



Formosan Entomologist

Journal Homepage: entsocjournal.yabee.com.tw

Enhancement Effects of Chemical Additives on the Virulence of *Spodoptera litura* Nucleopolyhedrovirus 【Research report】

斜紋夜蛾核多角體病毒化學增效作用之研究【研究報告】

Cheng-Jen Shih* and Shu-Tseng Lee

石正人*、李淑增

*通訊作者E-mail :

Received: Accepted: Available online: 1998/12/01

Abstract

This paper presents a study on enhancers for *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus (SINPV). In order to enhance the virulence of SINPV, several chemicals, eg., congo red, sorbic acid, boric acid, fluorescent brightener 28, leucophor, lecithin, phosphatidyl choline, and phosphatidyl ethanolamine, were respectively mixed with the virus suspension to evaluate the efficacy of enhancement. We tested 5 different species of NPVs to check their efficacy. The results revealed that SINPV was the most effective for infecting *S. litura* larvae. When we added chemicals into the cell culture medium, TNM-FH, the SL7B cell line could grow only when the concentration was 0.01%. Consequently, we investigated the TCID₅₀ of SINPV B strain ECV with or without 0.01% chemical addition. Results revealed that several chemicals could reduce the TCID₅₀ of SINPV B strain ECV. However, larvae fed on artificial diet containing 1% of different chemicals showed no adverse effects. Bioassay revealed that an artificial diet surface-contaminated with virus suspension contained 1% of different chemicals could increase the mortality of *S. litura* larvae as compared to virus suspension only. The mortality of *S. litura* larvae increased with increasing concentration of chemicals added in the virus suspension except for fluorescent brightener 28.

摘要

本文測試多種化學藥品添加劑，評估其對斜紋夜蛾 (*Spodoptera litura*) 核多角體病毒致病力之增強效果。測試五種不同核多角體病毒，得知對斜紋夜蛾幼蟲致病力最強的病毒為分離自台灣的斜紋夜蛾核多角體病毒。選取數種藥品包括剛果紅 (congo red)、山梨酸 (sorbic acid)、硼酸 (boric acid)、卵磷脂 (lecithin)、磷酸醯乙醇胺 (phosphatidyl ethanolamine)、磷酸醯膽鹼 (phosphatidyl choline)、螢光增白劑 (leucophor) 及螢光增亮劑 (fluorescent brightener 28) 等，進行其對斜紋夜蛾核多角體病毒增效作用之測試。結果在細胞培養液中分別添加上述幾種化學藥品，僅在添加0.01%之劑量時，細胞方可維持正常生長。利用細胞培養方法測試各種化學藥品對病毒感染細胞之增效作用，結果添加0.01%之sorbic acid及boric acid可以降低TCID₅₀。在斜紋夜蛾幼蟲的活體試驗中，取純化之斜紋夜蛾核多角體病毒，與數種供試化學增效劑分別混合後，結果增效作用較強者leucophor、fluorescent brightener 28、lecithin、phosphatidyl choline、及phosphatidyl ethanolamine等五種化學藥品。除fluorescent brightener 28外，四種化學藥品的濃度對增效作用之效果呈正相關。

Key words: *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus, enhancement, viral insecticides, insect control.

關鍵詞: 斜紋夜蛾核多角體病毒、增效作用、病毒殺蟲劑、蟲害防治

Full Text:  [PDF\(2.06 MB\)](#)

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

斜紋夜蛾核多角體病毒化學增效作用之研究

石正人* 李淑增 國立台灣大學昆蟲學系 台北市羅斯福路四段113巷27號

摘 要

本文測試多種化學藥品添加劑，評估其對斜紋夜蛾 (*Spodoptera litura*) 核多角體病毒致病力之增強效果。測試五種不同核多角體病毒，得知對斜紋夜蛾幼蟲致病力最強的病毒為分離自台灣的斜紋夜蛾核多角體病毒。選取數種藥品包括剛果紅 (congo red)、山梨酸 (sorbic acid)、硼酸 (boric acid)、卵磷脂 (lecithin)、磷酯醯乙胺醇 (phosphatidyl ethanolamine)、磷酯醯膽鹼 (phosphatidyl choline)、螢光增白劑 (leucophor) 及螢光增亮劑 (fluorescent brightener 28) 等，進行其對斜紋夜蛾核多角體病毒增效作用之測試。結果在細胞培養液中分別添加上述幾種化學藥品，僅在添加0.01%之劑量時，細胞方可維持正常生長。利用細胞培養方法測試各種化學藥品對病毒感染細胞之增效作用，結果添加0.01%之 sorbic acid 及 boric acid 可以降低 TCID₅₀。在斜紋夜蛾幼蟲的活體試驗中，取純化之斜紋夜蛾核多角體病毒，與數種供試化學增效劑分別混合後，結果增效作用較強者有 leucophor、fluorescent brightener 28、lecithin、phosphatidyl choline、及 phosphatidyl ethanolamine 等五種化學藥品。除 fluorescent brightener 28 外，四種化學藥品的濃度對增效作用之效果呈正相關。

