



Comparison of the Characterization and Pathogenesis of Three Lepidopteran Nucleopolyhedroviruses (HearNPV, SpeiNPV and SpltNPV) Isolated from Taiwan. 【Research report】

本省三種夜蛾科害蟲核多角體病毒特性鑑定及致病力之比較【研究報告】

Tuan, S. J. 1), Cheng, D. J. 2), Kao, S. S. 1), Chao, Y. C. 3), and Hou, R. F. 2)
段淑人1)*、鄭朵智2)、高穗生1)、趙裕展3)、侯豐男2)

*通訊作者E-mail: Helicoverpa armigera, Spodoptera exigua, Spodoptera litura, nucleopolyhedrovirus, characterization.

Received: 1998/11/17 Accepted: 1999/03/01 Available online: 1999/06/01

Abstract

Three nucleopolyhedroviruses isolated from the larvae of *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera exigua*, and *S. litura* with nucleopolyhedrosis in Taiwan were characterized and compared morphologically, biochemically, immunologically and pathologically. The polyhedra were all irregular in shape, measuring ca. 0.79 ± 0.22 , 1.07 ± 0.16 , and 1.61 ± 0.32 μm , respectively under electron microscopic observation. The nucleocapsid is elongated with parallel sides and two straight ends, measuring $319.80 \pm 7.80 \times 44.45 \pm 4.54$, $297.40 \pm 9.14 \times 46.72 \pm 4.00$, and $332.26 \pm 13.55 \times 47.16 \pm 1.42$ nm, respectively. There were distinct differences between their viral proteins only in minor bands. The molecular weights of purified undegraded polyhedrins were all approximately 31 kDa. Polyhedrins were assayed by ELISA with polyclonal antipolyhedrin antisera specific to each polyhedrin of HearNPV, SpeiNPV and SpltNPV, demonstrating that there were a close relationship between these viruses. Restriction endonuclease profiles of these viral genomes digested with BamH I、Bgl II、EcoR I、Hind III、Pst I and Xho I restriction endonucleases indicated that these viruses were markedly different from each other, the genome sizes were estimated to be 121.7 ± 2.1 , 132.4 ± 2.4 , and 137.8 ± 1.8 kbp, respectively. HearNPV isolate is highly specific and pathogenic to *H. armigera* larvae, its LD50 values were 4, 38, 742, and 4,710 PIBs/larva to first to fourth instar, respectively as assayed with an inoculum-imbibing method. These 3 viruses were not pathogenic to *Plutella xylostella*.

摘要

自本省朴子、埔里及霧峰三地分別採得玉米穗蟲(*Helicoverpa armigera*)、甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)及斜紋夜蛾(*S. litura*)等三種夜蛾科害蟲之罹病蟲體，經蔗糖梯度離心純化可得三種核多角體病毒(nucleopolyhedrovirus)，進行病毒形態、構造、生化及生物特性之鑑定與比較。包涵體之形態、構造及每個病毒粒子內所含有之核蛋白鞘數量間差異頗大。其中以斜紋夜蛾核多角體病毒包涵體最大，平均直徑為 $1.61 \pm 0.32 \mu\text{m}$ ，而甜菜夜蛾病毒則為 $1.07 \pm 0.16 \mu\text{m}$ ，此二病毒粒子內均含多個核蛋白鞘(nucleocapsid)同屬MNPV；另玉米穗蟲則是最小且為單一核蛋白鞘(SNPV)，平均直徑為 $0.79 \pm 0.22 \mu\text{m}$ 。三種病毒核蛋白鞘平均大小依序為 $332.26 \pm 13.55 \times 47.16 \pm 1.42$ ， $297.40 \pm 9.14 \times 46.72 \pm 4.00$ 及 $319.80 \pm 7.80 \times 44.45 \pm 4.54$ nm。利用SDS-PAGE之方法分析包涵體蛋白質，得知此三種病毒在微量蛋白質上有明顯差異，然主要蛋白質之分子量極為接近均在31 kDa左右。利用抗多角體蛋白質之多源抗體進行酵素聯結免疫吸附檢定法(ELISA)，顯示三種病毒之多角體蛋白質間具有極高之交互免疫反應(cross immune reaction)。三種病毒之基因組核酸，以內核酸限制酶BamH I、Bgl II、EcoR I、Hind III、Pst I及Xho I切割後，進行核酸片段之比對，得知其間亦具有明顯之差異，玉米穗蟲、甜菜夜蛾及斜紋夜蛾三種核多角體病毒之核酸大小依序約為 121.7 ± 2.1 ， 132.4 ± 2.4 ，及 137.8 ± 1.8 kbp。以接種源飲入法餵予此三種害蟲之四齡初蛻幼蟲，每隻幼蟲接種相同病毒劑量(106 PIBs/larva)，置於25°C生長箱中培養，觀察至幼蟲化蛹。由幼蟲累積死亡率得知：三種病毒對本身寄主害蟲具極高之致病力，玉米穗蟲核多角體病毒以接種源飲入法測得其對玉米穗蟲一至四齡幼蟲之半致死劑量分別為4, 38, 742, 4,710 PIBs/larva，且具高度專一性，對斜紋夜蛾幼蟲不具致死效果，而對甜菜夜蛾幼蟲則有15%左右之死亡率；而斜紋夜蛾核多角體病毒對另二種幼蟲尚有30%以上之死亡率，甜菜夜蛾核多角體病毒則可使玉米穗蟲及斜紋夜蛾幼蟲發生13.7~28.4%之死亡率，而此三種病毒以飼料表面污染法接種三齡小菜蛾，病毒劑量為 7.6×10^2 PIBs/mm³ diet，置於25°C生長箱中培養，觀察至幼蟲化蛹。結果發現此三種病毒對小菜蛾不具致病力。

Key words: *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera litura*, nucleopolyhedrovirus, characterization.

關鍵詞: 玉米穗蟲、甜菜夜蛾、斜紋夜蛾、核多角體病毒、特性鑑定

Full Text: [PDF\(4.79 MB\)](#)

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

本省三種夜蛾科害蟲核多角體病毒特性鑑定及致病力之比較

段淑人* 高穗生 台灣省農業藥物毒物試驗所生物藥劑系 台中縣霧峰鄉光明路 11 號

鄭朶智 侯豐男 國立中興大學昆蟲學系 臺中市國光路 250 號

趙裕展 中央研究院分子生物研究所 臺北市南港區研究院路二段 128 號

摘 要

自本省朴子、埔里及霧峰三地分別採得玉米穗蟲(*Helicoverpa armigera*)、甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)及斜紋夜蛾(*S. litura*)等三種夜蛾科害蟲之罹病蟲體，經蔗糖梯度離心純化可得三種核多角體病毒(nucleopolyhedrovirus)，進行病毒形態、構造、生化及生物特性之鑑定與比較。包涵體之形態、構造及每個病毒粒子內所含有之核蛋白鞘數量間差異頗大。其中以斜紋夜蛾核多角體病毒包涵體最大，平均直徑為 $1.61 \pm 0.32 \mu\text{m}$ ，而甜菜夜蛾病毒則為 $1.07 \pm 0.16 \mu\text{m}$ ，此二病毒粒子內均含多個核蛋白鞘(nucleocapsid)同屬MNPV；另玉米穗蟲則是最小且為單一核蛋白鞘(SNPV)，平均直徑為 $0.79 \pm 0.22 \mu\text{m}$ 。三種病毒核蛋白鞘平均大小依序為 $332.26 \pm 13.55 \times 47.16 \pm 1.42$ ， $297.40 \pm 9.14 \times 46.72 \pm 4.00$ 及 $319.80 \pm 7.80 \times 44.45 \pm 4.54 \mu\text{m}$ 。利用SDS-PAGE之方法分析包涵體蛋白質，得知此三種病毒在微量蛋白質上有明顯差異，然主要蛋白質之分子量極為接近均在31 kDa左右。利用抗多角體蛋白質之多源抗體進行酵素聯結免疫吸附檢定法(ELISA)，顯示三種病毒之多角體蛋白質間具有極高之交互免疫反應(cross immune reaction)。三種病毒之基因組核酸，以內核酸限制酶BamH I、Bgl II、EcoR I、Hind III、Pst I及Xho I切割後，進行核酸片段之比對，得知其間亦具有明顯之差異，玉米穗蟲、甜菜夜蛾及斜紋夜蛾三種核多角體病毒之核酸大小依序約為 121.7 ± 2.1 ， 132.4 ± 2.4 ，及 $137.8 \pm 1.8 \text{ kbp}$ 。以接種源飲入法餵予此三種害蟲之四齡初蛻幼蟲，每隻幼蟲接種相同病毒劑量(10^6 PIBs/larva)，置於25°C生長箱中培養，觀察至幼蟲化蛹。由幼蟲累積死亡率得知：三種病毒對本身寄主害蟲具極高之致病力，玉米穗蟲核多角體病毒以接種源飲入法測得其對玉米穗蟲一至四齡幼蟲之半致死劑量分別為4, 38, 742, 4,710 PIBs/larva，且具高度專一性，對斜紋夜蛾幼蟲不具致死效果，而對甜菜夜蛾幼蟲則有15%左右之死亡率；而斜紋夜蛾核多角體病毒對另二種幼蟲尚有30%以上之死亡率，甜菜夜蛾核多角體病毒則可使玉米穗蟲及斜紋夜蛾幼蟲發生13.7~28.4%之死亡率，而此三種病毒以飼料表面污染法接種三齡小菜蛾，病毒劑量為 7.6×10^2 PIBs/mm³ diet，置於25°C生長箱中培養，觀察至幼蟲化蛹。結果發現此三種病毒對小菜蛾不具致病力。

