



# Formosan Entomologist

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

## Boric Acid as a Synergist of *Spodoptera exigua* and *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Viruses 【Research report】

### 硼酸可做為加州苜蓿夜蛾及甜菜夜蛾核多角體病毒之生物農藥協力劑【研究報告】

Tzzy-Rong Jinn Suey-Sheng Kao, Chia-I Liu and Hsin-Yu Tseng Tzong-Yuan Wu\*  
靳子蓉 高穗生、劉佳宜、曾馨俞 吳宗遠\*

\*通訊作者E-mail: [tywu@cycu.edu.tw](mailto:tywu@cycu.edu.tw)

Received: 2004/05/12 Accepted: 2004/06/21 Available online: 2004/06/01

#### Abstract

In this study, we attempted to demonstrate the enhanced insecticide activity of boric acid on *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) and *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (SpeiMNPV). The data show that the LT50 value for third-instar *Trichoplusia ni* (T. ni) larvae was reduced from 4.1 days for AcMNPV alone to 3 days in the presence of 2% boric acid. Similarly, the LT50 value for third-instar *S. exigua* Hubner larvae was also reduced from 6.2 days for SpeiMNPV alone to 5.3 days in the presence of 2% boric acid. In addition, increasing the concentration of boric acid resulted in a significant increase in the prevalence of virus-induced mortality, although the mean time to death of larvae exposed to virus mixed with 0.5% boric acid did not significantly differ from that of larvae inoculated with AcMNPV and SpeiMNPV. The combination of AcMNPV with 1, 2 and 4% boric acid caused increases of 10, 40, and 53.4% in the mortality of third-instar T. ni larvae at 3 days after virus inoculation, respectively. The synergistic effect of boric acid on AcMNPV also acted on SpeiMNPV. The combination of SpeiMNPV with 1, 2, and 4% boric acid caused increases of 10, 30, and 50% mortality of *S. exigua* third-instar larvae at 4 days after virus inoculation, respectively. Thus, boric acid significantly enhanced the insecticide activity of AcMNPV and SpeiMNPV and acted as an effective viral synergist.

#### 摘要

本實驗探討加州苜蓿夜蛾核多角體病毒 (*Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus; AcMNPV) 和甜菜夜蛾核多角體病毒 (*Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus; Spei MNPV) 分別添加硼酸 (boric acid) 後，對擬尺蠖 (*Trichoplusia ni*) 與甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua* Hubne) 幼蟲致病力之影響。結果顯示以  $1 \times 10^8$  polyhedral inclusion bodies (PIBs)/ml 之AcMNPV加入2% 硼酸一同感染三齡擬尺蠖幼蟲後，其半致死時間 (half-lethal time; LT50) 由4.1天縮短為3天。另外，以  $1 \times 10^8$  PIBs/ml 之SpeiMNPV加入2% 硼酸一同感染三齡甜菜夜蛾幼蟲後，其LT50由6.2天縮短為5.3天。雖然，0.5% 硼酸分別與  $1 \times 10^8$  PIBs/ml 的AcMNPV和SpeiMNPV混合，其對應之三齡甜菜夜蛾和擬尺蠖幼蟲之死亡率均未有顯著之影響，但  $1 \times 10^8$  PIBs/ml 的AcMNPV與1, 2, 4% 硼酸混合後感染三齡擬尺蠖幼蟲，依1, 2, 4% 不同之硼酸濃度，三天後則分別增加了10, 40, 53.4% 的死亡率。此外， $1 \times 10^8$  PIBs/ml 的 SpeiMNPV與1, 2, 4% 硼酸混合後，感染三齡甜菜夜蛾，四天後死亡率分別比對照組增加了10, 30, 50%。綜合上述之結果，本研究證實硼酸可有效的增強AcMNPV及SpeiMNPV對擬尺蠖幼蟲和甜菜夜蛾幼蟲的致死率並縮短半致死時間，可以作為桿狀病毒生物農藥的協力劑。

**Key words:** nucleopolyhedrovirus, *Trichoplusia ni*, *Spodoptera exigua*, boric acid, viral synergist

**關鍵詞:** 核多角體病毒、擬尺蠖、甜菜夜蛾、硼酸、病毒協力劑

Full Text: [PDF \(0.69 MB\)](#)

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

# 硼酸可做為加州苜蓿夜蛾及甜菜夜蛾核多角體病毒之生物農藥協力劑

靳子蓉 中興大學生物科技研究所·行政院農委會農業藥物毒物試驗所生物藥劑組

高穗生 劉佳宜 曾馨俞 行政院農委會農業藥物毒物試驗所生物藥劑組

吳宗遠\* 中原大學生物科技系 桃園縣中壢市普忠里普仁 22 號

## 摘要

本實驗探討加州苜蓿夜蛾核多角體病毒 (*Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus; AcMNPV) 和甜菜夜蛾核多角體病毒 (*Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus; Spei MNPV) 分別添加硼酸 (boric acid) 後, 對擬尺蠖 (*Trichoplusia ni*) 與甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua* Hubne) 幼蟲致病力之影響。結果顯示以  $1 \times 10^8$  polyhedral inclusion bodies (PIBs)/ml 之 AcMNPV 加入 2% 硼酸一同感染三齡擬尺蠖幼蟲後, 其半致死時間 (half-lethal time;  $LT_{50}$ ) 由 4.1 天縮短為 3 天。另外, 以  $1 \times 10^8$  PIBs/ml 之 SpeiMNPV 加入 2% 硼酸一同感染三齡甜菜夜蛾幼蟲後, 其  $LT_{50}$  由 6.2 天縮短為 5.3 天。雖然, 0.5% 硼酸分別與  $1 \times 10^8$  PIBs/ml 的 AcMNPV 和 SpeiMNPV 混合, 其對應之三齡甜菜夜蛾和擬尺蠖幼蟲之死亡率均未有顯著之影響, 但  $1 \times 10^8$  PIBs/ml 的 AcMNPV 與 1, 2, 4% 硼酸混合後感染三齡擬尺蠖幼蟲, 依 1, 2, 4% 不同之硼酸濃度, 三天後則分別增加了 10, 40, 53.4% 的死亡率。此外,  $1 \times 10^8$  PIBs/ml 的 SpeiMNPV 與 1, 2, 4% 硼酸混合後, 感染三齡甜菜夜蛾, 四天後死亡率分別比對照組增加了 10, 30, 50%。綜合上述之結果, 本研究證實硼酸可有效的增強 AcMNPV 及 SpeiMNPV 對擬尺蠖幼蟲和甜菜夜蛾幼蟲的致死率並縮短半致死時間, 可以作為桿狀病毒生物農藥的協力劑。