關鍵詞：斜紋夜蛾核多角體病毒，增效作用，病毒殺蟲劑，蟲害防治。

前 言

斜紋夜蛾 (*Spodoptera litura*) 為我國重要的蔬菜害蟲之一，往昔雖曾使用生長調節劑及性費洛蒙進行防治 (Shih and Chu, 1995)，但目前大都仍依賴合成化學殺蟲劑。由於化學殺蟲劑的缺點逐漸地浮現，例如抗藥性的產生、對環境的污染以及對天敵的傷害，使得微生物殺蟲劑成為新興的非農藥防治法中強而有力的替代方案 (Hou,

1991; Casida and Quistad, 1998)。微生物殺蟲劑的寄主專一性高，對天敵與環境的衝激少，且因基因組小，易於進行生物技術的改造，將來運用潛力大 (Richards *et al.*, 1998)。此外，病毒可與農藥混合使用，容易整合於害蟲綜合防治系統中，因此昆蟲病原微生物在蟲害防治重要性日益提高 (Shih, 1994)。

病毒殺蟲劑在實際運用上，會遭遇到許多困難，例如病毒的寄主專一性高，在田間

*抽印本索取及論文聯繫之負責人

若欲同時防治多種害蟲，勢必一次施用多種病毒，方可達到目的 (Tuan *et al.*, 1997)，因此擴大病毒寄主範圍是當前研究重點之一 (Maeda *et al.*, 1993; Thiem *et al.*, 1996)。同時，昆蟲病毒從施用到害蟲死亡所需的時間長，導致農民排斥使用病毒防治害蟲，所以很多研究焦點集中於基因轉殖以提高病毒殺蟲活性 (Hu *et al.*, 1994; Bonning and Hammock, 1996; Shih and Hu, 1996)；此外，開發紫外光保護劑以延長病毒在田間之殺蟲效果 (Kao and Huang, 1992, Shih *et al.*, 1995) 及尋找協力劑以增強病毒對害蟲之致病能力 (Shapiro and Argauer, 1997)，均受到蟲害防治研究人員的矚目。

有關化學添加物用來增加核多角體病毒致病力的研究，已經有多年歷史。Yamamoto and Tanada (1980) 以醯胺類界面活性劑 (acrylamine cationic detergent) 進行測試，將其添加至粟夜盜核多角體病毒 (*Pseudaletia unipuncta* NPV) 中以感染粟夜盜幼蟲，發現在濃度為 0.03% 時具有增效作用。Tuan and Hou (1988) 以玉米穗蟲 (*Heliothis armigera*) 進行測試，在病毒液中添加卵磷脂 (lecithin)，只需 5 mg/ml 的濃度，即可有效提高幼蟲的死亡率及縮短其半數致死時間。除了磷脂類以外，一些其他化學物質亦可以有效提高核多角體病毒之致病力。Shapiro and Bell (1982) 以多種化學藥品進行增效作用的測定，得知添加 boric acid 及 sodium borate 可顯著降低舞蛾 (*Lymantria dispar*) 核多角體病毒之 LC₅₀。Shapiro and Robertson (1992) 測試多種螢光劑的增效作用，發現 leucophor 及 Tinopal LPW，均可降低核多角體病毒的 LC₅₀，其中 Tinopal LPW 的增效作用隨著濃度提高而增加，可將核多角體病毒的殺蟲效

果提高 184 倍。同時 Shapiro (1992) 亦測試 leucophor 及 Tinopal LPW 對核多角體病毒之保護效果，也得到不錯的結果，可知這兩種螢光劑與剛果紅同為多功能的增效劑，也可以作為紫外線保護劑。

本文即在探討添加化學增效劑對於斜紋夜蛾核多角體病毒殺蟲效果的影響，期能提高斜紋夜蛾核多角體病毒之殺蟲效用，使能推廣病毒殺蟲劑實際運用於田間，用以防治斜紋夜蛾。

材料與方法

一、供試昆蟲

供試蟲源為本實驗累代飼育之斜紋夜蛾。本蟲飼育於 25°C 的生長箱中，L:D = 12:12。所有與幼蟲相關之試驗均於此條件下進行。斜紋夜蛾幼蟲之飼養、人工飼料配方及齡期之判別等均根據 Shih (1995) 之報告進行。

二、供試病毒

斜紋夜蛾核多角體病毒為本實驗室自野外罹病蟲體中分離純化而得 (Shih *et al.*, 1995)。通常在實驗室以 10⁶ PIB / 蟲之劑量餵食斜紋夜蛾四齡幼蟲，感染病毒約 7 天後，收集罹病幼蟲，置於 -20°C 冰箱備用。芹菜夜蛾 (*Anagrapha falcifera*) 及松柏鋸角葉蜂 (*Neodiprion sertifer*) 之核多角體病毒由美國 BIOSYS 公司提供，舞蛾 (*Lymantria dispar*) 核多角體病毒及其商品化之 GYPCHEK 核多角體病毒殺蟲劑由美國農部贈送。斜紋夜蛾核多角體病毒之胞外病毒粒子 (extracellular virus, ECV) 由本實驗室自罹病斜紋夜蛾幼蟲體液建立之體外培養病毒株 (SINPV B strain)。

若欲同時防治多種害蟲，勢必一次施用多種病毒，方可達到目的 (Tuan *et al.*, 1997)，因此擴大病毒寄主範圍是當前研究重點之一 (Maeda *et al.*, 1993; Thiem *et al.*, 1996)。同時，昆蟲病毒從施用到害蟲死亡所需的時間長，導致農民排斥使用病毒防治害蟲，所以很多研究焦點集中於基因轉殖以提高病毒殺蟲活性 (Hu *et al.*, 1994; Bonning and Hammock, 1996; Shih and Hu, 1996)；此外，開發紫外光保護劑以延長病毒在田間之殺蟲效果 (Kao and Huang, 1992, Shih *et al.*, 1995) 及尋找協力劑以增強病毒對害蟲之致病能力 (Shapiro and Argauer, 1997)，均受到蟲害防治研究人員的矚目。

