

昆蟲桿狀病毒殺蟲劑之研究：生物技術之應用

王重雄、蔡璧妃、蔡恕仁
國立臺灣大學植物病蟲害學系

摘要：昆蟲病毒中，以含雙股環狀 DNA 基因組之桿狀病毒最具有應用於生物防治之潛力，其優點除了寄主域狹窄 (尤其對脊椎動物不具感染力) 外，並不需考慮會造成環境污染和昆蟲抗性產生之問題。然而此病毒之應用仍受限於一些因素，諸如施用之時機、病毒致病力、大量生產以及施用後病毒殘留的問題。自然界所發生的桿狀病毒經體外培養過程，可利用病毒斑分析法 (plaque assay) 或限數稀釋法 (limiting dilution) 從各地收集之病毒選殖出高致病力之病毒株，並經形態、生化及 DNA 圖譜之特徵研究以及生物檢定，以確保病毒株致病力的穩定。再則利用桿狀病毒表現載體 (baculovirus expression vector system) 方法，將昆蟲之特異性激素或酵素基因及毒素蛋白基因，銜入桿狀病毒基因組內，期所構築的重組病毒能增強致病力及縮短致病時間。桿狀病毒如同其他昆蟲病原體經體外培養後亦有致病力趨弱的現象，因此大量體外增殖的研究，除了儘可能降低培養基及設備 (生物反應器等) 的成本外，致病力的維持亦須考慮。倘若以蟲體大量增殖，雖不需顧慮有致病力趨弱的現象，然而健康蟲體之獲得必須發展出快速且靈敏的病原檢測方法，以確保病毒之品質。

關鍵詞：桿狀病毒、微生物殺蟲劑、生物技術。

前 言

昆蟲桿狀病毒 (baculoviruses) 是昆蟲主要病原體，雖然其他蟲生病原性病毒 (entomopathogenic viruses) 亦被認為具有生物防治之潛能，如質型多角體病毒 (cytoplasmic polyhedrosis virus, CPV)、蟲生痘病毒 (entomopoxiviruses, EPVs)，但昆蟲桿狀病毒被公認是值得大幅度開發成殺蟲劑 (viral insecticides) 的重要蟲生病原性病毒。並於 1973 年世界衛生組織 (WHO) 賦予桿狀病毒可作為害蟲防治的微生物⁽²⁷⁾。

昆蟲桿狀病毒早在西元 1527 年家蠶 (*Bombyx mori*) 之黃疸病 (jaundice disease) 已有描述，西元 1856 年義大利科學家 Maestri 和 Cornelia 首次將家蠶黃疸病與罹病家蠶體內之折射性結晶體 (病毒封埋體) 的出現釐清其因果關係。西元 1947 年 Bergold 指出此結晶體乃是桿狀病毒之特性。第二次世界大戰之後研究桿狀病毒著重於對重要經濟害蟲防治應用之可行性研究。西元 1950-1960 年確定桿狀病毒可作為病毒殺蟲劑 (viral insecticides)。然而合成殺蟲劑之出現，並挾其寄主域廣、便宜、高殺蟲效果，使病毒殺蟲劑未能進一步商品化⁽²⁹⁾。西元 1970-1980 年由於太依賴化學殺蟲劑導致了許多未能被接受的農業、環境和人體健康的問題。這些因素再加上新化學藥劑的開發困難皆促進了改變昆蟲防治的策略。雖然桿狀病毒受到生物防治界如此的高度重視，然而應用上則浮現一些問題亟待克服，諸如：(1) 殺蟲時效長未能達到害蟲防治之經濟水平、(2) 環境緊

迫子對殺蟲效果的影響及成效、和 (3) 大量生產等。近年來有關的研究上除了加強研究桿狀病毒之基本生物學外，亦嘗試利用生物技術方法篩選高致病力之病毒株或重組病毒基因組以達提昇毒效，縮短殺蟲時間以及利用體外培養大量生產。這些的努力皆企盼微生物殺蟲劑在殺蟲時效上和製劑成本上能與化學藥劑朋比才能為農業界所接受。

