

# 甜菜夜蛾核多角體病毒噴霧感染甜菜夜蛾之效果評估

靳子蓉 高穗生 行政院農委會農業藥物毒物試驗所生物藥劑組  
陳滢如 吳宗遠\* 中原大學生物科技系

## 摘 要

於本研究中，我們證明加州苜蓿夜蛾核多角體病毒 (*Autographa californica* multiple capsid nucleopolyhedrovirus, AcMNPV) 可以噴霧的方式感染甜菜夜蛾幼蟲。進一步的研究顯示二齡甜菜夜蛾幼蟲對 SpeiMNPV 噴霧感染法之感受性較三或四齡甜菜夜蛾幼蟲為高；可達 76% 的感染率。除此之外我們也證實硼酸可以增強甜菜夜蛾幼蟲對 SpeiMNPV 噴霧感染法之感受性。因此我們進一步建立以甜菜夜蛾幼蟲蟲體噴霧感染法生產甜菜夜蛾核多角體病毒的方法，結果以三齡甜菜夜蛾幼蟲最適合以噴霧感染法生產甜菜夜蛾核多角體病毒之包含體。

關鍵詞：核多角體病毒、噴霧感染、生物農藥、甜菜夜蛾、硼酸。

## 前 言

化學農藥是蟲害防治工作的一項利器，其效果迅速、使用方便和價格便宜，使得以往植物保護的工作幾乎完全依賴化學農藥，然而自 1962 年，卡遜女士 (Rachel Carson) 之名著：「寂靜的春天 (Silent Spring)」出版後，人們也漸漸感受到化學農藥對環境生態所造成的浩劫，尤其在害蟲對化學農藥產生抗藥性後，可降低甚至可替代化學農藥的生物防治法將是未來植物保護研究的重點。在以微生物進行生物防治的研究資材上，桿狀病毒 (baculovirus) 是最具潛力的生物防治劑之一 (Moscardi, 1999)，在 1973 年世界衛生組織及農糧組織 (WHO-FAO) 聯合會議中已揭示

桿狀病毒可作為有效且安全的微生物殺蟲劑。桿狀病毒生物農藥的特性為寄主的專一性高且對天敵安全、不感染人類和植物、不污染環境也不易引發寄主抗藥性，並且能在害蟲族群中形成流行病，而達到長期控制害蟲的目的。

桿狀病毒屬於桿狀病毒科 (Baculoviridae)，可分為 Nucleopolyhedrovirus (NPV) 和 Granulovirus (GV) 兩個屬 (Mayo, 2002)。桿狀病毒已知可以感染超過 500 種以上的昆蟲，尤其是鱗翅目昆蟲，例如吉普賽舞蛾 (*Lymantria dispar* (gypsy moth))，擬尺蠖 (*Trichoplusia ni* (cabbage looper))，斜紋夜蛾 (*Spodoptera litura*)，甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 和玉米穗蟲 (*Helicoverpa armigera*)

\*論文聯繫人  
e-mail: tywu@cycu.edu.tw

Hubner) 等, 都可以利用桿狀病毒加以防治。至今至少已有 30 種以上的桿狀病毒登記作為生物防治劑, 而全世界已有 18 個國家, 以桿狀病毒進行鱗翅目昆蟲的生物防治工作 (Moscardi, 1999)。

雖然桿狀病毒是目前最被看好的生物性農藥之一, 但對於大量的商業化生產並於田間實際運用尚有下列之障礙需克服: (1) 桿狀病毒對害蟲的致死效率和能迅速致死的化學農藥相較差異極大, 一般需要 4~8 天或以上的時間方能殺死其寄主, 因此受感染的害蟲仍能持續危害農作物一段時間。(2) 每一種桿狀病毒有其特定的寄主, 使其防治之害蟲種類較窄, 無法作為廣效性之生物防治製劑。(3) 桿狀病毒的生產成本高, 尤其是以昆蟲細胞大量培養生產桿狀病毒作為生物製劑時。

自 Smith *et al.* (1983) 成功的利用桿狀病毒: 加州苜蓿夜蛾核多角體病毒 (*Autographa californica* multiple capsid nucleopolyhedrovirus, AcMNPV) 作為真核外源蛋白表現系統起, 現在已有數百種以上的外源蛋白以重組桿狀病毒自昆蟲細胞成功的生產 (Possee, 1997; Kost *et al.*, 2005)。基因工程的引進除作為重要的重組蛋白生產工具外, 亦提供了解決野生型桿狀病毒緩慢致死效率和狹窄寄主的方法。諸如以 (1) 能減少昆蟲血淋巴量 (hemolymph volume) 的 diuretic hormone esterase (Maeda, 1989), 或 (2) 蘇力菌毒素 (Bt toxin) (Merryweather *et al.*, 1990) 以及 (3) 針對昆蟲之神經系統作用的昆蟲專一性神經毒素, 包括蝸毒 AaIT (Hammock *et al.*, 1990, Maeda *et al.*, 1991, Tomalski and Miller, 1991), 蠟蜂毒素 antigen 5 (Tomalski *et al.*, 1993) 和蟎毒素 (Mite toxin, Txp-1, Maeda, 1991) 等酵素基因或毒蛋白基因進行改造時, 都可以增益殺蟲