有關化學添加物用來增加核多角體病毒致病力的研究，已經有多年歷史。Yamamoto and Tanada (1980) 以醯胺類界面活性劑 (acrylamine cationic detergent) 進行測試，將其添加至粟夜盜核多角體病毒 (*Pseudaletia unipuncta* NPV) 中以感染粟夜盜幼蟲，發現在濃度為 0.03% 時具有增效作用。Tuan and Hou (1988) 以玉米穗蟲 (*Heliothis armigera*) 進行測試，在病毒液中添加卵磷脂 (lecithin)，只需 5 mg/ml 的濃度，即可有效提高幼蟲的死亡率及縮短其半數致死時間。除了磷脂類以外，一些其他化學物質亦可以有效提高核多角體病毒之致病力。Shapiro and Bell (1982) 以多種化學藥品進行增效作用的測定，得知添加 boric acid 及 sodium borate 可顯著降低舞蛾 (*Lymantria dispar*) 核多角體病毒之 LC_{50} 。Shapiro and Robertson (1992) 測試多種螢光劑的增效作用，發現 leucophor 及 Tinopal LPW，均可降低核多角體病毒的 LC_{50} ，其中 Tinopal LPW 的增效作用隨著濃度提高而增加，可將核多角體病毒的殺蟲效

果提高 184 倍。同時 Shapiro (1992) 亦測試 leucophor 及 Tinopal LPW 對核多角體病毒之保護效果，也得到不錯的結果，可知這兩種螢光劑與剛果紅同為多功能的增效劑，也可以作為紫外線保護劑。

本文即在探討添加化學增效劑對於斜紋夜蛾核多角體病毒殺蟲效果的影響，期能提高斜紋夜蛾核多角體病毒之殺蟲效用，使能推廣病毒殺蟲劑實際運用於田間，用以防治斜紋夜蛾。

材料與方法

一、供試昆蟲

供試蟲源為本實驗累代飼育之斜紋夜蛾。本蟲飼育於 25°C 的生長箱中，L:D = 12:12。所有與幼蟲相關之試驗均於此條件下進行。斜紋夜蛾幼蟲之飼養、人工飼料配方及齡期之判別等均根據 Shih (1995) 之報告進行。

二、供試病毒

斜紋夜蛾核多角體病毒為本實驗室自野外罹病蟲體中分離純化而得 (Shih *et al.*, 1995)。通常在實驗室以 10^5 PIB / 蟲之劑量餵食斜紋夜蛾四齡幼蟲，感染病毒約 7 天後，收集罹病幼蟲，置於 -20°C 冰箱備用。芹菜夜蛾 (*Anagrapha falcifera*) 及松柏鋸角葉蜂 (*Neodiprion sertifer*) 之核多角體病毒由美國 BIOSYS 公司提供，舞蛾 (*Lymantria dispar*) 核多角體病毒及其商品化之 GYPCHEK 核多角體病毒殺蟲劑由美國農部贈送。斜紋夜蛾核多角體病毒之胞外病毒粒子 (extracellular virus, ECV) 由本實驗室自罹病斜紋夜蛾幼蟲體液建立之體外培養病毒株 (SINPV B strain)。

三、供試藥品

本試驗供試藥品名稱及來源分別為 fluorescent brightener 28、boric acid、sorbic acid、phosphatidyl choline、phosphatidyl ethanolamine 購自 Sigma 公司，congo red 購自 Fluka 公司。依照藥品說明書，分別溶於酒精或水中，以滅菌過蒸餾水配製成不同稀釋比率，添加於核多角體病毒感染液中進行試驗。

四、供試細胞株

本試驗使用之細胞株為本實驗室所建立之斜紋夜蛾 IBLO-SL7B 細胞株 (Shih and Chang, 1997)。通常培養於 28°C 生長箱，以 TNM-FH 培養液培養，並添加 8% 胎牛血清、50IU/ml 青黴素 (penicillin) 及 1.75 mg/ml 鏈黴素 (streptomycin) 防治黴 (fungizone)，每隔 3 天進行一次繼代培養。

五、斜紋夜蛾核多角體病毒之純化

參考 O'Reilly *et al.* (1992) 方法，進行病毒純化，主要步驟如下：將約 20 隻之罹病斜紋夜蛾幼蟲以均質機打碎，以絲襪過濾，收集濾液，經過 5000 xg 離心 10 min，將沈澱溶於 20ml 的水中，再加入等體積的正己烷 (hexane)，以 2000 rpm 離心 10 min，以萃取蟲體中的脂肪，離心後移走正己烷及脂肪層。將水溶液以 5000 xg，離心 10 min，可將病毒沈澱下來。將沈澱重新溶於 20ml 之 0.5% SDS 溶液中，再以 5000xg，離心 10 min，以 20 ml 之 0.5 M NaCl 將沈澱溶解，重新將病毒沈澱下來。此時將病毒溶於 20 ml 的水中，以進行蔗糖梯度離心。在 35 ml 的超高速離心管底層先放入 5 ml 之 60% (w/w) 蔗糖溶液，其上加注 15 ml 50% 的蔗糖溶液，最上層則放入 15 ml 上述之病毒液。以超高速離