關鍵詞：玉米穗蟲、甜菜夜蛾、斜紋夜蛾、核多角體病毒、特性鑑定。

前 言

目前已知可感染昆蟲之病毒種類甚多，分屬於12個病毒科，其中以桿狀病毒科(Baculoviridae)最為重要，被認為是最具生物防治潛能的病原之一，其主要的寄主昆蟲包括鱗翅目、膜翅目、雙翅目及鞘翅目等，至今已自不同蟲類分離多達1000餘種桿狀病毒。國際病毒分類委員會(International Committee on Taxonomy of Virus)將桿狀病毒科分為核多角體病毒屬(Nucleopolyhedrovirus, 簡稱NPV)及顆粒體病毒屬(Granulovirus, 簡稱GV) (Murphy *et al.*, 1995)。若依病毒粒子 envelope 內含 nucleocapsid 數量之多寡區分為兩類：即 single nucleocapsid NPV (SNPV)，以家蠶核多角體病毒(*Bombyx mori* NPV)為代表種；及 multiple nucleocapsid NPV (MNPV)，以加州苜蓿夜蛾核多角體病毒(*Autographa californica* NPV)為代表種 (Francki *et al.*, 1991)。核多角體病毒經由幼蟲取食進入腸道，藉由鹼性腸液及酵素之作用，而溶解多角體蛋白質、釋出病毒粒子，而在寄主的真皮層細胞、脂肪體細胞、腸壁細胞、氣管鞘細胞、神經細胞及血球細胞等核內大量複製，造成急性感染使細胞崩解而導致幼蟲在數天內死亡，且自罹病蟲體內產生大量病毒，成為二次感染源繼續感染其他寄主 (Granados and Williams, 1986; Tuan *et al.*, 1994; 1997)。此病毒只對節肢動物有致病性，對人、畜、及天敵均無毒害，可供作安全有效的防治害蟲利器 (Groner, 1986)。在田間實際應用上已證實NPV之防治效果甚至比化學藥劑為高 (Smits *et al.*, 1987; Tuan *et al.*, 1989; 1998)，且有二十種病毒曾經商品化，如 *Anticarsia gemmatalis* NPV, *A. californica* NPV, *Heliothis zea*

NPV, *Lymantria dispar* NPV, *Neodiprion sertifer* NPV, *Orgyia pseudotsugata* NPV, *Spodoptera exigua* NPV (Agathos, 1991)。

斜紋夜蛾 (*Spodoptera litura* (Fabricius))、玉米穗蟲 (*Helicoverpa armigera* (Hubner))、甜菜夜蛾 (*S. exigua* (Hubner)) 幼蟲均屬雜食性，全年為害多種作物，包括十字花科蔬菜、高粱、玉米、芋頭、青蔥、馬鈴薯及洋桔梗、康乃馨等數種花卉，為本省重要經濟害蟲，易引起農產品嚴重之損失，且時常發生三種害蟲共同為害之情形。由於此三種害蟲幼蟲期食量龐大又喜藏匿於玉米穗、青蔥蔥管、豆莢、花苞及蕃茄果內，造成防治上之困難。由於化學藥劑防治易造成農藥殘留及抗藥性問題，故需開發安全有效之生物防治方法。吾人自霧峰芋頭田、埔里滿天星田、及朴子玉米田中採集到此三種害蟲受核多角體病毒感染之幼蟲，其中前二種害蟲之病毒經由前人試驗證明對寄主具高度之致病力，並可利用蟲體大量生產 (Smits and Vlak, 1988b; Huang and Kao, 1994; Tuan *et al.*, 1994; 1995b; 1998)。本文針對此三種夜蛾科害蟲之核多角體病毒，進行病毒形態、構造、生化特性及生物活性等之鑑定及比較，以期篩選出具防治潛力之病毒株，並在日後研發此類病毒殺蟲劑時，可利用本試驗所建立簡易之鑑定資料，做為主成份分析及品質管制之依據。

材料與方法

供試蟲源及飼育

甜菜夜蛾、斜紋夜蛾、玉米穗蟲及小菜蛾 (*Plutella xylostella* (L.)) 等四種之幼蟲分別採自溪湖青蔥田、草屯芋頭田、朴子玉米田及梨山蔬菜田。三種夜蛾科幼蟲均以半合

成人工飼料(Tuan *et al.*, 1997)飼育於恆溫箱 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ，光照 12L: 12D、濕度 $70 \pm 5\%$ R.H.。一齡幼蟲於裝有人工飼料之布丁杯內集中飼育，待生長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。而小菜蛾則飼育於 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ，幼蟲均以油菜苗集體飼育，約 100 對成蟲置於一個網箱內交尾產卵。卵塊或卵粒先以 5% 福馬林溶液浸泡 15 分鐘，再以自來水淋洗 15 分鐘，以消除附於卵表面之有害微生物。於室內繼代飼養三代以上，而確定蟲群健康後，才可挑選適齡幼蟲進行生物檢定。

病毒來源與純化

白霧峰芋頭田、埔里滿天星、及朴子玉米田中，採集到斜紋夜蛾、甜菜夜蛾、玉米穗蟲三種害蟲之罹病幼蟲，經光學顯微鏡 400 倍鏡檢確定為核多角體病毒感染致死後，即將罹病蟲體研磨再經尼龍紗網過濾後，以接種源飲入法分別接種此三種寄主害蟲之四齡初蛻幼蟲，2 小時後再給予新鮮人工飼料。置入 25°C 恆溫生長箱中發病，至蟲體腫脹、約接種後第六天起單隻收集病蟲。加州苜蓿夜蛾核多角體病毒則由台灣大學動物學系羅竹芳教授贈予，經飼料污染法接種擬尺蠖 (*Trichoplusia ni* (Hubner)) 四齡幼蟲，接種後第五天起收集病蟲。並參考 Caballero *et al.* (1992) 的方法，利用不連續蔗糖梯度離心，以純化病蟲體中的核多角體病毒。先以無菌水稀釋蟲屍利用均質機打碎蟲後，經雙層尼龍紗網過濾後，以 1:1 體積之正己烷 (n-hexane) 混合均勻，用 3000 rpm 離心 10 分鐘 (Hitachi Centrifuge O5P-21)，取沈澱物再以無菌水懸浮，置於 30% (w/v) 蔗糖液上層，以

11,200 xg 離心 30 分鐘收集沉澱物，加入 0.1 M Tris-HCl pH7.2 緩衝液懸浮，再經 42-62% 蔗糖兩段式梯度以 80,000 xg 離心 60 分鐘。病毒包涵體可自 42 及 62% 兩蔗糖層的界面中收集。再用無菌水懸浮經 25,200 xg 離心 10 分鐘。如此重覆 2-3 次即可得到高純度之病毒包涵體，做為病毒試驗之接種源。

病毒粒子的純化

將純化出來的本省三種病毒包涵體經超音波 (Vibra Cell S&M, 20% output) 作用 1 分鐘三次後，加入三分之一體積的鹼溶緩衝液 (3X DAS: 0.3M Na_2CO_3 , 0.5M NaCl, 0.03 M EDTA, pH 10.5) 於室溫下作用 16 小時，之後加入一倍體積的蒸餾水將未溶解的包涵體以 500 xg 低速離心 1 分鐘。上清液則以 36-56% 連續糖梯離心 80,000 xg 60 分鐘 (5°C)，收集多層白色環帶部分即為病毒粒子。再以蒸餾水懸浮，經 80,000 xg 離心 60 分鐘，沈澱物以 10mM Tris/HCl, 1mM EDTA, pH 7.5 buffer 懸浮，並貯存於 4°C ，以備電子顯微鏡觀察及核酸抽取用。

病毒包涵體及核蛋白鞘形態之觀察

將純化的本省三種包涵體經超音波均勻打散後，取 10ul 的病毒液加入等量的 0.1% bovine serum albumin，於蠟膜上充分混合，並將銅網覆蓋於其上作用 10 分鐘，之後將銅網上多餘的水分以濾紙吸乾。再將吸覆過的銅網覆蓋於 1% 磷鎢酸 (PTA) 上作用 5 分鐘進行負染，最後以蒸餾水滴洗 10 秒。病毒粒子則以 2.5% uranyl acetate 染 15 分鐘後，以蒸餾水稍加滴洗，即以 Hitachi H-300 穿透式電子顯微鏡進行包涵體及核蛋白鞘之外形觀察，並以 50 個包涵體之平均直徑表示其大小，同時計算長桿狀核蛋白鞘之長與寬。此三種病毒中甜菜夜蛾及斜紋夜蛾核多

角體病毒包涵體及核蛋白鞘之形態雖已發表 (Tuan *et al.*, 1994; Tuan *et al.*, 1995b)，但因病毒形態大小可受寄主生理狀況、感染時期及病毒收穫時機等多種因素而有所差異，且同一個寄主細胞內之病毒包涵體間大小亦有明顯差異，為提高試驗資料間比對之可信度，作者於本試驗中同時進行三種病毒之測量比對。病毒包涵體構造之觀察

(1)樣品的處理及固定：自病發死亡的蟲體中挑取病變的脂肪體，將之與8% agarose 充分混合後，切成1mm的小塊，置於稱量瓶中，加入2.5% glutaraldehyde (in 0.1M cacodylate buffer, pH7.2, 4°C)進行前固定步驟2小時，之後以含0.25M的蔗糖--二甲次磷酸緩衝液 (0.25M sucrose in 0.1M cacodylate buffer, pH7.2)浸洗三次，每次15分鐘。再以2%的四氧化銨 (osmium tetroxide in 0.1M cacodylate buffer, 4°C)進行後固定2小時，然後用常溫之二甲次磷酸緩衝液浸洗三次，每次15分鐘。

(2)脫水及包埋：以序列濃度(50, 70, 80, 90, 95, 100%)之酒精進行脫水，每一種酒精濃度二次，每次15分鐘。最後換上環氧丙烷 (propylene oxide)，15分鐘二次。置換時膠體 (spurr's resin)與環氧丙烷以1:2, 1:1, 2:1的體積比漸次置換，每次2小時，直到純膠中，以低速振盪隔夜，再換一次純膠2小時後進行包埋。