之效率。Cory 等人於 1993~1994 年, 以含蠟毒基因之桿狀病毒進行田間測試時與野生型 AcMNPV 對擬尺蠖的毒殺效果相較, 含蠟毒基因的 GMBV 確實縮短了桿狀病毒對擬尺蠖的致死時間, 同時對作物的損害也大為的降低 (Cory *et al.*, 1994)。因此基因工程的引進將可以解決桿狀病毒緩慢致死的缺點, 甚至透過寄主因子基因 (host range factors) 的選殖進而擴大桿狀病毒的寄主範圍。因此桿狀病毒生物農藥能否普及施用的關鍵將在於開發一低成本的工業化量產流程。於桿狀病毒的生產上, 以昆蟲細胞進行發酵量產, 是工業界常用的方法, 此方法雖然較省人力, 但其機器設備與細胞培養液卻都是高成本。除了成本高外, 以甜菜夜蛾核多角體病毒 (SpeiMNPV) 為例, 當以甜菜夜蛾細胞株進行甜菜夜蛾核多角體病毒生產時, 則會有稱為缺陷病毒粒子 (defective interfering particles, 簡稱 DI) 的產生, 而使甜菜夜蛾核多角體病毒的殺傷力降低 (Pijlman *et al.*, 2001), 因此在甜菜夜蛾的防治上, 用蟲體生產桿狀病毒生物農藥是較佳的選擇。然而當以蟲體進行量產開發時仍有障礙待克服: 昆蟲的飼育, 雖然成本上較昆蟲細胞發酵生產來得低廉, 卻較為費時並需要較高的人工成本。因此開發省時省力的蟲體量產桿狀病毒方法將是發展桿狀病毒生物農藥的重要工作。於本研究中, 我們發現桿狀病毒 AcMNPV 可以噴霧的方式, 有效的感染擬尺蠖幼蟲, 而對小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 和甜菜夜蛾幼蟲也有 30~40% 的感受性, 但對斜紋夜蛾及玉米穗蟲則無法以 AcMNPV 進行噴霧感染。由於甜菜夜蛾是危害本省蔬菜的重要經濟作物害蟲, 因此我們進一步建立以蟲體噴霧感染法生產甜菜夜蛾核多角體病毒的方法, 並計算蟲體產生 PIB 之數目, 以評估用噴霧感染法生產甜菜夜蛾核多角體病毒的可行性。

## 材料與方法

### 一、蟲體飼育

購自美國亞培 (Abbott) 的擬尺蠖及台灣南方地區 (員林、官田) 田間採集的甜菜夜蛾，以人工飼料繼代飼育幼蟲及以含蜂蜜水配方餵飼成蛾，之後置於產卵箱內進行交尾產卵，卵塊經 5% 福馬林溶液進行卵表面之消毒。卵孵化後置於裝有人工飼料之布丁杯中集體飼育，至末齡蟲即需分散飼養，以防止幼蟲自相殘食及因飼育密度高而引發蟲體罹病。進行測試實驗是以健康之幼蟲為試驗蟲。生長箱條件為  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，光暗週期為 12L:12D，相對溼度為  $65\pm 5\%$  R. H.。

### 二、芽體 SpeiMNPV 桿狀病毒之製備

首先以  $1 \times 10^9$  PIBs/ml 甜菜夜蛾核多角體病毒進行餵食感染，接種於三齡末之甜菜夜蛾幼蟲，經四天，達到病毒表現的高峰期，隨後將所有甜菜夜蛾供試蟲收集，加入 10 ml 之無菌水，研磨，過濾，以 5000 rpm 離心 30 分，取上清液，即為 SpeiMNPV 之芽體病毒。(每次此試驗均感染 30 隻健康之三齡末甜菜夜蛾幼蟲)

### 三、紅螢光病毒 vAcRed 之製備與定量

在我們先前的研究結果顯示，攜有源自珊瑚紅螢光蛋白基因 DsRed 的重組 AcMNPV 病毒，可以使感染的擬尺蠖幼蟲，在日光下發出肉眼即可見的紅螢光，因此我們可以很輕易的判斷測試之標的害蟲 (target pest) 是否受重組桿狀病毒感染 (Jinn *et al.*, 2005)。