桿狀病毒生物學和生活史

有關桿狀病毒的生物學和生活史於早期文章中^(2,3,8) 已有詳盡的報導，本文摘其重點簡介如下：

桿狀病毒科 (Baculoviridae) 是無脊椎動物病毒中的大科，可分成兩個亞科：真桿狀病毒亞科 (Eubaculovirinae) 和裸桿狀病毒亞科 (Nudibaculovirinae)⁽²⁸⁾。真桿狀病毒亞科之最大特徵是在被感染的細胞核內會形成結晶狀體即封埋體 (inclusion body)，封埋體內包埋著病毒粒子，此病毒稱之為包埋性病毒 (occluded viruses, 簡稱 OV) 或稱多角體病毒 (polyhedra-derived viruses, PDVs)。由於封埋體和 OV 之不同，可分成兩個屬，核多角體病毒屬 (nucleopolyhedroviruses, 簡稱 NPV) 和顆粒體病毒屬 (granulosis viruses, 簡稱 GV)。NPV 所形成的封埋體稱之多角體 (polyhedra)，大小約 1-10 μm ，感染的細胞內多則可達 30 顆以上，每個多角體內可含多至 120 個以上病毒粒子，若病毒粒子含有兩個以上核蛋白質鞘 (nucleocapsid, 簡稱 NC, 可多達 19 個以上) 包裹在一個脂蛋白組成的外膜 (envelope) 稱之繁核多角體病毒 (multiple enveloped nucleocapsid NPV, MNPV)，若外膜只包裹一個核蛋白質鞘則稱單核多角體病毒 (single enveloped nucleocapsid NPV, SNPV)。至於 GV 之封埋體稱之顆粒體 (capsule)，大小約 120-300 \times 300-500 nm，只包埋一個病毒粒子，每個病毒粒子只具單一蛋白質鞘。封埋體是由單一蛋白所組成，多角體蛋白 (polyhedrin) 約 25-31 kDa 結晶成多角體，顆粒體蛋白 (granulin) 約 25-30 kDa 形成顆粒體。封埋體的形成有助於病毒對惡劣環境之抗性，如紫外線、乾燥及其他化學因子，並能持續地維持感染力於環境中。

昆蟲被 NPV 或 GV 感染而罹患核多角體病 (nucleopolyhedrosis)，病蟲常有往上攀爬並倒懸於樹枝而死的現象，病蟲體內充滿著游離狀的封埋體，表皮一經接觸即破裂並流出含大量封埋體之膿汁，此有助於封埋體之散佈。因此昆蟲的核多角體病之流行常是季節性，並被認為是調控昆蟲族群主要因素之一⁽¹⁾。

昆蟲食入含有封埋體的食物後，於昆蟲中腸內強鹼環境下 (pH 10 左右)，封埋體內的蛋白酵素 (protease) 被活化並分解結晶狀的核多角體蛋白 (或顆粒體蛋白) 釋出包埋性病毒，OV 經圍食膜後其外膜與中腸細胞之細胞膜融合，於是核蛋白質鞘被釋入細胞內。核蛋白質鞘進入細胞核前先進行褪鞘作用 (uncoated)，鞘蛋白在胞質內被分解而裸露出病毒 DNA 再進入核內，進行複製增殖。

桿狀病毒生活史是屬雙相式複製過程，感染初期並不產生封埋體，只進行病毒複製增殖，並經出芽方式離開感染的細胞，所產生的病毒稱之為胞外病毒或稱出芽性病毒 (extracellular viruses, ECVs 或 budded viruses, BVs) 進行細胞間感染。感染末期 (從感染開始約 18 小時後) 許多後期基因主要是多角體蛋白基因和 p10 基因開始啟動，產生多角體蛋白 (或顆粒體蛋白) 和纖維狀物質 (fibrillar material) 於細胞內，並開始進行多角體結晶狀體和包埋性病毒的形成並進行包裹作用。一般感染末期之蟲體內的蛋白質含量中，多角體蛋白可多達 50% 以上，可見其基因具有強勢之啟動子。此外 p10 蛋白在末期亦為顯著的病毒蛋白。從其生活史可知若桿狀病毒缺乏後期之基因，

亦能持續地在細胞間進行複製感染的作用，只是不能形成封埋體進行蟲體間之感染，因此多角體基因(或顆粒體基因)和 p10 基因雖是強勢基因，但對病毒而言是非必要基因(nonessential gene)。桿狀病毒具有雙螺旋環狀的 DNA 基因組，大小約 88-150 kbp (kilobase pairs)，可利用已商品化的限制酶(restriction enzyme)和連接酶(ligase)剪接構築，並且可將其中某一片段直接植入質體(plasmid)內，進行大量增殖並進行基因之鑑定、修飾和構築等工作(8, 24)。因此桿狀病毒之基因適宜進行基因改造的工作。目前超過 600 種桿狀病毒株被分離，主要的寄主昆蟲是鱗翅目(Lepidoptera)，其次是膜翅目(Hymenoptera)、雙翅目(Diptera)、鞘翅目(Coleoptera)和毛翅目(Trichoptera)。其中 GV 和 MNPVs 只發現在鱗翅目，SNPVs 則在所有的目皆有發現(16, 29)。一般寄主域狹窄只限一屬或一科內的種類，但也有例外：加州首蓓尺蠖蛾 NPV 之寄主超過 30 種昆蟲(9)，並可在許多細胞株內進行複製增殖。因此有關桿狀病毒寄主域之探討亦是近年研究的重點。

