



## Interaction of the Microsporidium and Nucleopolyhedrovirus in *Spodoptera litura* 【Research report】

### 斜紋夜蛾微孢子蟲與核多角體病毒間之交互作用 【研究報告】

Shu-Jen Tsai, and Chung-Hsiung Wang\*  
蔡恕仁、王重雄\*

\*通訊作者E-mail: [shu-jen@yabee.com.tw](mailto:shu-jen@yabee.com.tw) Tel (02)23630231 ext.2503

Received: 2001/04/09 Accepted: 2001/05/22 Available online: 2001/06/01

#### Abstract

Third-instar *Spodoptera litura* larvae were infected with various combinations of polyhedral inclusion bodies (PIBs) of *S. litura* nucleopolyhedrovirus (SpltNPV) and spores of a microsporidium, *Nosema spodopterae*, by the diet surface contamination method. LD50 values of SpltNPV and *N. spodopterae* to third-instar larvae of *S. litura* 21 days post-infection (incubated at  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , 75–80% RH, and L:D = 12:12) were  $8.51 \times 10^3$  PIBs/larva and  $1.13 \times 10^4$  spores/larva, respectively. The numbers of dead larvae after coinfections with the two pathogens were counted, and two lethal peaks were found at 8 and 18 days post-infection. The dead larvae first contained PIBs only and later contained spores only. These two lethal times coincided with those of infection with SpltNPV only or *N. spodopterae* only, respectively. Only 0.5% of dead larvae contained both PIBs and spores. The results of binomial tests of accumulated mortalities reveal that antagonism between the two pathogens occurred at combinations of  $5 \times 10^3$  spores with PIBs, and independence occurred especially at high spore dosages. The factor of interference existing with coinfection of SpltNPV and *N. spodopterae* needs to be elucidated in future studies.

#### 摘要

以斜紋夜蛾 (*Spodoptera litura*) 之兩種重要病原體——斜紋夜蛾核多角體病毒 (*S. litura* nucleopolyhedrovirus, SpltNPV) 與斜紋夜蛾微孢子蟲 (*Nosema spodopterae*)——混合感染斜紋夜蛾三齡幼蟲。於  $26^\circ\text{C}$  下，接種後21日之兩種病原體單獨感染之 LD50值各為 SpltNPV:  $8.51 \times 10^3$  PIBs/larva、*N. spodopterae*:  $1.13 \times 10^4$  spores/larva。混合感染試驗結果顯示因核多角體病死亡之高峰期在接種後第8日，而因微孢子蟲病死亡之高峰期則於第18日。在鏡檢下，死亡幼蟲中只有0.5%可檢測到病毒包涵體與微孢子蟲孢子，其餘則只檢測出單一病原體 (SpltNPV或*N. spodopterae*)。利用累積死亡率進行二項分佈檢定 (binomial test)，發現只有在*N. spodopterae* 劑量為  $5 \times 10^3$  spores/larva 時對不同核多角體病毒劑量呈拮抗作用 (antagonism)，高劑量的微孢子蟲則與核多角體病毒之感染呈不相關 (independence) 的現象，Tammes圖形分析結果亦相似。但高劑量的微孢子蟲感染會抑制核多角體病的發生，因此，此二種病原體間在同一寄主內確實的干擾因子有待進一步釐清。

**Key words:** antagonism, coinfection, *Nosema spodopterae*, *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus (SpltNPV).

**關鍵詞:** 斜紋夜蛾核多角體病毒、斜紋夜蛾微孢子蟲、共感染、拮抗作用

Full Text: [PDF \(0.19 MB\)](#)

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

## 斜紋夜蛾微孢子蟲與核多角體病毒間之交互作用

蔡恕仁 國立台灣大學昆蟲學系 台北市羅斯福路四段 1 號

王重雄 國立台灣大學昆蟲學系 台北市羅斯福路四段 1 號

### 摘 要

以斜紋夜蛾 (*Spodoptera litura*) 之兩種重要病原體 斜紋夜蛾核多角體病毒 (*S. litura* nucleopolyhedrovirus, SpltNPV) 與斜紋夜蛾微孢子蟲 (*Nosema spodopterae*) 混合感染斜紋夜蛾三齡幼蟲。於 26 °C 下，接種後 21 日之兩種病原體單獨感染之 LD<sub>50</sub> 值各為 SpltNPV:  $8.51 \times 10^3$  PIBs/larva *N. spodopterae*:  $1.13 \times 10^4$  spores/larva。混合感染試驗結果顯示因核多角體病死亡之高峰期在接種後第 8 日，而因微孢子蟲病死亡之高峰期則於第 18 日。在鏡檢下，死亡幼蟲中只有 0.5% 可檢測到病毒包涵體與微孢子蟲孢子，其餘則只檢測出單一病原體 (SpltNPV 或 *N. spodopterae*)。利用累積死亡率進行二項分佈檢定 (binomial test)，發現只有在 *N. spodopterae* 劑量為  $5 \times 10^3$  spores/larva 時對不同核多角體病毒劑量呈拮抗作用 (antagonism)，高劑量的微孢子蟲則與核多角體病毒之感染呈不相關 (independence) 的現象，Tammes 圖形分析結果亦相似。但高劑量的微孢子蟲感染會抑制核多角體病的發生，因此，此二種病原體間在同一寄主內確實的干擾因子有待進一步釐清。

關鍵詞：斜紋夜蛾核多角體病毒、斜紋夜蛾微孢子蟲、共感染、拮抗作用。

### 前 言

昆蟲病原微生物常是自然界中調控昆蟲族群之重要因子，不同季節間田間常可發現受不同病原體感染之罹病昆蟲。其中引發昆蟲季節流行病之兩種重要病原體是核多角體病毒 (nucleopolyhedrovirus, NPV) 與微孢子蟲 (microsporidia)，所引起的疾病分別稱之為核多角體病 (nucleopolyhedrosis) 和微