製備含珊瑚的紅螢光蛋白基因 DsRed 的重組 AcMNPV 病毒 vAcRed 方法如下：我們以聚合酶連鎖反應 (polymerase chain

reaction, PCR) 將位於質體 pDsRed1-N1 (ClonTech) 上，選殖自珊瑚 *Discosoma* sp. (Matz *et al.*, 1999) 的 *DsRed* 基因進行增幅。進行 PCR 反應的引子對序列如下：5'NheI ATCGGCTAGCGGTGCGCCACCATGGTGC GCTCT 和 3'EcoRI GTAGGAATTCGCTAC AGGAACAGGTGGTGG (限制酶切位 *NheI* 和 *EcoRI* 如標線所示)。經 PCR 反應所得的 DNA 片段經限制酶 *NheI* 和 *EcoRI* 處理後再選殖進桿狀病毒轉移載體 pBlueBac4.5 (Invitrogen)，並將此載體命名為 pBacRed。將 pBacRed 與桿狀病毒 DNA, Bac-N-Blue (Invitrogen)，一起共轉染秋行軍蟲卵巢細胞株 Sf21 並將所得含 *DsRed* 基因的重組病毒以終點稀釋法進行純化，所得之病毒命名為 vAcRed。

### 四、噴霧感染流程

配製所需之試驗病毒液 (包括 AcMNPV 與 SpeiMNPV 之芽體病毒)，並置於冰上備用。同時挑取 30 隻齡期一致之健康蟲體於固定容器中，稱重後放置於噴霧塔 (Spray tower; Burkard Co. Ltd) 下，以每平方英寸含 8 英磅 (8 lb/in<sup>2</sup>) 的壓力將已配製之 1 ml 病毒液進行噴霧感染，待各蟲體表面全乾後，分別至入 30 孔之飼育盤。於試驗期間，這些被噴霧感染之供試蟲被放置於  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 12L:12D,  $65\pm 5\%$  R. H. 定溫箱中，每日提供新鮮人工飼料。並逐日觀察及記錄該供試蟲之累積死亡數、螢光數及秤重。

### 四、餵食感染

先將飼料塊 (直徑 7 mm × 高 10 mm) 分別置於 30 孔培養盤中，再以 15  $\mu\text{l}$  之病毒液 (含 PIB 之濃度為  $10^8$  PIBs/ml) 均勻滴於人工飼料塊上，待病毒懸浮液滲透完全並稍陰

乾後再單隻接入供試蟲（先經飢餓處理 6 小時），另以 15  $\mu$ l 無菌二次水滴於人工飼料塊上作為對照組。經上述步驟處理後之幼蟲置於 25 $\pm$ 1 $^{\circ}$ 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，每日更換新鮮無病毒之飼料，並每天記錄供試蟲之幼蟲死亡率。（以上不同之試驗，均於不同時間進行，至少重複三次，每組試驗處理 30 隻幼蟲）。

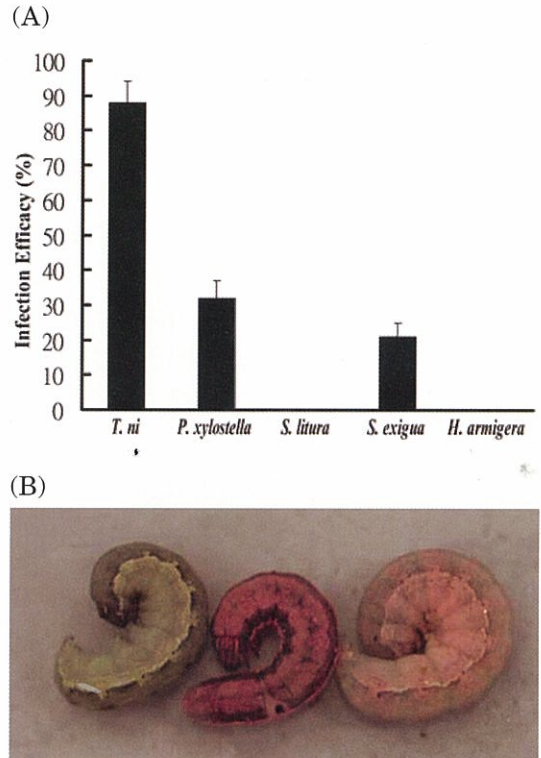
## 五、PIB 之收集與計數

將噴霧及餵食感染後之死蟲、活蟲收集起來，加入適量的無菌水（通常不超過 1 ml）研磨，三層紗網過濾，去除蟲體殘骸。取下層濾液以 5000 rpm、離心 5 min，將 PIBs 沉降，最後再以 1  $\times$  PBS 溶液回溶。取 10  $\mu$ l 至血球計數器，放置於光學顯微鏡下，計數 PIBs 數目，並推算出 PIBs 的密度。

## 結 果

### 一、AcMNPV 芽體病毒可以噴霧感染方式感染鱗翅目害蟲

利用此 vAcRed 重組桿狀病，我們嘗試分析以芽體桿狀病毒對鱗翅目害蟲進行噴霧感染（spray infection）的可行性。桿狀病毒的生活史中，蟲體間的感染路徑為包含體病毒經口感染後，在腸道內釋出包含體衍生病毒（PDV）感染腸道內皮細胞後，釋出芽體病毒（budding virus, BV），在細胞間進行感染並透過氣管系統而感染整隻蟲體（Engelhard *et al.*, 1994），因此一般咸信包含體病毒為蟲體感染之媒介，而芽體病毒只能感染細胞而不會進行蟲體感染。當以包含體基因剔除的 vAcRed 芽體病毒用 Potter Spray Tower 在 8 lb/in<sup>2</sup> 的壓力下，分別對三齡之擬尺蠖、小菜蛾、斜紋夜蛾、甜菜夜蛾和玉米穗蟲噴灑 1 ml