鱗翅目幼蟲受 NPV 感染時通常是在中腸細胞感染後引發多器官感染，細胞核形成多角體(顆粒體)後組織液化(tissue liquification)，死前脆弱的表皮破裂釋出大量多角體。在理想的條件下，每隻可產生 6×10^9 個多角體。田間受感染的幼蟲可在 3 至 15 天內死亡，死亡的時間與病毒種類和寄主有關。其他主要因素則是病毒濃度、昆蟲齡期和溫度。一般情況之下，幼蟲在死亡之前並未停止取食。由於感染至死亡的時間過長，而且幼蟲並未停止取食，再加上田間常有潛伏感染的發生，因此如何篩選高致病力(virulence)的病毒株，尋求增強致病力的因子，以及利用基因重組方式改進病毒的致病力等期能達化學藥劑的水平。

桿狀病毒病原性之遺傳和分子層次的了解並不充分。近年來發現 AcNPV 之 *egt* 基因有抑制昆蟲蛻皮激素(ecdysteroid insect molting hormone)阻止幼蟲蛻皮的作用。此作用也許是提供了病毒一種選汰上的利益(19)。另有報導指出 AcMNPV 多角體之主要毒性是出自產生 74 kDa 蛋白質的基因，但對病原性的作用尚未確定。於擬尺蠖顆粒性病毒(*Trichoplusia ni* GV, TnGV)萃取出一種病毒增強因子，其基因已被選殖出，此基因產生脂蛋白質為 90-126 kDa，附在顆粒體上可協助病毒通過圍食膜，增加感染率，此因子可以縮短 NPV 感染至死亡的時間到 10-63 小時(10)。目前有部份生防學家嘗試利用混合不同來源的 NPVs 期能達縮短致死時間的目的。

桿狀病毒之殺蟲製劑

WHO-FAO 會議中賦予桿狀病毒可作為殺蟲劑使用的權力(27)，主要是桿狀病毒除具寄主域的特異性外，還有安全使用、生產上容易和自然界分佈廣的優點。目前已有超過十種商品化的桿狀病毒殺蟲劑上市(3, 9, 21)。

在北美，美國和加拿大共有七種桿狀病毒製劑已被登記做為森林和農業害蟲的防治(29)。其中只有 Gypcheck 用以防治吉普賽舞蛾(*Lymantria dispar*)和 Tm-BioControl-1 防治黃杉毒蛾(douglas-fir tussock moth, *Orgyia pseudotsugata*)被商品化上市。西元 1990 年超過 600 英畝的森林施用 Gypcheck (Espro, Inc., Columbia, Md., 出品)，以及相等於可施 150,000 英畝的 Tm-BioControl-1 量被用於美國西北部。於西歐至少有 4 種桿狀病毒製劑登記，但使用有限。蘇聯有 8 種，中國大陸有相當多種被用作田間試驗，西元 1989 年第一個病毒殺蟲劑生產用以防治 *Heliothis* 屬的棉花害蟲。另外在巴西以 NPV 防治花生主要害蟲 *Anticarsia gemmatalis* 的產品稱之 Multigen，銷售已達 20 萬英畝量，並預計 3 至 4 年內病毒施用地區可望達到超過 4 百萬畝(18)。雖然有以上所述桿

狀病毒殺蟲劑之應用，事實上所有使用面積對世界整個耕地、森林及果樹的面積而言還是相當有限。全世界生物防治的應用量只佔殺蟲劑量之1%，而桿狀病毒殺蟲劑又只佔其中的0.2%而已。其因素雖然前面已分別敘述，現將之綜合如下：(一)致病力(virulence)，(二)寄主域(host range)，(三)持續性(persistence)，(四)生產(production)，(五)產品穩定度(product stability)和(六)註冊(registration)與專利(patentability)⁽²⁰⁾。首先致病力是主要的缺點亦是亟待克服的重點，化學殺蟲劑之快速殺蟲和殺蟲譜廣的特性，使桿狀病毒殺蟲劑尚未能被農民普遍接受。其次自然來源的病毒具種之特異性，雖是其特色亦是其缺點，因殺蟲譜窄相對的市場上之應用亦受限，市場小，於是不易大量生產。