(3)切片、染色及觀察：將所得的樣品修成0.2×0.3mm之梯形，以超薄切片機 (Sorvall MT2-B)進行超薄切片，將所得的薄片樣品黏附於銅網上，經2.5% uranyl acetate水溶液染20分鐘，以蒸餾水滴洗10秒。再以lead citrate染12分鐘，蒸餾水滴洗10秒，並以濾紙將多餘的水分吸乾。將銅網置於grid holder中，保存於乾燥箱中備用。以Hitachi H-300穿透式電子顯微鏡觀察。

病毒之蛋白質分析

(1)病毒包涵體 SDS-PAGE 分析：取純化之加州苜蓿夜蛾、玉米穗蟲、甜菜夜蛾及斜紋夜蛾核多角體病毒包涵體懸浮液 (1.2×10^{10} PISs/ml, 15 μ l/well) 加入等量 2X sample buffer 煮沸5分鐘進行 SDS-PAGE 分析，並以 protein marker (Bio-Rad, SDS-PAGE standards, low range No. 161-0304) 為分子量估算依據，參考 Laemmli (1970) 之方法，配製 4% stacking gel 及 15% resolving gel，用 BIO-RAD Mini-PROTEAN II (0.75 mm spacers) 及 20-30 mA 之電流進行電泳分析，而後以 0.2% Coomassie brilliant blue R-250 染色，再以 25% 甲醇及 10% 醋酸褪染，以塑膠膜封片陰乾。並以 Alpha Innotech Corporation IS-1000 Digital Imaging System 電腦軟體計算各片段之大小。

(2)多角體蛋白質之純化：取純化病毒包涵體與同體積二倍濃度之 sample buffer 混合煮沸五分鐘後，參考 Laemmli (1970) 之方法，進行 SDS-PAGE (7.5%, 60 V, 15 hrs, 4°C)，並以 0.2M KCl 於 4°C 染色 20 分鐘，切下分子量約為 31 kDa 之白色凝膠帶，即為多角體蛋白質 (polyhedrin) 帶，經切割該條膠片後再以 Isco electroelutor/concentrator 進行蛋白質溶離 (3W, 4 hrs, 4°C，electroelution buffer: a) outer buffer: 40mM Tris-acetate, pH 8.6; b) inner buffer: 10mM Tris-acetate, pH 8.6 + 1 mM EDTA + 0.1% SDS)，溶出之蛋白質於 4°C 冰箱中以 PBS (pH 7.2) 緩衝液透析三次，並做蛋白質定性 (SDS-PAGE, Bio-Rad Mini-PROTEAN II, 150V, 45mins) 及定量 (Pierce BSA protein assay, spectrophotometer absorbance at 562 nm)，以確定其為所要之蛋白質及配製濃度，再分裝冷凍供免疫製備抗

體用。

(3) 酵素聯結免疫吸附檢定 (Enzyme link immunosorbent assay, ELISA) :

a) 多源抗血清之製備：取步驟(2)純化之多角體蛋白質為免疫用抗原，與乳化劑 complete Freund's adjuvant (0.5ml 0.2 mg/ml polyhedrin + 0.5 ml 乳化劑) 做完全乳化作用後，以皮下多處注射法免疫紐西蘭白兔，每隔二週一次 (第二次起乳化劑採用 incomplete Freund's adjuvant)，連續三次，於追加第三劑後第六天大量採血，其間於每次注射前均自兔子耳朵中央動脈抽取血液，裝於血清分離管中靜置 30 分鐘後，離心 3,000 轉，15 分鐘。再參考 Ma *et al.* (1984) 及 Tuan *et al.* (1993) 之方法以 indirect ELISA 方法，測定稀釋 200 倍至 102,400 倍之三種抗多角體蛋白質血清之反應值，追蹤抗體力價產生曲線。以採取力價最高之抗多角體蛋白質陽性血清冷凍備用。

b) 三種病毒多角體蛋白質間交互免疫反應 (cross reaction)：分別 Coating 三種病毒多角體蛋白質，濃度均為 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，於 4°C 隔夜培養後，棄卻上清液並以 0.5% 安佳脫脂奶粉進行 blocking，於室溫反應 1 小時。以 PBS-Tween 利用自動洗盤機清洗三次。而後分別加入相同力價之三種抗多角體蛋白質陽性血清溶液，於室溫培養 1 小時，每種病毒多角體蛋白質均與三種抗體進行交互免疫反應。重覆清洗動作三次。而後加入 Alkaline Phosphatase-conjugated Affini-Pure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) 3000 倍稀釋濃度，於室溫 1 小時。重覆清洗動作五次。最後加入 0.1 % PNPP/substrate buffer，於室溫下呈色一小時後，以 Molecular Devices kinetic microplate reader Vmax 判讀於波長 405nm 時之吸光值，以判別此三種病毒多角體蛋白質及抗體間交互反應之強弱。

病毒核酸限制酶片段多態型之比對

取純化之加州苜蓿夜蛾、玉米穗蟲、甜菜夜蛾及斜紋夜蛾核多角體病毒粒子懸浮液以十分之一體積之 10 倍濃度病毒溶解液 (10X VDS: 100mM Tris-HCl, pH7.6, 100mM EDTA, 2.5% SDS) 加入 proteinase K (使最終濃度為 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 於 50°C 反應 16 小時。再與等體積之 phenol: chloroform: isoamyl alcohol = 25: 24: 1 溶液均勻混合，離心 14,000 rpm (Kubota 15200) 5 分鐘後，以去頭之 1 ml 吸管吸取上清液，重覆此步驟至離心後界面無雜質為止，以完全去除蛋白質。再與等體積 chloroform: isoamyl alcohol = 24: 1 溶液充分混合，同上離心步驟反覆二次，以去除其中之酚。經萃取之核酸溶液加入等體積之 isopropanol 及 10 分之一體積之 3M NaOAc, pH 5.2 並置於 -70°C 1 小時以上以沈澱核酸，並於 4°C 下離心 14,000rpm (Beckman GS-15R Centrifuge) 30 分鐘，去除上清液管底之沈澱物再以 70 及 95% 之酒精洗，沈澱物以無菌水回溶。純化之四種病毒核酸均以內核酸限制酶 *Bam*H I、*Bgl* II、*Eco*R I、*Hind* III、*Pst* I 及 *Xho* I (BioLabs, NE-Buffer 依序為 U^{dd}, NEB III, U^{dd}, NEB II, NEB III, NEB II) 於 37°C 切割 6 小時後，加入 6 分之一體積之 6 倍濃度之 loading buffer，經過 0.8% 洋膠及 0.5X Tris-acetate buffer (TAE: 40mM Tris-acetate, 2mM EDTA)，以 80V 進行電泳分析 3 小時 20 分鐘，再以 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethidium bromide 染色 30 分鐘後，經紫外燈照射後，以 1kb DNA ladder (Gibco-BRL) 及加州苜蓿夜蛾核多角體病毒經 *Pst* I 切割之片段為標準，比對三種病毒基因組核酸經不同酵素切割後之核酸片段數量與大小，由於分子量較大之核酸片段，需經較長時間之電泳分析，始能計算出

正確分子量，故於電泳進行4、8及16小時分別再經紫外燈照射，以利較大之核酸片段觀察，並以Alpha Innotech Corporation IS-1000 Digital Imaging System 電腦軟體計算各片段之大小。

玉米穗蟲核多角體病毒對玉米穗蟲幼蟲的致病力

以接種源飲入法為接種方式，接種濃度及接種量則因蟲齡大小而有異。(1)初齡蟲的接種：初齡蟲體弱小，故以24孔培養盤為接種容器，每孔加入2 μ l之病毒液，再接入5隻剛孵化的一齡幼蟲，2小時後再將所有的幼蟲移入50孔培養盤(每孔直徑3cm \times 高2.5cm)，每孔5隻，再餵予人工飼料。三天後，待蟲體發育為二齡蟲時再予以單隻飼育，連續觀察十天並記錄死亡率。(2)其他各齡蟲體的接種：挑取將蛻皮的蟲隻，並飢餓處理16小時之後再餵予病毒液，各齡蟲(2、3、4及5齡)的餵予藥量分別為0.5、2、3及4 μ l，飲入二小時後，再分別給予飼料，並單隻飼育。依據Smits and Vlak (1988a)對甜菜夜蛾幼蟲飲水量測定結果及本試驗中對幼蟲飲水情形之觀察，估計一齡幼蟲飲入量約為0.2 μ l；由於幼蟲均先經飢餓處理12小時以上，且供試病毒液中均含有5%蔗糖以誘引幼蟲儘速完成飲入接種源，故二至五齡幼蟲均可於數分鐘內飲完供試劑量，接種後連續觀察十天，並記錄每天的死亡蟲數。試驗蟲培育條件為25 \pm 1 $^{\circ}$ C、光照12L:12D、濕度70 \pm 5% R.H.。所得幼蟲罹病死亡率再以對數換算，分析劑量-死亡率線性迴歸關係(Finney, 1971)，求得各齡期之半致死濃度(LC₅₀)、半致死劑量(LD₅₀)及半致死時間(LT₅₀)。