孢子蟲病 (microsporidiosis)。罹患核多角體病之瀕死昆蟲典型的病徵為蟲體表皮脆弱，輕觸後即後流出含有大量病毒包涵體之膿狀物 (Su, 1990; Tuan *et al.*, 1995)。此種病毒只感染無脊椎動物，具有高度的寄主專一性，可作為一種安全有效的防治害蟲之生物製劑 (Ignoffo, 1973)。此外此病毒亦被應用於桿狀病毒表現載體系統 (baculovirus expression vector system) 大量表現外源蛋

\*論文聯繫人

Te(02)23630231 ext.2503

白質 (Smith *et al.*, 1983)。而罹患微孢子蟲病之昆蟲的主要病原體以 *Nosema* 屬的種類為主，罹病昆蟲取食意願降低、發育延遲，呈現典型之慢性寄生蟲病徵，在外觀形態上並無明顯的病徵，但其糞便經鏡檢常見大量孢子。罹病死亡之蟲體表皮不易破裂，此點可與核多角體病之病徵明顯區辨。

昆蟲病原體之交互作用常見於科學雜誌上，如顆粒體病毒 (granulosis virus, GV) 對核多角體病毒的感染有協力作用 (synergism) (Tanada, 1956, 1959; Tanada and Hukuhara, 1971)，但核多角體病毒與微孢子蟲則呈拮抗作用 (antagonism)。Nordin and Maddox (1972) 曾經報告核多角體病毒與兩種微孢子蟲 (*Pleistophora schubergi hyphantriae* 和 *Nosema* sp.) 感染美國白蛾 (*Hyphantria cunea*) 幼蟲會產生拮抗現象，但其作用機制並不清楚。Fuxa (1979) 研究殺蛾多形孢蟲 *Vairimorpha necatrix* 與三種病原體 (細菌、病毒及真菌) 於夜蛾科玉米穗蟲 (*Heliothis zea*) 之交互作用，發現不同病原體間存在著不同的交互作用型式，其中微孢子蟲與核多角體病毒二者屬於拮抗作用。

斜紋夜蛾 (*Spodoptera litura*) 為台灣重要之經濟害蟲，斜紋夜蛾核多角體病常發生於秋季，其病原體稱為斜紋夜蛾核多角體病毒 (*S. litura* nucleopolyhedrovirus, Splt NPV) (Hwang and Ding, 1975; Shih *et al.*, 1995)，為一具高致病力及專一性之病原體。與 SpltNPV 相較之下，感染斜紋夜蛾之斜紋夜蛾微孢子蟲 (*Nosema spodopterae*) (Hsu, 1984) 為一慢性之病原體，亦可於秋季發現此病之流行，並常見與 SpltNPV 混合感染的情形。斜紋夜蛾受到此二病原體混合感染的現象在印度亦有報導 (Narayanan and Jayaraj, 1979)，但如同台灣例子，斜紋夜

蛾混合感染的現象皆未曾作深入的探討。本試驗基於探討此二病原體交互作用之機制，乃先嘗試建立實驗室感染模式，期能供往後深入探討二病原體交互作用機制之參考。

## 材料與方法

### 一、供試昆蟲之飼養

供試昆蟲斜紋夜蛾以 Hung and Hwang (1988) 之半合成人工飼料配方飼育於溫度  $26 \pm 2$  °C，相對濕度 75-80%，12 小時光照之恆溫生長箱中。以剛蛻皮之三齡幼蟲為受試昆蟲 (約五日齡)，分開飼育於 30 孔塑膠養蟲盤內。接種病原體前先經 6 小時之飢餓處理。

### 二、病原體之純化

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而得。核多角體病毒包涵體 (polyhedral inclusion body, PIB) 之純化係根據 Wang *et al.* (1996b) 之報告進行，以蔗糖梯度離心進行純化工作。包涵體濃度依使用需要而調整之。

斜紋夜蛾微孢子蟲 (*N. spodopterae*) 收集自田間罹病幼蟲，並以感染實驗室飼育之三齡幼蟲。首先將罹微孢子蟲病之幼蟲，經鏡檢確定後，將蟲體加入 TE 緩衝液 (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5) 研磨，經每平方英寸 200 網孔的不鏽鋼網加以過濾。濾液經低速離心後取沈澱，最後以 90% Percoll® (Pharmacia) 密度梯度離心法 (30,000 × *g*, 30 分鐘) 進行純化。純化之微孢子蟲孢子經二次 TE 緩衝液懸浮後再離心，置於 4 °C 備用。孢子濃度依使用需要而調整之。

### 三、病原體之接種

本試驗以飼料表面污染法接種受試昆

蟲, SplitNPV 包涵體序列稀釋為下列劑量： $2 \times 10^3$ 、 $4 \times 10^3$ 、 $8 \times 10^3$ 、 $1.6 \times 10^4$  及  $3.2 \times 10^4$  PIBs/larva；*N. spodopterae* 孢子則稀釋成： $5 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $2 \times 10^4$  及  $4 \times 10^4$  spores/larva。病原體相互作用關係以 30 種處理 (6 種病毒劑量  $\times$  5 種微孢子蟲劑量, 包含 0 的劑量) 表示, 每一處理 30 隻, 待幼蟲食畢污染飼料後換置於正常飼料中飼養。每日記錄死亡情形, 除以病徵分辨造成死亡之原因外, 並於顯微鏡下鏡檢判斷。於感染後 21 日計算結果並以 Abbott's formula 校正死亡率。

