



# Formosan Entomologist

Journal Homepage: [entsocjournal.yabee.com.tw](http://entsocjournal.yabee.com.tw)

## In vivo Mass Production and Control Efficacy of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) Nucleopolyhedrovirus 【Research report】

### 斜紋夜蛾(鱗翅目：夜蛾科)核多角體病毒體內量產與防治效果評估【研究報告】

Shu-Jen Tuan, Wen-Lin Chen, and Suey-Sheng Kao  
段淑人\*、陳文霖、高穗生

\*通訊作者E-mail :

Received: Accepted: 1998/06/16 Available online: 1998/06/01

#### Abstract

The *Spodoptera litura* larvae became less susceptible to *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus (SpItNPV) with increasing age using dietary inoculation. Neonates were the most susceptible, while the 6th-instar larvae were the least. Percentage of non-typical NPV infection was higher in 2nd-, 3rd-, and 4th- than in 5th-instar larvae. Results also show that the number of polyhedral inclusion bodies (PIBs) produced was positively correlated with larval weight from 3rd-instar to 5th-instar. It is suggested that SpItNPV is optimal for mass production with early 5th-instar larvae individually infected by diet-incorporation (an inoculum of  $3 \times 10^6$  PIBs/ml diet) after incubating for 7 d at 30°C. The average yield was  $1.4 \times 10^9$  PIBs/larva. Standardization and quality control of SpItNPV products can be achieved by visual counting, bioassay, SDS-PAGE, and ELISA. And, ELISA has proven to be better than SDS-PAGE; it is a sensitive and handy tool to quantify viral products. Spraying of SpItNPV on egg-masses can significantly induce larval mortality, and reduce larval densities and leaf area eaten on cabbage pods. Application of SpItNPV at a low concentration on egg-masses immediately before hatching resulted in 77.4% larval mortality compared with 50.4% on newly laid egg-masses. Applications of SpItNPV at high concentrations (108 PIBs/ml) resulted in 99.2% larval mortality and 94.2% reduction of leaf area eaten. Therefore, viral application should coincide as closely as possible with egg-mass hatching. The control efficacy of SpItNPV with high concentrations was better than that with bifenthrin and *Bacillus thuringiensis* products 1 wk post application.

#### 摘要

斜紋夜蛾(*Spodoptera litura*)幼齡幼蟲對斜紋夜蛾核多角體病(*Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus, SpItNPV)之感受性很高，造成罹病幼蟲死亡率偏高，在短時間內幼蟲尚未生長，即已發病死亡，因此病毒在其體內增殖的條件受到很大的限制；且非典型病毒死亡的比例，又以二、三、四齡幼蟲遠高於五齡幼蟲，然而六齡幼蟲蟲體雖然很大，但相對的對病毒之感受性亦明顯下降。故擬以五齡初蛻幼蟲為病毒量產的蟲體，利用飼料混拌法接種病毒，在30°C培養七天後，全盤收穫進行冷凍乾燥，平均每隻幼蟲可生產 $1.4 \times 10^9$ 個病毒包涵體。病毒品管的方法除傳統之鏡檢法、及生物檢定法之外，蛋白質電泳分析法(SDS-PAGE)及酵素聯結免疫吸附檢定法(ELISA)亦可估算病毒之濃度及純度。定量分析上免疫法較電泳法為精確，同時可檢驗大量樣品，應為值得採用之方法。田間甘藍菜盆栽噴藥試驗顯示，施用該病毒可使田間幼蟲罹病死亡、降低害蟲棲群密度、減少作物受損面積。在卵塊即將孵化之際施用低濃度病毒可造成77.4%之幼蟲死亡率，其防治效果較卵塊初產之際的50.4%為佳。而施用高濃度(108 PIBs/ml)之病毒，可導致99.2%之幼蟲死亡率，並減少94.2%之葉片取食面積，故施用期應儘量接近卵孵化之際。對二齡幼蟲施用後一週，高濃度病毒防治斜紋夜蛾的效果甚至優於一般化學藥劑及蘇力菌製劑之防治效果。

**Key words:** *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus (SpItNPV), mass production, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) SDS-PAGE, field test.

**關鍵詞:** 斜紋夜蛾核多角體病毒、大量生產、酵素聯結免疫吸附檢定法、蛋白質電泳分析法、田間試驗

Full Text:  [PDF \(0.99 MB\)](#)

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

# 斜紋夜蛾(鱗翅目：夜蛾科)核多角體病毒體內量產與防治效果評估

段淑人\* 陳文霖 高穗生 台灣省農業藥物毒物試驗所 生物藥劑系 台中縣霧峰鄉舊正村光明路11號

## 摘 要

斜紋夜蛾(*Spodoptera litura*)幼齡幼蟲對斜紋夜蛾核多角體病毒(*Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus, SpltNPV)之感受性很高,造成罹病幼蟲死亡率偏高,在短時間內幼蟲尚未生長,即已發病死亡,因此病毒在其體內增殖的條件受到很大的限制;且非典型病毒死亡的比例,又以二、三、四齡幼蟲遠高於五齡幼蟲,然而六齡幼蟲蟲體雖然很大,但相對的對病毒之感受性亦明顯下降。故擬以五齡初蛻幼蟲為病毒量產的蟲體,利用飼料混拌法接種病毒,在30°C培養七天後,全盤收穫進行冷凍乾燥,平均每隻幼蟲可生產 $1.4 \times 10^8$ 個病毒包涵體。病毒品管的方法除傳統之鏡檢法、及生物檢定法之外,蛋白質電泳分析法(SDS-PAGE)及酵素聯結免疫吸附檢定法(ELISA)亦可估算病毒之濃度及純度。定量分析上免疫法較電泳法為精確,同時可檢驗大量樣品,應為值得採用之方法。田間甘藍菜盆栽噴藥試驗顯示,施用該病毒可使田間幼蟲罹病死亡、降低害蟲棲群密度、減少作物受損面積。在卵塊即將孵化之際施用低濃度病毒可造成77.4%之幼蟲死亡率,其防治效果較卵塊初產之際的50.4%為佳。而施用高濃度( $10^8$  PIBs/ml)之病毒,可導致99.2%之幼蟲死亡率,並減少94.2%之葉片取食面積,故施用期應儘量接近卵孵化之際。對二齡幼蟲施用後一週,高濃度病毒防治斜紋夜蛾的效果甚至優於一般化學藥劑及蘇力菌製劑之防治效果。

**關鍵詞**：斜紋夜蛾核多角體病毒、大量生產、酵素聯結免疫吸附檢定法、蛋白質電泳分析法、田間試驗。

## 前 言

桿狀病毒(Baculovirus)可感染鱗翅目、雙翅目、膜翅目及鞘翅目,並造成蟲體罹病死亡,且已有600餘種桿狀病毒被描述(Martignoni and Iwai, 1986)。斜紋夜蛾(*Spodoptera litura*)為本省中南部之重要經濟害

蟲,一年可發生八至十一世代,幼蟲為雜食性、食量頗大,喜取食十字花科蔬菜、瓜類、番茄、玉米、高粱、花卉、芋頭、馬鈴薯、蕃薯、茶及菸草等作物,老熟幼蟲於藏匿於土中化蛹,雌成蟲交尾後於作物葉片背面產下約300~400粒卵之卵塊,害蟲大發生時會造成農作物嚴重之損害(Ou-Yang and

