



Factors Affecting Pathogenicity and Stability of *Spodoptera litura* Nuclear Polyhedrosis Virus Isolated in Taiwan 【Research report】

影響斜紋夜蛾核多角體病毒台灣分離株致病力及穩定性因子之研究【研究報告】

Tuan, S. J.*, Kao, S.S., and Leu, U. L.
段淑人*、高穗生、劉貞良

*通訊作者E-mail :

Received: Accepted: 1995/01/14 Available online: 1995/03/01

Abstract

The pathogenicity and stability of *Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis Virus (S1MNPV) were affected by incubation temperature, heating, pH, chloride ion, water quality, and sunlight. The final mortality of 3rd-instr larvae of *S. litura* caused by S1MNPV was not significantly increased, but the incubation period was decreased at higher temperatures. The LT₅₀ values were 3.29、5.06、5.49、8.79 and 18.93 days from 35°C to 15°C respectively. Histological sections showed that nuclei of epidermal cells, fat body, tracheal membrane, and column cells of midgut were more rapidly infected at higher temperatures of incubation. The virus in a dry powder was more thermostable than in a suspension. Of the original activity 80 percent was remained when the virus was exposed at 55°C for 24 h. S1MNPV was not affected significantly on suspension at pH 5, 7, and 9 for 24 h, but greatly inactivated on exposure to pH 3 and 11, and to solutions containing chloride ions at high concentrations. Solar radiation was the most powerful factor that inactivated viral activity in a brief period of exposure. Uric acid provided significant protection from sunlight for S1MNPV.

摘要

斜紋夜蛾核多角體病毒 (*Spodoptera litura* multiple nuclear polyhedrosis virus, S1MNPV) 對斜紋夜蛾幼蟲之致病力會受到培育溫度、日照、高溫、強酸、氯離子及水質之影響。三齡幼蟲經病毒接種後在35、30、25、20、及15°C生長箱中培養發病，結果測得其半致死時間分別為：3.29、5.06、5.49、8.79、及18.93天。隨著培育溫度的下降，幼蟲發病之潛伏期及罹病死亡之時間亦明顯延長；然累記至幼蟲化蛹前，幼蟲之總罹病死亡率並不因溫度而增減，且差異不顯著。經石蠟切片觀察，病毒感染幼蟲真皮層細胞、脂肪體細胞、氣管被膜細胞、以及中腸柱狀細胞等細胞核之感染程度均隨著溫度之上升而加速其嚴重性。病毒以粉末型式較水懸液耐高溫加熱處理，經55°C處理24小時，仍保留80%以上之活性。在中性及pH值9的磷酸緩衝液中，病毒之原有活性保留百分率較高，但在強酸、強鹼及含高濃度氯離子之溶液中則極易喪失活性。在田間稀釋用水，應以中性及無氯離子之地下水為宜。病毒在自然日光之照射下很容易喪失活性，但有尿酸作為抗紫外線保護劑者，可延長病毒在甘藍葉上之持續性。

Key words: *Spodoptera litura*, nuclear polyhedrosis virus, pathogenicity, stability.

關鍵詞: 斜紋夜蛾、核多角體病毒、致病力、穩定性。

Full Text:  [PDF \(1.61 MB\)](#)

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

影響斜紋夜蛾核多角體病毒台灣分離株致病力及穩定性因子之研究

段淑人*、高穗生、劉員良 台灣省農業藥物毒物試驗所

摘 要

斜紋夜蛾核多角體病毒(*Spodoptera litura* multiple nuclear polyhedrosis virus, SIMNPV)對斜紋夜蛾幼蟲之致病力會受到培育溫度、日照、高溫、強酸、氯離子及水質之影響。三齡幼蟲經病毒接種後在35、30、25、20、及15°C生長箱中培養發病，結果測得其半致死時間分別為：3.29、5.06、5.49、8.79、及18.93天。隨著培育溫度的下降，幼蟲發病之潛伏期及罹病死亡之時間亦明顯延長；然累記至幼蟲化蛹前，幼蟲之總罹病死亡率並不因溫度而增減，且差異不顯著。經石蠟切片觀察，病毒感染幼蟲真皮層細胞、脂肪體細胞、氣管被膜細胞、以及中腸柱狀細胞等細胞核之感染程度均隨著溫度之上升而加速其嚴重性。病毒以粉末型式較水懸液耐高溫加熱處理，經55°C處理24小時，仍保留80%以上之活性。在中性及pH值9的磷酸緩衝液中，病毒之原有活性保留百分率較高，但在強酸、強鹼及含高濃度氯離子之溶液中則極易喪失活性。在田間稀釋用水，應以中性及無氯離子之地下水為宜。病毒在自然日光之照射下很容易喪失活性，但有尿酸作為抗紫外線保護劑者，可延長病毒在甘藍葉上之持續性。

關鍵詞：斜紋夜蛾、核多角體病毒、致病力、穩定性。

前 言

斜紋夜蛾核多角體病毒(SIMNPV)對斜紋夜蛾幼蟲具有頗高之致病力(Tuan *et al.*, 1995)。病毒經口進入幼蟲中腸後，經鹼性腸液及酵素作用後使得病毒粒子自包含體內釋出，並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、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)。病毒接種濃度愈高，死亡率愈高，潛伏期也愈短；寄主幼蟲隨著齡期之增長對病毒之感受性亦漸低(Tuan *et al.*, 1989; 1994)。溫度亦是影響感病幼蟲發病死亡率之重要因子，溫度高時病毒可以縮短幼蟲發病潛伏期，於較短的時間內導致感病幼蟲大量死亡，而溫度偏低時幼蟲死亡時間則明顯延長，然過高的溫度