圖一 重組桿狀病毒 vAcRed 對鱗翅目害蟲噴霧感染的可行性分析 (A) 與甜菜夜蛾幼蟲噴霧感染 vAcRed 後體色呈現紅螢光而未感染成功的幼蟲則呈褐色 (左一)。

Fig. 1. Assessment of infection efficacy of vAcRed for Lepidoptera pests (A) and *Spodoptera exigua* larvae emitted red fluorescence under sunlight when infected with vAcRed by aerosol (B).

的病毒液 (1  $\times$  10<sup>8</sup> pfu/ml) 時，我們發現以擬尺蠖幼蟲的感受性最佳可達 88%，其次為小 (圖一 A)。雖然甜菜夜蛾幼蟲體色較小菜蛾及擬尺蠖幼蟲深但受 vAcRed 芽體病毒噴霧感染後的若蟲於日光下就可呈現紅色 (圖一 B)。但 vAcRed 芽體病毒則無法以噴霧感染的方式對斜紋夜蛾和玉米穗蟲 (圖一 A) 進行感染，雖然以注射方式對斜紋夜蛾仍可以成功的進行感染 (Jinn *et al.*, 2005)。故由上述的實驗結果顯示，以噴霧的方式可以芽體型式的

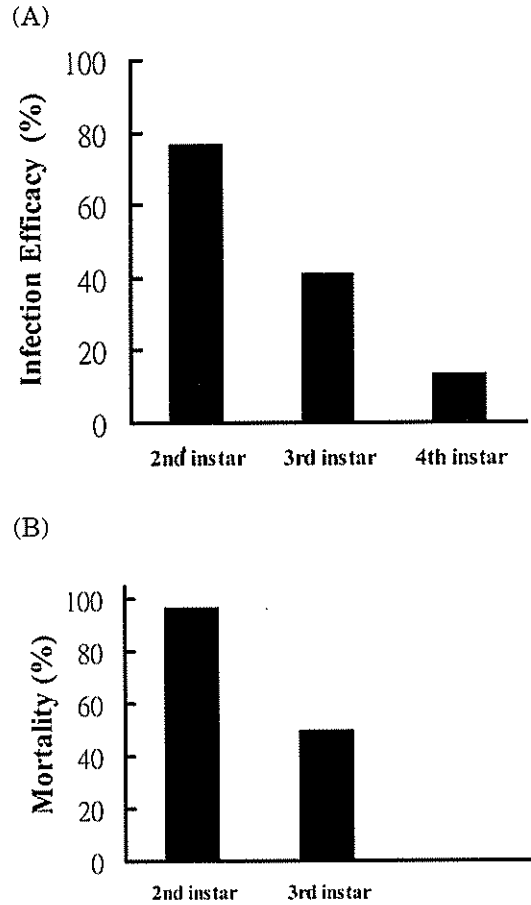
AcMNPV 病毒對擬尺蠖、小菜蛾和甜菜夜蛾進行感染，但以甜菜夜蛾的感受性最差（圖一 A）。然而擬尺蠖在台灣的危害並沒有小菜蛾和甜菜夜蛾大，因此我們嘗試以甜菜夜蛾核多角體病毒（SpeiMNPV）對甜菜夜蛾幼蟲進行噴霧感染，測試其感染率是否較 AcMNPV 佳並探討用桿狀病毒噴霧感染法來生產甜菜夜蛾核多角體病毒 SpeiMNPV 的可行性。

## 二、SpeiMNPV 芽體病毒可以噴霧感染方式感染甜菜夜蛾幼蟲

我們以 SpeiMNPV 之 PIB 餵食三齡甜菜夜蛾幼蟲後，經研磨和離心去除蟲體組織和 PIB，取其含芽體病毒之上清液後，以 Poter Spray Tower 在 8 lb/in<sup>2</sup> 的壓力下，分別對二齡、三齡和四齡之甜菜夜蛾幼蟲進行噴霧感染。圖二 A 之結果顯示，對三齡蟲之感染率可達 41%，約為 vAcRed 的兩倍（比較圖一 A 和圖二 A），而在二齡蟲時，感染率可達 77%，但對四齡蟲則感染率僅有 13%，因此 SpeiMNPV 之芽體病毒可以噴霧之方式在 8 lb/in<sup>2</sup> 之條件下成功的感染甜菜夜蛾幼蟲，且其感受性隨齡期之降低而升高（圖二 A）。由於野生型之 SpeiMNPV 並不像 vAcRed 有紅螢光蛋白作為標誌，只能以蟲體是否具有病毒感染之特徵進行判斷，為進一步證實我們測得的感染率，我們分別在 SpeiMNPV 芽體病毒對二齡、三齡之甜菜夜蛾進行噴霧感染後的第八天，記錄蟲體的死亡率，結果如圖二 B 所示，其死亡率分別為 97% 和 50%，和感染率之結果有一致性，因此 SpeiMNPV 之芽體病毒應可以噴霧方式對甜菜夜蛾幼蟲進行噴霧感染。