心機 (Hitachi SCP 85H2) 進行 24,000 rpm，離心 30 min。離心完畢，收集病毒在 50 與 60% 蔗糖溶液間所形成的懸浮帶，並加入 3 倍體積的水，以 5000 xg，離心 20 min，可得到純化之核多角體病毒。

六、核多角體病毒對斜紋夜蛾幼蟲致病力測試

為挑選一種對斜紋夜蛾最具防治效果的核多角體病毒，本試驗選擇斜紋夜蛾、芹菜夜蛾、松柏鋸角葉蜂、舞蛾等蟲的核多角體病毒及美國農部所贈送的 Gypchek，將這五種病毒，分別以 10^5 PIBs / 蟲的濃度感染斜紋夜蛾三齡幼蟲，7 天後記錄幼蟲之死亡率。斜紋夜蛾核多角體病毒半數致死劑量之測試，則以 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 PIB / 蟲的濃度，將病毒滴在人工飼料上餵食斜紋夜蛾三齡幼蟲，直到人工飼料被完全取食後，更換新鮮未含病毒飼料繼續飼養供試蟲。七天後記錄幼蟲的死亡率。以 Probit analysis 計算病毒半數致死劑量 (LD_{50})。

七、化學增效劑對斜紋夜蛾細胞生長及核多角體病毒 $TCID_{50}$ 之影響

為測試添加增效劑之後細胞生長情形，以 10^3 cells / well 的密度，將細胞接種於 96 孔平板中，分別加入 1、0.1、0.01% 之增效劑，將平板置於 28°C 生長箱中，每隔 12 小時觀察細胞生長情形，以定點照相法記錄細胞數目，本試驗重複三次。為測試增效劑對半數培養細胞感染病毒劑量 (50% Tissue Culture Infective Dose, $TCID_{50}$) 之影響，將 *SINPV* B strain 之 ECV 作連續性稀釋成 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 等 10 種濃度，取 10 μ l 病毒稀釋液與內含 0.01% 增效劑 (共分六種，fluorescent brightener 28、leucophor、

lecithin、sorbic acid、boric acid 及 congo red) 之細胞液100 μ l (10⁴ cells/well) 均勻混合後，接種於96孔平板中，置於28°C生長箱中培養，一週後觀察細胞受感染情形。依 Summers and Smith (1987) 之方法計算TCID₅₀。比較各不同增效劑處理組間的TCID₅₀差異，以評估增效作用，本試驗重複三次。

八、化學增效劑對斜紋夜蛾核多角體病毒感染幼蟲死亡率之影響

以八種化學藥品fluorescent brightener 28、leucophor、卵磷脂 (lecithin)、磷脂醯乙醇胺 (phosphatidyl ethanolamine, PE)、磷脂醯膽鹼 (phosphatidyl choline, PC)、剛果紅 (congo red)、2,4-己二烯酸 (山梨酸, sorbic acid) 及硼酸 (boric acid) 進行增效測試。在供試病毒液中添加1%的化學藥品，並以斜紋夜蛾核多角體病毒之半數致死劑量 (3×10⁴ PIB/蟲) 滴在人工飼料上餵食三齡幼蟲，直到人工飼料被全部取食後，更換新鮮而不含病毒之飼料。感染病毒7日後，記錄供試幼蟲之死亡率。以鄧肯氏變域檢定法 (Duncan's multiple range test) 計算試驗組與對照組間之顯著差異。根據上述試驗結果，挑選五種增效作用最強的藥劑 (leucophor、fluorescent brightener

28、lecithin、phosphatidyl choline、phosphatidyl ethanolamine等) 進行濃度效應測試。在病毒液中分別添加1、0.1%及0.01%的藥劑。每隻蟲以病毒之LD₅₀餵飼，於7日後觀察並記錄幼蟲的死亡率，並與僅餵食病毒及無餵飼病毒之對照組比較，本試驗重複三次。

結 果

一、核多角體病毒對斜紋夜蛾幼蟲之致病力測試

斜紋夜蛾幼蟲感染各種核多角體病毒後之死亡率如表一。僅斜紋夜蛾核多角體病毒可感染斜紋夜蛾幼蟲，其它供試之各種昆蟲核多角體病毒對斜紋夜蛾之致病性均甚低，僅以松柏鋸角葉蜂核多角體病毒感染之試驗組對斜紋夜蛾幼蟲有致病效果 (3.33%)，但與對照組 (僅餵食水者) 的死亡率比較，沒有顯著性差異。因此往後之化學藥品對病毒之增效試驗，均以本實驗室純化之斜紋夜蛾核多角體病毒進行試驗。

利用蔗糖梯度離心法，自罹病斜紋夜蛾幼蟲體萃取之核多角體病毒，常可發現呈黑色及白色兩種形式之多角體病毒。將此兩種斜紋夜蛾核多角體病毒，分別感染三齡幼蟲後，記錄在不同病毒濃度下，二種病毒感染幼蟲之死亡率，結果如表二所示。利用

表一 斜紋夜蛾三齡幼蟲餵食不同核多角體病毒之死亡率

Table 1. Mortality of *Spodoptera litura* 3rd instar larvae fed with various nucleopolyhedroviruses