由於對桿狀病毒之分子層次及遺傳上之逐漸了解，企能應用生物技術篩選和操控桿狀病毒基因以求克服應用上的困境。

高致病力病毒株之篩選

來自不同地區同一種寄主的桿狀病毒或甚至來自同一地區同一寄主的桿狀病毒，可視為是一群不同遺傳性狀的族群。因此對昆蟲之致病力亦有差異，將族群內之高致病力的分離株篩選出並將特徵定性則有助於提昇致病力和產品的穩定。陳等⁽⁷⁾取9株來自大陸各省之斜紋夜蛾核多角體病毒分離株比較對斜紋夜蛾幼蟲的毒性，確定當地分離株(Z₂-75)之致病力高於其他8株⁽⁴⁾。將台灣分離株(TWN-1)與(Z₂-75)比較，證實台灣分離株無論對源自廣州或台灣的斜紋夜蛾致病力皆高。因此篩選自然界已存在的高致病力病毒株作為生物防治的病原體來源亦是一種有效力的方法。

昆蟲之高接受性細胞株的建立，促進病毒體外培養與增殖的成功，可從事病毒株化的工作和致病力之篩選，其詳盡的報導於前篇文章中已討論⁽²⁾，將摘其重點敘述如下：

桿狀病毒體外增殖之建立，除了有助於對此病毒的基本生物學的了解外，並可利用細胞株，作病毒株化、效價以及基因改造的工作。病毒株化的工作可利用限數稀釋法(limiting dilution method)或病毒斑法(plaque assay)選出不同性狀病毒再進行體內外致病力的測試。體外效價的測試可利用TCID₅₀/ml(tissue culture infective dose)或PFU(plaque formation unit)確定，體內效價可經由生物檢定(bioassay)以LD₅₀(lethal dose)決定⁽⁵⁾。經株化的病毒經大量增殖之後，並確定其生物、生化上的特性：如蛋白質圖譜及基因組限制酶圖譜等，以作為維持產品品質的穩定之基本參考資料。

病毒致病力之增強因子

病原體間之交互感染的現象常見於田間罹病之蟲體，因此病原體間之協力作用(synergistic)和拮抗作用(antagonist)，值得進一步探討。如前述之顆粒體病毒具有增強因子可協助桿狀病毒通過圍食膜增加感染率。又如斜紋夜蛾微粒子(*Nosema lituræ*)與斜紋夜蛾核多角體病毒間有拮抗作用(王和蔡，未發表之結果)。因此以桿狀病毒作為殺蟲劑時，其他病原體污染的現象必然會影響致病力的效果。除此之外，核多角體病毒之寄主域並不在於胞膜上的受子(receptor)而在細胞內病毒所產生的螺旋酶(helicase)活性上⁽¹²⁾。故同源或異源病毒之交互作用亦是往後研究重點之一。

應用生物技術修飾桿狀病毒基因組

昆蟲桿狀病毒表現載體 (Baculovirus expression vector system, BEVS)

1983年 Smith 等人利用 AcNPV 之非必要且強勢 (高表現力) 之後期基因：多角體基因及 p10 基因選殖入質體內，並將其轉譯區 (coding region) 切除後殖入可作為多重限制酶切割之多選殖區 (multiple cloning region)，只留下基因之 5' 啟動子區及 3' 轉譯終區而構成傳送載體 (transfer vector) (23)。外源基因則轉殖入多種嵌接區，再經大腸桿菌內增殖後，取轉送載體 DNA 與野生型 AcNPV DNA 共轉染 (cotransfection) 於昆蟲細胞內，由於 DNAs 之同序列重組 (homologous recombination) 的結果，有 1/100~1/1000 機率之子病毒是重組病毒；再經病毒斑或限數稀釋法篩選出重組病毒，並經核酸探子 (probe) 證實含有外源基因，同時再利用免疫法偵測外源蛋白表現量。

經 BEVS 生產出的外源蛋白證實其抗原性及質量皆優於其他表現載體；1985年 Maeda 等人亦建立以家蠶 NPV (BmNPV) 的表現載體 (14)。截至目前已有相當多的外源蛋白利用此系統表現。

BEVS 應用於生物防治

遺傳標誌片段之殖入

桿狀病毒之遺傳修飾 (genetical modification) 始自西元 1986 年，起先只是將合成的寡核酸標誌銜入 AcNPV 基因組之非必要區，使其能產生遺傳性的標誌外還能保持產生多角體之能力，此重組病毒在昆蟲細胞內進行 50 個病毒增殖週期後還保持穩定。至於其他構築方法亦被嘗試，諸如病毒寄主域、病毒物理穩定度之改變。這種遺傳上之修飾並不影響桿狀病毒之表徵 (phenotype)。將遺傳修飾之 AcNPV 於實驗中感染甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 幼蟲，將此病毒感染的幼蟲放於網室內之甜菜上 (sugar beet plants)，再放入未感染的幼蟲，被感染者死於 7 日內。在滅菌網室內此標誌之病毒可經福馬林滅菌之後清除，此嘗試證明了可利用遺傳修飾病毒防治害蟲並可控制此病毒在施用地之殘留，此結果提供了田間安全使用之基礎 (22)。