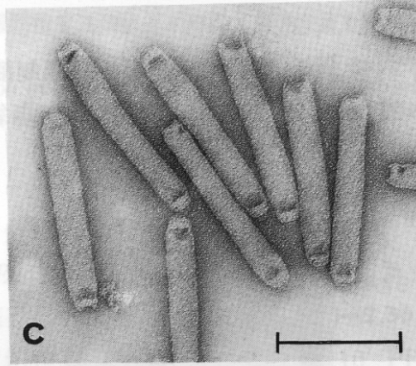
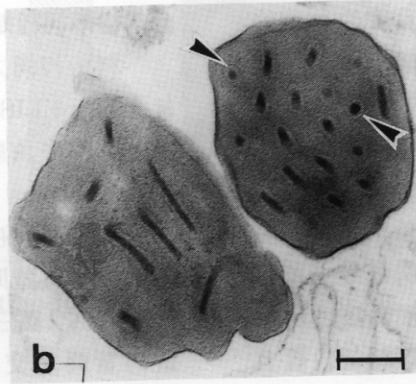
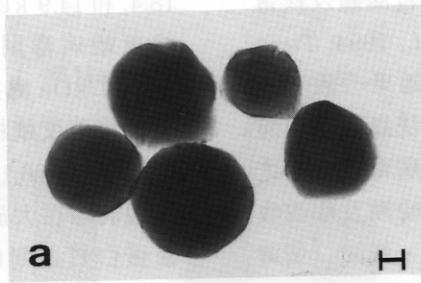
三種核多角體病毒對其寄主與小菜蛾致病力之測定

將本省三種病毒液以接種源飲入法(Tuan *et al.*, 1994; 1997)。餵予此三種害蟲之四齡初蛻幼蟲，每隻幼蟲接種相同病毒劑量(10⁶ PIBs/larva)，置於25 $^{\circ}$ C長箱中培養，每日記錄幼蟲罹病死亡率至所有供試幼蟲化蛹或死亡。另以飼料表面污染法接種小菜蛾之三齡初蛻幼蟲，病毒劑量為7.6 \times 10² PIBs/mm³ diet，置於25 \pm 1 $^{\circ}$ C、光照12L:12D、濕度70 \pm 5% R.H.生長箱中，觀察至幼蟲化蛹並記錄幼蟲累積死亡率，以比較三種病毒間之寄主範圍及致病力強弱。罹病死亡幼蟲經鏡檢確認病原死因，並取死蟲體液加入等量2X sample buffer煮沸5分鐘，依前述方法進行SDS-PAGE分析感染病毒蛋白質(15 μ l/well)，以判別病蟲體內之病毒種類。

結 果

病毒包涵體及核蛋白鞘之形態及構造

病毒包涵體及核蛋白鞘經負染法及超薄切片處理後，以穿透式電子顯微鏡觀察得知，此三種病毒包涵體之大小、結構及每個病毒粒子內所含有之核蛋白鞘數量間差異頗大。以斜紋夜蛾核多角體病毒包涵體最大，50個包涵體平均直徑為1.61 \pm 0.32 μ m，且病毒粒子內含之核蛋白鞘數量最多，每個病毒粒子內含之核蛋白鞘數量差異頗大，可含3~9個核蛋白鞘。但甜菜夜蛾之病毒包涵體則較小，平均直徑為1.07 \pm 0.16 μ m，每個病毒粒子內含之核蛋白鞘數量多為2~4個核蛋白鞘。而玉米穗蟲則最小平均直徑僅為0.79 \pm 0.22 μ m，且每個病毒粒子內僅含單一核蛋白鞘(圖一)。此三種病毒之核蛋白鞘大小依序為332.26 \pm 13.55 \times 47.16 \pm 1.42, 297.40 \pm 9.14 \times 46.72 \pm 4.00及319.80 \pm 7.80 \times 44.45 \pm 4.54 nm(表一)。由於甜菜



圖一 a. 玉米穗蟲核多角體病毒包涵體外形；b. 玉米穗蟲核多角體病毒包涵體內部構造，每個病毒粒子含一個核蛋白鞘；c. 玉米穗蟲核多角體病毒核蛋白鞘為長桿狀。(bar=0.2 μ m)。

Fig. 1. Electron micrographs of polyhedra and virions of HearNPV. a. External structure of polyhedra; b. Internal structure of polyhedra showing a single nucleocapsid in an envelope; c. Negative preparation of virions. bar=0.2 μ m.

表一 玉米穗蟲、甜菜夜蛾及科紋夜蛾核多角體病毒包涵體及核蛋白鞘形態之比較

Table 1. Comparison of polyhedra and nucleocapsid sizes of HearNPV, SpeiNPV and SpltNPV

Virus	PIB (diameter)(μ m)	Nucleocapsid (L \times W)(nm)
HearNPV	0.79 \pm 0.24	319.80 \pm 7.84 \times 44.45 \pm 4.54
SpeiNPV	1.07 \pm 0.16	297.40 \pm 9.14 \times 46.72 \pm 4.00
SpltNPV	1.61 \pm 0.32	332.26 \pm 13.55 \times 47.16 \pm 1.42

夜蛾及斜紋夜蛾核多角體病毒包涵體及核蛋白鞘之形態已發表(Tuan *et al.*, 1994; Tuan *et al.*, 1995b), 且與本次試驗結果一致, 故圖一中不再重覆, 只提出玉米穗蟲核多角體病毒之電顯照片。然而同一種病毒包涵體之大小可受寄主生理狀況、感染時期及病毒收穫時機等多種因素而有所差異, 且同一個寄主細胞內之病毒包涵體間大小亦有明顯差異, 為提高試驗資料間比對之真實性及可信度, 故於表一中仍提出本次試驗中同時測得之三種病毒大小之數據結果。

病毒包涵體蛋白質之分析

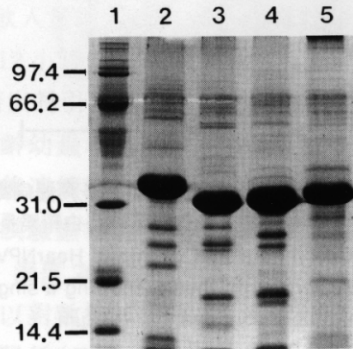
利用 SDS-PAGE 之方法分析病毒包涵體之所有蛋白質, 得知本省三種病毒最主要蛋白質—多角體蛋白質之分子量極為接近均在 31 kDa 左右, 然在其他次要及微量蛋白質上均有明顯差異。在電泳膠片上量較明顯的蛋白質帶如: 玉米穗蟲病毒於 31.8, 27.5, 25.3, 20.0, 18.6, 和 11.7 kDa 處共有六條蛋白質帶, 甜菜夜蛾病毒於 31.5, 28.2, 26.5, 26.1,

18.4, 和 14.9 kDa 處共有六條蛋白質帶, 而斜紋夜蛾病毒則於 32.0, 29.2, 26.9, 21.5, 12.8, 和 11.7 kDa 處共有六條蛋白質帶, 亦不同於加州苜蓿夜蛾核多角體病毒包涵體之蛋白質 33.9, 28.2, 26.1, 23.5, 12.8, 和 11.7 kDa, 此四種病毒在大於多角體蛋白質分子量之各微量蛋白質帶間(34~85 kDa)亦有所差異(圖二)。故由病毒包涵體蛋白質之圖譜亦可清楚分辨出不同種類的病毒。

利用相同力價的抗多角體蛋白質之多源抗體進行 ELISA 檢驗, 顯示各抗體對三種病毒之完整多角體蛋白質間具有極高之交互免疫反應(cross immune reaction)可達 80% 以上, 唯甜菜夜蛾病毒多角體蛋白質與斜紋夜蛾病毒抗體間之交互反應較低一些, 但亦高於 70% (圖三)。顯示三種病毒間之多角體蛋白質間之交互免疫反應仍有程度上之差異。

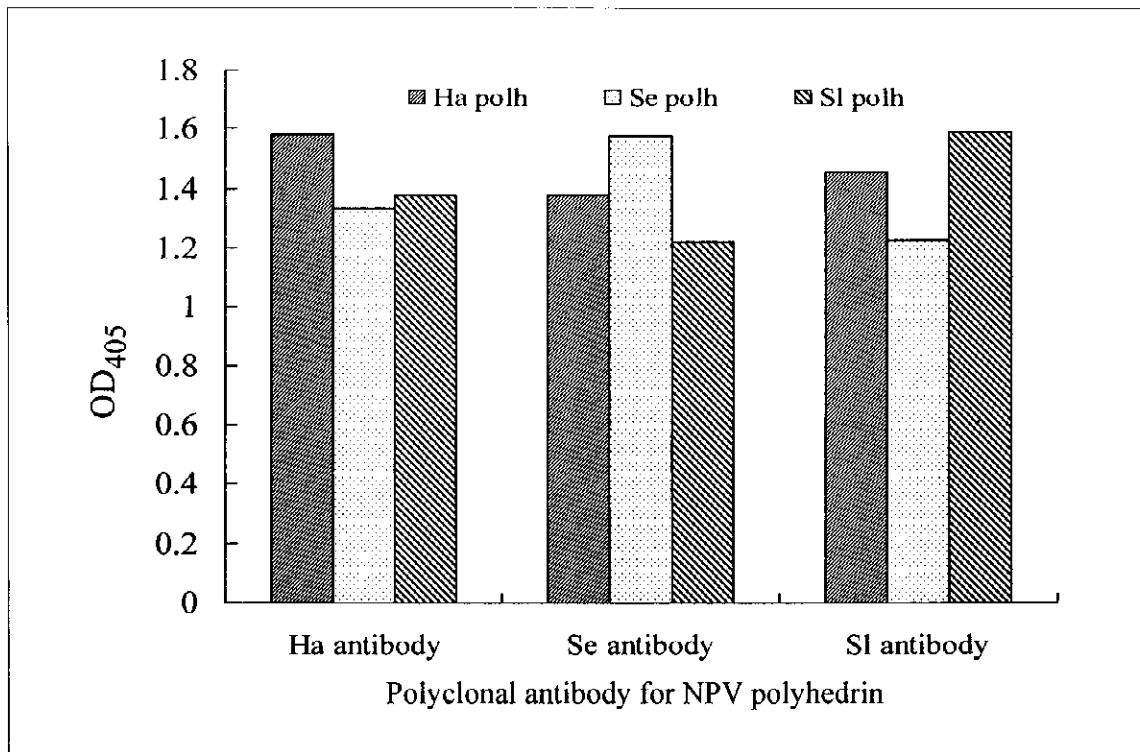
病毒核酸限制酶片段多態型之分析

三種病毒經過鹼溶處理及蔗糖密度梯度



圖二 加州苜蓿夜蛾、玉米穗蟲、甜菜夜蛾及斜紋夜蛾核多角體病毒包涵體蛋白質電泳分析圖譜。1: 蛋白質標記(Bio-Rad), 2: 加州苜蓿夜蛾核多角體病毒, 3: 甜菜夜蛾核多角體病毒, 4: 玉米穗蟲核多角體病毒, 5: 斜紋夜蛾核多角體病毒

Fig. 2. Protein profiles of AcMNPV (lane 2), SpeiNPV (lane 3), HearNPV (lane 4), and SpItNPV (lane 5) polyhedra in 15% SDS-polyacrylamide gel. Lane1: Protein marker (Bio-Rad).