NPV (10 ⁶ PIBs / larva)	Mortality (%) ± S.E.
AfNPV ^a	0
Gypchek	0
NsNPV	3.33 ± 1.57
LdNPV	0
SlNPV	53.33 ± 1.73

^a AfNPV: *Anagrapha falcifera* NPV; Gypchek: Commercial *Lymantria dispar* NPV; NsNPV: *Neodiprion sertifer* NPV; LdNPV: *Lymantria dispar* NPV; SlNPV: *Spodoptera litura* NPV

表二 黑化與正常之斜紋夜蛾核多角體病毒半數致死劑量之測試

Table 2. LD₅₀ of melanized and normal *S. litura* nucleopolyhedroviruses to *S. litura* 3rd instar larvae

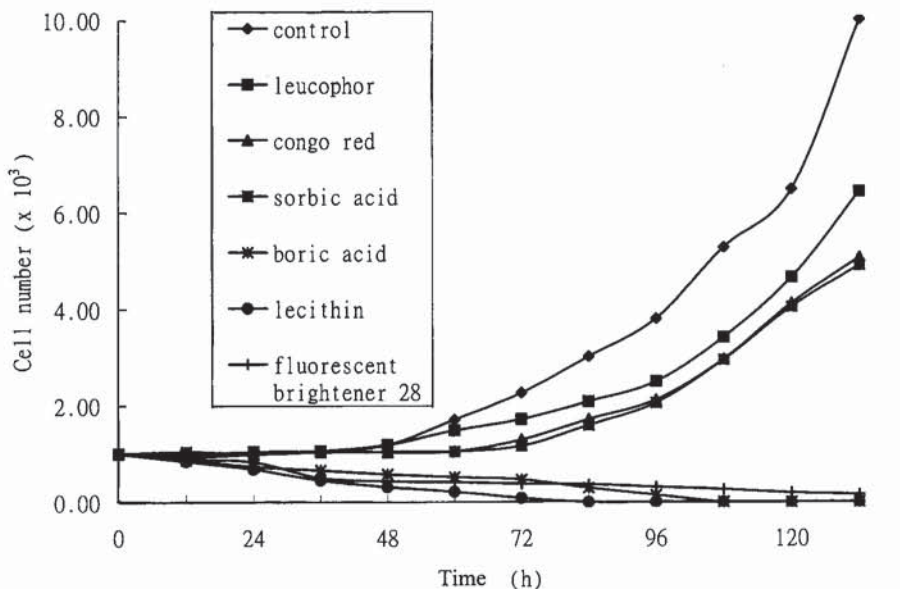
Dosage (PIBs / larva)	Mortality (%) ± S.E	
	Melanized NPV	Normal NPV
10 ⁷	80.00 ± 0.0	96.7 ± 0.02
10 ⁶	56.67 ± 0.07	80.0 ± 0.09
10 ⁵	23.33 ± 0.02	66.7 ± 0.07
10 ⁴	3.33 ± 0.02	33.3 ± 0.02
H ₂ O	0	0
LD ₅₀ (PIBs / larva)	6.3 × 10 ⁶	3.2 × 10 ⁴

Probit analysis方法，計算兩種病毒之LD₅₀，結果黑化及白色核多角體病毒之LD₅₀分別為6.7 × 10⁶及3.2 × 10⁴。兩者相差達20倍之多。

二、化學增效劑對斜紋夜蛾細胞生長及核多角體病毒TCID₅₀之影響

為測試選用之化學藥品是否會對斜紋夜蛾細胞或幼蟲產生傷害，本試驗先以斜紋夜蛾SL7B細胞進行試驗。分別添加1%、0.1%

及0.01%之各種供試化學藥品於細胞培養液中進行細胞培養，記錄細胞存活數及細胞生長情形。結果培養液中添加各種比率化學藥品培養時，經過132小時之培養，細胞僅可在添加0.01%化學藥品的培養液中生長，當添加化學藥品超過此濃度，則細胞生長緩慢或破裂死亡。在添加0.01%化學藥品試驗組中，各種化學藥品對斜紋夜蛾細胞生長曲線之影響，從圖一可知，boric acid、lecithin及fluorescent brightener 28三種化學藥品添



圖一 斜紋夜蛾細胞培養於含0.01%化學藥品之生長曲線

Fig. 1. Cell growth curve of the SL7B cell line cultured in a medium containing 0.01% of various chemicals.

加後，細胞雖能存活但均無法增生，而leucophor、congo red及sorbic acid對細胞生長影響較小，但細胞生長速率仍比對照組慢。為測試選用之化學增效劑是否能增強病毒感染細胞的能力，本試驗利用半數培養細胞感染病毒劑量(TCID₅₀)作為指標，評估化學藥品對病毒感染細胞之增效作用。從前述試驗中，已知供試化學藥品添加0.01%之劑量，對細胞生長影響最小，因此本項試驗以0.01%之劑量，添加於細胞培養液中，並感染病毒。在病毒感染後第7天，以細胞核中是否產生病毒多角體作為細胞病變(cytopathic effect)指標，觀察並記錄在96孔平板細胞培養盤中，各種不同病毒濃度感染下，細胞受病毒

感染的情形。依Summers and Smith(1987)之計算方法，可知斜紋夜蛾核多角體病毒SIB之TCID₅₀為 3.09×10^{-8} ，若添加0.01%各種化學藥品之後，其對TCID₅₀的影響則如表三所示。從試驗結果可知，sorbic acid及boric acid對斜紋夜蛾胞外病毒感染細胞之增效作用最佳。