桿狀病毒之封埋體能抵抗外界之不良因素，如乾燥、潮濕、紫外光等，因此經基因改造的病毒若不經事後的處理，極易殘留環境中，有可能造成環境的另一種污染。故利用 BEVS 方法進行利用核多角體等基因之啟動子，以遺傳標誌基因 (或 DNA 片段) 取代多角體蛋白基因而構築出含遺傳標示之負封埋體 (occlusion negative virus) AcNPV，在實驗室內以負封埋體病毒感染甜菜夜蛾幼蟲後再釋放於網室內之甜菜上，一星期後所有感染的幼蟲皆死。兩星期之後具感染性之病毒 (infectious virus) 於植物表面或土壤內已不能測得。由此證實了修飾的桿狀病毒殺蟲劑可自然地消除於環境中。

西元 1988-1989 年間進一步作此負包含體病毒釋放試驗，以含有大腸桿菌 (*Escherichia coli*) β -galactosidase (*lac Z*) 之 AcNPV 重組病毒為供試病毒，此重組病毒經繼代培養於細胞株和昆蟲體內證明能穩定的大量產生 β -galactosidase。含 *lac Z* 負封埋體之重組病毒所產生的外源基因產物便於偵測。結果證實此病毒確實不能長時間殘留於田間。400 隻甜菜夜蛾以重組病毒感染後再釋入網室內，同時再釋入相同量未感染的幼蟲放於不同區。感染幼蟲釋放病毒之偵測則可從供試幼蟲、葉子和實驗區之土壤標本作為指標。在實驗室內，將上述之標本飼以此病毒之高接受性的擬尺蠖 (*Trichoplusia ni*) 以偵測重組病毒之存在。這種生物指示劑系統是相當可靠且靈敏。兩年的田間試驗結果並不盡滿意。結論是負封埋體病毒在實驗室分析上雖認為可行，但不宜用於田間，

其因素是甜菜夜蛾並非本病毒之高接受性寄主。進一步認為具封埋體病毒殺蟲劑 (the polyhedrin-positive baculovirus insecticides) 有必要在田間釋放的試驗中作進一步的深入探討。

上述之修飾病毒基因組的試驗是基於病毒的偵測和殘留而設計並未企圖增加病毒之殺蟲效果。如何改變桿狀病毒的遺傳特性以增強殺蟲效果是近代研究之重點。目前被選擇的基因包括有下列三種：激素、酵素或毒素。其目的即是在能增強致病力、縮短殺蟲時間或至少能減少為害的程度。

昆蟲特異性激素和酵素基因之殖入

1. 利尿激素 (diuretic hormone, DH)

昆蟲體內之恆定現象依賴利尿及抗利尿 (antidiuretic hormone) 之作用。基於重組桿狀病毒在蟲體內生產某一激素則必干擾蟲體之恆定現象而致死。一種利尿激素來自煙草天蛾 (*Manduca sexta*, tobacco horn worm)，其蛋白質含有41 AA，依 AA 序列推算出 DNA 序列，並合成寡核酸。於其 OH 之 5- 端再接入果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 表皮蛋白之分泌肽轉譯序列，以促進病毒感染之細胞合成之 DH 分泌出胞外。將此組成之片段利用家蠶 NPV (BmNPV) 表現載體構築出負封埋體重組病毒。此負封埋體重組病毒可在家蠶細胞內增殖，注射入幼蟲體內會使血淋巴量下降至 30%。更進一步感染幼蟲於一天內可導致死亡較快於正常病毒感染。至於 DH 在幼蟲產生則藉由 mRNA 之分析測知。然而直接偵測 DH 標準法還未建立⁽¹³⁾。

2. 青春素酯酶 (J. H. esterase, JHE)

幼蟲末期，JHE 有中止取食和引起變態的作用，是因 JHE 能將 JH 分解。倘若 JHE 被抑制則會造成大型的幼蟲。若於幼蟲發育早期時，過量 JHE 將可抑制 JH 作用，結果是抑制取食甚至造成早熟蛹化 (premature pupation)。利用親和性層析分離煙草夜蛾 (*Heliothis virescens*) 之 JHE，並進行部份定序。此提供了合成寡核酸探針 (oligonucleotide probe) 之基本序列再從此蛾 mRNA 所建立之 cDNA 庫 (cDNA library) 分離出含有此段的質體。並構築出 JHE 基因之重組病毒 (AcRP23 · JHE)。