**關鍵詞**：核多角體病毒、擬尺蠖、甜菜夜蛾、硼酸、病毒協力劑

## 前言

在 1973 年世界衛生組織及農糧組織 (WHO-FAO) 聯合會議中認定昆蟲核多角體病毒可作為有效且安全的微生物殺蟲劑, 其特

性為寄主的專一性高且對天敵安全、不感染人類和植物、不污染環境也不引發寄主抗藥性, 並且能在害蟲族群中形成流行病, 而達到長期控制害蟲的目的。雖然核多角體病毒具有上述安全與環保的特質, 但核多角體病毒目前於田

\*論文聯繫人  
e-mail: tywu@cycu.edu.tw

間運用並不普及，除生產成本高外尚有二大主因：1. 病毒的寄主範圍太窄，故無法以一種病毒有效防治多種害蟲。2. 病毒進入蟲體後，必須經過數天才會使蟲體發病死亡感染過程中仍會繼續取食因而危害作物造成損失 (Boucias *et al.*, 1980)。近年來由於分子生物及遺傳工程技術的蓬勃發展，在擴大感染宿主範圍與致死效率的增益上均已具有相當豐碩的進展及成果，但礙於田間風險評估上的限制，目前尚無法將已成功基因改造之重組病毒落實運用於田間。因此，尋找安全、有效的病毒協力劑 (synergists)，將是目前增進核多角體病毒作為生物農藥實用價值的另一重要研究課題。

在過去相關的研究中，已有使用化學藥品增強細菌類、真菌類和病毒類等生物性製劑致病力的文獻報導 (Benz, 1971; Govindarajan, 1976; Chaudhari, 1992)。在增進核多角體病毒的致病力上的化學藥劑已知醯胺類界面活性劑 (acrylamine cationic detergent) 可有效的增強栗夜盜蛾核多角體病毒 (*Pseudaletia unipuncta* NPV) 對栗夜盜蛾的毒性 (Yamamoto and Tanada, 1980)，而硼酸及其鹽類如硼酸鈉則可降低舞蛾核多角體病毒 (*Lymantria dispar* NPV) 之 LC<sub>50</sub> (Shapiro and Bell 1982)，而其它的化學藥劑如卵磷脂 (lecithin)、螢光增白劑 (leucophor) 及螢光增亮劑 (fluorescent brightener) 和 Tinopal CBS 光學增亮劑 (optical brightener) 亦被證實能有效降低核多角體病毒的 LT<sub>50</sub> 及 LC<sub>50</sub> (Shapiro and Bell, 1992; Goulson *et al.*, 2000)。上述之化學藥劑以硼酸被應用為生物殺蟲劑的佐劑或協力劑最為廣泛，其是一低毒性、不具揮發性的安全化學物質，1948 年即被登記為殺蟲劑，1993 年市面上已有 189 種登記的殺蟲劑中含有硼酸 (U. S. EPA., 1993)。硼酸在殺蟲的活性上已普遍

應用在螞蟻 (ants)、蜚蠊 (roaches)、蟋蟀 (crickets)、白蟻 (termites) 和衣魚 (silverfish) 等有害昆蟲的防治上 (Hooper *et al.*, 1999; Klotz *et al.*, 1996, Klotz *et al.*, 1997; Patricia and Jaramillo, 2003)。此外硼酸亦已證實具有抗真菌 (fungicidal) 和殺草劑 (herbicidal) 之活性。

擬尺蠖 (*Trichoplusia ni*) 與甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua* Hubne) 為常見之田間害蟲，而甜菜夜蛾幼蟲在台灣更是危害瓜類、豆類、蕃茄、甘藍及白菜等重要經濟作物之農業害蟲，尤因其對化學農藥已普遍產生抗藥性在防治上有相當高的難度而該蟲以 SpeiMNPV 防治時，致死的時間長，約需 5-7 天。而室內生物檢定已證實斜紋夜蛾核多角體病毒、秋行軍蟲核多角體病毒與硼酸混合之劑型，較單獨施用病毒更能有效的控制斜紋夜蛾及秋行軍蟲之幼蟲 (Govindarajan, 1976; Cisneros *et al.*, 2002)。因此，本研究探討硼酸對增益加州苜蓿夜蛾核多角體病毒 (*Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus; AcMNPV) 和甜菜夜蛾核多角體病毒 (*Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus ; Spei MNPV) 分別在擬尺蠖與甜菜夜蛾幼蟲致病力之影響。結果顯示硼酸可有效的增強 AcMNPV 及 SpeiMNPV 對擬尺蠖幼蟲和甜菜夜蛾幼蟲的致死率並縮短半致死時間，進而達到增強殺蟲效率之目的。

## 材料與方法

### 一、擬尺蠖及甜菜夜蛾之大量飼育

購自美國亞培 (Abbott) 的擬尺蠖及至台灣嘉南地區田間採集的甜菜夜蛾，以人工飼料繼代飼育 (Hung and Hwang, 1988)，並以 20% 蜂蜜水餵飼成蛾。每十對成蛾置於一產卵

箱內進行交尾產卵，卵塊經 5% 福馬林溶液浸泡 15 分鐘後，以自來水淋洗 15 分鐘，進行卵表面之消毒。卵孵化後置於裝有人工飼料之布丁杯中集體飼育，至三齡即分別單隻飼養，以防止幼蟲自相殘食及因飼育密度高而引發蟲體罹病。生長箱條件為  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，12L: 12D， $65\pm 5\%$  RH。