Chu, 1990; 1991)。斜紋夜蛾核多角體病毒(*Spodoptera litura nucleopolyhedrovirus*, SpltNPV)對斜紋夜蛾幼蟲具有高度之致病力,可造成全身組織病變,如脂肪體細胞、真皮層細胞、肌肉及氣管被膜細胞、消化道細胞等之細胞核腫脹及破裂、導致蟲體死亡,並流出大量含病毒體液(Su, 1990; Tuan *et al.*, 1995a)。該病毒亦會減弱雄成蟲之繁殖能力,使子代之卵孵化率明顯降低(Santiago-Alvarez and Vargas Osuna, 1988)。核多角體病毒除了對害蟲具有極高的致病力之外,並具有高度的寄主專一性,對人、畜、及害蟲天敵均無毒害,可利用為一安全有效的防治因子(Ignoffo, 1973)。田間應用上已證實在適當的條件下核多角體病毒之防治效果甚至比化學藥劑高(Smits *et al.*, 1987)。目前商品化之病毒,如*Heliothis zea* NPV, *Orgyia pseudotsugata* NPV, *Lymantria dispar* NPV,及*Neodiprion sertifer* NPV計有二十種(Agathos, 1991; Deseo and Rovesti, 1992)。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。然而,病毒之大量生產與其品質、產量的控制乃為開發利用的重要關鍵,必須每一批量產病毒的質、量均符合品管標準,才能保障田間施用之藥效。由於影響病毒生產品質與產量的因素甚多——如供試蟲齡期、接種病毒的濃度、培育發病的溫度、供給食物量(Huang and Kao, 1994; Tuan *et al.*, 1995a)。另外濕度、光照、飼育容器、病毒接種方法及收穫時間等均會影響病毒的收穫量(Shapiro, 1982; 1986; Tuan *et al.*, 1995a)。故掌握病毒之致病活性與大量生產之最適條件,並以低人工成本之方式提高經濟效益,以及病毒量產後品質與產量之標準化,均為重要的準備工作,使其可供田間推廣應用,並經製劑後成為防治斜紋夜蛾之微生物藥劑,以

降低化學藥劑用量及害蟲為害程度,達到安全、有效、經濟的防治目的。本文探討主題有二:1)建立病毒在蟲體內量產之最適條件與品質管制測定方法。2)評估本所製備之斜紋夜蛾核多角體病毒施用於甘藍菜盆栽之田間藥效,並與常用之化學藥劑及蘇力菌商品做一比較,同時測出最適當的施藥濃度及時機。以期開發該病毒為防治斜紋夜蛾之微生物藥劑。

## 材料與方法

### 一、病毒在蟲體內量產流程之建立

1)斜紋夜蛾之大量飼育:採自霧峰芋葉田之斜紋夜蛾卵塊,以5%福馬林溶液浸泡15分鐘,再以自來水淋洗15分鐘,進行卵塊表面消毒。卵塊孵化後,挑一齡幼蟲於裝有半合成人工飼料(Hung and Hwang, 1988)之布丁杯內集中飼育,待至三齡末即分別單隻飼育,以防止幼蟲自殘、或密度過高導致幼蟲罹病。幼蟲化蛹後、鑑別雌雄,待羽化後並以含維生素C及啤酒之20%蜜水飼育成蟲,每15對成蛾置於一產卵筒內進行交尾卵,以繁衍後代。生長條件定為 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 12L:12D, 70% $\pm$ 5%R.H。

2)試驗病毒材料之製備:以接種源飲入法接種五齡初蛻幼蟲,置入 $25^\circ\text{C}$ 恆溫生長箱中發病,至蟲體腫脹、即約接種後第五至六天時單隻收集病蟲,研磨蟲體、並經尼龍紗網過濾,即可獲得純度及濃度均高的病毒包涵體,做為病毒試驗之接種源。而本文中所述病毒濃度均指病毒包涵體之濃度。

3)病毒接種濃度、幼蟲齡期、及病蟲收穫時間之探討:以飼料混拌法、將不同濃度之病毒懸浮液、直接混入人工飼料中均勻攪拌(注意溫度須低於 $55^\circ\text{C}$ )(Tuan *et al.*, 1995a),並以機器自動切割成 $1\text{cm}^3$ 之小塊,置入可

棄式塑膠30孔盤，單隻餵予二至六齡初蛻幼蟲，而一齡初孵化幼蟲則先採集體餵食接種，三天後再個別單隻挑開繼續培育，各齡期測試5至6個系列稀釋病毒濃度，每處理30隻幼蟲，並重覆三次。所有試驗蟲均置於30°C、70%±5% R.H.、12L:12D生長箱中發病，記錄幼蟲死亡率，並比較三至六齡供試蟲感病後至化蛹前最終病毒產量，以篩選出最適合的供試蟲齡及接種濃度與回收病蟲的時間。

4) 病毒產量評估與量產流程訂定：以四齡及五齡初蛻幼蟲為供試蟲，利用上述之接種法，以可棄式塑膠30孔盤進行試驗，每孔置入二塊飼料塊及一隻供試蟲。每一次處理使用900隻，重覆四次。四齡幼蟲病毒接種濃度為 $2 \times 10^6$  PIBs / ml diet，置於25°C，70±5% R.H.，12L:12D生長箱中發病，於接種後第14天全面收病蟲。而五齡幼蟲病毒接種濃度為 $3 \times 10^6$  PIBs / ml diet，置於30°C，70±5% R.H.，12L:12D生長箱中發病，於接種後第七天全面收病蟲。將整個養蟲盤、病蟲、剩餘飼料及蟲糞一起送入真空乾燥機(Kingmech, FD-6-24, -60°C, 70 ATM)進行冷凍乾燥處理二天，而後以磨粉機將全盤乾燥塊打碎製成粉末，並以血球計數器計算每隻病蟲或每克粉末中病毒包涵體之含量。並以此量產病毒進行後續田間藥效試驗。

## 二、量產病毒品管檢驗方法之建立

經由人工接種方式而大量生產之病毒，每批大量產之品質與含量必須符合一定之標準。而此標準之研訂又必須先有值得信賴的檢驗方法，本試驗擬以下列各方法，就病毒包涵體含量及多角體蛋白質含量進行測定，以建立量產病毒在生物活性與含量之品管標準。

1) 光學顯微鏡計數法：將病毒以無菌水

稀釋後，在400倍放大倍數之光學顯微鏡下觀察，以血球計數器計算病毒包涵體之含量，以求出每毫升懸浮液、每隻罹病幼蟲、及每克冷凍乾燥粉末中所含病毒包涵體數目。

2) SDS-聚丙烯醯胺膠體電泳分析法(SDS-PAGE)：參考Bio-Rad Mini Protean II使用說明，製備4% stacking gel及12.5% separating gel，病毒液經10倍連續稀釋後，加入等體積樣品緩衝液於100°C煮沸10分鐘後，離心5分鐘、取上清液，以恆電壓100伏特進行二小時，再以Coomassie blue染色15分鐘(Finnerty *et al.*, 1994)，以測定量產病毒之多角體蛋白質含量，並藉由所含主要蛋白質之分子量大小以確定為原接種病毒。

3) 酵素聯結免疫吸附檢定法(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)：純化之病毒溶液經連續稀釋後，每一濃度取100 $\mu$ l置於EIA plate (96 well)孔中，每一濃度重覆八次。而後置於4°C中過夜進行coating作用。依據Tuan *et al.* (1993)試驗方法進行抗原及抗體之製備，以及該檢定法之全程試驗步驟，抗血清採用抗斜紋夜蛾核多角體病毒蛋白質之多源抗體(稀釋1000倍)，加入Alkaline Phosphatase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) 2500倍稀釋濃度，於室溫反應1小時。並以PBS-Tween利用自動洗盤機清洗五次，加入0.1% PNPP / substrate buffer，呈色一小時後以Molecular Devices kinetic microplate reader Vmax判讀於波長405nm時之吸光值，以計算出OD值(y)與多角體蛋白質濃度(Log,x)之相關式 $y = a + bx$ 。