## 三、硼酸可以增益 SpeiMNPV 對甜菜夜蛾幼蟲噴霧感染的感受性

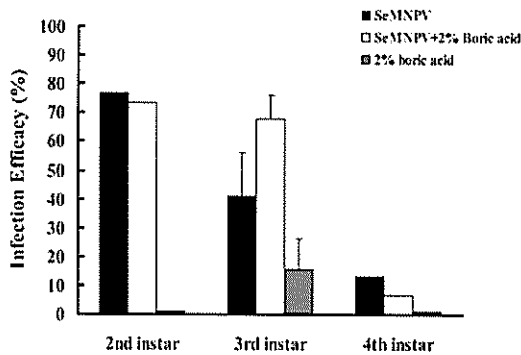
在我們先前的研究結果顯示，硼酸除可以



圖二 SpeiMNPV 噴霧感染不同齡期之甜菜夜蛾幼蟲的感染率分析。  
Fig. 2. Aerosol infectivity of SpeiMNPV budding virus on different instars of *Spodoptera exigua* larva (A) Infection efficacy (B) Mortality.

增益 AcMNPV 對擬尺蠖餵食感染的感受性外，亦可以增益三齡甜菜夜蛾幼蟲對 SpeiMNPV 的感受性 (Jinn *et al.*, 2004)，因此我們嘗試以 SpeiMNPV 對三齡甜菜夜蛾幼蟲進行噴霧感染時，添加 2% 之硼酸做為協同劑，並分析其感染率。結果顯示硼酸可以增加 SpeiMNPV 對三齡甜菜夜蛾幼蟲進行噴霧感染的感受性，感染率由 41% 增加至 70% (圖

三)。與此實驗結果一致的是，硼酸的添加亦可增加 SpeiMNPV 芽體病毒在噴霧感染後第 8 天的死亡率，可由 48% 增加至 70% (圖四)。圖四的結果亦顯示，硼酸的添加亦可加速 SpeiMNPV 對三齡甜菜夜蛾幼蟲噴霧感染的致死效率，如第 5 天時，單獨處理 SpeiMNPV 時，其死亡率僅有 27%，而 2% 硼酸的添加則可以增加至 43%，因此硼酸除可以增益三齡甜菜夜蛾幼蟲對 SpeiMNPV 餵食感染的感受性外，亦可在噴霧感染時發揮相同的效果，因此硼酸對桿狀病毒生物農藥製劑配方的發展將有其重要性。



圖三 2%硼酸對 SpeiMNPV 噴霧感染不同齡期之甜菜夜蛾幼蟲的感染率分析。

Fig. 3. The effect of 2% boric acid on the infection efficacy of different instars of *Spodoptera exigua* larva infected with SpeiMNPV budding virus by aerosol.