## 二、增殖及純化核多角體病毒包含體

將分別由甜菜夜蛾及擬尺蠖幼蟲，分離取得之 SpeiNPV 和 AcMNPV 包含體 (polyhedral inclusion bodies; PIBs) 分別餵食感染三齡或四齡甜菜夜蛾及擬尺蠖的幼蟲。將收集來的病蟲加入適量的 1 x TE 緩衝劑 (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5)，研磨，經二層紗布過濾，濾液先以 1000 rpm， $10^{\circ}\text{C}$  離心 15 分鐘，除去細胞碎片，懸浮液再以 3000 rpm， $10^{\circ}\text{C}$  離心 20 分鐘，沉澱物，再以 1 x TE 緩衝劑沖散，此即是含核多角體的懸浮液，以 35~56% (w/w) 蔗糖密度階梯離心，74,000 xg， $4^{\circ}\text{C}$  離心 30 分鐘後，收集所有核多角體集中帶，並加入二次蒸餾水稀釋 3 倍，然後用 3500 rpm，30 分鐘將它沈澱下來，即得純化的 SpeiMNPV 及 AcMNPV 之核多角體包含體。

## 三、核多角體病毒包含體計數

將由蟲體純化而來的核多角體，以 5000 rpm、離心 5 min，將 PIBs 沉降，最後以 1x PBS 溶液回溶。取 10  $\mu\text{l}$  至血球計數器，放置於光學顯微鏡下，計數 PIBs 數目，並推算出 PIBs 的密度。

## 四、硼酸添加劑協力病毒包含體之生物檢定

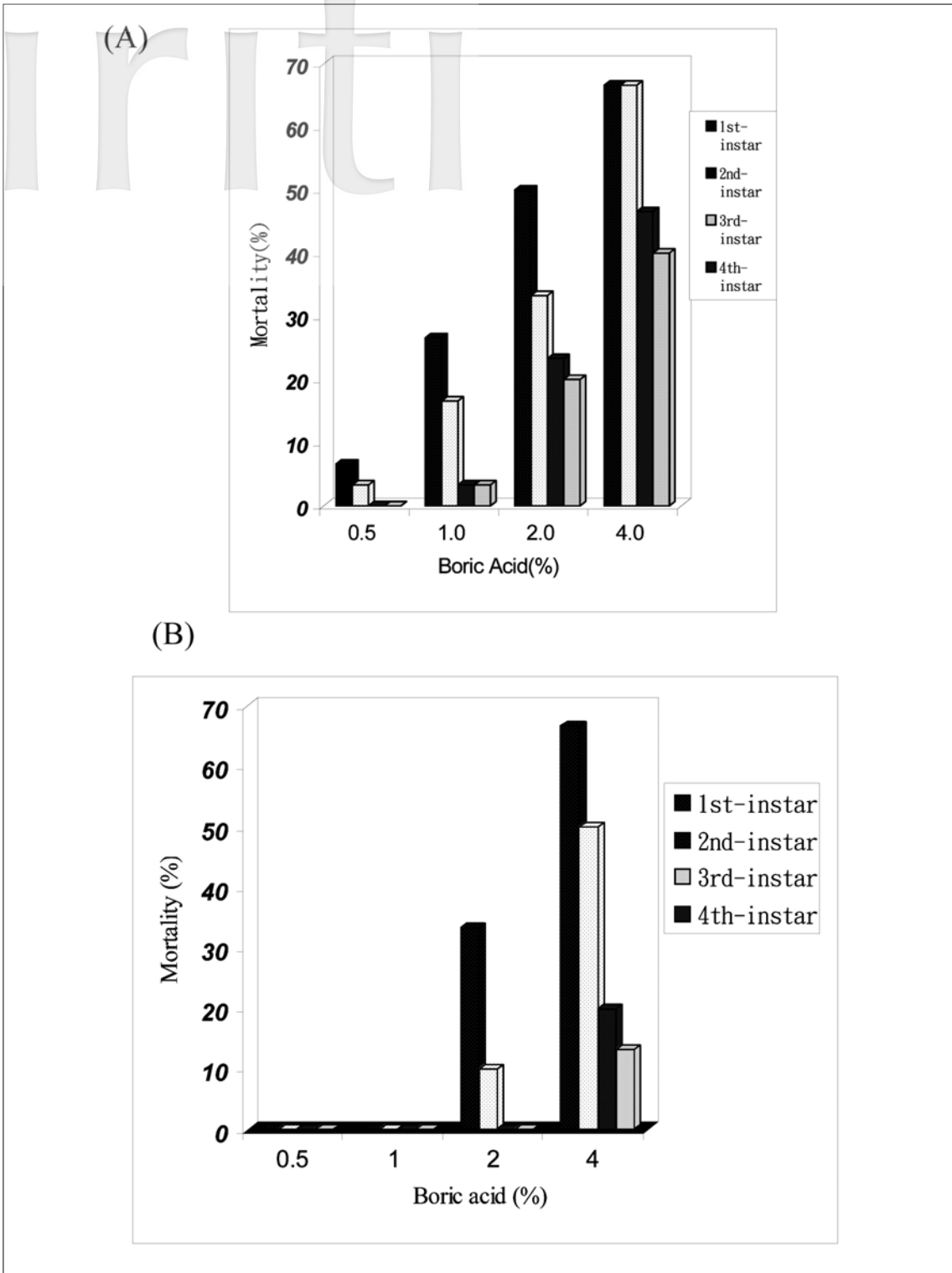
以飼料表面污染法進行病毒 PIBs 對蟲體的感染試驗，簡述如下：先將飼料塊 (每個直

徑 7 mm  $\times$  高 10 mm) 分別置於 30 孔培養盤中，再以 15  $\mu\text{l}$  之病毒液 (病毒濃度為  $10^8$  PIBs/ml) 均勻滴於人工飼料塊上，待病毒懸浮液滲透完全並稍陰乾後再單隻接入供試蟲 (先經飢餓處理 6 小時)，而以 15  $\mu\text{l}$  無菌二次水滴於人工飼料塊上作為對照組。病毒液中另添加至 0.5, 1, 2 和 4 % 等不同濃度的硼酸，每試驗組處理 30 隻幼蟲。經上述步驟處理後之幼蟲置於  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、光照 12L: 12D、溼度  $65\pm 5\%$  RH 之恆溫生長箱中，並於接種後三天更換新鮮無病毒之飼料，每天紀錄供試蟲之幼蟲死亡率，並利用 SAS 統計軟體分析  $LT_{50}$ 。(以上不同之試驗，均於不同時間進行，每組試驗至少重複三次)