4) 生物檢定法：以斜紋夜蛾四齡幼蟲為供試蟲，測定各批量產病毒之致病力，以了解各批量產病毒之生物活性品質是否一致。

## 三、病毒在田間盆栽之藥效試驗

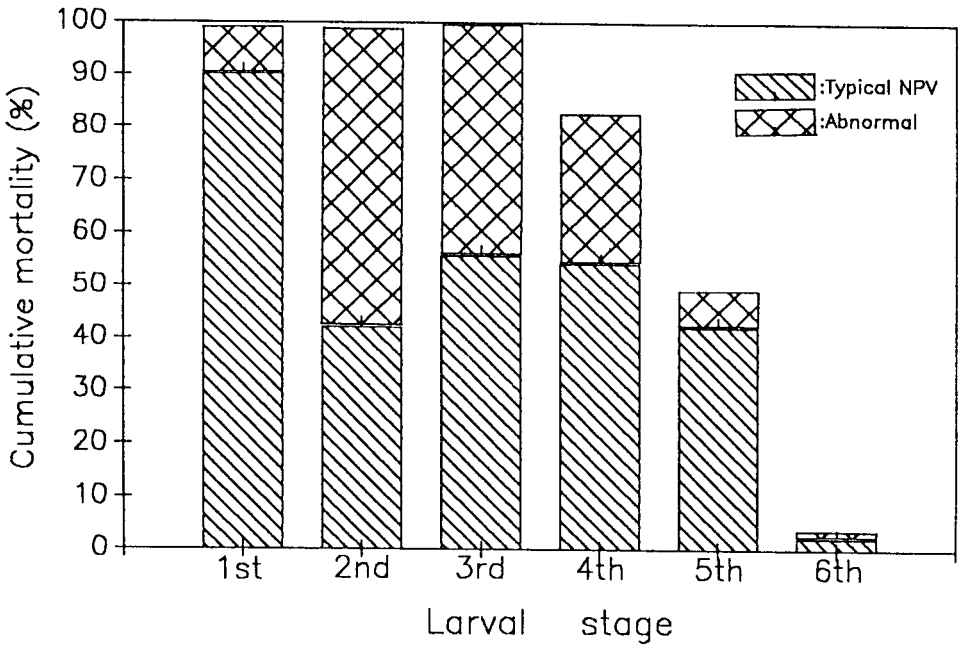
1) 卵期噴藥試驗：在網室內以盆栽法種植甘藍菜苗，至發育為含五片約60cm<sup>2</sup>之葉片之植株時進行試驗，將發育一、二、三天之卵塊(約350顆卵粒/塊)，分別以釘書針固定於每一植株之第三片葉之葉背，以手壓式噴壺噴灑藥液，每片葉片正反面各噴1ml，待自然風乾後、以塑膠筒(直徑22.5公分、高30公分)及白絹網罩住整盆植株，以防止不預期之蟲種進入為害或供試蟲逃離。藥劑處理分別有斜紋夜蛾核多角體病毒三種濃度(10<sup>8</sup>、2×10<sup>7</sup>、4×10<sup>6</sup> PIBs/ml)、化學藥劑畢芬寧(2000倍稀釋)、並以水做為對照組。各處理有四重覆、且均加入展著劑『不怕雨<sup>®</sup>』(4000倍稀釋)。並於卵塊孵化、幼蟲取食葉片四天後，計算幼蟲罹病死亡率、每棵盆栽之幼蟲存活數及取食葉片面積。試驗期間為八月至九月間。

2) 幼蟲期噴藥試驗：以盆栽法種植甘藍菜苗，至發育為含六片如手掌大小之葉片之植株時進行試驗，以手壓式噴壺噴灑藥液，每片葉片正反面各噴1ml，待自然風乾後，接上二齡初蛻幼蟲、每盆30隻，並以塑膠筒(直徑22.5公分、高30公分)及白絹網罩住以防止幼蟲出入。藥劑處理分別有斜紋夜蛾核多角體病毒三種濃度(10<sup>8</sup>、2×10<sup>7</sup>、4×10<sup>6</sup> PIBs/ml)、蘇力菌XENTARI<sup>®</sup> 10.3% WP(4000倍稀釋)、TUREX<sup>®</sup> 3.8% WP(1000倍稀釋)、及化學藥劑畢芬寧(2000倍稀釋)、並以水做為對照組。各處理有15盆、且均加入展著劑不怕雨<sup>®</sup>(4000倍稀釋)。試驗一週後記錄幼蟲死亡率、存活數及葉片受害面積。試驗期間為冬季十二月間。

## 結 果

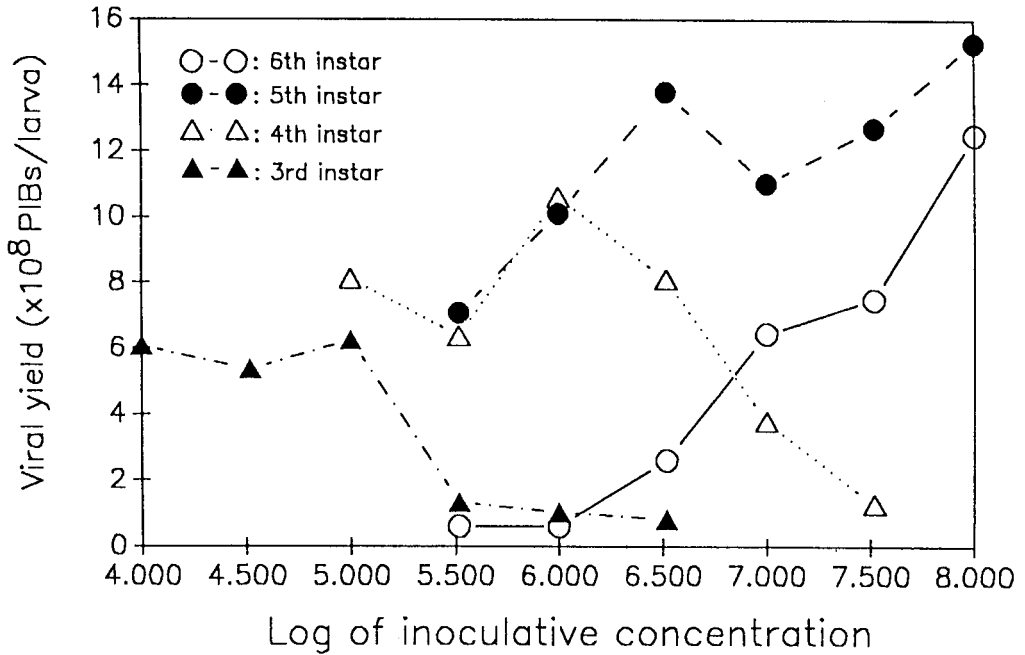
### 一、病毒接種濃度、幼蟲齡期、及病蟲收穫時間之探討

測定斜紋夜蛾一至六齡各齡期幼蟲，經不同接種病毒濃度之飼料處理後，得知較幼齡之幼蟲不適合做為量產病毒之材料。因幼齡幼蟲對病毒及其他病原之感受性較高，造成罹病幼蟲死亡率偏高，一齡幼蟲於化蛹前因病毒導致之幼蟲死亡率高達90%；且非典型病毒死亡的比例，又以二、三、四齡幼蟲遠高於五齡幼蟲，其中約有50%之死亡率係來自於其他死亡原因——如脫皮不正常或因混合感染其他病原致死，而真正完全因接種病毒而死、且體液充滿病毒包涵體者僅約50%(圖一)，得知接種齡期會直接影響病毒量產的純度及產量。然而六齡幼蟲蟲體雖然很大，但相對的對病毒之感受性亦明顯下降。而在三至六齡幼蟲之病毒產量試驗中，在病毒接種濃度為3.3×10<sup>5</sup>至3.3×10<sup>6</sup> PIBs/ml diet之間時，三齡及六齡幼蟲之最終病毒產量均不及四齡及五齡幼蟲，其間差距由數倍至二、三十倍之多，其中又以五齡幼蟲之病毒產量最高(圖二)，可見接種病毒供試幼蟲之齡期選擇極為重要。而供試幼蟲在化蛹前之最終病毒量，又必須在適宜的接種濃度下，方能達到最高點。接種濃度偏低則產量相對降低，隨著接種濃度之上升，其產量亦有增加之趨勢。但是以三齡及四齡幼蟲而言，過高之病毒接種濃度，會使幼蟲提早罹病死亡，罹病幼蟲在短時間內尚不及長大、即已發病死亡，導致病毒在蟲體內增殖的空間受到很大的限制，不但無法獲得相對的病毒產量，反而病毒產量不如低接種濃度者，當三齡幼蟲之病毒接種濃度超過10<sup>5</sup> PIBs/ml diet時，其最終病毒產量急遽下降、減產80%以上，而四齡幼蟲亦有類似之情況發生，當病毒接種濃度超過10<sup>6</sup> PIBs/ml diet時，其最終病毒產量反而直線下降、減產90%(圖二)。因此選擇適量的接種濃度，不但可以節省病毒成本，又可提高病毒產量。



圖一 斜紋夜蛾一至六齡幼蟲經接種核多角體病毒( $3.3 \times 10^5$  PIBs /  $\text{cm}^3$  Diet)於化蛹前罹病死亡情形之比較。

Fig. 1. Comparison of cumulative mortalities of 1st- to 6th-instar larvae of *Spodoptera litura* after inoculation with SpltNPV at viral concentration of  $3.3 \times 10^5$  PIBs /  $\text{cm}^3$  diet.

