



Formosan Entomologist

Journal Homepage: entsocjournal.yabee.com.tw

Production of *Spodoptera exigua* Nuclear Polyhedrosis Virus in Larvae **【Research report】**

甜菜夜蛾核多角體病毒之生產 **【研究報告】**

Li-Hsin Huang and Suey-Sheng Kao
黃莉欣、高穗生

*通訊作者E-mail :

Received: Accepted: 1994/05/21 Available online: 1994/09/01

Abstract

Polyhedra of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus (SeNPV) were propagated in 4th-instar larvae of *S. exigua*, which were reared on virus-contaminated semisynthetic diet. The virus yield was compared by producing at four inoculum rates : 2x10⁴, 4x10⁴, 2x10⁵ and 4x10⁵ PIB/cm² diet surface, and incubated at 25, 28, 30 and 32°C. The results showed that virus yields were not significantly correlated with inoculum rates but were slightly correlated with incubated temperatures. The highest average virus yield was obtained at 30°C at each of four inoculum rates. The polyhedra were detected 1-2 days after the larvae were placed on the virus-contaminated diet and then increased rapidly until day 5. Afterward, the number of polyhedra per larva decreased but stabilized at an average of 4x10⁸ PIB/ larva until day 10. Larvae began to show symptoms of disease at 2 days after inoculation, and died of viral infection at 3 days after inoculation. The number of microbial contaminants was relatively large on the first day of incubation, but decreased by day 2. The number again increased rapidly until day 4 and then slowly decreased until day 7. Total food consumption of virus-infected 4th-instar larvae to death was less than of healthy larvae from 4th-instar to pupation, but both differed significantly. When virus-infected larvae were fed on the diet less than 4 days, virus yield was significantly decreased. Based on food consumption, virus yield, larval mortality and microbial contamination, we suggest that SeNPV is optimal to produce by an artificial diet 1.54±0.23g (diameter 1.0cm, height 0.5cm), inoculum rate of 2x10⁵ PIB/cm² at 30°C and harvested 5-6 days after inoculation.

摘要

將甜菜夜蛾核多角體病毒 (*Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus, SeNPV) 稀釋成四種接種濃度，以表面污染法分別接種於人工培養基上，使濃度成為2x10⁴、4x10⁴、2x10⁵及4x10⁵ PIB/cm²等四種，供甜菜夜蛾四齡幼蟲取食，於25、28、30及32°C之培養箱中進行增殖試驗，結果顯示病毒產量與接種濃度沒有明顯相關，而與培養溫度有正相關趨勢。四種接種濃度於30°C培養下，所得之病毒產量最高。病毒接種後第1-2天，幼蟲體內即可發現含有病毒包含體，至第五天達最高；其後，含量減少，但至第10天每隻幼蟲體內病毒仍維持在4x10⁸ PIB上下波動。幼蟲初期病徵出現於第2天，第3天即可發現有明顯病徵之罹病蟲體。病毒培養第1天即有雜菌污染，至第4天達最高，隨後下降，至第7天所含雜菌最低。已感病之四齡幼蟲至死亡前所消耗的食物量較健康蟲體者為少。對已感病蟲體至少需提供4天的食物量，對其病毒產量才不致有顯著影響。依據食物消耗量、病毒生產、幼蟲死亡率及雜菌污染程度，認為甜菜夜蛾核多角體病毒生產條件為：接種培養基為1.54±0.23g (直徑約1cm，高約0.5cm)，接種濃度為每平方公分培養基表面含有2x10⁵ PIB，於30°C下培養，在接種後第5-6天收穫。

Key words: *Spodoptera exigua*, nuclear polyhedrosis virus, production.

關鍵詞: 甜菜夜蛾、核多角體病毒、生產。

Full Text:  [PDF\(0.41 MB\)](#)