## 結 果

### 一、硼酸對擬尺蠖及甜菜夜蛾幼蟲之毒性測試

分別將 0.5、1、2 和 4% 硼酸餵食 1~4 齡擬尺蠖幼蟲及 1~4 齡甜菜夜蛾幼蟲，7 天後幼蟲之死亡率如圖一(A)和圖一(B)所示，硼酸的致死效率隨著甜菜夜蛾及擬尺蠖幼蟲齡期的降低而增加，幼蟲的死亡率亦隨著硼酸濃度的增加而增加。尤其，當以 4% 高濃度的硼酸處理 1~2 齡的甜菜夜蛾及 1~4 齡的擬尺蠖幼蟲時較低濃度硼酸處理時，提前加速幼蟲死亡的時間，因此 4% 硼酸對 1~4 齡的擬尺蠖幼蟲和 1~2 齡的甜菜夜蛾幼齡均具有毒殺的效果 (圖一 A、圖一 B)。以 0.5-1% 的硼酸除對 1 齡和 2 齡之擬尺蠖幼蟲有少許的毒性外，對 3 齡和 4 齡之擬尺蠖幼蟲並無任何顯著的致死毒性。進一步的分析顯示將 3 齡之擬尺蠖幼蟲，分別處理 1, 2 和 4% 硼酸，7 天後之化蛹率則分別平均降低了 10, 30 和 81%，因此硼酸雖對 3 齡和 4 齡之擬尺蠖幼蟲並無任何顯著的致死毒性，卻影響了擬尺蠖幼蟲的生長速率及化蛹



圖一 硼酸對擬尺蠖(A)及甜菜夜蛾(B)幼蟲之毒性測試

Fig. 1. Toxicity of boric acid tested on *Trichoplusia ni* (A) and *Spodoptera exigua* Hubne (B) larvae.

Table 1. LT<sub>50</sub> of AcMNPV with boric acid on *Trichoplusia ni* larvae

Treatment	*Mean LT <sub>50</sub> (day) ± SD (n = 4)			
	1 <sup>st</sup> instar	2 <sup>nd</sup> instar	3 <sup>rd</sup> instar	4 <sup>th</sup> instar
AcMNPV	3.17±0.58	3.31±0.19	4.15±0.63	4.91±0.15
AcMNPV with 0.5% boric Acid	2.94±0.74	3.20±0.24	3.96±0.69	4.96±0.74
AcMNPV with 1% boric Acid	2.67±0.43	2.99±0.57	3.48±0.76	4.06±0.59
AcMNPV with 2% boric Acid	2.46±0.56	2.74±1.0	3.03±0.75	3.79±0.56
AcMNPV with 4% boric Acid	2.26±0.62	2.35±0.56	2.52±0.48	3.11±0.58

\*LT<sub>50</sub>'s correlation with the concentration of boric acid in this test was  $r^2=0.90$ ,  $P<0.05$

率。與擬尺蠖幼蟲相較之下，甜菜夜蛾幼蟲則明顯的對硼酸此化學物質有較高的耐受性，1~4 齡甜菜夜蛾對 0.5、1 和 2% 的硼酸處理，均無明顯的致死毒性。只有當以高濃度 4% 硼酸處理時，才出現較高的毒性致死的情形 (圖一 B)。但硼酸同樣會影響甜菜夜蛾幼蟲之生長，以 1, 2 和 4% 硼酸處理 3 齡甜菜夜蛾，7 天後活蟲之平均體重與對照組 (無菌二次水) 比較，每隻幼蟲分別平均降低了 16, 26 和 73 mg。

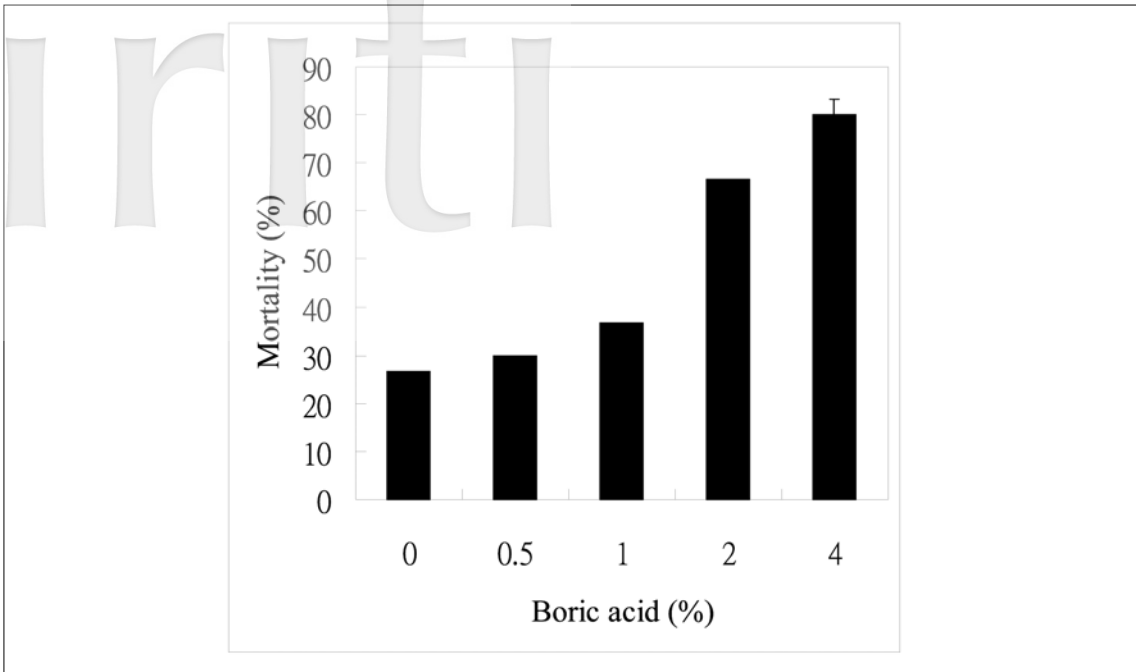
## 二、添加硼酸對加州苜蓿夜蛾核多角體病毒 (AcMNPV) 感染擬尺蠖幼蟲致死率之影響