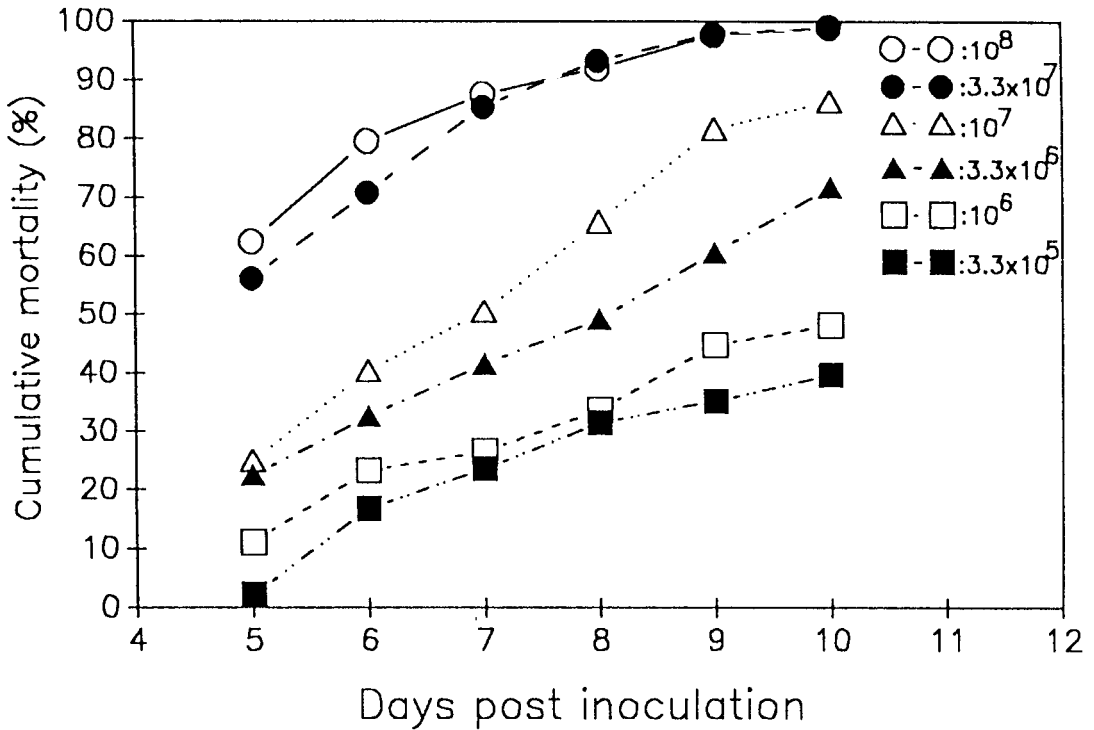


圖二 斜紋夜蛾三至六齡幼蟲經接種不同濃度之核多角體病毒於化蛹前之最終病毒產量。

Fig. 2. Final viral production of 3rd- to 6th-instar larvae of *Spodoptera litura* after inoculation with SpltNPV at various viral concentrations.

故經考量蟲體操作方便性、對病毒感受性、及病毒產量與品質等因素後，擬定以五齡初蛻幼蟲為病毒量產的材料。以五齡幼蟲而言，病毒接種濃度自 $3.3 \times 10^5$ 至 $1.0 \times 10^8$  PIBs / ml diet，於接種後七天所造成之幼蟲罹病死亡率由24%至87%，乃隨著接種濃度之上升而增加(圖三)。其各濃度的半致死時間(LT<sub>50</sub>)亦隨病毒濃度之增加而縮短，當病毒

濃度為 $3.3 \times 10^6$ 及 $1.0 \times 10^7$  PIBs / ml diet時，其半致死時間分別為7.9及6.8天，病毒濃度低於 $1.0 \times 10^6$  PIBs / ml diet時，則需超過9.8天方能達到50%之幼蟲死亡率，為 $3.3 \times 10^7$  PIBs / ml diet之兩倍時間(表一)。測試病毒產量與收穫時間，發現 $3.3 \times 10^6$ 至 $3.3 \times 10^7$  PIBs / ml diet三種濃度中，病毒的產量並無顯著的差異，且收穫時間自第六天起至第十



圖三 斜紋夜蛾五齡幼蟲經接種不同濃度之核多角體病毒後第五至第十天之罹病死亡率。

Fig. 3. Cumulative mortality of 5th-instar larvae of *Spodoptera litura* after inoculation with SpltNPV at various viral concentrations from 5th to 10th day post inoculation.

表一 斜紋夜蛾五齡幼蟲感染不同濃度核多角體病毒之半致死時間

Table 1. LT<sub>50</sub> values for 5th-instar larvae of *Spodoptera litura* fed on diet incorporated with various concentrations of SpltNPV

Concentration (PIBs / ml)	LT <sub>50</sub> (d)	Time-mortality regression line	r <sup>a</sup>
$3.3 \times 10^7$	4.75	$y=2.773+0.469x$	0.999
$10^7$	6.80	$y=2.536+0.363x$	0.995
$3.3 \times 10^6$	7.89	$y=2.984+0.256x$	0.999
$10^6$	9.83	$y=2.768+0.227x$	0.975

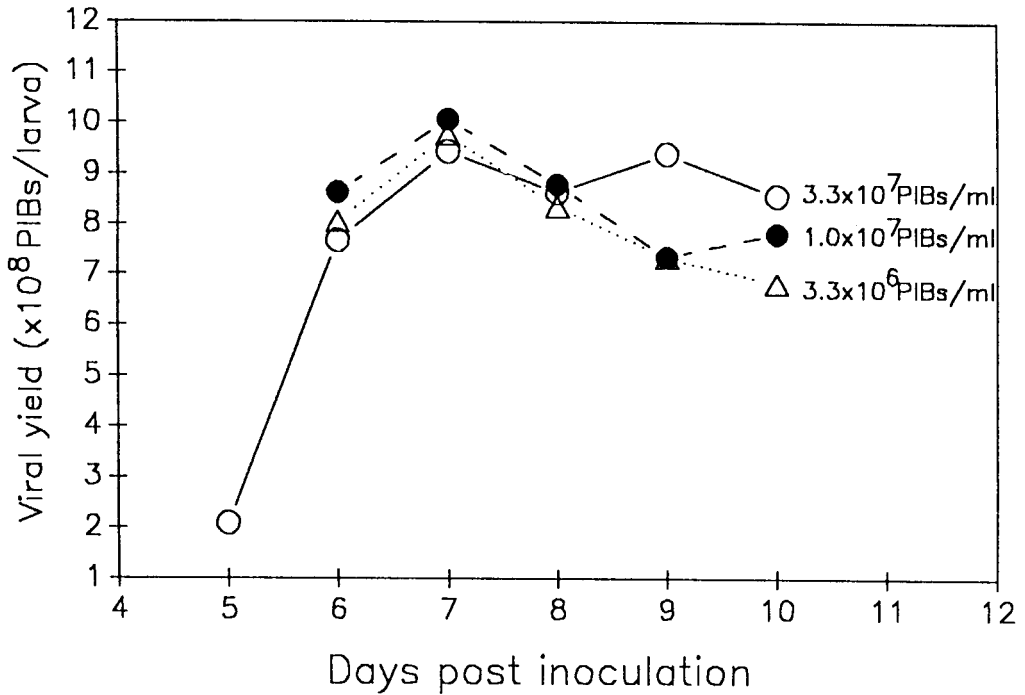
<sup>a</sup> correlation coefficient

天之間亦無明顯差異，其中又以第七天之病毒產量最高(圖四)。故選定病毒接種濃度為 $3.3 \times 10^6$  PIBs / ml diet，而在接種後第七天無論蟲體大小及感染程度全面收病蟲。此建議接種濃度與收穫時間均極接近五齡幼蟲之半致死濃度(LC<sub>50</sub>)(表二)與在該濃度下之半致死