AcRP23 · JHE 在昆蟲細胞培養中和剛孵化之擬尺蠖 (*T. ni*) 幼蟲體內作用顯著。將病毒飼于擬尺蠖幼蟲，即可影響其取食活動，然而 AcRP23 · HE 感染的昆蟲於蛻皮前之血淋巴內 JHE 含量與正常的量相同。因此重組病毒在蛻皮前並未能產生更多量的 JHE。結論是末期幼蟲感染後所產生的 JHE 並未能克服 JH 的合成。另外推測病毒基因所轉譯的蛻皮酮醯醯轉化酶 (virus gene-encoded ecdysteroid UDP-glycosyl transferase) 也許會降低了 JHE 的作用。其次 JHE 在蟲體內十分不穩定，促使此重組病毒未能成功地作為桿狀病毒殺蟲劑，但無論如何這方面的研究還是鼓舞了昆蟲基因可作為一種改善桿狀病毒殺蟲劑效果方面的研究。無疑的，如何增加重組病毒產生 JHE 量和增強其穩定度是必須進一步探討。或許將 JHE 轉譯區修飾也是一條可以思考的路⁽¹¹⁾。

昆蟲特異性毒素基因之殖入

1. 蘇力菌 δ -內毒素 (*Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin)

蘇力菌 δ -內毒素為 130 kDa 之不具活性的原毒素 (protoxin) 經昆蟲消化道內酵素分解成具活性的 62 kDa 毒素，此毒素很快地引起昆蟲之取食降低，其機制是使胞膜產生孔道，導致細胞無法維持其滲透壓而分解。目前已被大量用以為殺蟲劑，並證實對環境不會產生污染。同樣利用重組桿狀病毒表現此毒素亦被認為是安全的。此重組桿狀病毒產生 δ -內毒素可在細胞

培養中於昆蟲細胞內形成大的結晶體。在化學結構上與蘇力菌內的伴孢晶體相同。將此重組病毒感染細胞之萃取物飼育昆蟲即可降低昆蟲之取食活動而終致死亡，此與來自蘇力菌 δ -內毒素毒性作用相仿^(15,17)。然而在蟲體及田間試驗上效果並未臻理想⁽⁶⁾，其因素可能為內毒素主要作用位在腸道細胞膜上，重組病毒所產生的內毒素若在細胞內未能釋出以及在蟲體內之細胞形成，必然未能發揮其作用力。因此如何增加內毒素之釋出以及促進活性毒素的產生是須克服的問題。

2. 昆蟲特異性神經毒素基因 (Insect specific neurotoxin genes) 之殖入

蠅 (*Pyemotes tritiae*) 之神經毒素基因 TXP-1 已被定序，其蛋白質分子是由 291 AA 組成，分子量大小為 33 kDa。其銜接入 AcNPV 之重組病毒能在體外培養成功地表現。擬尺蠖之第五齡幼蟲注射入重組病毒後隔天即麻痺。具多角體型的重組病毒亦被開發成功。此病毒除能降低幼蟲之取食外，並可縮短病毒發病的時間⁽²⁵⁾。

北美蠅 (*Androctonus australis*) 產生毒液中含有一種昆蟲特異性神經毒。此神經毒作用於神經的 Na⁺ 離子流上，引起前突觸刺激作用 (a presynaptic excitatory effect) 導致麻痺死亡。基於構築成功的寡核酸，再將 AcNPV 醣蛋白 (glycoprotein) gp 67 的信息勝肽轉譯序列加入其 5' 端⁽²⁶⁾。組成的基因銜入 AcNPV 表現載體內，構築出重組病毒。在細胞培養下其可釋出毒素並具生物活性。從重組病毒培養液經 HPLC 純化出的毒素注入家蠅 (*Musca domestica*) 成蟲體內，呈預期的症狀。進一步研究對幼蟲取食的影響發現可降低 50 % 的芥蘭菜葉 (cabbage leaves) 的破壞⁽²²⁾。因此昆蟲特異性毒素及神經毒素基因之利用可提供較野生病毒有利的一些條件，但能達經濟效益及農業界所接受的目標尚遠，更須進一步研究發展。