反而會使接種幼蟲罹病死亡率降低(Ignoffo, 1966; Boucias *et al.*, 1980; Salama *et al.*, 1986; Tuan *et al.*, 1989)。病毒耐高溫之程度亦因種類而異，一般而言，有完整包含體保護之病毒(occluded virus)核蛋白(nucleoprotein)較無包含體結構之病毒(Non-occluded virus)耐高溫。大部分之昆蟲病毒經70-80°C處理10分鐘後，即會喪失全部或絕大部分之活性(Martignoni and Iwai, 1977)。然而斜紋夜蛾核多角體病毒在90°C高溫下10分鐘後仍可保留部分活性(Harpaz and Raccach, 1978)。病毒懸浮液之酸鹼度過高及過低時會影響病毒活性，以中性較適宜(Ignoffo and Garcia, 1966)。作物葉表露水之pH值及離子成分是一重要的影響因子，尤其是當核多角體病毒與鹼性露水作用後，會使病毒包含體溶解而失去大量的活性(Young *et al.*, 1977; Tuan *et al.*, 1989)。擬尺蠖核多角體病毒在酸性土壤中，較在中性土壤中容易喪失活性(Thomas *et al.*, 1973)。在田間影響病毒持久性最主要之因子為陽光之不活化作用(Young and Yearina, 1974; Tuan *et al.*, 1989)，其中尤以高能量短光波280-320 nm之紫外線對病毒活性之傷害最大(Timans, 1982)。利用紫外線保護劑可減弱病毒活性受日照的損害程度，如尿酸(uric acid)、葉酸(folic acid)、活性炭(activated charcoal)、奶粉(milk powder)及卵蛋白(egg albumin)等添加物均可增強病毒在田間日照下之持續性，提高原有病毒活性保留百分率(Original activity remaining, OAR%)(Kao and Huang, 1992)。由於核多角體病毒之致病力與持續性會受到環境中各種理化因子影響，為使我們更了解本省斜紋夜蛾核多角體病毒之穩定性及最適宜的環境條件，以達到妥善運用病毒為害蟲防治之利器，本文就培育溫度、耐熱性、耐酸鹼性、抗陽光輻

射性、及在田間施用時之最佳稀釋水等事項做初步探討。

材料與方法

一、斜紋夜盜蛾之大量飼育

以人工飼料(Hung and Hwang, 1988)繼代飼育採自霧峰鄉芋仔田之斜紋夜蛾幼蟲，成蛾餵予20%之蜂蜜水，每十對成蛾置於一產卵箱內交尾產卵。卵塊經5%福馬林溶液浸泡15分鐘後，以清潔之流水淋洗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，以防止幼蟲自殘、並預防因飼育密度高而引發蟲體罹病。幼蟲化蛹後分雌雄，待羽化後再配成對繁衍子代。生長箱條件為 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 12L: 12D, $65 \pm 5\%$ R.H. 並於第三代以後選擇健康蟲體進行試驗。

二、核多角體病毒之來源

核多角體病毒係分離自本省霧峰鄉芋頭田中之罹病斜紋夜蛾幼蟲蟲體，以接種源飲入法(Klein, 1978)將病毒懸浮液點滴於飼育杯之杯壁上，接種健康的四齡初或五齡初幼蟲，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。蟲體經加入磷酸緩衝液研磨、再以兩層100目之尼龍網粗濾後即可獲得大量活化之病毒。

三、培育溫度對病毒感染幼蟲之影響

以三齡初蛻幼蟲為供試蟲，利用接種源飲入法餵予每隻幼蟲 2×10^4 病毒包含體(PIBs)，接種後二小時給予新鮮人工飼料，並分別置於15、20、25、30及35°C五種溫度之恆溫生長箱中俟發病，每處理30隻供試蟲、各處理均重覆三次，並以無菌水為對照組。連續觀察直至供試蟲死亡或化蛹測試，並記錄死亡率。計算各溫度下之半致死時

間(LT₅₀)。同時又自各溫度處理組中，取接種後三天至七天之感病幼蟲，置於固定液中(福馬林：醋酸：70%酒精=1:1:20)。以序列酒精進行脫水，後以二甲苯與石蠟成1:1之體積比於45°C的烘箱中浸漬隔夜，最後換成純蠟浸漬隔夜即可進行包埋及切片。切片厚度為4 μm，以Hamm(1966)的方法，利用Azocarmine 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，在200倍光學顯微鏡下觀察，感染核多角體病毒的細胞核呈明顯的鮮紅顏色，與正常細胞區別。藉此比較培育溫度對病毒在寄主體內感染組織之影響。

四、影響核多角體病毒活性因子之研究

以下所有之生物檢定試驗均以斜紋夜蛾四齡初蛻幼蟲為供試蟲，病毒濃度均為10⁷ PIBs/ml，以接種源飲入法單隻餵予3 μl，後置於25°C恆溫生長箱內培育，連續觀察十天記錄幼蟲罹病死亡率，並以無菌水為對照組以校正死亡率。

1. 高溫處理對病毒之影響：以45、55、65、75及95°C五種高溫分別處理核多角體病毒懸浮液及冷凍乾燥粉末24小時後，進行生物檢定測試病毒耐熱性，每重覆30隻幼蟲、每處理有六重覆，並與貯存於-20°C之未經加熱處理之病毒液比對，換算原有活性保留百分率，以了解病毒粉末及懸浮液耐高溫之極限。

2. 酸鹼度對病毒之影響：在室溫下以酸鹼度3、5、7、9、11之磷酸緩衝液處理病毒24小時後，進行生物檢定測試病毒之活性，每重覆90隻幼蟲，每處理有四重覆，並與pH7.2之磷酸緩衝液稀釋病毒液比對，測得病毒原有活性保留百分率，以掌握病毒懸浮之最適酸鹼度及容忍範圍。

3. 水質及氯離子濃度對病毒之影響：以地

下水、灌溉水、二次去離子水、自來水，以及含0.1%、1%、10%三種濃度之次氯酸鈉(NaOCl)溶液稀釋病毒，在室溫下經5-24小時懸浮處理後，進行生物檢定測試病毒對幼蟲之致死率，每重覆30隻幼蟲，每處理有三重覆，並與pH 7.2之磷酸緩衝液稀釋病毒液比對，測得病毒原有活性保留百分率，以了解各種不同之水質及含氯離子濃度對病毒活性之影響。