圖三 利用多源抗體及酵素聯結免疫吸附檢定法測試玉米穗蟲、甜菜夜蛾及斜紋夜蛾核多角體病毒多角體蛋白質間之免疫交互反應。

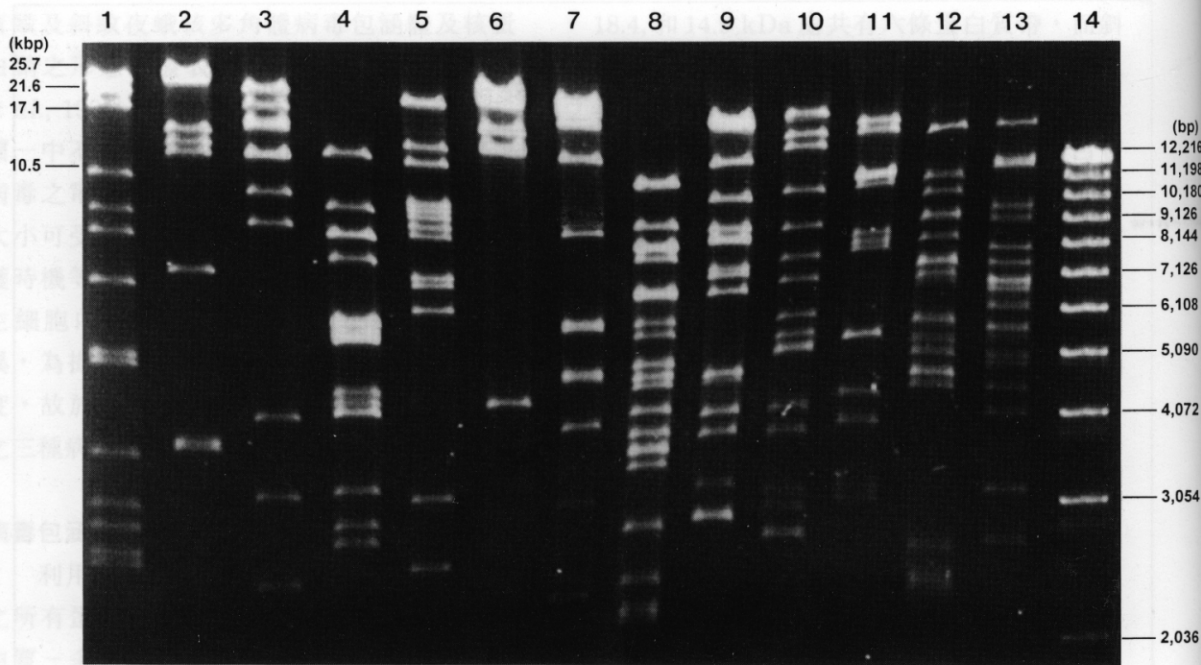
Fig. 3. Comparison of cross reaction in polyhedrin of HearNPV, SpeiNPV and SpitNPV by ELISA with polyclonal antibodies generated against each viral polyhedrin.

離心後，抽取病毒之核酸，並分別以內核酸限制酶 *Bam*H I、*Bgl* II、*Eco*R I、*Hind* III、*Pst* I 及 *Xho* I 切割後，進行核酸片段之比對，得知各病毒核酸之酵素切位具有明顯之差異(圖四)，故利用核酸限制酶圖譜之分析方法可清楚鑑別病毒之種類。玉米穗蟲、甜菜夜蛾及斜紋夜蛾三種核多角體病毒之基因組核酸大小依序約為 121.7 ± 2.1 , 132.4 ± 2.4 , 和 137.8 ± 1.8 kbp (表二)。其中以斜紋夜蛾核多角體病毒之基因組核酸最大，玉米穗蟲核多角體病毒之基因組核酸最小。

三種核多角體病毒之致病力與交互感染

玉米穗蟲核多角體病毒以接種源飲入

法，測得其對玉米穗蟲一至四齡幼蟲之半致死濃度依序為 2.23×10^4 , 7.60×10^4 , 3.71×10^5 , 和 1.57×10^6 PIBs/ml，五齡幼蟲則高於 1×10^7 PIBs/ml；經由飲入接種量換算得其半致死劑量一至四齡幼蟲分別為 4, 38, 742, 4,710 PIBs/larva；以 3.3×10^6 PIBs/ml 病毒濃度接種一至四齡幼蟲，其半致死時間依序為 4.24, 4.46, 6.29 及 8.43 天(表二)。顯示隨著幼蟲齡期之增長寄主對病毒之感受性亦明顯下降，末齡幼蟲之半致死劑量高於幼齡幼蟲千倍。以接種源飲入法將高濃度之三種核多角體病毒懸浮液，分別餵予此三種害蟲之四齡初蛻幼蟲，每隻幼蟲接種相同病毒劑量 (10^6 PIBs/larva)，置於 25°C 長箱中



圖四 加州苜蓿夜蛾、玉米穗蟲、甜菜夜蛾及斜紋夜蛾核多角體病毒染色體核酸經限制酶切割之瓊膠電泳分析圖譜。1: 加州苜蓿夜蛾核多角體病毒核酸經 *Pst* I 切割, 2-5: 玉米穗蟲核多角體病毒核酸經 *Bam* HI, *Bgl* II, *Eco* RI 及 *Hind* III 切割, 6-9: 甜菜夜蛾核多角體病毒核酸經 *Bam* HI, *Bgl* II, *Eco* RI 及 *Pst* I 切割, 10-13: 斜紋夜蛾核多角體病毒核酸經 *Bam* HI, *Bgl* II, *Eco* RI 及 *Xho* I 切割, 14: 1kb 核酸標記。

Fig. 4. Restriction endonuclease profiles of genomic DNA from AcMNPV, HearNPV, SpeiNPV and SpltNPV in 0.8% agarose gel. Lane1: AcMNPV digested with *Pst* I, lanes 2-5: HearNPV digested with *Bam* HI, *Bgl* II, *Eco* RI and *Hind* III, lanes 6-9: SpeiNPV digested with *Bam* HI, *Bgl* II, *Eco* RI and *Pst* I, lanes 10-13: SpltNPV digested with *Bam* HI, *Bgl* II, *Eco* RI and *Xho* I, lane 14: 1kb DNA marker (Gibco-BRL).

培養，並觀察至供試幼蟲死亡或化蛹。由幼蟲累積死亡率得知：三種病毒對本身寄主害蟲均具極高之致病力，且具高度專一性，對斜紋夜蛾幼蟲不具致死效果、對甜菜夜蛾幼蟲引起 15% 左右之死亡率；而斜紋夜蛾核多角體病毒對另二種幼蟲尚有 30% 以上之致死率，甜菜夜蛾則可使玉米穗蟲及斜紋夜蛾幼蟲發生 13.7~28.4% 之死亡率(表四)。

進一步將罹病幼蟲經由蛋白質電泳分析結果得知，三種病毒間交互感染之病蟲體內所含之病毒並非試驗接種之病毒，而為其本身之核多角體病毒，亦即玉米穗蟲幼蟲接種甜菜夜蛾或斜紋夜蛾核多角體病毒後，罹病

幼蟲體液中所含的係大量繁殖之玉米穗蟲核多角體病毒；而甜菜夜蛾幼蟲亦在接種另一種核多角體病毒後反而偵測到其本身之核多角體病毒包涵體蛋白質(圖五)。而此三種病毒以飼料表面污染法接種三齡小菜蛾，病毒劑量為 7.6×10^3 PIBs/mm³ diet，置於 25°C 長箱中培養，觀察至幼蟲化蛹，結果發現此三種病毒對小菜蛾幾乎不具致病力。本試驗顯示本省之三種夜蛾科害蟲核多角體病毒之專一性較高，無法在其他兩種害蟲體內進行大量繁殖，顯示其感染寄主域較窄。

表二 玉米穗蟲，甜菜夜蛾及斜紋夜蛾核多角體病毒染色體核酸經不同酵素切割後之核酸片段及大小

Table 2. Size of HearNPV, SpeiNPV and SpltNPV restriction fragments (kbp)