時間(表一)。

## 二、病毒在蟲體內量產流程之建立

以室內長期飼育之健康幼蟲為材料，可順利進行病毒之大量增殖。接種幼蟲之齡期、病毒接種之濃度、與培育溫度均會影響



圖四 斜紋夜蛾五齡幼蟲經接種不同濃度之核多角體病毒後第五至第十天之病毒產量。

Fig. 4. Viral production of 5th-instar larvae of *Spodoptera litura* after inoculation with SpItNPV at various viral concentrations from 5th to 10th day post inoculation.

表二 斜紋夜蛾五齡幼蟲感染核多角體病毒之半致死濃度之比較

Table 2. Comparison of LC<sub>50</sub> values for 5th-instar larvae of *Spodoptera litura* fed on diet incorporated with SpItNPV

Time post-inoculation	LC <sub>50</sub> (PIBs / ml)	Dose-mortality regression line	r <sup>a</sup>
5	$3.34 \times 10^7$	$y = -1.841 + 0.909x$	0.979
6	$9.74 \times 10^6$	$y = -0.181 + 0.741x$	0.977
7	$4.20 \times 10^6$	$y = -0.580 + 0.843x$	0.962
8	$2.07 \times 10^6$	$y = -0.663 + 0.897x$	0.955
9	$1.10 \times 10^6$	$y = -1.650 + 1.100x$	0.972
10	$7.89 \times 10^5$	$y = -0.590 + 0.964x$	0.986

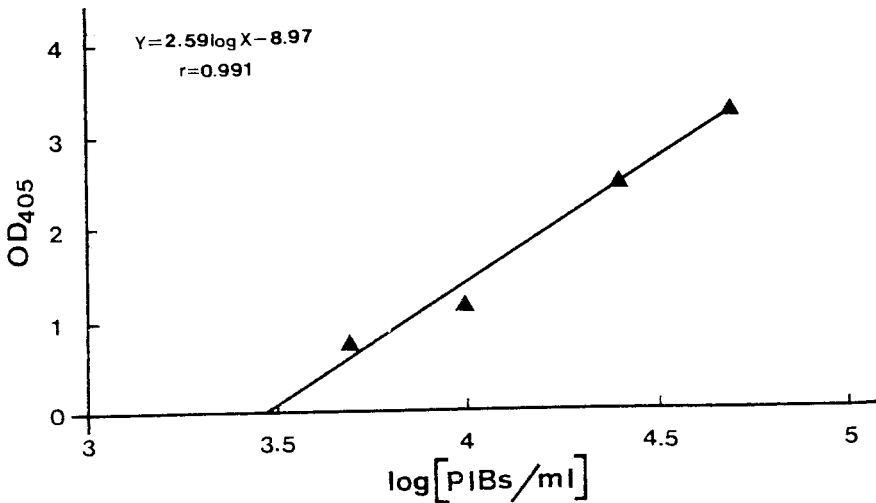
<sup>a</sup> correlation coefficient



病毒產量。以飼料混拌法接種五齡供試蟲，於30°C培養七天後，平均每隻幼蟲可生產病毒 $1.4 \times 10^9$  PIBs、每克冷凍乾燥粉末含 $3 \times 10^9$  PIBs；而四齡供試蟲於25°C培養14天後，每隻幼蟲可生產 $3.2 \times 10^8$  PIBs、每克冷凍乾燥粉末含 $7.8 \times 10^8$  PIBs。經考量蟲體操作方便性、對病毒感受性、及病毒產量與品質等因素後，擬定以五齡初蛻幼蟲為病毒量產之供試蟲，病毒接種濃度為 $3.3 \times 10^6$  PIBs/ml diet，於30°C培養七天後，不論幼蟲發病及發育情況如何，即全盤連同蟲糞及剩餘飼料，一起收入冷凍乾燥機處理二天，將所有乾燥物一併回收，再經磨粉機研磨後，每克粉末含 $3 \times 10^9$  病毒包涵體。且各批所產之病毒產量均於 $\pm 20\%$ 之範圍內異動，且在顯微鏡400倍觀察結果，並未發現其他蟲生病原。而各批量產病毒以斜紋夜蛾四齡幼蟲為供試蟲，測定各批量產病毒之致病力，結果顯示其致病活性高且穩定。

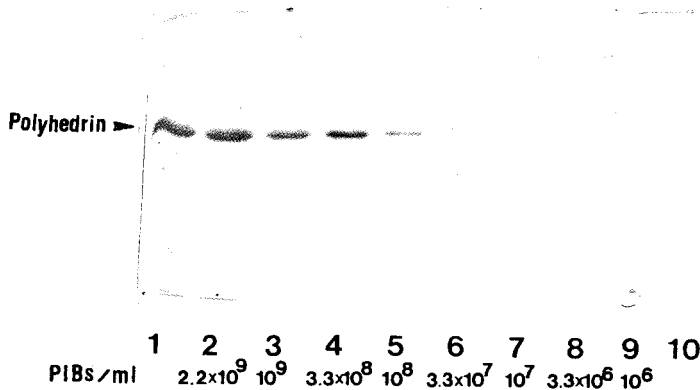
### 三、量產病毒品管檢驗方法之比較

利用ELISA方法進行病毒濃度之檢驗，結果顯示以抗斜紋夜蛾核多角體病毒蛋白質之多源抗體與病毒多角體表面蛋白抗原進行酵素呈色反應後，在405nm之光波下，發現反應液之吸光值與病毒包涵體數量間呈現良好之正相關性，且經直線迴歸分析其相關係數 $r = 0.991$ (圖五)，在 $3.3 \times 10^8$  PIBs/ml即可測得吸光值。而利用SDS-PAGE之方法分析多角體蛋白質，以反應病毒包涵體數量之試驗，雖然亦有正相關反應，但其敏感度較ELISA低數千倍，病毒濃度需高至 $10^7$  PIBs/ml才能偵測到，至 $3.3 \times 10^6$  PIBs/ml時，幾乎無法以肉眼識別是否有多角體蛋白質帶(圖六)，故ELISA較SDS-PAGE之方法適合作為量產病毒之監測法。由於本試驗中係利用Coomassie blue染色、較不敏感，或許改為銀染便可提升其偵測敏感度，同時提高此法之可用性。然而銀染之成本相當高，以此染劑進行蛋白質定量試驗時需考慮經濟效



圖五 核多角體病毒之數量與酵素聯結免疫吸附檢定吸光值之相關性。

Fig. 5. Relationship between the number of SplitNPV and absorbance using ELISA.



圖六 由蛋白質電泳分析法測定病毒包涵體之數量。  
Fig. 6. Quantification of the number of SpltNPV by SDS-PAGE.