五、光照時間對病毒活性之影響

1. 以10⁸ PIBs/ml濃度之病毒懸浮液(含展著劑不怕雨4000倍稀釋)噴灑於桔梗葉上，每葉正、反面各噴1 ml，經自然日照處理13天後，每隔一天採葉片進行生物檢定，以四齡初蛻幼蟲為供試蟲經取食24小時後，單隻挑入飼育杯中飼予新鮮無毒無福馬林之人工飼料，置於25°C生長箱中培育，觀察十天之幼蟲死亡率，並以無菌水噴灑之桔梗葉為對照組，同時以初噴灑病毒液經自然風乾之葉片做為比對，計算病毒原有活性保留百分率。光照試驗期係於1993年9月13日至16日進行。

2. 以10⁸、2×10⁷、4×10⁶ PIBs/ml濃度之病毒懸浮液、及分別加入1%尿酸(uric acid)之病毒液，每種病毒液均含4000倍稀釋之展著劑不怕雨，均勻噴灑於甘藍菜葉片上，每葉正、反面各噴1 ml，經自然陽光曝曬1-3天後，每隔一天採葉片進行生物檢定，以三齡初蛻幼蟲為供試蟲，經取食48小時後，單隻挑入飼育杯中飼予新鮮無毒無福馬林之人工飼料，置於25°C生長箱中培育，觀察十四天之幼蟲死亡率，並以只含展著劑之無菌水及尿酸懸浮液噴灑之甘藍葉為對照組，同時以初噴灑病毒液經自然風乾之葉片做為比對，計算病毒原有活性保留百分率。光照試驗期於1994年8月24日至27日。

結 果

之溫度(圖一)。

一、培育溫度對病毒感染幼蟲之影響

以三齡幼蟲為例，每隻幼蟲飲入病毒劑量為 2×10^4 PIBs，分別在35、30、25、20及15°C生長箱中培養發病。結果測得其半致死時間依序為：3.29、5.06、5.49、8.79及18.93天。隨著培育溫度的下降，幼蟲發病之潛伏期及罹病死亡之時間亦明顯延長。在35°C之高溫下，幼蟲於病毒接種後第三天開始，即有三分之一以上之供試蟲罹病死亡，至第六天時幾乎已全部死亡。而在15°C之低溫下，幼蟲之罹病死亡速率極為緩慢，直至接種後第十三天才開始有罹病死亡之情形發生，爾後需再經過二週後才有90%之死亡率。25及30°C之半致死時間極為接近，但各溫度下感病幼蟲直至化蛹前之總死亡率均可達到90%以上，經鄧肯氏分析無顯著差異(表一)。在35°C下，幼蟲經接種後2-5天，其罹病死亡率呈對數直線成長趨勢，30°C、25°C和20°C分別於接種後4-7天、4-8天、和8-10天出現相似之現象，而15°C低溫時卻延至18-20天之間，幼蟲發病的速率乃隨著溫度的上升而急遽加速，五種培育溫度中，30及35°C為致使感病幼蟲在最短時間內產生高死亡率

核多角體病毒可感染斜紋夜蛾幼蟲之真皮層、脂肪體、氣管被膜，亦可感染中腸、馬氏管、肌肉鞘、神經鞘及其他器官或組織。病毒接種後第三天分別自五個不同溫度之生長箱中進行感病幼蟲之取樣，經石蠟切片及光學顯微鏡觀察，發現在30及35°C之高溫下，病毒在蟲體內之中腸柱狀細胞、脂肪體細胞、表皮真皮層細胞、氣管鞘細胞核內，且快速的感染，大量複製病毒，而導致細胞核嚴重腫大。嚴重感染的細胞核也因不勝負荷急遽增殖的病毒包含體而被脹破，同時可見一顆顆病毒包含體自細胞核內釋出。相反地，在15及20°C之低溫下，病毒感染速率緩慢，雖可見脂肪體細胞、真皮層細胞及中腸柱狀細胞之細胞核有被感染的情形，但只是稍微腫脹、被感染的細胞核內病毒增殖的量很少，且被感染的細胞數量及感染組織也不如高溫下來得多。25°C下之感染情形介於高低溫之間為中度感染(圖二)。七天時，高溫處理的蟲隻因病毒感染而早已大量死亡，所以無法繼續取樣切片；25°C處理之幼蟲其體內各細胞也已被病毒嚴重感染，大部分之組織均崩解潰爛。然低溫處理之蟲體

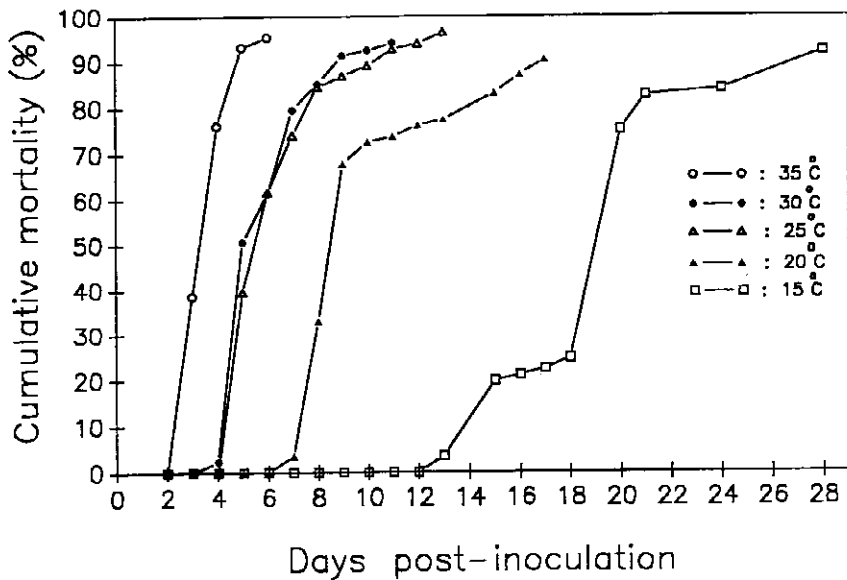
表一 於不同培育溫度下斜紋夜蛾核多角體病毒對斜紋夜蛾三齡期幼蟲之總死亡率、潛伏期、及半致死時間