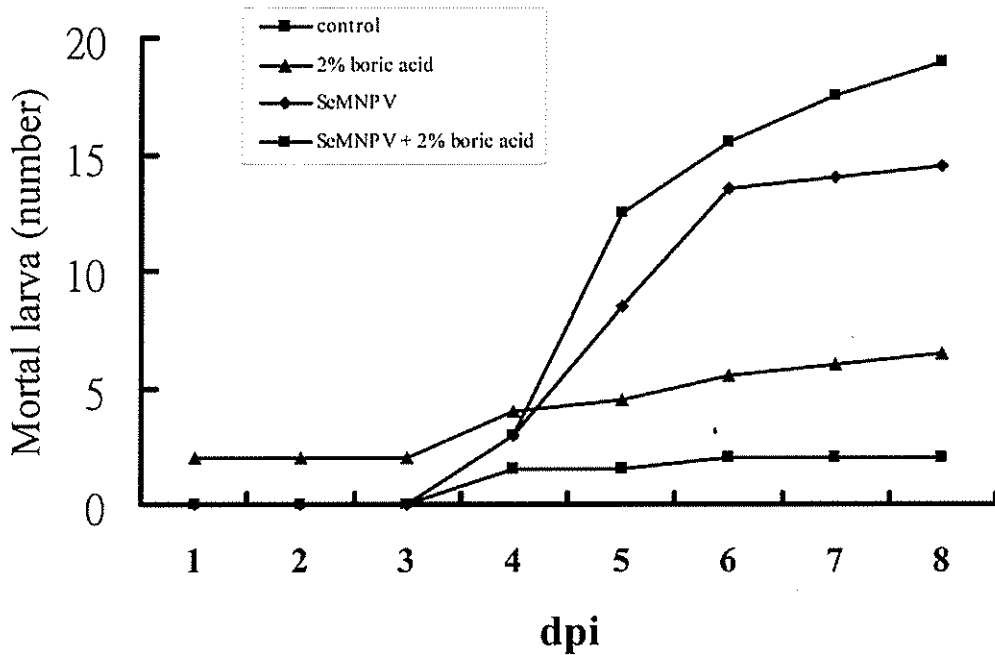
#### 四、以噴霧感染進行 SpeiMNPV 包含體的生產

研發桿狀病毒生物農藥最關鍵的技術，在於能廉價的大量生產桿狀病毒 PIB。目前的生產方式主要有二種 (1) 以昆蟲細胞進行發酵生產 (2) 利用蟲體接種生產。當以發酵槽進行生產時雖然較少人工成本，但其發酵槽設備及細胞培養液卻都是高價之成本，而利用蟲體生

產時，蟲子飼養之成本與設備雖較低，但卻費時費力。而在 SpeiMNPV 桿狀病毒生物農藥的製備上，尤要考慮的問題是，當以細胞進行繼代生產時，只要到了第 5 個繼代即會有 DI 病毒的產生 (Pijlman *et al.*, 2001)，而無法產生具高感染率的 SpeiMNPV 桿狀病毒，因此若能利用噴霧感染進行 SpeiMNPV PIB 的生產應可大量降低人力成本，因利用 Poter Spray Tower 進行噴霧感染時，只要 10 秒的時間，即可完成對 30 隻幼蟲的感染。因此我們測試並比較以噴霧感染的方式感染甜菜夜蛾幼蟲時，其蟲體產生 PIB 之數量與傳統餵食感染方式所得的 PIB 數目是否有所差異。實驗結果顯示感染二齡蟲，餵食感染方式每隻蟲體約可產生  $2.5 \times 10^6$  PIB，而若以噴霧感染時，則僅有  $3.3 \times 10^5$  PIB/larva (圖五 A)，故二齡甜菜夜蛾幼蟲雖有較佳的噴霧感染效率，但其 PIB 產量低並不適合做為量產的宿主。而四齡蟲則因其噴霧感染效率極低，亦不適合，因此我們嘗試以三齡甜菜夜蛾幼蟲進行噴霧感染生產 SpeiMNPV PIB 的宿主。結果顯示其 PIB 產量可達  $5 \times 10^7$ /larva，約為二齡蟲的 100 倍，但是其產量僅有以餵食感染所得 PIB 數目的一半 (圖五)。故若要以噴霧感染法進行 SpeiMNPV 桿狀病毒生物農藥之量產時，我們的實驗結果顯示三齡蟲是最佳的選擇。

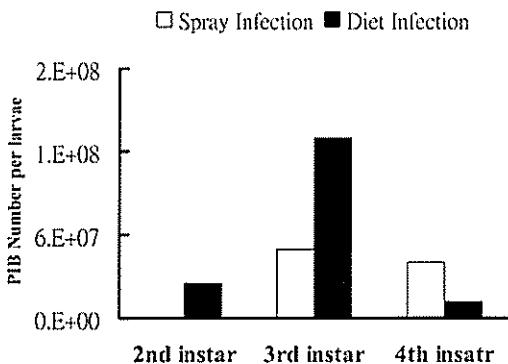
## 討 論

以蟲體來生產桿狀病毒生物農藥，除成本低廉的優點外，由於蟲體本身之產能遠大於細胞培養之產能，是目前量產的最佳途徑。一般來說，桿狀病毒對幼蟲之感染途徑可分為兩大類，病毒在幼蟲個體之間的傳染與進入蟲體後組織細胞的感染。幼蟲個體之間的感染需由口進入，幼蟲經口感染桿狀病毒包含體 (OV)，



圖四 2%硼酸對 SpeiMNPV 噴霧感染三齡甜菜夜蛾幼蟲的死亡率分析。

Fig. 4. The effect of 2% boric acid on the mortality of third instars *Spodoptera exigua* larva infected with SpeiMNPV budding virus by aerosol.



圖五 不同齡期之甜菜夜蛾幼蟲以 SpeiMNPV 芽體病毒進行噴霧感染或包含體餵食感染生產包含體之分析。

Fig. 5. Production of occlusion bodies in different instars of *Spodoptera exigua* larva infected with SpeiMNPV budding virus by aerosol infection or diet infection.