下載其它卷期全文 Browse all articles in archive: <http://entsocjournal.yabee.com.tw>

甜菜夜蛾核多角體病毒之生產

黃莉欣、高穗生 臺灣省農業藥物毒物試驗所 生物藥劑系 臺中縣霧峰鄉舊正村光明路 11 號

摘 要

將甜菜夜蛾核多角體病毒 (*Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus, SeNPV) 稀釋成四種接種濃度，以表面污染法分別接種於人工培養基上，使濃度成為 2×10^4 、 4×10^4 、 2×10^5 及 4×10^5 PIB / cm^2 等四種，供甜菜夜蛾四齡幼蟲取食，於 25、28、30 及 32°C 之培養箱中進行增殖試驗，結果顯示病毒產量與接種濃度沒有明顯相關，而與培養溫度有正相關趨勢。四種接種濃度於 30°C 培養下，所得之病毒產量最高。病毒接種後第 1~2 天，幼蟲體內即可發現含有病毒包含體，至第五天達最高；其後，含量減少，但至第 10 天每隻幼蟲體內病毒仍維持在 4×10^8 PIB 上下波動。幼蟲初期病徵出現於第 2 天，第 3 天即可發現有明顯病徵之罹病蟲體。病毒培養第 1 天即有雜菌污染，至第 4 天達最高，隨後下降，至第 7 天所含雜菌最低。已感病之四齡幼蟲至死亡前所消耗的食物量較健康蟲體者為少。對已感病蟲體至少需提供 4 天的食物量，對其病毒產量才不致有顯著影響。依據食物消耗量、病毒生產、幼蟲死亡率及雜菌污染程度，認為甜菜夜蛾核多角體病毒生產條件為：接種培養基為 1.54 ± 0.23 g (直徑約 1 cm，高約 0.5 cm)，接種濃度為每平方公分培養基表面含有 2×10^5 PIB，於 30°C 下培養，在接種後第 5~6 天收穫。

關鍵詞：甜菜夜蛾、核多角體病毒、生產。

Production of *Spodoptera exigua* Nuclear Polyhedrosis Virus in Larvae

Li-Hsin Huang and Suey-Sheng Kao Biopesticide Department, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, 11, Kuang-Ming Road, Wufeng, Taichung Hsien Taiwan, R.O.C.

ABSTRACT

Polyhedra of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus (SeNPV) were propagated in 4th-instar larvae of *S. exigua*, which were reared on virus-contaminated semisynthetic diet. The virus yield was compared by producing at four inoculum rates: 2×10^4 , 4×10^4 , 2×10^5 and 4×10^6 PIB/cm² diet surface, and incubated at 25, 28, 30 and 32°C. The results showed that virus yields were not significantly correlated with inoculum rates but were slightly correlated with incubated temperatures. The highest average virus yield was obtained at 30°C at each of four inoculum rates. The polyhedra were detected 1-2 days after the larvae were placed on the virus-contaminated diet and then increased rapidly until day 5. Afterward, the number of polyhedra per larva decreased but stabilized at an average 4×10^8 PIB/larva until day 10. Larvae began to show symptoms of disease at 2 days after inoculation, and died of viral infection at 3 days after inoculation. The number of microbial contaminants was relatively large on the first day of incubation, but decreased by day 2. The number again increased rapidly until day 4 and then slowly decreased until day 7. Total food consumption of virus-infected 4th-instar larvae to death was less than of healthy larvae from 4th-instar to pupation, but both differed in significantly. When virus-infected larvae were fed on the diet less than 4 days, virus yield was significantly decreased. Based on food consumption, virus yield, larval mortality and microbial contamination, we suggest that SeNPV is optimal to produce by an artificial diet 1.54 ± 0.23 g (diameter 1.0cm, height 0.5cm), inoculum rate of 2×10^6 PIB/cm² at 30°C and harvested 5-6 days after inoculation.

Key words: *Spodoptera exigua*, nuclear polyhedrosis virus, production.

前 言

甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)為臺灣重要經濟害蟲之一，其幼蟲食性雜，為害寄主植物達 40 種以上(Chen and Chang, 1989)，又因對化學藥劑極易產生忍受性或抗性(Poe *et al.*, 1973; Cobb and Bass, 1975)，造成防治上極大的困擾。目前正式推廣防治甜菜夜蛾之藥劑為 2.8% 畢芬寧乳劑，而部分地區也利用懸掛性費洛蒙誘殺器或噴施黑殭菌進行防治工作(Kao and Tsai, 1989;

Cheng *et al.*, 1989)，尚無法有效地控制該蟲的為害，因此，找尋其他有效的防治方法，納入綜合防治之列，是刻不容緩的課題。核多角體病毒(nuclear polyhedrosis virus, NPV)對鱗翅目幼蟲具有頗高之致病力，且對人畜無害，是昆蟲病毒種類中最具有微生物防治潛力者，其應用相當廣，且部分種類已有商品化，如 *Heliothis zea* NPV、*Orgyia pseudotsugata* NPV、*Lymantria dispar* NPV 及 *Neodiprion sertifer* NPV (Ignoffo, 1973; Shapiro, 1982, 1986; Yearian and