Table 1. Mortality, incubation period, and LT_{50} of 3rd-instar larvae of *Spodoptera litura* inoculated with SIMNPV suspension (2×10^4 PIBs/larva) and incubated at varied temperatures¹⁾

| Incubated temp. | Cumulative mortality(%) | Incubation ²⁾ period(days) | LT_{50} (days) (95% confidence limits) |
|-----------------|-------------------------|---------------------------------------|---|
| 35°C | 95.40 ± 3.99a | 1-2 | 3.29 (3.02-3.49) |
| 30°C | 94.13 ± 5.43a | 3 | 5.06 (4.01-5.52) |
| 25°C | 96.43 ± 6.19a | 4 | 5.49 (4.95-5.86) |
| 20°C | 90.43 ± 7.39a | 6 | 8.79 (8.58-9.01) |
| 15°C | 92.22 ± 13.47a | 12 | 18.93 (18.40-19.42) |

1) Recorded until pupation after inoculation, and corrected with Abbott's formula; means followed by the same letter are not significantly different at 5% analyzed with DMRT.

2) Days post-inoculation until larvae died.



圖一 斜紋夜蛾三齡幼蟲於接種核多角體病毒後，於不同培育溫度下之每日幼蟲罹病死亡率。
 Fig. 1. Cumulative mortality of 3rd-instar larvae of *Spodoptera litura* after being inoculated with SIMNPV, and incubated at varied temperatures.

內，至接種後三週其病毒感染之情形亦是異常嚴重。可見培育溫度對病毒感染之速率影響頗大。

二、影響核多角體病毒活性因子之研究

1. 高溫處理對病毒之影響：以45、55、65、75及95°C等高溫分別處理病毒粉末及水懸液24小時，發現病毒粉末可耐55°C高溫處理，活性仍可保留87%，65°C尚餘48%之活性，至75°C時則活性完全喪失。而病毒水懸液則較粉末為差，至55°C時僅剩50%之活性，於65°C時則活性完全喪失。兩種型式之病毒於45°C下處理24小時仍可保留幾近100%之活性(表二)。

2. 酸鹼度對病毒之影響：以酸鹼度3、5、7、9、11之溶液處理病毒24小時後，其病毒之原有活性保留百分率分別為34.8%、60.4%、76.2%、67.7%、48.7%，得知在pH 5至pH 9之間為病毒較適合之活性範圍，而在強酸或強鹼之下病毒活性喪失50%以上，且

強酸又較強鹼之破壞性高(圖三)，故田間施用時應儘量避免使用酸性水或與其他酸性藥品混合使用。

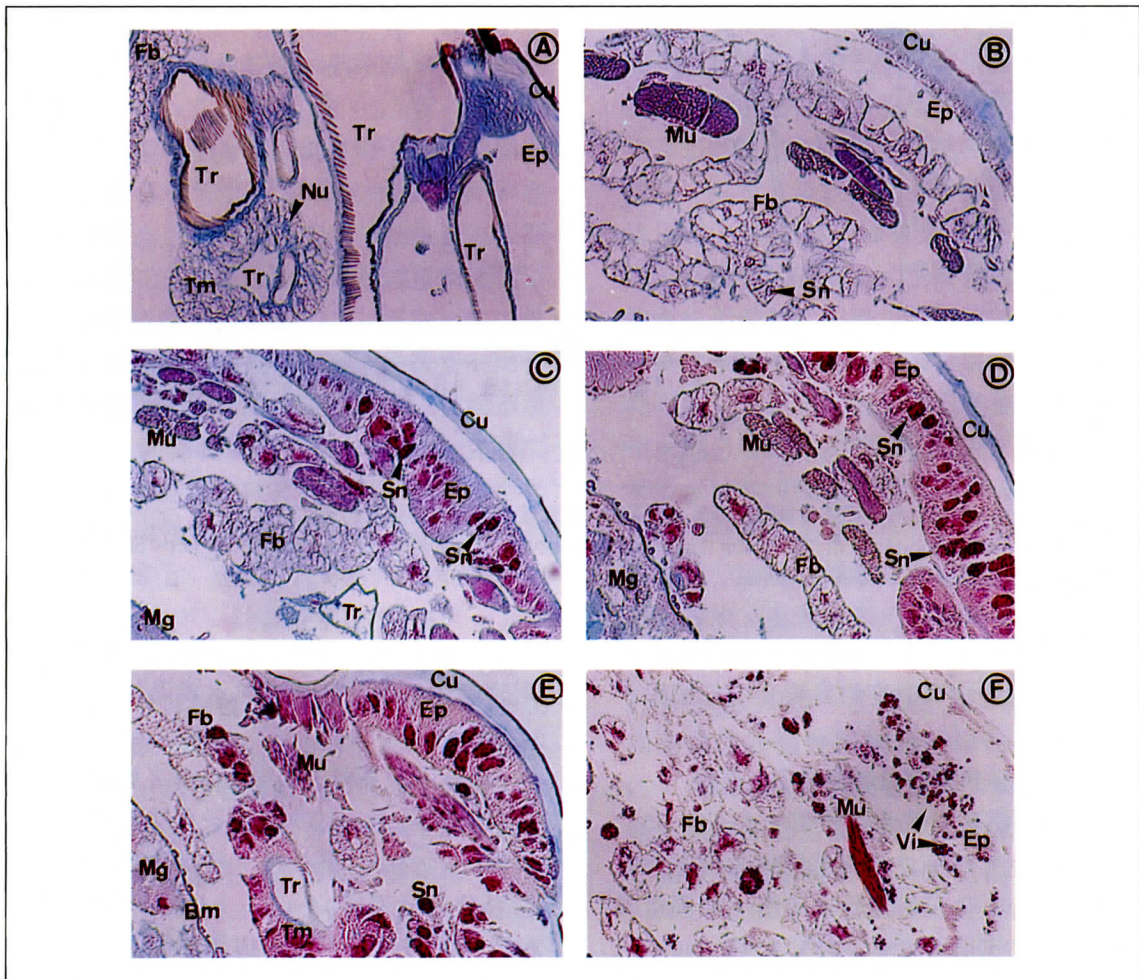
3. 水質及氯離子濃度對病毒之影響：以地下水、灌溉水、二次去離子水及自來水浸泡病毒，經24小時懸浮後，病毒之原有活性保留百分率分別為94.4%、84.1%、73.8%、65.1%，發現自來水對病毒活性有負面之影響，較不適用於病毒之稀釋。而灌溉水及地下水均適合於田間病毒施用時稀釋之用。以含不同氯離子濃度(次氯酸鈉：0.1%–10%)之溶液懸浮處理病毒五小時後，即發現氯離子對於病毒有很強的傷害力。在0.1%次氯酸鈉溶液中，病毒失活率高達35%。病毒於1%之次氯酸鈉溶液中，活性急遽下降為原有之45.5%。而在10%高濃度之次氯酸鈉溶液中，幾乎無活性可言，僅存9.3%之活性(圖三)。故稀釋病毒時應特別注意氯離子之濃度，並應避免與含氯之藥劑混合使用。