以半致死時間(LT<sub>50</sub>)和死亡率(mortality)做為評估硼酸增進 AcMNPV 對擬尺蠖幼蟲致死效率的影響。將 0.5、1、2 和 4% 硼酸與  $1 \times 10^8$  PIBs/ml 之 AcMNPV 混合後，感染 1 至 4 齡擬尺蠖幼蟲，其 LT<sub>50</sub> 明顯較無添加硼酸之試驗組縮短，結果如表一所示。以 3 齡擬尺蠖之幼蟲為例，當以  $1 \times 10^8$  PIBs/ml 的 AcMNPV 混合硼酸感染時，其 LT<sub>50</sub> 可伴隨著 0.5、1、2、4% 硼酸的加入由 4.2 天分別降低為 4.0、3.5、3.0 和 2.5 天。由上述的實驗結果可知當伴隨處理 0.5% 的硼酸時並沒有顯著

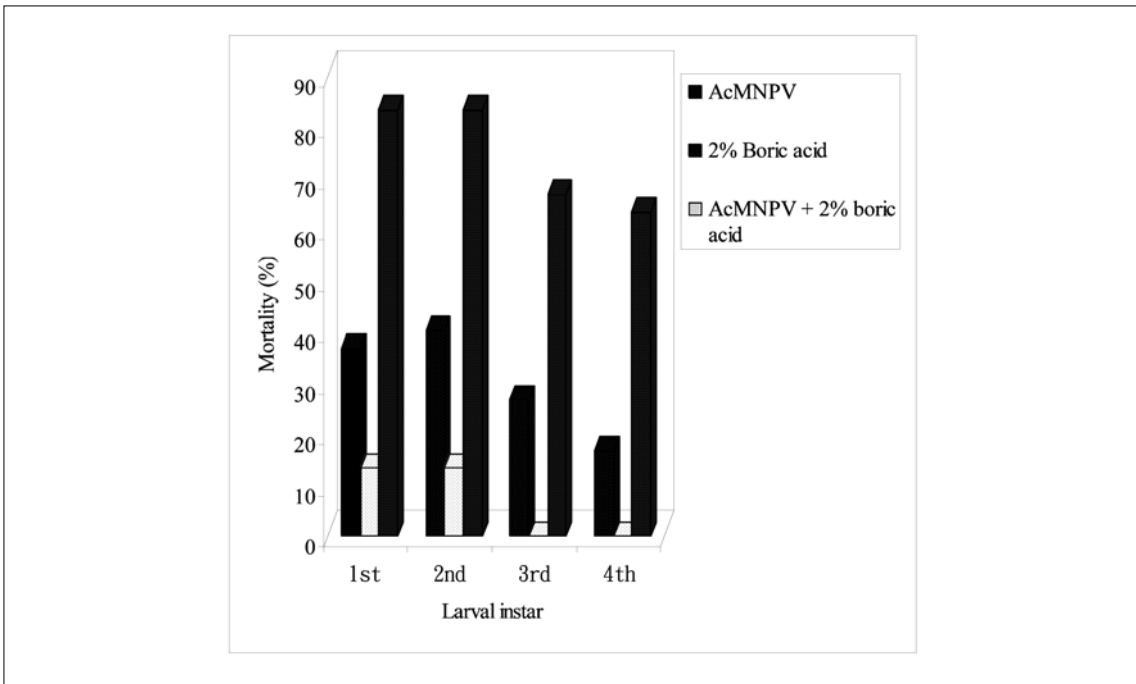
的提高 AcMNPV 對擬尺蠖幼蟲的致死效率，但隨著硼酸的濃度的升高，則可提高殺蟲效果。以三齡的擬尺蠖幼蟲為例，當 AcMNPV 伴隨 1、2、4% 的硼酸處理時，三天後分別可增加 10、40、53% 的死亡率 (圖二)。因此，證實硼酸可有效增強 AcMNPV 的殺蟲效率。因目前所有硼酸在農業相關的應用文獻報導，均未指出 4% 硼酸在應用上對自然界生態環境是安全可使用的濃度，而由圖二中顯示以 2% 的硼酸做為協力劑時即可達到 4% 硼酸作用效果的四分之三強。因此擬再以 2% 硼酸混合  $1 \times 10^8$  PIBs/ml 之 AcMNPV 分別感染 1~4 齡擬尺蠖幼蟲並於感染後第三天計算其死亡率，結果顯示 2% 硼酸的添加可比 AcMNPV 單獨處理 1 至 4 齡擬尺蠖幼蟲分別增加了 46.7、43.3、40.0 和 26.0% 的死亡率 (圖三)。故 2% 硼酸的添加確實可以降低 AcMNPV 擬尺蠖幼蟲的 LT<sub>50</sub> 及加速其致死效率而作為 AcMNPV 防治擬尺蠖的有效協力劑。

## 三、硼酸對甜菜夜蛾核多角體病毒 (SpeiMNPV) 感染甜菜夜蛾幼蟲死亡率之影響

我們進一步探討硼酸是否亦可增益 SpeiMNPV 對感染甜菜夜蛾幼蟲之致死效



圖二 比較不同濃度硼酸與 AcMNPV 一同感染三齡擬尺蠖三天後之致死率  
 Fig. 2. Enhancement of mortality by different concentrations of boric acid with AcMNPV on third instar *Trichoplusia ni* larvae.



圖三 2%硼酸對 AcMNPV 感染不同齡期擬尺蠖幼蟲死亡率之影響  
 Fig. 3. Effect on mortality of *Trichoplusia ni* larvae of AcMNPV with 2% boric acid.