Young, 1982; Smits *et al.*, 1984)。甜菜夜蛾核多角體病毒 (SeNPV) 對甜菜夜蛾幼蟲具有頗高之致病力，也具有田間防治效果 (Shapiro, 1982; Gelernter and Federici, 1986; Gelernter *et al.*, 1986; Smits *et al.*, 1987)，故有發展成爲微生物製劑之潛力。

病毒生產是將病毒感染活體後，於體內增殖，再行分離而得。從經濟效益的觀點，病毒製劑之製備首要工作是在低成本下，大量生產具有病毒活性及雜菌污染最低的病毒。病毒生產過程中，影響質與量的因子很多，如蟲齡及蟲期、接種濃度、培養環境條件，如溫度、濕度、光照、容器及收穫時間等 (Shapiro, 1982, 1986)。本研究僅就接種濃度、培養溫度及收穫時間等因子進行探討，期能在經濟有效的條件下，建立室內生產 SeNPV 的方法，以提供未來田間應用時大量生產 SeNPV 之參考。

材料與方法

一、蟲源之飼育

自田間採得之甜菜夜蛾幼蟲攜回室內，以半合成人工培養基飼育繁殖 (Kao and Huang, 1992)。成蟲配成 10 對飼養並餵食 20% 蜜水，每日收集卵片，以 10% 福馬林 (Formalin) 浸泡 60 min 後，以清水沖洗 20 min，將卵片風乾後，置入培養皿內，俟其孵化後，再移入塑膠杯內飼養。爲避免自殘行爲的發生，於四齡即以單隻飼育。化蛹後鑑定雌雄，分別置放，羽化後再行配對飼養。幼蟲及成蟲均培養於 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ，60~65% RH, 12L:12D 之培養箱中。

二、核多角體病毒之製備

SeNPV 係於埔里滿天星園中發現甜菜夜蛾罹病蟲隻，攜回實驗室內，經離心、純化，以掃描式電子顯微鏡及穿透式電子顯微

鏡鑑定爲 NPV 所引起之罹病現象，後亦經 Cheng (1990) 及 Tuan *et al.* (1994) 以 TEM 及生化方法確定爲 NPV。SeNPV 之製備是將 NPV 接種於幼蟲培養基上，供四齡幼蟲取食，罹病蟲體以指形管收集之，並貯存於 -20°C 下，爾後，再將蟲體磨碎、過濾，所得之懸浮液是爲供試病毒。

三、帶病蟲體食物提供及供給時間對病毒產量及幼蟲體重之影響

四齡幼蟲餵食含有病毒包含體 (polyhedral inclusion body, PIB) 培養基 24 小時後，更換餵食不含 PIB 之新鮮培養基，是爲帶病蟲體。將不含 PIB 之培養基分別讓帶病蟲體取食 2 天、4 天及連續取食至死亡，與不供給食物等四種處理，分析比較其每隻病蟲所含 PIB 量及其蟲體重之差異。

四、SeNPV 接種濃度與培養溫度之測定

本項試驗是以單隻飼育盒飼養觀察。將培養基截成直徑約 1 cm，高約 0.5 cm 之定量，置於飼育盒內，SeNPV 稀釋成四種濃度，接種於培養基表面上，使培養基表面濃度爲 2×10^4 、 4×10^4 、 2×10^5 及 4×10^5 PIB/cm²，爲避免蟲體大小造成 PIB 產量上估算的差異，故以一定之體重標準，比較其產量上的差異。將四齡幼蟲稱重後 ($12.0 \pm 2 \times 1.9$ mg, mean \pm 2SD) 移入飼育盒內，分別於 25、28、30 及 32°C 之培養箱中培養，逐日觀察記錄死亡情形，並將罹病死亡蟲體放置在 -10°C 冷凍庫內，待屍體殭硬後，每隻病蟲加入 200 cc 之無菌水後，以均質機磨碎、過濾，以血球計數盤 (hemacytometer) 於位相差顯微鏡 600 倍下，計算每隻罹病蟲所含 PIB 之數量。每組試驗供試蟲 210 隻四齡幼蟲。