三、光照時間對病毒活性之影響

將病毒噴灑於桔梗葉上，經自然日照處

理一、二、三天後，發現病毒活性保留率分別為

60.9 ± 12.2 %、34.6 ± 4.7 % 及 19.4 ±



圖二 A. 斜紋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。(320倍)。B. 接種病毒後，於15°C培育三天後核多角體病毒感染斜紋夜蛾幼蟲少部份之組織細胞，表皮真皮層及脂肪體細胞輕微病變，細胞核腫大現象不明顯。(320倍)。C. 接種病毒感後，於20°C培育三天之中度感染斜紋夜蛾幼蟲之情況(320倍)。D. 接種病毒感後於25°C培育三天之重度感染斜紋夜蛾幼蟲之情況。(320倍)。E. 接種病毒並培育於30°C三天後，罹病之斜紋夜蛾幼蟲蟲體內充滿了大量複製之核多角體病毒，所有之組織細胞均嚴重感染、已無正常之細胞，中腸亦有分離現象，病變之細胞核破裂釋出大量病毒包含體。(320倍)。F. 接種病毒並培育於35°C三天後，罹病之斜紋夜蛾幼蟲蟲體內充滿大量增殖、游離之病毒包含體，絕大多數之組織細胞已崩解潰爛不成型。(320倍)。Bm：基底膜；Cc：柱狀細胞；Cu：表皮；Ep：真皮層；Fb：脂肪體；Mg：中腸；Mu：肌肉；Nu：細胞核；SN：膨大細胞核；Tm：氣管被膜；Tr：氣管；Vi：病毒。

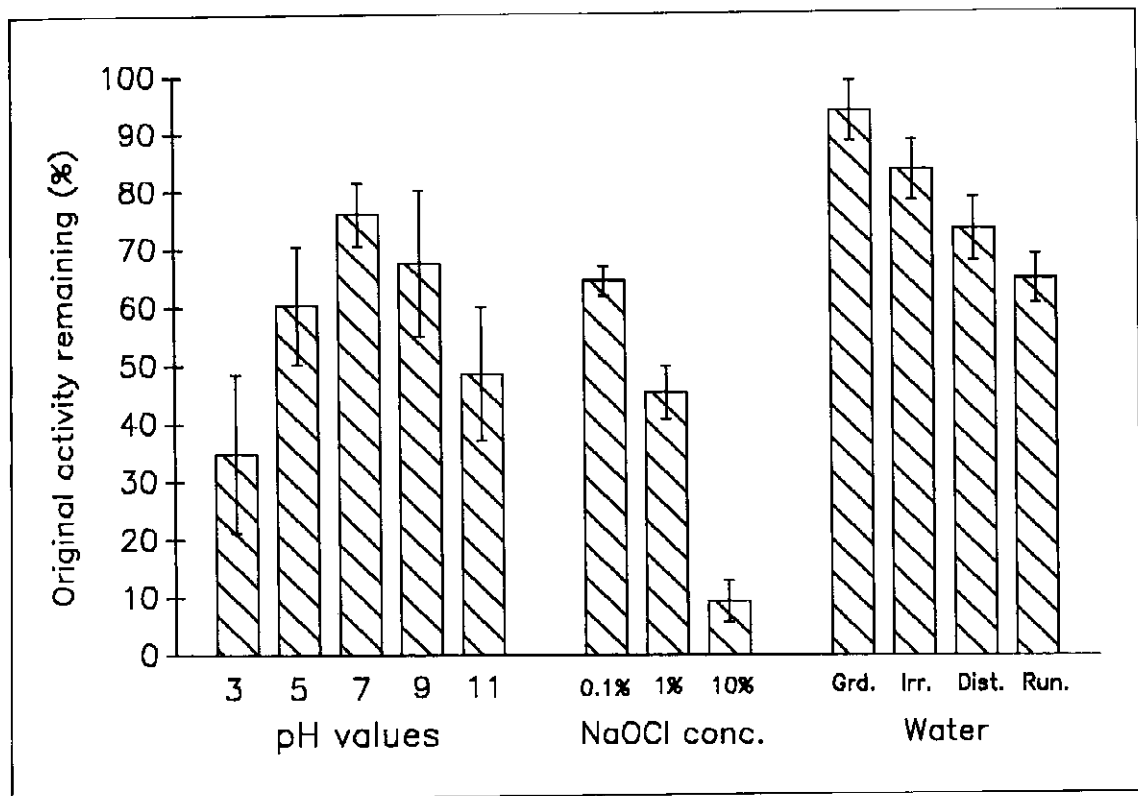
Fig. 2. A. Cross section of a healthy larva of *Spodoptera litura*, showing normal cell size and structure. (320×); B. Epidermal and fat body cells of *Spodoptera litura* larva showing lightly swollen nuclei three days after inoculation and incubated at 15 °C. (320×); C. Moderately infected symptoms three days after inoculation and incubated at 20 °C. (320×); D. Heavily infected symptoms three days after inoculation and incubated at 25 °C. (320×); E. Serious infection of larval tissues, most cells lysing, and tracheal matrix cells swelling three days after inoculation. Larval tissues full of SIMNPV polyhedra, and the midgut showing dissociation three days after inoculation at 30 °C. (320×); F. Tissues and cell lyses occurring at 35 °C and body cavity full of lysed tissues, cell debris and viruses. (320×). Bm: Basement membrane; Cc: Columnar cell; Cu: Cuticle; Ep: Epidermis; Fb: Fat body; Mg: Midgut; Mu: Muscle; Nu: Nucleus; Sn: Swollen nucleus; Tm: Trachea membrane; Tr: Trachea; Vi: Virus.