再於鹼性之腸道下釋出芽體病毒 (BV) 粒子，而感染腸道細胞。蟲體本身之組織細胞感染則是於桿狀病毒進入腸道細胞，約 12 小時後即可產生出芽體形式桿狀病毒，在蟲體內感染各組織細胞。由於昆蟲的氣管系統延伸到蟲體表面形成氣孔 (spiracles)，顯示桿狀病毒有可能經由噴霧的形式以芽體病毒進行蟲體的感染。而 1994 年美國加州柏克萊大學 Volkman 教授對桿狀病毒之感染途徑所進行的研究亦顯示昆蟲之氣管系統 (tracheal system) 可能是桿狀病毒能在蟲體內快速蔓延，感染整個蟲體各組織的原因 (Engelhard *et al.*, 1994)。Volkman 的研究小組發現，在餵食感染的 16 小時後，有 54% 的氣管母細胞 (tracheoblasts) 受感染，是第一個受桿狀病毒

感染的非腸道表皮細胞 (non-midgut epithelial cell)。因此我們推測，若以芽體病毒進行噴霧，應可以對幼蟲進行感染。如圖一和圖二的結果所示，桿狀病毒之芽體病毒確實可以對幼蟲進行噴霧感染，但其感受性對不同種的幼蟲則有所差異。我們的結果顯示 AcMNPV 芽體病毒對擬尺蠖的感受性最佳，其次是小菜蛾和甜菜夜蛾，但對斜紋夜蛾及玉米穗蟲則無法以噴霧感染法進行病毒接種。是故，雖然腸道細胞的屏蔽已改由昆蟲的氣管系統，但病毒之宿主範圍並無法擴大，進一步的以帶有螢光基因之病毒對幼蟲進行感染，然後進行病理分析，追蹤病毒經氣孔後之感染途徑，將是瞭解此噴霧感染機制的重要工作。

甜菜夜蛾是台灣重要的經濟害蟲，年發生 11 世代，周年會發生但以 3~4 月及 9~11 月發生密度較高，由於已對許多化學農藥產生抗藥性，因此發展有效的生物防治法將有其必要性，而桿狀病毒 SpeiMNPV 是一很好的選擇。然桿狀病毒生物農藥要能普遍施用於田間，則開發低成本的量產製程將是一大關鍵。於本研究中，我們發現桿狀病毒 AcMNPV 可以噴霧感染的方式，感染擬尺蠖、小夜蛾和甜菜夜蛾，但不能以此感染途徑感染斜紋夜蛾和玉米穗蟲。於是我們進一步利用噴霧感染的方式，建立以甜菜夜蛾核多角體病毒 (SpeiMNPV) 對甜菜夜蛾幼蟲進行噴霧感染，發現分離自蟲體的 SpeiMNPV 芽體病毒可以有效的以噴霧感染方式感染二齡和三齡的甜菜夜蛾幼蟲，而雖然二齡蟲的感染率可達 77%，高於三齡蟲的 41%，但若計算 PIB 的產量時，則三齡蟲的產量則為二齡蟲的 100 倍，其 PIB 產量可達  $5 \times 10^7$ /larva，因此當利用 SpeiMNPV 芽體病毒以噴霧感染法來進行甜菜夜蛾核多角病毒生物農藥的量產時，三齡幼蟲是較佳的選擇。

在我們的實驗中，發現甜菜夜蛾 SpeiMNPV 芽體病毒，可對甜菜夜蛾二齡幼蟲進行極有效率的噴霧感染，而目前已商品化的 SpeiMNPV 病毒製劑 Spodex® 即主要是針對二齡之甜菜夜蛾進行防治，而以芽體病毒即可進行噴霧感染，顯示在田間亦有可能以芽體病毒進行生物防治。利用包含體病毒進行防治的好處在於包含體可以抵抗環境之壓力，存於田間之時日較長，甚至可以造成流行病，然則若是以基因重組之病毒，其長存於環境之中是不利的，因此芽體病毒的噴霧感染將可提供另一選擇，尤其是基因重組之病毒在實驗室階段或是半田間測試時，省時省力的噴霧感染法將可做為評估重組病毒是否具有增益殺蟲效果的分析平台。除此之外，我們亦發現硼酸的添加亦可增加 SpeiMNPV 對三齡甜菜夜蛾的致死效率 (圖四)，這與我們先前證明硼酸可做為 SpeiMNPV 包含體病毒協力劑的研究結果一致 (Jinn *et al.*, 2004)，因此硼酸亦可應用在桿狀病毒的噴霧感染防治上。

於本研究中，我們亦嘗試以噴霧感染法來感染甜菜夜蛾幼蟲，以生產 SpeiMNPV 包含體，希望能建立一方便且價廉的生產流程。而且除可降低成本外，以蟲體來生產 SpeiMNPV 亦可避免以細胞培養進行生產時，DI 病毒的產生。我們的結果顯示二齡甜菜夜蛾幼蟲雖有最佳之感染率 (圖三)，但因其生物質量 (biomass) 較低或是對病毒之抗性較差。其每隻幼蟲的 PIBs 產量約只有三齡甜菜夜蛾幼蟲的 1/10 (圖五)，因此若於 PIBs 的生產上，三齡幼蟲是較佳的選擇，而四齡蟲雖生物質量大，但有鑑於其感染效率與感受性兼低，並不適合用在 PIBs 的生產上。而若比較噴霧感染法和餵食感染法，則可知噴霧感染法在 PIBs 的產量上僅有餵食感染的一半。這可能是感染途徑不同所造成的差異，顯示在自然的環境