展 望

作為生物防治之昆蟲微生物病原體應用於防治，對環境之衝擊較輕；因此篩選高致病力再加上環境壓迫子之調控應可達高防治率的目標。雖然利用外源基因改造病原體的工作極具潛力，但對環境之衝擊大小須經風險評估 (risk-assessment analysis) 後才能應用於田間。然而病原體之大量生產亦是開發的瓶頸之一，譬如細胞大量培養之生物反應器 (bioreactor) 之研究和健康蟲體之飼育。病原體感染蟲體早期診斷之建立必然有助於自然流行病的研究 (環境壓迫子之研究) 及大量生產病原體的開發。總之，昆蟲微生物病原體作為生物防治的路途雖不近亦不遠矣，對將來的研究重點建議如下：(1) 加強流行病學的研究；(2) 篩選高致病力之病毒株及研究病原體間之交互作用；(3) 發展大量生產的技術；(4) 尋找更有效的昆蟲特異性調控基因以及毒素基因；(5) 研究基因構築的新方法。台灣地處亞熱帶，昆蟲相複雜，昆蟲資源可說是相當豐富；同樣地，昆蟲微生物病原體資源亦相當充足。但是有關的研究尤其昆蟲病毒病原體的研究尚稱闕如，此對從事昆蟲病理研究的學者而言，理當是責無旁貸的任務。近兩年來承農委會農糧處植保科陳科長秋男及同仁之支持重視，此方面研究才能順利踏出一小步，期能獲得更多的關懷以及有更多的研究同仁參與，這也算是經營大台灣的工作之一。

參考文獻

1. 王重雄、蔡恕仁。1995。榕樹透翅毒蛾 *Perina nuda* (Fabricius) 之生活史及蛹之病毒產量。中華

- , 昆蟲 15: 59-68。
2. 王重雄、羅竹芳。1990。利用昆蟲細胞及幼蟲生產外源蛋白。中華昆蟲特刊第五號: 153-161。
 3. 石正人。1994。利用基因轉殖微生物以提高殺蟲活性。於生物農業研究與發展研討會專刊。李國欽、高穗生和費雯綺編。36 頁。
 4. 石正人、樊修秀、王重雄。1995。斜紋夜蛾多角體病毒台灣分離株特性之研究。植物保護學會會刊 37: 157-167。
 5. 石正人、樊修秀、王重雄。1995。紫外線對斜紋夜蛾核多角體病毒之影響。植物保護學會會刊 37: 169-177。
 6. 胡耀中、羅竹芳、石正人。1994。構築含蘇力菌內毒素基因之重組昆蟲桿狀病毒。中華昆蟲 14: 445-461。
 7. 陳其津、龍繁新、甘才光、劉復生、蒲蟄龍、林璧欣。1990。斜紋夜蛾核型多角體病毒不同分離株的毒性比較。於斜紋夜蛾核型多角體病毒殺蟲劑中試生產研究及應用鑒定資料: 103-106。中山大學昆蟲研究所。
 8. 羅竹芳、郭光雄、王重雄、石正人。1990。桿狀病毒表現載體系統之研究。科學發展 18: 565-574。
 9. Entwistle, P. F. and Evans, H. F. 1985. Viral control, pp. 347-412. In L. I. Gilbert & G. A. Kerkut. [eds.], Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Vol. 12. Pergamon Press, Oxford.
 10. Gallo, L. G., Corsaro, B. G., and Hughes, P. R. 1991. *In vivo* enhancement of baculovirus infection by the viral enhancing factor of a granulosis virus of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Invertebr. Pathol. 58: 203-210.
 11. Hammock, B. D., Bonning, B. C., Possee, R. D., Hanzlik, T. N., and Maeda, S. 1990. Expression and effects of the juvenal hormone esterase in a baculovirus vector. Nature 344: 458-461.
 12. Maeda, S. 1989a. Expression of foreign genes in insects using baculovirus vectors. Ann. Rev. Entomol. 34: 351-372.
 13. Maeda, S. 1989b. Increased insecticidal effect by a recombinant baculovirus carrying a synthetic diuretic hormone. Biochem. Biophys. Res. Commun. 165: 1177-1183.
 14. Maeda, S., Kawai, T., Obinata, M., Fujiwara, H., Horiudi, T., Saeki, Y., Sato, Y. and Furusawa, M. 1985. Production of human α -interferon in silkworm using a baculovirus vector. Nature 315: 592-594.
 15. Martens, J. W. M., Honee, G., Zuidema, D., van Leut, J. W. M., Visser, B., and Vlak, J. M. 1990. Insecticidal activity of a bacterial crystal protein expressed by a recombinant baculovirus in insect cells. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2764-2770.
 16. Martignoni, M. E. and Iwai, P. J. 1986. A catalog of viral diseases of insects, mites and ticks. USDA Forest Service PNW-195. Washington, D. C. USGPO. 55 pp.
 17. Merryweather, A. T., Weyer, U., Harris, M. P. G., Hirst, M., Booth, T., and Possee, R. D. 1990. Construction of genetically engineered baculovirus insecticides containing the *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* HD-73 delta endotoxin. J. Gen. Virol. 71: 1535-1544.