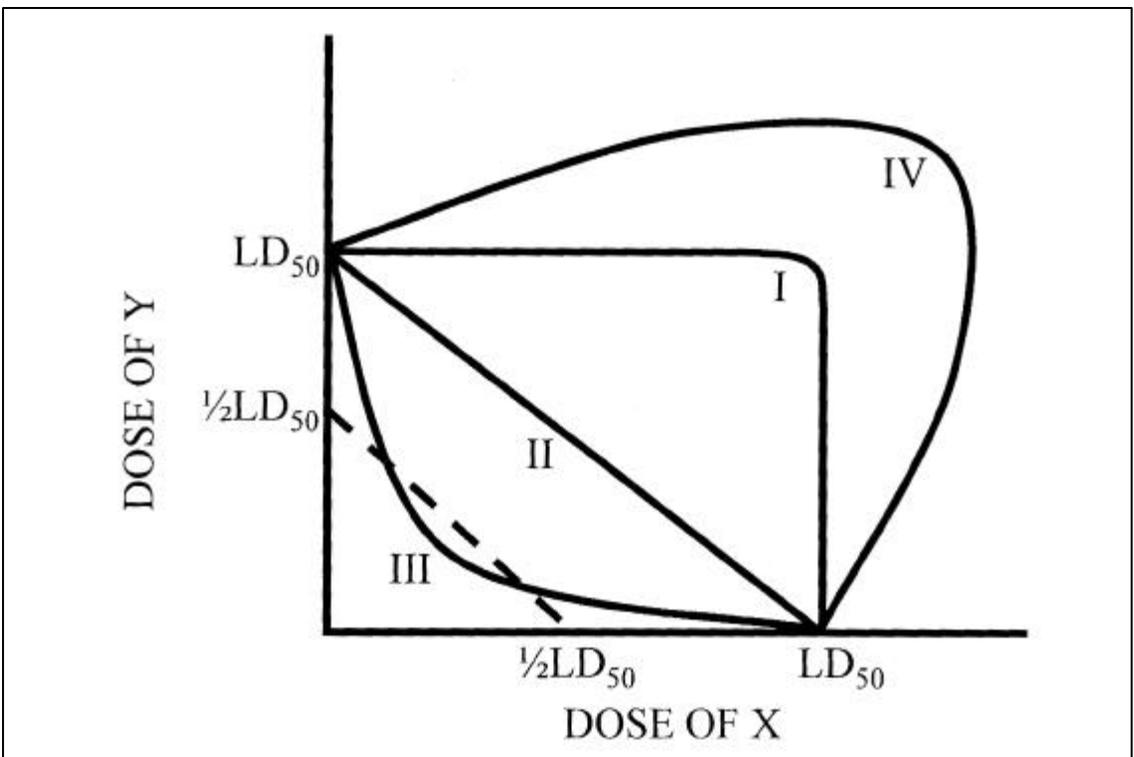
#### 四、交互作用之評估

半數致死劑量 ( $LD_{50}$ ) 以對機數 (probit)

分析 (Finney, 1971)。交互作用評估以二種方法：(1) 二項分佈檢定 (binomial test)：根據 Steel and Torrie (1980) 比較觀察值與期望值是否具有顯著性差異。方程式如下：

$$Z = \frac{O - E}{\sqrt{p(1-p)/n}}$$

其中  $O$  為觀察值,  $E$  為期望值,  $p$  為事件發生之機率,  $n$  為樣品數。(2) Isobole 圖形分析: Tammes (1964) 將不同處理中之  $LD_{50}$  值所形成的曲線型式 (稱為 isobole) 定義成四種不同的交互作用類型, 分別為無相關、加成、協力及拮抗。依圖形結果可顯示二者間之相互關係 (圖一)。



圖一 Tammes 氏 isobole 圖形分析之交互作用型式 (據 Fuxa, 1979)。I = 不相關, II = 加成作用, III = 協力作用, IV = 拮抗作用。

Fig. 1. Tammes' s interaction analysis with isoboles drawn by Fuxa (1979). I = independence, II = additivity, III = synergism, IV = antagonism.

## 結 果

### 一、SplitNPV 和 *N. spodopterae* 對同源三齡幼蟲之單獨致病力

斜紋夜蛾三齡幼蟲以飼料表面污染法接種 SplitNPV  $2 \times 10^3$ 、 $4 \times 10^3$ 、 $8 \times 10^3$ 、 $1.6 \times 10^4$  及  $3.2 \times 10^4$  PIBs/larva 劑量之幼蟲於

26 °C，21 日內之死亡率從 26.67%至 75%不等 (表一)。未死亡之幼蟲其化蛹時間及羽化時間與控制組 (未感染之幼蟲) 並無明顯差異，其 LD<sub>50</sub> 值為  $8.51 \times 10^3$  PIBs/larva (表二)。另接種 *N. spodopterae*  $5 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $2 \times 10^4$  及  $4 \times 10^4$  spores/larva 劑量之幼蟲於 26 °C，21 日內之死亡率從 23.33%至 86.21%

表一 斜紋夜蛾三齡幼蟲受斜紋夜蛾微孢子蟲和核多角體病毒感染之交互作用

Table 1. Interaction of *Nosema spodopterae* and SplitNPV to third-instar larvae of *Spodoptera litura*

Test	<i>N. spodopterae</i> dose ( $\times 10^3$ spores/larva)	SplitNPV dose ( $\times 10^3$ PIBs/larva)	Observed mortality (%) <sup>a</sup>	Expected mortality (%) <sup>a,b</sup>	Z value of binomial test
A	-	2	26.67		
	-	4	40.00		
	-	8	48.28		
	-	16	55.17		
	-	32	75.00		
B	5	2	25.00	43.78	-1.987*
	5	4	36.67	54.00	-1.899
	5	8	38.46	60.34	-2.232*
	5	16	46.67	65.63	-2.078*
	5	32	73.33	80.83	-0.822
C	10	2	50.00	56.00	-0.635
	10	4	56.67	64.00	-0.803
	10	8	70.00	68.97	0.113
	10	16	75.86	73.10	0.297
	10	32	71.43	85.00	-1.436
D	20	2	68.97	82.30	-1.436
	20	4	79.31	85.52	-0.669
	20	8	75.86	87.51	-1.255
	20	16	80.00	89.18	-1.006
	20	32	60.00	93.97	-3.721**
E	40	2	79.31	89.89	-1.139
	40	4	82.76	91.72	-0.966
	40	8	83.33	92.87	-1.044
	40	16	76.92	93.82	-1.723
	40	32	92.86	96.55	-0.391
F	5	-	23.33		
	10	-	40.00		
	20	-	75.86		
	40	-	86.21		

<sup>a</sup> After 21 days.

<sup>b</sup>  $O_V + O_N(1 - O_V)$ , where  $O_V$  = observed % mortality for SplitNPV alone,  $O_N$  = observed % mortality for *Nosema spodopterae* alone, at the given dose.