下，PIBs 經口感染而釋出 ODV 與經由高壓下 (約  $5.5 \times 10^4$  pa) 經氣管感染之 BV，於蟲體內之致病機轉有所不同，而於腸道釋出之 ODV 顯然可以產生較多之 PIBs，這也顯示若能以 ODV 進行噴霧感染也許可以得到較多之 PIBs。

## 引用文獻

- Cory, J. S., M. L. Hirst, T. Williams, R. S. Halls, D. Coulson, B. M. Green, T. M. Carty, R. D. Possee, P. J. Cayley, and D. H. L. Bishop. 1994. Field trial of a genetically improved baculovirus insecticide. *Nature*. 370: 138-140.
- Engelhard, E. K., L. N. W. Kan-Morgen, J. O. Washburn, and L. E. Volkman. 1994. The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nucleopolyhedrosis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 3224-3227.
- Hammock, B. D., B. C. Eonning, R. D. Possee, T. N. Hanzlik, and S. Maeda. 1990. Expression and effects of the juvenile hormone esterase in a baculovirus system. *Nature*. 344: 458-461.
- Jinn, T. R., S. S. Kao, and T. Y. Wu. 2004. Boric acid as a synergist of *Spodoptera exigua* and *Autographa californica* nuclear polyhedrosis viruses. *Formosan Entomol.* 24: 173-184. (in Chinese)
- Jinn, T. R., S. S. Kao, J. T. C. Tzeng, and T. Y. Wu. 2005. Coral red fluorescence protein as genetic modified baculovirus tracer. *J. Biotechnol.* 119: 255-259.
- Kost, T. A., J. P. Condreay, and D. L. Jarvis. 2005. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 23: 567-575.
- Maeda, S. 1989. Increased insecticidal effect by a recombinant baculovirus carrying a synthetic diuretic hormone gene. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 165: 1177-1183.
- Maeda, S., S. L. Volrath, T. N. Hanzlik, S. A. Harper, K. Majima, D. W. Maddox, B. D. Hammock, and E. Fowler. 1991. Insecticidal effects of an insect-specific neurotoxin expressed by a recombinant baculovirus. *Virology* 184: 777-780.
- Matz, M. V., A. F. Fradkov, Y. A. Labas, A. P. Savisky, A. G. Zaraisky, M. L. Markilov, and S. A. Lukyanov. 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat. Biotechnol.* 17: 969-973.
- Mayo, M. A. 2002. Virus taxonomy – Houston 2002. *Arch. Virol.* 147: 1071-1076.
- Merryweather, A. T., U. Weyer, M. P. Harris, M. Hirst, T. Booth, and R. D. Possee. 1990. Construction of genetically engineered baculovirus insecticides containing the *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 delta endotoxin. *J. Gen. Viral.* 71: 1535-1544.
- Moscardi, F. 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control

- of Lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 44: 257-289.
- Pijlman, G. P., E. van den Born, D. E. Martens, and J. M. Vlak.** 2001. *Autographa californica* baculoviruses with large genomic deletions are rapidly generated in infected insect cells. *Virology* 283: 132-138.
- Possee, R. D.** 1997. Baculovirus as expression vectors. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 569-572.
- Smith, G. E., M. D. Summers, and M. J. Fraser.** 1983. Production of human beta interferon in insect cells infected with baculovirus expression vector. *Mol. Cell. Biol.* 3: 2156-2165.
- Tomalski, M. D., and L. K. Miller.** 1991. Insect paralysis by baculovirus-mediated expression of a mite neurotoxin gene. *Nature* 352: 82-85.
- Tomalski, M. D., T. P. King, and L. K. Miller.** 1993. Expression of hornet genes encoding venom allergen antigen 5 in insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 22: 303-313.

收件日期：2007年4月24日

接受日期：2007年6月13日

# Assessment of the efficacy of aerosol infection by baculovirus on *Spodoptera exigua* larvae

Tzyy-Rong Jinn, Suey-Sheng Kao Biopesticides Division, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Taichung 413, Taiwan

Ying-Ju Chen, Tzong-Yuan Wu\* Department of Bioscience Technology, Chung Yuan Christian University, Chungli 320, Taiwan

## ABSTRACT

*Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (SpeiMNPV) is a potentially promising biological control microbe. However, the generation of defective interfering particles (DI) when produced in a laboratory by insect cultures is an obstacle for the practical use of SpeiMNPV based insecticide. In this study, we established a convenient aerosol infection procedure for *Spodoptera exigua* larvae and occlusion body production by *S. exigua* larvae. We found that second instar *S. exigua* larvae were more accessible than third or fourth instar larvae for infection with SpeiMNPV budding virus using aerosol. Furthermore, 2% boric acid can enhance the efficacy of aerosol infection as well as the mortality for *S. exigua* larvae. We also demonstrated that the *S. exigua* third instar larvae were optimal for occlusion body production by aerosol infection.

**Key words:** multiple nucleopolyhedrovirus, spray infection, bioinsecticide, *Spodoptera*, boric acid