HearNPV				SpeiNPV				SpltNPV			
<i>Bam</i> HI	<i>Bgl</i> II	<i>Eco</i> RI	<i>Hind</i> III	<i>Bam</i> HI	<i>Bgl</i> II	<i>Eco</i> RI	<i>Pst</i> I	<i>Bam</i> HI	<i>Bgl</i> II	<i>Eco</i> RI	<i>Xho</i> I
29.02	21.49	13.25	17.85	22.75	19.73	11.12	16.08	17.00	16.08	14.96	15.37
25.76	17.04	10.18	13.94	21.91	17.48	11.12	16.08	15.06	15.16	11.02	12.20
14.96	15.47	8.91	12.61	20.11	17.11	9.11	12.92	14.04	11.20	10.32	11.84
13.99	15.07	8.81	10.36	19.73	15.84	8.16	10.48	10.78	11.20	9.16	9.57
13.02	12.91	8.01	10.08	15.26	13.12	8.16	9.12	9.12	11.20	9.02	9.07
7.67	12.91	6.11	9.77	13.83	8.67	7.81	8.67	7.90	11.02	8.35	7.93
3.82	10.44	6.11	9.36	13.83	5.88	6.82	8.67	7.13	8.76	7.39	7.41
3.79	9.21	6.02	8.94	4.34	5.88	6.76	7.61	6.12	8.45	7.39	6.94
1.82	4.08	5.81	7.49	1.16	4.85	5.82	7.37	5.74	8.18	7.05	6.94
1.82	3.19	5.81	7.25		4.85	5.61	6.76	5.41	5.69	5.97	6.74
1.82	2.45	5.64	6.51		4.01	4.85	4.89	5.41	5.69	5.97	6.26
1.31		5.64	3.16		3.04	4.62	4.89	5.41	5.69	5.65	5.74
0.42		4.58	2.63			2.36	4.42	4.24	4.28	5.18	5.09
		4.34	1.86			2.36	4.09	3.93	3.91	4.03	4.82
		4.17	1.54			1.81	3.82	3.28	3.24	3.26	4.82
		4.17					1.39	3.62	2.86	3.05	3.14
		3.26						3.62	2.86	2.84	1.82
		2.93						3.46	2.86	2.84	1.69
		2.81						2.87	1.11	2.84	1.64
		1.73						2.49		1.51	2.32
		1.01						2.21		1.15	1.98
		0.77						2.09			1.98
								1.91			1.73
								1.67			1.13
								1.56			
								1.51			
								1.42			
								1.17			
								0.91			
								0.69			
119.22	124.26	120.07	123.35	132.92	128.41	133.49	134.68	134.78	138.38	138.49	139.68
121.73±2.13				132.38±2.40				137.83±1.83			

討 論

本省三種病毒包涵體之形態與結構差異頗大，以斜紋夜蛾核多角體病毒包涵體最大，平均直徑為 $1.61 \pm 0.32 \mu\text{m}$ ，且病毒粒子之核蛋白鞘數量最多，多者可達 8~9 個核蛋白鞘，與甜菜夜蛾病毒同屬 MNPV (Tuan

et al., 1994; 1995b)；但甜菜夜蛾之病毒包涵體則較小，平均直徑為 $1.07 \pm 0.16 \mu\text{m}$ ，而玉米穗蟲則最小平均直徑僅為 $0.79 \pm 0.22 \mu\text{m}$ ，且為單一核蛋白鞘(SNPV)。依病毒的種類包涵體外形差異頗大，如芹菜夜蛾(*Anagrapha falcifera*)核多角體病毒為 $1.87 \pm 0.09 \mu\text{m}$ ，範圍自 2.0 至 $3.0 \mu\text{m}$ (Hostetter and

表三 玉米穗蟲核多角體病毒對玉米穗蟲各齡期幼蟲之半致死濃度、半致死劑量與半致死時間之比較

Table 3. Comparison of LC₅₀, LD₅₀ and LT₅₀ values of HearNPV to *Helicoverpa armigera* larvae

Instar	LC ₅₀ ^{a)} (PIBs/ml)	Dose mortality ^{b)} regression line	Coeff. value	Imbibed volume (ul)	LD ₅₀ (PIBs/larva)	LC ₅₀ ^{a)} (Days)
1st	2.23 × 10 ⁴	y = -2.50 + 1.73x	0.97	0.2	4	4.24
2nd	7.60 × 10 ⁴	y = -1.14 + 1.26x	0.99	0.5	38	4.46
3rd	3.71 × 10 ⁵	y = 0.02 + 0.90x	0.99	2	742	6.29
4th	1.57 × 10 ⁶	y = 1.47 + 0.57x	0.99	3	4,710	8.43

a) Recorded mortality until 7th day after inoculation, and corrected with Abbott's formula.

b) y = mortality in probits, x = log dose (PIBs/ml)

c) Inoculative concentration: 3.3 × 10⁵ PIBs/ml.

表四 玉米穗蟲、甜菜夜蛾及斜紋夜蛾核多角體病毒對三種鱗翅目四齡幼蟲致病力之比較

Table 4. Comparison of pathogenicity of HearNPV, SpeiNPV and SpltNPV to 4th-instar larvae of three lepidopteran species

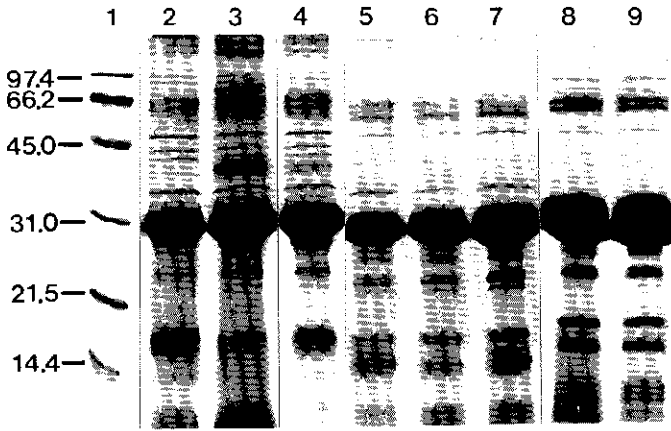
Virus	Mortality ^{a)} (%) (Mean ± SD)		
	<i>H. armigera</i>	<i>S. exigua</i>	<i>S. litura</i>
HearNPV	99.13 ± 0.75	15.48 ± 8.29	0.00 ± 0.00
SpeiNPV	28.40 ± 11.65	100.0 ± 0.00	13.73 ± 5.13
SpltNPV	33.97 ± 9.78	31.05 ± 12.23	96.62 ± 4.08

a) Inoculative dosage: 10⁶ PIBs/larva, and recorded mortality corrected with Abbott's formula

Puttler, 1991); *Lambdina fiscellaria* 之三種斜紋夜蛾病毒包涵體直徑大小自 1.5 至 3.0 μm (Levin *et al.*, 1997); *Platynota idaeusalis* 病毒平均大小為 0.91 ± 0.03 μm, 但其範圍自 0.35 至 1.35 μm, 大小差異頗大 (Wang and McCarthy, 1993); 而本省之甜菜夜蛾核多角體病毒較美國加州 SpeiNPV-608 株之包涵體小 (Gelernter and Federici, 1986)。一般而言, 核蛋白鞘的大小直徑約 40~50 nm、長度約 200~400 nm, 鞘的兩端結構不同 (Fraser, 1986), 雖然兩端均為平緩的圓弧形, 但其中一端之電子密度明顯地較另一端為高, 此現象在甜菜夜蛾及斜紋夜蛾核多角體病毒上亦可明顯見之 (Tuan *et al.*, 1994; 1995b)。玉米穗蟲核多角體病毒之包涵體因屬 SNPV, 故包涵體較其他 MNPV 病毒小, 直徑僅為斜紋夜蛾病毒之一半, 甜菜夜蛾病毒則為斜紋夜蛾病毒之 2/3。然而同一種

病毒包涵體之大小可受寄主生理狀況、感染時期及病毒收獲時機等多種因素影響, 且同一個寄主細胞內之病毒包涵體間大小亦有明顯差異, 本試驗中同種病毒包涵體本身之大小間亦有 15~30% 的差異, 斜紋夜蛾核多角體病毒包涵體直徑 1.61 ± 0.32 μm, 與 Tuan *et al.* (1995b) 所述包涵體直徑 1.90 ± 0.27 μm 間雖不相同, 但經 t-test 分析 (α=0.05) 並無顯著差異。而甜菜夜蛾核多角體病毒包涵體直徑 1.07 ± 0.16 μm, 與 Tuan *et al.* (1994) 所述包涵體直徑 1.05 ± 0.21 μm 間極為接近, 且經 t-test 分析 (α=0.05) 亦無顯著差異。

多角體蛋白質係核多角體病毒在感染寄主細胞後晚期產生之最主要的蛋白質, 其分子量約為 25-31 kDa, 依病毒種類不同而異 (Caballero *et al.*, 1992), 此以晶格狀排列之蛋白質可保護病毒在田間抗陽光紫外線、乾



圖五 玉米穗蟲、甜菜夜蛾及斜紋夜蛾幼蟲分別接種三種核多角體病毒後罹病蟲體蛋白質電泳分析圖譜。1: 蛋白質標記, 2-4: 玉米穗蟲幼蟲接種玉米穗蟲、甜菜夜蛾及斜紋夜蛾核多角體病毒, 5-7: 甜菜夜蛾幼蟲接種玉米穗蟲、甜菜夜蛾及斜紋夜蛾核多角體病毒, 8-9: 斜紋夜蛾幼蟲接種甜菜夜蛾及斜紋夜蛾核多角體病毒經 Coomassie 藍染色。

Fig. 5. Electrophoresis of *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera exigua*, and *S. litura* larvae inoculated with HearNPV, SpeiNPV and SpliNPV in 15% SDS-PAGE. Lane 1: Protein marker (Bio-Rad), lanes 2-4: *H. armigera* larvae inoculated with HearNPV, SpeiNPV and SpliNPV respectively, lanes 5-7: *S. exigua* larvae inoculated with HearNPV, SpeiNPV and SpliNPV respectively, lanes 8-9: *S. litura* larvae inoculated with SpeiNPV and SpliNPV, respectively.