三、化學增效劑對斜紋夜蛾核多角體病毒感染幼蟲死亡率之影響

為測試各種供試化學藥品對斜紋夜蛾核多角體病毒感染幼蟲之增效作用，本試驗先混拌5 μ l含1%化學藥品於人工飼料中，餵食幼蟲後測試其對幼蟲生長的影響。結果發現，

表三 添加化學藥品對斜紋夜蛾核多角體病毒感染細胞之增效作用
Table 3. Enhancement of TCID₅₀ of extracellular virus from *S. litura* nucleopolyhedrovirus after adding various chemicals

Chemical added(0.01%)	TCID ₅₀
SIB ECV only	3.80×10^{-18}
+sorbic acid	1.00×10^{-8}
+boric acid	1.00×10^{-8}
+congo red	1.65×10^{-8}
+lecithin	1.80×10^{-8}
+leucophor	3.89×10^{-8}
+fluorescent brightener 28	7.59×10^{-8}

餵食5 μ l之1%化學藥品，並不會對幼蟲的生長造成影響，因此乃根據此種添加劑量，進行化學藥品對病毒感染幼蟲之增效作用測試。在病毒液中添加1%化學藥品後，感染斜紋夜蛾三齡幼蟲，結果供試幼蟲死亡率如表四所示。從表四可知，fluorescent brightener 28、leucophor、lecithin、phosphatidyl ethanolamine及phosphatidyl choline對病毒感染幼蟲之增效作用較強。且與對照組比較，均具有顯著性差異。在測試的八種化學藥品中僅congo red及sorbic acid的增效作用不明顯。

從前述試驗中得知 leucophor、fluorescent brightener 28、lecithin、phosphatidyl choline及phosphatidyl ethanolamine等五種化學藥品對斜紋夜蛾核多角體病毒感染幼蟲之增效作用較大，因此選用此五種化學藥品進一步測試濃度效應對增效作用的影響。結果在病毒液中分別添加不同濃度之化學藥品後，斜紋夜蛾幼蟲死亡率如表五所示。經分析各處理間的差異顯著性，結果顯示 leucophor、lecithin、phosphatidyl choline及phosphatidyl ethanolamine等化學增效劑，不同濃度間均有顯著性差異，但 fluo-

表四 化學藥品對斜紋夜蛾核多角體病毒之增效作用

Table 4. Enhancement effect of different chemicals on the *S. litura* nucleopolyhedrovirus

Chemicals added(1%)	Mortality(%) ± S.E ^a
control	0
PIB only(3×10 ⁴ PIBs / larva)	52.00 ± 1.73 f
+leucophor BSB	94.67 ± 4.18 a
+fluorescent brightener 28	91.33 ± 5.13 a
+phosphatidyl ethanolamine	71.00 ± 8.54 b
+lecithin	64.33 ± 2.31 bc
+phosphatidyl choline	64.33 ± 5.13 bcd
+boric acid	61.33 ± 5.13 cde
+sorbic acid	56.67 ± 5.13 def
+congo red	54.33 ± 5.13 ef

^a Data were transformed to \sin^{-1} prior to statistical analysis, and values in a given column followed by the same letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

表五 不同濃度之化學藥品對斜紋夜蛾核多角體病毒之增效作用

Table 5. Dosage-response effect of different chemicals on enhancement of pathogenicity of *S. litura* nucleopolyhedrovirus

Chemical added	Mortality(%) ± S.E ^a		
	1%	0.1%	0.01%
H ₂ O	0	0	0
NPV only	52.00 ± 1.73	52.00 ± 1.73	52.00 ± 1.73
+leucophor	94.67 ± 4.04 a	64.33 ± 5.13 b	52.00 ± 1.73 c
+fluorescent brightener 28	91.33 ± 5.13 a	74.33 ± 12.5 a	75.33 ± 6.81 a
+lecithin	64.30 ± 2.31 a	57.67 ± 4.04 ab	52.33 ± 4.04 b
+phosphatidyl choline	64.33 ± 5.13 a	57.67 ± 5.03 ab	52.00 ± 1.73 b
+phosphatidyl ethanolamine	71.00 ± 8.54 a	53.33 ± 3.51 b	52.00 ± 1.73 b

^a Data were transformed to \sin^{-1} prior to statistical analysis, and values in a given row followed by the same letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

rescent brightener 28 之濃度效應不顯著。

討 論

為落實斜紋夜蛾核多角體病毒在蟲害防治上之利用，本試驗進行病毒增效作用之測定。利用五種不同種類之核多角體病毒測試對斜紋夜蛾之致病效果，結果只有分離自台灣之斜紋夜蛾核多角體病毒具有致病性，顯示核多角體病毒具有寄主專一性。Tuan et al. (1997)以苜蓿夜蛾核多角體病毒 (*Autographa californica* nucleopolyhedrovirus,