\* Significant at  $p < 0.05$ ; \*\* Significant at  $p < 0.01$ .

表二 斜紋夜蛾核多角體病毒與斜紋夜蛾微孢子蟲對斜紋夜蛾三齡幼蟲之半數致死劑量及劑量 - 死亡率直線迴歸方程式  
Table 2. Dosage-mortality response of the third-instar larvae of *Spodoptera litura* larvae to SpItNPV and *Nosema spodopterae*

Pathogen	LD <sub>50</sub> <sup>a</sup>	Dosage-mortality regression line	Coefficient value
SpItNPV	8.51 × 10 <sup>3</sup> PIBs/larva	y = 0.989 x + 1.118 <sup>b</sup>	r = 0.980
<i>N. spodopterae</i>	1.13 × 10 <sup>4</sup> spores/larva	y = 2.130 x - 3.637	r = 0.986

<sup>a</sup> Mortality recorded 21 days post-inoculation.

<sup>b</sup> y = mortality in probits, x = log dose.

不等 (表一), 其 LD<sub>50</sub> 值為 1.13 × 10<sup>4</sup> spores/larva (表二)。受 *N. spodopterae* 感染之斜紋夜蛾幼蟲, 發育明顯遲緩, 行動不活潑。部分幼蟲於蛻皮時無法順利將舊的表皮完全蛻除, 使舊的表皮黏附於蟲體末端, 甚至會影響幼蟲排泄的功能。

如表一及圖四所示, 單獨感染 SpItNPV (圖四 A) 之死亡率與感染劑量呈線性關係, 死亡率從 26.67–75% (表一), 即感染劑量高者其死亡率高, 多數於感染後第 8 日死亡。單獨感染 *N. spodopterae* 之死亡率 (表一) 從 23.33–86.21%, 顯然較 A 組為高, 亦呈線性關係, 死亡高峰於感染後第 18 日。

## 二、SpItNPV 及 *N. spodopterae* 之共感染

### (1) 共感染後每單日內幼蟲之死亡數

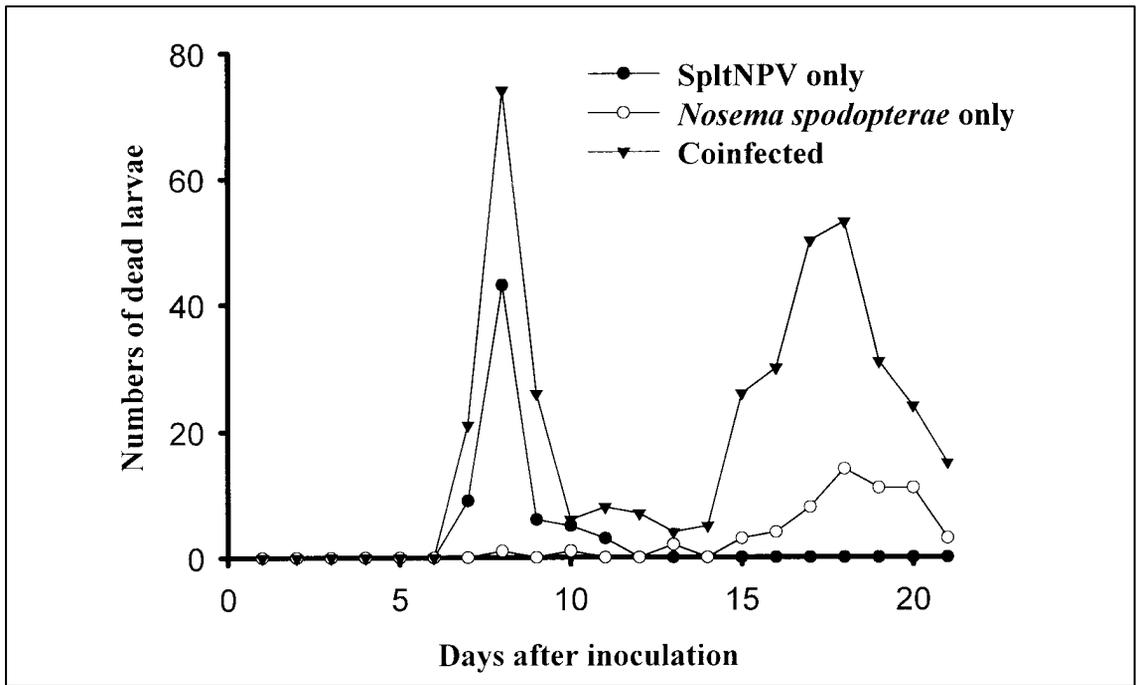
接種病原體後, 不論共感染劑量, 每單日之死亡蟲數統計如圖二所示, 可見有二高峰期, 分別位於接種後第 8 日及第 18 日。依鏡檢觀察結果, 前者之檢體內充滿病毒包涵體, 未見有孢子的存在, 因此推測致死之主要是受到 SpItNPV 感染所造成之死亡。反之, 後者之檢體只有孢子而未見病毒包涵體存在, 因此致病源主要是 *N. spodopterae*。部分檢體於鏡檢時亦發現有大量細菌夾雜在孢子之間, 應是受 *N. spodopterae* 感染後細菌所造成之二次感染的結果。所有觀察中僅有三檢體可見病毒包涵體與孢子同時存在,

分別發生於接種後第 12 日 (2 × 10<sup>4</sup> spores + 1.6 × 10<sup>4</sup> PIBs)、第 13 日 (1 × 10<sup>4</sup> spores + 2 × 10<sup>3</sup> PIBs) 及第 15 日 (1 × 10<sup>4</sup> spores + 8 × 10<sup>3</sup> PIBs), 此三瀕死之蟲體外觀呈現典型核多角體病之病徵, 但鏡檢時除病毒包涵體外亦可發現為數不少之微孢子蟲孢子。