益。而ELISA可同時進行大量之檢體測試、節省人力並可減少人為誤差。然而鏡檢法仍屬必要之程序，一般於光學顯微鏡400倍下，利用血球計數器計算病毒包涵體之數量，同時鏡檢病蟲體液中是否含有其他病原菌，係既方便又直接的方法。至於生物檢定法則是品管體系中不可或缺的關卡，可直接反應量產病毒之生物活性，以監測各批產品對寄主幼蟲之致病力是否穩定。

#### 四、病毒在田間盆栽之藥效試驗

夏季甘藍菜盆栽試驗於卵期噴藥者，無論是針對新產下之卵塊、或將孵化之卵塊均有良好的防治效果。即發育一至三日齡之卵塊經噴撒高、中、低濃度病毒液 ( $10^8$ 、 $2 \times 10^7$ 、 $4 \times 10^6$  PIBs/ml)，俟卵塊孵化、幼蟲取食葉片四天後，測得幼蟲之平均死亡率分別為97.1%、85.9%、及59.2%，而高濃度病毒處理組與畢芬寧間有顯著性差異，而中濃度處理組無論在死亡率、幼蟲存活數及葉片取食面積，均與畢芬寧處理組間無顯著性差異、防治效果相當。在各濃度病毒與化學

藥劑之施用後，均有良好的殺蟲效果、且與對照組間有顯著性差異，不但大幅降低作物上斜紋夜蛾幼蟲之數量，更明顯減少葉片受害面積；唯低濃度病毒處理組之防治效果較差，與對照組相比仍有約三分之一之幼蟲繼續存活，而葉片受害面積亦與其他處理組間有顯著性差異(表三)。

將一日、二日、或三日齡之卵塊經噴施病毒後，再以對照組數據為基礎，換算各處理組之幼蟲存活百分率及葉片受害百分率時，以即將孵化之三日齡卵塊的防治效果較佳，於施用高濃度病毒後，可導致99.2%之幼蟲死亡率，並減少94.2%之葉片取食面積。高濃度病毒無論施用在幾日齡之卵塊上，均可表現良好的防治效果，使幼蟲存活率及葉片受害率，分別降至4%及8%以下。但低濃度病毒之施用時機則明顯地影響防治效果，若於三日齡時施用病毒，尚可導降低幼蟲存活率至22.6%，同時減少約70%之葉片取食面積；但若在二日齡時施藥，幼蟲存活率上升至34.5%，葉片受害率升至41.9%；對於一日齡之卵塊而言，低濃度病毒之防治效果遠不

表三 斜紋夜蛾核多角體病對一至三日齡卵塊之半田間平均藥效

Table 3. Semi-field efficiency of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrosis Virus on 1- to 3-d developed egg-masses.

Treatment	Mortality(%)	Surviving insects per plant	Leaf area eaten (cm <sup>2</sup> )
SpltNPV			
1 × 10 <sup>8</sup>	97.1 <sup>a</sup>	5.4 <sup>a</sup>	6.7 <sup>a</sup>
(PIBs / ml)			
2 × 10 <sup>7</sup>	85.9 <sup>b</sup>	42.7 <sup>ab</sup>	23.3 <sup>a</sup>
4 × 10 <sup>6</sup>	59.2 <sup>c</sup>	105.3 <sup>b</sup>	49.4 <sup>b</sup>
Bifenthrin	89.0 <sup>b</sup>	34.3 <sup>ab</sup>	9.9 <sup>a</sup>
H <sub>2</sub> O	0.9 <sup>d</sup>	322.7 <sup>c</sup>	95.3 <sup>c</sup>

Means within a column followed by the same letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

表四 斜紋夜蛾核多角體病毒對不同日齡卵塊之幼蟲存活率與葉片取食率之影響<sup>a</sup>Table 4. Surviving and leaf-eating percentages of *Spodoptera litura* larvae hatched from eggs sprayed with various concentrations of SpltNPV<sup>a</sup>

Treatment (PIBs / ml)	Surviving percentage(%) <sup>b</sup>			Leaf-eating percentage(%) <sup>c</sup>		
	1 d old	2 d old	3 d old	1 d old	2 d old	3 d old
1 × 10 <sup>8</sup>	3.2 ± 2.8	1.9 ± 1.6	0.8 ± 0.6	7.9 ± 6.2	7.5 ± 5.9	5.8 ± 3.8
2 × 10 <sup>7</sup>	19.4 ± 12.7	13.9 ± 10.7	9.6 ± 4.6	27.7 ± 15.4	28.1 ± 16.2	17.9 ± 13.3
4 × 10 <sup>6</sup>	49.6 ± 32.1	34.5 ± 12.7	22.6 ± 8.3	84.7 ± 42.8	41.9 ± 25.2	29.1 ± 19.4

<sup>a</sup> Percentage (%): Means ± SD.

<sup>b</sup> Surviving percentage: based upon number of surviving larvae with control in each treatment as 100%.

<sup>c</sup> Leaf-eating percentage: based upon leaf area eaten by larvae with control in each treatment as 100%.

如其他濃度，僅可降低約50%之幼蟲存活率，及約15%之葉片受害率(表四)。顯示卵期之施用病毒時機確實左右防治效果的高低，在卵塊即將孵化之際施用病毒可造成較高的防治效果。

冬季甘藍菜盆栽試驗於幼齡幼蟲期噴藥者，結果顯示高濃度之病毒對二齡幼蟲之防治效果與化學藥劑畢芬寧相仿，均可造成80%以上之幼蟲死亡率，並大幅降低植株上之幼蟲存活數及葉片受害面積。而中、低濃度之病毒造成之幼蟲存活數則與兩種蘇力菌製劑相近，且均可造成50%~60%之幼蟲死亡率，以葉片受害面積而言，雖然其間無顯著性差異，但蘇力菌處理組較病毒處理組之受害面積少(表五)，可能是因為蘇力菌之作用機制為破壞中腸之細胞膜、並導致中腸麻

痺，抑制幼蟲正常取食之故。

## 討 論

斜紋夜蛾核多角體病毒對斜紋夜蛾幼蟲具頗高之致病力(Su, 1990; Tuan *et al.*, 1995a)，在田間應可利用為防治害蟲猖獗的微生物製劑。加上蟲生病毒具有很高的專一性，對人、畜及有益昆蟲均無害，又無殘毒之虞。同時在田間長久施用後，可潛伏於蟲體、或殘存於環境土壤中達十餘年之久，並在害蟲密度高時引發疫病，達到壓抑害蟲族群之功效(Evans, 1986)，故利用核多角體病毒防治害蟲係值得開發的方向。然而在量產病毒之過程中，幼蟲的體型、齡期與健康狀況，病毒接種之方法與濃度，及幼蟲培育發

表五 斜紋夜蛾核多角體病毒與蘇力菌及畢芬寧對二齡斜紋夜蛾幼蟲之半田間藥效比較

Table 5. comparison of semi-field efficiency of *Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus, *Bacillus thuringiensis*, and bifenthrin on 2nd-instar larvae of *Spodoptera litura*

Treatment	Mortality(%)	Surviving insects per plant	Leaf area eaten (cm <sup>2</sup> )
<i>SpltNPV</i> (PIBs / ml)			
1 × 10 <sup>8</sup>	81.5 <sup>a</sup>	4.8 <sup>a</sup>	2.1 <sup>a</sup>
2 × 10 <sup>7</sup>	54.0 <sup>b</sup>	11.9 <sup>c</sup>	12.7 <sup>b</sup>
4 × 10 <sup>6</sup>	54.8 <sup>b</sup>	11.7 <sup>b</sup>	12.2 <sup>b</sup>
<i>Bacillus thuringiensis</i>			
XENTARI <sup>®</sup>	49.6 <sup>b</sup>	13.1 <sup>b</sup>	5.7 <sup>ab</sup>
TUREX <sup>®</sup>	59.1 <sup>b</sup>	10.6 <sup>b</sup>	5.0 <sup>ab</sup>
Bifenthrin	88.7 <sup>a</sup>	2.9 <sup>a</sup>	0.7 <sup>a</sup>
H <sub>2</sub> O	0.8 <sup>c</sup>	0.7 <sup>a</sup>	34.4 <sup>c</sup>

Means within a column followed by the same letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test.