五、SeNPV 接種後培養時間與 PIB 產量及微生物污染之關係

爲便於試驗操作，本項試驗以 24 孔培養盤進行飼育培養。將含 PIB 之培養基 (2×10^5

PIB / cm²) 定量置於每孔內，並接入四齡幼蟲，定溫培養之，所選用接種濃度與培養溫度見結果與討論中 SeNPV 接種濃度與培養溫度之測定。逐日取出一盤置於-10℃ 冷凍庫內，至第 10 天止，共計 11 盤(包括餵食不含 PIB 培養基之處理一盤)。不論幼蟲罹病與否，所取出之培養盤於 48 小時內，以一隻蟲體加入 10cc. 無菌水的比例，均勻磨碎、過濾後，估算每隻幼蟲平均所含 PIB 數目。並以 10 倍連續稀釋法將懸浮液培養於 plate-count-agar (PCA, Merck) 上(Smits, 1987)，進行微生物污染測試，以決定 PIB 產量最多且雜菌數最低的培養時間，作為 SeNPV 生產時收穫時間的依據。

結果與討論

一、帶病蟲體食物提供及供給時間對 PIB 產量及幼蟲體重之影響

四齡幼蟲感病後，食物提供及供給時間對 PIB 在幼蟲體內增殖的數量有顯著影響(表一)，不供給任何食物者，大約可存活 4 天，每隻幼蟲體內平均含有 5.6×10^7 PIB，與有食物供給之處理間有顯著差異，隨著食物供給時間的增加，PIB 產量亦隨之增加，取食 2 天者，平均每隻幼蟲含有 6.26×10^8 PIB，與取食 4 天及連續取食者間亦有差異，但後二者 PIB 產量則沒有顯著差異，平均每隻幼蟲含有 1.3×10^9 PIB。幼蟲最後體重也隨著食物供給時間的增加而顯著增加，與 PIB 的增殖數量呈正相關。由此顯示，食物供給與否及供給時間為病毒生產過程中應考慮的重要因子。

昆蟲病原微生物在寄主體內增殖時會引起寄主食物消耗量的改變(Hajek, 1989)，食物消耗量之增減因蟲種而異，例如 *Trichoplusia ni* 幼蟲感染 NPV 後對食物之消耗量

減少(Harper, 1973)，*L. dispar* 幼蟲感染蟲生真菌(*Entomophaga maimaiga*)後至死亡前二天取食量亦較健康蟲體少(Hajek, 1989)，但 *Spodoptera litura* 幼蟲感染 NPV 後對食物總消耗量卻增加(Subrahmanyam and Ramakrishnan, 1981)。一隻健康的甜菜夜蛾四齡幼蟲至化蛹所需消耗的食物量平均為 458.2 ± 173.2 mg，而帶病之四齡幼蟲至罹病死亡之前(約感染後 3~6 天)所消耗的食物量平均為 267.5 ± 184.2 mg，較健康蟲體為少，經 t-test ($p=0.05$) 檢定結果有顯著差異(表二)。依據表一之結果，SeNPV 生產過程中至少需提供幼蟲四天的食物量，每隻幼蟲約需 412.8 mg(不考慮已感病蟲體最後化蛹或病死)，由於培養基會因蒸散作用而流失水分，為減少水分流失而影響幼蟲食慾，故供給的培養基必須大於 412.8 mg，因此將培養基定量截成直徑約 1 cm，高約 0.5 cm，其每塊平均重量為 1.54 ± 0.23 g，約可維持 6~7 天，才需更換培養基，故依據該定量培養基的方法，作為 SeNPV 生產過程中食物供給量的標準，亦為爾後供試培養基之供給標準。

二、SeNPV 接種濃度與培養溫度之測定

SeNPV 增殖試驗中，將 SeNPV 四種稀釋濃度分別接種於供試培養基上，餵食甜菜夜蛾四齡幼蟲，並培養於 25、28、30 及 32℃ 等四種溫度下。由表三顯示蟲體死亡速率，隨著濃度及溫度的增加而逐漸縮短，在 SeNPV 二種低濃度 (2×10^4 , 4×10^4 PIB / cm²) 下，幼蟲死亡率隨培養溫度之增高而增加，後者濃度於 30℃ 及 32℃ 下則有顯著的增加；但於高濃度 (2×10^5 , 4×10^5 PIB / cm²) 下則沒有顯著增加的現象。接種濃度與培養溫度對 PIB 產量有顯著影響(表四)，就接種濃度而言，同溫度下，PIB 產量沒有明顯的隨接種濃度的增加而增加，於 25℃ 及 28℃ 下不同接種濃度稍有差異，30℃ 及 32℃ 則無明顯差