AcMNPV) 感染多種鱗翅目幼蟲，結果 *AcMNPV* 僅對擬尺蠖、小菜蛾等具有高致病力，但對斜紋夜蛾及亞洲玉米螟等之致病力則低。

通常在室溫下進行核多角體病毒萃取純化時，多角體病毒會有黑化的現象。但若全程以冰浴進行萃取步驟，則可得到白色之病毒。根據 LD₅₀ 的測試，發現黑化的病毒其 LD₅₀ 較高，約為未黑化者的 20 倍。若將黑化之病毒靜置於 4°C 冰箱中一段時間，黑色物質溶於水中，沈澱下來的病毒漸漸變白，經過數次換水之後，可得正常之白色病毒沈澱。重新

測定其LD₅₀，此時所得之結果即與在冰浴下所得之白色病毒相同。因此將來在病毒殺蟲液萃取或田間使用上，如何保存核多角體病毒使其免於黑化，例如添加抗氧化劑等，或可增強病毒之感染力。有關黑化對病毒致病力之影響，有待進一步探討。

測試添加化學藥品對病毒感染之增效作用，發現化學藥品的添加可降低胞外病毒的TCID₅₀。顯示藉由添加化學藥品，可能提高病毒對細胞感染力。在利用細胞生產病毒殺蟲劑時，可能藉由添加 sorbic acid 或 boric acid 來提高病毒產量。此種增效作用對斜紋夜蛾幼蟲亦有相同結果，試驗顯示可藉由外來添加物提高斜紋夜蛾核多角體病毒之殺蟲效果，且大多數的藥品均具有濃度效應，幼蟲的死亡率會隨著添加化學藥品的劑量不同，而有所變化。

一般而言，添加磷脂類物質可以克服病毒被膜 (envelope) 上的負電位，使其可以更容易與細胞結合 (Tuan and Hou, 1988)。除了添加磷脂類物質外，添加含陽離子之界面活性劑 (鹽胺類)，會增加細胞與病毒粒子的結合，據 Yamamoto and Tanada (1980) 的推測，由於鹽基為疏水性，而病毒的被膜對C₁₂-acyl具親和性，所以兩者會吸附在一起，此時病毒被膜上的負電位即被中和，而減少了病毒與昆蟲細胞膜間的斥力，因而產生增效作用。

雖然在細胞培養液中添加1%之化學藥品會導致細胞的死亡。但以1%之化學藥劑對幼蟲進行感染，發現其對幼蟲生長並不產生影響，幼蟲仍可正常化蛹，因此在田間使用上，化學添加劑的劑量可以高些。然而從增效劑之濃度效應結果可知，在低濃度的劑量即可達到增效作用，因此在實際運用上，添加增效劑的劑量可以較低，如此不但可節省成本，且可降低對作物之污染。而在濃度效

應較顯著的藥品使用上(例如，leucophor)，應在防治效果及環境污染之間取得一個平衡。

本試驗供試八種化學藥品中，有五種在幼蟲活體試驗中具有顯著之增效作用。其中 fluorescent brightener 28 及 leucophor 為衣物之螢光染劑，因此添加此類物質，除了可以提高核多角體病毒的殺蟲效果之外，亦可保護核多角體病毒，減少紫外線所造成的傷害。Shapiro (1989) 以剛果紅 (congo red) 進行紫外線保護效果的測試。發現添加剛果紅不止具有保護病毒免受紫外線破壞的效果，也可以作為病毒之增效劑。Nickle (1992) 亦以 fluorescent brightener 28 作為病毒的紫外線保護劑，而據 Shapiro and Argauer (1995) 的研究，此種保護作用與 pH 值及溫度有關。Yamamoto and Tanada (1978) 以粟夜盜核多角體病毒感染粟夜盜幼蟲時，發現磷脂類的磷脂醯乙醇胺 (phosphatidyl ethanolamine) 或磷脂醯膽鹼 (phosphatidyl choline) 可以提高幼蟲受感染的比例。

綜合上述結果可知，添加化學藥品可有效提高斜紋夜蛾核多角體病毒之致病力，增強其在田間防治效果，值得進一步開發，以便推廣於田間使用。

誌 謝

本研究承蒙行政院國家科學委員會計畫經費補助 NSC-87-2313-B-002-122，特此致謝。

參考文獻

Bonning, B. C., and B. D. Hammock.
1996. Development of recombinant

- baculovirus for insect control. *Ann. Rev. Entomol.* 41: 191-210.
- Casida, J. E., and G. B. Quistad.** 1998. Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Ann. Rev. Entomol.* 43: 1-16.
- Hou, R. F.** 1991. Recent status of insect pathology in Taiwan. *Chinese J. Entomol. Special Publication No. 7.* 87-97.
- Hu, Y. C., C. F. Lo, and C. J. Shih.** 1994. Construction of recombinant baculovirus containing the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin gene. *Chinese J. Entomol.* 14: 445-461.
- 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.
- Maeda, S., S. G. Kanita, and A. Kondo.** 1993. Host range expansion of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (NPV) following recombination of a 0.6-kilobase DNA fragment originating from *Bombyx mori* NPV. *J. Virol.* 67: 6234-6238.
- Nickle, W. R., and M. Shapiro.** 1992. Use of a stilbene brightener, tinopal LPW, as a radiation protectant for *Steinernema carpocapsae*. *J. Nematol.* 24: 371-373.
- O'Reilly, D. R., L. K. Miller, and V. A. Luckow.** 1992. *Baculovirus Expression Vector*. W. H. Freeman, New York. 347 pp.
- Richards, A., M. Matthews, and P. Christian.** 1998. Ecological considerations for the environmental impact evaluation of recombinant baculovirus insecticides. *Ann. Rev. Entomol.* 43: 493-517.
- Shapiro, M.** 1989. Congo red as an ultraviolet protectant for the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus. *J. Econ. Entomol.* 82: 548-550.
- Shapiro, M.** 1992. Use of optical brighteners as radiation protectants for gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus. *J. Econ. Entomol.* 85: 1682-1686.
- Shapiro, M., and R. Argauer.** 1995. Effects of pH, temperature, and ultraviolet radiation on the activity of an optical brightener as a viral enhancer for the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) baculovirus. *J. Econ. Entomol.* 88: 1602-1606.
- Shapiro, M., and R. Argauer.** 1997. Components of the Stilbene optical brightener Tinopal LPW as enhancers for the Gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) baculovirus. *J. Econ. Entomol.* 90: 899-904.
- Shapiro, M., and R. A. Bell.** 1982. Enhanced effectiveness of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus formulated with boric acid. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 75: 346-349.
- Shapiro, M., and J. L. Robertson.** 1992. Enhancement of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) baculovirus ac-