表二 於不同高溫處理24小時後，兩種型式病毒之原有活性保留百分率

Table 2. Percent of original activity remaining (OAR) of SIMNPV after treatment at varied high temperatures for two viral preparations as assayed on *Spodoptera litura**

| Viral preparation | OAR (%) (Mean \pm S.D.) | | | | |
|-------------------|---------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------|
| | 45°C | 55°C | 65°C | 75°C | 95°C |
| Powder | 96.42 \pm 5.06 ab | 86.78 \pm 6.15 b | 48.46 \pm 1.96 c | 1.50 \pm 2.12 d | 0.00 d |
| Suspension | 100 a | 49.65 \pm 6.80 c | 0.00 d | 0.00 d | 0.00 d |

* OAR, based upon -20°C stock virus suspension with 10^7 PIBs / ml mortality as 100%; means followed by the same letter are not significantly different at 5% analyzed with DMRT.



圖三 斜紋夜蛾核多角體病毒經不同酸鹼度、含氯離子濃度之緩衝液及四種水質處理後，病毒之原有活性保留百分率。
Fig. 3. Percent of original activity remaining (OAR) of SIMNPV after treatment with phosphate buffer of varied pH and concentrations of NaOCl, and various waters as assayed on 4th-instar larvae of *Spodoptera litura*.

4.0%。病毒經一天之日照已喪失了40%之活性，至第三天僅剩不到20%之活性，可見日照確為使病毒在田間無法持續之重要因子。

以三種每隔五倍稀釋濃度之病毒懸浮液、及分別加入1%尿酸之病毒液，計六種不同配方之病毒液均含4000倍稀釋之展著劑。

均勻噴灑於甘藍菜葉片上，每葉正、反面各噴1 ml。而後經田間陽光連續曝曬三天後，發現低濃度且不含尿酸之病毒液效果最差，且消退速率亦最快。經日照一天後所剩之病毒活性僅能致死27%之幼蟲，隨著日照處理之時間加長，病毒之活性保留率亦明顯下

降。若加入尿酸則可將病毒活性之持續性明顯提高二倍之多。以 2×10^7 PIBs/ml濃度之病毒在甘藍葉上經兩天之曝曬仍可保有60%以上之幼蟲致死率，同樣地加入尿酸亦可顯著增強病毒之持續性，經連續三天之田間高溫曝曬後，仍有68%之幼蟲致死率。在高濃度病毒液經三天日照後仍有80%以上之毒效，而含有尿酸之高濃度病毒液卻可在三天後仍有100%之幼蟲致死率(表三)。可見日照時間對病毒之活性持續能力有很大之影響，且病毒濃度愈高則可在田間持續愈久。而尿酸亦可做為有效之抗紫外線或抗陽光輻射線之保護劑，對病毒在長時間之強烈日照下顯著地延長活性之持續性。

討 論

培育溫度對病毒在幼蟲體內之感染速率影響極大，*Anticarsia gemmatilis*病毒在 16°C 及 21°C 低溫時，其複製速率雖較在 32°C 高溫下為慢，但罹病幼蟲之總死亡率卻較高溫時高出30-50%。而以 27°C 為兼具致死率高、且半致死時間短的雙重優點，為病毒之最適感染與複製溫度(Boucias *et al.*, 1980)。*Choristoneura occidentalis*核多角體病毒對幼蟲之致病率，於 $15-30^\circ\text{C}$ 間隨著溫度

之上升而增加，其間半致死濃度相差50倍以上，證實高溫可以增加病毒之致病力，Reichenbach (1985)認為溫度之高低會直接影響幼蟲之代謝作用及病毒粒子侵入血腔之快慢，以致影響發病速率。本試驗亦發現培育溫度對病毒之感染速率影響甚鉅，然而對幼蟲之總死亡率卻無顯著影響。此結果與Ignoffo (1966)所做之高溫可以縮短幼蟲發病潛伏期，但對於最終累積死亡率無影響的結論類似。本病毒對溫度之適應範圍較玉米穗蟲核多角體病毒為廣，前者在 35°C 時仍可達到95%之幼蟲死亡率，而後者在 35°C 下則僅能有61%之死亡率(Tuan *et al.*, 1989)。唯本病毒在如此之高溫下由於病毒增殖太快而使幼蟲在未及生長到最大體重前即已罹病死亡，故會影響最高病毒產量(Tuan *et al.*, 1995)，因此在 15 到 35°C 之間仍以 30°C 為最適之病毒感染與量產之培育溫度。

昆蟲病毒通常在低溫冷藏下均可長久保存，但對高溫則有不同的忍受限度。病毒耐高溫之能力與病毒構造有關，一般而言，具有包含體保護者其病毒粒子之活性可適應較高的溫度與較長高溫處理時間。但大部分之昆蟲病毒，無論是懸浮液或乾燥粉末，在經過 $70-80^\circ\text{C}$ 處理10分鐘後，即會喪失幾近100%之活性(Martignoni and Iwai, 1977)