表一 甜菜夜蛾四齡幼蟲感染甜菜夜蛾核多角體病毒後取食新鮮人工飼料的時間長短對病毒包含體產量及幼蟲最後體重的影響

Table 1. Effects on length of feeding on fresh diet after 4th-instar *S. exigua* larvae infected with SeNPV against production of polyhedral inclusion bodies and larval final weight¹⁾

Treatment	Final weight before death per larva (mg)	Virus yield ($\times 10^8$ PIB / larva)
Starved	19.8c	0.56c
Fed for 2days after infection	59.0b	6.26b
Fed for 4days after infection	89.3a	13.44a
Fed continuously up to dead	98.2a	13.30a

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

表二 甜菜夜蛾四齡幼蟲感染核多角體病毒後至罹病死亡與健康蟲體至化蛹前取食量之比較

Table 2. Comparison of food consumption by healthy and infected 4th-instar *S. exigua* larvae up to pupation and death

Treatment	No. test	Food consumption / larva (\pm SD mg)	t-value ($\alpha=0.05$)
Healthy 4th-instar larvae up to pupation	39	458.2 \pm 173.2	
Infected 4th-instar larvae up to death	43	267.5 \pm 184.2	4.815* ¹⁾

1) *Significantly different.

表三 不同溫度下，接種濃度對甜菜夜蛾四齡幼蟲半數致死時間及死亡率之影響

Table 3. Influence of inoculum rate on LT_{50} and mortality of *S. exigua* 4th-instar larvae at various temperatures^{1,2)}

Inoculum rate (PIB / cm^2)	LT_{50} (days)				% Mortality ³⁾			
	25°C	28°C	30°C	32°C	25°C	28°C	30°C	32°C
2x10 ⁴	—	—	8.5c	7.0c	46.7c A	48.6c A	54.8c A	58.6c A
4x10 ⁴	8.7b C	8.5b C	7.4b B	5.8b A	53.3c B	58.6b B	76.2b A	80.0b A
2x10 ⁵	6.2b D	5.5a C	4.8a B	4.4a A	95.2a A	93.3a A	90.5a A	91.9a A
4x10 ⁵	5.7a B	5.0a A	4.6a A	4.4a A	90.0b A	91.9a A	91.9a A	91.9a A

1) Incubation period for each treatment was 10days.

2) 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).

3) Mortality was corrected using Abbot's formula before statistical analysis.

異，與 Hedlund and Yendol (1974) 指出病毒濃度並沒有顯著影響病毒產量之結果相仿。就培養溫度而言，同濃度下，PIB 產量有隨溫度的增高而顯著增加，培養溫度於

30°C 時，任一接種濃度所得之 PIB 數量均達最高，以 2x10⁴ PIB / cm^2 所產生的 2.2x10⁹ PIB / larva 最高，4x10⁴ PIB / cm^2 所生產者次之，二種高濃度所生產之 PIB 數量均為

表四 不同接種濃度及培養溫度對甜菜夜蛾核多角體病毒之生產影響

Table 4. Effects of inoculum rates and incubated temperature on the yield of SeNPV in 4th-instar larvae of *S. exigua*^{1,2)}

Temperature (°C)	Virus yield(x10 ⁹ PIB / larva)			
	Inoculum rate(PIB / cm ²)			
	2x10 ⁴	4x10 ⁴	2x10 ⁵	4x10 ⁵
25	1.0c B	1.4b A	1.5bc A	1.2b AB
28	1.6b A	1.1b B	1.4c AB	1.3b AB
30	2.2a A	2.1a A	1.9a A	1.9a A
32	1.8ab A	1.9a A	0.8ab A	1.9a A

1) Incubation period for each treatment was 10days.

2) 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).