### (2) 共感染之分析

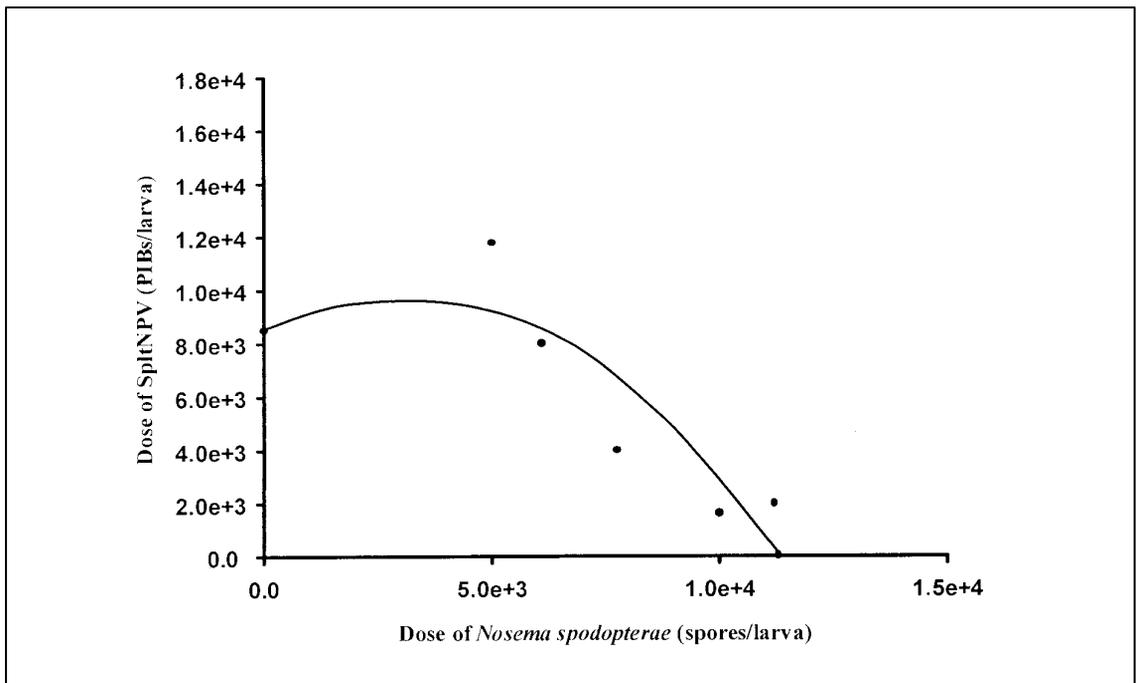
根據二項分布檢定, SpItNPV 與 *N. spodopterae* 的交互作用傾向於不相關 (independence), 但在 *N. spodopterae* 低劑量 (5 × 10<sup>3</sup> spores/larva) 時則呈拮抗現象 (表一)。死亡率觀察值 (observed mortality) 20 組資料中有 18 組低於死亡率期望值 (expected mortality), 但具有顯著性差異者僅有 4 組。其中三組 ( $p < 0.05$ ) 集中於 *N. spodopterae* 劑量為 5 × 10<sup>3</sup> spores/larva, 分別為 5 × 10<sup>3</sup> spores + 2 × 10<sup>3</sup> PIBs、5 × 10<sup>3</sup> spores + 4 × 10<sup>3</sup> PIBs 和 5 × 10<sup>3</sup> spores + 1.6 × 10<sup>4</sup> PIBs。另有一組資料則呈  $p < 0.01$  為 2 × 10<sup>4</sup> spores + 3.2 × 10<sup>4</sup> PIBs。以 Tamme 圖形所呈現的曲線比較, 本研究結果之曲線, 二病原體的交互作用傾向於拮抗和不相關之間, 在低劑量時呈現拮抗現象, 此結果與二項分布檢定的結果相仿 (圖三)。因此我們推測 *N. spodopterae* 低劑量時與 SpItNPV 為拮抗現象, 高劑量時則呈不相關現象。

(3) 各組共感染於感染後 21 日內之死亡率比較  
經病徵觀察和顯微鏡鏡檢確定真正死亡



圖二 接種病原體後每日之幼蟲死亡數。

Fig. 2. Numbers of larvae died after infected with SpltNPV, *Nosema spodopterae* or in combinations at given day.



圖三 利用 Tammes 氏 isobole 圖形分析斜紋夜蛾核多角體病毒與斜紋夜蛾微孢子蟲對斜紋夜蛾三齡幼蟲之交互作用。

Fig. 3. Tammes' s isobole interaction analysis with SpltNPV and *Nosema spodopterae* in third-instar *Spodoptera litura* larvae.

原因，由表一和圖四所示，總死亡率大多與所感染的劑量呈正相關，唯有 D 組之  $2 \times 10^4$  spores +  $3.2 \times 10^4$  PIBs 組死亡率 (60%) 與期望值差距約為 34% 之多。由圖四可知只含病毒包涵體不含孢子的幼蟲之死亡率會因孢子的劑量升高而明顯的下降。然而，高孢子高病毒包涵體劑量 (圖四 D, E) 之死亡幼蟲，則只含孢子不含病毒包涵體之死亡幼蟲較僅含包涵體不含孢子者多至 2-10 倍。但若於低孢子劑量 ( $1 \times 10^4$  spores/larva, 圖四 B-C) 時，則只含孢子不含病毒包涵體死亡之幼蟲數量相當低。圖四 C 可見在接近二種病原體  $LD_{50}$  值時 ( $1 \times 10^4$  spores +  $8 \times 10^3$  PIBs)，二種病原體所造成的死亡率比例相當。因此從圖四所示，二病原體在幼蟲體內確實有相互競爭的現象。雖然在 B 組內有 3 組合，D 組有 1 組合之死亡率與期望值呈顯著差異，但從總死亡率而言 (表一)，並未見因劑量改變而有顯著的差異。