表三 不同配方之核多角體病毒於田間甘藍葉上經不同曝曬時間後對斜紋夜蛾三齡幼蟲之致死率
Table 3. Inactivation of SIMNPV by sunlight in the field at various days after spraying on cabbage leaves with SIMNPV suspension of various concentrations containing uric acid(1%) as assayed on 3rd-instar larvae of *Spodoptera litura*¹⁾

| Time exposed | Mortality (%) ²⁾ | | | | | |
|--------------|-----------------------------|--------------------|-----------------|--------------------|---------|-----------|
| | 4×10^6 | 4×10^6 -U | 2×10^7 | 2×10^7 -U | 10^8 | 10^8 -U |
| 1 hr | 86.4a B | 89.2a B | 90.7a B | 100a A | 100a A | 100a A |
| 1 day | 26.9b E | 63.7b D | 70.8b C | 89.0b B | 100a A | 100a A |
| 2 days | 19.9bcE | 37.9c D | 62.9c C | 85.5b B | 87.1b B | 100a A |
| 3 days | 14.0c F | 29.9d E | 36.6d D | 68.1c C | 83.5b B | 100a A |

1) Mortality recorded until 14 days after assay, and corrected with Abbott's formula.

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

。然而斜紋夜蛾核多角體病毒對高溫的穩定性則較其他的病毒高出許多，在90℃下加熱十分鐘後仍可保留部份活性(Harpaz and Ra-ccah, 1978)。但經75-95℃之高溫處理24小時後則活性盡失，本試驗發現病毒乾燥粉末比懸浮液有較高之耐熱性，在65℃下24小時後仍有將近50%之原有活性保留百分率，此兩種病毒劑型均可耐45℃，在處理24小時後仍可保留全部之活性。

過高或偏低pH值之溶液均會影響病毒包含體之穩定性，因酸或鹼可溶解包含體蛋白質(polyhedrin)，或使其變性而降低病毒之活性(Jaques, 1985)。玉米穗蟲核多角體病毒在pH值4至9時不受影響，但在0.02 M Ca(OH)₂ pH值12.4之強鹼性溶液中24小時後即喪失99%之病毒活性(Ignoffo and Garcia, 1966)。昆蟲病毒對於酸鹼度之忍受程度隨著病毒種類之不同而有差異，斜紋夜蛾核多角體病毒在pH 4-10之間，經24小時處理後仍對斜紋夜蛾保持高度之感染力(Yen and Wong, 1977)。本試驗中病毒經24小時懸浮於pH 5-9之溶液，其原活性保留百分率並無顯著差異，但在pH 3及11之強酸、強鹼下則病毒活性受到顯著的影響。由於水質之酸鹼度與離子成份均會影響病毒穩定性，故田間施用時應注意稀釋水之水質。而田間噴灑時應配合中性、且不可與含有氯離子成份之抗紫外線保護劑或其他化學藥劑混合使用，避免造成病毒活性受損，以確保病毒在田間之應用藥效。

桿狀病毒(Baculovirus)會嚴重受到陽光中紫外線之不活化作用，使得絕大多數病毒之田間半衰期(half-life)僅有幾個小時(David *et al.*, 1968; Morris, 1971; Smirnoff, 1972)。田間之高溫可增強紫外線對病毒之不活化作用，使病毒於48小時之內幾無活性(McLeod *et al.*, 1977)。本試驗光照進行

期間分別在1993年及1994年8-9月間，田間之氣候乾燥而高溫、日照長且光度強，在白天平均氣溫達攝氏34度、日照時間長達14小時之曝曬情況下，使斜紋夜蛾核多角體病毒迅速地失去大幅的活性，低濃度不含保護劑之病毒其半衰期僅有十幾小時。氣候因子對病毒在田間的持續性有顯著的影響，在冬天日照短、光度弱、氣溫低的條件下，玉米穗蟲核多角體病毒在田間的持續性良好，經曝曬十四天後仍有90%以上的原有活性保存百分率，而夏天時則僅剩不到4%(Tuan *et al.*, 1989)。因此田間施用病毒的時機、次數與濃度均應參考氣候條件予以調整，才能以節省的施用量達到最好的防治效果。以同樣高濃度不含保護劑之病毒液而言，在甘藍葉上之病毒活性較在桔梗葉上穩定，推測其原因可能是兩種葉面之平坦程度不同所致。Young and Yearian (1974)亦發現HNPV在蕃茄葉上較在大豆及棉花葉片上之持久性為佳，歸因於蕃茄葉面捲曲造成部分遮陰效果所致。而玉米穗絲成束且多細毛之構造，可盛載大量病毒不被雨水沖刷流失之外，更因具有遮陰效果可防止直接日曬，所以在田間七天後仍可保有58-88%之病毒活性(Tuan *et al.*, 1989)。Jaques (1972)認為未經純化且含有雜質之病毒懸浮液較純化之病毒液有較高之持續性，可能是因為其中之雜質有良好之遮陰效果，防止陽光迅速使病毒活性受損。吾人很認同此說法，因此本試驗所使用之病毒液僅為罹病死亡之蟲體經研磨、過篩後之粗濾病毒液，而不經過其他的純化步驟。為了增強病毒在田間之持續性，抗紫外線保護劑之研發與應用是最佳解決之道。卵蛋白可有效地增強玉米穗蟲核多角體病毒在太陽花上之持續性；大豆粉、奶粉及活性炭均可在豆類作物上增強病毒活性。而尿酸、葉酸及活性炭亦可作為保護劑，使甜菜夜蛾核多角體

病毒在滿天星葉片上之持續性明顯增強(Kao and Huang, 1992)。本試驗亦證實尿酸可做為很有效的紫外線保護劑，可顯著增強斜紋夜蛾核多角體病毒在甘藍葉上之持續性。在作物之葉面施用尿酸不僅可以保護病毒之活性，亦可做為葉面施肥用之有機肥料，雖然尿酸之成本較奶粉或大豆粉為高，但不會引發煤污病造成間接病害，亦不會像活性炭會影響葉片之光合作用，因此只要能克服尿酸之價格問題，或是在純度上勿要求太高以降低成本，尿酸仍可視為很好的保護劑兼葉肥劑。