18. Moscardi, F. 1988. Production and use of entomopathogens in Brazil, pp. 53-60. In D. W. Roberts & R. R. Granados [eds.], *Biotechnology, Biological pesticides and Novel Plant-Pest resistance for Insect Pest Management*. Proc. Int Conf. Ithaca, N. Y.
19. O'Reilly, D. R. and Miller, L. K. 1989. A baculovirus blocks insect molting and producing ecdysteroid UDP-glycosyl transferase. *Science* 245: 1110.
20. Payne. 1988. Pathogens for the control of insect: Where next? *Phil. Trans. R. Soc. London Ser. B.* 318: 225-248.
21. Podgewart, J. D. 1985. Strategies for field use of baculoviruses, pp. 775-797. In K. Maramorosch & K. E. Sherman [eds.], *Viral Insecticides for Biological Control*. Academic Press, New York.
22. Possee, R. D. 1993. Viral approaches for insect control, pp. 99-112. In L. Kim [ed.] *Advanced Engineered Pesticides*. Marcel Dekker, Inc. N. Y. Based, Hongkong.
23. Smith, G. E., Summers, M. D., and Fraser, M. J. 1983. Production of human betainterferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell. Biol.* 3: 156-165.
24. Tien, N. Y., Lo, C. F., Yang, P. L., Wu, T. T., Yang, M. D., Wang, C. H., Lee, C. H., Fraser, M. J., and Kou, G. H. 1994. Influence of nucleotide sequences related to the 5'- untranslated leader region of polyhedrin mRNA on the expression of HBsAg in insect cells. *Zoological Studies* 33: 140-152.
25. Tomalski, M. D. and Miller, L. K. 1991. Insect paralysis by baculovirus-mediated expression of a mite neurotoxin gene. *Nature* 352: 82-85.
26. Whitford, M., Stewart, S., Kuzio, J. and Faulkner. 1989. Identification and sequence analysis of a gene encoding gp67, an abundant envelope glycoprotein of the baculovirus, *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.*, 63: 1393-1399.
27. WHO-FAO. 1973. Expert Group (GTRES): The use of virus for the control of Insect pests. World Health Organization Technical Report Series. 531.
28. Wilson. 1991. Description of virus family and groups-baculoviridae, pp. 117-131. In R. I. B. Francki, C. M. Fauquet, D. L. Knudson and F. Brown [eds.], *Archives of Virology (Supplementum 2): Classification and Nomenclature of Viruses*, Springer- Verlag Wien, New York.
29. Wood, H. A. and Granados, R. R. 1991. Genetically engineered baculoviruses as agents for pest control. *Ann. Rev. Microbiol.* 45: 69-87.

The Studies of Baculovirus Insecticide : Application of Biotechniques

Chung-Hsiung Wang, Pi-Fei Tsay and Shu-Jen Tsai

Department of Plant Pathology and Entomology, National Taiwan University

Abstract

Several entomopathogens offer the opportunity for use as control agents of certain insect pest species. Baculoviruses containing a double-strands, circular DNA have a high potential for this purpose. The benefit of baculovirus as a microbial control agent has not only a restricted host range but also less evocation of pollution in the environment and the development of resistance in the insect population. The application of this pathogen has been limited several factors, such as application time, virulence, mass production and persistence of virus. The high virulent strains of baculoviruses from the nature infected larvae origin can be cloned *in vitro* by plaque assay or limiting dilution method, thereafter the cloned virus shall be characterized by morphological, biochemical, DNA profile, and bioassay techniques for ensuring the quality of products. Baculovirus expression vector system (BEVS) has been used to reconstruct the viral genome for increasing the virulence of virus. Insect specific hormones, enzymes and even toxin genes had been inserted into baculovirus DNA by BEVS with the prediction of increasing virulence and decreasing the infected time. As the other entomopathogens, the virulence of baculovirus will be declined after serial passage *in vitro*. Therefore the maintenance of viral virulence as well as the studies of mass production including the development of media and bioreactor are major subjects in further studies. Based on the virulence of baculovirus, *in vivo* multiplication of baculovirus is better than *in vitro*. The high quality of microbial insecticides must be come from the inoculated insects that are free from other pathogen contamination, so the development of rapid diagnosis method for entomopathogens is necessary for this purpose.

Key words: baculovirus, microbial insecticide, biotechnique.