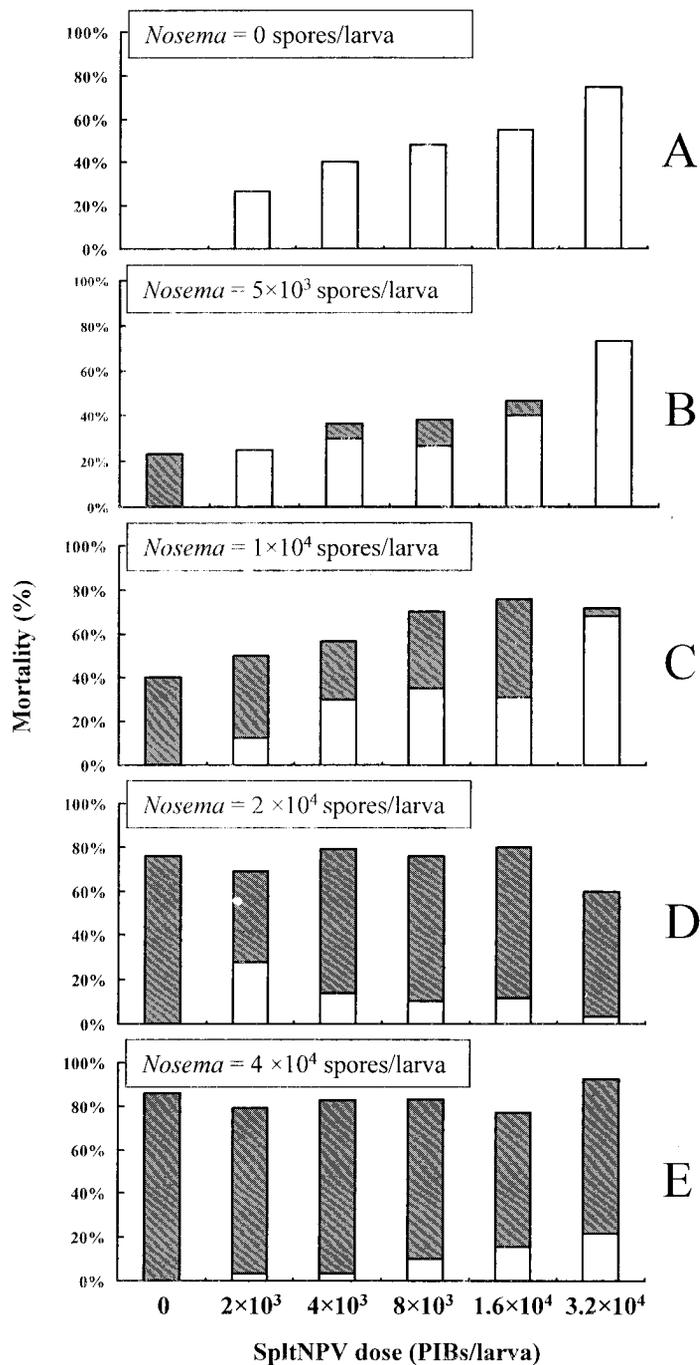
## 討 論

斜紋夜蛾而在田間採集或實驗室飼育中，常發現有核多角體病毒與微孢子蟲大量感染而導致族群數量大幅下降的現象，此二病原體被認為具有作為微生物製劑以防治此蟲的潛力。因此對此二病原體在本省已有多篇的研究報導 (Hsu *et al.*, 1991; 1992; Shih *et al.*, 1995; Tuan *et al.*, 1995)。但是這些報導之研究重點主要在個別病原體之形態特徵的闡述、感染力以及生物製劑的調配等。雖然如此，不可忽略的是在田間之罹病害蟲中，不乏有許多核多角體病毒與微孢子蟲共感染現象之罹病幼蟲的發現，但二病原體之交互作用及機制，目前尚未有國內學者涉及，因此在同一寄主體內之應用，必會影響此二

病原在生物防治上之效果，是值得深入探討的課題。

核多角體病毒及微孢子蟲隸屬不同種類的病原體，對寄主的感染亦呈現不同症狀。核多角體病毒引發的核多角體病屬系統性的感染 (systematic infection)，寄主常在 3 - 10 日內死亡，亦可能造成潛伏性感染 (Chao *et al.*, 1992); 而微孢子蟲主要是感染脂肪體，通常是引發慢性感染，若在高劑量感染下，則會引發急性感染，使中腸組織遭受嚴重的破壞而致死 (Chu and Jaques, 1979)。一般而言，昆蟲幼蟲受微孢子蟲感染之致死時間較長，甚至可成長為成蟲並產下子代。但也有發生系統性感染的例子。因此可確定的是核多角體病毒是引起急性感染而微孢子蟲較偏向慢性感染。

關於核多角體病毒與微孢子蟲兩種病原體的交互作用，Nordin and Maddox (1972) 以微孢子蟲 *Nosema* sp. 與核多角體病毒共感染 *H. cunea* 幼蟲的實驗中，認為二者之間會產生拮抗作用，其機制可能發生於：(1) 競爭中腸柱狀細胞；(2) 病毒的侵入過程受到干擾；和 (3) 病毒複製的過程受到干擾。事實上，此微孢子蟲後來被重新鑑定後，認為應屬於 *Vairimorpha* 屬而命名為 *V. necatrix* (Pillay, 1976)。進一步 Fuxa (1979) 研究 *V. necatrix* 與 *Heliothis* NPV 共感染 *He. zea* 幼蟲間的拮抗作用，而認為：(1) 兩種病原體於侵入血體腔時有干擾現象；(2) 脂肪體的競爭；和 (3) 代謝的干擾。由於 *V. necatrix* 對寄主昆蟲之致病能力較 *Nosema* 屬的種類強，於感染後 4 - 6 日即會因微孢子蟲病而死亡，殺蟲時間稍早於核多角體病毒所造成的死亡 (8 日)，因此其採用共感染第 8 日死亡率為觀察值做為統計資料。而本實驗中所使用的 *Nosema* 屬之斜紋夜蛾微孢子蟲，



圖四 微孢子蟲病與核多角體病之致死率。

Fig. 4. The mortalities of the third-instar *Spodoptera litura* larvae coinfecting with various combinations of SpltNPV and *Nosema spodopterae* showing the larvae containing PIB only, and spores only.