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、唐立正老師、暨研究所鄭榮智小姐之協助，及本所林秀昭、林姿瑩小姐提供試驗蟲隻，使得試驗順利完成，在此一併誌最誠摯的感謝。

參考文獻

- 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.
- David, W. A. L., B. O. C. Gardiner, and M. Woolner.** 1968. The effects of sunlight on a purified granulosis virus of *Pieris brassicae* applied to cabbage leaves. *J. Invertebr. Pathol.* 11: 496-501.
- Hamm, J. J.** 1966. A modified azan staining technique for inclusion body viruses. *J. Invertebr. Pathol.* 8: 125-126.
- Harpaz, I., and B. Raccach.** 1978. Nucleopolyhedrosis virus (NPV) of the Egyptian cotton worm, *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera, Noctuidae): Temperature and pH relations, host range, and synergism. *J. Invertebr. Pathol.* 32: 368-372.
- 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. (In Chinese)
- 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.** 1966. Effects of temperature on mortality of *Heliothis zea* larvae exposed to sublethal doses of a nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.* 8: 290-292.
- Ignoffo, C. M., and C. Garcia.** 1966. The relation of pH to the activity of inclusion bodies of a *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.* 8: 426-427.
- Jaques, R. P.** 1972. The inactivation of foliar deposits of viruses of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae)

- and tests on protectant additives. *Can. Entomol.* 104: 1985-1994.
- Jaques, R. P.** 1985. Stability of insect viruses in the environment. pp.285-360. *in* K. Maramorosch and K. E. Sherman, eds. *Viral Insecticides for Biological Control*. Academic Press. Florida.
- Kao, S. S., and L. H. Huang.** 1992. Effectiveness of UV protectants for *Spodoptera exigua* (Hubner) nuclear polyhedrosis virus. *Chinese J. Entomol.* 12: 31-40. (In Chinese)
- 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.
- Martignoni, M. E., and P. J. Iwai.** 1977. Thermal inactivation characteristics of two strains of nucleopolyhedrosis virus (Baculovirus subgroup A) pathogenic for *Orgyia pseudotsugata*. *J. Invertebr. Pathol.* 30: 255-262.
- McLeod, P. J., W. C. Yearian, and S. Y. Young.** 1977. Inactivation of Baculovirus heliothis by ultraviolet irradiation, dew, and temperature. *J. Invertebr. Pathol.* 30: 237-241.
- Morris, O. N.** 1971. The effect of sunlight, ultraviolet and gamma radiations and temperature on the infectivity of nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.* 18: 292-294.
- Reichenbach, N. G.** 1985. Responses of the western spruce budworm to temperature and dose of a virus, a growth regulator, and an organophosphate. *Entomol. Exp. Appl.* 38: 57-63.
- 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.
- Smirnoff, W. A.** 1972. The effect of sunlight on the nuclear polyhedrosis virus of *Neodiprion swainei* with measurement of solar energy received. *J. Invertebr. Pathol.* 19: 179-188.
- Su, C. Y.** 1990. Histopathological studies of *Spodoptera litura* infected by nuclear polyhedrosis virus. *Chinese J. Entomol.* 10: 61-67. (In Chinese)
- Thomas, E. D., C. F. Reichelderfer, and A. M. Heimpel.** 1973. The effect of soil pH on the persistence of cabbage looper nuclear polyhedrosis virus in soil. *J. Invertebr. Pathol.* 21: 21-25.
- Timans, U.** 1982. Effects of UV-radiation on the nuclear polyhedrosis virus of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Z. Angew. Entomol.* 94: 382-401.
- 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)
- Tuan, S. J., S. S. Kao, and U. L. Leu.** 1995. Pathogenicity and propagation of *Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus isolated in Taiwan. Chinese J. Entomol. 15(1) (in press) (In Chinese)
- Whitlock, V. H.** 1974. Symptomatology of two viruses infection *Heliothis armigera*. J. Invertebr. Pathol. 31: 48-56.
- Yen, D. F., and Y. C. Wong.** 1977. Studies of the field stability of microbial insecticide (NPV). Memoirs of the college of agriculture Taiwan National University. 17: 127-132. (In Chinese)
- Young, S. Y., and W. C. Yearian.** 1974. Persistence of *Heliothis* NPV on foliage of cotton, soybean, and tomato. Environ. Entomol. 3: 253-255.
- Young, S. Y., W. C. Yearian, and K. S. Kim.** 1977. Effect of dew from cotton and soybean foliage on activity of *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus. J. Invertebr. Pathol. 29: 105-111.
- 收件日期：1994年10月6日
接受日期：1995年1月14日

Factors affecting pathogenicity and stability of *Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus isolated in Taiwan

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

ABSTRACT

The pathogenicity and stability of *Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus (SIMNPV) were affected by incubation temperature, heating, pH, chloride ion, water quality, and sunlight. The final mortality of 3rd-instar larvae of *S. litura* caused by SIMNPV was not significantly increased, but the incubation period was decreased at higher temperatures. The LT_{50} values were 3.29、5.06、5.49、8.79 and 18.93 days from 35°C to 15°C respectively. Histological sections showed that nuclei of epidermal cells, fat body, tracheal membrane, and column cells of midgut were more rapidly infected at higher temperatures of incubation. The virus in a dry powder was more thermostable than in a suspension. Of the original activity 80 percent was remained when the virus was exposed at 55°C for 24 h. SIMNPV was not affected significantly on suspension at pH 5, 7, and 9 for 24 h, but greatly inactivated on exposure to pH 3 and 11, and to solutions containing chloride ions at high concentrations. Solar radiation was the most powerful factor that inactivated viral activity in a brief period of exposure. Uric acid provided significant protection from sunlight for SIMNPV.

Key words: *Spodoptera litura*, nuclear polyhedrosis virus, pathogenicity, stability.