病條件，均對病毒之產量與品質有絕對的影響。本試驗中一齡幼蟲對病毒之感受性極高，但罹病幼蟲體型太小即死亡，病毒產量相對過低，造成回收量偏低不符合經濟效益。而二、三齡幼蟲之幼蟲死亡率雖高，但其中有近50%之死亡率來自於其他死亡原因——如脫皮不正常或因混合感染其他病原致死，而真正因接種病毒而死者僅約50%，故會影響病毒的產量及純度。然而六齡幼蟲之半致死劑量(LD<sub>50</sub>)較五齡幼蟲高出75倍之多，顯示老熟幼蟲對病原菌具成熟免疫性(Tuan *et al.*, 1995a)，故不適合做為增殖病毒之供試蟲。而四齡幼蟲之病毒產量亦不如五齡幼蟲高，此結果與Tuan等(1995a)所做以接種源飲入法接種幼蟲，五齡較四齡蟲病毒產量為高之結果相符，雖然接種源飲入法較本試驗之飼料混拌法所得每隻病蟲病毒產量高出76%之病毒包涵體。在培育溫度之探討上，Tuan等(1995b)認為25~35℃為病毒最適之增殖溫度，而感病幼蟲於30℃下增殖之病毒產量亦較35℃為高(Tuan *et al.*, 1995a)。故考量病毒之生產成本及效益後，建議量產病毒之流程如下，在一齡幼蟲孵化

後，採集體飼育至三齡末，將欲蛻皮之幼蟲挑入含病毒飼料塊之三十孔盤中，以選取發育整齊且健康之幼蟲，每孔放三隻幼蟲，以防止飼育密度太高會造成幼蟲自殘行為發生。再繼續養至五齡初，而後單隻挑入放有含病毒液飼料塊(3.3 × 10<sup>9</sup> PIBs / ml diet)之三十孔盤內，於30℃生長箱中培育，至接種後一週即全盤收穫，將全盤之蟲體(無論罹病程度及蟲體大小)、剩餘飼料及蟲糞置入冷凍乾燥機中去除水份，並以打碎機磨粉製成病毒半成品。其中儘量減少人工支出，並模擬機械化量產方式，所得之病毒產量經鏡檢、血球計數器計算後，以1.4 × 10<sup>9</sup> PIBs / larva為標準產量，各批次產量以±20%產量為容許異動範圍。病毒生產成本亦可因供給飼料量之減少、人工飼料配方試藥等級之降低、養蟲用具之回收再利用而降低。據Huang and Kao (1994)所做甜菜夜蛾四齡幼蟲感病後，食物供給量對病毒在幼蟲體內增殖的數量有顯著影響，隨著食物供給量的充足，幼蟲體重隨之增加，病毒產量亦相對增加。然而在生產甜菜夜蛾核多角體病毒過程中至少需提供幼蟲四天之食物量，且考慮水分蒸散

作用造成食物含水量降低而影響幼蟲食慾，故應提供多餘實際需求量之飼料量。因本試驗中供給五齡幼蟲每隻兩塊 $1\text{cm}^3$ 之含病毒飼料，然而卻有80%以上之供試蟲未能將飼料食盡，且半數以上之幼蟲均剩餘約40%之飼料量，造成病毒接種源及人工飼料之浪費。估計若減少40%之飼料供應量，不但可降低27%之生產成本，每克冷凍乾燥粉末中病毒之含量亦會相對提高1.4倍，進而提高生產效率。目前擬以較便宜之飼料配方，代替原用昂貴精製之材料，並減少病蟲飼料之供應量，及採用養蟲盤回收使用之方式，估計可再降低生產流程之部份支出，同時可提高量產病毒之純度與濃度。

病毒量產時必須注意各批次產品病毒包涵體之數量是否均達到一定的標準，本試驗以鏡檢法、蛋白質電泳分析法及酵素聯結免疫吸附檢定法進行比較，發現後者靈敏度較高、且可同時進行大量樣品檢驗，不失為一可利用之檢驗方法。雖然本試驗每隻供試蟲僅生產病毒 $1.4 \times 10^9$  PIBs、每克冷凍乾燥粉末僅含 $3 \times 10^9$  PIBs，較Tuan等(1995b)以接種源飲入法及單隻病蟲回收方式所得病毒產量差。但因飼料混拌法係利用大量配製人工飼料時，將病毒液倒入混拌，再以自動切割機定型飼料後，定量餵予供試蟲，較接種源飲入法需單隻餵予病毒液後，再給予人工飼料之方式省工省時。又本試驗最後收穫病蟲之方式係採用全盤收穫方式，雖然會將剩餘飼料、蟲糞一併回收，而降低了病毒之相對濃度，但此方式乃屬低人工成本處理法，較單隻回收病蟲要節省成本，且較符合企業化、機械化的操作模式。只要在供應飼料量上適度的減少，使成本再降低、病毒相對含量增高，仍係值得採用的方法。而在產品的品質上亦應考量是否有其他病原或腐生菌的污染，在本試驗中為了防止幼蟲感染其他病

原、或飼料腐敗，故於人工飼料中添加甲基安息香酸(methyl-p-hydroxybenzoate)、山梨酸(sorbic acid)、丙酸(propionic acid)及鏈黴素(streptomycin)等四種抗微生物劑，以儘量避免供試幼蟲之健康及量產病毒之品質受損。在飼育供試蟲至接種病毒後回收病蟲之過程中，以光學顯微鏡觀察並未發現黴菌及其他蟲生病原菌，唯在死蟲體液中可見細菌污染的情形。Huang and Kao (1994)在以蟲體量產甜菜夜蛾核多角體病毒時，發現病毒培過程中受到污染的種類以細菌為主、真菌相當少，且在第三天後因病蟲死亡及排泄物的增加，使得微生物快速孳生。而海灰翅夜蛾(*S. littoralis*)核多角體病毒量產過程中，不同批次之產品含有2~11種細菌，亦有在健康蟲體腸道中孳生的共生菌，大多數係屬於世界衛生組織(WHO)訂定的最低危險群，且無任何對人類有害之病原菌(Grzywacz *et al.*, 1997)。雖然其伴隨的微生物對人體無安全之虞，但為了施用後生態的平衡，及申請登記證時通過毒理試驗，大量微生物污染的情形仍應儘量避免。故考慮病毒產量及後期腐生菌的污染問題，應掌握適當的收穫時間。Huang and Kao (1994)認為在 $30^\circ\text{C}$ 培育條件下，量產甜菜夜蛾核多角體病毒，以接種後5~6天為佳；而Smith (1987)則認為第七天較佳，與本試驗所擬定之量產流程收穫時間相同。

斜紋夜蛾核多角體病毒對斜紋夜蛾幼蟲具頗高之致病力(Su, 1990; Tuan *et al.*, 1995a)，在田間應可利用為防治害蟲猖獗的微生物製劑。加上蟲生病毒具有很高的專一性，對人、畜及有益昆蟲均無害，又無殘毒之虞慮。同時在田間長久施用後，可潛伏於蟲體、或殘存於環境土壤中達十餘年之久而達到適時引發疫病、壓抑害蟲族群之功效(Evans, 1986)，故利用核多角體病毒防治