其對幼蟲之致死時間較長，因此本研究採用感染後第 21 日之致死率為觀察值做為統計分析。

本研究根據共感染後死亡蟲體的鏡檢結果(圖二)，發現無論是單獨感染或共感染處理，幼蟲的檢體中只含病毒包涵體者，死亡日期均在感染後 12 日前，死亡高峰則在第 8 日，而檢體中只含孢子者之死亡高峰在第 18 日左右。由此可知，共感染並未造成與病原體單獨感染之致死時間的改變。在檢出只有病毒包涵體或孢子之幼蟲中，我們並不能排除這些幼蟲未受另一種病原體的感染。但可以確定的是在第 12 日前死亡之蟲體內，核多角體病毒的感染佔優勢；相同地，12 日後死亡之蟲體則是微孢子蟲感染佔優勢。這種現象亦說明了佔優勢的病原體之感染抑制了另一種病原體的增殖與發育。

Bauer *et al.* (1998) 研究吉普賽舞蛾核多角體病毒 (*Lymantria dispar* NPV, LdNPV) 與微孢子蟲 (*Nosema* sp.) 之共感染實驗中指出，LdNPV 之感染力和致死時間並不因與微孢子蟲同時感染與否有所差異。另則，若先感染微孢子蟲後再感染 LdNPV 則有明顯的協力作用，使平均死亡時間縮短 2 日。本研究只從事二病原體同時共感染的試驗，結果與 Bauer *et al.* (1998) 相同。SplItNPV 並不影響單獨感染的致死時間，不同的是 SplItNPV 並不會完全壓制微孢子蟲的競爭(圖二)，此現象也許與寄主、病原體致病力、感染劑量，以及飼育溫度有關，真正的因素，仍有待進一步的研究以釐清。

斜紋夜蛾微孢子蟲體外培養中，發現孢子萌發後開始感染，孢質 (sporoplasm) 經極絲 (polar filament) 彈出再感染細胞，須經至少 6 日才会有新生子孢子的形成 (Wang *et al.*, 1996a)，亦即在細胞內須 6 日才能完

成一代，因此在感染後 12 天前死亡之幼蟲新生子孢子推測最多只經二次世代之增殖，未有足夠量的子孢子在幼蟲檢體可被檢出，亦有可能 12 日前死亡之幼蟲，必然是微孢子蟲發育受到 SplItNPV 的干擾而發育不完全即未有足量成熟之子孢子可共檢出，所以 12 日前幼蟲死亡因素，當然是以 SplItNPV 感染為主。感染 12 日後之死亡數量呈對數成長，但趨勢明顯較 6-8 日之死亡率為緩；相同地，8-14 日與 18-20 日之死亡數亦呈相對應的現象(圖二)，這也說明了 SplItNPV 與微孢子蟲引起寄生死亡之特性不同，微孢子蟲病引起幼蟲主要是慢性感染，因此幼蟲死亡時間分布較廣，然而 SplItNPV 則是急性感染狀況，多數幼蟲死亡集中於第 8 日。

田間常見兩種病原體共存於罹病斜紋夜蛾幼蟲的情形與本研究中只有 3 例檢體 (佔死亡幼蟲數之 0.5%) 的情況迥異。可能是於自然狀況下，蟲體先帶有一種病原體，爾後再遭受另一種病原體的感染而呈現兩種病原體共存的情形。Bauer *et al.* (1998) 作同時感染及不同時序之感染：先微孢子蟲感染後 LdNPV 感染，或先 LdNPV 感染再感染微孢子蟲，發現於共感染情形下孢子與病毒包涵體的形成皆有減少的現象。

雖然本研究未計算共感染後孢子及病毒包涵體數目，但明顯地有部份幼蟲因細菌的二次感染而使孢子的產生減少現象。由於這兩種病原體皆有垂直傳播之能力，因此由親代所獲得的病原體可能與兩種病原體共存的情形有密切的關聯。

核多角體病毒與微孢子蟲在細胞內增殖位置不同，前者位於核內，後者位於細胞質中，其中核多角體之感染途徑是經中腸細胞增殖後，以胞外病毒 (extracellular virion, ECV) 方式進入血體腔再感染其他組織，對

中腸細胞之破壞並不嚴重。微孢子蟲之感染途徑為孢子於中腸萌發之後進入中腸細胞形成營養體再進入幼蟲血體腔內，感染以脂肪體為主，再其次為肌肉組織；但若急性微孢子蟲病則中腸細胞會導致嚴重感染 (Chu and Jaques, 1979)。因此推測單獨 SpItNPV 感染並未嚴重破壞中腸細胞，但高劑量孢子感染則導致中腸細胞壞死，使腸內菌進入血腔引起敗血症而致死，這也說明了多數有菌血現象的檢體皆有孢子的存在的現象。

從事核多角體病毒與微孢子蟲共感染的研究報導並不多，此次的研究成果，可提供共感染之兩病原體互動模式的進一步研究，再加上斜紋夜蛾微孢子蟲體外培養系統已建立 (Wang *et al.*, 1996a)，兩病原體之抗體及 PCR 反應之特異性引子均已製備完成，將來可提供此二病原體組織競爭、潛伏感染，以及各種分子層次、基因控制上的研究。

## 誌 謝

本研究承農委會 90 農科 - 6.2.4 - 檢 - B 四之經費補助，以及行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所高穗生博士提供試驗昆蟲，謹誌謝忱。