1.9x10⁹ PIB，稍低於低濃度者，其原因可能是幼蟲在高濃度處理的死亡時間縮短，病毒無法在蟲體內獲得足夠的活細胞及營養而增殖所致。於32°C培養的 PIB 產量雖較30°C為低，但差異不顯著。4x10⁴及2x10⁵ PIB / cm²二種濃度於25°C培養所得之 PIB 量較28°C稍高，但差異不顯著。依據 PIB 產量、死亡率及幼蟲半數致死時間(LT₅₀)認為室內生產 SeNPV 時，接種濃度為每平方公分培養基表面含有2x10⁵ PIB，培養溫度為30°C為宜，但依據此條件所生產之 SeNPV 平均每隻幼蟲約可生產1.9x10⁹ PIB，此結果較 Gelernter *et al.* (1986)所報導2.1x10⁹ PIB 稍低，但較 Shapiro (1982)每隻甜菜夜蛾幼蟲最高平均產量為6x10⁸ PIB 之結果為高，由於生物本身之變異性極大，可能是造成接種濃度及產量上差異的原因。

病毒生產時，接種濃度隨著蟲種或研究者之不同而有差異。一般而言，接種濃度有自1x10⁵至5x10⁷ PIB / ml (Shapiro, 1982)。本研究認為 SeNPV 生產時接種濃度為2x10⁵ PIB / cm²(配製濃度約3x10⁶ PIB / ml)較 Smits *et al.* (1984)報導每小塊培養基(2.5x2.5 cm)接種5x10⁵ PIB 為低，亦較 Smits 於1987年報導7.5x10⁴ PIB / cm²為低。培養溫度除與病毒產量有關外，也影響

病毒品質。Shapiro (1986)指出一般病毒生產的溫度在20~26°C之間，溫度若高於32°C，其產量均不及於29°C以下者，較本研究認為30°C為較佳之培養溫度為低。Watanabe and Tanada (1972)認為高溫會阻礙多角體蛋白的合成(polyhedron-protein synthesis)，而無法形成多角體的外鞘(poly-saccharide coat)，造成病毒感染的蟲體死亡率降低：如 *Pieris rapae* 感染顆粒體病毒(granulosis virus, GV)後飼養於36°C下，*T. ni*與 *H. zea* 感染 NPV 後在39°C下飼養，以及 *Bombyx mori* 感染 NPV 飼養於36°C等，其病毒幾乎無法感染蟲體致死。該現象可能亦就是本研究於32°C培養下之 PIB 產量及高濃度下之死亡率均稍降的原因。Thompson (1959)指出適宜的溫度能使病毒在寄主細胞內得到充分的增殖，然甜菜夜蛾主要分佈於熱帶及亞熱帶地區，在25°C下完成一世代約需23.5天，於30及33°C下分別約需17天及15天(Smits, 1987)，因此推測30°C可能為其適宜溫度的範圍，故於30°C培養下，PIB 產量豐度達最高，而較其他研究者所提出之溫度為高。由本研究結果觀之，接種濃度與培養溫度對 PIB 產量之影響，並非單獨之影響，而是兩者相互作用之影響，故病毒生產時接種濃度與培養溫度應