燥或其化學因子，使病毒粒子完整地被保護在多角體內，使病毒的活性不易受到破壞。包涵體外圍又被一層富含碳水化合物 calyx 包圍著，以 thiol-linked 方式與多角體蛋白質聯結，對病毒之穩定性有增強作用 (Whitt and Manning, 1988)。利用 SDS-PAGE 之方法分析病毒包涵體之所有蛋白質，得知本省三種病毒最主要蛋白質—多角體蛋白質之分子量極為接近均在 31 kDa 左右，然在其他次量及微量蛋白質上均有明顯差異，亦不同於加州苜蓿夜蛾核多角體病毒包涵體之蛋白質，此四種病毒在大於多角體蛋白質分子量之各微量蛋白質帶間 (34~85 kDa) 亦有所差異。故由病毒包涵體蛋白質之圖譜亦可清楚分辨出不同種類的病毒。Caballero *et al.* (1992) 亦利用病毒蛋白質之圖譜，鑑別四個不同地理分離株之甜菜夜蛾核多角體病毒。

本省三種病毒間之多角體蛋白質間具有

極高之交互免疫反應，但其間仍有程度上之差異。探究其原因應係此三種病毒多角體蛋白質間具高度之同源性之故，甜菜夜蛾與斜紋夜蛾核多角體病毒之多角體蛋白質氨基酸序列之一致性可達 85%，而兩者與玉米穗蟲核多角體病毒間均可高達 87% (van Strien *et al.*, 1992; Cowan *et al.*, 1994; Croizier and Croizier, 1994)。其實大多數之核多角體病毒之多角體蛋白均很相似，例如榕樹透翅毒蛾核多角體病毒之多角體蛋白質氨基酸序列與其他十九種核多角體病毒間之一致性就可高達 85~90% (Chou *et al.*, 1996)。而就血清反應上而言，一種核多角體病毒蛋白質之抗體可與多種病毒之蛋白質發生免疫反應，Pritchett *et al.* (1979) 利用抗體免疫擴散法，可鑑別 AcMNPV, HaMNPV, HzSNPV, *Trichoplusia ni* SNPV 及 *Pseudoplusia includens* SNPV 等五種病

毒，而 TnSNPV 與 PiSNPV 間之血清關係 (serological relationship) 相當密切。其間均有一些共同之抗原。而 Singh *et al.* (1979) 探討 AcMNPV, TnMNPV, TnSNPV 及 PiSNPV 間血清關係，則認為無法區辨同屬 SNPV 或同屬 MNPV 之包涵體蛋白質與病毒粒子蛋白質，但可區別 SNPV 與 MNPV 兩類病毒之蛋白質。Keddie and Erlandson (1995) 以 *Malacosoma disstria* MNPV 病毒粒子蛋白質為抗原製備多源抗體，可與 AcMNPV 產生高度之免疫反應，但 AcMNPV capsid 專有之 p39 的單源抗體則與 MdMNPV 間無任何交互反應，由於 *Malacosoma* 屬之害蟲分佈很廣且為害多種作物，故可利用此共通性之抗體進行田間病毒之分佈。Volkman and Falcon (1982) 亦利用 TnSNPV 病毒多角體蛋白質製備抗體，以 ELISA 之方法偵測幼蟲感染核多角體病毒病之百分率，於病毒接種幼蟲後一天，即可偵測到 67% 之罹病率，第三天可測得 91% 之罹病率，然以肉眼只判得 20%，此法較以肉眼觀察病徵提早約 3 天可先偵測到幼蟲確實罹病。利用抗多角體蛋白質之多源抗體及 ELLISA 方法可進行斜紋夜蛾核多角體病毒包涵體之定量，其偵測濃度限界可低至 3.3×10^3 PIBs/ml (Tuan *et al.*, 1998)。

另外利用病毒多角體蛋白質基因高保守序列之引子組 (*polh* prime)，對核多角體病毒核酸進行聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)，以增幅多角體蛋白質基因做為感染核多角體病毒之診斷依據，對於透翅毒蛾核多角體病毒 (*Perina nuda* NPV) 及甜菜夜蛾核多角體病毒之可偵測濃度為 1×10^4 及 1×10^3 PIBs/ml，而利用雙階 PCR 則可提高 100 至 1000 之偵測效率 (Leu, 1996)。故無論是核酸或蛋白質層次，均可利用適當的方法，進行幼蟲感染病毒之早期診

斷。Ma *et al.* (1984) 利用已 coating 抗體之塑膠 bead 於試管內進行呈色反應，簡易測得吉普賽蛾 (*Lymantria dispar* (L.)) 末齡幼蟲及蛹體是否已感染核多角體病毒，並建議將此方法應用於田間疫病發生情況之偵測上，農民及植保或生態研究人員甚至可在無任何精密儀器及專業生化技術背景之情況下，亦可以測知病毒發生情形。而本試驗中利用純化之三種多角體蛋白質製備多源抗體，雖其間仍具有相當程度之交互反應，較不適用於此三種病毒之種類鑑別，但由於在室內飼育或田間自然情況下，此三種病毒與寄主昆蟲間均不易發生病毒交互感染之狀況，故可應用於室內大量飼育蟲體感染病毒之初步預警系統、或田間害蟲疫病與病毒分佈之偵測體系，以及時判斷是否應加強管理室內養蟲環境之衛生條件，或者在田間改變害蟲管理策略以助長病毒發生，而達到安全、經濟又有效之防治目的。

核多角體病毒核蛋白鞘內含有以 protaminelike protein 為主之蛋白質 (p6.9 or basic protein or core protein or VP12)，與雙股環狀去氧核糖核酸 (dsDNA) 形成核心 (core) (Tweeten *et al.*, 1980)。一般而言基因組核酸的長度約 80-200 kbp 依病毒種類而異，而 BmNPV 及 AcMNPV 的核酸長度均約為 130 kbp (Burgess, 1977; Ayres *et al.*, 1994)。本試驗中三種病毒之核酸以內核酸限制酶切割後，進行核酸片段之比對，得知其間酵素切位具有明顯之差異。Maeda *et al.* (1990) 認為核酸限制酶圖譜之比對可精確而有效地鑑別核多角體病毒之地理分離株，以此法將 100 株斜紋夜蛾核多角體病毒歸類為四群，且證實此法與體外感染寄主域及多角體蛋白質分子量與胙肽圖譜之鑑別結果極為一致；而 Caballero *et al.* (1992) 亦藉由病毒基因組核酸酵素切位之異同，將核酸大小均約

為 134 kbp 之美國、泰國及西班牙二株等四個地理分離株之甜菜夜蛾核多角體病毒做精確的鑑別分類。Miller and Dawes (1978) 亦提出利用核酸限制酶圖譜之分析方法鑑定桿狀病毒殺蟲劑之來源，提供了直接又準確的鑑定依據。而加州苜蓿夜蛾核多角體病毒經由小菜蛾幼蟲連續 20 次繼代感染而篩選出較原先野生型病毒毒性增強 15 倍之變異株，其除在病毒構造上稍有改變外，最明顯的即在病毒核酸限制酶圖譜上之差異 (Kolodny-Hirsch and van Beek, 1997)。Stiles and Himmerich (1998) 認為目前大多數人均只重視利用基因工程去改造病毒成為更有效之殺蟲劑，而忽略從田間篩選具廣寄主域及高致病力之病毒株的重要性，他們利用各病毒分離株在核酸限制酶圖譜及生物活性上之差異，探討如何增進病毒之寄主域及致病力。故核酸限制酶圖譜之分析方法不僅可利用於病毒株之偵測與鑑定，亦可應用於高致病力病毒分株離之篩選，在研發微生物殺蟲劑之篩選過程中提供準確之依據。

寄主幼蟲在感染核多角體病毒後，初期並無明顯病徵，隨著病毒在寄主細胞核內大量複製包涵體，使細胞內充滿無數病毒而逐漸脹破，至三~四天時表皮體色變淡或發亮、體節腫脹及行動遲緩等現象，而第五~七天病蟲即陸續死亡並流出大量病毒膿汁，而發病死亡之時間又依供幼蟲齡期、病接種濃度及培育溫度等環境因子而有很大的差異 (Keddie *et al.*, 1989; Tuan *et al.*, 1994; 1995a; 1995b)。斜紋夜蛾核多角體病毒對斜紋夜蛾二至五齡幼蟲之半致死劑量分別為 45, 1,232, 9,360, 142,870 PIBs/larva (Tuan *et al.*, 1995b)。甜菜夜蛾核多角體病毒對甜菜夜蛾一至五齡幼蟲之半致死劑量分別為 4, 23, 57, 1,219, 47,025 PIBs/larva (Tuan *et al.*, 1994)。玉米穗蟲核多角體病毒對玉米穗蟲一

至四齡幼蟲之半致死劑量分別為 4, 38, 742, 4,710 PIBs/larva。顯示核多角體病毒對寄主幼齡幼蟲具高致病力，且隨著幼蟲齡期之增長，寄主對病毒之感受性亦明顯下降，未齡幼蟲之半致死劑量高於幼齡幼蟲千倍至萬倍，即老熟幼蟲具有成熟免疫性 (mature immunity) (Smite and Vlak, 1988a; Tuan *et al.*, 1994; 1995b)。本省三種核多角體病毒對本身寄主害蟲均具極高之致病力，但對其他兩種非寄主害蟲之四齡幼蟲致死率僅約 14~34%，對小菜蛾亦幾乎不具致病力。而由蛋白質電泳分析結果得知，三種病毒間交互感染之病蟲體內所含之病毒為寄主本身之核多角體病毒。故非寄主原有之病毒並不能在供試幼蟲體內大量繁殖，但可引起原寄主體內潛在低量之病毒的發生 (Tuan *et al.*, 1997)。本試驗顯示本省之三種夜蛾科害蟲核多角體病毒之寄主專一性較高，無法在其他兩種害蟲體內進行大量繁殖，即其感染寄主域較窄。所以雖然此三種病毒對其個別寄主具頗高之致病力，但不如加州苜蓿夜蛾及芹菜夜蛾核多角體病毒之寄主範圍廣 (Granados and Williams, 1986; Hostetter and Puttler, 1991)，因此在害蟲防治之推廣應用上受到很大的限制。故日後在田間欲同時害蟲防治玉米穗蟲、甜菜夜蛾及斜紋夜蛾三種害蟲時，則需考慮混合三種病毒或配合其他防治方法，以達到良好之防治效果。

引用文獻

- Agathos, S. N.** 1991. Mass production of viral insecticides. In "Biotechnology for Biological Control of Pests and Vectors". (Maramorosch, K. ed.), CRC Press, Boca Raton, FL. 278 pp.
- Ayres, M. D., S. C. Howard, J. Kuzio, M. Lo-**