## 引用文獻

- Bauer, L. S., D. L. Miller, J. V. Maddox, and M. L. McManus.** 1998. Interactions between a *Nosema* sp. (Microspora: Nosematidae) and nuclear polyhedrosis virus infecting the gypsy moth, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae). *J. Invertebr. Pathol.* 74: 147-153.
- Chao, Y. C., H. A. Wood, C. Y. Chang, H. J. Lee, W. C. Shen, and H. T. Lee.** 1992. Differential expression of Hz-1 baculovirus genes during productive and persistent viral infections. *J. Virol.* 66: 1442-1448.
- Chu, W. H., and R. P. Jaques.** 1979. Pathologie d'une microsporidiose de l'arpenreuse du chou, *Trichoplusia ni* [Lep.: Noctuidae], par *Vairimorpha necatrix*. *Entomophaga* 24: 229-235.
- Finney, D. J.** 1971. Probit Analysis. Cambridge University Press, London. 333 pp.
- Fuxa, J. R.** 1979. Interaction of the microsporidium *Vairimorpha necatrix* with a bacterium, virus, and fungus in *Heliothis zea*. *J. Invertebr. Pathol.* 33: 316-323.
- Hsu, T. H.** 1984. Studies on microsporidiosis of *Spodoptera litura* Fab. Master's thesis, Graduate Institute of Plant Pathology and Entomology, National Taiwan University. 77 pp. (in Chinese)
- Hsu, T. H., E. L. Hsu, and F. Y. Yen.** 1991. Spore ultrastructure of a microsporidian species (*Nosema* sp.) from the tobacco cutworm, *Spodoptera litura*. *Chinese J. Entomol.* 11: 242-251 (in Chinese).
- Hsu, T. H., E. L. Hsu, and F. Y. Yen.** 1992. *Nosema spodopterae* n. sp., a new species of microsporidia from the tobacco cutworm, *Spodoptera litura*. *J. Agr. Assoc., China* 157: 81-90 (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*. Ann. Rep. TACTRI. pp. 50-52 (in Chinese).
- Hwang, G. H., and T. Ding.** 1975. Studies on the nuclear polyhedrosis virus disease of the cotton leaf-worm, *Prodenia litura* F. Acta. Entomol. Sinica 18: 17-24.
- Ignoffo, C. M.** 1973. Development of a viral insecticide: concept to commercialization. Exp. Parasitol. 33: 380-406.
- Narayanan, K., and S. Jayaraj.** 1979. Occurrence of mixed infections of virus and protozoa in two species of Lepidoptera. Curr. Sci. 48: 825.
- Nordin, G. L., and J. V. Maddox.** 1972. Effects of simultaneous virus and microsporidian infections on larvae of *Hyphantria cunea*. J. Invertebr. Pathol. 20: 66-69.
- Pilley, B. M.** 1976. A new genus, *Vairimorpha* (Protozoa: Microsporida), for *Nosema necatrix* Kramer 1965: pathogenicity and life cycle in *Spodoptera exempta* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Invertebr. Pathol. 28: 177-183.
- Shih, C. J., S. S. Farn, and C. H. Wang.** 1995. Characterizations of *Spodoptera litura* nuclearpolyhedrosis virus isolated from Taiwan. Plant Prot. Bull. 37: 157-167 (in Chinese).
- Smith, G. A., M. D. Summers, and M. J. Fraser.** 1983. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. Mol. Cell. Biol. 3: 2156-2165.
- Steel R. G. D., and J. H. Torrie.** 1980. Principles and Procedures of Statistics: a Biometrical Approach, Second edition. McGraw-Hill Book Company, Auckland. 633 pp.
- Su, C. Y.** 1990. Histopathological studies of *Spodoptera litura* infected by nuclear polyhedrosis virus. Chinese J. Entomol. 10: 61-67 (in Chinese).
- Tammes, P. M. L.** 1964. Isoboles, a graphic representation of synergism in pesticides. Neth. J. Plant Pathol. 70: 73-80.
- Tanada, Y.** 1956. Some factors affecting the susceptibility of the armyworm to virus infections. J. Econ. Entomol. 49: 52-57.
- Tanada, Y.** 1959. Synergism between two viruses of the armyworm *Pseudaletia unipuncta* (Haworth) (Lepidoptera, Noctuidae). J. Insect Pathol. 1: 215-231.
- Tanada, Y., and T. Hukuhara.** 1971. Enhanced infection of a nuclear-polyhedrosis virus in larvae of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*, by a factor in the capsule of a granulosis virus. J. Invertebr. Pathol. 17: 116-126.

**Tuan, S. J., S. S. Kao, U. L. Leu, and D. J. Cheng.** 1995. Pathogenicity and propagation of *Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus isolated in Taiwan. Chinese J. Entomol. 15: 19-33 (in Chinese).

**Wang, C. H., S. J. Tsai, and C. F. Lo.**1996a. Infection and development of *Nosema liturae* (Microspora) in IPLB SF-21AE cell line. p. 689. *In*: Proceedings of XX International Congress of Entomology.

Aug. 25-31, 1996, Firenze, Italy.

**Wang, C. H., C. M. Chou, H. C. Liu, S. L. Kau, G. H. Kou, and C. F. Lo.** 1996b. Continuous cell line from pupal ovary of *Perina nuda* (Lepidoptera: Lymantriidae) that is permissive to nuclear polyhedrosis virus from *P. nuda*. J. Invertebr. Pathol. 67: 199-204.

收件日期：2001年4月9日

接受日期：2001年5月22日

# Interaction of the Microsporidium and Nucleopolyhedrovirus in *Spodoptera litura*

Shu-Jen Tsai, and Chung-Hsiung Wang\* Department of Entomology, National Taiwan University, No. 1, Sec. 4, Roosevelt Rd., Taipei 106, Taiwan, R.O.C.

## ABSTRACT

Third-instar *Spodoptera litura* larvae were infected with various combinations of polyhedral inclusion bodies (PIBs) of *S. litura* nucleopolyhedrovirus (SpltNPV) and spores of a microsporidium, *Nosema spodopterae*, by the diet surface contamination method. LD<sub>50</sub> values of SpltNPV and *N. spodopterae* to third-instar larvae of *S. litura* 21 days post-infection (incubated at 26 ± 2°C, 75–80% RH, and L:D = 12:12) were 8.51 × 10<sup>3</sup> PIBs/larva and 1.13 × 10<sup>4</sup> spores/larva, respectively. The numbers of dead larvae after coinfections with the two pathogens were counted, and two lethal peaks were found at 8 and 18 days post-infection. The dead larvae first contained PIBs only and later contained spores only. These two lethal times coincided with those of infection with SpltNPV only or *N. spodopterae* only, respectively. Only 0.5% of dead larvae contained both PIBs and spores. The results of binomial tests of accumulated mortalities reveal that antagonism between the two pathogens occurred at combinations of 5 × 10<sup>3</sup> spores with PIBs, and independence occurred especially at high spore dosages. The factor of interference existing with coinfection of SpltNPV and *N. spodopterae* needs to be elucidated in future studies.

Key words: antagonism, coinfection, *Nosema spodopterae*, *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus (SpltNPV).