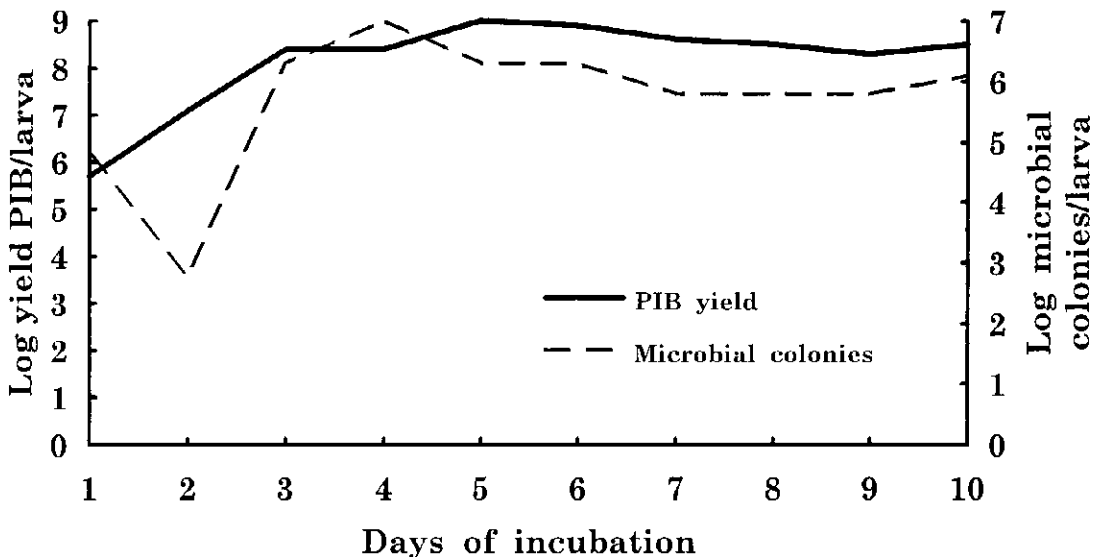
該共同考慮之。

三、病毒接種後培養時間與 PIB 產量及微生物污染之關係

甜菜夜蛾四齡幼蟲接種病毒後，第 1~2 天內並沒有發現罹病蟲體，但接種後第二天即開始有病徵的出現，有些蟲體行動緩慢，身體稍微腫大，與 Smits *et al.* (1984) 報導接種後第三天才開始出現病徵之結果不同，但 Smits (1987) 又指出感染後第二天之幼蟲便有病徵出現，與本結果相同。培養至第 5~6 天，有些罹病蟲體色變黑，少數病蟲則因 PIB 增殖腫大，而使表皮破裂，流出含有 PIB 之體液，造成病蟲收集上的困擾。

由圖一結果顯示，幼蟲感染病毒後第一天即可發現幼蟲體內已含有 PIB，平均每隻幼蟲含有 10^5 PIB，隨著培養時間的延長，PIB 數量快速增加，每隻幼蟲產生 PIB 約 $10^7 \sim 10^9$ 個。培養至第 5 天時，PIB 增殖

數量達最高，每隻幼蟲約為 1×10^9 PIB，此一結果與 Smits *et al.* (1984) 指出培養至第 8 天產量達 1.3×10^9 PIB / larva 為最高之結果有異。在第 5 天後產量雖降低，但尚維持穩定，每隻幼蟲體內所含 PIB 數量約在 4×10^8 PIB 上下波動，較 Smits (1987) 之報導培養至第 4 天以後，每隻幼蟲所含 PIB 約為 $1 \sim 2 \times 10^8$ 個之結果為低，亦較前項試驗(病毒接種濃度與培養溫度之測定)於 30°C 培養下，每隻幼蟲平均含有 1.9×10^8 PIB 為低，前項試驗是考慮接種濃度與培養溫度的篩選，故以收集完整之罹病蟲單隻計數之，而本項試驗則為了配合大量生產時大量收集蟲體而考慮，故不論幼蟲罹病與否，均一起收集、磨碎，再計數平均一隻病蟲所含 PIB 的數量，然而所收集之病蟲其罹病死亡時間長短不一，有些表皮已破裂，導致 PIB 流失而無法收集完整之蟲體，因而造成 PIB 產量的減少。另外，



圖一 甜菜夜蛾四齡幼蟲接種甜菜夜蛾核多角體病毒後每日幼蟲病毒包涵體產量及其雜菌污染程度。

Fig. 1. Production and microbial contamination of polyhedral inclusion body harvested at daily intervals after infection of *S. exigua* 4th-instar larvae with SeNPV (2×10^8 PIB / cm^2 on diet surface) at 30°C .

本項試驗是以 24 孔培養盤進行培養(每孔直徑約 1.8 cm, 高約 2.0 cm), 其空間較單隻飼育盒(直徑約 2.5 cm, 高約 5 cm)為小, 蟲體的生長受到限制, 因而影響 PIB 的產量, 可能是造成產量降低的另一原因。由此觀之, 培養器材之大小可能也是造成 PIB 產量多寡的因素之一。

病毒生產是將病毒接種在半合成人工培養基上, 再讓幼蟲取食感染, 於蟲體內進行增殖。因此, 生產過程中, 難免受到其他微生物如細菌、真菌類的污染。本研究發現病毒培養過程中, 受到微生物污染的種類以細菌為主, 真菌相當少, 與 Shapiro (1986)及 Smits *et al.* (1984)之報導相仿。從圖一中可看出微生物污染程度並不與培養時間呈正相關, 培養一天以後, 微生物污染相當高, 但培養至第二天時, 污染程度卻明顯降低, 可能是因幼蟲人工培養基內含有鏈黴素(streptomycin)及山梨酸(sorbic acid)之抑制劑, 而暫時抑制微生物的增殖。第 3 天以後, 因為蟲體開始死亡及排泄物的存在, 微生物又明顯的增加, 至第四天時達最高, 第五天之後, 蟲體開始大量死亡, 而且有些蟲體表皮破裂, 流出體液, 其微生物污染則呈降低趨勢, 第 10 天時, 則又小幅攀升, 可能是因腐生菌的感染所致。因此, 從每日 PIB 產量及微生物污染程度之結果, 認為收集病蟲的時間以病毒接種後培養 5~6 天較佳, 而 Smits (1987)則認為 SeNPV 培養在 30°C 時, 培養第 7 天收穫之較佳。

