Entomol.* 10: 61-67. (In Chinese with English summary)
- Tinsley, T. W., and D. C. Kelly.** 1985. Taxonomy and nomenclature of insect pathogenic viruses. In "Viral Insecticides for Biological Control.", K. Maramorosch and K. E. Sherman, eds. Academic Press, London. pp. 3-26.
- Trumble, J. T., and T. C. Baker.** 1984. Flight phenology and pheromone trapping of *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in southern coastal California. *Environ. Entomol.* 13: 1278-1282.
- 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.
- Vail, P. V., and I. M. Hall.** 1969. The histopathology of a nuclear polyhedrosis virus in larvae of the cabbage looper related to symptoms and mortality. *J. Invertebr. Pathol.* 13: 188-189.
- Vail, P. V., D. L. Jay, and D. K. Hunter.** 1973. Infectivity of a nuclear polyhedrosis virus from the alfalfa looper, *Autographa californica*, after passage through alternate hosts. *J. Invertebr. Pathol.* 21: 16-20.
- Watababe, H.** 1967. Autoradiographic studies on the nucleic acid synthesis in the fat body and some tissues of the silkworm, *Bombyx mori*, infected with nuclear polyhedrosis virus. *Appl. Entomol. Zool.* 2: 147-157.
- Whitlock, V. H.** 1974. Symptomatology of two viruses infection *Heliothis armigera*. *J. Invertebr. Pathol.* 31: 48-56.

收件日期：1993年10月20日

接受日期：1993年12月3日