Table 2. LT<sub>50</sub> of SpeiMNPV with boric acid on *Spodoptera exigua* Hubne larvae

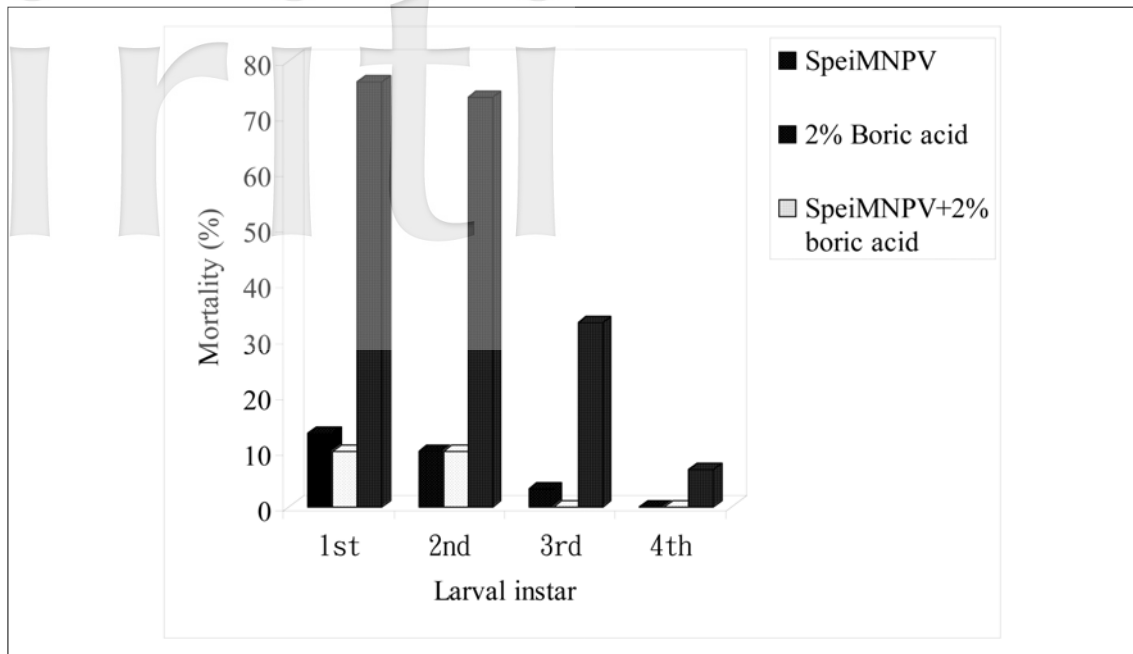
Treatment	*Mean LT <sub>50</sub> (day) ± SD (n = 4)		
	1 <sup>st</sup> instar	2 <sup>nd</sup> instar	3 <sup>rd</sup> instar
AcMNPV	4.4±0.44	5.24±0.33	6.24±0.27
AcMNPV with 0.5% boric Acid	4.4±0.44	4.42±0.14	5.53±0.26
AcMNPV with 1% boric Acid	3.9±1.00	3.82±0.13	5.50±0.26
AcMNPV with 2% boric Acid	3.5±0.40	3.00±0.31	5.27±0.26
AcMNPV with 4% boric Acid	2.92±0.70	2.51±0.82	4.04±0.74

\*LT<sub>50</sub>'s correlation with the concentration of boric acid in this test was  $r^2=0.86$ ,  $P<0.05$

率。將 0.5、1、2 和 4% 硼酸與  $1 \times 10^8$  PIBs/ml 之 SpeiMNPV 混合後，感染 1 至 3 齡甜菜夜蛾幼蟲，其 LT<sub>50</sub> 之統計值如表二所示。當感染三齡之該幼蟲其 LT<sub>50</sub> 可伴隨著 1、2、4% 硼酸的加入由 5.8 天降低為 5.5、5.2 和 4.1 天（表二）。因 4 齡甜菜夜蛾幼蟲對硼酸的抗性高（圖一 B）且對 SpeiMNPV 感染之抗性亦強，經實驗 7 天死亡率均無超過 50%，故無法計算其 LT<sub>50</sub>。當以  $1 \times 10^8$  PIBs/ml 之 SpeiMNPV 混合 2% 硼酸，感染 1 至 4 齡甜菜夜蛾幼蟲於第 4 天時，分別比 SpeiMNPV 單獨感染時增加了 58、53、30 和 6.6% 的死亡率（圖四），顯示 2% 硼酸會增加 SpeiMNPV 對 1~3 齡甜菜夜蛾幼蟲的死亡率但對四齡之甜菜夜蛾幼蟲則似乎無明顯的效果。進一步的分析顯示 SpeiMNPV 單獨感染四齡甜菜夜蛾幼蟲於第七天時僅有 6.6% 的死亡率，但當添加 2% 硼酸處理後，持續感染至第七天時則可增加 23.4% 的死亡率，故 2% 硼酸的添加在 SpeiMNPV 感染 1 至 3 齡甜菜夜蛾幼蟲第四天時可明顯增加 1~3 齡甜菜夜蛾幼蟲對 SpeiMNPV 的感受性，但 2% 硼酸對 4 齡甜菜夜蛾幼蟲對 SpeiMNPV 的感受性則要至感染後的第七天才較顯著。

## 討 論

核多角體病毒是當前和未來生物農藥發展的重要生物製劑之一。但由於核多角體病毒的寄主範圍較為專一，故相對的殺蟲範圍較窄而且致死時間長，使得農民不太願意使用來防治害蟲，因此如何適當提高核多角體病毒殺蟲劑之殺蟲效率，是讓核多角體病毒落實田間運用的重要關鍵之一。本試驗嘗試加入硼酸為核多角體病毒的協力劑，以加強 AcMNPV 和 SpeiMNPV 的殺蟲效率。依據前人之研究，1976 年 Govindarajan 即證實硼酸與斜紋夜蛾核多角體病毒 (*Spodoptera litura* NPV; SpltMNPV) 混合後，可有效的控制斜紋夜蛾幼蟲，於 1992 年 Chaudhari 更進一步證實硼酸還可降低 SpltMNPV 在防治斜紋夜蛾時的 LC<sub>50</sub>。室內生物檢定亦證實硼酸能加強黎豆夜蛾核多角體 (*Anticarsia gemmatalis* NPV) 的殺蟲效果 (Morales *et al.*, 1997)，最近 Cisneros 等人 (2002) 更進一步證實將硼酸與秋行軍蟲核多角體病毒混合後，施灑至墨西哥中南部 (Morelos) 的玉米田間，發現可有效的控制田間的秋行軍蟲幼蟲。硼酸除會增強上述核多角體病毒對鱗翅目昆蟲的殺蟲效果外，也有實驗證明硼酸會增加蘇力菌對吉普賽