- pez-Ferber, and R. D. Possee.** 1994. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 202: 586-605.
- Burgess, S.** 1977. Molecular weights of Lepidopteran baculovirus DNAs: derivation by electron microscopy. *J. Gen. Virol.* 37: 501-510.
- Caballero, P., D. Zuidema, C. Santiago-Alvarez, and J. M. Viak.** 1992. Biochemical and biological characterization of four isolates of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *Biocont. Sci. Tech.* 2: 145-157.
- Chou, C. M., C. J. Huang, C. F. Lo, G. H. Kou, and C. H. Wang.** 1996. Characterization of *Perina nuda* nucleopolyhedrovirus (PenuNPV) polyhedrin gene. *J. Invertebr. Pathol.* 67: 259-266.
- Cowan, P., D. Bulach, K. Goodge, A. Robertson, and D. E. Trlbe.** 1994. Nucleotide sequence of the polyhedrin gene region of *Helicoverpa zea* single nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus: placement of the virus in lepidoptera nuclear polyhedrosis virus group II. *J. Gen. Virol.* 75: 3211-3218.
- Croizier, L., and G. Croizier.** 1994. Nucleotide sequence of the polyhedrin gene of *Spodoptera littoralis* multiple nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus. *Biochim. Biophys. Acta* 1218: 457-459.
- Finney, D. J.** 1971. *Probit Analysis*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Francki, R. I. B., C. M. Fauquet, D. Knudsdson, and F. Brown.** 1991. Classification and Nomenclature of Viruses. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, *Arch. of Virol. Suppl.* 2,450pp.
- Fraser, M. J.** 1986. Ultrastructural observations of virion maturation in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infected *Spodoptera frugiperda* cell cultures. *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.* 95: 189-195.
- 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.
- Granados, R., and K. Williams.** 1986. In vivo infection and replication of baculoviruses. In "The Biology of Baculoviruses". (R. R. Granados and B. A. Federic, eds.), Vol. 1, pp. 89-108. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Groner, A.** 1986. Specificity and safety of baculoviruses. In "The Biology of Baculoviruses". (R. R. Granados and B. A. Federic, eds.), Vol. 1, pp. 177-202. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Hosteller, D. L., and B. Pultter.** 1991. A new broad host range polyhedrosis from a celery looper, *Anagrapha falcifera* (Kirby), (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Entomol.* 20: 1480-1488.
- 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 TA-CTRI, pp. 50-52. (In Chinese)
- Ignoffo, C. M.** 1973. Development of a viral insecticide: Concept to commercialization. *Exp. Parasitol.* 33: 380-406.
- Keddie, A., and M. Erlandson.** 1995. Characterization of nuclear polyhedrosis virus from the forest tent caterpillar, *Malacosoma disstria*. *J. Invertebr. Pathol.* 65: 43-47.
- Keddie, B. A., G. W. Aponte, and L. E. Volkman.** 1989. The pathway of infection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in an insect host. *Science* 243: 1728-1730.
- Kolodny-Hirsch, D. M., and N. A. M. Van Beek.** 1997. Selection of a morphological variant of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus with increased virulence following serial passage in *Plutella xylostella*. *J. Invertebr. Pathol.* 69: 205-211.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Leu, H. C.** 1996. Detection of baculoviral infection by polymerase chain reaction. Master's thesis. National Taiwan University. 58 pp.
- Levin, D. B., A. M. Laitinen, T. Clarke, C. J. Lucarotti, B. Morin, and I. S. Otvos.** 1997. Characterization of nuclear polyhedrosis viruses from three subspecies of *Lambdina fiscellaria*. *J. Invertebr. Pathol.* 69: 125-134.
- Ma, M., J. K. Burkholder, R. E. Webb, and H. T. Hsu.** 1984. Plastic-bead ELISA: an inexpensive epidemiological tool for detection gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus. *J. Econ. Entomol.* 77: 537-540.
- Maeda, S., Y. Mukohara, and A. Kondo.** 1990. Characteristically distinct isolates of the nuclear polyhedrosis virus from *Spodoptera litura*. *J. Gen. Virol.* 71: 2631-2639.
- Miller, L. K., and K. P. Dawes.** 1978. Restriction endonuclease analysis for the identification of baculovirus pesticides. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 411-421.
- Murphy, F. A., C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo, and M. D. Summers.** 1995. "Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Virus", pp. 104-113, *Arch. Virol. Suppl.* 10. Springer-Verlag, Wein.
- Pritchett, D. W., H. A. Scott, and S. Y. Young.** 1979. Serological relationships of five nuclear polyhedrosis viruses from lepidopterous species. *J. Invertebr. Pathol.* 33: 183-188.
- Schmidt, J. O., T. S. Lee, and J. T. Chao.**

1993. Pharmacological activities of *Polistes rothneyi grahami* and *P. olivaceus* (Hymenoptera: Vespoidea) venoms, a preliminary report. Chinese J. Entomol. 13: 259-263.
- Singh, S. P., R. T. Gudauskas, and J. D. Harper.** 1979. Serological comparison of polyhedron protein and virions from four nuclear polyhedrosis viruses of *Plusiine* larvae (Lepidoptera: Noctuidae). J. Invertebr. Pathol. 33: 19-30
- Smits, P. H., and J. M. Vlak.** 1988a. Biological activity of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus against *S. exigua* larvae. J. Invertebr. Pathol. 51: 107-114.
- Smits, P. H., and J. M. Vlak.** 1988b. Selection of nuclear polyhedrosis viruses as biological control agents of *Spodoptera exigua* [Lep.: Noctuidae]. Entomophaga 33: 299-308.
- 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.
- Stiles, B., and S. Himmerich.** 1998. *Autographa californica* NPV isolates: restriction endonuclease analysis and comparative biological activity. J. Invertebr. Pathol. 72: 174-177.
- 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 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, U. C. Chao, and R. F. Hou.** 1997. Investigation of pathogenicity of AcMPV to nine lepidopteran pests in Taiwan. Chinese J. Entomol. 17: 209-225. (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)
- Tuan, S. J., W. L. Chen, and S. S. Kao.** 1998. *In vivo* mass production and control efficacy of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus. Chinese J. Entomol. 18: 101-116. (in Chinese)
- Tweeten, K. A., L. A. Bulla, and R. A. Consigli.** 1980. Characterization of an extremely basic protein derived from granulosis virus nucleocapsids. J. Virol. 33: 866-876.

- van Strien, E. A., D. Zuidema, R. W. Goldbach, and J. M. Vlak.** 1992. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the polyhedrin gene of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.* 73: 2813-2821.
- Volkman, L. E., and L. A. Falcon.** 1982. Use of monoclonal antibody in an enzyme-linked immunosorbent assay to detect the presence of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) S nuclear polyhedrosis virus polyhedrin in *T. ni* larvae. *J. Econ. Entomol.* 75: 868-871.
- Wang, S. W., and W. J. McCarthy.** 1993. Purification and characterization of the *Platynota idaeusalis* baculovirus pathogenic to the tufted apple bud moth. *J. Invertebr. Pathol.* 62: 37-46.
- Whitt, M. A., and J. S. Manning.** 1988. A phosphorylated 34-kda protein and a subpopulation of polyhedrin are thiol-linked to the carbohydrate layer surrounding a baculovirus occlusion body. *Virology* 163: 33-42.

收件日期：1998年11月17日

接受日期：1999年3月1日

Comparison of the Characterization and Pathogenesis of Three Lepidopteran Nucleopolyhedroviruses (HearNPV, SpeiNPV and SpltNPV) Isolated from Taiwan

Tuan, S. J.* and Kao, S. S. Biopesticide Department, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan 413, R.O.C

Cheng, D. J. and Hou, R. F. Department of Entomology, National Chung Hsing University, Taichung 402, Taiwan, R.O.C.

Chao, Y. C. Institute of Molecular Biology, Academia Sinica, 128 Yen-Chiu Road, Sec. 2, Nankang, Taipei, Taiwan 115, R.O.C.

ABSTRACT

Three nucleopolyhedroviruses isolated from the larvae of *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera exigua*, and *S. litura* with nucleopolyhedrosis in Taiwan were characterized and compared morphologically, biochemically, immunologically and pathologically. The polyhedra were all irregular in shape, measuring ca. 0.79 ± 0.22 , 1.07 ± 0.16 , and $1.61 \pm 0.32 \mu\text{m}$, respectively under electron microscopic observation. The nucleocapsid is elongated with parallel sides and two straight ends, measuring $319.80 \pm 7.80 \times 44.45 \pm 4.54$, $297.40 \pm 9.14 \times 46.72 \pm 4.00$, and $332.26 \pm 13.55 \times 47.16 \pm 1.42 \text{ nm}$, respectively. There were distinct differences between their viral proteins only in minor bands. The molecular weights of purified undegraded polyhedrins were all approximately 31 kDa. Polyhedrins were assayed by ELISA with polyclonal antipolyhedrin antisera specific to each polyhedrin of HearNPV, SpeiNPV and SpltNPV, demonstrating that there were a close relationship between these viruses. Restriction endonuclease profiles of these viral genomes digested with *Bam*H I · *Bgl* II · *Eco*R I · *Hind* III · *Pst* I and *Xho* I restriction endonucleases indicated that these viruses were markedly different from each other, the genome sizes were estimated to be 121.7 ± 2.1 , 132.4 ± 2.4 , and $137.8 \pm 1.8 \text{ kbp}$, respectively. HearNPV isolate is highly specific and pathogenic to *H. armigera* larvae, its LD₅₀ values were 4, 38, 742, and 4,710 PIBs/larva to first to fourth instar, respectively as assayed with an in-oculum-imbibing method. These 3 viruses were not pathogenic to *Plutella xylostella*.

Key words: *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera litura*, nucleopolyhedrovirus, characterization.