害蟲是值得開發的方向。

由盆栽試驗顯示施用病毒可使田間幼蟲罹病死亡、降低害蟲棲群密度、減少作物受損面積。無論在冬季或夏季，於斜紋夜蛾卵及稚齡幼蟲初侵入之際，即噴佈病毒均可達顯著之成效。然而在卵期施用病毒之時機尤以接近孵化時間為佳，以中、低濃度病毒而言，對三日齡卵塊之防治效果即優於一、二日齡卵塊。以玉米穗蟲核多角體病毒 (*Heliothis armigera* NPV) 防治田間玉米穗蟲時，發現在卵即將孵化前噴撒病毒於玉米果穗穗絲上，可達到93.6%之幼蟲死亡率，而對新產下之卵粒則僅能有36.9%之死亡率。雖然夜蛾科幼蟲孵化時會取食卵殼，而污染在卵表面之病毒即成為接種源，可導致幼蟲罹病死亡，但病毒在田間很容易受到陽光中紫外線之破壞，而喪失部份活性 (Ignoffo *et al.*, 1977; Tuan *et al.*, 1995a)，故Potter and Watson (1983) 建議在防治菸芽夜蛾 (*H. virescens*) 時，最好儘量接近卵將孵化之際噴撒病毒，可將幼蟲死亡率由19.4%升至79.9%。在玉米田以玉米穗蟲核多角體病毒防治即將孵化之卵，可明顯降低幼蟲為害百分率且顯著增加可上市果穗，效果較加保扶處理組好 (Tuan *et al.*, 1989)。對於田間幼蟲施用病毒，就以施藥後一週為觀察期，高濃度病毒甚至比一般化學藥劑、及蘇力菌製劑之防治效果更好。故在適當時機施用病毒，確實可以達到良好的防治效果，但病毒為絕對寄生病原，必須利用蟲體或細胞株來繁殖量產，其生產成本相當昂貴。單以本試驗之量產流程而言，包括蟲源之培育、供試蟲之篩檢、病毒接種、及病蟲回收、乾燥、磨粉等，估計平均每生產一隻含 $1.4 \times 10^9$  PIBs之病蟲，需耗費新台幣6元。因此在經濟效益上，無法與一般化學殺蟲劑或蘇力菌相提並論。但以永續農業經營理念而言，將病毒納

入害蟲管理綜合防治策略的成員之一善加利用，與作用機制不相同之藥劑或其他生物防治法，同時配合使用以截長補短，而在減低化學藥劑施用量、及噴灑頻率之情況下，增加防治效果。

## 誌 謝

本試驗承蒙行政院農業委員會85科技-1.2-糧-17(9)經費補助，本所林秀昭、謝名禎、林月美及蘇珍桂小姐提供試驗蟲隻，並協助病毒接種及田間藥效試驗，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, 278 pp.
- Bell, M. R.** 1991. Effectiveness of microbial control of *Heliothis* spp. developing on early season wild geraniums: field and field cage tests. J. Econ. Entomol. 84: 851-854.
- Deseo, K. K. V., and L. Rovesti.** 1992. Lotto microbiological control fitofagi teorie e pratica. Edagricole, Bologna, pp. 156-157.
- Evans, H. F.** 1986. Ecology and epizootiology of baculoviruses. pp. 89-132. in R.R. Granados and B.A. Federici eds. The Biology of Baculoviruses. Vol. II. CRC Press, Boca Raton, FL, 276 pp.
- Finnerty, C. M., R. R. Granados, P. R.**

- Hughes, and A. C. Bellotti.** 1994. Bioassay of several baculoviruses for virus-induced mortality in *Manduca sexta* larvae and induction of infection-specific protein. *J. Invertebr. Pathol.* 63: 140-144.
- Grzywacz, D., D. McKinley, K. A. Jones, and G. Moawad.** 1997. Microbial contamination in *Spodoptera littoralis* nuclear polyhedrosis virus produced in insects in Egypt. *J. Invertebr. Pathol.* 69: 151-156.
- Huang, L. H. and S. S. Kao.** 1994. Production of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus in larvae. *Chinese J. Entomol.* 14: 343-352 (in Chinese).
- 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.** 1973. Development of a viral insecticide: concept to commercialization. *Exp. Parasitol.* 33: 380-406.
- Ignoffo, C. M., D. L. Hostetter, P. P. Sikorowski, G. Sutter, and W. M. Brooks.** 1977. Inactivation of representative species of entomopathogenic virus, a bacterium, fungus, and protozoan by an ultra-violet light source. *Environ. Entomol.* 6: 411-415.
- Martignoni, M. E., and P. J. Iwai.** 1986. A catalog viral diseases of insects, mites, and ticks. USDA Forest Service PNW-195. Washington, USA.
- 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).
- Potter, M. F. and T. F. Watson.** 1983. Timing of nuclear polyhedrosis virus-bait spray combinations for control of egg and larval stages of tobacco budworm. *J. Econ. Entomol.* 76: 446-448.
- 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, 720 pp.
- Shapiro, M.** 1986. In vivo production of baculoviruses. pp. 31-62. in R. R. Granados and B. A. Federici, eds. *The Biology of Baculoviruses*. Vol. 2. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Smith, P. H.** 1987. Nuclear polyhedrosis

- virus as biological control agent of *Spodoptera exigua*. Ph. D. Thesis, Agricultural Univ. Wageningen. 125 pp.
- Smits, P. H., M. van de Vrie, and J. M. Vlak.** 1987. Nuclear polyhedrosis virus for control of *Spodoptera exigua* larvae on glass-house 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).
- Tuan, S. J., L. C. Tang, and R. F. Hou.** 1989. Control of *Heliothis armigera* in maize with a nuclear polyhedrosis virus. Appl. Entomol. Zool. 24: 186-192.
- Tuan, S. J., S. L. Hsuan, and S. S. Kao.** 1993. Enzyme-linked immunosorbent assay for measuring the potency of *Bacillus thuringiensis* products. Plant Prot. Bull. 35: 70-78 (in Chinese).
- Tuan, S. J., S. S. Kao, and U. L. Leu.** 1995a. Factors affecting pathogenicity and stability of *Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus isolated in Taiwan. Chinese J. Entomol. 15: 47-58 (in Chinese).
- Tuan, S. J., S. S. Kao, U. L. Leu, and D. J. Cheng.** 1995b. Pathogenicity and propagation of *Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus isolated in Taiwan. Chinese J. Entomol. 15: 19-33 (in Chinese).

收件日期:1998年4月13日

接受日期:1998年6月16日



# *In vivo* Mass Production and Control Efficacy of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) Nucleopolyhedrovirus

Shu-Jen Tuan, Wen-Lin Chen, and Suey-Sheng Kao Biopesticide Department, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, 11 Kung-Ming Rd., Wufeng, Taichung, Taiwan 413, R.O.C.

## ABSTRACT

The *Spodoptera litura* larvae became less susceptible to *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus (SplNPV) with increasing age using dietary inoculation. Neonates were the most susceptible, while the 6th-instar larvae were the least. Percentage of non-typical NPV infection was higher in 2nd-, 3rd-, and 4th- than in 5th-instar larvae. Results also show that the number of polyhedral inclusion bodies (PIBs) produced was positively correlated with larval weight from 3rd-instar to 5th-instar. It is suggested that SplNPV is optimal for mass production with early 5th-instar larvae individually infected by diet-incorporation (an inoculum of  $3 \times 10^6$  PIBs/ml diet) after incubating for 7 d at 30°C. The average yield was  $1.4 \times 10^9$  PIBs/larva. Standardization and quality control of SplNPV products can be achieved by visual counting, bioassay, SDS-PAGE, and ELISA. And, ELISA has proven to be better than SDS-PAGE; it is a sensitive and handy tool to quantify viral products. Spraying of SplNPV on egg-masses can significantly induce larval mortality, and reduce larval densities and leaf area eaten on cabbage pods. Application of SplNPV at a low concentration on egg-masses immediately before hatching resulted in 77.4% larval mortality compared with 50.4% on newly laid egg-masses. Applications of SplNPV at high concentrations ( $10^8$  PIBs/ml) resulted in 99.2% larval mortality and 94.2% reduction of leaf area eaten. Therefore, viral application should coincide as closely as possible with egg-mass hatching. The control efficacy of SplNPV with high concentrations was better than that with bifenthrin and *Bacillus thuringiensis* products 1 wk post application.

**Key words :** *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus (SplNPV), mass production, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), SDS-PAGE, field test.