圖四 2%硼酸對 SpeiMNPV 感染甜菜夜蛾幼蟲死亡率影響

Fig. 4. Effect on the mortality of *Spodoptera exigua* Hubne larvae of SpeiMNPV with 2% boric acid.

蛾 (*Porthetria dispar*) 的致病力 (Doane and Walli, 1964)。由於 AcMNPV 對擬尺蠖幼蟲有特別高的致病力 (Tuan *et al.*, 1997)，故本試驗採用擬尺蠖作為評估 AcMNPV 殺蟲效益之測試蟲，當  $1 \times 10^8$  PIBs/ml 感染 1、2 齡之擬尺蠖幼蟲時，於處理後的第四天可達到 90% 以上的死亡率 (data not shown)，此結果與 Tuan *et al.*, (1997) 的研究報告相同。而當此 1、2 齡擬尺蠖幼蟲隨著硼酸的加入及濃度的增加，其每日的死亡率亦會隨之增加。但，3、4 齡的擬尺蠖幼蟲對硼酸的敏感度則不如 1、2 齡擬尺蠖幼蟲，當 AcMNPV 伴隨處理 0.5% 的硼酸時並沒有顯著的提高殺蟲效果，但若提高硼酸的濃度時，則就可提高殺蟲效果。以三齡的擬尺蠖幼蟲為例，當 AcMNPV 伴隨 1、2、4% 的硼酸處理時，三天後分別可增加 10、40、53.4% 的死亡率 (圖二)。因此，證實硼酸可有效增強

AcMNPV 的殺蟲效率。

相較之下，因甜菜夜蛾幼蟲對硼酸有較高的耐受性 (圖一 B)，此可解釋為何當硼酸協同 SpeiMNPV 處理甜菜夜蛾幼蟲時，其效果不似處理擬尺蠖幼蟲時顯著，且只有對幼齡(1~2 齡)的甜菜夜蛾才具有顯著殺蟲效果，對 3~4 齡之幼蟲，需高濃度 4% 硼酸處理下，才可明顯增益 SpeiMNPV 對甜菜夜蛾幼蟲之感染率。但目前所有硼酸在農業相關的應用文獻報導，均未指出 4% 硼酸在應用上對自然界生態環境是安全可使用的濃度。因此，必須提高 SpeiMNPV 的使用濃度及劑量，才可能達到以低濃度硼酸，如 2%；增益 SpeiMNPV 的殺蟲效果。

硼酸及它的鹽類自從 1860 年開始就被醫學上用來當殺菌劑及抗真菌劑，並使用在防腐的用途上。已知硼酸的殺蟲機制乃是由於硼酸本身對螞蟻、蜚蠊、蟋蟀、白蟻、衣魚等昆蟲

的消化道有破壞之毒性 (stomach poison), 進而達到殺蟲的效果 (Hooper-Bui and Rust, 1999; Quarles, 2001), 此外, 硼酸亦有可能造成昆蟲的外骨骼受到磨蝕。故推測硼酸會增強核多角體病毒的殺蟲效果可能是因硼酸會破壞腸道的周食膜 (peritrophic membrane) 和內壁 (lining), 因此會使病毒能便捷的入侵昆蟲之血體腔, 進而增進了核多角體病毒對昆蟲細胞的感染機率及效果。經毒性及致癌性測試後, 於 1993 年 EPA 已公佈將硼酸分類為 E 群、非致癌原 (non-carcinogenicity), 故硼酸對人類是一安全的化學藥劑。另在生態上硼酸對鳥類、魚類和水生動物亦均無毒性。在農業上, 硼酸已被使用在農作物及果園, 作為殺蟲、除草、抗真菌之用, 同時已知硼酸鹽 (borates) 可提供一些農作物例如: 甜菜、高麗菜等嗜硼作物 (boron-loving crops) 的養分供給。所以, 綜合硼酸特性, 將其應用在農業上將十分合乎目前政府所提倡之農業綜合管理 (integrated pest management) 之目標。

雖然在斜紋夜蛾細胞培養液中添加 1% 硼酸會導致細胞死亡 (Shih and Lee, 1998)。但以 1% 硼酸對斜紋夜蛾幼蟲進行處理時, 發現其對幼蟲的生長並不產生影響, 幼蟲仍可正常化蛹 (Shih and Lee, 1998), 於本試驗進行 1% 硼酸處理 3 齡之斜紋夜蛾及玉米穗蟲 (*Helicoverpa armigera*) 亦得到同樣的結論。於 2002 年 Cisneros 由室內生物檢定結果 1-2% 硼酸對秋行軍蟲幼蟲並無顯著毒性, 同時並將它施灑至玉米田間, 並不會減少該處之自然天敵及非目標昆蟲, 只會對一些非目標的節肢動物有些微影響, 推測 2% 硼酸並不會破壞生態上的平衡。且由本試驗亦證實了 2% 硼酸可有效的增強 AcMNPV 及 SpeiMNPV 分別對擬尺蠖及甜菜夜蛾幼蟲的每日致死率 and

縮短  $LT_{50}$  的時間, 故 2% 硼酸可達到增強 AcMNPV 和 SpeiMNPV 殺蟲效率之目的, 因此利用 2% 硼酸作為核多角體病毒的協力劑, 可節省 AcMNPV 和 SpeiMNPV 未來應用於田間時的使用量而降低 AcMNPV 和 SpeiMNPV 應用時的生產成本。因此, 硼酸應可增強 AcMNPV 和 SpeiMNPV 在生物農藥上的經濟效益。