- tivity by optical brighteners. *J. Econ. Entomol.* 85: 1120-1124.
- Shih, C. J.** 1994. Using transgenic microorganism to improve insecticidal effect. pp. 5.1-5.36. Proceeding of the Symposium on Research and Development of Biopesticides, Taichung, Taiwan.
- Shih, C. J.** 1995. Determination of larval stadium and effect of temperature on the development of *Spodoptera litura*. *Mem. Coll. Agric. NTU* 35: 393-400.
- Shih, C. J., and J. C. Chang.** 1997. High level expression of recombinant protein in a cell line derived from *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl. Entomol. Zool.* 32: 179-188.
- Shih, C. J., and Y. I. Chu.** 1995. Evaluation of sex pheromone for forecasting the population of tobacco cutworm, *Spodoptera litura*, on Chinese cabbage. *Plant Prot. Bull.* 37: 381-392.
- Shih, C. J., and Y. C. Hu.** 1996. The insecticidal activity of genetically engineered *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus containing the *Bacillus thuringiensis* toxin gene to SF9 cell line and *Spodoptera litura* larvae. *Chinese J. Entomol.* 16: 1-12.
- Shih, C. J., S. S. Farn, and C. H. Wang.** 1995. Characterizations of *Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus isolated from Taiwan. *Plant Prot. Bull.* 37: 157-167.
- Shih, C. J., S. S. Farn, and C. H. Wang.** 1995. The effect of ultraviolet on *Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus. *Plant Prot. Bull.* 37: 169-177.
- Summers, M. D., and G. E. Smith.** 1987. A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures. Texas Agricultural Experiment Station Press, Texas. 57 pp.
- Thiem, S. M., X. Du, M. E. Ouentin, and M. M. Berner.** 1996. Identification of a baculovirus gene that promotes *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus replication in a non-permissive cell line. *J. Virol.* 70: 2221-2229.
- Tuan, S. J., and R. F. Hou.** 1988. Enhancement of nuclear polyhedrosis virus infection by lecithin in the corn earworm, *Heliothis armigera*. *J. Invertebr. Pathol.* 52 : 180-182.
- Tuan, S. J., S. S. Kao, Y. C. Chao, and R. F. Hou.** 1997. Investigation of pathogenicity of AcMNPV to nine lepidopteran pests in Taiwan. *Chinese J. Entomol.* 17: 209-225.
- Yamamoto, T., and Y. Tanada.** 1978. Phospholipid, an enhancing component in the synergistic factor of a granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. *J. Invertebr. Pathol.* 31: 48-56.
- Yamamoto, T., and Y. Tanada.** 1980. Physicochemical properties and location of capsule components in particular the synergistic factor in the

occlusion body of a granulosis virus
of the armyworm *Pseudaletia uni-*
puncta. Virology 107: 434-440.

收件日期：1998年6月16日
接受日期：1998年11月2日

Enhancement Effects of Chemical Additives on the Virulence of *Spodoptera litura* Nucleopolyhedrovirus

Cheng-Jen Shih* and Shu-Tseng Lee Department of Entomology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, R.O.C.

ABSTRACT

This paper presents, a study on enhancers for *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus (*SINPV*). In order to enhance the virulence of *SINPV*, several chemicals, eg., congo red, sorbic acid, boric acid, fluorescent brightener 28, leucophor, lecithin, phosphatidyl choline, and phosphatidyl ethanolamine, were respectively mixed with the virus suspension to evaluate the efficacy of enhancement. We tested 5 different species of NPVs to check their efficacy. The results revealed that *SINPV* was the most effective for infecting *S. litura* larvae. When we added chemicals into the cell culture medium, TNM-FH, the SL7B cell line could grow only when the concentration was 0.01%. Consequently, we investigated the TCID₅₀ of *SINPV* B strain ECV with or without 0.01% chemical addition. Results revealed that several chemicals could reduce the TCID₅₀ of *SINPV* B strain ECV. However, larvae fed on artificial diet containing 1% of different chemicals showed no adverse effects. Bioassay revealed that an artificial diet surface-contaminated with virus suspension contained 1% of different chemicals could increase the mortality of *S. litura* larvae as compared to virus suspension only. The mortality of *S. litura* larvae increased with increasing concentration of chemicals added in the virus suspension except for fluorescent brightener 28.

Key words: *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus, enhancement, viral insecticides, insect control.