誌 謝

本文承農委會補助經費(79 農建-7.1-糧-51), 試驗期間又承林美雀及陳連絲二位小姐的協助, 使試驗得以順利進行, 文稿後復蒙中興大學侯豐男教授悉心斧正及三位未具名

專家細心審閱修正與建議, 謹此致謝。

參考文獻

- Chen, W. S., and F. I. Chang. 1989. The ecology of beet armyworm and its control. Chinese J. Entomol., Special Publication No.4 p161-195. (In Chinese).
- Cheng, J. C. 1990. Molecular cloning of polyhedrin gene from *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. Master Thesis. Research Institute of Biology, Fu Jen Catholic University. 58pp. (In Chinese).
- Cheng, E. Y., W. Y. Su, C. N. Chen, W. G. Lin, and D. F. Lin. 1989. Application of synthetic sex pheromone for beet armyworm, *Spodoptera exigua*, control in green onion field. Chinese J. Entomol., Special Publication No.4 p199-213. (In Chinese).
- Cobb, P. P., and M. H. Bass. 1976. Beet armyworm: Dosage-mortality studies on California and Florida strain. J. Econ. Entomol. 68: 813-814.
- 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.
- Gelernter, W. D., N. C. Toscano, K. Kido, and B. A. Federici. 1986. Comparison of a nuclear polyhedrosis virus and chemical insecticides for

- control of the beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on head lettuce. *J. Econ. Entomol.* 79: 714-717.
- Hajek, A. E.** 1989. Food consumption by *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) larvae infected with *Entomophaga maimaiga* (Zygomycetes: Entomophthorales). *Environ. Entomol.* 18: 723-727.
- Harper, J. D.** 1973. Food consumption by cabbage loopers infected with nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.* 21: 191-197.
- 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.
- Ignoffo, C. M.** 1973. Development of a viral insecticide: Concept to commercialization. *Expl. Parasitol.* 33: 380-406.
- Kao, C. W., and Y. S. Tsai.** 1989. Control of beet armyworm with Entomopathogenic fungi. *Chinese J. Entomol.*, Special Publication No.4 p214-225. (In Chinese).
- Kao, S. S., and L. H. Huang.** 1992. Effectiveness of UV protectants for *Spodoptera exigua* (Hübner) nuclear polyhedrosis virus. *Chinese J. Entomol.* 12: 31-40. (In Chinese).
- Poe, S. L., G. L. Crane, and D. Cooper.** 1973. Bionomics of *Spodoptera exigua* (Hübner), the beet armyworm, in relation to floral crops. *J. Trop. Reg. Am. Soc. Hort. Sci.* 178: 389-396.
- 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. N. Y. 720 pp.
- Shapiro, M.** 1986. *In vivo* production of Baculoviruses. pp. 31-62. In R. R. Granadas and B. A. Federici, eds. *The Biology of Baculoviruses. Vol. II. Practical application for insect control.* CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 276 pp.
- Smits, P. H.** 1987. Nuclear polyhedrosis virus as biological control agent of *Spodoptera exigua*. Ph. D. Thesis, Agricultural University, Wageningen. 125 pp.
- Smits, P. H., M. van de Vrie, and J. M. Vlæk.** 1987. Nuclear polyhedrosis virus for control of *Spodoptera exigua* larvae on glasshouse crops. *Entomol. Exp. Appl.* 43: 73-80.
- Smits, P. H., R. von Schomberg, M. van de Vrie, and J. M. Vlæk.** 1984. Production of a nuclear polyhedrosis virus in larvae of beet armyworm, *Spodoptera exigua* Hbn (Noctuidae). *Med Fac. Landbouw Rijksuniv Gent.* 49 / 3a: 867-873.
- 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.
- Thompson, C. G.** 1959. Thermal inhibition of certain polyhedrosis virus disease. *J. Insect Pathol.* 1: 189-190.

- Tuan, S. J., Kao, S. S., and Cheng, D. J.** 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.
- Yearian, W. C., and S. Y. Young.** 1982. Control of insect pests of agricultural importance by viral insecticides. In E. Kustak, ed. Microbial and viral pesticides. Marcel Dekker Inc. N. Y. 720 pp.

收件日期：1994年1月11日

接受日期：1994年5月21日