## 誌 謝

本研究承農業藥物毒物試驗所黃麗欣助理研究員, 提供統計上之卓見及行政院農委會委託計畫 92 農科-4.2.3-糧-Z2 之補助, 使得本研究可順利完成, 謹致謝忱。

## 引用文獻

- Benz, G.** 1971. Synergism of microorganisms and chemical insecticides. pp.327-355. In : Burges, H. D. and Hussey, N. W. eds. Microbial control of insects and mites. Academic Press, London.
- Boucias, D. G., D. W. Johnson, and G. E. Allen.** 1980. Effects of host age, virus dosage, and temperature on the infectivity of a nucleopolyhedrosis virus against velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, larvae. Environ. Entomol. 9: 59-61.
- Chaudhari, S.** 1992. Formulation of nuclear polyhedrosis virus of *Spodoptera litura* with boric acid. Indian J. Ent. 54(2): 202-206.
- Cisneros, J.** 2002. Formulation of a

- nucleopolyhedrovirus with boric acid for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize. *Bio. Control* 23: 87-95.
- Doane, C. C., and R. C. Wallis.** 1964. Enhancement of the action of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner on *Porthetria dispar* (Linnaeus) in laboratory test. *J. Invert.Pathol.* 6: 423-429.
- Goulson, D., A.-M. Martinez, W. O. H. Hughes, and T. Williams.** 2000. Effects of optical brighteners used in biopesticide formulations on the behavior of pollinators. *Bio. Control.* 19: 232-236.
- Govindarajan, R.** 1976. Mortality of the tobacco caterpillar, *Spodoptera litura* (F.) when treated with *Bacillus thuringiensis* combinations with boric acid and insecticides. *Phytoparasitica* 4(3): 193-196.
- Hooper-Bui, L., and M. K. Rust.** 1999. Oral toxicity of abmectin, boric acid, fipronil, and hydramethylnon to laboratory colonies of argentine ants (Hymenoptera: Formicidae). *J. Econ. Entomol.* 93: 858-864.
- 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, Taipei, Taiwan pp.50-52. (In Chinese)
- Klotz, J., K. Vail, and D. Williams.** 1997. Toxicity of a boric acid-sucrose water bait to *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *J. Econ. Entomol.* 90: 488-491.
- Klotz, J. H., D. H. Oi, K. M. Vail, and D. F. Williams.** 1996. Laboratory evaluation of a boric acid liquid bait on colonies of *Tapinoma melanocephalum*, Argentine ants and Pharaoh ants (Hymenoptera: Formicidae). *J. Econ. Entomol.* 89: 673-677.
- Morales, L., F. Moscardi, Sosa-Gomez, D. R., Paro, F. E., and I. L. Soldorio.** 1997. Enhanced activity of *Anticarsia gemmatilis* Hub. (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus by boric acid in the laboratory. *Ann. Soc. Entomol.* 88: 815-824.
- Patricia U. C. and G. I. Jaramillo.** 2003. Effects of boric acid, fipronil, hydramethylnon, and diflubenzuron baits on colonies of ghost ants (Hymenoptera: Formicidae). *J. Econ. Entomol.* 96 (3): 856-862.
- Quarles, W.** 2001. Boric acid, borates and household pests. *IPM Practitioner.* 23(3): 1-12. Bio-integral Research Center, Berkeley, CA.
- 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 M. R. Bell.** 1982. Enhanced effectiveness of *Lymantria*

*dispar* NPV formulated with boric acid. Ann. Ent. Soc. Am. 75(3): 345-349.

**Shih, C. J., and S. T. Lee.** 1998. Enhancement effects of chemical additives on the virulence of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus. Chinese J. Entomol. 18: 273-283.

**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.

**U. S. EPA.** 1993. Boric acid. R.E.D. Facts. Office of Pesticide Programs, Washington, DC.

**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 unipuncta*. Virology 107: 434-440.

收件日期：2004年5月12日

接受日期：2004年6月21日

# Boric Acid as a Synergist of *Spodoptera exigua* and *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Viruses

Tzyy-Rong Jinn Institute of Biotechnology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan 402, R.O.C.

Suey-Sheng Kao, Chia-I Liu and Hsin-Yu Tseng Biopesticides Division, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Taichung, Taiwan 413, R.O.C.

Tzong-Yuan Wu\* Department of Bioscience Technology, Chung Yuan Christian University, Chungli, Taiwan 320, R.O.C.

## ABSTRACT

In this study, we attempted to demonstrate the enhanced insecticide activity of boric acid on *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) and *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (SpeiMNPV). The data show that the  $LT_{50}$  value for third-instar *Trichoplusia ni* (*T. ni*) larvae was reduced from 4.1 days for AcMNPV alone to 3 days in the presence of 2% boric acid. Similarly, the  $LT_{50}$  value for third-instar *S. exigua* Hubner larvae was also reduced from 6.2 days for SpeiMNPV alone to 5.3 days in the presence of 2% boric acid. In addition, increasing the concentration of boric acid resulted in a significant increase in the prevalence of virus-induced mortality, although the mean time to death of larvae exposed to virus mixed with 0.5% boric acid did not significantly differ from that of larvae inoculated with AcMNPV and SpeiMNPV. The combination of AcMNPV with 1, 2 and 4% boric acid caused increases of 10, 40, and 53.4% in the mortality of third-instar *T. ni* larvae at 3 days after virus inoculation, respectively. The synergistic effect of boric acid on AcMNPV also acted on SpeiMNPV. The combination of SpeiMNPV with 1, 2, and 4% boric acid caused increases of 10, 30, and 50% mortality of *S. exigua* third-instar larvae at 4 days after virus inoculation, respectively. Thus, boric acid significantly enhanced the insecticide activity of AcMNPV and SpeiMNPV and acted as an effective viral synergist.

**Key words:** nucleopolyhedrovirus, *Trichoplusia ni*, *Spodoptera exigua*, boric acid, viral synergist